

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA ADACIK HÜCRELERİ İLE KOKÜLTÜRE
EDİLEN LUTEAL HÜCRELERİN, HÜCRE CANLILIĞI,
REVASKÜLARİZASYON VE İMMUN YANITA ETKİLERİ**

GÜLBAHAR BÖYÜK

FİZYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. A.Arzu YİĞİT

2017 – KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA ADACIK HÜCRELERİ İLE KOKÜLTÜRE
EDİLEN LUTEAL HÜCRELERİN, HÜCRE CANLILIĞI,
REVASKÜLARİZASYON VE İMMUN YANITA ETKİLERİ**

GÜLBAHAR BÖYÜK

FİZYOLOJİ (VETERİNER) ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. A.Arzu YİĞİT

**Tez Çalışması Kırıkkale Üniveristesi Bilimsel Araştırma
Projeleri birimince 2015/128 nolu proje ve TÜBİTAK 2214 A
Doktora Sırasında Yurt Dışı Araştırma Bursu ile desteklenmiştir.**

2017 - KIRIKKALE

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18 / 01/2017



İmza

Prof.Dr. A.Arzu YİĞİT
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı



İmza

Prof.Dr. Bahri EMRE
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



İmza

Doç.Dr. Miyase ÇINAR
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



İmza

Doç.Dr. Hakan ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye



İmza

Doç.Dr. Aytül KÜRÜM
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası.....	ii
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER.....	xi
ÇİZELGELER.....	vi
ÖZET.....	1
SUMMARY	3
GİRİŞ	5
1. PANKREASIN HİSTOLOJİSİ.....	6
1.1. Adacıklardaki Mikrodamar Yapısı.....	8
1.2. Adacık Hücrelerinin Farklılaşması.....	8
1.3. Glikoz Homeostazı.....	9
1.4. İnsülin.....	10
1.4.2. İnsülinin Salınımı Mekanizması	12
1.4.3. Glukagon	12
2. ŞEKER HASTALIĞI.....	13
2.1. Tip 1 Şeker Hastalığı.....	13
2.2. Tip 2 Şeker hastalığı.....	14
2.3. Gebelik Dönemi Şeker Hastalığı.....	14
2.4. Diğer Şeker Hastalığı Türleri	15
2.5. Hayvanlarda Diyabet.....	15
3. ŞEKER HASTALIĞININ KLASİK TEDAVİ YÖNTEMLERİ	16
3.1. Beslenme Tedavisi	16
3.2. Egzersiz	16

3.3. İnsülin tedavisi	16
3.4. Oral Antidiyabetik ilaçlar ile Tip 2 Şeker Hastalığının Tedavisi.....	17
3.5. Şeker Hastalığının Alternatif Tedavi Yöntemleri	17
3.5.1. Pankreas Nakli	17
3.5.2. Adacık Hücre Nakli	18
3.5.3. Adacık Naklinde İmmun Cevaplar	19
3.5.4. Adacık Hücreleri ile Kombine Edilen Hücresel Tedavi Yöntemleri	21
3.5.5. Adacıkların Nakil Yöntemleri.....	22
3.5.6 Adacık Hücre Nakillerinin Başarısı Üzerinde Etkili Olan Sitokinler ve Damarlaşma Faktörleri.....	24
3.5.7. Hayvanlarda Adacık Nakli Çalışmaları ve Diyabet Tedavi Seçenekleri .	27
4. LUTEAL HÜCRELER	29
4.1. Ratlarda Ovaryum Gelişimi ve Östrus	29
4.2. Korpus luteum.....	29
4.2.1. Korpus Luteum Hormonları.....	31
4.3. Ovaryumlarda Anjiyogenez	33
4.4. Ovaryumda İmmün Olaylar	34
5. GEREÇ VE YÖNTEM	36
5.1. Dişi Ratlara Süperovulasyon Yapılması	36
5.2. Luteal Hücre Kültürü Medialarının Hazırlanması	36
5.3. Luteal Hücrelerin Elde Edilmesi.....	37
5.4. Percoll Dansitesi.....	38
5.5. Hücrenin Canlılık Oranının Belirlenmesi ve Hücre Sayım Protokolü.....	39
5.6. Luteal Hücrelerin Kültüre Edilmesi	40
5.7. Luteal Hücrelerinin Steroid Boyaması.....	40
5.8 Adacık Hücrelerinin İzolasyonu:	42

5.11. Adacık+Luteal Hücre Ko-Kültür Çalışması	44
5.12. Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) ile Hücrelerin Canlılığına Bakılması	46
5.13. Glikoz Stimulasyon Testi.....	46
5.14. ELISA	46
5.15. Flow Sitometri ile CD31 Analizi	47
İstatistiksel Analiz.....	47
6. BULGULAR.....	48
6.1. Canlılık Analizi	48
6.2. Glikoz Stimulasyon Testi Analizleri	51
6.3.ELISA Sonuçları	53
6.3.2. bFGF Sonuçları	54
6.3.3. IL-10 Sonuçları	55
6.3.4. Progesteron Sonuçları	56
6.4 CD31 Sonuçları.....	56
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	60
8. KAYNAKLAR	66
EKLER.....	79
ÖZGEÇMİŞ	81

ÖNSÖZ

Adacık hücre nakli, tip I diyabet tedavisinde son zamanlarda oldukça güncel bir yaklaşım olmuştur. Ancak adacık nakillerinden sonra hücrelerin vaskülarizasyonundaki gecikmeler nakledilen adacık hücrelerin canlılığını azaltmakta ve işlevsel hücre sayısında düşüşe neden olmaktadır. Ayrıca nakledilen hücrelere karşı gelişen immün atak nakilden önce verilen immunsupresanlara rağmen hücre sayısını azaltmaya devam etmektedir. Bu nedenle adacık nakillerinde hem revaskülarizasyonun bir an önce sağlanması hem de immün reddi azaltmak için çalışmalar devam etmekte olup, yapılan bu araştırma da bu amaca yönelik olarak planlanmıştır.

Tez çalışmamın tüm aşamalarında bana güvenen ve desteğini esirgemeyen, Doktora tezim boyunca benimle beraber tezin her aşamalarına katılıp benimle beraber olan ve akademik alanda gelişmem için desteğini esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT'e, tez deneylerim sırasında yardımcı olan ve benimle beraber deneylerime katılan Safiye BÖYÜK'e ve bilimsel alanda gelişmemi sağlayan ve bu konuda eğitim aldığım tüm hocalarıma bana verdikleri değerli katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Hem eğitimim sırasında hem de sosyal yaşantımda benim her zaman yanımda olan, maddi manevi her zaman destek veren ve benim üzerimde emeği çok olan canım aileme her zaman yanımda olup destek verdikleri için çok teşekkür ederim.

Doktora tezim sırasında 2214 A Tübitak bursu ile Baylor Üniversitesi Tıp Merkezinde bulunan Adacık hücre laboratuvarında 6 ay süreliğine bulunmamı sağlayan Tübitak'a hem Doktora tezim için hem de bilimsel anlamda edindiğim bu güzel tecrübeye katkı sağladıkları ve ufkumu genişletip bilimsel faaliyetlerde daha istekli olmamı sağladıkları için çok teşekkür ederim. Ayrıca Amerika da bulunduğum süre boyunca Adacık hücre laboratuvarında bana çalışmalarım boyunca destek olan ve yardım eden laboratuvar direktörü Bashoo Naziruddin'e de çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

3D	Üç Boyutlu
ADA	Amerikan Diyabet Birliği
ADP/ATP	Adenozin Difosfat/Adenozin Trifosfat
APC	Kemokinleri Salgılayan Yerleşik Antijen Sunan Hücreler
BD Donör	Beyin Ölümü Gerçekleşen Verici
BETA2	MODY de Tanımlanmış Heterozigot Gen Mutasyonu
BLC	Büyük Luteal Hücreler
BM-MSC	Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
BrdU	Bromodeoksiüridin
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CREB	cAMP ye Karşılık Gelen Element Bağlayıcı Preotein
CXCL12	C-X-C Motif Kemokin 12
CTLA4	Sitotoksik T-Lenfosit İlişkili Protein 4
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Kartal Medyumu
ECM	Ekstrasellüler Matriks
EDTA	Etilendiamine Tetraasetik Asit
EGFP	Geliştirilmiş Yeşil Floresan Protein
ER	Endoplazmik Retikulum
ERK1/2	Hücre Dışı Sinyal İle Düzenlenen Protein Kinaz 1 ve 2

FBS	Fötal Sığır Serumı
FDA	Floresein Diasetat
FGF-bFGF	Fibroblast Büyüme Faktörleri
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
FG scaffold	3D Kültür Ortamında Oluşan Matriks Yapı
GH	Büyüme Hormonu
GLUT	Glikoz Taşıyıcısı
GIP	Gastrointestinal Peptid
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptid-1
GLP-2	Glukagon Benzeri Peptid-2
HbA1c	Glikoza Bağlanmış Hemoglobin (a1c)
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution Medium
hIAPP	İnsan Adacık Amiloid Polipeptid
HLA	İnsan Lokosit Antijeni
hMSCs	İnsan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
HNF	Hepatik Nükleer Faktör
HSS	Heterosferoidler
IBMIR	Anında Kan Yoluyla Oluşan Enflamatuvar Reaksiyon
IEQ	Adacık Eşdeğeri
IFN γ	İnterferon Gamma
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü -1
IL	İnterlökin

IPC	İnsülin Üreten Hücrelere Dönüşen Hücreler
IPF-1	İnsülin Promoting Faktör
IR	İnsülinin Reseptörü
JNK kinaz	Jun-N-Terminal Kinaz
Ki67	Proliferasyon İndeksi
KL	Korpus Luteum
KLH	Küçük Luteal Hücreler
LH	Luteinleştirici Hormon
Maf A/B	Lösün Fermuar Kopyalama Faktörleri A/B
MAP	Kinaz Mikrotübülle İlişkili Proteini
MIN6	İnsülinoma 6 Hücresi
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MODY	Genç Yaşta Ortaya Çıkan Tip 2 DM ve Otozomal Kalıtım
ml	Mililitre
NCSC	Nöral Krest Kök Hücre
NF-κB	Nüklear Faktör Kappa B
NUDE	İmmun Sistemi Baskılanmış Hayvan
UPR	Katlanmamış Protein Cevabı
PAX6	Eşleşmiş Kutu Protein 6
PA-CAP	Pitüiter Adenilat Siklaz Aktive Edici Protein
PBS	Fosfatla Tamponlanmış Salin

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDX-1	Pankreas ve Duodenal Homeobox Protein 1
PDGF	Trombosit Türevi Büyüme Faktörü
PECAM- 1	Trombosit- Endotel Hücre Adezyonmolekülü-1/ CD31
PI ³	Fosfotidilinositol
PI	Propidyum İyodid
PPAR- γ	Peroksizom Proliferator-Aktive Reseptör- γ
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Rho	Bakteri Genlerinin Transkripsiyonunun Bitiren Protein
ROS	Reaktif Oksijen Radikalleri
SUR-1	Sulfanilüre veya Benzeri İlaçlar
STZ	Streptozotosin
TF	Doku Faktörü
TNF- α	Tümör Büyüme Faktörü Alfa
tSNARES	Hedef Çözünür (NSF) Ek Protein Reseptörü
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VIP	Vazoaktif İntestinal Peptid
vSNARES	Vezikül Çözünür (NSF) Ek Protein Reseptörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Adacık hücrelerinde bulunan hücre tiplerinin şematize edilmesi.....	8
Şekil 1.2. İnsülin proteininin yapısı.....	10
Şekil 1.3. İnsülinin golgi aygıtından ayrılarak paketlenmesi şematize edilmesi.....	11
Şekil 4,1.Bağışıklık hücreleri ve luteal hücreleri arasındaki etkileşim.....	35
Şekil 5.1.Süperovülasyonun son gününde ovaryumların görüntüsü.....	37
Şekil 5.2 Ovaryumlardaki foliküllerin patlatılarak enzimatik sindirime hazır hale getirilmesi.....	38
Şekil 5.3 Yeni izole edilen luteal hücrelerinin dansite işlemi sonrasında tabakalaşması.....	39
Şekil 5.4 Taze izole edilen Luteal hücrelerin Tripan blue boyası ile boyanarak canlılık tayini ve Sayımı.....	39
Şekil 5.5 Kokültür kabı içerisinde adacık ve luteal hücrelerinin konumu.....	40
Şekil 5.6 Yeni izole edilen luteal hücrelerin 3-beta HSD boyaması	41
Şekil 5.7 48 saat kültüre edilen luteal hücrelerin 3-beta HSD boyaması.....	41
Şekil 5.8 48 saat kültüre edilen ve 3-beta HSD ile boyanan luteal hücreler ile Dithiozon ile boyanan adacık hücreleri.....	41
Şekil 5.9 96 saat kültüre edilen luteal hücrelerin 3-beta HSD boyaması.....	41
Şekil 5.10.48 saat kültüre edilen ve 3-beta HSD ile boyanan luteal hücrelerle Dithiozon ile boyanan adacık hücreleri.....	42
Şekil 5.11.Sıçan pankreasının duktusunun kanüle edilmesi ve enzim ile şişirilmesi.	43
Şekil 5.12. Enzim ile şişirilen pankreasın bir bütün olarak çıkarılması.....	44
Şekil 6.1.0. saatte kültüre edilmeden önce adacık hücrelerinin canlılığı.....	48
Şekil 6.2. 48 saatte kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı.....	49

Şekil 6.3.48 saatte luteal hücreler ile kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı....	49
Şekil 6.4. 96 saatte kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı.....	50
Şekil6.5.96 saatte luteal hücreler ile kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı.....	50
Şekil6.6. 48 saat adacık CD31 boyaması.....	57
Şekil 6.7. 48 saat adacık+luteal hücre kokültürlü adacıkların CD31 boyaması.....	57
Şekil6.8. 96. saat adacık CD31 boyaması.....	58
Şekil 6.9. 96. saat adacık+luteal hücre kokültürlü adacıkların CD31 boyaması.....	58



ÇİZELGELER

Çizelge 3.1 Köpeklerde yapılan adacık hücre nakli.....	28
Çizelge 5.1 Percoll dansite oranları ve kullanılan NaCl miktarları.....	38
Çizelge 5.2 Gruplarda analizlerde kullanılan hücre sayıları ve yapılan analizleri....	45
Çizelge 6. 1 Adacık hücrelerinin izolasyondan hemen sonra (0. saatte), 48. saatte ve 96. saatteki FDA/PI canlılık	51
Çizelge 6. 2. 48 ve 96. saatlerde 16.7 mM glikoza karşı adacık hücrelerinin verdiği cevap.....	51
Çizelge 6. 3. 48 ve 96. saatlerde 3.3 mM glikoza karşı adacık hücrelerinin verdiği cevap.....	52
Çizelge 6. 4. 48 ve 96. saatlerde Stimülasyon İndekslerine göre hücrelerinin verdiği cevap.....	53
Çizelge 6. 5 48 ve 96. saatlerde süpernatant örneklerinde VEGF analizleri.....	54
Çizelge 6. 6. Süperntandan alınan örneklerin 48 ve 96. saatlerde bFGF analizleri.....	54
Çizelge 6. 7. Süpernatanttan alınan örneklerin 48 ve 96. saatlerde IL-10 analizleri....	55
Çizelge 6.8. Süperntandan alınan örneklerin 48 ve 96. saatlerde progesteron analizleri.....	56
Çizelge 6. 9. 48 ve 96. saatlerde tek hücre süspansiyonu haline getirilen adacık hücrelerinin flow sitometri analizleri.....	59

ÖZET

Ratlarda Adacık Hücreleri ile Kokültüre Edilen Luteal Hücrelerin, Hücre Canlılığı, Revaskularizasyon ve İmmun Yanıtta Etkileri

Diyabet tedavisinde çeşitli tedavi yöntemleri denenmiş olmasına rağmen, uzun dönem komplikasyonları önleyebilecek ve kişinin hayat standartlarını yükseltebilecek yeni tedavi yöntemleri aranmaya devam etmektedir. Bu alternatiflerden biri olan pankreas adacık hücrelerinin nakli, gelecek için diyabet tedavisinde bir umut olmaya devam etmektedir.

Bu amaçla, luteal hücreler ve adacık hücreleri izole edilerek, hem ayrı ayrı hem de birlikte kültüre edildi. Hücrelerin birlikte inkubasyonunun 0. 48. ve 96. saatlerinde adacıklara canlılık ve glukoz stimülasyon testleri yapıldı, total insülin salınımları belirlendi, ayrıca luteal hücre ve kokültür medyumlarında progesteron, VEGF, bFGF ve IL-10 düzeyleri ölçüldü. Adacık hücre kültürlerinde de progesteron hariç diğer parametrelerin ölçümü yapıldı. Adacık hücrelerinde damarlanmanın başlayıp başlamadığı da CD 31 markırı ile belirlendi. Ayrıca, pratikte 48 saatlik bir kültürden sonra infüze edilen adacık hücrelerinin, luteal hücre salgılarının etkisiyle daha uzun süre kültüre edilebilirlikleri araştırıldı.

Adacık hücrelerinin canlılığı ve fonksiyonelliğinin, luteal hücreler ile kültüre edilmiş grupta 48. saatte arttığı görüldü ($P<0.05$). Damarlaşmanın belirtisi olarak VEGF hem 48 hem de 96. saatlerde luteal hücreler ile kokültüre edilen grupta yüksek bulundu ($P< 0,001$). bFGF değeri ise 96. saatteki kokültür grubunda adacık grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P< 0.001$). Hem 48. saatte hem de 96. saatlerdeki adacık grupları ve kokültür grupları karşılaştırıldığında kokültür gruplarında CD 31 düzeyinin yükseldiği görüldü ($P<0.05$). IL-10 düzeyi ise 48. saatte adacık grubuna kıyasla kokültür grubunda daha azalmışken 96. saatte tam tersi etki ederek kokültür grubunda adacık grubuna göre anlamlı olarak yükseldi ($P< 0,001$). Luteal hücrelerin salgıladıkları progesteron düzeyleri inkubasyonun 48. ve 96. saatlerinde artmış olmasına karşın inkübasyonun ne 48. saat ne de 96. saatlerinde kokültür gruplarıyla luteal hücre grupları arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmedi. Sonuç olarak, rutin prosedürde 48 saat inkübasyondan sonra aktarımı yapılan adacık hücrelerinin luteal hücreler ile kokültüre edildiklerinde canlılık ve

fonksiyonelliklerini koruyarak 96 saate kadar inkübe edilebildikleri ve bu kokültürün etkisiyle adacık hücrelerinde damarlaşmayı uyarıcı CD-31, VEGF ve bFGF düzeylerinin kokültür ortamında arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçların, adacık hücrelerinin naklinden sonra bölgede bir an önce damarlaşmanın başlatılması ve adacıkların canlılıklarının ve fonksiyonlarının korunarak insülin salınımının başlatılması için luteal hücreler ile kokültüre edilmiş biçimde aktarımının yapılabileceğini göstermesi açısından son derece önemli olduğu düşünülmektedir.



Anahtar Kelimeler: adacık hücreleri, canlılık, immun yanıt, kokültür, luteal hücreler, revaskülarizasyon

SUMMARY

The effects of the luteal cells cocultured with islet cells on cell viability, revascularization and immune response in rats.

Although various treatment methods have been tried in the treatment of diabetes, new treatment methods that could prevent long-term complications and improve people's living standards still continue to be sought. One of these alternatives is the transplantation of pancreatic islet cells, remain a hope to treat of diabetes for the future.

For this purpose, luteal cells cultured separately and together with islet cells and the islets viability and glucose stimulation tests wperformed and total insulin secretion determined in the islet medium and cocultur medium, and progesterone, VEGF, bFGF and IL- 10 levels measured in luteal cell medium and cocultur medium at 0 th, 48 th and 96 th hours. Also, the latter prameters except progesteron measured in islet cell cultures at the same incubation time and CD 31 marker in islet cells determined for observing the revascularization. In addition, whether infused islet cells after 48 hours culture in practice, cultured more than 48 hours in culture by the effect of luteal cell secretion investigated.

It was observed that islet cocultured with luteal cell group's islets increased viability and function than islet group ($P < 0.05$). VEGF, as a sign of vascularization, was observed at both 48 and 96 hours found to be higher in the cocultured group with luteal cells ($P < 0,001$). bFGF value was statistically significant at the 96. hour in the coculture group compared to the islet group ($P < 0,001$). When compared with islet groups and cocultural groups at both the 48. hour and the 96. hour observed that CD 31 level was increased in coculture groups ($P < 0.05$). IL-10 levels were lower in coculture group compared to the islet group at 48 hours and it increased significantly in the coculture group compared to the islet group by the opposite effect at 96 hours ($P < 0,001$). Although progesterone levels secreted by luteal cells increased during the 48th and 96th hours of incubation no statistically significant difference was observed between the luteal cell groups and the coculture groups at either 48 or 96 hours of incubation. As a result, the routine procedure is that after 48 hours of incubation, the transferred islet cells are cocultured with luteal cells can be kept up to 96 hours while

maintaining their viability and functionality and it was determined that CD-31, VEGF, and bFGF, which stimulate vascularization in islet cells, increase with this coculture effect. These results suggest that cocultured form immediately contributing start of the vascularity after transplantation of the islets and maintaining the viability and functionalities of the islets to the initiation of insulin secretion is extremely important from the point of view that luteal cells can be transplanted.



Keywords: cocultur, immune response, islet cells, luteal cells, revascularization, viability

GİRİŞ

Kandaki glukozun hücre içine alınmasını sağlayan insülin hormonunun sekresyonu, etkisi veya her ikisinin birden bozukluğundan kaynaklanan diyabetes mellitus, hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Başlıca, pankreasın endokrin dokusundaki beta hücrelerinin kalıcı yıkımına yol açan tip 1 diyabet ve insülin direncinden kaynaklanan tip 2 diyabet olmak üzere 2 tipi görülür. İnsülin tedavisi diyabet hastalığının en çok görülen komplikasyonlarını azaltmakta ve önlemekte yardımcı olmakla birlikte uzun dönemde bu etkinin korunması güçtür. Adacık hücresi naklinin tip 1 diyabet hastalarında glukoz homeostasisini korumada etkili olduğu görülmüştür. Ancak, nakilden sonra adacık hücrelerinin çoğu hipoksiden dolayı kayba uğrarken (% 60 kadar) yalnızca küçük bir oran başarılı bir şekilde uyum sağlamaktadır. Bu kaybın yarısı nakilden sonraki 3 gün içerisinde gerçekleşir. Bu yüzden adacık hücre naklinin başarısını yükseltmek için hem revaskülarizasyonun bir an önce başlaması hem de gelişecek immun reddin en aza indirilmesini hedefleyen çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla, luteal hücrelerin adacık hücrelerinin canlılığına, insülin salınımına etkisinin olup olmadığını incelenmiş, kokültür ortamına luteal hücreler tarafından revaskülarizasyonu sağlayacak olan faktörlerin ve adacık hücrelerini koruyacak immunsupresanların salınıp salınmadığını belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarının, *in vivo* olarak yapılacak daha sonraki araştırmalar için bir temel teşkil etmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, yapılan olan bu kokültür denemesi ile, başarılı bir transplantasyon için 48 saat kültüre edildikten sonra aktarımı yapılan adacık hücrelerinin *in vitro* olarak 48 saatten daha fazla canlılıklarını ve işlevlerini koruyabildikleri de gösterilmiştir.

Bu araştırmanın amacı, pankreas dokusundan elde edilen adacık hücrelerinin canlılığını ve işlevini artırmak amacıyla luteal hücreler ile kokültüre edilmesi ve inkübasyon sırasında, luteal hücrelerin adacıkların canlılığını, fonksiyonelliğini ve revaskülarizasyonunu arttırıcı ve immun baskılayıcı rollerinin olup olmadığını incelenmesidir.

1. PANKREASIN HİSTOLOJİSİ

Pankreas damarsal yapısı ile koordine olarak ekzokrin, endokrin ve duktal olmak üzere 3 tip hücreye sahiptir.

Ekzokrin hücreler (Asiner hücreler): Pankreas dokusunun büyük bir kısmını oluşturan lumeni kuşatan bu hücreler, tek sıralı piramit şeklinde olup, salgılarını pankreasın ana kanalı olan Wirsung kanalına bırakır, oradan da duodenuma geçen sindirim enzimlerini (amilaz, lipaz ve proteaz gibi) salgırlar. Pankreasın duktusları ise; pankreatik sekresyona bikarbonat ve su ekleyen interkalar duktuslar, Enteroendokrin hücreler ve ara sırada goblet hücrelerinde görülen intralobuler duktus ağı, çizgili duktus, ana pankreatik kanalına (wirsung kanalı) açılan interlobuler duktuslar bulunmaktadır (Young ve ark., 2001).

Duktal hücreler; Asiner hücreleri birbirine bağlayarak bağırsak tüpü ile devamlılığı olan bir tübüler epitel ağ oluşturan hücrelerdir. Asinerlerin ürettiği ekzokrin salgılar bu kanallardan geçerek duodenuma ulaşır. Duktal hücreler midenin asidik yapısını etkisizleştirmek için bikarbonattan zengin sıvı ve müsin üretimi gerçekleştirir. Yapılan araştırmalarda, az miktarda da olsa duktal hücrelerde endokrin hücrelerin varlığından bahsedilmiş (Eurell ve ark., 2006) ve bu hücrelerin ekzokrinden endokrin hücreye dönüşebilen öncül hücreler olabileceğinden söz edilmiştir (Bonner-Weir ve Smith, 1994).

Endokrin hücreler (Langerhans adacıkları): Langerhans adacıklarının hormon salgılayan epitel bağları ve bu hücreler arasında yerleşen zengin kapiller ağlardan oluşan bir yapısı vardır ve ekzokrin dokunun içinde kümeler halinde ama dağınık halde bulunurlar. Ratlarda pankreas zarsı yapıdadır ve baş kısmı duodenuma sarılı kuyruk kısmı ise dalağa doğru uzanır. İzolasyon işlemi ile ortalama ağırlıktaki bir sıçan pankreasından 600 ile 1000 arasında adacık hücresi elde edilir (Comtet ve ark., 1975). Adacıklar başlıca 4 tip hücreye sahiptir: α , β , Δ ve PP hücreleri, ki bunlar glikoz homeostazından sorumlulardır.

