

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS ADACIK KAYNAKLI MAFA⁺/PAX4⁺ KÖK
HÜCRELERİN KULLANILMASIYLA DESELLÜLARİZE
KARACİĞER EKSTRASELLÜLER MATRİKSİNDEN İNSÜLİN
SALGILAYAN ENDOKRİN PANKREAS İŞLEVİNE SAHİP
DOKU ÜRETİMİ**

Ahmet ÖZTÜRK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2016

T.C

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS ADACIK KAYNAKLI MAFA⁺/PAX4⁺ KÖK
HÜCRELERİN KULLANILMASIYLA DESELLÜLARİZE
KARACİĞER EKSTRASELLÜLER MATRİKSİNDEN İNSÜLİN
SALGILAYAN ENDOKRİN PANKREAS İŞLEVİNE SAHİP
DOKU ÜRETİMİ**

Ahmet ÖZTÜRK

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

KOCAELİ

2016

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ




(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Pankreas Adacık Kaynaklı MafA+/Pax4+ Kök Hücrelerin Kullanılmasıyla
Desellülarize Karaciğer Ekstrasellüler Matriksinden İnsülin Salgılayan Endokrin
Pankreas İşlevine Sahip Doku Üretimi

Tez yazarı: Ahmet Öztürk
Tez savunma tarihi: 23.06.2016

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Gökhan Duruksu

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Anabilim Dalı Yüksek
Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	Doç. Dr. Yusufhan Yazır	
Üye	Yard. Doç. Dr. Gökhan Duruksu	
Üye	Yard. Doç. Dr. Kanat Güllü	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız

ÖZET

Pankreas Adacık Kaynaklı MafA+/Pax4+ Kök Hücrelerin Kullanılmasıyla Desellülerize Karaciğer Doku İskelesinin İnsülin Salgılayan Doku Parçasına Dönüştürülmesi

AMAÇ: Sunulan tez çalışmasında sıçan karaciğerlerinin desellülarizasyonu ile elde edilen karaciğer doku iskelesinin Pax4 (paired box gene 4) ve MafA (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) genleri aktarılmış sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH) ile resellülarizasyonu sonucu endokrin pankreas işlevine sahip doku üretimi amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Çeşitli deterjan serileri kullanılarak karaciğer hücrelerinden arındırılmıştır. Böylece doku ve organları oluşturmak için üzerinde hücrelerin tutunup çoğalmalarına olanak tanıyan 3 boyutlu doku iskelesi elde edilmiştir. Bu biyolojik materyalde hücreler bileşenlerin kalmadığı moleküler, histokimyasal ve immün floresan tekniklerle gösterilmiştir. Kültürde çoğaltılan MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'ler doku iskelesine ekilerek yeni bir kültür ortamına alınmışlar ve buraya tutunup çoğalmaları sağlanmıştır. Hücreler doku iskelesine ekildikten sonra standart besi yeri ile kültüre alındıklarında yalnızca matriksin farklılaştırma etkisi, endokrin farklılaştırma besi yeri ile kültüre alındıklarında da matriks etkisine ilaveten kimyasal uyarının etkisi birlikte incelenmiştir. Doku iskelesindeki hücrelerin pankreatik adacıklarda bulunan hücrelere farklılaşmalarını değerlendirmek için çeşitli belirteçler incelenmiştir. Bu inceleme immün floresan yöntemlerle boyanarak, Real Time PCR ile gen ekspresyon seviyesinde, ELISA kullanılarak protein seviyesinde yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar 2 boyutlu standart ve endokrin farklılaştırma besi yeri içeren kültürler ve pankreatik adacıklar ile karşılaştırılarak yöntemin etkinliği incelenmiştir.

BULGULAR: Elde edilen sonuçlar desellülarizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Karaciğer doku iskelesinin hücrelerin çoğalmalarını engellemediğini ve hücre bölünmelerinin devam ettiği görülmüştür. Matriks içinde kültüre alınan hücrelerin 2 boyutlu hücre kültürü ile kıyaslandığında insülin gen ekspresyonunda ve insülin üretiminde çok daha verimli olduğu gözlemlenmiştir.

SONUÇ: Hüresizleştirilen karaciğer doku iskelesinde hüresel herhangi bir bileşenin kalmadığı gösterilmiştir. Bu doku iskelesinin MafA⁺/Pax4⁺sPA-MKH'ler ile yeniden hücrelendirilmesi aşamasında ise hücrelerin matrikse tutunduğu ve bölünüp çoğaldıkları, matriksin etkisi ve endokrin yönde kimyasal uyarılma aşaması ile endokrin pankreas dokusuna benzer karakteristik özellikler gösteren bir yapıya büründükleri gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, resellülarizasyon, ekstrasellüler matriks, endokrin pankreas, doku mühendisliği



ABSTRACT

Development of Decellularized Liver Scaffold into Insulin Secreting Tissue by MafA⁺/Pax4⁺ Pancreatic Islet Derived Stem Cells

OBJECTIVE: In the proposed thesis study, it was aimed the production of tissue with endocrine pancreatic function by the recellularization of decellularized rat liver tissue scaffold with Pax4 (paired box gene 4) and MafA (musculoponeurotic fibrosarcome oncogene homolog A) transfected pancreatic islet derived mesenchymal stem cells (MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH).

METHOD: By a serie of detergent applications, liver was removed from the cells. In this way, 3D tissue scaffold were derived supporting the cell adhesion and proliferation to generate tissue and organ structures. By molecular, histochemical and immunofluorescence techniques, the remnant of cellular component, including nucleic acids, was shown in this biological material. The cultured MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MSCs was seeded onto the tissue scaffold, and cell adhesion and proliferation was provided. Following the recellularization, the effect of matrix was analyzed by culturing the cells in the standard culture medium, and the effect of chemical signalling beside the matrix was evaluated by culturing the cells in the endocrine differentiation medium. Various markers were analyzed for the evaluation of cell differentiation in the tissue scaffold into the pancreatic islet cells. These analyses were performed at protein level by immunoflourescence and ELISA methods and at gene level by Real-Time PCR method. The efficacy of this method was evaluated by comparing the observations to the 2D cultures supplemented with standard and endocrine differentiation medium, as well as with rat pancreatic islet cells.

RESULTS: These results of study shows that decellularization was successfully completed. The capability of liver tissue scaffold in supporting maintenance and expansion of cells were determined. In terms of insulin expressions and productions, 3D culture was much more efficient compared to 2D.

CONCLUSIONS: It was demonstrated that none of the cellular components were presented in the tissue scaffold of decellularized liver. At the recellularization stage of this scaffold with MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MSCs, the adhesion and proliferation of the cells were

observed under the influence of the matrix and chemical induction of differentiation into endocrine cells.

Keywords: Mesenchymal stem cells, recellularization, extracellular matrix, endocrine pancreas, tissue engineering



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca öneri ve desteklerini esirgemeyerek bizlerin gelişimine sağladığı katkılardan dolayı bölüm başkanım, hocam Sayın Doç. Dr. Yusufhan YAZIR'a, her zaman güler yüzlü sevecen tavırları ile bilgi ve tecrübelerini paylaşan hocam Sayın Gülçin GACAR'a, bize bir abla olan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLAR'na, birlikte olduğumuz süre boyunca gelişimimize verdiği önem ve bu doğrultuda yaptığı katkılardan dolayı hocam Sayın Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda hissettiğim, birlikte öğrenip birlikte keşfettiğimiz, birlikte üzüldüğümüz birlikte sevindiğimiz benim için hep özel kalacak olan Ceren ÖZEL, Nilbeste BEKİROĞLU, Merve GÖRGÜÇ ve Esra ALBAYRAK; büyük bir teşekkür de sizlere ederim.

Yine, laboratuvarında sürekli birlikte olduğumuz değerli arkadaşlarım Bulut YURTSEVER'e, Ayşenur KAYA'ya, Kamil Can KILIÇ'a, Leyla KAYIŞ'a, Selen ÖNDER'e, Büşra ÖNCEL DUMAN'a, Ayşegül BAĞLAR'a, Sema YUSUFUĞLU'na ve Gülay ERMAN'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ve tabiki öğrenmeyi sevdiren eğlenceli yapısıyla bize hem öğretmen hem arkadaş olan danışmanım, hocam Sayın Gökhan DURUKSU'ya bu güne kadar vermiş olduğu emeklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Gecenin gündüzüne katarak bizlerle ilgilendiği, bizlere destek olduğu için...

Laboratuvardaki arkadaşlarım ve hocalarım benim ailem oldular. Hepsine sükran borçluyum. Ancak en büyük teşekkürü ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, benim için her türlü zorluğa göğüs geren, benim bu günlere gelmemde kuşkusuz en büyük paya sahip olan, sağladıkları huzurlu ve mutlu ortam ile, verdikleri doğru ve ahlaklı eğitim ile, gösterdikleri sabır, besledikleri sevgi ile benim ben olmamı sağlayan anneme, babama ve kardeşlerime ederim.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

06/06/2016

Ahmet ÖZTÜRK



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.2. Kök Hücreler	2
1.2.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	4
1.3. Karaciğer ve Pankreas Histolojisi	9
1.3.1. Karaciğer Histolojisi	9
1.3.2. Pankreas Histolojisi.....	15
1.4. Tip 1 Diabetes Mellitus	30
1.4.1. Diyabet Tedavisinde Kök Hücreler.....	31
1.4.2. Gen Klonlama Teknolojisiyle İnsülin Üreten Hücre Eldesi	32
1.5. Doku Mühendisliği.....	35
1.5.1. Hücreler	37
1.5.2. Biyoaktif Moleküller	37
1.5.3. Biyomateryaller	38
1.6. Desellülarizasyon	40
1.6.1. Desellülarizasyon Ajanları.....	42
1.6.2. Desellülarizasyon Yöntemleri	47
1.6.3. Desellülarize Edilmiş Ekstrasellüler Matriksin Sterilizasyonu.....	49
1.6.4. Desellülarize Edilmiş Ekstrasellüler Matriksin Değerlendirilmesi.....	50
1.7. Resellülarizasyon	50
1.7.1. Organ İskelelerinin Parankim Resellülarizasyonu.....	51
2. AMAÇ.....	56
3. YÖNTEM.....	57

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	57
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	57
3.3. Karaciğerin <i>In vivo</i> Perfüzyonu ve Çıkarılması	58
3.3. Tam Karaciğer Desellülarizasyonu	59
3.4. Karaciğer Desellülarizasyonunun Değerlendirilmesi	59
3.4.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi	59
3.4.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar	60
3.4.3. Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi	61
3.5. Resellülarizasyon	61
3.5.1. Karaciğer Doku İskelesinde Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi	61
3.6. Karaciğer Doku İskelesinde MafA ⁺ /Pax4 ⁺ -sPA-MKH'lerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaştırılması	62
3.7. 2-Boyutlu <i>In Vitro</i> Kültürlerde MafA ⁺ /Pax4 ⁺ -sPA-MKH'lerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaştırılması	62
3.8. Kantitatif Real Time-PCR Yöntemiyle Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	63
3.9. ELISA Yöntemiyle İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi	64
3.10. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar	65
3.11. İstatistiksel Analiz	66
4. BULGULAR	67
4.1. MafA ve Pax4 Genleri Aktarılmış Hücrelerin Kültürü ve Çoğaltılması	67
4.2. Perfüze Edilmiş Sıçan Karaciğerinin Çıkarılması	68
4.3. Desellülarize Karaciğer Matrisinin Karakterizasyonu	69
4.3.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi	70
4.3.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar	71
4.3.3. Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi	75
4.4. Karaciğer Doku İskelesinin Resellülarizasyonu	76
4.5. 2-Boyutlu Kültürde ve Karaciğer Doku İskelesinde MafA ⁺ /Pax4 ⁺ -sPA-MKH'lerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaştırılması	79
5. TARTIŞMA	93
5.1. Sınırlılıklar	104
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	105
KAYNAKLAR	106
ÖZGEÇMİŞ	118
EKLER	121



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2B: İki Boyutlu

3B: Üç Boyutlu

CD: Cluster of Differentiation

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DM: Diabetes Mellitus

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FBS: Fetal Sığır Serumumu

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü-1

gER: Granüllü Endoplazmik Retikulum

HE: Hematoksilen ve Eozin

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörleri

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

kb: Kilo Baz

LIF: Lösemi İnhibitör Faktör

MafA: Muskuloaponevrotik Fibrosarkoma Onkogen Homolog A

mg: Miligram

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

mL: Mililitre

PAA: Perasetik Asit

Pax4: Paired Box Gene 4

PBS: Fosfat Salin Tamponu

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

RGD: Arjinin-Glisin-Aspartik Asit

SDS: Sodyum Dodesül Sülfat

T1DM: Tip 1 Diabetes Mellitus

T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

uPKH: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Telomeraz enziminin çalışma prensibi.....	3
Çizim 1.2. Bir karaciğer lobülünün şematik görünümü.....	11
Çizim 1.3. İnsülinin posttranslasyonel işlenmesi.....	20
Çizim 1.4. Kollajen tip 4 ağ oluşumu.....	28
Çizim 4.1. Gen aktarılmış pankreatik adacık kök hücre kültürü.....	67
Çizim 4.2. Gen aktarımı ile epitelyal bir görünüm kazanan MafA ⁺ /Pax4 ⁺ -sPA-MKH'lerinin zıt-faz ışık mikroskobu görüntüleri.....	68
Çizim 4.3. Sıçan karaciğeri izole edilmeden önce organdaki kanın uzaklaştırılması amacıyla yapılan perfüzyon işlemi.....	69
Çizim 4.4. Sıçan karaciğer desellülarizasyonu.....	70
Çizim 4.5. Desellülarizasyon sonrası matriksten genomik DNA izolasyonu ve jel elektroforezi ile matriks içinde DNA kalmadığının belirlenmesi.....	71
Çizim 4.6. Normal karaciğer dokusundan ve desellülarize karaciğer matriksinden alınan kesitlerde HE boyaması.....	72
Çizim 4.7. Normal karaciğer ve desellülarize matriks kesitlerinde pikrosirius red boyaması.....	73
Çizim 4.8. Normal ve desellülarize karaciğer matriks görünümü.....	74
Çizim 4.9. Hücrelerden arındırılmış karaciğer doku iskelesinde desellülarizasyon sonrası damar yapılarının görüntülenmesi.....	75
Çizim 4.10. Normal karaciğer ve desellülarize karaciğer ekstrasellüler matriksinde ağırlıkça kollajen içeriğinin matriks toplam ağırlığına göre yüzde cinsinden belirlenmesi.....	76

Çizim 4.11. Desellülarize sıçan karaciğer matriksinin kök hücreler ile resellülarizasyonu.....	77
Çizim 4.12. 15 günlük resellülarize doku kültüründe hücre bölünmesinin görüntülenmesi.....	78
Çizim 4.13. Metabolik olarak aktif hücre sayısını belirlemek için yapılan WST-1 proliferasyon analizi.....	79
Çizim 4.14. Besi ortamına salgılanan insülin miktarının belirlenmesi.....	80
Çizim 4.15. Karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde endokrin farklılaştırma besi yeri ile kültüre edilen hücrelerin zamana bağlı olarak ortama salgıladığı insülin miktarı.....	81
Çizim 4.16. 15. gün sonunda standart ve endokrin farklılaşma besi yerinde kültüre edilmiş 3B yapılarındaki hücrelerin insülin ve Pdx1 boyaması.....	82
Çizim 4.17. 15. gün sonunda standart ve endokrin farklılaşma besi yerinde kültüre edilmiş 3B yapılarındaki hücrelerin GckR ve glukagon boyaması.....	83
Çizim 4.18. 15. gün sonunda standart ve endokrin farklılaşma besi yerinde kültüre edilmiş 3B yapılarındaki hücrelerin MafA ve Pax4 boyaması.....	84
Çizim 4.19. Gruplar arası karşılaştırmalı insülin gen ekspresyon analizi.....	85
Çizim 4.20. Ekstrasellüler matriks üzerinde yapılan kültürlerde haftalık insülin gen ekspresyon analizi.....	86
Çizim 4.21. Gruplar arası karşılaştırmalı glukokinaz ve Pdx1 gen ekspresyon analizi.....	87
Çizim 4.22. Pax4 ve MafA gen ekspresyon analizi.....	88
Çizim 4.23. Deney gruplarındaki α -hücre farklılaşmasını değerlendirebilmek için yapılan glukagon gen ekspresyon analizi.....	89

Çizim 4.24. Deney gruplarındaki δ -hücre farklılaşmasını değerlendirebilmek için yapılan somatostatin gen ekspresyon analizi.....	90
Çizim 4.25. Deney gruplarında hepatic belirteçlerin ekspresyon miktarlarının belirlenmesi.....	91
Çizim 4.26. 3B kültürlerde hepatic belirteç ekspresyonunun 3 hafta boyunca değişiminin incelenmesi.....	92



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnsan ve fare kökenli embriyonik kök hücrelerin özellikleri.....	6
Çizelge 1.2. Karaciğerin fizyolojik görevleri.....	10
Çizelge 1.3. Desellülarize edilmiş dokulardan oluşan klinik ürünler.....	42
Çizelge 3.1. Deney gruplarının belirlenmesi.....	58
Çizelge 3.2. Konvansiyonel PCR reaktifleri ve konsantrasyonları.....	60
Çizelge 3.3. qRT-PCR’da kullanılan genlere ait primer baz dizilimleri.....	64
Çizelge 3.4. Blok Serum, primer antikor ve sekonder antikor tablosu.....	66

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Enerji, yaşamın temel kaynağıdır. Her hareket hatta her düşünce bile bir miktar enerji kullanımını gerektirir. Günlük yaşamda yapılan onca eylem düşünüldüğünde ciddi bir enerji gereksinimi ortaya çıkmaktadır. Bu ihtiyaç yiyeceklerden alınan karbonhidratlardan, yağlardan ve proteinlerden karşılanır. Ancak, bu büyük moleküllerin vücutta emiliminin gerçekleşebilmesi için yapı taşlarına kadar sindirilmeleri gerekmektedir. Karbonhidratlar monosakkaritlere, proteinler aminoasitlere ve yağlar da yağ asidi ve gliserollere... 6 karbonlu bir monosakkarit olan glukoz da söz konusu yapı taşları içinde en önemlilerinden birisidir. Başta beyin olmak üzere vücudun tüm organları için glukoz son derece önemli bir besin kaynağıdır.

Glukozun hücreler tarafından kullanımında pankreas bezinden salgılanan bir hormonun rolü oldukça büyüktür. İnsülin olarak bilinen bu hormonun eksikliğinde özellikle iskelet kası, kalp kası ve adipoz dokuda glukozun hücre içine alınımında ve kullanımında çok ciddi sorunlar ortaya çıkmaktadır.

Tip 1 diabetes mellitus (T1DM), pankreasta yer alan *Langerhans* adacıklarındaki insülin üreten β -hücrelerinin otoimmün saldırılar sonucu hasar görmesinin veya ölmesinin bir sonucu olarak vücudun ihtiyaç duyduğu insülini üretememesi ile karakteriz edilmektedir (Davies ve diğ. 1994). Bu durumda hastalar mutlak veya göreceli olarak insülin yetersizliği yaşayacaklarından dolayı ömür boyu dışarıdan insülin almak zorunda kalırlar. Dolayısıyla T1DM, insüline bağımlı diyabet olarak da adlandırılmaktadır. Ancak, ömür boyu dışarıdan insülin takviyesine muhtaç olmak hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir. Arzu edilen tedavi ise, hasar gören bölgenin onarımı ya da bir şekilde vücudun kendi insülinini ihtiyacı ölçüsünde üretebilmesidir.

Son yıllarda hücresel tedavi başlığı altında kök hücreler kendini yenileyebilmeleri, yüksek bölünebilme kapasiteleri ve diğer hücrelere farklılaşabilme potansiyelleri ile hastaların umut ışığı olmaktadır. Özellikle kişinin kendi vücudundan elde edilen (otolog) hücreler immünolojik olarak reddedilmeyeceği için deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu güne kadar hasar gören β -hücrelerinin yerine konulması için birçok uygulama denenmiş olsa da bu stratejilerden üçü ön plana çıkmıştır: (i) hücre nakli, (ii) adacık nakli ve (iii) pankreas nakli (Watson 2015). Ancak pankreas ve adacık nakli hem donör organ bulma konusundaki sıkıntılardan dolayı hem de immün sistemin ömür boyu baskılanmasını gerektirdiğinden dolayı ciddi sorunlar barındırmaktadır. Ayrıca bu yaklaşımlar dolaşıma verilen hücrelerin istenilen bölgeye göç etmelerindeki ya da ne kadarının göç edeceği hakkındaki soru işaretleri, hangi hücre tipinin seçileceği ve uygulama yerinin neresi olacağı gibi kendi içinde cevaplar bekleyen soruları barındırmaktadır.

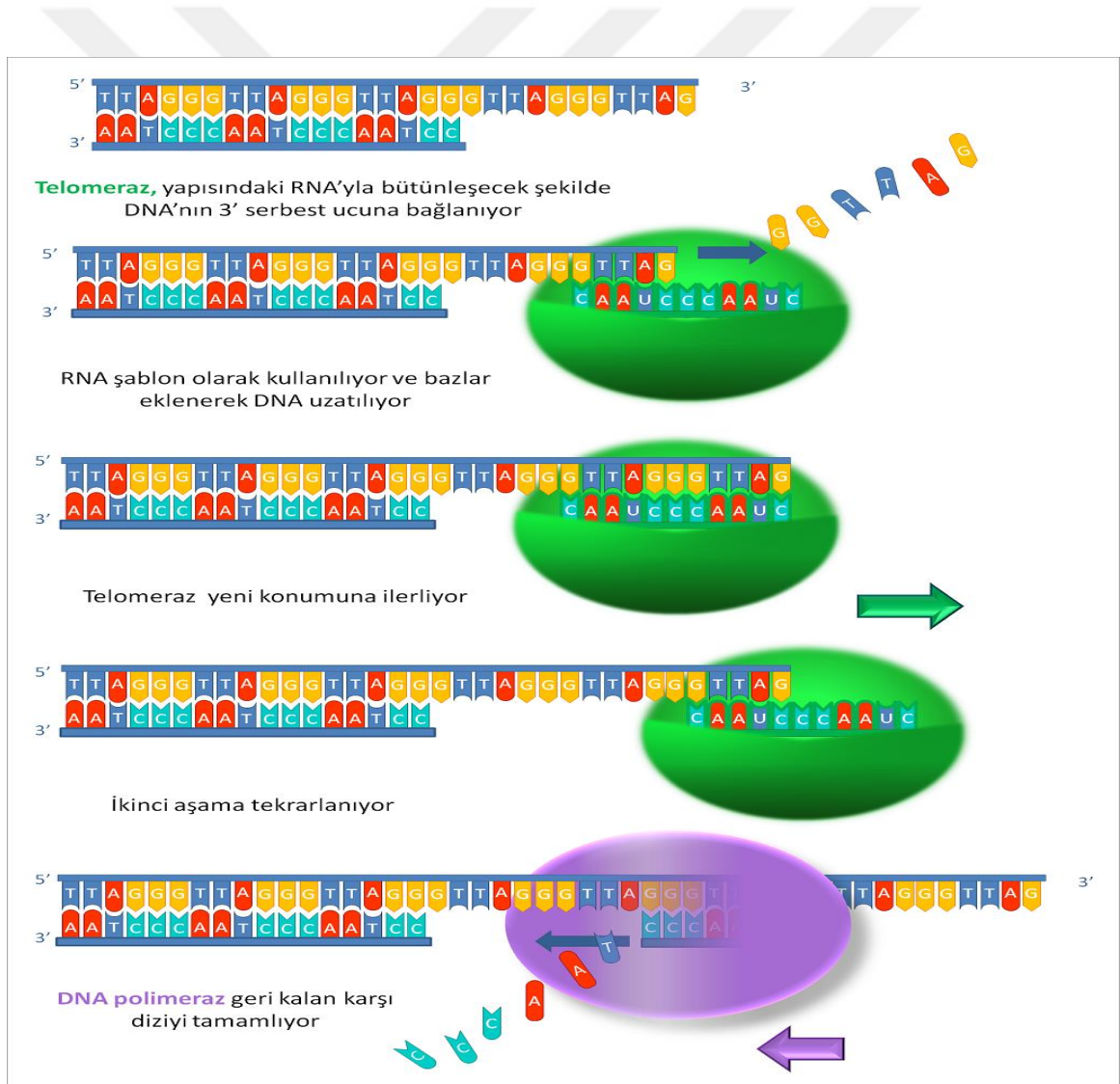
Yeni ve heyecan verici yaklaşımları ile hasarlı ya da kayıp organ ve dokuların onarımını ya da yeniden yapılanmasını hedefleyen doku mühendisliğinin kendine has yöntemleri ile organlarda ya da dokularda oluşan sorunların çözümü için ortaya koyduğu potansiyel günden güne daha iyi anlaşılmaktadır. Bu teknoloji laboratuvar ortamında otolog hücreler ile kişiye uyumlu dokuların ve organların üretilmesini bizlere vaat etmektedir. Doku mühendisliği, birçok farklı hastalıkta olduğu gibi, T1DM hastaları için de umut ışığı olmaktadır.

1.2. Kök Hücreler

Kök hücre kavramı döllenme ile başlayıp yaşamın sonuna kadar devam eden geniş bir yelpazedir. Bu yelpaze hem doku ve organların yapımını hem de yenilemek ve tamir etmek amacını içinde barındırır. Kök hücreler; kendini yenileyebilme ve gerektiğinde çoğalabilme özelliğine sahip olan, ihtiyaç halinde farklı hücre türlerine farklılaşabilen özelleşmemiş hücrelerdir (Sangkum 2016). Günümüzde hücresel tedavilerin olmazsa olmazları arasında yer alan bu hücreler hem yenileyici (rejeneratif) hem de tamir edici (reperatif) tıp olarak da adlandırılan ve hasarlı doku ve organların onarımını ya da yeniden yapılandırılmasını kapsayan bu alanda aktif roller üstlenmektedir. Kök hücreler -yoğun kendini yenileme ve farklılaşabilme özelliklerinde dolayı- uzun yıllar boyunca ilgi odağı olacak ve söz konusu amaçlar için ilk tercih edilecek hücre türlerinin başında gelmeye devam edecektir.

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran önemli özelliklerden biri de yüksek seviyede bölünebilmeleri ve bu bölünmeler sonucunda özelliklerini hâlâ koruyor olmalarıdır. Bu bölünme kapasitelerini "telomer" olarak adlandırılan, kromozomların uç kısımlarında

bulunan DNA dizileri belirler. Telomerler, ökaryotik doğrusal kromozomların fiziksel uçlarıdır ve transkripsiyon açısından faal olmayan (gen kodlamayan), heterokromatin yapılarıdır. Omurgalılarda bu yapı 3'-TTAGGG-5' hekzanükleotit sıralamasının uzun tekrarlarından oluşur. Bu sayı insanda 15 kb'ye ve kemirgenlerde 100 kb'ye kadar uzanır. (Batista 2014). Hücreler ne kadar uzun telomere sahipse o kadar fazla sayıda bölünebilmektedir. Ancak her bölünmenin sonunda telomer uzunluğu 50-150 baz çifti azalır (Reddel 2003). Çünkü DNA polimeraz enzimi, ana zincirin 3' ucunda yeni bir DNA sentezi başlatamaz. Telomeraz enzimi ise, yapısında taşıdığı RNA'yı (hTR) taslak olarak kullanır ve -ters transkriptaz olan- protein katalitik alt birimi (hTERT) yardımıyla da telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna eklenmesiyle bu kısalma problemini çözer (Çizim 1.1).



Çizim 1.1. Telomeraz enziminin çalışma prensibi

Genel olarak somatik hücrelerde telomeraz aktivitesi düşük olduğundan ya da hiç olmadığından dolayı çok fazla bölünme kapasitesine sahip değildirler. Öte yandan insan germ hücrelerinde, çoğu tümör hücrelerinde ve embriyonik kök hücrelerde önemli bir telomeraz aktivitesi bulunmuştur (Kong ve diğ. 2015). Bu hücrelerin neredeyse sınırsız olan bölünme yeteneklerinin sebebinin telomeraz enzimi olduğu tahmin edilmektedir. Benzer şekilde kök hücrelerde de mevcut olan bu enzim aktivitesi “kök hücreler uzun zaman boyunca bölünüp çoğalabilirler” ifadesini kurmamıza sebep olmaktadır.

1.2.1. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücrelerin önemli özelliklerinden biri vücutta özelleşmiş görevleri yerine getiren dokulardaki hücelere benzer yapıda olmamalarıdır. Ancak ihtiyaç halinde kan, kas, kemik gibi özelleşmiş dokuları oluşturan hücelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Tipik olarak kök hücreler, gelişimsel potansiyellerine göre sınıflandırılır ve bu potansiyel, onların farklılaşabilme özelliklerini belirler (Batista 2014). Hücrelerin diğer hücre türlerine farklılaşabilme kabiliyetine potansi denir.

Farklılaşma göreceli bir kavramdır ve farklılaşan hücrenin fenotipinde meydana gelen değişimler başka bir hücre ile kıyaslandığında anlam kazanır. Günümüzde epigenetik mekanizmaların, hücre farklılaşması üzerinde rol oynayan en önemli etmen olduğu artık bilinmektedir. 1957 yılında ilk kez C. Waddington tarafından oluşturulan modelde hücre farklılaşması üzerinde rol oynayan ve kalıtılabilen genom ötesi düzenlemeler hücrenin hangi farklılaşma durumunda olacağını belirlemektedir (Goldberg 2007 alıntı Waddington 1957). Ayrıca bu mekanizmal etkilerin artması ya da azalması ile hücre durum değiştirebilmektedir (Can 2013, s.45). Histon asetilasyonu, DNA metilasyonu, X kromozom inaktivasyonu gibi etkenler bu sürecin aktif elemanlarıdır.

Hücrelerin farklılaşma mekanizması bir çark sistemine benzer. Tek yönlü çalışmayıp tersi yönde de çalışabilmektedir. Genelde ileriye doğru farklılaşan (diferansiyasyon) hücreler geriye farklılaşma (dediferansiyasyon) da yapabilmektedir. Deneysel olarak elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH) bunun en iyi örneklerindedir.

1.2.1.1. Totipotent Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşabilme kabiliyetlerine göre sınıflandırdığında ilk olarak totipotent kök hücreler karşımıza çıkmaktadır. Totipotensi, tek bir hücrenin bölünebilme ve ait olduğu organizmadaki tüm hücre türlerine farklılaşarak dokuyu hatta organizmayı oluşturabilme yeteneğini ifade eden bir terimdir. Hücre potansiyeli spektrumunda tamamen, büsbütün anlamındaki *totus* kelimesinden türetilen totipotensi en büyük farklılaşabilme kapasitesini temsil eder. Sporlar ve zigot totipotent hücreye örnek verilebilir (Mitalipov ve Wolf 2009). Zigotun oluşmasından itibaren erken embriyonik dönemde örneğin 8 hücreli aşamada hücreler totipotenttir.

1.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Hücre biyolojisinde, pluripotensi üç germ tabakasına da kaynaklık edebilen; ektodermden, mezodermden ve endodermden oluşan dokulardaki hücelere farklılaşabilen kök hücrelerin 'farklılaşabilme' kapasitelerini ifade eder. Fertilizasyondan sonraki 4-5 günlük embriyo blastokist aşamasındadır. Bu aşamada, blastokisti dışarıdan saran trofoblastlar ve blastosöl sıvısının bulunduğu boşluğa bakan iç hücre kitlesi oluşur. Trofoblast hücrelerine dönüşemeyen ve üç germ tabakasına ait hücelere dönüşebilme potansiyeli olan iç hücre kitlesi hücreleri pluripotent hücrelerdir. İmplantasyon öncesi dönemde kültür ortamına alınıp çoğaltılan bu hücelere embriyonik kök hücre (EKH) denir. İlk olarak 3,5 günlük fare blastokistinin iç hücre kitlesinden elde edilmişlerdir. Lösemi inhibitör faktör (LIF) varlığında ve uygun bir besleyici tabaka varlığında pluripotent olarak kalabilirler (Evans ve Kaufmann 1981). İmplantasyon ile birlikte iç hücre kitlesi, epiblast ve hipoblasta dönüşür. Buradaki epiblast hücreleri de pluripotent hücrelerdir. Dolayısı ile hücrelerin kültür ortamına alındığı döneme göre farklı pluripotent hücre dizileri elde edilir. Ayrıca embriyonik karsinoma hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri ve bunlardan elde edilen embriyo germ hücreleri de pluripotent hücrelerdir.

2006 yılında, Takahashi ve Yamanaka'nın çalışmalarını yayınladıkları makale (Takahashi ve Yamanaka 2006) kök hücre alanında yeni bir çığır açmıştır. Bir dizi transkripsiyon faktörleri (Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc) somatik hücelere aktararak hücrenin geriye farklılaşması sağlanmıştır. Bu yolla elde edilen pluripotent kök hücreler, uPKH olarak adlandırılmıştır. Fare fibroblastlarından uPKH elde edilmesinden bir yıl sonra yine Takahashi ve Yamanaka'nın da içinde bulunduğu bir grup tarafından insan hücrelerinden de uPKH eldesi başarılmıştır (Takahashi ve diğ. 2007). Aynı yıl farklı

transkripsiyon faktörleri (Oct4, Sox2, Lin28 ve Nanog) kullanılarak uPKH dizileri elde edilmiştir (Yu ve diğ. 2007).

Diğer hücelere kıyasla pluripotent kök hücrelerde kromatin yapısı daha esnektir ve daha kolay açılır. EKH'lerde histon proteinleri ve histon olmayan kromatin proteinleri kromatine gevşek tutunur (Meshorer 2006). Hücreler farklılaştıkça birçok gende kapanmalar görülür.

Çizelge 1.1. İnsan ve fare kökenli embriyonik kök hücrelerin özellikleri (Can 2013, s.225)

Belirteç	İnsan EKH	Fare EKH
SSEA-1	-	+
SSEA-3, SSEA-4	+	-
TRA-1-60, TRA-1-81	+	-
TRA-2-54	+	-
GCTM-2	+	-
TG343	+	Bilinmiyor
TG30	+	Bilinmiyor
CD9	+	+
CD133	+	+
Oct4	+	+
Nanog	+	+
Sox2	+	+
Telomeraz	+	+
Alkalın Fosfataz	+	+

1.2.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Pluripotent kök hücrelerle kıyaslandığında bölünme ve farklılaşabilme yetenekleri daha sınırlı olan, her üç germ tabakasına ait hücelere farklılaşabilmenin aksine birbirine

daha yakın hücre gruplarına farklılaşabilen ve pluripotent hücrelerin özelleşmesiyle oluşan kök hücrelerdir. Multipotent kök hücreler, genellikle birkaç hücre gurubuna farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler. Örneğin, multipotent bir hücre olan hematopoetik kök hücreler lenfositler, monositler, nötrofiller gibi kan hücrelerine farklılaşabilirler. Fakat beyin hücrelerini oluşturamazlar. Multipotent kök hücreler kordon kanında (Zhao ve Mazzone 2010), adipoz dokuda (Tallone ve diğ. 2011), kalpte (Beltrami ve diğ. 2003) ve daha birçok dokuda bulunurlar.

Mezenkimal kök hücreler (MKH)

Hematopoetik kök hücrelerin keşfini takiben *Friedenstein* ve ark. tarafından yine fare kemik iliği dokusunda multipotent kök hücrelerin farklı bir popülasyonunun varlığı gözlemlenmiştir. Bu hücre grubu, plastik yüzeylerde kültüre edildiğinde fibroblastoid koloniler oluşturabilmesi ve başka dokulara nakledildiğinde kemik, yağ, retikulum hücrelerine farklılaşabilmesi ile karakterize edilmiştir (Friedenstein ve diğ.1970), (Friedenstein ve diğ. 1966). İlerleyen yıllarda, hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak yapılan çalışmalar neticesinde MKH'ler her üç germ yaprağından köken alan hücre ve dokuları oluşturan multipotent kök hücreler olarak tanımlanmıştır (Karaöz ve Ovalı, 2004). Bu hücreler vücutta ayrıca immün düzenleyici roller de üstlenmektedir (Kyurkchiev ve diğ, 2014).

Birçok farklı kaynaktan MKH elde etmek mümkündür. Muhtemelen bu sebepten dolayı MKH terimi birbirinden farklı oranlarda farklılaşma yeteneğine sahip heterojen bir hücre popülasyonunu karşılamaktadır. Bu hücrelerin ortak belirteçleri konusunda sıkıntılar olsa da Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (International Society for Cellular Therapy, ISCT) CD73, CD90 ve CD105 moleküllerini bu hücrelerin temel belirteçleri olarak belirlemiştir (Dominici ve diğ. 2006).

Günümüzde MKH elde edilmesi ve tanımlanması bazı standartlar üzerine oturtulmuştur. Bazı belirteçlerin yüksekliği, bazı belirteçlerin yok denecek kadar azlığı, plastik yüzeylere tutunmaları, bu yüzeyler üzerinde çoğalmaları ve *in vitro* ortamda en az üç farklı hücre serisine farklılaştırılabilmeleri bu standartları oluşturmaktadır.

İnsan vücudunda MKH'ler özellikle damarca zengin olan bağ dokusu barındıran dokularda bol miktarda bulunur. Özellikle kemik iliğinin bir mezenkimal kök hücre deposu

olduğu düşünölmektedir. Bunun yanı sıra yağ dokusu, göbek kordonu stroması da bol miktarda MKH içermektedir (Ong ve Sugii 2013). Ayrıca, 2010 yılında Karaöz ve ekibinin pankreatik adacıklardan elde ettikleri kök hücreler üzerinde yaptıkları bir çalışmada bu hücrelerin tipik MKH olabileceği ve özellikle T1DM'de hücrenel tedavi çalışmalarımda kemik iliği MKH'lerine göre daha iyi bir aday olacağı ileri sürölmektedir (Karaöz ve diğ. 2010a).

Elde edildiği kaynağa göre MKH'ler farklı genotiplere (Wagner ve diğ. 2005), farklı sitokin ve kemokin salgılama (Friedman ve diğ. 2007) özelliklerine sahiptir. Huang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin kondrojenik farklılaşma yeteneğinin adipoz dokudan elde edilen MKH'lere göre daha iyi olduğunu ileri sürmüşlerdir (Huang ve diğ. 2005). MKH'ler arasındaki bu fark onların elde edildikleri kaynağa göre farklı özellikler taşıdıklarını göstermektedir.

Özellikle adipoz dokuda ve kemik iliğinde bolca bulunan mezenkimal kök hücreler en yaygın çalışılan multipotent kök hücrelerdir. Hem elde edilebilmesi diğer kaynaklara göre göreceli olarak kolay olması hem de immün düzenleyici özellikleri bunda etkili olmaktadır (Kyurkchiev ve diğ, 2014).

Vücuttaki tüm çekirdekli hücrelerin yüzeylerinde bulunan ve işlevi sitotoksik T lenfositlerine bazı protein parçalarını sunmak olan MHC Sınıf I molekülü vücudun kendine ait olan hücreleri yabancı hücrelerden ayırt etmesini sağlamaktadır. Bu moleküller belli oranlarda MKH'lerde de bulunmaktadır. Ancak söz konusu bu moleküller MKH'lerde düşük oranda bulunmaktadır. Buna ek olarak MHC Sınıf II antijeninden yoksun olmaları sebebiyle MKH'ler oldukça düşük -hatta yok denecek- bir immün yanıtı neden olurlar (Gebler ve diğ. 2012). Birçok çalışmada da MKH'lerin bağışıklık sistemi tarafından tanınmadığını, bunun da ötesinde immün yanıtları engellediği gösterilmiştir (Noel ve diğ. 2007). Bu özellikleri onların immün düzenleyici özellikleri (Kyurkchiev ve diğ, 2014) ile birleşince, MKH'lerin bilim insanları arasında neden bu kadar popüler bir yere sahip olduğunu açıklamaktadır. Çünkü düşük bir immün yanıtı neden olmaları onları hem allotransplantasyona hem de ksenotransplantasyona uygun bir hale getirmektedir (Karaöz ve diğ. 2013).

Mezenkimal kök hücrelerden bahsederken üzerinde durulması gereken önemli konulardan biri de farklılaşma potansiyelleridir. Birçok araştırmada bu hücrelerin hem

mezoderm hem de mezoderm olmayan hücre serilerine farklılaştıkları gösterilmiştir. Adipositler, nöroglial hücreleri, osteositler (Karaoz ve diğ. 2013), endotel hücreleri (Oswald ve diğ. 2004), kardiyomiyositler (Makino ve diğ. 1999), hepatositler (Snykers ve diğ. 2009) ve nöron benzeri hücreler (Phinney ve Prockop 2007, Arthur ve diğ. 2008) MKH'lerin farklılaştığı hücrelerdendir. Ayrıca bu hücreler endokrin hücrelere de farklılaşabilme potansiyeline sahiptir (Gabr ve diğ. 2015, Neshati ve diğ. 2010). Dolayısıyla, MKH'ler bu güne kadar birçok kez diyabetin hücresel terapi çalışmalarında kullanılan hücreler arasında yer almıştır. Söz konusu çalışmaların önemli bir bölümünde MKH'lerin insülin salgılayan hücrelere dönüştürülmesi hedeflenmiştir. Bu farklılaştırma işlemi bazen kimyasal indükleme (Khorsandi ve diğ. 2015, Karaoz ve diğ. 2013) ile bazen uPKH teknolojisi kullanılarak (Raikwar ve diğ. 2015) ve bazen de gen aktarımı ya da santral dogmayı etkileyebilecek olan miRNA gibi teknolojiler kullanılarak yapılmıştır (Jafarian ve diğ. 2015).

1.2.1.4. Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücreler, bölünme ve farklılaşabilme özellikleri oldukça sınırlı olan ve yalnızca birkaç hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Lenfoid ve miyeloid kök hücreler oligopotent kök hücrelere örnek olarak verilebilir.

Bunun dışında, iki hücre türüne (hepatosit ve kolanjiosit) farklılaşabilen hepatoblast gibi hücrelere bipotent (Chikada ve diğ. 2015), tek bir hücre türüne farklılaşabilen hücrelere ise unipotent kök hücreler denmektedir.

1.3. Karaciğer ve Pankreas Histolojisi

1.3.1. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer insan vücudunda olduğu gibi fare, sıçan gibi kemirgenlerin de en büyük salgı organıdır. Hem endokrin hem de ekzokrin bir organdır. Yaşamın devamı için gerekli olan hayati fonksiyonlara sahiptir (Çizelge 1.2). Karaciğer yokluğunda veya işlev yitiminde, diyalizle kısa bir süre fonksiyonları devam ettirilebilir. Fakat karaciğer

fonksiyonunun uzun süreli yokluğunda, telafi edebilmenin hiçbir yolu yoktur. Karaciğerin büyük bir kısmı periton zarı ile çevrilidir. Bu zar *tunika seroza* ve *tunika fibroza* olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Kollajen ve elastik liflerden oluşan *glisson* kapsülünün (tunika fibroza) organın iç kısımlarına doğru uzamasıyla lob ve lobüller oluşmaktadır. İnsanda kemirgenlerde olduğu gibi sağ ve sol loblar iki büyük lobu oluştururken, kuadrat ve kaudat loblar küçük lobları oluşturur. Kemirgenlerde ise küçük loblar median ve kaudat loblardır. Her lobül merkezi venin etrafında karaciğerin parankim hücreleri olan hepatositlerin dizilmesiyle oluşur. Sıçanlarda, insanlarda olanın aksine safra kesesi bulunmamaktadır.

