



**PANKREAS ADACIK HÜCRELERİNİN CANLILIĞININ KORUNMASI İÇİN
KİMYASAL YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ**

Sercan MERCAN

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2016

Sercan MERCAN tarafından hazırlanan “PANKREAS ADACIK HÜCRELERİNİN CANLILIGININ KORUNMASI İÇİN KİMYASAL YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Fatma ARSLAN

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI

Kimya, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Kimya, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Servet ÇETE

Kimya, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 27 / 07 / 2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Hadi GÖKÇEN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sercan MERCAN

27.07.2016

PANKREAS ADACIK HÜCRELERİNİN CANLILIĞININ KORUNMASI İÇİN
KİMYASAL YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Sercan MERCAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2016

ÖZET

Tip 1 şeker hastalığının tedavisinde pankreas adacık hücre nakli, bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı şartı ile başarılı bir tedavi yöntemidir. Uzun süre bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçlarının kullanılmasının ciddi yan etkileri bulunmaktadır. Adacık hücrelerinin, bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve sitokin saldırısını engellemek, hem bu ilaçların kullanımını ortadan kaldıracak hem de naklin başarısını arttıracak etmenlerdendir. Bu çalışmada, bağışıklık sistemi saldırılarından adacık hücrelerini korumak için adacık hücrelerinin yüzeyi biyouyumlu polimer olan poli-L-Glutamik asit (PLGA) ve türevleri ile modifiye edildi. Sentezlenen bütün polimerlerin yapıları ¹H-NMR ve FT-IR ile aydınlatıldı. PLGA'nın serbest karboksilik asit grubu *N*-hidroksisüksinimit (NHS) kimyasalı ile aktifleştirildi. Aktifleştirilen PLGA ile adacık hücre yüzeyindeki amin grupları arasında kovalent bağ oluşturuldu ve adacık hücre yüzeyi modifiye edildi. Yüzey modifikasyonu işleminin adacık hücre canlılığı, fonksiyonelliği ve endoplazmik retikulum stresi üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı gözlemlendi. NHS türevi bileşilerinin suda geç çözülme problemini aşmak için *N*-hidroksisülfosüksinimit (sülfo-NHS) kimyasalı kullanıldı. Sülfo-NHS ile aktifleştirilen PLGA kullanılarak adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu işlemi gerçekleşti. Yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıklar sitokin karışımı içeren besiyeri ile 48 saat kültüre edildi. Adacık hücrelerinin % canlılıkları değerlendirildiğinde PLGA ile yüzeyi modifiye edilen adacık hücrelerinin canlılığının kontrol grubundan % 12 daha fazla olduğu gözlemlendi ($p < 0.001$). Yüzey modifikasyonu işleminin gerçekleştiğini floresan grubu bağlanarak sentezlenen PLGA ile ispatlandı. Hücre yüzeyindeki tabaka kalınlığını streptavidin-biyotin etkileşimi ile arttırmanın yüzey modifikasyonu işleminde etkinliği biyositin grubu bağlanarak sentezlenen PLGA ile araştırıldı. Bu etkileşimin adacık hücre fonksiyonelliği olan insülin salınımı üzerine olumsuz etkisinin olduğu gözlemlendi. Çalışmanın *in-vivo* başarısını değerlendirmek için yüzeyi PLGA-sülfo-NHS ile muamele edilen sıçan adacık hücreleri farelerin böbrek kapsülü altına nakil edildi. Kontrol grubunda 11 günlük *in-vivo* başarı gözlenirken PLGA grubunda 17 günlük başarı gözlemlendi.

Bilim Kodu : 20104
Anahtar Kelimeler : Adacık hücresi, Yüzey modifikasyonu, poli-L-Glutamik asit.
Sayfa Adedi : 120
Danışman : Doç. Dr. Fatma ARSLAN

THE DEVELOPMENT OF CHEMICAL METHODS TO PROTECT THE VIABILITY
OF PANCREAS ISLET CELL

(Ph. D. Thesis)

Sercan MERCAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

July 2016

ABSTRACT

Pancreatic islet cell transplantation is a considerable successful treatment method for the treatment of type 1 diabetes with the usage of immune suppressing drugs. However, there are serious side effects of prolonged use of immune suppressing drugs. To prevent the recognition of islet cells by the immune system and to prevent the cytokines attack are the factors, which will both eliminate the use of these drugs and also increase the success of the transplantation. In this study, the surface of islet cells are modified with poly-L-glutamic acid (PLGA), a biocompatible polymer and its derivatives, to protect the islet cells from the immune system attack. The structure of all synthesized polymers was clarified by ¹H-NMR and FT-IR. The free carboxylic acid group of PLGA was activated with *N*-hydroxysuccinimide (NHS) chemicals. A covalent bond was formed between amine groups on the surface of islet cells and activated PLGA, and the surface of islet cells was modified. Any kind of adverse effect of surface modification processes was not found on the viability of the islet cells functionality or endoplasmic reticulum stress. *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) chemical was used to overcome the problem of late disintegration of NHS derivatives component in water. The surface modification of islet cells was done by using PLGA activated by Sulfo-NHS. The modified islets were cultured for 48 hours in medium containing cytokine mixture. By the assessment of the % viability of islet cell viability, it is determined that the viability rates of islet cells with surface modification with PLGA are 12% more than control group ($p < 0.001$). The surface modification process was demonstrated with PLGA synthesized by fluorescence group binding. The operation of increase of layer thickness of cell surface with streptavidin-biotin interaction on surface modification process was studied with PLGA synthesized by connecting biocytin group. Adverse effect of this interaction was found on insulin secretion, which is islet cell functionality. To evaluate the *in-vivo* success of the study, the rat islet cells, whose surface was treated with PLGA-sulfo-NHS, was transplanted under the kidney capsule of mice. A 11-days success was observed in control group, while it was 17-days for PLGA-group.

Science Code : 20104

Key Words : Islet cell, Surface modification, poly-L-Glutamic acid

Page Number : 120

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Fatma ARSLAN

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğiyle her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam Sayın Doç. Dr. Fatma ARSLAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yine bilgi ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan değerli tez izleme komite üyelerim hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a ve hocam Sayın Prof. Dr. Şule PEKYARDIMCI'ya teşekkür ederim. Çalışmalarımı '2214-A- Doktora sırası yurt dışı araştırma bursu' ve '3001- Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı' ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Mürsel ÇALIŞKAN, Mehmet Sedat FEYAT, Safiye BÖYÜK, İbrahim ULUSOY, Ziya KARAKULLUKÇU, Adacell araştırma laboratuvarı ve Aziz Sancar araştırma merkezi yönetimi ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim. Her türlü desteğiyle ve sevgisiyle bana güç veren eşim Yeliz MERCAN'a ve kızım Elif MERCAN'a teşekkür ederim. Eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli babam Mehmet MERCAN, annem Fatma MERCAN, kardeşim Serhat MERCAN'a ve Mürsel DEMİR'e en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xiii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Şeker Hastalığı Tipleri	3
2.1.1. Tip 1 şeker hastalığı.....	3
2.1.2. Tip 2 şeker hastalığı.....	8
2.1.3. Gestasyonal şeker hastalığı	9
2.2. İnsan Pankreası.....	9
2.2.1. Ekzokrin pankreas	10
2.2.2. Endokrin pankreas	10
2.3. Biyoyapay Pankreas	15
2.4. Konformal Kaplama Yöntemi ile Adacık Hücrelerinin Yüzey Modifikasyonu.	18
2.4.1. Adacık hücre yüzey modifikasyonu yöntemleri	18
2.4.2. Aracı moleküller ile biyoaktif maddelerin immobilizasyonu	25
2.5. Poli-aminoasitler	26
2.5.1. Poli(L- glutamik asit) (PLGA)	26

	Sayfa
2.6. Endoplazmik Retikulum ve Endoplazmik Retikulum Stresi	27
2.6.1. Protein kinaz RNA (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK).....	28
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI	29
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	35
4.1. Deneysel Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	36
4.2. Deneysel Kullanılan Çözeltiler.....	38
4.2.1. Kolajenaz tip 5 çözeltisi	38
4.2.2. HBSS (+) çözeltisi.....	38
4.2.3. RPMI 1640 (+) çözeltisi.....	38
4.2.4. Stok Floresein diasetate çözeltisi (24 µM).....	38
4.2.5. Stok Propidiyum İyodür çözeltisi (750 µM).....	38
4.2.6. 3,3 mM ve 16,7 mM glukoz içeren RPMI 1640 çözeltileri	38
4.2.7. 3,3 mM ve 16,7 mM glukoz içeren Krebs çözeltileri	38
4.2.8. MES tampon çözeltisi	39
4.2.9. Tris çözeltisi	39
4.2.10. Stacking çözeltisi (2X).....	39
4.2.11. Resolving tamponu (3X).....	39
4.2.12. Transfer çözeltisi (5X)	40
4.2.13. Transfer tamponu (SDS ilavesiz) (10X)	40
4.2.14. Yürütme tamponu (5X).....	40
4.2.15. Yükleme çözeltisi (Laemlie) (5X)	40
4.2.16. Stripping tamponu	40
4.2.17. TBST çözeltisi (5X)	40
4.2.18. TBS çözeltisi (1X).....	41

Sayfa

4.2.19. TBE çözeltisi (5X)	41
4.2.20. RIPA tamponu.....	41
4.2.21. Sitokin çözeltilerinin hazırlanması.....	41
4.3. Deneyleerde Kullanılan Cihazlar	41
4.4. Deneysel Aşamalar.....	42
4.4.1. Sıçanlardan pankreas adacık hücre izolasyonu	42
4.4.2. Adacık hücrelerinin canlılıklarının değerlendirilmesi	45
4.4.3. Adacıkların statik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımlarının belirlenmesi.....	47
4.4.4. Poli-L-Glutamik asit-NHS sentezi	48
4.4.5. pH'sı 8 olan HBSS içerisinde Poli-L-Glutamik asit-NHS'in hazırlanması	48
4.4.6. Poli-L-Glutamik asit-NHS ile adacık hücrelerinin muamele edilmesi	48
4.4.7. Western blot analizi ile endoplazmik retikulum stresinin belirlenmesi ...	49
4.4.8. Poli-L-Glutamik asitin sodyum tuzunun (MA 50000-100000) poli-L-glutamik asite (PLGA) dönüştürülmesi	50
4.4.9. Poli-L-Glutamik asitin (PLGA) N-Hidroksisülfosüksinimit ile aktifleştirilmesi.....	50
4.4.10. Sülfö-NHS ile aktifleştirilen PLGA ile adacık hücre yüzey modifikasyonu.....	51
4.4.11. Sülfö-NHS ile aktifleştirilen PLGA ile adacık hücre yüzey modifikasyonu yapılan adacıkların sitokinlere maruz bırakılması	52
4.4.12. Sülfö-NHS ile aktifleştirilen PLGA polimerine fluoressan grup takılması	52
4.4.13. Fluoressan grup takılan sülfö-NHS ile aktifleştirilen PLGA polimerinin adacık hücre yüzeyine bağlandığının tespiti.....	53
4.4.14. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin Sentezi.....	53

Sayfa

4.4.15. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin ile adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu.....	56
4.4.16. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile adacık hücrelerinin yüzeyi kaplandığının ispatı	57
4.4.17. Pankreas adacık hücrelerinin yüzeyinin modifikasyon yüzdesinin belirlenmesi	58
4.4.18. Sülfö-NHS ile aktifleştirilen PLGA nın belirlenen uygun derişimi ile kaplanan adacık hücreleri diyabetli farelerin böbrek kapsülü altına nakli.....	61
4.5. İstatiksel Analiz.....	62
5. SONUÇLAR.....	63
5.1. Adacık Hücrelerinin PLGA-NHS ile Yüzey Modifikasyonu İşleminin Sonuçları	64
5.1.1. Adacık hücrelerini % canlılık sonuçları	64
5.1.2. Glukoz Stimülasyonu Testi Sonuçları.....	66
5.1.3. Endoplasmik retikulum stresi sonuçları	67
5.2. Sentezlenen Poli-L-Glutamik Asit Türevlerinin Karakterizasyonu	69
5.2.1. Poli-L-Glutamik asit sodyum tuzu'nun karakterizasyonu	69
5.2.2. Poli-L-Glutamik asit'in karakterizasyonu	71
5.2.3. Poli-L-Glutamik asit-N-hidroksisülfosüksinimit'in (PLGA-Sülfö-NHS) karakterizasyonu	72
5.2.4. Poli-L-Glutamik asit-N-hidroksisülfosüksinimit-Floresein Glisin Amit'in (PLGA-Sülfö-NHS-FGA) karakterizasyonu	74
5.2.5. Poli-L-glutamik asit-N-hidroksisüksinimit'in (PLGA-NHS) karakterizasyonu	76
5.2.6. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin'in (PLGA-Biyositin) karakterizasyonu..	78
5.3. Farklı Derişimlerde PLGA-Sülfö-NHS ile Yüzey Modifikasyonu Gerçekleşen Adacıkların % Canlılık Sonuçları	80
5.4. Farklı Derişimlerde PLGA-Sülfö-NHS ile Yüzey Modifikasyonu Gerçekleşen Adacıkların Stimülasyon İndeksi Sonuçları.....	83

Sayfa

5.5. Floresan Grup Bağlanan Sülfö-NHS ile Aktifleştirilen PLGA Polimerinin Adacık Hücre Yüzeyine Bağlandığının Tespiti	84
5.6. Biyositin Grubu Bağlanan PLGA ile Yüzeyi kaplanan adacık hücrelerinin % canlılık sonuçları	85
5.7. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzeyi Modifiye Edilen Adacık Hücrelerinin Stimülasyon İndeksi Sonuçları	87
5.8. Adacık Hücrelerinin Yüzeyinin Biyotiniendiğinin İspatı	88
5.9. Pankreas Adacık Hücrelerinin Yüzeyinin Modifikasyon Yüzdesinin belirlenmesi sonuçları	89
5.10. Diyabetli Farelerin Böbrek Kapsülü Altına Gerçekleştirilen Adacık Hücre Nakli Sonrası Farelerin Kan Glukoz Değerleri	91
5.10.1. Adacık grubu farelerinin kan glukozu değerleri	91
5.10.2. Yüzeyi PLGA modifiye adacık grubu farelerinin kan glukozu değerleri.....	91
5.10.3. Kontrol grubu farelerinin kan glukozu değerleri.....	92
5.10.4. Diyabetli grubu farelerinin kan glukozu değerleri	92
5.10.5. 4 farklı gruptaki farelerin ortalama kan glukozu değerleri	92
6. TARTIŞMA VE SONUÇLARIN YORUMU	99
KAYNAKLAR	107
EKLER.....	117
EK-1. Hayvan deneyleri yerel etik kurul kararı (Sıçan)	118
EK-2. Hayvan deneyleri yerel etik kurul kararı (Fare)	119
ÖZGEÇMİŞ	120

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Pankreas ekzokrin enzimleri	10
Çizelge 2.2. Pankreas adacık hücresindeki hücrelerin adı ve salgıladığı hormonlar	11
Çizelge 4.1. Deneyleerde kullanılan kimyasalların listesi	40
Çizelge 5.1. FDA ve PI ile boyanmış olan adacık hücrelerinin MAT-LAB programı ile analiz edilen canlılıkları	65
Çizelge 5.2. Adacıkların izolasyondan sonra, 24 ve 48 saat kültürden sonraki stimülasyon indeksi sonuçları	66
Çizelge 6.1. PLGA-sülfo-NHS ile yüzeyi modifiye edilen adacıkların normal ve sitokinli besiyeri ile 48 saat kültür işleminden sonra % canlılıklarının kontrol grubundaki adacıklar ile karşılaştırılması.....	101
Çizelge 6.2. PLGA-Biyositin ile yüzeyi modifiye edilen adacıkların normal ve sitokinli besiyeri ile 48 saat kültür işleminden sonra % canlılıklarının kontrol grubundaki adacıklar ile karşılaştırılması.....	102

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Pankreas'ın donörden alınması, laboratuvara taşınması, sindirimi, saflaştırılması, kültüre edilmesi ve naklinin şematik gösterimi	8
Şekil 2.2. Beta hücreleri içerisine glukozun girişi ve insülinin salgılanma mekanizması	13
Şekil 2.3. Amin reaktif moleküllerin hücre yüzeyindeki primer aminler ile kovalent bağlanma tepkimeleri	19
Şekil 2.4. <i>N</i> -hidroksisüksinimit'in ve <i>N</i> -hidroksisülfosüksinimit'in kimyasal yapısı. ...	20
Şekil 2.5. Karboksilat gruplarının EDC ve NHS / sülfon-NHS ile aktifleştirilme, amin molekülleri ile kararlı amit bağı oluşturma tepkimeleri	21
Şekil 2.6. Tiyol reaktif moleküllerin hücre yüzeyindeki tiyoller ile kovalent tepkimeleri	22
Şekil 2.7. A. Galaktoz oksidaz ile hücre yüzeyindeki galaktoz grubunun aldehit grubuna dönüş tepkimesi. B. Periyodat ile hücre yüzeyindeki siyalik asit gruplarının aldehit grubuna dönüş tepkimesi. Her iki tepkime sonucu oluşan aldehit grupları hidrazit grubu ile hidrazon bağı, alkoksiamin grubu ile oksim bağı oluşturur.	23
Şekil 2.8. A. PEG-Lipit türevlerinin kimyasal yapısı, B. . PEG-lipit'in hücre yüzeyine hidrofobik etkileşim ile tutunması	24
Şekil 2.9. Pankreas adacık hücre yüzeyinin tabaka-tabaka yöntemi ile modifikasyonu	25
Şekil 2.10. Aracı moleküller ile biyoaktif moleküllerin immobilizasyonu	26
Şekil 2.11. Poli(L-glutamik asit)'in yapısı.....	27
Şekil 2.12. ER stresi esnasında PERK'in eIF2 α 'yı fosforlama işlemi.....	28
Şekil 3.1. Adacıkların PEG ile kaplanması.....	29
Şekil 3.2. a) Biotin-PEG-GLP-1 (7-37) sentezi. b) Biotin-PEG-NHS'in proteinlerindeki amin grupları ile NHS grubu arasındaki kovalent reaksiyon ile adacık yüzeyine tutunması. Daha sonra, biyotin ve streptavidinin birbirlerine olan yüksek affinitesi ile streptavidinin biyotine tutunması ile biotin-PEG-GLP-1 in Streptavidine tutunması	30
Şekil 3.3. Adacık hücre yüzey biyotinleme yöntemleri.....	31
Şekil 4.1. PLGA-NHS sentez reaksiyonu	47

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Adacık hücrelerinin poli-L-Glutamik asit ile kovalent modifikasyonu.....	48
Şekil 4.3. PLGA-Na un asidik forma dönüşüm reaksiyonu.....	49
Şekil 4.4. PLGA-Sülfo-NHS sentez reaksiyonu	50
Şekil 4.5. PLGA-Sülfo-NHS ile adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu	51
Şekil 4.6. PLGA-FGA sentez reaksiyonu	52
Şekil 4.7. PLGA-Na un asidik forma dönüşüm reaksiyonu.....	53
Şekil 4.8. PLGA-NHS sentez reaksiyonu	54
Şekil 4.9. PLGA-Biyositin sentezi.....	55
Şekil 4.10. Adacık hücre yüzeyinin biyotinlenme, streptavidinlenme ve PLGA-Biyositin ile kaplanma işlemlerinin şematik gösterimi	56
Şekil 4.11. Adacık hücre yüzeyinin biyotindendiğinin ispatı olarak streptavidin-FITC ile muamelesinin şematik gösterimi.....	57
Şekil 4.12. Adacık hücre yüzeyinin kaplandığının 1. ispat yönteminin şematik gösterimi	59
Şekil 5.1. Adacıkların izolasyondan sonra, 24 ve 48 saat kültürden sonraki canlılıkları.	65
Şekil 5.2. Adacıkların izolasyondan sonra, 24 ve 48 saat kültürden sonraki stimülasyon indeksi sonuçları.	66
Şekil 5.3. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Ser51 üzerinden eIF2 α fosforilasyonu (p-eIF2 α) ve toplam eIF2 α protein miktarlarının β -Aktin protein ile normalize edilmesi.	68
Şekil 5.4. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Thr980 üzerinden PERK fosforilasyonu (p-PERK) ve toplam PERK protein miktarlarının β -Aktin protein ile normalize edilmesi.	69
Şekil 5.5. Poli-L-Glutamik asit sodyum tuzu'nun FT-IR görüntüsü	70
Şekil 5.6. Poli-L-Glutamik asit'in ¹ H-NMR görüntüsü	70
Şekil 5.7. Poli-L-Glutamik asit'in FT-IR görüntüsü.....	71

Şekil	Sayfa
Şekil 5.8. Poli-L-Glutamik asit'in ¹ H-NMR görüntüsü.....	72
Şekil 5.9. Poli-L-Glutamik asit-N-hidroksisülfosüksinimit'in (PLGA-Sülfo-NHS) FT-IR görüntüsü.....	73
Şekil 5.10. Poli-L-Glutamik asit-N-hidroksisülfosüksinimit'in (PLGA-Sülfo-NHS) ¹ H-NMR görüntüsü.....	74
Şekil 5.11. PLGA-Sülfo-NHS-FGA'nın FT-IR görüntüsü.....	75
Şekil 5.12. PLGA-Sülfo-NHS-FGA'nın ¹ H-NMR görüntüsü.....	76
Şekil 5.13. Poli-L-Glutamik asit-N-hidroksisüksinimit'in (PLGA-NHS) FT-IR görüntüsü.....	77
Şekil 5.14. Poli-L-Glutamik asit-N-hidroksisüksinimit'in (PLGA-NHS) ¹ H-NMR görüntüsü.....	78
Şekil 5.15. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin'in (PLGA-Biyositin) FT-IR görüntüsü	79
Şekil 5.16. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin'in (PLGA-Biyositin) ¹ H-NMR görüntüsü..	80
Şekil 5.17. Farklı derişimlerde PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıkların % canlılık sonuçları.....	81
Şekil 5.18. Farklı derişimlerde PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıkların % canlılıklarının istatistik sonuçları.....	81
Şekil 5.19. PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıkların stimülasyon indeksi sonuçları	82
Şekil 5.20. PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıkların stimülasyon indekslerinin istatistiksel analiz sonuçları.....	83
Şekil 5.21. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzey modifikasyonu yapılan adacık hücrelerinin % canlılık sonuçları.....	84
Şekil 5.22. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzey modifikasyonu yapılan adacık hücrelerinin % canlılık istatistiksel analiz sonuçları	86
Şekil 5.23. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzey modifikasyonu yapılan adacık hücrelerinin stimülasyon indeksi sonuçları	87
Şekil 5.24. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzey modifikasyonu yapılan adacık hücrelerinin stimülasyon indeksinin istatistiksel analiz grafiği	88
Şekil 5.25. Adacık hücrelerinin yüzeyine bağlanan HRP enzimi tarafından kullanılan substratın OD değerleri	90

Şekil	Sayfa
Şekil 5.26. Adacık grubu farelerinin 30 Günlük kan glukozu değerleri (mg/dL).....	93
Şekil 5.27. Yüzeyi PLGA modifiye adacık grubu farelerinin 30 günlük 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL)	94
Şekil 5.28. Kontrol grubu farelerinin 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL).....	95
Şekil 5.29. Diyabet grubu farelerinin 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL)	96
Şekil 5.30. 4 farklı gruptaki farelerinin 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL)	97



RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. İnsan pankreasının anatomik yapısı	9
Resim 2.2. Pankreas adacık hücresinin yapısı	11
Resim 2.3. İnsülin'in yapısı	12
Resim 2.4. Glukagonun'un yapısı	14
Resim 2.5. Somatostatin hormonunun molekül formülü	14
Resim 2.6. Adacık hücrelerinin yarı-geçirgen membran ile enkapsülasyonu.....	16
Resim 2.7. Biyoyapay pankreas tipleri	16
Resim 2.8. Enkapsülasyon boyutlarının karşılaştırılması	17
Resim 2.9. Adacık hücre yüzey modifikasyon yöntemleri	18
Resim 4.1. Sıçan pankreas adacık hücre izolasyonunda yapılan cerrahi işlemler. A. Sıçan'ın dış derisinin kesilmesi işlemi, B. Pankreasın duktus kanalından kolajenaz enziminin enjeksiyonu	44
Resim 4.2. İzole edilen adacık hücrelerinin ışık mikroskobu altında 20X görüntüsü	45
Resim 4.3. Adacık hücrelerinin canlılık değerlendirilmesinde kullanılan FDA (A) ve PI (B) boyalarının adacık hücre içerisindeki ışımaları	46
Resim 4.4. MAT-LAB programı ile canlılığı hesaplanan adacık hücreleri	47
Resim 5.1. Adacık hücrelerinin floresan mikroskobu altındaki görüntüleri A. Adacık hücrelerinin beyaz ışık altındaki görüntüsü. B. Adacık hücrelerinin FDA ile boyanarak mavi floresan ışık altındaki görüntüsü. C. PI ile boyanan adacık hücrelerinin yeşil floresan ışık altında çekilen görüntüsü	64
Resim 5.2. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleştiren adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Ser51 üzerinden eIF2 α fosforilasyonu (p-eIF2 α) ve toplam eIF2 α protein miktarları.....	67
Resim 5.3. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleştiren adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Thr980 üzerinden PERK fosforilasyonu (p-PERK) ve toplam PERK protein miktarları	68

Resim	Sayfa
Resim 5.4. PLGA-sülfo-NHS-FGA ile yüzey modifikasyonu yapılan hücrelerin görüntüsü. A. Yüzey modifikasyonunun yapıldığı gün floresan mikroskobu görüntüsü, B. Yüzey modifikasyonu yapılan adacıkların kültürün 10. gününde alınan örneğin floresan mikroskobu görüntüsü.	85
Resim 5.5. Adacık hücrelerinin yüzeyinin biyotinlendiğinin ispatı. Adacık hücreleri biyotinlendikten sonra streptavidin-FITC ile muamele edildi. A. Adacıkların yüzey modifikasyonu yapıldıktan sonraki floresan görüntüsü, B. Adacıkların yüzey modifikasyonu yapıldıktan 30 gün sonraki floresan görüntüsü.	89
Resim 5.6. Pankreas adacık hücrelerinin yüzeyinin modifikasyon yüzdesinin belirlenmesi için yapılan deneysel işlemlerin görüntüsü.	89



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ϵ	Epsilon
γ	Gama
cm^{-1}	Absorbsiyon piki
ppm	milyon başına pay

Kısaltmalar

Açıklamalar

CITR	Uluslararası Adacık Hücre Nakli
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Floresein diasetat
FGA	Floresein Glisin Amit
HBSS	Hank'in Dengeli Tuz Çözeltisi
PLGA	Poli-L-Glutamik asit
PI	Propidyum iyodür
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

1. GİRİŞ

Şeker hastalığı (Diabetes Mellitus, DM), binlerce yıldır bilinen bir rahatsızlıktır. Diabetes kelimesi Kapadokya'da yaşamış olan Areteus tarafından koyulmuş bir antik yunan kelimesidir ve idrara geçen anlamındadır. Mellitus kelimesi ise tatlı idrar ile ilişkili olan Latince tatlı baldan gelmektedir [1]. Şeker hastalığı, pankreas adacık hücrelerindeki beta hücrelerinden insülin salgılanmasının, insülinin etkisinin ya da bunların kombinasyonlarının bozulmasından kaynaklanan ve kan glukoz seviyesinin yükselmesi ile karakterize edilen bir kronik metabolik hastalık grubudur [2]. Bu hastalık, tüm dünyada önemli bir sağlık problemidir. Yaşam süresini ortalama 15 yıl azaltmaktadır. Kalp-damar hastalık riskini iki ile dört kat arttırmakta, hipertansiyon, sinir sistemi rahatsızlıkları, diş problemleri, hamilelik sorunları, böbrek yetmezliği ve erişkin başlangıçlı körlük gibi birçok hastalığa neden olmaktadır [3].

Pankreas adacık hücreleri pankreasın endokrin işlevini gören ve vücut için önem arz eden hormonların salgılandığı bir hücre türüdür [4]. Adacık hücresinin bu önemi fonksiyonelliği şeker hastalığı ortaya çıktığında daha belirgin hale gelmektedir.

Tip 1 şeker hastalığı için rutin olarak kullanılan insülin tedavisi tek başına adacık hücresinin sağladığı fonksiyonelliği sağlayamamaktadır [5]. Adacık hücre nakli ile gerçekleşen tedavi yöntemi, şeker hastasında kaybolan hücrelerin tekrar vücutta yer alması sonucu ile daha başarılı bir tedavi yöntemidir. Adacık hücre nakli için vücutta çeşitli nakil bölgeler aranmakta ve şu an için en uygun karaciğer ön görüldüğü için nakiller karaciğere yapılmaktadır [6]. Ancak nakil edilen adacık hücrelerinin yaklaşık olarak % 50'lik bir kısmı nakil sonrası ölmektedir [7-9] . Bu kaybın çeşitli nedenleri bulunmaktadır. Bunlar; adacık hücrelerinin hemen damarlanamaması, nakil bölgesindeki oksijenin yetersizliği, hücrelerin yeni ekstra selüler ortama geç adaptasyonu, bağışıklık sistemi saldırısı gibi nedenlerdir [10]. Bunların içerisinde en önemlilerinden biri olan bağışıklık sistemi saldırısı, nakil edilen hücrelerin vücut tarafından yabancı algılanması sonucu ortaya çıkmaktadır. Buna neden olan ise adacık hücrelerinin yüzey antiijenleridir. Bağışıklık sisteminin saldırısını engellemek için bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçlar kullanılsada bunların vücutta başka sorunlara neden olduğu belirtilmektedir [11].

Adacık hücrelerinin yüzey antijenlerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engellemeye yönelik biyoyumlu yarı geçirgen bir membran içerisine hapsedilmesi işlemleri biyoyapay pankreas olarak tanımlanmaktadır. Adacık hücrelerinin makroenkapsülasyonu ve mikroenkapsülasyonu biyoyapay pankreas tiplerini oluşturmaktadır. Biyoyapay pankreas tiplerinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlardan en önemlisi, adacık hücrelerinin kapsüllenmesi sonrası hacimlerinin artması ve sonucunda nakil edilme zorluğunun yaşanmasıdır. Bu problemi aşmak için, biyoyapay pankreasa alternatif olarak adacık hücrelerinin yüzeyinin konformal kaplanması yöntemi kullanılmaktadır [12]. Konformal kaplama nanoboyutta olduğundan hacim artışı olmamaktadır. Konformal kaplama yönteminde adacık hücrelerinin yüzey antijenleri biyoyumlu polimerler kullanılarak modifiye edilmektedir [13]. Adacık hücre yüzey modifikasyonu; kovalent bağlanma, elektrostatik etkileşim veya hidrofobik etkileşim yöntemleri ile gerçekleştirilmekte ve adacık hücre yüzey antijenlerini maskelenmektedir [14]. Bu yöntemler kullanılarak ve iyileştirmeler yapılarak adacık hücrelerinin bağışıklık sistemi saldırılarına karşı canlılığı arttırılmaya çalışılmaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, adacık hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engellemek için adacık hücre yüzeyi kovalent bağlanma yöntemiyle modifiye edildi. Modifikasyon işlemi için biyoyumlu polimer olan ve daha önce adacık hücre yüzey modifikasyonu işleminde kullanılmayan poli-L-Glutamik asit (PLGA) kullanıldı. PLGA'nın serbest karboksilik asit grubu aktifleştirdikten sonra adacık hücre yüzeyindeki kolajen tabakada bulunan amin grupları ile kovalent bağ oluşturması sağlandı. Adacık hücre yüzeyinin modifiye edildiği floresan grup takılı olan poli-L-Glutamik asit ile belirlendi. Yüzey modifikasyonu işleminin endoplazmik retikulum stresine neden olup olmadığı değerlendirildi. Adacık hücre yüzey modifikasyonu işleminde yüzeyin tabaka kalınlığının arttırılmasının etkinliği biyotin-streptavidin etkileşiminden yararlanılarak incelendi. *In-vitro* çalışmalar tamamlandıktan sonra yüzey modifikasyonu işleminin bağışıklık sistemi saldırılarına karşı koruma başarısı *in-vivo* nakil çalışmaları ile değerlendirildi. *In-vivo* çalışmada, sıçanlardan izole edilen yüzeyi modifiye adacık hücreleri diyabetli farelere nakil edildi ve farelerin kan glukoz değerleri takip edilerek nakil başarısı değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

Uluslararası diyabet federasyonunun (IDF) verilerine göre, 2015 yılında dünyada yaklaşık olarak 415 milyon diyabetli yaşadığı ve önlem alınmazsa 2040 yılına gelindiğinde bu sayının 642 milyona çıkacağı düşünülmektedir. Yaklaşık 5 milyon kişinin şeker hastalığından öldüğü ve sağlık harcamaları ile ilişkili yıllık maliyetin erişkinlerde 673 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir [15].

Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2000 yılında Türkiye’de 2.920.000 diyabetli bulunduğu belirlenmiş olup bu sayının 2030 yılında 6.442.000 olacağı düşünülmektedir.

Şeker hastalığının 3 ana tipi vardır [15]. Bunlar; Tip 1 şeker hastalığı, Tip 2 şeker hastalığı ve Gestasyonel şeker hastalığıdır.

2.1. Şeker Hastalığı Tipleri

2.1.1. Tip 1 şeker hastalığı

Tip 1 şeker hastalığı, insüline bağımlı şeker hastalığı olarak da bilinir. Her yaşta tespit edilebilmesine rağmen erken çocukluk ve genç erişkin başlangıçlıdır. Pankreasın adacık hücrelerindeki insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün hasarlanması sonucu ortaya çıkmaktadır. Şeker hastalığı vakalarının yaklaşık %5 ila 10’nu oluşturur [16, 17].

Tip 1 şeker hastalığının patojenezi bir otoimmün yanıt olduğunu göstermektedir. Bu hastalığı tetikleyen mekanizma halen bilinmemektedir, fakat genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu öngörülmektedir. Pankreas adacık hücrelerindeki beta hücrelerinde doğal olarak açığa çıkan proteinlere karşı kişinin T hücreleri duyarlılaşır ve immün sistem, pankreas adacık hücrelerinin harabına yol açacak spesifik bir atağa başlar. GAD65, insülin ve ZnT8 de içeren birçok protein tanımlanmıştır [18, 19].

Yakın zamana kadar, Tip 1 şeker hastalığı için mevcut tedavi ekzojen insülin tedavisi olarak bilinmekteydi. Ancak, Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları Araştırması (DCCT) göstermiştir ki, insülin yerine koyma tedavisi şeker hastalığı ilişkili komplikasyonları

geciktirebilmesine rağmen tamamen ortadan kaldıramamaktadır ve zamanla ikincil sağlık problemlerinin gelişmesine neden olmaktadır [11]. Kan glukoz seviyesinin düşürülmesi için çok fazla insülin kullanımı da hipoglisemik ataklara neden olabilmektedir [20]. Bu ataklar ketoasidozis ile tanımlanabilmektedir. Hipoglisemik ataklar komaya hatta ölüme yol açabilmektedirler. Mikrodamarların zarar görmesinden dolayı körlük, periferik nöropati ve kardiyovasküler komplikasyonlar gibi birçok sekonder hastalıklara da neden olmaktadır.

Uygun beta hücre tedavisi için hem deneysel hem de kliniksel metotlar bulunmaktadır. Bunlardan ilki klinik olarak başarı ile uygulanan pankreas nakli, diğeri ise pankreas adacık hücre naklidir.

Tip 1 şeker hastalığı tedavisinde pankreas nakli

Pankreasın ilk klinik nakli 1966 yılında Minnesota üniversitesinde yapılmıştır. İlk altı aylık sonuçlarda % 5'ten daha az nakil başarısı elde edilmiştir. Bu olumsuz sonucun başarısını arttırmak için uygulanan immün sistem baskılayıcı ilaçlara mikofenolat mofetil ve takrolimus'da eklenmiştir. 1 yıllık pankreas nakil başarısı % 20'den % 80'e artmıştır. Uluslar arası pankreas nakil kayıtlarına göre 2010 yılının sonuna kadar 35.000'den daha fazla pankreas nakli yapılmıştır. Bunlardan 24.000 kadarı Amerika'da 12.000 kadarı diğer ülkelerde yapılmıştır. Amerika'da böbrek nakli ile birlikte yapılan pankreas nakillerinde, nakilden sonraki ilk yılda başarı oranı % 86 iken beş yılda % 60 oranına düştüğü gözlenmiştir [21].

Pankreas nakli avantajlı ve başarılı bir tedavi yöntemidir. Ancak, ciddi cerrahi operasyon yan etkilerine yol açması, nakil sonrası erken dönemde damarların içerisinde pıhtı oluşumunun gözlenmesi, oniki parmak barsağında sızıntıların olması, pankreas çevresinde sıvı toplanması, hastanede kalma süresinin uzun süreli ve maliyetli olması, her pankreasın nakil edilememesi gibi birçok dezavantaja da sahiptir [22].

Tip 1 şeker hastalığı tedavisinde adacık hücre nakli, adacık hücre naklinin tarihsel gelişimi, güncel durumu ve yöntemi

Adacık hücre nakli

Pankreas adacık hücre nakli, vericiden alınan pankreasa çeşitli kimyasal ve mekanik işlemler uygulayarak elde edilen adacıkların alıcıya naklini içeren bir tedavi yöntemidir. Pankreas nakli ile karşılaştırıldığında, adacık hücre naklinin daha kolay ve basit olması, uygulanan cerrahi yöntemin güvenli, minimum operasyon alanının olması ve nakil ilişkili ölüm ve hastalıkların olmaması, nakil sonrası doku uyumu sonucu doku reddinin daha az olması, ihtiyaç duyulduğunda operasyonun birkaç kez daha tekrarlanabilmesi, uzun süreli c-peptit pozitiflik gözlenmesi, şiddetli ve sık hipoglisemik atakların ortadan kalkması, yaşam kalitesinin artması, kronik komplikasyonlarda gerileme ve stabilizasyon gözlenmesi gibi birçok olumlu yanıt adacık hücre nakli tedavisinin başarı kriterlerini oluşturmakta ve bu yöntemin uygulanmasına yönelik katkı sağlayan faktörleri oluşturmaktadır.

Tarihsel gelişimi ve güncel durumu

1893 yılında Watson-Williams ve Harshant tarafından, kıyılmış koyun pankreasının diyabetik ketoasidozlu genç bir hastanın uyluk kısmına nakli ile ilk adacık hücre nakli rapor edilmiştir. Hastanın 24 saat içerisinde geçici olarak glikozürisi artmasına rağmen, bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçların olmaması ve nakil edilen bölgenin damarlanmasının az olması nedenleriyle nakil başarısız olmuştur [23].

1921 yılında Best ve Banting, pankreas transplantasyon deneylerini bıraktıktan sonra 'şekerle ilgili madde' olarak tanımladıkları insülini keşfettiler [24].

1923'ten itibaren insülin'in kullanımında hipoglisemik insülin reaksiyonları rapor edilmesine rağmen, insülin 1970'lere kadar insülin eksikliği için tek tedavi olarak kalmıştır.

1965 yılında Moskalewski, glukozun insülin salınımına etkisinin olup olmadığını *in-vitro* incelerken, kolajenaz enzimi ile enzimatik parçalama ile pankreasın mekanik parçalamasını birleştirerek kobay adacık hücrelerini izole edebildi [25].

1967 yılında Lacy, pankreası intraduktal şişirme yöntemini kullanarak adacık hücre izolasyonu gerçekleştirmişlerdir [26].

1969 yılında Lindall ve arkadaşları, yoğunluk gradiyent yöntemi kullanarak adacık hücrelerini saflaştırmışlardır [27].

1972 yılında Ballinger ve Lacy, normal ratlardan adacık hücre izole ettikten sonra bu hücreleri streptozitosin ile indüklenmiş diyabetli ratlara nakil ederek başarı sağlamışlardır [28].

1980 yılında başlangıç denemesi olarak Najarian ve arkadaşları, ağırlı kronik pankreatitli 10 hastanın pankreaslarını çıkarıp, izole ettikleri adacıkları saflaştırmadan portal venden otogreft nakil yapmışlardır. İnsülin bağımsızlık sadece 3 hastada sırasıyla 1, 9 ve 38 ay sağlanmıştır [29].

1981 yılında Horaguchi ve arkadaşları, pankreasa duktus kanalı aracılığıyla kolajenaz enzimi enjekte ederek adacık hücre izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir [30].

1984 yılında Gray, geniş bir yelpazede adacık hücre izolasyonu gerçekleştirmiştir [31].

1992 yılında Pyzdrowski, 265.000 adacık nakil ederek insülin bağımsızlık sağlamıştır [32].

2000 yılında Shapiro ve arkadaşları tarafından, Edmonton protokolü olarak bilinen glukokortikoid içermeyen bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaç kullanımı ile 7 diyabetli hastaya adacık hücre nakli yapılmış. Uygulanan bu protokol sonucunda 1 yılda insülin bağımsızlık % 10 olarak gözlenmiştir [33].

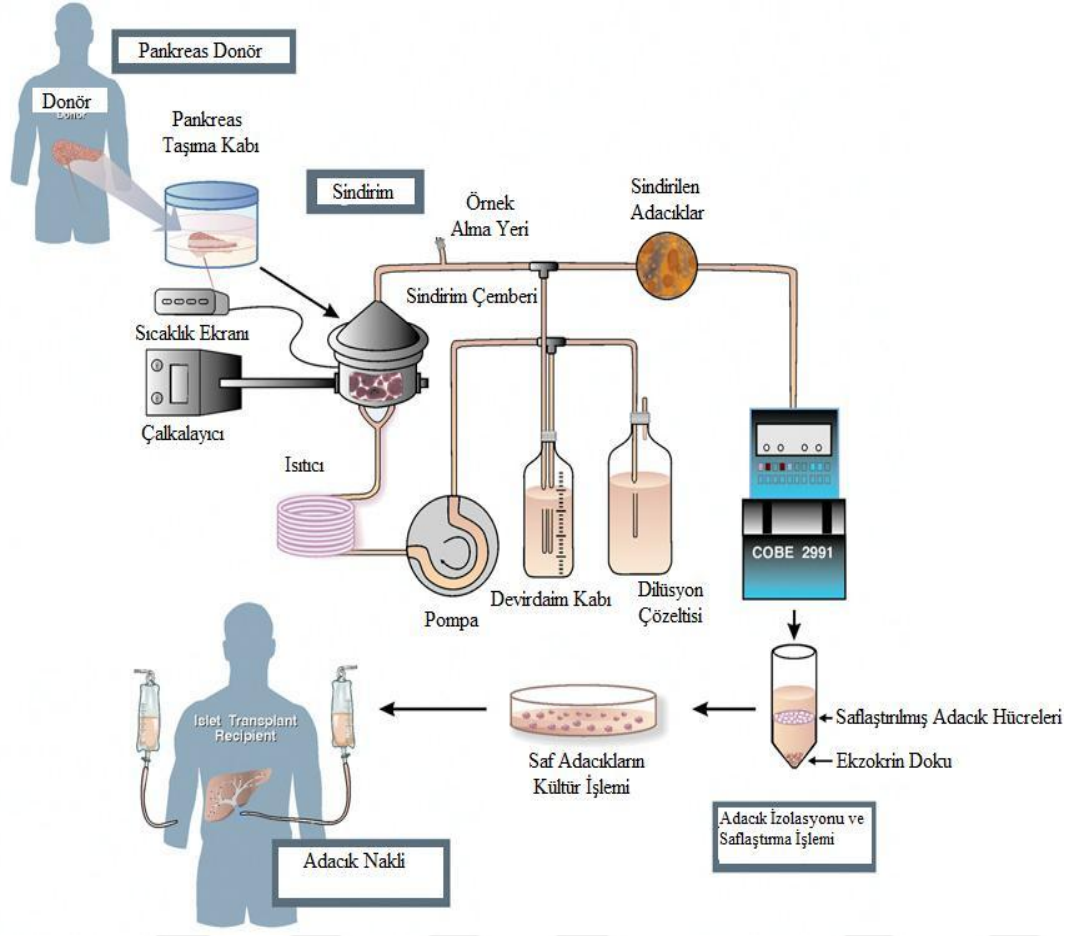
2000 yılında elde edilen bu başarı ile adacık hücre nakli çalışmaları hızlanmıştır. Uluslararası Adacık Hücre Nakil (CITR) verilerine göre; 864 diyabetli hastaya yapılan nakil sonrasında; 5 yıllık insülin bağımsızlık oranı % 25 olarak tespit edilmiştir. Günlük insülin ihtiyacı <0,43 U/kg olan, T hücre deplesyonu ve TNF-alfa inhibisyonu gerçekleştirilebilen 96 diyabetli hastaya yapılan adacık hücre nakli sonrasında 5 yıllık insülin bağımsızlık oranı % 55 olarak tespit edilmiştir. 2011-2014 verilerine göre, yapılan nakil işlemlerinde herhangi bir hasta ölümü gözlemlenmemiştir [34]. Bazı adacık hücre nakil merkezleri, 5 yıl sonundaki insülin bağımsızlık oranlarının % 80 oranlarına ulaştığını bildirmişlerdir.

Adacık hücre izolasyonu yöntemi

İnsan pankreasının farklı kısımlardan oluşması nedeniyle [35, 36] adacık hücre izolasyonu yöntemi farklı yöntem gelişimlerine ihtiyaç duymaktaydı. Yapılan bir çok optimizasyon çalışmaları (kullanılacak kolajenaz enziminin belirlenmesi, enzim için optimum sıcaklık olan 37 °C'nin ayarlanması, saflaştırma basamaklarında kullanılacak olan çözeltilerin ve yöntemlerin seçilmesi gibi) ile adacık hücrelerinin izolasyonu ve elde edilen adacık hücrelerinin kaliteleri, saflıkları, sayıları iyi duruma getirilmeye çalışıldı.