Alfa (α) hücreleri: Glukagon salınımı gerçekleştirilir. Erişkin insan pankreasında yaklaşık olarak adacık kütlelerinin %10-20'sini alfa hücreleri oluşturmaktadır. Alfa hücreleri adacığın dış kısmında bir tabaka şeklinde görülür. Pankreasın, kuyruk,

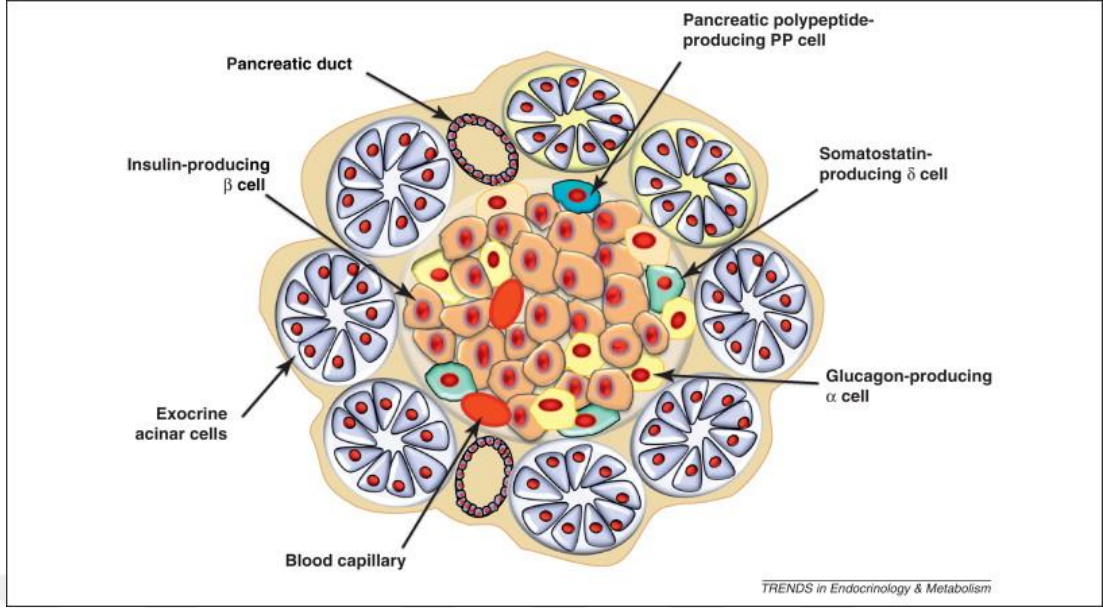
gövde ve başın üst bölümü glukagon bakımından zengin ancak pankreatik polipeptid bakımından fakirdir. Pankreas başının büyük bir bölümü ise glukagondan fakir ancak PP bakımından oldukça zengindir. (Chera ve ark., 2014)

Beta (β) hücreleri: Endokrin pankreastaki hücrelerin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. İnsülin, amilin ve diğer peptidlerin salınımından sorumludur (Guest ve ark., 1991). İnsülin salınımı çoğunlukla yüksek glikoz seviyeleri ile uyarılmaktadır. Bunun yanında glukagon, gastrik inhibe edici peptid ve epinefrin de insülin salınımını uyarır. Beta hücreleri salgı granülleri ile kaplıdır. Birçok memelide beta hücreleri adacığın merkezine diğer hücreler ise periferine yerleşmişlerdir (Ross ve ark., 2014). Erişkin insan pankreasında yaklaşık olarak adacık kütlelerinin % 60-70'ini beta hücreleri oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalarda, bir adacık hücresindeki tüm beta hücrelerinin aynı olmadığını ve insülin duyarlılıklarının da birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir. Tek bir izole adacık hücresindeki beta hücreleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde her birinin glikoza verdiği yanıtın ve glikoz eşik değerinin farklı olduğu gösterilmiştir. Bu sebepten dolayı daha fazla glikoz verildiğinde daha fazla insülin salınımı olmaktadır. Aynı adacıktaki beta hücreleri heterojen olup beta hücresi başına düşen ortalama insülin sekresyonu da adacıktan adacığa farklılık göstermektedir (Hiriart ve Ramirez-Medeles, 1991).

Delta (Δ) hücreleri: Somatostatin salınımı gerçekleştirilir. Erişkin insan pankreasında yaklaşık olarak adacık kütlelerinin %5'ini delta hücreleri oluşturmaktadır, (Chera ve ark 2014).

Pankreatik polipeptid (PP) hücreleri: Erişkin insan pankreasında yaklaşık olarak adacık kütlelerinin %1'ini PP hücreleri oluşturmaktadır. Somatostatin salgılanmasını ve pankreasın dış salgısını durdurucu etki yapar. Safra kesesini gevşetir ve bunun sonucu olarak da duodenuma aktarılan safra salgısının miktarında azaltıcı etki yapar (Ellis, 2007).

G hücresi: Midenin pilorik ucundaki şişlik kısmında bulunan musin ve gastrin salgılayan hücrelerdir. Langerhans adacıklarında dağınık halde bulunur ve 300 nm çapta granüllü yapıdadır (Ellis, 2007).



Şekil 1.1. Adacık hücrelerinde bulunan hücre tiplerinin şematize edilmesi (Efrat ve Russ, 2012)

1.1. Adacıklardaki Mikrodamar Yapısı

Adacık hücrelerindeki mikro damar yapısı özellikle beta hücrelerinin beslenmesi açısından önemlidir. Çünkü insülin salgılayan beta hücreleri birçok türde merkeze yakın olarak iç kısımlarda bulunurlar. Dolayısıyla beta hücrelerinin canlılığının korunması ve fonksiyonelliğini devam ettirebilmesi için adacığın damarlanması çok önemlidir. Adacığın boyutuna göre de adacığın damarlanması farklılık göstermektedir. İnsan, maymun, köpek ve sıçan adacıklarında kan akımının beta-alfa-delta hücreleri yönünde olduğu saptanmıştır (Stagner ve ark., 1988).

1.2. Adacık Hücrelerinin Farklılaşması

Adacıklar da ekzokrin hücreler gibi pankreatik duktal hücrelerden farklılaşmaktadır. Ancak öncül hücrelerin aynı mı yoksa farklı mı olduğu halen araştırılmaktadır. Tek hücre haline getirilmiş adacık hücrelerinin kültür ortamında yeniden kümelenme gösterdiği ve bu kümelerin ise pankreasta yer alan adacıklara benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Halban ve ark., 1987). Doğumdan sonra pankreas dokusunun adacık hacmine oranında azalma olurken; fetustan erişkin döneme kadar pankreas dokusu giderek artmaktadır. Yeni doğanlarda adacıklar pankreas dokusunun yaklaşık %20 sini, çocuklarda yaklaşık %7,5'ini, erişkinlerde ise %1'ni oluşturmaktadır. Yani beta hücrenin çoğalması için temel mekanizma bölünmedir ve postnatal dönemde hem neogenez hem de çoğalma devam etmektedir (Hellerström ve ark., 1988). Adacık

içerisindeki beta hücrelerinin birbirleri ile iletişimi ve etkileşimi, hücrelerin hayatta kalması, insülin salgılaması ve fonksiyonelliği için gereklidir (Liu ve ark., 2014). Hormon sekresyonu aynı zamanda otonom sinirler tarafından da kontrol edilir. Beta hücre çoğalmasını belirlemek için insülin ile immün işaretleme yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemler ile hücrelere; nükleer işaretleme yöntemi olan timidin veya Bromodeoksiüridin (BrdU) tutulması ve Ki67 gibi hücre siklusu proteinlerinin immünoboyanması ile çifte işaretleme yapılmaktadır. Beta hücre büyümesinde prolaktin, büyüme hormonu ve glikoz etkili bir uyarandır. Gebelik durumunda beta hücrelerinde hem çoğalma hem de beta hücre kitlesinde artış meydana gelmektedir (Kahn ve ark., 2008).

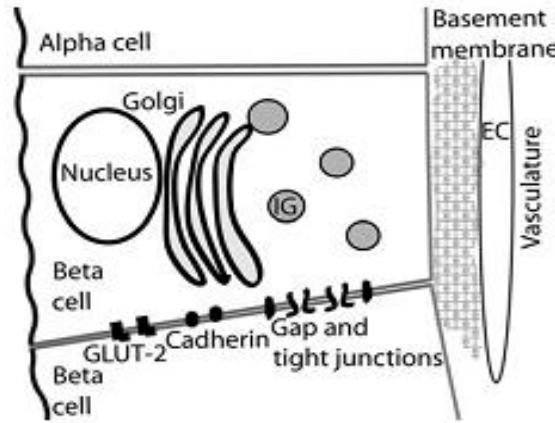
1.3. Glikoz Homeostazi

Plazma glikoz seviyesi, normal ve sağlıklı insanlarda açlık için 70–110 mg/dl, tokluk için 100–140 mg/dl arasında, sıçanlarda ise 80–110 mg/dl aralığında seyretmektedir. Glikoz seviyesi, plazmadan glikoz alımı, karaciğerde glikozun üretimi ve bağırsaklardan glikoz emilimi arasında oluşan denge ile kontrol edilmektedir. Glukoz, kanda bulunan temel bir karbohidrattır ve enerji kaynağı olarak vücudumuz tarafından kullanılmaktadır (Aronoff ve ark., 2004).

Karaciğer ve kas dokusunda glikozu glikojen halinde depolamak için gerekli sinyali sağlayan ana hormon insülidir. Kan glukozu yükseldiğinde, ilk olarak insüline duyarlı periferel dokularda glikozun hücre içine alımı, karaciğerde fazla miktardaki glikozun glikojene dönüşerek depo edilmesi, pankreas alfa hücrelerine sinyal göndererek glukagon salınımının baskılanması ve hepatik glikoz üretiminin inhibisyonu ile oluşur. Kanda glikoz seviyesinin düşmeye başladığı zaman glukagon hormonunun kontrolü ile hem pankreastan salgılanan insülin miktarı azalır hem de glikojen parçalanır ve glikoza dönüşmeye başlar. Glikojenin parçalanmasıyla oluşan glikoz tekrar dolaşıma geçerek kan glikoz seviyesi yükselir. Karaciğerde oluşan bu mekanizma kas hücrelerinde bulunmamaktadır. Kas hücrelerinde depolanan glikojen glikoza dönüştürüldükten sonra yalnız kas hücreleri tarafından acil durumlarda ihtiyacı karşılamak üzere kullanılır (Aronoff ve ark., 2004).

Golgi de proteazların da etkisi ile C-peptid segmentini yitirir ve insüline dönüşür. Bu dönüşüm insülin depo veziküllerinde de devam eder. Bu aşamadan sonra kristal haldeki insülin içeren veziküller depolanabilir, multigranüler cisimciklerle birleşip krinofaji yoluyla parçalanabilir ya da programlı salgı yoluna girerek ekzositozla salgılanabilir. İnsülin salınımı ekzositozla gerçekleşirken beraberinde C-peptid ile birlikte salınır (Hoang ve Thorn, 2015).

İnsülin içeren salgı granülleri ise; mikrotübüllerle birleşir ve hücre yüzeyine doğru ilerler. Stoplazmada kalsiyum artışı olur ve kalsiyum ilk olarak kalmoduline (CaM) ve CaM'a bağlanmış kalsiyumda kalmodülinazlara bağlanır. İnsülinde, kalmodülinaz 2 bulunur ve bu kinaz mikrotübülle ilişkili proteini (MAP) ve sinapsin I gibi proteinleri fosforiller. Bu proteinler hücre membranında bulunan vezikül çözünür N-etilmaleimid-sensitif fusionprotein (NSF) Ek Protein Reseptörü (vSNARES) ve hedef çözünür N-etilmaleimid-sensitif fusionprotein (NSF) Ek Protein Reseptörü (tSNARES) gibi granüllerin iskele olmasını sağlayan anahtar proteinleri de düzenleyebilir.



Şekil 1.3. İnsülinin Golgi aygıtından ayrılarak paketlenmesinin şematize edilmesi (Kahn ve ark., 2008).

Glikoz, glukagon, özellikle arginin gibi aminoasitler, sekretin, gastrin, vazotif intestinal peptid, kolesistokinin gibi gastrointestinal hormonlar, büyüme hormonu (GH), glukokortikoidler, prolaktin, plasental laktojen ve parasempatometik ajanlar insülin salınımını uyarırlar (Kahn ve ark., 2008).

1.4.2. İnsülinin Salınımı Mekanizması

İnsülin üreten beta hücreleri arasında iletişim plazma membranına bağlı moleküller ile yapılır. Bu moleküllerin alfa ve beta olmak üzere iki alt birimi vardır. İnsülin beta alt birimini kullanır. Beta alt birimi kendi kendini fosforile etme özelliğine sahiptir. Fosforile olduktan sonra beta alt kuyruğu aktive olur. İnsülinin reseptörüne (IR) bağlanması sonrasında bu reseptör tirozin kinazı aktifleştirir. Aktifleşme sonrasında, IR'ündeki substratlarda tirozin rezüdüleri fosforillenir. Bu fosforillenmiş tirozin substratlar da daha sonra insülin sinyal kaskadında birçok intrasellüler proteine bağlanır ve bu proteinlerin aktifleşmesini sağlar. Metabolik olarak en önemli fosfotidilinositol (PI)³ kinazdır. Bu proteinlerin birbirlerine yaklaşması ile spesifik sinyal yolu aktif hale gelir ve insülin hücre içerisinde etki göstermeye başlar (Kahn ve ark., 2008).

Hücre içerisinde yüksek kapasiteye sahip Na⁺ bağımsız taşıyıcı GLUT 2 (özellikle pankreasın β hücrelerinde, ince bağırsakların bazolateral yüzünde ve karaciğerde bulunan insülin taşıyıcı protein) ile taşındıktan sonra, glukoz enzim glukokinaz ile fosforillenir ve glikoliz ve Krebs döngüsü içerisinde metabolize olur. Enerji üretiminin artması hücre içi ADP/ATP oranının artmasına ve bu da adenin nükleotid-sensitif potasyum kanallarının inhibisyonuna sebep olur (Matschinsky ve ark., 1993). Hücrede depolarizasyon gerçekleşir ve bunun sonucunda voltaja duyarlı olan Ca⁺² kanalları açılır, sitozolik kalsiyum artışı gerçekleşir ve insülin granüllerinin salgılanması gerçekleşmiş olur. Ayrıca beta hücreleri endoplazmik retikulumda preproinsülin biyosentezini artırır.

1.4.3. Glukagon

Beyin, canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan glikozu dolaşımdan almaktadır. Açlık ve tokluk durumuna göre insülin ve glukagon hormonu hemeostaziyi sağlamak için salınımlarını ayarlarlar. Merkezi sinir sistemi glikopeniyi algılar ve hipoglisemiye karşı yanıt vermek için nöral-sempatoadrenal hormonları tetikler. Ventromediyal hipotalamusun hipogliseminin iyi bir sensörü olduğu ve katekolamin, büyüme hormonu ve glukokortikoid salınımı ile kontr-regulatuvar hormonların (glukagon, adrenalin, kortizol, büyüme hormonu) yanıtları uyaran nöral afferent sinyalleri başlattığı düşünülmektedir. Yemek sonrasında insülin hormonu artan kan

glikozunu azaltmak için aktif hale gelirken glukagon inaktif formda olur. Açlıkta ise bu durumun tam tersi gerçekleşir. İnsülin yemek arasında glikozun karaciğer, kas ve yağ dokusundan alınmasını sağlayarak dolaşımdan glikozu uzaklaştırırken glukagon ise karaciğerde glikozun oluşumunu sağlar ve dolaşıma glikoz geçmesi gerçekleşir. Hem böbrek (% 30) hem de karaciğerde (% 20) glukagonun 5 dakika içerisinde dolaşımdan temizlenir. Geriye kalan glukagon ise; dolaşımda bulunan serin, sistein proteaz, DPP4 ve katepsin B gibi proteolitik enzimler tarafından parçalanır. Glukagonun en önemli fizyolojik fonksiyonları ise, karaciğer tarafından glukoneogenez, glikojenoliz ve ketogenezi ve depolanmış enerjiyi serbest bırakmak için yağ dokusunda lipoliz ve kas dokusunda glikojenolizi artırmasıdır (Kahn ve ark., 2008).

2. ŞEKER HASTALIĞI

Şeker hastalığı, vücudun kendisi için gerekli olan insülini yeteri kadar üretememesi ve/veya var olan insülini gerektiği gibi kullanamaması sonucu oluşan ciddi komplikasyonları olan bir metabolik hastalıktır. (Halban ve ark., 2001).

Şeker hastalığının 4 tipi şeker hastalığı bulunmaktadır.

- Tip 1 şeker hastalığı
- Tip 2 şeker hastalığı
- Gebelik dönemi şeker hastalığı
- Diğer tip şeker hastalıkları

2.1. Tip 1 Şeker Hastalığı

Tip 1 şeker hastalığında insülin, beta hücrelerinin otoimmün olarak hasarlanmasına ve karaciğerde glikojenesize, lipolize ve keto cisimciklerinin artmasına neden olur. Genellikle 15 yaşının altında olan bireylerde görüldüğü için “çocukluk çağı şeker hastalığı” olarak da isimlendirilir. Son yapılan araştırmalardan elde edilen verilere göre, şeker hastalığının bu formunun her yaşta görülebileceği ancak erken dönemde insüline bağımlı olmayabileceği gösterilmiştir (Gepts, 1965).

Tip 1 şeker hastalığında insülin üreten Beta hücrelerinin toplamı veya neredeyse tamamı kaybedilir. Bu nedenden dolayı hasta ömür boyu eksojen insüline

bağımlı olarak yaşamını devam ettirir. Glisemiden korunmak ve şeker hastalığı ile ilişkili komplikasyonları en aza indirmek için kullanılan insülin temel bir tedavi yöntemidir. Ancak bazı hastalarda değişken bir metabolik kontrol görülüp istenmeyen hipoglisemik ataklar gösterebilmektedir. Tip 1 şeker hastalığında, pankreatik beta hücrelerinin otoimmün harabiyeti sonucu glikozun kontrolsüz üretimi, lipolize ve ketogenezde artışa neden olur. Tip 1 şeker hastalığının uzun dönemde ciddi komplikasyonları oluşmaktadır. Özellikle göz, böbrek, kalp ve damarları içeren çeşitli organ yetmezlikleri, hasar ve fonksiyon azalması ile karakterizedir (Seino ve ark., 2010).

2.2. Tip 2 Şeker hastalığı

Bu tip şeker hastalığının sonucunda, yağ dokusu ve karaciğerde insülin direnci ile beta hücrelerinde yetersizliğin oluşmasına ve dolayısıyla glikoz seviyesinde artışa, lipit ve protein metabolizmasında değişikliklere neden olmaktadır. İnsanları etkileyen en yaygın metabolik hastalıktır. Uzun süreli komplikasyonların görülmesi; hızlanmış atheroskleroz, nefropati, retinopati gibi hastalıkların sıklığını arttırması ve bu hastalığın önemli bir sağlık sorunu olduğunu bize göstermektedir (Diabetes research working group, 1999). Tip 2 şeker hastalığında, beta hücre fonksiyon bozukluğunun çeşitli nedenlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Bunlardan biri yanlış katlanmış insan adacık amiloid polipeptid (hIAPP) birikintileri ile oluşan adacık amiloid adı verilen toksik protein agregatlarıdır. hIAPP'nin hatalı katlanması ve agregasyonu, endoplazmik retikulum (ER) hemostazını bozarak katlanmamış protein cevabını (UPR) aktive eder (Cadavez ve ark., 2014).

2.3. Gebelik Dönemi Şeker Hastalığı

Gebelik dönemi şeker hastalığında ise; daha önceden şeker hastalığı tanısı konulmayan ve ilk olarak gebelik sırasında tespit edilen bir şeker hastalığı türüdür. Karbonhidratlara karşı bireyin verdiği değişik oranlarda hiperglisemik ataklardan oluşur (Seino ve ark., 2010). Özellikle gebeliğin 4 ve 8. haftası içerisinde meydana gelen hiperglisemik durumlar konjenital anomalilere veya fetüsün kaybına neden olabilir (Comess ve ark, 1969). İnsanlarda, hamilelerde 24-28. haftalar arasında açlık plazma glikoz düzeyinin 126 mg/dl nin üzerinde olması veya herhangi bir zamanda bakılan kan şekerinin 200 mg/dl nin üzerinde olması durumunda gebelik şekeri tanısı

konulmaktadır. Genellikle 25 yaş üstü, fazla kilolu olan ailesinde şeker hastalığı öyküsü bulunan anormal glikoz toleransı hikayesi olan kadınlara (Alberti ve ark., 1998)

2.4. Diğer Şeker Hastalığı Türleri

Diğer şeker hastalığı türlerinde ise; çoğunlukla erken yaşlarda kendini gösteren hiperglisemik atak ve dominant kalıtım özelliği görülmektedir. Bu hastalara genellikle, gençliğin erişkin başlangıçlı şeker hastalığı (MODY) adı verilmektedir. Bu şeker hastalığı türünde insülinin etkinliğinin çok az olması veya insülin salınımında meydana gelen bozukluklar nedeniyle meydana gelmektedir. İnsülin direncinden değil de, beta hücresinde meydana gelen fonksiyon bozukluğu MODY'nin göstergesidir.

Pankreatit, kistik fibroz ve obezite gibi durumlar da aynı zamanda sekonder şeker hastalığına sebep olmaktadır (Association, 2010).

2.5. Hayvanlarda Diyabet

Şeker hastalığı kedi ve köpeklerde de insanlardaki kadar yaygın görülmektedir. Hayvanlarda da şeker hastalığı Tip 1 ve Tip 2 olarak 2'ye ayrılır. Tip 1 insanlardakine benzer olarak, juvenil şeker hastalığı olarak adlandırılır. Tip 2 şeker hastalığı ise pankreasın yeterli insülin üretememesi sonucu şekillenir. Köpeklerde şeker hastalığının genellikle oluşma nedeni tam olarak tespit edilmiştir. Ancak genetik olarak yatkınlık varsa, insülitis (mononükleer inflamatuvar infiltrasyon) veya pankreatiti varsa şeker hastalığına yatkınlığının olduğu belirtilmektedir. Genel belirtiler ise; aşırı yemek yeme isteği olan hayvanlarda buna rağmen aşırı kilo kaybının, aşırı su içmesine ve sık sık idrar yapmanın görülmesidir. İdrar ve kan örneği alınarak kan şekeri ve idrarda glikozüri tespiti ile şeker hastalığı doğrulanır. Köpeklerde sıklıkla görülen şeker hastalığı tipi Tip 1'dir ve dışarıdan eksojen insülin takviyesi ile tedavi edilir. Kedilerin büyük bir kısmında ise Tip 2 şeker hastalığı görülür ancak yine de oral anti diyabetik ajanlar yerine tedavisinde insülin alımı gerekebilir. Beslenmenin düzenlenmesi ve doğru uygulanan bir tedavi ile kedilerde kan şekerinde düzelme ve tamamen iyileşme görülebilir (Öhlund ve ark., 2016).

Köpeklerde ise tedavi süreci devam eder ve tam bir iyileşme görülmez (Davidson, 2007).

3. ŞEKER HASTALIĞININ KLASİK TEDAVİ YÖNTEMLERİ

3.1. Beslenme Tedavisi

1987’de Amerikan Diyabet derneğinin şeker hastalığı tedavisi ve pratik eğitim kurumunun yapmış olduğu bir açıklamada, kişiye özgü öğün planlamasının öneminden bahsetmiş ve şeker hastalığının tedavisinde yeni bir görüş ortaya atmışlardır (Ryan ve ark., 1984). Bu kapsamda oluşturulan tıbbi beslenme tedavisi öğeleri aşağıda belirtildiği gibidir.

- Sağlıklı ağırlıkta olmak,
- Tam tahıllı ürünleri her gün tüketmek,
- Her gün sebze meyve tüketimi yapmak,
- Doymuş yağ ve kolesterolü düşük yağ ürünleri ile beslenmek,
- Orta düzeyde şeker içeren yiyecek ve içeceklerin tüketilmesi,
- Alkollü içecek içiliyorsa onun asgari miktara çekilmesi.

3.2. Egzersiz

Tip 1 şeker hastalığı görülen hastalarda, egzersizin sonucunda glikoz homeostazisi ve yakıt metabolizmasını düzenlemek hedef alınmıştır. Aynı zamanda tip 2 şeker hastalığına sahip kişilerde de egzersiz önemlidir. Obez hastalarda ise vücut ağırlığının korunması ve azaltılmasında bununla birlikte insülin duyarlılığının düzeltilmesinde de önemli bir rol oynar (Whelton ve ark., 2002).

3.3. İnsülin tedavisi

İnsülin keşfedildikten sonraki ilk 60 yılında sığır ve domuz preparatlarından elde edilirken 1980 yılından sonra ise rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak insan insülinleri elde edilmektedir. Bu keşiften sonra insülinler ihtiyaca göre tasarlanmıştır. İnsülin tipleri ise;

- Hızlı etkili insulin analogları: Lispro ve Aspart
- Kısa etkili insülinler: Regüler
- Orta etkili insülinler: NPH ve Lente

- Uzun etkili insülinler: Ultralente
- Uzun etkili insülin analogu: Glargin

3.4. Oral Antidiyabetik ilaçlar ile Tip 2 Şeker Hastalığının Tedavisi

Günümüzde kullanımda olan farklı tipte oral antidiyabetik ajanlar bulunmaktadır. Bunlar; insülin salınımını arttıranlar, insülin direncini azaltanlar ve gastrointestinal sistem içerisinde glikozun giriş hızını değiştiren ajanlar olarak gruplara ayrılmıştır (Krentz ve Bailey, 2012).

3.5. Şeker Hastalığının Alternatif Tedavi Yöntemleri

3.5.1. Pankreas Nakli

Yukarıda belirtilen tedavilerin yanı sıra özellikle tip 1 şeker hastalarında insülin tedavisine rağmen devam eden komplikasyonlardan dolayı alternatif tedavi yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu alternatiflerden biri olan pankreas nakli ilk defa 1893’de Dr. Watson–Williams ve Mr. Hansant isimli araştırmacılar tarafından koyun pankreasının 15 yaşında olan bir şeker hastasının derialtı dokusuna nakil edilmesiyle yapılmıştır. Bu tedavi sonucunda hasta 3 gün sonra kaybedilmiştir. 1927’li yıllarda ise pankreasın tamamının şeker hastalarına nakli yapılmış ancak bu nakiller sonrasında pankreasın kendini sindirmesi, nakledilen pankreasın immün reddi, vasküler tromboz ve pankreas kanalı drenaj gibi problemlerle karşılaşmıştır (Garcia ve ark., 2003). Ayrıca pankreas nakillerinin başarılı olması için immün baskılayıcı ilaçların kullanılması gerekliliği de ortaya çıkmıştır (Burke ve ark., 2015).

Pankreas nakilleri ciddi bir cerrahi işlem gerektirir ve belirli bir morbitide ve mortaliteye sahiptir. (Fioretto ve ark., 1998).

Pankreas nakilleri doku uyumu uygun verici bulma sıkıntısı ve cerrahi işleminin kompleks olması sebebiyle sıklıkla kullanılan bir yöntem değildir. Ayrıca pankreas nakilleri sonrasında dokunun rejeksiyonu da yine sıklıkla görülen olumsuzluklardandır. Pankreas transplantasyonu, diyabetik nefropatinin lezyonlarını azaltabilir ancak normagliseminin sağlanması için 5 yıldan fazla süreye ihtiyaç vardır (Fioretto ve ark., 1998).

3.5.2. Adacık Hücre Nakli

Adacık nakli, tip 1 şeker hastalığında alternatif bir tedavi şeklidir. 1970'li yılların başında kollejenaz enziminin adacık hücrelerinin izolasyonunda başarılı bir şekilde kullanılmasından sonra, kemirgenlerde adacık nakilleri başarılı bir şekilde yapılmıştır. Böylelikle karmaşık bir cerrahi işlem gerektiren pankreas nakilleri yerine daha basit ve kısa süreli yapılabilen adacık nakilleri umut vaat etmiştir. Uluslararası Adacık nakli kayıtlarına göre, 1990-1998 yılları arasında yapılan nakillerden sadece %12'sinde 1 hafta insülden bağımsızlık görülürken, sadece %8'i 1 yıldan daha uzun insülden bağımsız olarak yaşamını devam ettirmiştir. Hastaların %30 unda ise C peptid düzeylerinde belirgin azalmalar gözlenmiştir (Bretzel ve ark., 1999).

Şeker hastalığı, insülin üreten beta hücresinin kitlesinde meydana gelen yetersizlik sonucu olduğundan beta-hücre kütlesinin geri kazanılmasını amacıyla uygulanan adacık nakillerinde ya kadavradan elde edilen adacık hücrelerinin nakli ya da kök hücrelerden elde edilen adacık veya beta hücre benzeri hücrelerin nakli yapılmaktadır.