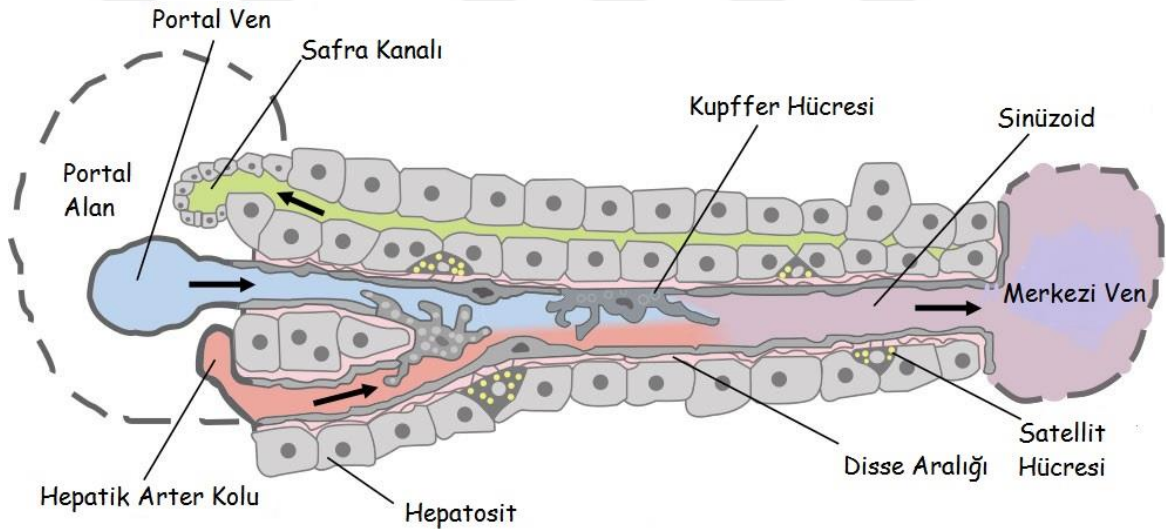
Çizelge 1.2. Karaciğerin fizyolojik görevleri

Vücudun plazma proteinlerinin çoğunun üretimi
Çeşitli vitaminlerin ve demirin depolanması ve dönüştürülmesi
İlaçların ve toksinlerin detoksifikasyonu
Önemli birçok metabolik yolağın işlevinin düzenlenmesi
Safranın üretimi
Endokrin benzeri roller, birçok hormonun yapı ve fonksiyonunu modifiye etme

Karaciğere kan iki kan damar yolu ile gelmektedir. Bunlardan biri ince bağırsak, pankreas ve dalaktan gelen kanı taşıyan ve karaciğere gelen kanın yaklaşık %75-80'ini getiren portal vendir. Bu damar desellülarizasyon tekniğinin kullanıldığı doku mühendisliği çalışmalarında da sık sık kullanılmaktadır. Karaciğere gelen oksijenlenmiş kanın taşındığı hepatik arter bu organdaki toplam kanın %20-25'ini getiren damar yoludur.

Karaciğeri iyi bir şekilde anlayabilmek için fonksiyonel ve yapısal birimlerini olan karaciğer lobüllerini iyi irdelemek gerekir (Çizim 1.2). Klasik bir karaciğer lobülü portal triad ile merkezi ven (*vena sentralis*) arasında kalan ve hepatositlerce doldurulan alandır. Portal triad ise bir hepatik arter, bir portal ven ve bir safra kanalının birbirine yakın konumlanmasıyla oluşan sisteme verilen isimdir. Portal venin kolu ile hepatik arterin kolu birleşerek karaciğer lobülüne yönelir. Bu birleşmeyle hepatositlerin arasındaki sinüzoidler oluşur. Bir başka ifade ile sinüzoidler, lobüllerin kenarlarına kadar gelen portal ven ve hepatik arterin hepatositlerin arasına girmiş uzantılarıdır. Bu ifadeden de anlaşılacağı gibi,

sinüzoidlerde hem hepatik portal ven aracılığı ile bağırsak, pankreas ve dalaktan gelen oksijen konsantrasyonu düşük olan kan bulunurken hem de hepatik arter aracılığı ile gelen oksijence zengin kan bulunmaktadır. Kan akışı periferden merkeze doğrudur. Safra akışı ise merkezden periferde doğrudur. Sinüzoidler bağırsakta emilen besin ve toksik maddeleri, kan hücrelerinin dalaktan gelen parçalanma ürünlerini, pankreastan gelen endokrin salgıları ve arter ile gelen oksijeni hepatositlere iletir. Benzer şekilde, hepatositlerin ürettiği yüzlerce sentez ürününü de merkezi ven yardımıyla genel dolaşıma aktarır. Perisinüzoidal aralık olarak da bilinen disse aralığı endotel hücreleri ile hepatositlerin arasında kalan alandır. Hepatositlerin bazal yüzeylerinden disse aralığına küçük, düzensiz mikroviluslar uzanır. Bu alanın temel işlevi kan ile karaciğer hücreleri arasındaki madde alışverişini sağlamaktır. Endotel hücreleri arasındaki boşluklar ve kesintisiz bazal laminanın olmaması disse aralığına kan girişine izin vermektedir (Ross MH ve Pawlina W, 2014).



Çizim 1.2. Bir karaciğer lobülünün şematik görünümü. <https://embryology.med.unsw.edu.au/>'dan uyarlanmıştır.

Hepatositler, sinüzoid endotel hücreleri, kupfer hücreleri, satellat (ito) hücreleri karaciğer lobülünde bulunan farklılaşmış hücrelerdir.

Karaciğer parankim dokusunun temel hücreleri olan hepatositler karaciğer ağırlığının %70-85'ini oluştururlar (Lee ve diğ. 2015). Yaklaşık 20-30 µm çapındaki hücrelerdir. Vücuttaki birçok hücrenin aksine granüllü endoplazmik retikulum (gER) açısından zengindirler. Protein sentezi ve depolanması, karbonhidratların dönüştürülmesi, kolesterol safra tuzları ve fosfolipitlerin sentezi, detoksifikasyon gibi vücut için hayati önem taşıyan görevleri yerine getirirler. Bir hepatositin ortalama yaşam süresi 150 gündür. Bu yaşam

süresi sindirim sistemi ile bağlantılı hücreler için oldukça uzun sayılabilecek bir süredir. Karaciğerde bulunan hepatositlerin %30-40'ı poliploid hücrelerdir (Celton-Morizur ve diğ. 2010). İki çekirdekli hücreler de yaygındır.

Sinüzoid endotel hücreleri, hepatik sinüzoidleri çevrelerler. Ancak bu çevreleme ince ve kesintilidir. Disse aralığı ile sinüzoidin arasında konumlanmışlardır.

Kupfer hücreleri, karaciğerde bulunan ve retikuloendotelyal sistemin bir parçası olan makrofajlardır (Naito ve diğ. 1997). Sinüzoid endotel hücrelerinin aralarında yer almaktadır.

İto hücreleri olarak da bilinen hepatik satellat hücreleri disse aralığında bulunan perisitlerdir. A vitamini metabolizmasında ve depolanmasında rol alırlar. Bazı patolojik durumlarda miyofibroblastlara farklılaşırlar. Kollajen sentezlerler. Tip 1 kollajen sentezine ek olarak laminin, proteoglikan ve büyüme faktörleri salgırlar. Bu sayede karaciğer fibrozisine katkıda bulunurlar (Bataller ve Brenner 2005). Bu hücreler mezenkimal kökenlidirler. Normal koşullarda sessiz fazda olup karaciğer hasarı olduğunda aktifleşirler. Aktifleşmiş satellat hücresi proliferasyon ve kemotaksis ile ayırt edilebilir. Hasarlı dokuya göç ederek kollajen salgısı yaparlar. Bu sayede hasar gören doku iskelesinin (ekstrasellüler matriks) onarımında aktif rol oynarlar. Zamanla senesense (hücre yaşlanması) uğrarlar ve natural killer (NK) hücreleri tarafından yok edilirler. Buradan anlaşılacağı üzere aktive olmuş satellat hücrelerinin senesensi karaciğer fibrozisini sınırlamaktadır (Krizhanovsky ve diğ. 2008). Aynı zamanda karaciğer fibrozisi sırasında CD8⁺ T lenfositleri başta olmak üzere immün sistem hücreleri ile de etkileşime girerler (Yi ve Jeong 2013).

1.3.1.1. Karaciğer Ekstrasellüler Matriksi

Hepatik ekstrasellüler matriks (doku iskelesi, *scaffold*) özellikle disse aralığının özel konfigürasyonu sebebiyle oldukça sıra dışı bir kompozisyona sahiptir. Genellikle fibronektin ve tip 1 kollajen ve az miktarda da kollajen tip 3, tip 4, tip 5 ve tip 7'den oluşan zayıf bir ekstrasellüler matrikse sahiptir (Martinez-Hernandez ve Amenta 1993). Bu konfigürasyon -endotel hücreleri arasındaki boşluklar ile birlikte değerlendirildiği zaman-plazma ve hepatositler arasındaki çift yönlü makromolekül alışverişinin düzenlenişini kolaylaştıran bir yapı olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ekstrasellüler matriks karaciğerin küçük bir bileşeni olmasına rağmen, yapısal bir iskele sağlaması ve hepatositlerin farklılaşmış durumlarını korumalarında, hayatta kalmalarında kritik role sahiptir. Bu kritik rol özellikle *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında belirgindir. Hepatosit fenotipinin hücreleri kültüre etmek için kullanılan ekstrasellüler matrikse göre değişkenlik gösterdiği birçok çalışmada ortaya konulmuştur (Katoonizadeh ve Poustchi 1994, Schuetz ve diğ. 1988, Rojkind ve diğ. 1980). Karaciğeri de içeren birçok dokuda ekstrasellüler matriks doku tamirini uyarıcı ve düzenleyen bir bileşendir (Martinez-Hernandez 1985).

Karaciğer ekstrasellüler matriksini değerlendirebilmek için kapsül, portal alan, disse aralığı ve merkezi alanı içeren dört alt başlık içinde incelemek uygun olacaktır.

Kapsül ince ve yarı saydam bir yapıya sahiptir. Kollajen tip 1, tip 3, tip 5, tip 6 ve fibronektinden oluşur (Martinez-Hernandez ve Amenta 1993). Kapsülün karaciğer loplarının içine doğru göç etmesiyle oluşan parmak şeklindeki çıkıntıları ile lobüller ekstrasellüler matriksin kaynaşması karaciğer ekstrasellüler matriksinin temelini inşa etmektedir.

Portal alan safra kanalı, ekstrasellüler matriks içine gömülü halde hepatik arter ve portal venin kollarını içerir. Safra kanalı epitel hücreleri çok ince bir bazal membran (30 nm) ile çevrilerek çevre parankimden ayrılır. Duktal epitelyal hücrelerin kendi bazal membran komponentlerinin sentezi ve salgılanmasından sorumlu oldukları yıllar önce Martinez-Hernandez'in çalışmalarıyla ortaya konulmuştur (Martinez-Hernandez 1991, Martinez-Hernandez 1985). Hepatik arter ve portal ven kolları –diğer organlarda bulunan benzer çaptaki damarlar gibi- bazal membran ve diğer ekstrasellüler matriks bileşenlerini içermektedir. Portal alanın ekstrasellüler matriksi kollajen tip I, tip III, tip V, tip VI, fibronektin ve elastik liflerden oluşmaktadır. Portal alandaki çapraz bağlı kollajen tip 1 lifleri hemen bitişikteki disse aralığındaki benzer fibriller ile süreklilik halindedir. Bu süreklilik merkezi alanı da kapsamaktadır. Bu şekilde bir karaciğer lobülünün yapısal doku iskelesini bahsi geçen kollajen lifleri ve demetleri oluşturmaktadır.

Lobül; sinüzoidleri, ışık mikroskopuyla hemen hemen algılanamaz bir disse aralığını ve hepatosit kordonlarını içeren bir alandır. İçinde birçok farklı yapıyı barındırdığı için bir lobülün ekstrasellüler matriksini daha iyi anlayabilmek bu yapıları tek tek incelemekten geçmektedir.

Sinüzoidlerde bazal membran yoktur. Endotel hücreleri arasında boşluklar mevcuttur. Bu nedenle aralarında özel bağlantılar da yoktur. Dolayısıyla, sinüzoidler oldukça geçirgen yapılardır.

Disse aralığı için yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında hem bazal membranının olmadığını hem de -az miktarda çapraz bağlı kollajen lifleri hariç- neredeyse ekstrasellüler matriks açısından yoksundur. Buna rağmen disse aralığında en bol bulunan ekstrasellüler matriks bileşeni fibronektindir (Martinez-Hernandez ve Amenta 1993). Portal triadlardan merkezi vene kadar tüm hepatik sinüzoid boyunca neredeyse kesintisiz bir astar olarak karşımıza çıkmaktadır. Fibronektin, kollajen tip 1'i kaplayacak şekilde ve diğer fibriller (kollajen tip 4, kollajen tip 5, kollajen tip 6) ile iç içe olarak ya granüler ya da ince filament yapılar halinde bulunur. Ayrıca endotel hücrelerinin intersitisyel yüzeyleriyle temas halindedir. Karaciğerde var olan eşsiz doku mimarisinin oluşmasında en aktif oyunculardan birisi fibronektindir. Endotel hücrelerinin ve hepatosit hücrelerinin yüzeylerini arasında kollajen tip 1 demetleri bağlantı kurar. Böylelikle hepatik lobülün farklı ögelerini tek tek fiziksel birimlere dönüştürür. Disse aralığında kollajen tip 3 yaygın değildir. Genellikle fibronektin ile kollajen tip 1'in çapraz bağlı olduğu yerlerde görülmektedir. Karaciğerde kollajen tip 5'in lokalizasyonu 1980 yılında ışık mikroskobuyla ortaya konulmuştur (Biempica ve diğ. 1980). Daha sonra elektron mikroskobu çalışmaları ile kollajen tip 5'in disse aralığı boyunca kesintili ve düzensiz bir şekilde bulunduğu gösterilmiştir. Yapılan kimyasal analizler kollajen tip 5'in hepatik ekstrasellüler matriks için olmazsa olmaz bir bileşen olmadığını göstermektedir. Kollajen tip 6 ise hepatik ekstrasellüler matriks içinde kollajen tip 5'e göre nispeten daha bol bulunur ve lobül boyunca homojen bir dağılım göstermektedir. Karaciğer lobülünde – özellikle de disse aralığında- bazal membran komponentlerinin durumu araştırmacıların ilgisini çeken noktalardan birisi olmuştur. Bunlardan perlekan, disse aralığının mimarisinde yer almamaktadır. Lamininin varlığı ise tartışmalı konulardan birisidir. Abrahamson, Bissell gibi bazı yazarlar lamininin var olduğunu savunurken (Abrahamson ve Caulfield 1985, Bissell ve diğ. 1987) bazı yazarlar ise karaciğerde lamininin olmadığı görüşündedirler (Sell ve Ruoslahti 1982, Martinez-Hernandez 1991). Bazal membranın önemli bileşenlerinden birisi olan kollajen tip 4 ise disse aralığında ayrı ayrı, kesintili ve agregat şeklinde bulunur. Ancak, bu agregatlar diğer tüm organlarda olanın aksine ne laminin ne de perlekan ile ilişkili değildir. Yani bazal membranın diğer elemanlarından bağımsız halde bulunmaktadır. Söz konusu bu durum disse aralığını eşsiz kılmaktadır.

Hepatositleri intersitisyumdan ayıran bir bazal membran yoktur. Ancak özellikle fibronektin olmak üzere diğer ekstrasellüler matriks elemanları hepatositlere yakın bir şekilde lokalize olmaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

Merkezi alan merkezi venleri (terminal hepatik venler) kapsayan, bir karaciğer lobülünün orta kısmına yakın yerleri incelemek için kullanılan terimdir. Bu venler laminin, kollajen tip 4 ve perlakanı içeren ince bir bazal membran ile sınırlandırılmış tek tabaka endotel hücreleri oluşturulur. Bu bazal membranın dışında bol miktarda kollajen tip 1 ve fibronektine ilaveten kollajen tip 3, kollajen tip 5 ve kollajen tip 6 da bulunmaktadır.

1.3.2. Pankreas Histolojisi

Pankreas omurgaluların sindirim ve endokrin sisteminde yer alan bez şeklindeki bir organdır. İnsanda midenin arkasında, karın boşluğunda (abdominal boşluk) yer alırken sıçanlarda daha çok mide, duodenum ve dalağın altında yerleştiği görülür. Pankreas; insülin, glukagon, somatostatin, pankreatik polipeptit gibi çok önemli hormonların üretildiği endokrin kısma sahiptir (Ross MH ve Pawlina W, 2014). Bunun yanında bir sindirim sistemi elemanı olarak da görev yapar. Bu kapsamda ince bağırsakta besinlerin sindirilmesi ve emilmesine yardımcı olan ve içinde parçalayıcı enzimler bulunan pankreas özsuyu salgılar. Bu enzimler karbonhidratlar, lipitler ve proteinleri daha küçük parçalarına ayırır.

Tıpkı karaciğer gibi pankreas da endoderm kökenli bir organdır. Erken embriyonik dönemde (insanda 26. gün, sıçanlarda embriyonik dönemim 8.5'inci gününde) (e8.5) ön bağırsağın arkaya doğru tomurcuklanması ile oluşmaya başlar. Altında bulunan epitel dokusu mezoderme doğru uzanır. Bu uzanım dorsal ve ventral pankreas tomurcuklarının oluşmasını sağlar. e14.5 ve e15.5 aralığında duktal epitel hücreleri ekzokrin pankreasa doğru farklılaşırlar. e15'te asinüsler açıkça görüntülenebilmektedir. Endokrin hücreler ise pankreas gelişiminin başladığı andan itibaren gelişmeye başlarlar. e14'te duktal epitel içinde tek hücre halinde dizilmiş olurlar. Daha sonra burada çoğalmaya başlarlar. Embriyonik dönemim 16. gününde endokrin hücreler adacık benzeri kümeler oluşturmaya başlarlar. Adacıklar doğumdan kısa bir süre öncesine kadar (e18 e19) tamamen oluşmamışlardır doğumdan 2-3 hafta sonrasına kadar bir olgunlaşma süreci içerisindeyler. Endokrin hücreler bağırsak endoderminde bulunan kök hücrelerden gelişir.

Önceleri endokrin hücrelerin nöral krest kökenli oldukları savunulmuş ancak bildiriciv-kimera deneyleri bu algıyı yok etmiştir. Artık iyi bilinmektedir ki, endokrin hücreler endodermden köken almaktadır. Embriyonik sıçan pankreaslarından elde edilen endoderm kökenli pankreatik kanal hücreleri *in vitro* ortamlarda fetal mezenkim varlığında direkt olarak hormon üreten hücelere farklılaştığı gösterilmiştir (Dudek ve diğ. 1991). Embriyonik dönemin erken safhalarında (e9.5) önbarsaktaki pankreatik taslakta hücrelerin glukagon, pankreatik polipeptit ve nöropeptit Y eksprese ettikleri görülür. Kısa bir süre sonra (e10-e10.5), bu hücrelerin glukagon ve insülini birlikte eksprese ettikleri ve ilerleyen embriyonik gelişimde bu hücrelerin glukagon üreten α -hücrelerine ve insülin üreten β -hücrelerine dönüştüğü gözlemlenir. Yaklaşık olarak e14'te somatostatin üreten hücreler ortaya çıkar.

Endokrin ve ekzokrin bölgelerin ayrımını sağlayan sinyal faktörleri de araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmüştür. 12.5 günlük sıçan embriyolarından elde edilen pankreatik tomurcuklarının pankreatik mezenkim varlığında kültüre edilmesiyle -yalnızca insülin üreten olgunlaşmamış birkaç hücre dışında- ekzokrin pankreatik doku gelişimi olduğu gösterilmiştir. Pankreatik tomurcuklarının pankreatik mezenkim olmadığı ortamda kültüre edilmesiyle endokrin doku gelişiminin olduğu, ekzokrin gelişimin ise durduğu gözlemlenmiştir (Miralles ve diğ. 1998).

Geçmiş yıllarda, pankreatik gelişimin düzenlenmesinde bazı transkripsiyon faktörlerinin kritik roller oynadığı keşfedilmiş ve araştırmaların bir bölümü araştırmalarını bu yöne doğru kaydırmıştır. Bu ekspresyon faktörleri gelişen pankreasın sınırlarını belirlemekle kalmayıp aynı zamanda tek tek hücre soylarının farklılaşma programlarını düzenlerler. Transkripsiyon faktörleri erken hücre gelişimin belirlenmesine ve bu sayede terminal farklılaşmış hücrelerin fenotiplerinin korunmasına hizmet ederler (Habener ve diğ. 2005). Transkripsiyon faktörlerinin insandaki birtakım hastalıkların patolojisiyle ilişkili olduklarının gösterilmesi -tıpkı diğer organlarda olduğu gibi- pankreas gelişiminin düzenlenmesine katılan bu faktörlerin tanımlanmasının önemini ortaya koymaktadır (bu faktörlere ilişkin detaylı bilgi bölüm 1.4.2'de kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır).

Pankreası daha detaylı ve sistematik bir şekilde incelemek için ekzokrin ve endokrin pankreası ayrı ayrı ele almak uygun olacaktır.

Ekzokrin pankreas seröz bir bez olup asiner ve tübüloasiner şekilli salgı birimleri bulunmaktadır. Bu birimler seröz hücrelerden oluşmaktadır. Pankreasın ekzokrin bölümü lopcuklu bir yapı göstermektedir. Bu lopcuklar 'asinüs' denen küçük birimlerden meydana gelmektedir. Lopcuklar ve asinüsler arasında bağ dokusu doldurmaktadır. Ancak bu yapılardaki bağ dokusu oldukça azdır. Asinüslerin duvarlarını pankreasın dış salgısını üreten epitel hücreleri oluşturmaktadır. Pankreatik asiner hücreler olarak adlandırılan bu hücrelerde yaygın bir gER, serbest ribozomlar ve iyi gelişmiş golgi cisimciği göze çarpmaktadır. Asiner hücreler apikal kısımlarından birbirlerine bağlantı kompleksleriyle bağlanırlar ve bu şekilde izole bir lümen oluştururlar. Bu lümene, asiner hücreler tarafından üretilen enzimler zimojen granülleri şeklinde salgılanmaktadır. Pankreatik asinüsler diğer bezlerde bulunan asinüslerden oldukça farklıdır. Asinüsten çıkan ilk kanal olan interkalar kanal aslında asinüsün içinde başlamaktadır. Asinüsün içinde kalan kanal kısmının bu hücreleri sentroasiner hücreler olarak adlandırılmaktadır. Sentroasiner hücreler, asinüs hücrelerinin aksine salgı granüllerince yoksundur (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

Zimojen granüllerinde bulunan proenzimler alınan besinlerin çoğunu sindirebilecek muhtevaya sahiptir. Endopeptidazlardan olan tripsinojen ve kimotripsinojen proteinlerin oluştuğu aminoasitler arasındaki peptit bağlarını koparıken prokarboksipeptidaz ve proaminopeptidazları içeren ekzopeptidazlar ise peptidin amino ya da karboksil ucundan amino asitleri keserek ayırır. Amilolitik enzimlerden olan α -amilaz ise karbonhidratların glikozidik bağlarını kesen bir enzimdir. Trigliseritlerin ester bağlarını keserek lipit sindirimi yapan lipazlar da yine asiner hücrelerin ürettiği sindirim enzimleri arasındadır. Bunlara ilaveten nükleik asitlerin sindiriminde rol alan enzimler de pankreas özsuğu içinde yer almaktadır. Deoksiribonükleaz ve ribonükleazlar nükleik asitleri sindirerek nükleotitlerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

Yukarıda bahsedilen pankreatik sindirim enzimleri üretildikleri andan itibaren fonksiyonel değillerdir. Bilakis, inaktif olarak sentezlenirler ve ancak ince bağırsak lümenine ulaştıkları zaman aktifleşirler. İnce bağırsakta bulunan intestinal hücrelerince salgılanan enterokinaz tripsinojeni güçlü bir proteolitik enzim olan tripsine dönüştürmektedir. Tripsin de diğer enzimlerin dönüşümünü katalizlemektedir (Eşrefoğlu M, 2016).

İnterkalar kanallar, ekzokrin pankreasın tarafından üretilen pankreas özsuynunun onikiparmak bağırsağına ulaşması için kullanılan ilk kanallardır. Bu kanallarda bulunan interkalar kanal hücreleri sodyum ve bikarbonat bakımından zengin bir sıvı salgılamaktadırlar. Böylece mideden onikiparmak bağırsağına (duodenum) gelen kimusun asiditesi nötralize edilir ve pankreatik enzimlerin çalışması için en uygun pH sağlanır. Bu kanallar kısadırlar ve intralobüler toplama kanallarına açılırlar. Asinüslerden oluşan pankreatik lobüllerde bu şekilde toplanan salgılar intralobüler kanalların açıldığı interlobüler kanallara geçer. İnterlobüler kanallar içinde az miktarda goblet hücresi ve enteroendokrin hücrelerinin bulunduğu prizmatik epitel ile döşelidir. İnterlobüler kanallar pankreastaki en büyük kanal olan *wirsung kanalına* (ana pankreatik kanal) açılır.

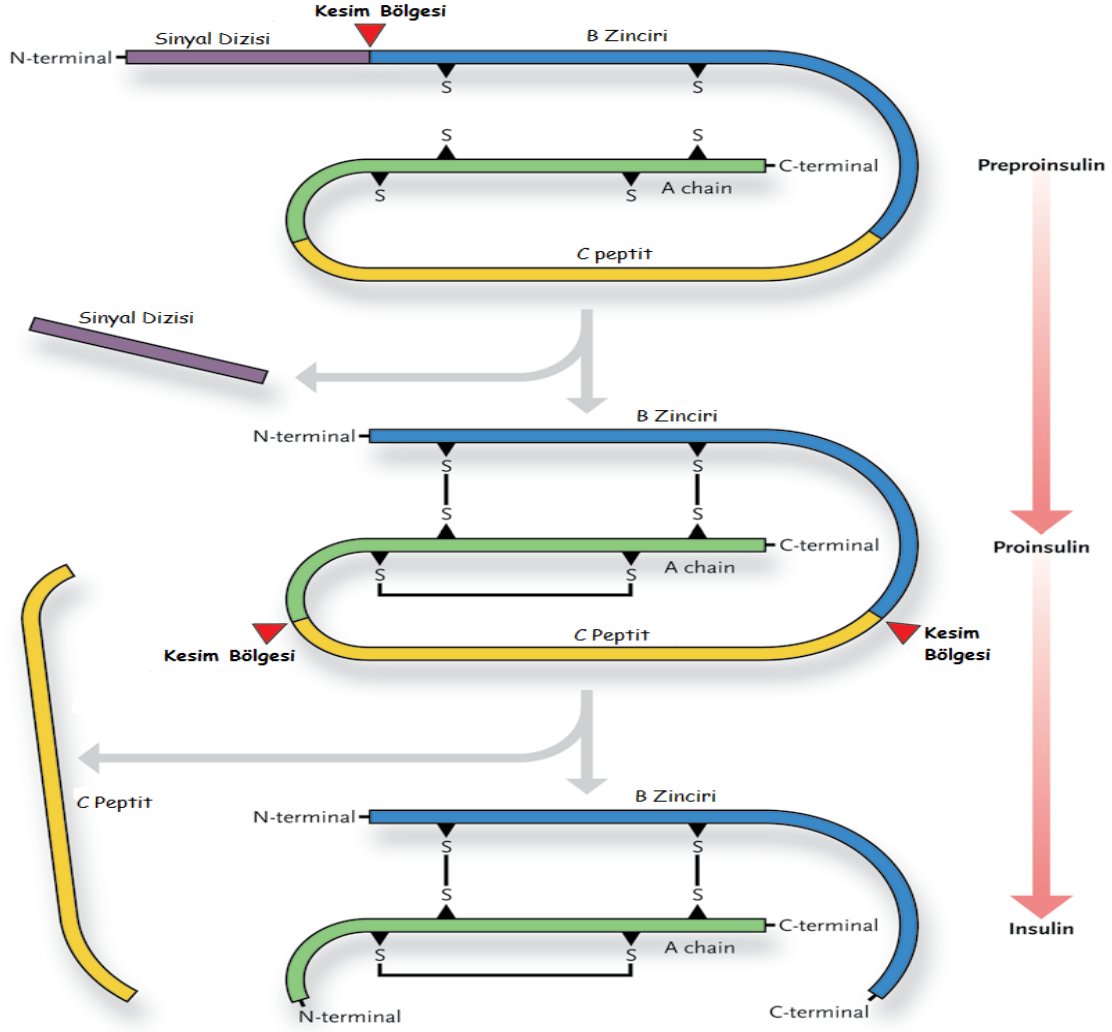
Endokrin pankreas, Langerhans adacıklarından oluşmaktadır. Bu adacıklar organ boyunca değişik büyüklüklerde olabilmektedir. Hematoksilen/Eozin boyamalarında *Langerhans* adacıkları yoğun boyanmış pankreatik asinüslerinin çevrelediği açık boyanmış hücre kümeleri halinde bulunmaktadır. Ancak klasik boyama yöntemleri ile adacıklarda bulunan hücre tipleri belirlenememiştir. Zenker-formol fiksasyonu ve Mallory-Azan yöntemi ile yapılan boyamalardan sonra üç temel hücre tipi tanımlanmıştır: kırmızıya boyanan α -hücresi (alfa hücresi), kahverengi-turuncuya boyanan β -hücresi (beta hücresi) ve maviye boyanan δ -hücresi (delta hücresi). Bu hücrelerden daha az oranlarda pankreatik polipeptit üreten PP hücreleri ve daha da az sayıda grehlin hormonu üreten Grehlin hücreleri bulunmaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014 s.650-51). Bu hücreler dışında adacıklarda kök hücrelerin varlığını ve bu kök hücrelerin de mezenkimal kök hücrelere benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Karaoz ve diğ. 2010a, Karaoz ve diğ. 2010b, Sariboyaci ve diğ. 2014)

Adacık kompozisyonları insan ve kemirgenlerde benzer olmasına karşın adacıkta bulunan hücre oranları önemli farklılıklar içermektedir. İnsanlarda β -hücresi adacıktaki tüm hücrelerin %54'ünü oluştururken farelerde %74.5'ini oluşturur. İnsan adacıklarında α -hücreleri %34.5 ve δ -hücreleri %10.5 oranında bulunmaktadır. Fare adacıklarında ise α -hücreleri %18.5 ve δ -hücreleri %6 oranında bulunmaktadır (Brissova ve diğ. 2005). Diğer kemirgenlerde oranlar faredeki oranlara çok yakındır. Özellikle dikkat çekici bir nokta kemirgenlerdeki β -hücre/ α -hücre oranı insandaki orandan bir hayli yüksektir.

β -hücreleri genellikle adacığın merkezi kısmında bulunurlar. Vücut için çok önemli bir horman olan insülini sentezler ve salgırlar. 110 amino asitten oluşan 12 kDA

ağırlığındaki tek bir polipeptit zincirinden oluşan insülinin ilk sentezlendiği bu yapısı preproinsülin olarak adlandırılır. Bu yapının amino ucunda hormon öncülünün gER'e girmesi için gerekli -24 amino asitten oluşan- bir sinyal dizisi yer almaktadır. gER sisternalarında bu molekülün sinyal dizisi proteolitik olarak kesilir ve proinsülin meydana gelir. Bu haliyle molekül 9 kDA ağırlığındadır ve yapısal olarak 'G' harfine benzemektedir. G'nin çizgisini üstteki ilmeğe bağlayan iki disülfid bağı molekülde yer almaktadır. Golgi cisimciğine geçen proinsülin 35 amino asitlik C peptit (bağlayıcı peptit) kısmı kesilerek salgı veziküllerinde depolanır (Çizim 1.3). İnsülin salgılandığında aynı miktarda C peptit de salıverilir. Ancak, C peptidin tanımlanabilen bir biyolojik fonksiyonu yoktur. Geriye kalan 30 amino asitlik B zinciri ile 21 amino asitlik A zincirinin birbirine iki disülfid bağıyla bağlı olduğu yapı insülin olarak adlandırılan fonksiyone kısım olarak iş görür (Çizim 1.3). Bu hormon endokrin salgıların en bol olanıdır. Temel etkileri karaciğer, iskelet kası ve adipoz doku üzerinedir. İnsülin spesifik membran taşıyıcıları ile glukozun dolaşımdan alınmasında rol almaktadır. Ayrıca glikojen sentaz enziminin aktivasyonu ve akabinde glukozun glikojen şeklinde depolanmasında fonksiyoneldir. İnsülinin glukoz metabolizmasındaki görevlerine ek olarak, adipoz doku hücrelerinde gliserol sentezlenmesini uyarır. Lipaz aktivitesini inhibe eder. Dolaşımdaki insülin, hücreler tarafından aminoasit alım miktarını artırır. Protein katabolizmasını artırır. Kan glukoz seviyesinin 7 mg/mL'nin üzerinde olması insülin salınımını uyarır. Böylece glukoz depo edilmeye başlanır. Kan glukoz seviyesinin 7 mg/mL'nin altına düşmesi insülin salgılanmasını durdurur. Deneysel T1DM çalışmalarında, açlık kan şekeri düzeyi genellikle 20 mg/mL'nin üzerinde ise deney hayvanı diyabetli olarak kabul edilmektedir (Onturk ve Ozbek 2007)

α -hücreleri adacıkların periferinde (dış tarafında) bulunmaktadır. Bu hücrelerin temel görevi glukagon salgılamaktır. Glukagon kan glukoz seviyesini arttıran bir hormondur. Genel olarak insülin ile antagonistik olarak çalışır. Karaciğerde glikojen yıkımını (glikojenoliz) uyararak kana glukoz salınımını uyarır. Glikoneogenizi (amino asitlerden glukoz sentezlenmesi) aktive eder. Bunun için proteolizisi uyarır. Hepatik lipazı stimule eder. Kan glukoz seviyesinin 7 mg/mL'nin altına düşmesi glukagon salgılanmasına sebep olur, bu değer belirlenmiş düzeyde üstüne çıktığında ise glukagon salgılanması durur.



Çizim 1.3. İnsülinin posttranslasyonel işlenmesi. Preproinsülin olarak sentezlenen ve tek bir polipeptit zincirinden oluşan insülinin işlenmemiş hali bir takım posttranslasyonel modifikasyonlara uğrar. İlk olarak gER sisternalarında sinyal dizisi kesilir. Oluşan daha kısa polipeptit dizisi proinsülin olarak adlandırılır. Proinsülin golgi cisimciğine taşınır ve burada disülfid bağları oluşturuktan sonra C peptit kısmı kesilip uzaklaştırıldıktan sonra biyolojik olarak aktif insülin oluşmaktadır. *Kaufman R.J. 2011'den uyarlanmıştır.*

δ -hücreleri *Langerhans* adacıklarının küçük bir kısmını oluşturur. Adacıkların periferine doğru lokalize olmuşlardır. δ -hücreleri somatostatin salgırlar. Bu hormonun adacıktaki kesin rolü tam olarak bilinmemektedir ancak genel olarak insülin ve glukagon salgılanmasını inhibe etmektedir.

1.3.2.1. *Langerhans* Adacıklarının Ekstrasellüler Matrisi

Langerhans adacıkları olarak da bilinen pankreatik adacıklar, kesintisiz bir ekzokrin doku ortamı içinde dağılmış küçük endokrin hücre kümeleridir. Yetişkin bir insanda çapı

50-200 µm arasında değişen yaklaşık olarak 1 milyon pankreatik adacık bulunmaktadır. Arteriol kan akışı sayesinde damarlaşma açısından zengindirler. Buna ilaveten hormon salgısını ve trofik fonksiyonu düzenleyen sempatik ve parasempatik sinirlerce de zengindir.

Langerhans adacıkları genellikle kesintisiz olmayan tek tabaka fibroblast ve bunların ürettiği kollajen fiberlerinden oluşan bir kapsül ile çevrilidir. Adacıkların periferal ekstrasellüler matriksleri ağırlıklı olarak laminin ve kollajen tip 4'ten oluşur (Meyer ve diğ. 1998b). Fibronektin (Meyer ve diğ. 1998b), kollajen tip 1 (Van Deijnen ve diğ. 1994, Meyer ve diğ. 1998b) kollajen tip 3 (Van Deijnen ve diğ. 1994, Meyer ve diğ. 1998b) kollajen tip 5 (Van Deijnen ve diğ. 1994) ve kollajen tip 6 (Meyer ve diğ. 1998a)'nın da bulunduğu yayınlarda bildirilmiştir. Ancak Hughes ve arkadaşlarının 2006 yılında periferal matriks kompozisyonunu nicel olarak değerlendirdikleri bir çalışmada kollajen tip 6 miktarını kollajen tip 1 ve kollajen tip 4'ten oldukça fazla bulmuşlardır (Hughes ve diğ. 2006). Vitronektin fetal dönemde adacık ekstrasellüler matriksinin önemli bileşenlerinden birisi iken yetişkin bireylerin adacık ekstrasellüler matrikslerinde miktarı yok denecek düzeyde olması dikkat çekici bir durumdur. Özellikle vitronektinin hücre göçünü (migrasyon) destekleyen bir yapıda olması durumu irdelemeye değer kılmaktadır (Cirulli ve diğ. 2000).

Pankreatik adacıkların kompozisyonu türler arasında değişiklik göstermektedir. Örneğin, köpek pankreatik adacıklarında ekstrasellüler matriksi insan veya sıçana göre daha fazla alanı kapsamaktadır. Domuzlarda ise ekstrasellüler matriks oldukça az olup hücre-hücre ilişkileri daha yoğundur (Van Deijnen ve diğ. 1992). Türler arasında bu şekilde farklılıklar söz konusu iken aynı bireyde yaştan yaşa da adacık ekstrasellüler matriksi konusunda farklılıklar söz konusudur. Yaşlı bireylerde adacık kapsülünü oluşturan proteinlerin ekspresyon seviyeleri genç bireylere göre daha yüksektir (Meyer ve diğ. 1997).

Pankreasta bulunan adacıkların periferinde durum böyle iken, adacık içindeki matriks bir hayli farklıdır. Bu yapılar özellikle mikrovasküler sistem ile ilişkili yüksek miktarda bazal membran barındırırlar. Ancak adacık endokrin hücrelerinin kendi bazal membranları yoktur. Direkt olarak -laminin ve kollajen tip 4'ten oluşan- vasküler endotelial bazal membran ile etkileşime girerler. Ancak son yıllarda yapılan bir çalışma adacıklardaki mikrovasküler yapının iki ayrı bazal membran tabakası ile çevrili olduğunu

göstermektedir (Virtanen ve diğ. 2008). Bu durumda, perivasküler bazal membran (intra-adacık), peri-adacık bazal membranı ile çevrilidir ve peri-adacık bazal membran endokrin hücrelerle direkt temas halinde değildir. Her iki bazal membran da farklı laminin izoformları içerir. Adacık içindeki bazal membranlarda kollajen tip 4 bol miktarda bulunsa da reseptör içerikleri incelendiğinde β -hücreleri kollajen tip 4'ten ziyade laminin ile bağlanma etkileşimlerine girerler. β -hücrelerinin saflaştırılmış kollajen tip 4 üzerindeki kültürlerinde de insülin üretiminin oldukça düştüğü gözlemlenmiştir (Kaido ve diğ. 2006). Perivasküler bazal membran tutunma etkileşimlerine ek olarak adacık içindeki vasküler yapıyı koruyarak ve endotel hücrelerinin tutunup göç etmelerini sağlayarak β -hücrelerinin canlılıklarını da korurlar. Bu önemli fonksiyonlara ek olarak perivasküler bazal membranın hayati rollerinden birisi de yeniden damarlaşabilme ve adacığa spesifik fenotipin korunması için gerekli vasküler büyüme faktörlerini (vascular growth factor) bağlayabilme ve salıverme özelliğidir.

Bazal membran haricinde *Langerhans* adacıklarında başka bir ekstrasellüler matriksten bahsetmek çok fazla mümkün değildir. Ancak bu durum muhtemelen endokrin hücrelerde hücre-hücre etkileşimlerinin önemini vurgulamaktadır. Adacık hücreleri *gap junction* dışında integrinler, nöral hücre adezyon molekülleri (N-CAM) ve E-kaderin gibi hücre adezyon molekülleri (cell adhesion molecules, CAM) ile de birbirlerine bağlanırlar (Cirulli ve diğ. 1994, Bosco ve diğ. 2007). Hücreler arası bu etkileşim adacık gelişimi, glukoz duyarlılığı ve insülin salgılanması ile ilgili süreçlerin sinyal iletiminde son derece önemlidir.

1.3.2.2. *Langerhans* Adacıklarının Ekstrasellüler Matriks ile Etkileşimleri

Pankreatik adacıkların içinde bulunduğu, onları çevreleyen fiziksel etkileşimlerin ve mimarinin karmaşık ve tamamen anlayamadığımız bir yapı olmasına rağmen adacıklar hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimlerinden yoğun bir şekilde etkilenirler. Olgun ve bozulmamış bir adacığın ekstrasellüler matriks ya da sentetik matriks materyalleri ile etkileşimlerinin canlılığı (Beattie ve diğ. 2002, Lucas-Clerc ve diğ. 1993), insülin salgısını (Beattie ve diğ. 2002, Lucas-Clerc ve diğ. 1993), çoğalmayı (Beattie ve diğ. 2002), adacıkların küresel morfolojisinin korunmasını (Lucas-Clerc ve diğ. 1993) düzenlediği bilinmektedir. Thomas ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmayla endokrin pankreas bölümünü oluşturan küre şeklindeki bu yapılar için ekstrasellüler matriksin önemi çok iyi bir şekilde ortaya konulmuştur (Thomas ve diğ. 1999). Çalışmanın sonuçlarına göre, tam

bir izolasyon olmadan –bir miktar doğal ekstrasellüler matriksi ile birlikte- elde edilen adacıkların, saflaştırılmış ve ekstrasellüler matriksten tamamen izole edilmiş olan adacıklarla kıyaslandığında apoptoz oranlarında oldukça önemli bir düşüş gözlenmiş ve insülin yanıtı bakımından önemli ölçüde daha işlevsel olduğu bulunmuştur.

Matriks ile etkileşimin önemi yalnızca yetişkin bireye ait dokular ile sınırlı kalmaz, fetal dokularda da bu etkileşimler oldukça önemlidir. Endokrin pankreas dokusunun gelişimi sırasında β -hücre farklılaşmasının, çoğalmasını, insülin salgılamasını ve adacığa özgü hücre migrasyonunu yine bu etkileşimler düzenler (Obergh-Welsh 2001, Cirulli ve diğ. 2000). Matriks etkileşimleri *in vitro* ortamlarda pankreatik duktal doku ya da hepatik oval hücrelerden adacık benzeri dokuların farklılaşmasını ve gelişimini de kapsamaktadır (Leite ve diğ. 2007, Bonner-Weir ve diğ. 2000).

Bu konu üzerine yapılan son çalışmalar arasında dikkat çekici olanlarından birisi de NF- κ B (Nükleer Faktör kappa B) aktivitesinde β -hücresi ile matriks etkileşiminin rolünün araştırıldığı bir çalışmadır (Hammar ve diğ. 2005). Bu çalışmada, glukoz ile uyarılmış insülin salgısı için β -hücresi-matriks etkileşimleri sonucu meydana gelen NF- κ B aktivasyonunun gerekli olduğu bulunmuştur.

Bugün adacıklardaki matriks ve reseptör etkileşimlerinin önemini vurgulayan hipotezlerin çokluğuna rağmen mevcut bilgi seviyemiz bu etkileşimin belirli ayrıntıları ve sonuçları ile ilgili pek çok soruyu yanıtsız bırakmaktadır.

