T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DEFEROKSAMİN İLE MUAMELESİ SONRASINDA ELDE EDİLEN ŞARTLANDIRILMIŞ MEDYUMUN DİYABETİK NEFROPATİ MODELİNDEKİ ETKİLERİ

SERBAY ÖZKAN

DANIŞMAN
PROF. DR. MERAL KOYUTÜRK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Serbay ÖZKAN (İmza)

İTHAF

Bu dünyaya gelmeme vesile olmuş cefakâr anneme ve babama ithaf ediyorum…

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatımın başından sonuna kadar bilgi ve tecrübeleri ile hep yanımda olan, tezim için gerekli tüm imkânları sağlayan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam **Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK**'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm lisansüstü eğitimim süresince desteklerini ve değerli katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. E.Elif Güzel MEYDANLI'ya, Prof. Dr. İsmail SEÇKİN'e, Prof. Dr. Faruk ALKAN'a, Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na, Doç. Dr. Gözde Erkanlı ŞENTÜRK'e, Doç. Dr. Gamze TANRIVERDİ'ye ve Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLUNA'na teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan başta Prof. Dr. Meltem KURUŞ'a olmak üzere diğer öğretim üyelerine destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Kürsümüzde uzmanlık eğitimlerini sürdürmekte olan Uzm. Dr. Özgür UZUN'a, Dr. H. Nurdan OLCAR'a, Dr. Duygu NECCAR'a, Dr. Kübra ÇAKILLI'ya ve Dr. Öğr. Gör. Belisa KALECİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, deney sürecindeki yardımları için, Araş. Gör. Merve ERÇİN'e, Beyza SAĞ'a, Aynur ABDULOVA'ya, Hakan ŞAHİN'e, Ebru AKYÖN'e, Funda ONAR'a ve Ercüment BOZTAŞ'a teşekkür ederim.

Dokuz senelik tüm lisansüstü eğitim sürecinde, her daim her konuda ellerinden gelen her türlü yardımı esirgemeyen ve her daim minnettar olacağım Zehra SEZER'e ve Halil İbrahim SAYGI'ya çok teşekkür ederim.

Son olarak; kendisine ayrı bir paragrafta teşekkür edilmesini haklı olarak rica eden **Başak IŞILDAR**'a beraber başladığımız yüksek lisans ve doktora süreçlerindeki yoldaşlığı için teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Kurum Koordinatörlüğü ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 219S378

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Böbreğin ve Nefronun Genel Yapısı ve Diyabetik Nefropatinin Karakterizasyonu 4
2.1.1. Diyabetik Nefropati Patogenezi 6
2.1.2. Klinik Anlamda Diyabetik Nefropatinin Tanı ve Tedavisi 8
2.1.3. Diyabetik Nefropati Modeli Oluşturma Ajanı Olarak Streptozosin 9
2.2. Mezenkimal Kök Hücreler 9
2.2.1. MKH Kaynaklı Şartlandırılmış Medyumların Terapötik Potansiyelleri 10
2.2.2. MKH'lerin Ön Koşullandırılması 10
2.2.3. Ön Koşullandırıcı Ajan Olarak Deferoksamin 11
3. GEREÇ VE YÖNTEM 13
3.1. Gereçler 13
3.1.1. Alet ve Teçhizat 13
3.1.2. Kimyasal Malzemeler 14
3.1.3. Cihazlar 16
3.2. İnsan Göbek Kordonundan MKH'lerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu 17
3.2.1. MKH'lerin İzolasyonu 17
3.2.2. MKH'lerin Karakterizasyonu 17
3.3. Şartlandırılmış Medyumların Elde Edilmesi 18
3.3.1. Normal Koşullarda ve Deferoksamin ile Ön Koşullandırılmış MKH'lerdeki HIF1-α Ekspresyonun İmmünositokimyasal Olarak Değerlendirilmesi 19

3.3.2. ŞM İçeriğindeki Deferoksamin Varlığının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi 19
3.3.3. ŞM İçeriğindeki Faktörlerin Tayini 20
3.4. *In Vivo* Diyabetik Nefropati Modelinin Oluşturulması 20
3.5. Fiziksel ve Biyokimyasal Analizler 22
3.6. Histolojik Analizler 23
3.6.1. Işık Mikroskobik Analizler 23
3.6.1.1. Hematoksilen ve Eozin 23
3.6.1.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Hematoksilen (H) 23
3.6.1.3. Masson Üçlü Boyaması 24
3.6.2. Elektron Mikroskobik Analizler 24
3.7. İmmünohistokimyasal Analizler 25
3.7.1. Nefrin ve WT-1 İmmünohistokimyasal Boyamaları 25
3.7.2. Beclin-1 İmmünohistokimyasal Boyaması 26
3.7.3. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick Uç Etiketleme (TUNEL) Analizi 26
3.8. İstatistiksel Analizler 27
4. BULGULAR 28
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu 28
4.2. Şartlandırılmış Medyumların Elde Edilmesi 30
4.2.1. Normal Koşullarda ve Deferoksamin ile Ön Koşullandırılmış MKH'lerdeki HIF1-α Ekspresyonun İmmünositokimyasal Olarak Değerlendirilmesi 30
4.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Analizi 30
4.2.3. ŞM İçeriğindeki Faktörlerin Tayini 31
4.3. Biyokimyasal ve Fiziksel Analizler 32
4.4. Histolojik Analizler 35
4.4.1. Işık Mikroskobik Analizler 35
4.4.1.1. Hematoksilen ve Eozin 35
4.4.1.2. Periyodik Asit Schiff ve Hematoksilen 36
4.4.1.3. Masson Üçlü Boyaması 36
4.4.2. Elektron Mikroskobik Analizler 37
4.5. İmmünohistokimyasal Analizler 38
4.5.1. Nefrin ve WT-1 İmmünohistokimyasal Boyamaları 38

4.5.2. Beclin-1 İmmünohistokimyasal Boyaması 40
4.5.3. TUNEL Analizi 41
5. TARTIŞMA 43
KAYNAKLAR 52
FORMLAR 64
ETİK KURUL KARARI 65
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 66
ÖZGEÇMİŞ 67

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: *İn vivo* kontrol ve deney grupları 21

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Nefron (A), renal korpüskül (B) ve filtrasyon bariyerinin (C) genel yapısı[42,43] 5
Şekil 2-2: Diyabetik nefropati mekanizması 6
Şekil 3-1: Şartlandırılmış medyumların elde edilme süreci..... 19
Şekil 3-2: Deney (a) ve kontrol (b) grupları için izlenen zaman çizelgeleri..... 21
Şekil 4-1: Doku eksplantı etrafında gözlenen iğ şekilli hücreler (a). H+E boyaması ile izole edilen hücrelerin iğ şekilli morfolojilerinin gösterilmesi (b) (100X) 28
Şekil 4-2: CD34 (a), CD44 (b), CD45 (c) ve CD90 (d) antikorları ile işaretlenmiş hücrelerin flow sitometrik analizlerinin histogram grafikleri ile gösterimi..... 29
Şekil 4-3: MKH'lerin osteojenik (a) ve adipojenik (b) farklılaşma potansiyellerinin gösterilmesi..... 29
Şekil 4-4: Normal koşullarda (a) ve deferoksamin ile ön koşullandırılmış (b) MKH'lerdeki HIF1-α nükleer ekspresyonunun gösterilmesi. 30
Şekil 4-5: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi analizinde DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen konsantre ŞM'deki (a), 1. (b) ve 2. (c) yıkamalar sonrasındaki ŞM içeriklerindeki DFS miktarının kantifikasyonu. 31
Şekil 4-6: N-ŞM ve DFS-ŞM içeriklerindeki faktörlerin kantitatif karşılaştırılması. 32
Şekil 4-7: Sıçanların biyokimyasal ve fiziksel analizleri. Deneyler süresince (a) ve sonundaki (b) kan glikoz seviyesindeki değişim. Tedavi öncesi ve sonrasındaki idrar albümin/kreatinin oranı (µg/mg) (c) ve kreatinin uzaklaştırılma hızı (ml/dk) (d) analizlerinin grafiksel gösterimi. Tedavi öncesi ve sonrasındaki yüzde ağırlık değişimi (e). Sıçan renal kitle indeksleri (f). 34
Şekil 4-8: H+E boyaması ile tübüler ve interstisyel alandaki histomorfolojik değişiklikler tespit edilmiştir (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). H+E boyaması sonrasında yapılan semi-kantitatif değerlendirmenin sonuçlarının grafiksel gösterimi (g). 35
Şekil 4-9: Glomerüler mezengial alan genişlemesi ve GBM kalınlığında artış PAS+H boyaması ile tespit edilmiştir (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). PAS+H boyaması sonrasında yapılan semi-kantitatif değerlendirmenin sonuçlarının grafiksel gösterimi (g)..... 36

Şekil 4-10: Glomerüler fibrozis gelişimi Masson üçlü boyaması ile tespit edilmiştir (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). Masson üçlü boyaması sonrasında yapılan semi-kantitatif değerlendirmenin sonuçlarının grafiksel gösterimi (g). 37
Şekil 4-11: Podosit ayakçık genişlikleri ve GBM kalınlıklarında ortaya çıkan değişimleri gösteren temsili TEM mikrografları (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). Ortalama podosit ayakçık genişliklerinin (g) ve GBM kalınlık (h) ölçümlerinin grafiksel gösterimi. 38
Şekil 4-12: Nefrin immünohistokimyasal boyaması (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). Nefrin immünohistokimyasal boyamasının kantitatif değerlendirmesine ait sonuçların grafiksel gösterimi (g). 39
Şekil 4-13: WT-1 immünohistokimyasal boyaması (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). WT-1 immünohistokimyasal boyamasının kantitatif değerlendirmesine ait sonuçların grafiksel gösterimi (g). 40
Şekil 4-14: Beclin-1 immünohistokimyasal boyaması (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). İncelenen alan başına düşen ortalama beclin-1 pozitif epitel hücresi içeren tübül kesit sayılarının grafiksel gösterimi (g). 41
Şekil 4-15: TUNEL analizi (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). İncelenen alan başına düşen ortalama TUNEL pozitif epitel hücre sayılarının grafiksel gösterimi (g). 42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KBH: Kronik böbrek hastalığı

SABH: Son aşama böbrek hastalığı

DN: Diyabetik nefropati

GBM: Glomerüler bazal membran

MKH: Mezenkimal kök hücre

Kİ: Kemik iliği

İGK: İnsan göbek kordonu

ŞM: Şartlandırılmış medyum

DFS: Deferoksamin

VEGF-α: Vasküler endotelyal büyüme faktör-alfa

NGF: Sinir büyüme faktörü

IL-4: İnterlökin-4

GDNF: Glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör

BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

CD2AP: CD2 ilişkili protein

WT-1: Wilm’s tümör baskılayıcı protein-1

EMT: Epitelyal mezenkimal dönüşüm

HIF1-α: Hipoksiyle indüklenen faktör1-alfa

PI3K: Fosfoinositol 3 kinaz PI3K

SGLT2: Sodyum glikoz ortak taşıyıcı 2

STZ: Streptozotosin

GFB: Glomerüler filtrasyon bariyeri

PBS: Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu

BCA: Bişinkoninik asit

AEC: 3-amino 9-etilkarbazol

SST: Sodyum sitrat tampon

RKI: Renal kitle indeksi

AKO: Albumin/Kreatinin oranı

KUH: Kreatinin uzaklaştırılma hızı

ELISA: Enzim bağlı immünosorbent deneyi

H: Hematoksilen

E: Eozin

PAS: Periyodik Asit Schiff

TEM: Geçirimli elektron mikroskobu

TBS: Tris tamponlu salin

BSA: Sığır serum albümini

TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick uç etiketleme

DAP: Diaminobenzidin

ÖZET

Özkan, S. (2022). Mezenkimal Kök Hücrelerin Deferoksamin İle Muamelesi Sonrasında Elde Edilen Şartlandırılmış Medyumun Diyabetik Nefropati Modelindeki Etkileri.

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Mezenkimal kök hücre (MKH) kaynaklı şartlandırılmış medyumlar (ŞM'ler) diyabetik nefropati (DN) dâhil birçok hastalığın tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak, MKH'lerin kriyoprezervasyonu, izole edildiği bireyin sağlık durumu ve yaşı gibi faktörler bu hücrelerden elde edilen ŞM'lerin terapötik etkilerini azaltabilmektedir. MKH'lerin çeşitli kimyasal ajanlar ile muamele edilmesi sonrasında terapötik potansiyellerinin arttırılabileceği ortaya konmuştur. Bu çalışmada, insan göbek kordonu kaynaklı MKH'lerin (iGK-MKH'lerin) deferoksamin (DFS) ile muamele edilmesi sonrasında toplanan ŞM (DFS-ŞM) ile normal ŞM'nin (N-ŞM'nin) sıçan DN modeli üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlandı. İGK-MKH'leri normal ve 150 µM DFS içeren serumsuz kültür ortamlarında 48 saat inkübe edilmesi sonrasında elde edilen iki farklı ŞM'nin içeriği ELISA yöntemi ile analiz edildiğinde; DFS-ŞM'de N-ŞM'ye göre VEGF-α, NGF ve GDNF konsantrasyonlarının arttığı, BDNF'nin ise azaldığı tespit edildi. ŞM'lerin sıçan DN modelindeki terapötik etkileri karşılaştırıldığında; kreatinin uzaklaştırılma hızı, her iki tedavi grubunda önemli oranda artarken; DFS-ŞM uygulanan grupta, albümin kreatinin oranı ve renal kitle indeksi değerlerindeki iyileşme N-ŞM uygulanan gruptan daha anlamlı bulundu. Işık ve geçirimli elektron mikroskobik yöntemler ile yapılan histopatolojik incelemelerde, her iki tedavi grubunda da benzer seviyede iyileşme görüldü. İmmünohistokimyasal yöntem ile belirlenen podositlere özgü nefrin ve WT-1 ekspresyonlarının, DN'li grupta azalırken, tedavi gruplarında önemli oranda arttığı tespit edildi. DN'li grubun tübüllerinde beclin-1 ekspresyonu önemli oranda artarken, tedavi gruplarında azaldığı tespit edildi. TUNEL analizlerinde; DN'li gruba ait tübüllerde apoptotik hücre ölümünde ciddi bir artış olduğu, her iki tedavi grubunda ise azalma tespit edilse de sadece D+DFS grubunda istatistiksel anlamlılık olduğu görüldü. Elde edilen bu bulgular; DFS-ŞM'nin N-ŞM'ye göre daha konsantre içeriği ile podosit hasarını ve tübüllerdeki apoptotik hücre ölümünü azaltarak ve ayrıca otofajik aktiviteyi düzenleyerek DN tedavisinde daha etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Deferoksamin, Diyabetik nefropati, Mezenkimal kök hücre, Ön koşullandırma, Şartlandırılmış medyum

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Kurum Koordinatörlüğü ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TUBİTAK) tarafından desteklenmiştir. Proje No: 219S378

ABSTRACT

Özkan, S. (2022). Evaluation of effects of conditioned medium obtained from mesenchymal stem cells which are pre-conditioned with deferoxamine on diabetic nephropathy model.

İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Histology and Embryology Department. PhD Thesis. İstanbul.

Mesenchymal stem cell (MSC)-derived conditioned media (CM) have significant potential in the treatment of many diseases including diabetic nephropathy (DN). However, factors such as cryopreservation of MSCs, health condition and age of the individual from which MSCs were isolated may reduce the therapeutic effects of CM obtained from these cells. It has been demonstrated that the therapeutic potential of MSCs can be increased after treatment with various chemical agents. The aim of this study was comparative evaluation of effects of N-CM and DFS-CM which are collected from normal (N) and deferoxamine (DFS) preconditioned human umbilical cord (hUC) derived MSCs on rat DN model. After incubation of hUC-MSCs in serum-free culture media with or without 150 μM DFS for 48 hours, the content of obtained N-CM and DFS-CM were analyzed by ELISA method and it was determined that VEGF-α, NGF and GDNF concentrations increased in DFS-CM compared to N-CM, while one of BDNF decreased. The evaluation of therapeutic effects of CMs on the rat DN model showed that while the rate of creatinine removal was increased significantly in both treatment groups, the improvement in albumin-creatinine ratio and renal mass index values for the DFS-CM group was found to be more significant than the ones of N-CM. In the histopathological examinations performed with light and transmission electron microscopic methods, a similar level of improvement was observed in both treatment groups. Immunohistochemical analyses showed that podocytes-specific nephrin and WT-1 expressions were found to be decreased in DN group and they increased significantly in both CM treatment groups. Beclin-1 expression in the tubules was significantly increased for the DN group, but it was decreased in both CM treatment groups. In addition, TUNEL analysis showed that apoptotic cell death was significantly increased in the tubules of DN group while it was decreased in the treatment groups, but the statistical significance was only observed for the one of D+DFS. The results obtained from this study showed that DFS-CM could be more effective in the treatment of DN by reducing podocyte damage and apoptotic cell death in tubules and regulating autophagic activity with its more concentrated content than N-CM.

Key Words: Deferoxamine, Diabetic nephropathy, Mesenchymal stem cell, Pre-conditioning, Conditioned medium.

The present work was supported by Istanbul University-Cerrahpasa, Institutional Coordinatorship of Academician Training Program (ÖYP) and The Scientific and Technological Research Council of Turkey. Project No. 219S378

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik böbrek hastalığı (KBH) yetişkin popülasyonun yaklaşık %10-11'inde görülmektedir ve bu oran artış eğilimindedir[1]. KBH tedavi edilememesi durumunda son aşama böbrek hastalığına (SABH) evrilmektedir. SABH durumunda, hasta diyalize ve bir sonraki evrede böbrek transplantasyonuna ihtiyaç duymaktadır[2]. Diyabetik nefropati (DN); mikrovasküler bir komplikasyondur ve diyabet hastalarının yaklaşık olarak 1/3'ünde görülmektedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar; DN'nin dünya genelinde KBH'ye yol açan en yaygın sebep olduğunu ve 2030 yılına kadar da ölümle sonuçlanan yedinci en yaygın neden olacağını tahmin etmektedir[3–5].

DN için risk faktörleri arasında başta hiperglisemi ve hipertansiyon gelmektedir. Ayrıca; ilerlemiş yaş, uzun hastalık süreci, obezite, yüksek tuzlu diyet, dislipidemi, nefrotoksik maddeler, akut böbrek hasarı ve aşırı protein alımı gibi durumlar da DN için risk oluşturmaktadır[5]. DN'nin klasik tanılayıcı belirtileri; başlangıçta glomerüler hiperfiltrasyon, sonrasında mikroalbüminüri ve proteinüride ciddi artış ile glomerüler filtrasyon hızında düşüşten oluşmaktadır. DN, en nihayetinde ise kronik böbrek yetmezliği ile sonuçlanmaktadır[6].

DN patolojisinde genel olarak, glomerüler bazal membran (GBM) kalınlaşması, mezengiyal alanda genişleme, glomerüler skleroz, renal interstisyal alanda fibrozis, inflamasyon ve renal tübüllerde atrofi görülmektedir[5]. Tüm bunların yanında, DN dâhil renal hastalıkların çoğunda, podosit hücre hasarı ve kaybının glomerülosklerozun başlangıcındaki ve ilerlemesindeki en temel sebeplerden biri olduğu kabul edilmiştir[7–9]. Ancak proteinüri kaynağı olarak sadece podosit hasarının değil, filtrasyon bariyer yapısına katılan; fenestralı endotel, bazal membran kompozisyonu ve eletriksel yükü, ayakçık uzantıları ile ilişkili slit diyafram yapısının birlikte değerlendirilmesi önem taşımaktadır[10]. Ayrıca DN patogenezinde, podositlerdeki ve tübüler hücrelerdeki apoptotik hücre ölümündeki artış önemli bir yer tutmaktadır[7,8,11–14]. Diğer taraftan son zamanlarda yapılan araştırmalar, otofajik aktivasyon seviyesindeki disregülasyonun da DN'nin patogenezinde etkili olduğunu göstermiştir[14].

DN'nin kesin tedavisi yoktur bu sebeple DN'nin gelişiminin engellenmesine yönelik önleyici tedbirler oldukça önemlidir. Bu noktada, diyabet gelişiminin erken dönemde tespit edilmesine yönelik rutin testlerin yapılması ve diyabet gelişimi

durumunda ise kan glikoz seviyesinin ve basıncının sıkı bir şekilde kontrol edilmesi DN gelişiminin ötelenmesi anlamında önemlidir[5]. Diğer taraftan ise DN ortaya çıkması durumunda, hastalığın ilerleyişini yavaşlatıcı etkiye sahip anti-hipertansiyon ilaç tedavileri uygulanmaktadır[15]. Son zamanlarda; mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), DN'nin tedavisinde önemli bir potansiyel terapötik ajan olarak ortaya çıkmıştır[4].

MKH'lerin multipotent karakterleri, düşük antijenite özelliği ve kültür ortamında kolay manipülasyonları bu hücreleri terapötik açıdan ön plana çıkarmaktadır[16]. Hasarlı hücreye farklılaşma potansiyellerinin yanı sıra; immünmodülatör, anti-fibrotik, anti-apoptotik ve pro-anjiyogenik faktörleri salgılamaları bakımından da önemli bir terapötik potansiyele sahiptirler[8,17]. MKH'ler; kemik iliği, dental pulpa, yağ dokusu gibi çok farklı dokudan elde edilebilmektedir[16]. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler (Kİ-MKH'ler), üzerinde çok sayıda çalışma yapılması bakımından altın standart olarak değerlendirilmektedir[18]. Diğer taraftan son zamanlarda yapılan çalışmalar, göbek kordonunun (GK'nın) kemik iliğine göre daha avantajlı bir kök hücre kaynağı olduğunu göstermektedir. Bu avantajlar arasında; göbek kordonundan izole edilen hücrelerin yüksek proliferasyon kapasiteleri, düşük immün reaksiyon oluşturmaları ve göbek kordonunun etik açıdan daha az sorun teşkil etmesi gibi faktörler sayılmaktadır[18–20].

Başlangıçta MKH'lerin renal hücrelere farklılaşma potansiyelleri göz önünde bulundurularak, direkt olarak terapötik amaçlı uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır ve renal fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir[17,21–26]. Ancak yapılan çalışmalarda, MKH'lerin direkt olarak hasarlı renal hücrelere farklılaşmaktan ziyade, salgıladıkları parakrin faktörler aracılığı ile iyileştirici etkilerini gösterdikleri ileriye sürülmüştür[17,27,28]. Hücrelerin serum içermeyen medyum içerisinde belirli süreyle kültürlenmesi sonrasında toplanan medyum, şartlandırılmış medyum (ŞM) olarak tanımlanmıştır. MKH'lerden elde edilen ŞM'nin içeriğindeki faktörlerin ve ekstraselüler veziküllerin birçok hastalığın tedavisinde MKH'lerin direkt uygulanmasına benzer seviyede terapötik etki gösterdiği ortaya konmuştur[29–31]. ŞM'lerin kriyoprezervasyonuna ihtiyaç duyulmamasının yanında, taşınmasının ve saklanmasının MKH'lere göre daha kolay olması, ŞM'leri terapötik anlamda avantajlı kılmaktadır[32]. Diğer taraftan, son zamanlarda yapılan çalışmalar; MKH'lerin uygulanmasından önce, uygun kimyasal ajanlar ile muamele edilmesinin terapötik potansiyellerini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Bu bağlamda MKH'lerin; lipopolisakkarit, tümör nekroz faktör alfa ve all-

trans retinoik asit gibi kimyasal ajanlarla belirli doz ve sürede muamelesini içeren ön koşullandırma işlemi sonrasında, terapötik potansiyellerinin arttığı gösterilmiştir. Son yıllarda, şelatör bir ajan olan deferoksamin (DFS) de, ön koşullandırıcı ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır[33,34]. MKH'lerin DFS ile ön koşullandırılması sonrasında elde edilen ŞM içeriğinde; vasküler endotelyal büyüme faktör-alfa (VEGF-α), sinir büyüme faktörü (NGF) ve anti-inflamatuvar interlökin-4 (IL-4) miktarlarında ve ayrıca anti-oksidan kapasite de bir artış saptanmıştır. Bunların yanında, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) gibi büyüme faktörlerin ekspresyonlarının mRNA seviyesinde artış gösterdiği tespit edilmiştir[34]. Bu bağlamda, DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerde mRNA seviyesinde ya da bu hücrelerden elde edilen ŞM içerisinde artışı gözlenen pro-anjiogenik VEGF-α, nöron koruyucu NGF, BDNF ya da GDNF gibi büyüme faktörlerinin DN'de özellikle de podositler üzerinde terapötik anlamda etkili olabileceğine dair veriler bulunmaktadır[35–37]. Bu sebeple DN tedavisinde, MKH'lerin DFS ile ön koşullandırılması sonrasında elde edilen ŞM'nin, normal ŞM'ye göre terapötik anlamda daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak bu çalışmada, normal koşullarda elde edilen ŞM ile DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen ŞM'lerdeki parakrin faktörlerin konsantrasyonlarının ve bu iki farklı koşulda elde edilen ŞM'lerin DN modelindeki olası terapötik etkilerinin fiziksel, biyokimyasal, immünohistokimyasal ve histolojik yöntemlerle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

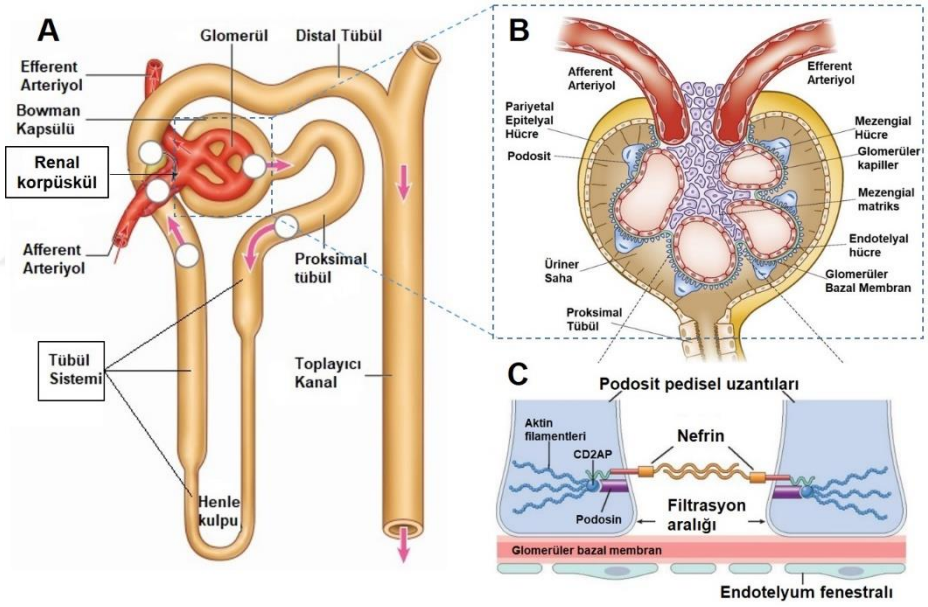
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin ve Nefronun Genel Yapısı ve Diyabetik Nefropatinin Karakterizasyonu

Üriner sistem temel olarak bir çift böbrek, bunlardan çıkan üreterler, idrar kesesi ve üretradan oluşmaktadır. Böbrekler vücüt homoestazında, metabolik atıkların uzaklaştırılmasını ve sıvı-elektrolitlerin dengesini sağlayarak önemli rol oynamaktadır. Tüm bunların yanında böbrekler çeşitli hormonların salınımına katkıda bulunarak endokrin organ olarak da fonksiyon göstermektedir. Böbrekler, retroperitoneal olarak abdominal boşluğun posteriyorunda, vertebral kolonun her iki tarafında lokalize olmaktadır. Böbrek yüzeyi bağ doku kapsülü ile örtülüdür. Böbrek dokusu korteks ve medulla olmak üzere iki kısımda incelenmektedir. Taze böbrek dokusunun enine kesitine bakıldığında; kırmızı kahverengi renklerde görülen dış kısım korteks ve daha açık renkte görülen kısım ise medulla olarak tanımlanmıştır. Korteks bölgesi, temel olarak renal korpüsküllerin ve ilişkili tübüllerin varlığı ile; medulla bölgesi ise düz tübüllerin, toplayıcı kanalların ve özelleşmiş kapiller ağlarının varlığı ile karakterizedir[38].