Pankreasın tamamı için kullanılan Ricordi metodu, adacık hücrelerinin daha fazla miktarda izole edilmesi ile sonuçlandı. 1986 yılında tanıtıldığından bu yana, adacık hücre izolasyonunun optimizasyonu için bir takım modifikasyonlar yürürlüğe koyuldu. Geliştirilen otomatize metot (Şekil 2.1) pankreasın aşırı sindirimin önleyerek, sindirim fazı boyunca adacık hücrelerinin büyük miktarlarının sürekli eldesine imkân sağladı.

Adacık hücre izolasyonu Şekil 2.1'de özetlendiği gibi yapılır. Donörden alınan pankreas organ taşıma kabı ile laboratuvara ulaştırılır. Pankreas bağlantılı olduğu dokulardan temizlendikten sonra, pankreasın enzimatik parçalanmasında kullanılan enzim pankreasa enjekte edilir. Pankreas küçük parçalara ayrılarak, Ricordi sindirim çemberinin içerisine yerleştirilir. 37 °C'de yaklaşık 10 dakika mekanik ve enzimatik sindirime maruz bırakılır. Sindirim sonrası dilüsyon çözeltisi ile yıkama işlemleri yapılır. Sindirilen pankreas dokusundaki hücreler COBE 2991 cihazında yoğunluklarına göre ayrılır ve adacık hücreleri saflaştırılır. Saflaştırılan hücreler direkt olarak ya da kültüre edilerek alıcıya nakil edilir.



Şekil 2.1. Pankreas'ın donörden alınması, laboratuvara taşınması, sindirimi, saflaştırılması, kültüre edilmesi ve naklinin şematik gösterimi

2.1.2. Tip 2 şeker hastalığı

İnsüline bağımlı olmayan şeker hastalığı olarak da bilinmektedir. Şeker hastalığının en sık görülen tipidir. Gelişmiş ülkelerde toplumun % 5-10'u Tip 2 şeker hastasıdır. T2DM, son yıllarda küresel bir boyuta ulaşan sağlık problemidir.

T2DM, iskelet kası, karaciğer ve adipöz dokuda çevresel insülin direnci ile karakterize edilen ve çevresel insülin direncini telafi etmek için yorulan pankreas adacık hücrelerindeki beta hücrelerin kaybı ile sonuçlanan kronik ilerleyici bir hastalıktır. Periferik insülin direnci genellikle hiperglisemi başlangıcından önce görülür. Dokulardaki insüline yanıt bozukluğunun nedeni hücre membranındaki insülin reseptörüdür. Azalan insülin etkisi, iskelet kaslarındaki glukoz alınımının azalmasına, adipöz dokudaki lipolizisin artmasına, glikojen sentezinin azalmasına ve karaciğerden glukoz çıkışının artmasına yol açar. Sonucunda,

plazma glukoz ve yağ asit seviyeleri artar [37, 38]. İnsülin duyarlılığını arttıran ve karaciğerde glukoz salınımını azaltan ilaçların kullanımı ile geri çevrilebilir.

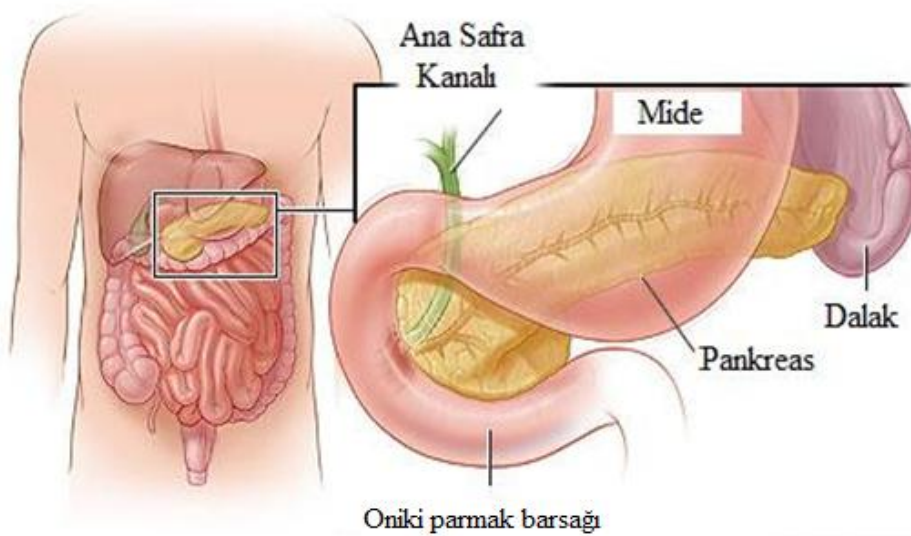
Tip 2 şeker hastalarının yaklaşık % 55'i obezdir [39]. Bu hastalık genellikle 40 yaşından sonra ortaya çıkar ve yaşlanma ile görülme sıklığı artar.

2.1.3. Gestasyonel şeker hastalığı

Hamilelik esnasında açığa çıkan şeker hastalığı tipidir. Anne ve çocuk için ciddi sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Anne ve çocuğun, ileriki dönemlerde Tip 2 şeker hastası olma riski ile ilişkili olduğu belirtilmektedir [15].

2.2. İnsan Pankreası

İnsan pankreası makroskopik olarak baş, kuyruk ve gövde olmak üzere 3 ana bölüme ayrılabilir [40]. İnsan pankreası, 14-18 cm uzunluğunda, 2-9 cm genişliğinde ve 2-3 cm kalınlığında ve 50-100 g kütleyle sahip bir organdır [41-43]. Pankreas, hem endokrin hem de sindirim (ekzokrin) fonksiyona sahip gastrointestinal sistem içinde midenin altında, karın arka duvarı boyunca uzanan, oniki parmak barsağı ve dalağa bağlantısı olan bir organdır (Resim 2.1).



Resim 2.1. İnsan pankreasının anatomik yapısı

2.2.1. Ekzokrin pankreas

Mezenşim hücreler ile birlikte toplam pankreas hacminin yaklaşık % 96-99'unu ekzokrin pankreas oluşturmaktadır [44, 45]. Ekzokrin pankreas yaygın olarak asiner doku olarak adlandırılmaktadır. Bunun ana görevi oniki parmak barsağı içerisine, bağlantılı olduğu duktus kanalı aracılığıyla sindirim enzimlerini salgılamaktır.

Çizelge 2.1. Pankreas ekzokrin enzimleri

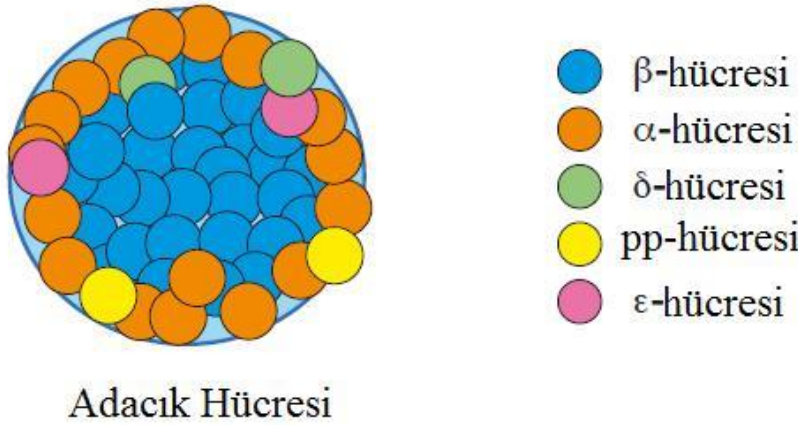
Enzimin Adı	İşlevi
Karboksipeptidaz A	Proteinleri karboksilik grubu ucundan yıkar.
α -amilaz	Amilozun 1 α -O-4' glikozidik bağını maltoz ve dekstrin'e parçalar
Tripsinojen	Proteinlerdeki lizin ve arjinin karboksilik bölgelerini ayırır.
Kimotripsinojen	Proteinlerdeki fenilalanin, tirozin ve triptofan'ın karboksilik bölgelerini ayırır.
Pankreatik elastaz (ELA-1)	Bağ dokudaki çoğu proteindeki elastini ayırır.
DNAz ve RNAz	Nükleik asitleri yıkar.
Pankreatik lipaz	Lipitlerin ester bağlarını hidrolizler.

Bu enzimlere ilaveten duktal hücreleri bikarbonat solüsyonları salgılamaktadır. Bu solüsyonlar mide asit salgılarından sonra oniki parmak barsağı pH ayarlanmasına yardımcı olurlar [46].

2.2.2. Endokrin pankreas

Pankreasın endokrin içeriği 1869 yılında Alman biyolog Paul Langerhans tarafından tanımlanmıştır. Bu yüzden endokrin pankreas hücreleri Langerhans adacıkları olarak adlandırılmaktadır [47]. Langerhans adacıklarının fonksiyonu ise 1893 yılında Edouard Laguesse tarafından belirlenmiştir [48]. Toplam pankreas hacminin % 1 ila 4'ü endokrin pankreastır ve pankreasın bu kısmı 'mikroorgan' olarak da kabul edilmektedir. Düşük hacme

sahip olmasına rağmen, pankreasın kan desteğinin % 15'ini almaktadır [49-51]. Adacık hücrelerine ilaveten asiner ve duktal hücreler boyunca dağılmış tekli endokrin hücrelerde bulunmaktadır. İnsan pankreasının endokrin kısmı yaklaşık olarak 1 milyon adacık hücresi içermektedir [49]. Adacık hücresinde polipeptit hormon salgılayan hücrelerin en az 5 tip bulunmaktadır. Bu hücreler; beta (β), alfa (α), delta (δ), pankreatik polipeptit (PP) ve epsilon (ϵ) hücreleridir (Resim 1.2).



Resim 2.2. Pankreas adacık hücresinin yapısı

Çizelge 2.2. Pankreas adacık hücresindeki hücrelerin adı ve salgıladığı hormonlar

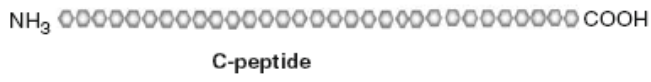
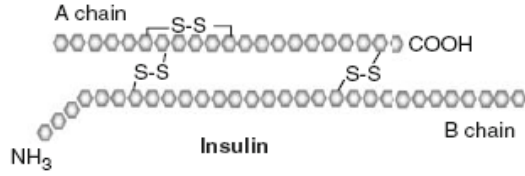
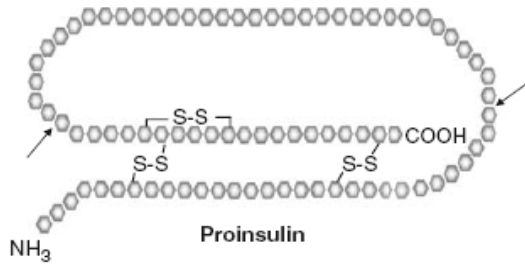
Hücrenin Adı	Salgıladığı Hormon
Beta	İnsülin
Alfa	Glukagon
Delta	Somatostatin
PP	Pankreatik polipeptit
Epsilon	Grelin

Beta hücresi

Beta hücresi, insan pankreasının endokrin pankreas içeriğinin % 50-70'ini oluşturur [52, 53].

Beta hücresi insülin hormonu ve amilin polipeptiti salgılar.

İnsülin 51 aminoasitten oluşan iki zincirli bir polipeptittir ve öncü protein olan proinsülininden meydana gelir (Resim 2.3). Temel olarak insülin, glukoz hemostazından sorumludur.

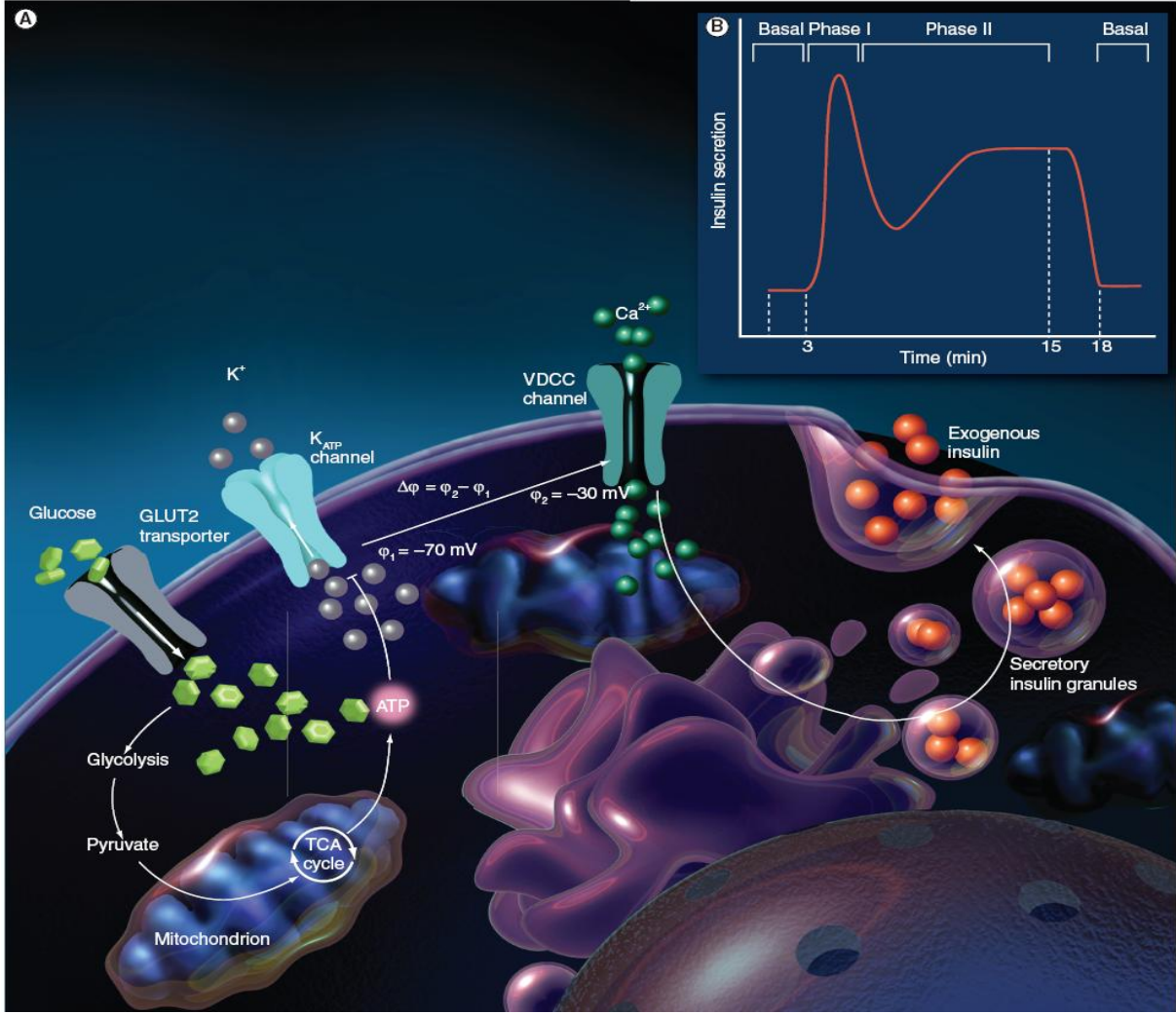


A chain: Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn

B chain: Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr

Resim 2.3. İnsülin'in yapısı

Beta hücreleri bu peptiti çeşitli stimüle edicilere yanıt olarak sentezler. Bunlar, parasempatik sinyaller [54], glukozaya bağlı insülinotropik polipeptit (GIP) ve glukogan-benzeri peptit-1 (GLP-1) [55], kolestikonin (CCK) [56], glukagon ve yüksek kan şekeri.



Şekil 2.2. Beta hücreleri içerisine glukozun girişi ve insülinin salgılanma mekanizması

Beta hücrelerindeki Tip 2 Glukoz Taşıyıcılar (GLUT 2) aracılığıyla glukoz hücre içerisine alınır. Glikoliz sonucu hücre içi ATP/ADP oranı artar. Yüksek ATP seviyesi K^+ kanallarını kapatır. Voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları açılır. Hücre içerisine giren Ca^{2+} , insülin granüllerinin ekzositozunu indükler ve insülin salınır. İnsülin salınımı 2 fazlıdır. İlk faz hızlıdır, önceden mevcut olan granüllerin ekzositozu ile sonuçlanır. İkinci faz daha uzundur, kan glukoz seviyesi yüksek olduğu sürece insülin sentezlenme fazıdır. Daha sonra tekrar insülin granüllerini depoladıktan sonra tamamlanır.

Amilin, adacık ilişkili polipeptit (IAPP) olarak da bilinen 37 aminoasitli bir polipeptittir [57]. Patolojik koşullarda IAPP molekülleri polimerleşerek adacık içi amiloid birikintilerine neden olur. Bu durumda Tip 2 diyabete ve insülinoma'ya neden olmaktadır. Son yıllarda, adacık

Bu peptit, glukagon, insülin ve pankreatik polipeptitin potansiyel inhibitörüdür [49, 62]. Delta hücreleri, bölgesel ve parakrin etkilediği önerilen, salgılayıcı granüller içeren nöronlara benzemektedir [63, 64].

Pankreatik polipeptit hücresi

Pankreatik Polipeptit (PP) hücreleri pankreatik polipeptit salgılar. Adacık hücre içeriğinin % 5'inden daha azını oluşturur [52, 53]. Pankreastan ekzokrin salgıların inhibisyon etkisi olduğu kanıtlanmıştır.

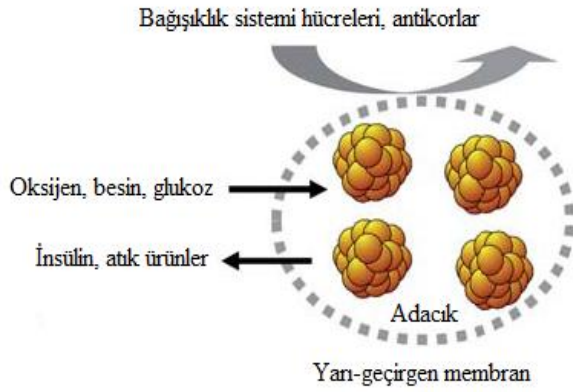
Epsilon hücresi

Epsilon hücreleri, grelin hormonu salgılamaktadır. İnsan adacık hücre içeriğinin % 1'inden daha azını oluşturur. Bu hücreler, bölgesel insülin salınımını düzenlemek ile görevlidir. Bu hücreler doğum sonrası adacık hücrelerinde azalır, yetişkin adacık hücrelerinde çok az bulunmaktadır. Epsilon hücrelerinden salgılanan grelin hormonu insülin salınımını inhibe etmekle görevlidir [65]. Ayrıca büyüme hormonu salınımından, metabolik düzenlemeden ve enerji dengesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir [66].

2.3. Biyoyapay Pankreas

İnsan donörlerden alınan pankreas adacık hücrelerinin tip 1 şeker hastalarına nakli bağışıklık sistem baskılayıcı ilaçların kullanımı şartı ile başarılı bir tedavi yöntemidir. Ancak, uzun dönem bağışıklık sistem baskılayıcı ilaçların kullanılmasının olumsuz yan etkileri bulunmaktadır. Adacık hücrelerinin yüzey antijenlerini maskeledikten sonra nakil etmek bu problemi çözebilir. İmmün sistem baskılayıcı ilaçların kullanımını kaldırabilir. Bu amaçla önerilen ve geliştirilen yöntemler biyoyapay pankreas olarak adlandırılmaktadır.

Biyoyapay pankreas, pankreas adacık hücrelerini immün reaksiyondan korumak, yüzey antijenlerini maskelemek ve vücudun farklı bölgelerine naklini kolaylaştırmak amacıyla bir bariyer oluşturulması olayıdır. Bu sistem glukoz, oksijen, besinler, insülin, glukagon gibi hormonların geçişine izin verirken, immünoglobülinler ve bağışıklık sistemi hücrelerinin geçişini engellemektedir (Resim 2.6).

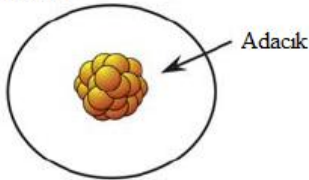


Resim 2.6. Adacık hücrelerinin yarı-geçirgen membran ile enkapsülasyonu [67]

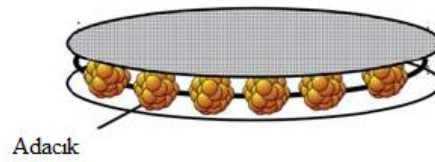
Başlıca 3 tip biyoyapay pankreas bulunmaktadır. Bunlar; difüzyon çemberi, boş fiber ünitesi ve mikrokapsül tipidir (Resim 2.7). Biyoyapay pankreasın difüzyon çemberi ve boş fiber ünit tipleri makrokapsül tip olarak sınıflandırılır [67].

Biyoyapay Pankreas

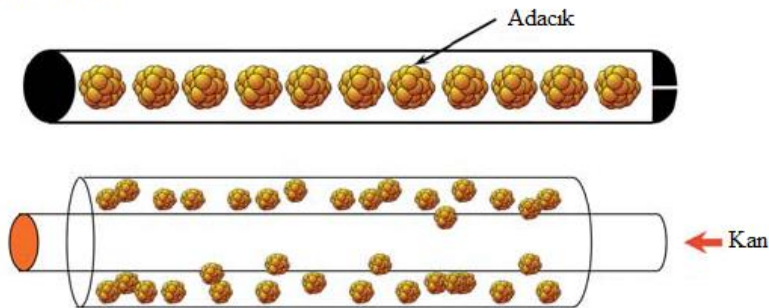
I. Mikrokapsül



II. Difüzyon çemberi



III. Boş fiber ünitesi

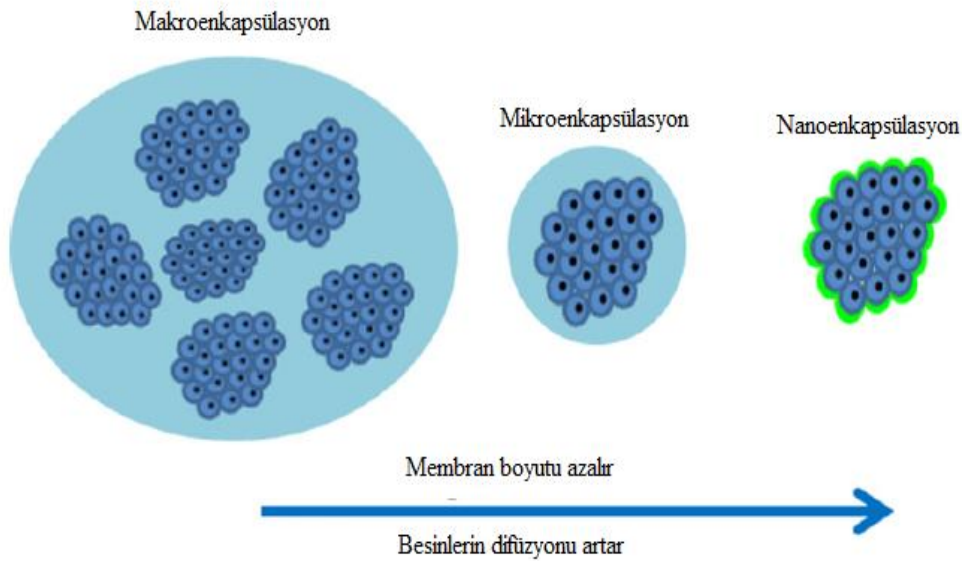


Resim 2.7. Biyoyapay pankreas tipleri

Biyoyapay pankreasın makrokapsül ve mikrokapsül tiplerinin dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, mikrokapsülasyon tekniği ile elde edilen kapsülün boyutu ortalama adacık boyutunu 3 kat arttırmaktadır. Yapılan hesaplamalara göre ise toplam hacim 27 kat arttığı belirlenmiştir [12].

Mikroenkapsülasyon tekniğinde hücrelerin hipoksik ölümleri, hücrelerin merkezine oksijen ve besinin yetersiz ulaşması, immün korumadaki yetersizlik, kullanılan materyallerin yeterince biyouyumlu olmaması, kapsül yüzeyine protein adsorpsiyonu ve fibroblast kaplaması bu tekniğin problem yönlerini belirtmektedir [67].

Biyoyapay pankreas tiplerinde karşılaşılan problemlere alternatif olarak adacıkların konformal kaplanması (nanoenkapsülasyonu, nanokaplanması) yani adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu yöntemi kullanılmaktadır (Resim 2.8).



Resim 2.8. Enkapsülasyon boyutlarının karşılaştırılması [68]

Hücreler veya dokular donörden alınarak alıcıya nakil edildiğinde, alıcının immün sistemi onları yabancı madde olarak algılayarak saldırmakta ve onları yok etmektedir. Doku veya organların hücre yüzeyindeki antijenlerin sunumu ile T hücreleri aktive olur ve vücut tarafından immün yanıt başlatılır. Ancak, immün yanıt daha başlamadan önce erken nakil sonrası dönemde kan ile buluşan doku ya da hücreye karşı kan pıhtılaşması ve kompleman

sistemi (kemotaktik faktörler, doku faktörü, kemokinler ve diğer inflamatuvar araçlar) kana salınır. Ani kan aracılı inflamatuvar reaksiyon (IBMIR) aktive olur ve nakil edilen hücre ya da organ zarar görür [69, 70]. Hücre yüzeyindeki antijenlerin maskelenmesi ya da modifiye edilmesi oluşan bu reaksiyonları inhibe edebilir veya azaltabilir.

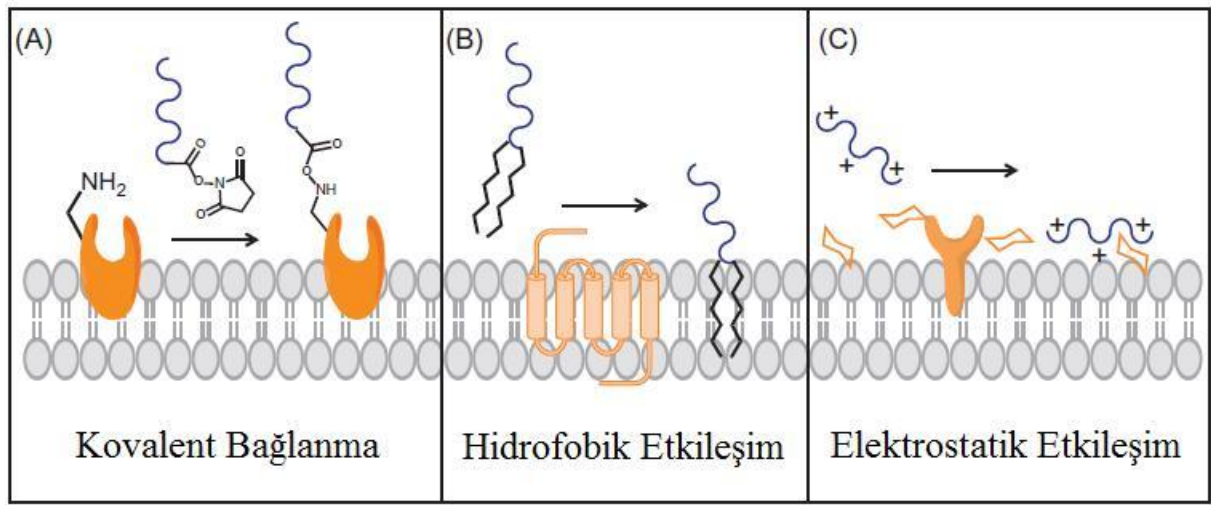
2.4. Konformal Kaplama Yöntemi ile Adacık Hücrelerinin Yüzey Modifikasyonu

Konformal kaplama yöntemi, polimer zincirleri ile hücre yüzeyini kaplamak ya da ince bir membranla hücre yüzey antijenlerini maskeleyerek hücre yüzeyinin modifikasyon işlemidir. Kaplama çok ince (nanometre boyutunda) olduğundan oksijen ve besinin difüzyon mesafesi oldukça azalır, sonuç olarak hücre canlılığı ve fonksiyonu artar. Diğer önemli bir avantajıda, adacıklar kaplandıklarında hacimleri artmaz, böylelikle intraportal nakillerde sıkıntı gerçekleşmez.

2.4.1. Adacık hücre yüzey modifikasyonu yöntemleri

Pankreas adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonları 3 başlık altında incelenebilir (Resim 2.9). Bunlar;

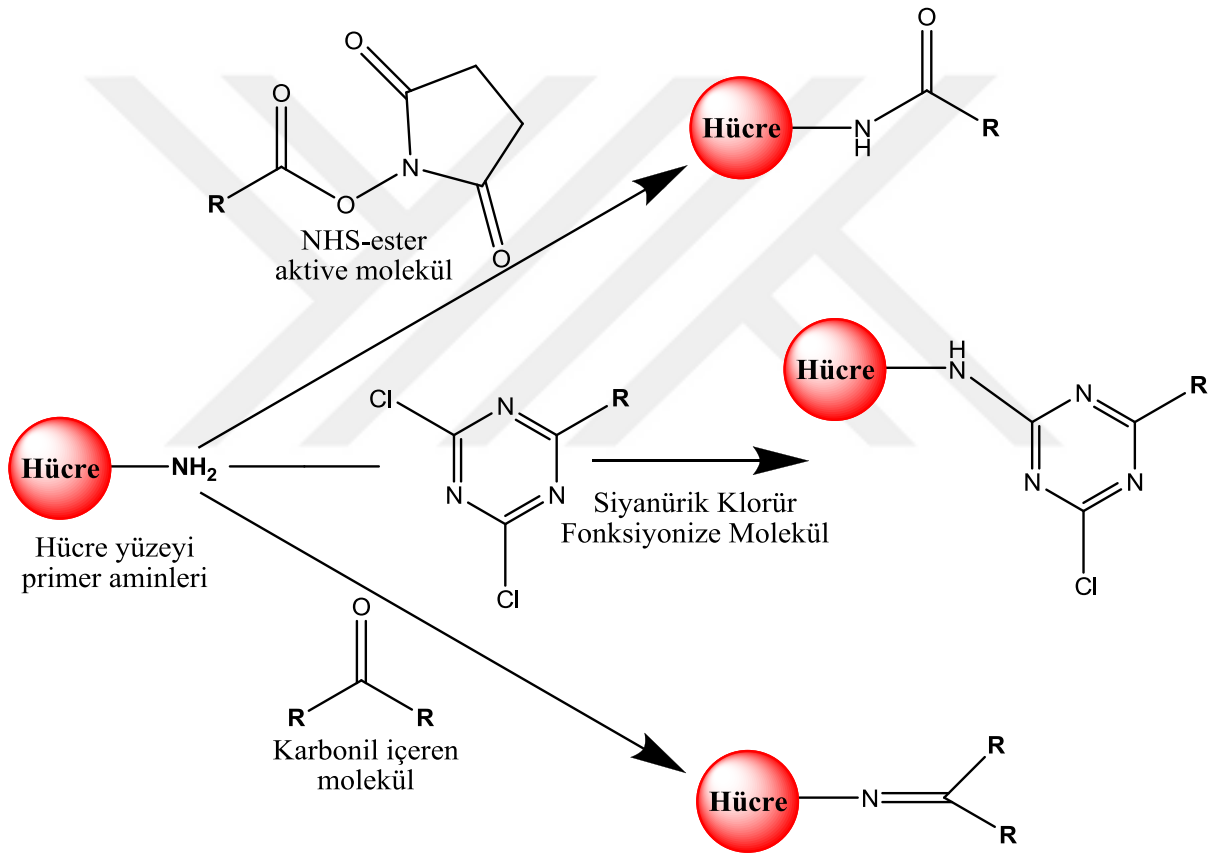
- A. Kovalent bağlanma
- B. Hidrofobik etkileşim
- C. Elektrostatik etkileşim



Resim 2.9. Adacık hücre yüzey modifikasyonu yöntemleri [71]

Kovalent bağlanma

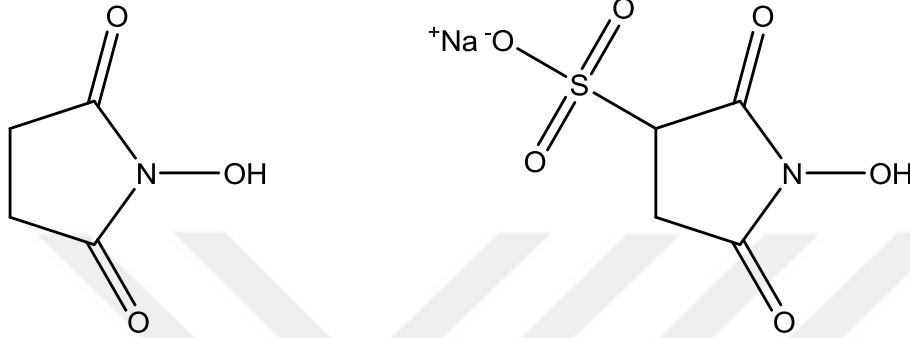
Kovalent bağlanma, adacık hücre yüzeyindeki kolajen tabakada ya da membran proteinlerinde bulunan amin, sülfhidril, karboksil ve karbonil grupları ile gerçekleşmektedir [72, 73]. Amin gruplarından genellikle primer aminler, kolay bağlanma ajanlarının bulunması ve tepkime koşullarının hücre uyumlu olması nedeniyle kovalent bağlanma ile gerçekleştirilen hücre yüzey modifikasyonu için kullanılan gruplardan en çok tercih edilenidir. Şekil 2.3 de hücre yüzeyindeki amin grupları ile gerçekleştirilen yüzey modifikasyonu gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Amin reaktif moleküllerin hücre yüzeyindeki primer aminler ile kovalent bağlanma tepkimeleri [71]

Hücre yüzeyindeki primer aminleri modifiye etmek için en çok kullanılan reaksiyon *N*-hidroksil-süksinimidil (NHS) ester grubu ile gerçekleştirilen reaksiyondur. NHS ile aktive edilen bileşikler ılımlı alkali koşullarda (pH 7,2-8,5) primer aminler ile amit bağı oluşturmaktadır. NHS kovalent bağlanma tepkimeleri için genellikle pH 7,2-8,0 fosfat tamponu kullanılır ve tepkime oda sıcaklığında ya da +4 °C'de gerçekleştirilir. NHS-ester

moleküllerinin sulu çözeltilerde çözünürlüğünü arttırmak için NHS grubu yerine $-SO_3$ grubu içeren sülf-NHS ester grupları kullanılmaktadır. Bu yüklü grup tepkime kimyasını etkilemeden tepkime ajanlarının suda çözünürlüğünü arttırmaktadır. Ayrıca, bu yüklü grup sülf-NHS bileşiklerinin hücre membranından geçişini engeller ve bağlanmanın hücre yüzeyinde gerçekleşmesini sağlar.



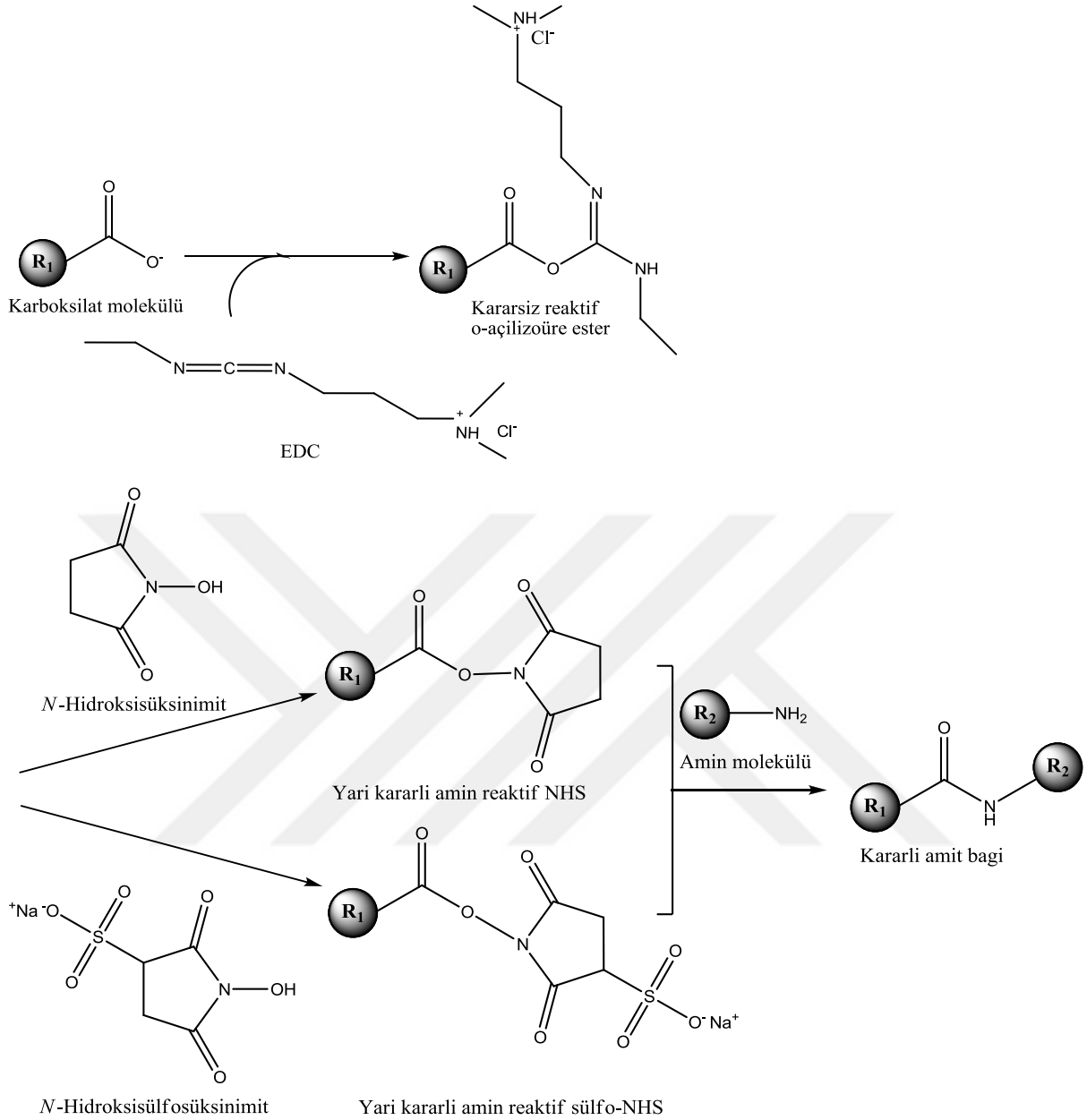
N-Hidroksisüksinimit

N-Hidroksisülfosüksinimit

Şekil 2.4. *N*-hidroksisüksinimit'in ve *N*-hidroksisülfosüksinimit'in kimyasal yapısı

Amin grubu ile karboksilik asit reaksiyona girdiklerinde amin tuzu oluştururken, NHS veya sülf-NHS ile aktifleştirilmiş karboksil grubu amin grubu ile amit bağı oluşturmaktadır.

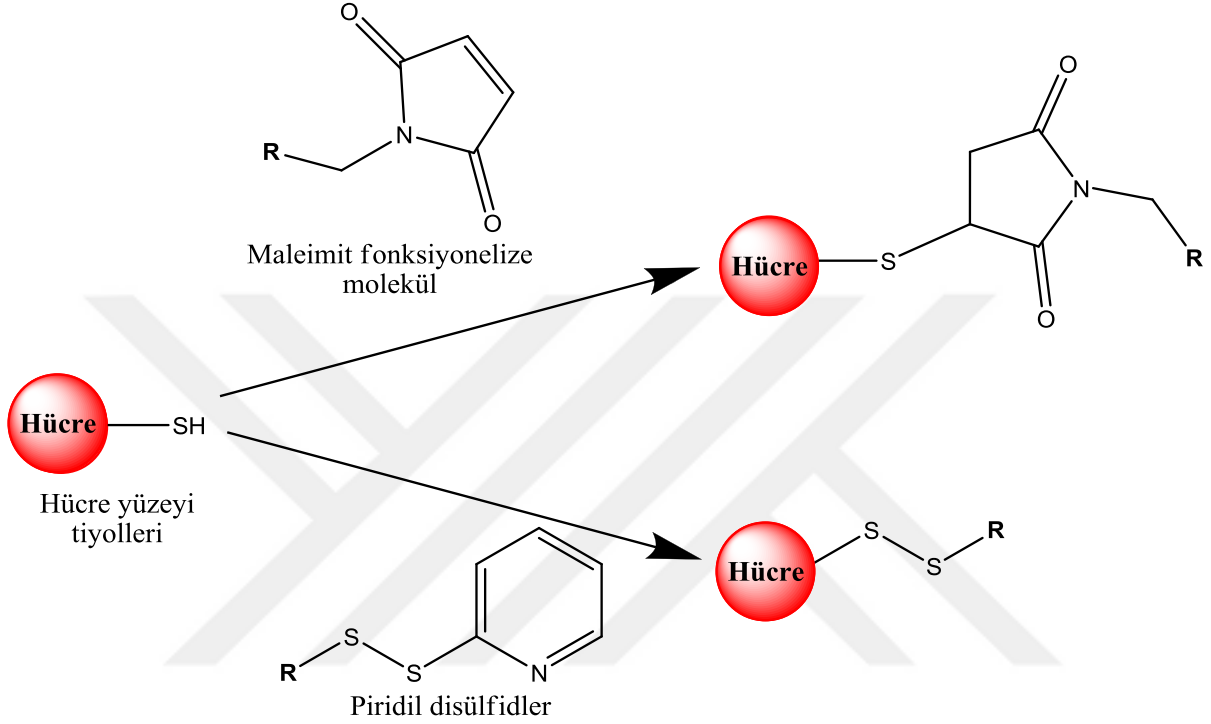
Karboksilik asiti, NHS veya sülf-NHS ile aktifleştirmek için *N,N'*-disikloheksilkarbodiimit (DCC) ya da etil (dimetilaminopropil) karboimit (EDC) gibi bağlayıcılar kullanılır.



Şekil 2.5. Karboksilat gruplarının EDC ve NHS / sülfö-NHS ile aktifleştirilme, amin molekülleri ile kararlı amit bağı oluşturma tepkimeleri [71]

Hücre yüzeyi amin gruplarının modifikasyonu için kullanılan diğer bir kimyasal ise siyanürik klorür aktive moleküllerdir. Siyanürik klorür aktive moleküllerin membran protein modifikasyonundaki etkinliği ve uygun tepkime koşullarında kullanılabilmesi avantaj yönlerini oluşturmaktadır. Bir diğer yöntem ise hücre yüzeyindeki amin grupları ile karbonil grubu içeren moleküller arasında oluşan imin bağı (Schiff bağı) dır. Ancak, bu metot hücre yüzey modifikasyonunda yaygın kullanılan bir teknik değildir.

Hücre yüzeyindeki en önemli ikinci fonksiyonel grup sülfhidril grupları yani tiyollerdir. Hücre yüzeyinde tiyol grupları ya oksidize disülfür köprüleri ya da indirgenmiş tiyol köprüleri olarak bulunmaktadır. Hücre yüzeyindeki tiyol modifikasyonu için kimyasal tepkime şekil 2.6 da gösterilmiştir.

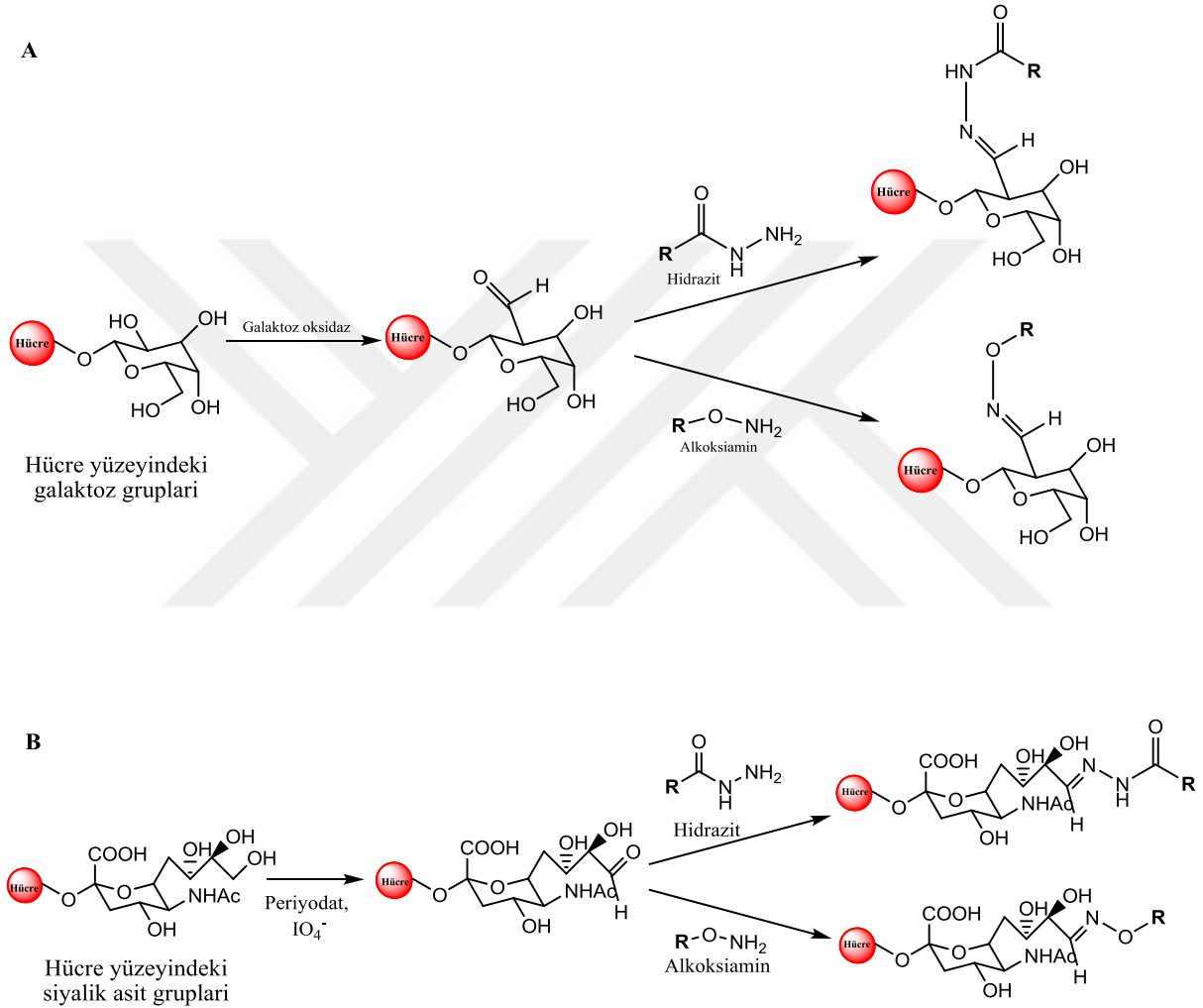


Şekil.2.6. Tiyol reaktif moleküllerin hücre yüzeyindeki tiyoller ile kovalent tepkimeleri [71]

Tiyol (-SH) grupları ile maleimit aktive molekülleri arasında yapılan en yaygın kovalent tepkime pH 6,5-7,5 arasında gerçekleşir ve kararlı tyoeter bağı oluşur. Bu tepkimeler fosfat tamponu içerisinde ya da 37 °C'de 90-120 dakikada gerçekleşmektedir.