Pankreatik adacıklar oldukça kompleks yapılardır. Çok sayıda ekstrasellüler matriks bileşenleri ile etkileşime girebilme yeteneğinde olan birçok farklı reseptörü içeren hücre türlerinden oluşan yapılardır. Her reseptör çoklu ligandları (ekstrasellüler matrikse ya da hücrelere bağlanabileceği bölgeleri) tanıyabilir ve her matriks proteini çoklu hücre bağlanma bölgelerini içerebilir.

Langerhans adacıklarının kompleks yapısını daha iyi anlayabilmek ve matriks-reseptör etkileşimlerinde yanıtsız kalan birçok soruya yanıt bulabilmek için söz konusu hücreler ile matrikslerin etkileşimine izin veren birçok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

1.3.2.4. *Langerhans* Adacıklarının İntegrin Kompozisyonu

İntegrinler hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşimleri için köprü vazifesi gören transmembran proteinleridir. Bu proteinler hücrelerin birbirleriyle ya da ekstrasellüler matriks ile etkileşimlerden oluşan sinyalleri hücre içine ileten ve böylece hücredeki çeşitli yolakların aktivasyonunu sağlayan kaskad şeklindeki bir dizi sinyal iletimlerini başlatan moleküllerdir. Söz konusu sinyaller sonucunda transkripsiyonel değişimler meydana gelir (aktivasyon ya da inhibisyon). Oluşan bu transkripsiyonel değişimler ise hücre döngüsünü, hücre şeklini, hareketliliği, hücre membranına yeni moleküllerin eklenmesini, ekstrasellüler matriks kompozisyonunun değiştirilmesini, hücre tutunmasını, hücre farklılaşmasını, hücre ölümünü ve daha birçok olayı kontrol eder. İntegrinler hücrelerde gerçekleşen birçok biyolojik sürecin kalbinde yer alan moleküllerdir. Dolayısıyla, integrinler hücreler ve onların içinde bulunduğu doku iskelesi için hayati öneme sahip yapılardır.

İntegrinlerin birçok tipi vardır ve hücreler de birçok integrin tipini membranlarında bulundurabilirler. Fibronektin, kollajen, vitronektin, laminin gibi ekstrasellüler matriks bileşenleri integrinler için ligandlardır.

İntegrinler α (alfa) ve β (beta) zincirleri olarak adlandırılan iki alt birimden oluşurlar. α ve β alt birimlerinin her biri plazma membranına gömülü olurlar ve küçük birer sitoplazmik alana da sahiptirler.

Adacık hücrelerinin integrin reseptör kompozisyonu hem karışık hem de tartışmalı konulardan biridir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar sonucu tam bir görüş birliği sağlanamamış olsa da bu konudaki mevcut bilgi karmaşası içinden bazı bileşenlerin varlığı ya da yokluğu şekillenmeye başlamıştır.

Wang ve arkadaşlarının yaptıkları kapsamlı incelemeler sonucu yetişkin insan adacık hücrelerinde $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv ve $\beta 1$ integrin bileşenlerinin pozitif olduğu, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 6$ ve $\beta 2$ integrinin ise negatif olduğu bulunmuştur (Wang ve diğ. 1999). Fetal pankreatik dokunun endokrin hücrelerinde ise $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ ve $\beta 1$ integrin bileşenlerinin pozitif olduğu gösterilmiştir (Wang ve diğ. 2005). Ris ve arkadaşları da benzer şekilde yetişkin insan adacık hücrelerinde $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv ve $\beta 1$ integrin bileşenlerinin pozitif olduğunu bulmuştur. Buna ilaveten integrin $\alpha 6$ 'nın adacık hücrelerinde eksprese olduğunu ancak saf β -hücrelerinde ekspresyonunun bir hayli düşük olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, integrin $\beta 4$ 'ün adacık hücrelerinde bulunduğunu fakat saf β -hücre popülasyonunda ise bulunmadığını

bildirmişlerdir (Ris ve diğ. 2002). Kaido ve arkadaşları literatüre saf β -hücrelerinin embriyonik gelişim boyunca integrin $\alpha\beta1$, $\alpha\beta5$ ve $\alpha1\beta1$ bulduklarını ancak yetişkin bireylerin saf β -hücrelerinde integrin $\alpha\beta1$ ekspresyon seviyesinde önemli derecede azalma olduğu bilgisini düşmüşlerdir (Kaido ve diğ. 2006). Bu çalışma, adacıkların doğru bir mimariye sahip olabilmeleri için gerekli olan hücre hareketinin β -hücrelerindeki integrin $\alpha1\beta1$ -kollajen tip 4 etkileşimine bağlı olduğunu belirtmektedir. Bunun yanında, integrin $\alpha\beta5$ 'in adezyondan sorumlu olduğunu ve β -hücrelerinin farklılaşmış formlarının korunması ile ilişkili olabileceği bildirmektedir. Yine bir diğer çalışmada, erken gelişim dönemindeki insan adacık dokusunda integrin $\alpha\beta5$, integrin $\alpha\beta3$ ve $\beta1$ integrinin pozitif olduğu ve integrin $\alpha5\beta1$ 'in negatif olduğu belirtilerek gelişimin daha sonraki evrelerinde $\alpha\beta5$ ve $\alpha\beta3$ integrin ekspresyonunun düştüğü gözlemlenmiştir (Cirulli ve diğ. 2000). Elde edilen bu sonuçlar duktal epitel hücrelerden adacık progenitör hücrelerinin oluşmasında $\alpha\beta5$ ve $\alpha\beta3$ integrinin önemli olduğunu, $\beta1$ integrinin ise adacık morfolojisinin oluşması ve korunmasında fonksiyonel olduğunu göstermektedir.

Sıçan β -hücrelerinin integrin $\alpha6\beta1$ ve $\alpha3\beta1$ ekspresyon ettikleri fakat $\beta4$ alt birimini ekspresyon etmedikleri bulunmuştur (Bosco ve diğ. 2000).

1.3.2.4. Langerhans Adacıklarında Bulunan Matriks Bileşenlerinin Özellikleri

Fibronektin

Ekstrasellüler matrikste genellikle en fazla bulunan içeriklerden birisi olan fibronektin yüksek molekül ağırlığına sahip glikoprotein yapısında bir bileşendir. İntegrinler ve fibronektin arasındaki etkileşim hücre-matriks etkileşimleri arasında en iyi karakterize edilen etkileşimlerden birisidir. fibronektinin yapısında amino asitlerden oluşan ve integrinlerin tanıyabileceği bazı motifler yer almaktadır. Bu motiflerden birisi olan arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) motifidir. Fibronektin, birçok integrini RGD motifinin tanınması sayesinde bağlar (Koivunen ve diğ. 1994). Adacık hücrelerinde bulunan integrinlerin birçoğu RGD motifine bağlanmaktadır. Tüm $\alpha\beta$, $\alpha5\beta1$ ve $\alpha3\beta1$ integrinler RGD motifini tanırlar. Ancak $\alpha3\beta1$ -RGD etkileşimi zayıftır. Fibronektin, RGD motifine ek olarak adacıklarla ilişkili olmayan integrinlerin de tanıyabileceği motifler içermektedir.

Köpek pankreatik adacıklarının süspansiyon kültürlerine çözünebilir fibronektin ilave edilmesinin kollajen kaplı yüzeylerdeki adacık kültürüne ya da çözünebilir

fibronektin ilave edilmemiş süspansiyon kültürlerine kıyasla iki kat daha fazla insülin salgısını uyarıldığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca yetişkin adacıklarının RGD aracılığı ile tutunma gösterdikleri de gözlemlenmiştir (Wang ve Rosenberg 1999). Buna karşın, izole edilmiş domuz adacık hücrelerinin fibronektin kaplı yüzeylerde kültürü yapıldığında güçlü bir tutunma ve yayılma göstermelerine rağmen fonksiyonel bir değişimin olmadığı bulunmuştur (Edamura ve diğ. 2003). Saflaştırılmış insan β -hücrelerinin fibronektine yapıştığı fakat fetal ve olgunlaşmış hücrelerin göç edebilme yeteneklerinin gözlemlenemediği, ayrıca olgunlaşmış hücrelerin yayılma ve hücre canlılığı konusunda sorunların olduğu bildirilmiştir (Ris ve diğ. 2002).

RGD ile ilgili ilginç sonuçlardan birisi yapılan bir *in vivo* çalışma ile elde edilmiştir. *NUDE* fareye (genetik mutasyon sonucu timusunun olmamasından dolayı oldukça az sayıda T lenfositleri olan laboratuvar faresi) transplantasyon sonrası fetal insan adacık prekürsör dokusunun yarışmalı olarak RGD bloklayan bir peptit ile muamelesi sonucu insülin pozitif hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. Buna göre, RGD'nin adacık gelişiminin erken döneminde hücre göçü için oldukça önemli olduğu ve bu etkileşime RGD içeren fibronektinin aracılık edebileceği belirtilmiştir (Cirulli ve diğ. 2000). RGD içermeyen laminin gibi bazal membran elemanlarının ise adacık morfolojisinin oluşması ve korunmasında rol alabileceği düşünülmektedir (Cirulli ve diğ. 2000).

Elde edilen veriler pankreatik gelişimde RGD'nin oldukça önemli olduğunu önerse de onun adacık kültürüne ve transplantasyonuna katkıları henüz yeterince net değildir.

Kollajen

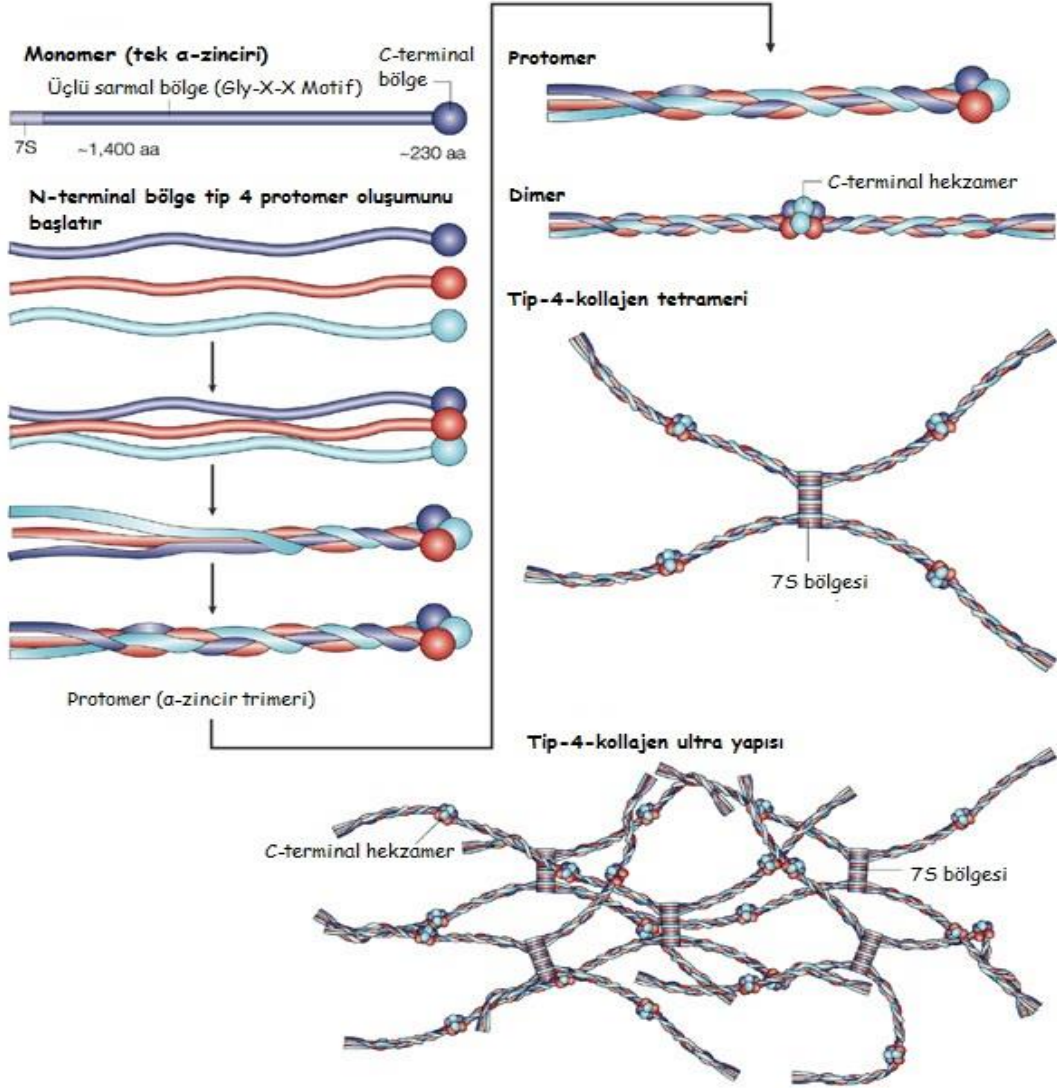
Kollajen birçok alt tipi olan, üçlü sarmal yapısındaki yapısal ekstrasellüler matriks proteinlerindedir. Yapısında iki identik zincir ($\alpha 1$) ve bir tane de kimyasal bileşimi biraz farklı olan ilave zincir ($\alpha 2$) bulundurur. Memelilerde en fazla bulunan protein olup vücut ağırlığının %25-35'ine karşılık gelen bir orana sahiptir. Kollajene, yapısı itibari ile her üç aminoasitte bir tekrar eden glisin içeren gly-x-x formu atfedilir.

Langerhans adacıklarında bulunan kollajenlerden kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve kollajen tip 5 fibriler yapıda, kollajen tip 4 ağ yapısında ve kollajen tip 6 boncuklu iplikçik yapısındadır. Adacıklarda en sık görülen kollajenöz yapı kollajen tip 4 olduğu için

kollajenin bu formunu ayrıntılı olarak irdelemek gerekmektedir. Bağ dokusunun uzun liflerini oluşturan fibriler kollajenlerin aksine tip 4 kollajen düzlemsel altıgen şeklinde toplanır. Kümes teline benzeyen bu yapılar paralel olmayan üçlü sarmal kollajen tip 4 alt birimlerinin dörütlü yapılarından (tetramer) oluşmaktadır. Tetramerler diğer tetramerlerle N-terminal (amino ucundaki) uzantılarıyla bağlantı kurarlar (Çizim 1.4).

Tip 4 kollajene bağlanan ana integrin $\alpha 1\beta 1$ 'dir. Bunun yanında $\alpha 2\beta 1$ ve $\alpha 3\beta 1$ 'de bağlanmaktadır. $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 2\beta 1$ integrinin kollajen tip 4 üzerinde bağlandığı diziler GFQGER (glisin-fenilalanin-glutamin-glisin-glutamik asit-arjinin) ve GQAGER (glisin-glutamin-alanin-glisin-glutamik asit-arjinin) dizileridir. Kollajen tip 4 üzerinde çoğu hücrenin bağlandığı aminoasit dizisi GXXGER motifidir. Kollajenin birçok tipi RDG motifini de içermektedir. Ancak, bu dizi heliks yapısının düzeninden dolayı gizli kalması sebebiyle genellikle inaktif yapıdadır. RGD motifi kollajenin denatürasyonu ya da enzimatik olarak sindirilmesinden sonra açığa çıkabilir ve aktif bir hale gelebilir. Bu durum da $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ gibi integrinlerin neden kollajene bağlandığını açıklayabilir.

Kollajen tip 4'ün adacık periferal ekstrasellüler matriksinde ve perivasküler bazal membranında yüksek miktarda bulunmasına rağmen, adacık fizyolojisindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.



Çizim 1.4. Kollajen tip 4 ağ oluşumu. Üç farklı α -zincirinin sarmal oluşturmasıyla meydana gelen proteomerden iki tanesi C-terminal uçlarından birleşmesi ile heksamer şeklindeki dimerler oluşur. Proteomerler esnek yapıları sayesinde içinde buldukları moleküle bükülebilme özelliği kazandırır. Dört tane dimerin N-terminal uçlarındaki 7S bölgelerinden glikozillenecek birleşmesi ile tip 4 kollajen tetramerleri oluşmaktadır. Tetramerdeki protomerlerin uç uca yatay olarak etkileşmesi tip 4 kollajen ağı oluşmaktadır. *Kalluri R. 2003'ten uyarlanmıştır.*

Kollajen tip 4'ün bozulmamış –bütün haldeki- adacıkların sağ kalımında kollajen tip 1'den çok daha fazla rol oynadığı gösterilmiş olsa da (Pinkse ve diğ. 2006), saflaştırılmış

β -hücrelerinde insülin üretimi ve salgılanmasını da azalttığı bulunmuştur (Kaido ve diğ. 2006). Sonuç olarak, adacıklarda kollajen tip 4 ve integrin bağlanmasının mekanizmasındaki eksikliklerden anlaşılacağı gibi ki, adacık hücreleri ile kollajen tip 4'ün yakın konumlanmasına rağmen etkileşimleri sınırlıdır.

Laminin

Laminin oldukça yüksek molekül ağırlığına sahip (400kDa) ekstrasellüler matriks proteinlerinden birisidir. Bazal membranın tabakalarından biri olan bazal laminanın temel bileşenidir. Lamininler disülfid bağlarıyla birleştirilmiş üç polipeptit zincirinden oluşan, çapraz bağlı heterotrimerik glikoproteinlerdir. Hücre farklılaşmasını, hücre göçünü ve hücre tutunmasını etkilerler. Lamininler α (alfa), β (beta) ve γ (gama) zincirleri içeren heterotrimerik yapılardır. Genellikle zincir kompozisyonlarına göre adlandırılırlar. Örneğin, $\alpha 5$, $\beta 1$ ve $\gamma 1$ zincirini içeren laminin, laminin511 olarak adlandırılır (Aumailley ve diğ. 2005). Lamininin kısa kolları laminin tabakası oluşumunu sağlayan diğer laminin molekülleriyle bağlanma konusunda görev alır, uzun kolları ise -doku hücrelerinin organize olmasına yardımcı olabilmek için- hücrelere bağlanabilme yeteneğine sahiptir. Hücrelerle bağlantı integrin ya da diğer membran molekülleri sayesinde kurulur.

Laminin izoformlarının adacıklardaki ekspresyonu ve dağılımı hakkında henüz yeteri kadar bilgiye sahip olmasak da bu konu üzerine yapılmış çalışmalar da yok değildir. Jiang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Laminin-111 (LM-111)'in gelişen fare pankreatik adacıklarının temel laminin izoformu olduğu (Jiang ve Cram 1999), ancak olgunlaşma ile birlikte yerinin tamamen Laminin-511'e bıraktığı bulunmuştur (Jiang ve diğ. 2002). Diğer bir çalışmada LM-332'nin insan ve sıçan adacıklarında bulunduğunu ve genel olarak α -hücreleriyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Parnaud ve diğ. 2006).

$\alpha 6$, $\alpha 3$, $\beta 4$ ve $\beta 1$ alt birimlerini içeren integrinler ve bazı diğer membran reseptörleri laminine tutunabilirler. Bu alt birimler adacıklarda eksprese olan birçok integrinde bulunurlar. Ancak adacıklarla etkileşimin yegane yolu değildir integrinler. İntegrin olmayan farklı reseptörlerin de laminine bağlandığı gösterilmiştir (Kramer 1994).

Birçok laminin izoformu RGD motifi içermektedir. Ancak bu diziler genellikle laminin konformasyonunda aktif olmayan bölgelerde yer alırlar (Kramer 1994). Kollajene benzer şekilde, bu gizli RGD dizileri molekülün denatürasyonu ya da enzimatik olarak sindirilmesi sonucu açığa çıktıklarından dolayı doku onarımı ya da dokunun yeniden modellenmesinde etkili olabilirler.

1.4. Tip 1 Diabetes Mellitus

Halk arasında diyabet ya da şeker hastalığı adıyla bilinen *diabetes mellitus* (DM), tüm diyabet hastalarının yaklaşık olarak % 7-10'luk bir kesimini oluşturan *tip 1 diabetes mellitus* (T1DM) ve diyabet vakaları içinde %90'dan fazla görülme sıklığı olan *tip 2 diabetes mellitus* (T2DM) olarak ayrılır. Her iki hastalığın da ortaya çıkma nedenleri birbirinden farklıdır ancak diyabetin bu iki alt tipi de metabolik birer hastalıktır.

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) verilerine göre *diabetes mellitus*'un 2025 yılına kadar 380 milyon insanı etkilemesi beklenmektedir. Dünya üzerindeki toplam insan ölümlerinin %5'inin DM'den kaynaklandığı ve bu oranın önümüzdeki on yılda %50 artacağı tahmin edilmektedir.

T1DM, pankreasta bulunan ve insülin üreten β -hücrelerinin özellikle T hücre aracılı otoimmün ataklar sonucu ölmesi ya da hasara uğraması ve bunun doğal bir getirisi olarak da yeteri kadar ya da hiç insülin üretilmemesi durumudur (Rother 2007). İnsülin miktarının yetersizliği kanda glukoz seviyesinin artmasına ve idrarda glukoz varlığına sebep olmaktadır. T1DM her yaşta görülebilir ancak ağırlıklı olarak 30 yaşın altında ortaya çıkar. Çocukluk çağında en sık görülen kronik hastalıklardan birisidir.

Bugün immünogenetik bilgilere dayanarak söylenilebilir ki, T1DM'nin gelişiminde hem genetik etmenler hem de çevresel etmenler β -hücre yıkımında ve bunu takiben ortaya çıkan insülitis gibi enflamatuar olayların gelişmesinde oldukça kritik roller oynamaktadır. T1DM'li kişilerde Addison hastalığı, çölyak hastalığı, otoimmün tiroidit gibi pek çok otoimmün hastalık riski artmaktadır (Kakleas ve diğ. 2015, Van den Driessche ve diğ. 2009).

Tip 1 diyabetin genetik nedenleri araştırıldığında T1DM riskini arttıran 20 den fazla gen bulunmuştur. Bunlar arasında hemen hemen tüm otoimmün hastalıklarda olduğu gibi T1DM'de de birinci derece sorumlu olan gen, 6. kromozomun kısa kolu üzerinde HLA (*human leukocyte antigen*) bölgesinde bulunan ve MHC (*major histocompatibility complex*) Sınıf II molekülleriyle ilişkili olan IDDM1 genidir (Concannon ve diğ 1998, Davies ve diğ. 1994). Diğer ilişkili lokuslar içinde iki güçlü aday gen bildirilmiştir: IDDM2 ve IDDM12'dir (Field 2002). IDDM2 ile gösterilen 11.kromozomdaki insülin geni (*INS*) VNTR (*variable number of tandem repeat*) belirtecinin insülin gen transkripsiyonu ile

ilişkili olabileceği düşünülse de, bunun T1DM'ye yatkınlıkta nasıl bir rol aldığı henüz tam olarak belirlenmemiştir. IDDM12'nin ise T hücre düzenleyicisi olan CTLA4 lokusu olduğu düşünülmektedir (Ueda ve diğ. 2003).

β -hücrelerine olan immün toleransın bozulması yoluyla T1DM'ye sebebiyet veren çevresel etmenleri incelemek için kardeşlerden birinin T1DM olduğu tek yumurta ikizlerinde yapılan çalışmalarda aynı genetik yapıya sahip diğer kardeşte diyabet görülme oranının %30-50 olduğu bulunmuştur (Redondo ve diğ. 2001, Barnett ve diğ. 1981). Bu oran otoimmün aktivasyonun tetiklenmesinde sadece genetik zeminin yeterli olmadığını, çevresel faktörlerin varlığının da çok önemli bir rol üstlendiğini gözler önüne sermektedir. Sağlıklı insanlarda immün sistem hücreleri kendinden olan hücreleri tanır. Fakat hücrel bütünlüğün bozulması immün toleransın yok olmasına sebep olur. β -hücrelerine karşı olan immün toleransın bozulup T1DM gelişmesine neden olan çevresel faktörlerin başında virüsler, toksinler ve bazı gıda maddeleri gelmektedir.

Virüsler β -hücrelerini enfekte ederek ya da enfekte etmeden yıkıma uğratabilirler. *Ensefalomyokardit* virüsü en önemli β -hücre lizisi yapan virüsdür. *Rubella* virüs, *retrovirüs*, *sitomegalovirüs*, kabakulak virüsleri otoimmün tetikleyici roller üstlenmektedir. Toksinler için streptozotosin (STZ) ve aloksan örnek olarak verilebilir. İnek sütü ve bazı gıda maddelerinin korunmasında kullanılan nitrosamin türevleri de otoimmün diyabete neden olan faktörlerden olabilirler. Özellikle inek sütünün fazla kullanıldığı ülkelerde T1DM insidansı yüksektir (Thorsdottir ve Ramel 2003).

1.4.1. Diyabet Tedavisinde Kök Hücreler

Tip 1 diabetes mellitus şu an için tedavisi olmayan ve dünya çapında ciddi etkileri olan bir hastalıktır. İnsülinin keşfi diyabet hastaları için önemli bir gelişme olmuştur. Pankreastan yeteri kadar üretilmeyen insülin, eksojen olarak karşılanmaya başlanmıştır. Bu nedenle T1DM, insüline bağımlı diyabet (Insulin Dependent Diabetes Mellitus=IDDM) olarak da isimlendirilmektedir. Enjeksiyon yoluyla dışarıdan aldıkları insülin sayesinde T1DM hastaları yaşamlarını idame ettirebilseler de düşük yaşam kalitesi aradan geçen 80 yıla rağmen hala bir sorun olarak sıcaklığını korumaktadır. Alternatif olarak pankreas veya adacık nakli denenmiştir. Ancak uygun donör bulunmasındaki zorluklar ve immün ret dolayısıyla tedavi sağlanamamıştır. Çünkü adacık hücre nakli klinik olarak uygulanan bir

yöntem olsa da tedavinin geçici bir süre sağlanabilmesi bu yöntemin yetersizliğine neden olmaktadır. Transplantasyon için uygun insan β -hücreyi elde etmekte çok zordur. Bu sebepler araştırmacıları yeni tedavi yolları aramaya yöneltmiştir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin insülin üretebilen hücelere farklılaşması yeni umutlar doğurmuştur (Akinci ve diğ. 2012, Ricordi ve diğ. 2012, Wong, 2011). Pankreasın ve β -hücrelerinin embriyonik dönemde oluşum mekanizmasının iyi bir şekilde anlaşılması ve ortaya koyulması öncül hücrelerin doğrudan ya da programlanarak β -hücelerine farklılaştırılması için oldukça önemlidir (Noguchi 2010). Doğum sonrasında öncül hücrelerden endokrin veya ekzokrin hücre farklılaşması yalnızca pankreasta herhangi bir hasar olduğunda gerçekleşmektedir.

1.4.2. Gen Klonlama Teknolojisiyle İnsülin Üreten Hücre Eldesi

Embriyonik dönem boyunca hücreler bir dizi farklılaşma basamaklarından geçerek vücudu oluşturan yaklaşık 200 farklı hücre tipinden birini dönüştürürler. Farklılaşmasını tamamlayıp artık olgun hücelere dönüşüp uzun süre stabil bir hal alırlar. Ancak, embriyonik gelişim boyunca hücre farklılaşmasında önemli roller üstlenen spesifik bazı transkripsiyon faktörlerinin tekrar eksprese olması sağlanarak, olgunlaşmış olan bu hücrelerin geri programlanması mümkündür. Böyle durumlarda genellikle direkt olarak hedef genin ekspresyonunun sağlanmasından ziyade, hücrenin yeni bir gen ekspresyon profiline sahip olması amaçlanmaktadır. Somatik hücrelerin -Yamanaka faktörlerinin etkisiyle- embriyonik kök hücreye benzer bir gen ekspresyon profiline (uPKH) dönüştürülmesi buna iyi bir örnektir (Zhou ve diğ. 2008).

Transkripsiyon faktörleri kullanılarak direkt olarak yeniden hücre programlanması çalışmaları birçok alanda yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bunların içinde göze çarpan çalışmalardan biri de -diyabet tedavisinin temel sorunlarından birisi olan transplantasyonda kullanılacak hücre kaynağına çözüm bulan- insülin üreten β -benzeri hücre elde edilmesi üzerinedir. (Akinci ve diğ. 2012). Transkripsiyon faktörleri farklılaşma (diferansiasyon), çoğalma (proliferasyon) ve apoptoz gibi biyolojik süreçleri kontrol eden önemli hücre içi moleküllerdir. Kromozom üzerinde yer alan *promotör* ya da *enhancer* bölgelerine bağlanarak genlerin aktive olmasını ya da baskılanmasını sağlarlar. Daha önce yapılan çalışmalarla *Langerhans* adacıklarındaki β -hücrelerinin gelişiminde ve fonksiyonlarının yerine getirilmesinde görev alan birçok transkripsiyon faktörü olduğu keşfedilmiştir (Bernardo ve diğ. 2008). Bu faktörlerin doğrudan yada dolaylı olarak β -hücrelerinin insülin

promotör bölgesini uyarılmasında ve özellikle insülin-glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde, bunun yanı sıra bu hücrelere özgün diğer özelleşmiş görevlerinin yerine getirilmesinde de etkinliklerinin olduğu saptanmıştır. (Andrali ve diğ. 2008).

Yapılan bilimsel çalışmalarla insülin miktarını artıran birtakım transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır: Pdx1, MafA, MafB, NeuroD1, Ngn3, Pax4, Pax6, Sox9, Sox17, Hnf1a, Hnf4a, Hnf6, Isl1, FoxA2, Nkx6.1, Nkx2.2 ve diğerleri (Spence ve diğ. 2009, Kaneto ve diğ. 2008, Odom ve diğ. 2004, Heremans ve diğ. 2002, Jacquemin ve diğ. 2000). Bu moleküller insülin üretimini ve salınımını kontrol eden metabolik yolağın farklı noktalarında görev almaktadır.

İnsülin promotör faktör olarak da bilinen Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox factor-1, insülin promotör faktör 1) (IDX-1 olarak da adlandırılır) hem β -hücre farklılaşmasını hem de duodenal farklılaşmayı indükleyen, pankreatik gelişim için olmazsa olmaz bir transkripsiyon faktörüdür (Stoffers ve diğ. 1997, Habener ve Stoffers 1998). Embriyonik dönemde pankreatik tomurcukların oluşmasında önemli görevler üstlenmektedir. Ayrıca pankreas oluşumunda ortaya çıkan öncül hücrelerin en önemli belirteçlerinden biridir. Önceleri bu transkripsiyon faktörünün β -hücrelerinde üretilen insülinin ve δ -hücrelerinde üretilen somatostatinin ekspresyonunu düzenlediği bulunmuş ancak daha sonra adacığa özgü glut-2 (Waeber ve diğ. 1996), amiloid polipeptit (Watada ve diğ. 1996a) ve glukokinaz (Watada ve diğ. 1996b) genlerinin ekspresyonlarında da rol aldığı bulunmuştur. Farklılaşmış bir β -hücrede Pdx1, insülin gen ekspresyonunun glukoz miktarına duyarlı bir düzenleyicidir (Petersen ve diğ. 1994, Melloul ve diğ. 1993). Pdx1'in glukoz yanıtındaki fonksiyonu ise onun hem fosforilasyonu (Macfarlane ve diğ. 1997) hem de translokasyonu (Rafiq ve diğ. 1998) ile düzenlenir. Embriyonik gelişim sırasında insülin sentezini doğrudan kontrol eden Pdx1 pankreasın onarılmasında, β -hücrelerinin insülin üretmesi ve sentezlemesinde, kanın değişen glukoz miktarına cevaben insülin salınımının düzenlenmesinde görev almaktadır (Kaneto ve diğ. 2007).

MafA (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family A), ilk olarak göz ve lens gelişiminde keşfedilen bir transkripsiyon faktörüdür. İnsülin üreten β -hücrelerinde ortaya çıkan MafA doğumdan sonra pankreas gelişimi ve β -hücre işlevleri için önemli bir proteindir (Hang ve Stain 2011). Ayrıca glukokinaz (Gck) ile birlikte kandaki glukoz seviyesine cevap verecek şekilde insülin sentezini kontrol eden anahtar bir moleküldür (Aguayo-Mazzucato ve diğ. 2011). NeuroD1 ve Pdx1 ile sinerjik işbirliği yapmaktadır.

Hücrede bağlandığı yere göre bir onkogen ya da tümör baskılayıcı etki yapmaktadır. MafB ise glukagon üreten α hücrelerinde görülür.

Ngn3 (neurogenin3) pankreasın tüm endokrin hücre soylarının gelişimi için gerekli olan bir faktördür (Gradwohl ve diğ. 2000). Bu sebeple endokrin hücre soyları Ngn3 pozitif hücre soyları olarak da belirtilmektedir. Ngn3, adacık prekürsör hücreleri için tanımlanan bir belirteçtir. Gelişen bir pankreasta Ngn3'ün aşırı ifadesi (overekspresyon) hızlandırılmış bir endokrin progenitör hücre farklılaşması ile sonuçlanmaktadır. Bu transkripsiyon faktörü insülin sentezinde de görev almaktadır. Son zamanlarda pankreas hasar modelleri oluşturulan çalışmalar göstermiştir ki; Ngn3 pankreasın onarılmasında, β -hücrelerinin yeniden oluşmasında ve proliferasyonunda görev almaktadır (Bonner-Weir ve Xu ve diğ. 2008, Weir 2005). Zhou ve arkadaşlarının 2008 yılında Nature'da yayınlanmış çalışmasında Ngn3, Pdx1 ve MafA genleri birlikte ekzokrin hücrelerine aktarılarak insülin salgılayan hücreler elde edilmiştir (Zhou ve diğ. 2008). Pdx1, Ngn3 (endokrin progenitör hücre belirteci) ve MafA genlerinin birlikte aktarılmasıyla yapılan başka bir çalışmada STZ ile diyabet modeli oluşturulmuş farelerde insülin pozitif hücrelerin üretildiği gösterilmiştir. Bu üç faktörü içeren adenovektörün karaciğer hücrelerini insülin üreten ve glukoz seviyesine duyarlı hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir (Akinci ve diğ. 2013).

Pax4 (paired box gene 4) ekspresyonu, merkezi sinir sistemi ve gelişmekte olan pankreas ile sınırlandırılmıştır. Sosa-Pineda'nın farelerde Pax4'ü blokladığı çalışmalarında pankreas fenotipinde çok şaşırtıcı değişimlerin meydana geldiğini bulmuştur. Pax4 homozigot mutant farelerin pankreaslarında insülin ve somatostatin üreten hücrelerin (β ve δ hücrelerinin) olmadığı ancak glukagon üreten α -hücre sayısının oldukça yüksek miktarda olduğu bulunmuştur (Sosa-Pineda ve diğ. 1997). Pax4, β -hücresi gelişiminde görev alan, Nkx2.2 ile birlikte çalışarak öncül hücrelerin β -hücresine farklılaşmasını tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Lock ve Tzanakakis, 2007, Wang ve diğ. 2004). Pankreas β -hücresinin fonksiyonlarının yerine getirilmesinde önemli görevlerinin yanında aktivin A ve β sellülün varlığında erişkin sıçan dokularında ifadesi artarak β -hücre kütlelerinde artışa sebep olduğu da gösterilmiştir (Brun ve diğ. 2004). Pax4 ekspresyonu Pax6'yi indüklemesiyle Pdx1'in yol açabileceği α -hücre farklılaşmasını bloke edeceğini ve β -hücre farklılaşmasının verimini artırdığı bildirilmiştir (Ritz-Laser ve diğ. 2002). Cdk4 ve c-Myc genlerini uyararak β -hücresi proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Brun ve Gauthier, 2008). Pax4 ektopik olarak uzun süreli eksprese edildiğinde Pdx1'i uyararak insülin

sentezini artırmasının yanında NF-kappa- β transkripsiyon faktörünü baskılayarak ve Bcl2 seviyesini artırarak β -hücrelerinin apoptoza gitmesini engellediği bulunmuştur (Hu He ve diğ. 2011, Brun ve Gauthier 2008). Bu sayede T1DM’de olduğu gibi bağışıklık sisteminin β -hücrelerine saldırıp onları yok etmelerinin önüne geçilebileceği önerilmiştir. Yapılan bir çalışmada MKH'lere Ngn3 ve Pax4 genleri aktarılmış ve farklılaşma görülmüştür. Pdx1 ekspresyonu artmış ancak hücrelerin bir kısmı α , bir kısmı ise β -hücrelerine farklılaştığı görülmüştür. İnsülin salınımında bir artış olmuş olsa da β -hücresi farklılaşma verimi düşük olmuştur. MafA ve c-peptit ekspresyonlarını farklılaşmış hücrelerde gözlemlenememiştir (Tang ve diğ. 2011).

1.5. Doku Mühendisliği

İnsan vücudu, oluşan küçük bozuklukları ya da yaraları onarma ve yeniden modelleme noktasında büyük bir yeteneğe sahiptir. Ancak, ciddi yaralanmalar veya doğum ile birlikte gelen anomalilerin (konjenital anomaliler) tamiri vücut için çok daha zor, bazen de imkansızdır. Bu nedenle kök hücre temelli terapileri ve doku mühendisliği uygulamalarını içeren yenileyici (rejeneratif) yaklaşımlar geliştirilmektedir. Bu yaklaşımların temelinde vücudun kendini yenileme özelliğini aktive etmek ya da hasarlı doku ve organları yeniden oluşturmak yatmaktadır. Bu bağlamda doku mühendisliği; hücre, materyal ve mühendislik bilimlerinin kombinasyonu şeklinde oluşan disiplinler arası bir bilimdir. Prof. Dr. Robert Langer’in tanımına göre doku mühendisliği, biyolojik bir dokunun ya da organın fonksiyonlarının korunması, yeniden düzenlenmesi veya iyileştirilmesi ya da tamamen yeniden biyolojik dokuların oluşturulması yönünde mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerinin uygulanmasıdır (Langer ve Vacanti 1993). MacArthur ise *Bringing the gap* adlı makalesinde “doku oluşumunun prensiplerini anlamak ve klinik kullanım için fonksiyonel doku üretiminde bu bilgileri uygulamak” olarak tanımlamaktadır (MacArthur ve Oreffo 2005).

Doku mühendisliği, önceleri biyomateryallerin bir alt birimi olarak kategorize edilmesine rağmen, kapsam ve önemi çok hızla bir şekilde büyümesi sonucu bugün kendi başına bir bilim dalı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bilim dalı geçtiğimiz 20 yılda doku ve organ yenilenmesi için yeni yaklaşımlar ve tedavileri üreten disiplinler arası bir alana dönüşmüştür. Doku mühendisliği sınırları günümüzde öylesine büyümüştür ki, rejeneratif tıp terimi neredeyse doku mühendisliği terimi için bir sinonim olarak kullanılabilir hale gelmiştir. Bilim insanlarının dikkatini çekmeyi başarmakla kalmayıp yapılan çalışmaların

yönünü de hızla kendine kaydıran doku mühendisliğinin en büyük amacı vücudu daha iyi taklit edebilmek hatta bire bir aynı ortamları oluşturmaya çalışmaktır.

Hücre kültürü biyolojik araştırmalar için oldukça önemli bir araçtır. Günümüzde hala en çok tercih edilen kültür yöntemi klasik kültür olarak bilinen, hücrelerin tek bir tabaka halinde kültüre edilmesiyle oluşan iki boyutlu (2B) kültürlerdir. Ancak, klasik kültür yöntemlerinin önemli bazı sorunları söz konusudur ve bu sorunlar sebebiyle vücuttaki işleyişi çok iyi taklit edemezler. Plastik yüzeylerde düz bir tabaka halinde büyüyen hücreler, vücut içindeki durumu doğru bir şekilde taklit edemezler. Fakat 2B kültürlerle kıyaslandığında 3B kültür yöntemleri hücrelerin tek bir yüzey boyunca büyümelerinin aksine istedikleri yüzeylere tutunmalarını sağlayarak doğal morfolojileri almalarına olanak verir. Buradan da anlaşılacağı gibi, 2B kültürler aslında hücrelerin morfolojilerini çok iyi yansıtan kültürler değildir. Klasik kültür yöntemlerinin sunamadığı avantajlardan birisi de hücrelerin 3B çevresi ile etkileşime girebilmesi, bir mikroçevre (niş) oluşturabilmesidir. Bir hücre için önemli olan canlılık, morfoloji, çoğalma, farklılaşma, uyarılara cevap, migrasyon ve invazyon, ilaç metabolizması, gen ekspresyonu ve protein sentezi, tümör hücrelerinin anjiogenez ve immün sistemden kaçması gibi özellikleri doğrudan etkileyen bir durum olduğu göz önüne alındığında, doku mühendisliği ile birlikte gelişen 3B hücre kültürü tekniklerinin ne derece değerli olduğu anlaşılmaktadır. Tüm bunlara ilaveten, 3B kültür yöntemlerinin doku ve organ oluşumuna izin verebilecek yapıda tasarlanabilmesi ise 2B klasik kültür yöntemleri ile kıyaslandığında çok büyük bir potansiyel fark ortaya çıkmaktadır.

Doku mühendisliği tekniklerinin gelişmesi bu alanın potansiyelini artık somut bir hale getirmeye başlamıştır. Gelişen teknoloji ile birlikte ilk ürünlerinin vermeye başlayan doku mühendisliği günümüzde deri materyalleri (Biedermann ve diğ. 2013), kapsüllenmiş pankreatik adacıklar (Lim ve Sun 1980), kan damarları (L'Heureux ve diğ. 2006), mesaneler (Oberpenning ve diğ. 1999) ve daha birçok biyolojik doku ve organın üretimine kaynaklık etmektedir. Bu çalışmalar, dokuların laboratuvar da üretilebileceğini ve hasarlı doku ve organ fonksiyonlarını düzeltmek için vücuda nakledilebileceğini açıkça göstermektedir.

Her ne kadar dokular hücre ve ekstrasellüler matriksten oluşan yapılar olsa da biyoaktif sinyal molekülleri de bu iki unsur arasındaki biyolojik ilişkiyi düzenlemesi açısından son derece önemlidir. Dolayısıyla doku mühendisliğinin üç temel ayağı olan

hücreler, biyomateryaller ve biyoaktif moleküller üzerinde durulması ve irdelenmesi gereken, doku mühendisliği çalışanlarının iyi özümsemesi gereken unsurlardandır.

1.5.1. Hücreler

Mühendislik teknikleri ya da biyolojik tekniklerle elde edilen biyoiskelelere hayat kazandırmak, fonksiyonellik sağlamak amacıyla hücrelerin kullanımı özellikle kök hücre biyolojinde süregelen ilerlemelere dikkat çekmiştir. Önceleri yetişkin farklılaşmış hücre tiplerine -bu amaç doğrultusunda- çok fazla rağbet olsa da (Puelacher ve diğ. 1994) zaman ilerledikçe yetişkin MKH (Fan ve diğ. 2008), EKH (Guenou ve diğ. 2009) ve uPKH (Thanasegaran ve diğ. 2013) kullanılmaya başlanmıştır. Biyomateryal üzerine ekilen hücreden beklenen özellikler planlanan çalışmaya göre değişiklik gösterse de yaygın olarak aranan özellikler hücrelerin biyo-materyaller üzerinde çoğalması ve gerekli durumlarda farklılaşmasıdır.

Biyoiskeleler üzerine kültür yapmanın en önemli ön hazırlıklarından birisi doğru hücre seçimidir. Hücrenin materyale karşı verdiği tepki, materyale tutunması, materyal üzerinde çoğalması, farklılaşması, protein sentezi profili gibi önemli faktörler aynı materyal üzerinde kültüre alınan hücreye göre değişiklik göstermektedir. Tüm bu değişkenler planlanan çalışmaya yön verebilecek önemli değişkenlerdir.

Hücrenin materyale vereceği tepkiyi öngörmek kullanılan hücre hakkında birtakım bilgilerle mümkündür. Hücrenin sahip olduğu yüzey reseptörleri –özellikle de integrinler- genel olarak hücrenin materyale tutunması konusunda araştırmacıya yön verebilmektedir. Ancak kök hücreler kullanılarak farklılaştırma yapılmak isteniyorsa, farklılaşması beklenen hücre türü için de materyalin uygun olup olmadığı bilinmeli ya da test edilmelidir.