Edmonton (1999) da yeni immün baskılayıcı ilaç protokolleri ile başarılı adacık naklini gerçekleştirmiş ve bu başarı sayesinde pankreasın tamamı yerine sadece adacık hücrelerinin naklini yeniden gündeme getirmiştir. Edmonton grubu, kg başına yaklaşık 11.000 IEQ adacık nakli gerçekleştirmiştir. Protokolleri anti IL-2R antikorları, rapamisin ve düşük doz FK506 içermektedir. Nakil yapılan alıcılarda insülin antikorları baskılanmış, GAD65 otoantikorları değişmemiştir. Ayrıca bu protokol ile nakil yetmezliği ile ilgili olan adacık otoantikorlarının oluşumu da engellenmiş olmaktadır. Bu grubun yaptığı nakiller sonrasında yaklaşık 17 hastada 2 yıla yakın insülden bağımsızlık ve normaglisemi görülmektedir. Dikkate değer bu sonuç o zamana kadar yapılan nakiller içerisinde en başarılı sonuç olmuştur (Shapiro ve ark., 2006).

Çoğunlukla pankreatiti olan ve bazı diğer sebeplerden dolayı pankreası çıkarılan hastaların pankreasları izole edilerek, aynı hastaya tekrar kendi hücrelerinin nakli gerçekleştirilir. Bu işlem otojenik nakil olduğundan dolayı hastaya nakilden sonra immün baskılayıcı ilaç kullanmaksızın başarılı olunur. Özellikle 300.000 adacık eşdeğeri (IEQ) kadar adacık hücresi elde edilip nakil gerçekleştirildiğinde

hastaların %70 kadarında en az 1 yıl süreliğine insülden bağımsızlık elde edilir. Bazı araştırmacılar 200.000 IEQ otoadacık naklinde bile başarılı sonuçlar alındığını bildirmişlerdir (White ve ark., 2001).

Pankreasın laboratuvara getirilirken korunma işleminin iyileştirilmesi, kullanılan enzim komplekslerinin ve diğer kollajenaz ve nötral proteaz kombinasyonunun geliştirilmesi, sindirim ve saflaştırmanın optimizasyonu, dijital görüntüleme analizleri, oksijen tüketim oranının belirlenmesi gibi çalışmalar adacık izolasyon ve nakil başarısını arttırabilecek diğer etkenleri oluşturmaktadır (Balamurugan ve ark., 2014).

Son 20 yıldır, pankreas adacık hücre izolasyonu ve klinik naklinin başarısı ile ilgili önemli gelişmeler olmaktadır. Ludwig ve arkadaşları (2014) adacık naklinin başarısını, hastadaki glikoza bağlanmış hemoglobin A1c (HbA1c) seviyeleri ve kan şekeri seviyeleri bakımından değerlendirmişlerdir. Çalışmada tüm hastalarda hipoglisemi olmaksızın HbA1c' de bir azalma olduğu ve kalıcı bir greft fonksiyonu ve sabit bir glisemik kontrolün olduğu gösterilmiştir. Tüm hastalarda aynı zamanda dışarıdan minimal insülin verilmiştir. Sonuç olarak, adacık naklinin, seçilmiş hastalar için mükemmel bir tedavi olabileceği bildirilmiştir. Adacık nakli için birincil hedef, insülden bağımsız olmasından ziyade sabit glisemi oluşturması ve hipogliseminin önlenmesi olmalıdır. Aynı makalede, dışarıdan az da olsa eksojen insülin vermeye devam edilirse; adacıklarda oluşacak metabolik stresi koruyabileceği ve hatta adacık greft fonksiyonunu uzatabileceğinden de bahsedilmiştir (Ludwig ve ark., 2014).

3.5.3. Adacık Naklinde İmmun Cevaplar

Nakil sonrası gelişen inflamatuvar yanıtın erken adacık hasarı ve greft kaybına, neden olduğu bilinmektedir. İnsülin bağımlı hastalarda doku adacığın naklinin yararlarını arttırmak için nakil öncesinde ve sonrasında inflamasyon kontrolü yapılarak adacık hasarı azaltılabilir. Donörle birlikte adacık hücrelerinde apoptoz da başlar. İskeminin başlangıcından itibaren greft revaskülarizasyonuna kadar adacıklar hipoksik koşullar altındadır. Bu nedenle, iskemi süresi nakil için adacık kalitesini arttırması açısından önemli bir husustur. Yapılan çalışmalarda soğuk iskemi süresinin 8 saatin altında olması gerektiği söylenmektedir. Doku adacığın izolasyonu için kullanılan enzimlerin de adacık naklinden tatmin edici sonuçların alınmamasının nedenlerinden biri

olabileceği düşünülmektedir. Enzimatik ve mekanik stres adacık içindeki inflamatuvar medyatörlerin savunmasına neden olabilmektedir (Kanak ve ark., 2014).

Adacık tahribatının önemli nedenlerinden biri de nakil sırasında anlık kan-aracılı inflamatuvar reaksiyondur. Doku faktörü (TF) adacıklar üzerinde bu tür bir tepkime için önemli bir tetikleyici olabilir. Sitokinleri ve kemokinleri salgılayan yerleşik antijen sunan hücreler (APC'ler) ile birlikte adacıklar inflamatuvar süreçte önemli bir rol oynamaktadır. Lökositlerin ve makrofajların infiltrasyonu önce adacık hücrelerinin yıkımını başlatır. Adacık infüzyon sonrası trombin antitrombin seviyesi ve kanda C-peptid seviyeleri ile ani artış göstermesinin anlık kan-aracılı inflamatuvar reaksiyon (IBMIR)' dan kaynaklandığı bildirilmiştir (Kanak ve ark., 2014).

Pıhtılaşma, adacık nakli esnasında portal kan ile doğrudan temas edildiği zaman hemen devreye girer. *In vivo* ve *in vitro* deneylerde, CD39 u aşırı eksprese eden transgenik farelerden alınan adacıklar kullanılarak yapılan nakillerden sonra daha az pıhtılaşma olduğu gösterilmiştir (Dawyer ve ark., 2006). Adacıklardaki yerleşik makrofajlar, karaciğer Kupffer hücreleri ve IL-1 β salgılayan nötrofiller insülin salgısını bozar ve adacık hücre apoptozisini uyarır (Johansson ve ark., 2006). İmmün reddi engellemek için; baryum-alginat ve diğer polimerler kullanılarak adacıkların yüzeyi makroenkapsülasyon teknikleri ile kaplanmaktadır. Chen ve arkadaşları (2015)' nin yaptığı bir çalışma da, CXCL12 karıştırılmış aljinat ile enkapsüle edilmiş allo- ya da ksenoadacıklar transplante edildiğinde sistemik immünosüpresyon kullanılmadan hücrelerin bağışıklık sistemi hücrelerinden korunduğu belirlenmiştir (Chen ve ark., 2015).

Adacık naklinde kullanılan mevcut immün baskılayıcı ilaç uygulamaları beta hücreleri için toksik olabilir, adacık naklinin geleceği ve başarısı immün baskılayıcı tedavilerin geliştirilmesine bağlıdır. Başka bir çalışmada (Lau ve ark., 2015) ise; nöral krest kök hücreler (NCSC) ile adacıkların yüzeyini kaplayarak adacıkların uyumunu ve işlevini artırmak hedeflenmiştir. Bu çalışmadan çıkan sonuçlara göre; adacıkların NCSC ile biyomühendisliği sonrasında intraportal naklinin, adacık uyumu ve işlevini geliştirmek için bir olanak sağladığı ortaya çıkmıştır.

Farhangi ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada (2014), yetişkin sıçan adacıkları izole edilmiş ve Streptozotosin (STZ) ile şeker hastalığı oluşturulanerkek sıçanların testis korteksine nakledilmiştir. Testis korteksi, hücrelerin nakilden sonra immün atağa karşı daha korunaklı bir alan olduğu düşünülerek seçilmiştir. Çalışmanın sonuçlarında; nakilden 20 gün sonra şeker hastası olan sıçanların kan şekeri ve C peptid seviyesinin normal sıçanlarla benzer seyrettiği belirlenmiştir. Dolayısıyla testis korteksinin adacık naklinde potansiyel olarak kullanılabilir alternatif immün ataktan arınmış bir alan olduğu gösterilmiştir.

Adacık nakli tedavisinde hücrelerin elde edilmesinde uygulanan rutin adacık hücre izolasyon tekniğinde, adacık hücreleri pankreasta sahip oldukları yoğun damarlanma profilini kaybetmeleri ile birlikte maruz kaldıkları oksijen yetersizliği hücreler üzerinde apoptotik etki oluşturarak nakil sonrası dönemde adacık hücre greftinin sağ kalımını olumsuz yönde etkilemektedir. Schaschkow ve arkadaşlarının (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, oksijen içeriği artırılmış plazma tabanlı matrislerin nakilden önce adacık kültürü için faydalı olabileceği ortaya konulmuştur. Böylelikle canlılık ve işlevsellik azalmadan hipoksiyi azaltarak ve adacık morfolojisini koruyarak kültür sırasında adacık dayanıklılığının artırılacağı sonucuna varılmıştır.

3.5.4. Adacık Hücreleri ile Kombine Edilen Hücresel Tedavi Yöntemleri

Rejeneratif tıpta gelişen teknolojiler, mevcut tedavi stratejilerini ve organ tedarik etmekteki yetersizlikleri aşmak için şeker hastalarında beta hücre yenilemesini sağlamaya yönelik gelişmeleri içermektedir. Adacık hücre tedavisindeki yeni yaklaşımlardan bazıları aşağıda sıralandığı gibidir:

1- Enkapsülasyon immün sistemin atağından korunmak için; adacık hücrelerinin boyutuna uygun şekilde aljinat kapsülleri veya diğer biyouyumlu kapsüller ile kaplanması tekniğidir.

2-Kök hücre tedavisi ve hücrelerin yeniden programlama tekniği ile; beta hücre yenilenmesinin sağlanması ve bu sayede daha fazla sayıda alıcının tedavisinin yapılması hedeflenmiştir. Ayrıca büyüme faktörleri, hormonlar ve küçük moleküllerin, beta-hücre çoğalmasını ve fonksiyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ek

olarak, potansiyel, hastaya özel otolog beta-hücre replasman tedavisi geliştirmek için, iPSC'den türetilen pankreas beta-benzeri hücrelerinin kullanılması da tartışılmaktadır (Pouch, 2015).

3-Pankreas ekstrasellüler matriksi ile organ biyomühendisliği; Ekstrasellüler matriks (ECM)'nin son zamanlarda yapılan çalışmalarda, adacık biyolojisinin gelişimini, morfolojisini, farklılaşmasını, hücre içi sinyalinin, gen ekspresyonunu, göç etmesini, beta hücre yenilenmesinin sağlanmasını ve hayatta kalması gibi çeşitli yönlerini düzenlediği gösterilmiştir. (Hiratsuka ve ark., 2014).

4-Rejeneratif tıp, Tip 1 şeker hastalarında endokrin fonksiyonunu düzeltebilen bir pankreası üretmek için biyomühendislik çalışmaları halen devam etmektedir (Hilderink ve ark., 2015).

3.5.5. Adacıkların Nakil Yöntemleri

Diğer nakli yapılan organlar gibi adacıklar da iskemi reperfüzyon hasarına yatkındır. İzole adacıklar kan dolaşımı içine infüze edildiğinde, oksijen metabolizması nedeniyle üretilen birçok sitotoksik ürünler, ksantin oksidaz tarafından katalize edilir. Reaktif oksijen radikalleri (ROS), Nüklear Faktör Kappa B (NF- κ B) inflamasyon yolağı ve zararlı ve parçalayıcı proteinler, lipidler ve nükleik asitler ile hücre ölümünü teşvik eder. Oksidatif stres, adacık izolasyon işlemi sırasındaki adacık hasarı ve kaybına neden olan önemli bir etkidir. Hipoksik durum ve vaskülogenesizin gecikmesi nakledilen adacıkları nekroz ve apoptosise teşvik eder. Adacık naklinde, bu sınırlamaları aşmak için, sıçan adacık hücreleri ve insan kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (hMSCs), heterosferoidler (HSS) oluşturduktan sonra böbrek ve karaciğere nakli yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, HSS kültürü sonrasında hipoksik durumunu değerlendirmek için adacık hücre anti-apoptotik gen ekspresyonuna bakılmış ve önemli bir artış sergilediği gözlenmiştir. HSS kültüründe hMSC'nin anjiyogenik ve anti-apoptotik proteinleri salgıladığı gösterilmiştir. Hem böbrek hem de karaciğere yapılan HSS nakillerinde aynı oranda başarılı sonuçlar elde edilmiştir. HSS sisteminin Tip 1 şeker hastalığının tedavisi için, geleneksel yöntemlere göre daha etkin bir nakil yöntemi olabileceği görüşüne varılmıştır (Shin ve ark., 2015).

Kök hücre tedavisi şeker hastalığı tedavisi için yeni bir ümit vaat eden yaklaşımdır ama farklılaşmış hücrelerin insülin salgılama oranı adacıktaki beta hücreleri ile kıyaslandığında düşüktür. Seyedi ve arkadaşları (2015) insan göbek kordonundan elde edilen mezenkimal hücrelerin (hUCMs) insülin üreten hücreye (IPC) dönüşümü ile elde edilen hücrelerin diğer farklılaşma protokollerine kıyasla beta hücrelerine yakın ve benzer insülin salınımı yaptıklarını göstermişlerdir (Seyedi ve ark., 2015). Başka bir araştırma da ise kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinden (BM-MKH) insülin üreten hücrelerin (IPC) farklılaşması üzerine FG scaffold (3D kültür ortamında) etkisi Khorsandi ve arkadaşları (2015)' nın yaptığı bir çalışmada değerlendirilmiştir. Bu çalışmadan çıkan sonuçlarda ise FG scaffold'un ratlarda BM-MKH 'lerden elde edilen IPCs farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir. Villani ve arkadaşları (2014)' nın yaptığı bir çalışmaya göre, amniyotik sıvı kaynaklı kök hücrelerin beta hücre hasarını engellediği de bildirilmektedir. Endojen β hücre işlevi ve proliferasyonunda amniyotik sıvı kök hücrelerinin tedavisel katkısı mümkündür. Bu kök hücrelerin koruyucu özellikleri yüksek seviyede hiperglisemi oluşumundan önce nakil yapılırsa görülmektedir. Bu da erken müdahalenin önemini göstermektedir (Villani ve ark., 2014). Lau ve arkadaşları (2015)' nın yaptığı bir çalışmada, fare adacıkları, geliştirilmiş yeşil floresan proteini (EGFP) eksprese eden fare nöral krest kök hücreleri (NCSC) ile inkübe edilerek yüzeyleri kaplandıktan sonra şeker hastası yapılan farelerin tedavisi için portal ven içine nakledilmiştir. NCSC biyomühendisliği ile nakledilen fare adacıkları kontrole göre glikoza daha iyi yanıt verdiği görüldü. Nakledilen NCSC ler adacık greftinde glial ve nöral hücrelere farklılaşmıştır. Adacıkların NCSC ile biyomühendisliği sonrasında intraportal nakli, adacık uyumu ve işlevini geliştirmek için bir olanak sağladığı sonucuna varılmıştır.

Kaslar, adacık naklinde tercih edilebilir nakil bölgesi olmasına rağmen, nakilde başarısı zayıf olan bir bölgedir. Fakat yapılan bir çalışmada, mezenkimal kök hücrelerle (MKH) adacıkların birlikte kas içine naklinde tek başına adacık nakline göre daha olumlu sonuçların elde edilebileceğine dair çalışmalar devam etmektedir. MKH' ler ile adacıkların kokültürü ve birlikte nakli sonrası naklin özellikle antiinflamatuvar etki açısından başarılı olduğu, antiapoptotik etkisi ve neovaskülarizasyon için daha anlamlı sonuçların elde edildiği de belirtilmiştir (Yoshimatsu ve ark., 2015).

Üç boyutlu (3D) hücre kültürleri; Bu hücre kültürleri, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini ve daha sonra hücre sinyal iletimini artırıcı in vivo mikroçevreyi taklit edebilmektedir. 3D hücre kültürü sistemleri, kök hücre farklılaşmasını yönlendirebilmesi için geliştirilmiştir. 3D kültür sistemleri mikroçevre kaynağı oluşturması ve işlevsel bakımdan adacık benzeri hücre kümeleri için ideal bir yöntemdir. Ancak, henüz bu işlevselliği arttıran mekanizmalar belirsizdir. Balb-c farelerden elde edilen adacık ve Sertoli hücrelerinin agregasyonu asılı damla tekniği metodu ile hazırlanmıştır. Bu agregasyon C57BL/6 farelerin karaciğerine insan adacık naklinde olduğu gibi portal damar yolu ile nakledilmiştir. Bu ko agregasyonun hem Sertoli hem de adacık hücrelerinin fonksiyonlarını koruduğu belirlenmiştir. Portal damar yolu ile 800 ko agregat C57BL/6 farelerin karaciğerine nakil edildiğinde 100 günü aşkın sürede nakil yapılan 7 farenin 6 sında normaglisemi görülmüştür. Özellikle bu allojenik ko agregatların Streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş şeker hastalığında portal damar yolu ile naklinde sistemik immün baskılayıcı ilaç kullanmaksızın uzun vadeli graft canlılığı sağlamıştır (Takemoto ve ark., 2014).

3.5.6 Adacık Hücre Nakillerinin Başarısı Üzerinde Etkili Olan Sitokinler ve Damarlaşma Faktörleri

Pankreas adacıklarında damarlanma oldukça yüksektir. Adacıklarda ekzokrin dokuya göre beş kat fazla damarlanma mevcuttur. Son yapılan araştırmalarda kan damarı endotellerinin endokrin pankreas gelişimi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Lammert ve ark., 2001). Lammert ve ark. (2003) nakil olan dokuda adacık gelişmesini, adacıkların çevresinin kan damarlarıyla çevrili olmasına ve yeni oluşan adacıklarda kılcal kan damarı gelişiminin artmasına bağlamaktadırlar. Adacıklar daha önceden oluşmuş damarların endotel sinyalleriyle uyarılmaktadır ve gelişimin ileriki aşamalarında kılcal damarların oluşumunu artırmak için adacıklarda VEGF ekspresyonuna ihtiyaç duyulmaktadır (Yazır 2007). Jansson ve Carlsson (2015) yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı sıçanlarda iki farklı adacık popülasyonunu incelemiş ve büyük adacıklara sahip grupta yoğun bir damar ağı ile iyi bir oksijenlenme, iyi beta hücre çoğalması ve güçlü bir salgı işlevi bulunduğu tespit edilmiştir. Diğer küçük boyutlu adacık hücre grubunda ise iyi bir

oksijenlenmenin olmadığı, bir beta hücre çoğalmasının çok az olduğu ve iyi bir salınmanın olmadığı görülmüştür.

Hücrelerin birbirleri ile bitişik olan yüzeylerinde bulunan PECAM-1 (CD 31) damardaki hücreler özellikle de bazı lökosit tipleri ve trombositler tarafından salınan bir proteindir. Fibroblast, epitel hücresi, kas ve damarsal olmayan diğer hücrelerin yüzeyinde CD 31 bulunmaz. Endotel hücre kültürlerinde ise; PECAM-1 yaygın olarak endotel hücreleri üzerinde yerleşmiştir. (Newman ve ark., 1990 ; Ergüler, Demir, ve Demir, 2002). Araştırmacılar endotel hücre ve kök hücreleri ayrı ayrı izole edip endotel hücre ile kaplayarak adacık hücreleri elde etmiş ve 6 gün kültüre edildikten sonra damarlanma etkisine bakmışlardır. Çalışmalarında CD 31 boyamasını formaldehitte tespit ettikleri preparatlarda floresan ışık altında incelemişlerdir. Bu çalışma sonucuna göre CD 31 pozitifliğinin endotel ve kök hücre ile kaplanan adacıklarda yüksek oranda olduğu ve revaskülarizasyonun arttığını bildirmişlerdir (Johansson ve ark., 2008). İnsan endokrin pankreasındaki mikrovasküler endotel hücrelerinden köken alarak üretilmiş adacık hücrelerinin uzun süre kültürü sonrasında karakterizasyonu ve vaskülarizasyonu araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Bu çalışmada adacık benzeri hücrelerinin CD 31 boyamasına flow sitometri kullanılarak bakılmıştır. Çalışmada elde edilen adacık benzeri hücrelerin anjiogenik özelliklerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Sordi ve ark., 2017).

Gen dizi çalışmaları izolasyondan hemen sonra anjiyogenezis, enflamasyon ile ilişkili genlerin uyarılması, apoptoz ve hücre büyümesinin 72 saat kültürden sonra daha fazla artış gösterdiğini bildirmişlerdir. İzolasyon ve adacıkların kültürünün de, İnterlökin 10b (IL-10) ekspresyonunu down regüle ettiği ayrıca düzenleyici T hücrelerinin gelişimini uyardığı bu sitokin ekspresyonunun negatif düzenleyici etkisinin de olduğu gösterilmektedir. Adacıkların kültüre edilmesiyle saflık yüzdesinde artma oluşur ve hasarlı adacıklar ile asiner hücreleri parçalanır. Adacık nakli sonrası görülen immun reddin baskılanması için adacık naklini takiben immunsupresan uygulamaları yapılmaktadır, ancak bu uygulamaların insülin sekresyonunu ciddi oranlarda bozduğu da görülmüştür (Ricordi ve ark., 1990). İnterlökin 10; sitokin sentez inhibitör faktör olarak da isimlendirilir, salınımında B

hücreleri, timositler, Th1 hücreleri, monosit ve NK hücreleri etkilidirler. IL-10 sayesinde makrofajlardan IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 ve Tümör Büyüme Faktörü alfa (TNF- α) salgılaması baskılanırken, T lenfositlerden de IFN- α salgılaması baskılanır. Bunu TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin sentezini transkripsiyonel (TNF- α ve IL-1) ve posttranskripsiyonel (IL-1 ve IL-6) düzeyde baskılayarak gerçekleştirir (Jeannin ve ark., 1998). IL-10 salınımının in vitro ortamda insanlarda progesteron tarafından uyarıldığı da bildirimler arasındadır Ancak ratlarda bu ilişkiyi gösteren bir literatüre rastlanılamamıştır. Glukokortikoidlerin in vitro olarak pro-inflamatuar sitokinleri ve doku faktörünü azalttığı ve nakledilen insan adacıklarının işlevlerini in vivo iyileştirdiğine yönelik yapılan bir çalışmanın sonucunda, glukokortikoidlerle beraber inkübe edilen adacıklarda immünomodülatör sitokin IL-10 ekspresyonunda belirgin bir artış gözlemlenmiştir. IL-10'un makrofajlar, dendritik ve T regülatör hücreler tarafından salgılandığı bilinmektedir. IL-10'un saflaştırılmış adacıklarda meydana gelen artışının taşıyıcı lökositlerden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Düzenleyici T hücrelerinin uyarılması yoluyla nakledilen adacıklar tarafından indüklenen immün yanıt üzerinde glukokortikoid kaynaklı IL-10 ekspresyonunun olumlu etkilere sahip olabileceği bu çalışma ile gösterilmiştir (Lund ve ark., 2008).

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF), polipeptit büyüme faktörlerinin içinde büyük bir aileyi oluşturmaktadır. FGF'ler içinde çeşitli mezoderm ve nöroektoderm'den köken alan hücreler olan fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreler, kondrositler, melanositler gibi hücreler bulunur. Bu hücrelerin kuvvetli mitojenik aktiviteleri, nörotropik özellikleri ve heparin bağlama özellikleri belirgindir (Sucularli ve Pinarli, 2014). Diyabet tedavisinde insan fetal pankreatik progenitör hücrelerinden türetilen adacıkların değerlendirilmesini yapan bir grup bilim adamının yayınladığı makaleye göre, adacık hücre benzeri kümeler oluşturmak için kültür ortamına ekledikleri 10 $\mu\text{g/L}$ dozunda bFGF ile bFGF'nin embriyonik gelişim sırasında hücre proliferasyonunda ve farklılaşmada çok önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu nedenle bFGF kullanarak bu hücrelerin proliferasyonunun gerçekleştiği öne sürülmüştür. Yaptıkları çalışmada insan fetal pankreatik progenitör hücrelerinin bu kültür ortamında kuvvetli bir çoğalma kabiliyeti sergilediğini göstermişlerdir (Zhang ve ark., 2013). bFGF ile tedavi edilen adacık progenitör hücrelerinin implantasyonu sıçanlarda streptozotosin kaynaklı

diyabeti iyileştirdiğine yönelik yapılan bir diğer çalışmada ise, proliferen olan adacık hücreleri 20 ng/ml dozunda bFGF ile kültüre edildiğinde aşamalı olarak endokrin gen ekspresyonu kaybedilmesine rağmen sıçan adacıklarında çoğalmayı uyardığı belirtildi ve bununda çoğalmaya etki eden bir yan etki olabileceğini göstermişlerdir (Li ve ark., 2010)

3.5.7. Hayvanlarda Adacık Nakli Çalışmaları ve Diyabet Tedavi Seçenekleri

Köpek adacıklarında, alfa hücreleri sol lobda merkezden periferen doğru yayılım gösterir ve beta hücreleri ise tüm bölgelerde dağınık olarak yerleşmiştir. (Tsuchitani ve ark., 2016). Açlık kan şekeri 148 dl/ml'den büyük olan köpekler şeker hastası olarak kabul edilir. Obez köpeklerde insülin resistansı görülür. Köpeklerde şeker hastalığı etyopatogenezinin daha iyi anlaşılması ile hastalığın erken evrelerinde müdahale etmek bu hastalığın ilerlemesinin yavaşlamasına neden olmadığı gibi, maalesef insüline bağımlılığından kaçınmak veya şeker hastalığını tamamen önlemek mümkün değildir. Ancak kedilerde insülinen bağımsızlık ve hatta diyabetin bile tamamen iyileşmesi söz konusu olabilmektedir. Bunu yanında köpeklerde diyabetin insülinen bağımsızlık olmamasına rağmen diğer potansiyel güvenli tedavilerden GLP-1 antagonistleri kullanılarak tedavi edilmesi mümkündür (Gilor ve ark., 2016). Köpek şeker hastalığı araştırmalarındaki gelişmelerin anlatıldığı ve eve adacık nakli sonuçlarının verildiği ilk yayın 1988 yılında yapılmıştır. Çalışmada toplamda 18 köpek kullanılmış ve bu köpeklerden 8'ine nakil yapılmıştır. Beş köpeğe sürekli immün rejeksiyonu engellemesi için siklosporin verilmiştir. Bir allogreft nakil yapılan köpeğin toplam kan şekerinin normal aralıklarda olması durumu (öglisemi) 231 gün sürmüştür. Öglisemili bir köpeğin nakilden 186 gün sonra pnömoniden öldüğü kaydedilmiştir. Diğer köpeklerde ise ögliseminin, 253 ila 716 gün arasında değişen süreler boyunca devam ettiği bildirilmiştir (Alejandro, ve ark, 1988). Daha yenilerde yapılan bir diğer çalışmada ise (Yang ve ark., 2016)., farelerin adacık hücreleri sitosan ile aljinat kapsülleri ile kaplandıktan sonra deneysel olarak diyabet edilen köpeklere nakli yapılmıştır. Bu ksenojenik naklin amacı ise sitosan-aljinat kapsülünün immün rejeksiyona etkisini incelemektir. Sitosan-aljinat kapsülü ile yapılan adacık naklinde 1 yıl öglisemi kaydedilmiştir ve immün rejeksiyon gözlenmemiştir. Klinik insan pankreas transplantasyon programlarında

uygulanmadan önce çeşitli muhafaza teknikleri veya immünoşüpresif protokolleri değerlendirmek amacıyla az sayıda çalışma köpeklerde yapılmıştır. Tüm allograft pankreas nakli yapılan köpeklerde, öglisemi sağlanmasına rağmen %90 oranında immün rejeksiyon tespit edilmiştir ve nakledilen hayvanların yarısının 14 günden fazla hayatta kaldığı bildirilmiştir. Ayrıca çok fazla cerrahi komplikasyonların olduğu bunların; duodenal sızıntı, yara enfeksiyonu, greft nekrozu ve greft vasküler tromboz, chyle sızıntı, karın içi apse ve pnömoni olduğu bildirilmiştir (Shyr ve ark., 2002). Bununla birlikte, köpek adacıklarının izolasyonu, korunması ya da nakli ile ilgili 40'dan fazla çalışma yapılmış ve büyük miktarda bilgi toplanmıştır (Vrabelova ve ark., 2014).

