

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PODOSİT HASAR MODELİNDE İNDÜKLENMİŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ETKİSİ**

Öğr. Gör. Özge Burcu ŞAHAN

**Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2023

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PODOSİT HASAR MODELİNDE İNDÜKLENMİŞ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ETKİSİ**

Öğr. Gör. Özge Burcu ŞAHAN

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Fatih ÖZALTIN

ANKARA

2023

ONAY SAYFASI**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****Podosit Hasar Modelinde İndüklenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi****Özge Burcu Şahan****Danışman: Prof.Dr. Ayşen Günel Özcan****İkinci Danışman: Prof.Dr. Fatih Özaltın**

Bu tez çalışması 09/01/2023 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Programı"nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ahmet Çevik Tufan*Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı***Üye: Prof. Dr. Kamil Can Akçalı***Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı***Üye: Prof.Dr. Aytekin Akyol***Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı***Üye: Doç.Dr. Betül Çelebi Saltık***Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı***Üye: Doç.Dr. Fatima Susanna F. Aerts Kaya***Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı*

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

06 Subat 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞCI ÖZKAN**Enstitü Müdürü**

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. (2)
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir

06/02/2023

Özge Burcu ŞAHAN

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) **Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.**
- (2) **Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.**
- (3) **Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.**

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

*** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN danışmanlığında ve Prof. Dr. Fatih ÖZALTIN ikinci danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Öğr. Gör. Özge Burcu Şahan

TEŞEKKÜR

Çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Ayşen GÜNEL-ÖZCAN, doktoramın tüm süresi boyunca ihtiyacım olan her zaman değerli bilgilerinizden ve tecrübelerinizden yararlanmamı sağladığınız için, çalışma motivasyonunuz, üretkenliğiniz ve bakış açınızla beni her daim zorladığınız ve geliştirdiniz için, desteğiniz ve emekleriniz için çok teşekkür ederim.

Çok değerli ikinci danışman hocam Prof. Dr. Fatih ÖZALTIN, tezimin konusu, gelişmesi ve ilerlemesinde başından sonuna kadar değerli bilgilerinizi ve desteğinizi her zaman paylaştığınız ve kısıtlı vakitlerinizde dahi zaman ayırarak yanımda olduğunuz, emekleriniz için çok teşekkür ederim.

Çok değerli hocam Prof. Dr. Kadri Şafak GÜÇER, deneylerimin planı, hazırlığından yürütülmesine kadar her aşamada yanımda olduğunuz, her daim enerjiniz ve güzel kalbiniz ile beni motive ettiğiniz için çok teşekkür ederim, sizi tanımaktan son derece onur duymaktayım.

Çok değerli hocam Prof. Dr. Duygu UÇKAN-ÇETİNKAYA, doktoramın ilk gününden itibaren sevginizi ve şefkatinizi esirgemediğiniz ve destekleriniz için çok teşekkür ederim.

Değerli hocam Doç. Dr. İlyas Onbaşılar, hayvan çalışmalarımın başından sonuna kadar her aşamada, bilginizi ve desteğinizi paylaştığınız ve tüm emekleriniz için çok teşekkür ederim.

Çok değerli hocam Prof. Dr. Fevziye Figen KAYMAZ, tüm hayvan çalışmalarımda verdiğiniz destek, sabır ve emekleriniz için çok teşekkür ederim.

Çok değerli hocalarım Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN paylaştığınız deneyimleriniz, bilgileriniz, tezimin yönlenmesini ve ilerlemesini sağladı. Sunduğunuz tüm destekler için çok teşekkür ederim.

Ayrıca;

Projelerinden verdiği desteklerle çalışmamın yürütülmesine destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL'e ve Prof. Dr. Aytekin AKYOL'a ve Doç. Dr. Fatima AERTS-Kaya'ya,

Çalışmalarına destek veren arkadaşlarım Ayşenur GÖK, Esra KOÇAK, Neslihan DÖNMEZ, Özgür Doğuş EROL, Mehmet Emin ŞEKER, Mustafa KELEŞ ve Ali Berk ALIŞAN'a; Her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üy. Beyza GÖKÇİNAR'a, Öğr. Gör. Dr. İrem AKAR ve ailesine, Dr. Öğr. Üy. Ilgın ÇAĞNAN'a, Öğr. Gör. Dr. Esin ALPDÜNDAR BULUT'a, her zaman desteğini hissettiğim değerli arkadaşlarım Öğr. Gör. Dr. Cansu ÖZDEMİR, Bihter MURATOĞLU'na, Özlem ALTUNDAĞ'a ve Öğr. Gör. Dr. Burcu ÖZÇİMEN'e, Burcu PERVİN'e, Gizem YILMAZ'a ve Sena BABADAĞ'a; Sevgili Doç. Dr. Betül ÇELEBİ-SALTIK başta olmak üzere Uzm. Biy. Özlem KÜÇÜKBAYRAK'a, Engin ÖZÇELİK'e, Selma ERDEL'e, Hülya Abla'ya ve diğer tüm Kök Hücre Ailesi Üyeleri'ne,

Ve Çok Sevgili Aileme,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Sahan, OB., Podosit Hasar Modelinde İndüklenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerinin Etkisi; Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Bilimleri Programı Doktora Tezi, Ankara, 2023. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) tedavisi, bu hücrelerin kendini yenileyebilme, multipotent ve immünmodülasyon özellikleri yanı sıra reddedilme risklerinin düşük olması ile, Fokal Segmental Glomerüloskleroz (FSGS) gibi progresif yıkıcı hastalıkları için önemli bir terapötik seçenek olabilir. Podosit hasarı nedeniyle böbrek yetmezliğine ilerleme potansiyeli olan FSGS'nin tedavisinde kullanılan kortikosteroid ve diğer immunosupresif ilaçlar kısmen işe yaramakta, son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle böbrek transplantasyonu olan hastalarda ise nakil sonrası hastalık tekrar nüks edebilmektedir. Bu tez çalışmasında insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) ile MKH'lerin indüklenmesinin (IGF-1+HGF_MKH), MKH'lerin terapötik etkisini güçlendireceği hipotezini test etmek için puromisin aminonükleozid (PAN) ile *in vitro* ve *in vivo* podosit hasar modeli üzerinde IGF-1+HGF_MKH etkisinin incelenmesi planlandı. Öncelikle IGF-1+HGF_MKH'lerin detaylı karakterizasyonu yapıldı. IGF-1+HGF_MKH'lerin CD200, CD271, CD184/CXCR4, SSEA4 tümörojenite ile ilişkili belirteçlerini ifade etmediği, yara çizgisinde daha hızlı kapanış, IDO-1 ve TGF- β gen ifadelerinde, pikolinik asit metaboliti, IL-6, MCP-1 ve anjiojenin salgı düzeylerinde artış gözlemlendi. *In vitro* PAN hasarı yapılmış podosit hücreleri üzerinde IGF-1+HGF_MKH'nin bozulmuş podosit aktin hücre-iskeleti yapısını düzelttiği, podosite özel INF2 gen ifadesini artırdığı görüldü. *In vivo* sıçan FSGS modelinde IGF-1+HGF_MKH uygulamasının konvansiyonel MKH'lere göre proteinüriyi daha fazla azalttığı ve ultrastrüktürel olarak slit diyafram kayıplarını geri döndürdüğü saptandı.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Fokal Segmental Glomerüloskleroz, Puromisin amino nükleozid, Podosit, IGF-1, HGF

Bu tez çalışması, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından THD-2016-12080 numarası ile Hızlı Destek Programı kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Sahan, OB., The Effect of Induced Mesenchymal Stem Cells On Podocyte Injury Model, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Department of Stem Cell Sciences Doctor of Philosophy Thesis, Ankara,2023. Self-renewal, multipotent, immunomodulating properties and low rejection risk of mesenchymal stem cell (MSC) render it to be an important therapeutic option in severe diseases such as Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS). Remission of FSGS after treatment with corticosteroids and other immunosuppressive drugs can be achieved only partially and progression to kidney failure due to podocyte damage is likely. In those patients who have had a kidney transplant due to end-stage renal disease, recurrence of the disease may occur. The aim of this thesis was to investigate the effect of MSCs primed by insulin growth factor-1 and hepatocyte growth factor (IGF-1+HGF_MSC) in *in vitro* and *in vivo* podocyte damage models induced by puromycin aminonucleoside (PAN) to test the hypothesis that IGF-1 and HGF priming would enhance the therapeutic effect of MSCs. Firstly, detailed characterization of IGF-1+HGF_MSC was performed. IGF-1+HGF_MSC does not express tumorigenesis related markers CD200, CD271, CD184/CXCR4, SSEA4 similar to conventional MSCs. *In vitro* scratch assay revealed that IGF-1+HGF_MSC showed faster closure of the wound area. Increase in the expression of IDO-1 and TGF- β , and in the secretion of IL-6, MCP-1, angiogenin and picolinic acid metabolite of the IGF-1+HGF_MSC group compared to conventional MSCs were observed. Co-culture assays revealed that IGF-1+HGF_MSC ameliorated the impaired podocyte actin cytoskeleton structure and caused an increase in the expression of INF2 gene. It was determined that the administration of IGF-1+HGF_MSC reduced proteinuria in the *in vivo* rat FSGS model better than the conventional MSCs and reversed the loss of slit diaphragm.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Focal Segmental Glomerulosclerosis, Puromycin amino nucleoside, Podocyte, IGF-1, HGF

This thesis study was supported by the project numbered THD-2016-12080, by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Podosit Hücreleri ve Gelişimi	4
2.2. Podositlerin Yapısı	5
2.3. Podosit Hasarı ve Glomeruloskleroz Gelişimi	6
2.4. Mezenkimal Kök Hücreler ve Böbrek Rejenerasyonu	19
2.4.1. Mezenkimal Kök Hücreler	19
2.5. İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)	25
2.6. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Ekspansiyonu, IGF-1 ve HGF ile Lisanslanması ve Karakterizasyonu	40
3.2. MKH'lerin CM-DIL ile İşaretlenmesi ve CM-DIL Sitotoksitesinin İncelenmesi	43
3.3. Lisanslanan MKH'lerin İleri Karakterizasyonları	44
3.3.1. IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF Uygulamasının MKH Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Gösterilmesi	44
3.3.2. Lisanslanan MKH'lerin Metabolomiksi	44
3.3.3. Lisanslamanın MKH Üzerindeki Sitokin Düzeylerinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi	45

3.3.4. Lisanslamanın MKH Üzerindeki Sitokin İfadelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	47
3.4. <i>In Vitro</i> Podosit Hasarı Üzerinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH'lerin Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH'ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi	48
3.4.1. Podosit Hücre Kültürü	48
3.4.2. Podosit Hasarı Oluşturulması	49
3.4.3. Podosit-MKH Ko-Kültürü	49
3.4.4. Podosit Aktin Hücre İskeleti Hasarının Gösterilmesi	49
3.5. <i>In Vivo</i> Fokal Segmental Glomeruloskleroz (FSGS) Modelinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH'lerin Terapötik Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH'ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi	50
3.5.1. Pilot Çalışmalar	50
3.5.2. <i>In Vivo FSGS Modelinde</i> Tek Doz Mezenkimal Kök Hücre Tedavilerinin Karşılaştırılması	52
3.5.3. İstatistiksel Analizler	55
4. BULGULAR	56
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Ekspansiyonu, IGF-1 ve HGF ile Lisanslanması ve Karakterizasyonu	56
4.2. MKH'lerin CM-DIL ile İşaretlenmesi ve CM-DIL Sitotoksitesinin İncelenmesi	64
4.3. MKH Hücrelerinin CM-DIL ile İşaretlendikten Sonra <i>İn Vitro</i> Takibi	64
4.4. Lisanslanan MKH'lerin İleri Karakterizasyonları	64
4.4.1. IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF Uygulamasının MKH Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Gösterilmesi	64
4.4.2. Lisanslanan MKH'lerin (MKH I+H) Metabolomiks Çalışmaları	64
4.4.3. Lisanslamanın MKH Üzerindeki Sitokin Düzeylerinin RNA Düzeyinde Belirlenmesi	75
4.5. <i>In vitro</i> Podosit Hasarı Üzerinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH'lerin Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH'ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi	81
4.5.1. Podosit Hücre Kültürü	81

4.5.2. Podosit Hasarı Oluşturulması	82
4.5.3. Podosit-MKH Ko-Kültürü	82
4.6. <i>In Vivo</i> FSGS Modelinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH'lerin Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH'ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi	89
4.6.1. Pilot Çalışmalar	89
4.6.2. <i>In Vivo</i> FSGS Modelinde Tek Doz Mezenkimal Kök Hücre Tedavilerinin Karşılaştırılması	98
5. TARTIŞMA	110
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	123
7. KAYNAKLAR	126
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK-3: Turnitin - Dijital Makbuz	
EK-4: Bildiriler	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTB	B-Aktin
ACTN4	Alfa-Aktinin-4
ANLN	Aktin Bağlayıcı Protein Anillin
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APOL2	Apolipoprotein L2
ARHGDIA	Rho GDP Disosiyasyon İnhibitorü Alfa
ATRA	<i>All-Trans Retinoic Acid</i>
Bax-2	<i>Bcl-2-Associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
bFGF	<i>Basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CD2AP	CD2-İlişkili Protein/Aktin Filamenti
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CGB5	<i>Chorionic Gonadotropin Subunit Beta 5</i>
CLCF-1	<i>Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1</i>
cm	<i>Centimeter</i>
CM-Dil	<i>Chloromethyl-Dialkylcarbocyanine</i>
c-MET	<i>Tyrosine-Protein Kinase Met</i>
CO₂	<i>Carbondioxide</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CXCR4	<i>C-X-C Chemokine Receptor Type 4</i>
DAG	Diasilgliserol
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol,
dk	Dakika
dL	Desilitre
DMEM-LG	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose</i>
dNTP	<i>Deoxynucleoside Triphosphate</i>
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt</i>
EM	Elektron Mikroskobu

EMP2	Epitelyal Membrane Protein 2
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPH	Endotelyal Progenitör Hücre
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FAK	Fokal Adezyon Kinaz
FAS	<i>Fas Cell Surface Death Receptor</i>
FBS-HI	<i>Fetal Bovine Serum-Heat Inactivated</i>
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FOXC2	<i>Forkhead Box Protein C2</i>
FP	<i>Foot Process</i>
FSGS	Fokal Segmental Glomeruloskleroz
g	Gram
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrojenaz
GBM	Glomerüler Bazal Membran
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
HLA-DR	<i>Human Leucocyte Antigen DR</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IDO-1	İndoleamin 2, 3-Dioksijenaz
IFN- γ	<i>Interferon Gamma</i>
IGF-1	İnsulin Büyüme Faktörü-1
IL	İnterlökin
INF2	<i>Inverted Formin 2</i>
IP3	İnoзит Trifosfat
Kg	Kilogram
LPS	Lipopolisakkarit
MAFB	V-Maf Muskuloaponeurotik Fibrosarkom Onkogen Homolog B

MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP	Monosit Kemoatraktan Protein
mCSF	Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör
MDC	Makrofaj Derive/CCL22 Kemokin
MDH	Minimal Değişiklik Hastalığı
mg	Miligram
MIG	<i>Monokine Induced By Interferon Gamma</i>
MIP-1	Macrophage Inflammatory Protein-1
mL	Mililitre
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Myo1E	Miyozin-1E
MYO1E	Miyozin 1E
NADPH	<i>Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz</i>
NaN₃	Sodyum Azid
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NOTCH	Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
NPHS1	Nefrin
NPHS2	Podosin
NS	Nefrotik Sendrom
P2RY11	<i>Purinergic Receptor P2y11</i>
PAX2	<i>Paired Box Gene 2</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PE	<i>Phycoerythrin</i>
pH	<i>Potential Of Hydrogen</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
P-kaderin	Plasental Kaderin
PLCε1	<i>Phospholipase C Epsilon 1</i>
PLS-DA	Partial Least Squares-Discriminant Analysis
PODXL	Podokaliksin

PTPRO	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type O</i>
PAN	Puromisin Aminonüklozid
Raf	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RhoA	<i>Ras Homolog Family Member A</i>
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>Revolutions Per Minute Of Rotor</i>
RT-qPCR	Real Time Qpcr
SCF	Stem Cell Factor
SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1</i>
Shc	Shc Adaptör Proteini
SNRBP2	<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide B2</i>
suPAR	<i>Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor</i>
SYNPO	<i>Synaptopodin</i>
TCF21	<i>Transcription Factor 21</i>
TEM	<i>Transmission/Geçirimli Elektron Mikroskobu</i>
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
TGIF	Tgfb Induced Factor Homeobox 1
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TRAIL	<i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
TRPC6	<i>Transient Receptor Potential Channel</i>
TTC21B	Tetratrikopeptid Tekrar Protein 21B
UCSF	<i>Urine Cerebrospinal Fluid Protein</i>
UO	<i>Unilateral Ureteral Obstruction</i>
V	Volume/Hacim
VEGF	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
WNT	<i>Wnt Family Member 1</i>
WST-1	<i>Water-Soluble Tetrazolium 1</i>
WT1	Wilms Tümör Proteini
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>
α-SMA	<i>Alpha-Smooth Muscle Actin</i>
μl	Mikrolitre

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Normal/sağlıklı podosit ve glomeruloskleroza bağlı podosit hasarı.	8
2.2. IGF-1 sinyal yolağı. IGF-1, IGF-1R'ye bağlanır ve IRS-1'i aktive eder.	27
3.1. ATCC'den satın alınan MKH'lerinin özellikleri	43
4.1. P3 MKH'lerin kültürde morfolojik olarak görüntülenmesi.	56
4.2. MKH ve IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin flow sitometri analizleri.	58
4.3. MKH gruplarının adipojenik farklılaşmalarının 21. günü görüntüleri.	62
4.4. MKH gruplarının adipojenik farklılaşmalarının 21. günü görüntüleri.	63
4.5. CM-DIL'in sitotoksitesinin WST-1 analizi ile belirlenmesi.	65
4.6. MKH hücrelerinin CM-DIL ile işaretlenmesi ve kültürde takibi.	65
4.7. MKH gruplarının 12, 18, 24 ve 36. saat yara iyileşmeleri.	66
4.8. MKH-1 ve MKH-2 metabolomiks analizlerinde çıkan tanımlanmış metabolitlerin kesişim kümesi.	67
4.9. MKH'lerin SIMCA analizine göre zorlanmış ayrımı.	69
4.10. MKH-1 deneyinde IGF1+HGF MKH'lerin Kontrol MKH'ye göre farklı çıkan metabolitleri.	69
4.11. IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF ile kombine indüklenen MKH'lerin kontrol MKH'lere göre anlamlı olarak farklı çıkan metabolitlerinin VENNY diagramında gösterilmesi.	70
4.12. MKH-2 deneyinde IGF1+HGF MKH'lerin Kontrol MKH'ye göre farklı çıkan metabolitleri.	71
4.13. IGF-1+HGF_MKH'lerin Kontrol MKH'lere göre deneylerde farklı çıkan metabolitlerinin VENNY diagramı.	71
4.14. MKH gruplarının sitokin analizleri.	76
4.15. MKH gruplarının zorlanmış analizinin ısı haritası.	77
4.16. Isı haritası MKH (1), MKH (2), IGF-1+HGF_MKH (1) ve IGF-1+HGF_MKH (2) Sitokin/kemokin analizinin membran görüntüleri ve ısı haritası görselleştirmesi.	78
4.17. MKH, MKH-IH, MKH-I ve MKH-H süpernatantlarının "LEGENDplex™-Multi-Analyte Flow Assay Kit" profili ile akış sitometrisinde analiz edilen IL-6 konsantrasyonları.	80
4.18. MKH gruplarının qRT-PCR analizleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri).	80
4.19. Kültürdeki farklılaşmış ve farklılaşmamış podosit hücrelerinin morfolojik olarak görüntülenmesi.	81

4.20.	<i>In vitro</i> PAN ile hasar uygulanan podositlerin metabolik aktivitelerinin, gen ifadelerinin grafikleri ve aktin hücre-iskeleti yapılarının görüntüleri.	84
4.21.	PAN hasarlı podosit-MKH ko-kültürlerindeki (8 µm) CM-DIL işaretli MKH gruplarının floresan mikroskobu görüntüleri ve işaretli hücre sayılarının bar grafiği.	86
4.22.	PAN+Podosit-MKH ko-kültürü (4 µm süzgeç) floresan mikroskobu görüntüleri.	87
4.23.	PAN-Podosit-MKH ko-kültürü (8 µm süzgeç) floresan mikroskobu görüntüleri.	88
4.24.	Pilot deney 1: Kontrol ve PAN gruplarının günlere göre ağırlıklarının, protein/kreatinin oranlarının, idrar protein ve kreatinin miktarlarının, su içimi ve idrar çıkışlarının grafikleri.	91
4.25.	Kontrol ve PAN grubunun böbrek glomerular kesitinin elektron mikroskobunda incelenmesi.	93
4.26.	PAN Hasarına bağlı SYNPO ve INF2 mRNA ifadelerinin bar grafikleri.	93
4.27.	PAN Hasarına bağlı Synaptopodin (Synpo) protein ifadesi değişiminin immunohistokimya görüntülemesi.	94
4.28.	28. Pilot çalışma 2: erken dönem ve geç dönem uygulanan PBS, MKH, MKH I+H verilen sıçan gruplarının protein/kreatinin oranlarının vücut ağırlığı grafikleri.	96
4.29.	Pilot çalışma 2: erken dönem ve geç dönem uygulanan PBS, MKH, MKH I+H verilen sıçan gruplarının protein/kreatinin oranlarının bar grafikleri.	97
4.30.	Sıçanlara IGF-1_MKH (MKH-I) ve HGF-MKH (MKH-H) uygulaması sonrası idrar protein/kreatin düzeyleri.	97
4.31.	PAN ile FSGS modeli oluşturulan ve MKH/I+H tedavisi uygulanan sıçanların vücut ağırlığı, proteinüri, idrar çıkışları ve su alımlarının grafikleri.	99
4.32.	PAN ile FSGS modeli oluşturulan ve CM-DIL işaretli MKH/I+H tedavisi uygulanan sıçanlarda tedavi sonrası 9. günde alınan böbrek ve akciğer kesitlerinde CM-DIL işaretli hücrelerin görüntülenmesi.	101
4.33.	PAN veriliminin ardından böbrek hasarına bağlı fizyolojik değişimler.	102
4.34.	Böbrek doku kesitlerinin skleroz gösteren glomerul ve hyalen silindir yüzde grafikleri.	103
4.35.	PAN ile FSGS modeli oluşturulmuş ve ardından MKH/MKH I+H tedavisi uygulanmış ve PBS (tedavi uygulanmayan) uygulamasının 9. Gününde alınan böbrek kesitlerinin HE ve PAS boyamaları.	104
4.36.	Sıçan böbrek dokularının <i>Synpo</i> ve <i>Inf2</i> mRNA ifadelerinin değişim grafiği.	105

- 4.37.** PAN ile FSGS modeli oluşturulmuş ve ardından MKH/MKH I+H tedavisi uygulamasının 9. Gününde alınan böbrek kesitlerinin Synpo antikoru ile işaretlendikten sonra çekilen görüntüleri. 106
- 4.38.** Sağlıklı, FSGS, FSGS_MKH ve FSGS_IGF-1+HGF_MKH grubu glomerüler kesitlerinin elektron mikroskobu görüntüleri. 15Kx büyütme 107
- 4.39.** Sağlıklı, FSGS, FSGS_MKH ve FSGS_IGF-1+HGF_MKH grubu glomerüler kesitlerinin elektron mikroskobu görüntülerinin 2’li karşılaştırmalı görüntüleri. 109

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Böbrek Hasarı/Hastalıklarında MKH kaynaklı tedavilerin kullanıldığı <i>clinicaltrials.gov</i> 'dan alınan klinik çalışmalar.	38
3.1. Sitokin Array hedef proteinlerin membran üzerindeki yerleşim sırasına göre listesi	46
3.2. RT-qPCR'da kullanılan primer oligonukleotit dizileri	48
4.1. MKH, IGF-1, HGF ve IGF-1 ve HGF ile indüklenen MKH'lerin yüzey marker ekspresyonları	61
4.2. MKH gruplarının 12, 18, 24 ve 36. saatlerdeki yara kapatma oranları	67
4.3. MKH-1 ve MKH-2 metabolomiks analizinde çıkan tanımlanmış metabolitlerin listesi	68
4.4. MKH-1 ve MKH-2 deneylerinde IGF-1+HGF'lerle indüklenen MKH'lerin, kontrol MKH'lere (indüklenmemiş) göre anlamlı olarak belirlenen metabolitlerin listesi	72
4.5. MKH-1 ve MKH-2 analizinde MKH I+H'lerin MKH'lere göre anlamlı farklı çıkan metabolitlerinin ilgili yolakları.	73
4.6. MKH (Kontrol), MKH-I, MKH-H, MKH-I+H'nin salgıladığı sitokinlerin konsantrasyon değerleri	79
4.7. Sağlıklı (Kontrol) ve hasta modeli (FSGS) ratların idrar parametreleri	92
4.8. FSGS modelinde PAN, MKH ve MKH I+H tedavi gruplarının 24 saatlik idrar analizleri.	100

1. GİRİŞ

Mezenkimal kök hücreler (MKH) multipotent hücreler olup immünmodülatör kapasitesi ile birçok hastalığın tedavisinde araştırılmaktadır. MKH'ler hasarlı alana göç ederek hasarlı alandaki inflamasyonu baskılayarak hasarın iyileşmesini hızlandırmaktadır (1). MKH'lerin hasar çalışmaları için uygulama öncesi bazı moleküllerle indüklenmesi MKH'lerin hasarlı bölgeye gidişini ve inflamasyon üzerine etkisini arttırmakta ve bu da iyileşme sürecini daha da hızlandırmaktadır (2). MKH uygulaması ile ilgili başarılı sonuçlar alınmasına rağmen, MKH'lerin çoğunluğu akciğer, dalak, kemik iliği ve karaciğer gibi organlara gitmekte, çok azı böbrek dokusuna giderek hasarı tamir etmekte, bu nedenle hasar kısmen geri döndürülebilmektedir (3). MKH'lerin hasar bölgesine gitmesi bu bölgeden salınan lokal ve sistemik inflamatuvar sinyaller aracılığı ile olduğundan hasar düzeyi ve salınan sitokin ve kemokin düzeyleri çok önemlidir. Yapılan çalışmalar verilecek MKH'lerin hasar alanına gitmesi ve onarım yapabilmesi için uygulamadan önce hasarlı ortamda bulunan molekülleri içeren kültür ortamında çoğaltılması, yani “ön-koşullama/lisanslama” yapılmasının hasar bölgesine göçü arttırdığını göstermiştir (4, 5). Hasarlı doku ortamını taklit eden kültür ortamlarında çoğaltılan MKH'ler ön-koşullandırılmış/lisanslanmış MKH olarak tanımlanmaktadır (6). IGF-1 ve HGF gibi moleküllerin tek tek uygulaması ile MKH'lerin indüksiyonu çeşitli hastalık modellerinde incelenmiştir (7, 8)

Proteinüri ile seyreden böbrek hastalıkları, çoğunlukla böbreğin temel hücreleri olan ve filtrasyon bariyerinin temel yapıtaşını oluşturan podosit hücrelerinde meydana gelen hasarlar ile ilişkilidir. Podosit hücrelerinin kaybına bağlı olarak fokal segmental glomeruloskleroz (FSGS) gibi nefrotik sendrom ya da izole proteinüri kliniği ile seyreden patolojiler ortaya çıkmakta ve zaman içinde son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemektedir (9). FSGS etiopatogenezine göre idiopatik (primer) veya enfeksiyonlara, ilaçlara, genetik nedenlere bağlı gelişen sekonder olarak sınıflandırılmaktadır (10). FSGS'nin genetik formu, podosit hücrelerinin ana gövdesi, slit diyafram ve podosit aktin hücre iskeletinin yapısında yer alan genlerde meydana gelen mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu genlerdeki ve bunların kodladığı proteinlerdeki fonksiyonel kayıplar ya da kazanımlar proteinüri ve bununla ilişkili böbrek hasarını hızlandırmaktadır (11). FSGS'nin ilerlemesiyle oluşan böbrek

hastalığının tedavisinde kortikosteroid ve diğer immunsupresif ilaçlar kısmen işe yaramakta, son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle böbrek transplantasyonu yapılan bazı hastalarda ise nakil sonrası hastalık tekrar nüks edebilmektedir.

Podosit hasarı ile oluşan nefrotik sendrom hayvan modelleri içinde en sık puromisin aminonüklozid, adriamisin ve streptozotosin hayvan modelleri kullanılmaktadır. Diyabetik nefropati, FSGS gibi modellerde MKH'lerin proteinüri ve hasarı azalttığı gösterilmiştir. MKH'lerin tedavide yararlı etkileri olduğu söylenmesine karşın, bu bilgilerin çoğunluğu konvansiyonel MKH'lerin kullanıldığı hayvan model çalışmaları ile çok az sayıdaki klinik çalışmaya dayanmaktadır (12). MKH'lerin terapötik etkilerinin tartışmalı olduğu ve kombine faktörle uygulanması ile modüle edilmesi sağlanarak etkin bir şekilde böbrek hastalıklarının tedavisinde yeni yaklaşımlar sağlayacağı düşünülmektedir. MKH'lerin salgıladığı IGF-1 ile tübüler hücre proliferasyonunu ve rejenerasyonunu sağladığı, post-operatif akut böbrek hasarında iyileşmeyi hızlandırdığı raporlanmıştır (13), HGF ise hücre proliferasyonunu indükleyip, apoptozu baskılayarak böbrek onarımını ve böbrek hücrelerinin çoğalmasını desteklemektedir (14), MKH'lerin HGF salgılaması podosit hücre apoptozunu azaltmakta, ektopik HGF eksprese eden MKH'ler akut böbrek hasarında apoptozu azaltarak iyileşmeyi artırmaktadır (15). MKH'lerin IGF-1 ve HGF'yi içeren faktörler salgılamasıyla böbrek hasarında koruyucu rolü olduğu ve hasarı azaltmaya katkıda bulunduğu rapor edilmiştir (16).

Bu tez çalışmasında, IGF-1 ve HGF ile birlikte MKH'lerin (MKH I+H), MKH kültür ortamına eklenmesi ile indüklenmesinin MKH'lerin terapötik etkisini güçlendireceği hipotezini test etmek için podosit hücrelerine etki eden puromisin aminonukleozid (PAN) kimyasalı insan podosit hücre kültür ortamına eklenerek *in vitro* hasar modeli ve Sprague Dawley sıçanlarına intravenöz verilerek *in vivo* hasar (FSGS) modeli oluşturulmuştur. *In vitro* podosit hasar oluşumu podosit aktin hücre-iskeleti yapısındaki değişimler ile gösterildi. *In vivo* hasar oluşumu proteinüri ile gösterildi. İnsülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) ile birlikte indüklenmiş insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin *in vitro* etkileri ko-kültür çalışmaları ile, *in vivo* etkileri ise PAN ile oluşturulan FSGS'li sıçanlara indüklenen MKH'lerin intravenöz uygulanmasının konvansiyonel MKH uygulaması ile karşılaştırılarak araştırıldı.

In vitro IGF-1+HGF_MKH'lerin temel karakterizasyonu canlılık, yüzey belirteç ifadeleri ve farklılaşma potansiyellerinin gösterilmesi ile, ileri karakterizasyonları ise *in vitro* yara iyileşmesi testi ile, metabolomiks profili, sitokin dizin profili ve bazı gen ifadelerinin RT-qPCR ile belirlenmesi ile yapıldı. PAN ile hasar oluşturulan podosit hücrelerinde indüklenen MKH'lerin *in vitro* etkileri hücre göçü, podosit aktin hücre-iskeleti yapısı ve podosite özel gen ifadelerinde değişimlerin konvansiyonel MKH'ler ile karşılaştırmalı değerlendirilmesi ile incelendi.

IGF-1+HGF_MKH'lerin *in vivo* etkisi; PAN ile oluşturulan Sprague Dawley sıçan FSGS modelinde toplanan idrarda protein/kreatinin oranı analiz edilerek, sakrifikasyondan sonra böbrek glomerüler kesitlerinin histokimyasal ve elektron mikroskopik analizi, podosit hasarında regülasyonu bozulan *Inf2* ve *Synpo* ifadelenmeleri RT-qPCR ile ve immunohistokimyasal boyama ile konvansiyonel MKH uygulama yapılan grup ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2016/38-3 karar numarası ile onaylanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Podosit Hücreleri ve Gelişimi

Podositler, böbreğin Bowman kapsülünün iç/viseral tabakasının epitel hücreleri olup, kandan idrara protein kaybını önleyen antiproteinürik mekanizmanın en önemli parçasını oluşturur. Podositler, glomerüler kapiller damarları iç içe geçmiş uzantıları ile kaplar. Glomerül, nefronun başlangıç kısmında bulunur ve glomerüler kapiller damar endoteli, glomerüler bazal membranı ve podosit ayakları/uzantıları/*foot process* (FP) ve bunlar arasındaki aralığı kapatan slit diyaframı içeren çok katmanlı hücresel bir bariyerden oluşur (17). Bu bileşenlerin herhangi birindeki yapısal ya da fonksiyonel hasar klinik olarak proteinüri ile sonuçlanan filtrasyon mekanizmasının bozulmasıyla sonuçlanır. Glomerülün hücresel yapısı, transkripsiyon faktörlerinin, epigenetik kontrol mekanizmalarının ve parakrin salgı yollarının etkileşimiyle çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (18).

Podosit Gelişimi

“Böbrek farklılaşması” ontogenetik olarak, pronefroz, mezonefroz ve son olarak metanefroz ile sonuçlanan üç aşamadan oluşmaktadır. Memeli böbreği, metanefroz, metanefrik mezenkim ve üreterik tomurcuğun interaksiyonuyla gelişir (19). Metanefrik mezenkim, nefron progenitor hücrelerine (NPH) ve podositlere, glomerüler parietal, proksimal ve distal tübül epitel hücrelerine, Henle kulpu ve nefron epiteline farklılaşan stromal progenitorlerden oluşur. Üreterik tomurcuktan iletilen Wnt sinyali, pretübüler hücre agregatı oluşturmak için NPH’lerin yoğunlaşmasını ve ardından epitelyal renal vezikül oluşumunu tetikler. Bu süreç mezenkimal-epitelyal geçiş (MET) olarak adlandırılır (20, 21). Renal vezikül daha sonra proksimo-distal eksen boyunca uzar ve podositlerin nefron epitelinin proksimal ucunda yer aldığı kararlı nefron segmentlerine farklılaşır (22). Renal vezikülün proksimalinden, WT1, MAFB gibi podosit ile ilişkili genleri ifade etmeye başlar (23). Renal vezikül aşamasında podosit hücre progenitorleri, apikal hücre-hücre temasları ile epitel benzeri hücre morfolojisi sergiler. Daha sonra, Renal vezikül, S-şekilli gövdeyi oluşturmak için segmentasyona uğrar ve sonunda nefron epiteline farklılaşır (22). Notch, Wnt, Fgf, Bmp, PI3-kinaz sinyal yolları, renal vezikülden S-şekilli gövdeye

geçişte proksimal-distal paternin oluşumunda önemlidir. Distal hücreler, Wnt4'ü yüksek seviyede ifade eder (24). Nefron eksenı boyunca Wnt/ β -katenin aktivitesi yüksek düzeydeyken podosit öncülerini içeren proksimal alanda β -katenin düzeyi çok düşüktür. Metanefrik organ kültüründe Wnt/ β -katenin sinyalleşmesinin “upregülasyonu” daha az podosit farklılaşması ile sonuçlanıyor olması bu aşama sırasında Wnt sinyalinin podosit gelişimi için baskılayıcı bir rolü olduğunu düşündürür (25). Proksimal tübül segmentlerinin ve glomerül bileşenlerinin normal gelişimi için Notch2 aracılığı ile Notch sinyalizasyonu gereklidir. Nefronun proksimal bölgesinde, normal podosit kimliği gelişimi, özellikle MAFB, *TCF21* ve *FOXC2* gibi çeşitli transkripsiyonel düzenleyicilerin etkisine bağlıdır (26-28). S-şekilli gövde aşamasında apikal zarlar genişlemektedir ve bu aşamada podositlerin hücre temasları bazal kısma kayıyor gibi görünür. Glomerül kapillerleri genişledikçe pre-podosit prekürsörleri katman değiştirir. Bu yeni oluşan podosit tabakası kapiller yüzeyi çevreleyen bir cep oluşturur ve glomerüler sapın bir parçası olarak arteriyel ve venöz beslenmeyi sağlayacak dış damar sistemi ile teması korur, ilkel podositler bu cebi oluştururken, glomerüler bazal membran (GBM), epitelyal ve kapiller bileşenler arasında sabit bir bariyer olarak kalır ve bu sırada birbirleriyle yan hücre-hücre bağlantılarını kaybetmeye başlarlar. Daha sonra ilkel podositler kapiller halkaların etrafında da göç etmeye başlarlar, GBM'ye bağlı kalırlar fakat artık klasik epitel hücrelerine benzememektedirler. Glomerüler gelişimin ve podosit olgunlaşmasının bu evresinde ayaksız uzantılar oluşmaya başlar ve özel bir hücre-hücre teması olan slit diyafram oluşur. Podositlerin ayaksız uzantıları, belirsizliğini koruyan bir şekilde kendi hücrel uzantılarıyla bağlantı kurmayı algılayabildiği ve önleyebildiği oldukça polarize bir düzenlenmeye sahiptir (29, 30). Podositler bu olgunlaşmış glomerüler dönemde ahtapot benzeri bir görünümü alır ve terminal olarak farklılaşmayı tamamlamış en olgun halini alır (31).

2.2. Podositlerin Yapısı

Böbreğin temel yapısını oluşturan podosit hücrelerini birbirine bağlayan slit diyaframının önemi ve yapısının keşfi 1988 yılında Orikasa ve arkadaşlarının çalışmalarına dayanmaktadır (29, 32). Podositler mimarisi, karakteri ve konumu ile eşsiz hücrelerdir ve son derece karmaşık hücrel organizasyona sahiptirler. Her olgun

podositin farklı anatomik ve işlevsel bileşenleri vardır (33). Hücre gövdesi hücrenin merkezindedir ve esas olarak idrar boşluğunda bulunur. Burada hücrenin çekirdeği, Golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi diğer hücre organelleri bulunur. Yapısal ve fonksiyonel olarak hücre gövdesi, primer/majör uzantıları ve sekonder/ayaksı uzantılar olmak üzere farklı segmentlere ayrılmaktadır. Podositler Bowman kapsülü içerisinde glomerular kapillerin dış kısmını çevrelemektedir ve ayaksı uzantılarıyla GBM'ye tutunmaktadır (Şekil 2.1.).

Ayaksı uzantılar apikal membran alanı, slit diyafram ve GBM ile temas halinde olan bazal membran alanı olarak üçe ayrılabilir (34). Her üç alan da aktin hücre iskeletine bağlıdır. Komşu hücrelerin ayaksı uzantısı düzenli olarak birbirine kenetlenmiştir ve birbirlerinden köprü oluşturan ekstraselüler slit diyafram yapı ile ayrılmaktadır. Bu yapı protein sızıntısına karşı en büyük bariyeri oluşturan oldukça özel bir ara bağlantıdır (35, 36). Ayaksı uzantılar integrinler ve distroglukanlar yoluyla alttaki GBM'ye bağlanır (36).

Podositler polarize hücrelerdir, eşsiz şekilleri, podositin omurgası olarak hizmet eden aktin hücre iskeleti sayesinde. Aktin hücre iskeleti ayrıca podositlere statik kalması veya sürekli şekil değiştirmesi için dinamik bir işlev sağlar. Hücre içindeki aktin hücre iskeletindeki değişiklikler, hücrenin şeklinin, hareketliliğinin ve hücre içi taşınımın korunması için gereklidir (37). Hücre iskeleti mikrofilyamentler, vimentin-tip ara filamyentler ve mikrotübüller olmak üzere üç farklı yapısal eleman içerir. Yoğun F-aktin ve miyozin içeren mikrofilyamentler, ayaksı uzantının baskın hücre iskeleti bileşenleridir. Podosit şeklini korumada önemli olan aktin polimerizasyonu, aktin bağlayıcı proteinler tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir (38). Fokal adezyonları oluşturan Talin-1, Vinculin, Paxillin, Fokal adezyon kinaz (FAK) proteinleri podosit hücre iskeletini integrinlere bağlar (39).

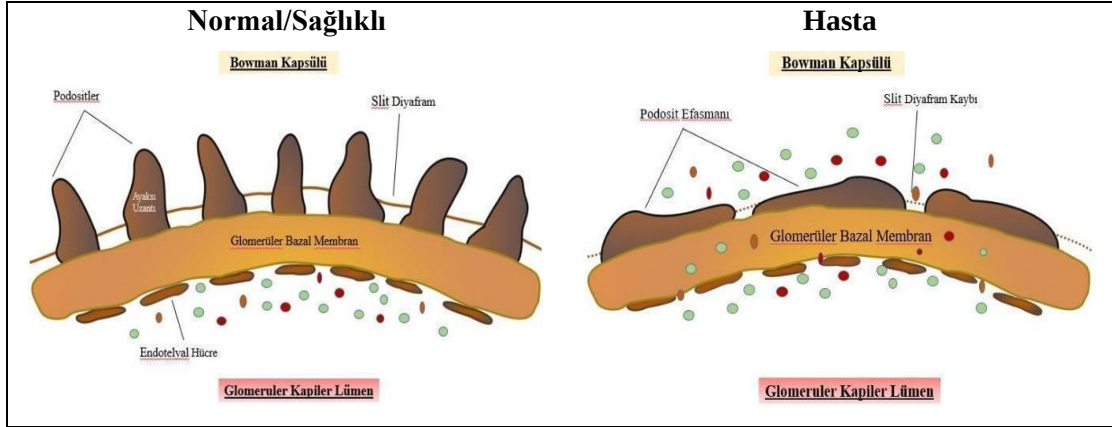
2.3. Podosit Hasarı ve Glomeruloskleroz Gelişimi

Podositler, glomerüler filtrasyon bariyerini oluşturmaktadır. Bu bariyerin stabilitesi ve aynı zamanda glomerülün dayanıklılığı bu hücrelerin yüksek oranda farklılaşmış postmitotik fenotipine bağlıdır. Podositler çeşitli streslere ve patolojik uyarılara karşı homeostazı sürdürmek için adapte olurlar ancak; mekanik stres, immünolojik ve oksidatif stres gibi fizyolojik veya patolojik uyarılar hücre

bütünlüğünün kaybına ve hücrel metabolizmanın düzenini bozmakta ve karmaşık biyolojik değişikliklere neden olmaktadır (40).

Fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS), Minimal değişiklik hastalığı (MDH), diyabetik ve diyabetik olmayan nefropati ve membranöz glomerulonefrit gibi glomerüler hastalıkların birçok formunda podositlerde hasar gözlenmektedir. Mekanik, oksidatif ve immünolojik stresler podosit hücre stresine ve hasarına yol açabilmektedir. Glomerüler hipertansiyon/hiperfiltrasyon ile artan kapiller basınç artışı ile ve kapillerlerin genişlemesi ile podosit uzantılarının uzamasının uyarılması, hücre iskeleti düzensizliğine ve hücre içi strese katkıda bulunur (41). İskemi-reperfüzyonu, idrardaki kimyasal/toksik maddeler gibi patolojik faktörler genellikle podositlerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olur (42). ROS oluşumunu aldosteron ve anjiyotensin II (AngII)'nin de desteklediği bildirilmiştir (43). İmmünolojik stres; CC kemokin reseptörü-2, tümör nekroz faktör reseptörü (TNF), RANK/L ve podositlerde kompleman C5b-9 aracılı hücre içi stres gibi sitokinler tarafından indüklenir (40)

Podosit hasarının erken evresi; slit diyaframın moleküler kompozisyonundaki değişimler ile karakterizedir ancak hücre morfolojisinde gözle görünür belirgin bir değişiklik bulunmamaktadır. Podosit hasarının moleküler patolojisinde; podositlerin birbirine 4yapışması, aktin hücre iskeleti yapısının bozulması, GBM yapısının veya podosit-GBM interaksiyonunun bozulması ve podositlerin negatif yüklü yüzeyinin bozulması rol oynamaktadır (35). Podosit hasarı, GBM'den hücrelerin geri çekilmesini, ayrılmasını ve vakuolizasyonu içeren morfolojik değişiklikler ile podosit ayakları uzantılarının silinmesi /efasmanı sonucu, kliniğe proteinüri olarak yansır (30) (Şekil.2.1.).



Şekil 2.1. Normal/sağlıklı podosit ve glomeruloskleroza bağlı podosit hasarı. Glomerüler filtrasyon bariyeri endotelial hücreler, glomerüler bazal membran (GBM) ve podosit ayakları uzantıları/ *foot* prosesinin ve arasında slit diyaframdan oluşmaktadır. İleri derecede inflamasyon, enfeksiyon vs. gibi durumlara bağlı podosit ayakları uzantılarının bozulmasıyla podosit efasmanı ve slit diyafram kaybı oluşmakta, albümin vb. büyük proteinlerin kandan idrara geçişi artmaktadır.

Glomerüloskleroz, podosit hasarının ilerlemesi ile ortaya çıkmaktadır. Klasik glomerüloskleroz ekstraselüler matriks tarafından glomerüler kapillerlerin segmental yıkımı ile tanımlanmakta ve sklerozu tamamlamak üzere gerileme olmadan ilerleyen bir süreç olduğu düşünülmektedir (40). FSGS'nin erken evresinde, transforme podositleri içeren hücresel lezyonlara segmental skleroz eşlik etmekte ve bu da podosit hasarının erken bir glomerüloskleroz olayı olabileceği gerçeğini desteklemektedir. Kim JS derlemesinde sınıflandığı üzere, glomerülosklerozun temel basamaklarını; 1- podosit slit diyaframda artan glomerüler kapiller basınç ve filtrasyon akışı, 2- adaptif bir yanıt olarak ayakları uzantısının silinmesi, 3- podosit hipertrofisi ve glomerüllerdeki uyumsuz büyüme, 4- podosit hücre gövdesinin gerilmesi ve zayıflaması, 5- GBM'nin çıplak alanlarından kısmen ayrılan podositin altında filtrat akışının engellenmesiyle psödokist oluşumu, 6- büyümüş psödokistler tarafından tam podosit ayrılması ve Bowman kapsülüne yapışma, 7- glomerülün Bowman kapsülüne yapışması, 8- filtratların nefronun dışında interstisyuma yayılması ve 9- interstisyel proliferasyon ve nefron dejenerasyonu oluşturmaktadır (44).

Podositlerin yapısı, hareketi, canlılığı ve fonksiyonu için aktin hücre iskeletinin dinamik regülasyonu son derece önemlidir. Aktin hücre iskeleti yapısında rol oynayan genlerde meydana gelen mutasyonlar, aktin hücre iskeleti yeniden düzenlenmesi,

filtrasyon bariyerinin bozulmasıyla beraber renal hastalıklara neden olabilmektedir (45). Podositlerin aktin hücre iskeletinin yapısı için önemli olan *inverted* formun 2 (INF2) (46), α -aktinin-4 (ACTN4) (47), sinaptopodin (SYNPO) (48), podokaliksin (49) miyozin 1E (MYO1E) (50), aktin bağlayıcı protein anillin (ANLN) (51), tetratrikopeptid tekrar protein 21B (TTC21B) (52) ve epitelyal membran protein 2 (EMP2) (53) ve Rho GDP disosiyasyonu inhibitörü alfa (ARHGDIA) (54) gibi proteinleri kodlayan genlerin inhibisyonuna yönelik çalışmalarda aktin hücre iskeletinin yapısının bozulmasına bağlı olarak podosit hasarı olduğu gösterilmiştir. Çalışmalar, nefrotik sendromların (NS) bazı tiplerinde slit diyafram proteinleri, aktin hücre iskeleti ve slit diyafram yapı dinamiği arasındaki ilişkiyi aydınlatmayı amaçlamaktadır. Nefrin, CD2AP, FAT, ZO-1, P-kaderin, Podosin, ve Neph1-3 gibi birçok proteinin slit diyafram ile ilişkili olduğu, slit diyafram bütünlüğü açısından önemli olduğu gösterilmiştir (55).

Fokal Segmental Glomeruloskleroz

Fokal segmental glomerüler skleroz (FSGS) en yaygın glomerüler hastalıklardan birisi olup, erişkin nefrotik sendromların tahminen %40'ında, çocuklarda %20'sinde görülen ilerleyici glomerüler hasarla giden son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) neden olmaktadır (56). Histolojik olarak bazı (fokal) glomerüllerin bazı bölümlerinde (segmental) skleroz ile karakterize edilen glomerüler hasardan kaynaklanan bir lezyondur. FSGS gelişiminde rol oynayan ana hücreler podosit hücreleridir. Podosit hasarı ve hasarın ilerlemesiyle protein kaybı/proteinüri ve ardından fokal skleroz lezyonların gelişmesine sebep olmaktadır (57, 58). Hastalık ilerledikçe daha yaygın ve global glomerüloskleroz ortaya çıkmaktadır (59). FSGS primer (idiopatik) ve maladaptif, viral enfeksiyonlar, genetik, ilaç ve toksiste indüklü sekonder formları ile kategorize edilmekte, bu ayrım hem prognostik hem de terapötik açıdan önem taşımaktadır (10). Primer FSGS, tam nedeni bilinmemekle beraber nefrotik sendroma yol açan dolaşımdaki faktörlerin neden olduğu düşünülen immünolojik bir hastalıktır. İmmüsupresif tedaviye yanıt vermekte, fakat böbrek naklinden sonra günler veya haftalar içerisinde nakledilen böbrekte tekrar edebilmektedir (10, 60). Sekonder formlar sıklıkla nefrotik düzeyde olmayan proteinüri ve ilerleyici böbrek yetmezliği ile ortaya çıkar, immüsupresif ilaçlara

dirençlidir ve tedavisi altta yatan nedenin çözülmesine odaklanmaktadır. Sekonder formlar, FSGS'yi tetikleyen altta yatan bir neden olmadığı sürece böbrek nakillerinde takılan böbrekte tekrarlamamaktadır. Genetik FSGS de immünsupresif tedaviye dirençlidir ve nakil sonrası tekrarlama oranı düşüktür (61).

Epidemiyoloji

FSGS'nin kesin insidans ve prevalans verilerinin, önemli ırksal ve coğrafi farklılıklar nedeniyle tespit edilmesi zor olmakla beraber tahmini insidansı, milyonda 1.4 ile 21 arasındadır (62). FSGS, MDH'den sonra en sık karşılaşılan primer glomerüler hastalıktır (59, 63). FSGS her yaşta ortaya çıkabilir; nefrotik sendromlu çocukların yaklaşık %7-10'unda ve yetişkinlerin %20-30'unda görülmektedir. Erişkin erkeklerde daha sık görülmektedir ve insidansı kadınlara göre 1,5 ila 2 kat daha fazladır (59). FSGS yüksek proteinüri seviyeleri ile beraber görüldüğünde, hastaların %50'sinde 3 ila 8 yıl içinde son dönem böbrek hastalığı (SDBY) gelişmektedir (64). Primer FSGS yaklaşık %40 ihtimalle böbrek transplantasyonu sonrası nüksetmektedir (65, 66).

FSGS Tanısı ve Histolojisi

FSGS tanısı hastanın klinik hikâyesinden sonra viral seroloji, böbrek fonksiyon testleri, serum albumin ve lipit laboratuvar testleri ile birlikte değerlendirilir. Biyopsi örneği, FSGS ve alt tiplerini belirlemek için gereklidir. Steroide dirençli nefrotik sendromlu hastalara genetik tarama yapılarak varsa altta yatan genetik bozukluk belirlenmektedir (67).

FSGS histolojisinde başlangıçta lezyon kortikomedüller bölgede yoğunlaşır ve bu nedenle tek biyopsi örneği incelenmesi ile tanı gözden kaçabilmektedir. İlk değişikliklerin sınırlı alanda olması sebebiyle, yalnızca elektron mikroskopik inceleme ile saptanabilir. FSGS lezyonu göstermeyen ilk biyopsiden uzun süre sonra alınan bir sonraki biyopside net FSGS lezyonları görülebilmektedir (68).

Podosit içindeki hücresel değişiklikler, podositin glomerüler bazal membrana bağlanmasını etkileyeceğinden skar oluşumundan önce gelir. Podositin GBM'den ayrılması ile GBM'nin çıplak kalması, kapiller yumağın yapışmasına ve çökmesine, daha sonra ise skleroz, hyalin odaklarının birikmesi, Bowman kapsülünde

yapışıklıkların oluşmasına neden olur. Segmental lezyonlar, anormal filtrasyon ve nefronun geri kalan kısmına filtratın/süzüntünün yayılması sonucu glomerüler disfonksiyon oluşur (69). FSGS fokal, segmental veya sklerotik olmayabilir; bazı alt tipleri ve histolojik lezyonları, çöken (*collapsing*) glomerulopati şeklinde glomerüler tip olarak kendini gösterir. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte daha yaygın ve global glomerüloskleroz, tubulointerstisyel ve vasküler lezyonlar gelişir.

FSGS'nin hayvan modellerinde glomerüllerin büyük çoğunluğu, üç boyutlu morfometrik analizde sklerotik lezyonlar göstermektedir (70). Sklerotik lezyonun hacmi ortalama olarak toplam glomerüler hacmin sadece %12,5'i (+/- 2.2) olduğundan, sklerozdan etkilenen glomerül sayısı, geleneksel tek kesit böbrek biyopsisi değerlendirmesinde büyük ölçüde eksik kalabilmektedir. Böbrek biyopsisinde az glomerül görülüyorsa, 2 µm kalınlığında kesitten 12 ila 15 seri kesit ve en az 8 glomerül değerlendirilip analiz edilmesi önerilmektedir (10, 71).

Etiyoloji

FSGS hastalarının yaklaşık %80'inin etiyoloji bilinmemekte, geri kalan vakalarda altta yatan diğer hastalıklara sekonder olarak gelişmektedir. İdiyopatik FSGS progresif renal fibroze ve nefrotik sendroma (NS) yol açan kronik bir hastalıktır (72). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, FSGS patogenezi ve etiyolojisine ışık tutmuştur. Podosit hasarının çeşitli genetik ve kazanılmış nedenleri tanımlanmıştır.

Genetik

Slit diyafram, hücre membran, hücre iskeleti, nükleer, mitokondriyal ve lizozomal proteinleri kodlayan birkaç genin mutasyona uğraması, glomerüler filtrasyon bariyerinin bütünlüğünün bozulmasına yol açmakta ve FSGS ile sonuçlanmaktadır.

FSGS'nin yaklaşık % 8'i aileseldir (45). Etkilenen genler, podositlerin aktin hücre-iskeletinin önemli düzenleyicilerini kodlar. Bu genlerden biri, slit diyaframın önemli bir yapısını içeren transmembran bir protein olan nefrin'dir. Nefrin (NPHS1), diğer birçok podosit ve slit diyafram proteini ile etkileşime girerek podositlerin slit diyafram yapısını korumakta ve önemli hücre sinyal yollarına aracılık etmektedir

(73). NPHS1 genindeki mutasyonlar, Fin tipi konjenital nefrotik sendromla ilişkilidir ve proteinüriye neden olur (74). Podosin (NPHS2), Nefrin ve CD2AP (CD2-ilişkili protein/aktin filamenti ile doğrudan etkileşime giren protein) proteinlerinin slit diyaframda doğru yere yönlendirilmesini ve filtrasyon bariyerinin işlevini kolaylaştıran bir adaptör proteindir ve slit diyaframı aktin hücre iskeletine bağlanmaktadır (75). CD2AP, bu bağlantının bir parçası olmanın yanı sıra, sitozolik katepsin-L ekspresyonunun düzenlenmesi ile podosit aktin hücre iskeletinin organizasyonunu sürdürmeye de yardımcı olur (76). NPHS2 genindeki mutasyonlar, konjenital veya çocukluk çağı nefrotik sendromlarına sebep olabilmektedir (77, 78). CD2AP geninin haplo-yetmezliği ise glomerüler hastalığa yatkınlık ile ilişkilidir (79).

Alfa-Aktinin-4 (ACTN4)

Aktin döngüsünün doğru düzenlenmesi için gerekli olan ve podositlerin normal morfolojisini ve işlevini sürdürmek için önemli olan aktin filamanlarını çapraz bağlayıcı bir proteindir (80). *ACTN4* mutasyonları sonucu ACTN4 F-aktine bağlanma afinitesi artmakta ve aktince zengin hücresel birikimler oluşturmaktadır. *ACTN4* mutasyonları otozomal dominant kalıtımla ailesel FSGS'ye sebep olmaktadır (81, 82). Bir kalsiyum kanalı proteini olan geçici reseptör potansiyel katyon kanalı 6 (TRPC6), aktin hücre iskeletinin bilinen bir modülatörü olan Ras homoloğu ailesi üyesi A (RhoA) yolağı üzerinden aktin hücre iskeleti üzerine etkisi olması muhtemeldir (83). TRPC6' nın, podosin ile birlikte, mekanik gerilimi iyon-kanalı aktivitesine çevirerek slit diyaframda bir mekanosensör olarak hareket ettiği düşünülmektedir (84) *TRPC6* fonksiyon kazanımı mutasyonları, kalsiyum akışını artırarak ve anormal sinyalleşme yoluyla aktin hücre iskeletini düzensizleştirerek, yetişkin dönemde NS'ye neden olmaktadır (78, 85).

Fosfolipaz C epsilon-1 (PLCε1)

Hücre büyümesini ve farklılaşma yollarını başlatan IP3 ve DAG gibi ikinci habercileri oluşturmak için membran fosfolipidlerinin hidrolizini katalize eden, fosfoinositide özgü fosfolipaz C ailesinin bir üyesidir (86). PLCε1, Rho GTPazlar ve MAPK'leri düzenleyerek, podositlerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve migrasyonunu düzenlemektedir (87). *PLCε1* mutasyonları, çoğunlukla hücre iskeletini

ve sinyalizasyonu bozarak erken başlangıçlı NS' ye neden olur. Bazı yanlış anlamlı/*missense* mutasyonlar ise immünosupresyona yanıt veren geç-başlangıçlı NS ile sonuçlanır (88)

Inverted Formin-2 (INF2)

Aktin polimerizasyonunu düzenleyen proteinlerden biridir ve formin protein ailesindendir. Forminler, FH2 alanları aracılığıyla mikrotübüllere bağlanır ve tam mekanizması karakterize edilmemiş olmakla beraber mikrotübül stabilitesini ve mikrotübüllerin aktin fiberleri ile hizalanmasını düzenlediği bilinmektedir (89). INF2, böbrekte, özellikle podositlerde ve tübüllerde ifade edilirken, beyin, karaciğer, kalp, plasenta ve iskelet kası gibi diğer organlarda da ifadelenmektedirler (90). *INF2*' deki mutasyonlar, otozomal dominant FSGS'nin bir nedeni olarak rapor edilmiştir (91). Rapor edilen mutasyonlardan üçünün (S186P, E184K, ve R218Q), kültür ortamında yapılan çalışmalar ile, farklılaşmamış insan podositlerin'de proteinin yanlış lokalizasyonuna sebep olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, FSGS oluşum mekanizmasının büyük olasılıkla podosit hücre iskeletinin regülasyonunun bozulması sonucu gerçekleştiğini düşündürmüştür (91).

Miyozin-1E (Myo1E)

Aktin filamentleri boyunca yerleşen yapısal motor proteinlerinden biridir, podosit hücre iskeletini stabilize etmektedir, podositlerin gelişimi ve ayaksı uzantısı için önemlidir (92). Myo1E esas olarak plazma zarında ifade edilir, ancak mutant Myo1E, podosit sitoplazmasında lokalizedir. Mutasyonları, çocuklukta (<13 yaş) başlayan, glukokortikoide dirençli FSGS ile ilişkilidir (93).

Permeabilite Faktörleri, Biyobelirteçler

"Permeabilite/geçirgenlik" terimi, proteinüriye yol açan glomerüler filtrasyon bariyerinin artan sızıntısını ifade eder (94). *Primer* FSGS, böbrek transplantasyonundan sonra çok hızlı bir şekilde tekrarlayabilmektedir (yetişkinlerde vakaların ~%30'u, çocuklarda >%50'si) (95). Sirkülasyondaki geçirgenlik/permeabilite faktörlerinin/sitokinlerin varlığı, ayaksı uzantı kaybı ve de

eşlik eden proteinüri artışı ile *primer* FSGS' ye ve transplantasyon sonrası hastalığın tekrarına yol açtığı düşünülmektedir.

FSGS'li hastalardan alınan plazma, plazma fraksinasyonları veya serumunun sıçanlara uygulanması sıçanlarda proteinüriye neden olmaktadır (96, 97). FSGS'li hastalardan alınan serum, ratlardan izole edilmiş glomerülere uygulandığında albümin geçirgenliğini arttırmaktadır (98). Bu serumda bulunan faktörlerden bazıları, kardiyotrofin benzeri sitokin faktör 1 (CLCF-1), çözünür ürokinaz plazminojen aktivatör reseptörü (suPAR) ve CD40 antikorları' dır (99).

Klinik öncesi çalışmaların verileri, yüksek suPAR seviyelerinin podosit hasarına sebep olduğunu göstermektedir (100). Mekanik olarak, suPAR'ın podosit beta 3 ($\beta 3$) integrinlerine bağlanması ve aktiflemesiyle FP mikrofilament sisteminin dışarıdan içeriye aktivasyonuna, podosit FP motilitesine ve dolayısıyla efasmanına neden olmaktadır (100). FSGS' li hastaların çoğunluğu yüksek suPAR serum seviyelerine sahiptir. Daha yüksek suPAR seviyelerin daha kötü patoloji (artmış interstisyel fibrozis, tübüler atrofi ve glomerüler kresent'ler) ve böbrek fonksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (101). suPAR'ın primer FSGS için bir biyomarker olarak kullanılması önerilmiştir ancak daha sonraki çalışmalar bunu desteklememiştir.

Primer FSGS' de izole edilmiş bir başka potansiyel geçirgenlik faktörü, tahmini moleküler ağırlığı 22 kDa olan IL-6, B hücresi uyarıcı sitokin ailesinin bir üyesi olan CLCF-1'dir. Tekrarlayan FSGS' li hastalarda CLCF-1 seviyeleri sağlıklı bireylere göre 100 kat daha yüksek bulunmuştur. CLCF-1'nin, podositlerin aktin hücre iskeletinin stabilizasyonunu bozarak FSGS' ye neden olduğu düşünülmektedir. CLCF-1 izole edilmiş sıçan glomerüllerinde ve kültürlenmiş fare podositlerin'de Nefrin ifadesini azaltmaktadır (102). Fare podositlerinin CLCF-1 ile inkübasyonu ile stres fiberleri oluşmuş, aktin hücre iskeleti düzenlenmesinde belirgin değişikliklere neden olmuştur. Bu değişikliklerin, CLCF-1 dozuna ve süreye bağlı olarak artması, hücrenin mekanik veya metabolik stres altında daha hassas ve daha hareketli bir fenotipe doğru yönelmesi ile oluştuğu bildirilmiştir (102).