Amin ve tiyol bazlı hücre yüzey modifikasyonları yoğun olarak kullanılmasına rağmen hücre yüzeyinde bulunan aldehit ve ketonların hücre yüzey karbonilleri kovalent olarak fonksiyonel olabilmektedirler. Karbonil grupları, fosfat tamponu içerisinde oda sıcaklığı ya da 37 °C de pH 5-7 de hidrazitler ile hidrazon bağı oluşturabilirler. Aynı tepkime koşullarında, karbonil grupları alkoksi aminler ile oksim bağı oluşturabilirler. Ancak, hücre yüzeyinde karbonil grubunun sınırlı bulunması nedeniyle yüzeyde karbonil grup sayısının artırılması için ilave basamaklara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu basamaklar ya periyodat aracılı kimyasal yöntem ile ya da galaktoz oksidaz aracılı enzimatik yöntem ile genellikle polisakkarit ve

glikoproteinlerin diollerinin oksidasyonunu içeren işlemlerdir. Oksidasyon aracılığıyla hücre yüzeyinde indüklenen karbonil grupları hidrazit aktive moleküller ile hidrazin bağı ya da alkoksi amin aktive moleküller ile oksim bağı oluşturabilirler. Şekil 2.7 de bu basamaklar özetlenmiştir. Bu işlem hücre yüzeyine hidrazit modifiye boyaların bağlanmasında kullanılmıştır [74]. Benzer uygulama hidrazit aktive biyotin kullanarak hücre yüzeyi biyotinlenmesinde kullanılmaktadır.



Şekil 2.7. A. Galaktoz oksidaz ile hücre yüzeyindeki galaktoz grubunun aldehit grubuna dönüş tepkimesi. B. Periyodat ile hücre yüzeyindeki siyalik asit gruplarının aldehit grubuna dönüş tepkimesi. Her iki tepkime sonucu oluşan aldehit grupları hidrazit grubu ile hidrazon bağı, alkoksiamin grubu ile oksim bağı oluşturur

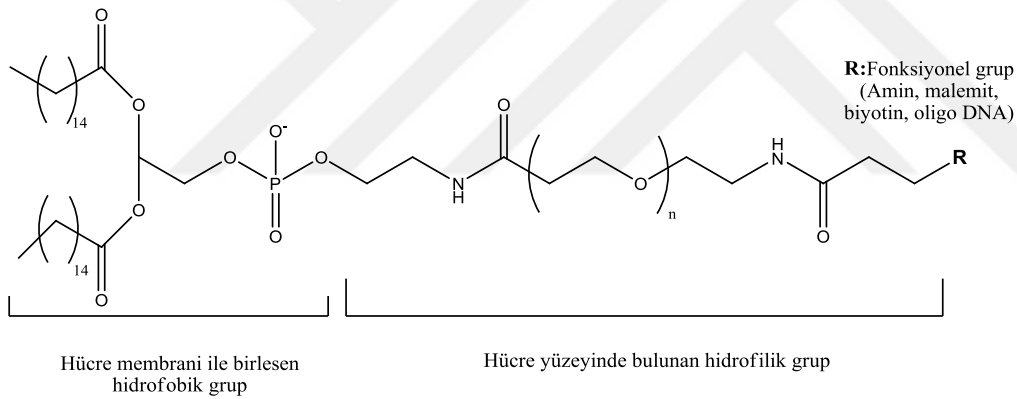
Kovalent immobilizasyon, membran proteinlerine kovalent bağlanma sebebiyle uzun süre dayanıklı ve kimyasal bozunmalara karşı dayanıklı olmasına rağmen, zamanla bu gruplar hücre yüzeyinden kaybolmaktadır [75].

Hidroforbik etkileşim

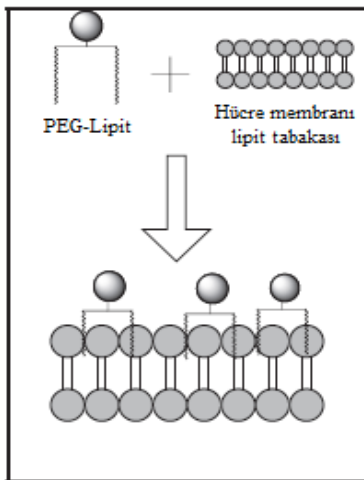
Diblok, dallanmış ve kopolimer içeren yapı amfifilik polimerler hücre yüzeyi modifikasyonu için kullanılabilir. Plazma membranındaki doğal lipitler ve diaçil lipitler arasındaki yüksek etkileşim sebebiyle polimer-fosfolipit konjugeleri hücre yüzeyi modifikasyonu için kullanılan en yaygın polimerlerdir [76].

Bu hücre yüzeyi modifikasyonunda, poli(etilen glikol) konjuge fosfolipitler (PEG-lipit) ve hidroforbik alkil yan zinciri içeren poli(vinil alkol) gibi amfifilik polimerler kullanılır. Amfifilik polimerlerin hidroforbik alkil zincirleri, hidroforbik etkileşim ile çift katmanlı lipit membranına kendiliğinden tutunurlar. PEG-lipit'in kendiliğinden birleşmesi fosfolipitin alkil zincirinin uzunluğu ve hidroforbikliğinden oldukça etkilenir.

A



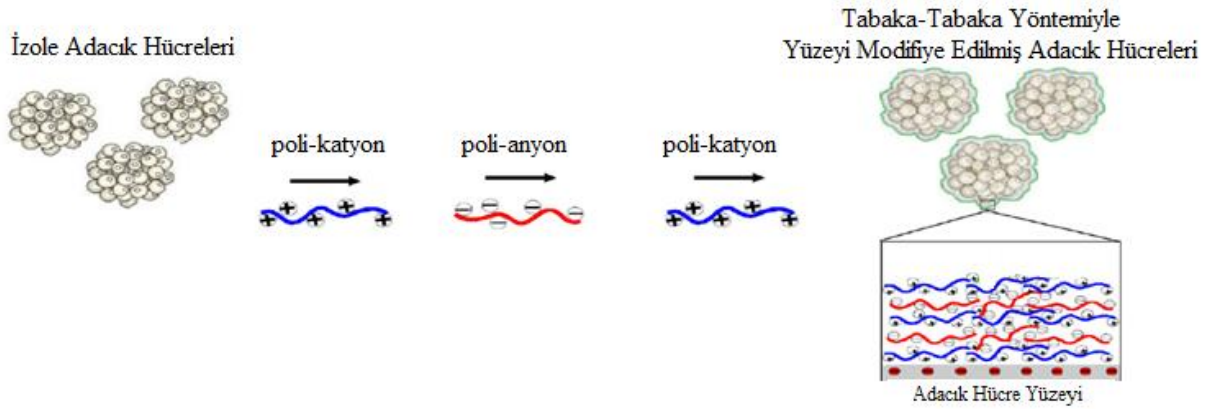
B



Şekil 2.8. A. PEG-Lipit türevlerinin kimyasal yapısı, B. . PEG-lipit'in hücre yüzeyine hidroforbik etkileşim ile tutunması

Elektrostatik etkileşim

Hücre membranı, fosfatidilserin ve fosfatidilinositol lipitleri gibi negatif yüklü lipitlerin yoğun bulunması nedeniyle negatif yüklüdür. Negatif yüklü hücre yüzeyi ve katyonik polimerler arasındaki elektrostatik etkileşimlerle hücre yüzeyi üzerinde ince bir polimer membran oluşturmak mümkündür ve daha sonra anyonik ve katyonik polimerler kullanılarak tabaka-tabaka tekniği ile modifiye edilebilir [77-81]. poli-(stiren sülfat), poli-L-lizin, poli-(allilamin hidroklorür) ve poli-(etilenimin) elektrostatik etkileşim için kullanılan pozitif yüklü polimerlerdendir. Elektrostatik etkileşim kullanılarak gerçekleştirilen tabaka-tabaka yöntemi hücrelerin yüzey modifikasyonu için kullanılan basit ve üzerine çalışılan bir yöntemdir [82]. Tabaka kalınlığı ve en dış tabakanın yükü kontrol edilebilir özelliktedir. Ancak, poli-L-lizin ve poli-(etilenimin) gibi çoğu polikasyonlar sitotoksiktir ve uygulanan hücrenin hücre zarını parçalayabilmektedirler. Katyonik polimer aracılı sitotoksititeyi engellemek için, katyonik polimerin yüzey yükü düzenlenmesi yapılmaktadır. Ancak, zayıf elektrostatik etkileşim hücre yüzeyinde polimerin tutunma direncini azalttığı için düşük verim elde edilmektedir.



Şekil 2.9. Pankreas adacık hücre yüzeyinin tabaka-tabaka yöntemi ile modifikasyonu [83]

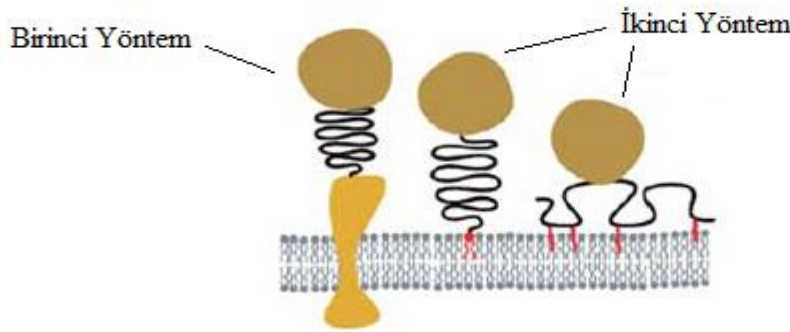
2.4.2. Aracı moleküller ile biyoaktif maddelerin immobilizasyonu

Biyoaktif moleküller hücre yüzeyi üzerine immobilize edilebilir. Bu metot için 2 yöntem vardır (Şekil 2.10).

Birinci yöntem; hücre yüzeyine amit bağı ile kovalent bağ oluşturarak bağlanan aracı molekül ile biyoaktif maddenin immobilizasyonudur. Örneğin, biyotin molekülü membran

proteinlerinin amino gruplarına çapraz bağlayıcılar ile kovalent olarak bağlanır. Yüzey daha sonra sırası ile avidin ve heparin solüsyonları ile muamele edilir.

İkinci yöntem; çeşitli fonksiyonel grup taşıyan PEG-lipit ve PVA-alkil gibi amfifilik polimerler kullanılarak hidrofobik etkileşim ile yüzeye biyoaktif moleküllerin immobilizasyonudur.



Şekil 2.10. Aracı moleküller ile biyoaktif moleküllerin immobilizasyonu [12]

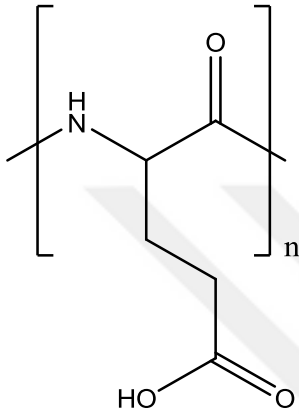
2.5. Poli-aminoasitler

Poli-aminoasitler, tek tür aminoasitlerden oluşan poliamitlerdir ve çeşitli yönleri ile proteinlerden farklıdır. Örneğin, proteinler çeşitli aminoasitlerden oluşurken, poli-aminoasitlerin iskeleti tek tür aminoasitten oluşmaktadır. Proteinler, aminoasitlerin α -amino ve α -karboksilik grupları arasında α -amit bağı oluşturarak bağlanırken, poli-aminoasitler arasında yan zincir grupları da bağ oluşturur (β - ve γ -karboksilik asit ve ϵ -amino grupları gibi) (Candela, 2006).

2.5.1. Poli(L-glutamik asit) (PLGA)

Poli(L-glutamik asit) (PLGA), biyobozunur, toksik olmayan, hidrofilik, immünojenite özelliği olmayan üstün biyolojik ve fizikokimyasal özellikleri olan bir poli-aminoasittir. PLGA, kolay

fonksiyonellenebilen karboksil grupları içermektedir. Mükemmel hidrofilik özellikleri sebebiyle hücrelerin tutunmasını kolaylaştırır. Bozunma ürünü olan L-glutamik asit, vücütün önemli bileşenlerindendir. Biyomedikal uygulamalar için umut verici bir polimerik materyaldir. Son zamanlarda, PLGA ilaç salım sistemlerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. PLGA ve ko-polimerleri doku mühendisliğinde iskele olarak kullanılmaktadır [84].



Şekil 2.11. Poli(L-glutamik asit)'in yapısı

2.6. Endoplazmik Retikulum ve Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), salgılanan ve ER'de yerleşik proteinlerin katlanmasından, olgunlaşmasından, hücre içinde işlev gösterecekleri bölgelere taşınmasından ve bu süreçte proteinlerin kalite kontrolünden sorumlu önemli bir organeldir. Salgı yollarına gidecek olan proteinler sitoplazmadan ER'e transfer edilir. Bu proteinler ER'de katlanır ve translasyon sonrası değişikliklere uğrar.

Memeli proteomunun yaklaşık %30'unun salgı yolları ile bağlantılı olduğu ve bu proteinlerin ER'de işlendiği düşünüldüğünde ER'in protein trafiği ve işlenmesi sürecindeki rolünün son derece önemli olduğu görülmektedir. Proteinlerin katlanamaması ya da hatalı katlanması durumunda ER içinde bulunan ERAD (ER-associated degradation) kontrol sistemi hasarlı ve hatalı katlanmış proteinlerin yıkımını sağlayarak proteinlerin ER içinde birikimini önlemektedir. ER'de katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi ve ER

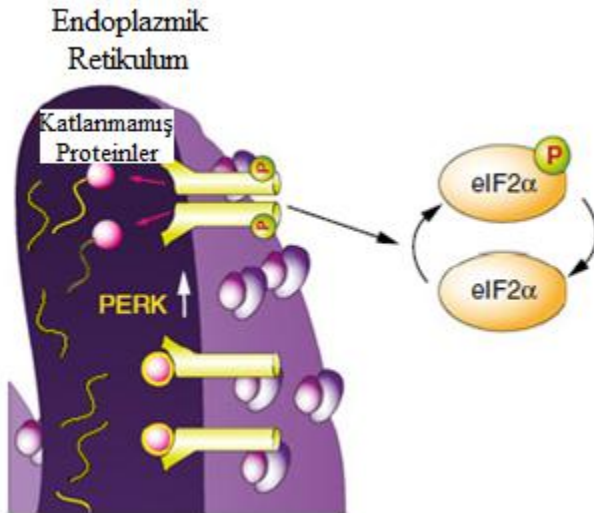
homeostazisinin bozulması durumunda ortaya çıkan hücresel cevap ER stresi olarak tanımlanmaktadır [85].

Adacık hücrelerinin bağışıklık sistemi saldırılarından korunamaması sonucu saldırıda bulunan sitokinler adacık hücrelerinde ER stresine neden olmaktadır. ER stresi de hücreyi ölüme götürebilmektedir [86].

Katlanmamış protein cevabı 3 farklı ana dönüştürücüye aktive ederek ER stresine yanıt verir. Bunlar; protein kinaz RNA (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK), inositol gerektiren enzim-1 (IRE1), ve aktifleştirici transkripsiyon faktör-6 (ATF6) dir.

2.6.1. Protein kinaz RNA (PKR)-benzeri ER kinaz (PERK)

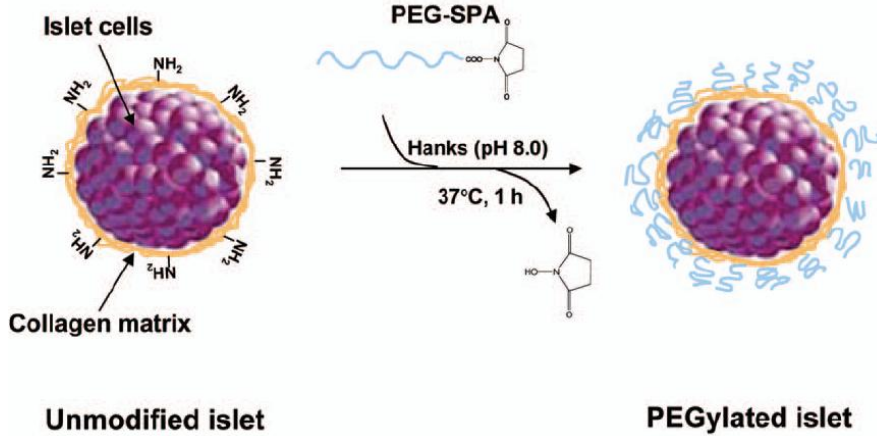
PERK, ER’de bulunan bir tip 1 transmembran kinazdır. ER stresi esnasında PERK’in aktivasyonu; protein sentezini azaltır, ER içerisine yeni proteinlerin girişini azaltır, PERK’i fosfo-PERK’e (P-PERK) dönüştürür. Bir hücre örneğinden elde edilen proteinlerde P-PERK ve P-eIF2 α proteinlerinin miktarının artışı hücrede ER stresinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 2.12. ER stresi esnasında PERK’in eIF2 α ’yı fosforlama işlemi [87]

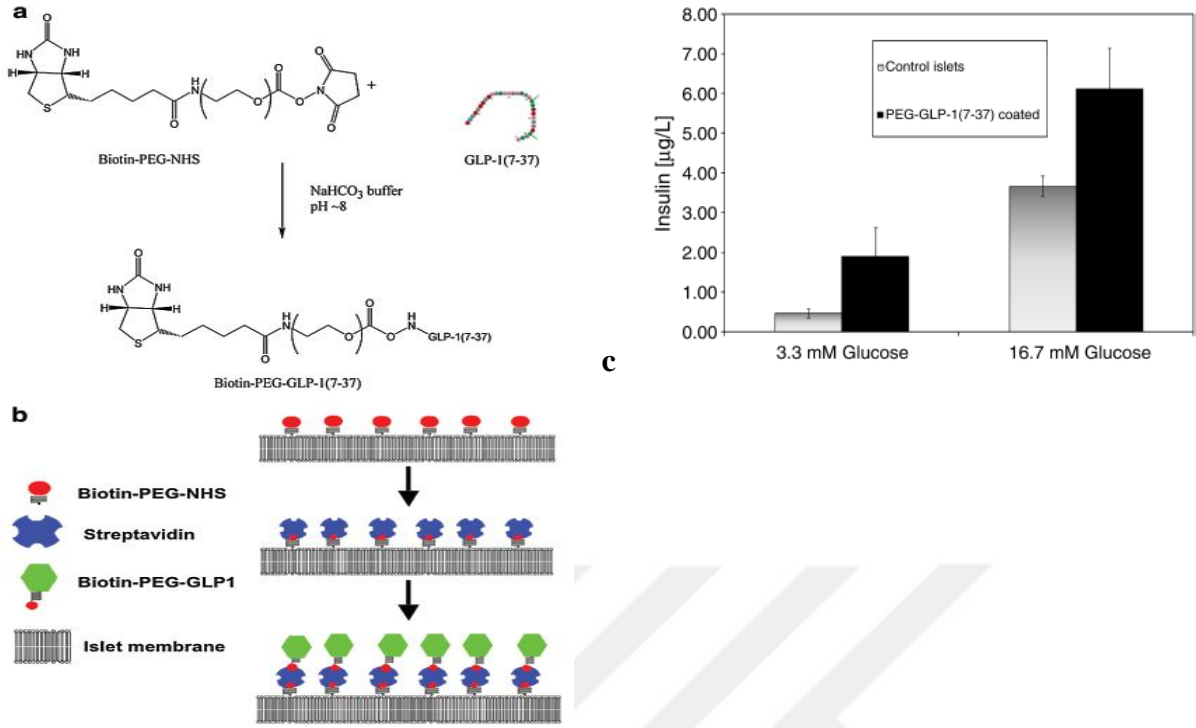
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Lee ve arkadaşları, 2006 yılında yaptıkları çalışmada adacık hücrelerinin kovalent bağlanma ile yüzey modifikasyonunu gerçekleştirmek için PEG polimerini kullanmıştır. Sprague Dawley türü ratlardan izole edilen 1200 adacık hücrelerini streptozitosin kimyasalı ile diyabet yaptıkları Fisher 344 türü ratların böbrek kapsülü altına naklinde poli-etilen glikol (PEG) in etkisi incelenmiştir. Yapılan nakillerde; sadece adacık nakil edilen gruplarda 5 günlük başarı sağlanırken PEG ile muamele edilerek gerçekleştirilen nakillerde başarı 14 güne kadar ulaşmıştır. PEG ile kaplanmış nakil edilen adacık hücrelerinin etrafında immün hücreler gözlenmezken, PEG ile muamele edilmemiş nakil edilen hücrelerin etrafında immün hücreler gözlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada ek olarak düşük doz immün sistem baskılayıcı ilaçların kullanımının nakil başarısına etkisi de incelenmiştir. Düşük doz Cyclosporine A (CsA) (3 mg/kg/gün) nakil ile aynı sürede başlayarak uygulandığında PEG'lu adacıklar 100 gün canlı ve kararlı aktivitede kalırken yalnız adacık ile gerçekleşen nakillerde 14 günlük başarı elde edilmiştir [88].



Şekil 3.1. Adacıkların PEG ile kaplanması [88]

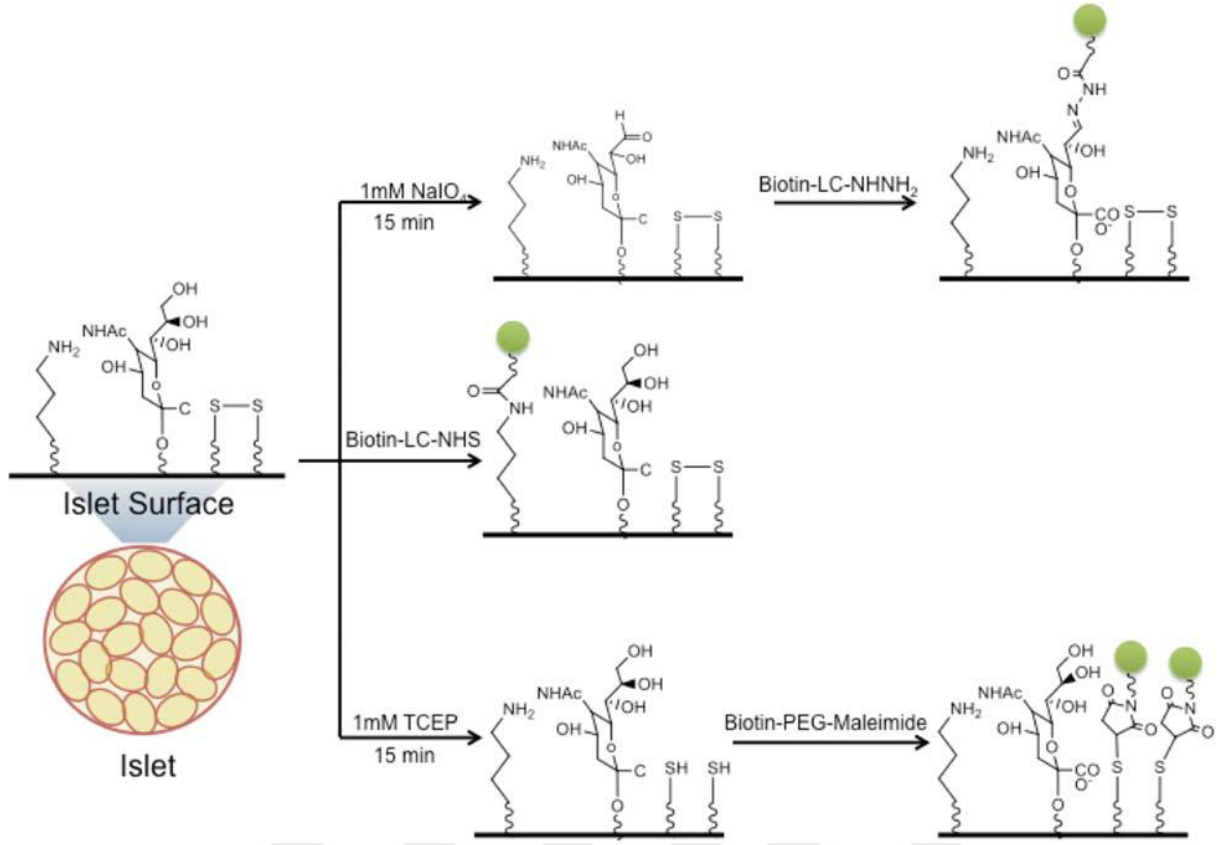
Kizilel ve arkadaşlarının, 2010 yılında yaptıkları çalışmada adacık hücrelerinin yüzeyini biyotinlemek için biotin-PEG-NHS polimeri ile kovalent modifikasyon gerçekleştirilmiştir. Pankreas adacık hücrelerini insülinotropik ligand olan GLP-1 (7-37)'yi biotin-PEG-NHS ile muamele ederek adacık hücre yüzeyine tutturmuşlardır. Bu yöntemle yüzeyleri modifiye edilmiş adacıkların kontrol adacıklarına göre daha fazla insülin salgıladıkları gözlenmiştir [89].



Şekil 3.2. a) Biyotin-PEG-GLP-1 (7-37) sentezi. b) Biyotin-PEG-NHS'in membran proteinlerindeki amin grupları ile NHS grubu arasındaki kovalent tepkimesi ile adacık yüzeyine tutunması. Daha sonra, biyotin ve streptavidinin birbirlerine olan yüksek affinitesi ile streptavidinin biyotine tutunması ile biyotin-PEG-GLP-1'in streptavidine tutunması. c) Adacık hücre yüzeyine GLP-1 bağlanması ile daha fazla insülin salgıladığının ispatı [89]

Wilson ve arkadaşlarının 2010 yılında adacık hücrelerinin yüzeyini kovalent bağlanma yöntemi ile biyotinlemek için sülfo-NHS-LC-biyotin kullanmışlardır. Yaptıkları optimizasyon çalışmasında optimum konsantrasyonu 4 mM, biyotinleme süresini ise 1 saat olarak bulmuşlardır [90].

SoRelle ve arkadaşlarının, 2015 yılında kovalent bağlanma yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada adacık hücrelerinin yüzeyini açılasyon, yükseltgenme ve indirgenme yöntemleri ile modifiye etmişlerdir. Yüzey modifikasyonunun gerçekleştiğini floresan boyalar ile ispat etmişlerdir. 7 günlük takipte açılasyon yöntemiyle gerçekleşen modifikasyonda ışımının en iyi olduğu yani açılasyonun adacık hücre yüzey modifikasyonunda başarılı olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir [91].



Şekil 3.3. Adacık hücre yüzey biyotinyleme yöntemleri [91]

Meier ve arkadaşlarının, 2014 yılında yaptıkları çalışmada izole ettikleri sıçan adacıklarını streptozosin ile diyabet edilmiş farelerin böbrek kapsülü altına nakil etmişlerdir. Yapılan kan glukozu takiplerinde ortalama 14 günlük normoglisemi başarıları sağlanmıştır [92].

Teramura ve arkadaşlarının, 2009 yılında yaptıkları çalışmada adacık hücre yüzey modifikasyonunu gerçekleştirmek için hidrofobik etkileşim yöntemi kullanılmıştır. Hamster adacıklarını PEG-lipit ile modifiye etmişler. Bu adacıklar daha sonra diyabetli farelerin karaciğerine nakil edilmiştir. Nakil sonrasındaki 60 dakikada kan insülin seviyeleri incelendiğinde PEG-lipit ile kaplı adacık grubunda insülin seviyesi daha düşük gözlenmiştir. Bu veride yüzey modifikasyonu gerçekleşmiş olan adacık hücrelerinin nakil sonrası hasarlanmasının daha az olduğu belirtilmiştir [93].

Panza ve arkadaşları, 2000 yılında PEG-izosiyonat kullanarak adacık hücre yüzeyine kovalent bağlanma işlemini gerçekleştirmişler. Rat pankreas adacıklarını PEG ile muamele etmişlerdir. Bu çalışmada PEG ile muamele edilen adacıkların canlılıkları ve işlevsellikleri

değerlendirilmiştir. Kültürdeki adacıkların 2. ve 5. günlerdeki canlılıklarının kontrol adacıklarına göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Statik ve dinamik glukoz stimülasyonu ile adacıklardan salınan insülin miktarlarında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Sonuç olarak, PEG molekülünün adacıklara zarar vermediği belirlenmiştir [94].

Takemoto ve arkadaşları, 2011 yılında hidrofobik etkileşim yöntemini kullanarak adacık hücre yüzeyini Oligo(dT)₂₀-PEG-lipit ile modifiye etmişlerdir. DNA hibridizasyonu ile de adacık hücre yüzeyine fibronolitik ürokinazı bağlamışlardır. Oligo(dT)₂₀-PEG-lipit'i sentezledikten sonra adacık hücre yüzeyine immobilize etmişlerdir. Oligo(dA)₂₀'yi ürokinaza tutturduktan sonra her iki oligo nükleotitin eşleşmesini sağlayarak ürokinaz adacık hücre yüzeyine immobilize edilmiştir. Eşleşme sonrası adacık morfolojisi ve fonksiyonelliğinde olumsuz bir etki gözlenmemiştir. Ürokinaz aktivitesi 4 gün sonra gözlenmemiş. Bunun sebebi olarak 1,2-distearil-*sn*-gliserol-3- fosfatidiletanolamin (DSPE) veya 1,2-dipalmitoil-*sn*-gliserol-3-fosfatidiletanolamin (DPPE)'nin hidrofobikliğinin, hidrofilik protein benzeri yüksek molekül ağırlığına sahip ürokinaz (54 kDa) ile konjugasyonunun yetersiz olabileceğinden kaynaklandığı düşünülmüştür [95].

Chen ve arkadaşları, 2011 yılında pankreas adacık hücre yüzeyine hidrofobik etkileşim yöntemini kullanarak DNA hibridizasyonu ile antikoagulant (argatroban) yüklü lipozomların immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Oligo(dA)₂₀-PEG-lipit adacık hücre yüzeyine tutturulduktan sonra oligo(dT)₂₀-PEG-lipit tutturularak lipozom ile baz eşleşmesi sağlanmıştır. Böylelikle adacık hücre yüzeyine lipozom yüklü ilaç immobilize edilmiştir. Adacık hücre morfolojisi ve fonksiyonu üzerine olumsuz herhangi bir etki gözlenmemiştir. Yapılan bu *in-vitro* çalışma nakillerin başarısını arttırabileceği düşünülmüştür [96].

Wilson ve arkadaşları, 2011 yılında elektrostatik etkileşim yöntemini kullanarak çokkatmanlı polielektrolit ince filmler ile ilgili çalışma yapmışlardır. Hücreler için zararlı olan polikasyonların toksisitesini azaltmak için yeni polimer sentezlemişlerdir. Sentezledikleri poli(L-lizin)-*graft*-poli(etilen glikol) (PLL-*g*-PEG)'in hücre için toksikliğini azalttığını bulmuşlardır [97].

Wilson ve arkadaşları, 2008 yılında elektrostatik etkileşim yöntemini kullanarak yaptıkları intraportal adacık hücre naklinde tabaka-tabaka yöntemiyle nano incelikte PEG kaplaması

yapmışlardır. Poli-(L-lizin)-g-poli(etilen glikol)(biotin) ve streptavidin kullanarak tabaka-tabaka kaplama yapmışlardır. Yapılan çalışmada elde edilen verilere göre bu kaplama yönteminin adacık hücrelerinin canlılık ve fonksiyonelliğine olumsuz bir etkisi göstermediği gözlenmiştir [98].

Brozzi ve arkadaşları, 2015 yılında yaptıkları çalışmada adacık hücrelerini IFN- γ , IL-1 β , TNF- α sitokinlerine maruz bıraktıklarında endoplazmik retikulum stresinin oluştuğunu belirlemişlerdir [99].

Guthrie ve arkadaşları, 2016 yılında yaptıkları çalışmada bağışıklık sistemi yanıtının endoplazmik retikulum stresi yolaklarından olan PERK sinyal yolağı ile etkileşimini göstermişlerdir [100].

Yan ve arkadaşları, 2014 yılında kendiliğinden çapraz bağlanan poli-L-Glutamik asit ve aljinat polimerleri ile hidrojel oluşturma üzerine yaptıkları çalışmada oluşturdukları enjekte edilebilir hidrojelin kırık dokuların hasarını çalışmalarında kullanılabileceklerini göstermişlerdir [101].

Cao ve arkadaşları, 2011 yılında poli-L-glutamik asit polimerinde bulunan karboksilik asit gruplarını EDC ve NHS kimyasalları ile aktifleştirmişlerdir. Daha sonra kitosanda bulunan amin grupları ile kovalanet bağ oluşturarak gözenekli bir doku iskeleti oluşturmuşlardır. Elde ettikleri doku iskeleti ile kondrosit hücrelerini *in-vitro* koşullarda kültür etmişlerdir. Doku mühendisliği uygulamalarında umut verici bir metot olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir [102].

Zhang ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları çalışmada poli anyon olarak poli-L-glutamik asit, poli katyon olarak kitosan kullanmışlardır. Her iki polimeri karıştırarak elektrostatik etkileşim ile elde ettikleri doku iskeletine adipoz kaynaklı kök hücreleri yüklemişler ve eklem kırık dokuların hasarlanmalarında kullanılabileceğini göstermişlerdir [103].

Ozcan ve arkadaşları, 2004 yılında Science dergisinde yayınladıkları çalışmada hücre kültürü ve fare deneyleri ile tip 2 diyabet insülin eylemi ve endoplazmik retikulum stresi arasındaki bağlantıyı göstermişlerdir [104].

Ozcan ve arkadaşları, 2006 yılında Science dergisinde yayınladıkları çalışmada Tip 2 şeker hastası fare modellerinde kimyasal şaperonların glukoz homeostasisini düzenlediğini ve ER stresini azalttığını bulmuşlardır [105].

Christina M. ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları bir çalışma ile IL-1 β + IL-6'nın ER stresine ve adacıkların fonksiyonel bozukluğuna neden olduğunu bulmuşlardır [106].

Miani M. ve arkadaşları, 2013 yılında yaptıkları bir çalışma ile IL-1 β ile indüklenmiş apoptozis ile pankreas adacık beta hücrelerinin ER stresini çalışmışlardır [107].



4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Deneysel çalışmaların işlem basamakları;

- Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler
- Deneysel çalışmalarda kullanılan çözeltiler
- Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar
- Deneysel aşamalar
- Sıçanlardan pankreas adacık hücre izolasyonu
- Adacık hücrelerinin canlılıklarının değerlendirilmesi
- Adacıkların statik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımlarının belirlenmesi
- Poli-L-Glutamik asit-NHS sentezi
- pH'sı 8 olan HBSS içerisinde Poli-L-Glutamik asit-NHS'in hazırlanması
- Poli-L-Glutamik asit-NHS ile adacık hücrelerinin muamele edilmesi
- Western blot analizi ile endoplazmik retikulum stresinin belirlenmesi
- Poli-L-Glutamik asitin sodyum tuzunun poli-L-glutamik asite (PLGA) dönüştürülmesi
- Poli-L-Glutamik asitin (PLGA) *N*-Hidroksisülfosüksinimit ile aktifleştirilmesi
- Sülf-NHS ile aktifleştirilen PLGA ile adacık hücre yüzey modifikasyonu
- Sülf-NHS ile aktifleştirilen PLGA ile adacık hücre yüzey modifikasyonu yapılan adacıkların sitokinlere maruz bırakılması
- Sülf-NHS ile aktifleştirilen PLGA polimerine fluoresan grup takılması
- Fluoresan grup takılan sülf-NHS ile aktifleştirilen PLGA polimerinin adacık hücre yüzeyine bağlandığının testi
- Poli-L-Glutamik asit-Biyositin sentezi
- Poli-L-Glutamik asitin sodyum tuzunun poli-L-glutamik asite (PLGA) dönüştürülmesi
- Poli-L-Glutamik asitin karboksilik asit grubunun aktifleştirilmesi
- Aktifleştirilen PLGA'dan Poli-L-Glutamik asit-Biyositin sentezi
- Poli-L-Glutamik asit-Biyositin ile adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu
- Biyositin grubu bağlanan PLGA ile adacık hücrelerinin yüzeyinin kaplandığının ispatı
- Pankreas adacık hücrelerinin yüzeyinin modifikasyon yüzdesinin belirlenmesi
- Sülf-NHS ile aktifleştirilen PLGA'nın belirlenen uygun derişimi ile kaplanan adacık hücreleri diyabetli farelerin böbrek kapsülü altına nakli

4.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 4.1. DeneYlerde kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasalın Adı	Kimyasalın Markası
Hanks'in Dengeli Tuz Çözeltisi (HBSS)	Lonza
Roswell Park Memorial Enstitüsü çözeltisi (RPMI)	Gibco
Fetal Sığır Serumı (FBS)	Gibco
Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B çözeltisi (Pen-Strep-Amp)	Lonza
L-Glutamin çözeltisi	Lonza
HEPES çözeltisi	Lonza
Kolajenaz Tip 5	Sigma-Aldrich
Floresein Diasetat	Sigma-Aldrich
Propidiyum İodür	Sigma-Aldrich
Biocoll 1100 çözeltisi	Biochrome
Biocoll 1077 çözeltisi	Biochrome
Aseton	Sigma-Aldrich
n-hekzan	Sigma-Aldrich
D-Glukoz	Sigma-Aldrich
Rat-Fare İnsülin Eliza Kiti	Millipore
Sodyum Klorür	Merck
Sodyum Bikarbonat	Merck
Potasyum Klorür	Merck
Magnezyum Klorür Hekza Hidrat	Merck
Kalsiyum Klorür Dihidrat	Merck
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma-Aldrich
Poli-L-Glutamik Asit (M_A 50000-100000)	Sigma-Aldrich
N-Hidroksisüksinimit (NHS)	Sigma-Aldrich
Sülfo-N-Hidroksisüksinimit (Sülfo-NHS)	Sigma-Aldrich
N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-ethylkarbodiimitt hidroklorür (EDC)	Sigma-Aldrich
4-Morfolinethansulfonyl asit (MES)	Sigma-Aldrich
10X Hanks'in Dengeli Tuz Çözeltisi (10X HBSS)	Lonza

Çizelge 4.1. (devam) Deneyleerde kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasalın Adı	Kimyasalın Markası
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	Sigma-Aldrich
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Hidroklorik Asit	Sigma-Aldrich
Sodyum Hidroksit	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat	Merck
Glisin	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
β -Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
Bromofenol mavisi	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Borik Asit	Sigma-Aldrich
4-Nonilfenil-polietilen glikol (NP-40)	Sigma-Aldrich
Proteaz ve Fosfotaz İnhibitörü	Roche
İnterlökin-1 β (IL-1 β)	BioLegend
Tümör Nekroziz Faktör- α (TNF- α)	BioLegend
İnterferon- γ (IFN- γ)	BioLegend
Fluoreseinil Glisin Amit (FGA)	Fisher Scientific
Biyositin	Sigma-Aldrich
Trietilamin	Sigma-Aldrich
Sülfo-N-hidroksisüksinimidil-6-(biotinamido)hekzanoat	Fisher Scientific
Streptavidin	Sigma-Aldrich
Streptavidin-Fluoreseinizotiyosiyonat (FITC)	Sigma-Aldrich
D-Destiyobiyotin (DSB-X Biyotin)	Fisher Scientific
Horseradish peroksidaz-streptavidin (HRP-Streptavidin)	Millipore
Tetrametil Benzidin (TMB)	Millipore
Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi	Biological Industries

4.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

4.2.1. Kolajenaz tip 5 çözeltisi

7 mg/pankreas olacak şekilde sıçan sayısına göre tartılan kolajenaz tip 5 enzimi 1 mg/mL derişiminde HBSS çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlandı.

4.2.2. HBSS (+) çözeltisi

440 mL HBSS çözeltisi üzerine 50 mL FBS eklendi. Üzerine 5 mL Pen-Strep-Amp ve 5 mL L-Glutamin 0,22 µm'lik filtreden süzülerek eklendi. +4 °C de muhafaza edildi.

4.2.3. RPMI 1640 (+) çözeltisi

427,5 mL HBSS çözeltisi üzerine 50 mL FBS ve 12,5 mL HEPES eklendi. Üzerine 5 mL Pen-Strep-Amp ve 5 mL L-Glutamin 0,22 µm'lik filtreden süzülerek eklendi. +4 °C de muhafaza edildi.

4.2.4. Stok floresein diasetat çözeltisi (24 µM)

1 mg FDA, 100 mL asetonda çözüldü. -20 °C de alüminyum folyo sarılı kapta muhafaza edildi.

4.2.5. Stok propidiyum iyodür çözeltisi (750 µM)

5 mg PI, 10 mL PBS (pH 7,4) çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlandı. +4 °C de alüminyum folyo sarılı kapta muhafaza edildi.

4.2.6. 3,3 mM ve 16,7 mM glukoz içeren RPMI 1640 çözeltileri

100 mL'lik D-Glukozsuz RPMI dan 14,5 mL alındı. Yerine 2,5 mL HEPES, 10 mL FBS, 1 mL Penisilin-Streptomisin, 1 mL L-Glutamin ilave edildi. 59,4 mg D-Glukoz tartılarak ve 100

mL'ye hazırlanan çözeltiliye eklendi. 0,22 µm lik filtreden geçirilerek 3,3 mM derişiminde glukoz içeren RPMI 1640 (+) besiyeri hazırlandı. 16,7 mM derişiminde glukoz içeren RPMI 1640 besiyeri hazırlamak içinde, 100 mL lik D-Glukozsuz RPMI dan 14,5 mL alındı. Yerine 2,5 mL HEPES, 10 mL FBS, 1 mL Penisilin-Streptomisin, 1 mL L-Glutamin ilave edilecek. 300 mg D-Glukoz tartıldı ve 100 mL'ye hazırlanan çözeltiliye eklendi.

4.2.7. 3,3 mM ve 16,7 mM glukoz içeren krebs çözeltileri

1,68 g NaCl (final derişimi 115 mM); 0,50 g NaHCO₃ (final derişimi 24 mM); 0,09 g KCl (final derişimi 5 mM); 0,05 g MgCl₂-6 H₂O (final derişimi 1 mM); 0,09 g CaCl₂-2 H₂O (final derişimi 2,5 mM); 0,25 g BSA (final derişimi % 0,1); 6,25 mL 1M HEPES çözeltilisinden eklendi. Hacim deiyonize su ile 250 mL'ye tamamlandı ve çözülünceye kadar karıştırıldı. pH = 7,3 – 7,5 aralığına 1M NaOH veya 1M HCl kullanılarak getirildi. 0,22 µm filtre sisteminden hazırlanan çözeltili geçirilerek steril edildi ve krebs çözeltili hazırlandı. 59,4 mg D-Glukoz tartılarak ve 100 mL krebs çözeltilisine eklendi. 0,22 µm lik filtreden geçirilerek 3,3 mM derişiminde glukoz içeren krebs çözeltili hazırlandı. 300 mg D-Glukoz tartılarak ve 100 mL krebs çözeltilisine eklendi. 0,22 µm lik filtreden geçirilerek 16,7 mM derişiminde glukoz içeren krebs çözeltili hazırlandı.

4.2.8. MES tampon çözeltilisi

976,2 mg MES ve 29,2 g sodyum klorür tartıldı. 100 mL deiyonize suda çözüldü.

4.2.9. Tris çözeltilisi

1M, pH 6.8 tris çözeltilisi hazırlamak için 121,1 g Tris 1000mL deiyonize suda çözüldü. 1,5M, pH 8.8 tris çözeltilisi hazırlamak için 181,7 g Tris 1000mL suda çözüldü.

4.2.10. Stacking çözeltilisi (2X)

250 mL 1 M tris çözeltilisi ve 20 mL %10 SDS çözeltilisi 1L ye su ile tamamlandı.