Çizelge 3.1. Köpeklerde yapılan adacık hücresi nakli, naklin verimliliği, hangi bölgeye nakledildiği ve öglisemi oranları ile ilgili daha önce yapılmış olan araştırmaların sonuçları (Vrabelova ve ark., 2014).

Refs.	# of Dogs	Yield	# of Islets Transplanted/kg Body Weight	Transplant Site	Normoglycemia (# of Dogs and Duration)
Horaguchi and Merrell ⁹⁵	7	2–3 × 10 ⁹ Pancreatic cells per pancreas		Liver, spleen	5/7
Noel et al. ¹⁰²	3	3553 Islets per gram of pancreas		Spleen	2/3 for 30 days
Alejandro et al. ⁸²	15	57 × 10 ⁶ Endocrine cells per pancreas		Mesenteric vein	120–600 days
Warnock ⁴⁹	20	103,200 Islets per pancreas	1000–8000	Liver, spleen	12/19 for 30–180 days
Cattral ⁵³	20		5444–8645		3–30 days
Evans et al. ³⁴	22			Liver, spleen, kidney	0–30 days
Warnock ³¹	59	129,733 Islet per pancreas	4763–10,263	Liver, spleen, kidney	30–270 days
Evans ⁵⁵	14		6811–7868	Liver, spleen, kidney	11/14 for 90 days
Kaufman et al. ⁸⁰	25	92,500 Islets	3150–8350		60–108 days
Kneteman et al. ⁵⁷	51	20–25% of beta cells		Spleen	90–600 days
Ao et al. ⁶¹	36	101,188 IEQ/pancreas	2264–5650	Spleen, pouch	10–90 days
Warnock et al. ⁶²	29		9033–9050	Spleen	5–35 days
Tashiro et al. ⁶⁷	5		4300–10,000	Omentum	3/5 for 28–49 days
Kin et al. ⁸¹	6	42,944 IEQ/pancreas	2233–5775	Omentum	0–143 days
Ito et al. ⁷²	15	65,012 IEQ/pancreas	3000	Liver	30 days

Spontan diyabetik kedi kemik iliği boşluğundaki alana biyo yapay olarak elde edilen adacıkların nakledildiği ve in vivo olarak sonuçların değerlendirildiği bir çalışmada, diyabetik bir kedinin femur kemik iliği oyuğuna on adet biyoyapay adacık yerleştirilmiştir. Sonuçlarına bakıldığında, kedinin ameliyattan sonra hâlâ hiperglisemisinin devam ettiği gözlenmiştir. Bununla birlikte, kedinin fizyolojik serum C-peptid seviyesinde bir artış olmuştur. Bu çalışma, spontan diyabetik kediler için kemik iliği oyuğuna implante edilen biyoyapay pankreatik hücrelerin etkili olduğunu ortaya koymuştur (Yang ve ark., 2010). Kedi gözünün subretinal uzantısına yapılan Langerhans adacıkları naklinde de hayvanlarda nekroz ya da inflamasyon gelişmemiştir. 21 güne kadar takip edilen hayvanlarda nakledilen alanlarda damarlanma oluşumu gözlenmiştir (Hatchell ve ark., 1998).

4. LUTEAL HÜCRELER

4.1. Ratlarda Ovaryum Gelişimi ve Östrus

Prepubertal ovaryum gelişimi gonadotropin seviyeleri ve morfolojik özelliklerine göre 4 döneme ayrılmıştır: Neonatal dönem doğumdan sonraki ilk hafta, infantil dönem doğumdan sonraki 1-3 hafta arası, juvenil dönem doğumdan sonraki 3-4.5 haftalar arasındaki dönem ve peripubertal dönem juvenil dönem sonrasındaki 3 gündür. Neonatal dönemde ovaryumlar Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) etkisi ile testosteronu östradiol-17 β 'ya metabolize ederler (Mülazımoğlu ve ark. 2010). İnfertil dönemde, FSH ve Luteinleştirici Hormon (LH) aktivitesi ile folliküllerde gelişime olur. Juvenil dönemde folliküllerde östrojen sekresyonunu oluşturur. Peripubertal dönem süresince uterus sıvı ile kaplıdır, folliküller yüksek oranda östrojen sekrete eder ve gonadotropinlerdeki yükselme ile ilk ovulasyon olur. Puberte ya da ilk östrus 28-42. günlerde meydana gelir. (Satie ve ark., 2011).

Fare ve ratlarda, östrus siklusu, vajinal açıklığın gözlenmesiyle, vajinal smear yöntemi kullanılarak takip edilebilir. Yaklaşık 4-5 gün sürer. Östrus siklusu, proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) olmak üzere başlıca 4 fazdan oluşur. Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat, diöstrus fazı ise 52-60 saat sürer (Petroianu ve ark. 2005). Korpus luteum maksimum büyüklüğüne erken diöstrus döneminde ulaşır. Siklusun düzenliliği, aydınlık-karanlık siklusunun kontrolü altındadır. Bu yüzden deney hayvanları laboratuvarlarında 12 saat aydınlık (L): 12 saat karanlık (D) uygulaması yapılır (Mülazımoğlu ve ark., 2010)

4.2. Korpus luteum

Korpus luteum (KL) ratlarda ovulasyondan 48 saat sonra ovaryum folikülünün duvarından gelişen, progesteron hormonu salgılayan geçici bir yapıdır (Hubscher ve ark., 2005). Kollegenaz kullanılarak birbirinden ayrılmış luteal hücrelere mikroskopik olarak bakıldığında üç tip hücre tanımlanır. Bunlar:

1. Küçük luteal hücreler (KLH)

2. Büyük luteal hücreler (BLH) ve

3. Temel olarak vasküler hücrelerden köken alan diğer hücre tipleridir. Bu hücreler, kapillar damarların kenarında bulunan endotel hücreler, alyuvarlar ve eozinofilleri de içine alan çeşitli lökositler, T-lenfositler ve makrofajları da bulunduğu immün hücreler ve fibroblastlardır (Meidan ve ark., 1999).

Yeni oluşan KL'un büyük luteal hücrelerinin kökeni granuloza hücreleriyken, küçük luteal hücrelerin kökeni teka hücreleridir (Milvae ve ark., 1996). Korpus luteumun yaşlanmasıyla bazı küçük luteal hücreler büyük hücrelere dönüşür (Hansel ve Blair, 1996). Hem büyük hem de küçük luteal hücreler progesteron üretimine katkıda bulunur. Büyük luteal hücreler küçük luteal hücrelere oranla az sayıda olsalar da daha fazla progesteron üretmektedirler (Milvae ve ark., 1996). Küçük ve büyük luteal hücrelerin ko-inkübasyonu (Milvae ve ark., 1991), büyük luteal hücrelerle endotelial hücrelerin ko-inkübasyonu (Fields ve Fields, 1996) progesteron sekresyonun artmasını sağlamaktadır. Ayrıca, Nelson ve arkadaşları (1992) tarafından yapılan bir araştırmada da büyük bir çoğunluğu vasküler kökenli olan ve progesteron salgılamayan hücrelerin, büyük luteal hücrelerle ko-kültüre edildiğinde, progesteron salgılanmasında birkaç kat artışa neden oldukları ortaya konulmuştur (Nelson ve ark., 1992).

Foliküllerin gelişimi sırasında teka ve granuloza hücrelerinin luteal hücrelere dönüşmesi ve luteal hücrelerde progesteron üretilmeye başlanması gibi bir dizi olayın gerçekleşmesi için gereken ihtiyaçların karşılanması için de anjiogenez esastır. Yeni oluşan KL' da vasküler gelişmeler başlıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGFA) (Ferrara ve ark., 1998) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF, FGF-2) (Gospodarowicz ve ark., 1985) ile düzenlenir.

Korpus luteum ovulasyondan itibaren birkaç gün içinde gelişir, çapı 1,5 cm kadar ulaşır. Bundan sonraki gelişimi döllenme olup olmamasına göre değişir. Eğer döllenme olmamışsa; KL birkaç gün sonra gerilemeye başlar, küçülür. Zamanla korpus albicans adı verilen beyazımsı bir yara izine dönüşür, daha da sonra yara izi de kaybolur (Widmaier ve ark. 2010).

Ratlarda yapılan çalışmalarda KLH' in 12-20 µm çapında olduğu belirlenmiş olup daha büyük çaptakiler de BLH olarak tanımlanmıştır (Nelson ve ark., 1992). Bahsedilen hücreler yapısal olarak birbirinden farklıdır (Wiltbank 1994).

Korpus luteum yaşlandığında bazı küçük luteal hücreler büyük hücrelere dönüşerek progesteron salınımına katkıda bulunur. Bununla birlikte, östrus siklusunun devam eden aşamalarında gözlenen büyük luteal hücreler, teka kökenli luteal hücrelerdir (Hansel ve Blair, 1996). Makrofajlar, fagositik aktivite ve KL'nin regresyonuyla ilgili immün cevapta rol almaları açısından önemlidirler. Bu nedenle bu hücrelerin luteal fonksiyonun düzenlenmesinde tamamlayıcı rolleri vardır (Meidan ve ark. 1999).

4.2.1. Korpus Luteum Hormonları

4.2.1.1. Progesteron

Progesteron steroid yapıda bir hormondur. Bu hormon progesterinlerin en önemlisidir.. Kandanda alınan kolesterolden az miktarda da asetil koenzim- A' dan sentezlenir. Progesteron kandanda plazma albumini ve özel progesteron bağlayıcı globulinler sayesinde taşınır. Progesteron salgılandıktan birkaç dakika sonra tamamen, progesteron etkisi bulunmayan diğer steroidlere yıkılır. Korpus luteumdan başka plasenta ve böbreküstü bezinden de progesteron salınımı gerçekleşir.

Ratlarda gebeliğin ilk dönemi boyunca, koitus ile aktifleşen prolaktin dalgaları sayesinde ovaryumdan stimüle olan progesteron salınır. Gebeliğin 2. döneminde ise plasenta da progesteron üretimine katılır. Gebeliğin 7. ve 13. günlerinde progesteron en yüksek seviyeye gelir. Ancak plasental salınan progesteron ratlarda gebeliğin devamı için yeterli değildir.

Rat embriyosu diğer hayvan türlerinden farklıdır ve östrojen üretimi gerçekleşmez. Anneden salınan östrojen gebeliği kontrol eder. Gebeliğin 11. gününde serum LH seviyelerinde diğer günlere göre dikkate değer oranda artış oluşur ve plasental luteotrop hormonların da gebeliğin 16. günde gelişimi olur ve gebelikte oluşan KL'nin büyüklüğünde bu dönemde artma meydana gelir.

Luteinleştirici Hormonun uyarısından bağımsız olarak büyük luteal hücreler de önemli oranda progesteron üretimini gerçekleştirir. Büyük luteal hücrelerde aktif durumda olan protein kinaz A bu hücrelerde bol progesteron salınımının nedeni olabilir (Diaz ve ark. 2002). Ek olarak BLH'lar KHL'lardan daha az sayıda LH reseptörü bulduğundan, LH artışı zaman progesteron üretimini de artırır, minimal düzeydeki LH'dan etkilenmeden bazal düzeydeki progesteron salınımını sürdürür. BLH'lar uyarılmadığında KHL'lara kıyasla 20 kat daha fazla progesteron salınımı yaparlar (Luborsky ve Behrman 1985).

Büyüme faktörleri de büyük ve küçük luteal hücreler arasında hücre içi aracılar olarak işlev görürler. Temel fibroblast büyüme faktörünün, transforme edici büyüme faktörün, sinir büyüme faktörünün ve insülin benzeri büyüme faktörünün korpus luteumda hücreler arası haberleşmede rol oynadığı belirtilmektedir (Pate, 1996).

Progesteronun etkileri:

- T-lenfositlerini baskılayıp aynı zamanda da immünolojik reddi önleyerek, blastosist implantasyonunu kolaylaştırır
- Serviks salgısını azaltarak, viskoziteliğini artırır
- Tuba uterinaların motilitesini azaltır
- Isıyı arttırıcı etkisi bulunmaktadır
- Natriüretik etki gösterir
- Solunumu uyarır
- İnsülin salgısını artırır
- Progesteron uterus ve serviksin kasılmasını engeller, antiprogesterinler erken doğuma neden olmaktadır
- Nitrik oksit ile birlikte uterus kasılmasını baskılar
- Meme dokusunun gelişimini uyarır.

4.2.1.2. Östrojen

Östrojenler kimyasal yapı olarak "steroid" yapıda hormonlardandır ve ön maddeleri asetat ve kolesteroldür. 17-Beta-Östradiol, Östriol ve Östron olmak üzere başlıca üç çeşit östrojen tipi bulunur. Gelişmiş folliküllerden, granüloza ve teka interna hücrelerinden ve intersitisyel hücrelerden östrojen salınımı gerçekleşir. Az miktarda da korpus luteumdan östrojen salgılanır. Meme bezi ve üreme sisteminin büyüme ve gelişmesini sağlar. Gebelik boyunca, rat plasentası tarafından östrojen üretilmez.

4.2.1.3. Prolaktin

Süt üretimi hipofizden salgılanan prolaktin (Laktotrop hormon, LTH) adlı hormonun etkisiyle gerçekleşir. Progesteron prolaktinin bu etkisini engeller. Böylece doğum olayı gerçekleşene kadar, memelerin büyümesine karşın, süt üretiminin gerçekleşmemesini sağlar. Bunun sonucunda prolaktin hormonunun etkisi serbest kalır ve süt üretimi başlar.

4.3. Ovaryumlarda Anjiyogenez

Anjiyogenez ovülasyon sırasında üreme sisteminde, korpus luteumun gelişmesinde, embriyogenesiste, laktasyonda, bağışıklık yanıtı sırasında, inflamasyon ve yara onarımı sırasında oluşabilen fizyolojik bir süreçtir. Anjiyogenez filizlenme ve/veya invazyonların kılcal damarlar içinde bölünmesiyle ya da dallanmalar şeklinde oluşur. Bu süreçte, proteinler ve büyüme faktörleri endotel hücrelerin bölünmesini teşvik eder, oluşturulan uyarana doğru göç ederek tübüler yapılarına farklılaşırlar. Endotel hücrelerinin kendileri de dahil olmak üzere, çeşitli hücreler tarafından salgılanan ekzojen veya endojen uyarılara yanıt olarak ve yerel olarak üretilen otokrin ve/veya parakrin fonksiyonları da vardır. Endotel hücre yüzeyi üzerindeki reseptörler ile etkileşime giren proteinler ve büyüme faktörleri, doğrudan (Bhadada ve ark., 2011) diğer hücreleri çekerek ve etkileşime girerek ya da dolaylı olarak anjiyogenezi teşvik edebilir. Bunlardan FGF (acid FGF/FGF-1), bFGF (temel FGF/FGF-2) ve VEGF günümüze kadar tanımlanmış en güçlü anjiyogenik büyüme faktörleridir (Hyder ve Stancel, 1999).

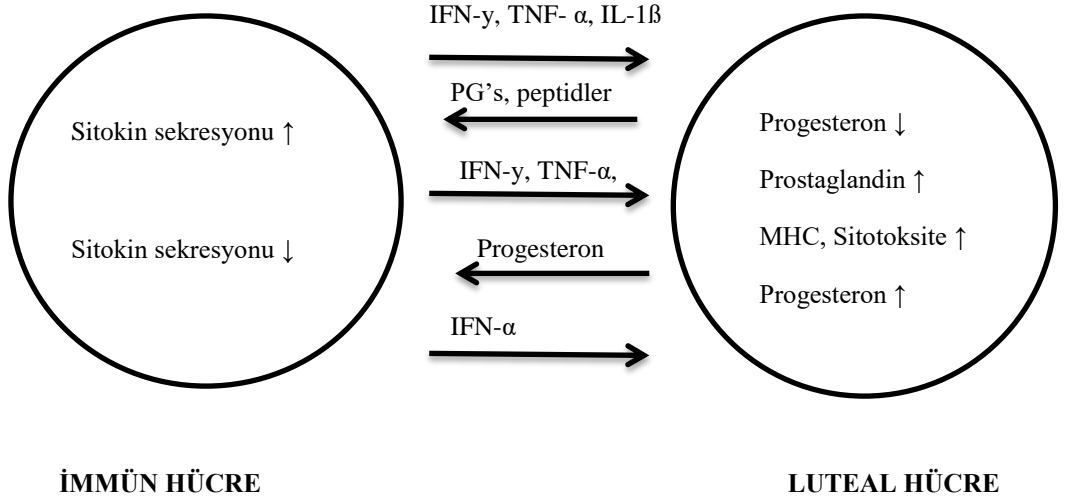
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü korpus luteumun olgunlaşmasını uyarak progesteron salgılanmasını sağlar. Uterus anjiyogenezi için de progesteron ve VEGF gereklidir. Ovaryumda korpus luteumun gelişmesi ve endokrin fonksiyonu yeni kapillerlerin büyümesine bağlıdır. Son çalışmalar korpus luteumun erken evrelerinde VEGF'in yüksek miktarda eksprese edildiğini göstermiştir. Ekspresyon orta-luteal fazda azalmakta olup, VEGF'in uterus anjiyogenezi ve korpus luteum gelişiminin uyarılmasında kilit bir role sahip olduğu bilinmektedir. VEGF inhibisyonu sıçanlarda uterus anjiyogenezi, korpus luteum gelişimini ve progesteron salgılanmasını tümüyle baskılamaktadır. Endotel hücreleri için önemli bir mitojen olan ve migrasyon etkisine

sahip bu faktör, fizyolojik olarak ovulasyondan hemen önce ovaryum folliküllerinden salgılanarak yeni damarların oluşumunu arttırırken, ovulasyondan sonra bu salgılama görevini korpus luteum üstlenir. Erken implantasyon döneminde ise embriyo trofoblastlarınca salgılanır (Tamanini ve De Ambrogi 2004).

Ovaryumlarda teka ve/veya granüloza hücreleri tarafından VEGF'in üretildiğini bildiren çalışmalara göre VEGF folikül büyümesinin düzenlenmesinde de önemli olabilir. Gonadotropinlerin, granuloza hücreleri tarafından VEGF üretimini teşvik ettiği de gösterilmiştir. Sıçanlar ve primatlarda, granuloza hücreleri tarafından VEGF ekspresyonunun takibi ile LH ovulasyon dalgalanmaları kolayca görülür. İnsanlarda LH yükseldiği zaman, foliküler sıvıda VEGF konsantrasyonlarında da artış gösterilmiştir. Buna ek olarak, FSH ve hCG uygulamasını takiben foliküler sıvıdaki VEGF konsantrasyonu ile foliküler sıvıdaki progesteron konsantrasyonları birbirleriyle ilişkili bulunmuştur (Danforth ve ark., 2003). Sıçanlarda KL oluşumu sırasında steroidojenik luteal hücrelerde VEGF ekspresyonu belirgin olarak artmaktadır. Dahası, VEGF reseptör blokerleri luteal vasküler proliferasyonu kesintiye uğratır (Reynolds ve Redmer 1998).

4.4. Ovaryumda İmmün Olaylar

Luteal hücreler ile immün hücreler arasında iki yönlü bir ilişki vardır. Korpus luteumdaki immün hücrelerin fonksiyonu, luteal hücreler tarafından üretilen prostaglandinler, peptidler ve steroidler tarafından düzenlenir. İmmün hücreler INF- γ , TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlerin sekresyonunu arttırdığında, INF- γ , TNF- α gibi sitokinler luteal hücreleri öldürerek üretilen progesteron üretimini azaltırken aynı zamanda prostaglandin sentezini artırırlar. İnterferon- α da bunun aksine luteal hücrelerde progesteron sentezini artırma eğilimindedir. Prostaglandinler (özellikle PGE₂), immün hücreleri sitokin sekresyonu ve hücre proliferasyonu için uyarmaya eğilimli iken, progesteron genellikle hem immün hücre fonksiyonunu hem de sitokinlerin neden olduğu prostaglandin üretimini baskılar (Şekil 7) (Pate, 1996).



Şekil 4.1. Bağışıklık hücreleri ve luteal hücreleri arasındaki etkileşim (Pate 1996).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Dişi Ratlara Süperovulasyon Yapılması

Araştırmanın etik onayı Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı (2014/30). Deneyde Sprague Dawley cinsi dişi luteal hücreleri izole etmek için 25-30 günlük, adacık hücreleriniz izole etmek için ise 3 aylık erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar *ad libitum* olarak beslendi ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamlarda tutuldu.

Luteal hücre elde etmek amacıyla her bir denemede 6 adet sıçan kullanıldı ve aynı prosedür 3 kez tekrar edildi.

Süperovulasyon amacıyla 30 IU/kg PMSG ve 53 saat sonra 25 IU/kg hCG ip olarak verildiğinde korpus luteum maksimum etkinliğine ulaştığı için 6. günde anesteziyi takiben ovaryumlar alındı.

5.2. Luteal Hücre Kültürü Medialarının Hazırlanması

Stok mediyumu: Dulbecco'nun modifiye Kartal mediyumu (DMEM) / HAM'S F-12 mediyumu (Biological Industries SKU: 01-170-1A) + %1 antibiyotik antimikotik (GİBCO kat no: 15140122) karışımı ilave edilerek hazırlandı.

Enzim Solusyonu: 500 µl Pulmozyme İnhalasyon Solüsyonu (Roche) , % 0.5 BSA (Sigma Aldrich kat no: A-3983-100G) ve stok mediyumu 20 ml'si bir karıştırıcıda karıştırıldı.

Kültür Mediyumu: F12/DMEM içine % 10 FBS (Gibco, kat no: 10082139) ve %1 pen-strep eklenerek, medyum kültürden önce 22 µm lik filtreden süzüldü.

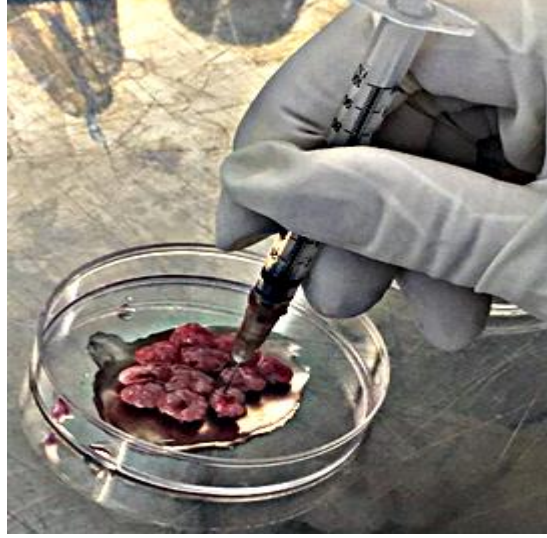
Daha sonra enzim solüsyonundan 5 ml alınıp 10 mg tip 2 kollojenaz (Sigma-Aldrich, kat no: C6885) üzerine koyuldu. Hücreleri mediyuma koymadan önce kollojenazlı mediyuma en az 2 dakika % 95 O₂ ve %5 CO₂ verildi. Kollojenazlı karışım her seferinde taze olarak hazırlandı.

5.3. Luteal Hücrelerin Elde Edilmesi

Süperovulasyon yapılan dişi ratların ovaryumları anesteziyi takiben çıkarıldı. Ovaryumlar soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırıldıktan sonra ovaryumlar çevre dokuları temizlendikten sonra 26 G lik iğne ovaryuma batırılarak ve PBS ile yıkanarak granulosa hücreleri ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra ovaryum % 0.25 lik Tripsin-EDTA solusyonu içerisinde 37 C de %5 CO₂ li ortamda 15 dk inkübe edilerek ovaryum yüzeyindeki epitel hücrelerden kurtulması sağlandı. Sonrasında da PBS ile yıkayıp DMEM' e alındı, laminar flow altında tüm dokular küçük parçalara bölündü. Steril 70 µm nylon cell strainer (BD Biosciences) den geçirilerek dokular mediumdan ayrılarak üzerine biraz daha medium koyularak filtrenin üzerinden doku iyice yıkandı. Filtrenin üzerinde kalan kısım (doku parçaları) 25 ml lik bir erlenmayere koyuldu. Hücrelerin üzerine yukarıda hazırlanmış olan 5 ml lik kollojenazlı karışımdan eklenerek ve daha sonra hücreler 37 °C çalkalamalı su banyosunda 1 saat inkubasyona bırakıldı ve her 10 dk da bir cam pastör pipeti ile karıştırıldı. Supernatant alınarak bir falkon tüpünde biriktirildi. Kalan doku tekrar 10 mg kollojenaz' a eklenmiş 5 ml medium ile karıştırıldı ve 1 saat inkübe edilerek ve üstteki sıvı tüpe aktarıldı (bu işlem 3 kez tekrarlandı). Filtre edilen hücreler 200 g (1400 devir/dk) de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Kalan hücrenin bulunduğu tüpe 15 ml taze medium ilave edildi ve tekrar hafifçe karıştırılarak, santrifüj işlemi 3 kez tekrarlandı (O'Shaughnessy ve Wathes, 1985).



Şekil 5.1. Süperovülasyonun son gününde ovaryumların görüntüsü



Şekil 5.2. Ovaryumlardaki foliküllerin patlatılarak enzimatik sindirime hazır hale getirilmesi

5.4. Percoll Dansitesi

1,5 M NaCl solüsyonu hazırlama: 0,88 gr ı 10 ml ye tamamlandı.

0.15 M NaCl solüsyonu hazırlama: 0,44 gr NaCl yi steril DS ile 50 ml ye tamamlandı.

Percoll solüsyonu hazırlanışı:

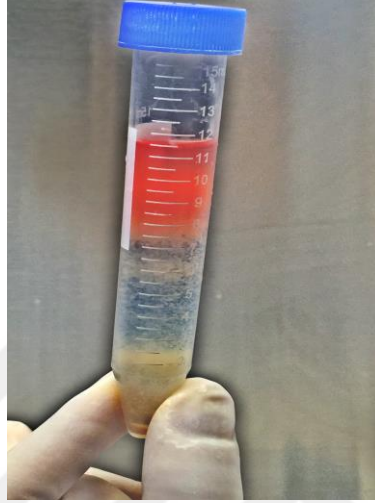
Bir kısım 1,5M NaCl solüsyonunu 9 kısım percoll ile karıştırarak izotonik percoll solüsyonu hazırlandı. Aşağıdaki tablodan yararlanarak 5'er ml % 20, 30 ve 40 lık percoll solüsyonu etiketli ve steril tüp içinde hazırlandı.

Çizelge 5.1. Percoll dansite oranları ve kullanılan NaCl miktarları.

