

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**PLASENTA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN KRONİK BÖBREK
YETMEZLİĞİNDE PROLİFERASYON VE
APOPTOZ MEKANİZMALARINA ETKİLERİ**

Büşra ÇETİNKAYA

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**PLASENTA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN KRONİK BÖBREK
YETMEZLİĞİNDE PROLİFERASYON VE
APOPTOZ MEKANİZMALARINA ETKİLERİ**

Büşra ÇETİNKAYA

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN**

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2014-131)

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”

Antalya, 2016

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir./...../2015

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Emin T¼rkay KORGUN

Akdeniz Üniversitesi

Tıp Fak¼ltesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ye:

: Prof. Dr. G¼ltekin S¼LEYMANLAR

Akdeniz Üniversitesi

Tıp Fak¼ltesi

İç Hastalıkları Anabilim Dalı

ye

: Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Hacettepe Üniversitesi

Tıp Fak¼ltesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun .../.../201.. tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Kök hücreler normal gelişimin sürdürülmesinde ve erişkin doku rejenerasyonunda birden çok role sahip olan hücrelerdir. Erişkin kök hücreler, hayat süresi sınırlı olan hücrelerin yenilenmesini böylece organların bütünlüğünün sağlanmasını ve hasara yanıt vererek hasar görmüş dokuların rejenerasyonunu sağlarlar. Erişkin kök hücrelerden biri olan mezenkimal kök hücreler, birden fazla hücre serisine farklılaşabilirler ve kendilerini yenileyebilirler. Osteositlere, kondrositlere ve adipositlere farklılaşabilen hücrelerdir. Bir çok çalışmada plasenta mezenkimal kök hücre (MKH) kaynağı olarak gösterildiği gibi, aynı zamanda göbek kordonu stroması, amniyon sıvısı ve amniyon zarı gibi bileşenler de MKH kaynağı olarak gösterilmektedir. Daha önceki çalışmalarda amniyotik membranın kondrojenik, osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya giden mezenkimal kök hücrelerden zengin olduğu gösterilmiştir.

Kronik böbrek yetmezliğinin (KBY) özelliği, sağlıklı dokunun erozyonu ve fibrozis nedeniyle zaman içerisinde sürekli olarak böbrek fonksiyonlarının kaybıdır. Daha önceki çalışmalarda, hasarı takiben böbreğin yenilenme kapasitesi, zarar gören tübüler hücrelerin değiştirilmesi olarak gösterilmektedir. MKH'lerin tübüler epitel hücrelerine farklılaştığı, böylece renal yapı ve fonksiyonunun yenilendiği gösterilmiştir. Ayrıca MKH'lerin KBY'de renal fonksiyonu koruduğu ve böbreğe yerleşerek ve büyüme faktörlerini salgılayarak renal hasarı engellediği gösterilmiştir.

Aristolohik asit (AA) KBY'ye neden olmaktadır. Morfolojik olarak, AA, tübüler atrofiye sebep olan interstisyel fibrozis ile karakterizedir. Bu çalışmada sıçanlara AA uygulanarak KBY modeli oluşturulmuştur. Amniyon membranından izole edilen mezenkimal kök hücreler, deney grubundaki her bir sıçana 6×10^5 hücre olarak kuyruk venlerinden transplante edilmiştir. 30 gün ve 60 gün süren iyileşme dönemi sonunda proliferasyon belirteçleri olan PCNA ve Ki67 proteinlerinin ekspresyonuna bakılmış ve kök hücre gruplarında bu proteinlerin ekspresyonu KBY grubuna göre artış göstermiştir. Ayrıca KBY grubunda kök hücre verilen gruplara göre apoptotik PARP'ın ekspresyonunun arttığı gösterilmiş ve TUNEL yöntemiyle de desteklenmiştir. Bunun yanında yine KBY grubunda hücre siklus inhibitörü proteinlerinden olan p57'nin ekspresyonunun kontrol, kök hücre ve sham gruplarına göre arttığı da gösterilmiştir. Bu çalışma ile birlikte insan plasentasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kronik böbrek yetmezliği sonucu oluşan fibrozisin onarılmasında proliferasyon ve apoptoz mekanizmalarında etkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, Kronik Böbrek Yetmezliği, Proliferasyon, Apoptoz, Amniyon Membranı

ABSTRACT

Stem cells have many important roles in progression of normal development and adult tissue regeneration. Adult stem cells provide regeneration of life limited stem cells thus permanence of tissues. They can response to injury and regenerate damaged tissues. Mesenchymal stem cells (MSCs) are one of the adult stem cells and they can differentiate into many cell lines and self-renewal. They can differentiate into osteocytes, adipocytes and chondrocytes. Many experiments have shown that placenta can be used as a source of mesenchymal stem cell as well stroma of umbilical cord, amnion fluid and amniotic membrane. Recent studies determined the amnion membrane has most of mesenchymal stem cells that can differentiate into osteocyte and adipocyte.

The feature of chronic kidney failure (CKF) is lost of kidney functions due to erosion of healthy tissue and fibrosis. Following injury, the regenerative capacity of kidney is shown by the replacement of damaged kidney tubules. Recent studies showed that MSCs differentiated to tubular epithelial cells thus renal function and structures renewed. Furthermore, MSCs protect renal function in CKF. They can engraft to kidney and secrete growth factors thus they prevent renal injury.

Aristolochic acid (AA) gives rise to CKF. Morphologically, AA is characterized by interstitial fibrosis that causes tubular atrophy. We constituted rat model of CKF by applying AA in this study. 6×10^5 mesenchymal stem cells that were isolated from amnion membrane transplanted into tail vein of rats. At the end of 30 day and 60 day recovery period, expression of PCNA and Ki67 proliferation markers increased in stem cell groups according to CKF group. Furthermore, expression of PARP-1 apoptosis marker increased in CKF group according to control, stem cell groups and sham group and it was supported with TUNEL. Also p57 that is cell cycle inhibitory protein increased in CKF group when compared to control, stem cell groups and sham groups. In this study, mesenchymal stem cells isolated from human placenta exhibited significant effects on proliferation and apoptosis mechanisms in the chronic kidney failure.

Key Words: Mesenchymal Stem Cell, Chronic Kidney Failure, Proliferation, Apoptosis, Amnion Membrane

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleşmesinde;

Danışman hocam Prof. Dr. Emin Tırkay KORGUN'a, tezimin gerçekleşmesi için yüksek lisans eğitimimin başından beri göstermiş oldukları tüm destekleri için,

Anabilim Dalımızdaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Birlikte alıştığım tüm ekip arkadaşlarıma (Aslı ÖZMEN, Gözde NEK, Ertan KATIRCI, Karolin DOğUM ve Müge MOLBAY) ihtiyaç duyduğum her anda bana yardımcı oldukları için,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına tüm emekleri için,

Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları nitesi'nin değerli çalışanlarına,

Sevgili annem, babam ve ablama bana destek oldukları, her an yanımda oldukları ve motivasyonumu yüksek tutmam için çaba gösterdikleri için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	IV
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	6
2.1. Rejeneratif Tıp	6
2.2. Kök Hücreler	6
2.2.1 Kök Hücre Tipleri	8
2.2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler	8
2.2.1.2. Uyarılmış Pluripotent Hücreler	9
2.2.1.3. Yetişkin Kök Hücreler	9
2.2.1.3.1. Hematopoetik Kök Hücreler	9
2.2.1.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler	10
2.3. Plasenta	14
2.3.1. Term Plasentanın Yapısı	14
2.3.1.1. Maternal Kısım	14
2.3.1.2. Fetal Kısım	15
2.3.2. Amniyon Membranı	17
2.4. Üriner Sistem	19
2.4.1. Böbreğin Gelişimi	19
2.4.1.1. Pronefroz Böbrek	20

2.4.1.2.	Mezonefroz Böbrek	20
2.4.1.3.	Metanefroz Böbrek	20
2.4.2.	Böbreğin Histolojisi	22
2.4.3.	Böbrek Hasarı	32
2.4.3.1.	Kronik Böbrek Yetmezliği	33
2.4.3.2.	Klinik Özellikleri ve Komplikasyonlar	34
2.4.3.3.	Nefron Tübül Hasarı ve KBY’de Malaptif Rejenerasyon	35
2.4.3.4.	Renal Fibrozis	37
2.4.3.5.	MKH ve Böbrek Onarımı	38
2.5.	Aristolohik Asit	40
2.6.	Hücrenin Yaşam Döngüsü	41
2.6.1.	Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni	42
2.6.2.	Ki67	42
2.6.3.	Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar	43
2.6.3.1.	CDK Aktivitesinin Regülasyonu	43
2.6.3.2.	CDK İnhibitörleri	43
2.6.4.	Poli ADP-Riboz Protein	44
GEREÇ ve YÖNTEM		46
3.1.	İnsan Term Plasentasından Amniyon Mezenkimal Kök Hücre izolasyonu	46
3.2.	Hücrelerin Flow Sitometri ile Karakterizasyonu	47
3.3.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Adiposit, Kondrosit ve Osteositlere Yönlendirilmesi	48
3.4.	İmmünofloresan Boyamalar	50
3.5.	Aristolohik Asit Kullanılarak KBY Modelinin Oluşturulması	50
3.6.	Özel Boyamalar	52
3.6.1	Masson Trikrom Boyaması	52
3.6.2.	Sirius Red Boyaması	53
3.7.	İmmünohistokimya Yöntemi	53
3.8.	TUNEL Yöntemi	54
3.9.	Western Blot Yöntemi	55
3.9.1.	Böbrek Dokusundan Lizat Hazırlama	55

3.9.2.	Protein miktarının belirlenmesi	55
3.9.3	SDS-PAGE Western Blot Protokolü	56
3.10.	Kreatinin ve Üre Testleri	57
3.11.	İstatistik	58
BULGULAR		59
4.1.	Aminyon Membranından Kök Hücre İzolasyonu Bulguları	59
4.2.	Hücrelerin Flow Sitometri ile Karakterizasyonu Bulguları	59
4.3.	İmmünofloresan Boyamaları Bulguları	61
4.4.	Mezenkimal Hücrelerin Adiposit, Kondrosit ve Osteositlere Yönlendirilmesi Bulguları	62
4.5.	Aristolohik Asit ile Kronik Böbrek Yetmezliği Modeli Oluşturulması	64
4.6.	Özel Boyamalar: Masson Trikrom ve Sirius Red Boyamaları Bulguları	65
4.7.	İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	71
4.8.	TUNEL Bulguları	72
4.9.	Western Blot Analizi Bulguları	77
4.10.	Serum Kreatinin, Serum Üre ve Kan Üre Nitrojen (BUN) Bulguları	80
TARTIŞMA		81
SONUÇLAR		88
KAYNAKLAR		89
ÖZGEÇMİŞ		98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Aristolohik Asit
AAN	: Aristolohik Asit Nefropati
ABH	: Akut Böbrek Hasarı
AHB	: Asimetrik Hücre Bölünmesi
AGM	: Aort-Gonad çıkıntısı- Mezonefroz
α-SMA	: Alfa-Düz Kas Aktin
BUN	: Kan Üre Nitrojen
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CKİ	: Siklin Kinaz İnhibitörü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
EGM	: Epitel- Mezenşim Geçişi
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GFO	: Glomerüler Filtrasyon Oranı
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
iAM	: İnsan Amniyon Membranı
iAMKH	: İnsan Amniyonik Mezenkimal Kök Hücre
iASKH	: İnsan Amniyonik Sıvı Kök Hücre
iKTH	: İnsan Koryonik Trofoblast Hücre
IL-6	: İnterlökin-6
iPH	: İndüklenmiş Pluripotent Hücre
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
NKH	: Nöral Kök Hücre
PARP	: Poli Adp-Riboz Protein
PCNA	: Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni
PEH	: Parietal Epitel Hücre

PDGF	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PTEH	: Proksimal Tübül Epitel Hücresi
SEBY	: Son Evre Renal Yetmezlik
TBGFβ1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1
TI	: Tübülointerstisyel
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktörü alfa
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı dUTP Uç Etiket
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
YKH	: Yetişkin Kök Hücre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.2.1.	Kök hücrenin kendi kendini yenilemesi, çoğalması ve farklılaşması	7
2.2.2.	Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli	8
2.2.1.3.2.	Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli	13
2.3.1.1.	İnsan plasentasının maternal ve fetal kısımlarının şematik diyagramı	15
2.3.1.2.1.	Plasentanın fetal kısmının yapısı	16
2.3.1.2.2.	Fetal ve maternal yüzeyler	17
2.4.1.3.	Metanefroz'un gelişimi	22
2.4.2.1.	Böbreğin Histolojik yapısı şematik görünümü	24
2.4.2.2.	Böbreğin genel düzenlenmesi	25
2.4.2.3.	Kortikal ve Jukstamedüller Nefron ve buna bağlı toplayıcı kanal ve tübülün bölümleri	26
2.4.2.4.	Böbrek cisimciğinin şematik görüntüsü	27
2.4.2.5.	Böbrek korteksinde proksimal (P) ve distal (D) kıvrımlı tübüller	30
2.4.3.3.1	Kronik Böbrek Yetmezliğinin gelişimi	35
2.4.3.3.2.	Glomerül homeostazisi ve hasardaki değişim	37
2.6.4.	PARP-1 proteininin yapısı	44
4.1.	Amniyotik kökenli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskopundaki görüntüsü	59
4.2.	Flow sitometri sonuçları	60
4.3.	İmmünofloresan Boyamalar	61
4.4.1.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrositlere Yönlendirilmesi	63
4.4.2.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteositlere Yönlendirilmesi	63
4.4.3.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipositlere Yönlendirilmesi	64

4.5.1.	AA gruplarının ve sham gruplarının ağırlıkları.	65
4.6.1	Masson Trikrom Boyaması. Glomerül ve çevresi	67
4.6.2.	Masson Trikrom Boyaması. Proksimal ve distal tübül.	68
4.6.3.	Sirius Red Boyaması. Proksimal ve distal tübül.	69
4.6.4.	Sirius Red Boyaması. Glomerül ve çevresi	70
4.7.1.	İnsan Mitokondriyal Antikor ile immünohistokimya boyaması	71
4.7.2.	PCNA immünohistokimyasal boyaması	73
4.7.3.	Ki67 immünohistokimyasal boyaması	74
4.8.1.	TUNEL boyaması. Glomerül ve çevresi	75
4.8.2.	TUNEL boyaması. Proksimal ve distal tübül.	76
4.9.1.	PCNA, p57 ve B-aktin Western Blot bantları	77
4.9.2.	AA ve kök hücre uygulamasından sonra PCNA ekspresyon düzeyleri.	78
4.9.3.	AA ve kök hücre uygulamasından sonra p57 ekspresyon düzeyleri.	78
4.9.4	Apoptotik Parp ve Full lenght Parp Western Blot Bantları	79
4.9.5.	PARP-1 ekspresyon düzeyleri.	79
4.10.1.	Serum kreatinin, serum üre ve BUN değerleri.	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
2.2.1.3.2.	MKH kaynağı dokular ve MKH'lerin farklılaştığı doku tipleri	11
2.4.3.2.1.	Kronik böbrek hastalığının evreleri	34
2.4.3.3.	Son evre böbrek yetmezliği sebepleri	35
3.9.3	Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikolar	58

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amacı

21.yüzyılda rejeneratif tıpla ilgili beklentiler arttıkça kök hücre biyolojisine olan ilgi de bu duruma paralel olarak artmıştır. Kök hücrelerin özelliklerinin tanımlanmasındaki hızlı gelişmeler, kök hücrelerin farklılaşarak farklı doku tiplerine ait hücrelerin elde edilebileceğini göstermektedir [1].

Kök hücreler normal gelişimin sürdürülmesinde ve erişkin doku rejenerasyonunda birden çok role sahiptir [2]. Erken evrede memeli embriyosundan izole edilen pluripotent kök hücreler (embriyonik kök hücreler) çeşitli hücre soylarına farklılaşma yeteneğine sahiptir. Embriyonik kök hücreler (EKH), uygun koşullarda kültüre edildiklerinde, pluripotensi özelliklerini devam ettirirler [3]. Gelişimin ilerlemesiyle, kök hücreler vücudun organlarını ve dokularını oluştururlar. Erişkin kök hücreler tipik olarak sınırlı potense sahiptirler (örneğin; multi-, bi, veya unipotent) [4]. Erişkin kök hücreler, hayat süresi sınırlı olan hücrelerin yenilenmesini sağlar, böylece organların tamamlanmasına ve devamlılığına hizmet ederler. Bununla birlikte, çoğu erişkin kök hücre, hasara yanıt vererek hasar görmüş dokuların rejenerasyonunu sağlar. Bu sebeplerden dolayı, erişkin kök hücrelerin yaşlanma, malignansi ve hastalıkların etiyojisi üzerinde etkiye sahip olduğu düşünülmektedir [5, 6]

Multipotent mezenkimal kök hücreler (MKH); fibroblast morfolojisine sahip hücrelerdir [7]. MKH'ler; kemik, yağ, kıkırdak, kas ve endotel hücrelerine farklılaşabilmektedir [8]. MKH'ler sahip oldukları özelliklerden ötürü rejeneratif tıpta yakın gelecekte çığır açabilir. Mezenkimal kök hücreler donörden kolaylıkla izole edilebilirler ve allojenik transplantasyon için uygun olabilirler [9, 10].

Klinik denemelerde, MKH'leri elde etmek için erişkin kemik iliği de kullanılır. Fakat kemik iliğinden mezenkimal kök hücreleri elde etmede bazı sorunlarla karşılaşılabilir. Eldesi zordur ve invaziv tekniklerin kullanılması gerekir. MKH'lerin kemik iliğindeki yüzdesi de düşüktür (0.001-0.01%) ve donör yaşıyla birlikte sayısında azalma meydana gelmektedir [11]. Bu yüzden plasenta, alternatif mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, plasentanın doğum sonrası atılan bir doku olması, etik tartışmalara yol açmaması, izolasyonu sırasında cerrahi

yöntemlere gerek olmayışı plasentayı MKH'ler için iyi bir kaynak olma potansiyelini arttırmaktadır. Plasenta, kök ve progenitör hücreler için önemli bir rezervdir [12].

Plasenta; amniyon zarı, koryonik tabaka ve maternal komponent olan desidua bazalis'den meydana gelir. Plasentada; MKH kaynağı olarak koryonik villuslar MKH olabileceği gibi aynı zamanda göbek kordonu stroması, amniyon sıvısı ve amniyon zarı gibi bileşenler de MKH kaynağı olarak gösterilebilir [13]. İnsan amniyotik membranı (İAM) ekstraembriyonik dokulardan gelişir ve plasenta amniyon zarı, koryonik tabaka ve maternal komponent olan desidua bazalis'den meydana gelir. İAM, avasküler stromadan oluşup tek katlı epitelden meydana gelir [13-15]. İAM, farklı embriyonik kökene sahip iki hücre tipini içerir: Embriyonik ektodermden köken alan insan amniyon epitel hücreleri ve embriyonik mezodermden köken alan insan amniyon mezenkimal stromal hücreleri [16]. Sonuç olarak, insan amniyon membranı (İAM) çeşitli klinik denemeler için kullanışlı progenitör hücre kaynağıdır [17].

In't Anker ve ekibi, amniyotik membranın osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya giden mezenkimal kök hücrelerden zengin olduğunu göstermişlerdir [17]. İnsan amniyotik membranından izole edilen mezenkimal kök hücreler, insan kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerle karşılaştırıldığında morfolojik olarak hiçbir fark gözlenmez. İnsan amniyotik membranından izole edilen kök hücrelerin immünofenotipik karakterleri kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerle uyum göstermektedir [18].

Böbrek boşaltım sisteminin bir bölümünü oluşturan kompleks bir organdır. Böbreğin metabolizma atık ürünlerini vücuttan atılmasını sağlamak, vücut sıvı elektrolit dengesini düzenlemek, vücudun asit baz dengesini düzenlemek, kan basıncını ayarlamak, alyuvar yapımını uyarmak gibi görevleri mevcuttur. Böbreğin işlevlerinde kayıp meydana geldiğinde böbrek yetmezliği ortaya çıkmaktadır. Böbrek yetmezliği iki sınıfa ayrılmaktadır: Akut böbrek hasarı (ABH) ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) [24].

Böbrek yetmezliği ciddi kronik böbrek hasarının sonucu olarak kabul edilmektedir ve semptomlar genellikle böbrek fonksiyonlarının bozulmasıyla kendini göstermektedir. Semptomların şiddeti arttığında diyaliz ve transplantasyon tedavisine gidilmektedir. KBY'nin belirgin özelliği, sağlıklı dokunun erozyonu ve fibrozis nedeniyle zaman içerisinde sürekli olarak böbrek fonksiyonlarının kaybıdır [19]. Böbrek yetmezliği glomerüler filtrasyon oranının (GFO) her 1.73 m²'de 15 ml/min'den daha az olması olarak veya diyaliz ya da transplantasyon gerekliliği olarak tanımlanır. Azalmış GFO komplikasyonunun diğer sonuçları kardiyovasküler hastalıklar, akut böbrek hasarı, enfeksiyon, onarılamaz fiziksel fonksiyonlar olarak sayılabilir. Bu komplikasyonlar herhangi bir evrede meydana gelebilir [20].

Hasarı takiben böbreğin yenilenme kapasitesi, zarar gören tübüler hücrelerin değiştirilmesi olarak gösterilir [21]. Renal fibrozis, fibrozis oluşumunu daha fazla

arttıran ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezinin arttırılmasını sağlayan sürekli böbrek inflamasyonu ile birlikte kombine olan ekstrasellüler matriks bileşenlerinin aşırı üretiminden kaynaklanmaktadır [22, 23].

Renal fibrojeniz sürecinde MKH'lerin bu süreci iyileştirici etkilerinin olduğu belirtilmektedir. MKH'lerin, Transforme Edici Büyüme Faktörü β (TGF) β 'nin profibrotik hareketini inhibe eden İnsülin Benzeri Büyüme Faktör-1, Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF), Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerini üretilmesiyle fibrozis geri döndürülebilmeğe böylece inflamasyon azalmakta ve böbrek doku yenilenmesi teşvik edilmektedir [24, 25].

Renal fibrozis, endotel-mezenkimal geçişi gibi epitel-mezenkimal geçişi (EMG) ve apoptozu kapsayan mekanizmalarla ilişkilidir [26-28]. EMG esnasında böbrek epitel hücreleri kendi fenotipik karakterlerini kaybeder ve mezenkimal hücrelerin karakteristik özelliklerini kazanırlar dolayısıyla, miyofibroblastların yenilenebilir kaynağını sağlarlar. Bu hücreler, fibroblastların ve düz kas hücrelerinin karakteristiğine sahip olurlar [28].

Daha önceki çalışmalarda, MKH'ler tarafından EMG'nin bloke edilmesinin, fibrozisi azaltan ve kronik renal hastalık sürecinin yavaşlatılmasının, tedavi yöntemi olabileceği öne sürülmüştür [29, 30]. Morigi ve ekibinin yaptığı bir çalışmada MKH'lerin ve hematopoetik kök hücrelerinin (HKH) terapötik potansiyellerini belirlemek için bu hücreleri cisplatin- indüklü akut böbrek yetmezliği modelinde kullandıklarında, hematopoetik kök hücrelerin (HKH) hiçbir yararlı etki göstermemesine rağmen, MKH'lerin tübül epitel hücrelerine farklılaştığını, böylece renal yapı ve fonksiyonunun yenilendiği gösterilmiştir [31]. Ayrıca MKH'lerin KBY'de renal fonksiyonu koruduğu ve böbreğe yerleşerek ve büyüme faktörlerini salgılayarak renal hasarı engellediği gösterilmiştir [32].

MKH uygulanmasından sonra iyileşme sağlanması birkaç mekanizmayla açıklanabilir. MKH'ler böbrek hücrelerine farklılaşır [33]. Kanıtlara göre bu mekanizmaların başında parakrin etki gelir [34]. Başka bir çalışmaya göre kronik allograft nefropatide sürekli inflamasyon nedeniyle MKH'ler hasarlı dokuya göç ederler ve entegre olurlar [35]. Kısacası, KBY modelinde MKH uygulandığında, MKH'lerin fibrojeniz sürecini iyileştirdiği belirlenmiştir [37].

Yakın zamandaki çalışmalarda, Çin bitkisi olan *Aristolochic fangchi*'deki Aristolohik Asitin (AA) renal hasar ve karsinomaya yol açtığı tespit edilmiştir [36]. İnsanda AA'nın karsinojenik ve nefrotoksik etkilerinin görülmesi için sıçanlarda, tavşanlarda ve farelerde deneysel modeller oluşturulmuştur [37, 38].

Yapılan çalışmalar sonucunda Aristolohik asitin (AA) KBY'ye neden olduğu

belirtmiştir. Genellikle medullar ışın ve dış korteks glomerule göre daha fazla etkilenmektedir [37]. AA uygulanan böbrekler boyut olarak daha küçüktür [39] ve AA'nın ana hedefi proksimal tübüler hücrelerdir [39]. AA nefropati (AAN), hızlı bir şekilde son evre renal yetmezliğe ilerler ve hastalığın ilerlemesi AA uygulaması kesilse bile devam eder [40]. AA'nın KBY'yi nasıl oluşturduğuna dair bilgiler net olmasa bile, bulgular aristolohik asit l'in (AAI) hipoksiye ve tübüler hücre ölümüyle sonuçlanan peritübüller kapillerin şiddetli redüksiyonunu indüklediğini göstermiştir [41, 42].

Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA), DNA replikasyonu ve hücre proliferasyonunda yer alan DNA polimeraz deltaya kofaktör olarak görev yapan 36 kDa'luk, 262 aminoasit içeren nükleer proteindir. DNA polimeraz delta S fazında, DNA'nın replikasyonu sırasında rol alır. DNA sentezi, tamiri ve hücre siklusu kontrolünde görevli birçok protein, PCNA'ya bağlanarak görev yapar. Böylece PCNA, DNA sentezi, tamiri ve hücre siklusu düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. DNA polimeraz deltanın, DNA replikasyonunda rolü bulunduğu ve hücre siklusunda düzenleyici bir protein olduğu kabul edilmektedir. Nükleusun G1 fazında salınımı başlar, S fazında maksimuma ulaşır ve G2, M fazında azalmaya başlar [43-45]. PCNA proliferasyon için iyi ve yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir [46]. Ki-67, 345 ve 395 kilo dalton ağırlığında iki molekülden oluşan, 10. kromozom üzerinde yerleşmiş, histon yapısında olmayan bir proteindir. Ki-67 direkt hücre proliferasyonu ile ilişkili bir proteindir. Ki-67 proteini G1, S, G2 ve mitoz gibi hücre döngüsünün tüm fazlarında bulunup hücrenin G0 evresinde bulunmaması nedeniyle büyüyen ve çoğalan hücre popülasyonunda eşsiz bir belirteçtir. Molekül G1 fazının ortasında eksprese olmaya başlayarak, S ve G2 fazı boyunca düzeyinde artış olur. M fazında pik yapar ve M fazı sonunda çok hızlı katabolize olur [47]. Poly (ADP-ribose) polimeraz (PARP-1) nükleusun içinde lokalize olan 113 kDa ağırlığına sahip korunmuş bir proteindir. PARP-1, DNA replikasyonu, DNA onarımı, gen ekspresyonu, hücrel farklılaşma ve apoptoz gibi fizyolojik ve patolojik olaylarda rol oynar [48]. PARP-1'in aktivasyonu, DNA hasarında en erken ve en hassas cevap olarak tanımlanır [49]. Bu sinyal modeli, PARP-1'in DNA tek ve çift zincir kırıklarını tanıyıp ve bu bölgeye hızlı bir şekilde bağlandığını öne sürmektedir [51]. PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içeren domeininden, Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 tarafından yarıklanması sonucunda, 24 ve 89 kDa'luk iki adet fragment oluşmaktadır ve bu nedenle yarıklanmış PARP (cPARP) apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır [50]. P57 ise, siklin D/CDK4, siklin E/CDK2 ya da siklin A/CDK2 komplekslerine bağlanarak onları inhibe eder ve böylece, G1/S, G2/S geçişini ve S fazının tamamlanmasını engeller [173].

Bu çalışmada, sıçanlara AA verilerek KBY modelinin oluşması sağlanmış, KBY modelinin oluşup oluşmadığı ise özel boyama teknikleriyle anlaşılmaya çalışılmıştır. Plasentanın amniyon membranından elde edilen mezenkimal kök hücreleri KBY oluşturulan hayvanlara kuyruk veninden transplante edilerek 30 gün ve 60 gün

iyileşme süreci için beklenilmiştir. Renal fibrozis’de glomerüller, tübüller ve vasküler yapılar etkilenmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin bu yapılarda gözlenen farklı hasarı onarma potansiyelleri araştırılmıştır. Bu çalışmanın amacı insan plasentasından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kronik böbrek yetmezliği sonucu oluşan fibrozisin onarılmasında proliferasyon ve apoptoz mekanizmalarında etkili olup olmadığını belirlemektir. Çalışmanın hipotezi ise, insan plasentası amniyon membranından elde edilen mezenkimal kök hücreler, kronik böbrek yetmezliği nedeniyle meydana gelen hasarın onarımında rol oynayabilir.

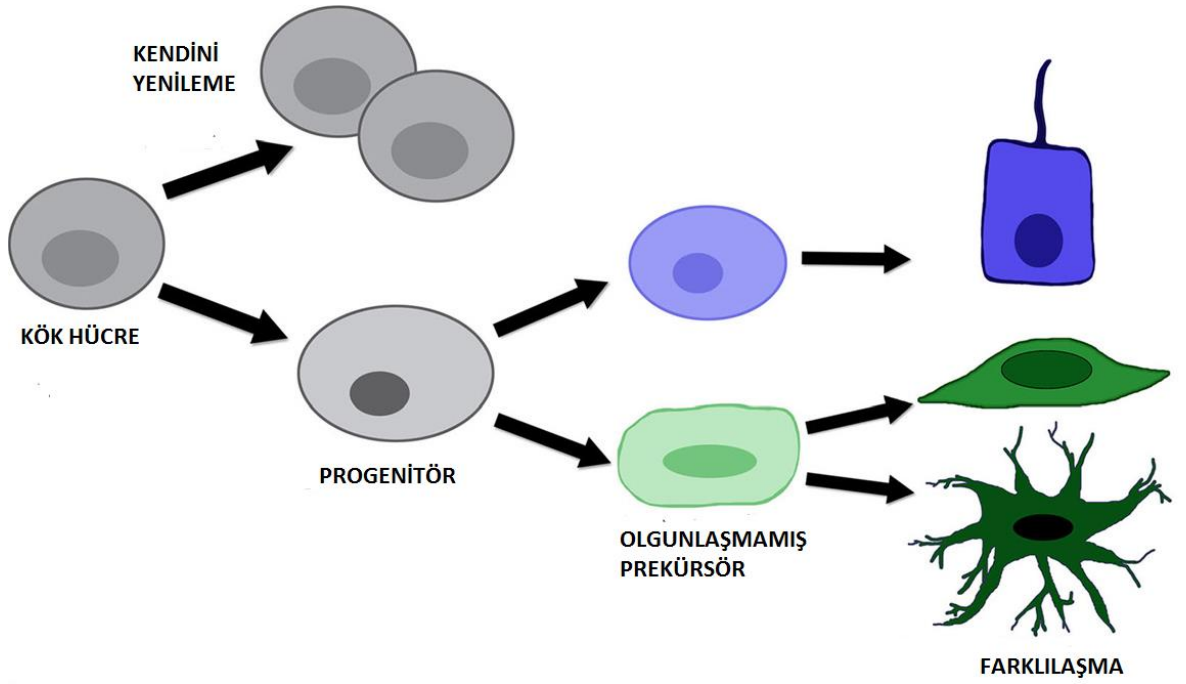
GENEL BİLGİLER

2.1. Rejeneratif Tıp

21.yüzyılda rejeneratif tıpla ilgili beklentiler arttıkça, kök hücre biyolojisine olan ilgi de bu duruma paralel olarak artmaktadır. Kök hücrelerin özelliklerinin tanımlanmasındaki hızlı gelişmeler, kök hücrelerin farklılaşarak farklı doku tiplerine ait hücrelerin elde edilebileceğini göstermektedir [1]. On yılı aşkın süredir rejeneratif tıp için kök hücrelerin kullanımı, sağlık hizmetlerinde yeni çağın habercisidir. Rejeneratif terapötiklerin bulunmasına yönelik araştırmalar, erişkin kök hücreleri veya farklılaşmış hücreleri manipüle ederek yeniden programlama metodlarının araştırılması ve embriyonik kök hücrelere (EKH) benzer potansiyeldeki soylara sahip olan indüklenmiş pluripotent hücrelerin (iPH) elde edilmesi çalışmalarını kapsamaktadır[7]. Rejeneratif tıbbın amacı, hastalık, hasar veya yaşlanmadan sonra zarar gören veya kaybolan hücreleri, dokuları veya yapıları yenilemektir. Günümüzdeki yaklaşım ise, kök hücre biyolojisi ve doku mühendisliği vasıtasıyla deney hayvanlarında embriyonik gelişmenin ve doku yenilenmesinin anlaşılmasına çalışılması yönündedir [51-54]. Rejeneratif tıp 3 şekilde gerçekleşmektedir [54]: (1) Kök hücrelerin implantasyonunun yeni yapıları meydana getirmesi, (2) implante olan hücrelerin önceden yönlendirilerek belirli bir yönde gelişmeleri (3) kayıp yapıları yenilemek için endojen hücrelerin uyarılması.

2.2. Kök Hücreler

Kök hücreler, uzun süre bölünebilen, kendini yenileyebilen, vücudun ihtiyacına göre farklı hücre tiplerine farklılaşabilen ve tüm bunları kendilerine özgü sinyaller ile gerçekleştirebilen eşsiz hücrelerdir [55]. Kök hücreler, ana kök hücrenin karakterini koruyarak simetrik hücre bölünmesiyle kendi kendilerini yenileyebilirler. Ayrıca kök hücreler, asimetric bölünmeyle organ ya da dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilirler [56]. Asimetric hücre bölünmesi (AHB) kendini yenileme ile farklılaşma arasında bir dengenin oluşması için gereken hücre bölünmesi tipidir. Bir başka ifadeyle, AHB sonucunda kök hücre kendini yenileme işlevini yerine getirirken aynı süreçte farklılaşmak üzere bir yavru hücre de üretmiş olur. Böylece, bölünen her kök hücre kendi sayısını, artma ve azalma olmaksızın sabit tutar. AHB'nin moleküler mekanizması farklı canlı türlerindeki kök hücrelerde aydınlatıldıkça bunun son derece korunmuş bir süreç olduğu anlaşılmaktadır [57].

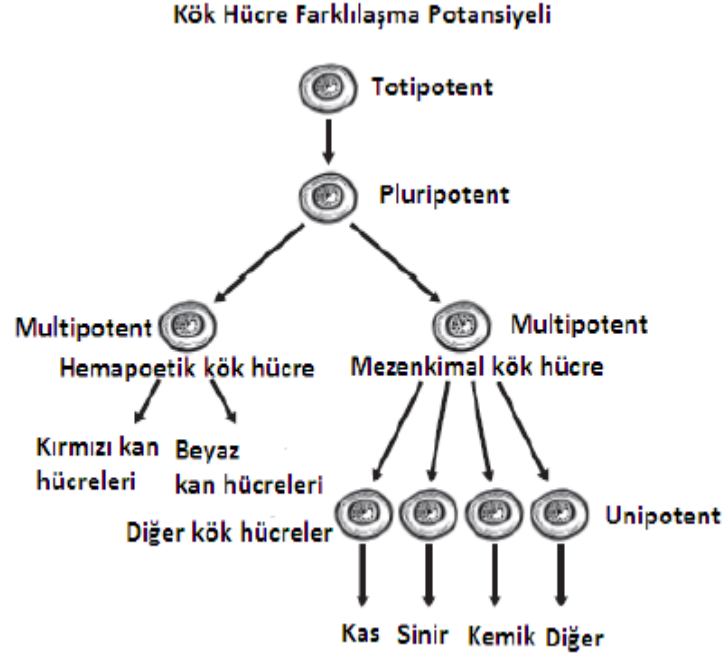


Şekil 2.2.1. Kök hücrenin kendi kendini yenilemesi, çoğalması ve farklılaşması [56].

Bir dokudan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam şartlarında, uygun uyarı verildiğinde farklı doku hücrelerine dönüşebildiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu kavram, plastisite (transdiferasyon) olarak tanımlanmıştır [58]. Kök hücreler, totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır [59]. İlk embriyonik hücre olan sperm ve oositin fertilizasyonu sonucu meydana gelen zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek yetenektir ve bu hücreye her hücreye farklılaşabilen 'totipotent hücre' denir. Totipotent hücre terimi, erken embriyonik dönemde 5. güne kadar olan tüm blastomerler için geçerlidir. Totipotent kök hücreler tüm hücre tiplerine farklılaşmanın yanı sıra, plasenta ve amniyon kesesi gibi embriyo dışı dokulara da farklılaşabilirler. Totipotent kök hücreler, gelişimin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşmektedirler [60]. Pluripotent kök hücreler, pre-implantasyonun 5. gününde oluşan blastosist aşamasındaki hücrelerdir. Blastosist, embriyo dışı tabakaları oluşturacak olan trofoblastik hücreler, blastosöl ve iç hücre kitlesinden oluşmaktadır. Embriyonik kök hücrelere (EKH), blastosisteki iç hücre kitlesi (embriyoblast hücreleri) kaynaklık eder ve bu hücreler pluripotent kök hücrelerdir. [61]. Ayrıca, gastrulasyon sonucu gelişen ektoderm, endoderm ve mezoderm hücreleri pluripotent özelliğe sahip kök hücreler olup gelişimin ilerlemesiyle birlikte herbiri somatik hücrelere farklılaşabilir [62].

'Multipotent kök hücreler', gelişimin ileri evresine (fötal, prenatal, postnatal, infertil ve çocukluk dönemleri) ait kök hücreler olup, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler (örn. hematopoetik kök hücre) ve yetişkin (dokuya özgü) kök

hücelere dönüşebilirler. Unipotent kök hücreler ise, sadece bir hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir (örn. Kas dokusundaki satellit hücreleri). [63]



Şekil 2.2.2. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli [64]

Multipotent hücreler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar. Başta kemik iliği olmak üzere vücudumuzun çeşitli organlarında ve bu organların belirli doku bölgelerinde lokalize olan, gerektiğinde kendini çoğaltıp, farklılaşabilen, multipotent kök hücrelere 'Yetişkin Kök Hücreler' (YKH) denir. YKH, doku ya da organa özel doku bütünlüğünün devamını sağlayan kök hücrelerdir [63]. Multipotent bir kök hücre olan yetişkin kök hücreleri, totipotent ve pluripotent kök hücrelerle karşılaştırıldığında, daha az sayıda hücre türüne farklılaşma kapasitesine sahiptirler [60]. Bu özelliklerinden dolayı, prekürsör (öncü veya progenitör) hücre olarak isimlendirilirler. YKH, retina, akciğer, kalp kası, iskelet kası, barsaklar, böbrek, dalak, kemik iliği, kan ve deri gibi dokuların oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler [65]. Ayrıca, sahip oldukları asimetric hücre bölünme potansiyeliyle, hemen hemen sınırsız bir şekilde kendilerini yenileme kabiliyetine de sahiptirler [66].

2.2.1. Kök Hücre Tipleri

2.2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Memeli embriyoları, bütün omurgalıların embriyoları gibi birbirine benzer görünümdeki blastosit, gastrula ve nörula evrelerini geçirir. EKH'ler, döllenmeden birkaç gün sonraki blastosit aşamasındaki iç hücre kitlesinden izole edilmektedirler.

Bu aşamada blastosist, plasentayı oluşturacak olan ve dış tabakayı oluşturan trofoblast hücreleri ile trofoblast hücrelerine komşu olan iç hücre kitlesinden oluşmaktadır. Bu iç hücre kitlesinden izole edilen EKH'ler pluripotent özelliktedirler. *In vitro*'da, sınırsız olarak çoğaltılıp istenilen her hücre tipine farklılaştırılabilmektedirler [67]

2.2.1.2. Uyarılmış Pluripotent Hücreler (iPS)

2006 yılında K.Takahashi ve S.Yamanaka'nın tarihi keşfi kök hücre alanında çok önemli bir devrin başlangıcı olmuştur. Farklılaşmış dermis fibroblastlarının farklılaşma programı bir dizi transkripsiyon faktörünün (Oct-4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) eksprese etmeleri sağlanarak (yeniden programlama) ve düşük verimli olsa da, somatik hücreler embriyo kök hücrelerinin bulunduğu pluripotent düzeye getirilmiş, yani farklılaşmada geriye gidilmiş ve hatta buradan farklılaştırılan yeni hücreler ile canlı organizma yeniden oluşturulmuştur. Bu hücelere uyarılmış pluripotent hücreler adı verilmektedir [68]. Yaklaşık bir yıl sonra iPS hücresi geliştirme teknolojisi insan hücrelerinde de başarıyla uygulanmıştır [69] ve aynı yıl farklı transkripsiyon faktörleri (Oct-4, Sox2, Nanog ve Lin28) kullanılarak insan hücre dizileri oluşturulmuştur [70].

