



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

**RENAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN SIÇAN
MODELİNDE ADİPOZ DOKU-MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN VE
MELATONİNİN ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Fatma KOCADERE

**Temmuz, 2021
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RENAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN SIÇAN
MODELİNDE ADİPOZ DOKU-MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN VE
MELATONİNİN ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Fatma KOCADERE

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi. Nazlı ÇİL

DENİZLİ 2021

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmasının yapılması aşamalarında ve bulguların analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Fatma KOCADERE

İmza :

ÖZET

RENAL İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULAN SIÇAN MODELİNDE ADİPOZ DOKU-MEZANKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN VE MELATONİNİN ETKİSİ

Fatma KOCADERE

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL

Haziran 2021, 76 Sayfa

Bu çalışmada renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre ve melatonin uygulamasının böbrekteki etkisini incelemeyi amaçladık.

Wistar Albino cinsi 60 erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubu (K) (n:10), Sham grubu (S) (n:10), İskemi Reperfüzyon grubu (IR) (n:10), iskemi reperfüzyon oluşturulduktan sonra intraperitoneal olarak melatonin verilen grup (IR+M) (n:10), iskemi reperfüzyon oluşturulduktan sonra lokal olarak adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulanan grup (IR+KH) (n:10), iskemi reperfüzyon oluşturulduktan sonra lokal olarak adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre ve intraperitoneal olarak melatonin birlikte verilen grup (IR+KH+M) (n:10). Her gruptan sıçanların 5 tanesi 3. gün, 5 tanesi 14. gün sakrifiye edildi. Alınan kan örneklerinden BUN, kreatinin bakıldı. Her gruptan alınan böbrek dokuları rutin doku takibin ardından Hematoksilen Eozin ve Masson Trikrom boyama yapılarak histopatolojik olarak skorlama ile incelendi. Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 ekspresyonları immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. TUNEL yöntemiyle apoptotik indeks hesaplandı.

IR grubunda kan BUN, kreatinin düzeyleri diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Tedavi grubunda hem 3. günde hem de 14. günde kan kreatinin düzeyleri IR grubuna göre düşük saptansa da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Kreatinin düzeylerinde IR+KH+M grubunda 14. günde 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı. 14. günde değerler karşılaştırıldığında IR grubunda BUN düzeyleri yine aynı değerlerde olmasına rağmen, M ve IR+KH+M gruplarında anlamlı olarak düştüğü görüldü. Yapılan histolojik değerlendirmede IR grubunda 3. günde glomerül epiteli ve tübül hücrelerinde dökülmeler, bowman boşluğunda genişleme, kanama alanları saptandı. 14. günde bu değişikliklerle birlikte fibrotik alanlar görüldü. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da tedavi gruplarında IR grubuna göre histolojik skorlama düşüktü. 3. ve 14. günleri kendi aralarında karşılaştırdığımızda IR+KH+M grubu 14. günde histolojik skorlama anlamlı olarak düşük bulundu. Kaspaz-3, Bax ekspresyonu IR grubunda artarken, tedavi grubunda özellikle 14. günde azaldığı saptandı. Bununla birlikte Bcl-2 ekspresyonunun IR grubunda tüm yapılarda negatif gözlenirken tedavi gruplarında ekspresyonun arttığı saptandı. Apoptozis IR grubunda en yüksek oranda saptanırken, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da tedavi gruplarında düştüğü görüldü. Çalışmamızın sonuçlarına göre uygulanan tedaviler iskemi reperfüzyon hasarında etkili olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Renal İskemi Reperfüzyon, Melatonin, Kök Hücre, Kaspaz-3, Bax, Bcl-2, TUNEL.

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2020SABE014).

ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate the effect of adipose-derived mesenchymal stem cell and melatonin administration on kidney in rats with renal ischemia-reperfusion injury.

60 male Wistar Albino rats were used. Rats were divided into 6 groups. Control group (K) (n:10), Sham group (S) (n:10), ischemia reperfusion group (IR) (n:10), group given melatonin intraperitoneally after ischemia reperfusion is created (IR+M) (n:10), group given locally adipose-derived mesenchymal stem cells after ischemia reperfusion is created (IR+KH) (n:10), group given locally with adipose-derived mesenchymal stem cells and intraperitoneally melatonin after ischemia reperfusion is created (IR+KH+M) (n:10). 5 of the rats from each group are 3. day, 5 of them 14. the day was sacrificed. BUN, creatinine were checked from the blood samples taken. Kidney tissues taken from each group were examined with histopathological scoring by staining Hematoxyline eosin and Masson's trichrome stain after routine tissue follow-up. Caspase-3, Bax, Bcl-2 expression were evaluated immunohistochemically. Apoptotic index was calculated by TUNEL method.

Blood BUN and creatinine levels were significantly higher in the IR group than in other groups ($p < 0.05$). Blood creatinine levels in both day 3 and day 14 were low in the treatment group, but it is not statistically significant ($p > 0.05$). A statistically significant decrease in creatinine levels was detected in the IR+KH+M group compared to day 3 on day 14. Although BUN levels in the IR group were still the same when the values on day 14 were compared, M and IR+KH+M groups were found to have dropped significantly. In histological evaluation, on the 3rd day in the IR group, the glomerul epithelial and tubule cells were shed, areas of dilation and bleeding were detected in the Bowman cavity. On the 14th day, fibrotic areas were seen with these changes. Although not statistically significant, histological scoring was low in treatment groups compared to the IR group. When we compared the 3rd and 14th days among themselves, the histological scoring of the IR+KH+M group on the 14th day was found to be significantly lower. Caspase-3, Bax expression increased in the IR group, but decreased in the treatment group especially at 14th day. However, Bcl-2 expression was negative in all structures in the IR group, while expression increased in the treatment groups. While apoptosis was detected at the highest level in the IR group, it was observed that it decreased in the treatment groups, although it was not statistically significant. According to the results of our study, the treatments applied were effective in correcting the ischemia reperfusion injury.

Keywords: Renal Ischemia Reperfusion, Melatonin, Stem Cell, Caspase, Bax, Bcl-2, TUNEL

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Project Coordinatin Unit through (Project numbers 2020SABE014).

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmamın tamamlanmasına kadar geçen süreçte değerli tecrübelerinden yararlandığım ve bana her türlü desteği büyük bir sabırla veren tez danışmanım çok değerli hocam Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Ü. Nazlı ÇİL'e, tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyerek tezime katkı sağlayan çok değerli yorumlarıyla tezime anlam katan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye ayrıca biyokimyasal analizlerde yardımını esirgemeyen Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Biyokimya Öğretim Üyesi Doç. Dr. Esin AVCI'ya ve cerrahi aşamada yardımına başvurduğum Cerrahi Tıp Bilimleri Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Ü. Yusuf ÖZLÜER'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım ve deneyimin yürütülmesi sırasında bana her konuda destek olan, Araş. Gör. Mutlu Yaka'ya, Araş. Gör. Elif ÖNDER'e, Araş. Gör. Hatice Şiyzen ÇOBAN'a, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı çalışanları olarak emeği geçen tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca bugünlere gelmemde her türlü desteği sağlayan hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan canım annem Nazife KOCADERE, babam Resul KOCADERE, kardeşim Fatih KOCADERE'ye ve nişanlım Emre YAŞAR'a kalben teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbreğin Embriyonik Gelişimi	3
2.2. Böbreğin pozisyon değişimleri.....	3
2.2.1. Pronefroz:.....	3
2.2.2. Mezonefroz:.....	3
2.2.3. Metanefroz (kalıcı börek):	4
2.3. Böbreklerin kan beslenmesindeki değişiklikler.....	4
2.4. Böbrek Yapısı, Histolojisi ve Fizyolojisi.....	5
2.5. Nefronların bölümleri:.....	6
2.5.1. Böbrek cisimciği ve kanın süzülme mekanizması:	6
2.6. İskemi ve Reperfüzyon.....	7
2.7. Kök Hücre	9
2.8. Farklılaşma Kapasitesine Göre Kök Hücreler	10
2.8.1. Totipotent kök hücre:	10
2.8.2. Pluripotent kök hücre:	10
2.8.3. Multipotent kök hücre:.....	10
2.9. Kök Hücre Kaynakları	11
2.9.1. Embriyonik kök hücreler:	11
2.9.2. Erişkin kök hücreler:	11
2.10. Melatonin	14
2.10.1. Melatonin sentezlenme mekanizması	15
2.10.2. Melatoninin koruyucu etki mekanizmaları	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
3.1. Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Transplantasyonu	18

3.2. Cerrahi Operasyon.....	18
3.3. Anestezi Uygulaması	19
3.4. Deney grupları ve protokol	19
3.4.1. Kontrol grubu (K):	19
3.4.2. Sham grubu (S):	19
3.4.3. İskemi reperfüzyon grubu (IR):	20
3.4.4. İskemi reperfüzyon + melatonin grubu (IR+M):	20
3.4.5. İskemi reperfüzyon + kök hücre grubu (IR+KH):	20
3.4.6. İskemi reperfüzyon + kök hücre + melatonin grubu (IR+ KH+M):	20
3.5. ELISA Yöntemi.....	21
3.6. Histopatoloji	22
3.6.1. Doku örneklerinin hazırlanması	22
3.6.2. Doku takibi.....	22
3.6.3. Hematoksilen-Eozin boyama	23
3.6.4. Masson Trikrom boyama	24
3.6.5. İmmünohistokimyasal boyama.....	24
3.6.6. TUNEL boyama.....	25
3.7. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR	27
4.1. Kök Hücre Karakterizasyonu.....	27
4.2. Grupların Kan BUN ve Kreatinin Değerlerinin Karşılaştırılması	28
4.3. Histolojik Değerlendirme	30
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	34
4.5. TUNEL Bulguları	41
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR.....	53
8. ÖZGEÇMİŞ	62
9. EKLER	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Böbrek genel görüntüsü.....	6
Şekil 4.1 Mezenkimal kök hücrelerin flow sitometri sonuçları.....	28
Şekil 4.2 ADMKH'nin üçüncü pasajda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik dokuya farklaşması	28
Şekil 4.3 Grupların kan kreatinin düzeylerinin karşılaştırmalı grafiksel analizi.....	29
Şekil 4.4 Grupların kan BUN düzeylerinin karşılaştırmalı grafiksel analizi.....	30
Şekil 4.5 3. gün sakrifiye edilen grupların H&E ve Masson Trikrom boyanma görüntüleri.....	32
Şekil 4.6 14. gün sakrifiye edilen grupların H&E ve Masson Trikrom boyanma görüntüleri.....	33
Şekil 4.7 Grupların histolojik olarak skorlamasının karşılaştırılması	34
Şekil 4.8 3. günde sakrifiye edilen grupların immünohistokimyasal görüntüleri	37
Şekil 4.9 3. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 eksprese eden hücrelerin H-Skoru analizi	38
Şekil 4.10 14. Günde sakrifiye edilen grupların immünohistokimyasal görüntüleri.	39
Şekil 4.11 14. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 eksprese eden hücrelerin H-Skoru analizi.....	40
Şekil 4.12 3. ve 14. günde sakrifiye edilen deney gruplarının TUNEL boyama görüntüleri	42
Şekil 4.13 3. ve 14. günde sakrifiye edilen deney gruplarının apoptotik indeks sonuçlarının karşılaştırılması.	43

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Hücre popülasyonlarının farklılaşma potansiyelini tanımlamak için kullanılan tanımlamalar.....	11
Tablo 4.1 Grupların kan kreatinin ve BUN sonuçları	30
Tablo 4.2 3. gün gruplarından alınan böbrek dokusundaki Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun H-skor analizi sonuçları.....	38
Tablo 4.3 14. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun H-skor analizi sonuçları.....	40
Tablo 4.4 Grupların histolojik skorlama ve TUNEL değerlendirme sonuçları	41

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA-NAT	Arilakilamin N-asetiltransferaz
ABY	Akut Böbrek Yetmezliği
ABH	Akut Böbrek Hastalığı
AD-MKH	Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre
AFSC	Amniyotik sıvı kök hücre
AMP	Adenozin Monofosfat
AQP	Aquoporin
a-SMA	Alfa düz kas aktin
ATP	Adenozin Trifosfat
BSA	Bovin Serum Albumin
BUN	Kan Üre Azotu
BUO	Bilateral Üreter Obstrüksiyon
Cr	Kreatinin
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate
EKH	Embriyonik Kök Hücre
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbet Assay
ET-1	Endotelin-1
Exo	Eksozom
H&E	Hematoksilen Eozin
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
H ₂ O	Hidrojen monoksit/su
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IGF-1	İnsulin-Like Growth Factor 1
IRI	İskemi reperfüzyon hasarı
IR	İskemi reperfüzyon
İPKH	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KBH	Kronik Böbrek Hastalığı
KBY	Kronik Böbrek Yetmezliği
KDH	Ksantin Dehidrojenaz
M	Melatonin
MDA	Melondialdehit
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NGAL	Nötrofil Jelatinaz ile İlişkili Lipokolin
nm	Nanometre
NO	Nitrik Oksit
OH	Hidroksil
O ₂	Oksijen
PAA	Poricoic Acid A
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Phosphate Buffered Salin
PCNA	Poliferatif Hücre Nükleer Antijeni

PMNL.....	Polimorf Nüveli Lökositler		
ROS.....	Serbest Oksijen Radikalleri		
SD.....	Sprague Dawley		
TDT.....	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase		
TUNEL.....	Terminal Uridine Nick End Labeling		
XO.....	Ksantin Oksidaz		
YKH.....	Yetişkin	Kök	Hücre

1. GİRİŞ

İskemi; bir dokuya kan akışının kısmen ya da tamamen ortadan kalkmasıdır. Dokunun yeterli düzeyde beslenememesi ve metabolik atıkların atılamaması sonucu sıvı-elektrolit dengesizliği oluşur. Buna bağlı olarak oluşan serbest oksijen radikallerinin (ROS) salınması dokunun zarar görmesine ve hücrel ölümlere neden olur. İskemi böbrekte akut böbrek yetmezliğine daha da ilerleyen boyutlarda kronik böbrek yetmezliğine kadar giden bir dizi olaylar dizisine sebep olmaktadır (Aydoğdu vd 2005, Şener vd 2009). Reperfüzyon ise dokuya yeniden kan akışının sağlanmasıdır ve dokuya yerleşen polimorf nüveli lökositler (PMNL) tarafından salınan mediyatörler ROS yıkımı artırıcı etki yaparak dokunun iskemiye göre daha fazla oranda zarar görmesine neden olmaktadır. İskemi sonucundan oluşan akut böbrek yetmezliği, glomerüler filtrasyon hızında azalma, tübüler nekroz ve böbrek damarlarında direnç oluşumuna sebep olurken buna bir de reperfüzyon ile dokuya nötrofillerin gelmesi ve mediatörlerin etkileri de eklenince apoptoz yoğunluğu da fazla olmaktadır. Böbrekler karmaşık mikrovasküler ağ yapısı ve yüksek enerjiye duydukları ihtiyaçtan dolayı diğer dokulara göre iskemi-reperfüzyon hasarından (IRI) oldukça fazla etkilenmektedir. (Conesa vd 2001, Slater 1984).

Hücrelerin yaşam siklusunda yapım-yıkım olayları doku homeostazisinin sağlamak için denge halinde olmak zorundadır. Fakat dengenin apoptoz lehinde bozulması birçok problemi de beraberinde getirmektedir. Proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin denge halinde olması yaşam ile ölüm arasındaki dengeyi belirlemektedir. Bax proteini apoptozisi indüklerken Bcl-2 proteini apoptozisi inhibe etmektedir. Kaspazlar da apoptozda rol alan proteazlardır ve aktive edici (kaspaz-2, kaspaz-8) ve inhibe edici kaspaz (Kaspaz-3, Kaspaz-6) formları bulunmaktadır (Akşit vd 2008).

Melatonin serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında etkin rol oynamaktadır. Genel olarak antioksidan maddeler oksidan maddeleri etkisiz hale getirirken daha az zararlı olan peroksidan maddelere dönüşür. Melatonin birçok antioksidandan farklı olarak ara basamaklarda oluşan maddelere de bağlanarak onlar için de antioksidan özellik göstermeye devam eder. Bu özelliğinden dolayı terminal antioksidan olarak isimlendirilir. Renal IRI görülen birçok deneysel çalışmalarda melatoninin koruyucu etkileri bildirilmiştir (Reiter vd 2000).

Erişkin kök hücre sınıfından olan mezenkimal kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilme ve rejenerasyon yeteneklerinin sahiptir. Böbrek dokusunda iskemik hasar sonrası doku yenilenmesini sağlayıp, zarar gören tübüller hücrelere farklılaşarak iskemi reperfüzyonun zararlı etkilerini ortadan kaldırmaya yardımcı olduğu çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir (Morigi vd 2004).

1.1. Amaç

Melatonin ve kök hücrenin renal iskemi reperfüzyon hasarında etkileri ayrı ayrı incelenmiş ve melatoninin mezenkimal kök hücrenin çoğalmasını ve koruyucu etkilerinin artmasını sağlayarak hücre ölümünü azalttığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Biz bu çalışmada renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan sıçanlarda adipoz kaynaklı kök hücrelerin böbreğin hangi yapılarına daha etkili olduğunu, serumda BUN ve kreatinin düzeylerine etkilerini bulmayı ve melatoninle adipoz kaynaklı kök hücrelerin uygulama şeklinin apoptotik açıdan tedaviye etkisini biyokimyasal, histokimyasal, immünohistokimyasal ve immünfloresan TUNEL yöntemleri kullanılarak karşılaştırmalı olarak incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreğin Embriyonik Gelişimi

İnsanlarda intrauterin yaşam boyunca kranialden kaudale doğru, birbirinden farklı 3 böbrek tipi peşpeşe ve kısmen de üst üste binecek şekilde oluşur: pronefroz, mezonefroz, metanefroz. Bu sistemlerden birincisi rudimenter, işlevsizdir ve primitif balıklardaki böbreğe analogdur (Moore vd 2016), ikinci sistem intrauterin yaşamın erken döneminde kısa süre fonksiyon gösterebilir; üçüncü sistemden ise kalıcı böbrekler meydana gelir (Hassa vd 1996).

2.2. Böbreğin pozisyon değişimleri

Primordiyal kalıcı böbrekler birbirine yakın olacak şekilde sakrumun ventralinde pelvisin içinde yerleşmiş haldedirler. Karnın ve pelvisin büyümesi ile birlikte yavaş yavaş karnın içerisine ve daha yukarı bölgelerine doğru konumlanırlar. Böbreğin yukarılara doğru konumlanma durumu hem vücudun dikleşmesi hem de lomber ve sakral bölgelerdeki büyümelerden kaynaklanmaktadır. 9. Haftaya ulaşıldığında yetişkin bireydeki pozisyonuna erişirler. Nefrogenezisin tamamlanması doğumla gerçekleşir (Hassa vd 1996).

2.2.1. Pronefroz:

İlk böbrek olarak adlandırılan yapı dördüncü haftanın başında 7. ve 14. Somit aralığına denk gelen (Hassa vd 1996) servikal bölgede 7-10 adet solid hücre topluluğu ve tübüler yapılar (Moore vd 2016) ile baş gösterirler. Pronefrik kanal, kaudal olarak uzanır ve kloaka'ya açılır (Moore vd 2016). Pronefrik yapılar dördüncü haftanın sonunda dejenere olur, pronefrik kanalların büyük kısmı kalır ve bir sonraki böbrek sistemi için temel oluşturur (Moore vd 2016).

2.2.2. Mezonefroz:

Orta safha böbrek olarak adlandırılan bu yapı 9. ve 26. somit aralığına denk gelen 70-80 çift mezonefrik kanallar (Hassa vd 1996) üst torasik ve üst lomber segmentlerin intermediate mezoderminden dördüncü haftanın sonlarında pronefrozların kaudalinde gelişir. Yaklaşık 4 hafta boyunca embriyoda işlev görürler (Moore vd 2016). İlk olarak boşaltım tübüllerinin boyu uzamaya başlar ve kıvrılarak S

şeklinde yapıya dönüşerek medial uzantıların ucunda kapiller bir yumaktan oluşan glomerül halini alırlar. Tübüller de glomerülün etrafında Bowman Kapsülünü oluştururlar. Kapsül ve glomerülden oluşan bu yapıya renal korpüskül denir (Hassa vd 1996). Mezonefrik tübüller pronefrik kanaldan kökenlenen bilateral mezonefrik kanala oradan da kloakaya açılır. Mezonefroz böbrekler birinci trimestlerin sonlarında dejenerasyona uğrarken mezonefrik tübüller erkek bireylerde testislerin efferent duktulilerine dönüşürken (Moore vd 2016) dişilerde bu yapı tamamen kaybolmaktadır (Hassa vd 1996).

2.2.3. Metanefroz (kalıcı börek):

Son böbrek olarak adlandırılan bu yapı 26. ve 28. somit aralığında embriyonun pelvik bölgesinde (Hassa vd 1996) metanefrik mezodermden beşinci haftada gelişmeye başlar. Fakat kanal gelişimi diğer böbrek sistemlerinden farklı olarak gerçekleşir. Üreterik tomurcuk mezonefrik kanalın kloakaya giriş kısmına yakın, dışa doğru gelişen divertiküldür. Üreter tomurcuğunun sap kısmı üreter olarak, baş kısmı da bölünerek metanefrozun toplayıcı tübüllerini oluşturur. İlk dört toplayıcı tübül genişleyerek birleşir ve majör kaliksleri, ikinci oluşan dört toplayıcı tübül birleşerek minör kaliksleri meydana getirir.

Her bir toplayıcı tübülden metanefrik veziküller, bu veziküllerin uzamasıyla da metanefrik tübüller oluşur (Moore vd 2016). Metanefrik tübüller S şeklini alır ve S'nin bir ucunda içeri doğru büyüyen kapiller, glomerüllere farklıdır. Oluşan tübül ve glomerül yapısı nefron ve boşaltım birimini oluşturur. Her nefronun proksimal ucu glomerül etrafını saran Bowman kapsülünü oluşturur. Tübülün distal ucu toplayıcı kanallarla ilişki kurup boşaltıcı tübülün uzamaya devam etmesi ile birlikte proksimal kıvrıntılı tübüller, henle kulpu, distal kıvrıntılı tübüller meydana getirir. Nefronlar doğuma kadar oluşmaya devam eder ve doğum gerçekleştiğinde böbrekte yaklaşık olarak 1 milyon nefron vardır. Böbrekler glomerüler kapillerlerin farklılaşmasından kısa süre sonra ve gebeliğin de 10. haftasından itibaren idrar üretimine başlarlar (Hassa vd 1996). Oluşan idrar amniyon boşluğuna verilir ve amniyon sıvısı ile karışır (Moore vd 2016).

2.3. Böbreklerin kan beslenmesindeki değişiklikler

Böbrekler pozisyon değişikliği süresince kan beslenmelerini yakındaki kan damarlarından gerçekleştirirler. Başlangıçta böbrek arterleri ana iliak arterden dallanır daha sonra da böbreklerin kan beslenmesi aortun distal ucundan gerçekleştirilir. Daha yukarıya ulaştıklarında ise aortun yan dallarından kan alırlar, kaudalde bulunan dallardaki gelişim geriler ve kaybolurlar. Böbreklerin gelişimi 9. haftaya geldiğinde

suprarenal bezlere ulaşılmış olur ve yükselme son bulur. Böbrekler en kranial arter dallarını abdominal aorttan alır ve bu dallar da kalıcı böbrek arterlerini oluşturur sağ arter sol arterden daha uzun olmakla birlikte daha superior yerleşimlidir (Moore vd 2016).

2.4. Böbrek Yapısı, Histolojisi ve Fizyolojisi

Üriner sistem bir çift böbrek, üreter, bir mesane ve üretradan meydana gelmektedir (Mescher 2015). Böbrekler karnın sağ ve sol arka duvarında retroperitoneal bölgede (Hinman 1996) kolumna vertebralisin iki yanında ve psoas kasının (Altunören vd 2017) lateralinde yerleşmiş olarak işlev gören yaklaşık olarak ağırlığı 125-160 gram arasında değişen organdır (Hinman 1996). Sağ böbrek, hemen üst kısmında bulunan karaciğer nedeniyle biraz daha aşağı yerleşimlidir. Her iki böbrek de hafif oblik pozisyonda durmaktadır ve üst polleri alt pollerine göre orta hata daha yakındır (Altunören vd 2017). İnsan böbreğinin boyutu 10-12 cm uzunluğunda, 5-6 cm genişliğinde, 3-4 cm kalınlığındadır (Hinman 1996). Sol böbrek sağ böbrekten yaklaşık olarak 1 cm kadar daha aşağıdadır (Altunören vd 2017).

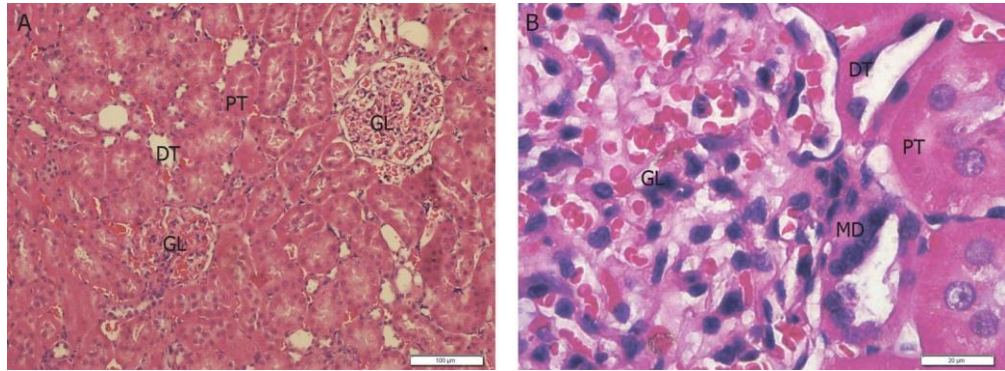
Böbrek; dıştan bol kollejen fibrin ve az sayıda da elastik fibrinlerden oluşan dayanıklı yapıda fibröz bir kapsül ile örtülüdür. Yaşa bağlı olarak kapsülün kalınlığı ve elastik fibrillerin sayısı artış gözlenir. Böbrekte bağ doku kısımlarına intersitisyum denilir ve fibröz kapsül böbreğin içeriye doğru büküldüğü kısım olan hilus kısmından girer. Aynı bölgeden hiluslarla birlikte arteria renalis girer, vena renalis ve üreter çıkar. Üreterin üst ucu hilusu dolduran pelvis renalis olarak adlandırılan bir genişleme yapar (Hassa vd 1996). Böbrek dokusunun longitudinal kesiti alındığında makroskopik olarak da gözlemlenebilen dışta korteks ve içte medulladan oluşan iki kısım dikkat çeker. Dışarıdan ise ince bir bağ dokusu yapısı olan kapsülün organı sardığı gözlenir (Hinman 1996). En dışta ise böbreği retroperitoneal olarak saran yağ dokusu bulunur ve böbreği travmatik dış etkilere karşı korur. Renal korteks böbreğin dış kısmındaki medullaya göre daha koyu renkte olan kısmıdır (Altunören vd 2017). Korteks ve medulla arasındaki geçiş iç içe geçmiş parmaklar gibi görülmektedir. Kortekste kapiller yumaklardan oluşan glomerüler yapılar bulunur. Glomerüllerin etrafını proksimal tübülün genişlemiş son kısmından oluşan bowman kapsülü çevreler. Glomerüler kapillerler ve bowman kapsülünün oluşturduğu bu yapıya Malpighi cisimciği denilir yaklaşık sayıları 1 milyon civarındadır. Medulla 10-18 tane koni şeklinde piramitten oluşur ve her bir piramitten de kortekse doğru uzanan medullar ışınlar çıkar. Piramitler 8-20 adet olan minör kalikslere açılır ve bu açıldıkları yere papilla denir. Piramit

şeklindeki medulla kısımlarının arasında uzanan korteks kısımlarına bertini kolonları denir. Medulla yapısal olarak glomerüllerin uzantısı olan tübüllerden oluşmaktadır ve yapısında glomerüle rastlanmaz. Medullanın kan dolaşımı kortekse oranla daha zayıf olmasından dolayı iskemik hasara karşı daha duyarlıdır (Altunören vd 2017).

Her bir böbrek idrar oluşturmak için özelleşmiş yaklaşık olarak bir milyon nefrondan oluşmaktadır. Nefronların sayısı yaşlanmaya, hasara ve hastalıklara ve yenilenme yeteneğine sahip olmamalarına bağlı olarak giderek azalmaktadır. Her bir nefron kandaki sıvıyı filtreleyen glomerüler kapillerler ve böbrek pelvisinde emilimi sağlayan ve sıvıların idrara dönüştüğü kısım olan tübülden oluşmaktadır. İdrar üretimi sırasında süzülen sıvı ilk olarak glomerüler kapillerlerden geçer. Daha sonra bowman kapsülüne oradan da kortekste yer alan proksimal tübüle geçer, buradan medulladaki Henle kulbunun çıkan koluna gelir, buradan da maküla densa ya geçer. Bu aşamalardan sonra sırasıyla önce distal tübül, birleştirici tübül, kortikal toplayıcı tübül, medüller toplayıcı tübül, toplayıcı kanallar, böbrek pelvisi, üreter ve mesaneye gelir (Set vd 2003).

2.5. Nefronların bölümleri: (Şekil 2. 1)

- Renal cisimcik
- Proksimal kıvrımlı tübül
- Henle kulbunun ince ve kalın uzantıları
- Distal kıvrımlı tübül



Şekil 2. 2 Böbrek genel görüntüsü (H&E boyanma PT: Proksimal Tübül, DT: Distal Tübül, G:Glomerül, MD: Maküla Densa A:20X büyütme, B:100X büyütme)

2.5.1. Böbrek cisimciği ve kanın süzülme mekanizması:

Nefronların başlangıç kısmında bulunurlar. Böbrek cisimciği bowman kapsülü olarak isimlendirilen dışta bazal lamina ile desteklenmiş tek katlı yassı epitelden oluşan

pariyetal tabakadan, içten her bir glomerüler kapilleri dıştan saran podosit adında yıldızsı epitel hücrelerden oluşan viseral tabaka ile çevrelenmiştir. Pariyetal ve viseral yapraklar arasında idrar boşluğu vardır. Her bir böbrek cisimciğinde getirici arteriol ve götürücü arteriolden oluşan damar kutbu ile proksimal kıvrımlı tübüllerin böbrek cisimciğiyle bağlantısının sağlandığı idrar kutbu yer almaktadır. Aferent arteriyoller bowman kapsülüne girdikten sonra, lobüllerde birbirine bağlanmış kılcal damarlardan oluşan bir ağ oluşturan iki ila beş dala bölünür. Kılcal damarların destekleyici tabakası olarak mezengiyum bulunur ve damarların dışını düz podositler çevreler. Bebeklerin ve küçük çocukların podositleri kübiktir. Kılcal damarların etrafını, kalın bir bazal membrana ve bir pariyetal epitele sahip Bowman kapsülü çevreler. Erkek çocuklarda, proksimal kıvrımlı tübüllerin epitelyumu genellikle kapsüler boşluğa doğru çıkıntı oluşturmaktadır (Şekil 2. 3) (Mescher 2015).

2.6. İskemi ve Reperfüzyon

İskemi, dokuya gelen arteriyel ya da venöz kan akımının azalması veya tamamen kesilmesine bağlı dokunun oksijenden yoksun kalmasıdır. Reperfüzyon ise iskemili dokunun yeniden kanlanmasını sağlamaktır (Yapca vd 2013, Şenol vd 2016). Böbrekte kan akışının aksamaması, endotel hasarı ve iskemiye bağlı olarak enerji krizine, nekroz ve apoptoza bağlı hızlı hücre sel ölüme neden olmaktadır (Changizi-Ashtiyani vd 2020).

Hücrede hasarlanma ya da ölme sonucunda oksijenli solunumun aksamaya uğraması olayına hipoksi adı verilmektedir. Hipoksiye yol açan en önemli etken, iskemi sonucu arteriyel veya venöz kan akımının aksamaya uğraması ile organ veya dokularda kanlanmanın yeteri kadar sağlanamamasıdır (Şenol vd 2016). Böbrekler Vasküler cerrahi işlemler, organ transplantasyonu (Ozan vd 2004), şiddetli hipotansiyon (Valdivielso vd 2001) gibi durumlarda hipoksinin uzun sürmesi sonucu hücre bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak hücre ölümlerine yatkındır (Şenol vd 2016). Hücrelerde enerji ATP'den sağlanmaktadır. Aerobik metabolizmada her bir glikoz molekülünden 38 ATP molekülü üretilirken, anaerobik metabolizmada her bir glikoz molekülünden 2 ATP üretilmektedir. ATP molekülleri; zar taşınması, kimyasal bileşik sentezi, mekanik çalışmalarda hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde önem arz etmektedir. Dokuda önemli düzeyde gerçekleşen iskemi mitokondrideki oksidatif fosforilasyonu durdurur. Bu esnada glikozun anaerobik olarak glikolizinin devam etmesine rağmen depolanmış olan ATP lerin de hızlı bir şekilde tüketilmesine neden olur (Pac-Soo vd 2002). Dolayısıyla enerji seviyesindeki düşüş toksik metabolitlerin

dokuda birikmesine neden olarak hücrede fonksiyon bozuklukları ve sonrasında da hücre ölümüne kadar giden biyokimyasal reaksiyona neden olur. Azalan ATP miktarı ile birlikte asidoz oluşumu artar, sonrasında gerçekleşen reperfüzyonla birlikte boşalan ATP depoları yaşamsal faaliyetlerin yerine getirilmesine yetecek düzeyde doldurulamaz. Reperfüzyondan sonra ortama gelen nötrofiller ve açığa çıkan mediatörlerin zararlı etkileri ile birlikte dokuda apoptozis görülmesi olağan hal alır. (Önal vd 2004, Marin vd 2001). Fakat hafif düzeyde seyreden iskemi sonrası reperfüzyon hızlı şekilde iyileşme sağlayabilir (Pac-Soo vd 2002), uzun süreli iskemi sonrası oluşan doku zedelenmesini reperfüzyon işlemi daha da kötüleştirebilir (Şenol vd 2016).

İskeminin devamlılığı dokuda kaçınılmaz olarak nekroz ve apoptozisin artışına neden olur. Bu da geri dönüşümsüz doku hasarı demektir. IRI, akut böbrek hasarının (ABH) ana nedenlerinden biridir ve parsiyel nefrektomi, böbrek nakli, aortik klempleme cerrahisi, kardiyopulmoner resüsitasyon, sepsis ve şok gibi çeşitli klinik durumlarda ortaya çıkar (Nieuwenhuijs-Moeke vd 2017, Perico vd 2004). İskemi oksidatif metabolizmanın azalmasına, metabolik atık ürünlerinin birikmesine ve ATP'nin tükenmesine neden olup besin eksikliği oluşmasına sebep olur (Bonventre vd 2011, Susantitaphong vd 2010). Dolayısıyla IRI'nın sonucu olarak Akut böbrek yetmezliği (ABY) gelişir ve ABY gelişimi kronik böbrek yetmezliği (KBY) için ciddi bir tehdittir. ABY ani böbrek yetmezliği ve hızlı böbrek fonksiyon kaybı şeklinde her 5 yetişkinden 1 inde ve her 10 çocuktan 3 ünde görülmektedir (Rahman vd 2012). ABY nin oluşması düşük tansiyon, ezilme yaralanması, inflamasyon ve idrar yolu tıkanıklığı veya enfeksiyonundan kaynaklanan böbrek iskemisi gibi birçok potansiyel nedene bağlıdır (Rahman vd 2012, Nargesi vd 2017). Yüksek kan üre azotu (BUN) ve kreatinin konsantrasyonları veya idrar üretiminde azalma ile teşhis edilir (Nargesi vd 2017). Kronik böbrek hastalığı (KBH), son dönem böbrek yetmezliğine ve inflamasyonun neden olduğu, fibrozise neden olan kollajen birikmesine yol açan ilerleyici bir böbrek fonksiyonu kaybı ile karakterizedir (McFetridge vd 2018). Böbrek fonksiyonlarının ani şekilde kaybolması sonucu ABY ortaya çıkar ve erken teşhis edilip altında yatan sebepler ortadan kaldırılmazsa geri dönüşümsüz böbrek fonksiyonu kaybına sebep olurken diyaliz veya böbrek nakli ile tedavi edilir (Şenel 2010). Böbrek naklinde donörden böbreğin aktarımı sırasında yapılan kısa süreli iskemi böbrekte hasara yol açmakta bu da önlenmesi imkansız böbrek hasarına yol açmaktadır (Şenel 2001).