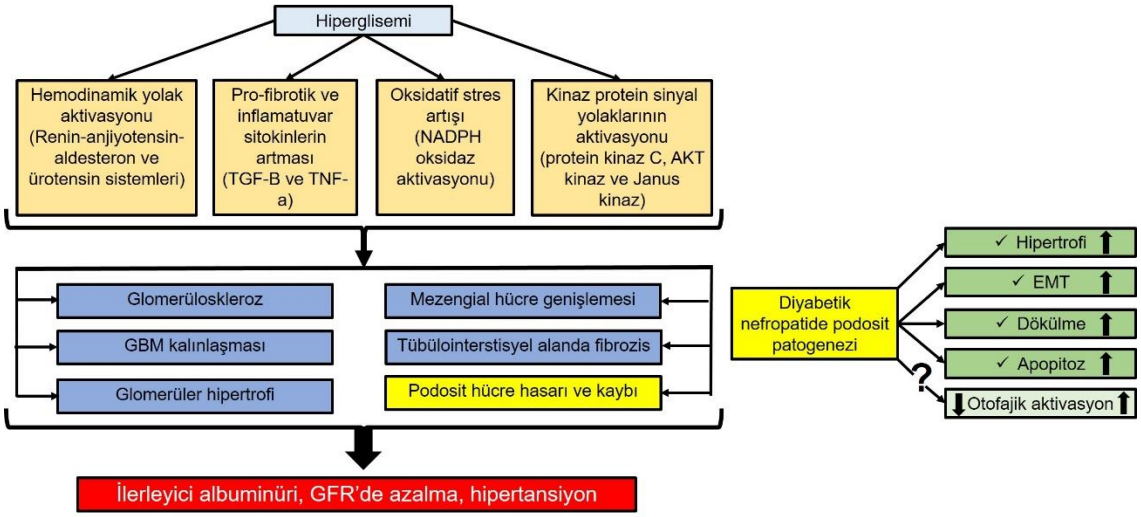
Nefron böbreğin yapısal ve fonksiyonel birimi olup, renal korpüskülden (böbrek cisimciği) ve bir tübül sisteminden oluşur (Şekil 2-1A). Renal korpüskül ise afferent arteriyol ile kanlanan ve efferent arteriyol ile drene edilen kapiller yumağından (glomerül) ve onu çevreleyen Bowman kapsülünün (renal kapsülün) viseral ve pariyetal epitel tabakalarından oluşmaktadır (Şekil 2-1B). Bowman kapsülünün iki tabakası arasında kalan bölge üriner saha olarak tanımlanmıştır. Glomerüler filtrasyon bariyeri (GFB) de, kapiller yumak içindeki kan ile idrar boşluğundaki ultra-filtratı birbirinden ayıran yapıdır. GFB; kapiller endoteli, Bowman kapsülünün viseral tabakasını oluşturan podositler ve bu iki hücrenin arasında bulunan ve ortak salgı ürünü olan glomerüler bazal membran (GBM) yapılarından oluşmaktadır (Şekil 2-1C). Glomerüler kapillerlerin aralarındaki boşluklarda ve damarların giriş ve çıkış yaptığı vasküler kutupta, mezengial hücreler ve salgıladıkları ekstraselüler matriksten oluşan mezangiyum bulunmaktadır (Şekil 2-1B)[38]. Nefronun diğer önemli komponenti olan tübül sistemi, temel olarak böbrek cisimciğinin üriner kutbundan başlayan proksimal tübül, henle kulpu ve distal tübülden oluşmaktadır (Şekil 2-1A). Böbrek cisimciğinden çıkan proksimal tübül; kıvrıntılı ve düz olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Kıvrıntılı kısmın tamamı ve düz kısmın bir bölümü korteks bölgesinde bulunmaktadır. Proksimal düz tübülün son bölümü, böbreğin medulla bölümünde de devamlılık gösterir ve Henle kulpunun inen ince

segmenti ile devam eder. Henle kulpunun çıkan ince segmenti distal düz tübül ile medulla içinde uzanarak böbreğin korteksine giriş yapar. Kortekste kıvrıntılı distal tübül yapısı kazanarak, bağlayıcı tübüller aracılığı ile nefrona dahil olmayan toplayıcı kanal sistemi ile birleşir (Şekil 2-1). Korteks bölgesindeki tübüllerin etrafında peritübüler kapillerler bulunurken, medullada uzanan tübüllerin etrafında da meduller kapiller ağ bulunmaktadır[38]. Bu bilgiler ışığında; diyabetik nefropatinin (DN'nin) mikrovasküler bir komplikasyon olduğu düşünüldüğünde, glomerüllerde ve kapiller ağ ile çevrili tübüllerde dolayısıyla nefronlarda hasar görülmesi beklenmektedir. Bu bağlamda, DN'nin patolojisinde temel olarak; glomerüloskleroz, GBM kalınlaşması, glomerüler hipertrofi, mezengial hücre genişlemesi, podosit hücre hasarı, tübüler hasar ve tübülointerstisyel alanda fibrozis görülmektedir[39–41] Bu patolojiler; ilerleyici albüminüriye, glomerüler filtrasyon hızında (GFR'de) azalmaya ve hipertansiyona sebep olmaktadır (Şekil 2-2)[15,40].



Şekil 2-1: Nefron (A), renal korpüskül (B) ve filtrasyon bariyerinin (C) genel yapısı[42,43]

DN'nin indüklenmesinde ve ilerlemesinde etkili moleküler mekanizma incelendiğinde (Şekil 2-2); hiperglisemi başta olmak üzere, hemodinamik yolak aktivasyonu, pro-fibrotik ve inflamatuvar sitokinlerin artması, oksidatif stres artışı ve kinaz protein sinyal yolaklarının aktivasyonu yer almaktadır[40]. Bu mekanizmalar; renal fibrozis, mezengial alan genişlemesi, glomerüler hipertrofi, oksidatif stres ve tübüler inflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını arttırmaktadır[40,41].



Şekil 2-2: Diyabetik nefropati mekanizması

2.1.1. Diyabetik Nefropati Patogenezi

Diyabetik nefropati öncellikle, glomerüllerde görülen histopatolojik değişikliklere dayanılarak glomerüler bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Glomerüler filtrasyon bariyeri; glomerüler endotelyal hücreleri, GBM ve pedisel uzantılarına sahip terminal olarak farklılaşmış podosit hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2-1C)[44,45]. DN dâhil renal hastalıkların çoğunda, podosit hücre hasarı ve kaybının glomerülosklerozun başlangıcındaki ve ilerlemesindeki en temel sebeplerden biri olduğu kabul edilmiştir[7–9]. Ayrıca, podosit kaybının, nefron dejenerasyonuna ve renal tübüler fibrozise sebep olarak renal fonksiyonu azalttığı gösterilmiştir[9]. Podosit spesifik nefrin, Wilm's tümör baskılayıcı protein-1 (WT-1), sinaptopodin, podokaliksin, podosin ve CD2 ilişkili protein (CD2AP) gibi proteinlerin ekspresyonlarındaki değişimler podosit hücre sayısının, dolayısıyla glomerüler hasarın takibinde önemli belirteçler olarak kabul edilmektedir[9]. Spesifik olarak; podosin, nefrin ve CD2AP proteinleri podositlerin pedisel uzantıları arasında bulunur ve filtrasyon bariyerinin önemli bir komponenti olan yarık diyaframının yapısal ve fonksiyonel elemanlarıdır[46]. DN'de podosit patogenezi incelendiğinde (Şekil 2-2), birinci olarak podositlerin hipertrofiye uğradıkları görülür. Bu durumun glomerüler dilatasyona bağlı ortaya çıkan GBM üzerindeki çıplak alanların örtülmesinde telafi edici bir adaptasyon olduğu bilinmektedir. İkinci olarak, podositlerin epitelyal mezenkimal dönüşüme (EMT) uğrayarak hücre bağlantılarını kaybettikleri, desmin gibi mezenkimal hücre belirteçlerini eksprese etmeye başladıkları, pedisel uzantılarında geri çekilmenin ve kalınlaşmanın varlığı gösterilmiştir[47]. Bu duruma bağlı olarak, podositlerin GBM ile

bağlantılarını kaybederek döküldükleri gösterilmiştir. Bu noktada, idrar içerisinde podosit varlığındaki (podositüri) artışın renal hasarın bir göstergesi olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca, apoptotik hücre sayısındaki artışın, DN'ye bağlı podosit patogenezinin bir diğer önemli parametresi olduğu düşünülmektedir[7,8,12,47,48]. Diğer taraftan son zamanlarda yapılan araştırmalar, podosit hücrelerindeki otofajik aktivasyon seviyesinin de DN'nin patogenezinde etkili olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda, podosit hücrelerinde görülen çok sayıdaki otofagozomun varlığı, bazal otofajik aktivitenin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Farelerde yapılan çalışmada, otofajik aktivitenin regülasyonunda etkili olan fosfoinositol 3 kinaz (PI3K) sınıf 3 proteininin podositlerde susturulmasının erken dönem proteinüriye, ilerleyici glomerüloskleroza ve böbrek yetmezliğine yol açtığı gösterilmiştir. Aynı şekilde otofaji aktivasyonunda yer alan Atg5 proteinin podosit spesifik susturulmasının da podosit kaybına, artmış proteinüriye ve glomerüloskleroza sebep olduğu tespit edilmiştir[49,50]. Bu noktada DN'de otofajinin rolüne bakıldığında, literatürde birbiriyle çelişen bulgular olduğu görülmektedir. Podosit hücrelerinin 24 saat süreyle yüksek glikoza maruz kalmaları sonrasında, otofajinin aktifleştiği ve hiperglisemi ile ilişkili apoptozu engelleyerek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir[51]. Diğer taraftan, yüksek glikozun kaspaz-3 aktivasyonu aracılığı ile apoptozu arttırırken, otofajik aktivasyonu inhibe ettiği beclin-1 ve LC3-II ekspresyonlarındaki azalma ile gösterilmiştir[52,53]. Bir başka çalışmada da, in vitro koşullarda 48 saat süreyle yüksek glikoza maruz bırakılan podosit hücrelerinin otofajik aktivitelerindeki azalma, beclin-1 ve Atg12-Atg5 ekspresyonlarındaki azalma ile gösterilmiştir[50,54].

Tüm bunların yanında, genel paradigmanın aksine, DN patogenezinde birincil olarak glomerüler alanın değil tübülerin alanın etkilendiği ortaya atılmıştır. Bu noktada hayvanlarda yapılan nefrotoksisite çalışmalarında, glomerüler patolojinin yokluğunda albüminürinin erken dönem tübül toksisitesinin oldukça hassas belirteci olduğu gösterilmiştir[55]. Dahası insan idrar örneklerinden yapılan biyobelirteç analizlerinde, proksimal tübül hasarının erken dönem DN gelişiminde birincil olarak rol oynadığı gösterilmiştir[56,57]. Bir başka çalışmada da proteinürisi olmayan tip I diyabet hastalarında, proksimal tübül hasar belirteci olan üriner KIM-1 [(Kidney injury marker-1 (KIM-1)] seviyesinin önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. Bu durum proksimal tübül hasarının, erken dönem renal fonksiyon kaybında glomerüler hasardan bağımsız olarak rol oynadığını göstermektedir[39,58]. DN ilişkili renal tübüler hasarlanmaların

mekanizmasında, özellikle proksimal tübüllerde, yüksek orandaki glikoz geri emilimi ve lokal hipoksi gelişimi, indükleyici faktörler olarak yer almaktadır. Hiperglisemiye bağlı olarak renal epitel hücrelerinde apoptotik hücre ölümlerinin arttığı gösterilmiştir[59,60]. Ayrıca diyabete bağlı renal tübül hasarı gelişiminde otofajik mekanizmanın disregülasyonu da önemli yer tutmaktadır. Bu noktada tip 1 fare diyabet modelinde, proksimal tübüllerde otofajik aktivitenin arttığı, distal tübüllerde ise değişmediği tespit edilmiştir[61,62]. Renal tübüllerdeki otofajik aktivitedeki artışın, oluşan stres koşullarına karşı hücresel hayatta kalma mekanizmasının aktivasyonu olarak yorumlanmıştır. Ancak farklı böbrek hasarı modellerinde, otofajik mekanizmanın rolünün değişkenlik gösterebileceği de ortaya konmuştur[63]. Örneğin gelişmekte olan ve yetişkin farelerde oluşturulan tek taraflı üreteral obstrüksiyon modellerinde, her ikisinde de tübüler hasar ve atrofi görülürken; otofajik aktivitenin yetişkin farelerde arttığı, gelişmekte olanlarda ise azaldığı tespit edilmiştir[63,64].

2.1.2. Klinik Anlamda Diyabetik Nefropatinin Tanı ve Tedavisi

Diyabetik nefropati (DN) gelişimi klinik olarak 5 aşamada incelenmektedir. Birinci aşama, glomerüler filtrasyon hızının (GFR'nin) normal ya da artmış seviyede olması ve renal hipertrofi ile karakterizedir. İkinci aşamada klinik semptom görülmez, GFR genelde normaldir, GBM kalınlığında ve mezengial matrikste artış görülür. Üçüncü aşama ise, hastalık başlangıcının 5. ile 10. yılları arasındaki dönemi olup, mikroalbüminüri (30-300 mg/24s) ve glomerüler hasarı içeren ilk klinik bulguların görülmesi ile karakterizedir. Dördüncü aşamada geri dönüşsüz proteinüri, GFR'de düşüş (60 ml/dk1.73 m^2 değerinin altına iner) ve sürekli hipertansiyon izlenir. Beşinci aşama ise böbrek yetmezliğinin görüldüğü son aşama böbrek hastalığı olarak tanımlanmış olup; GFR'nin 15 ml/dk1.73 m^2 değerinin altına inmesi ile tanılanmaktadır[65,66].

DN'nin kesin tedavisi olmamakla birlikte, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak amacıyla ilaç tedavileri klinikte uygulanmaktadır. Anti-hipertansiyon ilaçları (anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ya da anjiyotensin reseptör-1 blokerleri), glomerül içi basıncı azaltarak DN ilerleyişini yavaşlatmaktadır. Ancak bu tür ilaçların, sadece proteinüri seviyesinin 300 mg/gün seviyesinden yüksek olan hastalarda etkili olduğu görülmüştür[15]. Bir diğer ilaç grubu ise, sodyum glikoz ortak taşıyıcı 2 (SGLT2) protein inhibitörleridir. SGLT2 inhibitörleri, hipoglisemik ajanlar olup glikoz geri emilimini engellerken, aynı zamanda sodyum geri emilimini de engeller. Azalan sodyum

geri emilimi, makula densadaki sensitif hücreler aracılığıyla glomerüler hiperfiltrasyonunun baskılanmasını sağlar[15,67,68]. Bu tür ilaçlar, DN'nin ilerleyişini yavaşlatsa da, en son evrede, hastalarda SABH görülmekte olup, bu durumda, düzenli olarak diyaliz ile kanın temizlenmesi ya da böbrek nakli gerekmektedir[15]. Bu bağlamda, DN'nin kesin tedavisine yönelik klinik öncesi çalışmalar büyük önem arz etmektedir.

2.1.3. Diyabetik Nefropati Modeli Oluşturma Ajanı Olarak Streptozosin

Streptozosin (STZ) kimyasal bir ajan olup glikoz taşıyıcısı-2 proteinlerine bağlanmak için glikoz ile rekabet ederek pankreatik beta hücrelerine girer. Hücre içerisine giren STZ, çeşitli sinyal yolaklarını aktifleştirerek insülin sekresyonunu azaltmasının yanında, serbest radikal kaynağı olarak beta hücrelerinin ölümüne yol açarak hiperglisemiyi, dolayısıyla diyabeti indükler. STZ, *in vivo* hayvan çalışmalarında kullanılan en yaygın DN oluşturma yöntemidir[23,69]. Genel olarak; hiperglisemi, proteinüri, glikozüride ve renal kitle indeksinde artışa eşlik eden renal ve glomerüler hipertrofi, glomerüleroskleroz, mezengial alanda artış, glomerüler hücre apoptozunda artış, glomerüler yumağın Bowman kapsülüne adezyonu gibi patolojik durumlara sebebiyet vermesi bakımından STZ ile indüklenen DN oldukça başarılı bir modeldir[26,47,70].

2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), rejeneratif tıpta önemli bir hücre kaynağıdır. MKH'lerin multipotent karakterleri, düşük antijenite özelliği ve kültür ortamında kolay manipülasyonları bu hücreleri terapötik açıdan ön plana çıkarmaktadır[16]. Hasarlı hücreye farklılaşma potansiyellerinin yanı sıra; immünmodülatör, anti-fibrotik, anti-apoptotik ve pro-anjiyogenik faktörleri salgılamaları bakımından da önemli bir terapötik potansiyele sahiptirler[8,17]. MKH'ler; kemik iliği, dental pulpa, yağ dokusu gibi çok farklı dokudan elde edilebilmektedir[16]. Kemik iliği kaynaklı MKH'ler, üzerinde çok sayıda çalışma yapılması bakımından altın standart olarak değerlendirilmektedir[18]. Diğer taraftan son zamanlarda yapılan çalışmalar, göbek kordonunun kemik iliğine göre daha avantajlı bir kök hücre kaynağı olduğunu göstermektedir. Bu avantajlar arasında; göbek kordonundan izole edilen hücrelerin yüksek proliferasyon kapasiteleri, düşük immün reaksiyon oluşturmaları ve göbek kordonunun etik açıdan daha az sorun teşkil etmesi bulunmaktadır[18–20].

2.2.1. MKH Kaynaklı Şartlandırılmış Medyumların Terapötik Potansiyelleri

Başlangıçta MKH'lerin renal hücrelere farklılaşma potansiyelleri göz önünde bulundurularak, direkt olarak terapötik amaçlı uygulanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu bağlamda, MKH'lerin farklı sıçan DN modellerinde, renal hücre sayısını ve hasarını iyileştirerek, inflamatuvar reaksiyonu, oksidatif stresi ve fibrozis gelişimini baskılayarak renal fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir[3,5,21–26]. Ancak yapılan çalışmalarda, uygulanan MKH'lerin terapötik etki göstermelerine rağmen, glomerül içerisinde çok az sayıda gözlendiği ve sistemik olarak başta akciğer olmak üzere diğer organlara tutundukları tespit edilmiştir[17,27,28]. Bu noktada, DN modellerinde uygulanan MKH'lerin iyileştirici etkilerinin nereden kaynaklandığı sorusu ortaya çıkmıştır ve MKH'lerin bu etkilerini farklılaşma özelliklerinden çok parakrin etkileşimler aracılığıyla ortaya koyduğu ileri sürülmüştür. MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış medyum (ŞM) içeriğinde; çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerden oluşan parakrin faktörlerin yanında mRNA, miRNA, DNA ve protein içeriklerine sahip ekstraselüler veziküllerin de bulunduğu gösterilmiştir. MKH'lerden elde edilen ekstraselüler veziküllerin, *in vivo* DN modelleri üzerinde MKH'lerin direkt uygulanmasına benzer seviyede iyileştirici etkiler gösterdiği tespit edilmiştir[4,71]. Ayrıca, ŞM'lerin taşınmasının ve saklanmasının MKH'lere göre daha kolay olması ve kriyoprezervasyonuna gerek duyulmaması terapötik kullanımını kolaylaştırması bakımından önemli avantajlardır[32].

2.2.2. MKH'lerin Ön Koşullandırılması

MKH'lerin hasarlanmış doku alanlarına olan çekimleri düşünüldüğünde, bu hücrelerin hasarlı alanın toksisitesinden etkilenmemeleri kaçınılmazdır[34]. Diyabetli ve metabolik sendromlu hastalardan izole edilen MKH'lerin; içlerindeki bulundukları dokudaki artmış inflamasyona ve oksidatif strese bağlı olarak kök hücre karakterlerinin olumsuz etkilendiği gösterilmiştir. Bu bağlamda; MKH'lerde CD90, CD105 ve CD73 gibi karakteristik yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyelerinde, kendini yenileyebilme kapasitelerinde, farklılaşma ve terapötik potansiyellerinde azalmalar tespit edilmiştir[16,72]. Ayrıca; terapötik amaçlı kullanılacak kök hücrelerin kriyoprezervasyon aşamasında canlılık ve sitogenetik özelliklerinin olumsuz etkilendiği ve koruyucu solüsyona bağlı toksitite gelişebildiği bildirilmiştir[73,74]. Sonuç olarak; MKH'lerin kriyoprezervasyonu, izole edildiği hastanın sağlık durumu ve yaşı gibi faktörler bu hücrelerin terapötik potansiyellerini önemli oranda etkilemektedir. Bu durum, MKH'lerin klinik

uygulamalarda kullanımından önce çeşitli yöntemlerle "gençleştirilmelerini" gerekli kılmaktadır[72]. Bu bağlamda çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bunlar arasında, MKH'lerdeki koruyucu sitokinlerin ya da anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarnın artırılmasını sağlayabilecek gen modifikasyonları yöntemi, MKH'lerin eşlik eden ilaç ya da biyomateryal ile transplantasyonu bulunmaktadır. Ancak gen modifikasyonu yönteminde, kanser ilişkili genlerin aktivasyonu riski bulunmakta olup, ilaç ya da biyomateryaller ile birlikte yapılan transferlerde de komplikasyon riskleri bulunmaktadır[75]. Diğer taraftan son zamanlarda, MKH'lerin uygun kimyasal ajanlar ile muamele edilerek terapötik potansiyellerinin arttırılması yöntemi, oldukça etkili bir strateji olarak öne çıkmıştır[72]. Dolayısıyla yapılan çalışmalarda MKH'lerin; lipopolisakkarit, tümör nekroz faktör alfa ve all-trans retinoik asit gibi kimyasal ajanlarla belirli doz ve sürede muamelesini içeren ön koşullandırma işlemi sonrasında, terapötik potansiyellerinin arttığı gösterilmiştir[34,76,77]. Literatürde, MKH'lerin iyileştirici etkilerinin artırılmasına yönelik ön koşullandırmayla ilgili çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu noktada, hipoksik ortamda kültürlenen adipoz kökenli MKH'lerden elde edilen ŞM'nin içeriğindeki koruyucu faktörlerin salınımında artış olduğu ve bu ŞM'nin sisplatin ile indüklenmiş akut böbrek hasarında daha iyi terapötik etki gösterdiği ortaya konulmuştur[78]. Nagaishi ve ark[16]. yaptıkları çalışmada, diyabetli hastalardan elde edilmiş Kİ-MKH'lerinin Wharton jeli lizatı süpernatantı ile ön koşullandırılması sonrasında, terapötik potansiyellerinin arttığını göstermiştir.

2.2.3. Ön Koşullandırıcı Ajan Olarak Deferoksamin

Deferoksamin (DFS) şelatör bir ajandır, demir ve alüminyum toksisitelerinin tedavisinde kullanılan ilaçların etken maddesidir[33,34]. İn-vitro şartlarda dorsal kök gangliyonu nöron hücreleri ile oluşturulan diyabetik nöropati modelinde kullanılması planlanan yağ dokusu kökenli MKH'lerin DFS ile muamelesi bir diğer deyiş ile ön koşullandırılması sonrasında, protein ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler ve terapötik potansiyelleri değerlendirilmiştir[34]. DFS ile ön koşullandırma sonrasında MKH'lerin morfolojileri ve canlılıkları etkilenmeden; konsantrasyona bağlı olarak hipoksiyle indüklenen faktör1-alfa (HIF1-α), vasküler endotelyal büyüme faktörü-alfa (VEGF-α) gibi pro-anjiyogenik faktörlerin, interlökin-4 (IL4) gibi anti-inflamatuvar karakterli sitokinlerin ve nöron koruyucu faktörler olan sinir büyüme faktörü (NGF), glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF), nörotrofin-1 ve beyin kaynaklı nörotrofik

faktör (BDNF) gibi büyüme faktörlerin ekspresyonlarının mRNA seviyesinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Sekretom içerisindeki VEGF-α, NGF ve IL-4 miktarlarında ve ayrıca anti-oksidan kapasite de bir artış saptanmıştır. Bu bağlamda, normal ŞM'ye göre; DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen ŞM, dorsal kök gangliyonu nöron hücrelerinde yüksek glikoza bağlı oluşan apoptozu azaltmada daha etkili olmuştur[34].