2.2.1.3. Yetişkin Kök Hücreler (YKH)

Yetişkin kök hücreler, erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan multipotent kök hücreler olarak tanımlanır. Yetişkin organizmadaki çoğalan geçici hücrelerin öncüsü olan bu hücreler hasarlanan dokuların yenilenmesinde de görev alır [57].

Yetişkin kök hücreler, dokularda ve organlarda bulunurken öncelikli rolleri homeostazi devam ettirmektir. Bunun yanında organ veya doku için yaşam süresince gerekli olan kök hücre miktarını karşılamak için önemlidirler [71]. YKH'ler, çoğunlukla kemik iliğinde, kanda, gözün kornea ve retinasında, beyinde, iskelet kasında, dış pulpasında, karaciğerde, deride, ve pankreasta bulunur. YKH'ler genellikle, spesifik şekil ve fonksiyona farklılaşan progenitör ve prekürsör hücreleri oluşturmak için bölünürler [59].

Günümüzde üzerinde en çok çalışılan YKH tipleri hematopoetik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH), nöral kök hücreler (NKH) ve endotel kök/öncü hücreleridir [57].

2.2.1.3.1. Hematopoetik Kök Hücreler

Erişkin bir insanda hematopoetik kök hücreler (HKH); kan trombositlerini ve diğer olgun kan hücrelerini, her saatte yaklaşık 1×10^9 kırmızı kan hücresi ve 1×10^8 beyaz kan hücresini yaşam boyu kesintisiz olarak oluşturur. HKH bunu başarmak ve sayısını korumak için kendisini yenilemelidir. Yani bir yandan türevlerine farklılaşmalı,

bir yandan da kendi özelliklerini koruyacak olan yavru hücreleri üretmelidir. HKH hematopoetik homeostazı sürdürmek için çok sayıdaki dış uyarana birlikte yanıt vermelidir. Dolayısıyla HKH, kan hücreleriyle ilgili farklılaşmanın söz konusu olduğu hiyerarşik sıralamada en baştaki hücredir [59].

Hematopoez memelilerin gelişim sürecinde, önce ilkel, daha sonra kalıcı kan yapımı olmak üzere birbirini izleyen iki aşamada ortaya çıkar. Her ikisi de özgün hücrel ve moleküler düzenleyicilerin yer aldığı, zaman ve yerleşim açısından farklı evrelerdir. İlkel kan hücreleri prenatal yaşamın erken evrelerinde embriyo dışı hematopoez bölgelerinden embriyo içi hematopoez bölgesine geçiş ile meydana gelir. Embriyoda hematopoez ilk olarak Aort-Gonad çıkıntısı-Mezonefroz (AGM) bölgesinde dördüncü haftada ortaya çıkar, daha sonra fetüs karaciğerine ardından da kemik iliğine geçer [57].

Günümüzde çeşitli hastalıkların tedavisinde gerektiğinde uygulanabilen HKH transplantasyonu için kök hücreler sıklıkla kemik iliği veya periferik kandan elde edilirken; kordon kanı, üçüncü bir HKH kaynağını oluşturmaktadır. Gebelik boyunca anneye fetüs arasındaki bağlantıyı sağlayarak bebeğin besin ile oksijen gereksinimini karşılayan göbek kordonunda yer alan bu kan, HKH yönünden oldukça zengindir. Geçtiğimiz dönemlerde, doğumun ardından çöpe atılan göbek kordonu bu nedenle artık tedavi amacıyla kullanılan bir kök hücre kaynağı haline gelmiştir. Kordon kanı, kemik iliği ve periferik kan gibi dokularla karşılaştırıldığında daha uzun telomere ve dolayısıyla yüksek proliferatif kapasiteye, başka canlılarla yüksek uyum gücüne sahip hücreler içermesi nedeniyle, daha avantajlıdır. Fakat tek bir vericiden toplanabilen kan miktarının sınırlı olması kordon kanının dezavantajıdır [72].

2.2.1.3.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkim terimi epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve daha sonra fetüsün yaşamında önemli yer tutan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir. Genellikle mezoderm tabakasından köken almaktadır. Bu dokuyu oluşturan hücreler; fenotip olarak, çevresindeki gevşek yapılı ve hücre matris ortamı içinde nispeten serbest hareket eden çok yüzlü, ince uzun uzantılı hücrelerdir [57].

HKH'nin keşfinden kısa süre sonra *Friedenstein ve ark.* farede kemik iliği stromasını bir başka dokuya naklettiklerinde kemik, yağ, kıkırdak ve retikulum hücrelerine dönüşebileceğini göstermişlerdir [73]. Bu bulgu kemik iliğinde hematopoetik olmayan bir grup öncü hücrenin bulunduğunu ortaya koymuştur. Bu hücrelerin etkinliği daha sonra HKH'nin etkinliğini ölçmede kullanılan yöntemin bir benzeri olan fibroblast kolonisi oluşturan birim (CFU-F) etkinliğiyle ölçülmüş ve bu hücrelerin fibroblastların öncüsü hücreler olduğu öne sürülmüştür [74]. Temel olarak bu hücreler plastik yüzeye yapışmaları ve in vitro olarak çoğaltılabilmeleriyle

tanımlanmışlardır. Bu hücreler tek bir koloniden ayrıştırılarak *in vitro* olarak osteoblast, adiposit ve kondrosite farklılaştırılmıştır [75]. Birden fazla hücre serisine farklılaşabilmeleri(multipotensi) ve *in vitro* çoğalabilmeleri (kendilerini yenileme), yani kısaca kök hücre özelliği göstermeleri nedeniyle bu hücreler mezenkimal kök hücreler (MKH) olarak adlandırılırlar [76, 77].

Genel olarak, MKH'ler oldukça heterojendir. Bu yüzden, MKH'lerin izolasyonu için sadece spesifik hücre yüzey belirteçleri kabul görmemiştir. Bunun yerine, MKH'lerin fonksiyonel özellikleri, multipotent farklılaşması ve fenotipik belirteçlerin kombinasyonunu kapsayan *in vitro* karakterlerinin birleşimiyle tanımlanır [78]. Hücrelerin MKH olarak değerlendirilmesi için hücre popülasyonunun minimal kriterleri şunlardır: (1) Kültürde izole edilen hücrelerin plastik adherensi, (2) hücre kültüründe CD105, CD73 ve CD90 belirteçlerinin ekspresyonunun %95'ten fazla olması, (3) CD34, CD45, CD14, veya Cd11b, CD79 α ya da CD19 ve HLA-DR belirteçlerinin ekspresyonlarının çok düşük olması veya olmaması, (4) MKH'lerin kemik, yağ ve kıkırdığa farklılaşmaları gerekmektedir [7].

MKH'ler genellikle kemik iliğinden izole edilmelerine rağmen, plasentadan, adipoz dokudan, periosteumdan, iskelet kasından, dermisten, diştten, perisitten, trabeküler kemikten, artiküler kıkırdaktan, kordon kanından, karaciğerden, dalaktan ve timustan ve çeşitli diğer dokulardan da elde edilebilirler [79, 80]. MKH'ler farklı kaynaklardan elde edilebilmelerine rağmen, aralarında proliferasyon kinetiği, farklı hücre hatlarına farklılaşma kapasitesi ve gen aktivasyon kapasitesi gibi özelliklerinde farklılık yoktur [7].

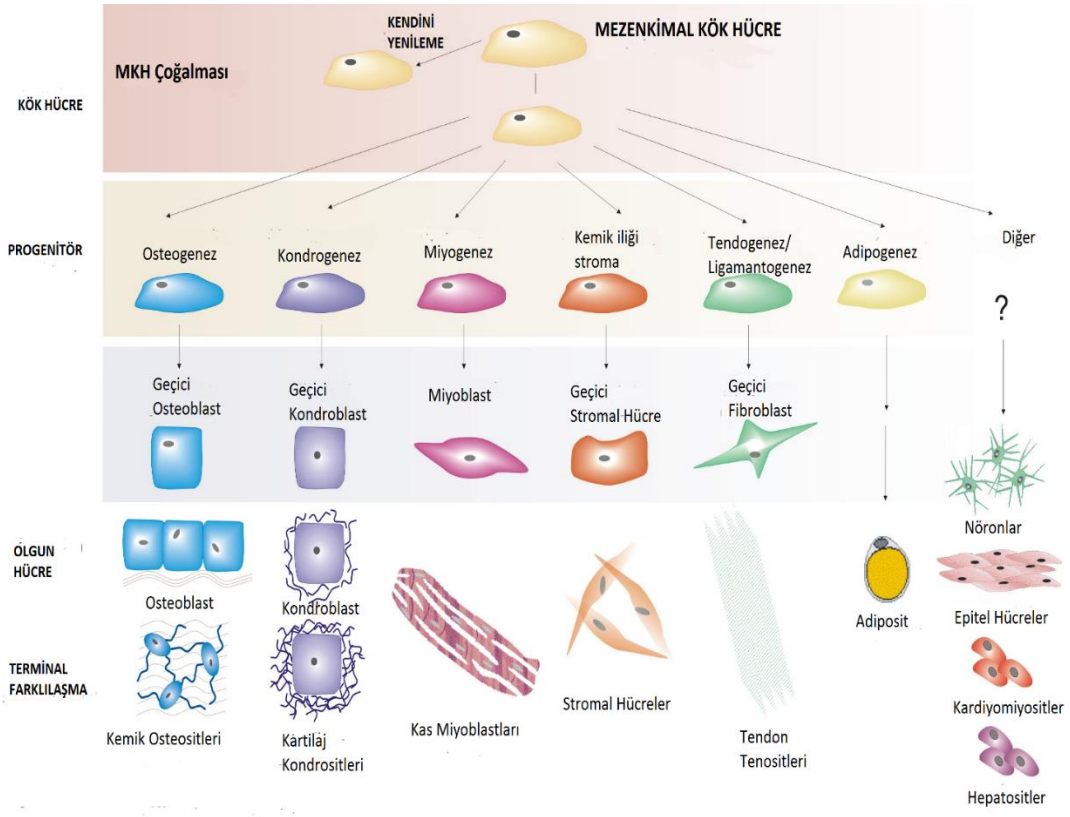
MKH'nin Elde Edildiği Başlıca Yetişkin Doku Tipleri	MKH'nin Farklılaşabildiği Başlıca Hücre / Doku Tipleri
Kemik iliği	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, adipoz, sinir
Adipoz doku	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, sinir
Plasenta	Kemik, kıkırdak, kemik iliği, kas, sinir
İskelet kası	Kemik, kıkırdak, tendon, düz ve çizgili kas, sinir
Beyin	Kas, sinir
Saç folikülü	Deri, düz kas, adipoz, beyin
Kornea, retina, pankreas, karaciğer, amniyotik sıvı	Kemik, kıkırdak, tendon, sinir, v.b.

Tablo 2.2.1.3.2. MKH kaynağı dokular ve MKH'lerin farklılaştıkları doku tipleri [79, 80]

MKH'ler kemik iliğinde çekirdekli hücrelerin çok küçük bir fraksiyonu olarak bulunur ve toplam popülasyonun sadece %0.01-0.1'ini oluştururlar [75]. MKH'ler doku kültüründe yüksek oranda bulunurlar ve izole edilebilirler. Bununla birlikte, spesifik şartlar altında farklılaşmaları için indüklenebilirler. Fibroblastik morfolojiye sahiptirler ve iğ şekillidirler. Uygun ortam koşulları altında, koloni oluşumunu sağlamak için kültür zeminine yapışırlar. Hücre kültüründe MKH'lerin çoğalması için genellikle serumla desteklenen bazal medyumlar kullanılır ve MKH farklılaştırması için büyüme faktörleri ilave edilebilir [2].

MKH'ler kültürde yüksek derecede çoğalma potansiyeline sahiptir. Bazı MKH kültürleri on beş kereden fazla pasajlanabilirken, diğer kök hücre tiplerinin bazıları ancak dört pasaja kadar gidebilmektedir. MKH'ler, *ex vivo*'da yüksek çoğalma potansiyeline rağmen, telomeraz aktivitelerini ve normal karyotip yapılarını kaybetmezler. Bununla birlikte; aşırı pasajlama yapıldığında senesenslerinin belirtileri ve apoptoz görülebilmektedir [81].

MKH'lerin kendilerini yenileme kapasiteleri vardır ve bu da onların klonojenik özelliklerini ve farklı hücre hatlarına farklılaşma potansiyellerini yansıtır. Ölümsüz olmamalarına rağmen, büyüme ve pluripotent potansiyellerini devam ettirerek kültürde pek çok kez bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Osteositlere, kondrositlere ve adipositlere farklılaşmanın yanında hematopoezi destekleyen stromal hücreleri de meydana getirebilirler [75]. MKH'lerin miyositlere ve kardiyositlere farklılaşmalarının yanında, mezodermal orijine sahip olmayan hepatositlere ve nöronlara bile farklılaşabilirler [82].



Şekil 2.2.1.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin farklılaşma potansiyeli [83].

MKH'ler kültür şartlarından, özellikle de büyüme faktörlerinden oldukça etkilenirler. Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) süper ailesi, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), Platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve Wnt gibi büyüme faktörlerinin MKH'ler üzerinde düzenleyici etkileri vardır [78].

MKH'lerin bir diğer önemli özelliği, uzun-sürelili göçü ve immün cevabın gelişmesinden sonra bile çeşitli dokulara yerleşebilmeleridir. İmplantelenen MKH'ler, doku hasarından sonra salınan faktörlerin yardımıyla hasarın farklı bölgelerine göç edebilirler. Bu özellik kemik kırıklarında, miyokardiyal enfarktüste ve iskemik serebral hasarda gözlenmiştir. MKH'lerin rejeneratif tıp ve doku mühendisliği için yüksek potansiyele sahip olması, kendilerinin terapötik değerlerini arttırmaktadır [81].

Klinik denemelerde, MKH'ler için genellikle erişkin kemik iliği kullanılır. Fakat kemik iliğinden mezenkimal kök hücreleri elde etmekte bazı sorunlarla karşılaşılabilir. Eldesi zordur ve invaziv tekniklerin kullanılması gerekir. MKH'lerin kemik iliğindeki yüzdesi düşüktür ve yaşla birlikte sayısında azalma meydana gelmektedir [84]. Bu yüzden plasenta, alternatif mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra, plasentanın doğum sonrası atılan bir doku olması, etik tartışmalara yol açmaması, izolasyonu sırasında cerrahi yöntemlere gerek olmayışı

nedeniyle oldukça iyi bir kaynaktır. Plasenta, kök ve progenitör hücrelerin önemli bir rezervidir [85].

2.3. Plasenta

Sadece memelilerde görülen plasenta, embriyo gelişimi sırasında koryon ve uterus mukozasının farklı şekillerde kaynaşması ile meydana gelen geçici bir organdır. Plasenta anne ile fetüs arasındaki bağlantıyı oluşturmaktadır. Plasenta fetüsün gelişip büyümesine olanak sağlayan organdır. Fetüsün yaşaması ve gelişimi için vazgeçilmez fonksiyonları vardır. Çeşitli hormonları sentezlemenin yanı sıra, maternal besin ve oksijenin fetüse ulaşmasından ayrıca fetal metabolik atıkların maternal dolaşıma verilmesinden sorumludur. Fetüsle anne arasındaki etkileşimler, özelleşmiş feto-maternal yüzeyin gelişimi ile mümkün hale gelir. Bu yüzeyin gelişimi plasantasyonun bir parçasıdır. Plasantasyon, plasentanın oluşumu ve gelişiminin yanısıra organı desteklemek üzere ilişkili maternal dokuların anatomik modifikasyonlarını da içerir. Plasenta ayrıca, fetüsü korucu bir bariyer olarak fonksiyon görür. Fetüs, zararlı kimyasallardan ve immunolojik reddin plasentanın varlığıyla korunur. Plasenta sadece mekanik bir bariyer ya da pasif bir transport organı değildir; iki yönlü transfer sürecini kontrol eder. Fetüse ulaştırılacak olan besinleri modifiye eder ve kendi aktivitelerini desteklemek için kendi enerji metabolizmasına sahiptir. Plasenta, fetüsün sağlıklı gelişimi için maternal metabolizmayı etkileyerek hormonların sentezini gerçekleştirir [86-91].

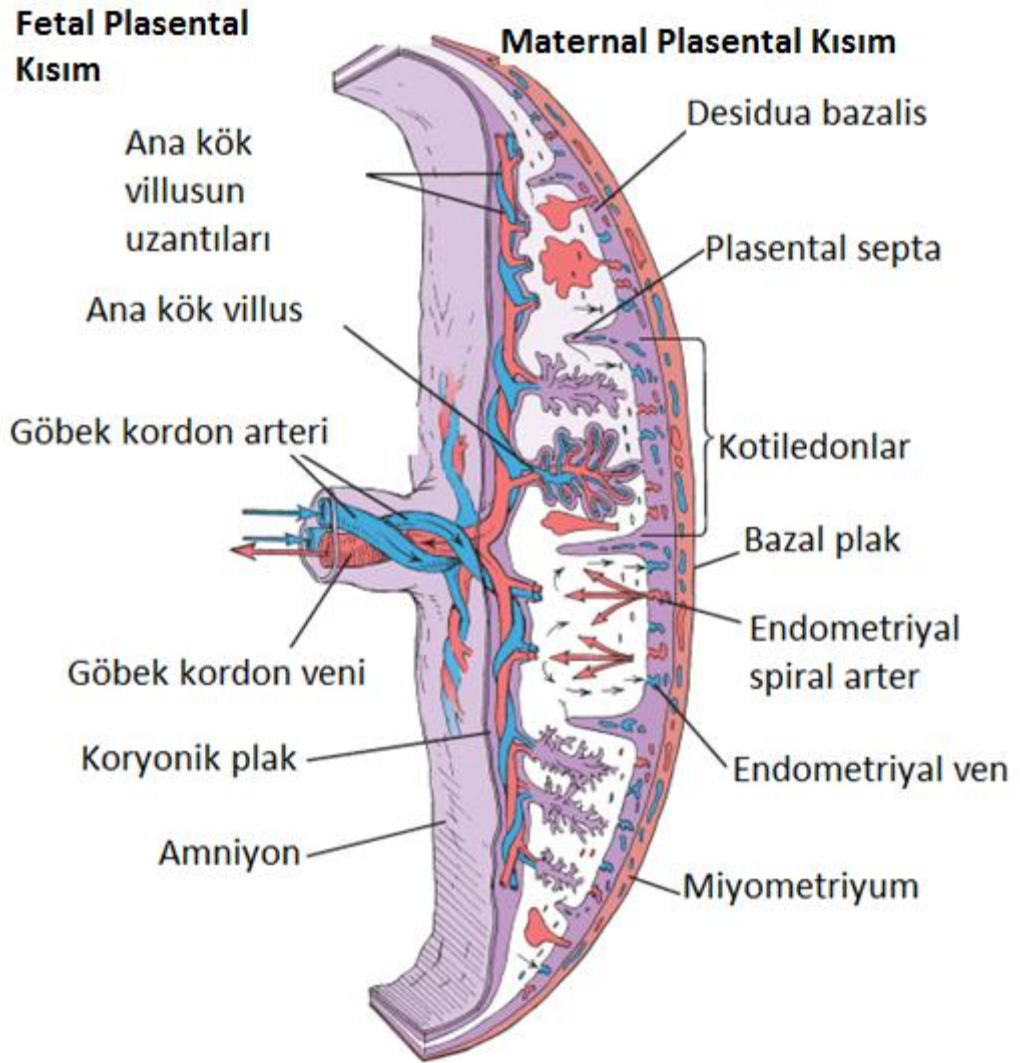
2.3.1. Term Plasentanın Yapısı

İmplantasyonun tamamlanmasından 7-8 gün sonra plasenta gelişmeye başlar. 5. aya kadar insan plasentası organizasyonu, fonksiyonu, biçimi ve büyüklüğü ile tam bir olgunluğa erişir. Bu durumunu gebeliğin sonuna kadar korur. Term plasenta, %90 oranda disk benzeri, yuvarlak ya da oval bir organdır. Plasentanın ortalama çapı 22cm, merkezi kısmının kalınlığı ortalama 2,5cm ve ağırlığı 470 gr'dır. 4. ayda plasenta yaklaşık 100gr ağırlığındadır ve olgun yapısını kazanmıştır. Term plasentada iki ayrı bölüm vardır:

- Maternal kısım
- Fetal kısım [94]

2.3.1.1. Maternal Kısım

Anneye ait olan bu kısım, plasental septumlar ve bazal plaktan (desidua bazalis) oluşur. Plasental septalar, fibrinoid ve çeşitli hücrelerden meydana gelmiş, bazal plaktan intervillöz aralığa doğru uzanan, hiçbir zaman koryonik plağa ulaşmayan ve plasental villus ağacını tam bölmeyen düzensiz yapılardır. Plasental septaların oluşması, gelişmenin 6-8. haftalarından itibaren belirir, gebelik yaşına bağlı olarak gelişirler. Bazal plak büyümesine uterus duvarı uyum sağlayamaz, bazal plak katlantılar yaparak septaları oluşturur. Villöz aralık içine doğru uzanan, plasental villus ağacını kısmen bölmelere ayıran septalar, aynı zamanda demirleyici villusların tutundukları çıkıntılar olarak da kabul edilir [92].



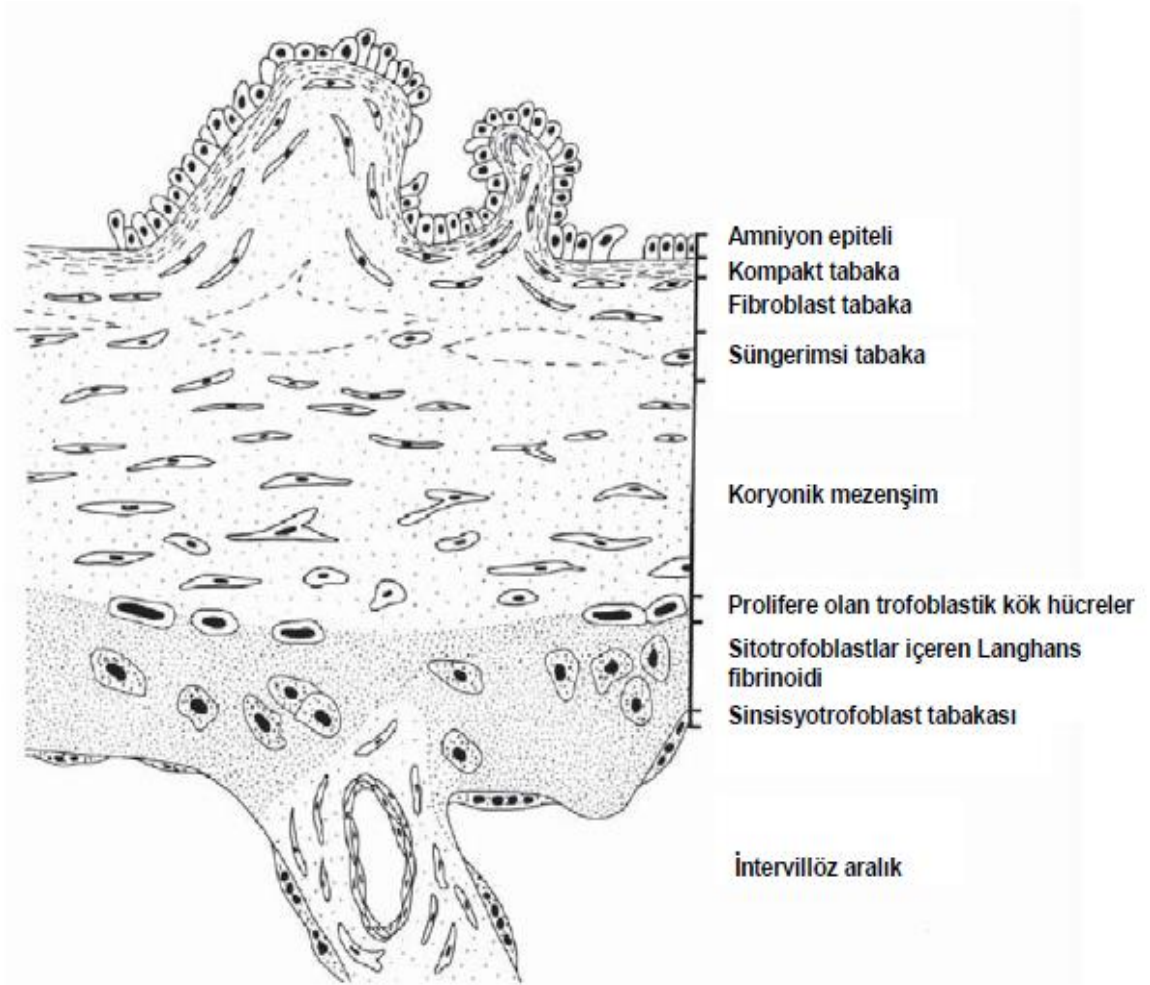
Şekil 2.3.1.1. İnsan plasentasının maternal ve fetal kısımlarının şematik diyagramı [93]

2.3.1.2. Fetal kısım

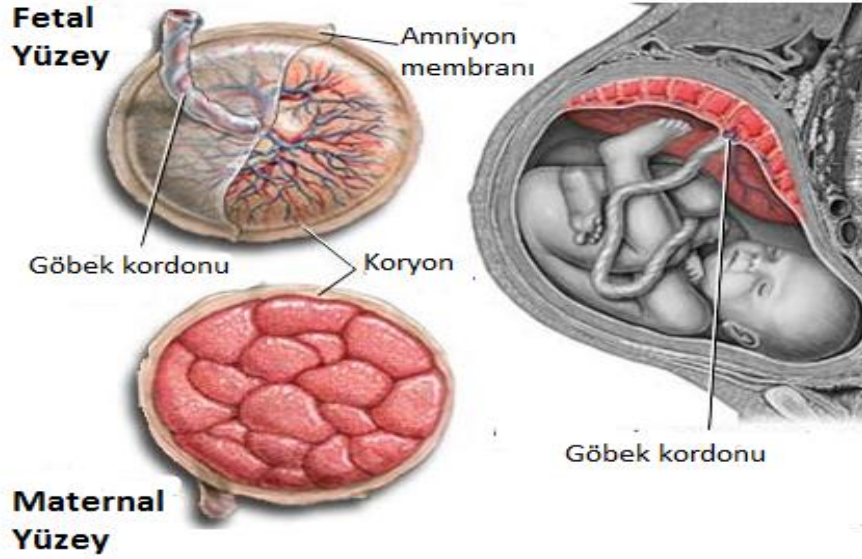
Koryon villuslarının oluşturduğu bu bölüm fetüse ait olup koryon frondosumdan gelişir. Yapının fetal yüzü amniyon membranı ile örtülüdür. Intervillöz boşluğa bakan yüzü ise sinsisyotrofoblast ve sitotrofoblast hücrelerinin oluşturduğu villuslardan oluşur. Anneden gelen temiz kan uterusun spiral arterleri ile oldukça düzenli aralıklarla intervillöz boşluklara açılır. Bu arterler lümenlerin açılma yerlerine doğru daralır. Temiz kan intervillöz boşluklara yüksek basınçla dökülür ve koryon ağacında bulunan küçük villuslara çarpar, villustaki kan ileri doğru itilir ve villusların dikleşmesi sağlanır[92].

İnsan plasentası fetal gelişimi, fetal beslenmesi ve immünolojik toleransta temel rol oynamasının yanı sıra, aynı zamanda önemli bir progenitör/kök hücre rezervidir. Plasental dokudan izole edilen hücrelerin fetal orijine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Fetal plaseenta; amniyon membranı(amniyon epiteli, kompakt tabaka, fibroblast tabaka, süngerimsi tabaka), koryonik mezenkimal bölge ve koryonik

trofoblastik bölgeye ayrılır. Bu bölgelerden değişik hücre popülasyonları izole edilebilir: insan amniyonik epitel hücreleri (iAEH), insan amniyonik mezenkimal kök hücreleri (iAMKH), insan koryonik mezenkimal kök hücreleri (iKMKH), insan koryonik trofoblast hücreleri (iKTH) [94].



Şekil 2.3.1.2.1. Plasentanın fetal kısmının yapısı [92]



Şekil 2.3.1.2.2.. Fetal ve maternal yüzeyler (<http://www.adamimages.com/Anatomy-of-a-normal-placenta-Illustration/PI7618/F4>)

2.3.2. Amniyon Membranı

İnsan amniyon membranı, fetal zarlardan köken alan plasentanın en iç katmanıdır. Yaklaşık olarak 0,02 mm ile 0,5 mm kalınlığındadır. Tek katlı mikrovilluslu kübik epitel, bazal membran ve avasküler stromal matriks olmak üzere başlıca üç tabakadan oluşur. Makroskopik olarak zarın; pürüzsüz, parlak, saydam, yapışkan olmayan epitel yüzü ile mat ve yapışkan olan stromal yüz olmak üzere iki farklı yüzü vardır. Amniyon membran epitelinin amniyon sıvısı ile temas eder. Epitel hücreleri çok sayıda hormon ve inflamasyon mediyatörü salgılayarak fetusun gelişimine katkıda bulunur. Stroma tabakası; yoğun bağ doku tabakası, fibroblast ve sünger tabakaları olmak üzere kendi içinde başlıca üç tabakadan oluşur. Yoğun bağ doku tabakası sıkı retiküler liflerden meydana gelen amniyon membranının en güçlü destek tabakasıdır. Fibroblast tabakası yoğun fibroblast ağı içeren amniyon membranının en kalın tabakasıdır. Süngerimsi tabaka ise koryonik membrana komşudur. [14, 95, 96].

İnsan vücudundaki en kalın bazal membran amniyon membranında bulunmaktadır. Bu özelliği sayesinde, klinikte -80° C’de dondurulup saklanmasına ve böylece epitel hücrelerinin uzun süre düzenli bir şekilde korunmasına ve canlı kalmasına olanak sağlar. Stroma; damarsız, düşük hücre yoğunluklu matriksten meydana gelmektedir. Tip 3 ve tip 5 kollajenin yanı sıra, tip 4 ve tip 7 kollajen, fibronektin, laminin 1 ve 5, fibroblast ve fibroblast dışı diğer büyüme faktörlerini de içermektedir. Elektron mikroskopik incelemede; epitel hücrelerin hemidesmosal bağlantılar ile bazal laminaya yapıştığı gözlenmektedir [95, 97].

Amniyon membran stromasında; çeşitli büyüme faktörleri, antianjiyojenik ve antiinflamasyon proteinleri, çeşitli proteaz inhibitörleri, steroid hormonları, hidrolitik enzimleri, oksidasyon-redüksiyon enzimleri içeren fetüsü koruyucu bir yapıdır. Epitelizasyonu hızlandıran, kollajen sentezini arttırıcı, adezyonu, yeni damar oluşumunu, skar gelişimini ve enflamasyonu azaltıcı, yara yüzeyinden protein ve sıvı kaybını önleyici, antibakteriyel etkileri vardır [96].

Amniyon membranı, kollajenden zengin mezenkimal tabakaya sahiptir [15]. İnsan amniyon membranı, farklı embriyonik kökene sahip iki hücre tipini içerir: Embriyonik ektodermden köken alan insan amniyon epitel hücreleri ve embriyonik mezodermden köken alan insan amniyon mezenkimal kök hücreleri [16]. Sonuç olarak, insan amniyon membranı (İAM) çeşitli klinik denemeler için kullanışlı progenitör hücre kaynağıdır [98].

In't Anker ve ekibi, amniyotik membranın osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya giden mezenkimal kök hücrelerden zengin olduğunu göstermişlerdir [17]. İnsan amniyon mezenkimal kök hücrelerin ekstraembriyonik mezodermden köken aldığı düşünülmektedir [99]. iAMKH'lerin plastisite yeteneği vardır. Fibroblast-benzeri şekilleri vardır. CD90, CD73, CD105 gibi spesifik hücre yüzey belirteçlerini %95'ten fazla oranda eksprese edebilirlerken, CD45, CD34, CD14, HLA-DR gibi hücre yüzey belirteçlerinin %2'den daha az oranda ekspresyonunu gösterirler. Osteojenik, adipojenik, kondrojenik ve vasküler/endotel gibi hücre hatlarına farklılaşma potansiyelleri vardır ve fetal orijinlidirler [94]. İnsan amniyotik membranından izole edilen mezenkimal kök hücreler, insan kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerle karşılaştırıldığında morfolojik olarak hiçbir fark gözlenmez. İnsan amniyotik membranından izole edilen kök hücrelerin immünofenotipik karakterleri kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerle uyum göstermektedir [18].

iAMKH'ler birinci, ikinci ve üçüncü trimesterden izole edilebilir [100]. iAMKH'ler maternal hücrelerin varlığını en aza indirmek için fetal yüzeyden ayrılan amniyondan izole edilir. Homojen iAMKH popülasyonu iki adım izlenerek elde edilebilir: küçük parçalara ayrılan amniyonun, epitel hücrelerden elimine edilmesi için tripsine maruz bırakılması ve kalan parçaların kollajenaz veya kollajenaz ve DNaz sindirimine bırakılmasıyla gerçekleştirilir. Term amniyonun her bir gram dokusundan yaklaşık 1×10^6 iAMKH elde edilebilir [101].

iAMKH'ler plastik yüzeye yapışabilir ve 5-10 pasaja kadar çoğaltılabilir. Daha önce yapılan çalışmalarda iAMKH proliferasyonunun 2.pasajdan sonra yavaşladığı belirtilmiştir [102]. Teorik olarak, amniyondan toplamda 5×10^8 iAMKH elde edilebilir [18] fakat pratikte başlangıç materyalinin her bir 100 cm^2 için yaklaşık 4×10^6 iAMKH elde edilebilmektedir [94].

iAMKH'ler *in vivoda* başarılı ve kalıcı olarak bir çok organ ve dokuya yerleşmektedirler. İnsan kimerizmi, insan amniyon hücrelerinin neonatal domuz ve sıçanlara intrapretonal veya intravenöz olarak transplantasyonundan sona böbrekte, beyinde, akciğerde, kemik iliğinde, timusta, dalakta, ve karaciğerde gösterilmiştir [103]

2.4. Üriner Sistem

Üriner sistem bir çift böbrek ve üreter ile tek mesane ve tek uretradan oluşur [104]. Üriner sistemin üç önemli görevi vardır: (1) süzme ve boşaltım ile kanın nitrojenli ve diğer artık metabolit ürünlerini temizlemek, (2) süzme ve boşaltım ile vücut sıvılarının ve elektrolitlerinin yoğunluğunu dengelemek, (3) geri emilim ile küçük molekülleri (aminoasitler, glukoz ve peptitler), iyonları ve suyu yeniden elde ederek kan homeostazını korumaktır.

Böbrek, renin enzimini üreterek kan basıncını düzenler. Renin anjiyotensinin aktif bileşen anjiyotensin II'ye dönüşümünü başlatır.

Böbrek, aynı zamanda endokrin bir organdır. Kemik iliğinde, kırmızı kan hücre üretiminin bir uyarıcı olan eritropoietin'i üretir. Aynı zamanda kalsiyum metabolizmasının kontrolü ile ilgili bir vitamin D türeviden olan 1,25-hidroksikolekalsiferol'ü aktive eder [105].

2.4.1. Böbreğin Gelişimi

Üriner ve genital sistem embriyoda yakın ilişki içinde gelişirler. Bu yüzden ürogenital sistem olarak adlandırılır [106]. Ürogenital sistem, embriyonun dorsal vücut duvarı boyunca yerleşen, intermediyer mezoderm'den gelişir. Embriyonun horizontal planda katlanması sırasında, bu mezoderm ventrale doğru çekilir [106, 107]. Bu sırada sölom boşluğuyla olan ilişkisini ve segmentasyonunu kaybeder, orijinal segment başına iki, üç ve hatta daha fazla boşaltım tübülü oluşturur. Sonuçta, segmente olmayan mezoderm'den, nefrojenik doku kordonlarını meydana getirir. Bunlar da boşaltım tübüllerini ve sölom boşluğunun arka duvarında her iki tarafta uzunlamasına yer alan ürogenital kabarıklıkları meydana getirir [108]. Bu doku daha sonra üriner ve genital sistemleri oluşturacaktır [107]. Üriner sistemi oluşturacak olan ürogenital kabartı kısmı "nefrojenik kordon" veya kabartı adını alırken, genital sistemi oluşturacak kısmı, "genital (gonadal) kabartı" olarak adlandırılır [107]. Dördüncü haftanın başında servikal bölgedeki intermediyer mezoderm, somitle olan bağlantısını kaybederek nefrotom adı verilen segmental hücre topluluklarını oluşturur [106, 108]. Bu ilkel boşaltım birimleri sadece rudimenter boşaltım tübüllerini meydana getirirler ve fonksiyon görmezler. İnsanlarda intrauterin yaşam boyunca, kranialden kaudale doğru, birbirinden farklı üç böbrek sistemi peşpeşe ve kısmen de üst üste binecek şekilde oluşur [108]. İlk olarak oluşan böbrek sistemi olan, pronefroz rudimenterdir ve fonksiyonel bir özelliğe sahip değildir.

2.4.1.1. Pronefroz böbrek

Pronefrozu, 7 çift pronefrik tübül ve kloakaya erişmek üzere embriyonun kaudal bölümüne doğru uzanan bir pronefrik kanal oluşturur [106]. Bu geçici, fonksiyonel olmayan yapılar insan embriyosunda ilk olarak dördüncü haftanın başlangıcında ortaya çıkarlar. Pronefrozlara, servikal bölgedeki 7-10 adet solid hücre topluluğu tarafından temsil edilirler [108]. Pronefrik duktus, kaudal olarak uzandıktan sonra kloaka'ya açılır. Rudimenter olan pronefrozlara ait yapılar, kısa bir süre içinde dejenerasyona uğrarlar ancak, pronefrik duktuslardan çoğu, belirli bir süre kalır ve bir sonraki böbrek sisteminde bunlardan yararlanır [107].

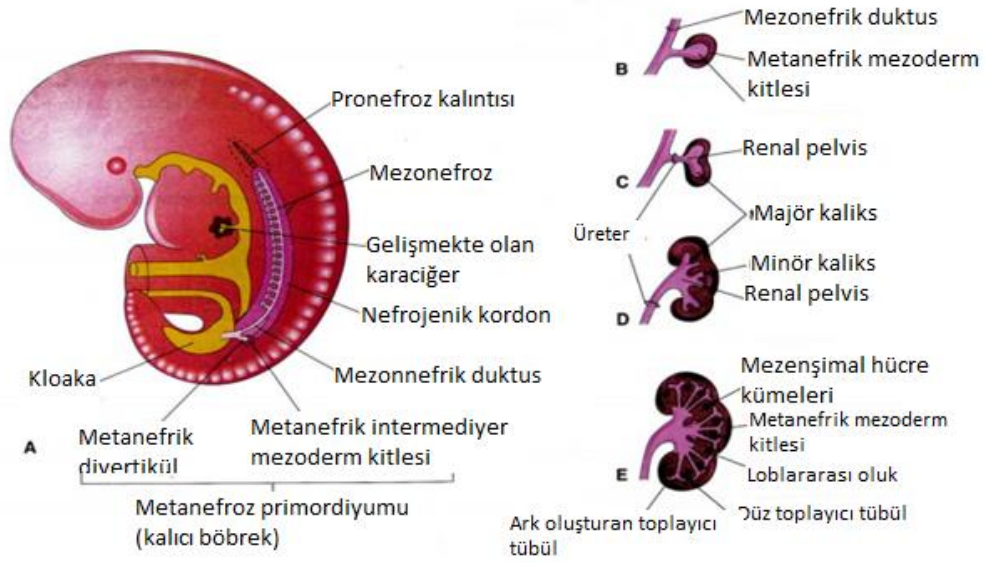
2.4.1.2. Mezonefroz böbrek:

Mezonefroz ve mezonefrik kanallar, üst torasik ile üst lumbal (L3) segmentlerin intermediyer mezodermden gelişirler [108]. Oldukça genişlemiş ve uzamış boşaltıcı organlar olan mezonefrozlara, dördüncü haftanın sonuna doğru, rudimenter yapılar olan pronefrozlara kaudalinde ortaya çıkarlar. Bu yapılar daha iyi gelişmiştir ve kalıcı böbrekler oluşuncaya kadar ara böbrekler olarak, embriyoda fonksiyon görürler [107]. Bu tübüller boyca hızla uzarlar, S şeklinde bir halka haline alırlar ve medial uzantılarının ucunda bir glomerulus oluştururlar. Burada tübüller, Bowman kapsülünü oluştururlar. Kapsül ve glomerül birlikte renal korpuskülü meydana getirirler. Tübülüs lateralde, mezonefrik veya Wolff kanalı olarak bilinen longitudinal toplayıcı kanala girer. İkinci ayın ortasında mezonefroz, orta hattın her iki yanında büyük ve oval şekilli bir organ haline gelir [108]. Mezonefrik böbrekler glomerüller ve mezonefrik tübüllerden oluşmuşlardır. Mezonefrik tübüller, pronefrik duktustan köken alan mezonefrik duktusa açılırlar. Mezonefrik duktus da kloakaya açılır. Mezonefrozlara, birinci trimesterin sonuna doğru dejenerer olurlar [107].