Aerobik dokularda üretilen ATP, adenozin monofosfat (AMP), adenozin, inozin ve hipoksantine parçalanır. Oluşan hipoksantin, ksantin dehidrojenaz (KDH) ile ksantin

ve ürik asite metabolize edilir. Aerobik dokularda hipoksantin, KDH'la olan metabolizmasında nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) kullanıldığı için, toksik oksijen radikalleri oluşmaz. Hipoksantin, iskemili dokuda KDH ile değil, ksantin oksidaz (XO) ile metabolize edilir. Çünkü iskemi döneminde KDH, XO'ya dönüştürülür. Hipoksantin, XO ile olan metabolizmasında moleküler oksijen (O_2) kullanıldığı için ara ürün olarak toksik oksijen radikalleri üretilir. Ancak, iskemili dokuda O_2 'nin yeterince bulunmaması nedeniyle, reperfüzyon olmadığı sürece biriken hipoksantin, ksantine dönüştürülemez ve ara ürün olarak toksik oksijen radikalleri üretilemez. Fakat uzun süre devam eden iskemide hücre enerji depoları boşalır. Hücre enerji depolarının boşalması, hücre membranında bulunan Na^+ , K^+ -ATPaz pompasının inhibisyonuna yol açar. ATPaz pompa inhibisyonu, hücre içinden Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarının hücre dışına geçişini durdurur ve intrasellüler Na^+ ve Ca^{+2} iyon konsantrasyonları artar. İntrasellüler Na^+ artışı, suyun da hücrelere geçişini pasif bir difüzyonla artırır ve hücrelerin şişmesine neden olur. Bu şişme, anerobik metabolizma ürünlerinin birikimi ile daha da artar. İntrasellüler Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artışı hücrelerde patolojik olayların başlatılmasına sebep olur. Bu nedenle iskemili dokuya ilk yapılacak müdahale, dokunun yeniden kanlanması (reperfüzyonunu) sağlamaktır. Reperfüzyonda reoksijenizasyonun sağlanmasıyla iskemi sırasında oluşan XO, O_2 'yi kullanarak, biriken hipoksantini ksantine dönüştürürken, aşırı serbest oksijen radikalinin oluşmasına neden olur. Reperfüzyon mediatörleri olarak bilinen bu serbest oksijen radikalleri, hücre membran lipidlerini oksidasyona uğratarak, lipidlerden aldehid ve melondialdehit (MDA) gibi toksik ürünlerin meydana gelmesini sağlar. Ayrıca oksijen radikalleri DNA ile de tepkimeye girerek DNA'nın oksidatif hasarına yol açarlar. Serbest radikal reaksiyonları sonrasında, nükleik asitlerde baz değişimleri ve DNA'da zincir kırılmaları meydana gelir. Bu değişim onarılamazsa DNA mutasyona uğratılır. 8-hidroksiguanin'in, DNA'nın mutajenik bir şekli olduğu kabul edilmiştir. Parks ve ark.'nın bağırsaklarda IR hasarının oluşan mukozal kalınlığa göre değerlendirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada iskemiden sonra reperfüzyon gerçekleştirdikleri gruptaki hasarın reperfüzyonsuz şekilde iskeminin neden olduğu hasardan çok daha fazla oluşturduğunu tespit etmişlerdir (Parks vd 1986).

2.7. Kök Hücre

Kök hücre işlevsel olarak farklılaşmamış fakat uygun ortam sağlandığında farklılaşabilen, çoğalma, büyüme, yenilenebilme, tamir edebilme ve kendi soyunu devam niteliğinde de hücreler üretebilme gibi özelliklere sahip hücrelerdir. Bu özelliklerinden dolayı kök hücreler in vitro ortamlarda üretilebilirler (Karaşahin 2012).

Kök hücreler vücutta buldukları yere göre sınıflandırıldığında 2 tiptirler. Canlı vücudunda bulunan her türlü hücreye dönüşebilme kapasitesinde olan embriyonik kök hücreler (Şimşek 2012) ve uzun süre kendini yenileme özelliğine sahip ve öncü hücrelere farklılaşabilen yetişkin kök hücreleridir (Sağsöz vd 2008). Bunun dışında kök hücrelerin bir başka sınıflandırma şekli de farklılaşma kapasitelerine göre dir. Farklılaşma kapasitesi en fazla olan totipotent kök hücreler, sonra pluripotent kök hücreler ve en az farklılaşan multipotent kök hücreler olarak sınıflanırlar. Bunun dışında bir başka sınıflandırma şekli ise kök hücrelerin izole edildiği dokulara göre olmaktadır (Tablo 2.1).

2.8. Farklılaşma Kapasitesine Göre Kök Hücreler

2.8.1. Totipotent kök hücre:

Canlıyı tümüyle oluşturacak (plasenta, göbek kordonu, organizmanın bütünü) tüm hücre tipine dönüşebilecek hücrelerdir. Embriyonun 5. gününe kadar oluşan hücrelerin tümü totipotent karakterdedir (Erden 2014).

2.8.2. Pluripotent kök hücre:

4-6 günlük embriyoda embriyo dışı hücreler hariç tüm somatik hücrelerin ve dokuların kaynağıdır ama tek başına birey oluşumunu gerçekleştirmez. 3 germ yaprağı hücreleri ve akabinde 2. haftadan itibaren beliren epiblast hücrelerinden farklılaşan primordiyal germ hücreleri pluripotent kök hücrelerdir (Erden 2014).

2.8.3. Multipotent kök hücre:

Pluripotent kök hücrelerin embriyonun implantasyonundan sonraki aşamada 3 germ yaprağına ait bazı hücrelere dönüşmesi sonucu gelişimin ilerleyen dönemlerinde de çoğalıp farklılaşarak doku içinde varlıklarını devam ettiren ve erişkin kök hücre olarak adlandırılan hücre gruplarını oluştururlar. Pluripotent hücrelerin daha özelleşmiş hücrelere dönüşmesi sonucu oluşurlar. Multipotent kök hücreler buldukları dokunun hücre tipini üretirler (Pınar 2019).

Tablo 2.1 Hücre popülasyonlarının farklılaşma potansiyelini tanımlamak için kullanılan tanımlamalar (Solmaz vd 2011)

İsim	Hücre Tipi	Farklanma Etkinliği	Farklanma Yönü
EKH	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyo ve embriyo dışı dokular
EKH	Blastokist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyo gövdesi (Tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreler	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi

2.9. Kök Hücre Kaynakları

2.9.1. Embriyonik kök hücreler:

Embriyo aşamasındaki kök hücreler gelişimin 4-5. günlerindeki preimplantasyon aşamasındaki embriyoda 3 farklı germ tabakasına da dönüşebilme kabiliyetine sahip blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen totipotent hücreler olabileceği gibi daha az tercih edilen morula aşamasındaki embriyodan elde edilen totipotent hücrelerdir. Bu hücreler canlıdaki tüm hücre tipine dönüşebilmesine karşın tek başlarına bir organizmanın tüm sistemlerini oluşturamazlar (Pınar 2019).

2.9.2. Erişkin kök hücreler:

Plasenta, göbek kordon kanı, kemik iliği ve erişkinlerin birçok dokusundan (kalp, böbrek, deri, beyin, göz, karaciğer vb.) elde edilebilen ve öncü hücrelere farklılaşma özelliği gösteren hücrelerdir. Erişkin kök hücreler ait oldukları dokularda kendi mikroçevrelerinde dinlenme evresinde kalabildikleri gibi yüksek telomeraz aktiviteleri olmasının yanında embriyonik kök hücrelere kıyasla farklılaşma özellikleri sınırlıdır. Bunun dışında dokuda belirli yerleşim yerleri olmadığından elde edilmeleri de kolay

olmadığı gibi embriyonik kök hücreler gibi uzun süre özelliklerini koruyarak üretilmeleri de kolay değildir (Ural 2006).

Hemapoetik kök hücreler, kemik iliği stromal kök hücreleri, kordon kanı kök hücreleri, endotelyal progenitör hücreler, iskelet kası kök hücreleri, kardiyak kök hücreleri, deri ve sindirim sistemindeki epitelyal öncü hücreler, pankreas, karaciğer, kornea, retina, diş kökü, omurilik ve merkezi sinir sistemi kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar son dönemde oldukça hız kazanmıştır. Bunlar arasında ise kemik iliği kök hücreleri klinik çalışmalarda etkinliği araştırılmakta olan en eski hücre tiplerinden birisidir ve uzun zamandır transplantasyon amacıyla klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Sağsöz vd 2008). Bilimsel çalışmalar ve klinik uygulamalarda elde edilmesi ve etik kurallardan dolayı erişkin kök hücrelerin kullanımı daha fazla olduğu görülmektedir.

Yakın zamana kadar yetişkin kök hücrelerin kendi içinde buldukları doku dışında bir dokuya farksızlaşmayacağı düşünülüyordu fakat yapılan deneyler doğrultusunda yetişkin kök hücrelerin 'plastisite' veya transdiferasyon olarak adlandırılan farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetilerinin olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalar insan yetişkin kök hücrelerinin kalp kası hücrelerine (Ferrari vd 1998), iskelet miyoblastlarına (Mezey vd 2000), nöroektodermal hücrelere (Lagasse vd 2000), hepatositler ve kolanjiositlere (Jackson vd 2001), deri, karaciğer, sindirim ve solunum sistemi epitelyum hücrelerine (Solmaz vd 2011) farklılaşabildiğini göstermiştir.

2.9.2.1. Hematopoetik kök hücreler:

Hematopoez prenatal dönemde sarı kesede başlayıp aort-gonad-mezonefroz bölgesi, plsentta, fetal karaciğer, timus, dalak gibi bölgelerde ve kemik iliğinin hematopoetik kök hücreler (HKH) için uygun mikroçevreyi sağlayabilecek erişkinliğe ulaştığı zamana kadar sürekli göç eder (Terzi vd 2012). Postnatal dönemde kemik iliğinde yer alan HKH'ler doğru sinyali aldıklarında kanda bulunan lenfositler, miyelositler ve trombositler gibi çeşitli hücre tiplerine dönüşebilirler. Hematopoetik kök hücreler kemik iliğinde kök hücreye uygun bir niche içinde yer alır ve ortamda kök hücreyi uyarıp çoğalmasını sağlayacak herhangi bir sinyal almadığı sürece G₀ fazında (Terzi vd 2012) bekler. Kandaki hücrelerde meydana gelen azalma, yuva içinde uyku durumunda olan HKH'lere uyarı olarak gelir ve bir kısmı kendini yenilerken bir kısmı da eksilen hücrelere dönüşürler. Bu uyarılar ve dönüşümler çok sıkı kontrol altında tutulur ve meydana gelecek herhangi mutasyon hücrelerin apoptozisine neden olur. Apoptozis kaspas enzimi ile aktive edilir. Hücrenin bilinçli şekilde apoptozise yönelmesi hücreyi ölümsüz

gibi davranıp kanserleşmesinden ve akabinde maligniteden korur (Özmen vd 2006). HKH'ler kemik iliğinden, fetal karaciğerden, periferik kandan, embriyonik kök hücrelerden, umbilikal kord kanından ve hematopoietik kök hücrelerin in vitro olarak çoğaltılması gibi yollardan elde edilebilirler. Kemik iliği stroması mezenkimal kök hücreleri arasında hematopoietik olmayan hücre grupları vardır. Bu hücre grupları kemik, kırıkta, yağ, kas gibi dokulara dönüşebilen multipotent kök hücreler içerirler. Bu hücreler in vivo ve in vitro şartlarda gelişebilmeleri ve in vitro üretimlerde cam ve plastiğe yapışmalarından dolayı hematopoietik hücrelerden kolaylıkla ayrılabilmesi deneysel çalışmalar için cazip hale gelmektedir.

2.9.2.2. Mezenkimal kök hücreler:

İnsanlarda mezenkimal kök hücre (MKH) kaynağı kemik iliği stromasındaki 'crista iliaca'dır. Kemik iliğinden alınan MKH'ler in vitro olarak çoğaltılabilmektedir. MKH'ler hücre bazlı tedavilerde ve belirli dokulara ait veya sistemsel hasarlarda tedavi amaçlı kullanılabilmektedir. Kanser tedavisi gören hastalarda malign hücrelere kemoterapik ilaçların taşınmasına yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Kemp ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada myeloablative tedavi uygulanmış hematoloji hastalarında, hematopoietik prekürsörlerle hematopoietik kök hücre engraftmanını arttırmak için mezenkimal kök hücrelerin etkili olabileceğini göstermişlerdir (Gündeşlioğlu vd 2013). Adipoz dokudan türetilen kök hücreler kolay elde edilebilmeleri ve hematopoietik kök hücreler kadar işlevsel olmalarından dolayı daha çok tercih edilmektedir (Karakükçü vd 2014).

Kök hücre tipleri

1. Dental pulptan türetilen MKH'ler
2. Embriyolardan türetilen MKH'ler
3. Amniyotik sıvıdan türetilen MKH'ler
4. Göbek kordonundan türetilen MKH'ler
5. İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerden (İPKH) türetilen MKH'ler
6. Yağ dokusundan türetilen MKH'ler
7. Kemik iliğinden türetilen MKH'ler

Adipoz dokusu mezenkimal kök hücrelerinin kemik iliği kaynaklı MKH'lere göre daha kolay üretilebilmeleri ve greft versus host hastalığının tedavisinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerle benzer etkinliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir (Ning vd 2006). Adipoz dokudan üretilen kök hücreler yağ dokusundan kolaylıkla izole edilebilen ve diğer MKH'lerle birçok benzer yenilenebilir özelliğine sahip olan kök hücre tipleridir.

MKH'lerin farklı türleri arasında, adipoz kökenli kök hücreler çeşitli nedenlerden dolayı hücre tedavisi için umut verici olarak görülmektedir. Bu hücrelerin uygun buldukları doku ve organlarda küçük hasarların giderilmesinde rol oynadığı ve in vitro koşullarda mezenkimal kaynaklı diğer kök hücreler gibi osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmanın yanı sıra miyosit ve nöronlara da dönüşebileceği gösterilmiştir (Karoui vd 2011, (Çam vd 2003).

Akut böbrek yetmezliği üzerine kök hücre ile tedaviye yönelik yapılan çalışmalar iskemi reperfüzyondan sonra meydana gelen vasküler hasarlara karşı koruma sağlandığını, inflamasyonları azalttığı, antikor üretimini desteklediğine böbrek hasarına karşı antioksidan ve antiapoptotik etkiye sahip olarak böbrek inflamasyonunu ve doku hasarını azalttığını göstermiştir (Shih vd 2013, Collett vd 2017).

2.10. Melatonin

Pineal (Epifiz) bez posterior komissür ile dorsal hebanular komissür arasında, üçüncü ventrikülün de posterior duvarına yapışık olarak konumlanmış endokrin bir bezdir. Pineal bezin boyutu ve pozisyonu türler içinde farklılık gösterir (McCord vd 1917).

Melatonin ilk olarak ineğin epifiz bezinden izole edilmiş ve akabinde de nöroendokrin hormon sınıfına dahil edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar birçok doku ve organın epifizin kullandığı sentez yolağını ve enzimlerini kullanarak melatonin sentezleyebilme yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Retina memeli olmayan omurgalı canlılarda önemli üretim yeridir. Memelilerdeki önemi ise hamster retinasından melatonin sentezinin asıl sirkadian salınımının in vitro olarak gösterilmesi ile anlaşılmıştır. Fakat memelilerdeki retinal melatonin memeli olmayanlardaki gibi dolaşıma katılmaz. Harderian ve gözyaşı bezinden, lens, siliyer cisim, testis, yumurtalık, uterus, kemik iliği, plasenta, oositler, kırmızı kan hücreleri, bitkicikler, lenfositler, astrositler, glia hücreleri, mast hücreleri ve nöronlardan sentezlenen melatonin normal fizyolojik durumlarda dolaşıma katılmamaktadır bunun dışında da salınımları belirli bir düzen doğrultusunda da değildir. Bağırsaklarda üretilen melatonin pineal beze kıyasla 2 kata yakın bir farkla fazla olduğu düşünülmektedir. Bunun yanı sıra kemik iliğinde, safrada, sıçan ve koyunlarda üçüncü ventriküler sıvıda ki melatonin miktarının serumdakine oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir (Yu vd 1981, Zayman 2019, Üstünsoy 2007, Tan vd 2018). Pineal bezde melatonin üretimi sirkadian ritime bağlı olarak üretilir. Gündüzleri gecelere göre daha düşük miktarlarda salgılanırlar. Gözde salgılanan melatonin hormonu de pineal bezdeki gibi sirkadian

ritme sahiptir. Çalışmalar neticesinde melatonin salınımının lenfositler tarafından da gerçekleştirildiği ve melatoninin immüneyi düzenlemede rol oynadığı görülmüştür. Melatoninin başka bir hipofiz dışı üretim yeri ise gastrointestinal sistemdir ve hipofiz bezinden 1000 kat daha fazla salgı yapması ve yiyecekler yardımıyla dışarıdan fazla miktarda triptofan alınması sonucu dolaşım sistemine de salındığı görülmüştür (Tan vd 2018). Çalışmalar göstermiştir ki ekstrapineal türetilmiş melatonin miktarları pineal bezden türetilene göre çok daha fazladır (Aslan vd 2020).

2.10.1. Melatonin sentezlenme mekanizması

Melatonin birçok canlıda birden fazla mekanizmada etkinlik gösteren triptofandan sentezlenen bir indol bileşiktir. Melatonin vücuda temel besinlerle (mısır, pirinç, buğday, arpa yulaf vb.) ve içecekler (şarap, bira, çay, kahve vb.) gibi besin yolu ile de alınmaktadır. Melatoninin, triptofan amino asiti öncülüğünde sentezlenir ve serumdaki triptofan miktarı da diyetle alınan miktara bağlı olarak değişiklik gösterir (Sadok vd 2017, Tan vd 2012). Melatonin depolanamaz, kan ve vücut sıvılarına hızlı bir şekilde dağılır (Üstünsoy 2007). Plazmada %70 oranında albümine bağlanarak taşınır, yüksek miktarlarda karaciğerde, düşük miktarlarda da böbrekte bulunur ve karaciğerde 6-hidroksimelatonine dönüşürken böbrekte sülfat ve glukuronik asitle bağ oluşturarak dışarı atılır (Sadok vd 2017). Triptofan kandan alınarak 5-hidroksitriptofana dönüştürülür, o da L-aromatik aminoasit dekarboksilaz ile seratonine (5-hidroksitriptamin) dönüşür. Seratonin daha sonra hız sınırlayıcı enzim olan arilakilamin N-asetiltransferaz aracılığı ile N-asetilseratonine çevrilir. N-asetilseratoninden de hidroksiindol O-metiltransferaz enzimi ile melatonin sentezlenir (Atasoy vd 2017).

Melatonin vücutta 3 aylıktan önce salgılanmaya başlar ve salgı miktarı yavaş yavaş artar. Sonunda 1-3 yaş aralığında miktarı geceleri maksimum seviyeye ulaşır, yetişkin döneme kadar yavaş yavaş düşer (Waldhauser vd 1993). Pineal bezdeki seratonin miktarı gece düşük miktarda iken gündüz yüksek miktarlarda görülür. Pineal bezdeki seratonin miktarını ışığın süresine ve şiddetine göre değişiklik göstermektedir. Melatonin sentezlendikçe seratonin miktarı düştüğünden dolayı melatonin miktarı ile seratonin arasında ters ilişki söz konusudur. Melatonin miktarının gece karanlıkta pineal bezde, kanda, serebrospinal sıvıda ve idrarda arttığı görülür (Tatar 2019).

Melatonin miktarı gece 20:00-21:00 saatleri arasında artmaya başlar, en yüksek düzeye en karanlık zamanlar olan 01:00-03:00 saatleri arasında ulaşır ve havanın aydınlanmaya başladığı 05:00-07:00 saatlerinde üretimi minimum düzeye kadar düşer. Beyinde bulunan suprakiazmatik bölge pineal bezden melatonin üretimini

biyolojik ritim çerçevesinde düzenlemektedir. Melatonin miktarını etkileyen tek faktör ışık değildir. Isı, gel-git olayı, nöradrenalin ve serotonin metabolizması üzerine etkili ilaçların etkilediği de düşünülmektedir (Fourtillan vd 2001).

2.10.2. Melatoninin koruyucu etki mekanizmaları

Melatonin, sirkadiyen ritmin düzenlenmesi, oksidatif stresin etkilerini ortadan kaldırılması, glikoz intoleransının ve insülin direncinin iyileştirilmesi, enerji metabolizmasının düzenlenmesi, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve yaşlanmanın geciktirilmesi gibi çok sayıda düzenleyici ve koruyucu etkilere sahiptir (Reiter vd 2007, Shieh vd 2009).

Melatoninin endokrin sistemin düzenlenmesi, immunitenin işlevselliğinin artırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadların baskılanması, organizmanın doğal yapısında yer alan ekzojen savunma sistem elemanları arasında yer almak gibi birçok fizyolojik aktivitede rol almakla birlikte güçlü de bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Brzezinski 1997). Melatonin klasik bir antioksidan değildir ve onu ayıran en önemli özellik ise serbest radikallere karşı son derece kararlı şekilde savaşıması, birçok kanseri engelleme özelliğine sahip olmasıdır (Tan vd 2015, Cutando vd 2012).

Mevcut kanıtlar melatoninin enflamatuar sitokinlerin salınımını azaltabildiğini, mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin proliferasyon kapasitesini arttırdığını ve MKH'lerin apoptozisini in vitro ve in vivo olarak ortadan kaldırdığını göstermiştir. Ayrıca, melatoninin ROS üreten etkenleri ve antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenleyerek, MKH'lerin koruyucu ve anti-apoptotik mekanizmalarını arttırdığı gösterilmiştir (Liu vd 2013). Böbrek IR'undan sonra melatonin tedavisinin serum TNF- α düzeylerindeki artışı ve böbrek dokusunda histopatolojik hasarı tersine çevirirken TNF- α 'nın serum seviyesini azaltarak koruyucu bir etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur (Oğuz vd 2015).

Melatonin tedavisi, kısmen aquaporin ekspresyonunu düzeltir ve enflamatuar yanıtı engeller ve renal ultrastrüktürel bütünlüğün korunması ile ilişkilendirilebilen bilateral üreteral obstrüksiyon veya bilateral uteral obstrüksiyon kaynaklı böbrek hasarını güçlü bir şekilde önler (Li vd 2019).

Melatonin ile tedavi edilen sıçan böbrek dokularında melatoninin IGF-1'in etkinliğini arttırıp Kaspaz-3 salınımını azaltarak hücre apoptozunu önlediği bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Ostrowska vd 2001).

Melatoninin lipofilik yapısı ona serbest radikal toplayıcı özelliği kazandırmaktadır ve serbest radikallerin makromoleküllerde oluşturduğu oksidatif hasara karşı en iyi bilinen serbest radikal tüketicisi olan glutatyon ve mannitole göre daha iyi koruyuculuğa sahip olduğu bildirilmiştir (Sinanoğlu vd 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Sıçanlarda renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı melatonin ve kök hücrenin koruyucu etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Araştırma Merkezi'nce üretilen 60 adet Wistar Albino cinsi 250-350 gr ağırlığındaki erişkin erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar standart şartlarda sıcaklığı (21±1°C) ve rutubeti (65-70%) kontrol edilen 12 saat ışık-karanlık çevrimi olan havalandırılmalı sessiz bir oda içinde, özel kafeslerde bakılıp, standart yem kullanılarak ad-libidum beslendiler. Çalışmalar Pamukkale Üniversitesi Etik Kurulu'nda PAUHADYEK-2020/10 nolu 30.01.2020 tarih ve 2020/02 sayılı etik kurul kararına uygun olarak yürütülmüştür.

3.1. Kök Hücrelerin Elde Edilmesi ve Transplantasyonu

Dr. Öğr. Ü. Nazlı ÇİL' in Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2019HZDP020 numaralı 'Siklofosfomide Bağlı oluşan Ovaryum Hasarında Yağ Dokudan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ve Phosphorylated Mammalian Target of Rapamycin (p-mTOR) ekspresyonuna etkisi' başlıklı projeden elde edilen Mezenkimal Kök Hücreler Akım sitometri analizi kullanılarak kök hücre yüzey belirteci olarak CD29, CD90, CD45, CD54, CD71, CD106 yönlerinden incelendi. Buradan alınan sonuçlara göre CD29, CD90, CD54 yüzey belirteçlerinin yüksek titrede olması ve CD45, CD71, CD106 yüzey belirteçlerinin çok düşük bulunmasıyla mezenkimal kök hücre olduğu gösterilen kök hücreler donduruldu. Bu çalışmada 2019HZDP020 nolu projede hem akım sitometriyle hem de farklılaşma deneyleriyle mezenkimal kök hücre olduğu desteklenen kök hücreler kullanıldı. 3. pasajda dondurduğumuz hücreler bazal medium hazırlayarak steril şartlarda ve 37 °C de laminal kabin altında çözüldü. T75 flasklara ekilen hücrelerin çoğalması takip edildi, deney prosedürü oluşturulduktan sonra kök hücre uygulanacak gruplara 1×10^6 hücre olarak 0,2 ml PBS içerisinde verildi.

3.2. Cerrahi Operasyon

Deneysel hayvanlarına intraperitoneal yol ile anestezisi uygulandı. Nefrektomi uygulanacak deneysel hayvanları anestezisi altında, sıcaklığı ılık ve sabit olan diseksiyon tablasına tespit edildi. Cerrahi uygulama bölgesinin %70'lik etanol ile temizliği yapıp IR gruplarına sağ böbrek nefrektomisi gerçekleştirildi. İskemi/reperfüzyon yapılacak deneysel hayvanlarına anestezisi altında, midline laparotomi yapılmıştır. Sol renal arter

izole edilerek, antitravmatik vaskular klemp yardımıyla 45 dakika süre ile sol renal arterden kan akışı durduruldu. 45 dakika iskeminin hemen ardından reperfüzyon süreci uygulandı. Hem nefrektomi hem de reperfüzyon süresince her bir deney hayvanına yapılan cerrahiden sonra kaybolan sıvının hipovolemik etkilerine engel olunması için karın boşluğuna steril serum fizyolojik verildi. Bu işlemi takiben, kas ve deri kesileri ayrı ayrı fakat devamlı olarak 3/0 ipek sütünle dikilerek kesi bölgesi kapatıldı ve poviodeks antiseptik solusyon ile laparotomi bölgesi temizlendi. (Özlülerden, 2017)

3.3. Anestezi Uygulaması

Denek sıçanlara anestezi işlemi 50 mg/kg ketamin (Ketalar flk., Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 5-10 mg/kg arası ksilazin hidroklorid (Alfazyne % 2, Alfasan International, Holland) ile intraperitoneal olarak sağlandı. Gerekliğinde sıçanların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 25 mg/kg) refleks yanıtlara (pensetle ayağa ağırlı uyaran verilmesi-pedal refleks, palpebral ve korneal refleksler) bakılarak tekrarlandı. Deneyde gerçekleştirilecek her bir operasyon için aynı dozlarda anestezi uygulandı. Genel anestezi altındaki sıçanlar operasyon masasına sırt üstü yatırılarak flaster yardımı ile ayaklarından masaya sabitlendi. Cerrahi işlemin gerçekleştirileceği batın orta hattı traş makinesi ile traş edildi. Operasyonun gerçekleştirileceği bölge povidone-iodine ile temizlendi. Uygun teknikle batın orta hat cerrahi aletlerle 3 cm kesilerek laparotomi yapıldı.

3.4. Deney grupları ve protokol

Sıçanlar ağırlıkları ölçülerek rastgele 6 gruba ayrıldı. Her bir grup 3. ve 14. gün grupları olarak 2 alt gruba ayrılmıştır (Alzahrani, 2019; Chen ve ark, 2019).

3.4.1. Kontrol grubu (K):

Gruplar belirlendikten sonraki 3. günde ve 14. günde genel anestezi altında orta hat laparotomi yapıldıktan sonra hiçbir işlem yapılmadan sol böbrekleri alınmıştır.

3.4.2. Sham grubu (S):

Sıçanlara genel anestezi altında orta hat laparotomi yapıldıktan sonra sağ böbrekleri alınmıştır (Ahmadiasl, 2014). Belirlenen 3. gün grupları laparotomiden 3 gün sonra ve 14. gün grupları da laparotomiden 14 gün sonra tekrar operasyona alınıp sol böbrekleri alınmış ve sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

3.4.3. İskemi reperfüzyon grubu (IR):

Sıçanlara genel anestezi altında orta hat laparotomi yapıldıktan sonra sağ böbrekleri alınmıştır. Sol böbrek, renal arter ve veni ortaya çıkarılıp atravmatik klemplerle klemlendi (Ahmadiasl, 2014). Böbrek 45 dk boyunca iskemiye maruz kaldıktan sonra klempler çıkarıldı. Reperfüzyon sağlandıktan sonra dokunun tam olarak kanlandığı makroskopik olarak görüldükten sonra denekler başka hiçbir işlem yapılmadan kapatılmıştır. Belirlenen 3. gün grupları laparotomiden 3 gün sonra ve 14. gün grupları da laparotomiden 14 gün sonra tekrar operasyona alınıp sol böbrekleri alınmış ve sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

3.4.4. İskemi reperfüzyon + melatonin grubu (IR+M):

Sıçanlara genel anestezi altında orta hat laparotomi yapıldıktan sonra sağ böbrekleri alınmıştır. Sol böbrek, renal arter ve veni ortaya çıkarılıp atravmatik klemplerle klemlendi (Ahmadiasl, 2014). Böbrek 45 dk boyunca iskemiye maruz kaldıktan sonra klempler çıkarıldı ve hemen ardından intraperitoneal olarak tek doz 25 mg/kg melatonin verildi (Chen ve ark, 2019). Reperfüzyon işleminin gerçekleştiği makroskopik olarak gözlemlendikten sonra deneklere başka hiçbir işlem yapılmadan kapatıldı. Belirlenen 3. gün grupları laparotomiden 3 gün sonra ve 14. gün grupları da laparotomiden 14 gün sonra tekrar operasyona alınıp sol böbrekleri alınmış ve sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

3.4.5. İskemi reperfüzyon + kök hücre grubu (IR+KH):

Sıçanlara genel anestezi altında orta hat laparotomi yapıldıktan sonra sağ böbrekleri alınmıştır. Sol böbrek, renal arter ve veni ortaya çıkarılıp atravmatik klemplerle klemlendi (Ahmadiasl, 2014). Böbrek 45 dk boyunca iskemiye maruz kaldıktan sonra klempler çıkarıldı ve hemen ardından lokal olarak tek doz 1×10^6 kök hücre 0,2 ml PBS içerisinde verildi (Zahran ve ark, 2020). Reperfüzyon işleminin gerçekleştiği makroskopik olarak gözlemlendikten sonra deneklere başka hiçbir işlem yapılmadan kapatıldı. Belirlenen 3. gün grupları laparotomiden 3 gün sonra ve 14. gün grupları da laparotomiden 14 gün sonra tekrar operasyona alınıp sol böbrekleri alınmış ve sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

3.4.6. İskemi reperfüzyon + kök hücre + melatonin grubu (IR+ KH+M):

Sıçanlara genel anestezi altında orta hat laparotomi yapıldıktan sonra sağ böbrekleri alınmıştır. Sol böbrek, renal arter ve veni ortaya çıkarılıp atravmatik klemplerle klemlendi (Ahmadiasl, 2014). Böbrek 45 dk boyunca iskemiye maruz

kaldıktan sonra klempler çıkarıldı ve hemen ardından intraperitoneal olarak tek doz 25 mg/kg melatonin, lokal olarak tek doz 0,2 ml PBS içerisinde 1×10^6 kök hücre verildi (Chen ve ark, 2019; Zahran ve ark, 2020). Reperfüzyon işleminin gerçekleştiği makroskopik olarak gözlemlendikten sonra deneklere başka hiçbir işlem yapılmadan kapatıldı. Belirlenen 3. gün grupları laparotomiden 3 gün sonra ve 14. gün grupları da laparotomiden 14 gün sonra tekrar operasyona alınıp sol böbrekleri alınmış ve sıçanlar kurban edilmektedir.

3.5. ELISA Yöntemi

10 cc venöz kan biyokimya tüpüne alınmış, örnekler yaklaşık 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10 dakika boyunca 3500 devirde santrifüj edilmiş ve elde edilen serum örnekleri kan üre azotu (BUN) ve kreatinin düzeyleri için analiz yapılana kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

Sıçan kan üre azotu (BUN) kolorimetrik yöntem (ürez) ile Elabscience (E-BC-K183-M), Sıçan kreatinin antijen antikor reaksiyonuna dayalı sandviç ELISA yöntemi kullanılarak (E0307Ra), YL-Biont (Shanghai YL Biotech Co. Ltd, China) ticari kitleri kullanılarak çalışılmıştır.

Analiz öncesi toplanan bütün örnekler ve kitler oda sıcaklığına getirilmiştir. Çalışmada kullanılan kitlerin standart ve kimyasalları hazırlandıktan sonra mikrop plakada bulunan kuyucuklara standartlar ve örnekler pipetlenmiştir. Ardından prospektüste anlatılan adımlar izlenerek örneklerin testlerin konsantrasyonlarına göre renklendirilmesi sağlanmıştır. Renk oluşumu gözlemlendikten sonra 450 nanometrede (nm) Biotek Elx800 Mikrop laka okuyucu (BioTek Instruments Inc., USA) kullanılarak kuyucukların absorbans değerleri okunmuştur. Gen5 data analiz programı ile serum absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Bulunan değerler BUN için mmol/L ve kreatinin için ise $\mu\text{mol/L}$ 'dir.

Sıçan BUN kolorimetrik yöntemi uygulama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir.

1. 100 mmol/L üre standardını ddH₂O ile uygun konsantrasyonda seyreltme işlemi yapılır.
2. Standart kuyucuğa 4 μL üre standart solüsyonundan, numune kuyucuğuna 4 μL numuneden, kontrol kuyularına 4 μL numuneden eklendi.

3. Standart kuyucuklar ve numune kuyucuklarına 50 µL Enzim Çalışma Solüsyonu, kontrol kuyucuğuna 50 µL Reaktif 3 eklendi ve mikropilaka okuyucu ile 37°C'de 10 saniye boyunca tamamen karıştırarak inkübasyona bırakıldı.
4. Her 3 kuyucuğa da ayrı ayrı 125 µL Reaktif 4 ve Reaktif 5 eklendi ve mikropilaka okuyucu ile 37°C'de 10 saniye boyunca tamamen karıştırarak inkübasyona bırakıldı.
5. Mikropilaka okuyucu cihazı (ELISA) ile her kuyucuğun konsantrasyon değeri 580 nm'de okuma işlemi yapıldı.
6. Sonuçlar hesaplanarak analiz edildi.

3.6. Histopatoloji

3.6.1. Doku örneklerinin hazırlanması

Sıçanlara nefrektomi yapıldıktan sonra %10 nötral formalinde 24 saat fikse edildi. Dehidratasyon ve onu takiben parafinizasyon işleminden sonra dokular parafin bloklara gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM-2125 Rotary Mikrotom yardımıyla 3µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitler Hematoksilin-Eozin, Masson Trikrom ve immünohistokimyasal olarak boyandı. Boyama işlemi takiben tüm kesitler ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirildi. Histolojik skora şu şekilde yapılmıştır. 40X büyütmede rastgele seçilen 10 alanda konjesyon, tübüler nekroz, cast formasyonu, fırçamsı kenar kaybı, tübüler dilatasyon miktarları 0'dan 5'e kadar derecelendirilmiştir. Her bir derecelendirmeye karşılık gelen hücre miktarı ise şu şekilde belirlenmiştir. 0: none (Normal), 1: ≤10 (minimal hasar), 2: %11-25 (hafif hasar), 3: %25-45 (orta hasar), 4: %46-75 (ciddi hasar), 5: ≥76 (Alzahrani 2019).

