

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA FGF23 ve
HASTALIĞIN PROGRESYONU ÜZERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
ETKİSİ

Ezgi AKAN

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARDA FGF23 ve
HASTALIĞIN PROGRESYONU ÜZERİNE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
ETKİSİ**

Ezgi AKAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-5982 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı'nda
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

09/07/2024

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Vural Taner YILMAZ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Güzin AYKAL
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz ÖZCAN GÜREL
Antalya Bilim Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun
görölmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/.....
sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Ezgi AKAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca benden bilgi, destek ve yardımını esirgemeyen; sadece bir danışmandan öte bana abla ve anne olan değerli hocam Prof. Dr. Dijle Kipmen Korgun'a;

Hayatım boyunca aldığım her kararda yanımda olan aileme;

Üzerimde en az danışman hocam kadar emeği olan hocalarım Prof. Dr. Akın Yeşilkaya ve Prof. Dr. Emin Türkay Korgun'a;

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerinden Prof. Dr. S. Halide Akbaş, Prof. Dr. Sebahat Özdem, Dr. Öğr. Üyesi İkbâl Özen Küçükçetin ve bana rol model olan sevgili hocam Prof. Dr. Ayşegül Çört ve Dr. Öğr. Üyesi Filiz Özcan Gürel'e;

Sadece doktora sürecimde değil, hayatımın her sürecinde yanımda olan Dr. Nilay Kuşcu, Dr. Bilge Karatoy Erdem, Gizem Akşehir, Ziba Akarcalı, Çağatay Yılmaz, Tuğçe Çeker, Aleyna Öztüzün Ün, Hazal Taş, Damla Aygöl Tekin, Merve Can ve hayatımda her daim var olmasını istediğim tüm dostlarıma ve asistan arkadaşlarıma,

Akademik ve idari her türlü konuda yardımcı olan, güleryüzlü ağabeyim Turhan Tat'a; deneylerimin sorunsuz yürümesinde yardımcı olan, 9 yıllık bu uzun süreç boyunca çok şey öğrendiğim Erol Nizamoğlu, Doğa Besne ve İbrahim Çalışkan'a;

Sevgili hocam Prof. Dr. Leyla Satı Duran başta olmak üzere, Elif Bozkır ve Burhan Çakmaz ile Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına;

Varlıkları için canım kızlarım Luna ve Maya'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç varlığınız ve yardımlarınız ile çok daha kolay ilerledi. İyi ki varsınız.

Hep sağlık, başarı, şans ve mutlulukla var olun.

ÖZET

Amaç: Kronik böbrek hasarının (KBH) erken teşhisi ve tedavisi, progresyonu ve ekstrarenal komplikasyonlarının önlenmesi açısından önemlidir. Deneysel çalışmalar mezenkimal kök hücrelerin (MKH) KBH modellerinde böbrek fonksiyonlarını iyileştirme potansiyelini ortaya çıkarmıştır. FGF23, KBH tanısı için önerilen biyobelirteçlerden biridir. Çalışmamızda nefrektomi yapılarak sıçanlarda kronik böbrek hastalığı oluşturulmuş ve bu sıçanlara insan plasentasından elde edilen MKH enjekte edildi. MKH'lerin terapötik etkileri, sıçanların böbreklerinde, FGF23 ve Klotho üzerinden değerlendirildi.

Yöntem: Term plasentalarındaki amniyon membranından MKH izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen hücreler için karakterizasyon ve yönlendirilme deneyleri yapıldı. 5/6 nefrektomi modeli yapılarak KBH modeli oluşturuldu. MKH enjekte edilmiş ve edilmemiş sıçanların böbrek dokusunda Western Blot protokolü ile protein; Real-time PCR metodu ile gen düzeyinde FGF23 ve Klotho analizleri gerçekleştirildi. ELISA yöntemi ile serum FGF23 ve α -Klotho düzeyleri; kolorimetrik metod ile idrarda albümin/kreatinin oranı ve fosfat düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Nefrektomi yapılan gruplarda, FGF23 gen ve protein ekspresyonlarında kontrol gruplarına kıyasla bir artış gözlemlendi. MKH verilen sıçanlarda, MKH verilmemiş KBH'li gruplara kıyasla FGF23 ekspresyonunda azalma belirlendi. MKH verilen gruplarda, nefrektomi gruplarına kıyasla α -Klotho protein ve gen düzeylerinde azalma belirlendi. ELISA bulgularına göre ise serum α -Klotho seviyeleri, nefrektomi grubu dokularda, kök hücre verilen gruplara kıyasla düşük olarak belirlendi.

Sonuç: Serum ve idrarda ölçülebilir bir biyobelirteç olan FGF23 KBH ilerlemesinde önemli role sahiptir. FGF23'ün albüminüri oluşumuna karşı oynadığı rol FGF23 ve koreseptörü olan α -Klotho üzerinden değerlendirilmiş ve bu rol üzerine MKH etkisi incelenmiştir. Çalışmamızın, KBH progresyonu ve MKH'lerin KBH üzerine terapötik etkisini araştıran çalışmalara yol göstereceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, kronik böbrek hastalığı, FGF23, Klotho

ABSTRACT

Objective: Early diagnosis and treatment of chronic kidney injury (CKD) is important for preventing its progression and extrarenal complications. Experimental studies have revealed the potential of mesenchymal stem cells (MSCs) to improve renal function in CKD models. FGF23 is one of the biomarkers suggested for CKD diagnosis. In our study, chronic kidney disease was induced in rats by nephrectomy and MSCs obtained from human placentas were injected into these rats. The therapeutic effects of MSCs were evaluated in the kidneys of rats via FGF23 and Klotho.

Method: MSCs were isolated from the amniotic membrane in term placentas. Characterization and guidance experiments were performed for the obtained cells. A CKD model was created by performing a 5/6 nephrectomy model. Protein analyses were performed with Western Blot protocol in the kidney tissues of rats injected with and without MSCs; FGF23 and Klotho analyses were performed at the gene level with Real-time PCR method. Serum FGF23 and α -Klotho levels were determined by ELISA method; Albumin/creatinine ratio and phosphate levels in urine were measured by colorimetric method.

Results: In nephrectomy groups, an increase was observed in FGF23 gene and protein expressions compared to control groups. In MSC-administered rats, a decrease in FGF23 expression was determined compared to CKD groups that did not receive MSC. In MSC-administered groups, a decrease in α -Klotho protein and gene levels was determined compared to nephrectomy groups. According to ELISA findings, serum α -Klotho levels were determined to be lower in nephrectomy group tissues compared to stem cell-administered groups.

Conclusion: FGF23, a measurable biomarker in serum and urine, has an important role in CKD progression. The role of FGF23 against albuminuria formation was evaluated through FGF23 and its coreceptor α -Klotho, and the effect of MSCs on this role was examined. We believe that our study will guide studies investigating CKD progression and the therapeutic effects of MSCs on CKD.

Keywords: Mesenchymal stem cell, chronic kidney disease, FGF23, Klotho

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek	3
2.1.1. Böbreğin Genel Yapısı	4
2.1.2 Böbrek Hasarı	5
2.1.3. Proteinüri ve Albüminüri Kavramları	6
2.1.4. Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)	7
2.2. Kök Hücreler	7
2.2.1. Kök Hücrelerin Oluşumu ve Farklılaşması	8
2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler	8
2.3. Plasenta	10
2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kronik Böbrek Hasarında Uygulanması	10
2.5. Kalsiyum ve Fosfor Metabolizması	13

2.6. Fosfatürik Hormonlar	13
2.6.1. FGF23	13
2.6.2. Klotho	15
2.7. Tez Çalışmasının Amacı	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Term Plasentalarındaki Amniyon Membranından Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu	20
3.2. Hücrelerin Flow Sitometre ile Karakterizasyonu	20
3.3. Hücrelerin Yönlendirme Deneyleri.....	21
3.4. Subtotal Nefrektomi Modelinin Oluşturulması	21
3.5. Western Blot Protokolü	23
3.6. SDS-PAGE Metodu	24
3.7. Real-Time PCR Protokolü.....	26
3.8. Serum FGF23 ve Klotho Düzeyinin Ölçülmesi.....	27
3.9. İdrar Albümin/ Kreatinin Düzeyinin Ölçülmesi	28
3.10. İdrar Fosfat Atılımının Ölçülmesi.....	28
3.11. İstatistiksel Analizler.....	28
4. BULGULAR	29
4.1. İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin FACS Analiz Sonuçları	29
4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Yönlendirme Sonuçları	31

4.3. Western Blot Bulguları.....	31
4.3.1. FGF23 Protein Ekspresyonu	31
4.3.2. α -Klotho Protein Ekspresyonu	32
4.4. Real-Time PCR Bulguları	33
4.4.1. FGF23 mRNA Ekspresyonu	33
4.4.2. α -Klotho mRNA Ekspresyonu	34
4.5. Kit Ölçüm Sonuçları	35
4.5.1. Serum FGF23 Düzeyi Ölçümü.....	35
4.5.2. Serum α -Klotho Düzeyi Ölçümü.....	36
4.5.3. İdrar Fosfat Ölçümü.....	36
4.5.4. İdrar Albümin/Kreatinin Oranı Ölçümü	37
5. TARTIŞMA.....	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2. 1. GFH ve Albüminüri sınıflandırması.....	6
Tablo 3. 1. Ayırma jeli hazırlamak için gerekli kimyasallar ve miktarları.....	25
Tablo 3. 2. Toplama jeli hazırlamak için gerekli kimyasallar ve miktarları.....	25
Tablo 3. 3. Western Blot yönteminde kullanılan antikorlar ve seyreltmeleri.....	26
Tablo 3. 4. Real-time PCR deneyi için kullanılan oligonükleotid primerler.....	28

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Böbreğin genel yapısı.....	3
Şekil 2. 2. Nefron yapısı ve bölümleri.....	4
Şekil 2. 3. Mezenkimal kök hücre kaynaklı doku, organ ve yapılar	10
Şekil 2. 4. FGF23'ün klasik olmayan etkileri	15
Şekil 2. 5. Klotho'nun yapısı.....	17
Şekil 2. 6. Böbrekte FGF23 ve Klotho'nun rolü	18
Şekil 4. 1. İzole edilen mezenkimal kök hücrelerin FACS analiz sonuçları.....	30
Şekil 4. 2. İzole edilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma boyamaları.....	31
Şekil 4. 3. FGF23 protein ekspresyonları.	32
Şekil 4. 4. Klotho protein ekspresyonları.....	33
Şekil 4. 5. FGF23 mRNA düzeyleri.	34
Şekil 4. 6. α -Klotho mRNA düzeyleri.	35
Şekil 4. 7. Serum FGF23 düzeyleri.	35
Şekil 4. 8. Serum α -Klotho düzeyleri	36
Şekil 4. 9. İdrar fosfat düzeyleri.....	37
Şekil 4. 10. İdrar albümin/kreatinin oranı.....	38

SİMGELER ve KISALTMALAR

ASC: Adipoz Kaynaklı Kök Hücre

BSA: Bovin Serum Albümin

DN: Diyabetik Nefropati

DNMT1: DNA Metiltransferaz 1

EMT: Epitelden Mezenkimale Geçiş

FGF23: Fibroblast Büyüme Faktörü 23

FGFR: FGF Reseptörü

GFH: Glomerüler Filtrasyon Hızı

KBH: Kronik Böbrek Hasarı

LXA4: Lipoksin A4

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

PTH: Paratiroid Hormonu

PPAR-A: Peroksizom Proliferatörü İle Aktive Olan Reseptör-A

rFGF23: Rekombinant FGF23

SDS-PAGE: Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDBH: Son Dönem Böbrek Hastalığı

SHPT: Sekonder Hiperparatiroidizm

TGF- β : Transforme Edici Büyüme Faktörü- β

ISCT: Uluslararası Hücre ve Gen Terapisi Derneği

1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Kronik böbrek hastalığı (KBH) kademeli olarak geri dönüşü olmayan böbrek hasarı ile karakterize olan, dünya çapında 850 milyon insanı etkileyen oldukça yaygın evrensel bir sağlık sorunudur. KBH'nin erken teşhisi ve tedavisi, progresyonu ve ekstrarenal komplikasyonlarının önlenmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte, mevcut KBH biyobelirteçlerinin çoğu yeterince duyarlı değildir ve erken evrede hastalığı tanımak için kullanılamaz. Bu nedenle böbrek hastalıklarını hafifletmek, iyileştirmek veya önlemek ve hastaların hayatta kalmasını ve yaşam kalitesini iyileştirmek için yeni ve daha iyi tedavi seçeneklerinin araştırılması zorunludur.

Kök hücreler (KH'ler), kendi kendini yenileme ve belirli koşullar altında çeşitli fonksiyonel hücrelere dönüşme yetenekleri ile tanımlanır. Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) çeşitli dokulardan izole edilebilir, çoklu hücre soylarına ayrılabilir ve inflamasyon ve bağışıklık tepkilerini iyileştiren benzersiz immünomodülatör özelliklere sahiptir. Son yıllarda, deneysel çalışmalar MKH'lerin çeşitli KBH modellerinde böbrek fonksiyonlarını iyileştirme potansiyelini ortaya çıkarmıştır ve birçok klinik çalışma KBH'de güvenlik ve etkinliğini göstererek bazı mekanizmalar yoluyla böbrek hastalığını tedavi ettiğini ortaya koymuştur.

Fibroblast Büyüme Faktörü 23 (FGF23), 10 yılı aşkın bir süredir nefroloji araştırmalarının ilgi odağı olmuştur. Esas olarak kemikteki osteositler ve osteoblastlar tarafından salgılanan ancak aynı zamanda tükürük bezleri, mide ve çok daha düşük konsantrasyonlarda iskelet kası, beyin, meme bezi, karaciğer ve kalp gibi diğer dokular tarafından da ifade edilen fosfatürik bir hormondur. Bu zamana kadar yapılan çalışmalarla FGF23 seviyelerinin, özellikle KBH'si olan hastalarda kardiyovasküler mortalite ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Önceki çalışmalar, dolaşımdaki çözünür α -Klotho'nun KBH tanısı için yararlı bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, dolaşımdaki α -Klotho, FGF23 ve diğer mineral metabolizması belirteçleri arasındaki ilişkiye ilişkin veriler sınırlıdır.

Bu çalışmada ilk aşamada nefrektomi yapılarak sıçanlarda kronik böbrek hastalığı oluşturuldu ve bu sıçanlara insan plasentasından elde edilen olan mezenkimal kök hücreler enjekte edildi. Mezenkimal kök hücrelerin, kronik böbrek hasarı üzerindeki terapötik etkisi, önemli bir biyobelirteç olan FGF23 ve FGF23'ün koreseptörü olan

Klotho üzerinden değerlendirildi. Bu amaçla; MKH enjekte edilmiş ve edilmemiş sıçanlarda serum FGF23 ve Klotho düzeyleri ile ELISA yöntemi ile; idrar albümin/kreatinin oranları ve idrarda fosfat atılım düzeyleri kolorimetrik kit ile, FGF23 ve Klotho protein ve gen ekspresyon düzeyleri ise Real-time PCR ve Western Blot yöntemleriyle belirlendi.

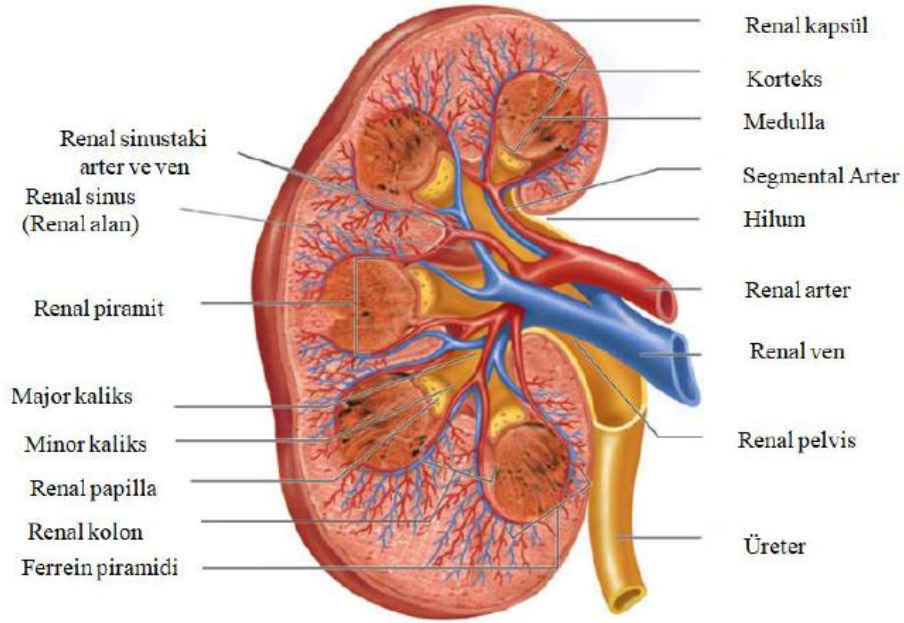


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek

Böbrekler, karın boşluğunun arkasında, göğüs kafesinin hemen altında, periton boşluğunun dışında ve lomber bölgenin hemen üzerinde her iki tarafta yer alan işlevsel organlardır. Sağ böbrek, karaciğerin pozisyonu nedeniyle sol böbreğe göre biraz daha aşağıda yer alır ve hacim olarak sol böbrekten biraz küçüktür. Vasküler yapıya sahip olan böbrekler, birçok kan damarı içermektedir. Böbrek, yapısal olarak, korteks, medulla ve pelvis olmak üzere üç bölgeye ayrılarak incelenmektedir. Böbrekler karmaşık organlardır ve normal vücut fonksiyonlarının sürdürülmesinde hayati önem taşır. Böbrek sistemi, vücut sıvılarını dengede tutarak ve diğer organların normal çalışmasını sağlayarak vücudun tüm kısmını etkiler. Böbrek ve böbrek ile ilgili tüm renal bozukluklar her yaşta bireyi etkilemektedir (Wallace, 1998.)

Böbreğin genel yapısı ve birimleri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Böbreğin genel yapısı

(Akan 2018)

Renal kapsül, böbreği çevreleyen dış zardır; ince ama sağlam ve lifli yapıdadır. Kortikal dokunun uzantılarını içeren böbreğin dış bölgesi ise renal korteks olarak tanımlanır; yaklaşık bir milyon nefron içerir. Medulla, böbreğin iç bölgesidir. Medüller piramitler, toplama kanalları tarafından oluşturulan böbreğin iç kısmıdır.

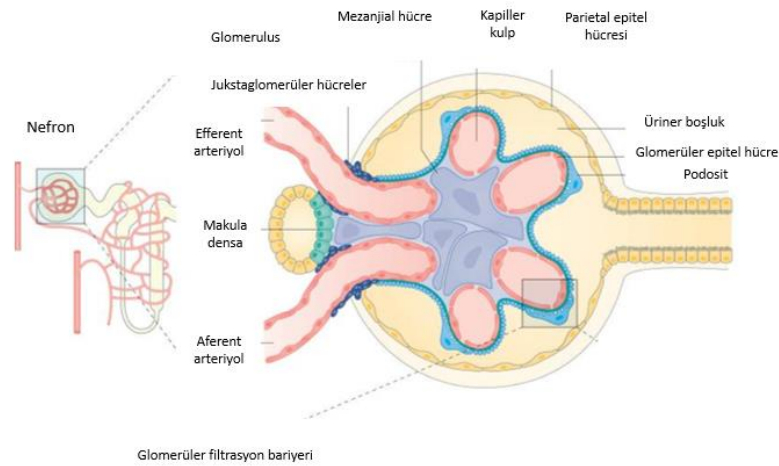
Nefron, böbreklerdeki filtrasyon birimleridir; aynı zamanda böbreğin en küçük yapısal birimi olarak da tanımlanır. Renal arter, aorttan çıkan dallardır; nefron içinde süzülme üzere böbreğe atık dolu kan getirir. Renal ven: filtrelenmiş kanı böbreklerden inferior vena cava'ya çıkarır. Renal kaliks renal pelvisin uzantısı olup idrarı piramitlerden renal pelvise yönlendirirler. Renal pelvis nefrondan idrar toplayan ve üreterin üst ucuna doğru daralan yapıdır. Üreter ise böbrek pelvisinden süzuntu ve idrarı toplayarak mesaneye götürür.

