

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ALLOJENİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ ÜÇ  
BOYUTLU MİKROAKIŞKAN PROKSİMAL TÜBÜL PLATFORMUNDAKİ  
İSKEMİK AKUT BÖBREK HASARINDA TERAPÖTİK ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Sefa Burak Çam**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır.**

**ANKARA**

**2022**



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ALLOJENİK MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ ÜÇ  
BOYUTLU MİKROAKIŞKAN PROKSİMAL TÜBÜL PLATFORMUNDAKİ  
İSKEMİK AKUT BÖBREK HASARINDA TERAPÖTİK ETKİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Sefa Burak Çam**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Olarak Hazırlanmıştır.**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Petek Korkusuz**

**ANKARA**

**2022**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışması ve uzmanlık eğitimim süresince bilimsel araştırma ortamını sağlayan, rehberliği ile teorik ve pratik olarak zeminimi ve ufkumu genişleten, desteğini her daim hissettiğim tez danışmanım sayın Prof. Dr. Petek Korkusuz'a,

Tıpta uzmanlık eğitimim boyunca araştırma, eğitim ve hizmet başlıkları kapsamında beni her gün bir adım ileriye taşıyan, hem profesyonel hem insani manada desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu, Prof. Dr. Figen Kaymaz, Prof. Dr. Pergin Atilla, Prof. Dr. Lale Karakoç Sökmensüer, Doç. Dr. Dilara Zeybek ve Dr. Öğr. Üyesi Elif Bilgiç'e,

Tez projesi kapsamında klinik bakış açısı ve öngörülerini ile desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Bülent Altun'a, PCR iş paketindeki destekleri için Doç. Dr. Ekim Zihni Taşkiran'a ve Gözde İmren'e,

Pratik becerilerim ve gelişimimde büyük emeği olan Dr. Eda Çiftci Dede'ye, laboratuvarında her konuda yardımına koşan Nazlıhan Gürbüz'e,

Eğitimimin büyük bölümünde beraber yetiştirdiğimiz dostlarım Dr. Deniz Ekin Doğan, Dr. Süleyman Erol ve Dr. Kübra Simay Aydın Akkurt'a,

Birlikte ilerlediğimiz eğitim yolculuğunda birbirimizi desteklediğimiz Dr. İlker Levent Erdem ve Dr. Serkan Türeli'ye,

Eğitimim ve tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen Emrah Tosun ve Hava Duygu özelinde tüm anabilim dalı idari personeline,

Çalışmamıza Kapsamlı Araştırma Projesi ((TSA-2020-18383) çerçevesinde finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne

Uzmanlık eğitimim süresince sevgisi ve desteği ile her daim elimi sımsıkı tutan sevgili eşim Zeynep Gür Çam'a, beni bugünlere getiren ve her daim destekleyen annem Fatma Zehra Çam, babam Mehmet Ali Çam ve kardeşim Zeynep Nur Çam'a, ikinci annem Ayşenur Gür ve ikinci babam Seddar Gür'e, minik patileriyle bana destek olan Benekli ve Nazlı'ya,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Sefa Burak Çam, Allojenik Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Üç Boyutlu Mikroakışkan Proksimal Tübül Platformundaki İskemik Akut Böbrek Hasarında Terapötik Etkilerinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2022.** Yüksek kronikleşme riski ve mortaliteli iskemik akut böbrek hasarında (ABH) hücrenel tedavilerin kliniğe aktarılabilmesi için gerçek zamanlı kişiselleştirilmiş modeller gerekmektedir. İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH) eksozomlarının hipoksik proksimal tübül epiteli (PTE) hasarındaki terapötik etkinliği üç boyutlu (3B) dinamik mikroakışkan platformunda ortaya konabilir. Akut hipoksik mikroakışkan düzeneğindeki insan PTE hücrelerinde, ZO-1 ve asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün immünreaktivitesi, dekstran geçirgenliği, proliferasyon hızı, BNIP3, HO-1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 ve GLUT2 gen ifadesi ölçülmüş; proliferatif tedavi penceresi belirlenen insan Kİ-MKH eksozomlarının ED50'de hipoksik hasardaki etkinliği 3B mikroakışkan platformuna uygulanarak değerlendirilmiştir. Mikroakışkan yongası akut hipoksiye bağlı PTE hasarı için optimize edilmiş; karakterize allojenik Kİ-MKH eksozomlarının gerçek zamanlı tedavi penceresi 172.582  $\mu$ g/ml ve 0-26 saat olarak belirlenmiş; eksozomlar ED50'de mikroakışkan yongasında 24. saatte akut hipokside bozulan bariyer bütünlüğünü düzeltmiş, ZO-1 işaretlenmesini arttırmış, PTE hücrelerini çoğaltmış, BNIP3 ifadesini azaltmış; HO-1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 ve GLUT2 ifadelerini arttırmıştır. Tez kapsamında optimize edilen hipoksik 3B mikroakışkan PTE platformunda allojenik Kİ-MKH eksozomlarının tedavi penceresindeki etkinliği yapı ve işlev açısından ortaya konmuştur. Yeni *ex vivo* sistem, nefroloji kliniğinde uygulanacak kişiselleştirilmiş teragnostik adayları doğruladığı için önemlidir.

**Anahtar Kelimeler: İskemik ABH, Proksimal Tübül, Eksozom, Mikroakışkan, Mezenkimal Kök Hücre**

**Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Kapsamlı Araştırma Projesi (TSA-2020-18383)**

## ABSTRACT

**Cam SB, The Assessment Of The Therapeutic Effects of Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Exosomes on Ischemic Acute Kidney Injury Model Constituting Three Dimensional Microfluidic Proximal Tubule-On-A-Chip Platform, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology Residency Thesis, Ankara, 2022.** Ischemic acute kidney injury (AKI) with high chronicity risk and mortality requires real-time personalized models to transfer cellular therapies to the clinic. The therapeutic efficacy of human bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MSC) exosomes in hypoxic proximal tubule epithelium (PTE) injury can be demonstrated in a three-dimensional (3D) dynamic microfluidic platform. ZO-1 and acetylated  $\alpha$ -tubulin immunoreactivity, dextran permeability, cell proliferation rate, BNIP3, HO-1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 and GLUT2 gene expressions were evaluated in human PTE cells in acute hypoxic microfluidic setup; The efficacy of human BM-MSC exosomes, whose proliferative treatment window was determined, in hypoxic damage at ED50 was evaluated by applying them on the optimized 3D microfluidic platform. Microfluidic chip setup was optimized for acute hypoxia-induced PTE injury. The real-time treatment window of characterized allogeneic BM-MSC exosomes was determined as 172.582  $\mu$ g/ml and 0-26 hours; exosomes at ED50 alleviated the acute hypoxic PTE injury by correcting the barrier integrity, increasing ZO-1 immunolabeling, increasing PTE cell numbers, decreasing BNIP3 expression; increasing HO-1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 and GLUT2 expressions at 24 hours in the microfluidic chip. In the hypoxic 3D microfluidic PTE platform optimized within the scope of the thesis, the efficacy of allogeneic BM-MSC exosomes in the treatment window was demonstrated in terms of structure and function. The new *ex vivo* system is important as it validates personalized therapeutic candidates to be applied in the nephrology clinic.

**Key words: Ischemic AKI, Proximal Tubule, Exosome, Microfluidic, Mesenchymal Stem Cells**

**Financial Support: Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, Research Fund (TSA-2020-18383)**

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLOLAR DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	14
2. GENEL BİLGİLER .....	17
2.1. Akut Böbrek Hasarı (ABH) .....	17
2.2. Akut Hipoksiye Bağlı Proksimal Tübül Epiteli (PTE) Hasarı Deney Düzenekleri .....	19
2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) ve MKH Eksozomları.....	20
2.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler.....	20
2.3.2. MKH Eksozomları .....	21
2.3.3. MKH Eksozomlarının İskemiye Bağlı ABH'daki Terapötik Rolü.....	22
2.4. Mikroakışkan Böbrek Yongası Teknolojisi .....	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	23
3.1. Çalışma Tasarımı .....	23
3.2. Üç Boyutlu (3B) Dinamik ve İki Boyutlu (2B) Statik PTE Hücre Kültürü Sistemlerinin Tasarımı, Optimizasyonu ve Akut Hipoksi Modelleri Oluşturulması .....	26
3.2.1. PTE Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması .....	26
3.2.2. PTE Hücrelerinin Işık ve Elektron Mikroskopunda Görüntülenmesi.....	27

3.2.3. 3B Dinamik ve 2B Statik PTE Hücre Kültürü Düzeneklerinin Optimizasyonu .....	29
3.2.4. 3B Dinamik ve 2B Statik PTE Hücre Kültürü Düzeneklerinde Akut Hipoksi Modelinin Optimizasyonu .....	31
3.3. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının 3B Dinamik ve 2B Statik Düzeneklerde Yapısal ve İşlevsel Olarak Değerlendirilmesi.....	32
3.3.1. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının Epitel Bariyerinin Bütünlüğüne Etkisinin Değerlendirilmesi .....	32
3.3.2. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının Yapısal Etkilerinin ZO-1 ve Asetillenmiş $\alpha$ -tübülün İmmün İşaretlemesi ile Değerlendirilmesi .....	33
3.3.3. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının Epitel Hücrelerinin Proliferasyon Hızına Etkisinin Değerlendirilmesi.....	34
3.3.4. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarında Glikoz Taşıyıcılarının ve Hasar Biyobelirteçlerinin mRNA Düzeyinde Değerlendirilmesi.....	34
3.4. İnsan Kİ-MKH'lerinden Eksozom İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Proliferatif Potansiyelinin Değerlendirilmesi .....	35
3.4.1. İnsan Kİ-MKH'lerinin Eldesi ve Çoğaltılması .....	35
3.4.2. İnsan Kİ-MKH'lerinden Eksozom İzolasyonu .....	36
3.4.3. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Protein Konsantrasyonu Açısından Karakterizasyonu.....	36
3.4.4. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Ultrastrüktürel Karakterizasyonu .....	37
3.4.5. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Yüzey Belirteçleri Açısından Karakterizasyonu.....	37
3.4.6. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Gerçek Zamanlı Tedavi Penceresinin Belirlenmesi .....	38
3.5. Allojenik Kİ-MKH Eksozomlarının Akut Hipoksiye Bağlı Yapısal ve İşlevsel PTE Hasarına Etkisinin 3B Dinamik Mikroakışkan Platformunda Değerlendirilmesi.....	39



3.5.1. Allojenik Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Epitel Geçirgenliği Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi .....	39
3.5.2. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Yapısal Etkilerinin İmmünfloresan İşaretleme ile Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi.....	39
3.5.3. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Proliferasyon Hızı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi.....	39
3.5.4. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Hasar Biyobelirteçleri Açısından Gen İfadesi Düzeyinde Değerlendirilmesi.....	40
3.6. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	42
4.1. İnsan PTE Hücreleri ile 2B Statik ve 3B Dinamik Kültür Düzeneklerinin Oluşturulması.....	42
4.2. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının 2B Statik ve 3B Dinamik Hücre Kültürü Düzeneklerinde Yapısal ve İşlevsel Olarak Değerlendirilmesi .....	44
4.2.1. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Epitel Geçirgenliğini Artırmıştır. ....	44
4.2.2. Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Mikroakışkan Platformunda ZO-1 ve Asetillenmiş $\alpha$ -tübülün İşaretlenmesini Azaltmıştır .....	46
4.2.3. Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Epitel Hücrelerinin Proliferasyon Hızını Azaltmıştır.....	52
4.2.4. Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Glikoz Taşıyıcıların ve Hasar Biyobelirteçlerinin Gen İfadelerini Değiştirmiştir .....	53
4.3. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Karakterizasyonu ve Akut Hipoksi Koşullarındaki İnsan PTE Hücrelerinde Proliferatif Etkisinin Değerlendirilmesi	55
4.3.1. Kİ-MKH Eksozomları Homojen Protein Konsantrasyonu Sağlamıştır ...	55
4.3.2. Kİ-MKH Eksozomları Ultrastrüktürel Olarak Karakterize Edilmiştir.....	55

4.3.3. Kİ-MKH Eksozomları Karakteristik CD63 ve CD81 Yüzey Belirteçlerini Bulundurmaktadır .....	57
4.3.4. Allojenik Kİ-MKH Eksozomlarının İnsan PTE Hücrelerindeki Tedavi Penceresi Belirlenmiştir .....	59
4.4. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları 3B Mikroakışkan Platformunda Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarının Yapısal ve İşlevsel Düzeyde Etkileri.....	63
4.4.1. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde Epitel Bariyer Bütünlüğünü Sağlamıştır.....	63
4.4.2. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde ZO-1 İmmün İşaretlenmesini Artırmış, Asetillenmiş $\alpha$ -Tübülün'i Değiştirmemiştir.....	65
4.4.3. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde Epitel Hücrelerinin Proliferasyon Hızını Artırmıştır .....	67
4.4.4. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde GLUT1, GLUT2, HO-1 ve HIF1 $\alpha$ Gen İfadelerini Artırmış; BNIP3'ü Azaltmıştır .....	68
5. TARTIŞMA .....	68
SONUÇ ve ÖNERİLER.....	81
KAYNAKLAR .....	82

### SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>2B</b>	: İki Boyutlu
<b>3B</b>	: Üç Boyutlu
<b>ABH</b>	: Akut Böbrek Hasarı
<b>DTFY</b>	: Düzeltilmiş Toplam Floresans Yoğunluğu
<b>HBSS</b>	: Hank'ın Dengeli Tuz Solüsyonu
<b>KBH</b>	: Kronik Böbrek Hasarı
<b>Kİ-MKH</b>	: Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre
<b>MKH</b>	: Mezenkimal Kök Hücre
<b>OFY</b>	: Ortalama Floresans Yoğunluğu
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponlu Salin
<b>PTE</b>	: Proksimal Tübül Epiteli
<b>ZO-1</b>	: Zonula Okludens 1
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>qRT-PCR</b>	: Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>cDNA</b>	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
<b>FBS</b>	: Fetal Bovin Serum
<b>BCA</b>	: Bikinkoninik Asit
<b>PE</b>	: Fikoeritrin
<b>RTCA</b>	: Gerçek Zamanlı Hücre Analizi
<b>ED50</b>	: %50 etkin doz
<b>FITC</b>	: Floresan İzotiyosiyanat
<b>TRITC</b>	: Tetrametilrodamin İzotiyosiyanat
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>ASM</b>	: Akım Sitometrisi
<b>TEM</b>	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
<b>HO-1</b>	: Hem Oksijenaz 1

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.1.</b> Çalışmanın varsayımını ifade eden şema. ....	16
<b>Şekil 2.1.1.</b> Akut böbrek hasarının etyolojisi ve etyolojide iskemiye bağlı ABH'nın rolünü gösteren şema. (BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.).....	19
<b>Şekil 3.1.1.</b> Çalışmaya ait iş akışı şeması. (BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.).....	25
<b>Şekil 3.3.1.1.</b> PTE hücrelerinin mikoplazma PCR jel elektroforezi görüntüsü. ....	27
<b>Şekil 3.2.2.1.</b> HK-2 PTE hücre hattına ait ışık ve transmisyon elektron mikrograflar. ....	28
<b>Şekil 3.2.3.1.</b> Hücre kültürü düzeneklerinin makroskopik ve şematik görünüşleri. ....	30
<b>Şekil 3.2.4.1.</b> Akut hipoksi koşullarında O <sub>2</sub> konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi grafiği. ....	32
<b>Şekil 3.4.1.1.</b> İnsan Kİ-MKH'lerine ait jel elektroforezi ve faz kontrast mikroskopi. ....	36
<b>Şekil 4.1.2.</b> İnsan PTE hücrelerinin 3B dinamik mikroakışkan platformunda faz kontrast mikroskopi.....	43
<b>Şekil 4.2.1.1.</b> Akut hipoksiye bağlı PTE hasarında epitel geçirgenliğinin değerlendirmesine ait floresan mikroskopi (A-H) ve saçılım grafiği (I). ....	46
<b>Şekil 4.2.2.1.</b> 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarında ZO-1 ve asetillenmiş $\alpha$ -tübülün immün işaretlemesine ait floresan mikroskopi.....	48
<b>Şekil 4.2.2.2.</b> 2B statik düzenekte akut hipoksiye bağlı PTE hasarında kırmızı ile izlenen ZO-1 ve yeşil ile izlenen asetillenmiş $\alpha$ -tübülün immün işaretlemesine ait floresan mikroskopi.....	50
<b>Şekil 4.2.2.3.</b> 2B statik ve 3B dinamik düzeneklerde akut hipoksiye bağlı PTE hasarında ZO-1 (A) ve asetillenmiş $\alpha$ -tübülün (B) immün işaretlemesine ait DTFY saçılım grafikleri. (*) p<0.05. ....	51
<b>Şekil 4.2.3.1.</b> 2B statik ve 3B dinamik düzeneklerde akut hipoksiye bağlı PTE hasarında hücre proliferasyon hızını gösteren saçılım grafiği. (*) p<0.05. ....	52
<b>Şekil 4.2.4.1.</b> 2B statik ve 3B dinamik düzeneklerde akut hipoksiye bağlı PTE hasarında hücrelerde GLUT1, GLUT2, BNIP3, HO-1 ve HIF1 $\alpha$ genlerinin ifadenmesini gösteren bar grafiği. ....	54

<b>Şekil 4.3.1.1.</b> Kİ-MKH eksozomların BCA ile homojen protein konsantrasyonlarını gösteren saçılım grafiği. ....	55
<b>Şekil 4.3.2.1.</b> Kİ-MKH eksozomlarına ait transmisyon elektron mikrografları ( <b>A</b> , <b>inset</b> ) ve boyut ölçümleri ( <b>B</b> , <b>C</b> ). ....	57
<b>Şekil 4.3.3.1.</b> Kİ-MKH eksozomlarına ait akım sitometrisi ile CD81 yüzey belirteci karakterizasyonu grafikleri. ( <b>A</b> ) CD63 konjuge boncukla yakalandıktan sonra CD81 ile işaretli eksozomlara ait temsili işaretlenme oranı eğrisi. PE-H, Fikoeritrin-yükseklik. ( <b>B</b> ) CD81'e ait izotip kontrol ile karşılaştırmalı ortalama floresans yoğunluğu (OFY) gösterilmiştir. (*) $p < 0.05$ .....	58
<b>Şekil 4.4.3.1.</b> 3B dinamik mikroakışkan platformunda allojenik Kİ-MKH eksozomları akut hipokside PTE hücre proliferasyonunu 24. saatte artırdığını gösteren saçılım grafiği. (*) $p < 0.05$ . ....	67
<b>Şekil 5.1.</b> Tez çalışması kapsamında sorulan araştırma sorularının yanıtları ve ulaşılan sonuçlar şematize edilmiştir .....	81

**TABLolar DİZİNİ**

<b>Tablo 3.1.1.</b> Çalışma için her iş paketine ait hesaplanmış örneklem büyüklüğü. ....	25
<b>Tablo 3.6.1.</b> İş paketlerinin çıktılarının dağılımı ve kullanılan istatistiksel analiz yöntemleri listelenmiştir.....	40

## 1. GİRİŞ

İskemiye bağlı akut böbrek hasarı (ABH), böbreğin kan akışının ve oksijen sunumunun azalması sonucu nefron mikroçevresinde hipoksi koşulları oluşması ile ortaya çıkan patolojik bir durumdur (1). Hipoksi koşulları altında nefronda oluşan yapısal ve işlevsel hasar, klinikte glomerüler filtrasyon hızı ve idrar oluşumunda azalma ile izlenir (2). Yüksek morbidite ve mortalite oranları ile izlenen ABH, dünyada yılda ortalama 13,3 milyon vaka ve 1,7 milyon ölümün yanı sıra kronik böbrek hastalığı (KBH) için de yüksek risk taşımaktadır (3). **Akut hipoksiye bağlı proksimal tübül epiteli (PTE) hasarı**; iskemiye bağlı ABH'da PTE'nin S3 kısmının düşük glikoliz kapasitesi nedeniyle (4) ortaya çıkan ve lokal enflamasyon, oksidan/antioksidan madde dengesinde bozulma, hücre ölümü gibi etkileri ile böbreğin salgılama, emilim, geri alım işlevlerini bozarak KBH gelişimi veya ölüm ile sonuçlanabilen bir hasar mekanizmasıdır (5). Akut hipoksiye bağlı PTE hasarının mekanizma ve terapötik yaklaşımlar açısından değerlendirilmesinde kullanılan *in vitro* iki boyutlu (2B) konvansiyonel hücre kültürleri uygun maliyetli ve çalışılması kolay olsa da (6) ultrafiltrat akışı, damarlanma, ekstrasellüler matris gibi parankimal ve stromal unsurların yokluğu (7, 8) başlıca kısıtlamalardır. Cerrahi iskemi prosedürleri ile oluşturulan *in vivo* düzenekler ise böbrek fonksiyonlarını değerlendirebilen, mikroçevrenin parankimal ve stromal elementlerini içeren modeller (6, 9, 10) olmasına rağmen; etik kaygıların (11) yanı sıra hücre ve doku düzeyinde türler arası farklılıklar nedeniyle kimyasal ve hücre temelli tedavilerin farmakokinetik ve farmakodinamik profillerini değerlendirmede yetersiz kalmaktadır (12-14). Hücre temelli tedavi adaylarının klinik kullanımı öncesinde standardizasyon, kişiselleştirilmiş etkinlik ve güvenlik değerlendirmesi için yeni prelinik modeller gereklidir (15, 16).

**Üç boyutlu (3B) mikroakışkan PTE yongaları**, fizyolojik koşullarda tübül epiteli hücresi polaritesini, tübül lümeninde akışı, tübülden geri emilimi, tübül lümenine salgılamayı ve hatta tübüle destek sağlayacak damarlanmayı sağlayabilen ve patolojik koşullarda bu parametrelerin değerlendirilebildiği standardize edilmiş dinamik mikro ortamlar sunan platformlardır (17-21). Prototip aşamasında olan polidimetilsiloksan (PDMS) temelli mikroakışkan yongalarında tekli veya çoklu

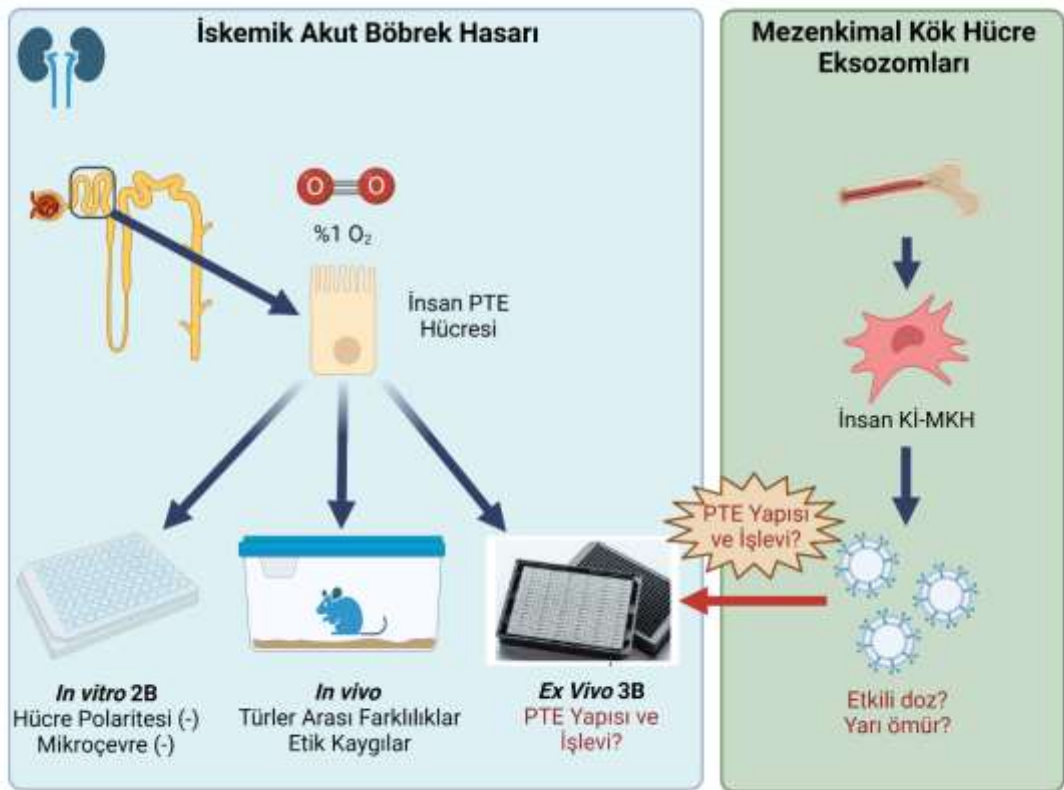
nefrotoksik ilaca bağlı ABH modelinde hücre proliferasyonu, apoptoz, hem oksijenaz-1 (HO-1) gibi biyobelirteçler, albümin geri alımı, alkalen fosfataz aktivitesi ve epitelde glukoz taşınımı araştırılmıştır (22-24). İlaça bağlı ABH modelinde PDMS temelli sistemlerde ayrıca proliferasyon hızı, hücre ölümü, albümin geri emilimi ve glikoz taşınımı değerlendirilmiştir (25). Bu prototipler, her yonga için pompalar ve harici borular gerektirmesi nedeniyle PTE'nin değerlendirilmesinde tekrarlanabilirlik ve rutin kullanım kolaylığı açısından standardizasyona ihtiyaç duymaktadır. Son yıllarda; yapay bir membran içermeyen, yerçekimi temelli akım prensibine sahip pompasız standardize dinamik mikroakışkan platformlarında, ilaca bağlı ABH modellerinde 3B PTE yapısı (26-28), hücre polaritesi (26-28), proliferasyon hızı (26, 28-31) ve epitel geçirgenliği (26, 30, 31) değerlendirilmiştir. Bu mikrofizyolojik sistemler, iskemik ABH'da akut hipoksiye bağlı PTE hasarının *in vitro* koşullarda modellenmesi ve hücrel terapötiklerin gerçek zamanlı değerlendirilmesinde kullanılabilir (19, 32).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) (33, 34) ve **MKH eksozomları** (10, 35), ABH için güçlü terapötik adaylardır ancak bunların klinikteki güvenilirlik (36, 37) ve etkinlikleri (38, 39) halen tartışmalıdır. Literatürde allojenik MKH temelli terapötikler ile post-operatif veya ilaca bağlı ABH'nı tedavi etmeyi hedefleyen tamamlanmış ve devam eden toplam 8 faz I ve II düzeyinde klinik çalışma bulunmakta olup (40), bunlardan bir tanesine ait veriler yayınlamıştır (41). Allojenik ve zenojenik MKH eksozomlarının iskemiye bağlı ABH'da *in vivo* düzeneklerde böbreğe yönelme gösterdiği (42, 43), parankimal hücre ölümünü azalttığı (9, 44, 45), serum kreatinin (9, 42, 44) ve kan üre nitrojen (9, 44) düzeylerini normale yaklaştırdığı; *in vitro* modellerde ise PTE'nde proliferasyon hızını artırdığı (42), hücre ölümünü (42, 44, 46) ve hasar biyobelirteçlerini azalttığı (47) gösterilmiştir. Potansiyel hücrel tedavi adayı olarak MKH eksozomlarına ait bazı olumlu çıktılarını kliniğe aktarımının gecikmesinde; yapılan çalışmalarda eksozomların güvenli doz aralığı (10-1000 µg/ml) (9, 47, 48) ve zaman penceresinde (0-48 saat) (49, 50) izlenebilen farklılıklar ve uygulanan heterojen eksozom popülasyonlarının (30-200 nm) (36, 39) etkili olabileceği düşünölmektedir. Allojenik ya da otojenik MKH eksozomlarının, güvenli, efektif ve hedefli tedavi ürünleri olarak kliniğe



aktarılmadan önce gerçek zamanlı kişiselleştirilmiş etki değerlendirilmelerinin yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (51).

**Bu çalışmada;** akut hipoksiye bağlı PTE hasarının 3B dinamik pompasız mikroakışkan yonga platformunda insan PTE hücreleri ile modellenebileceği; allojenik kemik iliği kökenli MKH (Kİ-MKH) eksozomlarının güvenli tedavi penceresi belirlenerek akut hipoksiye bağlı PTE hasarındaki terapötik etkilerinin *ex vivo* koşullarda değerlendirilebileceği varsayılmıştır (**Şekil 1.1**).



**Şekil 1.1.** Çalışmanın varsayımını ifade eden şema. (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

**Çalışmanın amacı;** 3B dinamik pompasız mikroakışkan yonga platformunda oluşturulacak akut hipoksiye bağlı PTE hasarı modelinin yapısal ve işlevsel düzeyde 2B statik akut hipoksi modeli ile paralel şekilde normoksi koşullarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmesi, izole ve karakterize edilecek insan MKH

eksozomlarının güvenli doz aralığının ve tedavi penceresinin gerçek zamanlı olarak saptanması, *ex vivo* koşullarda allojenik Kİ-MKH eksozomlarının optimize edilen 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarı düzeneğinde yapısal ve işlevsel düzeyde etkilerinin değerlendirilmesidir.