4.2.11. Resolving tamponu (3X)

750 mL 1,5 M tris çözeltisi ve 30 mL %10 SDS çözeltisi 1L ye su ile tamamlandı.

4.2.12. Transfer çözeltisi (5X)

30.3 g glisin, 15,4 g tris, 5 mL % 20'lik SDS çözeltileri 1L ye su ile tamamlandı.

4.2.13. Transfer tamponu (SDS ilavesiz) (10X)

144.1 g glisin, 30,3 g tris 1L su içerisinde çözülerek hazırlandı.

4.2.14. Yürütme tamponu (5X)

30.3 g tris, 142,5 g glisin, 5 g SDS, 2,9 g EDTA 1L su içerisinde çözülerek hazırlandı.

4.2.15. Yükleme çözeltisi (laemlie) (5X)

10 g SDS, 50 mL gliserol, 30 mL 1M tris, 20 mL β -merkaptotanol, 1 mL % 1'lik BPB 100 mL su içerisinde çözülerek hazırlandı.

4.2.16. Stripping tamponu

980 mL TBS (1X) üzerine 20 mL % 20 SDS eklendi.

4.2.17. TBST çözeltisi (5X)

6 g tris, 43,9 g NaCl, 5 mL Tween 20, 1,5 g EDTA 1L su içerisinde çözülerek hazırlandı (pH 7,4).

4.2.18. TBS çözeltisi (1X)

2,4 g tris, 17,5 g NaCl, 0,6 g EDTA 2 L su içerisinde çözülerek hazırlandı (pH 7,5).

4.2.19. TBE çözeltisi (5X)

53 g tris, 27,5 g borik asit, 20 mL 0,5 M EDTA 1L su içerisinde çözülerek hazırlanır (pH 8,0).

4.2.20. RIPA tamponu

50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, % 1 NP-40 ve % 0,1 SDS), 1'er tablet proteaz ve fosfotaz inhibitörleri ilave edilir ve 50 mL olarak hazırlanır.

4.2.21. Sitokin çözeltilerinin hazırlanması

TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokinleri DPBS çözeltisi içerisinde çözülerek 10 μ g/mL derişiminde stok çözeltiler hazırlandı. 50 mL RPMI 1640 (+) çözeltisi içerisinde 5 μ L IL-1 β , 25 μ L TNF- α ve 25 μ L IFN- γ eklendi ve 1 ng/mL IL-1 β , 5 ng/mL TNF- α ve 5 ng/mL IFN- γ içeren sitokin çözeltisi hazırlandı.

4.3. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

4.3.1. Floresan mikroskobu

Adacık hücrelerinin canlılığını ve morfolojisini değerlendirmek için Leica marka, DMI 3000 B model floresan mikroskobu kullanıldı.

4.3.2. Santrifüj

Adacık hücre izolasyonu esnasında Hettich marka, Rotina 420 R model santrifüj kullanıldı.

4.3.3. Manyetik karıştırıcı

Deneyde kullanılan polimerlerin tepkimelerini gerçekleştirme esnasında Heildolph marka, MR Hei model manyetik karıştırıcı kullanıldı.

4.3.4. CO₂ inkübatörü

Adacık hücrelerinin *in-vitro* ortamda canlı kalmalarını sağlamak için Sanyo marka, MCO-5AC model CO₂ inkübatörü kullanıldı.

4.3.5. Su banyosu

Adacık hücre izolasyonu esnasında GFL marka, 1083 model su banyosu kullanıldı.

4.3.6. Biyogüvenlik kabini

Adacık hücre izolasyonu ve kültür işlemlerinde sterilizasyon koşullarını sağlamak için Telstar marka, Clean Air model biyogüvenlik kabini kullanıldı.

4.3.7. Çoklu kuyucuk okuyucu

Adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonunun ispatı esnasında absorban değerlerinin ölçümü için Tecan marka, M200 Pro model çoklu kuyucuk okuyucu kullanıldı.

4.3.8. NMR cihazı

Sentezlenen polimer türevlerinin karakterizasyonu için Bruker marka, Ultrashield 300 MHz model NMR cihazı kullanıldı.

4.3.9. FT-IR cihazı

Sentezlenen polimer türevlerinin karakterizasyonu için Thermo marka, Nicolet is50 model FT-IR cihazı kullanıldı.

4.3.10. Cerrahi set

Sıçanlardan pankreas çıkarma işleminde FTS marka cerrahi set kullanıldı.

4.3.11. Kan glukozu ölçme cihazı

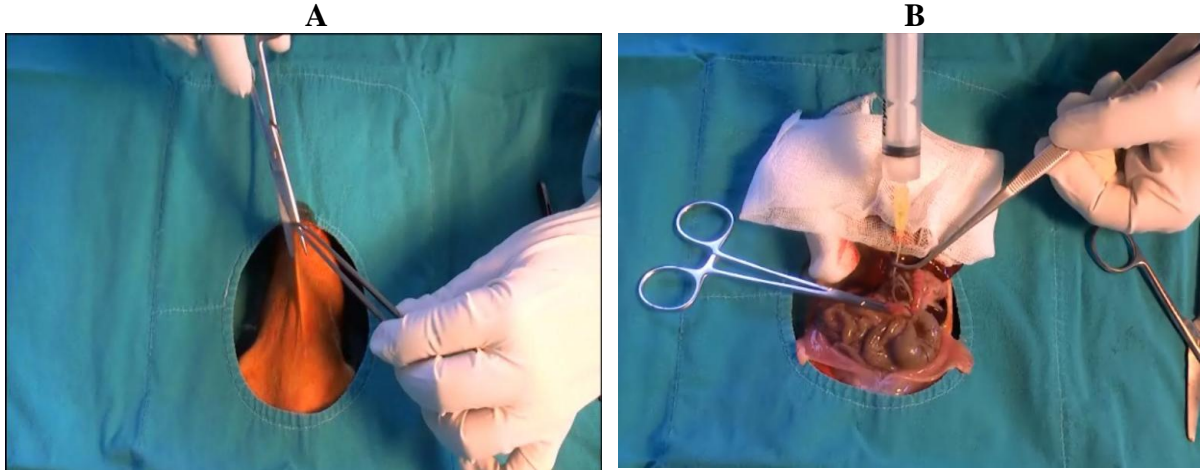
Farelerin kan glukozun ölçmek için On Call Plus marka glukometre kullanıldı.

4.4. Deneysel Aşamalar

4.4.1. Sıçanlardan pankreas adacık hücre izolasyonu

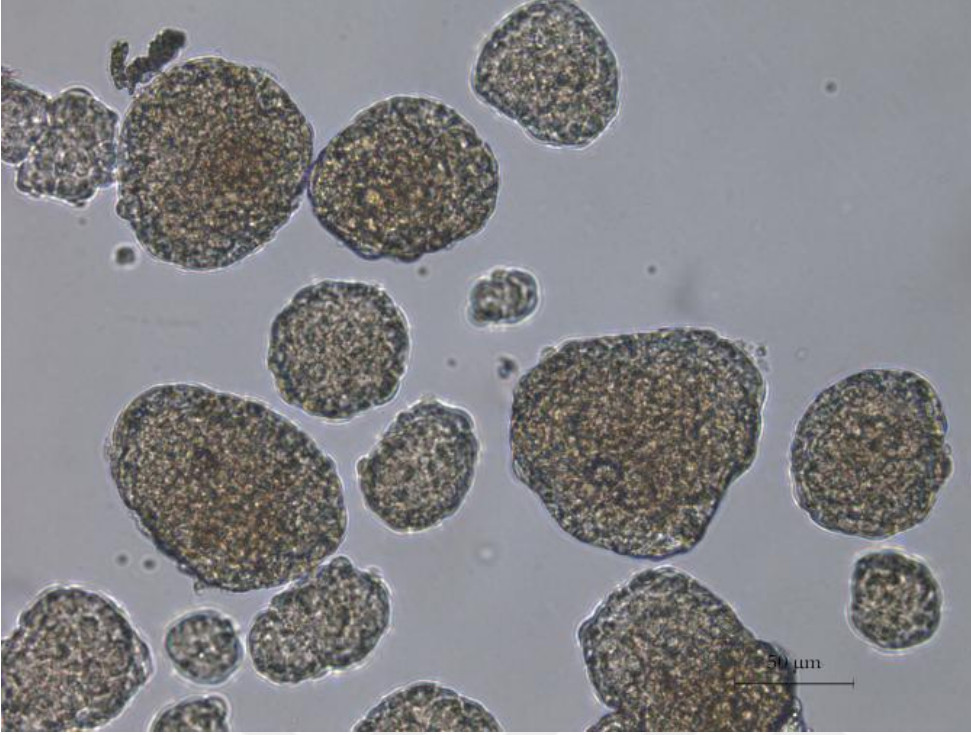
Deneysel çalışmalar, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Hayvanları ünitesinde 2013/58 protokol no'lu Hayvan Deneysel Yönetim Kurulu Kararı (Ek 1) alınarak gerçekleştirildi. Ad-libitum olarak beslenen sıçanlar ketamin/ksilazin anestezi maddesi ile uyutulan Wistar albino türü erkek sıçanın karın bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silindi. Dış deri kesildikten (Resim 4.1.A) sonra karaciğere bastırılarak pankreasın duktus kanalı belirginleştirildi. Pankreastan oniki parmak barsağına açılan kanal kleplendi. Mavi renk yada sarı renk katater kullanılarak duktus kanalına girildi (Resim 4.2.B) ve pankreasa 7 mL 1 mg/mL derişimindeki soğuk kollajenaz tip 5 enzimi enjekte edildi.

Ratın kalbi kesilerek öldürüldü. Pankreas bağlantılı olduğu dokulardan ayrılarak 50 mL lik falkon tüpün içerisinde buza koyuldu. Hazır olan 37 °C'deki su banyosunda pankreaslar 18 dakika inkübe edildi.



Resim 4.1. Sıçan pankreas adacık hücre izolasyonunda yapılan cerrahi işlemler. A. Sıçan'ın dış derisinin kesilmesi işlemi, B. Pankreasın duktus kanalından kolajenaz enziminin enjeksiyonu

İnkübasyon sonrası pankreas çalkalanarak homojenize edildi. 25 mL soğuk HBSS (%10 fetal bovine serumu (FBS), % 1 L-Glutamin, % 1 Penisilin-streptomisin-Amfotersin B) [HBSS (+)] çözeltisi eklendi ve kuvvetlice çalkalanarak pankreas parçalandı. 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet çalkalanarak homojenize edildi. 25 mL soğuk HBSS (+) çözeltisi eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet çalkalanarak homojenize edildi. 50 mL soğuk HBSS (+) çözeltisi eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. 425 µm'lik çelik elekten pankreas dokusu 50 mL'lik falkon tüp içerisine süzüldü. 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet çalkalanarak homojenize edildi. Pellet üzerine 5 mL Biocoll 1100 çözeltisi ilave edildi. Çalkalanarak homojenlik sağlandı. Üzerine yavaşça 10 mL Biocoll 1077 çözeltisi ilave edildi. En son olarak 10 mL RPMI 1640 çözeltisi ilave edildi. 2400 rpm'de 20 dakika 1 hız 0 frende 4 °C'de santrifüj edildi. 1077 yoğunluğu ve RPMI çözeltisi tabakalarının arasındaki adacık hücreleri RPMI 1640 (%10 fetal bovine serumu (FBS), % 1 L-Glutamin, % 1 Penisilin-streptomisin-Amfotersin B, 25 mM HEPES) [RPMI 1640 (+)] çözeltisi içerisine toplandı. 2 kez 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C'de santrifüj edilerek yıkama yapıldı ve adacık hücreleri elde edildi. Adacık hücreleri mikropipet ile RPMI 1640 (+) çözeltisi içerisine mikroskop altında toplandı [108].

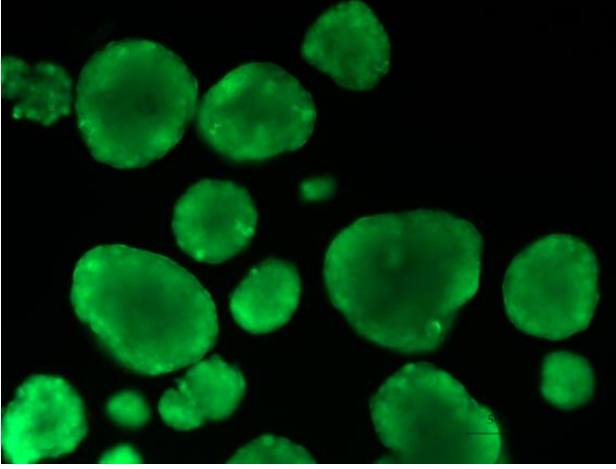


Resim 4.2. İzole edilen adacık hücrelerinin ışık mikroskobu altında 20X görüntüsü

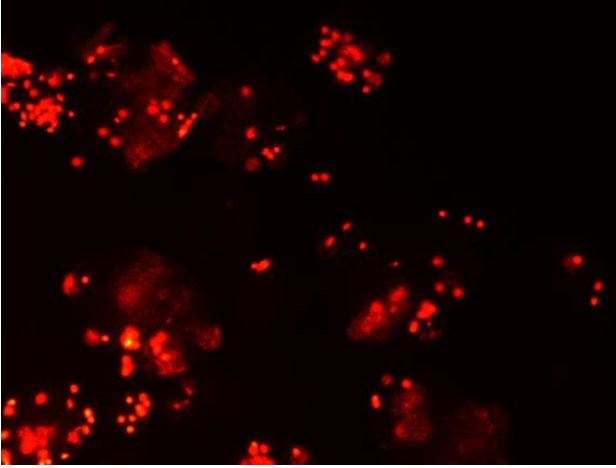
4.4.2. Adacık hücrelerinin canlılıklarının değerlendirilmesi

35 mm'lik petri kabının içerisine 910 μ L DPBS (pH 7,4) çözeltisi eklendi. Üzerine 90 μ L adacık örneği eklendi. 20 μ L floresein diasetat (FDA) stok çözeltisinden, 20 μ L de propidiyum iyodür (PI) stok çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanır) ilave edilerek karanlık ortamda 5 dakika saklandı ve floresan mikroskobunda 20 X ve 40 X büyütmede canlılık belirlendi. Floresein diasetat adacık hücresindeki canlı hücrelerin membranından geçerek sitoplazmadaki esteraz enzimleri tarafından floreseine dönüşerek mavi fluoresan eksitasyon ışık altında yeşil renkli ışımaya yaptığı gözlemlendi. Böylelikle canlı hücreler belirlendi (Resim 4.3.A). Propidiyum iyodür, canlı hücrelerin membranından geçemediği için adacık hücresindeki ölü hücrelerin DNA'larına bağlanarak yeşil fluoresan eksitasyon ışık altında kırmızı renkli ışımaya yaptığı gözlemlendi. Böylelikle ölü hücreler belirlendi (Resim 4.3.B) [108].

A

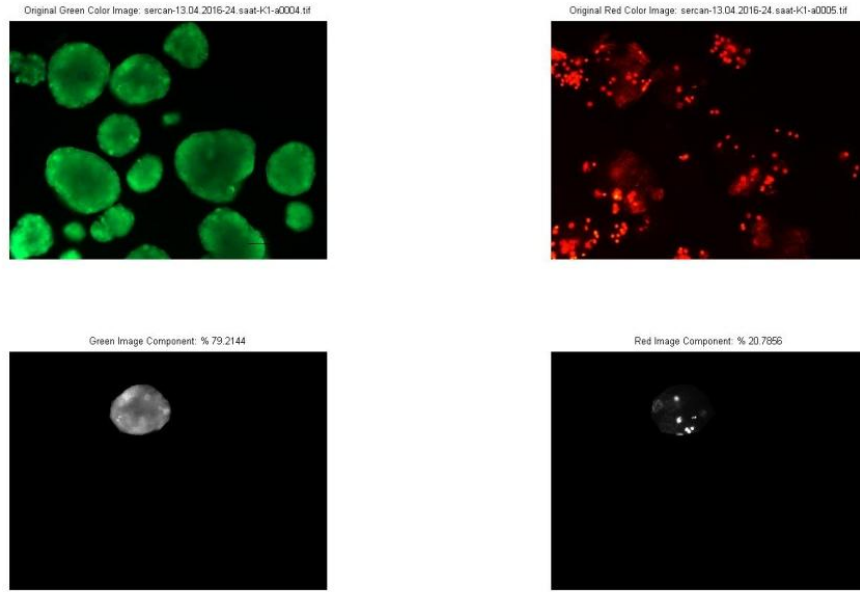


B



Resim 4.3. Adacık hücrelerinin canlılık değeriendirilmesinde kullanılan FDA (A) ve PI (B) boyalarının adacık hücre içerisindeki ışmaları

Her iki ışma altında da hücrenin fotoğrafları çekildi ve çekilen fotoğraflar MAT-LAB programı kullanılarak birbirine oranlandı ve hücrenin % canlılığı hesaplandı (Resim 4.4).



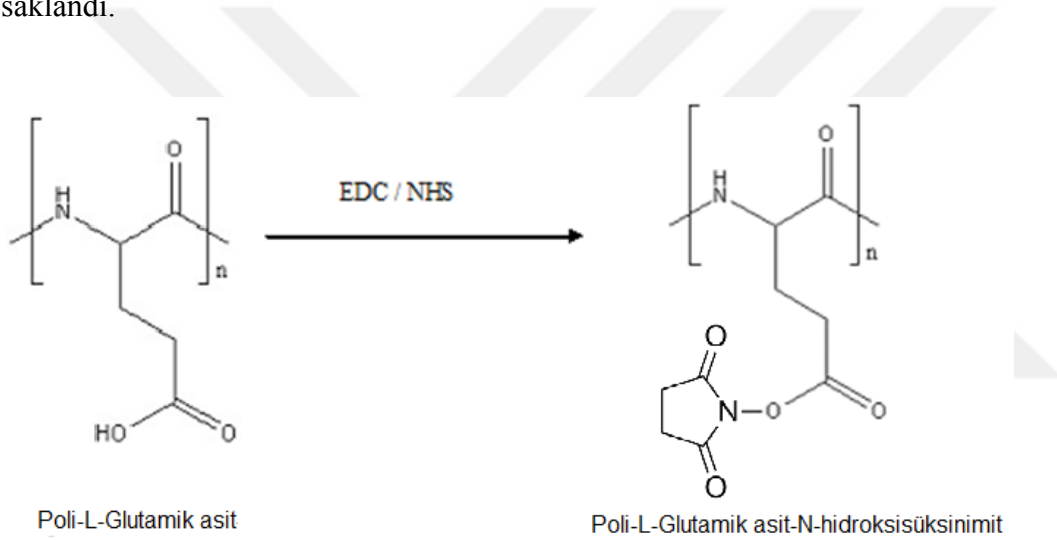
Resim 4.4. MAT-LAB programı ile canlılığı hesaplanan adacık hücreleri

4.4.3. Adacıkların statik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımlarının belirlenmesi

Deneye başlamadan önce glukoz stimülasyonunda kullanılacak olan RPMI 1640 ya da Krebs çözeltileri hazırlandı. Çözeltiler hazırlandıktan sonra 24 gözenekli kültür kabınının 1 ve 2 numaralı kuyularına 1'er mL 3,3 mM glukoz çözeltisi, 3 numaralı kuyusuna 1 mL 16,7 mM glukoz çözeltisi eklendi. 1 numaralı kuyuya 8 µm gözenek çapına sahip membran yerleştirildi ve membran içerisine 25 adet yaklaşık 150 µm çapında adacık hücresi koyuldu. 30 dakika 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra membran bu gözenekten alınarak 3,3 mM glukoz derişimine sahip çözelti bulunan 2. gözeneğe alındı ve 60 dakika 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. 60. dakikada membran 16,7 mM glukoz derişimine sahip çözelti bulunan 3. gözeneğe yerleştirildi ve 2. gözenekteki çözeltilerden insülin ölçümü için 500 µL örnek alındı. Membran 3.gözenekte 60 dakika 37 °C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi ve 60. dakika sonunda da 3. gözenekten 500 µL insülin örneği alındı. Alınan örneklerdeki insülin miktarları Rat/Mouse insülin eliza kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile çalışıldı. 16,7 mM glukoz derişiminde elde edilen insülin miktarı, 3,3 mM glukoz derişiminde elde edilen insülin miktarına oranlanarak stimülasyon indeksi hesaplandı [108].

4.4.4. Poli-L-Glutamik asit-NHS sentezi

0,025 g poli-L-Glutamik asit sodyum tuzu (PLGA-Na) 2,5 mL taze hazırlanan 0,5 M NaCl içeren 50 mM MES tamponu (pH=6,5) içerisinde çözüldü. Üzerine 0,375 mmol (0,075 g) *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N*'-ethylkarbodiimit hidroklorür (EDC) ilave edildi. Tüp içerisine balık atılarak +4 °C'de 30 dakika karıştırıldı. Üzerine 0,188 mmol (0,022 g) *N*-hidroksisüksinimit (NHS) ilave edildi. +4 °C'de 1 gece balık ile karıştırıldı. Daha sonra PLGA-NHS karışımı, geçirgenliği M_A 12000-14000 olan diyaliz membranına koyuldu ve 500 mL deiyonize su içerisinde 3 gün +4 °C'de diyaliz edildi. Hergün su değiştirildi. Diyaliz edilen PLGA-NHS, 15 mL'lik falkon tüp içerisine alındı. Elde edilen çözelti +4 °C'de saklandı.



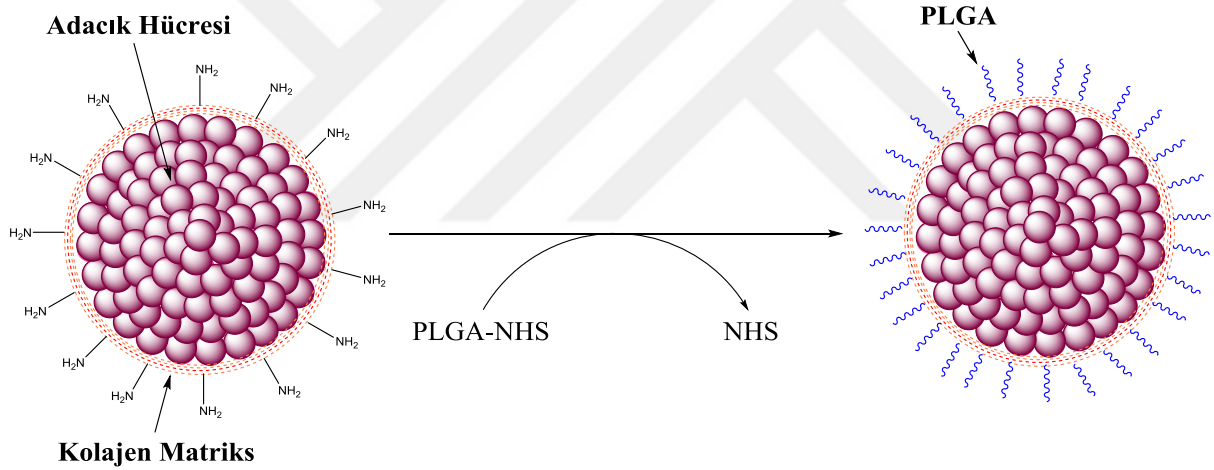
Şekil 4.1. PLGA-NHS sentez reaksiyonu

4.4.5. pH'sı 8 olan HBSS içerisinde Poli-L-Glutamik asit-NHS'in hazırlanması

+4 °C'de bekletilen PLGA-NHS üzerine 0,4 mL HBSS 10X eklendi. PLGA-NHS'in hacmi 4 mL oldu. % 0,625'lik PLGA-NHS elde edildi. PLGA-NHS'in pH'ı 0,1 M NaOH ile pH 8'e ayarlandı.

4.4.6. Poli-L-Glutamik asit-NHS ile adacık hücrelerinin muamele edilmesi

Sıçan adacık hücre izolasyonu yapıldıktan sonra, adacık hücrelerine canlılık ve glukoz stimülasyon testleri yapıldı. Elde edilen hücreler 24 saat 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildiler. Hücrelerin 24. saat canlılıklarına bakıldı. Kalan hücrelerden 250 tanesi 8 µm gözenek çapına sahip membran kültür kabı içerisine yerleştirildi. HBSS 1X ile 3 kez yıkandı. 24 gözenekli kültür kabının bir gözüne 1 mL pH=8 PLGA-NHS eklendi ve üzerine adacık içeren membran yerleştirildi. 1 saat 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyon yapıldı. Membranlar 24 gözenekli hücre kültür kabından alındı ve 2 kez HBSS 1X ile yıkandı. Membranın içine pipetaj yapılarak hücreler RPMI 1640 (+) ile membrandan alındı. Kontrol grubuna 24., 48., ve 72. saatlerde, PLGA grubuna 24. ve 48. saatlerde canlılık ve glukoz stimülasyonu testleri yapıldı.



Şekil 4.2. Adacık hücrelerinin poli-L-Glutamik asit ile kovalent modifikasyonu

4.4.7. Western blot analizi ile endoplazmik retikulum stresinin belirlenmesi

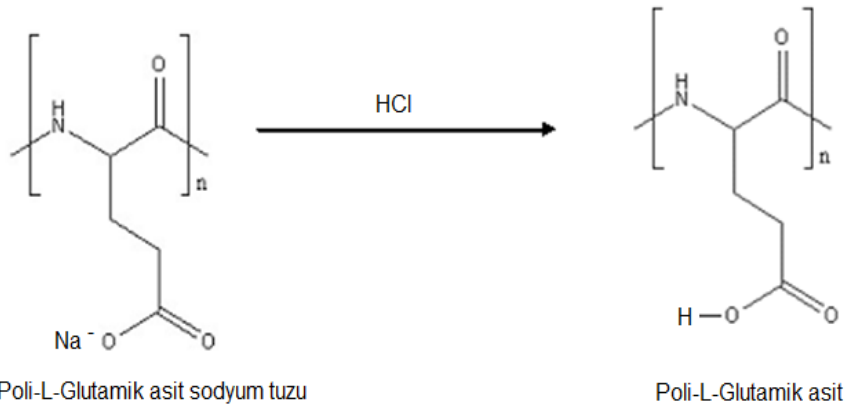
2000 adacık örneği üzerine 400 µL soğuk RIPA tamponu eklendi. Adacık hücrelerini lizis etmek için 20^{3/4} boyutundaki iğne ucu kullanıldı. Adacıklar bu iğne ucu kullanılarak 20 kez pipetaj edildi. Homojenize edilen hücreler 30 dakika 4 °C’de inkübe edildi. 20000 g’de 30 dakika santrifüj edildiler. 1,5 mL’lik ependorf tüplerin her birine 80 µg protein eklendi. Proteinler Laemmli tamponu kullanılarak 100 °C’de 5 dakika denatüre edildiler. Tüplerdeki proteinler SDS-PAGE jele yüklenmeden önce 15 dakika oda sıcaklığında tutuldular. Daha

sonra proteinler jele yüklendiler ve yürütüldüler. Daha sonra proteinler jelden membrana aktarıldılar. Membran % 10 bloklama çözeltisi içeren TBS çözeltisinde 1 saat inkübe edildi. Membran daha sonra % 5 bloklama çözeltisi ile birincil antikor içeren TBST çözeltisinde 4 °C’de 1 gece inkübe edildi. Son olarak membran %10 bloklama çözeltisi ile ikincil antikor içeren TBST çözeltisinde 1 saat inkübe edildi. Membran 3 kez TBST tamponu ile yıkandı. Kemilüminesans test sistemi ile immunoblotlama yapıldı. Bantlar Kodak yansıtma filminde görüntülendi. Bantların yoğunluğu Image J programı ile değerlendirildi.

4.4.8. Poli-L-Glutamik asitin sodyum tuzunun (M_A 50000-100000) poli-L-glutamik asite (PLGA) dönüştürülmesi

Ependorf tüp içerisine 20 mg poli-L-glutamik asit sodyum tuzu (PLGA-Na) koyuldu. Üzerine 112 μ L deiyonize su eklendi. PLGA-Na çözüldü. Çözeltinin üzerine 26 μ L derişik HCl eklendi. Kısa bir süre sonra beyaz jel halinde çökelek oluştu [109].

Oluşan çökelek 3 kez 4500 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Her santrifüj sonrası süpernatant mümkün olduğunca atıldı.

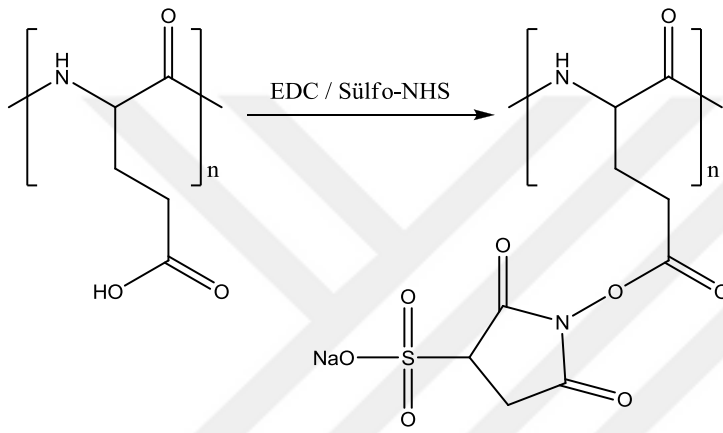


Şekil 4.3. PLGA-Na un asidik forma dönüşüm reaksiyonu

4.4.9. Poli-L-Glutamik asitin (PLGA) N-Hidroksisülfosüksinimit ile aktifleştirilmesi

Oluşturulan PLGA üzerine 500 μ L DMSO eklenerek çözüldü. Cam beher içerisine bu PLGA çözeltisi eklenerek hacmi 5 mL’ye DMSO ile tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 0,045 g N-Hidroksisülfosüksinimit sodyum tuzu (Sülfo-NHS) eklendi. Sülfo-NHS

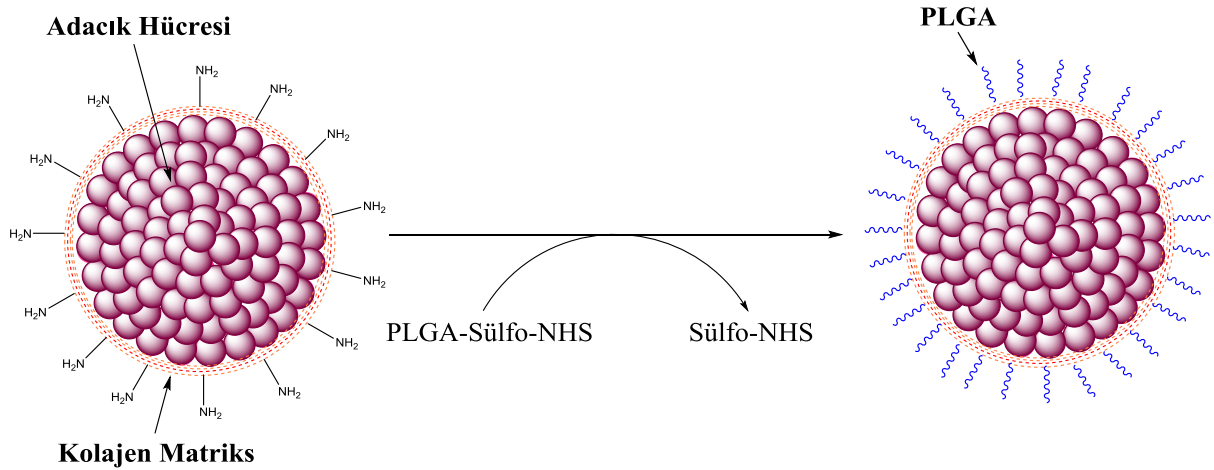
çözöldükten sonra 0,074 g *N*-(3-Dimetiylaminopropil)-*N*'-etilkarbodiimit hidroklorür (EDC) ilave edildi. Oda sıcaklığında 20 saat karıştırıldı. Çözelti beher içerisinde bulunan 20 mL aseton üzerine dököldü. 2-3 dakika sonra çökelek oluşmaya başladı. Çökelek olgunlaşması için yaklaşık 5 dakika beklendi. Karışımlar cam deney tüplerine koyuldu ve 1300 rpm 3 hız 1 frende 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Oluşan ürün 3 kez aseton, 1 kez *n*-hekzan ile yıkandı ve santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Ürün kuruduktan sonra tartıldı ve ependorf tüp içerisinde koyularak silika jel ortamında +4 °C'de saklandı. Toplam 35,5 mg ürün oluştu [110].



Şekil 4.4. PLGA-Sülfö-NHS sentez reaksiyonu

4.4.10. Sülfö-NHS ile aktifleştirilen PLGA ile adacık hücre yüzey modifikasyonu

Wistar rat'lardan izole edilen adacık hücreleri T25 kültür flaskında 37 °C %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. Karboksilik asit grubu aktifleştirilen poli-L-glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit (PLGA-Sülfö-NHS) 11 mM glukoz içeren DPBS çözeltisi (DPBSWG) içerisinde 3 mg/mL, 2 mg/mL ve 1 mg/mL derişiminde 3 ayrı çözeltisi hazırlandı. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandıktan sonra 4 parçaya bölündüler. Hazırlanan çözeltiler ile 30 dakika 37 °C %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildiler. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandıktan sonra 6'lı hücre kültür kabında 3 mL RPMI 1640 (+) besiyeri ile 48 saat 37 °C %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edildiler. 0, 24 ve 48. saatlerde hücrelerin % canlılıkları belirlendi. 48. saat de raporun 4.2.7 kısmında anlatıldığı gibi Krebs çözeltisi ile glukoz stimölasyon testi yapıldı.



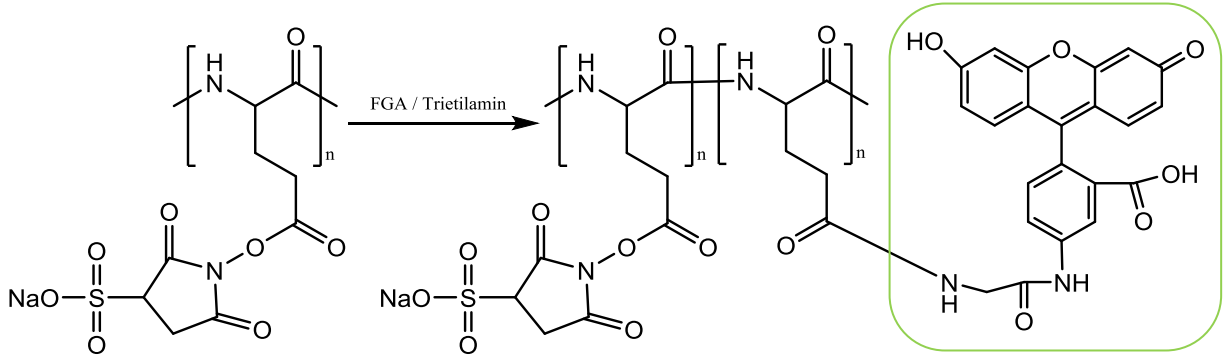
Şekil 4.5. PLGA-Sülfo-NHS ile adacık hücrenin yüzey modifikasyonu

4.4.11. Sülfo-NHS ile aktifleştirilen PLGA ile adacık hücre yüzey modifikasyonu yapılan adacıkların sitokinlere maruz bırakılması

Yüzey modifikasyonu gerçekleştiren adacık hücreleri kültüre kaldırıldıktan 3 saat sonra ayrı bir 6'lı hücre kültür kabında IL-1 β (1 ng/mL), TNF- α (5 ng/mL) ve IFN- γ (5 ng/mL) [83] içeren 3 mL RPMI 1640 (+) çözeltilisi ile kültüre edildiler. Hücreler 48 saat 37 °C %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildiler. 0, 24 ve 48. saatlerde hücrelerin % canlılıkları tespit edildi.

4.4.12. Sülfo-NHS ile aktifleştirilen PLGA polimerine fluoreсан grup takılması

10 mg PLGA-Sülfo-NHS 2,5 mL DMSO'da çözüldü. Üzerine 1 mL DMSO'da çözülen 0,5 mg Fluoresenil Glisin Amit (FGA) çözeltilisinden 10 μ L eklendi. 3 μ L trietilamin eklendi. Karanlık ortamda 24 saat karıştırıldı. Çözelti beher içerisinde bulunan 20 mL aseton üzerine döküldü. 2-3 dakika sonra çökelek oluşmaya başladı. Çökelek olgunlaşması için yaklaşık 5 dakika beklendi. Karışımlar cam deney tüplerine koyuldu ve 1300 rpm 3 hız 1 frende 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Oluşan ürün 3 kez aseton, 1 kez n-hekzan ile yıkandı ve santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Ürün kuruduktan sonra tartıldı ve ependorf tüp içerisinde koyularak silika jel ortamında +4 °C'de saklandı. Toplam 3,3 mg ürün oluştu.



Şekil 4.6. PLGA-FGA sentez reaksiyonu

4.4.13. Floresan grup takılan sülfo-NHS ile aktifleştirilen PLGA polimerinin adacık hücre yüzeyine bağlandığının tespiti

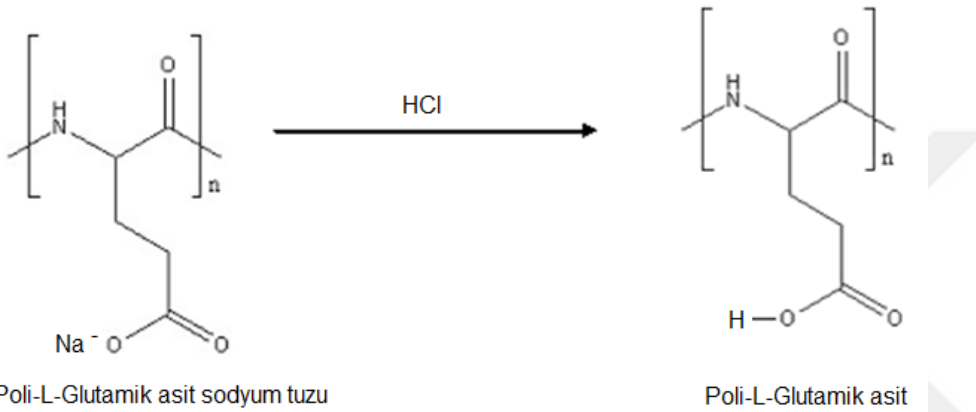
İzole edilen pankreas adacık hücreleri 24 saat kültüre edildikten sonra 15 mL'lik falkon tüp içerisine koyuldu. 3 kez 11 mM glukoz içeren DPBS çözeltisi (DPBSWG) ile yıkandı. Her aşamada 15 mL lik falkon içerisinde 1300 rpm de 3 hız 1 frende oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı. 15 mL lik falkon içerisindeki adacıkların üzerine karanlıkta tartılıp DPBSWG içerisinde çözülerek hazırlanan 2 mg/mL derişimindeki floresan grup takılan poli-L-Glutamik asit-Sülfo-NHS (PLGA-Sülfo-NHS-FGA) adacıkların üzerine koyuldu. Tüpler alüminyum folyaya sarıldıktan sonra kapakları gevşek halde 30 dakika 37 °C CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Tüpler her 10 dakikada bir çalkalandı. 1300 rpm de 3 hız 1 frende oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandıktan sonra, 3 mL RPMI 1640 (+) besiyeri ile 37 °C CO₂ inkübatöründe inkübe edildiler. Adacıkların yüzeylerinin kaplanıp kaplanmadığı mavi floresan ışık altındaki fotoğraf çekimi ile belirlendi.

4.4.14. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin sentezi

Poli-L-Glutamik asit-Biyositin sentezinin ilk basamağında Poli-L-Glutamik asitin sodyum tuzunun poli-L-glutamik asite (PLGA) dönüştürüldü, daha sonra Poli-L-Glutamik asitin karboksilik asit grubu aktifleştirildi. En son basamak olarak aktifleştirilen PLGA ve Biyositin kullanılarak Poli-L-Glutamik asit-Biyositin sentezlendi.

4.4.14.1. Poli-L-Glutamik asitin sodyum tuzunun poli-L-glutamik asite (PLGA) dönüştürülmesi

Ependorf tüp içerisine 15 mg poli-L-glutamik asit sodyum tuzu (PLGA-Na) koyuldu. Üzerine 5,6 µL deiyonize su/mg PLGA-Na olacak şekilde 84 µL deiyonize su eklendi. PLGA-Na çözüldü. Üzerine 0,65 µL hidroklorik asit (HCl)/mg PLGA-Na olacak şekilde 9,75 µL derişik HCl eklendi . Kısa bir süre sonra beyaz jel halinde çökelek oluştu.

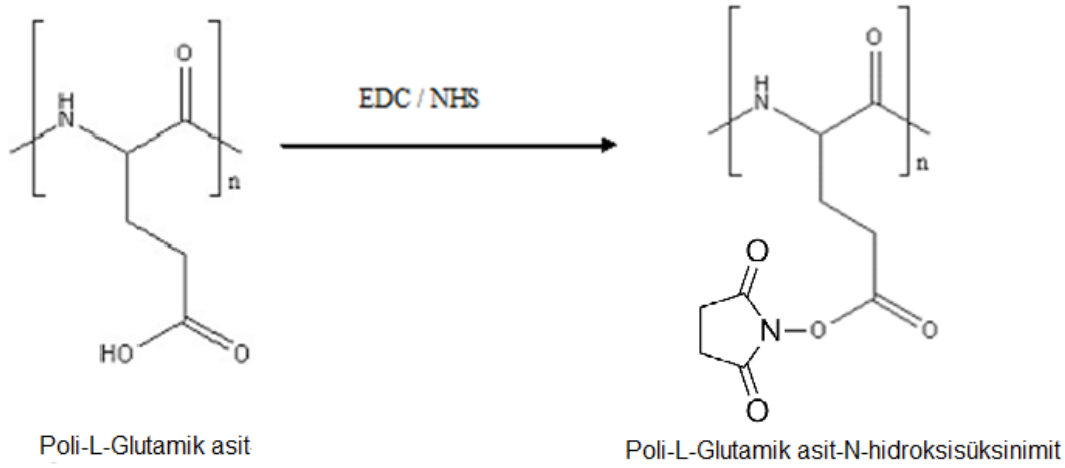


Şekil 4.7. PLGA-Na un asidik forma dönüşüm reaksiyonu

Oluşan çökelek 3 kez 4000 rpm de 3 dakika santrifüj edildi. Her santrifüj sonrası süpernatant mümkün olduğunca atıldı.

4.4.14.2. Poli-L-Glutamik asitin karboksilik asit grubunun aktifleştirilmesi

Elde edilen PLGA üzerine 150 µL DMSO eklenerek çözüldü. Cam beher içerisine bu PLGA çözeltisi koyuldu ve hacmi 5 mL'ye DMSO ile tamamlandı. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 0,045 g NHS eklendi. NHS çözüldükten sonra 0,074 g EDC koyuldu. Oda sıcaklığında 20 saat karıştırıldı.



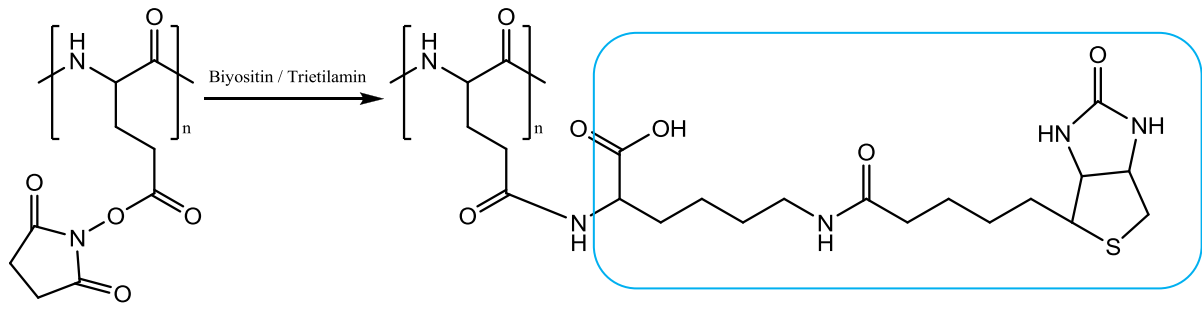
Şekil 4.8. PLGA-NHS sentez reaksiyonu

Karışım beher içerisinde bulunan 20 mL aseton üzerine döküldü. 2-3 dakika sonra çökelek oluşmaya başladı. Çökelek olgunlaşması için yaklaşık 5 dakika beklendi. Karışımlar cam deney tüplerine koyuldu ve 1300 rpm 3 hız 1 frende 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Oluşan ürün 2 kez aseton, 1 kez n-hexan ile yıkandı ve santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Tüplere biraz eğim verilerek kurumaları sağlandı. Ürün kurduktan sonra tartıldı ve kriotüp içerisine koyularak silika jel ortamında +4 °C'de saklandı. Toplam 12,1 mg ürün oluştu.