Böbrek gelişimi ve fonksiyonel devamlılığı üriner sistem başta olmak üzere pek çok yapı için kritik öneme sahiptir.

2.1.1. Böbreğin Genel Yapısı

Böbrek, gelişimsel olarak ara mezodermden gelişen karmaşık bir organdır; elektrolit, su ve asit-baz dengesini korur, yabancı ve atık bileşikler uzaklaştırır, kan basıncını düzenler ve hormon salgılar (Trivedi ve Kumar 2021).

Böbreğin fonksiyonel birimi olarak tanımlanan ‘nefron’, bir filtreleme ünitesinden oluşur: önemli besin maddelerinin geri kazanılmasından sorumlu proksimal kısma bölünmüş uzun bir tübül ile bağlantılı olan glomerulus; ozmolarite düzenlemesi için önemli olan bir ara bölüm; ince ayar ve elektrolit dengesinden sorumlu olan son bölüm. Nefron yapısı ve bölümleri ayrıntılı bir biçimde Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. Nefron yapısı ve bölümleri

(Daehn ve ark., 2021)

Memelilerde nefron yapısı, embriyonik ve fetal gelişim sırasında üç böbrek yapısı içinde oluşur: pronefroz, mezonefroz ve metanefroz. Ara mezodermin bu gelişimsel

türevleri, embriyonun ön-arka eksenı boyunca konumlanan, nefrojenik kordon ve nefrik kanal adı verilen ara mezoderm kökenli hücre popölasyonlarından sırayla gelişir. Memelilerde oluşan son ve işlevsel böbrek olan metanefrik böbrek, insan embriyonik aşamalarında gelişmeye başlar, insan fetal gelişiminin geri kalanı boyunca gelişmeye devam eder ve doğumdan kısa bir süre önce sona erer. Böbrek fonksiyonu bir kez edinildikten sonra organizmanın yaşamı için zorunlu olmaya devam eder. Böbrek yapısında yer alan epitel hücreleri, endotel hücreleri, interstisyel hücreler ve bağışıklık hücreleri iç dengeyi korumak için kritik öneme sahiptir (Balzer ve ark., 2022).

2.1.2 Böbrek Hasarı

Böbrek hastalıkları, hızla artan insidansı nedeniyle küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Bu hastalıklar, yaşlanan nüfustaki küresel artışın yanı sıra diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve hipertansiyon gibi etiyolojilerin sıklığındaki artış nedeniyle küresel nüfusun %10'undan fazlasını etkilemektedir (Liu ve ark. 2020).

Böbrek hastalıkları için rutin bir tedavi olarak, çoklu ilaç tedavisi gören hastaların çoğunda son dönem böbrek hastalığına (SDBH) girme süreci tersine çevrilemez ve böbrek replasman tedavisi veya böbrek transplantasyonu gerektirir. Yüksek tıbbi maliyetleri ve hastanın yaşam kalitesi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle diyaliz ideal bir tedavi stratejisi olarak görülmemektedir (Abecassis ve ark., 2008; Wolfe ve ark., 1999).

Böbrek nakli, hastaların kendi böbrek fonksiyonlarını yeniden kazanmalarını sağlar; bununla birlikte, ciddi organ donör kıtlığı ve potansiyel organ reddi kullanımını sınırlar. Böbrek fonksiyonu kötüleştikçe, hiperfosfatemisi gibi mineral metabolizmasında bozukluklar açıkça gelişir. Bu metabolik bozukluklar, kötü prognoz ve sağkalım ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır (Chartsrisak ve ark., 2013). Bu nedenle, KBH'nin erken teşhisi ve tedavisi, progresyonu ve ekstrarenal komplikasyonları önlemek için önemlidir. Bununla birlikte, mevcut KBH biyobelirteçlerinin çoğu yeterince duyarlı değildir ve erken evrede hastalığı tanımak için kullanılamaz (Lopez-Giacoman ve Madero 2015). Tüm bunların sonucu olarak, böbrek hastalıklarını hafifletmek, iyileştirmek veya önlemek ve hastaların yaşam kalitesini iyileştirmek için yeni ve daha iyi tedavi seçeneklerinin araştırılması zorunludur (Liu ve ark., 2020).

2.1.3. Proteinüri ve Albüminüri Kavramları

Proteinüri, idrarla günde 150 mg veya daha fazla proteinin kalıcı olarak atılımını ifade eder. Her ne kadar fizyolojik nedenlerden dolayı (örneğin, aşırı efor sarf etme, ateş sonrası, stres, uzun süreli ayakta durma vb.) idrarda protein bulunabilse de, idrarda kalıcı protein bulunması, böbrek ve idrar yolunu ilgilendiren bir bozukluğun varlığına işaret eder. İdrar proteini seviyesi ne kadar yüksek olursa hayati prognozun o kadar kötü olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Proteinüri, glomerüler filtrasyon hızındaki (GFH) azalma hızını belirleyen bir faktördür ve bu nedenle tedavinin en önemli hedefidir (Iseki 2011).

Albümin, taşıyıcı görevinin yanı sıra kan hacminin ve basıncının korunmasına yardımcı olan bir proteindir. Böbreğin görevi, atık ürünleri uzaklaştırmak için kanı filtrelemektir ve bu filtreler albümin gibi büyük moleküllerin geçmesini engeller. Bu filtrelerin hasar görmesi durumunda ise albümin kandan idrara geçer. Böbrek fonksiyonu azaldıkça, idrara geçen albümin yoğunluğuna göre bu durum ‘mikroalbüminüri’ ve ‘makroalbüminüri’ olarak tanımlanabilir. İdrardaki albüminüri KBH’nin erken bir belirtisi olarak bilinmektedir (Christofides ve Desai 2021).

			Albuminüri kategorileri Tanım ve aralık		
			A1	A2	A3
			Normal – az miktarda yüksek <30 mg/g <3 mg/mmol	İlımlı miktarda yüksek 30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	Şiddetli miktarda yüksek >300 mg/g >30 mg/mmol
GFR kategorileri (mL/dk/1.73 m ²) Tanım ve aralık	G1	Normal veya yüksek	≥90	KBH varsa 1	1
	G2	Az miktarda düşük	60-89	KBH varsa 1	2
	G3a	Az – ılımlı miktarda düşük	45-59	1	3
	G3b	İlımlı - şiddetli miktarda düşük	30-44	2	3
	G4	Şiddetli miktarda düşük	15-29	3	4+
	G5	Böbrek hasarı	<15	4+	4+

Tablo 2.1. GFR ve Albüminüri sınıflandırması (Chen ve ark., 2023)

2.1.4. Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)

Kronik böbrek hastalığı (KBH), kademeli olarak geri dönüşü olmayan böbrek hasarı ile karakterize olan (Khodeir ve ark., 2019) dünya çapında 850 milyon insanı etkileyen oldukça yaygın evrensel bir sağlık sorunudur (A. De Jong ve ark., 2021). KBH hastaları sıklıkla daha kötü kardiyovasküler sonuçlara ve daha yüksek ölüm oranına sahiptir. Yüksek riskli hastaların erken taranması, SDBH'nin önlenmesiyle ilişkili genel maliyetleri iyileştirebilir. Diyaliz maliyetindeki kademeli artış KBH hastaları için endişe vericidir; ancak kronik böbrek hasarı, her bireyde böbrek yetmezliğine kadar ilerlemez. KBH'de olumsuz sonuçların prognozu ve zamanlaması hastadan hastaya değişir. KBH erken tespit edilebilirse, tedavi böbrek fonksiyonlarındaki azalmayı ve böbrek yetmezliğine ilerleme potansiyelini yavaşlatabilir (Zhang ve ark., 2022).

Özellikle Tip 2 diyabetli hastalarda çeşitli tedavilerin kronik böbrek hastalığının ilerleme riskini azalttığı gösterilmiştir. Ancak kronik böbrek hastalığının ilerlemesini yavaşlatan, son dönem böbrek hastalığı ve kardiyovasküler hastalığın gelişimini önleyen ve hayatta kalma süresini uzatan hiçbir tedavi mevcut değildir. Ancak, başlangıçta diğer hastalıkları tedavi etmek için geliştirilen bazı ilaçların, kronik böbrek hastalığının potansiyel tedavileri olabileceğini gösteren kanıtlar günden güne artmaktadır (Mende 2022).

Kronik böbrek hastalığı olan hastalar tıbbi açıdan karmaşıktır ve neredeyse çoğu zaman birden fazla ilaca ihtiyaç duyarlar. KBH'nin erken evrelerinde, nedensel durumlara (başta diyabet ve hipertansiyon) yönelik ve KBH'nin ilerlemesini hafifletmek için tedavi gereklidir. Böbrek fonksiyonu azaldıkça, KBH komplikasyonlarını yönetmek için mineral ve kemik bozuklukları, anemi, hiperlipidemi ve kardiyovasküler komplikasyonların tedavisi de dahil olmak üzere ilave ilaçlar kaçınılmazdır (Mason 2011).

2.2. Kök Hücreler

Kök hücreler, kendi kendini yenileme ve belirli koşullar altında çeşitli fonksiyonel hücrelere dönüşebilme yetenekleri ile tanımlanır ve elde edildikleri kaynaklara göre embriyonal kök hücreler ve embriyon dışı kök hücreler olmak üzere iki genel grup altında incelenir. Embriyon dışı kök hücreleri genel olarak erişkin kök hücreler veya dokuya özgü kök hücreler olarak adlandırılır. Erişkin kök hücrelerinden en yaygın

alışılanları hematopoetik kök hücreler ve non-hematopoetik kök hücreleridir. Hematopoetik erişkin kök hücreleri, kemik iliği, kordon kanı veya periferik kandan elde edilir. Non-hematopoetik kök hücreleri arasında en çok çalışılanı mezenkimal kök hücreleridir (Sivakumar ve ark., 2015; Zakrzewski ve ark., 2019).

2.2.1. Kök Hücrelerin Oluşumu ve Farklılaşması

Kök hücre teknolojisindeki son gelişmeler, henüz tedavi edilemeyen hastalık ve rahatsızlıklara sahip hastalar için yeni bir kapı açmaktadır. İnsan pluripotent kök hücreleri ve multipotent mezenkimal kök hücreleri içeren kök hücre bazlı tedavi, yakın zamanda rejeneratif tıpta önemli bir oyuncu olarak ortaya çıkmıştır (Hoang ve ark., 2022).

Kök hücreler, potansiyellerine bağlı olarak farklı hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. İnsan pluripotent kök hücrelerinin en çok kullanılan iki kaynağı, insan embriyonik kök hücreleri ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerdir. Organ yenilenmesinde, hücre ve doku naklinde, ilaç testlerinde, doku onarımında ve yara iyileşmesi gibi çeşitli hastalıkların tedavilerinde kullanılırlar. Geçtiğimiz yirmi yılda, uygun hücre dışı koşullarla in vitro kök hücre farklılaşması yoluyla uygun doku veya hücre türlerinin üretilmesi için büyük çaba sarf edilmiştir.

Hücre-hücre ve hücre-mikro evre etkileşimlerinin kök hücre farklılaşması üzerinde büyük etkisi vardır. Hücre dışı matris bileşimleri doku türüne bağlı olarak değişkenlik gösterir (Ogi ve Jin 2023).

Plastisite, sonsuz amplifikasyon ve genetik manipülasyon kolaylığının avantajlarına dayanan kök hücre tedavisi, neredeyse tüm insan hastalıkları için yeni yollar açmıştır. Kök hücre tedavisinin immünolojik, vasküler, kardiyak ve renal hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde uygulanması kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. KH'lerin kullanımı böbrek hastalıkları için de umut verici bir terapötik stratejidir (Liu ve ark., 2020).

2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

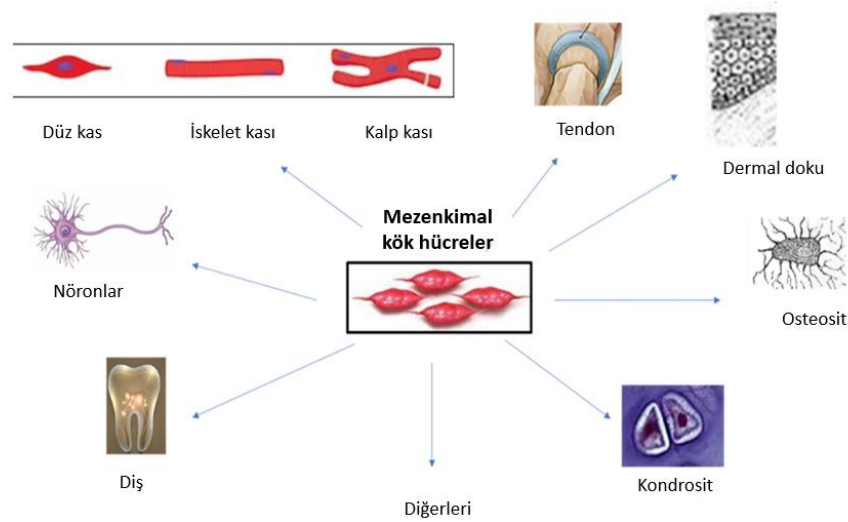
MKH'ler, Uluslararası Hücre ve Gen Terapisi Derneği'ne (ISCT) göre, kendini yenileme yeteneğine ve mezenkimal soylara farklılaşma potansiyeline sahip çok potansiyelli progenitör hücrelerdir. MKH'ler çeşitli dokulardan izole edilebilir, çoklu hücre soylarına ayrılabilir ve inflamasyon ve bağışıklık tepkilerini iyileştiren immünomodülatör özelliklere sahiptir (Gao ve ark., 2016). MKH'ler yaygın olarak

kemik iliğinden izole edilir. Hücre kültürü kaplarına ekildiğinde, plastik yüzeylere kolayca yapışır ve klinik olarak faydalı hücre sayıları verecek şekilde çoğaltılabilir. Spesifik olarak MKH'lerin özelliklerini sergileyen hücreler, kemik iliğinin yanı sıra göbek kordonu, yağ dokusu ve plasenta gibi çoklu fetal ve yetişkin dokulardan da izole edilebilir (Neuhuber ve ark., 2008).

Uluslararası Hücresel Terapi Derneği MKH tanımı için; plastisite, hücre yüzeyinde CD105, CD73 ve CD90 ifadesi için pozitif; CD45, CD34, CD19 ve CD79α ifadesi için negatif ve kontrollü in vitro kültür koşulları altında kondrositlere, osteoblastlara ve adipositlere farklılaşma kapasitesi sergilemek gibi bazı kriterler önermiştir (Schauwer ve ark., 2010; Perico ve ark., 2018).

Son yıllarda, deneysel çalışmalar MKH'lerin çeşitli KBH modellerinde böbrek fonksiyonlarını iyileştirme potansiyelini ortaya çıkarmıştır ve birçok klinik çalışma KBH'de güvenlik ve etkinliğini göstermiştir (Peired ve ark., 2016). Bu zamana kadar yapılan çalışmalarla, kemik iliği, amniyotik sıvı, idrar ve göbek kordonu gibi organ veya dokulardan türetilen MKH'lerin, otofajinin başlatılması, anti-apoptotik veya anti-inflamatuar etkiler dahil bazı mekanizmalar yoluyla böbrek hastalığını tedavi ettiği ortaya konulmuştur (Pan ve Fan 2020).

MKH'ler, belirli uyaranlara yanıt olarak kondrositler, adipositler ve osteositler gibi diğer mezodermal hücre tiplerine farklılaşabilir. Hatta her üç embriyonik katmanın dokularına da transdifere olabilirler. Bu kapasite, rejeneratif tıpta büyük bir klinik potansiyel ortaya koyar. Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'lerde in vitro özelliklerin ve yüzey moleküler ifadelerinin farklılık gösterebileceğini belirtmekte fayda vardır. Bu nedenle MKH'lerin doku yenilenmesindeki kapasitesi, toplandıkları doku kaynaklarıyla ilişkili olabilir. Şekil 2.3'te mezenkimal kök hücrelerin farklılaşabildiği yapılar gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. Mezenkimal kök hücre kaynaklı doku, organ ve yapılar

(Afshari ve ark., 2020)

2.3. Plasenta

Plasenta, fetüsün gerekli maddeleri alarak beslenmesi ile atık maddelerin uzaklaştırılıp temizlenmesinde rol oynayan oldukça önemli fonksiyona sahip bir organdır. Plasental doku tıbbi atık olarak kolayca elde edilebilir. Placenta alternatif olarak MKH kaynağı olarak kullanılır ve plasenta kök hücreler ve progenitor hücreler için önemli bir rezervdir. Placentaldan üretilen mezenkimal kök hücreler, adipoz doku toplanması gibi invaziv prosedürlerden arındırılmış olarak temin edilebilir ve embriyonik kök hücrelerden farklı olarak kullanımını çevreleyen hiçbir etik zorluk yoktur (Akan 2018).

Koryonik villus, amniyotik membran, göbek kordonu stroması ve amniyotik sıvının plasentaldaki MKH'lerin kaynağı olduğu belirtilmektedir. Diaz-Prado ve arkadaşları, insan amniyotik mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu, lokalizasyonu, fenotipik karakterizasyonu ve farklılaşma potansiyelini belirlemiştir. CD90, CD44, CD73, CD105, CD166 ve CD29 gibi spesifik hücre yüzeyi belirteçlerini eksprese ederler ve CD45, CD34, CD14, HLA-DR ekspresyonundan yoksundurlar (Cetinkaya ve ark., 2019).

2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kronik Böbrek Hasarında Uygulanması

Böbrek hastalığı, klinik ortamda yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden, birçok nedene bağlı olarak ortaya çıkabilen, yaşla birlikte görülme sıklığı artan, yaşamı tehdit eden bir hastalıktır. Kök hücre bazlı tedaviler, özellikle mezenkimal kök hücrelerin

kullanımına dayalı olarak böbrek hastalıklarının tedavisinde rejeneratif bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır (Hong ve ark., 2023).

MKH'ler, kemik iliği ve yağ dokusu gibi farklı doku kaynaklarından klinik olarak yararlı sayıda kolayca izole edilebilir ve bağışıklık düzenlemesinin yanı sıra anti-skarlaşma ve rejeneratif süreçlere aracılık edebilen kemokinler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi çok çeşitli biyoaktif moleküller salgılayabilir.

Son zamanlarda mezenkimal kök hücreler, çok yönlü farklılaşma ve kendini yenileme yetenekleri sayesinde yaralanmaların onarılmasında büyük fayda göstermiştir. MKH'lerin klinik öncesi ve klinik çalışmalarda böbrek hasarının tedavisi için güvenli ve etkili bir terapötik strateji olarak hizmet ettiği bildirilmiştir (Almeida ve ark., 2022).

Mezenkimal kök hücreler, hücre çoğalması, hayatta kalma ve farklılaşmasıyla ilgili faktörleri salarak doku onarımına veya yenilenmesine katkıda bulunabildikleri için KBH için de hücre bazlı tedaviler geliştirmede çekici adaylar olarak gösterilmektedir.

Çeşitli raporlar, MKH'lerin anjiyojenik ve rejeneratif özelliklerinin, MKH bazlı tedavinin KBH ve diğer böbrek hastalıklarının tedavisinde oldukça etkili olabileceği fikrini destekleyen çeşitli patolojik koşulları in vivo olarak iyileştirebileceğini öne sürmüştür (Go ve ark., 2022). İşlevsel olarak MKH'ler, bağışıklık tepkisini, renal tübüler hücre apoptozunu, tübüler epitelyal-mezenkimal geçişi, oksidatif stresi, anjiyogenezi düzenleyerek böbrek hasarının ilerlemesini iyileştirir. Ek olarak, parakrin mekanizmaları yoluyla hem akut böbrek hasarında hem de kronik böbrek hastalığında önemli bir etkinlik sergiler.

Konu ile ilgili son yıllarda yapılan klinik çalışmalar da mezenkimal kök hücrelerin böbrek hastalıklarının tedavisinde kullanıldığında etkili ve güvenli olduğunu kanıtlamıştır. MKH'ler rollerini esas olarak trofik faktörleri salgılayarak ve hücre dışı kesecikleri sunarak gerçekleştirir. Önemli bir hücresel iletişim aracı olarak MKH'den türetilen bu keseciklerde bulunan genetik materyaller ve proteinler, böbrek hastalıklarının hedefe yönelik tedavisi için bir araştırma odağı haline gelmiştir. Bu keseciklerin akut böbrek hasarı, kronik böbrek hastalığı, diyabetik nefropati ve aterosklerotik renovasküler hastalık üzerinde belirgin terapötik etkileri gösterilmiştir.