Somatik hücrelerden pluripotent kök hücrelerin elde edilmesi diğer birçok alan gibi doku mühendisliği için de heyecan verici gelişmelerden biri olmuştur. Etik endişelerin olmaması, kolaylığı ve tekrarlanabilir oluşu uPKH'lerin insan MKH yerine kullanılabilmesi umudunu arttırmıştır.

1.5.2. Biyoaktif Moleküller

Organ düzeyinde doku mühendisliği bir mikroçevre gerektirir. Bu mikroçevre hücrelere çoğalmaları için yüzeyler sağlamanın yanında dokuya spesifik bir yapının içinde hücrelere doğru morfoloji ve farklılaşmanın ipuçlarını da verir.

Büyüme faktörleri doku yenilenmesinde anahtar roller oynarlar. Önceki bölümde de bahsedildiği gibi damarlaşıma doku mühendisliği yapıları için önemli bir darboğazdır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor, VEGF), farklı doku mühendisliği stratejilerinde damar büyümesini teşvik etmek için sıklıkla kullanılmıştır (Chiu ve Radisic 2010). Fibroblast büyüme faktörü-1 (fibroblast growth factor, FGF-1), insülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor-1, IGF-1), hepatosit büyüme faktörleri (hepatocyte growth factor, HGF), angiopoetin-1 ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) gibi bazı büyüme faktörleri de *in vitro* ortamlarda damarlaşmayı arttırmak için kullanılmışlardır Freeman ve Cohen 2009).

Organ seviyesinde bir morfoloji için yine büyüme faktörleri, bazı proteinler, transkripsiyon faktörleri kullanılmıştır. Örneğin, kemik dokusu elde etmek için araştırmacılar kemik morfojenik protein (bone morphogenic protein, BMP) ailesi üyelerini kullanmışlardır (Cowan ve diğ. 2005). Benzer şekilde kıkırdak, sinir ve deri biyomühendisliğinde birçok grup transforme edici büyüme faktörü beta (transforming growth factor-beta, TGF- β), FGF, epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) gibi indüleyici etkileri olan molekülleri dokuya özel büyümeler için başarıyla kullanmıştır (Roberts 1995, Midha ve diğ. 2003). Ancak fonksiyonel bir organ oluşturmak için, birçok büyüme faktöründen oluşan, zamanlaması ve etkileşim süresi iyi planlanmış çok sayıda molekülün planlı bir şekilde etkileşimi gerekmektedir.

1.5.3. Biyomateryaller

Doku mühendisliğinde biyomateryaller önemli bir yere sahiptir. Biyolojik malzemedan üretilen biyomatriksler doku yenilenmesine ciddi katkı sağlarlar. İdeal olarak bir biyomateryal dokuya özel mekanik özellikler sayesinde yapısal bir çevre oluşturmalı ve hücreye porlu yapıda biyoyumlu nişler sağlamalıdır.

Günümüzde kullanılan biyomalzeme yelpazesi oldukça geniştir. Kollajen, kitosan, ipek gibi doğal biyomateryallerden polilaktik asit (PLA), poliglutamik asit (PGA),

plikaprolakton (PCL) gibi sentetik biyomateryallere kadar pek çok malzeme doku iskeleleri oluşturup hücreleri desteklemek için kullanılmaktadır. Bahsedilen malzemelerle laboratuvar şartlarında oluşturulan iskeleler -ister doğal polimerlerden isterse sentetik polimerlerden oluşturuluyor olsun- sentetik biyoiskelelerdir. Araştırmacı tarafından tasarlanabilen bu iskelelerin doku mühendisliğinde kullanımı oldukça yaygındır. Ancak bu tarz biyoiskelelerde hedeflenen dokunun mikromimari yapısını iyi taklit etmek oldukça zor ve beceri isteyen bir iştir. Bunun yanında tasarımı yapılarak oluşturulan iskelelerdeki en büyük sorun damar yapısının vücut dokularında olduğu kadar mükemmel olmamasıdır. Günümüzün gelişmiş teknolojisine ve altından kalkılamayacak derecede artmış bilgi birikimine rağmen oluşturulan yapı iskelelerindeki vasküler ağın yeterli olmaması sorunu henüz çözülebilmemiş değildir. Laboratuvar ortamında imal edilen iskeleler kullanılarak fonksiyonel kompleks dokuların oluşturulamamasındaki sorunların temelinde yatan problem de yine damarlaşma sorunudur. Özellikle oluşturulmak istenen doku büyük hacimlerde ise dokunun merkezi kısımlarında bu sorun daha belirgin hale gelmektedir. Oysa stromal dokunun oluşumu için fonksiyonel bir mikrovasküler ağın var olması ön koşuldur.

İyi bir biyomateryalde mikrovasküler ağ dışında dikkat edilmesi gereken diğer bazı özellikler de olmalıdır. Materyalin uygun boyutlarda poröz bir yapıda olması gerekmektedir. Hücre migrasyonu, gaz alış-verişinin sağlanması, hücre-hücre etkileşimlerinin olması porlu yapıyla mümkündür. Uygun boşlukları içeren bir biyomateryal elde edilmesi hücrelerin materyal üzerindeyken doğru bir şekilde desteklenmesi noktasında tek başına yeterli değildir. İyi bir doku iskelesi büyüme faktörleri, hücre tutunmasında görevli moleküller gibi biyoaktif molekülleri de yapısında barındırmalıdır. Kullanılan biyoaktif moleküller hücrenin ihtiyacına göre düzenlenmeli ve yarı ömürleri mutlaka dikkate alınmalıdır. Oluşturulan yapı iskeleleri özellikle canlıya nakledilecekse biyobozunur özellikte olması ve materyalin kontrolü bir şekilde bozunması genellikle avantaj sağlayacaktır. Malzemenin zamanla ve uygun bir hızda bozunması vücudun bozunan kısımları kendi ihtiyacına göre ve 'doğal bir şekilde' onarmasını sağlayacaktır.

Organ düzeyinde doku mühendisliği çalışmalarını hızlandırabilecek potansiyele sahip diğer bir biyomateryal ise desellülarize edilmiş dokulardan elde edilen doğal biyoiskelelerdir. Tüm hücresel içeriğin uzaklaştırılmasıyla dokunun kendi ekstrasellüler

matriksinin izole edilmesi tekniğine dayanan desellülarizasyon yönteminden elde edilen doku iskeleleri diğer yöntemlerle elde edilen iskelelere göre birçok yönden avantajlıdır. Materyalin hücreler için biyouyumluluk sorununun bulunmaması, en ideal biyomalzeme karışımının doğal olarak var olması, dokudaki muntazam damarsal sistemin kullanılıyor olması bu avantajlardan yalnızca birkaçıdır.

1.6. Desellülarizasyon

Doku ve organlar genellikle iki bileşenden oluşurlar: hücreler ve çeşitli proteinlerden oluşan yapı iskeleleri. Desellülarizasyon ise normal bir dokuda birbiriyle sürekli etkileşim halinde olan bu iki etmeni birbirinden ayırıp yalnızca yapı iskelelerinin elde edilmesi sürecini tanımlayan biyolojik bir terimdir.

Dokuların desellülarizasyonu ile elde edilen ekstrasellüler matrikslerin klinik olarak kullanım sıklığı hızlı bir şekilde artmaktadır. Önceleri çok mümkün olmayan ancak ilerleyen teknoloji ile birlikte artık yapılabilir hale gelen tam organ desellülarizasyonu sayesinde bir organın ekstrasellüler matriksi bütünüyle elde edilebilir hale gelmiştir (Ott ve diğ. 2008, Uygun ve diğ. 2010, Petersen ve diğ. 2010). Bu durum özellikle doku ve organ transplantasyonu, rejeneratif tıp ile ilgilenen klinik araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Organ bağıışı sayısının son derece az olması ve buna bağlı olarak da transplante edilebilir organ sayısındaki çok düşük rakamlar klinik düzeyde ciddi zorluklar yaratmaktadır. Bu sorunlara bir de doku uyumu ve yaşam boyu immün baskılayıcı ilaçların kullanımı, graft versus host hastalığı gibi zorluklar da eklenince organ yetmezliği konusuna alternatif çözümler aramak kaçınılmaz hale gelmektedir. İşte tam da bu noktada, desellülarizasyon teknolojisi ile elde edilen biyoiskeleler üzerinde hastanın vücut hücrelerini kullanarak yeniden hücrelendirebilme (resellülarizasyon) ve doku hatta organ oluşturabilme potansiyeli tüm bu sorunları ortadan kaldıracı niteliklere sahiptir. Mesane, kalp kapakçığı, dermis, ince bağırsak gibi birçok klinik ürün allojenik ve ksenojenik olarak ekstrasellüler matriks materyallerinden elde edilmiştir. Bugün, diş hekimlerinden göz doktorlarına kadar pek çok alanda çalışan doktor hastalarının tedavisinde desellülarizasyon ile elde edilmiş ürünleri kullanmaktadır (Çizelge 1.3)

Ekstrasellüler matriksin hücre mitojenitesi (Lee ve diğ. 2014, Antebi ve diğ. 2015), kemotaksisini (Bornstein ve diğ. 2002), hücre farklılaşmasını (Cortiella ve diğ. 2010, Cheng ve diğ. 2009, Ross ve diğ. 2009) vb. birçok özelliği etkilediği yapılan çalışmalarla

gösterilmiştir. Bu etkiler muhtemelen doku iskelesinin yüzey topografisinden, 3 boyutlu (3B) yapısından ve matriks proteinlerinin içeriğinden kaynaklanmaktadır.

Ksenojenik ve allojenik hücrel antijenler konak canlı tarafından yabancı olarak tanınır. Bunun bir sonucu olarak da ya enflamatuar bir cevap başlatılır ya da immün sistem aracılığı ile doku reddi gerçekleşir. Doku ve organ nakillerinde donör bulma sıkıntısı ile birlikte aktarılan biyolojik materyale karşı oluşan immün yanıtlar oldukça önemli sorunlardandır. Ancak, ekstrasellüler matriks bileşenleri genellikle türler arasında korunmuş yapılardır ve ksenojenik transplantasyonlarda dahi tolere edilebilirler, immün red ya da çok önemli bir enflamatuar yanıtı neden olmazlar (Bernard ve diğ. 1983, Exposito ve diğ. 1992, Mazza ve diğ. 2015). Ancak iyi bilinmektedir ki, biyoiskeleler içindeki hücrel kalıntılar materyalin *in vivo* yeniden doku oluşumu esnasında kullanımının avantajlarını önemli ölçüde azaltmaktadır (Brown ve diğ. 2009). Desellülarizasyon gibi doku materyallerinin kullanılacağı çalışmalarda tercih edilen yöntemlerin ne kadar iyi çalıştığı belirlenmesi klinik başarı için hayati noktaların başında gelmektedir. Desellülarize edilmiş materyallerin yeniden hücrelendirilerek organ elde edilebilecek potansiyeli taşıması yakın bir gelecekte bu materyalleri klinisyenler için vazgeçilmez kılacak özelliktedir.

Çizelge 1.3. Desellülarize edilmiş dokulardan oluşan klinik ürünler (Crapo ve diğ. 2011)

Ürün (Üretici)	Doku Kaynağı	Uygulama Alanı
AlloDerm® (Lifecell Corp.)	İnsan Dermis	Yumuşak Doku
AlloPatch HD™, FlexHD® (Musculoskeletal Transplant Foundation)	İnsan Dermis	Tendon, Meme
NeoForm™ (Mentor Worldwide LLC)	İnsan Dermis	Meme
GraftJacket® (Wright Medical Technology Inc.)	İnsan Dermis	Yumuşak Doku, Kronik Yaralar
Strattice™ (Lifecell Corp.)	Domuz Dermis	Yumuşak Doku
Zimmer Collagen Repair Patch™ (Zimmer Inc.)	Domuz Dermis	Yumuşak Doku
TissueMend® (Stryker Corp.)	Siğir Dermis	Yumuşak Doku
MatriStem®, Acell Vet (Acell Inc.)	Domuz Mesane	Yumuşak Doku
Oasis®, Surgisis® (Cook Biotech Inc.)	Domuz İnce Bağırsak	Yumuşak Doku
Restore™ (DePuy Orthopaedics)	Domuz İnce Bağırsak	Yumuşak Doku
FortaFlex® (Organogenesis Inc.)	Domuz İnce Bağırsak	Yumuşak Doku

CorMatrix ECM™ (CorMatrix® Cardiovascular Inc.)	Domuz İnce Bağırsak	Perikardium, Kardiyak Doku
Meso BioMatrix™ (Kensey Nash Corp.)	Domuz mezotelyum	Yumuşak Doku
IOPatch™ (IOP Inc.)	İnsan Perikardium	Oftalmoloji
OrthAdapt®, Unite® (Synovis Orthopedic and Woundcare Inc.)	At Perikardium	Yumuşak Doku, Kronik Yaralar
CopiOs® (Zimmer Inc.)	Siğir Perikardium	Diş Hekimliği
Lyoplast® (B. Braun Melsungen AG)	Siğir Perikardium	Dura Mater
Perimount® (Edwards Lifesciences LLC)	Siğir Perikardium	Kapak Replasmanı
Hancock® II, Mosaic®, Freestyle® (Medtronic Inc.)	Domuz Kalp Kapakçığı	Kapak Replasmanı
Prima™ Plus (Edwards Lifesciences LLC)	Domuz Kalp Kapakçığı	Kapak Replasmanı
Epic™, SJM Biocor® (St. Jude Medical Inc.)	Domuz Kalp Kapakçığı	Kapak Replasmanı

Bir desellülarizasyon sürecinde hücrelerin dokulardan uzaklaştırılma etkinliği kullanılan dokunun kökenine ve desellülarizasyon işlemi için seçilen fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlere bağlıdır. Bu uygulamaların her biri dokunun biyokimyasal özelliklerini ve mikro mimarisini bir miktar etkilemektedir. Arzu edilen durum, bu etkilenmenin en aza indirilmesidir ve bu yönde birçok protokol de geliştirilmiştir. Desellülarizasyon işlemi bittiğinde ekstrasellüler matriksin bütünlüğünün ve biyoaktivitesinin hala korunuyor olması kullanılan teknik ve ajanların optimizasyonuna bağlıdır.

1.6.1. Desellülarizasyon Ajanları

Bir doku için en iyi desellülarizasyon ajanı dokunun yoğunluğuna, kalınlığına, lipit içeriğine, hücresel yoğunluğuna ve daha birçok faktöre bağlıdır. Dolayısıyla, biyoiskelesi çıkarılacak dokunun ayrıntılı bir biçimde incelenmesi ve özelliklerinin iyi biliniyor olması gerekmektedir. Günümüzde hücreleri dokulardan uzaklaştırmak için kullanılacak her ajanın ve yöntemin ekstrasellüler matriks kompozisyonunu değiştireceği ve dokunun mikro mimarisini bir miktar bozacağı iyi bilinmektedir. Dolayısıyla, desellülarizasyonun amacı bu etkilerden tamamen kaçınmaktan ziyade mümkün olan en düşük düzeye indirmektedir. Desellülarizasyon için kullanılan ajanlar genellikle fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılmaktadır.

1.6.1.1. Fiziksel Ajanlar

Fiziksel ajanların kullanıldığı yöntemler tek başına etkili bir desellülarizasyon yapamazlar. Ancak, dokuların desellülarizasyonu kolaylaştıracak kullanımlara sahiptirler. Dondurup çözme, doğrudan basınç, ses dalgalarının kullanıldığı sonikasyon sistemleri ya da çalkalama gibi etmenler fiziksel desellülarizasyon ajanlarından sayılabilmektedir. Burada ses dalgaları ya da çalkalama gibi literatürde daha az tercih edilmiş olan yöntemler üzerinde durulmayıp daha fazla kullanıma sahip olan basınç ve dondurup çözme teknikleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Dondurup çözme -hücre içinde buz kristallerinin oluşmasına ve bunların da membranları parçalaması neden olduğundan dolayı- doku ve organlardaki hücreler için etkili bir hücre lizisi sağlar. Ancak membran, sitoplazma ve nükleer kalıntıların dokudan iyice uzaklaştırılması için ek işlemlere ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmalarda çoklu dondurup çözme döngüsünü kullanılarak elde edilen doku iskelelerinde ekstrasellüler matriks proteinleri açısından önemli bir kayıp gözlenmemiştir (Patel ve diğ. 2008). Biyolojik materyalin mikro mimari yapısında çok düşük bir bozulma gözlenmiş (Hopkinson ve diğ. 2008) olsa da bu bozulma kabul edilebilir seviyededir.

Özellikle hızlı dondurma tekniklerinin kullanıldığı desellülarizasyon yöntemleri genellikle tendon ve ligament benzeri yapılar (Jackson ve diğ. 1987a, Jackson ve diğ. 1987b, Roberts ve diğ.1991) ve sinir dokusu (Gulati 1988) için daha çok tercih edilmiştir.

Mekanik kuvvet de desellülarizasyona yardımcı olabilecek yöntemlerden birisi olmakla beraber direkt mekanik kuvvetin dokular üzerine uygulanması -bazal membran ya da diğer ekstrasellüler matriks bileşenlerine de zarar vereceği için- çok fazla tercih edilmez (Hopkinson ve diğ. 2008). Hidrostatik basınç ve basınç süresince sıcaklığı arttırmak gibi denemeler yapılmış olsa da doku iskelesine kabul edilebilir düzeyin üzerinde hasar verdiği için desellülarizasyon uygulamalarını çok da ileriye götürememiştir. Ancak kan damarları gibi basınca nispeten daha dayanıklı dokuların desellülarizasyonunda bu uygulamalar kullanılmaktadır (Funamoto ve diğ. 2010).

1.6.1.2. Kimyasal Ajanlar

Asitler ve Bazlar

Asitler ve bazlar biyolojik moleküllerin hidrolitik yıkımını katalizler ya da buna sebep olurlar. Ancak desellülarizasyon için kullanılacak asit ya da bazların seçimi oldukça dikkatli yapılmalıdır. Doku içeriğinde bulunan ekstrasellüler matriks bileşenlerine yapacağı etkileri iyi araştırılmalıdır. Örneğin, asetik asit sülfatlanmış glikozaminoglikanlara zarar vermezken, kollajen içeriğinde hasara sebep olur (Dong ve diğ. 2009). Perasetik asit (PAA) yaygın olarak dezenfeksiyon ve sterilizasyon amacıyla kullanılsa da nükleik asit kalıntılarının uzaklaştırılması ve matriks kompozisyonu üzerinde çok düşük bir etkiye sahip olması ile bir desellülarizasyon ajanı olarak da kullanılabilir (Hodde ve diğ. 2007). Bazlar genellikle dermis desellülarizasyonunun erken basamaklarında kılların uzaklaştırılması için kullanılmaktadır. Fakat bazların kullanımını sınırlandıran oldukça önemli dezavantajları vardır. Özellikle matriksten büyüme faktörlerini tamamen uzaklaştırmaları ve ekstrasellüler matriksin mekanik özelliklerinde önemli olumsuz değişimlere sebep olmaları bu olumsuzlukların başında gelmektedir (Reing ve diğ. 2010). Sodyum hidroksit gibi bazlar kollajen çapraz bağlarını bozar ve kollajen fibrillerini keserler (Gorschewsky ve diğ. 2005).

Hipotonik ve Hipertonik Çözeltiler

Hipertonik tuz çözeltileri DNA'dan proteinlerin ayrılmasını sağlar. Hipotonik çözeltiler ise matrikse olan düşük etkilerine karşılık osmatik etkilerinden dolayı basit bir şekilde hücre lizisini sağlayabilirler. Maksimum osmatik etki için hipotonik ve hipertonik çözeltiler sıra ile döngü halinde dokudan geçirilebilir. Bu çözeltiler ayrıca liziz olan hücrelerin dokulardan uzaklaştırılmasına da yardımcı olurlar.

Deterjanlar

Desellülarizasyon süreçlerinde iyonik deterjanların, aniyonik deterjanların veya her ikisinin birlikte kullanımı yaygındır. Bu kimyasalların hücre membranlarını çözebilme ve proteinlerden DNA'nın ayrılmasını sağlaması onların desellülarizasyon süreçlerinde kullanımının nedenlerini oluşturmaktadır. Dolayısıyla deterjanların kullanımı dokulardan hücrelerin ve hücresel içeriğin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Ancak dokulardan protein izolasyonu sırasında deterjanların kullanımı önemli bir noktadır (Alhamdani ve diğ. 2010, Patel ve diğ. 2008). Bir dokudan hücrelerin uzaklaştırılması için deterjanlara maruz kalma süresi birçok parametreye bağlıdır. Kullanılan deterjanın türü, konsantrasyonu, tercih edilen desellülarizasyon yöntemi, doku türü ve dokunun büyüklüğü

bu değişkenlerin bir kısmını oluşturmaktadır. Bir desellularizasyon protokolünde farklı deterjan kombinasyonları arttıka matriks proteinlerine verilen zarar da genel olarak artmaktadır (Rieder ve diğ. 2004, Cebotari ve diğ.2010). Triton X-100 hücre kalıntılarının dokulardan uzaklaştırılması konusunda iyi bir deterjandır. Ancak özellikle böbrek gibi yoğun dokuların desellularizasyonunda yetersiz kalmaktadır. Doku delipidasyonlarında (proteinlerden lipitlerin uzaklaştırılması) iyonik olmayan Triton X-100 gibi deterjanlar deoksikolat gibi iyonik deterjanlara göre daha iyi sonuçlar vermektedir (Cebotari ve diğ.2010). Sodyum dodesül sülfat (SDS) hücresel içeriklerin dokulardan uzaklaştırılmasında Triton X-100'den çok daha etkili bir deterjandır. Temporamandibular eklem dokusunun mekaniğini bozmadan etkili bir desellularizasyona izin verdiği Lumpkins'in yaptığı çalışmada gösterilmiştir (Lumpkins ve diğ. 2008). Buna ilaveten SDS karaciğer, böbrek vb. birçok organın desellularizasyonu için en sık kullanılan ajanlardan birisidir (Uygun ve diğ. 2010, Nakayama ve diğ. 2010). Bir desellularizasyon protokolüne SDS gibi bir deterjanın eklenmesi parçalanmamış, bütün haldeki çekirdeklerin ya da hasar görmüş çekirdeklerin dokudan uzaklaştırılması noktasında oldukça büyük bir fark yaratır (Yang ve diğ. 2010). Fakat dokunun mikro mimarisinde meydana gelen bir miktar bozulmanın da önüne geçilmesi oldukça zordur. SDS'in hücre bileşenlerini uzaklaştırma konusundaki üstün özellikleri yalnızca Triton X-100'e göre olmayıp diğer deterjanlara göre de daha üstündür. Yine de bir desellularizasyon protokolünde SDS kullanılıyorsa araştırmacı oldukça dikkatli olmalıdır. Düşük konsantrasyonlarda kullanım SDS'in dezavantajlarının bir miktar önüne geçmektedir.

Alkoller

Alkoller -genel olarak dehidratasyona ve hücre lizisine yardımcı olarak- desellularizasyon süreçlerini kolaylaştırlar (Prasertsung ve diğ. 2008). Aslında etanol, metanol, izopropanol gibi alkoller dokulardan lipitlerin uzaklaştırılmasında lipazlara göre daha etkili ve daha hızlıdırlar (Flynn ve diğ.2010). Metanol ve kloroform kombinasyonların dokuların delipidasyonu için kullanılmıştır (Prasertsung ve diğ. 2008). Ancak, alkollerin fiksatif özellikleri proteinleri öktürmeleri, ve ekstrasellüler matrikse zarar vermeleri desellularizasyon için kullanımında oldukça dikkatli olmayı gerektirmektedir.

1.6.1.3. Biyolojik Ajanlar

Enzimler

Desellülarizasyon çalışmalarında sık kullanılan ajanlardan olan enzimler hücrel içeriklerin ve istenmeyen ekstrasellüler matriks bileşenlerinin uzaklaştırılmasında oldukça etkilidirler. α -galaktozidaz, termolizin, dispaz, lipaz, tripsin ve nükleazlar doku iskeleleri elde etmek amacıyla kullanılan enzimlerdendir. Her ne kadar enzimlerin kullanımı yaygın ve desellülarizasyona etkileri oldukça iyi olsa da tek başına kullanımları çok iyi sonuçlar vermemektedir. Enzim kullanımının yer aldığı desellülarizasyon işlemlerinde dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Bunlardan ilki ve belki de en önemlisi dokunun enzimle işlem görme süresidir. Protokolün bu kısmı çok iyi optimize edilmelidir. Çünkü inkübasyon süresinin az olması desellülarizasyon sürecinin başarısızlığına yol açabilmektedir. Bu sürenin gereğinden uzun olması ise proteinlerden oluşan matrikste bozulmalara yol açabilmektedir. Enzim kullanımında dikkat edilmesi gereken hususlardan birisi de desellülarizasyon işleminin gerçekleştirileceği ortamın sıcaklığı ve bu sıcaklığın sürdürülebilir olmasıdır. Çünkü enzimlerin çalışabildiği belli bir sıcaklık vardır ve bu sıcaklık korunması gerekir. Aksi takdirde yapılan hücresizleştirme işlemi ya tamamen ya da kısmen başarısız olabilir.

Tripsin, desellülarizasyon için en yaygın kullanılan proteolitik enzimlerden birisidir. Kollajen gibi ekstrasellüler matriks proteinlerinin tripsininin sindirme işlemine karşı direnci sınırlıdır (Waldrop ve diğ. 1980). Bu nedenle tripsin kullanımında -özellikle kollajen içeriği yoğun olan dokularda- dikkatli olunmalıdır. Birçok deterjana göre tripsin elastin ve kollajen için daha yıkıcıdır ve hücreleri daha yavaş çıkarır fakat glikozaminoglikan içeriğini daha iyi korur (Kasimir ve diğ. 2003 Yang ve diğ. 2009). Tripsinden kaynaklanan matriks hasarı doku iskelesinin hem mekanik hem de biyolojik özelliklerindeki değişim ile ilişkilendirilebilir (Yang ve diğ. 2009).

Sık kullanılan enzimlerden bir diğeri de nükleazlardır. Ancak nükleazlar direkt olarak kullanılmazlar. Hücre lizizi gerçekleştirildikten sonra nükleik materyallerin parçalanması amacıyla kullanılırlar. Benzonaz gibi endonükleazlar nükleotitleri daha kısa frangmentler halinde kestikleri için ekzonükleazlardan daha etkilidir (Petersen ve diğ. 2010). Bu da DNA'nın daha etkin bir şekilde uzaklaştırılmasında araştırmacının işini kolaylaştırmaktadır.

Enzimatik Olmayan Ajanlar

Etilendiamintetra asetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetraasetik asit (EGTA) gibi şelatlayıcı ajanlar daha hassas bir desellülarizasyon için protokollere eklenebilmektedir. Genellikle deterjanlarla birlikte kullanılırlar (Gui ve diğ. 2010, Lehr ve diğ. 2011). Bu maddelerin -metal iyonlarını tutabilme özelliği sayesinde- ekstrasellüler matriks proteinlerinden hücrelerin ayrılmasını kolaylaştıran özellikleri vardır (Gailit ve diğ. 1988). Muhtemelen şelatlayıcı ajanlar yine aynı mekanizma ile protein-protein etkileşimlerinde ustaca tasarlanmış aksaklıklara sebep olmaktadır.

Bunların dışında desellülarizasyon süreçlerinde sitotoksik özelliklerinden yararlanmak için enzimatik olmayan biyolojik ajanlardan toksinlerin kullanımı (Gillies ve diğ. 2011), antibiyotiklerin kullanımı da söz konusudur.

1.6.2. Desellülarizasyon Yöntemleri

1.6.2.1. Tam Organ Perfüzyonu

Desellülarizasyonun tarihsel gelişimi göz önüne alındığında tam organ perfüzyon sistemleri oldukça yeni bir yaklaşımdır. Optimizasyon sağlandığında ekstrasellüler matriksin 3B yapısını oldukça iyi koruyan perfüzyon sistemleri doku ya da organın damar sistemini kullandığı için oldukça etkin desellülarizasyonlara imkan sağlarlar. Hücresel içeriğin dokudan uzaklaştırılması konusunda en avantajlı yöntemlerden birisidir. Günümüze kadar kalp (Ott ve diğ. 2008), karaciğer (Uygun ve diğ. 2010), akciğer (Petersen ve diğ. 2010), böbrek (Liu ve diğ. 2009) gibi organların desellülarizasyonlarında perfüzyon sistemi başarıyla kullanılmıştır.

Tam organ perfüzyon desellülarizasyonlarında peristaltik sistemlerin bağlanacağı damarın seçimi oldukça önemlidir. Doku ya da organın tamamının desellülarize olması sağlanacak damarlar seçilmelidir. Seçilen damar perfüzyon sisteminin bağlanabilmesine imkan verecek ebatlarda olmalıdır. Tüm bunlar da ekstrasellüler matriksi elde edilecek dokunun histolojik özelliklerinin iyi biliniyor olmasını gerektirmektedir. Ayrıca kullanılan cihaz dokuya hava, köpük girişini engelleyecek özellikte olmalıdır. Eğer araştırmacı böyle bir sisteme sahip değilse özellikle kullanılan kimyasalların değiştirilmesi sırasında oldukça

dikkatli olmalı ve dokuya kesinlikle hava girişine izin vermemelidir. Çünkü dokuya giren hava damar sisteminin bir bölümünün tıkanmasına sebep olmaktadır. Bu küçük ayrıntı desellülarizasyonun başarısını doğrudan etkilemektedir.

Perfüzyon desellülarizasyonları için tercih edilen ajanlar genellikle deterjanlardır. SDS ve Triton X-100 desellülarizasyon için en çok kullanılan deterjanlardandır (Uygun ve diğ. 2010, Schneider ve diğ. 2016).

1.6.2.2. Basınç Gradienti Yöntemi

Doku boyunca bir basınç gradienti oluşturmak özellikle enzim temelli desellülarizasyon uygulamalarına yardımcı olmakta ve dokunun mikro mimarinde üstün bir koruma sağlamaktadır (Prasertung ve diğ. 2008). Hidroksiprolin miktarı ölçülerek ısı değişimlerinin olduğu akış, çalkalamalı akışa göre daha az miktarda kollajen bozulmasına neden olduğu belirlenmiştir. Mesane desellülarizasyonu basınç gradienti yönteminin kullanıldığı desellülarizasyonlara örnek olarak gösterilebilir (Bolland ve diğ. 2007). Bu yöntemde kollajen tip 1'in, kollajen tip 4'ün lamininin ve glikozaminoglikanın desellülarizasyon sürecinden etkilenmediği bildirilmiştir.

1.6.2.3. Sıvıda Bekletme ve Çalkalama Yöntemi

Desellülarizasyon ajanlarının içinde bulunduğu bir sıvıya dokuların daldırılarak bekletilmesiyle ya da bu işlemi çalkalamalı olarak yapılmasıyla doku ve organlardan biyoiskeleler elde etmek mümkündür. Wilson ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları bir kornea desellülarizasyonu buna örnek olarak gösterilebilir (Wilson ve diğ. 2015). Ancak her dokunun hücreleri bu yöntem ile tam olarak uzaklaştırılamayabilir. Özellikle hücresel açıdan aşırı yoğun olmayan, damarsal olarak zengin ve desellülarizasyon sıvısının dokuya difüzyonunu engelleyecek yapıları içermeyen dokular tercih edilmelidir. Bu yöntem uygun dokular için tek başına kullanılabilirdiği gibi bazı dokularda da diğer desellülarizasyon yöntemleriyle birlikte kullanılabilir. Günümüze kadar pek çok dokunun desellülarizasyonu, desellülarizasyon ajan veya ajanlarını içeren sıvılarda dokuların bekletilmesi ya da çalkalanmasıyla yapılmıştır. İskelet kası ve tendonları (Woods ve Gratzler 2005, Deeken ve diğ. 2011), kan damarları (Montoya ve McFetridge 2009), kalp kapakçıkları (Meyer ve diğ. 2006), kıkırdak (Elder ve Kim 2010), özafagus (Ozeki ve diğ. 2006), trakea (Remlinger ve diğ.2010), mesane (Yang ve diğ. 2010), kornea (Wilson ve diğ. 2015) bunlardan

bazılarıdır. Bu yaklaşımların kullanıldığı protokollerin süresi çalkalamanın yoğunluğuna, doku kalınlığına, dokunun yoğunluğuna, kullanılan desellülarizasyon ajanına değişkenlik göstermektedir. Mesane gibi ince dokular kolaylıkla hücreleştirilebilir ve bu süre çok uzun zamanlara yayılmaz. Ancak, dermiş, tendon, trakea gibi yoğun dokular günlerce hatta birkaç aya kadar uzayabilen uzun bir çalkalama süreci gerektirir. Bu tar dokularda genellikle deterjan, enzim ve alkol kombinasyonları kullanılmaktadır.

1.6.3. Desellülarize Edilmiş Ekstrasellüler Matriksin Sterilizasyonu

Bir dokudan biyoiskele elde edildikten sonra *in vivo* transplantasyon yapılacaksa tüm değerlendirme ve tahminlerden önce malzemenin sterilizasyonu ve dolayısıyla hasta güvenliği mutlaka ele alınmalıdır. Eğer ekstrasellüler matrikste hücre kültürü yapılacaksa da mutlaka sterilizasyon işlemi yapılmalıdır. Dokuda bulunma olasılığı olan endotoksinler, viral veya bakteriyel ajanların matriksten uzaklaştırılması sırasında özenle korunmaya çalışılan dokunun mikro ve nano yapılarının değişmemesi de son derece önemlidir. Biyoiskelelerin sterilizasyonu asit (Hodde ve Hiles 2002) ya da çözücülerde bekletme gibi basit işlemlerle yapılabilir. Ancak bu tarz yöntemler etkili bir penetrasyon sağlamayabilir ve ekstrasellüler matriksin önemli bileşenlerine zarar veren bir uygulamayı da içerebilir. Özellikle etilen oksit, gama ışınlama, elektron ışınlamaların ekstrasellüler matriks yapısını ciddi şekilde değiştirdiği bilinmektedir.

Son zamanlarda yaygınlaşan süperkritik karbondioksit ekstrasellüler matriks sterilizasyonuna alternatif bir yöntem sunmaktadır. Diğer yöntemlere göre oldukça düşük miktarda ekstrasellüler matriks değişimlerine neden olmaktadır (Qiu ve diğ. 2009).

Henüz doku iskelelerinin sterilizasyonu amacıyla kullanılmaya yeni başlanan PAA sterilizasyonu ise küf ve bakteri sporlarına bile oldukça etkili bir şekilde nüfuz etmekte ve biyolojik materyalin sterilizasyonunu etkili bir şekilde gerçekleştirmektedir. PAA ile çok düşük yoğunluklarda bile başarıyla sterilizasyon işlemi yapılabilmektedir. Desellülarizasyon süresince kullanılan malzemenin yoğunluğu ne kadar düşük olursa ekstrasellüler matriksin mikro mimari yapısına etkisi de o kadar az olacaktır. PAA kullanımı bu avantajlarının yanı sıra araştırmacıya hızlı, ucuz ve pratik bir sterilizasyon yöntemi sunmaktadır (Yoganarasimha ve diğ. 2014, Kajbafzadeh ve diğ. 2013).

1.6.4. Desellülarize Edilmiş Ekstrasellüler Matriksin Değerlendirilmesi

Doku iskelesi içinde hücre kalıntılarının olması biyo-uyumluluk problemlerine ve canlı bir bireye nakledildiğinde istenmeyen immünolojik yanıtların oluşmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla desellülarizasyon sonrasında elde edilen materyalin değerlendirilmesi son derece kritiktir. Çift zincirli DNA, mitokondri, fosfolipit gibi hücre membranıyla ilişkili moleküller gibi hücre bileşenleri nicel olarak incelenebilmektedir. Desellülarizasyon işlemi sonrasında hücre kalıntılarının tamamını ekstrasellüler matriksten ayırmak pek mümkün gözükmemektedir. Desellülarizasyon amacını karşılamaya yeterli olacak bazı kriterler belirlenmiştir.

- i- 1 mg ekstrasellüler matriks kuru ağırlığında 50 ng'dan az çift zincirli DNA'nın bulunması
- ii- DNA parçalarının uzunluğunun 200 baz çiftinden kısa olması
- iii- 4',6- diamino-2-fenilindol (DAPI) ya da hematoksilen-eozin (HE) boyamalarında görünür bir nükleer boyamanın olmaması

Nükleik asitlerin direkt olarak transplantasyon sonrası istenmeyen yanıtların oluşması ile bağlantılı olmasından dolayı, yukarıdaki kriterlerde çekirdek materyali üzerine odaklanılmıştır. Bu ölçütler genel olarak da diğer hücre kalıntıları hakkında fikir sağlamaktadır. Birinci ve ikinci kriter polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) sonrası ticari olarak temin edilebilen PicoGreen, propidyum iodyd, etidyum bromür gibi DNA enterkalasyon ajanı ve jel elektroforezi ile kolaylıkla belirlenebilmektedir. Üçüncü kriter ise histoloji boyama ya da bir immün floresan boyama yapılarak gerçekleştirilir ve ilk iki yöntemi nitel olarak doğrulamaktadır.

Ancak zamanla anlaşılmıştır ki, sitoplazmik bileşenlerle ve membranla ilişkili bileşenler ile olumsuz konak yanıtları arasında bir ilişki vardır. Dolayısıyla yukarıda belirtilen ölçütlerin bu sonuçları da göz önüne alarak değiştirilmesi gerekmektedir.

Şu ana kadar ekstrasellüler matriksin mekanik özelliklerine etkileri hakkında desellülarizasyon ajanlarının ayrı ayrı değerlendirilmesiyle oluşturulmuş bir fikir birliği yoktur.

1.7. Resellülarizasyon

Desellülerize edilmiş ekstrasellüler matrikslere hücreler ekilerek yeniden hücrelendirilmesi ve canlandırılması işlemi resellülarizasyon olarak adlandırılmaktadır. Tam organ desellülarizasyonu yapılmış doku iskelelerinin kök hücreler kullanılarak yeniden hücrelendirilmesi doku mühendisliği ürünleri olan organları oluşturmak için yeni bir kapı açmıştır. Son yıllarda birçok çalışma desellülarizasyon ve resellülarizasyon uygulamalarının fonksiyonel yapay organlar elde edilmesindeki potansiyelini ortaya koymuştur. (Goh ve diğ. 2013)

1.7.1. Organ İskelelerinin Parankim Resellülarizasyonu

Resellülarizasyon işlemi; uygun hücre kaynaklarını, optimize edilmiş hücre ekim yöntemlerini ve fizyolojik olarak uygun bir kültür yöntemlerini gerektirir. Organ rejenerasyonu için implantasyon öncesinde vasküler sistem, destekleyici bileşenler ve parankima yeniden oluşturulmuş olmalıdır. Birçok grup en uygun resellülarizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmaktadır. Ancak fonksiyonel organ oluşturulmasının karmaşıklığı, uzmanlaşma ve maliyet gibi sınırlamalar çalışmaların hızını azaltmaktadır. Özellikle implantasyonu kapsayan *in vivo* çalışmalar sınırlıdır.

1.7.1.1. Parankimal Resellülarizasyonda Kullanılan Hücreler

Resellülarizasyon tekniklerini kullanarak hastaya spesifik organlar oluşturmak amacıyla araştırmacılar kök hücrelere yönelmişlerdir. Kök hücreler -kültür ortamında çoğaltılabilmeleri ve birçok hücre soyuna farklılaşabilmeleriyle- ilginç hücrelerdir.

Resellülarizasyon için en fazla kullanılan kök hücre türlerinden biri de EKH'lerdir. Bu hücreler genellikle organ matriksleri üzerinde farklılaşmaları için denenmiştir. Desellülerize edilmiş sıçan böbrek ekstrasellüler matriksi üzerine herhangi bir dış kaynaklı farklılaşma sinyali olmadan fare EKH'leri ekilmiştir (Donandrini ve diğ. 2014). EKH'lerin pluripotensileri azalırken renal ve endotel hücre belirteçlerini ifade ettikleri gözlemlenmiştir. Bir başka çalışmada resus maymunlarından elde edilen akciğer ve böbrek doku iskeleleri üzerine insan EKH'leri ekilmiştir (Nakayama ve diğ. 2013). Ancak ekilen hücreler akciğer ve böbrek hücrelerine ait belirteçler ifade etse de organa spesifik bir ekspresyon gözlenmemiştir. Organ ekstrasellüler matriksleri EKH'lerin farklılaşmaları için gerekli sinyalleri tek başına sağlayabilme konusunda muhtemelen sınırlı bir kapasiteye

sahiptirler. Bu sınırlama Nakayama'nın neden organa spesifik belirteçler elde edemediği konusuna da açıklık getirmektedir.

Organ resellülarizasyonları için denenen diğer bir hücre tipi de uPKH'lerdir. Somatik hücrelere spesifik pluripotent genlerin aktarılması yoluyla embriyonik benzeri bir statüye yeniden programlanmalarını içeren bu teknik sayesinde kişiye spesifik pluripotent hücreler elde edilebilmektedir. Bu yaklaşım hastaya spesifik organlar oluşturmak için hücre kaynağı sağlamaktadır. Yakın bir zamanda akciğer resellülarizasyonu için uPKH'lerin kullanıldığı çalışmada uPKH'lerin yüksek verimlilikle tip 2 alveolar epitelyal hücrelere farklılaştığı gözlemlenmiştir (Ghaedi ve diğ. 2013). Bu hücrelerin sürfektan protein B ve C gibi tipik akciğer belirteçleri eksprese ettikleri tespit edilmiştir. Fare kalp matriksleri üzerine aort yoluyla uPKH kaynaklı miyosit progenitör hücrelerin ekimi yapıldıktan 20 gün sonra spontan olarak kasıldıkları gözlemlenmiştir. Ancak ekokardiogramda gözlemlenmiştir ki bu kasılma düzensiz ve senkronize değildir (Lu ve diğ. 2013).

Organ mühendisliği çalışmaları için son derece önemli olan hücrelerden biri de mezenkimal kök hücrelerdir. Klinik uygulanabilirliği, yetişkin bireylerden elde edilebilen bir kök hücre kaynağı oluşu, kültürünün kolay olması, farklı hücre tiplerine farklılaşabilmesi, doku tamirinde rol alması, sitokin ve kemokin salgılayarak stromal destek sağlaması, immünojenik olmaması, immün düzenleyici rolleri ve invazif özellikleri gibi pek çok sıra dışı özelliği MKH'leri doku mühendisliği için olmazsa olmazlar arasına sokmaktadır. Doku iskelelerinin MKH'lerin farklılaşmasını tetiklediği yönünde kanıtlar vardır. Jiang ve arkadaşları kemik iliği kaynaklı MKH'leri 2B statik kültür koşullarında ve 3B karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde aynı koşullarda kültüre almışlardır. 4 hafta sonra karaciğer doku iskelesinde kültüre alınan MKH'lerin 2B kültürle kıyasladığında çok daha etkili bir şekilde hepatik farklılaşmaya gittiği gözlemlenmiştir (Jiang ve diğ. 2014). Ayrıca fulminan hepatik yetmezlik modeli oluşturulmuş farelere MKH'ler ile resellülarize edilmiş karaciğer iskeleleri aktarıldığında transplantasyondan sonra karaciğer fonksiyonlarının korunduğu gözlemlenmiştir.