Oran	SIP V_i	0.15M NaCl V_Y	Dansite
%40	2,00 ml	3,00 ml	1.052
%30	1,5 ml	3,50 ml	1.040
%20	1,00 ml	4,00 ml	1.028

Yukarıdaki tabloya göre hazırlanan solüsyonlar iyice karıştırıldı. Tüpün en dibine % 40'lık solüsyon gelecek şekilde sırasıyla her bir solüsyondan 3 ml üst üste tabaka oluşturacak şekilde yerleştirildi. En üste de daha önceden hazırlanmış hücre süspansiyonu (2 ml) eklendi. Hücreler dansiteye eklenmeden önce hücrelerin

birbirine yapışmamış ve iyice ayrışık olduklarından emin olunmalıdır. Hücreler 400 g de 10 dakika, frensiz olacak şekilde santrifüj edildi. Ayrışan hücre tabakaları incelenip değerlendirildi. BLH %30-40 arası-KLH %30-20 arasından bir falkon tüpe toplandı.



Şekil 5.3. Yeni izole edilen luteal hücrelerinin dansite işlemi sonrasında tabakalaşması.

5.5. Hücrenin Canlılık Oranının Belirlenmesi ve Hücre Sayım Protokolü

1 ml hücre mediası içinden 10 μ l hücre süspansiyonu alındı, üzerine 10 μ l trypan blue koyup, karıştırılarak thoma lamı ile canlı-ölü hücre oranı belirlendi. Boya almayan hücreler canlı hücrelerdir. Son bulunan rakam sulandırma oranı ile çarpıldı.



Şekil 5.4 Taze izole edilen Luteal hücrelerin Tripan blue boyası ile boyanarak canlılık tayini ve sayımı.

5.6. Luteal Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Luteal hücrelerin 0. saati: Luteal hücreler izole edildikten sonra 3 wellin her birine 10^5 hücre üzerine 5 ml %10 FBS içeren F12/DMEM olacak şekilde 6 kuyucuklu pleytlere alındı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Böylece luteal hücrelerin pleyte yapışması sağlanırken, 24 saat sonra bunların dışındaki hücreler ortamdan elimine edildi.



Şekil 5.5. Kokültür kabı içerisinde adacık ve luteal hücrelerin konumu.

5.7. Luteal Hücrelerinin Steroid Boyaması

Paraformaldehit Solusyonunun Hazırlanışı:

200 ml distile suya 2 gr formaldehit ve 1,8 gr NaCl eklendi. (Bao ve ark., 1995).

PBS (0.01 M) in Hazırlanışı (Sigma P4417)

200 ml distile su içine 1 adet PBS tableti eklendi. Manyetik karıştırıcıda eriyinceye kadar karıştırıldı.

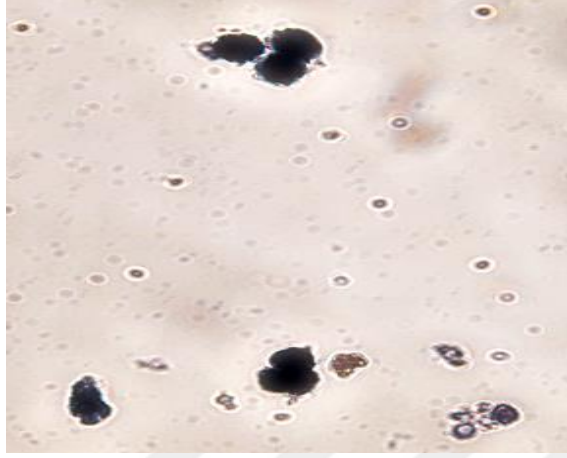
Boya solusyonunun hazırlanması:

0.01 M 'lik PBS ile 0.1 %BSA, 1.5 mM NAD, 0.25 mM nitro blue tetrazolium ve etanolde hazırlanmış 0.2 mM 5β -androsteneol-17 ile hazırlanır.

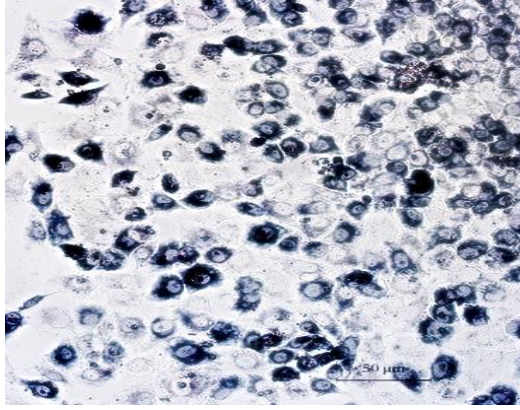
Hücrelerin Boyanması

Wellere yapışan hücreler paraformaldehit ile 20 dk tespit edildikten ve 3 kez PBS ile yıkadıktan sonra. üzerine 800 μ l boya solüsyonu eklendi. Alüminyum folyo ile petri

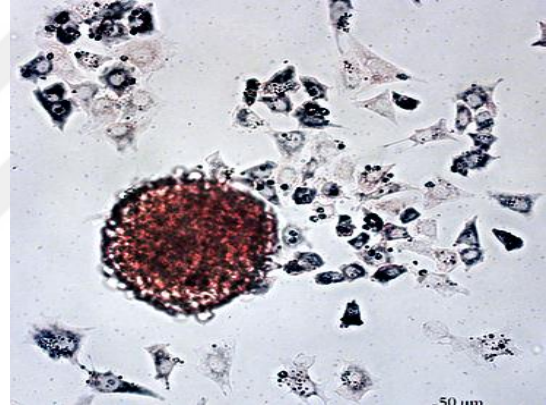
kabı kaplandıktan sonra, 37 derecede, karanlıkta 1 gece bekletildi. İnkubasyon sırasında boya alan hücreler steroid hormon üreten hücrelerdir (Payne ve ark., 1980).



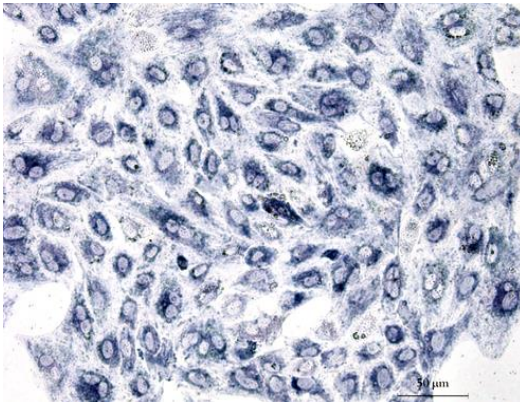
Şekil 5.6. Taze izole edilen luteal hücrelerin 3 beta HSD boyaması (10X)



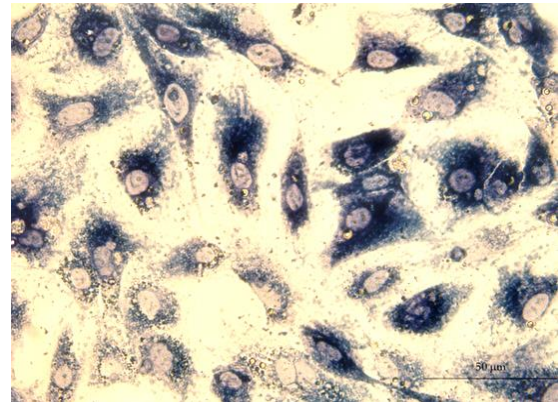
Şekil 5.7. 48 saat kültüre edilen luteal hücrelerin 3-beta HSD boyaması (10X).



Şekil 5.8. 48 saat kültüre edilen ve 3-beta HSD ile boyanan luteal hücreler ile Dithiozon ile boyanan adacık hücreleri (20X).

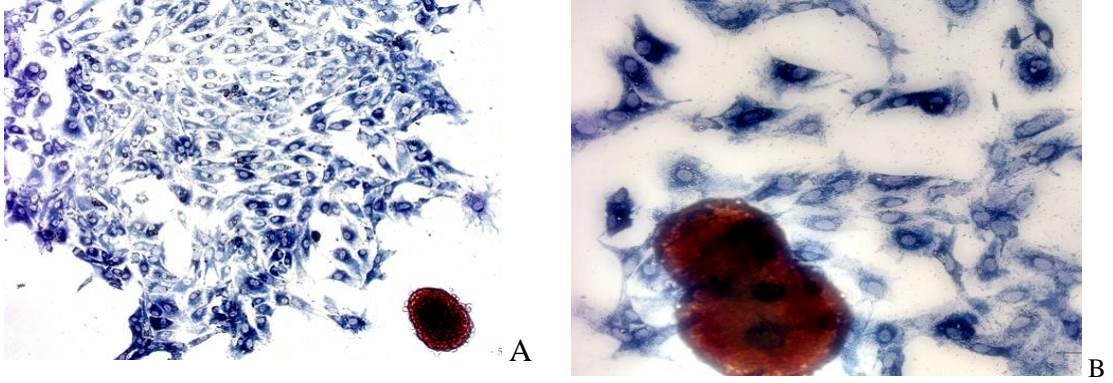


A



B

Şekil 5.9. 96 saat kültüre edilen luteal hücrelerin 3-beta HSD boyaması A. (10X), B. (40X)



Şekil 5.10. 48 saat kültüre edilen ve 3-beta HSD ile boyanan luteal hücrelerle Dithiozon ile boyanan adacık hücreleri. (A:10X; B:20X)

5.8 Adacık Hücrelerinin İzolasyonu:

Yıkama solusyonlarının hazırlanması

Solusyon 1: 500 ml'lik Hank's Buffered Medium (fenol redsiz HBSS, Lonza) içine; 50 ml fetal bovine serum (%10) (FBS, Lonza) yavaşça ve köpürtmeden konuldu. Ardından içine 5 ml penisilin/ streptomisin/amp (%1) (Lonza) ve 5 ml L-glutamin (%1) (Lonza) eklendi.

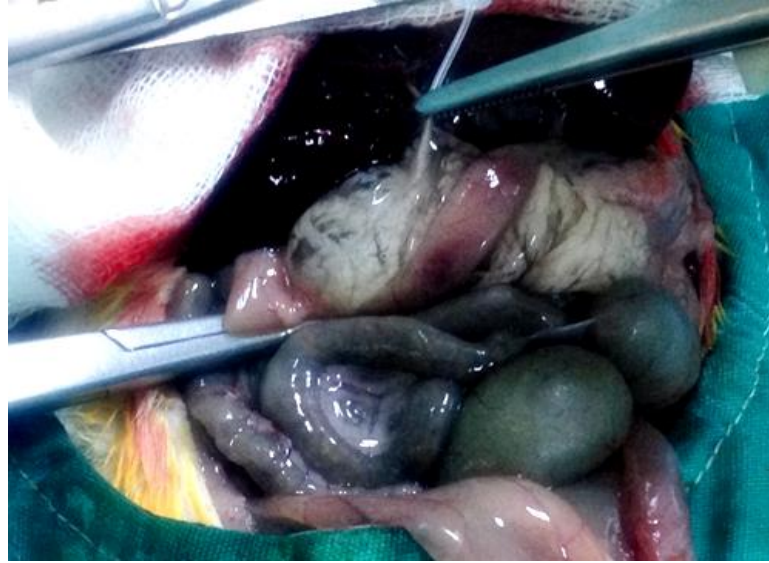
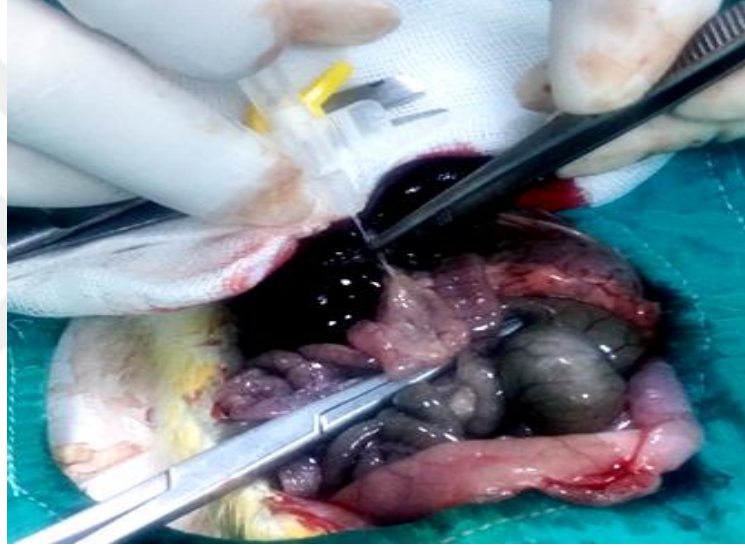
Solusyon 2: 500 ml Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640 with L glutamin, Lonza) içine 50 ml FBS (%10) köpürtmeden yavaşça konuldu. (%1)(Lonza) ve 5 ml L-glutamin (%1) (Lonza) eklendi.

Ditizon (DTZ) boyası: 10 g DTZ (Sigma) ile 5 ml DMSO tüpe eklendi. Karışımın üzerine 25 ml HBSS eklenir. Tüm karışım bir enjektöre çekilerek ucuna 0,4 µm filtre takılır ve filtreden geçirildi. DTZ boyası günlük kullanım için ependorf tüplerine alikotlandı.

Kollagenaz hazırlanması: 1000 g lık kollegenaz V (Sigma- C9263) içinden 50 mg kollegenaz alınarak 50 ml'lik falkon tüpüne koyuldu. Üzerine 50 ml'ye kadar HBSS w/Ca ilave edildi.

Adacık hücreleri luteal hücrelerin inkübasyonunun 24. saatine denk gelecek şekilde izole edildi. Bu amaçla her bir izolasyonda 12 adet olmak üzere 36 adet erkek sıçan kullanıldı

Öncelikle anestezi edilmiş sıçanlar baş yukarıda sırt üzeri yatırıldı karın bölgesi açıldı. Karaciğer gazlı bez arasında göğüs kafesine doğru alınıp pankreatik ductus belirlendi. Duodenuma açılan ampula water kleplendi. 10 ml vidalı enjektöre daha önceden hazırlanan 7 ml kollegenaz tip V (Sigma Aldrich) çözeltisi alındı. İntraket ductusa yerleştirildi ve enzim yavaş yavaş enjekte edilip pankreas şişirildi. İşlem tamamlandıktan sonra, göğüs kafesi altından kalp kesilerek ötenazi yapıldı. Hızla pankreas diğer dokulardan ve organlardan ayrıştırıldı. Pankreas 50 ml lik falkon tüpe alınarak 37 °C de su banyosunda 18 dakika inkübasyonu yapıldı (Liao ve ark., 2012).



Şekil 5.11. Sıçan pankreasının duktusunun kanüle edilmesi ve enzim ile şişirilmesi.

İnkübasyon sonunda %10 FBS, %1 lik antibiyotik antimikotik içeren RPMI 1640 mediumu ile yıkama yapıldı. Yavaş frende 1000 rpm de 1 dakika santrifüj yapılır. çelik elekten (425 µm'lik) süzülerek huniden 50 ml lik falkon tüpe alındı. Medium ile yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı (Dagli Gul ve ark.,2013).



Şekil 5.12. Enzim ile şişirilen pankreasın bir bütün olarak çıkarılması.

5.9. Dansite aşaması

Ficoll 1100 – 1077 ve serumsuz RPMI 1640 ile yapıldı. 2400 rpm de 12 dakika frensiz santrifüj edildi. Dansite aşamasından sonra, 1000 rpm de yavaş frende 1 dakika santrifüj yapıldı. Aynı işlem iki kez daha tekrarlandı (Liao ve ark., 2012).

5.10. Hücrelerin sayılması

60x15 mm'lik petri kaplarına 5 ml hacminde hücre ile media alındı. Mikropipet yardımıyla hücreler tek tek (Handpicking) toplandı.

5.11. Adacık+Luteal Hücre Ko-Kültür Çalışması

Luteal hücreler inkübasyonlarının 24. saatine denk gelecek şekilde izole edilmiş olan adacık hücreleri ile kokültüre edildi.

Kokültür Mediumu: RPMI-1640 (25mM HEPES li) içine 22 µm lik filtreden süzülerek % 1 ITS ve %1 pen-strep, %1 L glutamin ve 2,5 ml HEPES eklenerek 100 ml ye tamamlandı.

Deney planına göre gruplar aşağıdaki gibi hazırlandı.

1. Sadece luteal hücre (5 well): Her wele 10^5 hücre+5 ml F12/DMEM mediumu olacak şekilde kültüre başlandı. Medyuma %1 antibiyotik ve %10 fetal sığır serumu (FBS) eklendi. 24 saat sonra luteal hücreler pleyte yapıştıktan sonra kültür medyumu olarak RPMI değiştirildi . İlk 3 well ELİSA analizleri için, 4. well hücrelerin 48. saatteki boyanmalarını göstermek için, 5. well de 96. saatteki boyanmalarını göstermek için kullanıldı.
2. Sadece adacık hücre (9 well): Her bir wele 150 adet adacık hücresi+5 ml RPMI 1640 solusyonu eklenir. Medyuma %1 antibiyotik ve %1 ITS eklendi. İlk 3 well medyumları ELİSA analizleri için, 2. 3 welldeki hücreler 48. saatteki CD 31, tolerans, canlılık ve boyama için, 3. 3 welldeki hücreler 96. saatteki CD 31, tolerans, canlılık ve boyama için kullanıldı.
3. Luteal hücre+adacık hücresi kokültürü (9 well): 24 saatte pleyte yapışmış olan luteal hücrelerin üzerine kokültür insert koyularak 150 adet adacık hücresi eklendi ve üzerine %1 antibiyotik ve %1ITS içeren medium ilave edildi. İlk 3 well medyumları ELISA analizleri için, ikinci 3 welldeki hücreler 48. saatteki CD 31, tolerans, canlılık ve boyama için, üçüncü 3 welldeki hücreler 96. saatteki CD 31, tolerans, canlılık ve boyama için kullanıldı.

Çizelge 5.2. Gruplarda analizlerde kullanılan hücre sayıları ve yapılan analizler

	örnek	0.saat	48.saat	96.saat
IL-10	LH medyumu, adacık hücre medyumu, kokültür medyumu		+	+
VEGF			+	+
bFGF			+	+
P4	LH medyumu, kokültür medyumu	+	+	+
Canlılık	adacık hücre, kokültürdeki adacık hücre	+	+	+
Tolerans		+	+	+
CD31			+	+

Her bir grubun 0., 48., ve 96. saatlerinde ilk 3 wellden medyum örnekleri alınarak, medyumlar -20 C' de depolanıp ve media değiştirme işlemi yukarıdaki gibi tekrar edildi. Bütün örnekler toplandıktan sonra elisa analizleri yapıldı.

5.12. Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) ile Hücrelerin Canlılığına Bakılması

Adacık hücrelerinin canlılığının değerlendirilmesi iki reaktif boyanın belli oranlarda karıştırılarak muamele edilmesi ile yapıldı. 30x15 mm petri kabının içerisine 918 µL PBS (pH 7.4) solüsyonu koyuldu. Üzerine 90 µL adacık örneği eklendi. 20 µL FDA stok solüsyonundan, 20 µL de PI stok solüsyonundan ilave edilerek karanlık ortamda 5 dakika saklandı. Floresan mikroskopunda 40-20-10 büyütmede canlılıkları belirlendi. Kullanılan floresan boyaların yeni derişimleri 0.46 µM FDA ve 14.34 µM PI oldu. Her bir analiz için en az 8-10 hücre canlılığına bakıldı. Fotoğrafları çekilen canlı ve ölü hücreler üst üste karşılaştırılarak MATLAB programı ile % canlılık hesabı yapıldı (Bank, 1987; Dagli Gul ve ark.,2013) (Şekil 6.1-5).

5.13. Glikoz Stimulasyon Testi

Yükselen glukoz düzeylerine yanıt olarak insülin salınımı, adacıkların kritik biyolojik fonksiyonudur. *İn vitro* ortamda fonksiyonel adacıkların düşük glikoz konsantrasyonuna düşük oranda insülin, yüksek glikoz konsantrasyonuna ise yüksek oranda insülin salınımı vermesi hedeflenmektedir.

Adacık hücreleri izole edildikten hemen sonra taze olarak, diğer saatlerde de kültürden petri kablarna alınarak işlemler yapılır. Düşük 3,3 mM ve yüksek 16,7 mM glikoz konsantrasyonlarını içeren krebs solüsyonu hazırlandı. 24 kuyucuklu petri kablarna da ayrı bir grup olarak 8 µm lik elekler yerleştirildikten sonra üzerine 15 adet 100-150 µm boyutunda adacık yerleştirildi. İlk olarak düşük glikozlu ortamda inkübe olduktan sonra ependorf tüpüne örnek alındı. İnsert yüksek glikoz içeren krebsin içine daldırıldı ve 1 saat daha inkübe edildi. İnkübasyon sonunda ependorf tüpüne örnekler alındı ve ELİSA çalışılana kadar -20 derecede bekletildi.

5.14. ELISA

Kültür süpernatantlarından alınan örneklerde progesteron (DRG progesterone ELISA EIA-1561), insülin (Rat/Mouse Insulin ELISA, Millipore cat no: EZRMI 13K), VEGF (Abcam ab100786 – VEGF Rat ELISA Kit), bFGF (RD system cat no: MFB00 Quantikine®ELISA) ve IL10 (Sigma AldrichRAB0246) analizleri yapıldı.

5.15. Flow Sitometri ile CD31 Analizi

Hücrelerdeki damarlanmayı gösteren boyalardan biri CD31 boyasıdır. Kontrol ve numune olarak 2 tüp hazırlandı. Her ikisine de hücreler (100 adacık) alındı ve 2 kere soğuk PBS ile 3500 rpm de 5 dk yıkandı. Hücreler 500 µl %0,25'lik tripsin EDTA (1 ml) ile 15 dk çalkalamalı su banyosunda tek hücre haline getirildi. Hücreler 2 kere (1 kez de olabilir) PBS (% 3 BSA lı) ile yıkandıktan (3500 rpm de 5 dk) sonra flow tüpü içerisinde resuspanse edildi (100ul olacak şekilde 100 ul içindeki 100 adacık üzerine Primer antikor (BD Mouse anti rat CD31, TLD 3A12) 10 µl / 10⁶ hücre ilave edildi. Oda ısısında ya da 4 ° C'de karanlıkta 40 dk inkübe edildi. 3500 rpm de 5 dk 9 hız 9 fren de hücreler soğuk PBS ile 3 kere yıkandı. BD FITC rat antimouse IgG (A85-1) seyreltmeden hücrelerin üzerine 4 µl konuldu. Oda ısısında ya da 4 ° C'de karanlıkta yarım saat inkübe edildi. 3500 rpm de 5 dk 9 hız 9 fren de hücreler soğuk PBS ile 1 kere yıkandı. 300 µl kadar sıvı ile flow tüplerine aktararak tüpler de yıkama işlemi gerçekleştirildi ve en son 600 µl kadar PBS kalacak şekilde BD Facs Aria II cihazında ölçüme götürüldü. Karanlıkta 4 ° C 'de hücre süspansiyonları analize kadar saklandı. En iyi sonuç için, en kısa sürede flow sitometride hücreleri analiz edildi.

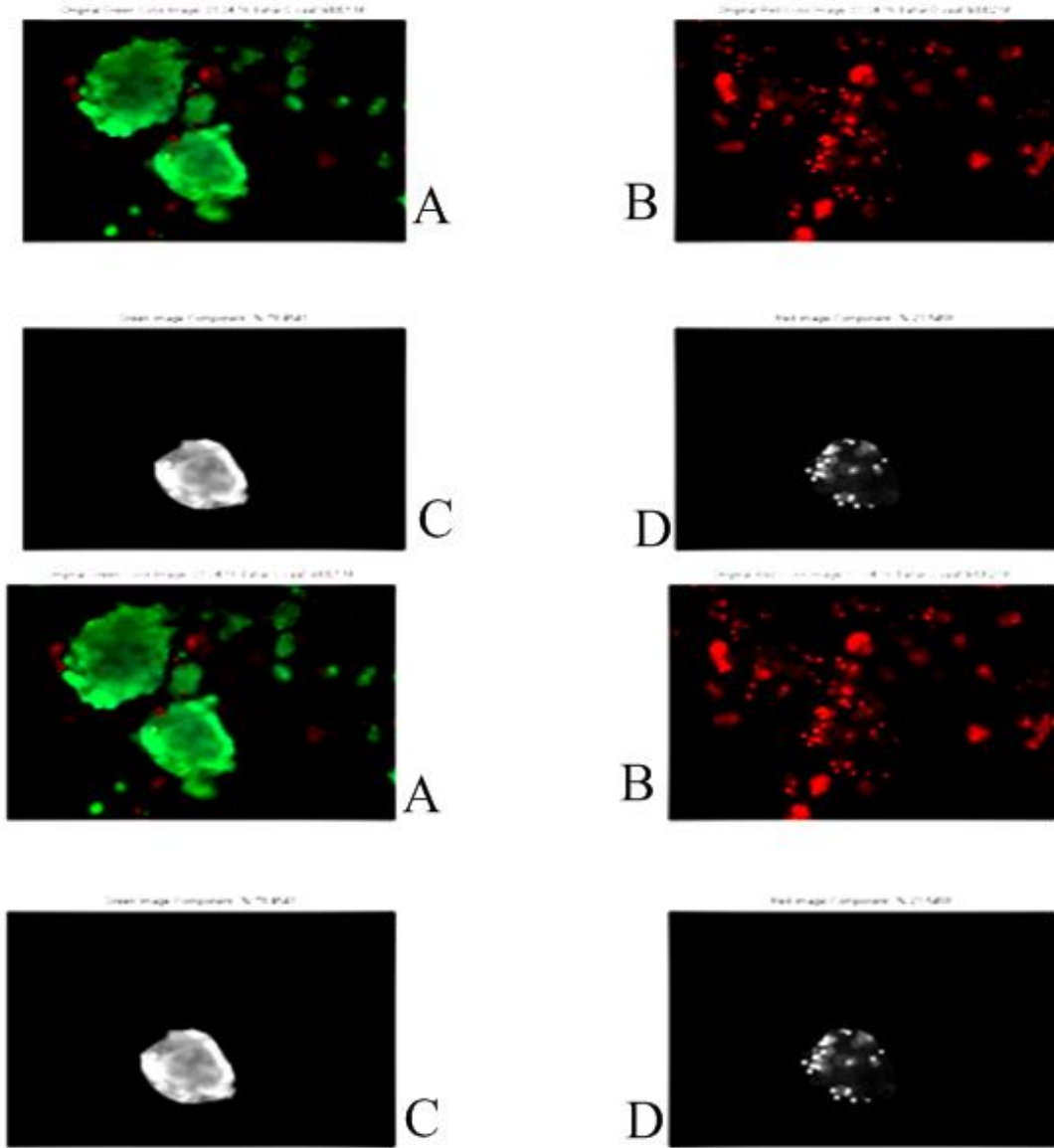
İstatistiksel Analiz

Tüm değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verildi. İstatistiksel analizleri Graphpad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA) paket programı ile yapıldı. Gruplara ait istatistiksel hesaplamalar ve grupların ortalama değerleri arasındaki farklılıkların önemliliğini belirlemek için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı. Gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Tukey testi kullanıldı. P<0.05 önemli olarak kabul edildi.