Tekrarlayan FSGS ile giden hastalık tablosunda, hastaların klinik örneklerinde CD40 oto-antikorları ve CD40 ligandının (CD40L) artmış olduğu ve sağlıklı kontrollere kıyasla FSGS' li hastalarda çözünür CD40L düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (103). Tanımlanmış 7 otoantikör (CD40, PTPRO,

CGB5, FAS, P2RY11, SNRBP2 ve APOL2) paneli arasında CD40 oto antikoru transplant öncesi yükselmesinin, FSGS' nin transplantasyon sonrası nüksü ile en yüksek korelasyon gösterdiği (%78 doğruluk) saptanmıştır (104). Hastaların serumundan elde edilen CD40 antikoru *in vitro* podosit kültürüne eklenmesinin, podositlerde aktin depolarizasyonuna ve hücre iskelet hasarına sebep olduğu gösterilmiştir (104, 105). CD40-CD40L sinyal yolunun bloklanması podosit hasarını azalttığı ve çoklu glomerulonefrit modellerinde koruyucu olduğu gösterilmiştir (104, 106). suPAR infüzyonunu takiben tekrarlayan FSGS' li hastalardan izole edilen CD40 otoantikoru'nun infüzyonu, farelerde proteinüriye yol açmıştır ve elektron mikroskopunda podositlerin silindiği görülmüştür (105).

FSGS'nin yüksek riskli hastalarda transplantasyon öncesi plazmaferез ile dolaşımdan permeabilite faktörlerinin kaldırılmasıyla önlenilebileceği veya geciktirilebileceği düşünülmesine karşın, rituximab-plazmaferез profilaksisinin FSGS oluşumunu önleyemediği gösterilmiştir (107).

Enfeksiyonlar

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonları ile birlikte eşlik eden mikrokistik tübüler değişiklikler ve aktif tübülo-interstisyel inflamasyon ile birlikte kollaps/çöken glomerulopati'ye neden olabilmektedir (108). Parvovirus B19 (PVB19), FSGS ve özellikle de kollaps nefropati ile bağlantılı olmasına rağmen nefrotoksik olup olmadığı ve FSGS lezyonlarıyla ilişkisine dair kanıtlar tam değildir (109). Bazı hastalarda sitomegalovirüs, Epstein-Barr virüsü veya simian virüsü ile enfekte olduklarında FSGS lezyonları görülmüştür (110).

İlaç, Madde ve Toksinler

FSGS ile ilişkili bulunan ilaçlar, toksinler veya maddeler arasında sigara, eroin, interferon, lityum, pamidronat, mTOR inhibitörleri, anabolik steroidler bulunur (111-113). Bir osteoklast inhibitörü olan pamidronatın, osteoklastın aktin hücre iskeleti üzerinde doğrudan toksik etkileri vardır. Podosit hücre iskeleti üzerinde benzer bir etkinin olduğu ve FSGS'yi indüklediği öne sürülmüştür (112). Podositler hem interferon α hem de β reseptörleri ve interferon γ 'ye yanıt olarak MHC-II antijeni ifade etmesi ile interferonlar doğrudan podositlere etki ederek FSGS'yi

indükleyebilmektedir (114). Anabolik steroidlerin kötüye kullanımı da FSGS oluşumu ile ilişkilendirilmiştir (115).

Hastalıklar

FSGS altta yatan hastalıklara bağlı olarak da gelişebilmektedir. Bu hastalıkların başlıcaları diabetes mellitus, hipertansiyon, obezite, renal arter stenozu, kolesterol embolisi ve vasküler hastalıklardır ve glomerüler hipertansiyon-hiperfiltrasyon sonucu mekanik strese ve hasarın ilerlemesiyle de FSGS'ye yol açabilmektedirler (116-120). Maladaptif FSGS; glomerüler hipertrofiye, intraglomerüler aşırı ECM birikime sebep olmaktadır (121). Histopatolojik olarak büyük glomerüller, glomerüller arasında sklerotik değişiklikler gösteren perihiler skarlar ve podosit kısmi ayaklı çıkıntıların efasını görülür (122).

FSGS İçin Hayvan Modelleri

FSGS patogenezi ve altında yatan mekanizmaları aydınlatmak için hayvan modelleri sıkça kullanılmıştır. Bu modeller arasında en yaygın fare ve sıçan modelleri nefropatiyi ve potansiyel terapötik hedefleri incelemek için kullanılmaktadır.

FSGS'yi araştırmak için kullanılan modellerin tümü, podosit hasarına sebep olmakta ve böylece insan FSGS'sini taklit etmektedir. En önemli farklılık ise, insanlarda primer FSGS çok daha sık karşılaşılan bir hastalık formu iken, birçok hayvan modeli FSGS'nin sekonder formunu yansıtmaktadır (10). Bununla birlikte, iki hastalık formunun patofizyolojik mekanizmaları benzerdir ve aynı histopatolojik tablo ile sonuçlanmaktadır. Bu da FSGS'nin altında yatan mekanizmaları anlamada hayvan modellerinin kullanımının gerekliliğini göstermektedir.

Renal ablasyon modeli

Glomerüler hastalığı incelemek için oluşturulan ilk sıçan modelidir ve en sık kullanılan modellerden biridir. Hipertansiyonu, belirgin böbrek hasarını ve FSGS'yi indükleyen 5/6 ablasyon modeli çoğu çalışmada kullanılır. 5/6 modeli, bir böbreğin çıkarılması ve kalan böbreğin 2/3'ünün kesilmesiyle üretilir. Böbrek kütleindeki ani azalmaya bağlı olarak glomerüler yapıdaki değişiklikler 2 hafta gibi erken bir sürede tespit edilir. 7. haftada, glomerüllerin %50'sinden fazlasında FSGS lezyonları ortaya

çıkmaktadır (123). 4/6 renal kütle azaltma modeli, hipertansiyona yol açmadığından ve sadece orta derecede renal disfonksiyon ve glomerüloskleroza tetiklemesi nedeniyle daha hafif-hastalık formu olarak kullanılır (124, 125). Sıçanların çoğu glomerüloskleroza duyarlıyken, farelerde 129/Sv ve Swiss-Webster fareleri skleroz gelişimine duyarlı, C57BL/6 fareleri glomerüloskleroz gelişimine oldukça dirençlidir (126).

FSGS gelişimi için spesifik toksin modelleri de geliştirilmiştir. Özellikle podositler için toksik olan adriamisin, puromisin amino nükleozid ve streptozotosin indüklü modeller en sık kullanılan FSGS modelleridir (127). FSGS' nin şiddeti genellikle toksin dozuna bağlı olarak arttığı için glomerüler hastalığın gelişimi güvenilirdir ve incelenmesi nispeten kolaydır. Bu tür modeller, proteinürik nefropatilerin gelişim mekanizmasını incelemek veya tedavilerin etkisini incelemek için uygundur (127). Spesifik toksinlerin yüksek miktarda tek enjeksiyonu; podosit ayak uzantısının silinmesine, yetersiz filtrasyon bariyerine ve nefrotik sendroma neden olabilmektedir.

Puromisin Amino Nükleozid (PAN)

Prokaryotlar ve ökaryotlarda protein sentezini engelleyen bir antibiyotiktir. PAN, podosit aktin hücre iskeleti yapısının ve ayaksı çıkıntıların bozulmasına, slit diyafram proteinlerinin ifadesinin azalması ve anormal dağılımı ile podosit hasarına sebep olmaktadır (128). PAN nefropatisi, sıçanlarda, çoklu intraperitoneal enjeksiyonlar veya eş zamanlı tek taraflı nefrektomi ile birlikte veya tek başına intravenöz (i.v.) uygulama gibi çeşitli indüksiyon rejimleri yoluyla indüklenebilir (129, 130). Tek doz PAN (50-150 mg/kg vücut ağırlığı) uygulamasından sonraki günler içinde masif proteinüri gelişmektedir (131, 132).

Adriamisin (ADR)

Primer FSGS'ye bağlı olarak insan kronik böbrek hastalığında gözlenen histolojik değişiklikleri yansıtan, sıçanlarda böbrek hasarının iyi bilinen bir toksik maddesidir. ADR, doza ve türe göre değişmektedir. Çoğu sıçan türleri, 1.5-7.5 mg/kg arasında değişen düşük dozlarda ADR'ye duyarlıyken çoğu fare türleri ADR' ye dirençlidir (133). Farelerde başarılı bir model üretmek için daha yüksek dozlarda ADR

gereklidir. Örneğin erkek BALB/C'de 10.8 mg/kg (134) ve C57BL/c farelerinde 13–25 mg/kg (135, 136) ADR gerekmektedir.

Streptozotosin (STZ)

Pankreasın insülin üreten beta hücreleri için toksik olan, doğal olarak oluşan bir kimyasaldır. STZ, sıçan ve fare hayvan modellerinde diyabeti indüklemek için kullanılmaktadır (137). STZ ile indüklenen diyabetik nefropati, FSGS' nin gelişiminden önce olmaktadır. Fare modelleri için en sık kullanılan fare türleri C57BL/6 olmakla beraber DBA/2, SHR (hipertansif model için), MRL/MP, 129/SvEv, BALB/c farelerde kullanılabilmektedir (138). Nefropatiyi içeren STZ modeli için standart düşük doz uygulama önerilmektedir. Art arda beş gün boyunca *i.p.* 50 mg/kg STZ enjekte edilmesi sonucu C57BL/6 farelerin yaklaşık %50' sinde üç hafta sonra diyabet gelişmektedir (139). STZ ile diyabetin indüklenmesini takiben, normotansif sıçanlara (WKY) kıyasla hipertansif SHR farelerde böbrek hasarının gelişimi hızlanmaktadır (140). STZ, dirençli suşlar için yüksek dozlarda (1x200 mg/kg veya 2 x 100-125 mg/g) kullanılmaktadır. Bununla birlikte, yüksek dozlarda STZ'nin farelerde ve sıçanlarda akut böbrek hasarına neden olduğu gösterilen spesifik olmayan sitotoksikite etkisi olmasının, bulguların yorumlanmasını zorlaştırdığı söylenmektedir (141).

STZ ile indüklenen Diyabetik Nefropati (DN) sıçan modelleri oluşturulduktan üç ay sonra mezengial alanın segmental genişlemesi ile karakterize FSGS görülmektedir. DN için yaygın olarak SD (Sprague Dawley), Wistar-Kyoto (WKY) veya spontan hipertansif (SHR) kullanılır. Bu modellerde, erkek sıçanlar 16 saat aç bırakılır ve bir kez *i.v.* STZ (SHR=45 mg/kg, SD=55 mg/kg, WKY=60 mg/kg,) enjekte edilir (138). Erkek Syrian APA hamsterlerinde ise *i.p.* 40 mg/kg enjeksiyonu ile, bir ay sonra glomerüler lipidoz ile sonuçlanan yüksek idrar seviyeleri ile devam eden hiperglisemi ve hiperlipidemi gelişir.

Bu modeller haricinde Buffalo/MWF (BUF Mna) (142) ve Munich-Wistar-Fromter (MWF) (143) spontan modelleri, difteri toksini (57), transgenik HIV (144), Mpv-17'nin inaktivasyonu (145), α -actinin-4 *knock-in*, Myo1E1 nakavt modelleri (50, 146), NPHS1, NPHS2 gen modifikasyon yaklaşımları (77, 147) veya podositler

üzerinde Thy-1.1 antijeninin ekspresyonunun eklenmesi gibi (148) FSGS' ye yol açan modeller de kullanılmaktadır.

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler ve Böbrek Rejenerasyonu

2.4.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) kendini yenileyebilen ve en az üç farklı hücre tipine farklılaşabilen, trofik ve immunomodülatör etkileri olan multipotent progenitör hücrelerdir. MKH'ler adipoz doku (AD), kemik iliği (Kİ), dermis, iskelet kası, trabeküler kemik gibi birçok farklı erişkin doku (149) yanı sıra, plasenta, kord kanı, amniyotik sıvı ve amniyotik doku olmak üzere fetal dokulardan da elde edilmektedir. MKH'ler kültür koşullarında plastiğe yapışmalı, fibroblast benzeri morfoloji göstermeleri, stromal yüzey belirteç ifade etmeleri (CD105, CD73 ve CD90 için >%95 pozitif) ama hematopoetik belirteçleri ifade etmemeleri (CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 ve HLA-DR yüzey molekülleri için pozitiflik <%2), osteojenik, adipojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaşmaları ile karakterize edilmektedirler (150).

MKH'ler hastalıklara bağlı olarak çeşitli hasar gören dokuların tedavisinde kullanılmaktadır. MKH'lerin etkisi doku kaynağı, donör yaşı, kültür ortamı, pasaj sayısı, uygulama yolu, çevresel faktörler, hasarın seviyesi ve hastalığın tipine göre değişmektedir. Kemik iliği ve adipoz doku en çok kullanılan MKH kaynakları olmasına rağmen, göbek kordonu ve göbek kordon kanı kemik iliğine kıyasla daha saf izolasyon ve ekspansiyon potansiyeline sahiptir (151). Otolog hücre uygulamaları için ise özellikle adipoz doku kökenli MKH'ler kullanılmaktadır (152).

MKH'ler kültür ortamına bağlı olarak osteosit, adiposit, kondrosit hücrelerinin dışında kardiyomiyosit-benzeri ve nöron-benzeri hücrelere, düz kas hücrelerine ve endotelial hücrelere farklılaşabilmektedir (153, 154). MKH'ler farklılaşma potansiyellerinin dışında doğal ve adaptif immün sistem etkisi ile immün cevabı regüle etmektedir (155-159).

Mezenkimal kök hücrelerin hasarlı dokuya migrasyonu ve birçok hücre tipine farklılaşması sebebiyle diyabette, kardiyak, karaciğer, kemik ve böbrek hastalıklarının tedavi etkinliğini belirlemek için deneysel araştırmalar ve klinik uygulamalar yapılmakta, çalışmalarından olumlu sonuçlar alınmaktadır (160). İnflamasyon ile MKH'

lerin immünsüpresif etkisi ve büyüme faktör üretimi uyarılmaktadır. MKH plastisitesinin durumu, farklı inflamasyon seviyesine verdiği farklı cevaplara, sitokin tiplerine ve immünosüpresanların varlığına veya yokluğuna bağlıdır. Önemli bir başka nokta da MKH'lerin normal ve inflamatuvar dokularda davranışının değişim göstermesidir. İnflamasyon olduğunda MKH'ler inflamasyon alanına göç etme yeteneği artmaktadır (161) ve multipotent farklılaşma kapasitesi ile fonksiyonel hücreye farklılaştığı ve hasarlı hücrenin yerini aldığı düşünülmektedir. İnflamatuvar sitokinlerin cevabına bağlı olarak, MKH'ler immünoregülatör faktörler üreterek inflamasyon sürecini düzenlemektedir. Ayrıca, MKH'ler oldukça fazla miktarda büyüme faktörü salgılayarak endotelial, fibroblast ve doku progenitör hücrelerini de stimüle etmektedir (162). MKH'ler salgıladıkları faktörler ile anjiyojenik, antifibrotik etki göstererek dokuların rejenerasyonuna yardımcı olabilmektedir (163).

Böbrek Kök/Progenitör Hücreleri

Böbrekler hücresel heterojenliği ile, çok karmaşık bir mimariye ve diğer organlara kıyasla daha düşük rejenerasyona sahiptir (164). Vasküler, interstisyel, glomerüler ve tübüler bölmelere dağılmış 24'ün üzerinde olgun kök hücre tipine sahiptirler (165). Renal rejenerasyon sırasında hasarlı böbrek kompartmanlarının her birinin onarımı için çok spesifik ve özelleşmiş mekanizmalar gerekmektedir.

Böbrek hasar onarım süreci için fibrotik yanıtı yavaşlatmanın gerekli olduğu düşünülmektedir. Kök/progenitör hücreler dokuyu yenileyebilmeli ve aynı zamanda büyüme faktörlerini salgılama kapasiteleri aracılığıyla hücre dışı matriks birikimini önleyebilmelidir (166). Podositlerin kendini yenileme kapasiteleri bulunmadığından glomerüler parietal epitel hücrelerinin (çoğalan ve podositlere komşu olan) glomerüler kapillerlere göç edebileceğini ve podositlere farklılaşabileceğini öne sürülmektedir (167). Böbrek kök hücrelerin birkaç nişi tanımlanmış olmasına rağmen, rollerinin ne olduğu, mekanizmaları ve böbrek hasarı sonrası onarımlarda nasıl davrandıkları halen bilinmemektedir. Yine de böbrek kök hücrelerinin, hasarlı böbrek dokusunun yeniden modellenmesi için terapötik hedefler olabileceği düşünülmektedir (168).

Kök/progenitör hücreler embriyonik dönemde epitelyal hücrelere, miyofibroblastlara, düz kas hücrelerine ve embriyonik metanefrik mezenkime farklılaşabilir (169). MKH'ler, böbreğin embriyogenezinde önemli bir rol

oyunmaktadır (170). Yetişkin böbrekte, yerleşik renal kök/progenitör hücreler ve kemik iliği kaynaklı dolaşımdaki kök/progenitör hücreler olmak üzere farklı iki kaynak, anti-inflamasyon ve immunmodülasyon yoluyla lokal onarım süreçlerini büyük ölçüde kolaylaştırmaktadır (171-173).

Fare ve insan erişkin glomerüllerinde MKH fenotipine sahip yerleşik progenitör hücreler bulunmuştur (174, 175). Bu hücreler, belirli kültürel koşullar altında mezodermal soylara, endotelial hücrelere, podositlere ve mezengial hücrelere farklılaşabilir. Diğer böbrek kök/progenitör hücrelerden farklı olarak CD133'ü eksprese etmezler. Bu hücreler sadece bir MKH fenotipi sergilemekle kalmaz, aynı zamanda Kİ-MKH'lerde negatif olan embriyonik kök hücre (EKH) belirteçleri CD24 ve Pax-2'yi ifade eder (174).

Bowman kapsülündeki renal kök/progenitör hücreler, yüksek kendini yenileme ve çoklu soya farklılaşma potansiyelinin yanı sıra MKH belirteci CD44'ü ifade eden, ancak soya özgü belirteçleri olmayan parietal epitel hücrelerinin özel bir türüdür (174). Bowman kapsülünde MKH ve böbrek kök hücre belirteçleri CD24 ve PAX2 ifade eden bir CD133–CD146+ hücre popülasyonu içerir. Glomerüler mezenkimal CD133–CD146+ popülasyonu (Gl-MKH) kendini yenileme yeteneği, klonojenisite ve çoklu farklılaşma potansiyeli sergilemiştir. Osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmaya ek olarak, bu hücrelerin Nefrin, Podocin ve Sinaptopodin gibi podosit belirteçlerini ifade ettiği ve endotel hücrelerine ve epitel hücrelerine farklılaşabildiği gösterilmiştir (176). MKH benzeri hücrelerin kökenini belirlemek için erkek donörden izole edilen Gl-MKH'ler, dışı bir alıcıya nakledilmiş ve dışıdan alınan böbreğin glomerüllerinden izole edilen MKH benzeri hücrede 48 metafazın karyotipinde XY kromozomu bulunmuştur (174).

Tübüllerde özellikle proksimal tübüllerde de kök/progenitör hücreler vardır (177, 178). Çoğu, tübüler epitel hücrelerine farklılaşabilir ve hatta adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soylar gibi mezodermal soylara farklılaşabilir. Bu hücrelerin PAX2 gibi renal EKH belirteçlerinin yanı sıra MKH benzeri işi bir morfoloji gösterdiği, CD90 pozitif, CD44 pozitif, CD133-negatif olduğu gösterilmiştir (177). Diğer çalışmalar, diğer tübüler hücrelerden morfolojik olarak farklı olmamasına rağmen, tübül kök/progenitör hücrelerin bazı MKH belirteçleri yanı sıra PAX2 için de pozitif olduğunu göstermektedir (178). Başka bir çalışma, bu hücrelerin kendilerini

yenileyebildiğini ve tübül epitel hücrelerine farklılaşabildiğini, MKH belirteci olan CD44'ü ve böbrek kök/progenitör hücre belirteci PAX8'i ifade ettiklerini göstermektedir. *In vitro* ortamda mezodermal soylara farklılaşabilmektedirler (179).

Erkek fareden dişi fareye Kİ-MKH transplantasyonu sonrası, dişi böbrekte Y kromozomlu bazı Kİ-MKH'lerin, morfolojisi ve lokalizasyonu açısından podosit fenotipi gösteren hücreler ile ve tübül epitel hücreleri ile glomerüllerde ko-lokalize olduğu bildirilmiştir (180). Bu çalışma, dolaşımdaki Kİ-MKH'lerin böbreğe yerleştiğini, tübüler epitel hücrelerine ve podositlere farklılaşabileceğini göstermektedir. Ayrıca, EGFP (*enhanced*-yeşil floresan protein) işaretli Kİ-MKH'lerin *i.v.* uygulaması ve ardından glomerüllerde dolaşan EGFP+ hücrelerinin PBS ile yeterli perfüzyon sonucu izole edilerek incelenmesi; bu hücrelerin glomerüler mezengial hücrelerinin çeşitli özelliklerini ve belirteçlerini sergilediğini göstermiştir (176). Bu hücrelerin sayılarının zamana bağlı bir şekilde artışının gözlenmesi, Kİ-MKH'lerinin böbrek hasarından sonra böbreğe göç etme ve mezengial hücrelere transdiferansiye olma yeteneğine sahip olduğunu düşündürmektedir (181).

MKH'ler ve Böbrek Rejenerasyonu

Doku tamiri, uyarılan hücreler ve salgılanan faktörlerin beraber hareket etmesi ile anjiyogenez, ekstraselüler matriks yeniden düzenlenme ve doku progenitör hücrelerinin farklılaşması ile gerçekleşmektedir.

Böbrek hasarına bağlı hiperfiltrasyon, renin-angiotensin aldosteron sistemini (RAAS) aktive etmekte ve proteinüriye sebep olmaktadır. Tübüllerde anjiyotensin II (AngII) ve protein geçirgenliğinin artması ile inflamasyon, glomerül ve tübüllerin fibrozisi oluşmaktadır. İnflamasyon bölgesinde IL-1, IL-6, TNF- α sitokinlerinin ve C-reaktif proteinin artmasına, RAAS değişimine, ateroskleroz, reaktif oksijen türlerinin birikimine, endotelial disfonksiyonuna MKH sayısının, proliferasyonunun, migrasyonunun azalması ile birlikte apoptozisin ve yaşlanmanın artması eşlik etmektedir. Bu nedenle MKH'lerin yerine konulması doku tamir sürecinde önemlidir (182).

Böbrek hasarı olan hayvan modellerinde ve hastalarda Kİ-MKH uygulamasına ait olumlu veriler mevcuttur. MKH'lerin majör histokompatibilite kompleks-II (MHC-II) genini ifade etmemeleri, MHC-I'i çok düşük seviyede ifade etmeleri sebebi ile

immün ret oluşmamaktadır (183). MKH'lerin üretim kolaylığı, yüksek miktarda ekspansiyon potansiyeli, immünomodülatör özellikleri, düşük immünojenite ve multipotent farklılaşma özelliği ile glomerulopati tedavilerinde oldukça etkilidirler (184). Sıçan, fare gibi hasar modeli oluşturulan *in vivo* çalışmalarda, modelin kendisine ait MKH'ler yanı sıra insan kaynaklı MKH'lerin uygulanması ile de etkili sonuçlar alınmaktadır (185-187).

MKH'ler, iskemik reperfüzyonu olan farelerde böbrek fibrozisini azalttığı (188), fare akut böbrek yetmezliğinde MKH *i.v.* uygulaması sonucu MKH'lerin tübüler epitele transdiferansiyasyonu ile yapısal ve fonksiyonel renal tamiri artırdığı gösterilmiştir (189). Ayrıca, MKH'ler nekrozu azaltmakta, böbrek fonksiyonu ve mezengial hücre proliferasyonunu artırmaktadır (190).

Parakrin etkisi ile akut renal hasar modellerinde hastalığın ilerlemesinin azalmasına yönelik MKH etkisi de saptanmıştır. MKH tedavisinin tip 1 diyabetik nefropatili sıçanlarda mikroalbuminüriyi azalttığı ve böbrek fonksiyon hasarlarını düzelttiği gösterilmiştir (191). MKH'lerin mikroalbuminüri üzerine terapötik etki mekanizması tam bilinmemekle beraber podosit hücre hasarını azaltarak etkili olduğu düşünülmektedir. Diyabetik nefropatili farelerde ise, EGFP+ Kİ-MKH'lerin uygulanmasından sonra tedavi edilmeyen farelerde belirgin glomerüler ve tübüler histopatolojik değişiklikler (skleroz, mezengial genişleme, tübüler dilatasyon, protein silindirleri, podosit kaybı) gözlenirken, MKH ile tedavi edilen farelerde, MKH'lerin renoprotektif etki gösterdiği ve tübüler yapıda sadece hafif bir genişleme olduğu görülmüştür. EGFP+Kİ-MKH'ler, diyabetik farelerin böbreğinde bulunurken, sağlıklı farelerde saptanmamıştır (192). EGFP+ sıçanların kemik iliğinin sağlıklı sıçanlara nakledilmesinden sonra, Kİ-MKH'lerin, glomerüler kapiller damarlar için yapısal destek sağlamak üzere, mezengial hücrelere farklılaştığı da gösterilmiştir (193).

Sıçan iskemi-reperfüzyon hasarından hemen veya 24 saat sonra sol karotid arterden MKH'lerin uygulamasının proinflamatuvar sitokinler IL-1 β , TNF- α , IFN- γ ve indüklenebilir nitrik oksit sentazın (NOS) ifadesini önemli ölçüde azaltmış ve anti-inflamatuvar IL-10 ve bFGF yanı sıra TGF- α ve Bcl-2 ifadelenmelerini tedavi edilen böbreklerde yüksek oranda artırarak böbrek fonksiyonunda anlamlı bir iyileşmeyi sağladığı, hücre proliferasyonunun hızlandırdığı ve transplantasyondan sonra apoptozu azalttığı gösterilmiştir (194). MKH'ler iskemik reperfüzyonu olan farelerde

böbrek fibrozisini azaltmaktadır (188). Fare akut böbrek yetmezliğinde MKH'lerin *i.v.* uygulaması ise tübüler epitele transdiferansiyasyonu ile yapısal ve fonksiyonel renal tamiri artırmaktadır (189). MKH uygulaması nekrozu azaltmakta, böbrek fonksiyonunu ve mezengial hücre proliferasyonunu arttırmaktadır (190). Hem kültür ortamlarında yapılan *in vitro* modellemeler hem de *in vivo* hayvan modellerinde yapılan diğer çalışmalarda Kİ-MKH'lerin podositlere, mezengial, tübüler epitel hücrelere vb. transdiferansiye olabildiği gösterilmiştir (189, 195-197).

Adriamycin ve PAN modellerinde göbek kordonu MKH'ler (GK-MKH'ler) veya Kİ-MKH uygulaması ile podosit kaybı azalmakta, renal fonksiyon artmaktadır (198, 199) MKH'lerin glomerüler podosit-pariyetal epitelyal hücre köprüleri oluşturarak ve Bowman kapsülü boyunca NCAM+ progenitör hücre dağılımını düzenleyerek glomerüloskleroza azalttığı düşünülmektedir (198). MKH'lerin böbrek üzerindeki onarım etkisinin, doğrudan hedef hücreler tarafından değil, hasarlı böbreklerdeki inflamatuvar reaksiyonları azaltmak için karmaşık bir parakrin mekanizma yoluyla uyarıldığı ve bu mekanizmanın, özellikle daha sonraki onarım döneminde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Hücre füzyonunun da, düşük olasılıklı bir olay olmasına ve önemli terapötik etkilerle çelişmesine rağmen, bir onarım şekli olma olasılığı dışlanmamalıdır.

MKH'ler ve Lisanslama

MKH uygulamalarının en önemli zorluğu engrafmanıdır ve uygulanan hücrelerin çoğu akciğerlerde tutulduğundan çok azı diğer organlara gidebilmektedir. MKH'lerin ~%40 kadarının hasarlı alana gidebildiği, 72 saat içerisinde ise ~%90'ının apoptoza gittiği veya kötü mikroçevre nedeniyle öldüğü saptanmıştır (200). MKH'lerin transplantasyondan sonra az oranda istenilen bölgeye ulaşan hücre miktarı da doku çevresindeki inflamatuvar mediatörler, superoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin artmasına bağlı oksidatif stres, iskemi, yetersiz besinler, bozulmuş ekstraselüler matriks (ECM), düşük oksijen/hipoksi nedeniyle bozulmakta, hücre sağ kalımını ve rejeneratif etkisini önemli oranda kaybetmektedir (201). Diğer bir deyişle, MKH tedavisinin etki potansiyeli hasarlı bölgeye ulaşma kapasitesi, hasarlı alandaki sağ kalımı ve böbrek hücreleriyle etkileşimine bağlıdır ve hücrelerin canlılığı, mikroçevre kontrolü için MKH kapasitesinin artırılması gerekmektedir. Bu amaçla

çok sayıda strateji geliştirilmektedir. Hücreleri uygulama öncesinde hazırlık/indüksiyon ve modifikasyon gibi **ön koşullandırma** veya **lisanslama** olarak nitelendirilen (İngilizcede *priming*) stratejiler umut vericidir. Bu stratejilerin başlıcaları sitokinler veya kimyasal bileşiklerle MKH'lerin inkübasyonu veya birlikte enjeksiyonu, hipoksi ile stimülasyonu ve genetik modifikasyonlarıdır. Bu stratejiler, MKH'lerin engraftmanını, immün düzenleyici etkisini, doku tamirine etkisini, rejenerasyon yeteneğini, ROS'a direncini ve sağ kalımını artırabilmektedir (202-204). MKH'lerin lisanslama stratejisi patolojik koşullara göre değişmektedir. Örneğin tümör mikroçevresi için MKH'ler kültürde immün sistemin aktivasyonunu uyaran interferon beta (IFN- β), IL-2, IL-12, IL-21 ile ve apoptozu tetikleyen IFN- α , TRAIL ile uyarılmaktadır (205). TNF- α , IL-17, IFN- γ ve hipoksi MKH'lerin immünomodülatör özelliklerini artırmakta, IGF-1, HGF, SDF-1, hipoksi ve ATRA, migrasyonu ve proliferasyonunu; melatonin, sfingosin-1-fosfat (S1P) sağkalımını; 3 boyutlu (3D)-kültür, TNF- α , TGF- β 1, bFGF, FGF-2, Apelin-13 angiogenez kapasitesini artırmaktadır (2, 202, 206-208).

Akut böbrek hasarı hayvan modellerini kullanan çalışmalarda, tek başına EGF, HGF veya IGF-1 gibi büyüme faktörlerinin uygulaması ile, rejenere olan proksimal tübülde DNA sentezi artmakta, hasar düzeyi azalmaktadır (209). Kİ-MKH'ler de IGF-1, HGF, VEGF salgılayarak organ rejenerasyonunu artırmaktadır (164) ve böbrek fonksiyonunun artışı nedeniyle mortalite azalmaktadır (210-212). Fare akut böbrek hasarı modelinde, fare Kİ-MKH'leri mitojenik ve sağ kalım faktörü IGF-1'i üreterek akut böbrek hasarında tübüler hücre onarımı üzerinde artış sağlamaktadır (213). HGF'nin renal tübüler epitel hücreleri üzerine mitojenik etkileri vardır ve bu etki sadece bir indüktör olarak değil, aynı zamanda renal rejenerasyon ve kompensatuar renal büyümede modülasyon ile gerçekleşmektedir (214). MKH'lerin IGF-1 veya HGF ile indüksiyonu akut böbrek hasarında da etkilidir (215-217). Kombine uygulaması ise domuz myokardial enfaktüs modelinde neovaskülarizasyon artışını sağlamaktadır (218).

2.5. İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)

IGF-1, somatomedin C olarak da bilinen küçük bir polipeptittir. Esas olarak karaciğerde sentezlenen bir hormondur ve sentezi hipofiz bezinden salgılanan büyüme

hormonu/*growth hormon* (GH) tarafından düzenlenir. IGF-1 proteini 70 amino asitten oluşan, yüksek oranda korunmuş tek zincirli bir polipeptittir ve IGF-1 geni tarafından kodlanmaktadır (219). İnsan IGF-1 geni 12q22-24 kromozom bölgesinde lokalizedir, 6 ekzon ve 5 introndan oluşur ve tüm memelilerde benzer şekilde yaklaşık ~85 kb uzunluğundadır (220). IGF-1, hemen hemen tüm dokular tarafından sentezlenir ve dolaşımda GH sekresyonunun hipotalamik/hipofiz regülasyonu üzerindeki negatif *feedback*/geribesleme inhibisyonundan sorumludur (221). IGF-1 yaşam boyunca doku büyümesi ve anabolik süreçlerde yer alır, doku onarımında, metabolizmanın kontrolünde ve hastalık patogenezinde rol oynar (220, 222, 223).

IGF-1 Sinyal Mekanizması

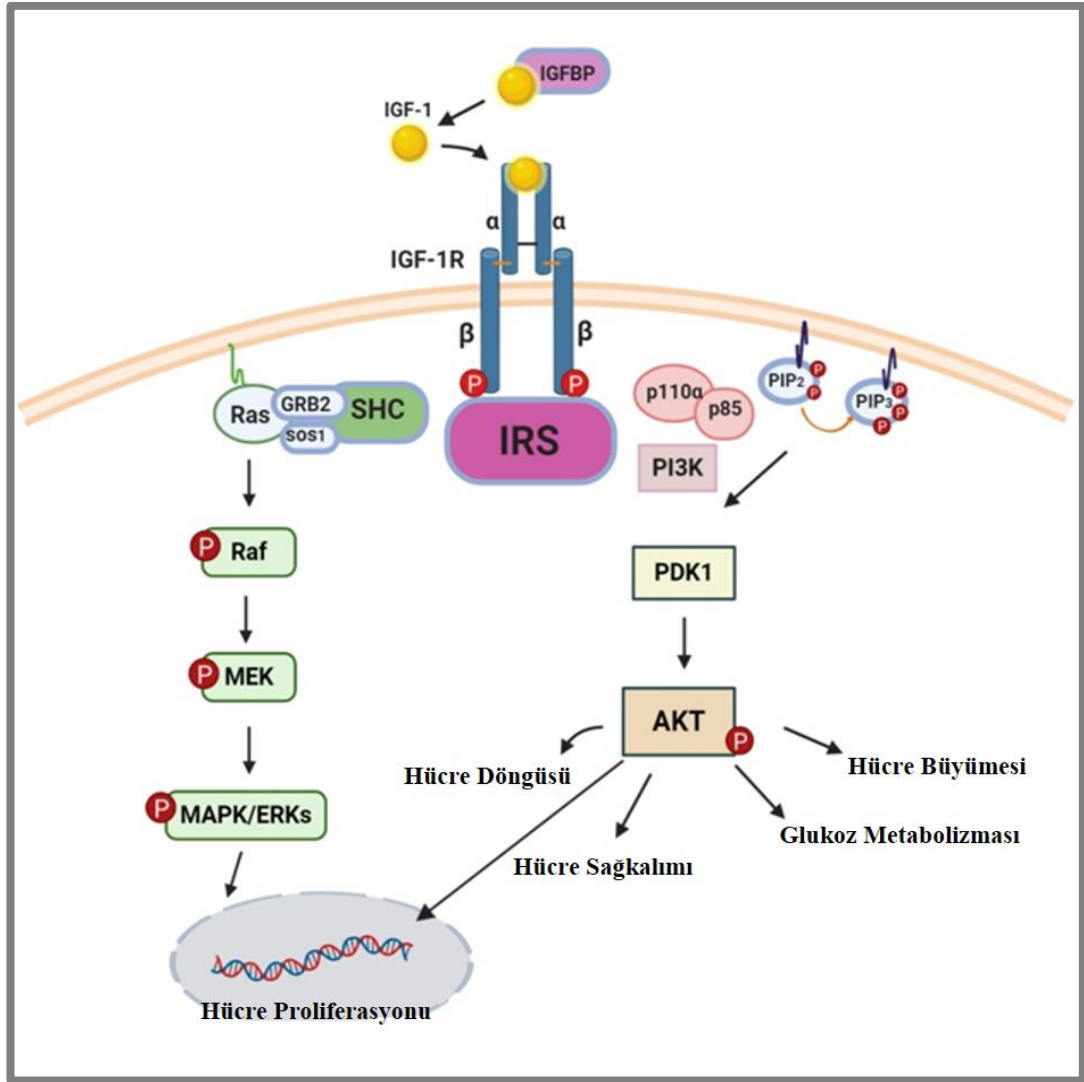
Dokularda ve dolaşımda IGF-1, yüksek afinite ile IGF bağlayıcı proteinlere (IGFBP'ler) bağlanmakta ve IGF-1'in aktivasyonunu veya inhibisyonunu düzenlemektedir. IGF-1, membrana bağlı bir tirozin kinaz olan reseptörü (IGF-1R) ile etkileşerek hücre içi otofosforilasyonu, enzimatik aktivasyonu ve insülin reseptörü substrat-1 (IRS-1) protein fosforilasyonunu başlatır. IRS-1 tirozin bölgelerinden fosforilasyon, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolları gibi birkaç hücre içi sinyal yolunun aktivasyonuna yol açar. Hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, olgunlaşması, sağ kalım ve glukoz regülasyonu üzerine etkisi PI3K-Akt ve RAS, RAF, MAPK sinyal yolu aktivasyonu tarafından desteklenir (Şekil 2.2.)

IGF-1'in Böbrek Gelişimi ve Hasarındaki Rolü

IGF-1, prenatal ve postnatal böbrek büyüme ve gelişiminde kritik rol oynayan düzenleyicilerden biridir (224, 225). Renal IGF-1, karaciğer ve böbrek olmak üzere iki farklı kaynaktan köken alır. Esas olarak karaciğerde sentezlenen IGF-1, dolaşımdaki IGF-1'in ≈%75'ini oluşturur (226, 227) ve IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP'ler) ile hücre yüzeyine bağlandığında hedef dokular üzerinde endokrin bir şekilde etki eder.

Böbrekte lokal olarak sentezlenen IGF-1, renal hücre metabolizması için otokrin veya parakrin düzenleyici faktör olarak görev yapar (228, 229). Hipofizektomi uygulanmış sıçanlara GH uygulaması ile IGF-1 mRNA ifadesinin ve lokal renal IGF-1 üretimini arttırdığı gösterilmiştir (228-231). IGF-1'in hem mezengial hücrelerde

(232), hem de podosit hücrelerinde ifadesi saptanmıştır (233). GH sinyalinin, aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde ve ayrıca ROS seviyelerini düzenlemede doğrudan bir rolü olduğu gösterilmiştir (233).



Şekil 2.2. IGF-1 sinyal yolağı. IGF-1, IGF-1R'ye bağlanır ve IRS-1'i aktive eder. IRS1'in fosforilasyonu, PI3K ve MAPK gibi hücre içi sinyal yolağı aktivasyonuna yol açar. Hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, olgunlaşması, hayatta kalması ve glukoz regülasyonu üzerine etkisi, PI3 kinaz-AKT ve RAS, RAF, MEK MAPK sinyal yolağının aktivasyonu ile desteklenir. IGF-1, insülin benzeri büyüme faktörü 1; IGF-1R, insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü; IRS-1, insülin reseptörü substratı 1; PI3K, fosfatidilinositol-3 kinaz; PDK1, Fosfoinositide bağımlı kinaz-1; Akt, serin/treonin spesifik protein kinaz; Shc, Shc adaptör proteini; SOS1, SOS Ras/Rac guanin nükleotid değişim faktörü 1; GRB2, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2; Raf, Hızla hızlanan fibrosarkom kinaz proteini; MEK, MAPK/ERK kinaz veya mitojenle aktive olan protein kinazlar/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar; ERK, Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz.

GH/IGF-1 yolağı, glomerülün tüm bileşen hücreleri üzerinde etkiler göstermektedir. GH ve özellikle IGF-1, mezengial hücre çoğalmasını ve göçünü uyarır. GH ve IGF-1'in iki yönlü etkileri nedeni ile podosit fonksiyonundaki fizyolojik rolü karmaşıktır. Hiperhomosisteinemiye bağlı podosit disfonksiyonu modelinde, GH, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) aktivasyonunu bloke ederek glomeruloskleroza yol açan epitelyal-mezenkimal geçişi inhibe etmektedir (234). IGF-1, kemoterapi ajanı etopozid varlığında podosit hücrelerinin apoptozunu azaltarak, sağ kalımını artırmaktadır (235). Podosit aktin hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu etkileyen reaktif oksijen türlerinin artması ile GH'nin podosit fonksiyonu üzerinde olumsuz etkiler gösterdiği de belirlenmiştir (233).

IGF-1 nakavt edilen kemirgen modelinde küçük böbrekler, azalmış nefron sayısı ve azalmış glomerüller boyut gözlenmiştir (236). Ayrıca IGF-1'in, IGF sinyalizasyonu ve PI3K yolu ile birlikte podosit sağ kalımında önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (235). IGF-1 sinyali, diyabetik nefropati gibi böbrekle ilgili birçok patolojide artmaktadır. Streptozotosin ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, bir NO sentaz inhibitörü olan L-NAME'in (N omega-Nitro-L-arginin metil ester hidroklorür) böbrek hiper-filtrasyonunu, hipertrofisini ve renal IGF-1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (237). IGF-1'in inhibe edilmesinin böbrekte hipertrofi ve albüminüri üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (238). Kronik diyabetik böbrek hastalığında, serum IGF-1 seviyesi böbrek hasarı veya proteinüri ile ilişkilendirilmemiş olsa da, serumda düşük IGF-1, son dönem böbrek hastalığı hastalarında artmış mortalite ile bağlantılı olduğu raporlanmıştır (239).

IGF-1'in Terapötik Etkisi ve Kullanım Modelleri

IGF-1 hemen hemen her dokuda sentezlenmekte ve salgılanmasındaki değişiklikler birçok sistemi etkilemektedir. IGF-1, hücre döngüsünün G1'den S fazına ilerlemesini sağladığı için "ilerleme/progresyon faktörü" olarak da bilinir. IGF-1 diğer büyüme faktörlerinin proliferatif etkisini desteklemekte, diyabet, iskemik ve nöronal hasar gibi patolojik durumlarda koruyucu bir etki göstermektedir (240, 241). IGF-1'in inflamatuvar süreçlerde düzenleyici olarak bağışıklık sistemi yanıtında yer aldığı ve ROS birikimini azaltarak oksidatif stresi azalttığı düşünülmektedir (242, 243).

Fare tek taraflı obstrüksiyon renal fibroz modelinde IGF-1, Bcl-2 ve ERK/MAPK sinyal yolunun *up-regülasyonunu* sağlayarak böbrek epitel hücrelerin apoptotik hücre ölümünü azaltmıştır (244). Akut böbrek hasarında IGF-1'in hasarlı proksimal tübüllerde artmış olması, onarım sürecine dahil olduğunu düşündürmektedir (224, 245). IGF-1 tedavisi, nefron rejenerasyonunu ve katabolik hızın azalmasıyla ilişkili olarak iyileşmeyi hızlandırmaktadır (211). Sıçan açlık modelinde IGF-1, glomerüler filtrasyon hızını ve böbrek plazma akışını arttırmaktadır. Preklinik çalışmalarda gözlemlenen bu etkilere rağmen, klinik çalışmalarda IGF-1'in önemli bir etkisi saptanamamıştır (246-248).

IGF-1 ile Lisanslanan MKH'ler

Endokrin/parakrin etkiler tarafından salgılanan anti-inflamatuar moleküller, IGF-1, VEGF, HGF gibi büyüme faktörleri, çözünür faktörler ve kemokinler içeren bir dizi koruyucu faktör aracılığıyla mezenkimal kök hücreler böbrek hasarı onarımında rol almaktadır (249). Renal proksimal tübüler hücrelere (PTEC) sisplatin ile hasar verildikten sonra MKH'ler ile ko-kültür, PTEC proliferasyonunu artırarak koruyucu bir etki sağlamıştır. Bu etkinin MKH'lerde yüksek oranda ifade edilen IGF-1 mRNA'sı ve proteini ile gerçekleştiği ve IGF-1 bloke edilmesi ile PTEC proliferasyonunun azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca fare sisplatin böbrek hasar modelinde IGF-1'i susturulmuş MKH'lerin uygulanması, böbrek fonksiyonu ve tübüler hücre onarımı üzerindeki etkisini normal kontrol MKH'lerine göre sınırlamıştır. Böylece IGF-1'in akut böbrek hasarında hücre onarımında faydalı etkileri olduğu sonucuna varılmıştır (213).

Sisplatin indüklü fare akut böbrek hasar modelinde 20 ng/ml IGF-1 ile 24 saatlik ön koşullandırmış MKH'lerin (IGF1_MKH) uygulanması, hücre engraftmanını ve böbrek fonksiyonunu artırmaktadır. Aynı çalışmanın *in vitro* kısmında IGF1_MKH'ların CXCR4 ifadesini ve MKH'lerin göçünü arttırdığını ve H₂O₂ ile indüklenen hasara karşı IGF1_MKH duyarlılığını azalttığı gösterilmiştir (215). Başka bir çalışmada, IGF-1 ifade eden plazmit taşıyan göbek kordonu MKH'ler (GK-MKH) gentamisin ile indüklenen akut böbrek hasarı sıçanlarına uygulanması sonrası, kontrol MKH'lere (GK-MKH veya GK-MKH vektörü) kıyasla tübüllerde daha az nekrotik ve dilate tübül, tübüllerde daha az efüzyon bulunmuştur (216). IGF-1'in zorlanmış ifadesi

ile GK-MKH'lerde CXCR4 ifadelenmesi ve migrasyon kabiliyetinde artış olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada, IGF-1 zorlanmış ifadesi ile GK-MKH'lerde azalmış apoptotik kaspaz 3, IL-6, TNF ve siklooksijenaz-2 (COX-2), ROS seviyeleri, artmış anti-apoptotik Bcl-2, anti inflamatuvar TGF- β ve IL-10, antioksidan eNOS seviyeleri gösterilmiştir (216).

2.6. Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF)

HGF, *scatter/saçılma* faktörü (SF) olarak da bilinen, mezenkimal kökenli hücrelerden üretilen ve birçok epitel hücreleri üzerinde mitojenik ve morfojenik aktivitelere sahip olan bir polipeptittir (250-252). HGF; embriyonik gelişim sırasında epitelyal hücrelerinin doğru proliferasyonunu ve morfogenezini sağlayarak, mezenkimal hücre etkileşimleri ile karaciğer, böbrek, akciğer, bağırsak gibi çoğu organın oluşturulmasında rol oynar (253). Organ gelişimi sırasında karaciğer, böbrek, pankreas, akciğer gibi mezenkimal ve epitel kökenli dokularda (254), yetişkinlik döneminde mezodermal kökenli dokularda (örn. fibroblastlar, trombositler, mononükleer hücreler) ifade edilir (255, 256). HGF geni türler arasında yüksek oranda korunmuş olup (257), insanlarda 7q11.2-21 bölgesinde lokalizedir (250).

HGF'nin inaktif öncüsü pro-HGF halinde hücre içinde bulunur ve doku hasarına yanıt olarak aktif formuna dönüşür (258-260). Aktif formuna dönüşmesi için aktivatörleri ile hücre dışında proteolizi gerekir. HGF, bir tirozin kinaz reseptörü ve bir protoonkogen olan c-MET'e bağlanır. c-MET, ligand kaynaklı reseptör dimerizasyonu ile oto-fosforile edilir (261, 262). c-MET'in tirozin bölgelerinden otofosforilasyonu, PI3K-Akt, Paxillin-Fak, Stat3/5 ve Ras/Raf/MAPK gibi hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ile (263) hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını, invazyonunu, motilitesini ve ayrıca tübulogenezini ve aktin hücre iskeleti hareketliliğini sağlar (264-266) (Şekil 2.3.).

HGF'nin Böbrek Gelişimi ve Hasarındaki Rolü

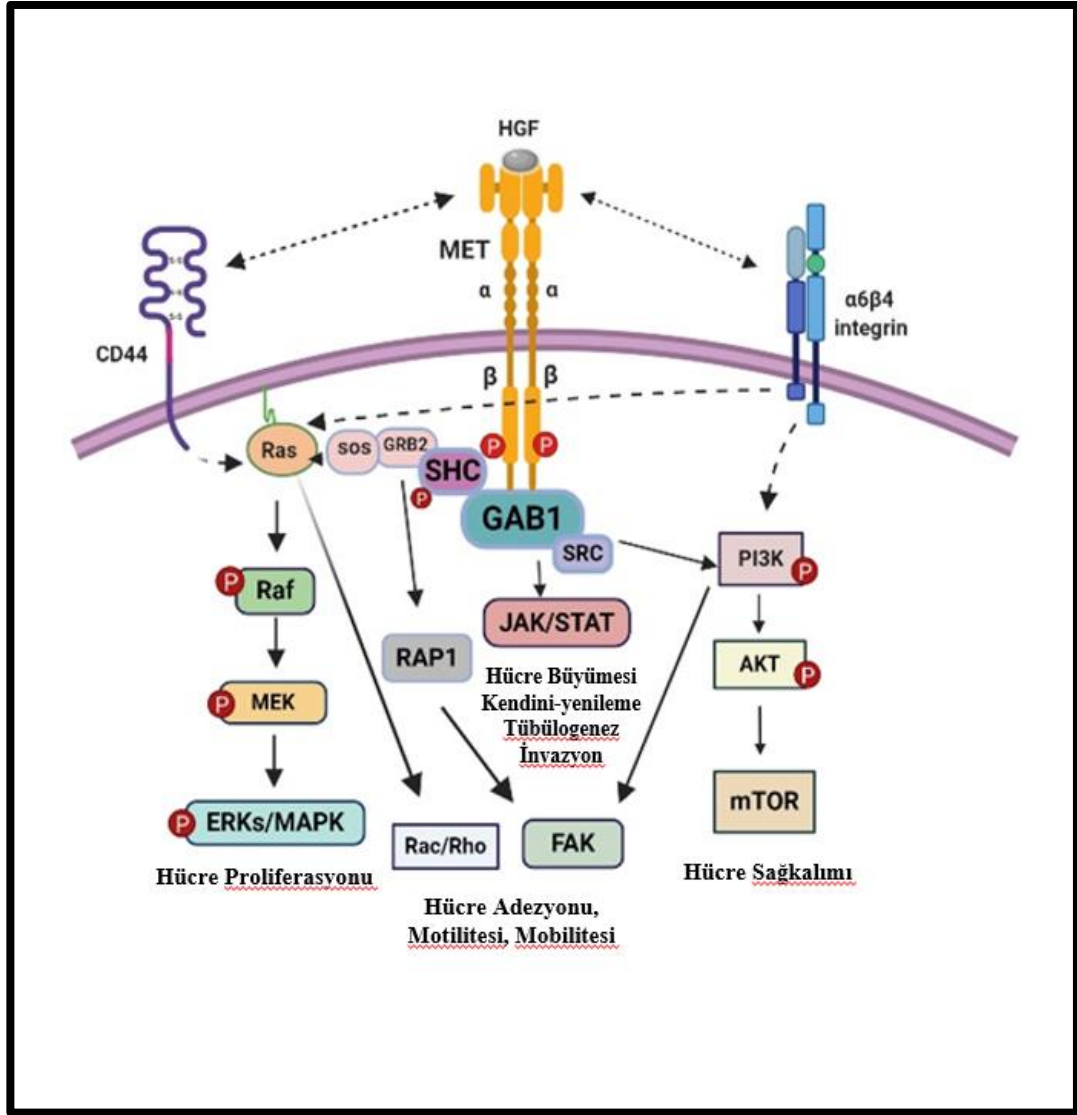
HGF ilk olarak hepatektomize sıçanların serumunda tanımlanmıştır (255). Daha sonra, primer kültürde sıçan hepatositlerinin çoğalmasını ve DNA sentezini uyaran bir faktör olarak saflaştırılması ve karakterizasyonunun tamamlandıktan sonra isimlendirilmiştir (267). HGF, embriyonik dönemde organ gelişimi için gereklidir.

Erişkin dönemde bazal düzeyde doku homeostazını sağlarken doku hasarına bağlı olarak plazma düzeyi artmaktadır (268).

HGF; karaciğer, böbrek, beyin, kalp ve deri gibi birçok organda sentezlenir ve büyüme, gelişme, rejenerasyon, onarım, fibroz, yeniden modellenme, onkogeneze ve anjiyogeneze gibi süreçlerde yer alır (269-274). HGF, ayrıca Rac1 (275) ve ROS üretimini düzenleyen enzim NADPH oksidaz aktivitesini düzenleyerek hücre canlılığını ve doku onarımını artırır (276).

Karaciğerde olduğu gibi, parsiyel nefrektomi sonrası geriye kalan böbrek dokusu nefronların kaybına adapte olarak büyüyerek doku kaybını telafi etmektedirler. Tek taraflı nefrektomi ile akut böbrek hasarı sonrasında renal rejenerasyonun başlamasından önce, böbreklerde ve sağlıklı organlarda (akciğerler gibi) HGF mRNA ve protein seviyeleri artması HGF'nin parakrin ve endokrin etkilerle renal rejenerasyona dahil olduğunu düşündürmektedir (277, 278). Akut böbrek hasarı oluşumundan 24 saat sonra ise böbrekteki HGF'nin total protein düzeyi düşmektedir (279, 280).

Böbrekte HGF'nin ana kaynakları makrofaj, epitelyal, endotelyal ve mezengial hücrelerdir. HGF-c-MET interaksyonu ve regülasyonunun stabilizasyonu, epitel mezenkimal geçiş (EMT) ve hücre sağkalımının düzenlenmesi için kritiktir (281). Anormal şekilde aktive olan HGF/MET sinyali, tümör oluşumu ve metastaz ile ilişkilidir (282). Renal fibrozis oluşumu TGF- β 1'in; 1) podosit, endotelyal ve tübüler epitel hücre apoptozunu indüklemesi ile, 2) büyük miktarlarda matriks bileşenleri üretmek için mezengial hücreleri ve interstisyel fibroblastları aktive etmesi ile ve 3) podositlerin, tübüler epitel hücrelerinin mezenkimal geçişini başlatması ile tetiklenmektedir (283, 284). HGF, diyabetik nefropati, obstrüktif nefropati, 5/6 renal ablasyon ve kronik allograft nefropatisi dahil çeşitli kronik böbrek hastalıklarının başlamasını ve ilerlemesini önleyen TGF- β 1'in profibrotik hareketlerini doğrudan antagonize eden güçlü bir anti-fibrotik yeteneğe sahip endojen bir renoprotektif faktördür (285-291). Sıçan renal interstisyel fibroblastlarda (NRK-49F) yapılan bir çalışmada HGF, aktive edilmiş Smad-2/3 nükleer translokasyonunu bloke ederek TGF- β 1'in profibrotik etkisini antagonize etmekte ve myofibroblast aktivasyonunu baskılamaktadır (292). Glomerüler mezengial hücrelerde ise HGF Smad ko-represörü



Şekil 2.3. HGF sinyal yolağı. HGF, reseptörü c-met'e bağlanır. Otofosforile edilmiş c-met, PI3K-AKT, FAK, JAK/STAT, Rac/Rho ve Ras/Raf/MEK, ERK/MAPK gibi çeşitli hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açar. HGF, Hepatosit büyüme faktörü; PI3K, fosfatidilinositol-3 kinaz; AKT, serin/treonin spesifik protein kinaz; mTOR, rapamisinin memeli hedefi; JAK, Janus kinazı; STAT, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü; Raf, Hızla hızlanan fibrosarkom kinaz proteini; MEK, MAPK/ERK kinaz veya mitojenle aktive olan protein kinazlar/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar; ERK, Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz; MAPK, mitojenle aktive olan protein kinazlar.

TGIF'nin degradasyonunu önleyerek stabilizasyonunu sağlamakta, α -SMA ve tip I kollajen ekspresyonunun baskılayarak TGF- β 1 aracılı mezengial hücre aktivasyonunu inhibe etmektedir (292). Proksimal tübüler epitel hücrelerinde

(PTEC'ler) ve tek taraflı üreter obstrüksiyonunda (UUO) TGF- β tarafından indüklenen *in vitro* ve *in vivo* böbrek fibrozis modellerinde c-Met agonistik monoklonal antikoru denenmiştir (293). Çalışmada, c-MET agonistik antikoru tarafından aktive edilen HGF sinyali, kollajen 1, fibronektin ve α -SMA gibi fibrozis belirteçlerini ve apoptoz belirteci Bax-2'yi azaltmış ve hücre-hücre adezyon molekülü E-kadherin'i ve anti-apoptotik Bcl-2'yi artırmıştır (293).

Böbrekte HGF'nin ana kaynakları makrofaj, epitelyal, endotelial ve mezengial hücrelerdir. HGF-c-MET interaksyonu ve regülasyonunun stabilizasyonu, epitel mezenkimal geçiş (EMT) ve hücre sağkalımının düzenlenmesi için kritiktir (281). Anormal şekilde aktive olan HGF/MET sinyali, tümör oluşumu ve metastaz ile ilişkilidir (282). Renal fibrozis oluşumu TGF- β 1'in; 1) podosit, endotelial ve tübüler epitel hücre apoptozunu indüklemesi ile, 2) büyük miktarlarda matris bileşenleri üretmek için mezengial hücreleri ve interstisyel fibroblastları aktive etmesi ile ve 3) podositlerin, tübüler epitel hücrelerinin mezenkimal geçişini başlatması ile tetiklenmektedir (283, 284). HGF, diyabetik nefropati, obstrüktif nefropati, 5/6 renal ablasyon ve kronik allogreft nefropatisi dahil çeşitli kronik böbrek hastalıklarının başlamasını ve ilerlemesini önleyen TGF- β 1'in profibrotik hareketlerini doğrudan antagonize eden güçlü bir anti-fibrotik yeteneğe sahip endojen bir renoprotektif faktördür (285-291). Sıçan renal interstisyel fibroblastlarda (NRK-49F) yapılan bir çalışmada HGF, aktive edilmiş Smad-2/3 nükleer translokasyonunu bloke ederek TGF- β 1'in profibrotik etkisini antagonize etmekte ve myofibroblast aktivasyonunu baskılamaktadır (292). Glomerüler mezengial hücrelerde ise HGF, Smad ko-represörü TGIF'nin degradasyonunu önleyerek stabilizasyonunu sağlamakta, α -SMA ve tip I kollajen ekspresyonunun baskılayarak TGF- β 1 aracılı mezengial hücre aktivasyonunu inhibe etmektedir (292). Proksimal tübüler epitel hücrelerinde (PTEC'ler) ve tek taraflı üreter obstrüksiyonunda (UUO) TGF- β tarafından indüklenen *in vitro* ve *in vivo* böbrek fibrozis modellerinde c-Met agonistik monoklonal antikoru denenmiştir (293). Çalışmada, c-MET agonistik antikoru tarafından aktive edilen HGF sinyali, kollajen 1, fibronektin ve α -SMA gibi fibrozis belirteçlerini ve apoptoz belirteci Bax-2'yi azaltmış ve hücre-hücre adezyon molekülü E-kadherin'i ve anti-apoptotik Bcl-2'yi artırmıştır (293).

In vitro diyabetik nefropati modelinde; HGF indüksiyonunun, yüksek glikoz uygulanmış sıçan mezengial hücrelerde oksidatif stresi azalttığı (294) ve HGF'nin antioksidan etkisinin protein kinaz G'yi (PKG) aktive etmesi ve protein kinaz-A'yı (PKA) inhibe etmesi ile oluştuğu gösterilmiştir (295).

Normal glomerüllerdeki podositler hücre yüzeyindeki *c-met* ifadesi ile HGF stimülasyonuna yanıt vermektedir. HGF' nin yaralanmadan sonra podosit yapısını ve işlevini korumada bir rolü olabileceği düşünülerek, Cre-LoxP rekombinasyon sistemi kullanılarak *c-met*'in podositlerde spesifik olarak delesyonu yapılan koşullu nakavt fareler oluşturulduğunda, podosit spesifik *c-met* delesyonu olan farelerin sağlıklı olduğunu ancak adriamisin ile oluşturulan akut böbrek hasarı sonrasında daha şiddetli albüminüri, podosit lezyonları ve podosit kaybı geliştiği gözlenmiştir (296). HGF'nin ektopik ekspresyonu, podosit fonksiyon bozukluğunu ve apoptozu iyileştirmesi ve proteinüriyi azaltması; HGF/c-MET sinyalinin patolojik koşullarda podosit yaralanmasını ve proteinüriyi önlemek için kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir (296).

HGF, akut böbrek hasarı sonrası tübüler rejenerasyonda rol oynayan bir pleiotropik faktördür (279, 297, 298). Morfojenik aktivitesi ile, üç boyutlu kültürde böbrek epitel hücrelerinin epitelyal tübül oluşumunu indüklemektedir ve HGF'ye karşı antikor kullanımı bu hücrelerin tübulojenik aktivitesini yok etmektedir (299). Gliserolle akut böbrek hasarı ve kısmi hepatektomi yapılan sıçanlarda HGF'nin zorlanmış ifadenmesi (overekspresyonu), tübüler apoptozu ve nekrozu azaltmıştır (300). Intravenöz olarak enjekte edilen rekombinant insan HGF'si (rhHGF), siplatin ve HgCl₂ indüklü akut böbrek hasarından sonra tübüler rejenerasyonu belirgin şekilde arttırmakta ve ağır böbrek fonksiyon bozukluğunu azaltmaktadır (301).

Hipoksi veya nötrofiller tarafından salgılanan elastaz ve reaktif oksidanlar, tübüler ve GBM hasarını artırır (302, 303). İskemik hasar, nötrofillerin retansiyonu ve aktivasyonu ve de oksidatif stresin artmasıyla akut böbrek hasarına neden olur (304, 305). Nötrofillerin aktivasyonları için endotel hücrelerine yapışması gerekir ve bu durum, hücre içi adezyon molekülü 1 (ICAM-1), P-selektin ve E-selektin gibi adezyon molekülleri aracılığıyla sağlanır. H₂O₂ ve iskemi/reperfüzyon modellerinde reaktif oksidanlar ICAM-1, P ve E-selektin ifadenmesini artırır (303, 306). HGF'nin iskemi/reperfüzyon hasarında, NF-κB yolu üzerinden ICAM-1 ve E-selektini azaltarak

nötrofil infiltrasyonunu dolaylı olarak inhibe ettiği ve anti-apoptotik etkisi ile doğrudan tübüler hücreleri koruduğu ve de hipoksik epiteli koruyarak hasarı azalttığı gösterilmiştir (307).