Doku iskelelerinin MKH farklılaşmasını uyarabilmeleri muhtemelen organa spesifik ekstrasellüler matriks-hücre etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır (Reilly ve Engler 2010). Organa spesifik stromaların oluşması bölgesel olarak kök hücre farklılaşmalarına ihtiyaç duyar. Örneğin, akciğer ya da karaciğer için lokal hepatosit ya da alveolar hücre farklılaşmaları gereklidir. Bu bağlamda, desellülarize edilmiş sıçan akciğer iskelesi üzerine

ekilen hem insan adipoz kaynaklı MKH'lerin hem de insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin pulmonar epitelyal kökene farklılaştığı gösterilmiştir. Bu çalışmada her iki kaynaktan da elde edilen MKH'lerin tip 2 alveolar hücre belirteci olan surfektan protein C ifade ettiği ancak yalnızca adipoz kaynaklı MKH'lerin *Clara cell* salgı protin (Club cell belirteci) ifade ettikleri ve yalnızca kemik iliği kaynaklı MKH'lerin de sitokeratin-5 (bazal epitelyal hücre belirteci) ifade ettikleri gözlemlenmiştir (Mendez ve diğ. 2014). Adipoz kaynaklı MKH'ler ayrıca akciğer doku iskelesinin üst kısımlarına (üst solunum yolu) tutunma eğilimi gösterirken bu davranış kemik iliği kaynaklı MKH'lerde gözlemlenmemiştir. Bu durum her iki MKH'nin de eşsiz tutunma özellikleri olduğuna işaret etmektedir.

1.7.1.2. Parankimal Resellülarizasyon

Organ resellülarizasyonlarında günümüze kadar birçok hücre tipi denendiği gibi birçok hücre ekim yöntemi de denenmiştir. Sıklıkla kullanılan resellülarizasyon yöntemi vasküler sistem olmuştur. Sıvıların akışından kaynaklanan stres ve basınç hücreleri etkileyebilmektedir. Dolayısıyla hücre ekim yöntemini iyi belirlemek ve özellikle optimizasyonunu iyi yapmak hücrelerin dağıtımında oldukça önemli bir basamaktır.

Karaciğer Parankimal Resellülarizasyonu

Karaciğer doku iskelesine damar sistemi kullanılarak hücre ekiminin birçok yolu vardır. Portal ven, hepatik ven (inferior vena cava) ve hepatik arter resellülarizasyon için kullanılan yollardandır. Ancak çalışmaların çoğunda ya portal ven ya da hepatik ven tercih edilmektedir. Karaciğer matriksine hücre ekiminde portal ven tercih edilirse hücreler daha çok periportal alanda konumlanırken hepatik ven kullanılırsa hücreler perisentral alanda konumlanırlar (Batista ve diğ. 2011). Batista bu çalışmasında akış yönünün hücrelerin hizalanmasını, dizilmesini de yönettiğini belirtmiştir. Vasküler ağın kullanılmadığı, direkt olarak hücrelerin bir şırınga yardımı ile ekstrasellüler matrikse ekildiği yöntemler de mevcuttur. Ancak bu tarz yöntemlerde hücrelerin birikip kümelenmesi (agregasyon), kuvvetli olmayan tutunmalar ve etkili olmayan bir dağılım göstermeleri söz konusudur. Sato-Gutierrez ve arkadaşları, desellülarize edilmiş sıçan karaciğer parankimini oluşturmak için fare hepatositlerinin ekim yöntemlerini değerlendirdikleri çalışmalarında (Sato-Gutierrez ve diğ. 2011) hepatik loblara iğne yardımıyla 5 enjeksiyon yapıldıktan sonra hücre tutunmasının %13'ten daha düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Biyoreaktörlerde

hücrelerin besi ortamı içinde kesintisiz olarak damar yoluyla verildiğinde ise hücre tutunma oranının %70'lere kadar çıktığı görülmüştür. Bir döngüsü 10-15 dakika süren sirküler bir besi ortamı akışı içinde hücreler verildiğinde ise hücre tutunması %86'ya kadar çıkmıştır. Döngüsel hücre ekim yöntemi Uygun ve arkadaşları tarafından sıçan karaciğerine sıçan hepatositleri ekildiğinde %95 hücre tutunmasının sağlandığı görülmüştür (Uygun ve diğ. 2010).

Karaciğerde var olan hepatik safra sistemi henüz çalışmalarda hücre ekimi için kullanılmamıştır.

Diğer Organların Parankimal Resellülarizasyonu

Akciğer iki farklı ekim yöntemi ile resellülarize edilebilmektedir: vaksüler sistem ve solunum yolu. Ott ve arkadaşları fetal sıçan akciğer hücrelerinin ekimi için trakeayı kullanmış, HUVEC (insan göbük bağındaki venden elde edilen endotel hücreler) ekimi için ise pulmoner arteri kullanmıştır (Ott ve diğ. 2010). Yapılan çalışmalardan yola çıkılarak söylenebilir ki tam akciğer resellülarizasyonu hem solunum yolu hem de pulmoner arter ve pulmoner ven kullanılarak vasküler sistemin iyi bir şekilde hücrelendirilmesine bağlıdır.

Böbrek resellülarizasyonları da vasküler sistem ya da üreter kullanılarak yapılabilir ancak en yaygın yol renal arteri kullanmaktır (Bonandrini ve diğ. 2014). Yeni yayınlanmış bir çalışmada renal arter perfüzyonu ile ekilen 40 milyon insan renal kortikal tübüler epitel hücrelerin 25 ml/dk hız ile ekimi ile renal alanın yaklaşık %50 sinin hücrelerce kaplandığı gözlemlenmiştir (Caralt ve diğ. 2015). Hücre ekimi için üreteri kullanan iki grup vardır. Ross ve arkadaşları hücre ekiminde renal arterin üretere kıyasla daha iyi bir hücre dağılımı ve tutunması (%95'e %50) sağladığını belirtmişlerdir (Ross ve diğ. 2009). Fakat, Song ve arkadaşları üreter yoluyla yapılan ekimin bölgeye spesifik olduğunu iddaa etmişlerdir (Song ve diğ. 2013).

Pankreas desellülarizasyonu ise diğer organlara kıyasla çok yaygın olmadığı için resellülarizasyonu da çok çalışılmış konular arasında değildir. Pankreatik kanal ya da vasküler sistem kullanılarak pankreas resellülarizasyonu yapılabilir. Goh ve arkadaşları MIN-6 pankreatik beta hücrelerini portal ven yoluyla AR42J pankreatik asiner hücrelerini de pankreatik kanal yoluyla ekmiştir (Goh ve diğ. 2013). AR42J pankreatik asiner hücreleri tübüler duktal alana yerleşirken, MIN-6 hücreleri ise luminal alana

tutunmuşlardır. Bu ekimde her iki hücrenin de aynı yerde konumlandığı görülmemiştir. Bu sonuçlar pankreas resellülarizasyonu için her iki kanal sisteminin de kullanımının faydalı olabileceğini göstermektedir.



2. AMAÇ

Bu çalışmada, doku mühendisliği teknikleri kullanılarak karaciğer doku iskelesi üzerinde insülin salgılayan endokrin pankreas benzeri bir doku oluşturulması hedeflenmiştir. Hem iki boyutlu klasik kültür yöntemlerinin hem de vücudu çok daha iyi taklit edebilen üç boyutlu (3B) kültür yöntemlerinin kullanıldığı bu tez çalışması aynı zamanda bir doku iskelesi üzerinde, sıra dışı olarak, iskelenin elde edildiği dokuya ait olmayan farklı bir dokuya benzer yapılar oluşturmayı amaçlamaktadır.

Doku mühendisliği gibi son derece ileri teknolojiler ile çalışan disiplinler arası bir alanda bile henüz denenmemiş olan ve dünyada bir ilk niteliği taşıyan bu yaklaşım ile bilim insanlarının ve araştırmacıların aklında yeni fikirlerin oluşumuna yol açmak da çalışmanın en önemli amaçları arasında yer almaktadır. Böylelikle, doku ve organ onarım çalışmalarının ya da doku ve organ üretebilme çalışmalarının sınırları genişlemiş olacaktır. Farklı doku materyallerini, hedeflenen amaçlar doğrultusunda birleştirebilmenin ve özellikle yeni doku tasarımları yapabilmenin mümkün olup olmayacağı ortaya konulmuş olacaktır. Belki de doku mühendisliği, benzer çalışmaların artması ile ‘doku tasarımı’ adı altında ya da benzeri ifadeler ile kendi bünyesinde yeni kavramlar dahi kazanabilecektir.

3. YÖNTEM

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Bu çalışmada kullanılan hücreler daha önceki çalışmalardan elde edilmiş pankreatik adacık kaynaklı kök hücrelerdir (Karaoz ve diğ. 2010a). Daha önceki bir çalışmada bu hücrelerin endokrin farklılaşma potansiyelini artırmak için Pax4 ve MafA genleri aktarılmıştır (Bağlar 2014). Gen aktarımı sonrasında yapılan karakterizasyon çalışmalarında bu hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliklerine sahip oldukları ve kimyasal uyarı olmadıkça farklılaşma sürecine girmedikleri belirlenmiştir (Bağlar 2014).

Bu hücreler; FBS (%10), Penisilin-streptomisin (%1) ve G418 (%0,4) eklentileri içeren RPMI 1460 besi yerinde kültüre edildi. Ekilen hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik ortamda inkübe edildi ve her 3 günde bir hücrelerin besi yeri değiştirildi. Hücreler %70-80 konfluent olunca pasajlandı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada esas olarak pankreatik adacık kaynaklı kök hücrelerin desellülarize karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde kültüre edilmesiyle insülin de salgılayan endokrin pankreas dokusu oluşturulması hedeflenmiştir. Bu amaçla, 3B ekstrasellüler matriks kültürleri hem standart RPMI besi yeri olarak tanımlanan FBS, Penisilin-streptomisin ve G418 eklentileri içeren RPMI 1460 ile kültüre edilecek (Çizelge 3.1, Grup 3) hem de endokrin farklılaştırma besi yeri olarak tanımlanan B27, EGF, Nikotinamide, Exendin4, HGF, Pentagastrin, FBS, Pen/Strep ve G418 eklentileri içeren RPMI 1460 ile kültüre edilecektir (Çizelge 3.1, Grup 4).

Çalışmanın diğer amaçlarından biri de pankreatik adacık kaynaklı kök hücrelerin klasik 2B kültürlerde endokrin farklılaşma potansiyelleri karşılaştırmalı olarak ile karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde 3B olarak endokrin farklılaşma potansiyellerini karşılaştırmalı olarak incelemektir. Bunun için deney gruplarına klasik 2B kültürlerde standart besi yeri ile kültürü yapılan (Çizelge 3.1, Grup 1) ve endokrin farklılaştırma besi yeri ile kültürü yapılan (Çizelge 3.1, Grup 2) deney grupları da eklendi.

Çalışma için tasarlanan deney grupları sayesinde 3B ekstrasellüler matriksin farklılaşma için sağladığı fiziksel indüklemeye ve farklılaştırma besi yerlerinin sağladığı kimyasal indüklemeye etkileri ayrı ayrı ve birlikte incelenebilir hale gelmiştir.

Çizelge 3.1. Deney gruplarının belirlenmesi

Deney Grupları	Ekim Yapılan Materyal	Besi Yeri	Farklılaşma Uyarıları	Kültür Türü
Grup 1	Klasik 2B Kültür	Standart RPMI Besi Yeri	Uyaran Yok	2 Boyutlu
Grup 2	Klasik 2B Kültür	Endokrin Farklılaştırma Besi Yeri	Kimyasal	2 Boyutlu
Grup 3	Doku İskelesi Üzerinde 3B Kültür	Standart RPMI Besi Yeri	Fiziksel	3 Boyutlu
Grup 4	Doku İskelesi Üzerinde 3B Kültür	Endokrin Farklılaştırma Besi Yeri	Fiziksel ve Kimyasal	3 Boyutlu

3.3. Karaciğerin İn vivo Perfüzyonu ve Çıkarılması

Çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden (DETAB) temin edilen 200-280 gramlık Wistar cinsi albino sıçanlar karaciğerlerin elde edileceği deney hayvanları olarak kullanıldı. Kan pıhtılarının damarları tıkamaması amacıyla 5000 ünite sodyum heparin 1 ml serum fizyolojik içinde çözülerek dolaşıma verildi. Karaciğer sıçanlardan alınmadan edilmeden önce anestezi altındaki sıçanlara %0.9'luk serum fizyolojik kullanılarak perfüzyon yapıldı. Bu işlem için kanül vasıtasıyla sol ventriküle girildi ve kanın dışarı çıkmasını sağlamak amacıyla sağ atriyuma kesi yapıldı. Sonrasında sol ventriküle koyulan kanülden %0.9'luk serum fizyolojik kan vücuttan tamamen uzaklaşınca kadar verildi. Kalp kasılması durduğunda perfüzyonun devam edebilmesi için serum fizyolojik deney hayvanından yaklaşık 1 m yükseklikte tutuldu.

Perfüzyon ile birlikte organların rengi iyice açıldıktan sonra sıçan karaciğerlerinin bütünlüğü bozulmadan diğer organlarla bağlantıları dikkatli bir şekilde kesilerek çıkarıldı.

3.3. Tam Karaciğer Desellülarizasyonu

Portal ven kanüle edilerek peristaltik pompaya bağlanmış ve sırasıyla %0.02 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren 500 ml fosfat salin tamponu (PBS), 500 ml %1'lik TritonX-100, 500 ml PBS, 500 ml %0.5'lik SDS, 1000 ml %1 SDS, matriksin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla %0.1'lik PAA 3 saat boyunca geçirilmiş ve son olarak doku iskelesi 1000 ml PBS ile yıkanarak karaciğerin desellülarizasyon işlemi tamamlandı. Tüm basamaklarda perfüzyon hızı 3 ml/dk olarak ayarlandı.

3.4. Karaciğer Desellülarizasyonunun Değerlendirilmesi

Desellülarizasyon işleminin etkinliğini değerlendirmek için; izole edilen karaciğer doku iskelesindeki DNA miktarını gözlemlemek amacıyla PCR yapıldı ve agaroz jel elektroforezinde DNA bantları incelendi. Ekstrasellüler matriksin yapısı histokimyasal ve immün floresan boyamalarla incelendi ve biyokimyasal olarak kollajen içeriği tespit edildi.

3.4.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi

Desellülarize edilen karaciğerden ve pozitif kontrol olarak normal karaciğer dokusundan DNA saflaştırma seti (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) ile genomik DNA izolasyonu yapıldı. Ardından hata okuma aktivitesi bulunan (proof reading) DNA polimeraz ve kullanılan tüm hücrelerde var olan Act β genine ait primerler kullanılarak PCR yapıldı. PCR'a ayrıca negatif kontrol olarak DNA içermeyen ancak diğer tüm bileşenleri içeren bir grup da eklendi. PCR reaktifleri çizelge 3.2'de gösterildi.

Denatürasyon (95°C, 30 sn.), bağlanma (55 °C, 45 sn.) ve uzama (72°C, 1 dk) aşamalarından oluşan reaksiyonlar 35 döngü şeklinde gerçekleştirildi. PCR sonrası ürünler ve 1 kb DNA belirteci Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) içinde %1'lik hazırlanan agaroz jelle Sybr Green ile birlikte yüklenmiştir. Jel 100 V'ta 30 dk yürütülerek görüntüleme cihazıyla (DNR Bio-Imaging Systems) görüntülendi.

Çizelge 3.2. Konvansiyonel PCR reaktifleri ve konsantrasyonları

Reaktif	Konsantrasyon
Taq DNA Pol. Tampon Çözeltisi	1X

MgCl₂	2 mM
dNTP	0,2 mM
Taq DNA Pol.	1 U
DNA	40 ng/ μ l
Primer	1 pM

3.4.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar

Desellülarizasyon işlemi tamamlandıktan sonra karaciğer doku iskelesinin histokimyasal ve immün floresan analizleri için ekstrasellüler matriks %10 formalin içinde fikse edildi. 3 gün formalinde bekleyen örnekler yıkandıktan sonra dehidratasyon için sırasıyla %70'lik etil alkol, %80'lik etil alkol, %90'lık etil alkol, %100'lük etil alkolde 20'er dk bekletildikten sonra tekrar %100'lük alkolde 40 dk daha bekletildi. Ardından ksilen içinde de 1 saat bekletilen dokular 60 °C'deki sıvı parafine atılarak 1 saat etüv içinde tutuldu. Bu işlemin ardından dokular metal bloklara yerleştirilerek parafin ile kaplandı. Dokulardan mikrotom ile 5 μ m kalınlığında kesilen kesitler lamlara alındı. İmmün floresan ve histolojik analizler için önce deparafinizasyon işlemi uygulanarak kesitlerden parafin uzaklaştırıldı. Bunun için 70 °C'deki etüvde bir saat bekletilen kesitler ksilenle dolu üç ayrı kapta 5'er dk bekletildi. Daha sonra %100'lük etil alkolde, %90'lık etil alkolde, %80'lik etil alkolde ve %70'lik etil alkolde 3'er dk bekletildi. Distile su ile yıkanan örneklerin antijen açığa çıkarma işlemi (antijen retrieval) 50 mM pH 6.0 olan kaynamış trisodyumsitrat çözeltisinde 20 dk bekletilerek yapıldı.

Histolojik olarak Hematoksilen-Eozin (HE) ve picrosirius red boyaması yapılmış lamlar Crystal Mounting Medium ile kapatılıp Leica DMI 4000 ışık mikroskobunda görüntülendi.

İmmün floresan boyamalar için dokuların uygun blok serumda 20 dk inkübasyonundan sonra anti-kollajen1 antikoru (Santa Cruz Biotechnology) ve anti fibronektin antikoru (Santa Cruz Biotechnology) ile +4 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra PBS ile yıkanan örnekler floresan boya eklenmiş uygun ikincil antikorlar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek işaretlendi. Bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için yıkama yapıldıktan sonra, son aşama olarak, nükleer boya içeren kapatma medyumunu DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (UltraCruz Mounting Medium for

fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

3.4.3. Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi

Desellülarize edilen karaciğer ekstrasellüler matriksinde bulunan kollajen miktarını normal karaciğer dokusunda var olan kollajen miktarı ile karşılaştırmak için biyokimyasal olarak hem normal karaciğerdeki hem de desellülarize matriksteki kollajen içeriği pikrosirius red ile boyanmış ve spektrofotometrede ışımaya ölçülerek belirlendi.

Bunun için 200'er mg normal karaciğer dokusu ve desellülarize karaciğer matriksi 3 gün boyunca oda sıcaklığında tripsin içinde bekletildi. Parçalanmamış dokuları uzaklaştırmak için 20.000 g'de 20 dk santrifüj edildi. Hem örnekler hem de standart oluşturmak için kullanılan sıçan kuyruk kollajeni 0.5 M asetik asit içinde hazırlanan 0.5 µM picosirius red ile oda sıcaklığında 20 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler 10 dk 2500 g'de santrifüj edildi. Hazırlanan süpernatantların 540 nm'de absorbansları ölçüldü ve 0.5 M asetik asit içinde hazırlanan 0.5 µM picosirius red absorbans değerinden çıkarılarak düzenlendi.

3.5. Resellülarizasyon

Desellülarize edilmiş karaciğer ekstrasellüler matriksine daha önce çoğaltılmış olan MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerden 25×10^6 hücre portal ven vasıtasıyla perfüzyon sistemi kullanılarak doku iskelesine ekildi. Bu işlem 15'er dk ara ile 4 kez tekrarlanmış ve toplamda 1×10^8 hücre matrikse ekildi. Hücreler karaciğer doku iskelesine verilerken perfüzyon hızı 1 ml/dk olarak belirlendi.

3.5.1. Karaciğer Doku İskelesinde Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Ekstrasellüler matriksin hücre bölünmesi üzerine etkisini araştırmak için WST-1 (Water soluble tetrazolium-1)'den yararlanıldı. Açık kırmızı renkli stabil tetrazolyum tuzu olan WST-1 kompleks bir dizi hücresel mekanizmalar sonucu koyu kırmızı renkli çözülebilen formazona dönüşür. Tetrazolyum tuzlarının formazona kesimi süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi tarafından gerçekleştirildi. Bu sistem mitokondrinin solunum zincirine aittir ve yalnızca metabolik olarak aktif hücrelerde faal durumdadır. Bu indirgeme reaksiyonu büyük ölçüde canlı hücrelerdeki glikolitik NAD(P)H üretimine bağlıdır.

Sonuçta, kültürde metabolik olarak aktif hücre sayısı ile formazonun spektrofotometrik ölçümü direkt olarak ilişkilidir.

Hücrelerde WST-1 deneyi gerçekleştirmek için kültür ortamı tamamen çıkarılıp %10 WST-1 reaktifi içeren RPMI-1460 ile 2.5 saat karanlık ortamdan standart hücre kültürü koşullarında inkübe edildi. Kör okuma olarak hücre içermeyen ancak WST-1 reaktifli besi yeri içeren kuyucuğun kullanıldığı deney planında 2B klasik kültür ortamında hücre çoğalmasının standardizasyonuna göre 1 hafta ve 2 hafta sonunda doku iskelesindeki hücre proliferasyonu tespit edildi.

3.6. Karaciğer Doku İskelesinde MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaştırılması

Yalnızca karaciğer ekstrasellüler matriksinin MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerinin endokrin yönde farklılaşmalarına etkisinin değerlendirilebilmesi için 1×10^8 hücre karaciğer doku iskelesine ekilmiş ve fetal sığır serumu (FBS) (%10), Penisilin/streptomisin (%1), G418 (%0,8) içeren RPMI 1640 besiyerinde 37 °C, %5 CO₂ kontrollü atmosfer kültür koşullarında 15 gün inkübe edildi (Çizelge 3.1). Mezenkimal kök hücrelerin -matriksin fiziksel farklılaştırma etkisine ek olarak- kimyasal olarak da endokrin yönde farklılaşmalarının uyarılması için B27 (1X), EGF (Epidermal growth factor, 25 ng/ml), Nikotinamide (10mM), Activin-A (2nM), Exendin-4 (10 nM), HGF (Hepatocyte growth factor, 100 pM), Pentagastrin (10 nM), FBS (%10), Penisilin/streptomisin (%1) ve G418 (%0,8) içeren RPMI 1640 besiyerinde 37°C, %5 CO₂ kontrollü atmosfer kültür koşullarında 15 gün inkübe edildi (Çizelge 3.1). Deney gruplarının besi yerleri her üç günde bir değiştirilerek tazelenmiştir. Sonuçları gen ekspresyonu düzeyinde değerlendirmek amacıyla Real Time-PCR, salgılanan insülin seviyesini belirlemek amacıyla insülin ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ve protein seviyesinde görmek amacıyla histokimyasal ve immün floresan teknikler kullanıldı.

3.7. 2-Boyutlu *In Vitro* Kültürlerde MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaştırılması

MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerin endokrin yönde farklılaşmalarında karaciğer ekstrasellüler matriksinin etkisinin daha detaylı irdelenebilmesi için 2 boyutlu kültür kaplarında hem standart RPMI besi yerinde hem de endokrin farklılaştırma besi yerinde 15 gün boyunca kültürü yapıldı. Bu amaçla 6 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna

150.000 hücre ekilmiştir. Farklılaşma sonunda gerçekleştirilecek immün floresan boyamalar için kuyucuklara cam slaytlar yerleştirildi. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan hücreler FBS (%10), Penicilin/streptomisin (%1), G418 (%0,4) içeren RPMI 1640 besiyerinde 37°C, %5 CO2 kontrollü atmosfer kültür koşullarında 15 gün inkübe edildi. Kök hücrelerin kimyasal olarak endokrin yönde farklılaşmalarının uyarılması için B27 (1X), EGF (Epidermal growth factor, 25 ng/ml), Nicotinamide (10mM), Activin-A (2nM), Exendin-4 (10 nM), HGF (Hepatocyte growth factor, 100 pM), Pentagastrin (10 nM), FBS (%10) ve Penicilin/streptomisin (%1) G418 (%0,4) içeren RPMI 1640 besiyerinde 37°C, %5 CO2 kontrollü atmosfer kültür koşullarında 15 gün inkübe edildi (Çizelge 3.1). Deney gruplarının besi yerleri her üç günde bir değiştirilerek tazelendi. Sonuçları gen ekspresyonu düzeyinde değerlendirmek amacıyla Real Time-PCR, salgılanan insülin seviyesini belirlemek amacıyla insülin ELISA ve protein seviyesinde görmek amacıyla histokimyasal ve immün floresan teknikler kullanıldı.

3.8. Kantitatif Real Time-PCR Yöntemiyle Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Tüm deney gruplarından kültür süresince hafta hafta alınan örneklerden set (High Pure RNA İsolation Kit, Roche) ile total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA'lerden OligodT primerler kullanılarak Revers Transkriptaz PCR (RT PCR) ile komplementer DNA (cDNA) kütüphanesi elde edildi.

Çizelge 3.3. qRT-PCR'da kullanılan genlere ait primer baz dizilimleri

Primerler	Açık Adları	Baz Dizilimi (5'-3')
INS-R	İnsülin	CCAGTTGTTAGAGGGAGCAG
INS-L		GACCTTGGCACTGAGGGTT
GCK-R	Glukokinaz	GGATCCTCACTGGGCCAGCATG
GCK-F		GCTAAGCTTATGGCTATGGATACTACAAGGTG

PDX1-R	İnsülin Promotör Faktör 1	CTCCTCGCCCGAGGTTAC
PDX1-F		CGTAGTAGCGGGACAACGA
PAX4-R	Paired Box 4	CGGATCCTTATGGCCATGGTAAGTAATAG
PAX4-F		GAAGCTTATGCAGCAGGACGGTCTC
MAFA-R	Pankreatik Beta-Hücre Spesifik Transkripsiyonel Aktivatör	GGATCCTCACATGAAAAATTCGGGAGAG
MAFA-F		GCAAGCTTATGGCTTCAGAACTGGC
GCG-R	Glukagon	GAGAAGGATCCATCAGCATGT
GCG-L		GGTGAAAGGCCGAGGAAG
SST-R	Somatostatin	CTGCAGCTCCAGCCTCAT
SST-L		CTGGAGCCTGAGGATTTGC
HNF 4 α -R	Hepatosit Nükleer Faktör-4 Alfa	GAGTCATACTGCCGGTCG
HNF 4 α F		GAGCTAGCAGAGATGAGCCG
ALB-R	Albümin	CCTTGCAACACTTGTCCACG
ALB-F		CACCAAGTGCTGTAGTGGGT
AFP-R	Alfa Fetoprotein	GGAGCATAACAGGAAGGGGTT
AFP-F		ACTGGCGATGGGTGTTTAGA
ACT β -R	Beta Aktin	GTACTCCTGCTTGCTGATCC
ACT β -F		AGAGAAGCTGTGCTATGTTG

Deney gruplarındaki hücrelerin endokrin yönde farklılaşmaları ve karaciğer matriksinden kaynaklanabilecek hepatik yönde farklılaşmaları gen ekspresyonu seviyesinde belirlemek için cDNA kütüphanesi kullanılarak kit (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) ile Real Time-PCR'da analiz yapıldı. Aktarımı yapılan MafA ve Pax4 genlerinin primerleri, insülin, glukokinaz, pdx1 gibi çeşitli beta hücre primerleri, alfa hücre belirteci glukagon genine ait primerler, delta hücre belirteci olan somatostatin genine ait primerler, hepatik farklılaşmayı değerlendirmek için HNF-4 α , albümin ve α -fetoprotein genlerine primerler ve referans gen olarak da beta aktin genlerine ait primerler (Çizelge 3.3) kullanılarak SYBR içeren master solüsyonu (Roche) ile reaksiyon kuruldu. Real-Time PCR cihazı (Lightcycler 480, Roche) ile DNA parçalarının çoğalması ölçüldü. Gen ekspresyon seviyeleri referans genlerin (GAPDH ve β -Aktin) ekspresyon seviyelerine göre belirlendi.

3.9. ELISA Yöntemiyle İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi

Deney gruplarındaki hücrelerin insülin salgılama seviyelerinin belirlenmesi ve kıyaslanması amacıyla her deney grubunun besi yerinden ayrı ayrı örnekler alındı. Alınan örneklerdeki insülin seviyesi ticari bir kit (Millipore Rat/Mause Insulin ELISA Kit) kullanılarak ELISA ile belirlendi. Sonuçlar 450 nm ve 590 nm’de absorban ölçümüyle belirlendi.

3.10. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar

2 hafta boyunca kültüre edilen deney grupları 15. günün sonunda histokimyasal ve immün floresan analizler için doku takip kasetlerine alınarak %10 formalin içinde fikse edildi. 3 gün formalinde bekleyen örnekler akar suda yıkandıktan sonra dehidratasyon için sırasıyla %70’lik etil alkol, %80’lik etil alkol, %90’lık etil alkol, %100’lük etil alkolde 20’şer dk bekletildikten sonra tekrar %100’lük alkolde 40 dk daha bekletildi. Ardından ksilen içinde de 30 dk bekletilen dokular 30 dk da parafin-ksilen karışımında bekletilmiş ve 56 °C’deki sıvı parafine atılarak 1 saat etüv içinde tutuldu. Bu işlemin ardından dokular metal bloklara yerleştirilerek parafin ile kaplandı. Dokulardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesilen kesitler lamlara alındı. İmmün floresan ve histolojik analizler için önce deparafinizasyon işlemi uygulanarak kesitlerden parafin uzaklaştırıldı. Bunun için 56 °C’deki etüvde bir saat bekletilen kesitler ksilenle dolu üç ayrı kapta 5’er dk bekletildi. Daha sonra %100’lük etil alkolde, %90’lık etil alkolde, %80’lik etil alkolde ve %70’lik etil alkolde 5’er dk bekletilerek rehidrate edildi. Distile su ile yıkanan örneklerin antijen açığa çıkarma işlemi (antijen retrieval) 50 mM pH 6.0 olan kaynamış trisodyumsitrat çözeltisinde 20 dk bekletilerek yapıldı.

Histolojik olarak Hematoksilen-Eozin (HE) ve picrosirius red boyaması yapılmış lamalar Crystal Mounting Medium ile kapatılıp Leica DMI 4000 ışık mikroskopunda görüntülendi.

İmmün floresan boyamalar için dokuların uygun blok serumda 20 dk inkübasyonundan sonra çeşitli primer antikolarla (Çizelge 3.4) boyanan örnekler +4 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkanan örnekler floresan boya eklenmiş uygun ikincil antikolar (Çizelge 3.4) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilerek işaretlendi. Bağlanmayan antikoların uzaklaştırılması için yıkama yapıldıktan sonra, son aşama olarak, nükleer boya içeren kapatma medyumu DAPI (4',6-diamidino-2-

phenylindole) (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

Çizelge 3.4. Blok Serum, primer antikor ve sekonder antikor tablosu

Antikor Adı	Katalog Numarası	Firma
Anti-İnsülin	sc-9168	Santa Cruz
Anti-Glukokinaz Reseptörü	sc-6340	Santa Cruz
Anti-Pdx1	sc-14664	Santa Cruz
Anti-Pax4	sc-98942	Santa Cruz
Anti-MafA	sc-66958	Santa Cruz
Anti-Glukagon	sc-7780	Santa Cruz
Anti-Kollajen1a1	sc-25974	Santa Cruz
Anti-Fibronektin	sc-8422	Santa Cruz
Goat Anti-rabbit IgG-FITC	sc-2012	Santa Cruz
Donkey Anti-goat IgG-FITC	sc-2024	Santa Cruz
Goat Anti-mouse IgG-FITC	sc-2010	Santa Cruz
Donkey-Antigoat-TR	sc-2783	Santa Cruz

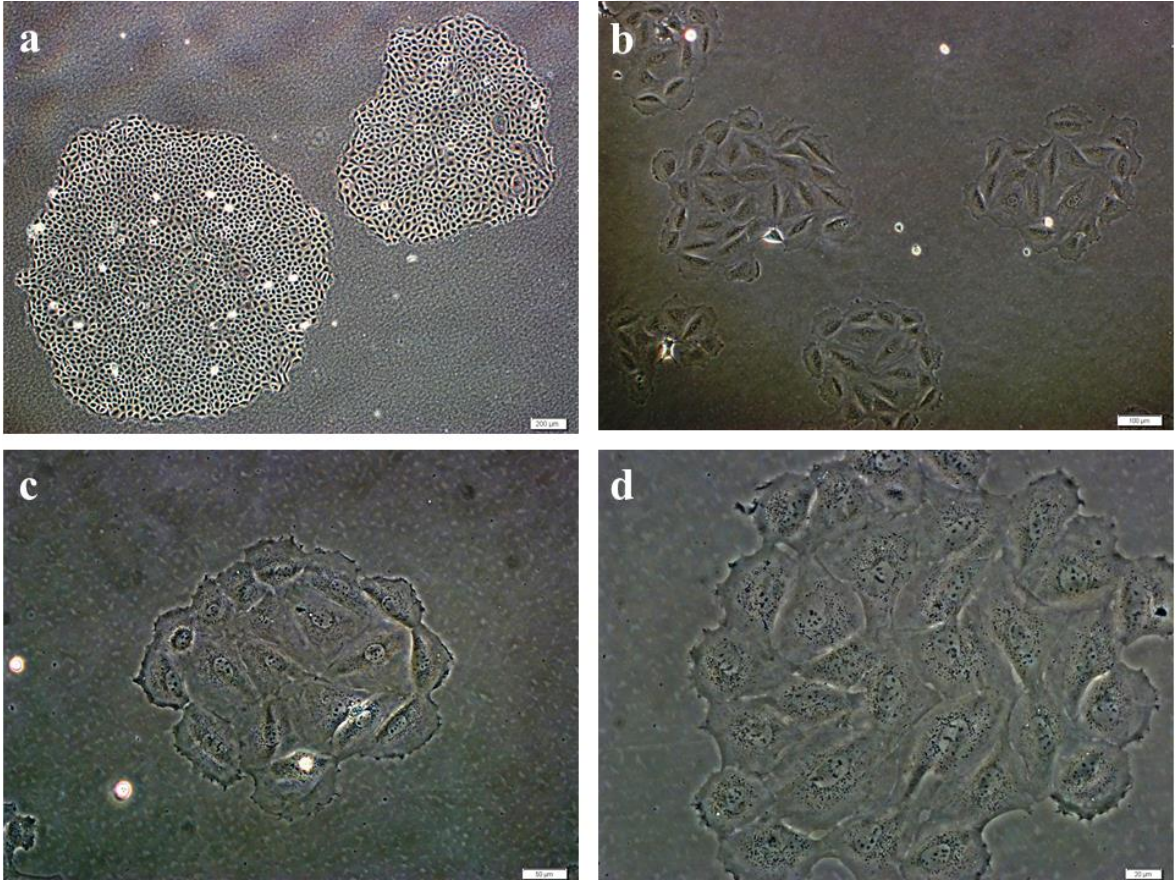
3.11. İstatistiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı ile yapıldı. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman-Keuls metodu ile test edildiler. Her deney en az üç kez tekrar edildi. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p < 0,05$ olduğunda anlamlı ve $p < 0,01$ olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

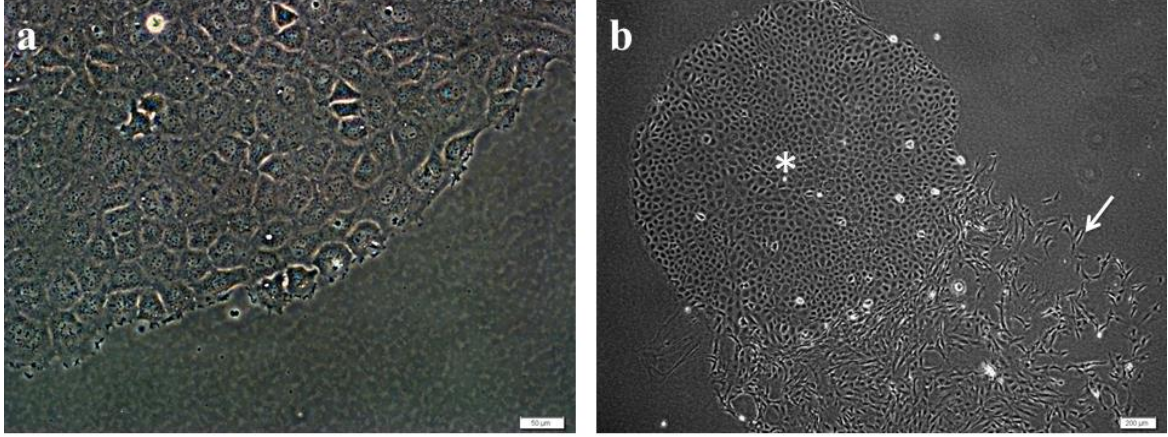
4.1. MafA ve Pax4 Genleri Aktarılmış Hücrelerin Kültürü ve Çoğaltılması

-150 °C’de dondurularak saklanan ve daha önceden karakterizasyonu tamamlanan 4. pasajdaki MafA⁺/Pax4⁺ hücreler çözüldükten sonra fetal sığır serumu (FBS) (%10), penisilin/streptomisin (%1), G418 (%0,4) içeren RPMI 1640 besiyerinde 37 °C, %5 CO₂ kontrollü atmosfer kültür koşullarında çoğaltılmak üzere kültüre alındı. Her 3 günde bir hücrelerin besi yeri değiştirildi. Kültür kabında % 70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi tripsin kullanılarak yapıldı. Faz kontrast mikroskopuyla yapılan incelemelerde hücrelerin koloni oluşturma eğiliminde oldukları gözlemlendi (Çizim 4.1).



Çizim 4.1. Gen aktarılmış pankreatik adacık kök hücre kültürü. (a-d) Koloni oluşturma eğilimindeki MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH morfolojisi. Ölçek çubuğu: 200 μm (a), 100 μm (b), 50 μm (c) ve 20 μm (d).

Gen aktarılmış hücrelerin koloni oluşturma eğilimlerine ek olarak mezenkimal kök hücrelerin iğsi, ince uzun, fibroblast benzeri morfolojilerinin yerini epitel benzeri hücre morfolojisine bıraktığı gözlemlendi (Çizim 4.2).



Çizim 4.2. Gen aktarımı ile epitelyal bir görünüm kazanan MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerinin zıt-faz ışık mikroskobu görüntüleri. **(a)** Kümeleşen yassılaştırmış ve poligonal şekilli kök hücreler. **(b)** Gen aktarımı sonrası seçim aşamasında olan farklı morfolojilere sahip karışık kültür ortamında epitelyal (yıldız) ve fibroblastik (Ok) morfolojilere sahip hücreler. Ölçüm çubuğu: 50 µm **(a)**, 200 µm **(b)**.

4.2. Perfüze Edilmiş Sıçan Karaciğerinin Çıkarılması

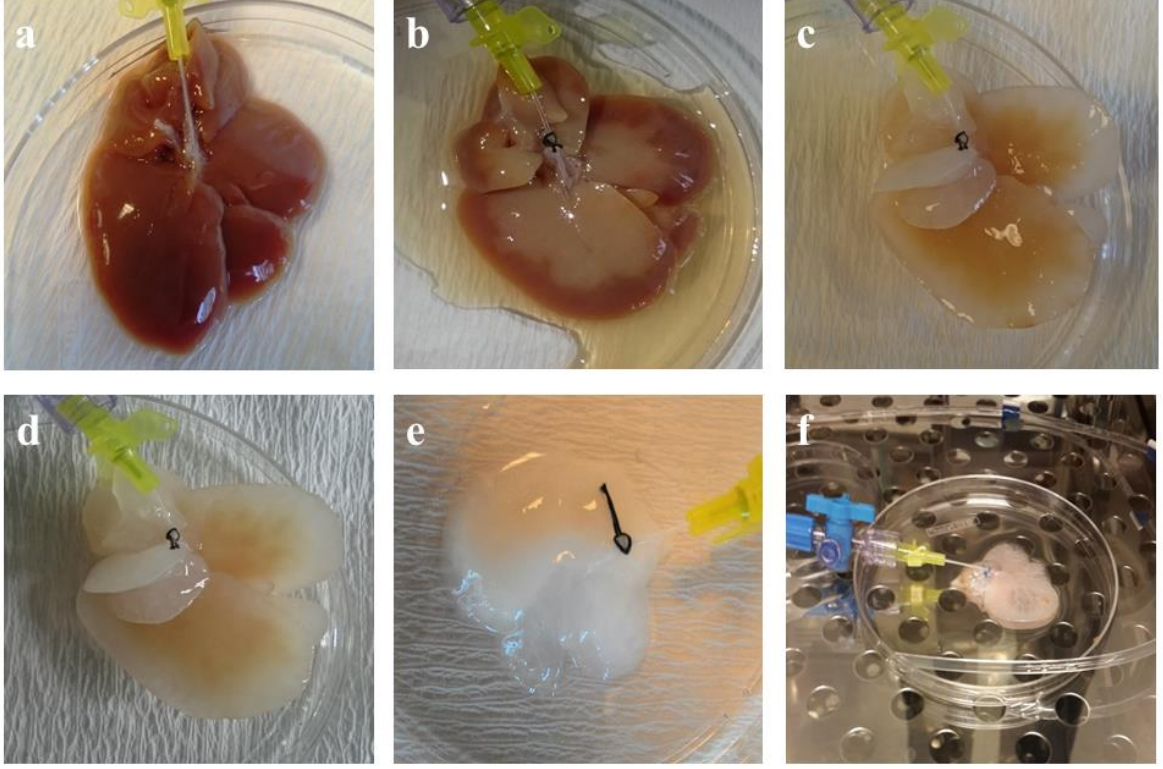
Yapılan ön çalışmalarda karaciğer sıçanlardan çıkarılırken oluşabilecek kan pıhtılaşmalarının perfüzyon desellülarizasyonunun verimliliğini düşürdüğü gözlemlendi. Kan pıhtılarının damarları tıkamaması amacıyla 5000 ünite sodyum heparin 1 ml serum fizyolojik içinde çözülerek dolaşıma verildi. Karaciğer izole edilmeden önce anestezi altındaki sıçanlara %0.9'luk serum fizyolojik kullanılarak perfüzyon yapıldı (Çizim 4.3). Bu işlem sonunda karaciğerin renginin açıldığı gözlemlendi.



Çizim 4.3. Sıçan karaciğeri izole edilmeden önce organdaki kanın uzaklaştırılması amacıyla yapılan perfüzyon işlemi.

4.3. Desellülarize Karaciğer Matriksinin Karakterizasyonu

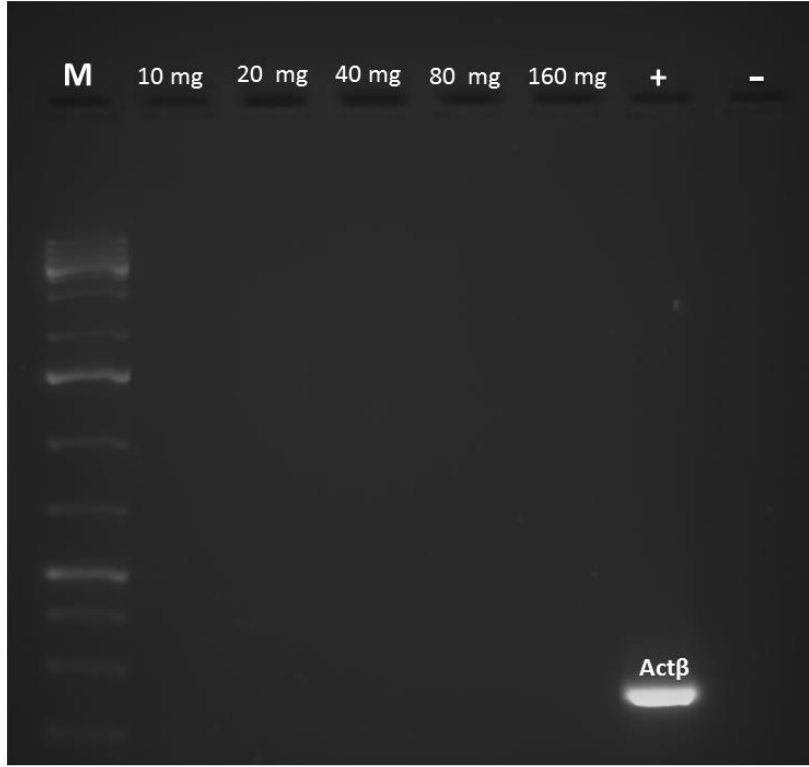
Karaciğerin bütün olarak desellülarizasyonu için perfüzyon desellülarizasyon yöntemi kullanıldı. 24G'lik bir kateter yardımıyla *vena portaya* girilerek peristaltik pompa sistemi ile karaciğer damar sistemi arasındaki bağlantı kuruldu. Sırasıyla EDTA, %1 Triton X-100, PBS, %0.5 SDS, %1 SDS, %0.1 PAA ve PBS geçirilerek yapılan desellülarizasyon işleminde doku rengi gittikçe açılmış ve desellülarizasyonun 25. saatinde karaciğerin şeklini koruyan yarı saydam hücresiz bir matriks elde edildi (Çizim 4.4). TritonX-100 desellülarizasyon başlangıcı için yeteri kadar yumuşak bir deterjan olup tam bir desellülarizasyon için uygun sertlikte değildir. Ancak, TritonX-100'e göre daha agresif bir ajan olan SDS özellikle %1 konsantrasyonda kullanıldığında daha etkili bir desellülarizasyon ajanı olduğu görüldü. Ancak kullanılan kimyasalın parçalayıcı özelliği arttıkça matrikse vereceği zararın da arttığı gözlemlendi. Bu nedenle bu tez çalışmasında yüksek konsantrasyonda SDS kullanımından kaçınılmıştır. Desellülarizasyon basamakları ilerledikçe şeffaflaşan karaciğerin damarları da gözle görülür hale geldi (Çizim 4.4).