Podosit ve nöronlar çok sayıda ortak karakteristik özelliğe sahiptir. Her iki hücre tipi de terminal olarak farklılaşmıştır; benzer dallanmış morfoloji ve özelleşmiş hücreler arası kontaklara, benzer hücre iskeleti organizasyonuna ve sinyal etkileşim süreçlerine, nefrin, sinaptopodin ve podosin gibi karakteristik proteinlerin ortak ekspresyonlarına sahiptirler[79–82]. Bu bağlamda, DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerde mRNA seviyesinde artışı gözlenen parakrin faktörlerin, spesifik olarak nöron koruyucu büyüme faktörlerinin, glomerular filtrasyon bariyerinin yapısına katılan podositlerin korunmasına yönelik tedavide de etkin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Birinci olarak, NGF'nin hem olgunlaşmamış hem de tamamen farklılaşmış insan podosit hücreleri tarafından üretildikleri ve salgılandıkları gösterilmiştir. Ayrıca podosit farklılaşma sürecinde uygulanan NGF nötralize edici antikorun ayakçık uzantılarının geri çekilmesine yol açtığı gösterilmiştir[35]. Nöron koruyucu BDNF'nin mikroRNA-134 ve mikroRNA-132 sinyalleri aracılığı ile aktin polimerizasyonunu arttırarak podosit morfolojisinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir[36]. Diğer bir nöron koruyucu GDNF'nin, hiperglisemi ile indüklenen diyabetik böbrek hasarını, PI3K/Akt yolağı üzerinden apoptotik direnci arttırarak iyileştirdiği gösterilmiştir[37]. Son olarak, pro-anjiyogenik VEGF-α'nın da glomerül kapiller endotel fonksiyonu ve fenestralı yapının korunmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir[39]. Normal koşullarda elde edilen ŞM'ye göre, DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen ŞM'de bu parakrin faktörlerin konsantrasyonlarındaki olası artışın ve DN modeli üzerindeki etkilerinin incelenmesi terapötik anlamda büyük önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın *in vitro* kısmını oluşturan mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda insan göbek kordonu kullanımı için gerekli izin; İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09.05.2019 tarih ve 83045809-604.01.02 sayı ile alındı. Ayrıca, çalışmanın *in vivo* kısmını oluşturan hayvan deneyleri için, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 09.07.2019 tarihli ve 2019/140 sayılı onay alındı ve tüm çalışmalar Etik Kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

Bu çalışma; İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doku Kültürü, Işık ve Elektron Mikroskobi Laboratuvarları'nda ve Biyokimya Anabilim Dalı, Fikret Biyal Merkez Araştırma Laboratuvarı'nda; İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Hücre Biyolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda ve Eczacılık Fakültesi, İlaç Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde; hayvan deneyleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda 24.06.2020-15.08.2021 tarihleri arasında yürütüldü. Çalışmada, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı'nda sezaryen ile doğum yapan gönüllü vericiden elde edilen 1 adet göbek kordonu kullanıldı.

3.1. Gereçler

3.1.1. Alet ve Teçhizat

Steril serolojik pipet 5 ml (Jet Biofil: GSP-010-005)
Steril serolojik pipet 10 ml (Jet Biofil: GSP-010-010)
1-10 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
10-100 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
10-200 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
100-1000 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
10 µl, 100 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik mikropipet uçları
15 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü (Corning Star: 430790)
50 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü (Corning Star: 430829)
Ependorf tüpü (Labosel 98/79/CE)
Kültür petri dish [(kapakları ile birlikte) BD Falcon)

25 m^2'lik hücre kültür tabağı (Jet Biofil: TCF-012-050)

75 m^2'lik hücre kültür tabağı (Jet Biofil: TCF-012-250)

24 kuyucuklu doku kültür tabağı (Biofil: TCP 011024)

70 µm'lik hücre filtresi (SPL Life Sciences)

Tek kullanımlık filtre 0,2 µm (Sartorius Biotech: 1653400449103)

Hemositometre (Marienfeld: 0640010)

Lam (Marienfeld)

Yuvarlak lamel (Marienfeld)

Bakır grid (EMS, G100-Cu)

Countour Plus Test çubukları (Bayer AG)

Metabolik kafes (KOBAY)

1 ml'lik enjektör (AYSET)

Cerrahi set

3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumu (DMEM/F12) (Thermo fisher: 11320074)

Leibovitz-15 medyum (Pan-Biotech: P04-27500)

Fetal sığır serumu (FBS: Hyclone: HY30160.03)

L-Glutamin 200 mM (Hyclone: SH30034.01)

Penisilin+Streptomisin+Amfoterisin B solüsyonu (Gibco: 15240062)

Tripsin/EDTA solüsyonu (Hyclone: SH30042.01)

Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS: Amresco E404)

CD34-FITC antikor (BD Biosciences: 555801)

CD44-PE- antikor (BD Biosciences:550989)

CD45-APC-Cy antikor (BD Biosciences: 557833)

CD90-APC-antikor (BD Biosciences: 559869)

APC Fare IgG1, izotip kontrol (Biolegend 400120)

APC/Cyanine7 Fare IgG1, izotip kontrol (Biolegend 400128)

PE Fare IgG1, izotip kontrol (Biolegend 400112)

FITC Fare IgG1, izotip kontrol (Biolegend 400110)

İnsan osteoblastik farklılaştırma medyumu (Sigma, 417D-250)

İnsan adipojenik farklılaştırma medyumu (Sigma 811D-250)

Alizarin Red S (Sigma, A5533-25G)

Oil Red O (Sigma, O0625-25G)

Bişinkoninik Asit (BCA) Protein Kantifikasyon Kiti (Abbkine: KTD3001)

Metanol (Sigma-Aldrich: 24229)

Gluteraldehit (Merck Millipore: 1.04239.0250)

Osmium tetroksit (Merck Millipore: 1.00983.2511)

Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma, 45359)

Jelatin Kapsül (EMS, 70104).

Etil Alkol %96 (Alkomed: CAS 64-17-5)

Propilen oksit (Merck: 8.07027.1000)

Toluidin mavisi (Merck: 7471451)

Uranil asetat dihidrat (Merck: 4087843)

Kurşun sitrat (Sigma 15326-100G)

Sodyum sitrat (Merc: 1.06448.1000)

Sitrik asit monohidrat (Merc: 100244)

Hematoksilen (Invitrogen 00-8011)

Eozin (Merck: 1.15935)

Entellan Alkol bazlı kapatma solüsyonu (Merck 1.07961)

Lityum karbonat (Merck: 105671)

Toluen (Merck: 1.08323.2500)

Periyodik asit (Merck 100524)

Schiff solüsyonu (Merck 109033)

Masson üçlü boya kiti (Atom Scientific RRSK20)

Paraformaldehit (Merck: 1.04005.1000)

Triton X-100 (Fisher BioReagents BP151)

Hipoksi indüklenmiş faktör-1 alfa (HIF-1α) antikor (Boster A00013)

HRP Anti-Polyvalent (ScyTek SHP125)

AEC kromojen kit (ScyTek)

Roche/cobas kreatinin analiz kiti (Roche Diagnostics)

Sıçan albümin ELISA kit (ElabScince E-EL-R0362)

İnsan NGF/NGFβ ELISA kit (Boster EK0469)

İnsan BDNF ELISA kit (Boster EK0307)

İnsan GDNF ELISA kit (Boster EK0362)

İnsan VEGF-A ELISA kit (Abbkine KET6033)

Nefrin primer antikoru (Abcam ab216341)

Wilm’s Tümör baskılayıcı protein-1 (WT-1) primer antikoru (Abcam ab212951)

Beclin-1 primer antikoru (Abbkine ABM0079)

TUNEL kit (Abcam ab206386)

Tween-20 (P2287 Sigma)

Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (161-0729 BioRAD)

Trizma-Base (T1503 Sigma)

PBS (2810305 MP Biomedicals)

Su bazlı kapatma medyumu (TA-125-UG Thermo Scientific)

Hidrojen peroksit (1.08600 Merck Millipore)

Ketamin HCl (Doğa İlaç)

Ksilazin HCl (Bayer)

3.1.3. Cihazlar

Sterile edilmiş sınıf II laminar havalandırmalı kabin (Esco: Class II)

İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i)

Santrifüj (Eppendorf: 5810 R)

Buzdolabı (Arçelik)

Vorteks (Biocote: Stuart SA8)

Dijital çalkalamalı sıcak su banyosu (Fisher Scientific)

Manyetik karıştırıcı (IKA Rct Basic)

Elektrikli pipet pompası (Ratiolab: Accupetta)

Hassas terazi (Sartorius)

Flow sitometer (BD FACSCanto II)

Etüv (Heraeus)

Mikrotom (Thermo Scientific Microm hm430)

Trimleme cihazı (Leica, EM TRIM2)

Ultramikrotom (Leica, EM UC7)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

Ters (İnvert) mikroskop (Olympus IX71)

Işık mikroskobu (Olympus BX61)

Kamera (Olympus DP72)

Elektron mikroskobu (Jeol Jem-1011)
Lionheart FX otomatikleştirilmiş mikroskop (BioTek)
Distile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF)
Masaüstü otoklav (Thermo Scientific Varioklav: 25T)
Countour Plus glukometre (Bayer)
Mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00)
Roche HITACHI Cobas c 501 analiz cihazı (Roche Diagnostics).
Sıvı Kromatografisi - Kütle - Kütle Spektrometresi Cihazı (Agilent Technologies Triple Quadrupole 6460)

3.2. İnsan Göbek Kordonundan MKH'lerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.2.1. MKH'lerin İzolasyonu

1- Göbek kordonları %1'lik (v/v) amfoterisin B içeren Leibovitz-15 taşıma medyumu içinde, düşük ısı ortamında laboratuvara taşındı.
2- Kordonlar, laminar havalandırmalı kabinde, fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS) ile 3 defa yıkandı ve kordon içindeki damarlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
3- MKH'lerin plastik yüzeye yapışma kabiliyetlerine dayanan doku eksplantı yöntemi ile hücreler izole edildi[20]. Bu bağlamda, göbek kordonu örnekleri 1-2 mm^3'lük küçük parçalara bölündükten sonra, plastik petri tabaklar içine yerleştirildi ve yapışmaları için 3 saat süreyle, %5 CO_2 ve 37 ºC'lik kültür ortamında inkübasyona bırakıldı.
4- İnkübasyon sonrasında, 10 ml büyüme medyumu [DMEM/F12(1/1), %10 fetal sığır serumu, 1% penisilin/streptomisin, 2,5 ug/mL amphoterisin B] eklendi, %5 CO_2 ve 37 ºC'lik kültür ortamında inkübe edildi. Haftada 3 kez medyum değiştirildi.
5- Hücrelerin yapışmasını takiben doku parçacıkları ortamdan uzaklaştırıldı.
6- %80–90 yoğunluğa ulaşıldıktan sonra hücreler pasajlanarak 1.pasaj hücreleri (P1) elde edildi ve sayıldı. 5000 hücre/cm^2 olarak T75 flasklara ekildi.

3.2.2. MKH'lerin Karakterizasyonu

1- 3. pasaja gelen hücrelerin morfolojileri hematoksilen ve eozin boyamaları ile ışık mikroskobik olarak değerlendirildi.
2- MKH'lere özgü CD44 ve CD90 belirteç proteinlerinin ve MKH'lere özgü olmayan CD34 ve CD45 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri flow sitometrik analizler ile değerlendirildi. 3. pasaj sonrasında toplanan hücreler 70 µm'lik filtrelerden geçirilerek süzüldü. Boyama tamponu ile bir kez yıkandı. Sonrasında boyama

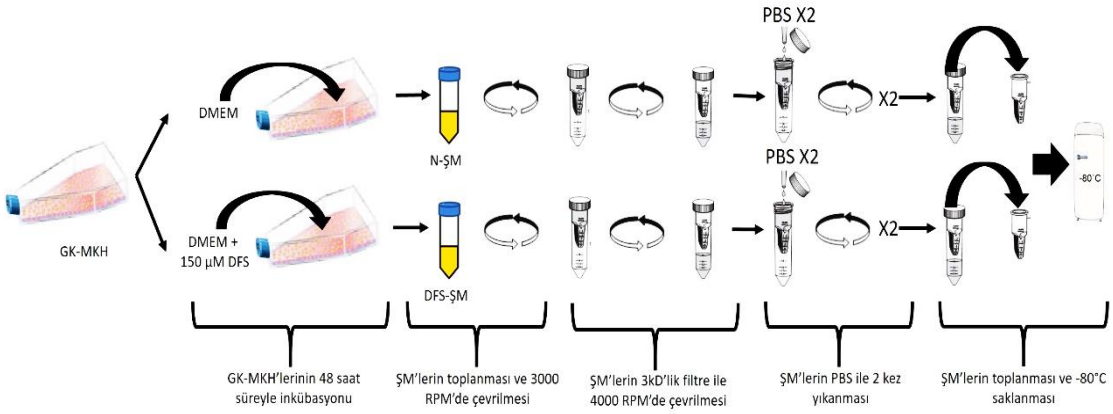
tamponu içinde hazırlanan antikorlarla 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Daha sonrasında, bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için santrifüjlenip, bir kez yıkanan örnekler BD FACS Calibur cihazı ile analiz edildi.

3- 3. pasaj sonrasında toplanan iGK-MKH'lerinin adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri değerlendirildi.
   - Osteojenik farklılaşma için MKH'ler, $1x10^4$ hücre/cm^2 olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre tabaklarına ekildi. 24 saat süreyle büyüme medyumu içerisinde, nemlendirilmiş ortamda, %5 CO_2 ve 37 ºC'lik kültür ortamında inkübe edildikten sonra, büyüme medyumu ortamdan uzaklaştırıldı ve insan osteoblastik farklılaştırma medyumu (Sigma, 417D-250) eklendi. Her 3 günde bir medyum değiştirildi. 23. günün sonunda, hücreler %4'lük paraformaldehit ile 20 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Sonrasında; fiksatif ortamdan uzaklaştırılıp PBS ile yıkama sonrasında, osteojenik farklılaşma Alizarin Red S (Sigma, A5533-25G) ile tespit edildi.
   - Adipojenik farklılaşma için MKH'ler $4x10^4$ hücre/cm^2 olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre tabaklarına ekildi. 3 gün süreyle büyüme medyumu içerisinde inkübe edildikten sonra, medyum ortamdan uzaklaştırıldı ve insan adipojenik farklılaştırma medyumu (Sigma 811D-250) eklendi. Her 3 günde bir medyum değiştirildi. 22. günün sonunda, hücreler %4'lük paraformaldehit ile 20 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Sonrasında; fiksatif ortamdan uzaklaştırılıp PBS ile yıkama sonrasında adipojenik farklılaşma, Oil Red O (Sigma, O0625-25G) boyama solüsyonu ile tespit edildi.

3.3. Şartlandırılmış Medyumların Elde Edilmesi

T75 flasklarda, %70-80 yoğunluğa ulaşmış 3. pasajdaki MKH'lerin medyumları uzaklaştırılıp, 15'er mL, 150 µM deferoksamin (DFS) içeren ve içermeyen serumsuz DMEM/F12 medyumlar ortama eklendi. 48 saatlik inkübasyon sonunda, şartlandırılmış medyumlar (ŞM'ler) toplandı. Hücre tabağı üzerinde kalan hücreler tripsin ile pasajlanıp, tripan mavisi ile ölü hücre oranı tespit edildi. Toplanan medyumlar hücre kalıntılarının ortamdan uzaklaştırılması için 3000 rpm'de 5 dakika çevrildi. Daha sonrasında 3kD'luk filtreler ile 4000 rpm'de 45 dakika süreyle çevrilerek konsantre hale getirildi. Sonrasında, aynı filtreler kullanılarak, konsantre edilen medyumun üzerine PBS eklendi ve 4000 rpm'de 45 dakika santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3-1). PBS ile

yıkama işlemi bir kez daha yapıldıktan sonra, elde edilen konsantre ŞM'lerdeki protein konsantrasonu bişinkoninik asit (BCA) protein kantifikasyon yöntemi ile belirlendi ve konsantre ŞM'ler sonrasında kullanılmak üzere -80°C'de saklandı.



Şekil 3-1: Şartlandırılmış medyumların elde edilme süreci

3.3.1. Normal Koşullarda ve Deferoksamin ile Ön Koşullandırılmış MKH'lerdeki HIF1-α Ekspresyonun İmmünositokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

24 kuyucuklu tabaklarda, yuvarlak lameller üzerine ekilen MKH'ler deferoksaminli ve deferoksaminsiz serum içermeyen DMEM/F12 medyum içerisinde 48 saat inkübe edildikten sonra medyum ortamdan uzaklaştırıldı. PBS ile yıkama sonrasında oda sıcaklığında 15 dk %4 paraformadehit ile fikse edildi. Fiksatif ortamdan uzaklaştırılıp PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Hücreler %0,1'lik PBS-Triton X-100 ile 5 dk inkübe edilerek geçirgenleştirildi. PBS ile yıkama sonrasında 5 dk süreyle bloklama işlemi gerçekleştirildi (ScyTek Laboratories SensiTek HRP kit). 5 µg/ml HIF1-α antikoru ile bir gece inkübasyona bırakıldı. PBS ile yıkama sonrasında, biyotinlenmiş sekonder antikor (ScyTek Laboratories SensiTek HRP kit) ile 20 dk inkübe edildi. Sonrasında PBS ile yıkama işleminin ardından, streptavidin peroksidaz solüsyonu ile 20 dk inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra, 3-amino-9 etilkarbazol (AEC) kromojen ile reaksiyon gelişimi beklendi. Reaksiyon PBS ile durduruldu ve lameller su bazlı kapatma medyumu ile lam üzerine kapatıldı. Örnekler Olympus BX61 mikroskop ile görüntülendi ve Olympus DP72 kamera ile fotoğraflandı.

3.3.2. ŞM İçeriğindeki Deferoksamin Varlığının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile Analizi

MKH'lerden elde edilen ŞM'lerin içeriğindeki deferoksamin varlığı yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analiz edildi. Bunun için sıvı kromatografisi – kütle

- kütle spektrometresi cihazı (Agilent Technologies Triple Quadrupole 6460) kullanıldı. ŞM'lerdeki DFS varlığı; yıkamalardan önce, birinci yıkama sonrasında ve ikinci yıkama sonrasında değerlendirildi. Elde edilen örnekler, LC-MS grade metanol: %2 formik asit (95:5) karışımından oluşan mobil faz kullanılarak, infüzyon şeklinde enjekte edildi. 3 µl enjeksiyon hacmi ve mobil faz akış hızı 1,0 ml/dk olacak şekilde 2 dk süreyle analiz edildi. Ana iyonun ve parçalanma ürününün kütle/yük (m/z) oranları sırasıyla 561,6 ve 201,2 olarak belirlendi ve bu iyonların analizi kütle dedektöründe gerçekleştirildi.

3.3.3. ŞM İçeriğindeki Faktörlerin Tayini

İki farklı koşulda elde edilen ŞM'ler, yukarıda belirtilen filtreleme yöntemi ile yaklaşık 50 kat oranında konsantre hale getirildi. ŞM'lerin içeriklerindeki NGF, BDNF, GDNF and VEGF-α büyüme faktörlerinin miktarları enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ile ticari kitin önerdiği protokol takip edilerek, mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00) ile belirlendi.

3.4. *In Vivo* Diyabetik Nefropati Modelinin Oluşturulması

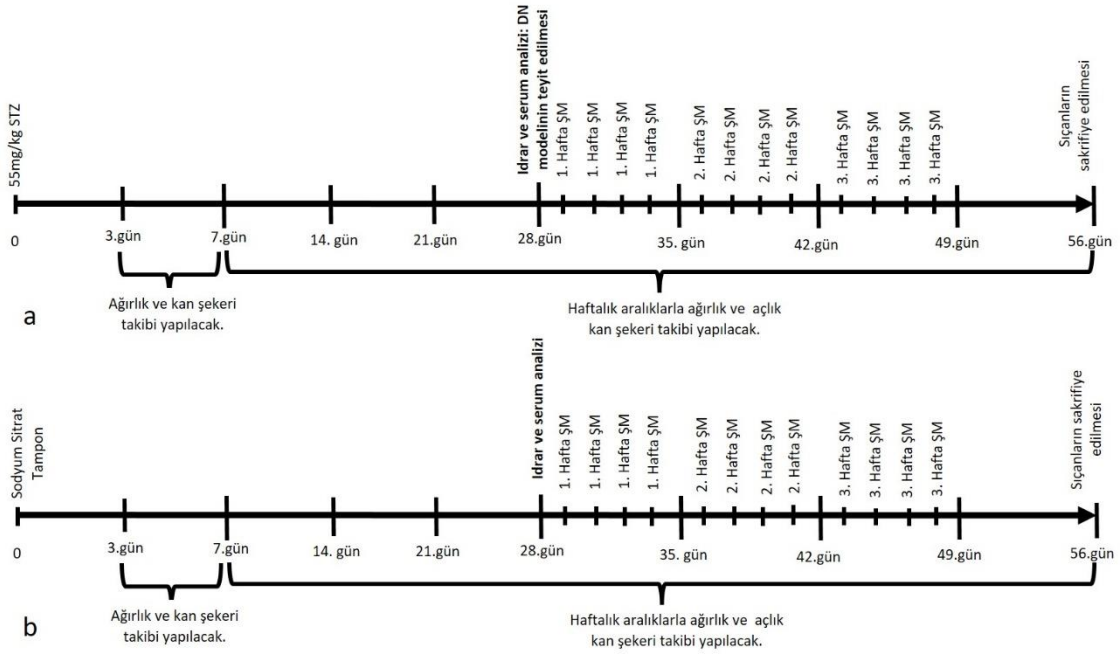
Çalışmanın *in vivo* kısmını oluşturan hayvan deneyleri için, 38 adet, ağırlıkları ortalama 400 gram olan 10-12 haftalık Sprague Dawley erkek sıçanlar kullanıldı. 20 adet sıçanda, 12 saatlik açlık sonrasında tek doz halinde sodyum sitrat tampon (SST, pH:4,5) içinde çözülmüş 55 mg/kg streptozosin (STZ) solüsyonunun intraperitoneal yolla uygulanması ile diyabet oluşumu indüklendi. 72 saat sonrasında, kuyruk veninden alınan kandan glukometre (Coutour Plus, Bayer) ile glikoz seviyesi ölçüldü. Kan glikoz seviyesi 250 mg/ml'den büyük olan sıçanlar diyabetli olarak kabul edildi ve sonrasında 1 hafta boyunca takip edildi. STZ enjeksiyonunu takip eden 4. haftanın sonunda, idrar albümin/kreatinin oranı (AKO) değerlendirildi ve 73 mg/g değerinden büyük çıkan sıçanlar diyabetik nefropatili olarak deneylere dâhil edildi (Şekil 3-2a).

DN oluşturulmuş 20 adet sıçan, 3 gruba bölündü; birinci gruba herhangi bir müdahalede bulunulmadı ikinci gruba MKH'lerden elde edilen normal ŞM (N-ŞM), üçüncü gruba ise DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen ŞM (DFS-ŞM) intraperitoneal yolla uygulanarak deney grupları oluşturuldu (Tablo 1). İki farklı koşulda elde edilen ŞM'ler, her dozda minimum 15 µg protein içeriğine sahip olacak şekilde eşit hacimlerde, DN gelişimini takip eden 3 hafta boyunca, haftada 4 doz olacak şekilde uygulandı (Şekil 3-2a).

18 adet sıçan ile de kontrol grupları oluşturuldu. 6 adet sıçana sadece SST; 6 adet sıçana SST ve N-ŞM; son olarak 6 adet sıçana da SST ve DFS-ŞM uygulanarak kontrol grupları oluşturuldu (Tablo 1**,** Şekil 3-2b). Sıçanlar son uygulamadan 1 hafta sonra, 8. haftanın sonunda, ketamin/ksilazin altında dekapite edilerek; böbrek dokuları ve kanları alındı.

Tablo 1: *İn vivo* kontrol ve deney grupları

Grup	Açıklama	Sayı
K	STT uygulanan sıçan grubu	6
K+NŞ	STT ve N-ŞM uygulanan sıçan grubu	6
K+DFS	STT ve DFS-ŞM uygulanan sıçan grubu	6
D	STT içerisinde STZ uygulanan ve DN gelişimi teyit edilen sıçan grubu	6
D+NŞ	STT içerisinde STZ uygulanan ve DN gelişiminin teyit edilmesinden itibaren 3 hafta boyunca haftada 4 doz olmak üzere N-ŞM uygulanan sıçan grubu	7
D+DFS	STT içerisinde STZ uygulanan ve DN gelişiminin teyit edilmesinden itibaren 3 hafta boyunca haftada 4 doz olmak üzere DFS-ŞM uygulanan sıçan grubu.	7



Şekil 3-2: Deney (a) ve kontrol (b) grupları için izlenen zaman çizelgeleri

3.5. Fiziksel ve Biyokimyasal Analizler

Deneyler süresince sıçanların vücut ağırlıkları haftalık periyotlarla takip edildi. Sakrifiye edildikten sonra, alınan böbrekler serum fizyolojik içerisinde yıkandıktan sonra, ağırlıkları ölçüldü. Daha sonrasında renal kitle indeksleri (RKI'ları) hesaplandı (RKI=(B÷V)×100 3-1).

RKI=(B÷V)×100 3-1

B) Böbrek ağırlığı, V) Vücut ağırlığı

STZ uygulanmasını takip eden 3 günlük sürenin sonunda, kuyruk veninden alınan kandan glukometre ile glikoz seviyesi ölçüldü; 250 mg/dl den büyük olan sıçanlar diyabetli olarak kabul edildi. Takip eden 1 hafta boyunca kan glikoz seviyelerinin ölçümüne devam edildi. Deneyler süresince haftalık periyotlarla kan glikoz seviyesi takip edildi.