2.4.1.3. Metanefroz böbrek:

Metanefroz veya kalıcı böbrekler, 5. haftada belirirler ve yaklaşık 4 hafta sonra da fonksiyonel hale gelirler [107, 108]. Mezonefrik sistemde olduğu gibi bu sistemin boşaltım birimi de metanefrik mezodermden gelişir. Ancak, kanal sisteminin gelişimi diğer böbrek sistemlerinden farklıdır [108]. Kalıcı böbrekler, mezoderm kaynaklı iki parçadan oluşur: Metanefrik divertikül (üreterik tomurcuk) ve intermediyer mezodermin metanefrik kitlesi (metanefrojenik blastem). Mezonefrik kanalın bir çıkıntısı olan tomurcuk; üreterler, renal pelvis, renal 4 kaliksler, toplayıcı kanallar ve toplayıcı tübülleri oluşturur [106-108]. Bu tomurcuk, metanefrik doku içine penetre olur. Penetrasyonun ardından üreter tomurcuğu genişleyerek primitif renal pelvisi oluşturur ve gelecekteki ana kaliksleri oluşturmak üzere kranial ve kaudal parçalara ayrılır. Kalikslerin her biri, metanefrik dokuya penetre olurken iki yeni tomurcuk oluşturur. Bu tomurcuklar 12 ve daha fazla sayıda tübül oluşturana kadar bölünmeye devam ederler. Bu sırada, periferde de 5. ayın sonuna kadar bir miktar tübül daha oluşur. İkinci generasyondaki tübüller genişleyerek, üç ve dördüncü generasyona ait tübülleri absorbe ederek renal pelvisin minör kalikslerini

oluştururlar. Gelişimin daha sonraki evrelerinde, 5. ve takibeden generasyonun toplayıcı tübüleri hatırı sayılır şekilde boyca uzarlar ve minör kaliksler içine doğru toplanarak renal piramidleri meydana getirirler [108]. Oluşan kollektör tübüller, distal uçtan bir metanefrik doku şapkası ile örtülüdür. Bu metanefrik doku içindeki hücreler, tübüllerin indükleyici etkisiyle renal vezikül olarak bilinen küçük kesecikleri oluştururlar ve daha sonra bunlardan küçük tübüller meydana gelir. Bu tübüller, glomerül adı verilen kapiller yumaklarıyla birlikte nefronları oluşturur [108]. Ara mezodermin kaudal parçasındaki metanefrojenik doku; nefronların geri kalan proksimal ve distal tübüleri, Henle kulbu ve böbrek cisimciğinin Bowman kapsülü kısımlarını oluşturur [106]. Bowman kapsülü, her nefrona ait proksimal ucun glomerül tarafından derin şekilde yaylandırılmasıyla sağlanır. Tübülün distal ucu ise, Bowman kapsülünden toplayıcı kanallara geçişi sağlayacak şekilde, toplayıcı kanallardan biriyle ilişki kurar. Boşaltıcı tübüllerin uzamaya devam etmesi sonucu proksimal kıvrımlı tübüller, Henle halkası ve distal kıvrımlı tübüller meydana gelir [108]. Toplayıcı tübüllerin son dallarının distal uçları başlangıçta metanefrojenik dokunun hücre kümeleri ile sarılmıştır. Bu hücre kümeleri, merkezi bir lümene sahip olan ilkel tübüllere dönüşerek, daha sonra nefronları yapacak olan içi boş veziküller oluştururlar. Tek katlı epitel ile döşeli tübüller, dıştan devamlı bazal membran ile sarılır, uzar ve sonunda kıvrımlı erişkin yapısına ulaşır. Tübüllerin distal (serbest) uçlarını örten epitel, böbrek cisimciğini oluşturmak üzere yassılaştır ve glomerüler kapiller kümesi tarafından doldurulur. İlkel nefron ve toplayıcı tübül ile yan yana sıralanır ve iki yapı bir idrar yolu oluşturmak üzere kaynaşırlar [106]. Doğumda böbrekler, lobüle bir görünümde dir. Süt çocukluğu döneminde nefronların büyümeye devam etmesi ile bu lobüle görünüm kaybolur. Ancak nefronların sayısında bir artış olmaz [108]. Metanefroz veya kalıcı böbrek, birinci trimesterin sonunda fonksiyonel hale gelir. İdrar amnion boşluğuna geçer ve amnion sıvısıyla karışır. Bu karışım, fetus tarafından yutulur ve bebeğin sindirim sistemine girer. Burada emilerek kan dolaşımına geçer ve tekrar böbrekler tarafından amnion sıvısına atılır. Fetal yaşam süresince yıkım ürünlerinin atılımından plasenta sorumlu olup, böbreklerin bu görevde fonksiyonu bulunmamaktadır. [107, 108].



Şekil 2.4.1.3. Metanefroz (kalıcı böbrek)'ün gelişimi, A: 5 haftalık embriyonun lateral görünümünde metanefroz primordiumu. (B-E): metanefrik divertikülün (üreterik tomurcuk) gelişme safhaları ve (5.-8. haftalar arası) üreter, renal pelvis, kaliksler ve toplayıcı tübüllerin gelişimi.

2.4.2. Böbreğin Histolojisi

Böbrekler columna vertebralis'in iki yanında, peritonun arkasında, karın arka duvarına yaslanmış olarak bulunurlar. Fasülyeye benzer bir görünümüleri vardır. Her bir böbreğin ön ve arka iki yüzü, konveks bir dış kenarı ile konkav bir iç kenarı vardır [109, 110]. İç kısmında; üreterler, kan damarları, lenfatikler ve sinirlerin geçtiği böbreğe giriş ve çıkışların yapıldığı dik bir yarık olan hilum bulunur [106, 109, 110]. Ortalama ağırlıkları erkeklerde 150 gr ve kadınlarda 135 gr'dır. Karaciğer nedeniyle sağ böbrek sol böbrekten yaklaşık 2 cm daha aşağıda yer almaktadır [111].

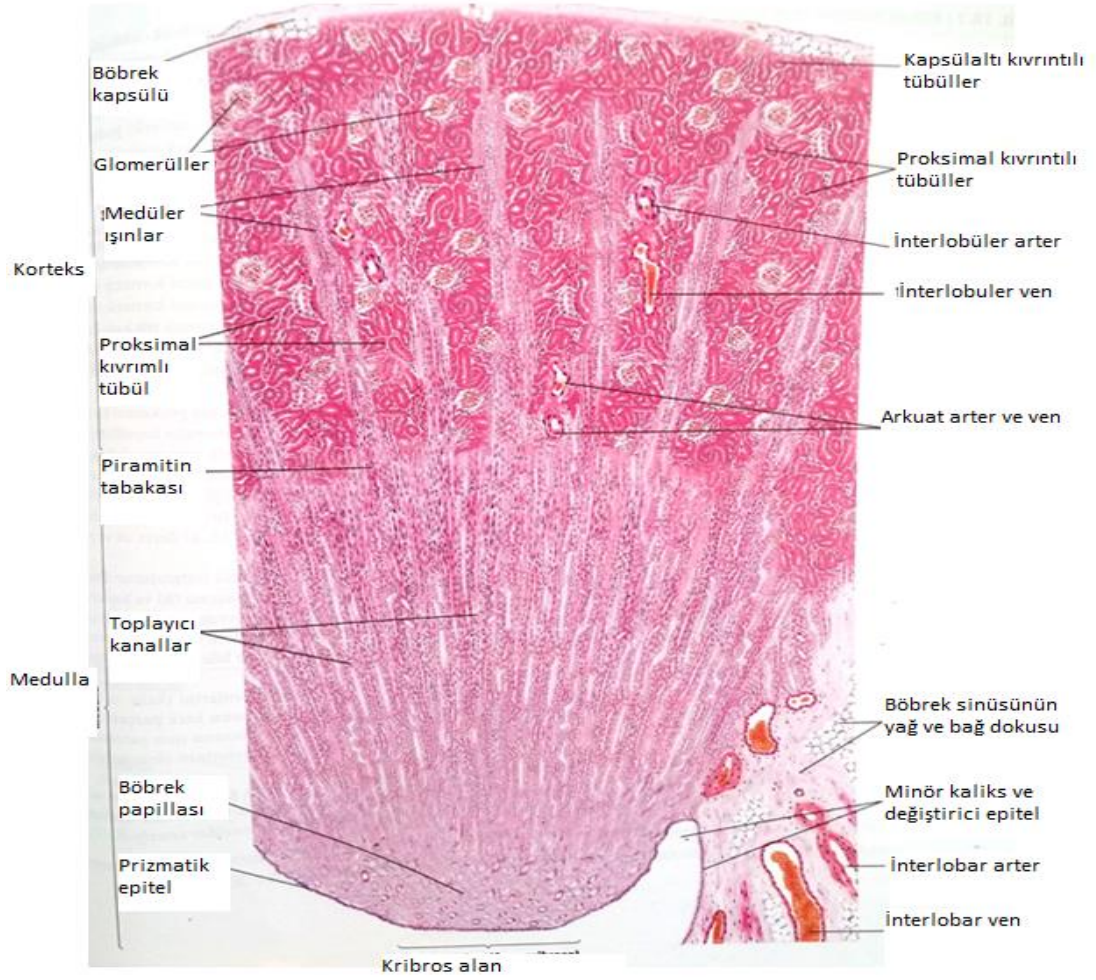
Böbrekler sıkı bağ dokusundan yapılmış ince bir kapsül ile sarılmıştır. Parankima; dışta koyu kırmızı korteks, iç kısımda daha açık çizgili medulla ve siğ bir boşluk olan renal sinüs içinde yer alan huni şekilli pelvis olarak ayrılır [106].

Kapsül: Böbreğin yüzeyi bağ doku karakterinde bir kapsülle örtülmüş durumdadır. Bu kapsül iki farklı katmandan oluşur: dışta bulunan katman fibroblastlar ve kollajen liflerce zengindir, iç kısımda ise miyofibroblast hücre bileşenleri yer alır. Miyofibroblastların kasılma yeteneği, böbreğin fonksiyon görmesi esnasındaki basınç ve hacim varyasyonlarına karşı böbreğin korunmasında yardımcı olmaktadır. Fakat spesifik özellikleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Böbreği saran kapsül hilumdan içeri doğru giriş yapar. Burada sinüs bir bağ doku tabakası ile örtülmüş, kalikslerin ve renal pelvisin duvarları da sürekli bir bağ dokusuyla astarlanmıştır [93]. Böbrek ve böbreküstü bezini en dıştan saran bağ doku karakterindeki örtü ise renal fasya adını

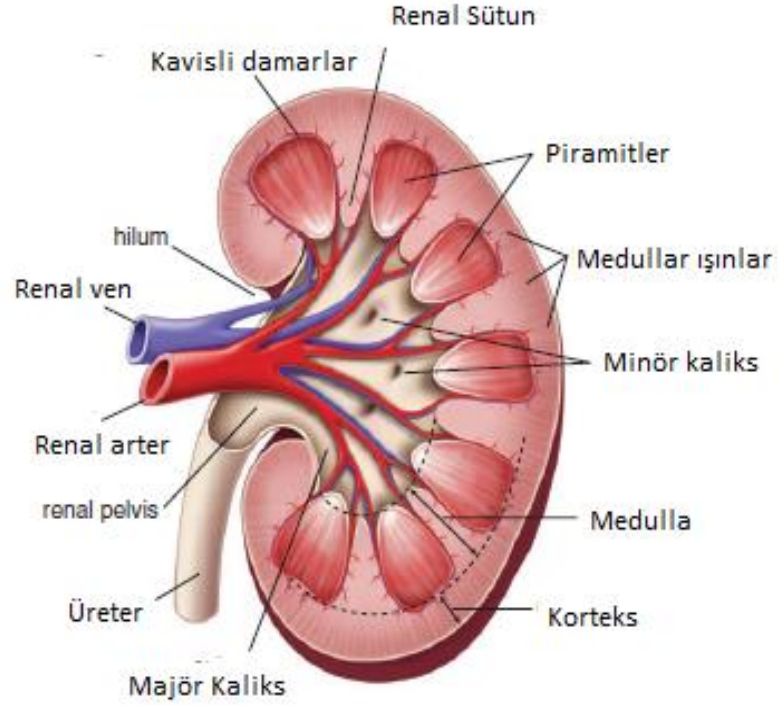
alır. Bu yaprak, hilumda renal damarların tunika adventisyası ile kaynaşmış durumdadır [109].

Parankima: Çıplak gözle taze bir böbrek incelendiğinde, farklı iki bölüm görülür. Kanın %90-95'inin geçtiği koyu renkli "korteks" kısmı ve %5-10'unun geçtiği soluk renkli "medulla"dır [93]. Medulla 12-15 konik renal piramitlerden oluşur. Bu piramitlerin her birinin korteksi sınırlayan geniş bir tabanı ve sinüse uzanan ve bir çıkıntı oluşturan tepesi (papilla) bulunur. Korteks parçaları renal sütunları oluşturmak üzere piramitler arası alanlara sokulurlar (Bertin kolonları). Üreterin yelpaze şeklindeki genişlemesi olan renal pelvis, en geniş yerinde iki ya da üç çanak benzeri majör kaliksleri oluşturur. Bunlar, her birine bir piramidin papillasının boşaldığı minör kalikslere ayrılır. Bir papilla ve onunla ilişkili parankima bölgesi böbrek lobu adını alır; her insan böbreği 12-15 lobdan oluşur. İdrar, piramitlerden ve kalikslerin içinden geçerek renal pelvise, oradan da böbreklerin dışına üreterlere akar [106]. Bir medulla piramiti, onu kaplayan korteks bölgesi ile birlikte bir böbrek lobunu oluşturur. Bu lobların kaynaşma bölgelerinden arta kalan yapılar halinde bulunan böbrek sütunları (Bertin sütunları) loblararası sınırı oluşturur [105]. Henle kulplarının ve toplayıcı kanalların paralel grupları, daha derindeki medulladan kortekse uzanan medulla ışınlarını oluşturur. Her medulla ışını ve onun kortikal parankiması bir böbrek lobülünü oluşturur [106].

Her bir böbrek 1 ile 4 milyon arasında nefron içerir. Her nefron genişlemiş bir bölüm olan renal cisimcik (veya böbrek cisimciği=Malpighi cisimciği), proksimal kıvrımlı tübül, Henle kulbunun ince ve kalın uzantıları ve distal kıvrımlı tübülden ve toplayıcı tübül ve kanallardan oluşmaktadır. Nefron, böbreğin işlevsel birimidir [104].



Şekil 2.4.2.1. Böbreğin Histolojik yapısı şematik görünümü [112].



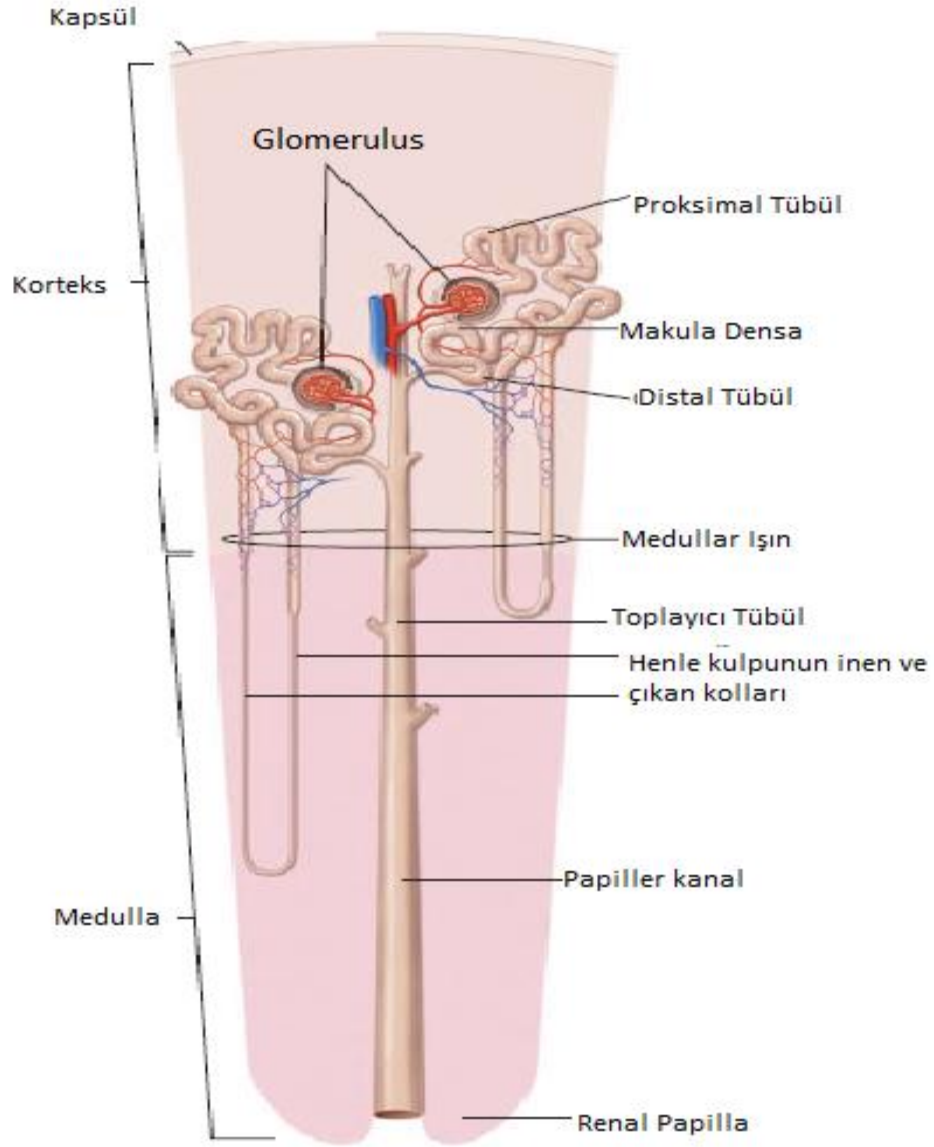
Şekil 2.4.2.2. Böbreğin genel düzenlenmesi[93]

Nefronlar, kortekste Malpighi cisimciklerinin yerleştiği yere göre; kortikal nefronlar ve jukstameduller nefronlar olarak ayrılırlar [106].

Kortikal nefronlar; Malpighi cisimcikleri korteksin dış kısmına yerleşmiş olan nefronlardır. Piramitlerin dış bölgelerine doğru uzayan kısa bir Henle kulbuna sahiptirler. Jukstameduller nefronlarda; Malpighi cisimcikleri meduller piramitlere yakındır. Bunlar piramitlerin iç bölgelerine doğru uzayan uzun Henle kulbuna sahiptir. İdrar konsantrasyon mekanizmasında özellikle rol oynarlar [105, 106]. Bir de buna ek olarak intermediyer nefronların varlığından bahsedilmektedir. İntermediyer nefronlarda ise Malpighi cisimcikleri korteksin orta bölgesindedir. Orta uzunlukta bir Henle kulbuna sahiptirler.

Nefron iki bileşenden oluşur: 1- Böbrek cisimciği (Malpighi cisimciği) 2- Böbrek tübülü

Böbrek tübülü birçok bölümden oluşur: Bunlar proksimal kıvrımlı tübül, Henle kulbu ve toplayıcı tübüle boşalan distal kıvrımlı tübüllerdir. Toplayıcı tübül, kortikal bölüm ile dış meduller ve iç meduller toplayıcı tübüller olmak üzere üç bölüme sahiptir: Henle kulbunun kalın inen ve kalın çıkan kolları sırasıyla proksimal ve distal kıvrıntılı tübüleri, Henle kulbunun ince koluna bağlar [104, 105]



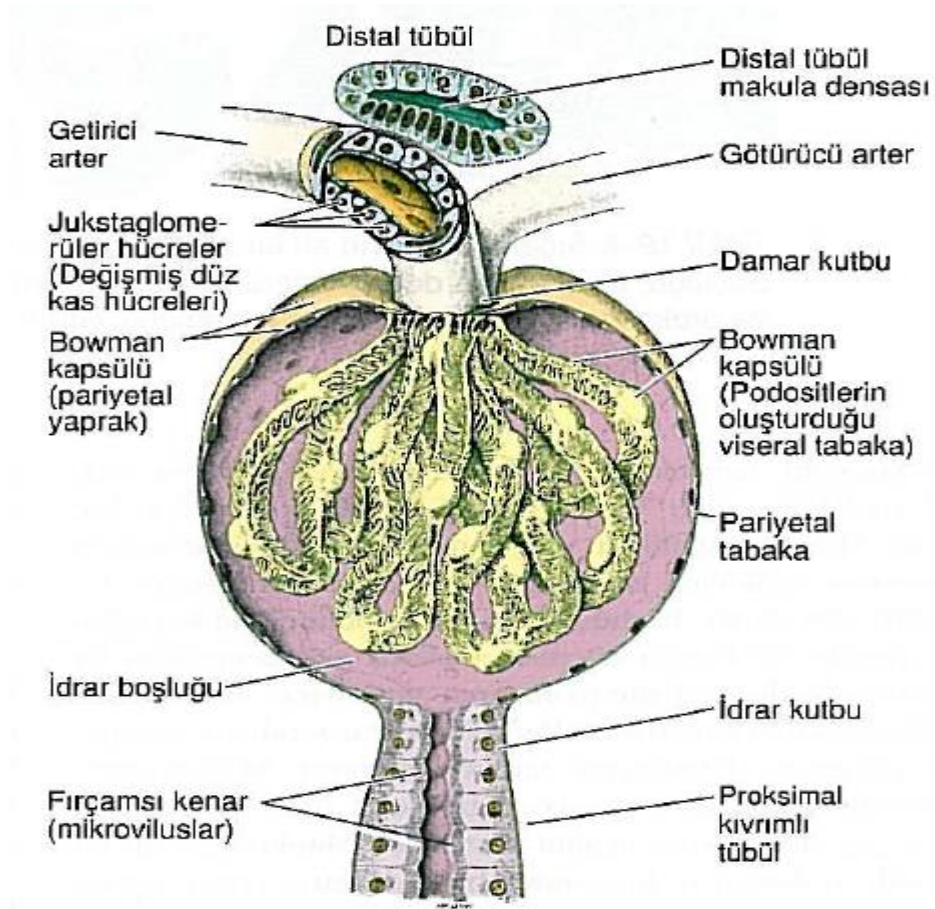
Şekil 2.4.2.3. Kortikal ve jukstamedüller Nefron ve buna bağlı toplayıcı kanal ve tübülün bölümleri [104].

Böbrek Cisimciği (Malpighi Cisimciği): Böbrek cisimciği, Bowman kapsülü denilen, epitelden oluşan çift duvarlı kese benzeri yapıdan ve glomerül kapiller kümesinden oluşur. Her renal cisimciğin çapı yaklaşık 200 μm 'dir. Bowman kapsülü glomerül kapillerindeki kandan süzülen filtratı alır. Bu kapsül iki tabakaya sahiptir. Bunlar, kapiller glomerüle tutunan viseral tabaka ve dış kısımda bulunan pariyetal tabakadır. Visseral tabaka, podositler olarak adlandırılan ve bir bazal lamina ile desteklenen epitel hücreleri ile döşelidir. Pariyetal tabaka, basit yassı epiteli destekleyen bir bazal lamina ile kuşatılır ve proksimal tübülün basit kübik /prizmatik epiteli ile devam eder. Plazma ultrafiltratı içeren idrar boşluğu (üriner boşluk- Bowman boşluğu), kapsülün

visseral ve pariyetal tabakaları arasında bulunur. İdrar boşluğu plazma ultrafiltratının içinden aktığı idrar kutbunda proksimal kıvrımlı tübülün lümeni ile devam eder. Afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin giriş ve çıkış bölgesi olan zıt kutup ise damar kutbu olarak adlandırılır [105].

Glomerül üç bileşenden oluşur:

- 1- Pencereli endotel hücreleri ile döşenen glomerüler kapilerler,
- 2- Mezengiyal matrikse gömülü mezengiyal hücrelerce oluşturulan mezangiyum,
- 3- Bowman kapsülünün viseral tabakasını oluşturan podositler [105].



Şekil 2.4.2.4. Böbrek cisimciğinin şematik görüntüsü [104].

Embriyonik gelişim sırasında pariyetal tabakanın epiteli nispeten değişmeksizin kalırken içteki viseral tabaka büyük ölçüde değişir. Bu iç tabakadaki hücrelerin gövdelerinden birkaç birincil uzantı şekillenir ve bu hücreler ayaklı hücreler (podositler) adını alır. Her bir primer uzantı ayakçık (pedisel) denen glomerülün kapilerlerini saran çok sayıda ikincil uzantı oluşturur. İkincil uzantılar, 25 nm'lik sabit

bir mesafede, bazal lamina ile doğrudan temas halindedirler. Ancak podositlerin hücre gövdeleri ve birincil uzantıları bazal laminaya değmez [104].

Podositlerin sekonder uzantıları birbirleriyle aralarında 25 nm'lik boşluklar oluşturacak şekilde kenetlenirler; bu aralıklar süzülme ya da filtrasyon yarıkları adı verilen yapıları oluşturur. Podositlerin sitoplazmasında bunların kasılabilmesini sağlayan aktin mikrofilaman demetleri vardır [104].

Glomerül kapillerlerindeki endotel hücreleriyle, bunların dış yüzeyini örten podositler arasında kalın bir bazal membran bulunur. Podositler ve pencereci endotel hücrelerinin her ikisi ve bunların ilişkide olduğu bazal lamina, glomerüler süzme bariyerini (glomerüler filtrasyon bariyeri) oluşturur [105]. Bu tabaka, kapillerlerdeki kanla idrar boşluğunu birbirinden ayıran bir süzülme engeli oluşturmaktadır. Bu bazal membran kapillerin ve podositin oluşturduğu bazal laminaların kaynaşmasından meydana gelmiştir. Elektron mikroskopik düzeyde bakıldığında, ortada elektron yoğun bir tabaka (lamina densa) ve her iki yanda daha fazla elektron geçirgen bir tabaka (lamina rara) yer alır [104]. Her iki elektron geçirgen lamina rara tabakası, hücrelerin tutunmasına yarayabilecek olan fibronektin içerir. Lamina densa ise negatif yüklü bir proteoglikan olan ve katyonik moleküllerin geçişini engelleyen heparan sülfat içeren bir matriks içinde tip IV kollajen ve lamininin oluşturduğu ağ şeklinde bir yapıdır. Yani glomerül bazal laminası, lamina densanın fiziksel bir filtre olarak iş gördüğü, lamina raradaki anyonik bölgelerin ise elektriksel bir engel oluşturduğu seçici bir makromoleküler filtredir. 10 nm'den daha büyük partiküller bazal laminadan geçemez; molekül ağırlığı albüminin molekül ağırlığından fazla olan negatif yüklü proteinler ise membrandan eser miktarda geçmektedir [104].

Aynı podositte veya komşu podositlerden hücre uzantılarının sonlanmaları olan pediseller, bazal laminayı kaplamak için birbirlerinin içine geçerler ve süzme yarıkları (filtrasyon yarıkları) olan boşluklar ile ayrılırlar [105, 106].

Glomerüler kapillerleri oluşturan endotel hücreleri arasında, 70-90 nm çapta bir fenestrata (pencere) bulunur. Ama burada, diğer fenestratalı kapillerlerde bulunan diyafram yapısı yer almaz. 3-4 kapiller birleşip "glomerüler kangal" denen grupçuklar oluştururlar. Bunların eksenlerini "mezangium" meydana getirir. Mezangium, kendi salgıladığı matriks içine yerleşmiş "mezangial hücreler"den oluşur. Bu hücrelerin sitoplazmik uzantıları, kapiler lümenine ulaşacak şekilde endotel hücrelerinin arasına sokulur. Ayrıca mezangial hücreler, kapillerleri saran ve destekleyen amorf yapıda bir madde salgırlar [105, 106]. Mezangial hücreler; kasılabilir, çoğalabilme yeteneğinde, matriks ve kollajen sentezleyen ve biyolojik olarak aktif maddeleri (prostaglandinler ve endotelinler) salgılayan hücrelerdir. Endotelinler, afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin kasılmasını uyarırlar [105].

Malpighi cisimciğinin vasküler kutbunda yer alan Jukstaglomerüler aygıt, çeşitli yapılardan oluşan ve küçük bir endokrin fonksiyonu gören bileşendir. Bunlar; distal kıvrımlı tübülün başlangıç kısmının ayrı bir bölgesi olan makula densa, ekstraglomerüler mezangial hücreler ve afferent glomerüler arteriyolün, daha az oranda da efferent glomerular arteriyolün renin üreten hücreleri (jukstaglomerüler hücreler) dir [104, 106].

Makula densa, NaCl derişimindeki değişikliklere duyarlıdır ve jukstaglomerüler hücrelerden renin salınımını etkiler. Renin, NaCl derişimi veya kan basıncı düştüğünde salgılanır. Ekstraglomerüler mezangial hücreler, birbirlerine ve jukstaglomerüler hücrelere gap-junction'larla bağlanırlar [105].

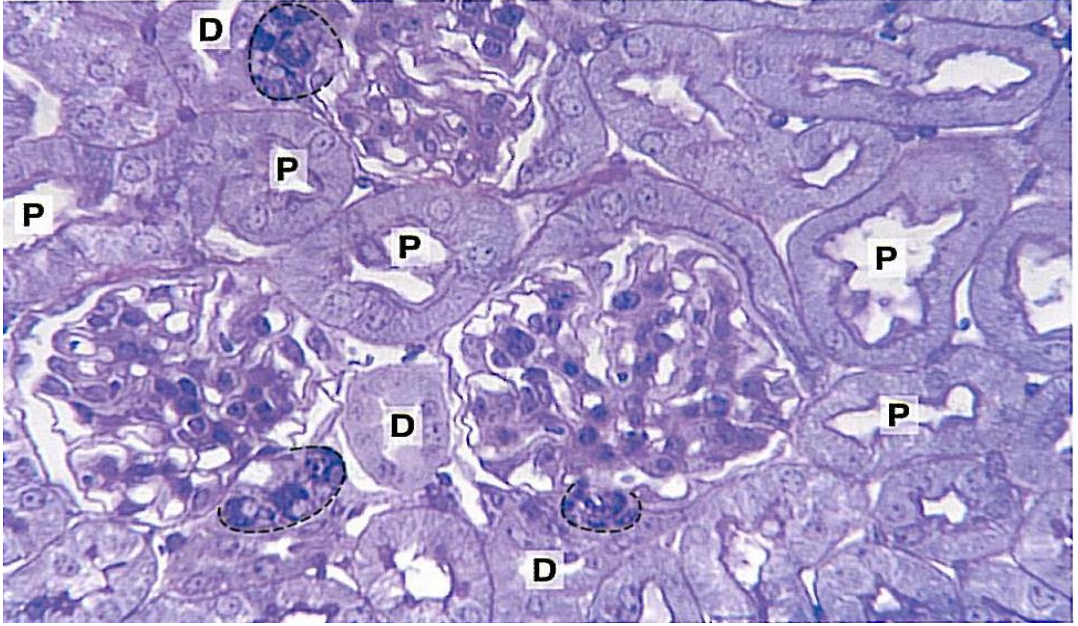
Böbrek tübülü: Böbrek cisimciğinin idrar kutbunda, Bowman kapsülünün pariyetal yaprağının tek katlı yassı epiteli; proksimal kıvrımlı tübüllerin kübik ya da alçak prizmatik epiteli ile devam eder. Bu kısım distal kıvrımlı tübüllerden daha uzundur ve bu yüzden korteks içindeki böbrek cisimciklerinin yanında daha sık görülür. Proksimal kıvrımlı tübüllerin hücreleri çok sayıdaki uzamış mitokondrisi nedeniyle asidofilik sitoplazmaya sahiptir [104, 106]. Hücrenin tepesinde fırçamsı kenarı oluşturan yaklaşık 1 µm uzunluğunda, çok sayıda mikrovillus bulunur. Bu yüzden tübüllerin lümeni büyük oranda küçülmüş ve daralmıştır [104].

Proksimal tübüller kortekste fazlaca kıvrımlıdır ve medullaya doğru düzleşir. Nefronun en uzun parçasıdır, kortikal parankimanın büyük bölümünü oluştururlar. Proksimal tübüller enine kesitlerde yuvarlak ya da ovaldir. Genellikle dörtten sekize kadar değişen sayıdaki yuvarlak nukleus, her hücrenin merkezinde ya da tabanına doğru yerleşir. Tek katlı kübik ya da alçak prizmatik epitelden oluşan duvarları, merkezdeki düzensiz şekilli lümeni çevreler. Proksimal tübüllerin apikal hücre zarlarında belirgin bir fırçamsı kenar oluşturan çok sayıda mikrovillus bulunması nedeniyle iç sınırları pürüzlüdür. Lateral hücre sınırları kısmen interdijitasyonların yaygın olması nedeniyle ışık mikroskobu ile genellikle belirgin değildir [106].

Proksimal tübül hücrelerinin apikal sitoplazmalarında, mikrovillusların tabanları arasında çok sayıda kanalcık bulunur. Bu kanalcıklar proksimal tübül hücrelerinin makromolekülleri emme yeteneğinde etkin rol oynarlar. Apikal zarların içe doğru yaptığı girintiler pinositotik vezikülleri oluşturur ve bu veziküller içinde glomerül süzgecinden geçen makromoleküller (esas olarak molekül ağırlığı 70 kDa'dan düşük olan proteinler) bulunur. Bu hücrelerin taban bölümlerinde yoğun iç girintiler ve komşu hücreler arasında yan kenetlenmeler bulunmaktadır. Mitokondriler hücrenin tabanında yoğunlaşmıştır ve hücrenin uzun eksenine paralel dizilim gösterirler. Mitokondrilerin bu şekilde yerleşimi ve hücrenin tabanında zarın

yüzey alanını arttıran bu düzenlenme, aktif iyon taşınmasında rol alan hücelere özgüdür. Lateral membran kenetlenmelerinin yaygınlığı nedeniyle (ışık mikroskopunda) incelenen proksimal tübül hücreleri arasındaki hücre sınırları belirgin olarak seçilemez. Proksimal kıvrımlı tübüller süzüntüdeki glikoz ve aminoasitlerin tümünü, suyun ve sodyum klorürün %85'ini ve ayrıca fosfat ve kalsiyumu emer. Bütün bu fonksiyonlara ek olarak proksimal kıvrımlı tübüller kreatinin gibi maddeleri ve paraaminohippurik asit ve penisilin gibi vücuda yabancı olan maddeleri idrara geçirirler. Bu olay tübüller salgılama olarak tanımlanan aktif bir işlemdir [104].

Distal kıvrımlı tübüldeki hücreler iyon geçişinde işlev gösteren daha incelikli bazal membran içe kıvrımlarına ve bunlara eşlik eden mitokondrionlara sahiptirler. Tübüller kortekste izledikleri yol boyunca kendi nefronlarına ait böbrek cisimciğinin damar kutbu ile temas halindedirler. Bu yakın temas noktasında distal tübül, aferent arteriyol gibi farklılaşır. Distal kıvrımlı tübül hücreleri bu jukstaglomerüler bölgede genellikle prizmatik hale dönüşür ve nukleusları da biraraya toplanır. Çoğu hücrenin bazal bölümünde Golgi kompleksi bulunur.



Şekil 2.4.2.5. Böbrek korteksinde proksimal (P) ve distal (D) kıvrımlı tübüller [104].

Mikroskopik örneklerde nukleusların yakın yerleşimi yüzünden daha koyu renkli görünen bu distal tübül alanı maküla densa olarak adlandırılır. Maküla densa hücreleri tübül içi sıvıdaki klorür iyon içeriğine ve su hacmine duyarlıdır, dolaşıma renin salgısını başlatan moleküler sinyaller üretirler [104].

Distal kıvrımlı tübülün distal kısmı ile toplayıcı kanallar antidiüretik hormon ve vazopressin varlığında suya geçirgendir [105]. Distal kıvrımlı tübüllerde aldosteron yoğunluğu yeterince yüksek olduğunda iyon değişimi gerçekleşir: sodyum emilir, potasyum iyonları dışarı verilir. Bu düzenek vücudun toplam su ve tuz içeriğini etkiler [104].

Distal kıvrımlı tübüllerden geçen idrar, birbirlerine bağlanarak daha büyük, düz toplayıcı kanalları oluşturan toplayıcı tübüllere boşalır [104]. Distal kıvrımlı tübülleri toplayıcı kanallara bağlayan toplayıcı tübüllerin çapları, proksimal parçalarda 40 µm'den, renal pelvis'teki toplayıcı kanallara yaklaştıkça 200 µm'ye kadar değişir. Bu kanallar, idrarı iletmek için kortekste, medüller ışınların içinde medullaya doğru uzanan kavisli toplayıcı tübüller olarak başlarlar. Bunlar daha sonra, medullada seyreden düz toplayıcı tübülleri oluşturmak üzere diğer kavisli tübüllerle birleşirler. Medullanın iç kısmında altı ya da yedi düz tübül uç papiller Bellini kanallarını oluşturmak üzere keskin açılarla birleşirler. Medulla piramitlerinin tepe kısmında, papiller kanallar renal papillayı delerek area cribrosa'yı (delikli alan) yaparlar [106].

Henle kulbu, proksimal kıvrımlı tübüllere yapıcı çok benzeyen bir kalın inen kol; bir ince inen kol; bir ince çıkan kol ve bir kalın çıkan koldan oluşan U şeklinde bir yapıdır. Kalın çıkan kol yapıcı distal kıvrımlı tübüllere çok benzer [104]. Kalın inen parça, proksimal kıvrımlı tübülün devamıdır. Kalın çıkan parça ise distal kıvrımlı tübül ile devam eder. İnce parçaların uzunluğu kortikal ve jukstamedüller nefronlarda farklıdır. Çıkan kol suya geçirgen olmadığından, süzülen suyun geri emilimi, çoğunlukla inen kolda, tübüler ve interstisyel sıvı arasındaki osmotik gradyanla gerçekleştirilir. Henle kulbu, süzölmüş suyun %15 kadarını ve NaCl, K⁺, Ca²⁺, ve HCO⁻³'ün %25 kadarını geri emer. Kolların kalın parçaları, proksimal tübüllerin epitel örtüsü ile değişen alçak kübik epitel ile döşeli iken, ince parçalar ise basit yassı epitel ile döşelidir [105].

Jukstamedüller nefronların henle kulbu çok uzundur ve medullanın derinliklerine dek inerler. Bu kulplar kısa bir kalın inen kol, uzun ince inen ve çıkan kollar ile kalın çıkan koldan oluşmuştur. Öte yandan kortikal nefronlarda inen ince kollar çok kısadır ve çıkan ince kol bulunmaz [104].

Henle kulbunun çıkan kalın kolu kortekse girer; belli bir yolu katettikten sonra, büklümlenir ve distal kıvrımlı tübülleri oluşturur. Bu tübül çıkan kol gibi tek katlı kübik epitelle döşelidir. Distal kıvrımlı tübüller proksimal kıvrımlı tübüllerden (her ikisi de kortekste bulunur) fırçamsı kenarlarının ve apikal kanallarının olmaması ve hücrelerinin daha küçük olması ile ayrılır. Fakat, hücrelerde nadiren kısa ve kalın mikrovillus bulunabilir. Bir diğer fark da distal tübül hücreleri proksimal tübül

hücrelerine göre daha düz ve daha küçük olduğu için distal tübülde, proksimal tübülde olduğundan daha fazla sayıda nukleus görülür [104, 106].