### **Çalışmanın hedefleri;**

1. İnsan PTE hücreleri ile 3B dinamik mikroakışkan yonga platformu ve 2B statik konvansiyonel hücre kültüründe akut hipoksiye bağlı PTE hasarı modeli oluşturulması
2. Oluşturulacak 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde akut hipoksiye bağlı PTE hasarı modellerinin epitel bariyerinin geçirgenliği, ZO-1 ve asetilenmiş  $\alpha$ -tübülün immünreaktivitesi ile yapısal; proliferasyon hızı ve hasar biyobelirteçlerinin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeyleri ile işlevsel düzeyde değerlendirilmesi
3. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının ardışık ultrasantrifüj + filtrasyon ile izolasyonu; transmisyon elektron mikroskobu (TEM), akım sitometrisi (ASM) ve bikinkoninik asit (BCA) protein tahlili ile karakterizasyonu; gerçek zamanlı empedans tabanlı hücre proliferasyon analizi (RTCA) ile güvenli doz aralığı ve tedavi penceresinin tespiti
4. Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarı düzeneğinde epitel bariyerinin geçirgenliği, zonula okludens-1 (ZO-1) ve asetilenmiş  $\alpha$ -tübülün immünreaktivitesi ile yapısal; proliferasyon hızı ve hasar biyobelirteçlerinin mesajcı ribonükleik asit (mRNA) düzeyleri ile işlevsel düzeyde etkilerinin değerlendirilmesi

Bu hedeflere ulaşmak için gereç ve yöntem bölümünde ifade edilen iş paketleri düzenlenmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

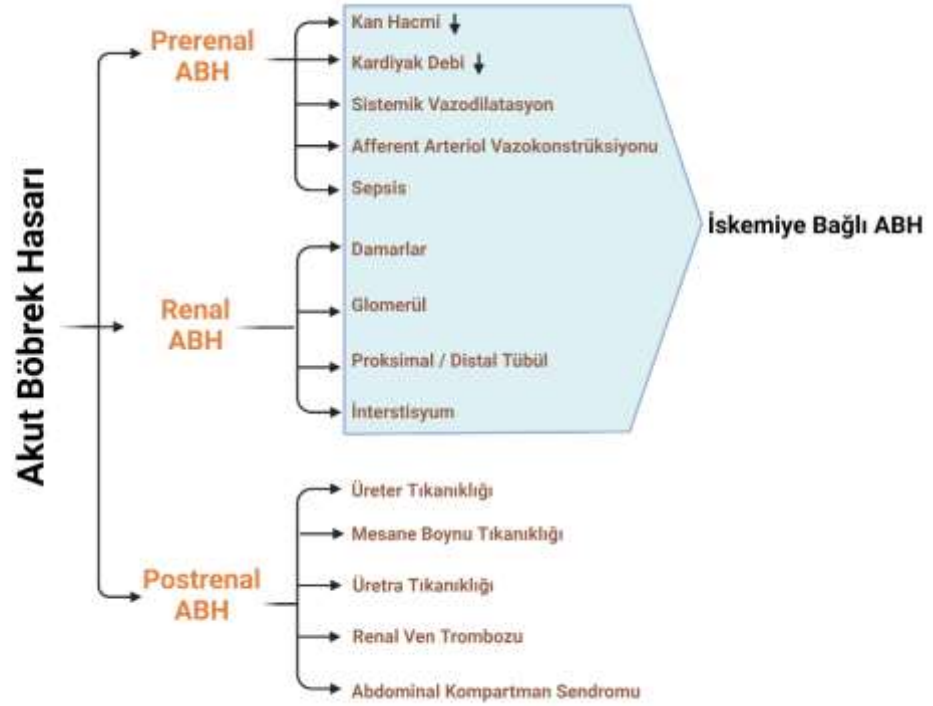
### **2.1. Akut Böbrek Hasarı (ABH)**

Akut böbrek hasarı, farklı etiyolojik nedenlerle oluşan ani işlev kaybı, buna bağlı olarak atıkların uzaklaştırılmaması, hücre içi ve dışı sıvı hacmi ve elektrolit içeriğinin bozulması ile tanımlanan bir hastalıktır (3). Dünyada yılda ortalama 13,3

milyon ABH vakası izlenmekte, 1,7 milyon hasta ölmektedir; yaşayan hastalar ise kronik böbrek hastalığı için yüksek risk taşımaktadır (3). Yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olması nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunu olan ABH, %85 oranında düşük veya orta gelirli ülkelerde görülmektedir (52). Dünya Sağlık Örgütü'nün açıkladığı ve Birleşmiş Milletler'in benimsediği sürdürülebilir gelişim hedefleri raporunda belirtilen 17 gelişim hedefinin tamamının alt başlıkları; ABH'nin önlenmesi, tanısı ve tedavisi konusundaki gelişim hedeflerini içermektedir (53).

Akut böbrek hasarı prerenal, renal ve postrenal nedenlerle ortaya çıkabilir (Şekil 2.1.1). Prerenal ve renal nedenler olguların %70ini oluşturmaktadır (54). Prerenal ve renal nedenli olguların patogeneğinde rol oynayan iskemiye bağlı ABH, öncelikli olarak glikoliz kapasitesi düşük olan PTE'nin S3 kısmına hasar verir (55). Akut hipoksiye bağlı PTE hasarının erken dönemde ortaya konması böbrek fonksiyonlarının geriye döndürülebilmesi ve kronikleşmenin önlenmesi için önem arz etmektedir (56, 57).

Akut böbrek hasarında mitokondriyon homeostazisi (58) ve mitofaji düzeyindeki (59-61) değişiklikler, Hem Oksijenaz 1 (HO-1) ve BNIP3 gibi biyobelirteçlerin hem mRNA hem protein düzeyinde akut dönemde artışı ile izlenmektedir. Erken dönemde HO-1 ve BNIP3 düzeylerindeki artış, hipoksi ile HIF1 $\alpha$  geninin ifadenmesinin artışı sonucu ortaya çıkar (58, 62, 63). Ayrıca PTE hücrelerinin enerji ihtiyacındaki artışa karşın doku düzeyinde O<sub>2</sub> sunumundaki azalma, hücre metabolizmasının anaerobik glikoliz yönüne kaymasına neden olmaktadır (4). Bu nedenle PTE hücrelerinde hücre zarında bulunan glikoz taşıyıcı GLUT1 ve GLUT2 proteinlerinin düzeyleri akut hipoksiye bağlı hasarda mRNA ve protein düzeyinde değişerek hasarın metabolizmaya etkilerini göstermektedir (64, 65). Bu biyobelirteçlerin hastalığın akut döneminde değerlendirilmesi, hasarın hücre metabolizmasına etkilerinin saptanmasında önem arz etmektedir.



**Şekil 2.1.1.** Akut böbrek hasarının etyolojisi ve etyolojide iskemiye bağlı ABH'nın rolünü gösteren şema. (BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Hipoksiye bağlı ABH'nın erken dönemini hedef alan tedavi adaylarının, klinik öncesi etkinlik ve güvenilirlik çalışmalarının tamamlanmasının morbidite ve mortaliteyi azaltabileceği düşünülmektedir (3, 56). Güncel olarak bu çalışmalar *in vitro* konvansiyonel hücre kültürü ve *in vivo* hayvan modelleri ile gerçekleştirilmektedir (2).

## 2.2. Akut Hipoksiye Bağlı Proksimal Tübül Epiteli (PTE) Hasarı Deney Düzenekleri

Son yıllarda, hipoksiye bağlı ABH'yı hedef alan tedavilerin değerlendirilmesinde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda çok sayıda deneysel model kullanılmıştır (2). Çalışmalarda *in vitro* koşullarda nefronun izole kısımlarında ortaya çıkan patolojik değişiklikler ve tedavilerin bu değişikliklere etkisi (46, 66), *in vivo* düzeneklerde ise böbrek fonksiyonlarının patolojik değişimi ve tedavilerin etkisi (46, 67) değerlendirilmiştir. Hipoksiye bağlı ABH'nın hücre düzeyindeki etkileri 2B

konvansiyonel *in vitro* hücre kültürü modellerinde 37°C'de %1 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörlerde veya diğer kapalı ortamlarda değişken sürelerde (1-48 saat) modellenmiştir (2). *In vitro* koşullarda uygulanmış 2B statik hipoksiye bağlı PTE hasarı modelleri sıklıkla gaz konsantrasyonları değiştirilebilen inkübatörler içerisinde (68, 69), hipoksik ortamda koşullandırılmış besiyeri kullanılarak (70) veya hipoksik kamara / fanus düzenekleri (71) ile uygulanmaktadır. Bu mekanik düzeneklerin yanısıra kobalt klorit (72), sodyum sülfid (72) veya H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (73) gibi hücresel düzeyde hipoksi benzeri etki yaratabilen kimyasallar da kullanılabilir. Bu seçenekler arasında güvenilir ve kontrol edilebilir olması nedeniyle en sık tercih edilen gaz konsantrasyonu değiştirilebilen inkübatörlerdir (2). *In vivo* hayvan modellerinde, sıklıkla fare (35, 67) ve sıçanlarda (66, 74); 30 (42, 75), 45 (66, 74), 60 (35, 76) dakikalar arasında değişen sürelerde cerrahi iskemi prosedürleri uygulanmaktadır. Sınırlı çalışmalarda ise hayvanların kafeslerine gaz düzenleyici bağlantısı oluşturulması yoluyla hipoksi oluşturulduktan sonra sakrifiye edilen hayvanlarda dokuda yapısal değerlendirme yapılmıştır (47, 77). *In vitro* konvansiyonel yöntemler ve *in vivo* hayvan modelleri dışında son yıllarda diğer ABH etyolojilerinin modellenmesinde kullanılan organ yongası, böbrek organoidi gibi 3B sistemlerin hipoksiye bağlı ABH'nın modellenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (2, 11).

### **2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) ve MKH Eksozomları**

#### **2.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler**

İnsan mezenkimal kök hücreleri (MKH'ler), kemik iliği ve yağ dokusu dahil olmak üzere çeşitli dokulardan izole edilebilen, kendini yenileme ve çoğalma potansiyeli olan multipotent hücrelerin özelliklerine sahip hücrelerdir (78). Bağışıklık aktivitesini düzenlemeleri, konakçı hücrelerin büyüme ve farklılaşma potansiyelini artırmaları, böylece hasarlı dokuların iyileşmesini destekleyen birçok sitokin ve büyüme faktörü salgılayabilmeleri, renal kan akımını düzenleyebilmeleri, endotel hücre sağkalımında ve immünolojik tepkilerde kritik roller oynamaları nedeniyle potansiyel anjiyojenik, proliferatif ve immünmodülatör özelliklere sahip MKH'ler, vücutta farklı bölgelerde hücre, doku veya organ düzeyindeki çeşitli patolojik durumların tedavisi için umut verici bir tedavi aracıdır (39). Güncel çalışmalarda,

MKH'lerin uygulandıkları mikroçevrede salgıladıkları faktörler ile komşu hücreleri apoptoza karşı koruduğu ve hücre proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir (79). Bazı çalışmalarda, MKH'lerin *in vivo* koşullarda epitel benzeri hücrelere farklılaştığı ve tedavi edici etkisinin bu yolla olabileceği de gösterilmiştir (80). Tüm bu özelliklere ek olarak, MKH'lerin bir başka özelliği de mikroçevrede bağışıklık yanıtını düzenlemeleridir. Hücrelerin immünmodülatör mekanizması tam olarak açık olmamakla birlikte, hücreler arası etkileşimlerin ve/veya çözünür immünsupresif faktörlerin salgılanması ile olabileceği düşünülmektedir (81). MKH'ler antienflamatuvar, proliferatif, antiapoptotik, damarlanmayı destekleyici ve immünomodülatör etkileri nedeniyle ABH tedavisi için güçlü bir adaydır. Ancak tüm bu olumlu yönlerinin yanında; allojenik ve ksenojenik tedaviler için immünsüpresyon gerekliliği, multipotens nedenli tümör oluşumu riski ve damar içi uygulamada tromboz riski MKH'ların klinik kullanımını kısıtlamaktadır (39).

### 2.3.2. MKH Eksozomları

Eksozomlar; bilinen tüm hücreler tarafından ortama salınan, boyutları 30 ile 100 nm arasında değişen nanoveziküllerdir (82). Herhangi bir hücre; hücrel atıkların uzaklaştırılması, hücrelerarası iletişim veya doku onarımı (hasar cevabı) olmak üzere üç farklı amaç için eksozom salımı yapabilir (83). Bu salım sonucu ortaya çıkan eksozomlar otokrin, parakrin veya endokrin etkili olabilir. Oluşumları; taşınım için gereken endozomal düzenleme kompleksi (ESCRT) bağımlı ve seramid bağımlı iki yolak ile gerçekleşmektedir. ESCRT bağımlı yolak üzerinde ubikitin ile işaretlenmiş kargo, ESCRT-0 tarafından tanınıp sırayla ESCRT-I, ESCRT-II ve ESCRT-III'e aktarılarak membran invajinasyonu ile endozom içerisine alınır ve endozom içerisinde vezikül haline gelir (84). Seramid bağımlı yolda ise endozom membranında bulunan sfingomyelinin nötral sfingomyelinaz enzimi ile seramide dönüşmesi sonucu invajinasyon ile kargo endozom içerisine alınır ve endozom içerisinde vezikül haline gelir (84). Her iki yolağın sonucunda endozom, multiveziküler cisime dönüşür. Multiveziküler cisim ya lizozom ile birleşir ve içeriği parçalanıp sitoplazmaya salınır, ya da hücre zarı ile kaynaşır ve eksozomlar hücre dışına salınmış olur (84). Eksozomlar salgılandıkları hücre tipine ve mikroçevreye bağlı olarak farklı nitelikte ve nicelikte protein, nükleik asit ve enzimleri kargo olarak taşır (85). Ayrıca yüzeylerinde tetraspanin ailesi (CD9, CD63, CD81),

multiveziküler cisim biyogenez proteinleri (Alix, TSG101, Klatrin), lipid raft bileşenleri ve hücrelere özel reseptörler bulundururlar (86). Bu yüzey belirteçlerinden tertraspaninler ve multiveziküler cisim biyogenez proteinleri eksozom belirteci olarak kullanılabilir (86). MKH eksozomları, MKH ile karşılaştırıldığında daha düşük immünojenisite ve daha yüksek güvenlik profili gibi avantajları ile çeşitli terapötik uygulamalarda hedef hücrelere işlevsel protein, nükleik asit ve enzimleri ileterek etki göstermektedir (87).

### 2.3.3. MKH Eksozomlarının İskemiye Bağlı ABH'daki Terapötik Rolü

MKH eksozomlarının iskemiye bağlı ABH'daki terapötik etkileri *in vitro* ve *in vivo* koşullarda birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmalarda allojenik ve zenojenik MKH eksozomlarının iskemiye bağlı ABH'da *in vivo* düzeneklerde böbreğe yönelme gösterdiği (42, 43), parankimal hücre ölümünü azalttığı (9, 44, 45), serum kreatinin (9, 42, 44) ve kan üre nitrojen (9, 44) düzeylerini normale yaklaştırdığı; *in vitro* modellerde ise PTE'nde proliferasyon hızını artırdığı (42), hücre ölümünü (42, 44, 46) ve hasar biyobelirteçlerini azalttığı (47) gösterilmiştir. Tüm bu olumlu çıktılarının kliniğe aktarımının gecikmesinde; yapılan çalışmalarda eksozomların güvenli doz aralığı (10-1000 µg/ml) (9, 47, 48) ve zaman penceresinde (0-48 saat) (49, 50) izlenebilen farklılıklar ve uygulanan heterojen eksozom popülasyonlarının (30-200 nm) (36, 39) etkili olabileceği düşünülmektedir.

### 2.4. Mikroakışkan Böbrek Yongası Teknolojisi

Nefroloji alanında organ yongası teknolojisi ile oluşturulan **mikroakışkan sistemlerde** böbrek epitel hücrelerinin mikrokanallarda kültüre edilmesi sonucu böbrek fonksiyonları *in vitro* koşullarda birebir modellenenmektedir (18, 88, 89). Son yıllarda mikroakışkan platformlar sayesinde proksimal tübülde diabetes mellitus (90), interstisyel fibrozis (91), nefrolithiazis (92) gibi hastalıklar modellenenmiştir. Diğer yandan pek çok ilaç ve çevresel etkene ait nefrotoksisite bu platformlarda oldukça duyarlı olarak izlenebilmektedir (24, 26, 27, 88, 93, 94). Proksimal tübülü modelleyen mikroakışkan sistemler deney tasarımına göre iki veya üç mikrokanal içeren, bu kanallarda sıvı akışının pompalı veya pompasız şekilde sağlanabildiği, biyouyumlu ve yüksek gaz geçirgenliğine sahip şeffaf polimer yapıları malzemenen

üretilen platformlardır (18, 88, 89). Bu sistemlerde tübüler mikroyapı, epitel hücrelerinin farklanması, peritübüler damarlanma ve proksimal tübül epitelinin işlevleri iki boyutlu kültür sistemlerine göre daha başarılı olarak taklit edilebilmektedir (18, 90, 92). Ancak varolan sistemler, yonga başına düşen maliyet ve işgücü, malzeme optimizasyonunda yaşanan sorunlar nedeniyle yaygın kullanım açısından sınırlılıklar taşımaktadır (18). Son yıllarda Hollanda'da Leiden Üniversitesi'nde geliştirilen ve nefrotoksisite çalışmalarında kullanılmaya başlanan ticari bir membransız mikroakışkan yonga platformu (*OrganoPlate*) adı geçen sınırlılıklara yeni çözüm önerileri getirmiştir (26, 94, 95). Bu platform tek plak üzerinde çok sayıda yonga sistemi oluşturarak işgücü ve maliyeti azaltmayı, çoklu analiz sistemleri ile uyumlu bir platform sağlamayı başarmıştır (26, 93). Bu sistemlerde; hücre-ekstrasellüler matriks ilişkisine sahip proksimal tübül modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuş, nefrotoksisite modelleri başarıyla uygulanmıştır (93, 94, 96).

**Sonuç olarak çalışmanın gerekçesi** iskemik ABH'da MKH eksozomlarının tedavi penceresinin gerçek zamanlı olarak belirlenmesi ve iskemik ABH tedavisinde kullanılacak ilaç adaylarının güvenle değerlendirilebilmesi için gerçekçi 3B mikroçevre koşullarını sağlayan deney düzeneklerinin geliştirilmesine ihtiyaç bulunmasıdır.

**Çalışmanın amacı** *in vitro* ve *ex vivo* koşullarda; 3B dinamik mikroakışkan insan PTE yongasında oluşturulacak hipoksiye bağlı akut hasar düzeneğinin yapısal ve işlevsel düzeyde 2B statik hasar düzeneği ile paralel şekilde normoksi koşullarıyla karşılaştırılarak değerlendirilmesi, izole ve karakterize edilecek insan Kİ-MKH eksozomlarının güvenli doz aralığının ve tedavi penceresinin gerçek zamanlı olarak saptanması, allojenik Kİ-MKH eksozomlarının optimize edilen 3B dinamik mikroakışkan platformunda hipoksiye bağlı akut PTE hasarı modelinde yapısal ve işlevsel düzeyde etkilerinin değerlendirilmesidir.

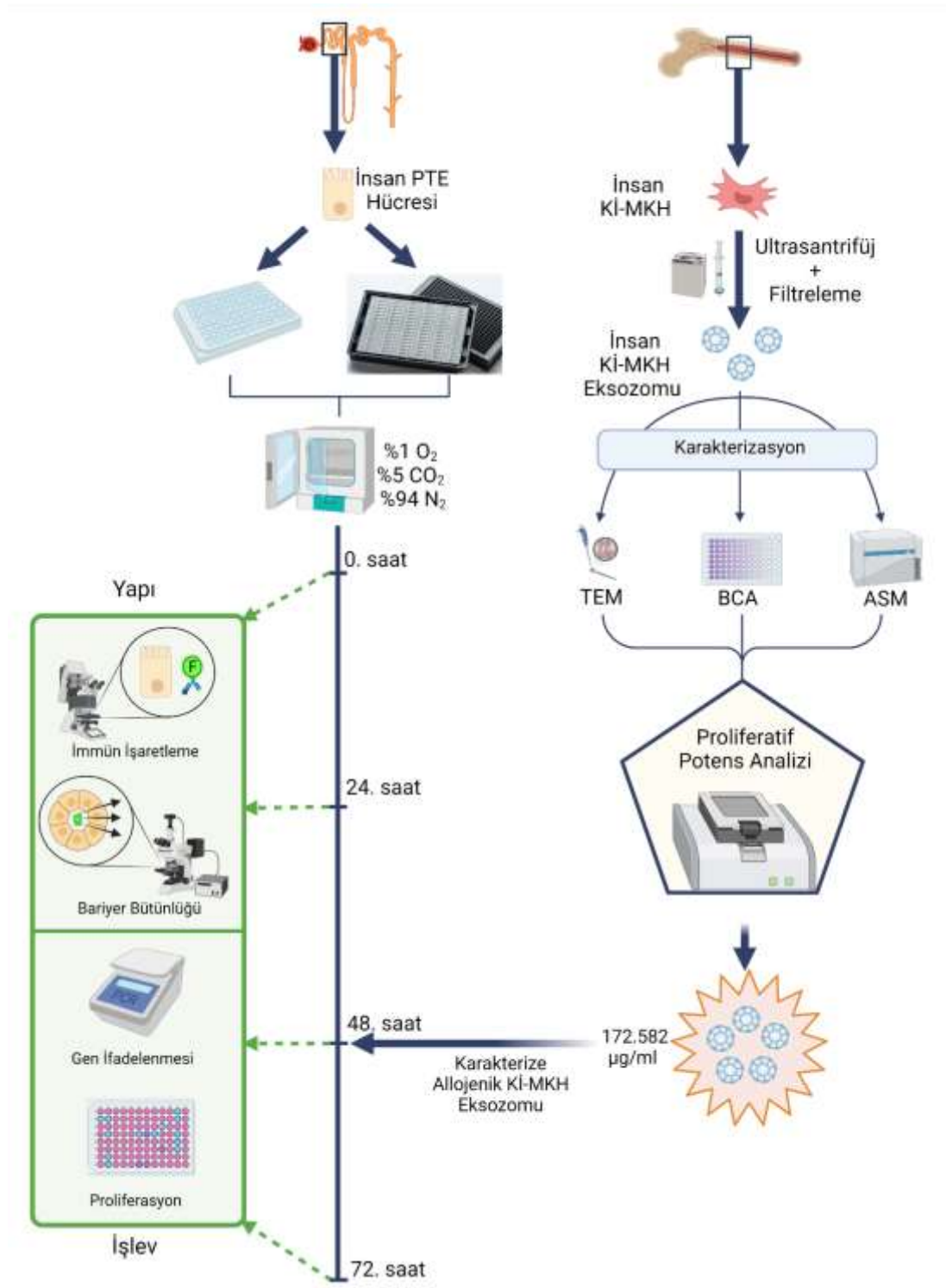
### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışma Tasarımı

Oluşturulan hipotezi doğrulamak üzere *in vitro* ve *ex vivo* koşullarda; prospektif, randomize, kontrol grubu içeren gözlemsel bir çalışma planlanmış ve yürütülmüştür.



Çalışma bir dizi hücre kültürü, görüntüleme, yapısal ve işlevsel değerlendirme iş paketlerinden oluşmaktadır. Çalışmanın tamamı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya ait iş akışı Şekil 3.1.1'de şematize edilmiştir.



**Şekil 3.1.1.** Çalışmaya ait iş akışı şeması. (BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Çalışmanın bağımsız değişkenleri kullanılan kültür düzenekleri (2B statik / 3B dinamik) ve uygulanan müdahale (normoksi / hipoksi / hipoksi+çözücü / hipoksi+eksozom) olup, bağımlı değişkenler ise hücre proliferasyonu sayısal sonuçları, bariyer bütünlük değerlendirmesi ile elde edilen geçirgenlik indeksleri, immün işaretleme sonrasında elde edilen mikrograflardan hesaplanan düzeltilmiş toplam floresan yoğunluğu (DTFY) sayısal sonuçları ve qRT-PCT ile elde edilen rölatif gen ifadenme sonuçlarıdır. Ayrıca eksozomların karakterizasyonu aşamasında dozlar bağımsız değişken, normalize edilmiş hücre indeksleri ise bağımlı değişken olarak değerlendirilmiştir. Değişkenlerin hipotez kapsamında değerlendirilmesi amacıyla tasarlanan çalışma grupları sırasıyla 2B Normoksi, 2B Hipoksi, 3B Normoksi, 3B Hipoksi, 3B Hipoksi-Çözücü ve 3B-Hipoksi-Eksozom olmak üzere çalışma grupları oluşturulmuştur. Çalışmanın örneklem büyüklüğü; %95 güç ve %5 tip-1 hata ile istatistiksel farkın anlamlı olarak gösterilebilmesi için her iş paketi için 2 tekrarlı olarak oluşturulmuştur (**Tablo 3.1.1**). Güç analizi ve örneklem büyüklüğü hesaplamaları Gpower v3.1 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.1.1.** Çalışma için her iş paketine ait hesaplanmış örneklem büyüklüğü.

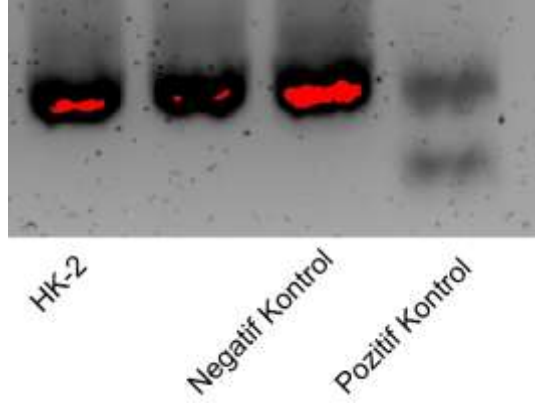
Yöntem İş Paketi Numarası	Örneklem Büyüklüğü
3.3.1	n=28
3.3.2	n=36
3.3.3	n=56
3.3.4	n=12 (Örnekler üçerli olarak havuzlanmıştır.)
3.4.3	n=6
3.4.4	n=32

3.4.5	n=2
3.4.6	n=22 (Normoksi), n=32 (Hipoksi)
3.5.1	n=6
3.5.2	n=10
3.5.3	n=12
3.5.4	n=6 (Örnekler üçerli olarak havuzlanmıştır.)

## 3.2. Üç Boyutlu (3B) Dinamik ve İki Boyutlu (2B) Statik PTE Hücre Kültürü Sistemlerinin Tasarımı, Optimizasyonu ve Akut Hipoksi Modelleri Oluşturulması

### 3.2.1. PTE Hücrelerinin Eldesi ve Çoğaltılması

Çalışmada insan kökenli ölümsüzleştirilmiş ticari HK-2 PTE hücre hattı (CRL-2190, ATCC-LGC, ABD), mikroakışkan PTE yongaları ile gerçekleştirilen kişiselleştirilmiş yaklaşımlarda öncelikli olarak tercih edildiği için kullanılmıştır (97). Hücreler üreticinin talimatları doğrultusunda *Keratinocyte-SFM* (17005042, Thermo Fisher Scientific, ABD) besiyeri ile önce 25 cm<sup>2</sup>'lik (70025, SPL, Güney Kore), ardından 75 cm<sup>2</sup>'lik (70075, SPL, Güney Kore) hücre kültür flasklarında konvansiyonel kültür ortamında 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda nemlendirilmiş inkübatörde (EC 160, Nüve, Türkiye) kültüre edilmiştir. Hücreler mikoplazma kontaminasyonu açısından PCR yöntemiyle denetlenmiştir (**Şekil 3.3.1.1 B**). Hücreler bu koşullarda 10. pasaja kadar kültüre edilmiştir (**Şekil 3.3.1.1 C, D**). İleri iş paketleri için yeterli sayıda hücre, üreticinin önerdiği koşullarda %7,5 Dimetil Sülfoksit (20385.01, Serva, Almanya) içeren besiyeri ile dondurma konteyneri (CLS432000-1EA, Corning, ABD) yardımıyla dondurularak -80°C dondurucuda (DF 290, Nüve, Türkiye) ve -196°C sıvı azot tankında depolanmıştır.

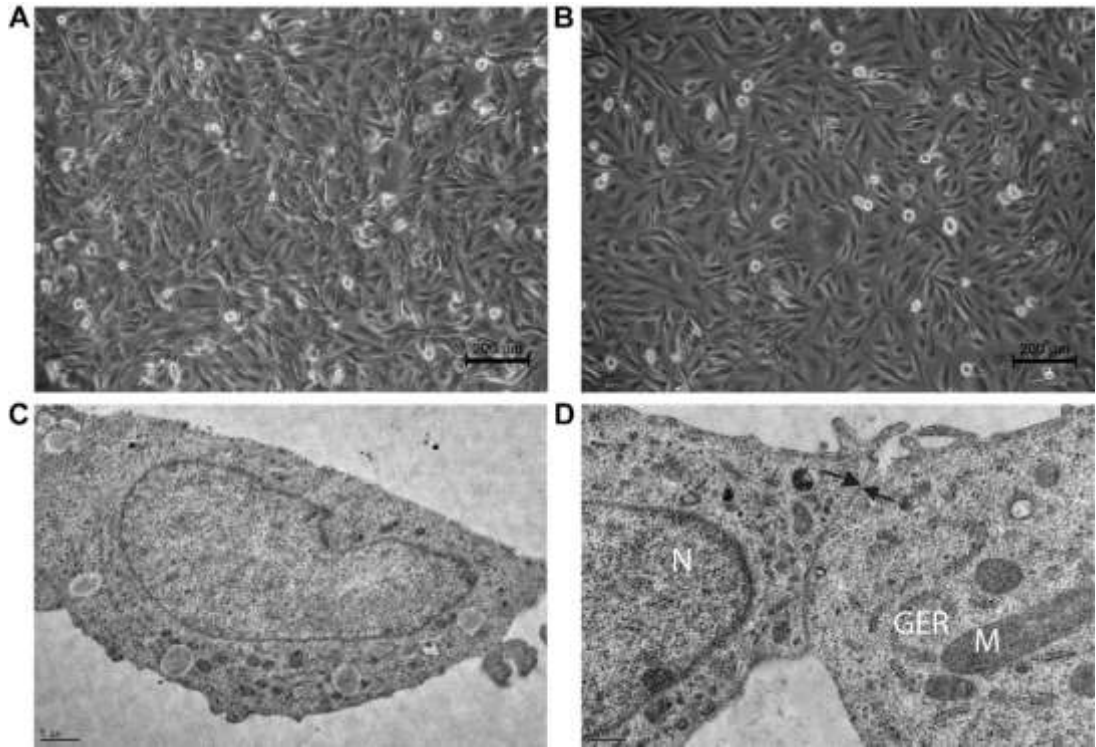


**Şekil 3.3.1.1.** PTE hücrelerinin mikoplazma PCR jel elektroforezi görüntüsü. Mikoplazma kontaminasyonu açısından PCR çalışması sonucunda elde edilen jel elektroforezi görüntüsünde HK-2 hücrelerinde negatif kontrol ile uyumlu tek bant görünümü izlenmiştir.

### 3.2.2. PTE Hücrelerinin Işık ve Elektron Mikroskopunda Görüntülenmesi

PTE hücreleri, her pasajda morfolojik özellikleri açısından faz kontrast mikroskobu altında değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.2.1 A-B). Hücrelerin ultrastrüktürel değerlendirilmesi TEM ile gerçekleştirilmiştir (98) (Şekil 3.2.2.1 C-D). Kısaca; flasklarda kültüre edilen hücreler, flask içerisindeki besiyeri aspire edilip fiksasyonu sağlamak için %2,5 gluteraldehit eklenerek oda sıcaklığında 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Ardından hücre kazıyıcı ile hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılması sağlanıp santrifüj tüpüne alındıktan sonra fosfat tamponu ile 3 kez 5er dakikalık yıkamalarla fiksatif uzaklaştırılmıştır. Yıkamalar arasında 1200 RPM'de 5 dakikalık santrifüjlerle hücreler pellet haline getirilmiştir. Yıkamalar sonrasında osmiyum tetroksit ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ikincil fiksasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından fosfat tamponu ile 3 kez 5er dakikalık yıkamalar ile fiksatif uzaklaştırılmıştır. Son yıkamanın ardından pellet haline getirilen hücreler agar içerisine gömülmüş ve katılaştıran agar 1 mm<sup>3</sup>'lük parçalar haline getirilmiştir. Küçültülen örnekler artan konsantrasyonda etanol serisi yardımıyla dehidrate edilip propilen oksitten geçirildikten sonra epoksi reçineye alıştırılıp plastik bloklar oluşturacak şekilde 60 °C'de 48 saat polimerize olması için bırakılmıştır. Polimerize

olan bloklardan önce izlem amaçlı 1µm kalınlığında yarı-ince kesitler alınıp Metilen mavisi boyaması ile incelenmiştir. Hedef alanlar seçildikten sonra 50-70 nm kalınlığında alınıp bakır gridlere yerleştirilen ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanmış, dijital kamera ataçmanlı (Gatan, ABD) transmisyon elektron mikroskobu (JEM-1400 TEM, JEOL, Fransa) ile görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerde hücreler ultrastrüktürel düzeyde incelendiğinde; ökromatik nükleuslu, granüllü endoplazma retikulumu ve mitokondriyonlardan zengin sitoplazmalı proksimal tübül epitel hücreleri sıkı bağlantı birimleri ile birbirine bağlı olarak izlenmiştir (**Şekil 3.2.2.1 C-D**).