3.6.2. Doku takibi

Nefrektomi işleminden sonra dokular %10'luk nötral formaline alınmıştır. Dokular içinde bulunduğu nötral formalin her 8 saatte bir 3 tur olacak şekilde taze nötral formalinle değiştirilmiştir. Daha sonra doku takibi için aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır.

- Alkol %70 1 saat
- Alkol %80 1 saat
- Alkol %90 1 saat
- Alkol %95 1 saat
- Alkol %100 1 saat
- Alkol %100 1 saat

- Ksilen I 1 saat
- Ksilen II 1 saat
- Ksilen III 1 saat
- Parafin 1,5 saat
- Parafin 1,5 saat
- Parafin 1 saat
- Bloklama

Doku takibi yapıldıktan sonra dokular parafin bloklama yapılarak kesit almaya hazır hale getirilmiştir. Kesit alma işlemlerinden sonra dokular deparafinizasyon işlemlerine tabi tutulmuşlardır. Doku kesitleri polilizinli lamlara alındıktan sonra deparafinizasyon işlemleri yapıp histokimyasal boyamalara uygun hale getirilmiştir.

Deparafinizasyon basamakları;

- Etüv (56-60°C) 1 saat
- Ksilen I 30 dakika
- Ksilen II 30 dakika
- Alkol %100 10 dakika
- Alkol %90 10 dakika
- Alkol %70 5 dakika
- Alkol %50 5 dakika
- Distile su 5 dakika yıka

3.6.3. Hematoksilen-Eozin boyama

Deparafinizasyon işleminden geçmiş dokular aşağıdaki basamaklara göre H&E boyanmıştır.

- Hematoksilen 3 dakika
- Akar su 30 saniye
- Asit alkol Daldır çıkar
- Akar su 30 saniye
- Amonyak Daldır çıkar
- Akar su 1 dakika
- Eozin 3 saniye
- Akar su 30 saniye
- Alkol %50 1 dakika

- Alkol %70 1 dakika
- Alkol %90 1 dakika
- Alkol %100 1 dakika
- Kurutma işlemi
- Ksilen I 10 saniye
- Ksilen II 10 saniye
- Entellan ile kapatma işlemi.

3.6.4. Masson Trikrom boyama

Farklı deney gruplarında uygulanan işlemlerde böbrek bağ dokudaki nekrotik, fibrotik değişimlerini gözlemlemek için yapılan Masson Trikrom histokimya boyama protokolü şu şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Bovin solüsyonu 1 saat (dokular açık sarı renk alacak)
- Distile su 10 saniye
- Demirli hematoksilen 10 dakika
- Distile su 10 saniye
- Trickrom solüsyonu 30 dakika
- Distile su 10 saniye
- Alkol %50 1 dakika
- Alkol %70 1 dakika
- Alkol %90 1 dakika
- Alkol %100 1 dakika
- Kurutma işlemi
- Ksilen I 10 saniye
- Ksilen II 10 saniye
- Entellan ile kapatma işlemi.

3.6.5. İmmünohistokimyasal boyama

Deney gruplarında gerçekleştirilen Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 immünohistokimyasal boyama prosedürü aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

- Dokular distile su ile yıkandı. Bu basamaktan sonra dokuların kurumamasına özen gösterilir.
- Antijen retrivel işlemi için Sodyum Sitrat Buffer solüsyonu örneklerin üzerini geçecek şekilde behere konularak mikrodalgada 20 dakika kaynatma işlemi gerçekleştirildi

- Oda sıcaklığında ya da akarsu altında dokuların soğuması sağlandı.
- 1X PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Kesitler 1 birim H₂O₂, 9 birim absolüt metanol ile muamele edildi.
- 1X PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Sekonder kitin A Solüsyonu ile dokuların üzeri kaplanarak 10 dakika bekletildi.
- Primer antikorlar (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3) dilüe edilerek (1/200) dokuların üzerine 100 µL damlatıldı ve dokular +4°C' de 12 saat üzeri kapalı ve nemli ortamda inkübasyona bırakıldı.
- 1X PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Sekonder kitin B Solüsyonu ile dokuların üzeri kaplanarak 10 dakika bekletildi.
- 1X PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Sekonder kitin C Solüsyonu ile dokuların üzeri kaplanarak 10 dakika bekletildi.
- 1X PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- DAB kiti kendi kullanım protokolüne uygun olarak karıştırılarak lamların üzerine damlatıldı ve karanlık ve üzeri kapalı bir ortamda kontrollü bir şekilde 15 dakika kadar kahverengileşene kadar bekletildi.
- 1X PBS ile 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Hematoksilene batırıp çıkarılarak boyanma sağlandı.
- Distile su ile yıkandı.
- Alkol serilerinden geçirilir. Kurutulup ksilene batırılır ve entellan ile kapatılır.
- Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 ekspresyonu gruplarda H skoru [H SCORE= $\sum P_i (I+1)$] kullanılarak semikantitatif olarak değerlendirildi. Burada I, boyama yoğunluğunu belirtir (0=ifade yok, 1=hafif, 2=orta ve 3=güçlü). Pi, her yoğunluk için boyanan hücrelerin yüzdesini belirtir (Zhang, 2015).

3.6.6. TUNEL boyama

Doku örnekleri terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-biotin nick end-labeling (TUNEL) andy Flour™ 488 apoptoz tespit kiti üreticinin protokolüne göre boyanarak apoptozis değerlendirildi.

- Doku kesitleri 1X PBS ile 2 kere 5'er dakika yıkandı.
- 1K Proteinaz K (Bileşen G) Solüsyonunda 30 dakika bekletildi.
- 1X PBS ile 2 kere 5'er dakika yıkandı.
- Kesitler distile su ile yıkandı.
- Her bir doku kesitinin üzerine 50 µL DNase I tamponu (Bileşen F) damlatılarak 10 dakika inkübe edildi.

- Her bir doku kesitinin üstüne 50 µL DNase I solüsyonu damlatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- Örnekler distile su ile yıkandı.
- Örneklerin üzerine 100 µL TdT reaksiyon tamponu (Bileşen A) damlatılarak 10 dakika inkübe edildi.
- 50 µL TdT Reaksiyon kokteyli ile dokuların yüzeyi kaplanır ve 37°C'de 60 – 120 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler %3'lük BSA içeren PBS içinde 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Kesitlere 100 µL Andy Flour TM 488 – Streptavidin boyama solüsyonu damlatılarak karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- Örnekler %3'lük BSA içeren PBS içinde 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Karanlık ortamda doku kesitlerinin üzerine Hoechst 33342 damlatılarak kapatma işlemi gerçekleştirilir.

TUNEL metodu kullanılarak glomerüller ve tübüler hücre apoptozu immünfloresan mikroskopunda değerlendirildi. Mikroskopik görüntülerde nukleusları yeşil floresan ışığa yapan glomerüller ve tübüler hücre çekirdekleri TUNEL pozitif hücre olarak değerlendirildi. Her lamda 20X büyütmede 10 rastgele alan seçilerek alanda parlak yeşil olarak görüntülenen hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirilerek TUNEL pozitif hücrelerin sayımı yapıldı. Apoptotik indeksi hesaplandı (Zhang, 2015).

Apoptotik İndeks (AI) : Pozitif hücreler X 100/Total Hücre sayısı (Zhang, 2015)

3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS statisticd 25 software (Amork, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup incelemelerinde Mann Whitney U testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Bağımsız grup incelemelerinde; Parametrik test varsayımları sağlandığında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA, post hoc: Tukey testi) kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Zhang 2015).

- Her bir doku kesitinin üstüne 50 µL DNase I solüsyonu damlatılarak oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- Örnekler distile su ile yıkandı.
- Örneklerin üzerine 100 µL TdT reaksiyon tamponu (Bileşen A) damlatılarak 10 dakika inkübe edildi.
- 50 µL TdT Reaksiyon kokteyli ile dokuların yüzeyi kaplanır ve 37°C'de 60 – 120 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Örnekler %3'lük BSA içeren PBS içinde 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Kesitlere 100 µL Andy Flour TM 488 – Streptavidin boyama solüsyonu damlatılarak karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- Örnekler %3'lük BSA içeren PBS içinde 3 kere 5'er dakika yıkandı.
- Karanlık ortamda doku kesitlerinin üzerine Hoechst 33342 damlatılarak kapatma işlemi gerçekleştirilir.

TUNEL metodu kullanılarak glomerüller ve tübüler hücre apoptozu immünfloresan mikroskopunda değerlendirildi. Mikroskopik görüntülerde nukleusları yeşil floresan ışığa yapan glomerüller ve tübüler hücre çekirdekleri TUNEL pozitif hücre olarak değerlendirildi. Her lamda 20X büyütmede 10 rastgele alan seçilerek alanda parlak yeşil olarak görüntülenen hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirilerek TUNEL pozitif hücrelerin sayımı yapıldı. Apoptotik indeksi hesaplandı (Zhang, 2015).

Apoptotik İndeks (AI) : Pozitif hücreler X 100/Total Hücre sayısı (Zhang, 2015)

3.7. İstatistiksel Analiz

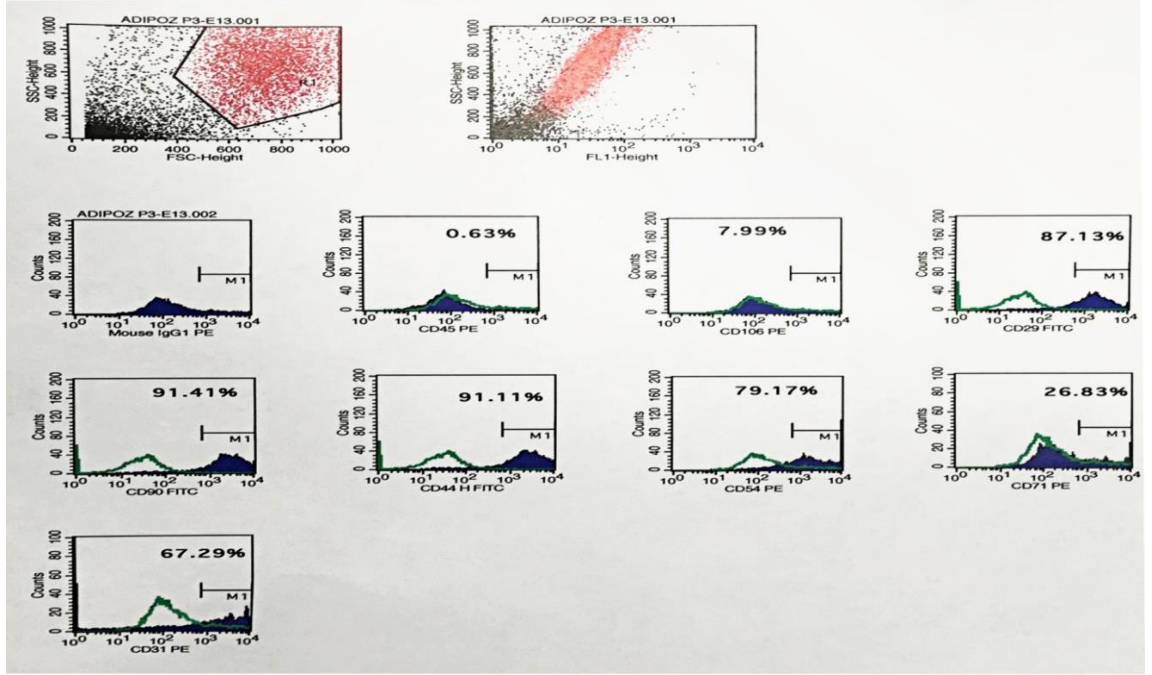
Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS statisticd 25 software (Amork, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Bağımsız grup incelemelerinde Mann Whitney U testi ve Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanıldı. Bağımsız grup incelemelerinde; Parametrik test varsayımları sağlandığında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA, post hoc: Tukey testi) kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Zhang 2015).

4. BULGULAR

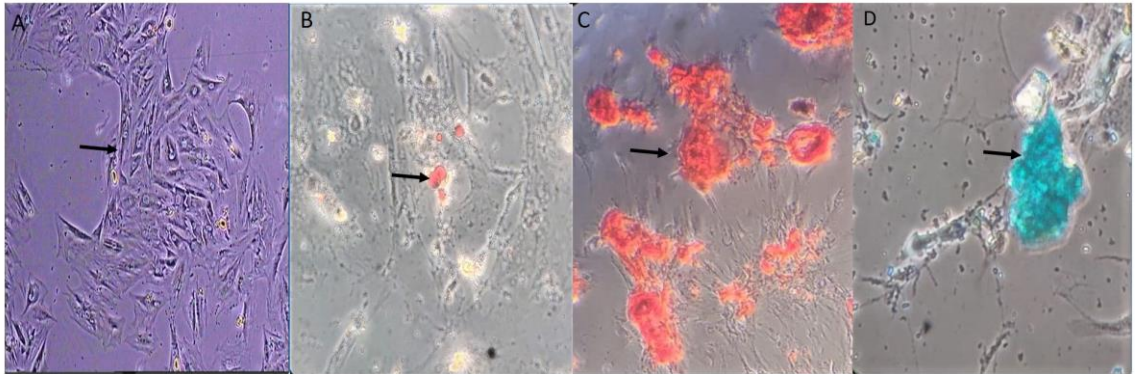
4.1. Kök Hücre Karakterizasyonu

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenen 2019HZDP020 numaralı 'Siklofosdomide Bağlı Oluşan Ovaryum Hasarında Yağ Dokudan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ve Phosphorylated Mammalian Target of Rapamycin (p-mTOR) Ekspresyonuna Etkisi' başlıklı projeden elde edilen Mezenkimal Kök Hücreler akım sitometri analizi kullanılarak kök hücre yüzey belirteci olarak CD29, CD90, CD44, CD45, CD54, CD71, CD106 yönlerinden incelendi. Buradan alınan sonuçlara göre CD29 (%87,13), CD90 (%91,41), CD54 (%91,11) yüzey belirteçlerinin yüksek titrede olması ve CD45 (%0,63), CD71 (%26,83), CD106 (%7,99) yüzey belirteçlerinin düşük bulunmasıyla mezenkimal kök hücre olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.1).

Yapılan farklılaşma deneyleri sonucunda kök hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaştığı gösterilerek, elde ettiğimiz hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu flow sitometri analizi sonuçlarına destek olarak ispatlanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Mezenkimal kök hücrelerin flow sitometri sonuçları. CD29, CD90, CD44 ekspresyonu sırasıyla 87,13%, 91,41%, 91,11% pozitif, CD45 ve CD106 ekspresyonu sırasıyla 0,63% ve 7,99% pozitifdir.

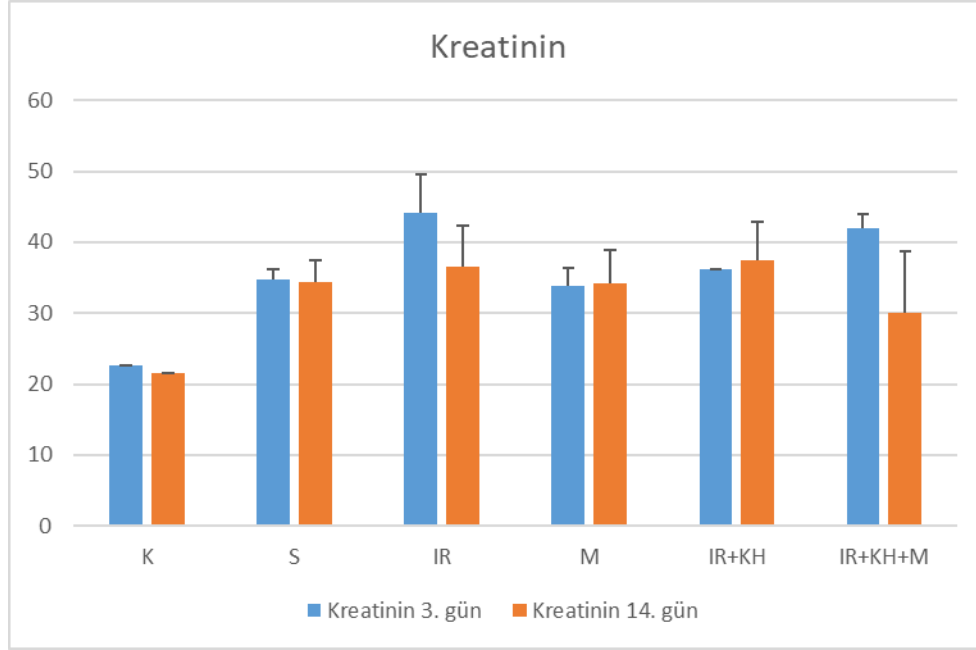


Şekil 4.2 ADMKH'nin üçüncü pasajda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik dokuya farklılaşması. ADMKH'nin çözüldükten sonraki görüntüsü (ok) (A), adipojenik farklılaşma (ok) (B), kondrojenik farklılaşma (ok) (C) ve osteojenik farklılaşma (ok) (D). X20, inverted mikroskop.

4.2. Grupların Kan BUN ve Kreatinin Değerlerinin Karşılaştırılması

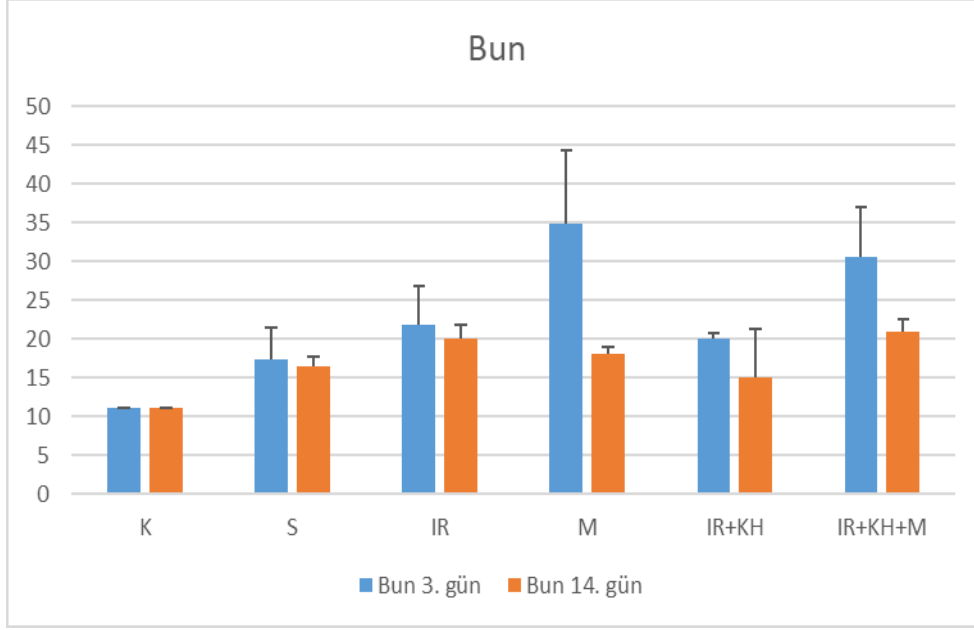
Grupların 3. Gün kan kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında, K grubuna göre bütün grupların kreatinin düzeyinin arttığı saptandı. Bu artış IR grubunda ve IR+KH+M grubunda anlamlı olarak fazlaydı ($p < 0,05$). Tedavi grubunda hem 3. gündeki hem de 14. gündeki kan kreatinin düzeyleri IR grubuna göre düşük saptansa da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Kreatinin düzeyleri IR+KH+M grubunda 14. günde 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı. IR+KH+M grubunda 3. gün

kreatinin düzeyi $41,95 \pm 2,1$ iken 14. günde $30,09 \pm 8,57$ ye düştü. (Şekil 4.3)
(Tablo 4.1)



Şekil 4.3 Grupların kan kreatinin düzeylerinin karşılaştırmalı grafiksel analizi

BUN düzeyleri 3. günde M ve IR+KH+M gruplarında K grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. M ve IR+KH+M gruplarının BUN düzeyleri 3. günde IR grubunda yüksekti ama istatistiksel olarak anlamlı değildi. 14. gündeki değerler karşılaştırıldığında IR grubunda BUN düzeyleri yine aynı değerlerde olmasına rağmen, M ve IR+KH+M gruplarında anlamlı olarak düştüğü saptandı. 14. gün kan BUN düzeyleri K ve S grubunda IR grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. (Şekil 4.4)
(Tablo 4.1)



Şekil 4.4 Grupların kan BUN düzeylerinin karşılaştırmalı grafiksel analizi

Tablo 4.1 Grupların kan kreatinin ve BUN sonuçları

		K	S	IR	M	IR+KH	IR+KH+M	Gruplar arası p
Kreatinin (umol/L)	3. gün	22.67 ± 0	34,73 ± 1,37	44,23 ± 5,42	33,78 ± 2,61	36.24 ± 0	41,95 ± 2,1	0.001*
	14. gün	21.60 ± 0	34,44 ± 2,99	36,54 ± 5,82	34,29 ± 4,67	37,37 ± 5,49	30,09 ± 8,57	0.051
		-	1	0.114	1	-	0.029*	
BUN (mmol/L)	3. gün	11.09 ± 0	17,35 ± 4,04	21,77 ± 4,99	34,86 ± 9,39	19,97 ± 0,8	30,59 ± 6,43	0.003*
	14.gün	11.09 ± 0	16,39 ± 1,26	20,06 ± 1,67	18,15 ± 0,85	15,03 ± 6,2	20,93 ± 1,69	0.004*
		-	0.886	0.686	0.029*	0.057	0.029*	

4.3. Histolojik Değerlendirme

K grubunda böbrek kesitlerinde tüm histolojik yapıların korunduğu görüldü. Glomerüller ve tübül yapıları normal görünümündeydi. Masson Trikrom boyama sonucunda glomerüller ve tübül yapılarında herhangi bir nekrotik değişiklik gözlenmedi. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

S 3. gün grubunda glomerül yapıları, proksimal, distal ve toplayıcı tübüller olağan görünümünde görüldü. Yer yer kanama alanları mevcuttu. Masson Trikrom boyanması K grubuyla uyumlu bir şekilde glomerül ve tübüllerde nekrotik boyanmaya rastlanmadı. S 14. gün grubunda glomerüller yapılar sağlam olarak görülmekle birlikte bazı tübüllerde dilatasyon saptandı. Ama genel olarak glomerül ve tübül yapıları hem

H&E hem de Masson Trikrom boyama sonuçlarının K grubuyla uyumlu olduğu görüldü. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

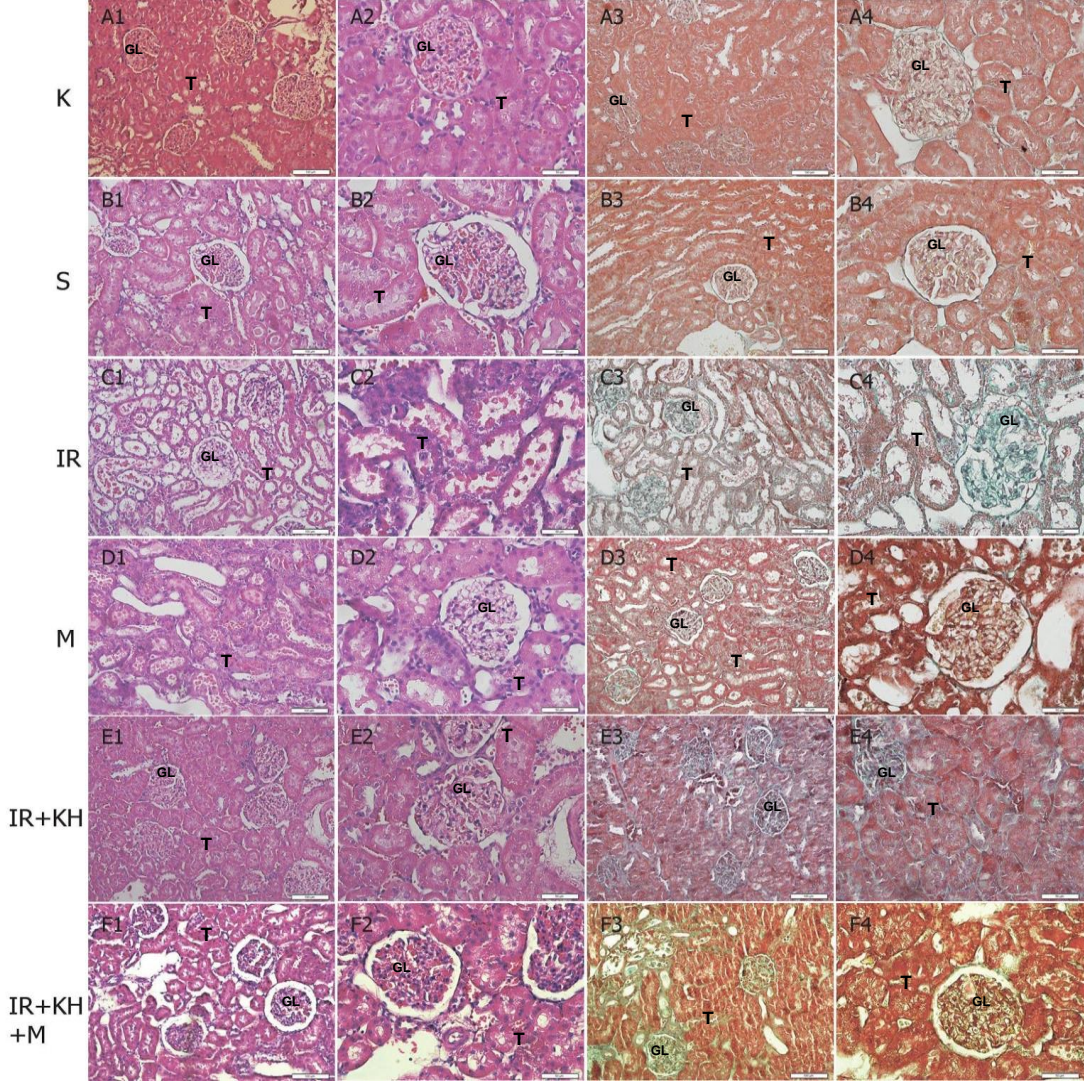
IR grubunda 3. gün H&E boyanan kesitlerde bazı glomerüller yapılar sağlam görülürken glomerüllerin bazılarında bowman boşluğunda genişleme, glomerüller yapılarında kayıp gözlemlendi. Korteks ve medulladaki tübüllerde dilatasyon, bazı tübüllerde cast formasyon dikkat çekiciydi. IR grubunda 14. gün sakrifiye edilen sıçanların böbreklerinde tübüler hasarın daha da arttığı gözlemlendi. Bowman boşluğundaki genişleme, bazı glomerüllerde yapının tamamen bozulduğu görülmüştür. 3. Gün böbreklerde glomerüllerde fibrotik değişiklikler görülürken, 14. gün böbreklerde glomerüllerdeki fibrozise ek olarak, damar çevresinde, tübüllerde ve özellikle medulladaki tübüllerdeki fibrozis dikkat çekiciydi. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

IR+M 3. gün grubunda bazı glomerüllerde bowman boşluğunda genişleme görülmesine rağmen genel olarak glomerül yapıları sağlamdı. Proksimal tübüllerde sağlam olanlarla birlikte dilate tübüller de görüldü. Yer yer tübül içi ve tübüller arası kanama alanları mevcuttu. Bazı tübüllerde tübül lümenine hücre dökülmesiyle birlikte, tübül lümeninde eozinofilik bir sıvı olduğu saptandı. Masson Trikrom sonuçlarında 3. gün grubunda fibrotik değişiklikler görülmedi. M verilen 14. gün grubunda ise glomerüllerde bowman boşluğunun düzeldiği, dilate tübüllerin 3. günde kiler nazaran azaldığı dikkati çekti. Masson Trikrom boyamada fibrotik değişiklikler bazı damar ve glomerül çevresinde sınırlı alanlarda saptandı. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

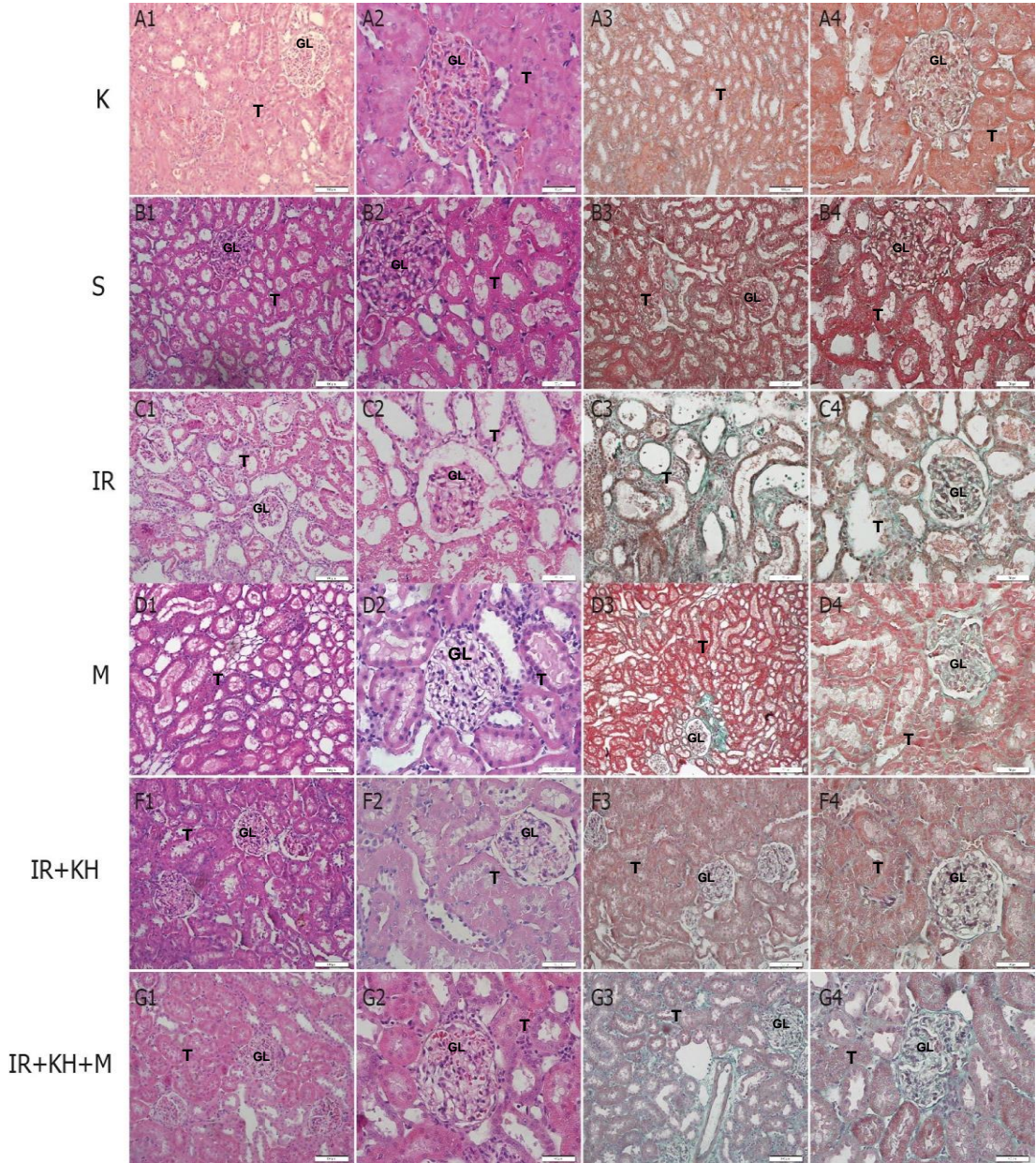
IR+KH 3. gün grubunda bazı alanlarda glomerüllerde ve damar dışında kanama alanları olmakla birlikte kortekste proksimal tübüllerde düzelme olduğu görüldü. Böbrek tübül lümenine hücre dökümler medulladaki bazı tübüllerde devam ederken kortekste azaldığı dikkati çekti. Masson Trikrom boyamada glomerül ve çevresinde fibrotik değişiklikler saptandı. KH 14. gün grubunda glomerüllerde proksimal tübüllerde düzelmeler belirginken bu tübüllerde dilatasyon hala devam etmekteydi. Masson Trikrom boyamada bazı glomerüllerde fibrotik değişiklikler görülmezken, tübüller arası fibrotik değişiklikler M grubundan daha fazlaydı. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

IR+KH+M 3. gün grubunda bazı glomerüller yapısal bütünlüğünü kaybetmişken bazı glomerüller normal yapıda görülmekteydi. Tübüllerin bazılarında hücre dökümler ve dilatasyon görülürken bazı tübüllerde özellikle proksimal tübüllerde düzelme dikkati çekti. Masson Trikrom boyamada dilate tübüllerin olduğu ve glomerül yapısının bozulduğu alanlarda fibrotik değişiklikler görüldü. KH+M grubunda 3. günde saptanan değişiklikler 14. günde daha belirgindi. Yer yer dilate tübüller görülse de

glomerül, tübül yapıları K ve S grubundaki gibi normaldi. Fakat Masson Trikrom boyamada bazı glomerüllerde damar çevresinde ve tübül çevrelerinde fibrotik değişiklikler gözlemlendi. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

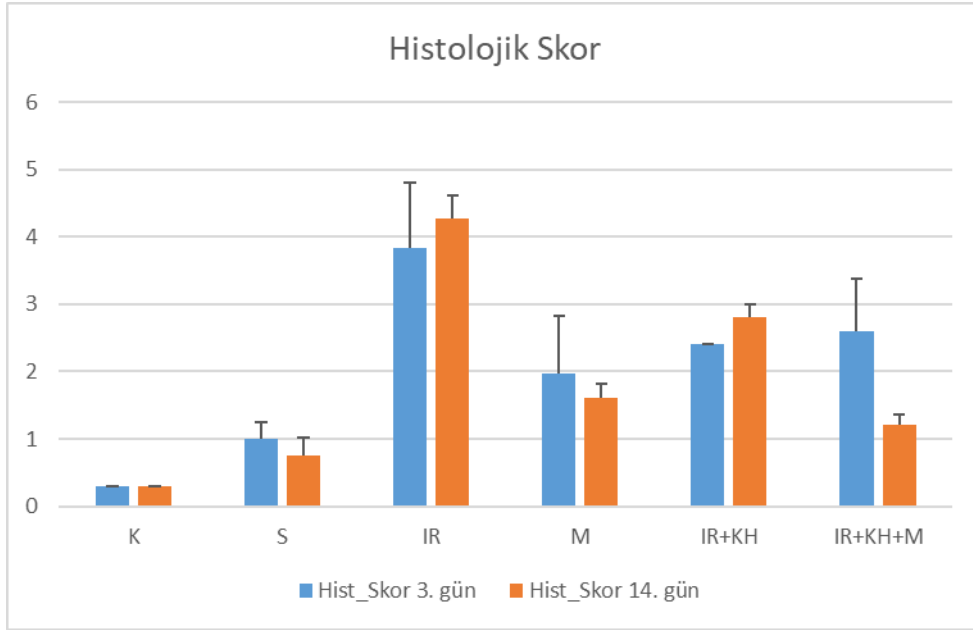


Şekil 4.5 3. gün sakrifiye edilen grupların H&E ve Masson Trikrom boyanma görüntüleri. (Hiçbir işlem yapılmayıp 3. Günde sakrifiye edilen K grubu (A1: H&E görüntüsü 20X büyütme, A2:H&E görüntüsü 40X büyütme, A3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, A4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). Sağ nefrektomi yapıp 3. günde sakrifiye edilen Sham grubu (B1: H&E görüntüsü 20X büyütme, B2: H&E görüntüsü 40X büyütme, B3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, B4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıp 3. günde sakrifiye edilen IR grubu (C1: H&E görüntüsü 20X büyütme, C2: H&E görüntüsü 40X büyütme, C3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, C4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra 3. günde sakrifiye edilen M grubu (D1: H&E görüntüsü 20X büyütme, D2: H&E görüntüsü 40X büyütme, D3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, D4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR + KH grubu (E1: H&E görüntüsü 20X büyütme, E2: H&E görüntüsü 40X büyütme, E3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, E4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR + KH + M grubu (F1: H&E görüntüsü 20X büyütme, F2: H&E görüntüsü 40X büyütme, F3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, F4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme) Glomerül (GL), Tübül (T)).