Çizim 4.4. Sıçan karaciğer desellülarizasyonu. Karaciğer desellülarizasyonunun (a) 0. saat, (b) 3. saat, (c) 9. saat, (d) 12. saat ve (e) 18. saat görüntüleri. (f) Desellülarizasyon sonrasında sterilizasyonu yapılarak hücre ekimine hazır hale gelmiş karaciğer doku iskelesi.

4.3.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi

Desellülarizasyon işlemi tamamlanmış olan karaciğer dokusundan elde edilen ekstrasellüler matrikste kalan DNA içeriğinin belirlenmesi amacıyla genomik DNA izolasyonu (Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) yapıldı. Buna ilaveten pozitif kontrol olarak MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerden de genomik DNA izolasyonu yapıldı. Ardından PCR ile Act β geni çoğaltıldı. Bu esnada yalnızca DNA içermeyen bir örnek de negatif kontrol olarak hazırlanmış diğer tüm koşullar aynı olarak PCR yapıldı. PCR ürünleri, %1'lik agaroz ile hazırlanan jel elektroforezi sonrasında jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi (Çizim 4.5).

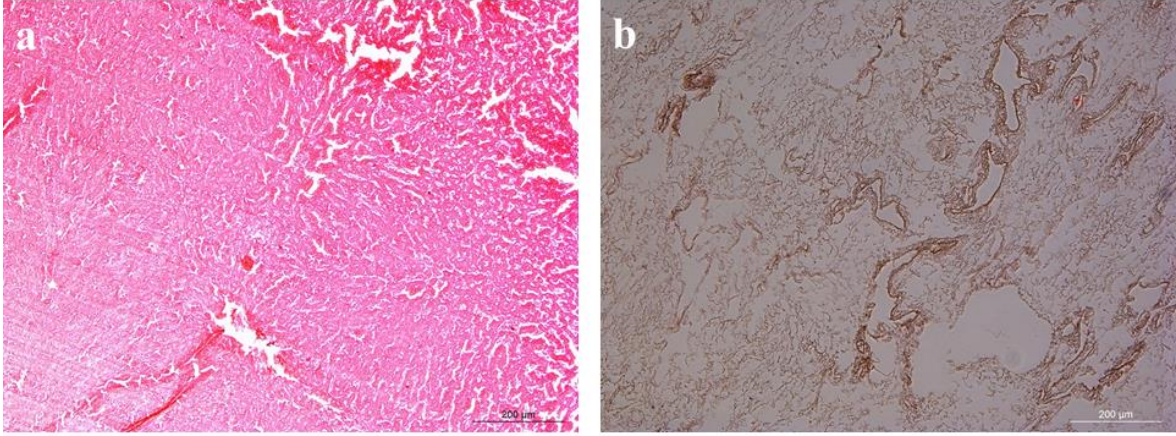


Çizim 4.5. Desellülarizasyon sonrası matriksten genomik DNA izolasyonu ve jel elektroforezi ile matriks içinde DNA kalmadığının belirlenmesi. Farklı ağırlıklarda matriks parçalarından, pozitif kontrolden ve DNA içermeyen negatif kontrolden PCR ile çoğaltılan Act β geninin agaroz jel elektroforezi sonrasında bant vermemesi matrikste DNA içeriğinin kalmadığını göstermektedir. DNA marker olarak (M) GeneRuler 1kb Plus (Thermo) kullanıldı.

4.3.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar

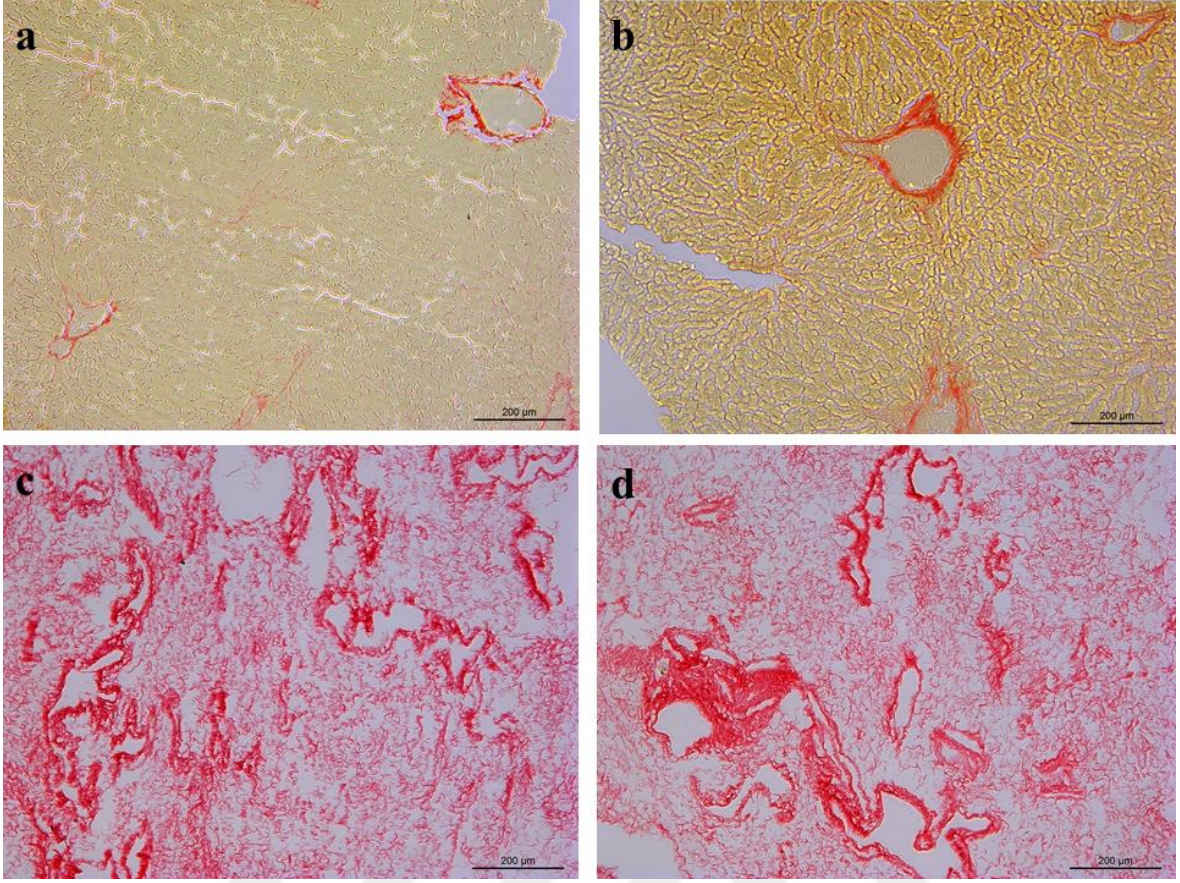
Desellülarize edilen karaciğer ekstrasellüler matriksi hem hematoksilen-eozin (HE) ve pikrosirius red ile histokimyasal olarak hem de kollajen-1 α 1 (Col-1 α 1) ve fibronektin ile immün floresan yöntemlerle boyanarak incelendi.

Histolojik değerlendirmelerde HE ile boyanan normal karaciğer dokusu ile karşılaştırıldığında desellülarize karaciğer matriksinde çekirdek bulunmadığı görülmektedir (Çizim 4.6).



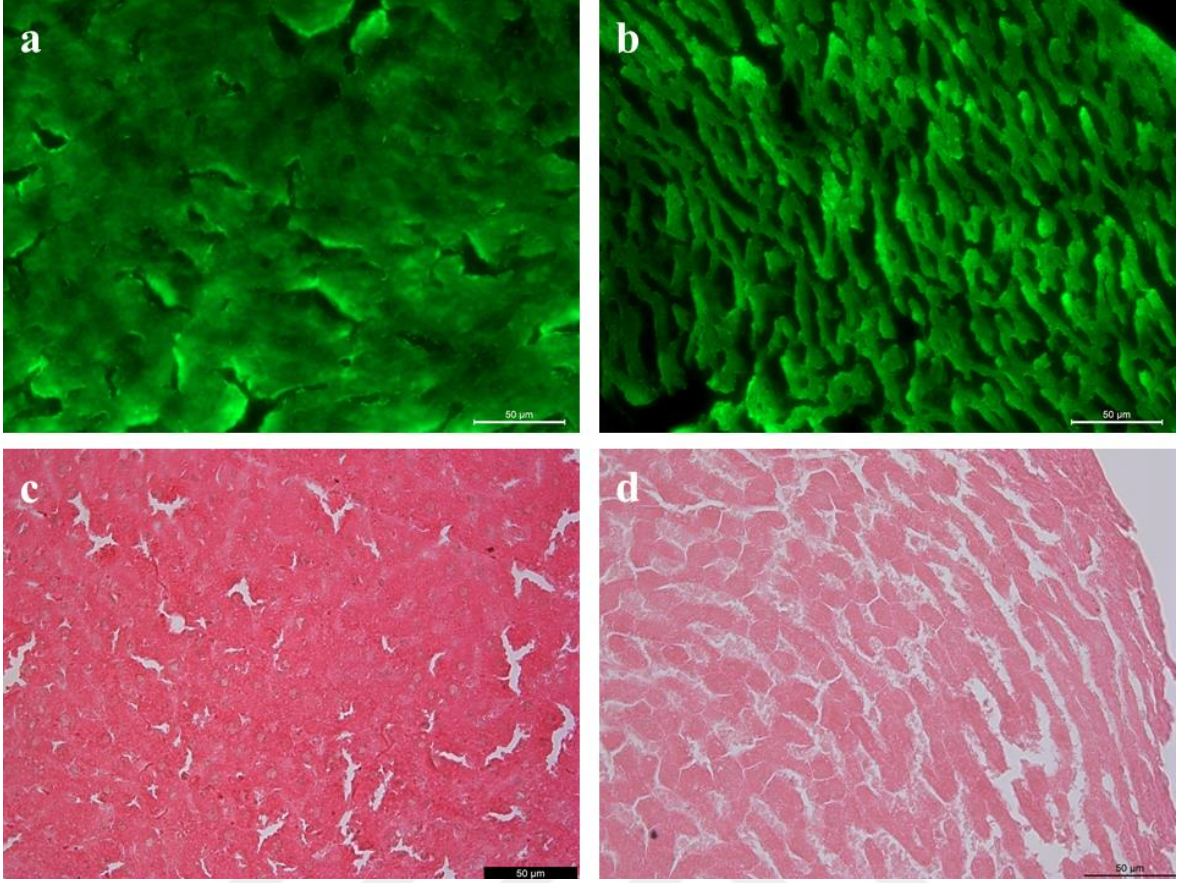
Çizim 4.6. Normal karaciğer dokusundan ve desellülarize karaciğer matriksinden alınan kesitlerde HE boyaması. **(a)** Normal karaciğer kesitinin HE boyaması, **(b)** desellülarize karaciğer matriksinin HE boyaması ile karşılaştırıldığında desellülarizasyon işleminin hücrelerin uzaklaştırılmasında oldukça etkin olduğu ve matrikste çekirdek kalmadığı görülmektedir. Ölçüm çubuğu: 200 µm **(a-b)**.

Hem normal karaciğer dokusundan alınan kesitler hem de desellülarize karaciğer matriksinden alınan kesitler çekirdek, sitoplazma, kas lifleri ve eritrositleri sarı boyarken kollajen liflerinin kırmızı renge boyayan pikrosirius red ile histolojik olarak boyandı. Normal karaciğer dokusunda yalnızca damar yapılarının çevresinde net bir şekilde kırmızı boyamalar göze çarparken desellülarize dokulardan alınan kesitlerde ise yalnızca kollajen liflerinin boyandığı görüldü (Çizim 4.7). Ayrıca desellülarize edilmiş matriks kesitlerinde sarı renkte boyamanın olmaması da bu kesitlerde nükleus ve sitoplazma kalmadığını göstermektedir (Çizim 4.7).



Çizim 4.7. Normal karaciğer ve desellülarize matriks kesitlerinde pikrosirius red boyaması. Ölçüm çubuğu: 200 µm.

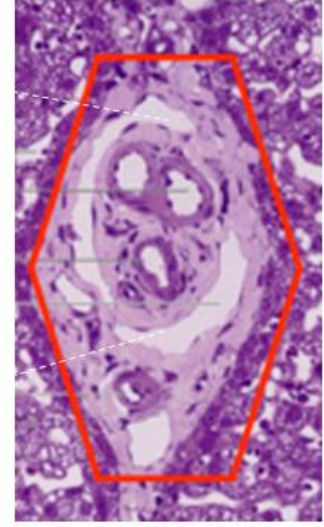
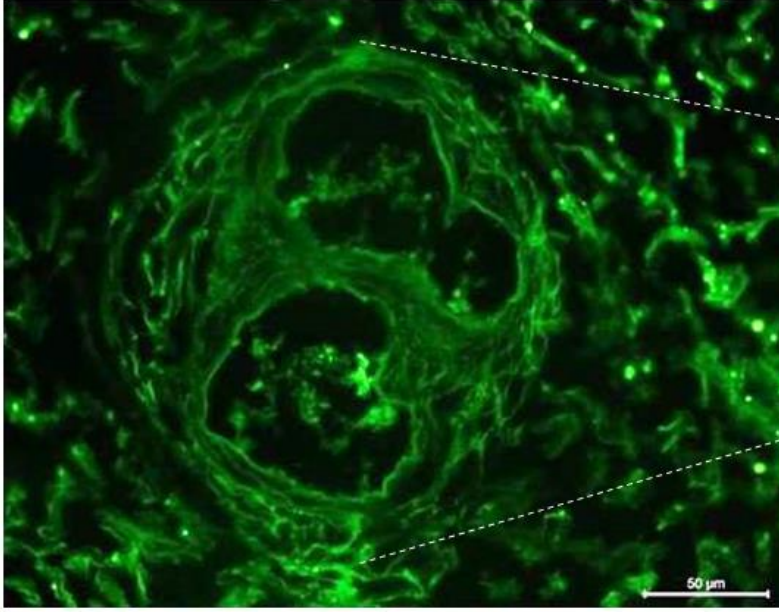
İki ekstrasellüler matriks proteini için yapılan immün boyamalarda (kollajen tip 1 ve fibronektin) ekstrasellüler matriksin yapısal bileşenlerinin iyi korunduğu gözlemlendi (Çizim 4.7 a,b). Yapılan histokimyasal ve immün floresan boyamalar desellülarize edilmemiş karaciğer matriksi ile desellülarizasyon sonrası çekilen matriks görüntülerinin birbirine oldukça benzer olduğunu ve matrikste desellülarizasyon protokolünden kaynaklanan ciddi bir hasarın olmadığı görülmektedir (Çizim 4.8).



Çizim 4.8. Normal ve desellülarize karaciğer matriks görünümü. **(a,b)** İmmün floresan olarak boyanan desellülarize karaciğerde **(a)** Col-1a1 ve **(b)** fibronektin boyamaları **(c,d)** HE ile histolojik olarak boyanan normal karaciğer matriksine oldukça benzemektedir. Ölçüm çubuğu: 50 µm **(a-d)**.

Desellülarize edilmiş dokuların immün floresan boyamalarında desellülarizasyon sonrası damar yapılarının da oldukça iyi korunduğu gözlemlendi (Çizim 4.9).

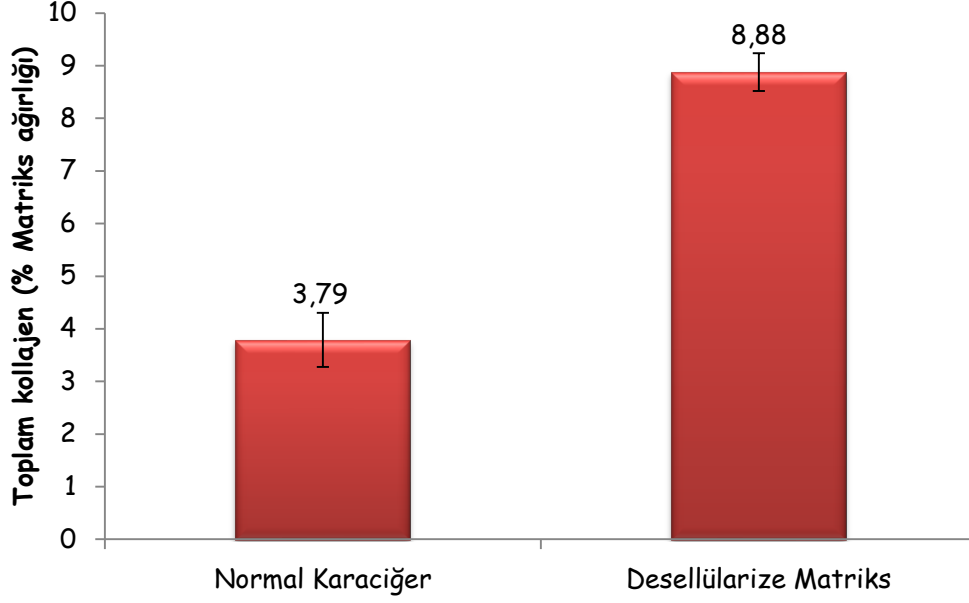
Çizim 4.6 b’de HE ile boyana kesitlerde çekirdek boyamasının olmaması, Çizim 4.8 a-b ve Çizim 4.9’de desellülarize karaciğer iskelelerinden alınan kesitlerde DAPİ ile boyamanın negatif oluşu matriks içinde çekirdek kalmadığını doğrulamaktadır.



Çizim 4.9. Hücrelerden arındırılmış karaciğer doku iskelesinde desellülarizasyon sonrası damar yapılarının görüntülenmesi. Matriksin Col-1a1 (yeşil) ile boyanması sonucu elde edilen görüntüler hepatik arter, portal ven ve safra kanalından oluşan portal triadlara çok benzeyen yapıların bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. Hücre çekirdeklerinin boyamak için DAPI (mavi) kullanılmıştır. Ölçüm çubuğu: 50 µm. Histolojik görüntü *Cram.com*'dan uyarlanmıştır.

4.3.3. Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi

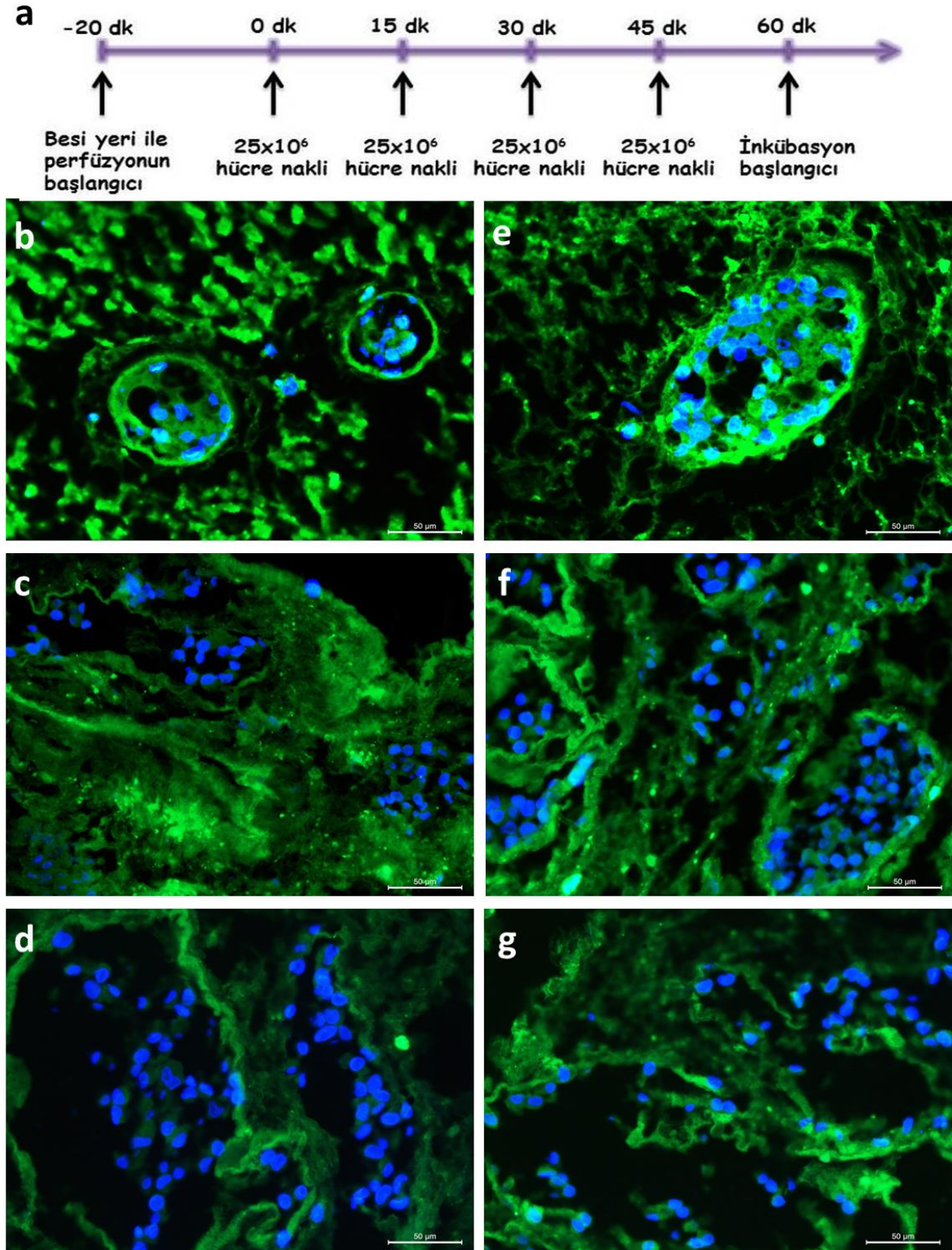
Hem normal karaciğerden hem de desellülarize karaciğer ekstrasellüler matriksinde bulunan kollajen içeriğini ölçmek için pikrosirius red aracılığı ile biyokimyasal analiz yapıldı. Elde edilen sonuçlar matriksin toplam ağırlığına göre % cinsinden verilerek karşılaştırıldı. Elde edilen verilere göre normal karaciğerden alınan doku parçasının ağırlıkça yaklaşık %4'ünün kollajen olduğu belirlenirken bu oran desellülarize doku iskelesinde yaklaşık %9 olarak belirlendi (Çizim 4.10).



Çizim 4.10. Normal karaciğer ve desellülarize karaciğer ekstrasellüler matrisinde ağırlıkça kollajen içeriğinin matriks toplam ağırlığına göre yüzde cinsinden belirlenmesi.

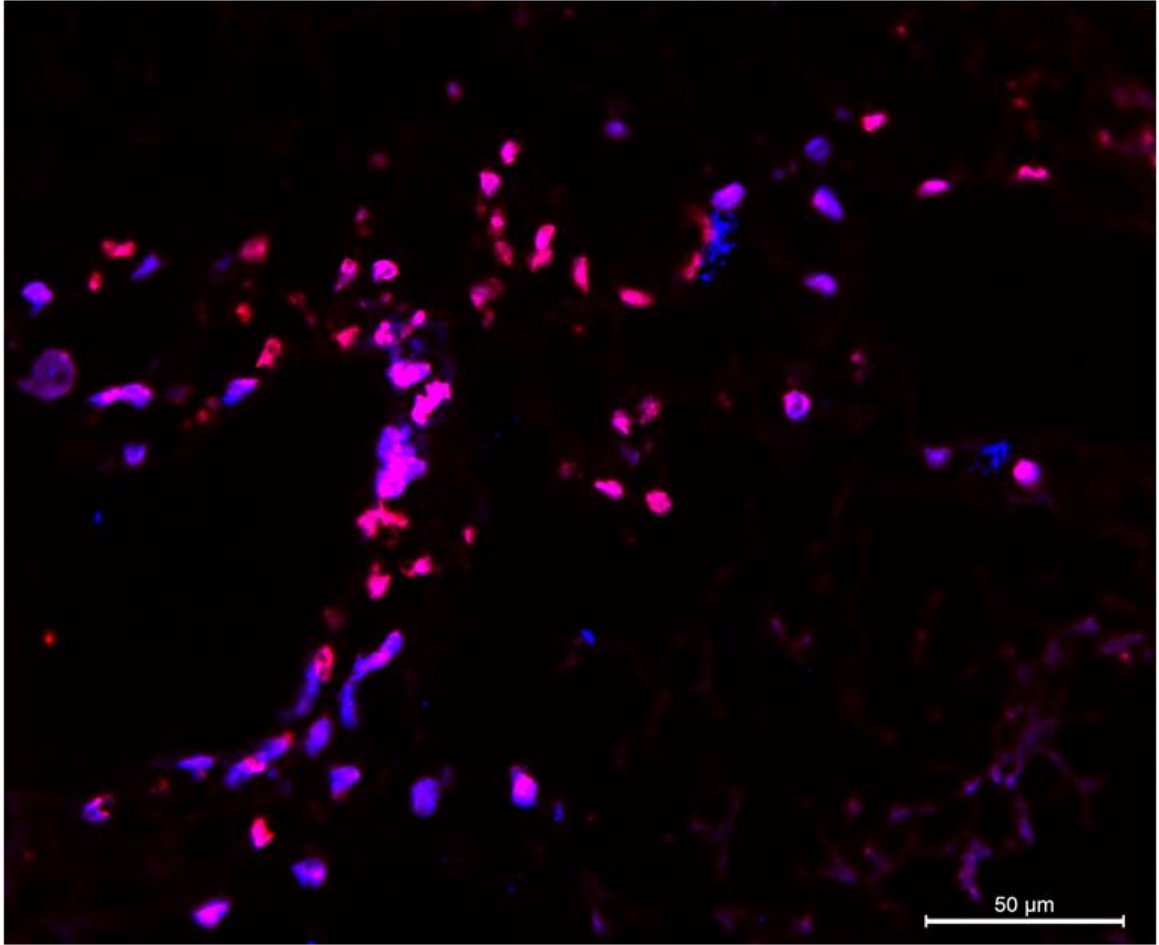
4.4. Karaciğer Doku İskelesinin Resellülarizasyonu

Desellülarizasyon işlemi sonrasında matristeki vasküler yatağın iyi bir şekilde korunması kontrollü bir resellülarizasyonunun gerçekleştirilebilmesine olanak tanımaktadır. Dolayısıyla karaciğer vasküler sistemi kullanılarak klasik kültür yöntemleriyle çoğaltılan hücreler karaciğer matrisine perfüzyon yardımıyla verildi. Resellülarizasyondan önce doku ortamı hücreler için uygun hale gelmesi amacıyla 20 dk boyunca hücresiz besi yeri doku dolaşımına verildi. 4 ayrı basamakta portal ven yoluyla dokuya verilen hücrelerin tutunmaları ve dokuda uygun yerlere yerleşmeleri amacıyla inkübasyona bırakıldı (Çizim 4.11a). Matriks içinde yer alan hücrelerin dağılımlarını gözlemek için yapılan incelemeler resellülarizasyonun ilk gününde hücrelerin damar benzeri yapılar içinde yoğunlaştıklarını ve çok fazla dağılım göstermediklerini ortaya koyarken 7. gün ve sonrasındaki incelemelerde hücrelerin ekstrasellüler matris içinde dağılım gösterdikleri saptandı. (Çizim 4.11b-g).



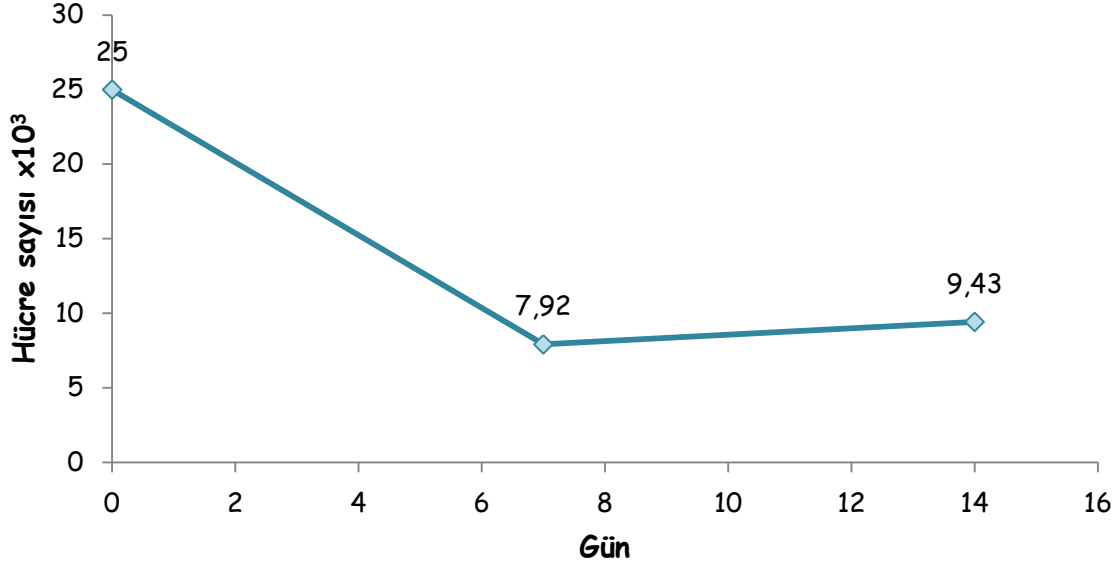
Çizim 4.11. Desellülarize sıçan karaciğer matriksinin kök hücreler ile resellülarizasyonu. **(a)** Doku iskelesinin resellülarizasyon şeması. **(b-d)** Fibronektin (yeşil) ve **(e-g)** kollajen tip 1 (yeşil) ile boyanan resellülarize edilmiş karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde **(b,e)** 1. gün, **(c,f)** 7. gün ve **(d,g)** 15. gün hücre dağılımları. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapıldı. Ölçüm çubuğu: 50 µm **(b-g)**.

Bölünmeye devam eden hücrelerin varlığını araştırmak amacıyla besi yerine timidin nükleositinin sentetik analogu olan ve çoğalan hücreleri belirlemek için kullanılan BrdU eklendi ve 2 gün boyunca hücre kültürüne BrdU'lu besi yeri ile devam edildi. BrdU bölünen hücrelerin genetik materyaline yerleşen 15. günde BrdU'ya karşı antikor boyamasıyla bölünen hücrelerin tespiti yapıldı (Çizim 4.12).



Çizim 4.12. 15 günlük resellülarize doku kültüründe hücre bölünmesinin görüntülenmesi. Kültüre eklenmiş BrdU'ya (kırmızı) karşı antikor boyaması ile genetik materyalde BrdU tespit edilmiştir. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapılmıştır. Ölçüm çubuğu: 50 µm

Matriks içindeki hücrelerin çoğalması belirlemek için ayrıca WST-1 ile canlılık ve proliferasyon analizi de yapılmıştır. Küçük bir karaciğer ekstrasellüler matriks örneği alınarak 25 bin hücre ekilmiş ve iki hafta boyunca metabolik olarak aktif hücre sayısı belirlenmiştir (Çizim 4.13).



Çizim 4.13. Metabolik olarak aktif hücre sayısını belirlemek için yapılan WST-1 proliferasyon analizi. 0. günde matrikse 25 bin ekilmiştir. Canlı hücre sayısı ilk haftanın sonunda yaklaşık 8 bine kadar düşmektedir. Bu noktadan sonra çoğalmaya başlayan hücreler sayılarını yaklaşık 10 bine kadar çıkarmaktadır.

Sonuçlar karaciğer ekstrasellüler matriksinin pankreatik adacıklardan elde edilen kök hücrelerin proliferasyonunu engellemediğini ve matriks üzerinde hücre bölünmelerinin gerçekleştiğini göstermektedir.

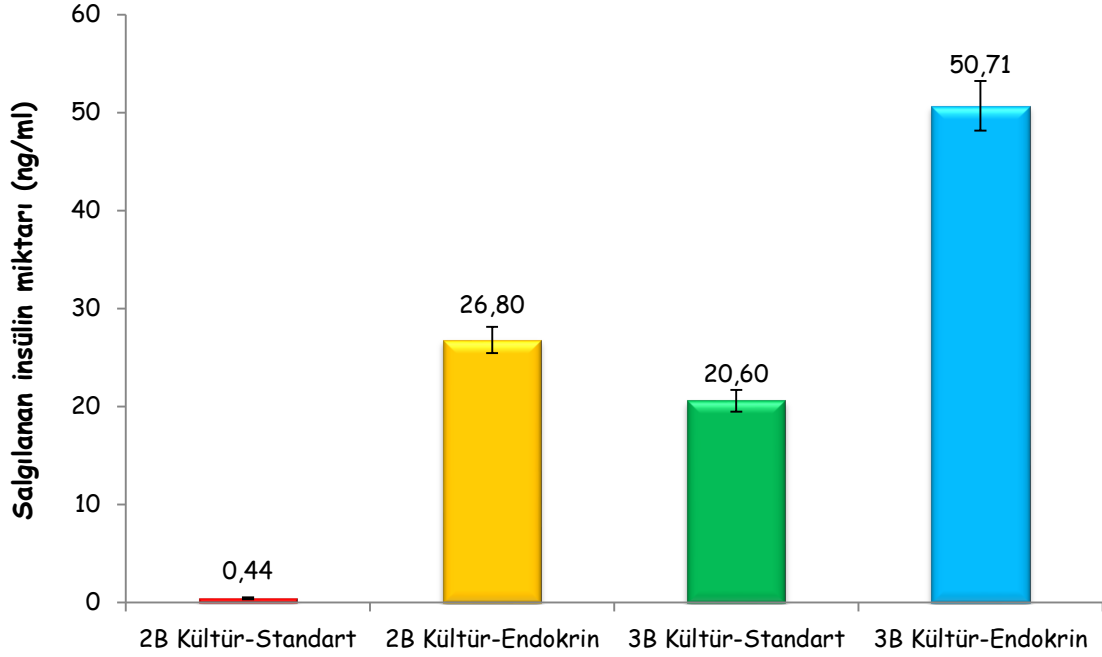
4.5. 2-Boyutlu Kültürde ve Karaciğer Doku İskelesinde MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH'lerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaştırılması

Karaciğer ekstrasellüler matriksine MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH ekimi yapılan deney gruplarından bir kısmı standart RPMI besi yeri (RPMI+FBS+Pen/Strep+G418) içinde 15 gün boyunca kültüre edilmiş, bir kısmı ise endokrin farklılaştırma besi yeri (PRMI+B27+EGF +Nikotinamide+Exendin4+HGF+Pentagastrin+FBS+Pen/Strep+G418) içinde kültüre edilmiştir.

Her 3 günde bir besi yeri değişimi yapılan deney gruplarının kültür ortamlarından alınan örneklerdeki insülin seviyesi ticari bir set (Millipore Rat/Mause Insulin ELISA Kit) kullanılarak ELİSA ile ölçüldü (Çizim 4.14).

Deney sonuçları 2B-standart kültür ortamında bulunan hücrelerin 0'a yakın bir insülin salgısı olduğunu ancak, 3B-standart kültür ortamında ise 20 ng/ml'den daha fazla

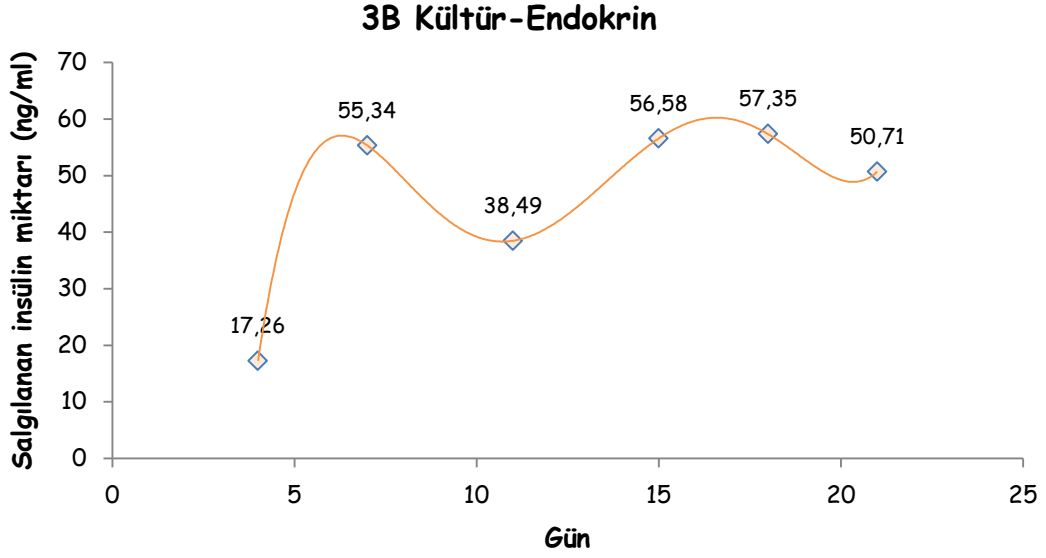
insülin salgısı olduğunu ortaya koymaktadır. 3B-endokrin farklılaşma kültür ortamında ise hücrelerin 50 ng/ml'den daha fazla olan insülin salgısı dikkat çekmektedir (Çizim 4.14).



Çizim 4.14. Besi ortamına salgılanan insülin miktarının belirlenmesi. Kültür sonunda 2B ve 3B kültür ortamlarından alınan besi yeri örneklerinden hücrelerin ortama salgıladıkları insülin miktarı belirlenmiştir. Hem standart besi yerinin içerdiği insülin miktarı hem de endokrin besi yerinin içerdiği insülin miktarı yine aynı yöntemle tespit edilmiş ve deney gruplarında saptanan insülin seviyesinden çıkarılmıştır.

3B-Endokrin farklılaştırma grubundaki insülin salgısı 3-4 günlük periyotlarda ölçülerek 3 hafta boyunca insülin salgısındaki değişim incelenmiştir. Bu esnada her ölçümden sonra besi yeri değiştirilmiş ve taze besi yeri eklenmiştir. İncelemelerde insülin salgısı miktarının bir dalgalanma gösterdiği ancak 2. haftadan sonra değişimin çok olmadığı görülmektedir (Çizim 4.15).

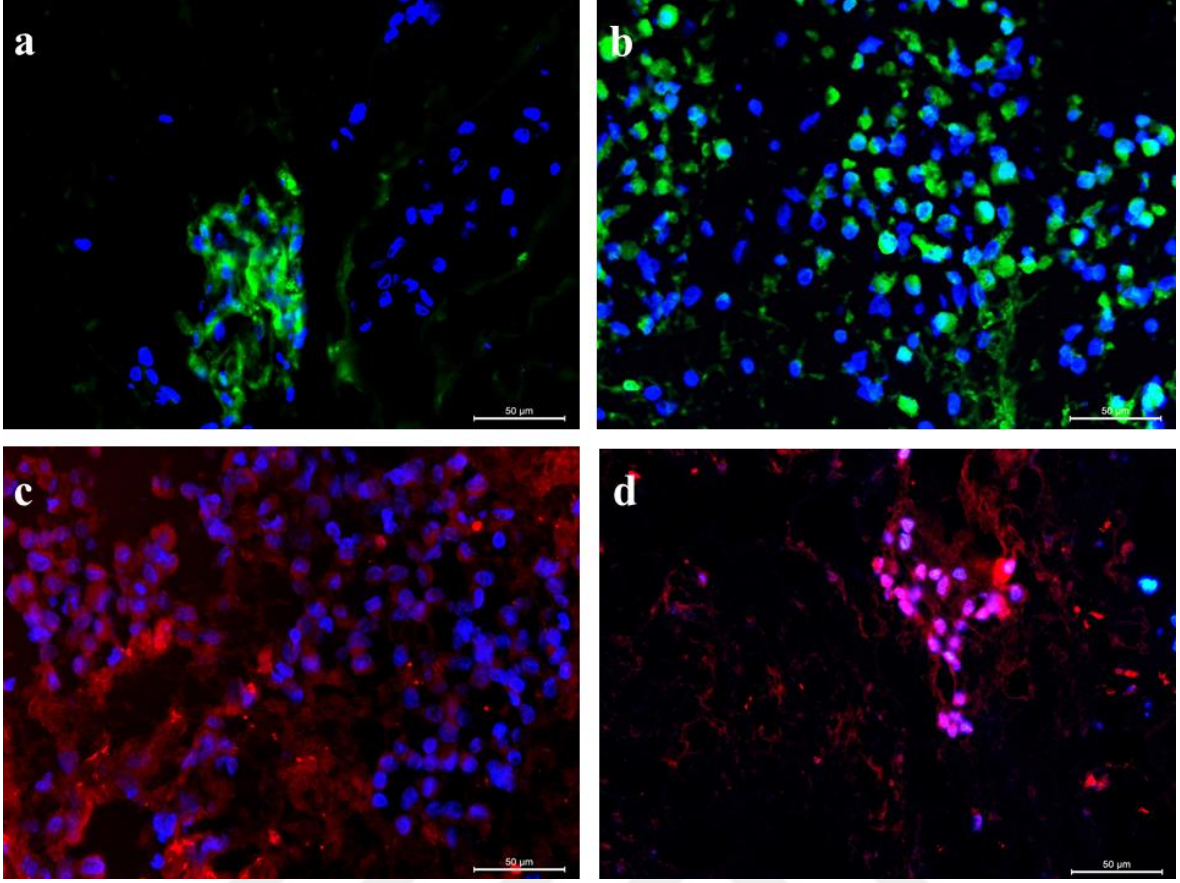
ELISA ile elde edilen bu veriler başlangıçta hemen hemen insülin salgısı olmayan (0,44 ng/ml) hücrelerin 3 boyutlu kültürlerde oldukça yüksek konsantrasyonlarda insülin salgıladığını göstermektedir.



Çizim 4.15. Karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde endokrin farklılaştırma besi yeri ile kültüre edilen hücrelerin zamana bağlı olarak ortama salgıladığı insülin miktarı.