STZ uygulamasını takip eden 4. haftanın sonunda; DN oluşumunun teyit edilmesi ve 8. haftanın sonunda deneyler sonlarındılmadan önce de renal fonksiyonların takibi için idrar ve serum örnekleri toplandı. Juguler venden elde edilen kan örnekleri ve metabolik kafeslerde toplanan 24 saatlik idrar örnekleri 2000 g'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi. Elde edilen süpernatantlar; serum kreatinin, idrar albümin ve kreatinin seviyelerinin ölçümü için -80˚C'de saklandı. Serum ve idrar kreatinin seviyeleri, çalışma prensibi kinetik kalorimetrik Jaffé yöntemine dayanan Roche HITACHI Cobas c 501 modülünde tayin edildi. İdrar albümin seviyesi ise kalorimetrik ELISA analizi ile üretici firmanın önermiş olduğu protokol takip edilerek değerlendirildi; mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00) ile ölçümler yapıldı. Renal fonksiyon, idrar albümin/kreatinin oranı (AKO) ve kreatinin uzaklaştırılma hızının (KUH'un) hesaplanması ile değerlendirildi. KUH,

KUH=(İK×V)÷SK **3-2**

denklemi ile hesaplandı ve mililitre/dakika olarak ifade edildi.

KUH=(İK×V)÷SK 3-2

İK) İdrar kreatinin miktarı, V) 24 saatlik idrar hacmi, SK) Serum kreatinin miktarı

3.6. Histolojik Analizler

3.6.1. Işık Mikroskobik Analizler

Sıçanların sakrifikasyonu sonrasında, sağ böbrekleri sagital düzlemde ikiye bölünüp ışık mikroskobik takip için %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonuna alındı. 24 saatlik fiksasyon sonrasında sırasıyla %70, %90, %96 ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyona maruz bırakıldı ve sonrasında toluende berraklaştırıldı. Daha sonrasında sıvı parafinde bekletildikten sonra parafine gömülüp bloklandı. Bloklardan alınan 4 μm'lik kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde tutulduktan sonra, toluende 30 dk bekletilerek parafinden arındırıldı. Daha sonrasında sırasıyla %100, %96, %90 ve %70'lik alkol serilerinden geçirilerek distile suya indirildi. Kesitlere hematoksilen & eozin (H+E), periyodik asit Schiff & hematoksilen (PAS+H) ve Masson üçlü boyası uygulandı. Olympus BX61 mikroskop ile görüntülendi ve Olympus DP72 kamerasıyla fotoğraflandı.

3.6.1.1. Hematoksilen ve Eozin

Distile suya indirilen kesitler, hematoksilende 25 dakika (dk) tutularak nukleuslar boyandı. Çeşme suyunda 20 dk morartma işleminin ardından asit alkolde 1 saniye tutulup tekrar 20 dk morartma yapıldı. %'1'lik lityum karbonat çözeltisinde mavileştirme işlemi yapıldıktan sonra eozinde 5 dk tutularak sitoplazmalar boyandı. Artan alkol serilerinden (70º, 90º, 96º, 100º) ve toluenden geçirilip Entellan ile kapatıldı. Elde edilen kesitler, tübüler hasar (dilatasyon ve vakuolasyon), interstisyel alan artışı (ödem veya inflamatuvar hücre infiltrasyonu) ve tübül lümenlerindeki hücre veya hücre kalıntıları varlığına göre değerlendirildi. Kortikal bölgeden rastgele seçilen 12 alan, 200X büyütmede, 0, +1, +2 ve +3 (sırasıyla % 5 den az, %5-25 arası, %25-75 arası ve %75 den fazla alanının etkilendiği) şeklinde semi-kantitatif olarak skorlandı. Her bir örnek için elde edilen skorlar toplanıp, incelenen alan sayısına bölünerek final skorlar elde edildi[83].

3.6.1.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Hematoksilen (H)

Distile suya indirilen kesitler, periyodik asitte 5 dk tutuldu. Akarsuda 6 dk tutulduktan sonra, kesitler distile suda yıkandı ve hemen ardından Schiff solüsyonunda karanlıkta 15 dk inkübasyona bırakıldı. Sonrasında, yıkama solüsyonunda 3 kez 5'er dk tutuldu. Akarsuda 2 dk yıkama işlemi uygulandıktan sonra hematoksilende 7 dk tutularak nukleuslar boyandı. Çeşme suyunda 10 dk morartmanın ardından, artan alkol serilerinden

(70º, 90º, 96º, 100º) ve toluenden geçirilerek Entellan ile kapatıldı. Mezengial alandaki genişleme ve GBM kalınlığındaki artış seviyeleri; ortalama 30 glomerül üzerinden, 400X büyütmede 0 ile +4 (yok - tüm glomerüle yayılmış mezangial alan artışı) arasında semi kantitatif olarak skorlandı. Her bir örnek için; elde edilen skorlar toplanıp, incelenen glomerül sayısına bölünerek final skorlar elde edildi[84,85].

3.6.1.3. Masson Üçlü Boyaması

Weigert'ın demirli hematoksileninde 2,5 dk tutularak nukleuslar boyandı. Çeşme suyunda 20 dk morartma işlemi sonrasında, pons ve asit fuksin karışımında 5 dk tutularak sitoplazma boyandı. Çeşme suyunda yıkandıktan sonra %1'lik asetik asitte 10 saniye tutulduktan sonra 30 dk fosfotungustik asit içerisinde farklılaştırıldı. %1'lik asetik asitte 10 saniye tutulduktan sonra ışık yeşili boyası içinde 30 saniye tutularak kollajen yapıları boyandı. Çeşme suyuna alınan kesitler, artan alkol serilerinden (70º, 90º, 96º, 100º) ve toluenden geçirilerek Entellan ile kapatıldı. Glomerüler alanlardaki fibrozis gelişimi; ortalama 30 glomerül üzerinden, 200X büyütmede 0 ile +4 (yok - tüm glomerüle yayılmış fibrotik alan artışı) arasında semi kantitatif olarak skorlandı. Her bir glomerül için elde edilen skorlar toplanıp, incelenen glomerül sayısına bölünerek final skorlar elde edildi[83].

3.6.2. Elektron Mikroskobik Analizler

Sıçanların sakrifikasyonu sonrasında, renal korteks bölgesi dikkatli bir şekilde kesildi ve 1 mm^3'lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları %2,5'luk gluteraldehitte fikse edildi. Fiksasyonu takiben 0,1 M fosfat tampon ile yıkandı. Daha sonrasında; örnekler %1'lik osmiyum tetroksit çözeltisinde +4°C'de 1 saat süreyle sekonder fiksasyona maruz bırakıldı. PBS ile yıkama işleminin ardından, %1'lik uranil asetatta +4°C'de 1 saat bekletildi ve tekrar PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Sonra sırasıyla %30, %50, %70, %80, %96 ve %100'lük alkol serilerinden 10'ar dakikalık inkübasyonlardan geçirilerek dehidrasyona maruz bırakıldı. Saf propilende 2 x 10 dk ve propilen-epon karışımlarında [(propilen oksit:epon (1:1), propilen oksit:epon (1:3) ve saf epon] 1 er saat oda sıcaklığında tutulduktan sonra epon kapsülde 60°C'de etüvde 18 saat polimerize edilerek bloklandı. Elde edilen bloklar trimleme cihazıyla tıraşlandı. Kesit yüzeyi elde edildikten sonra 0,5 μm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak glomerüllerin yeri tespit edildi. Sonrasında kesilen 40-60 nm kalınlığında ultra ince kesitler, bakır gridler üzerine alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat damlaları üzerinde sırasıyla 30 dk ve 10 dk bekletilerek kontrastlandıktan sonra Jeol Jem-1011 model geçirimli elektron

mikroskobunda (TEM'de) incelendi ve incelenen alanlar Olympus Soft Imaging kamera sistemi ile görüntülendi ve fotoğraflandı. Glomerüllerin periferal bölgelerinden 20,000X büyütmede elde edilen 5 farklı TEM görüntüsü üzerinde, 2 farklı morfometrik analiz gerçekleştirildi. Birinci olarak GBM kalınlığı, endotelyal ve podosit hücre membranları arasındaki dikey uzaklığın ölçümü ile değerlendirildi. Podosit ayakçık geri çekilmesi ise podosit ayakçık uzantılarının ortalama genişliğinin hesaplanması ile değerlendirildi. Bunun için yaklaşık 7000 nm GBM uzunluğu üzerinde yer alan filtrasyon yarıkları sayıldı. Sonrasında GBM uzunluğunun yarık sayısına bölünmesi ile ortalama ayakçık genişliği hesaplandı[86].

3.7. İmmünohistokimyasal Analizler

3.7.1. Nefrin ve WT-1 İmmünohistokimyasal Boyamaları

Elde edilen 4 μm'lik kesitler 1 gece 56 °C'lik etüvde tutulduktan sonra 30 dk toluende bekletilerek parafinden arındırıldı. Sonrasında inen alkol serilerinden geçirilerek (2 x 3 dk 100º, 3 dk 96º, 3 dk 70º ve 3 dk 50º alkolde bekletilerek) distile suya alındı. TRIS-EDTA (pH: 9.0) tampon çözeltisinde 20 dk (2 dk x 10) mikrodalgada antijen iyileştirmesi (retrieval) yapıldı. 5 dk distile suda soğutulduktan sonra, 5 dk x 2 kez PBS ile yıkama yapıldı. Oda sıcaklığında 25 dk %3'lük H_2O_2 solüsyonunda inkübasyona bırakıldı. PBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra 6 dk SensiTek Super Block ile bloklama işlemi uygulandı. Sonrasında 1ug/ml WT-1 ve 0,607 ug/ml nefrin primer antikorları ile gece boyu +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. PBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra SensiTek biotinlenmiş antikor ile 20 dk inkübe edildi. PBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra, streptavidin peroksidaz sekonder antikoru ile 20 dk inkübasyon uygulandı. PBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra AEC kromojeni uygulandı. Su bazlı kapatma medyumu ile kapatıldı. Nefrin immünohistokimyasal boyanmaları; ortalama 30 glomerül üzerinden Fiji ImageJ programı ile glomerül başına düşen boyanma yoğunluğunun hesaplanması ile değerlendirildi[87,88]. WT-1 immünohistokimyasal boyanmaları; ortalama 30 glomerül üzerinden, 200X büyütmede her bir glomerüldeki WT-1 pozitif hücrelerin sayılması ile değerlendirildi. Sonrasında her bir glomerül için elde edilen skorlar toplanıp, glomerül sayısına bölünerek her bir örnek için final skor elde edildi.

3.7.2. Beclin-1 İmmünohistokimyasal Boyaması

Parafinden arındırılan kesitler inen alkol serilerinden geçirilerek (2 x 3 dk 100º, 3 dk 96º, 3 dk 70º ve 3 dk 50º alkolde bekletilerek) distile suya alındı. Sitrat tampon çözeltisinde (pH:6.0) 20 dk (2 dk x 10) mikrodalgada antijen iyileştirmesi (retrieval) yapıldı. 5 dk distile suda soğutulduktan sonra, 5 dk x 2 kez tris tamponlu salin (TBS) ile yıkama yapıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 25 dk %3'lük H_2O_2 solüsyonunda inkübasyona bırakıldı. TBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra PBS içinde hazırlanan %5'lik sığır serum albümini (BSA) ile 1 saat bloklama yapıldı. Sonrasında %5'lik BSA içerisinde, beclin-1 (1/100 dilüsyon) primer antikorları ile gece boyu +4°C inkübasyona bırakıldı. TBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra SensiTek biotinlenmiş antikor ile 20 dk inkübasyon uygulandı. PBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra, SensiTek streptavidin peroksidaz solüsyonu ile 20 dk inkübe edildi. PBS ile 5 dk x 3 kez yıkama yapıldıktan sonra AEC kromojeni uygulandı. Su bazlı kapatma medyumu ile kapatıldı. Her bir örnek için; kortikal bölgeden 200X büyütmede rastgele seçilen 10 alan değerlendirilmiştir. Glomerüllerdeki beclin-1 pozitif hücrelerin sayıları ve tübüler alandaki beclin-1 pozitif epitel hücresi içeren tübül kesitlerinin sayıları belirlendi. Sonrasında değerlendirilen alan başına düşen beclin-1 pozitif hücre içeren tübül kesit sayısı ve glomerül başına düşen beclin-1 pozitif hücre sayısı her bir örnek için hesaplandı.

3.7.3. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Nick Uç Etiketleme (TUNEL) Analizi

Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick uç etiketleme (TUNEL) analizi için üretici firmanın önermiş olduğu protokol takip edildi. Kısaca, parafinden arındırılan kesitler inen alkol serilerinden geçirilip, TBS içine alındı. 20 dk proteinaz K ile inkübe edilerek geçirgenleştirme işlemi uygulandı. TBS ile yıkama işlemi uygulandıktan sonra, peroksidaz aktivitesinin susturulması için kesitler metanol ile seyreltilmiş %3'lük H_2O_2 ile 5 dk süreyle muamele edildi. TBS ile yıkama işleminin ardından, TdT dengeleme tamponu ile 30 dk inkübasyona bırakıldı. Hemen ardından TdT enzimi ile 1,5 saat inkübe edildi. TBS ile yıkamanın ardından, durdurma tamponu ile 5 dk muamele edilip tekrar yıkama işlemi uygulandı. Bloklama tamponu ile 10 dk süreyle inkübasyonun ardından, bloklama tamponu içinde seyreltilmiş konjugat ile 30 dk inkübe edilerek saptama (deteksiyon) işlemi gerçekleştirildi. 4,6 diamidin-2 fenilidol (DAP) uygulaması ile renk reaksiyonu geliştirildi. Metil yeşili ile zıt boyama uygulandıktan sonra dehidre edilen

kesitler kapatma medyumu ile kapatıldı. Her bir örnek için; kortikal bölgeden, 200X büyütmede rastgele seçilen 15 alan değerlendirildi. Glomerüler ve tübüler alanlardaki TUNEL pozitif hücre sayıları belirlendi. Sonrasında alan başına düşen TUNEL pozitif hücre sayıları ayrı ayrı her bir örnek için hesaplandı.

3.8. İstatistiksel Analizler

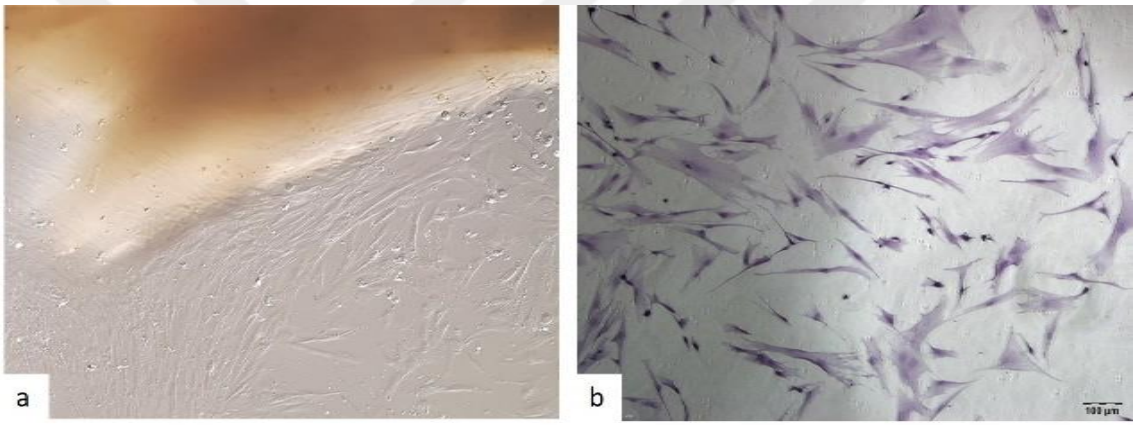
İstatiksel analizler SPSS sürüm 21.0 istatistik programı ile yapıldı. Veriler ortalama ± standart hata ile ifade edildi. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma sahip grupların ortalamalarının karşılaştırılmasında parametrik tek yönlü varyans analizi (Tek Yönlü ANOVA) uygulanmış olup ANOVA ile anlamlı fark bulunduğunda; ikili gruplar arasındaki karşılaştırmalar, post-hoc Tukey testi ile yapıldı. Normalliğin sağlanmadığı durumda ise parametrik olmayan Wilcoxon Signed Rank ya da Kruskal-Wallis testleri ile gruplar arasındaki anlamlılık değerlendirildi. $P<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi[89].

4. BULGULAR

4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

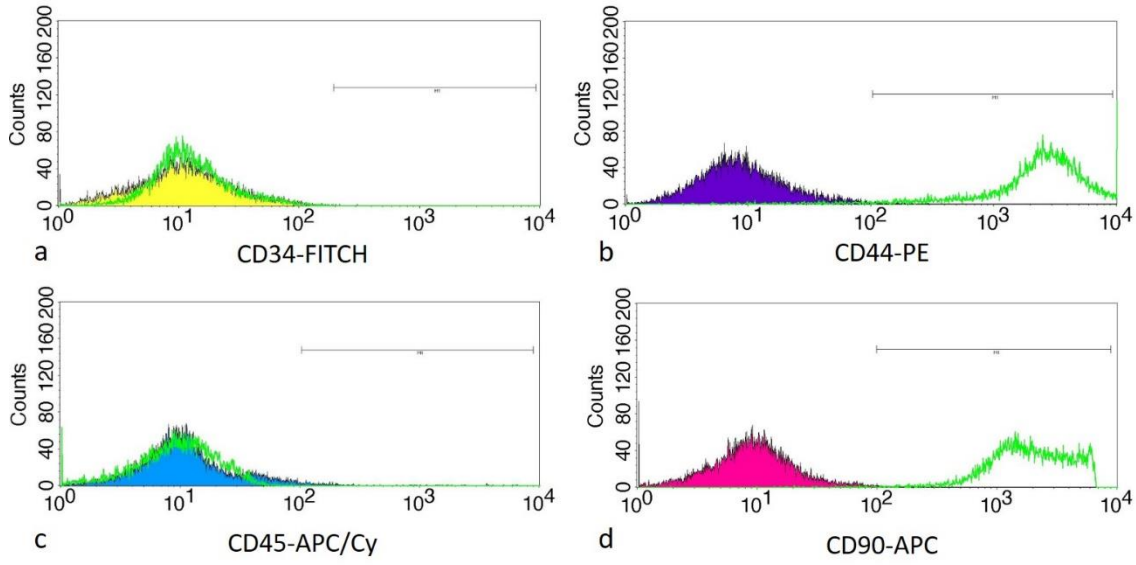
MKH'lerin plastik yüzeye yapışabilme yetenekleri prensibine dayanan doku eksplantı yöntemi ile hücrelerin izolasyonu gerçekleştirildi. 1-2 mm^3 lük parçalara ayrılmış olan göbek kordonu dokularının etrafında 10. günün sonunda iğ şekilli hücreler gözlendi (Şekil 4-1a). 16. günün sonunda da %90 yoğunluğa ulaşmış petri tabakları pasajlanarak 1. pasaj (P1) hücreleri elde edildi.

1- İzole edilen iGK-MKH'lerinin 3. pasajdaki morfolojileri incelendiğinde, MKH'lere özgü olan iğ şekilli hücre morfolojisi ile uyumluluk gösterdikleri tespit edildi (Şekil 4-1b).



Şekil 4-1: Doku eksplantı etrafında gözlenen iğ şekilli hücreler (a). H+E boyaması ile izole edilen hücrelerin iğ şekilli morfolojilerinin gösterilmesi (b) (100X)

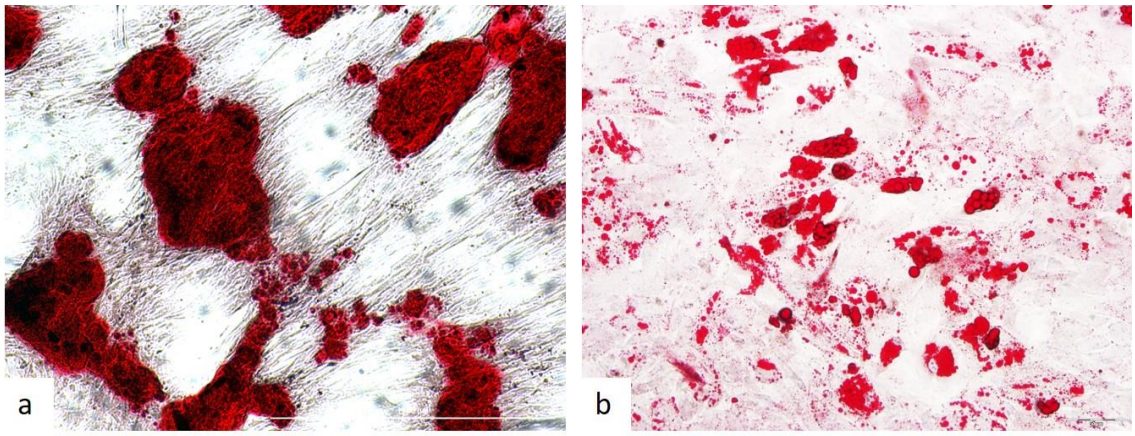
2- Flow sitometrik yöntemler ile izole edilen iGK-MKH'lerindeki, CD34 ve CD45 hematopoetik kök hücre belirteçleri ile CD44 ve CD90 MKH belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. MKH'lere özgü CD90 ve CD44 belirteçlerinin ekspresyon seviyesi sırasıyla % 99,54 ve % 95,90; hematopoetik kök hücrelere özgü CD45 ve CD34 belirteçlerinin ekspresyon seviyeleri ise sırasıyla % 0,35 ve % 0,12 olarak ölçüldü (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: CD34 (a), CD44 (b), CD45 (c) ve CD90 (d) antikorları ile işaretlenmiş hücrelerin flow sitometrik analizlerinin histogram grafikleri ile gösterimi.

Sırasıyla a, b, c ve d histogramlarında gösterilen sarı, mor, mavi ve pembe alanlar FITC, PE, APC/Cy ve APC izotip kontrollerine ve yeşil sınırlı alan ise boyanan hücrelere karşılık gelmektedir. Y aksisi sayım miktarına, X aksisi ise bahsi geçen yüzey belirtecinin floresans yoğunluğuna karşılık gelmektedir.

3- İzole edilen iGK-MKH'leri adipojenik ve osteojenik farklılaşma medyumları içerisinde inkübe edildi. Sonrasında osteojenik farklılaşma, Alizarin Red S boyasının ekstraselüler ortamdaki kalsiyum birikimlerini kırmızı renkte boyaması ile gösterildi (Şekil 4-3a). Adipojenik farklılaşma ise Oil Red O boyasının, hücre içerisindeki lipit damlacıklarını kırmızı renkte boyaması ile gösterildi (Şekil 4-3b).



Şekil 4-3: MKH'lerin osteojenik (a) ve adipojenik (b) farklılaşma potansiyellerinin gösterilmesi.

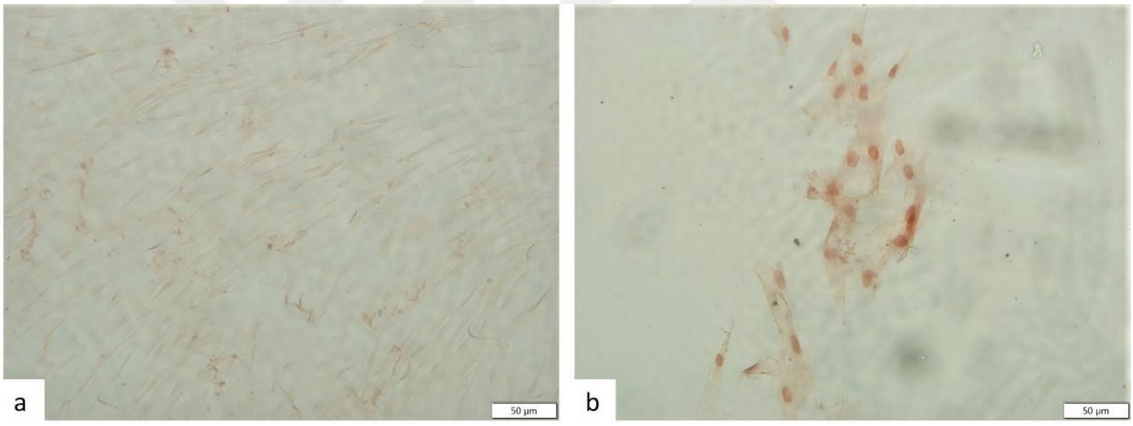
MKH'lerin osteoblastlara farklılaşması sonrasında, ekstraselüler ortamdaki kalsiyum birikimleri Alizarin Red S ile kırmızı renkte boyandı (a). MKH'lerin adipositlere farklılaşması sonrasında, hücre içerisindeki lipit damlacıkları Oil Red O ile kırmızı renkte boyandı (b).

4.2. Şartlandırılmış Medyumların Elde Edilmesi

İGK-MKH'lerinin normal ve 150 µM DFS içeren serumsuz medyumlar içinde 48 saat süreyle inkübe edilmesi sonrasında elde edilen N-ŞM ve DFS-ŞM'ler toplandı. DFS'nin hücre canlılığına etkisi, tripan mavisi yöntemi ile değerlendiridi ve bu MKH'lerdeki hücre ölüm oranı, % 1,3 olarak belirlendi. Toplanan ŞM'ler yaklaşık 50 kat konsantre edildikten sonra yapılan BCA analizlerinde, N-ŞM ve DFS-ŞM'lerde sırasıyla 200,28 µg/ml ve 475,97 µg/ml protein tespit edildi.

4.2.1. Normal Koşullarda ve Deferoksamin ile Ön Koşullandırılmış MKH'lerdeki HIF1-α Ekspresyonun İmmünositokimyasal Olarak Değerlendirilmesi

Ön koşullandırma ajanına maruz bırakılmamış serumsuz DMEM/F21 medyum içerisinde inkübe edilen MKH'lerde HIF1-α ekspresyonu tespit edilmedi (Şekil 4-4a). Diğer taraftan ise 150 µM DFS ile 48 saat süreyle ön koşullandırılmış MKH'lerde belirgin seviyede nükleer HIF1-α ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4-4b).