Şekil 4.6 14. gün sakrifiye edilen grupların H&E ve Masson Trikrom boyanma görüntüleri. (Hiçbir işlem yapılmayıp 14. Günde sakrifiye edilen K grubu (A1: H&E görüntüsü 20X büyütme, A2:H&E görüntüsü 40X büyütme, A3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, A4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). Sağ nefrektomi yapıp 14. günde sakrifiye edilen S grubu (B1: H&E görüntüsü 20X büyütme, B2: H&E görüntüsü 40X büyütme, B3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, B4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıp 14. günde sakrifiye edilen IR grubu (C1: H&E görüntüsü 20X büyütme, C2: H&E görüntüsü 40X büyütme, C3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, C4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra 14. günde sakrifiye edilen M grubu (D1: H&E görüntüsü 20X büyütme, D2: H&E görüntüsü 40X büyütme, D3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, D4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR + KH grubu (E1: H&E görüntüsü 20X büyütme, E2: H&E görüntüsü 40X büyütme, E3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, E4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR + KH + M grubu (F1: H&E görüntüsü 20X büyütme, F2: H&E görüntüsü 40X büyütme, F3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, F4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme) Glomerül (GL), Tübül (T)).

Yapılan histolojik skorlamada grupların 3. günleri değerlendirildiğinde IR grubu histolojik olarak K ve S grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,05$). 14. gündeki histolojik skorlamayı değerlendirdiğimizde IR yapıları ve sadece KH verilen gruptaki yükselme dikkat çekiciydi. IR+KH grubu K grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p<0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da tedavi gruplarında IR grubuna göre histolojik skorlama düşüktü. 3. ve 14. günleri kendi aralarında karşılaştırdığımızda IR+KH+M grubu 14. günde histolojik skorlama anlamlı olarak düşük bulundu. (Şekil 4.7)



Şekil 4.7 Grupların histolojik olarak skorlamasının karşılaştırılması

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubunda Kaspaz-3 glomerül hücrelerinde hem pozitif, hem de negatif ekspresyon gösterdi. Tübül hücrelerinde ve damar endotelinde de reaksiyonun zayıf pozitif olduğu belirlendi. Bax ekspresyonu glomerül paryetal epitelinde yer yer zayıf, yer yer kuvvetli pozitif reaksiyon gösterirken, tübüllerde ve damar endotelinde boyanma negatifti. Bcl-2 glomerül paryetal epitelinde kuvvetli pozitif tübüllerde orta derecede ekspresyon gösterdi. (Şekil 4.8) (Şekil 4.10).

S 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüllerde paryetel epitelde kuvvetli pozitif, tübül hücrelerinde ise negatif reaksiyon gösterdi. Tübüllerin çoğu negatif olarak izlenirken bir bölümünde pozitif reaksiyon dikkati çekti. Bax ekspresyonu tüm yapılarda negatif olarak izlendi. Bcl-2 ekspresyonu tübüllerin çoğunda, glomerüler hücrelerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitif. (Şekil 4.8). S 14. gün grubunda Kaspaz-3 reaksiyonu bu grupta tübüllerde ve damar endotelinde pozitif ekspresyon olurken glomerüllerde negatif ekspresyon gözlemlendi. Bax glomerül hücrelerinde ve tübüllerde zayıf ekspresyonda izlendi. Bcl-2 bu grupta glomerülde negatif ekspresyon olurken, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitif. (Şekil 4.10).

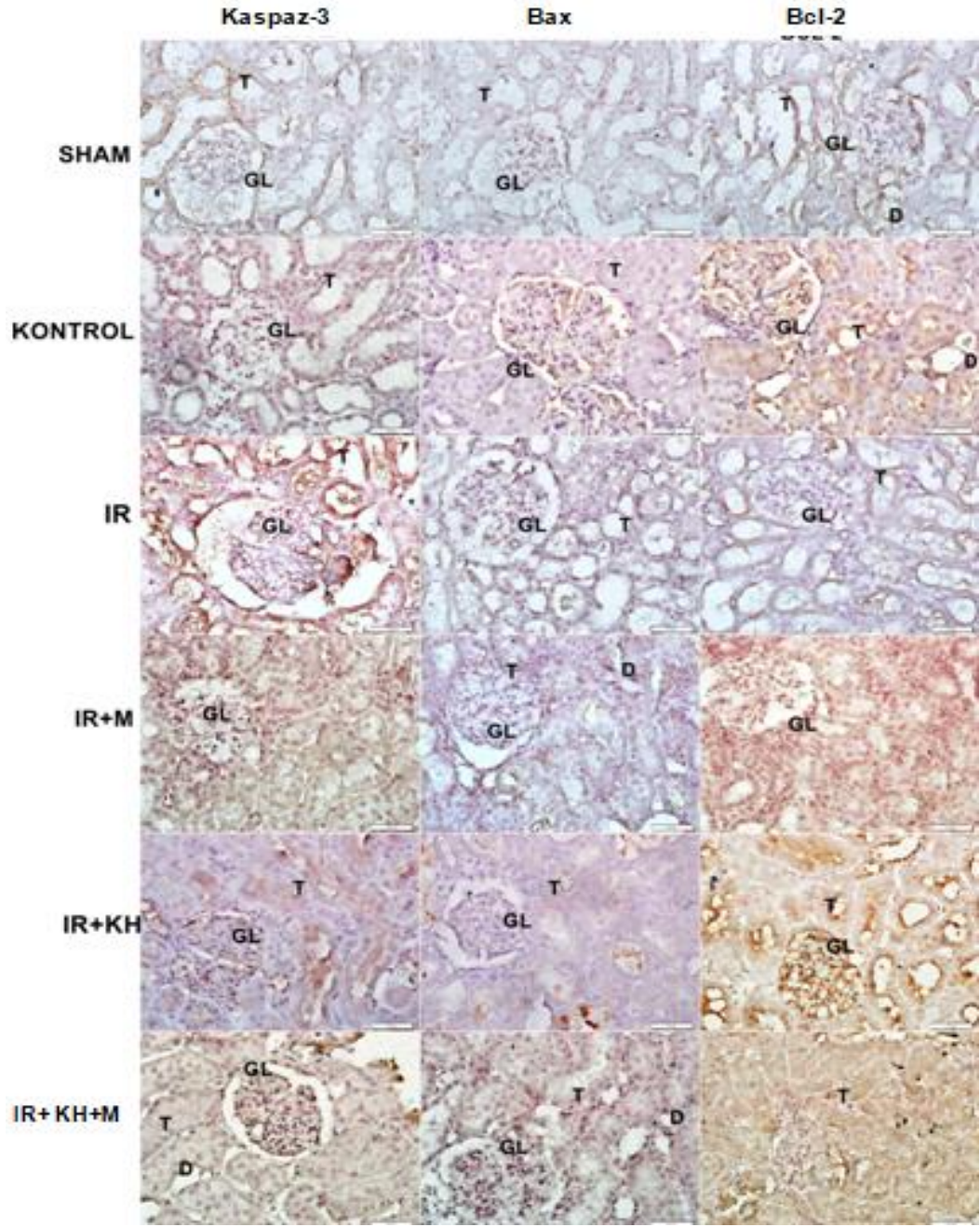
IR 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerül paryetel epitelinde, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli reaksiyon gösterdi. Bununla birlikte glomerülde hücrelerin çoğunluğu negatifti. Bu grupta Bax ekspresyon tüm yapılarda zayıf pozitif ekspresyon gösterdi. Bcl-2 ekspresyonu glomerüllerin ve tübüllerin çoğunda negatif izlenmesine karşın bazı tübüllerde zayıf pozitif boyanma dikkati çekti. (Şekil 4.8). IR 14. gün grubunda Kaspaz-3 ve Bax glomerüllerde, tübüllerde ve endotelde kuvvetli ekspresyon gösterdi. Bcl-2 ekspresyonu ise Bax ve Kaspaz-3' ten farklı olarak tüm yapılarda negatifti. (Şekil 4.10).

IR+M 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüllerde pozitif tübüllerde zayıf, endotelde ise kuvvetli pozitif derecede ekspresyon gösterdi. Bax tüm yapılarda negatifti bununla birlikte bazı tübüllerin lümeni pozitif reaksiyon gösteren salgı ile dolu olarak izlendi. Bcl-2 glomerül hücrelerinde kuvvetli derecede, tübüllerde ve endotelde ise orta derecede pozitif. (Şekil 4.8). IR+M 14. günde Kaspaz-3 reaksiyonu glomerüllerde negatifken tübüllerin bir bölümünde ve endotelde zayıf pozitif boyanma gösterdi. Bu grupta Bax reaksiyonu glomerülde ve endotelde negatifken tübüllerde reaksiyon zayıf pozitif olarak izlendi. Bcl-2 ekspresyonu glomerüllerde, tübüllerde ve endotelde ise kuvvetli pozitif. (Şekil 4.10).

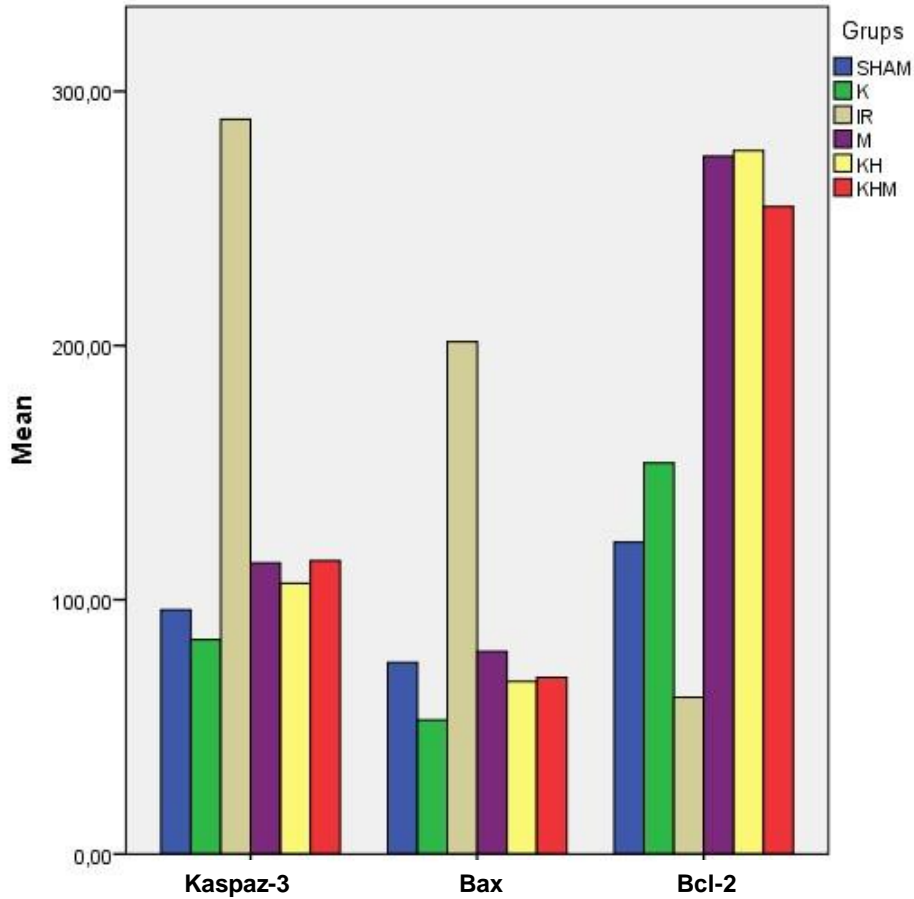
IR+KH 3. gün grubunda Kaspaz-3 ekspresyonu glomerülde orta derecede tübüllerde ise zayıf ekspresyon göstermiştir. Bax ekspresyonu glomerüler hücrelerinde ve tübüllerde negatifti. Bcl-2 ekspresyonun ise glomerülerde ve tübüllerde kuvvetli pozitif olarak reaksiyon gösterdiği dikkati çekti. (Şekil 4.8). IR+KH 14. gün grubunda Kaspaz-3 glomerülde ve tübüllerde zayıf ekspresyon gösterdi. Bax ekspresyonu bu grupta tüm yapılarda negatifti. Bcl-2 glomerüllerde, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. (Şekil 4.10).

IR+KH+M 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüllerde orta derece pozitif reaksiyon gösterirken tübüllerde reaksiyon negatifti. Endotel hücrelerinin ise kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi. Bu grupta Bax glomerüllerde ve tübüllerde zayıf pozitifliği. Bcl-2 ekspresyonu glomerüllerde, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitifliği. (Şekil 4.8). IR+KH+M 14. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüle hücrelerinde, tübüllerde zayıf pozitif ekspresyon gösterdi. Bax ekspresyonu tüm yapılarda çok zayıf pozitif olarak izlendi. Bcl-2 ekspresyonu glomerül hücrelerinde ve tübüllerde kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. (Şekil 4.10).

Semikantitatif H skoru analizinde 3. Günde IR grubunda Kaspaz-3 ekspresyonu diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksekken Bcl-2 ekspresyonu anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Tedavi gruplarında Kaspaz-3 salınımı azalıp Bcl-2 salınımı artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). 3. günde Bax ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). (Şekil4.9) (Tablo4.2). 14. gün Kaspaz-3 ve Bax ekspresyonunun IR grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığı, Bcl-2 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. (Şekil4.11) (Tablo4.3)



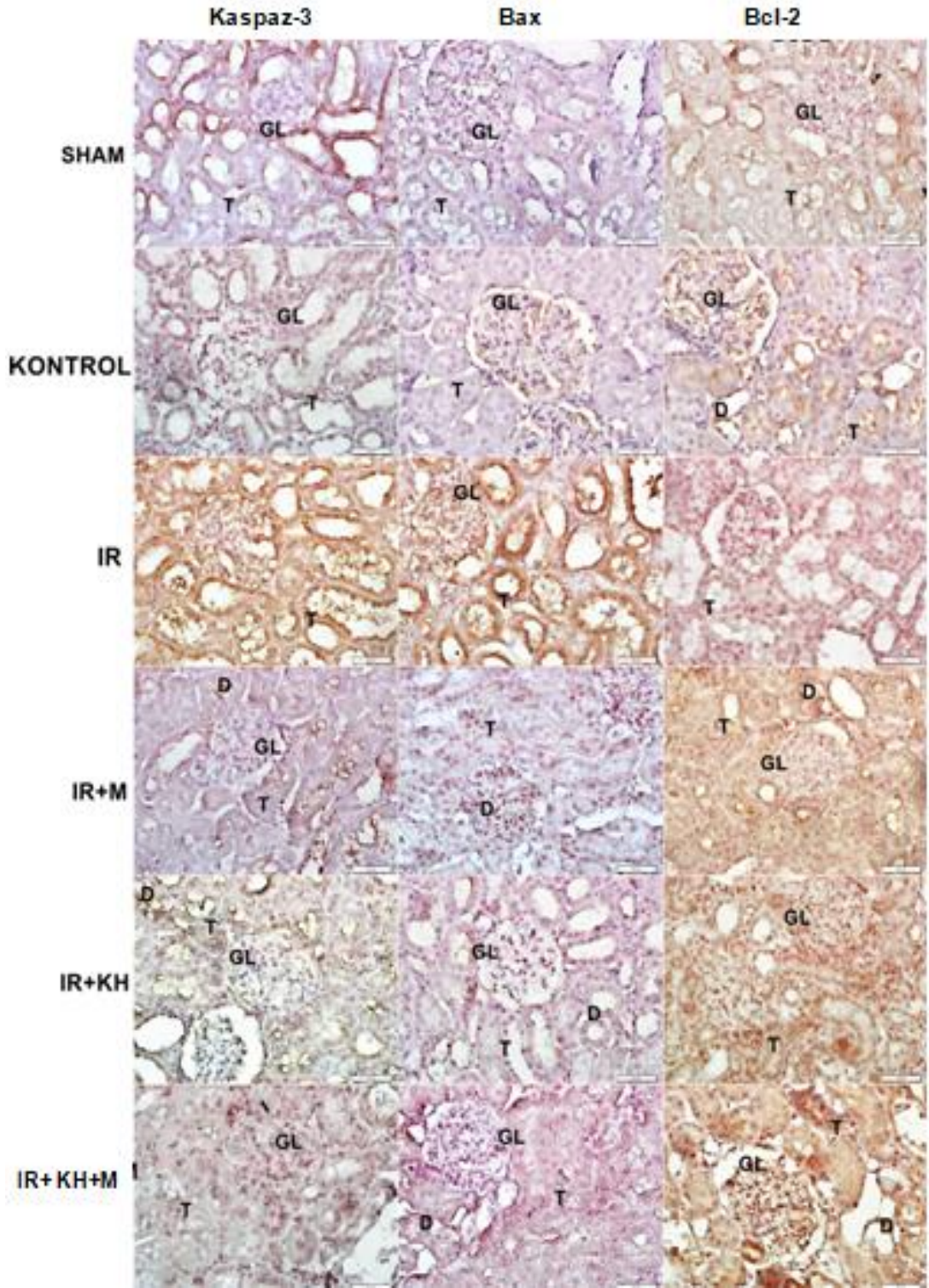
Şekil 4.8 3. günde sakrifiye edilen grupların immünohistokimyasal görüntüleri (Sağ nefrektomi yapıp 3. günde sakrifiye edilen S grubu. IR yapıp 3. günde sakrifiye edilen IR grubu. IR yapıldıktan sonra 3. günde sakrifiye edilen KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR+KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR+KH+M grubu. IR yapıldıktan sonra melatonin uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR+M grubu. Gruplardan alınan böbrek kesitlerinde Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonu. Glomerül (GL), Tübül (T), Damar (D). İmmünoperoksidaz X400, Bar 50µm.)



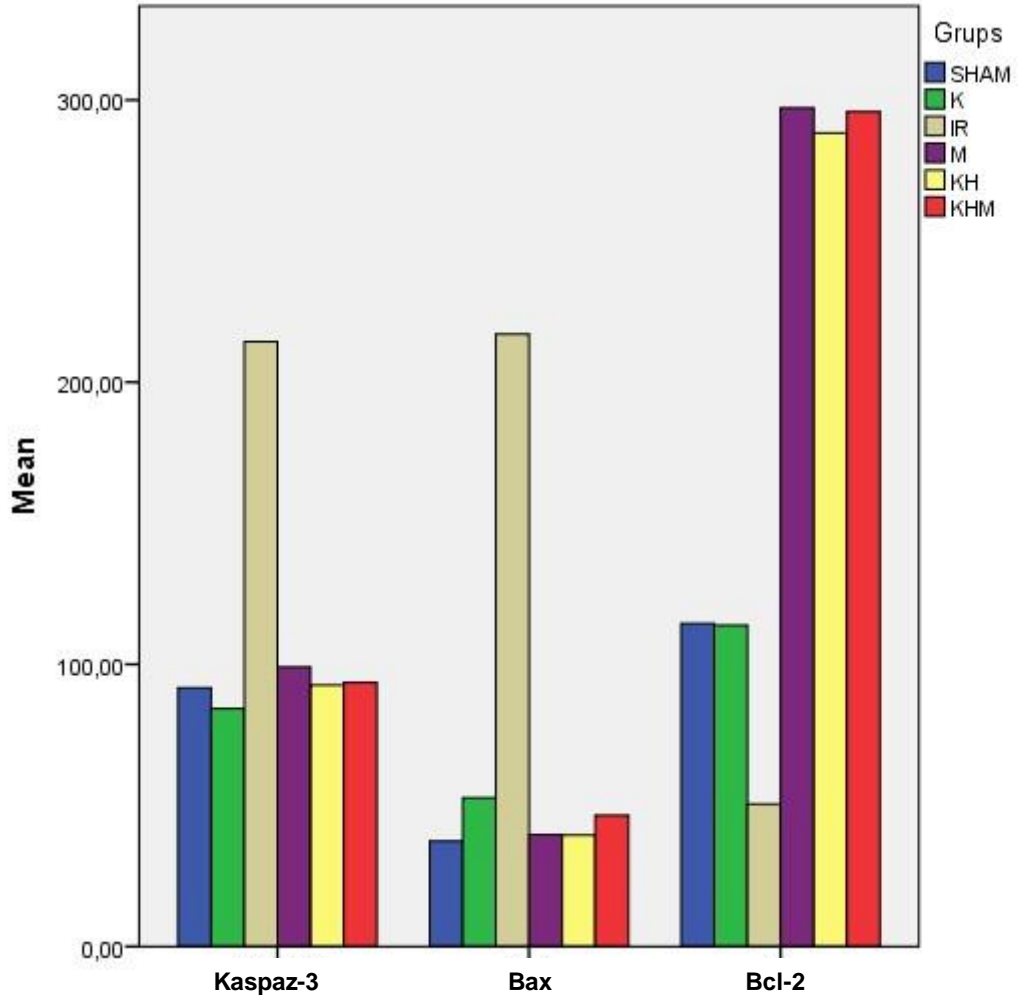
Şekil 4.9 3. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 ekspresyon eden hücrelerin H-Skoru analizi

Tablo 4.2 3. gün gruplarından alınan böbrek dokusundaki Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun H-skor analizi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlılık: *** $p < 0,05$

3. Gün	Kaspaz-3	Bax	Bcl-2
	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma
S	96,00±15,36	75,33±17,97	132,66±10,7
K	84,33±16,8	54,66±9,8	153,83±35,06
IR	289,00±13,43***	201,50±32,32	66,83±10,68***
IR+M	106,66±12,58	79,66±15,84	274,56±11,86
IR+KH	106,50±9,81	67,83±10,16	276,66±13,48
IR+KH+M	115,33±11,36	69,50±28,17	254,66±28,54



Şekil 4.10 14. Günde sakrifiye edilen grupların immünohistokimyasal görüntüleri. (Sağ nefrektomi yapıp 14. günde sakrifiye edilen S grubu. IR yapıp 14. günde sakrifiye edilen IR grubu. IR yapıldıktan sonra 14. günde sakrifiye edilen KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR+KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR +KH+M grubu. IR yapıldıktan sonra melatonin uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR+M grubu. Gruplardan alınan böbrek kesitlerinde kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonu. Glomerül (GL), Tübül (T), Damar (D). İmmünoperoksidaz X400, Bar 50µm.)



Şekil 4.11 14. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 ekspresyon eden hücrelerin H-Skoru analizi

Tablo 4.3 14. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun H-skor analizi sonuçları İstatistiksel olarak anlamlılık: *** $p < 0,05$

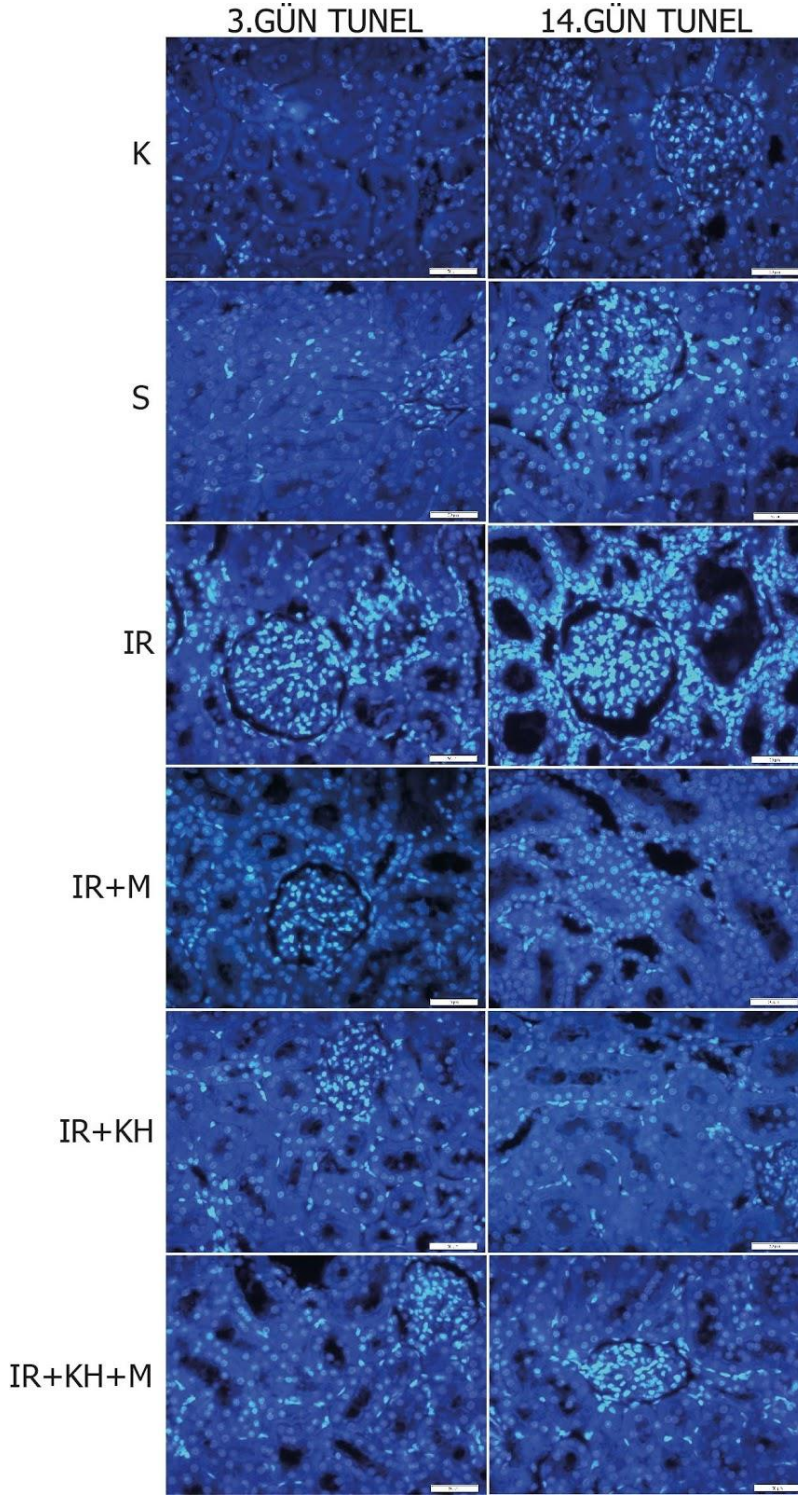
14. Gün	Kaspaz-3	Bax	Bcl-2
	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma
S	91,66±9,28	37,33±5,31	114,15±23,08
K	84,33±16,86	52,66±10,1	113,83±25,63
IR	214,33±12,7***	217,00±19,4***	50,50±5,54***
IR+M	99,00±4,51	39,66±10,38	297,16±3,31
IR+KH	92,66±8,11	39,50±9,07	288,00±11,3
IR+KH+M	93,55±6,22	46,50±6,44	295,83±5,94

4.5. TUNEL Bulguları

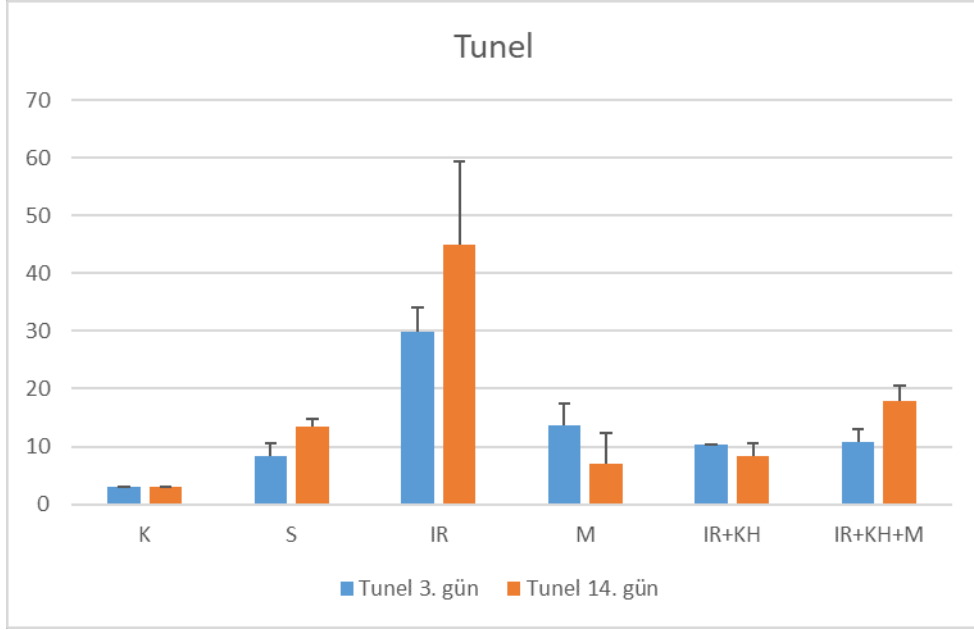
Grupların 3. ve 14. gündeki hesaplanan apoptotik indekslerini karşılaştırdığımızda IR grubunda K ve S grubuna göre anlamlı yükseklik saptandı. Apoptotik hücre artışı glomerüler yapılarda daha belirgindi. İlginç bir şekilde histolojik skorlama IR+KH+M grubunda 14. günde anlamlı olarak azalırken, TUNEL(+) hücrelerin anlamlı olarak artması dikkat çekiciydi ($p < 0,05$). (Tablo 4.4) (Şekil 4.12) (Şekil 4.13)

Tablo 4.4 Grupların histolojik skorlama ve TUNEL değerlendirme sonuçları

		S	IR	M	IR+KH	IR+KH+M	Gruplar arası p	
Histolojik Skor	3. gün	0.3 ± 0	1 ± 0,24	3,83 ± 0,97	1,98 ± 0,85	2.4 ± 0	2,6 ± 0,78	0.002*
	14. gün	0.3 ± 0	0,75 ± 0,26	4,28 ± 0,34	1,6 ± 0,22	2,8 ± 0,2	1,2 ± 0,16	0.001*
		0.2	0.886	0.886	-	0.029*		
TUNEL (Aİ)	3. gün	2.92 ± 0	8,35 ± 2,11	29,77 ± 4,26	13,63±3,72	10.24 ± 0	10,69± 2,27	0.002*
	14. gün	2.92 ± 0	13,37±1,43	44,98±14,35	6,97 ± 5,27	8,32 ± 2,31	17,78± 2,86	0.002*
		0.029*	0.114	0.229	-	0.029*		



Şekil 4.12 3. ve 14. günde sakrifiye edilen deney gruplarının TUNEL boyama görüntüleri (40X büyütme)



Şekil 4.13 3. ve 14. günde sakrifiye edilen deney gruplarının apoptotik indeks sonuçlarının karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Bizim çalışmamızda verilen tedaviler istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kan kreatinin ve BUN düzeylerini düşürmüştür. Grupların 3. gündeki histopatolojik görüntülerinde K ve S grubu kadar iyi olmasa da IR grubuna göre belirgin bir düzelme vardı. Fakat 14. gündeki histolojik düzelme deney gruplarında oldukça belirgindir. IR grubunda 3. ve 14. günlerde TUNEL pozitif hücre ve Kaspaz-3 ve Bax ekspresyonu artarken, Bcl-2 ekspresyonunun gözlenmemesi iskeminin apoptotik yolağı tetiklediğini göstermiştir. Bütün tedavi gruplarında ve özellikle 14. günde olmak üzere apoptotik gen ekspresyonunu ve apoptotik indeksi düşürmesi tedavinin etkin olduğunu göstermektedir.

Akut iskeminin ortaya çıkmasından sonra, renal perfüzyonun restorasyonu, süperoksit, hidrojen peroksit (HOOH) ve hidroksil (OH) radikali dahil olmak üzere proinflamatuar sitokinlerin ve ROS üretimini tetikleyen vasküler endotel hücrelerini hızla aktive eder. Akut böbrek hasarında iskemi reperfüzyonu takiben, kusurlu antioksidan süreçler, endojen antioksidanların tükenmesine ve redoks tarafından düzenlenen enzimlerin aktivitesinin azalmasına neden olarak hücre içi ROS birikimini şiddetlendirir. Azaltılmış antioksidan kapasite ile ilişkili bu artan ROS üretimi, bir oksidatif stres durumuna yol açar (Lee vd 2019). Sonuçta mitokondriyal hasar, ATP'nin tükenmesi, artan lipid peroksidasyonu ve hücre ölüm yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. ROS'un diğer bir zararlı etkisi, hücre zarı proteinlerinin oksidatif modifikasyonudur; bu, iyon ve besin taşınmasını, enerji metabolizmasını ve hücrel homeostaz için gerekli olan organel fonksiyonunu bozar. Ayrıca, NF- κ B'nin ROS aracılı aktivasyonu, böbrek fonksiyonu üzerinde zararlı bir etkisi olan tübül epitel hücre apoptozunu ve böbrek fibrozunu tetikleyerek sistemik inflamasyonu şiddetlendirmeye devam eder (Lee vd 2019).

İskemi, tübül hücrelerinde NO (nitrik oksit) sentazı aktifler. Daha sonra oluşan ROS proteinlerinin aktivasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, apoptozisin indükasyonu yolu ile renal tübül hücrelerinin hasarına neden olur. Melatonin akut böbrek yetmezliğinde antiinflamatuardır, antioksidandır ve endoplazmik retikulum stresini azaltır. Shi ve ark. diyabetik sıçanlarda melatoninin IR üzerindeki etkisine bakmışlar. 4 hafta boyunca melatonin verdikleri diyabetik ve nondiyabetik sıçanlarda IR

oluşturmuşlar ve melatoninin diyabette oksidatif hasarı ve apoptozisi hafiflettiğini bulmuşlardır (Shi vd 2019).

Ahmediasl ve ark.'nın yaptığı çalışmada tek taraflı nefrektomi ve sonrasında renal iskemi reperfüzyon oluşturdukları sıçanlara, iskemi öncesi 10 mg/kg melatonin ve 5000 U/kg eritropoietin verilip, 24 saat sonra sakrifiye etmişler. Serum üre seviyeleri melatonin verilen grupta anlamlı olarak azalmış. MDA seviyesi anlamlı olarak diğer gruplara göre düşük saptanmıştır. Melatonin uygulanması histopatolojik anormallikleri azaltmıştır (Ahmediasl vd 2014) Melatoninle tedavi edilmiş akut pankreatikli hayvanlarda pankreas iltihabında, amilaz, lipaz ve inflamatuvar öncüllerinden olan sitokinlerin seviyelerinde azalma olduğu, inflamatuvarı önleyen interlökinlerin seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise melatonin bir başka antioksidan etkisi ise miyeloperoksidaz seviyesini azaltması, kan akışını düzenlemesi, prostaglandin seviyesinde azalma, apoptoz ve nekrozu kontrol altına alması olarak gözlemlenmiştir (Carrasco vd 2013). Başka bir çalışmada peroksil radikalinin neden olduğu hasara karşı melatoninin doz miktarına bağlı olarak reperfüzyon sırasında koruyucu etki gösterdiğini gözlemlenmiştir (Dobsak vd 2003).

Melatoninin in vitro olarak uygulanmasında, histon deasetilaz sinyalinin hedeflenmesiyle A549 ve PC9 akciğer adenokarsinom hücrelerini baskıladığını ve apoptoz molekülleri olan PUMA ve Bax moleküllerinin reseptör miktarında artışa; proliferasyonla ilgili olan, antiapoptoz molekülü Bcl-2 reseptörlerinde azalmaya neden olduğu ve kansere karşı etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Fan vd 2015).

Li ve arkadaşları böbreklerde çift taraflı tıkanıklığın yol açtığı sorunların melatonin tedavisi ile giderilmesine yönelik çalışma yapmışlar. 60 adet Sprague-Dawley (SD) erkek sıçanları her biri 20 sıçandan oluşan 3 gruba ayırmışlar ve bu grupları yapacakları uygulamalara göre kontrol grubu olarak kullanacakları sham, bilateral üreter obstrüksiyon (BUO) ve BUO+Melatonin olacak şekilde 3 ayrı gruba her grubu da kendi içinde 2 alt gruba ayırmış. BUO-R+melatonin grubuna BUO başlangıcında melatonin 20 mg/kg ve 50 mg/kg 6 saat sonra, serbest bırakıldıktan sonra 50 mg/kg ve 2 gün boyunca günlük olarak verilmiştir. BUO'dan 24 saat sonra, sıçanlar, kontrol sıçanlarına kıyasla plazma üre ve kreatinin düzeylerini önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Melatoninin yararlı mekanizmalarının BUO ve BUO-R sıçanlarında böbrek fonksiyonunun bozulması sonucu renal AQP -1, -2, -3 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak inflamatuvar infiltrasyon ve sitokinlerin salgılanmasını büyük ölçüde inhibe ettiğini, obstrüksiyondan sonra böbrek ultrastrüktürel bütünlüğünü

korumasını sağladığı görülmüş. Melatonin tedavisinin renal hemodinamik düzenleme, renal yapı ve tübüler fonksiyon bütünlüğünü koruma sağladığını, BUO'nun salınmasından önce ve sonra potansiyel olarak koruyucu bir rol üstlendiğini göstermişler (Li vd 2019).