Küçük toplayıcı tübüller kübik epitelle döşelidir ve çapları ortalama 40 µm'dir. Bu tübüller medullanın derinliklerine doğru indikçe hücrelerin boyu prizmatik olana kadar uzar. Piramitlerin ucuna yakın bölümlerde toplayıcı kanalın çapı 200 µm'ye ulaşır. Toplayıcı tübülleri oluşturan hücreler rutin boyalarla zayıf boyanırlar. Sitoplazmaları az sayıda organel içerir ve elektron geçirgendir. Toplayıcı tübüllerde ve korteksteki toplayıcı kanallarda koyu boyanan ara bir hücre tipi de görülmektedir; bu hücrelerin önemi anlaşılammıştır. Işık mikroskobu ile bakıldığında toplayıcı tübül ve kanal hücrelerinin hücrelerarası sınırları net olarak seçilebilir [104].

Tabanları ince bir bazal membran üzerine oturur ve apikal yüzeyleri geniş bir merkezi lümen ile temas eder. Bunların lateral hücre sınırları, hücrelerarası çıkıntıların ya da invajinasyonların olmayışı nedeniyle, ürinifer tübüllerin diğer parçalarında olduğundan daha belirgindir. Her bir hücre yuvarlak, merkezi bir çekirdeğe, soluk sitoplazmaya ve ürinifer tübüllerin diğer parçalarıyla karşılaştırıldığında nispeten daha az sayıda organelle sahiptir. Nukleusun çevresinde çoğu kez bir hale vardır. Bu hale, çoğunlukla glikojenden dolaydır ki ışık mikroskobu ile genellikle solmuş olarak görülür [106].

Toplayıcı kanallar, farklı işlevsel evreleri gösteren ince yapı farkları olan açık (esas) hücreler ve koyu (interkale) hücreler denilen iki tip epitel hücrelerine sahiptir. Koyu hücreler idrarın asitleştirilmesinde daha aktif rol oynarken, açık hücreler daha çok organeller, apikal veziküller ve bazal katlantılar içerir. Koyu hücrelerin apikal yüzeylerinde de daha çok sayıda, kısa ve kalın mikrovilluslar bulunur; açık hücreler tek bir silyum taşıyabilir. Her iki hücre tipi de sıkı bağlantılar içerir; bazal plazma zarları ince bir bazal membran üzerinde yerleşmiştir. Toplayıcı tübüller arka hipofizden salgılanan antidiüretik hormon tarafından kontrol edilen bir miktar su absorpsiyonu yaparak, idrarı nefrondan renal pelvise taşır. ;Ayrıca, aktif olarak H⁺ ve HCO₃ salgılar ve K⁺'u geri emerler. Toplayıcı kanallar yalnızca taşıma işlevi yapan kanalcıklar olmayıp, ayrıca idrarı yoğunlaştırmada ve asit-baz dengesini düzenlemede rol oynar [106].

2.4.3. Böbrek Hasarı

Böbreğin temel olarak fizyolojik görevi, metabolik atıkları atılım maddesine dönüştüren osmoregülasyon olarak bilinen hemostatik fonksiyonları gerçekleştirmektir. Günümüzdeki böbrek hastalıkları Dünya çapında daha yüksek oranlara tırmanmaya devam eden, epidemik oranlara ulaşan genel toplum sağlık problemi haline gelmiştir. Bu artış, yaşlı populasyonun ve kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon ve diyabetin neden olduğu renal komplikasyonların yaygınlığının

artmasıyla ilişkilendirilmektedir [113]. Böbrek hastalıkları akut böbrek hasarı (ABH) veya kronik böbrek yetmezliğinden (KBY) kaynaklanan durumlarla birlikte konjenital defektlerden ileri gelmektedir [114-118]. ABH, sepsisin, toksinlerin ve iskeminin neden olabileceği ani renal hücre hasarından böbrek fonksiyonlarının hızlı bir şekilde kaybını içerir [115-117]. KBY'nin belirgin özelliği, sağlıklı dokunun erozyonu ve fibrozis nedeniyle zaman içerisinde sürekli olarak böbrek fonksiyonlarının kaybıdır [118]. Böbrek hastalıkları transplantasyon veya diyalizle birlikte renal değişim tedavisi gerektiren son evre böbrek yetmezliği (SEBY) olarak bilinen organ yetmezliğine neden olmaktadır. Renal yetmezlikle klinikte başa çıkılabilesine rağmen, çok yüksek ölüm oranına sahiptir ve yoğun bir şekilde uzun bir tedavi süreci gerektirmektedir. Tedavi merkezleri hasta ve hasta yakınlarına ekonomik bir yük olarak ve sağlık sisteminde sosyoekonomik bir yük olarak düşünülmektedir [113]

2.4.3.1. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), dünyada ve ülkemizde epidemiy halini almış, kronik, renal veya sistemik hastalıklara bağlı olarak böbrek fonksiyonlarının dönüşümsüz kaybı ile karakterize olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Giderek artan sıklığı, yol açtığı yüksek morbidite ve mortalite oranları ve bunlarla birlikte yaşam kalitesini ciddi şekilde etkilemesi nedeniyle toplumsal yükü büyük olan bir hastalıktır [119].

Kronik böbrek yetmezliği, glomerül filtrasyon oranının (GFO) 80 ml/dk'nın altına inmesi olarak tanımlanır [120]. GFO'nun geriye dönüşsüz bir şekilde azalması, gelişmekte olan KBY'nin en önemli göstergesidir [121] ve etken ajan ortadan kalksa bile hastalık progresif seyretmekte ve son evre böbrek yetmezliğine (SEBY) doğru ilerleme göstermektedir [122]. Son evre böbrek yetmezliği olan hastalar, yaşam kalitesinin iyi olabilmesi için uzun dönem ve düzenli olarak hemodiyaliz tedavisine gereksinim duymaktadırlar [77].

Ülkelerin 2007 yılına ait SEBY prevalanslarına bakıldığında listenin başında Tayvan, Japonya ve ABD yer almaktadır. Ülkemizde ise Türk Nefroloji Derneği kayıtlarına SEBY yıllık ortalama %12'lik artış hızına sahiptir [119]. Birleşik Krallık'ta SEBY görülme oranı 20 yıl öncesine göre iki katına çıkmış olup, pek çok gelişmiş ülkede de yıllık %5-8 oranında artış göstermesi beklenmektedir. Bu artışa etki eden iki önemli etmen bulunmaktadır; popülasyondaki yaşlı nüfusun artışı ve tip 2 diyabet mellitusun dünya genelinde epidemik hale gelmesidir [118]. Kronik böbrek yetmezliğinin gelişim sürecini etkileyen diğer etmenleri ise yaş, cinsiyet, ırk, genetik, proteinüri, lipidler, hipertansiyon, sigara vb. şeklinde sıralayabiliriz [120].

Ülkemizde KBY için gereken organ naklinin yüksek maliyeti nedeniyle, hastalar hayat boyu hemodiyaliz ya da periton diyaliz tedavisine bağımlı olarak yaşamlarını sürdürürler [119].

Hemodiyaliz, böbrek yetmezliği sebebiyle böbrek fonksiyonlarını kaybeden hastaların hayatlarını devam ettirebilmeleri için vücutta oluşan toksik madde ve sıvıların vücuttan atılmalarını sağlayan bir tedavi yöntemidir. Özel membranlar ile hasta kanı makineler aracılığı ile temizlenir. Hemodiyaliz işleminin gerçekleşmesi için yeterli kan akımı, bir membran ve hemodiyaliz makinesi sağlanmalıdır. Hemodiyaliz tedavisi hastanın böbrek yetmezliğinin şiddetine, çıkardığı idrar miktarına bağlı olmak üzere haftada 2 - 3 kez, 4 - 6 saat süre ile uygulanır [123].

2.4.3.2. Klinik Özellikleri ve Komplikasyonlar

KBY, GFO'ya göre evrelendirilebilir. Üremi varlığında ilk belirtiler iştahsızlık, bulantı, kusma, halsizlik, kilo kaybı, bilinç düzeyindeki değişiklikler, kaşıntı, nefes darlığı, bacaklarda huzursuzluk hissi, perikardit kanama gibi durumlarda çeşitli doku ve organ sisteminin üremik havuzdan etkilenmeleri sonucu ortaya çıkar. Özellikle yaşlı olgular düşük üre düzeylerinde (100-120 mg/dl) bu belirtileri gösterirken bazı olgular yüksek üre düzeylerinde (200-250 mg/dl) bile asemptomatik kalabilmektedir [120].

Evre	Klinik Tanım	GFR (mL/dk/1,73 m ²)	Değerlendirme
1	Normal GFO	≥ 90	Birincil hastalık, kardiyovasküler hastalık riski
2	Düşük derecede azalmış GFO	60-89	Hiperparatiroidizmin erken evresi, KBY'nin ilerlemesi
3	Orta derecede azalmış GFO	30-59	Anemi, dislipidemi, hücre dışı sıvı hacmi
4	Çok düşük GFO	15-29	Elektrolit bozuklukları, diyaliz ve organ nakli için uygunluk
5	Böbrek Yetmezliği	< 15 ya da diyaliz	İleri KBY ve diyaliz komplikasyonları

Tablo 2.4.3.2.1. Kronik böbrek hastalığının evreleri [124].

Kronik böbrek yetmezliğinde temeldeki böbrek hastalığı ne olursa olsun histolojik incelemede glomeruler skleroz, hücreler arası matriks artışı, periglomeruler ve interstisyel fibrozis, tübüler atrofi gözlenir. Bu durumda birincil hastalıktan bağımsız olarak ilerleyici böbrek hasarında çeşitli mekanizmaların rol aldığı düşünülmektedir. Bundan dolayı evreler arasındaki ilerleyici böbrek hasarı, yüksek tansiyon, hızlanmış lokal ateroskleroz, hipertrofi ve bu hastalıkların mekanizmalarıyla ilişkili büyüme faktörleri ile açıklanmaya çalışılmıştır [124].

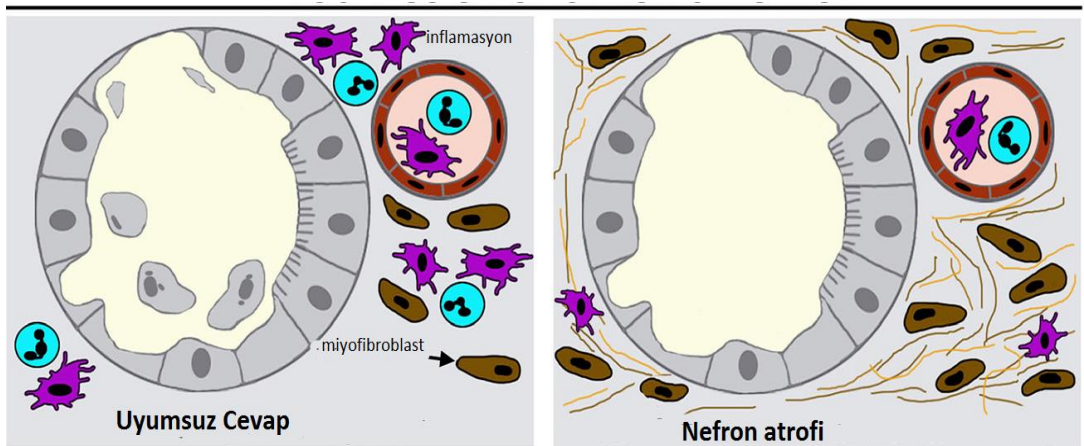
Yapılan bir çalışmada SEBY’de mortaliteye etki ettiği belirtilen 128 etmen değerlendirilmiş ve etki sırasına göre aşağıda adı geçen dokuz faktörün mortaliteyle anlamlı ilişkisi olduğu ortaya konmuştur: (1) Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), (2) Hematokrit, (3) İnterlökin-6, (4) Troponin T, (5) Kreatinin/ Üre hacmi (Kt/Vüre), (6) Prealbumin, (7) Üre azalma oranı, (8) Serum albumin (9) C-reaktif proteini [125]. SEBY’in oluşmasında pay sahibi olan hastalıklar gösterilmiştir [126].

Hastalık	Oran (%)
Kronik glomerulonefrit	20
Diabetes mellitus	30
Yüksek tansiyon	20
Polikistik böbrek	10
Pyelonefrit / reflüks nefropati	5
Dokular arası nefrit	5
Diğer	15

Tablo 2.4.3.2. Son evre böbrek yetmezliği sebepleri.

2.4.3.3. Nefron Tübül Hasarı ve KBY’de Maladaptif (Uyumsuz) Rejenerasyon

ABH araştırmaları, nefron tübüllerinin doğal tamir yeteneğine ışık tutsa da, bu özellik fibrotik mikroçevreye sahip KBY tübüller hasarlarını karşılamakta yetersiz kalmaktadır. KBY, heterojen bir klinik spektruma sahiptir. KBY patogeneğinde, sıklıkla glomerül veya tübülde, primer bir hasar sonrası gelişen artan fibrozis ortak özelliktir. Fibrozis, glomerülde ya da tübülointerstisyel alanda ilerleyebilir. Bu lezyonlar zamanla ilerleyerek, nefron disfonksiyonuna, atrofi ve tam fonksiyon kaybına neden olur ki bu duruma fibrogenezin ilerlemesini tetikleyen vasküler hasarın katılması da söz konusudur [127].

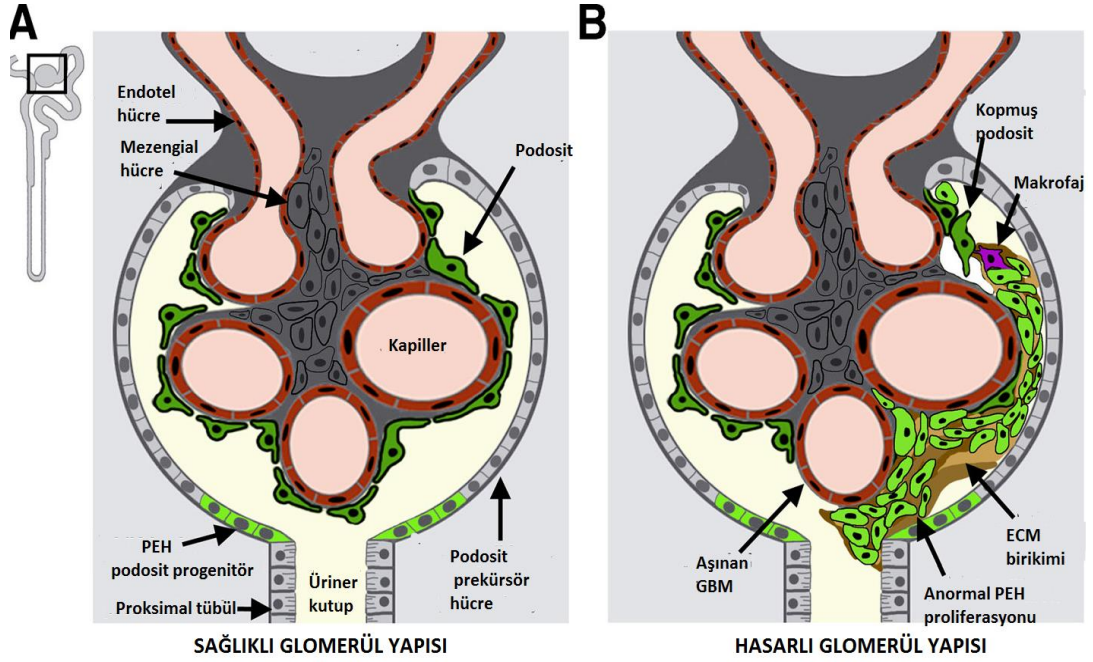


Şekil 2.4.3.3.1. Kronik böbrek yetmezliğinin gelişimi. Sol: KBY’de tübüller hasar uzun süreli

inflamasyonla birlikte gerçekleşir ve miyofibroblast aktivasyonu meydana gelir. Sağ: Miyofibroblastlardan oluşan lezyonlar sağlıklı renal dokuyla yer değiştirir ve kalıcı nefron erozyonu gerçekleşir [128]

Böbrek fibrozisi süreci, tersine işleyen bir yara iyileşme sürecine benzetilmektedir [129]. Renal hücre hasarının, sitokinleri ve miyofibroblastların ortaya çıktığı inflamatuvar süreçleri başlatan diğer sinyalleri tetiklediği bilinmektedir. Nefron tübüler rejenerasyonu hakkında daha fazla şey bilmek, KBY hastalarında nefron kaybının azaltılması için hayati ipuçları sağlayabilir. Aslında, ABH sonrası gelişen anormal tübüler rejenerasyonun KBY'ye neden olan mekanizmalardan biri olduğu düşünülmektedir ve ABH'nin şiddeti, KBY gelişimi için güçlü bir öngörüdür [130]. Tübüler rejenerasyon kapasitesinin tekrarlayan hasarlarda azaldığını gösteren hayvan çalışmaları mevcuttur [131]. Azalan tübül rejenerasyonunu arttıracak çözüm yollarının keşfi nefron kaybını önlemede hayati bir bulvar sağlar ve miyofibroblast aktivitesinin iyileştirilmesi KBY tedavisinde anahtar rol oynama olasılığı yüksektir [128].

Glomerül en az 4 hücre çeşidinden oluşmaktadır: ekstra-glomerüler demeti oluşturan parietal epitel hücreler (PEH), podositlerden oluşan merkezi glomerüler demet, endotel hücreler ve mezangiyal hücreler [132]. Glomerüler hasar sonrasında, PEH hücrelerinin anormal proliferasyonunun KBY'ye yol açan maladaptif glomerular lezyonlara neden olduğu deneysel olarak ortaya konmuştur [133, 134] (Şekil 2.4.3.3.1.A). Patolojik değişiklikler arasında, ekstrakapiller alanda proliferasyon alan hücrelerin akümüasyonu ile oluşan glomerüler hilal şeklinde gözlenen hiperplastik lezyonlar yer almaktadır [133]. Zamanla, bu hilal biçimli lezyonlar glomerülerden tübüllere akışı/sızıntıyı tıkayabilir ve tübül dejenerasyonuna ve nefron yıkımına neden olabilir. İlaveten, aktive olan PEH'ler, artan glomerüler yaralanmaya [134] neden olan, hücrelerin ekstraselüler matriks depositlerini ve kapsülü invaze ettiği sklerotik lezyon yapılarına katılabilirler. Glomerüler yaralanma glomerülü harap eder ve proteinüri'ye neden olarak nefronu tamamen parçalar (Şekil 2.4.3.3.1.B). Maladaptif PEH davranışına çare bulmak ve anlamak için anormal PEH proliferasyonuna neden olan sinyallerin araştırılması gerekmektedir [135].



Şekil 2.4.3.3.1. Glomerül homeostazisi ve hasardaki değişimi. A. Sağlıklı böbrek. B. Glomerüler hasar, Bowman kapsülünde hücrelerin ve ekstrasellüler matriksin (ECM) birikmesiyle ve glomerüler bazal membranın (GBM) aşınmasından meydana gelir [83].

2.4.3.4. Renal Fibrozis

Renal fibröz, fibröz oluşumunu daha fazla arttıran ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezinin arttırılmasını sağlayan sürekli böbrek inflamasyonu ile birlikte kombine olan ekstrasellüler matriks bileşenlerinin (ECM) aşırı üretiminden kaynaklanmaktadır [22, 23].

Renal fibrojeniz sürecinde MKH'lerin, TGF- β 'nin profibrotik stimülasyonunu inhibe eden insülin benzeri büyüme faktör-1, HGF, vasküler endotel büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin üretimini sağlamasıyla fibrozisin geri döndürülebildiği böylece inflamasyonun azaldığı ve böbrek doku yenilenmesinin teşvik edildiği hala tartışmalıdır [24, 136].

Renal fibrozis, endotel-mezenkimal geçişi gibi epitel-mezenkimal geçişi (EMG) ve apoptozu kapsayan mekanizmalarla ilişkilidir [26, 27]. EMG esnasında böbrek epitel hücreleri kendi fenotipik karakterlerini kaybeder ve mezenkimal hücrelerin karakteristik özelliklerini kazanırlar dolayısıyla, miyofibroblastların yenilenebilir kaynağını sağlarlar. Bu hücreler fibroblastların ve düz kas hücrelerinin karakteristiğine sahip olurlar. Bu hücreler TGF- β , anjiyotensin II ve PDGF tarafından düzenlenir. EMG'nin basamakları Yang ve Liu tarafından şu şekilde sıralanmıştır:

1. Epitel hücre adezyon kaybı
2. Vimentin ve α -SMA ekspresyonu

3. Tübüler membran yüzeyinin bozulması
4. Bozulmuş membrana karşılık farklılaşmamış hücrelerin göçü [28].

Yapılan çalışmalarda, MKH'ler tarafından EMG'nin bloke edilmesinin, fibrozisi azaltan ve kronik renal hastalık sürecinin yavaşlatılmasının tedavi yöntemi olabileceği öne sürülmüştür [29, 30].

KBY sürecindeki inflamasyonun rolü iyi bilinmektedir. Proinflamatuvar sitokinler epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere geçişi sağlar (EMG). İnflamatuvar hücreler TGF- β , platelet kökenli büyüme faktörü, endotel kökenli büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü 2 gibi birkaç faktörü salgılayabilir, bu durumda EMG meydana gelir [137]. TGF- β , EMG'yi tetikleyen ana moleküldür. Bununla birlikte, EMG'nin, proteinüri, kronik hipoksiya, oksidatif stres ve inflamator sitokinlerin oluşumuna neden olan faktörler belirlenmiştir [137, 138]. KBY sırasında tüm bu faktörler bulunmaktadır. MKH uygulandığına bu faktörler azalmaktadır ve böylece MKH uygulamasının EMG'yi azalttığı düşünülmektedir. Bunun yanısıra, MKH uygulanmış hayvanların böbreklerinde proinflamatuvar sitokin olan interlökin-6 (IL-6) ve Tümör nekrozis faktör α (TNF- α) miktarı azalmıştır [34].

2.4.3.5. MKH ve Böbrek Onarımı

Hasarı takiben böbreğin yenilenme kapasitesi, zarar görmüş ve tübüler hücrelerin değiştirilmesi olarak gösterilir [21]. Bununla birlikte, hasar görmüş böbrekteki bu süreç, iç renal medullanın dış şeridinde bulunan sağlıklı progenitor ve yetişkin hücrelerin sayısı kadarla sınırlanabilir [21, 139].

Renal doku yenilenmesini açıklayan mekanizmalar ise, (1) *transdifferansiyasyon* (MKH'lerin başka dokunun erişkin hücrelerine farklılaşma süreci ; (2) *hücre füzyonu* (kemik iliği MKH'leriyle, etkilenen organdan elde edilen hücreler arasında, hasar görmüş organın fenotipiyle birlikte hibrit hücrenin meydana getirilmesi) ve (3) *MKH'lerin parakrin etkisi* , *kalan doku üzerinde inflamator cevabı modüle eden çeşitli büyüme faktörlerinin ve inflamator sitokinlerin salgılanmasıdır*. Ek olarak, nişte bulunan renal hücrelerle MKH'lerin etkileşimi, bu hücrelerde elde edilen parakrin mekanizmaları indükleyerek çeşitli hücre soylarına farklılaşabilir. Yine de, renal doku onarımında MKH'lerin rolü, iki veya daha fazla süreç veya başka süreçler vasıtasıyla tabii sonuç gerektirebilir [22].

DeneySEL KBY'nin farklı modellerinde çeşitli yollarda hücre terapisinin uygulandığı rapor edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmada kemik iliğinden kökenlenen hücreler KBY'li sıçanların renal parankimalarına implante edildiğinde, stabilize edilmiş orandaki kreatinin klerensinde azalma veya önemli derecede bir düşüş gözlenmiştir. Cavaglieri ve grubu, nefroktomiyle indüklenen KBY'li hayvanların

renal subkapsüler bölgesine MKH'lerin enjeksiyonundan sonra kan basıncının, proteinürinin, serum kreatinin azalmasıyla MKH'lerin renoprotektif etkilerini göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada, MKH'lerin göç etmesi ve kortikal ve medulla bölgesi içine dağılması gösterilmiştir [140-145].

Morigi ve ekibinin yaptığı bir çalışmada MKH'lerin ve hematopoetik kök hücrelerinin (HKH) terapötik potansiyellerini belirlemek için bu hücreleri cisplatin- indüklü akut böbrek yetmezliği modelinde kullandıklarında, HKH'lerin hiçbir yararlı etki göstermemesine rağmen, MKH'lerin tübüler epitel hücrelerine farklılaştığını, böylece renal yapı ve fonksiyonunun yenilendiği gösterilmiştir [31].

Choi ve grubu ise, renal fonksiyonlarının korunması için MKH enjeksiyonu yapmışlardır. Yapılan çalışmada sağlıklı erkek sıçanlardan izole edilen MKH'ler, KBY'li dişi sıçanlara verilmiştir. Sağlıklı erkek sıçanlardan elde edilen MKH'lerin hasar oluşturulduktan sonra sıçan kuyruk veninden 1×10^6 hücre şeklindeki enjeksiyonu yapılmış ve KBY'li sıçanlarda proteinüri ilerlemesini azalttığı görülmüştür. Ayrıca MKH'lerin KBY'de renal fonksiyonu koruduğu ve böbreğe yerleşerek ve büyüme faktörlerini salgılayarak renal hasarı engellediği gösterilmiştir [32].

Semedo ve ekibinin yaptığı çalışmada, MKH'lerin KBY böbrek modellerine uygulanması sonucu proteinüri, serum kreatin, üre seviyesi gibi bazı fonksiyonel parametrelerde iyileşme meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu çalışmada, fibrozis ve glomerulosklerozis üzerine odaklanılmıştır. Masson Trikrom ve Sirius Red boyama ile MKH uygulanan grubun fibrotik bölgesinde önemli derecede azalma görülmüştür. Glomerulosklerozisin seviyesinde de bir azalma meydana gelmiştir. FSP-1, vimentin, kollajen I gibi miyofibroblastlar tarafından eksprese edilen moleküller MKH uygulanan hayvanlarda ciddi ölçüde azalmıştır. Tip III kollajen, fibronektin ve α -SMA gibi diğer moleküller MKH uygulanan gruplarda azalma göstermiştir. Epitel-Mezenkimal geçiş (EMG) ile ilgili olan transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β) ve Smad3 'ün ekspresyonları önemli ölçüde azalmıştır [34].

Wu ve ekibi, albumin-indüklü tübüler inflamasyon ve fibrozis üzerindeki mezenkimal kök hücrelerin etkisini inceledikleri çalışmada, kemik-iliği kökenli MKH'ler kullanılmıştır. MKH'lerin tübüler inflamasyon ve epitel-mezenşimal geçişi üzerinde düzenleyici olduğu ortaya konmaya çalışılmıştır. MKH'lerin ve insan proksimal tübül epitel hücreleri (PTEH) arasındaki iletişimin anlaşılması için kültür sistemi kurulmuştur. MKH'lerin onarıcı etkisinin KBY'nin bir çok formundan biri olan albumin yüklemesi durumunda tübüler inflamasyonu ve fibrozisi azalttığı gösterilmiştir. Bu durum, MKH'lerin Hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve TSG-6 ve diğer faktörlerin parakrin etkisi albumin-indüklü NF- κ B aktivasyonunun azalmasına neden olur. Bu azalmayla birlikte inflamatuvar kemokinler artış gösterir ve bunun

sonucunda tübüler hücrelerin EMG fenotipik değişimi gerçekleşir. Fenotip değişimi sonucunda oluşan hücre tübülointerstiyal inflamasyon ve fibrozisi düzenler. Ayrıca, MKH'lerin α -SMA ve kollajen IV gibi fibrotik belirteçlerin PTEH'lerdeki artan ekspresyonlarını önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir [146].

MKH uygulanmasından sonra iyileşme sağlanması birkaç mekanizmayla açıklanabilir. MKH'ler böbrek hücrelerine farklılaşır [33]. Kanıtlara göre bu mekanizmaların başında parakrin etki gelir [34]. Başka bir çalışmaya göre kronik allograft nefropatide sürekli inflamasyon nedeniyle MKH'ler hasarlı dokuya göç ederler ve entegre olurlar [35]. Kısacası, KBY modelinde MKH uygulandığında, MKH'lerin fibrojeniz sürecini iyileştirdiği belirlenmiştir [34].

2.5. Aristolohik Asit (AA)

Yakın zamandaki çalışmalarda, Çin bitkisi olan *Aristolochic fangchi*'deki aristolohik asitin (AA) renal hasar ve karsinomaya yol açtığı tespit edilmiştir [36]. İnsanda AA'nın karsinojenik ve nefrotoksik etkilerinin görülmesi için sıçanlarda, tavşanlarda ve farelerde deneysel modeller oluşturulmuştur [37, 38, 147]. AA, çoğu ülkede yasaklanmıştır fakat AA-içerikli ilaç ürünlerinin tüketimi yüzünden hala risk bulunmaktadır. Şuanki tedaviler, hastalarda fibrozis ilerlemesini yavaşlatmaktadır fakat hasar gören tübülleri yenilemekte başarısızdırlar [148].

Aristolohik asit (AA) KBY'ye neden olmaktadır [147]. Genellikle medullar ışın ve dış korteks glomeruliye göre daha fazla etkilenmektedir [37]. AA uygulanan böbrekler boyut olarak daha küçüktür [39] ve AA'nın ana hedefi proksimal tübüler hücrelerdir [149]. AA nefropati (AAN) hastaları yüksek serum kreatinin oranıyla birlikte anemi, proteinüri, glikozüri ve lökositüri göstermektedir [150].

AAN, hızlı bir şekilde son evre renal yetmezliğe ilerler [40] 4 çeşit AA vardır: bunlardan biri AAI'dir ve böbrek hasarıyla sonuçlanan en yüksek toksisiteye sahip olduğu düşünülmektedir. AA'nın KBY'yi nasıl oluşturduğuna dair bilgiler net olmasa bile, bulgular aristolohik asit'in (AAI) hipoksiya ve tübüler hücre ölümüyle sonuçlanan peritübüller kapillerin şiddetli redüksiyonunu indüklediğini göstermiştir [41, 42]. AAI, tübüler epitel hücrelerinde eksprese olan epidermal büyüme faktörünü (EGF) azaltarak bu hücrelerde rejenerasyonu engeller [42]. Bunun yanında, AAI, fibrojenik sitokinleri TGF β 1 ve konnektif doku büyüme faktörünün ekspresyonunu artırır [42]. Tüm bunların ışığında AAI, tübülointerstiyal fibrozise neden olan geri dönüşümsüz hasarı indükler.

AAN toksik kökenli tübülointerstiyal (Tİ) nefrit olarak tanımlanır ve hızlı bir şekilde ilerler [151]. AAN süreci lenfosit infiltrasyonu, kalıcı tübüler atrofi ve bozulmamış glomerülü ile birlikte Tİ fibrozisin değişken yoğunluğuyla karakterizedir

[152]. Daha önceki dönemlerde AA'ya maruz kalma böbrek dokusunda AA'nın DNA'ya bağlanması ile sonuçlanır ve böylece DNA onarım mekanizmasında bozulma meydana gelir [153, 154]. Bir çalışmada, insan AAN'si oluşturulan Wistar sıçanlarında AA toksisitesi, AA uygulandıktan 35 gün sonra renal yetmezliğe yol açan tübül atrofi ve interstisyel fibrozisle sonuçlanmıştır. AA enjeksiyonundan yaklaşık 20 gün sonra proksimal tübül enzimürüde geçişin azaldığı ve proksimal tübül epitel hücrelerinin (PTEH) yenilenmesinin engellendiği gözlemlenmiştir [155]. Fizyolojik olarak, akut hasardan sonra renal onarım, hayatta kalan epitel hücrelerinin yenilenmesi ve çoğalmasıyla meydana gelir [156]. AA uygulandığında, PTEH çoğalma kapasitesinin engellendiği ve yenilenmeyi de negatif yönde etkilediği in vivo ve in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir [156].

Pozdzik ve grubu, AA nedenli toksisitenin PTEH rejenerasyonunu değiştirdiğini ve apoptozun geri dönüşümü olmayan proksimal tübül atrofisine neden olduğunu ileri sürmüştür. Ayrıca, atrofik tübüllerde interstisyel fibrozis ve EMG incelenmiştir [157]. Pozdzik ve grubunun çalışmasında, kronik faz sırasında tübüller atrofik hale gelir ve tipik olarak membran yüzeyi kalınlaşması gösterirler. AA uygulanan sıçanlar kontrollerle karşılaştırıldığında, 35. günde toplam böbrek doku yüzeyi önemli derecede azalmıştır [157].

Li ve ekibinin yaptığı çalışmada, kronik aristolohik asit nefropatili (AAN) sıçan modellerinde kemik- iliği kökenli kök hücrelerinin terapötik potansiyelini incelemişlerdir. AAN'deki tübül nekrozis ve interstisyel fibrozisde TGF- β 1 ve HGF yer almaktadır. Çalışmada, renal dokularda TGF- β 1 ve HGF'nin ekspresyonu üzerinde MKH transplantasyonunun etkisi gösterilmiştir. Aristolohik asit indüklü akut tübül nekrosizinin TGF- β 1'in artışı ve EGF'nin azalışıyla ilişkili olduğu ve MKH'den sonra TGF- β 1'in renal ekspresyonunun önemli derecede azalışı gösterilmiştir. MKH gruplarında HGF'nin arttığı ve HGF'nin proliferasyonu ve farklılaşmayı uyardığı görülmüştür. HGF, TGF- β 1'in antagonistidir. TGF- β 1, α -SMA aktivasyonunu artırır ve tüm böbrekte, böbrek kollajen içeriği, interstisyel matriks artar. MKH'den sonra HGF'nin ekspresyonunun artması, TGF- β 1'in seviyesini azaltarak renal fibrozisi azaltır [158].

2.6. Hücrenin Yaşam Döngüsü

Hücreler canlıların büyüüp gelişmesi, dokularının yenilenmesi ya da üreme faaliyetlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla bölünür. Hücre siklusu bir bölünmeden, onu izleyen diğer bir bölünmeye kadar geçen süredir. Hücrelerin ikiye bölünmesi mitoz (veya gonadlarda mayoz) ile gerçekleşmektedir.

Hücre bölünmesi; gen transkripsiyonunda değişiklikler, yeni proteinlerin oluşturulması, organellerin hareketi ve çoğalması ve DNA sayısının iki katına çıkmasını içeren bir süreçtir. Ancak bu sürecin ilerlemesi oldukça iyi bir şekilde düzenlenmelidir ki, bu sayede hücre farklı durumlara kolayca adapte olabilmeli ve bu sayede zarar

görmemelidir. Hücre siklusu bölünmenin yanı sıra, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücre fonksiyonları da düzenlemektedir. Bu düzenlemenin olması, organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik ve patolojik durumda (örneğin tümör oluşumu) hücre siklusunun ne denli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim kanserlerde hücre siklusunun regülatör proteinlerinin düzeylerinde anormallikler saptanmaktadır [152]

Hücre, büyüme faktörleri, mitojenler veya sitokinler gibi çeşitli bölünme sinyallerinin varlığında siklusa girer. Hücre siklusu çok iyi kontrol edilmektedir. Bu kontrolün proliferasyon belirteçleri olarak adlandırılan değişik tip proteinler tarafından sağlandığı bilinmektedir [153].

2.6.1. Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)

PCNA, çekirdekte bulunan 36 kDa ağırlığında bir proliferasyon belirtecidir [159]. Hücre siklusunun geç G_1 fazında DNA sentezi başlamadan hemen önce sentezlenmeye başlar, S fazında maksimum miktara ulaşır ve G_2 ve M fazlarında ise miktarı azalır [160]. PCNA, erken S fazında tanecikli dağılım sergiler ve çekirdekçikte bulunmaz ama S fazının sonunda çekirdekçiğe geçer. DNA sentezi, tamiri ve hücre siklusu kontrolünde görevli birçok protein, PCNA'ya bağlanarak görev yapar. Böylece PCNA, DNA sentezi, tamiri ve hücre siklusu düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. DNA polimeraz deltanın bir kofaktörü olan PCNA, bir homotrimer halka oluşturarak DNA çift sarmalını sarar. DNA replikasyonu sırasında, DNA polimeraz deltanın DNA'ya tutunmasını sağlar ve öncü iplikçik (leading strand) sentezine yardımcı olur [161]. Ayrıca, DNA hasarına yanıt olarak, PCNA ubiquitinlenerek RAD6-bağımlı DNA tamirinde rol alır [162]. PCNA ekspresyonu, proliferasyon için iyi ve yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir [46].

2.6.2. Ki67

Ki67 antijeni, 345 ve 395 kDa ağırlığında iki izoformu olan, proliferan hücrelerde görülen bir çekirdek proteini [163]. Hücre siklusunun geç G_1 , S, G_2 ve M fazlarında ekspresyon edilir, fakat G_0 ve erken G_1 evrelerindeki hücrelerde bulunmaz [164]. Farklı hücre siklusu fazlarında, Ki67'nin hücre içindeki lokasyonu değişmektedir. G_1 'de, başlıca perinükleolar bölgede yerleşim gösterirken, sonraki fazlarda çekirdek matriksi başta olmak üzere çekirdek boyunca gözlenir [165]. Ki67 antijeninin fonksiyonu bilinmemektedir ancak hücre siklusu boyunca ekspresyon edilmesinden dolayı, hücre proliferasyonunun sürdürülmesinde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir [166]. Ki67 proteinin fosforilasyonu ile defosforilasyonu in vivo olarak hücrelerin mitoz geçişi ile aynı zamana rastlar. Bu işlemler düzenleyici kompleks olan siklin B/CDK1 kompleksi tarafından kontrol edilir [167]. Ki67, genel olarak mitoz sayısı ile iyi korelasyon gösterir ve rutin olarak kullanılan bir proliferasyon belirtecidir [47].

2.6.3. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK)

Hücre siklusunun düzenlenmesi, siklusa özgü ökaryotik proteinler olan siklinler, siklin bağımlı kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKİ) tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu proteinlerin seviyeleri, hücre siklusunun çeşitli evrelerinde farklılıklar gösterir ve kompleks bir şekilde siklusun ilerlemesini düzenler [168].

2.6.3.1. CDK Aktivitesinin Regülasyonu

Hücre döngüsünün ilerlemesi esnasında CDK aktivitesi en az 4 moleküler mekanizmayla düzenlenir. Düzenlemenin ilk basamağı CDK'ların kendilerine özgü siklinlerle eşleşmesidir. İkinci adım, siklin/CDK kompleksinde CDK'nın 160. pozisyonundaki threoninin fosforile edilerek aktive edilmesidir. CDK'ların fosforilasyonla aktivasyonu CAK (CDK aktive edici kinaz) ile katalizlenir. Üçüncü düzenleme CDK proteinlerinin amino ucundaki threonin ve tirozin ile gerçekleşen inhibisyonudur. Özellikle CDK1 ve CDK2, threonin 14 ve tirozin 15'in fosforilasyonu ile inhibe edilir. Son düzenleme ise siklin/CDK komplekslerine inhibitör proteinlerin (CKİ) bağlanmasıyla gerçekleştirilir [168].

2.6.3.2. CDK İnhibitörleri (CKİ)

Düzenli olarak kontrol edilmeyen CDK aktivitesi, artmış hücre çoğalmasına ve genomik instabiliteye neden olmaktadır ve bu durum, kanserle sonuçlanabilir. CDK inhibitörleri (CKİ) hücre döngüsünün negatif kontrolünden sorumludurlar ve tümör baskılayıcı fonksiyonları vardır [169]. CKİ'lerin seviyelerindeki değişiklikler, bazı tümörlerde veya hücre yaşlanmasında görülebilir [170]. CKİ'ler siklinlere, CDK'ların kendisine ya da siklin/CDK komplekslerine bağlanarak CDK'ların aktivitelerini inhibe ederler. Günümüze kadar, memelilerde yedi farklı CKİ bulunmuştur ve bunlar yapısal ve fonksiyonel benzerliklerine dayanarak iki sınıfa ayrılırlar: Ink4 ve Cip/Kip aileleri [171, 172].