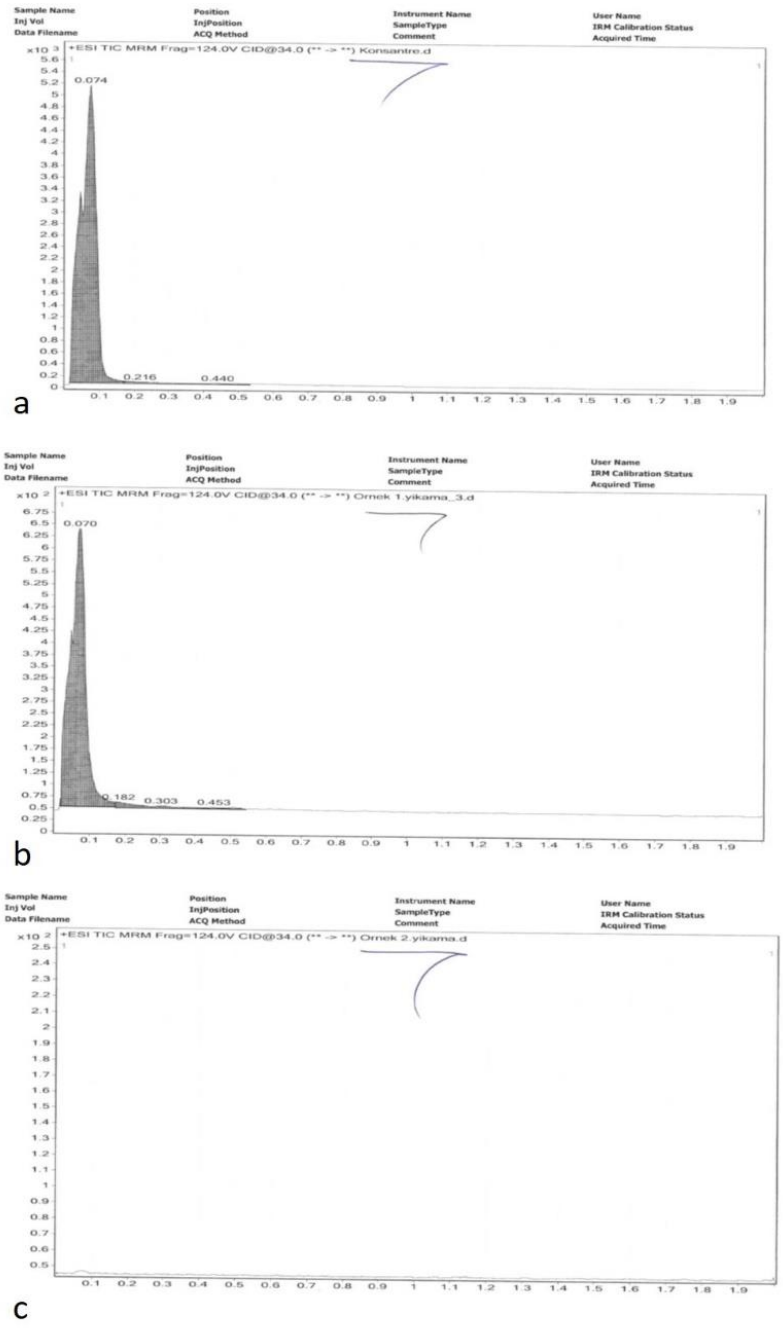
Şekil 4-4: Normal koşullarda (a) ve deferoksamin ile ön koşullandırılmış (b) MKH'lerdeki HIF1-α nükleer ekspresyonunun gösterilmesi.

Kahverengi nukleuslar HIF1-α immün boyanmasını göstermektedir (200X).

4.2.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Analizi

DFS ile ön koşullandırılmış GK-MKH'lerden elde edilen ŞM'lerden DFS'nin uzaklaştırılması için, örnekler 3kD'luk filtreler kullanılarak konsantre edildi. Daha sonrasında 2 kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemlerinin sonunda deferoksaminin uzaklaştırılıp uzaklaştırılmadığı; İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İlaç Araştırma Ve Uygulama Merkezi'nde, yüksek performanslı sıvı kromatografi analizi ile test edildi. Bunun için konsantre ŞM'de (Şekil 4-5a) 1. (Şekil

4-5b) ve 2. yıkama sonrasındaki ŞM'lerde (Şekil 4-5c) deferoksamin varlığı arandı. Şekil 4-5c'de görüleceği gibi 2. yıkama sonunda deferoksamin tamamen uzaklaştırıldı.

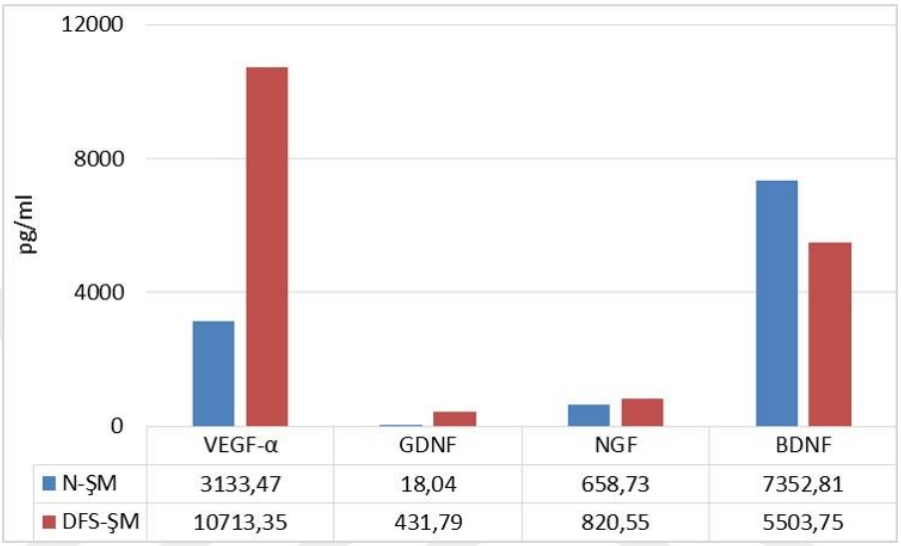


Şekil 4-5: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi analizinde DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen konsantre ŞM'deki (a), 1. (b) ve 2. (c) yıkamalar sonrasındaki ŞM içeriklerindeki DFS miktarının kantifikasyonu.

4.2.3. ŞM İçeriğindeki Faktörlerin Tayini

İki farklı koşulda elde edilen ŞM'lerin (N-ŞM ve DFS-ŞM) içeriklerindeki VEGF-α, GDNF, NGF ve BDNF büyüme faktörlerinin miktarları ELISA yöntemi ile

belirlendi. N-ŞM'ye göre, DFS-ŞM'de VEGF-α (3133 pg/ml ve 10713 pg/ml), GDNF (18 pg/ml ve 431 pg/ml) ve NGF (658 pg/ml ve 820 pg/ml) büyüme faktörlerinin konsantrasyonlarında artış olduğu tespit edildi (Şekil 4-6). Diğer taraftan, BDNF salınımının DFS-ŞM'de azaldığı belirlendi (7352 pg/ml ve 5503 pg/ml) (Şekil 4-6) [VEGF-α, GDNF, NGF ve BDNF ELISA analizleri için R^2 değerleri sırasıyla: 0.99, 0.97, 0.98 ve 0,99 olarak hesaplandı].



	VEGF-α	GDNF	NGF	BDNF
N-ŞM	3133,47	18,04	658,73	7352,81
DFS-ŞM	10713,35	431,79	820,55	5503,75

Şekil 4-6: N-ŞM ve DFS-ŞM içeriklerindeki faktörlerin kantitatif karşılaştırılması.

4.3. Biyokimyasal ve Fiziksel Analizler

STZ enjeksiyonunu takip eden 3. günde yapılan kan glikoz seviyesi ölçümleri, hayvanların tamamının diyabetik aralığa (>250 mg/ml) girdiğini gösterdi (Şekil 4-7a). Takip eden haftalarda hem deney grubunda hem de iki farklı ŞM tedavisi uygulanan gruplarda, kan şekeri seviyesinde önemli bir değişim gözlenmedi (Şekil 4-7a-b).

STZ enjeksiyonunu takip eden 4. haftanın sonunda, diyabetik ve kontrol sıçanlarının idrar albümin/kreatinin oranları (AKO'ları) ve kreatinin uzaklaştırılma hızları (KUH'ları) karşılaştırıldı. Normal böbrek fonksiyonlarına sahip sıçanların AKO değerleri genel olarak 73 ug/mg değerinin altında belirlendi[16]. Bu bağlamda 4. haftanın sonunda kontrol ve diyabet gruplarında sırasıyla 67±5 ve 679±44 ug/mg ortalama AKO ölçüldü ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4-7c). Ayrıca 4.haftanın sonundaki KUH değerleri karşılaştırıldığında, kontrol gruplarına (1,89±0,08 ml/dk) göre diyabet gruplarında (0,91±0,05 ml/dk) önemli oranda azalma gözlendi ($p<0,001$) (Şekil 4-7d). Bu bulgular STZ enjeksiyonunu takip eden 4.haftanın sonunda diyabetik nefropati modelinin oluşturulduğunu göstermektedir. Daha sonrasında kontrol

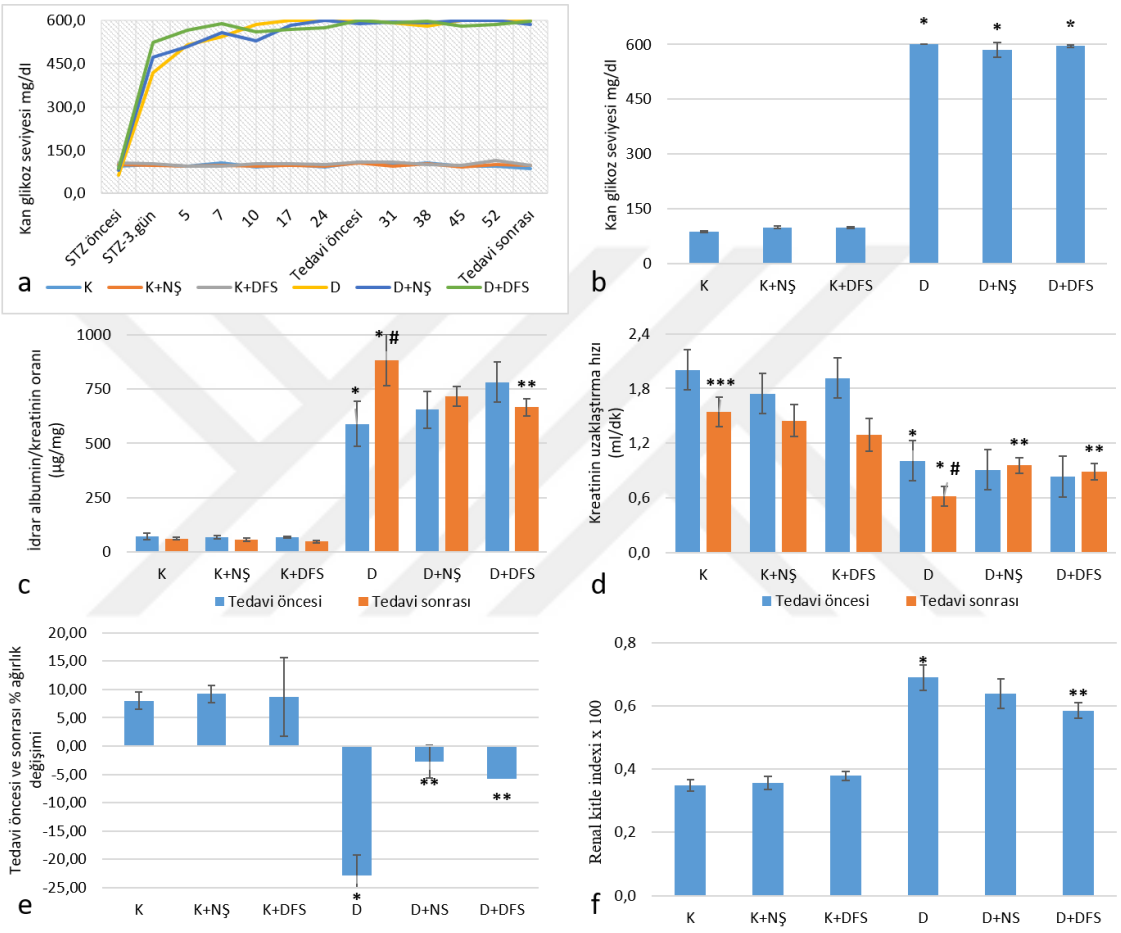
ve deney grupları AKO ve KUH değerlerine göre homojen bir şekilde alt gruplara (K, K+NŞ, K+DFS; D, D+NŞ, D+DFS) ayrıldı (Tablo 1).

Deney sonunda kontrol (K, K+NŞ ve K+DFS) ve deney grupları (D, D+NŞ, D+DFS) karşılaştırıldığında; AKO değeri deney gruplarında önemli oranda fazlayken, KUH değerinin önemli oranda düştüğü görüldü (Şekil 4-7c-d). Kontrol grupları kendi içinde karşılaştırıldığında AKO ve KUH değerleri için istatistiksel olarak fark görülmedi (Şekil 4-7c-d). AKO değerinin hem D+NŞ (716±35 ug/mg) hem de D+DFS (666±30 ug/mg) gruplarında D grubuna (884±97 ug/mg) göre azaldığı görüldü. Bu azalma D+DFS grubu için istatistiksel anlamlılık (p=0,044) gösterirken, D+NŞ grubu için anlamlı değildi (Şekil 4-7c). KUH değerlerinin hem D+NŞ [0,95±0,06 ml/dk (p=0,011)] hem de D+DFS [0,88±0,07 ml/dk (p=0,047)] gruplarında, D grubuna (0,61±0,09 ml/dk) göre önemli oranda arttığı görüldü (Şekil 4-7d).

Son olarak tedavi öncesi ve sonrası AKO ve KUH değerleri tüm gruplar için ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. K grubunda, AKO'da (70±13 ug/mg ve 60±5 ug/mg) anlamlı bir değişim görülmezken, KUH (2.00±0.15 ml/dk ve 1.54±0.13 ml/dk) değerinde önemli oranda azalma görüldü (p=0,008) (Şekil 4-7c,d). K+NS grubunda ise hem AKO (66±6 ug/mg ve 56±7 ug/mg) hem de KUH (1,74±0,03 ml/dk ve 1,44±0,14 ml/dk) değerleri için tedavi öncesi ve sonrası arasında bir fark görülmedi (Şekil 4-7c,d). K+DFS grubunda, KUH (1,91±0,2 ml/dk ve 1,29±0,14 ml/dk) değerinde değişme görülmezken, AKO (67±10 ug/mg ve 47±11 ug/mg) değerinde önemli oranda azalma görüldü (Şekil 4-7c,d). Diğer taraftan, D grubunda ise AKO'nun (589±85 ug/mg ve 884±97 ug/mg) önemli oranda arttığı, KUH'un (1,00±0,09 ml/dk ve 0,61±0,09 ml/dk) ise önemli oranda azaldığı görüldü (sırasıyla p=0,041 ve 0,046) (Şekil 4-7c,d). D+NŞ grubunda, hem AKO (654±63 ug/mg ve 717±35 ug/mg) hem de KUH (0,90±0,31 ml/dk ve 0,95±0,17 ml/dk) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi (Şekil 4-7c,d). Son olarak D+DFS grubunda, tedavi sonrasında AKO (782±70 ug/mg ve 666±30 ug/mg) azalmış ve KUH (0,83±0,07 ml/dk ve 0,88±0,07 ml/dk) ise artmış olsa da bu değişimler istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemektedir (Şekil 4-7c,d).

Tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki ağırlık değişiminin yüzde oranları karşılaştırıldığında, kontrol gruplarındaki sıçanların ağırlıklarındaki artış gruplar arasında önemli bir fark göstermezken, deney gruplarında gözlenen ağırlık kaybı istatistiksel olarak önemlidir. Bu noktada, D grubundaki ağırlık kaybı (-%23±6), hem D+NŞ [-%3±3 (p=0,003)] hem de D+DFS [-%6±2 (p=0,011)] grubundaki % ağırlık kaybından

istatistiksel olarak fazladır (Şekil 4-7e). Son olarak gruplar arasında renal kitle indeksleri (RKI'leri) karşılaştırıldığında, deney gruplarının RKI'lerinin önemli oranda arttığı görüldü. Deney grupları kendi arasında karşılaştırıldığında D (0,69±0,03) grubuna göre, hem D+NŞ (0,63±0,03) hem de D+DFS (0,58±0,01) gruplarında azalma görülse de, bu azalma sadece D+DFS (p=0,015) grubu için istatistiksel anlamlılık göstermektedir (Şekil 4-7f).



Şekil 4-7: Sıçanların biyokimyasal ve fiziksel analizleri. Deneyler süresince (a) ve sonundaki (b) kan glikoz seviyesindeki değişim. Tedavi öncesi ve sonrasındaki idrar albümin/kreatinin oranı (µg/mg) (c) ve kreatinin uzaklaştırılma hızı (ml/dk) (d) analizlerinin grafiksel gösterimi. Tedavi öncesi ve sonrasındaki yüzde ağırlık değişimi (e). Sıçan renal kitle indeksleri (f).

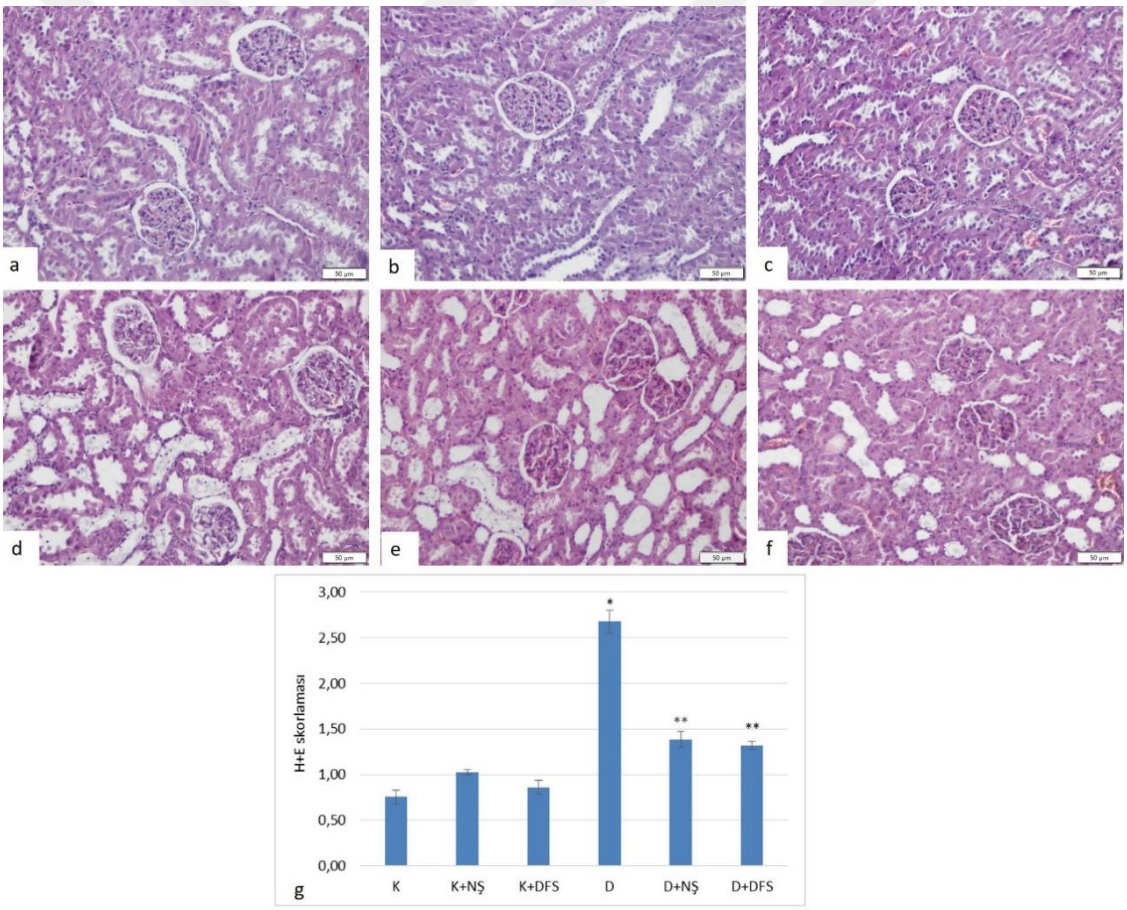
*p < 0,001 K, K+NŞ ve K+DFS gruplarına göre; **p < 0,05 D'ye göre; #p <0,05 tedavi öncesi D'ye göre; ***p < 0,01 tedavi öncesi K'ye göre.

4.4. Histolojik Analizler

4.4.1. Işık Mikroskobik Analizler

4.4.1.1. Hematoksilen ve Eozin

H+E boyası ile gruplar tübüler hasar, interstisyel genişleme ve tübül lümenlerindeki hücre veya hücre kalıntıları görülen alanların yüzdesi bakımından 0 (%5'den az) +3 (%75'den fazla) arası skorlandı ve bu gruplara ait temsili görüntüler Şekil 4-8a-f'de görülmektedir. Bu değerlendirme sonucunda, diyabet (D) grubunun skorunda kontrol gruplarına göre (K, K+NŞ ve K+DFS) belirgin oranda artış görüldü ($p<0,0001$). Tedavi gruplarında da (D+NŞ ve D+DFS) D grubuna göre belirgin oranda azalma görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 4-8g).

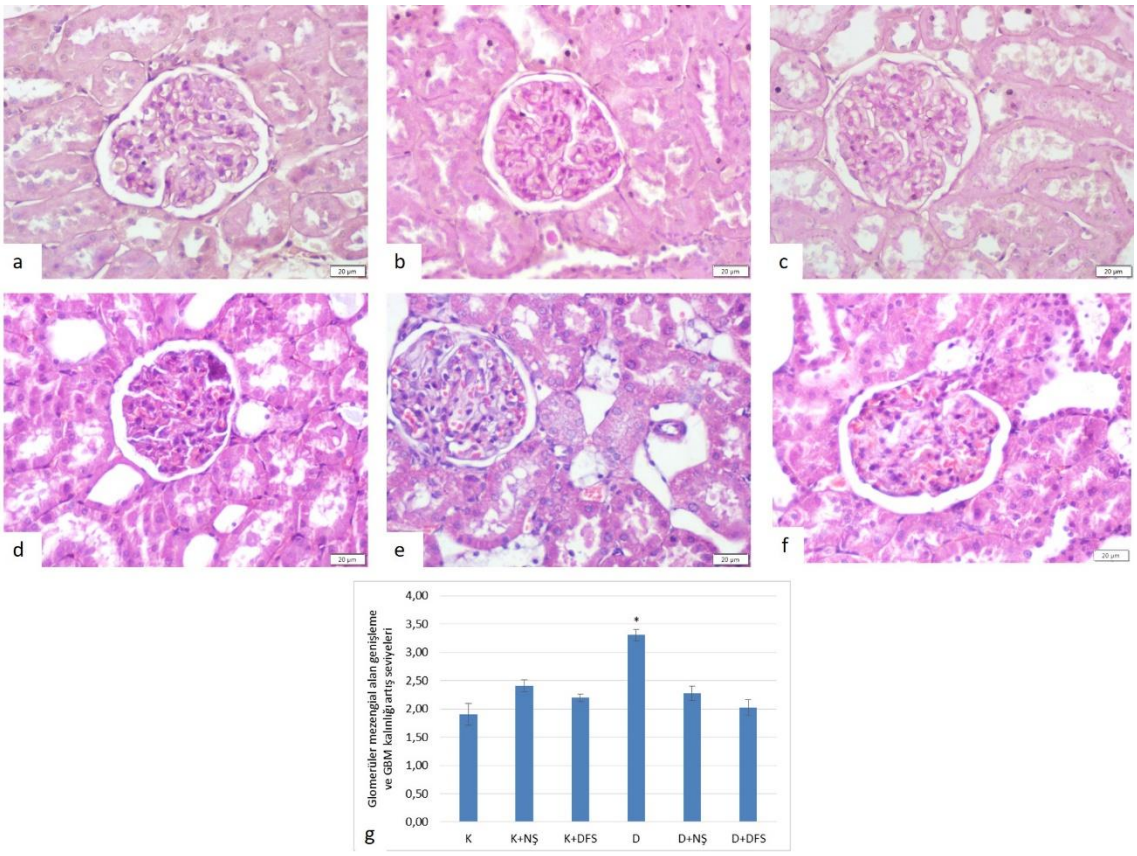


Şekil 4-8: H+E boyaması ile tübüler ve interstisyel alandaki histomorfolojik değişiklikler tespit edilmiştir (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). H+E boyaması sonrasında yapılan semi-kantitatif değerlendirmenin sonuçlarının grafiksel gösterimi (g).

*$p<0,0001$ diğer tüm gruplara göre; **$p < 0,005$ K ve K+DFS gruplarına göre.

4.4.1.2. Periyodik Asit Schiff ve Hematoksilen

PAS+H boyaması ile gruplar glomerüler mezengial alan genişlemesi ve GBM kalınlığındaki artış seviyeleri bakımından değerlendirilirken 0 ile +4 arası skorlama yapıldı ve bu gruplara ait temsili görüntüler Şekil 4-9a-f'de görülmektedir. Bu değerlendirme sonucunda, diyabet (D) grubunda, kontrol ve tedavi gruplarına göre (K, K+NŞ, K+DFS, D+NŞ ve D+DFS) belirgin oranda artış tespit edildi ($p<0,005$) (Şekil 4-9g).