Chen ve ark. 2019 renal IR sıçanlarında melatonin ve poricoic acid A (PAA)nin etkisine bakmışlar. Yapılan incelemeler sonucunda IRI sıçanları sham grubu ile karşılaştırıldığında a-SMA (alfa düz kas aktin) kollagen I ve fibronektin ekspresyonu artmış 14. günden sonra IRI grubunda belirgin interstisyel fibrozis görülmüş. IRI grubuna göre melatonin ve PAA ile tedavi gruplarında a-SMA kollagen I ve fibronektinin azaldığı; hem melatonin hem PAA inhibitör etki göstermiş ve buna ek olarak M+ PAA kombinasyonunda ise daha etkili sonuç alınmış ve bu etkiyi de fibrozisi engelleyerek yaptığını gözlemlemişler (Chen ve ark. 2019).

Panah ve ark. yaptığı çalışmada 18 yaş üstü böbrek nakli yapılan hastalarda oral melatoninin inflamatuvar ve oksidatif stres faktörleri, böbrek fonksiyon biyobelirteçleri ve Klotho gen/protein ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmişler. Kontrol grubu IR+plasebo, işlem yapılan grup IR+M olarak isimlendirilmiş. Kontrol ve işlem grubunda transplantasyondan 24 saat önce serumda kreatinin ve üre miktarlarının, Plazma melatonin, TNF- α ve nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin (NGAL) seviyeleri malondialdehit (MDA) seviyesi, tam kan hücrelerinden Klotho mRNA ölçümü ve Klotho Western blot analizi yapılması adına kan örnekleri alınmış kan alımına ek olarak taburcu olana kadar (25 gün) işlem grubuna oral olarak melatonin, kontrol grubuna da aynı şekil ve renkte plasebo verilmiş, taburcu olurken tekrar kan örnekleri alınmıştır. Melatonin verilen grupta plasebo grubuna göre BUN, Cr, özellikle NGAL'nin, TNF- α seviyesinin ve lipid peroksidasyonun azaldığı görülmüştür. Melatoninin anti-inflamatuvar ve anti-stres özellikleri belirginken, Klotho protein ekspresyonunu etkilerinden farklı olduğu gözlenmiş. Genel olarak bu çalışmanın sonuçları melatoninin IR kaynaklı böbrek hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Panah vd 2019). Santos ve ark.'nın 2018 de Peristan kaynaklı lupus farelerinde oral yoldan 6 ay alınan melatoninle lupus nefrit böbrek hasarını iyileştirmeye yönelik bir çalışma yapmışlar. Bu farelerde Bax ekspresyonu, çok zayıf renal Bax ekspresyonu gösteren kontrol farelerine göre renal tübüler epitel hücrelerinde ve glomerüler mezanjial hücrelerde orta derecede yükselmiştir. Araştırmacılar Melatoninin tedavisi sonucunda Bax ekspresyonunun azaldığını saptamışlardır (Santos vd 2018).

Bizim çalışmamızda M tedavisi hem 3. gün hem de 14. günde sakrifiye edilen sıçanlarda böbrek histolojik görüntüsünün düzelmesine katkı sağlamıştır. Fibrotik değişikliklerin bazı damar ve glomerül çevresinde sınırlı kaldığı saptanmıştır. Kaspaz-3 ve Bax ekspresyonunun IR gruplarına göre azalması ve Bcl-2'nin artması diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. TUNEL pozitif hücrelerin IR grubuna göre, özellikle 14. gün sakrifiye edilen grupta azalması bize melatoninin apoptotik yolakta etkili olduğunu düşündürdü.

MKH'ler konakçı organların hücre fenotipini üretme, doku onarımı ve rejenerasyonu, iyileştirme konusundaki doğal kapasitesi nedeniyle akut böbrek hasarında etkili tedavi olarak kullanılabilir. Hasarlı doku içerisindeki daha fazla MKH, MKH tedavilerinin pozitif etkilerini daha da artırır. Fakat bu enjekte edilen MKH'lerin en büyük engel, mikroortamın negatif etkisi nedeniyle daha yüksek erken ölüm oranıdır. Oksidatif hasar, hipoksinin indüklediği apoptozu, erken iltihap oluşumu MKH'nin enjekte edildiği yerde erken ölümüne neden olur (Alzahrani 2019).

Xie ve ark 'nın 2019 da Klotho da transfekte edilmiş kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı etkisi üzerine yaptıkları çalışmada 10 haftalık SD sıçanlara sağ nefrektomi, sol iskemi reperfüzyon yapılarak gruplar oluşturulmuş. Tedavi gruplarında IR grubuna göre serum kreatininde anlamlı azalma, böbrek doku MDA düzeylerinde azalma, histolojik yapıda düzelleme ve apoptotik hücre sayısında azalma saptanmıştır. En belirgin azalma Klotho gen transfeksiyonu yapılan grupta saptanmıştır (Xie vd 2019).

Chen ve ark. yaptığı çalışmada bilateral iskemi reperfüzyon hasarı oluşturdukları böbrek dokusuna olog olarak hazırladıkları adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreleri lokal olarak uygulamışlar. Yapılan çalışmada sonuç olarak adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin böbrek BUN ve kreatinin düzeylerini renal iskemi reperfüzyon hasarı yapılan gruba göre düzelttiğini, inflamatuvar, oksidatif stres ve apoptotik biyomarkerların kök hücre verilen grupta daha düşük, anti-inflamatuvar, anti-oksidatif ve anti-apoptotik markerların anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptamışlar. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin renal iskemi reperfüzyon hasarını, oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtı minimize ederek etki ettiğini savunmuşlardır (Chen vd 2011).

Yapılan bir çalışmada renal iskemi oluşturulan sıçanlara AD-MKH verilmiş. Böbrek fonksiyon parametrelerinde, daha az oksidatif stres ve böbrek dokusu hasarının önlenmesinde AD-MKH enjeksiyonundan 48 saat sonra önemli iyileşme gösterilmiştir.

Yaptıkları çalışmada, AD-MKH'lerin intravenöz enjeksiyonu ile, muhtemelen tıkanıklığı ve antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri azaltarak çeşitli böbrek fonksiyonları ve histopatolojik parametreleri iyileştirdiğini göstermişler. 45 dakika renal iskemi geçirmiş sıçanlarda fetal membranlardan türetilmiş insan MKH'lerinin enjeksiyonu, parakrin mekanizmalar, çeşitli sitokinlerin salgılanması ve inflamasyonu azaltarak fonksiyonel ve morfolojik iyileşmeyi geliştirdi (Changizi-Ashtiyani vd 2020).

Akut organ hasarı genellikle doğuştan gelen bağışıklığı hedef alarak inflamasyon, apopitozis ve oksidatif stres'le sonuçlanır. Bunların tümü hasara doğrudan katkıda bulunur. Yapılan bu çalışmada IR hasarı yapılan grupta yüksek derecede böbrek hasarı görülmüştür. Yüksek üre, kreatinin, Retinol bağlayıcı protein değerleri, yüksek TNF- α , IL-1 β ve NF- κ β gibi inflamatuvar stikonderde artış, yüksek DNA hasarı, yüksek oksidatif marker değerleri saptanmıştır. Tek başına MKH, melatonin ve Exo tedavilerinin teker teker veya kombinasyon oluşturularak uygulanması sonucunda azalmış fakat kombine kullanımları kadar etkili olmamıştır. En etkili olduğu kombine yöntem ise M+Exo olmuştur (Zahran vd 2020). Bu gruplar önceki çalışma ile uyumludur (Chen vd 2014, Chang vd 2015).

Minocha ve ark.'nın 2019 da amniyon sıvısı kaynaklı kök hücre ile sisplatinden kaynaklanan akut böbrek yetmezliğinin iyileştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada Sisplatin enjeksiyonunun 5. gününde sıçanlar, sağlıklı kontrollere kıyasla BUN ve serum kreatinin seviyelerinde önemli bir artış sergilemiş, 8. günde, AFSC ile tedavi edilen grupta, salin ile tedavi edilen gruba kıyasla BUN ve serum kreatinin seviyelerinde önemli bir düşüş gözlenmiş, ancak her iki grupta sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek seviyeler varken 12. günde, AFSC ile tedavi edilen gruptaki kan biyokimyasal parametreleri sağlıklı kontrollerinkiyile karşılaştırılabilir hale gelmiş, sağlıklı kontrollere kıyasla salin ile tedavi edilen grupta hala önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüş. Böbrek dokularının histopatolojik analizi, sisplatin enjeksiyonunun 5. gününde, IR sıçanlarının böbreklerinin, fırça kenarlığının kaybı, hiyalin döküm oluşumu ve tübüler dilatasyon ile birlikte şiddetli tübüler nekroz sergilediğini ortaya koymuş, 8. günde böbrekler, salinle tedavi edilen gruba kıyasla AFSC ile tedavi edilen grupta tübüler hasarda önemli bir zayıflama sergilemiş. 12. günde, salinle tedavi edilen sıçanların böbrekleri hala nekrotik tübüler hücreler ve hiyalin döküntüleri gösterirken AFSC ile tedavi edilen sıçanların böbrekleri, infüze edilen hücreler tarafından böbrek hasarının azaldığını gösteren daha düşük bir hücrel hasar indeksi göstermiş ve AFSC ile tedavi edilen grup ile salin ile tedavi edilen grup arasında Jablonski derecelendirme skorunda önemli bir fark ortaya

koyulmuş. Sisplatin enjeksiyonundan sonra 8. ve 12. günlerde apoptozla ilişkili sinyal yolu proteinlerinin seviyelerini belirlemek için Western blot analizi yapılmış. Proapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerinde önemli bir artış, Sağlıklı kontrollere kıyasla salinle tedavi edilen grupta proapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerinde, yani PUMA, Bax/Bcl2 oranı, parçalanmış Kaspaz-3 ve parçalanmış Kaspaz-9'da önemli bir artış gözlemlendi. Bununla birlikte, AFSC uygulamasından sonra, salinle tedavi edilen gruba kıyasla AFSC ile tedavi edilen gruptaki tüm pro-apoptotik proteinlerin belirgin down-regülasyonu izlenmiş. Bu çalışma, sisplatin ile indüklenen ABY'de AFSC uygulamasının, otofajinin aktivasyonu ve apoptozun inhibisyonu yoluyla böbrek fonksiyonunun ve histolojinin hızlı iyileşmesi ile sonuçlandığını göstermiştir (Minocha ve ark.'nın 2019).

Apoptozisin renal iskemide tübüler hücre ölümü için mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir. Tübüler epitelyal hücrelerdeki apoptotik değişiklikler iskemi reperfüzyon oluşan hayvan modellerinden ve insanlardan alınan böbrek biyopsilerinde gösterilmiştir. Tübül epitel hücrelerinde gerçekleşen apoptozis için çeşitli mekanizmalar vardır. İskemi boyunca tübül epitel hücrelerinde proapoptotik olan Bax proteinini upregüle eder. Bu da antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin azalmasına neden olur. Böylece apoptozisin başlamasını teşvik eder (Lee 2019).

Yapılan çalışmalarda akut böbrek yetmezliğinde kemik iliğinden üretilen mezenkimal kök hücrelerin böbrek tübüler hasara karşı korumada, M2 makrofaj infiltrasyonu ve inflamatuvar yanıtların azaltılmasında, böbrek fonksiyonunun iyileştirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Geng vd 2014). Bir başka çalışmada in vivo köpek akut böbrek yetmezliği modelinde umbilical cord'dan türetilen mezenkimal kök hücrelerin BUN ve kreatinin düzeylerinin düşmesinde, böbrek lezyonlarının düzelip böbrek fonksiyonlarının iyileşmesinde ve hücre yaşlanmasında ve inflamasyonun azalmasında, glomerüler filtrasyonun iyileştirilmesinde, böbrek hücrelerinin proliferasyonunun artmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Lee vd 2017, Rodrigues vd 2017). 2013 yılında (NCT01840540) faz I keşif çalışmasında altı hastada AD-MKH kullanılarak klinik çalışma yapılmıştır. Bu çalışma KBY hastalarında AD-MKH uygulamasının güvenilirliğini ve toksikitesini test etmeyi amaçlamış, AD-MKH'nin klinik kullanım potansiyeli ve MKH markerinin özellikleri doğrulanmıştır (Camilleri vd 2016). Ayrıca, MKH'lerin, bağışıklık aktivitesini düzenleyen ve konakçı hücrelerin genişleme ve farklılaşma potansiyelini arttıran, böylece hasarlı dokuların iyileşmesini destekleyen birçok farklı sitokin ve büyüme faktörü salgılayabileceği görülmüştür (Choi vd 2015). Kronik böbrek yetmezliğinde kemik iliğinden türetilen MKH'lerin kollajen birikimini

azaltarak sitokin ve kemokin ekspresyonunu düzenleyerek renal fibrozis ve kronik inflamasyonu hafiflettiği görülmüştür (Wu vd 2014). Başka bir çalışma insan AD-MKH'den türetilen eksozomların farelerde ABY'nin böbrek hastalığının gelişimi ile ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan SOX9'un modülasyonu yoluyla ABH-KBH geçişini inhibe ettiğini öne sürmüştür (Kumate vd 1988). Ayrıca diyabetik nöropatili sıçanlarda streptozosin ile indüklenen böbrek hasarı ve böbrek dokusu hücre apoptozunda AD-MKH tedavisinin böbrekte histolojik değişiklikleri iyileştirdiği, apoptoz oranını ve Wnt/ β -katenin ekspresyonunu azalttığı ve kredo ekspresyonunu arttırdığı ve daha ilginç RNA kullanılarak Klotho'nun düşürülmesi AD-MKH'lerin Bax ve Wnt/ β -katenin yolunu inhibe ederek podosit hasarını azalttığı bulunmuştur (Ni vd 2015).

Çalışmamızda sağ nefrektomi, sol iskemi reperfüzyon oluşturduğumuz sıçanlara lokal olarak tek doz AD-MKH verildi. KH tedavisi kan BUN, kreatinin düzeylerini düşürmüştür. Yapılan çalışmalardaki gibi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da histolojik skorlama ve TUNEL sonuçları IR grubuna göre tedavi gruplarında iyileşmenin olduğunu göstermiştir.

Chen ve ark. 2014 yılında yaptığı çalışmada sepsis'in indüklediği renal hasar oluşturulan sıçan modelinde yağ dokudan elde edilen kök hücre intravenöz olarak ve melatonin intraperitoneal olarak birlikte uygulamışlar ve diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazla iyileşme saptamışlardır (Chen vd 2014). Yapılan bir başka çalışmada 24 saat melatoninle inkübe edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan dişi sıçanlara verilmiş yapılan deney sonucunda melatoninle inkübasyonun mezenkimal kök hücrelerin koruyucu etkisini daha da güçlendirdiği gösterilmiştir (Alzahrani vd 2019). Rashed ve ark. diyabetik nefropati erkek sıçan modelinde in-vitro 24 saat melatoninle muamele edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin böbrek fonksiyonlarını anlamlı bir şekilde düzenlediğini ve proliferasyon yeteneğini arttırdığını göstermişlerdir. Melatonin ve kök hücre verilen grupta superakutdismutaz-1 ve Beclin-1 seviyelerini kök hücre grubuna göre anlamlı olarak arttırdığını, TGF-Beta markerlarını böbrek dokusunda azalttığını saptamışlardır (Rashed vd 2018).

Renal iskemi reperfüzyona karşı melatonin ve mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların iyileştirici etkisi üzerine yapılan çalışmada; histopatolojik olarak böbrek hasarı skorunda azalma, böbrek hasarının tespitinde yol gösteren BUN ve kreatinin seviyelerinin kanda önemli düzeyde azaldığı, azalmış oksidatif stres durumu, antioksidan seviyelerinde artış, apoptozun azalması, indüklenmiş antiapoptotik etki

inflamasyonun inhibasyonu, iyileştirilmiş rejenerasyon, gelişmiş anjiyogenez gibi en iyi koruyucu etkiye sahip olduğu tespit etmişlerdir (Alzahrani 2019).

60 dişi sıçan üzerinde yapılan bir çalışmada iki taraflı renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulmuş. Bir gruba IR + renal artere 1×10^6 MKH enjekte etmişler. Diğer gruba melatonin ile birlikte MKH ile önkoşullandırılmış Exozom (M+Exo) verilirken bir gruba da melatonin verilmeden sadece Exozom verilmiş. Sonuçta M+Exo grubunun diğer tedavi gruplarına göre renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı daha etkili olduğunu savunmuşlar (Alzahrani 2019).

Zahran ve ark.'nın 2020 de bilateral renal iskemi reperfüzyon yaptıkları sıçanlara 20mg/kg melatonin 3 gün, 1×10^6 MKH renal arter içine enjekte ederek ve bunların eksozomlarıyla deney gruplarını oluşturmuşlar. Grupların serumdaki üre, kreatinin, Retinol Bağlayıcı Protein değerleri IR grubunda sham ve kontrol grubuna göre ciddi artış gözlenmiş, tek başına M ve MKH uygulanan gruplarda seviyeleri IR oluşturulanlara göre daha düşük düzeylerde ölçülmüş, M+MKH grubunda tek başına uygulamaya göre daha düşükken normal seviyelerle karşılaştırılabilecek düzeye kadar düşen grup ise M+Exo grubu olmuştur. Histopatolojik düzelme en iyi düzeyde Exo, M+MKH ve Exo+M gruplarında saptanmıştır. Enflamasyon ve hasarla ilişkili genler ve TNF α proteini ekspresyon seviyeleri IR grubunda en yüksek seviyedeysen tedavi uygulanan gruplarda azalmış fakat en düşük seviyeler ise M+Exo grubunda görülmüş (Zahran vd 2020).

Melatonin akciğer, bağırsaklar gibi organlarda iskemik hasarda kök hücre tedavisinde kullanılmıştır (Zahran 2020). Zahran ve ark.'na göre sıçanlarda melatonin, mezenkimal kök hücreler ve onların exozom'ları renal iskemi reperfüzyon hasarını azaltmıştır. Sadek ve ark. renal IR oluşturdukları Amerika sıçanlarına kemik iliği MHK enjeksiyonu yapmışlar. Operasyondan 24 saat ve 72 saat sonra tedavi gruplarında renal fonksiyonların daha iyiye gittiğini bulmuşlar. H&E, PAS (Periyodik Asit Schiff) ve Proliferatif hücre nükleer antijen (PCNA) boyanmaları sonucunda tedavi grubunda hasarın daha az olduğunu görmüşler (Sadek vd 2013).

Yapılan çalışmalar, KH+M Uygulamasının renal iskemi reperfüzyon hasarında etkili olduğunu çeşitli yönleriyle göstermiştir. Bizim çalışmamızda IR+KH+M özellikle 14. gün grubunda kan BUN, kreatinin değerlerini anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Bu da bize KH+M tedavisinin histolojik ek olarak fizyolojik düzelmenin de başladığını göstermiştir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda tedavi gruplarında IR gruplarına göre Kaspaz-3 reaksiyonu azalma gösterirken, Bcl-2 ekspresyonu artmıştır. TUNEL pozitif hücreler bütün tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da belirgin düşüş göstermiştir. Bunlara ek olarak histopatolojik düzelme en belirgin IR+KH+M grubunda gözlenmiştir. Bu nedenle denek sayısının arttırılacağı ve daha uzun süreli takipli grupların olacağı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

Akşit H, Bildik A . Apoptozis. **YYÜ Vet Fak Derg.** 2008; 19(1): 55-63.

Alzahrani FA. Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Am J Transl Res** 2019; 11(5): 2887–2907.

Altunören O, Aydın G, Güngör Ö. “Böbrek Anatomisi”, Böbrek Fizyopatolojisi, Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ, **Reaktif**, Türkiye, 2017, 1-6.

Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemati A, Baradaran B, Azimian E. Effect of a combined treatment with erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion injury in male rats. **Clin Exp. Nephrol**, 2014; 18:855-864.

Aslan G. Ardkoşullanma ve melatoninin serebral iskemi-reperfüzyon hasarında mitofaji aracılı etkileri. Doktora Tezi, **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**, Elazığ, 2020, s. 84.

Atasoy ÖB, Erbaş O. Melatonin Hormonunun Fizyolojik Etkileri. **FNG & Bilim Tıp Dergisi** 2017; 3(1): 52-62.

Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında nasetilsisteinin etkileri. **Fırat Tıp Dergisi** 2005; 10(4): 151-5.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J Clin Invest.** 2011; 121(11): 4210-4221.

Brzezinski A. Melatonin in Humans. **N. Engl. J. Med** 1997; 336:186-195.

Camilleri ET, Gustafson MP, Dudakovic A, Riester SM, Garces CG, Paradise CR Takai H, Karperien M, Cool S, Sampen HJ, et al. Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production. **Stem cell Res Ther.** 2016; 7:107.

Carrasco C, Marchena AM, Holguin-Arevalo MS, Martin-Partido G, Rodriguez AB, Paredes SD, Pariente JA. Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. **Cell Biochem Funct** 2013; 31(7): 585-90.

Chang CL, Sung PH, Sun CK et al. Protective effect of melatonin-supported adipose-derived mesenchymal stem cells against small bowel ischemia-reperfusion injury in rat. **J. Pineal Res.** 2015; 59: 206–20.

Changizi-Ashtiyani S, Hafazeh L, Ghasemi L, Najafi H, Babaei S, Mashayekhii FJ, Hoseini SJ, Bastani B. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on renal function and histopathology in a rat model of ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. **Iran J Basic Med Sci.** 2020; 23(8): 999-1006.

Chen DQ, Cao G, Zhao H, Chen L, Yang T, Wang M, Vaziri ND, Guo Y, Zhao YY. Combined melatonin and picroic acid A inhibits renal fibrosis through modulating the interaction of Smad3 and β -catenin pathway in AKI-to-CKD continuum. ***Therapeutic Advances in Chronic Disease***, 2019; 10: 1-19.

Chen HH, Lin KC, Wallace CG, Chen YT, Yang CC, Leu S, Chen YC, Güneş CK, Tsai TH, Chen YL, Chung SY, Chang CL, Yip HK. Additional benefit of combined therapy with melatonin and apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell against sepsis-induced kidney injury. ***J Pineal Res.*** 2014; 57:16–32.

Chen YT, Sun CK, Lin YC, Chang LT, Chen YL, Tsai TH, Chung SY, Chua S, Kao YH, Yen CH, Shao PL, Chang KC, Leu S, Yip HK. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. ***J Transl Med.*** 2011; 9:51.

Choi JR, Pingguan-Murphy B, Wan Abas WA, Yong KW, Poon CT, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Xu F, Wan Safwani WK. In situ normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumorigenesis. ***PLoS One.*** 2015; 10: e0115034.

Collett JA, Traktuev DO, Mehrotra P, Crone A, Merfeld-Clauss S, March KL, Basile DP. Human adipose stromal cell therapy improves survival and reduces renal inflammation and capillary rarefaction in acute kidney injury. ***J Cell Mol Med.*** 2017, 21(7): 1420–1430.

Conesa LE, Valero F, Nadal JC. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. ***Am J Physiol*** 2001; 281:730-7.

Cos S, Fernandez R, Guezmes B, Sanchez-Barcelo EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. ***Cancer Res.*** 1998; 58(19): 4383-90.

Cutando A, Lopez-Valverde A, Arias-Santiago S, Vicente J, Diego RG. Role of melatonin in cancer treatment. ***Anticancer Res.*** 2012; 32: 2747–2753.

Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. ***Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası***, 2003; 56:2, 103-112.

Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC et al. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. ***Pathophysiology***, 2003; 9:179–187.

Erden S. Kök hücreler ve klinikte kullanımları. ***Journal of New Results in Engineering and Natural Science*** 2014; 3:1-8.

Fan C, Pan Y, Yang Y, Di S, Jiang S, Ma Z, Li T, Zhang Z, Li W, Li X, Reiter RJ, Yan X. HDCA1 inhibition by melatonin leads to suppression of lung adenocarcinoma cells via induction of oxidative stress and activation of apoptotic pathways. ***J Pineal Res.*** 2015; 59(3): 321-33.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. ***Science*** 1998; 279:1528.

Fourtillan JB BA, Fourtillan M at al. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. **Physiol-Endocrinology Metab.** 2001; 280:e11-e2.

Geng Y, Zhang L, Fu B, Zhang J, Hong Q, Hu J, li D, Lou C, Cui S, Zhu F and Chen X. Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of m2 macrophages. **Stem Cell Res Ther.** 2014; 5(3): 80.

Gündeşlioğlu AÖ, Altuntaş Z, İnce B, Dadacı M, Aktan M, Duman S. Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler ve Plastik Cerrahide Uygulama Alanları. **Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi** 2013; 21:3.

Hassa O ve Aştı RN. Langman's Medikal Embriyoloji. 5. Çeviri Editörü: Başaklar C. **Palme Yayıncılık**, Ankara, 1996, s.129-130.

Hinman FJ. Development of kidney, ureter and adrenal gland. Hinman FJ. Atlas of Urosurgical Anatomy, **WB Saunders Company**, Philadelphia, 1996, 23-254

Karakükçü M, Çetin M. Graft versus host hastalığında mezenkimal kök hücre uygulamaları. **Türkiye Klinikleri J Hematol-Special Topics**, 2014; 7(4):31-8.

Karaşahin T. Embriyonik kök hücreler. **Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg** 2012; 9(1):65-71.

Karoui S, Badri T, Benmously R, Ben Brahim E, Chadli-Debbiche A, Mokhtar I, Fenniche S. Adenolipoma of the skin. **Pathologica** 2011; 103:343-5.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Micheal LM, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. **J Clin Invest.** 2001; 107:1395.

Kumate J, Sepulveda-Amor J, Valdespino JL, de Mucha J, Diaz-Ortega JL, Garcia-Sainz JA, Ruiz-Puente J, Jimenez-Paredes J, ruiz-Arriaga A, Gutierrez G, et al. Mexican contributions to vaccines. **Gac Med Mex.** 1988; 124:73-97.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cell can differentiate into hepatocytes in vivo. **Nature Med.** 2000; 6:1229.

Lee SJ, Ryu MO, Seo MS, Park SB, Ahn JO, Han SM, Kang KS, Bhang DH, Youn HY. Mesenchymal stem cells contribute to improvement of renal function in a canine kidney injury model. **In Vivo.** 2017; 31(6):1115-1124.

Lee KH, Treng WC, Yang CY and Tarng DC. The anti-inflammatory, anti-avidative and anti-apoptotic benefits of stem cells in acute ischemic kidney injury. **International Journal of Molecular Sciences**, 2019.

Li Z, Wang Y, Sun N, Liu X, Song E, Zhang Z, Wen J, Zheng T. Melatonin therapy protects against renal injury before and after release of bilateral ureteral obstruction in rats. **Life Sci.** 2019; 15; 229: 104-115.

Liu X, Gong Y, Xiong K, Ye Y, Xiong Y, Zhuang Z, Luo Y, Jiang Q, He F. Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cells. **J Pineal Res.** 2013; 55(1): 14–25.

Matin SF, Novick AC. Renal dysfunction associated with staged bilateral partial nephrectomy: the importance of operative positioning. **J Urol.** 2001; 165(3):880-881.

McCord CP, Allen FP. Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. **J Exp Zool.** 1917; 23:207–224.

McFetridge ML, Del Borgo MP, Aguilar MI, Ricardo SD. The use of hydrogels for cell-based treatment of chronic kidney disease. **Clin. Sci.** 2018; 132, 1977–1994.

Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitabı. Çeviri Editörü Seyhun Solakoğlu. **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul, 2015, s.388-392.

Mezey E, Chandross K, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood in brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** 2000; 290(5497):1779-82.

Minocha E, Sinha RA, Jain M, Chaturvedi CP and Nityanand S. Amniotic fluid stem cells ameliorate cisplatin-induced acute renal failure through induction of autophagy and inhibition of apoptosis. **Stem Cell Research & Therapy**, 2019; 10: 370.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. **Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi**, Dalçık H, 10. Baskıdan Çeviri, **Elsevier**, United Kingdom, 2016, s.241-280.

Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M and Remuzzi G. Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure. **Journal of the American Society of Nephrology** 2004; 15(7): 1794-1804.

Nargesi AA, Lerman LO, Eirin A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: Current status and looming challenges. **Stem cell research & Therapy** 2017; 8 , 273.

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

Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Nieuwenhuijs VB, Seelen MAJ, Berger SP, van den Heuvel MC, Burgerhof JGM, Ottens PJ, Ploeg RJ, Leuvenink HGD, Struys MMRF. Propofol-based anaesthesia versus sevoflurane-based anaesthesia for living donor kidney transplantation: results of the VAPOR-1 randomized controlled trial. **Br J Anaesth** 2017; 118(5): 720-732.

Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. **Differentiation** 2006; 74:510-8.

Oğuz E, Yılmaz Z, Ozbilge H, Baba F, Tabur S, Yerer MB, Hekimoğlu A. Effects of melatonin on the serum levels of pro-inflammatory cytokines and tissue injury after renal ischemia reperfusion in rats. **Ren Fail.** 2015; 37(2): 318-22.

Ostrowska Z, Kos-Kudła B, Swietochowskab E , Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielska-Kopacz N. Influence of pinealectomy and long-term melatonin administration on GH-IGF-I axis function in male rats. **Neuro. Endocrinol. Lett.** 2001; 22(4): 255-262.

Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan olarak prostoglandin E₁(PGE₁) kullanımının incelenmesi: Deneysel Çalışma. **Fırat Tıp Dergisi**, 2004; 9(3):67-71

Özlülerden Y, Toktaş C, Aybek H, Küçükataş V, Şen Türk N, Zümrütbas AE. The renoprotective effects of mannitol and udenafil in renal ischemia-reperfusion injury model. **Investig Clin Urol.** 2017;58(4):289-295.

Önal A, Astarçioğlu H, Örmen M, Atila K, Sarioğlu S. Sıçandaki renal iskemi-reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery Ulus Travma Derg,** 2004; 10(3):160-167.

Özmen S, Fındıkçioğlu F, Siemionow M. Kök Hücreler. **Türk Plast Rekonstr Est Cer Derg,** 2006; 14(3).

Pac-Soo CK, Mathew H and Ma D. Ischaemic conditioning strategies reduce ischemia/reperfusion-induced organ injury. **British Journal of Anaesthesia** 2015; 114(2):204-16.

Panah F, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Haiaty S, Rashtchizadeh N, Hosseini I, Dastmalchi S, Rezaeian R, Alirezaei A, Japarpour M, Ahmad SNS, Sanajou D. The effect of oral melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in transplant patients: A double-blind, randomized controlled trial. **Continents lists available at Sciencedirect,** 2019; 57, 101241.

Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **Am J Physiol.** 1986; 250 (6 Pt 1):G749-53.

Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. **Lancet.** 2004; 364(9447): 1814–1827.

Pevet P. Melatonin. **Dialogues Clin Neurosci** 2002; 4(1): 57-72.

Pınar E. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin Grafen-Nanofiber Matris üzerinde nöronal farklılaşma potansiyelinin incelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, **Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı,** İstanbul, 2019, s. 136.

Rahman M, Shad F, Smith MC. Acute Kidney Injury: A Guide to Diagnosis and Management Am. Dostum. **Phys.** 2012 , 86: 631-639.

Rashed LA, Elattar S, Eltablawy K, Ashour H, Mahmoud LM, El-Esawy Y. Mesenchymal stem cell pretreated with melatonin ameliorate kidney functions in a rat model of diabetic nephropathy. **Biochem Cell Biol.** 2018; 96(5): 564-571.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Koppisepi S. Medical Implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. **Adv Med Sci.** 2007; 52:11-28.

Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of biomedical science,** 2000; 7(6): 444-58.

Rodrigues CE, Capha JMC, de Braganca AC, Sanches TR, Gouveia PQ, de Oliveira PAF, Malheiros DMAC, Volpini RA, Santinho MAR, Santana BAA, Calado RT, Noronha IL and Andrade L. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells protect against premature renal senescence resulting from oxidative stress in rats with acute kidney injury. **Stem Cell Res Ther.** 2017; 8:19.

Sadek EM, Afifi NM, Elfattah LIA, Monsar MAA. Histological study on effect of mesenchymal stem cell therapy on experimental renal injury induced by ischemia/reperfusion in male albino rat. **International Journal of Stem Cells Vol.** 2013; 6:1.

Sadok I, Gamian A, Staniszevska MM. Chromatographic analysis of tryptophan metabolites. **Journal Of Separation Science**, 2017; 40(15): 3020-3045.

Sağsöz H, Ketani MA. Kök Hücreler. **Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.** 2008; 1(2):29-33.

Santos MD, Favero G, Bonomini F, Stacchiotti A, Rodella LF, Veronese FV, Rezzani R. Oral supplementation of melatonin protects against lupus nephritis renal injury in a pristane-induced lupus mouse model. **Life sciences**, 2018; 193: 242-251.

Set T, Şahin EM. Birinci Basamak Hekimi İçin Böbrek Fonksiyon Testleri. **Sted**, 2003; 12:9, 344-348.

Shi S, Lei S, Tang C, Wang K, Xia. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Bioscience Reports**, 2019; 39.

Shieh JM, Wu HT, Cheng KC, Cheng JT. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC ζ -Akt-GSK β pathway in hepatic cells. **J Pineal Res.** 2009; 47(4): 339-44.

Shih YC, Lee PY, Cheng H, Tsai CH, Ma H, Tarng DC. Adipose-derived stem cells exhibit antioxidative and antiapoptotic properties to rescue ischemic acute kidney injury in rats. **Plast Reconstr Surg.** 2013; 132: 940e-51e.

Siah KTH, Wong RKM, Ho KY. Melatonin for the treatment of irritable bowel syndrome. **World J Gastroenterol** 2014; 20(10): 2492-2498.

Sinanoğlu O, Sezgin G, Öztürk G, Tuncdemir M, Güney S, Aksungur FB, Yener N. Melatonin With 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$ Protects Against Apoptotic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Kidney. **Renal Failure** 2012; 34(8): 1021-1026.

Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. **J Biochem** 1984; 222:1-15.

Solmaz S, Matur İ. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. **Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi**, 2011; 20(3):168-186.

Subramaniam P, Mirunalini S, Dakshayani KB, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. **J Pineal Res.** 2007; 43(3): 305-12.

Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, Jaber BL. World incidence of AKI: A meta-analysis. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** 2013; 8: 1482-1493.

Şenel F. Böbrek yetmezliği. **Bilim ve Teknik Dergisi**, 2010; 509: 96-99.

Şenel F. Organ nakilleri. **Bilim ve Teknik Dergisi**, 2001; 402: 68-69.

Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. **Klinik Gelişim Derg.** 2009; 22(3):5-14.

ŞenoL ŞP, Tunçtan B. Miyokardiyal ve Renal İskemi/Reperfüzyon Zedelenmesi ve Deneysel Modelleri. **Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi**, 2016; 5(2): 93-109.

Şimşek Ö. Yetişkin kök hücrelerin dünü ve bugünü. **Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.** 2012; 7(3): 231-236.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Korkmaz A, Ma S, Rosales-Corral S, Reiter RJ Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. **J Exp Bot.** 2012; 63(2): 577-97.

Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero A, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and melatonin. **Moleculs** 2015; 20(10): 18886-18906.

Tan DX, Xu B, Zhou X, Reiter RJ. Pineal calcification, melatonin production, aging, associated health consequences and rejuvenation of the pineal gland. **Molecules** 2018; 23(2): 301.

Tatar M. Rat testisinde tunikamisin ile oluşturulan endoplazmik retikulum stresine karşı melatonin kullanımının etkisi. Doktora Tezi, **Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Veteriner)**, Aydın, 2019, s. 144.

Terzi YK, Güran Ş. Kök hücre biyolojisi ve hematolojik malignitelerde kök hücrenin rolü. **Cumhuriyet Tıp Dergisi**, 2012; 34: 235-241.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science** 1998; 282(5391): 1145–1147.