5/6 nefrektomi sıçan modeli, kronik böbrek hastalığının araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu model, ilerleyen dönem böbrek hasarındaki fibrozis, inflamasyon ve oksidatif stres gibi klinik KBH sonuçlarını yüksek benzerlikte taklit eder. Bu modeli

kullanan çalışmalar, altta yatan mekanizmalar ve terapötik müdahale potansiyeli hakkında değerli bilgiler sunmaktadır (Liu ve ark., 2024).

Maires ve ark (2022), yaptıkları bir çalışmada, literatürde de yaygın olarak tanımlandığı gibi, 5/6 böbrek ablasyonu gerçekleştirerek; insandaki ilerleyici nefropatiyi taklit eden tutarlı bir deneysel modeli oluşturmuşlardır. KBH'nin karakteristik özelliklerinin çoğu, 5/6 nefrektomi modeli oluşturulduktan 15 gün sonra tamamen belirlendiğinden, KBH'den etkilenmiş hayvanlar üzerindeki etkileri daha iyi araştırmak amacıyla deneysel tedavileri gözlemlemek için bu aşamayı tercih etmiş ve deney sonuçlarını buna göre yorumlamışlardır. Buna göre KBH gelişiminden önce, başlangıçta hayvanların temel protein ve albümin idrar atılım değerlerinin, normal böbrek fonksiyonunun fizyolojik seviyeleri ile uyumlu olduğunu ortaya koymuşlardır. Renal ablasyondan 15 gün sonra ise, böbrek hasarı oluşturulmuş hayvanlar, kontrol grubuna kıyasla, önemli miktarda artmış proteinüri ve albüminüri sergilemiştir. İnsanda kronik nefropatide genellikle gözlenen duruma benzer şekilde, bu parametreler tedavi edilmemiş KBH hayvanlarında zamanla kötüleşerek yüksek ölüm oranlarına yol açmıştır.

Cavaglieri ve ark., 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin, 5/6 böbrek ablasyon modeli oluşturulmuş Wistar tür ratların böbrek subkapsüler boşluğına uygulandığında, hayvanların hipertansiyon, albüminüri ve glomerüloskleroz gelişiminden korunduğunu göstermiştir.

Eirin ve ark, daha önce kemik iliği kaynaklı MKH transplantasyonunun böbrek fibrozisini azalttığını, proteinüri ve üre konsantrasyonunu azaltarak iskemik böbrek fonksiyonunu iyileştirdiğini ve protein plazma seviyelerinde artış ve kreatinin azalması eğilimi göstermiştir (Eirin ve ark., 2014). Aynı alışma grubunun 2023 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada da, kemik iliğinden türetilen MKH'lerin, böbrek parankiminin morfolojik restorasyonunun yanısıra böbrek fibrozisini tersine eviren anti-fibrotik ve anti-inflamatuar olayları düzenleyerek böbrek parankiminin yeniden şekillenmesinde pleiotropik bir role sahip olduğunu göstermişlerdir (Hong ve ark., 2023).

Bu sonuçlar, MKH'lerin böbrek fibrozunun iyileştirilmesi ve doku rejenerasyonu için nasıl faydalı olabileceğinin artan bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunarak, renal

subkapsüler bölgeye MKH uygulanmasının KBH tedavisi için olası bir terapötik stratejiyi temsil ettiği fikrini destekler (Eirin ve ark., 2015).

2.5. Kalsiyum ve Fosfor Metabolizması

Kalsiyum ve fosfor homeostazisini anlamak, bu homeostatik sistemde anormallikleri olan hastaları tedavi için gereklidir. Kalsiyum, fosfor ve iskelet metabolizması bozuklukları endokrinolojide en sık görülen hastalık grupları arasındadır. Bunlar, iki mineralin, özellikle de kalsiyumun serum konsantrasyonlarındaki anormalliklerini, kemik anormalliklerini ve başta paratiroid bezi, böbrekler ve gastrointestinal sistem olmak üzere başlıca düzenleyici organ sistemlerindeki anormallikleri içerebilir.

Malignite ve primer hiperparatiroidizm durumlarında serum kalsiyum konsantrasyonu anormal derecede yüksek görülürken; böbrek yetmezliği ve hipoparatiroidizmde serum kalsiyum konsantrasyonu anormal derecede düşük olabilir.

Gastrointestinal sistemde, malabsorbsiyon durumlarında düşük kalsiyum emilimi gerçekleşirken; D vitamini intoksikasyonu ve süt-alkali sendromunda olduğu gibi normalden yüksek kalsiyum emilimi de görülebilir. Böbrekler, kalsiyumun vücuttan atılmasıyla ilgili bazı hiperkalsemik bozukluklarda ve nefrolitiazisli bazı hastalarda, böbrek yetmezliğinde fosforun yetersiz salgılanması ve FGF23'ün etki mekanizmasındaki bazı kusurlar nedeniyle kalsiyumu az salgılayabilir. Bunun tam tersi olarak, bazı renal tübüler bozukluklarda ve FGF23 ve diğer fosfoninlerin fazlalığına bağlı olarak fosforun aşırı salgılanması da görülebilir (Shaker ve ark., 2023).

2.6. Fosfatürik Hormonlar

Fibroblast büyüme faktörleri, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip polipeptit büyüme faktörleridir. Anjiyogenez, mitogenez, hücrel farklılaşma, hücre göçü ve doku hasarının onarımı gibi süreçlerde rol alırlar. FGF ailesi yedi filogenetik gruba ayrılan 22 üyeden oluşur. Fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF23), fibroblast büyüme faktörü 19 ve fibroblast büyüme faktörü 21 ile birlikte endokrin alt ailesine aittir ve FGF protein ailesinin en genç üyesidir (Kurpas ve ark., 2021).

2.6.1. FGF23

FGF23, 10 yılı aşkın bir süredir nefroloji araştırmalarının ilgi odağı olmuştur. FGF23, 251 amino asitli bir N-terminali ve bir C-terminal bölgesi olan 32 kDa'lık bir

polipeptiddir. Esas olarak kemikteki osteositler ve osteoblastlar tarafından salgılanan ancak aynı zamanda tükürük bezleri, mide ve çok daha düşük konsantrasyonlarda iskelet kası, beyin, meme bezi, karaciğer ve kalp gibi diğer dokular tarafından da ifade edilen fosfatürik bir hormondur (Vervloet 2020).

Normal fizyoloji altında, FGF23'ün temel işlevleri fosfatüriyi artırmak, kalsitriol sentezini azaltmak ve paratiroid hormonu (PTH) oluşumunu azaltmaktır. FGF23 üretimi, fosfat, kalsiyum, PTH, 1,25-dihidroksi vitamin D, demir eksikliği ve eritropoietin gibi çeşitli faktörler tarafından uyarılır. FGF23 konsantrasyonlarındaki artışlar, renal fosfat atılımını indükleyerek normal serum fosfat seviyelerini korumak için fizyolojik bir yanıt olarak ortaya çıkar (Takkavatakarn ve ark., 2021).

FGF ailesinin üyeleri, FGF reseptörlerine (FGFR'ler) bağlanır. Ancak FGF23'ün FGFR'lere afinitesi zayıftır. FGF23, yalnızca reseptöre bağlanmasına aracılık eden α -Klotho adı verilen alternatif bir koreseptör varlığında etki edebilir (Martin ve ark., 2012).

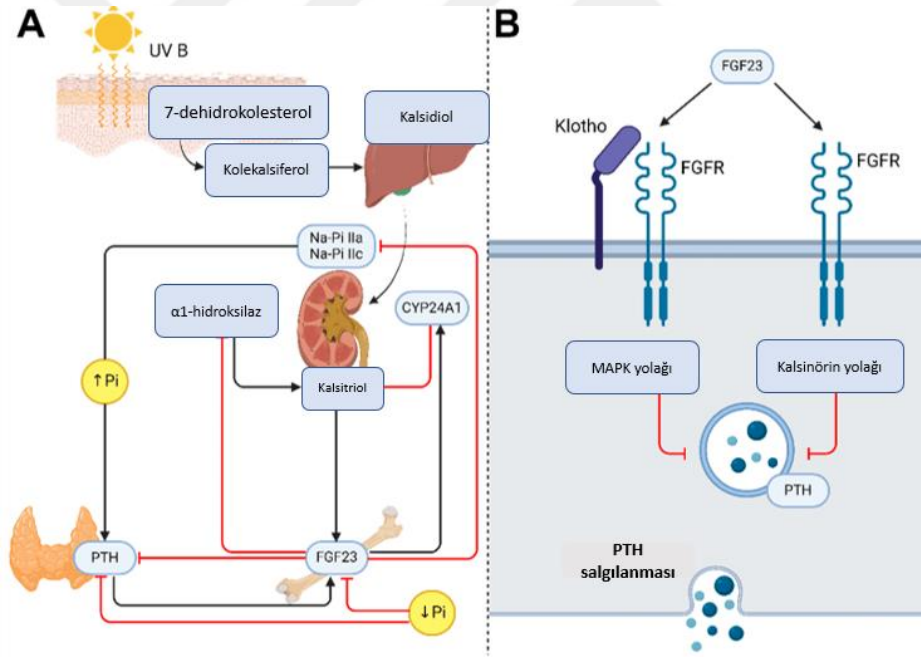
Dolaşımdaki FGF23 seviyeleri, KBH'nin erken döneminde, yani diğer kemik ve mineral metabolizması parametrelerinde saptanabilir değişikliklerden önce yükselir (Jong ve ark., 2021). Birkaç çalışma, daha yüksek FGF23 seviyesinin, KBH'li hastalarda artan ilerleyici böbrek fonksiyon kaybı riski ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (Titan ve ark., 2011; Mendoza ve ark., 2017; Sugiura ve ark., 2018).

Kronik böbrek hastalığı sıklıkla kemikle ilişkili mineral metabolizması üzerinde önemli bir etkiye sahip olan ve böbrek hastalığının kötüleşmesine, ilerlemesine ve ilişkili komorbiditelerin başlamasına yol açan metabolik değişikliklere neden olur. Bu komorbiditeler arasında sekonder hiperparatiroidizm (SHPT), KBH'nin doğrudan bir sonucu olarak kabul edilmiştir.

KBH hastalarında kemik ve mineral metabolizmasında gerçekleşen karmaşık metabolik değişiklikler mortaliteyi artırır. SHPT, gizli başlangıç ve hızlı ilerleme özelliklerini taşır. Bu nedenle SHPT geliştirme riski taşıyan hastaların belirlenmesi zorunludur. KBH gelişimi sırasında kemikle ilişkili mineral metabolizmasındaki değişiklikler esas olarak fosfat, kalsiyum, D vitamini, paratiroid hormonu (PTH) ve metabolik asidoz gibi serum faktörlerinin düzeylerinde artışa yansır. Bu faktörlerin doğrudan veya dolaylı olarak FGF23'ü arttırabileceği dikkate alınmalıdır. Örneğin PTH, osteositleri doğrudan etkileyerek FGF23 ekspresyonunun artmasına yol açar.

Aşırı oral fosfor yüklemesi, kemikte inorganik fosfattan pirofosfata dönüşümü kontrol ederek FGF23 ekspresyonunu arttırabilir. SHPT, FGF23'ün ekspresyonunu arttırır ve bu ilişki KBH'nin ilerlemesine katkıda bulunur (Wu ve ark., 2022).

Ağırlıklı olarak osteositlerde üretilen FGF23, α -Klotho aracılığıyla reseptörüne bağlanır ve proksimal tübülü hedef alır. Buradaki etkisi, KBH patogenezi sırasında idrarda fosfat atılımında bir artışa yol açarak fosfat birikimini önlemektir. 2014 yılında yayınlanan bir çalışmada (Andrukhova ve ark., 2014) rekombinant FGF23 uygulamasının Na-Cl yardımcı taşıyıcılarının aktivitesinde önemli bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. FGF23'ün lokal renin-anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) aktivasyonunu tetiklediği ve fibrozisi teşvik ettiği görülmektedir. 5/6 nefrektomize sıçanlarda FGF23 ile uyarıldıktan sonra RAAS ile ilgili genlerin ekspresyonunda önemli bir artış olduğu belirtilmiştir (Mattinzoli ve ark., 20203).



Şekil 2. 4. FGF23'ün klasik olmayan etkileri

(Martínez-Heredia ve ark., 2024)

2.6.2. Klotho

Klotho, FGF23 koreseptörüdür ve erken yaşlanma özelliklerine sahip farelerde yaşlanma karşıtı bir faktör olarak tesadüfen keşfedilmiştir. Bu proteinin 3 izoformu vardır (α , β ve γ). Klotho geni, 13q12 kromozomunda bulunur; KL1 ve KL2 olarak

adlandırılan iki hücre dışı alandan oluşan β -glukuronidaz aktivitesine sahip 1014 amino asitlik ve 130 kDA'lık bir tip I transmembran proteinini kodlar. (Rodelo-Haad ve ark., 2019).

Klotho geni (aynı zamanda α -Klotho olarak da bilinir) çoğunlukla distal tübülde ve daha az olarak pankreasta, akciğerde, karaciğerde, iskelet kasında, aortta, beyinde ve prostatta ifade edilir. Klotho esas olarak böbrekte ifade edilmesine rağmen, FGF23'ün fosfat taşıyıcıları ve D vitamini metabolizması üzerindeki etkileri proksimal tübülde meydana gelir.

Klotho, farklı ancak her ikisi de yakından ilişkili roller oynayan ve özellikle her ikisi de FGF23'ün ortak reseptörleri olarak yer alan, membrana bağlı ve çözünür olmak üzere iki protein formunda bulunur.

Klotho öncelikle FGF23'ün bir koreseptörü olarak görev yapar, ancak aynı zamanda transformasyon büyüme faktörü- β ve insülin reseptörleri ve Wnt gibi sinyal yolları dahil, diğer reseptör sistemleriyle de etkileşime girer.

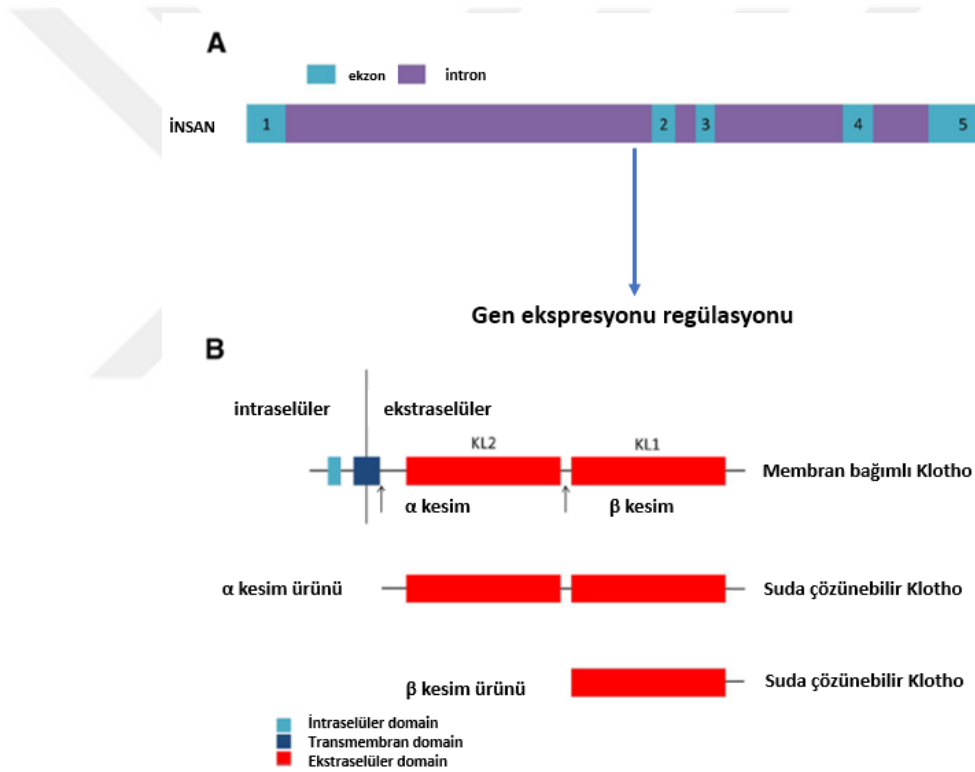
Klotho, KBH ile ilişkilidir ancak farklı reseptörler ve düzenleyici sistemler nedeniyle de kardiyovasküler koruyucu etki gösterir. Sadece insülin reseptör sistemi aracılığıyla değil, aynı zamanda Akt ekspresyonunu indükleyerek oksidatif stresi azaltır ve endotelde nitrik oksit üretimini artırarak da endotel disfonksiyonunu önler. Ayrıca Klotho eksikliği, özellikle arter duvarlarının sertliğini artırarak hipertansiyon gelişimi ile ilişkilidir. Klotho ve FGF23'ün kalsiyum dengesi ve arteriyel kalsifikasyonun yanı sıra osteoprotegerin gibi diğer pro-inflamatuar faktörlerle de ilişkisi vardır (Castillo ve Simic 2022).

Farelerin proksimal tübülünde Klotho'nun ablasyonu, yalnızca yüksek fosfatlı bir diyetle tehdit edildiğinde hiperfosfatemi ile sonuçlanır. İnsanlarda veya farelerde Klotho eksikliği, FGF23 eksikliğine benzer şekilde şiddetli hiperfosfatemiye, 1,25(OH)₂D artışına ve kalsiyum seviyelerine yol açar. KBH ilerlemesi sırasında α -Klotho seviyeleri FGF23'teki artışlara paralel olarak azalır (Biscetti ve ark., 2023).

Erken yaşlanmaya ve hiperfosfatemiye yol açan Klotho'nun, KBH'li hastalarda daha kısa bir yaşam süresi, vasküler kalsifikasyon ve kemik bozuklukları ile ilişkilendirilmiştir. Klotho eksikliğinin bu belirtilere katkısı klinik gözlemler ve hayvan modelleri ile desteklenmiştir. Örneğin, deasetilasyon ve metilasyonun

farmakolojik hedeflemesi, tek taraflı üreteral tıkanıklığı olan farelerde Klotho seviyelerini arttırmış ve renal fibrozisi azaltmıştır (Castillo ve Simic 2022).

KBH'de Klotho ekspresyonu, epigenetik mekanizmalar yoluyla düzenleniyor gibi görünmektedir. Örneğin, üremik toksinlere maruz kalan farelerde, Klotho geninin DNA hipermetilasyonuna ve Klotho proteininin ekspresyonunda azalmaya yol açan DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) seviyeleri artmıştır. Bu veriler öncelikli olarak çoğunlukla genetiği değiştirilmiş hayvan modellerinden elde edildiğinden, bu etkilerin FGF23 aktivitesinin artmasından mı, Klotho fonksiyonunun azalmasından mı kaynaklandığı açık değildir (Li ve ark., 2019).



Şekil 2. 5. Klotho'nun yapısı

(Zou ve ark., 2018)

2.7. Tez Çalışmasının Amacı

Manou ve ark., yaptıkları çalışmada dolaşımdaki çözünür α -Klotho'nun KBH tanısı için yararlı bir biyobelirteç olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, dolaşımdaki α -Klotho, FGF23 ve diğer mineral metabolizması belirteçleri arasındaki ilişkiye ilişkin veriler sınırlıdır (Khodeir ve ark., 2019).

önemli bir biyobelirteç olan FGF23 ve FGF23'ün koreseptörü olan α -Klotho üzerinden değerlendirildi. Bu amaçla; MKH enjekte edilmiş ve edilmemiş sıçanlarda serum FGF23 ve Klotho düzeyleri ile ELISA yöntemi ile; idrar albümin/kreatinin oranları ve idrarda fosfat atılım düzeyleri kolorimetrik kit ile tespit edildi. Buna ek olarak FGF23 ve Klotho protein düzeyleri Western blot yöntemi ile; FGF23 ve Klotho gen ekspresyon düzeyleri ise Real-time PCR yöntemi ile belirlendi.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Term Plasentalardaki Amniyon Membranından Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü'nden temin edilen plasenta, hücre kültürü laboratuvarında laminar kabin içine alındı. Plasentadaki amniyon membranı, koryon membranından nazik bir şekilde uzaklaştırıldı. Amniyon steril bir kaba alınarak, antibiyotik içeren (%1 penisilin/streptomisin, %1 Amfoterisin B) fizyolojik serum ile yıkandı. Yıkama işlemine, amniyon membranı kandan arındırılarak şeffaf hale gelene dek devam edildi.