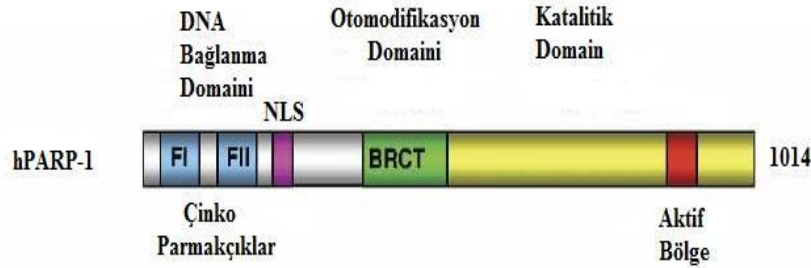
Cip/Kip (CDK inhibitör protein/Kinaz inhibitör protein) ailesinde ise üç farklı CKİ tanımlanmış olup, bunlar p21^{Cip1} (p21, cdkn1a), p27^{Kip1} (p27, cdkn1b) ve p57^{Kip2} (p57, cdkn1c)'dir [152]. Cip/Kip ailesi üyeleri, siklin D, -E, -A veya B/CDK komplekslerine bağlanarak aktivitelerini inhibe edebilir [173]. Bazı insan dokularında Cip/Kip CKİ ekspresyon paterni, proliferasyon belirteçleri olan PCNA ve Ki67'nin tam olarak zıttını göstermektedir [174].

P57 ise, siklin D/CDK4, siklin E/CDK2 ya da siklin A/CDK2 komplekslerine bağlanarak onları inhibe eder ve böylece, G1/S geçişini ve S fazının tamamlanmasını engeller [173].

2.6.4. Poli ADP-Riboz Protein (PARP)

PARP, hücrenin yaşamsal faaliyetleri ve programlı hücre ölümü ve diğer biyolojik işlevleri de düzenleyen bir proteindir. Bu işlevler arasında, transkripsiyonun düzenlenmesi, telomer kohezyonu, hücre bölünmesi esnasında mitotik içcik şekillenmesi, hücre içi beslenme ve enerji metabolizması sayılabilir [175]. PARP süper ailesinin üzerinde en çok çalışılan üyesi PARP-1'dir. DNA hasarına bağlı olarak NAD⁺ 'ı kullanarak daima kromatin ile ilişkili çekirdekteki kabul edici (akseptör) proteinlere çok dallı veya düz olacak şekilde ADP-riboz polimerlerini sentezler [176]. PARP-1, 1q41-q42 kromozom bölgesinde bulunan ADPRT geninin 113 kDa ağırlığındaki transkripsiyon ürünüdür [177]. PARP-1'in yapı-işlev ilişkisi oldukça iyi anlaşılmıştır. Altı domainden dördünün özel fonksiyonları gösterilmiştir;

- Domain A, DNA bağlayıcı domain olarak bilinir ve DNA kırıkları ile PARP-1 arasındaki ilişkiden sorumlu olup 2 adet çinko parmak modeli içermektedir.
- Domain B, NLS için çift taraflı bir PARP-1 ve bölgesinin bulunduğu Kaspaz-3 yarıklanma domainidir.
- Domain D, otomodifikasyon bölgesidir.
- Domain F, PARP-1'in katalitik bölgesidir [176].



Şekil 2.6.4. PARP-1 proteininin yapısı [177].

Çinko parmak modelleri PARP-1'in hasarlı DNA üzerindeki bölgesini tanıması için gereklidir [176, 178]. İlk çinko parmak hem tek hemde çift zincirdeki kırığa bağlanırken ikinci çinko parmak yalnızca tek zincir kırıklarını tanımaktadır [177]. Merkezi otomodifikasyon domaini poli(ADP-riboz)ilasyon (PARilasyon) bölgesini içermektedir ve PARP-1'in DNA ile bağlantısını düzenlemekle görevlidir. C-terminal bölgesi ise, NAD'ın bağlandığı bölgedir [178]. PARP-1, DNA hasarlarında devreye girerek DNA tamirini gerçekleştirirken, yüksek miktardaki DNA hasarı PARP-1 aktivasyonunu tetikleyerek PARP-1'in hücredeki substratı olan NAD'ın hücrede tükenmesine sebep olur. Bu durumda NAD'ın yeniden sentezlenmesi için ATP kaybına neden olarak hücrenin enerji kaybından dolayı ölümüne sebep olmaktadır [179].

PARP-1, DNA kırıkları ve DNA kırıklarının uzaysal onarımında anahtar bir role sahip olup bu kırıkların tanımlanmasında rol alan moleküler algılayıcıdır. Oldukça iyi korunmuş çok işlevsel bir enzim olup, katalitik faaliyet, DNA kırıklarının üzerinde 500'den fazla katlantı ile ortaya çıkar. Bu fiziksel birliktelik boyunca DNA metabolizması ve kromatin yapısı, PARilasyon ve yardımcı proteinler (histonlar, HMG proteinleri, topoizomeraz I ve II, DNA helikaz, tek zincir kırık onarımı proteinleri (SSBR), baz çıkarım onarımı proteinleri (BER) ve çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir [176]. PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içeren domeininden, Kaspaz-3 ve Kaspaz-7 tarafından yarıklanması sonucunda, 24 ve 89 kDa'luk iki adet fragment oluşturmaktadır ve bu nedenle yarıklanmış PARP (cPARP) apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır [50].

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İnsan Term Plasentasından Amniyon Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Kullanılan Kimyasallar

- **Penicillin-Streptomycin P/S (10,000 U/ml) (100 X)** (Life Tech, #15140-122)
- **Amphotericin B solution 250 µg/mL Fungizone** (Sigma, #A2942-100ML)
- **HBSS** (Invitrogen, # 14065-056)
- **Dispase 2.5 U/ml**(Roche, #10103586001)
- **RPMI 1640** (Lonza, # BE12-167F)
- **Fetal Bovine Serum (FBS)** (Life Tech, #10270106)
- **L-Glutamin** (Lonza, BE17,605E)
- **Collagenase A** (Roche, #10103586001)
- **DNaseI** (Roche, #10104159001)
- **DMEM W/low glucose** (Lonza,#BE12-708F)
- **Akutaz** (Sigma, #A6964-100ML)

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum bölümü doğumhanesinden temin edilen plasentanın koryoamniyonik zarlarının yapısı kontrol edildi. Amniyon zarı, kenarlardan başlanarak koryon zarından nazikçe uzaklaştırıldı. Amniyon steril bir kaba alındı, Serum fizyolojik (SF) + %2P/S +%2 Fungizone solüsyonuyla yıkandı. İşleme amniyon kandan uzaklaşınca kadar devam edildi. Kalan kan parçacıkları ve jölemsi kısımlar bisturi ile kesilerek uzaklaştırıldı. Tamamen şeffaf renkte, kan içermeyen bir amniyon kalıncaya kadar işleme devam edildi. Amniyon bisturi yardımıyla 3x3 cm² lik parçalara ayrıldı. Kesilen parçalar sayılarak + %1 P/S + %1 Fungizone içeren steril bir kaptaki toplandı. Bu adım 2 kez tekrarlanarak kandan olabildiğince uzaklaştırma sağlandı.

Enzim Solüsyonu 1: (Dispase 2.5 U/ml)

Parçalar pens ile kabın kenarından süzdürerek steril bir kaptaki **Enzim Solüsyonu 1**'e alınır, hızlıca çalkalanır. Bir amniyon zarından yaklaşık 11-30 parça çıkmaktadır ve bunun için 15 ml Enzim Solüsyonu 1 kullanıldı. Parçalar 9 dk 37° C'deki su banyosunda çalkalamadan inkübe edildi. (Bazal membran sindirimi için). Parçalar

pens yardımıyla hızlı şekilde 40 ml complete RPMI 1640 medyumunu içeren steril kaba konularak en az 3 dk bekletildi.

Complete RPMI 1640: RPMI 1640 içine, %10 FBS +%1 P/S olarak hazırlandı.

%5 FBS'li RPMI 1640 medyumunu: RPMI 1640 içine %5 FBS, %1 P/S ve %1 L-Glu eklendi.

Enzim Solüsyonu 2: %5 FBS'li RPMI 1640 medyumunu içine collagenase, DNaseI eklendi.

Parçalar pensle kabın kenarından süzdürülerek steril kaptaki enzim solüsyonu 2'ye alındı. 2-2.5 saat 37° C'de su banyosunda inkübe edildi. Süre sonunda, solüsyon ve içindeki parçalar 2 adet 50 ml steril falkona eşit olarak paylaştırıldı, üzerine HBSS + %1 P/S + %1 Fungizone eklenerek 50 ml'ye tamamlandı. Tüpler 900 rpm'de 3 dk 20° C santrifüj edildi. Süpernatantlar steril 100 µm cell strainer (Corning, #352360)'dan geçirilerek falkonlara alındı. Falkonların üzerlerine HBSS + %1 P/S + %1 Fungizone eklenerek 50 ml'ye tamamlandı ve 1300 rpm'de 10 dk 20°C santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı ve falkonlardaki pelletler falkona hafifçe vurularak resüspanse edildi.

DMEM W/low glucose medyumunu: DMEM W/low glucose içine %15 FBS, %1 P/S ve %1 L-Glu eklendi.

Pelletin üzerine DMEM W/low glucose medyumunu eklenerek ve trypan blue kullanılarak thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Thoma lamının her iki kenarındaki ortada bulunan büyük karelerdeki hücreler sayıldı, ikiye bölünerek ortalaması alındı. Çıkan rakam 2 X 10.000 X 5 ile çarpıldı. Hücreler flaska ekildi. Ertesi gün (24 saat sonra), hücrelerin medyumunu değiştirildi. Hücrelerin medyumunu 3 günde bir DMEM W/low glucose medyumunuyla değiştirildi. Hücreler konflüent olduğunda pasajlama yapıldı. 25'lik fask için 2 ml ve 75'lik flasklar için 3 ml akutaz kullanıldı. Eski medyum çekildi, HBSS ile 1 kez yıkandı, flaska 2 ml akutaz konuldu ve 37 °C inkübatörde 1-3 dk beklendi. Mikroskopta kontrol edildi. Hücrelerin tamamı kalkınca üzerine 5 ml medyum ilave edildi. 900 rpm'de 7 dk 20° Cde santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve DMEM W/low glucose medyumunu ile resüspanse edilerek flasklara dağıtıldı.

3.2. Hücrelerin Flow Sitometre ile Karakterizasyonu

Kullanılan kimyasal: Mezenkimal kök hücre kiti (BD, 562245)

Hücreler Akkutaz ile kaldırıldı ve yıkandı (BD marka stain buffer ile) . 1400 rpm +4°C 5dk santrifüj edildi. 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde pelet "BD marka Stain buffer" ile resüspanse edildi. 1-10 arası tüpler yazıldı (1.5 ml'lik steril eppendorf). 1×10^6 hücre/ml hücre süspansiyonundan 100 µl hücre tüm tüplere pipetlendi. Böylece her bir eppendorfa 1.10^5 hücre/ml konsantrasyonda hücre konuldu. Her bir tüp için belirlenmiş olan antikorlardan uygun miktarda pipetleme yapıldı.

1.tüp: - / (Sadece hücre (100 µl))

2. PE hMSC Negatif İzotip Kontrol Kokteyl (20 µl)
3. hMSC Pozitif İzotip Kontrol Kokteyl (20 µl)
4. hMSC Pozitif İzotip Kontrol Kokteyl (20 µl) + PE Mouse IgG2b İzotip kontrol (5 µl)(4 pozitifin izotip kontrol kokteyli)
5. FITC Mouse Anti Human CD90 (5 µl)
6. PE Mouse Anti Human CD44 (5 µl)
7. PerCP Mouse Anti human CD105 (5 µl)
8. APC Mouse Anti human CD73 (5 µl)
9. hMSC Pozitif Kokteyl (20 µl) + PE hMSC Negatif Kokteyl (20 µl)
10. hMSC Pozitif Kokteyl (20 µl) + PE Mouse Anti Human CD44 (5 µl) (4 pozitif marker)

Tüpler kısaca vortekslenildi. Tüpler 45 dakika inkübe edildi. Hücre 1 ml Stain buffer ile 2 kez yıkandı. (2 yıkama arası 1400 rpm, 4°C derecede 5 dk santrifüj). Santrifüj sonrası pellet 300-500µl Stain buffer ile resüspanse edildi ve flow sitometri analizine alındı.

3.3. Mezenkimal Hücrelerin Adiposit, Kondrosit ve Osteositlere Yönlendirilmesi

Osteositlere Yönlendirme için **StemPro Osteogenesis kiti** (Life Tech, #A10072-01) kullanıldı.

Flaskta hücrelerin konflüent olduğu belirlendi. Eski medyum çekildi ve flask HBSS ile yıkandı. Flaska 2 ml akutaz konuldu. 1-3 dk inkübatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlendi. Üzerine 5 ml medyum eklendikten sonra 900 rpm'de 7 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Hücre canlılığının belirlenmesi için triphan mavisi kullanıldı. Thoma lamında hücreler sayıldı. Hücreler 96'lık well plate'e ekildi. Hücrelerin üzerine DMEMlow glukoz+FBS+P/S medyumunu konularak hücreler %5 CO₂, 37°C'lik inkübatörde minimum 2 saat boyunca inkübe edildi.

Medyum çekildi ve su banyosunda ısıtılmış Complete Osteogenesis Differentiation medyumunu eklendi. Bu medyum 3 günde bir değiştirilerek 21 gün boyunca hücreler inkübe edildi.

Osteogenesis Differentiation Medyum: 100 ml için, 90 ml StemPro Osteosit Bazal Medyum+ 10 ml StemPro Osteogenesis Supplement+ 50 µl P/S

21 gün sonunda Alizarin Red S boyaması yapılarak invert mikroskopta görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Alizarin Red S Boyaması: 2 gr Alizarin Red S(Santa Cruz, #205998) 100 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve pH ölçüldü (pH 4.1-4.3). Filtreden geçirildi. Hücrelerin üzerindeki medyum çektilererek 1 kez PBS ile yıkandı. Hücreler formalin ile 30 dk oda sıcaklığında fikse edildi. Formalini uzaklaştırmak için hücreler dH₂O ile 2 veya 3 kere yıkandı.

Alizarin Red S hücrelerin üzerine konuldu ve 30 dk beklenildi. dH₂O ie 3 kez yıkandı. PBS konularak invert mikroskopta görüntülendi.

Adipositlere yönlendirme için bulunan **StemPro Adipogenesis kiti** (Life Tech, #A10070-01) kullanıldı. Osteosite farklılaştırmada olduğu gibi akutazla kaldırılan hücreler santrifüj edilip süpernatantları atıldıktan sonra 96 kuyucuklu plate'te her bir kuyucuğa 1×10^4 cells/cm² hücre ekildi. Hücrelerin üzerine DMEMlow glukoz+FBS+P/S medyumunu konularak hücreler %5 CO₂, 37°C'lik inkübatörde minimum 2 saat boyunca inkübe edildi. Medyum çekildi ve su banyosunda ısıtılmış Complete Adipogenesis Differentiation medyumunu eklendi. Bu medyum 3 günde bir değiştirilerek 21 gün boyunca hücreler inkübe edildi. 21 gün sonunda Oil Red O boyaması yapılarak invert mikroskopta görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Adipogenesis Differentiation Medyum: 100 ml için, 90 ml StemPro Adiposit Bazal Medyum 10 ml StemPro Adipogenesis Supplement+ 50 µl P/S

Oil Red O Boyaması: 50 ml izopropanol içine 250 mg Oil red O (Sigma, 00625) konularak stok solüsyon hazırlandı. Hücrelerin üzerindeki medyum çektirildi 1 kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin fikse olması için formalin konuldu ve 30 dk oda sıcaklığında beklenildi. Formalini uzaklaştırmak için hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. 30 ml Oil Red O stok solüsyonuna 20 ml dH₂O eklenerek boyama solüsyonu hazırlandı. %60'lık izopropanol solüsyonu hazırlandı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra hazırlanan %60'lık izopropanol solüsyonu hücrelerin üzerine konuldu ve 5 dk beklenildi. İzopropanol solüsyonu çektirildikten hemen sonra Oil Red O solüsyonu eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında beklenildi. Hücreler dH₂O ile 3 kez yıkandı ve zıt boyama yapıldı. PBS eklenerek invert mikroskopta görüntülendi.

Kondrositlere yönlendirme için **StemPro Kondrogenesis kiti** (Life Tech, #A10072-01) kullanıldı. Osteosite farklılaştırmada olduğu gibi akutazla kaldırılan hücreler santrifüj edilip süpernatantları atıldıktan sonra 1×10^6 hücre ependorfa ekilerek pellet kültürü yapıldı. 21 gün inkübe edilerek ve 3 günde bir eski medyum çektirilerek 1 ml Complete Kondrogenesis Differentiation medyumunu eklendi.

Complete Kondrogenesis Differentiation Medyum: 100 ml için, 90 ml StemPro Kondrosit Bazal Medyum + 10 ml StemPro Kondrogenesis Supplement+ 50 µl P/S 21 gün sonunda Alcian Blue ve Sirius Red boyaması yapıldı ve fotoğraflandı.

Alcian Blue Boyaması: Pellet halindeki hücreler parafine ekildikten sonra kesitleri alındı.

%1'lik Alcian Blue ve %3 asetik asit içeren boyama solüsyonu hazırlandı. Kesitler boyama solüsyonunda 30 dk bekletildi. Kesitler 3 kez %1'lik HCl'de yıkandı. Zıt boyama yapılarak kapatma yapıldı.

Sirius Red Boyaması: 0,1 gr Direct Red 80 (Sigma, #365548), 100 ml pikrik asit (Sigma, #P6744-1GA) içerisinde çözülerek Sirius Red boyası hazırlanır. Kesitler solüsyona

konularak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. %2'lik asetik asit içeren solüsyonda kesitler yıkandı. Zıt boyaması yapılarak kapatma yapıldı.

3.4.İmmünofloresan Boyamalar

İmmünofloresan deneyleri sonucunda CD90, CD105 ve Vimentin boymaları yapılmıştır. Akutazla kaldırılan hücreler santrifüj edilip süpernantantları atıldıktan sonra Thoma lamında sayıldı. Chamber slide'lar jelatinle kaplandı ve en az 2 saat beklenir. Chamber slide'lara hücre-medyum süspansiyonu konuldu. (4'lu chamber slide için kuyucuk başına 10^4 hücre - 500 μ l medyum içinde). Gece boyunca 37°C'lik inkübatörde tutuldu. Chamber slide'lar PBS'le yıkandı ve ters kapatılarak en az 1 saat oda ısısında kurumaları sağlandı. Hücreler soğuk, 1:1 metanol-aseton karışımı ile -20°C'de 10 dk boyunca fikse edildi. Fazla fiksatif uzaklaştırılır. PBS ile yıkanır (2x5 dk). Ultra V Block ile 5 dk boyunca bloklandı. 1 saat oda sıcaklığında primer antikor ile inkübasyon yapıldı. Primer antiko Antibody diluentle ile dilue edilip hazırlandı. İzotip kontrolleri de primer antikorlarla aynı konsantrasyonda hazırlandı. Antikorlar:

o Vimentin: Monoklonal Mouse IgG1 (Clone V9,# M0725)

o CD105: Rabbit IgG, (Abcam, #ab107595) (1:200)

o CD90: Rabbit IgG, (Abcam, #ab133350) (1:100)

PBS ile 3x5 dk yıkama yapıldı. Florasan işaretli, primer antikora uygun sekonder antikor hazırlandı ve 1 saat, karanlıkta, oda ısısında inkübasyon yapıldı.

Sekonder antikorlar:

o Goat anti-rabbit IgG-FITC: (Santa Cruz, #sc-2012), yeşil (1:250)

o Goat anti-mouse IgG-PE: (Santa Cruz, #sc-3738), kırmızı (1:250)

PBS ile 3x5 dk yıkama yapıldı. DAPI'li kapama solüsyonu ile kapatma yapıldı.

3.5. Aristolohik Asit Kullanılarak KBY Modelinin Oluşturulması

Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen 4 haftalık yaklaşık 150-200 g ağırlığına sahip Wistar türü erkek sıçanlar kullanıldı. Aristolohik asit I (Sigma, #A5512) kullanımıyla KBY meydana gelmektedir. 100 mg AA 10 ml DMSO (Sigma, #D2650) içerisinde çözüldü. KBY modeli için her 3 gün de bir 10 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak AA enjeksiyonu 6 hafta boyunca yapıldı. Enjeksiyon sonrasında KBY'nin meydana gelmesi için 6 hafta beklendi. Sham grubuna ise 6 hafta boyunca DMSO verildi ve 6 hafta beklenildi.

6 hafta boyunca AA verilir ve 6 hafta beklendikten sonra 6 adet hayvan kurban edildi. Ketamin HCl ve %2 xylazine ile birlikte intraperitoneal anesteziden sonra böbrekler hızlı bir şekilde alınıp işleme sokuldu.

AA verilen 11 hayvana amniyon zarından izole edilen 6×10^5 mezenkimal kök hücre enjeksiyonu 0.5 ml medyum içerisinde kuyruk veninden verildi. Hayvanlara mezenkimal kök hücre verilmesinden 1 gün önce Cyclosporin A (Cell Signaling, #9973S) subkutan verildi ve bu işlem hücre verilmesinden 7 gün sonra kadar devam etti. 100 mg cyclosporin 10 ml DMSO içerisinde çözüldü ve hayvan başına 1mg/gün olmak üzere verildi. Cyclosporinin verilmesinin amacı, sıçanların insan plasentası kökenli mezenkimal kök hücrelerini reddetmesini engellemek içindir.

Kök hücre enjeksiyonunu takiben, 11 hayvandan 5 adet hayvan 30 gün bekletilirken (AA+KH+30 grubu) (n=5) diğer kalan 6 hayvan ise 60 gün bekletildi (AA+KH+60 grubu)(n=6). 30 gün ve 60 gün bekletilen hayvanlar sakrifiye edilerek böbrekleri hızlı bir şekilde işleme alındı.

Gruplar:

Sham+30 (n=5): 6 hafta DMSO verildikten sonra 6 hafta daha beklenildi. AA verilen gruplara kök hücre verilmesini takiben bu grup da 30 gün daha bekletildi.

Sham+60 (n=6): 6 hafta DMSO verildikten sonra 6 hafta daha beklenildi. AA verilen gruplara kök hücre verilmesini takiben bu grup da 60 gün daha bekletildi.

AA grubu (n=6): 6 hafta AA verildikten sonra 6 hafta hastalık gelişiminin sağlanması için bekletildi.

AA+KH+30: 6 hafta AA verildikten sonra 6 hafta hastalık gelişiminin sağlanması için bekletildikten sonra kuyruk veninden mezenkimal kök hücre verildi ve 30 gün iyileşme süresi için bekletildi.

AA+KH+60: 6 hafta AA verildikten sonra 6 hafta hastalık gelişiminin sağlanması için bekletildikten sonra kuyruk veninden mezenkimal kök hücre verildi ve 30 gün iyileşme süresi için bekletildi.

Böbrekler alındıktan sonra formaline maruz tutularak fikse olmaları sağlandı. Fikse edilen dokular, 2-3 saat musluk suyunda yıkandı ve ardından sıra ile %70, %80, %90'lık alkol serilerinde 24'er saat ve %100'lük alkolde 3 saat tutularak dehidrasyon işleminden geçirildi. Ksilol içinde 3 defa 2'şer dakika bekletilerek şeffaştırıldı. 58°C'ye ayarlı etüvde, dokular 3 defa 1'er saatlik parafin banyosunda tutuldu. 3.saatin sonunda içerisinde dokular bulunan temiz parafin etüvden çıkarıldı ve oda ısısında donması sağlandı. Daha sonra, hazırlanan parafin bloklardan alınan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitlere rutin ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal teknikler uygulandı.

AA 'nın KBY'ye neden olup olmadığını görmek için özel boyamalar yapıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda Kronik böbrek yetmezliği sonucunda fibrozisin meydana geldiği ve ekstrasellüler matrikste artışın olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da fibrozisi göstermek için Masson Trikrom ve Sirius Red boyası yapıldı.

3.6. Özel Boyamalar

3.6.1. Masson Trikrom Boyaması

Solüsyonlar:

1. Regaud Hematoksilen

- 1 gr Hematoksilen (Merck, #1.04302.0025)
- 10 ml %95 alkol
- 10 ml Gliserin (Sigma, #G-5516)
- 80 ml dH₂O

2. Pikrik Alkol

- 2 hacim %95 alkol
- %7 doymuş Pikrik asit (Merck, #1.08685.2500)
- 1 hacim %95 alkol

3. Ferric Ammonium Sülfat (FeNH₄)SO₂.12H₂O (Merck, #A146895):

- dH₂O'da %5 'lik olarak hazırlandı. 45°C'de ısıtıldı.

4. Fosfomolibdik asit (Merck, #1.00532.0100) : dH₂O'da %1'lik olarak çözüldü.

5. Anilin Blue

- 2,5 gr Anilin Blue (Merck, #42755)
- 2 ml Asetik asit
- 100 ml dH₂O

6. Biebrich Scarlet-Acit Fuksin

- 90 ml dH₂O'da %1'lik . Biebrich Scarlet
- 10 ml dH₂O'da %1'lik Asit-Fuksin
- 1 ml asetik asit

Boyama protokolü:

1. Bloklardan alınan kesitler deparafinize edildi ve alkol serilerinden geçirilerek suya getirildi

2. 45°C'de ısıtılan Ferric Ammonium Sülfatta kesitler 5 dk bekletildi.

3. Kesitler musluk suyunda yıkandı.

4. Regaud Hematoksilende 5 dk bekletildi.

5.Kesitler %95'lik alkolde yıkandı.

6.Pikrik alkolden geçirildi.

7._Biebrich Scarlet-Acit Fuksin'de 3 dk

8. dH₂O'da yıkandı.

9.Fosfomolibdik asitte 5 dk

10.Anilin Blue 5 dk

11. dH₂O'da yıkandı.

12. Fosfomolibdik asitte 5 dk

13. Önce %95'lik alkolden daha sonra %100'lük alkolden geçirildi ve ksilolden de geçirilerek kapatma yapıldı.

3.6.2.Sirius Red Boyaması

- Bloklardan alınan kesitler deparafinize edildi ve alkol serilerinden geçirilerek suya getirildi.
- 0,1 gr Direct Red 80 (Sigma, #365548), 100 ml pikrik asit (Sigma, #P6744-1GA) içerisinde çözülerek Sirius Red boyası hazırlandı. Kesitler solüsyona konularak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. %2'lik asetik asit içeren solüsyonda kesitler yıkandı. Zıt boyaması yapıp alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek kapatma yapıldı.

3.7. İmmünohistokimya Yöntemi

Deneklere ait doku bloklarından alınan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitler superfrost plus (manyetik olarak statik) lamalar üzerine alınarak 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon aşaması için, parafin kesitler 2 defa 10'ar dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. Distile su ile 5 dakika muamele edildi. Dokudaki antijenik epitoplara ortaya çıkması için kesitler, sitrik asit tamponu (pH:6.0; 900 ml distile suda 2,1 gr sitrik asit) içine alınarak üç defa 5'şer dakika mikrodalga fırında 750 watta tutuldu. Mikrodalga uygulamasından sonra kesitler sitrik asit içerisinde 30 dakika boyunca oda ısısında soğutuldu. Kesitler PBS'e alındıktan sonra dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildi. Daha sonra kesitler 3 defa 5'er dakika PBS'ten geçirildi. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için metanolle hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika inkübe edildi. Kesitler PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra dokulardaki özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek amacıyla, bloklama solüsyonu (Ultra V Block, LabVision Corporation, #TA-125UB) ile 8 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Serum kesitler üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra, kesitler fare monoklonal PCNA (PC-10)(Cell Signaling,#2586S) 1:1000, tavşan monoklonal Ki67(Abcam, #16667) 1:100 ve fare monoklonal insan mitokondriyal antikor 1:250 (Abcam, #92824) primer antikorlarıyla

+4°C'de gece boyu muamele edildi. Kesitler primer antikolar ile inkübasyondan sonra, 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitler, biyotinleştirilmiş ve primer antikora bağlanma özelliği olan keçi anti-fare ve anti-tavşan sekonder antikoru (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent) (Dako LSAB 2 System-HRP #K0609) ile 45 dakika inkübe edildi. Sonrasında 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler, 45 dakika streptavidin peroksidaz kompleksi (Streptavidin Peroxidase (Ready-To-Use) Dako LSAB 2 System-HRP #K0609) ile inkübasyona bırakıldı. PBS ile tekrar 3 kez 5'er dakika yıkamadan sonra, immunoreaktiviteyi saptamak için kesitler AEC (AEC substrate system (Ready-To-Use) (Scytek,#SHP125) ile 1-5 dakika muamele edildi. Daha sonra kesitler distile suya alındı ve sonrasında Mayer'in hematoksileni ile 20 saniye zıt boyama yapılarak akar musluk suyunda yıkandı. Kesitler Kaiser'in gliserol jelatini (MERCK Darmstadt Almanya, OB514196) kapatma solüsyonu ile kapatıldı, Axioplan ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) böbrek kesitlerindeki PCNA, Ki67, insan mitokondriyal antikor proteinlerinin dağılımları ve immunoreaktiviteleri tespit edilip incelendi ve fotoğraflandı.

3.8. TUNEL(Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı dUTP uç etiketi) Yöntemi

Deneklere ait doku bloklarından alınan 5 mikrometre kalınlığındaki kesitler superfrost plus lamlar üzerine alınarak 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Deparafinizasyon aşaması için, parafin kesitler 2 defa 10'ar dakika ksilolden geçirildi. Kesitler daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) 5'er dakika bekletildi. Kesitler suya konarak TUNEL işlemine başlandı. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dk yıkama yapıldı. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için metanolle hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 30 dakika inkübe edildi. Soğutulmuş Permeabilizasyon solüsyonunda +4°C'de 8 dakika inkübe edildi. PBS'de 2x5 dk yıkandı.

Permeabilizasyon Solüsyonu: 100 ml dH₂O+ 100 µl Triton-X(Sigma, #t8787)+ 0.1 gr Sodyum Sitrat

TUNEL solüsyonunun hazırlanması:

In situ cell detection kiti (Roche, #11684817910) kullanıldı.

- Enzim solüsyonu (vial 1) 50 µl pipetlendi
- İşaretleme solüsyonu (vial 2) 450 µl pipetlendi
- Ek olarak TUNEL dilüsyon solüsyonu eklenerek dilüsyon oranı ½'ye düşürüldü.

TUNEL solüsyonu örneklerin üzerine uygulandı ve kesitler 37°C'de, 1 saat, nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi. . PBS'de 2x5 dk yıkandı. 30 µl Converter-POD kesitler üzerine damlatıldı ve 30 dk, nemli ve karanlık ortamda inkübe edildi. . PBS'de 2x5 dk yıkandı. AEC kromojen ile geliştirme yapıldı. Zıt boyama yapılarak Kaisers jelatin ile kapatma yapıldı. Işık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı.

3.9. Western Blot Yöntemi

3.9.1. Böbrek Dokusundan Lizat Hazırlama

Kullanılan solüsyonlar

- **Lizis Buffer:**
 - ❖ 10ml 0,1M Tris (pH 7.4), (Bio-Rad, #161-0719)
 - ❖ 90ml distile su, 1ml 100X Na-orthovanadate (Sigma, #S6508)
 - ❖ 1gr SDS (Sigma, # L4390)
- **Proteaz inhibitör kokteyli** (Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, #1169749800120)

Doku temini esnasında kriyotüpler içine alınan ve sıvı nitrojende (-196°C) muhafaza edilen böbreklerden aşağıda anlatılan şekilde lizatlar hazırlandı. Böbrek örnekleri, içerisinde sıvı nitrojen bulunan havanda dövülerek dokuların tamamen parçalanması sağlandı. Toz haline gelen böbrekler eppendorf tüplerine alınarak ağırlıkları tartıldı. 0,2 gr doku başına 600 mikrolitre lizis buffer ve 24 mikrolitre proteaz inhibitör kokteyli olacak şekilde hesaplama yapılarak eppendorflara lizis buffer ve proteaz inhibitör kokteyli eklendi. Örnekler 10 dakika buz üzerinde bekledikten sonra sonikasyon ile homojenizasyonları sağlandı. 30 dakika daha buz üzerinde bekletilerek toplam 40 dakika lizis buffer ile inkübasyonu sağlandı. Ardından örnekler 15.000 rpm'de 15 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar alınıp pelet kısmı atılarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatlar -20°C de muhafaza edildi.

3.9.2. Protein miktarının belirlenmesi

Kullanılan solüsyonlar ve Cihazlar

- **Bovine Serum Albümin** (Sigma, # A 9647)
 - **BioRad DC Protein Assay Kit (BD, #500-0116)**
 - **Spektrofotometre:** µQuant BioTek Spectrophotometer
- BioRad DC Protein Assay Kitinin içerisinde 3 solüsyon bulunmaktadır:
1. A solüsyonu (BD, #500-0113)
 2. B solüsyonu (BD, #5000-114)
 3. S solüsyonu (BD, #5000-115)

1. Kitin içerisindeki hazırlama şartlarına göre önce A' solüsyonu hazırlandı. (A' solüsyonu: 1ml A+20 µl S)

2. BSA 1mg/ml dH₂O içerisinde hazırlandı. BSA için, 8 tane eppendorf tüp üzerine 0-7'ye kadar numara yazıldı. S0 numuneye mililitresinde 1 mg BSA'dan 1000 µl konuldu,

diğer tüplere ise 500 µl dH₂O eklendi. İlk tüpten (S0), 500 µl alınarak diğer tüpe (S1) 500 µl ilave edildi ve böylece numune dilue edilmiş olur. S1 den de S2 ye 500 µl ilave edilir ve bu şekilde devam edilerek dilüe edildi.

Standart BSA hazırlanışı: Çiftli olarak hazırlandı, her bir kuyucuğa 5 µl BSA+25 µl A' solüsyonu ve 200 µl B solüsyonu konuldu.

Kör: Çiftli olarak hazırlandı, her bir kuyucuğa 5 µl dH₂O +25 µl A' solüsyonu ve 200 µl B solüsyonu sırasıyla konuldu.

Numune: Süpernatant halindeki ana numuneden 5 µl örnek +25 µl A' solüsyonu ve 200 µl B solüsyonu sırasıyla konuldu. Numunelerin dilüsyonları hazırlandı (1/20, 1/50). Numuneler 96 kuyucuklu plate'e konularak absorbands değerleri 750nm'de okutuldu.

3.9.3.SDS-PAGE Western Blot Protokolü

Kullanılan Solüsyonlar

5X Yürütme Tamponu:

- ❖ 9 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- ❖ 43.2 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- ❖ 3gr SDS (Sigma,# L4390)
- ❖ 600 ml Distile Su
- ❖ Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı

Transfer Tamponu:

- ❖ 14.3 gr Glisin (Bio-Rad, #161-0718)
- ❖ 3 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- ❖ 700 ml bidistile su içerisinde çözüldü. Bu solüsyona 200 ml Metanol (Merck,#1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):

- ❖ 5gr süt tozu (Bio-Rad) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.

10X TBS Tamponu:

- ❖ 60.55 gr Tris (Bio-Rad, #161-0719)
- ❖ 87.66 gr NaCl
- ❖ 800 ml distile suda çözdürülür. PH HCl ile 7.4'e ayarlanır. PH ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

TBS-T Solüsyonu:

❖ 1 litre 1X TBS içerisine 1000µl Tween-20 (Sigma, P9416) eklendi ve oda ısısında saklandı.

- **Thick Blot Paper** (Bio-Rad,#165-0921)
- **Blotting-Grade Blocker nonfat dry milk (Süt tozu)** (Bio-Rad, # 170-6404)
- **West Pico Chemiluminescent substrates** (Pierce, #34080)
- **Nitroselüloz Membran** (Amersham,#RPN203D)
- **Kaleidoscope Prestained Standards, broad range** (Bio-Rad,#161-0324)
- **CL- Xposure film 18x24 cm** (Thermo Scientific,# 34089)
- **PQ Universal Developer 5L** (ILFORD,#1757314)
- **Hypam Fixer 5L** (ILFORD,#1758285)

Çalışılacak olan proteinin kilo dalton (kDa) ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Her kuyucuğa 8 mikrolitre numune yüklenerek jel elektroforezi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrasında immunoblotting yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Proteinlerin nitrosellüloz membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısısında pH'sı 7.2-7.4 olan ,% 0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu ile hazırlanan % 5 lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Membran PCNA, p57, PARP-1 ve Beta Aktin antikorları ile uygun sıcaklık ve sürede karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar liste halinde aşağıda görülmektedir. İnkübasyon sonrasında, 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkamanın ardından membran, sekonder antikorla oda ısısında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membran SuperSignal Chemiluminisans'la uygun sürede geliştirilip, membrandaki protein bandları karanlık odada hiperfilme aktarıldı.

Primer Antikor	Dilüsyon	Katalog Numarası	Sekonder Antikor
PCNA (PC-10)	1:2000	Cell Signaling,#2586S	1:2000 BioRad 170-6516
P57	1:250	Santa Cruz, #sc-1040	1:1000 BioRad 170-6515
PARP-1	1:500	Abcam, #ab32138	1:1000 BioRad 170-6515
Beta Aktin	1:5000	Abcam, #ab6276	1:5000 BioRad 170-6516

Tablo 3.9.3. Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

3.10. Kreatinin ve Üre Testleri

Deney gruplarındaki hayvanlar sakrifiye edilmeden önce kanları alındı. Kanlar 3500 rpm'de 7 dakika santrifüj edilerek serumları toplandı. Kreatinin assay kit ve üre assay kit kullanılarak firmanın verdiği protokol doğrultusunda ölçümler yapıldı. Üre ölçümüne dayalı olarak da kan üre nitrojen (BUN) hesaplandı.

3.11.İstatistik

Tüm deney gruplarındaki hayvan ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldükten sonra GraphPad programı kullanılarak One Way ANOVA testinde Tukey metodu ile çoklu karşılaştırma yapıldı ve $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

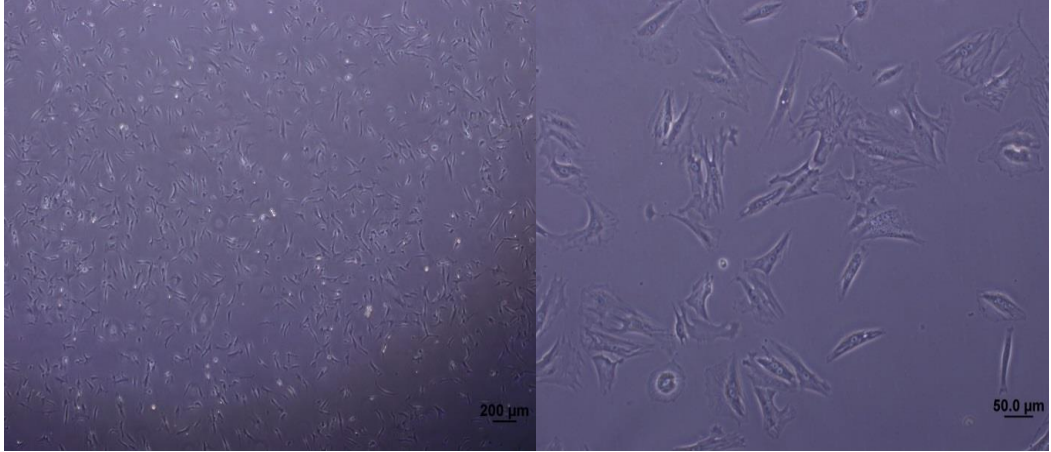
Western Blot bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçüldü. Değerler Beta Aktin yoğunluklarına göre normalize edildi Elde edilen verilere GraphPad programı kullanılarak One Way ANOVA testinde Tukey metodu ile çoklu karşılaştırma yapıldı ve $p \leq 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Amniyon Membranından Kök Hücre İzolasyonu Bulguları

Normal gebelik süreci geçirip doğum yapan kadınlardan plasenta temini sağlanmıştır. Plasenta temini sağlandıktan sonra Term plasentası amniyon membranından mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu protokolü laboratuvar şartlarına oturtulmaya çalışılmıştır ve doğum sonrası alınan plasentalar, hücre kültürü laboratuvarında laminar kabin içine alınarak plasentadaki amniyon membranı, koryon membranından ayrılmıştır. Ayrılan amniyon membranından kök hücre izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon yapılan hücreler her gün takip edilerek 3 günde bir medyumunu değiştirilmiştir ve pasajlanarak hücre sayısında artış sağlanmıştır.

İzolasyon sonucunda hücre kültüründeki insan amniyotik kök hücreleri invert mikroskop ile fotoğraflanmıştır.