Aktifleştirilen PLGA'dan Poli-L-Glutamik asit-Biyositin sentezi

7 mg Biyositin, 5 mL DMSO'da çözüldü. Üzerine 1 mL DMSO'da çözülen 7 mg PLGA-NHS eklendi. 3 µL trietilamin eklendi. Oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. Çözelti beher içerisinde bulunan 10 mL aseton üzerine döküldü. 2-3 dakika sonra çökelek oluşmaya başladı. Çökelek olgunlaşması için yaklaşık 5 dakika beklendi. Karışımlar cam deney tüplerine koyuldu ve 1300 rpm 3 hız 1 frende 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

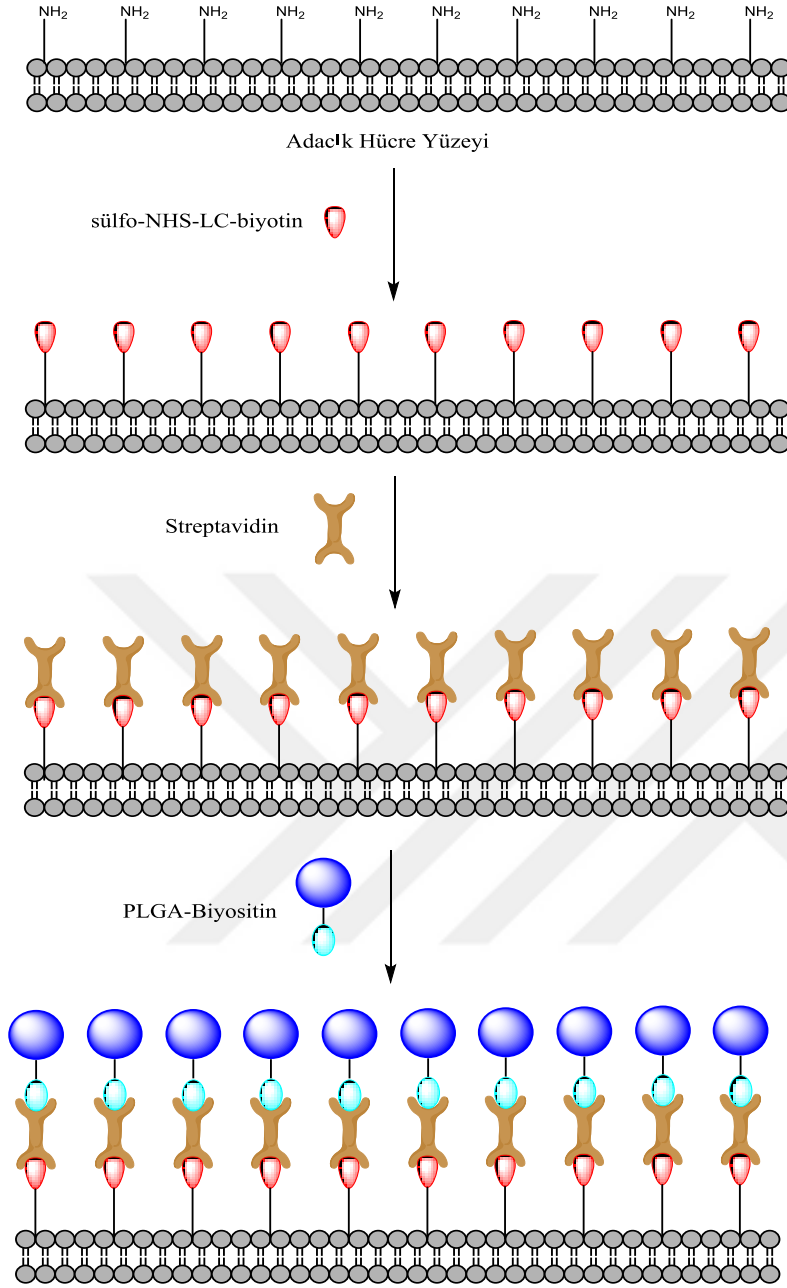
Oluşan ürün 3 kez aseton, 1 kez n-hekzan ile yıkandı ve santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Ürün kurduktan sonra tartıldı ve ependorf tüp içerisine koyularak silika jel ortamında +4 °C'de saklandı. Toplam 4 mg ürün oluştu.



Şekil 4.9. PLGA-Biyositin sentezi

4.4.15. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin ile adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu

Wistar rat'lardan izole edilen adacık hücreleri T25 kültür flaskında 37 °C %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. 11 mM glukoz içeren DPBS çözeltisi (DPBSWG) içerisinde 4 mM derişiminde sNHS-LC-biyotin çözeltisi hazırlandı. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat sülfö-NHS-LC-biyotin çözeltisi ile inkübe edildiler [90]. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandıktan sonra DPBSWG de çözülerek hazırlanan 0,01 mg/mL derişiminde streptavidin çözeltisi ile 10 dakika inkübe edildiler [89]. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandılar. DPBSWG ile hazırlanan 2 mg/mL derişiminde ki Poli-L-Glutamik asit-Biyositin ile 10 dakika 37 °C %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildiler. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandıktan sonra RPMI 1640 (+) besiyeri ile kültüre edildiler.

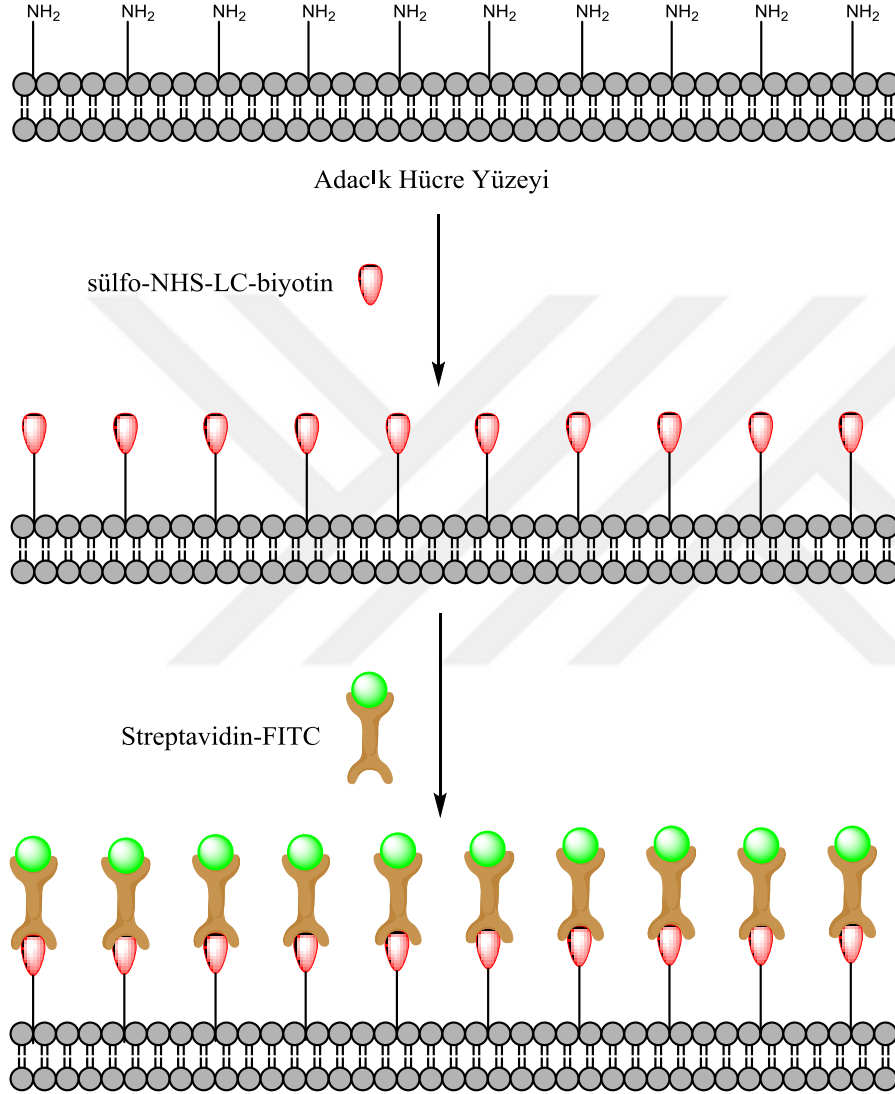


Şekil 4.10. Adacık hücre yüzeyinin biyotinlenme, streptavidinlenme ve PLGA-Biyositin ile kaplanma işlemlerinin şematik gösterimi

4.4.16. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile adacık hücrelerinin yüzeyi kaplandığının ispatı

Wistar rat'lardan izole edilen adacık hücreleri T25 kültür flaskında 37 °C %5 CO₂ inkübatöründe kültüre edildi. 11 mM glukoz içeren DPBS çözeltisi (DPBSWG) içerisinde 4 mM derişiminde sNHS-LC-biotin çözeltisi hazırlandı. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile

yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat sNHS-LC-biotin çözeltisi ile inkübe edildiler. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandıktan sonra DPBSWG de çözülerek hazırlanan 0,01 mg/mL derişiminde streptavidin-FITC çözeltisi ile 10 dakika inkübe edildiler. Hücreler 2 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandılar. Daha sonra RPMI 1640 (+) besiyeri ile kültüre edildiler.

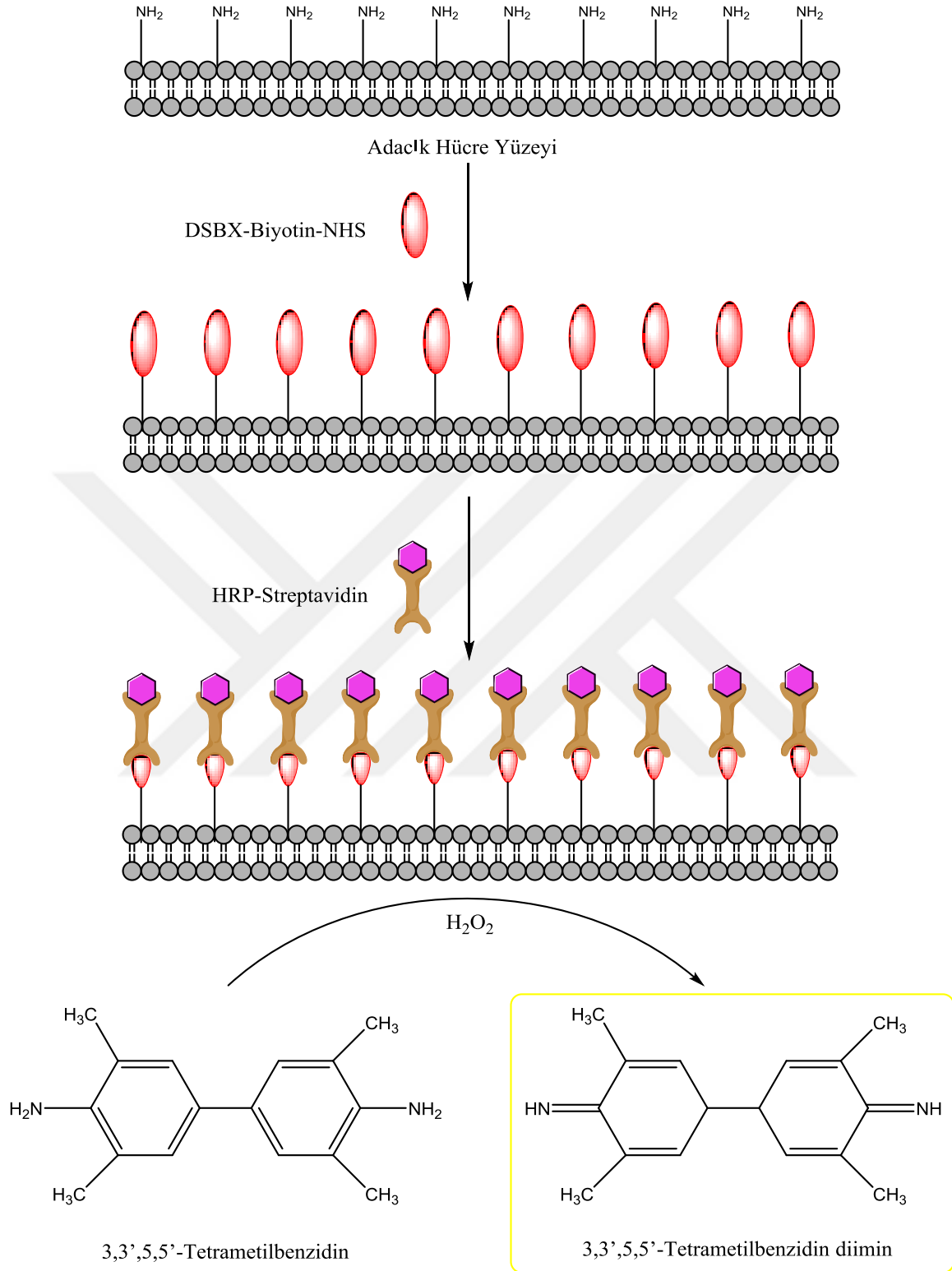


Şekil 4.11. Adacık hücre yüzeyinin biyotinylendiğinin ispatı olarak streptavidin-FITC ile muamelesinin şematik gösterimi

4.4.17. Pankreas adacık hücrelerinin yüzeyinin modifikasyon yüzdesinin belirlenmesi

Aktifleştirilen poli-L-glutamik asitin adacık hücrelerinin yüzeyine kovalent bağ ile bağlandığını tespit etmek için, karboksilik asit grubu aktifleştirilmiş olan biyotinin bağlanma derecesi karşılaştırıldı. Hipotezimize göre, eğer yüzey modifikasyonu gerçekleştiyse aktifleştirilmiş biyotinin bağlanma oranında düşüş gerçekleşecekti. Bu işlem için aşağıdaki şekilde bir deneysel aşama planlandı.

200 µg DSB-X biyotin içerisine 900 µL DPBSWG eklendi. Vortekslendi. 24 kuyucuklu hücre kültür kabının ayrı kuyularına 300 µL eklenerek 3 parçaya bölündü. Bu çözeltilere, kontrol, 1 mg/mL ve 2 mg/mL gruplarının hücrelerini içeren insertler koyularak 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dakikada bir çalkalandılar. İnkübasyon sonrasında 4 kez 700 µL DPBSWG ile insertteki adacıklar yıkandı. 3 adet 1:50 oranında dilüsyon yapılan (14 µL HRP-SA / 700 µL toplam hacim) Horseradish peroksidaz-Streptavidin (HRP-SA) çözeltileri 1,5 mL lik ependorf tüpte, adacıklar son yıkama işlemindeyken hazırlandı. Bu çözeltiler 24 kuyucuklu hücre kültür kabının ayrı kuyularına eklendi, üzerine insert içerisindeki adacıklar yerleştirildi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildiler. İnkübasyon sonrasında 4 kez 700 µL DPBSWG ile insertteki adacıklar yıkandı. Pipetaj yapılarak kuyucuklu hücre kültür kabının ayrı kuyularına her bir gruptan n=3 olacak şekilde 100 µL hücre eklendi. Hücrelerin çökmesi için plate santrifüjünde spin ettirildiler. Her bir kuyuda 100 µL örnek kalacak şekilde süpernatant atıldı. Üzerlerine karanlıkta 100 µL TMB substratı ilave edildi. Kör numune içinde 3 kuyuya 100 µL TMB substratı eklendi. Aluminyum folyoya sarıldı. 300 rpm de 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı cihaz ile çalkalandılar. Üzerlerine 50 µL Stop çözeltisi ilave edildi. Hücrelerin çökmesi için santrifüj ettirildiler. Her bir kuyucuktan 100 µL örnek alınarak yeni 96 lık plate koyuldu. Absorbans değerleri çoklu kuyucuk okuyucuda 450 nm'de okundu [90].

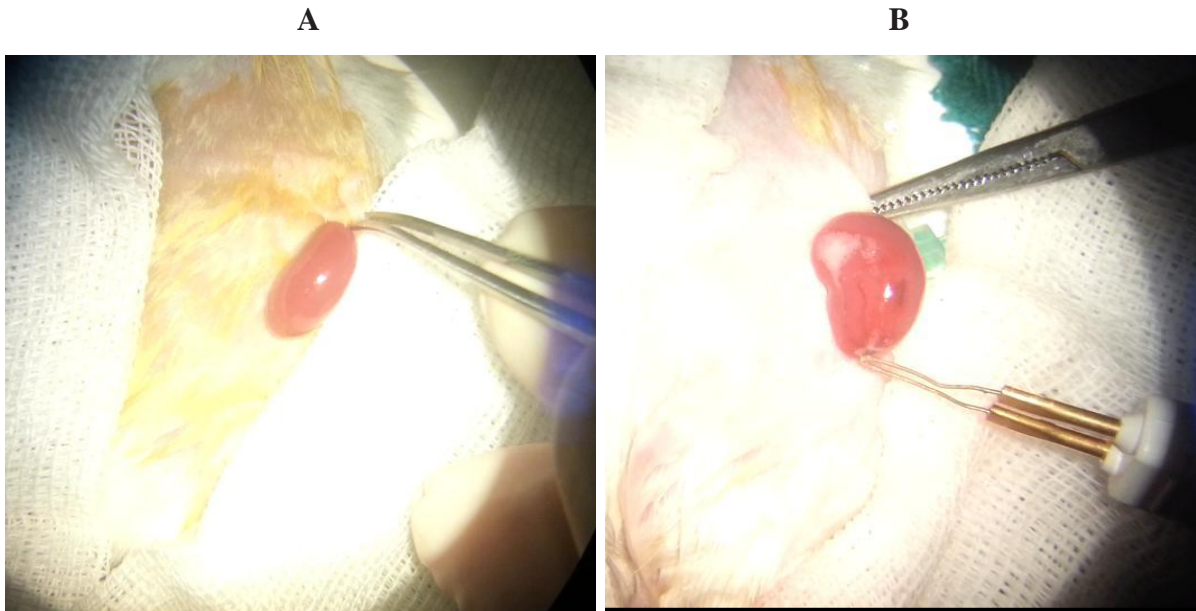


HRP-Streptavidin : Horseradish peroksidaz-Streptavidin (HRP-SA)

Şekil 4.12. Adacık hücre yüzeyinin modifikasyon yüzdesinin belirlenmesinin şematik gösterimi

4.4.18. Sülfö-NHS ile aktifleştirilen PLGA nın belirlenen uygun derişimi ile kaplanan adacık hücreleri diyabetli farelerin böbrek kapsülü altına nakli

Deneyisel çalışmalar, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları ünitesinde 2016/32 protokol no'lu Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı (Ek 2) alınarak gerçekleştirildi. 6 saat aç bırakılan Balb-c farelere 150 mg/kg dozunda streptozosin pH 4,5 sitrat tamponu içerisinde çözülerek intraperitoneal olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan 3 gün sonra kan glukoz değeri 300 mg/dL'den yüksek olan fareler diyabetli olarak kabul edildi. 10 gün süresince 300 mg/dL'den yüksek kan glukoz değerine sahip fareler nakil çalışmalarında kullanıldı. Wistar sıçanlardan izole edilen adacık hücreleri 24 saat kültüre edildikten sonra 3 kez DPBSWG çözeltisi ile yıkandılar. Kontrol grubu hücreleri DPBSWG çözeltisinde, kaplama grubu hücreleri DPBSWG çözeltisinde çözülerek hazırlanan 2 mg/mL PLGA-Sülfö-NHS içerisinde 37 °C de 30 dakika inkübe edildiler. 3 kez HBSS çözeltisi ile yıkandılar. Daha sonra PE 50 kanül içerisinde yerleştirilen 500 adet adacık Hamilton şırıngası yardımıyla Streptozosin ile diyabet edilen Balb/c farelerin sol böbrek kapsülü altına nakil edildiler. Kan glukoz değerleri 30 gün boyunca farelerin kuyruk veninden On Call Plus glukometre cihazı ile ölçüldü. Nakil başarısı günleri, farenin kan glukoz değerinin 200 mg/dL ve altında olduğu günler olarak belirlendi [111].



Resim 4.5. Diyabetli farenin böbrek görüntüsü (A), diyabetli farenin böbrek kapsülü altına nakil edilen adacık hücreleri ve kapsüle girilen bölgenin koterle yakma işlemi (B)

4.5. İstatiksel Analiz

Gruplar arasındaki istatistiksel farkı belirlemek için GraphPad Prism 6 programı kullanıldı. Student's t test, One-Way ya da Two-Way ANOVA testleri kullanıldı.



5. SONUÇLAR

Şeker hastalığı her geçen gün sayısı artan bir metabolik rahatsızlıktır. Bu metabolik hastalığın tedavilerinden birisi olan pankreas adacık hücre nakli şeker hastaları için umut vaat eden bir tedavi yöntemidir. Uygulanan bu tedavi yönteminin kısıtlayıcı yönleri bulunmaktadır. Nanotıp uygulamaları tedavi başarısını arttırıcı yönde bu kısıtlamalara katkı sağlamaktadır.

Bağışıklık sistemi saldırılarını engellemek ve nakil edilen hücrelerin daha uzun ömürlü olmalarını desteklemek adacık hücrelerinin nakil başarısını arttıracak olan bir etkidir. Bizde çalışmamızda bu amaca uygun olacak şekilde pankreas adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonunu, aktifleştirilen poli-L-glutamik asit türevleri ile gerçekleştik, Endoplazmik retikulum (ER) stresi ile olan ilişkisini değerlendik ve farelerin böbrek kapsülü altına adacık hücre nakli yaparak çalışmamızın *in-vivo* başarısını değerlendirdik.

ER stresinin değerlendirilmesi çalışmaları ‘TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu Programı’ desteği ile gidilen Amerika Birleşik Devletleri Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi Özcan laboratuvarında gerçekleştirdik. Tezdeki diğer çalışmalar ‘TÜBİTAK 3001- Başlangıç Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı’ desteği ile Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya bölümü ve Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Adacell Adacık hücre araştırma merkezi ortak çalışması olarak devam ettirdik.

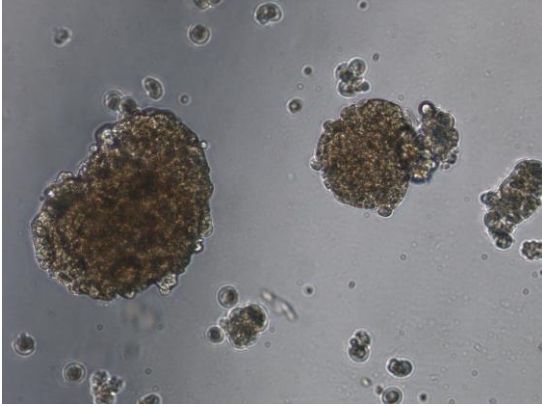
Tezin bu kısmında yapılan deneysel çalışmaların sonuçları aşağıdaki başlıklar altında verildi. Bu başlıkları; izole edilen adacık hücrelerinin % canlılık sonuçları, adacık hücrelerinin aktifleştirilen PLGA ile muamelesi, adacık hücrelerine glukoz stimülasyon testinin yapılması, yüzey modifikasyonunun hücrede endoplazmik retikulum stresi oluşturup oluşturmadığı, Biotin-streptavidin etkileşimi ile adacık hücre yüzeyindeki tabaka kalınlığının arttırılması, yüzey modifikasyonunun gerçekleştiğinin ispat yöntemleri ve yüzeyi modifiye edilen adacık hücrelerinin *in-vivo* başarısının değerlendirilmesi oluşturmaktadır.

5.1. Adacık Hücrelerinin PLGA-NHS ile Yüzey Modifikasyonu İşleminin Sonuçları

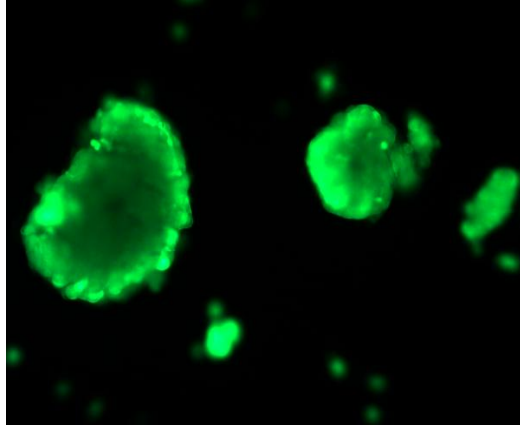
5.1.1. Adacık hücrelerinin % canlılık sonuçları

Herbir gruptaki adacıkların fotoğrafları floresan mikroskobu ile çekildi ve fotoğraflar resim 5.1 de gösterildi. Resim 5.1.A. da adacık hücrelerinin beyaz ışık altındaki görüntüsü görülmektedir. Resim 5.1.B. adacık hücrelerinin FDA ile boyanarak mavi floresan ışık altındaki görüntüsünü göstermektedir. Resim 5.1.B. incelendiğinde FDA ile boyanmış adacık hücrelerindeki canlı hücrelerin yeşil renkli olduğu görüldü. Resim 5.1.C. PI ile boyanan adacık hücrelerinin yeşil floresan ışık altında çekilen görüntüsünü göstermektedir. Resim 5.1.C incelendiğinde PI ile boyanmış adacık hücrelerinin kırmızı renkli olması ölü hücreler olduğunu göstermektedir. Görüntüler 40X büyütmede alınmıştır.

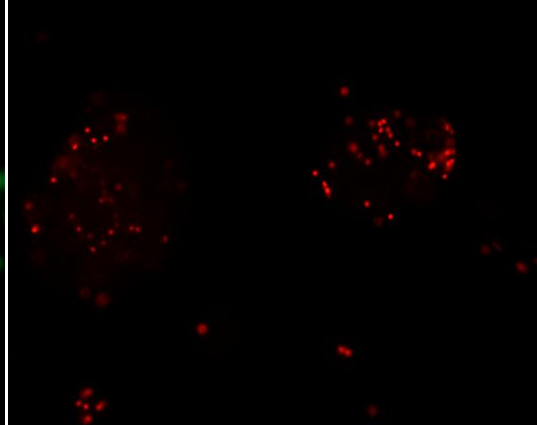
A



B



C



Resim 5.1. Adacık hücrelerinin floresan mikroskobu altındaki görüntüleri A. Adacık hücrelerinin beyaz ışık altındaki görüntüsü. B. Adacık hücrelerinin FDA ile boyanarak mavi floresan ışık altındaki görüntüsü. C. PI ile boyanan adacık hücrelerinin yeşil floresan ışık altında çekilen görüntüsü

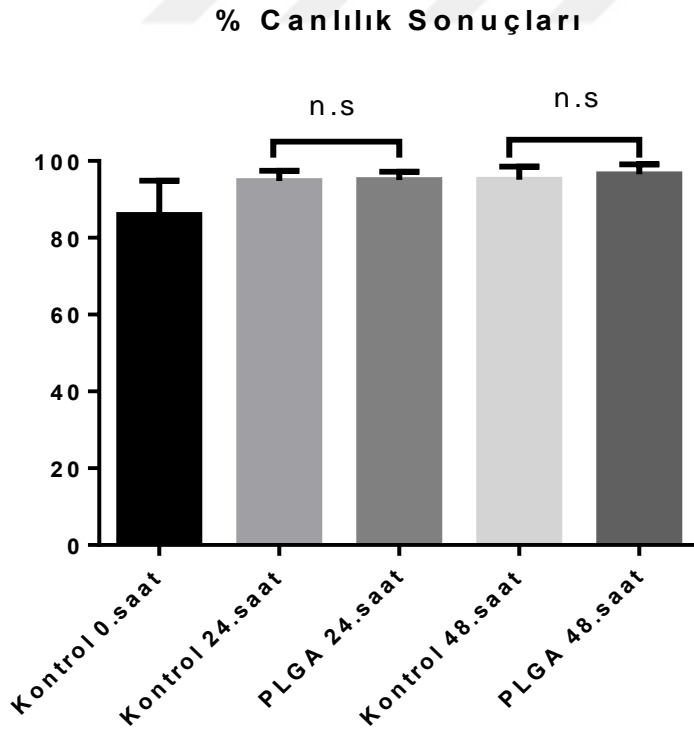
FDA ve PI fotoğrafları çekilen adacık hücreleri MAT-LAB programı kullanılarak iki fotoğraf üst üste koyuldu ve adacık hücrelerinin % canlılıkları belirlendi ve çizelge 5.1 de sonuçlar verildi.

Çizelge 5.1. FDA ve PI ile boyanmış olan adacık hücrelerinin MAT-LAB programı ile analiz edilen canlılıkları.

	0.saat	24. saat	48. saat
Kontrol	83,9	92,5	92,1
PLGA	--	94,0	95,1

Çizelge 5.1 incelendiğinde yapılan 48 saatlik *in-vitro* takipte kontrol grubunun % canlılıkları ile PLGA grubunun % canlılıklarının benzer çıktığı gözlemlendi. PLGA kaplamasının, adacık hücre canlılığı üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı belirlendi.

Elde edilen % canlılık sonuçlarının istatistiksel analizi yapıldığında şekil 5.1 de görüldüğü üzere gruplar arasında istatistiksel fark gözlenmediği belirlendi.



Şekil 5.1. Adacıkların izolasyondan sonra, 24 ve 48 saat kültürden sonraki canlılıkları. n.s : istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır

5.1.2. Glukoz stimülasyonu testi sonuçları

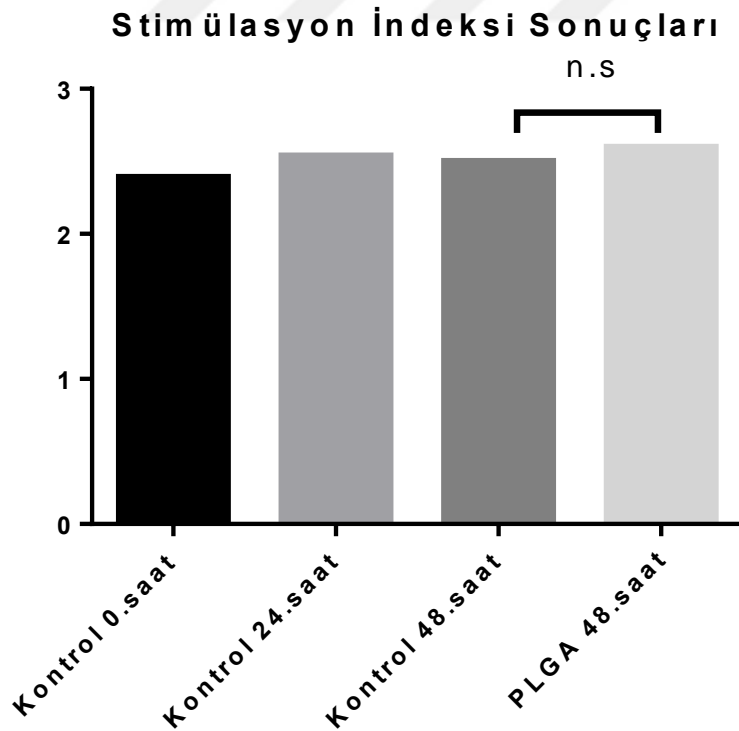
Adacık hücrelerinin fonksiyonelliklerini belirlemek için glukoz stimülasyon testi yapıldı. Glukoza yanıt olarak salgıladıkları insülin miktarları ile stimülasyon indeksi hesaplandı ve sonuçlar Çizelge 5.2’de verildi.

Çizelge 5.2. Adacıkların izolasyondan sonra, 24 ve 48 saat kültürden sonraki stimülasyon indeksi sonuçları

	0.saat	24. saat	48. saat
Kontrol	2,39	2,54	2,50
PLGA	----	----	2,60

Çizelge 5.2 incelendiğinde kontrol grubu ve PLGA grubunun stimülasyon indeksi değerlerinin benzer değerlerde olduğu gözlemlendi.

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda Şekil 5.2’de gösterildiği gibi kontrol grubu ile PLGA grubu arasında istatistiksel farkın olmadığı gözlemlenmiştir.

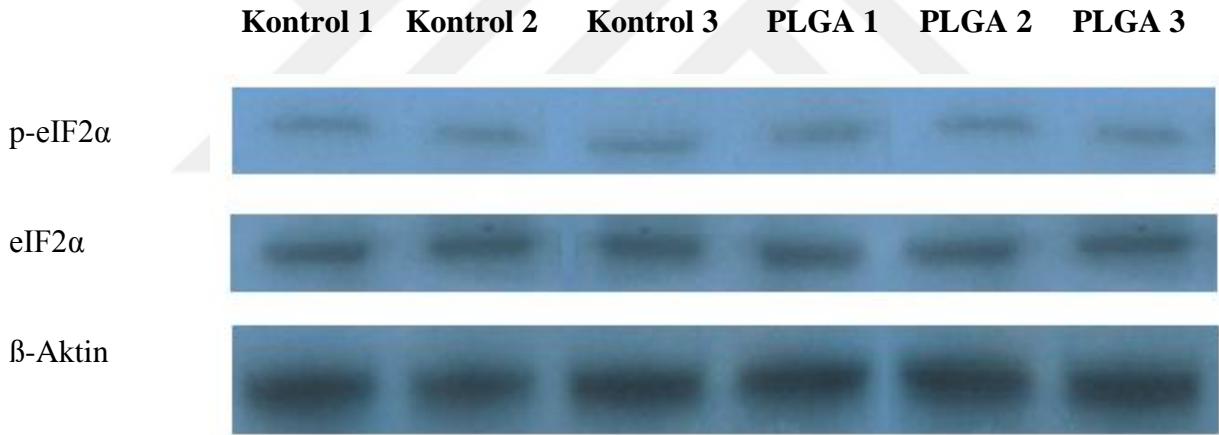


Şekil 5.2. Adacıkların izolasyondan sonra, 24 ve 48 saat kültürden sonraki stimülasyon indeksi sonuçları. n.s: istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır

5.1.3. Endoplasmik retikulum stresi sonuçları

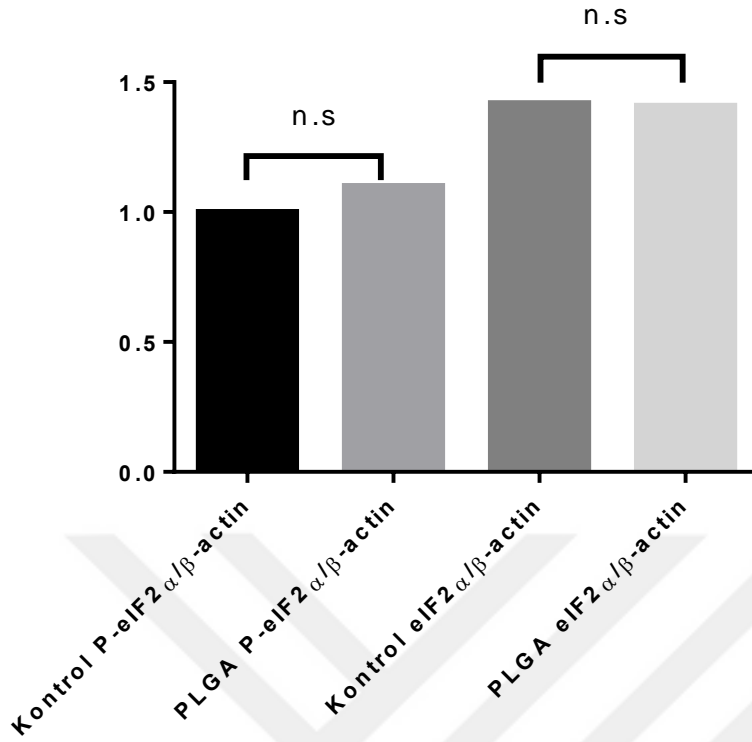
Adacık hücrelerine yapılan yüzey modifikasyonu işleminin endoplasmik retikulum stresine neden olup olmadığı western blot protein miktarı belirleme yöntemi ile tespit edildi. Bunun için endoplasmik retikulum stres yollarından olan eIF2 α ve PERK yolağı incelendi. İlk olarak; Ser51 aminoasiti üzerinden fosforile olan eIF2 α (p-eIF2 α) protein miktarı ve toplam eIF2 α protein miktarına, ikinci olarak da Thr980 amino asiti üzerinden fosforile olan PERK (p-PERK) protein miktarına ve toplam PERK protein miktarına bakıldı. Filme yansıtılan protein miktarlarının hesaplanması Image J programı ile gerçekleştirildi. Her bir yolaktaki protein miktarları hücrenin temel proteinlerinden olan β -Aktin ile standartize edildi.

Resim 5.2 incelendiğinde kontrol grubuna ve PLGA grubuna yapılan western blot analizinde fosforile olan eIF2 α (p-eIF2 α) protein miktarlarının ve toplam eIF2 α protein miktarları ile benzer çıktığı gözlemlendi.



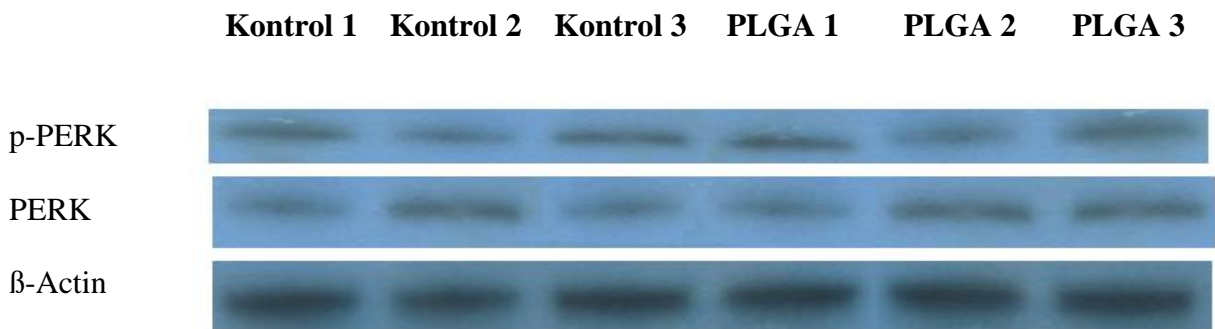
Resim 5.2. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Ser51 üzerinden eIF2 α fosforilasyonu (p-eIF2 α) ve toplam eIF2 α protein miktarları. Herbir grup 3 kez tekrarlandı

Protein miktarları β -Aktin proteini ile standardize edildikten sonra şekil 5.3 de görüldüğü üzere grafiğe geçirildi ve istatistiksel analiz yapıldı. Kontrol grubu ve PLGA grupları arasında herhangi bir istatistiksel fark gözlenmedi.



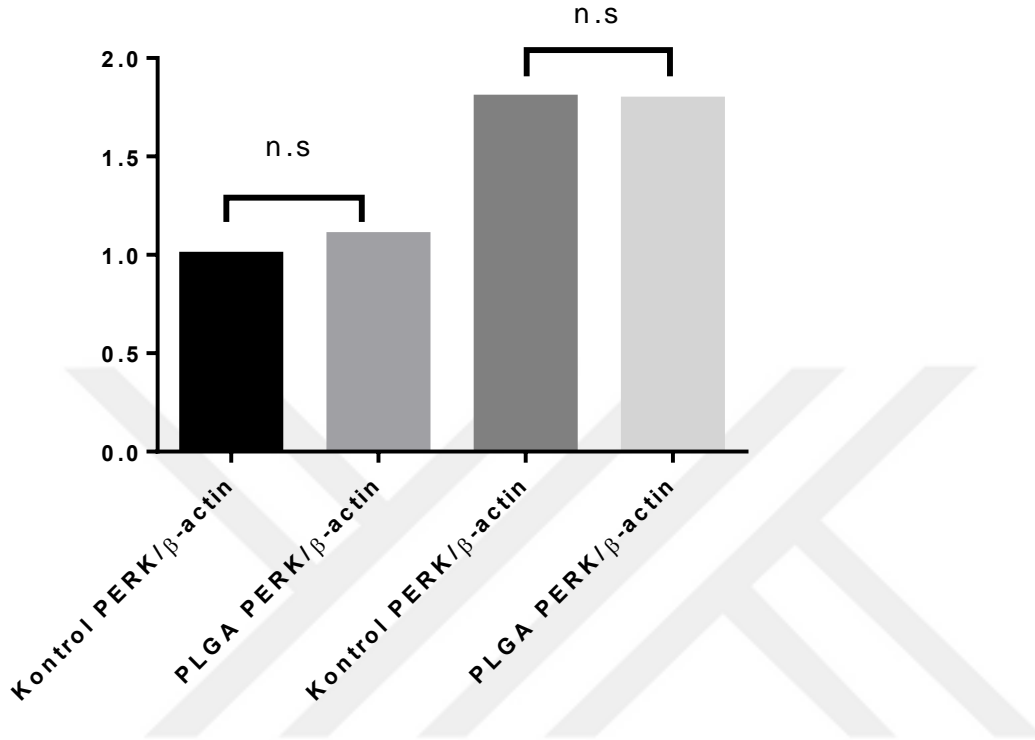
Şekil 5.3. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Ser51 üzerinden eIF2 α fosforilasyonu (p-eIF2 α) ve toplam eIF2 α protein miktarlarının β -Aktin protein ile normalize edilmesi. Herbir grup 3 kez tekrarlanmıştır. n.s : istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır

Resim 5.3 incelendiğinde kontrol grubuna ve PLGA grubuna yapılan western blot analizinde fosforile olan PERK (p-PERK) protein miktarlarının ve toplam PERK protein miktarları ile benzer çıktığı gözlenmiştir.



Resim 5.3. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Thr980 üzerinden PERK fosforilasyonu (p-PERK) ve toplam PERK protein miktarları. Herbir grup 3 kez tekrarlanmıştır. n.s: istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır

Protein miktarları β -Aktin proteini ile standardize edildikten sonra şekil 5.4’de görüldüğü üzere grafiğe geçirildi ve istatistiksel analiz yapıldı. Kontrol grubu ve PLGA grupları arasında herhangi bir istatistiksel fark gözlenmedi.



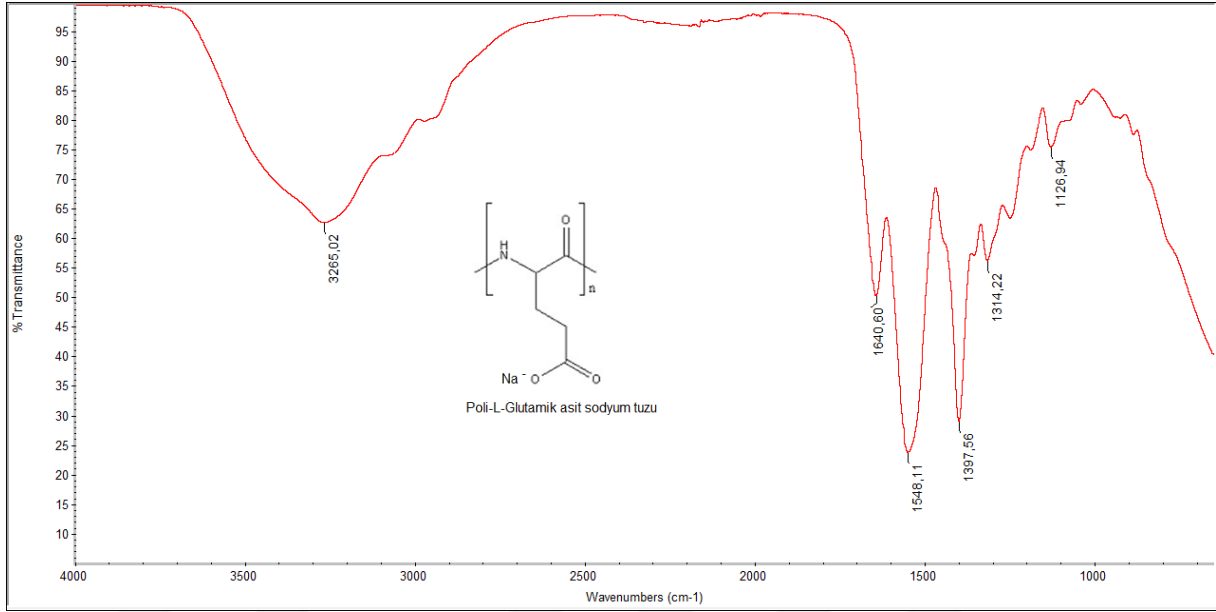
Şekil 5.4. Kontrol grubu ve PLGA ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacık hücrelerinin western blot ile belirlenen Thr980 üzerinden PERK fosforilasyonu (p-PERK) ve toplam PERK protein miktarlarının β -Aktin protein ile normalize edilmesi. Herbir grup 3 kez tekrarlanmıştır. n.s : istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır

5.2. Sentezlenen Poli-L-Glutamik Asit Türevlerinin Karakterizasyonu

DeneySEL aşamanın bu kısmında, aktifleştirilmiş Poli-L-Glutamik asit ve türevlerinin karakterizasyonu FT-IR ve $^1\text{H-NMR}$ kullanılarak yapıldı.