HGF-cMET interaksiyonu ve regülasyonunun stabilizasyonu epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) ve hücre sağ kalımının düzenlenmesi için de kritiktir (281). Anormal şekilde aktive olan HGF/MET sinyali, tümör oluşumu ve metastaz ile ilişkilidir (282). Böbrekler gelişimleri sırasında mezenkimal-epitelyal geçişe (MET) uğrayan birkaç organdan biridir. Bu süreç, HGF ve kemik morfojenik protein-7 (BMP-7) gibi büyüme faktörleri tarafından kontrol edilen metanefrik mezenkimal hücrelerinin polarize epitel hücrelerine dönüşüm sürecini gerektirir. Nefropatilerin ilerlemesinde yer alan süreçlerden biri olan hücre dışı matriks üreten epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) artışının HGF gibi faktörler ile tersine çevrilmesi, böbrek rejenerasyonu için geliştirilmeye çalışılan terapötik stratejiler arasında yer almaktadır (283, 284). Tüm bu çalışmalar, HGF'nin böbrek rejenerasyonu için renotropik ve sitoprotektif bir faktör olduğunu ve böbrek doku ve fonksiyon rejenerasyonu ve korunması için doğal olarak oluşan bir tropik faktör olarak terapötik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

HGF ile Lisanslanan MKH'ler

HGF gibi parakrin veya hücre dışı/ekstraselüler vezikül tarafından iletilen büyüme faktörleri, MKH'lerin böbrek hasarı üzerinde terapötik etkiler uyguladığı ana mekanizmalardır. MKH'ler IGF-1, HGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerini ifade ederek böbrek hasarında iyileşmeyi artırmakta ve özellikle akut böbrek hasarı modellerinde koruyucu etki göstermektedir. Bu sistemin etki mekanizmasının otokrin, parakrin ve endokrin etkiler gibi birkaç farklı modda olduğu düşünülmektedir.

Akut böbrek hasarının erken döneminde, böbrekteki HGF ve reseptörü *c-met* mRNA ifadesi önemli oranda artmakta; bununla birlikte, böbrekteki HGF'nin toplam protein seviyesi, yaralanmadan 24 saat sonra azalmaktadır. HGF ile lisanslanan MKH'ler akut böbrek hasarı tedavisinde üstün terapötik etkiler göstermektedir. İnsan GK-MKH'lerinin (GK-MKH) transplantasyonunun iskemi/reperfüzyonda böbrek fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Akut böbrek hasar sıçan modelinde HGF ile

modifiye edilmiş GK-MKH'ler, antiapoptotik ve anti-inflamatuar mekanizmalar yoluyla akut böbrek hasarı tedavisinde yüksek verimlilik gösterir.

Tek taraflı üreter obstrüksiyon (UUO) modeli oluşturulan sıçan böbreklerinde, HGF kodlayan plazmitlerin transfekte edildiği MKH'lerin (HGF-MKH'ler), fibrozisi baskıladığı gösterilmiştir ve bu etkinin kollajen birikimini ve fibronektin (FN) seviyesini azaltarak gerçekleştiği gösterilmiştir (217, 308).

IGF-1 ve HGF MKH'ler

IGF-1 ve HGF'nin beraber kullanımının tek başına IGF-1 ve HGF'ye göre etkileri en çok miyokardiyal enfarktüs modellerinde çalışılmıştır. Kardiyak kök hücreleri (KKH) IGF-1 ve HGF reseptörlerini ifade etmektedirler. HGF, kardiyak kök/progenitör hücrelerin mobilizasyonunu, IGF-1 ise proliferasyon ve sağ kalımını artırmaktadır. Fare MI modelinde, IGF-1 ve HGF'yi kalbe enjekte ettiklerinde KKH'ler kalp zarından ölü dokulara geçerek büyümekte ve canlılığını devam ettirmekte, arteriyol, kapiller ve miyositlerin rejenerasyonunu artırmaktadır (309). Sıçan MI modeline, IGF-1 ve HGF salınımı sağlayan polilaktik-koglikolik asit mikro taşıyıcılarla beraber MKH verilmesi ile MKH'lerin engraftmanı artmakta, aritmi skoru ve enfarkt alanı azalmaktadır (310). Domuz miyokardiyum'unda, IGF-1 veya HGF ile, c-Kit⁺ CD45⁻ KKH'lerin uyarılması sonucunda hücreler kardiyomiyojenik farklılaşma göstermektedirler. Akut MI sonrası IGF-1 ve HGF uygulaması ile hasarlı alanda KKH'ler artmakta ve sol ventrikül işlevinde iyileşme ve enfarktüs boyutunda azalma görülmektedir (311). IGF-1/HGF MKH tedavisi ile domuz MI'da inflamasyonun azaldığı ve iskemik doku neovaskülarizasyonun arttığı gözlenmiştir (218). Miyositler üzerindeki IGF-1R ve HGF reseptörünün ifadesi ile MKH'lerin hasarlı alana göçünün ve mikroçevredeki sağ kalımının arttığı dikkati çekmektedir.

Böbrekte c-kit⁺ progenitör/kök hücreleri sıçanlarda I/R hasarı sonrası epitelyal tübüler hücreleri yeniden üretebilmektedir. MDH ve PAN ile oluşturulan FSGS modellerinde c-Kit⁺ kök/progenitor hücrelerin podositlerin efasmanını azaltarak böbrek iyileşmesini artırmaktadır (312). Böbrekte iskemi hasarı durumunda muhtemel hipoksik mikroçevre nedeni ile, kök/progenitör hücreler hasarlı alana göç etmekte, farklılaşmakta ve doku tamirini artırmak için anjiogeneze faktörlerinin üretimini indüklemektedir. Erişkin böbrekteki kök/progenitor hücrelerin çoğunluğu CD44⁺ gibi

MKH belirteçlerini ifade etmektedir (313). Glomerular mezenkimal hücrelerinin (CD133- CD146+) MKH karakteristiği yanı sıra synaptopodin, nefrin gibi podosit belirteçleri ifade eden epitel hücrelerine ve endotel hücrelere farklılaşmaktadır (174). Böbreğin organogenezi sırasında IGF-1 ve HGF'ler gereklidir. IGF-1 ve HGF doku rejenerasyonu için öne çıkan töröpatik faktörlerdir ve bu faktörlerin böbrek gelişiminde önemli olması rejenerasyonda kilit büyüme faktörleri olduklarını düşündürmektedir (256, 314). Akut böbrek hasarı oluşumunun hemen ardından böbrek dokusunda IGF-1 ve HGF proteinlerinin artışının rejenerasyonla ilgili olduğu ve daha sonra azalışı ise hasarın artışı ile ilişkilendirilmektedir (279, 315). Anjiyojenik ve kemotaktik bir faktör olan HGF'nin böbrek hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı, migrasyonu ve tubülogenez için önemli olması (316), IGF-1'in podosit hücrelerinin sağ kalımında yer alması ve glomerular bütünlüğü sağlaması (235). MKH'lerin böbrek hasarında HGF ve IGF-1 ifadelerini artırması ve parakrin etki ile hasar onarımına katkıda bulunması, iki faktörün beraber kullanımının additif veya sinerjik etkisinin olabileceğine işaret etmektedir. Podosit hücreleri IGF-1R ve HGF reseptörü *c-MET*'i ifade etmektedir (317). Podositlerin IGF-1R ve HGF reseptörü *c-MET*'i ifade edebildiği sürece, IGF-1 ve HGF indüksiyonu MKH'lerin hasarlı alana göçünü, MKH'lerin sağ kalımını ve podosit hasarını düzeltme etkisini artırabilir.

Böbrek Hastalıklarında MKH Klinik Denemeleri:

Mevcut durumda böbrek yetmezliği, akut böbrek hasarı, kronik böbrek hasarı ve Fokal Segmental Skleroz, nefropati ve mezenkimal kök hücre anahtar kelimeleri ile *ClinicalTrials* veri tabanında Aralık 2022 tarihi itibarı ile 47 mevcut klinik deneme bulunmaktadır. Bu denemelerde kemik iliği, adipoz, göbek kordonu, *Wharton* jeli MKH kaynakları kullanılmıştır. Bu çalışmalardan 17'si 2 yıl içerisinde hiçbir veri alınamamış (*unknown*), 1'i hastaların takip edilememesi nedeni ile geri çekilmiş (*withdrawn*), 1'i sonlandırılmış (*terminated*), 4'ünde MKH'ler ilaç olarak kullanılmamıştır. Kalan 25 çalışmadan 7 çalışma 2016-2019 yılları arasında tamamlanmasına rağmen çalışmaların sonuçları henüz raporlandırılmamıştır. Sonlandırılmış, hasta çağrısı ve alımı süren, aktif, tamamlanmış klinik çalışmalar tabloda özetlenmiştir (Tablo 2.1.)

Tablo 2.1. Böbrek Hasarı/Hastalıklarında MKH kaynaklı tedavilerin kullanıldığı *clinicaltrials.gov*'dan alınan klinik çalışmalar.

No	Klinik Çalışma No	Hastalık/Durum	Durumu	Girişimler	Katılımcı Sayısı/Dağılım	Faz
1	NCT04194671	Akut Böbrek Hasarı	Hasta alımı devam etmiyor	Biyolojik: GK-MKH, Diğer: Tuz	80 katılımcı/Single-center, Randomize	1/2
2	NCT01602328	Akut Böbrek Hasarı	Sonlandırılmış	Biyolojik: AC607 (2 x 10 ⁶ MKH/kg, tek doz) Biyolojik: Plasebo	156 katılımcı-Randomize	2
3	NCT03015623	Akut Böbrek Hasarı	Aktif, Hasta alımı devam etmiyor	Deneysel: Düşük Doz Grubu: SBI-101 cihazı (25x10 ⁷ MKH) Deneysel: Yüksek Doz Grubu: SBI-101 cihazı (75x10 ⁷ MKH) Sham: Kontrol:MKH içermeyen cihaz	24 katılımcı/Randomize	1/2
4	NCT04445220	COVID-19 Akut böbrek Hasarı Sepsis	Aktif, Hasta alımı devam etmiyor	Deneysel: Düşük Doz Grubu: SBI-101 cihazı (25x10 ⁷ MKH) Deneysel: Yüksek Doz Grubu: SBI-101 cihazı (75x10 ⁷ MKH) Girişim olmayan: Kontrol Vakalar	22 katılımcı/ Randomize	1/2
5	NCT04388761	İskemi Reperfüzyon Hasarı	Hasta alımı devam ediyor	İlaç: Allojenik A-MKH	15 katılımcı/Randomize Olmayan	1
6	NCT04125329	Dişabetik Nefropati	Hasta alımı devam ediyor	İlaç: GK-MKH (i.v. ayda bir toplam 3 doz)	15 katılımcı- Tek Grup	1
7	NCT05362786	Kronik Böbrek Hastalığı	Hasta alımı devam ediyor	İlaç: A-MKH- i.v. 100x10 ⁶ hücre- 0. ve 84. günler-toplam2 doz) İlaç: A-MKH- i.v. 200x10 ⁶ hücre- 0. gün tek doz)	20 katılımcı/Randomize Olmayan	1
8	NCT02166489	Kronik Böbrek Yetmezliği Polikistik Böbrek Hastalığı	Tamamlanmış	Biyolojik: i.v. otolog MKH (2x10 ⁶ /kg)	6 katılımcı- Tek Grup	1
9	NCT05512988	Kronik Böbrek Hastalığı	Hasta alımı devam ediyor	Biyolojik: GK-MKH (i.v. 1x10 ⁶ /Kg-2 doz 2 hafta arayla), Biyolojik: Salin (250ml- 2 doz 2 hafta arayla)	44 katılımcı Randomize	1/2
10	NCT05042206	Kronik Böbrek Hastalığı Evre 3B Kronik Böbrek Hastalığı Evre 4	Hasta alımı devam ediyor	Biyolojik: Cellgram-CKD Allojenik KI-MKH i.v. Cellgram-CKD 10mL (5 X 10 ⁷ hücre)- 3 doz 2 hafta arayla	10 katılımcı-Tek Grup	1
11	NCT02195323	Kronik Böbrek Hastalığı	Tamamlanmış	Biyolojik: i.v. otolog KI-MKH (2x10 ⁶ /kg)	7 katılımcı-Tek Grup	1
12	NCT05018845	Kronik Böbrek Hastalığı	Hasta alımı devam ediyor	Biyolojik: AlloRx (Kültüre edilmiş GK-MKH- 10X10 ⁶)	20 katılımcı- Tek Grup	1
13	NCT04869761	CKD, Diyabet Mellitus 1-2, Diyabetik Nefropati	Hasta alımı devam ediyor	İlaç: Allojenik adipose-(MKH)-Tek veya İki doz	40 katılımcı- Randomize Olmayan	1
14	NCT04392206	Son Dönem Böbrek Hastalığı	Hasta alımı devam ediyor	İlaç: A-MKH (3-5x10 ⁶ hücre-5ml Ringer Laktat Solüsyonu içerisinde)	15 katılımcı- Tek Grup	1

Tablo 2.1.(Devam) Böbrek Hasarı/Hastalıklarında MKH kaynaklı tedavilerin kullanıldığı *clinicaltrials.gov*’dan alınan klinik çalışmalar.

No	Klinik Çalışma No	Hastalık/Durum	Durumu	Girişimler	Katılımcı Sayısı/Dağılım	Faz
15	NCT01840540	Atherosclerotic Böbrek Arter Stenozu İskemik Nefropati Renovasküler Hipertansiyon	Tamamlanmış	İlaç: Arteriyel otolog MKH- Tek intra-arteriyel doz	6 katılımcı- Tek Grup	1
16	NCT04342325	Glomerulonefrit, IGA	Aktif, Hasta alımı devam etmiyor	Biyolojik: ADR-001 (MKH)- 100 x 10 ⁶ hücre. (2 hafta arayla tek veya iki doz)	9 katılımcı- Tek Grup	1
17	NCT02266394	Böbrek Arter Stenozu İskemik Nefropati Renovasküler Hastalık Kronik Böbrek Hastalığı	Tamamlanmış	İlaç: MKH- Intra-arteriyel (i.a.) Tek-doz MKH	42 katılımcı- Randomize Olmayan	1
18	NCT03939741	Kronik Böbrek Hastalığı	Hasta alımı devam ediyor	Biyolojik: Otolog -i.v A-MKH. (>1 x 10 ⁶ hücre- 5 ml SVF solüsyonunda)	31 katılımcı- Tek Grup	1/2
19	NCT02808208	Son Evre Böbrek Hastalığı Vascular Giriş Komplikasyonu	Hasta Çağrısı Devam Ediyor	Biyolojik: otolog AMKH- Tek veya iki doz İlaç: Plasebo	74 katılımcı-Randomize	1/2
20	NCT04592640	Kronik Böbrek Hastalığı Kalsifik Üremik Arteriyopati	Aktif, Hasta alımı devam etmiyor	Diğer: Amniyotik-MKH (i.v.3 hafta arayla 6 doz)	7 katılımcı-Tek Grup	N/A
21	NCT01429038	Karaciğer Yetmezliği Böbrek Yetmezliği	Tamamlanmış	Karaciğer veya Böbrek Transplantasyonu sonrası i.v. 3+/2 gün allojenik MKH (1,5 veya 3x10 ⁶ hücre) Biyolojik: Human umbilical cord MKH (i.v. 1 x 10 ⁶ hücre / kg)	40 katılımcı- Randomize Olmayan	1/2
22	NCT05631717	Systemic Lupus Eritematozus Lupus Nefrit	Hasta alımı devam ediyor	İlaç: Interleukin-2 (1x10 ⁶ IU, subkutan 2 hafta arayla 7 doz)	40 katılımcı- Randomize	3
23	NCT04318600	Lupus Nefrit	Tamamlanmış	İlaç: human amniotic MKH (i.v. 1x10 ⁶ /kg hücre, 3 doz (ayda 1)).	16 katılımcı- Randomize Olmayan	1
24	NCT03673748	Lupus Nefrit Lupus Eritematozus	Hasta alımı devam etmiyor	İlaç: MKH (MKH)-i.v. İlaç: Plasebo	20 katılımcı- Randomize	2
25	NCT03174587	Lupus Nefrit	Tamamlanmış	Biyolojik: Allojenik Kİ- MKH (1-2-3x10 ⁶ hücre/kg)	7 katılımcı-Tek Grup	1
26	NCT03840343	Dişabetik Böbrek Hastalığı, Dişabetik Nefropati Dişabet Tıp 1/2 Kronik Böbrek Hastalığı Böbrek Yetmezliği	Hasta alımı devam ediyor	Biyolojik: Otolog A-MKH Düşük Doz (2.5x 10 ⁶ /kg- i.a. 3 ay arayla 2 doz) Biyolojik: Otolog A-MKH Yüksek Doz (5x 10 ⁶ /kg i.a. 3 ay arayla- 2 doz)	30 katılımcı- Randomize Olmayan	1

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Ekspansiyonu, IGF-1 ve HGF ile Lisanslanması ve Karakterizasyonu

Mezenkimal Kök Hücre Kültürü (MKH)

İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri ticari olarak satın alındı (kat no: PCS-500-012, lot no: 63354572, ATCC). Gelen hücreler (P2 MKH'ler) MKH yüzey belirteçlerine göre ve farklılaşma analizlerine göre (adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma) karakterizasyonu yapılmış hücrelerdir ve analiz sertifikasında belirtildiği gibi CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 için >%90 pozitif, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45 için <%1 negatiftir, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma assaylerini geçmiştir (Şekil 3.1.).

MKH'lerin çoğaltılması için kültür ortamı, bazal besiyeri (ATCC, kat no: PCS-500-030) ve besiyeri içerisine final konsantrasyonları %7 FBS, 15 ng/mL rh IGF-1, 5 ng/mL rh FGF-b ve 2.4 nM L-Alanyl-L-Glutamine olacak şekilde büyüme kiti (ATCC *Mesenchymal Stem Cell Growth Kit*'i (kat no: PCS-500-041)) ve 1x Penisilin-Streptomisin (100x Penisilin-Streptomisin (10,000 Ünite/ml) Thermo Fisher Scientific, kat no: 15140122) eklenerek hazırlandı.

Laboratuvarımıza dondurulmuş olarak teslim edilen MKH'lerin çözülmesinden önce, T75 flasklara 15 ml büyüme ortamı eklenerek 37°C, %5 CO₂, nemlendirilmiş bir inkübatöre yerleştirildi ve hücreler ekilmeden önce ortam sıcaklığı ve pH için 30 dakika önceden dengelenmesi sağlandı. Kültür kapları dengelenirken, MKH içeren kriyo-tüpü azot tankından çıkarıldı ve hücreler 37°C'lik bir su banyosunda hafifçe çalkalayarak hızlıca çözüldü (yaklaşık 1-2 dakika).

Uygun hacimde tam büyüme ortamı [hacim= (1 mL x 3 (kültür kabı/flask sayısı)] steril bir konik falkon tüpe eklendi. Steril bir pipet kullanarak hücreleri kriyoviyalden falkon tüpe aktarıldı, süspansiyonu homojenize etmek için hücreleri nazikçe pipetlendi. Önceden dengelenmiş kültür kaplarının her birine 1ml hücre süspansiyonu 400.000 hücre/T75 kültür kabı (5000 hücre/cm²) aktarıldı. Birkaç kez yukarı ve aşağı pipetlendi, ardından hücreleri eşit şekilde dağıtmak için tüm kapların kapağı kapatıldı ve hafifçe sallayarak hücrelerin kabın her tarafına dağılması sağlandı. Kültür kapları 37°C, %5 CO₂, inkübatöre yerleştirildi. Hücrelere 24 saat hiç

dokunulmadan kültüre edildi. 24 saat sonra hücre kabına yapışan hücrelerin besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi. Hücreler 3-4 günde bir taze besiyeri ile beslenerek çoğaltıldı. Hücreler %70-80 oranında kültür kabını kapladıklarında % 0,05 Tripsin-EDTA (kat no: 25300054, Gibco-ThermoFisher) ile kaldırılıp sayıldıktan sonra - *pasajlamaları yapıldı*. Daha sonra hücre kültürüne DF10 ortamı (%10 oranında fetal buzağı serumu (FBS, kat no:105000064, Gibco), %1 penisilin/streptomisin ve %1 L-glutamin (kat no: K0100-670, Cegrogen) içeren DMEM-LG ile devam edildi. Hücrelerin hastalık modelinde etkinliğinin saptanmasında beşinci pasajdaki MKH'ler kullanıldı.

MKH'lerin IGF-1 ve HGF ile Lisanslanması

MKH'ler kendi ortamında 24 saat aç bırakılarak (%2 FBS içeren DMEM-LG ortamı) kültüre edildikten sonra, *in vivo* ve *in vitro* deneylerin 24 saat öncesinde- 20 ng/ml rekombinant insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1, kat no: 11343316, Immunotools) ve 6 saat öncesinde 10 ng/ml hepatosit büyüme faktörü (HGF, kat no: 11343413, Immunotools)) kültür ortamına eklenerek MKH'ler indüksiyon/ *ön-koşullama (preconditioned)* /lisanslama ortamında tutuldu (IGF-1+HGF_MKH) (206, 208).

MKH'lerin Karakterizasyonu

Karakterizasyonu yapılmış ticari olarak satın alınan MKH'ler IGF-1 ve HGF ile lisanslandıktan sonra hücrelerin immüofenotiplendirmesi yapıldıktan sonra adipojenik ve osteojenik farklılaşmasını değerlendirmek için; hücrelere farklılaştırma ortamlarına alındı ve 21 gün sonra hücreler adipojenik farklılaşma için Oil Red O ve osteojenik farklılaşma için Alizerin Red ile boyanarak farklılaşmaları değerlendirildi.

MKH'lerin İmmunofenotiplendirilmesi

Pasaj 5 MKH (Kontrol), IGF-1_MKH, HGF_MKH, IGF-1+HGF_MKH'leri kültürden kaldırıldıktan sonra her tüpe 1×10^5 hücre gelecek şekilde sayıldı. Hücreler 2 kere en az ($1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$) PBS ile yıkandıktan sonra, ($1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$) PBS+% 2 BSA solüsyonu eklenerek 30 dk inkübe edildi. Santrifüj edildikten sonra (450 g x 5 dk 25°C) çökelti PBN (PBS/BSA/NaN₃) + % 0,2 AB serumunda süspanse edildi (100 μl x tüp

sayısı) ve her tüpe 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. MKH'ler negatif belirteci olarak CD45 (Anti-human CD45-APC *clone*:2D1, E-bioscience, #17-9459-42), CD34 (Anti-human *clone*:S81 Biolegend), HLA-DR pozitif belirteçler olarak CD90 (Anti-human CD90-FITC *clone*:5E10, Biolegend, #328108), CD73 Anti-human (CD73-FITC *clone*:AD2, Biolegend,#344016), ve CD105 (Anti-human CD105-PE *clone*:5N6, E-bioscience, #12-1057-41), CD44 (Anti-human CD44-FITC *clone*:BJ18 Biolegend), ayrıca CD133 (Anti-human CD133-PE *clone*:EMK08, Biolegend), SSEA-4 (Anti-human SSEA4-FITC *clone*: MC813-70, Biolegend), ve CD184/CXCR4 (Anti-human CD184-PE, *clone*:12G5, Biolegend), CD271 (anti-human APC) antikorları ile işaretlendikten sonra BD Accuri™ C6 akım sitometri cihazında okutuldu ve analiz edildi.

- **Adipojenik Farkılaştırma Ortamı:** %10 FBS-HI, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, 1 µM deksametazon (kat no: D2915, Sigma), 60 µM indometazin kat no: 17378, Sigma), 500 µM izobutilmetilksantin (kat no: I5879, Sigma) ve 5 µg/mL insulin (kat no: I6634, Sigma) içeren DMEM-LG'dir. Ortam 3-4 günde bir yenilendi ve 21. günde adipojenik farklılaşmanın gösterilmesi için hücreler %10'luk formalin ile fikse edildikten sonra, hücredeki lipidlere özgü *Oil Red O* (ORO; kat no: O0625, Sigma-Aldrich) ile boyanan hücreler farklılaşma pozitif olarak değerlendirildi.
- **Osteojenik Farkılaştırma Ortamı:** %10 FBS-HI, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, 100 nM deksametazon (kat no: D2915, Sigma), 10 mM β-Gliserofosfat (kat no: A2253, Applichem) ve 0.2 mM L-askorbik asit (kat no: A4034, Sigma) içeren DMEM-LG'dir. Ortam 3-4 günde bir yenilendi ve 21. günde osteojenik farklılaşma için hücreler %10'luk formalin ile fikse edildikten sonra, *Alizarin Red S* (ARS; pH 4.2) ile boyandı. Hücre dışı mineral matriks pozitif boyanması gösteren hücreler farklılaşmış hücreler olarak değerlendirildi.

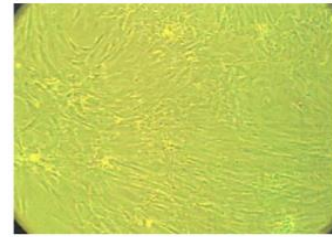


CERTIFICATE OF ANALYSIS

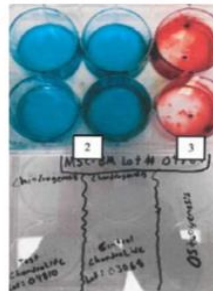
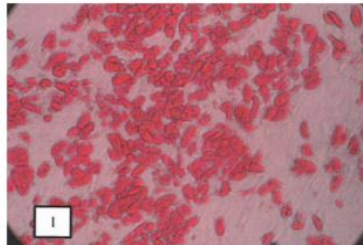
ATCC® Number: PCS-500-012™
Lot Number: 63354572

Characterization/Cell-specific staining		
CD29	> 90% positive	99.97% positive
CD44	> 90% positive	99.65% positive
CD90	> 90% positive	99.92% positive
CD105	> 90% positive	99.81% positive
CD166	> 90% positive	98.88% positive
CD73	> 90% positive	99.78% positive
CD14	< 5% positive	1.75% positive
CD31	< 5% positive	0.26% positive
CD34	< 5% positive	0.27% positive
CD45	< 5% positive	0.36% positive
CD19	< 5% positive	0.20% positive
Differentiation		
Adipocyte Differentiation Assay	Pass	Pass
Chondrocyte Differentiation Assay	Pass	Pass
Osteocyte Differentiation Assay	Pass	Pass

Picture of undifferentiated, passage 4 Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (lot 63354572), shown on day 10.



Picture of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (lot 63354572) differentiated to adipocytes (1), chondrocytes (2) and osteocytes (3)



Şekil 3.1. ATCC'den satın alınan MKH'lerinin özellikleri

3.2. MKH'lerin CM-DIL ile İşaretlenmesi ve CM-DIL Sitotoksitesinin İncelenmesi

MKH'ler 96 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başı 5000 hücre olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra besiyeri literatürde belirtilen dozlarda (318) 2 µg/ml Dil boyası- Klorometilbenzamido (Cell Tracker CM-Dil Dye, kat no: C7001, Invitrogen) içeren 90 µl besiyeri ile değiştirildi ve ardından hücreler 37°C'de 5 dk ve ardından buz üzerinde 15 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 10 µl WST-1 (1:10) (*cell proliferation reagent*, kat no: 0501594401, Roche) eklenerek 4 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda hücrelerin absorbanası, *microplate* okuyucuda (Tecan-Sunrise) 450 nm dalga boyunda okutuldu. CM-DIL'in hücre sitotoksitesi, CM-DIL eklenmeyen MKH'lere (Kontrol grubu) kıyaslanarak değerlendirildi.

In vivo deneyler için MKH veya IGF-1+HGF_MKH hücreleri 2×10^5 hücre/sıçan olarak PBS içerisinde sayıldıktan sonra, hücrelerin üzerine 2 µg/ml CM-DIL (final konsantrasyonu) eklendi ve 37°C'de 5 dk ve ardından buz üzerinde 15 dk inkübasyona bırakıldı. İki kere PBS ile yıkandıktan sonra 500 µl PBS içerisine alınarak sıçanlara kuyruk veninden uygulandı.

3.3. Lisanslanan MKH'lerin İleri Karakterizasyonları

3.3.1. IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF Uygulamasının MKH Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

MKH'ler 6 kuyucuklu kültür kabına DMF10 ortamı içerisinde 5×10^3 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. Hücreler konfluent duruma gelince, 24 saat açılığın ardından ortam IGF-1, HGF veya IGF-1+HGF'li ortam ile değiştirildi. İnkübasyon sonunda p200 pipet ucu ile kuyucuklara boylu boyunca çizik atarak yara hasar modeli oluşturuldu ve 12, 18, 24 ve 36 saat sonra *inverted* mikroskopta (Olympus CKX 41) resimleri çekildi. Alınan resimlerde oluşan yara alanındaki kapanma 5 farklı yerden ölçüm yapılarak ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Yara Kapanma oranı (%) = $100 \times$ (migrasyon hücre yüzey alanı aşağıdaki formülüne göre hesaplandı.

$$[\text{Alan}_0 - \text{Alan}_i \text{ (i=0,12,18,24,36)}] / \text{toplam yüzey alanı (Alan}_0\text{)} \quad (319).$$

3.3.2. Lisanslanan MKH'lerin Metabolomiksi

Metabolomiks çalışmaları GC-MS (GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu) ile gerçekleştirildi. GC-MS için örnek hazırlığı aşağıda anlatıldığı şekilde yapıldı. MKH (Kontrol), IGF-1-MKH, HGF-MKH, IGF-1+HGF_MKH kültür süpernatantları ve boş medium 1ml olacak şekilde toplandı. Örnekler uçurulmadan 1 önceki gün= 1 ml örnek üzerine, 2 ml metanol:su (9:1) karışımı eklendikten sonra vortekslendi ve 80°C'de gece boyu bırakıldı. -80°C'den çıkarılan örnekler 15000 rpm'de (Centrifuge 5810R, Eppendorf) 5 dk santrifüj edilmiş sonra 2 ml süpernatant yeni tüpe alındı ve 1 gün boyunca örnekler uçurulmak için bırakıldı (AVC 2-18 CO PLUS, Christ). Her örneğin

üzerine 20 µl MeOX-Metoksilaminhidroklorür (Sigma #226904 (5g)-Methoxyamine hydrochloride) ve piridin (Sigma)) bileşimi (20 mg/ml konsantrasyonda olması için 1 ml piridin içerisinde 20 mg Meox çözüldü) eklendikten sonra 30°C’de 90 dk. çalkalanarak inkübe edildi. Daha sonra örneğin üzerine 80 µl N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroasetamid (MSTFA) konulduktan sonra [MSTFA + %1 TMCS (Thermo Scientific #TS48915 (1ml)] 37°C’de 30 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnek katı kısma değmeden yeni cihaza uygun *insert* içeren tüplere aktarıldı ve cihaza (GCMS-QP2010 ULTRA- Shimadzu) yüklendi. Çıkan sonuçlar MS-DIAL GC-MS programı ile analiz edildi, analiz sonuçlarına göre gruplar arası anlamlı çıkan metabolitler *t-test* yapılarak ($p<0,05$) saptandı.

3.3.3. Lisanslamanın MKH Üzerindeki Sitokin Düzeylerinin Protein Düzeyinde Belirlenmesi

IGF-1 ve HGF ile lisanslamanın MKH üzerindeki immun düzenleyici etkisini protein düzeyinde incelemek için membrana emdirilmiş antikor bazlı dizin ve boncuk-bazlı dizin kullanıldı. Membrana emdirilmiş antikor bazlı dizin için Human Cytokine Antibody Array C5 (kat no: AAH-CYT-5-2, RayBiotech) kiti kullanıldı. Kit içerisindeki tablodaki (Tablo 3.1.) membran bazlı antikorlar içeren 80 farklı sitokin ve büyüme faktörünün incelenmesini sağlamaktadır. Dot-blotlama esasına göre çalışan test kit protokolü takip edilerek ve kitten çıkan solüsyonlar kullanılarak gerçekleştirildi. Kit içerisinde bulunan antikor işaretli membran 2 ml bloklayıcı solüsyonu içerisinde 30 dk boyunca bekletildi. Membranın bloklanması sonrası 1 ml hücre *süpernatantları* ile (MKH veya IGF-1+HGF_MKH) 5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında, membran 3 kez yıkama solüsyonu-1 (*wash buffer I*) içerisinde 5'er dk ardından 2 kez yıkama solüsyonu-2 (*wash buffer-II*) ile yıkandı, 1 ml biyotinile antikor kokteyli ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar yıkama solüsyonlarıyla yıkandı. Daha sonra 2 ml 1x HRP-Streptavidin ile 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve tekrar yıkama yapıldı. Peroksidaz aktivitesi için Deteksiyon Buffer C ve Deteksiyon Buffer D 1:1 oranında karıştırıldı ve membran üzerine karışım eklenerek 2 dk oda sıcaklığında karanlıkta tutuldu ve ardından kemilüminasan görüntüleme ile görüntülerek ve ImageJ yazılımı (ImageJ 1.53k, NIH, ABD) kullanılarak densitometrik analizleri yapıldı. Hedef protein nokta (*dot*)

yoğunlukları pozitif kontrollere (POS) göre normalize edilerek hesaplandı ve grafikleri GraphPad (GraphPad Prism 8) yazılımı kullanılarak çizildi.

Tablo 3.1. Sitokin Array hedef proteinlerin membran üzerindeki yerleşim sırasına göre listesi

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	ENA-78 (CXCL5)	G-CSF	GM-CSF	GRO a/b/g (CXCL1)	GRO alpha (CXCL1)
2	I-309 (CCL1)	IL-1 alpha (IL-1 F1)	IL-1 beta (IL-1 F2)	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8 (CXCL8)	IL-10
3	IL-12 p40/p70	IL-13	IL-15	IFN- gamma	MCP-1 (CCL2)	MCP-2 (CCL8)	MCP-3 (CCL7)	M-CSF	MDC (CCL22)	MIG (CXCL9)	MIP-1 beta (CCL4)
4	MIP-1 delta	RANTES (CCL5)	SCF	SDF-1 alpha	TARC (CCL17)	TGF beta 1	TNF alpha (TNFSF1B)	EGF	IGF-1	Angiogenin	
5	OSM	TPO	VEGF-A	PDGF-BB	Leptin	BDNF	BLC (CXCL13)	Ck beta 8-1 (CCL23)	Eotaxin-1 (CCL11)	Eotaxin-2 (CCL24)	Eotaxin-3 (CCL26)
6	FGF-4	FGF-6	FGF-7 (KGF)	FGF-9	FLT-3 Ligand	Fractalkine (CX3CL1)	GCP-2 (CXCL6)	GDNF	HGF	IGFBP-1	IGFBP-2
7	IGFBP-3	IGFBP-4	IL-16	IP-10 (CXCL10)	LIF	LIGHT (TNFSF14)	MCP-4 (CCL13)	MIF	MIP-3 alpha	NAP-2 (CXCL7)	NT-3
8	NT-4	OPN (SPP1)	OPG (TNFRSF11)	PARC	PLGF	TGF beta 2	TGF beta 3	TIMP-1	TIMP-2	POS	POS

Boncuk-Bazlı İmmunoassay ile Analiz İçin

LEGENDplex™ Multianalyte Flow Assay Kit- [Human Th Cytokine Panel (13-plex) ve Human Th Panel (13-plex), Biolegend kat no: 740721]'i kullanıldı. MKH (Kontrol), IGF-1_MKH, HGF_MKH, IGF-1+HGF_MKH kültür süpernatantları olmak üzere her bir grup için 5 farklı deneyden toplandı ve toplamda 1 ml olacak şekilde her grup kendi içinde *pool* edilerek analiz yapılacak güne kadar -80°C soğutucuda saklandı. Arka plan ışımayı elemek için hücre içermeyen boş ortam kullanıldı. -80°C soğutucudan çıkarılan örnekler buz üzerinde çözündükten sonra her örnekten 25 µl alındı ve üzerine LEGENDplex™ Multianalyte Flow Assay Kit 25 µl assay buffer konuldu (Assay standartları için örnek yerine 25 µl dilüe edilmiş standartlar konuldu (0 pg/ml- 10³ pg/ml arasında olmak üzere C0'dan C7'ye kadar numaralandırılmış standartlar). Ardından miks boncukları 30 saniye kadar vortekslendikten sonra örnek-assay buffer karışımının üzerine 25 µl konuldu. Tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra karıştırıcıda oda sıcaklığında 500 rpm'de (Heidolph Titramax 1000, Titreşimli Platform Çalkalayıcı) 2 dk tutuldu. Tüpler santrifüj edildikten sonra üst sıvı faz uzaklaştırıldı. 2x yıkama tamponu (*wash buffer*) ile yıkandı. Yıkama tamponu uzaklaştırıldıktan sonra her tüpe 25 µL of *Detection Antikor* (İnsan IL-5 IL-13 IL-2 IL-6 IL-9 IL-10 IFN-γ TNF-α IL-17A IL-17F IL-4 IL-21 IL-22) konuldu. 500 rpm'de 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerlerine 25 µL Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) eklendi. Tekrar tüp 500 rpm'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. 2x Wash Buffer

ile yıkandıktan sonra her tüpe 1x yıkama tamponu eklendi ve 1 dk daha karıştırıcıda tutuldu. Daha sonra örnekler Akım Sitometri cihazında okutuldu. LEGENDplex™ Data Analysis Software kullanılarak analizi yapıldı.

3.3.4. Lisanslamanın MKH Üzerindeki Sitokin İfadelerinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

IGF-1 ve HGF ile lisanslamanın MKH üzerindeki immun düzenleyici etkisini gen ifadenme düzeyinde incelemek için öncelikle **RNA izolasyonu** yapıldı. Bunun için kültür kabına ekilen hücrelere QIAzol (Qiagen) eklendikten sonra hücreler 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından kap yüzeyinden ayrılan hücreler yine kullanılan aynı solüsyon içerisinde 1,5 ml'lik konik tabanlı tüpe (ependorfa) alınarak -80 °C'de saklandı ve RNA izolasyonuna kadar saklandı. miRNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Olası genomik DNA (gDNA) kontaminasyonunu önlemek için RNA örneklerine RNase-free DNase Digestion (Qiagen) ile muamele edildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ABD) spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü.

cDNA Sentezi

cDNA random Hexamer primerler ile High Fidelity cDNA sentez kiti (Roche Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kit- #05091284001) kullanılarak sentezlendi (500 ng). RNA ve primer karışımı 65°C 10 dk thermal cycler cihazında (Eppendorf epgradientS) inkübasyonu yapıldıktan sonra, karışıma reaksiyon *mix* (buffer, oligodT, dNTP, RNAz inhibitör) eklenerek (29°C 10 dk, 48°C 60 dk, 85°C 5 dk) x1 siklus koşullarında reverz transkripsiyon enzimi ile thermal cycler'da (Eppendorf epgradientS) cDNA sentezlendi.

Gerçek Zamanlı Rölatif Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR):

Interlökin 10 (IL-10), Transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-β), nitrik oksit sentaz 2 (NOS2), Indoleamin 2, 3-dioksijenaz (IDO-1) gen ifadeleri spesifik oligonukleotidleri (Tablo 3.2.; Custom Primers, IDT) 5 µl 2xSYBR green master mix

(QuantiTect, Qiagen #204143) ve 4,5 µl cDNA'ler kullanılarak reaksiyon (10 µl) 384'lük plakada Light Cycler® 480 (Roche) cihazında gerçekleştirilen RT-qPCR ile saptandı. PCR koşulları Hot start 95°C 15 dk 1 döngü, sonrasında herbir döngüde Denatürasyon, Annealing ve Uzama (Extension) sırası ile 94°C 30 sn, 60°C 30 sn, 72°C 30 sn olacak şekilde 45 döngü olarak gerçekleştirildi. Erime eğrisi (melting curve) analizi 65-95 °C arasında yapıldı. Hedef ve referans genler için crossing point (Cp; veya threshold cycle –Ct-) değeri “*Second Derivative Maximum*” metoduna göre hesaplandı. Örneklerde her gen ifadesi ikili veya üçlü tekrar ile çalışıldı ve bu tekrarların Ct değerlerinin ortalaması hesaplandı. Her örnek için ΔCt ($\Delta Ct = \text{Ortalama } Ct_{\text{HEDEF}} - \text{Ortalama } Ct_{\text{REFERANS}}$) değeri, $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt -lisanslama yapılan MKH - ΔCt -kontrol MKH), $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplandı ve 2 tabanına göre logaritmik transformasyon uygulandı (320).

Tablo 3.2. RT-qPCR’da kullanılan primer oligonukleotit dizileri

	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')
<i>ACTB</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA
<i>NOS2</i>	GGAACCTACCAACTGACGGG	GTCGATGCACAGCTGAGTGA
<i>IL-10</i>	AGGACTTAAAGGGTTACCTGG	TCACATGCGCCTTGATGT
<i>IDO1</i>	GGGACACTTTGCTAAAGGCG	TGCCTTTCCAGCCAGACAA
<i>TGF-b</i>	CTATTGCTTCAGCTCCACGG	ATGACACAGAGATCCGCAGT

3.4. *In Vitro* Podosit Hasarı Üzerinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH’lerin Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH’ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi

3.4.1. Podosit Hücre Kültürü

SV40-T geni ile transfeksiyon yoluyla geliştirilen insan ölümsüzleştirilmiş podosit hücre dizisi (AB8/13 hücre hattı, Prof. Dr. Fatih Özaltın’a Rush Üniversitesi’nden Mehmet Mete Altıntaş tarafından hediye edilmiştir) hücreleri uygun besiyeri içerisinde (RPMI 1640+%10 FBS+%1 ITS+%1 Penicillin-Streptomycin) kültüre edildi. Kültürde hücreler proliferasyon için ilk olarak 33°C’de inkübe edildi %50-60 kültür kabını kapladığında, farklılaşma için 37°C’deki inkübatöre alındı.

3.4.2. Podosit Hasarı Oluşturulması

Podosit hasarı oluşturulacak doz WST-1 testi sonrası hücrelerin en fazla %50'sini öldüren etkili inhibitör konsantrasyon göre belirlendi. Hücrelere 37°C'de kültüre alındıktan sonra 14. Günde hasar için Puromycine Aminonucleoside (PAN) 50-100 µg/ml arası dozlar kullanılarak 48 saat inkübasyon sonrası WST-1 analizi yapıldı. Podosit hücreleri 96 kuyucuklu kültür kaplarına, kuyucuk başı 2000 hücre olacak şekilde ekildi ve 14 gün sonra besiyeri 50-100 µg/ml arasındaki dozlarda PAN içeren 90 µl besiyeri ile değiştirildi ve 48 saat inkübasyon sonrası 10 µl WST-1 (1:10) (*cell proliferation reagent*, (Roche-#0501594401) eklenerek 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin absorbansı, *microplate* okuyucuda (Tecan-Sunrise) 450 nm dalga boyunda okutuldu. PAN'in hücreye toksisitesi, PAN eklenmeyen MKH'lere (Kontrol) göre normalize edilerek değerlendirildi.

3.4.3. Podosit-MKH Ko-Kültürü

Podosit hücrelerine 48 saat (50µg/ml) PAN uygulamasının ardından hücre kaplarına 4 µm veya 8 µm'luk süzgeç (*transwell*) konuldu ve her *süzgeç* üzerine öncesinde CM-DIL ile işaretlenmiş olan 1×10^4 MKH, IGF_MKH, HGF_MKH veya IGF-1+HGF_MKH'ler eklendi ve 48 saat boyunca ko-kültür yapıldıktan sonra aşağıda açıklandığı şekilde Phalloidin boyaması ile podosit aktin hücre iskeleti üzerindeki hasar gösterildi.

3.4.4. Podosit Aktin Hücre İskeleti Hasarının Gösterilmesi

Podosit hücreleri 50 ve 100 µg/ml PAN ile muamele edildikten sonra fiksasyon için %4 paraformaldehit ile (PFA) eklenerek oda sıcaklığında 20 dk tutulduktan sonra 2 kere yıkama solüsyonu (1xPBS+%0,05 Tween 20) ile yıkandı. Hücre fiksasyonunun ardından permeabilizasyon tamponu (%0,1 Triton X-100) eklendi ve 5 dk tutulduktan sonra hücreler 2 kere yıkama solüsyonu ile yıkandı. Sonrasında bloklama solüsyonu (%1 PBS içerisinde %1 BSA) eklenerek 20 dk inkübe edildi. Aktin Boyası olan Phalloidin (Sigma, cat no: FAK100) antikoruna (1:250) ile 1 saat inkübe edildi. 2 kere yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra 5 dk hücre çekirdeğini boyayan DAPI boyası

ile hücreler inkübe edildi. Daha sonra floresan mikroskopunda (LEICA DMI600B) görüntüleri alınarak değerlendirildi.

3.5. *In Vivo* Fokal Segmental Glomeruloskleroz (FSGS) Modelinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH'lerin Terapötik Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH'ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi

Hayvan deneyleri ile ilgili çalışmalarımız, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından incelenmiş olup 2016/05 no'lu toplantı 2016/38-3 karar numarası ile gerekli izinler alınarak yapılmıştır. FSGS modeli PAN (puromisin aminonükleozid) ile 4-6 haftalık (90-120 g) sağlıklı erkek Sprague Dawley sıçanlarda (Kobay Deney Hayvanları Lab. San. Ve Tic. A.Ş.) yapıldı.

3.5.1. Pilot Çalışmalar

Ana deney öncesinde deney hayvan sayısını azaltmak ve optimize etmek için pilot deneyler yapıldı. 1. pilot çalışmada literatürde belirtilen protokol kullanılarak (321) PAN ile FSGS modelinin oluşup oluşmadığı değerlendirildi. 2. Pilot çalışmada IGF-1+HGF_MKH'lerin *in vivo* FSGS modelinde uygulama zamanı ve etki süresi belirlendi. Sadece IGF-1 ve sadece HGF ile indüklenmiş MKH'lerin FSGS modeli üzerine etkisinin belirlenmesi için ise 3. pilot çalışma yapıldı.

İdrar toplamak için sıçanlar 24 saat süreyle metabolik kafese alındı. İdrarlar Hacettepe Hastanesi Biyokimya Merkez Laboratuvarında analiz edildi. Modelin oluştuğu hasarın en iyi göstergesi olan idrarda proteinürinin gözlenmesi ile saptandı. Proteinüri değeri protein (UCSF (P))/kreatinin (K) oranına göre (P/K (mg/mg)) belirlendi. 4,5 mg/mg üzeri değerler '*proteinüri*' olarak değerlendirildi. Her çalışma öncesinde sıçanların idrarları toplandı ve başlangıç P/K oranları analiz edildi.

PAN ile FSGS Modeli Oluşturma (Pilot Çalışma-1)

Bu çalışma için sağlıklı (kontrol) (n:2) ve FSGS hasta modeli (FSGS) (n:2) olmak üzere toplam 4 sıçan çalışmaya dahil edildi. FSGS modeli oluşturmak için Puromycine Aminonucleoside (PAN) uygulandı. PAN ticari olarak satın alındı. Toz halindeki PAN 50mg/ml apirojenik su içerisinde çözülerek kullanıldı. FSGS modeli

için ratlara 150 mg/kg PAN intraperitoneal (*i.p.*) olarak uygulandı. Kontrol grubuna *i.p* salin (PBS) solüsyonu verildi. Sıçanların PAN uygulaması öncesi ve PAN uygulaması ardından 48. saatte metabolik kafese alındı 72. saatte ve 90. saatte idrarları toplandı ve analiz edildi.

IGF-1+HGF_MKH'lerin FSGS Modeli Üzerinde Etki Süresinin Belirlenmesi (Pilot Çalışma-2)

Etki süresi belirlemesi için tedavi uygulaması PAN uygulamasının 80. saatinde (hasar erken dönem tedavi) veya 128. saatinde (hasar geç dönem tedavi) gerçekleştirildi. Her bir zamanda MKH, IGF-1+HGF_MKH veya PBS (kontrol) uygulamaları her bir grupta tek hayvana yapıldı. Bu pilot çalışmada toplamda 6 sıçan kullanıldı. 0.5 ml PBS'de süspanse 2×10^5 MKH'ler veya 2×10^5 IGF-1+HGF_MKH'ler intravenöz (*i.v.*) olarak sıçanlara uygulandı. Sıçanlar PAN uygulama öncesinde, tedavi öncesinde ve tedavileri takiben 3, 9. ve 20. günün 24 saat öncesinde idrarlarını toplamak için metabolik kafese alındı.

Deney Grupları:

Hasar Erken Dönem Tedavi (n=3): 0. gün PAN (150mg/kg) enjeksiyonunu takiben, 80. saatte hayvanlara PBS, MKH veya IGF-1+HGF_MKH verildi.

FSGS (n=1): 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 80. saatte intravenöz *i.v.* 0.5 ml PBS tedavisi,

FSGS-MKH (n=1): 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 80. saatte *i.v.* 0.5 ml MKH (2×10^5 hücre) tedavisi,

FSGS-IGF-1+HGF_MKH (n=1): 0. Gün *i.p.* PAN; 80. saatte *i.v.* 0.5 ml IGF-1+HGF_MKH (2×10^5 hücre) tedavisi.

Hasar Geç Dönem Tedavi (n=3): 0. gün PAN (150mg/kg) enjeksiyonunu takiben, 128. saatte hayvanlara PBS, MKH veya IGF-1+HGF_MKH verildi.

FSGS (n=1): 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 128. saatte *i.v.* 0.5 ml PBS tedavisi,

FSGS-MKH (n=1): 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 128. saatte *i.v.* 0.5 ml MKH (2×10^5 hücre) tedavisi,

FSGS- IGF-1+HGF_MKH (n=1): 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 128. saatte *i.v.* 0.5 ml IGF-1+HGF_MKH (2×10^5 hücre) tedavisi.

IGF-1 veya HGF ile İndüklenmiş/Lisanslanmış MKH'lerin FSGS Modeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi (Pilot Çalışma-3)

Tedavi grupları IGF-1_MKH (n:2) ve HGF_MKH (n:2) olmak üzere toplam dört sıçan çalışmaya dahil edildi. PAN uygulamasının 90. saatinde tedaviler uygulandı. Sıçanlar PAN uygulamasından önce, tedavi öncesi ve tedaviyi takiben 9. günün 24 saat öncesinde metabolik kafese alındı.

Gruplar:

FSGS-IGF-1-MKH (n=2): 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 90. saatte *i.v.* 0.5 ml IGF-1_MKH (2×10^5 hücre) tedavisi,

FSGS-HGF-MKH (n=2): 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 90. saatte *i.v.* 0.5 ml HGF_MKH (2×10^5 hücre) tedavisi.

3.5.2. In Vivo FSGS Modelinde Tek Doz Mezenkimal Kök Hücre

Tedavilerinin Karşılaştırılması

Tek doz uygulanan konvansiyonel kültür ortamında çoğaltılan MKH ve lisanslanan MKH tedavilerinin etkilerini karşılaştırmak için toplam 18 sıçan kullanıldı. 150 mg/kg Puromycine Aminonucleoside (PAN) *i.p.* uygulanarak FSGS modeli oluşturuldu. Tedavi kontrol grubuna PBS uygulandı. Her grupta 6 sıçan kullanıldı.

Proteinürinin gözlemlendiği 4. Günde (96. Saat) 2×10^5 hücre içeren MKH, IGF-1+HGF_MKH' ler veya 0.5 ml PBS içerisinde sıçanların kuyruk veninden enjekte edildi. Pilot deneylerdeki bulgular doğrultusunda kuyruk veni enjeksiyonu sonrası 9. günde sıçanlar ötenazi edildi. PAN uygulaması, MKH uygulaması öncesinde ve ötenaziden 24 saat öncesinde hayvanlar metabolik kafese tek tek konularak 24 saatlik idrarları toplandı. Hasar oluşumu ve tedavi etkinliği için proteinüri miktarı değerlendirildi.

Grup 1 (n:6) FSGS: 0. Gün *i.p.* PAN uygulaması; 4. gün intravenöz PBS tedavisi,

Grup 2 (n:6): FSGS-MKH: 0. gün *i.p.* PAN uygulaması; 4. gün *i.v.* MKH (2×10^5 hücre) tedavisi,

Grup 3 (n:6): FSGS-IGF-1+HGF_MKH: 0. gün *i.p.*PAN uygulaması; 4. gün *i.v.*IGF-1+HGF_MKH (2×10^5 hücre) tedavisi.

FSGS Hasar Modeli Oluşumunun Değerlendirilmesi:

PAN ile FSGS oluşumunu saptamak için fareler 3. gün metabolik kafese alındı ve 4. gün toplanan idrardan protein düzeyi ölçüldü ve PAN verilen gruplarda proteinüri olan hayvanlar ile deneylere devam edildi. MKH uygulamaları yapıldıktan 8 gün sonra sıçanlar metabolik kafese tekrar alınarak 9. Günde toplanan 24 saatlik idrarlarından protein/kreatin değerleri ölçüldü. 9. gün sıçanlar anestezi altında bayıltıldı (ketamin/xylesine), kanları intrakardiyak girişimle toplandı. Böbrek ve akciğer dokuları RNA later solüsyonu içerisinde ve frozen kesit için -80'de saklandı, ayrıca paraffin kesitleri hazırlandı. Böbrek dokuları çıkarıldıktan sonra doku kesitleri alınarak kesitlerin, ışık mikroskobu ve elektron mikroskopları altında histopatolojik ve ultrastrüktürel değerlendirmesi yapıldı. Ayrıca böbrek dokularının bir kısmından RNA izole edilerek podosite özgü genlerin (INF2 ve synaptopodin) ifade düzeyleri RT-qPCR ile saptandı.

Elektron Mikroskobu İncelemesi: Böbrek dokuları hızlıca 1mm³'lük küçük parçalara ayrıldıktan sonra, %2.5 gluteraldehit ile +4°C de 24 saat ve %1 osmium tetroksit ile oda sıcaklığında, karanlıkta 1 saat tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri takip için Leica EM TP takip cihazına alındı. Takip cihazında tampon solüsyonu ile 45 dk yıkanarak dehidratasyonu sağlamak için sırayla %50, %60, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerden geçirildi. Doku örnekleri ardından propilen oksit ile yıkanmış, daha sonra sudan kurtarılan doku parçaları bloklanmadan önce dörtlü plastik karışımında alıştırıldı. 10 saat dörtlü plastik karışımında tutulduktan sonra dörtlü plastik karışımla bloklanarak etüvde 60 °C'de 48 saat polimerize edildi. Leica RM 2265 mikrotomunda alınan 1µm yarı ince kesitler %1 lik boraks içindeki %1'lik metilen mavisi- Azur II karışımında boyandıktan sonra TEM de incelenecek alanın belirlenebilmesi için DC490 digital camera (Leica, Wetzlar-Germany) bağlı Leica DM6000B (Wetzlar-Germany) mikroskop ile incelendi ve fotoğraflandı. Elektron mikroskobunda görüntüleme alabilmek için Leica Ultracut R ile 70 nm'lik ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. Gridler Leica EM AC20 cihazı kullanılarak uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandıktan sonra böbrek glomerulari JEOL Jem 1400 elektron

mikroskobunda incelendi ve CCD kamera (Gatan Inc. Pleasanton, CA, USA) ile fotoğraflandı. Ultrastrüktürel inceleme ve değerlendirmeler Prof. Dr. Figen Kaymaz tarafından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

Immunohistokimyasal Boyama: Böbrek dokuları çıkarıldıktan sonra 1 parçası da immunohistokimyasal boyama (IHC) için %10 formaldehit solüsyonuna alındı. Daha sonra dokular takibe alındı (Thermo Shandon PethCentre), ardından paraffin bloklama yapılarak (Thermo Shandon Histocenter) +4°C’de saklandı. IHC için parafine gömülü dokulardan 3 mm kalınlığında kesitler alındı (Thermo Shandon Finesse Manual Microtome). Ardından doku deparafinize edildi ve fiksasyon sırasında formalin ile çapraz bağ yapan antijenlerin maskelenmesini ortadan kaldırmak için antijen retrieval (Tris EDTA Ph 9.0) 20 dakika tutulduktan sonra Synaptopodin (Novus Biologicals cat no: NBP2-39100) antikoru ile işaretleme (1:800 dilüsyon) ve hematoxilen boyaması otomatik IHC cihazı (Leica BOND-MAX automated IHC/ISH stainer) ile yapıldı. İmmunohistokimyasal inceleme ve değerlendirmeler Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları öğretim üyesi Prof. Dr. Şafak Güçer tarafından Çocuk Patoloji Ünitesinde gerçekleştirildi.

RNA’ların Saklanması ve İzolasyonu: Sıçanlarda PBS, MKH ve IGF-1+HGF_MKH uygulanan grupların böbrek dokuları çıkarıldıktan sonra ‘RNA-later’ (Invitrogen) solüsyonu içerisine alınarak -80°C soğutucuda saklandı. ‘RNA-later’ içinden alınan dokular 100 mg/ml olacak şekilde QIAzol (Qiagen) içerisine alınarak doku beadleriyle (Qiagen-stainless steel beads, 5mm) homojenizatörde (TissueLyser LT-Qiagen) parçalandı. Daha sonra santrifüj edilerek üst faz toplandı, Üst fazın üzerine 1/5 V Kloroform eklendi ve 12000 g’de 15 dk. 4 °C’de santrifüj edildi. Üst faz toplanarak 1.5V’ü kadar %100 etanol eklenerek 10 dk. 25 °C’de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 12000 g’de 10 dk. 4 °C’de santrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan sonra, %90 ve ardından %70 etanol eklenerek (başlangıç lizis miktarı kadar) 7500 g’de 5 dk. 4°C’de santrifüj edildi. 37 °C’de kapak açılarak alkol uçana kadar tutuldu ardından çökelti (*pellet*) büyüklüğüne göre RNase içermeyen su eklenerek iyice çözündürüldü ve elde edilen RNA’nın konsantrasyonu NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, ABD) spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü. cDNA sentezi ve RT-qPCR bölüm 3.3.2 de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. 105 bp

uzunlukta ampikon ürünü veren INF2 (Assay Id: Hs.PT.58.5068547.gs) için kullanılan primer dizileri sense 5'-GTTCATGACAATGCTGAAGCG ve antisense 5'-GCCCTGTGCATCTACTCTC ; 93 bp uzunlukta ampikon ürünü veren Synaptopodin (Assay Id: Hs.PT.58.15710383.gs) için kullanılan primer dizileri sense 5'-CTCCAATCCCTCTTCTTAACCC-3' ve antisense 5'-GTTTGCATCTTAGGTCACACC-3' ve referans için 143 bp uzunlukta ampikon ürünü veren GAPDH (Assay Id: Hs.PT.39a.22214836) için kullanılan primer dizileri sense 5'-TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG-3' ve antisense 5'-ACATCGCTCAGACACCATGPCR-3', 5 µl 2x Gotaq probe master mix (Promega) ve 4, 5 µl cDNA kullanılarak 95°C 2s x 1 döngü; (95°C 15s, 60 °C 1dk)x 45 döngü; 40 °C 30s x1 döngü şeklinde RT-qPCR gerçekleştirildi.

3.5.3. İstatistiksel Analizler

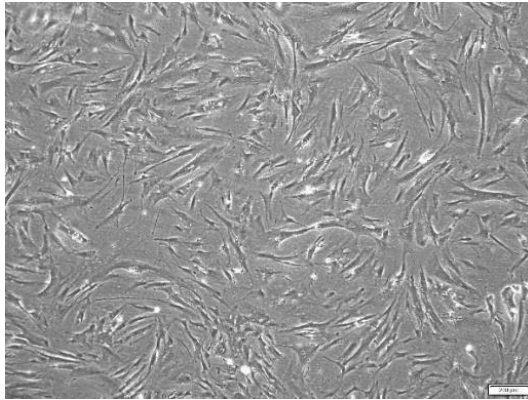
Analizler için GraphPad Prism 8.0.1 yazılımı kullanıldı. 2'li grup analizleri unpaired t test ile, grup analizleri one-way Annova metodu uygulandı. $p \leq 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Metabolomiks analizleri multivaryant data analiz yazılımı (SIMCA®) ile yapıldı. SIMCA'ya göre zorlanmış ayırım (PLS-DA) ile tüm grupların çoklu analizleri oluşturdıkları kümelenmeler anlamlı farklı çıkan ($p \leq 0,05$) metabolitler ile belirlendi.

4. BULGULAR

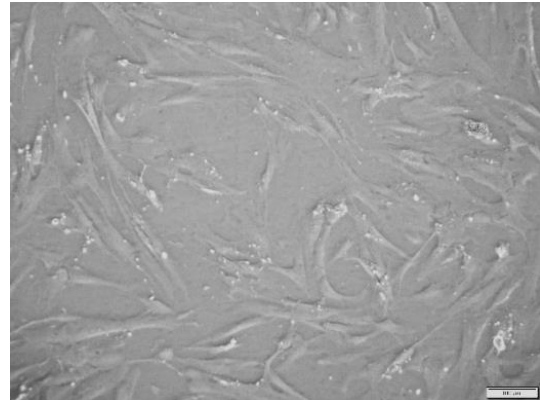
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerinin Ekspansiyonu, IGF-1 ve HGF ile Lisanslanması ve Karakterizasyonu

Pasaj 3 MKH'ler kültür kabına ekildikten sonra kültür kabının yüzeyine yapışması, fibroblast hücresi benzeri iğsi morfoloji göstermesi (Şekil 4.1.) ve hızlı bir şekilde çoğalması ile MKH fenotipine kültürde benzerlik göstermiştir.