Şekil 4.1. Amniyotik kökenli mezenkimal kök hücrelerin invert mikroskopundaki görüntüsü.

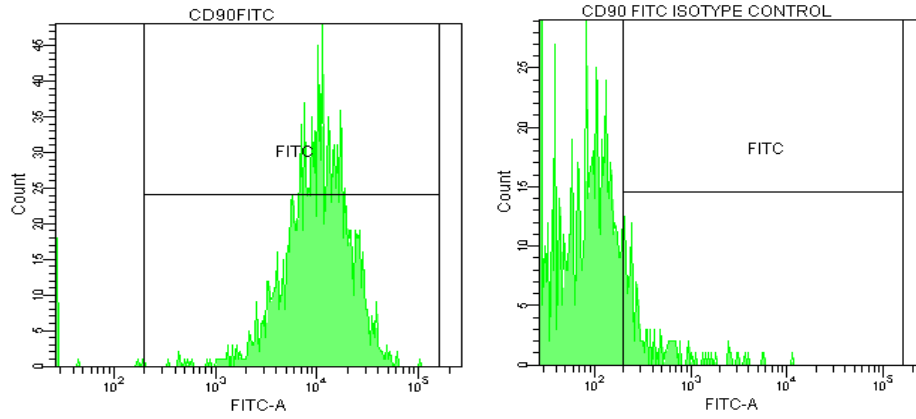
4.2. Hücrelerin Flow Sitometre ile Karakterizasyonu Bulguları

Hücreler izole edildikten sonra yeterli sayıya ulaştıklarında Mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD44, CD90, CD73, CD105 pozitif, CD34, CD45, CD14, CD19 ve HLA-DR negatif olacak şekilde flow sitometri ile karakterizasyonu yapıldı.

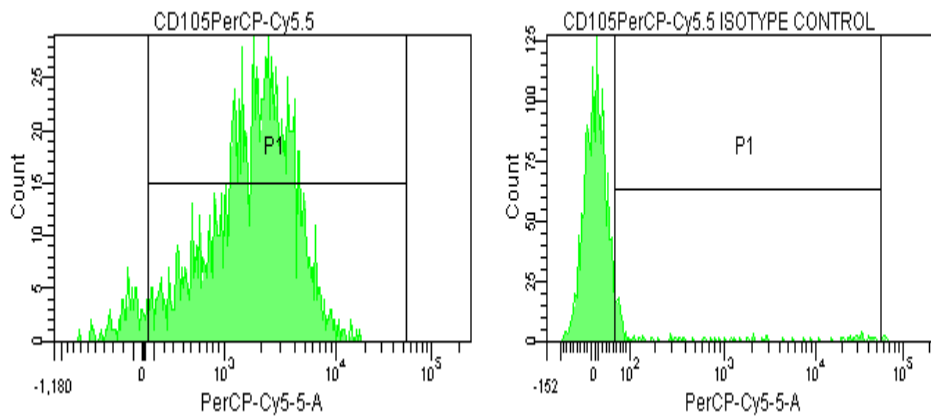
İzole edilen hücreler flow sitometri sonuçları aşağıdaki şekildedir. CD 90, CD73, CD105 ve CD44 kök hücre markerlarıyla yapılan Flow sitometri deney sonuçlarına göre pozitif

hücrelerin oranları , CD90, 98.8, CD73 %93.5, CD105 %95,3, CD44 % 88,6 iken negatif kokteylin (CD34, CD11b, CD19, CD44, HLA-DR) oranı %3.9'dur.

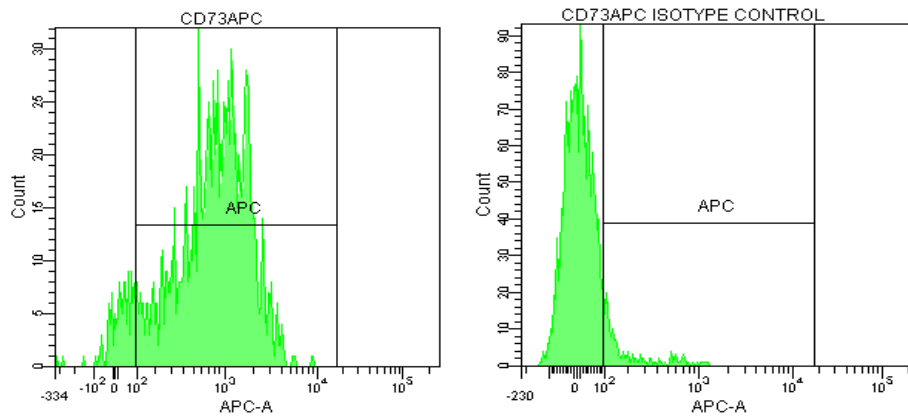
CD 90 :



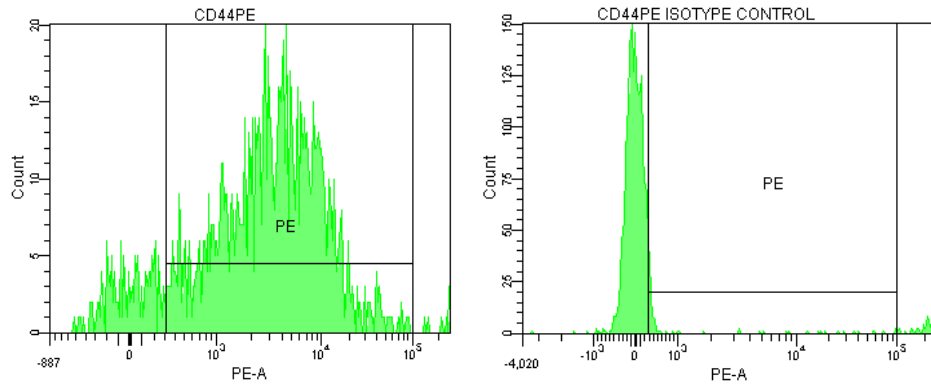
CD 105:



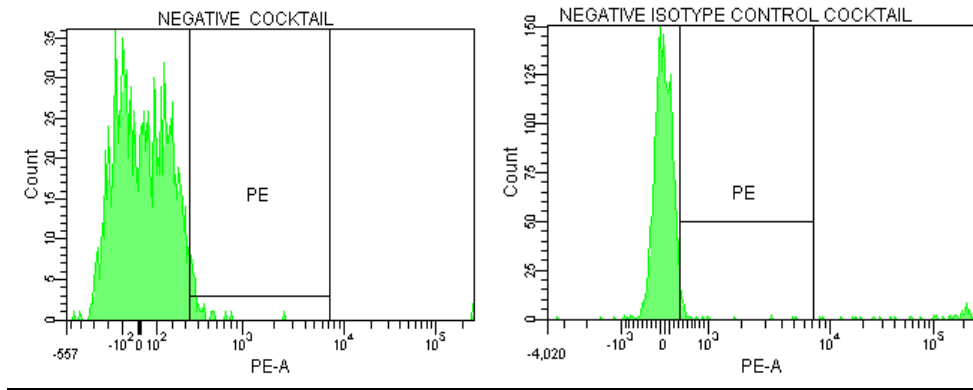
CD 73:



CD 44:

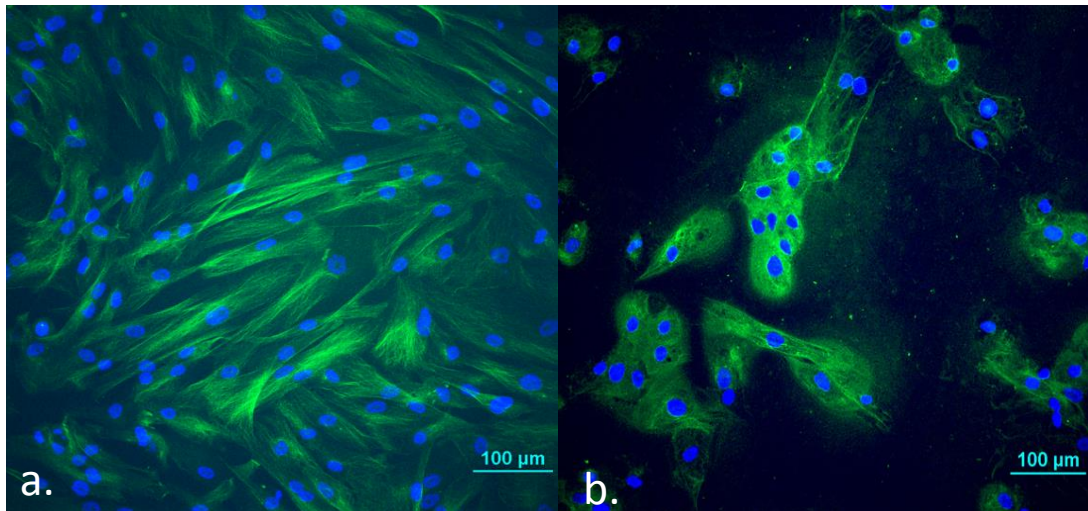


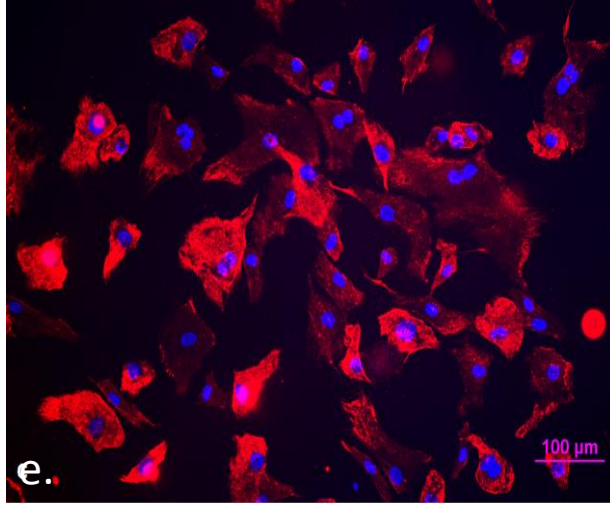
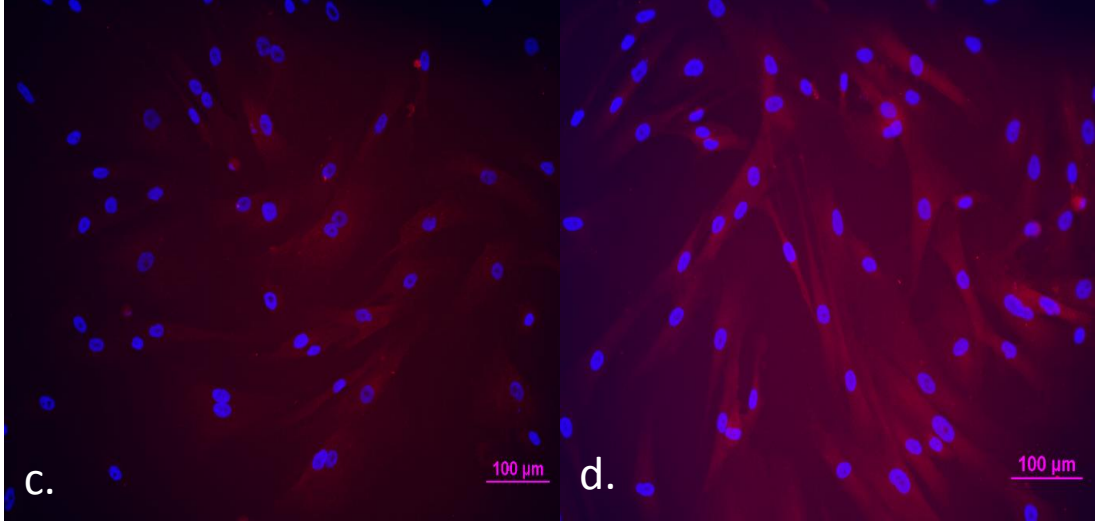
Negatif Kontrol Kokteyl:



4.3. İmmünofloresan Boyamaları Bulguları

İmmünofloresan deneyler sonucunda CD90, CD105, CD73, CD44 ve mezenkimal hücre belirteci olan Vimentin boyanmaları yapılmıştır.

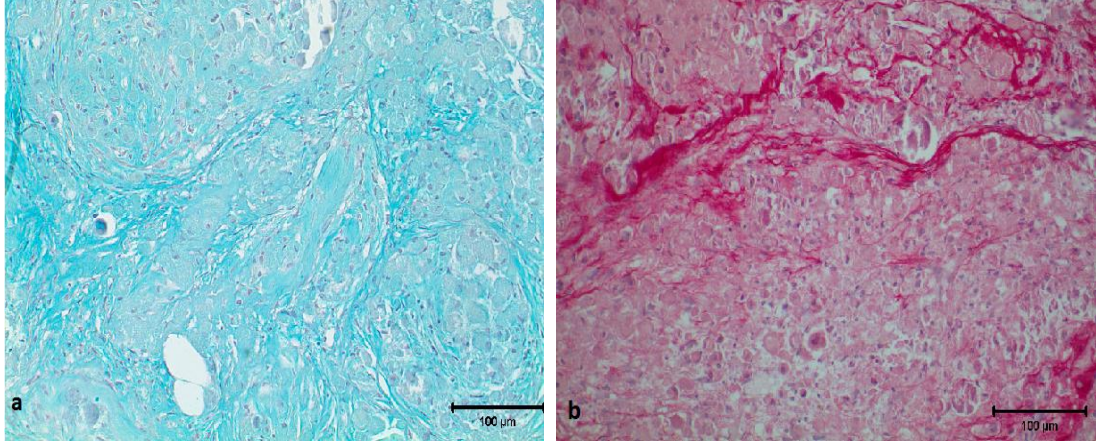




Şekil 4.3. İmmü Floresan boyamalar. CD90 boyaması x20 (a). CD105 boyaması x20 (b). CD73 boyaması x20 (c). CD44 boyaması x20 (d). Vimentin boyaması x20 (e).

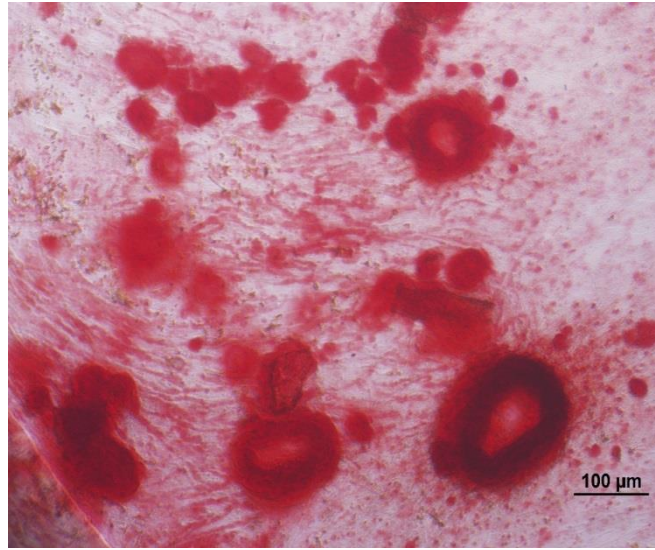
4.4. Mezenkimal hücrelerin Adiposit, Kondrosit ve Osteositlere Yönlendirilmesi Bulguları

Kondrojenik farklılaşmayı göstermek için yönlendirilen hücrelerde için Alcian Blue ve kollajen liflerin gösterilmesi için Sirius Red boyaması yapılmıştır. Kondrosite yönlendirmede yapılan pellet kültüründe farklılaşan MKH'ler kıkırdak yapısını oluşturmaya başlar. Alcian blue ile kıkırdak proteoglikanlar boyanırken, sirius red ile de kıkırdak kollajenleri boyanmıştır.



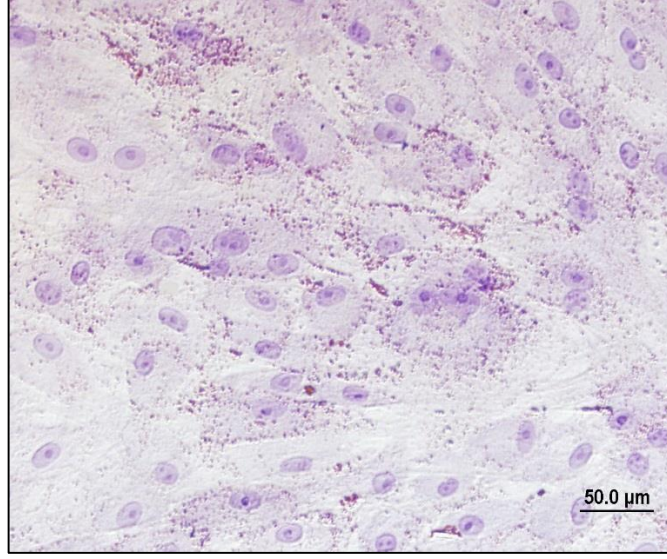
Şekil 4.4.1. Mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere yönlendirilmesi. (a) Alcian Blue ile boyama (20x)
(b) Sirius Red ile boyama (20x)

Osteojenik farklılaşmayı göstermek için yönlendirilen hücrelerde kalsiyum depolanmalarını belirlemek için Alizarin red S boyaması yapılmıştır.



Şekil 4.4.2. Mezenkimal kök hücrelerin osteositlere yönlendirilmesi. Alizarin Red S boyaması x20.

Adipojenik farklılaşmayı göstermek için yönlendirilen yağ hücreleri için Oil red O boyası yapılmıştır.

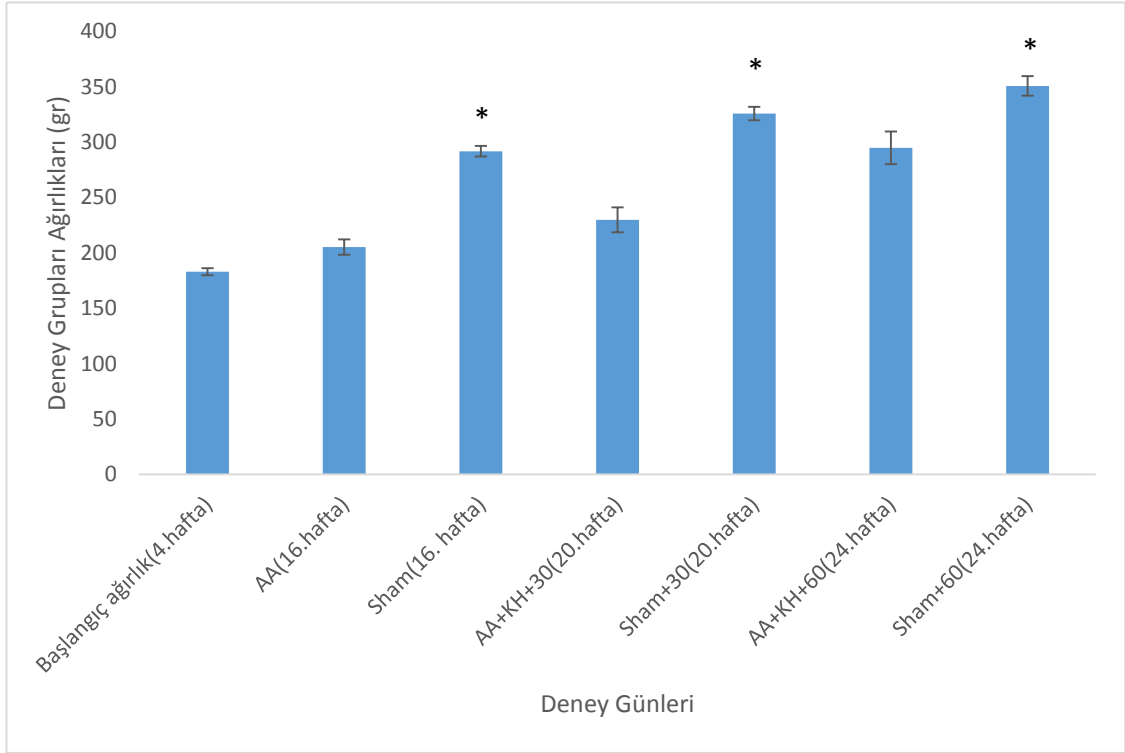


Şekil 4.4.3. Mezenkimal kök hücrelerin adipositlere yönlendirilmesi. Oil Red O boyaması.

4.5. Aristolohik Asit ile Kronik böbrek Yetmezliği Modeli Oluşturulması

4 haftalık yaklaşık 150-200 gr ağırlığına sahip Wistar türü sıçanlar erkek kullanılmıştır. Kronik böbrek yetmezliği modeli için her 3 gün de bir 10 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak AA enjeksiyonu 6 hafta boyunca yapılmıştır. Kontrol grubuna ise DMSO verilmiştir. 6 hafta AA enjeksiyonu yapıldıktan sonra 6 hafta beklenmiştir. Bunun sonucunda Kronik Böbrek Yetmezliği oluşması beklenmiştir.

Deney başlangıcında 16. haftada, 20. haftada ve 24. haftada AA, Sham ve AA uygulandıktan sonra kök hücre verilen grupların ağırlıkları ölçülmüştür. AA'nın deney hayvanlarında anlamlı olarak ağırlık azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5.1.).



Şekil 4.5.1. AA gruplarının ve sham gruplarının ağırlıkları. 16. Hafta ise 6 hafta AA uygulandıktan sonra 6 hafta bekleme süreci sonundaki ağırlıklardır. 20. hafta AA+KH+30 gruplarının ağırlıklarıyken, 24. hafta AA+KH+60 gruplarının ağırlıklarıdır. Sham gruplarına sadece 6 hafta DMSO uygulanmıştır.

4.6. Özel Boyamalar: Masson Trikrom ve Sirius Red Boyamaları Bulguları

Daha önce yapılan çalışmalarda Kronik böbrek yetmezliği sonucunda fibrozisin meydana geldiği ve ekstrasellüler matrikste artışın olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada da fibrozisi göstermek için Masson Trikrom ve Sirius Red boyası yapılmıştır. Aristolohik asit uygulanan grupların yanı sıra sham grubuna, AA uygulandıktan sonra kök hücre verilir 30 ve 60 gün bekleyen gruplara da Masson Trikrom ve Sirius Red boyaması yapılarak aralarındaki farklılıkların gösterilmesi amaçlanmıştır.

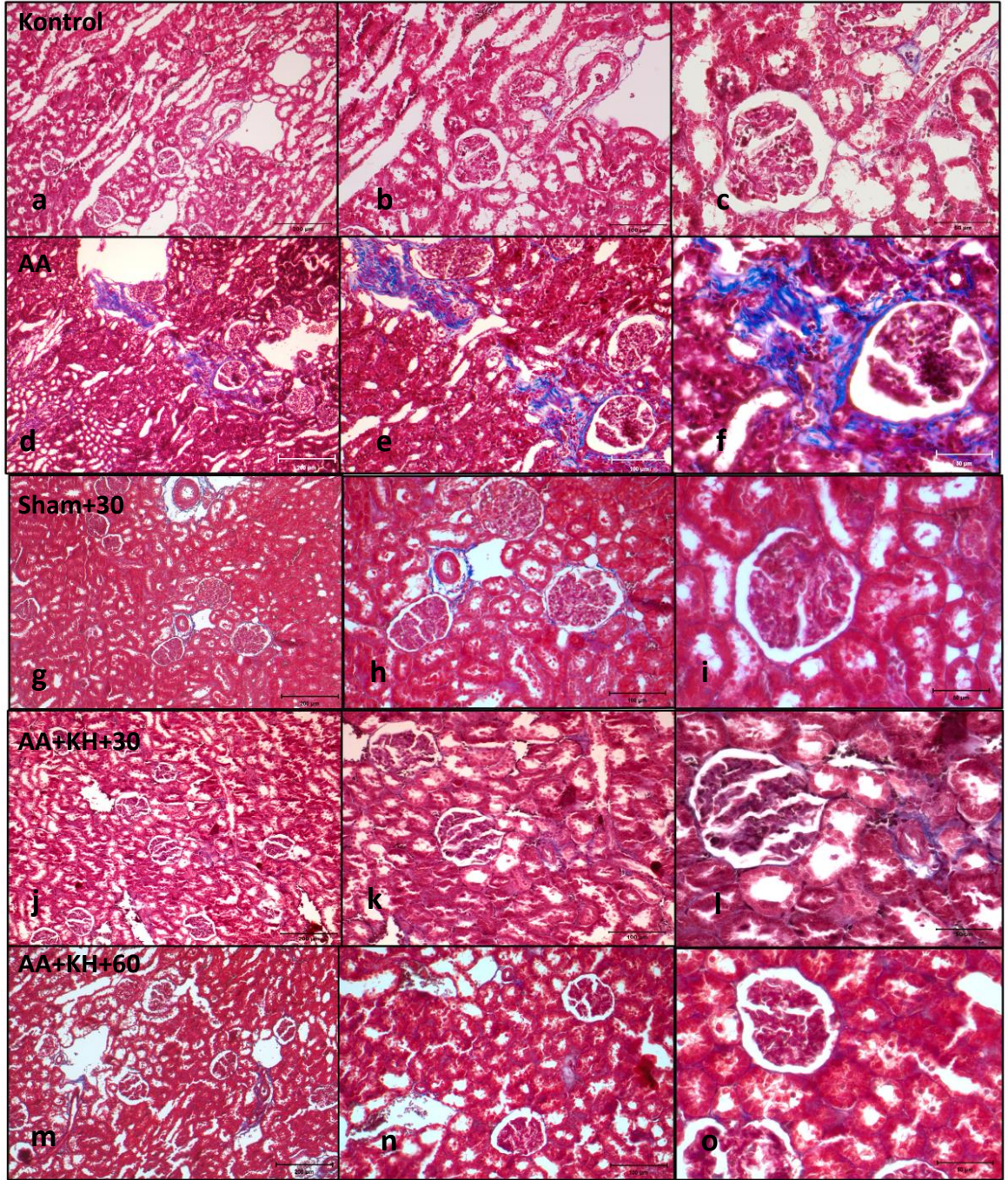
Renal fibrozis, fibrozis oluşumunu daha fazla arttıran ve ekstrasellüler matriks bileşenlerinin sentezinin arttırılmasını sağlayan sürekli böbrek inflamasyonuyla birlikte kombine olan ekstrasellüler matriks bileşenlerinin aşırı üretiminden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada AA grubundaki ekstrasellüler matriksteki artış ve kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplardaki ekstrasellüler matriks Masson Trikrom boyasıyla gösterilmiştir (Şekil 4.6.1,2). Kollajen artışı ise Sirius Red boyasıyla (Şekil 4.6.3,4) gösterilmiştir.

AA uygulanan grupta bağ doku alanları sham, AA uygulandıktan sonra kök hücre verilen gruplara göre daha fazla olduğu ve bu alanların anilin blue ile koyu mavi olarak daha koyu boyandığı gösterilmiştir. AA uygulanmasından sonra bağ doku

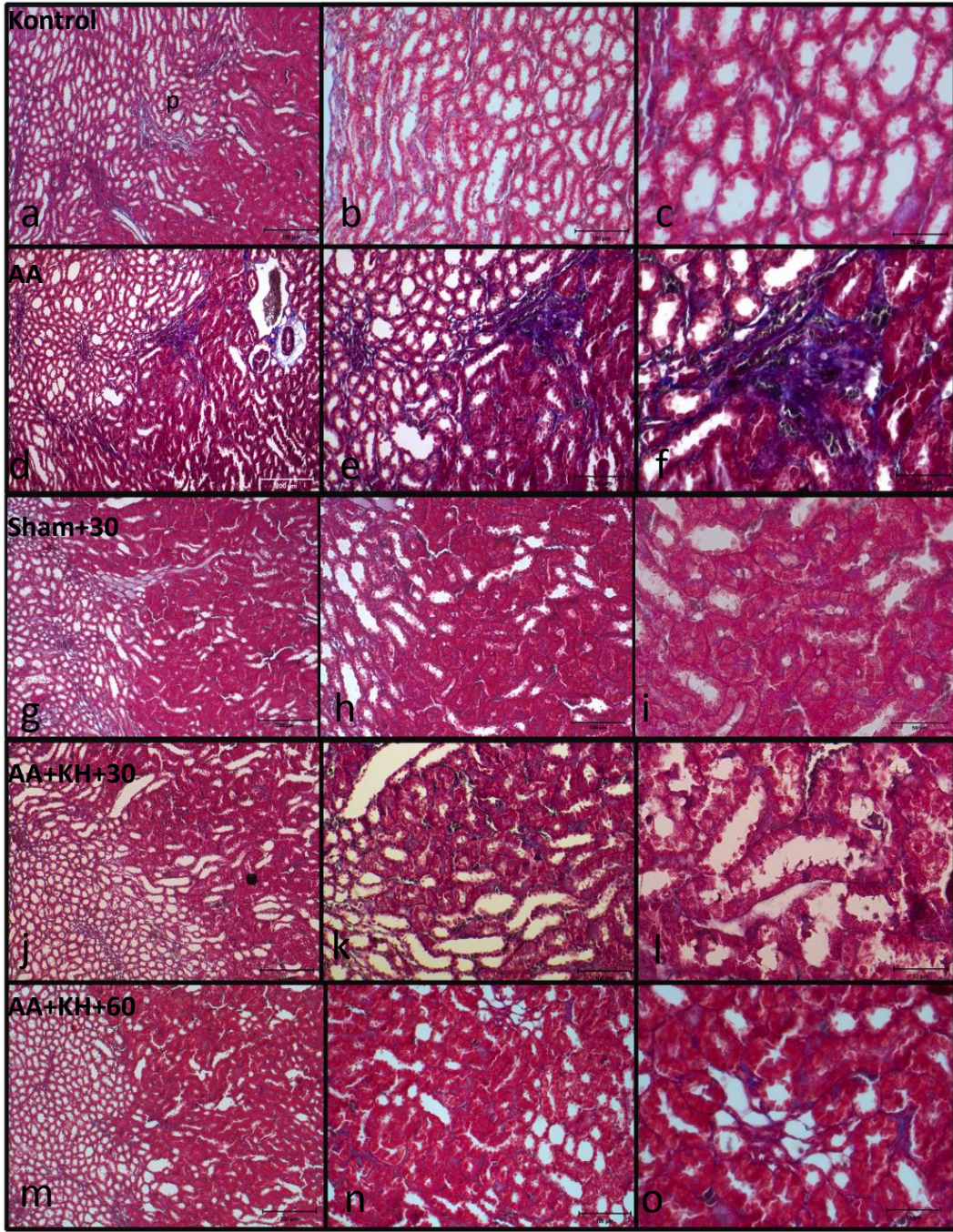
alanları artmıştır ve özellikle korteks bölgesinde proksimal ve distal tübüllerin çevresinde yoğun olduğu anilin blue ile boyanarak tespit edilmiştir.

AA uygulanan grupta kollajen miktarı; sham ve AA uygulandıktan sonra kök hücre verilen gruplara göre daha fazladır. Bu kollajen birikimleri özellikle proksimal ve distal tübüllerin çevresinde yoğun olarak gözlenmiştir ve sirius red ile boyanmıştır.

Masson Trikrom Boyaması:

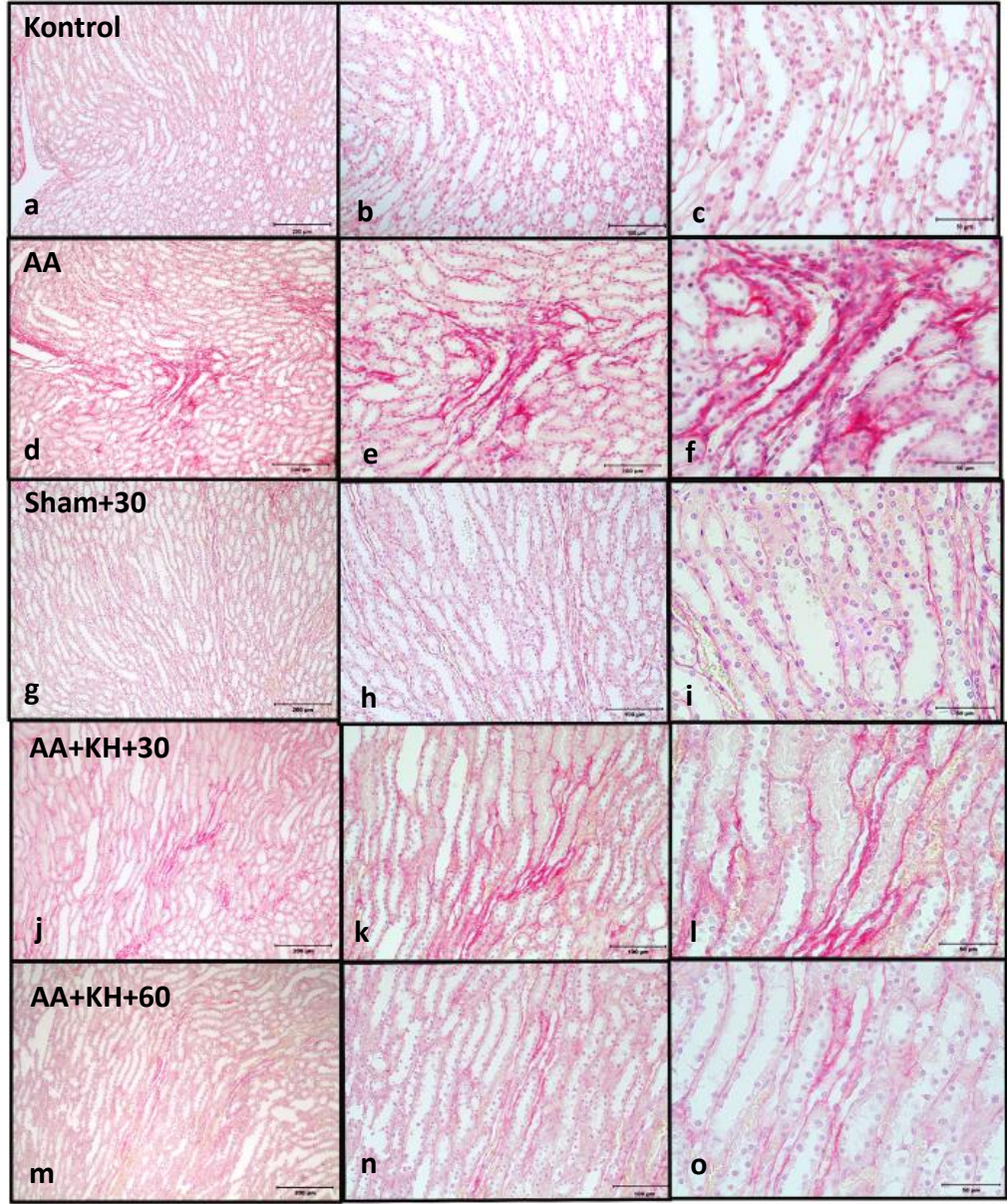


Şekil 4.6.1. Masson Trikrom Boyaması. Glomerül ve çevresi. Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c). Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o)

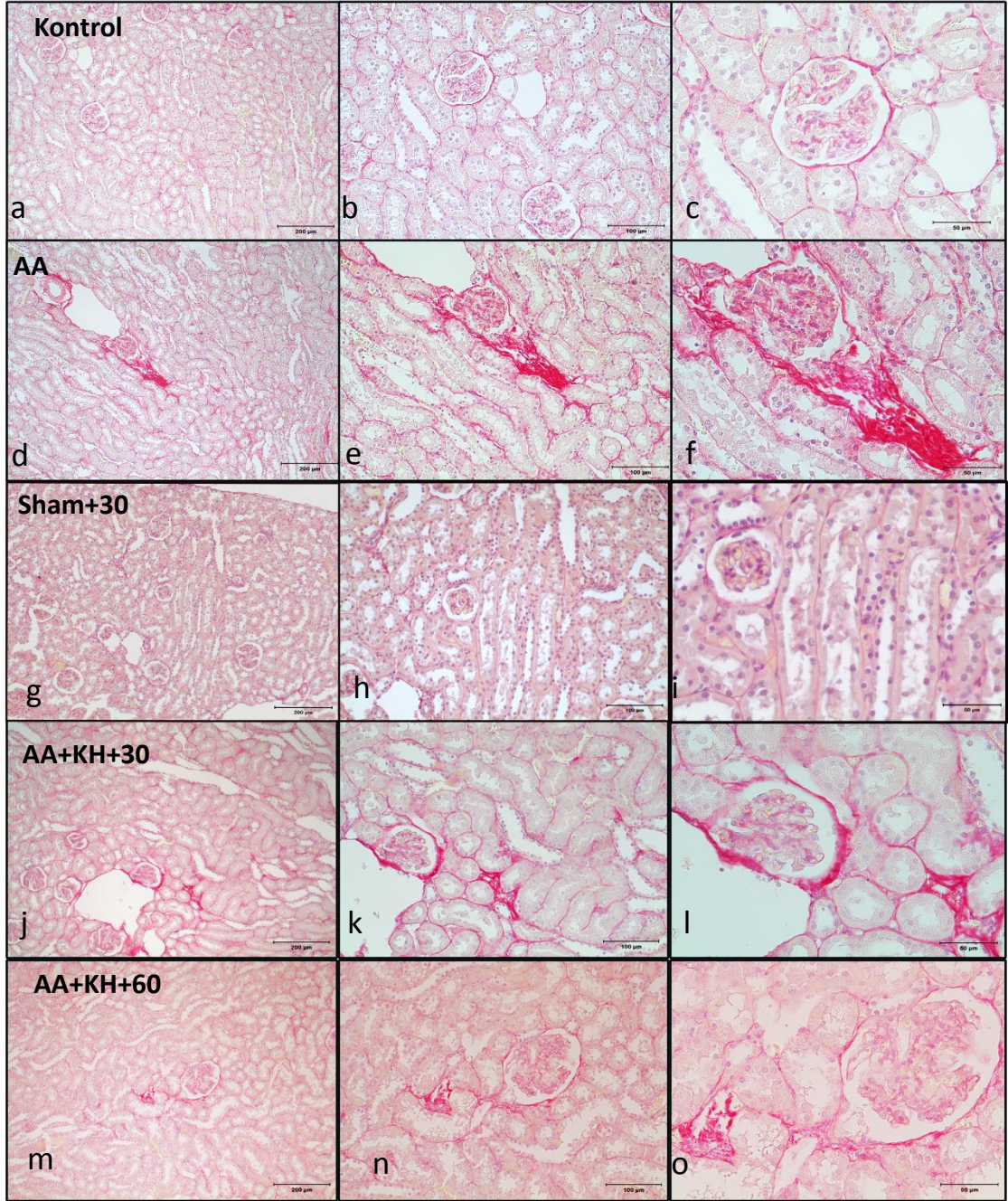


Şekil 4.6.2. Masson Trikrom Boyaması. Proksimal ve distal tübül. Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c). Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o).

Sirius Red Boyamaları:



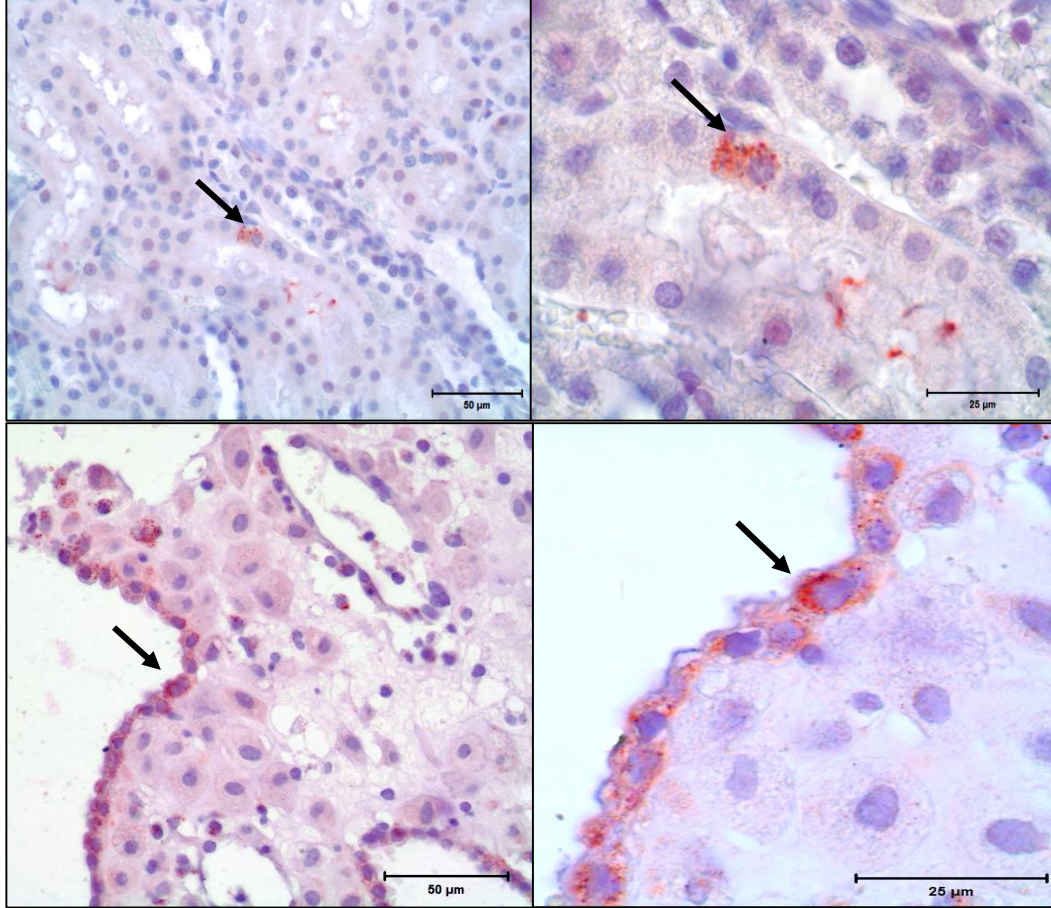
Şekil 4.6.3. Sirius Red Boyaması. .Proksimal ve distal tübül. Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c). Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o).