**Şekil 3.2.2.1.** HK-2 PTE hücre hattına ait ışık ve transmisyon elektron mikrograflar. (A) 1. ve (B) 10. pasajdaki hücreler kültür kabının tabanına tutunmuş ve karakteristik kaldırım taşı görünümünde izlenmektedir. (C, D) Ökromatik nükleuslu (N) granüllü endoplazma retikulumu (GER) ve mitokondriyonlardan (M) zengin sitoplazmalı PTE hücreleri (D)'de sıkı bağlantı birimleri (ok) ile birbirine bağlanmıştır. (A, B) x100, (C) x15.000, (D) x30.000. (C, D) uranil asetat, kurşun sitrat.

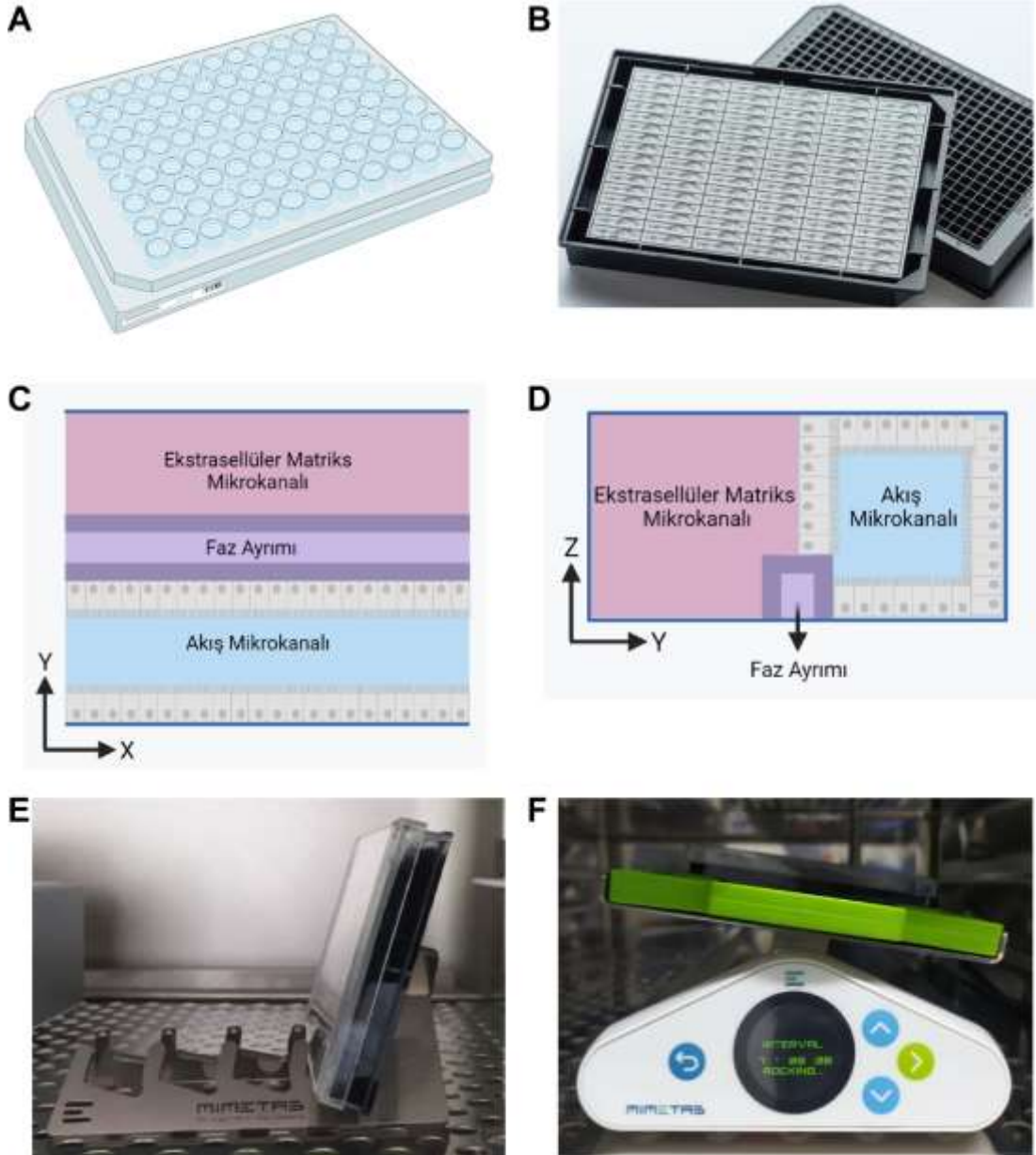
### 3.2.3. 3B Dinamik ve 2B Statik PTE Hücre Kültürü Düzeneklerinin Optimizasyonu

Konvansiyonel 2B PTE hücre kültürü düzeneğini oluşturmak için 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü plakları (92096, TPP, İsviçre) kullanılmıştır (29) (**Şekil 3.2.3.1 A**). Dondurulup saklanan PTE hücreleri, 37 °C su banyosunda çözülmüş, 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flasklarında konvansiyonel kültür ortamında çoğaltılmış, %80 yoğunluğa ulaştıkları gözlemlendikten sonra %0,25 Tripsin-%0.02 EDTA solüsyonu (01-867-1B, Biological Industries, İsrail) ile kaldırılıp hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarının her kuyucuğuna  $1.5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 100µl besiyeri ile aktarılmıştır. Ardından 48 saatte bir besiyeri değişimi ve mikroskopik değerlendirme ile hücreler izlenmiştir.

3B dinamik mikroakışkan hücre kültürü modeli için kompartmanında 2 mikrokanala sahip mikroakışkan yongası içeren, kanalların birleşim bölgesinde kompartmanları membransız olarak birbirinden ayrı tutan faz ayrımı bulunan, platform başına 96 yonga içeren mikroakışkan kültür plağı (9605-400-B, Mimetas, Hollanda) ve mikroakışkan yongalarında yerçekimi temelli akım sağlayan aralıklı salınım cihazı (OrganoFlow L, Mimetas, Hollanda) kullanılmıştır (26) (**Şekil 3.2.3.1 B-F**). Her mikroakışkan yongasının jel mikrokanalına 2 µl ekstrasellüler matriks (356277, Corning, ABD) eklenip 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> koşullarında nemlendirilmiş inkübatörde 30 dakika süreyle polimerleşmesi sağlanmıştır. Dondurulup saklanan PTE hücreleri 37 °C su banyosunda çözülmüş, 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültür flasklarında konvansiyonel kültür ortamında çoğaltılmış, %80 yoğunluğa ulaştıkları gözlemlendikten sonra %0,25 Tripsin-%0.02 EDTA solüsyonu (01-867-1B, Biological Industries, İsrail) ile kaldırılıp hücre sayımı yapıldıktan sonra her mikroakışkan yonganın akış mikrokanalına  $1.5 \times 10^4$  hücre içeren 2 µl besiyeri eklenmiştir. Hücrelerin ekstrasellüler matriks üzerine yerleşmesini sağlamak için plak, plak standı yardımıyla akış mikrokanalları yukarıda kalacak şekilde zemine 75° açı ile inkübatör içerisinde konumlandırılıp 4 saat süreyle inkübe edilmiştir (**Şekil 3.2.3.1 E**). 4 saatlik inkübasyonun ardından plak aralıklı salınım cihazına yerleştirilmiş ve fizyolojik koşullarda 2 dyne/cm<sup>2</sup> makaslama kuvveti oluşturacak şekilde (-7°) - (+7°) açı ve 8 dk aralıklı salınım olacak şekilde çalıştırılarak

mikrokanallarda akım sağlanmıştır (Şekil 3.2.3.1 F). Ardından 48 saatte bir besiyeri değişimi ve mikroskopik değerlendirme ile hücreler 8 gün süreyle izlenmiştir.

Her iki grup invertte faz kontrast mikroskobu (DMI 6000, Leica, Almanya veya IX73, Olympus, Japonya) ile değerlendirilmiş ve kamera atışmanı (DFC 7000 T, Leica, Almanya) ile yüksek çözünürlüklü mikrograflar elde edilmiştir.



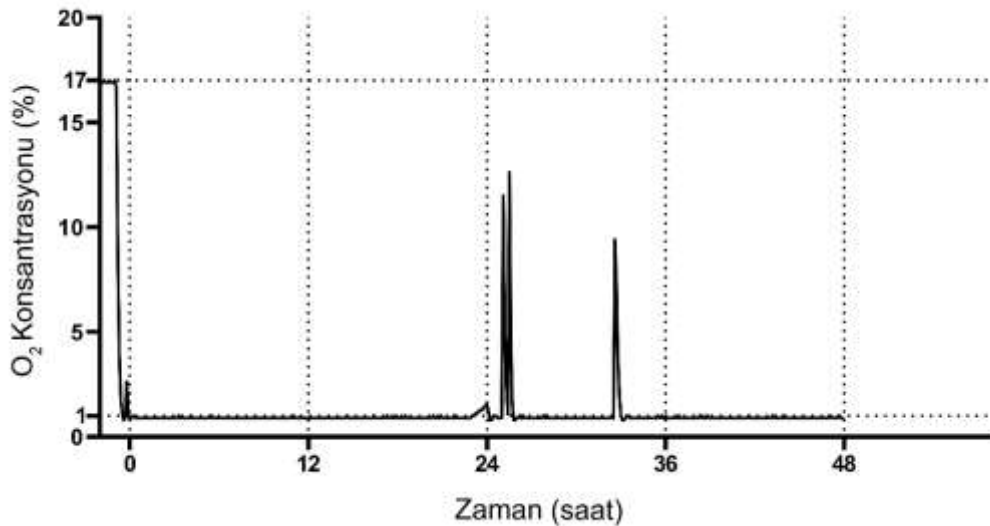
**Şekil 3.2.3.1.** Hücre kültürü düzeneklerinin makroskopik ve şematik görünümü. (A) 2B statik ve (B) 3B dinamik sistemlerin makroskopik görünümü; 3B dinamik mikroakışkan platformunun şematik çizimleri (C, D), inkübatör içerisinde plak standı

(E) ve aralıklı salınım cihazı (F) üzerinde görünümü verilmiştir. (A, C, D) Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.

### 3.2.4. 3B Dinamik ve 2B Statik PTE Hücre Kültürü Düzeneklerinde Akut Hipoksi Modelinin Optimizasyonu

2B statik hücre kültürü modeli ve aralıklı salınım cihazı ile akım sağlanan 3B dinamik mikroakışkan platformu invertte mikroskop altında gözlenip 2B statik modelde %80 hücre yoğunluğu gözleendiğinde, 3B dinamik platformda ise hücrelerin akış mikrokanalının tamamını kapladığı gözleendiğinde modellerin stabilize olduklarına karar verilmiş ve deneyler başlatılmıştır.

Hipoksi koşulları çok gazlı inkübatörde (MCO-170M, Panasonic, Japonya) N<sub>2</sub> gazı yardımıyla inkübatör içi O<sub>2</sub> düzeyi %1 seviyesine düşürülerek %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonu eşliğinde gerçekleştirilmiştir (68, 69). Normoksi koşulları ise inkübatör içerisinde %17 O<sub>2</sub> ve %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. 48 saatlik hipoksi koşulları süresince inkübatörün zirkonyum sensörünün 6 dakikalık aralıklarla kaydettiği O<sub>2</sub> ve CO<sub>2</sub> değerleri takip edilmiş, inkübatör kapağının açılması dışında O<sub>2</sub> düzeyinde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 3.2.4.1).





**Şekil 3.2.4.1.** Akut hipoksi koşullarında O<sub>2</sub> konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi grafiği. O<sub>2</sub> konsantrasyonunun 48 saat süreyle %1 seviyesinde kaldığı, izlenen kısa süreli piklerin inkübatör kapağının açıldığı saniyelere denk geldiği görülmektedir.

### 3.3. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının 3B Dinamik ve 2B Statik Düzeneklerde Yapısal ve İşlevsel Olarak Değerlendirilmesi

#### 3.3.1. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının Epitel Bariyerinin Bütünlüğüne Etkisinin Değerlendirilmesi

3B mikroakışkan platformunda PTE'nin sızdırmaz bariyer bütünlüğünün normoksi ve hipoksi koşullarında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi için mikrokanal lümeninde dolaşan besiyerine floresan izotiyosiyanat (FITC) veya tetrametilrodamin izotiyosiyanat (TRITC) ile işaretli 20 veya 155 kilodalton (kDa) ağırlığında dekstran molekülleri (FD20S ve T1287, Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır (26). Seçilen 20 ve 155 kDa dekstran, sırayla glomerüler filtrasyon bariyerinden fizyolojik ve patolojik koşullarda geçen molekülleri modellemektedir (99). Çalışmanın 0., 24. ve 48. saatlerinde normoksi ve hipoksi koşullarındaki mikroakışkan platformlara ait akış kanallarındaki besiyeri, 0,5 mg/ml konsantrasyonda işaretli dekstran molekülü içeren besiyeri ile değiştirildikten sonra 10 dakika süreyle her 2 dakikada bir invertte floresan mikroskop (IX73, Olympus, Japonya) altında uygun dalga boylarında (Eksitasyon/emisyon; FITC, 495/517 nm; TRITC, 550/573 nm) görüntülenmiştir.

İşaretli moleküllerin ekstrasellüler matriks mikrokanalına sızma miktarı, elde edilen mikrograflarda ImageJ görüntü analiz yazılımı yardımıyla her iki kanaldaki floresan intensitesi sayısal olarak belirlenmesi ile analiz edilerek daha önceki çalışmalarda kullanılmış olan (26) ve aşağıda verilen geçirgenlik endeksi formülü yardımıyla her örnek için bir geçirgenlik endeksi hesaplanmıştır.

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = (\Delta C_{receiver} \times V_{receiver}) / (\Delta t \times A_{barrier} \times C_{donor})$$

Formülde;  $P_{app}$  cm/s cinsinden geçirgenlik indeksini,  $\Delta C_{receiver}$  mikrokanallar arasındaki normalize edilmiş intensite farkını,  $V_{receiver}$  ekstrasellüler matriks

mikrokanalının hacmini,  $\Delta t$  geçen zamanı,  $A_{barrier}$  mikrokanalların temas ettiği yüzeyin alanını,  $C_{donor}$  dekstran konsantrasyonunu ifade etmektedir.

### 3.3.2. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının Yapısal Etkilerinin ZO-1 ve Asetillenmiş $\alpha$ -tübülün İmmün İşaretlemesi ile Değerlendirilmesi

Epitel hücrelerinin polaritesi, sitoplazmadaki mikrotübüllere özgü asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün ve lateral sıkı bağlantı birimlerinin bütünlüğü, sıkı bağlantılara özgü ZO-1 direkt immün işaretleme tekniğiyle değerlendirilmiştir (27). Bunun için Alexa Fluor 594 floroforu ile konjuge fare anti- insan ZO-1 antikoru (339194, Invitrogen, Thermo Fisher, ABD), FITC floroforu ile konjuge fare anti-insan asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün antikoru (sc-23950, SantaCruz Biotechnology, ABD) ve 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) çekirdek boyası (D9542, Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. ZO-1 ve asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün antikorlarının minimum etkili çalışma konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin optimizasyonu amacıyla 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her kuyucuğa  $1.5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiş olan ve normoksi koşullarında inkübe edilen HK-2 hücreleri farklı dilüsyonlarda (1/50, 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000) konjuge antikorlar ile inkübe edilmiştir. Optimum koşullar oda sıcaklığında ZO-1 için 1/1000, asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün için 1/200 konsantrasyonda 1 saat inkübasyon ile sağlanmıştır.

Tüm örnekler, besiyeri çekilip hücreler 2 kez Hank'ın dengeli tuz solüsyonu (HBSS) tamponu ile yıkayıp her kuyuya 50  $\mu$ l HBSS içerisinde %3,7 paraformaldehit eklenerek oda sıcaklığında 10 dakika süreyle tespit edilmiştir. Ardından PBS içerisinde %0,3 Triton X-100 ile membran geçirgenliği sağlanıp PBS içerisinde %2 BSA, %0,2 Triton X-100 ile bloklama işlemi yapılmıştır. Hücreler bloklama solüsyonu çekilip iki kez HBSS tamponu ile yıkandıktan sonra HBSS içerisine konjuge primer antikorlar ile 1 saat süreyle oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun sonunda tekrar yıkama işlemi uygulanan kuyulara 100 ng/ml DAPI eklenerek 5 dk süreyle oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilerek çekirdek boyaması gerçekleştirilmiştir. Ardından tekrar HBSS ile yıkama gerçekleştirilip son olarak her kuyuya 50  $\mu$ l HBSS eklenerek görüntülemeye hazır hale getirilmiştir. İmmün işaretleme yapılan hücreler invert floresan mikroskop altında görüntülenmiş ve elde edilen mikrograflarda ImageJ

görüntü analiz yazılımı ile intensite, alan ve arkaplan ölçümleri yapıp alana düşen hücreler sayıldıktan sonra literatürde belirtilen formül yardımıyla her örnek için DTFY hesaplanmıştır (100).

$DTFY = \frac{[Entegre\ Yoğunluk - (Alan \times Ortalama\ Arka\ Plan\ Yoğunluğu)]}{Alandaki\ Toplam\ Hücre\ Sayısı}$

### **3.3.3. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının Epitel Hücrelerinin Proliferasyon Hızına Etkisinin Değerlendirilmesi**

Hipoksiye bağlı hasarın PTE hücre canlılığı üzerine etkisi, 0.,24., 48. saatlerde deney ve kontrol gruplarında WST-1 tekniği ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu teknik, canlı hücrelerde mitokondriyon kökenli dehidrogenaz enziminin test solüsyonunda bulunan tetrazolyum tuzu WST-1'i (11644807001, Roche, İsviçre) formazana çevirmesi ve formazan miktarının kolorimetrik olarak saptanması prensibi ile çalışmaktadır. Bölünen hücreler metabolik olarak bölünmeyenlere göre daha aktif oldukları için WST-1 testi hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde kullanılabilir (101).

Değerlendirme için 2B ve 3B düzeneklerde hipoksi veya normoksi koşullarında 0, 24 veya 48 saatlik inkübasyon sonrasında besiyerine %10 test solüsyonu eklenerek 37°C'de inkübatörde 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Ardından örneklerdeki besiyeri boş 96 kuyucuklu plaklara alınıp kolorimetrik mikropalak okuyucusunda (Versamax, Molecular Devices, ABD) 440nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmış ve elde edilen sonuçlar gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

### **3.3.4. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarında Glikoz Taşıyıcılarının ve Hasar Biyobelirteçlerinin mRNA Düzeyinde Değerlendirilmesi**

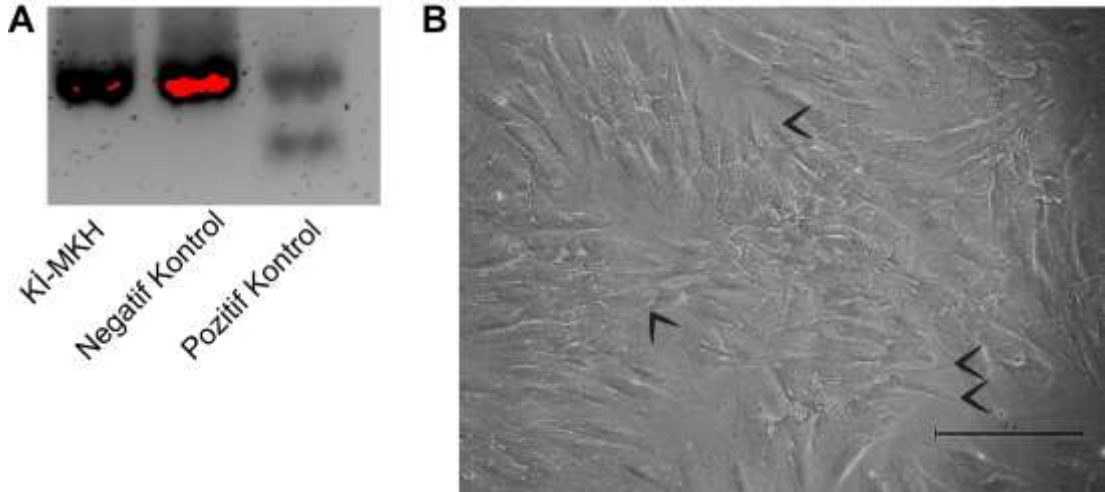
Hipoksiye bağlı PTE hasarında glikoz taşıyıcılarının ve hasar belirteçlerinin mRNA düzeyinde belirlenmesi için normoksi veya hipoksi koşullarında inkübe edilen hücrelerden RNA elde edilmiş qRT-PCR yöntemiyle mRNA düzeyleri değerlendirilmiştir (102). Çalışmanın 0., 24. ve 48. saatlerinde RNA izolasyon kiti ile (EZ-RNA Total RNA İzolasyon Kiti, 20-400-100, Biological Industries, İsrail) RNA elde edilmiş;  $\beta$  Aktin (ACTB, PPH00073G, Qiagen, Almanya), HO-1 (HMOX1, PPH00161F, Qiagen, Almanya), BNIP3 (BNIP3, PPH00301C, Qiagen, Almanya),

HIF1A (PPH01361B, Qiagen, Almanya), GLUT1 (SLC2A1, PPH02043C, Qiagen, Almanya) ve GLUT2 (SLC2A2, PPH13360F, Qiagen, Almanya) genlerine ait primerler ile cDNA miktarları kantitatif olarak değerlendirilmiştir.  $\beta$  Aktin gen ifadesi gardiyan gen olarak seçilmiş, diğer genlerin ifadesi gardiyan gene ve bazal ifadeye (0. Saat) göre kat değişimi olarak belirtilmiştir.

### **3.4. İnsan Kİ-MKH'lerinden Eksozom İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Proliferatif Potansiyelinin Değerlendirilmesi**

#### **3.4.1. İnsan Kİ-MKH'lerinin Eldesi ve Çoğaltılması**

İnsan Kİ-MKH hücre hattı ticari olarak elde edilmiştir (PCS-500-012, ATCC, ABD). Soğuk zincir koşullarında temin edilen hücreler %10 *fetal bovine serum* (FBS) ve %1 pen-strep içeren *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) besiyeri içerisinde önce 25 cm<sup>2</sup>'lik (70025, SPL, Güney Kore), ardından 75 cm<sup>2</sup>'lik (70075, SPL, Güney Kore) hücre kültürü flasklarında konvansiyonel kültür ortamında 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda nemlendirilmiş inkübatörde (EC 160, Nüve, Türkiye) kültüre edilmiştir. Hücreler üreticinin multipotent özelliklerin korunduğunu taahhüt ettiği aralıkta yer alan 4. pasaja kadar kültüre edilmiştir (103). Hücreler mikoplazma kontaminasyonu açısından PCR yöntemiyle denetlenmiştir (**Şekil 3.4.1.1 A**). Tüm iş paketlerinde 4. pasajdaki hücreler kullanılmıştır (**Şekil 3.4.1.1 B**). İleri iş paketleri için yeterli sayıda hücre, üreticinin önerdiği koşullarda %10 Dimetil Sülfoksit (20385.01, Serva, Almanya) ve %40 FBS içeren besiyeri ile dondurma konteyneri (CLS432000-1EA, Corning, ABD) yardımıyla dondurularak -80°C dondurucuda (DF 290, Nüve, Türkiye) ve -196°C sıvı azot tankında depolanmıştır.



**Şekil 3.4.1.1.** İnsan Kİ-MKH'lerine ait jel elektroforezi ve faz kontrast mikrografı. (A) 4. pasajdaki hücreler mikoplazma için negatiftir. (B) İğsi şekilli sitoplazmik uzantılı hücreler (<) kültür kabına tutunmuştur. (B) Orijinal büyütme x100.

### 3.4.2. İnsan Kİ-MKH'lerinden Eksozom İzolasyonu

Kültüre edilen insan Kİ-MKH'ler T75 flaklarda %70 yoğunluğa ulaştıklarında fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkayıp ve 48 saat süreyle eksozomsuz FBS (%10) eklenmiş besiyeri içerisinde %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C'de inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda toplanan besiyeri sırasıyla 1500xg'de 10 dakika, 10000xg'de 10 dakika ve 30000xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj aşamaları ile sırayla besiyerindeki hücreler, hücre artıkları ve mikroveziküller uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süpernatant, 2 kez 90 dakika süreyle 100000xg hızda ultrasantrifüj işlemine tabi tutularak eksozom pelleti elde edilmiştir. Elde edilen pellet 100 µl PBS içinde çözülmüş ve -80°C'de saklanmıştır (15).

### 3.4.3. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Protein Konsantrasyonu Açısından Karakterizasyonu

Kİ-MKH eksozomlarının protein konsantrasyonunun tayini için Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi (#23225, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile kolorimetrik ölçüm yapılmıştır (104). Değerlendirmede eğri çizimi için protein standardı olarak *bovine serum albumin* (BSA) örnekleri kullanılmıştır. Üreticinin talimatlarına uygun şekilde eksozom örnekleri 30 dk süreyle çalışma solüsyonu ile inkübe edilip 10 dakikalık

soğuma periyodunun ardından 562 nm dalgaboyunda kolorimetrik plak okuyucu (VersaMax, Molecular Devices, ABD) ile ölçümler yapılmıştır. Elde edilen ölçümlerde arkaplan düzeltilmesi uygulandıktan sonra örneklerdeki protein konsantrasyonlarının tayini için standartların ölçüm sonuçları ile “protein konsantrasyonu x absorbans” eğrisi çizilip bu eğriden elde edilen formül ile örneklerin protein konsantrasyonu mg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

#### **3.4.4. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Ultrastrüktürel Karakterizasyonu**

Eksozomların şekil ve boyutları pozitif ve negatif boyama yöntemleriyle transmisyon elektron mikroskopunda (TEM) değerlendirilmiştir (105). Kısaca, eksozom içeren solüsyon 200 mesh formvar/karbon kaplı nikel gridler (EMS, ABD) üzerine damlacık şeklinde bırakılıp yerçekimi ile grid zeminine çökmesi için oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından gridler sırayla %1 fosfotungstik asit ve %2 uranil asetat ile boyanmıştır. Her basamak öncesinde ve sonrasında üçer kez distile su ile yıkama yapılmıştır. Gridler oda sıcaklığında havada kurutulduktan sonra dijital kamera (Gatan, ABD) ataçmanlı TEM (JEM 1400, JEOL, Japonya) altında güç analizinde hedeflenen örneklem büyüklüğüne ulaşmak üzere iki tekrarlı olarak Kİ-MKH eksozomlarının kısa ve uzun çapları ölçülerek karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

#### **3.4.5. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Yüzey Belirteçleri Açısından Karakterizasyonu**

Eksozomlar, tanımsal yüzey belirteçleri olan tetraspanin protein ailesinden CD63 ve CD81 kullanılarak akım sitometrisi ile karakterize edilmiştir (106). Kısaca, eksozomlar CD63 primer antikoru ile kaplanmış boncuklar (ab 239686, abcam, İngiltere) ile 1:2 oranında karıştırılarak oda sıcaklığında bir gece inkübe edilmiştir. Ardından örnekler PBS içerisinde %5'lik BSA ile 4 saat oda sıcaklığında inkübe edilip 1:50 dilüsyonda fikoeritrin (PE) ile konjuge edilmiş CD81 primer antikoru (130-118-481, Miltenyi Biotec, ABD) ile işaretlenmiştir. Yıkama basamaklarından sonra örnekler akım sitometrisi cihazında (Novocyte 2000, Agilent, ABD) en az 2000 okuma boncuk popülasyonu belirlendikten sonra izotip kontrol örneği (PE IgG1, 3240907, ABD) ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

### 3.4.6. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Gerçek Zamanlı Tedavi Penceresinin Belirlenmesi

Eksozomların normal ve düşük oksijen konsantrasyonlarında akut etkili doz ve zaman penceresinin belirlenmesi için kültüre insan PTE hücrelerine (HK-2, CRL-2190, ATCC-LGC, ABD) logaritmik hesaplama sağlayacak biçimde literatürde uygulanan en geniş doz (49, 50) ve zaman aralığını (36, 39) esas alarak allojenik Kİ-MKH eksozomları uygulanmış ve gerçek zamanlı empedans temelli hücre proliferasyonu hesaplanmıştır. Empedans değişimleri 96 kuyucuklu kültür kabının tabanında bulunan altın elektrotlar ile ölçülerek hücre indeksi birimi üzerinden kaydedilmiştir (107). Eksozomların zaman aralığının tespiti için PTE hücreleri,  $1.5 \times 10^4$  hücre/kuyu yoğunlukta 96 kuyucuklu E-plaklar üzerine ekilmiş ve RTCA SP (Xcelligence, Agilent, ABD) cihazına yerleştirilip  $37^\circ\text{C}$  sıcaklık ve %5  $\text{CO}_2$  konsantrasyonunda nemlendirilmiş inkübatörde (EC 160, Nüve, Türkiye) kültüre edilmiştir. Hücrelerin çoğalması RTCA yazılımı ile hücre indeksi cinsinden sayısal olarak takip edilip bu parametre tüm gruplar için “1” değerine ulaştığında hücrelere besiyeri içerisinde  $5 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^0$ ,  $5 \times 10^1$  ve  $5 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$  dozlarda Kİ-MKH eksozomları veya sadece besiyeri verilmiştir. Eksozom uygulamasının ardından deney 48 saat süreyle devam ettirilmiştir. Normoksi koşullarında gerçekleştirilen bu deneyde tedavi penceresinin sonlanımı, “%50 etkin doz (ED50) x zaman” grafiğinde ED50 değerinin ani artış gösterdiği nokta olarak belirlenmiştir.

Güvenli doz aralığının tespiti için ikinci bir deney düzeneğinde aynı yoğunlukta ekilen PTE hücrelerinin hücre indeksi tüm gruplar için “1” değerine ulaştığında hipoksi uygulaması başlatılmış, 48 saatlik hipoksi periyodu sonrasında besiyeri içerisinde sırayla  $5 \times 10^{-1}$ ,  $5 \times 10^0$ ,  $5 \times 10^1$  ve  $5 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$  dozlarda Kİ-MKH eksozomları hücrelere verilmiştir. Eksozom uygulamasının ardından normalize hücre indeksleri 48 saat süreyle takip edilmiştir. Normoksi düzeneğinde tespit edilen tedavi penceresinin sonlanma noktası için ED50 değeri hesaplanmış, ileri iş paketlerinde eksozomlar hesaplanan dozda kullanılmıştır.