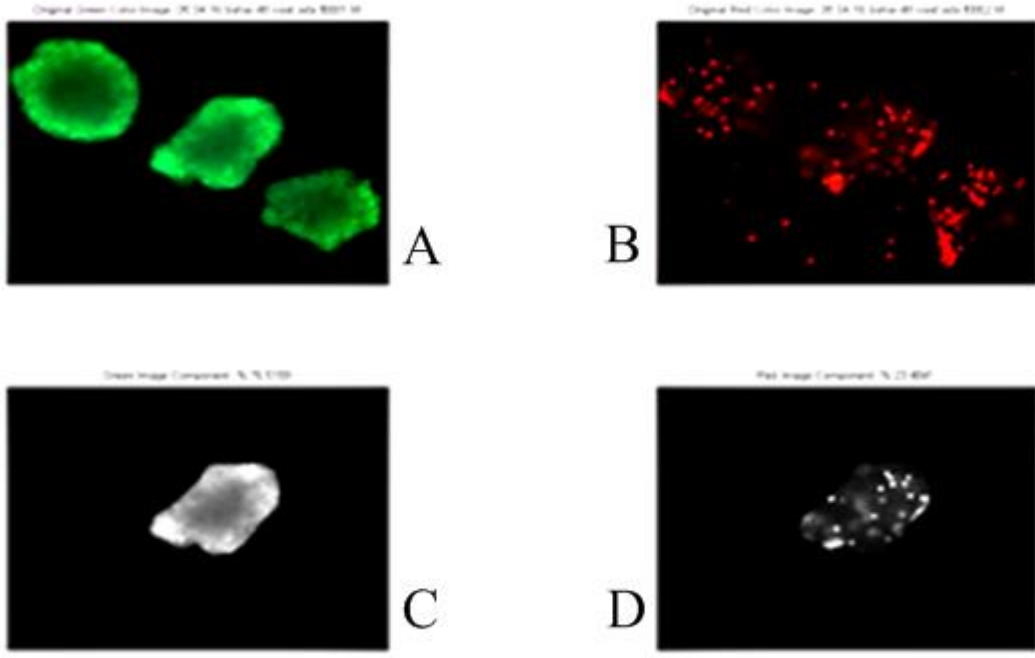
6. BULGULAR

6.1. Canlılık Analizi

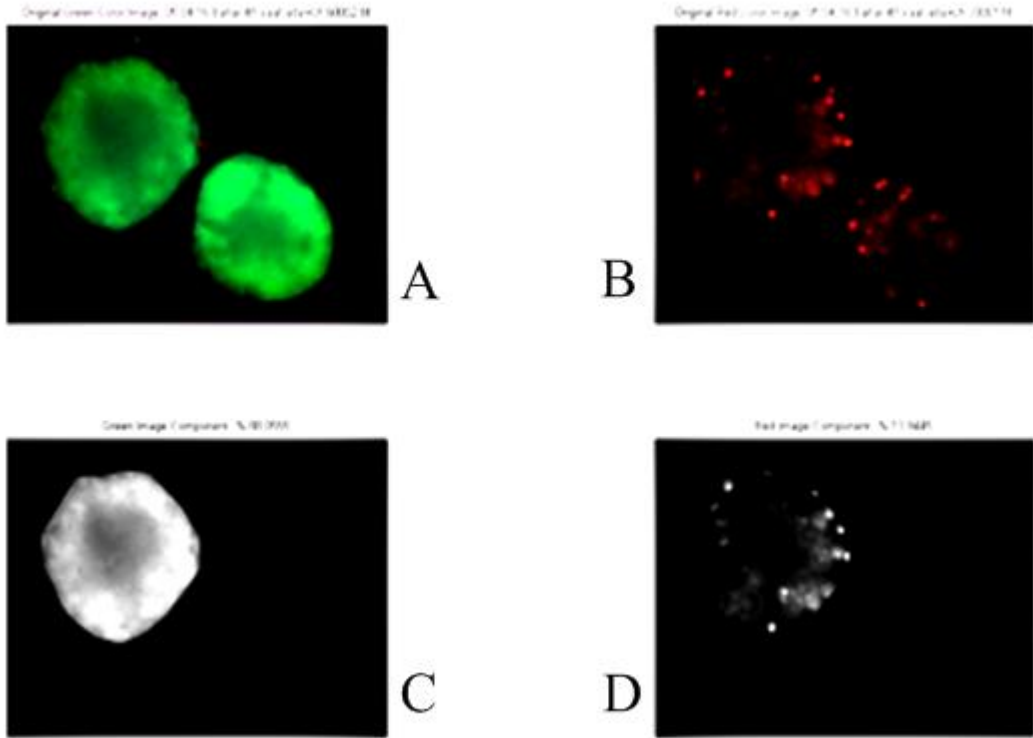
FDA ve PI boyaması yapıldıktan sonra adacık hücrelerine MAT-LAB programı ile canlılık tayini yapıldı. Her grupta eşit sayıda hücre incelendi. Canlılık sonuçları incelendiğinde özellikle 48. saatte lueal hücrelere beraber kültüre edilen adacıkların canlılığının anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p < 0,005$).



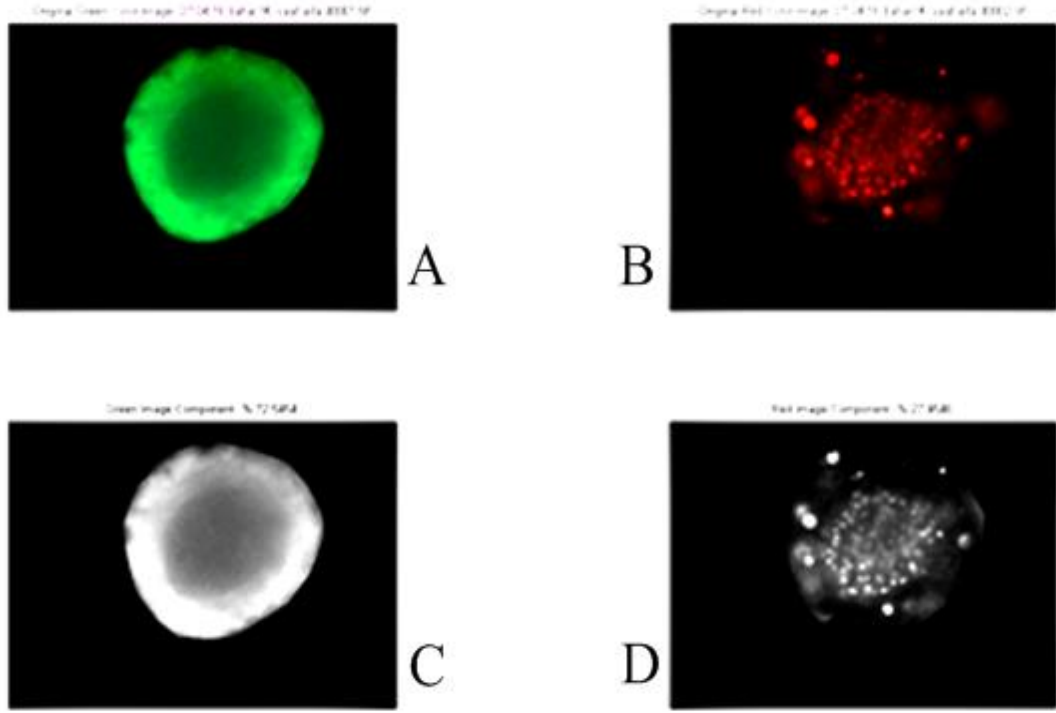
Şekil 6.1. 0. saatte kültüre edilmeden önce adacık hücrelerinin canlılığı
A. FDA ile yeşil boyanmış canlı hücreler, B: PI ile kırmızı boyanmış ölü hücreler
C. Matlab programı ile hesaplanan canlı hücre oranı: %81
D. Matlab programı ile hesaplanan ölü hücre oranı. (20X)



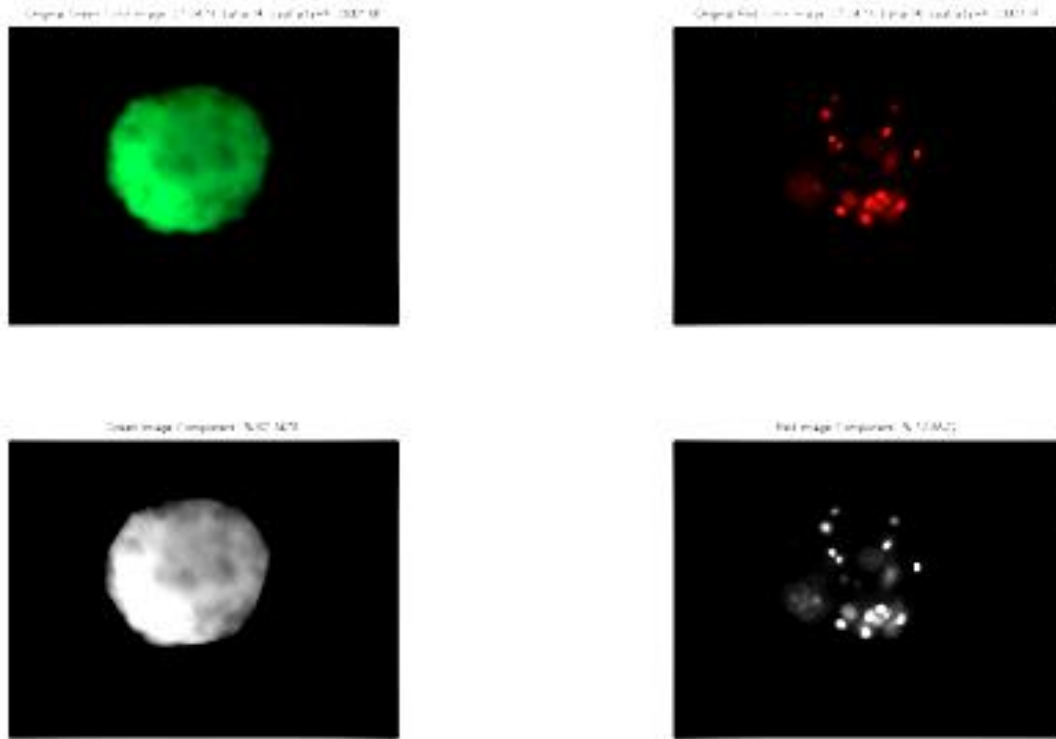
Şekil 6.2. 48. saatte kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı.
 A. FDA ile yeşil boyanmış canlı hücreler, B: PI ile kırmızı boyanmış ölü hücreler
 C. Matlab programı ile hesaplanan canlı hücre oranı: %79.3
 D. Matlab programı ile hesaplanan ölü hücre oranı. (20X)



Şekil 6.3. 48. saatte luteal hücreler ile kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı.
 A. FDA ile yeşil boyanmış canlı hücreler, B: PI ile kırmızı boyanmış ölü hücreler
 C. Matlab programı ile hesaplanan canlı hücre oranı: %85
 D. Matlab programı ile hesaplanan ölü hücre oranı. (20X)

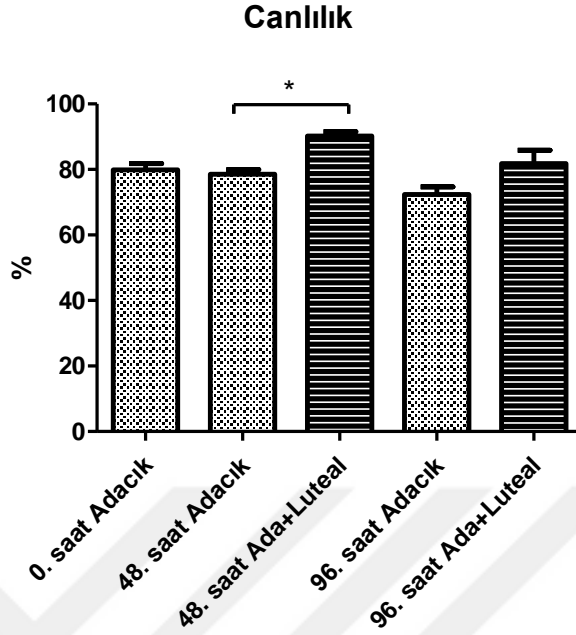


Şekil 6.4. 96. saatte kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı.
 A. FDA ile yeşil boyanmış canlı hücreler, B: PI ile kırmızı boyanmış ölü hücreler
 C. Matlab programı ile hesaplanan canlı hücre oranı: %70
 D. Matlab programı ile hesaplanan ölü hücre oranı. (20X)



Şekil 6.5. 96. saatte luteal hücreler ile kültüre edilen adacık hücrelerinin canlılığı.
 A. FDA ile yeşil boyanmış canlı hücreler, B: PI ile kırmızı boyanmış ölü hücreler
 C. Matlab programı ile hesaplanan canlı hücre oranı: %83
 D. Matlab programı ile hesaplanan ölü hücre oranı. (20X)

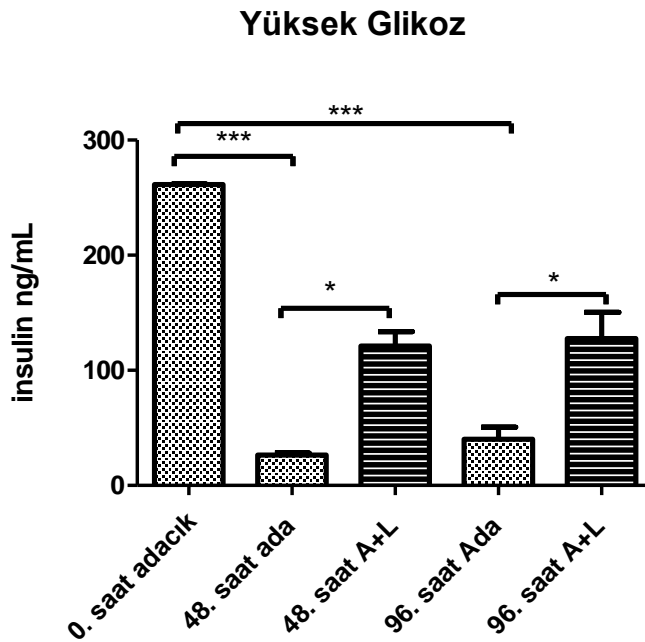
Çizelge 6. 1. Adacık hücrelerinin izolasyondan hemen sonra (0. saatte), 48. saatte ve 96. saatteki FDA/PI canlılık değerleriyle 48. ve 96. saat kokültürlerdeki FDA/PI canlılık analizleri *: P<0.05



6.2. Glikoz Stimulasyon Testi Analizleri

Kokültüre edilen adacık hücrelerinin yüksek glikoz konsantrasyonlarına karşı verdikleri cevap istatistiksel olarak incelendiğinde 0. saatte yüksek olan glukoz salınımının 48 ve 96. saatlerde önemli oranda azaldığı görüldü (P<0.05).

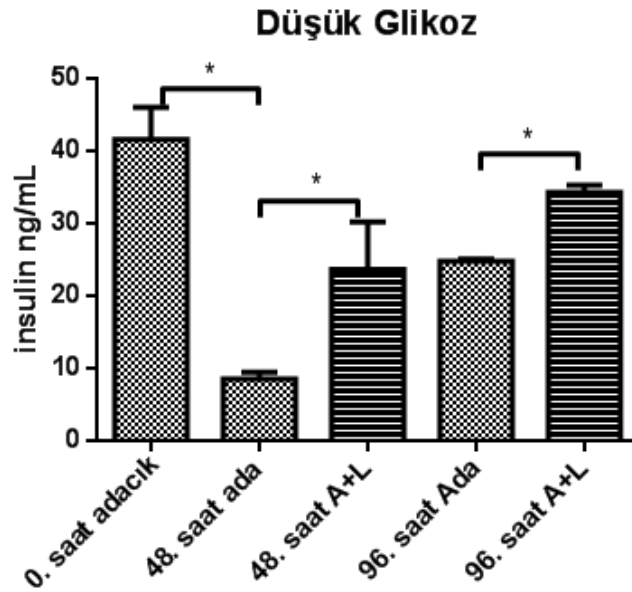
Çizelge 6. 2. 48 ve 96. saatlerde 16.7 mM glikoza karşı adacık hücrelerinin verdiği cevap. *: P<0.05



48.ve 96. saatlerde adacık ve kokültür gruplarının yüksek glukoza karşı insülin salınımları ise istatistiksel olarak $P<0.05$ oranında arttı (Çizelge 6. 2).

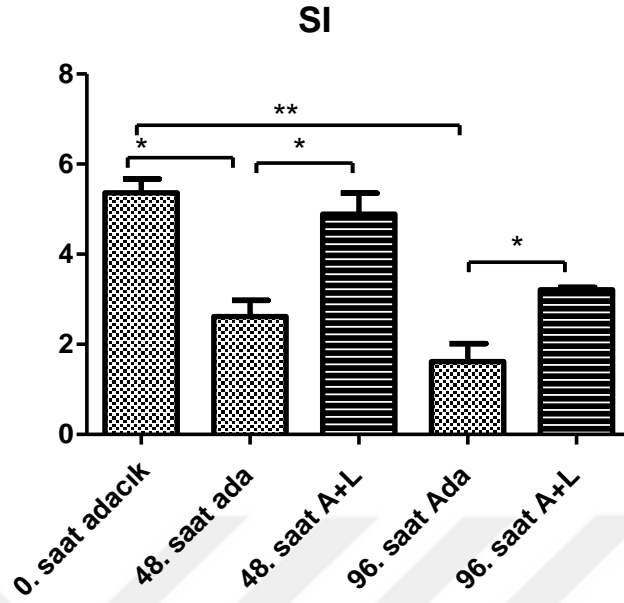
Adacık hücrelerinin düşük glikoza verdikleri yanıt incelendiğinde ise, insülin salınımındaki düşüşün 48. saatte daha belirgin olduğu belirlendi ($P<0.05$). Kokültür gruplarında ise adacık gruplarına göre insülin salınımı önemli oranda arttı ($P<0.05$) (Çizelge 6. 3).

Çizelge 6. 3. 48 ve 96. saatlerde 3.3 mM glikoza karşı adacık hücrelerinin verdiği cevap*: $P<0.05$



Stimülasyon indeksleri (SI) yani yüksek glikoz konsantrasyonunun düşük glikoz konsantrasyonuna oranlanması ile adacıkların genel olarak işlevsellik kapasitesi ölçüldü. Kokültüre edilmeyen adacık grubunun 96. saate kadar kademeli olarak işlevselliğinin azaldığı buna karşılık özellikle kokültüre edilen grubun 48. saatteki stimülasyon indeksinin neredeyse yeni izole edilen adacıklardakine benzer olduğu görülmüştür. Ayrıca kokültür grubunun 48. ve 96. saatlerdeki stimülasyon indeksinin yalnız adacık grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü ($p < 0.05$). (Çizelge 6. 4).

Çizelge 6. 4. 48 ve 96. saatlerde Stimülasyon İndekslerine göre hücrelerinin verdiği cevap. *: P<0.05

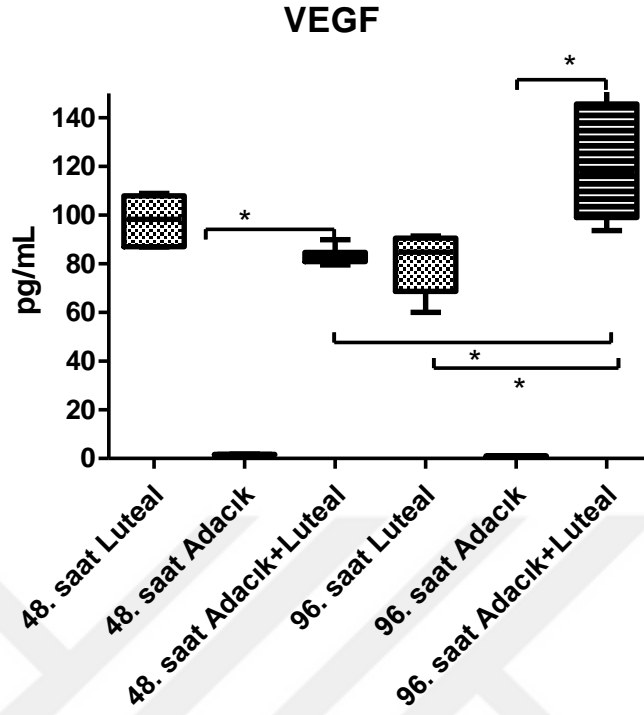


6.3.ELISA Sonuçları

6.3.1. VEGF sonuçları

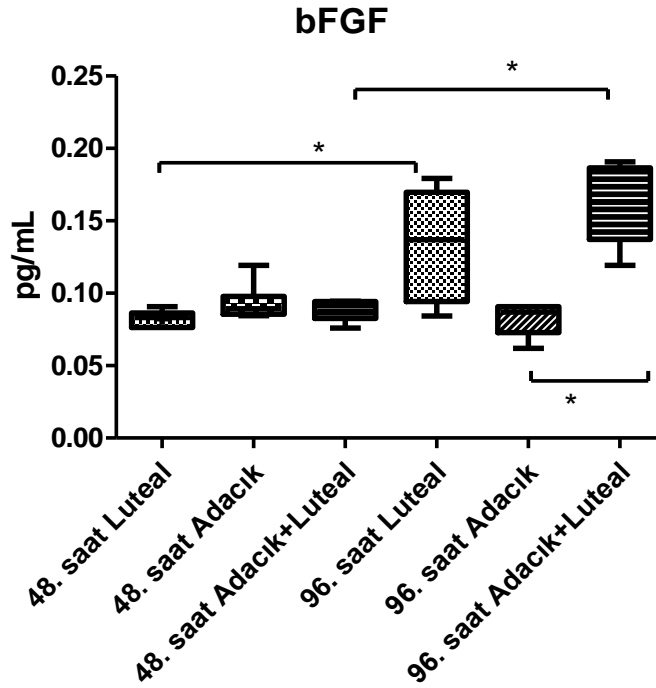
Luteal hücre ile 96. saatteki kokültür grubu; adacık hücreleri ile hem 48 hem de 96. saatteki kokültür grubu ve, 48 ve 96. saatteki kokültür grupları karşılaştırıldığında VEGF salınımının belirgin olarak arttığı (P<0.001) görüldü (Çizelge 6. 5).

Çizelge 6. 5. 48 ve 96. saatlerde süpernatant örneklerinde VEGF analizleri. * P< 0.001



6.3.2. bFGF Sonuçları

Çizelge 6. 6. Süperntandan alınan örneklerin 48 ve 96. saatlerde bFGF analizleri. * P< 0.001

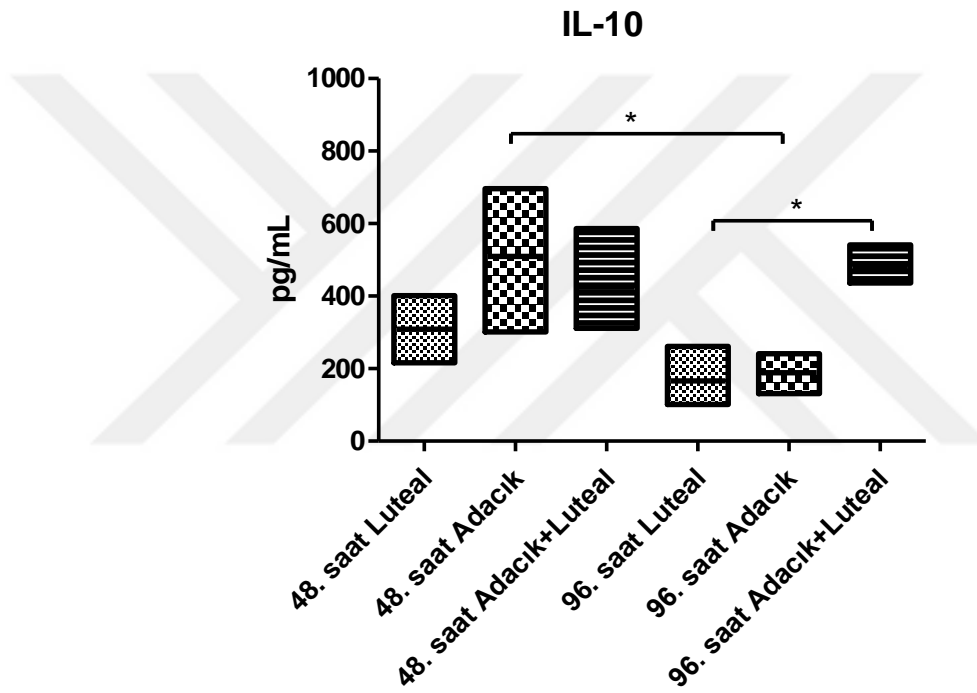


48. ve 96. saat adacık+luteal hücre kokültürleri ve 96. saat adacık ile kokültür grupları arasında istatistiksel olarak $P < 0.001$ oranında bir artış gözlemlendi. Ayrıca luteal hücre gruplarının 48 ve 96. saatleri arasında da artış görüldü (Çizelge 6. 6).

6.3.3. IL-10 Sonuçları

Çizelge 6. 7 incelendiğinde hem adacık gruplarının hem de kokültür gruplarının 48. ve 96. saatlerindeki IL-10 salınımları arasında anlamlı bir fark görüldü ($*P < 0.001$).

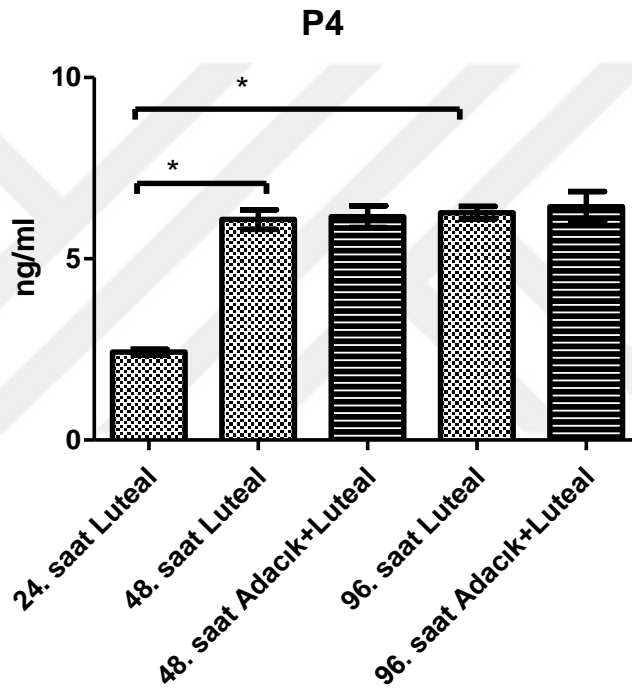
Çizelge 6. 7. Süpernatanttan alınan örneklerin 48 ve 96. saatlerde IL-10 analizleri. *: $P < 0.001$



6.3.4. Progesteron Sonuçları

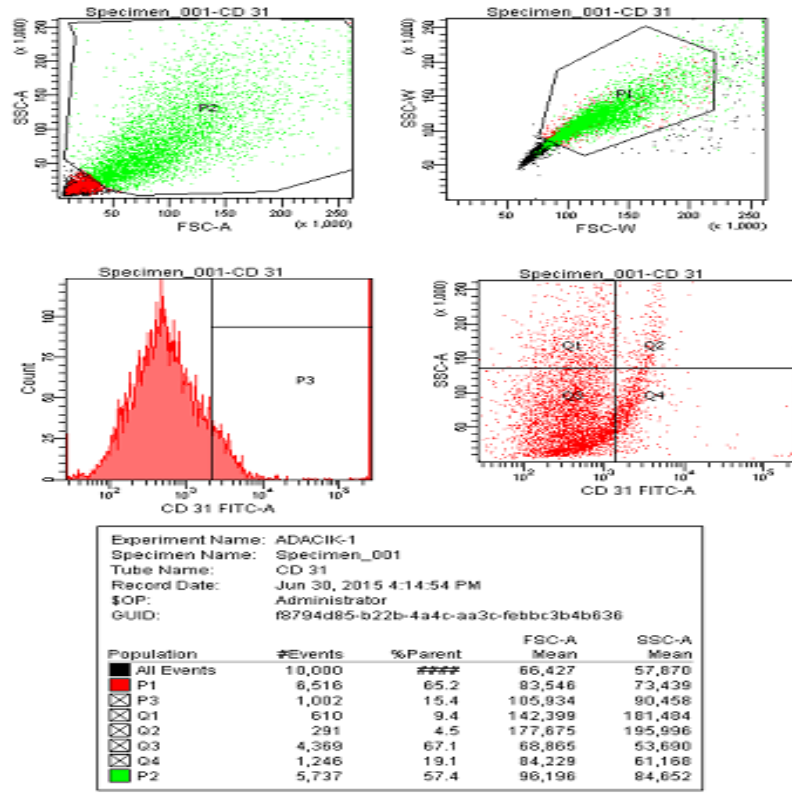
Luteal hücrelerin 24. saatinde salgılanan progesteron değerleri 48. ve 96. saatlerde artış gösterdi ($p<0.001$). Ancak 48. ve 96. saatlerde luteal hücreden salgılanan progesteron arasında önemli bir farklılık görülmedi. Her ne kadar 48. ve 96. saatlerde luteal hücrelerden salgılanan progesteron artış gösterse de bu artış kokültüre yansımada (Çizelge 6. 8).