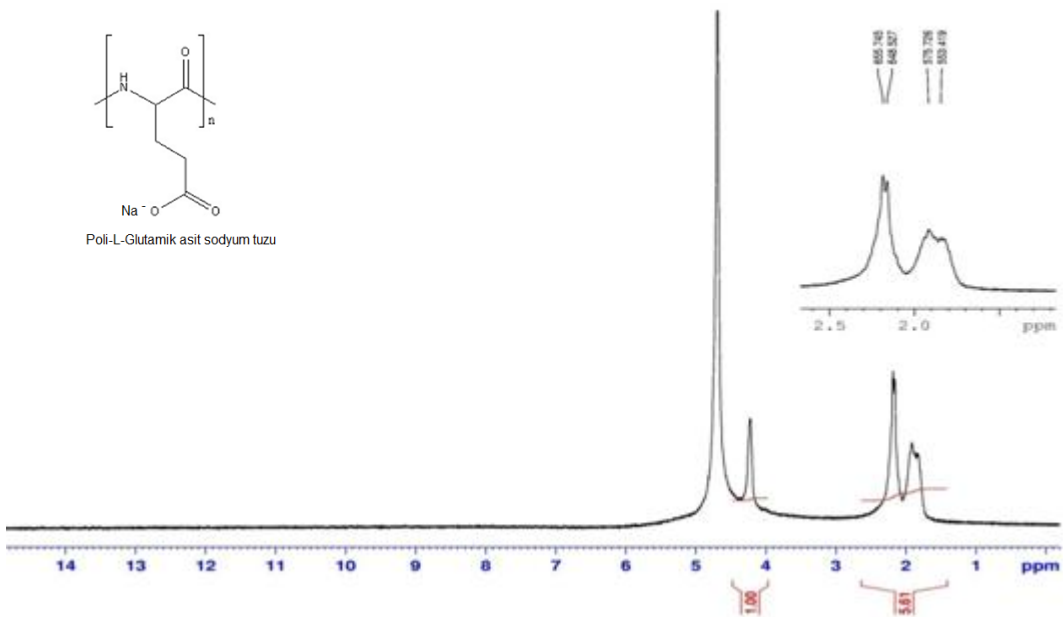
5.2.1. Poli-L-Glutamik asit sodyum tuzu'nun karakterizasyonu

Ticari olarak satın alınan poli-L-glutamik asit sodyum tuzu (PLGA-Na)'nun (M_A 50000-100000) FT-IR ve $^1\text{H-NMR}$ ile karakterizasyonu yapıldı. Şekil 5.5 incelendiğinde yaklaşık 1397 cm^{-1} de gözlenen gerilme titreşiminin poli-L-glutamik asit'deki $-\text{COO}^-$ e ait olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.5. Poli-L-Glutamik asit sodyum tuzu'nun FT-IR görüntüsü

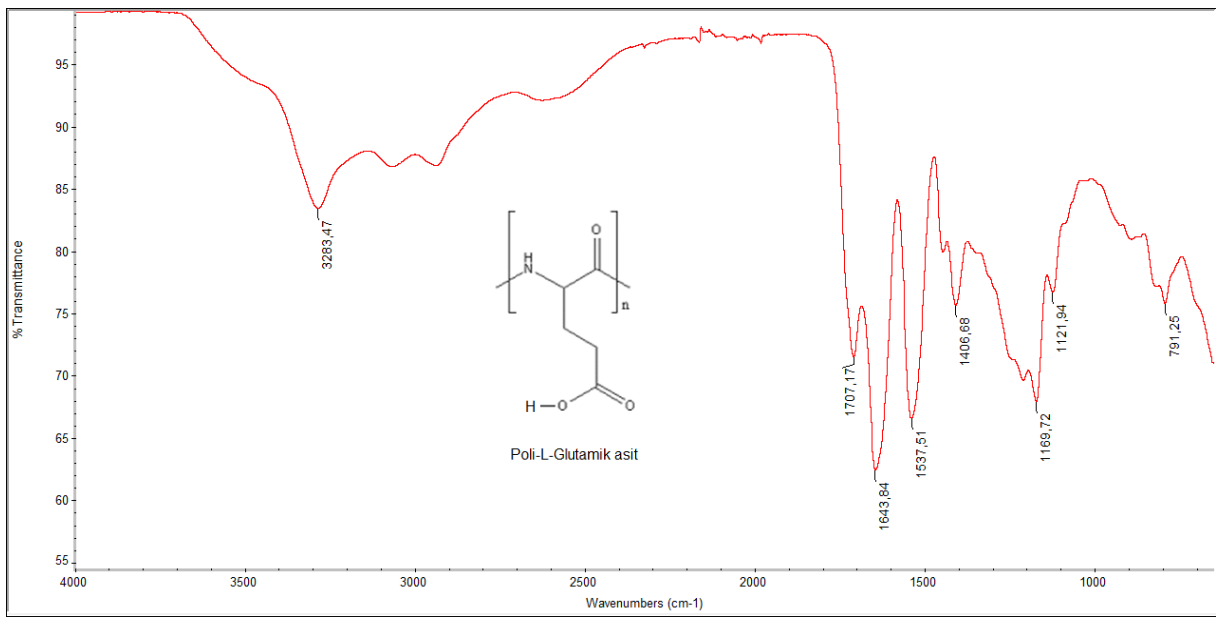
PLGA-Na'un $^1\text{H-NMR}$ 'ı suda çözülerek alındı. Şekil 5.6 incelendiğinde 1,8 ppm'de gözlenen çoklu yayvan pikin PLGA-Na'da bulunan β karbonundaki hidrojenlere ait olduğu, yaklaşık 2,2 ppm de gözlenen çoklu pikin NH protonu ile $-\text{CH}_2\text{COO}^-$ grubundaki protonlara ait olduğu ve yaklaşık 4 ppm'de gözlenen pikin $-\text{NHCHCO}$ grubundaki karbon protonuna ait olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.6. Poli-L-Glutamik asit sodyum tuzu'nun $^1\text{H-NMR}$ görüntüsü

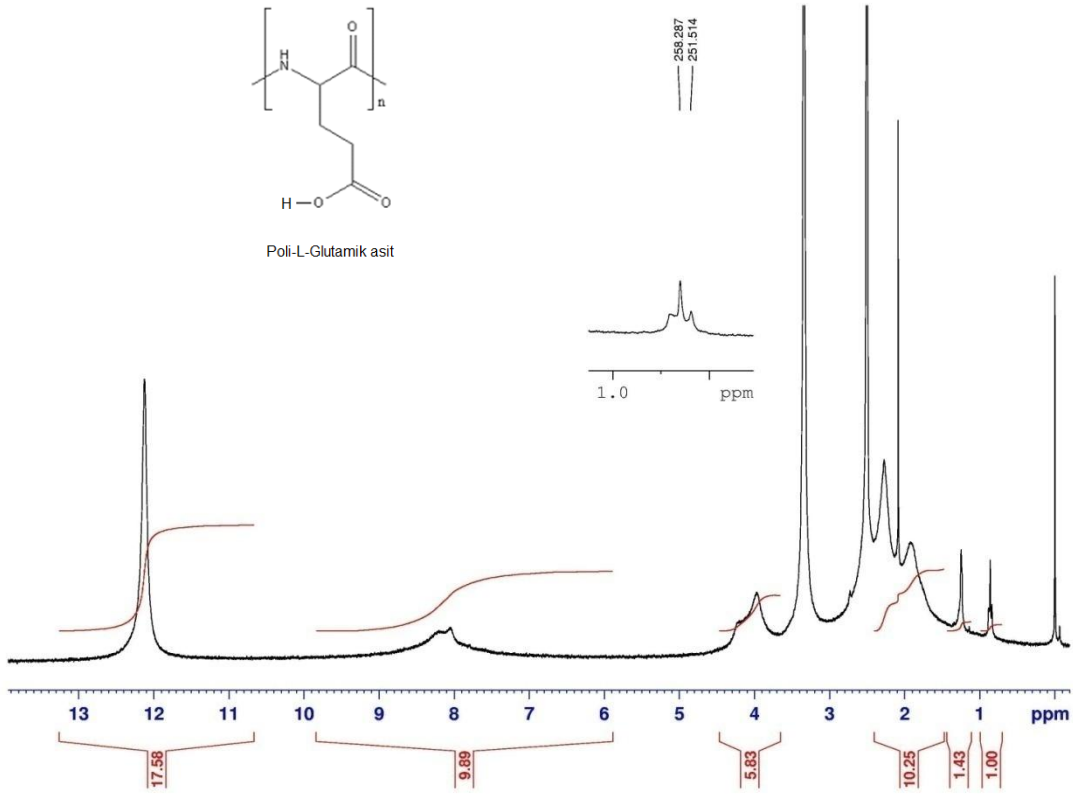
5.2.2. Poli-L-Glutamik asit'in karakterizasyonu

Dimetilsülfoksit'te çözünürlüğünü sağlamak için HCl asit ile Poli-L-glutamik asit sodyum tuzundan Poli-L-glutamik asit formu elde edildi. Poli-L-glutamik asit'in FT-IR ve $^1\text{H-NMR}$ ile karakterizasyonu yapıldı. Şekil 5.7 incelendiğinde 1643 cm^{-1} de gözlenen gerilme titreşimi poli-L-glutamik asit'deki COOH grubundaki C=O grubuna ait olduğu gözlemlendi. 1169-1250 aralığındaki gerilme titreşimleri poli-L-glutamik asit'deki COOH grubundaki C-O grubuna ait olduğu gözlemlendi.



Şekil 5.7. Poli-L-Glutamik asit'in FT-IR görüntüsü

PLGA'nın $^1\text{H-NMR}$ 'ı DMSO- d_6 'da çözülerek alındı. Şekil 5.8'deki $^1\text{H-NMR}$ incelendiğinde PLGA-Na'un $^1\text{H-NMR}$ görüntüsünde (Şekil 5.6) olmayan piklerden yaklaşık 8,2 ppm'de gözlenen pikin $-\text{NH}$ grubundaki protona ait olduğu, yaklaşık 12 ppm'de gözlenen pikin $-\text{COOH}$ grubundaki protona ait olduğu gözlenmiştir. 12 ppm'deki pikin gözlenmesi PLGA'da bulunan $-\text{COO}^-$ grubunun protonlandığını göstermektedir.

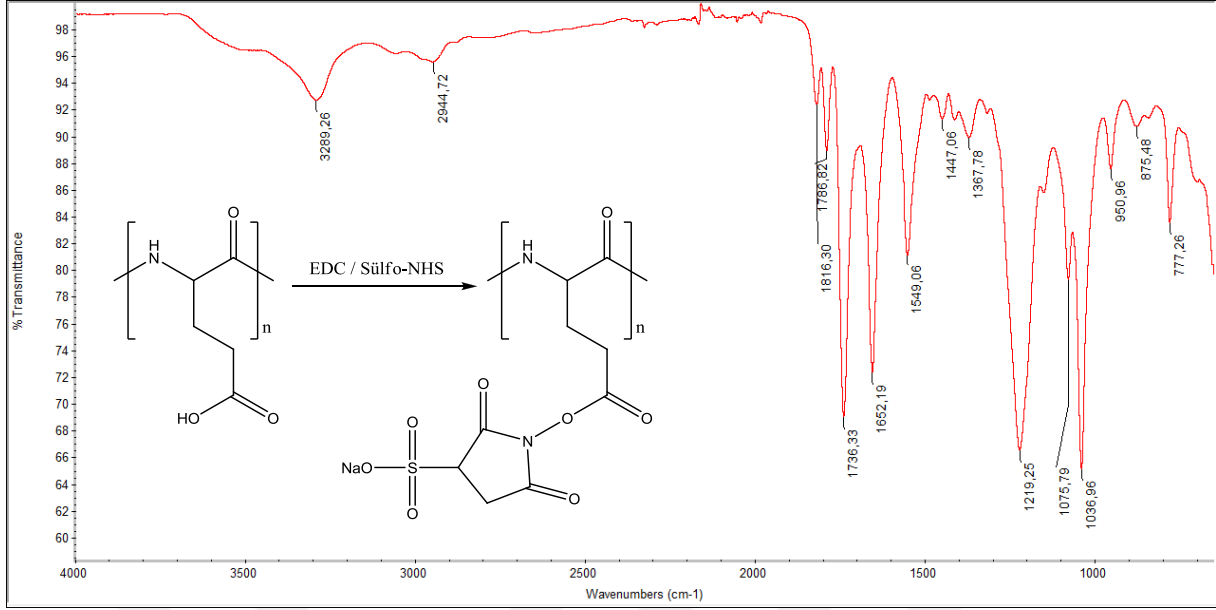


Şekil 5.8. Poli-L-Glutamik asit'in ¹H-NMR görüntüsü

5.2.3. Poli-L-Glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit'in (PLGA-Sülfo-NHS) karakterizasyonu

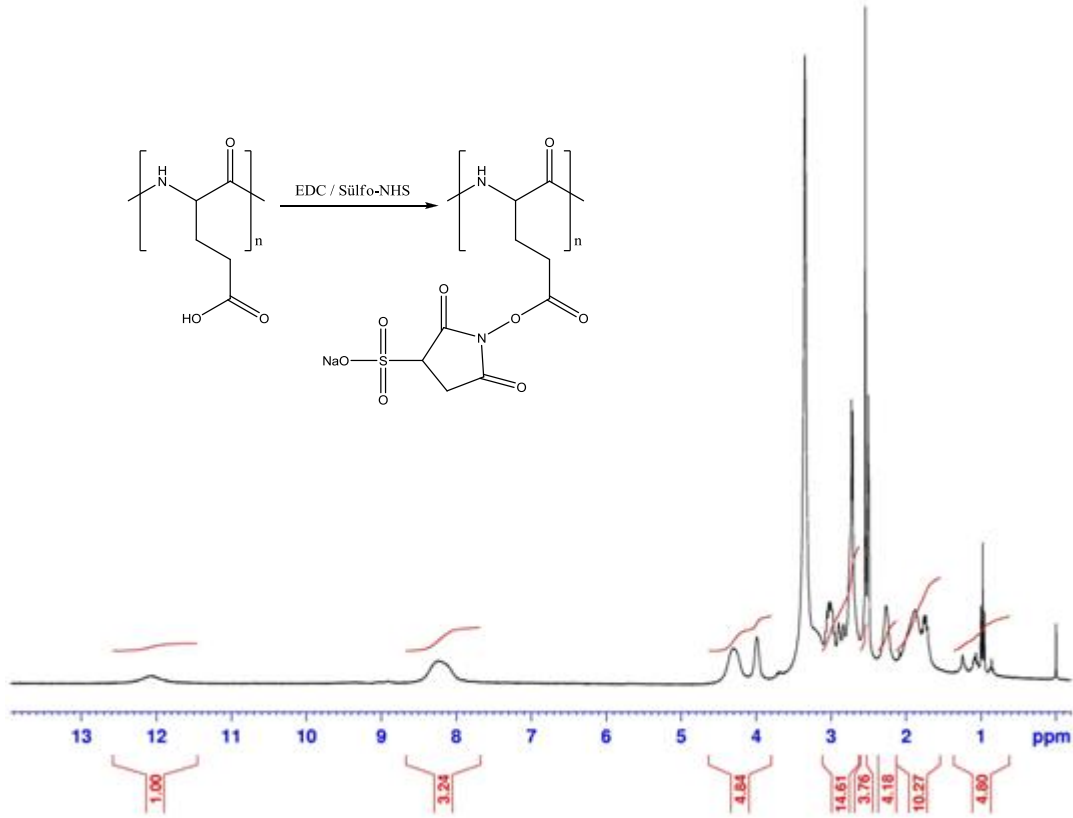
Poli-L-glutamik asit'in suda çözünürlüğünü arttırmak ve adacık hücre yüzeyine kovalent bağ ile bağlanmasını sağlamak için karboksilik asit grupları sülfo-NHS ile aktifleştirildi. PLGA-Sülfo-NHS'in karakterizasyonu FT-IR ve ¹H-NMR analizleri ile yapıldı.

Şekil 5.9 incelendiğinde 1736, 1786 ve 1816 cm⁻¹ de gözlenen gerilme titreşimlerinin poli-L-glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit'deki NHS grubundaki C=O grubuna ait olduğu gözlemlendi. Bu FT-IR görüntüsüne göre poli-L-glutamik asidin karboksilik asit grubunun sülfo-NHS ile aktifleştirildiği belirlendi.



Şekil 5.9. Poli-L-Glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit'in (PLGA-Sülfo-NHS) FT-IR görüntüsü

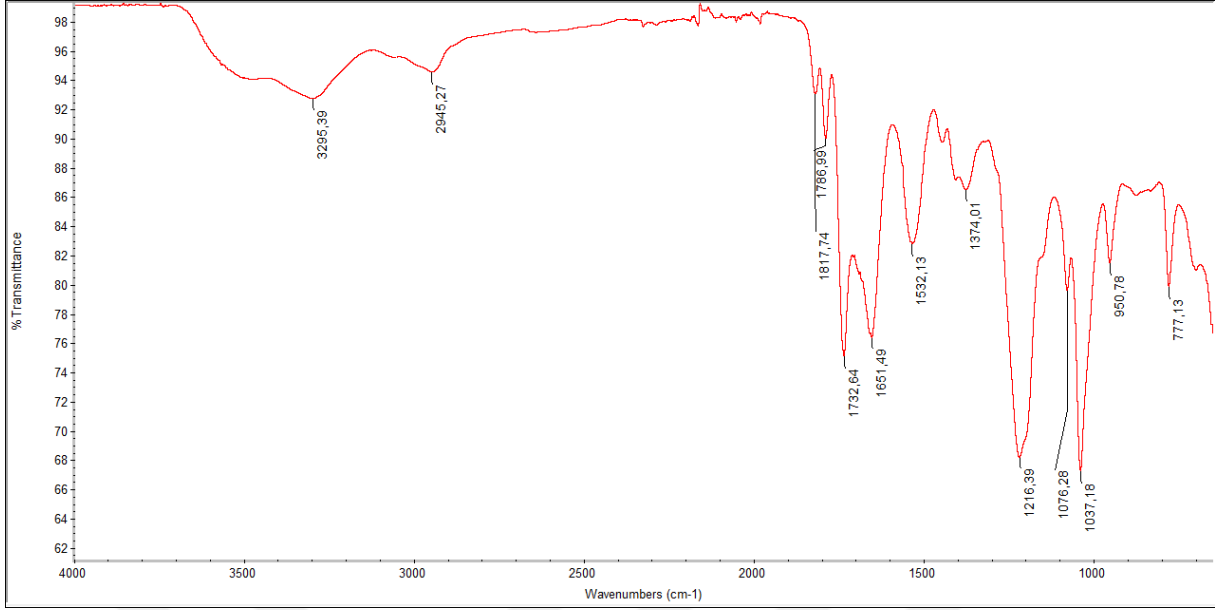
PLGA-sülfo-NHS'in $^1\text{H-NMR}$ 'ı DMSO- d_6 'da çözülerek alındı. Şekil 5.10'daki $^1\text{H-NMR}$ görüntüsünü PLGA'nın $^1\text{H-NMR}$ görüntüsü (Şekil 5.8) ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2,8 ppm'de gözükken pikin *N*-hidroksisülfosüksinimit grubundaki CH_2 protonlarından, 4 ppm'deki pikin *N*-hidroksisülfosüksinimit grubundaki CH protonundan, 12 ppm'de gözlenen pikin ya polimerin uç grubunda bulunan $-\text{COOH}$ daki protana ait ya da aktive olmamış $-\text{COOH}$ grubundaki protondan geldiği gözlenmiştir. 12 ppm'deki pikin şiddetinin azalması $-\text{COOH}$ grubunun sülfo-NHS ile yerdeğiştirdiğini ispatlamıştır.



Şekil 5.10. Poli-L-Glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit'in (PLGA-Sülfö-NHS) ¹H-NMR görüntüsü

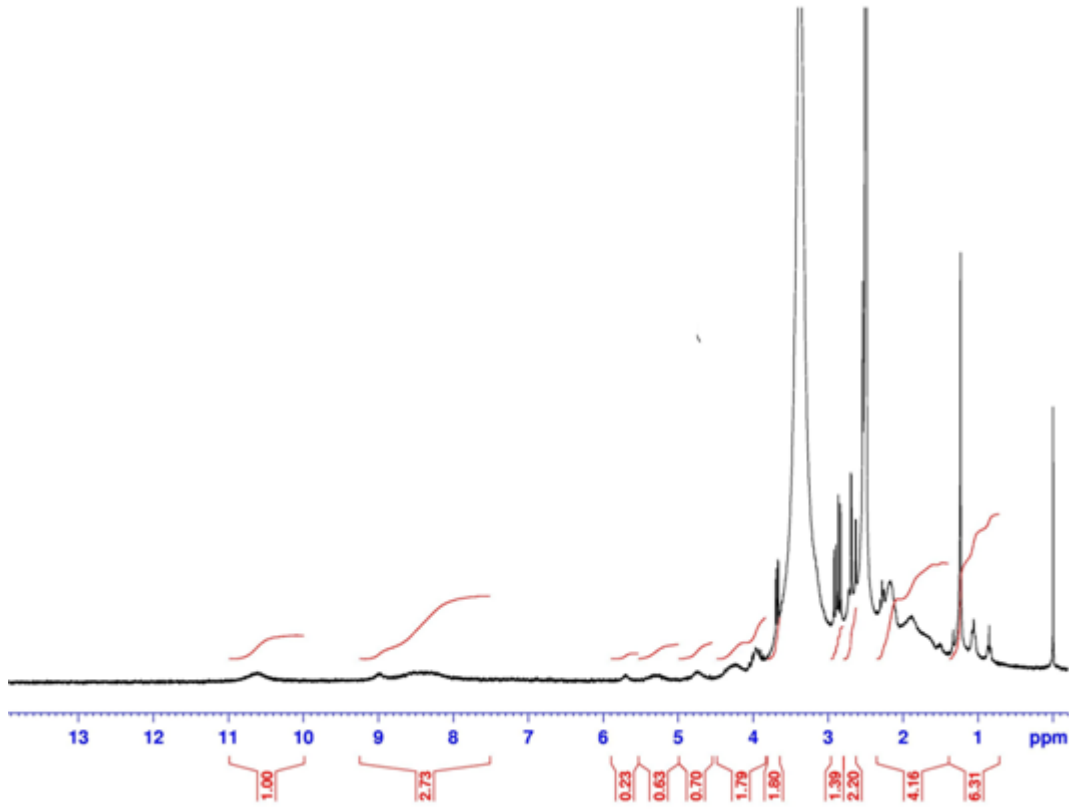
5.2.4. Poli-L-Glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit-Floresin Glisin Amit'in (PLGA-Sülfö-NHS-FGA) karakterizasyonu

Poli-L-Glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit (PLGA-Sülfö-NHS) ile floresin glisin amit (FGA) tepkimeye sokularak poli-L-Glutamik asit'e floresan grup takıldı. Tepkimeye PLGA:FGA (2000:1) oranında koyuldu. PLGA-Sülfö-NHS'in karakterizasyonu FT-IR ve ¹H-NMR analizleri ile yapıldı. Şekil 5.11'deki FT-IR analizi incelendiğinde 3205 cm⁻¹ de gözlenen pikin yayvan hale gelmesi FGA grubundaki -COOH grubundan kaynaklandığı düşünülmektedir. 1732, 1786 ve 1817 cm⁻¹ de gözlenen piklerin sülfö-NHS grubundaki -C=O çift bağına ait gerilme titreşimi olduğu gözlenmiştir. Tepkimeye giren FGA miktarının az olmasından kaynaklı FGA grubuna ait piklerin net olarak gözlenemediği düşünülmektedir.



Şekil 5.11. PLGA-Sülfo-NHS-FGA'nın FT-IR görüntüsü

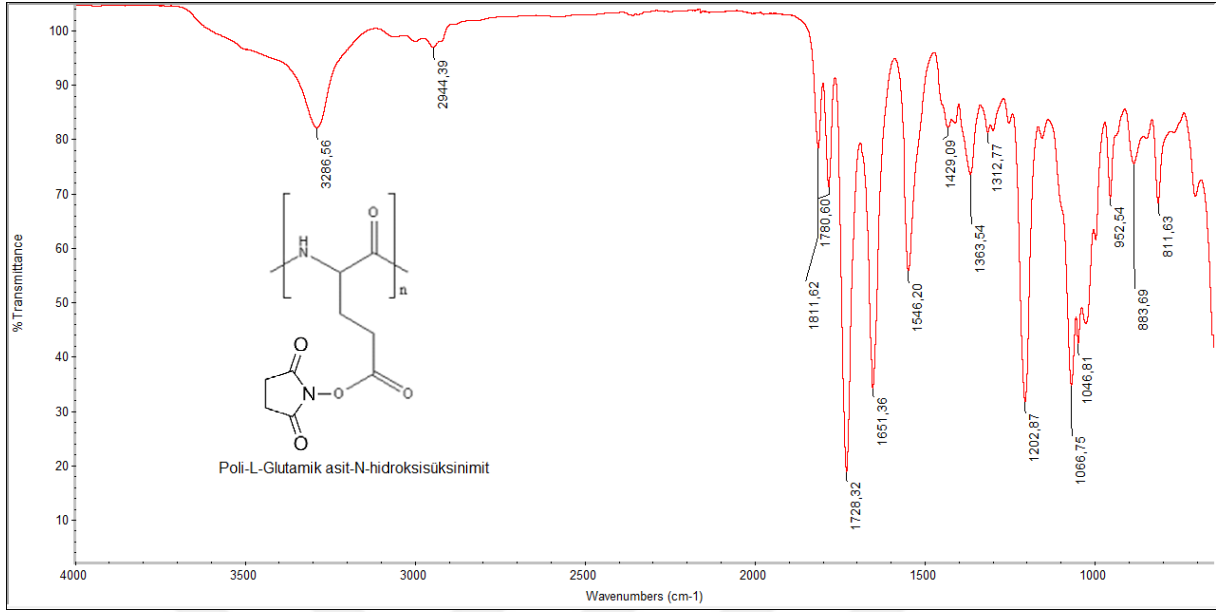
PLGA-sülfo-NHS'in ¹H-NMR'ı DMSO-d₆'da çözülerek alındı. Şekil 5.12'deki ¹H-NMR görüntüsü PLGA-sülfo-NHS ¹H-NMR görüntüsü (Şekil 5.10) ile karşılaştırıldığında 8 ppm'den başlayan yayvan pikin poli-L-glutamik asitdeki NH protonuna ve FGA grubundaki benzen halkası protonlarına ait olduğu, 9 ppm'deki pikin PLGA ile FGA arasında oluşan amit bağındaki NH protonuna ait olduğu, yaklaşık 10,6 ppm'de gözlenen pikin FGA'daki -OH grubu protonuna ait olduğu gözlenmiştir.



Şekil 5.12. PLGA-Sülfo-NHS-FGA'nın $^1\text{H-NMR}$ görüntüsü

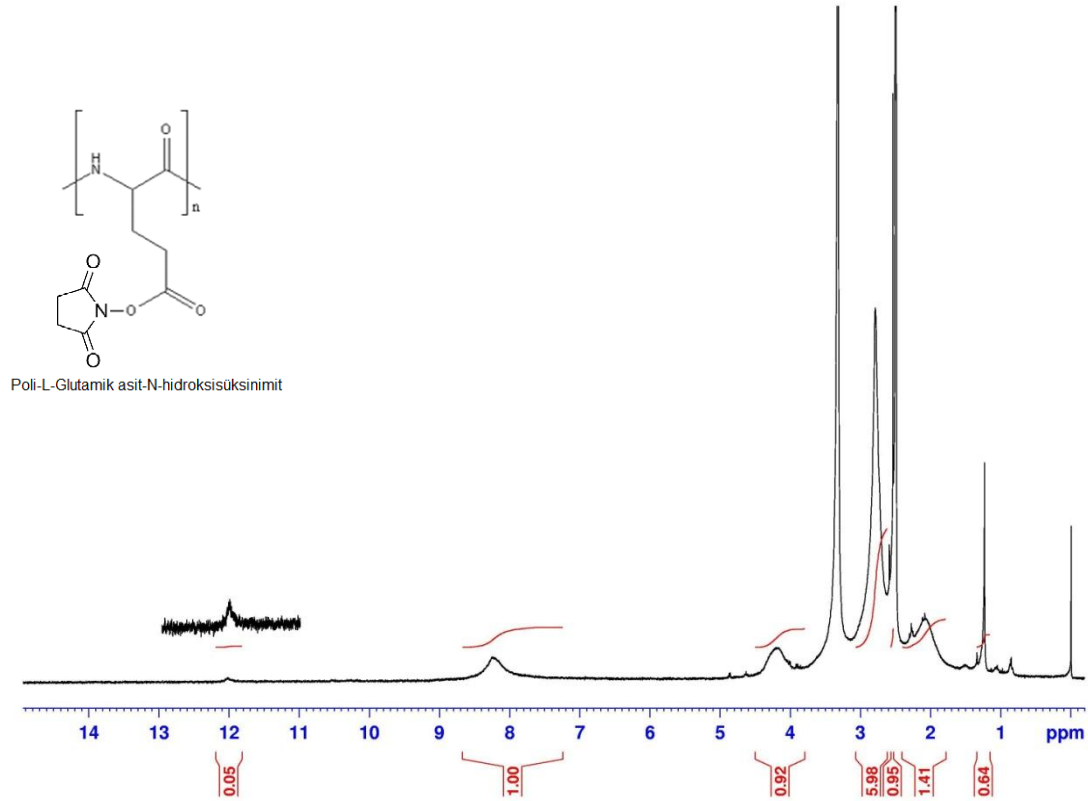
5.2.5. Poli-L-glutamik asit-N-hidroksisüksinimit'in (PLGA-NHS) karakterizasyonu

PLGA polimerinin karboksilik asit grubu NHS ile aktiveştirilerek biyositin ile arasında kovalent bağ oluşturuldu. PLGA-NHS'in karakterizasyonu FT-IR ve $^1\text{H-NMR}$ analizi ile yapıldı. Şekil 5.13 incelendiğinde 1728, 1780 ve 1811 cm^{-1} de gözlenen gerilme titreşimi poli-L-glutamik asit-N-hidroksisüksinimit'deki NHS grubundaki C=O grubuna ait olduğu gözlemlendi.



Şekil 5.13. Poli-L-glutamik asit-*N*-hidroksisüksinimit'in (PLGA-NHS) FT-IR görüntüsü

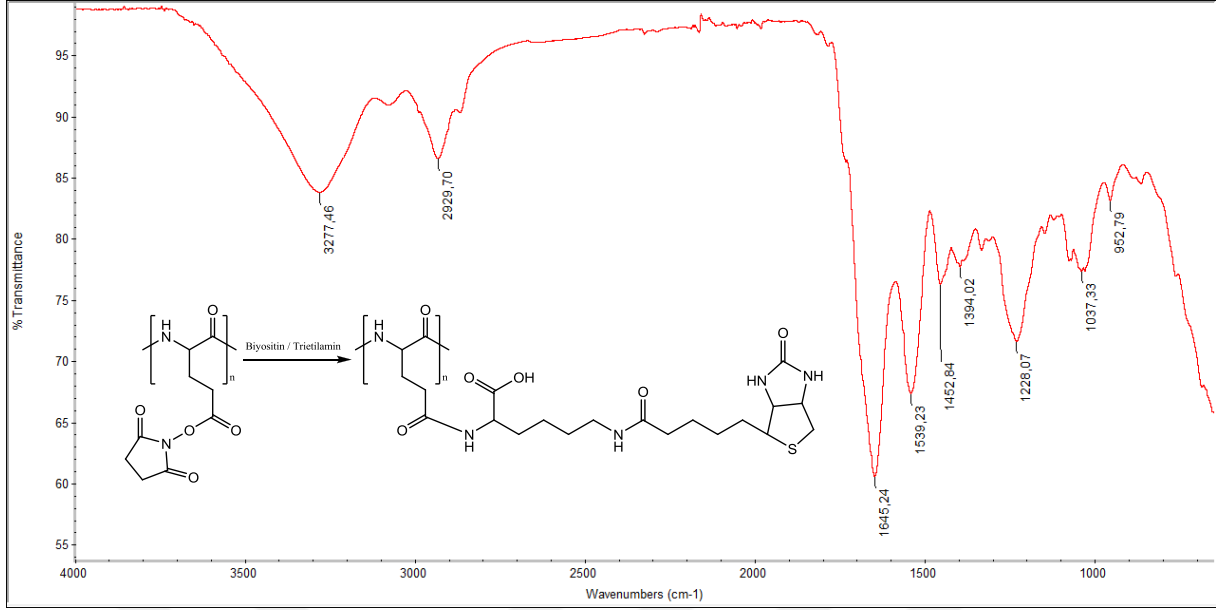
PLGA'nın $^1\text{H-NMR}$ 'ı DMSO- d_6 'da çözülerek alındı. Şekil 5.14'deki $^1\text{H-NMR}$ görüntüsü PLGA'nın $^1\text{H-NMR}$ görüntüsü (Şekil 5.8) ile karşılaştırıldığında yaklaşık 2,8 ppm de gözükten yayvan pikin *N*-hidroksisüksinimit grubundaki protonlarından geldiği ve poli-L-glutamik asitdeki $-\text{CH}_2\text{COO}$ grubundaki protonlara ait olduğu, 12 ppm de gözlenen pikin ya polimerin uç grubunda bulunan $-\text{COOH}$ daki protana ait ya da aktive olmamış $-\text{COOH}$ grubundaki protona ait olduğu görülmektedir. 12 ppm'deki pikin şiddetinin azalması $-\text{COOH}$ grubunun sülfon-NHS ile yerdeğiştirdiğini ispatlamıştır.



Şekil 5.14. Poli-L-glutamik asit-*N*-hidroksisüksinimit'in (PLGA-NHS) ¹H-NMR görüntüsü

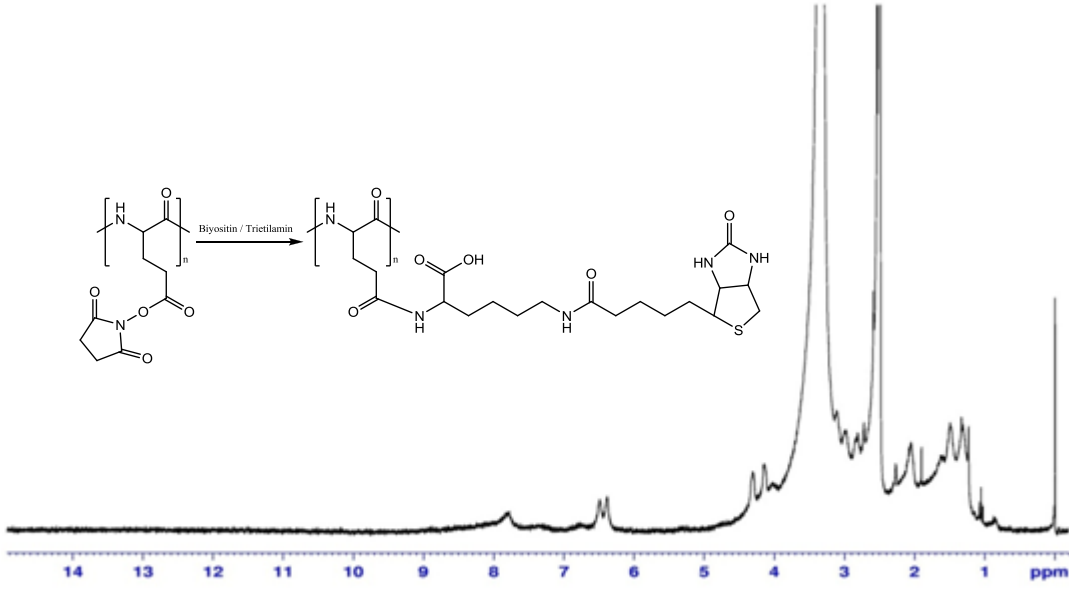
5.2.6. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin'in (PLGA-Biyositin) karakterizasyonu

Adacık hücre yüzey modifikasyonunda tabaka kalınlığını arttırmak için biyositin-streptavidin etkileşiminden faydalandık. Bu amaçla, Poli-L-Glutamik asit-*N*-hidroksisülfosüksinimit (PLGA-Sülfö-NHS) ile biyositin'in NH₂ grubunu tepkimeye sokarak kovalent bağ oluşturduk. PLGA-Biyositin'in karakterizasyonu FT-IR ve ¹H-NMR analizleri ile yapıldı. Şekil 5.15 incelendiğinde poli-L-glutamik asit-*N*-hidroksisüksinimit'deki NHS grubundaki C=O grubuna ait olan 1736, 1786 ve 1816 cm⁻¹ de gözlenen gerilme titreşimlerinin kaybolduğu gözlemlendi. Bu piklerin kaybolması kovalent bağ oluştuğunu göstermektedir. 3277 cm⁻¹ de gözlenen pikteki yayvanlaşmada biyositin grubundan kaynaklı olacağı düşünüldü.



Şekil 5.15. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin'in (PLGA-Biyositin) FT-IR görüntüsü

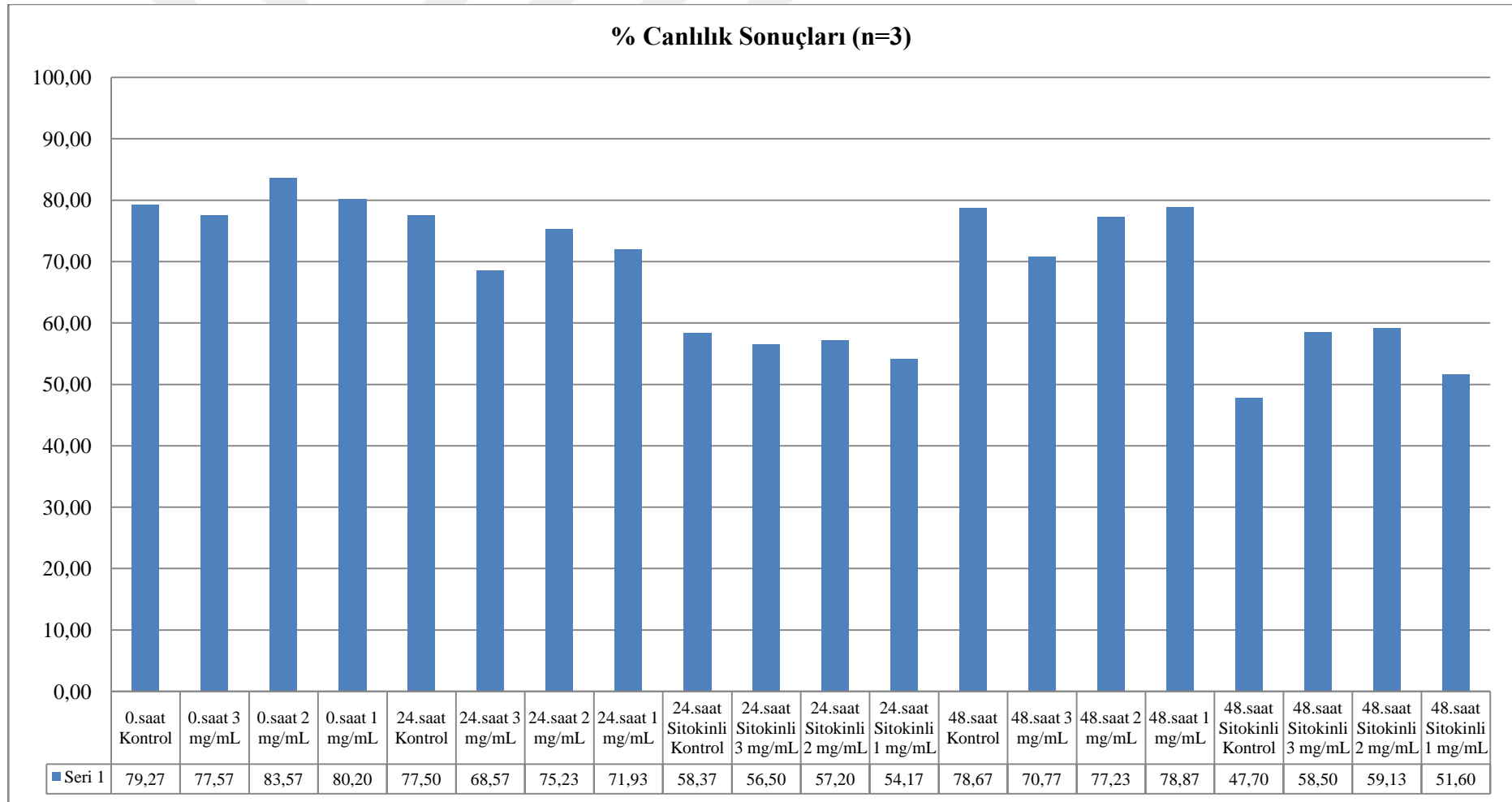
Şekil 5.16'daki $^1\text{H-NMR}$ görüntüsünde görüldüğü üzere PLGA-NHS'nin $^1\text{H-NMR}$ görüntüsünde (Şekil 5.14) gözükmeyen yaklaşık 1,5 ppm ile 2 ppm arasında gözlenen çoklu piklerin biyositin grubundaki $-\text{CH}_2$ protonlarından geldiği görülmektedir. PLGA-NHS'nin $^1\text{H-NMR}$ görüntüsündeki 2,8 ppm de gözükken yayvan pikin kaybolması *N*-hidroksisüksinimit grubunun polimerden ayrıldığını göstermektedir. 3,5 ppm'deki pikin yayvanlaşması biyositin grubundaki $-\text{CH}_2\text{S}$ protonlarına ait olduğunu göstermektedir. Yaklaşık 4,3 ppm'de gözlenen çoklu pikleri biyositin grubundaki halkalı yapıda bulunan $-\text{CH}_2$ protonlarına ait olduğu görülmektedir. 6,5 ppm'deki pikler biyositin grubundaki halkalı yapıda bulunan N-H gruplarına ait olduğu görülmektedir.



Şekil 5.16. Poli-L-Glutamik asit-Biyositin'in (PLGA-Biyositin) $^1\text{H-NMR}$ görüntüsü

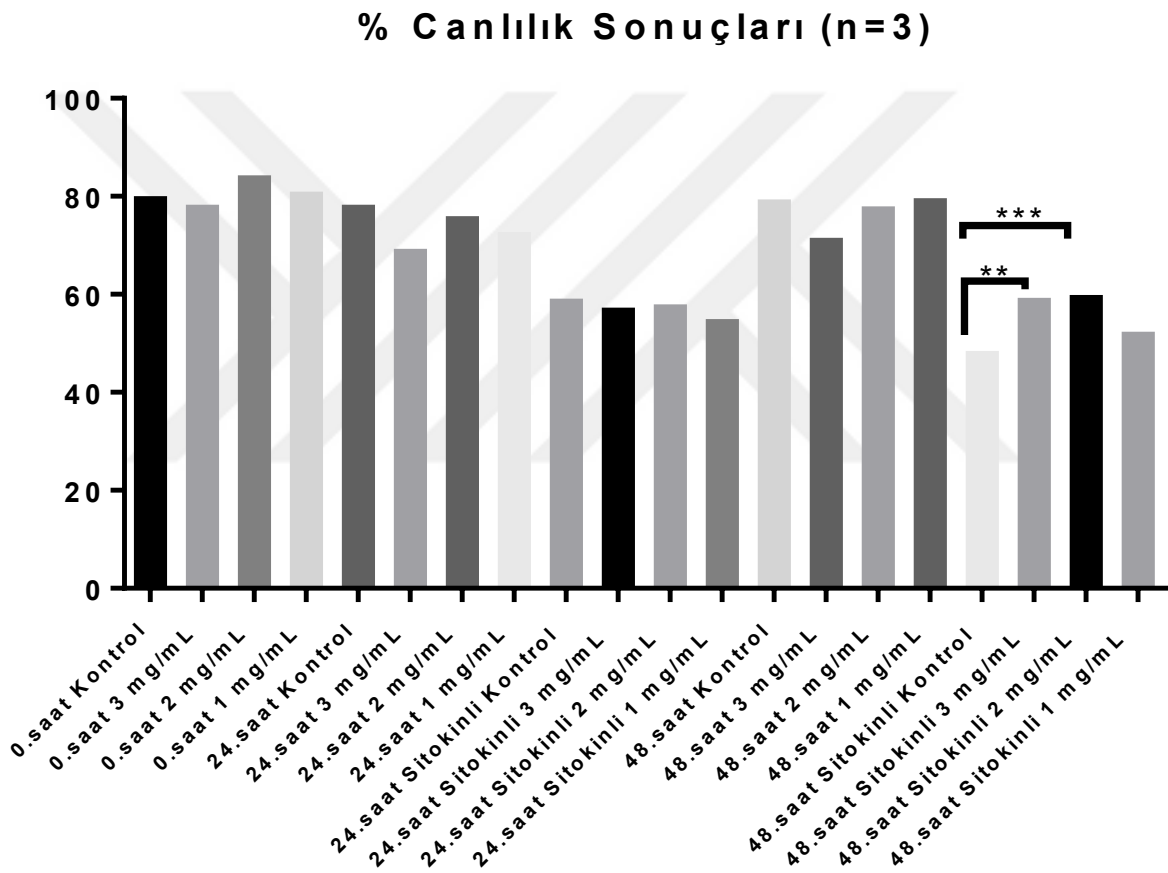
5.3. Farklı Derişimlerde PLGA-Sülfo-NHS ile Yüzey Modifikasyonu Gerçekleşen Adacıkların % Canlılık Sonuçları

Sülfo-NHS ile aktiveştirilen PLGA polimeri 3 mg/mL, 2 mg/mL ve 1 mg/mL derişimlerdeki 3 farklı dozda DPBSWG çözeltisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiler adacık hücrelerinin yüzeyini modifiye edebilmek için, adacık hücreleri ile 30 dakika inkübe edildi. Yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıklar hem RPMI 1640 (+) çözeltisi ile hemde sitokin karışımı içeren RPMI 1640 (+) çözeltisi ile 48 saat inkübe edildi. 0., 24. ve 48. saatlerde her bir grubun % canlılıkları tekrar sayısı 3 (n=3) olacak şekilde değerlendirildi. Şekil 5.17'de % canlılık sonuçları verildi.