### **3.5. Allojenik Kİ-MKH Eksozomlarının Akut Hipoksiye Bağlı Yapısal ve İşlevsel PTE Hasarına Etkisinin 3B Dinamik Mikroakışkan Platformunda Değerlendirilmesi**

#### **3.5.1. Allojenik Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Epitel Geçirgenliği Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi**

Mikroakışkan yonga sisteminde hipoksi koşullarındaki örneklerde Kİ-MKH eksozomlarının epitel geçirgenliği üzerindeki etkisi eksozom uygulamasından 24 saat sonra 3.3.1 numaralı kısımda tanımlandığı gibi FITC işaretli 20 kDa veya TRITC işaretli 155 kDa dekstran molekülleri ile değerlendirilip geçirgenlik endeksi formülü yardımıyla her örnek için bir geçirgenlik endeksi hesaplanmıştır. Çözücü ve eksozom uygulamaları sonucunda elde edilen veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

#### **3.5.2. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Yapısal Etkilerinin İmmünfloresan İşaretleme ile Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi**

Kİ-MKH eksozomlarının yapısal etkilerinin değerlendirilmesi için 3.3.2 numaralı kısımda belirtildiği gibi Alexa Fluor 594 ile konjuge ZO-1 antikoru, FITC ile konjuge asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün antikoru ve DAPI çekirdek boyası ile immün işaretleme yapılmış, hücreler konfokal mikroskop altında görüntülenmiş ve elde edilen mikrograflarda ImageJ görüntü analiz yazılımı ile intensite, alan ve arkaplan ölçümleri yapıp alana düşen hücreler sayıldıktan sonra literatürde belirtilen formül yardımıyla her örnek için DTFY hesaplanmıştır.

#### **3.5.3. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Proliferasyon Hızı Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi**

3B dinamik mikroakışkan platformunda hipoksiye bağlı akut PTE hasarında Kİ-MKH eksozomlarının hücre canlılığı üzerine etkisi, uygulamadan 24 saat sonra



3.3.3 numaralı kısımda tanımlandığı gibi çözücü ile karşılaştırılarak WST-1 tekniği ile değerlendirilmiştir.

#### 3.5.4. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Mikroakışkan Platformunda Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Modelinde Hasar Biyobelirteçleri Açısından Gen İfadesi Düzeyinde Değerlendirilmesi

Hipoksiye bağlı PTE hasarında Kİ-MKH eksozomlarının glikoz taşıyıcıları ve hasar belirteçlerinin mRNA düzeylerine etkisinin gösterilmesi için, 3.3.4 numaralı kısımda belirtildiği gibi hipoksi koşullarında inkübe edilen hücrelerden RNA elde edilmiş ve qRT-PCR yöntemiyle  $\beta$  Aktin, HO-1, BNIP3, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 ve GLUT2 genlerinin mRNA düzeyleri kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

#### 3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm iş paketlerinden bağımlı ve bağımsız değişkenlerden elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildikten sonra parametrik veriler için t testi ve tek yönlü çoklu değişken analizi, parametrik olmayan veriler için Mann Whitney U testi ve Kruskal Wallis testi kullanılarak veri analizleri gerçekleştirilmiştir. İş paketlerinin değerlendirilmesinde kullanılan testler Tablo 3.6.1’de belirtilmiştir. Bağımlı ve bağımsız değişkenlere ait tanımlayıcı istatistiksel veriler parametrik ya da parametrik olmayan dağılımlara göre ortanca, minimum, maksimum ya da ortalama değerleri  $\pm$  SD olarak grafiklere dökülmüştür. Tüm değerlendirmelerde %95’lik güven aralığında çalışılmış ve analizler için IBM SPSS Statistics 23.0, grafikler için GraphPad Prism 8 yazılımları kullanılmıştır.

**Tablo 3.6.1.** İş paketlerinin çıktılarının dağılımı ve kullanılan istatistiksel analiz yöntemleri listelenmiştir.

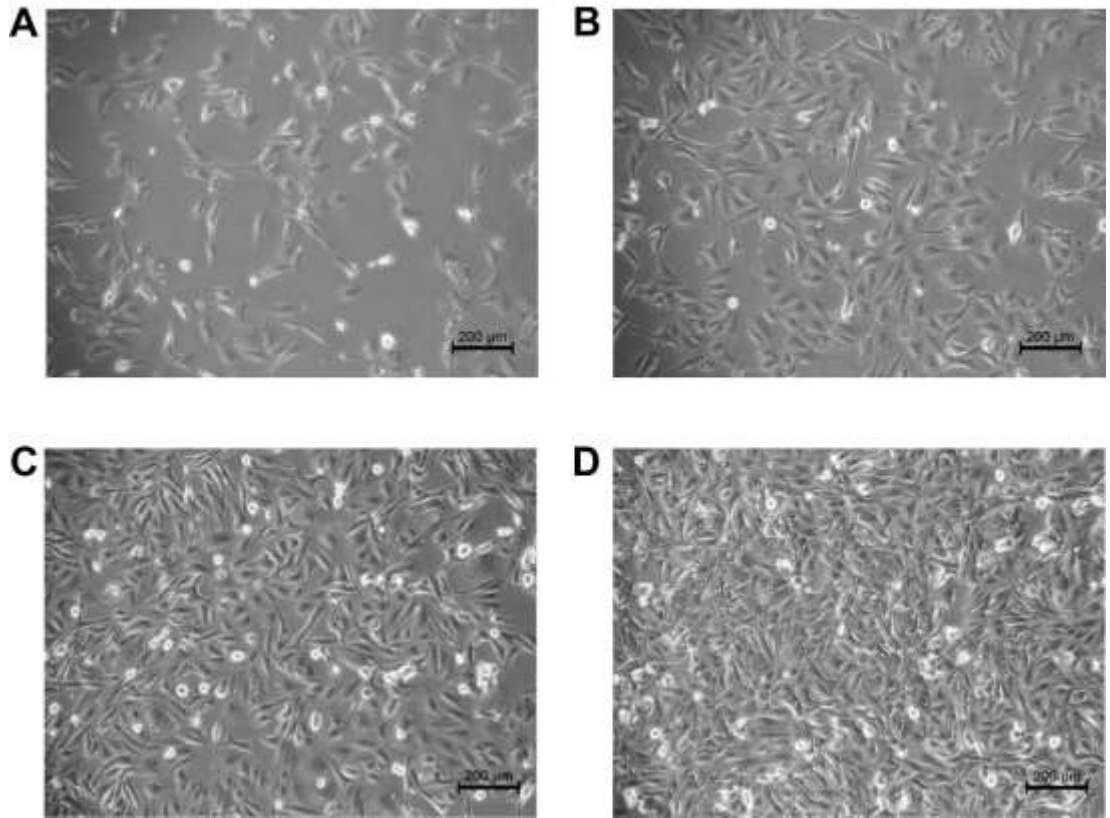
Yöntem İş Paketi Numarası	Verilerin Dağılımı	Verilerin İstatistiksel Analizi
3.3.1	Parametrik	Tek yönlü çoklu değişken analizi + Tukey testi
3.3.2	Parametrik /	Tek yönlü çoklu değişken analizi + Tukey

	Parametrik Değil	testi, Mann Whitney U testi, Bağımsız t testi
3.3.3	Parametrik	Tek yönlü çoklu değişken analizi + Sidak testi
3.3.4	Parametrik Değil	$\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle göreceli gen ifadesi hesaplanması
3.4.3	Parametrik	Bağımsız t testi
3.4.4	Parametrik	Bağımlı t testi
3.4.5	Parametrik	Bağımsız t testi
3.4.6	Parametrik / Parametrik Değil	Tek yönlü çoklu değişken analizi + Tukey testi, Kruskal-Wallis testi + Dunn testi
3.5.1	Parametrik	Bağımsız t testi
3.5.2	Parametrik	Bağımsız t testi
3.5.3	Parametrik	Bağımsız t testi
3.5.4	Parametrik Değil	$\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle göreceli gen ifadesi hesaplanması

## 4. BULGULAR

### 4.1. İnsan PTE Hücreleri ile 2B Statik ve 3B Dinamik Kültür Düzeneklerinin Oluşturulması

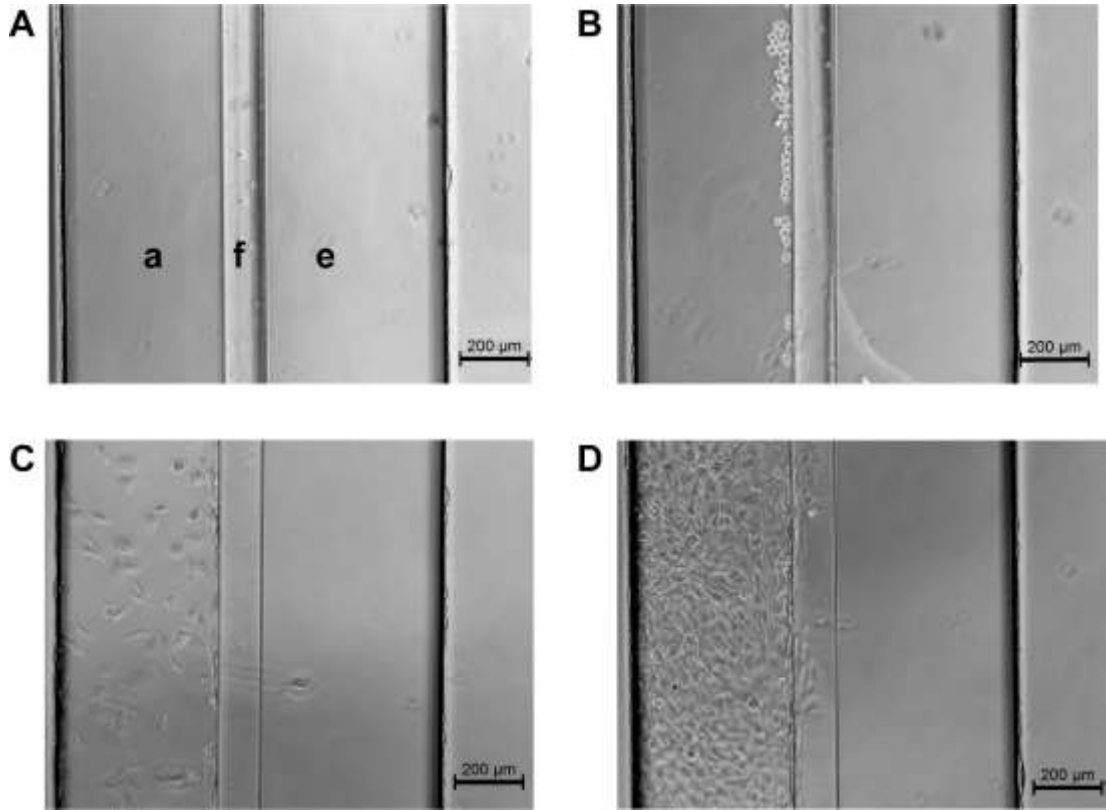
İnsan PTE hücrelerinin 2B statik kültür ortamında kültür kabının yüzeyine tutundukları ve hücre ekimi sonrası 8. günde %80 yoğunluk oranına ulaştıkları, karakteristik kaldırım taşı görünümü aldıkları ve birbirlerine tutundukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.1.).



**Şekil 4.1.1.** İnsan PTE hücrelerinin 2B statik kültür düzeneğinde faz kontrast mikrografları. Hücreler ekim sonrası 2. (A), 4. (B), 6. (C), 8. (D) günlerde değerlendirildiğinde 8. günde karakteristik kaldırım taşı görünümüne ulaştıklarına dikkat ediniz. x100.

3B mikroakışkan platformu hücre ekilmeden önce düzgün kenarlı kanallar ve faz ayrımı yapısıyla izlenmiştir (Şekil 4.1.2. A). PTE hücreleri platforma ekildiğinde,

zemine  $75^\circ$  açı ile 4 saatlik statik koşullarda inkübasyon sonrasında hücrelerin hedeflendiği gibi ekstrasellüler matriks yüzeyine çöktüğü gözlenmiştir (**Şekil 4.1.2. B**). Akış sağlanarak plağın dinamik koşullara alınmasının ardından 8. günde hücrelerin akış mikrokanalının tamamını kapladığı gözlemlenmiştir (**Şekil 4.1.2. C-D**). Mikrokanalın faz ayrımı ile komşu olan sınır bölgesinin, kanalın kalanına göre hücre sayısı açısından daha yoğun izlenmesi ve faz kontrast mikroskobunda farklı odak seviyelerinde birden fazla hücre popülasyonunun gözlenmesi, 3 boyutlu tübül yapısının başarıyla oluşturulduğunu göstermiştir (**Şekil 4.1.2. D**).

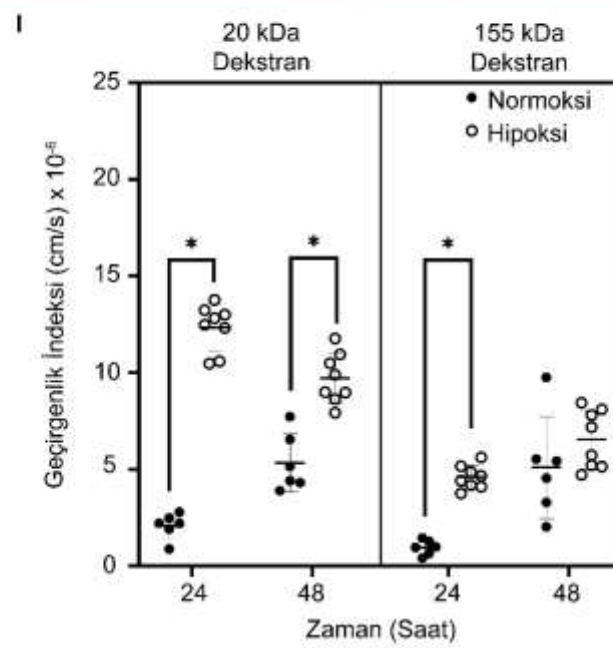
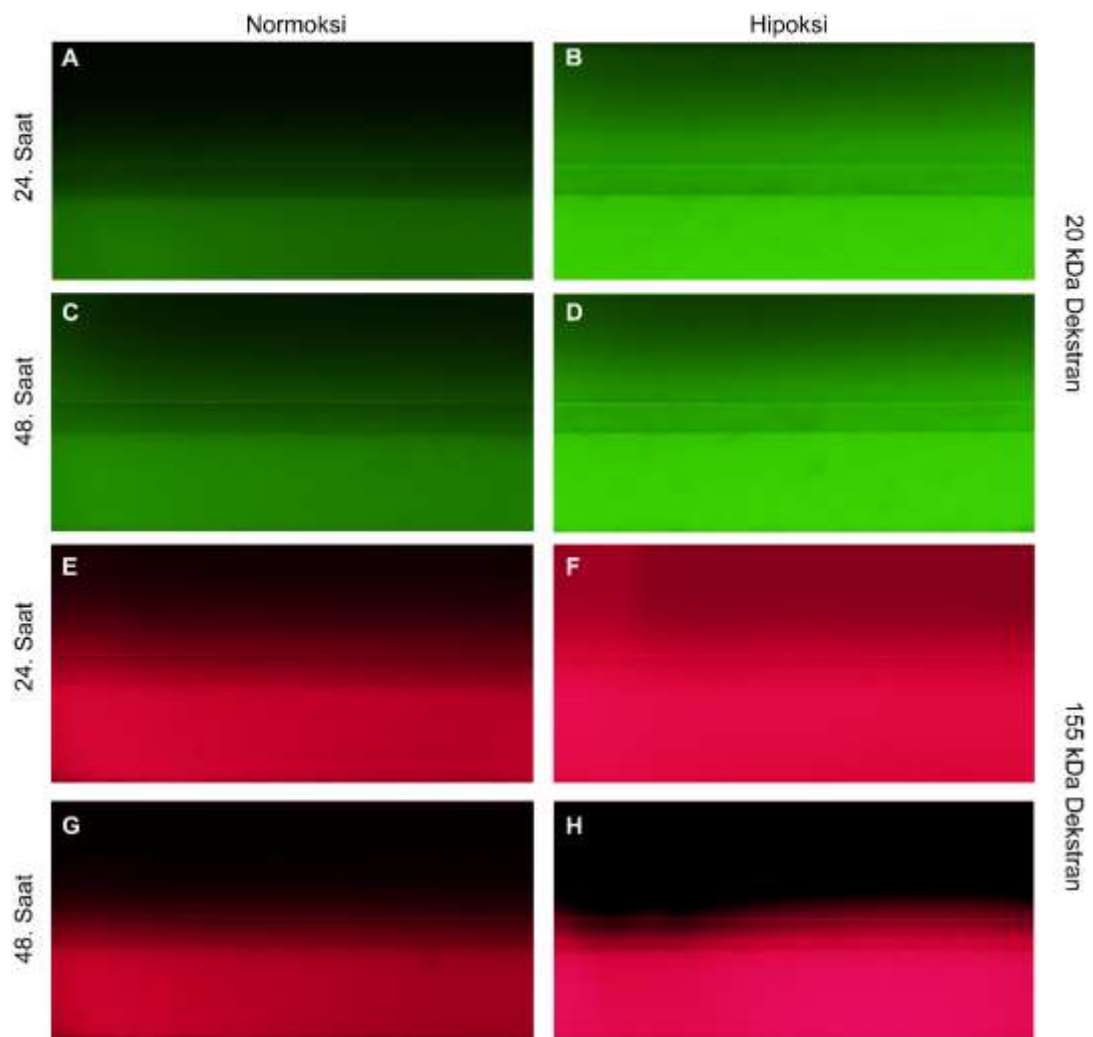


**Şekil 4.1.2.** İnsan PTE hücrelerinin 3B dinamik mikroakışkan platformunda faz kontrast mikrografları. 3D mikroakışkan platformunun boş mikrografından (**A**) akış mikrokanalı (a), ekstrasellüler matriks mikrokanalı (e) ve faz ayrımı (f) izlenmektedir. Hücre ekimi ve  $75^\circ$  açıyla 4 saatlik statik inkübasyonu takiben hücreler faz ayrımı seviyesinde çökmüştür (**B**). Kültürün 4. (**C**) ve 8. (**D**) günlerinde hücrelerin akış kanalının yüzeylerine tutunduğu, kanal kenarlarında daha çok hücre bulunduğu izlenmiştir. x100.

## **4.2. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarının 2B Statik ve 3B Dinamik H¼cre K¼lt¼r¼ D¼zeneklerinde Yapısal ve İşlevsel Olarak Değerlendirilmesi**

### **4.2.1. Hipoksiye Bağlı Akut PTE Hasarı Epitel Geğirgenliğini Artırmıştır.**

Hipoksiye bağlı akut PTE hasarının, 24. saatte 20 kDa ve 155 kDa dekstrana karşı PTE geğirgenliğini normoksi koşullarına g¼re sırasıyla 6 ve 4 kat artırdığı g¼sterilmiřtir (sırasıyla  $p<0,0001$  ve  $p<0,0001$ ; **şekil 4.2.1.1.**). 20 kDa dekstrana karşı PTE geğirgenliği artışı, 48. saatte normoksi koşullarına g¼re 2 kat y¼ksek olarak devam etmiştir ( $p=0.0006$ , **şekil 4.2.1.1.**). 155 kDa dekstrana karşı PTE geğirgenliği, 48. saatte normoksi koşulları ile benzer indeksi g¼stermiřtir ( $p>0.05$ , **şekil 4.2.1.1.**).



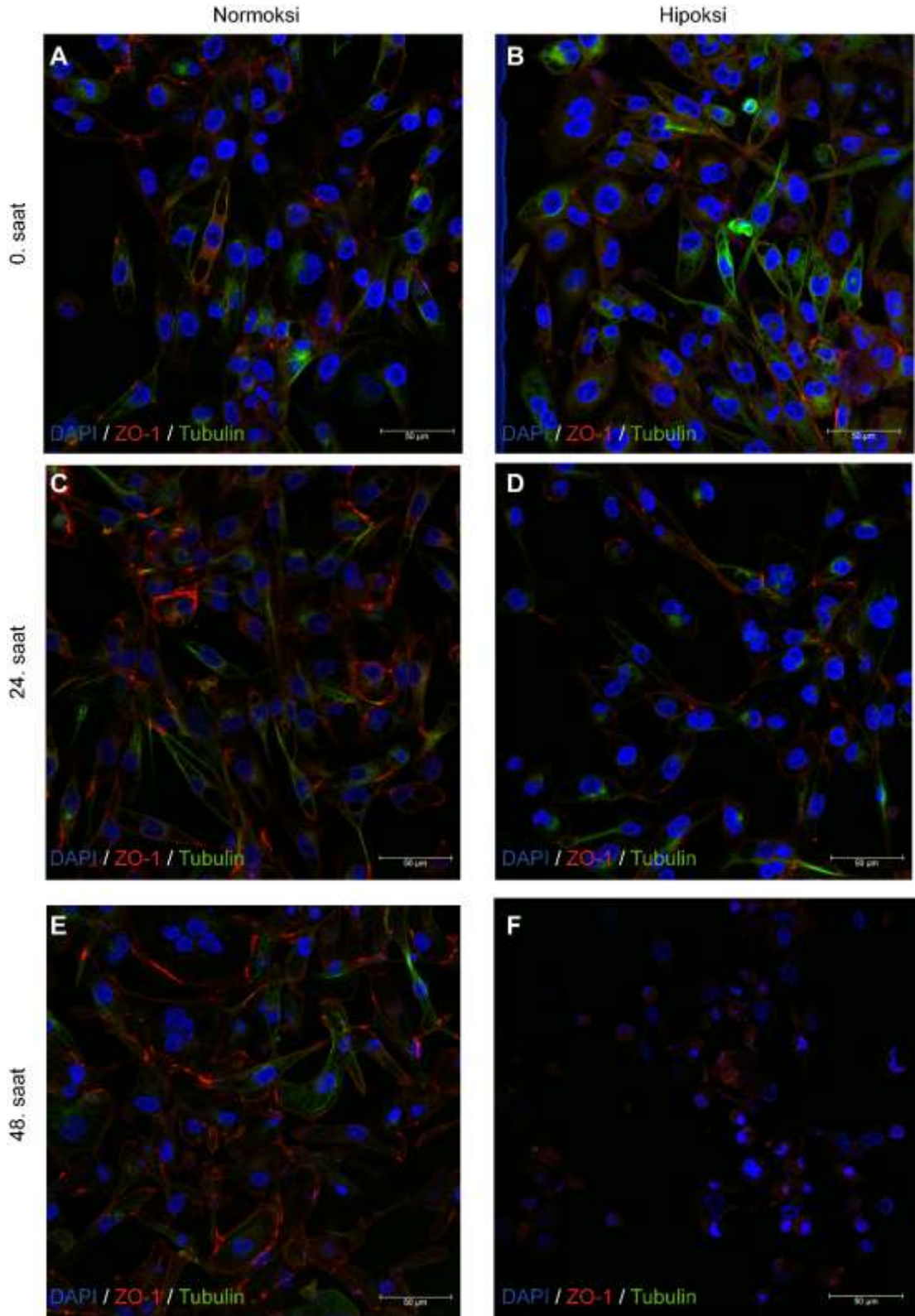
**Şekil 4.2.1.1.** Akut hipoksiye bağlı PTE hasarında epitel geçirgenliğinin değerlendirmesine ait floresan mikrograflar (A-H) ve saçılım grafiği (I). Normal oksijen konsantrasyonunda (sol kolon) yeşil ile işaretli 20 kDa FITC-dekstran ve kırmızı ile işaretli 155 kDa TRITC-dekstran moleküllerinin ekstrasellüler matriks kanalına (üst) geçmediği, akut hipoksi koşullarında (sağ kolon) ise 24. Saatte her iki molekül ağırlığında geçişin arttığı, 48. Saatte 155 kDa dekstran için geçişin azaldığı gözlemlenmiştir. Epitelin 20 kDa ve 155 kDa dekstran molekülüne karşı hesaplanan geçirgenlik indeksi değerleri saçılım grafiği (I) olarak verilmiştir. x100, (\*) p<0.05.

#### **4.2.2. Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Mikroakışkan Platformunda ZO-1 ve Asetillenmiş $\alpha$ -tübülün İşaretlenmesini Azaltmıştır**

Normal oksijen konsantrasyonunda 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerdeki PTE hücreleri aralarındaki sıkı bağlantılara özgü ZO-1 ile yaygın olarak işaretlenmiştir. ZO-1 ile işaretli, bariyer bütünlüğünü koruyan hücreler devamlı retiküler patern göstermiştir (**Şekil 4.2.2.1.** ve **Şekil 4.2.2.2.**). Hipoksi uygulaması sonrası ZO-1 işaretli hücrelerin diffüz retiküler paterni bozulmuş, hücrelerde bunun yerine granüler bir işaretlenme izlenmiş, bu görünüm bariyer bütünlüğünün bozulduğu yönünde değerlendirilmiştir (**Şekil 4.2.2.1.** ve **Şekil 4.2.2.2.**). ZO-1 immünreaktivitesi gösteren PTE hücrelerinin DTFY değerleri, 3B mikroakışkan platformunda 0 ve 24. saatte normoksi ve hipoksi koşullarında benzer düzeyde izlenmiştir (**Şekil 4.2.2.3.**). 3B mikroakışkan platformunda 48. saatte hipoksiye bağlı olarak PTE hücrelerinin ZO-1 DTFY'si normal oksijen koşullarına göre anlamlı olarak azalmıştır (p=0.0131, **Şekil 4.2.2.3.**). 2B statik düzenekte 0, 24. ve 48. saatlerde normoksi ve hipoksi koşullarında PTE hücrelerinde ZO-1 DTFY'si değişmemiştir (Sırayla p>0.05, p>0.05 ve p>0.05, **Şekil 4.2.2.3.**). 2B statik ve 3B dinamik düzeneklerde PTE hücrelerindeki ZO-1 DTFY'si normal oksijen konsantrasyonunda 0 ile 48. saatler arasında anlamlı değişiklik göstermemiştir (**Şekil 4.2.2.3.**). Diğer yandan hipoksi koşullarında 3B dinamik platformda PTE'deki ZO-1 DTFY'si 24. Saatten itibaren 48. Saate kadar düşmüş ancak bu düşüş istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır (**Şekil 4.2.2.3.**).

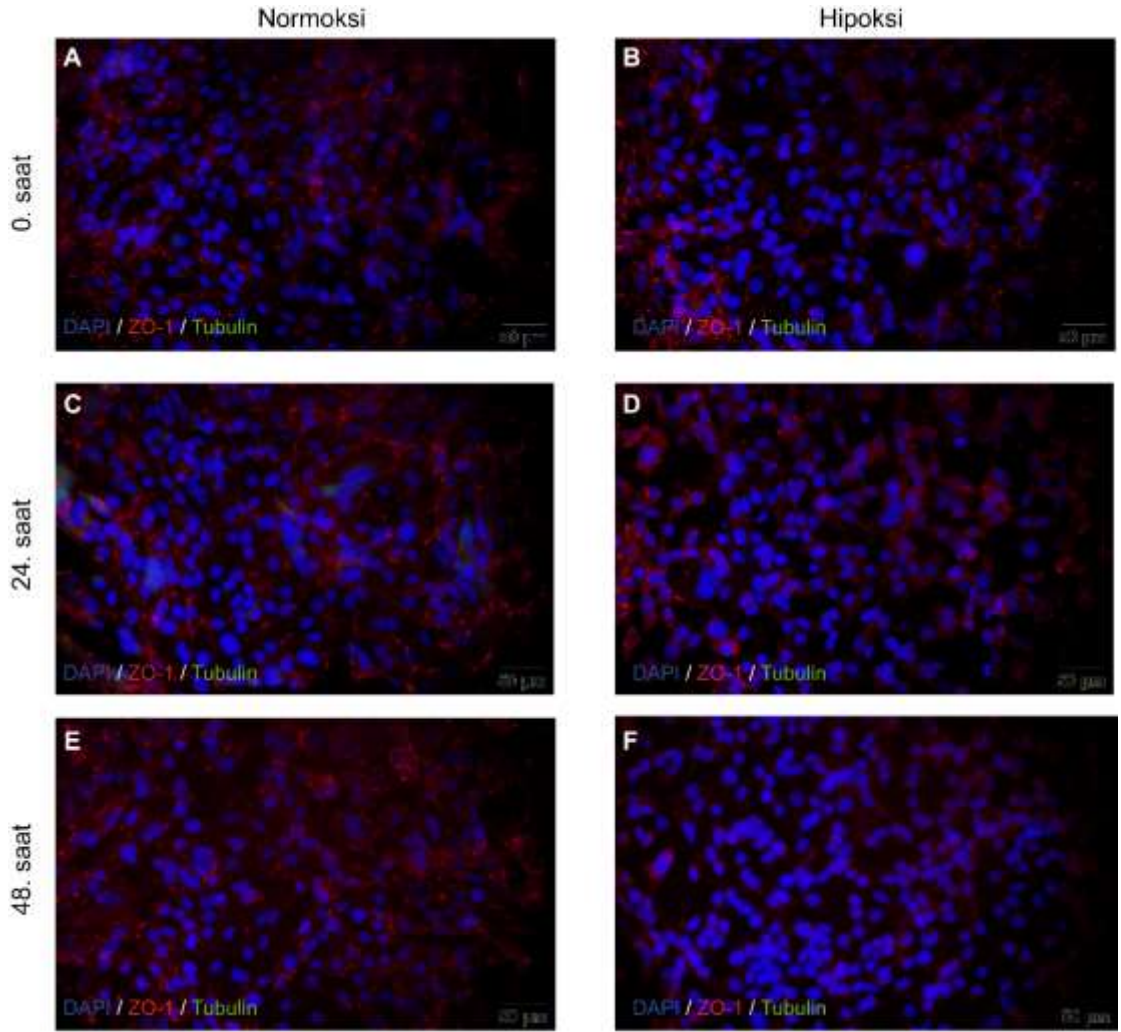
Normal ve düşük oksijen konsantrasyonunda oluşturulan 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde, PTE hücreleri sitoplazmadaki mikrotübüllere özgü asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün ile ZO-1'e göre sınırlı olarak işaretlenmiştir (**Şekil 4.2.2.1.** ve **Şekil 4.2.2.2.**). Diğer yandan, normal oksijen konsantrasyonunda 3B dinamik mikroakışkan platformunda sitoplazmik asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün işaretlenmesi diğer gruplara, özellikle 2B statik düzeneğe göre daha belirgin olarak izlenmiştir (**Şekil 4.2.2.1.** ve **Şekil 4.2.2.2.**). Normoksi koşullarında 3B dinamik düzenekte PTE hücrelerinin asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün DTFY'si, 0, 24 ve 48. saatlerde 2B statik düzeneğe göre yüksek olarak izlenmiştir ( $p=0,0003$ , **Şekil 4.2.2.3.**). 3B dinamik düzeneğe hipoksi uygulandıktan sonra asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün için PTE DTFY değerleri 24. ve 48. Saatlerde 0. saate göre anlamlı olarak azalmıştır (sırasıyla  $p=0.003$  ve  $p=0.0023$ , **Şekil 4.2.2.3.**). 2B statik düzenekte hipoksi uygulaması asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün için PTE DTFY değerlerini 0, 24. ve 48. saatlerde değiştirmemektedir (**Şekil 4.2.2.3.**).