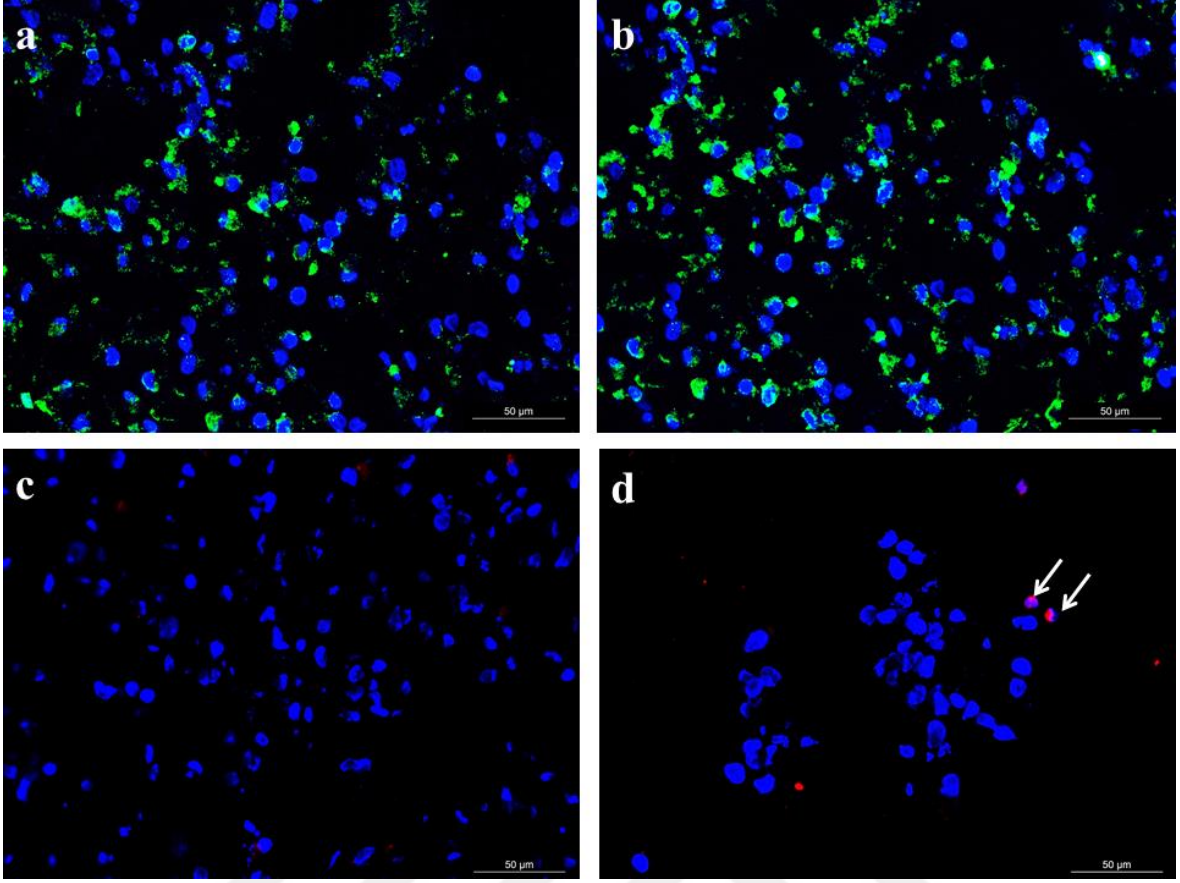
ELISA ile elde edilen bulguları doğrulamak amacıyla kültür sonunda formalin ile fiksasyonu yapılan deney gruplarından alınan doku kesitlerinde insülin, GckR, Pdx1, glukagon, Pax4 ve MafA boyamaları immün floresan olarak yapılmıştır.

Ekstrasellüler matriks üzerinde yapılan hem standart hem de endokrin kültürlerde immün floresan olarak insüline karşı antikor boyamasında standart kültürde daha lokal boyamalar göze çarparken endokrin kültürde ise daha geniş alanda ve daha yoğun olarak boyandığı görülmektedir (Çizim 4.16 a,b). Bir transkripsiyon faktörü olan Pdx1'in ise çekirdekte lokalize olması beklenmektedir. Standart besi yerinde yapılan kültürde Pdx1 boyamalarında pozitifliğe çok rastlanılmamış olmasına rağmen endokrin farklılaşma kültürlerinde ise Pdx1 ile pozitif boyanan hücre kümelerine rastlanmaktadır (Çizim 4.16 c,d).



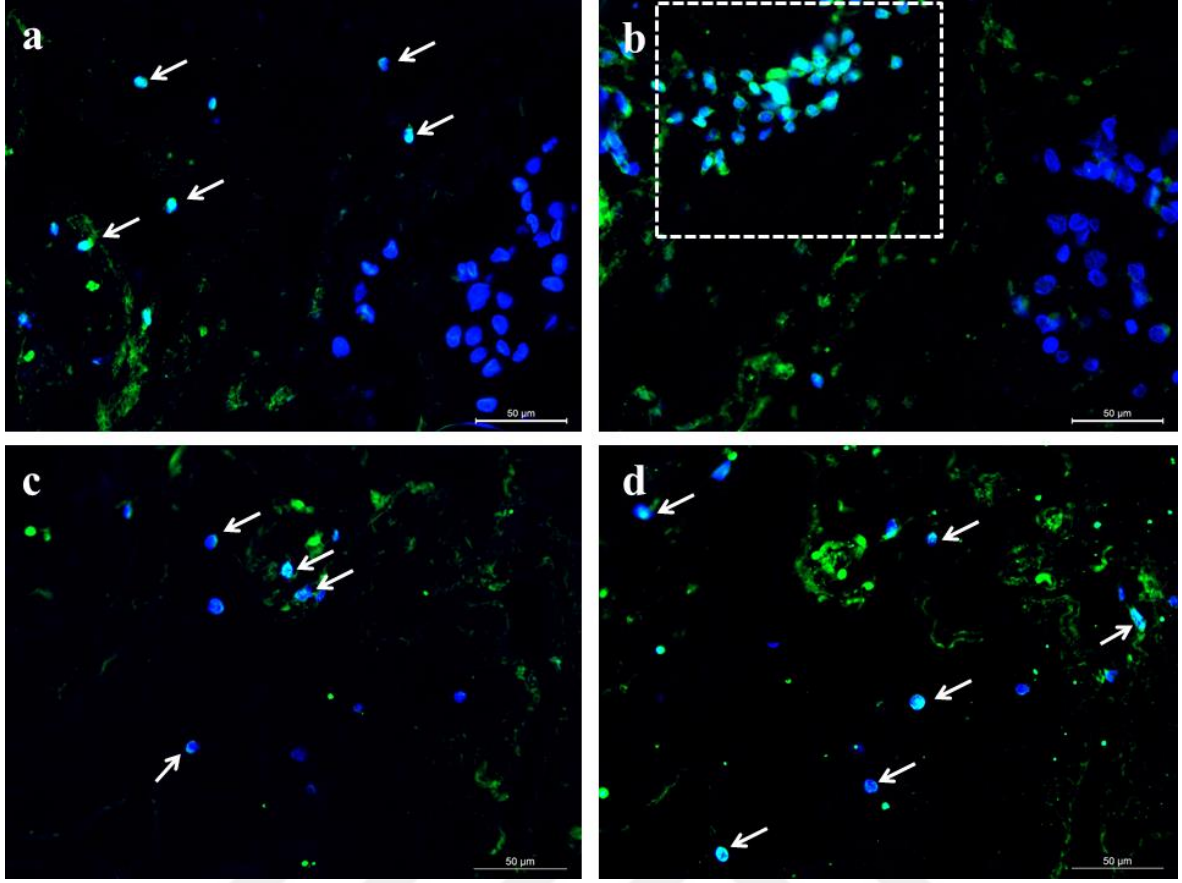
Çizim 4.16. 15. gün sonunda standart ve endokrin farklılaşma besi yerinde kültüre edilmiş 3B yapılarındaki hücrelerin insülin ve Pdx1 boyaması. **(a,c)** Standart besi yeri içinde yapılan kültürde **(a)** insülin (yeşil) ve **(c)** Pdx1(kırmızı), **(b,d)** endokrin besi yerinde **(b)** insülin ve **(c)** Pdx1 boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapılmıştır. Ölçüm çubuğu: 50 µm **(a-d)**.

Karaciğer doku iskelesi üzerinde yapılan kültürlerde glukokinaz reseptörü ve α -hücre farklılaşmasını değerlendirmek için glukagon boyaması immün floresan olarak yapılmıştır. 3B standart kültürde GckR pozitif hücreler göze çarparken endokrin kültürde pozitif hücre sayısında gözle görülür bir artış söz konusu olmaktadır (Çizim 4.17 a,b). Anti-glukagon antikoruyla boyamalarda ise çok nadir pozitiflikler görüntülenmektedir (Çizim 4.17 c,d). Bu sonuçlar doku iskelesi içindeki hücrelerin az bir miktarının α -hücrelerine farklılaşmış olabileceğine işaret etmektedir.



Çizim 4.17. 15. gün sonunda standart ve endokrin farklılaşma besi yerinde kültüre edilmiş 3B yapılarındaki hücrelerin GckR ve glukagon boyaması. **(a,c)** Standart besi yeri içinde yapılan kültürde **(a)** GckR (yeşil) ve **(c)** glukagon (kırmızı), **(b,d)** endokrin besi yerinde **(b)** GckR ve **(c)** glukagon boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapılmıştır. Ölçüm çubuğu: 50 μ m **(a-d)**.

MafA ve Pax4 genleri aktarılmış olan pankreatik adacıklardan elde edilen kök hücrelerde bu genlerin ürünleri olan transkripsiyon faktörlerinin çekirdekte lokalize olması beklenmektedir. Anti-MafA ve anti-Pax4 antikorlarıyla boyanan hücreler floresan mikroskopta incelenmiştir. Elde edilen görüntülerde MafA ve Pax4 pozitif olan hücreler görülmektedir. Ancak hücrelerin tamamının pozitif olmaması da dikkat çekmektedir. Özellikle standart kültürde diğer hücrelerden uzak, tek başına olan hücreler MafA proteinine karşı yapılan boyamada pozitif boyanmışken küme halinde bulunan hücrelerin ise negatiftir (Çizim 4.18 a). Endokrin kültürde ise MafA proteinine karşı yapılan boyamada boyanan hücrelerin bir arada olması dikkat çekmektedir (Çizim 4.18 b). Pax4'e karşı yapılan boyamada ise hem standart kültürde hem de endokrin kültürde boyanan hücrelerin lokalizasyonları benzerlik göstermektedir (Çizim 4.18 c,d).

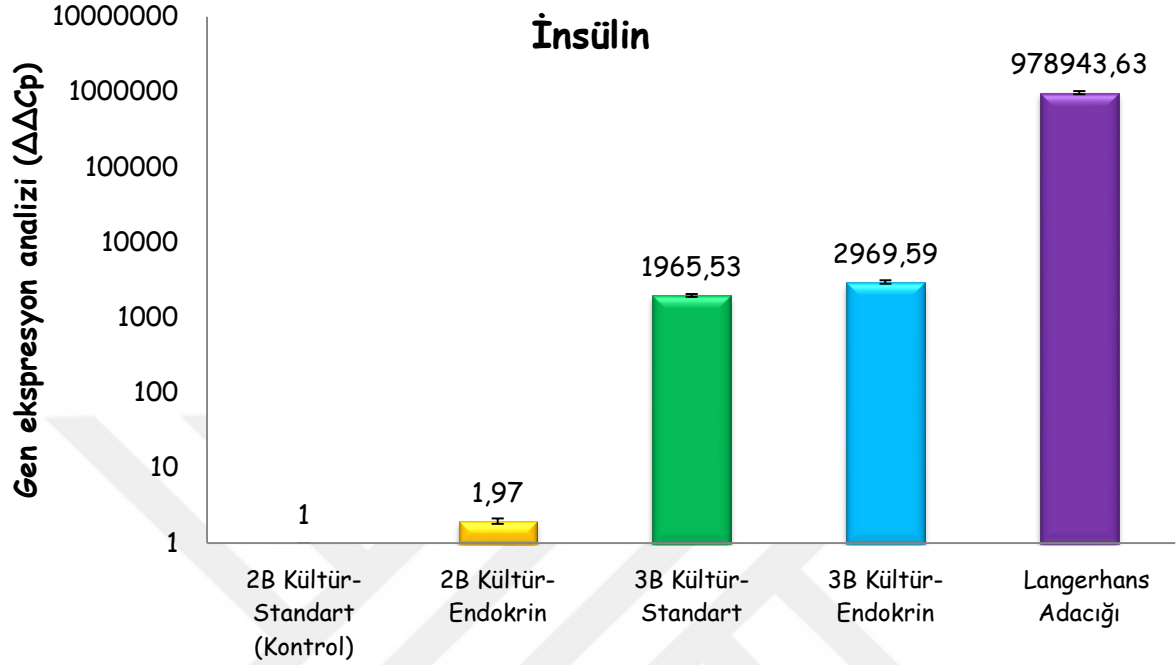


Çizim 4.18. 15. gün sonunda standart ve endokrin farklılaşma besi yerinde kültüre edilmiş 3B yapılarındaki hücrelerin MafA ve Pax4 boyaması. **(a,c)** Standart besi yeri içinde yapılan kültürde **(a)** MafA (yeşil) (ok) ve **(c)** Pax4 (yeşil) (ok), **(b,d)** endokrin besi yerinde **(b)** MafA (kesikli kare) ve **(d)** Pax4 (ok) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI ile yapılmıştır. Ölçüm çubuğu: 50 μ m **(a-d)**.

ELISA ve immün floresan tekniklerle elde edilen bulguları doğrulamak amacıyla, desellülarize karaciğer ekstrasellüler matriksi içinde normal besi yeri ve endokrin farklılaştırma besi yeri ile kültüre edilen dokulardaki hücrelerin endokrin farklılaşmalarını değerlendirmek amacıyla insülin, glukokinaz (Gck), Pdx1, Pax4, MafA glukagon, somatostatin, HNF-4 α , albümin, α -Fetoprotein ve Act β genlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir (Çizim 4.19 – 4.26).

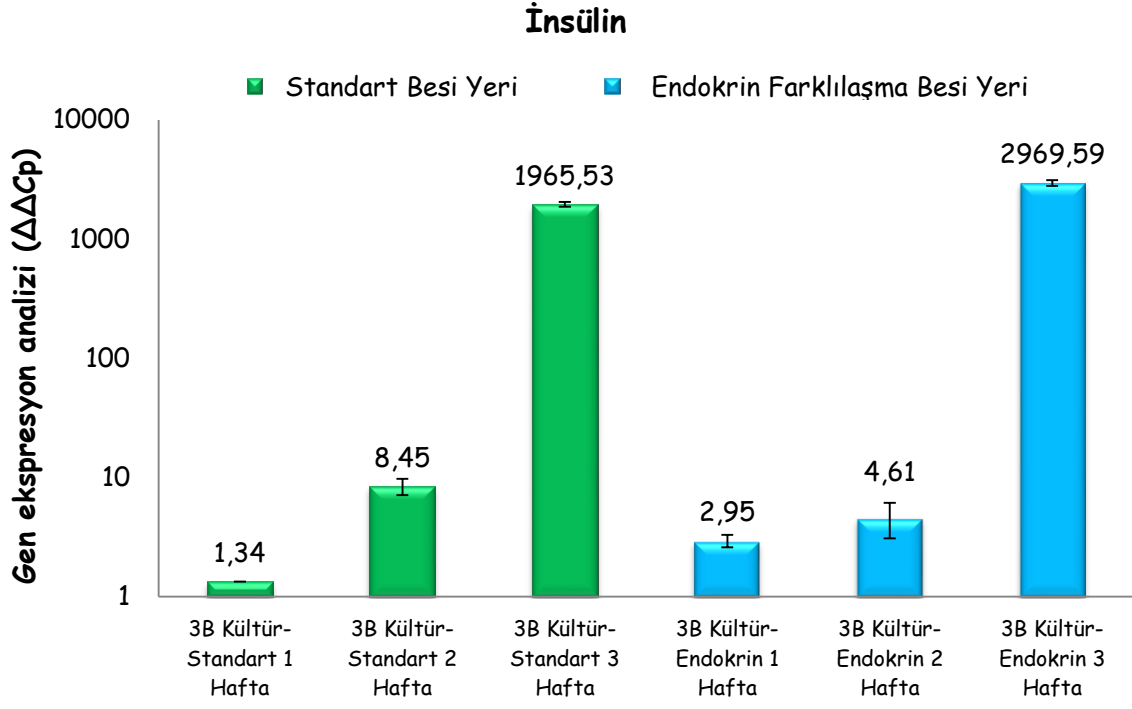
Gruplar arası karşılaştırmalarda klasik 2B kültürlerine göre karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde yapılan 3B kültürlerde insülin ekspresyonu oldukça yüksek bulunmuştur. Yapılan analizler sonucu standart besi yerinde 2B yöntemlerle kültüre edilen hücrelere göre 3B olarak kültüre edilen hücrelerde yaklaşık 2000 kat, endokrin farklılaştırma besi yerinde 3B olarak kültüre edilen hücrelerde ise yaklaşık 3000 kat daha fazla insülin

ekspresyonu belirlenmiştir. 2B endokrin farklılaştırma besi yerinde yapılan kültürde ise insülin ekspresyon oranı kontrol grubuna göre yalnızca 2 kat artış göstermiştir (Çizim 4.19).



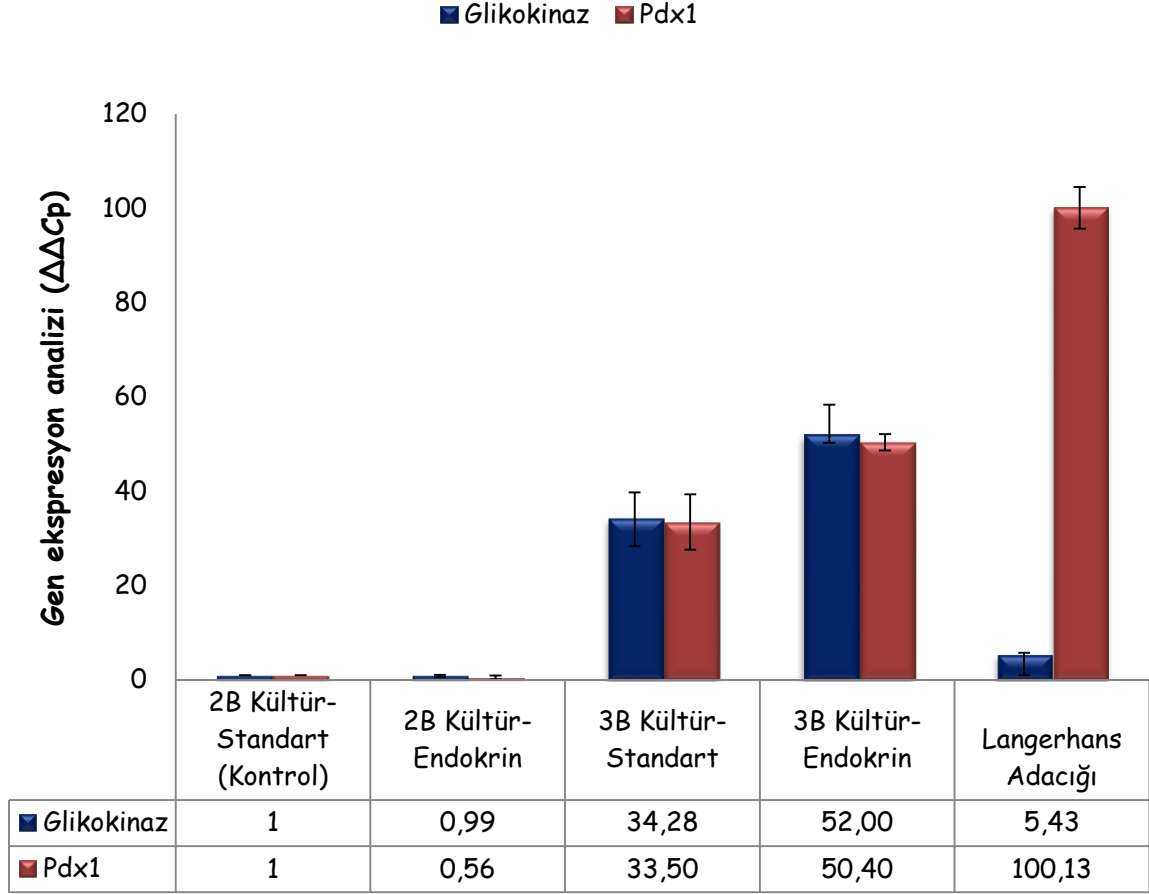
Çizim 4.19. Gruplar arası karşılaştırmalı insülin gen ekspresyon analizi. Standart besi yerinde 2B klasik kültür yöntemiyle kültüre edilen MafA⁺/Pax4⁺-sPA-MKH hücrelerin negatif kontrol grubu (1. sütun) olarak kullanıldığı çalışmada endokrin farklılaştırma besi yerinde 2B klasik kültür yöntemiyle (2. sütun), standart besi yerinde doku iskelesi üzerinde kültür yöntemiyle (3. sütun) ve endokrin farklılaştırma besi yerinde doku iskelesi (4. sütun) üzerinde kültür yöntemiyle kültüre edilen hücrelerde insülin gen ekspresyonu karşılaştırılmıştır. *Langerhans* adacıkları ise pozitif kontrol grubu (5. sütun) olarak kullanılmıştır. Referans gen olarak β-Aktin kullanılmıştır.

Karaciğer doku iskelesinde yapılan kültürde hücrelerin bu denli yüksek insülin ekspresyonu göstermesi ilgi uyandırmış ve kültür süresince insülin ekspresyon düzeyindeki değişimler hafta bazında incelenmiştir. Bunun için 3 hafta boyunca hem standart besi yerinde hem de endokrin farklılaştırma besi yerinde kültüre edilen dokularda 1. haftanın, 2. haftanın ve 3. haftanın sonunda gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar özellikle 2. haftadan sonra ekspresyon seviyesinin çok hızlı bir şekilde arttığını göstermektedir. Bu artış endokrin farklılaştırma ortamı içinde daha da yüksek olduğu tespit edilmiştir (Çizim 4.20).



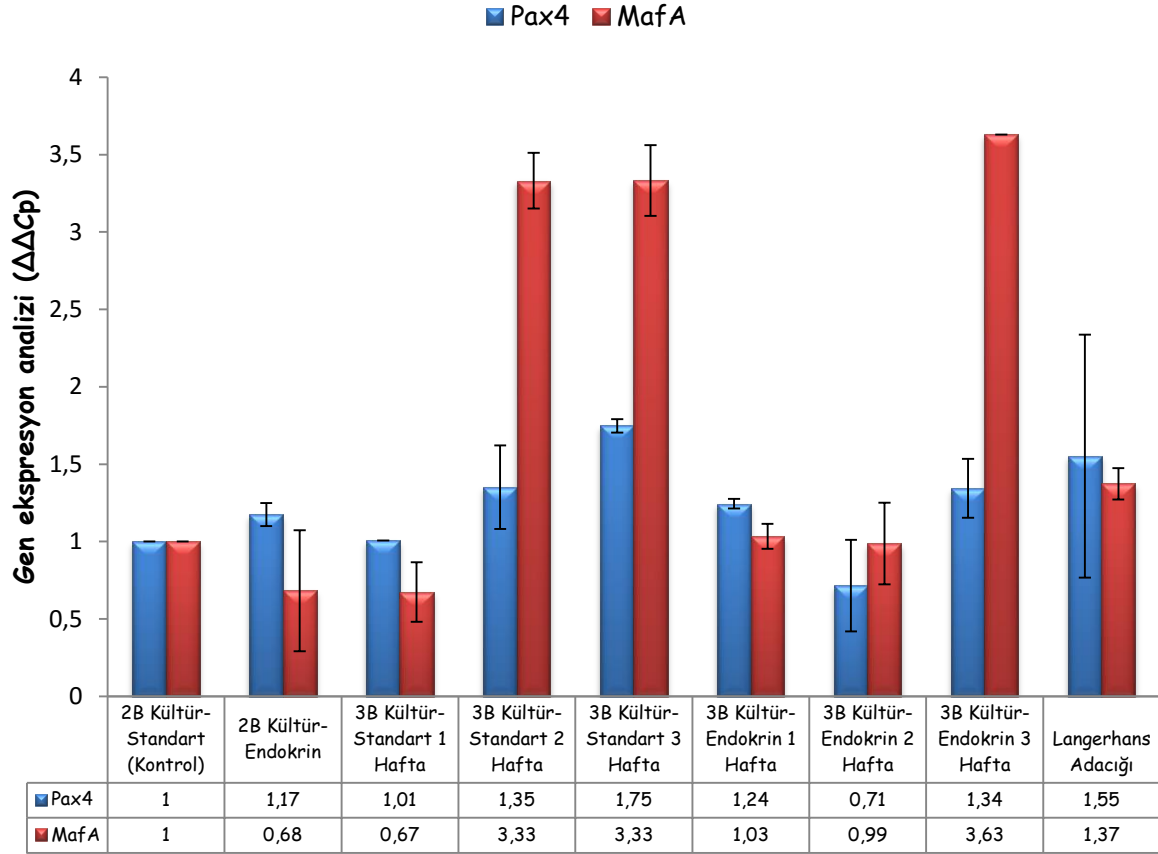
Çizim 4.20. Ekstrasellüler matriks üzerinde yapılan kültürlerde haftalık insülin gen ekspresyon analizi. Hem standart besi yerinde (yeşil) hem de endokrin farklılaşma besi yerinde (mavi) kültürü yapılan hücrelerin haftalık ekspresyon düzeyleri 2B standart besi yeri içeren kültürdeki hücelere kıyasla belirlenmiştir. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

Glukoz sensörü olarak görev yapması ve yükselen ve azalan glukoz oranına göre hücre metabolizması düzenlemesi sebebiyle karbonhidrat metabolizmasında önemli bir yer tutan glukokinaz gen ekspresyonu Pdx1 ekspresyonu ile birlikte değerlendirilmiştir. Pdx1, insülin ile birlikte ortak eksprese olan ve β -Hücre olgunlaşması için gerekli transkripsiyon faktörüdür. Bu iki genin ekspresyon seviyelerinin 2B kültürlerde çok değişmediği hatta endokrin yönde uyarılan 2B kültürde Pdx1 ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bunun aksine 3B kültürlerde her iki genin de ekspresyon seviyelerinde artış dikkat çekmektedir. Standart besi yerinde yaklaşık 35 katlık ve farklılaştırma besi yerinde yaklaşık 50 katlık bir artış söz konusudur. Özellikle Pdx1 ekspresyonu pozitif kontrol olarak kullanılan Langerhans adacıklarındaki seviyeye oldukça yaklaşmıştır ve aralarındaki fark 2 kat olarak ölçülmüştür (Çizim 4.21). Standart besi yerinde yapılan 3B kültürdeki glukokinaz ve Pdx1 ekspresyon seviyesinin birbirine olan yakınlığı ilginç bir şekilde endokrin yönde farklılaşması için uyarılan 3B kültürde de gözlemlenmektedir.



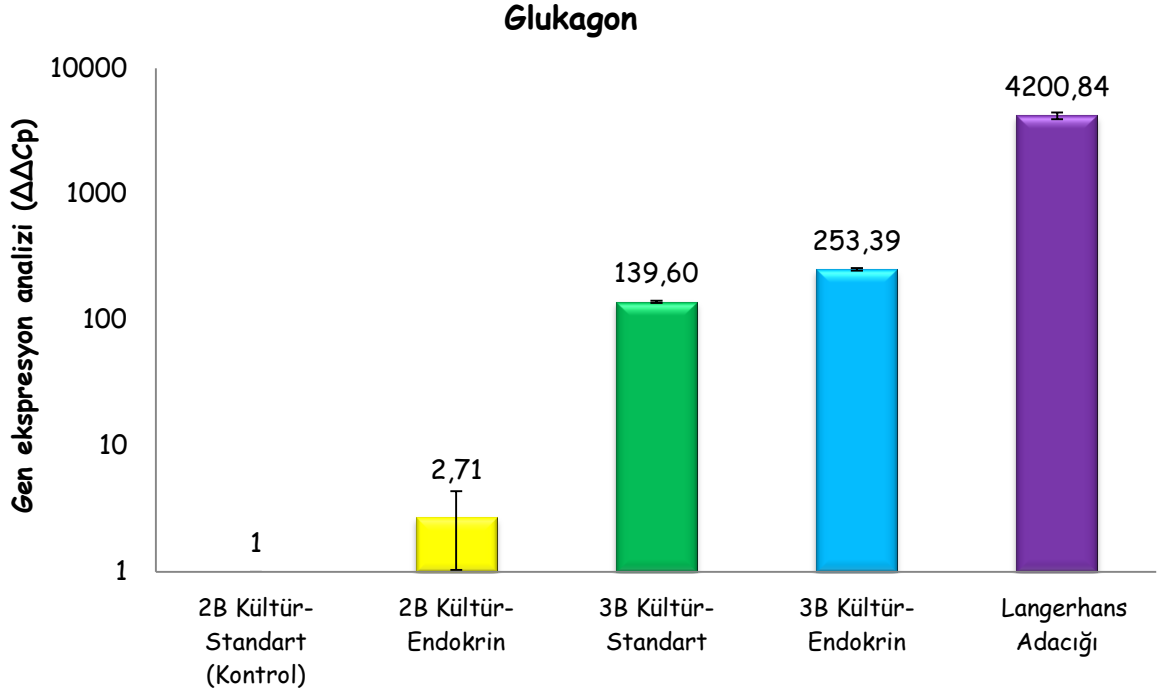
Çizim 4.21. Gruplar arası karşılaştırmalı glukokinaz ve Pdx1 gen ekspresyon analizi. Deney grupları arasındaki glukokinaz ve Pdx1 gen ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Langerhans adacıklarının pozitif kontrol olarak kullanıldığı analizde 2B-Standart kültür ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. β -Aktin ise referans gen olarak kullanılmıştır.

Pankreatik adacıklardan elde edilen kök hücrelerin MafA ve Pax4 genleri aktarılmıştır. Bu genlerin farklı kültür koşullarındaki ekspresyonları incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda Pax4 ekspresyonunun kültür ortamındaki değişikliklerden çok fazla etkilenmediği gözlemlenmiştir. Adacıklarda 1,55 kat olarak ölçülen Pax4 ekspresyonu deneyde kurgulanan ortamlarda ve aynı ortamlardaki farklı kültür sürelerinde 0,7 ile 1,75 kat arasında değiştiği görülmüştür. 3 hafta sonunda matrikslerde kültüre edilen hücrelerdeki Pax4 ekspresyonu adacık hücrelerindeki ekspresyon seviyesi oldukça yakın bulunmuştur. MafA ekspresyonları ise 2 ve 3 haftalık 3B standart kültürde ve 3 haftalık 3B endokrin kültürde en yüksek seviyelere ulaşmıştır (Çizim 4.22).



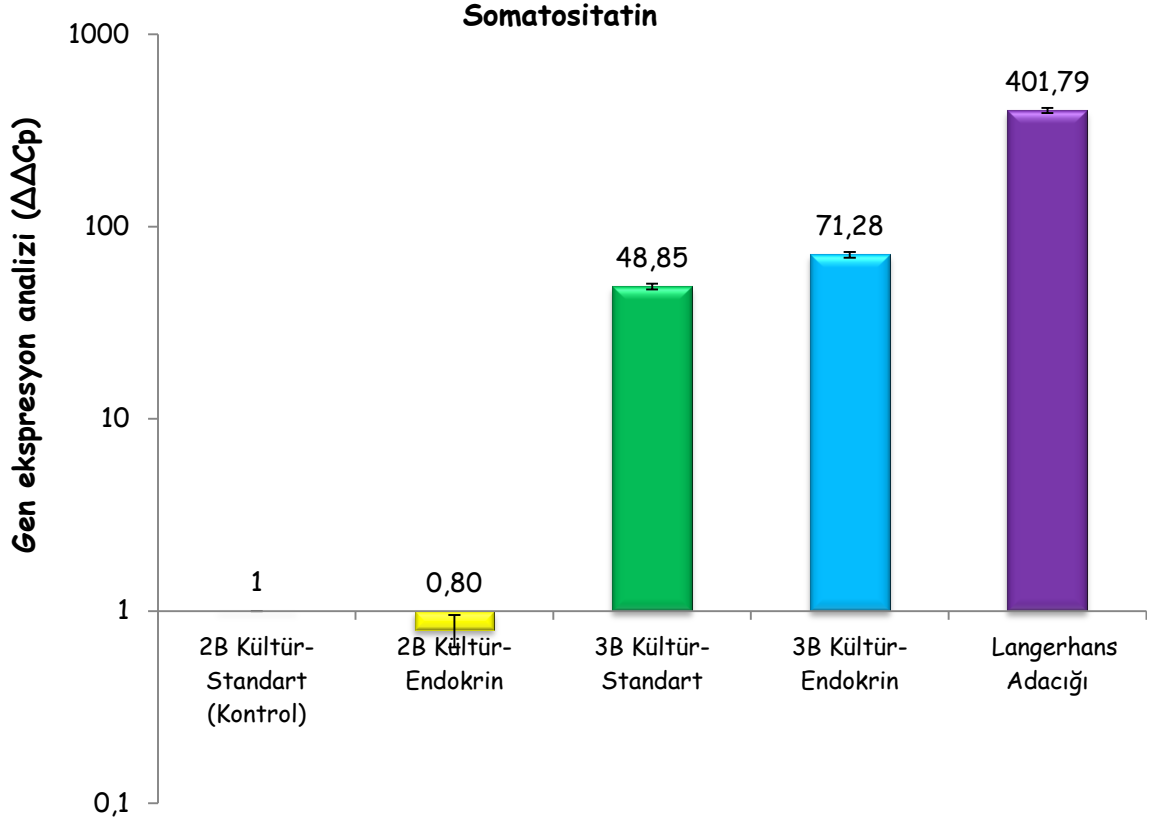
Çizim 4.22. Pax4 ve MafA gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan farklı kültür koşullarındaki değişim oranlar ve bu gen ekspresyonlarının *Langerhans* adacıklarındaki ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

Pankreastaki α -hücrelerince üretilen ve insülin hormonu ile ters etkiye sahip olan glukagonun ekspresyon seviyesi ölçüldüğünde kontrol grubuna göre 3B standart kültürde 140 kat, 3B endokrin kültürde ise bu oranın 250 kattan fazla arttığı bulunmuştur. 2B endokrin kültürde ise ekspresyon seviyesi 3 katın altında kalmaktadır. Bu incelemeler karaciğer ekstrasellüler matriksinde yapılan kültürün MKH'lerin α -hücrelerine dönüşümünü de indükleyebileceğini göstermektedir (Çizim 4.23).



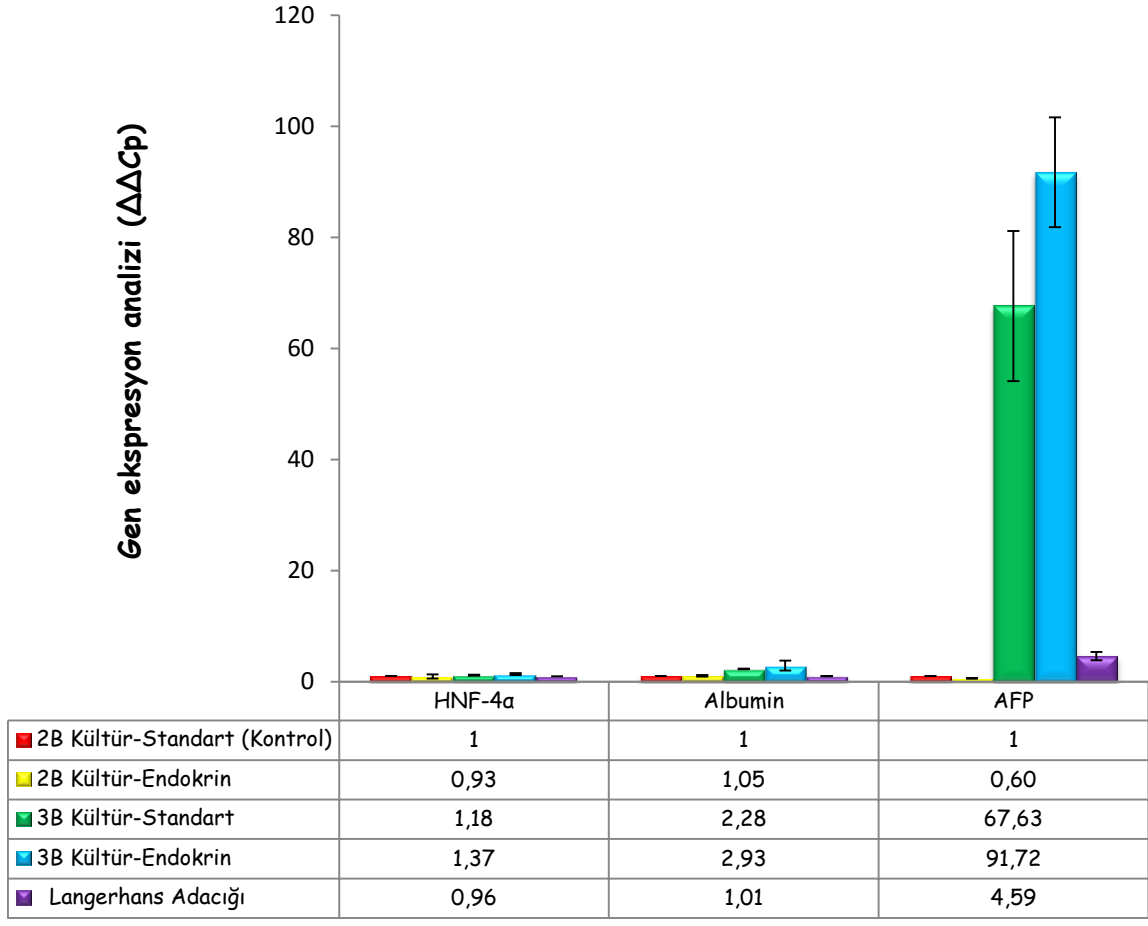
Çizim 4.23. Deney gruplarındaki α -hücre farklılaşmasını değerlendirebilmek için yapılan glukagon gen ekspresyon analizi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

δ -hücrelerce üretilen somatostatinin ekspresyon seviyesinin incelenmesi 3B matrisler üzerinde yapılan kültürün adacıklarda bulunan bir diğer endokrin hücreye (δ -hücreleri) farklılaşma etkileri hakkında bilgi verecektir. Yapılan analizlerde görülmüştür ki 2B endokrin farklılaşma kültüründe somatostatin azalırken karaciğer ekstrasellüler matrisi üzerinde yapılan endokrin kültürde ise somatostatin 71 kat artmıştır. Adacıklarda somatostatin ekspresyon miktarı ise 400 kat olarak bulunmuştur. Bu veriler ışığında değerlendirildiğinde başlangıçtaki 400 katlık oran 3B endokrin kültür ile yaklaşık 3.5 kat kadar düşürülmüş ve adacıklarda eksprese olan somatostatin miktarına oldukça yaklaşmıştır (Çizim 4.24).



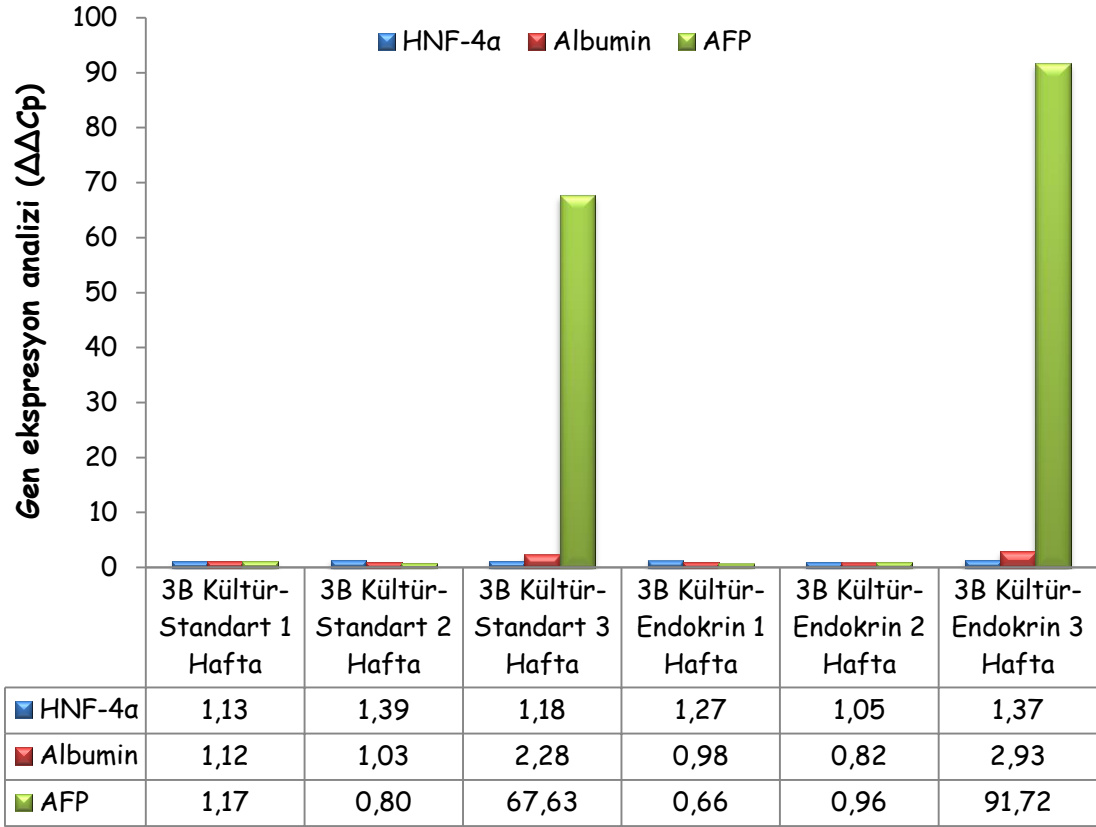
Çizim 4.24. Deney gruplarındaki δ -hücre farklılaşmasını değerlendirebilmek için yapılan somatostatatin gen ekspresyon analizi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

Karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde yapılan kültürün hepatik farklılaşmaya etkisini inceleyebilmek için HNF4-a, albümin ve AFP genlerinin ekspresyonları incelenmiştir. Matriks üzerinde hem standart besi yeri ile yapılan farklılaşmada hem de endokrin besi yeri ile yapılan farklılaştırma çalışmalarında HNF4-a ve albümin ekspresyon seviyesinde ciddi değişimlerin olmadığı, fakat AFP ekspresyonunun 3B kültürlerde yükseldiği gözlemlenmiştir (Çizim 4.25).



Çizim 4.25. Deney gruplarında hepatik belirteçlerin ekspresyon miktarlarının belirlenmesi. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

Karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde yapılan kültürlerde AFP'nin yüksek seviyesi biraz daha irdelenerek 3 hafta boyunca hem endokrin hem de standart besi yerindeki ekspresyon değişimleri incelenmiştir. Elde edilen veriler her iki kültürde de ilk 2 hafta boyunca herhangi bir artışın olmadığını ancak 3. haftada AFP ekspresyonunun hızla yükseldiğine işaret etmektedir (Çizim 4.26).



Çizim 4.26. 3B kültürlerde hepatik belirteç ekspresyonunun 3 hafta boyunca değişiminin incelenmesi. Karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde yapılan kültürlerde 3 hafta boyunca HNF-4a, albümin ve AFP ekspresyon seviyelerinin incelenmesi. 3 haftalık standart ve endokrin kültürlerdeki AFP seviyesi dışınca hepatik genlerdeki ekspresyon seviyelerinde ciddi değişimler olmamaktadır. Referans gen olarak β -Aktin kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA

Günümüzde tip 1 diyabette olduğu gibi vücutta üretilen insülinin kan şekerini düşürmede yetersiz olması insanları farklı arayışlara yönlendirmiştir. Beta hücre, pankreatik adacık ve pankreas transplantasyonu bu arayışlardan bazılarıdır. Ancak söz konusu yaklaşımlarda immünolojik sorunlar ve donör yetersizliği oldukça büyük engellerdir. Dışarıdan, ekzojen olarak, alınan insülin alternatif olarak kullanılsa da yaşam kalitesini düşürmesi ve hastaların insüline bağımlı halde yaşamaları gibi etmenler sebebiyle birçok araştırmacı gerçek bir tedavi üretebilmenin yollarını aramaktadır.