A)



B)



Şekil 4.1. P3 MKH'lerin kültürde morfolojik olarak görüntülenmesi. MKH'lerin morfolojik olarak fibroblast benzeri iğsi görünüme sahip olduğu ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Büyütme A) 4x B)10x

MKH'lerin IGF-1 ve HGF ile Lisanslanması

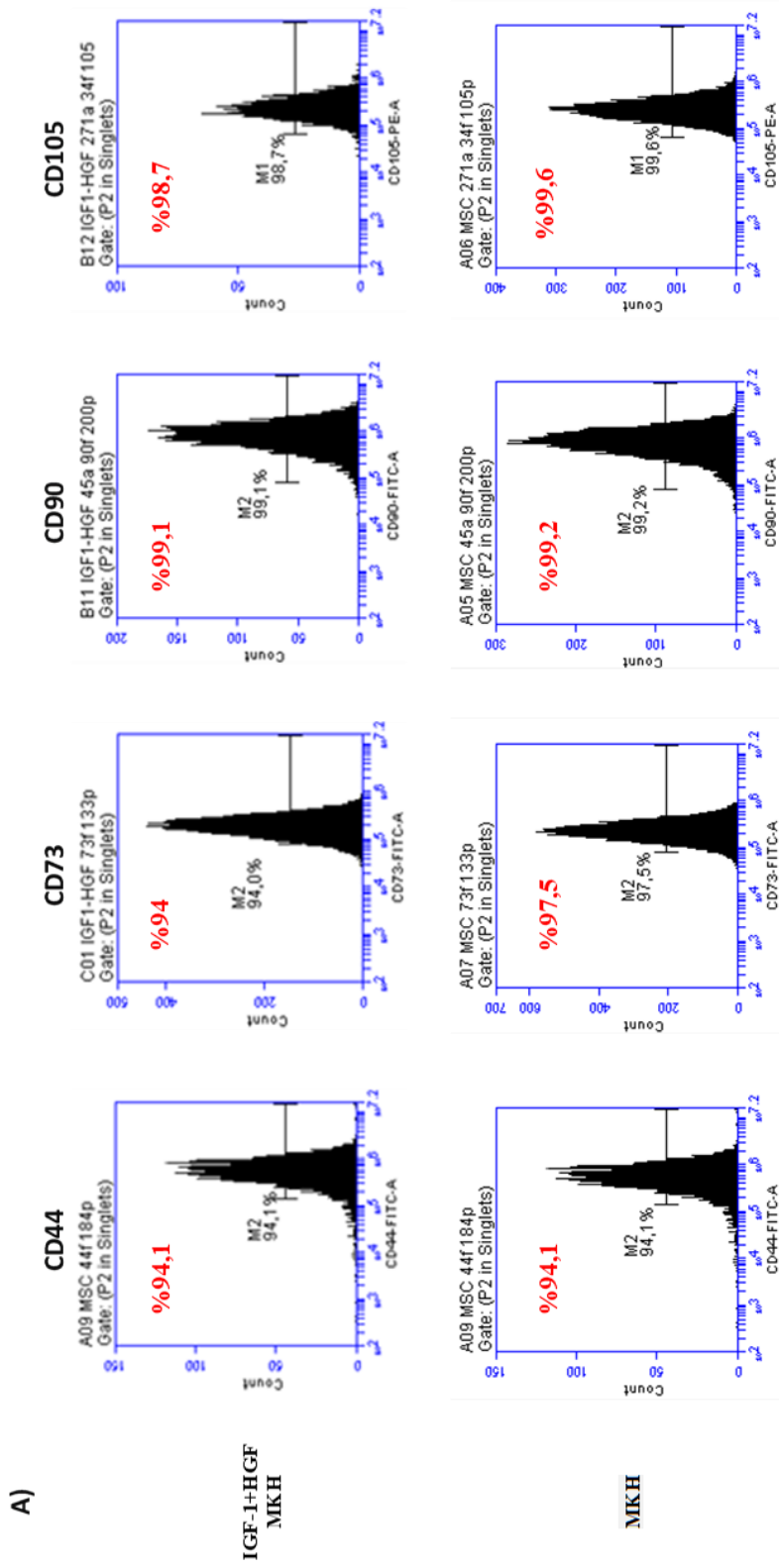
MKH'lere IGF-1 ile 24 saat, HGF ile 6 saat boyunca inkübe edildikten sonra ileri çalışmalar yapılmıştır. IGF-1+HGF uygulanan MKH'ler (MKH I+H) ile tek başına IGF-1 (MKH I) veya tek başına HGF'nin (MKH H) uygulandığı MKH'ler ve herhangi bir faktör uygulanmayan MKH'ler (MKH) ile ayrıca karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

MKH'lerin Karakterizasyonu:

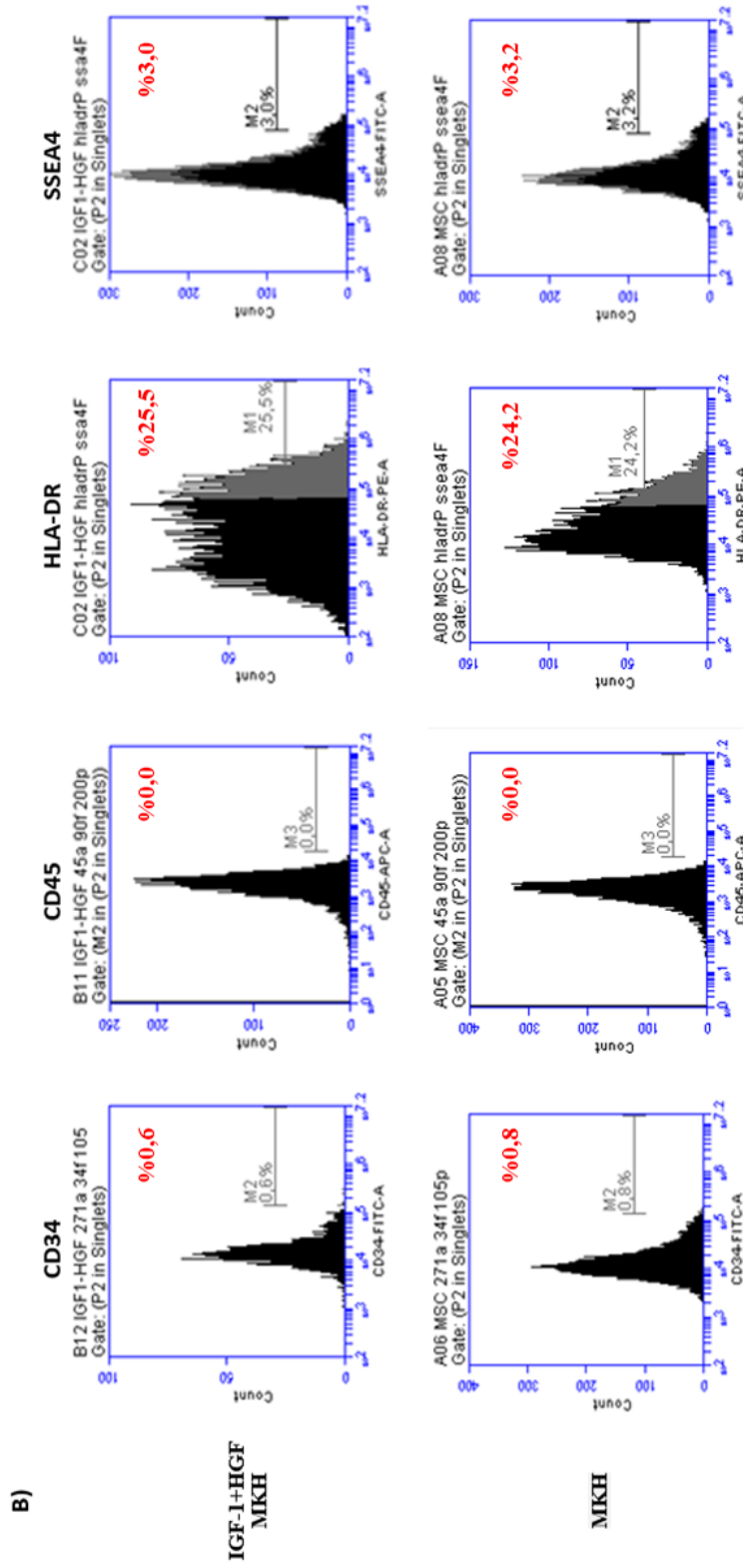
IGF-1+HGF, IGF-1, HGF uygulanan Pasaj 5 (P5) MKH'lerin flow sitometri ile yüzey belirteçleri değerlendirilmiştir. Adipojenik ve osteojenik ortamda 21 gün boyunca hücre kültüründe takip edilerek *in vitro* adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasiteleri incelenmiştir.

MKH'lerin İmmunofenotiplendirilmesi

Pasaj 5 MKH (Kontrol), IGF-1-MKH, HGF-MKH, IGF-1+HGF_MKH'ler, MKH negatif belirteçleri olan CD45, HLA-DR, CD184/CXCR4 pozitif belirteçleri olan CD90, CD73 ve CD105, CD44, ayrıca pluripotent hücre belirteci *early stage-specific embryonic antigen-4* (SSEA-4) ve CD133, CD200, CD271 (anti-human APC) antikorları ile işaretlendikten sonra analiz edildi (Şekil 4.2.). P5 MKH'ler IGF-1, HGF veya IGF-1 + HGF eklenerek IGF-1 ile 24 saat, HGF ile 6 saat kalacak şekilde kültüre edilip *in vitro* CD45-APC, CD34-FITC, HLA-DR-PE, CD73-FITC, CD90-FITC, CD105-PE, CD44-FITC, CD133-PE, SSEA-4, CD184/CXCR4-PE, CD200-PE, CD271-APC antikorları ile işaretlendi. Buna göre IGF-1, HGF ve IGF1+HGF ile indüklenen MKH'lerin CD44, CD73, CD90, CD105 >%94 pozitif ve CD45 ve CD34 negatif olması <%1 (Tablo 4.1., Şekil 4.2.) indüklenmeye bağlı mezenkimal kök hücre karakterinin değişmediğini göstermektedir. IGF-1 ve HGF uygulamasında ayrıca uygulamada tümörojenik potansiyelini değerlendirmek için kanser kök hücre markerı ve MKH'lerde yüksekliği immünsüpresif özelliği ile ilişkili olan CD200 (322, 323), ve mezenkimal kök hücre fenotipinde ve pluripotensi markerlarının yanında MKH markerlarını da ifade eden kanser kök hücre markerı, tümör desteği sağlayan CD133 (324, 325) ve embriyonik kök hücre markerı ve aynı zamanda tümörojenik etkinliği yüksek hücrelerde ifade olan SSEA4 (326), baş ve boyun kanserlerinde tümör initiating hücre olarak geçen ve hipofarinks kanserinde kötü prognozla ilişkili kök hücre karakterinde hücrelerle ilişkilendirilen ve tümör bölgesindeki MKH'lerde özellikle yüksek bulunan CD271 (327, 328) tümör başlatıcı/initiating hücrelerde ve radyoresistant kanser kök hücrelerinde ifadesi olan CD184/CXCR4 (329) ekspresyonlarının negatif olarak bulunması bu hücrelerin tümörojenik potansiyelini bilinen markerlar üzerinden göstermediğini ve kliniğe uygulanabilir yönde olduğunu işaret etmektedir. Ayrıca tek IGF-1 ve HGF ile indüklenen MKH'lerin yüzey markerlarına da bakılmıştır ve benzer yönde karakteristik özellikleri tanımlanmıştır. IGF-1, HGF, IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin ve kontrol indüklenmeyen MKH'lerin sayısal yüzde değerleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.1).

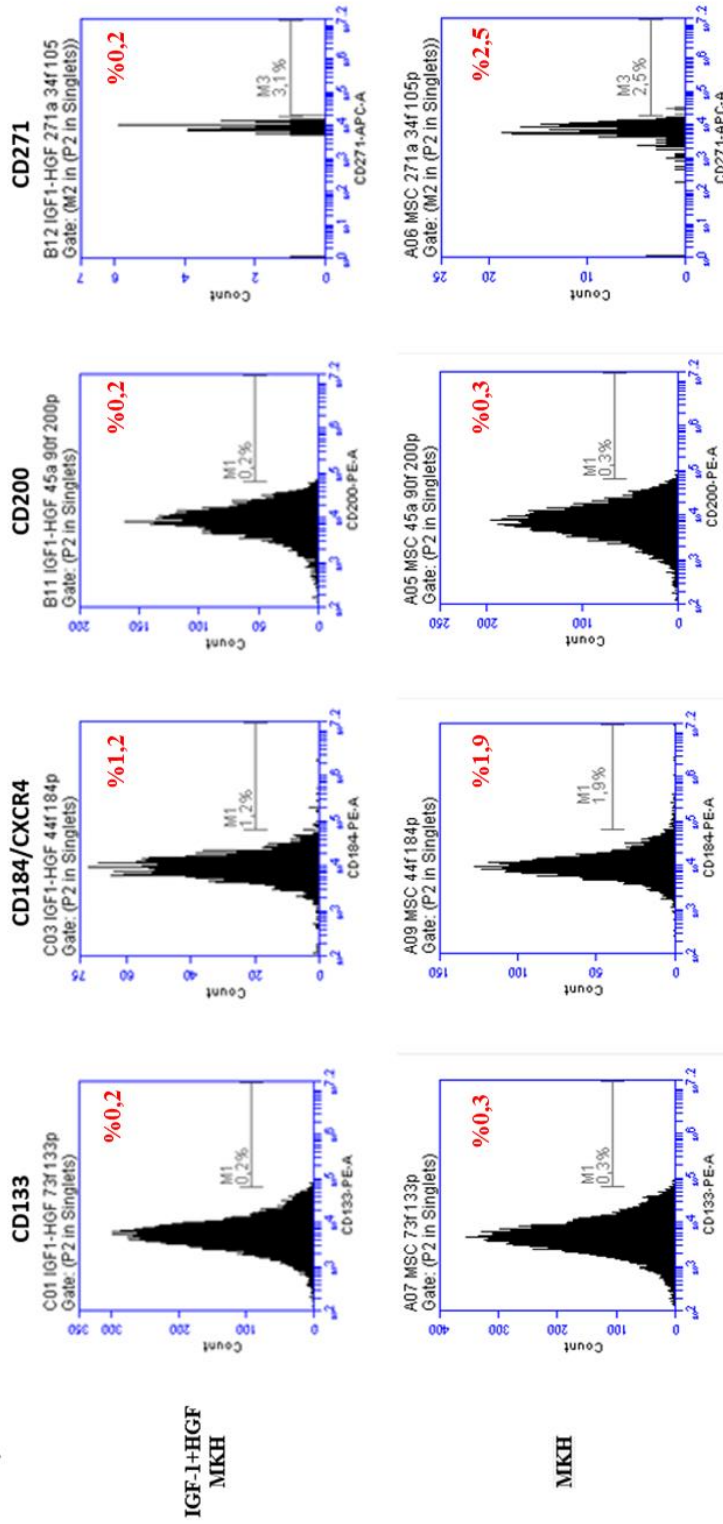


Şekil 4.2. MKH ve IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin flow sitometri analizleri. A) MKH pozitif belirteçleri CD44, CD73 ve CD105 B) MKH Negatif Belirteçleri CD34, CD45, HLA-DR ve SSEA-4 C) Tümöröjenite ile ilgili belirteçler CD133, CD200, CXCR4, CD271 ve SSEA4.



Şekil 4.2. (Devam) MKH ve IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin flow sitometri analizleri. A) MKH pozitif belirteçleri CD44, CD73 ve CD105 B) MKH Negatif Belirteçleri CD34, CD45, HLA-DR ve SSEA-4 C) Tümöröjenite ile ilgili belirteçler CD133, CD200, CXCR4, CD271 ve SSEA4.

c)



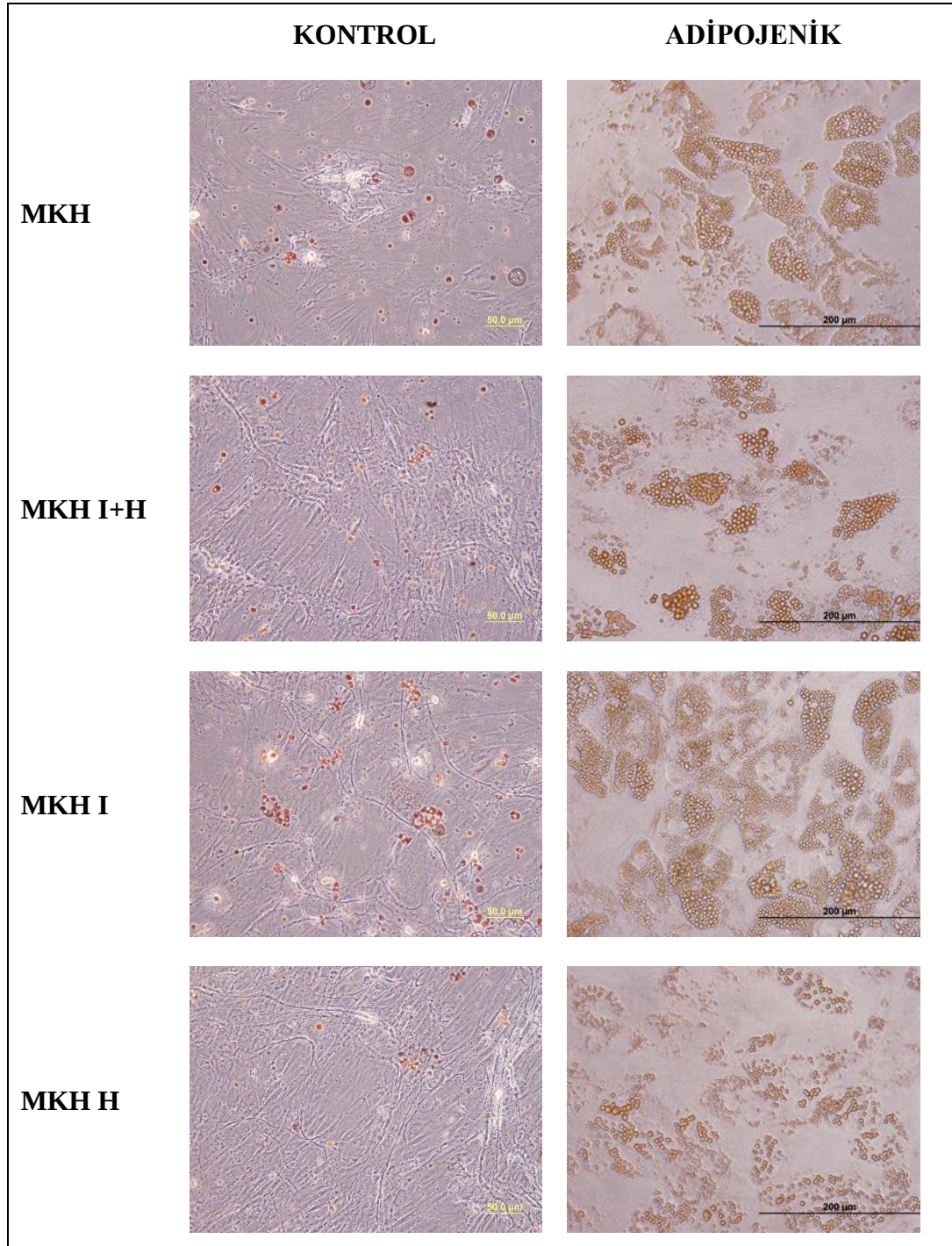
Şekil 4.2.(Devam) MKH ve IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin flow sitometri analizleri. A) MKH pozitif belirteçleri CD44, CD73 ve CD105 B) MKH Negatif Belirteçleri CD34, CD45, HLA-DR ve SSEA-4 C) Tümöröjenite ile ilgili belirteçler CD133, CD200, CXCR4, CD271 ve SSEA4.

Tablo 4.1. MKH, IGF-1, HGF ve IGF-1 ve HGF ile indüklenen MKH'lerin yüzey marker ekspresyonları

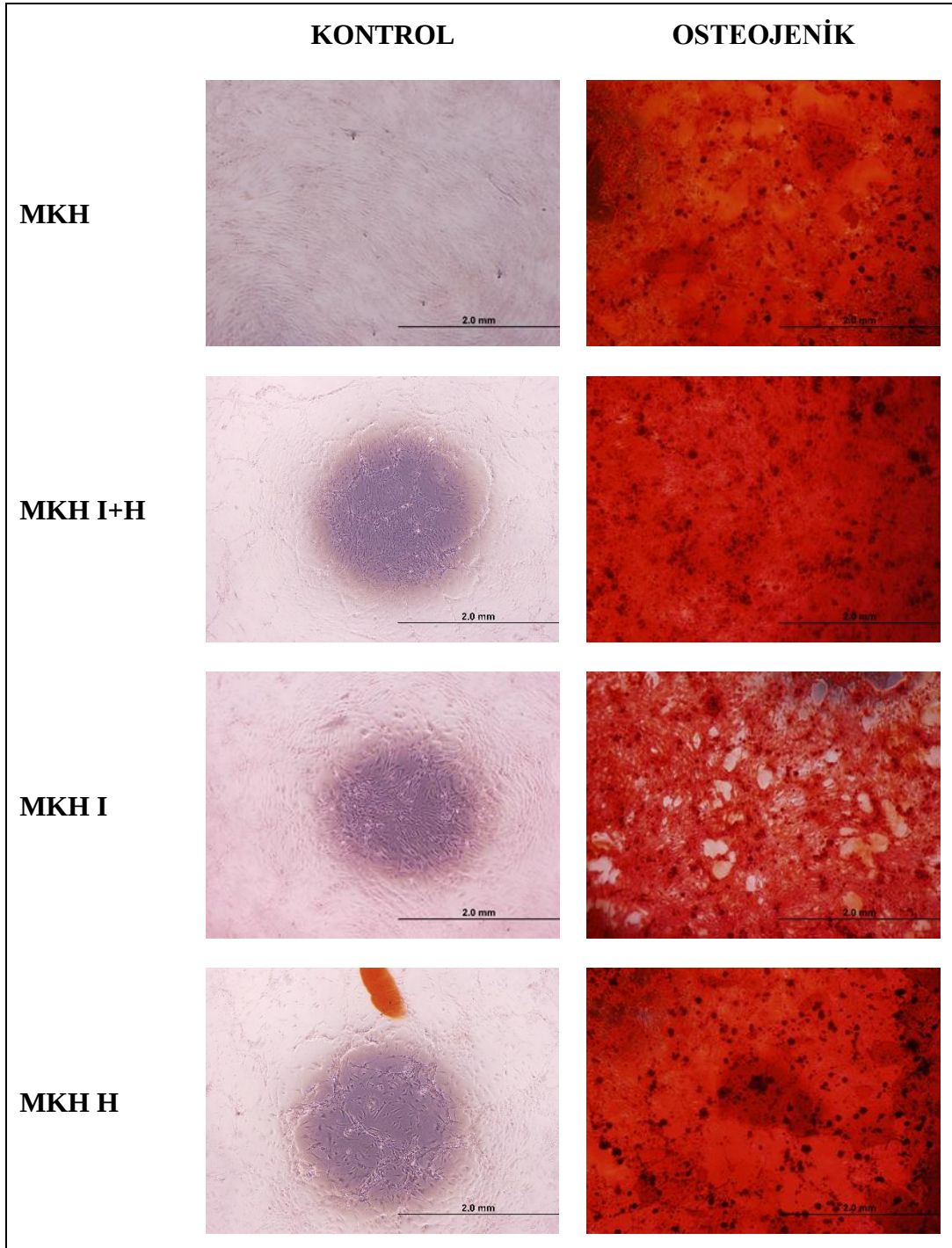
	MKH (%)	MKH IGF-1 (%)	MKH HGF (%)	MKH IGF-1+HGF (%)
CD44	94,1	94,7	96	94,1
CD73	97,5	96,1	96,1	94
CD90	99,2	99	99,1	99,1
CD105	99,5	98,9	99,1	98,7
CD133	0,3	0,4	0,2	0,2
CD200	0,3	0,4	0,5	0,2
CD271	2,5	2,9	5	3,1
SSEA4	3,2	3,5	5,6	3
CD184/CXCR4	1,9	2,5	1,0	1,2
CD34	0,9	1,3	0,5	0,6
CD45	0	0,1	0	0
HLA-DR	24,2	23,7	29,7	25,5

MKH'lerin Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşması

IGF-1+HGF, IGF-1, HGF uygulanan MKH'lerin adipojenik farklılaşma potansiyelini etkileyip etkilemediği incelenmesi sonucunda tüm grupların adipojenik hücre farklılaşmasını gösteren üzüm salkımı şeklinde morfoloji gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.3.). Osteojenik farklılaşma potansiyelini etkileyip etkilemediği incelenmesi sonucunda tüm gruplarda osteojenik farklılaşmanın göstergesi olan kalsiyum depozitleri (siyah renkte noktalar) alizarin red boyası ile pozitif olarak boyandı (Şekil 4.4.). MKH'lerin IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF ile koşullanması hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşabilme kapasitesini etkilememektedir.



Şekil 4.3. MKH gruplarının adipojenik farklılaşmalarının 21. günü görüntüleri. IGF-1+HGF (MKH I+H), IGF-1 (MKH I) ve HGF (MKH H) ile işaretlenen MKH'lerin sol (kontrol) normal besiyerinde büyütülmüş 21. günde Oil Red O boyası ile boyanmış görüntüleri, sağ (adipojenik) adipojenik farklılaşma besiyerinde büyütülmüş ve 21. günde Oil Red O boyası ile boyanmış görüntüleri. Işık mikroskobu (Büyütme 40x)



Şekil 4.4. MKH gruplarının adipojenik farklılaşmalarının 21. günü görüntüleri. IGF-1+HGF (MKH I+H), IGF-1 (MKH I) ve HGF (MKH H) işaretlenen MKH'lerin MKH'lerin sol (kontrol) normal besiyerinde büyütülmüş 21. günde Alizerin Red boyası ile boyanmış görüntüleri, sağ (osteojenik) osteojenik farklılaşma besiyerinde büyütülmüş ve 21. günde Alizerin Red boyası ile boyanmış görüntüleri. Işık mikroskobu (Büyütme 4x).

4.2. MKH'lerin CM-DIL ile İşaretlenmesi ve CM-DIL Sitotoksitesinin İncelenmesi

MKH'ler oluşturulan podosit hasar modeli sonrası sıçanlara uygulamadan önce *CellTracker™* CM-DIL floresan boyası ile işaretlendi ve 2 µg/ml CM-DIL'in (318) hücreler üzerine sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile saptandı (Şekil 4.5.) WST analizine göre CM-DIL ile işaretlenen MKH'ler, işaretlenmeyen kontrol MKH'lere göre ortalama % 9,4 azalmaktadır. İstatiksel analiz (*unpaired t test*) yapıldığında ise kontrol MKH'lerle, CM-DIL işaretli MKH'ler arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

4.3. MKH Hücrelerinin CM-DIL ile İşaretlendikten Sonra *In Vitro* Takibi

Hücreler 2 µg/ml olacak şekilde işaretlendikten sonra boyandığı (Şekil 4.6A.) bir kısım hücre *in vitro* olarak 1 ay süresince takip edildi. 1 ay sonunda hücrelerin boyayı taşımaya devam ettiği görüldü (Şekil 4.6B.).

4.4. Lisanslanan MKH'lerin İleri Karakterizasyonları

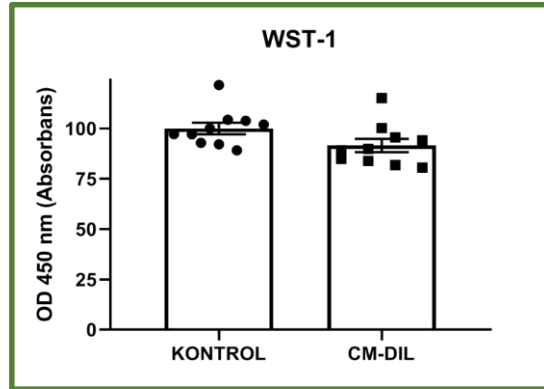
4.4.1. IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF Uygulamasının MKH Yara İyileşmesi Üzerine Etkisinin Gösterilmesi

MKH'ler (Kontrol), tek IGF, tek HGF ve IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin kültür tabağı p200 pipet ucu ile boylu boyunca çizik atılarak yara hasar modeli oluşturuldu ve 12, 18, 24 ve 36 saat sonra alınan resimlerde oluşan yara alanındaki kapanma 5 farklı yerden ölçüm yapılarak ImageJ programı kullanılarak analiz edildi. Lisanslama yapılan tüm MKH gruplarında yara iyileşmesi 12. ve 18. saatlerde lisanslama yapılmayan MKH grubuna göre anlamlı olarak farklılık göstermiştir ve 12. ve 18. Saatlerde anlamlı olarak en hızlı yara iyileşmesi IGF-1 ve HGF ile birlikte lisanslama yapılan grupta görülmüştür (Şekil 4.7., Tablo 4.2.).

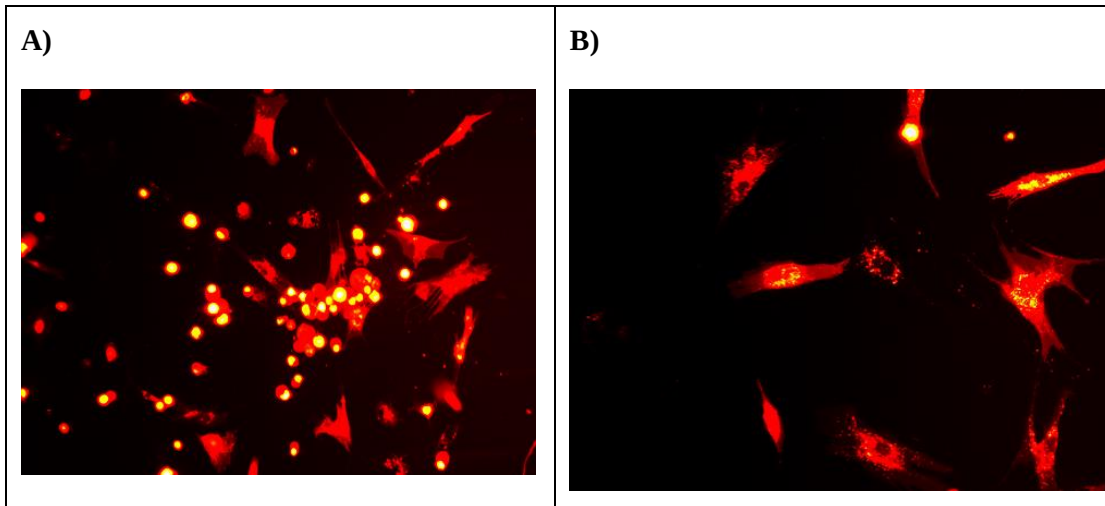
4.4.2. Lisanslanan MKH'lerin (MKH I+H) Metabolomiks Çalışmaları

MKH (Kontrol) ve IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin kültür süpernatantlarının iki farklı zamanda (MKH-1 ve MKH-2) yapılan metabolomiks analizine göre, MKH-1 deneyinde 535 adet metabolit yakalandı. Bunlardan 103 tanesi

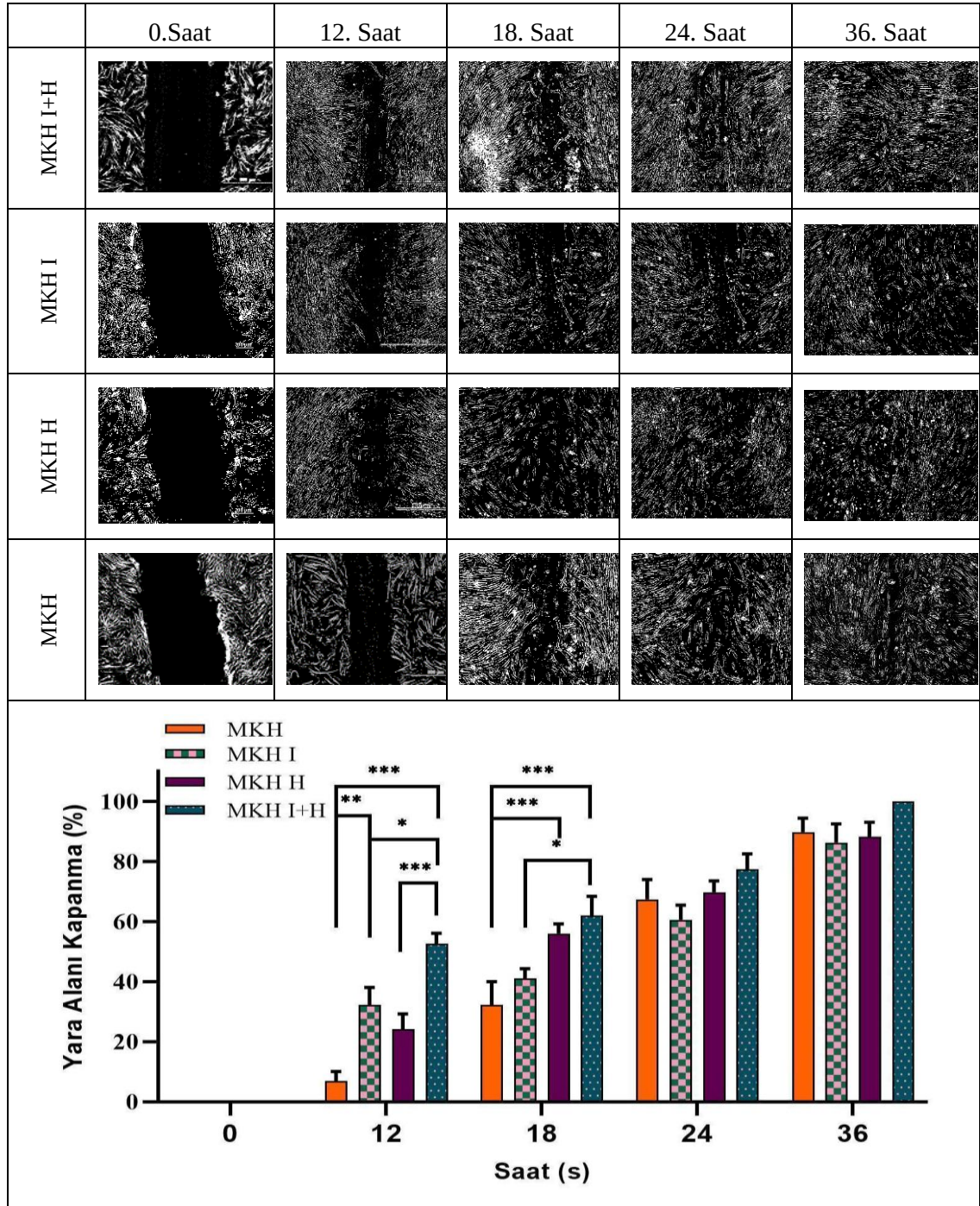
tanımlanmış metabolit, 432 tanesi tanımlanmamış metabolittir. MKH-2 deneyinde metabolomiks analizi sonucu 582 adet metabolit yakalandı. Bunlardan 102 tanesi tanımlanmış metabolit, 480 tanesi tanımlanmamış metabolittir. Tanımlanmış metabolitlerden 62 tanesi iki analizde de ortak çıkmıştır (Şekil 4.8.). İki analizde de ortak çıkan ve ortak olmayan metabolitlerin listesi tabloda belirtilmiştir (Tablo 4.3.).



Şekil 4.5. CM-DIL'in sitotoksitesinin WST-1 analizi ile belirlenmesi. Kontrol (MKH) ve CM-DIL (CM-DIL ile işaretlenmiş MKH) hücrelerinin WST-1 belirteci konulduktan 4 saat sonra *microplate* okuyucuda 450 nm'de alınan rölatif absorbans değerleri.



Şekil 4.6. MKH hücrelerinin CM-DIL ile işaretlenmesi ve kültürde takibi. MKH hücrelerinin CM-DIL ile işaretlendikten ve kültür kabına ekildikten A) 1. gün ve B) 30. gündeki floresan mikroskobu görüntüleri (Büyütme 20x).

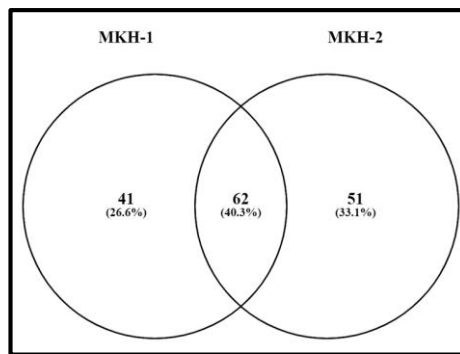


Şekil 4.7. MKH gruplarının 12, 18, 24 ve 36. saat yara iyileşmeleri. IGF-1 (MKH I), HGF (MKH H) ve IGF-1+HGF MKH'lerinin (MKH I+H) 12, 18, 24 ve 36. saatlerdeki kültür tabağındaki yara alanındaki kapanmalarının ışık mikroskopunda çekilen (büyütme 10x) ve ardından image J yazılımında düzenlenen görüntüleri ve bar grafiği.

Tablo 4.2. MKH gruplarının 12, 18, 24 ve 36. saatlerdeki yara kapatma oranları

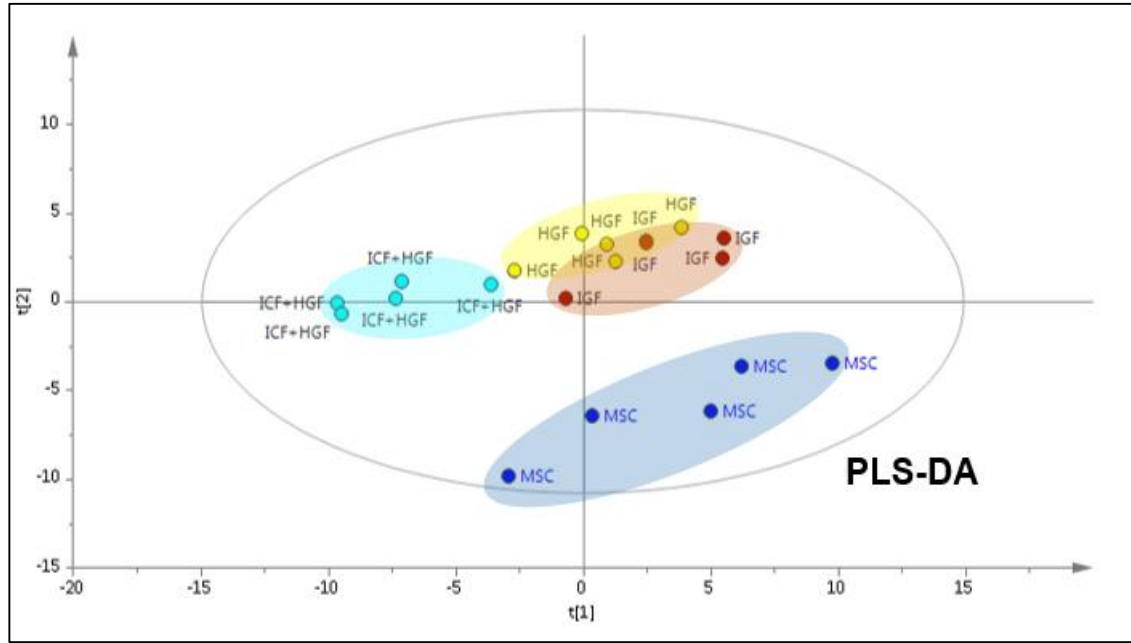
SAATLER GRUPLAR	0 (%)	12 (%)	18 (%)	24 (%)	36 (%)
MKH	0,00	7,04	32,21	67,45	89,83
MKH I	0,00	32,34	41,05	60,65	86,34
MKH H	0,00	24,12	56,04	69,80	88,20
MKH I+H	0,00	52,69	62,06	77,42	100

MKH-1 analizinde ayrıca IGF-1, HGF ile indüklenen MKH'ler, IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin ve kontrol MKH'lerin kültür süpernatantlarının metabolomiks analizi multivaryant data analiz yazılımı (SIMCA®) yapılmıştır. SIMCA'ya göre zorlanmış ayırım (PLS-DA) ile tüm grupların çoklu analizleri oluşturdukları kümelenmeler anlamlı farklı çıkan ($p < 0,05$) metabolitler ile belirlenmiştir (Şekil 4.9.). IGF-1+HGF_MKH'lerin kontrol MKH'lere göre ikili karşılaştırması sonucunda 2-hidroksiestron, maleik asit, gliseraldehit, porfin, mimozin, fenilalanin, metionin, metil sterat, tagatoz, n-asetil-l-glutamik asit, serin, lizin, 6-deoksi-d-glukoz artış gösterirken, picolonik asit, kreatinin, sitrullin, miristik asit, oksalik asit, n-asetil-l-aspartik asit, trans-3-heksenedioik asit, metik-beta-d-galaktopiranozit, tireitol, sükroz, ribonik asit-gama-lakton, 6-deoksi-d-glukoz metabolitleri azalmıştır (Şekil 4.10.).

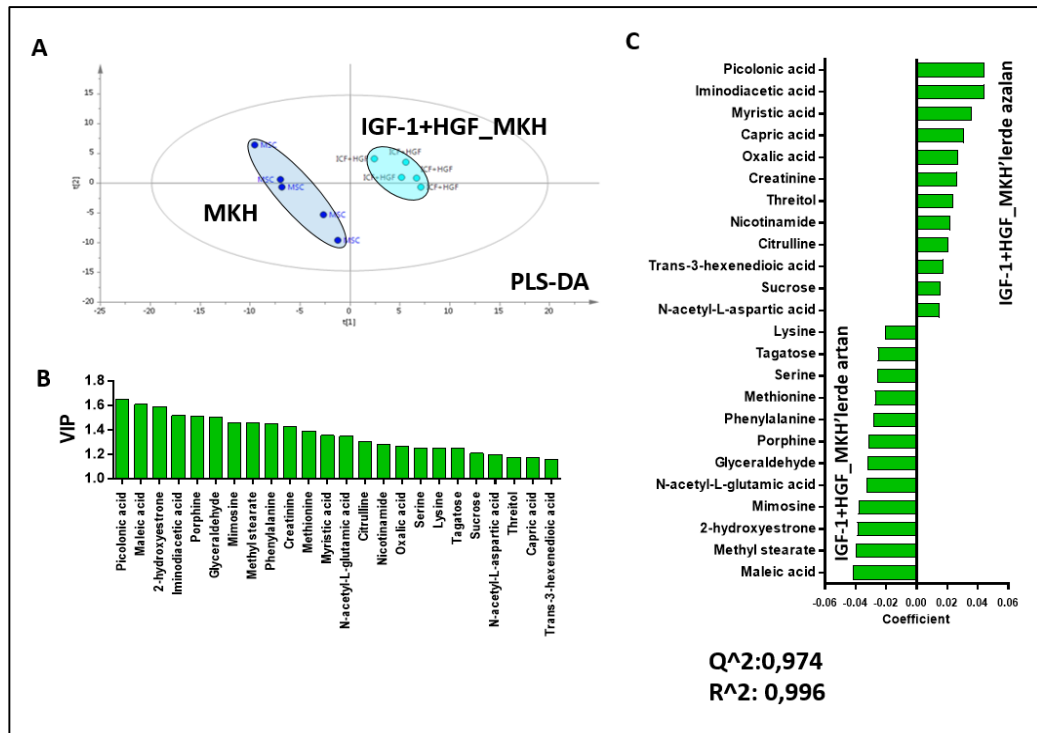
**Şekil 4.8.** MKH-1 ve MKH-2 metabolomiks analizlerinde çıkan tanımlanmış metabolitlerin kesişim kümesi.

Tablo 4.3. MKH-1 ve MKH-2 metabolomiks analizinde çıkan tanımlanmış metabolitlerin listesi

MKH-1	MKH-2	MKH-1+MKH-2
2-amino-1-phenylethanol	1,3-diaminopropane	2-ketoadipic acid
2-hydroxyestrone	10-hydroxydecanoic acid	2-ketoisocaproic acid
2-ketobutyric acid	3-methyl-2-oxobutanoic acid	4-methyl-5-thiazoleethanol
2-keto-L-gulonic acid	5-aminovaleric acid	Alanine
2-phenylacetamide	6-hydroxy caproic acid	Alpha ketoglutaric acid
3-indolelactic acid	Alpha-d-glucosamine	Benzoic acid
6-deoxy-d-glucose	Alpha-d-glucosamine phosphate	Beta- alanine
Acetol	Arabitol	Caprylic acid
Adipic acid	Aspartic acid	Cholesterol
Allose	Behenic acid	Citric acid
Allothreonine	Canavanine	Citrulline
Altrose	Cystine	Creatinine
Arachidic acid	Dehydroascorbic acid	Cysteine
Capric acid	D-glucosaminic acid	Fumaric acid
Citramalic acid	D-glucose	Glucoheptonic acid
Galactose	D-glucose-6-phosphoric acid	Gluconic acid
Glucosamine 1-phosphate	DL-dihydrosphingosine	Glutamic acid
Glucosaminic acid	DL-glyceraldehyde	Glyceric acid
Glucose	DL-isoleucine	Glycine
Glyceraldehyde	D-malic acid	Glycolic acid
Glycerol 1-phosphate	D-mannitol	Heptadecanoic acid
Hydroquinone	D-sorbitol	Homoserine
Iminodiacetic acid	D-sphingosine	Isoleucine
Lauric acid	D-threitol	Lactamide
Lyxose	Fructose	Lactic acid
Maleic acid	Galactinol	Lactose
Malic acid	Galacturonic acid	Lactulose
Mannitol	Glutamine	Leucine
Mannose	Histidine	Lysine
N-acetyl-L-glutamic acid	Isomaltose	Melibiose
Palatinose	Isopropyl beta-d-1-thiogalactopyranoside	Methionine
Palmitoleic acid	L- sorbose	Methyl stearate
Phenylpyruvate	Lactobionic acid	Methyl-beta-d-galactopyranoside
Picolonic acid	Linoleic acid	Mimosine
Shikimic acid	Malonamide	Myo-inositol
Squalene	Malonic acid	Myristic acid
Sucrose	Methyl eicosanoate	N-acetyl-L-aspartic acid
Threitol	Methyl myristate	Nicotinamide
Threo-beta-hydroxyaspartic acid	Methyl oleate	Oleic acid
Threose	Methyl palmitate	Oxalacetic acid
Trans-3-hexenedioic acid	N-acetyl-L-cysteine	Oxalic acid
	Neohesperidin	Palmitic acid
	Norvaline	Pantothenic acid
	Ornithine	Phenylalanine
	Phloroglucinol	Phenyl-beta-glucopyranoside
	Pyridoxine	Porphine
	Sedoheptulose	Pyroglutamic acid
	Thymidine	Pyruvic acid
	Tryptophan	Ribitol
	Tryptophane	Ribonic acid-gamma-lactone
	Uric acid	Serine
		Stearic acid
		Succinic acid
		Tagatose
		Talose
		Threonine
		Tyrosine
		Uracil
		Urea
		Valine
		Xanthine
		Xylitol

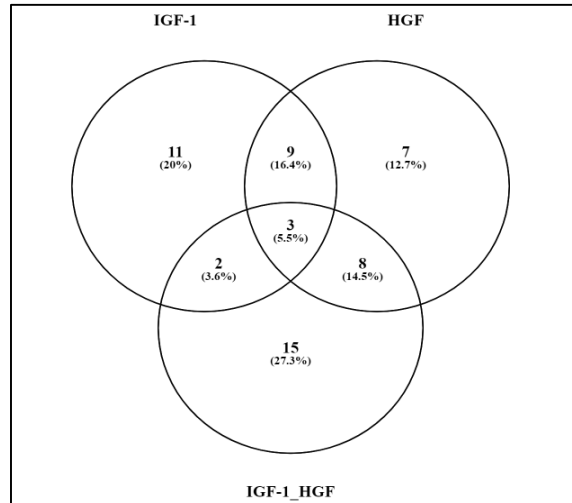


Şekil 4.9. MKH'lerin SIMCA analizine göre zorlanmış ayrımı (PLS-DA). MKH (MSC) ve IGF-1 (IGF) , HGF ve IGF-1+HGF (ICF+HGF) ile indüklenen MKH'lerin SIMCA analizine göre zorlanmış ayrımı (PLS-DA).

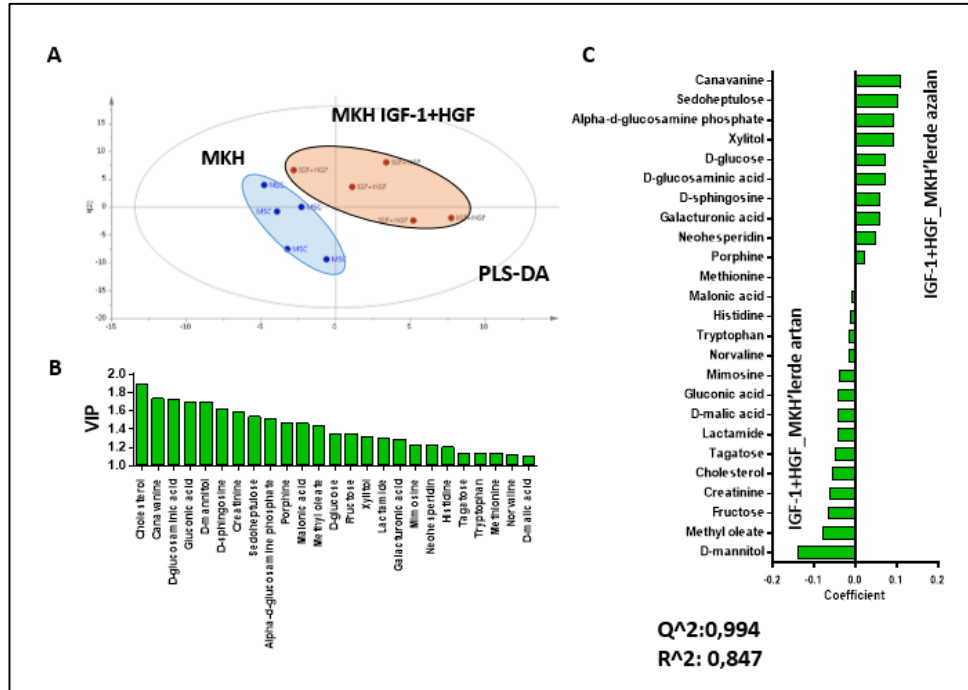


Şekil 4.10. MKH-1 deneyinde IGF1+HGF MKH'lerin Kontrol MKH'ye göre farklı çıkan metabolitleri. a) metabolitlerin skor plotlarının ayrım analizi (PLS-DA) ve b) bunlara karşılık gelen en önemli değişkenler (VIP). c) azalan ve artan metabolit grafiği. R²: Median uygunluk değeri Q²: iki grubun tahmin etme gücü.

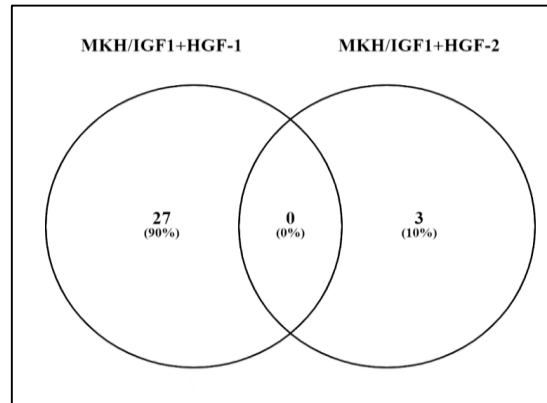
Daha sonra IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin tek başına IGF-1 ve HGF ile indüklenen MKH metabolitlerinden farklı olan metabolitleri belirlenmiştir (Şekil 4.11.). Ortak olan 3 metabolit Iminodiasetik asit, Pikolonik asit (artış gösteren), Metil stearat (azalış gösteren) metabolitleridir. MKH-2 analizinde sadece IGF-1+HGF_MKH'ler ve kontrol MKH'ler karşılaştırılmıştır. IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin ve kontrol MKH'lerin kültür süpernatanlarının SIMCA'ya göre zorlanmış ayrımı (PLS-DA) yapılmış ve anlamlı çıkan metabolitlerden ($p < 0,05$) Bu metabolitlerden IGF-1+HGF'lerde kolesterol (ort: MKH I+H =1,06; MKH=0,87 ($p=0,019$)) ve Glukonik Asit (ort: MKH I+H=1,23; MKH=1,06 ($p=1,23$)), MKH'lere göre artmakta, D-glukozaminik asit ise (ort: MKH I+H=0,68; MKH=1,00 ($p=0,68$)), azalmaktadır. (Şekil 4.12.). İki ayrı analizde anlamlı çıkan metabolitlerin listesi tabloda verilmiştir (Tablo 4.4.). MKH-1 ve MKH-2 metabolitleri kıyaslandığında, MKH-I+H'lerde kontrol MKH'lere göre anlamlı düzeyde çıkan metabolitler arasında ortak metabolitler çıkmamıştır (Tablo 4.4., Şekil 4.13.). Metabolik yolak analizine bakıldığında MKH-1 analizinden 2-Hidroksiesteron ile MKH-2 analizinden kolesterolün ortak olduğu "steroid hormon metabolizması" yolağı bir tek iki analizde ortak olarak belirlenmiştir (Tablo 4.5.).



Şekil 4.11. IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF ile kombine indüklenen MKH'lerin kontrol MKH'lere göre anlamlı olarak farklı çıkan metabolitlerinin Venn diagramında gösterilmesi.



Şekil 4.12. MKH-2 deneyinde IGF1+HGF MKH'lerin Kontrol MKH'ye göre farklı çıkan metabolitleri. a) metabolitlerin skor plotlarının ayırım analizi (PLS-DA) ve b) bunlara karşılık gelen en önemli değişkenler (VIP). c) azalan ve artan metabolit grafiği. R²: Median uygunluk değeri Q²: iki grubun tahmin etme gücü; VIP: en önemli değişkenler.



Şekil 4.13. IGF-1+HGF_MKH'lerin Kontrol MKH'lere göre deneylerde farklı çıkan metabolitlerinin Venny diagramı. IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin indüksiyon yapılmamış MKH'lere (MKH) göre 1. Deneyde (MKH/IGF-1+HGF-1) ve 2. Deneyde (MKH/IGF-1+HGF-2) analiz edilen ve anlamlı çıkan metabolitlerinin karşılaştırmalı venny diyagramında gösterilmesi.

Tablo 4.4. MKH-1 ve MKH-2 deneylerinde IGF-1+HGF’lerle indüklenen MKH’lerin, kontrol MKH’lere (indüklenmemiş) göre anlamlı olarak belirlenen metabolitlerin listesi

MKH/IGF-1+HGF_MKH (1)	MKH/IGF-1+HGF_MKH (2)
2-hydroxyestrone 6-deoxy-d-glucose Capric acid Citrulline Creatinine Glyceraldehyde Iminodiacetic acid Lysine Maleic acid Methionine Methyl stearate Methyl-beta-d-galactopyranoside Mimosine Myristic acid N-acetyl-L-aspartic acid N-acetyl-L-glutamic acid Nicotinamide Oxalic acid Phenylalanine Picolonic acid Porphine Ribonic acid-gamma-lactone Serine Sucrose Tagatose Threitol Trans-3-hexenedioic acid	Cholesterol D-glucosaminic acid Gluconic acid

Tablo 4.5. MKH-1 ve MKH-2 analizinde MKH I+H’lerin MKH’lere göre anlamlı farklı çıkan metabolitlerinin ilgili yolları.

Pathway Name	Match Status	p	-log(p)	Holm p	FDR	Impact	Details
Arginine biosynthesis	2/14	0.021761	1.6623	1.0	1.0	0.22843	KEGG
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	3/48	0.04397	1.3568	1.0	1.0	0.0	KEGG
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1/4	0.065489	1.1838	1.0	1.0	0.5	KEGG SMP
Biotin metabolism	1/10	0.15605	0.80674	1.0	1.0	0.0	KEGG SMP
Phenylalanine metabolism	1/10	0.15605	0.80674	1.0	1.0	0.35714	KEGG SMP
Fatty acid biosynthesis	2/47	0.18507	0.73266	1.0	1.0	0.0	KEGG SMP
Nicotinate and nicotinamide metabolism	1/15	0.22501	0.64779	1.0	1.0	0.1943	KEGG SMP
Starch and sucrose metabolism	1/18	0.26376	0.5788	1.0	1.0	0.05023	KEGG SMP
Pentose phosphate pathway	1/22	0.31252	0.50512	1.0	1.0	0.04712	KEGG SMP
Lysine degradation	1/25	0.34705	0.45961	1.0	1.0	0.0	KEGG SMP
Galactose metabolism	1/27	0.36913	0.43282	1.0	1.0	0.03888	KEGG SMP
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	1/28	0.3799	0.42033	1.0	1.0	0.08654	KEGG SMP SME
Steroid hormone biosynthesis	2/85	0.42225	0.37443	1.0	1.0	0.0156	KEGG SMP
Cysteine and methionine metabolism	1/33	0.43115	0.36537	1.0	1.0	0.10446	KEGG SMP SME
Steroid biosynthesis	1/42	0.51332	0.28961	1.0	1.0	0.0282	KEGG
Primary bile acid biosynthesis	1/46	0.54606	0.26276	1.0	1.0	0.05065	KEGG SMP

1. Arginine biosynthesis: **L-Citrulline; N-Acetyl-L-glutamate**

2. Aminoacyl-tRNA biosynthesis: **L-Phenylalanine; L-Methionine; L-Lysine**

3. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis: **L-Phenylalanine**

4. Biotin metabolism: **L-Lysine**

5. Phenylalanine metabolism: **L-Phenylalanine**

6. Fatty acid biosynthesis: **Tetradecanoic acid; Decanoic acid;**

7. Nicotinate and nicotinamide metabolism: **Nicotinamide**

8. Starch and sucrose metabolism: **Sucrose**
9. Pentose phosphate pathway" **D-Gluconic acid**

10. Lysine degradation: **L-Lysine**

11. Galactose metabolism: **Sucrose**

12. Alanine, aspartate and glutamate metabolism: **N-Acetyl-L-aspartate**

13. Steroid hormone biosynthesis: **Cholesterol; 2-Hydroxyestrone**

14. Cysteine and methionine metabolism: **L-Methionine**

15. Steroid biosynthesis: **Cholesterol**

16. Primary bile acid biosynthesis: **Cholesterol**

MKH ve IGF-1+HGF ile Lisanslanmış MKH'lerin Sitokin Düzeyleri

MKH, IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF_MKH'lerin salgıladıkları protein düzeylerini belirlemek için kültür süpernatantları toplanarak membran bazlı antikorlar içeren sitokin analizi gerçekleştirildi. Sitokin Array 80 farklı sitokin ve büyüme faktörünü tespit etmektedir (Şekil 4.14.). Her spot için net görünür intensite seviyesi, arka plan çıkarıldıktan sonra pozitif kontrollerin ortalamasına göre normalizasyon yapılarak belirlendi. IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF ile lisanslanmış MKH spotları, lisanslanmamış MKH'lerin karşılık gelen spotları ile karşılaştırıldı ve arkaplanı çıkartılmış MKH'lere göre normalize edildi. İfade değerleri >80 spot intensite (si) dikkate alınacak sitokinler için bir eşik belirlemek üzere analiz edilebildi. Membran üzerinde düşük intensitesi tespit edilen ve düşük ifadesi gözlenen sitokin ve büyüme faktörlerinin renk ile yüksek ifadesi gözlenenler ise ile ısı haritası/*heatmap* üzerinde gösterildi (şekil 4.15.). Tamamen *background*/arkaplanın çıkarıldığı MKH, IGF-1, HGF, değerler ise grafik üzerinde gösterildi. IGF-1+HGF ile tekrar edilen çalışmanın MKH'ye göre karşılaştırmalı analizi de *heatmap* üzerinde gösterildi (Şekil 4.16.).

Arka planın tamamen çıkarıldığı analiz sonuçlarına göre, sitokinler arasında, IGF-1+HGF-MKH'lerde kontrol MKH, IGF-1 VE HGF_MKH'lere göre IL-6 en yüksek artışı gösterirken, Angiogenin, BDNF ve IGFBP2'de artmaktadır. IGF-1+HGF ile kombine indüklenen MKH'lerde tek başına IGF-1 ve HGF ile indüklenen MKH'lere göre MCP-1, SDF-1 α , TIMP1 lisanslanmayan MKH'lere yakın ifade göstermektedir. IGF-1 ifadesi ise sadece IGF-1 ve IGF-1+HGF ile indüklenen grupta gözlenmektedir. Normalize intensitelerin (sitokin/pozitif kontrol) kat değişimlerini gösteren relatif çubuk grafiği Şekil 4.14b'de gösterilmektedir. Eşik değer sinyalinin azaltıldığı (zorlanmış analiz) analize göre IGF-1+HGF_MKH'ler MKH, MKH I ve MKH H gruplarıyla karşılaştırıldığında GRO-alfa, IL-8, M-CSF, MDC, MCP-3, MIG, MIP-1-Beta, SCF, TNF-alfa, TNF-beta, (≤ 1.5 kat) ifadeleri artmakta ve IL-16 (≥ 20 kat) ifadesi ise azalmaktadır (şekil 4.15.).

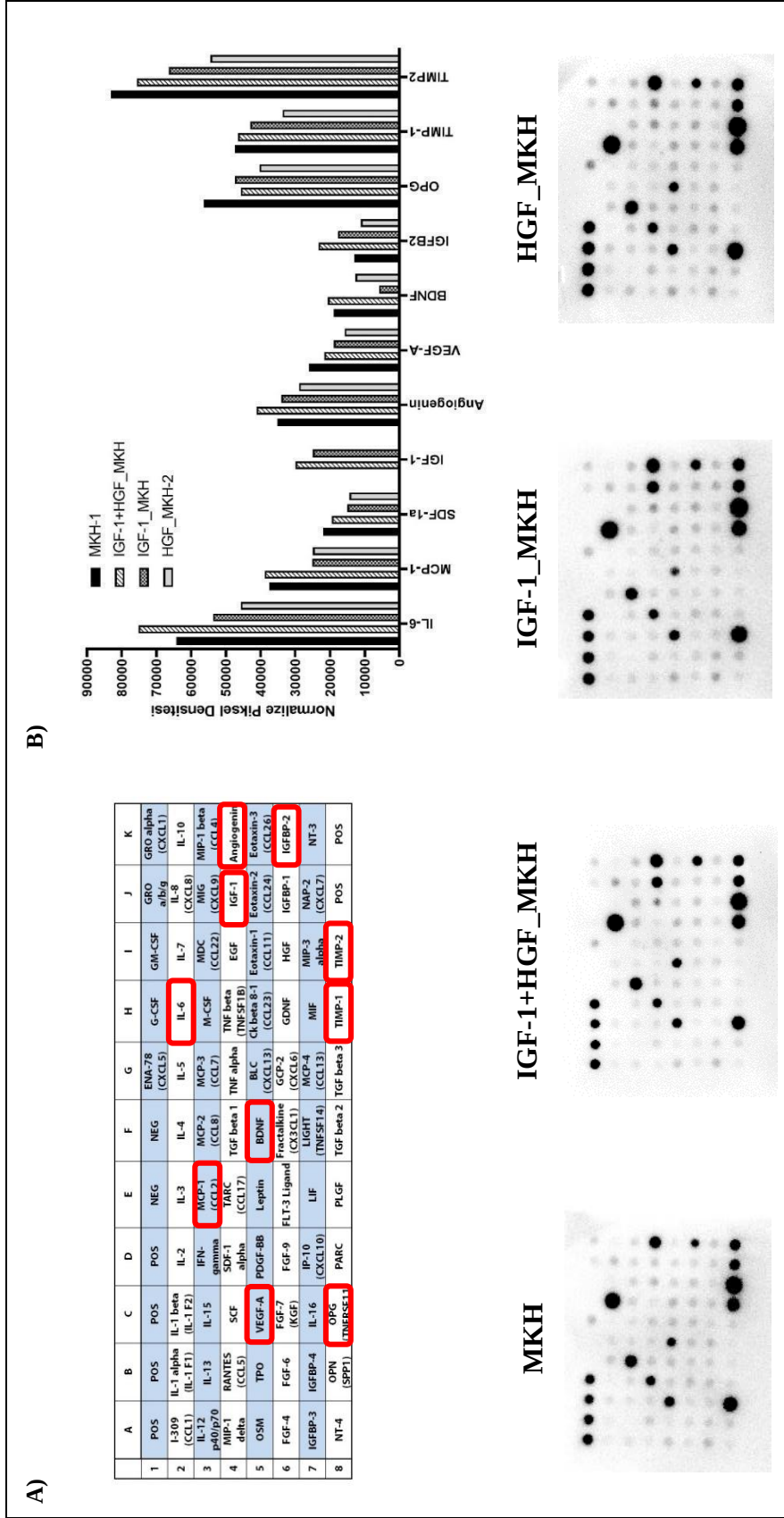
MKH ve IGF-1+HGF_MKH'lerle iki defa sitokin analizi gerçekleştirilmiş olup iki deneyin de sonuçlarının zorlanmış analizinin karşılaştırılması ısı haritası olarak gösterilmiştir. İki analizde de örüntü benzer olup, zorlanmış analizde IGF-1+HGF_MKH'lerde MKH'lere göre Leptin, MIF ve Osteopontin ifadesi azalmakta,

HGF ve NAP2 ifadesi artmaktadır (Şekil 4.16.). MKH (1) ve IGF-1+HGF_MKH'lerde membran arkaplanı çok kirli olduğu için analizlerin yapılması zor olmuştur. Karşılaştırma açısından örüntüler benzer olmasına rağmen düşük ifadeli proteinler için net bir analiz yapılmasını güçleşmiştir.