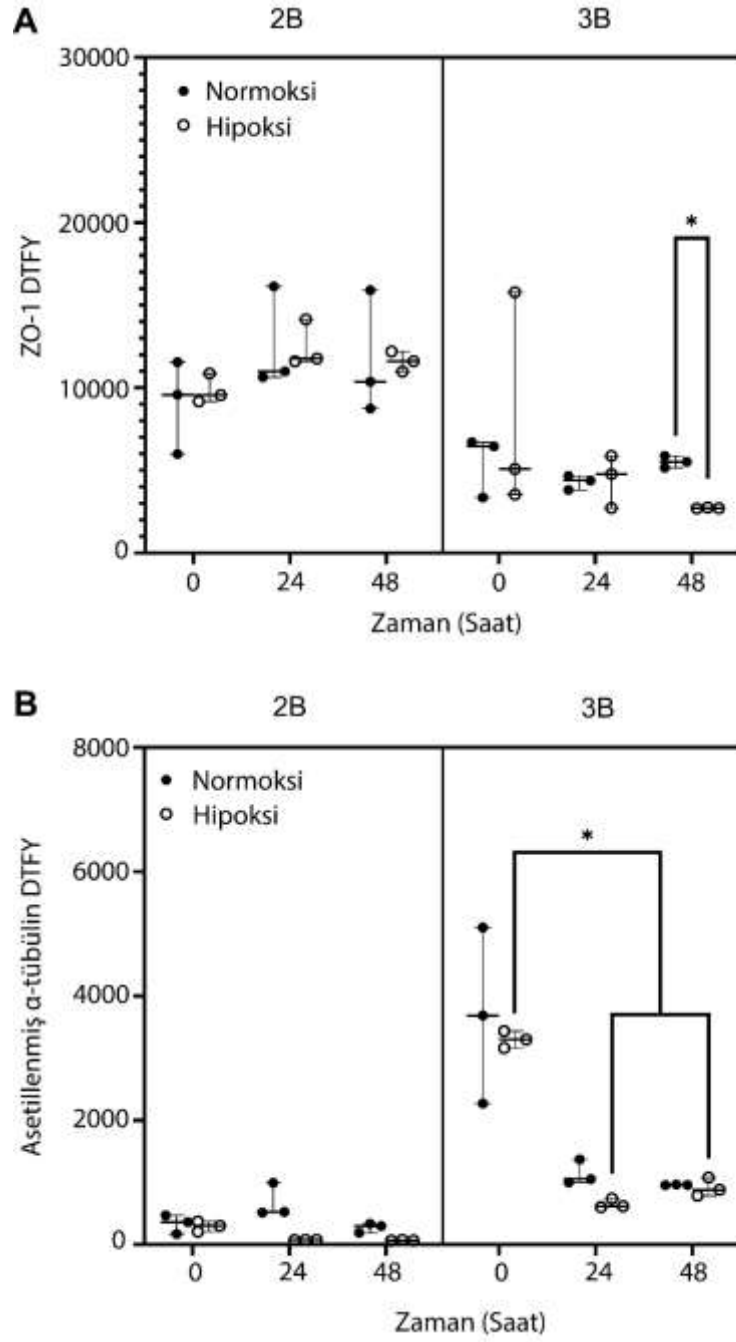


**Şekil 4.2.2.1.** 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarında ZO-1 ve asetillenmiş  $\alpha$ -tübülin immün işaretlemesine ait floresan

mikrograflar. Normal oksijen konsantrasyonunda (**A, C, E**) hücrelerin kanal zeminine tutunduğu ve 48 saat boyunca ZO-1 ve asetillenmiş  $\alpha$ -tübülin işaretlenmesinin devam ettiği izlenmiştir. Akut hipoksi koşullarında (**B, D, F**) ise 24. Saatte her iki protein için de işaretlenme düzeyleri azalmış, 48. Saatte çok az miktarda işaretlenme ve hücre çekirdeği sayısında azalma gözlemlenmiştir. Görüntüler konfokal mikroskopta elde edilmiştir. x400.



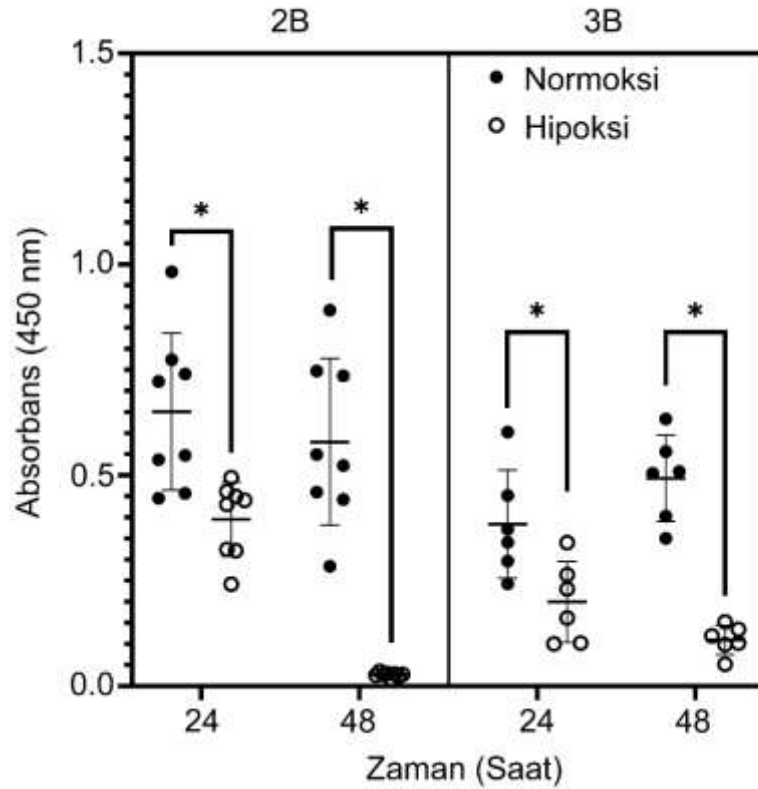
**Şekil 4.2.2.2.** 2B statik düzenekte akut hipoksiye bağlı PTE hasarında kırmızı ile izlenen ZO-1 ve yeşil ile izlenen asetillenmiş  $\alpha$ -tübülin immün işaretlemesine ait floresan mikrograflar. Normal oksijen konsantrasyonunda (**A, C, E**) hücrelerin kanal zeminine tutunduğu ve 48 saat boyunca ZO-1 ve asetillenmiş  $\alpha$ -tübülin işaretlenmesinin devam ettiği izlenmiştir. Akut hipoksi koşullarında (**B, D, F**) ise 24. Saatte her iki protein için de işaretlenme düzeyleri azalmış, 48. Saatte çok az miktarda işaretlenme ve hücre çekirdeği sayısında azalma gözlemlenmiştir. Görüntüler floresan mikroskopta elde edilmiştir. x400.



**Şekil 4.2.2.3.** 2B statik ve 3B dinamik düzeneklerde akut hipoksiye bağlı PTE hasarında ZO-1 (A) ve asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün (B) immün işaretlemesine ait DTFY saçılım grafikleri. (\*)  $p < 0.05$ .

### 4.2.3. Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Epitel Hücrelerinin Proliferasyon Hızını Azaltmıştır

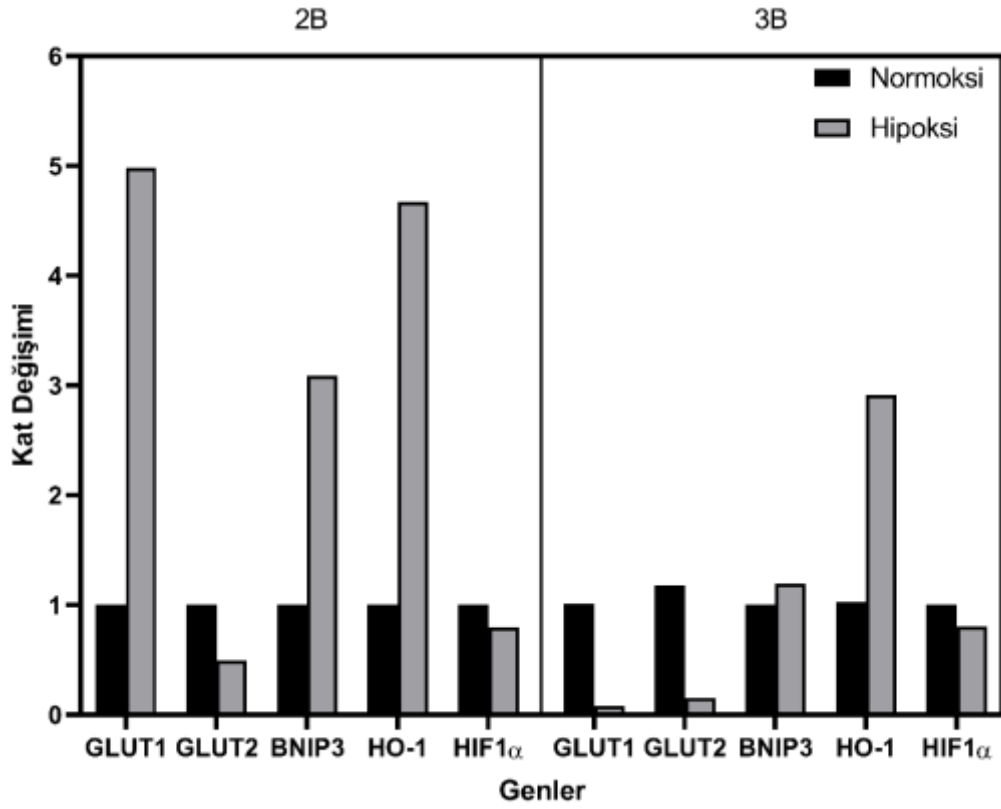
Akut hipoksi, 3B dinamik ve 2B statik hücre kültürü düzeneklerinin her ikisinde de 24. ve 48. saatlerde PTE hücrelerinin proliferasyon hızını normal oksijen koşullarına göre anlamlı olarak düşürmüştür (3B düzenek için sırasıyla  $p=0.0069$  ve  $p=0.0001$ ; 2B düzenek için sırasıyla  $p=0.0167$  ve  $p=0.0003$ , Şekil 4.2.3.1.). Devam eden akut hipoksi 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerdeki hücre proliferasyon hızını, 48. Saatte, 24. Saate göre anlamlı olarak azaltmıştır (Sırasıyla  $p=0.0258$  ve  $p=0.0001$ , Şekil 4.2.3.1.). Normal oksijen konsantrasyonlarında inkübe edilen 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerdeki PTE hücreleri 24 ve 48. Saatlerde benzer proliferasyon hızları göstermiştir.



Şekil 4.2.3.1. 2B statik ve 3B dinamik düzeneklerde akut hipoksiye bağlı PTE hasarında hücre proliferasyon hızını gösteren saçılım grafiği. (\*)  $p<0.05$ .

#### **4.2.4. Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Glikoz Taşıyıcıların ve Hasar Biyobelirteçlerinin Gen İfadelerini Değiştirmiştir**

Akut hipoksi, 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde 24. saatte PTE hücrelerindeki hem oksijenaz-1 (HO-1) ifadenmesini normal oksijen konsantrasyonuna göre sırasıyla 2.91 ve 4.67 kat artırmıştır (**Şekil 4.2.4.1.**). Akut hipoksi, 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde 24. saatte PTE hücrelerindeki BNIP3 ifadenmesini normal oksijen konsantrasyonuna göre sırasıyla 1.19 ve 3.08 kat artırmıştır (**Şekil 4.2.4.1.**). PTE hücrelerindeki HIF1 $\alpha$  ifadenmesi akut hipoksiye bağlı olarak hem 3B dinamik hem de 2B statik düzeneklerde 24. saatte normoksi ile karşılaştırıldığında sırasıyla 0.8 kat ve 0.79 kat azalmıştır (**Şekil 4.2.4.1.**). Akut hipoksi, PTE hücrelerinde 24. saatte GLUT1 ifadenmesini 3B dinamik düzenekte normal oksijen koşullarına göre 0.07 kat azaltmış, 2B düzenekte 4.98 kat artırmıştır (**Şekil 4.2.4.1.**). PTE hücrelerindeki GLUT2 ifadenmesi akut hipoksiye bağlı olarak 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde normoksi ile karşılaştırıldığında 24. saatte sırayla 0.15 ve 0.49 kat azalmıştır (**Şekil 4.2.4.1.**).

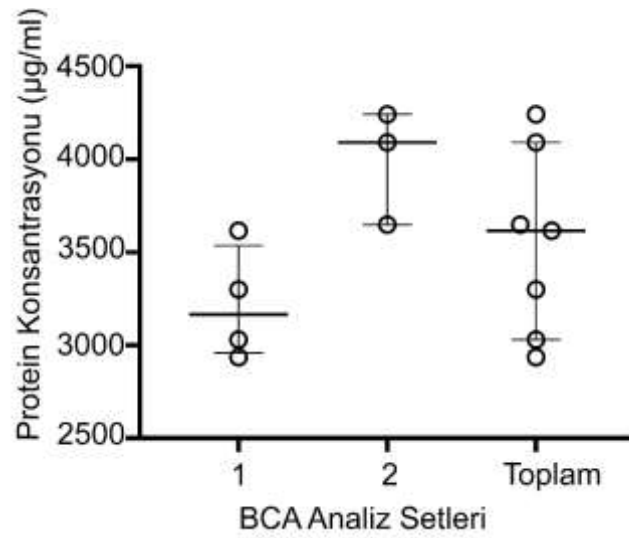


**Şekil 4.2.4.1.** 2B statik ve 3B dinamik düzeneklerde akut hipoksiye bağlı PTE hasarında hücrelerde GLUT1, GLUT2, BNIP3, HO-1 ve HIF1 $\alpha$  genlerinin ifadenmesini gösteren bar grafiği. İlgili genlerin ifadenme düzeyleri  $\beta$  aktin genine göre kat değişimi olarak verilmiştir. Deneş her grupta n=3 örnek havuzlanarak tek tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

### 4.3. İnsan Kİ-MKH Eksozomlarının Karakterizasyonu ve Akut Hipoksi Koşullarındaki İnsan PTE Hücrelerinde Proliferatif Etkisinin Değerlendirilmesi

#### 4.3.1. Kİ-MKH Eksozomları Homojen Protein Konsantrasyonu Sağlamıştır

İnsan Kİ-MKH eksozomlarının protein konsantrasyonları tüm deney düzeneklerinde birbiriyle benzer, homojen ölçümler vermiştir. Eksozomlarının ortalama protein konsantrasyonu  $3552 \pm 499,1 \mu\text{g/ml}$  olarak saptanmıştır (Şekil 4.3.1.1).



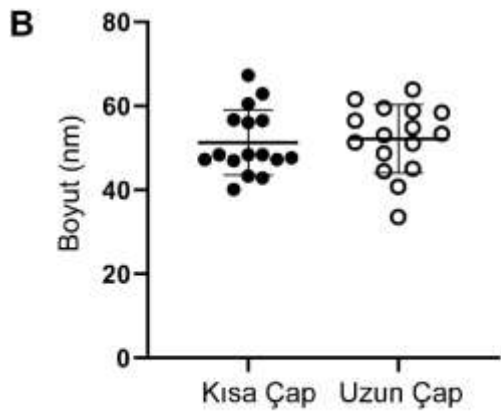
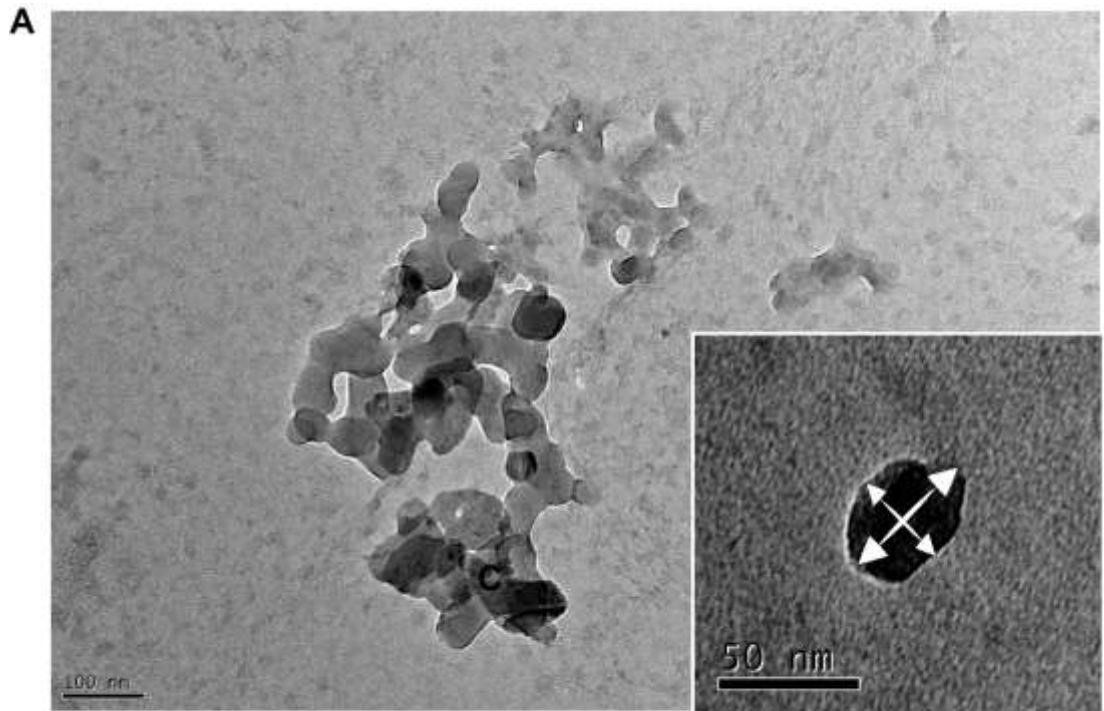
Şekil 4.3.1.1. Kİ-MKH eksozomların BCA ile homojen protein konsantrasyonlarını gösteren saçılım grafiği.

#### 4.3.2. Kİ-MKH Eksozomları Ultrastrüktürel Olarak Karakterize Edilmiştir

İnsan Kİ-MKH eksozomları transmisyon elektron mikroskopunda küçük büyütmelerde çoğunlukla kümelenmiş, büyük büyütmelerde tek tek dağılmış ve yapısal bütünlüğü korunmuş küre biçimli nanoveziküller olarak izlenmiştir (Şekil 4.3.2.1). Veziküller negatif ve pozitif boyayı almalarına göre fosfotungstik asitle elektron az yoğun ya da uranil asetat ile elektron yoğun olarak seçilmiştir. Tüm



deney setlerinden izole edilen örnekler kantitatif olarak değerlendirildiğinde vezikül çaplarının 33.55 – 67.33 nm aralığında homojen bir dağılım gösterdiği saptanmıştır. Ultrastrüktürel kısa ve uzun çap ölçümleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olmadığı ( $p>0.05$ ) izlenmiştir. Bu durum eksozomların karakteristik küresel yapısını desteklemiştir. Eksozomlar ultrastrüktürel karakterizasyon sonrası 4.4 numaralı iş paketlerinde güvenle kullanılmıştır.



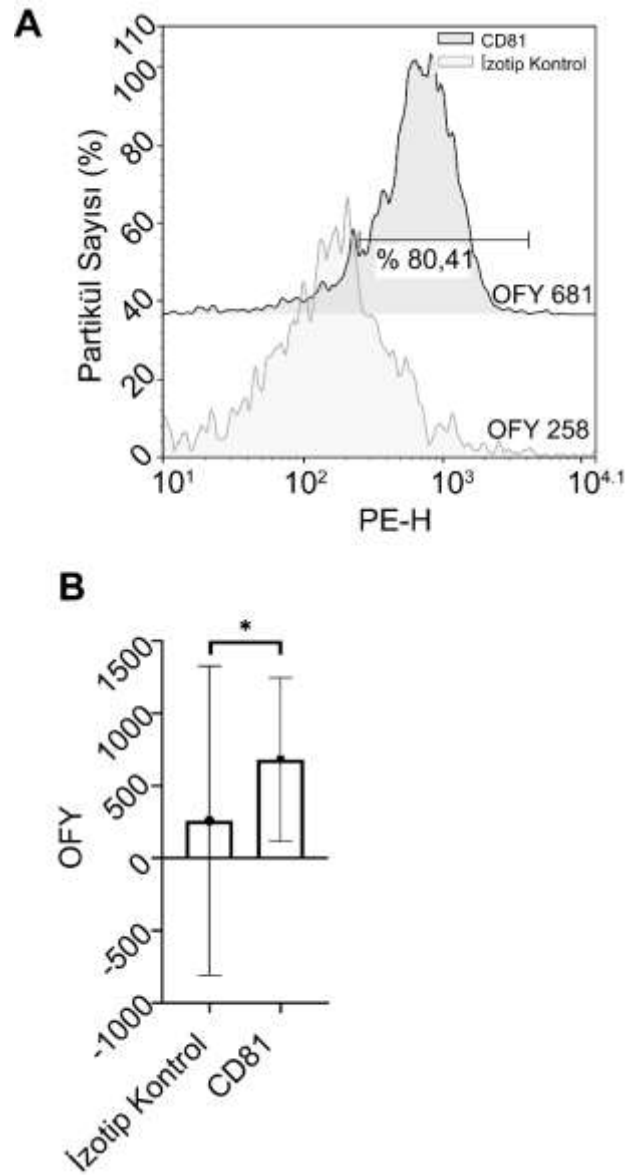
**C**

Tanımlayıcı İstatistiksel Veriler		
Uzun Çap	Ortalama $\pm$ SD	52,18 $\pm$ 2,037
	Minimum	33,55
	Maksimum	63,93
Kısa Çap	Ortalama $\pm$ SD	51,27 $\pm$ 1,944
	Minimum	40,1
	Maksimum	67,33

**Şekil 4.3.2.1.** Kİ-MKH eksozomlarına ait transmisyon elektron mikrografları (**A**, **inset**) ve boyut ölçümleri (**B**, **C**). Eksozomlar ultrastrüktürel olarak küçük büyütmelerde (**A**) kümelenmiş, büyük büyütmelerde (**inset**) tek başına elektrondens veziküller şeklinde izlenmektedir. Benzer kısa ve uzun çap ölçümleri (**B**) veren Kİ-MKH eksozomları 33.55 – 67.33 nm aralığında izlenmiştir (**C**). (A) x150.000, (inset) x250.000. Uranil asetat, fosfotungustik asit.

#### **4.3.3. Kİ-MKH Eksozomları Karakteristik CD63 ve CD81 Yüzey Belirteçlerini Bulundurmaktadır**

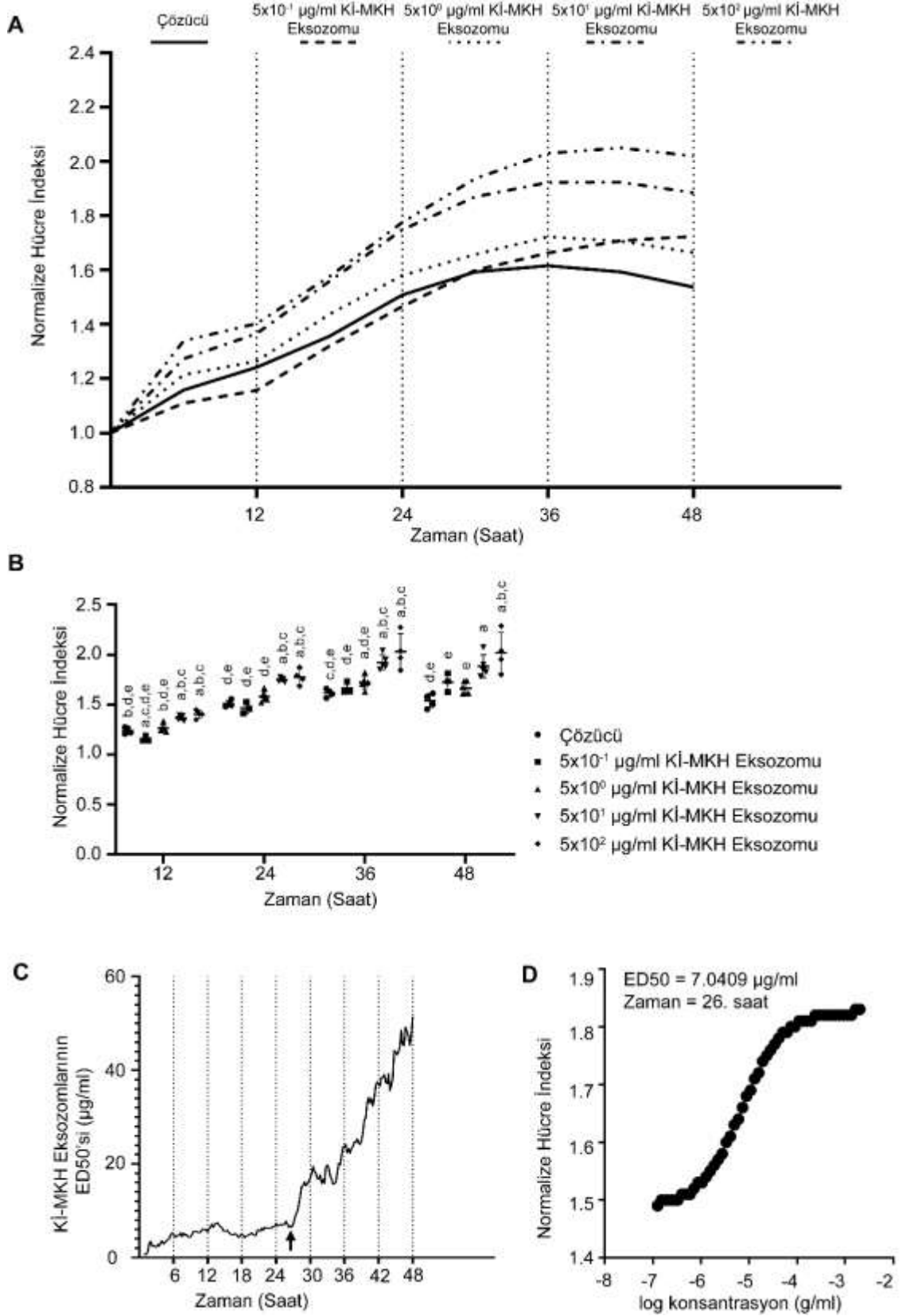
Tüm deney setlerinden elde edilen insan Kİ-MKH eksozomlarının CD63 ile yakalandıktan sonra CD81 yüzey belirtecini izotip kontrole göre 2.63 kat daha fazla ifade ettiği, eksozomların %80,41'inin CD81 ile işaretlendiği akım sitometrisi yöntemiyle gösterilmiştir (**Şekil 4.3.3.1.**). Yüzey belirteçleri açısından karakterize edilen eksozomlar sonraki iş paketlerinde güvenle kullanılmıştır.



**Şekil 4.3.3.1.** KI-MKH eksozomlarına ait akım sitometrisi ile CD81 yüzey belirteci karakterizasyonu grafikleri. **(A)** CD63 konjuge boncukla yakalandıktan sonra CD81 ile işaretli eksozomlara ait temsili işaretlenme oranı eğrisi. PE-H, Fikoeritrin-yükseklik. **(B)** CD81'e ait izotip kontrol ile karşılaştırmalı ortalama floresans yoğunluğu (OFY) gösterilmiştir. (\*)  $p < 0.05$

#### 4.3.4. Allojenik Kİ-MKH Eksozomlarının İnsan PTE Hücrelerindeki Tedavi Penceresi Belirlenmiştir

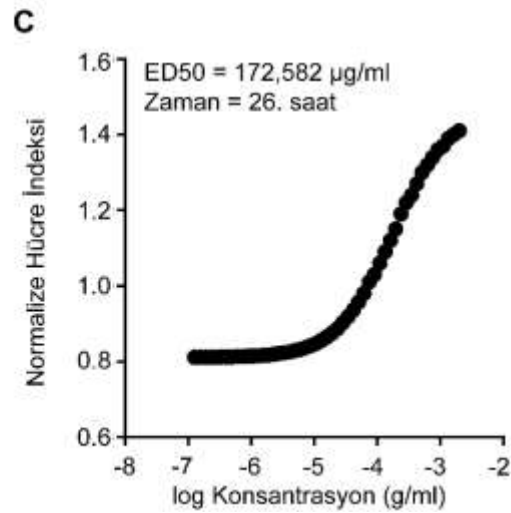
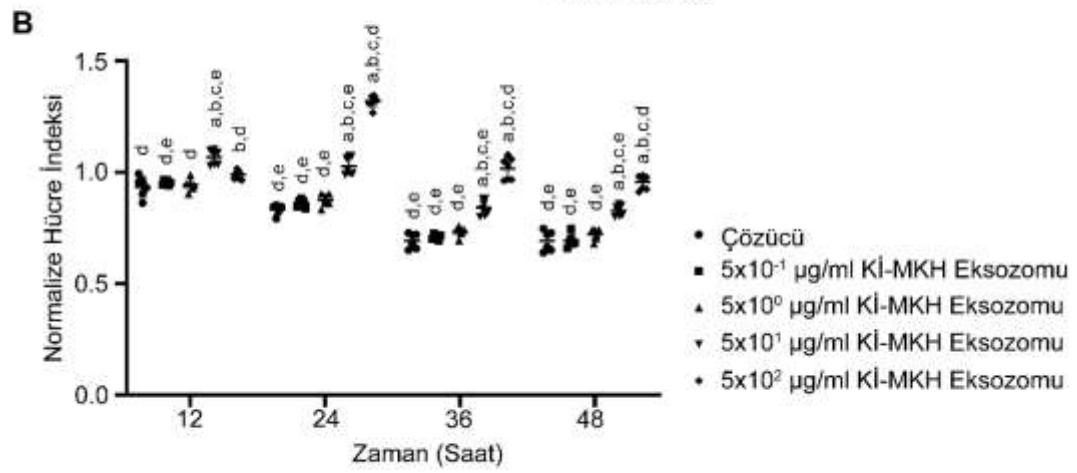
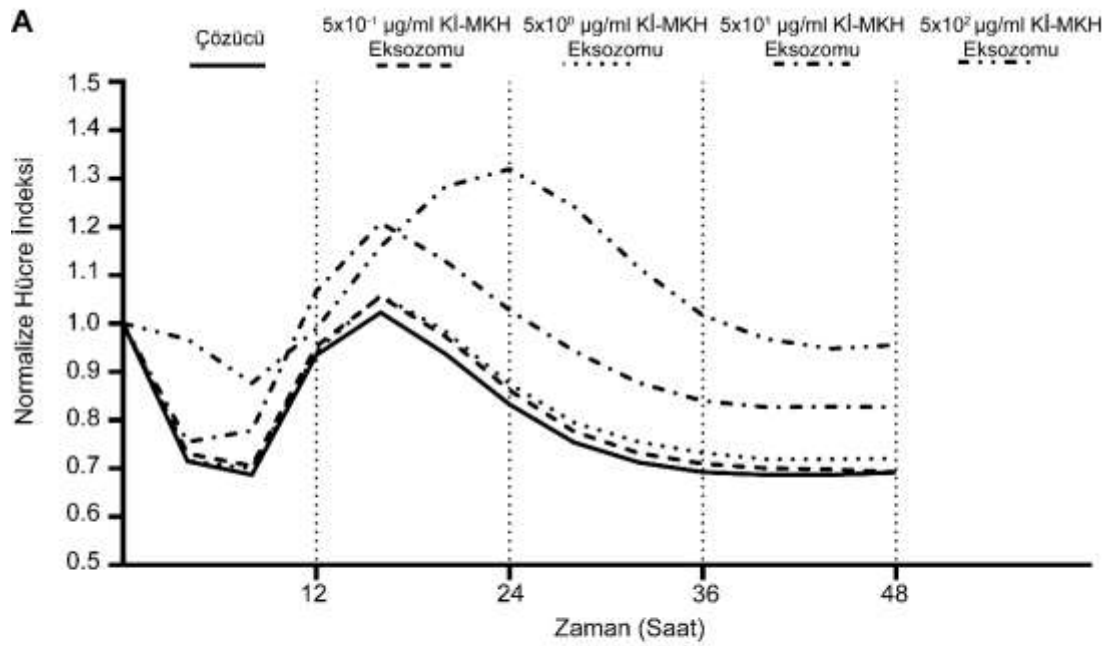
Allojenik Kİ-MKH eksozomları; normal oksijen konsantrasyonlarında  $5 \times 10^1$  ve  $5 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$  dozlarda PTE hücrelerinin proliferasyon hızını 12. saatten 48. saate kadar kontrole göre artırmıştır (12. saat için  $p=0.0003$  ve  $p<0.0001$ , 24. saat için  $p<0.0001$  ve  $p<0.0001$ , 36. saat için  $p=0.021$  ve  $p=0.0132$ , 48. saat için  $p=0.0028$  ve  $p=0.0002$ ; **Şekil 4.3.4.1.**). Eksozomlar  $5 \times 10^1$  ve  $5 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$  dozunda uygulandığında 12, 24, 36 ve 48. saatlerde birbiriyle benzer etki gösterdi. Eksozomlar  $5 \times 10^{-1}$  ve  $5 \times 10^0$   $\mu\text{g/ml}$  dozlarda uygulandığında 12, 24, 36 ve 48. saatlerde kontrole göre PTE hücrelerinin proliferasyonunu artırmamıştır (**Şekil 4.3.4.1.**). Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının; normal oksijen konsantrasyonlarında PTE hücreleri üzerindeki proliferatif ED50'si 26. saatte  $7.0409 \mu\text{g/ml}$  olarak ölçülmüştür ( $R^2 = 0.99926$ , **Şekil 4.3.4.1.**). “ED50 x Zaman” grafiğinde ED50'nin belirgin biçimde yükselmeye başladığı deneyin 26. saati, veziküllerin proliferatif etkisini kaybetmeye başladığı nokta olarak görülmektedir (**Şekil 4.3.4.1.**).