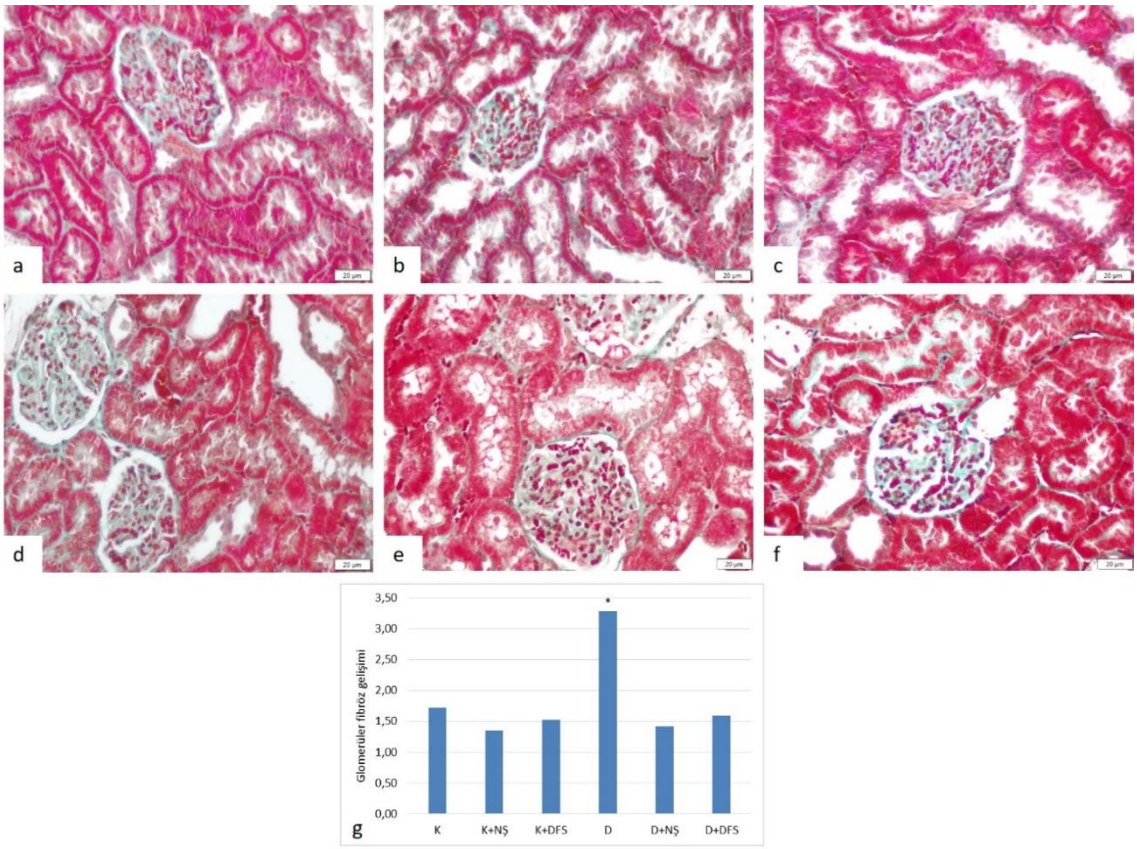
Şekil 4-9: Glomerüler mezengial alan genişlemesi ve GBM kalınlığında artış PAS+H boyaması ile tespit edilmiştir (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). PAS+H boyaması sonrasında yapılan semi-kantitatif değerlendirmenin sonuçlarının grafiksel gösterimi (g).

*$p<0,005$ diğer tüm gruplara göre, (400X).

4.4.1.3. Masson Üçlü Boyaması

Masson üçlü boyaması ile gruplar glomerüler fibrozis gelişimesi bakımından 0 ile +4 arası skorlandı ve bu gruplara ait temsili görüntüler Şekil 4-10a-f'de görülmektedir. Bu değerlendirme sonucunda, diyabet (D) grubunda, kontrol ve tedavi gruplarına göre

(K, K+NŞ, K+DFS, D+NŞ ve D+DFS) belirgin oranda artış tespit edildi (p<0,0001) (Şekil 4-10g).



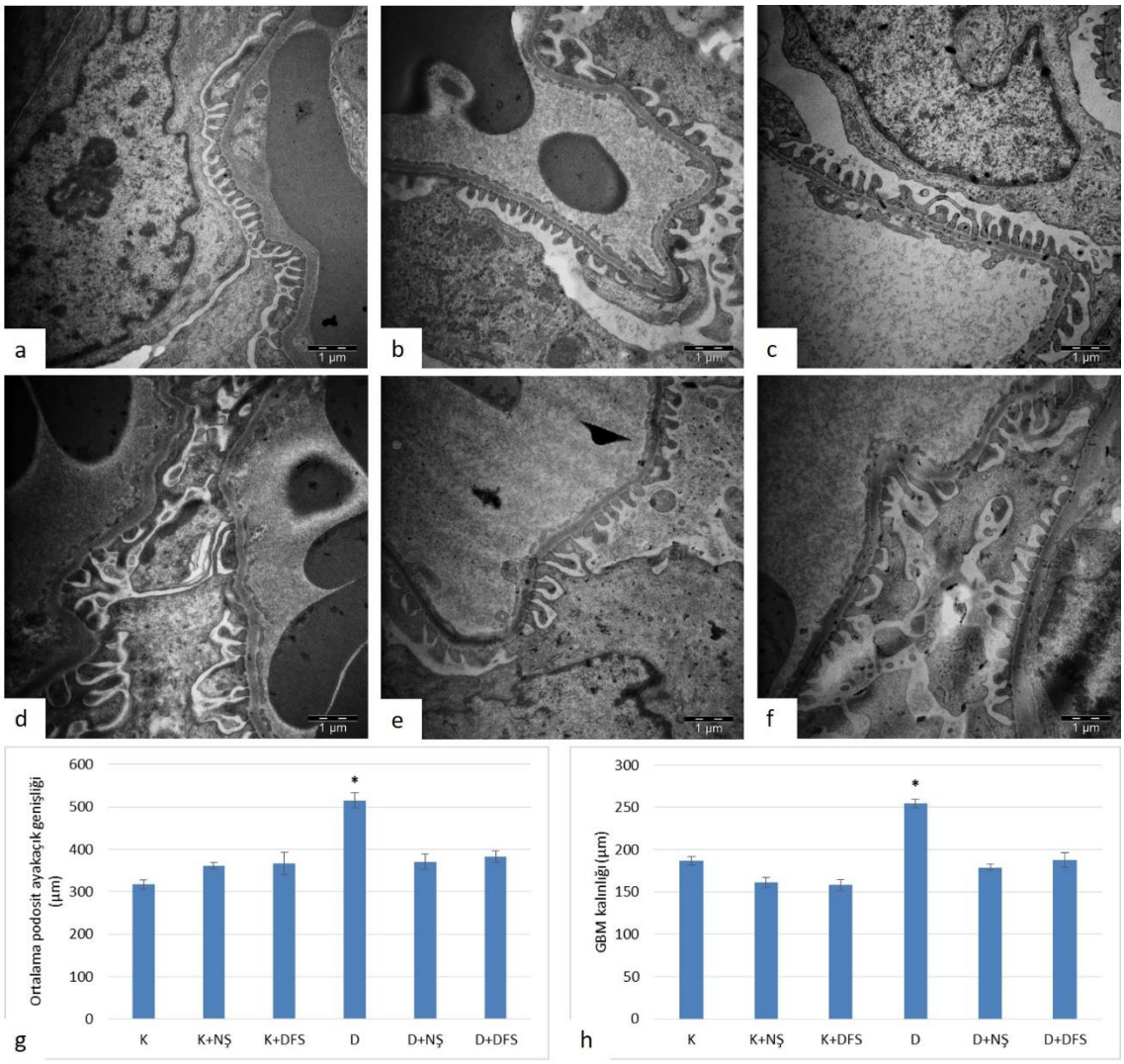
Şekil 4-10: Glomerüler fibrozis gelişimi Masson üçlü boyaması ile tespit edilmiştir (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). Masson üçlü boyaması sonrasında yapılan semi-kantitatif değerlendirmenin sonuçlarının grafiksel gösterimi (g).

*p<0,0001 diğer tüm gruplara göre, (400X).

4.4.2. Elektron Mikroskobik Analizler

Geçirimli elektron mikroskobik analizler ile ortalama podosit ayakçık genişlikleri ve glomerüler bazal membran (GBM) kalınlıkları değerlendirildi. Bu değerlendirmelere ait temsili mikrograflar Şekil 4-11a-f'de görülmektedir. Ortalama podosit ayakçık genişliği kontrol grupları arasında farklılık göstermemekte olup, diyabet (D) grubunda önemli oranda artış gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-11g; p<0,0001). Tedavi gruplarında (D+NŞ ve D+DFS) ise önemli oranda azalma tespit edilmiş olup iki grup arasında ve kontrol grupları arasında önemli fark görülmedi (Şekil 4-11g; p<0,0001). Benzer şekilde GBM kalınlıkları kontrol grupları arasında farklılık göstermezken, diyabet grubunda önemli oranda artış görüldü (Şekil 4-11h; p<0,0001). Tedavi gruplarında ise GBM

kalınlığı önemli oranda azalırken, iki grup arasında ve kontrol grupları arasında istatistiksel bir fark tespit edilmedi (Şekil 4-11h; p<0,0001).



Şekil 4-11: Podosit ayakçık genişlikleri ve GBM kalınlıklarında ortaya çıkan değişimleri gösteren temsili TEM mikrografları (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). Ortalama podosit ayakçık genişliklerinin (g) ve GBM kalınlık (h) ölçümlerinin grafiksel gösterimi.

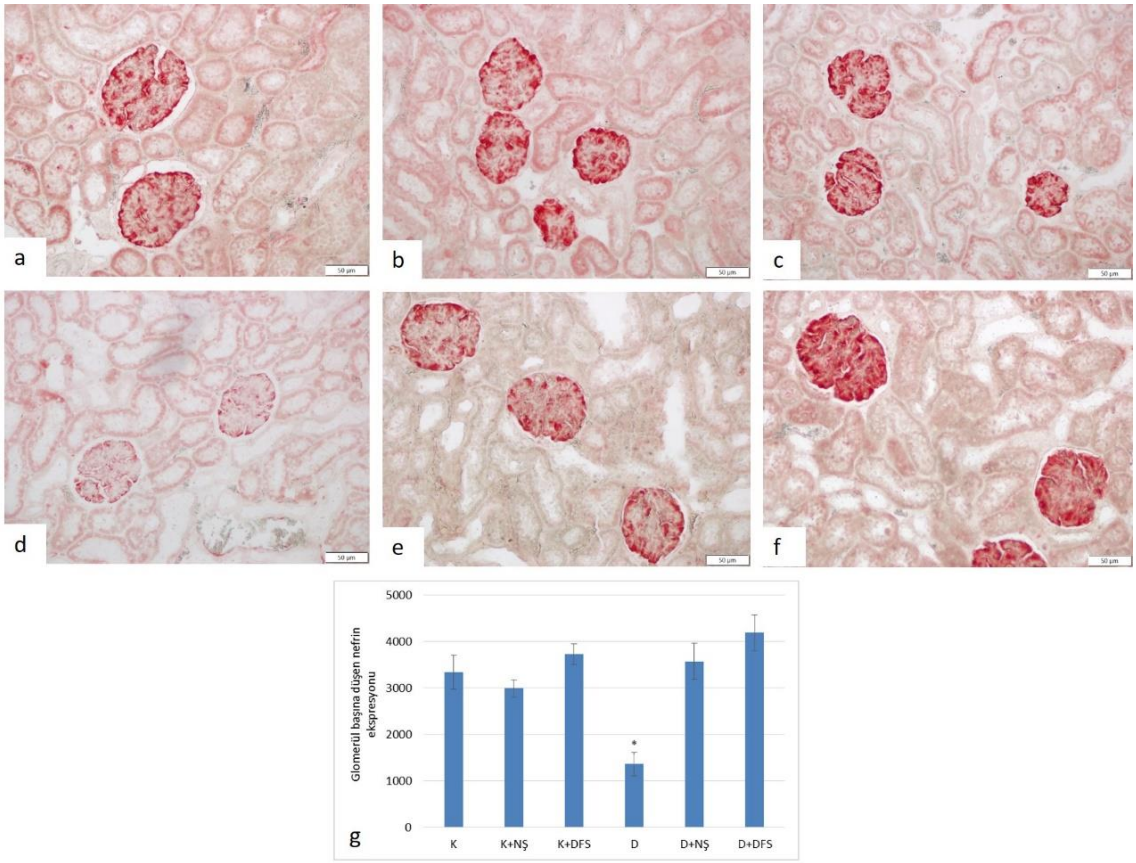
*p<0,0001 diğer tüm gruplara göre, (20 000X).

4.5. İmmünohistokimyasal Analizler

4.5.1. Nefrin ve WT-1 İmmünohistokimyasal Boyamaları

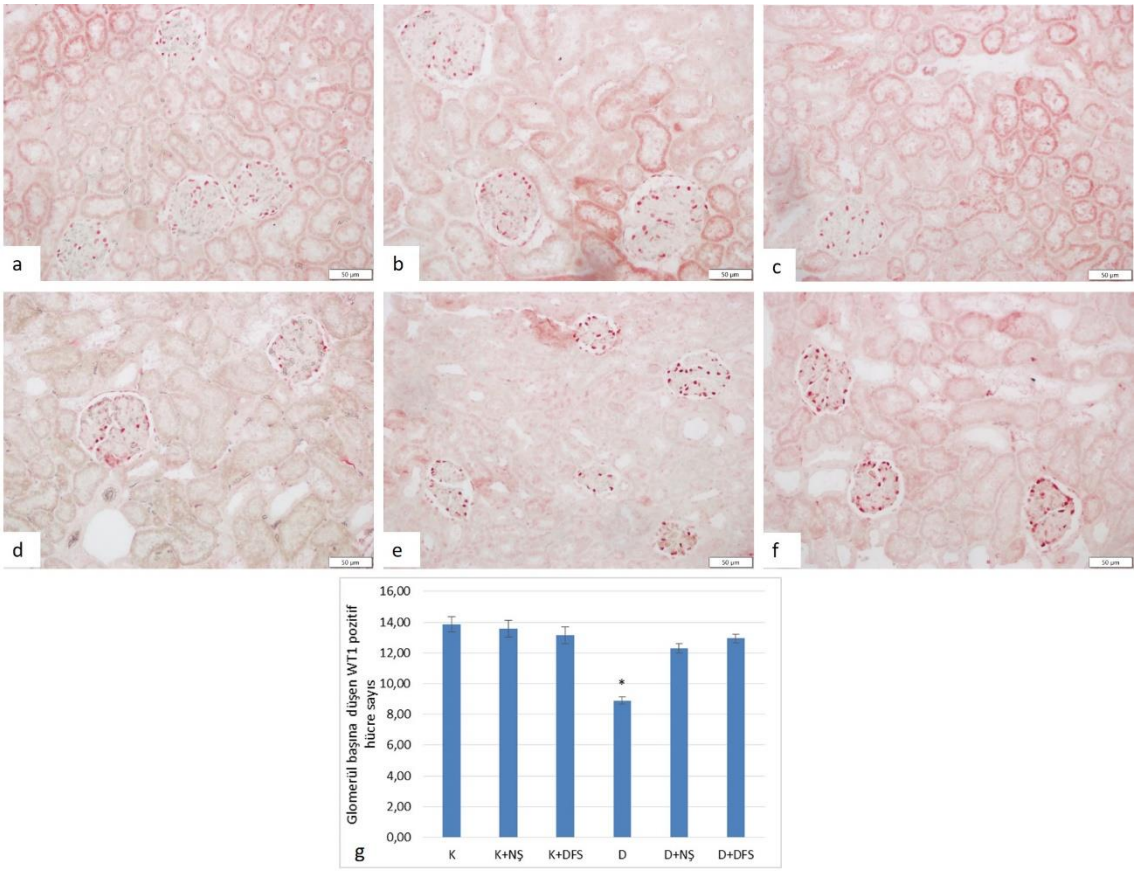
Nefrin ve WT-1 immünohistokimyasal boyamalarına ait temsili mikrograflar sırasıyla Şekil 4-12a-f ve Şekil 4-13a-f'de görülmektedir. Nefrin ekspresyonu diyabet (D) grubunda, kontrol gruplarına (K, K+NŞ ve K+DFS) göre önemli oranda azalırken; tedavi gruplarında (D+NŞ ve D+DFS) önemli oranda arttığı tespit edildi (Şekil 4-12g,

p<0,0001). WT-1 ekspresyonu da aynı şekilde D grubunda kontrollere göre önemli oranda azalırken; tedavi gruplarında önemli oranda artış gösterip kontrol grupları ile aynı seviyededir (Şekil 4-13g, p<0,0001).



Şekil 4-12: Nefrin immünohistokimyasal boyaması (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). Nefrin immünohistokimyasal boyamasının kantitatif değerlendirmesine ait sonuçların grafiksel gösterimi (g).

*p<0,0001 diğer tüm gruplara göre, (200X).

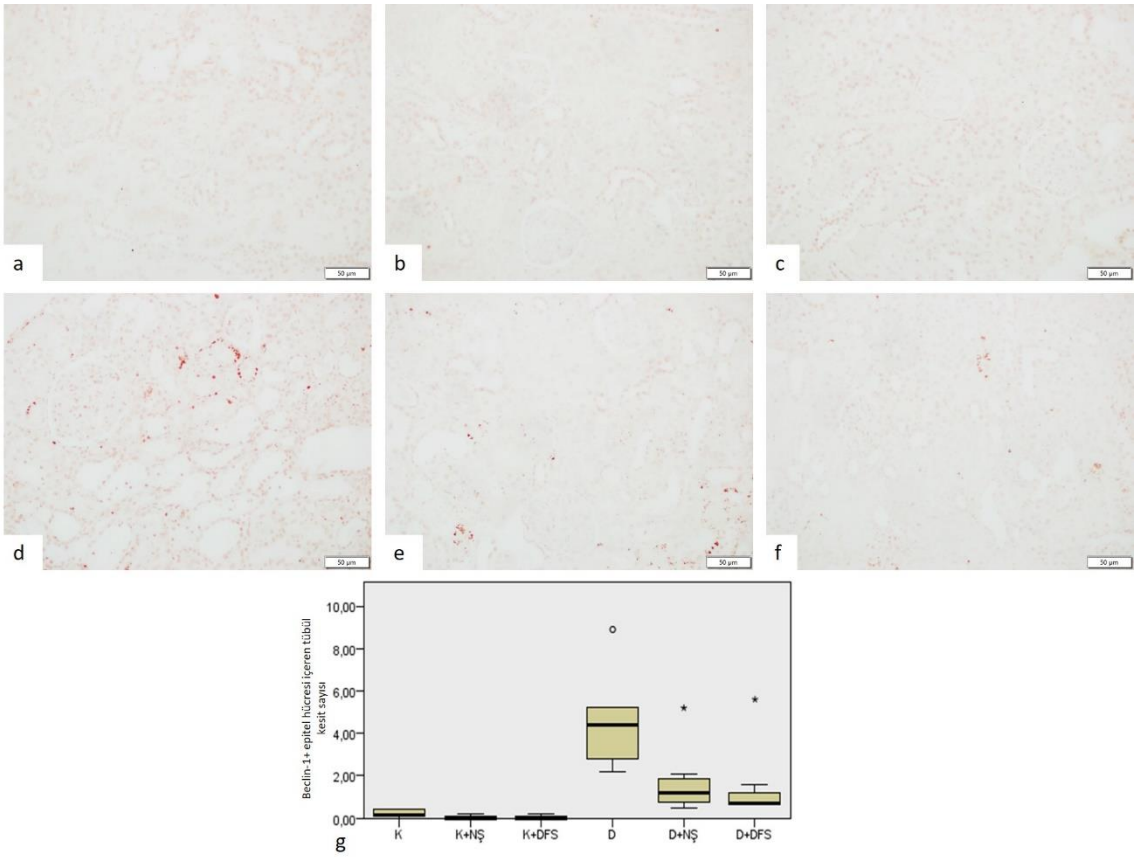


Şekil 4-13: WT-1 immünohistokimyasal boyaması (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). WT-1 immünohistokimyasal boyamasının kantitatif değerlendirmesine ait sonuçların grafiksel gösterimi (g).

*p<0,0001 diğer tüm gruplara göre, (200X).

4.5.2. Beclin-1 İmmünohistokimyasal Boyaması

Tüm gruplarda incelenen glomerüllerde genel olarak sitoplazmik beclin-1 ekspresyonuna rastlanmadı. Diğer taraftan ise kortikal bölgeden rastgele seçilen 10 adet alanda, tübüllerde beclin-1 pozitif hücreler görüldü (Şekil 4-14a-f). Bu alanlardaki otofaji ilişkili beclin-1 proteinindeki ekspresyon seviyesi, her bir grup için incelenen alan başına düşen ortalama beclin-1 pozitif epitel hücresi içeren tübül kesiti sayısı üzerinden değerlendirildi. Bu noktada, kontrol gruplarına göre, diyabet ve tedavi gruplarında önemli oranda artış tespit edildi (Şekil 4-14g; $p<0,05$). Diğer taraftan ise tedavi gruplarında diyabet grubuna göre önemli oranda azalma tespit edildi (Şekil 4-14g; $p<0,05$).

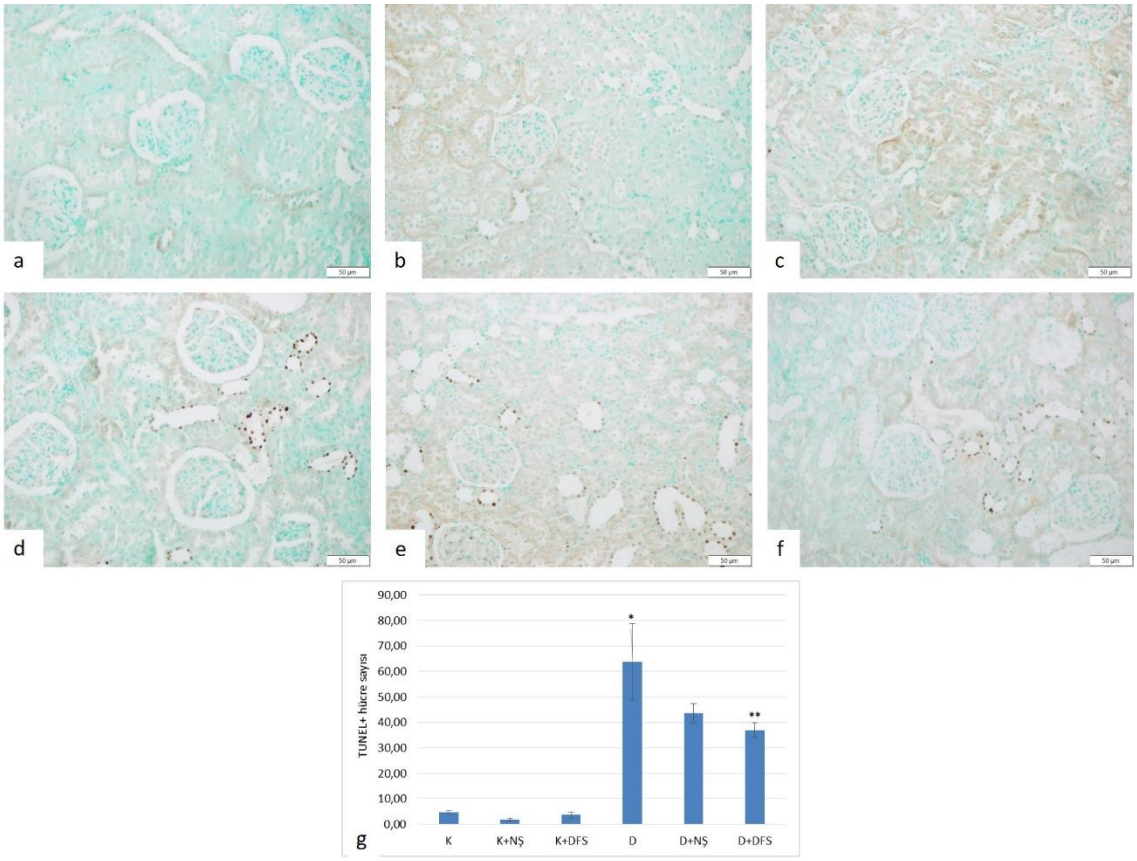


Şekil 4-14: Beclin-1 immünohistokimyasal boyaması (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). İncelenen alan başına düşen ortalama beclin-1 pozitif epitel hücresi içeren tübül kesit sayılarının grafiksel gösterimi (g).

˚p<0,05 diğer tüm gruplara göre; *p<0,05 D, K, K+NŞ ve K+DFS gruplarına göre (200X).

4.5.3. TUNEL Analizi

Tüm gruplarda incelenen glomerüllerde nadir olarak, istatistiksel değerlendirme için yetersiz sayıda TUNEL pozitif hücreye rastlandı. Diğer taraftan tübüllerde TUNEL pozitif hücreler izlendi ve kortikal bölgeden rastgele seçilen 15 alanda değerlendirme yapıldı (Şekil 4-15a-f). Bu alanlardaki apoptotik hücre miktarı, incelenen alan başına düşen ortalama TUNEL pozitif epitel hücre sayısı üzerinden değerlendirildi. Bu noktada, kontrol gruplarına göre, diyabet grubunda önemli oranda artış tespit edildi. İki tedavi grubundaki TUNEL pozitif hücre sayısında azalma görülse de, diyabet gubuna göre sadece D+DFS grubunda istatistiksel azalma görüldü (Şekil 4-15; p<0,05).



Şekil 4-15: TUNEL analizi (a: K, b: K+NŞ, c: K+DFS, d: D, e: D+NŞ, D+DFS). İncelenen alan başına düşen ortalama TUNEL pozitif epitel hücre sayılarının grafiksel gösterimi (g).

*p<0,05 K, K+NŞ, K+DFS ve D+DFS gruplarına göre; **p<0,05 K, K+NŞ, K+DFS ve D gruplarına göre (200X).