Temizlenen amniyon membranı, bistüri yardımıyla 3 x 3 cm büyüklüğünde kesilerek, 2.4 U/mL dispase içeren PBS içerisinde 37°C'de 7 dk inkübe edildi. Amniyon membran parçaları, FBS ve 2,2 mM L-glutamin içeren RPMI 1640 medyumunda, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi; daha sonra 75 mg/mL kollajenaz ve 20 µg/mL DNase içeren enzim solüsyonunun içerisinde 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

Amniyon parçaları, 100 µL'lik steril hücre filtresinden (Corning, #352360) geçirilerek 50 mL'lik falkonlara alındı. Toplanan hücreler 200 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dibe çöken pellet, mezenkimal kök hücre büyüme medyumuna alındı, hücreler flaska koyularak %5 CO₂ inkübatör içine yerleştirildi.

3.2. Hücrelerin Flow Sitometre ile Karakterizasyonu

Hücrelerin karakterizasyonu için Mezenkimal Kök Hücre Kiti (BD, 562245) kullanıldı. Hücreler Akutaz ve BD marka stain buffer ile kaldırıldı ve yıkandı; 1400 rpm'de +4°C'de 5 dk santrifüj edildi ve 1x10⁶ hücre/mL olacak şekilde pellet BD marka Stain buffer ile resüspanse edildi. Daha sonra 1x10⁶ hücre/mL hücre süspansiyonundan tüm tüplere 100 µL hücre pipetlenerek, her bir tüpe 1.10⁵ hücre/mL konsantrasyonunda hücre eklenmiş oldu.

Her bir tüp için aşağıda belirlenmiş olan antikorlardan uygun miktarda pipetleme yapıldı.

- 1.- / (Sadece hücre (100 µL)
2. PE hMSC Negatif İzotip Kontrol Kokteyl (20 µL)
3. hMSC Pozitif İzotip Kontrol Kokteyl (20 µL)

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

Mezenkimal kök hücre belirteçleri olan CD44, CD90, CD73, CD105 pozitif, CD34, CD45, CD14, CD19 ve HLA-DR negatif olacak şekilde flow sitometri ile FACS Aria III Cell Sorter aleti aracılığıyla hücreler karakterize edildi.

3.3. Hücrelerin Yönlendirme Deneyleri

Farklılaşan mezenkimal kök hücrelerde, kıkırdak proteoglikanlarının boyandığının belirlenmesi ve kıkırdak yapısının oluşmaya başladığını göstermek için Prusya Mavisı, kıkırdak kollajenlerini göstermek için Sirius kırmızısı, kalsiyum depolanmalarını göstermek için Alizarin kırmızısı S, adipojenik farklılaşmayı göstermek için Oil Kırmızısı O boyamaları yapıldı.

3.4. Subtotal Nefrektomi Modelinin Oluşturulması

KBH hayvan modelini oluşturmak için, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden, Wistar cinsi toplam 36 erkek sıçan (180-250 g) temin edildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Ünitesi'nde 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20-22°C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

5/6 Nefrektomi (5/6 Nef): Sol böbrekte bulunan renal arterin polar 3 dalından 2'sine ligasyon yapılır. 2 hafta sonra ise sağ böbrek çıkarılarak 8 hafta beklenir. Bu sürecin sonunda nefrektomi gerçekleşir.

36 adet Wistar erkek sıçan (180-250 g) randomize olarak 6 gruba ayrıldı.

1. Sham Grubu (Kontrol Grubu): 6 hayvan.

Hayvanlar sadece 0. ve 14. günlerde açılıp kapatıldı, hayvanlara herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı. 14. günün sonunda 2 ay süre ile beklendi. Deney süresi tamamlanan hayvanlar metabolik kafes içerisine alınarak 24 saatlik idrar toplandı, sol böbrekler alındı ve son olarak hayvan uygun koşullarda sakrifiye edildi.

2. 5/6 Nefrektomi grubu: 6 hayvan.

Sol böbrekteki 3 ana arterin 2 tanesi (yakılarak ya da bağlanarak) işlevsiz hale getirildi. 14 gün sonunda sağ böbrek alındı, böylece 5/6 nefrektomi süreci başlatıldı. 2 ayın sonunda deney süresi tamamlanan hayvanlar metabolik kafes içerisine alınarak 24 saatlik idrarları toplandı, sol böbrekleri alındı ve son olarak hayvanlar uygun koşullarda sakrifiye edildi.

3. 5/6 Nefrektomi + 15 gün Grubu: 6 hayvan.

Sol böbrekteki 3 ana arterin 2 tanesi (yakılarak ya da bağlanarak) işlevsiz hale getirildi. 14 gün sonunda sağ böbrek alındı, böylece 5/6 nefrektomi süreci başlatıldı. 2 ay 15 gün sonunda deney süresi tamamlanan hayvanlar metabolik kafes içerisine alınarak 24 saatlik idrarları toplandı, sol böbrekleri alındı ve son olarak hayvanlar uygun koşullarda sakrifiye edildi.

4. 5/6 Nefrektomi + 30 Gün Grubu: 6 hayvan

Sol böbrekteki 3 ana arterin 2 tanesi (yakılarak ya da bağlanarak) işlevsiz hale getirildi. 14 gün sonunda sağ böbrek alındı, böylece 5/6 nefrektomi süreci başlatıldı. 3 ay beklendikten sonra, deney süresi tamamlanan hayvanlar metabolik kafes içerisine alınarak 24 saatlik idrarları toplandı, sol böbrekleri alındı ve son olarak hayvan uygun koşullarda sakrifiye edildi.

5. 5/6 Nefrektomi + Mezenkimal kök hücre + 15 gün Grubu: 6 hayvan.

Sol böbrekteki 3 ana arterin 2 tanesi (yakılarak ya da bağlanarak) işlevsiz hale getirildi. 14 gün sonunda sağ böbrek alındı, böylece 5/6 nefrektomi süreci başlatıldı. 2 ay sonunda 5/6 nefrektomi oluşturulmuş olan bu gruptaki hayvanlara, hayvan başına 1 milyon olacak şekilde hesaplama yapılarak gereken miktarda MKH kuyruk veninden enjekte edildi. Kök hücre enjeksiyonundan sonra 15 gün beklendi, 15. gün sonunda deney süresi tamamlanan hayvanlar metabolik kafes içerisine alınarak 24 saatlik idrarları toplandı, sol böbrekleri alındı ve son olarak hayvanlar uygun koşullarda sakrifiye edildi.

6. 5/6 Nefrektomi + Mezenkimal kök hücre + 30 gün Grubu: 6 hayvan

Sol böbrekteki 3 ana arterin 2 tanesi (yakılarak ya da bağlanarak) işlevsiz hale getirildi. 14 gün sonunda sağ böbrek alındı, böylece 5/6 nefrektomi süreci başlatıldı. 2 ay sonunda 5/6 nefrektomi oluşturulmuş olan bu gruptaki hayvanlara hesaplama yapılarak gereken miktarda MKH kuyruk veninden enjekte edildi. Kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün beklendi, 30. gün sonunda hayvan açılarak sol böbreği alındı ve uygun koşullarda sakrifiye edildi.

Kök hücre grubundaki ratlara, kuyruk veninden intravenöz enjekte edilen MKH'ler, insan plasentasından elde edildiği için sıçanlara uygulanması immün red oluşturma riski taşımaktadır. Bu nedenle, kök hücre enjeksiyonu yapılacak hayvan gruplarına, enjeksiyondan 1 gün önce başlanarak 8 gün boyunca immüsupresif ajan "siklosporin" insülin iğnesiyle subkutan olarak 100 µL enjekte edilir. 100 mg siklosporin (toz halinde) 10 mL DMSO içerisinde çözülerek hazırlandı.

Her bir grup için farklı olmak üzere, deney süresi tamamlandıktan sonra sıçanlar metabolik kafese alınarak 24 saatlik idrarı toplandı ve karın bölgesindeki arterden 5 mL'lik kan tüpüne kan alındı. Dokuda belirlenen analizlerin gerçekleştirilmesi için, her bir gruptaki (n=6) sıçanlar, o gruptaki gerekli cerrahi müdahalelerin bitiminde uygun koşullarda sakrifiye edildi. Alınan kan santrifüj edildi, pellet uzaklaştırıldı, kan serumu ve alınan 24 saatlik idrarlar, ilgili deneylerde kullanılıncaya dek -20°C'de saklandı.

3.5. Western Blot Protokolü

Deney gruplarına ve kontrollere ait böbrek doku örneklerinin ağırlıkları ölçüldü. 0.2 g dokuya 600 µL lizis tamponu ve 10 µL proteaz inhibitör kokteyli (PIK) olacak şekilde ilgili hesaplamalar yapılarak dokulara eklendi ve dokular homojenize edilerek toplam protein miktarları belirlendi. Numuneler, 15.000 rpm'de, +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları alındı. Süpernatantlar alınıp pellet kısmı atılarak lizatlar hazırlandı. Hazırlanan lizatların protein miktarları Bradford Kit (Thermo Scientific™, Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit) kullanılarak hesaplandı. Protein içeriklerine göre her bir grup içerisine distile su ve Laemmli eklenerek örnekler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) yürütülmeye hazır hale getirildi.

3.6. SDS-PAGE Metodu

Kullanılan Solüsyonlar:

- ✓ Ayırma Solüsyonu: 18,17 g Tris + 0,4 g SDS 80 mL dH₂O'da çözülür, pH 8,8'e ayarlanır ve 100 mL'ye tamamlanır.
- ✓ Toplama solüsyonu: 6,06 g Tris + 0,4 g SDS 80 mL dH₂O'da çözülür, pH'ı 6,8' ayarlanır ve 100 mL'ye tamamlanır.
- ✓ Akrilamid- Bisakrilamid (Poliakrilamid): 7,5 g hazır akrilamid – bisakrilamid 37,5:1 toplam hacim 25 mL olacak şekilde distile suda çözülerek hazırlanır.
- ✓ TEMED (TEtra Metil Etilen Diamin)
- ✓ %10'luk APS (Amonyum PerSülfat)
- ✓ Elektroforez yürütme solüsyonu (5X): 9 g TRIS, 43,2 g Glisin ve 3 g SDS 600 mL dH₂O'da çözünür. Kullanılacağı zaman 1x olacak şekilde distile su ile seyreltilir.
- ✓ Blotlama Solüsyonu: 3 g TRIS ve 14,3 g Glisin 700 mL dH₂O'da çözündükten sonra üzerine 200 mL Metanol eklenerek hazırlanır. Solüsyonun pH'ı 8,3-8,6 arasında çıkmalıdır, ayarlama yapılmaz.
- ✓ TBS (10X): 60,55 g TRIS ve 87,66 g NaCl 800 mL dH₂O'da çözünür, pH 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Kullanılacağı zaman 1x şeklinde seyreltilir. 1000 mL TBS'e 1 mL Tween-20 eklenerek yıkama solüsyonu olan TBS-T hazırlanır.

Çalışılacak olan proteinin molekül ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlandı. Jel yüzdeleri için kullanılması gereken miktarlar aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 3. 5. Ayırma jeli hazırlamak için gerekli kimyasallar ve miktarları

Jel yüzdesi (µL)	%5	%7,75	%10	%12,5	%15
Distile su	4680	4000	3300	2640	2000
Ayrılma Solüsyonu	2000	2000	2000	2000	2000
Poliakrilamid	1320	2000	2640	3300	4000
TEMED	10	10	10	10	10
%10'luk APS	60	60	60	60	60

Tablo 3. 6. Toplama jeli hazırlamak için gerekli kimyasallar ve miktarları

(µL)	1 jel için	2 jel için	3 jel için
Distile su	1155	2310	3465
Toplama Solüsyonu	500	1000	1500
Poliakrilamid	330	660	990
TEMED	2,5	5	7,5
%10'luk APS	15	30	45

Jeller hazırlandıktan sonra 95°C'de 5 dk kaynatılmış olan örneklerin (her bir kuyucukta 20 µg protein olacak şekilde hesap yapıldı) ve çalışılan proteinin molekül ağırlığına bağlı olarak seçilmiş olan uygun marker yüklemeleri gerçekleştirildi ve örnekler elektroforez solüsyonu içerisinde 80 Volt'ta 2 saat 10 dakika yürütüldü. Yürüme tamamlandıktan sonra jeldeki örnekler nitroselüloz membrana aktarıldı. 350 mA'de 1 saat oda sıcaklığında blotlama aşaması yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı.

Blotlama işleminin sonunda, çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat %5'lik BSA (TBS-T içinde hazırlandı) ile bloklama aşaması gerçekleştirildi. Bloklama aşamasından sonra membranlar FGF-23, α -Klotho ve β -aktin antikorları ile uygun dilüsyonlarda gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membranlar, 3 defa 10 dk TBS-T ile yıkanarak, uygun dilüsyonda sekonder antikor eklenerek karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Süre sonunda 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkanan membran, kemilüminesans reaktifle yaklaşık 5 dakika geliştirildikten sonra, membrandaki protein bantları, görüntüleme cihazı aracılığıyla tespit edildi. Elde edilen bantlar dansitometre ile okunarak protein miktarları belirlendi. İnternal standart olarak β -aktin kullanıldı.

Tablo 3. 7. Western Blot yönteminde kullanılan antikorlar ve seyreltmeleri

Primer antikor	Seyreltme	Sekonder antikor	Seyreltme
FGF23	1/250	Anti-Rabbit	1/2000
α-Klotho	1/100	Anti-Rabbit	1/1000
β-aktin	1/1000	Anti-Mouse	1/5000

3.7. Real-Time PCR Protokolü

Böbrek dokusu örneklerinden Total RNA izolasyonu Trizol (Invitrogen) reaktifi kullanılarak gerçekleştirildi. Böbrek dokuları MagNa Lyser Green Beads tüplerine alındı ve üzerine 1'er mL Trizol reaktifi eklendi. Homojenizasyon, MagNa-Lyser cihazında 6000 rpm'de 25 saniyede gerçekleştirildi. Homojenizasyon işleminden sonra Invitrogen'in protokolüne göre RNA izole edildi. Protokol sonunda elde edilen RNA pelletleri üzerine RNase-free su eklendi. Elde edilen RNA için konsantrasyon ölçümü spektrofotometrik olarak 260 nm ve 280 nm dalga boylarında yapıldı. İşlem sonunda tüpler -80°C'ye kaldırıldı.

DNase muamelesi RNA (3 μ g) 1U DNase I (Invitrogen) ile muamele edildi ve komplementer DNA (cDNA) sentezi için kullanıldı. cDNA sentezi, SuperScript™ III First-Strand Synthesis System kiti (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirildi. DNaz ile muamele edilmiş olan 3 μ g RNA örneğine, 10xRT tamponu, 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTPmix, 0.1 M DTT, 50 ng/ μ L random heksamerler, RNaseOUT ve Superscript III Reverse Transkriptase (200 U/ μ L)'den oluşan toplam

10 µL'lik cDNA sentez karışımı ilave edilip yavaşça karıştırıldı. Bu karışım, 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 50 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, 1 µL RNase H eklenip 37°C'de 20 dakika inkübe edilerek sonlandırıldı. Elde edilen cDNA'lar PCR için kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

Sıçan FGF23 ve α-Klotho için spesifik primerler kullanılarak QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazında, Power SYBR® Green Master Mix protokolüne göre Real-time PCR çalışıldı. Reaksiyon karışımı; 10 µL Power SYBR® Green PCR Master Mix, 10 µM forward, 10 µM reverse primer, 2 µL cDNA ile toplam hacim 10 µL olacak şekilde nuclease-free su ile hazırlandı.

Amplifikasyon koşulları; 95°C'de 10 dakika, 95°C'de 15 saniye ve 60°C'de 30 saniye olacak şekilde gerçekleştirildi. QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems) cihazına ait software programı yardımıyla CT (siklus eşik değerleri) değerleri belirlendi. Elde edilen CT değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülünde kullanılarak her genin kontrol grubuna kıyasla göreceli değişim düzeyleri hesaplandı. Amplifikasyon, 40 siklusa gerçekleştirildi. Ayrıca, Melting Curve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılarak PCR ürünlerinin doğruluğu değerlendirildi.

Tablo 3. 8. Real-time PCR deneyi için kullanılan oligonükleotid primerler

FGF23	rFGF23bf	5'-GCTGGCTCCGTAGTGATAATAGG-3'	132 bp
	rFGF23br	5'-GCCGTTCTCTAGCGTCCACT-3'	
α-Klotho	rαKlf	5'-TTTGCTTGGGGAGTGGTTGA-3'	82 bp
	rαKlr	5'-CCCACAGATAGACATTCGGGTC-3'	
GAPDH	rGAPDHf	5'-GTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3'	91 bp
	rGAPD Hr	5'-AGAGAAGGCAGCCCTGGTAA-3'	

3.8. Serum FGF23 ve Klotho Düzeyinin Ölçülmesi

Kontrol ve deney gruplarından alınan kan örneklerinde FGF23 ve α-Klotho düzeyleri ELISA yöntemine dayalı ölçüm kitleri kullanılarak ölçüldü.

3.9. İdrar Albümin/ Kreatinin Düzeyinin Ölçülmesi

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen idrar örneklerinde albümin/kreatinin düzeyleri kolorimetrik olarak, sıçana özgü ölçüm kitleri kullanılarak ölçüldü.

3.10. İdrar Fosfat Atılımının Ölçülmesi

Kontrol ve deney gruplarından elde edilen idrar örneklerinde idrarda fosfat atılım düzeyleri kolorimetrik olarak, sıçana özgü ölçüm kitleri kullanılarak ölçüldü.

3.11. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistik hesaplamalar bilgisayar ortamında GraphPad Prism programı ile gerçekleştirilmiştir (version 5.0, GraphPad Software Incorporated).

Grupların karşılaştırılmasında Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Eşleştirilmiş örneklerin karşılaştırılması için Wilcoxon işaretli sıra testi kullanılmış ve $p \leq 0.05$ için değerler anlamlı kabul edilmiştir.

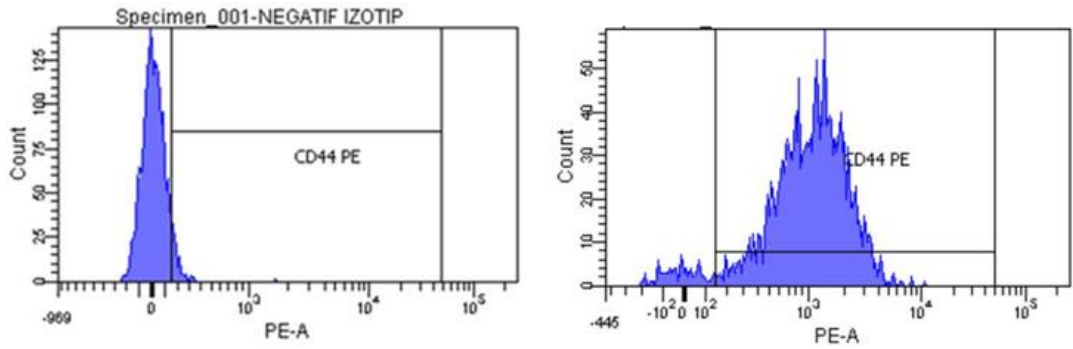
Dansitometrik analizler için Image J programı kullanılmıştır

4. BULGULAR

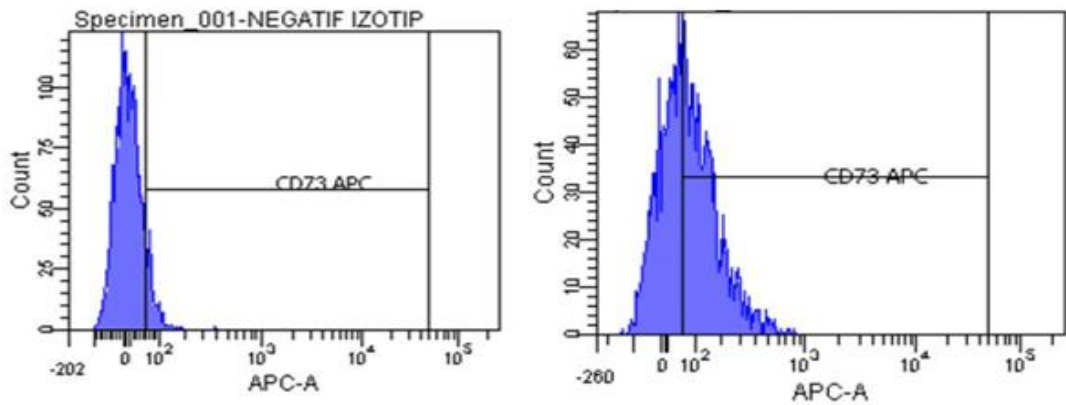
4.1. İzole Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin FACS Analiz Sonuçları

Mezenkimal kök hücreler izole edildikten sonra, flow sitometre analizi sonuçlarına göre CD44, CD90, CD73, CD105 pozitif, hematopoetik belirteçler olan CD34, CD45, CD14, CD19 ve HLA-DR negatif bulunmuştur. CD44, CD73, CD90 ve CD105 mezenkimal kök hücre belirteçleriyle yapılan FACS deney sonuçlarına göre pozitif hücrelerin oranları CD44 %94.2, CD73 %48, CD90 %96 ve CD105 %68.2'dir.