Şekil 4.3.4.1. Allojenik KI-MKH eksozomlarının normal oksijen konsantrasyonunda PTE hücreleri üzerindeki proliferatif tedavi penceresinin belirlenmesine ait grafikler.

(A) On beş dakika aralıklarla ölçülen hücre indeksleri ile oluşturulmuş proliferasyon grafiğinde Kİ-MKH eksozomlarının normal oksijen koşullarında  $5 \times 10^1$  ve  $5 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$  dozlarında PTE hücrelerini daha yüksek hücre indeksi değerlerine ulaştırdığı izlenmiştir. (B) Eksozomlar bu dozlarda PTE hücrelerinin proliferasyon hızını 12, 24, 36 ve 48. saatlerde kontrole göre anlamlı biçimde artırmıştır. (C) “ED50 x Zaman” grafiğinde ED50’nin belirgin biçimde yükselmeye başladığı deneyin 26. Saati ( $\uparrow$ ), veziküllerin proliferatif etkisini kaybetmeye başladığı nokta olarak belirlenmiştir. (D) Eksozomların normal oksijen koşullarında 26. saatte proliferatif ED50 değeri akut hipoksi koşullarında  $7.0409 \mu\text{g/ml}$  olarak ölçülmüştür. (B) grafiğinde a, kontrole göre anlamlı; b,  $5 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı; c,  $5 \times 10^0 \mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı; d,  $5 \times 10^1 \mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı; e,  $5 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı.

Allojenik Kİ-MKH eksozomları; hipoksi koşullarında  $5 \times 10^1$  ve  $5 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$  dozlarında PTE hücrelerinin proliferasyon hızını 12, 24, 36 ve 48. saatlerde kontrole göre anlamlı biçimde artırmıştır (12. saat için  $p < 0.0001$  ve  $p = 0.0215$ ; 24. saat için  $p = 0.01$  ve  $p < 0,0001$ ; 36 saat için  $p < 0,0001$  ve  $p < 0,0001$ ; 48 saat için  $p < 0,0001$  ve  $p < 0,0001$ ; **Şekil 4.3.4.2. B**).  $5 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$  dozunda uygulanan eksozomların PTE hücrelerindeki proliferatif etkisi 12, 24, 36 ve 48. saatlerde  $5 \times 10^1 \mu\text{g/ml}$  dozuna göre daha yüksek olarak saptanmıştır (12. Saat için  $p = 0.003$ , 24. Saat için  $p < 0.0001$ , 36. Saat için  $p < 0.0001$ , 48. Saat için  $p < 0.0001$ ; **Şekil 4.3.4.2. B**). Eksozomlar  $5 \times 10^{-1}$  ve  $5 \times 10^0 \mu\text{g/ml}$  dozlarında uygulandığında 12, 24, 36 ve 48. saatlerde kontrole göre PTE hücrelerinin proliferasyon hızını değiştirmemiştir (**Şekil 4.3.4.2.**). Eksozomların normal oksijen koşullarında tespit edilen tedavi penceresinin sonlandığı 26. saatte proliferatif ED50 değeri akut hipoksi koşullarında  $172.582 \mu\text{g/ml}$  olarak ölçülmüştür ( $R^2 = 0.99999$ , **Şekil 4.3.4.2. C**). Böylece allojenik Kİ-MKH eksozomlarının insan PTE hücrelerindeki tedavi penceresi belirlenerek 3B dinamik mikroakışkan platformundaki iş paketlerinde uygulanmıştır.



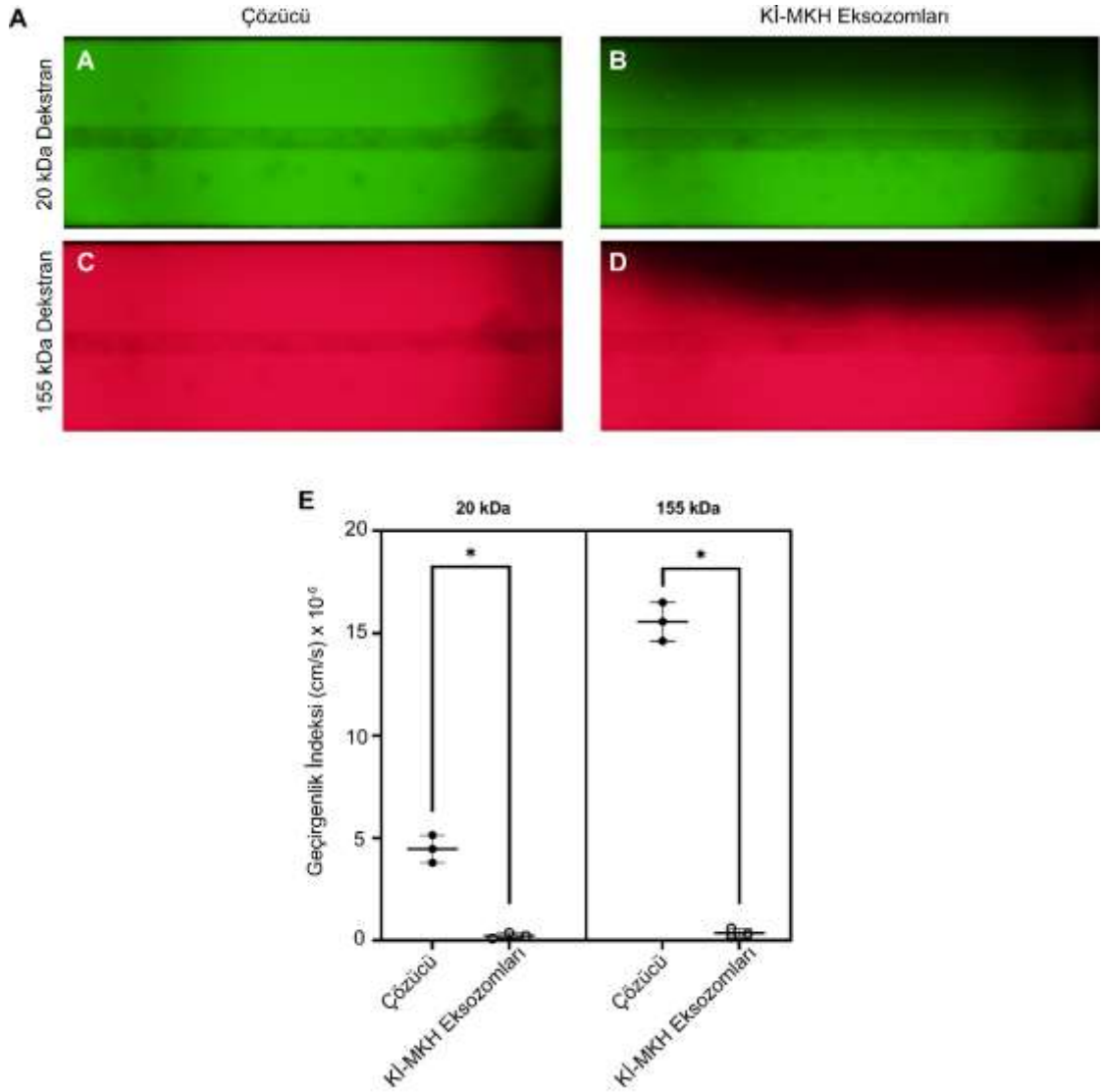
**Şekil 4.3.4.2.** Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının akut hipoksiye bağlı PTE hasarında hücreler üzerindeki proliferatif tedavi penceresinin belirlenmesine ait grafikler. **(A)** On beş dakika aralıklarla ölçülen hücre indeksleri ile oluşturulmuş proliferasyon grafiğinde Kİ-MKH eksozomlarının akut hipoksida  $5 \times 10^1$  ve  $5 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$  dozlarında PTE hücrelerini daha yüksek hücre indeksi değerlerine ulaştırdığı izlenmiştir. **(B)** Eksozomlar bu dozlarda PTE hücrelerinin proliferasyon hızını 12, 24, 36 ve 48. saatlerde kontrole göre anlamlı biçimde artırmıştır. **(C)** Eksozomların normal oksijen koşullarında 26. saatte proliferatif ED50 değeri akut hipoksi koşullarında 172.582  $\mu\text{g/ml}$  olarak ölçülmüştür. **(B)** grafiğinde a, kontrole göre anlamlı; b,  $5 \times 10^{-1}$   $\mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı; c,  $5 \times 10^0$   $\mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı; d,  $5 \times 10^1$   $\mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı; e,  $5 \times 10^2$   $\mu\text{g/ml}$  doza göre anlamlı.

#### **4.4. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları 3B Mikroakışkan Platformunda Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarının Yapısal ve İşlevsel Düzeyde Etkileri**

##### **4.4.1. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde Epitel Bariyer Bütünlüğünü Sağlamıştır**

Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının ED50'de uygulanmasının, akut hipoksiye bağlı PTE hasarı modelinde 24. saatte artan epitel geçirgenliğini çözücü grubu ile karşılaştırıldığında 20 kDa dekstrana karşı 20 kat ( $p=0.0004$ , **Şekil 4.4.1.1.**), 155 kDa dekstrana karşı 45 kat ( $p<0.0001$ , **Şekil 4.4.1.1.**) azalttığı, böylece bariyer bütünlüğünü koruduğu gösterilmiştir.

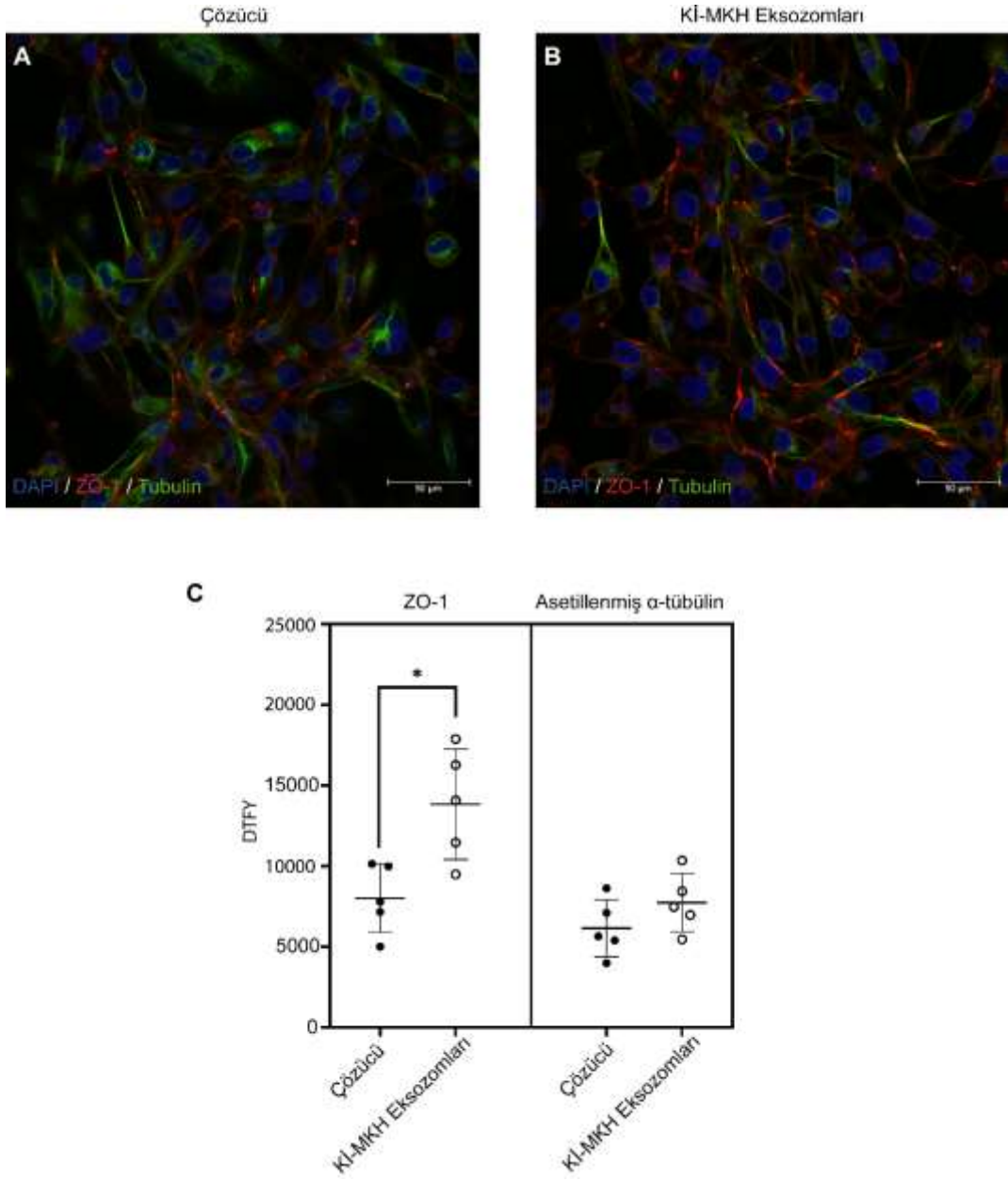




**Şekil 4.4.1.1.** Akut hipoksiye bağlı PTE hasarında allojenik KI-MKH eksozomlarının epitel geçirgenliğine etkisinin değerlendirilmesine ait floresan mikrograflar (**A-D**) ve saçılım grafiği (**E**). Yeşil renkte izlenen FITC işaretli 20 kDa dekstran ve kırmızı renkte izlenen TRITC işaretli 155 kDa dekstran moleküllerinin çözücü uygulandığında (**A, C**) ekstrasellüler matriks kanalına (üst) geçtiğine, KI-MKH eksozomları uygulandığında (**B, D**) ise minimal geçiş izlendiğine dikkat ediniz. Epitelin 20 kDa ve 155 kDa dekstran molekülüne karşı hesaplanan geçirgenlik indeksi değerleri saçılım grafiği (**E**) olarak verilmiştir. (Orijinal büyütme x100). (\*)  $p < 0.05$ .

#### **4.4.2. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde ZO-1 İmmün İşaretlenmesini Artırmış, Asetillenmiş $\alpha$ -Tübülün'ü Değiştirmemiştir**

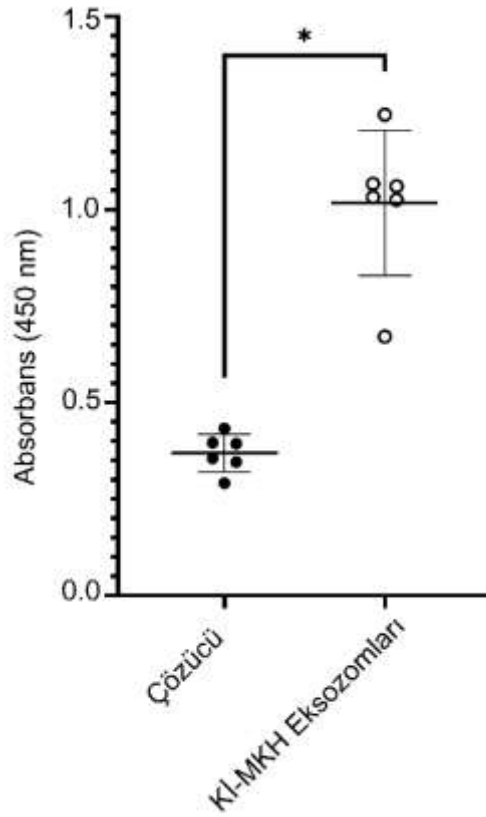
Akut hipoksiye bağlı olarak 3B mikroakışkan platformundaki PTE hücreleri arasındaki lateral yüzey bağlantılarının hasarı nedeniyle bu bölgelerde granüler ZO-1 görüntüsünün, allojenik Kİ-MKH eksozomu uygulaması ile kısmen devamlılık kazandığı izlenmiştir (**Şekil 4.4.2.1. A**). Allojenik Kİ-MKH eksozomu tedavisi, PTE hücrelerinde akut hipoksi hasarı sonrasında 24. saatte ZO-1 DTFY'sini çözücü grubuna göre anlamlı düzeyde artırmıştır ( $p=0.0121$ , **Şekil 4.4.2.1. A-B**). Akut hipoksik hasar oluşturulan 3B mikroakışkan platformundaki insan PTE hücreleri allojenik Kİ-MKH eksozomu tedavisi sonrası asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün işaretlenmesini benzer biçimde sürdürmüştür (**Şekil 4.4.2.1.**) DTFY'sinde gruplar arasında anlamlı fark izlenmemiştir (**Şekil 4.4.2.1. A-B**).



**Şekil 4.4.2.1.** Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarında ZO-1 ve asetillenmiş  $\alpha$ -tübülin immün işaretlemesine etkisini gösteren floresan mikrograflar (**A**, **B**) ve saçılım grafiği (**C**). Kİ-MKH eksozomları akut hipoksiye bağlı PTE hasarında 24. saatte ZO-1 immünreaktivitesini çözücüye göre arttırmıştır. (**B**) de kırmızı renkte ZO-1 işaretlenmesinin kısmi devamlılık kazandığına dikkat ediniz. Görüntüler konfokal mikroskopta elde edilmiştir (Orijinal büyütme x400) (\*)  $p < 0.05$ .

#### 4.4.3. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde Epitel Hücrelerinin Proliferasyon Hızını Artırmıştır

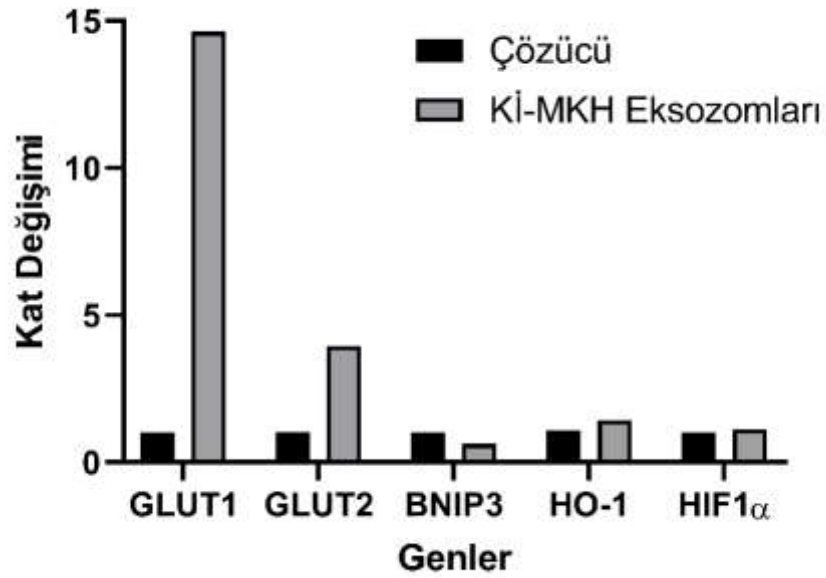
Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının ED50'de uygulanması, hipoksiye bağlı hasar modelinde çözücü grubu ile karşılaştırıldığında PTE hücrelerinin proliferasyon hızını 24. saatte anlamlı olarak artırmıştır ( $p < 0.0001$ , Şekil 4.4.3.1.).



Şekil 4.4.3.1. 3B dinamik mikroakışkan platformunda allojenik Kİ-MKH eksozomları akut hipokside PTE hücre proliferasyonunu 24. saatte artırdığını gösteren saçılım grafiği. (\*)  $p < 0.05$ .

#### 4.4.4. Allojenik Kİ-MKH Eksozomları Akut Hipoksiye Bağlı PTE Hasarı Modelinde GLUT1, GLUT2, HO-1 ve HIF1 $\alpha$ Gen İfadelerini Artırmış; BNIP3'ü Azaltmıştır

Allojenik Kİ-MKH eksozomları akut hipoksizde tedavi dozunda uygulandığında, GLUT1, GLUT2, HO-1 ve HIF1 $\alpha$  genlerinin ifadenme düzeylerini çözücü grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla 14.64, 2.95, 1.43 ve 1.12 kat artırmış, BNIP3 geninin ifadenmesini ise 0.62 kat azaltmıştır (Şekil 4.4.4.1.).



Şekil 4.4.4.1. Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarında hücrelerdeki GLUT1, GLUT2, BNIP3, HO-1 ve HIF1 $\alpha$  genlerinin ifadenmesine etkilerini gösteren bar grafiği. Deney her grupta n=3 örnek havuzlanarak tek tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

**Bu tez çalışması kapsamında;** insan böbrek PTE hücreleri ile oluşturulan 3B dinamik pompasız mikroakışkan yongası platformunda akut hipoksi modeli oluşturularak başarıyla optimize edilmiş; ultrasantrifüj ile izole edilen, homojen boyut, protein miktarı ve CD63, CD81 yüzey belirteçlerinin varlığı açısından

karakterize edilmiş Kİ-MKH eksozomlarının gerçek zamanlı tedavi penceresi 172.582 µg/ml ve 0-26 saat olarak belirlenmiş; allojenik Kİ-MKH'lerin ED50'de uygulanması 3B dinamik pompasız mikroakışkan yonga platformundaki akut hipoksi modelinde böbrek PTE ZO-1 immünreaktivitesini artırarak bariyer bütünlüğünü sağlamış, hücreleri sayıca çoğaltmış, BNIP3 düzeyini azaltıp GLUT1 ve 2 düzeylerini artırmış, böylece allojenik Kİ-MKH eksozomlarının klinikte kişiselleştirilmiş hücresele tedavi adayı olarak kullanımı öncesinde etki penceresi gerçek zamanlı olarak ortaya koyulmuştur. Böylece iskemik ABH için klinik kullanımda allojenik ya da otojenik hücresele terapötik aday olarak moleküler yapı ve işleve olumlu etki profili doğrulanmıştır. Aşağıdaki bölümde; çalışmanın çıktıları kapsamında her araştırma sorusuna verilen yanıt alt başlıklar halinde sırasıyla tartışılacaktır. Son bölümde çalışmanın sınırlamaları verilerek yaygın etkisi ortaya koyulacaktır.

**Üç boyutlu dinamik pompasız mikroakışkan yonga platformunda, normal oksijen konstantasyonunda 8. günden itibaren insan PTE hücrelerinin sızdırmaz bir epitel bariyeri oluşturduğu gösterilmiştir.** İdrardan elde edilen primer (28) ve ticari RPTEC(26) insan böbrek PTE hücrelerinde doz ve zaman bağımlı akut nefrotoksitesinin araştırıldığı ABH modellerinde aynı 3B mikroakışkan platformunda, 7 ila 10. gün arasında sızdırmaz epitel tabakasının oluşturulduğu bildirilmiştir (26, 28). Çalışmamızda 8. günde başarıyla oluşturulan sızdırmaz PTE bariyeri, önceki çalışmalarda ilaca bağlı nefrotoksitesite modellerinde ilaç uygulanmayan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında mikroakışkan platformunun zaman bağımlı standart çalışma performansını doğrulamaktadır. Bu tez çalışmasında 8. günde sızdırmaz epitel bariyerinin oluşturulması ile fizyolojik koşulların sağlanması, 3B mikroakışkan platformunun 48 saat süreyle %1 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub> ve %94 N<sub>2</sub> koşullarında inkübe edilmesi yoluyla akut hipoksiye bağlı PTE hasarı güvenle oluşturulmuştur.

**Akut hipoksinin insan böbrek PTE hücrelerine yapı düzeyinde etkileri değerlendirildiğinde; 3B dinamik pompasız mikroakışkan platformunda 24 ve 48. saatlerde epitel bariyerini bozduğu; 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde 48. saatte ZO-1, 24 ve 48. saatlerde asetilenmiş  $\alpha$ -tübülin immünreaktivitesini**

**azalttığı gösterilmiştir.** Akut hipoksi, **epitel bariyerinin geçirgenliğini** 3B dinamik pompasız mikroakışkan platformunda normoksiye göre 24. saatte 20 kDa ve 155 kDa dekstrana karşı sırasıyla 6 ve 4 kat, 48. saatte 20 kDa dekstrana karşı 2 kat artırmıştır. Bariyer bütünlüğünün değerlendirilmesi için kullanılan 20 kDa molekül ağırlığındaki dekstran, vücutta fizyolojik koşullarda glomerüler filtrasyon bariyerinden (GFB) geçen küçük moleküller için işleyen seçici bariyere karşılık gelmektedir (99). Uygulanan 155 kDa molekül ağırlığındaki dekstran ise ABH gibi patolojik koşullarda GFB'den sızan büyük molekülleri temsil etmektedir (99). İlaça bağlı ABH'nı benzer 3B mikroakışkan sistemlerde araştıran çalışmalarda uygulanan farklı nefrotoksik ajanların doz ve zaman bağımlı olarak epitel bariyerinin bütünlüğüne verdiği hasar 20 ve 155 kDa dekstran moleküllerinin geçişi üzerinden hesaplanmıştır (26, 30, 108, 109). Daha önce 3B dinamik pompasız mikroakışkan platformunda iskemik ABH modeli oluşturulmadığından PTE geçirgenliği GFB açısından 3B yapısal olarak değerlendirilmemiştir. Bu tez çalışmasında 3B dinamik pompasız mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarında 24 ve 48 saatlerde bariyer bütünlüğünün kaybı küçük ve büyük moleküller için ayrı ayrı, zaman bağımlı geçirgenlik indeksi ile ilk kez hesaplanmıştır. Bariyer bütünlüğüne ait bu kantitatif çıktılar 3B dinamik pompasız mikroakışkan platformunda iskemik ABH'yı modelleyecek ileri teragnostik çalışmalara standart oluşturacağı için önemlidir.