Çizelge 6. 8. Süperntandan alınan örneklerin 48 ve 96. saatlerde progesteron analizleri. * $P<0.001$

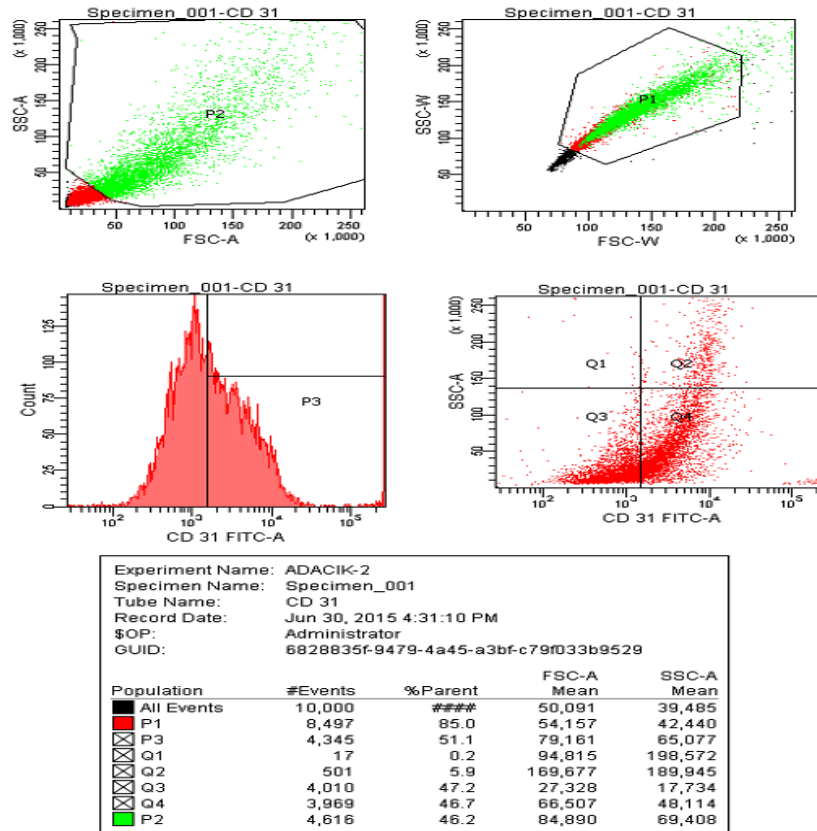


6.4 CD31 Sonuçları

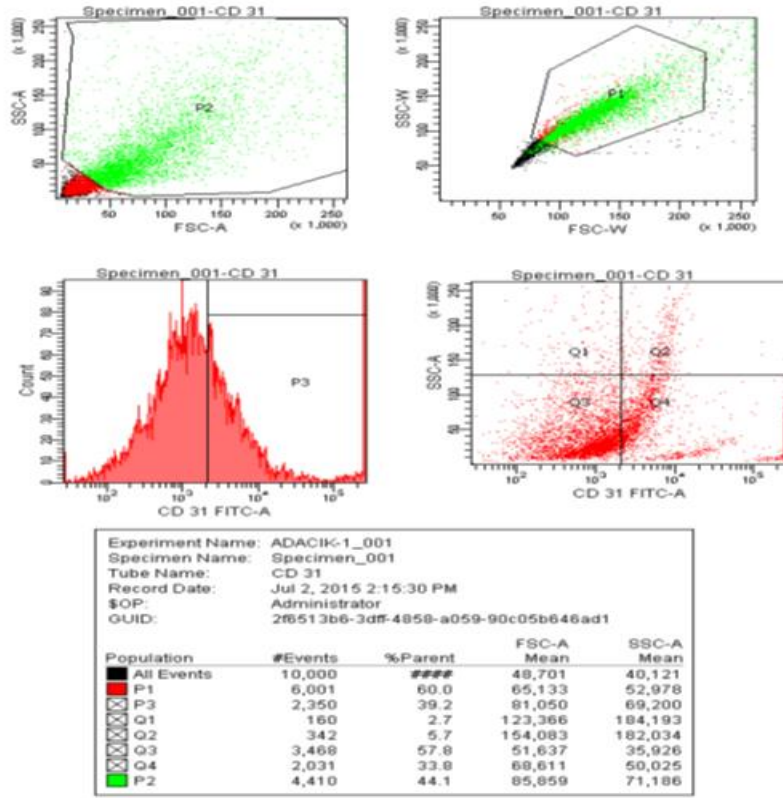
Damarlaşmanın bir göstergesi olan CD31 düzeyi adacık ve kokültür grupları karşılaştırıldığında yalnızca 48. saatte artış ($p<0.05$) gösterdi (Çizelge 6. 9).



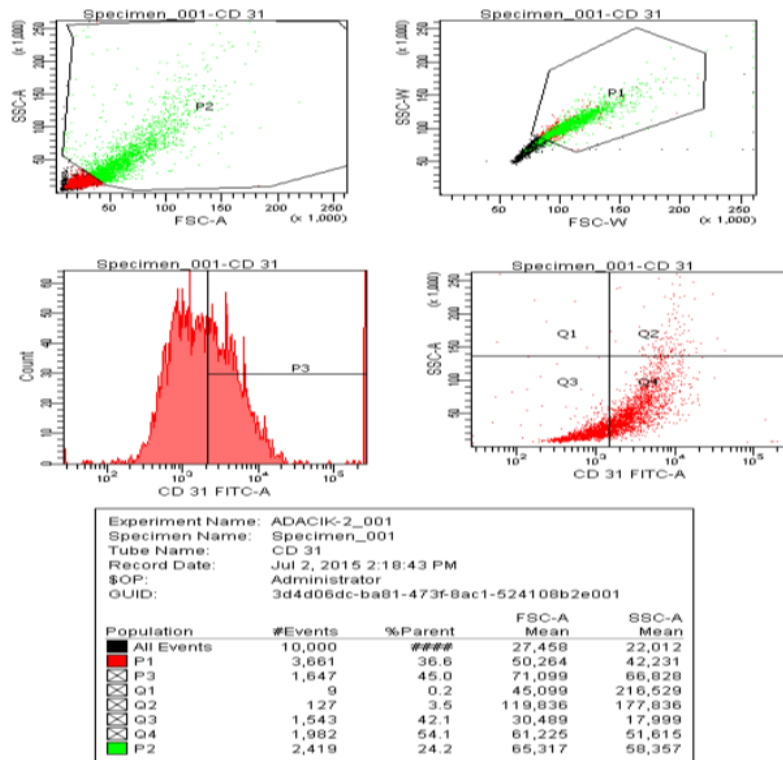
Şekil 6.6. 48. saat adacık CD31 boyaması



Şekil 6.7. 48. saat adacık+luteal hücre kokültürlü adacıkların CD31 boyaması

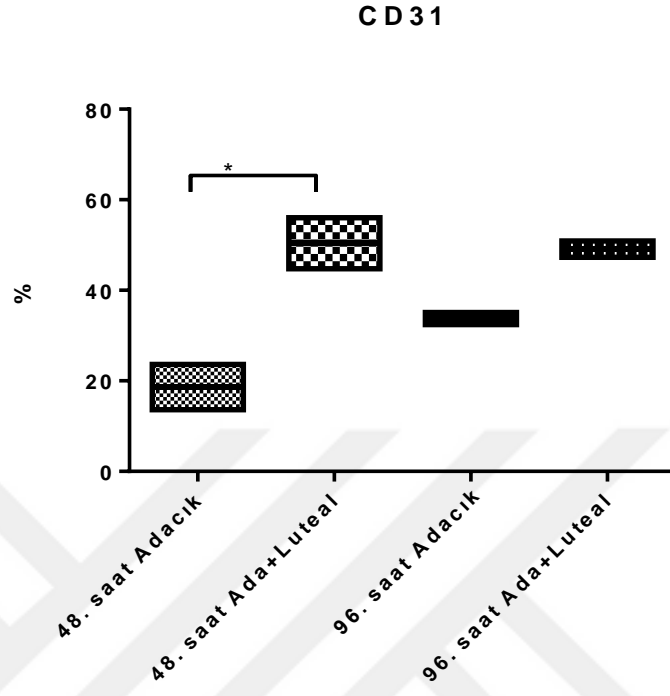


Şekil 6.8. 96. saat adacık CD31 boyaması



Şekil 6.9. 96. saat adacık+luteal hücre kokültürlü adacıkların CD31 boyaması

Çizelge 6. 9. 48 ve 96. saatlerde tek hücre süspansiyonu haline getirilen adacık hücrelerinin flow sitometri analizleri. *: P<0.05



7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Şeker hastalığı, vücudun kendisi için gerekli olan insülini yeteri kadar üretememesi ve/veya var olan insülini gerektiği gibi kullanamaması sonucu oluşan ciddi komplikasyonları olan bir metabolik hastalıktır. Pankreas adacıklarının nakli, tüm pankreasın nakline kıyasla daha kolay, cerrahi komplikasyonunun daha az olması ve genellikle doku uyumu gibi parametrelere bakılmaksızın naklin gerçekleştirilmesi nedeniyle Tip 1 diyabet tedavisinde insülin tedavisine karşı alternatif bir tedavi şekli olmuştur. Son 20 yıldır, pankreas adacık hücre izolasyonu ve naklinin klinik başarısı ile ilgili önemli gelişmeler olmaktadır. Özellikle immün sistemi baskılayıcı ilaçların değiştirilmesi ile nakledilen adacıklara karşı oluşan apoptoz engellenmeye çalışılmıştır. Adacık hücre naklinde immün rejeksiyon, sürekli immün süpresyon kullanımı ile baskılanmaktadır. Ancak immunsupresanların uzun süre kullanımı kanser ve enfeksiyon riskini arttırmaktadır. Bunun yanı sıra, özellikle nakilden önce kültür ortamında oluşacak immün atağı azaltmak ve hızlıca damarlanmasını sağlamak amacıyla yaygın olarak çalışmalar yapılmıştır. Doğal yolla immün baskılayıcı ilaç kullanılmaksızın sadece immün sistemi baskılayan hücreler; hepatik stellat hücreler, Sertoli hücreleri ve mezenkimal kök hücreleri gibi hücreler ile tedavi yöntemleri geliştirmeye devam edilmektedir (Balamurugan ve ark., 2012).

Adacık naklinin başarısını etkileyen en önemli unsur şüphesiz ki adacıkların insülin salgılayabilme yetenekleridir. Özellikle uzun süren adacık hücre kültürlerinde, adacık hücrelerinin insülin salgısı giderek azalmaktadır. Adacıklar taze izole edildiğinde de daha fazla insülin salgılayabiliyorken hemen nakil gerçekleştirildiğinde damarlanma yeteneği olmadığı için fonksiyonel olsalar dahi naklin başarısı düşmektedir. Kültüre edilen adacıklarda ise; az sayıda hücrenin hızla damarlanması ancak buna paralel olarak da az sayıda insülin salınımına sahip olmaları nedeniyle yine adacık hücre naklinde istenilen başarıya ulaşılamamaktadır. Bu yüzden yapılan çalışmalarda hem adacıkların canlılığını hem de nakilden sonra hücrelerin damarlanarak adaptasyonunu sağlamak ana hedef olmuştur. Bu amaçla kullanılan araçlardan biri de progesteron (P4) olmuştur. Ahangarpour ve arkadaşlarının (2014) yaptıkları bir çalışmada H₂O₂ hasarına karşı adacık hücrelerinin önceden P4 ile muamele edilirse insülin salınma kapasitelerinin

korunduğu oksijen radikallerine karşı korunduğu gsterilmiştir. Dolayısıyla progesteronun stres koşullarında dahi adacıklardaki insülin salgılama özelliğini devam ettirerek adacıkların fonksiyonelliğini korumaya yardımcı olduğu sonucuna varılmıştır. Steroid hormonlardan progesteron ve östrojenin kendi reseptörlerine bağlanarak insülin sekresyonu ve adacık hücre çoğalması üzerine direkt etki gstererek beta hücre fizyolojisini etkilediğini gsteren yayınlar bulunmaktadır (Dong ve ark., 2016). Ancak bazı araştırmacılar (Picard ve ark., 2002) özellikle hamilelik döneminde progesteronun diyabetojenik etkisi olduğundan ve adacıklarda az miktarda insülin salgılama yeteneğinin olduğundan da bahsetmektedirler. Özellikle hamilelik durumunda iskelet kası ve yağ dokusunda, GLUT4'ün ekspresyonunda bir azalma olması ile bu durumun etkisi çoğunlukla insülin direncinin arttırılmasıyla açıklanmaktadır (Sugaya ve ark., 2000). Yapılan araştırmada adacık hücrelerinin stimülasyon indeksi (SI) hem 48 hem de 96. saatte 0. saate göre azalırken, kokültüre edilen grupta önemli oranda artış görüldü. SI'yi 3 ve üzeri olan adacık hücrelerini nakil için uygun olduğu bilindiğinden (Komatsu ve ark.,2013) luteal hücreler ile kokültüre edilen grupta progesteron salınımı (~6000 ng/ml ve üzeri) olduğu zaman adacıkların insülin salınımları adacık grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı ve nakil edilebilir düzeyde (48. saatteki SI= ~5 ng/ml ve 96. saatteki SI= ~3 ng/ml) olarak yüksek bulundu.

Adacık hücre canlılığı adacık hücre naklinde önemli bir parametredir. Adacıkların işlevselliği ile de paralel olarak gsterildiği için çok önemlidir. Nakledilecek adacıkların ortalama canlılıklarının %80 ve üzerinde olması hedeflenmektedir. Bu koşul genellikle izolasyon prosedürleri oturmuş olan nakil merkezlerinde kolayca sağlanmaktadır. Ancak adacıklar kültüre edildikten sonra hızla canlılığının azalması ve adacık merkezinde oluşan hipoksiden kaynaklı olarak canlılığında azalma ve dolayısıyla da işlevsizlik görülmektedir. Bu sorunu ortadan kaldırmak amacıyla araştırmacılar çeşitli hücre tipleriyle; çoğunlukla kök hücre, endotel hücre ve skafoldlar ile uzun dönem kültür denemeleri yapmışlar ve bu sayede 48 saatten sonra adacık hücrelerinin *in vitro* ortamda uzun süre canlı olarak sağkalımlarını koruduklarını gstermişlerdir (White ve ark., 2001). Yapılan araştırmada da adacık hücrelerinin luteal hücreler ile kokültürü özellikle 48. saatte adacık hücrelerinin canlılıklarının dikkate değer oranda arttığı ($p<0.05$), 96. saatte de

bu etki görülmesine rağmen istatistiksel bir anlam görülmediği ($p>0.05$) belirlendi. Araştırma sonucunda luteal hücreler ile kokültüre edilen adacıkların canlılık oranlarının nakil edilebilir düzeyin (%80) üstünde olduğu ve insülin salınımları da dikkate alındığında nakillerinde başarılı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

Vasküler endotelial büyüme faktörü'nün endotel hücrelerini apoptozise karşı koruduğu da bilinmektedir (Kleespies ve ark. 2004). Endotel hücreleri ile kaplanan ve Sertoli hücreleri ile kokültüre edilen adacık hücrelerinin tek başına kültüre edilen adacık hücreleri ile kıyaslandığında VEGFA, TGF beta ve bFGF değerlerinin anlamlı olarak yüksek çıktığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2013). Daha önce yapılan bir araştırmada da (Takemoto ve ark., 2014) bir germ hücresi ile kokültürü yapılarak Balb-c farelerden elde edilen adacık ve Sertoli hücrelerinin agregasyonu asılı damla tekniği metodu ile hazırlanmıştır. Bu agregasyon C57BL/6 farelerin karaciğerine insan adacık naklinde olduğu gibi portal damar yolu ile nakledilmiştir. Bu ko-agregasyonun hem Sertoli hem de adacık hücrelerinin fonksiyonlarını koruduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmada da bu amaçla adacık hücreleri luteal hücreler ile kokültüre edip fonksiyonellik ve damarlanma özellikleri dikkate alındı. Yetişkin rat adacığı endokrin hücreleri VEGF-A üretebilir (Inoue ve ark., 2002). VEGF-A adacık mikrovasküleritesinde insülin salınımı için önemli olduğundan adacık nakli sonrasında revaskülarizasyon için de önemlidir. Ovaryumdaki VEGF' in, ratlarda steroidojenik (steroid hormon salgılayan) luteal hücrelerde lokalize olduğu da gösterilmiştir (Shweiki ve ark., 1993). Bu çalışmada ovaryumlarda hiperstimülasyon yapıldığında KL' da VEGF ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. VEGF inhibisyonu sıçanlarda da uterus anjiyogenezini, corpus luteum gelişimini ve progesteron salınmasını tümüyle baskılamaktadır (Tamanini ve De Ambrogi, 2004). Adacık hücrelerinde de VEGFA salınımının olduğu bilinmektedir (Konstantinova ve Lammert, 2004). Yapılan çalışma da özellikle izolasyon aşamasında adacığın kaybettiği damarlanma yeteneğini kokültür ortamında yeniden kazanmayı hedeflemiş olup, kokültürlerde VEGF'in adacık hücrelerine göre önemli oranlarda artmış olmasının ($p<0.05$) luteal hücrelerden salınan VEGF'in kokültürlerdeki VEGF salgısına olan pozitif etkisinden kaynaklanabileceği düşünülebilir. Bu sayede adacık hücreleri 96. saate kadar kültüre edilse bile luteal hücrelerden salınan VEGF

sayesinde, nakledildiğinde adacık hücrelerinin hızla damarlanma yeteneği göstereceği ve naklin başarısının artacağı düşünülmektedir.

Yapılan araştırmada flow sitometri tekniği ile CD31 pozitiflik oranları belirlenen adacıkların damarlanma yetenekleri incelendi. Taze adacıklarda damar ağı tamamen kopmuş olduğu için 48. ve 96. saatlerde alınan adacıklardan analiz yapıldı. Sonuçlar hem istatistiksel hem de görsel olarak değerlendirildiğinde luteal hücreler ile kokültüre edilen adacık hücrelerinin CD31+ değeri anlamlı olarak yüksek bulundu (48.saatte $p<0.05$). Böylelikle VEGF analizlerine paralel olarak CD31 analizi de luteal hücre kokültürünün adacık hücre damarlanmasını arttırıcı yönde etkileyerek adacık grubuna kıyasla daha iyi sonuçlar verdiği gösterdi.

Beta hücrelerinde PAX6, NEUROD1, Glukokinaz ve insülin gen ifadelerinin daha yüksek olduğu saptandı. Bununla beraber, beta hücrelerinde FGF, FGFR, siklin D1, TGF beta ve alfa, p53, IL- 8, laminin alfa, beta ve gamma genlerin ifadeleri daha az olarak saptanmıştır (Sucularli ve Pinarli, 2014). Yaptığımız araştırmada da luteal hücrelerin bFGF salınımlarına bakıldığında da 96. saatte 48. saate göre oldukça önemli oranda bir artış saptanması, kokültür çalışması sonucunda özellikle 96. saatte hem adacık grubuna hem de 48. saat kokültür grubuna kıyasla bFGF değerinin anlamlı olarak yükselmesini açıklamaktadır ($p<0.05$). CD31 ve VEGF değerleri de gözönünde bulundurulduğunda luteal hücrelerin adacık hücrelerinde damarlanmayı arttırdığı görülmektedir

Tip 1A şeker hastası olan bireylerde, adacık ve pankreas nakillerinde karşılaşılan en ciddi sorunlar ise otoimmünitenin tekrarlaması ve nakil alloimmünitesidir. Buna karşı gelişen başlıca sitokinler TGF- β ve IL-10' dur. IL-10'un düzenleyici T hücre aktivitesine neden olduğu da bilinmektedir (Chen ve ark., 2015). Timositlerin, B hücrelerinin, mast hücrelerinin aktivasyon ve proliferasyonunu sağlarlar. Progesteronun gebelikte immunsupresif etkisinin olduğu bilinmektedir (Szekeres-Bartho ve Wegmann, 1996; Vollenhoven ve McGuire, 1994).Yapılan *in vitro* çalışmalarda da progesteron varlığında supresor hücre aktivitesinin arttığı görülmüş (Holdstock ve ark., 1982), gebe olan maymunlarda da uygulanan deri homografitinin ömrünün gebe olmayanlara göre daha uzun olmasının nedeni progesteron hormonuna bağlanmıştır. Progesteronun aynı zamanda, lenfositopeni,

eozinopeni ve lökositozaya neden olarak implantasyonu kolaylaştıran bir immunsupresör olarak gebeliğin korunmasına yardımcı olduğu düşünülmekte ise de (Munroe, 1971), gebelikteki immunsupresif etkisini in vitro ortamda da gösterip göstermeyeceğine dair herhangi bir bulguya henüz rastlanılamamıştır. Yapılan çalışmada IL-10 düzeyi 48. saatten 96. saate kadar standart kültüre edilen adacıklarda IL-10 düzeyinin azaldığı görülmüştür. Buna karşılık luteal hücreler ile kokültüre edildiğinde ise adacık hücrelerinin 96. saatte 48. saatteki IL-10 miktarına yakın bir IL-10 salınımı gösterdiği dolayısıyla azalma olmadığı tam tersine IL-10 miktarının korunduğu görülmüştür. Ayrıca 96. saatte hem luteal hem de adacık hücre grubunda IL-10 salınımı azalmasına rağmen, kokültürde sinerjistik bir etkiyle salınımın anlamlı olarak arttığı ($p < 0.05$) da belirlenmişti. Bu sonuçlar IL-10'un özellikle 96. saatte belirgin bir etki göstererek 96. saatten sonra adacık hücrelerinin luteal hücreler ile birlikte kokültür yapılarak gerçekleştirilen nakillerinde immunsupresif etkilerinin olabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Ancak bu gruplarda progesteron düzeyinde önemli bir değişim gözlenmemesi IL-10 düzeyindeki değişimin progesteron üretiminden kaynaklanmadığını düşündürmektedir.

Yapılan araştırma sonucunda, adacık hücrelerinin luteal hücreler ile kokültüre edildiklerinde tek başına kültüre edilmelerine göre canlılıklarını korumada daha başarılı oldukları, insülin salınımlarının daha yüksek olduğu (fonksyonelliklerini artırarak korudukları) ve damarlaşma faktörlerini artırdıkları ve özellikle 96. saatte immunsupresan etkinin de görülebileceği kanısına varıldı. Hatta normal prosedürde inkübasyon süresi uzadığında canlılık ve fonksyonellikleri azaldığından dolayı 48 saatlik inkübasyondan sonra nakilleri gerçekleştirilen adacıkların luteal hücre ile kokültüre edilerek bu sürenin 96 saate kadar çıkarılabileceği belirlendi.

Yapılan çalışma aynı zamanda adacık hücrelerinin uzun süreli kültürü için de bir optimizasyon çalışması oldu. Allojenik adacık hücre nakillerinde donörün 48 saat öncesinden pankreasının bağışlanacağı haberinin gelmediği veya önceden alıcı hastaya immünsüpresan tedavisinin uygulanmasının gerekli olduğu durumlarda hücrelerin daha uzun süre kültüre edilerek hem alıcının hem de izolasyon ve nakil ekibinin şartlara uygunluğunun sağlanması için zaman kazandıracağı da düşünülmektedir. Bunun yanında luteal hücrelerin daha çok damarlanma üzerine

olumlu etki göstermesi ancak immün red üzerindeki etkisinin çok belirgin olmamasından dolayı bu konu üzerinde daha farklı kültür denemelerinin yapılmasına da ihtiyaç duyulabilir. Yapılan bu kültür denemesinin *in vitro* etkisinin yanı sıra *in vivo* etkilerinin de daha sonra yapılacak çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.



8. KAYNAKLAR

- AHANGARPOUR, A., HEİDARİ, H., MARD, S. A., HASHEMİTABAR, M., & KHODADADİ, A. (2014). Progesterone and cilostazol protect mice pancreatic islets from oxidative stress induced by hydrogen peroxide. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(3), 937–944.
- ALEJANDRO, R., FELDMAN, E. C., SHİENVOLD, F. L., & MİNTZ, D. H. (1988). Advances in canine diabetes mellitus research: etiopathology and results of islet transplantation. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193(9), 1050–1055.
- ARONOFF, S. L., BERKOWİTZ, K., SHREİNER, B., & WANT, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17(3), 183–190.
- ASSOCIATION, A. D. (2010). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 33(Supplement 1), S62–S69.
- LOGANATHAN, G., TAKİTA, M., BARTON, F. B. (2014). Islet Product Characteristics and Factors Related to Successful Human Islet Transplantation From the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 1999-2010: Islet Product Characteristics in CITR. *American Journal of Transplantation*, 14(11), 2595–2606.
- BANK, H. L. (1987). Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia*, 30(10), 812–816.
- BAO, B., THOMAS, M. G., GRİFFİTH, M. K., BURGHARDT, R. C., & WİLLİAMS, G. L. (1995). Steroidogenic activity, insulin-like growth factor-I production, and proliferation of granulosa and theca cells obtained from dominant preovulatory and nonovulatory follicles during the bovine estrous cycle: effects of low-density and high-density lipoproteins. *Biology of Reproduction*, 53(6), 1271–1279.
- BHADADA, S. V., GOYAL, B. R., & PATEL, M. M. (2011). Angiogenic targets for potential disorders. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25(1), 29–47.
- BONNER-WEİR, S., & SMİTH, F. E. (1994). Islet cell growth and the growth factors involved. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 5(2), 60–64.