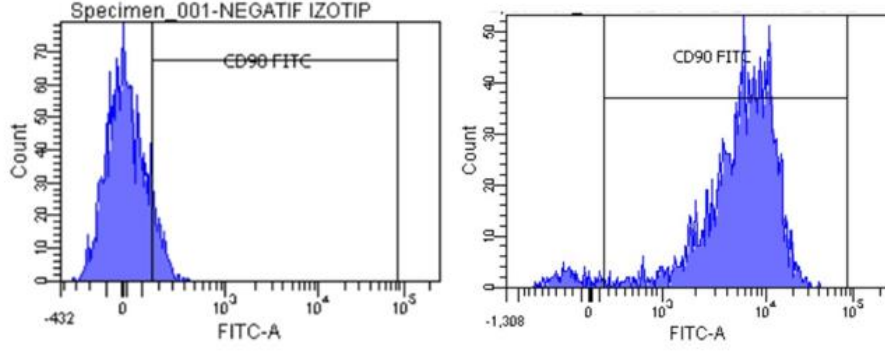
A)



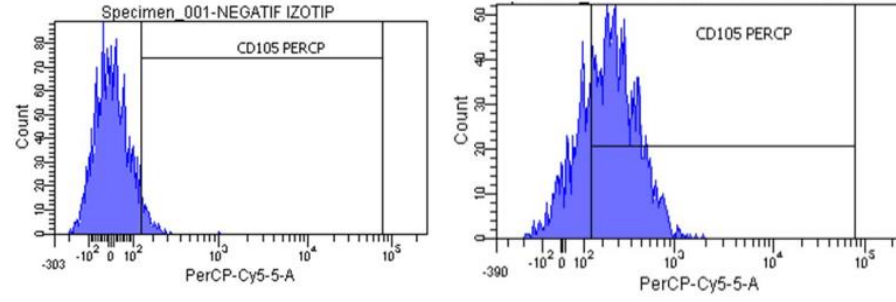
B)



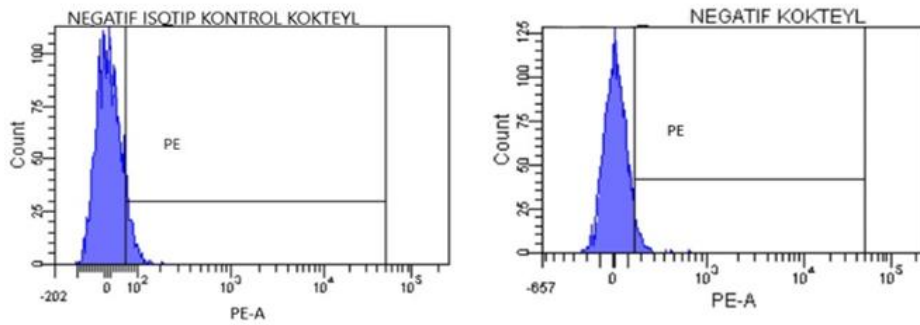
C)



D)



E)

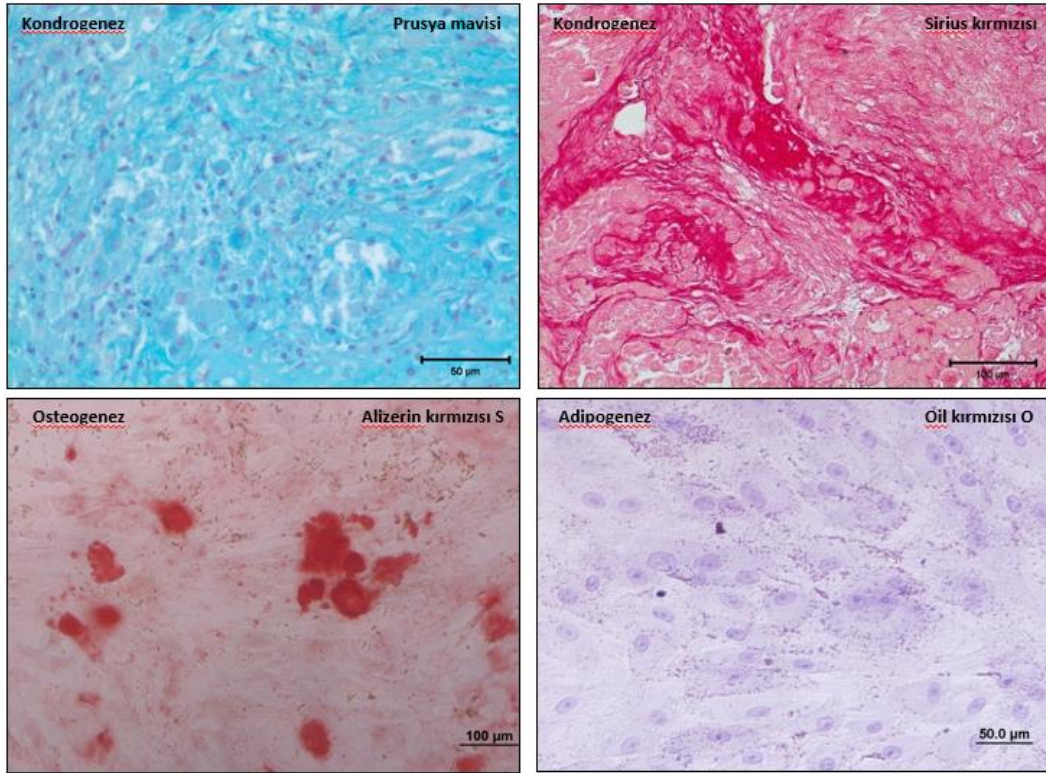


Şekil 4. 1. İzole edilen mezenkimal kök hücrelerin FACS analiz sonuçları

A) CD44 B) CD73 C) CD90 D) CD105 E) Negatif Kontrol için FACS analiz sonuçları.

4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Yönlendirme Sonuçları

Farklılaşan mezenkimal kök hücrelerin kondrosite yönlendirme sonrası Prusya Mavisi ile boyanması sonucunda kıkırdak proteoglikanlarının boyandığının belirlenmesi kıkırdak yapısının oluşmaya başladığını göstermiştir. Kıkırdak kollajenlerinin boyanması için Sirius kırmızısı boyası kullanılmıştır. Osteojenik farklılaştırmayı göstermek için yönlendirilen hücrelerdeki kalsiyum depolanmalarını belirlemek için Alizerin kırmızısı S boyaması yapılmıştır. Adipojenik farklılaştırmayı göstermek amacıyla, yönlendirilen yağ hücreleri için Oil Kırmızısı O boyaması yapılmıştır.



Şekil 4. 2. İzole edilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma boyamaları

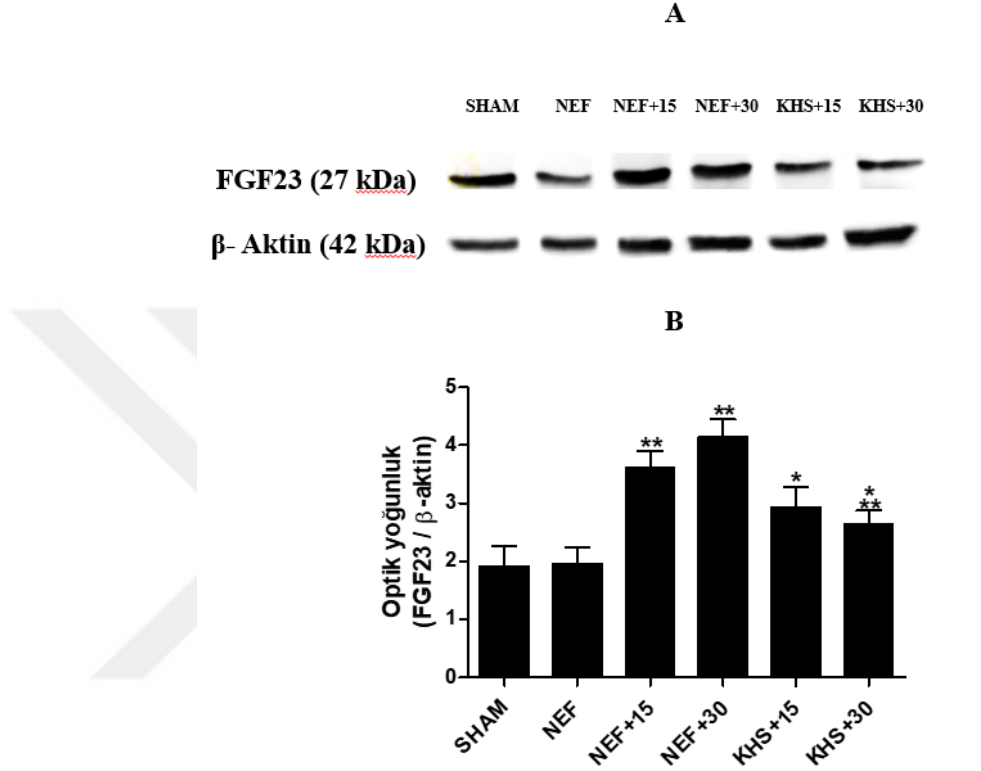
MKH'lerin kondrojeniz sonrası kıkırdak hücrelerine (Prusya Mavisi ve Sirius Kırmızısı boyanmaları), Osteojenez sonrası kemik hücrelerine (Alizerin Kırmızısı S) ve Adipojenez sonrası (Oil Kırmızısı O) boyaları ile yağ hücrelerine farklılaşması.

4.3. Western Blot Bulguları

4.3.1. FGF23 Protein Ekspresyonu

5/6 nefrektomi modeli oluşturulduktan sonra 15 ve 30 gün beklenerek ilerlemiş böbrek hasarı oluşturulan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla FGF23 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,01$). Nefrektomi yapılarak 30 gün

beklenen gruba kıyasla, kök hücre verilerek 15 ve 30 gün beklenen grupların FGF23 protein ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,01$). Kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün beklenen grup FGF23 protein ekspresyonu seviyelerinde, Nefrektomi+15 gün grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,05$).

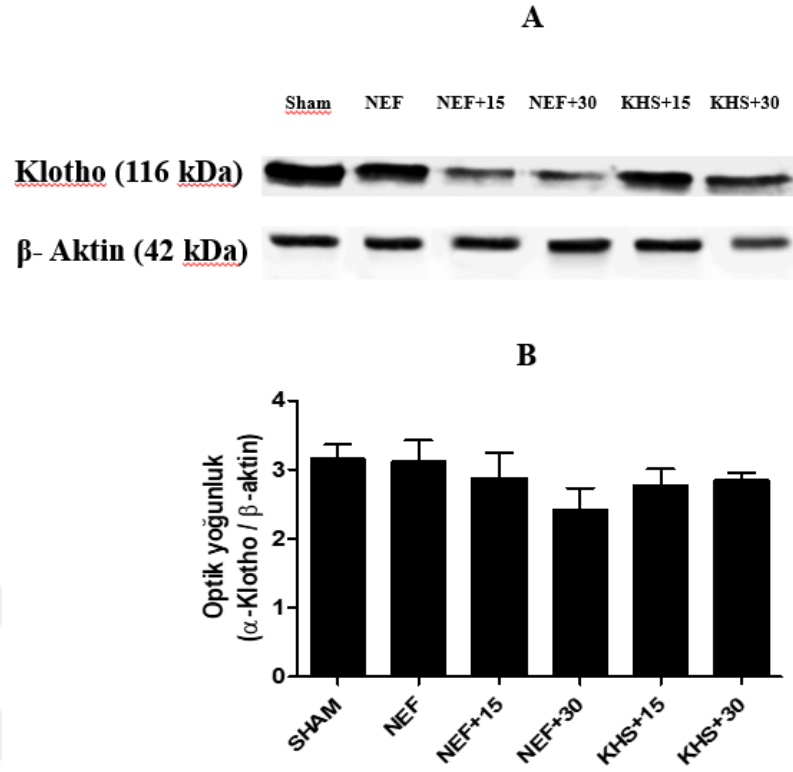


Şekil 4. 3. FGF23 protein ekspresyonları.

A) Tüm gruplara ait FGF23 ve internal kontrol olarak kullanılan β -Aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. B) Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması ile elde edilen veriler sütun grafikleri şeklinde belirtilmiştir ($\pm$ standart hata, * $p<0,05$ NEF+15 vs KHS+30; ** $p<0,01$ NEF+30 vs KHS+30; NEF+30 vs KHS+15; SHAM vs NEF+30; SHAM vs NEF+15; NEF vs. NEF+30 ve $n=6$).

4.3.2. α -Klotho Protein Ekspresyonu

Nefrektomi modeli oluşturulan her üç grup da, kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyede Klotho protein ekspresyonu göstermesine rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kök hücre verilen gruplarda, α -Klotho ekspresyonunun, nefrektomi yapılarak 30 gün beklenen gruba kıyasla arttığı belirlendi (Şekil 4.4).



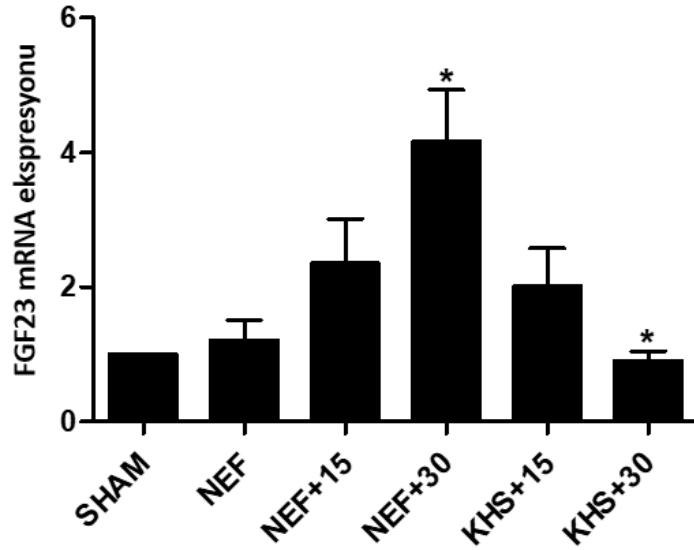
Şekil 4. 4. Klotho protein ekspresyonları.

A) Tüm gruplara ait Klotho ve internal kontrol olarak kullanılan β -Aktin proteinlerinin western blot sonucuna ait bantlar gösterilmektedir. B) Western blot sonuçlarının bantlarına ait yoğunlukların taranması ile elde edilen veriler sütun grafikleri şeklinde belirtilmiştir ($\pm$ standart hata ve n=6).

4.4. Real-Time PCR Bulguları

4.4.1. FGF23 mRNA Ekspresyonu

Real-time PCR bulgularına göre, FGF23'ün gen düzeyinde ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla nefrektomi oluşturulan tüm gruplarda bir artış göstermiştir. Bununla birlikte, nefrektomi oluşturulduktan sonra kök hücre verilerek 30 gün beklenen grupta, hastalığın en ilerlemiş hali olan Nefrektomi+30 gün grubuna kıyasla FGF23 mRNA ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Kök hücre verilerek 30 gün beklenen gruptaki FGF23 mRNA ekspresyonu, nefrektomi+30 gün grubuna kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır (Şekil 4.5).

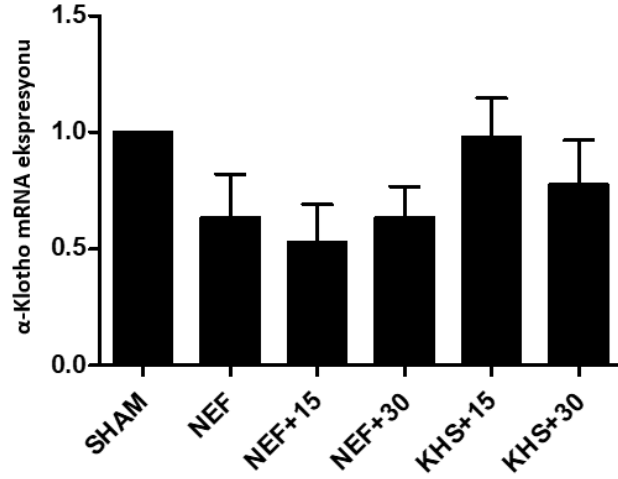


Şekil 4. 5. FGF23 mRNA düzeyleri.

Tüm gruplara ait FGF23 ve internal kontrol olarak kullanılan β -Aktin genlerinin Real-Time PCR sonuçlarına ait veriler sütun grafik şeklinde belirtilmiştir ($\pm$ standart hata, * $p < 0.05$ NEF+30 vs. KHS+30; NEF vs NEF+30 ve $n=6$).

4.4.2. α -Klotho mRNA Ekspresyonu

Sıçan α -Klotho genine özgü primerler kullanılarak, deney gruplarına ait böbrek dokularında Real-time PCR deneyleri gerçekleştirildi. Buna göre, Sham grubu ile kıyaslandığında, nefrektomi gruplarında α -Klotho gen ekspresyon düzeyinde azalma gözlenmiştir. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kök hücre verilen her iki grupta da α -Klotho ekspresyonu nefrektomi oluşturulmuş gruplara kıyasla bir artış göstermiştir fakat bu fark da istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.6).



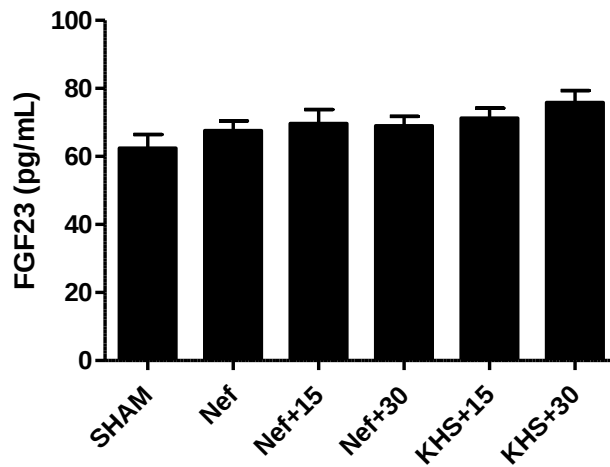
Şekil 4. 6. α-Klotho mRNA düzeyleri.

Tüm gruplara ait α-Klotho ve internal kontrol olarak kullanılan β-Aktin genlerinin Real-Time PCR sonuçlarına ait veriler sütun grafik şeklinde belirtilmiştir ($\pm$ standart hata ve n=6).

4.5. Kit Ölçüm Sonuçları

4.5.1. Serum FGF23 Düzeyi Ölçümü

Sıçana özgü ELISA kiti kullanılarak, tüm hayvan gruplarına ait serum örnekleri incelendi. Kitin belirttiği şekilde hazırlanan standart grafikten yararlanılarak serum FGF23 seviyeleri pg/mL cinsinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, serum FGF23 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.7).