Şekil 4.6.4. Sirius Red Boyaması.Glomerül ve çevresi.. Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c). Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o).

4.7. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Mezenkimal kök hücrelerin böbrek dokusuna transplante olduğu belirlenmesi için İnsan Mitokondriyal Antikor ile immünohistokimyasal boyama yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak da insan desidua dokusu kullanılmıştır.



Şekil 4.7.1. İnsan mitokondriyal antikor ile immünohistokimya boyaması. Kök hücre enjeksiyonu uygulanan sıçan böbrek kesiti x40 (a). X100 (b). Pozitif kontrol olarak kullanılan insan desidua kesiti x40 (c). X100 (d).

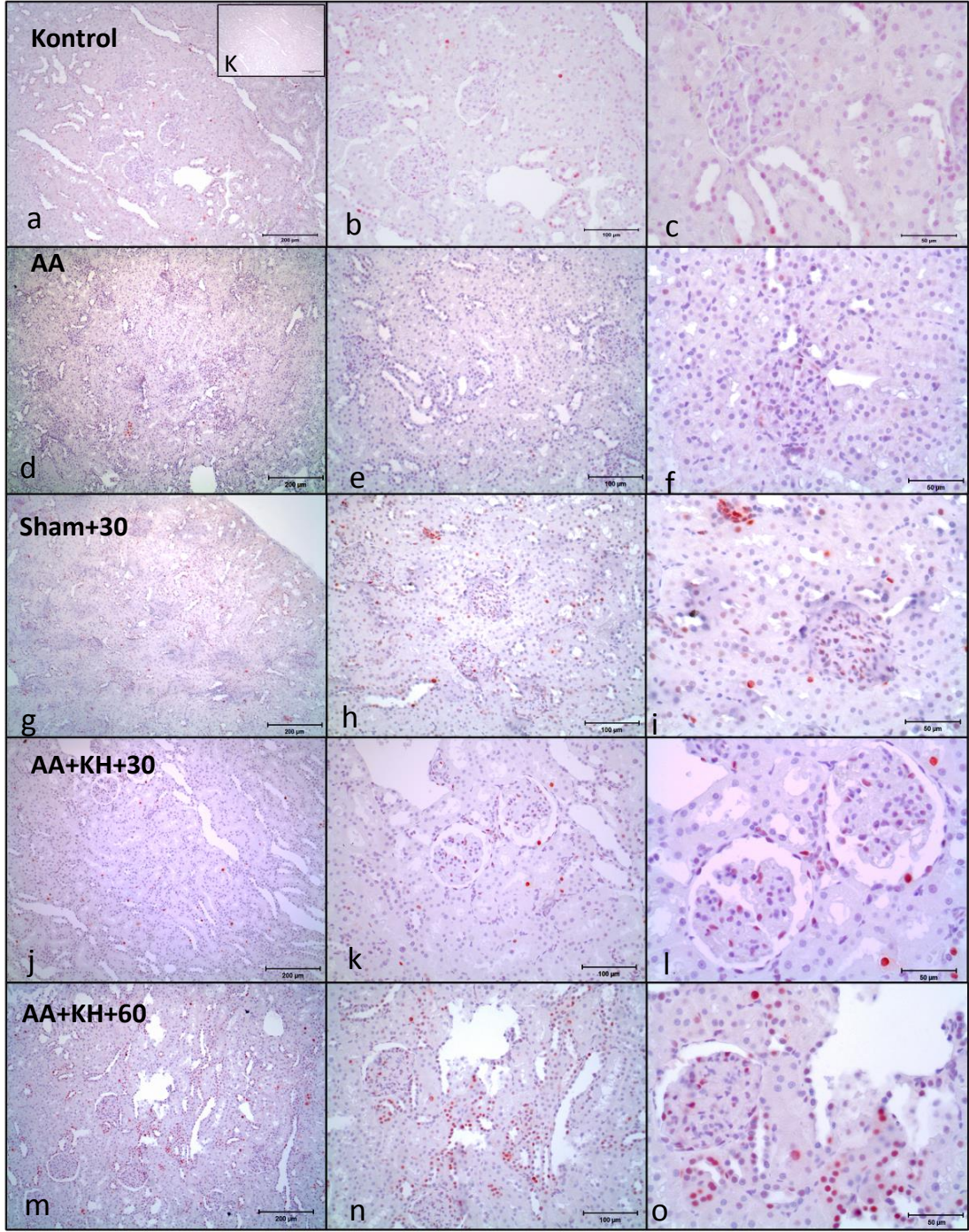
Bu çalışmada, PCNA'nın immünohistokimyasal boyanması tüm gruplar için yapılmıştır. PCNA ekspresyonu Aristolohik asit gruplarında azalırken, Sham ve Aristolohik asit uygulandıktan sonra kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplarında arttığı gözlenmiştir. PCNA ekspresyonu böbrek cisimciğinde, proksimal ve distal tübül hücrelerinde boyanmıştır (Şekil 4.7.2).

Bu çalışmada, Ki67'nin immünohistokimyasal boyanması tüm gruplar için yapılmıştır. Ki67 ekspresyonu Aristolohic acid gruplarında azalırken, Sham ve Aristolohik asit uygulandıktan sonra kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplarında arttığı ve özellikle distal ve proksimal tübül hücrelerinde boyandığı gözlenmiştir (Şekil 4.7.3).

4.8. TUNEL Bulguları

Bu alışmada, TUNEL testi tüm gruplar için yapılmıştır. Aristolohik asit gruplarında boyanma daha fazla iken, Sham ve AA uygulandıktan sonra kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplarında boyanmanın azaldığı gözlenmiştir (şekil 4.8.1,2). AA grubunda distal tübüllerde ve özellikle proksimal tübüllerde boyanmanın olduğu belirlenmiştir.

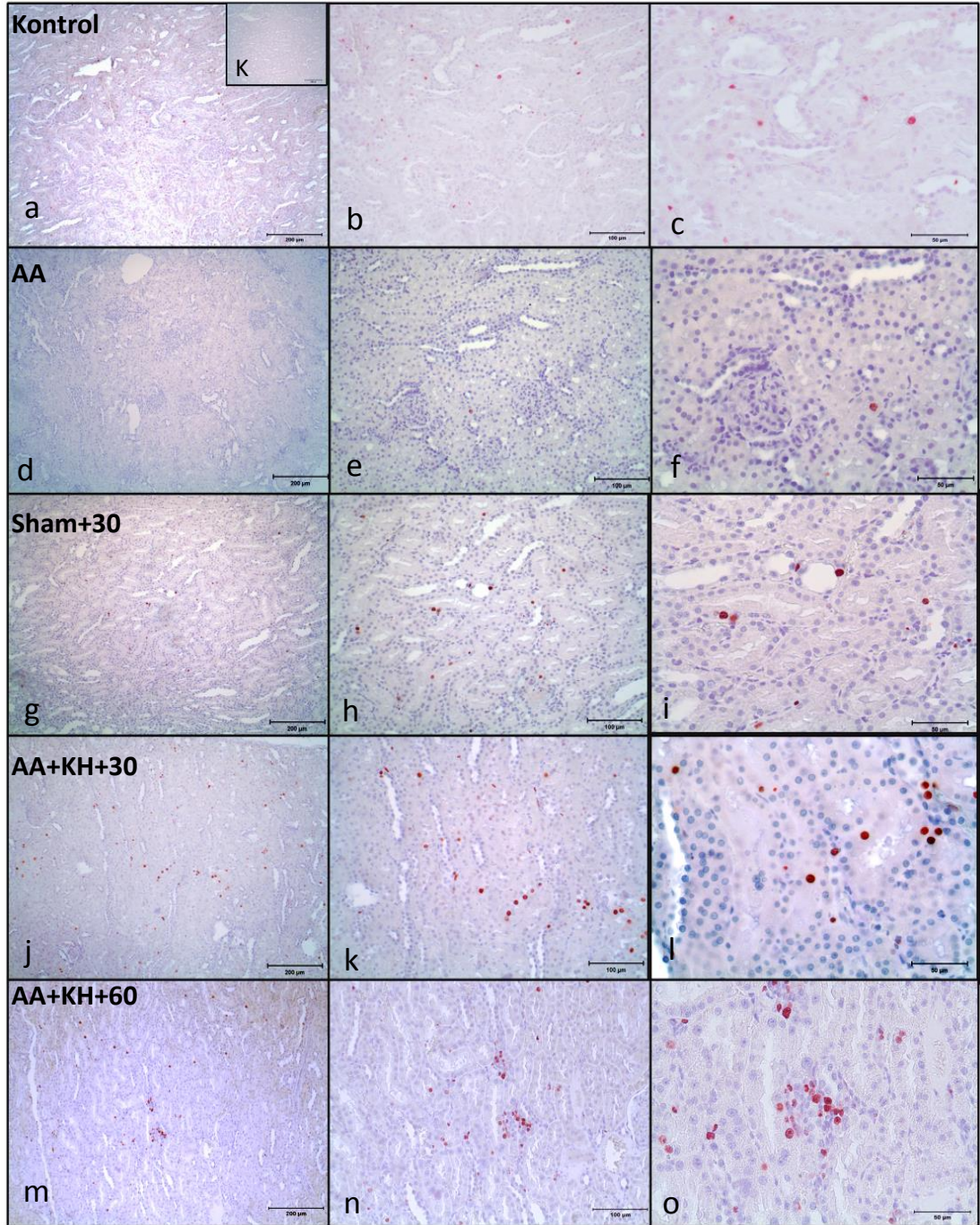
PCNA immünohistokimyasal boyaması:



Şekil 4.7.2. PCNA immünohistokimyasal boyaması Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c).

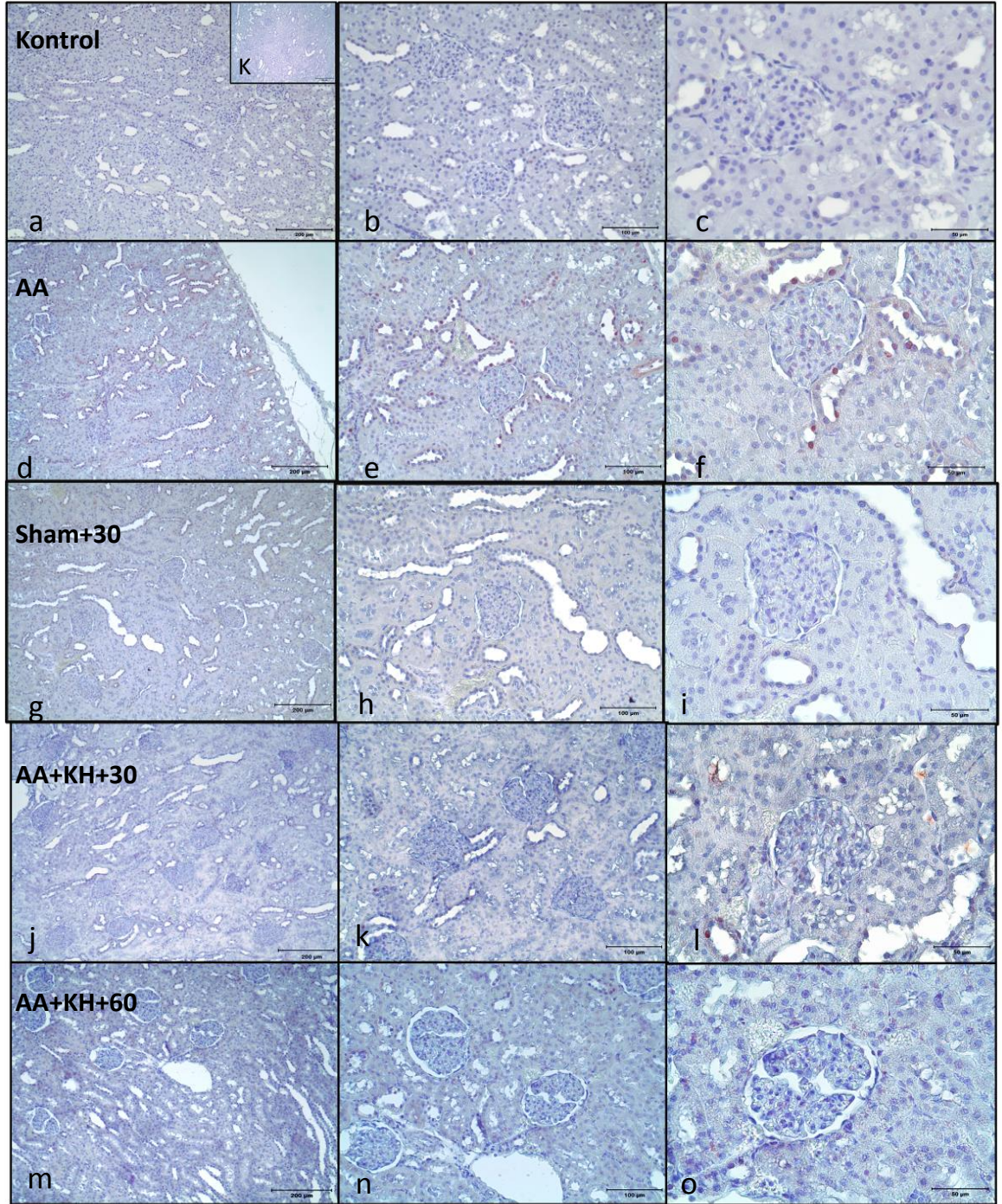
Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o). Negatif kontrol x10 (K)

Ki67 immünohistokimya boyaması:



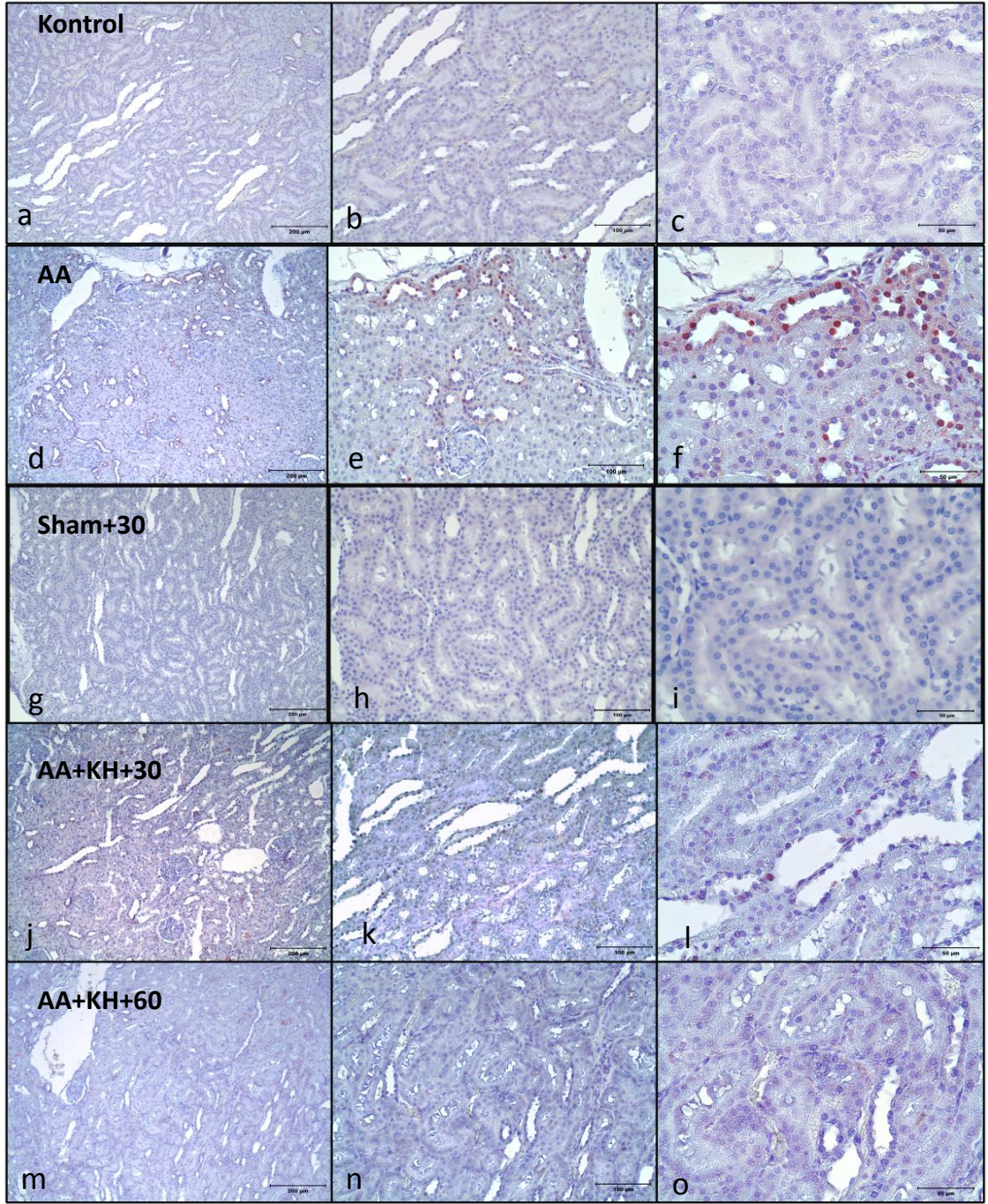
Şekil 4.7.3. Ki67 immünohistokimyasal boyaması Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c). Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o). Negatif Kontrol (K)

TUNEL Boyaması :



Şekil 4.8.1.: TUNEL Boyaması. Glomerül ve çevresi. Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c).

Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o). Negatif kontrol x10 (K)

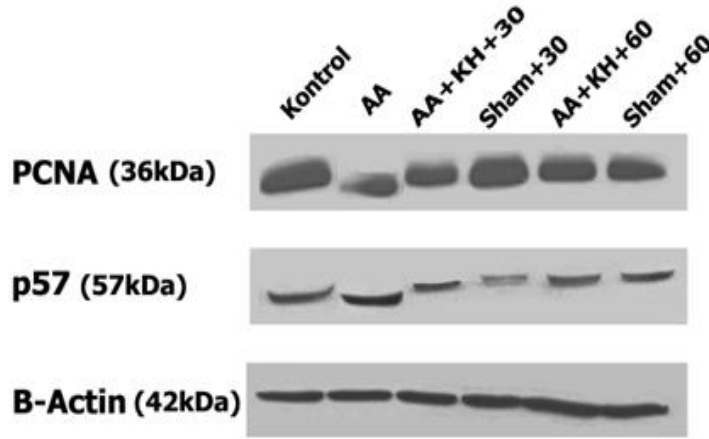


Şekil 4.8.2.: TUNEL Boyaması. Proksimal ve distal tübül. Kontrol x10 (a). x20 (b). x40 (c).

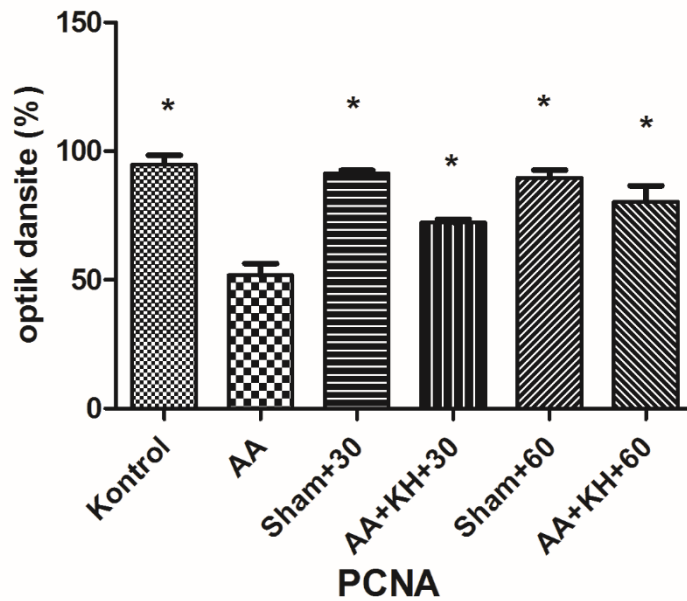
Aristolohik asit uygulanan grup (AA) x10 (d). X20 (e). X40 (f). Sham+30 grubu x10 (g). X20 (h). X40 (i). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün bekletilen grup (AA+KH+30) x10 (j). X20 (k). X40 (l). Aristolohik asit uygulanıp kök hücre enjeksiyonundan sonra 60 gün bekletilen grup (AA+KH+60) x10 (m). X20 (n). X40 (o).

4.9. Western Blot Analizi Bulguları

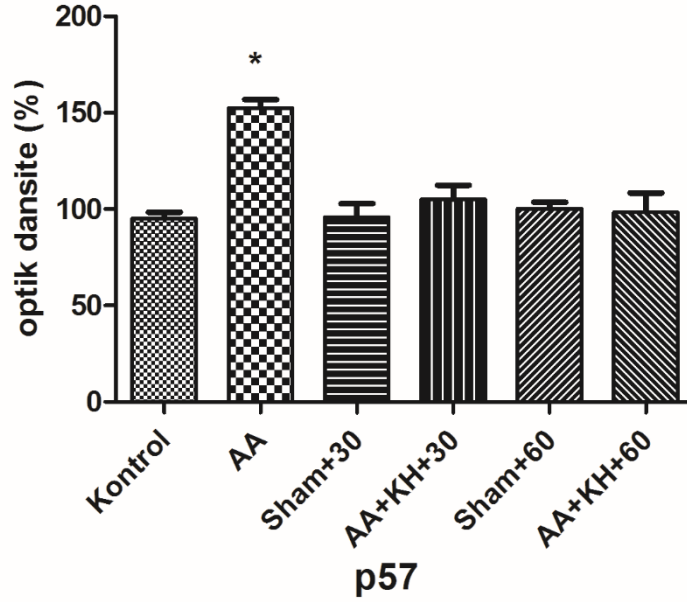
Kontrol, Sham+30, Sham+60, AA, AA+KH+30 ve AA+KH+60 gruplarıyla ilişkin deneylerin sonrasında alınan böbrek dokularına proliferasyon ve hücre siklusu ilişkili proteinlerin western blot analizi yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre PCNA proteinin western blot analizinde, AA grubunun sham ve kök hücre verilen gruplarla karşılaştırılmasının sonucunda anlamlı derecede ekspresyonunun azaldığı ($p \leq 0,05$) teyit edilmiştir. Bunun yanında hücre siklus inhibitörü olan p57 ekspresyonunun da AA grubunda diğer sham ve kök hücre gruplarına göre arttığı ($p \leq 0,05$) teyit edilmiştir. Western Blot bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçülerek değerler Beta Aktin yoğunluklarına göre normalize edilmiştir.



Şekil 4.9.1. PCNA, p57 ve B-aktin Western Blot bantları.

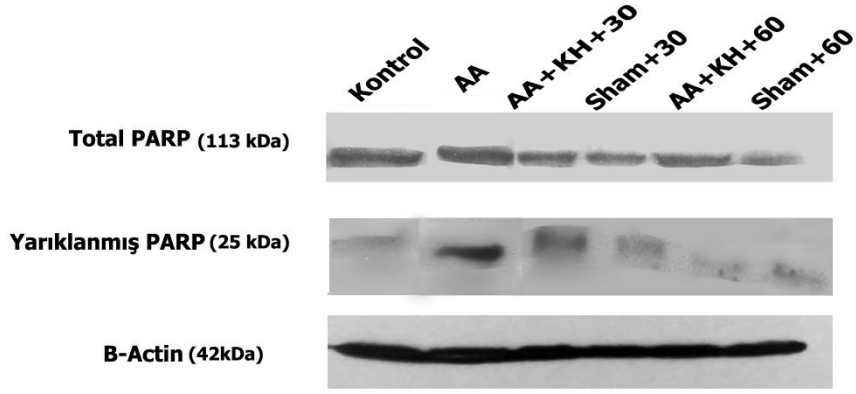


Şekil 4.9.2. AA ve kök hücre uygulamasından sonra PCNA ekspresyon düzeyleri. İstatistiksel grafikler. AA grubundaki PCNA ekspresyonu Kontrol, Sham grupları (Sham+30 ve Sham+60) ve kök hücre transplante edilen gruplara (AA+KH+30 ve AA+KH+60) göre anlamlı derecede azalma göstermiştir. ($p \leq 0.05$) Kontrol, Sham grupları ve Kök hücre transplante edilen gruplar da birbirleriyle kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p \leq 0.05$).

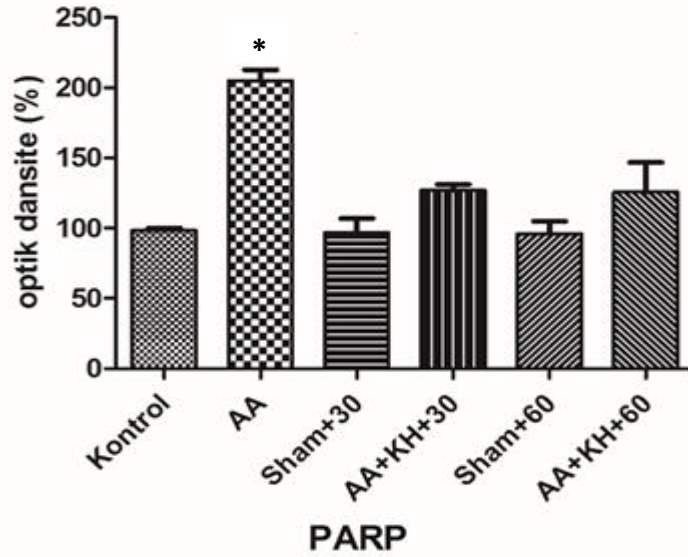


Şekil 4.9.3. AA ve kök hücre uygulamasından sonra p57 ekspresyon düzeyleri. İstatistiksel grafikler. AA grubundaki p57 ekspresyonu Kontrol, Sham grupları (Sham+30 ve Sham+60) ve kök hücre transplante edilen gruplara (AA+KH+30 ve AA+KH+60) göre anlamlı derecede artış göstermiştir ($p \leq 0.05$). Kontrol, Sham grupları ve Kök hücre transplante edilen gruplar da birbirleriyle kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p \leq 0.05$).

Kontrol, Sham+30, Sham+60, AA, AA+KH+30 ve AA+KH+60 gruplarıyla ilişkin deneylerin sonrasında alınan böbrek dokularına apoptoz ilişkili proteinlerin western blot analizi yapılmıştır. Apoptoz belirteci olan PARP-1 proteinin western blot analizinde, AA grubunun sham ve kök hücre verilen gruplarla karşılaştırılmasının sonucunda diğer gruplara göre anlamlı derecede ekspresyonunun arttığı ($p \leq 0,05$) teyit edilmiştir. PARP-1 proteini 25 ve 89 kDa'luk proteinlere yarıklanmaktadır. Western blot analizinde PARP'ın yarıklanmış formu olan Asp214(25 kDa)'ün Western Blot bantların yoğunlukları DigiDog 1000 programında ölçülerek değerler total (113 kDa) formunun yoğunluklarına göre normalize edilmiştir.



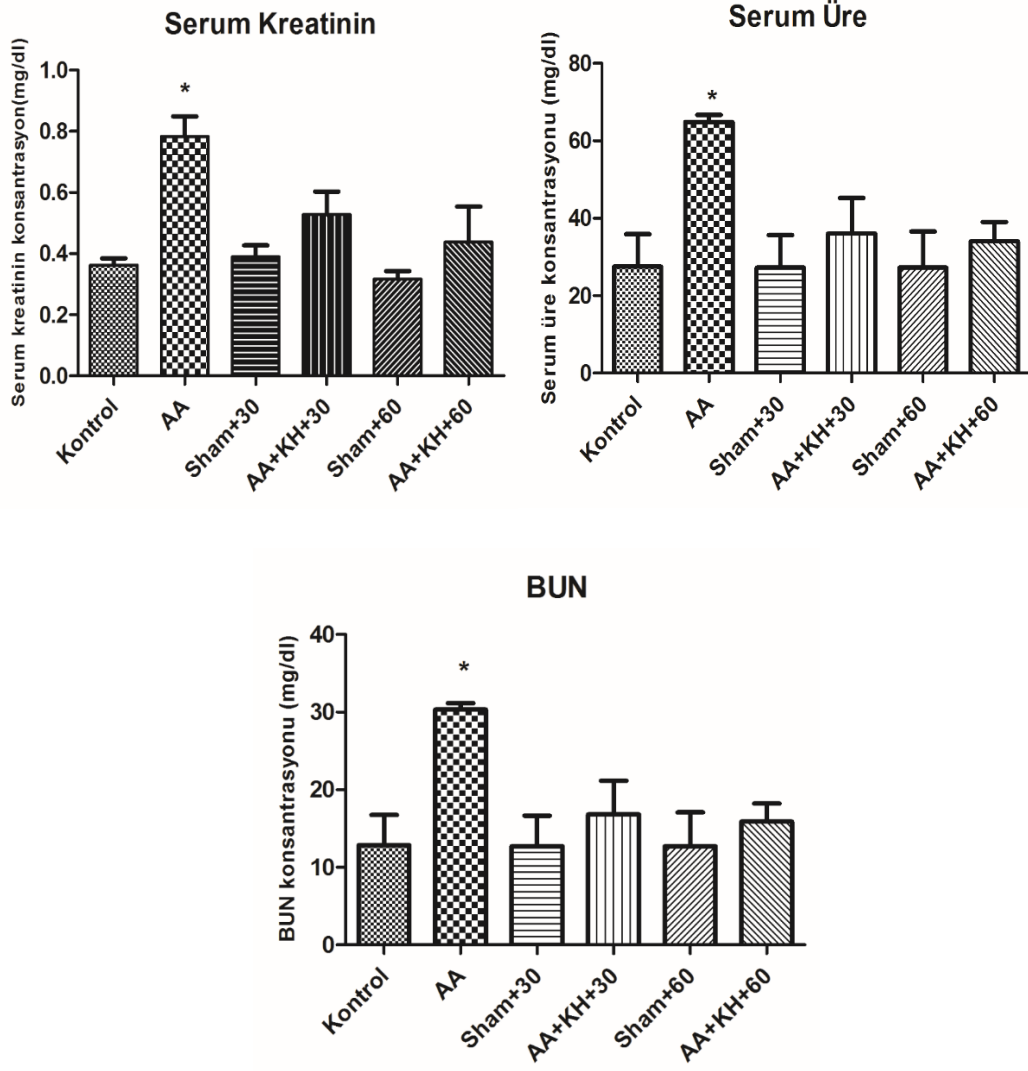
Şekil 4.9.4. Apoptotik Parp ve total Parp Western Blot Bantları.



Şekil 4.9.5. AA ve kök hücre uygulamasından sonra apoptotik PARP ekspresyon düzeyleri. İstatistiksel grafikler. AA grubundaki p57 ekspresyonu Kontrol, Sham grupları (Sham+30 ve Sham+60) ve kök hücre transplante edilen gruplara (AA+KH+30 ve AA+KH+60) göre anlamlı derecede artış göstermiştir ($p \leq 0.05$). Kontrol, Sham grupları ve Kök hücre transplante edilen gruplar da birbirleriyle kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p \leq 0.05$).

4.10. Serum Kreatinin, Serum Üre ve Kan Üre Nitrojen (BUN) Bulguları

Kreatinin ve üre değerlendirme kitleri kullanılarak deney hayvanlarından alınan serumlarda kreatinin, üre ve BUN değerlerinin analizi yapıldı. Bulgulara göre, AA grubunda serum kreatinin, üre ve BUN değerleri kontrol, sham grupları ve kök hücre verilen gruplara göre önemli derecede artış göstermiştir.



Şekil 4.10.1. Serum kreatinin, serum üre ve BUN değerleri.

TARTIŞMA

KBY, majör toplum sağlık problemi olarak günden güne artmaktadır. Kanıtlar son evre renal yetmezliğe doğru giden KBY'nin kardiyovasküler hastalıkların ve felcin meydana gelmesinde önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Bu yüzden KBY tedavisi için çözümler aranmaktadır. Böbrek hasarının onarımı için hücre bazlı tedaviler uygulanmaktadır. Bir çok çalışmada renal onarımının sağlanması için hasarlı böbreğe mezenkimal kök hücrelerin transplantasyonu gerçekleştirilmiştir [180].

Van Koppen ve ekibinin yaptığı çalışmada, koşullu medyumun(CM) (MKH salgıları ile yaşamaları için kullanılan besiyerinin toplamı), KBY oluşturulmuş sıçan modeli üzerinde yapısal ve fonksiyonel etkilerinin olabileceği ve KBY ilerlemesini azaltabileceği yönündedir. KBY, sıçanlarda 5/6 nefrektomi (NPX) müdahalesiyle indüklenmiştir. NPX'ten 6 hafta sonra, KBY sıçanlarına, günde iki kere olmak üzere CM ya da sadece besiyeri (NCM) intravenöz olarak ardışık olarak 4 gün boyunca uygulanmıştır. CM uygulamalı tedaviden 6 hafta sonra fonksiyonel olarak etki görülmüştür: glomerüler filtrasyon oranı (inülin klerens) ve etkin renal plazma akışı (PAH klerens) CM tedavisinde NCM'ye göre önemli ölçüde yüksektir. Sistolik kan basıncı CM'de NCM'ye göre daha düşüktür. Proteünüria, CM'den sonra daha düşük bir oran göstermiştir. Tübüler ve glomerüler hasar azalmıştır ve CM'den sonra daha fazla glomerüler endotel hücreler bulunmuştur. DNA hasarı onarımı CM'den sonra artmıştır. KBY modeli oluşturulan sıçanlarda, MKH-CM uygulamasının uzun süreli terapötik iyileştirme fonksiyonu, KBY ilerlemesini, hipertansiyonu ve glomerüler hasarı azaltmasıyla belirlenmiştir [181].

MKH'lerin KBY'nin ilerlemesi üzerindeki etkisi ve rejeneratif etkiyle ilgili olan moleküler belirteçlerin ekspresyonları değerlendirilmiştir. 5/6 NPX'e (nefrektomi) tabi tutulan erişkin erkek Sprague-Dawley türü sıçanlara kültür mediumu veya 0.5×10^6 MKH'nin tek intravenöz infüzyonu uygulanmıştır. Sadece medyum injeksiyonuna maruz kalan grup da kontrol olarak kullanılmıştır. MKH infüzyonundan 5 hafta sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir. MKH'lerin immünofloresans analizi yapılmıştır. Böbrek fonksiyonu plazma kreatinin kullanılarak değerlendirilmiştir. Yapısal hasar hematoksilan-eozin boyamasıyla, ED-1 miktarı ve α -SMA ile değerlendirilmiştir. Onarım süreci; fonksiyonel ve yapısal analizler ve anjiyojenik/epiteliyojenik protein ekspresyonu tarafından belirlenmiştir. MKH uygulanmış NPX grubu plazma kreatinin seviyesinde ve işaretli hasar belirteçleri ED-1 ve α -SMA'da azalma gösterir. Buna ek olarak, tedavi gören sıçanlar epiteliyojenik [Pax-2, bFGF (temel fibroblast büyüme faktörü) ve BMP-7 (kemik morfojenetik protein-7)] ve anjiyojenik [VEGF (vasküler

endotel büyüme faktörü) ve Tie-2] proteinlerinde önemli ölçüde induksiyon göstermektedir. Bu belirteçlerin ekspresyonunun artışı rejenerasyonun meydana geldiğini göstermektedir [182].

Bir başka çalışmada kronik böbrek yetmezliği oluşturulan modeller kullanılarak MKH'lerin fibrojenizdeki rolü araştırılmıştır. MKH'ler erkek Wistar sıçanların uyluk ve kavalkemiğinden elde edilmiştir. Dişi Wistar sıçanları KBY modeli olarak kullanılmıştır ve 2×10^5 MKH intravenöz olarak her bir sıçana transplante edilerek 12 hafta takip edilmiştir. SRY gen ekspresyonu, erkek MKH'leri uygulanan dişi sıçanlarda gözlemlenmiştir ve CD73+CD90+ hücrelerinin immün lokalizasyonu 8. haftada belirlenmiştir. Serum ve üre analizi MKH uygulanan hayvanlarda fonksiyonel parametrelerinde iyileşme göstermiştir. Masson trikrom ve Sirius kırmızı boyama, MKH-uygulanan hayvanlarda fibrozisin seviyesinin azaldığını göstermektedir. Bu sonuçlar, vimentin, tip-1 kollajen, transforme edici büyüme faktörü β , fibroblast spesifik protein 1 (FSP-1), monosit kemoatraktan protein 1 ve Smad3 mRNA ekspresyonu ve α -SMA (düz kas aktin) ve FSP-1 protein ekspresyonu tarafından teyit edilmiştir. Renal interlökin (IL-6) ve TNF- α 'nın mRNA ekspresyonu MKH uygulamasından sonra önemli ölçüde azalmıştır oysaki IL-4 ve IL-10 ekspresyon miktarı artmıştır. Tüm serum sitokin ekspresyon miktarı MKH-uygulanan hayvanlarda azalmıştır. Tüm bunlar bir araya getirildiğinde, bu sonuçlar, MKH terapisinin başlangıç fazdaki kronik renal hasarını takip eden inflamatör cevabın modüle edebildiğini önermektedir. İmmünosupresif ve MKH'lerin özelliklerinin yeniden modellenmesi, böbrekte fibrozisi azaltabileceğini göstermiştir [34].

Amniyotik membran, fetüsü çevreleyen en içteki membrandır. Hamilelik boyunca kök hücrelerin rezervuarı olduğu düşünülmektedir. Çünkü gastrulasyondan önce embriyonik epiblast hücrelerinden meydana gelmektedir [183]. Geçmiş yıllarda, İAM plastik cerrahi, dermatoloji ve jinekoloji prosedürleri için biyolojik membran olarak kullanılmıştır. Bu nedenlerden dolayı erişkin MKH'lerin kaynağı olarak iAMKH'ler, hücre transplantasyonu ve rejeneratif tıpta ilgi odağı olmuştur [98].

Diaz-Prado ve ekibinin yaptığı çalışmada, iAMKH'lerin izolasyonu, lokalizasyonu, morfolojik ve fenotipik karakterizasyonları ve farklı hücrelere farklılaşma potansiyelleri belirlenmiştir. iAMKH'ler plastik adherens gösterirler ve kemik iliğinden elde edilen MKH'lerde görülen fibroblast benzeri büyüme gözlenir. Ayrıca, bu hücrelerin immünofenotipik karakterizasyonu genel olarak tanımlanan insan MKH belirteçlerinin varlığını gösterirler (CD90, CD44, CD73, CD166, CD105 ve CD29). Pasaj 9'a kadar iAMKH'ler fenotipik özelliği göstermeye devam eder [98].

Bizim çalışmamızda da literatüre uygun olarak, plasentanın amniyon membranından mezenkimal kök hücreler izole edilmiştir. Fenotipik karakterleri flow sitometri ile belirlenmiştir ve diğer çalışmalarla uygun olarak pozitif hücrelerin oranları CD44 % 88,6, CD73 %93,5, CD90, 98,8 ve CD105 %95,3 ve negatif belirteçler

olan CD34, CD116, CD19, CD45 ve HLA-DR'nin pozitif yüzdesi %3.9 olarak belirlenmiştir. Böylece flow sitometri analiziyle amniyonik membrandan elde ettiğimiz hücrelerin MKH oldukları belirlenmiştir.