Ural AU. Kök Hücreler. **TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi**, 2006; 5(3-4): 142-143.

Üstünsoy AB. Lipopolisakkarit antijeni ile stimüle edilmiş deneysel tıkanma sarılığı modelinde; karaciğer, böbrek doku NF- κ B düzeyleri ile kan ve doku lipid peroksidasyonu üzerine melatoninin etkisi. Uzmanlık Tezi, **Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı**, Mersin, 2007, s.132.

Valdivielso JM, Crespo C, Alonso JR, Maartinez-Salgado C, Eleno N, Arevalo M, Perez-Barriocanal F and Lopez-Novoa JM. Renal ischemia in the rat stimulates glomerular nitric oxide synthesis. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp physiol** 2001; 280: R771-R779.

Waldhauser F, Ehrhart B, Förster E. Clinical aspects of the melatonin action: Impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. **Experientia** 1993; 49(8): 671-81.

Wu HJ, Yiu WH, Li RX, Wong DW, Leung JC, Chan LY, Zhang Y, Lian Q, Lin M, Tse HF, et al. Mesenchymal Stem Cells Modulate Albumin-Induced Renal Tubular Inflammation and Fibrosis. **PLOS ONE** 2014; 9, e90883

Xie LB, Chen X, Chen B, Wang XD, Jiang R, Lu YP. Protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells modified with klotho on renal ischemia-reperfusion injury. **Renal Failure**, 2019; 41(1): 175-182.

Yapca ÖE, Börekçi B, Süleyman H. Ischemia-Reperfusion Damage. The Eurasian Journal of **Medicine** 2013; 45: 126-127.

Yu HS, Pang SF, Tang PL. Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. **J Endocrinol** 1981; 91(3): 477-81.

Zahran R, Ghozy A, Elkholy SS, El-Taweel F, El-Magd MA. Combination therapy with melatonin, stem cells and extracellular vesicles is effective in limiting renal ischemia-reperfusion injury in a rat model. **International Journal of Urology**, 2020; 27: 1039-1049.

Zayman E. Acetamidipridin Testis Toksisitesine Karşı Melattonin ve Vitamin E'nin koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, **İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**, Malatya, 2019, s.128.

Zhang Y, Zhang J, Cui L, Yang S. Autophagy activation attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, 2015; 240(12): 1590-1598.

Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Lou C, Zhou S, Sirianna AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. **J Neurosci Off J Soc Neurosci**. 2014; 34(8): 2967-78.

8. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Denizli'de doğdu. Öğrenim hayatını Denizli'de geçirdi. 2006 yılında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde başladığı lisans eğitimini 2010 yılında tamamladı. Öğrenimini tamamladığı yıl Pamukkale Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'nda işe başladı. 2016 yılında Pamukkale Üniversitesi Okul Öncesi Öğretmenliği'ni kazanarak iş hayatıyla birlikte okul hayatına başladı ve akabinde 2017 yılında Pamukkale Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Tezli Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2018 yılında İstanbul Esenyurt İlçe Nüfus Müdürlüğü'ne atandı ve 2020 yılında da İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Biyokimya Merkez Laboratuvarı'nda iş hayatına ara vermeden devam etti. Halen İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde çalışmaya devam etmektedir.

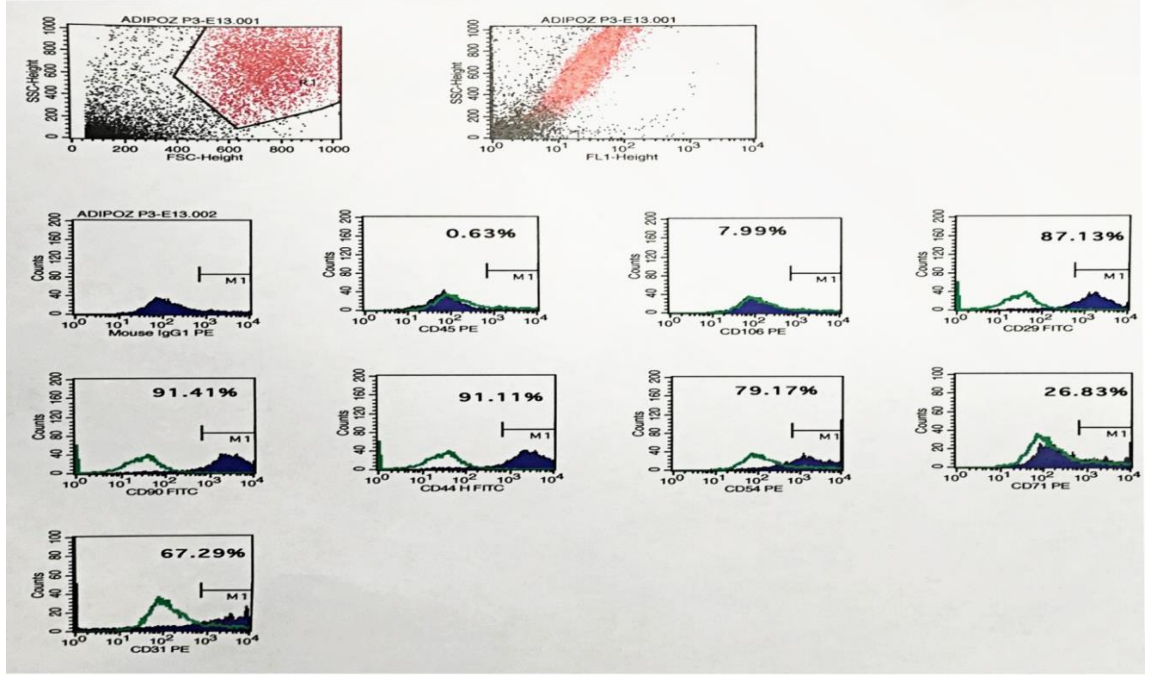
9. EKLER

4. BULGULAR

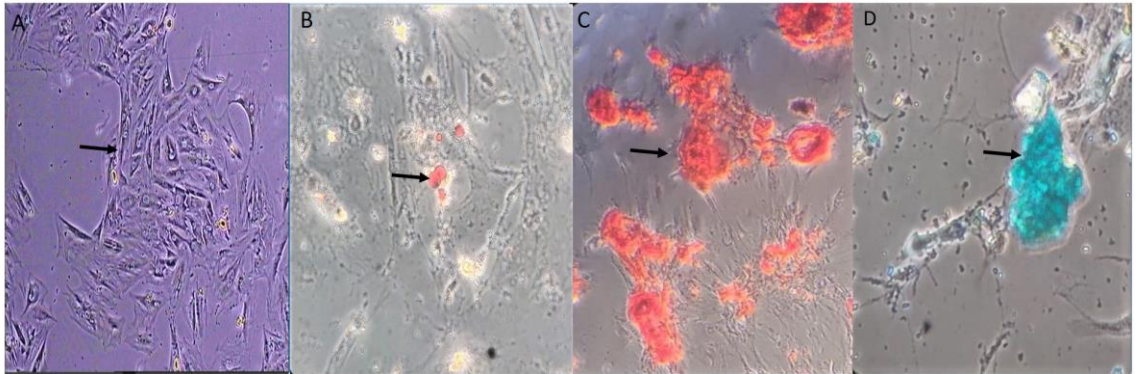
4.1. Kök Hücre Karakterizasyonu

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel araştırma Projeleri Koordinasyonu Birimi tarafından desteklenen 2019HZDP020 numaralı 'Siklofosdomide Bağlı Oluşan Ovaryum Hasarında Yağ Dokudan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ve Phosphorylated Mammalian Target of Rapamycin (p-mTOR) Ekspresyonuna Etkisi' başlıklı projeden elde edilen Mezenkimal Kök Hücreler akım sitometri analizi kullanılarak kök hücre yüzey belirteci olarak CD29, CD90, CD44, CD45, CD54, CD71, CD106 yönlerinden incelendi. Buradan alınan sonuçlara göre CD29 (%87,13), CD90 (%91,41), CD54 (%91,11) yüzey belirteçlerinin yüksek titrede olması ve CD45 (%0,63), CD71 (%26,83), CD106 (%7,99) yüzey belirteçlerinin düşük bulunmasıyla mezenkimal kök hücre olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.1).

Yapılan farklılaşma deneyleri sonucunda kök hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaştığı gösterilerek, elde ettiğimiz hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu flow sitometri analizi sonuçlarına destek olarak ispatlanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1 Mezenkimal kök hücrelerin flow sitometri sonuçları. CD29, CD90, CD44 ekspresyonu sırasıyla 87,13%, 91,41%, 91,11% pozitif, CD45 ve CD106 ekspresyonu sırasıyla 0,63% ve 7,99% pozitifdir.

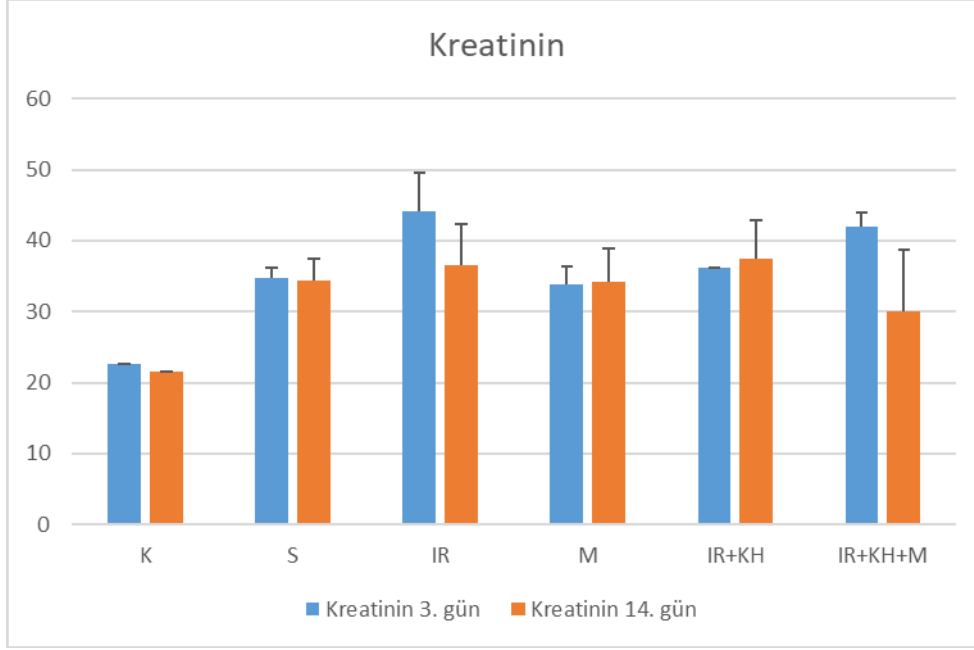


Şekil 4.2 ADMKH'nin üçüncü pasajda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik dokuya farklılaşması. ADMKH'nin çözüldükten sonraki görüntüsü (ok) (A), adipojenik farklılaşma (ok) (B), kondrojenik farklılaşma (ok) (C) ve osteojenik farklılaşma (ok) (D). X20, inverted mikroskop.

4.2. Grupların Kan BUN ve Kreatinin Değerlerinin Karşılaştırılması

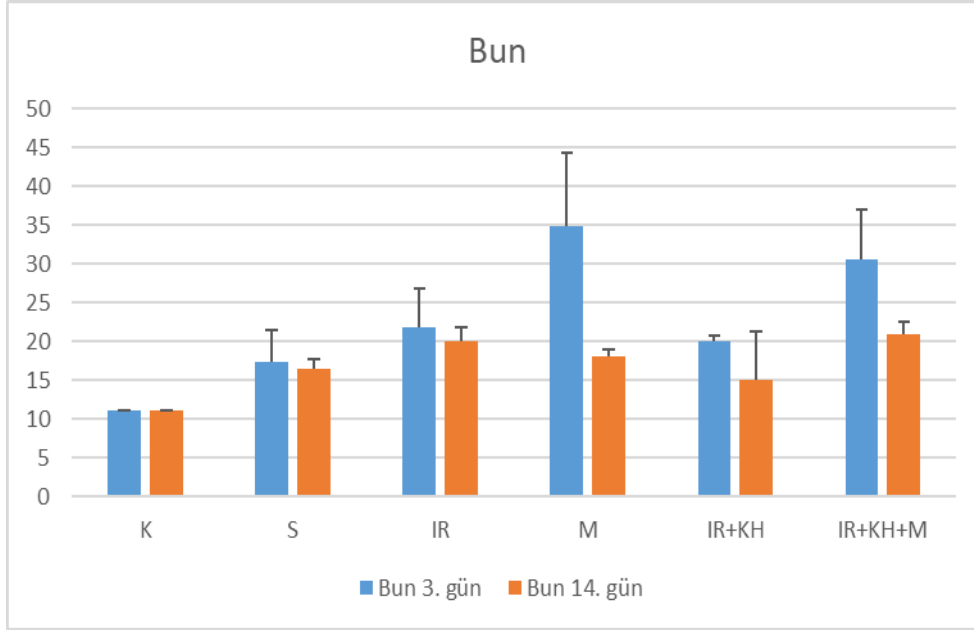
Grupların 3. Gün kan kreatinin düzeyleri karşılaştırıldığında, K grubuna göre bütün grupların kreatinin düzeyinin arttığı saptandı. Bu artış IR grubunda ve IR+KH+M grubunda anlamlı olarak fazlaydı ($p < 0,05$). Tedavi grubunda hem 3. gündeki hem de 14. gündeki kan kreatinin düzeyleri IR grubuna göre düşük saptansa da istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Kreatinin düzeyleri IR+KH+M grubunda 14. günde 3. güne göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı. IR+KH+M grubunda 3. gün

kreatinin düzeyi $41,95 \pm 2,1$ iken 14. günde $30,09 \pm 8,57$ ye düştü. (Şekil 4.3) (Tablo 4.1)



Şekil 4.3 Grupların kan kreatinin düzeylerinin karşılaştırmalı grafiksel analizi

BUN düzeyleri 3. günde M ve IR+KH+M gruplarında K grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. M ve IR+KH+M gruplarının BUN düzeyleri 3. günde IR grubunda yüksekti ama istatistiksel olarak anlamlı değildi. 14. gündeki değerler karşılaştırıldığında IR grubunda BUN düzeyleri yine aynı değerlerde olmasına rağmen, M ve IR+KH+M gruplarında anlamlı olarak düştüğü saptandı. 14. gün kan BUN düzeyleri K ve S grubunda IR grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. (Şekil 4.4) (Tablo 4.1)



Şekil 4.4 Grupların kan BUN düzeylerinin karşılaştırmalı grafiksel analizi

Tablo 4.1 Grupların kan kreatinin ve BUN sonuçları

		K	S	IR	M	IR+KH	IR+KH+M	Gruplar arası p
Kreatinin (umol/L)	3. gün	22.67 ± 0	34,73 ± 1,37	44,23 ± 5,42	33,78 ± 2,61	36.24 ± 0	41,95 ± 2,1	0.001*
	14. gün	21.60 ± 0	34,44 ± 2,99	36,54 ± 5,82	34,29 ± 4,67	37,37 ± 5,49	30,09 ± 8,57	0.051
		-	1	0.114	1	-	0.029*	
BUN (mmol/L)	3. gün	11.09 ± 0	17,35 ± 4,04	21,77 ± 4,99	34,86 ± 9,39	19,97 ± 0,8	30,59 ± 6,43	0.003*
	14.gün	11.09 ± 0	16,39 ± 1,26	20,06 ± 1,67	18,15 ± 0,85	15,03 ± 6,2	20,93 ± 1,69	0.004*
		-	0.886	0.686	0.029*	0.057	0.029*	

4.3. Histolojik Değerlendirme

K grubunda böbrek kesitlerinde tüm histolojik yapıların korunduğu görüldü. Glomerüller ve tübül yapıları normal görünümündeydi. Masson Trikrom boyama sonucunda glomerüller ve tübül yapılarında herhangi bir nekrotik değişiklik gözlenmedi. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

S 3. gün grubunda glomerül yapıları, proksimal, distal ve toplayıcı tübüller olağan görünümünde görüldü. Yer yer kanama alanları mevcuttu. Masson Trikrom boyanması K grubuyla uyumlu bir şekilde glomerül ve tübüllerde nekrotik boyanmaya rastlanmadı. S 14. gün grubunda glomerüller yapılar sağlam olarak görülmekle birlikte bazı tübüllerde dilatasyon saptandı. Ama genel olarak glomerül ve tübül yapıları hem

H&E hem de Masson Trikrom boyama sonuçlarının K grubuyla uyumlu olduğu görüldü. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

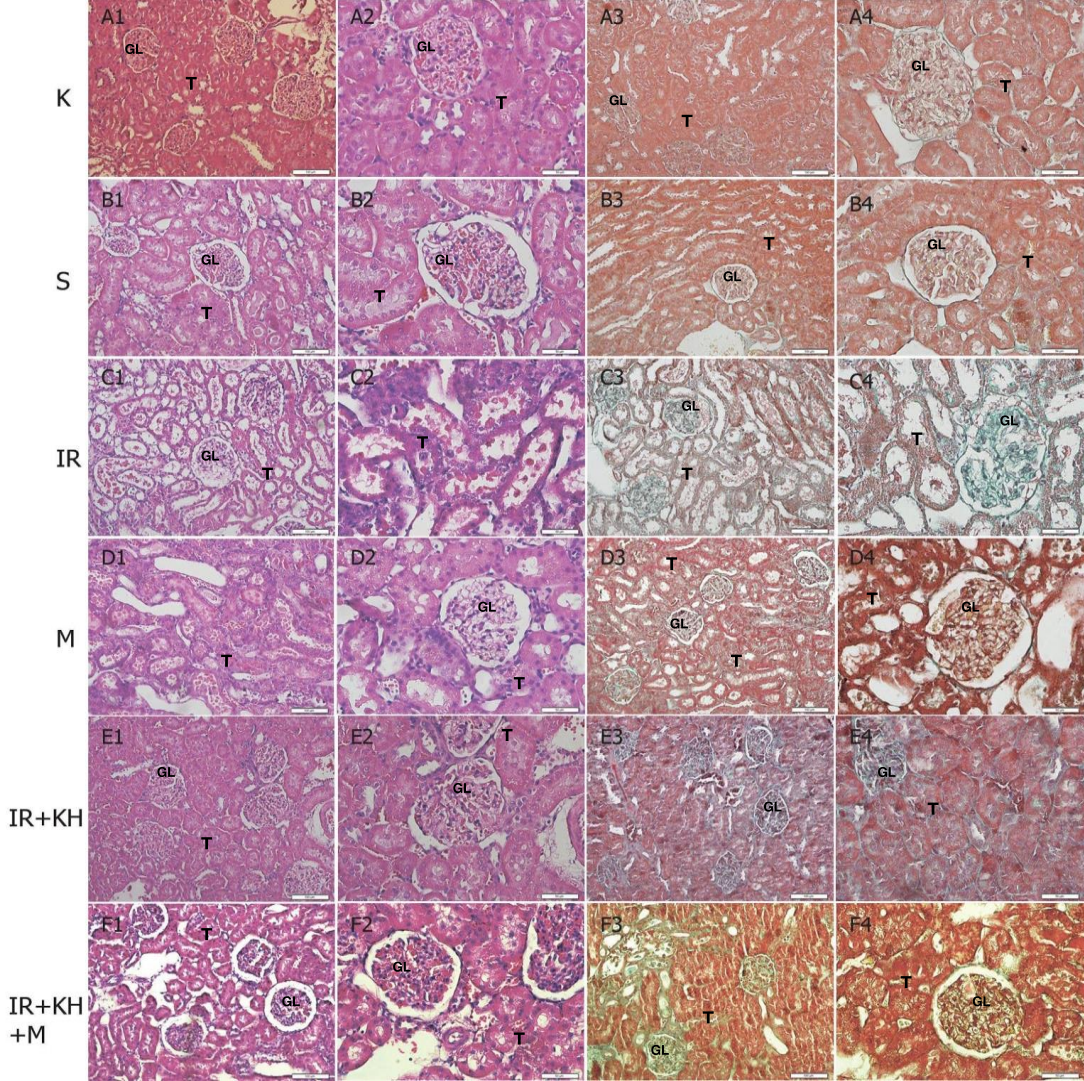
IR grubunda 3. gün H&E boyanan kesitlerde bazı glomerüller yapılar sağlam görülürken glomerüllerin bazılarında bowman boşluğunda genişleme, glomerüller yapılarında kayıp gözlemlendi. Korteks ve medulladaki tübüllerde dilatasyon, bazı tübüllerde cast formasyon dikkat çekiciydi. IR grubunda 14. gün sakrifiye edilen sıçanların böbreklerinde tübüler hasarın daha da arttığı gözlemlendi. Bowman boşluğundaki genişleme, bazı glomerüllerde yapının tamamen bozulduğu görülmüştür. 3. Gün böbreklerde glomerüllerde fibrotik değişiklikler görülürken, 14. gün böbreklerde glomerüllerdeki fibrozise ek olarak, damar çevresinde, tübüllerde ve özellikle medulladaki tübüllerdeki fibrozis dikkat çekiciydi. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

IR+M 3. gün grubunda bazı glomerüllerde bowman boşluğunda genişleme görülmesine rağmen genel olarak glomerül yapıları sağlamdı. Proksimal tübüllerde sağlam olanlarla birlikte dilate tübüller de görüldü. Yer yer tübül içi ve tübüller arası kanama alanları mevcuttu. Bazı tübüllerde tübül lümenine hücre dökülmesiyle birlikte, tübül lümeninde eozinofilik bir sıvı olduğu saptandı. Masson Trikrom sonuçlarında 3. gün grubunda fibrotik değişiklikler görülmedi. M verilen 14. gün grubunda ise glomerüllerde bowman boşluğunun düzeldiği, dilate tübüllerin 3. günde kiler nazaran azaldığı dikkati çekti. Masson Trikrom boyamada fibrotik değişiklikler bazı damar ve glomerül çevresinde sınırlı alanlarda saptandı. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

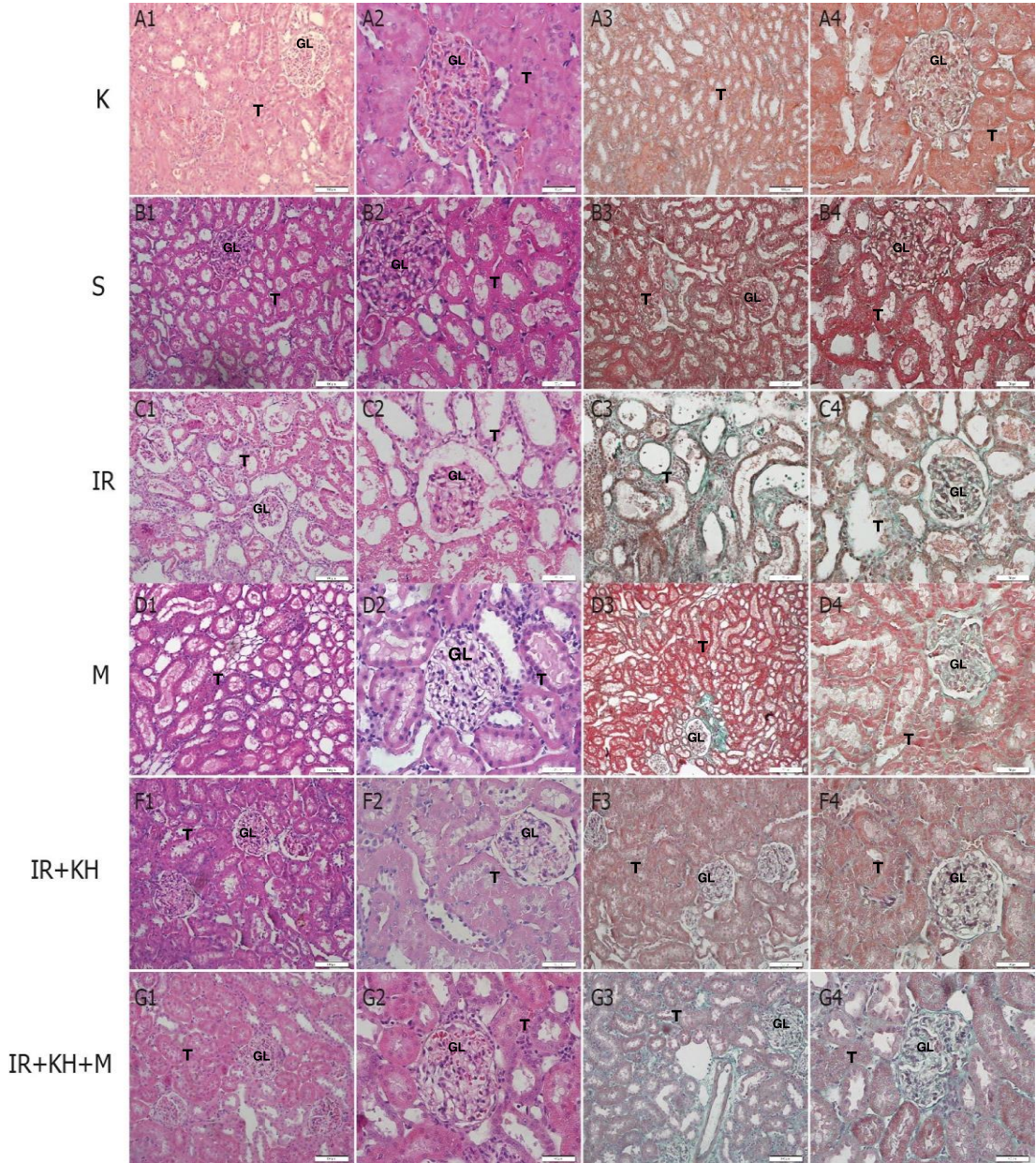
IR+KH 3. gün grubunda bazı alanlarda glomerüllerde ve damar dışında kanama alanları olmakla birlikte kortekste proksimal tübüllerde düzelme olduğu görüldü. Böbrek tübül lümenine hücre dökülmeleri medulladaki bazı tübüllerde devam ederken kortekste azaldığı dikkati çekti. Masson Trikrom boyamada glomerül ve çevresinde fibrotik değişiklikler saptandı. KH 14. gün grubunda glomerüllerde proksimal tübüllerde düzelmeler belirginken bu tübüllerde dilatasyon hala devam etmekteydi. Masson Trikrom boyamada bazı glomerüllerde fibrotik değişiklikler görülmezken, tübüller arası fibrotik değişiklikler M grubundan daha fazlaydı. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

IR+KH+M 3. gün grubunda bazı glomerüller yapısal bütünlüğünü kaybetmişken bazı glomerüller normal yapıda görülmekteydi. Tübüllerin bazılarında hücre dökülmeleri ve dilatasyon görülürken bazı tübüllerde özellikle proksimal tübüllerde düzelme dikkati çekti. Masson Trikrom boyamada dilate tübüllerin olduğu ve glomerül yapısının bozulduğu alanlarda fibrotik değişiklikler görüldü. KH+M grubunda 3. günde saptanan değişiklikler 14. günde daha belirgindi. Yer yer dilate tübüller görülsede

glomerül, tübül yapıları K ve S grubundaki gibi normaldi. Fakat Masson Trikrom boyamada bazı glomerüllerde damar çevresinde ve tübül çevrelerinde fibrotik değişiklikler gözlemlendi. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)

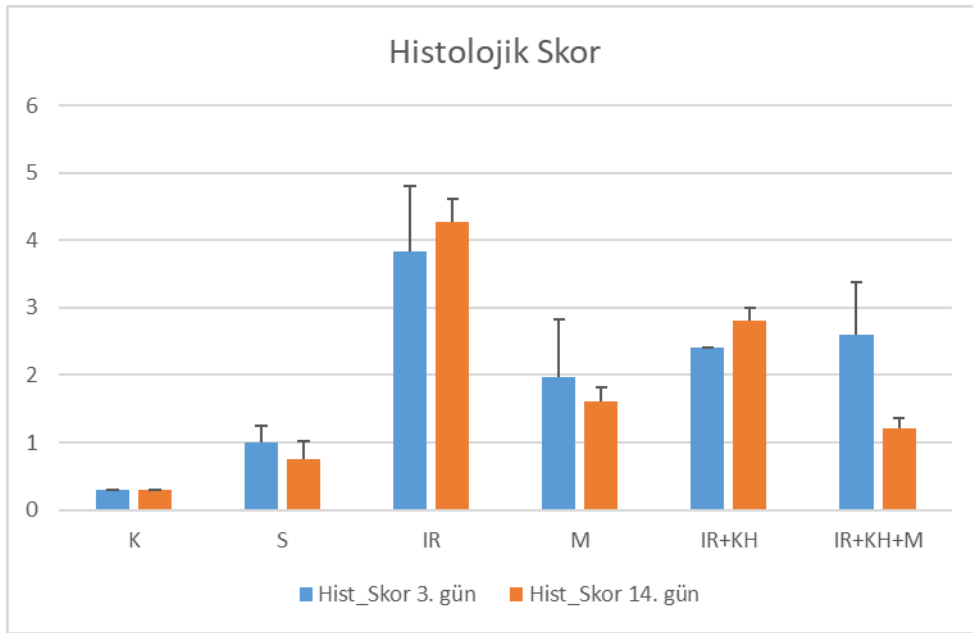


Şekil 4.5 3. gün sakrifiye edilen grupların H&E ve Masson Trikrom boyanma görüntüleri. (Hiçbir işlem yapılmayıp 3. Günde sakrifiye edilen K grubu (A1: H&E görüntüsü 20X büyütme, A2:H&E görüntüsü 40X büyütme, A3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, A4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). Sağ nefrektomi yapıлып 3. günde sakrifiye edilen Sham grubu (B1: H&E görüntüsü 20X büyütme, B2: H&E görüntüsü 40X büyütme, B3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, B4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıлып 3. günde sakrifiye edilen IR grubu (C1: H&E görüntüsü 20X büyütme, C2: H&E görüntüsü 40X büyütme, C3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, C4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra 3. günde sakrifiye edilen M grubu (D1: H&E görüntüsü 20X büyütme, D2: H&E görüntüsü 40X büyütme, D3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, D4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR + KH grubu (E1: H&E görüntüsü 20X büyütme, E2: H&E görüntüsü 40X büyütme, E3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, E4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR + KH + M grubu (F1: H&E görüntüsü 20X büyütme, F2: H&E görüntüsü 40X büyütme, F3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, F4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme) Glomerül (GL), Tübül (T)).



Şekil 4.6 14. gün sakrifiye edilen grupların H&E ve Masson Trikrom boyanma görüntüleri. (Hiçbir işlem yapılmayıp 14. Günde sakrifiye edilen K grubu (A1: H&E görüntüsü 20X büyütme, A2:H&E görüntüsü 40X büyütme, A3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, A4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). Sağ nefrektomi yapıp 14. günde sakrifiye edilen S grubu (B1: H&E görüntüsü 20X büyütme, B2: H&E görüntüsü 40X büyütme, B3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, B4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıp 14. günde sakrifiye edilen IR grubu (C1: H&E görüntüsü 20X büyütme, C2: H&E görüntüsü 40X büyütme, C3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, C4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra 14. günde sakrifiye edilen M grubu (D1: H&E görüntüsü 20X büyütme, D2: H&E görüntüsü 40X büyütme, D3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, D4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR + KH grubu (E1: H&E görüntüsü 20X büyütme, E2: H&E görüntüsü 40X büyütme, E3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, E4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme). IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR + KH + M grubu (F1: H&E görüntüsü 20X büyütme, F2: H&E görüntüsü 40X büyütme, F3: Masson Trikrom görüntüsü 20X büyütme, F4: Masson Trikrom görüntüsü 40X büyütme) Glomerül (GL), Tübül (T)).

Yapılan histolojik skorlamada grupların 3. günleri değerlendirildiğinde IR grubu histolojik olarak K ve S grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0,05$). 14. gündeki histolojik skorlamayı değerlendirdiğimizde IR yapıları ve sadece KH verilen gruptaki yükselme dikkat çekiciydi. IR+KH grubu K grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p<0,05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da tedavi gruplarında IR grubuna göre histolojik skorlama düşüktü. 3. ve 14. günleri kendi aralarında karşılaştırdığımızda IR+KH+M grubu 14. günde histolojik skorlama anlamlı olarak düşük bulundu. (Şekil 4.7)



Şekil 4.7 Grupların histolojik olarak skorlamasının karşılaştırılması

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubunda Kaspaz-3 glomerül hücrelerinde hem pozitif, hem de negatif ekspresyon gösterdi. Tübül hücrelerinde ve damar endotelinde de reaksiyonun zayıf pozitif olduğu belirlendi. Bax ekspresyonu glomerül paryetal epitelinde yer yer zayıf, yer yer kuvvetli pozitif reaksiyon gösterirken, tübüllerde ve damar endotelinde boyanma negatifti. Bcl-2 glomerül paryetal epitelinde kuvvetli pozitif tübüllerde orta derecede ekspresyon gösterdi. (Şekil 4.8) (Şekil 4.10).

S 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüllerde paryetel epitelde kuvvetli pozitif, tübül hücrelerinde ise negatif reaksiyon gösterdi. Tübüllerin çoğu negatif olarak izlenirken bir bölümünde pozitif reaksiyon dikkati çekti. Bax ekspresyonu tüm yapılarda negatif olarak izlendi. Bcl-2 ekspresyonu tübüllerin çoğunda, glomerüler hücrelerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitif. (Şekil 4.8). S 14. gün grubunda Kaspaz-3 reaksiyonu bu grupta tübüllerde ve damar endotelinde pozitif eksprese olurken glomerüllerde negatif ekspresyon gözlemlendi. Bax glomerül hücrelerinde ve tübüllerde zayıf ekspresyonda izlendi. Bcl-2 bu grupta glomerülde negatif eksprese olurken, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitif. (Şekil 4.10).

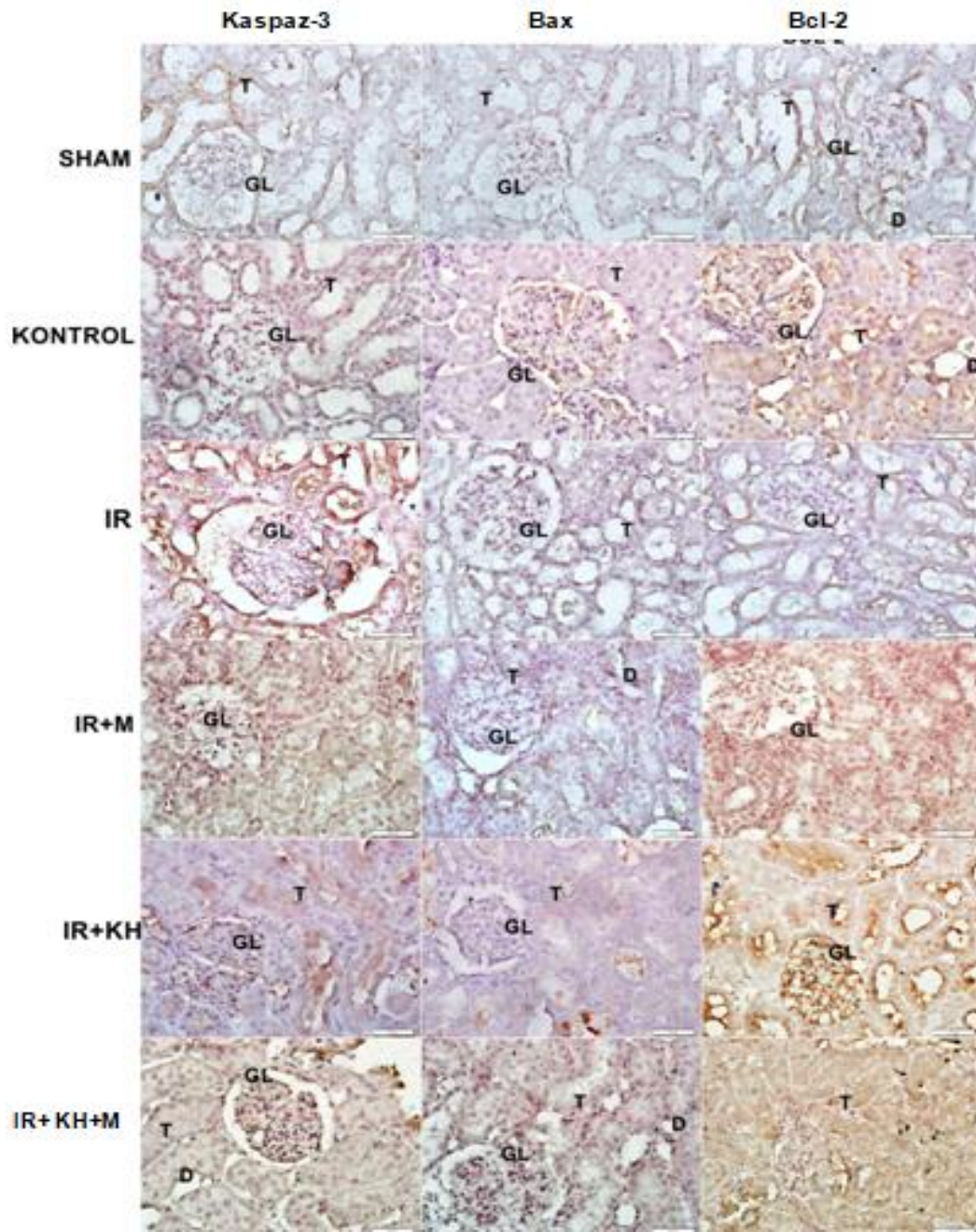
IR 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerül paryetel epitelinde, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli reaksiyon gösterdi. Bununla birlikte glomerülde hücrelerin çoğunluğu negatifti. Bu grupta Bax ekspresyon tüm yapılarda zayıf pozitif ekspresyon gösterdi. Bcl-2 ekspresyonu glomerüllerin ve tübüllerin çoğunda negatif izlenmesine karşın bazı tübüllerde zayıf pozitif boyanma dikkati çekti. (Şekil 4.8). IR 14. gün grubunda Kaspaz-3 ve Bax glomerüllerde, tübüllerde ve endotelde kuvvetli ekspresyon gösterdi. Bcl-2 ekspresyonu ise Bax ve Kaspaz-3' ten farklı olarak tüm yapılarda negatifti. (Şekil 4.10).