Şekil 5.17. Farklı derişimlerde PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıkların % canlılık sonuçları

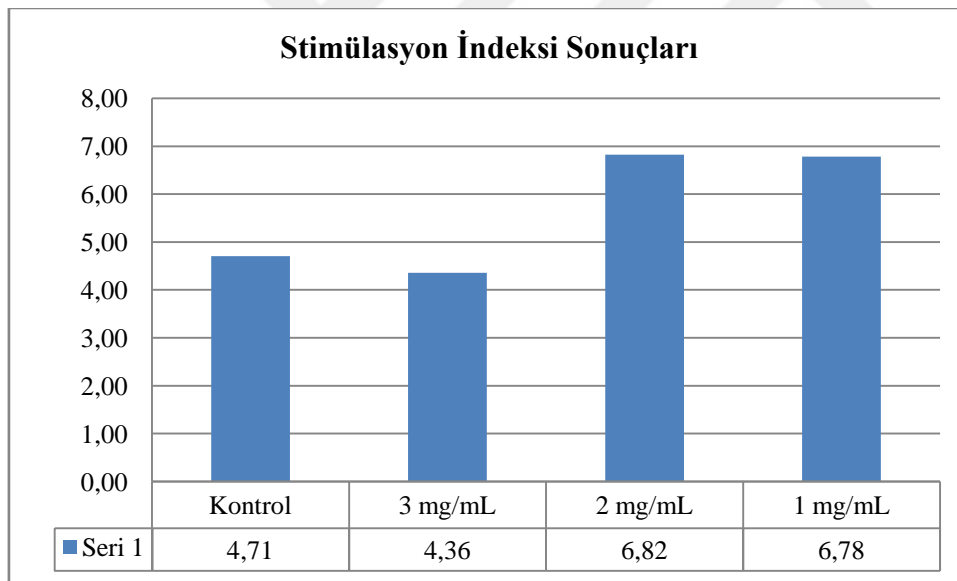
% Canlılıkların istatistiksel analizi GraphPad Prism programı ve Two-Way ANOVA metodu ile yapıldı. Yüzey modifikasyonunun başarısı adacıkların sitokin saldırısına karşı % canlı sağ kalımları ile belirlendi. Şekil 5.18 incelendiğinde 48 saat boyunca sitokin ile kültüre edilen adacıklarda 3 mg/mL ile kaplanan adacıkların canlılıkları kontrol grubundaki adacıkların canlılıklarından % 10,8 daha fazla, 2 mg/mL ile kaplanan adacıkların canlılıkları kontrol grubundaki adacıkların canlılıklarından % 11,4 daha fazla olduğu gözlenmiştir. 2 mg/mL derişimindeki PLGA ile modifiye edilen adacıkların % canlılıkları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha anlamlı çıkmıştır.



Şekil 5.18. Farklı derişimlerde PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen adacıkların % canlılıklarının istatistik sonuçları (** $p < 0,05$ ve *** $p < 0,001$)

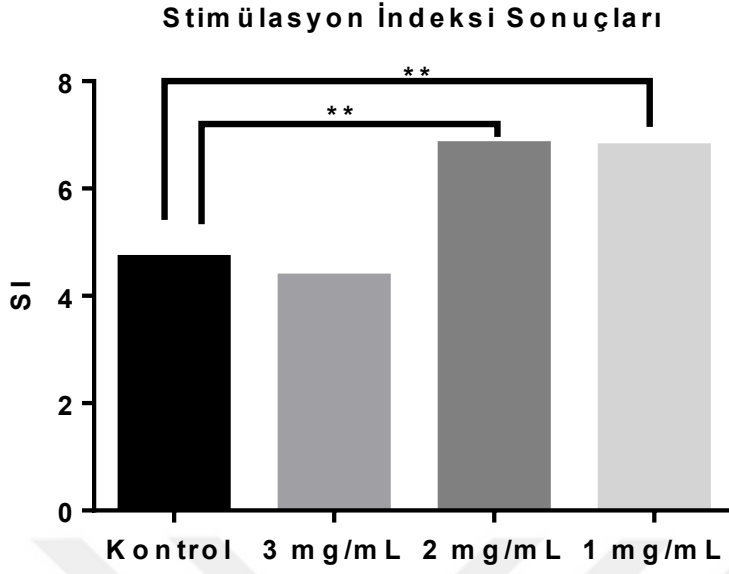
5.4. Farklı Derişimlerde PLGA-Sülfo-NHS ile Yüzey Modifikasyonu Gerçekleşen Adacıkların Stimülasyon İndeksi Sonuçları

PLGA-sülfo-NHS'in 3 farklı derişimi ile yüzey modifikasyonu işlemi yapılan adacık hücreleri 48 saat boyunca kültüre edildi. 48 saat sonra adacık hücrelerine 3,3 mM ve 16,7 mM glukoz çözeltileri ile glukoz stimülasyon testi yapıldı. 16,7 mM glukoz çözeltisi ile inkübasyon sonucu elde edilen insülin miktarı 3,3 mM glukoz çözeltisi ile inkübasyon sonucu elde edilen insülin miktarına oranlanarak stimülasyon indeksi (SI) hesaplandı. Şekil 5.19 incelendiğinde 3 mg/mL derişiminde PLGA ile yüzeyi modifiye edilen adacık hücrelerinin stimülasyon indeksi değeri ile kontrol grubu arasındaki sonuçlar benzer çıkarken, 2 mg/mL ve 1 mg/mL PLGA ile modifiye edilen adacık hücrelerinin stimülasyon indeksi daha yüksek değerde çıktı. Her bir grubun SI tekrar sayısı 3 (n=3) olacak şekilde değerlendirildi.



Şekil 5.19. PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıkların stimülasyon indeksi sonuçları

Elde edilen stimülasyon indeksi değerlerinin istatistiksel analizi GraphPad Prism programı ve Two-Way ANOVA metodu ile yapıldı. Şekil 5.20 incelendiğinde 2 mg/mL ve 1 mg/mL PLGA derişimlerinin SI sonuçları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıktı (** $p < 0,05$)



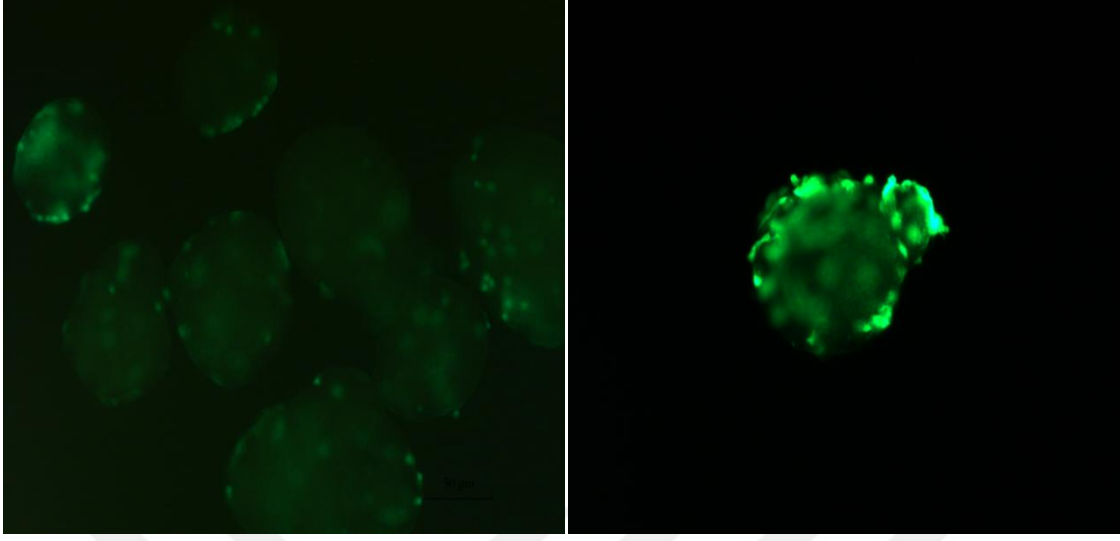
Şekil 5.20. PLGA-Sülfo-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen adacıkların stimülasyon indekslerinin istatistiksel analiz sonuçları

5.5. Floresan Grup Bağlanan Sülfo-NHS ile Aktifleştirilen PLGA Polimerinin Adacık Hücre Yüzeyine Bağlandığının Tespiti

Adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonunun gerçekleştiğini ispatlamak için PLGA-sülfo-NHS-FGA kullanıldı. PLGA derişimi belirleme çalışmalarında optimum derişim olarak belirlenen 2 mg/mL derişimi PLGA-sülfo-NHS-FGA içinde kullanıldı. Resim 5.4.A incelendiğinde hücrenin yüzeyinde floresan ışımının gözlenmesi ile PLGA'nın adacık hücre yüzeyine bağlandığı ispatlandı. 10. güne kadar yapılan takipte Resim 5.4.B'deki fotoğrafta görüldüğü gibi floresan ışımının varlığı PLGA'nın adacığın hücre yüzeyinde olduğunu gösterdi.

A

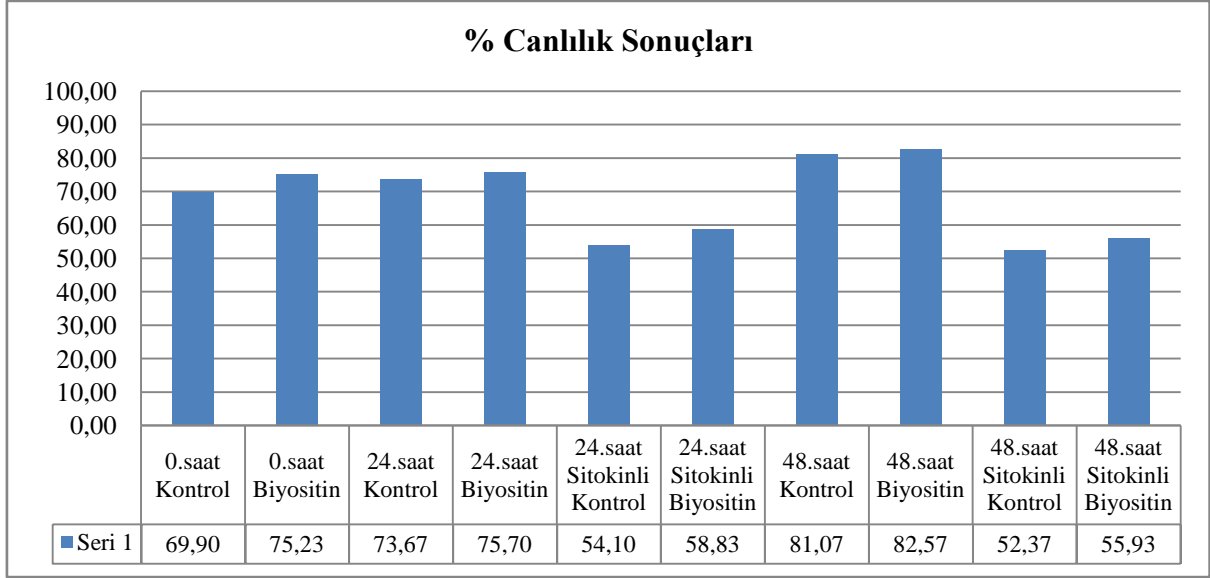
B



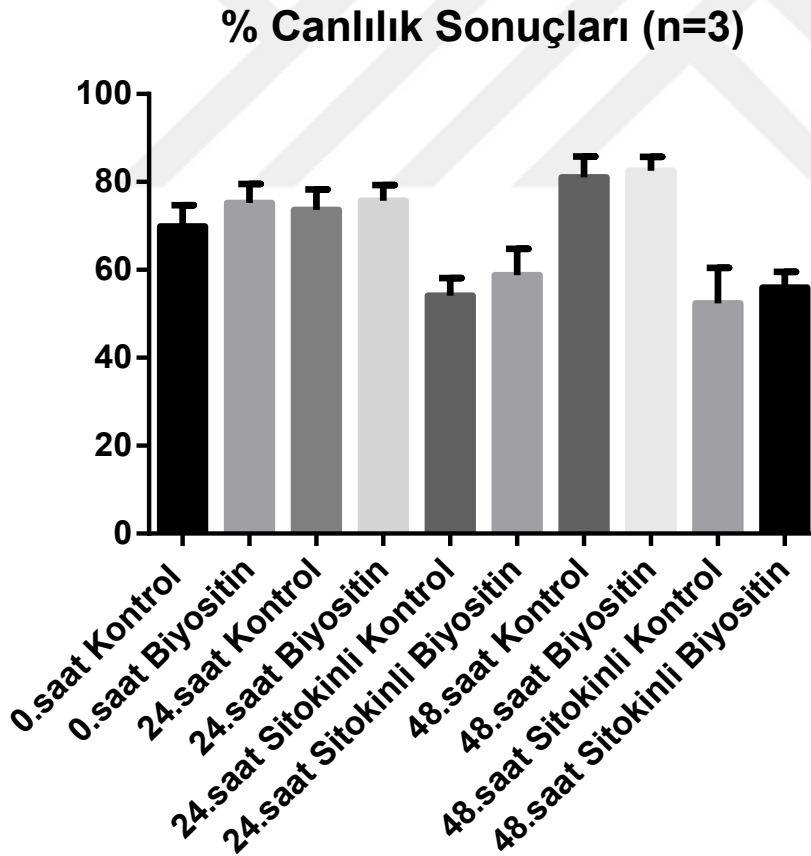
Resim 5.4. PLGA-sülfo-NHS-FGA ile yüzey modifikasyonu yapılan hücrelerin görüntüsü.
 A. Yüzey modifikasyonunun yapıldığı gün floresan mikroskobu görüntüsü,
 B. Yüzey modifikasyonu yapılan adacıkların kültürün 10. gününde alınan örneğin floresan mikroskobu görüntüsü

5.6. Biyositin Grubu Bağlanan PLGA ile Yüzeyi Kaplanan Adacık Hücrelerinin % Canlılık Sonuçları

Adacık hücrelerinin tabaka kalınlığını arttırmak için biyositin-streptavidin etkileşiminden yararlandık. Adacık hücrelerinin yüzeyini biyotinlendikten sonra streptavidin ile muamele ettik. Daha sonra biyositin grubu bağlanan PLGA ile adacık hücresi muamele edilerek yüzey modifikasyonu işlemi tamamladık. Adacık hücreleri 48 saat hem normal RPMI 1640 (+) besiyeri ile hem de sitokin karışımı içeren RPMI 1640 (+) besiyeri ile kültüre edildi. Şekil 5.21 incelendiğinde 48 saat kültür işleminin sonunda kontrol grubu ile biyositin ile yüzeyi modifiye edilen grubu adacık hücrelerinin % canlılıkları arasında fark gözlenmedi. Sitokinli grupta ise biyositin grubunun canlılığı yaklaşık % 3,6 daha fazla olduğu gözlemlendi.



Şekil 5.21. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzey modifikasyonu yapılan adacık hücrelerinin % canlılık sonuçları

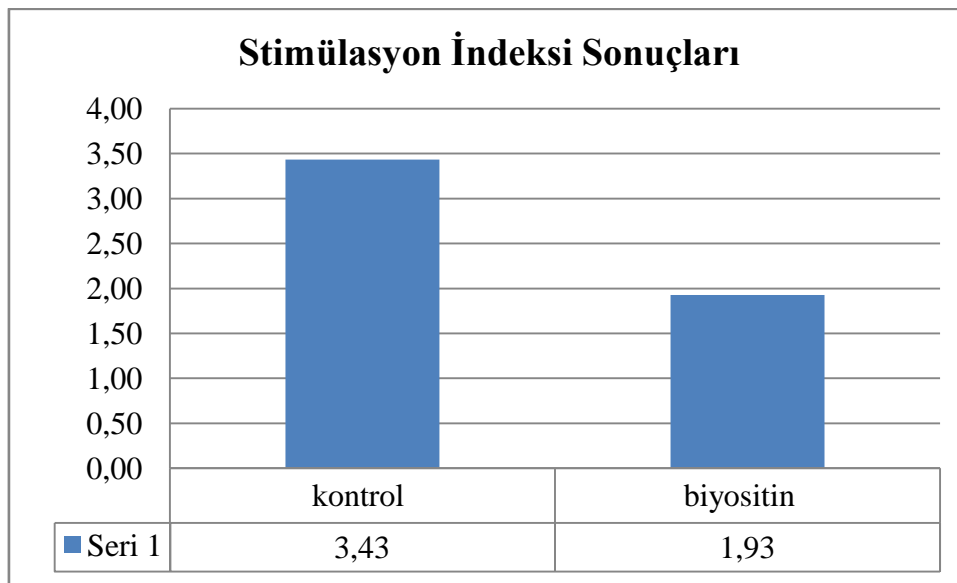


Şekil 5.22. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzey modifikasyonu yapılan adacık hücrelerinin % canlılık istatistiksel analiz sonuçları

Şekil 5.22'de görüldüğü üzere % canlılık sonuçlarının istatistiksel analizi yapıldığında 48. saatde gruplar arasında istatistiksel fark gözlenmedi.

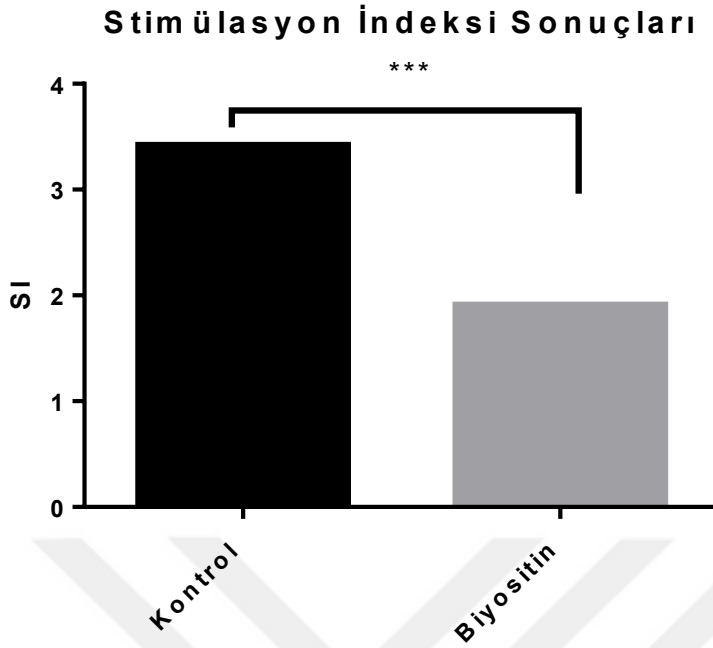
5.7. Biyositin Grubu Bağlanan PLGA ile Yüzeyi Modifiye Edilen Adacık Hücrelerinin Stimülasyon İndeksi Sonuçları

Adacık hücrelerinin yüzeyi PLGA-Biyositin ile modifiye edildikten sonra 3,3 mM ve 16,7 mM glukoz derişimine sahip Krebs çözeltileri ile glukoz stimülasyonu yapıldı. Daha sonra alınan insülin örnekleri ölçülerek stimülasyon indeksi hesaplandı. Şekil 5.23 incelendiğinde tabaka kalınlığının arttırılması adacık hücrelerinin insülin salınımını azalttığı görüldü.



Şekil 5.23. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzeyi modifiye edilen adacık hücrelerinin stimülasyon indeksi sonuçları

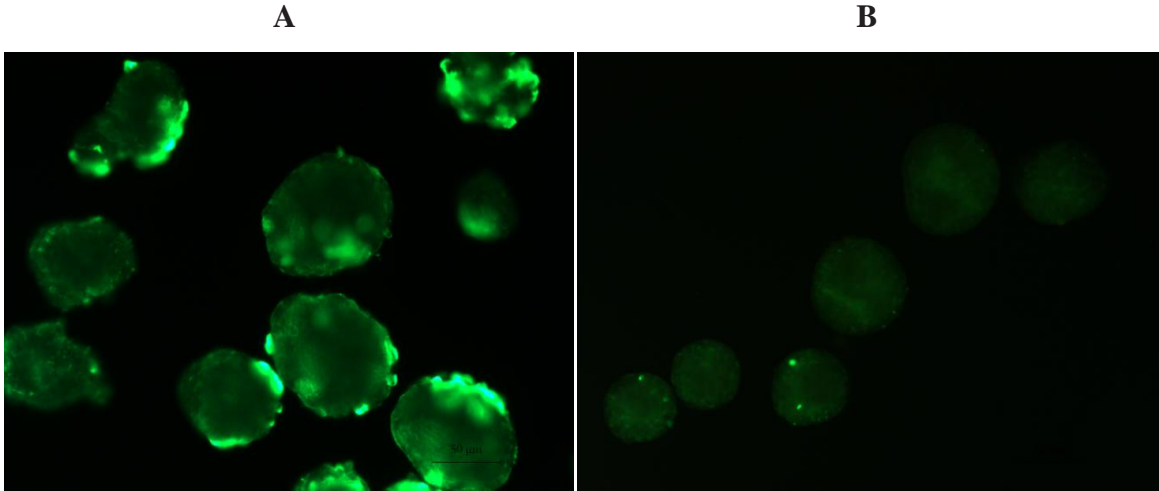
Şekil 5.24'de görüldüğü üzere stimülasyon indeksi sonuçlarının yapılan istatistiksel analizinde, biyositin grubunun stimülasyon indeksi sonucunun kontrol grubunun stimülasyon indeksi sonucundan istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu görüldü (***) $p < 0,05$).



Şekil 5.24. Biyositin grubu bağlanan PLGA ile yüzeyi modifiye edilen adacık hücrelerinin stimülasyon indeksinin istatistiksel analiz grafiği (***) $p < 0,05$)

5.8. Adacık Hücrelerinin Yüzeyinin Biyotinlendiğinin İspatı

Adacık hücrelerinin yüzeyinin biyotinlendiğini ispatlamak için adacık hücreleri biyotinlendiren sonra floresan boya takılı olan streptavidin-FITC ile muamele edildi. Floresan mikroskopu ile çekilen resim 5.5.A da adacık hücrelerinin yüzeyinin modifikasyon işlemi yapıldıktan sonraki fotoğrafı görülmektedir. Adacık hücrelerinde görülen yeşil ışıklar hücrenin yüzeyinin biyotinlendiğini göstermektedir. Floresan mikroskopu ile çekilen resim 5.5.B görüntüsü ise 30 gün kültüre edilen yüzeyi biyotinlenmiş ve boyanmış adacık hücrelerinin fotoğrafı görülmektedir.

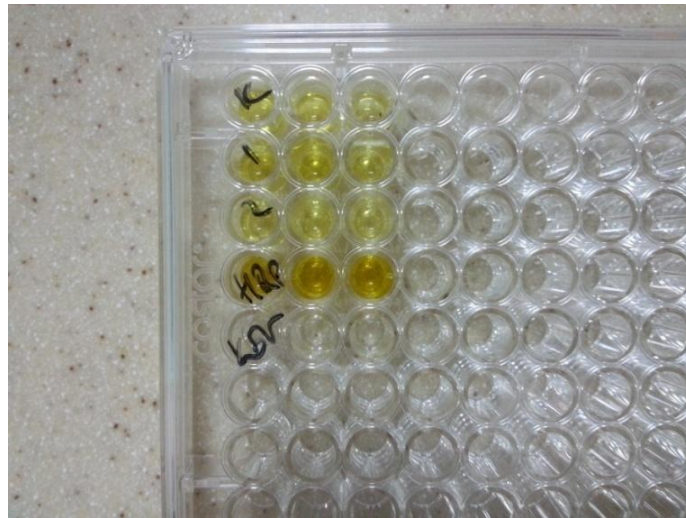


Resim 5.5. Adacık hücrelerinin yüzeyinin biyotinlendiğinin ispatı. Adacık hücreleri biyotinlendikten sonra streptavidin-FITC ile muamele edildi. A. Adacıkların yüzey modifikasyonu yapıldıktan sonraki floresan görüntüsü, B. Adacıkların yüzey modifikasyonu yapıldıktan 30 gün sonraki floresan görüntüsü

5.9. Pankreas Adacık Hücrelerinin Yüzeyinin Modifikasyon Yüzdesinin Belirlenmesi

Sonuçları

Adacık hücrelerinin yüzeyi 1 mg/mL ve 2 mg/mL PLGA-NHS ile modifiye edildikten sonra hücrelerin yüzeyinin modifikasyon yüzdesini belirledik. İlk olarak adacık hücrelerinin yüzeyine kovalent bağ oluşturacak olan NHS grubu içeren DSB-X biyotin ile adacık hücre yüzeyi biyotinlendi. Daha sonra HRP enzimi bağlı olan streptavidin ile hücreler muamele edildi.



Resim 5.6. Pankreas adacık hücrelerinin yüzeyinin modifikasyon yüzdesinin belirlenmesi için yapılan deneysel işlemlerin görüntüsü

96 kuyucuklu kültür kabının kuyucuk dizaynı;

K : Kontrol

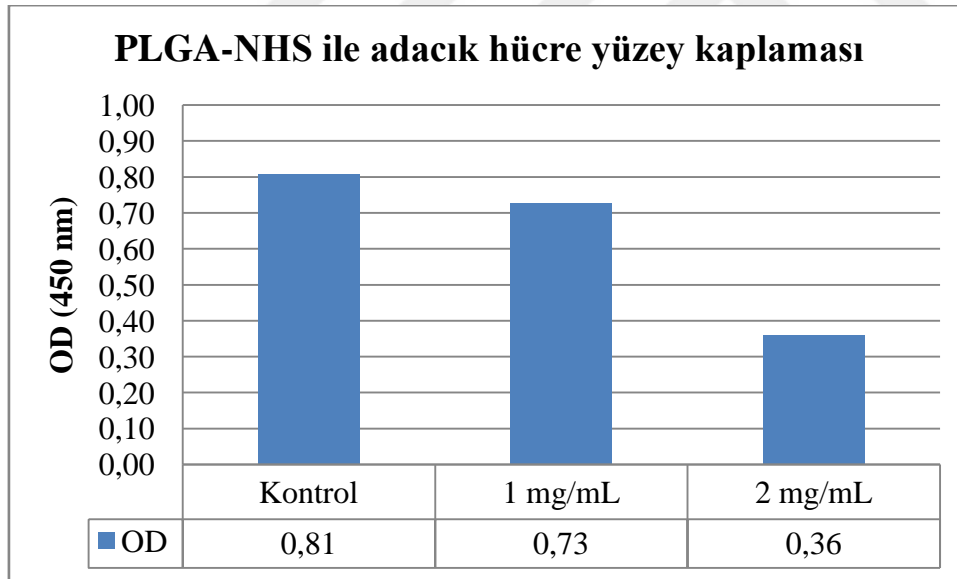
1 : 1 mg/mL PLGA-NHS çözeltisinde inkübe edilen adacıklar

2 : 2 mg/mL PLGA-NHS çözeltisinde inkübe edilen adacıklar

HRP : Hazırlanan HRP'den eklenen örnek

Kör : 100 µL TMB substrat + 50 µL Stop çözeltisi

Bu deneyde adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu gerçekleştiyse aktifleştirilmiş biyotinin bağlanma oranında düşüş gerçekleşecekti. Şekil 5.25 incelendiğinde yapılan OD hesaplamalarına göre; eğer biyotin kontrol grubundaki adacıklara %100 oranında bağlandığı kabul edilirse, bu bağlanma 1 mg/mL PLGA-NHS grubunda %90 oranında, 2 mg/mL PLGA-NHS grubunda %44 oranında gerçekleşmiştir. Yani 2 mg/mL derişimindeki PLGA-NHS ile modifiye edilen adacıklarda yüzey modifikasyonu % 56 oranında gerçekleşmiştir.



Şekil 5.25. Adacık hücrelerinin yüzeyine bağlanan HRP enzimi tarafından kullanılan substratın OD değerleri

5.10. Diyabetli Farelerin Böbrek Kapsülü Altına Gerçekleştirilen Adacık Hücre Nakli Sonrası Farelerin Kan Glukoz Değerleri

Adacık hücre yüzey modifikasyonu işleminin *in-vivo* başarısını ve adacık hücrelerine karşı bağışıklık sistemi saldırılarını değerlendirmek için sıçan adacık hücreleri diyabetli farelerin böbrek kapsülü altına nakil edildi. Fareler aşağıda tanımlanan 4 gruba ayrıldı.

1. Adacık grubu: 500 adet sıçan adacığı diyabetli farelerin böbrek kapsülü altına nakil edildi.
 2. Yüzeyi PLGA modifiye adacık grubu: 500 adet sıçan adacığının yüzeyi 2 mg/mL PLGA-sülfo-NHS ile modifiye edildikten sonra diyabetli farelerin böbre kapsülü altına nakil edildi.
 3. Kontrol grubu: Herhangi bir işlem yapılmayan sağlıklı fareler.
 4. Diyabet grubu: Herhangi bir işlem yapılmayan diyabetli fareler.
- 300 mg/dL ve üzerinde kan glukoz değerine sahip fareler diyabetli olarak kabul edildi. *In-vivo* nakil başarısı için kan glukozu değerleri 200 mg/dL ve alt değerleri olarak kabul edildi.

5.10.1. Adacık grubu farelerinin kan glukozu değerleri

Sıçanlardan izole edilen adacık hücreleri 24 saat kültüre edildikten sonra 500 adet adacık/fare olacak şekilde diyabetli Balb-c farelerin böbrek kapsülü altına nakil edildi. 30 gün boyunca farelerin kan glukoz değerleri takip edildi. 200 mg/dL ve alt değerindeki kan glukozu değerleri nakil başarısı olarak kabul edildi. Şekil 5.26'daki kan glukoz değerleri incelendiğinde nakil başarısı, nakil yapılan 4 farede 7 ile 15 güne kadar gözlemlendi ve kan glukoz değerleri şekil 5.26'da gösterildi.

5.10.2. Yüzeyi PLGA modifiye adacık grubu farelerinin kan glukozu değerleri

24 saat kültüre edilen sıçanlardan izole edilen adacık hücrelerinin yüzeyi 2 mg/mL PLGA ile modifiye edildi. 500 adet yüzeyi modifiye adacık/fare olacak şekilde diyabetli Balb-c farelerin böbrek kapsülü altına nakil edildi. 30 gün boyunca farelerin kan glukoz değerleri takip edildi. 200 mg/dL ve alt değerindeki kan glukozu değerleri nakil başarısı olarak kabul edildi. Şekil 5.27'deki kan glukoz değerleri incelendiğinde nakil başarısı, nakil yapılan 4 farede 16 gün ile 30 güne kadar gözlemlendi ve kan glukoz değerleri şekil 5.27'de gösterildi.

5.10.3. Kontrol grubu farelerinin kan glukozu değerleri

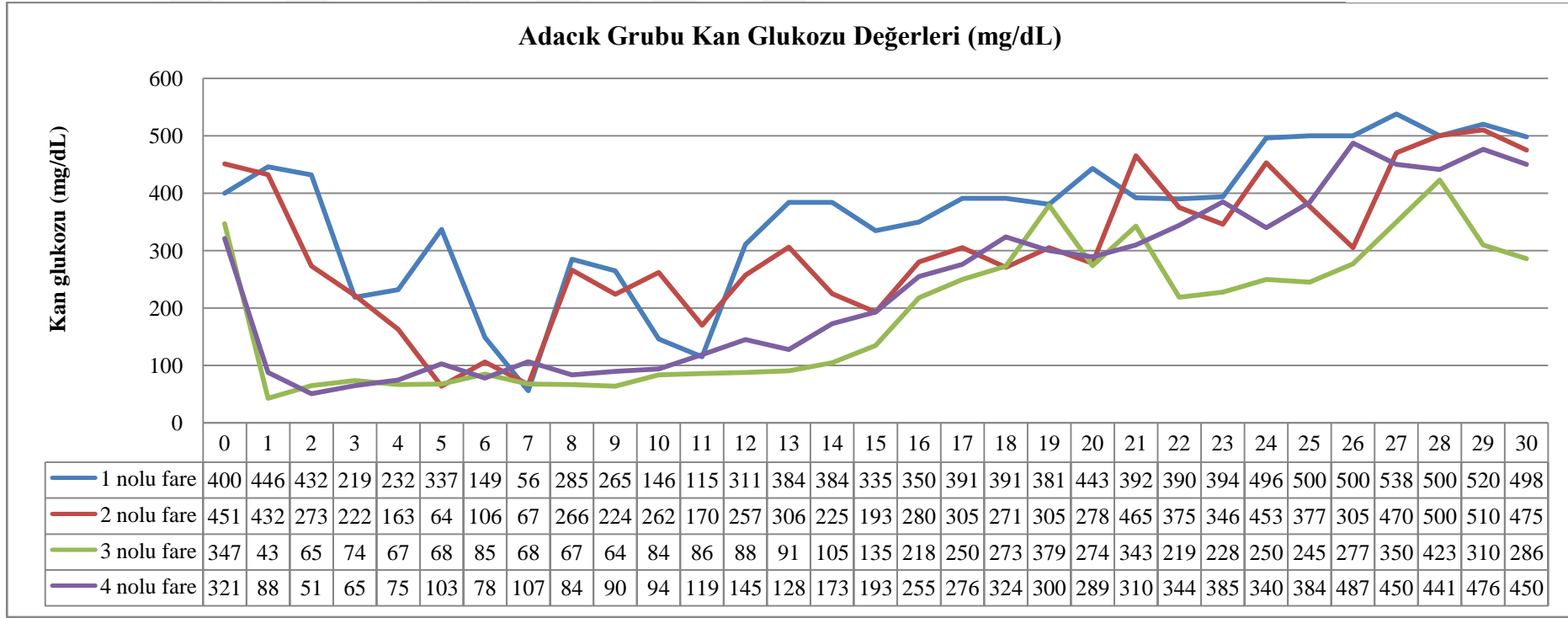
Şekil 5.28 incelendiğinde herhangi bir işlem yapılmayan sağlıklı farelerin 30 gün boyunca takip edilen kan glukoz değerlerinin 91-126 mg/dL aralığında değiştii gözlemlendi.

5.10.4. Diyabetli grubu farelerinin kan glukozu değerleri

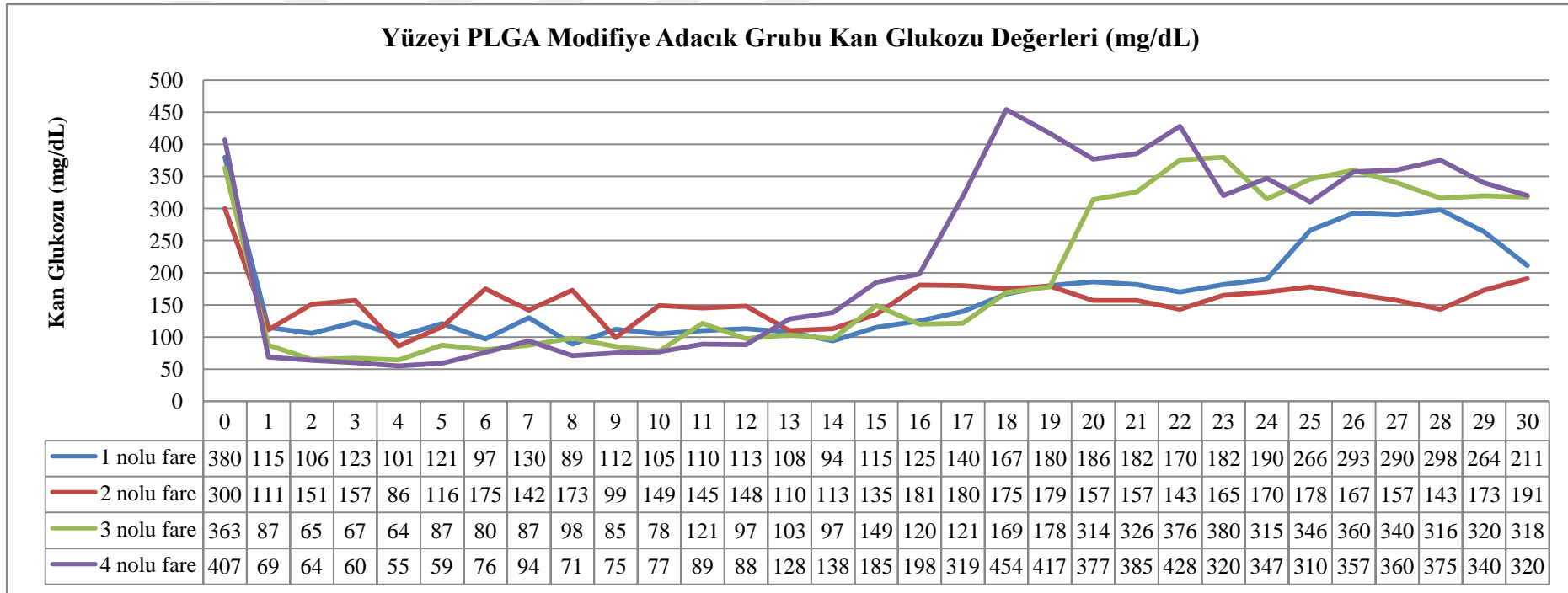
Şekil 5.29 incelendiğinde streptozosin ile diyabet edilen farelerin 30 gün boyunca takip edilen kan glukoz değerlerinin 300 mg/dL üzerinde olduğu gözlemlendi.

5.10.5. 4 farklı gruptaki farelerin ortalama kan glukozu değerleri

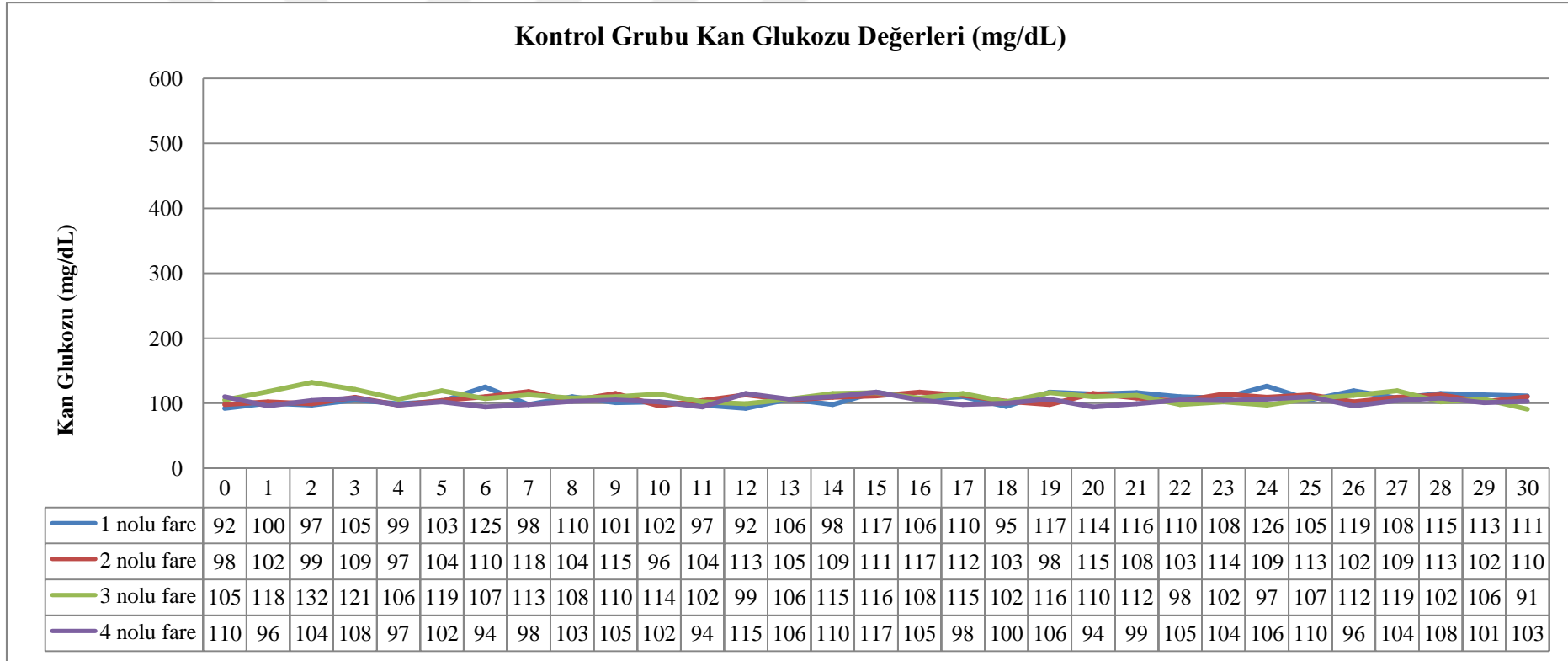
Şekil 5.30'da 4 farklı grupta bulunan farelerin ortalama kan glukoz değerleri verildi. 200 mg/dL ve alt değerindeki kan glukozu değerleri nakil başarısı olarak kabul edildiğinde, adacık grubunda ortalama 11 günlük başarı mevcutken kaplamalı adacık grubunda 17 günlük başarı elde edilmiştir. Ayrıca, yüzeyi modifiye adacık grubunun kan glukoz değerlerinin kontrol grubundaki farelere daha yakın olduğu gözlemlendi.



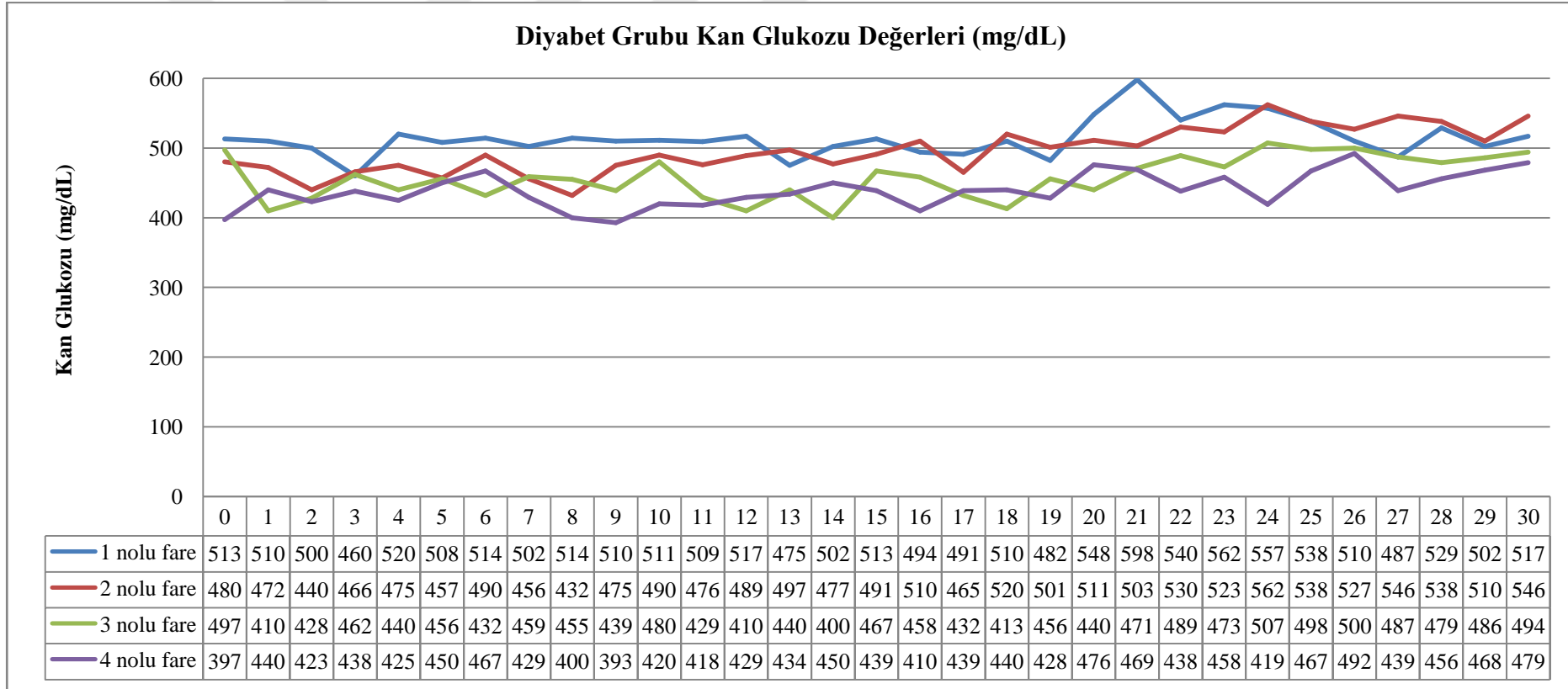
Şekil 5.26. Adacık grubu farelerinin 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL)



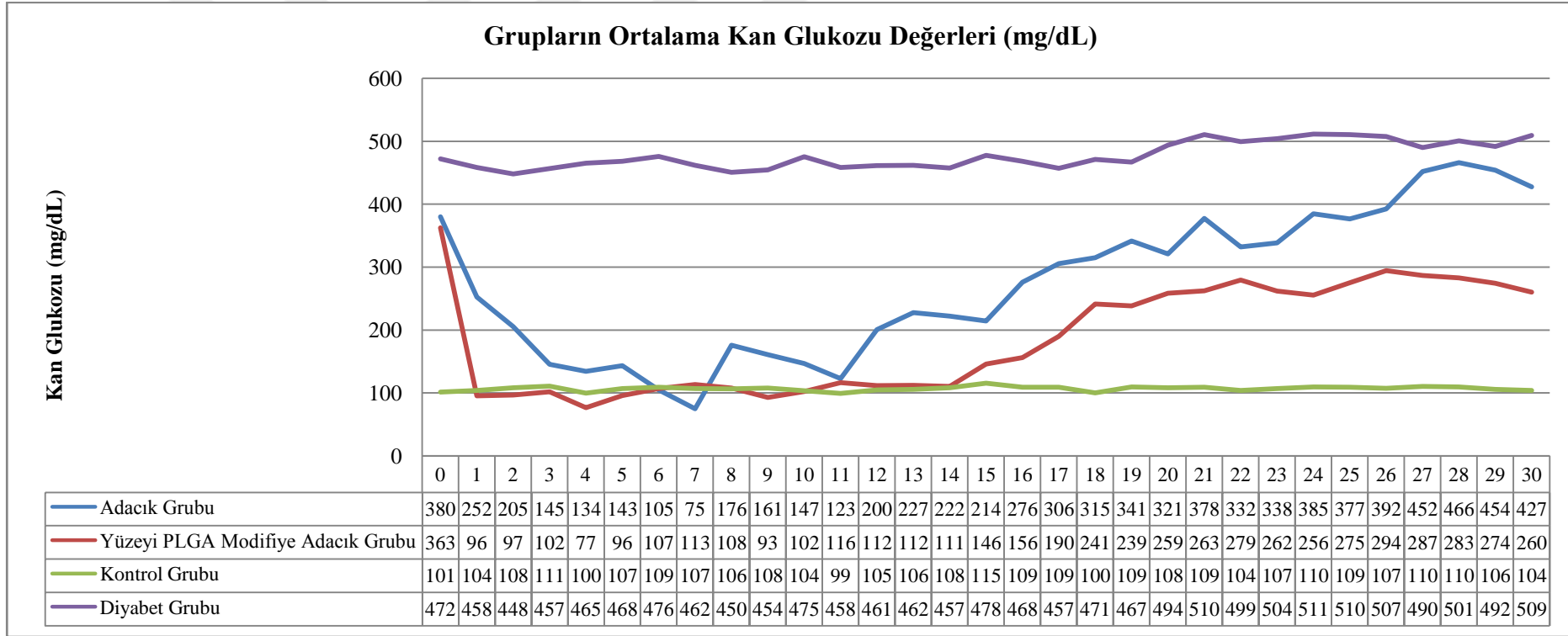
Şekil 5.27. Yüzeysel PLGA modifiye adacık grubu farelerinin 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL)



Şekil 5.28. Kontrol grubu farelerinin 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL)



Şekil 5.29. Diyabet grubu farelerinin 30 günlük kan glukozu değerleri (mg/dL)



Şekil 5.30. 4 farklı gruptaki farelerin 30 günlük ortalama kan glukozu değerleri (mg/dL)



6. TARTIŞMA VE SONUÇLARIN YORUMU

Şeker hastalığının tedavisinde pankreas adacık hücre nakli bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçların kullanımı şartı ile başarılı bir tedavi yöntemidir. Adacık hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını engellemek için yapılan adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu işlemi kullanılan yöntemlerdendir. Bu amaçla bizde çalışmamızda, pankreas adacık hücrelerinin yüzeyini biyouyumlu bir polimer olan poli-L-glutamik asit ile modifiye ettik. Öncelikle poli-L-glutamik asit'in serbest karboksilik asit gruplarını aktifleştirerek *N*-hidroksisüksinimit ve sülf- *N*-hidroksisüksinimit gruplarına çevirdik. Daha sonra adacık hücreleri ile bu polimeri muamele ederek adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonunu gerçekleştirdik. Son aşamada ise yüzey modifikasyonu işleminin *in-vivo* başarısını değerlendirdik.