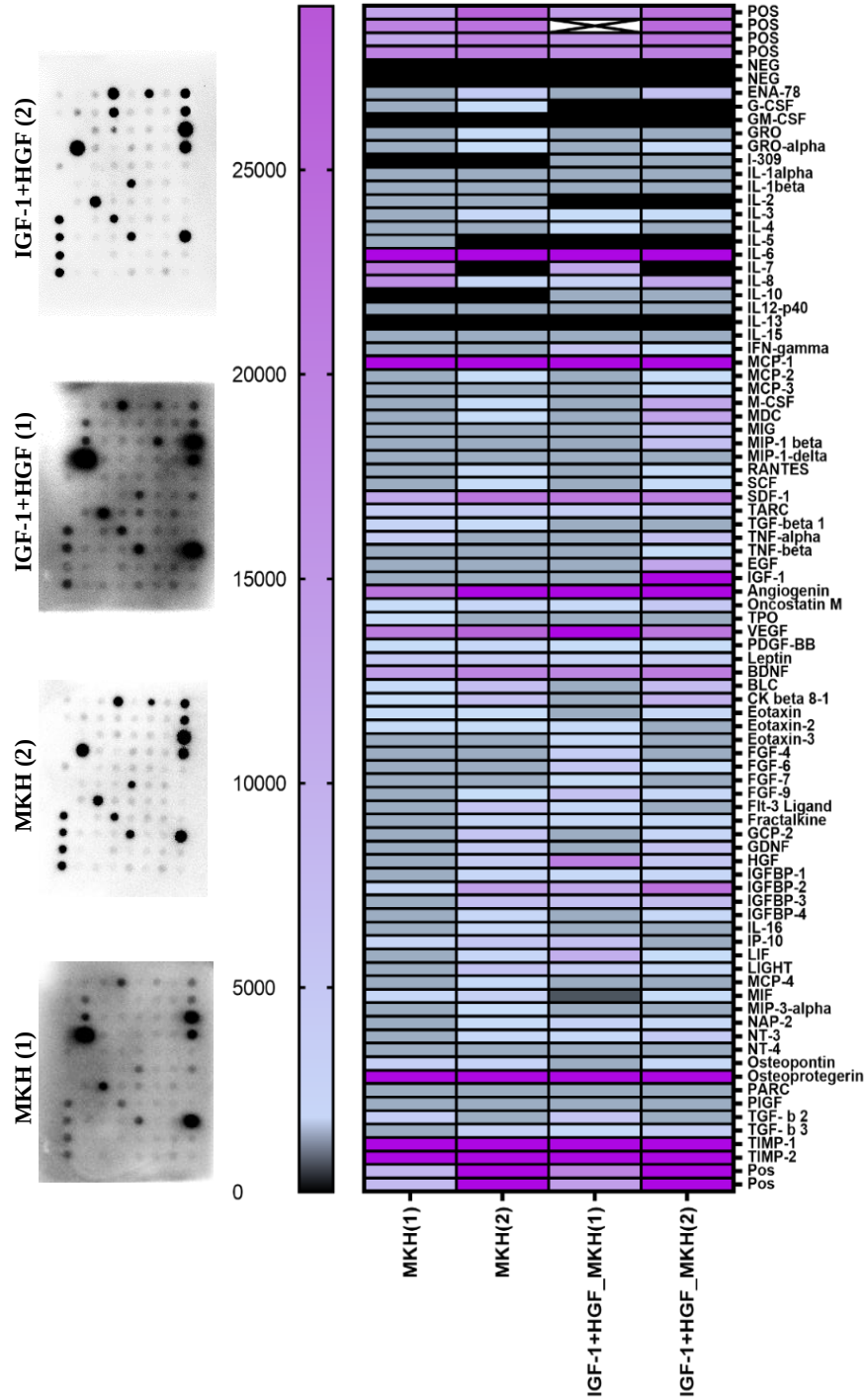
MKH (Kontrol), MKH I, MKH H, MKH I+H kültür süpernatantlarından ayrıca Boncuk-Bazlı İmmunoassay Analizi ile yardımcı T hücre (*T helper/Th*) paneli olan IL-2, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IFN- γ , TNF- α , IL-17A, IL-17F, IL-4, IL-21, IL-22 sitokin düzeylerine bakılmıştır ve flow sitometre ile analiz edilen konsantrasyonları belirtilmiştir (Tablo 4.6.). Th paneli hücrelerin çeşitli hastalık proseslerinde immün cevabı anlamak için önemli bir paneldir. IGF-1+HGF'lerde IL-6 hem membran bazlı sitokin panelinde (MKH I+H: 75097si, MKH: 64260si, MKH I: 53629si, MKH H: 45720si) hem de boncuk-bazlı Th panelinde (MKH I+H: 6598,3 pg/ml, MKH: 6356,3 pg/ml, MKH I: 3253 pg/ml, MKH H: 3205,8 pg/ml) diğer gruplara göre yüksek çıkmıştır, kontrol MKH'lere ise ifadesi yakın düzeydedir (Şekil 4.15. ve 4.17.). IL-6, MKH I+H'lerin proliferasyonu artırmakta, apoptoza karşı korumakta, farklılaşmamış düzeyde kalmasında ve yara iyileşmesine katkısında önemli bir rol oynuyor olabilir (330).

4.4.3. Lisanslamanın MKH Üzerindeki Sitokin Düzeylerinin RNA Düzeyinde Belirlenmesi

IGF-1, HGF ve IGF1_HGF MKH'lerin etkisinin mekanizmasını belirlemek amacıyla Prof. Dr. Güneş Esendağlı'dan alınan *IL-10*, *TGF- β* , *NOS2*, *IDO-1* ve elimizde mevcut olan *FOXP3* gen ifadelerine bakılmıştır. Gen ifadeleri β -actin gen ifadesine göre normalize edilmiştir. Belirlenen koşullarda *IL-10*, ve *NOS2* primerleri çalışmamış, optimizasyon sonrası da veri alınamamıştır. *IDO1*, *TGF- β* ve *B-Actin* ile çalışılmıştır. Buna göre, *IDO-1* ifadesi IGF1+HGF ile indüklenen MKH'lerde (IGF-1, HGF ve MKH gruplarına göre yaklaşık ~4 kat (ort= MKH I+H: 3,68; MKH-I: 0,83; MKH H: 0,94)), *TGF-B* 1,6 kat (ort=MKH I+H: 1,61; MKH-I: 1,16; MKH H: 1,05) artmıştır (Şekil 4.18.). *FoxP3* mRNA ifadeleri gruplar arasında düşük olarak bulunmuş (>40 CT değeri) 4 grup karşılaştırıldığında ise en yüksek ifadenin IGF-1 ile indüklenen MKH'lerde izlendiği görülmüştür (ort=MKH I+H: 1,33; MKH I: 7,71; MKH H: 7,71).



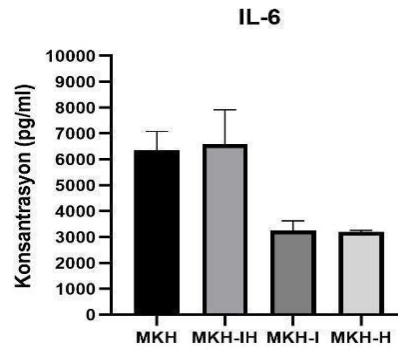
Şekil 4.14. MKH gruplarının sitokin analizleri. Standart MKH besiyeri/MKH ve IGF-1 (IGF-1_MKH), HGF (HGF-1_MKH), IGF-1+HGF içeren MKH (IGF-1+HGF-MKH) besiyerinde çoğaltılan sitokin array sonuçları. A) IGF-1+HGF-MKH’lerde ifadesi gösterilen sitokinler kırmızı çerçeve içerisinde alınarak işaretlendi. B) MKH ve HGF-MKH’lerin normalize intensitelerinin kat değişimlerini gösteren bar grafik.



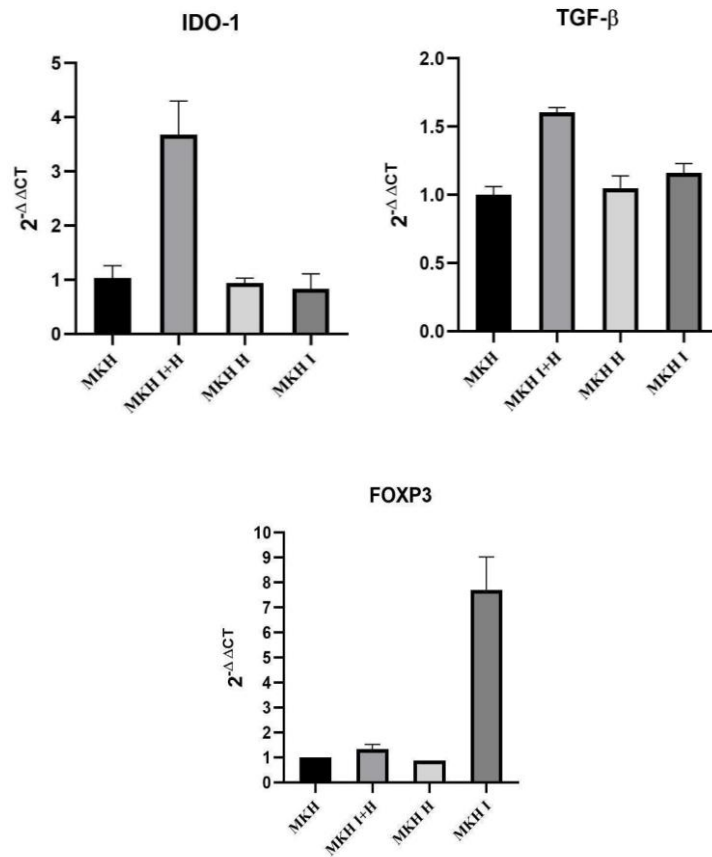
Şekil 4.16. Isı haritası MKH (1), MKH (2), IGF-1+HGF_MKH (1) ve IGF-1+HGF_MKH (2) Sitokin/kemokin analizinin membran görüntüleri ve ısı haritası görselleştirmesi.

Tablo 4.6. MKH (Kontrol), MKH-I, MKH-H, MKH-I+H'nin salgıladığı sitokinlerin konsantrasyon değerleri

Örnek	Dilasyon	IL5	IL13	IL2	IL6	IL9	IL10	IFNg	TNFa	IL17A	IL17F	IL4	IL21	IL22
		pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
MKH	1	<0.71	<0.65	0,97	7088,13	1,47	0,84	<1.33	<0.73	<1.00	<0.88	1,15	<1.51	1,02
MKH	1	<0.71	<0.65	0,69	5624,47	<1.38	0,9	<1.33	<0.73	<1.00	<0.88	<1.10	<1.51	<1.01
MKH-I+H	1	3,75	0,75	2,02	5272,08	2,28	2,38	6,53	3,58	1,07	2,18	5,01	<1.51	1,81
MKH-I+H	1	<0.71	<0.65	<0.66	7924,54	<1.38	<0.78	<1.33	<0.73	<1.00	<0.88	<1.10	<1.51	<1.01
MKH-I	1	<0.71	<0.65	0,79	3631,05	<1.38	1,16	1,76	<0.73	<1.00	1,48	3,18	<1.51	1,35
MKH-I	1	0,86	<0.65	1,47	2874,96	1,78	1,41	3,29	1,83	1,08	1,57	3,60	<1.51	1,24
MKH-H	1	1,82	<0.65	2,06	3147,15	<1.38	1,52	1,61	1,83	1,04	1,01	3,92	<1.51	1,71
MKH-H	1	<0.71	<0.65	<0.66	3264,46	<1.38	<0.78	<1.33	<0.73	<1.00	<0.88	<1.10	<1.51	<1.01
BOŞ MEDIUM	1	<0.71	<0.65	<0.66	<0.42	<1.38	<0.78	<1.33	<0.73	<1.00	<0.88	<1.10	<1.51	<1.01
BOŞ MEDIUM	1	<0.71	<0.65	<0.66	<0.42	<1.38	<0.78	<1.33	<0.73	<1.00	<0.88	1,30	<1.51	<1.01



Şekil 4.17. MKH, MKH-IH, MKH-I ve MKH-H süpernatantlarının “LEGENDplex™-Multi-Analyte Flow Assay Kit” profili ile akış sitometrisinde analiz edilen IL-6 konsantrasyonları.



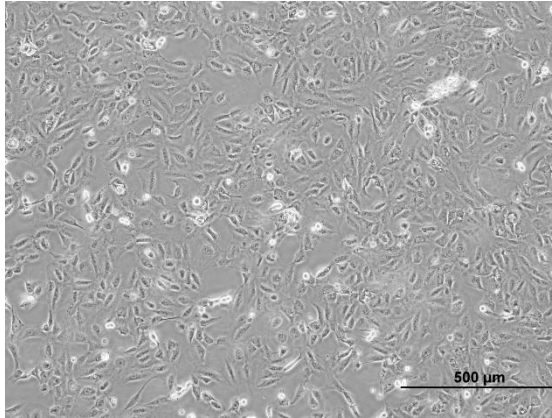
Şekil 4.18. MKH gruplarının qRT-PCR analizleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri). Kontrol MKH, IGF-1, HGF ve IGF-1+HGF. MKH’ler kültür besiyerinde IGF-1+HGF ile (I (20ng/ml) + H (10ng/ml)), tek başına IGF-1 ile (I) 24 saat veya HGF (H) ile 6 saat boyunca indüklendikten sonra toplanarak IDO-1, TGF- β ve FOXP3 mRNA ifadeleri verisi B-göre normalize edildikten sonra indüklenmemiş kontrol MKH’lere (MKH) göre göreceli/relatif ifadesi alınmıştır. Tek çalışmanın (n=1) teknik tekrarı ile standart sapmalar hesaplanmıştır.

4.5. *In vitro* Podosit Hasarı Üzerinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH'lerin Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH'ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi

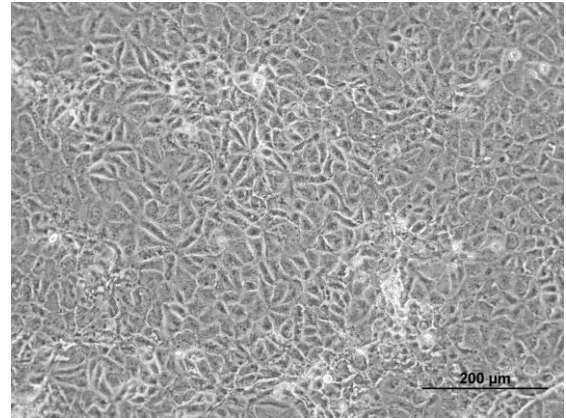
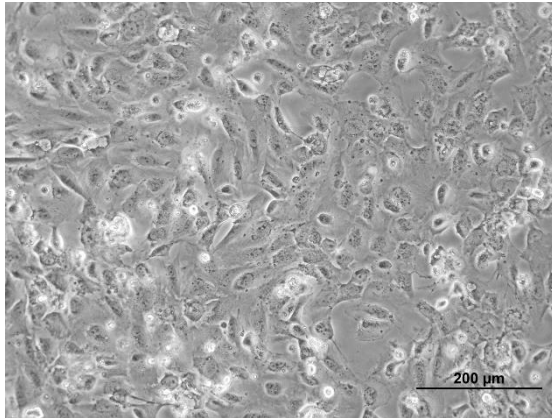
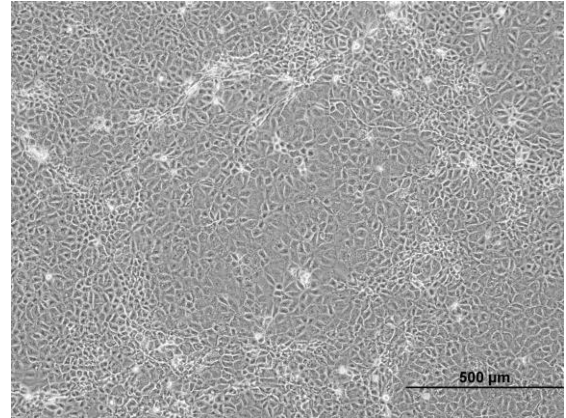
4.5.1. Podosit Hücre Kültürü

Podosit hücrelerinin çoğaltılma/proliferasyonu 33°C'de, farklılaşması ise 37°C'de sıcaklıkta inkübe edilmesi gerekmektedir. 33°C'deki farklılaşmamış hücreler küçük ve çakıl taşı/*cobblestone* benzeri bir morfoloji gösterirken, 37°C'deki 12-14 gün sonunda farklılaşmış podosit hücrelerinin geniş çekirdek ve hücre gövdesine sahip, sitoplazma hacmi büyük, dallanmış hücreler olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.19.).

Farklılaşmamış Podosit



Farklılaşmış Podosit



Şekil 4.19. Kültürdeki farklılaşmış ve farklılaşmamış podosit hücrelerinin morfolojik olarak görüntülenmesi. Farklılaşmamış hücreler küçük boyutludur ve çakıl taşı benzeri bir morfoloji gösterirken, farklılaşmış hücreler geniş çekirdekli, hacimli sitoplazmalı ve dallanma süreçleri olan genişlemiş hücre gövdelerine sahiptir. 10x ve 20x büyütme. Işık mikroskobu görüntüleri, ölçek çubukları: 500 µm ve 200 µm.

4.5.2. Podosit Hasarı Oluşturulması

Podosit hücre hasar ve ko-kültür çalışmaları 33°C’de %50-60 kültür kabını kapladıktan (3-5 gün) ve ardından 37°C inkübatöre alınarak 14. Gün sonrasında farklılaşmasını tamamlamasının ardından yapıldı. 14 gün sonunda hücre besiyeri içerisine, hücre aktin hücre iskeleti yapısını bozan Puromisin aminonükleozid (PAN) kimyasalı eklendi. PAN dozunu belirlemek için hücrelere 50 ve 100 µg/ml PAN eklenerek 48 saat sonunda WST-1 ile hücreye canlılığı ölçüldü. Aktin-hücre iskeletini görüntülemek için hücreler Phalloidin antikoru ile işaretlenerek floresan mikroskopunda görüntüleri alınarak analiz edildi.

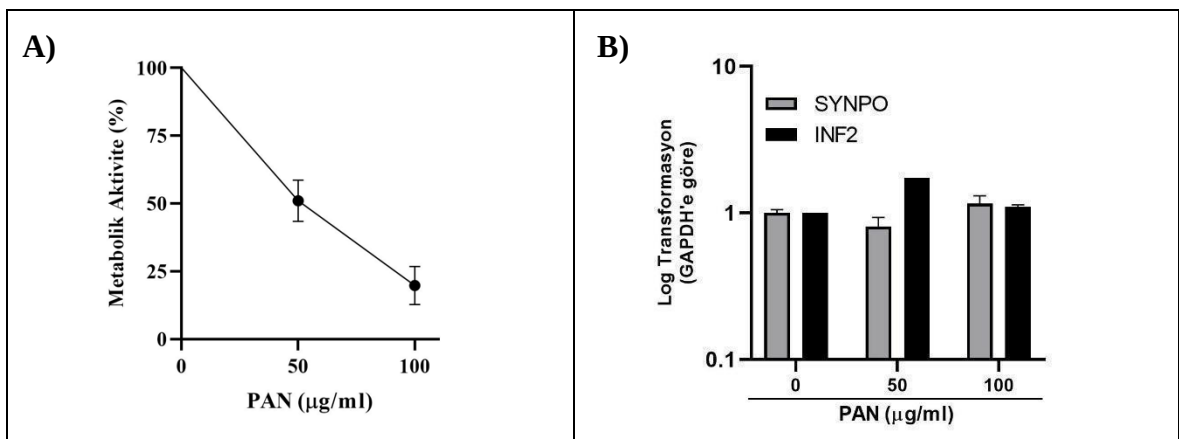
WST-1 okumasına göre, 50 µg/ml PAN ile hücre metabolik aktivitesi ~%63 iken ve 100 µg/ml PAN ~%22 olarak belirlendi (Şekil 4.20a.). Hem 50 hem 100 µg/ml PAN uygulanan podosit hücrelerinin morfolojileri PAN uygulanmayan kontrol podoite göre karşılaştırıldığında, hücre gövdelerinin yassılaştığı ve aktin hücre iskeleti yapısı düzenliliğin bozulduğu ve hücre boyutlarının küçüldüğü görüldü (Şekil 4.20C.).Literatürde de sitotoksik doz olduğu gösterilen (331, 332) ve bizim çalışmamızda da ~%37 oranında hücrede metabolik aktivitenin azaldığını gösteren 50 ug/ml PAN dozu ile ileri deneylere devam edilmesine karar verildi.

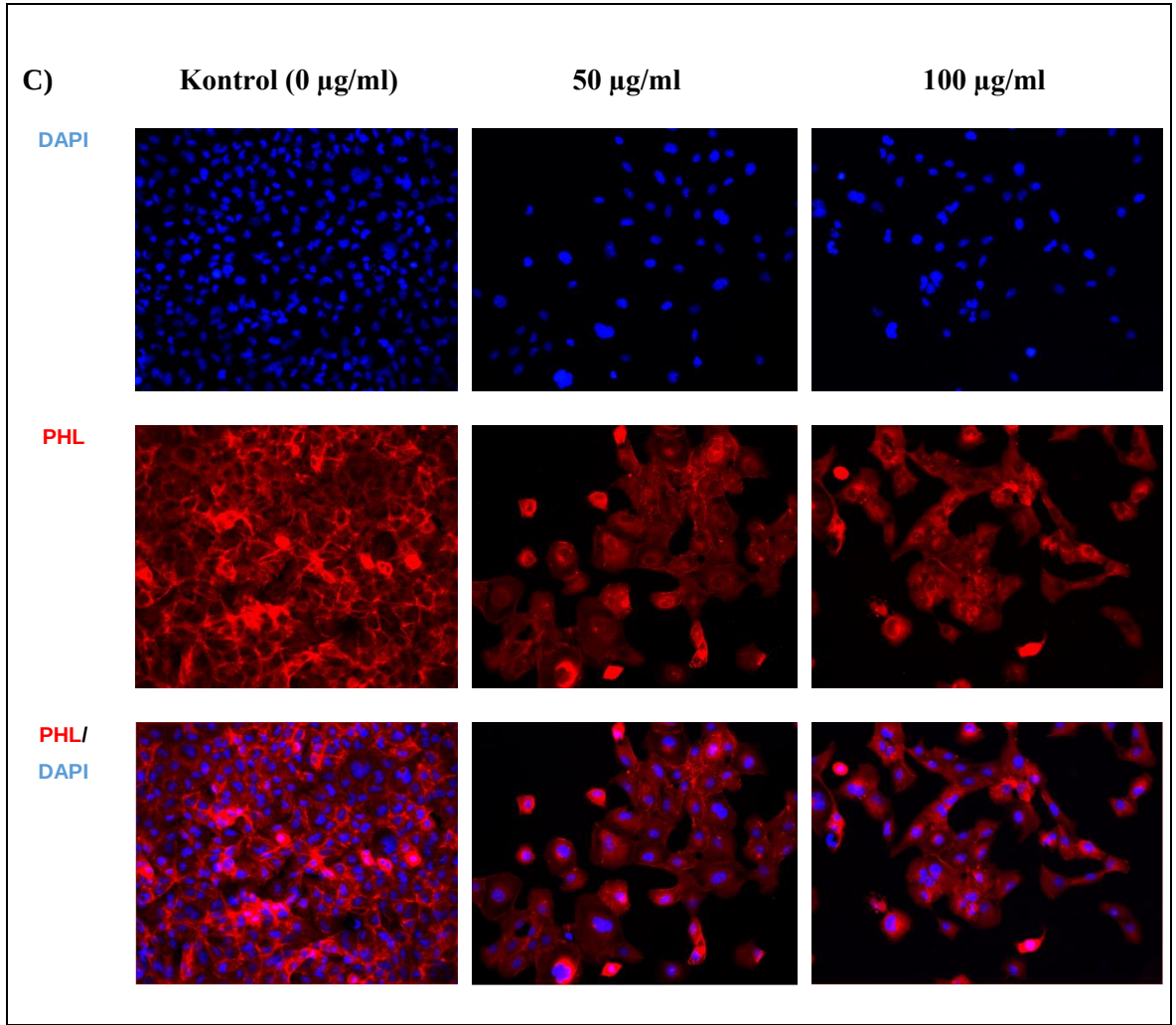
Podosit hücre besiyerine daha sonra 50 µg/ml PAN eklenerek 48 saat sonrasında MKH ve IGF-1, HGF veya IGF-1+HGF ile indüklenen MKH’lerle 48 saat ko-kültüre edilmiştir. Podosit hücrelerinde ifade olduğu bilinen *Synpo* ve *Inf2* mRNA ifadelerine bakılmıştır (Şekil 4.20B.). Hasar ile birlikte ifadelerinin azalmasını beklediğimiz *Synpo* ve *INF2* ifadelerinin azalmaması nedeniyle MKH-podosit ko-kültür çalışmalarından sonra ayrıca *Synpo* ve *INF2* mRNA ifadelerine ayrıca bakılmıştır.

4.5.3. Podosit-MKH Ko-Kültürü

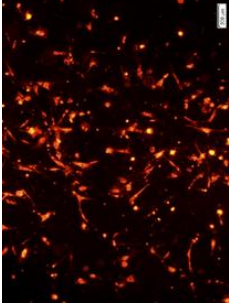
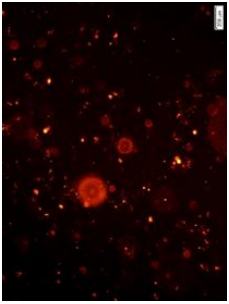
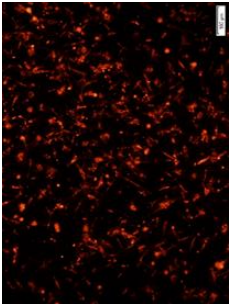
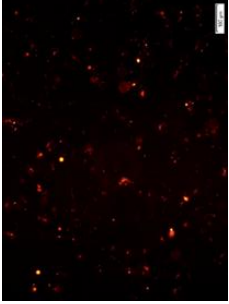
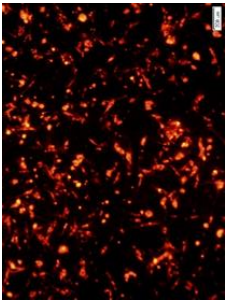
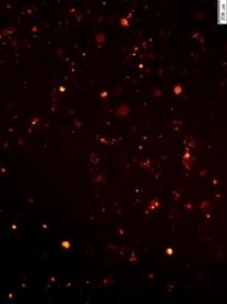
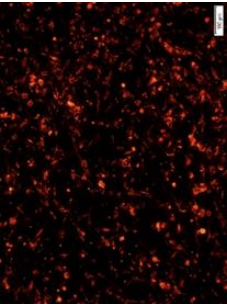
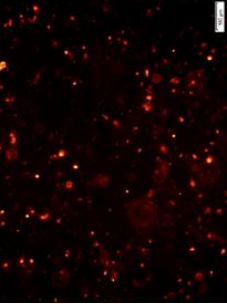
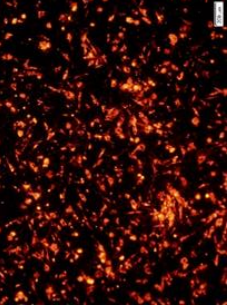
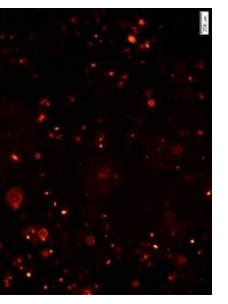
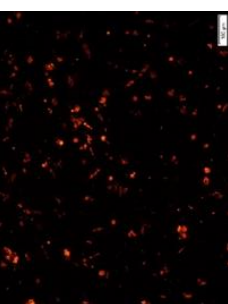
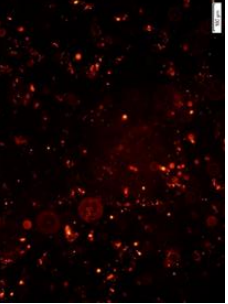
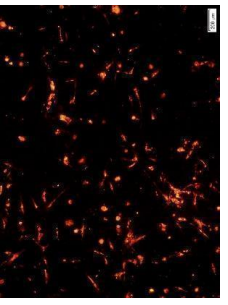
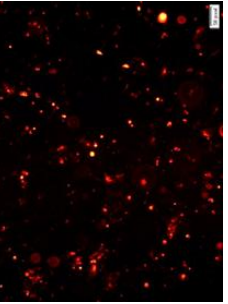
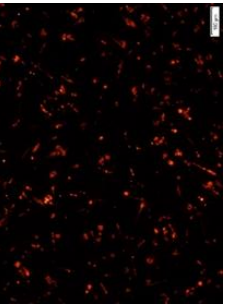
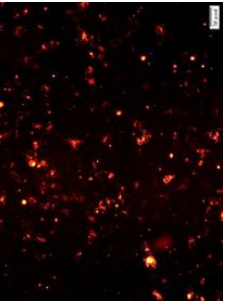
PAN ile hasar gören podositlerin aktin hücre iskeleti üzerine MKH, IGF-1_MKH (MKH I), HGF_MKH ve IGF-1+HGF_MKH’lerin (MKH I+H) etkisini değerlendirmek için Phalloidin antikoru ile işaretlendikten sonra floresan mikroskopunda görüntüleri alınarak incelenmiştir. Podosit hücrelerine PAN uygulandıktan 48 saat sonra hücre kültür kabına 4 µm ve 8 µm süzgeçler yerleştirilerek süzgeçlerin üzerine CM-DIL (kırmızı) ile işaretlenen MKH grupları ekilmiştir.

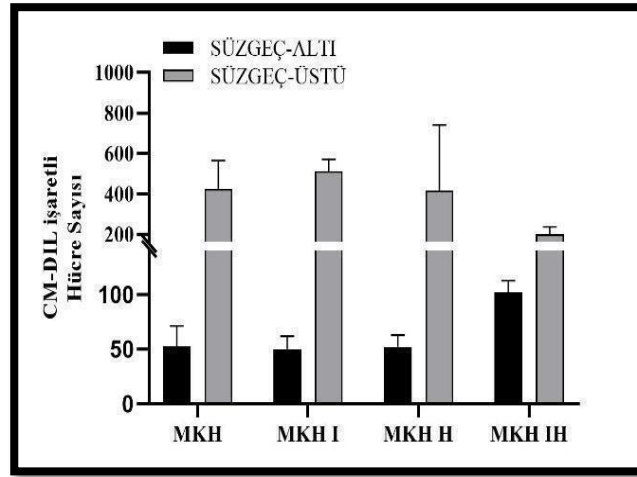
MKH'ler 8 μ m süzgeçten geçmekte 4 μ m süzgeçten ise geçememektedir. 8 μ m süzgeç ile MKH'lerin direk etkisi, 4 μ m süzgeç kullanılarak MKH'lerin salgısı ile indirek/doğrudan olmayan etkisi değerlendirilmiştir. Her MKH grubu için iki tekrar yapılmış ve süzgeç üstü ve süzgeç altının (kültür kabı yüzeyi) floresan mikroskobu görüntüleri çekilmiştir (Şekil 4.21.). IGF-1+HGF_MKH grubunun 8 μ m süzgeç üstünde diğer gruplara göre hücre sayılarının azaldığı süzgeç altında ise sayılarının arttığı gösterilmesi IGF-1+HGF'nin hücrelerin migrasyonunu artırdığını göstermektedir. 4 μ m süzgeç kullanıldığında tüm MKH gruplarında süzgeç altına hücre geçişi olmadığından kültür kabında floresan bir sinyal alınmamıştır 4 μ m süzgeç ko-kültürlerinde MKH grupları arasında aktin hücre iskeleti yapısına bakıldığında, MKH I+H'ler ile podosit aktin stres fiberlerinin düzensizliğinin azaldığı ve hücre boyutlarının arttığı gözlemlendi. MKH H grubunda da bazı hücrelerde aktin yapılarının daha düzenli olduğu gözlenmiş, tek başına IGF-1 ve sadece MKH ile ko-kültüre podositlerde ise yapılan tedavinin gözle görülen bir etkisi görülmemiştir (Şekil 4.22.). 8 μ m süzgeçli ko-kültürlerde hücre geçişi ile ise IGF-1+HGF ve HGF-ile indüklenen MKH'ler ile podositlerin aktin stres fiberlerinin azaldığı ve kontrol sağlıklı podositlerin aktin yapısı düzenine yakın şekilde aktin hasarını geri çevirebildiği gözlenmiştir. Tek başına IGF-1'in de aktin hücre iskeleti hasarını çoğu hücrede geri çevirebildiği fakat lisanslanmamış MKH'lerin (kontrol) salgısının ve kendisinin hasarı çok az geri çevirebildiği görülmüştür (Şekil 4.23.)



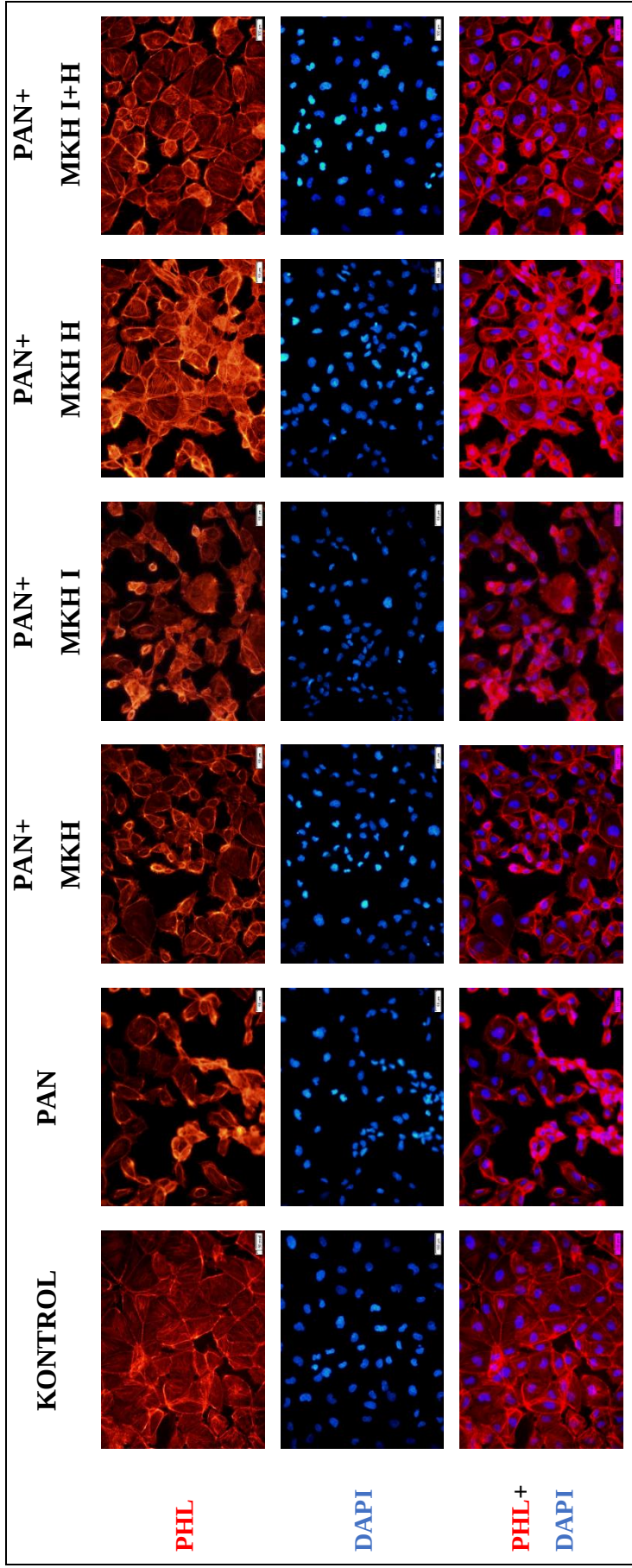


Şekil 4.20. *In vitro* PAN ile hasar uygulanan podositlerin metabolik aktivitelerinin, gen ifadelerinin grafikleri ve aktin hücre-iskeleti yapılarının görüntüleri. 0 (Kontrol), 50, ve 100 µg/ml PAN uygulanan podosit hücrelerinin WST-1 analizi, A) Hücrelerin metabolik aktivitelerinin WST-1 analizi ile 450 nm’de ölçülmüş absorbans değerlerinin teknik tekrarlarının analizinin % grafiği. B) Synaptopodin (*Synpo*) ve Inverted Formin-2 (*INF-2*) mRNA ifadeleri (qRT-PCR ile teknik tekrarlar ile ölçülen mRNA ifadeleri GAPDH referans genine göre normalize edildi). C) Aktin hücre-iskeleti yapısını gösteren Phalloidin (Phl)-(kırmızı), hücre çekirdeğini boyayan DAPI (mavi), Phl ve DAPI etiketli hücrelerin floresan mikroskopunda çakışan görüntüsü. 20X büyütme.

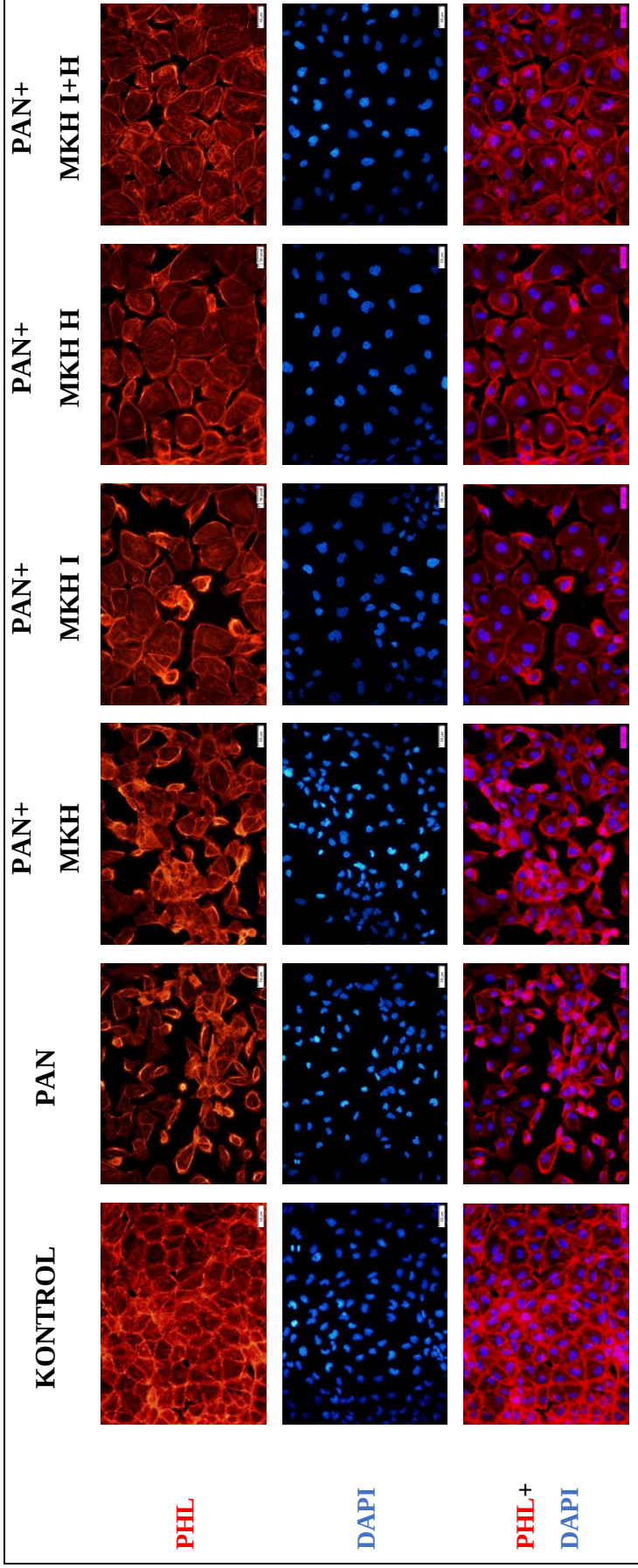
Süzgeç (<i>Transwell</i> -8 µm)	1.Süzgeç üstü	1.Süzgeç altı	2.Süzgeç üstü	2.Süzgeç altı
MKH				
MKH I				
MKH H				
MKH I+H				



Şekil 4.21. PAN hasarlı podosit-MKH ko-kültürlerindeki (8 μ m) CM-DIL işaretli MKH gruplarının floresan mikroskobu görüntüleri ve işaretli hücre sayılarının bar grafiği. MKH ve IGF-1 (I), HGF (H) ve IGF-1+HGF (I+H) ile indüklenen ve 50 μ g/ml PAN uygulanan podositlerle ko-kültüre edilen 8 μ m porlu süzgeç üzerine ekilen CM-DIL işaretli MKH'lerin (kırmızı işaretli) süzgeç üstünde kalan (süzgeç üstü) ve süzgeçte kalan (süzgeç altı) floresan mikroskobunda çekilen görüntüleri (10X büyütme) ve işaretli hücrelerin sayısını yansıtan bar grafiği.



Şekil 4.22. PAN+Podosit-MKH ko-kültürü (4 µm süzgeç) floresan mikroskobu görüntüleri. 4 µm porlu süzgeç üzerine ekilen MKH ve IGF-1 (I), HGF (H) ve IGF-1+HGF (I+H) ile indüklenen MKH'lerle ko-kültüre edilen 50µg/ml PAN uygulanan podositlerin ve sağlıklı PAN uygulanan podositlerin (Kontrol) aktin hücre-iskeleti yapısını gösteren Phalloidin boyamasının floresan mikroskobunda gösterilmesi. 40X büyütme PHL=Phalloidin



Şekil 4.23. PAN-Podosit-MKH ko-kültürü (8 µm süzgeç) floresan mikroskobu görüntüleri. 8 µm porlu süzgeç üzerine ekilen MKH ve IGF-1 (I), HGF (H) ve IGF-1+HGF (I+H) ile indüklenen MKH'lerle ko-kültüre edilen 50µg/ml PAN uygulanan podositlerin ve sağlıklı PAN uygulanan podositlerin (Kontrol) aktin hücre-iskeleti yapısını gösteren Phalloidin boyamasının floresan mikroskobunda gösterilmesi. 40X büyütme. PHL=Phalloidin

4.6. *In Vivo* FSGS Modelinde IGF-1 ve HGF ile Lisanslanan MKH'lerin Etkisinin Standart Kültür Ortamında Hazırlanan MKH'ler ile Karşılaştırmalı İncelenmesi

In vivo FSGS modeli üzerine MKH'leri uygulamadan önce FSGS modelinin oluşumunun modellenmesi için Pilot Çalışma-1; MKH I+H'lerin etki süresinin ve doğru tedavi zamanının belirlenmesi için Pilot Çalışma-2; tek başına IGF-1 ve HGF ile lisanslanan MKH'lerin etkisinin incelenmesi için Pilot Çalışma-3 yapıldıktan sonra ana deneyde MKH I+H'ler FSGS modeli oluşturulan sıçan modeline verildikten sonra hasar geri dönüşümü 24 saatlik idrar protein/kreatinin (proteinüri) değerleri, kesitlerdeki sklerotik alanlar, protein birikimleri, immunohistokimyasal ve elektron mikroskobu analizleri ile değerlendirilmiştir.

4.6.1. Pilot Çalışmalar

Fokal Segmental Glomeruloskleroz (FSGS) Modeli Oluşturma (Pilot Çalışma-1)

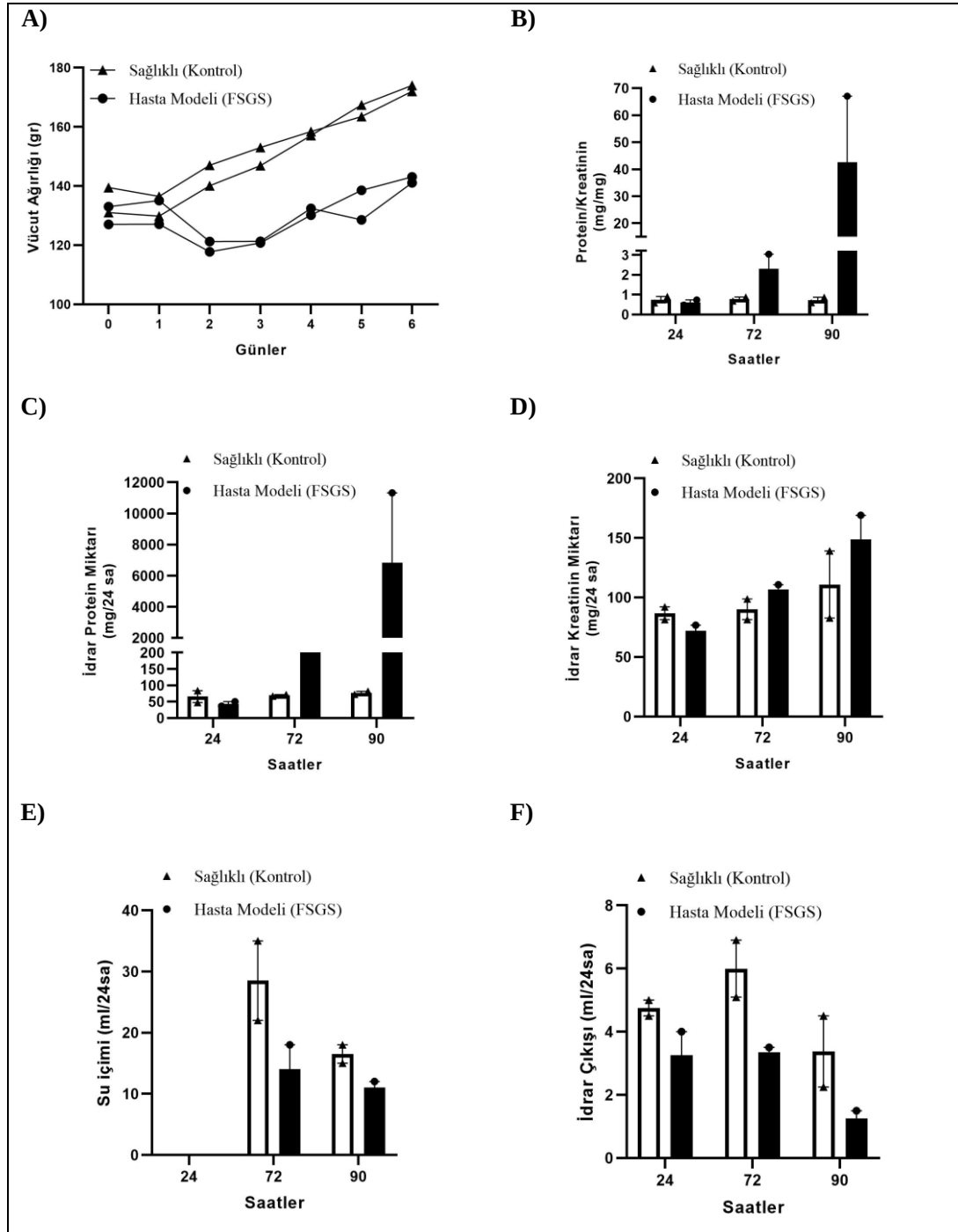
Sıçanlar sağlıklı (kontrol) (n:2) ve FSGS hasta modeli (FSGS) (n:2) grubu olarak ayrılmıştır. PAN intraperitoneal uygulama öncesi ve ötanazi işlemleri öncesi tüm gruplar 24 saatliğine metabolik kafese alınmıştır. Toplanan idrarlardan protein ve kreatinin düzeylerine bakılarak böbrek hasar düzeyi proteinüri (protein/kreatinin) üzerinden değerlendirilmiştir.

Podosit hasarına bağlı FSGS hastalığında; insanlarda böbrek hasarından kaynaklı ağır proteinüriye bağlı ödeme bağlı kilo alımı görülmektedir. Bizim çalışmamızda da sıçanların her gün ağırlıkları ölçülmüş ve not edilmiştir. Buna göre; PAN/ hasarlı sıçanların (P1 ve P2) ağırlıkları ikinci günde azalıp daha sonra ödeme bağlı olarak artarken, kontrol/ sağlıklı sıçanların (K1, K2) ise ağırlıklarında düzenli bir artış görülmüştür. 6. günde ağırlıkları karşılaştırıldığında kontrol grubunun ağırlıkları ortalaması 173 gram (g) iken PAN grubunun ortalaması 142,1 g'dır (Şekil 4.24.). Kontrol grubunun yani sağlıklı sıçanların ağırlığı 30.9 g daha fazladır. PAN grubunun idrarında protein/kreatin (P/K) seviyelerine enjeksiyonu takiben 72. ve 90. Saatlerde bakılmıştır. 72. Saatte PAN grubunun P/K oranı (2.31 mg/mg) kontrol grubundan (0.78 mg/mg) ≈ 3 kat fazlayken; 90. saatte (PAN grubunun (42,64 mg/mg), kontrole

göre (0.73 mg/mg) $\approx$ 58 kat fazla P/K oranı saptanmıştır (Şekil 4.24b.). PAN grubunda protein ve kreatinin düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı ayrıca grafiksel olarak gösterilmiştir (şekil 4.24c. ve 4.24d.). Ayrıca sıçanların su içimleri ve idrar çıkışlarının kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. 72. saatte PAN grubunun su içim ortalaması 14 ml idrar çıkışı 3,35 ml, 90. saatte su içimi 11 ml, idrar çıkışı 1,25 ml'dir. MKH grubunun su içim ortalaması 72. saatte 26,5 idrar çıkışı 6 ml, 90. saatte su içimi 16,5 idrar çıkışı 6,38 ml'dir. 150 mg/kg PAN uygulaması ile sıçanlarda ağırlığın azalması, su içimi ve idrar çıkışının azalması idrar testine bakıldığında tüm gruplarda Glukoz, Bilirubin, Üronobilojen, Kan, Keton, Nitrit, Lökosit parametrelerinin negatif olması ve sadece PAN grubunda proteinüriyi gösteren UCSF/Kreatinin artışı proteinürinin artması modelin oluştuğunu göstermektedir. PAN ve Kontrol gruplarının UCSF/PROTEİN (mg/dl), Kreatinin, Proteinüri (UCSF/Kreatinin), Mikroalbumin, Glukoz, Bilirubin, Üronobilojen, pH, Kan, Keton, Nitrit, Lökosit, Bulanıklık, Dansite, Renk ve Arjinosüksinik Asit değerleri ve parametreleri de tabloda gösterilmiştir (Tablo 4.7.).

Sağlıklı (Kontrol) ve Hasta Modeli (FSGS) gruplarının elektron mikroskobu incelemelerinde sağlıklı (kontrol) grubunda podosit hücreleri normal yapılarını korurken; PAN grubunda ise 1-2 podosit hücresi dışında tüm podosit yapılarının ve slit diyaframlarının kaybolduğu ve hücre efasmanlarının meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.25).

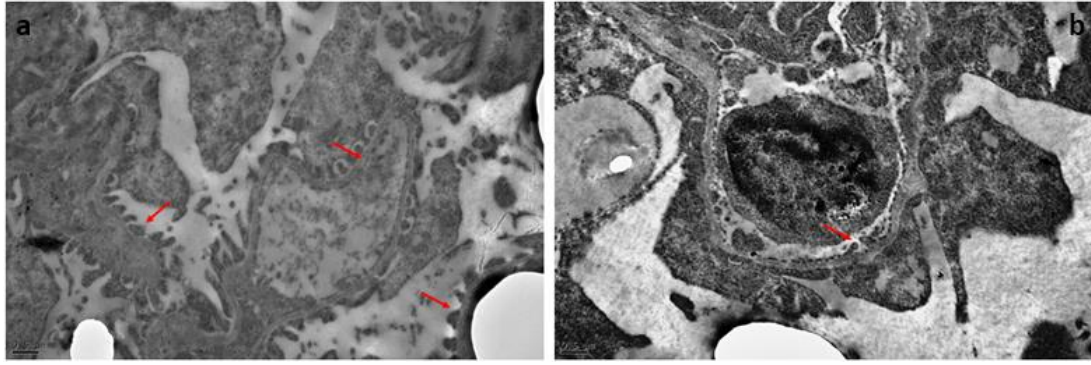
FSGS hastalığında podosite özgü synaptopodin (Synpo), inverted formin 2 (INF2) gibi mRNA ve proteinlerin ifadesi azaldığı daha önceki yayınlanan çalışmalar ile bilinmektedir (208, 333). Sıçanların böbrek dokularından RNA izole edip, ardından cDNA sentezi yaptıktan sonra, qPCR ile *Synpo* ve *Inf2* mRNA ifadeleri incelendiğinde PAN ile Kontrol grupları arasında *Synpo* ifadeleri arasında anlamlı bir farklılık yokken (ort PAN: $\sim$ 1,06) ve azalması beklenen *Inf2* ifadeleri PAN grubunda yaklaşık 1,93 kat artmıştır (Şekil 4.26.). Bu sonucu, RNA izolasyonunu tüm böbrek dokusundan izole etmiş olmamıza bağladık. Böbrek doku kesitlerinden immunohistokimyasal boyama ile Synpo düzeylerine bakıldığında PAN grubunda kontrole göre Synpo boyaması glomerüllerde daha koyu ve böbrek tübüllerinde de boyanma görülmektedir (Şekil 4.27.).



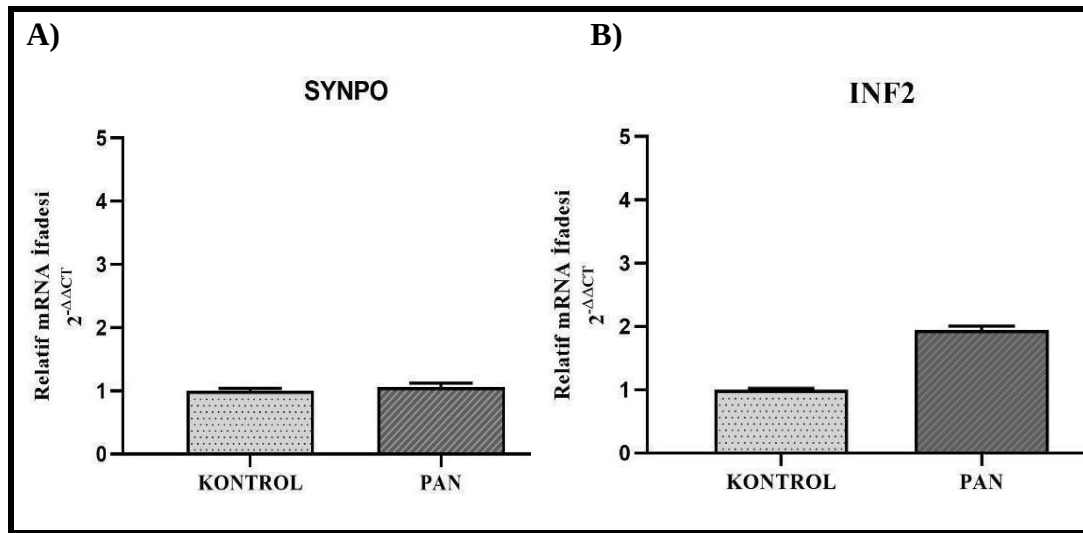
Şekil 4.24. Pilot deney 1: Kontrol ve PAN gruplarının günlere göre ağırlıklarının, protein/kreatinin oranlarının, idrar protein ve kreatinin miktarlarının, su içimi ve idrar çıkışlarının grafikleri. Pilot deney 1= Sağlıklı (Kontrol) ve Hasta Modeli (FSGS) gruplarının PBS ve PAN intraperitoneal enjeksiyonundan sonraki 0-6 gün boyunca takip edilen a) ağırlıkları, b) protein/kreatinin oranları, c) İdrar protein miktarı d) Kreatinin Miktarı, e) Su içimi ve f) İdrar Çıkışı. Kontrol= (Sağlıklı sıçanlar (PBS verilen grup), Hasta Modeli (FSGS) oluşturulan sıçanlar (PAN verilen grup).

Tablo 4.7. Sağlıklı (Kontrol) ve hasta modeli (FSGS) ratların idrar parametreleri

		GRUPLAR			
		Kontrol (1)	Kontrol (2)	Hasta Modeli (FSGS) (1)	Hasta Modeli (FSGS) (2)
<u>Parametreler</u>					
4.gün (90.saat/18 sa. idrar)	VÜCUT AĞIRLIĞI (0.GÜN)	129,8	136,5	127,1	135,1
	VÜCUT AĞIRLIĞI	174	172	143,1	141,1
	UCSF/PROTEİN (mg/dl)	71,6	66,7	175,2	311,2
	KREATİNİN (mg/dl)	82,75	139,09	128,84	169,04
	PROTEİNURİ (UCSF/KREATİNİN)	0,87	0,59	18,27	67,01
	MİKROALBUMİN (mg/dl)	0,609	0,870	<0,200	N/A
	GLUKOZ	NEG	NEG	NEG	NEG
	BİLİRUBİN	NEG	NEG	NEG	NEG
	ÜRONOBİLOJEN	NEG	NEG	NEG	NEG
	pH	5	6,5	6,5	6,5
	KAN	NEG	NEG	NEG	NEG
	KETON	NEG	NEG	NEG	NEG
	NİTRİT	NEG	NEG	NEG	NEG
	LÖKOSİT	NEG	NEG	NEG	NEG
	BULANIKLIK	ÇOK BULANIK	ÇOK BULANIK	ÇOK BULANIK	ÇOK BULANIK
	DANSİTE	1,057	1,000	1,015	1,000
	RENK	KOYU SARI	YEŞİL	SARI	YEŞİL
	ARJİNOSÜKSİNİK ASİT	NEG	NEG	20mg/dl	NEG



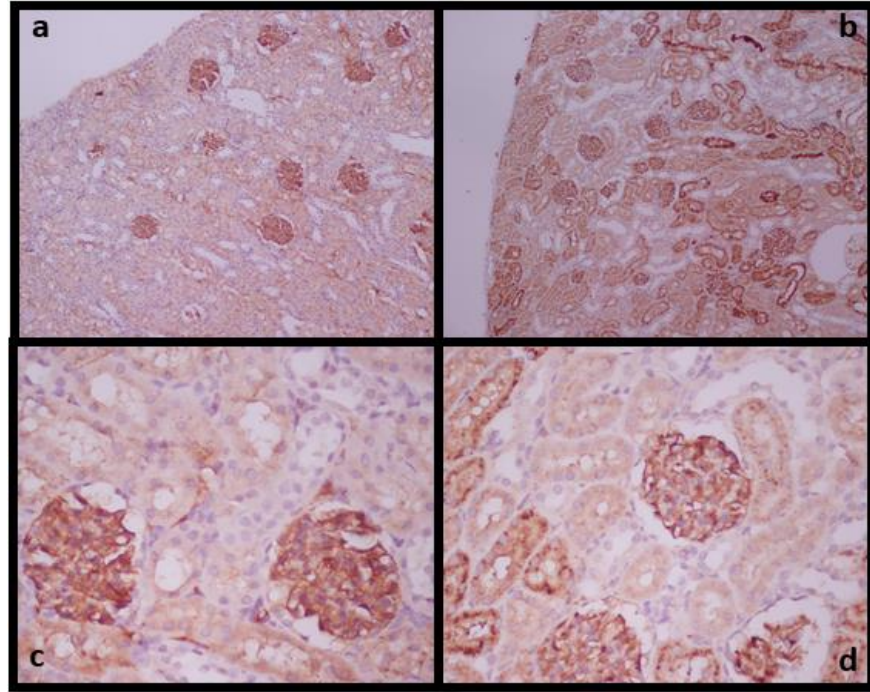
Şekil 4.25. Kontrol ve PAN grubunun böbrek glomerular kesitinin elektron mikroskopunda incelenmesi. Pilot deney 1= Sağlıklı (Kontrol) ve Hasar Modeli (FSGS) gruplarının PBS ve PAN intraperitoneal enjeksiyonundan sonra 6. gün sonunda toplanan böbrek doku glomerular kesitlerinin elektron mikroskopu görüntüleri (20K $\times$ büyütme). a) Kontrol= (Sağlıklı sıçanlar (PBS verilen grup)), FSGS= (Fokal Segmental Glomeruloskleroz (FSGS) modeli oluşturulan sıçanlar (PAN verilen grup))



Şekil 4.26. PAN Hasarına bağlı SYNPO ve INF2 mRNA ifadelerinin bar grafikleri. Kontrol (sağlıklı iki hayvan n=2) ve PAN (FSGS modeli oluşturulan hayvanlar n=2) gruplarının böbrek dokusundaki A) *Synpo* ve B) *Inf2* mRNA ifadeleri GAPDH'a göre normalize edilmiştir ve sağlıklı kontrole göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak göreceli/relatif mRNA ifadeleri belirlenmiştir.

Pilot deney 1 çalışmasının sonuçlarına göre PAN verilmesini takiben 72. saatten itibaren FSGS modeli oluşmaktadır. Bu sonuçlar ışığında, pilot deney 2 çalışması için MKH ve IGF-1+HGF_MKH (MKH I+H) tedavisini erken dönem olarak

72-96 saatler (3-4 gün) arasında, geç dönem olarak ise 120-132. saatler (5-6 gün) arasında uygulamaya karar verdik.



Şekil 4.27. PAN Hasarına bağlı Synaptopodin (Synpo) protein ifadesi değişiminin immunohistokimya görüntülemesi. a ve c) Kontrol (sağlıklı sıçanlar) ve b ve d) Hasar Modeli (FSGS modeli oluşturulan sıçanlar) gruplarının böbrek dokusu kesitlerinin Synpo antikoru ile işaretlendikten sonra ışık mikroskopunda alınan görüntüleri (a ve b 10x; b ve d 40x büyütme).

IGF-1+HGF_MKH'lerin FSGS Modeli Üzerinde Etki Süresinin Belirlenmesi (Pilot Çalışma-2):

MKH I+H tedavi gününün belirlenmesi için ikinci bir pilot deney yapılmıştır. Tüm sıçanlara ilk önce PAN verilerek (150 mg/kg) FSGS modeli oluşmasının ardından, ayrı zamanlarda MKH veya MKH I+H uygulanmıştır. PAN ile hasar modeli daha önceki deneyde (pilot deney 1) oluşturulduğu için, bu deneyde hayvan sayısını azaltmak adına sağlıklı kontrol grubu oluşturulmamıştır.