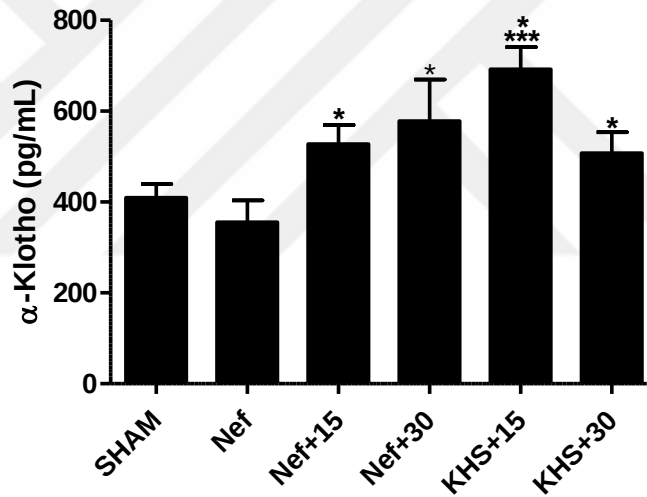


Şekil 4. 7. Serum FGF23 düzeyleri.

($\pm$ standart hata ve n=6)

4.5.2. Serum α -Klotho Düzeyi Ölçümü

Sıçana özgü ELISA kiti kullanılarak, tüm hayvan gruplarına ait serum örnekleri incelendi. Kitin belirttiği şekilde hazırlanan standart grafikten yararlanılarak serum α -Klotho seviyeleri pg/mL cinsinden hesaplandı. Elde edilen sonuçlara göre, Nefrektomi grubuna kıyasla, Nefrektomi+15 ve Nefrektomi+30 gün gruplarında serum α -Klotho seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmış bulundu ($p<0,05$). Serum α -Klotho seviyeleri, Nefrektomi grubu dokularda, kök hücre verilerek 15 gün beklenen grup ($p<0.001$) ve kök hücre verilerek 30 gün beklenen gruba ($p<0.05$) kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak belirlendi. Nefrektomi yapıldıktan sonra 15 gün beklenen gruptaki α -Klotho ekspresyonu, kök hücre enjeksiyonundan sonra 15 gün beklenen gruptaki ekspresyona kıyasla anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0,05$).



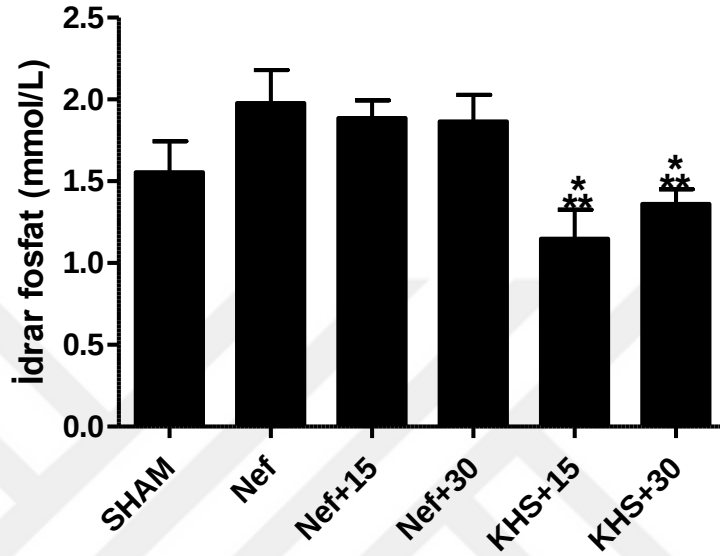
Şekil 4. 8. Serum α -Klotho düzeyleri

($\pm$ standart hata; * $p<0.05$: Nef vs KHS+30; Nef+15 vs KHS+15; Nef vs Nef+30; Nef vs Nef+15; *** $p<0.001$: Nef vs. KHS+15 ve $n=6$)

4.5.3. İdrar Fosfat Ölçümü

Sıçana özgü kolorimetrik kit kullanılarak, tüm hayvan gruplarına ait 24 saatlik idrar örnekleri incelendi. Kitin belirttiği şekilde hazırlanan standart grafikten yararlanılarak idrar fosfat seviyeleri mmol/L cinsinden hesaplandı. Buna göre, kök hücre enjeksiyonundan sonra 15 ve 30 gün beklenen her iki grupta da idrar fosfat seviyeleri, nefrektomi grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olarak belirlendi ($p<0,05$). Nefrektomi oluşturulduktan sonra 30 gün beklenen grupta, kök hücre

verilen her iki gruba kıyasla fosfat seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$). Nefrektomi yapıldıktan sonra 15 gün beklenen gruptaki idrar fosfat ekspresyonunun, kök hücre enjeksiyonu yapılan her iki gruptaki idrar fosfat ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) şekilde yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.9).

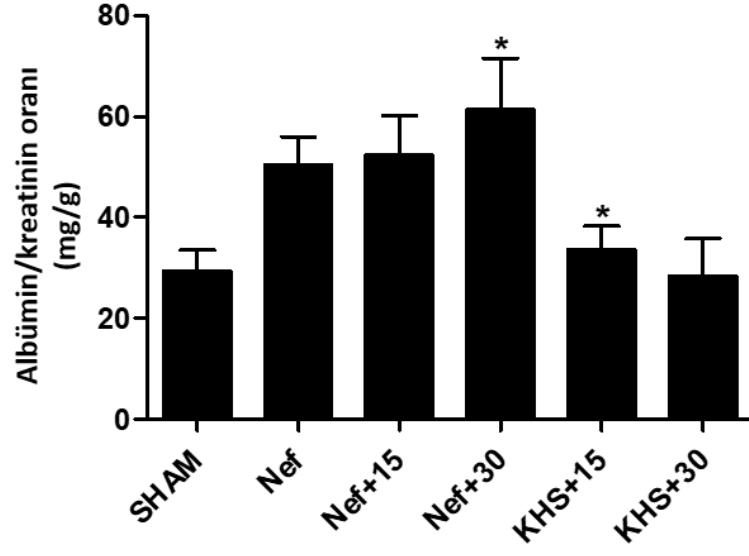


Şekil 4. 9. İdrar fosfat düzeyleri

($\pm$ standart hata; * $p<0,05$: Nef vs KHS+15; Nef vs KHS+30; Nef+30 vs KHS+15; Nef30 vs KHS+30. *** $p<0,01$: Nef+15 vs. KHS+15; Nef+15 vs. KHS+30 ve $n=6$)

4.5.4. İdrar Albümin/Kreatinin Oranı Ölçümü

Sıçana özgü kolorimetrik kit kullanılarak, tüm hayvan gruplarına ait 24 saatlik idrar örnekleri incelendi. Kitin belirttiği şekilde hazırlanan standart grafikten yararlanılarak idrar albümin/kreatinin oranı mg/g cinsinden hesaplandı. Buna göre, nefrektomi + 30 gün grubunun albümin kreatinin oranının, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0,05$). Kök hücre verildikten sonra 15 gün beklenen gruba kıyasla, nefrektomi grubu ile nefrektomi oluşturulduktan sonra 30 gün beklenen gruptaki albümin / kreatinin oranlarına bakıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$). Benzer şekilde, kök hücre verildikten sonra 15 gün beklenen gruba kıyasla, nefrektomi oluşturulduktan sonra 15 gün beklenen gruptaki albümin kreatinin oranında da bir azalma görüldü fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. İdrar albümin/kreatinin oranı

($\pm$ standart hata; * $p < 0.05$: Nef+30 vs KHS+15; Nef vs KHS+15; SHAM vs Nef+30 ve $n=6$)

5. TARTIŞMA

Kronik böbrek hastalığı, 21. yüzyılda insan sağlığını tehdit eden en önemli halk sağlığı sorunlarından biridir (Yan ve Shao 2024). KBH'ye bağlı ölümler dünya çapında artmaktadır ve KBH, 2040 yılına kadar en yaygın beşinci ölüm nedeni olma yolunda ilerlemektedir. Geç teşhis ve sınırlı tedavi araçları, bu ilerleyişi etkileyen iki faktördür. KBH, esas olarak çeşitli patojenik faktörlerin böbrek yapısına ve fonksiyon bozukluğuna neden olduğu ve böbrek fonksiyonlarında geri dönüşümsüz kaybın meydana geldiği bir hastalık türüdür. KBH etiyojisi karmaşıktır ve fibrozise yol açan düzensiz sinyal yollarını içerir. Mevcut tedaviler sınırlı olmakla birlikte, daha etkili tanı ve tedavi yöntemlerine yönelik arayışlar yoğunudur (Reiss ve ark., 2024).

Kendini yenileme ve farklı soylardan hücreler oluşturma kapasitesi kök hücrelerin iki iyi özelliğidir. Kök hücreler kökenlerine göre sınıflandırılabilir; embriyonik kök hücreler, yetişkin kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücreler. Yetişkin kök hücreler, vücuttaki çeşitli dokularda bulunan ve o spesifik doku veya organın birden fazla hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip, farklılaşmamış hücrelerdir. Bu kök hücreler mezenkimal kök hücreleri, hematopoietik kök hücreleri, uydu hücrelerini ve kas kök hücrelerini içerir. Mezenkimal kök hücreler ilk olarak kobayların kemik iliği ve dalağından izole edilmiştir (Habiba ve ark., 2024).

Mezenkimal kök hücrelerin diyabet, kanser, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere çok sayıda hastalıktaki etkisi geniş çapta araştırılmıştır. Pro-anjiyogenik, immünosüpresif ve anti-fibrotik yetenekleri inflamasyonla mücadele etmelerine ve doku onarımını teşvik etmelerine olanak tanır ve bu da onları potansiyel olarak fibrozisi de tedavi edebilen bir hücre popülasyonu haline getirir. Genel olarak MKH'ler, böbrek fibrotik sürecinin spesifik aşamalarını engelleyerek koruyucu fibrotik araçlar olarak görev yapar (Liu ve ark., 2024).

Mezenkimal kök hücrelerin böbrekler üzerinde olumlu etkileri olduğu, glomerüler boyut, podosit apoptozu, glomerüler matris genişlemesi/skleroz, peritübüler interstisyel fibrozis, renal tübüler epitel hücre ölümü ve farklılaşması, tübülointerstisyel fibrozis gibi çeşitli negatif süreçlerde azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Bu etkiler albüminürinin azalması ve böbrek fonksiyonunun önemli bir ölçüsü olan glomerüler filtrasyon hızının stabilizasyonu ile de bağlantılıdır (Habiba ve ark., 2024).

Mezenkimal kök hücreler geniş bir klinik uygulama yelpazesi için uygun ve uygulanabilir kaynaklardır. Reinders ve ark., 2021 yılında yaptıkları randomize klinik çalışmada, MKH tedavisi ile 24 hafta sonunda kantitatif fibroz skorlarının iyileştiğini bulmuşlardır. Ek olarak, post-hoc analizlerle MKH grubundaki korunmuş böbrek fonksiyonunu ortaya koymuşlardır.

Mezenkimal kök hücrelerin salgıladığı parakrin faktörler, MKH'lerin kültür koşullarına, hücre geçiş sayısına, kültür ortamının boyutuna (iki veya üç boyutlu) ve kültür ortamına bağlı olarak büyük çeşitlilik gösterdiğinden MKH içeriğini ve böbrek hasarı üzerindeki terapötik etkinliğini standardize etmek zordur. Nagaishi ve ark., 2016 yılında yaptıkları çalışmada, MKH'lerin antifibrotik bir etki göstererek diyabetik nefropatiyi (DN) iyileştirip iyileştiremediğini araştırmışlardır. MKH'lerden türetilen ekzosomların bu işlevlerde kısmen yer alabileceğini ortaya koymuşlardır. Çalışmanın sonucuna göre, MKH tedavisi tübüler interstisyel fibrozu baskılamış, transforme edici büyüme faktörü- β 'nın (TGF- β) artan ektopik ekspresyonunu tersine çevirmiş; diyabetli farelerin tübülointerstisyumunda da olumlu yönde fibrotik değişiklikler gözlemlenmiştir.

Alfarano ve ark., 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada, kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin, iskemi-reperfüzyon sonrası böbrekteki işlev bozukluğunu ve bu bozulmaya dahil olan mekanizmaları araştırmayı amaçlamışlardır. Bu kapsamda, iskemi-reperfüzyon ve immünosüpresif tedaviden sonra klinikte oluşan kronik böbrek hasarının gelişimini taklit eden orijinal bir kemirgen modelini kullanmışlardır. Bu modeli kullanarak, doğrudan böbreğe enjekte edilen MKH'leri kullanılarak yapılan hücre bazlı tedavinin, fibrozis gelişimini önleyip önlemediği veya azaltıp azaltmadığını araştırmışlardır. Bu amaçla, sağ böbrekte nefrektomi, sol böbrekte iskemi-reperfüzyon hasarı ve 28 gün boyunca siklosporin tedavisini kapsayan bir hayvan modeli oluşturmuşlardır. Erkek Lewis sıçanlarının kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler, iskemi-reperfüzyon hasarından 7 ve 14 gün sonra böbrek parankimine doğrudan enjekte edilmiştir. MKH enjeksiyonunun böbrek fonksiyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek için, iskemi-reperfüzyon hasarından 7, 14 ve 28 gün sonra toplanan kan örneklerinde kreatinin ve üre plazma seviyelerini ölçmüşlerdir. Bu deneysel koşullarda, plazma kreatinin ve üre konsantrasyonları kontrol grubuna kıyasla hasta grupta önemli bir artış göstermiştir. Aynı zamanda, MKH'lerin intraparenkimal enjeksiyonunun, böbrek fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, MKH'lerin terapötik etkinliğinin varlığı belirtilmiş, fakat bu etkinin renal fibrozis derecesine bağlı olabileceğini vurgulanmıştır.

An ve ark., 2019 yılında yaptıkları bir çalışmada, ilk kez, mezenkimal kök hücre uygulamasını insan olmayan diyabetik primatlar üzerinde denemişlerdir. Araştırmacılar, rhesus makak maymunlarında diyabetik nefropati modeli geliştirmiş ve bu hayvanlara 2 ay boyunca dört kez mezenkimal kök hücre uygulamışlardır. Verilen etiketli MKH'lerin böbreklere göç ettiğini tespit eden araştırmacılar; bu hayvanlarda MKH tedavisinden sonra, proksimal tübüler epitel hücrelerinde sodyum glukoz kotransporter-2 (SGLT-2) regülasyonunu baskılanması ve glisemik değerlerde iyileşme gibi diyabetik nefropati ile ilişkisi olan farklı metabolik değişikliklerle böbrek fonksiyonu üzerindeki iyileşmeyi tespit etmişlerdir.

Konu ile ilgili yapılan bir başka çalışmada, araştırmacılar kemik kaynaklı kök hücrelerin miR-124a ile kombinasyonunun, böbrek dokusunu koruduğunu göstermiştir. miR-124a ile birlikte MKH uygulaması, podosit hücrelerinin proliferasyonunu arttırmış ve apoptozunu engellemiştir (Sun ve ark., 2018).

2019 yılında Bai ve ark., yaptıkları bir çalışmada, MKH'lerin DN modelinde lipid metabolizmasını düzenleyerek koruyucu etkilerini göstermişlerdir. Araştırmacılar, ilk olarak, MKH tedavisinden sonra DN grubu sıçanların böbreklerinde Lipoksin A4'ün (LXA4) önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur. LXA4, MKH'lerin koruyucu mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Daha sonra, diyabetik nefropati ile ilişkili fibrozis sinyal yolu ve proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini belirleyen araştırmacılar, hem mezenkimal kök hücre hem de LXA4 tedavisinin, TGF- β /Smad sinyallemesini ve TNF- α , IL-6, IL-8 ve IFN- γ dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Bu veriler, MKH'lerin DN'deki TGF- β /Smad sinyallemesini ve proinflamatuvar sitokinleri hedef alarak LXA4 aracılığıyla DN patogenezinin ilerlemesini baskıladığını göstermektedir.

Adipoz doku kaynaklı kök hücre nakli (ASC) de, diyabetik nefropati için umut vaadeden bir tedavidir. Ancak, bu hücrelerin intravasküler uygulanması hedef organlarda düşük tutunma ile sonuçlanır. Bu nedenle, hücre tabakası teknolojisini ASC'lere uygulamayı düşünen Takemura ve ark., ASC tabakalarını doğrudan bir DN sıçan modelinin böbreklerine naklederek terapötik sonuçları analiz etmişlerdir. Böbrek

koruyucu etkilerin, nakledilen ASC'lerden salgılanan çeşitli trofik faktörlerin parakrin etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Mevcut çalışmada, ASC tabakalarının üst sıvısında BMP-7, EGF, HGF, IGF-1 ve PGI2 salgılanması tespit edilmiştir; bu faktörlerin böbrek hasarının iyileşmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Nakledilen allojenik hücrelerin nakilden 14 gün sonrasına kadar hayatta kaldığını doğrulayan araştırmacılar, ASC'lerin parakrin etkisi aracılığıyla sağlanan böbrek koruyucu etkinin sağkalım süreleri boyunca başarıyla gerçekleştirildiğini ve allojenik ASC'lerin diyabetik nefropatinin iyileşmesine katkıda bulunuyor olduğunu düşünmüşlerdir. Özetle, ASC tabakası nakli, tutunma verimliliğini arttırmış; kök hücre uygulaması, böbrek yapısını hem glomerüler hem de tübüler seviyelerde korumuştur (Takemura ve ark., 2020).

2015 yılında, Ni ve ark., yaptıkları bir çalışmada, diyabetik nefropati modeli oluşturulmuş sıçanlarda adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre transplantasyonunun koruyucu etkilerini araştırmışlardır. Buna göre, ASC tedavisinin böbrekteki histolojik değişiklikleri iyileştirdiğini, apoptoz oranını ve Wnt/ β -katenin ekspresyonunu azalttığını ve Klotho ekspresyonunu arttırdığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, sıçana özgü kolorimetrik kiti kullanarak, tüm hayvan gruplarına ait 24 saatlik idrar örneklerinde albümin/kreatinin oranları tespit ettik. Kitin belirttiği şekilde hazırlanan standart grafikten yararlanılarak idrar albümin/kreatinin oranını ölçtük. Buna göre, nefrektomi+30 gün grubunun albümin kreatinin oranının, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak arttığını belirledik ($p<0,05$). Kök hücre verildikten sonra 15 gün beklenen gruba kıyasla, nefrektomi grubu ile nefrektomi oluşturulduktan sonra 30 gün beklenen gruptaki albümin/kreatinin oranlarına baktığımızda, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gördük ($p<0,05$). Benzer şekilde, kök hücre verildikten sonra 15 gün beklenen gruba kıyasla, nefrektomi oluşturulduktan sonra 15 gün beklenen gruptaki albümin/kreatinin oranında da bir azalma tespit ettik. Elde ettiğimiz sonuçların, literatürdeki ilgili diğer çalışmalarla ortaya koyulan sonuçlar ile uyumlu olması, hayvan modelimizin doğruluğunu bize kanıtladı.

Ulusal Böbrek Vakfı, ABD Gıda ve İlaç Dairesi ve Avrupa İlaç Ajansı'nın ortak bir çalışmayı, albüminüride erken bir değişikliğin klinik çalışmalarda KBH ilerlemesi için uygun bir belirteç olabileceğini önermiştir. Buna göre; Green ve ark. (2023), T2D ve evre 2-3 KBH bireyleri içeren 807 yetişkin ile gerçekleştirdikleri randomize ve kontrollü Faz 2 çalışmasında (çalışmaya idrar albümin/kreatinin oranı (UACR) ≥ 300 –

<5000 mg/g olan kişiler dahil edilmiştir) idrar albümin/kreatinin oranının düşürülmesi ile böbrek iyileşmesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde, diyabeti olan yaklaşık 500.000 kişiyi içeren bir meta-analizde, idrar albümin/kreatinin oranındaki bir değişikliğin son evre böbrek hastalığına ilerleme riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Coresh ve ark., 2019). Yine başka bir çalışmada, diyabetli>20.000 katılımcıya ait veriler içeren 41 klinik çalışmanın meta-analizi, albüminüri ile böbrek arasında net bir ilişki ortaya koymuştur. Albüminürideki %30'luk bir azalma, son evre böbrek hastalığı da dahil olmak üzere böbrek hastalığı ilerleyişinde %27'lik bir azalma ile ilişkilendirilmiştir (Heerspink ve ark., 2019). Elde ettiğimiz bulgular, bu sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Kronik böbrek hasarı ve mineral-kemik iliği metabolizması ile ilgili yakın zamanda tanımlanan iki yeni oyuncu FGF23 ve α -Klotho'dur. FGF23 esas olarak kemikteki osteositler tarafından üretilen fosfatürik bir hormondur. FGF23 sentezi ve salgılanmasının düzenlenmesi tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen Pi, kalsiyum, D vitamini türevleri, PTH ve diğer faktörlerin FGF23 düzeyini etkilediği görülmektedir. FGF23, fibroblast büyüme faktörü reseptörleri 1c, 3c ve 4'e bağlanır ve serum Pi seviyelerinin doğrudan düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bunu, proksimal tübülde sodyuma bağlı Pi ortak taşıyıcıları olan sodyum-Pi IIa ve IIc'yi aşağı regüle ederek ve böylece renal Pi atılımını artırarak yapar (Yamada ve Giachelli 2017). Ek olarak FGF23, 1α -hidroksilazı inhibe eder ve 24α -hidroksilaz aktivitesini artırır, böylece kalsitriol seviyelerini azaltır; bu da serum Pi normalizasyonunu destekler. Fonksiyonel D vitaminindeki azalma, bağırsakta fosfat ve kalsiyum emilimini sınırlar. FGF23'ün FGFR'lere bağlanması, zorunlu bir yardımcı reseptör olarak tip I transmembran proteini α -Klotho'yu gerektirir. FGFR'ler pek çok yerde eksprese edildiğinden, bir hücre üzerinde α -Klotho'nun varlığının, FGF23 etkisi için doku spesifikliğini sağladığı düşünülmektedir. α -Klotho esas olarak böbrek, paratiroid bezi ve koroid pleksusta eksprese edildiğinden, FGF23'ün fonksiyonunun tarihsel olarak bu organlarla sınırlı olduğu düşünülüyordu, ancak bu paradigma, FGF23'ün başka reseptörlere ve kalp dahil başka hedef dokulara sahip olabileceğine dair artan kanıtlarla değişmektedir (Portales-Castillo ve Simic 2022).