Akut hipoksi, 3B dinamik mikroakışkan platformunda insan PTE hücrelerinin arasındaki lateral sıkı bağlantı birimlerinin ana bileşeni olan (110) **ZO-1** proteininin immünreaktivitesini 48. saatte normal oksijen konsantrasyonlarına göre azaltmıştır. Ayrıca epitel hücrelerinde sağlıklı koşullarda izlenen diffüz retiküler ZO-1 işaretlenme paterni, akut hipoksi ile devamlılığını yitirmiştir. Bu granüler görünüm PTE hücreleri arasındaki sıkı bağlantı birimlerinin 3B devamlılığının bozulması lehine değerlendirilmiştir. Diğer yandan akut hipokside 2B statik hücre kültür düzeneğindeki ZO-1 immün işaretlenmesindeki benzer granüler paterne rağmen işaretlenme yoğunluğu (DTFY) değişmemiştir. Sıkı bağlantı birimlerinin ana bileşeni olarak (110) ZO-1'in 3B dinamik kültür düzeneğindeki işaretlenme kaybı, epitel kutupluluğunun kaybı, lateral bağlantıların gevşemesine karşılık gelmektedir. Bu bulgu 48. Saatte 20 ve 155 kDa ağırlığındaki dekstran moleküllerinin geçişine ait bozulma ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Küçük ve büyük dekstran

moleküllerine bağlı geçiş indeksi 24. saatten itibaren artmakta, epiteldeki ZO-1 ilişkili sıkı bağlantıların kaybı 48. Saatten itibaren hipoksiye bağlı hasara eşlik etmektedir. Konvansiyonel 2B statik PTE hücre kültürü düzeneğinde 24. ve 48. saatlerde hipoksiye bağlı granüler ZO-1 immün işaretlemesine ait veriler 3B mikroakışkan platformundakiler ile paraleldir. Diğer yandan bu grupta tek düzlemde statik koşullardaki kültür düzeneğinin hücre kutupluluğunu korumadaki sınırlılığı nedeniyle ZO-1 immün işaretlenme yoğunluğundaki (DTFY) değişiklikler izlenmemiştir. Bu bulgu 3B mikroakışkan platformunun iskemik ABH'nın *ex vivo* koşullarda fizyolojik ortama uygun olarak modellenmesindeki etkinliğini desteklemiştir. Daha önce vücut dışında tasarlanmış sepsis (111) ve ilaca (31) bağlı ABH modellerinde insan kökenli farklı PTE hücre hatlarında ZO-1 immün işaretlenme yoğunluğu üzerinden epiteldeki sıkı bağlantıların bütünlüğü değerlendirilmiştir. *In vitro* koşullarda sepsise bağlı ABH'nın incelendiği çalışmada (111) renal karsinom hastalarından manyetik hücre ayrıştırma yöntemiyle elde edilen konvansiyonel 2B statik insan böbrek tübülü epiteli hücre kültürü düzeneğinde sepsis tanımlı hasta plazması ile oluşturulan sepsis koşullarının ZO-1 immünreaktivitesini sağlıklı plazma uygulanan gruba göre %50 oranında azalttığı saptanmıştır. Çalışmamızda 2B statik HK-2 hücre kültürü düzeneği akut hipoksiye bağlı hasarı ZO-1 immün işaretlenmesinin granüler paterni ile gösterilmiş olmakla beraber işaretlenme yoğunluğundaki kaybı tespit edememiştir. İskemik ABH'ya bağlı akut hasar; yaygın metabolik, enflamatuvar yıkım ile giden sepsise bağlı ABH ile karşılaştırıldığında daha hafif bir profil sergilediği için (112) konvansiyonel tek katlı statik hücre kültürleri moleküler olarak hasarı saptamada yetersiz kalabilmektedir. Nitekim, bu gerekçeyle tasarlanarak optimize edilen 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı olarak lateral bağlantı birimleri bozulan PTE hücrelerinin ZO-1 ile granüler paternine eşlik eden DTFY düşüşü hassasiyetle saptanmıştır. Çok sayıda ilaca bağlı ABH'nın karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği 3 kanallı 3B dinamik mikroakışkan platformunda (31) insan RPTEC hücre hattında nefrotoksik ajanların doz ve zaman bağımlı olarak ZO-1 DTFY'sini %20-90 oranında azalttığı saptanmıştır. Akut hipoksinin iki kanallı 3B dinamik mikroakışkan platformunda incelendiği çalışmamızda insan HK-2 hücrelerindeki ZO-1 DTFY'sinin 48. saatte %50 oranında kaybının saptanması, her iki çalışmada ortak



olarak kullanılan 3B dinamik mikroakışkan platformunun PTE hücrelerinin lateral sıkı bağlantı birimlerini değerlendirmedeki etkinliğini ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasında 3B dinamik mikroakışkan platformu, normal oksijen konsantrasyonunda **asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün** DTFY'sini 48 saat süreyle 2B statik düzeneğe göre anlamlı olarak yüksek tutmuştur. Asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün immünreaktivite yoğunluğu 0 ila 48. saatte 2B statik düzenekte değişiklik göstermeden düşük düzeyde devam etmiştir. Bu bulgu, 3B mikroakışkan platformunun sağladığı fizyolojik makaslama kuvvetinin PTE hücre iskeletini koruyarak hücre polaritesini 48 saat süreyle sürdürdüğünü göstermiştir. Akışın sağlanmadığı PTE hücrelerinin tek katlı düzenekte besiyeri ile desteklendiği statik ortam, polarite kaybını önleyemediği için kültürün ilk saatinden itibaren optimal asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün işaretlenmesini sağlamamaktadır. Akut hipoksi, 3B dinamik mikroakışkan platformunda insan PTE hücrelerinin asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün DTFY'sini 24 ve 48 saatte 0. saate göre sırasıyla %80 ve %70 oranında azaltmıştır. Buna karşın, 2B statik kültür düzeneğinde olasılıkla hücre polaritesi korunamadığından, akut hipoksi koşullarında PTE hücrelerinin asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün immünreaktivite yoğunluğu 0 ila 48. Saatler arasında normoksi koşulları ile benzer şekilde hep düşük seyretmiş ve değişim göstermemiştir. Keele ve ark. (113) insan RPTEC hücrelerinde asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün işaretlenmesinin 150 RPM hızında çalışan çalkalayıcı ile makaslama kuvveti sağlanan 2B dinamik ortamda 48. saatte statik koşullara göre arttığını ve %1 oksijen konsantrasyonu ile oluşturulan akut hipoksiye bağlı olarak azaldığını kalitatif olarak immünfloresan mikrograflarda göstermiştir. Çalışmamızda 7 dakikada bir 8° açılı intermittan akış sağlayan 3B dinamik mikroakışkan platformunun insan PTE hücrelerinin asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün floresan yoğunluğunu normal oksijen konsantrasyonunda kantitatif olarak 48 saat süreyle 2B statik düzeneğe göre yüksek düzeyde sürdürmesi diğer çalışmanın bulguları ile uyumlu olup Keele ve ark.nın 2B dinamik düzenekte sağladığı akış koşullarını fizyolojiye uygun 3B ortamda standardize ederek hücre polaritesini koruyucu etkisini kantitatif olarak ortaya koymuştur. Önceki çalışma ile benzer olarak %1 O<sub>2</sub> konsantrasyonu ile oluşturduğumuz akut hipoksi modeli, 3B dinamik mikroakışkan platformunda 2B dinamik düzeneğe benzer şekilde 48. saatte asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün immünfloresan işaretlenmesini normoksi koşullarına göre azaltmıştır. Bizim asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün

verilerimiz kantitatif farklara dayanmakta olup, diğerk çalışmaya ek olarak 24. ve 48. saat sonuçlarını içermektedir. Bu çıktıları tez kapsamında akut renal hipoksi için optimize edilen 3B dinamik mikroakışkan platformunun standardizasyon aşamalarından PTE polaritesi ile ilgili koşulun sağlanabildiğini ortaya koymuştur.

**Akut hipoksinin insan böbrek PTE hücrelerinin işlevine etkileri değerlendirildiğinde; 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde 24. ve 48. saatlerde proliferasyonu azalttığı, HO-1 ve BNIP3 düzeylerini artırdığı, HIF1 $\alpha$  ve GLUT2 düzeylerini azalttığı, GLUT1 düzeyini değiştirdiği gösterilmiştir.** Akut hipoksi, PTE hücre sayılarını 3B mikroakışkan platformunda 24. saatte %49 ve 48. saatte %78, 2B statik düzenekte 24. saatte %40 ve 48. saatte %97 oranında azaltmıştır. Her iki kültür düzenesinde 0. saatten 48. saate doğru hücre sayıları benzer biçimde zaman bağımlı olarak anlamlı düşüş göstermiştir. Bu bulgular %1'lik akut hipoksi modelinin 48. saatlik süreyle işlerliğini doğrulamıştır. Konvansiyonel 2B statik koşullarda insan PTE hücre sayılarının hipoksiye bağlı olarak zaman içerisinde 3B dinamik koşulların sağlandığı mikroakışkan platformdakine göre daha keskin düşüşler gösterdiği izlenmiştir. Ticari insan (114), ticari fare (59, 115-117) ve primer fare(118) PTE hücreleri 2B statik düzeneklerde kültüre edildiklerinde %1 O<sub>2</sub> konsantrasyonu ile oluşturulan akut hipoksinin hücre sayılarını 24. saatte %30-95 (114-116, 118) ve 48. saatte %65-99 (117, 118) aralığında azalttığı bildirilmiştir. Adı geçen çalışmalardaki hipoksi protokolünün benzer biçimde tetrazolyum tuzları aracılı WST-1 tekniği ile değerlendirildiği çalışmamızda insan HK-2 hücre hattı ile elde edilen 24 ve 48. saat proliferasyon verileri yukarıdaki aralığa denk gelmektedir. Yani verilerimiz bilinen bilgileri doğrular niteliktedir. İlaça bağlı ABH'nın değerlendirildiği 3 kanallı 3B dinamik mikroakışkan platformlarında (26, 29-31) insan PTE hücrelerinde benzer şekilde 48. saatte %10-99 aralığında proliferasyon düşüş oranları bildirilmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan 3 kanallı 3B dinamik pompasız mikrokakışkan platformu, tez kapsamındaki platform ile benzerdir. Bu tez çalışmasında %1 oksijen temelli akut hipoksi modeli ilk kez 3B dinamik pompasız mikrokakışkan platformuna uygulanmış ve PTE hücrelerinin proliferasyon hızının normoksi koşulları ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, uygulanan hipoksi modelinin platformda başarıyla işlediği ve 48.

saate kadar hücre proliferasyon hızlarının normal koşullardakine göre anlamlı olarak düştüğünü ilk kez ortaya koymuştur.

Akut hipoksi, PTE hücresi hasarına özgü **BNIP3** ve **HO-1** genlerinin ifadelemesini 3B dinamik mikroakışkan platformunda normal oksijen konsantrasyonuna göre 24. saatte sırasıyla 1.19 kat ve 2.91 kat, 2B statik düzenekte sırasıyla 3.08 kat ve 4.66 kat artırmıştır. Aynı zamanda mitofaji belirteci (59-61) olan BNIP3 ve mitokondriyal homeostaziyi düzenleyen (58) HO-1, akut hipoksiye bağlı PTE hasarını gösteren temel biyobelirteçler olarak bildirilmektedir. Akut anoksinin *in vitro* koşullarda 2B statik düzenekte sıçan primer PTE hücrelerinde BNIP3 gen ifadesini 6. saatte 5 kat ve 24 saatte 2.5 kat artırdığı (59), 60 dakikalık cerrahi iskemi ile oluşturulan akut hipoksinin ise fare böbreğinde 48. Saatte BNIP3 ifadesini 4 kat ve bununla korele şekilde PTE hasarı histolojik skorunu normale göre 3 kat artırdığı gösterilmiştir (119). Bu tez çalışmasında %1'lik O<sub>2</sub> konsantrasyonunda 2B statik düzenekte kültüre edilen insan HK-2 PTE hücreleri 24. Saatte önceki *in vitro* çalışmadaki anoksik koşullarla benzer BNIP3 gen ifadesi artışı göstermiştir. Çalışmamızda 3B dinamik mikroakışkan platformunda uygulanan akut hipoksi BNIP3 gen ifadesini 24. saatte 2B düzenektekinin yarısı seviyesinde yükseltmiştir. Çalışmamızda elde edilen BNIP3 gen ifade artış miktarı Ishihara ve ark.'nın *in vivo* koşullarda akut iskemi reperfüzyon sonrası 48. saatte fare böbreğinde saptadıkları artışa göre düşüktür. Yukarıdaki deney düzenekleri, hipoksi protokolü ve zaman noktalarının tez çalışmasında test edilen 3B dinamik mikroakışkan platformundakine göre farklılıklar göstermesi sağlıklı bir karşılaştırma yapılmasını zorlaştırmaktadır. Otuz dakikalık cerrahi iskemi uygulaması, fare böbreğinde HO-1 geninin ifadenmesini 4. saatte 8.3 kat ve 18. saatte 5.7 kat artırmış, bu artışın sırasıyla plazma kreatinin düzeylerinde 1.73 kat ve 1.8 kat artış ile korele olduğu gösterilmiştir (120). Tez kapsamında akut hipoksiye bağlı PTE hasarında 24. saatte 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde HO-1 geninin kat artış oranı koşullar birbirinden farklı da olsa cerrahi iskemi çalışması ile uyumlu olup *in vivo* modelde renal HO-1 gen ifadesinin plazma kreatinin seviyesi ile korelasyonu, akut hipoksik hasar biyobelirteci olarak 3B dinamik mikroakışkan platformunda değerlendirilmesinin geçerliliğini desteklemektedir.

Çalışmamız kapsamında insan PTE hücrelerindeki **HIF1 $\alpha$**  ifadelenmesi akut hipoksiye bağlı olarak hem 3B dinamik hem de 2B statik düzeneklerde 24. saatte normoksi ile karşılaştırıldığında sırasıyla 0.8 kat ve 0.79 kat azalmıştır. *In vitro* ve *in vivo* koşullarda oluşturulan renal akut hipoksi modellerinde HIF1 $\alpha$  ifadelenmesinin ABH'nın ilk 24 saatinde hızla yükselip tekrar düştüğü izlenmiştir (62, 63). Hipoksi döneminde böbrek parankimi ve stromasında erken dönem HIF1 $\alpha$  ifadelenmesinin sonucu olarak HO-1 ve BNIP3 üretimi artmakta, BNIP3 mitofajide rol oynamakta (59-61), HO-1 ise mitokondriyal homeostaziyi düzenlemektedir (58). Önceki çalışmalarda HO-1 ve BNIP3 artışının negatif geribildirimi ile HIF1 $\alpha$  ifadesinin azalması (58), çalışmamızda akut hipoksi gruplarındaki düşüşü açıklayabilir. Diğer yandan, çalışılan deney düzeneği sadece PTE hücrelerini kapsadığından, hipoksidede böbrek parankimindeki HIF1 $\alpha$  sentez artışını bu hücreler sağlayamıyor olabilir. Tez kapsamında yalnız PTE hücreleri ile ilgili veriler elde edilmiş olup, bu veriler böbrek parankimini temsil etmek için yetersiz olarak değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında oluşturulan akut hipoksi modeli, PTE hücrelerinde 24. saatte **GLUT1** geninin ifadelenmesini 3B dinamik düzenekte normal oksijen koşullarına göre 0.07 kat azaltmış, 2B düzenekte 4.98 kat artırmıştır. PTE hücrelerindeki **GLUT2** geninin ifadelenmesi ise akut hipoksiye bağlı olarak 3B dinamik ve 2B statik düzeneklerde normoksi ile karşılaştırıldığında 24. saatte sırayla 0.15 ve 0.49 kat azalmıştır. Böbrek proksimal tübüllerinde glikoz taşınmasından sorumlu moleküller olarak tanımlanan GLUT1 ve GLUT2, fizyolojik koşullarda proksimal tübülün sırayla S3 ve S1 kısımlarında yerleşen taşıyıcı proteinlerdir (64). GLUT1 apikal yüzden hücre içerisine glikoz taşınımını sağlarken, GLUT2 bazolateral yüzde hücre dışına glikoz taşımaktadır (65). Akut hipoksi koşullarında PTE hücrelerinin artmış glikoz ihtiyacına bağlı uyarıldığı daha önce gösterilen anaerobik glikoliz (4), çalışmamızda GLUT2 gen ifadesini kontrole göre azalmasının nedeni olarak değerlendirilebilir. Diğer yandan glikozu PTE hücresinin içine taşımaktan sorumlu GLUT1 ifadesinin 3B ve 2B düzeneklerde akut hipoksi ile zıt yönde değişiklik göstermesi GLUT2 ile ilgili ifade değişimlerini destekler nitelikte değildir. Deney sayısının azlığı ve olası teknik eksiklikler bu duruma neden olmuş olabileceğinden iş paketinin daha büyük örneklemele tekrar edilmesi uygun olacaktır. Sonuç olarak

yüksek maliyetleri nedeniyle sınırlı mikroakışkan yongası sayısı tez çalışması kapsamındaki PCR deney sayılarını kısıtladığından bu iş paketi bir ön biyobelirteç çalışması olarak gerçekleştirilmiş olup çıktılarının geçerlilik ve güvenilirliği sınırlı olarak değerlendirilmiştir. Ancak ön çalışma niteliğinde de olsa BNIP3, HO-1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 ve GLUT2 biyobelirteçlerinin akut hipoksi modelinde 3B dinamik mikroakışkan platformunda insan PTE hücrelerindeki gen ifadenme düzeylerindeki kantitatif değişimlerin beraberce ilk kez bu çalışmayla ortaya koyulması alandaki ileri çalışmalar için önemli bir zemin oluşturmuştur.

**İnsan Kİ-MKH eksozomları ardışık ultrasantrifüj ve filtrasyon yöntemiyle izole edilmiş; homojen boyut, protein miktarı ve CD63, CD81 yüzey belirteçlerinin varlığı açısından başarıyla karakterize edilmiştir.** İzole edilen Kİ-MKH eksozomları; ultrastrüktürel seviyede 33.55-67.33 nm boyut aralığında **tipik çift zarla çevrili, homojen küresel veziküller** olarak görüntülenmiş, BCA ile **3694 $\pm$ 439.2  $\mu$ g/ml protein konsantrasyonuna** ulaşıldığı gösterilmiştir. İskemik ABH'da farklı kaynaklarda elde edilmiş allojenik ya da otojenik MKH eksozomu tedavilerini kapsayan çalışmalarda (42, 45, 46, 66, 67, 77) izole edilen eksozomların boyutları 20-150 nm aralığında raporlanmıştır. Eksozom boyutlarına ait aralığın geniş ve çalışmalar arasında heterojen olması, izolasyon için uygulanan ardışık ultrasantrifüj + filtrasyon (42, 45, 66), tek başına ardışık ultrasantrifüj (46, 67) ve yoğunluk gradyanlı ultrasantrifüj (77) protokollerine bağlı olarak değerlendirilebilir. Ardışık ultrasantrifüj, 0,22  $\mu$ m'lik por çapında filtrasyon ve çoklu yıkama adımları içeren izolasyon protokolümüz hücre artıkları ve diğer ekstrasellüler vezikül çeşitlerinden kaçınmayı amaçlayarak tasarlandığından, saf ve homojen bir eksozom popülasyonu ile sonuçlanmıştır. Nitekim, tez kapsamında elde edilen Kİ-MKH eksozomları spesifik yüzey belirteci olan **CD63** (121) ile konjuge boncuklar ile yakalandıktan sonra spesifik **CD81** (121) ile izotip kontrolüne göre 2.63 kat daha yüksek OFY'de işaretlenme göstermiştir. İnsan epidural yağ dokusu (122), göbek kordonu (123), amniyon sıvısı (106) ve kemik iliği (106) kökenli MKH eksozomlarında akım sitometrisi (106, 122, 123) ve western blot teknikleri (9, 66, 124, 125) ile CD81 işaretlenmesi %63-98.4 aralığında bildirilmiştir. CD81 OFY'sine ait verilerimiz ile istatistiksel hesaplama yapılmamış olmasına rağmen

işaretili eksozom yüzdelerimiz (Şekil 4.3.3.1.) önceki verilerle uyum göstermektedir. Sonuç olarak çalışmamız kapsamında elde edilen insan Kİ-MKH eksozomları; güncel çalışmalarda benimsenen üçlü karakterizasyon stratejisi (126) doğrultusunda morfoloji, protein konsantrasyonu ve yüzey belirteçleri açısından başarıyla karakterize edilmiştir. Böylece insan Kİ-MKH eksozomları allojenik potansiyel hücrel terapötik olarak iskemik ABH protokolünde güvenle uygulanabilmiştir.

**Kİ-MKH eksozomlarının proliferatif potens analizi, akut hipoksiye bağlı PTE hasarında tedavinin 26 saat süreyle ED50'si 172.582 µg/ml olarak saptanmıştır.**

Mezenkimal kök hücre kökenli eksozomların doz bağımlı etki potansiyeli ile ilgili çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalarda insan kemik iliği (81, 127) ve göbek kordonu (81) MKH kökenli eksozomların *in vitro* koşullarda T lenfosit popülasyonlarının farklılaşmasındaki etkilerinin değerlendirilmesi için immünmodülatör potens analizleri tanımlanmış olsa da proliferatif etki için böbrek hasarını kapsayan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. İskemik ABH'nın *in vivo* modellerinde farklı kaynaklardan elde edilen MKH eksozomlarının allojenik ve otojenik uygulamaları doz ve zaman açısından oldukça heterojen protokolleri kapsamakta olup çalışmaların hiçbirinde gerçek zamanlı tedavi penceresi hesaplanmamıştır (128). *In vitro* koşullarda 2B statik düzeneklerde oluşturulmuş akut hipoksi modellerinde PTE hücrelerinde allojenik ve otojenik MKH eksozomlarının değişen dozlarda uygulamalarının proliferatif etkileri değerlendirilmiş olmakla birlikte (67, 75, 77, 124, 129, 130) tedavi penceresi için gerçek zamanlı potens analizi yapılmamıştır. Bu çalışmalar 3B dinamik mikroakışkan platformunda eksozomların akut hipoksiyi düzeltici etkisinin değerlendirildiği kısımda ayrıntılı olarak tartışılacaktır. Literatürde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda iskemik ABH tedavisi için MKH eksozom uygulamasını içeren çalışmalar incelendiğinde 10-1000 µg/ml'lik ve 0-48 saatlik geniş doz (9, 47, 48) ve zaman aralıkları (49, 50) bildirildiği görülmektedir. Bu noktadan hareketle çalışmamızda allojenik Kİ-MKH eksozomları 48 saat süreyle oldukça geniş bir logaritmik doz aralığında insan PTE hücrelerine hem normoksi hem de akut hipoksi koşullarında uygulandıktan sonra gerçek zamanlı ve impedans temelli proliferatif etki pencereleri hesaplanmıştır. Buna göre ilk kez insan Kİ-MKH eksozomlarının akut hipoksizde PTE hücrelerindeki tedavi penceresi **172.582 µg/ml** ve **0-26 saat** olarak belirlemiştir. Eksozomlar için saptanan ED50

değeri, önceki çalışmalardaki geniş doz aralığının içerisinde yer almakla birlikte, oldukça dar bir doz ve zaman penceresini işaret etmiştir. Çalışmamız kapsamında allojenik Kİ-MKH eksozomlarının tedavi penceresinin yanı sıra hücresel terapötik aday olarak bu veziküllerin yarı ömürleri gerçek zamanlı olarak belirlenmiş; böylece eksojen işaretleme (131), haberci proteinler (132) ve biyoluminesans yöntemlerini (133) geride bırakabilecek yeni bir analiz stratejisi sunulmuştur. Tanımladığımız proliferatif potens analizi, eksozomların güvenli ve standardize klinik kullanımını öncesinde kişiselleştirilmiş kritik bir değerlendirme basamağı teşkil edebilecektir.

**Çalışmamızda allojenik Kİ-MKH eksozomları, 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarı modelinde uygulandıklarında epitel bariyerini ve hücre polaritesini korumuştur.** Allojenik Kİ-MKH eksozomlarının ED50'de uygulanması, akut hipoksiye bağlı PTE hasarı modelinde **epitel geçirgenliğini** 24. saatte çözücü grubuna göre 20 ve 155 kDa dekstrana karşı sırasıyla 20 ve 45 kat azaltmış ve böylece bariyer bütünlüğünü korumuştur. İnsan Kİ-MKH eksozomlarının PTE bariyerinin bütünlüğü üzerindeki etkileri daha önce çalışılmamıştır.

Allojenik Kİ-MKH eksozomları, insan PTE hücrelerinde akut hipoksi hasarında 24. saatte **ZO-1** DTFY'sini çözücü grubuna göre artırmış, asetillenmiş  $\alpha$ -tübülün DTFY'sini değiştirmemiştir. Pan ve ark. (134), fare Kİ-MKH eksozomlarının fare mikrovasküler endotel hücrelerinde 6/24 saatlik hipoksi/reoksijenizasyon hasar modelinde ZO-1 immünreaktivitesini artırdığını göstermiştir. Allojenik anne sütü eksozomları insan intestinal epitel hücrelerinde (135) lipopolisakkarit ile indüklenmiş epitel hasarı ve nekrotizan enterokolit modellerinde ZO-1 mRNA düzeyi ve protein miktarını artırmıştır. Çalışmamızda allojenik Kİ-MKH eksozomlarının epitel bariyerinin bütünlüğünü sağlayıcı ve lateral sıkı bağlantı birimlerinin bileşeni olan ZO-1 işaretlenmesini artırıcı etkileri bağırsak epiteli ve damar endotelinin çalışıldığı önceki çalışmalardaki (134, 135) epitel hasarını onarıcı etkisi ile uyumludur. Çalışmamızda akut hipokside PTE bariyerinin geçirgenliğini ilk kez kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Tez kapsamında allojenik Kİ-MKH eksozomlarının ED50'de uygulanması, 3B dinamik mikroakışkan düzeneğinde akut hipoksinin 24. saatte PTE hücrelerinin proliferasyon hızını kontrol grubuna göre 3

kat artırmıştır. Gerçek zamanlı olarak tedavi penceresi belirlendikten sonra intermittan akış ve fizyolojik makaslama kuvvetleri ile epitel hücre polaritesi ve bariyer bütünlüğünün korunduğu üç boyutlu mikroakışkan yonga platformunda allojenik Kİ-MKH eksozomlarının PTE hücrelerindeki proliferatif etkisi ilk kez bu çalışmada ortaya konmuştur. Benzer mikroakışkan yonga platformlarında daha önce nefrotoksik ajanların insan PTE hücrelerindeki antiproliferatif etkisi ilaca bağlı ABH için araştırılmıştır (23, 29, 136, 137). Bu çalışmalar platformun hipoksi düzeneğinde eksozomlar için işleyebileceği konusunda çalışmamızın dayanak noktasını oluşturmuş, orijinal bulgularımız sistemin işlerliğini doğrulamıştır. Çalışmamızda akut hipoksi ile 3B mikroakışkan platformunda düzeyleri artan BNIP3, HO-1 ve GLUT1, azalan HIF1 $\alpha$  ve GLUT2, allojenik Kİ-MKH eksozomlarının ED50'de uygulanması ile 24. saatte BNIP3 geninin ifadenmesi 0.62 kat azalmış; HO-1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 ve GLUT2 genlerinin ifadenmesi sırasıyla 1.43, 1.12, 14.64 ve 2.95 kat artmıştır. Önceki hedefler kapsamında tartışıldığı gibi, yüksek maliyetleri nedeniyle sınırlı sayıda mikroakışkan yonga sağlanabildiğinden, tez çalışması kapsamındaki PCR deney tekrarları sınırlıdır. Bu nedenle nefroloji kliniğinde eksozomların iyileştirici etkinliğini değerlendirmede oldukça önemli biyobelirteçleri araştıran bu iş paketi bir ön çalışma olarak gerçekleştirilmiş olup çıktılarının geçerlilik ve güvenilirliği sınırlı olarak değerlendirilmiştir. Ancak ön çalışma niteliğinde de olsa BNIP3, HO-1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 ve GLUT2 biyobelirteçlerinin 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı hücre hasarı allojenik kök hücre eksozomlarının iyileştirme etkinliğini gen ifadenme düzeylerindeki kantitatif değişimlerle ilk kez bu çalışmada belirlediğinden translasyonel klinik araştırmalar için temel teşkil etmektedir.

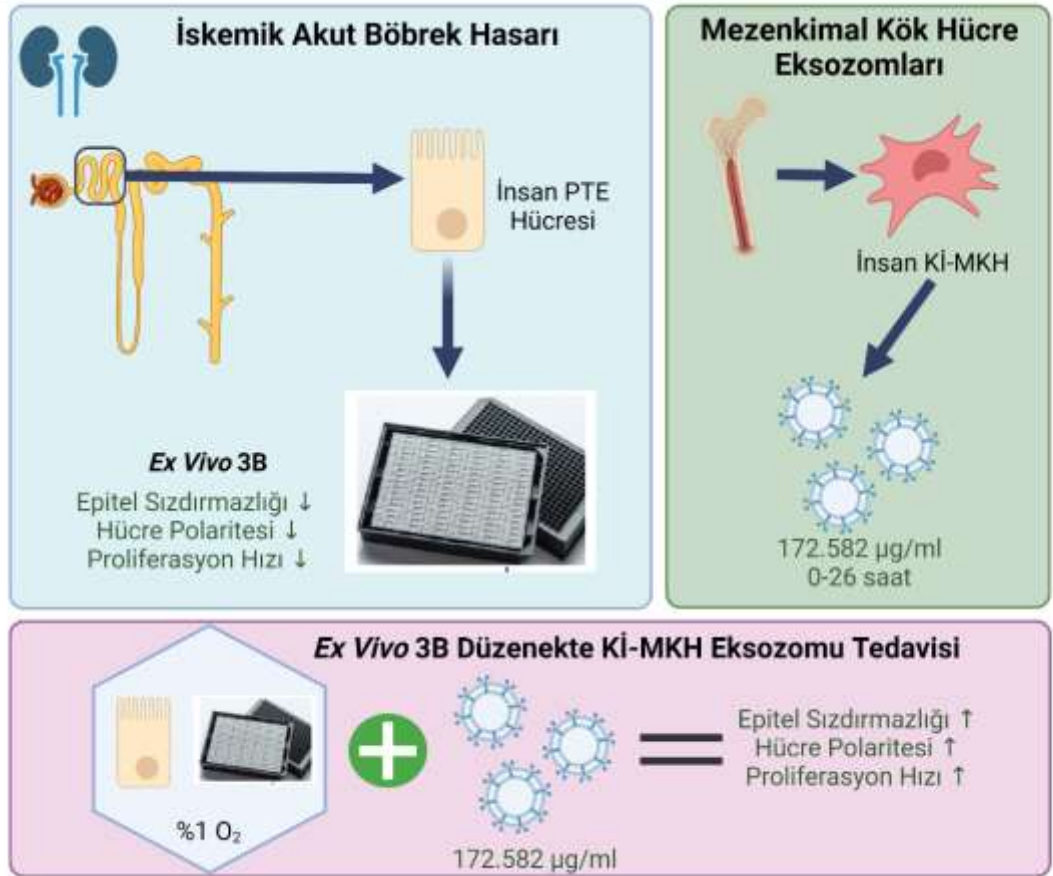
Yukarıda ayrıntılı olarak tartışıldığı üzere giriş bölümünde belirtilen tüm amaç ve hedeflere ulaşılmış olmasına rağmen bu tez çalışması bazı sınırlılıklar içermektedir. Çalışmada allojenik Kİ-MKH eksozomlarının proliferatif potansi ve 3B dinamik mikroakışkan platformunda akut hipoksiye bağlı PTE hasarındaki etkileri *ex vivo* koşullarda ortaya konmuştur. Vücut dışında gerçek zamanlı ve fizyolojik mikroçevreye uygun ortama uygun düzeneklerde uygulanmalarına rağmen tek hücre hattı ile ulaşılan veriler *in vivo* koşullarda çoklu organ ve sistemlerdeki işleyişe birebir karşılık gelmeyebilir. Diğer yandan insan kökenli hücre tedavilerin vücutta



denenmesi etik kurallarla sınırlanmış olup *in vivo* hayvan modelleri de bu tedavilerin etkinliğini belirlemede yetersiz kalabilmektedir (11, 17, 32). Çalışmada kullanılan proliferatif potens analizi, terapötik ajanların gerçek zamanlı tedavi penceresini belirleyerek kliniğe aktarımını sağlayan geçerli bir platform olarak bildirilmektedir (138, 139). Standardize MKH ve PTE hücre hatları insan kökenli olmalarına rağmen hastanın yaş, cinsiyet, genetik ve ırkı ile hastalığın böbreği etkileme derecesinden kaynaklı olarak iskemik ABH'yı tüm hastalar için modellemeyebilir. Buradan hareketle sağlıklı bireyden allojenik ya da iskemik ABH hastalarından otojenik olarak elde edilecek insan MKH eksozomlarının sınırlı sayıda gönüllü iskemik ABH hastasından elde edilecek böbrek PTE hücrelerinde 3B mikroakışkan yonga platformunda hipoksik koşullar için denenmesi, kişiselleştirilmiş hedefli terapötik adaylar olarak nefroloji kliniklerine aktarılmaları için mutlaka gereklidir. Diğer yandan bu çalışma kapsamında eksozomlara ek olarak hücre temelli diğer kişiselleştirilmiş ilaç adaylarını test etmek üzere optimize edilen mikroakışkan platformu prototip olarak klinik araştırmalara sunulmuştur. Çalışmamızda allojenik Kİ-MKH eksozomlarının hasar belirteçleri ve glikoz taşıyıcılarının gen ifadelerinin değerlendirilmesinde tekrar sayılarının azlığı sonuçların güvenilirliğini etkileyebilecek bir kısıtlılık teşkil etmektedir. Yine de biyobelirteçlerin ön çalışma niteliğindeki gen ifadenme düzeylerindeki değişiklikler 3B mikroakışkan platformunda akut hipoksi modelinde ve eksozomların etkisi ile ilgili olarak ilk kez ortaya koyulduğu için literatüre katkıda bulunacaktır.

## SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında 3B mikroakışkan platformunda oluşturduğumuz akut hipoksiye bağlı PTE hasarı modeli ve allojenik Kİ-MKH eksozomlarının tedavi penceresini belirleyen yeni tanımlanmış proliferatif etki analizi; kişiselleştirilmiş hücresel tedavilerde güvenlik, etkililik ve tekrarlanabilirlik odaklı iki aşamalı bir değerlendirme yaklaşımı sağlamaktadır (Şekil 5.1.).



**Şekil 5.1.** Tez çalışması kapsamında sorulan araştırma sorularının yanıtları ve ulaşılan sonuçlar şematize edilmiştir. (Biorender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)

Bu yaklaşımla allojenik Kİ-MKH eksozomları, akut hipoksiye bağlı PTE hasarında belirli doz ve zaman aralığında potansiyel bir hücresel tedavi ajanı olarak ortaya koyulmuştur. Tezin çıktıları ve sağlıklı veya hasta gönüllülere ait materyaller ile gerçekleştirilecek ileri çalışmalar, nefroloji kliniğinde kullanım için faz çalışmalarına geçişte tedavinin güvenliği ve etkililiği konusunda güvence sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Ullah MM, Basile DP. Role of Renal Hypoxia in the Progression From Acute Kidney Injury to Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol.* 2019;39(6):567-80.
2. Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. *Life Sci.* 2020;256:117860.
3. García-Ortuño LE, Bobadilla NA. Integrative View of the Mechanisms that Induce Acute Kidney Injury and its Transition to Chronic Kidney Disease. *Rev Invest Clin.* 2018;70(6):261-8.
4. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210-21.
5. El Sabbahy M, Vaidya VS. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2011;3(5):606-18.
6. Soo JY, Jansen J, Masereeuw R, Little MH. Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(6):378-93.
7. Wilmer MJ, Ng CP, Lanz HL, Vulto P, Suter-Dick L, Masereeuw R. Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening. *Trends Biotechnol.* 2016;34(2):156-70.
8. Nieskens TT, Wilmer MJ. Kidney-on-a-chip technology for renal proximal tubule tissue reconstruction. *Eur J Pharmacol.* 2016;790:46-56.
9. Zhang XF, Wang N, Huang YH, Li Y, Li G, Lin YX, et al. Extracellular vesicles from three dimensional culture of human placental mesenchymal stem cells ameliorated renal ischemia/reperfusion injury. *Int J Artif Organs.* 2021:12.
10. Zhao M, Liu SY, Wang CS, Wang YZ, Wan MH, Liu F, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Mitochondrial Damage and Inflammation by Stabilizing Mitochondrial DNA. *ACS Nano.* 2021;15(1):1519-38.
11. Ingber DE. Is it Time for Reviewer 3 to Request Human Organ Chip Experiments Instead of Animal Validation Studies? *Adv Sci (Weinh).* 2020;7(22):2002030.
12. Shang ZZ, Jiang YB, Guan X, Wang AA, Ma B. Therapeutic Effects of Stem Cells From Different Source on Renal Ischemia- Reperfusion Injury: A Systematic Review and Network Meta-analysis of Animal Studies. *Front Pharmacol.* 2021;12:22.
13. McCafferty K, Forbes S, Thiemermann C, Yaqoob MM. The challenge of translating ischemic conditioning from animal models to humans: the role of comorbidities. *Dis Model Mech.* 2014;7(12):1321-33.
14. Singh AP, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep.* 2012;64(1):31-44.
15. Willis GR, Kourembanas S, Mitsialis SA. Toward Exosome-Based Therapeutics: Isolation, Heterogeneity, and Fit-for-Purpose Potency. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:63.
16. Fazekas B, Griffin MD. Mesenchymal stromal cell ? based therapies for acute kidney injury: progress in the last decade. *Kidney International.* 2020;97(6):1130-40.
17. Rothbauer M, Bachmann BEM, Eilenberger C, Kratz SRA, Spitz S, Holl G, et al. A Decade of Organs-on-a-Chip Emulating Human Physiology at the Microscale: A Critical Status Report on Progress in Toxicology and Pharmacology. *Micromachines (Basel).* 2021;12(5).

18. Ashammakhi N, Wesseling-Perry K, Hasan A, Elkhammas E, Zhang YS. Kidney-on-a-chip: untapped opportunities. *Kidney Int.* 2018;94(6):1073-86.
19. Peired AJ, Mazzinghi B, De Chiara L, Guzzi F, Lasagni L, Romagnani P, et al. Bioengineering strategies for nephrologists: kidney was not built in a day. *Expert Opin Biol Ther.* 2020;20(5):467-80.
20. Cong Y, Han X, Wang Y, Chen Z, Lu Y, Liu T, et al. Drug Toxicity Evaluation Based on Organ-on-a-chip Technology: A Review. *Micromachines (Basel).* 2020;11(4).
21. Ramadan Q, Zourob M. Organ-on-a-chip engineering: Toward bridging the gap between lab and industry. *Biomicrofluidics.* 2020;14(4):041501.
22. Adler M, Ramm S, Hafner M, Muhlich JL, Gottwald EM, Weber E, et al. A Quantitative Approach to Screen for Nephrotoxic Compounds In Vitro. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(4):1015-28.
23. Maass C, Sorensen NB, Himmelfarb J, Kelly EJ, Stokes CL, Cirit M. Translational Assessment of Drug-Induced Proximal Tubule Injury Using a Kidney Microphysiological System. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2019;8(5):316-25.
24. Weber EJ, Lidberg KA, Wang L, Bammler TK, MacDonald JW, Li MJ, et al. Human kidney on a chip assessment of polymyxin antibiotic nephrotoxicity. *JCI Insight.* 2018;3(24).
25. Jang KJ, Mehr AP, Hamilton GA, McPartlin LA, Chung S, Suh KY, et al. Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment. *Integr Biol (Camb).* 2013;5(9):1119-29.
26. Vormann MK, Gijzen L, Hutter S, Boot L, Nicolas A, van den Heuvel A, et al. Nephrotoxicity and Kidney Transport Assessment on 3D Perfused Proximal Tubules. *Aaps j.* 2018;20(5):90.
27. Vriend J, Nieskens TTG, Vormann MK, van den Berge BT, van den Heuvel A, Russel FGM, et al. Screening of Drug-Transporter Interactions in a 3D Microfluidic Renal Proximal Tubule on a Chip. *The AAPS journal.* 2018;20(5):87.
28. Vriend J, Peters JGP, Nieskens TTG, Skovronova R, Blaimschein N, Schmidts M, et al. Flow stimulates drug transport in a human kidney proximal tubule-on-a-chip independent of primary cilia. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020;1864(1):129433.
29. Suter-Dick L, Mauch L, Ramp D, Caj M, Vormann MK, Hutter S, et al. Combining Extracellular miRNA Determination with Microfluidic 3D Cell Cultures for the Assessment of Nephrotoxicity: a Proof of Concept Study. *The AAPS Journal.* 2018;20(5):86.
30. Vormann MK, Vriend J, Lanz HL, Gijzen L, van den Heuvel A, Hutter S, et al. Implementation of a Human Renal Proximal Tubule on a Chip for Nephrotoxicity and Drug Interaction Studies. *J Pharm Sci.* 2021;110(4):1601-14.
31. Vriend J, Vormann MK, Lanz HL, Joore J, Trietsch SJ, Russel FGM, et al. Nephroscreen: A robust and versatile renal tubule-on-a-chip platform for nephrotoxicity assessment. *Current Opinion in Toxicology.* 2021;25:42-8.
32. Hargrove-Grimes P, Low LA, Tagle DA. Microphysiological systems: What it takes for community adoption. *Exp Biol Med (Maywood).* 2021;246(12):1435-46.
33. Tseng WC, Lee PY, Tsai MT, Chang FP, Chen NJ, Chien CT, et al. Hypoxic mesenchymal stem cells ameliorate acute kidney ischemia-reperfusion injury via enhancing renal tubular autophagy. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):22.

34. Zhou S, Qiao YM, Liu YG, Liu D, Hu JM, Liao J, et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells pretreated with erythropoietin accelerate the repair of acute kidney injury. *Cell Biosci.* 2020;10(1):12.
35. Shen B, Liu J, Zhang F, Wang Y, Qin Y, Zhou ZH, et al. CCR2 Positive Exosome Released by Mesenchymal Stem Cells Suppresses Macrophage Functions and Alleviates Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Injury. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9.
36. Massa M, Croce S, Campanelli R, Abba C, Lenta E, Valsecchi C, et al. Clinical Applications of Mesenchymal Stem/Stromal Cell Derived Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of an Acellular Product. *Diagnostics.* 2020;10(12):17.
37. Nargesi AA, Lerman LO, Eirin A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: current status and looming challenges. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:12.
38. Moghadasi S, Elveny M, Rahman HS, Suksatan W, Jalil AT, Abdelbasset WK, et al. A paradigm shift in cell-free approach: the emerging role of MSCs-derived exosomes in regenerative medicine. *J Transl Med.* 2021;19(1):21.
39. Yun CW, Lee SH. Potential and Therapeutic Efficacy of Cell-based Therapy Using Mesenchymal Stem Cells for Acute/chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(7):16.
40. Lee PW, Wu BS, Yang CY, Lee OK. Molecular Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy in Acute Kidney Injury. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
41. Tögel FE, Westenfelder C. Kidney protection and regeneration following acute injury: progress through stem cell therapy. *Am J Kidney Dis.* 2012;60(6):1012-22.
42. Cao JY, Wang B, Tang TT, Wen Y, Li ZL, Feng ST, et al. Exosomal miR-125b-5p deriving from mesenchymal stem cells promotes tubular repair by suppression of p53 in ischemic acute kidney injury. *Theranostics.* 2021;11(11):5248-66.
43. Altun B, Yilmaz R, Aki T, Akoglu H, Zeybek D, Piskinpasa S, et al. Use of Mesenchymal Stem Cells and Darbepoetin Improve Ischemia-Induced Acute Kidney Injury Outcomes. *American Journal of Nephrology.* 2012;35(6):531-9.
44. Zhang ZY, Hou YP, Zou XY, Xing XY, Ju GQ, Zhong L, et al. Oct-4 Enhanced the Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Acute Kidney Injury. *Kidney Blood Press Res.* 2020;45(1):95-108.
45. Lim SW, Kim KW, Kim BM, Shin YJ, Luo K, Quan Y, et al. Alleviation of renal ischemia/reperfusion injury by exosomes from induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med.* 2021.
46. Zhu G, Pei L, Lin F, Yin H, Li X, He W, et al. Exosomes from human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells protect against renal ischemia/reperfusion injury via transferring miR-199a-3p. *J Cell Physiol.* 2019;234(12):23736-49.
47. Zhou YJ, Liu SY, Zhao M, Wang CS, Li L, Yuan YJ, et al. Injectable extracellular vesicle-released self-assembling peptide nanofiber hydrogel as an enhanced cell-free therapy for tissue regeneration. *J Control Release.* 2019;316:93-104.
48. Cao HM, Cheng YQ, Gao HQ, Zhuang J, Zhang WG, Bian Q, et al. In Vivo Tracking of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Improving

- Mitochondria! Function in Renal Ischemia- Reperfusion Injury. *ACS Nano*. 2020;14(4):4014-26.
49. Zhang C, Shang Y, Chen X, Midgley AC, Wang Z, Zhu D, et al. Supramolecular Nanofibers Containing Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) Peptides Boost Therapeutic Efficacy of Extracellular Vesicles in Kidney Repair. *ACS Nano*. 2020;14(9):12133-47.
50. Zhang KY, Chen S, Sun HM, Wang LN, Li HF, Zhao JL, et al. In vivo two-photon microscopy reveals the contribution of Sox9(+) cell to kidney regeneration in a mouse model with extracellular vesicle treatment. *J Biol Chem*. 2020;295(34):12203-13.
51. Nguyen VVT, Witwer KW, Verhaar MC, Strunk D, van Balkom BWM. Functional assays to assess the therapeutic potential of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles*. 2020;10(1):e12033.
52. Mehta RL, Cerdá J, Burdmann EA, Tonelli M, García-García G, Jha V, et al. International Society of Nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet*. 2015;385(9987):2616-43.
53. Luyckx VA, Tonelli M, Stanifer JW. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bull World Health Organ*. 2018;96(6):414-22d.
54. Farrar A. Acute Kidney Injury. *Nurs Clin North Am*. 2018;53(4):499-510.
55. Shu S, Wang Y, Zheng M, Liu Z, Cai J, Tang C, et al. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Kidney Injury and Repair. *Cells*. 2019;8(3).
56. Ow CPC, Ngo JP, Ullah MM, Hilliard LM, Evans RG. Renal hypoxia in kidney disease: Cause or consequence? *Acta Physiol (Oxf)*. 2018;222(4):e12999.
57. Liu BC, Tang TT, Lv LL, Lan HY. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018;93(3):568-79.
58. Jiang N, Zhao H, Han Y, Li L, Xiong S, Zeng L, et al. HIF-1 $\alpha$  ameliorates tubular injury in diabetic nephropathy via HO-1-mediated control of mitochondrial dynamics. *Cell Prolif*. 2020;53(11):e12909.
59. Ishihara M, Urushido M, Hamada K, Matsumoto T, Shimamura Y, Ogata K, et al. Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013;305(4):F495-509.
60. Lin Q, Li S, Jiang N, Jin H, Shao X, Zhu X, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy. *Autophagy*. 2021;17(10):2975-90.
61. Fu ZJ, Wang ZY, Xu L, Chen XH, Li XX, Liao WT, et al. HIF-1 $\alpha$ -BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury. *Redox Biol*. 2020;36:101671.
62. Wang Z, Zhang W. The crosstalk between hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and microRNAs in acute kidney injury. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2020;245(5):427-36.
63. Nangaku M, Rosenberger C, Heyman SN, Eckardt KU. Regulation of hypoxia-inducible factor in kidney disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013;40(2):148-57.
64. Mather A, Pollock C. Glucose handling by the kidney. *Kidney Int Suppl*. 2011(120):S1-6.

65. Vallon V. Glucose transporters in the kidney in health and disease. *Pflugers Arch.* 2020;472(9):1345-70.
66. Alzahrani FA. Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Transl Res.* 2019;11(5):2887-907.
67. Wang C, Zhu G, He W, Yin H, Lin F, Gou X, et al. BMSCs protect against renal ischemia-reperfusion injury by secreting exosomes loaded with miR-199a-5p that target BIP to inhibit endoplasmic reticulum stress at the very early reperfusion stages. *FASEB J.* 2019;33(4):5440-56.
68. Ruan Y, Wang L, Zhao Y, Yao Y, Chen S, Li J, et al. Carbon monoxide potently prevents ischemia-induced high-mobility group box 1 translocation and release and protects against lethal renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney International.* 2014;86(3):525-37.
69. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Nishi H, Aburatani H, Kato H, et al. Metallothionein is upregulated by hypoxia and stabilizes hypoxia-inducible factor in the kidney. *Kidney Int.* 2009;75(3):268-77.
70. Carmago S, Shah SV, Walker PD. Meprin, a brush-border enzyme, plays an important role in hypoxic/ischemic acute renal tubular injury in rats. *Kidney Int.* 2002;61(3):959-66.
71. Combe C, Burton CJ, Dufourco P, Weston S, Horsburgh T, Walls J, et al. Hypoxia induces intercellular adhesion molecule-1 on cultured human tubular cells. *Kidney Int.* 1997;51(6):1703-9.
72. Park J, Heo YJ, Kwon S. Interaction Between Hepatocytes and Proximal Tubular Epithelial Cells in Hypoxia-induced Lipotoxicity. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2022;27(1):30-9.
73. Xing YX, Wang Q, Zhang J, Li WJ, Duan AP, Yang JP, et al. Chromatin accessibility of kidney tubular cells under stress reveals key transcription factor mediating acute and chronic kidney disease. *Febs Journal.* 2021;288(18):5446-58.
74. Li L, Wang RL, Jia YC, Rong RM, Xu M, Zhu TY. Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Renal Ischemic-Reperfusion Injury Through Inhibiting Inflammation and Cell Apoptosis. *Front Med.* 2019;6:8.
75. Zhu FM, Shin O, Pei GC, Hu ZZ, Yang J, Zhu H, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells employed exosomes to attenuate AKI-CKD transition through tubular epithelial cell dependent Sox9 activation. *Oncotarget.* 2017;8(41):70707-26.
76. Lin KC, Yip HK, Shao PL, Wu SC, Chen KH, Chen YT, et al. Combination of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes for protecting kidney from acute ischemia-reperfusion injury. *Int J Cardiol.* 2016;216:173-85.
77. Collino F, Pomatto M, Bruno S, Lindoso RS, Tapparo M, Sicheng W, et al. Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(2):226-43.
78. Morigi M, Rota C, Remuzzi G. Mesenchymal Stem Cells in Kidney Repair. *Methods Mol Biol.* 2016;1416:89-107.
79. Ezquer F, Giraud-Billoud M, Carpio D, Cabezas F, Conget P, Ezquer M. Proregenerative Microenvironment Triggered by Donor Mesenchymal Stem Cells

Preserves Renal Function and Structure in Mice with Severe Diabetes Mellitus. *Biomed Res Int*. 2015;2015:164703.

80. Fang Y, Tian X, Bai S, Fan J, Hou W, Tong H, et al. Autologous transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats by inhibiting oxidative stress, pro-inflammatory cytokines and the p38 MAPK signaling pathway. *Int J Mol Med*. 2012;30(1):85-92.

81. Pachler K, Ketterl N, Desgeorges A, Dunai ZA, Laner-Plamberger S, Streif D, et al. An In Vitro Potency Assay for Monitoring the Immunomodulatory Potential of Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2017;18(7).

82. Liang Y, Duan L, Lu J, Xia J. Engineering exosomes for targeted drug delivery. *Theranostics*. 2021;11(7):3183-95.

83. Wu P, Zhang B, Ocansey DKW, Xu W, Qian H. Extracellular vesicles: A bright star of nanomedicine. *Biomaterials*. 2021;269:120467.

84. Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):170.

85. Zhang Y, Liu Y, Liu H, Tang WH. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*. 2019;9(1):19.

86. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478).

87. Birtwistle L, Chen XM, Pollock C. Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles to the Rescue of Renal Injury. *Int J Mol Sci*. 2021;22(12):27.

88. Nieskens TTG, Sjögren AK. Emerging In Vitro Systems to Screen and Predict Drug-Induced Kidney Toxicity. *Semin Nephrol*. 2019;39(2):215-26.

89. Yeung CK, Himmelfarb J. Kidneys on Chips Emerging Technology for Preclinical Drug Development. *Clin J Am Soc Nephro*. 2019;14(1):144-6.

90. Lin NYC, Homan KA, Robinson SS, Kolesky DB, Duarte N, Moisan A, et al. Renal reabsorption in 3D vascularized proximal tubule models. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(12):5399-404.

91. Zhou M, Ma H, Lin H, Qin J. Induction of epithelial-to-mesenchymal transition in proximal tubular epithelial cells on microfluidic devices. *Biomaterials*. 2014;35(5):1390-401.

92. Sakolish CM, Philip B, Mahler GJ. A human proximal tubule-on-a-chip to study renal disease and toxicity. *Biomicrofluidics*. 2019;13(1).

93. Saleh A, Vormann M, Gijzen L, van Vught R, Trietsch S, Joore J, et al. High-Throughput Kidney Proximal Tubules-on-a-Chip for Predictive Renal Toxicity Screening. *Drug Metab Pharmacok*. 2019;34(1):S55-S.

94. Suter-Dick L, Mauch L, Ramp D, Caj M, Vormann MK, Hutter S, et al. Combining Extracellular miRNA Determination with Microfluidic 3D Cell Cultures for the Assessment of Nephrotoxicity: a Proof of Concept Study. *The AAPS journal*. 2018;20(5):86.

95. Vulto P, Podszun S, Meyer P, Hermann C, Manz A, Urban GA. Phaseguides: a paradigm shift in microfluidic priming and emptying. *Lab on a Chip*. 2011;11(9):1596-602.

96. Gijzen L, Vormann MK, Hutter S, Vriend J, Trietsch SJ, Joore J, et al. 3D NephroScreen: high throughput drug-induced nephrotoxicity screening on a proximal tubule-on-a-chip model. *Toxicology Letters*. 2018;295:S68.



97. Garcia-Perez E, Ryu D, Kim HY, Kim HD, Lee HJ. Human Proximal Tubule Epithelial Cells (HK-2) as a Sensitive In Vitro System for Ochratoxin A Induced Oxidative Stress. *Toxins (Basel)*. 2021;13(11).
98. Gökçinar-Yagci B, Yersal N, Korkusuz P, Çelebi-Saltik B. Generation of human umbilical cord vein CD146+ perivascular cell originated three-dimensional vascular construct. *Microvascular Research*. 2018;118:101-12.
99. Lawrence MG, Altenburg MK, Sanford R, Willett JD, Bleasdale B, Ballou B, et al. Permeation of macromolecules into the renal glomerular basement membrane and capture by the tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(11):2958-63.
100. Dubisova J, Burianova JS, Svobodova L, Makovicky P, Martinez-Varea N, Cimpean A, et al. Oral treatment of 4-methylumbelliferone reduced perineuronal nets and improved recognition memory in mice. *Brain Res Bull*. 2022;181:144-56.
101. Boyacioglu O, Bilgic E, Varan C, Bilensoy E, Nemitlu E, Sevim D, et al. ACPA decreases non-small cell lung cancer line growth through Akt/PI3K and JNK pathways in vitro. *Cell Death & Disease*. 2021;12(1).
102. Kose S, Aerts-Kaya F, Kopru CZ, Nemitlu E, Koskonmaz B, Karaosmanoglu B, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells secrete endocannabinoids that stimulate in vitro hematopoietic stem cell migration effectively comparable to beta-adrenergic stimulation. *Experimental Hematology*. 2018;57:30-41.
103. Clinton J, Yin D, Wells J, Zou C. Comparative analysis of cell proliferation, immunosuppressive action, and multi-lineage differentiation of immortalized MSC and MSC from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood 2014.
104. Long C, Cen S, Zhong Z, Zhou C, Zhong G. FOXO3 is targeted by miR-223-3p and promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by enhancing autophagy. *Hum Cell*. 2021;34(1):14-27.
105. Jung MK, Mun JY. Sample Preparation and Imaging of Exosomes by Transmission Electron Microscopy. *J Vis Exp*. 2018(131).
106. Tracy SA, Ahmed A, Tigges JC, Ericsson M, Pal AK, Zurakowski D, et al. A comparison of clinically relevant sources of mesenchymal stem cell-derived exosomes: Bone marrow and amniotic fluid. *J Pediatr Surg*. 2019;54(1):86-90.
107. Yersal N, Kose S, Horzum U, Ozkavukcu S, Orwig KE, Korkusuz P. Leptin promotes proliferation of neonatal mouse stem/progenitor spermatogonia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020;37(11):2825-38.
108. Englezakis A, Gozalpour E, Kamran M, Fenner K, Mele E, Coopman K. Development of a hollow fibre-based renal module for active transport studies. *J Artif Organs*. 2021;24(4):473-84.
109. Nieskens TTG, Persson M, Kelly EJ, Sjogren AK. A Multicompartment Human Kidney Proximal Tubule-on-a-Chip Replicates Cell Polarization-Dependent Cisplatin Toxicity. *Drug Metab Dispos*. 2020;48(12):1303-11.
110. Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol*. 2020;30(10):805-17.
111. Cantaluppi V, Medica D, Quercia AD, Dellepiane S, Figliolini F, Virzi GM, et al. Perfluorocarbon solutions limit tubular epithelial cell injury and promote CD133(+) kidney progenitor differentiation: potential use in renal assist devices for sepsis-associated acute kidney injury and multiple organ failure. *Nephrol Dial Transplant*. 2018;33(7):1110-21.

112. Peerapornratana S, Manrique-Caballero CL, Gomez H, Kellum JA. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. *Kidney Int.* 2019;96(5):1083-99.
113. Keele GR, Prokop JW, He H, Holl K, Littrell J, Deal AW, et al. Sept8/SEPTIN8 involvement in cellular structure and kidney damage is identified by genetic mapping and a novel human tubule hypoxic model. *Sci Rep.* 2021;11(1):2071.
114. Yu W, Mao QF. Inhibition of TRAF1 protects renal tubular epithelial cells against hypoxia/reoxygenation injury. *Journal of Mens Health.* 2021;17(3):167-73.
115. Wang Z, Guan W, Han Y, Ren H, Tang X, Zhang H, et al. Stimulation of Dopamine D3 Receptor Attenuates Renal Ischemia-Reperfusion Injury via Increased Linkage With Galpha12. *Transplantation.* 2015;99(11):2274-84.
116. Zhao WY, Han S, Zhang L, Zhu YH, Wang LM, Zeng L. Mitochondria-targeted antioxidant peptide SS31 prevents hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by down-regulating p66Shc in renal tubular epithelial cells. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(3):591-600.
117. Li ZY, Zhu JN, Wan ZH, Li GH, Chen L, Guo YL. Theaflavin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by activating the Nrf2 signalling pathway in vivo and in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2021;134.
118. Biju MP, Akai Y, Shrimanker N, Haase VH. Protection of HIF-1-deficient primary renal tubular epithelial cells from hypoxia-induced cell death is glucose dependent. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(6):F1217-26.
119. Tang C, Han H, Liu Z, Liu Y, Yin L, Cai J, et al. Activation of BNIP3-mediated mitophagy protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis.* 2019;10(9):677.
120. Zager RA, Johnson AC, Becker K. Plasma and urinary heme oxygenase-1 in AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(6):1048-57.
121. Wang L, Liu L, Qian W, Zheng Z. CD5L Secreted by Macrophage on Atherosclerosis Progression Based on Lipid Metabolism Induced Inflammatory Damage. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2022;70(1):10.
122. Sung SE, Seo MS, Kang KK, Choi JH, Lee SJ, Lim JH, et al. Isolation and Characterization of Extracellular Vesicle from Mesenchymal Stem Cells of the Epidural Fat of the Spine. *Asian Spine J.* 2021.
123. Chen J, Chen J, Cheng Y, Fu Y, Zhao H, Tang M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes protect beta cells against hypoxia-induced apoptosis via miR-21 by alleviating ER stress and inhibiting p38 MAPK phosphorylation. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):97.
124. Yuan X, Li D, Chen X, Han C, Xu L, Huang T, et al. Extracellular vesicles from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells (hiPSC-MSCs) protect against renal ischemia/reperfusion injury via delivering specificity protein (SP1) and transcriptional activating of sphingosine kinase 1 and inhibiting necroptosis. *Cell Death Dis.* 2017;8(12):3200.
125. Zahran R, Ghozy A, Elkholy SS, El-Taweel F, El-Magd MA. Combination therapy with melatonin, stem cells and extracellular vesicles is effective in limiting renal ischemia-reperfusion injury in a rat model. *Int J Urol.* 2020;27(11):1039-49.
126. Shekari F, Nazari A, Assar Kashani S, Hajizadeh-Saffar E, Lim R, Baharvand H. Pre-clinical investigation of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles: a systematic review. *Cytotherapy.* 2021;23(4):277-84.

127. Dal Collo G, Adamo A, Gatti A, Tamellini E, Bazzoni R, Takam Kamga P, et al. Functional dosing of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for the prevention of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells*. 2020;38(5):698-711.
128. Teryek M, Doshi A, Sherman LS, Rameshwar P, Jung S, Parekkadan B. Clinical Manufacturing of Human Mesenchymal Stromal Cells using a Potency-Driven Paradigm. *Current Stem Cell Reports*. 2022.
129. Zou X, Gu D, Xing X, Cheng Z, Gong D, Zhang G, et al. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats. *Am J Transl Res*. 2016;8(10):4289-99.
130. Collino F, Lopes JA, Correa S, Abdelhay E, Takiya CM, Wendt CHC, et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Under Hypoxia: Changes in Extracellular Vesicles Secretion and Improvement of Renal Recovery after Ischemic Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2019;52(6):1463-83.
131. Simonsen JB. Pitfalls associated with lipophilic fluorophore staining of extracellular vesicles for uptake studies. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1).
132. Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Kato K, Yamashita T, et al. Quantitative Analysis of Tissue Distribution of the B16BL6-Derived Exosomes Using a Streptavidin-Lactadherin Fusion Protein and Iodine-125-Labeled Biotin Derivative After Intravenous Injection in Mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;104(2):705-13.
133. Jung KO, Youn H, Lee C-H, Kang KW, Chung J-K. Visualization of exosome-mediated miR-210 transfer from hypoxic tumor cells. *Oncotarget*. 2016;8(6).
134. Pan Q, Kuang X, Cai S, Wang X, Du D, Wang J, et al. miR-132-3p priming enhances the effects of mesenchymal stromal cell-derived exosomes on ameliorating brain ischemic injury. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):260.
135. He S, Liu G, Zhu X. Human breast milk-derived exosomes may help maintain intestinal epithelial barrier integrity. *Pediatr Res*. 2021;90(2):366-72.
136. Lin N, Zhou X, Geng X, Drewell C, Hubner J, Li Z, et al. Repeated dose multi-drug testing using a microfluidic chip-based coculture of human liver and kidney proximal tubules equivalents. *Sci Rep*. 2020;10(1):8879.
137. Sakolish CM, Philip B, Mahler GJ. A human proximal tubule-on-a-chip to study renal disease and toxicity. *Biomicrofluidics*. 2019;13(1):014107.
138. Oberg HH, Peters C, Kabelitz D, Wesch D. Real-time cell analysis (RTCA) to measure killer cell activity against adherent tumor cells in vitro. In: Galluzzi L, Rudqvist NP, editors. *Tumor Immunology and Immunotherapy - Cellular Methods, Pt A. Methods in Enzymology*. 6312020. p. 429-41.
139. Yah CS, Simate GS. Engineered nanoparticle bio-conjugates toxicity screening: The xCELLigence cells viability impact. *Bioimpacts*. 2020;10(3):195-203