Sıçanlar MKH veya MKH I+H'nin verilme zamanına bağlı olarak Erken Dönem ve Geç Dönem Grubu olmak üzere 2 ana gruba ayrılmıştır, her grupta 3 deney hayvanı ile çalışılmıştır. Tüm gruplar, PAN ve MKH/MKH I+H uygulamaları öncesinde ve MKH/ MKH I+H tedavi sonrası 3., 9. günde ve 20. günde (ötanazi

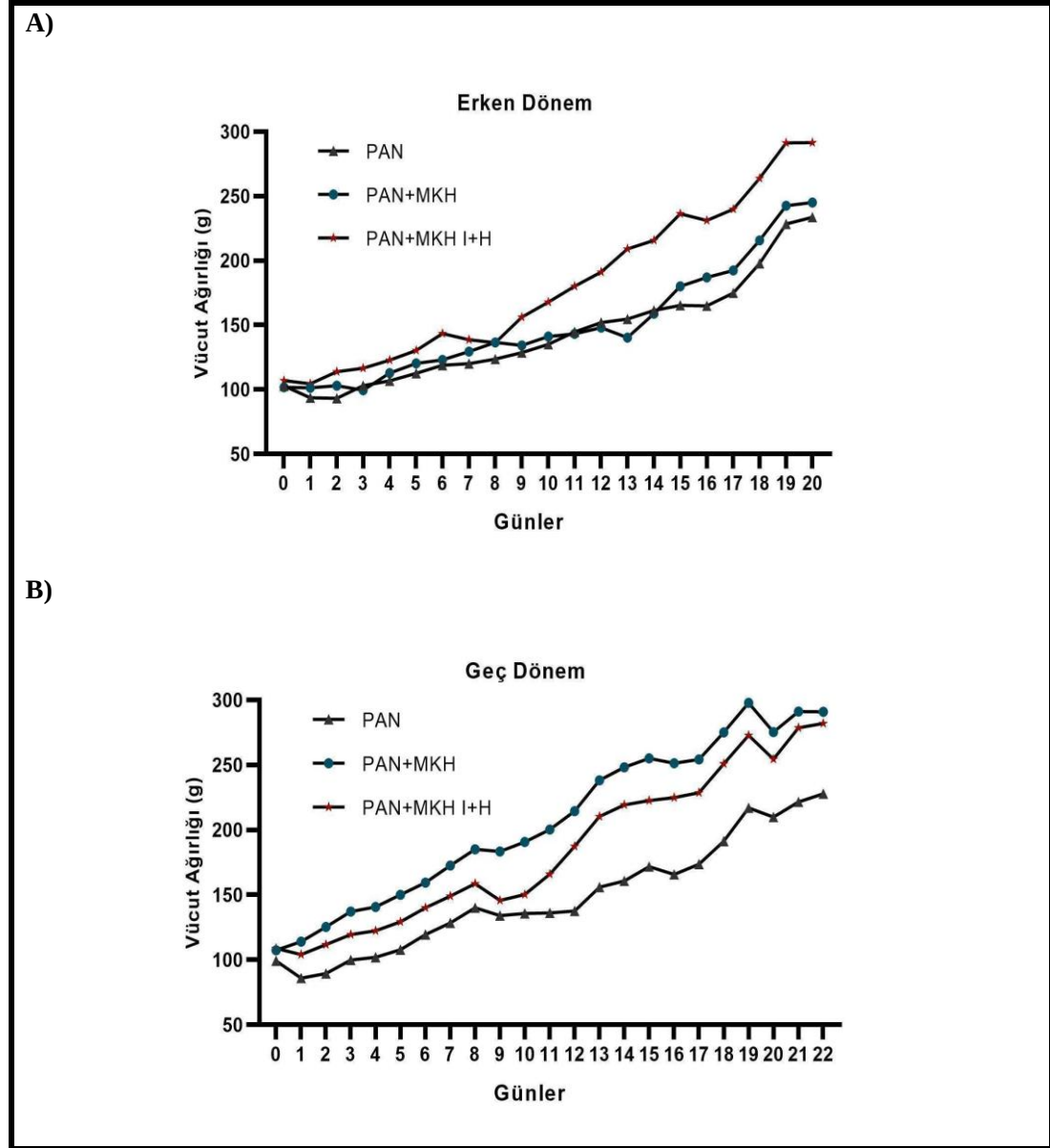
işlemleri öncesi) 24 saatliğine metabolik kafese alınmıştır. Toplanan idrarlardan protein ve kreatinin düzeylerine bakılarak böbrek hasarı/proteinürinin geri dönüşümü değerlendirilmiştir.

Sıçanların ağırlıklarını her gün tarttığımızda, erken dönemde MKH I+H verilen grubun ağırlığının, MKH ve PBS gruplarına göre (20. Gün ağırlık ort PBS: 233,70g; MKH: 245,1 g, MKH I+H: 291,5g); geç dönemde ise, MKH ve MKH I+H gruplarının ağırlıklarının PBS grubuna göre anlamlı bir şekilde artmış olduğunu gördük (20. Gün ağırlık ort PBS: 227,8 g; MKH: 291 g, MKH I+H: 282 g) (şekil 4.28.). Sıçanların protein/kreatinin (P/K) düzeylerine ise; PAN verilmeden önce (0.gün), PBS, MKH ve MKH I+H verilmeden önce (i.v. MKH öncesi) ve verildikten sonra (i.v. MKH sonrası) 3., 9. ve 20. günlerde analiz ettik. Buna göre; erken dönemde 3. günden itibaren MKH (75,80 mg/mg) ve PBS (85,24 mg/mg) gruplarının P/K düzeyi artarken, MKH I+H (17,02 mg/mg)- verilen grubun P/K düzeyi MKH grubuna göre yaklaşık 4,45 kat, PBS grubuna göre 5 kat azalmıştır. Geç dönemde ise, tedaviden sonraki 3. (PBS: 95,79; MKH: 2,12; MKH I+H: 2,17 mg/mg) ve 9. gün (PBS: 70,59; MKH: 1,04; MKH I+H: 1,42 mg/mg) MKH ve MKH I+H gruplarının P/K düzeyleri PBS grubuna göre azalmıştır (şekil 4.29) Geç dönemin 20. gününde gruplardan proteinüri analizi için yeterli idrar toplanmamıştır. Pilot Deney 2 Sonuçlarına göre erken dönemde MKH I+H verilimi 3. günden itibaren proteinüriyi azaltırken; geç dönemde hem MKH hem IGF-1+HGF_MKH uygulaması proteinüriyi PBS grubuna göre anlamlı şekilde azaltmaktadır. Akut dönemde ise MKH I+H uygulamasının proteinüriyi MKH'ye göre daha hızlı düşürürken uzun süre takip edildiğinde (20. günde) MKH'ye yakın değerlerdedir.

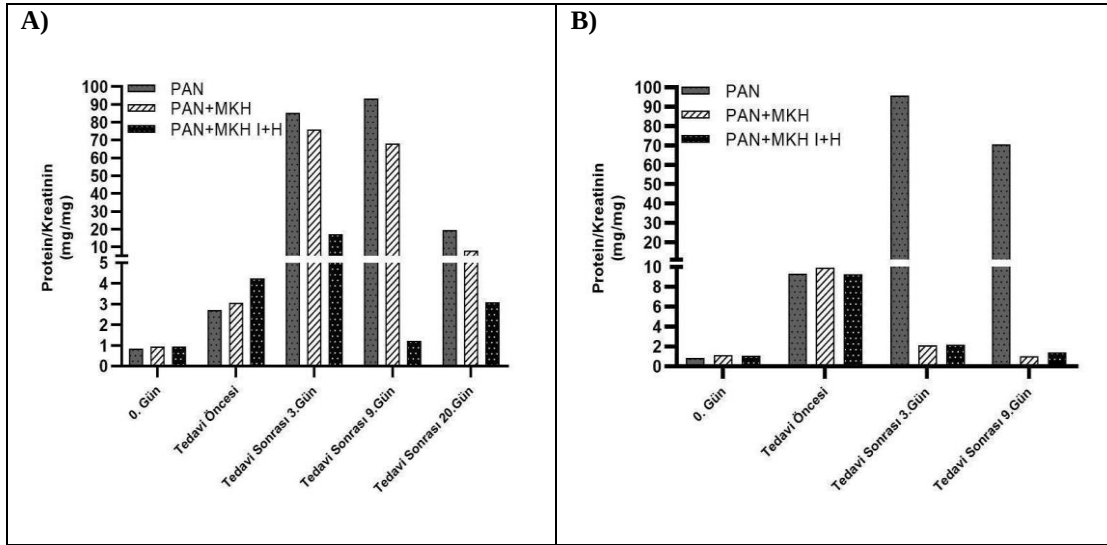
IGF-1 veya HGF ile İndüklenmiş/Lisanslanmış MKH'lerin FSGS Modeli Üzerine Etkisinin Belirlenmesi (Pilot Çalışma-3)

IGF-1 ve HGF'nin tek başına MKH kültür ortamına eklendikten sonra FSGS modeli oluşturulan sıçanlara uygulanmasının etkisini değerlendirmek için MKH I (n:2) ve MKH H (n:2) sıçanlara intravenöz uygulandıktan sonra idrar proteinüri düzeyleri analiz edildi (Şekil 4.30.). IGF-1_MKH uygulanan sıçanlarda proteinüri düzeyi tedavi öncesinde ortalama 51,53 mg/mg iken tedavi sonrası 65,27 mg/mg saptanmıştır; HGF-MKH uygulanan sıçanlarda proteinüri düzeyi tedavi öncesinde ortalama 58,325

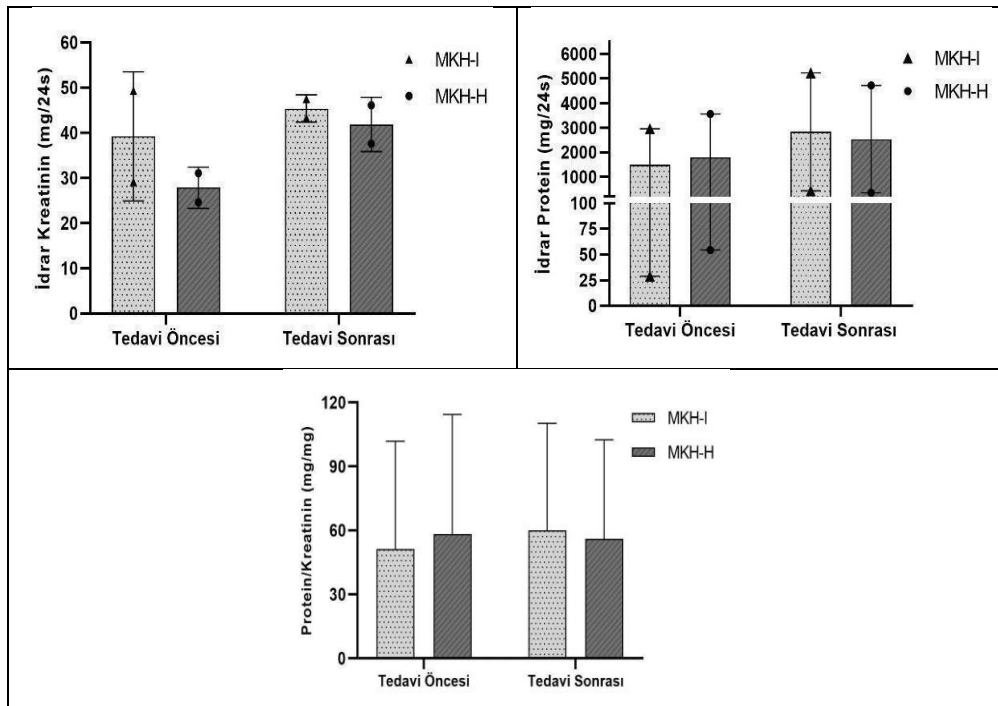
mg/mg iken tedavi sonrası 56,02 mg/mg bulunmuştur. IGF -1ve HGF tedavilerinin tek tek verilimi sıçanlarda böbrek hasarına bağlı proteinüriyi düzeltememiştir.



Şekil 4.28. 28. Pilot çalışma 2: erken dönem ve geç dönem uygulanan PBS, MKH, MKH I+H verilen sıçan gruplarının protein/kreatinin oranlarının vücut ağırlığı grafikleri A) PAN veriliminin ardından (0. Gün) ardından erken dönemde (80. Saat) PBS, MKH, MKH I+H verilen sıçan gruplarının 0-20. günlerde alınan kilo/ağırlık (g) grafiği, B) PAN veriliminin ardından (0. Gün) ardından geç dönemde (128. Saat) PBS, MKH, MKH I+H verilen sıçan grupların 0-20. günlerde alınan kilo/ağırlık (g) grafiği.



Şekil 4.29. Pilot çalışma 2: erken dönem ve geç dönem uygulanan PBS, MKH, MKH I+H verilen sıçan gruplarının protein/kreatinin oranlarının bar grafikleri. A) PAN hasarının ardından erken dönemde (80. saatte) ve B) geç dönemde (128. Saat) PBS, MKH, MKH I+H tedavisi uygulanan grupların, tedavi sonrası erken dönem 3., 9. ve 20. Günlerdeki geç dönem 3. ve 9. Günlerdeki protein/kreatinin oranları, geç dönem 0. Gün=PAN uygulaması günü, Tedavi= sıçanlara PAN veriliminin ardından 80. Saatte veya 128. saatte i.v. PBS, MKH veya MKH I+H uygulanmıştır (n=1).



Şekil 4.30. Sıçanlara IGF-1_MKH (MKH-I) ve HGF-MKH (MKH-H) uygulaması sonrası idrar protein/kreatin düzeyleri. Tedavi öncesi=PAN uygulaması sonrası 4. Gün, Tedavi sonrası= sıçanlara i.v. MKH I veya MKH H uygulamasının 9. Günü (n=2).

4.6.2. *In Vivo* FSGS Modelinde Tek Doz Mezenkimal Kök Hücre Tedavilerinin Karşılaştırılması

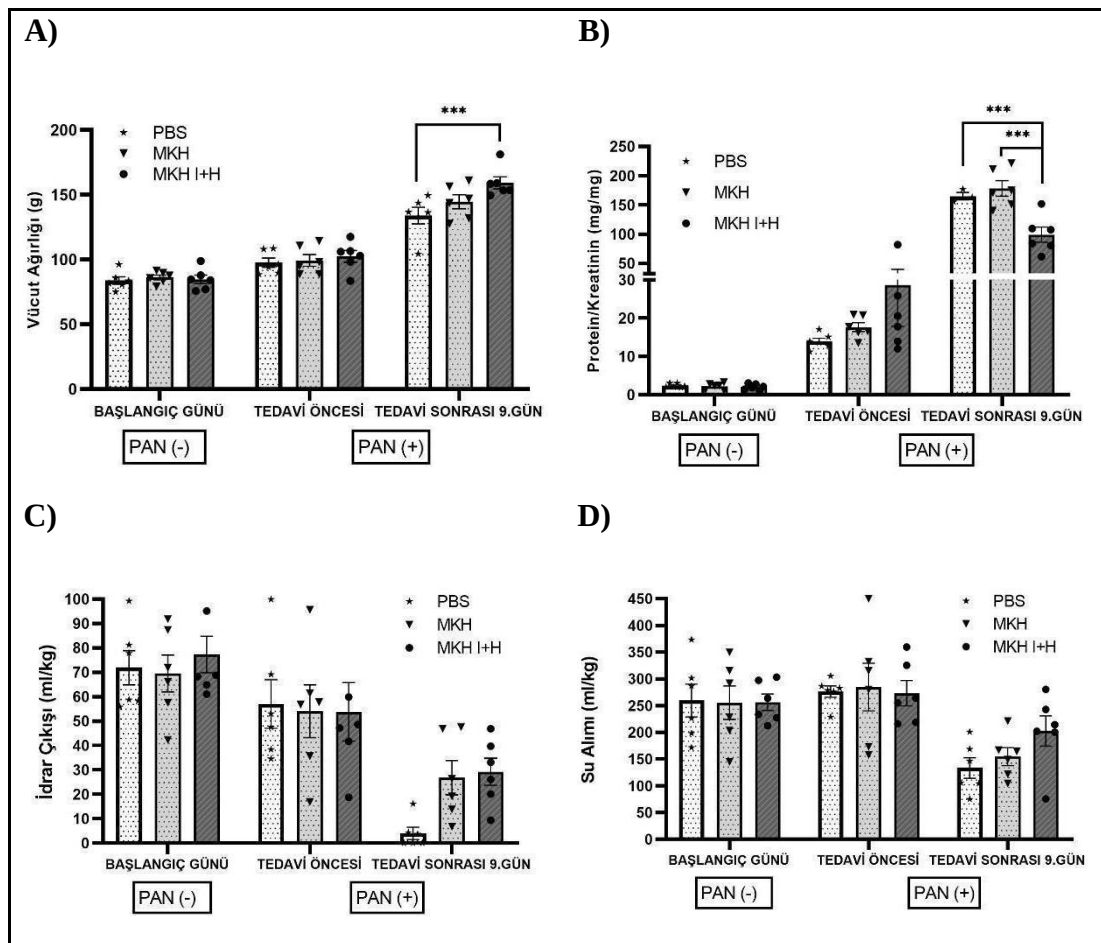
Yaklaşık 5-6 haftalık erkek Sprague-Dawley (SD) sıçanlara PAN verilerek FSGS modeli oluşturulması ve hasar oluşumunu takiben (PAN verilimi sonrası 4. gün) intravenöz olarak insan MKH/MKH-I+H uygulaması amaçlanmıştır. MKH/MKH-I+H uygulaması öncesi ve sonrası sıçanlar metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarları toplanmış ve protein/kreatin oranları analiz edilmiştir. PAN hasarı verilmeden önce ve hasar sonrası MKH/MKH-I+H tedavisi öncesinde ve tedavi sonrası 9. Gündeki ağırlıkları, su alımları ve idrar çıkışları değerlendirilmiştir.

Tedavi sonrası 9. günde sıçanlar sakrifiye edilerek, hasara bağlı vücut içi sıvıları/asit birikimi olup olmadığı not edilmiş ve böbrek ve akciğer dokuları (MKH'lerin en çok tutulum gösterdiği organ) çıkarılmış ve daha sonra kesitleri incelenmiştir.

IGF-1+HGF verilen sıçan grubunda MKH ve PBS grubuna göre tedavinin 9. gününde en fazla kilo artışı görülmüştür (ort=PBS: 133,97±14,3; MKH:144,67±11,98; MKH I+H:159,23±10,39 g). IGF-1+HGF grubunda PBS (tedavi almayan) gruba göre anlamlı bir kilo farkı görülürken (p: 0,0004), MKH'lere göre artış gözlenmesine rağmen anlamlı fark bulunmamıştır (p: 0,055, şekil 4.31A). Tüm gruplarda MKH/MKH I+H uygulaması öncesinde FSGS modeli olduğu sıçanların idrar protein/kreatin (>4,5 mg/mg) düzeyleri analiz edilerek gösterilmiştir (FSGS+PBS ort: 13,97 mg/mg, FSGS+MKH: 17,67, FSGS+MKH I+H: 28,69 mg/mg). Uygulama sonrası 9. Günde FSGS grubunda 3 sıçandan 24 saatlik idrar toplanabilirken diğer 3 sıçandan idrar toplanamamıştır. FSGS modelinde MKH I+H grubunun protein/kreatin oranı (ort: 98,96 mg/mg) edildiğinde hem MKH grubuna (ort: 168,80 mg/mg) hem de PBS grubuna (ort: 178,06) göre proteinürinin azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.31B., Tablo 4.8.).

Tedavi sonrası idrar çıkışları değerlendirildiğinde MKH I+H (ort= 29,22 ml±12,40 ml/kg) ve MKH (ort: 26,8±15,6 ml/kg) grupları arasında ortalama değerler benzer bulunmasına rağmen tedavi sonrası PBS (ort: 4,03±5,7 ml/kg) grubuna göre idrar çıkışı iki grupta da daha fazladır fakat anlamlı değildir ("PBS vs. MKH" p: 0,134,"PBS vs. MKH I+H" p: 0,088) (Şekil. 4.31C.). Tedavi sonrası su alımları değerlendirildiğinde ise MKH I+H (ort= 202,57±63,17 ml/ kg) grubunun su alımı

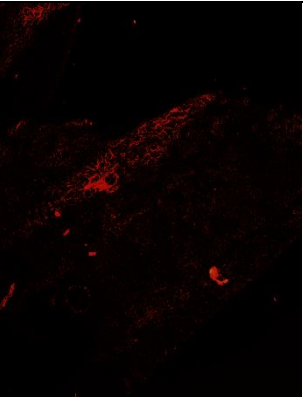
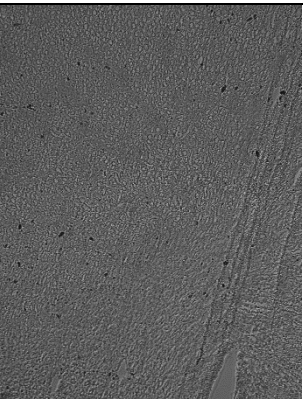
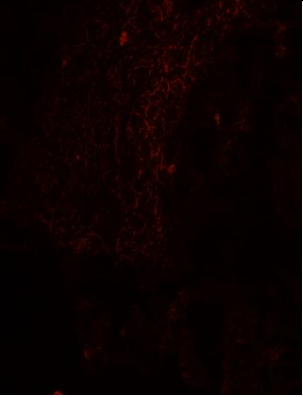
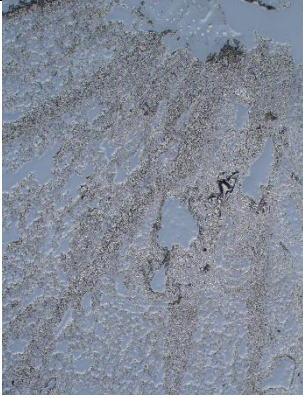
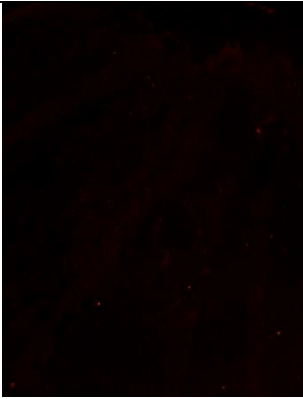
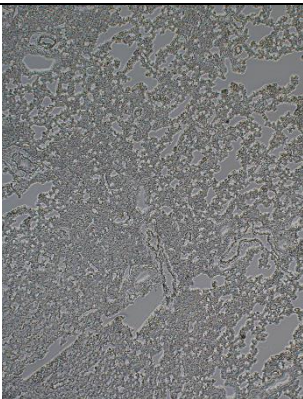
MKH (ort= 154,5±37,24 ml/kg) ve PBS (ort= 133,42±42,73 ml/kg) gruplarına göre daha fazla bulunmuştur (Şekil. 4.31D.). Böbrek ve akciğer doku kesitlerinden işaretli MKH/IGF-1+HGF_MKH'lere floresan mikroskobunda bakıldığında böbrek dokularında akciğer dokularına göre her iki grupta da floresan yoğunluğu fazla olmasına rağmen hücreler spesifik olarak muhtemel doku arkaplan ışımasından kaynaklı ayırt edilememektedir. (Şekil 4.32).



Şekil 4.31. PAN ile FSGS modeli oluşturulan ve MKH/I+H tedavisi uygulanan sıçanların vücut ağırlığı, proteinüri, idrar çıkışları ve su alımlarının grafikleri. Sıçanların başlangıç gününde, tedavi öncesinde ve tedavi sonrası 9. günde A) vücut ağırlıkları (g) B) Proteinüri değerleri (protein/kreatinin) C) 24 saatlik idrar çıkış miktarları (ml/kg) D) Su alımları (ml/kg). Başlangıç günü: PAN verilimi öncesi, Tedavi Öncesi= sıçanlara PAN verilmesinin ardından 4. gün, iv PBS, MKH veya IGF-1+HGF_MKH (MKH I+H) uygulama günü, Tedavi sonrası: PBS, MKH veya MKH I+H tedavisinin 9. Günü (***)P-değeri $\leq 0,0001$)

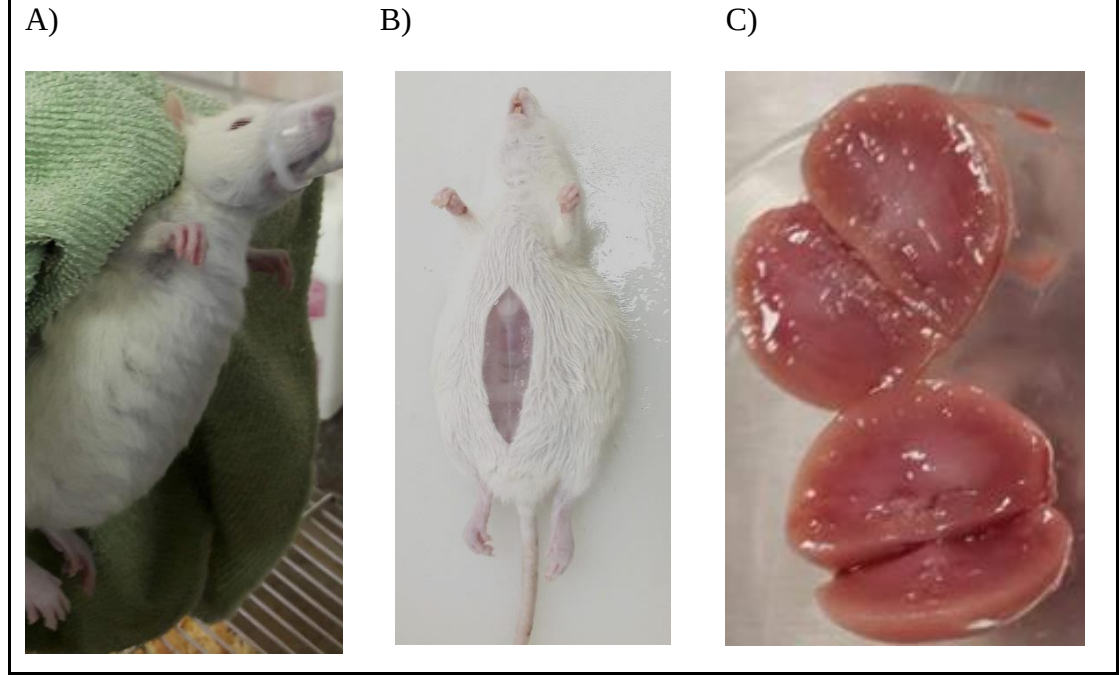
Tablo 4.8. FSGS modelinde PAN, MKH ve MKH I+H tedavi gruplarının 24 saatlik idrar analizleri.

0.GÜN			TEDAVİ ÖNCESİ				TEDAVİ SONRASI 9.GÜN				
Gruplar	Sıçan No	Kreatinin (K)	Protein (P)	P/K	Kre	Protein (P)	P/K	Kre	Protein (P)	P/K	Vücut içi Asit
PBS	1	39,3	79,1	2,01	55,7	775,7	13,93	45,5	8041,9	176,75	var
	2	52,4	113,8	2,17	38	425,2	11,19	İdrar Çıkışı Yok	İdrar Çıkışı Yok		var
	3	37,3	113,0	3,03	41,3	529,1	12,81	49,6	7690,2	155,04	var
	4	51,4	96,9	1,89	38,1	520	13,65	İdrar Çıkışı Yok	İdrar Çıkışı Yok		var)
	5	35,6	106,1	2,98	45,6	688,5	15,10	19,5	3170,7	162,60	var
	6	56,8	115,8	2,04	37,03	633,9	17,12	İdrar Çıkışı Yok	İdrar Çıkışı Yok		var
MKH	1	42,5	50,2	1,18	44,2	735,4	16,64	37,3	6362,4	170,57	var
	2	28,7	35,2	1,23	38,6	684	17,72	37	5175	139,86	var
	3	37,02	90,3	2,44	52,6	860,8	16,37	36	7597	211,03	var
	4	35,1	114,2	3,25	46,2	625,7	13,54	35,6	5372,8	150,92	var
	5	34,5	95,1	2,76	34,3	713,3	20,80	26,5	5865,4	221,34	var
	6	32,7	77	2,35	39,4	825,8	20,96	35,3	6165,1	174,65	var
MKH I+H	1	36,9	53,6	1,45	37,5	452	12,05	34,3	2104,1	61,34	yok
	2	23,03	25,4	1,10	35	622,7	17,79	25,8	2072,4	80,33	yok
	3	41,1	88,3	2,15	55,2	772,5	13,99	36,7	3077,3	83,85	yok
	4	32,4	91,2	2,81	24,2	497,2	20,55	28,9	3163,6	109,47	yok
	5	38,4	117	3,05	33	852,7	25,84	35,3	3785,3	107,23	yok
	6	35	65,8	1,88	30	2458,3	81,94	32,1	4864,1	151,53	var

Böbrek	A) 	B) 	C) 	D) 
Akciğer	E) 	F) 	G) 	H) 

Şekil 4.32. PAN ile FSGS modeli oluşturulan ve CM-DIL işaretli MKH/I+H tedavisi uygulanan sıçanlarda tedavi sonrası 9. günde alınan böbrek ve akciğer kesitlerinde CM-DIL işaretli hücrelerin görüntülenmesi. A, B, E, F MKH I+H, C, D, G, H MKH böbrek ve akciğer dokuları . A, C, E, G ışık B, D, F, H floresan mikrokobu görüntüleri 4x büyütme.

Kontrol ve MKH grubu sıçanların hepsinde hasara bağlı vücut içi sıvısı, şiş bir karın ve böbrek morfolojisinin bozulduğu gözlenirken (Şekil 4.33.), MKH I+H grubunda sadece bir sıçanda vücut içi sıvı/asidite gözlenmiştir.



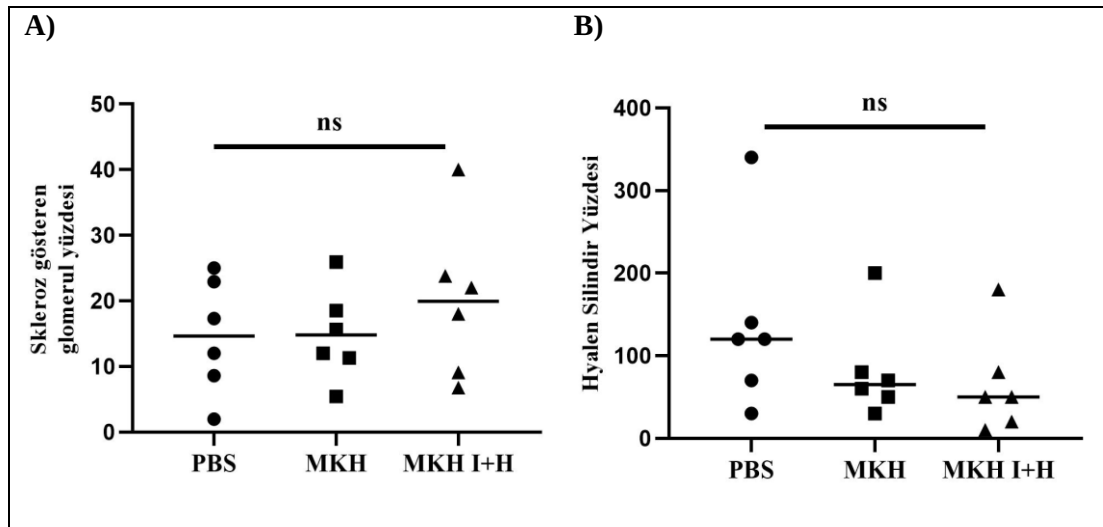
Şekil 4.33. PAN veriliminin ardından böbrek hasarına bağlı fizyolojik değişimler. A- B) Böbrek hasarına bağlı vücut içi sıvı birikiminden kaynaklı şiş karın, C) hasarlı böbrek görüntüsü. Resimler tedavi uygulamasından sonra 9. günde alınmıştır.

Histokimya Boyamaları

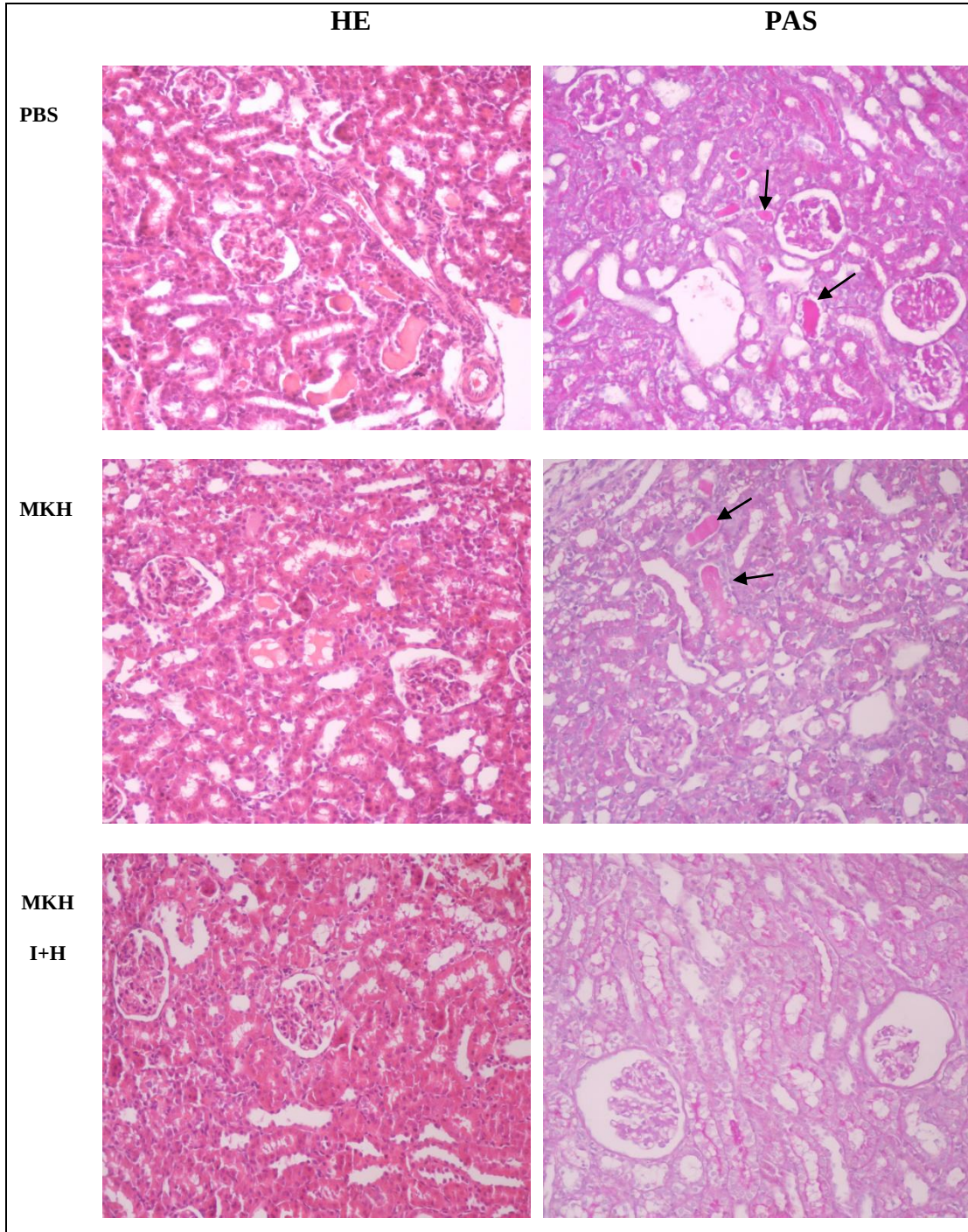
Sıçan böbrek dokuları sakrifikasyon aşamasında çıkarıldıktan sonra parafine gömülerek veya frozen olarak dondurulmuştur. Parafine gömülü sıçan böbrek dokuları kesildikten sonra Hematoksilen-eozin (HE), Periyodik-Asit (PAS), Trikrom ve Jones metenamin silver (JMS) boyamaları yapılmıştır. Sıçan böbrek dokularının birçoğundan ince kesit alınamadığından ötürü Trikrom ve JMS Boyamaları sonuç vermemiştir. HE boyaması ile dokulara bakıldığında PBS ve MKH uygulanan grupların dokularında glomerüller kaçağa bağlı, glomerül dışındaki bölgelerde protein birikimleri (pembe renk) birçok yerde birikim göstermesine rağmen, MKH I+H'lerde bu protein granüllerinin az sayıda olduğu gözlenmiştir. Ayrıca MKH I+H uygulanan grupta PAS boyaması ile glomerüller bazal membrandan ayrımı net şekilde gözlemlenmiştir ancak glomerüllerin diğer bölümleri daha bütün halde bulunmakta ve segment ayrımı net bir şekilde görülmektedir. PAN verilip FSGS oluşturulup PBS,

MKH ve MKH I+H verilen sıçanların böbrekleri histokimyasal boyamanın ardından her grupta en az 50 glomerul sayılmış ve skleroz gösteren glomerullerin glomerul sayısına göre yüzdesi hesaplanmıştır, Aynı zamanda en az 10 alana bakılarak proteinüriyi gösteren hyalen silindirler sayılmış ve alana düşen protein droplet/silindir yüzdesi hesaplanmıştır (Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.).

Bu incelemeye göre sırasıyla sklerozlu glomerul ve hyalen silindirlerinin yüzdesi PBS grubunda %14,99 ve %136,67, MKH grubunda %14,85 ve %81,67; MKH I+H grubunda ise %19,84 ve %65 olarak bulunmuştur (Şekil 4.35.). MKH I+H verilen grupta anlamlı olarak hyalen silindir sayısı azalmıştır bu da bizim proteinüri azalmasını histolojik incelemeyle de kanıtlar niteliktedir. Glomerular sklerozun artması şaşırtmıştır elektron mikroskopisi sonuçlarına göre fakat alınan kesit seviyesi kalınlığı ve PAS boyamasının yanında dokuların Masson Trikrom ile boyanamaması skleroz ile ilişkili azalma veya artma konusunda kesin bir fikir verememektedir.



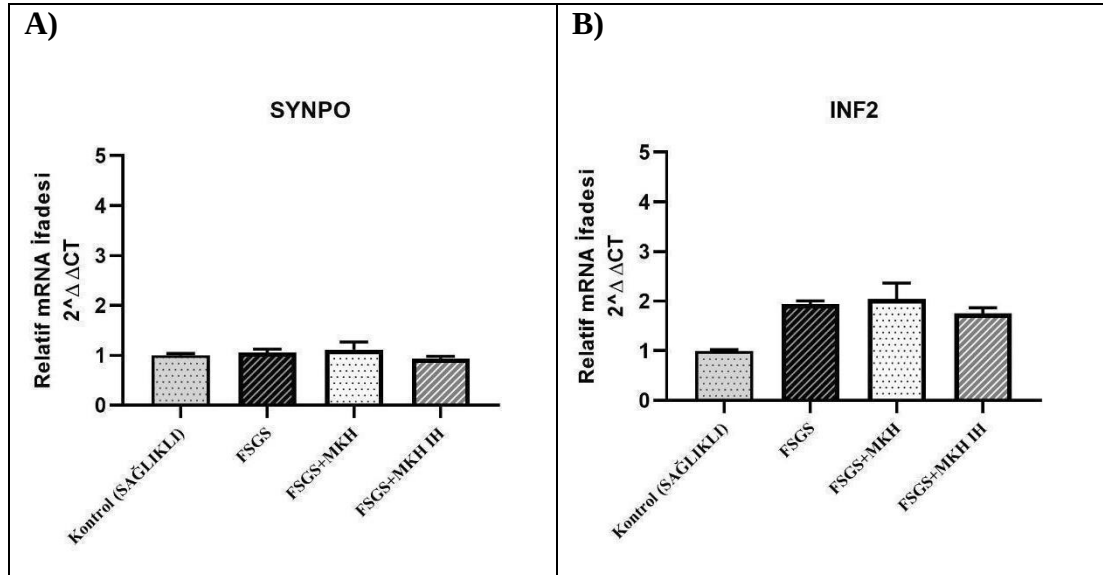
Şekil 4.34. Böbrek doku kesitlerinin skleroz gösteren glomerul ve hyalen silindir yüzde grafikleri. PBS, MKH ve MKH I+H gruplarının tedavinin 9. Gününde alınan böbrek doku kesitlerinin A) skleroz gösteren glomerul ve B) hyalen silindir yüzdelерinin grafikleri. ns= not significant (p-değeri $\geq 0,05$)



Şekil 4.35. PAN ile FSGS modeli oluşturulmuş ve ardından MKH/MKH I+H tedavisi uygulanmış ve PBS (tedavi uygulanmayan) uygulamasının 9. Gününde alınan böbrek kesitlerinin HE ve PAS boyamaları. Sıçan dokularının histopatolojik analizi. Ok=protein birikimlerini göstermektedir. HE=Hematoksilen-eozin, PAS= Periyodik asit shiff

SYNPO ve INF2 mRNA İfadelerinin Gösterilmesi

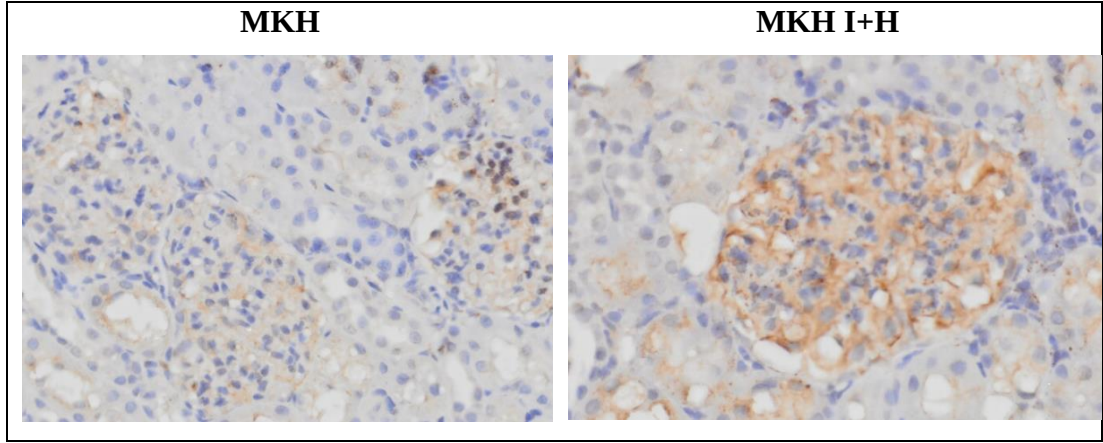
Sıçan böbrek dokuları çıkarıldıktan sonra mRNA düzeyinde *Inf2* ve *Synpo* ifadelerinin gösterilmesi amaçlandı. Bu amaçla kontrol(sağlıklı) sıçana göre FSGS, FSGS-MKH ve FSGS-MKH I+H gruplarının *Synpo* ve *Inf2* ifadeleri analiz edildi. Kontrole göre *Synpo* ifadesi hiçbir grupta değişmezken. *Inf2* ifadesi yaklaşık 2 kat kadar her grupta artış göstermektedir. Gruplar birbiriyle kıyaslandığında ise aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Şekil 4.36). PAN verilimine bağlı podosit hasarını takiben *Synpo* ve *Inf2* seviyelerinin azalması beklenirken, total böbrek dokusundan RNA elde edildiği için glomeruldeki azalmanın saptanamamış olabilir veya örneklemdaki zamanlama doğru olmayabilir.



Şekil 4.36. Sıçan böbrek dokularının *Synpo* ve *Inf2* mRNA ifadelerinin değişim grafiği. Kontrol (sağlıklı sıçanlar n=2) ve FSGS (FSGS modeli oluşturulan sıçanlar her grup için n=6) gruplarının böbrek dokusundaki A) *Synpo* ve B) *Inf2* mRNA ifadeleri GAPDH'a göre normalize edilmiştir ve sağlıklı kontrole göre $\Delta\Delta CT$ metodu kullanılarak kat değişimi belirlenmiştir.

Immunohistokimya Analizleri

FSGS modeline MKH/MKH I+H tedavisi sonrası 9. günde aldığımız böbrek kesitlerini *Synpo* antikoru ile boyadığımızda MKH I+H'lerde glomerullarda *Synpo* boyanmasının MKH'lere oranla daha koyu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.37.).

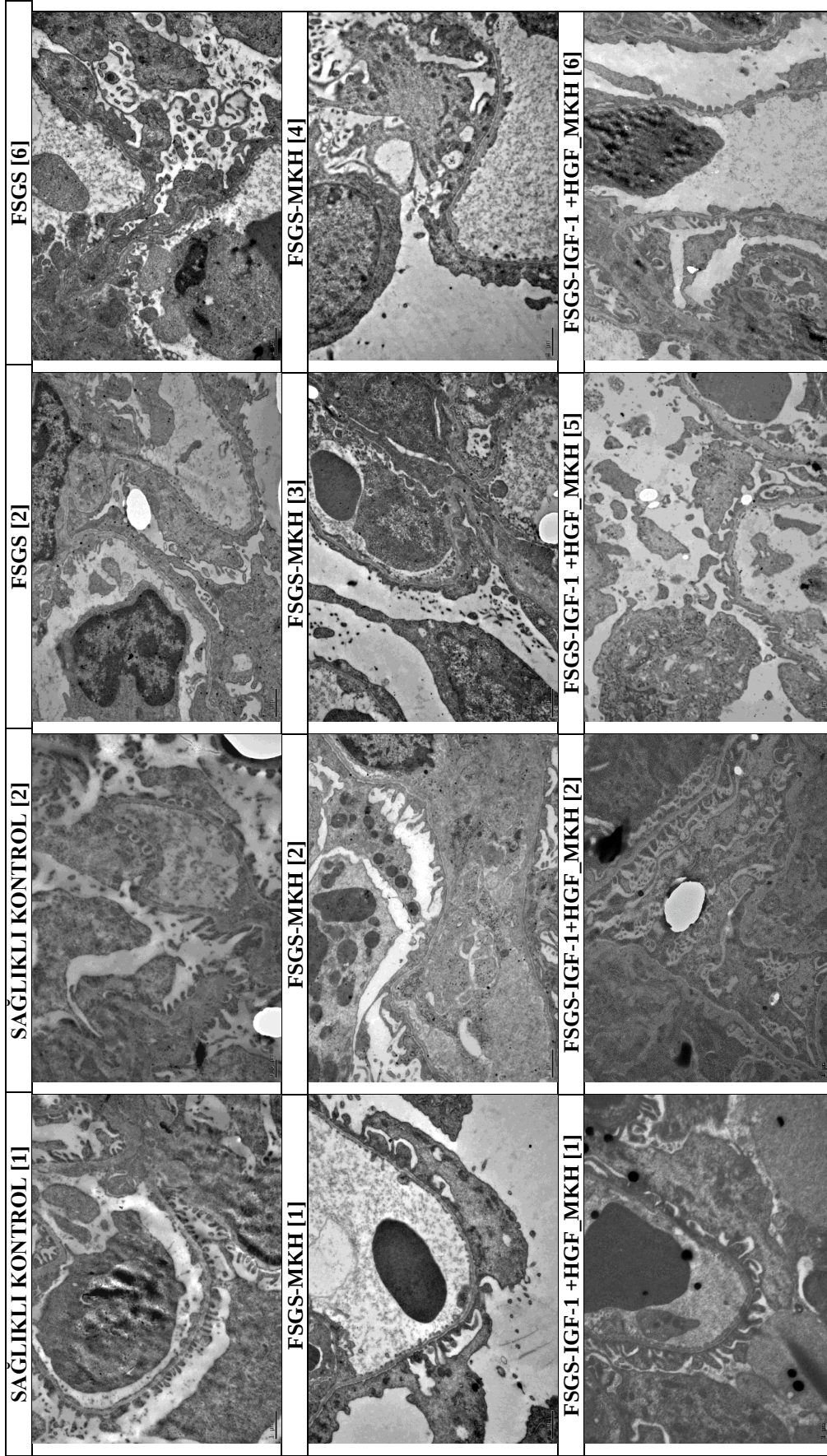


Şekil 4.37. PAN ile FSGS modeli oluşturulmuş ve ardından MKH/MKH I+H tedavisi uygulamasının 9. Gününde alınan böbrek kesitlerinin Synpo antikoru ile işaretlendikten sonra çekilen görüntüleri.

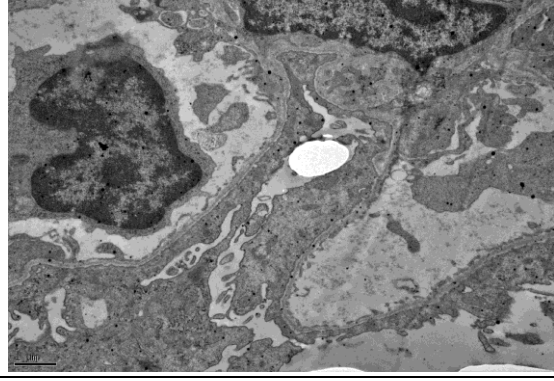
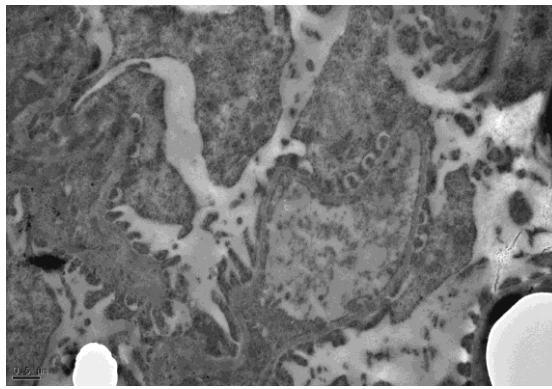
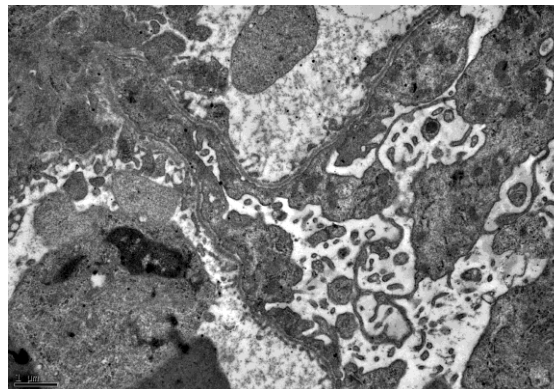
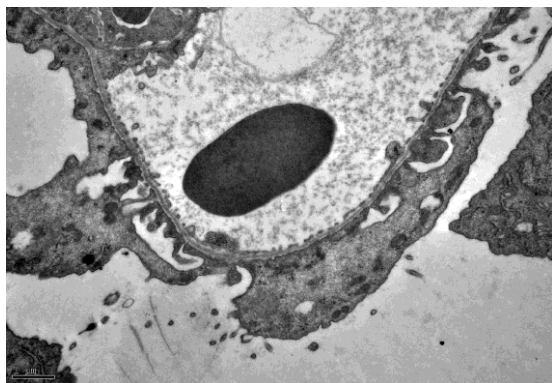
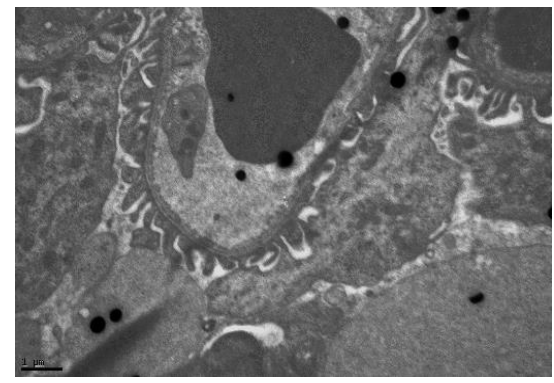
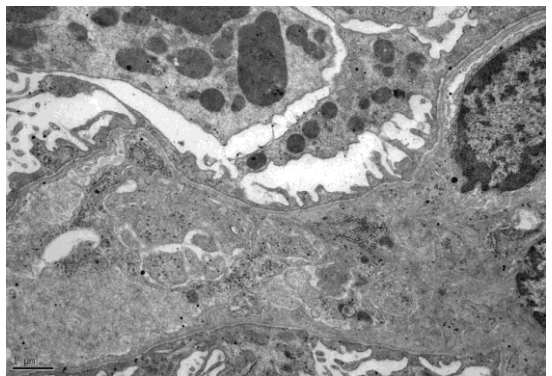
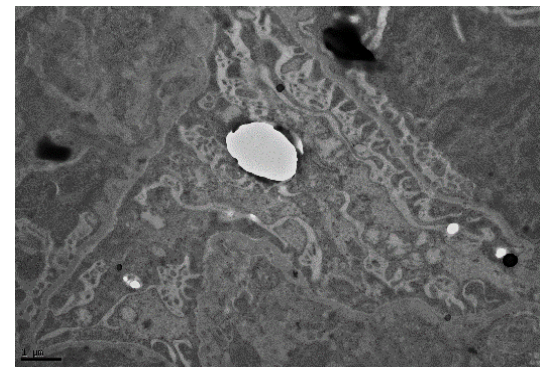
Elektron Mikroskobu Görüntüleri

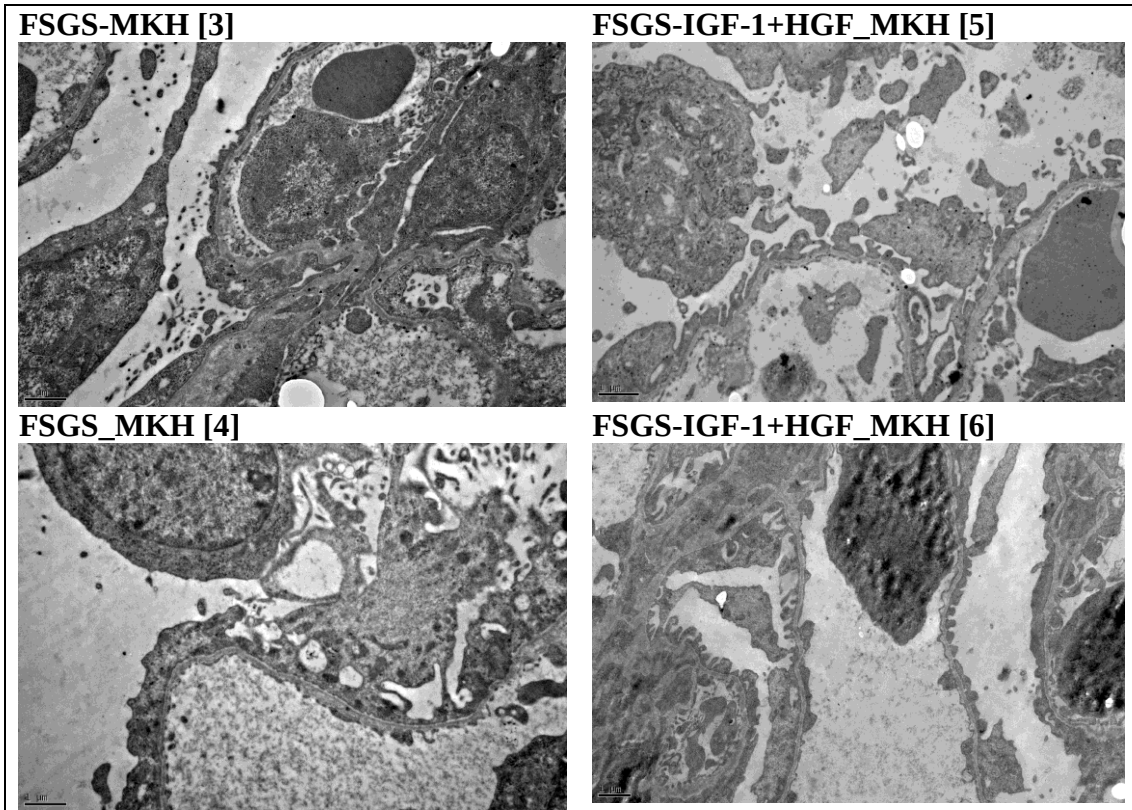
Sıçanların çıkarılan böbrek dokuları aynı zamanda elektron mikroskobunda (EM) da incelenmiştir. EM görüntülerine göre PAN grubunda tamamen slit diyafram kaybı ve podosit efasmanı gözlenirken, MKH I+H grubunda yer yer slit diyafram kaybı ve podosit efasmanı gözlenmesine rağmen genel olarak podositlerin ayaksa çıkıntıları net bir şekilde görülmekte, podositler bütün yapısını korumaya devam etmektedirler (Şekil 4.38. ve Şekil 4.39.). Her dokuya ait kesitler hazırlanmasına rağmen, elektron mikroskobu (EM) görüntüleri, kesitlerin iyi alınamaması ve görüntüleme esnasında yanması sonucu tüm hayvan dokulardan alınamamıştır.

Tüm sonuçları toplayıp değerlendirdiğimizde IGF-1+HGF ile indüklenen kemik iliği kaynaklı MKH'ler migratuar ve immunmodülatör kapasitesi yüksek hücrelerdir. *In vitro* ve *in vivo* podosit hasar modeli için MKH I+H'ler podositlerin aktin hücre iskeleti yapısını geri kazandırması, slit diyafram rejenerasyonu ile protein kaçaklarını azaltması ile nefrotik sendromlar için tedavi kaynağı olarak rejeneratif potansiyeli yüksek hücreler olarak gözükülmektedirler.



Şekil 4.38. Sağlıklı, FSGS, FSGS_MKH ve FSGS_IGF-1+HGF_MKH grubu glomerüler kesitlerinin elektron mikroskobu görüntüleri.
15Kx büyütme

SAĞLIKLI KONTROL [1]**FSGS [2]****SAĞLIKLI KONTROL [2]****FSGS [6]****FSGS-MKH [1]****FSGS-IGF-1 +HGF_MKH [1]****FSGS-MKH [2]****FSGS-IGF-1+HGF_MKH [2]**



Şekil 4.39. Sağlıklı, FSGS, FSGS_MKH ve FSGS_IGF-1+HGF_MKH grubu glomerüler kesitlerinin elektron mikroskobu görüntülerinin 2'li karşılaştırmalı görüntüleri. Sağlıklı (PAN uygulanmayan n=2, Sağlıklı Kontrol No [1] ve [2]), FSGS (*i.p.* PAN uygulanan n=2 FSGS No [1] ve [2]), FSGS_MKH (*i.p.* PAN uygulanan n=4, FSGS_MKH No [1], [2], [3] ve [4]) FSGS-IGF-1+HGF_MKH (*i.p.* PAN uygulanan n=4 FSGS No [1], [2], [5] ve [6]). 15Kx büyütme

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'nin podosit kimyasal hasar modellerinde hasarlı alana göçünün artacağı, inflamasyonun baskılanarak rejenerasyona katkı sağlayacağı ve bu sayede hastalığın seyrini yavaşlatacağı yönündeki hipotezimizi test etmek için *in vitro* ortamda Kİ-MKH'leri IGF-1 ve HGF ile lisanslandıktan sonra temel karakterizasyonu; hücre morfolojisi, farklılaşma potansiyeli ve yüzey belirteçlerinin ifadeleri ile ve ileri karakterizasyonları ise; yara iyileşmesi, salgıladığı faktörler ve gen ifade analizleri ile yapıldı, IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerin hasarlı podosit hücreleri üzerine etkisi *in vitro* hasar modelinde podosit aktin hücre iskeleti yapısı ve gen ifade düzeyinde değişimler ile saptandı ve sıçanlarda oluşturulan *in vivo* hasar modelinde etkisi proteinüri analizi, gen ifadeleri, histokimya, immunohistokimya ve elektron mikroskobu incelemeleri ile gösterildi.

Deneylerde kullanılan MKH'ler ticari olarak satın alınmış ve karakterizasyonu tamamlanmış hücreler olmasına rağmen, hücrelerin çeşitli faktörlerle indüklenmesi MKH'leri farklılaşmaya yönlendirebilmekte ve morfolojik görünümünü değiştirerek hücrelerin karakterini değiştirebilmektedir (2, 334). HGF lisanslaması ile kemik iliği, kemik iliğinden izole edilen CD90⁺ hücreler ve kemik iliği progenitor hücreleri, HGF +FGF-4 lisanslaması ile hepatositlere ve hepatosit benzeri hücrelere farklılaşmaktadır (335-338). IGF-1'in yüksek konsantrasyonu ise (400-800 ng/ml) MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını indüklemektedir (339). MKH'lerin farklı araştırmacılar tarafından tutarsız karakterizasyonunun önünü almak için, Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT), MKH'leri tanımlamada plastiğe- yapışan, spesifik yüzey antijen ekspresyonu, akış sitometrisi ile değerlendirme ve standart *in vitro* koşullar altında çoklu farklılaşma potansiyeli dahil olmak üzere minimum kriterleri belirlemiştir (150). IGF-1+HGF indüksiyonu ile MKH'lerin, mezenkimal kök hücre karakterizasyonu koruduğu, kültür kabına yapıştığı ve fibroblast benzeri iğsi morfolojisi gösterdiği (şekil 4.1.), yüzey belirteçleri yönünden standart kültür ortamlarında çoğaltılan MKH'ler ile benzer olduğu (şekil 4.2.), adipojenik ve osteojenik hücrelere farklılaşabildiği (şekil 4.3. ve 4.4) gösterildi.

IGF-1+HGF_MKH'ler adipojenik ve osteojenik farklılaşma ortamında kültürde 21 gün tutulduktan sonra adipojenik farklılaşmayı gösteren Oil Red-O ile ve osteojenik farklılaşma karakterini gösteren Alizarin Red boyaları ile pozitif olarak

boyandı, MKH belirteçleri CD44, CD73, CD90 ve CD105'i yüzey belirteçlerini pozitif olarak ifade ettiği (>90%), CD34 ve CD45 hematopoetik hücre yüzey belirteçlerini ise negatif olarak (<%2) olduğu gösterildi. Negatif olarak çıkması beklenen HLA-DR ifadesi ise hem lisanslanan hem lisanslanmayan MKH'lerde %20 civarında bulundu. Bu sonuç, ISCT kriterlerine göre MKH özelliğinden sapma göstermiştir ancak düşük floresan yoğunluğuna sahiptir. Bu seçilen antikörün epitopu kaynaklı olabileceği gibi; Kİ-MKH'lerin, HLA-DR'yi yalnızca IFN- γ gibi enflamatuar moleküller varlığında değil normal kültür koşulları altında da ifade ettiğini gösteren çalışmalar bildirilmiştir (340, 341). Kültürdeki Kİ-MKH'lerde değişken HLA-DR+ hücre yüzdeleri Barselona hücre üretim tesisinde (ortalama $19,8 \pm 15,6$, otolog kullanım için klinik araştırmalara kayıtlı hastalardan, min %<1-max % 77.7) ve Helsinki hücre üretim tesisinde (ortalama $19,2 \pm 17,4$, allojenik kullanım için sağlıklı donörlerden, min %<1-max %60.5) üretilen 130 partide gösterilmiştir (342). Her iki merkezden alınan MKH serileri fenotip, kültürde plastik yüzeye yapışma, fibroblast benzeri morfoloji, farklılaşma potansiyeli ve *in vitro* immünomodülasyon kapasitesi açısından kendi düzenleyici otoriteleri tarafından onaylanan spesifikasyonlara uygun bulunmuştur (342). HLA-DR ifadesi dikkate alınmamış, MKH'lerin transplantasyon sonrası rejeksiyona sebep olduğu bildirilmemiştir, aksine, graft-versus-host hastalığının (GvHD) tedavisinde kullanılmaktadır (183, 343) . İlginç bir şekilde, HLA-DR ifade artışına sebep olan IFN- γ ile lisanslanan MKH'ler, toleransı indüklemek için GvHD'nin tedavisinde kullanılmaktadır (341). Tüm bu tartışmanın ötesinde HLA-DR'nin pozitifliğinin epitop kaynaklı olabileceği göz önünde tutularak epitopu farklı bir antikörle incelenmesi uygun olacaktır.