Böbrekte FGF23, FGF reseptörüne ve onun yardımcı reseptörü Klotho'ya bağlanır. Hem akut hem de kronik böbrek hasarı, hiperfosfatemiyi önleme mekanizması olarak dolaşımdaki FGF23 düzeylerini artırır. Yüksek FGF23 düzeylerinin böbrek hastalığı

olan hastalarda morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ancak α -Klotho'nun genel popülasyonda ve KBH hastalarında koruyucu etkilerini test eden hiçbir klinik çalışma bulunmamaktadır (Yamada ve Giachelli 2017).

Çalışmamızda ilk olarak term plasentaların amniyon membranından izole edilen mezenkimal kök hücrelerin flow sitometre ile karakterizasyonunu gerçekleştirdik. Daha sonra bu hücrelerin adiposit, kondrosit ve osteositlere yönlendirilme deneylerini yaptık. 5/6 nefrektomi oluşturulan bazı gruplara (kök hücre+15 gün (n=6) ve kök hücre+30 gün grupları (n=6)) kök hücre enjekte ettik.

Tüm gruplarda FGF23 ve α -Klotho düzeylerini Western Blot yöntemi ile belirledik. Analiz sonuçlarına göre 5/6 nefrektomi modeli oluşturulduktan sonra 15 ve 30 gün beklenerek ilerlemiş böbrek hasarı oluşturulan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla FGF23 protein ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözledik ($p<0,01$). Nefrektomi yapılarak 30 gün beklenen gruba kıyasla, kök hücre verilerek 15 ve 30 gün beklenen grupların FGF23 protein ekspresyon seviyeleri arasında ise anlamlı bir azalma gördük ($p<0,01$). Kök hücre enjeksiyonundan sonra 30 gün beklenen grup ile Nef+15 gün grubu arasında FGF23 protein ekspresyonu seviyeleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirledik ($p<0,05$). Nefrektomi modeli oluşturulan her üç grup da, kontrol grubuna kıyasla daha düşük seviyede Klotho protein ekspresyonu gösterdi. Kök hücre verilen her iki gruptaki protein düzeyindeki Klotho ekspresyonunun ise, nefrektomi yapılan gruba kıyasla arttığını belirledik. Western Blot bulgularımızın literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu olması, deneyimizi tasarlarken planladığımız sonuçlara ulaştığımızı bize gösterdi. Mezenkimal kök hücre enjeksiyonundan sonra nefrektomi gruplarında FGF23 protein ekspresyon seviyesindeki azalma ile Klotho protein ekspresyon seviyelerinde artış, renal hasara karşı MKH'lerin terapötik etkilerinden kaynaklanıyor olabilir.

FGF23 ve α -Klotho mRNA ekspresyonlarını Real-Time PCR yöntemi ile değerlendirdik. Buna göre, FGF23'ün gen düzeyinde ekspresyonu, kontrol grubuna kıyasla nefrektomi oluşturulan tüm gruplarda bir artış gösterdi. Bununla birlikte, nefrektomi oluşturulduktan sonra kök hücre verilerek 30 gün beklenen gruptaki mRNA ekspresyonlarını, hastalığın en ilerlemiş hali olan Nefrektomi+30. gün grubu kıyasla ($p<0,05$) anlamlı olarak azalmış bulduk. Gruplar arasında en belirgin azalmayı, ($p<0,05$) Nefrektomi+30. gün grubu ile kök hücre verilerek 30 gün beklenen grup arasında belirledik. Sham grubu ile kıyasladığımızda, nefrektomi gruplarında α -Klotho

gen ekspresyon düzeyinde bir azalma belirledik. α -Klotho gen ekspresyon seviyeleri, kök hücre verilen her iki grupta da nefrektomi oluşturulmuş gruplara kıyasla bir artış gösterdi. Real-time PCR deneylerinde elde ettiğimiz sonuçlar hem kendi içinde hem de literatür ile tutarlıydı. Gen düzeyinde elde ettiğimiz sonuçlar, Western blot deneyleri ile protein düzeyinde tespit ettiğimiz sonuçlar ile uyumluydu. Bu paralellik, mezenkimal kök hücre uygulanmasının protein düzeyinde olduğu gibi gen düzeyinde de bir iyileşmeye neden olması ile açıklanabilir.

Yamada ve ark. (2017), yaptıkları bir çalışmada araştırmacılar kronik böbrek hasarının aslında bir α -Klotho eksikliği durumu olarak tanımlanabileceğinden bahsetmiştir. Bu sebeple KBH'li hastalarda çözünebilir α -Klotho'yu yenilemek veya membrana bağlı α -Klotho'nun ekspresyonunu arttırarak KBH ilerleyişinin önüne geçme önerisini ortaya koymuşlardır. Klotho esas olarak distal tübülde ifade edilirken, FGF-23'ün fosfat taşıyıcıları ve D vitamini metabolizması üzerindeki etkileri proksimal tübülde meydana gelir. Onal ve ark. (2018), bunu kanıtlamak için, yaptıkları bir çalışmada farelerin proksimal tübülünde Klotho'nun ablasyonu gerçekleştirilmiş ve yüksek fosfatlı bir diyetle tehdit edildiğinde bu durumun hiperfosfatemi ile sonuçlandığı belirlenmiştir. İnsanlarda veya farelerde Klotho eksikliği, FGF23 eksikliğine benzer şekilde şiddetli hiperfosfatemiye ve 1,25(OH)₂D seviyelerinde azalmaya yol açar. KBH ilerlemesi sırasında α -Klotho seviyelerinin FGF23'teki artışa paralel olarak azaldığı ortaya koyulmuştur. Bizim sonuçlarımız da bu verileri destekler niteliktedir.

Çalışmamızda FGF23'ün böbrek fonksiyonu ile olan ilişkisi bilindiğinden FGF23 ve α -Klotho'nun serum düzeyleri sıçana özgü ELISA kit ile; idrarda fosfat atılım düzeylerini de sıçana özgü kolorimetrik kit kullanarak ölçtük. İlk olarak tüm hayvan gruplarına ait serum örneklerinde FGF23 düzeylerini ELISA kit yardımıyla belirledik. Buna göre, kontrol grubuna kıyasla, nefrektomi gruplarında serum FGF23 seviyelerini daha yüksek olarak belirledik. Ayrıca, sıçana özgü ELISA kit kullanarak serum α -Klotho seviyelerini belirledik. Buna göre, Nefrektomi grubuna kıyasla kök hücre verilerek 15 gün beklenen grup ($p<0.001$) ve kök hücre verilerek 30 gün beklenen gruptaki ($p<0.05$) Klotho düzeyleri, istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulduk. Nefrektomi yapıldıktan sonra 15 gün beklenen gruptaki α -Klotho ekspresyonu ise, kök hücre enjeksiyonundan sonra 15 gün beklenen gruptaki ekspresyona kıyasla anlamlı şekilde düşüktü.

Desbiens ve ark., (2022) yaptıkları bir çalışmada, KBH olan (çoğunlukla evre 3A) ve olmayan bireyler arasında FGF23 düzeylerinin farkında bakmışlar ve KBH'de FGF23'ün erken dönemde arttığını gösteren bir sonuç ortaya koymuşlardır. Konu ile ilgili yapılan bir başka çalışmada, KBH'de, eGFR 60 mL/dk/1,73 m²'nin altına düştüğü anda, fosfat tutulumu, plazma D vitamini ve kalsiyumda azalma ile birlikte FGF23 düzeylerinde artış ortaya koyulmuştur. Araştırmacılar, tüm bu değişen faktörlerin, ilerlemiş böbrek hasarı ve sekonder hiperparatiroidizm gelişimi ile olan ilişkisini göstermişlerdir (Sinha ve ark., 2022). Bizim çalışmamızda, böbrek hasarının ilerleyişi ile ölçülen FGF23 seviyelerindeki artış, bu örnek çalışmaları destekler niteliktedir.

Çalışmamızda aynı zamanda, sıçana özgü kolorimetrik kit kullanarak, tüm hayvan gruplarına ait 24 saatlik idrar örneklerinde fosfat düzeylerini belirledik. Kitin belirttiği şekilde hazırlanan standart grafikten yararlanılarak idrar fosfat seviyelerini hesapladık. Buna göre, nefrektomi grubundaki idrar fosfat düzeyleri, kök hücre verilen her iki gruba kıyasla anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$). Nefrektomi oluşturulduktan sonra 30 gün beklenen grupta, kök hücre verilen her iki gruba kıyasla fosfat seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştı ($p<0,05$). Nefrektomi yapıldıktan sonra 15 gün beklenen gruptaki idrar fosfat atılımının, kök hücre enjeksiyonu yapılan her iki gruptaki idrar fosfat ekspresyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$) şekilde yüksek olduğunu belirledik.

Paratiroid hormonu ve FGF23, KBH patogenezinde merkezi bir rol oynar. Her iki hormon da böbrek fonksiyonu azaldıkça, muhtemelen normal fosfat dengesini korumaya bir yanıt olarak artar, ancak hastalar böbrek yetmezliğine ulaştığında, PTH ve FGF23 fosfatürik etkilerini göstermede başarısız olur, bu da hiperfosfatemiye ve PTH ve FGF23'te daha fazla yükselmeye yol açar. Orta ve ileri evre KBH'li hastalarda, normofosfatemi, FGF23 ve PTH'nin fosfatüriyi artırmaya yönelik etkisi ile korunur, ancak KBH'nin ilerlemesi, renal Klotho ekspresyonunun azalmasıyla birlikte böbreğin üriner fosfat salgılama yeteneğinde bir azalmaya yol açarak belirgin bir hiperfosfatemi gelişmesi ile sonuçlanır (Komaba 2023). Bu sürece kalsitriol düzeylerinde kademeli bir azalma eşlik eder ve bu da PTH salgılanmasını daha da uyarır. Bu nedenle ilerlemiş KBH'li hastalarda sıklıkla hiperfosfatemi, azalmış kalsitriol seviyeleri ve sekonder hiperparatiroidizm görülür. Bu veriler bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, kronik böbrek hasarının tanı ve progresyonunun değerlendirilmesi için önemli bir biyobelirteç olan FGF23'ün renal

hasardaki önemini elde ettiğimiz bulgularla desteklediğimizi düşünüyoruz. Aynı zamanda, elde ettiğimiz sonuçların, mezenkimal kök hücrelerin kronik böbrek hasarı üzerindeki iyileştirici etkisi ile ilgili yapılan çalışmalara katkı sağlayabileceğine inanıyoruz.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda nefrektomi modeli yapılarak kronik böbrek hastalığı oluşturulmuş sıçanlarda, mezenkimal kök hücrelerin terapötik etkileri önemli bir biyobelirteç olarak önerilen FGF23 ve onun koreseptörü Klotho'nun gen ve protein düzeyindeki ekspresyonları ile serum konsantrasyonundaki değişiklikler üzerinden incelenmiştir. Ayrıca deney grubuna dahil olan sıçanların tümünün, sakrifiye edilmeden önceki son 24 saatlik idrarı toplanmış, ve bu idrarlarda fosfat düzeyleri ile, albümin/kreatinin oranları ölçülmüştür. Çalışmamızın sonuçlarını aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

1. Fosfatürik bir hormon olan FGF23, kronik böbrek hastalığı için biyobelirteç olarak önerilen 251 aminoasitli bir polipeptiddir.

2. Tüm deney gruplarında, FGF23 protein ekspresyonları Western Blot yöntemi ile incelendiğinde, kontrol gruplarına kıyasla nefrektomi gruplarındaki protein ekspresyonlarında artış ortaya koyuldu. Buna ek olarak, FGF23'ün metabolik aktivitelerini gerçekleştirmek için ihtiyaç duyduğu koreseptör olan Klotho'nun da tüm deney gruplarındaki protein ekspresyonları Western Blot yöntemi ile incelenmiş; kontrol gruplarına kıyasla nefrektomi gruplarının protein ekspresyonlarındaki azalma belirlenmiştir. FGF23 ve Klotho için elde ettiğimiz bu sonuçlar, FGF23'ün etki mekanizmasını destekler niteliktedir. Mezenkimal kök hücre enjeksiyonundan sonra ise nefrektomi gruplarında FGF23 protein ekspresyon seviyesindeki azalma ile Klotho protein ekspresyon seviyelerinde artış, renal hasara karşı MKH'lerin terapötik etkilerinden kaynaklanıyor olabilir.

3. Tüm gruplar için FGF23 ve Klotho mRNA ekspresyonları Real-time PCR metodu ile incelenmiştir. FGF23 mRNA ekspresyonları, kontrol grubuna kıyasla, nefrektomi yapılan gruplarda artmış; kök hücre enjeksiyonundan sonra ise azalma göstermiştir. Kontrol grubuna kıyasla, nefrektomi gruplarında Klotho mRNA ekspresyonunda tespit edilen azalma ise, kök hücre enjeksiyonundan sonra artış göstermiştir. Gen ve protein düzeyinde elde ettiğimiz paralel sonuçlar, mezenkimal kök hücre uygulanmasının protein düzeyinde olduğu gibi gen düzeyinde de bir iyileşmeye neden olması ile açıklanabilir.

4. Hayvan modeli olarak subtotal nefrektomi oluşturulduktan sonra, KBH'nin önemli parametrelerinden biri olarak kabul edilen "fosfatüri"yi doğrulamak adına, 24 saatlik idrarda fosfat atılım düzeyleri kolorimetrik kit yardımıyla belirlenmiştir. Buna göre,

fibrozis şiddeti arttıkça idrar ile atılan fosfat miktarının giderek arttığı; kök hücre enjeksiyonundan sonra ise anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuştur. FGF23 gibi PTH de, KBH patogeneğinde merkezi bir rol oynar. Her iki hormon da böbrek fonksiyonu azaldıkça, muhtemelen normal fosfat dengesini korumaya bir yanıt olarak artar, ancak böbrek hasarı ilerlediğinde PTH ve FGF23 fosfatürik etkilerini göstermede başarısız olur, bu da hiperfosfatüriye ve PTH ve FGF23'te daha fazla yükselmeye yol açar. Elde ettiğimiz sonuçlar bu mekanizmayla uyumlu olmakla birlikte, mezenkimal kök hücrelerin renal hasar üzerindeki terapötik etkisini de destekler niteliktedir.

5. Hayvan modeli olarak subtotal nefrektomi oluşturulduktan sonra, KBH'nin önemli parametrelerinden bir diğeri olarak kabul edilen albümin/kreatinin oranı da 24 saatlik idrarda sıçana özgü kolorimetrik kit ile belirlenmiştir. Buna göre, deney gruplarında böbrek hasarının şiddeti arttıkça idrarda hesaplanan albümin/kreatinin oranının giderek arttığı; kök hücre enjeksiyonundan sonra bu artışın yerini azalmaya bıraktığını tespit ettik. Bu sonuçlar da, hayvan modelimizin doğruluğunu bize göstermiştir.

Sonuç olarak, kronik böbrek hasarının tanı ve progresyonunun değerlendirilmesi için önemli bir biyobelirteç olan ve uygun terapötik müdahale seçimlerine yol açan değerli klinik bilgiler sağlamaya yardımcı olabileceğine inandığımız FGF23'ün renal hasardaki önemini, elde ettiğimiz bulgularla desteklediğimizi düşünmekteyiz. Aynı zamanda, elde ettiğimiz sonuçların, mezenkimal kök hücrelerin kronik böbrek hasarı üzerindeki iyileştirici etkisi ile ilgili yapılan çalışmalara katkı sağlayabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

Abecassis M., Bartlett S. T., Collins A. J., Davis C. L., Delmonico F. L., Friedewald J. J., Hays R., Howard A., Jones E., Leichtman A. B., Merion R. M., Metzger R. A., Pradel F., Schweitzer E. J., Velez R. L., and Gaston R. S. Kidney Transplantation as Primary Therapy for End-Stage Renal Disease: A National Kidney Foundation/Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Conference. Clin J Am Soc. Nephrol. 2008 Mar; 3(2): 471–480.

Afshari A., Shamdani S., Uzan G., Naserian S., Azarpira N. Different approaches for transformation of mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. Stem Cell Res Ther. 2020 Feb 7;11(1):54.

Akan E. Sıçanlarda Kronik Böbrek Yetmezliğinin Progresyonunda Adiponektin Etki Mekanizması ve Bu Mekanizma Üzerine Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2018.

Alfarano C., Roubex C., Chaaya R., Ceccaldi C., Calise D., Mias C., Cussac D., Bascands J.L., Parini A. Intraparenchymal Injection of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reduces Kidney Fibrosis after Ischemia-Reperfusion in Cyclosporine-Immunosuppressed Rats. Cell Transplantation, Vol. 21, pp. 2012.

Almeida A., Lira R., Oliveira M., Martins M., Azevedo Y., Silva K. R., Carvalho S., Cortez E., Stumbo A. C., Carvalho L., Thole A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation ameliorates renal injury through anti-fibrotic and anti-inflammatory effects in chronic experimental renovascular disease. Biomed J. 2022 Aug; 45(4): 629–641.

An X., Liao G., Chen Y., Luo A., Liu J., Yuan Y., Li L., Yang L., Wang H., Liu F., Yang G., Yi S., Li Y., Cheng J., Lu Y. Intervention for early diabetic nephropathy by mesenchymal stem cells in a preclinical nonhuman primate model. Stem Cell Research & Therapy 2019. 10:363.

Andrukhova O., Slavic S., Smorodchenko A., Zeitz U., Shalhoub V., Lanske B., Pohl E. E., Erben R. G. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. EMBO Mol Med. 2014 Jun;6(6):744-59.

Bai Y., Wang J., He Z., Yang M., Li L., Jiang H. Mesenchymal Stem Cells Reverse Diabetic Nephropathy Disease via Lipoxin A4 by Targeting Transforming Growth Factor β (TGF- β)/smad Pathway and Pro-Inflammatory Cytokines. *Med Sci Monit.* 2019; 25: 3069–3076.

Balzer M. S., Rohacs T., Susztak K. How Many Cell Types Are in the Kidney and What Do They Do? *Annu Rev Physiol.* 2022. 10:84:507-531.

Biscetti F., Rando M. M., Cecchini A. L., Nicolazzi M. A., Rossini E., Angelini F., Iezzi R., Eraso L. H., Dimuzio P. J., Pitocco D., Gasbarrini A., Massetti M., Flex A. The role of Klotho and FGF23 in cardiovascular outcomes of diabetic patients with chronic limb threatening ischemia: a prospective study. *Scientific Reports.* 2023. 13:6150.

Cavaglieri R. C., Martini D., Sogayar M. C., Noronha I. L. Mesenchymal Stem Cells Delivered at the Subcapsule of the Kidney Ameliorate Renal Disease in the Rat Remnant Kidney Model. *Transplantation Proceedings.* 2009;41(3):947–951.