Plasentadan izole edilen MKH'ler kondrojenik, osteojenik, adipojenik, endotel, hepatositik, miyojenik ve nörojenik hatlara farklılaşabilirler. Diaz-Prado ekibinin yaptığı çalışmada, insan amniyon kökenli hücreler uyarıldığında osteosit, kondrosit ve adiposit hücrelere farklılaşmıştır. Adipojenik farklılaşmada, adipojenik medyumda 21 gün kültüre edilen hücrelere Oil Red O boyaması yapılarak gösterilmiştir. Osteojenik farklılaşma potansiyeli ise Alizarin Red boyası kullanılarak kalsifikasyonun varlığı gösterilmiştir. Kondrojenik farklılaşmada toluidine mavisi kullanılarak proteoglikanlar boyanmıştır [96].

Bu çalışmada da iAMKH'ler uyarılarak, adiposit, osteosit ve kondrositlere farklılaştırılmıştır. Adipositler için Oil Red O, osteositler için Alizarin Red ve kondrositler için Alcian Blue ve Sirius Red boyamaları yapılarak farklılaşma gösterilmiştir. Kondrositlerdeki farklılaşmada Alcian Blue glikozaminoglikanları boyarken Sirius Red ile kollajen boyamaları yapılmıştır. Yapılan farklılaştırma diğer çalışmalarla [20, 99, 180] paralellik göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda, Çin bitkisi olan *Aristolochic fangchi*'deki aristolohik asitin renal hasar ve karsinomaya yol açtığı tespit edilmiştir [36]. AA KBY'ye neden olmaktadır. Genellikle medullar ışın ve dış korteks, glomeruliye göre daha fazla etkilenmektedir [37]. AAN hastalarından alınan böbrekler boyut olarak daha küçüktür [39]. AA'nın nasıl KBY'ye neden olduğuyla ilgili mekanizma kesin değildir. Bulgular, AAI'in peritübüller kapillerin şiddetli redüksiyonunu indüklediği ve bu durumun hipoksiye ve hücre ölümüyle sonuçlandığını gösterir [41, 42]. AAI, tübüler epitel hücrelerinde epidermal büyüme faktörünün ekspresyonunu azaltır ve bu hücrelerde rejenerasyon eksikliği ortaya çıkar [45]. Böylece AAI, tübülointertisyel ile sonuçlanan geri dönüşümsüz tübül hasarını indükler [147]. Huang ve ekibinin yaptığı çalışmada, böbrek fibrozisinin hasarın 9. haftasında dış korteks bölgesinin çevresinde olduğu Masson Trikrom boyamasıyla gösterilmiştir ve kollajen birikimi 12.haftaya kadar arttığı gösterilmiştir. Bununla birlikte glomerülde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca böbrek kollajeninin AA uygulandığında 9. haftadan itibaren başladığı ve 12. haftaya kadar arttığı gösterilmiştir [147].

Bu çalışmada da 6 hafta AA enjeksiyonundan sonra 6 hafta beklenerek toplam 12 haftada hastalık modeli oluşturulmuştur. 12 hafta sonunda böbrekler işleme alındıktan sonra fibrozisi belirlemek için Masson Trikrom boyaması yapılmıştır. Sadece AA uygulanan grupta sham gruplarına göre fibrozisde önemli derecede artış vardır. Özellikle kollajen birikimi glomerülün çevresinde proksimal ve distal tübüllerde gerçekleşmektedir. Daha önce yapılan çalışmalardaki gibi AA'nın hedefi öncelikle proksimal tübüller hücreleridir. Kök hücre transplante edilen gruplarda yapılan

Masson Trikrom boyanmasında ise, kollajen birikiminin azaldığı görülmüştür ve MKH'lerin fibrozisi engellediği düşünülmektedir. Huang ve ekibinin yaptığı çalışmada AA uygulanan böbreklerde intertisyel alanda kollajenin arttığı gösterilmiştir [147]. Bu çalışmada da kollajen birikiminin gösterilmesi için Sirius Red boyaması yapılmıştır. AA enjekte edilen grup ile sham grupları karşılaştırıldığında, korteks bölgesinde özellikle glomerül çevresinde, proksimal ve distal tübüllerde kollajen birikimine rastlanmıştır. Kök hücre transplante edilen gruplarda ise bu kollajen birikiminin sadece AA enjekte edilen gruplara göre azaldığı tespit edilmiş ve böylece tübüler hasarın MKH enjeksiyonundan sonra iyileşme gösterdiği düşünülmektedir.

Tübülointertisyel (TI) lezyonlarının ilerlemesinde tübüler epitel hücrelerin ve inflamatuvar hücrelerin epitel-mezenşim geçişinin (EMG) rolü tartışmalıdır. Aristolohik Asit Nefropatide (AAN) renal fonksiyonlar hızlı bir şekilde bozulmaktadır ve birkaç ay içinde son evre renal yetmezlik ortaya çıkmaktadır. AA progresyonu, lenfosit infiltrasyonlarının çeşitli yoğunlukları, kalıcı tübüler atrofi ve TI fibrozis ile karakterizedir. AA enjeksiyonundan yaklaşık 20 gün sonra proksimal tübül enzimüride geçici azalma görülmektedir ve bu PTEH rejenerasyonunun olabileceğini ileri sürmektedir. Fizyolojik olarak, akut hasardan sonra renal onarım, epitel hücrelerinin rejenerasyonu ve proliferasyonu ile değerlendirilmektedir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarında renal epitel hücrelerinde spesifik AA-DNA eklenmesinin oluşumu gösterilmiştir, bu oluşum PTEH proliferasyon kapasitesini engelleyebilir. Bununla birlikte kronik böbrek yetmezliği modelinde apoptoz gösterilmiştir ve bunun tübüler epitel hücre delesyonunun mekanizması olabileceği öne sürülmektedir [157].

Pozdzik ve ekibi, AA tübülotoksitesinin antioksidatif enzimlerin ve mitokondriyal hasarın defektif aktivasyonu ile sonuçlandığını göstermişlerdir. İlerleyen tübüler atrofi, PTEH'nin onarılamayan rejenerasyonu ve apoptozu ile ilişkilidir. PTEH'nin transmembran migrasyonu EMG'nin belirtisini göstermektedir. İntertisyel bölgede vimentin ve α -SMA pozitif hücrelerin birikimi ve TGF β 1'in ekspresyonunun artışı yerleşik tübüler fibroblastların arttığını ve AAN sırasında kollajen birikiminin ana kaynağı olduğu düşünülmektedir. Kronik faz sırasında dış medulladaki bölgede tübüllerin atrofik hale geldiği ve tipik bazal membranın kalınlaştığı görülmüştür. Kronik faz sırasında, Ki67 hücrelerin sayısı PTEH ve tübüler atrofideki hücrelerle ilişkili olarak negatiftir. Ek olarak, Ki67 ve PCNA boyaması, DNA hasarı hakkında bilgi verir. PTEH'lerde PCNA ekspresyonunun azalması, AA-DNA eklenmesi oluşumuna karşı cevapta DNA onarımının bozulması olarak düşünülmektedir ve bu durum defektif hücre proliferasyonuna ve tübüler atrofisinin gelişmesine neden olur. Benzer bilgi cisplatin modelinde de kanıtlanmıştır. Dahası, *in vitro*'da PTEH'nin hücre siklusunun tutulması AA uygulamasından sonra gerçekleştiği rapor edilmiştir. PTEH proliferasyonunun defektif farklılaşmayla birlikte azalması tübüler atrofisinin gelişmesiyle sonuçlanır. Bu modelde, PTEH'te aktif kaspaz-

3'ün indüksiyonu tübüler atrofide PTEH apoptozuna neden olduğu görülmüştür [156].

Bu çalışmada da, PCNA ve Ki67 immünohistokimya boyamaları yapılmıştır. AA enjekte edilen grupta sham grubuna göre proliferasyon belirteçleri olan hem PCNA hem de Ki67 boyamalarında azalma görülmüştür. Bunun nedeni AA-DNA eklenmesi oluşumu ve bunun sonucunda DNA onarım mekanizmasındaki bozulma olabilir. Bu durum, AA enjekte edilen grupta proliferasyonun azaldığına işaret etmektedir. Bunun yanında, PCNA proteinin ekspresyonunun belirlenmesi için western blot bulgularında PCNA ekspresyonunun AA enjekte edilen grupta kontrol grubu ve sham gruplarına göre anlamlı derecede azalması da AA enjekte edilen grupta proliferasyonun azaldığını desteklemektedir. Hücre ölümü ise, western blot analiziyle apoptotik PARP proteininin miktarı ayrıca TUNEL boyama yöntemi yapılarak gösterilmiştir. AA enjekte edilen grup ile kontrol ve sham grubu kıyaslandığında, AA grubunda tübüler alanda ve özellikle PTEHlerde daha fazla boyanma görülmektedir. Western blot analizinde ise apoptotik PARP protein ekspresyonunun AA enjekte edilen grupta kontrol grubu ve sham gruplarına göre anlamlı derecede artış gösterdiği bulunmuştur. Diğer çalışmalarla [180, 184] uyumlu olarak, hem TUNEL bulguları hem de western blot bulguları AA grubunda apoptozun arttığına işaret etmektedir. Çünkü AA geri dönüşümsüz olarak hasar vermektedir ve AA-DNA eklenmesiyle DNA onarım mekanizması bozulduğundan hücre DNA hasarını onarımına gidemeden apoptoza gidebilir. Yapılan bir çalışmada, PTEH'nin hücre siklusunun tutulması AA uygulamasından sonra gerçekleştiği rapor edilmiştir[185]. Burada hücre siklus inhibitörleri devreye girebilir. Hücre siklus inhibitörlerinden biri olan p57'nin ekspresyonu AA enjekte edilen grupta sham gruplarına göre artış göstermiştir. Böylece onarılamayan PTEH'ler apoptoza yönelebilir.

Sun ve ekibinin yaptığı çalışmada, insan amniyonik sıvı kök hücrelerinin (iASKH) hücre bazlı terapide kullanımları değerlendirilmiştir. KBY modellerinden biri olan unilateral üretal darlık modelinde iASKH'lerin renal interstisyel fibrozis üzerinde etkili olup olmadığı incelenmiştir. Bu çalışmada, iASKH enjeksiyonunun terapötik etkisini değerlendirmek için tübüler hücrelerin proliferasyon ve apoptoz mekanizmaları incelenmiştir. Sonuçlarına göre, iASKH enjeksiyonunun tübüler epitel hücrelerin hasar gören kısımlarında proliferasyonu arttırdığı ve apoptozu engellediği görülmüştür. Tübüler epitel hücre proliferasyonunu ve apoptozunu kapsayan mekanizma parakrin etkiyi kapsamaktadır. Ayrıca yerleşik epitel hücrelerinin proliferasyonu iskemi-indüklü tübüler hasarı modelinde de temel onarım mekanizması olabileceği öne sürülmüştür [180].

Bir başka çalışmada ise, mezenkimal kök hücre kökenli mikroveziküllerin uygulanmasının, iskemi-reperfüzyon hasarıyla indüklenen KBY ve ABH'yi iyileştirebileceği değerlendirilmiştir. Mikrovezikül enjeksiyonundan sonra,

mikroveziküller glomerülide ve hasarlı tübüllerde geçici olarak birikmişler ve tübüler hücre proliferasyonunu indüklemişlerdir. Ek olarak, mikroveziküller renal koruma mekanizması gibi davranarak hasar genişliğini sınırlandırmışlar ve önemli ölçüde tübüler hücre apoptozunu azaltmışlardır. Bu biyolojik etkiler MKH kökenli mikroveziküller için spesifiktir çünkü fibroblastlardan elde edilen mikroveziküllerde bu etkiler görülmemiştir [184].

Bu çalışmamızda, insan amniyotik kök hücrelerinin Aristolohik asit indüklü kronik böbrek yetmezliği modelindeki terapötik etkilerini inceledik. iAMKH'lerin enjeksiyonu sonrasında renal dokuda proliferasyon ve apoptoz değerlendirilmiştir. PCNA ve Ki67 immünohistokimyasal boyamalarında iAMKH verilen hem AA+KH+30 hem de AA+KH+60 grubunda AA grubuna göre önemli derecede artış gözlenmiştir. Bu durum tübülointertisyel hasar meydana gelen renal dokuda iAMKH'lerin renal doku hücrelerinin proliferasyonunda etkili olduğunu göstermektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, özel boyamalar da tübülointertisyel fibrozisin iAMKH enjeksiyonundan sonra azaldığını göstermektedir ve proliferasyon belirteçleri olan PCNA ve Ki67 hücrelerindeki boyanmalar proliferasyon artışını göstermektedir. Bununla birlikte, western blot analizinde de iAMKH enjekte edilen gruplarda AA grubuna göre PCNA ekspresyonunda önemli derecede artış tespit edilmiştir. Böylece western blot analizi de immünohistokimyasal boyama sonuçlarını desteklemektedir. iAMKH'lerin enjeksiyonu ile renal doku hücrelerindeki proliferasyonun artışıyla, meydana gelen fibrozisin iyileştirilebildiği düşünülmektedir. Bu çalışma literatürde olduğu gibi MKH'lerin tübüler atrofide etkin bir rol oynadığını özellikle PTEHlerde ve diğer hücrelerde meydana gelen hasarı engelleyebileceği hipotezini desteklemektedir. Bu durum iAMKH'lerin terapötik özelliğe sahip olabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, proliferasyondaki bu artış iAMKH'lerin hasar gören hücrelerle yer değiştirerek erişkin doku hücrelerine farklılaşmasıyla ve parakrin etki göstererek çeşitli büyüme faktörlerini ve sitokinlerin salınmasına neden olabileceğini düşündürmektedir.

AA indüklü KBY'de renal doku hücrelerinde özellikle tübüler hücrelerde apoptoz meydana gelmektedir. Sonuçlarımıza göre, AA verilen gruplarda apoptotik PARP proteinin ekspresyonunun arttığını ve TUNEL boyamalarında da AA grubunda artış olduğunu tespit ettik. iAMKH enjeksiyonu sonrasında TUNEL boyamalarında kök hücre gruplarında AA grubuna göre daha az boyama belirlendi. Bu sonuca uyumlu olarak, apoptotik PARP protein ekspresyonunda iAMKH verilen gruplarda (AA+KH+30 ve AA+KH+60) AA grubuna göre anlamlı derecede azalma meydana gelmiştir. Bunun yanında hücre siklusu inhibitörü olan p57 proteininin ekspresyonu da iAMKH verilen gruplarda AA grubuna göre azalma meydana geldiği görülmüştür. Bu durum, AA enjeksiyonundan sonra renal hücrelerdeki AA-DNA eklenmesi oluşunun etkisiyle hücrenin apoptoza gittiği fakat iAMKH enjeksiyonundan sonra mezenkimal kök

hücrelerin hasarlı hücrelerle yer değiştirdiği ve böylece sağlıklı tübüler hücre rejenerasyonunun gerçekleşmesiyle apoptozun engellendiği düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda, çeşitli KBY modellerinde MKH transplantasyonu sonrasında serum kreatinin, üre ve BUN değerlerinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir [34, 145, 184]. Bu çalışmada da; serum kreatinin, serum üre ve BUN değerleri analiz edildiğinde, AA grubundaki değerler diğer kontrol, sham grupları ve kök hücre verilen grupların değerleriyle karşılaştırıldığında önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir. Kök hücre verilen gruplardaki değerler ile sham grupları ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. AA-indüklü KBY modelinde iAMKH'lerin transplantasyonu sonucu, serum kreatinin ve üre seviyesinin azalması iAMKH'lerin renoprotektif etkilerinin olduğunu gösterebilir.

Sonuç olarak, iAMKH'ler AA indüklü KBY'de etkin rol oynayarak renal hasarı iyileştirebileceği ve fibrozis sonucu meydana gelen apoptozu engelleyebileceğini öne sürebiliriz. Sonuç olarak iAMKHlerin KBY'de terapötik etkilerinin olduğu söylenebilir.

SONUÇLAR

Bu tezde insan plasentası amniyon kökenli mezenkimal hücrelerin kronik böbrek yetmezliği modelinde apoptoz ve proliferasyon mekanizmalarına etkisi araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar ortaya çıkmıştır:

1. Aristolohik asitin uygulanması renal dokuda fibrozise neden olmaktadır.
2. Aristolohik asit uygulanarak oluşturulan KBY modelinde mezenkimal kök hücrelerin transplantasyonu sonucunda PCNA ve Ki67 bulguları doğrultusunda proliferasyonun arttığı belirlenmiştir.
3. Apoptotik PARP ve TUNEL bulguları sonuçlarına dayanarak aristolohik asit indüklü KBY'de renal doku hücrelerinde apoptoz artmaktadır.
4. Hücre siklus inhibitörü olan p57 proteinin ekspresyonu iAMKH transplante edilen gruplarda AA uygulanan gruplara göre azalma göstermektedir. Bu bulgular, AA grubunun hücre siklusunda duraklama evresine girdiğini ve bunun sonucu olarak apoptoza yönelebileceğini göstermektedir.
5. Fonksiyonel olarak üre, kreatinin ve BUN konsantrasyon miktarlarının diğer gruplarda, AA uygulanan gruplara göre azalması iAMKH'lerin renal fibrozisde etkili olabileceğini düşündürmektedir.
6. Bu çalışma, özetle AA-indüklü KBY'de iAMKH'lerin renal dokuda proliferasyon ve apoptoz mekanizmalarını etkilediğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Majumdar, M.K., et al., *Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells*. J Cell Physiol, 1998. **176**(1): p. 57-66.
2. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p. 568-84.
3. Yamanaka, S. and H.M. Blau, *Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches*. Nature, 2010. **465**(7299): p. 704-12.
4. Hsu, Y.C. and E. Fuchs, *A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(2): p. 103-14.
5. Burness, M.L. and D.A. Sipkins, *The stem cell niche in health and malignancy*. Semin Cancer Biol, 2010. **20**(2): p. 107-15.
6. Sharpless, N.E., *Hot topics in stem cells and self-renewal: 2010*. Aging Cell, 2010. **9**(4): p. 457-61.
7. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
8. Liechty, K.W., et al., *Severe pulmonary hypoplasia associated with giant cervical teratomas*. J Pediatr Surg, 2006. **41**(1): p. 230-3.
9. Reyes, M., et al., *Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2615-25.
10. Trounson, A., et al., *Clinical trials for stem cell therapies*. BMC Med, 2011. **9**: p. 52.
11. Mihu, C.M., et al., *Isolation and characterization of stem cells from the placenta and the umbilical cord*. Rom J Morphol Embryol, 2008. **49**(4): p. 441-6.
12. Vellasamy, S., et al., *Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells derived from human placenta tissue*. World J Stem Cells, 2012. **4**(6): p. 53-61.
13. Jin, C.Z., et al., *Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair*. Tissue Eng, 2007. **13**(4): p. 693-702.
14. Niknejad, H., et al., *Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering*. Eur Cell Mater, 2008. **15**: p. 88-99.
15. Wilshaw, S.P., et al., *Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering*. Tissue Eng, 2006. **12**(8): p. 2117-29.
16. Tamagawa, T., et al., *Induced in-vitro differentiation of neural-like cells from human amnion-derived fibroblast-like cells*. Hum Cell, 2008. **21**(2): p. 38-45.
17. In 't Anker, P.S., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1338-45.
18. Alviano, F., et al., *Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 11.
19. Nwankwo, E., A.K. Bello, and A.M. El Nahas, *Chronic kidney disease: stemming the global tide*. Am J Kidney Dis, 2005. **45**(1): p. 201-8.
20. Levey, A.S. and J. Coresh, *Chronic kidney disease*. Lancet, 2012. **379**(9811): p. 165-80.
21. Anglani, F., et al., *In search of adult renal stem cells*. J Cell Mol Med, 2004. **8**(4): p. 474-87.

22. Little, M.H., *Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2390-401.
23. Mattoli, S., A. Bellini, and M. Schmidt, *The role of a human hematopoietic mesenchymal progenitor in wound healing and fibrotic diseases and implications for therapy*. Curr Stem Cell Res Ther, 2009. **4**(4): p. 266-80.
24. Romagnani, P. and R. Kalluri, *Possible mechanisms of kidney repair*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2009. **2**(1): p. 3.
25. Togel, F., et al., *Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(1): p. F31-42.
26. Hay, E.D., *The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it*. Dev Dyn, 2005. **233**(3): p. 706-20.
27. Skromne, I. and C.D. Stern, *Interactions between Wnt and Vg1 signalling pathways initiate primitive streak formation in the chick embryo*. Development, 2001. **128**(15): p. 2915-27.
28. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
29. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
30. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
31. Morigi, M., et al., *Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(7): p. 1794-804.
32. Choi, S., et al., *The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(3): p. 521-9.
33. Humphreys, B.D. and J.V. Bonventre, *Mesenchymal stem cells in acute kidney injury*. Annu Rev Med, 2008. **59**: p. 311-25.
34. Semedo, P., et al., *Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model*. Stem Cells, 2009. **27**(12): p. 3063-73.
35. Inumaru, J., et al., *Molecular mechanisms regulating dissociation of cell-cell junction of epithelial cells by oxidative stress*. Genes Cells, 2009. **14**(6): p. 703-16.
36. De Broe, M.E., *Chinese herbs nephropathy and Balkan endemic nephropathy: toward a single entity, aristolochic acid nephropathy*. Kidney Int, 2012. **81**(6): p. 513-5.
37. Cosyns, J.P., et al., *Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy?* Kidney Int, 2001. **59**(6): p. 2164-73.
38. Debelle, F.D., et al., *Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(2): p. 431-6.
39. Reginster, F., M. Jadoul, and C. van Ypersele de Strihou, *Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(1): p. 81-6.
40. Vanherweghem, L.J., *Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy)*. J Altern Complement Med, 1998. **4**(1): p. 9-13.
41. Sun, D., et al., *Role of peritubular capillary loss and hypoxia in progressive tubulointerstitial fibrosis in a rat model of aristolochic acid nephropathy*. Am J Nephrol, 2006. **26**(4): p. 363-71.
42. Yang, L., X. Li, and H. Wang, *Possible mechanisms explaining the tendency towards interstitial fibrosis in aristolochic acid-induced acute tubular necrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(2): p. 445-56.

43. Celis, J.E. and A. Celis, *Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(10): p. 3262-6.
44. Mallick, S., et al., *PCNA and anti-apoptotic Mcl-1 proteins predict disease-free survival in oral cancer patients treated with definitive radiotherapy*. Oral Oncol, 2010. **46**(9): p. 688-93.
45. Merkerova, M., H. Bruchova, and R. Brdicka, *Expression analysis of PCNA gene in chronic myelogenous leukemia--combined application of siRNA silencing and expression arrays*. Leuk Res, 2007. **31**(5): p. 661-72.
46. Wolf, H.K. and K.L. Dittrich, *Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology*. J Histochem Cytochem, 1992. **40**(9): p. 1269-73.
47. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
48. Herceg, Z. and Z.Q. Wang, *Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death*. Mutat Res, 2001. **477**(1-2): p. 97-110.
49. de Murcia, G. and J. Menissier de Murcia, *Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor*. Trends Biochem Sci, 1994. **19**(4): p. 172-6.
50. Petrilli, V., et al., *Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice*. J Clin Invest, 2004. **114**(8): p. 1072-81.
51. Alonso, L. and E. Fuchs, *Stem cells of the skin epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11830-5.
52. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 349-55.
53. Radtke, F. and H. Clevers, *Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1904-9.
54. Stocum, D.L., *Tissue restoration through regenerative biology and medicine*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2004. **176**: p. III-VIII, 1-101, back cover.
55. Odorico, J.S., D.S. Kaufman, and J.A. Thomson, *Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 193-204.
56. Stocum, D.L., *Stem cells in regenerative biology and medicine*. Wound Repair Regen, 2001. **9**(6): p. 429-42.
57. Can, A., *Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları, Mezenkimal kök hücreler*. 2014.
58. Vescovi, A., et al., *Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential*. Cells Tissues Organs, 2002. **171**(1): p. 64-76.
59. Weissman, I.L., *Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-68.
60. Chapman, A.R., Frankel, M. S., Garfinkel, M. S., *Stem cell research and applications: Monitoring the frontiers of biomedical research*. Am. Assoc. Adv. Sci. Inst. Civil. Soc, 1999. **34**: p. 405-416.
61. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
62. Bongso, A., Lee, E. H., *Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources, Stem Cells From Bench to Bedside*. 2005, Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
63. Can, A., *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar*. 1. Baskı. 2009, Ankara: TÜBA. 113.
64. Alwattar, B.J., R. Schwarzkopf, and T. Kirsch, *Stem cells in orthopaedics and fracture healing*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2011. **69**(1): p. 6-10.
65. Grove, J.E., E. Bruscia, and D.S. Krause, *Plasticity of bone marrow-derived stem cells*. Stem Cells, 2004. **22**(4): p. 487-500.

66. Schwab, K.E., R.W. Chan, and C.E. Gargett, *Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle*. *Fertil Steril*, 2005. **84 Suppl 2**: p. 1124-30.
67. Lanza, R., Klimanskaya, I., *Essential Stem Cell Methods*, 2009, Academic Press Elsevier: USA. p. 608.
68. Can, A., *KÖK HÜCRE*. 2014, Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi. 261.
69. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 861-72.
70. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. *Science*, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
71. Serakinci, N., Keith, W., N., *Therapeutic potential of adult stem cells*. *European Journal of Cancer*, 2006. **42**(9): p. 1243-1246.
72. Lanza, R., Klimanskaya, I., *Essential Stem Cell Methods*. 2009, USA: Academic Press Elsevier. 608.
73. Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. *J Embryol Exp Morphol*, 1966. **16**(3): p. 381-90.
74. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina, *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. *Cell Tissue Kinet*, 1970. **3**(4): p. 393-403.
75. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
76. Caplan, A.I., *Mesenchymal stem cells*. *J Orthop Res*, 1991. **9**(5): p. 641-50.
77. Prockop, D.J., *Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 71-4.
78. Liu, Z.J., Y. Zhuge, and O.C. Velazquez, *Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells*. *J Cell Biochem*, 2009. **106**(6): p. 984-91.
79. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(4): p. 313-9.
80. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
81. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, *Mesenchymal stem cells*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001. **226**(6): p. 507-20.
82. Jiang, Y., et al., *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. *Nature*, 2002. **418**(6893): p. 41-9.
83. Caplan, A.I. and S.P. Bruder, *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. *Trends Mol Med*, 2001. **7**(6): p. 259-64.
84. Susman, S., et al., *Placental stem cell differentiation into islets of Langerhans-like glucagon-secreting cells*. *Rom J Morphol Embryol*, 2010. **51**(4): p. 733-8.
85. Armstrong, L., et al., *Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage*. *Stem Cells*, 2005. **23**(4): p. 516-29.
86. Desoye, G., Shafir, E., *The Human Placenta in Diabetic Pregnancy*. *Diabetes Reviews*, 1996. **4**(1): p. 71-92.
87. Pijnenborg, R., et al., *Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals*. *Placenta*, 1981. **2**(1): p. 71-91.
88. McParland, P. and J.M. Pearce, *Doppler blood flow in pregnancy*. *Placenta*, 1988. **9**(4): p. 427-50.
89. Kam, E.P., et al., *The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries*. *Hum Reprod*, 1999. **14**(8): p. 2131-8.

90. Handwerger, S. and M. Freemark, *The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development.* J Pediatr Endocrinol Metab, 2000. **13**(4): p. 343-56.
91. Cross, J.C., *Genetic insights into trophoblast differentiation and placental morphogenesis.* Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(2): p. 105-13.
92. Kurt Benirschke, P.K., Baergen, R. N., *Pathology of The Human placenta.* Fifth Edition ed. 2006, New York: Springer.
93. Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W., *Histology a text and atlas.* 4th ed. 2003, Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins. 603-641.
94. Parolini, O., et al., *Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells.* Stem Cells, 2008. **26**(2): p. 300-11.
95. Demirkan, F., Çolakoglu, N., Herek, O., Erkula, G., *Fleksör Tendon Kesilerinde Amniotik Zarın Kullanımı: Tavuklarda Deneysel Model.* Artroplastisi Artroskopik Cerrahi, 2002. **Vol. 13, No. 1**; p. 34-40.
96. Koizumi, N., et al., *Comparison of intact and denuded amniotic membrane as a substrate for cell-suspension culture of human limbal epithelial cells.* Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2007. **245**(1): p. 123-34.
97. Choi, H.J., K.B. Kim, and Y.M. Kwon, *Effect of amniotic membrane to reduce postlaminectomy epidural adhesion on a rat model.* J Korean Neurosurg Soc, 2011. **49**(6): p. 323-8.
98. Diaz-Prado, S., et al., *Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane.* J Cell Biochem, 2010. **111**(4): p. 846-57.
99. Moore KL, P.T., *The developing human.* 6th ed. 1998, Philadelphia: W.B. Saunders Company. 41-62.
100. Bilic, G., et al., *In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells.* Am J Obstet Gynecol, 2004. **190**(1): p. 87-92.
101. Casey, M.L. and P.C. MacDonald, *Interstitial collagen synthesis and processing in human amnion: a property of the mesenchymal cells.* Biol Reprod, 1996. **55**(6): p. 1253-60.
102. Portmann-Lanz, C.B., et al., *Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration.* Am J Obstet Gynecol, 2006. **194**(3): p. 664-73.
103. Chan, J., N.L. Kennea, and N.M. Fisk, *Placental mesenchymal stem cells.* Am J Obstet Gynecol, 2007. **196**(2): p. e18; author reply e18-9.
104. Junqueira, L.C., Corneiro, J., *Temel histoloji*, ed. Y. AYTEKİN, Solakoğlu, S. 2003, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
105. Kierszenbaum, A.L., *Histoloji ve hücre biyolojisi.* 2006, Ankara: Plame Yayıncılık.
106. Ovalle, W.K., Nahirney, P.C., *Netter Temel Histoloji.* 2009, Ankara: Güneş Tıp Evleri.
107. Moore KL, P.T., *İnsan embriyolojisi klinik yönleri ile.* 2002, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
108. Sadler, T.W., *Langman's medikal embriyoloji.* 1996, Ankara: Palme Yayıncılık.
109. Yıldırım, M., *Topografik Anatomi.* 2000, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 258-62.
110. Yıldırım, M., *Resimli İnsan Anatomisi.* 2002, İstanbul: Nbel Tıp Kitabevi.
111. Ozan, H., *Ozan Anatomi.* 2004, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. 292-304.
112. Eroschenko, V., *diFiore'nin Histoloji Atlası.* 2013, Ankara: Palme Yayıncılık.
113. Weiner, D.E., *Public health consequences of chronic kidney disease.* Clin Pharmacol Ther, 2009. **86**(5): p. 566-9.
114. Schedl, A., *Renal abnormalities and their developmental origin.* Nat Rev Genet, 2007. **8**(10): p. 791-802.
115. Bonventre, J.V. and L. Yang, *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury.* J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4210-21.

116. Murugan, R. and J.A. Kellum, *Acute kidney injury: what's the prognosis?* Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(4): p. 209-17.
117. Venkatachalam, M.A., et al., *Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease.* Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(5): p. F1078-94.
118. Meguid El Nahas, A. and A.K. Bello, *Chronic kidney disease: the global challenge.* Lancet, 2005. **365**(9456): p. 331-40.
119. Arık, N., Ateş, K., Süleymanlar, G., Tonbul, H.Z., Türk, S., *Hekimler için hemodiyaliz kaynak kitabı.* 2009, Ankara: Güneş Tıp Kitabevi. 24-49.
120. Arık, N., *Nefroloji.* 2001, İstanbul: Deniz Matbaacılık.
121. Serdengeçti, K., *Kronik böbrek yetmezliği fizyopatolojisi ve klinik bulgular.* Aktüel Tıp Dergisi, 1997. **2**(4): p. 190-197.
122. Kızıl, M., *Hemodiyaliz tedavisi alan kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda obezitenin beslenme durumu ile biyokimyasal parametreler üzerine etkisi,* 2006, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Ankara. p. 3-5.
123. Ayköse, G., *Kronik böbrek yetmezliği nedeni ile hemodiyaliz tedavisi gören cinsel disfonksiyonlu erkeklerde gonadal fonksiyonların ve testosteron replasman tedavisinin değerlendirilmesi,* 2006, Dr. Lütfi Kırdal Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi: İstanbul. p. 2-6.
124. Remuzzi, G., A. Benigni, and A. Remuzzi, *Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes.* J Clin Invest, 2006. **116**(2): p. 288-96.
125. Desai, A.A., et al., *The relationship between laboratory-based outcome measures and mortality in end-stage renal disease: a systematic review.* Hemodial Int, 2009. **13**(3): p. 347-59.
126. Chapel, H., Haeney, M., Misbah, S., Snowden, N., *Essentials of clinical immunology.* 5th ed. 2006, Oxford: Blackwell Publishing.
127. Liu, Y., *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis.* Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(12): p. 684-96.
128. Li, Y. and R.A. Wingert, *Regenerative medicine for the kidney: stem cell prospects & challenges.* Clin Transl Med, 2013. **2**(1): p. 11.
129. Hirschberg, R., *Wound healing in the kidney: complex interactions in renal interstitial fibrogenesis.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(1): p. 9-11.
130. Chawla, L.S., et al., *The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease.* Kidney Int, 2011. **79**(12): p. 1361-9.
131. Grgic, I., et al., *Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis.* Kidney Int, 2012. **82**(2): p. 172-83.
132. Kriz, W. and K. Endlich, *Podocytes and disease: introduction.* Semin Nephrol, 2012. **32**(4): p. 305-6.
133. Smeets, B., et al., *Renal progenitor cells contribute to hyperplastic lesions of podocytopathies and crescentic glomerulonephritis.* J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(12): p. 2593-603.
134. Smeets, B., et al., *Tracing the origin of glomerular extracapillary lesions from parietal epithelial cells.* J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(12): p. 2604-15.
135. Smeets, B. and M.J. Moeller, *Parietal epithelial cells and podocytes in glomerular diseases.* Semin Nephrol, 2012. **32**(4): p. 357-67.
136. Lange, C., et al., *Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats.* Kidney Int, 2005. **68**(4): p. 1613-7.
137. Noronha, I.L., C.K. Fujihara, and R. Zatz, *The inflammatory component in progressive renal disease--are interventions possible?* Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(3): p. 363-8.

138. Strutz, F.M., *EMT and proteinuria as progression factors*. *Kidney Int*, 2009. **75**(5): p. 475-81.
139. Abbate, M., D. Brown, and J.V. Bonventre, *Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(3 Pt 2): p. F454-63.
140. Nangaku, M. and T. Fujita, *Activation of the renin-angiotensin system and chronic hypoxia of the kidney*. *Hypertens Res*, 2008. **31**(2): p. 175-84.
141. Ninichuk, V., et al., *Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice*. *Kidney Int*, 2006. **70**(1): p. 121-9.
142. Hostetter, T.H., *Progression of renal disease and renal hypertrophy*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 263-78.
143. Griffin, K.A., M. Picken, and A.K. Bidani, *Method of renal mass reduction is a critical modulator of subsequent hypertension and glomerular injury*. *J Am Soc Nephrol*, 1994. **4**(12): p. 2023-31.
144. Santos, L.S., et al., *Surgical reduction of the renal mass in rats: morphologic and functional analysis on the remnant kidney*. *Acta Cir Bras*, 2006. **21**(4): p. 252-7.
145. Cavaglieri, R.C., et al., *Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model*. *Transplant Proc*, 2009. **41**(3): p. 947-51.
146. Wu, H.J., et al., *Mesenchymal stem cells modulate albumin-induced renal tubular inflammation and fibrosis*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e90883.
147. Huang, L., et al., *Development of a chronic kidney disease model in C57BL/6 mice with relevance to human pathology*. *Nephron Extra*, 2013. **3**(1): p. 12-29.
148. Vanherweghem, J.L., et al., *Effects of steroids on the progression of renal failure in chronic interstitial renal fibrosis: a pilot study in Chinese herbs nephropathy*. *Am J Kidney Dis*, 1996. **27**(2): p. 209-15.
149. Nortier, J.L., et al., *Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria*. *Kidney Int*, 1997. **51**(1): p. 288-93.
150. van Ypersele de Strihou, C. and J.L. Vanherweghem, *The tragic paradigm of Chinese herbs nephropathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 1995. **10**(2): p. 157-60.
151. Vanherweghem, J.L., et al., *Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs*. *Lancet*, 1993. **341**(8842): p. 387-91.
152. Depierreux, M., et al., *Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs*. *Am J Kidney Dis*, 1994. **24**(2): p. 172-80.
153. Schmeiser, H.H., et al., *Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy*. *Cancer Res*, 1996. **56**(9): p. 2025-8.
154. Nortier, J.L., et al., *Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi)*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(23): p. 1686-92.
155. Lebeau, C., et al., *Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20**(11): p. 2321-32.
156. Bonventre, J.V., *Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14** **Suppl 1**: p. S55-61.
157. Pozdzik, A.A., et al., *Aristolochic acid induces proximal tubule apoptosis and epithelial to mesenchymal transformation*. *Kidney Int*, 2008. **73**(5): p. 595-607.
158. Li, W., H. Jiang, and J.M. Feng, *Isogenic mesenchymal stem cells transplantation improves a rat model of chronic aristolochic acid nephropathy via upregulation of hepatic growth factor and downregulation of transforming growth factor beta1*. *Mol Cell Biochem*, 2012. **368**(1-2): p. 137-45.

159. Zieske, J.D., *Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors during corneal wound repair*. Prog Retin Eye Res, 2000. **19**(3): p. 257-70.
160. Takahashi, T. and V.S. Caviness, Jr., *PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall*. J Neurocytol, 1993. **22**(12): p. 1096-102.
161. Travali, S., et al., *Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen*. J Biol Chem, 1989. **264**(13): p. 7466-72.
162. Hoegge, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
163. Mighell, A.J., P.A. Robinson, and W.J. Hume, *PCNA and Ki-67 immunoreactivity in multinucleated cells of giant cell fibroma and peripheral giant cell granuloma*. J Oral Pathol Med, 1996. **25**(5): p. 193-9.
164. Gerdes, J., et al., *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67*. J Immunol, 1984. **133**(4): p. 1710-5.
165. Gerdes, J., *Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies*. Semin Cancer Biol, 1990. **1**(3): p. 199-206.
166. Falini, B., et al., *Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody*. J Histochem Cytochem, 1989. **37**(10): p. 1471-8.
167. Duchrow, M., J. Gerdes, and C. Schluter, *The proliferation-associated Ki-67 protein: definition in molecular terms*. Cell Prolif, 1994. **27**(5): p. 235-42.
168. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science.
169. Tsihlias, J., L. Kapusta, and J. Slingerland, *The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer*. Annu Rev Med, 1999. **50**: p. 401-23.
170. Pollard D, E.C., *Cell Biology*. 1st ed. 2002, Philadelphia: Saunders.
171. Nakayama, K. and K. Nakayama, *Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development*. Bioessays, 1998. **20**(12): p. 1020-9.
172. Sherr, C.J. and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression*. Genes Dev, 1999. **13**(12): p. 1501-12.
173. Matsuoka, S., et al., *p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene*. Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 650-62.
174. Zhang, P., et al., *Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 151-8.
175. Schreiber, V., et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517-28.
176. Smith, S., et al., *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1484-7.
177. Diefenbach, J. and A. Burkle, *Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(7-8): p. 721-30.
178. Dantzer, F., et al., *Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair*. Biochimie, 1999. **81**(1-2): p. 69-75.
179. Wang, X.G., et al., *PARP1 Val762Ala polymorphism reduces enzymatic activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **354**(1): p. 122-6.
180. Sun, D., et al., *Therapeutic effects of human amniotic fluid-derived stem cells on renal interstitial fibrosis in a murine model of unilateral ureteral obstruction*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e65042.

181. van Koppen, A., et al., *Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38746.
182. Villanueva, S., et al., *Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model*. Clin Sci (Lond), 2011. **121**(11): p. 489-99.
183. Ilancheran, S., et al., *Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential*. Biol Reprod, 2007. **77**(3): p. 577-88.
184. Gatti, S., et al., *Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(5): p. 1474-83.
185. Li, Y., et al., *Aristolochic acid I-induced DNA damage and cell cycle arrest in renal tubular epithelial cells in vitro*. Arch Toxicol, 2006. **80**(8): p. 524-32.

ÖZGEÇMİŞ

BÜŞRA ÇETİNKAYA 1988 yılında Eskişehir’de doğdu. 2006 yılında Eskişehir Muzaffer Çil Anadolu Lisesi’nden mezun oldu. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden mezun oldu. 2011 yılında İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü’nde Biyoteknoloji yüksek lisans programına başladı. Eğitimine devam ederken, 2013 yılında ‘Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP)’yi kazanarak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Yüksek Lisans ve Doktora eğitimini almak üzere Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na görevlendirilmesi yapıldı ve Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans programına başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.