Ayrıca, Kİ-MKH'lerde IGF-1+HGF ile indüksiyon sonrası, köklülük ve tümörojenite ile ilişkili CD200, CD271, CD184/CXCR4, SSEA4 yüzey belirteçlerinin ifadesinin akım sitometri ile negatif (<%3) olduğu belirlendi (şekil 4.2.). CD200, Kİ-MKH'lerde RUNX2 ve DLX5 genlerinin ifadesini artırarak osteoblastik soya yönelimi artırmaktadır (344). Prostat (PC3, DU145, VCAP) ve meme kanserlerinde (MDA-MB231, MCF-7) CD44+ hücre popülasyonu içerisinde, glioblastoma (SF295, SNB75, U251) ve kolon kanserlerinde (HT-29, HT-116, SW48) CD133+ popülasyonu içerisinde CD200+ ifade eden hücrelerin kanser kök hücre sağ kalımını, tümör toleransını koruduğu ve daha invaziv ve metastatik hücreler olduğu gösterilmiştir

(345) CD44+ normal insan kemik iliği MKH'lerinde CD200'ü de ifade eden farklı bir alt popülasyonun bulunması ve CD200R+ ifade eden makrofajlardan TNF- α sekresyonunu azaltması, kök hücrelerin immün sistemden kaçmak için CD200 ifadesini artırdığını düşündürmektedir (322, 344). CD133, epitel hücrelerde ifade edilmekte, kanser kök hücre belirteci olarak glioblastoma (346), kolon kanseri ve çeşitli kanserlerde hücre çoğalması ve farklılaşmasında yer almakta (347) ve agresif kanser fenotipi ile ilişkilendirilmektedir (348). Yüksek agresif karakterizasyon gösteren Ewing sarkom ailesi tümörlerinde CD133+ kanser kök hücre popülasyonunu MKH benzeri adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma gösterdiği, CD133+ glioblastoma başlatıcı hücrelerin ise MKH belirteçleri CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 ve CD166 ifade ettiği gösterilmiştir. SSEA4, pluripotent kök hücre belirteci ve aynı zamanda kemoterapiye dirençli kötü progresyonlu, metastatik kanserlerle ilişkilendirilmiştir (326, 337, 349, 350). Erkek nude farelerle yapılan bir çalışmada androjene duyarlı LNCaP prostat kanser hücreleri ile beraber MKH'ler subkutan uygulaması sonrası, MKH'lerin SSEA4 *overespresyonu* ile tümör hücre gelişimini desteklediği gösterilmiştir (351). İnsan prostat kanser ve hepataselüler kanserlerinde SSEA4 ifade eden MKH'lerin daha kötü prognozla ve sağ kalımla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (351, 352). CD271 (CD75-nörotrofin reseptörü), meme, metastatik melanoma, beyin, baş boyun kanserlerinde yüksek ifadesi görülmektedir (353-356). Meme kanserinde, kemik iliği MKH'lerde GD2 ile beraber CD271 ifadesinin kanseri başlatıcı hücrelerle pozitif korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir (357). CD184/CXCR4 glioblastoma ve baş boyun kanserlerde tümör başlatıcı/initiating hücrelerde, radyoterapi veya kemoterapiye dirençli kanserlerde ve kanser kök hücrelerinde ifade olmaktadır (329, 358, 359). MKH'lerde CD200, CD271, CD184/CXCR4, SSEA4 ekspresyonlarının negatif olarak bulunması MKH'leri IGF-1 ve HGF'nin birlikte koşullandırma stratejisinin güvenli olduğuna, tümörojenik potansiyelinin olmadığına ve kliniğe uygulanabilir olduğuna işaret etmektedir.

MKH'lerin IGF-1+HGF ile fenotipine yönelik karakterizasyonunun ardından ileri karakterizasyonları için hücrelerin migrasyon profili *in vitro* yara iyileşmesi ile gösterildi (Şekil 4.7.). 12. saatten itibaren yara iyileşmesi/kapanmasının en iyi IGF-1+HGF ile indüklenen MKH grubunda olduğunun gözlenmesi IGF-1 ve HGF indüksiyonunun MKH'lerin migrasyonunu hızlandırarak yara iyileşmesini

artırabileceğine işaret etmektedir. MKH kültüründe IGF-1 ve HGF uygulaması ile sekretomu; sitokin, büyüme faktörleri ve de salgılanan metabolitleri kapsamında değerlendirildi. Sekretom, fizyolojik ve/veya patolojik uyaranlara yanıt olarak hücre dışı boşluğa salgılanan bir dizi biyoaktif molekül/faktör içerir, dokulara ve hücrelere özgüdür (360). MKH'lerin sekretomunun bileşimi üzerine yapılan çalışmalar, MKH'lerin dinamiklerinin ve terapötik etkilerinin altında yatan mekanizmaların anlaşılması için değerli bir araçtır (361, 362). IGF-1 ve HGF ile lisanslanan MKH'lerin iki ayrı kültüründen toplanan süpernatantlarla iki ayrı farklı zamanda yapılan metabolomiks analizi ile yakalanan ve tanımlanmış metabolitlerden %40'ı ortak olarak saptandı. Yapılan iki analiz sonuçları IGF-1+HGF_MKH'lerin MKH'lere göre anlamlı olarak değişen ortak bir metabolit kümesi vermedi. Ortak yolak olarak ise, sadece 1. Analizden 2-hidroksiesteronun ve 2. Analizden çıkan Kolesterol ile, steroid hormon metabolizması belirlendi. Metabolitler, enerji dönüşümü ve biyosentezde yer alan küçük biyolojik moleküllerdir. Metabolizmanın incelenmesi, metabolitlerin reaktivitesi, yapısal çeşitliliği ve geniş konsantrasyon aralığı nedeniyle doğası gereği zordur (363). GC-MS, suda çözünür geniş metabolit aralığını ölçebilen çok yönlü bir tekniktir (364). Düşük moleküler ağırlıklı ve uçucu analitleri ölçmektedir. Ancak GC, enjeksiyon prosedürü sırasında moleküllerin buharlaşmasını gerektirir. Sıcak enjeksiyonlar, di- ve trifosfatlar gibi ısıya duyarlı bileşiklerin zarar görmeden ölçülmesini imkansız hale getirmektedir (363). Trimetilasyonla örnekler türevlendirilmesine rağmen örnekler enjeksiyon sırasında ayrışabilmektedir (365). Aynı örnekte bile farklı zamanlarda tanımlanabilen ortak metabolitlerin sayısının azlığı ve dolayısıyla ortak metabolitlerin belirlenememesinin kaynağı GC-MS ile ilgili limitasyonlardan kaynaklı olabilir.

Metabolomiks analizlerinden yapılan iki analizden ilkinde IGF-1+HGF ile lisanslanan MKH'ler yanı sıra tek başına IGF-1 veya HGF ile lisanslanan MKH gruplarının metabolitleri de kıyaslandı. İlk analiz değerlendirildiğinde tek IGF-1 veya HGF ile indüklenen MKH'lerde anlamlı olarak Iminodiacetic acid, Picolonic acid metabolitleri artmakta, Metil stearate ise azalmaktadır. Picolinic Acid, L-tripofanın (TRP) endojen metaboliti olup, vücutta nöroprotektif, immünolojik ve anti-proliferatif etkileri vardır. Picolinic Asit'in sentezi, Kynurenin yolağının (KY) ürünü olarak yer almakta ve diğer KY metabolitleri gibi merkezi sinir sistemi inflamatuvar

hastalıklarının ve muhtemel diğer organların patogeneğinde rol oynamaktadır (366). İminodiasetik asit (IA), genellikle IDA olarak kısaltılan HN (CH₂CO₂H)₂ formülüne sahip organik bileşiktir. Beyaz bir katı olan bileşik, bir dikarboksilik asit amindir. IA'nın yüksek metal-şelat kapasitesi vardır. IA- modifiye insan serum albüminin (I-HSA) Alzheimer hastalığı ile ilişkili metal indüklü amiloid β -protein agregasyonunu inhibe ettiği, sitotoksitesini ve aynı zamanda reaktif oksijen türleri aracılı hasarı azalttığını göstermişlerdir (367), Metil stereat, yağ asit metil ester ve ostadokanoat esterdir, mezenkimal kök hücrelerin migrasyonunu artırmakta ve kırıkta hasar tamirini hızlandırmaktadır (368).

IGF-1+HGF ile indüklenen MKH'lerden daha sonra salgıladığı faktörler açısından terapötik etki potansiyelini değerlendirmek amacıyla sitokin dizin yapılmıştır. IGF-1+HGF grubunda, IGF-1, HGF, ve kontrol MKH'lere göre en yüksek IL-6 düzeyi olmak üzere anjiyojenin ve IGFBP2 düzeyleri de artış göstermektedir. IL-6, tek IGF-1 ve tek HGF ile indüklenen MKH gruplarında ise azalmaktadır. IL-6'ya *Multi-Analyte Flow Assay Kit* ile bakıldığında da IGF-1+HGF'lerde IGF-1 ve HGF ile indüklenen MKH gruplarına göre artış göstermekte, kontrol MKH'lerine yakın düzeyde ifade edilmektedir. IL-6 sadece immün ve inflamatuvar yanıtı düzenlemekle kalmayıp aynı zamanda hematopoezi, metabolizmayı ve organ gelişimini de etkileyen bir pleiotropik sitokindir. Birçok glomerüler hastalıkta, IL-6'nın glomerüler inflamasyonun önemli bir aracısı olduğu gösterilmiştir (369). Podosit hücrelerinin üzerinde IL-6 reseptörü (IL-6R) bulunmaktadır. IL-6 esas olarak lökositler tarafından üretilmekte fakat, anjiyotensin II'ye yanıt olarak mezengiyal hücrelerden ve lipopolisakkarit uyarımı sonrasında podosit hücrelerinden de sentezlenmekte ve salgılanmaktadır (370). Podosit kültürüne rekombinant IL-6 uygulamasının bu hücrelerin proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (371). Bununla beraber yüksek glukoz podositlerde IL-6 salgılanmasını arttırmaktadır ve podosit hipertrofisini indüklemektedir (372). MKH'lerin IL-6 ile indüklenmesi ise kök hücre köklülüğünü artırmakta ve farklılaşmayı azaltmaktadır (330). IL-6 overeksprese eden MKH'lerin immünosüpresif etkisi artmaktadır. IL-6'nın MKH'lerin proliferasyon yeteneğine, apoptoza karşı korunmasına, farklılaşmamış düzeyde kalmasına ve yara iyileşmesine bilinen etkileri düşünüldüğünde IL-6 düzeylerinin kontrol grubuna göre

IGF-1 ve HGF ile birlikte indüksiyonunun benzer olması tek IGF-1 veya HGF indüksiyonundan (330) daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tek IGF-1 veya HGF ile indüksiyonu MKH'lerde IL-6, BDNF, MCP-1, SDF-1 α ve TIMP-1'i kontrole göre belirgin olarak azaltmaktadır. IGF-1 ile indüksiyon Angiogenin salgısında belirgin değişime yol açmazken, HGF ile indüksiyon azalmaya yol açmaktadır. IGF-1+HGF ile birlikte MKH indüksiyonu sonucu diğer gruplara göre Angiogenin salgısında artış gözlenmesi ilginçtir. Angiogenin, anjiyogenezi için önemli bir faktör olup, MKH'lerin sağ kalımını, engrafmanını, hasar mikroçevresinde canlılığını artırmakta, miyokardiyal enfarksiyonda angiogenin taşıyan MKH'ler, vaskülogenezi artırarak ventriküler yeniden modellenmesini hafifletmektedir (373). İlerleyici böbrek yetmezlikleri tubulointerstisyel ve glomerüler fibrozis gelişimi ile mikrovaskülizasyonda progresif kayıp ile karakterizedir (374). Böbrek vasküler yapısındaki değişikliklerin mikrovasküler proliferasyonu tetikleyen böbrek hasarına bağlı olabileceği gösterilmiştir (375) ve vasküler modellemelerin böbrek fonksiyonunu artırdığı, vaskülarizasyonu artıracak terapötik yaklaşımların geliştirilmesi gerekliliği üzerinde vurgu yapılmaktadır (376). Farklı donörlerden alınan MKH'lerle insan endotelial hücrelerle (HUVEC) yapılan ko-kültür çalışmasında, endotelial hücrelerin anjiyogenezi ile beraber MKH'lerin besiyerinde VEGF, HGF, MCP-1, IL-6 ve TGF- β 1'in anlamlı olarak, IGF-1'in minimal düzeyde arttığı, nötralize edici antikorlar varlığında ise VEGF, MCP-1, IL-6'nın parakrin anjiyojenik etkilere sahip faktörler olduğu gösterilmiştir (377).

Bu tez çalışmasında IGF-1 ile indüksiyon IGFBP2 salgısında artışa yol açarken HGF ile indüksiyon azalışa yol açtığı saptandı. IGFBP2'de artışın IGF-1 ve HGF birlikte indüksiyonu ile tek başına IGF-1 indüksiyonundan daha fazla olması dikkat çekicidir. IGFBP2, pro-anjiyojenik özellikleriyle tanınmaktadır, nükleer translokasyonlar ile VEGF geni promotorunu aktive etmekte ve anjiyogenezi artırmaktadır (378). Serumda IGFBP2 düşüklüğü obezite, tip 2 diyabet, insülin duyarlılığı riski ile ilişkilendirilmesine rağmen (379) IGFBP2 metabolik hastalıkların ve karsinomun patogenezinde yer almaktadır (380). Erken böbrek hasarında ise IGFBP2 düzeyinin artması biyo-belirteç olarak kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır (381). İnsulin bağlama proteinleri (IGFBP) dolaşımdaki IGF-1'lerin bağlanmasını sağlayarak IGF'in sinyalleşmesini modüle etmekte ve IGF'lerin yarı

ömrünü uzatmaktadır (382, 383). IGF-1+HGF ve IGF-1 gruplarında IGFBP2 artışı IGF-1 artışı ile pozitif korelasyon gösteriyor olabilir. TIMP-2 salgısı en fazla HGF ile indüklenen grupta olmak üzere tüm indüksiyon gruplarında azalmıştır. IGF-1 salgısı ise sadece IGF-1 ve IGF-1+HGF ile indüklenen grupta gözlenmektedir. Eşik değer sinyalinin azaltıldığı (zorlanmış analiz) analize göre IGF-1+HGF, MKH'ler tek başına IGF-1 ile indüksiyon ve tek başına HGF ile indüksiyon gruplarıyla karşılaştırıldığında IL-16 düzeyi yaklaşık 20 kat azalmaktadır (şekil 4. 15.). IL-16 lenfosit kemoatraktan proteini olup, böbrekte en çok tübüllerde ifade olmakta, glomerüllerde ve nefronlarda da IL-16'nın kemotaktik formu güçlü bir şekilde saptanmaktadır (384). IL-16'nın antagonistik antikor tedavisi veya inaktivasyonu, iskemik reperfüzyon hasarı fare modelinde kontrol farelerine kıyasla düşük serum kreatinin veya kan üre nitrojen seviyelerinin eşlik ettiği iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmaktadır (384). IGF-1+HGF indüksiyonu ile MKH'lerde IL-16'nın düşüklüğü böbrek hasar modelleri için avantaj olabileceğine işaret etmektedir.

MKH gruplarının mRNA ifadelerine bakıldığında ise IGF-1+HGF_MKH'lerde *IDO 1* ve *TGF- β* mRNA ifadeleri diğer gruplara göre artış göstermektedir. IDO-1'in immunosüpresif fonksiyonu vardır, inflamasyona cevap olarak hücrelerden salınmaktadır (385). MKH'ler tarafından salgılanan TGF- β , MKH'lerin immün modülatör fonksiyonu ile ilişkili önemli bir faktördür (161). TGF- β , aşırı inflamatuvar yanıtların inhibisyonunda yer alan, iyi bilinen bir immünosüpresif faktördür (386-388). IDO-1, böbrek fibrojenezi sırasında böbrek tübüllerinde artmaktadır, *in vitro* böbrek tübüler hücrelerde (MDCK hücreleri) TGF- β 1 indüksiyonu ile IDO-1 düzeyi artmaktadır ve *in vivo* sıçan UUO modelinde IDO'nun TGF- β ile tübüllerde ko-lokalizasyonu görülmektedir. IDO inhibitörü 1-Methyl-D-tryptophan (1-MT) kullanıldığında fibrotik onarım mekanizmasının bir parçası olduğuna inanılan TGF- β 1 kaynaklı epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) artması, IDO'nun böbrek fibrojeninde artan EMT'yi azaltarak renoprotektif bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir (389).

MKH I+H'lerde IL-6, MCP-1, Anjiyojenin faktörlerinin yanı sıra *TGF- β* ifadesinin de arttığının gözlenmesi hücrelerin anjiyojenik etki potansiyelinin arttığını, *IDO-1* ile *TGF- β* beraber yüksek ifadesinin ise anti-inflamatuvar etkisi ve IDO-1 modülasyonu ile EMT geçişini azaltarak renoprotektif etki potansiyelinin

artabileceğini göstermektedir. Pikolinik asit (PA) metaboliti kyneurin yolağında IDO-1'in alt sinyal yolunda bulunmaktadır, IGF-1+HGF MKH'lerde PA artışı kyneurin yolağında IDO-1 üzerinden olabilir. Böbrek tübüler hücrelerde PA, kinolinik asit ile beraber hücrelerin apoptozunu artırmakta, tek başına ise hücreler üzerine bir etkisi gözlenmemektedir (390). MKH I+H'lerde IDO-1 ve TGF- β ifade düzeylerinin artması; hücrelerin anti-inflamatuar yönde bir profil göstermekte olduğunun ve yanı sıra böbrek rejenerasyonunda da IDO-1'in regülatör rolü ile hücrelerin renoprotektif etki potansiyelini artıracak olduğunu düşündürmektedir.

Hücreler *in vitro* ve *in vivo* takibi için çeşitli floresan moleküllerle veya nanopartiküllerle işaretlenerek takip edilmektedir (391, 392). Hücrelerin floresan moleküllerle işaretlendikten sonra kültürde canlı hücrelerde ve hayvan modellerinde takibi hayvan canlıyken veya sakrifiye edildikten sonra doku kesitlerinden floresan görüntüleme cihazlarıyla sağlanabilmektedir. CM-DIL hücre içine alımı ve uyumu, hücre işaretlendikten sonra uzun süreli takibe olanak vermesi ile hücre için en uygun lipofilik floresan ajanlardandır (393). CM-DIL'in miktarını ve dozunu literatürde sıçan MKH işaretlemesinde kullanılan doz ile gerçekleştirdik (394) ve CM-DIL'in insan MKH'leri üzerine toksik etki göstermediğini WST-1 analizi ile gösterdik (şekil 4.5.) ve 30 günlük takip sonunda MKH'lerin floresanı taşımaya devam ettiğini saptadık (şekil 4.6.). *In vivo* deneylerde CM-DIL ile işaretlenmiş hücreler uygulandı ancak otofloresans nedeniyle işaretli hücrelerin takibi ve analizi zor oldu. Sıçan dokusunda insan hücrelerini takip için insan spesifik (örn. β 2-mikroglobulin) gen veya tekrar dizileri (örn. ALU dizileri) takip edilebilir (395, 396).

Çalışmamızda puromisin aminonükleozid kimyasalı ile *in vitro* ve *in vivo* podosit hasar modelleri oluşturulmuştur. *In vitro* PAN dozu podosit aktin hücre-iskeleti fiberlerinin yapısının bozulduğu, hücre boyutlarının küçüldüğü durum göz önüne alınarak ve WST-1 analizi ile hücre sitotoksitesisi ölçülerek 50 μ g/ml PAN dozu kullanıldı. Doz belirlendikten sonra MKH ile hasarlı podosit hücresi arasındaki etkileşimi göstermek amacıyla süzgeç/*transwell* kullanılan doğrudan olmayan/indirekt bir ko-kültür sistemi kuruldu. Ko-kültür için MKH'lerin geçebileceği büyük porlu-8 μ m ve sadece hücre salgısının geçebileceği 4 μ m'lik süzgeçler kullanıldı. IGF-1+HGF_MKH'ler hem salgısı ile hem hücrenin parakrin etkisi ile IGF-1, HGF ve kontrol MKH gruplarına göre podositlerin hücre boyutlarını artırdığı ve aktin hücre-

iskeleti yapısını iyileştirdiği aktine özgü Phalloidin boyası ile işaretlendikten sonra gösterildi (şekil 4.23.). 8 µm'lik süzgeç kullanıldığında migrasyonunun en fazla olduğu hücrelerin IGF-1+HGF_MKH'ler olduğu CM-DIL taşıyan hücreler sayılarak gösterildi. HGF ile yapılan migrasyon ve invazyon çalışmaları ile HGF indüksiyonunun migratuar hücre profilini artırdığı gösterildi. IGF-1'in de invaziv ve mitojenik özelliği vardır. Alt kuyuda biriken hücre sayısı HGF ile indüklenen MKH'lerde kontrol ve IGF-1 gruplarına yakın olduğu aktin yapıyı hücre geçişi ile düzenlemekte olduğu gösterildi (Şekil 4. 23.).

In vitro çalışmaların sonucu daha sonra *in vivo* FSGS modelinde IGF+HGF_MKH etkisi konvansiyonel MKH ile karşılaştırmalı test edildi. Literatürde FSGS modelini oluşturmak için Adriamycin, PAN, LPS gibi kimyasallar kullanılmaktadır (133). Akut FSGS oluşturmak için PAN iyi bir modeldir ve çalışmamız literatürdeki PAN dozu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (397). FSGS'de slit diyafram kaybı ile hastaların idrarındaki protein düzeyleri artmaktadır ve protein (mg/dL)/kreatinin (mg/dL) oranının insanlarda 0.2 mg/mg'den düşük olması beklenirken, 3,5 mg/mg'dan yüksek olması nefrotik sendromla ilgili proteinüri göstergesidir (398). Çalışmamızda podosit hasar oluşumu idrarda proteinüri saptanması ve immunohistokimyasal ve elektron mikroskobu ile morfolojik olarak gösterildi. Yüksek doz PAN veriliminin ardından 2. günden itibaren proteinüri oluşumu, 3. günde ise podosit hasarı ve slit diyafram kaybı görülmektedir (397). PAN veriliminin ardından 72. saat ve 90. saatlerde topladığımız idrar proteinüri düzeylerine baktığımızda 90. saatte 72. saate göre en az 10 kat kadar proteinüri düzeyinde bir artış gördük. PAN uygulaması ile sıçanlar başlangıçta hızlı bir şekilde kilo kaybetmekte sonra muhtemelen ödeme bağlı kilo almaktadır, çalışma süresi sonunda Kontrol/sağlıklı sıçanlara göre vücut ağırlığı ort. beraber sıçanlar yaklaşık 20g azalmaktadır. Klinikte FSGS hastalarında anlamlı bir kilo farkı görülemekte, hayvan çalışması ile PAN uygulaması ile kilo kaybı olmasına rağmen, hızlı bir kilo kaybı ve çalışma boyunca belirgin kilo farkı literatürden yüksek seviye bulundu (399, 400).

FSGS hastalığında hastalarda proteinüri düzeyi idrar protein/kreatin (P/K) oranına göre hesaplanmaktadır (401). Sıçanlarda ise kesin bir aralık bulunmamaktadır. Pilot deneylerimizde sağlıklı hayvanlarda saptadığımız en yüksek değer olan 4,5 mg/mg ve fazlasını proteinüri olarak kabul ettik. FSGS hastalığında ayrıca podosite

özgü Synaptopodin (Synpo), Inverted Formin 2 (INF2) ve Nefrin gibi bazı proteinlerin ifadeleri glomerüllerde azalmaktadır (402-404) Synpo'yu hem RNA hem protein düzeyinde sırası ile RT-qPCR ve immünohistokimyasal olarak, *Inf2*'yi ise RT-qPCR ile değerlendirdik. Immunohistokimyasal olarak incelendiğinde Synpo miktarı glomerüllerde azalmakta, tübüllerde ise artmaktadır. RT-qPCR analizlerinde gruplar birbiriyle kıyaslandığında *Synpo* ve *Inf2* seviyelerinin aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır. PAN verilimine bağlı podosit hasarını takiben *Synpo* ve *Inf2* ifadenme seviyelerinin azalması beklenirken, total böbrek dokusundan RNA elde edilmesi glomerüllerdeki *Synpo* ve *Inf2* ifadenme azalmasını saptanmasını gölgelemiş olabilir. Elektron mikroskobunda ise slit diyafram kaybı ve podosit efasmanı veya tam kaybı olmaktadır. Bu sonuçlara göre FSGS hasar modeli 3. günde oluşmaktadır.

Hasar oluşumunun ardından 2. Hedefimiz hasarın ardından sıçanlara erken dönemde (80. saat) ve geç dönemde (128. saat) MKH veya IGF-1+HGF_MKH uygulanmasının hangisinin daha etkili olacağını karşılaştırmalı olarak belirlemektir. İlk pilot deneyden alınan sonuçlara göre sıçanlara PAN uygulamasını takiben 72. saatte proteinüri olduğu, 90. saatte ise proteinüri değerinin 72. saate göre en az 10 kat arttığı görülmüştür. 90. saatte idrar analizinde proteinüri olduğu, elektron mikroskobunda podosit hasarı ve slit diyafram kaybı ile ileri derecede böbrek hasarı oluştuğunu saptadık. Bu nedenle erken dönem olarak hasarın ivme kazandığı 72 ile 90. saatleri arasında 80. saat (3.-4. Gün arası) ve ileri derecede hasarın meydana geldiği 128. Saat (5.-6. gün arası) geç dönem olarak seçildi. Erken dönem ve geç dönem verilen konvansiyonel MKH ve IGF-1+HGF_MKH'ları 20 gün boyunca takip ederek 3., 9. ve 20. günlerde 24 saatlik idrarlarını topladık. Erken dönemde IGF-1+HGF_MKH'ler 9. günde proteinüriyi azaltırken konvansiyonel MKH'lerin ise herhangi bir etkisinin olmadığını gözlemledik. Geç dönemde tedavi uygulamasında ise hem MKH'lerin hem IGF-1+HGF_MKH'lerin 9. günde proteinüriyi azalttığını saptadık. FSGS'de erken dönem tedavi uygulamalarında IGF-1+HGF_MKH'lerin daha etkin olabileceği ön bulgusundan yola çıkarak ve etkinin en iyi 9. günde görülmesi nedeniyle ana çalışmada PAN hasarının erken döneminde tedavi uygulamasına ve 9. günde deneyin sonlandırılmasına karar verdik.

Pilot deneyleri yapmaktaki diğer bir amacımız ise IGF ve HGF ile kombine indüklenmiş MKH'lerin *in vivo* etkisi ile tek başına IGF-1 veya HGF ile indüklenmiş MKH'ler etkisi arasında fark olup olmadığı sorusunu cevaplamaktı. Bu pilot deney için ise IGF-1 için 2, HGF için 2 olmak üzere toplam 4 sıçanla çalışıldı. Her grupta tek sıçanda proteinüri azalırken, diğer sıçanda proteinürinin devam etmesi, tek büyüme faktörü ile indüklenen MKH'lerin ikili büyüme faktörü ile indüklenen MKH'ler kadar etki edemeyebileceği düşüncesini doğurdu. *In vitro* yara iyileşmesi deneylerinde ikili büyüme faktörü ile indüklenen MKH'lerde tekli büyüme faktörü ile indüklenen MKH'lerden veya indüklenmeyen MKH'lerden daha hızlı gerçekleştiğini gözlemlememiz *in vivo* deneylerde ikili büyüme faktörü ile indüklenen MKH'ler ile alınan sonuçlarımızı desteklemektedir.

Ana deneyde PAN ile hasar oluşturulması ardından sıçanlar üç gruba ayrıldı ve gruplara 3. günde PBS, konvansiyonel MKH veya IGF-1 ve HGF ile kombine indüksiyon yapılarak IGF-1+HGF_MKH verildi. PAN ile hasar verilen ve sadece PBS uygulanan sıçanlar (PAN-PBS grubu) kontrol grubu olarak kullanıldı. Her grupta 6 adet sıçan olmak üzere toplam 18 adet sıçan ile çalışıldı. 9. günde 24 saatlik idrarları toplanarak biyokimyasal olarak proteinüri değerlendirildi. Proteinüri miktarının IGF-1+HGF_MKH grubunda 9. günde halen devam etse de kontrol ve MKH gruplarına göre önemli ölçüde azaldığı gösterildi. Ayrıca MKH grubuyla kıyaslandığında MKH grubu sıçanlarının hepsinde karın içi sıvısı artışı/asidite gözlemlenirken, IGF-1+HGF_MKH grubunda sadece bir sıçanda karın içi sıvı gözlemlendi. Bu sıçanda proteinüri miktarı (81,94 mg/mg) diğer sıçanlara göre oldukça yüksekti (diğer sıçanlarda ortalama protein/kreatinin=18,05±5,46 mg/mg). Muhtemelen çok ileri seviyede hasar oluşumuna bağlı olarak vücut içi sıvının oluştuğu değerlendirildi. IGF-1+HGF_MKH tedavisi ile idrar protein/kreatinin oranlarında PBS veya MKH uygulanan gruplara göre anlamlı azalma saptandı ancak normal düzeylere inmedi. Bu durum tedavinin iki doz olarak uygulamanın FSGS modelinde daha etkin bir düzelme sağlayıp sağlayamayacağı sorusunu doğurdu ve bu soruyu cevaplamak için 72 saatte MKH'lerin böbrekte kaybolduğu yönünde literatür bilgisinden yola çıkarak (397) ilk dozdan 72 saat sonra 2. doz MKH/IGF-1+HGF_MKH vermeye karar verildi. 18 adet sıçan ile çalışma planlanmasına rağmen elimizde yeterli PAN kalmaması ve talep etmiş olduğumuz EK bütçe reddedilmesi nedeniyle 13 adet sıçanda PAN ile FSGS

modeli oluşturuldu. Kontrol grubuna (n=2) PBS, tedavi gruplarına ise MKH (n=5) veya IGF-1+HGF_MKH (n=5) uygulandı. Deney sürecinde 1 adet PBS uygulanan kontrol grubundan ve 1 adet IGF-1+HGF_MKH grubundan iki adet sıçan öldü ve 11 sıçan (PAN (n=1), MKH (n=5), ve IGF-1+HGF_MKH (n=5)) deney sürecini tamamlayabildi. MKH ve IGF-1+HGF_MKH'lerin 72 saat arayla verilmesinin ardından 9. Günde proteinüri değerlendirildi. Sadece PBS uygulanan PAN grubuna göre değerlendirildiğinde hem konvansiyonel MKH ve hem IGF-1+HGF_MKH tedavi grubunda proteinüri de bir azalma gözlemlenmedi (ilgili veriler tezde sunulmamıştır). Ayrıca IGF-1+HGF_MKH grubunda çok fazla vücut içi sıvı ve özellikle karaciğer ve pankreasta organomegali gözlemlendi. İki doz ile çalışmanın daha ileri histolojik ve ultrastrüktürel değerlendirilmeleri yapılmadı ve iki doz etkinin incelenmesi için deneylerin tekrarlanması sonrası IGF-1+HGF_MKH'lerin organomegali bulguları teyit edilirse kliniğe geçiş öncesi bu durumun fizyopatolojisine yönelik daha ileri araştırmalar yapılması gerekecektir.

Bu sonuçlara göre IGF-1 ve HGF ile indüklenmiş MKH uygulaması ile FSGS modeli olan PAN podosit hasarında düzelme saptanmıştır. Proteinüri oluşumu IGF-1+HGF_MKH ile azalmakta ve yavaşlamaktadır. 2 doz IGF-1+HGF_MKH verilimi ise etkili olmamaktadır. IGF-1+HGF_MKH'lerin hasar üzerine ne şekilde etki ettiği ve bu hücrelerin hasarlı bölgeye göçü üzerine *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların artırılması gereklidir. *In vitro* olarak böbrek hücreleriyle MKH'lerin ko-kültür deneyleri ayrıca IGF-1+HGF_MKH'lerin salgıladığı sitokinlerin miktarlarının ELİSA gibi testler ile doğrulamalarının yapılması ve hangi yolak üzerinden inflamasyonu baskıladığı veya rejenerasyona katkısı değerlendirilmelidir. *In vivo* olarak da 2. dozun zamanının değişmesi belki daha etkili bir tedavinin gelişmesini sağlayabilir.

FSGS sıçan modelinde tek doz IGF-1 ve HGF ile kombine indüklenmiş IGF-1+HGF_MKH uygulaması normal düzeylere gerilememekle birlikte idrar protein/kreatinin oranlarında anlamlı düzeyde düşme saptanmıştır. Bu bulgumuz FSGS hastalıklarının tedavisinde IGF-1+HGF_MKH'nın etkili olabileceğine dair ilk kanıtları göstermektedir ve literatüre önemli özgün katkı sağlamaktadır. Tekrarlı dozların daha etkili olup olamayacağını anlamak için daha fazla tekrarlı doz çalışmalarına ihtiyaç vardır. Saptamış olduğumuz terapötik etkinin mekanizması daha ileri kapsamlı projeler ile açıklanabilir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili çıkan yayınlar aşağıda listelenmiştir:

A. Makale ve Kitap Bölümleri:

- 1) **Ozge Burcu Sahan**, Aysen Gunel-Ozcan. “Hepatocyte Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-1 based Cellular Therapies for Oxidative Stress Injury”, Curr Stem Cell Res Ther2021;16(7):771-791, doi:10.2174/1574888X16999201124153753. PMID: 33238860.
- 2) **Şahan Ö. B.**, Özcan A. “Rejenerasyon Kapasitesi Güçlendirilmiş Mezenkimal Kök Hücreler” Kök Hücre ve Rejeneratif Tıp- 2021, Prof. Dr. Ayşen Günel Özcan, Editör, Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, ss.26-33, 2021 (Kitap Bölümü)

B. Kongrelerde sunulan ve kongre kitapçığında yayınlanan poster özetleri:

- 1) **Şahan Ö. B.**, Onbaşılar İ., Güçer K. Ş., Kaymaz F. F., Atayar E., Özaltın F., Özcan A. “Single dose application IGF-1 and HGF induced bone marrow mesenchymal stem cells reduced proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis model” FEBS OPEN BIO , cilt.11, ss.35, 07.2021-**SÖZLÜ SUNUM**
- 2) **Ozge Burcu Şahan**, Ilyas Onbasilar, Kadri Safak Gücer, Kaymaz Fevziye Figen, Atayar Emine, Fatih Özaltın, Aysen Gunel Ozcan., “IGF-1 and HGF Preconditioning of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduced Proteinuria in Rat Focal Segmental Glomerulosclerosis Model”, 28- 29 Mayıs, Paris, Fransa- Cytotherapy, cilt 22, ss.100, 2020 doi:10.1016/j.jcyt.2020.03.177 (Kongre bildirisi özeti)
- 3) **O.B. Sahan**, E. Korkmaz, I. Onbasilar, S. Gücer, F. Kaymaz, F. Özaltın, A. Günel Özcan: “Effect of IGF1 and HGF Induced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Focal Segmental Glomerulosclerosis in SpragueDawley Rats: A pilot study”, 43rd Febs Congress, 7-12 Temmuz 2018, Prag, Çekya, Türkiye, **POSTER**

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1) *In vitro* IGF-1+HGF ile MKH'lerin migrasyonu, anjiyojenik ve immunmodulator kapasitesi artmaktadır:
 - a. IGF-1+HGF ile MKH'lerin lisanslanmasının MKH karakterini değiştirmediği, akım sitometrisi ile MKH hücre yüzey belirteçleri ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma analizi göstermiştir.
 - b. IGF-1+HGF ile lisanslanan MKH'lerin yara iyileşiminin tek başına IGF-1 ve HGF'ye göre iyi olduğu yara iyileşimi testi ile, sitokin analizi ile IL-6 artışı,IDO-1 ve TGF- β artışı ile gen ifadesi yönünden immünmodülasyon kapasitesinin daha iyi olduğunu göstermiştir.
 - c. IGF-1+HGF ile lisanslanan MKH'lerin PAN hasarlı podosit aktin hücre iskeleti yapısını rejenerasyonunu hem salgısı hem de salgı+hücre interaksyonu ile artırdığı gösterilmiştir.
- 2) *In vivo* FSGS modeli oluşan podosit hasarını IGF-1+HGF ile lisanslanan MKH'lerin konvansiyonel MKH'lere göre azalttığını göstermiştir.
 - a. IGF-1+HGF_MKH'ler ile sıçanların vücut ağırlığı, idrar çıkışı ve su içimleri artmış, proteinüri düzeyleri ise azalmıştır.
 - b. IGF-1+HGF ile lisanslanan MKH'lerin podosit rejenerasyonunu artırdığı, Immunohistokimya ile böbrek glomerullerinde SYNPO düzeyi artışı, Elektron mikroskopisi ile podosit rejenerasyonunu artırdığı slit diyafram artışı ve hücre ayaksı görünümünün artışı ile gösterilmiştir.
 - c. Podosit hasarının düşük olduğu erken safhasında IGF-1+HGF lisanslanan MKH'lerin engrafmanı proteinüriyi azaltmaktadır. IGF-1+HGF ile lisanslanan MKH tedavisi akut podosit hasarından 9 gün sonra podosit slit diyafram kaybını azaltarak, sağkalımını ve hücre bütünlüğünü artırarak proteinüri düzeyini azaltmaktadır. Hasarın geç döneminde MKH'lerin IGF-1+HGF lisanslanmasının tedavi açısından bir avantajı bulunmamaktadır.
 - d. IGF-1+HGF_MKH'ler ile glomeruldaki protein silendirlerinin azaldığı, podosite özğü SYNPO ifadesinin glomerullerde arttığı, podosit sağ-kalımının, aktin hücre iskeleti yapısı ve slit diyafram bütünlüğünün arttığı gözlenmiştir. Bazı yerlerde podosit efasmanlarının EM'de gösterilmesi ve fokal

glomeruloskleroz odakları düzeyi azalan fakat devam eden proteinüri düzeyini açıklamaktadır.

- 3) MKH'lerin IGF-1+HGF indüksiyonu ve *in vivo* uygulaması ile podosit rejenerasyonunda böbrek kök/progenitör hücreleriyle (BKH) benzer özellikler gösterdiği düşünülerek beraber hareket edip etmediği, BKH'lerin aktivasyonu, farklılaşması ya da matürasyonuna katkısı olup olmadığı, pariyetal epitelyal hücreler üzerinden mi yoksa tam fonksiyon kaybı oluşmadıysa INF2 gibi proteinlere fonksiyon kazandırarak mı etki ettiği ve aktin hücre iskeleti yapısının rejenerasyonunu artırdığı araştırılması gereken bir sorudur.
- 4) Podosite özgü gen ifadeleri ve protein düzeylerinin hasar sonrası azaldığı bilirse de INF2'nin, PAN uygulaması ile ve IGF-1+HGF lisanslaması ile gen ifadesinin artışı ile protein düzeylerindeki değişimin korelasyonunun test edilmesi ve ileri çalışmalarla hasar ve lisanslamanın aktin reorganizasyonunda yer alan proteinlerle ilişkisinin aydınlatılması gerekmektedir.
- 5) IGF-1+HGF_MKH'ler ile tedavinin ardından glomerular kesitler histokimyasal olarak incelendiğinde skleroz odakları konvansiyonel MKH tedavi grubuna ve hasar grubuna yakın düzeydedir. Bu durum proteinüri devam ettiği için alınan kesit, sayılan bölge kesit kalınlığına göre değişebilmektedir. Histolojik kesitlerin insan dokularında da hastalık formları için güvenilir olmaması sebebiyle podosite özgü SYNPO gibi belirteçlerle boyanması ve EM'de detaylı incelenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.
- 6) Tek doz IGF-1+HGF MKH'lerin ne kadarının hasarlı alana ulaştığı bilinmemektedir. 20 gün takip edildiğinde 9. günde azalan proteinüri düzeyi artmaktadır. Tek doz tedavide saptadığımız podosit rejenerasyonun daha yüksek düzeylere çıkıp çıkmayacağı için hücre dozları artırılarak veya hücrelerin tekrar dozu/dozları uygulanarak rejeneratif etkinin değerlendirilmesi gelecek çalışmalar için önerilir.
- 7) IGF-1+HGF ile MKH lisanslaması basit, etkili ve klinik olarak uygulanabilir ve podosit rejenerasyonunu sağlayan bir tedavi stratejisinin gelişmesini sağlayabilir yöndedir. Onkojenik bir farklılaşma olmadığı yüzey belirteçleri ile bu çalışmada gösterilmiş olsa da immün yetmezlikli farelere bu hücreler cilt altına uygulanarak tümörojenite açısından değerlendirilmesi önerilir.

- 8) Podosit hücresiyle çalışmanın kısıtlılıkları vardır; bu hücreler terminal olarak farklılaşmasını tamamlamış post-mitotik bölünmeyen erişkin hücrelerdir ve son derece özelleşmiş yapıda karmaşık bir organizasyona sahiptir. Podosit hücrelerinin karmaşıklığı sebebiyle tedavi stratejilerinin hücrenin yapısı ve fonksiyonu üzerine etkisi olmamakta veya çok düşük düzeyde kalabilmektedir. Çalışmamızda, IGF-1+HGF'lerin podosit hücre hasarı üzerine etkili olması ve hücre bütünlüğünün artması, slit diyafram kaybının geri çevrilmesiyle proteinüri düzeylerinin azaldığının gösterilmesi literatüre konu ile ilgili ilk orjinal bilgileri kazandırmıştır ve klinikte kullanılabilirlik açısından oldukça umut vaat edicidir.

7. KAYNAKLAR

1. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell transplantation*. 2010;19(6):667-79.
2. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1428-42.
3. Kurtz A. Mesenchymal stem cell delivery routes and fate. *Int J Stem Cells*. 2008;1(1):1-7.
4. Yew TL, Hung YT, Li HY, Chen HW, Chen LL, Tsai KS, et al. Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell Transplant*. 2011;20(5):693-706.
5. Masoud MS, Anwar SS, Afzal MZ, Mehmood A, Khan SN, Riazuddin S. Pre-conditioned mesenchymal stem cells ameliorate renal ischemic injury in rats by augmented survival and engraftment. *J Transl Med*. 2012;10:243.
6. Chen H, Min XH, Wang QY, Leung FW, Shi L, Zhou Y, et al. Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF-alpha, IL-1beta and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. *Sci Rep*. 2015;5:8718.
7. Bai L, Lennon DP, Caplan AI, DeChant A, Hecker J, Kranso J, et al. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nat Neurosci*. 2012;15(6):862-70.
8. Khan M, Akhtar S, Mohsin S, S NK, Riazuddin S. Growth factor preconditioning increases the function of diabetes-impaired mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011;20(1):67-75.
9. Moura LR, Franco MF, Kirsztajn GM. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis in adults: response to steroids and risk of renal failure. *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia*. 2015;37(4):475-80.
10. D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(2):368-82.
11. Wen Y, Shah S, Campbell KN. Molecular Mechanisms of Proteinuria in Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Frontiers in medicine*. 2018;5:98.
12. Mihajlovic M, Wever KE, van der Made TK, de Vries RBM, Hilbrands LB, Masereeuw R. Are cell-based therapies for kidney disease safe? A systematic review of preclinical evidence. *Pharmacol Ther*. 2019;197:191-211.
13. Morigi M, Inrona M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells*. 2008;26(8):2075-82.

14. Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Hepatocyte growth factor accelerates recovery from acute ischemic renal injury in rats. *Am J Physiol.* 1994;266(1 Pt 2):F129-34.
15. Chen Y, Qian H, Zhu W, Zhang X, Yan Y, Ye S, et al. Hepatocyte growth factor modification promotes the amelioration effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells on rat acute kidney injury. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):103-13.
16. Tian H, Lu Y, Shah SP, Wang Q, Hong S. 14S,21R-dihydroxy-docosahexaenoic acid treatment enhances mesenchymal stem cell amelioration of renal ischemia/reperfusion injury. *Stem Cells Dev.* 2012;21(7):1187-99.
17. Miner JH. Organogenesis of the kidney glomerulus: focus on the glomerular basement membrane. *Organogenesis.* 2011;7(2):75-82.
18. Schell C, Wanner N, Huber TB. Glomerular development--shaping the multicellular filtration unit. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;36:39-49.
19. Costantini F, Kopan R. Patterning a complex organ: branching morphogenesis and nephron segmentation in kidney development. *Dev Cell.* 2010;18(5):698-712.
20. Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP. Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature.* 1994;372(6507):679-83.
21. Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell.* 2005;9(2):283-92.
22. Yoshimura Y, Nishinakamura R. Podocyte development, disease, and stem cell research. *Kidney Int.* 2019;96(5):1077-82.
23. Brunskill EW, Park JS, Chung E, Chen F, Magella B, Potter SS. Single cell dissection of early kidney development: multilineage priming. *Development.* 2014;141(15):3093-101.
24. Mugford JW, Yu J, Kobayashi A, McMahon AP. High-resolution gene expression analysis of the developing mouse kidney defines novel cellular compartments within the nephron progenitor population. *Dev Biol.* 2009;333(2):312-23.
25. Lindstrom NO, Lawrence ML, Burn SF, Johansson JA, Bakker ER, Ridgway RA, et al. Integrated beta-catenin, BMP, PTEN, and Notch signalling patterns the nephron. *Elife.* 2015;3:e04000.
26. Maezawa Y, Onay T, Scott RP, Keir LS, Dimke H, Li C, et al. Loss of the podocyte-expressed transcription factor Tcf21/Pod1 results in podocyte differentiation defects and FSGS. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(11):2459-70.
27. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, et al. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophages. *Mol Cell Biol.* 2006;26(15):5715-27.

28. Takemoto M, He L, Norlin J, Patrakka J, Xiao Z, Petrova T, et al. Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function. *EMBO J.* 2006;25(5):1160-74.
29. Kreidberg JA. Podocyte differentiation and glomerulogenesis. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(3):806-14.
30. Kumar V, Abbas, A. K., & Aster, J. C. . Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders. Ninth edition ed2015.
31. Garg P. A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol.* 2018;47 Suppl 1:3-13.
32. Orikasa M, Matsui K, Oite T, Shimizu F. Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol.* 1988;141(3):807-14.
33. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl).* 1995;192(5):385-97.
34. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 2003;83(1):253-307.
35. Asanuma K, Mundel P. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol.* 2003;7(4):255-9.
36. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006;69(12):2131-47.
37. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev.* 2014;94(1):235-63.
38. Blaine J, Dylewski J. Regulation of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. *Cells.* 2020;9(7).
39. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:160.
40. Nagata M. Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int.* 2016;89(6):1221-30.
41. Neal CR, Muston PR, Njegovan D, Verrill R, Harper SJ, Deen WM, et al. Glomerular filtration into the subpodocyte space is highly restricted under physiological perfusion conditions. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(6):F1787-98.
42. Chen S, Meng XF, Zhang C. Role of NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species in podocyte injury. *Biomed Res Int.* 2013;2013:839761.
43. Liu Y, Hitomi H, Diah S, Deguchi K, Mori H, Masaki T, et al. Roles of Na(+)/H(+) exchanger type 1 and intracellular pH in angiotensin II-induced reactive oxygen species generation and podocyte apoptosis. *J Pharmacol Sci.* 2013;122(3):176-83.
44. Kim JS, Han BG, Choi SO, Cha SK. Secondary Focal Segmental Glomerulosclerosis: From Podocyte Injury to Glomerulosclerosis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1630365.

45. Buscher AK, Konrad M, Nagel M, Witzke O, Kribben A, Hoyer PF, et al. Mutations in podocyte genes are a rare cause of primary FSGS associated with ESRD in adult patients. *Clin Nephrol.* 2012;78(1):47-53.
46. Subramanian B, Sun H, Yan P, Charoonratana VT, Higgs HN, Wang F, et al. Mice with mutant Inf2 show impaired podocyte and slit diaphragm integrity in response to protamine-induced kidney injury. *Kidney Int.* 2016;90(2):363-72.
47. Feng D, Notbohm J, Benjamin A, He S, Wang M, Ang LH, et al. Disease-causing mutation in alpha-actinin-4 promotes podocyte detachment through maladaptation to periodic stretch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(7):1517-22.
48. Ning L, Suleiman HY, Miner JH. Synaptopodin Is Dispensable for Normal Podocyte Homeostasis but Is Protective in the Context of Acute Podocyte Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(12):2815-32.
49. Refaeli I, Hughes MR, Wong AK, Bissonnette MLZ, Roskelley CD, Wayne Vogl A, et al. Distinct Functional Requirements for Podocalyxin in Immature and Mature Podocytes Reveal Mechanisms of Human Kidney Disease. *Sci Rep.* 2020;10(1):9419.
50. Krendel M, Kim SV, Willinger T, Wang T, Kashgarian M, Flavell RA, et al. Disruption of Myosin 1e promotes podocyte injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(1):86-94.
51. Hall G, Lane BM, Khan K, Pediaditakis I, Xiao J, Wu G, et al. The Human FSGS-Causing ANLN R431C Mutation Induces Dysregulated PI3K/AKT/mTOR/Rac1 Signaling in Podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(8):2110-22.
52. Bezdzicka M, Zemkova D, Skalova S, Hovorkova E, Podhola M, Burkert J, et al. Tubuloglomerular Disease With Cone-Shaped Epiphyses Associated With Hypomorphic Variant and a Novel p.Cys14Arg in the TTC21B Gene: A Case Report. *Front Pediatr.* 2021;9:752878.
53. Wan X, Chen Z, Choi WI, Gee HY, Hildebrandt F, Zhou W. Loss of Epithelial Membrane Protein 2 Aggravates Podocyte Injury via Upregulation of Caveolin-1. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(4):1066-75.
54. Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, Hurd TW, Vega-Warner V, Fang H, et al. ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest.* 2013;123(8):3243-53.
55. Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthofer H, Kriz W, Endlich K. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney international.* 2004;66(1):91-101.
56. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(2):414-30.
57. Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Sanden SK, Hussain S, Filipiak WE, et al. Podocyte depletion causes glomerulosclerosis: diphtheria toxin-induced

- podocyte depletion in rats expressing human diphtheria toxin receptor transgene. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(10):2941-52.
58. Kriz W. The pathogenesis of 'classic' focal segmental glomerulosclerosis-lessons from rat models. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18 Suppl 6:vi39-44.
 59. Shabaka A, Tato Ribera A, Fernandez-Juarez G. Focal Segmental Glomerulosclerosis: State-of-the-Art and Clinical Perspective. *Nephron*. 2020;144(9):413-27.
 60. Rudnicki M. FSGS Recurrence in Adults after Renal Transplantation. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3295618.
 61. Rood IM, Deegens JK, Wetzels JF. Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(3):882-90.
 62. Sim JJ, Batech M, Hever A, Harrison TN, Avelar T, Kanter MH, et al. Distribution of Biopsy-Proven Presumed Primary Glomerulonephropathies in 2000-2011 Among a Racially and Ethnically Diverse US Population. *Am J Kidney Dis*. 2016;68(4):533-44.
 63. Turkmen A, Sumnu A, Cebeci E, Yazici H, Eren N, Seyahi N, et al. Epidemiological features of primary glomerular disease in Turkey: a multicenter study by the Turkish Society of Nephrology Glomerular Diseases Working Group. *BMC Nephrol*. 2020;21(1):481.
 64. Korbett SM. Clinical picture and outcome of primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14 Suppl 3:68-73.
 65. Pardon A, Audard V, Caillard S, Moulin B, Desvaux D, Bentaar B, et al. Risk factors and outcome of focal and segmental glomerulosclerosis recurrence in adult renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(4):1053-9.
 66. Hickson LJ, Gera M, Amer H, Iqbal CW, Moore TB, Milliner DS, et al. Kidney transplantation for primary focal segmental glomerulosclerosis: outcomes and response to therapy for recurrence. *Transplantation*. 2009;87(8):1232-9.
 67. Sprangers B, Meijers B, Appel G. FSGS: Diagnosis and Diagnostic Work-Up. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4632768.
 68. Howie AJ, Pankhurst T, Sarioglu S, Turhan N, Adu D. Evolution of nephrotic-associated focal segmental glomerulosclerosis and relation to the glomerular tip lesion. *Kidney Int*. 2005;67(3):987-1001.
 69. Kriz W, Hahnel B, Hosser H, Ostendorf T, Gaertner S, Kranzlin B, et al. Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(7):1904-26.
 70. Remuzzi A, Pergolizzi R, Mauer MS, Bertani T. Three-dimensional morphometric analysis of segmental glomerulosclerosis in the rat. *Kidney Int*. 1990;38(5):851-6.
 71. Fuiano G, Comi N, Magri P, Sepe V, Balletta MM, Esposito C, et al. Serial morphometric analysis of sclerotic lesions in primary "focal" segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*. 1996;7(1):49-55.

72. Schnaper HW. Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003;23(2):183-93.
73. Li X, He JC. An update: the role of Nephrin inside and outside the kidney. *Sci China Life Sci.* 2015;58(7):649-57.
74. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1998;1(4):575-82.
75. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest.* 2001;108(11):1621-9.
76. Yaddanapudi S, Altintas MM, Kistler AD, Fernandez I, Moller CC, Wei C, et al. CD2AP in mouse and human podocytes controls a proteolytic program that regulates cytoskeletal structure and cellular survival. *J Clin Invest.* 2011;121(10):3965-80.
77. Mollet G, Ratelade J, Boyer O, Muda AO, Morisset L, Lavin TA, et al. Podocin inactivation in mature kidneys causes focal segmental glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(10):2181-9.
78. Bierczynska A, Soderquest K, Koziell A. Genes and podocytes - new insights into mechanisms of podocytopathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:226.
79. Lowik M, Levchenko E, Westra D, Groenen P, Steenbergen E, Weening J, et al. Bigenic heterozygosity and the development of steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(10):3146-51.
80. Weins A, Kenlan P, Herbert S, Le TC, Villegas I, Kaplan BS, et al. Mutational and Biological Analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(12):3694-701.
81. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 2000;24(3):251-6.
82. Feng D, DuMontier C, Pollak MR. The role of alpha-actinin-4 in human kidney disease. *Cell Biosci.* 2015;5:44.
83. Tian D, Jacobo SM, Billing D, Rozkalne A, Gage SD, Anagnostou T, et al. Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal.* 2010;3(145):ra77.
84. Spassova MA, Hewavitharana T, Xu W, Soboloff J, Gill DL. A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(44):16586-91.
85. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science.* 2005;308(5729):1801-4.
86. Smrcka AV, Brown JH, Holz GG. Role of phospholipase Cepsilon in physiological phosphoinositide signaling networks. *Cell Signal.* 2012;24(6):1333-43.

87. Yu S, Choi WI, Choi YJ, Kim HY, Hildebrandt F, Gee HY. PLCE1 regulates the migration, proliferation, and differentiation of podocytes. *Exp Mol Med*. 2020;52(4):594-603.
88. Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, Vlangos CN, Seelow D, Nurnberg G, et al. Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet*. 2006;38(12):1397-405.
89. Labat-de-Hoz L, Alonso MA. The formin INF2 in disease: progress from 10 years of research. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(22):4581-600.
90. Gbadegesin RA, Lavin PJ, Hall G, Bartkowiak B, Homstad A, Jiang R, et al. Inverted formin 2 mutations with variable expression in patients with sporadic and hereditary focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2012;81(1):94-9.
91. Brown EJ, Schlondorff JS, Becker DJ, Tsukaguchi H, Tonna SJ, Uscinski AL, et al. Mutations in the formin gene INF2 cause focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*. 2010;42(1):72-6.
92. Chase SE, Encina CV, Stolzenburg LR, Tatum AH, Holzman LB, Krendel M. Podocyte-specific knockout of myosin 1e disrupts glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(7):F1099-106.
93. Mele C, Iatropoulos P, Donadelli R, Calabria A, Maranta R, Cassis P, et al. MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(4):295-306.
94. Maas RJ, Deegens JK, Wetzels JF. Permeability factors in idiopathic nephrotic syndrome: historical perspectives and lessons for the future. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(12):2207-16.
95. Jefferson JA, Shankland SJ. Has the circulating permeability factor in primary FSGS been found? *Kidney Int*. 2013;84(2):235-8.
96. Sharma M, Sharma R, Reddy SR, McCarthy ET, Savin VJ. Proteinuria after injection of human focal segmental glomerulosclerosis factor. *Transplantation*. 2002;73(3):366-72.
97. Avila-Casado Mdel C, Perez-Torres I, Auron A, Soto V, Fortoul TI, Herrera-Acosta J. Proteinuria in rats induced by serum from patients with collapsing glomerulopathy. *Kidney Int*. 2004;66(1):133-43.
98. Savin VJ, Sharma R, Sharma M, McCarthy ET, Swan SK, Ellis E, et al. Circulating factor associated with increased glomerular permeability to albumin in recurrent focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 1996;334(14):878-83.
99. Konigshausen E, Sellin L. Circulating Permeability Factors in Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Review of Proposed Candidates. *Biomed Res Int*. 2016;2016:3765608.
100. Wei C, El Hindi S, Li J, Fornoni A, Goes N, Sageshima J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med*. 2011;17(8):952-60.

101. Huang J, Liu G, Zhang YM, Cui Z, Wang F, Liu XJ, et al. Plasma soluble urokinase receptor levels are increased but do not distinguish primary from secondary focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2013;84(2):366-72.
102. Savin VJ, Sharma M, Zhou J, Gennochi D, Fields T, Sharma R, et al. Renal and Hematological Effects of CLCF-1, a B-Cell-Stimulating Cytokine of the IL-6 Family. *J Immunol Res.* 2015;2015:714964.
103. Doublier S, Zennaro C, Musante L, Spatola T, Candiano G, Bruschi M, et al. Soluble CD40 ligand directly alters glomerular permeability and may act as a circulating permeability factor in FSGS. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188045.
104. Delville M, Sigdel TK, Wei C, Li J, Hsieh SC, Fornoni A, et al. A circulating antibody panel for pretransplant prediction of FSGS recurrence after kidney transplantation. *Sci Transl Med.* 2014;6(256):256ra136.
105. Wei C, Sigdel TK, Sarwal MM, Reiser J. Circulating CD40 autoantibody and suPAR synergy drives glomerular injury. *Ann Transl Med.* 2015;3(19):300.
106. Kairaitis L, Wang Y, Zheng L, Tay YC, Wang Y, Harris DC. Blockade of CD40-CD40 ligand protects against renal injury in chronic proteinuric renal disease. *Kidney Int.* 2003;64(4):1265-72.
107. Naciri Bennani H, Elimby L, Terrec F, Malvezzi P, Noble J, Jouve T, et al. Kidney Transplantation for Focal Segmental Glomerulosclerosis: Can We Prevent Its Recurrence? Personal Experience and Literature Review. *J Clin Med.* 2021;11(1).
108. Wyatt CM, Klotman PE, D'Agati VD. HIV-associated nephropathy: clinical presentation, pathology, and epidemiology in the era of antiretroviral therapy. *Semin Nephrol.* 2008;28(6):513-22.
109. Kauffmann M, Bobot M, Daniel L, Torrents J, Knefati Y, Moranne O, et al. Parvovirus B19 infection and kidney injury: report of 4 cases and analysis of immunization and viremia in an adult cohort of 100 patients undergoing a kidney biopsy. *BMC Nephrol.* 2020;21(1):260.
110. Chandra P, Kopp JB. Viruses and collapsing glomerulopathy: a brief critical review. *Clin Kidney J.* 2013;6(1):1-5.
111. Petersen CE, Amaral S, Frosch E. Lithium-induced nephrotic syndrome in a prepubertal boy. *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2008;18(2):210-3.
112. Markowitz GS, Appel GB, Fine PL, Fenves AZ, Loon NR, Jagannath S, et al. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(6):1164-72.
113. Letavernier E, Bruneval P, Mandet C, Duong Van Huyen JP, Peraldi MN, Helal I, et al. High sirolimus levels may induce focal segmental glomerulosclerosis de novo. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(2):326-33.
114. Markowitz GS, Nasr SH, Stokes MB, D'Agati VD. Treatment with IFN- α , β , or γ is associated with collapsing focal segmental glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(4):607-15.

115. Herlitz LC, Markowitz GS, Farris AB, Schwimmer JA, Stokes MB, Kunis C, et al. Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(1):163-72.
116. Alkhunaizi AM, Chapman A. Renal artery stenosis and unilateral focal and segmental glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis*. 1997;29(6):936-41.
117. Freedman BI, Sedor JR. Hypertension-associated kidney disease: perhaps no more. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(11):2047-51.
118. Oliva-Damaso N, Mora-Gutierrez JM, Bomback AS. Glomerular Diseases in Diabetic Patients: Implications for Diagnosis and Management. *J Clin Med*. 2021;10(9).
119. Li X, Bayliss G, Zhuang S. Cholesterol Crystal Embolism and Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).
120. Lopez-Novoa JM, Rodriguez-Pena AB, Ortiz A, Martinez-Salgado C, Lopez Hernandez FJ. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications. *J Transl Med*. 2011;9:13.
121. Kriz W, Lemley KV. A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(2):258-69.
122. Rosenberg AZ, Kopp JB. Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(3):502-17.
123. Purkerson ML, Hoffsten PE, Klahr S. Pathogenesis of the glomerulopathy associated with renal infarction in rats. *Kidney Int*. 1976;9(5):407-17.
124. Krivosikova Z, Sebekova K, Spustova V, Lajdova I, Dzurik R. Enalapril in subantihypertensive dosage attenuates kidney proliferation and functional recovery in normotensive ablation nephropathy of the rat. *Physiol Res*. 1999;48(6):429-35.
125. Matsuguma K, Ueda S, Yamagishi S, Matsumoto Y, Kaneyuki U, Shibata R, et al. Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(8):2176-83.
126. Ma LJ, Fogo AB. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background. *Kidney Int*. 2003;64(1):350-5.
127. Yang JW, Dettmar AK, Kronbichler A, Gee HY, Saleem M, Kim SH, et al. Recent advances of animal model of focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Exp Nephrol*. 2018;22(4):752-63.
128. Ha TS, Park HY, Seong SB, Ahn HY. Puromycin aminonucleoside increases podocyte permeability by modulating ZO-1 in an oxidative stress-dependent manner. *Exp Cell Res*. 2016;340(1):139-49.
129. Rossmann P, Bukovsky A, Matousovic K, Holub M, Kral J. Puromycin aminonucleoside nephropathy: ultrastructure, glomerular polyanion, and cell surface markers. *J Pathol*. 1986;148(4):337-48.