Cetinkaya B., Unek G., Kipmen-Korgun D., Koksoy S., Korgun E. T. Effects of Human Placental Amnion Derived Mesenchymal Stem Cells on Proliferation and Apoptosis Mechanisms in Chronic Kidney Disease in the Rat. *International Journal of Stem Cells* Vol. 12, No. 1, 2019.

Chartsrisak K., Vipattawat K., Assanatham M., Nongnuch A., Ingsathit A., Domrongkitchaiporn S., Sumethkul V., and Distha-Banchong S. Mineral metabolism and outcomes in chronic kidney disease stage 2–4 patients. *BMC Nephrology* 2013, volume 14, Article number: 14.

Chen T. K., Hoenig M. P., Nitsch D., Grams M. E. Advances in the management of chronic kidney disease. *BMJ.* 2023 Dec 5:383: e074216.

Christofides E. A. ve Desai N. Optimal Early Diagnosis and Monitoring of Diabetic Kidney Disease in Type 2 Diabetes Mellitus: Addressing the Barriers to Albuminuria Testing. *Journal of Primary Care & Community Health* Volume 12: 1–7. 2021.

Coresh J., Heerspink H. J. L., Sang Y., Matsushita K., Arnlov J., Astor B. C., Black C., Brunskill N. J., Carrero J. J., Feldman H. I., Fox C. S., Inker L. A., Ishani A., Ito S., Simerjot S., Konta T., Polkinghorne K., Romundstad S., Solbu M. D., Stempniewicz N., Stengel B., Tonelli M., Umesawa M., Waikar S. S., Wen C. P.,

Wetzels J. F. M. Woodward M., Grams M. E., Kovesdy C. P., Levey A. S., Gansevoort R. T. Change in albuminuria and subsequent risk of end-stage kidney disease: an individual participant-level consortium meta-analysis of observational studies. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019; 7: 115–127.

Daehn I. S., Duffield J. S. The glomerular filtration barrier: a structural target for novel kidney therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Oct;20(10):770-788.

Desbiens L. C., Sidibe A., Ung R.V., Mac-Way F. FGF23-Klotho Axis and Fractures in Patients Without and With Early CKD: A Case-Cohort Analysis of CARTaGENE. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 May 17;107(6): e2502-e2512.

Eirin A., Zhang X., Zhu X. Y. Renal vein cytokine release as an index of renal parenchymal inflammation in chronic experimental renal artery stenosis. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(2), 274–282.

Eirin A., Zhu X. Y., Ferguson C. M., Riester S. M., van Wijnen A. J., Lerman A., Lerman L. O. Intra-renal delivery of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury after reversal of hypertension in porcine renovascular disease. *Stem Cell Res Ther.* 2015; 6(1): 7.

Fliser D., Kollerits B., Neyer U., Ankerst D. P., Lhotta K., Lingenhel A., Ritz E., Kronenberg F., MMKD Study Group; Kuen E., König P., Kraatz G., Mann J. F. E., Müller G. A., Köhler H., Riegler P. Fibroblast growth factor 23 predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 2600–2608.

Gao F., Chiu S. M., Motan D. A. L., Zhang Z., Chen L., Ji H-L., H-F Tse, Fu Q-L., Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis.* 2016 Jan 21;7(1): e2062.

Green J. B., Mottl A. K., Bakris G., Heerspink H. J. L., Mann J. F. E., McGill J. B., Nangaku M., Rossing P., Scott C., Gay A., Agarwal R. Design of the COmbination effect of FInerenone anD EmpaglifloziN in participants with chronic kidney disease and type 2 diabetes using a UACR Endpoint study (CONFIDENCE). *Nephrol Dial Transplant.* 2023 Apr; 38(4): 894–903.

Go G., Yoon Y. M., Yoon S., Lee G., Lim J. H., Han S.Y., Lee S.H. Melatonin Protects Chronic Kidney Disease Mesenchymal Stem/Stromal Cells against Accumulation of

Methylglyoxal via Modulation of Hexokinase-2 Expression. *Biomolecules & Therapeutics* 30(1), 28-37 (2022).

Habiba U. E., Khan N., Greene D. L., Shamim S., Umer A. The therapeutic effect of mesenchymal stem cells in diabetic kidney disease. *J Mol Med (Berl)*. 2024; 102(4): 537–570.

Heerspink H. J. L., Greene T., Tighiouart H., Gansevoort R. T., Coresh J., Simon A. L., Chan T. M., Hou F. F., Lewis J. B., Locatelli F., Praga M., Schena F. P., Levey A.S., Inker L. A. Change in albuminuria as a surrogate endpoint for progression of kidney disease: a meta-analysis of treatment effects in randomised clinical trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2019; 7: 128–139.

Hoang D. M., Pham P. T., Bach T. Q., Ngo A. T. L., Nguyen Q. T., Phan T. T. K., Nguyen G. H., Phuong T. T. Le, Hoang V. T., Forsyth N. R., Heke M., Nguyen L. T. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022; 7: 272.

Hong S., Zhu X.Y., Jiang Y., Zhang L., Tang H., Jordan K. L., Saadiq I. M., Huang W., Lerman A., Eirin A., Lerman L. O. Autologous Extracellular Vesicles Attenuate Cardiac Injury in Experimental Atherosclerotic Renovascular Disease More Effectively Than Their Parent Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2023 Apr;19(3):700-712.

Iseki K. Role of Urinalysis in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease (CKD) *JMAJ* 54(1): 27–30, 2011.

Jong M. A. D., Eisenga M. F., van Ballegooijen A. J., Beulens J. W. J., Vervloet M. G., Navis G., Gansevoort R. T., Bakker S. J. L. and De Borst M. H. Fibroblast growth factor 23 and new-onset chronic kidney disease in the general population: the Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease (PREVEND) study. *Nephrol Dial Transplant* (2021) 36: 121–128 doi: 10.1093/ndt/gfz266.

Khodeir S. A., Okda H. I., Abdalal H. M. Clinical Significance of Fibroblast Growth Factor-23 and Soluble Alpha Klotho in Different Stages of Chronic Kidney Disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2019;30(1):108-118.

Komaba H. Roles of PTH and FGF23 in kidney failure: a focus on nonclassical effects. *Clin Exp Nephrol*. 2023; 27(5): 395–401.

Kuro-o M. Klotho and the Aging Process. *Korean J Intern Med*. 2011 Jun; 26(2): 113–122.

Kurpas A., Supeł K., Idzikowska K., and Zielińska M. FGF23: A Review of Its Role in Mineral Metabolism and Renal and Cardiovascular Disease. *Hindawi Disease Markers* Volume 2021, Article ID 8821292, page 12.

Li Y., Chen F., Wei A., Bi F., Zhu X., Yin S., et al. Klotho recovery by genistein via promoter histone acetylation and DNA demethylation mitigates renal fibrosis in mice. *J Mol Med* (2019) 97(4):541–52.

Liu B., Hu Y., Tian D., Dong J., Li B. F. Assessing the effects of tempol on renal fibrosis, inflammation, and oxidative stress in a high-salt diet combined with 5/6 nephrectomy rat model: utilizing oxidized albumin as a biomarker. *BMC Nephrol*. 2024 Feb 23;25(1):64.

Liu D, Cheng F., Pan S., & Liu Z. Stem cells: a potential treatment option for kidney diseases. *Stem Cell Research & Therapy*, 2020, volume 11, Article number: 249.

Liu H. Wang J., Yue G., Xu J. Placenta-derived mesenchymal stem cells protect against diabetic kidney disease by upregulating autophagy-mediated SIRT1/FOXO1 pathway. *Ren Fail*. 2024; 46(1): 2303396.

Lopez-Giacoman S., and Madero M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J Nephrol*. 2015 Feb 6; 4(1): 57–73.

Mace M. L., Gravesen E., Nordholm A., Hofman-Bang J., Secher T., Olgaard K., and Lewin E. Kidney fibroblast growth factor 23 does not contribute to elevation of its circulating levels in uremia. *Kidney Int*. 2017 Jul;92(1):165-178.

Manou E., Thodis E., Arsos G., Pasadakis P., Panagoutsos S., Papadopoulou D., and Papagianni A. Fibroblast Growth Factor 23 and α -Klotho Protein Are Associated with Adverse Clinical Outcomes in Non-Dialysis CKD Patients. *Kidney Blood Press Res* 2020; 45:900–915.

Maires M. P.C., Pereira K. R., Silva E. K. V. B., Souza V. H. R., Teles F., Barbosa P.F., Garnica M. R., Ornellas F. M., Noronha I. L., Fanelli C. Synergic Renoprotective Effects of Combined ASC Therapy with RAAS Blockade in Experimental Advanced CKD. *Stem Cells Int*. 2022 Mar 25:2022:5111782.

Martin A., David V., and Quarles L. D. Regulation and Function of the FGF23/ Klotho Endocrine Pathways. *Physiological Reviews* 2012, 92:131–155.

Martínez-Heredia L., Canelo-Moreno J. M., García-Fontana B., Muñoz-Torres M. Non-Classical Effects of FGF23: Molecular and Clinical Features. *Int J Mol Sci.* 2024 May; 25(9): 4875.

Mason N. A. Polypharmacy and medication-related complications in the chronic kidney disease patient. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011 Sep;20(5):492-7.

Mattinzoli D., Molinari P., Romero-González G., Bover J., Cicero E., Pesce F., Abinti M., Conti C., Castellano G., Alfieri C. Is there a role in acute kidney injury for FGF23 and Klotho? *Clinical Kidney Journal*, Volume 16, Issue 10, October 2023, Pages 1555–1562.

Mende C. W. Chronic Kidney Disease and SGLT2 Inhibitors: A Review of the Evolving Treatment Landscape. *Adv Ther.* 2022; 39(1): 148–164.

Mendoza J. M., Isakova T., Cai X., Bayes L. Y., Faul C., Scialla J. J., Lash J. P., Chen J., He J., Navaneethan S., Negrea L., Rosas S. E., Kretzler M., Nessel L., Xie D., Anderson A. H., Raj D. S., Wolf M. Inflammation and elevated levels of fibroblast growth factor 23 are independent risk factors for death in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2017; 91: 711–719.

Muñoz-Castañeda J. R., Rodelo-Haad C., de Mier M. V. P-R., Martin-Malo A., Santamaria R., and Rodriguez M. Klotho FGF23 and Wnt Signaling as Important Players in the Comorbidities Associated with Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel).* 2020.

Nagaishi K., Mizue Y., Chikenji T., Otani M., Nakano M., Konari N., Fujimiya M. Mesenchymal stem cell therapy ameliorates diabetic nephropathy via the paracrine effect of renal trophic factors including exosomes. *Sci Rep.* 2016; 6: 34842.

Neuhuber B., Swanger S. A., Howard L., Mackay A., Fischer I. Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp. Hematol.* 2008 Sep;36(9):1176-85.

Ni W., Fang Y., Xie L., Liu X., Shan W., Zeng R., Liu J., Liu X. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation Alleviates Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. *J Histochem Cytochem.* 2015 Nov; 63(11): 842–853.

Ogi D. A. ve Jin S. Transcriptome-Powered Pluripotent Stem Cell Differentiation for Regenerative Medicine. *Cells*. 2023 May 22;12(10):1442.

Onal M., Carlson A. H., Thostenson J. D., Benkusky N. A., Meyer M. B., Lee S. M. A novel distal enhancer mediates inflammation-, PTH-, and early onset murine kidney disease-induced expression of the mouse FGF23 gene. *JBMR plus* 2018. 2(1):31–46.

Pan B., Fan G. Stem cell-based treatment of kidney diseases. *Exp Biol Med* (Maywood). 2020 May;245(10):902-910. doi: 10.1177/1535370220915901.

Peired A. J., Sisti A., Romagnani P. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Kidney Disease: A Review of Clinical Evidence. *Stem Cells Int*. 2016:4798639.

Perico N., Casiraghi F., Remuzzi G. Clinical Translation of Mesenchymal Stromal Cell Therapies in Nephrology. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Feb;29(2):362-375.

Portales-Castillo I., Simic P. PTH, FGF-23, Klotho and Vitamin D as regulators of calcium and phosphorus: Genetics, epigenetics and beyond. *Front Endocrinol* (Lausanne). 2022 Sep 29;13:992666.

Reinders M. E. J., Groeneweg K. E., Hendriks S. H., Bank J. R., Dreyer G. J., de Vries A. P. J., van Pel M., Roelofs H., Huurman V. A. L., Meij P., Moes D. J. A. R., Fibbe W. E., Claas F. H. J., Roelen D. L., van Kooten C., Kers J., Heidt S., Rabelink T. J., de Fijter J. W. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell therapy with early tacrolimus withdrawal: The randomized prospective, single-center, open-label TRITON study. *Am J Transplant*. 2021 Sep; 21(9): 3055–3065.

Reiss A.B., Jacob B., Zubair A., Srivastava A., JohnsonM., De Leon J. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *J Clin Med*. 2024 Apr; 13(7): 1881.

Rodelo-Haad C., Santamaria R., Muñoz-Castañeda J. R., Pendón-Ruiz de Mier M. V., Martín- Malo A., and Rodríguez M. FGF23, Biomarker or Target? *Toxins* (Basel). 2019 Mar; 11(3): 175.

Schauwer C. D., Meyer E., Van de Walle G. R., Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*. 2011 May;75(8):1431-43.

Shaker J. L., Deftos L. et al. Calcium and Phosphate Homeostasis. *Endocrinology Book*, 2023.

Sivakumar M, Dineshshankar J., Sunil P. M., Nirmal R. M., Sathiyajeeva J., Saravanan B., and Senthileagappan A. R. Stem cells: An insight into the therapeutic aspects from medical and dental perspectives. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015 Aug; 7(Suppl 2): S361–S371.

Sinha A. K., Sun L., Didero M., Martins D., Norris K. C., Lee J. E., Meng Y. X., Sung J. H., Sayre M., Carpio M. B., Nicholas S. B. Vitamin D3 Repletion Improves Vascular Function, as Measured by Cardiorenal Biomarkers in a High-Risk African American Cohort. *Nutrients.* 2022 Aug; 14(16): 3331.

Sugiura H., Matsushita A., Futaya M., Teraoka A., Akiyama K., Usui N., Nagano N., Nitta K., Tsuchiya K. Fibroblast growth factor 23 is upregulated in the kidney in a chronic kidney disease rat model. *PLoS One.* 2018; 13(3): e0191706.

Sun J., Zhao F., Zhang W., Lv J., Yin A. BMSCs and miR-124a ameliorated diabetic nephropathy via inhibiting notch signalling pathway. *J Cell Mol Med.* 2018 Oct; 22(10): 4840–4855.

Takemura S., Shimizu T., Oka M., Sekiya S., Babazono T. Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cell sheets directly into the kidney suppresses the progression of renal injury in a diabetic nephropathy rat model. *J Diabetes Investig.* 2020 May; 11(3): 545–553.

Takkavatakarn K., Wuttiathanun T., Phannajit J., Praditpornsilpa K., Eiam-Ong S., Susantitaphong P. Effectiveness of fibroblast growth factor 23 lowering modalities in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *Int Urol Nephrol.* 2021

Titan S. M., Zatz R., Gracioli F. G., dos Reis L. M., Barros R. T., Jorgetti V., and Moysés R. M. A. FGF-23 as a Predictor of Renal Outcome in Diabetic Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6: 241–247.

Trivedi N., Kumar D. Fibroblast growth factor and kidney disease: Updates for emerging novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 2021 Dec;236(12):7909-7925.

Vervloet M. G. FGF23 measurement in chronic kidney disease: What is it really reflecting? *Clinica Chimica Acta* Volume 505, 2020, Pages 160-166.

Wallace M. A. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J.* 1998, 68(5):800, 803-16, 819-20; quiz 821-4.

Wolfe R. A., Ashby V. B., Milford E. L., Ojo A. O., Ettenger R. E., Agodoa L. Y., Held P. J., Port F. K. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999; 341:1725–30.

Wu Q., Fan W., Zhong X., Zhang L., Niu J., Gu Y. Klotho/FGF23 and Wnt in SHPT associated with CKD via regulating miR-29a. *Am J Transl Res.* 2022; 14(2): 876–887.

Yamada S., Giachelli C. M. Vascular Calcification in KBH-MBD: Roles for Phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone.* 2017 Jul;100:87-93.

Yan Z., Shao T. Chronic Inflammation in Chronic Kidney Disease. *Nephron* (2024) 148 (3): 143–151.

Zakrzewski W., Dobrzyński M., Szymonowicz M., Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res. Ther.* 2019 Feb 26;10(1):68.

Zhang X., Fang Y., Zou Z., Hong P., Zhuo Y., Xu Y., Wan J. Risk Factors for Progression of CKD with and without Diabetes. *J Diabetes Res.* 2022 Aug 22:2022:9613062.

Zou D., Wu W., He Y., Ma S., Gao J. The role of klotho in chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2018; 19: 285.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ezgi	Uyruğu	T.C.
Soyadı	AKAN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Beşiktaş Atatürk Anadolu Lisesi	2008
Lisans	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi -Biyokimya Bölümü	2014
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü	2014-2015
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	2018
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Devam ediyor

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Stajyer	Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009
Stajyer	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2012
Erasmus Researcher	Miguel Hernández University of Elche, Department of Pharmacology, Pediatrics and Organic Chemistry	2013
Erasmus Researcher	Miguel Hernández University of Elche, Department of Bioengineering	2013
Erasmus Researcher	Medical University of Vienna, Austria	2017
Erasmus Researcher	Karolinska Institute, Stockholm, Sweden	2023
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (ÖYP)	2015-2022
Araştırma Görevlisi	Amasya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı (ÖYP)	2015- devam ediyor

Yabancı Dil

	Sınav türü	Puan
İngilizce	YÖKDİL	81.25

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre
Sıçanlarda Kronik Böbrek Hastalığının Progresyonu Üzerine Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi	BAP	2016-2018
Sıçanlarda Kronik Böbrek Yetmezliğinin Progresyonunda Adiponektin Etki Mekanizması ve Bu Mekanizma Üzerine Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi	BAP	2016-2019
Steviosid'in Normal ve Hiperglisemik Koşullarda Sıçan Plasentasında, İnsan Plasental Endotel ve Trofoblast Hücrelerinde Glukoz Transportuna Etkisinin Araştırılması	TÜBİTAK	2017-2020
Sıçanlarda Kronik Böbrek Hastalığının Progresyonu Üzerine Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisinin NADPH Oksidaz Üzerinden Değerlendirilmesi	BAP	2019-2022
Kronik Böbrek Hastalığı Oluşturulmuş Sıçanlarda FGF23 ve Hastalığın Progresyonu Üzerine Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi	BAP	2021- 2024

Yayınlar ve Bildiriler:

Kipmen-Korgun D., **Akan E.**, Mendilcioglu I., Suleymanlar G., Korgun E. T. **“Nefrektomi yapılmış sıçanlarda mezenkimal kök hücrelerin fibrozis üzerine etkisi”**. 2. Ulusal Proteomik Kongresi. 24-25 Kasım 2017, İstanbul, Türkiye.

Suleymanlar G., **Akan E.**, Cetinkaya B., Molbay M., Ozmen A., Koksoy S., Korgun E. T. **“Sıçanlarda Oluşturulan 5/6 Nefrektomi Modelinde Plasenta Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Renal Fibrozis Üzerine Potansiyel Etkileri”**. Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 2016. 33. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi SS/OP-021, 19-23 Ekim 2016, Antalya, Türkiye.

Akan E., Cetinkaya B., Koksoy S., Mendilcioglu I., Kipmen Korgun D., Suleymanlar G., Korgun E. T. **“The effects of amnion-derived mesenchymal stem cells on fibrosis mechanisms in nephrectomy rat model”**. 5th Annual Conference of GSCN Poster Presentation No 001, 11-13 September 2017, Jena, Germany.

Akan E. **“Cardiovascular Research-an overview of the process of atherosclerosis”** Course certificate. Karolinska Institutet and Karolinska University Hospital. 8-12.05.2023. Stockholm, Sweden.

Akan E. **“Immunohistochemistry Staining Revealed Pathological Changes in Mouse AAA Development Upon VSMC Pcsk6 Deficiency”**, poster sunum. 26. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. 20-23 Eylül 2023. Eskişehir, Türkiye.