5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) kendilerini yenileyebilme kapasiteleri, çok sayıda farklı hücre hattına farklılaşabilmeleri ve düşük immün reaksiyon oluşturma özellikleri ile önemli bir terapötik olarak ön plana çıkmışlardır [90,91]. MKH'lerin rejeneratif potansiyellerinin yanı sıra, çeşitli büyüme faktörlerini, sitokinleri ve ekstraselüler vezikülleri salgılayarak terapötik anlamda etkili olabileceklerine dair araştırmalar bulunmaktadır[91]. MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış medyumların (ŞM'lerin) birçok hastalığın tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir[29–31]. Diğer taraftan bu hücrelerden elde edilen ŞM'lerin terapötik potansiyelinin arttırılması, kliniğe yönelik uygulamaların başarısını arttıracaktır. Bu bağlamda MKH'lerin uygun kimyasal ajanlar ile muamele edilmesi olarak tanımlanan ön koşullandırma stratejisi, ŞM'lerin sekretom profillerinin terapötik anlamda iyileştirilmesi bakımından oldukça önemlidir[92–94]. Bu çalışmada, insan göbek kordonundan izole edilen MKH'ler, hipoksimimetik bir ajan olan deferoksamin (DFS) içeren ve içermeyen normal (N) kültür ortamlarında kültüre edilerek iki farklı şartlandırılmış medyum (DFS-ŞM ve N-ŞM) elde edildi. İki farklı koşulda elde edilen ŞM'lerdeki total protein miktarları ve VEGF-α, NGF, GDNF, BDNF parakrin faktörlerinin konsantrasyonları ELISA yöntemi ile belirlendi. Daha sonrasında iki farklı koşulda elde edilen ŞM'lerin, tek doz streptozosin uygulanarak oluşturulan sıçan diyabetik nefropati (DN) modelindeki terapötik etkileri karşılaştırıldı. Bu bağlamda biyokimyasal olarak kan glikoz seviyesi, albümin kreatinin oranı (AKO) ve kreatinin uzaklaştırma hızı (KUH) ve fiziksel olarak da ağırlık değişimi ve renal kitle indeksi (RKI) değerlendirildi. Ayrıca böbrek dokularındaki histopatolojik değişiklikler ışık ve geçirimli elektron mikroskobik yöntemlerle incelenerek immünohistokimyasal analizler ile podosit spesifik nefrin ve WT-1 proteinlerinin ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Son olarak, glomerüler ve kortikal tübüler alanlardaki apoptotik hücre ölümü ve otofajik aktivasyon seviyeleri sırasıyla TUNEL ve beclin-1 immün boyamaları ile analiz edildi.

Diyabetik nefropati (DN) diyabete bağlı gelişen mikrovasküler bir komplikasyon olup ilerleyen aşamada böbrek fonksiyonlarının kronik kaybına dolayısıyla son aşama böbrek hastalığına yol açan en yaygın sebeptir[90,91,95]. DN, erken dönemde glomerüler hiperfiltrasyon, hipertrofi, mikroalbüminüri, glomerüler bazal membran (GBM) kalınlaşması ve mezengial alan genişlemesi ile karakterize edilmektedir. DN'nin ilerleyen

dönemi ise glomerüler filtrasyon hızının düşmesi, makroalbüninüri, kreatinin uzaklaştırma hızında azalma, glomerüler ve tübülointerstisyel alanda fibrozis gelişimi gibi patolojiler ile tanımlanmaktadır[96]. Günümüzde, DN'nin tedavisinde uygulanan yöntemler genel olarak kan basıncının düşürülmesi ve glisemik kontrol temeline dayanmaktadır. Bu bağlamda, hastalara renin-anjiyotensin-aldesteron sistem blokerleri ya da sodyum glikoz ortak taşıycı-2 protein inhibitörleri uygulanmaktadır[68,97]. Ancak bu tedavilerin DN'nin ilerleyişini engellemede tam anlamıyla etkili olamadıkları ortaya konmuştur[91]. Bu sebeple, DN'nin ilerlemesine engel olacak özgün tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi bu alandaki çalışmaların ana hedefini oluşturmaktadır.

MKH'ler kemik iliği, yağ dokusu ve göbek kordonu gibi birçok farklı dokudan izole edilebilmektedir. Bu noktada, kemik iliği kaynaklı MKH'ler (Kİ-MKH'ler), üzerinde en çok çalışılan MKH tipi olması bakımından altın standart olarak kabul edilmektedir[18]. Ancak son zamanlarda yapılan araştırmalar, göbek kordonundan izole edilen MKH'lerin (GK-MKH'lerin) birçok açıdan Kİ-MKH'lerinden daha avantajlı bir kaynak olduğunu ortaya koymuştur[18,19]. Bu avantajlar arasında; göbek kordonun biyolojik atık materyal olması ve eldesinin invazif yöntem gerektirmemesi ve GK-MKH'lerinin diğer kaynaklardan elde edilenlere göre düşük immün reaksiyon oluşturma, yüksek proliferasyon, farklılaşma ve hızlı kendilerini yenileyebilme potansiyelleri bulunmaktadır[20,74,96,98]. Bu sebeple, yapmış olduğumuz bu çalışmada, MKH kaynağı olarak göbek kordonunu seçtik. Doku eksplantı yöntemi ile izole edilen insan GK-MKH'lerin karakterizasyonu yapılırken Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin belirlediği kıstaslar dikkate alınmıştır[99]. Bu bağlamda, izole edilen hücreler, MKH'lere özgü iğ şekilli hücre morfolojisi ile uyumlu olup plastik yüzeye yapışma kabiliyeti göstermektedir. Ayrıca flow sitometrik analizler ile MKH'lere özgü CD90 ve CD44 yüzey belirteçlerinin varlığının %95'in üzerinde olduğu diğer taraftan ise hematopoetik kök hücrelere özgü CD34 ve CD45 yüzey belirteçlerinin ekspresyon seviyelerinin %1'in altında olduğu tespit edildi. Son olarak, elde edilen hücrelerin farklı hücre hatlarına farklılaşma potansiyelleri değerlendirildi. Bunun için osteojenik ve adipojenik farklılaşma indükleyici medyumlar içerisinde inkübasyon sonrasında hücrelerdeki kalsiyum birikimi ve lipit vakuol oluşumları sırasıyla Alizarin Red S ve Oil Red O boyamaları ile tespit edildi. Tüm bu değerlendirmeler, doku eksplantı yöntemi ile izole edilen hücrelerin MKH'ler olduğunu göstermektedir.

MKH'lerin direkt olarak uygulanmasının, DN ilişkili hasarların onarılmasında ve ilişkili hücresel kayıpların rejenerasyonunda etkili olabileceği düşünülmüştür. Bundan önce sıçan ve fare DN modellerinde yapılan çalışmalarda, MKH'lerin direkt uygulanmasının DN'nin ilerlemesini durdurduğu ya da yavaşlattığı gösterilmiştir[4,22,90,100,101]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, MKH'lerin direkt uygulanması sonrasında görülen iyileştirici etkilerin MKH'lerin hasarlı hücrelere farklılaşmasından ziyade parakrin faktörler aracılığı ile olduğunu ortaya koymuştur[17,27,28]. Özellikle direkt olarak enjekte edilen MKH'lerin hasarlı alanlardan ziyade çoğunlukla akciğerlerde birikim göstermesi, MKH'lerin terapötik etkilerinin parakrin kaynaklı olduğunu desteklemektedir[17,27,28]. Tüm bunların yanında, MKH'lerin istenmeyen hücre tiplerine farklılaşması ve tümör oluşturması gibi riskler, MKH'lerin serum içermeyen medyum içerisinde belirli bir süre kültüre edilmesi sonrasında elde edilen ŞM'lerin terapötik etkilerinin değerlendirilmesine yönelik çalışmaları desteklemektedir[102]. Ayrıca ŞM'lerin kriyoprezervasyonuna gerek duyulmaması, taşınmasının ve saklanmasının MKH'lerden daha kolay olması, ŞM'leri klinik kullanım için daha elverişli kılmaktadır[32].

Son zamanlarda MKH'lerin gen modifikasyonları ya da uygun kimyasal ajanlarla ön koşullandırılması gibi stratejiler ile terapötik anlamda önemli parakrin faktörleri salgılama kapasitelerinin arttırılabileceği ortaya konmuştur[72,75]. Bu noktada deferoksamin (DFS) şelatör ajan olması yanında hipoksi indükleyici ajan olarak da bilinmektedir. MKH'lerin DFS ile ön koşullandırılmaları sonrasında bu hücrelerdeki HIF1-α ekspresyonunda ve NGF, GDNF, BDNF, VEGF-α gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonlarının mRNA seviyesinde artış olduğu tespit edilmiştir[34]. Bu bağlamda, nöron koruyucu faktörlerden NGF'nin hem olgunlaşmamış hem de tamamen farklılaşmış insan podosit hücreleri tarafından salgılandıkları ve podositlerin farklılaşma sürecinde uygulanan NGF nötralize edici antikorun ayakçık uzantılarının geri çekilmesine yol açtığı gösterilmiştir[35]. GDNF'nin ise hiperglisemi ile indüklenen diyabetik böbrek hasarını, PI3K/Akt yolağı üzerinden apoptotik direnci arttırarak iyileştirdiği gösterilmiştir[37]. BDNF ekspresyonunun ise, yüksek glikoz ile muamele edilmiş HK-2 hücre hatlarında, miR-365 aracılı olarak azaldığı ve ekstraselüler matriks birikiminin arttığı gösterilmiştir[103]. Ayrıca BDNF'nin aktin polimerizasyonunu arttırarak podosit morfolojisinde iyileşme sağladığı gösterilmiştir[36]. VEGF-α'nın ise glomerüler endotel fonksiyonun ve fenestralı yapının korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda anti-VEGF kullanılan onkoloji hastalarında proteinüri ve hipertansiyon

saptanması VEGF-α'nın glomerüler fonksiyon için gerekliliğini ortaya koymaktadır[39,104]. Bu büyüme faktörlerinin özellikle podosit ilişkili böbrek hasarlarının onarımındaki etkili rolleri dikkate alındığında, çalışmamızda ön koşullandırıcı ajan olarak DFS kullanmaya karar verdik. Bu bağlamda izole ettiğimiz iGK-MKH'leri 150 μM DFS içeren ve içermeyen serumsuz ortamlarda 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra, beklenildiği gibi DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerde HIF1-α ekspresyonun arttığı tespit edildi. Daha sonrasında ise toplanan ŞM'lerdeki total protein konsantrasyonlarının yanında VEFG-α, NGF, GDNF ve BDNF büyüme faktörlerinin miktarları karşılaştırıldı. Öncelikle kalorimetrik bişinkoninik asit yöntemiyle, DFS-ŞM'deki protein konsantrasyonunun N-ŞM'ye göre ciddi oranda artış gösterdiği tespit edildi (475,97 μg/ml ve 200,28 μg/ml). Pro-anjiyogenik VEGF-α ve nöron koruyucu faktörlerden NGF ve GDNF'nin DFS ile ön koşullandırılmış ŞM'deki miktarlarında artış tespit edildi. Ancak diğer bir nöron koruyucu faktör olan BDNF'nin DFS-ŞM içerisindeki miktarında azalma görüldü. Oses ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada, mRNA seviyesinde BDNF ekspresyonun arttığı belirtilmiştir; bu sebeple çalışmamız, DFS ile yapılan ön koşullandırma ile mRNA seviyesinde görülen bu artışın sekresyona yansımadığını göstermektedir. Ancak Oses ve ark.'larının MKH kaynağı olarak yağ dokusu kullandığını da dikkate almak gerekmektedir, farklı kaynaklardan elde edilen ŞM içeriklerine ait henüz yeterli çalışma bulunmamaktadır[34].

DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen ŞM'nin yüksek doz glikoz ile hasarlanmış dorsal ganglionu nöronlarında *in vitro* olarak terapötik etki sağladığı gösterilmiştir[34]. Bu noktada, nöronlar ile podositler arasındaki morfolojik ve nefrin, sinaptopodin ve podosin gibi karakteristik proteinlerin ekspresyon profillerindeki benzerlikler, DFS ile ön koşullandırılmış MKH'lerden elde edilen ŞM'nin normal ŞM'ye göre *in vivo* diyabetik nefropati (DN) modelindeki olası terapötik etkileri arttırabileceğini düşündürtmüştür[36,80–82]. Bu hipotezi test etmek için çalışmamızda, tek doz 55 mg/kg STZ uygulanarak sıçan diyabet modeli oluşturulmuştur. STZ enjeksiyonunu takip eden 4. haftanın sonunda diyabetli grupların, kontrol gruplarına göre albümin/kreatinin oranları (AKO) yaklaşık 10 kat artış gösterirken, kreatinin uzaklaştırma (KUH) hızlarının ise %50 oranında azaldığı tespit edildi. Bu bulgular 4. hafta sonunda DN modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermekte olup Hayvan Modelleri Diyabetik Komplikasyonlar Konsorsiyumu'nun (AMDCC'nin) nefropati alt komitesinin, DN hayvan modelleri için insan DN'sinin klinik ve patolojik özelliklerine dayanarak belirlediği kriterleri büyük

oranda sağlamaktadır[16,105,106]. DN oluşturulmuş sıçanlara N-ŞM ve DFS-ŞM uygulandı. Deneyler sonlandırıldığında, diyabetik nefropati grubu (D) ile iki tedavi grubu (D+NŞ ve D+DFS) karşılaştırıldığında, her ne kadar AKO değerleri hem D+NŞ hem de D+DFS grubunda azalma gösterse de bu azalma sadece D+DFS grubu için istatistiksel anlamlılık göstermektedir. Diğer taraftan ise KUH değerleri her iki tedavi grubunda da önemli oranda iyileşme göstermektedir. Deney gruplarında yüzde ağırlık kayıpları kontrol gruplarından istatistiksel olarak fazla olsa da tedavi gruplarındaki ağırlık kaybı diyabet grubundan önemli oranda azdır. Bir diğer fiziksel parametre olan renal kitle indeksinde ise, diyabet grubuna göre sadece D+DFS grubunda önemli oranda azalma tespit edildi. Son olarak tedavi öncesi ve sonrası AKO ve KUH değerleri karşılaştırıldığında, diyabet grubunda her iki parametre de önemli oranda kötüleşirken, D+DFS grubunda iyileşme görülse de her iki tedavi grubunda da önemli bir değişim görülmemektedir. Tüm bu biyokimysal ve fiziksel analizler, iki farklı koşulda MKH'lerden elde edilen ŞM'lerin, MKH'lerin direkt uygulanmasına benzer seviyede iyileştirici etki gösterdiğini ortaya koymaktadır[90]. Diğer taraftan ise DFS-ŞM'nin AKO ve RKI seviyelerinin azalmasındaki anlamlı etkisi dikkate alındığında, N-ŞM'ye göre daha etkili olduğu görülmektedir.

DN'nin histopatolojik özellikleri incelendiğinde, ışık mikroskobik yöntemlerle tespit edilebilen mezengial matriks genişlemesi, glomerüler ve tübülointerstisyel alanda skleroz ve tübüler hasar bulunmaktadır[55,106,107]. Ayrıca elektron mikroskobik incelemelerle tespit edilebilen GBM kalınlığında artış ve podosit ayakçık uzantılarında geri çekilme bulunmaktadır[106]. Tüm bunlar dikkate alındığında, oluşturmuş olduğumuz sıçan DN modelinde, biyokimyasal parametrelerdeki bozulmanın yanında, glomerüler ve tübüler alanlarda histopatolojik bozulmalar görülmektedir[90,105,108] Bu noktada, deney grupları histopatolojik açıdan karşılaştırıldığında diyabet grubuna göre, iki tedavi grubunda da tübüler hasarda, interstisyel genişlemede, mezengial matriks birikiminde ve glomerüler fibrozis gelişiminde önemli oranda azalma görüldü. Özellikle tübüler hasar, interstisyel genişleme ve mezengial matrik birikimi bakımından tedavi grupları arasında istatistiksel fark olmasa da D+DFS grubu daha etkili görülmektedir. Benzer şekilde, geçirimli elektron mikroskobik değerlendirmelerde, her iki tedavi grubunda da diyabet grubuna göre GBM kalınlığının önemli oranda azaldığı tespit edildi. Elde edilen bu bulgular, uygulanan her iki ŞM'nin histomorfolojik açıdan benzer seviyelerde iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Podositler, glomerüler filtrasyon bariyerinin (GFB'nin) önemli bir komponentidir. Podositler primer, sekonder, tersiyer ayakçık uzantılarına sahiptir[109]. Ayakçık uzantıları interdijitasyonlar yaparak filtrasyon yarıklarını oluştururlar. Bu yarıklarda bulunan ve ayakçık uzantılarını birbirine bağlayan diyaframlar ise GFB'nin seçici geçirgenliğinde önemli bir role sahiptir[109,110]. Bu bağlamda, nefrin; yarık diyaframının önemli bir yapısal elemanı olmasının yanı sıra birçok sinyal yolağının regülasyonunda yer alan ve GFB'nin normal fonksiyonunu sürdürmesinde kritik role sahip bir proteindir[110]. Ekspresyonunda görülen azalma ya da mutasyon çoğunlukla ciddi proteinüriye yol açarak böbrek yetmezliğine sebep olabilmektedir[111]. Bu çalışmada da, kontrol grubuna göre, diyabet grubunda nefrin ekspresyonunun önemli oranda azaldığı her iki tedavi grubunda ise önemli oranda arttığı tespit edildi. Nefrin ekspresyonundaki azalmanın da içinde yer aldığı bir dizi olay sonucunda yarık diyafram yapılarının ortadan kalkarak podosit ayakçık uzantılarının geri çekildiği ortaya konmuştur[109]. Bu noktada yapılan geçirimli elektron mikroskobik analizlerde, diyabet grubunda ayakçık uzantılarının önemli oranda geri çekildiği tespit edildi. Tedavi gruplarında ise bu geri çekilmenin önemli oranda telafi edildiği görüldü. Bir diğer önemli podosit belirteci de nukleusta eksprese edilen WT-1 proteinidir[112]. Podosit kaybı sonrasında WT-1 proteininin, potansiyel podosit projenitör hücrelerinin proliferasyonunda ve migrasyonunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir[113]. Çalışmamızda da, diyabet grubunda WT-1 ekspresyonunda önemli oranda azalma görülürken tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. Bu noktada hem nefrin hem de WT-1 podosit belirteç proteinlerinin ekspresyon seviyeleri, istatistiksel anlamlılık göstermese de D+DFS grubunda D+NŞ grubundan daha fazladır. VEGF-α, NGF ve GDNF gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonlarındaki ve salınımındaki azalma DN patogenezinde önemlidir. Bu bağlamda, biyokimyasal parametrelerde ve podosit ilişkili protein ekspresyonlarında görülen bu iyileşmenin, DFS ile ön koşullandırma sonrasında ŞM içeriğinde artışı görülen VEGF-α, NGF ve GDNF faktörleri ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda, MKH'lerin direkt uygulandığı fare DN modelinde ya da yüksek glikoz ile muamele edilmiş podositlerle beraber inkübe edilmesi sonrasında görülen iyileştirici etkilerin[91] MKH kaynaklı ŞM'ler aracılığı ile de görülebilmesi, MKH'lerin parakrin faktörler aracılığı ile terapötik etki gösterdiği görüşünü desteklemektedir.

Otofaji sitoplazmik proteinlerin ve lizozomlar içindeki diğer büyük moleküllerin degredasyonunda ve geri dönüştürülmesinde kritik role sahip önemli bir süreçtir. Otofaji,

sitoplazma içerisindeki proteinlerin ve organellerin çift katlı membran içerisine alınması (otofagozomlar), sonrasında lizozomlar ile birleşerek otofajik vakuollerin ya da otofagolizozomların oluşmasını içeren olaylar zinciridir. Otofagozom oluşumu beclin-1, LC3 ve Atg gibi proteinlerin indüksiyonu ile başlamaktadır[114]. Otofajik aktivasyonun, özellikle hücresel stres durumunda oluşan yeni çevresel koşullara adaptasyonun bir parçası olduğu düşünülmektedir[114]. Biz de çalışmamızda, glomerüler ve kortikal tübüler alandaki otofajik aktivite seviyesini incelemek için beclin-1 ekspresyon seviyesini immünohistokimyasal yöntemle değerlendirdik. Birinci olarak tüm deney ve kontrol gruplarında glomerüler alanda sitoplazmik beclin-1 ekspresyonuna rastlanmadı. Diğer taraftan ise tübüler alanda, diyabet grubunda kontrol grubuna göre beclin-1 ekspresyonunda önemli oranda artış tespit edildi. Her iki tedavi grubunda ise diyabet grubuna göre önemli oranda azalma belirlendi. Bu bulgular DN'li grupta tübüler alandaki otofajik aktivitenin önemli oranda arttığını ve tedavi uygulanan gruplarda ise bu otofajik aktivite seviyesinin azaldığını göstermektedir. Proksimal tübüller; pozisyonları gereği ana geri emilimin gerçekleştiği segment olması ve glomerüler filtrat içindeki albümin, yüksek glikoz ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE'ler) gibi toksik faktörlere maruz kalması gibi durumlar dikkate alındığında tübüler hasar gelişimine en yatkın nefron parçasıdır. Bu noktada, Sakai ve ark. yapmış oldukları çalışmada, STZ enjeksiyonu ile oluşturdukları tip 1 fare diyabet modelinde, proksimal tübüllerde otofajik aktivitenin arttığını distal tübüllerde ise değişmediğini tespit etmişlerdir[61,62]. Renal tübüllerde görülen otofajik aktivitedeki artışın, hiperglisemiye bağlı gelişen stres koşullarına karşı bir çeşit hücresel hayatta kalma mekanizmasının aktivasyonu olduğu ileri sürülmüştür[63]. Bu bağlamda tedavi gruplarında görülen otofajik aktivitedeki azalma; uygulanan ŞM'lerin tübüllerdeki otofajik aktivitenin artışında etkili olan stres faktörlerinin azalmasını sağladığı şeklinde yorumlanabilir.

Renal patolojilerde hücre kaybı ve ölümü yaygın olarak görülmektedir. Sürekli hiperglisemi, reaktif oksijen türlerinin (ROS'ların) üretimini indüklemektedir. ROS'ların renal parankimal hücrelerde birikmesi, apoptoza ve DN'nin ilerlemesine sebep olmaktadır[90,115]. Bu noktada, çalışmamızda DN'ye bağlı böbrek dokularındaki apoptoz seviyesini görmek için TUNEL testi uygulandı. Hem kontrol hem de deney gruplarında, glomerüllerde apoptotik hücre çok nadir görülmüş olup istatistiksel değerlendirme için yetersizdir. Benzer şekilde, Zhang ve ark. tip 2 diyabetli farelerle yaptıkları çalışmada, tübül epitel hücrelerinde TUNEL işaretli apoptotik hücrelerin varlığını gösterirken,

glomerül içerisinde tespit edememişlerdir[116]. DN'li durumda glomerüllerde apoptotik hücre görülmemesi, özellikle GFB'nin en önemli komponenti olan podositlerin kaybının apoptozdan farklı mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştiğini göstermektedir. Bu noktada 40 000 elektron mikroskobik görüntünün değerlendirildiği bir çalışmada, GBM üzerinde apoptotik cisimciklere sahip podositlere rastlanmamış olması da bu görüşü desteklemektedir[117]. Podosit kaybının, mitotik katastrofi, epitelyal mezenkimal dönüşüm ve podosit kaybının daha çok podosit kaybını tetiklemesi gibi mekanizmaların aktifleşmesi sonucunda dökülmeye bağlı olabileceği düşünülmektedir[118,119]. Çalışmamızda diyabet ve tedavi gruplarında (D+NŞ ve D+DFS) tübüllerdeki apoptotik hücre önemli oranda artış gösterirken, tedavi gruplarında D grubuna göre apoptotik hücre ölümünde bir azalma görülmüş olup, sadece D+DFS grubu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Bu noktada yapılan bazı araştırmalarda, diyabetik böbrek hasarının birincil olarak glomerüllerden ziyade tübüllerde özellikle de proksimal tübüllerde ortaya çıktığı iddia edilmektedir[55]. Ayrıca apoptotik hücre ölümü sürecinde gerçekleşen olayların gelişimi dikkate alındığında, DNA fragmantasyonu geç evrede görülen bir durumdur[120]. Bu sebeple DN gelişim sürecinde glomerüllerdeki apoptotik hücre ölümünün daha erken evrede olabileceği ya da farklı mekanizmaların tetiklendiği düşünülebilir.