Çalışmamızda elde edilen sonuçları aşağıda yorumladık;

Adacık hücrelerinin PLGA-NHS ile yüzey modifikasyonu, hücrelerin izolasyonundan 24 saat sonra gerçekleştirildi. Yüzeyi modifiye edilen hücreler 48 saat kültürde inkübe edildikten sonra canlılık testi yapıldığında kontrol grubunun canlılığı % 92,1 iken yüzey modifikasyonu gerçekleşen grubun canlılığı % 95,1 olarak belirlendi. 24. saat ve 48. saat sonuçları birbirleri ile karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmadı. İstatistiksel bir farkın çıkmaması, yüzey modifikasyon işleminin adacık hücre canlılığı üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermektedir. *SoRelle ve arkadaşlarının* 2015 yılında, kovalent bağlanma ile yaptıkları adacık hücre yüzey modifikasyonunda modifikasyon işleminin % canlılık üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını ve adacık hücrelerinin % canlılıklarının % 90 üzerinde elde edildiğini belirlemişlerdir [91].

Adacık hücrelerinin PLGA-NHS ile yüzey modifikasyonu işleminden 48 saat sonra fonksiyonellik testi yapıldı. Bu testin sonuçları stimülasyon indeksi cinsinden hesaplandı. Stimülasyon indeksi değerinin 2 ve üzerinde olması adacık hücrelerinin fonksiyonel olduğunu göstermektedir. İki grubu kendi arasında karşılaştırdığımızda kontrol grubunun stimülasyon indeksi 2,5 iken yüzey modifikasyonu gerçekleşen grubun 2,6 olarak belirlendi. 48. saat sonuçları birbirleri arasında karşılaştırıldığında iki grup arasındaki

istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır. İstatistiksel bir farkın çıkmaması, yüzey modifikasyon işleminin adacık hücre fonksiyonelliği üzerine olumsuz bir etkisinin olmadığını göstermektedir. *Dong ve arkadaşlarının* 2012 yılında yaptıkları çalışmada, kovalent bağlanma ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirdikleri adacıklarda stimülasyon indeksi sonucunu 2 değerinin üzerinde elde etmişler ve kontrol grubu ile modifikasyon grubu arasında istatistiksel fark gözlemlenmemişlerdir [112].

PLGA-NHS ile adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonunun endoplazmik retikulum stresine neden olup olmadığını araştırdık. Bunun için, 48 saat kültüre edilen kontrol grubu adacık hücrelerinden ve yüzey modifikasyonu yapılan adacık hücrelerinden protein izolasyonu yapılarak western blot işlemi yapıldı. Endoplazmik retikulum stresi için hem kontrol grubu adacıklarında hem de yüzey modifikasyonu gerçekleşmiş adacıklarda PERK, p-PERK, eIF2 α ve p-eIF2 α markerlarına antikorları kullanılarak bakıldı. Sonuçları hücrenin temel proteinlerinden olan β -aktin ile standardize edilerek yorumlandı. Her iki grupta da elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı. İstatistiksel bir farkın çıkmaması, yüzey modifikasyon işleminin adacık hücrelerinde ER stresine neden olmadığını göstermektedir. *Lee ve arkadaşlarının* 2010 yılında yaptıkları çalışmada adacıklardaki ER stresini belirlemek için bizimde çalışmamızda incelediğimiz eIF2 α ve p-eIF2 α proteinlerinin miktarlarına incelemişler [113]. *Yapılan literatür taramasında* adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu işleminin endoplazmik retikulum stresi değerlendirmesine ait bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda yüzey modifikasyonu işleminin, kontrol grubuna göre farklı bir endoplazmik retikulum stresine de neden olmadığı tespit edildi.

N-hidroksisüksinimit türevi polimerlerin suda çözünmelerinin 1-2 saat sürmesi problemini aşmak için poli-L-glutamik asit'in serbest karboksilik asit gruplarını *N*-hidroksisülfosüksinimit gruplarına çevirdik. Daha sonra adacık hücrelerini, aktiveleştirilen bu polimerin farklı derişimleri ile muamele ettik ve adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonunu gerçekleştirdik. 3 farklı doz denemesi yapıldı. Kontrol grubu hücreleri normal besiyeri ile 48 saat kültüre edildi. Yüzey modifikasyonu gerçekleşen hücrelerde aynı anda TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokin karışımı içeren sitokinli besiyeri ile 48 saat kültüre edildi. 24. saat de % canlılıkları değerlendirildi. 48. saat de hem % canlılıkları hem de glukozaya yanıt olarak verdikleri insülin salınımları değerlendirildi.

48.saat verilerine göre kontrol grubunun canlılığı % 78,67 iken 3 mg/mL PLGA grubunun % 70,77, 2 mg/mL PLGA grubunun % 77,23, 1 mg/mL PLGA grubunun % 78,87 olarak hesaplanmıştır. Sitokin ile muamele edilen adacık grubunda ise kontrol grubunun canlılığı % 47,70 iken 3 mg/mL PLGA grubunun % 58,50, 2 mg/mL PLGA grubunun % 59,13, 1 mg/mL PLGA grubunun % 51,60 olarak hesaplanmıştır. Çizelge 6.1 incelendiğinde sitokinli grupta 3 mg/mL ve 2 mg/mL PLGA gruplarının % canlılık sonuçlarının kontrol grubuna göre istatistiksel sonuçlarda anlamlı bir artış belirlenmiştir ($p<0,001$). İstatistiksel sonuçları da anlamlı bir değişikliğin olması, 3 mg/mL ve 2 mg/mL PLGA ile yüzeyi modifiye edilen adacıkların sitokinlere karşı daha dayanıklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 6.1. PLGA-sülfo-NHS ile yüzeyi modifiye edilen adacıkların normal ve sitokinli besiyeri ile 48 saat kültür işleminden sonra % canlılıklarının kontrol grubu adacıkları ile karşılaştırılması

<i>Gruplar</i>	<i>Normal besiyeri</i>	<i>Sitokinli Besiyeri</i>
<i>3 mg/mL</i>	% 70,77	% 58,50
<i>2 mg/mL</i>	% 77,23	% 59,13
<i>1 mg/mL</i>	% 78,87	% 51,60
<i>Kontrol</i>	% 78,67	% 47,70

Shahbazov ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sitokin karışımı ile kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılıklarının % 50'nin altında olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda ise, yüzey modifikasyonu gerçekleşip sitokin karışımına maruz bırakılan adacıkların % canlılıkları % 50'nin üzerinde çıkmıştır [114].

Glukoz stimülasyonu sonucunda elde edilen stimülasyon indeksi (SI) değerlerinde kontrol grubunun SI değeri 4,71 iken 3 mg/mL PLGA grubunun 4,36, 2 mg/mL PLGA grubunun 6,82, 1 mg/mL PLGA grubunun 6,78 olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatistiksel analizde 2 mg/mL ve 1 mg/mL grubunun kontrol grubuna göre SI sonuçları anlamlı artış olduğu belirlenmiştir. Gözlenen anlamlı artışın PLGA kaynaklı olduğu gözlenmiştir.

Hem % canlılık hem de SI sonuçlarına göre ideal derişimin 2 mg/mL PLGA-sülfo-NHS derişimi olduğu belirlenmiştir.

Adacık hücrelerinin yüzeyine PLGA polimerinin bağlandığını, floresan boya grubu takarak sentezlediğimiz PLGA-Sülfo-NHS-FGA ile belirledik. PLGA ile yüzey modifikasyonu için optimum derişim olan 2 mg/mL derişimi, sentezlenen PLGA-Sülfo-NHS-FGA polimeri içinde kullanıldı. 2 mg/mL derişimindeki PLGA-Sülfo-NHS-FGA ile adacık hücreleri muamele edildi. Kültürde takip edilen yüzeyi modifiye adacık hücrelerinin 10. gün de dâhil olmak üzere, yüzeyinde floresan ışması gözlendi. Bu yöntemle adacıkların yüzeyini PLGA ile modifiye edildiği görüldü. *Literatür taramasında* PLGA-Sülfo-NHS-FGA'nın sentezini ve adacık hücreleri ile muamelesini içeren bir çalışma bulunmamaktadır, ilk defa bu çalışmada yapılmıştır.

Hücrenin yüzey modifikasyonunda tabaka kalınlığını arttırmanın etkinliğini araştırmak için biyotin-streptavidin etkileşiminden yararlandık. *Wilson ve arkadaşlarının* 2010 yılında yaptıkları çalışmada adacık hücrelerinin yüzeyini biyotinlemek için kullanılan Sülfo-NHS-LC-Biyotin'in uygun derişimini 4 mM olarak belirlemişler. Bizde çalışmamızda bu derişimi kullanarak adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu gerçekleştirdik. Daha sonra 0,01 mg/mL Streptavidin [89] ile muamele edildi ve en son olarak sentezlediğimiz PLGA-Biyositin'in 2 mg/mL dozu ile muamele edildi. Bu işlemler sonucunda adacık hücrelerinin yüzey modifikasyonu işleminde tabaka kalınlığı arttırıldı.

Kontrol grubu hücreleri ve yüzey modifikasyonu gerçekleşen hücreler aynı anda TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ sitokin karışımı ile 48 saat kültüre edildiler. 24. saat de % canlılıkları değerlendirildi. 48. Saat de hem % canlılıkları değerlendirildi hem de glukoza yanıt olarak verdikleri insülin salınımları değerlendirildi. 48.saat verilerine göre kontrol grubunun canlılığı % 81,07, biyositin grubunun canlılığı % 82,57 olarak bulunmuştur. Sitokin ile muamele edilen adacık grubunda ise kontrol grubunun canlılığı % 52,37 iken biyositin grubunun canlılığı % 55,93 olarak bulunmuştur (Çizelge 6.2).

Çizelge 6.2. PLGA-Biyositin ile yüzeyi modifiye edilen adacıkların normal ve sitokinli besiyeri ile 48 saat kültür işleminden sonra % canlılıklarının kontrol grubu adacıkları ile karşılaştırılması

<i>Gruplar</i>	<i>Normal besiyeri</i>	<i>Sitokinli Besiyeri</i>
<i>Biyositin</i>	% 82,57	% 55,93
<i>Kontrol</i>	% 81,07	% 52,37

Kızılel ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada kontrol grubu adacıkları ile yüzeyi streptavidin-biyotin tabaka-tabaka yöntemiyle modifiye edilen adacıkların % canlılık sonuçlarının bizim çalışmamızla uyumlu olacak şekilde benzer çıktığı gözlenmiştir [89]. *Shahbazov ve arkadaşlarının* 2016 yılında yaptıkları çalışmada sitokin karışımı ile kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılıklarının % 80'lerden % 50'nin altına düştüğünü gözlemlemişler [114]. Bizim sonuçlarımızda bu literatür ile uyumludur. Hatta sitokinli grubumuzdaki adacık hücrelerimizin % canlılıkları % 50'nin üzerindedir ve yüzey modifiye grubumuzun % canlılıkları kontrol grubuna göre % 3 daha fazla canlıdır. Glukoz stimülasyonu sonucunda elde edilen stimülasyon indeksi (SI) değerlerinde kontrol grubunun SI değeri 3,43 iken biyositin grubunun 1,93 olarak bulunmuştur. Yüzey modifikasyonu grubunun stimülasyon indeksi değerinin kontrol grubuna göre daha düşük çıkmasının sebebi hücrelerin glukozu karşı duyarlılığının azalması olarak düşünülmüştür.

Adacık hücre yüzeyinin Sülfö-NHS-LC-Biyotin ile biyotindikten sonra yüzeyin biyotindendiğini ispatlamak için floresan boya grubu takılı olan Streptavidin-FITC ile muamele edildi. 30. gün de dâhil olmak üzere ışına gözlemlendi. *SoRelle ve arkadaşlarının* 2015 yılında yaptıkları çalışmada adacık hücrelerinin yüzeyini Sülfö-NHS-LC-Biyotin ile biyotindikten sonra streptavidin-FITC ile muamele etmişler 7 gün süre ile takip etmişler. 7 gün süresince ışına gözlemlenmiş [91].

Pankreas adacık hücrelerinin yüzeyinin modifikasyon yüzdesini belirlemek için kontrol grubundaki adacıklar ile PLGA-NHS ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirildiği düşünülen polimer grubundaki adacık hücreleri, ilk olarak karboksilik asit grubu aktive edilmiş DSBX-biyotin ile daha sonra HRP enzimi içeren streptavidin ile muamele edildiler. Ortama substrat olarak TMB koyulduğundaki renk değişimi ile yüzeye tutunan biyotin oranı tespit edilmiş oldu. Bu işlemde, biyotinin adacık yüzeyine bağlanma oranı azaldığında yüzey modifikasyonunun gerçekleşme yüzde oranı artmaktadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde, eğer biyotin kontrol grubundaki adacıklara %100 oranında bağlandığı kabul edilirse, bu bağlanma 1 mg/mL PLGA-NHS grubunda %90 oranında, 2 mg/mL PLGA-NHS grubunda % 44 oranında gerçekleşmiştir. Yani 2 mg/mL derişimindeki PLGA-NHS ile modifiye edilen adacıklarda yüzey modifikasyonu % 56 oranında gerçekleşmiştir. Bu deneme, PLGA'nın adacık hücre yüzeyine kovalent bağlanma yöntemi ile bağlandığını göstermiştir. *Literatür taramasında* adacık hücrelerinin yüzey

modifikasyon yüzdesini belirlemek üzere bu çalışmaya benzer bir çalışma bulunmamaktadır, ilk defa bu çalışmada yapılmıştır.

In-vitro çalışmalar tamamlandıktan sonra yüzey modifikasyonu işleminin *in-vivo* etkinliğini araştırmak için *in-vivo* adacık hücre nakil çalışmaları yapıldı. Nakil çalışmaları deney gruplarından sadece PLGA-sülfo-NHS ile modifiye adacık grubu için yapıldı. PLGA-biyositin modifiye adacık grubunun glukoz stimülasyon indeksi sonuçları kontrol grubuna göre düşük çıktığı için bu grubun nakil çalışmaları yapılmadı.

Yüzey modifikasyonu gerçekleşen adacıkların bağışıklık sistemi saldırılarından korunma başarısını değerlendirmek için sıçanlardan izole edilen adacık hücreleri diyabetli farelerin böbrek kapsülü altına nakil edildi. Çalışmada adacık, yüzeyi PLGA modifiye adacık, kontrol ve diyabetli olmak üzere 4 farklı nakil grubu oluşturuldu ve her grupta 4 fare kullanıldı. Bütün gruptaki farelerin 30 gün süreyle kan glukoz değerleri takip edildi. 200 mg/dL ve altındaki kan glukozu değerleri nakil başarısı olarak kabul edildi.

Yüzey modifiye adacık grubunda ortalama 17 günlük nakil başarısı elde edilirken adacık grubunda ortalama 11 günlük nakil başarı elde edildi. PLGA ile yüzeyi modifiye edilen adacıkların ortalama nakil başarısı gününün yaklaşık 1,5 kat daha fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca, yüzeyi modifiye adacık grubunun kan glukoz değerlerinin kontrol grubundaki farelere daha yakın olduğu gözlemlendi.

Meier ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada 1000 adet rat adacığını diyabetik farelerin böbrek kapsülü altına nakil etmişlerdir. Yaptıkları 30 günlük takipte nakil sonrası ortalama 14 günlük nakil başarısı elde edilmiştir [92]. Bizim nakil çalışmamızda ise 500 adet adacık nakil edildi ve adacık grubunda ortalama 11 günlük başarı edildi.

Aghajani-Lazarjani ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptıkları çalışmada wistar türü ratlardan izole ettikleri adacıkların yüzeyini poli-etilen glikol (PEG) kullanarak kovalent bağlanma yöntemi ile modifiye etmişlerdir. Daha sonra 1200 adet yüzeyi modifiye adacığı aynı tür ratlara nakil yapmışlardır. Ortalama 24 günlük nakil başarısı elde etmişlerdir. Yüzeyi modifiye edilmeden nakil edilen adacıklarda ise ortalama 6 günlük başarı sağlanmıştır [111]. Bizim çalışmamızda farklı türler arası nakil yapılmasına rağmen

yüzeyi modifiye adacık grubunda 17 günlük başarı sağlanırken kontrol grubumuzda 11 günlük başarı sağlandı.

Tip 1 diyabetin tedavi yöntemlerinden olan adacık hücre naklinin başarısını arttıracak olan çalışmalar güncelliğini koruyarak devam etmektedir. Adacık hücre naklinde karşılaşılan en büyük problemlerden biri alıcının bağışıklık sisteminin nakil edilen adacık hücrelerini harap etmesidir. Biyoyapay pankreas, bu problemi aşmak için uygulanan yöntemlerdendir. Bizde tez çalışmamızda adacık hücrelerinin yüzeyini biyouyumlu polimer olan poli-L-Glutamik asit ile modifiye ettik. *In-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarda yüzey modifikasyonu ile başarı sağlandığını ve bu yüzey modifikasyonu metodunun adacık hücre nakli çalışmalarında kullanılabilir, umut vaat eden bir metot olduğunu gözlemledik.



KAYNAKLAR

1. Medvei, V. C. (1993). *The history of clinical endocrinology: a comprehensive account of endocrinology from earliest times to the present day*. Carnforth, Lancashire, UK: Parthenon Publication Group, 97-98.
2. Konstantia, Z., Konstantina, S. N. (2015). Special issue on emerging technologies for the management of diabetes mellitus. *Medical, Biological Engineering, Computing*, 53, 1255–1258.
3. İnternet: American diabetes association. <http://www.webcitation.org / query ?url = http%3A%2F%2Fwww.diabetes.org%2Fdiabetesbasics%2Fstatistics%2F&date=2016-08-04/> . Son Erişim Tarihi: 04.08.2016.
4. Hoang, D. T., Matsunari, H., Nagaya, M., Nagashima, H., Millis, J. M., Witkowski, P., Periwal, V., Hara, M., Jo, J. (2014). A Conserved Rule for Pancreatic Islet Organization. *Plos One*, 9(10), 1-9.
5. Merani, S., Shapiro, J. A. M. (2006). Current status of pancreatic islet transplantation. *Clinical Science*, 110, 611–625.
6. Rheinheimer, J., Bauer, A. C., Silveiro, S. P., Estivalet, A. A. F. (2015). Human pancreatic islet transplantation: an update and description of the establishment of a pancreatic islet isolation laboratory. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, 59 (2), 1-5.
7. Biarnés, M., Montolio, M., Nacher, V., Raurell, M., Soler, J., Montanya, E. (2002). Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes*, 51(1), 66–72.
8. Davalli A. M., Scaglia, L., Zangen, D. H., Hollister, J., Bonner-Weir, S., Weir, G. C. (1996). Vulnerability of islets in the immediate posttransplantation period. Dynamic changes in structure and function. *Diabetes*, 45(9), 1161–1167.
9. Mattsson, G., Jansson, L., Nordin, A., Andersson, A., Carlsson, P. O. (2004). Evidence of functional impairment of syngeneically transplanted mouse pancreatic islets retrieved from the liver. *Diabetes*. 53(4), 948–954.
10. Giraldo, J. A., Weaver, J. D., Stabler, C. L. (2010). Enhancing Clinical Islet Transplantation through Tissue Engineering Strategies. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 4(5), 1238-1247.
11. David, W. (Editör) (2011). Beta Cell Replacement Therapy, Type 1 Diabetes - Pathogenesis, *Genetics and Immunotherapy*, 503-526.
12. Teramura, Y., Iwata, H. (2010). Bioartificial pancreas, Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 827–840.

13. Haque, M. R., Jeong, J. H., Byun, Y. (2016). Combination strategy of multi-layered surface camouflage using hyperbranched polyethylene glycol and immunosuppressive drugs for the prevention of immune reactions against transplanted porcine islets. *Biomaterials*, 84, 144-156.
14. Teramura, Y., Asif, S., Ekdahl, K. N., Nilsson, B. (2015). Cell Surface Engineering for Regulation of Immune Reactions in Cell Therapy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 865, 189-209.
15. International Diabetes Federation. (2015). IDF diabetes Atlas. *Seventh Edition*, 1-144.
16. Bottino, R., Trucco, M. (2005). Multifaceted therapeutic approaches for a multigenic disease. *Diabetes*, 54, 79-86.
17. Stock, P. G., Bluestone, J. A. (2004). Beta-Cell Replacement for Type I Diabetes. *Annual Review of Medicine*, 55(1), 133-156.
18. Harlan, D. M., Kenyon, N. S., Korsgren, O., Roep, B. O. (2009). Current Advances and Travails in Islet Transplantation, *Diabetes*, 58(10), 2175-2184.
19. Shapiro, A. M. J., Nanji, S. A., Lakey, J. R. T. (2003). Clinical islet transplant: current and future directions towards tolerance. *Immunological Reviews*, 196(1), 219-236.
20. Cooke, D. W. P. L., Plotnick, L. (2008). Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. *Pediatric Reviews*, 29(11), 374-384.
21. Júnior, R. F. M., Salvalaggio, P., Pacheco-Silva, A. (2015). Pancreas transplantation: review. *Einstein (Sao Paulo)*, 13(2), 305-309.
22. Troppmann, C. (2010). Complications after pancreas transplantation. *Current Opinion Organ Transplantation*, 15, 112-118.
23. David, E. R. S., Rainer, W. G. G. (2004). Transplantation of the Pancreas. *History of Pancreas Transplantation Book*, 39-68.
24. Tattersall, R. (1995). Pancreatic organotherapy for diabetes, 1889-1921. *Medical History*, 39(3), 288-316.
25. Moskalewski, S. (1965). Isolation and culture of islets of langerhans of the guinea pig. *General and Comparative Endocrinology*, 5, 342-353.
26. Lacy, P.E., Kostianovsky, M. (1967). Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 16, 35-39.
27. Lindall, A., Steffes, M., Sorenson, R. (1969). Immunoassayable insulin content of subcellular fractions of rat islets. *Endocrinology*. 85(2), 218-223.

28. Ballinger, W. F., Lacy, P. (1972). Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*, 72, 175–186.
29. Najarian, J. S., Sutherland, D.E., Baumgartner, D. (1980). Total or near total pancreatectomy and islet autotransplantation for treatment of chronic pancreatitis. *Annals of Surgery*, 192, 526–542.
30. Horaguchi, A., Merrell R. C. (1981). Preparation of viable islet cells from dogs by a new method. *Diabetes*, 30, 455-458.
31. Thompson, N. W., Lloyd, R. V., Nishiyama, R. H., Vinik, A. I., Strodel, W. E., Allo, M. D., Eckhauser, F. E., Talpos, G., Mervak. T. (1984). MEN I Pancreas: A Histological and Immunohistochemical Study. *World Journal of Surgery*, 8, 561-574.
32. Pyzdrowski, K. L., Kendall, D. M., Halter, J. B. (1992). Preserved insulin secretion and insulin independence in recipients of islet autografts. *The New England Journal of Medicine*, 327, 220–226.
33. Shapiro, A. M. J., Lakey, J. R. T., Ryan, E. A. (2000). Islet transplantation in 7 patients with type1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppression regimen. *The New England Journal of Medicine*, 343, 230–238.
34. Collaborative Islet Transplant Registry (CITR). (2013). *Eight Annual Report*, 15-27.
35. Scharp, D. W., Lacy, P. E. , Finke, E. (1987). Low temperature culture of human islets isolated by the distention method and purified with ficoll or percoll gradiyents. *Surgery*, 5, 869-879.
36. Munoer, B. L., Caramia, F., Lacy, P. E. (1965). The Ultrastructural Basis for The Identification of Cell Types in The Pancreatic Islets II. Rabbit, Dog and Opossum. *Zeitschrift für Zellforschung*, 67, 776-798.
37. Saltiel, A. R. (2000). Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(2), 163–164.
38. Chang, Y. C., Hee, S. W., Hsieh, M. L., Jeng, Y. M., Chuang, L. M. (2015). The Role of Organelle Stresses in Diabetes Mellitus and Obesity: Implication for Treatment. *Analytical Cellular Pathology*, 1-14.
39. Eberhart, M.S., Ogden. C., Engelgau, M., Cadwell, B., Hedley. A. A., Saydah, S. H. (2004). Prevalence of Overweight and Obesity Among Adults with Diagnosed Diabetes-United States, 1988--1994 and 1999--2002". *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 53(45), 1066–1068.
40. Bockman, D. E. (1993). Anatomy of the Pancreas. The Pancreas: Biology, Pathobiology, and Disease. *Raven Press*, 1993, 1-8.

41. Rahier, J., Wallon, J., Henquin, J. C. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia*, 20, 540-546.
42. Rahier, J., Goebbels, R.M., Henquin, J. C. (1983). Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia*, 24, 366-371.
43. Ogilvie, R. F. (1937). A quantitative estimation of the pancreatic islet tissue. *QJM*, 6, 287-300.
44. Saito, K., Iwama, N., Takahashi, T. (1978). Morphometrical analysis on topographical difference in size distribution, number and volume of islets in the human pancreas. *Tohoku Journal Of Experimental Medicine*, 124, 177-186.
45. Rahier, J., Wallon, J., Henquin, J. C. (1981). Cell populations in the endocrine pancreas of human neonates and infants. *Diabetologia*, 20, 540-546.
46. Domínguez-Bendala, J. (2009). Pancreatic Stem Cell, *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*, 13-14.
47. Langerhans, P. (1937). Contributions to the microscopic anatomy of the pancreas. *Bulletin of the Institute of the History of Medicine*, 5, 1-39.
48. Scharfmann, R., Xiao, X., Heimberg, H., Mallet, J., Ravassard, P. (2008). Beta cells within single human islets originate from multiple progenitors. *PloS ONE*, 3(10), 1-8.
49. Weir, G. C., Bonner-Weir, S. (1990). Islets of Langerhans: the puzzle of intraislet interactions and their relevance to diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 85(4), 983-987.
50. Ballian, N., Brunicardi, F. C. (2007). Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function. *World Journal of Surgery*, 31(4), 705-714.
51. Lifson, N., Kramlinger, K. G., Mayrand, R. R., Lender, E. J. (1980). Blood flow to the rabbit pancreas with special reference to the islets of Langerhans. *Gastroenterology*, 79(3), 466-473.
52. Pepper, A. R., Gala-Lopez, B., Ziff, O., Shapiro J. A. M. (2013). Revascularization of Transplanted Pancreatic Islets and Role of the Transplantation Site. *Clinical and Developmental Immunology*, 1-13.
53. Dolensek, J., Rupnik, M. S., Stozer, A. (2015). Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas. *Islets*, 7(1), 1-16.
54. Gilon, P., Henquin, J. C. (2001). Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. *Endoconology. Reviews*, 22, 565-604.
55. Baggio, L. L., Drucker, D. J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132, 2131-2157.

56. Heijboer, A.C., Pijl, H., Van den Hoek, A.M., Havekes, L.M., Romijn, J.A., Corssmit, E.P. (2006). Gut-brain axis: regulation of glucose metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*, 18, 883–894.
57. Johnson, K. H., O'Brien, T. D., Hayden, D.W. (1988). Immunolocalization of islet amyloid polypeptide (IAPP) in pancreatic beta cells by means of peroxidase-antiperoxidase (PAP) and protein A-gold techniques. *American Journal of Pathology*, 130(1), 1–8.
58. Potter, K. J., Abedini, A., Marek P. (2010). Islet amyloid deposition limits the viability of human islet grafts but not porcine islet grafts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4305–4310.
59. Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 53(9), 1087–1097.
60. Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2334–2339.
61. Clark, A., Wells, C. A., Buley, I. D. (1988). Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes. *Diabetes Research*, 9(4), 151–159.
62. Bloom, S. R., Polak, J. M. (1987). Somatostatin. *British Medical Journal*, 295(6593), 288–289.
63. Grube D., Bohn, R. (1983). The microanatomy of human islets of Langerhans, with special reference to somatostatin (D-) cells. *Archivum Histologicum Japonicum*, 46(3), 327–353.
64. Veld, P. I., Marichal, M. (2010). Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 654, 1–19.
65. Dezaki, K., Kakei, M., Yada, T. (2007). Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes*, 56, 2319–2327.
66. Pepper, A.R., Gala-Lopez, B., Ziff, O., Shapiro, A. M. J. (2013). Revascularization of Transplanted Pancreatic Islets and Role of the Transplantation Site. *Clinical and Developmental Immunology*, 1-13.
67. Zhi, Z. L., Khan, F., Pickup, J. C. (2013). Multilayer nanoencapsulation: A nanomedicine technology for diabetes research and management. *Diabetes research and clinical practice*. 100(2), 162–169.

68. Kozlovskaya, V., Zavgorodnya O. Kharlampieva, E. (2012). Encapsulation and Surface Engineering of Pancreatic Islets: Advances and Challenges. *Biomedicine*, 1-25.
69. Korsgren, O., Lundgren, T., Felldin, M., Foss, A., Isaksson, B., Permert, J., Persson, N. H., Rafael, E., Ryd_en, M., Salmela, K., Tibell, A., Tufveson, G., Nilsson, B. (2008). Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation. *Diabetologia*, 51, 227–232.
70. Bennet, W., Sundberg, B., Groth, C. G., Brendel, M. D., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Bretzel, R. G., Elgue, G., Larsson, R., Nilsson, B., Korsgren, O. (1999). Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?. *Diabetes*, 48, 1907–1914.
71. Karp, J. M., Zhao, W. (2014). Micro- and Nanoengineering of the Cell Surface, *Micro and Nano Technologies*, 27-30.
72. Kellam, B., De Bank P. A., Shakesheff, K. M. (2003). Chemical modification of mammalian cell surfaces. *Chemical Society Reviews*, 32, 327-337.
73. Stephan, M. T., Irvine, D. J. (2011). Enhancing cell therapies from the outside in: cell surface engineering using synthetic nanomaterials. *Nano Today*, 6, 309-325.
74. Wilchek, M., Spiegel, S., Spiegel, Y. (1980). Fluorescent reagents for the labeling of glycoconjugates in solution and on cell surfaces. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 92(4), 1215-1222.
75. Teramura, Y., Kaneda, Y., Totani, T., Iwata, H. (2008). Behavior of synthetic polymers immobilized on a cell membrane. *Biomaterials*, 29, 1345–1355.
76. Wilson, J. T., Chaikof, E. L. (2014). Molecular Engineering of Cell and Tissue Surfaces with Polymer Thin Films, *Micro and Nanoengineering of the Cell Surface Book, Chapter 13*, 281-310.
77. Krol, S., del Guerra, S., Grupillo, M., Diaspro, A., Gliozzi, A., Marchetti, P. (2006). Multilayer nanoencapsulation. New approach for immune protection of human pancreatic islets. *Nano Letter*, 6, 1933-1939.
78. Elbert, D. L., Herbert, C. B., Hubbell, J. A. (1999). Thin polymer layers formed by polyelectrolyte multilayer techniques on biological surfaces. *Langmuir*, 15, 5355-5362.
79. Chanana, M., Gliozzi, A., Diaspro, A., Chodnevskaja, I., Huewel, S., Moskalenko, V. (2005). Interaction of polyelectrolytes and their composites with living cells. *Nano Letter*, 5, 2605-2612.
80. Germain, M., Balaguer, P., Nicolas, J. C., Lopez, F., Esteve, J. P., Sukhorukov, G. B. (2006). Protection of mammalian cell used in biosensors by coating with a polyelectrolyte shell. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1566-1573.

81. Veerabadrán, N. G., Goli, P. L., Stewart-Clark, S. S., Lvov, Y. M., Mills, D. K. (2007). Nanoencapsulation of stem cells within polyelectrolyte multilayer shells. *Macromolecular Bioscience*, 7, 877-882.
82. Decher, G. (1997). Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites. *Science*, 277, 1232-1237.
83. Zhi, Z., Kerby, A., King, A. J. F., Jones, P. M., Pickup, J. C. (2012). Nano-scale encapsulation enhances allograft survival and function of islets transplanted in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*, 55(4), 1081-1090.
84. Candela, T., Fouet, A. (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria—micro review. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1091–1098.
85. Gündeflli, H., Dinçer, P. (2008). Endoplazmik retikulum stresinin moleküler mekanizması ve kas patolojisi arasındaki ilişki. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 109-114.
86. Eizirik, D. L., Miani, M., Cardozo, A. K. (2013). Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Diabetologia*, 56(2), 234-241.
87. Park, S. W., Ozcan, U. (2013). Potential for therapeutic manipulation of the UPR in disease. *Seminars in Immunopathology*, 35, 351–373.
88. Lee, D. Y., Park, S. J., Nam, J. H., Byun, Y. (2006). A New Strategy Toward Improving Immunoprotection in Cell Therapy for Diabetes Mellitus: Long-Functioning PEGylated Islets In Vivo. *Tissue Engineering*, 12(3), 1-5.
89. Kizilel, S., Scavone, A., Liu, X., Nothias, J. M., Ostrega, D., Witkowski, P., Millis, M. (2010). Encapsulation of Pancreatic Islets Within Nano-Thin Functional Polyethylene Glycol Coatings for Enhanced Insulin Secretion. *Tissue Engineering: Part A*, 16(7), 1-4.
90. Wilson, J. T., Haller, C. A., Qu, Z., Cui, W., Urlam, M. K., Chaikof, E. L. (2010). Biomolecular Surface Engineering of Pancreatic Islets with Thrombomodulin, *Acta Biomaterialia*, 6(6), 1895–1903.
91. SoRelle, J. A., Kanak, M. A., Itoh, T., Horton, J. M., Naziruddin, B., Kane, R. R. (2015). Comparison of surface modification chemistries in mouse, porcine, and human islets. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(3), 869-877.
92. Meier, R. P. H., Seebach, J. D., Morel, P., Mahou, R., Borot, S., Giovannoni, L., Parnaud, G., Montanari, E., Bosco, D., Wandrey, C., Berney, T., Bühler, L. H., Muller, Y. D. (2014). Survival of Free and Encapsulated Human and Rat Islet Xenografts Transplanted into the Mouse Bone Marrow. *PloS One*, 9(3), 1-10.
93. Teramura, Y., Iwata, H. (2009). Surface Modification of Islets With PEG-Lipid for Improvement of Graft Survival in Intraportal Transplantation, *Transplantation*, 88(5), 1-8.

94. Panza, J. L., Wagner, W. R., Rilo, H. L., Rao, R. H., Beckman, E. J., Russell, A. J. (2000). Treatment of rat pancreatic islets with reactive PEG. *Biomaterials*. 21(11), 1155-1164.
95. Takemoto, N., Teramura, Y., Iwata, H. (2011). Islet Surface Modification with Urokinase through DNA Hybridization. *Bioconjugate Chemistry*, 22, 673–678.
96. Chen, H., Teramura, Y., Iwata, H. (2011). Immobilization of anticoagulant-loaded liposomes on cell surfaces by DNA hybridization. *Biomaterials* 32, 7971-7977.
97. Wilson, J. T., Cui, W., Kozlovskaya, V., Kharlampieva, E., Pan, D., Qu, Z., Krishnamurthy, V. R., Mets, J., Kumar, V., Wen, J., Song, Y., Tsukruk, V. V., Chaikof, E. L. (2011). Cell Surface Engineering with Polyelectrolyte Multilayer Thin Films, *Journal of the American Chemical Society*, 133, 7054–7064.
98. Wilson, J. T., Cui, W., Chaikof, E. (2008). Layer-by-Layer Assembly of a Conformal Nanothin PEG Coating for Intraportal Islet Transplantation, *Nano Letter*, 8(7), 1-4.
99. Brozzi, F., Nardelli, T. R., Lopes, M., Millard, I., Barthson, J., Igoillo-Esteve, M., Grieco, F. A., Villate, O., Oliveira, J. M., Casimir, M., Bugliani, M., Engin, F., Hotamisligil, G. S., Marchetti, P., Eizirik, D. L. (2015). Cytokines induce endoplasmic reticulum stress in human, rat and mouse beta cells via different mechanisms. *Diabetologia*, 58, 2307–2316.
100. Guthrie, L. N., Abiraman, K., Plyler, E. S., Sprenkle, N. T., Gibson, S. A., McFarland, B. C., Rajbhandari, R., Rowse, A. L., Benveniste, E. N., Meares, G. P. (2016). Attenuation of PERK Signaling Selectively Controls Endoplasmic Reticulum Stress Induced Inflammation Without Compromising Immunological Responses. *Journal of the American Chemical Society*, 10, 1-22.
101. Yan, S., Wang, T., Feng, L., Zhu, J., Zhang, K., Chen, X., Cui, L., Yin, J. (2014). Injectable In Situ Self-Cross-Linking Hydrogels Based on Poly(L- glutamic acid) and Alginate for Cartilage Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 15, 4495–4508.
102. Cao, B., Yin, J., Yan, S., Cui, L., Chen, X., Xie, Y. (2011). Porous scaffolds based on cross-linking of poly(L-glutamic acid). *Macromolecular Bioscience*, 11, 427-434.
103. Zhang, K., Zhang, Y., Yan, S., Gong, L., Wang, J., Chen, X., Cui, L., Yin, J. (2013). Repair of an articular cartilage defect using adipose-derived stem cells loaded on a polyelectrolyte complex scaffold based on poly(L-glutamic acid) and chitosan. *Acta Biomaterialia*, 9, 7276–7288.
104. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L. H., Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306(5695), 457-461.
105. Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R. O., Görgün, C. Z., Hotamisligil, G. S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313(5790), 1137-1140.

106. O'Neill, C. M., Lu, C., Corbin, K. L., Sharma, P. R., Dula, S. B., Carter, J. D., Ramadan, J., Xin, W., Lee, J. K., Nunemake, C. S. (2013). Circulating Levels of IL-1B+IL-6 Cause ER Stress and Dysfunction in Islets From Prediabetic Male Mice. *Endocrinology*, 154(9), 3077–3088.
107. Eizirik, D. L., Miani, M., Cardozo, A. K. (2013). Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. *Diabetologia*, 56(2), 234-241.
108. Feyat, M. S., Mercan, S., Çalışır, E., Böyük, G., Pınarlı, F. A., Yeşilyurt, A., Fadilloğlu, E., Delibaşı, T. (2014). Pancreatic Beta Cell Purification by Flow Cytometer and a Modified Rat Pancreatic Islet Cell Isolation Method. *Niche*, 3, 1-8.
109. Pan, H. M., Subramanian, A., Ochs, C. J., Dewavrin, J. Y., Beyer, S., Trau, D. W. (2014). Edible polyelectrolyte microcapsules with watersoluble cargo assembled in organic phase. *RSC Advances*, 4, 35163–35166.
110. Iwata, H., Matsuda, S., Mitsuhashi, K., Itoh, E., Ikada, Y. (1998). A novel surgical glue composed of gelatin and N-hydroxysuccinimide activated poly(L-glutamic acid): Part 1. Synthesis of activated poly(L-glutamic acid) and its gelation with gelatin. *Biomaterials*, 19, 1869-1876.
111. Aghajani-Lazarjani, H., Vasheghani-Farahani, E., Hashemi-Najafabadi, S., Shojaosadati, S.A., Zahediasl, S., Tiraihi, T., Atyabi, F. (2013). Optimization of monomethoxy poly(ethylene glycol) grafting on Langerhans islets capsule using response surface method. *Progress in Biomaterials*, 2(7), 1-7.
112. Dong, H., Fahmy, T. M., Metcalfe, S. M., Morton, S. L., Dong, X., Inverardi, L., Adams, D. B., Gao, W., Wang, H.. (2012). Immuno-Isolation of Pancreatic Islet Allografts Using Pegylated Nanotherapy Leads to Long-Term Normoglycemia in Full MHC Mismatch Recipient Mice. *Plos One*, 7(12), 1-7.
113. Lee, Y. Y., Hong, S. H., Leeb, Y. J., Chung, S. S., Jung, H. S., Park, S. G., Park, K. S. (2010). Tauroursodeoxycholate (TUDCA), chemical chaperone, enhances function of islets by reducing ER stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(4), 735–739.
114. Shahbazov, R., Kanak, M. A., Takita, M., Kunnathodi, F., Khan, O., Borenstein, N., Lawrence, M. C., Levy, M. F., Naziruddin, B. (2016). Essential phospholipids prevent islet damage induced by proinflammatory cytokines and hypoxic conditions. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32, 268–277.





EKLER

EK 1. Hayvan deneyleri yerel etik kurul kararı (Sıçan)



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi



DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 04.11.2013
Protokol No. : 2013/58

Proje yürütücüsünün adı soyadı: Doç. Dr. Fatma ARSLAN
Projenin başlığı : **Pankreas Adacık Hücrelerinin Canlılığının Korunması**
İçin Kimyasal Yöntemlerin Geliştirilmesi
Proje ekibi : Prof. Dr. Tuncay Delibaşı, Sercan Mercan

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Wistar Hannover Rat
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 3 aylık, 270-300 gr

Adı geçen araştırmancın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına karar verildi.

<p>(Katılmadı) Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI (Kurul Başkanı)</p>	<p> Doç. Dr. Osman YÜKSEL (Başkan Vekili)</p>
<p>Doç. Dr. Ekrem YETER (Üye) </p>	<p> Vet. Hek. Başak BOZTOK ÖZGERMEN (Üye)</p>
<p>Ecz. İlhan ÇAYIR (Üye) </p>	<p>Ecz. Mine BARUT (Üye) </p>

EK 2. Hayvan deneyleri yerel etik kurul kararı (Fare)



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi



T.C. Sağlık Bakanlığı

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 14.06.2016
Protokol No : 2016 / 32

Proje yürütücüsünün Adı-Soyadı : **Doç. Dr. Fatma ARSLAN**
Projenin başlığı : **Pankreas Adacık Hücrelerinin Canlılığının Korunması İçin Kimyasal Yöntemlerin Geliştirilmesi**
Proje ekibi : Kim.Sercan MERCAN

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Balb/C, Fare
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 2-6 Aylık, 18-30 gr

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına karar verildi.

<p>Doç. Dr. Ahmet YEŞİLYURT (Kurul Başkanı)</p> <p><i>(Signature)</i></p> <p>Uzm. Vet. Hekim Ziya KARAKULLUKÇU (Üye)</p> <p>Dr. M. Yunus ALP (Üye)</p>	<p>Prof. Dr. Hakan KORKMAZ (Başkan Vekili)</p> <p><i>(Signature)</i></p> <p>Dr. Ferda ALPAŞLAN PINARLI (Üye)</p> <p><i>(Signature)</i></p> <p>(KATILMADI) Bio. Hatice KANTAR (Üye)</p>
<p>Fatma KILIÇ (Üye)</p> <p><i>(Signature)</i></p>	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Mercan, Sercan
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 14.11.1985 / İstanbul
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (546) 415 02 38
 Faks : --
 e-mail : sercanmrcn@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	2013
Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya Bölümü	2010
Lise	Küçükçekmece Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010-Halen	Dışkapı Yıldırım Beyazıt E.A. Hast.	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Feyat, M. S., Mercan, S., Çalışır, E., Büyük, G., Pınarlı, F. A., Yeşilyurt, A., Fadılloğlu, E., Delibaşı, T. (2014). Pancreatic Beta Cell Purification by Flow Cytometer and a Modified Rat Pancreatic Islet Cell Isolation Method. *Niche*, 3, 1-8.

Uzunalli, G., Tumas, Y., Delibasi, T., Yasa, O., Mercan, S., Guler, M. O., Tekinay, A. B. (2015). Improving pancreatic islet in vitro functionality and transplantation efficiency by using heparin mimetic peptide nanofiber gels. *Acta Biomaterialia*, 22, 8-18

Hobiler

Gezmek, Yüzmek



GAZİ GELECEKTİR..