130. Grond J, Weening JJ, van Goor H, Elema JD. Application of puromycin aminonucleoside and adriamycin to induce chronic renal failure in the rat. *Contrib Nephrol*. 1988;60:83-93.
131. Diamond JR, Karnovsky MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *Am J Pathol*. 1986;122(3):481-7.
132. Drukker A, Eddy AA. Failure of antioxidant therapy to attenuate interstitial disease in rats with reversible nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(2):243-51.
133. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*. 2011;16(1):30-8.
134. Cao Q, Wang Y, Zheng D, Sun Y, Wang Y, Lee VW, et al. IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(6):933-42.
135. Heikkila E, Juhila J, Lassila M, Messing M, Perala N, Lehtonen E, et al. beta-Catenin mediates adriamycin-induced albuminuria and podocyte injury in adult mouse kidneys. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(8):2437-46.
136. Jeansson M, Bjorck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(1):114-22.
137. Jyothirmayi GN, Alluru I, Reddi AS. Doxazosin prevents proteinuria and glomerular loss of heparan sulfate in diabetic rats. *Hypertension*. 1996;27(5):1108-14.
138. Tesch GH, Allen TJ. Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2007;12(3):261-6.
139. Diabetic Complications Consortium (DiaComp) [Internet].
140. Cooper ME, Allen TJ, Macmillan P, Bach L, Jerums G, Doyle AE. Genetic hypertension accelerates nephropathy in the streptozotocin diabetic rat. *Am J Hypertens*. 1988;1(1):5-10.
141. Tay YC, Wang Y, Kairaitis L, Rangan GK, Zhang C, Harris DC. Can murine diabetic nephropathy be separated from superimposed acute renal failure? *Kidney Int*. 2005;68(1):391-8.
142. Akiyama K, Morita H, Suetsugu S, Kuraba S, Numata Y, Yamamoto Y, et al. Actin-related protein 3 (Arp3) is mutated in proteinuric BUF/Mna rats. *Mamm Genome*. 2008;19(1):41-50.
143. Fassi A, Sangalli F, Maffi R, Colombi F, Mohamed EI, Brenner BM, et al. Progressive glomerular injury in the MWF rat is predicted by inborn nephron deficit. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(8):1399-406.
144. Kajiyama W, Kopp JB, Marinos NJ, Klotman PE, Dickie P. Glomerulosclerosis and viral gene expression in HIV-transgenic mice: role of nef. *Kidney Int*. 2000;58(3):1148-59.
145. Binder CJ, Weiher H, Exner M, Kerjaschki D. Glomerular overproduction of oxygen radicals in Mpv17 gene-inactivated mice causes podocyte foot process

- flattening and proteinuria: A model of steroid-resistant nephrosis sensitive to radical scavenger therapy. *Am J Pathol.* 1999;154(4):1067-75.
146. Kos CH, Le TC, Sinha S, Henderson JM, Kim SH, Sugimoto H, et al. Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease. *J Clin Invest.* 2003;111(11):1683-90.
 147. Juhila J, Lassila M, Roozendaal R, Lehtonen E, Messing M, Langer B, et al. Inducible nephrin transgene expression in podocytes rescues nephrin-deficient mice from perinatal death. *Am J Pathol.* 2010;176(1):51-63.
 148. Assmann KJ, van Son JP, Dijkman HB, Mentzel S, Wetzels JF. Antibody-induced albuminuria and accelerated focal glomerulosclerosis in the Thy-1.1 transgenic mouse. *Kidney Int.* 2002;62(1):116-26.
 149. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis research & therapy.* 2003;5(1):32-45.
 150. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
 151. Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A, et al. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2010;34(7):693-701.
 152. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95.
 153. Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease.* 2016;7:e2062.
 154. Kaundal U, Bagai U, Rakha A. Immunomodulatory plasticity of mesenchymal stem cells: a potential key to successful solid organ transplantation. *J Transl Med.* 2018;16(1):31.
 155. Denburg JA, Inman MD, Wood L, Ellis R, Sehmi R, Dahlback M, et al. Bone marrow progenitors in allergic airways diseases: studies in canine and human models. *International archives of allergy and immunology.* 1997;113(1-3):181-3.
 156. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British journal of haematology.* 2005;129(1):118-29.
 157. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in immunology.* 2007;28(5):219-26.
 158. Siegel G, Schafer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2009;87(9 Suppl):S45-9.

159. Fan XL, Zhang Y, Li X, Fu QL. Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77(14):2771-94.
160. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int.* 2013;2013:496218.
161. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol.* 2014;5:148.
162. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2014;21(2):216-25.
163. Miceli V, Bulati M, Iannolo G, Zito G, Gallo A, Conaldi PG. Therapeutic Properties of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: The Need of Cell Priming for Cell-Free Therapies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2021;22(2).
164. Flaquer M, Romagnani P, Cruzado JM. [Growth factors and renal regeneration]. *Nefrologia.* 2010;30(4):385-93.
165. Reule S, Gupta S. Kidney regeneration and resident stem cells. *Organogenesis.* 2011;7(2):135-9.
166. Romagnani P, Kalluri R. Possible mechanisms of kidney repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2009;2(1):3.
167. Appel D, Kershaw DB, Smeets B, Yuan G, Fuss A, Frye B, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(2):333-43.
168. Maeshima A. Label-retaining cells in the kidney: origin of regenerating cells after renal ischemia. *Clin Exp Nephrol.* 2007;11(4):269-74.
169. Oliver JA, Barasch J, Yang J, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283(4):F799-809.
170. Bruno S, Chiabotto G, Camussi G. Concise review: different mesenchymal stromal/stem cell populations reside in the adult kidney. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(12):1451-5.
171. Huang Y, Johnston P, Zhang B, Zakari A, Chowdhry T, Smith RR, et al. Kidney-derived stromal cells modulate dendritic and T cell responses. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):831-41.
172. Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* 2010;20(5):510-8.
173. Liu D, Cheng F, Pan S, Liu Z. Stem cells: a potential treatment option for kidney diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):249.
174. Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, di Cantogno LV, Herrera MB, et al. Isolation and characterization of resident mesenchymal stem cells in human glomeruli. *Stem Cells Dev.* 2009;18(6):867-80.

175. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2204-13.
176. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(9):2443-56.
177. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, et al. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(11):3028-40.
178. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(12):3138-46.
179. Challen GA, Bertoncello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH. Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1896-912.
180. Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasah S, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol.* 2001;195(2):229-35.
181. Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong YU, Nagasawa R, Okabe M, et al. The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(7):1401-9.
182. Hickson LJ, Eirin A, Lerman LO. Challenges and opportunities for stem cell therapy in patients with chronic kidney disease. *Kidney international.* 2016;89(4):767-78.
183. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond).* 2005;2:8.
184. Jin M, Xie Y, Li Q, Chen X. Stem cell-based cell therapy for glomerulonephritis. *Biomed Res Int.* 2014;2014:124730.
185. Kim HJ, Lee JH, Kim SH. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cells on traumatic brain injury in rats: secretion of neurotrophic factors and inhibition of apoptosis. *J Neurotrauma.* 2010;27(1):131-8.
186. Urdzikova LM, Ruzicka J, LaBagnara M, Karova K, Kubinova S, Jirakova K, et al. Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *International journal of molecular sciences.* 2014;15(7):11275-93.
187. Yousefifard M, Nasirinezhad F, Shardi Manaheji H, Janzadeh A, Hosseini M, Keshavarz M. Human bone marrow-derived and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for alleviating neuropathic pain in a spinal cord injury model. *Stem cell research & therapy.* 2016;7:36.
188. Alfarano C, Roubex C, Chaaya R, Ceccaldi C, Calise D, Mias C, et al. Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces

- kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats. *Cell Transplant*. 2012;21(9):2009-19.
189. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate 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):1794-804.
 190. Yen TH, Alison MR, Cook HT, Jeffery R, Otto WR, Wright NA, et al. The cellular origin and proliferative status of regenerating renal parenchyma after mercuric chloride damage and erythropoietin treatment. *Cell Prolif*. 2007;40(2):143-56.
 191. Wang S, Li Y, Zhao J, Zhang J, Huang Y. Mesenchymal stem cells ameliorate podocyte injury and proteinuria in a type 1 diabetic nephropathy rat model. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19(4):538-46.
 192. Ezquer F, Ezquer M, Simon V, Pardo F, Yanez A, Carpio D, et al. Endovenous administration of bone-marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells prevents renal failure in diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(11):1354-65.
 193. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(12):2625-35.
 194. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1):F31-42.
 195. Perry J, Tam S, Zheng K, Sado Y, Dobson H, Jefferson B, et al. Type IV collagen induces podocytic features in bone marrow stromal stem cells in vitro. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(1):66-76.
 196. Oliver JA. Adult renal stem cells and renal repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13(1):17-22.
 197. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME. A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int*. 2002;62(4):1285-90.
 198. Zoja C, Garcia PB, Rota C, Conti S, Gagliardini E, Corna D, et al. Mesenchymal stem cell therapy promotes renal repair by limiting glomerular podocyte and progenitor cell dysfunction in adriamycin-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(9):F1370-81.
 199. Ornellas FM, Ramalho RJ, Fanelli C, Garnica MR, Malheiros D, Martini SV, et al. Mesenchymal Stromal Cells Induce Podocyte Protection in the Puromycin Injury Model. *Sci Rep*. 2019;9(1):19604.
 200. Rodrigues M, Turner O, Stolz D, Griffith LG, Wells A. Production of reactive oxygen species by multipotent stromal cells/mesenchymal stem cells upon exposure to fas ligand. *Cell transplantation*. 2012;21(10):2171-87.

201. Li L, Chen X, Wang WE, Zeng C. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem Cells Int.* 2016;2016:9682757.
202. Noronha NC, Mizukami A, Caliari-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem cell research & therapy.* 2019;10(1):131.
203. Saeedi P, Halabian R, Imani Fooladi AA. A revealing review of mesenchymal stem cells therapy, clinical perspectives and Modification strategies. *Stem Cell Investig.* 2019;6:34.
204. Nie WB, Zhang D, Wang LS. Growth Factor Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:1241-56.
205. Chulpanova DS, Kitaeva KV, Tazetdinova LG, James V, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Application of Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Agent Delivery in Anti-tumor Treatment. *Front Pharmacol.* 2018;9:259.
206. Huang YL, Qiu RF, Mai WY, Kuang J, Cai XY, Dong YG, et al. Effects of insulin-like growth factor-1 on the properties of mesenchymal stem cells in vitro. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2012;13(1):20-8.
207. Gorin C, Rochefort GY, Bascetin R, Ying H, Lesieur J, Sadoine J, et al. Priming Dental Pulp Stem Cells With Fibroblast Growth Factor-2 Increases Angiogenesis of Implanted Tissue-Engineered Constructs Through Hepatocyte Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Secretion. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(3):392-404.
208. Valente S, Ciavarella C, Pasanisi E, Ricci F, Stella A, Pasquinelli G. Hepatocyte Growth Factor Effects on Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Arteries: A Novel Strategy to Accelerate Vascular Ulcer Wound Healing. *Stem cells international.* 2016;2016:3232859.
209. Hammerman MR, Miller SB. Therapeutic use of growth factors in renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 1994;5(1):1-11.
210. Padanilam BJ, Martin DR, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I-enhanced renal expression of osteopontin after acute ischemic injury in rats. *Endocrinology.* 1996;137(5):2133-40.
211. Miller SB, Martin DR, Kissane J, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(24):11876-80.
212. Humes HD, Cieslinski DA, Coimbra TM, Messana JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest.* 1989;84(6):1757-61.
213. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L, et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(11):2921-8.
214. Miya M, Maeshima A, Mishima K, Sakurai N, Ikeuchi H, Kuroiwa T, et al. Enhancement of in vitro human tubulogenesis by endothelial cell-derived

- factors: implications for in vivo tubular regeneration after injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(2):F387-95.
215. Xinaris C, Morigi M, Benedetti V, Imberti B, Fabricio AS, Squarcina E, et al. A novel strategy to enhance mesenchymal stem cell migration capacity and promote tissue repair in an injury specific fashion. *Cell Transplant*. 2013;22(3):423-36.
 216. Liu P, Feng Y, Dong D, Liu X, Chen Y, Wang Y, et al. Enhanced renoprotective effect of IGF-1 modified human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on gentamicin-induced acute kidney injury. *Sci Rep*. 2016;6:20287.
 217. Liu X, Shen W, Yang Y, Liu G. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells transfected with hepatocyte growth factor transplanted in rat kidney with unilateral ureteral obstruction. *J Pediatr Surg*. 2011;46(3):537-45.
 218. Gomez-Mauricio G, Moscoso I, Martin-Cancho MF, Crisostomo V, Prat-Vidal C, Baez-Diaz C, et al. Combined administration of mesenchymal stem cells overexpressing IGF-1 and HGF enhances neovascularization but moderately improves cardiac regeneration in a porcine model. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):94.
 219. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *The Journal of biological chemistry*. 1978;253(8):2769-76.
 220. Rotwein P. Diversification of the insulin-like growth factor 1 gene in mammals. *PloS one*. 2017;12(12):e0189642.
 221. Kineman RD, Del Rio-Moreno M, Sarmiento-Cabral A. 40 YEARS of IGF1: Understanding the tissue-specific roles of IGF1/IGF1R in regulating metabolism using the Cre/loxP system. *J Mol Endocrinol*. 2018;61(1):T187-T98.
 222. Wrigley S, Arafa D, Tropea D. Insulin-Like Growth Factor 1: At the Crossroads of Brain Development and Aging. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017;11:14.
 223. Haywood NJ, Slater TA, Matthews CJ, Wheatcroft SB. The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes. *Molecular metabolism*. 2019;19:86-96.
 224. Kamenicky P, Mazziotti G, Lombes M, Giustina A, Chanson P. Growth hormone, insulin-like growth factor-1, and the kidney: pathophysiological and clinical implications. *Endocr Rev*. 2014;35(2):234-81.
 225. Bach LA, Hale LJ. Insulin-like growth factors and kidney disease. *Am J Kidney Dis*. 2015;65(2):327-36.
 226. Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(12):7088-92.

227. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7324-9.
228. D'Ercole AJ, Applewhite GT, Underwood LE. Evidence that somatomedin is synthesized by multiple tissues in the fetus. *Dev Biol*. 1980;75(2):315-28.
229. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(3):935-9.
230. Murphy LJ, Bell GI, Friesen HG. Growth hormone stimulates sequential induction of c-myc and insulin-like growth factor I expression in vivo. *Endocrinology*. 1987;120(5):1806-12.
231. Roberts CT, Jr., Lasky SR, Lowe WL, Jr., Seaman WT, LeRoith D. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol*. 1987;1(3):243-8.
232. Aron DC, Rosenzweig JL, Abboud HE. Synthesis and binding of insulin-like growth factor I by human glomerular mesangial cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1989;68(3):585-91.
233. Reddy GR, Pushpanathan MJ, Ransom RF, Holzman LB, Brosius FC, 3rd, Diakonova M, et al. Identification of the glomerular podocyte as a target for growth hormone action. *Endocrinology*. 2007;148(5):2045-55.
234. Li CX, Xia M, Han WQ, Li XX, Zhang C, Boini KM, et al. Reversal by growth hormone of homocysteine-induced epithelial-to-mesenchymal transition through membrane raft-redox signaling in podocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27(6):691-702.
235. Bridgewater DJ, Ho J, Sauro V, Matsell DG. Insulin-like growth factors inhibit podocyte apoptosis through the PI3 kinase pathway. *Kidney Int*. 2005;67(4):1308-14.
236. Rogers SA, Powell-Braxton L, Hammerman MR. Insulin-like growth factor I regulates renal development in rodents. *Dev Genet*. 1999;24(3-4):293-8.
237. Levin-Iaina N, Iaina A, Raz I. The emerging role of NO and IGF-1 in early renal hypertrophy in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27(3):235-43.
238. Cingel-Ristic V, Schrijvers BF, van Vliet AK, Rasch R, Han VK, Drop SL, et al. Kidney growth in normal and diabetic mice is not affected by human insulin-like growth factor binding protein-1 administration. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005;230(2):135-43.
239. Jia T, Gama Axelsson T, Heimbürger O, Barany P, Lindholm B, Stenvinkel P, et al. IGF-1 and survival in ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(1):120-7.
240. Stiles CD, Capone GT, Scher CD, Antoniadis HN, Van Wyk JJ, Pledger WJ. Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth

- factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979;76(3):1279-83.
241. Doi T, Striker LJ, Elliot SJ, Conti FG, Striker GE. Insulinlike growth factor-1 is a progression factor for human mesangial cells. *Am J Pathol*. 1989;134(2):395-404.
 242. Kluge A, Zimmermann R, Weihrauch D, Mohri M, Sack S, Schaper J, et al. Coordinate expression of the insulin-like growth factor system after microembolisation in porcine heart. *Cardiovasc Res*. 1997;33(2):324-31.
 243. Che W, Lerner-Marmarosh N, Huang Q, Osawa M, Ohta S, Yoshizumi M, et al. Insulin-like growth factor-1 enhances inflammatory responses in endothelial cells: role of Gab1 and MEKK3 in TNF-alpha-induced c-Jun and NF-kappaB activation and adhesion molecule expression. *Circ Res*. 2002;90(11):1222-30.
 244. Wu Z, Yu Y, Niu L, Fei A, Pan S. IGF-1 protects tubular epithelial cells during injury via activation of ERK/MAPK signaling pathway. *Scientific reports*. 2016;6:28066.
 245. Feld S, Hirschberg R. Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney. *Endocr Rev*. 1996;17(5):423-80.
 246. Hirschberg R, Brunori G, Kopple JD, Guler HP. Effects of insulin-like growth factor I on renal function in normal men. *Kidney international*. 1993;43(2):387-97.
 247. Franklin SC, Moulton M, Sicard GA, Hammerman MR, Miller SB. Insulin-like growth factor I preserves renal function postoperatively. *Am J Physiol*. 1997;272(2 Pt 2):F257-9.
 248. Hladunewich MA, Corrigan G, Derby GC, Ramaswamy D, Kambham N, Scandling JD, et al. A randomized, placebo-controlled trial of IGF-1 for delayed graft function: a human model to study postischemic ARF. *Kidney international*. 2003;64(2):593-602.
 249. Nigam e S, Lieberthal W. Acute renal failure. III. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2000;279(1):F3-F11.
 250. Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, et al. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(16):7001-5.
 251. Furlong RA, Takehara T, Taylor WG, Nakamura T, Rubin JS. Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *Journal of cell science*. 1991;100 (Pt 1):173-7.
 252. Naldini L, Weidner KM, Vigna E, Gaudino G, Bardelli A, Ponzetto C, et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the MET receptor. *The EMBO journal*. 1991;10(10):2867-78.

253. Kolatsi-Joannou M, Moore R, Winyard PJ, Woolf AS. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor, MET, suggests roles in human embryonic organogenesis. *Pediatr Res*. 1997;41(5):657-65.
254. Sonnenberg E, Meyer D, Weidner KM, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J Cell Biol*. 1993;123(1):223-35.
255. Nakamura H, Tashiro K, Nakamura T, Shiokawa K. Molecular cloning of *Xenopus* HGF cDNA and its expression studies in *Xenopus* early embryogenesis. *Mechanisms of development*. 1995;49(1-2):123-31.
256. Vargas GA, Hoefflich A, Jehle PM. Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. *Kidney Int*. 2000;57(4):1426-36.
257. Plaschke-Schlutter A, Behrens J, Gherardi E, Birchmeier W. Characterization of the scatter factor/hepatocyte growth factor gene promoter. Positive and negative regulatory elements direct gene expression to mesenchymal cells. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(2):830-6.
258. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, et al. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *The EMBO journal*. 1992;11(13):4825-33.
259. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(14):10024-8.
260. Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, Kitamura N. Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J Biol Chem*. 1994;269(12):8966-70.
261. Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM. Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene*. 1989;4(11):1383-8.
262. Lee CC, Yamada KM. Alternatively spliced juxtamembrane domain of a tyrosine kinase receptor is a multifunctional regulatory site. Deletion alters cellular tyrosine phosphorylation pattern and facilitates binding of phosphatidylinositol-3-OH kinase to the hepatocyte growth factor receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(2):507-10.
263. Lam BQ, Dai L, Qin Z. The role of HGF/c-MET signaling pathway in lymphoma. *Journal of hematology & oncology*. 2016;9(1):135.
264. Organ SL, Tsao MS. An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2011;3(1 Suppl):S7-S19.
265. Goyal L, Muzumdar MD, Zhu AX. Targeting the HGF/c-MET pathway in hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(9):2310-8.

266. Lee D, Sung ES, Ahn JH, An S, Huh J, You WK. Development of antibody-based c-Met inhibitors for targeted cancer therapy. *ImmunoTargets and therapy*. 2015;4:35-44.
267. Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T. Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett*. 1987;224(2):311-6.
268. Mungunsukh O, McCart EA, Day RM. Hepatocyte Growth Factor Isoforms in Tissue Repair, Cancer, and Fibrotic Remodeling. *Biomedicines*. 2014;2(4):301-26.
269. Matsumoto K, Nakamura T. HGF: its organotrophic role and therapeutic potential. *Ciba Found Symp*. 1997;212:198-211; discussion -4.
270. Sato T, Yoshinouchi T, Sakamoto T, Fujieda H, Murao S, Sato H, et al. Hepatocyte growth factor(HGF): a new biochemical marker for acute myocardial infarction. *Heart Vessels*. 1997;12(5):241-6.
271. Yasuda S, Goto Y, Sumida H, Noguchi T, Baba T, Miyazaki S, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition restores hepatocyte growth factor production in patients with congestive heart failure. *Hypertension*. 1999;33(6):1374-8.
272. Nakamura T, Matsumoto K, Mizuno S, Sawa Y, Matsuda H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents tissue fibrosis, remodeling, and dysfunction in cardiomyopathic hamster hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2131-9.
273. Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(6):553-72.
274. Crestani B, Marchand-Adam S, Quesnel C, Plantier L, Borensztajn K, Marchal J, et al. Hepatocyte growth factor and lung fibrosis. *Proc Am Thorac Soc*. 2012;9(3):158-63.
275. Lee KH, Kim JR. Reactive oxygen species regulate the generation of urokinase plasminogen activator in human hepatoma cells via MAPK pathways after treatment with hepatocyte growth factor. *Exp Mol Med*. 2009;41(3):180-8.
276. Clavijo-Cornejo D, Enriquez-Cortina C, Lopez-Reyes A, Dominguez-Perez M, Nuno N, Dominguez-Meraz M, et al. Biphasic regulation of the NADPH oxidase by HGF/c-Met signaling pathway in primary mouse hepatocytes. *Biochimie*. 2013;95(6):1177-84.
277. Nagaike M, Hirao S, Tajima H, Noji S, Taniguchi S, Matsumoto K, et al. Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy. *J Biol Chem*. 1991;266(34):22781-4.
278. Igawa T, Matsumoto K, Kanda S, Saito Y, Nakamura T. Hepatocyte growth factor may function as a renotropic factor for regeneration in rats with acute renal injury. *Am J Physiol*. 1993;265(1 Pt 2):F61-9.
279. Liu Y, Tolbert EM, Lin L, Thursby MA, Sun AM, Nakamura T, et al. Up-regulation of hepatocyte growth factor receptor: an amplification and targeting

- mechanism for hepatocyte growth factor action in acute renal failure. *Kidney Int.* 1999;55(2):442-53.
280. Homsí E, Janino P, Biswas SK, Mizuno S, Nakamura T, Lopes de Faria JB. Attenuation of glycerol-induced acute kidney injury by previous partial hepatectomy: role of hepatocyte growth factor/c-met axis in tubular protection. *Nephron Exp Nephrol.* 2007;107(3):e95-106.
 281. Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, Wei H, Fan C, et al. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer.* 2018;17(1):45.
 282. Zhang Y, Du Z, Zhang M. Biomarker development in MET-targeted therapy. *Oncotarget.* 2016;7(24):37370-89.
 283. Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. *Am J Pathol.* 2008;172(2):299-308.
 284. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287(1):F7-16.
 285. Matsumoto K, Nakamura T. Renotropic role and therapeutic potential of HGF in the kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 9:59-61.
 286. Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int.* 2000;57(3):937-48.
 287. Azuma H, Takahara S, Matsumoto K, Ichimaru N, Wang JD, Moriyama T, et al. Hepatocyte growth factor prevents the development of chronic allograft nephropathy in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(6):1280-92.
 288. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):96-107.
 289. Dworkin LD, Gong R, Tolbert E, Centracchio J, Yano N, Zanabli AR, et al. Hepatocyte growth factor ameliorates progression of interstitial fibrosis in rats with established renal injury. *Kidney Int.* 2004;65(2):409-19.
 290. Mizuno S, Nakamura T. Suppressions of chronic glomerular injuries and TGF-beta 1 production by HGF in attenuation of murine diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(1):F134-43.
 291. Herrero-Fresneda I, Torras J, Franquesa M, Vidal A, Cruzado JM, Lloberas N, et al. HGF gene therapy attenuates renal allograft scarring by preventing the profibrotic inflammatory-induced mechanisms. *Kidney Int.* 2006;70(2):265-74.
 292. Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction. *Am J Pathol.* 2003;163(2):621-32.

293. Kim YC, Lee J, An JN, Kim JH, Choi YW, Li L, et al. Renoprotective effects of a novel cMet agonistic antibody on kidney fibrosis. *Scientific reports*. 2019;9(1):13495.
294. Li H, Jiang T, Lin Y, Zhao Z, Zhang N. HGF protects rat mesangial cells from high-glucose-mediated oxidative stress. *Am J Nephrol*. 2006;26(5):519-30.
295. Hui L, Hong Y, Jingjing Z, Yuan H, Qi C, Nong Z. HGF suppresses high glucose-mediated oxidative stress in mesangial cells by activation of PKG and inhibition of PKA. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(3):467-73.
296. Dai C, Saleem MA, Holzman LB, Mathieson P, Liu Y. Hepatocyte growth factor signaling ameliorates podocyte injury and proteinuria. *Kidney Int*. 2010;77(11):962-73.
297. Safirstein R. Gene expression in nephrotoxic and ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 1994;4(7):1387-95.
298. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int*. 2001;59(6):2023-38.
299. Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell*. 1991;67(5):901-8.
300. Kinoshita T, Hirao S, Matsumoto K, Nakamura T. Possible endocrine control by hepatocyte growth factor of liver regeneration after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;177(1):330-5.
301. Kawaida K, Matsumoto K, Shimazu H, Nakamura T. Hepatocyte growth factor prevents acute renal failure and accelerates renal regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(10):4357-61.
302. Donovan KL, Davies M, Coles GA, Williams JD. Relative roles of elastase and reactive oxygen species in the degradation of human glomerular basement membrane by intact human neutrophils. *Kidney international*. 1994;45(6):1555-61.
303. Linas SL, Whittenburg D, Parsons PE, Repine JE. Ischemia increases neutrophil retention and worsens acute renal failure: role of oxygen metabolites and ICAM 1. *Kidney international*. 1995;48(5):1584-91.
304. Lauriat S, Linas SL. The role of neutrophils in acute renal failure. *Semin Nephrol*. 1998;18(5):498-504.
305. Kezic A, Stajic N, Thaiss F. Innate Immune Response in Kidney Ischemia/Reperfusion Injury: Potential Target for Therapy. *J Immunol Res*. 2017;2017:6305439.
306. Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol*. 1993;264(4 Pt 1):L406-12.
307. Mizuno S, Nakamura T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. *Am J Pathol*. 2005;166(6):1895-905.

308. Xie M, Wan J, Zhang F, Zhang R, Zhou Z, You D. Influence of hepatocyte growth factor-transfected bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards renal fibrosis in rats. *Indian J Med Res.* 2019;149(4):508-16.
309. Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res.* 2005;97(7):663-73.
310. Savi M, Bocchi L, Fiumana E, Karam JP, Frati C, Bonafe F, et al. Enhanced engraftment and repairing ability of human adipose-derived stem cells, conveyed by pharmacologically active microcarriers continuously releasing HGF and IGF-1, in healing myocardial infarction in rats. *J Biomed Mater Res A.* 2015;103(9):3012-25.
311. Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vicinanza C, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(9):977-86.
312. Gomes SA, Hare JM, Rangel EB. Kidney-Derived c-Kit(+) Cells Possess Regenerative Potential. *Stem Cells Transl Med.* 2018;7(4):317-24.
313. Huang J, Kong Y, Xie C, Zhou L. Stem/progenitor cell in kidney: characteristics, homing, coordination, and maintenance. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):197.
314. Gurevich E, Segev Y, Landau D. Growth Hormone and IGF1 Actions in Kidney Development and Function. *Cells.* 2021;10(12).
315. Friedlaender M, Popovtzer MM, Weiss O, Nefesh I, Kopolovic J, Raz I. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) enhances recovery from HgCl₂-induced acute renal failure: the effects on renal IGF-1, IGF-1 receptor, and IGF-binding protein-1 mRNA. *J Am Soc Nephrol.* 1995;5(10):1782-91.
316. Liu Y. Hepatocyte growth factor and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2002;11(1):23-30.
317. Reiser J, Sever S, Faul C. Signal transduction in podocytes--spotlight on receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(2):104-15.
318. Ren C, Kumar S, Chanda D, Chen J, Mountz JD, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells.* 2008;26(9):2332-8.
319. Cukjati D, Rebersek S, Miklavcic D. A reliable method of determining wound healing rate. *Medical & biological engineering & computing.* 2001;39(2):263-71.
320. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
321. Duner F, Lindstrom K, Hultenby K, Hulkko J, Patrakka J, Tryggvason K, et al. Permeability, ultrastructural changes, and distribution of novel proteins in the

- glomerular barrier in early puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron Exp Nephrol.* 2010;116(2):e42-52.
322. Pietila M, Lehtonen S, Tuovinen E, Lahteenmaki K, Laitinen S, Leskela HV, et al. CD200 positive human mesenchymal stem cells suppress TNF-alpha secretion from CD200 receptor positive macrophage-like cells. *PLoS One.* 2012;7(2):e31671.
 323. Jung YS, Vermeer PD, Vermeer DW, Lee SJ, Goh AR, Ahn HJ, et al. CD200: association with cancer stem cell features and response to chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2015;37(3):327-35.
 324. Barzegar Behrooz A, Syahir A, Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J Drug Target.* 2019;27(3):257-69.
 325. Pavon LF, Sibov TT, de Oliveira DM, Marti LC, Cabral FR, de Souza JG, et al. Mesenchymal stem cell-like properties of CD133+ glioblastoma initiating cells. *Oncotarget.* 2016;7(26):40546-57.
 326. Nakamura Y, Miyata Y, Matsuo T, Shida Y, Hakariya T, Ohba K, et al. Stage-specific embryonic antigen-4 is a histological marker reflecting the malignant behavior of prostate cancer. *Glycoconj J.* 2019;36(5):409-18.
 327. Imai T, Tamai K, Oizumi S, Oyama K, Yamaguchi K, Sato I, et al. CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer. *PLoS One.* 2013;8(4):e62002.
 328. Kudo-Saito C. Cancer-associated mesenchymal stem cells aggravate tumor progression. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:23.
 329. Eckert F, Schilbach K, Klumpp L, Bardoscia L, Sezgin EC, Schwab M, et al. Potential Role of CXCR4 Targeting in the Context of Radiotherapy and Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol.* 2018;9:3018.
 330. Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem.* 2009;108(3):577-88.
 331. Ransom RF, Lam NG, Hallett MA, Atkinson SJ, Smoyer WE. Glucocorticoids protect and enhance recovery of cultured murine podocytes via actin filament stabilization. *Kidney Int.* 2005;68(6):2473-83.
 332. Wang L, Zhang L, Hou Q, Zhu X, Chen Z, Liu Z. Triptolide attenuates proteinuria and podocyte apoptosis via inhibition of NF-kappaB/GADD45B. *Sci Rep.* 2018;8(1):10843.
 333. Srivastava T, Garola RE, Whiting JM, Alon US. Synaptopodin expression in idiopathic nephrotic syndrome of childhood. *Kidney international.* 2001;59(1):118-25.
 334. Tan L, Liu X, Dou H, Hou Y. Characteristics and regulation of mesenchymal stem cell plasticity by the microenvironment - specific factors involved in the regulation of MSC plasticity. *Genes Dis.* 2022;9(2):296-309.
 335. Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells

- into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochemical and biophysical research communications*. 2000;279(2):500-4.
336. Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, et al. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;304(4):691-5.
 337. Aloia A, Petrova E, Tomiuk S, Bissels U, Deas O, Saini M, et al. The sialyl-glycolipid stage-specific embryonic antigen 4 marks a subpopulation of chemotherapy-resistant breast cancer cells with mesenchymal features. *Breast Cancer Res*. 2015;17(1):146.
 338. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(10):1291-302.
 339. Reible B, Schmidmaier G, Moghaddam A, Westhauser F. Insulin-Like Growth Factor-1 as a Possible Alternative to Bone Morphogenetic Protein-7 to Induce Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(6).
 340. Grau-Vorster M, Rodriguez L, Torrents-Zapata S, Vivas D, Codinach M, Blanco M, et al. Levels of IL-17F and IL-33 correlate with HLA-DR activation in clinical-grade human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cell expansion cultures. *Cytotherapy*. 2019;21(1):32-40.
 341. Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38(6):1745-55.
 342. Grau-Vorster M, Laitinen A, Nystedt J, Vives J. HLA-DR expression in clinical-grade bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells: a two-site study. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):164.
 343. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(5):a015560.
 344. Pontikoglou C, Langonne A, Ba MA, Varin A, Rosset P, Charbord P, et al. CD200 expression in human cultured bone marrow mesenchymal stem cells is induced by pro-osteogenic and pro-inflammatory cues. *J Cell Mol Med*. 2016;20(4):655-65.
 345. Kawasaki BT, Mistree T, Hurt EM, Kalathur M, Farrar WL. Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;364(4):778-82.
 346. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821-8.
 347. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007;445(7123):106-10.

348. Park J, Kim SK, Hallis SP, Choi BH, Kwak MK. Role of CD133/NRF2 Axis in the Development of Colon Cancer Stem Cell-Like Properties. *Front Oncol.* 2021;11:808300.
349. Harada J, Miyata Y, Taima T, Matsuda T, Mukae Y, Mitsunari K, et al. Stage-specific Embryogenic Antigen-4 Expression in Castration-resistant Prostate Cancer and its Correlation With the Androgen Receptor. *Anticancer Res.* 2021;41(7):3327-35.
350. Lou YW, Wang PY, Yeh SC, Chuang PK, Li ST, Wu CY, et al. Stage-specific embryonic antigen-4 as a potential therapeutic target in glioblastoma multiforme and other cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(7):2482-7.
351. Cheng J, Yang K, Zhang Q, Yu Y, Meng Q, Mo N, et al. The role of mesenchymal stem cells in promoting the transformation of androgen-dependent human prostate cancer cells into androgen-independent manner. *Sci Rep.* 2016;6:16993.
352. Jing Y, Han Z, Liu Y, Sun K, Zhang S, Jiang G, et al. Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* 2012;7(8):e43272.
353. Filipp FV, Li C, Boiko AD. CD271 is a molecular switch with divergent roles in melanoma and melanocyte development. *Sci Rep.* 2019;9(1):7696.
354. Murillo-Sauca O, Chung MK, Shin JH, Karamboulas C, Kwok S, Jung YH, et al. CD271 is a functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2014;5(16):6854-66.
355. Chung MK, Jung YH, Lee JK, Cho SY, Murillo-Sauca O, Uppaluri R, et al. CD271 Confers an Invasive and Metastatic Phenotype of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through the Upregulation of Slug. *Clin Cancer Res.* 2018;24(3):674-83.
356. Forsyth PA, Krishna N, Lawn S, Valadez JG, Qu X, Fenstermacher DA, et al. p75 neurotrophin receptor cleavage by alpha- and gamma-secretases is required for neurotrophin-mediated proliferation of brain tumor-initiating cells. *J Biol Chem.* 2014;289(12):8067-85.
357. De Giorgi U, Cohen EN, Gao H, Mego M, Lee BN, Lodhi A, et al. Mesenchymal stem cells expressing GD2 and CD271 correlate with breast cancer-initiating cells in bone marrow. *Cancer Biol Ther.* 2011;11(9):812-5.
358. Ehtesham M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett.* 2009;274(2):305-12.
359. De-Colle C, Menegakis A, Monnich D, Welz S, Boeke S, Sipos B, et al. SDF-1/CXCR4 expression is an independent negative prognostic biomarker in patients with head and neck cancer after primary radiochemotherapy. *Radiother Oncol.* 2018;126(1):125-31.

360. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18(9).
361. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie.* 2013;95(12):2196-211.
362. Brown KJ, Formolo CA, Seol H, Marathi RL, Duguez S, An E, et al. Advances in the proteomic investigation of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics.* 2012;9(3):337-45.
363. Lu W, Su X, Klein MS, Lewis IA, Fiehn O, Rabinowitz JD. Metabolite Measurement: Pitfalls to Avoid and Practices to Follow. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:277-304.
364. Halket JM, Waterman D, Przyborowska AM, Patel RK, Fraser PD, Bramley PM. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J Exp Bot.* 2005;56(410):219-43.
365. Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner PJ. Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008;870(2):222-32.
366. Grant RS, Coggan SE, Smythe GA. The physiological action of picolinic Acid in the human brain. *Int J Tryptophan Res.* 2009;2:71-9.
367. Xie B, Zhang H, Li X, Dong X, Sun Y. Iminodiacetic Acid-Modified Human Serum Albumin: A Multifunctional Agent against Metal-Associated Amyloid beta-Protein Aggregation and Cytotoxicity. *ACS Chem Neurosci.* 2017;8(10):2214-24.
368. Liu Y, Xu L, Hu L, Chen D, Yu L, Li X, et al. Stearic acid methyl ester promotes migration of mesenchymal stem cells and accelerates cartilage defect repair. *J Orthop Translat.* 2020;22:81-91.
369. Fukatsu A, Matsuo S, Tamai H, Sakamoto N, Matsuda T, Hirano T. Distribution of interleukin-6 in normal and diseased human kidney. *Lab Invest.* 1991;65(1):61-6.
370. Moriyama T, Fujibayashi M, Fujiwara Y, Kaneko T, Xia C, Imai E, et al. Angiotensin II stimulates interleukin-6 release from cultured mouse mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 1995;6(1):95-101.
371. Moutabarrik A, Nakanishi I, Ishibashi M. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor are expressed by cultured glomerular epithelial cells. *Scand J Immunol.* 1994;40(2):181-6.
372. Jo HA, Kim JY, Yang SH, Han SS, Joo KW, Kim YS, et al. The role of local IL6/JAK2/STAT3 signaling in high glucose-induced podocyte hypertrophy. *Kidney Res Clin Pract.* 2016;35(4):212-8.
373. Liu XH, Bai CG, Xu ZY, Huang SD, Yuan Y, Gong DJ, et al. Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction. *Microvasc Res.* 2008;76(1):23-30.

374. Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2001;37(3):601-11.
375. Chade AR, Bentley MD, Zhu X, Rodriguez-Porcel M, Niemeyer S, Amores-Arriaga B, et al. Antioxidant intervention prevents renal neovascularization in hypercholesterolemic pigs. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(7):1816-25.
376. Lerman LO, Chade AR. Angiogenesis in the kidney: a new therapeutic target? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(2):160-5.
377. Kwon HM, Hur SM, Park KY, Kim CK, Kim YM, Kim HS, et al. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascul Pharmacol.* 2014;63(1):19-28.
378. Azar WJ, Azar SH, Higgins S, Hu JF, Hoffman AR, Newgreen DF, et al. IGFBP-2 enhances VEGF gene promoter activity and consequent promotion of angiogenesis by neuroblastoma cells. *Endocrinology.* 2011;152(9):3332-42.
379. Boughanem H, Yubero-Serrano EM, Lopez-Miranda J, Tinahones FJ, Macias-Gonzalez M. Potential Role of Insulin Growth-Factor-Binding Protein 2 as Therapeutic Target for Obesity-Related Insulin Resistance. *Int J Mol Sci.* 2021;22(3).
380. Shin M, Kang HS, Park JH, Bae JH, Song DK, Im SS. Recent Insights into Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2 Transcriptional Regulation. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2017;32(1):11-7.
381. Li HL, Yan Z, Ke ZP, Tian XF, Zhong LL, Lin YT, et al. IGFBP2 is a potential biomarker in acute kidney injury (AKI) and resveratrol-loaded nanoparticles prevent AKI. *Oncotarget.* 2018;9(93):36551-60.
382. van Beijnum JR, Pieters W, Nowak-Sliwinska P, Griffioen AW. Insulin-like growth factor axis targeting in cancer and tumour angiogenesis - the missing link. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2017;92(3):1755-68.
383. Allard JB, Duan C. IGF-Binding Proteins: Why Do They Exist and Why Are There So Many? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:117.
384. Wang S, Diao H, Guan Q, Cruikshank WW, Delovitch TL, Jevnikar AM, et al. Decreased renal ischemia-reperfusion injury by IL-16 inactivation. *Kidney Int.* 2008;73(3):318-26.
385. Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X, et al. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2014;74(5):1576-87.
386. Kelly A, Houston SA, Sherwood E, Casulli J, Travis MA. Regulation of Innate and Adaptive Immunity by TGFbeta. *Adv Immunol.* 2017;134:137-233.
387. Noh MY, Lim SM, Oh KW, Cho KA, Park J, Kim KS, et al. Mesenchymal Stem Cells Modulate the Functional Properties of Microglia via TGF-beta Secretion. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(11):1538-49.

388. de Araujo Farias V, Carrillo-Galvez AB, Martin F, Anderson P. TGF-beta and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018;43:25-37.
389. Matheus LHG, Simao GM, Amaral TA, Brito RBO, Malta CS, Matos YST, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) increases during renal fibrogenesis and its inhibition potentiates TGF-beta 1-induced epithelial to mesenchymal transition. *BMC Nephrol.* 2017;18(1):287.
390. Mohib K, Guan Q, Diao H, Du C, Jevnikar AM. Proapoptotic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase expressed in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;293(3):F801-12.
391. Prohazka F, Dallman MJ, Lo Celso C. From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface focus.* 2013;3(3):20130001.
392. Mortensen LJ, Levy O, Phillips JP, Stratton T, Triana B, Ruiz JP, et al. Quantification of Mesenchymal Stem Cell (MSC) delivery to a target site using in vivo confocal microscopy. *PLoS One.* 2013;8(10):e78145.
393. Beem E, Segal MS. Evaluation of stability and sensitivity of cell fluorescent labels when used for cell migration. *Journal of fluorescence.* 2013;23(5):975-87.
394. Qi Y, Niu L, Zhao T, Shi Z, Di T, Feng G, et al. Combining mesenchymal stem cell sheets with platelet-rich plasma gel/calcium phosphate particles: a novel strategy to promote bone regeneration. *Stem cell research & therapy.* 2015;6:256.
395. Funakoshi K, Bagheri M, Zhou M, Suzuki R, Abe H, Akashi H. Highly sensitive and specific Alu-based quantification of human cells among rodent cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):13202.
396. Quesada MP, Garcia-Bernal D, Pastor D, Estirado A, Blanquer M, Garcia-Hernandez AM, et al. Safety and Biodistribution of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Injected Intrathecally in Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency Mice: Preclinical Study. *Tissue Eng Regen Med.* 2019;16(5):525-38.
397. Hosoyamada M, Yan K, Nishibori Y, Takiue Y, Kudo A, Kawakami H, et al. Nephron and podocyte expression around the onset of puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Pharmacol Sci.* 2005;97(2):234-41.
398. Zhang A, Huang S. Progress in pathogenesis of proteinuria. *International journal of nephrology.* 2012;2012:314251.
399. Lowenborg EK, Jaremko G, Berg UB. Glomerular function and morphology in puromycin aminonucleoside nephropathy in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(10):1547-55.
400. Jo CH, Kim S, Kim GH. Association of Proteinuria with Urinary Concentration Defect in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis. *Electrolyte Blood Press.* 2020;18(2):31-9.

401. Xin G, Wang M, Jiao LL, Xu GB, Wang HY. Protein-to-creatinine ratio in spot urine samples as a predictor of quantitation of proteinuria. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2004;350(1-2):35-9.
402. Yu SM, Nissaisorakarn P, Husain I, Jim B. Proteinuric Kidney Diseases: A Podocyte's Slit Diaphragm and Cytoskeleton Approach. *Frontiers in medicine*. 2018;5:221.
403. Verma R, Venkatareddy M, Kalinowski A, Li T, Kukla J, Mollin A, et al. Nephrin is necessary for podocyte recovery following injury in an adult mature glomerulus. *PloS one*. 2018;13(6):e0198013.
404. Tamura H, Nakazato H, Kuraoka S, Yoneda K, Takahashi W, Endo F. Reduced INF2 expression in nephrotic syndrome is possibly related to clinical severity of steroid resistance in children. *Nephrology*. 2016;21(6):467-75.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-72

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 27.07.2016 (ÇARŞAMBA)
TOPLANTI SAYISI	: 2016/05
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2016/38
KARAR NUMARASI	: 2016/38 – 3
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Doç. Dr. Ayşen Günel ÖZCAN
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR, Uzm. Bio. Özge Burcu ŞAHAN
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Doç. Dr. Fatih ÖZALTIN, Dr. Emine KORKMAZ, Prof. Dr. Şafak GÜÇER, Prof. Dr. Figen KAYMAZ
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 58 Adet Sprague-Dawley Sıçan (150-200g)

Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Fakültesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ayşen Günel ÖZCAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2016/38 kayıt numaralı *"Podosit Kimyasal Hasar Modeli Üzerine İndüklenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi"* isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul üyesi Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR çıkar çatışması nedeni ile tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

Telefon:
www

Faks:

Ayrıntılı Bilgi için:

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ
 TOPLANTI TARİHİ : 27.07.2016 (ÇARŞAMBA)
 TOPLANTI SAYISI : 2016/05
 TOPLANTI SAATİ : 14.00

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ (Başkan)	Prof. Dr. Nüket Örnek BÜKEN (Üye)	KATILMADI Prof. Dr. M. Yıldırım SARA (Üye)
Doç. Dr. Meltem TUNCER (Üye)	Doç. Dr. A. Cevdet AKMAN (Üye)	Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR (Üye)
Doç. Dr. Güneş ESENDAĞLI (Üye)	Doç. Dr. Aytekin AKYOL (Üye)	KATILMADI Doç. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
Doç. Dr. H. ONBAŞILAR (Üye)	Doç. Dr. Mehmet Alper ÇETİNKAYA (Üye)	Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide TEL (Üye)
Mevlüt ÖKSÜZOĞLU (Üye)	İZİMLİ Serdar ÇAKIROĞLU (Üye)	Avukat Yasemin ÖZSELÇUK (Üye)

EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu

TEZİN TAM BAŞLIĞI: KİMYASAL VE GENETİK PODOSİT HASAR MODELLERİNDE İNDÜKLENMİŞ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ETKİSİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: ÖZGE BURCU ŞAHAN

DOSYANIN TOPLAM SAYFASI: 130

Podosit Hasar Modelinde İndüklenmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi

ORJİNALLİK RAPORU

%4	%3	%2	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
3	avesis.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	www.pedistem.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	d-nb.info İnternet Kaynağı	<%1
6	www.ijccm.org İnternet Kaynağı	<%1
7	Ozge Burcu Sahan, Aysen Gunel-Ozcan. "Hepatocyte Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-1 based Cellular Therapies for Oxidative Stress Injury", Current Stem Cell Research & Therapy, 2021 Yayın	<%1

EK-3: Turnitin - Dijital Makbuz



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin **Turnitin**'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Özge Burcu Şahan
Ödev başlığı:	Podosit Hasar Modelinde İndüklenmiş Mezenkimal Kök Hücr...
Gönderi Başlığı:	Podosit Hasar Modelinde İndüklenmiş Mezenkimal Kök Hücr...
Dosya adı:	turnitin_02.02._tez-_zge.docx
Dosya boyutu:	55.66M
Sayfa sayısı:	130
Kelime sayısı:	26,156
Karakter sayısı:	181,818
Gönderim Tarihi:	02-Şub-2023 05:11 ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	2004769582



Copyright 2023 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

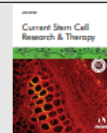
EK-4: Bildiriler

Current Stem Cell Research & Therapy, 2021, 16, 771-791



MINI-REVIEW ARTICLE

Hepatocyte Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-1 based Cellular Therapies for Oxidative Stress Injury

Özge Burcu Sahan¹ and Aysen Gunel-Ozcan^{1,*}¹Department of Stem Cell Sciences, Graduate School of Health Sciences

ARTICLE HISTORY

Received: June 04, 2020
 Revised: September 14, 2020
 Accepted: September 21, 2020

DOI:
 10.2174/1574888X16999201124153753



Abstract: Imbalance between free radicals and antioxidants causes oxidative stress by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the tissues and organs. Oxidative stress occurs in many damaged conditions, and the increase of ROS and reduction of antioxidants enhances inflammation, apoptosis, fibrosis and may worsen the pathology leading to organ failure. The potential therapies aim to increase antioxidants and decrease ROS. Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the stroma of various tissues are multipotent cells and have beneficial effects on several diseases with their immunomodulation and regeneration capacities. MSCs trigger the proliferation of the cells with various secretory factors, reduce oxidative stress and decrease apoptosis, inflammation, fibrosis and thus, increase regeneration. However, survival, engraftment, and differentiation problems of transplanted MSCs restrict their protective and regenerative effects. Preconditioning of MSCs with several factors, such as cytokines, hypoxia, chemical agents, pharmacological drugs, physical factors and growth factors, enhances their repairing efficacy for injury and disease models. This review is mainly focused on insulin-like growth factor (IGF-1) and hepatocyte growth factor (HGF), and discusses the research on MSC priming/induction with IGF-1 and HGF stimulation either by supplementation or overexpression that can enhance the regenerative potential of MSCs on various oxidative stress conditions such as acute/chronic kidney diseases, lung injury, cancer, metabolic and cardiovascular diseases.

Keywords: Oxidative stress, reactive oxygen species, mesenchymal stem cells, preconditioning, insulin-like growth factor, hepatocyte growth factor.

Rejenerasyon Kapasitesi Güçlendirilmiş Mezenkimal Kök Hücreler

Empowered Mesenchymal Stem Cells with Enhanced Regenerative Capacity

Özge Burcu ŞAHAN^a,
 Aysen GÜNEL ÖZCAN^a

ÖZET Mezenkimal kök hücreler (MKH) multipotent hücreler olup kemik, kas, yağ gibi dokulara farklılaşabilme, salgıladığı trofik faktörler ve parakrin özellikleri sayesinde yara/hasar bölgesinde rejenerasyona katkıda bulunmaktadır. MKH'lerin klinikte uygulanımındaki en büyük sorunlar transplantasyondan sonra dokuya sınırlı sayıda hücrenin ulaşması, çoğunun akciğerlerde tutulması ve hasarlı dokunun zararlı mikroçevresinden kaynaklı hücrelerin canlı kalamamasından kaynaklıdır. Bu nedenle, MKH'lerin rejeneratif potansiyeli ve etkinliği sınırlanmaktadır. MKH'lerin hedeflenen dokuya engraftmanını ve rejeneratif kapasitesini artırmak için ex vivo kültürlerde çeşitli lisanslama/hazırlama stratejileri araştırılmaktadır. Hali hazırda bu stratejilerin çoğu, gelecekte klinik kullanımda rejeneratif kapasitesi ve etkinliği daha güçlü MKH'ların üretimi için umut vaat eden preklinal çalışmalar düzeyindedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre; rejeneratif tıp; önkoşullama; kök hücre kültürü

ABSTRACT Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells and contribute to the regeneration of the wound / injury area by secreting trophic factors and paracrine properties and differentiation into various tissues such as adipose, bone and cartilage. The biggest problem in the clinical application of MSCs is the limited engraftment to the targeted tissue after transplantation by being trapped in the lungs. Due to the harmful microenvironment of damaged tissue survival rate of the transplanted MSCs is also low. Therefore, therapeutic efficiency and regenerative potency of MSCs are restrained. In order to increase engraftment and regenerative capacity of MSCs, various licensing/priming strategies are investigated for their ex vivo expansion. Currently, these strategies are at the level of preclinical studies that promise hope for the production of empowered MSCs with increased regenerative capacity and more effective MSCs in future clinical use.

Keywords: Mesenchymal stem cells; regenerative medicine; priming/preconditioning; stem cell culture



Türkiye Klinikleri

TIBBİ GENETİK

MEDICAL GENETICS

ÖZEL KONULAR/SPECIAL TOPICS

KÖK HÜCRE VE REJENERATİF TIP

STEM CELLS AND REGENERATIVE MEDICINE

Editor/Editor: Prof. Dr. Ayşen GÜNEL ÖZCAN

- | | | |
|----|--|---|
| 1 | Kök Hücrelerde Genom Kararlılığı, Hücre Kaderi ve Rejenerasyon | Ayşen GÜNEL ÖZCAN |
| 10 | Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerle Nadir Hastalık Modellemesi | Özgür Doğan EROL, Mehmet Emin ŞEKER, Fatma AERTS KAYA |
| 18 | İnsan ve Fare Pluripotent Kök Hücrelerinden Erkek Germ Hücrelerinin Üretilmesi | Nilgin YERSAL, Merve GİZER, Petek KORKUSUZ |
| 26 | Rejenerasyon Kapasitesi Güçlendirilmiş Mezenkimal Kök Hücreler | Özge Burcu ŞAHAN, Ayşen GÜNEL ÖZCAN |
| 34 | Kök Hücre Ürünleri ve Kök Hücre Temelli İleri Tedavi Tıbbi Ürünlerinde Kalite, Yasal Düzenlemeler... | Tarkan ELDEN |
| 44 | Dental Kökenli Kök Hücrelerin Rejeneratif Tıp... | Abdullah Cevdet AKMAN, Şerife Buket BOZKURT, Rahime Menal NOHUTCU |
| 53 | Ormurilik Yaralanmalarında Kök Hücre Uygulamaları | Serdar SOLMAZ, Ayhan ATTAR |
| 62 | Santral Sinir Sistemi Hastalıklarında Kök Hücre Uygulamaları | Çağrı KİSER, Defne ENGÖR, Şemin GENÇ |
| 67 | Plastik Cerrahide Adipoz Kaynaklı Kök Hücre Uygulamaları | Muhammed Furkan AÇIL, İbrahim VARGEL |
| 74 | Akciğer Hastalıklarında Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları | Birce SUNMAN, H. Uğur ÖZÇELİK |
| 82 | Kritik Hastada Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları | Ölmez DEMİRKIRAN, Oğuzhan KAYHAN, Erdem YALÇINKAYA |
| 88 | Kardiyovasküler Cerrahide Kök Hücre Uygulamaları | Berk ARAP, Çiğdem TEL ÜSTÜNİŞİK, Deniz GÖKSEDEF |

ShT-06.4-1**Single dose application IGF-1 and HGF induced bone marrow mesenchymal stem cells reduced proteinuria in focal segmental glomerulosclerosis model**

Ö.B. Şahan¹, I. Onbasilar², K.S. Gucer³, F.F. Kaymaz⁴,
E. Atayar⁵, F. Ozaltin^{5,6}, A. Günel Özcan¹

¹*Department of Stem Cell Sciences, Graduate School of Health Sciences, Center for Stem Cell Research and Development, Hacettepe University, Ankara, Turkey,* ²*Laboratory Animal Breeding and Experimental Medical Research Unit, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey,* ³*Department of Pediatric Pathology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey,* ⁴*Department of Histology and Embryology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey,* ⁵*Nephrogenetics Laboratory, Department of Pediatric Nephrology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey,* ⁶*Department of Pediatric Nephrology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey*

Mesenchymal stem cells (MSCs) are used in the treatment of various pathologic states with their trophic and immunomodulatory properties. Induction of MSCs in culture by particular growth factors increases their migration, immunomodulator and survival capacity. IGF-1 and HGF have been proposed as promising therapeutic agents especially in renal diseases with their renoprotrophic and nephroprotective effects. In our study, we hypothesized that IGF-1 and HGF induced MSCs (iMSCs) would better migrate to the site of damage and ameliorate proteinuria in Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) rat model with their immunomodulatory properties. iMSCs was performed by 10 ng/ml IGF-1 and 20 ng/ml HGF. FSGS model was technically

those of
expansion
to be

out on
XP10
with a
at pas-
Quantitative,
days of
Cell
ansion
K are
ometry
s from

strated
ality of
STACK.
n large
ng the
biore-
y.
ift of a
ble.

174

IGF-1 and HGF Preconditioning of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduced Proteinuria in Rat Focal Segmental Glomerulosclerosis Model

O.B. Sahan^{1,*}, I. Onbasilar², K.S. Gucer³, F.F. Kaymaz⁴, E. Atayar⁵,
F. Ozaltin^{6,7}, A. Gunel Ozcan⁸

¹ Department of Stem Cell Sciences, Graduate School of Health Sciences, Center for Stem Cell Research and Development, Hacettepe University, Ankara, Turkey; ² Laboratory Animal Breeding and Research Unit, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ³ Department of Pediatric Pathology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ⁴ Department of Histology and Embryology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ⁵ Nephrogenetics Laboratory, Department of Pediatric Nephrology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ⁶ Nephrogenetics Laboratory, Department of Pediatric Nephrology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ⁷ Department of Pediatric Nephrology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey; ⁸ Department of Stem Cell Sciences, Graduate School of Health Sciences, Center for Stem Cell Research and Development, Hacettepe University, Ankara, Turkey

Background & Aim Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) is one of the leading causes of end-stage kidney disease requiring renal replacement therapy for survival. It is characterized by massive proteinuria that results in hypoalbuminemia, edema and hyperlipidemia, and is known as irreversible kidney disease that steroid-based drugs only slow down the progression.

The use of Mesenchymal stem cells (MSCs) has been successful in the treatment of glomerular diseases. The biggest challenge of the MSC application is its engraftment into the site of injury and its loss due to

Effect of IGF-1 and HGF Induced Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells on Focal Segmental Glomerulosclerosis in Sprague-Dawley Rats: A pilot study

P.05-013-Mon

O.B. Sahan^I, E. Korkmaz^{II}, I. Onbasilar^{III}, S. Güter^{IV}, F. Kaymaz^V, F. Özalın^{VI}, A. Günel Özcan^I

^ICenter for Stem Cell Research and Development-PEDI-STEM, Hacettepe University, Ankara, Turkey,

^{II}Nephrogenetics Laboratory, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey, ^{III}Laboratory Animal Breeding and Experimental Medical Research Unit, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey,

^{IV}Department of Pediatric Pathology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey, ^VDepartment of Histology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey, ^{VI}Department of Pediatric Nephrology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

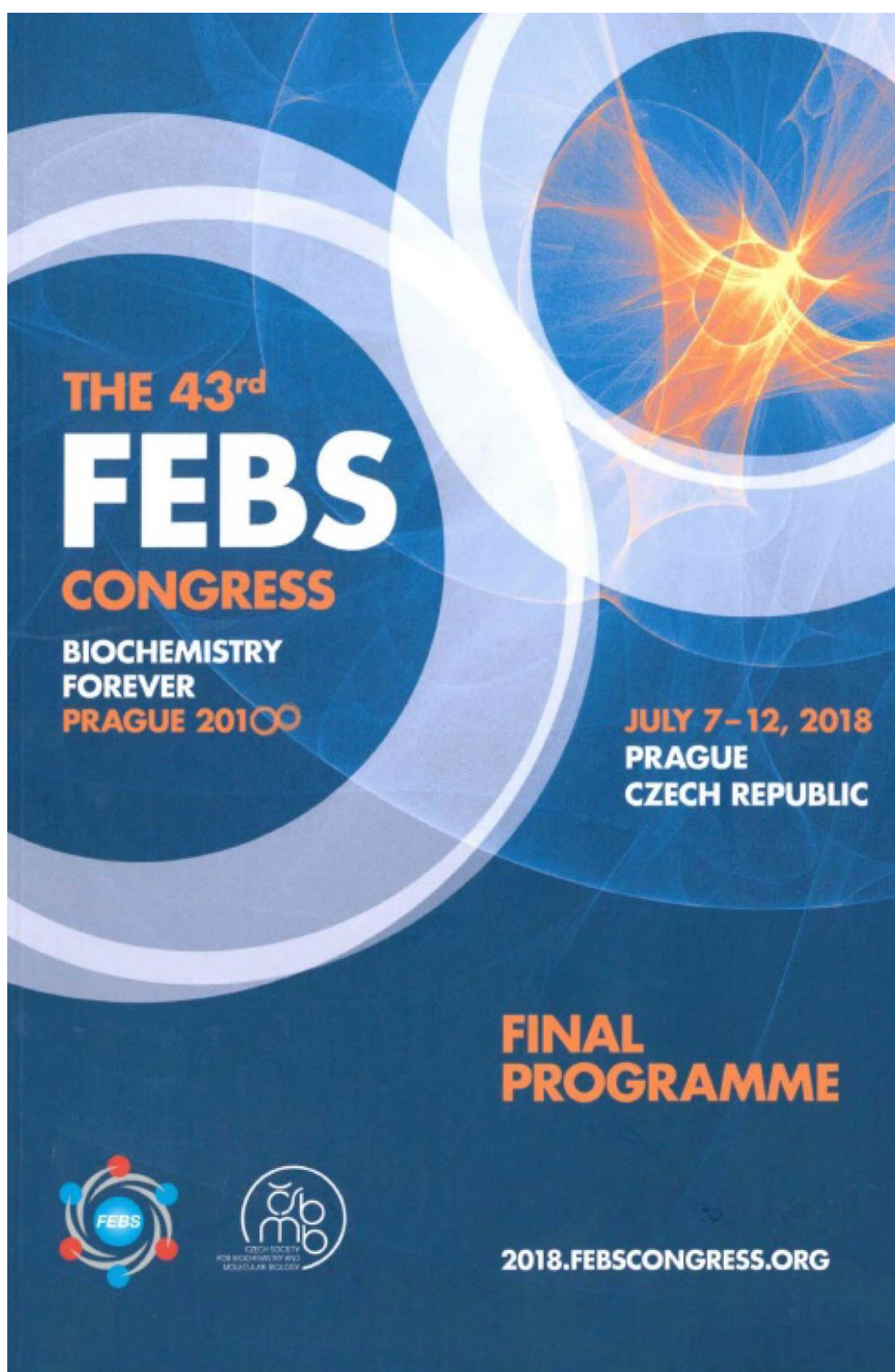
Addition of growth factors to cell culture media can change many properties such as cell survival, proliferation, adhesion, and migration. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are able to gain proinflammatory or antiinflammatory properties due to their induction by certain growth factors as IGF-1 expressing MSCs were shown to enhance repair in kidney, heart, liver and pancreas. Migration of MSCs increases upon HGF treatment. The aim of this study was to investigate the effect of HGF and IGF-1 induced bone marrow MSCs (iMSC) on the Focal Segmental Glomerulosclerosis (FSGS) rat model.

Rat (Sprague-Dawley) FSGS model was technically induced by injection of intraperitoneal single-dose Puromycin Aminonucleoside (PAN) (150 mg/kg). The occurrence of FSGS were assessed by biochemistry (increased urinary protein/creatinine (Up/Uc) ratio), immunohistochemistry (decrease in glomerular SYNPO protein level) and electron microscopy (podocyte effacement). After PAN administration, we injected 2×10^5 naive MSCs or iMSCs (induced by 10 ng/ml IGF-1 and 20 ng/ml HGF) intravenously to the rats on days 3 (early-stage) and 5 (late-stage). The effect of treatment was assessed by Up/Uc ratios in twenty-four hour urine samples collected on the days 3, 9 and 20.

Based on Up/Uc ratios, proteinuria completely disappeared on day 9 (Up/Uc:1.22 mg/mg) by early-stage iMSC treatment whereas proteinuria persisted by naive MSC treatment on day 9 (Up/Uc:68.13 mg/mg), which eventually decreased on day 20 (Up/Uc:8.02 mg/mg). In late-stage treated rats after the injury, proteinuria disappeared completely on day 9 by naive MSCs as well as iMSCs.

Our results indicate that IGF-1 and HGF induced MSCs are capable to repair glomerular injury both at early stage and late stage of acute injury. Treatment by naive MSCs may be insufficient at early stage, but can be as effective as iMSCs at late stages.

Key Words: Induced Mesenchymal Stem Cell, Focal Segmental Glomerulosclerosis, Puromycin Aminonucleoside, Proteinuria



9. ÖZGEÇMİŞ