IR+M 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüllerde pozitif tübüllerde zayıf, endotelde ise kuvvetli pozitif derecede ekspresyon gösterdi. Bax tüm yapılarda negatifti bununla birlikte bazı tübüllerin lümeni pozitif reaksiyon gösteren salgı ile dolu olarak izlendi. Bcl-2 glomerül hücrelerinde kuvvetli derecede, tübüllerde ve endotelde ise orta derecede pozitif. (Şekil 4.8). IR+M 14. günde Kaspaz-3 reaksiyonu glomerüllerde negatifken tübüllerin bir bölümünde ve endotelde zayıf pozitif boyanma gösterdi. Bu grupta Bax reaksiyonu glomerülde ve endotelde negatifken tübüllerde reaksiyon zayıf pozitif olarak izlendi. Bcl-2 ekspresyonu glomerüllerde, tübüllerde ve endotelde ise kuvvetli pozitif. (Şekil 4.10).

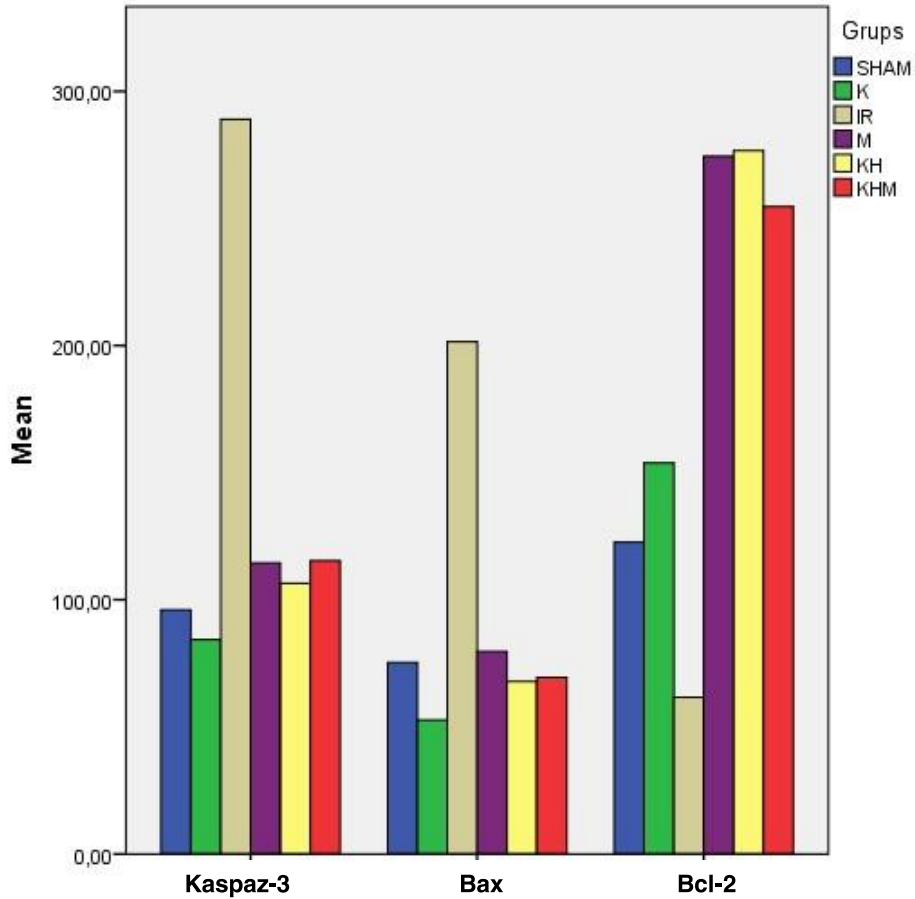
IR+KH 3. gün grubunda Kaspaz-3 ekspresyonu glomerülde orta derecede tübüllerde ise zayıf ekspresyon göstermiştir. Bax ekspresyonu glomerüler hücrelerinde ve tübüllerde negatifti. Bcl-2 ekspresyonun ise glomerülerde ve tübüllerde kuvvetli pozitif olarak reaksiyon gösterdiği dikkati çekti. (Şekil 4.8). IR+KH 14. gün grubunda Kaspaz-3 glomerülde ve tübüllerde zayıf ekspresyon gösterdi. Bax ekspresyonu bu grupta tüm yapılarda negatifti. Bcl-2 glomerüllerde, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. (Şekil 4.10).

IR+KH+M 3. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüllerde orta derece pozitif reaksiyon gösterirken tübüllerde reaksiyon negatifti. Endotel hücrelerinin ise kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdiği belirlendi. Bu grupta Bax glomerüllerde ve tübüllerde zayıf pozitifliği. Bcl-2 ekspresyonu glomerüllerde, tübüllerde ve damar endotelinde kuvvetli pozitifliği. (Şekil 4.8). IR+KH+M 14. gün grubunda Kaspaz-3 glomerüle hücrelerinde, tübüllerde zayıf pozitif ekspresyon gösterdi. Bax ekspresyonu tüm yapılarda çok zayıf pozitif olarak izlendi. Bcl-2 ekspresyonu glomerül hücrelerinde ve tübüllerde kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi. (Şekil 4.10).

Semikantitatif H skoru analizinde 3. Günde IR grubunda Kaspaz-3 ekspresyonu diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksekken Bcl-2 ekspresyonu anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). Tedavi gruplarında Kaspaz-3 salınımı azalıp Bcl-2 salınımı artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). 3. günde Bax ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). (Şekil4.9) (Tablo4.2). 14. gün Kaspaz-3 ve Bax ekspresyonunun IR grubunda diğer gruplara göre anlamlı olarak arttığı, Bcl-2 ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0,05$). Diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. (Şekil4.11) (Tablo4.3)



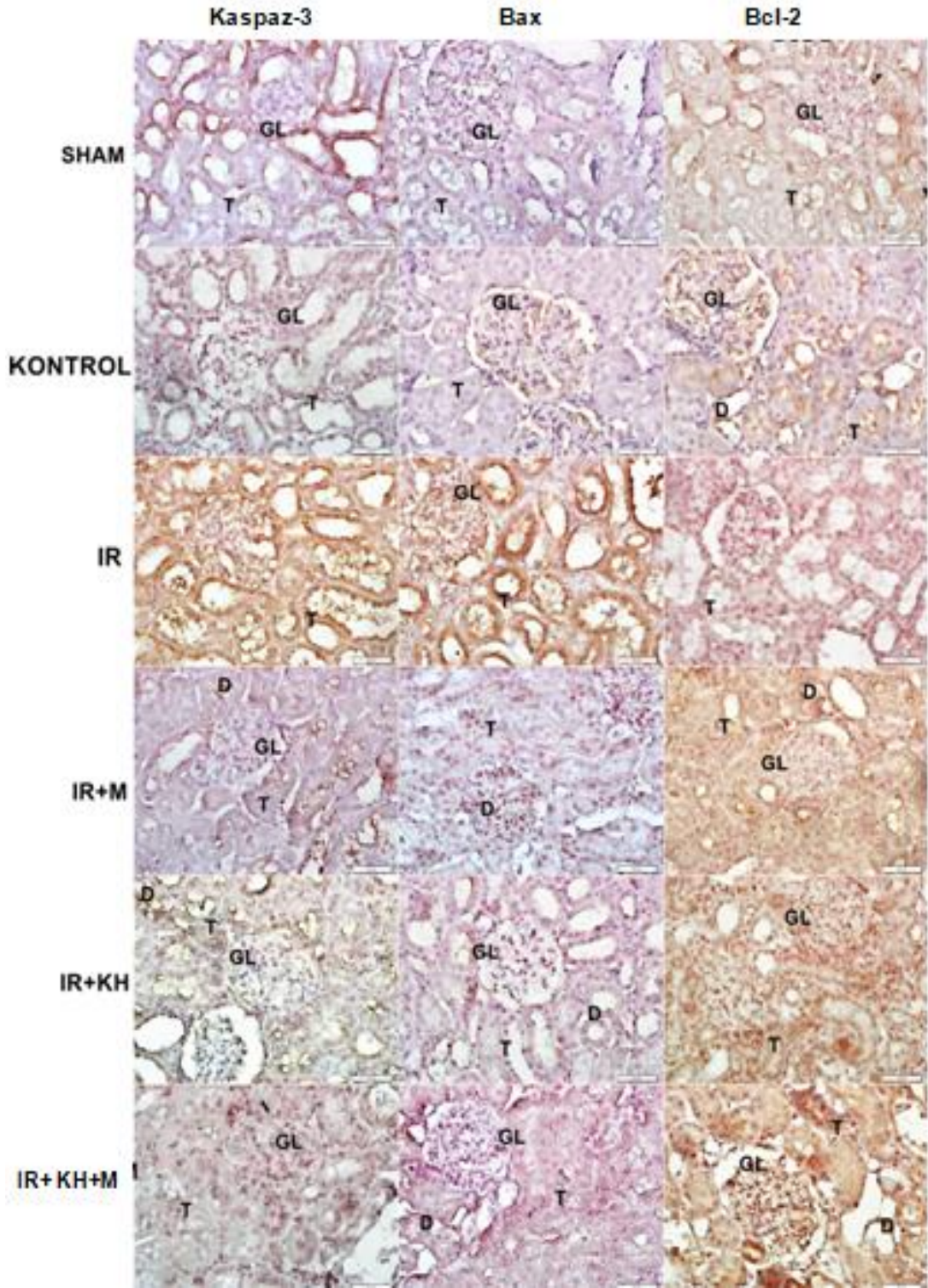
Şekil 4.8 3. günde sakrifiye edilen grupların immünohistokimyasal görüntüleri (Sağ nefrektomi yapıp 3. günde sakrifiye edilen S grubu. IR yapıp 3. günde sakrifiye edilen IR grubu. IR yapıldıktan sonra 3. günde sakrifiye edilen KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR+KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR+KH+M grubu. IR yapıldıktan sonra melatonin uygulanıp 3. günde sakrifiye edilen IR+M grubu. Gruplardan alınan böbrek kesitlerinde Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonu. Glomerül (GL), Tübül (T), Damar (D). İmmünoperoksidaz X400, Bar 50µm.)



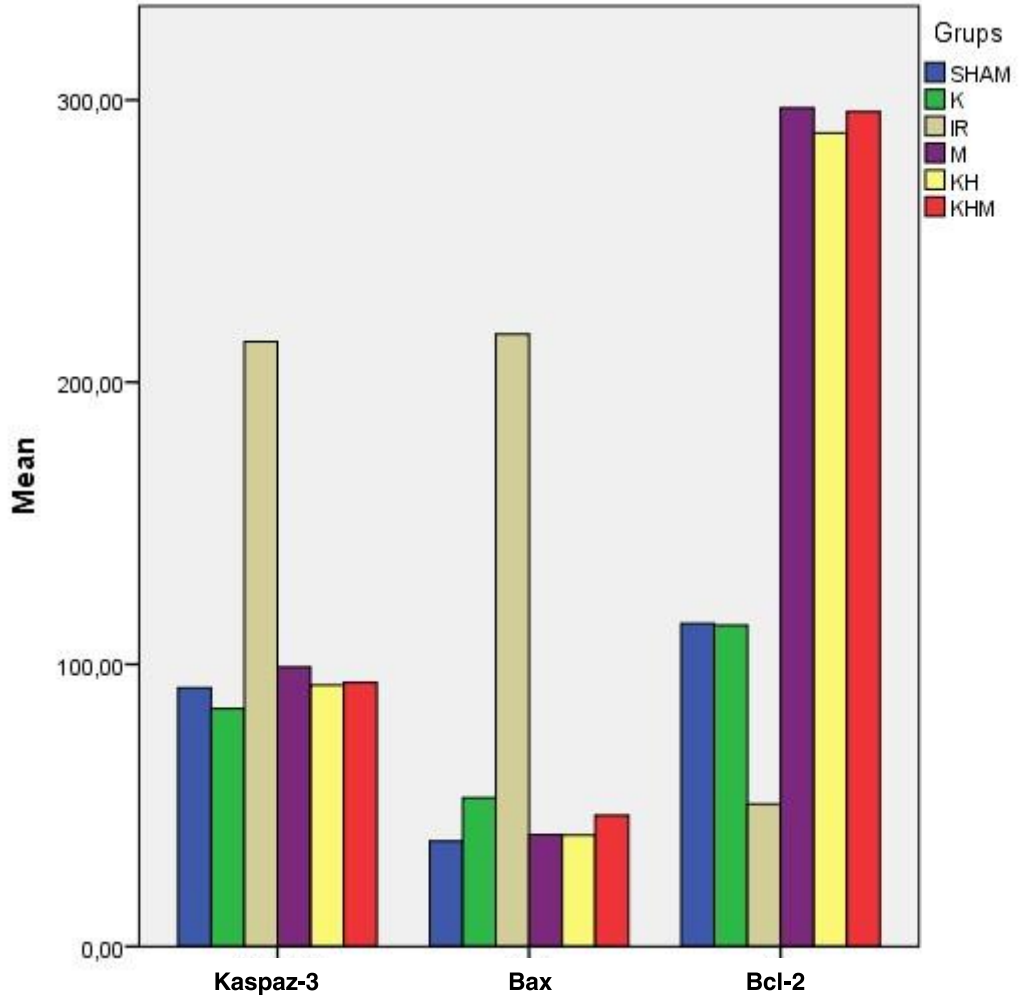
Şekil 4.9 3. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 eksprese eden hücrelerin H-Skoru analizi

Tablo 4.2 3. gün gruplarından alınan böbrek dokusundaki Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun H-skor analizi sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlılık: *** $p < 0,05$

3. Gün	Kaspaz-3	Bax	Bcl-2
	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma
S	96,00±15,36	75,33±17,97	132,66±10,7
K	84,33±16,8	54,66±9,8	153,83±35,06
IR	289,00±13,43***	201,50±32,32	66,83±10,68***
IR+M	106,66±12,58	79,66±15,84	274,56±11,86
IR+KH	106,50±9,81	67,83±10,16	276,66±13,48
IR+KH+M	115,33±11,36	69,50±28,17	254,66±28,54



Şekil 4.10 14. Günde sakrifiye edilen grupların immünohistokimyasal görüntüleri. (Sağ nefrektomi yapıp 14. günde sakrifiye edilen S grubu. IR yapıp 14. günde sakrifiye edilen IR grubu. IR yapıldıktan sonra 14. günde sakrifiye edilen KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR+KH grubu. IR yapıldıktan sonra kök hücre ve melatonin uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR+KH+M grubu. IR yapıldıktan sonra melatonin uygulanıp 14. günde sakrifiye edilen IR+M grubu. Gruplardan alınan böbrek kesitlerinde kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonu. Glomerül (GL), Tübül (T), Damar (D). İmmünoperoksidaz X400, Bar 50µm.)



Şekil 4.11 14. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax, Bcl-2 ekspresyonunun H-Skoru analizi

Tablo 4.3 14. gün gruplarından alınan böbrek dokusunda Kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunun H-skor analizi sonuçları İstatistiksel olarak anlamlılık: *** $p < 0,05$

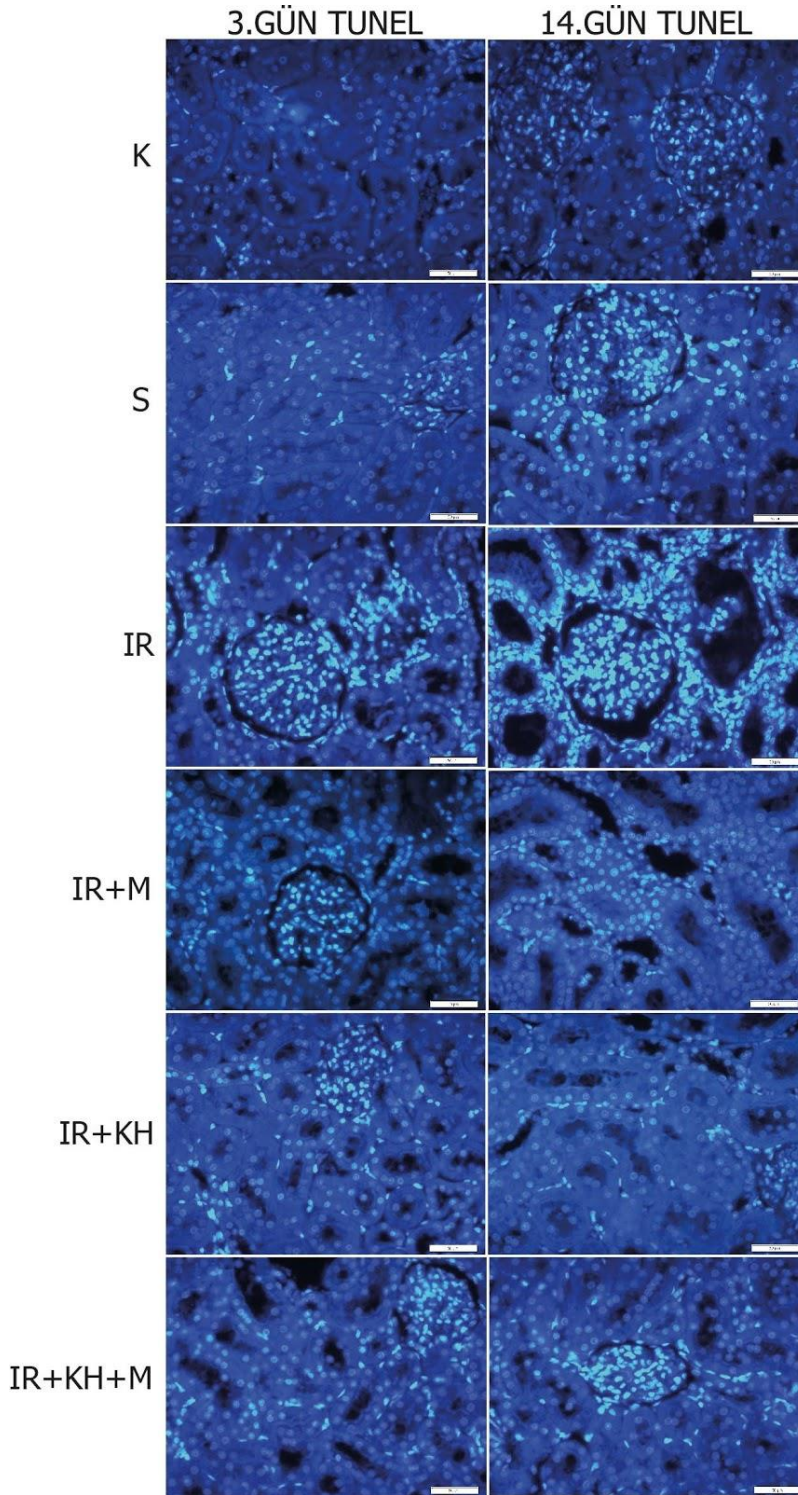
14. Gün	Kaspaz-3	Bax	Bcl-2
	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma	Ortalama±Standart sapma
S	91,66±9,28	37,33±5,31	114,15±23,08
K	84,33±16,86	52,66±10,1	113,83±25,63
IR	214,33±12,7***	217,00±19,4***	50,50±5,54***
IR+M	99,00±4,51	39,66±10,38	297,16±3,31
IR+KH	92,66±8,11	39,50±9,07	288,00±11,3
IR+KH+M	93,55±6,22	46,50±6,44	295,83±5,94

4.5. TUNEL Bulguları

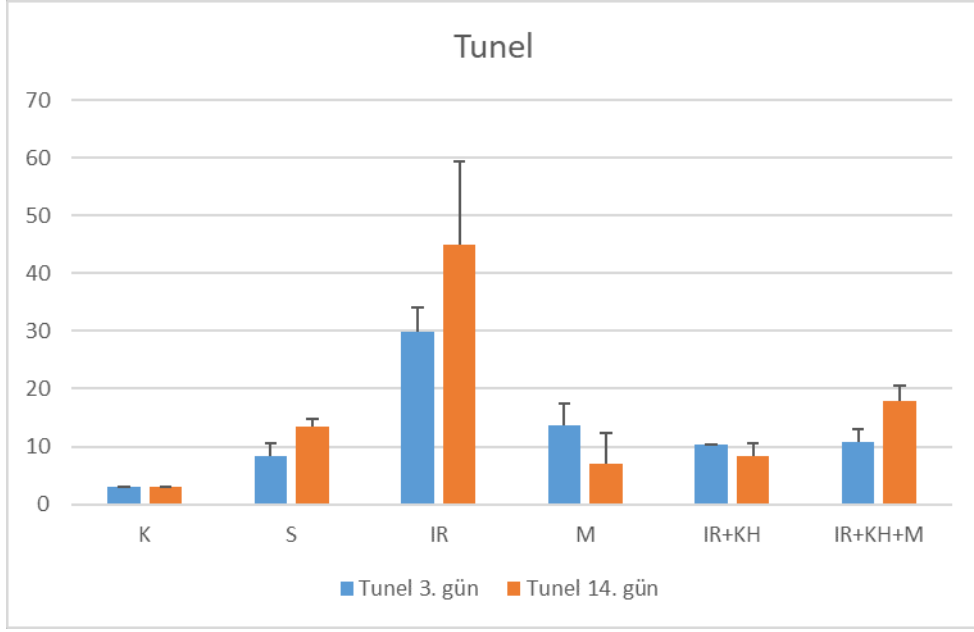
Grupların 3. ve 14. gündeki hesaplanan apoptotik indekslerini karşılaştırdığımızda IR grubunda K ve S grubuna göre anlamlı yükseklik saptandı. Apoptotik hücre artışı glomerüler yapılarda daha belirgindi. İlginç bir şekilde histolojik skorlama IR+KH+M grubunda 14. günde anlamlı olarak azalırken, TUNEL(+) hücrelerin anlamlı olarak artması dikkat çekiciydi ($p < 0,05$). (Tablo 4.4) (Şekil 4.12) (Şekil 4.13)

Tablo 4.4 Grupların histolojik skorlama ve TUNEL değerlendirme sonuçları

		S	IR	M	IR+KH	IR+KH+M	Gruplar arası p	
Histolojik Skor	3. gün	0.3 ± 0	1 ± 0,24	3,83 ± 0,97	1,98 ± 0,85	2.4 ± 0	2,6 ± 0,78	0.002*
	14. gün	0.3 ± 0	0,75 ± 0,26	4,28 ± 0,34	1,6 ± 0,22	2,8 ± 0,2	1,2 ± 0,16	0.001*
		0.2	0.886	0.886	-	0.029*		
TUNEL (Aİ)	3. gün	2.92 ± 0	8,35 ± 2,11	29,77 ± 4,26	13,63±3,72	10.24 ± 0	10,69± 2,27	0.002*
	14. gün	2.92 ± 0	13,37±1,43	44,98±14,35	6,97 ± 5,27	8,32 ± 2,31	17,78± 2,86	0.002*
		0.029*	0.114	0.229	-	0.029*		



Şekil 4.12 3. ve 14. günde sakrifiye edilen deney gruplarının TUNEL boyama görüntüleri (40X büyütme)



Şekil 4.13 3. ve 14. günde sakrifiye edilen deney gruplarının apoptotik indeks sonuçlarının karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Bizim çalışmamızda verilen tedaviler istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kan kreatinin ve BUN düzeylerini düşürmüştür. Grupların 3. gündeki histopatolojik görüntülerinde K ve S grubu kadar iyi olmasa da IR grubuna göre belirgin bir düzelme vardı. Fakat 14. gündeki histolojik düzelme deney gruplarında oldukça belirgindir. IR grubunda 3. ve 14. günlerde TUNEL pozitif hücre ve Kaspaz-3 ve Bax ekspresyonu artarken, Bcl-2 ekspresyonunun gözlenmemesi iskeminin apopitotik yolağı tetiklediğini göstermiştir. Bütün tedavi gruplarında ve özellikle 14. günde olmak üzere apopitotik gen ekspresyonunu ve apopitotik indeksi düşürmesi tedavinin etkin olduğunu göstermektedir.

Akut iskeminin ortaya çıkmasından sonra, renal perfüzyonun restorasyonu, süperoksit, hidrojen peroksit (HOOH) ve hidroksil (OH) radikali dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin ve ROS üretimini tetikleyen vasküler endotel hücrelerini hızla aktive eder. Akut böbrek hasarında iskemi reperfüzyonu takiben, kusurlu antioksidan süreçler, endojen antioksidanların tükenmesine ve redoks tarafından düzenlenen enzimlerin aktivitesinin azalmasına neden olarak hücre içi ROS birikimini şiddetlendirir. Azaltılmış antioksidan kapasite ile ilişkili bu artan ROS üretimi, bir oksidatif stres durumuna yol açar (Lee vd 2019). Sonuçta mitokondriyal hasar, ATP'nin tükenmesi, artan lipid peroksidasyonu ve hücre ölüm yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır. ROS'un diğer bir zararlı etkisi, hücre zarı proteinlerinin oksidatif modifikasyonudur; bu, iyon ve besin taşınmasını, enerji metabolizmasını ve hücre homeostaz için gerekli olan organel fonksiyonunu bozar. Ayrıca, NF- κ B'nin ROS aracılı aktivasyonu, böbrek fonksiyonu üzerinde zararlı bir etkisi olan tübül epitel hücre apoptozunu ve böbrek fibrozunu tetikleyerek sistemik inflamasyonu şiddetlendirmeye devam eder (Lee vd 2019).

İskemi, tübül hücrelerinde NO (nitrik oksit) sentazı aktifler. Daha sonra oluşan ROS proteinlerinin aktivasyonu, lipid peroksidasyonu, DNA hasarı, apoptozisin indükasyonu yolu ile renal tübül hücrelerinin hasarına neden olur. Melatonin akut böbrek yetmezliğinde antiinflamatuardır, antioksidandır ve endoplazmik retikulum stresini azaltır. Shi ve ark. diyabetik sıçanlarda melatoninin IR üzerindeki etkisine bakmışlar. 4 hafta boyunca melatonin verdikleri diyabetik ve nondiyabetik sıçanlarda IR

oluşturmuşlar ve melatoninin diyabette oksidatif hasarı ve apoptozisi hafiflettiğini bulmuşlardır (Shi vd 2019).

Ahmediasl ve ark.'nın yaptığı çalışmada tek taraflı nefrektomi ve sonrasında renal iskemi reperfüzyon oluşturdukları sıçanlara, iskemi öncesi 10 mg/kg melatonin ve 5000 U/kg eritropoietin verilip, 24 saat sonra sakrifiye etmişler. Serum üre seviyeleri melatonin verilen grupta anlamlı olarak azalmış. MDA seviyesi anlamlı olarak diğer gruplara göre düşük saptanmıştır. Melatonin uygulanması histopatolojik anormallikleri azaltmıştır (Ahmediasl vd 2014) Melatoninle tedavi edilmiş akut pankreatikli hayvanlarda pankreas iltihabında, amilaz, lipaz ve inflamatuvar öncüllerinden olan sitokinlerin seviyelerinde azalma olduğu, inflamatuvarı önleyen interlökinlerin seviyelerinde artış olduğu tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise melatonin bir başka antioksidan etkisi ise miyeloperoksidaz seviyesini azaltması, kan akışını düzenlemesi, prostaglandin seviyesinde azalma, apoptoz ve nekrozu kontrol altına alması olarak gözlemlenmiştir (Carrasco vd 2013). Başka bir çalışmada peroksil radikalinin neden olduğu hasara karşı melatoninin doz miktarına bağlı olarak reperfüzyon sırasında koruyucu etki gösterdiğini gözlemlenmiştir (Dobsak vd 2003).

Melatoninin in vitro olarak uygulanmasında, histon deasetilaz sinyalinin hedeflenmesiyle A549 ve PC9 akciğer adenokarsinom hücrelerini baskıladığını ve apoptoz molekülleri olan PUMA ve Bax moleküllerinin reseptör miktarında artışa; proliferasyonla ilgili olan, antiapoptoz molekülü Bcl-2 reseptörlerinde azalmaya neden olduğu ve kansere karşı etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Fan vd 2015).

Li ve arkadaşları böbreklerde çift taraflı tıkanıklığın yol açtığı sorunların melatonin tedavisi ile giderilmesine yönelik çalışma yapmışlar. 60 adet Sprague-Dawley (SD) erkek sıçanları her biri 20 sıçandan oluşan 3 gruba ayırmışlar ve bu grupları yapacakları uygulamalara göre kontrol grubu olarak kullanacakları sham, bilateral üreter obstrüksiyon (BUO) ve BUO+Melatonin olacak şekilde 3 ayrı gruba her grubu da kendi içinde 2 alt gruba ayırmış. BUO-R+melatonin grubuna BUO başlangıcında melatonin 20 mg/kg ve 50 mg/kg 6 saat sonra, serbest bırakıldıktan sonra 50 mg/kg ve 2 gün boyunca günlük olarak verilmiştir. BUO'dan 24 saat sonra, sıçanlar, kontrol sıçanlarına kıyasla plazma üre ve kreatinin düzeylerini önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Melatoninin yararlı mekanizmalarının BUO ve BUO-R sıçanlarında böbrek fonksiyonunun bozulması sonucu renal AQP -1, -2, -3 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak inflamatuvar infiltrasyon ve sitokinlerin salgılanmasını büyük ölçüde inhibe ettiğini, obstrüksiyondan sonra böbrek ultrastrüktürel bütünlüğünü

korumasını sağladığı görülmüş. Melatonin tedavisinin renal hemodinamik düzenleme, renal yapı ve tübüler fonksiyon bütünlüğünü koruma sağladığını, BUO'nun salınmasından önce ve sonra potansiyel olarak koruyucu bir rol üstlendiğini göstermişler (Li vd 2019).

Chen ve ark. 2019 renal IR sıçanlarında melatonin ve poricoic acid A (PAA)nin etkisine bakmışlar. Yapılan incelemeler sonucunda IRI sıçanları sham grubu ile karşılaştırıldığında a-SMA (alfa düz kas aktin) kollagen I ve fibronektin ekspresyonu artmış 14. günden sonra IRI grubunda belirgin interstisyel fibrozis görülmüş. IRI grubuna göre melatonin ve PAA ile tedavi gruplarında a-SMA kollagen I ve fibronektinin azaldığı; hem melatonin hem PAA inhibitör etki göstermiş ve buna ek olarak M+ PAA kombinasyonunda ise daha etkili sonuç alınmış ve bu etkiyi de fibrozisi engelleyerek yaptığını gözlemlemişler (Chen ve ark. 2019).

Panah ve ark. yaptığı çalışmada 18 yaş üstü böbrek nakli yapılan hastalarda oral melatoninin inflamatuvar ve oksidatif stres faktörleri, böbrek fonksiyon biyobelirteçleri ve Klotho gen/protein ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmişler. Kontrol grubu IR+plasebo, işlem yapılan grup IR+M olarak isimlendirilmiş. Kontrol ve işlem grubunda transplantasyondan 24 saat önce serumda kreatinin ve üre miktarlarının, Plazma melatonin, TNF- α ve nötrofil jelatinaz ile ilişkili lipokalin (NGAL) seviyeleri malondialdehit (MDA) seviyesi, tam kan hücrelerinden Klotho mRNA ölçümü ve Klotho Western blot analizi yapılması adına kan örnekleri alınmış kan alımına ek olarak taburcu olana kadar (25 gün) işlem grubuna oral olarak melatonin, kontrol grubuna da aynı şekil ve renkte plasebo verilmiş, taburcu olurken tekrar kan örnekleri alınmıştır. Melatonin verilen grupta plasebo grubuna göre BUN, Cr, özellikle NGAL'nin, TNF- α seviyesinin ve lipid peroksidasyonun azaldığı görülmüştür. Melatoninin anti-inflamatuvar ve anti-stres özellikleri belirginken, Klotho protein ekspresyonunu etkilerinden farklı olduğu gözlenmiş. Genel olarak bu çalışmanın sonuçları melatoninin IR kaynaklı böbrek hasarı üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Panah vd 2019). Santos ve ark.'nın 2018 de Peristan kaynaklı lupus farelerinde oral yoldan 6 ay alınan melatoninle lupus nefrit böbrek hasarını iyileştirmeye yönelik bir çalışma yapmışlar. Bu farelerde Bax ekspresyonu, çok zayıf renal Bax ekspresyonu gösteren kontrol farelerine göre renal tübüler epitel hücrelerinde ve glomerüler mezanjijyal hücrelerde orta derecede yükselmiştir. Araştırmacılar Melatoninin tedavisi sonucunda Bax ekspresyonun azaldığını saptamışlardır (Santos vd 2018).

Bizim çalışmamızda M tedavisi hem 3. gün hem de 14. günde sakrifiye edilen sıçanlarda böbrek histolojik görüntüsünün düzelmesine katkı sağlamıştır. Fibrotik değişikliklerin bazı damar ve glomerül çevresinde sınırlı kaldığı saptanmıştır. Kaspaz-3 ve Bax ekspresyonunun IR gruplarına göre azalması ve Bcl-2'nin artması diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir. TUNEL pozitif hücrelerin IR grubuna göre, özellikle 14. gün sakrifiye edilen grupta azalması bize melatoninin apoptotik yolakta etkili olduğunu düşündürdü.

MKH'ler konakçı organların hücre fenotipini üretme, doku onarımı ve rejenerasyonu, iyileştirme konusundaki doğal kapasitesi nedeniyle akut böbrek hasarında etkili tedavi olarak kullanılabilir. Hasarlı doku içerisindeki daha fazla MKH, MKH tedavilerinin pozitif etkilerini daha da artırır. Fakat bu enjekte edilen MKH'lerin en büyük engel, mikroortamın negatif etkisi nedeniyle daha yüksek erken ölüm oranıdır. Oksidatif hasar, hipoksinin indüklediği apoptozu, erken iltihap oluşumu MKH'nin enjekte edildiği yerde erken ölümüne neden olur (Alzahrani 2019).

Xie ve ark 'nın 2019 da Klotho da transfekte edilmiş kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı etkisi üzerine yaptıkları çalışmada 10 haftalık SD sıçanlara sağ nefrektomi, sol iskemi reperfüzyon yapılarak gruplar oluşturulmuş. Tedavi gruplarında IR grubuna göre serum kreatininde anlamlı azalma, böbrek doku MDA düzeylerinde azalma, histolojik yapıda düzelleme ve apoptotik hücre sayısında azalma saptanmıştır. En belirgin azalma Klotho gen transfeksiyonu yapılan grupta saptanmıştır (Xie vd 2019).