- BRETZEL, R. G., BRANDHORST, D., BRANDHORST, H., ECKHARD, M., ERNST, W., FRIEMANN, S., BRENDEL, M. D. (1999). Improved survival of intraportal pancreatic islet cell allografts in patients with type-1 diabetes mellitus by refined peritransplant management. *Journal of Molecular Medicine*, 77(1), 140–143.
- BURKE, G. W., VENDRAME, F., VIRDÌ, S. K., CIANCIO, G., CHEN, L., RUIZ, P., PUGLIESE, A. (2015). Lessons From Pancreas Transplantation in Type 1 Diabetes: Recurrence of Islet Autoimmunity. *Current Diabetes Reports*, 15(12), 121.
- CADAVEZ, L., MONTANE, J., ALCARRAZ-VÍZÁN, G., VISA, M., VIDAL-FÀBREGA, L., SERVITJA, J.-M., & NOVÍALS, A. (2014). Chaperones Ameliorate Beta Cell Dysfunction Associated with Human Islet Amyloid Polypeptide Overexpression. *PLoS ONE*, 9(7), e101797.
- CHEN, T., YUAN, J., DUNCANSON, S., HIBERT, M. L., KODISH, B. C., MYLAVAGANAM, G., POZNANSKY, M. C. (2015). Alginate Encapsulant Incorporating CXCL12 Supports Long-Term Allo- and Xenoislet Transplantation Without Systemic Immune Suppression: CXCL12 Containing Encapsulant for Islets. *American Journal of Transplantation*, 15(3), 618–627.
- CHERA, S., BARONNIER, D., GHILA, L., CIGLIOLA, V., JENSEN, J. N., GU, G., HERRERA, P. L. (2014). Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic δ -cells into insulin producers. *Nature*, 514(7523), 503–507.
- CHUN, S. Y., EISENHAEUER, K. M., MINAMI, S., BILLIG, H., PERLAS, E., & HSUEH, A. J. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137(4), 1447–1456.
- COMESS, L. J., BENNETT, P. H., BURCH, T. A., & MILLER, M. (1969). Congenital Anomalies and Diabetes in the Pima Indians of Arizona. *Diabetes*, 18(7), 471–477.
- COMTET, J. J., MONATTE, J. P., & MACHENAUD, A. (1975). [The use of Swanson implants for the repair of proximal interphalangeal joints following trauma. Approach - Results - Indications (author's transl)]. *Annales De Chirurgie*, 29(5), 471–474.
- DAGLI GUL, A. S., FADILLIOGLU, E., KARABULUT, I., YESILYURT, A., & DELIBASI, T. (2013). The effects of oral carvacrol treatment against H₂O₂ induced injury on isolated pancreas islet cells of rats. *Islets*, 5(4).

- DANFORTH, D. R., ARBOGAST, L. K., GHOSH, S., DICKERMAN, A., ROFAGHA, R., & FRIEDMAN, C. I. (2003). Vascular Endothelial Growth Factor Stimulates Preantral Follicle Growth in the Rat Ovary. *Biology of Reproduction*, 68(5), 1736–1741.
- DAVIDSON, G. S. (2007). Including pets in diabetic care. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 11(2), 124–128.
- DEAN, P. M. (1973). Ultrastructural morphometry of the pancreatic β -cell. *Diabetologia*, 9(2), 115–119.
- DIABETES RESEARCH WORKING GROUP. (1999). Conquering Diabetes: A Report From the Diabetes Research Working Group. *Diabetes Spectrum*, 12(4), 243.
- DÍAZ, F. J., ANDERSON, L. E., WU, Y. L., RABOT, A., TSAI, S. J., & WILTBANK, M. C. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F₂alpha production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191(1), 65–80.
- DONG, F., LING, Q., YE, D., ZHANG, Z., SHU, J., CHEN, G., LI, C. (2016). TCF7L2 involvement in estradiol- and progesterone-modulated islet and hepatic glucose homeostasis. *Scientific Reports*, 6.
- DAWYER, K. M., MYSORE, T. B., CRİKİS, S., ROBSON, S. C., NANDURKAR, H., COWAN, P. J., & D'APICE, A. J. F. (2006). The Transgenic Expression of Human CD39 on Murine Islets Inhibits Clotting of Human Blood: *Transplantation*, 82(3), 428–432.
- EFRAT, S., & RUSS, H. A. (2012). Making β cells from adult tissues. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(6), 278–285.
- ELLİS, H. (2007). Anatomy of the pancreas. *Surgery (Oxford)*, 25(2), 72–73.
- ERGÜLER, G., DEMİR, N., & DEMİR, R. (2002). Adezyon Moleküllerinin Yapısal Özellikleri Ve Fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 22(3), 313–327.
- EURELL, J. A. C., FRAPPIER, B. F., & DELLMANN, H.-D. (Ed.). (2006). *Dellmans textbook of veterinary histology* (6th ed). Ames, IO: Blackwell, Chapter 10.

- FARHANGÍ, A., NOROUZÍAN, D., MEHRABÍ, M. R., CHÍANI, M., SAFFARÍ, Z., FARAHNAK, M., & AKBARZADEH, A. (2014). Immunoisolated transplantation of purified langerhans islet cells in testis cortex of male rats for treatment of streptozotocin induced diabetes mellitus. *Indian Journal of Clinical Biochemistry: IJCB*, 29(4), 406–417.
- FERRARA, N., CHEN, H., DAVIS-SMYTH, T., GERBER, H. P., NGUYEN, T. N., PEERS, D., SCHWALL, R. H. (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Medicine*, 4(3), 336–340.
- FIELDS, M. J., & FIELDS, P. A. (1996). Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, 45(7), 1295–1325.
- FIORETTO, P., STEFFES, M. W., SUTHERLAND, D. E. R., GOETZ, F. C., & MAUER, M. (1998). Reversal of Lesions of Diabetic Nephropathy after Pancreas Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 339(2), 69–75.
- GARCÍA, V. D., GARCÍA, C. D., & SANTIAGO-DELPÍN, E. A. (2003). Organ transplants in Latin America. *Transplantation Proceedings*, 35(5), 1673–1674.
- GEPTS, W. (1965). Pathologic Anatomy of the Pancreas in Juvenile Diabetes Mellitus. *Diabetes*, 14(10), 619–633.
- GILOR, C., NIESSEN, S. J. M., FURROW, E., & DIBARTOLA, S. P. (2016). What's in a Name? Classification of Diabetes Mellitus in Veterinary Medicine and Why It Matters. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), 927–940.
- GOSPODAROWÍCZ, D., CHENG, J., LUÍ, G. M., BAIRD, A., ESCH, F., & BOHLEN, P. (1985). Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 117(6), 2383–2391.
- GUEST, P. C., BAÍLYES, E. M., RUTHERFORD, N. G., & HUTTON, J. C. (1991). Insulin secretory granule biogenesis. Co-ordinate regulation of the biosynthesis of the majority of constituent proteins. *Biochemical Journal*, 274(1), 73–78.
- HALBAN, P. A., POWERS, S. L., GEORGE, K. L., & BONNER-WEIR, S. (1987). Spontaneous Reassociation of Dispersed Adult Rat Pancreatic Islet Cells Into Aggregates With Three-Dimensional Architecture Typical of Native Islets. *Diabetes*, 36(7), 783–790.

- HANSEL, W., & BLAIR, R. M. (1996). Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, 45(7), 1267–1294.
- HATCHELL, D. L., EMBABI, S. N., MAENO, T., SALOUPIS, P., OLSON, G., BRAUN, R. D., & TOTH, C. A. (1998). Transplantation of feline islets of Langerhans in the subretinal space of cat eyes. *Transplantation Proceedings*, 30(2), 593–595.
- HELLERSTRÖM, C., SWENNE, I., & ANDERSSON, A. (1988). Islet Cell Replication and Diabetes. İçinde P. J. Lefèbvre & D. G. Pipeleers (Ed.), *The Pathology of the Endocrine Pancreas in Diabetes* (ss. 141–170).
- HILDERINK, J., SPIJKER, S., CARLOTTI, F., LANGE, L., ENGELSE, M., VAN BLITTERSWIJK, C., VAN APELDOORN, A. (2015). Controlled aggregation of primary human pancreatic islet cells leads to glucose-responsive pseudoislets comparable to native islets. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(8), 1836–1846.
- HIRATSUKA, I., SUZUKI, A., KONDO-ANDO, M., HIRAI, H., MAEDA, Y., SEKIGUCHI-UEDA, S., ITOH, M. (2014). Utility of Glucagon Stimulation Test in Type 1 Diabetes After Pancreas Transplantation. *Transplantation Proceedings*, 46(3), 967–969.
- HIRIART, M., & RAMIREZ-MEDELES, M. C. (1991). Functional Subpopulations of Individual Pancreatic B-Cells in Culture. *Endocrinology*, 128(6), 3193–3198
- HOANG DO, O., & THORN, P. (2015). Insulin secretion from beta cells within intact islets: Location matters. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(4), 406–414.
- HOLDSTOCK, G., CHASTENAY, B. F., & KRAWITT, E. L. (1982). Effects of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. *Clinical and Experimental Immunology*, 47(2), 449–456.
- HUBSCHER, C., BROOKS, D., & JOHNSON, J. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry*, 80(2), 79–87.
- HYDER, S. M., & STANCEL, G. M. (1999). Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 13(6), 806–811.

- INOUE, M., HAGER, J. H., FERRARA, N., GERBER, H.-P., & HANAHAN, D. (2002). VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. *Cancer Cell*, 1(2), 193–202.
- JANSSON, L., & CARLSSON, P.-O. (2002). Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia*, 45(6), 749–763.
- JEANNIN, P., LECOANET, S., DELNESTE, Y., GAUCHAT, J.-F., & BONNEFOY, J.-Y. (1998). IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *The Journal of Immunology*, 160(7), 3555–3561.
- JOHANSSON, H., GOTO, M., SIEGBAHN, A., ELGUE, G., KORSGREN, O., & NILSSON, B. (2006). Low Molecular Weight Dextran Sulfate: A Strong Candidate Drug to Block IBMIR in Clinical Islet Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 6(2), 305–312.
- JOHANSSON, U., RASMUSSEN, I., NICLOU, S. P., FORSLUND, N., GUSTAVSSON, L., NILSSON, B., MAGNUSSON, P. U. (2008). Formation of Composite Endothelial Cell-Mesenchymal Stem Cell Islets: A Novel Approach to Promote Islet Revascularization. *Diabetes*, 57(9), 2393–2401.
- KAHN, C. R., YUMUK, V., WEIR, G. C., KING, G. C., JACOBSON, A. M., MOSES, A. C., & SMITH, R. J. (2008). *Joslin's diabetes mellitus*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.
- KANAK, M. A., TAKITA, M., KUNNATHODI, F., LAWRENCE, M. C., LEVY, M. F., & NAZIRUDDIN, B. (2014). Inflammatory Response in Islet Transplantation. *International Journal of Endocrinology*, 2014, 1–13.
- KLEESPIES, A., GUBA, M., JAUCH, K.-W., & BRUNS, C. J. (2004). Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 87(2), 95–104.
- KOMATSU, M., TAKEI, M., ISHII, H., & SATO, Y. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(6), 511–516.
- KONSTANTINOVA, I., & LAMMERT, E. (2004). Microvascular development: learning from pancreatic islets. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 26(10), 1069–1075.

- KRENTZ, D. A. J., & BAILEY, C. J. (2012). Oral Antidiabetic Agents. *Drugs*, 65(3), 385–411.
- LAU, J., VASYLOVSKA, S., KOZLOVA, E., & CARLSSON, P.-O. (2015). Surface-coating of pancreatic islets with neural crest stem cells improves engraftment and function after intraportal transplantation. *Cell Transplantation*. Volume 24, 2263–2272(10)
- LAMMERT, E., CLEAVER, O., & MELTON, D. (2001). Induction of Pancreatic Differentiation by Signals from Blood Vessels. *Science*, 294(5542), 564–567.
- LÍ, G., HUANG, L., JIANG, M., WU, H., CHEN, J., HUANG, Y., LU, D. (2010). Implantation of bFGF-treated islet progenitor cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(11), 1454–1463.
- LÍ, Y., XUE, W., LIU, H., FAN, P., WANG, X., DING, X., FAN, X. (2013). Combined Strategy of Endothelial Cells Coating, Sertoli Cells Coculture and Infusion Improves Vascularization and Rejection Protection of Islet Graft. *PLoS ONE*, 8(2), e56696.
- LIAO, Y.-T., JIANG, J.-X., YE, J., QI, H., & LI, F.-R. (2012). A Novel Protocol for Mouse Islet Isolation. *Pancreas*, 41(7), 1134–1135.
- LIU, X., YAN, F., YAO, H., CHANG, M., QIN, J., LI, Y., PEI, X. (2014). Involvement of RhoA/ROCK in insulin secretion of pancreatic β -cells in 3D culture. *Cell and Tissue Research*, 358(2), 359–369.
- LUBORSKY, J. L., & BEHRMAN, H. R. (1985). [25] Isolation and functional aspects of free luteal cells. İçinde B. W. O. Lutz Birnbaumer (Ed.), *Methods in Enzymology* (C. Volume 109, ss. 298–316).
- LUDWIG, B., REICHEL, A., KRUPPA, A., LUDWIG, S., STEFFEN, A., WEITZ, J., & BORNSTEIN, S. (2014). Islet Transplantation at the Dresden Diabetes Center: Five Years' Experience. *Hormone and Metabolic Research*, 47(1), 4–8.
- LUND, T., FOSBY, B., KORSGREN, O., SCHOLZ, H., & FOSS, A. (2008). Glucocorticoids reduce pro-inflammatory cytokines and tissue factor “in vitro” and improve function of transplanted human islets “in vivo”. *Transplant International*, 21(7), 669–678.

- MATSCHINSKY, F., LIANG, Y., KESAVAN, P., WANG, L., FROGUEL, P., VELHO, G., JETTON, T. L. (1993). Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *Journal of Clinical Investigation*, 92(5), 2092–2098.
- MEIDAN, R., MÍLVAE, R. A., WEISS, S., LEVY, N., & FRIEDMAN, A. (1999). Intraovarian regulation of luteolysis. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 54, 217–228.
- MÍLVAE, R. A., ALÍLA, H. W., BUSHMÍCH, S. L., & HANSEL, W. (1991). Bovine corpus luteum function after removal of granulosa cells from the preovulatory follicle. *Domestic Animal Endocrinology*, 8(3), 439–443.
- MÍLVAE, R. A., HÍNCKLEY, S. T., & CARLSON, J. C. (1996). Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45(7), 1327–1349.
- MUNROE, J. S. (1971). Progesteroids as immunosuppressive agents. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 9(4), 361–375.
- MÜLAZIMOĞLU, İDE T, & ASLAN S. (2010). Ratlarda Üreme, 39–44.
- NELSON, S. E., MCLEAN, M. P., JAYATÍLAK, P. G., & GÍBORÍ, G. (1992). Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology*, 130(2), 954–966.
- NEWMAN, P. J., BERNDT, M. C., GORSKÍ, J., WHÍTE, G. C., LYMAN, S., PADDOCK, C., & MULLER, W. A. (1990). PECAM-1 (CD31) Cloning and Relation to Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Gene Superfamily. *Science*, 247(4947), 1219–1222.
- ORCÍ, L. (1976). The microanatomy of the islets of langerhans. *Metabolism*, 25(11, Supplement), 1303–1313.
- O'SHAUGHNESSY, P. J., & WATHES, D. C. (1985). Characteristics of bovine luteal cells in culture: morphology, proliferation and progesterone secretion in different media and effects of LH, dibutyryl cyclic AMP, antioxidants and insulin. *The Journal of Endocrinology*, 104(3), 355–361.

- ÖHLUND, M., EGENVALL, A., FALL, T., HANSSON-HAMMLIN, H., RÖCKLINSBERG, H., & HOLST, B. S. (2016). Environmental Risk Factors for Diabetes Mellitus in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*.
- PATE, J. L. (1996). Intercellular communication in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 45(7), 1381–1397.
- PAYNE, A. H., DOWNING, J. R., & WONG, K.-L. (1980). Luteinizing Hormone Receptors and Testosterone Synthesis in Two Distinct Populations of Leydig Cells. *Endocrinology*, 106(5), 1424–1429.
- PETROIANU, A., VASCONCELLOS, L. DE S., ALBERTI, L. R., & NUNES, M. B. (2005). The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. *Journal of Surgical Research*, 124(2), 175–179.
- PICARD, F., WANATABE, M., SCHOONJANS, K., LYDON, J., O'MALLEY, B. W., & AUWERX, J. (2002). Nonlinear partial differential equations and applications: Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to β -cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15644–15648.
- POUCH, S. M. (2015). Infectious complications of pancreatic islet transplantation: clinical experience and unanswered questions. *Current Infectious Disease Reports*, 17(5), 482.
- REYNOLDS, L. P., & REDMER, D. A. (1998). Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *Journal of Animal Science*, 76(6), 1671–1681.
- RICORDI, C., GRAY, D. W. R., HERING, B. J., KAUFMAN, D. B., WARNOCK, G. L., KNETEMAN, N. M., LACY, P. E. (1990). Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetologica Latina*, 27(3), 185–195.
- ROSS, M. H., PAWLINA, W., & BAYKAL, B. (2014). *Histology: konu anlatımı ve atlas*. Ankara: Palme Yayıncılık, Chapter 15.
- RYAN, C., VEGA, A., LONGSTREET, C., & DRASH, A. (1984). Neuropsychological changes in adolescents with insulin-dependent diabetes. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 52(3), 335–342.

SATIÉ, A.-P., MAZAUD-GUITTOT, S., SEÏF, I., MAHE, D., HE, Z., JOUVE, G., DEJUCQ-RAÏNSFORD, N. (2011). Excess Type I Interferon Signaling in the Mouse Seminiferous Tubules Leads to Germ Cell Loss and Sterility. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 23280–23295.

SCHASCHKOW, A., MURA, C., BIETIGER, W., PERONET, C., LANGLOIS, A., BODÏN, F., MAILLARD, E. (2015). Impact of an autologous oxygenating matrix culture system on rat islet transplantation outcome. *Biomaterials*, 52, 180–188.

SEÏNO, Y., NANJO, K., TAJÏMA, N., KADOWAKÏ, T., KASHÏWAGÏ, A., ARAKÏ, E., UEKÏ, K. (2010). Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus: The Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetology International*, 1(1), 2–20.

SEYEDÏ, F., FARSIÑEJAD, A., MOSHREFÏ, M., & NEMATOLLAHÏ-MAHANÏ, S. N. (2015). In vitro evaluation of different protocols for the induction of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*.

SHAPIRO, A. M. J., RÏCORDI, C., HERING, B. J., AUCHÏNCLOSS, H., LÏNDBLAD, R., ROBERTSON, R. P., LAKEY, J. R. T. (2006). International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 355(13), 1318–1330.

SHÏN, J.-Y., JEONG, J.-H., HAN, J., BHANG, S. H., JEONG, G.-J., HAQUE, M. R., KÏM, B.-S. (2015). Transplantation of Heterospheroids of Islet Cells and Mesenchymal Stem Cells for Effective Angiogenesis and Antiapoptosis. *Tissue Engineering Part A*, 21(5–6), 1024–1035.

SHWEÏKÏ, D., ITÏN, A., NEUFELD, G., GÏTAY-GOREN, H., & KESHET, E. (1993). Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 91(5), 2235–2243.

SHYR, Y.-M., SU, C.-H., LÏ, A. F.-Y., WU, C.-W., & LUÏ, W.-Y. (2002). Canine pancreas allotransplantation with enteric drainage. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi = Chinese Medical Journal; Free China Ed*, 65(10), 483–488.

SORDÏ, V., FERRÏ, A., CESERANÏ, V., CÏUSANÏ, E., DUGNANÏ, E., PELLEGRÏNÏ, S., ALESSANDRÏ, G. (2017). Establishment, characterization and long-term culture of

human endocrine pancreas-derived microvascular endothelial cells. *Cytotherapy*, 19(1), 141–152.

STAGNER, J. I., SAMOLS, E., & BONNER-WEIR, S. (1988). $\beta \rightarrow \alpha \rightarrow \delta$ Pancreatic Islet Cellular Perfusion in Dogs. *Diabetes*, 37(12), 1715–1721.

SUCULARLI, C., & PINARLI, F. A. (2014). Comparison of Gene Expression Profiles between Human Pancreatic Beta Cells and Duct Cells. *Niche Journal*, 2(1), 9–14.

SUGAYA, A., SUGIYAMA, T., YANASE, S., SHEN, X.-X., MINOURA, H., & TOYODA, N. (2000). Expression of glucose transporter 4 mRNA in adipose tissue- and skeletal muscle of ovariectomized rats treated with sex steroid hormones. *Life Sciences*, 66(7), 641–648.

SZEKERES-BARTHO, J., & WEGMANN, T. G. (1996). A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *Journal of Reproductive Immunology*, 31(1–2), 81–95.

TAKEMOTO, N., LIU, X., TAKII, K., TERAMURA, Y., & IWATA, H. (2014). Transplantation of Co-aggregates of Sertoli Cells and Islet Cells Into Liver Without Immunosuppression: *Transplantation Journal*, 97(3), 287–293.

TAMANINI, C., & DE AMBROGI, M. (2004). Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 39(4), 206–216.

TSUCHITANI, M., SATO, J., & KOKOSHIMA, H. (2016). A comparison of the anatomical structure of the pancreas in experimental animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, 29(3), 147–154.

VAN VOLLENHOVEN, R. F., & MCGUIRE, J. L. (1994). Estrogen, progesterone, and testosterone: can they be used to treat autoimmune diseases? *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 61(4), 276–284.

VAREWIJCK, A. J., & JANSSEN, J. A. M. J. L. (2012). Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. *Endocr Relat Cancer*, 19(5), 63–75.

VILLANI, V., MILANESI, A., SEDRAKYAN, S., DA SACCO, S., ANGELOW, S.,

- CONCONÍ, M. T., PERÍN, L. (2014). Amniotic fluid stem cells prevent β -cell injury. *Cytotherapy*, 16(1), 41–55.
- VRABELOVA, D., ADÍN, C., GÍLOR, C., & RAJAB, A. (2014). Pancreatic Islet Transplantation: From Dogs to Humans and Back Again. *Veterinary Surgery*, 43(6), 631–641.
- YAZIR, Y. (2007). vasküler endotelial büyüme faktörü ve türleri -. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 29 (3), 128–136.
- YOUNG, B., HEATH, J. W., STEVENS, A., & WHEATER, P. R. (2001). *Wheater's functional histology: a text and colour atlas* (4. ed, repr). Edinburgh: Churchill Livingstone, Chapter 15.
- WHELTON, S. P., CHÍN, A., XÍN, X., & HE, J. (2002). Effect of Aerobic Exercise on Blood Pressure A Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. *Annals of Internal Medicine*, 136(7), 493–503.
- WHÍTE, S. A., JAMES, R. F. L., SWÍFT, S. M., KÍMBER, R. M., & NÍCHOLSON, M. L. (2001). Human islet cell transplantation - future prospects. *Diabetic Medicine*, 18(2), 78–103.
- WIDMAIER, E. P., RAFF, H., STRANG, K. T., VANDER, A. J., & DEMİRGÖREN, S. (2010). *Vander insan fiziyojisi*. Izmir: Güven Kİtabevi.
- WÍLTBANK, M. C. (1994). Cell types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus luteum function. *Journal of Animal Science*, 72(7), 1873–1883.
- YANG, H. K., HAM, D.-S., PARK, H.-S., RHEE, M., YOU, Y. H., KÍM, M. J., YOON, K.-H. (2016). Long-term Efficacy and Biocompatibility of Encapsulated Islet Transplantation With Chitosan-Coated Alginate Capsules in Mice and Canine Models of Diabetes. *Transplantation*, 100(2), 334–343.
- YANG, K.-C., WU, C.-C., LÍN, S.-C., SUMÍ, S., & LÍN, F.-H. (2010). The in vivo performance of bioartificial pancreas in bone marrow cavity: A case report of a spontaneous diabetic feline. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(3), 362–364.
- YOSHIMATSU, G., SAKATA, N., TSUCHÍYA, H., MÍNOWA, T., TAKEMURA, T.,

MORÍTA, H., UNNO, M. (2015). The Co-Transplantation of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells Reduced Inflammation in Intramuscular Islet Transplantation. *PLOS ONE*, 10(2), e0117561.

ZHANG, W.-J., XU, S.-Q., CAI, H.-Q., MEN, X.-L., WANG, Z., LIN, H., LOU, J.-N. (2013). Evaluation of islets derived from human fetal pancreatic progenitor cells in diabetes treatment. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(6), 141.



EKLER

Ek 1: Deneysel Hayvan Etik Kurul Formu

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

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 06.06.2014
Protokol No : 2014/30

Proje yürütücüsünün adı soyadı: Prof. Dr. Ayşe Arzu YİĞİT
Projenin başlığı : Adacık Hücreleri ile Kokültüre Edilen Luteal Hücrelerin,
Hücre Canlılığı, Revaskularizasyon ve İmmün Yanıtta
Etkileri
Proje ekibi : Prof. Dr. Tuncay Delibaşı, Y. Bio. Gülbahar Büyük

Denyede kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Sprague Dawley Rat
Denyede kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 25-30 günlük, 50-70 gr

Adı geçen araştırmannın, 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.

(KATILMADI) Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI (Kurul Başkanı)	Doç. Dr. Osman YÜKSEL (Başkan Vekili)
Doç. Dr. Ekrem YETER (Üye)	Vet. Hek. Başak BOZTÖK ÖZGERMEN (Üye)
Ecz. İlhan ÇAYIR (Üye)	Ecz. Mine BARUT (Üye)

İrfan Baştuğ Caddesi No:12 Dışkapı-Atındağ/ANKARA • Telefon: 0 312 596 20 00 • Faks: 0 312 318 66 90 • www.diskapiiesh.gov.tr

Ek 2: Baylor Araştırma Enstitüsü Başarı Sertifikası



Ek3: Baylor Araştırma Enstitüsü Deneş hayvanı kullanım sertifikası



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Gülbahar

Soyadı: BÖYÜK

Doğum Yeri ve Tarihi: Tosya-16.05.1984

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

Adres: Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı,
Yahşihan, 71451, KIRIKKALE.

Telefon: 0318 357 42 42

E-posta: gulbaharmayis16@gmail.com

II- Eğitimi

Lise : Ankara Bahçelievler Deneme Lisesi 2002

Lisans: Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi 2007

Yüksek Lisans: Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü 2011

Yabancı Dili: İngilizce

III- Mesleki Deneyimi

2008-2015 Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi Etlik Polikliniği,
ADACELL Araştırma Merkezi. Pankreas Adacık Hücre
Transplantasyonu Merkezi oluşturma projesi (DPT ve

SANTEZ projesi), Proje Araştırma Görevlisi, Ankara -
Türkiye

2015 Ağustos- 2016 Őubat Baylor Üniversitesi Tıp Merkezi, cGMP laboratuvarı
klinik pankreas adacık hücre izolasyonu, Adacık Hücre Araştırma Laboratuvarı
preklinik araştırma merkezi, Araştırma Asistanı, Dallas/Texas - Amerika. (6 ay)

IV- Bilimsel İlgil Alanları

Katıldığı Kurs, alıştay, Kongre ve Sempozyumlar:

1. Introduction to Good Clinical Practise (GCP), basis of GCP implementation in Clinical trials. Ankara, 26-27 may 2008 (Vienna School of clinical Research certifies)
2. Rodentlerde Pankreas Adacık Hücre İzolasyon ve Transplantasyon Sempozyumu, 17-23 Kasım 2008, Ankara
3. Deney Hayvanı uygulama ve Etik kursu VI, 23.03-01.04.2009, Gazi Üniversitesi, Ankara.
4. II. Pankreas Adacık hücre Araştırmaları Sempozyumu: Kadavradan İnsan Pankreas Adacık hücre İzolasyonu kursu, 01-06 Haziran 2010, Ankara
5. Pankreas Adacık Nakli Kursu, 11 mayıs 2011, Antalya
6. IV. Pankreas Adacık Hücre Araştırmaları Sempozyumu: Pankreatik adacık ve kök hücre korelasyonu kursu (23-29 Nisan 2012), Ankara.
7. Beta Cells in Health and Disease, may 21-22.2014, Kocaeli
8. Certificate of Appreciation, Baylor Research Institute Islet Cell Transplant Program (August 2015- February 2016)

Altı araştırma makalem ve çeşitli bilimsel toplantılarda sunulmuş 5 sözlü, 17 poster sunumum bulunmaktadır.