Mezenkimal kök hücrelerden (MKH'lerden) elde edilen şartlandırılmış medyumların (ŞM'lerin) birçok hastalığın tedavisinde önemli bir potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan bu hücrelerden elde edilen ŞM'lerin terapötik potansiyelinin arttırılması, kliniğe yönelik uygulamaların başarısını arttıracaktır. Bu bağlamda, yapmış olduğumuz çalışmada insan göbek kordonundan izole ettiğimiz MKH'lerin 150 μM deferoksamin ile muamele edilmesi sonrasında toplanan ŞM'lerin içeriğinde, total protein miktarının ve spesifik olarak da VEGF-α, NGF ve GDNF parakrin faktörlerinin konsantrasyonlarının arttığını tespit ettik. Daha sonrasında iki farklı koşulda elde edilen ŞM'lerin sıçan DN modelindeki terapötik etkileri karşılaştırılmıştır. DFS-ŞM uygulanan grupta, AKO ve RKI parametrelerindeki iyileşmenin N-ŞM uygulanan gruptan daha iyi olduğu görülmüştür. Işık ve geçirimli elektron mikroskobik yöntemler ile yapılan histopatolojik incelemelerde, her iki tedavide de benzer morfolojik değerlendirmeler elde edilmiştir. Podositlere özgü nefrin ve WT-1 ekspresyonları diyabet grubunda azalırken, tedavi gruplarında önemli oranda artış göstermiştir. Tüm gruplarda, glomerüllerde beclin-1 ekspresyonu izlenmezken, diyabet durumunda tübüllerdeki beclin-1 ekspresyonu önemli oranda artış göstermiştir, tedavi uygulanan gruplarda ise

azalmıştır. Ayrıca, glomerüllerde TUNEL pozitif apoptotik hücre ölümü çok nadir görülürken, tübüllerde önemli oranda apoptotik hücre ölümü görülmüştür. Tedavi uygulanan gruplarda, tübüllerdeki apoptotik hücre ölümü azalmıştır ancak sadece D+DFS grubunda istatistiksel anlamlılık saptanmıştır. Genel olarak AKO ve RKI gibi parametrelerde DFS-ŞM uygulamasının daha etkili olduğu istatistiksel olarak ortaya konulmuş olsa da, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerde D+DFS'de görülen terapötik iyileşme istatistiksel olarak N-ŞM uygulanan gruptan ayrılmamıştır. Bu noktada, MKH'lerin daha yüksek konsantrasyonlu deferoksamin ile ön koşullandırılması sonrasında toplanan ŞM'lerin içeriklerinin ve terapötik etkilerinin değerlendirilmesi, iki tedavi grubu arasındaki ayrışmanın tüm parametrelerde anlamlı olarak gösterilmesi bakımından önemli olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca elde edilen bulgular, MKH kaynaklı ŞM'lerin DN'ye yönelik terapötik potansiyellerinin ortaya konulmasının yanında uygun ön koşullandırma stratejileri ile bu hücrelerin sekretom profillerinin terapötik hedeflere göre modifiye edilebileceğinin gösterilmesi bakımından önemlidir. Bu sonuçlar doğrultusunda; ön koşullandırma sürecinde, farklı uyaranların doz ve zamana bağlı olarak ŞM içeriklerinde meydana getirdiği değişikliklerin kapsamlı analizlerinin yapılmasının klinik uygulamalar açısından önem taşıdığı, *in vitro* ve *in vivo* yeni çalışmalarla desteklenmesi gerektiği söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Rota C, Morigi M, Cerullo D, vd. Therapeutic potential of stromal cells of non-renal or renal origin in experimental chronic kidney disease. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):220. doi:10.1186/s13287-018-0960-8
2. Berger K, Schulte K, Boor P, vd. The regenerative potential of parietal epithelial cells in adult mice. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(4):693–705. doi:10.1681/ASN.2013050481
3. Li H, Rong P, Ma X, vd. Paracrine effect of mesenchymal stem cell as a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy. *Life Sci*. 2018;215:113–118. doi:10.1016/j.lfs.2018.11.001
4. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, vd. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. *Sci Rep*. 2016;6:34842. doi:10.1038/srep34842
5. Xiang E, Han B, Zhang Q, vd. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells prevent the progression of early diabetic nephropathy through inhibiting inflammation and fibrosis. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):336. doi:10.1186/s13287-020-01852-y
6. Doshi SM, Friedman AN. Diagnosis and management of type 2 diabetic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(8):1366–1373. doi:10.2215/CJN.11111016
7. Dai H, Liu Q, Liu B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*. 2017;2017:1–10. doi:10.1155/2017/2615286
8. Khalilpourfarshbafi M, Hajiaghaalipour F, Selvarajan KK, Adam A. Mesenchymal stem cell-based therapies against podocyte damage in diabetic nephropathy. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;14(3):201–210. doi:10.1007/s13770-017-0026-5
9. Sakairi T, Abe Y, Kajiyama H, vd. Conditionally immortalized human podocyte cell lines established from urine. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2010;298(3):F557-67. doi:10.1152/ajprenal.00509.2009
10. Kalluri R. Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(9):2383–2389. doi:10.1681/ASN.2006060628
11. Czirok S, Fang L, Radovits T, vd. Cinaciguat ameliorates glomerular damage by

reducing ERK1/2 activity and TGF-ß expression in type-1 diabetic rats. *Sci Rep*. 2017;7(1):11218. doi:10.1038/s41598-017-10125-3

12. Ji L, Chen Y, Wang H, vd. Overexpression of Sirt6 promotes M2 macrophage transformation, alleviating renal injury in diabetic nephropathy. *Int J Oncol*. Published online 14 Mayıs 2019. doi:10.3892/ijo.2019.4800
13. Liapis H, Romagnani P, Anders H-J. New insights into the pathology of podocyte loss. *Am J Pathol*. 2013;183(5):1364–1374. doi:10.1016/j.ajpath.2013.06.033
14. Gouda K, AbdelHamid S, Mansour A, Omar N, El-Mesallamy H. Amelioration of diabetic nephropathy by targeting autophagy via rapamycin or fasting: relation to cell apoptosis/survival. *Curr Issues Mol Biol*. 2021;43(3):1698–1714. doi:10.3390/cimb43030120
15. A/L B Vasanth Rao VR, Tan SH, Candasamy M, Bhattamisra SK. Diabetic nephropathy: An update on pathogenesis and drug development. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2019;13(1):754–762. doi:10.1016/j.dsx.2018.11.054
16. Nagaishi K, Mizue Y, Chikenji T, vd. Umbilical cord extracts improve diabetic abnormalities in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and increase their therapeutic effects on diabetic nephropathy. *Sci Rep*. 2017;7(1):8484. doi:10.1038/s41598-017-08921-y
17. Li Y, Liu J, Liao G, vd. Early intervention with mesenchymal stem cells prevents nephropathy in diabetic rats by ameliorating the inflammatory microenvironment. *Int J Mol Med*. 2018;41(5):2629–2639. doi:10.3892/ijmm.2018.3501
18. Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells*. 2007;25(6):1384–1392. doi:10.1634/stemcells.2006-0709
19. Fong CY, Chak LL, Biswas A, vd. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*. 2011;7(1):1–16. doi:10.1007/s12015-010-9166-x
20. Ozkan S, Isildar B, Oncul M, Baslar Z, Kaleli S, Koyuturk M. Ultrastructural analysis of human umbilical cord derived MSCs at undifferentiated stage and during osteogenic and adipogenic differentiation. *Ultrastruct Pathol*. 2018;42(3):199–210. doi:10.1080/01913123.2018.1453905

21. Abdel Aziz MT, Wassef MA, Ahmed HH, vd. The role of bone marrow derived-mesenchymal stem cells in attenuation of kidney function in rats with diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6(1):34. doi:10.1186/1758-5996-6-34
22. Fang Y, Tian X, Bai S, vd. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by inhibiting oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the p38 MAPK signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2012;30(1):85–92. doi:10.3892/ijmm.2012.977
23. Griffin TP, Martin WP, Islam N, O'Brien T, Griffin MD. The promise of mesenchymal stem cell therapy for diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep*. 2016;16(5):42. doi:10.1007/s11892-016-0734-6
24. Lv S, Liu G, Sun A, vd. Mesenchymal stem cells ameliorate diabetic glomerular fibrosis in vivo and in vitro by inhibiting TGF-beta signalling via secretion of bone morphogenetic protein 7. *Diab Vasc Dis Res*. 2014;11(4):251–261. doi:10.1177/1479164114531300
25. Lv SS, Liu G, Wang JP, vd. Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting macrophage infiltration. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(2):275–282. doi:10.1016/j.intimp.2013.05.031
26. Wang S, Li Y, Zhao J, Zhang J, Huang Y. Mesenchymal stem cells ameliorate podocyte injury and proteinuria in a type 1 diabetic nephropathy rat model. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2013;19(4):538–546. doi:10.1016/j.bbmt.2013.01.001
27. Ezquer F, Ezquer M, Simon V, vd. Endovenous administration of bone-marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells prevents renal failure in diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2009;15(11):1354–1365. doi:10.1016/j.bbmt.2009.07.022
28. Zhou H, Tian HM, Long Y, vd. Mesenchymal stem cells transplantation mildly ameliorates experimental diabetic nephropathy in rats. *Chin Med J*. 2009;122(21):2573–2579. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19951572
29. Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, vd. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1656. doi:10.3390/ijms20071656
30. Benavides-Castellanos MP, Garzón-Orjuela N, Linero I. Effectiveness of

mesenchymal stem cell-conditioned medium in bone regeneration in animal and human models: a systematic review and meta-analysis. *Cell Regen*. 2020;9(1):5. doi:10.1186/s13619-020-00047-3

31. Vizoso F, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9):1852. doi:10.3390/ijms18091852
32. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–14. doi:10.1155/2014/965849
33. Kattamis A, Aydinok Y, Taher A. Optimising management of deferasirox therapy for patients with transfusion-dependent thalassaemia and lower-risk myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol*. 2018;101(3):272–282. doi:10.1111/ejh.13111
34. Oses C, Olivares B, Ezquer M, vd. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2017;12(5):e0178011. doi:10.1371/journal.pone.0178011
35. Caroleo MC, Carito V, Pingitore A, vd. Human kidney podocyte cell population as a novel biological target of nerve growth factor. *Growth Factors*. 2015;33(1):14–22. doi:10.3109/08977194.2014.975799
36. Li M, Armelloni S, Zennaro C, vd. BDNF repairs podocyte damage by microRNA-mediated increase of actin polymerization. *J Pathol*. 2015;235(5):731–744. doi:10.1002/path.4484
37. Zhang L, Li K, Liu X, vd. Repeated systemic administration of human adipose-derived stem cells attenuates overt diabetic nephropathy in rats. *Stem Cells Dev*. 2013;22(23):3074–3086. doi:10.1089/scd.2013.0142
38. Ross M, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*, 6th Edition. Içinde: *Histology: A Text and Atlas*. ; 2010.
39. Chang J, Yan J, Li X, Liu N, Zheng R, Zhong Y. Update on the mechanisms of tubular cell injury in diabetic kidney disease. *Front Med*. 2021;8. doi:10.3389/fmed.2021.661076
40. Arora MK, Singh UK. Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: An update. *Vascul Pharmacol*. 2013;58(4):259–271.

doi:10.1016/j.vph.2013.01.001

41. Kato M, Natarajan R. Epigenetics and epigenomics in diabetic kidney disease and metabolic memory. *Nat Rev Nephrol*. 2019;15(6):327–345. doi:10.1038/s41581-019-0135-6
42. Kitching AR, Hutton HL. The Players: Cells involved in glomerular disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2016;11(9):1664–1674. doi:10.2215/CJN.13791215
43. N. Uwaezuoke S. *Childhood Idiopathic Nephrotic Syndrome as a Podocytopathy*. Içinde: *Glomerulonephritis and nephrotic syndrome*. IntechOpen; 2019. doi:10.5772/intechopen.85994
44. Ali IH, Brazil DP. Under the right conditions: protecting podocytes from diabetes-induced damage. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):119. doi:10.1186/scrt330
45. Ritz E, Wolf G. *Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Natural History of Diabetic Nephropathy*. Içinde: *Comprehensive Clinical Nephrology*. Elsevier; 2010:359–376. doi:10.1016/B978-0-323-05876-6.00029-0
46. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han Gd, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier (Review Article). *Nephrology*. 2006;11(4):274–281. doi:10.1111/j.1440-1797.2006.00583.x
47. Czirok S, Fang L, Radovits T, vd. Cinaciguat ameliorates glomerular damage by reducing ERK1/2 activity and TGF-ss expression in type-1 diabetic rats. *Sci Rep*. 2017;7(1):11218. doi:10.1038/s41598-017-10125-3
48. Liapis H, Romagnani P, Anders HJ. New insights into the pathology of podocyte loss: mitotic catastrophe. *Am J Pathol*. 2013;183(5):1364–1374. doi:10.1016/j.ajpath.2013.06.033
49. Lin T-A, Wu VC-C, Wang C-Y. Autophagy in chronic kidney diseases. *Cells*. 2019;8(1):61. doi:10.3390/cells8010061
50. Yang D, Livingston MJ, Liu Z, vd. Autophagy in diabetic kidney disease: regulation, pathological role and therapeutic potential. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(4):669–688. doi:10.1007/s00018-017-2639-1
51. Lenoir O, Jasiek M, Hénique C, vd. Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis. *Autophagy*. 2015;11(7):1130–1145. doi:10.1080/15548627.2015.1049799
52. Susztak K, Raff AC, Schiffer M, Bottinger EP. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of

diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2006;55(1):225–233. doi:10.2337/diabetes.55.01.06.db05-0894

53. Xin W, Li Z, Xu Y, vd. Autophagy protects human podocytes from high glucose-induced injury by preventing insulin resistance. *Metabolism*. 2016;65(9):1307–1315. doi:10.1016/j.metabol.2016.05.015
54. Tagawa A, Yasuda M, Kume S, vd. Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2016;65(3):755–767. doi:10.2337/db15-0473
55. Bonventre J V. Can we target tubular damage to prevent renal function decline in diabetes? *Semin Nephrol*. 2012;32(5):452–462. doi:10.1016/j.semnephrol.2012.07.008
56. Miltenyi M, Korner A, Tulassay T, Szabo A. Tubular dysfunction in type I diabetes mellitus. *Arch Dis Child*. 1985;60(10):929–931. doi:10.1136/adc.60.10.929
57. Mogensen CE, Christensen NJ, Gundersen HJG. The acute effect of insulin on renal haemodynamics and protein excretion in diabetics. *Diabetologia*. 1978;15(3):153–157. doi:10.1007/BF00421231
58. Nowak N, Skupien J, Niewczas MA, vd. Increased plasma kidney injury molecule-1 suggests early progressive renal decline in non-proteinuric patients with type 1 diabetes. *Kidney Int*. 2016;89(2):459–467. doi:10.1038/ki.2015.314
59. Habib SL. Diabetes and renal tubular cell apoptosis. *World J Diabetes*. 2013;4(2):27. doi:10.4239/wjd.v4.i2.27
60. Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londoño I, Gingras D, Bendayan M. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Investig*. 2003;83(7):1069–1080. doi:10.1097/01.LAB.0000078687.21634.69
61. Sakai S, Yamamoto T, Takabatake Y, vd. Proximal tubule autophagy differs in type 1 and 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2019;30(6):929–945. doi:10.1681/ASN.2018100983
62. Bhatia D, Choi ME. *Autophagy in Kidney disease: Advances and Therapeutic Potential*. Içinde: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. ; 2020:107–133. doi:10.1016/bs.pmbts.2020.01.008
63. Lin F. Autophagy in renal tubular injury and repair. *Acta Physiol*. 2017;220(2):229–237. doi:10.1111/apha.12852
64. Li L, Zepeda-Orozco D, Black R, Lin F. Autophagy is a component of epithelial

cell fate in obstructive uropathy. *Am J Pathol*. 2010;176(4):1767–1778. doi:10.2353/ajpath.2010.090345

65. Gheith O, Farouk N, Nampoory N, Halim MA, Al-Otaibi T. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J nephropharmacology*. 2016;5(1):49–56. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28197499
66. Sulaiman MK. Diabetic nephropathy: Recent advances in pathophysiology and challenges in dietary management. *Diabetol Metab Syndr*. 2019;11(1):7. doi:10.1186/s13098-019-0403-4
67. Maki T, Maeno S, Maeda Y, vd. Amelioration of diabetic nephropathy by SGLT2 inhibitors independent of its glucose-lowering effect: A possible role of SGLT2 in mesangial cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):4703. doi:10.1038/s41598-019-41253-7
68. Cassis P, Locatelli M, Cerullo D, vd. SGLT2 inhibitor dapagliflozin limits podocyte damage in proteinuric nondiabetic nephropathy. *JCI Insight*. 2018;3(15). doi:10.1172/jci.insight.98720
69. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012;166(3):877–894. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
70. Lang H, Dai C. Effects of bone marrow mesenchymal stem cells on plasminogen activator inhibitor-1 and renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy. *Arch Med Res*. 2016;47(2):71–77. doi:10.1016/j.arcmed.2016.03.002
71. Ebrahim N, Ahmed I, Hussien N, vd. Mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorated diabetic nephropathy by autophagy induction through the mtor signaling pathway. *Cells*. 2018;7(12):226. doi:10.3390/cells7120226
72. Kornicka K, Houston J, Marycz K. Dysfunction of mesenchymal stem cells isolated from metabolic syndrome and type 2 diabetic patients as result of oxidative stress and autophagy may limit their potential therapeutic use. *Stem Cell Rev Reports*. 2018;14(3):337–345. doi:10.1007/s12015-018-9809-x
73. Da-Croce L, Gambarini-Paiva GH, Angelo PC, Bambirra EA, Cabral AC, Godard AL. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell Tissue Bank*. 2013;14(1):65–76. doi:10.1007/s10561-012-9301-9
74. Isildar B, Ozkan S, Oncul M, vd. Comparison of different cryopreservation protocols for human umbilical cord tissue as source of mesenchymal stem cells. *Acta Histochem*. 2019;121(3):361–367. doi:10.1016/j.acthis.2019.02.008

75. Zhang W, Liu L, Huo Y, Yang Y, Wang Y. Hypoxia-pretreated human mscs attenuate acute kidney injury through enhanced angiogenic and antioxidative capacities. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–10. doi:10.1155/2014/462472

76. Lin T, Pajarinen J, Nabeshima A, vd. Preconditioning of murine mesenchymal stem cells synergistically enhanced immunomodulation and osteogenesis. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):277. doi:10.1186/s13287-017-0730-z

77. Pourjafar M, Saidijam M, Mansouri K, Ghasemibasir H, Karimi dermani F, Najafi R. All-trans retinoic acid preconditioning enhances proliferation, angiogenesis and migration of mesenchymal stem cell in vitro and enhances wound repair in vivo. *Cell Prolif*. 2017;50(1):e12315. doi:10.1111/cpr.12315

78. Overath JM, Gauer S, Obermüller N, vd. Short-term preconditioning enhances the therapeutic potential of adipose-derived stromal/stem cell-conditioned medium in cisplatin-induced acute kidney injury. *Exp Cell Res*. 2016;342(2):175–183. doi:10.1016/j.yexcr.2016.03.002

79. Li M, Armelloni S, Ikehata M, vd. Nephrin expression in adult rodent central nervous system and its interaction with glutamate receptors. *J Pathol*. 2011;225(1):118–128. doi:10.1002/path.2923

80. Prunotto M, Farina A, Lane L, vd. Proteomic analysis of podocyte exosome-enriched fraction from normal human urine. *J Proteomics*. 2013;82:193–229. doi:10.1016/j.jprot.2013.01.012

81. Sun Y, Zhang H, Hu R, vd. The expression and significance of neuronal iconic proteins in podocytes. Mallucci GR, ed. *PLoS One*. 2014;9(4):e93999. doi:10.1371/journal.pone.0093999

82. Vitureira N, Andrés R, Pérez-Martínez E, vd. Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. Andreu AL, ed. *PLoS One*. 2010;5(8):e12003. doi:10.1371/journal.pone.0012003

83. Wu Y, Zhang J, Liu F, vd. Protective effects of hbsp on ischemia reperfusion and cyclosporine a induced renal injury. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:1–12. doi:10.1155/2013/758159

84. Saygı Hİ, Güngör ZB, Kalay F, Seçkin İ. In glomerular cells of puromycin aminonucleoside nephrosis rats both phosphorylated and total STAT3 levels increased during proteinuria. *Acta Histochem*. 2018;120(6):595–603.

doi:10.1016/j.acthis.2018.07.005

85. Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int*. 1984;26(2):137–143. doi:10.1038/ki.1984.147
86. Saygı Hİ, Güngör ZB, Kalay F, Seçkin İ. In glomerular cells of puromycin aminonucleoside nephrosis rats both phosphorylated and total STAT3 levels increased during proteinuria. *Acta Histochem*. Published online 2018. doi:10.1016/j.acthis.2018.07.005
87. Stampfl S, Stampfl U, Bellemann N, vd. Immunohistochemical characterization of specific inflammatory tissue reactions following embolization with four different spherical agents in the minipig kidney model. *J Vasc Interv Radiol*. 2009;20(7):936–945. doi:10.1016/j.jvir.2009.03.040
88. Shi W, Guo L, Liu G, vd. Protective effect of calcitriol on podocytes in spontaneously hypertensive rat. *J Chinese Med Assoc*. 2018;81(8):691–698. doi:10.1016/j.jcma.2018.01.010
89. Yen C-F, Liao S-K, Huang SJ, vd. Decreased endometrial expression of leukemia inhibitory factor receptor disrupts the stat3 signaling in adenomyosis during the implantation window. *Reprod Sci*. 2017;24(8):1176–1186. doi:10.1177/1933719116681515
90. Nie P, Bai X, Lou Y, vd. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce oxidative damage and apoptosis in diabetic nephropathy by activating Nrf2. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):450. doi:10.1186/s13287-021-02447-x
91. Wang Y, Liu J, Zhang Q, vd. Human umbilical cord mesenchymal stem cells attenuate podocyte injury under high glucose via TLR2 and TLR4 signaling. *Diabetes Res Clin Pract*. 2021;173:108702. doi:10.1016/j.diabres.2021.108702
92. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1428–1442. doi:10.1111/jcmm.13492
93. Zhao L, Hu C, Zhang P, Jiang H, Chen J. Melatonin preconditioning is an effective strategy for mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease. *J Cell Mol Med*. 2020;24(1):25–33. doi:10.1111/jcmm.14769
94. Philipp D, Suhr L, Wahlers T, Choi Y-H, Paunel-Görgülü A. Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):286.

doi:10.1186/s13287-018-1039-2

95. Collins AJ, Foley RN, Chavers B, vd. US Renal Data System 2013 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis*. 2014;63(1):A7. doi:10.1053/j.ajkd.2013.11.001
96. Li H, Rong P, Ma X, vd. Mouse umbilical cord mesenchymal stem cell paracrine alleviates renal fibrosis in diabetic nephropathy by reducing myofibroblast transdifferentiation and cell proliferation and upregulating MMPs in mesangial cells. *J Diabetes Res*. 2020;2020:1–14. doi:10.1155/2020/3847171
97. Heerspink HJL, Stefánsson B V., Correa-Rotter R, vd. Dapagliflozin in patients with chronic kidney disease. *N Engl J Med*. 2020;383(15):1436–1446. doi:10.1056/NEJMoa2024816
98. Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(9):1293–1306. doi:10.1517/14712598.2015.1051528
99. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, vd. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–317. doi:10.1080/14653240600855905
100. Lv S, Cheng J, Sun A, vd. Mesenchymal stem cells transplantation ameliorates glomerular injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via inhibiting oxidative stress. *Diabetes Res Clin Pr*. 2014;104(1):143–154. doi:10.1016/j.diabres.2014.01.011
101. Park JH, Park J, Hwang SH, Han H, Ha H. Delayed treatment with human umbilical cord blood-derived stem cells attenuates diabetic renal injury. *Transplant Proc*. 2012;44(4):1123–1126. doi:10.1016/j.transproceed.2012.03.044
102. Yang Y-HK, Ogando CR, Wang See C, Chang T-Y, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):131. doi:10.1186/s13287-018-0876-3
103. Zhao P, Li X, Li Y, Zhu J, Sun Y, Hong J. Mechanism of miR-365 in regulating BDNF-TrkB signal axis of HFD/STZ induced diabetic nephropathy fibrosis and renal function. *Int Urol Nephrol*. 2021;53(10):2177–2187. doi:10.1007/s11255-021-02853-3
104. Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, vd. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by Anti-VEGF antibodies and soluble VEGF

Receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem*. 2003;278(15):12605–12608. doi:10.1074/jbc.C300012200

105. Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC, vd. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(1):27–45. doi:10.1681/ASN.2004080648
106. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;Volume 9:279–290. doi:10.2147/IJNRD.S103784
107. Vallon V, Thomson SC. The tubular hypothesis of nephron filtration and diabetic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020;16(6):317–336. doi:10.1038/s41581-020-0256-y
108. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;Volume 9:279–290. doi:10.2147/IJNRD.S103784
109. Rabelink TJ, Heerspink HJL, de Zeeuw D. *The Pathophysiology of Proteinuria*. Içinde: *Chronic Renal Disease*. Elsevier; 2015:92–105. doi:10.1016/B978-0-12-411602-3.00009-3
110. Welsh GI, Saleem MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol*. 2010;220(3):328–337. doi:10.1002/path.2661
111. Tung C-W, Hsu Y-C, Shih Y-H, Chang P-J, Lin C-L. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy. *Nephrology*. 2018;23:32–37. doi:10.1111/nep.13451
112. Ornellas FM, Ramalho RJ, Fanelli C, vd. Mesenchymal stromal cells induce podocyte protection in the puromycin injury model. *Sci Rep*. 2019;9(1):19604. doi:10.1038/s41598-019-55284-7
113. Kaverina N V., Eng DG, Largent AD, vd. WT1 is necessary for the proliferation and migration of cells of renin lineage following kidney podocyte depletion. *Stem Cell Reports*. 2017;9(4):1152–1166. doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.020
114. Yang C, Kaushal V, Shah S V., Kaushal GP. Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Physiol*. 2008;294(4):F777–F787. doi:10.1152/ajprenal.00590.2007
115. Tanaka Y, Kume S, Kitada M, vd. Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res*. 2012;2012:1–12. doi:10.1155/2012/628978
116. Zhang Y, Yuen DA, Advani A, vd. Early-outgrowth bone marrow cells attenuate

renal injury and dysfunction via an antioxidant effect in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012;61(8):2114–2125. doi:10.2337/db11-1365

117. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley K V. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Physiol*. 2013;304(4):F333–F347. doi:10.1152/ajprenal.00478.2012
118. Lasagni L, Lazzeri E, J. Shankland S, Anders H-J, Romagnani P. Podocyte mitosis - a catastrophe. *Curr Mol Med*. 2013;13(1):13–23. doi:10.2174/156652413804486250
119. Ichikawa I, Ma J, Motojima M, Matsusaka T. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005;14(3):205–210. doi:10.1097/01.mnh.0000165884.85803.e1
120. Abou-Ghali M, Stiban J. Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci*. 2015;22(6):760–772. doi:10.1016/j.sjbs.2015.03.005

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DEFEROKSAMİN İLE MUAMELESİ SONRASINDA ELDE EDİLEN ŞARTLANDIRILMIŞ MEDYUMUN DİYABETİK NEFROPATİ MODELİNDEKİ ETKİLERİ

ORİGİNALİTY REPORT

6%	5%	1%	2%
SİMİLARİTY İNDEX	İNTERNET SOURCES	PUBLİCATİONS	STUDENT PAPERS

PRİMARY SOURCES

1	www.researchgate.net Internet Source	1%
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBİTAK) Student Paper	1%
3	acikerisim.istanbul.edu.tr Internet Source	<1%
4	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	<1%
5	toad.halileksi.net Internet Source	<1%
6	Submitted to Marmara University Student Paper	<1%
7	www.thed.org.tr Internet Source	<1%
8	Submitted to Istanbul University Student Paper	<1%

ÖZGEÇMİŞ