Chen ve ark. yaptığı çalışmada bilateral iskemi reperfüzyon hasarı oluşturdukları böbrek dokusuna olog olarak hazırladıkları adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreleri lokal olarak uygulamışlar. Yapılan çalışmada sonuç olarak adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin böbrek BUN ve kreatinin düzeylerini renal iskemi reperfüzyon hasarı yapılan gruba göre düzelttiğini, inflamatuvar, oksidatif stres ve apoptotik biyomarkerların kök hücre verilen grupta daha düşük, anti-inflamatuvar, anti-oksidatif ve anti-apoptotik markerların anlamlı olarak daha yüksek olduğunu saptamışlar. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin renal iskemi reperfüzyon hasarını, oksidatif stresi ve inflamatuvar yanıtı minimize ederek etki ettiğini savunmuşlardır (Chen vd 2011).

Yapılan bir çalışmada renal iskemi oluşturulan sıçanlara AD-MKH verilmiş. Böbrek fonksiyon parametrelerinde, daha az oksidatif stres ve böbrek dokusu hasarının önlenmesinde AD-MKH enjeksiyonundan 48 saat sonra önemli iyileşme gösterilmiştir.

Yaptıkları çalışmada, AD-MKH'lerin intravenöz enjeksiyonu ile, muhtemelen tıkanıklığı ve antioksidan ve anti-inflamatuar etkileri azaltarak çeşitli böbrek fonksiyonları ve histopatolojik parametreleri iyileştirdiğini göstermişler. 45 dakika renal iskemi geçirmiş sıçanlarda fetal membranlardan türetilmiş insan MKH'lerinin enjeksiyonu, parakrin mekanizmalar, çeşitli sitokinlerin salgılanması ve inflamasyonu azaltarak fonksiyonel ve morfolojik iyileşmeyi geliştirdi (Changizi-Ashtiyani vd 2020).

Akut organ hasarı genellikle doğuştan gelen bağışıklığı hedef alarak inflamasyon, apoptozis ve oksidatif stres'le sonuçlanır. Bunların tümü hasara doğrudan katkıda bulunur. Yapılan bu çalışmada IR hasarı yapılan grupta yüksek derecede böbrek hasarı görülmüştür. Yüksek üre, kreatinin, Retinol bağlayıcı protein değerleri, yüksek TNF- α , IL-1 β ve NF- κ β gibi inflamatuvar stikonderde artış, yüksek DNA hasarı, yüksek oksidatif marker değerleri saptanmıştır. Tek başına MKH, melatonin ve Exo tedavilerinin teker teker veya kombinasyon oluşturularak uygulanması sonucunda azalmış fakat kombine kullanımları kadar etkili olmamıştır. En etkili olduğu kombine yöntem ise M+Exo olmuştur (Zahran vd 2020). Bu gruplar önceki çalışma ile uyumludur (Chen vd 2014, Chang vd 2015).

Minocha ve ark.'nın 2019 da amniyon sıvısı kaynaklı kök hücre ile sisplatinden kaynaklanan akut böbrek yetmezliğinin iyileştirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada Sisplatin enjeksiyonunun 5. gününde sıçanlar, sağlıklı kontrollere kıyasla BUN ve serum kreatinin seviyelerinde önemli bir artış sergilemiş, 8. günde, AFSC ile tedavi edilen grupta, salin ile tedavi edilen gruba kıyasla BUN ve serum kreatinin seviyelerinde önemli bir düşüş gözlenmiş, ancak her iki grupta sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek seviyeler varken 12. günde, AFSC ile tedavi edilen gruptaki kan biyokimyasal parametreleri sağlıklı kontrollerinkiyile karşılaştırılabilir hale gelmiş, sağlıklı kontrollere kıyasla salin ile tedavi edilen grupta hala önemli ölçüde yüksek olduğu görülmüş. Böbrek dokularının histopatolojik analizi, sisplatin enjeksiyonunun 5. gününde, IR sıçanlarının böbreklerinin, fırça kenarlığının kaybı, hiyalin döküm oluşumu ve tübüler dilatasyon ile birlikte şiddetli tübüler nekroz sergilediğini ortaya koymuş, 8. günde böbrekler, salinle tedavi edilen gruba kıyasla AFSC ile tedavi edilen grupta tübüler hasarda önemli bir zayıflama sergilemiş. 12. günde, salinle tedavi edilen sıçanların böbrekleri hala nekrotik tübüler hücreler ve hiyalin döküntüleri gösterirken AFSC ile tedavi edilen sıçanların böbrekleri, infüze edilen hücreler tarafından böbrek hasarının azaldığını gösteren daha düşük bir hücrel hasar indeksi göstermiş ve AFSC ile tedavi edilen grup ile salin ile tedavi edilen grup arasında Jablonski derecelendirme skorunda önemli bir fark ortaya

koyulmuş. Sisplatin enjeksiyonundan sonra 8. ve 12. günlerde apoptozla ilişkili sinyal yolu proteinlerinin seviyelerini belirlemek için Western blot analizi yapılmış. Proapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerinde önemli bir artış, Sağlıklı kontrollere kıyasla salinle tedavi edilen grupta proapoptotik proteinlerin ekspresyon seviyelerinde, yani PUMA, Bax/Bcl2 oranı, parçalanmış Kaspaz-3 ve parçalanmış Kaspaz-9'da önemli bir artış gözlemlendi. Bununla birlikte, AFSC uygulamasından sonra, salinle tedavi edilen gruba kıyasla AFSC ile tedavi edilen gruptaki tüm pro-apoptotik proteinlerin belirgin down-regülasyonu izlenmiş. Bu çalışma, sisplatin ile indüklenen ABY'de AFSC uygulamasının, otofajinin aktivasyonu ve apoptozun inhibisyonu yoluyla böbrek fonksiyonunun ve histolojinin hızlı iyileşmesi ile sonuçlandığını göstermiştir (Minocha ve ark.'nın 2019).

Apoptozisin renal iskemide tübüler hücre ölümü için mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir. Tübüler epitelyal hücrelerdeki apoptotik değişiklikler iskemi reperfüzyon oluşan hayvan modellerinden ve insanlardan alınan böbrek biyopsilerinde gösterilmiştir. Tübül epitel hücrelerinde gerçekleşen apoptozis için çeşitli mekanizmalar vardır. İskemi boyunca tübül epitel hücrelerinde proapoptotik olan Bax proteinini upregüle eder. Bu da antiapoptotik protein olan Bcl-2'nin azalmasına neden olur. Böylece apoptozisin başlamasını teşvik eder (Lee 2019).

Yapılan çalışmalarda akut böbrek yetmezliğinde kemik iliğinden üretilen mezenkimal kök hücrelerin böbrek tübüler hasara karşı korumada, M2 makrofaj infiltrasyonu ve inflamatuvar yanıtların azaltılmasında, böbrek fonksiyonunun iyileştirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (Geng vd 2014). Bir başka çalışmada in vivo köpek akut böbrek yetmezliği modelinde umbilical cord'dan türetilen mezenkimal kök hücrelerin BUN ve kreatinin düzeylerinin düşmesinde, böbrek lezyonlarının düzelip böbrek fonksiyonlarının iyileşmesinde ve hücre yaşlanmasında ve inflamasyonun azalmasında, glomerüler filtrasyonun iyileştirilmesinde, böbrek hücrelerinin proliferasyonunun artmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Lee vd 2017, Rodrigues vd 2017). 2013 yılında (NCT01840540) faz I keşif çalışmasında altı hastada AD-MKH kullanılarak klinik çalışma yapılmıştır. Bu çalışma KBY hastalarında AD-MKH uygulamasının güvenilirliğini ve toksikitesini test etmeyi amaçlamış, AD-MKH'nin klinik kullanım potansiyeli ve MKH markerinin özellikleri doğrulanmıştır (Camilleri vd 2016). Ayrıca, MKH'lerin, bağışıklık aktivitesini düzenleyen ve konakçı hücrelerin genişleme ve farklılaşma potansiyelini arttıran, böylece hasarlı dokuların iyileşmesini destekleyen birçok farklı sitokin ve büyüme faktörü salgılayabileceği görülmüştür (Choi vd 2015). Kronik böbrek yetmezliğinde kemik iliğinden türetilen MKH'lerin kollajen birikimini

azaltarak sitokin ve kemokin ekspresyonunu düzenleyerek renal fibrozis ve kronik inflamasyonu hafiflettiği görülmüştür (Wu vd 2014). Başka bir çalışma insan AD-MKH'den türetilen eksozomların farelerde ABY'nin böbrek hastalığının gelişimi ile ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan SOX9'un modülasyonu yoluyla ABH-KBH geçişini inhibe ettiğini öne sürmüştür (Kumate vd 1988). Ayrıca diyabetik nöropatili sıçanlarda streptozosin ile indüklenen böbrek hasarı ve böbrek dokusu hücre apoptozunda AD-MKH tedavisinin böbrekte histolojik değişiklikleri iyileştirdiği, apoptoz oranını ve Wnt/ β -katenin ekspresyonunu azalttığı ve kretin ekspresyonunu arttırdığı ve daha ilginç RNA kullanılarak Klotho'nun düşürülmesi AD-MKH'lerin Bax ve Wnt/ β -katenin yolunu inhibe ederek podosit hasarını azalttığı bulunmuştur (Ni vd 2015).

Çalışmamızda sağ nefrektomi, sol iskemi reperfüzyon oluşturduğumuz sıçanlara lokal olarak tek doz AD-MKH verildi. KH tedavisi kan BUN, kreatinin düzeylerini düşürmüştür. Yapılan çalışmalardaki gibi istatistiksel olarak anlamlı olmasa da histolojik skorlama ve TUNEL sonuçları IR grubuna göre tedavi gruplarında iyileşmenin olduğunu göstermiştir.

Chen ve ark. 2014 yılında yaptığı çalışmada sepsis'in indüklediği renal hasar oluşturulan sıçan modelinde yağ dokudan elde edilen kök hücre intravenöz olarak ve melatonin intraperitoneal olarak birlikte uygulamışlar ve diğer gruplara göre anlamlı olarak daha fazla iyileşme saptamışlardır (Chen vd 2014). Yapılan bir başka çalışmada 24 saat melatoninle inkübe edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan dişi sıçanlara verilmiş yapılan deney sonucunda melatoninle inkübasyonun mezenkimal kök hücrelerin koruyucu etkisini daha da güçlendirdiği gösterilmiştir (Alzahrani vd 2019). Rashed ve ark. diyabetik nefropati erkek sıçan modelinde in-vitro 24 saat melatoninle muamele edilen kemik iliği mezenkimal kök hücrelerin böbrek fonksiyonlarını anlamlı bir şekilde düzenlediğini ve proliferasyon yeteneğini arttırdığını göstermişlerdir. Melatonin ve kök hücre verilen grupta superakutdismutaz-1 ve Beclin-1 seviyelerini kök hücre grubuna göre anlamlı olarak arttırdığını, TGF-Beta markerlarını böbrek dokusunda azalttığını saptamışlardır (Rashed vd 2018).

Renal iskemi reperfüzyona karşı melatonin ve mezenkimal kök hücre kaynaklı eksozomların iyileştirici etkisi üzerine yapılan çalışmada; histopatolojik olarak böbrek hasarı skorunda azalma, böbrek hasarının tespitinde yol gösteren BUN ve kreatinin seviyelerinin kanda önemli düzeyde azaldığı, azalmış oksidatif stres durumu, antioksidan seviyelerinde artış, apoptozun azalması, indüklenmiş antiapoptotik etki

inflamasyonun inhibasyonu, iyileştirilmiş rejenerasyon, gelişmiş anjiyogenez gibi en iyi koruyucu etkiye sahip olduğu tespit etmişlerdir (Alzahrani 2019).

60 dişi sıçan üzerinde yapılan bir çalışmada iki taraflı renal iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulmuş. Bir gruba IR + renal artere 1×10^6 MKH enjekte etmişler. Diğer gruba melatonin ile birlikte MKH ile önkoşullanırılmış Exozom (M+Exo) verilirken bir gruba da melatonin verilmeden sadece Exozom verilmiş. Sonuçta M+Exo grubunun diğer tedavi gruplarına göre renal iskemi reperfüzyon hasarına karşı daha etkili olduğunu savunmuşlar (Alzahrani 2019).

Zahran ve ark.'nın 2020 de bilateral renal iskemi reperfüzyon yaptıkları sıçanlara 20mg/kg melatonin 3 gün, 1×10^6 MKH renal arter içine enjekte ederek ve bunların eksozomlarıyla deney gruplarını oluşturmuşlar. Grupların serumdaki üre, kreatinin, Retinol Bağlayıcı Protein değerleri IR grubunda sham ve kontrol grubuna göre ciddi artış gözlenmiş, tek başına M ve MKH uygulanan gruplarda seviyeleri IR oluşturulanlara göre daha düşük düzeylerde ölçülmüş, M+MKH grubunda tek başına uygulamaya göre daha düşükken normal seviyelerle karşılaştırılabilecek düzeye kadar düşen grup ise M+Exo grubu olmuştur. Histopatolojik düzelme en iyi düzeyde Exo, M+MKH ve Exo+M gruplarında saptanmıştır. Enflamasyon ve hasarla ilişkili genler ve TNF α proteini ekspresyon seviyeleri IR grubunda en yüksek seviyedeysen tedavi uygulanan gruplarda azalmış fakat en düşük seviyeler ise M+Exo grubunda görülmüş (Zahran vd 2020).

Melatonin akciğer, bağırsaklar gibi organlarda iskemik hasarda kök hücre tedavisinde kullanılmıştır (Zahran 2020). Zahran ve ark.'na göre sıçanlarda melatonin, mezenkimal kök hücreler ve onların exozom'ları renal iskemi reperfüzyon hasarını azaltmıştır. Sadek ve ark. renal IR oluşturdukları Amerika sıçanlarına kemik iliği MHK enjeksiyonu yapmışlar. Operasyondan 24 saat ve 72 saat sonra tedavi gruplarında renal fonksiyonların daha iyiye gittiğini bulmuşlar. H&E, PAS (Periyodik Asit Schiff) ve Proliferatif hücre nükleer antijen (PCNA) boyanmaları sonucunda tedavi grubunda hasarın daha az olduğunu görmüşler (Sadek vd 2013).

Yapılan çalışmalar, KH+M Uygulamasının renal iskemi reperfüzyon hasarında etkili olduğunu çeşitli yönleriyle göstermiştir. Bizim çalışmamızda IR+KH+M özellikle 14. gün grubunda kan BUN, kreatinin değerlerini anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Bu da bize KH+M tedavisinin histolojik ek olarak fizyolojik düzelmenin de başladığını göstermiştir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda tedavi gruplarında IR gruplarına göre Kaspaz-3 reaksiyonu azalma gösterirken, Bcl-2 ekspresyonu artmıştır. TUNEL pozitif hücreler bütün tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da belirgin düşüş göstermiştir. Bunlara ek olarak histopatolojik düzelme en belirgin IR+KH+M grubunda gözlenmiştir. Bu nedenle denek sayısının arttırılacağı ve daha uzun süreli takipli grupların olacağı ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

Akşit H, Bildik A . Apoptozis. **YYÜ Vet Fak Derg.** 2008; 19(1): 55-63.

Alzahrani FA. Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Am J Transl Res** 2019; 11(5): 2887–2907.

Altunören O, Aydın G, Güngör Ö. “Böbrek Anatomisi”, Böbrek Fizyopatolojisi, Arınsoy T, Güngör Ö, Koçyiğit İ, **Reaktif**, Türkiye, 2017, 1-6.

Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemati A, Baradaran B, Azimian E. Effect of a combined treatment with erythropoietin and melatonin on renal ischemia reperfusion injury in male rats. **Clin Exp. Nephrol**, 2014; 18:855-864.

Aslan G. Ardkoşullanma ve melatoninin serebral iskemi-reperfüzyon hasarında mitofaji aracılı etkileri. Doktora Tezi, **Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı**, Elazığ, 2020, s. 84.

Atasoy ÖB, Erbaş O. Melatonin Hormonunun Fizyolojik Etkileri. **FNG & Bilim Tıp Dergisi** 2017; 3(1): 52-62.

Aydoğdu N, Kaymak K, Yalçın Ö. Sıçanlarda böbrek iskemi/reperfüzyon hasarında nasetilsisteinin etkileri. **Fırat Tıp Dergisi** 2005; 10(4): 151-5.

Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J Clin Invest.** 2011; 121(11): 4210-4221.

Brzezinski A. Melatonin in Humans. **N. Engl. J. Med** 1997; 336:186-195.

Camilleri ET, Gustafson MP, Dudakovic A, Riester SM, Garces CG, Paradise CR Takai H, Karperien M, Cool S, Sampen HJ, et al. Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production. **Stem cell Res Ther.** 2016; 7:107.

Carrasco C, Marchena AM, Holguin-Arevalo MS, Martin-Partido G, Rodriguez AB, Paredes SD, Pariente JA. Anti-inflammatory effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. **Cell Biochem Funct** 2013; 31(7): 585-90.

Chang CL, Sung PH, Sun CK et al. Protective effect of melatonin-supported adipose-derived mesenchymal stem cells against small bowel ischemia-reperfusion injury in rat. **J. Pineal Res.** 2015; 59: 206–20.

Changizi-Ashtiyani S, Hafazeh L, Ghasemi L, Najafi H, Babaei S, Mashayekhii FJ, Hoseini SJ, Bastani B. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on renal function and histopathology in a rat model of ischemia-reperfusion induced acute kidney injury. **Iran J Basic Med Sci.** 2020; 23(8): 999-1006.

Chen DQ, Cao G, Zhao H, Chen L, Yang T, Wang M, Vaziri ND, Guo y, Zhao YY. Combined melatonin and poricoic acid A inhibits rena fibrosis through modulatiogng the interaction of Smad3 and β -catenin pathway in AKI-to-CKD continuum. ***Therapeutic Advances in Chronic Disease***, 2019; 10: 1-19.

Chen HH, Lin KC, Wallace CG, Chen YT, Yang CC, Leu S, Chen YC, Güneş CK, Tsai TH, Chen YL, Chung SY, Chang CL, Yip HK. Additional benefit of combined therapy with melatonin and apoptotic adipos-derived mesenchymal stem cell against sepsis-induced kidney injury. ***J Pineal Res.*** 2014; 57:16–32.

Chen YT, Sun CK, Lin YC, Chang LT, Chen YL, tsai TH, Chung SY, Chua S, Kao YH, Yen CH, Shao PL, Chang KC, Leu S, Yip HK. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stres and inflammatory reaction. ***J Transl Med.*** 2011; 9:51.

Choi JR, Pinguan-Murphy B, Wan Abas WA, Yong KW, Poon CT, Noor Azmi MA, Omar SZ, Chua KH, Xu F, Wan Safwani WK. In situ normoxia enhances survival and proliferation rate of human adipose tissue-derived stromal cells without increasing the risk of tumourigenesis. ***PLoS One.*** 2015; 10: e0115034.

Collett JA, Traktuev DO, Mehrotra P, Crone A, Merfeld-Clauss S, March KL, Basile DP. Human adipose stromal cell therapy improves survival and reduces renal inflammation and capillary rarefaction in acute kidney injury. ***J Cell Mol Med.*** 2017, 21(7): 1420–1430.

Conesa LE, Valero F, Nadal JC. N-acetyl-L-cysteine improves renal medullary hypoperfusion in acute renal failure. ***Am J Physiol*** 2001; 281:730-7.

Cos S, Fernandez R, Guezmes B, Sanchez-Barcelo EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. ***Cancer Res.*** 1998; 58(19): 4383-90.

Cutando A, Lopez-Valverde A, Arias-Santiago S, Vicente J, Diego RG. Role of melatonin in cancer treatment. ***Anticancer Res.*** 2012; 32: 2747–2753.

Çam A, Erdoğan MF. Melatonin. ***Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası***, 2003; 56:2, 103-112.

Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC et al. Melatonin protects against ischemia–reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. ***Pathophysiology***, 2003; 9:179–187.

Erden S. Kök hücreler ve klinikte kullanımları. ***Journal of New Results in Engineering and Natural Science*** 2014; 3:1-8.

Fan C, Pan Y, Yang Y, Di S, Jiang S, Ma Z, Li T, Zhang Z, Li W, Li X, Reiter RJ, Yan X. HDCA1 inhibition by melatonin leads to suppression of lung adenocarcinoma cells via induction of axidative stres and activation of apoptotic pathways. ***J Pineal Res.*** 2015; 59(3): 321-33.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow derived myogenic progenitors. ***Science*** 1998; 279:1528.

Fourtillan JB BA, Fourtillan M at al. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Physiol-Endocrinology Metab.* 2001; 280:e11-e2.

Geng Y, Zhang L, Fu B, Zhang J, Hong Q, Hu J, li D, Lou C, Cui S, Zhu F and Chen X. Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of m2 macrophages. *Stem Cell Res Ther.* 2014; 5(3): 80.

Gündeşlioğlu AÖ, Altuntaş Z, İnce B, Dadacı M, Aktan M, Duman S. Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler ve Plastik Cerrahide Uygulama Alanları. *Türk Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi* 2013; 21:3.

Hassa O ve Aştı RN. Langman's Medikal Embriyoloji. 5. Çeviri Editörü: Başaklar C. *Palme Yayıncılık*, Ankara, 1996, s.129-130.

Hinman FJ. Development of kidney, ureter and adrenal gland. Hinman FJ. Atlas of Urosurgical Anatomy, *WB Saunders Company*, Philadelphia, 1996, 23-254

Karakükçü M, Çetin M. Graft versus host hastalığında mezenkimal kök hücre uygulamaları. *Türkiye Klinikleri J Hematol-Special Topics*, 2014; 7(4):31-8.

Karavaşin T. Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg* 2012; 9(1):65-71.

Karoui S, Badri T, Benmously R, Ben Brahim E, Chadli-Debbiche A, Mokhtar I, Fenniche S. Adenolipoma of the skin. *Pathologica* 2011; 103:343-5.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Micheal LM, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001; 107:1395.

Kumate J, Sepulveda-Amor J, Valdespino JL, de Mucha J, Diaz-Ortega JL, Garcia-Sainz JA, Ruiz-Puente J, Jimenez-Paredes J, ruiz-Arriaga A, Gutierrez G, et al. Mexican contributions to vaccines. *Gac Med Mex.* 1988; 124:73-97.

Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cell can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med.* 2000; 6:1229.

Lee SJ, Ryu MO, Seo MS, Park SB, Ahn JO, Han SM, Kang KS, Bhang DH, Youn HY. Mesenchymal stem cells contribute to improvement of renal function in a canine kidney injury model. *In Vivo.* 2017; 31(6):1115-1124.

Lee KH, Treng WC, Yang CY and Tarng DC. The anti-inflammatory, anti-avidative and anti-apoptotic benefits of stem cells in acute ischemic kidney injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019.

Li Z, Wang Y, Sun N, Liu X, Song E, Zhang Z, Wen J, Zheng T. Melatonin therapy protects against renal injury before and after release of bilateral ureteral obstruction in rats. *Life Sci.* 2019; 15; 229: 104-115.

Liu X, Gong Y, Xiong K, Ye Y, Xiong Y, Zhuang Z, Luo Y, Jiang Q, He F. Melatonin mediates protective effects on inflammatory response induced by interleukin-1 beta in human mesenchymal stem cells. *J Pineal Res.* 2013; 55(1): 14–25.

Matin SF, Novick AC. Renal dysfunction associated with staged bilateral partial nephrectomy: the importance of operative positioning. *J Urol.* 2001; 165(3):880-881.

- McCord CP, Allen FP. Evidence associating pineal gland function with alterations in pigmentation. **J Exp Zool.** 1917; 23:207–224.
- McFetridge ML, Del Borgo MP, Aguilar MI, Ricardo SD. The use of hydrogels for cell-based treatment of chronic kidney disease. **Clin. Sci.** 2018; 132, 1977–1994.
- Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitabı. Çeviri Editörü Seyhun Solakoğlu. **Nobel Tıp Kitapları**, İstanbul, 2015, s.388-392.
- Mezey E, Chandross K, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood in brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** 2000; 290(5497):1779-82.
- Minocha E, Sinha RA, Jain M, Chaturvedi CP and Nityanand S. Amniotic fluid stem cells ameliorate cisplatin-induced acute renal failure through induction of autophagy and inhibition of apoptosis. **Stem Cell Research & Therapy**, 2019; 10: 370.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. **Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi**, Dalçık H, 10. Baskıdan Çeviri, **Elsevier**, United Kingdom, 2016, s.241-280.
- Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, abbate M, Rottoli D, Angioletti S, Benigni A, Perico N, Alison M and Remuzzi G. Mesenchymal Stem Cells Are Renotropic, Helping to Repair the Kidney and Improve Function in Acute Renal Failure. **Journal of the American Society of Nephrology** 2004; 15(7): 1794-1804.
- Nargesi AA, Lerman LO, Eirin A. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: Current status and looming challenges. **Stem cell research & Therapy** 2017; 8 , 273.
- Ni W, Fang Y, Xie L, Liu X, Shan W, Zeng R, Liu J and Liu X. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Transplantation Alleviates Renal Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy. **J Histochem Cytochem** 2015; 63(11): 842-853.
- Nieuwenhuijs-Moeke GJ, Nieuwenhuijs VB, Seelen MAJ, Berger SP, van den Heuvel MC, Burgerhof JGM, Ottens PJ, Ploeg RJ, Leuvenink HGD, Struys MMRP. Propofol-based anaesthesia versus sevoflurane-based anaesthesia for living donor kidney transplantation: results of the VAPOR-1 randomized controlled trial. **Br J Anaesth** 2017; 118(5): 720-732.
- Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. **Differentiation** 2006; 74:510-8.
- Oğuz E, Yılmaz Z, Ozbilge H, Baba F, Tabur S, Yerer MB, Hekimoğlu A. Effects of melatonin on the serum levels of pro-inflammatory cytokines and tissue injury after renal ischemia reperfusion in rats. **Ren Fail.** 2015; 37(2): 318-22.
- Ostrowska Z, Kos-Kudła B, Swietochowskab E , Marek B, Kajdaniuk D, Ciesielska-Kopacz N. Influence of pinealectomy and long-term melatonin administration on GH-IGF-I axis function in male rats. **Neuro. Endocrinol. Lett.** 2001; 22(4): 255-262.
- Ozan E, Koyutürk L, Sapmaz T. Böbrek iskemi-reperfüzyon hasarında antioksidan olarak prostoglandin E₁(PGE₁) kullanımının incelenmesi: Deneysel Çalışma. **Fırat Tıp Dergisi**, 2004; 9(3):67-71

- Özlülerden Y, Toktaş C, Aybek H, Küçükataş V, Şen Türk N, Zümrütbaş AE. The renoprotective effects of mannitol and udenafil in renal ischemia-reperfusion injury model. **Investig Clin Urol**. 2017;58(4):289-295.
- Önal A, Astarçioğlu H, Örmen M, Atila K, Sarıoğlu S. Sıçandaki renal iskemi-reperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. **Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery Ulus Travma Derg**, 2004; 10(3):160-167.
- Özmen S, Fındıkçioğlu F, Siemionow M. Kök Hücreler. **Türk Plast Rekonstr Est Cer Derg**, 2006; 14(3).
- Pac-Soo CK, Mathew H and Ma D. Ischaemic conditioning strategies reduce ischemia/reperfusion-induced organ injury. **British Journal of Anaesthesia** 2015; 114(2):204-16.
- Panah F, Ghorbanihaghjo A, Argani H, Haiaty S, Rashtchizadeh N, Hosseini I, Dastmalchi S, Rezaeian R, Alirezaei A, Japarpour M, Ahmad SNS, Sanajou D. The effect of oral melatonin on renal ischemia-reperfusion injury in transplant patients: A double-blind, randomized controlled trial. **Continents lists available at Sciencedirect**, 2019; 57, 101241.
- Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. **Am J Physiol**. 1986; 250 (6 Pt 1):G749-53.
- Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. **Lancet**. 2004; 364(9447): 1814–1827.
- Pevet P. Melatonin. **Dialogues Clin Neurosci** 2002; 4(1): 57-72.
- Pınar E. Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin Grafen-Nanofiber Matris üzerinde nöronal farklılaşma potansiyelinin incelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi, **Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı**, İstanbul, 2019, s. 136.
- Rahman M, Shad F, Smith MC. Acute Kidney Injury: A Guide to Diagnosis and Management Am. Dostum. **Phys**. 2012 , 86: 631-639.
- Rashed LA, Elattar S, Eltablawy K, Ashour H, Mahmoud LM, El-Esawy Y. Mesenchymal stem cell pretreated with melatonin ameliorate kidney functions in a rat model of diabetic nephropathy. **Biochem Cell Biol**. 2018; 96(5): 564-571.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Koppisepi S. Medical Implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. **Adv Med Sci**. 2007; 52:11-28.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. **Journal of biomedical science**, 2000; 7(6): 444-58.
- Rodrigues CE, Capha JMC, de Braganca AC, Sanches TR, Gouveia PQ, de Oliveira PAF, Malheiros DMAC, Volpini RA, Santinho MAR, Santana BAA, Calado RT, Noronha IL and Andrade L. Human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells protect against premature renal senescence resulting from oxidative stress in rats with acute kidney injury. **Stem Cell REs Ther**. 2017; 8:19.

Sadek EM, Afifi NM, Elfattah LIA, Monsar MAA. Histological study on effect of mesenchymal stem cell therapy on experimental renal injury induced by ischemia/reperfusion in male albino rat. **International Journal of Stem Cells Vol.** 2013; 6:1.

Sadok I, Gamian A, Staniszevska MM. Chromatographic analysis of tryptophan metabolites. **Journal Of Separation Science**, 2017; 40(15): 3020-3045.

Sağsöz H, Ketani MA. Kök Hücreler. **Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.** 2008; 1(2):29-33.

Santos MD, Favero G, Bonomini F, Stacchiotti A, Rodella LF, Veronese FV, Rezzani R. Oral supplementation of melatonin protects against lupus nephritis renal injury in a pristane-induced lupus mouse model. **Life sciences**, 2018; 193: 242-251.

Set T, Şahin EM. Birinci Basamak Hekimi İçin Böbrek Fonksiyon Testleri. **Sted**, 2003; 12:9, 344-348.

Shi S, Lei S, Tang C, Wang K, Xia. Melatonin attenuates acute kidney ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by activation of the SIRT1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. **Bioscience Reports**, 2019; 39.

Shieh JM, Wu HT, Cheng KC, Cheng JT. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC ζ -Akt-GSK β pathway in hepatic cells. **J Pineal Res.** 2009; 47(4): 339-44.

Shih YC, Lee PY, Cheng H, Tsai CH, Ma H, Tarng DC. Adipose-derived stem cells exhibit antioxidative and antiapoptotic properties to rescue ischemic acute kidney injury in rats. **Plast Reconstr Surg.** 2013; 132: 940e-51e.

Siah KTH, Wong RKM, Ho KY. Melatonin for the treatment of irritable bowel syndrome. **World J Gastroenterol** 2014; 20(10): 2492-2498.

Sinanoğlu O, Sezgin G, Öztürk G, Tuncdemir M, Güney S, Aksungur FB, Yener N. Melatonin With 1,25-Dihydroxyvitamin D $_3$ Protects Against Apoptotic Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat Kidney. **Renal Failure** 2012; 34(8): 1021-1026.

Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. **J Biochem** 1984; 222:1-15.

Solmaz S, Matur İ. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. **Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Arşiv Kaynak Tarama Dergisi**, 2011; 20(3):168-186.

Subramaniam P, Mirunalini S, Dakshayani KB, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine. **J Pineal Res.** 2007; 43(3): 305-12.

Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, Jaber BL. World incidence of AKI: A meta-analysis. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** 2013; 8: 1482-1493.

Şenel F. Böbrek yetmezliği. **Bilim ve Teknik Dergisi**, 2010; 509: 96-99.

Şenel F. Organ nakilleri. **Bilim ve Teknik Dergisi**, 2001; 402: 68-69.

Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. **Klinik Gelişim Derg.** 2009; 22(3):5-14.

ŞenoL ŞP, Tunçtan B. Miyokardiyal ve Renal İskemi/Reperfüzyon Zedelenmesi ve Deneysel Modelleri. **Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi**, 2016; 5(2): 93-109.

Şimşek Ö. Yetişkin kök hücrelerin dünü ve bugünü. **Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.** 2012; 7(3): 231-236.

Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Korkmaz A, Ma S, Rosales-Corral S, Reiter RJ Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. **J Exp Bot.** 2012; 63(2): 577-97.

Tan DX, Manchester LC, Esteban-Zubero A, Zhou Z, Reiter RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: Synthesis and melatonin. **Moleculs** 2015; 20(10): 18886-18906.

Tan DX, Xu B, Zhou X, Reiter RJ. Pineal calcification, melatonin production, aging, associated health consequences and rejuvenation of the pineal gland. **Molecules** 2018; 23(2): 301.

Tatar M. Rat testisinde tunikamisin ile oluşturulan endoplazmik retikulum stresine karşı melatonin kullanımının etkisi. Doktora Tezi, **Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Veteriner)**, Aydın, 2019, s. 144.

Terzi YK, Güran Ş. Kök hücre biyolojisi ve hematolojik malignitelerde kök hücrenin rolü. **Cumhuriyet Tıp Dergisi**, 2012; 34: 235-241.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science** 1998; 282(5391): 1145–1147.

Ural AU. Kök Hücreler. **TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi**, 2006; 5(3-4): 142-143.

Üstünsoy AB. Lipopolisakkarit antijeni ile stimüle edilmiş deneysel tıkanma sarılığı modelinde; karaciğer, böbrek doku NF- κ B düzeyleri ile kan ve doku lipid peroksidasyonu üzerine melatoninin etkisi. Uzmanlık Tezi, **Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı**, Mersin, 2007, s.132.

Valdivielso JM, Crespo C, Alonso JR, Maartinez-Salgado C, Eleno N, Arevalo M, Perez-Barriocanal F and Lopez-Novoa JM. Renal ischemia in the rat stimulates glomerular nitric oxide synthesis. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp physiol** 2001; 280: R771-R779.

Waldhauser F, Ehrhart B, Förster E. Clinical aspects of the melatonin action: Impact of development, aging, and puberty, involvement of melatonin in psychiatric disease and importance of neuroimmunoendocrine interactions. **Experientia** 1993; 49(8): 671-81.

Wu HJ, Yiu WH, Li RX, Wong DW, Leung JC, Chan LY, Zhang Y, Lian Q, Lin M, Tse HF, et al. Mesenchymal Stem Cells Modulate Albumin-Induced Renal Tubular Inflammation and Fibrosis. **PLOS ONE** 2014; 9, e90883

Xie LB, Chen X, Chen B, Wang XD, Jiang R, Lu YP. Protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells modified with klotho on renal ischemia-reperfusion injury. **Renal Failure**, 2019; 41(1): 175-182.

Yapca ÖE, Börekçi B, Süleyman H. Ischemia-Reperfusion Damage. The Eurasian Journal of **Medicine** 2013; 45: 126-127.

Yu HS, Pang SF, Tang PL. Increase in the level of retinal melatonin and persistence of its diurnal rhythm in rats after pinealectomy. **J Endocrinol** 1981; 91(3): 477-81.

Zahran R, Ghozy A, Elkholy SS, El-Taweel F, El-Magd MA. Combination therapy with melatonin, stem cells and extracellular vesicles is effective in limiting renal ischemia-reperfusion injury in a rat model. **International Journal of Urology**, 2020; 27: 1039-1049.

Zayman E. Acetamidridin Testis Toksisitesine Karşı Melattonin ve Vitamin E'nin koruyucu Etkilerinin Araştırılması. Tıpta Uzmanlık Tezi, **İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**, Malatya, 2019, s.128.

Zhang Y, Zhang J, Cui L, Yang S. Autophagy activation attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, 2015; 240(12): 1590-1598.

Zhou H, Wang J, Jiang J, Stavrovskaya IG, Li M, Li W, Wu Q, Zhang X, Lou C, Zhou S, Sirianna AC, Sarkar S, Kristal BS, Friedlander RM, Wang X. N-acetyl-serotonin offers neuroprotection through inhibiting mitochondrial death pathways and autophagic activation in experimental models of ischemic injury. **J Neurosci Off J Soc Neurosci**. 2014; 34(8): 2967-78.