Günümüzde hızla gelişen ve çalışmaların önemli bir ayağı haline gelen, gelecek için büyük potansiyel taşıyan doku mühendisliği yaklaşımlarından biri olan hücresizleştirme işlemi ile birçok vücut parçası üretilebilir duruma gelmiştir (Çizelge 1.4). Bunların bir kısmı tedavi olarak uygulanmaya başlamış bir kısmı da deneme aşamasında olan çalışmalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle hastalardan alınan hücrelerle inşa edilen doku parçalarının immünolojik tepkilere yol açmaması dikkat çekmektedir. Ne yazık ki, hem oldukça kompleks ve taklit edilmesi günümüzde bir hayli zor olan pankreasın yeniden modelleme noktasındaki sıkıntılardan dolayı hem de oldukça hassas bir organ olması sebebiyle cerrahi müdahalelere çok açık olmaması gibi sorunlar tip 1 diyabet hastaları için doku mühendisliği yaklaşımlarının elini zayıflatmaktadır.

Çalışmamızda insülin üreten endokrin pankreas benzeri bir doku parçası üretmek üzerine yoğunlaşmış ve bu işlem için özgün olarak karaciğer ekstrasellüler matriksi kullanılmıştır. Bu çalışmada insülin üretebilen doku parçasının karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde elde edilmesinin hedeflenmesinde birçok etken söz konusu olmaktadır. Karaciğer rejenerasyon kapasitesinin oldukça yüksek olması, pankreasa göre cerrahi işlemlere daha dayanıklı oluşu, pankreas gibi endoderm kaynaklı bir organ oluşu, hacim olarak çok daha büyük bir organ olması sebebiyle bir kısmı alındığında bile görevini yerine getirebilmesi ve yalnızca pankreas-karaciğer için değil vücudun diğer organ matrikslerini de çeşitli hastalık tedavilerinde doku iskelesi olarak kullanılabilceğini göstermek bu etkenler arasındadır. Bu seçim pankreatik doku mühendisliğine alternatif bir yaklaşım da sunmaktadır. Dolayısıyla bu çalışma doku mühendisliğinde klasikleşen aynı matriks üzerinde aynı organı oluşturma mantığının bir adım ötesine geçerek farklı matriksler üzerinde farklı organ ve dokuların da oluşturulabileceğini ortaya koyması ile son derece önemli bir misyonu da üstlenmektedir. Ancak, bu çalışmada karaciğer ekstrasellüler

matriksi kullanılmasına iten asıl sebep *Langerhans* adacıklarının damarlaşma özellikleri, adacık periferinin ekstrasellüler matriks özellikleri, adacık içi ekstrasellüler matriks özellikleri ve β -hücrelerinin integrin kompozisyonu incelendiğinde karaciğer ekstrasellüler matriksine ne kadar uyumlu olduklarını gözlemlemek olmuştur. Bu kısmı daha açık bir şekilde irdelemek gerekirse başlangıç noktasının hem karaciğerin hem de pankreasın endodermden köken alması olduğu söylenebilir. Ancak, endodermden türevlenen diğer organlar içinde karaciğer, mikro yapısı ile de endokrin pankreasa oldukça uyumlu görünmektedir. Bu uyum şu şekilde özetlenebilir:

1- Karaciğer damarlaşma açısından oldukça zengin bir organdır. Bu zenginlik hem vasküler sistem kullanılarak oldukça etkili bir reseptörizasyona olanak tanır hem de pankreasta yer alan ve damarlaşma açısından oldukça zengin olduğu bilinen *Langerhans* adacıklarının (Ross MH ve Pawlina W, 2014 s.631-32,654) oluşturulabilmesi için iyi bir zemin hazırlar.

2- Pankreastaki konumları incelendiğinde *Langerhans* adacıkları fibroblastların ürettiği kollajen fiberlerinden bir ağ ile çevrilidir (Meyer ve diğ. 1998b). Bu durum, kollajen tip 1'in karaciğer ekstrasellüler matriksini bir ağ gibi ördüğü düşünüldüğünde adacıkların ya da elde edilebilecek olan β -benzeri hücrelerin oturacağı zemini hazır hale getirmektedir.

3- Adacıkların periferel ekstrasellüler matriksleri laminin, kollajen tip 4, fibronektin (Meyer ve diğ. 1998b) ve kollajen tip 1 (Van Deijnen ve diğ. 1994, Meyer ve diğ. 1998b) içermektedir. Karaciğer ekstrasellüler matriks bileşenleri incelendiğinde kollajen tip 1 ve fibronektin ağırlıklı olmak üzere laminin, kollajen tip 4, kollajen tip 5 ve kollajen tip 6 gibi komponentleri yapısında bulundurmaktadır. Özellikle fibronektin her iki ekstrasellüler matrikste de yoğundur.

4- Periferin aksine adacık içindeki ekstrasellüler matriks oldukça farklıdır. Bu yapılar özellikle mikrovasküler sistem ile ilişkili bol bazal membran barındırırlar. Ancak adacık endokrin hücrelerinin kendi bazal membranları yoktur. Bu ilginç durum hepatositler için de benzer olup hepatositleri de intersitisyumdan ayıran bir bazal membran yoktur.

5- Adacık içi ekstrasellüler matrikste kollajen tip 4 ve laminin diğer bileşenlere göre daha yoğundur. Oysa karaciğer ekstrasellüler matriksinde kollajen tip 4, kollajen tip 1 kadar yoğun değildir. Ancak, β -hücrelerinin reseptör içerikleri incelendiğinde bu hücrelerin kollajen tip 4'ten ziyade laminin ile bağlanma etkileşimlerine girdikleri, β -hücrelerinin saflaştırılmış kollajen tip 4 üzerindeki kültürlerinde de insülin üretiminin

oldukça düştüğü gözlemlenmiştir (Kaido ve diğ. 2006). Kaido ve arkadaşlarının literatüre sunduğu bu veri karaciğer doku iskelesinde kollajen tip 4'ün çok yoğun bir şekilde bulunmamasını avantaja çevirebilecek bir durum olarak göze çarpmaktadır.

6- Karaciğer ekstrasellüler matriksi kapsül, portal alan, disse aralığı ve merkezi alan olmak üzere dört kısma ayrılır. Her bölge kendine has özellikler sergilemektedir. Dolayısıyla, ekimi yapılacak olan ve β -benzeri hücelere farklılaşması beklenen adacık kaynaklı kök hücrelerin benimseyebileceği, kendi nişini oluşturabileceği alternatif ekstrasellüler matriks yapıları da desellülarize edilmiş karaciğer ekstrasellüler matriksi içinde var olacaktır.

7- Bilindiği gibi MKH'lerin ekstrasellüler matriks proteinlerini sentezleyebilme yetenekleri de söz konusudur (Chen ve diğ. 2014). Dolayısıyla insülin üretmesi beklenen hücreler için niş ortamını daha uygun bir hale de getirmesi olası durumlardan biridir.

Vücutta yaklaşık 200 farklı hücre tipi içinden insülin de üretebilen endokrin pankreas dokusunu oluşturacak doğru hücrelerin seçimi de çalışmanın kritik basamaklarından birini oluşturmaktadır. Çalışmanın amacı dikkate alındığında hem çoğalabilme özellikleri hem de farklılaşabilme özellikleri ile kök hücreler ilk göze çarpan hücreler olmaktadır. Literatürde yer alan bilgiler seçilmesi gereken kök hücre türünün hangisi olacağı hakkında ipuçları içermektedir. Mezenkimal kök hücrelerin birçok dokudan kolaylıkla izole edilebilmesi, ekstrasellüler matriks sentezi yapabilmesi ve endokrin hücelere farklılaşabilmeyi de kapsayan geniş farklılaşma yelpazesi (Gabr ve diğ. 2015, Neshati ve diğ. 2010), özellikle endokrin hücreler içinde insülin üreten hücelere dönüşebilmesi (Karaöz ve diğ. 2013, Khorsandi ve diğ. 2015) seçilebilecek olan hücreyi işaret etmektedir. Birçok MKH kaynağı mevcut olup bu hücreler dokudan dokuya farklı özellikler gösterebilmektedir. 2010 yılında Karaöz ve ekibinin pankreatik adacıklardan elde ettikleri kök hücreler üzerinde yaptıkları bir çalışmada bu hücrelerin tipik MKH olabileceği ve özellikle T1DM'te hücresel tedavi çalışmalarında kemik iliği MKH'lerine göre daha iyi bir aday olacağı ileri sürülmektedir (Karaöz ve diğ. 2010a). 2014 yılında Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı'nda yapılan bir çalışmada bu hücelere ektopik olarak MafA ve Pax4 geni aktarıldığında MKH karakterini korumakla birlikte endokrin farklılaşma potansiyelini taşıdıkları bildirilmiştir (Bağlar 2014). Ancak söz konusu çalışmada yalnızca gen aktarımının endokrin farklılaşma için yeterli olmadığı bildirilmesi bu hücrelerin kullanılabilirliğini düşündürmektedir. Ayrıca *Langerhans* adacık kaynaklı kök hücreler

olması da bu hücrelerin seçiminde önemli bir yer tutmaktadır. Karaciğer ekstrasellüler matriksinin kullanımı (yukarıda belirtilen sebeplerle farklılaşma için uyumlu olabileceği) ve gerekirse kimyasal uyarı da uygulanarak bu hücrelerin gen aktarımı ile arttırılmış olan endokrin farklılaşma potansiyeli açığa çıkarabilmesi olası sonuçlardan biridir. Matriks içine verilen hücrelerin bir kısmının farklılaşması ve bir kısmının ise farklılaşmayı seçmemesi olması muhtemel olan sonuçlardan bir diğeridir. Bu noktada çalışmada kullanılan hücrelerin MKH olması çok önemli avantajlar sunmaktadır;

1- Bilindiği gibi MKH'ler vasküler ağ oluşumunu desteklemesidir (König ve diğ. 2015; Freiman ve diğ. 2016). Dolayısıyla farklılaşmadan kalan ve kendi özelliğini koruyan MKH'ler oluşabilecek adacık benzeri yapılar için vasküler ağ yapısına katkıda bulunabilirler. Yukarıda belirtildiği gibi *Langerhans* adacıklarının zengin bir vasküler sisteme sahip olmaları fonksiyonel adacıkların oluşumunda MKH'lerin alabileceği rollere ışık tutmaktadır. Yalnızca adacık transplantasyonu yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında MKH'lerle birlikte yapılan nakillerde adacık çevresindeki damarlaşmada önemli oranda artış görülmektedir. MKH'ler ile birlikte transplantasyonun adacıkların yaşamı ve fonksiyonelliğinde ciddi iyileşmeleri beraberinde getireceği vurgulanmaktadır (Borg ve diğ. 2014). Kotransplantasyon (adacık ve MKH'lerin birlikte transplante edilmesi) modellerinde VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-6, IL-8, HGF (hepatocyte growth factor) ve TGF- β (transforming growth factor β) gibi anjiyojenik faktörlerin salınımı ile damarlanma oranının erken başladığı tespit edilmiştir (Cao ve diğ. 2016).

2- MKH'ler tarafından salgılanan matriks elemanları da önceden var olan ekstrasellüler matriksin onarımına ya da yeniden düzenlenmesine katkıda bulunabilir.

3- MKH'ler adacıkların nakli sırasında maruz kaldığı hipoksik ve inflamatuvar etkilerden korunmasını sağlayacak olan anti-apoptotik etkiye sahiptirler (Lu ve diğ. 2010).

Bu zeminde planlanan yüksek lisans tez çalışmasında desellülarizasyonu yapılacak olan karaciğerin sıçanlardan elde edilmeden önce perfüzyonunun yapılması desellülarizasyon sürecini pozitif yönde etkilediği gözlemlenmiştir. Perfüze edilmeden alınmış karaciğer desellülarizasyonlarında kan pıhtılaşmasının damar tıkanıklıklarına yol açabileceği ve bu tıkanıklıkları aşmak için daha yüksek basınçlı desellülarizasyon süreçleri gerektirebilmektedir. Bu yüksek basınç da doku iskelesinde tahribata yol açmaktadır. Bu durumu engellemek için daha uzun süreli bir desellülarizasyon alternatif olarak görünse de deterjanlara doku iskelesinin maruz kalma süresi arttıkça ekstrasellüler matriksteki bozulmalar da paralel olarak artmaktadır. Dolayısıyla bu ön aşama (karaciğerin perfüze

edilerek alınması) aslında desellülarizasyon sürecini kısalttığı için daha sağlıklı ekstrasellüler matriks eldesi sağlanmasında ve resellülarizasyon etkinliğinin artırılmasında da rol üstlenecektir.

Hücrelerin doku iskelelerinden uzaklaştırılarak yalnızca ekstrasellüler matriksin elde edilebileceğinin anlaşılmasından sonra organların yeniden inşası için birçok desellülarizasyon yöntemi geliştirilmiştir (Elbert 2011). Desellülarizasyon için yaygın olarak kullanılan dondurma-çözme ve çalkalama gibi mekanik yöntemlerde desellülarizasyon işlemi organ büyüklüğüne de bağlı olarak haftalarca sürebilmektedir. Ancak, 2010 yılında Uygun ve arkadaşlarının karaciğer desellülarizasyonu için geliştirdikleri perfüzyon desellülarizasyonu ile söz konusu süre oldukça azaltılmaktadır (Uygun ve diğ. 2010). Bu tez çalışmasında da hücrelerin etkili bir şekilde ve kısa süre içinde matriksten atılmasına olanak tanıyan perfüzyon desellülarizasyonu kullanılmıştır. Kullanılan bu teknikte zamanın azalmasındaki temel etken desellülarizasyon ajanının hücrelere ulaşması için gerekli olan difüzyon mesafesinin damar sistemi sayesinde oldukça kısılması ve konvektif taşıma sayesinde hücresel materyalin dokudan kolaylıkla uzaklaştırılmasıdır (Soto-Gutierrez ve diğ. 2012, Song ve Ott 2011). Dolayısıyla bu teknik 3B organ matriksinin yapısını da koruyarak etkili ve hızlı bir şekilde hücresiz doku iskelesi elde edilmesine olanak tanır. Yapılan desellülarizasyon sonunda yarı saydam karaciğer ekstrasellüler matriksi elde edilmiştir (Çizim 4.4). Ancak, bu görünümün elde edilmesi işlemin başarılı olarak tanımlanması için yeterli değildir. Daha önceki çalışmalarda desellülarizasyonun başarılı olabilmesi için 1) hücresel materyalin tamamının ya da tamamına yakınının matriksten uzaklaştırılması ve 2) ekstrasellüler matriks kompozisyonunun korunuyor olması gerektiği belirtilmiştir (Badylak ve diğ. 2011). Desellülarize edilen karaciğer ekstrasellüler matriksinde yapılan histolojik incelemelerde görülmüştür ki yapı iskelesi içinde herhangi bir hücre kalmamıştır (Çizim 4.6 b). Bu bulgu immün floresan boyamalarla da desteklenmektedir. Nükleer boya içeren kapatma medyumu DAPI ile kapatılan desellülarize doku kesitleri incelenmiş ve matriks üzerinde herhangi bir nükleer boyanma gözlemlenmemiştir (Çizim 4.7 a,b, Çizim 4.8). Desellülarize edilmiş doku iskelesinden genomik DNA izolasyonu yapılmış ve Act β geni PCR da çoğaltılarak agaroz jelde yürütülmüştür. Pozitif kontrolde Act β 'nin bant oluşturması ve negatif kontrolde herhangi bir bant gözlemlenmemesi PCR'ın doğru çalıştığını göstermektedir. Çok düşük konsantrasyondaki DNA örneklerini bile görünür hale getirebilen PCR yönteminde desellülarize dokulara ait hiçbir DNA bandının görülmemesi

desellülarizasyonun oldukça başarılı olduğunu ortaya koymaktadır (Çizim 4.5). Bu durum desellülarizasyon sonrası materyalin DNA içeriği bakımından negatif olduğunu göstermektedir.

Desellülarize edilen dokuda DNA içeriğinin kalmamasına ek olarak materyalin bütünlüğünü korumak da başarı kriterlerimiz arasındadır. Matriks yapısını incelemek için yapılan histokimyasal incelemeler ve immün floresan yöntemler doku bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir. Desellülarize dokuların ekstrasellüler matriks yapısı ile normal karaciğer dokusunun ekstrasellüler matriks bütünlüğü karşılaştırıldığında her iki materyalde de neredeyse aynı matriks bütünlüğünün var olduğu gözlemlenmektedir (Çizim 4.7). Resellülarizasyon sırasında vasküler sistem aracılığı ile hücrelerin dokunun hemen her yerine dağılması beklenmektedir. Bu sebeple desellülarizasyon sonrasında damar yapılarının bütünlüğünün korunması oldukça önemlidir. Elde edilen veriler damar bütünlüğü hakkında son derece olumlu sonuçları ortaya koymaktadır (Çizim 4.8). Biyokimyasal analizler ile karaciğer dokusu ve desellülarize doku arasındaki kollajen miktarının tespiti yapılmıştır. Baptista ve arkadaşları desellülarize ettikleri karaciğer ekstrasellüler matriksinin kollajen içeriğini %7,2 bulduklarını bildirmişlerdir (Baptista ve diğ. 2011). Bu tez çalışmasında yapılan biyokimyasal analizler sonucunda desellülarize karaciğer matriksinin kollajen miktarı %8,8 olarak bulunmuştur. (Çizim 4.9). Bu veri desellülarizasyon sürecinin matriksin korunumu açısından da oldukça başarılı olduğunu göstermektedir. Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak söylenebilir ki elde edilen sonuçlar desellülarizasyonun başarılı olarak tanımlanabilmesi için gerekli olan şartları sağlamaktadır.

Organ desellülarizasyonu için önemli noktalarda birisi de biyolojik olarak aktif ekstrasellüler matriks komponentlerinin kaybını ve istenmeyen değişiklikleri mümkün olan en düşük seviyelere çekmektir. Bu kritik bilgi göz önüne alınarak çalışmada yüksek konsantrasyonlarda SDS kullanımından kaçınılmıştır. Ayrıca matriksin SDS ile etkileşim süresini de kısaltmak için SDS kullanmadan önce hücre membranlarının çözünür hale gelmesi amacıyla TritonX-100 kullanılmıştır. TritonX-100'ün SDS'e yardımcı olan bu etkisi muhtemelen hücre membranlarını çözmek için lipit-lipit ve lipit-protein etkileşimlerini bozmasından kaynaklanmaktadır (Sabetkish ve diğ. 2015). Ardından düşük konsantrasyonlarda (%0,5 ve %1) kullanılan SDS ile hücreler tamamen lizise uğratılmış, sitoplazmik bileşenler ve membran lipitleri çözülerek matriksteki nükleer kalıntılar da hem

SDS aracılığı ile hem de yöntemin yıkama etkisiyle temizlenmiştir. Karaciğer ekstrasellüler matriksinin anahtar proteinlerinden olan kollajen tip 1 ve fibronektin desellülarizasyon sonrasında da matriks organizasyonunda yerini kaybetmediği gözlemlenmektedir. Resellülarize edilen matrikste 2 hafta boyunca hücrelerin canlı kalabilmesi ve 2 haftanın sonunda hücre proliferasyonunun var olması da matriksin biyoyumluluğunu ve biyolojik olarak aktif ekstrasellüler matriksin hücrelere ev sahipliği yaptığını ortaya koymaktadır (Çizim 4.9). Her ne kadar doğal bir biyoiskele olması sebebiyle zaten biyoyumlu olması beklenen karaciğer ekstrasellüler matriksi desellülarizasyon protokolü sebebiyle fazla tahribata uğrayabilir. Bunun doğal bir sonucu olarak hücrelerin tutunup proliferasyonunu sağlayabilecek kompozisyonu kaybetmesi de oldukça muhtemel bir durumdur.

β -hücrelerinin yaşam ve fonksiyonelliğinde ekstrasellüler matriks-hücre etkileşimleri oldukça kritik bir aşamadır (Weber ve diğ. 2008, Daoud ve diğ. 2010). Bu sebeple hücrelerin insülin üretimi kültürde edildikleri yüzey/materyal ile sıkı bir ilişki içindedir.

Günümüze kadar pek çok çalışmada kök hücrelerin insülin üreten hücrelere dönüştürülmesi denenmiştir (Thakkar ve diğ. 2015, Li ve diğ. 2016). Yüksek farklılaşma potansiyeline sahip olan EKH'ler ve uPKH'ler başlıca ilgi odakları olsa da zaman zaman MKH'ler de bahsi geçen çalışmalara dâhil edilmişlerdir. Bazı çalışmalarda MKH'lerin β -hücrelerini de içeren endokrin hücrelere farklılaştıkları belirtilse de başarının çok yüksek bir verim elde edilememiştir (Chen ve diğ. 2004, Milanesi ve diğ. 2012). Khorsandi ve ekibi 2015 yılında kemik iliği kaynaklı MKH'leri insülin üreten hücrelere dönüştürmeye çalışmış ve hücrelerin başlangıçtaki haline göre insülin gen ekspresyonunda yaklaşık 5 katlık bir artış gözlemlemiştir (Khorsandi ve diğ. 2015). Kim ve arkadaşları bademcik ve adipoz kaynaklı MKH'leri insülin üreten hücrelere dönüştürmeye çalışmış ve adipoz kaynaklı hücrelerde yaklaşık 40 katlık, bademcik kaynaklı MKH'lerde ise yaklaşık 50 katlık bir insülin gen ekspresyon artışı olduğunu belirtmişlerdir (Kim ve diğ. 2015). Bu çalışmada ise 3B ekstrasellüler matriks üzerinde yapılan endokrin kültürdeki insülin gen ekspresyon seviyesinin cam slaytlar üzerinde yapılan 2B klasik kültüre göre yaklaşık 3000 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu bulgular β -hücrelerinin ekstrasellüler matriksin sağladığı 3B niş ortamına cevap verdiğini göstermektedir. Önceki çalışmalarda da 3B matrikslerin hücre-matriks etkileşiminde 2B substratlardan daha uygun olduğu bildirilmiştir (Chun ve diğ. 2006).

Resellülarizasyon çalışmalarının hemen hemen hepsinde hücre hattı kullanılmaktadır (Goh ve diğ. 2013, Crabbé ve diğ. 2015). Kullanılan bu hücre hatlarının da birçoğu da sarkoma, blastoma gibi tümör hücre hatlarıdır (Goh ve diğ. 2013, Mazza ve diğ. 2015). Bu tarz hücreler sürekli bölünüp çoğalabilme yeteneğinde oldukları için desellülarize matrikslerin resellülarizasyonları için büyük kolaylık sağlamaktadır. Ancak bu yöntemle elde edilebilecek olan doku ve organ parçalarının klinik kullanımı kısmı büyük bir soru işareti oluşturmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında ise izole edilmiş kök hücreler kullanılmaktadır. Dolayısıyla bu hücrelerin resellülarizasyonunda ortama uyum sağlamaları, çoğalmaları çok daha zorlu bir süreci kapsamaktadır. Ancak bu yaklaşımımız hastalardan alınabilecek kök hücreler ile resellülarize edilmiş dokuları temsil etmektedir. Yani bireylerin kendi hücreleri ile resellülarize edilmiş, biyo-uyumlu ve klinik kullanıma uygun doku ve organ parçaları üretebilmek için seçilen bir yaklaşımdır. Bu açıdan bakıldığında β -hücre hattı vb. hatları kullanmadan bu derece yüksek insülin gen ekspresyonlarına ulaşmak söz konusu başarıyı özel kılmaktadır. Bununla birlikte söz konusu ekspresyonun proteine dönüşmesi de son derece önemlidir. Her ne kadar insülin mRNA'sı sentezlense de iyi bilinmektedir ki sentezlenen mRNA'ların proteine dönüşümünü engelleyici bir dizi mekanizmalar da hücrelerde mevcuttur (Mouillet ve diğ. 2015). Yapılan immün floresan boyamalar hücrelerde sentezlenen insülin mRNA'larının proteine dönüştüğünü göstermektedir (Çizim 4.11 a,b). Ayrıca insülin ELISA ile hücrelerce sentezlenen insülin miktarını da sayısal olarak belirlenmiştir (Çizim 4.11, Çizim 4.12). Tüm bu analizler birbirini destekler niteliktedir. 3B karaciğer ekstrasellüler matrikslerinde -özellikle de endokrin farklılaştırma deney grubunda- kültüre edilen hücrelerin salgıladıkları yüksek insülin miktarı yapılan analizlerle güçlü bir şekilde ortaya koyulmuştur.

Pdx1, pankreatik gelişim için önemli olan bir transkripsiyon faktörü olmakla birlikte β -hücre olgunlaşmasında da aktif roller üstlenmektedir. Pdx1 knockout fare embriyolarında pankreatik tomurcukların oluştuğu ancak pankreas gelişiminin olmadığı bildirilmiştir (Jonsson ve diğ. 1994). Gelişen β -hücresinde Pdx1, NKX6-1 ve insülin birlikte ifade olur. Bu sürecin sonuçlarından biri de MafB'nin sessizleşmesi ve MafA'nın ekspresyonun artmasıdır (D'Amour ve diğ. 2006). Pdx1, β -hücrelerinin yaşamı için de gereklidir. Pdx1 ekspresyonunun azaltıldığı hücrelerde apoptotik ölüm oranının arttığı gözlemlenmiştir (Johnson ve diğ. 2006). Bu genin gastrik kanserde ekspresyonunun tamamen durması ise

bir tümör baskılayıcı olabileceğini düşündürmektedir (Ma ve diğ. 2008). Tüm bu bilgiler ışığında endokrin pankreas gelişimi, insülin salgısının sürekliliği, β -hücrelerinin hayatta kalması, glukagonla antagonistik olarak insülinin çalışması gibi endokrin pankreasın düzenli bir şekilde işlev yapmasında anahtar görevi göre Pdx1 ekspresyonu incelenmiş ve 3B matrikslerde yapılan kültürde kontrol grubuna kıyasla 50 kat artmıştır. *Langerhans* adacıklarındaki Pdx1 ekspresyonunun ise 3B endokrin kültürün yalnızca iki katı kadar olduğu gözlemlenmiştir (Çizim 4.14). İmmün floresan boyamalarla (Çizim 4.11 d) da desteklenen bu veri fonksiyonel bir endokrin pankreas dokusu eldesinde son derece kritiktir.

Glukokinaz memelilerde 4 dokuda keşfedilmiştir: karaciğer, pankreas, ince bağırsak ve beyin. Bu dokuların tümünde kan glukoz seviyesinin artması ya da azalmasına göre hayati roller oynamaktadır. Glukokinaz, glikoliz yolunda görev alan ve glikozun glikoz-6-fosfata dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Aynı zamanda glukoz sensörü olarak da bilinir, β -hücrelerini artan kan glukoz seviyesine göre uyarır ve insülin salgılanmasını sağlar. Glukokinaz aktivitesi sonucu oluşan glikoz-6-fosfat tüketildiğinde ATP miktarı artar. Bu durum insülin salgısıyla sonuçlanan bir dizi olayları tetikler. Artan hücresel solunumun β -hücrelerinde ortaya çıkan ilk sonuçlarından birisi NADH ve NADPH konsantrasyonunun yükselmesidir. β -hücrelerinin redoks durumundaki bu değişim hücre içi kalsiyum seviyesindeki yükselmelere yol açar ve ATP bağımlı potasyum kanalları kapanır. İnsülin salgı granüllerinin hücre membranıyla birleşmesi, membran depolarizasyonu ve kana insülinin geçmesi ile sonuçlanır. Glukokinaz ekspresyonu oldukça sıra dışı bir mekanizmaya sahiptir. İki promotöre sahip olan glukokinazda ilk promotör pankreatik adacıklardaki hücrelerde, nöral dokuda ve enterositlerdeki glukokinaz ekspresyonundan sorumludur (Iynedjian ve diğ. 1989a). İkinci promotör ise hepatositlerdeki glukokinaz ekspresyonundan sorumludur (Iynedjian ve diğ. 1989b). Glukokinazın bu özel durumu muhtemelen farklı dokulardaki ekspresyon seviyelerini birbirinden ayırmak içindir. Çünkü karaciğerde glukokinaz glukozun 'toplu işlenmesi' için rol oynar. Oysa nöroendokrin sistemde ise hücre genelindeki karbonhidrat metabolizmasına hücresel yanıtın tetiklenmesinde rol oynar (Iynedjian 2009). Dolayısıyla hücrelerin düzenli ve olması gerektiği şekilde insülin salgılanması için gerekli olan glukokinaz ekspresyonu çalışmamızın önemli hedeflerinden birisidir. Ancak bu güne kadar kök hücrelerden insülin üreten hücrelere farklılaştırma çalışmalarında bu hücrelerdeki glukokinaz çok fazla incelenen bir durum olmamıştır (Agulnick ve diğ. 2015, Shaer ve diğ,

2015). Bu çalışmada ise GckR varlığı protein seviyesinde immün floresan boyamalarla gösterilmiştir (Çizim 4.12). Buna göre 3B-standart besi yeri ile kültüre edilen deney grubunda GckR ekspresyonunun olduğu görülmekte (Çizim 4.12 a) ancak 3B-endokrin farklılaşma besi yeri ile kültüre edilen deney grubunda daha fazla hücrenin boyandığı (Çizim 4.12 b) görülmektedir. Gck gen ekspresyon seviyesinde de Real Time PCR ile ortaya konulmuştur (Çizim 4.14). Elde edilen verilere göre Gck ekspresyonu adacıklarda görülen ekspresyon seviyesinden 6-10 kat daha yüksektir.

Glukagon kan glukoz konsantrasyonunun artmasını sağlayan, α -hücrelerinden salgılanan bir hormondur. İnsülin ile birlikte kan glukoz seviyesinin stabil kalmasını sağlayan bu iki hormon arasında geri-bildirim (feedback) mekanizması söz konusudur. Glukagon α -hücre belirteci olarak kullanılır. Somatostatin ise pankreatik adacıklarda da bulunan δ -hücrelerinden üretilir. Somatostatin; insülin ve glukagon salgısını baskılar. Büyüme hormonu baskılayıcı hormon (growth hormone–inhibiting hormone) olarak da bilinen somatostatin δ -hücre belirteçidir. Bu çalışmada da 3B matriksler üzerinde oluşturulmaya çalışılan endokrin pankreas dokusunda α -hücre farklılaşmasını değerlendirmek için glukagon, δ -hücre farklılaşmasını değerlendirmek için ise somatostatin kullanılmıştır. Yapılan immün floresan boyamalarda sayıca az olmasına rağmen glukagon pozitif hücreler görülmüştür. Gen ekspresyon düzeyinde ise 3B standart kültür ile 3B endokrin kültür arasında endokrin kültür lehine 2 katlık bir fark olup bu oran kontrol grubu ile kıyaslandığında 250 kattan fazladır. Adacıklardaki hücrelerin yaklaşık %5'ini oluşturan somatostatin ekspresyonunda ise 3B kültürler arasındaki fark biraz daha azalarak 1.5 kata kadar inmiştir. 3B endokrin kültür ile adacıklardaki somatostatin ekspresyonu kıyaslandığında ise adacıklarda yaklaşık 4.5 katlık fazlalık söz konusudur. Ancak bu oran kontrol grubu hücrelerinde 400 kata denk gelmektedir.

Hücrelere, β -hücre elde edilmesi için bu güne kadar birçok gen aktarılmıştır. Pax4, MafA v Ngn3 bunlar içinde en sık karşılanılan genlerdendir (Zhou ve diğ. 2008). Daha önce yapılan bir çalışmada pankreatik adacıklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelere Pax4, MafA ve Ngn3 birlikte aktarılmıştır. Ancak bu çalışmada 3 genin de aktarıldığı hücrelerin endokrin farklılaşma için kimyasal uyarıya cevap vermedikleri belirtilmektedir (Bağlar 2014). MafA postnatal dönemde pankreas gelişimi ve beta hücre işlevleri için önemli bir proteindir (Hang ve Stain, 2011). Gck ile birlikte kan glukoz seviyesine cevap verecek şekilde insülin sentezini kontrol eden önemli bir moleküldür (Aguayo-Mazzucato

ve diğ. 2011). Pax4, pankreas β -hücresi gelişiminde görev alan, progenitör hücrelerin β -hücresine farklılaşmasını tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Lock ve Tzanakakis, 2007). Bu çalışmada kullanılan hücreler Pax4⁺/MafA⁺ hücrelerdir. Dolayısıyla hem 2B hem de 3B kültürlerde bu genlerin ekspresyon sevipleri arasında daha önceki genlerin ekspresyonları arasında olduğu kadar büyük farklıklar söz konusu değildir. 3B matrikslerde yapılan 3 haftalık kültürlerde MafA ekspresyon seviyeleri yükselmiş olmakla birlikte kontrol grubu ile aradaki fark MafA için yaklaşık 2.5 kattır (Çizim 4.17). Pax4 ekspresyonunun Pax6 aracılığı ile Pdx1'i indüklemesi sonucu α -hücre farklılaşmasını bloke edeceğini ve β -hücre farklılaşmasının verimini artırdığı bildirilmiştir (Ritz-Laser ve diğ. 2002). İmmün floresan boyamalarda glukagon pozitif hücrelerin nadir olması Pax4'ün domino etkisi yaratan bu özelliğinden kaynaklanabilir. İnsülin üreten hücreler için fonksiyonelliğin devamının MafA ekspresyonunun yetişkinlerde de devam etmesine bağlı olduğu önceki çalışmalar ile bildirilmiştir (Artner ve diğ. 2010). Gen ekspresyon analizlerinde -3hafta boyunca yapılan 3B kültürler incelendiğinde- ciddi oranlarda MafA ve insülin artışının aynı zamanlarda gerçekleşmesi literatürde yer alan bilgilerle kaynaşmaktadır.

HNF-4 α , HNF-1 α 'yı da içeren bazı genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörüdür. Albümin ise serumda en fazla bulunan protein olup çeşitli maddelerin taşınımı ve zararlı maddelerin detoksifikasyonu ile ilişkili bir proteindir. AFP ise embriyonik dönemdeki albümin olarak da bilinir. Ancak görevi tam olarak belirlenmemiştir. Endokrin pankreas dokusu elde edilmesi amaçlanan bu çalışma karaciğer ekstrasellüler matriksi üzerinde yapılmıştır. Bunun doğal bir sonucu olarak hücreler hepatik farklılaşmaya da gidebilirler. Matriks üzerinde kültüre edilen hücrelerin hepatik farklılaşmalarını değerlendirmek amacıyla HNF-4 α , ALB ve AFP ekspresyonlarına bakılmıştır (Çizim 4.17). Deney grupları ve *Langerhans* adacıkları incelendiğinde HNF-4 α ve ALB seviyesinde önemli bir artış gözlemlenmemiştir. Ancak AFP seviyesi adacıklarda kontrol grubuna göre 4.5 kat artmıştır. 3B matriksler üzerinde ise bu oran adacıklara göre yaklaşık 20 kat daha yüksektir. Bu beklenmeyen artışı daha detaylı inceleyebilmek için 3B kültürlerin 3 hafta boyunca haftalık olarak AFP ekspresyon düzeyleri incelenmiş ve ekspresyon seviyesindeki yükselmenin 2. haftadan sonra olduğu gözlemlenmiştir (Çizim 4.18). Sıçan embriyoları ile yapılan daha önceki bir çalışmada embriyonik gelişimin 12. gününde dorsal pankreasta AFP varlığı gösterilmiştir. 12. günden önce ise AFP varlığı pankreas gelişiminde görülmemiştir (Suzuki ve diğ. 1983). Söz konusu çalışmada AFP'nin

erken gelişim aşamalarında embriyonun hızla büyüdüğü dönemlerde önemli rolleri olabileceğinin düşünüldüğü belirtilmektedir. Başka bir çalışma da AFP mRNA'larının embriyonik gelişim süresince pankreas ve böbrekler bulunduğu, bulunan bu mRNA'ların karaciğerden elde edilen AFP mRNA'ları ile aynı olduğunun yani muhtemelen proteine dönüşecek olan mRNA'lar olduğu ileri sürülmektedir. Yine bu çalışmada doğumdan sonra giderek azalmakla birlikte yetişkin pankreas dokularında da az miktarda AFP mRNA'nın tespit edildiği vurgulanmaktadır (Nohan ve diğ. 1988). Nohan ve arkadaşları dotblot analizi ile AFP'yi protein seviyesinde de çalışmalarında göstermektedir.

5.1. Sınırlılıklar

3B yapıların yer aldığı bu çalışmada konfokal mikroskopu ile ekstrasellüler matrikslerden daha derin görüntüler alınarak hücrelerin matriksteki konumları hakkında bilgilere ulaşılabilmektedir.

Deneyde biyokimyasal analiz ile matriksin ve normal karaciğerin kollajen içeriği belirlenmiştir. Ancak bu işlem liyofilizatör ile kurutulmuş dokular üzerinde yapılması daha net sonuçlara ulaşılmasını sağlamaktadır.

Dolayısıyla konfokal mikroskopu ve liyofilizatörün laboratuvar ekipmanları arasında yer alması yukarıda bahsedilen çalışmaların yapılmasına imkan tanıyacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında desellülarize edilmiş hepatik ekstrasellüler matriksin Langerhans adacıklarından elde edilen MafA⁺/Pax4⁺-MKH'ler kullanılarak resellülarize edilmesiyle insülin salgılayan endokrin pankreas benzeri bir doku üretmek amaçlanmıştır. Bu haliyle dünyada bir ilk niteliği taşıyan söz konusu çalışmada hem matriksin sağladığı fiziksel uyarılar ile hem de endokrin farklılaştırma besi yerinden kaynaklanan kimyasal uyarılar ile hücrelerin pankreatik adacık hücrelerine benzer özellikler sergileyeceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar hepatik matriksler üzerinde yapılan 3B kültürlerde insülin salgısının 2B klasik kültürlerle göre çok daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu veri hem gen ekspresyonlarıyla hem de immün floresan analizlerle desteklenerek kuvvetli bir şekilde ortaya koyulmuştur. Bunun yanında tıpkı adacıklarda olduğu gibi hücrelerin glukagon, glukokinaz gibi adacıklarda var olması gereken proteinleri de sentezlediği görülmektedir.

Karaciğer desellülarizasyonu için kullanılan protokolün matrikse çok ciddi bir hasar vermediği, doku iskelesinin doğal yapısına oldukça yakın bir içeriğe sahip olduğu histokimyasal ve immün floresan tekniklerle ortaya koyulmuş, biyokimyasal analizler ile desteklenmiştir.

Karaciğer ekstrasellüler matriksinin pankreas dokusundan elde edilen kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasına engel olmadığı ve adacık ekstrasellüler matriksine benzer özellikler sunarak hücrelere niş ortamı sağladığı görülmüştür.

Yine bu çalışma ile farklı organ matrikslerinin ait olduğu organ dışındaki yapıların üretilmesi için de kullanılabileceği gösterilmiş ve doku mühendisliğine yeni bir yaklaşım sunulmuştur.

Çalışmada gözlemlenen glukokinaz ekspresyonunun bu genin hangi promotörü vasıtasıyla gerçekleştiğini belirlemek için bu konu üzerinde yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Elde edilen endokrin pankreas benzeri dokuların glukoz duyarlılığı test edilmeli ve diyabetik hayvanlara nakledildiğinde kan glukoz seviyesini düşürdüğü gösterilmelidir. Bu şekilde elde edilen doku parçalarının işlevselliği gösterilecektir.

KAYNAKLAR

- Abrahamson DR, Caulfield JP. Distribution of laminin within rat and mouse renal, splenic, intestinal, and hepatic basement membranes identified after the intravenous injection of heterologous antilaminin IgG. *Lab Invest.* 1985 Feb;52(2):169-81
- Aguayo-Mazzucato C, Koh A, El Khattabi I ve diğ. Mafa expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia.* 2011 Mar;54(3):583-93.
- Sangkum P. Research highlights on stem cell therapy for the treatment of Peyronie's disease. *Transl Androl Urol.* 2016 Jun;5(3):363-5.
- Agulnick AD, Ambruzs DM, Moorman MA ve diğ. Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Oct;4(10):1214-22.
- Akinci E, Banga A, Greder LV ve diğ. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *Biochem J.* 2012 Mar 15;442(3):539-50.
- Akinci E, Banga A, Tungatt K ve diğ. Reprogramming of various cell types to a beta-like state by Pdx1, Ngn3 and MafA. *PLoS One.* 2013 Nov 29;8(11):e82424.
- Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL ve diğ. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochem J.* 2008 Oct 1;415(1):1-10.
- Arthur A, Rychkov G, Shi S ve diğ. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells.* 2008 Jul;26(7):1787-95
- Artner I, Hang Y, Mazur M ve diğ. MafA and MafB regulate genes critical to beta-cells in a unique temporal manner. *Diabetes.* 2010 Oct;59(10):2530-9.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG ve diğ. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* 2005 Aug;24(5):326-32.
- Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng.* 2011 Aug 15;13:27-53.
- Bağlar A. Mezenkimal kök hücrelerden pankreas adacık beta hücrelerine benzer insülin salgılayan hücrelerin rekombinant DNA teknolojisi ile eldesi. Yüksek lisans tezi. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- Baptista PM, Siddiqui MM, Lozier G ve diğ. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology.* 2011 Feb;53(2):604-17.
- Barnett AH, Eff C, Leslie RD ve diğ. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia.* 1981 Feb;20(2):87-93.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):209-18.
- Batista LF. Telomere Biology In Stem Cells And Reprogramming. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2014;125:67-88.
- Beattie GM, Montgomery AM, Lopez AD ve diğ. A novel approach to increase human islet cell mass while preserving beta-cell function. *Diabetes.* 2002 Dec;51(12):3435-9.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D ve diğ. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent And Support Myocardial Regeneration. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):763-76

- Bernardo AS, Hay CW, Docherty K. Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. *Mol Cell Endocrinol.* 2008 Nov 6;294(1-2):1-9.
- Biedermann T, Boettcher-Haberzeth S, Reichmann E. Tissue engineering of skin for wound coverage. *Eur J Pediatr Surg.* 2013 Oct;23(5):375-82.
- Biempica L, Morecki R, Wu CH ve diğ. Immunocytochemical localization of type B collagen: a component of basement membrane in human liver. *Am J Pathol.* 1980 Mar;98(3):591-602.
- Bissell DM, Arenson DM, Maher JJ ve diğ. Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest.* 1987 Mar;79(3):801-12.
- Bonandrini B, Figliuzzi M, Papadimou E ve diğ. Recellularization of well-preserved acellular kidney scaffold using embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2014 May;20(9-10):1486-98.
- Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC ve diğ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Jul 5;97(14):7999-8004.
- Bonner-Weir S, Weir GC. New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol.* 2005 Jul;23(7):857-61.
- Borg DJ, Weigelt M, Wilhelm C ve diğ. Mesenchymal stromal cells improve transplanted islet survival and islet function in a syngeneic mouse model. *Diabetologia.* 2014 Mar;57(3):522-31.
- Bosco D, Meda P, Halban PA ve diğ. Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin. *Diabetes.* 2000 Feb;49(2):233-43.
- Bosco D, Rouiller DG, Halban PA. Differential expression of E-cadherin at the surface of rat beta-cells as a marker of functional heterogeneity. *J Endocrinol.* 2007 Jul;194(1):21-9.
- Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE ve diğ. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem.* 2005 Sep;53(9):1087-97.
- Brun T, Franklin I, St-Onge L ve diğ. The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes beta-cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol.* 2004 Dec 20;167(6):1123-35.
- Brun T, Gauthier BR. A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease. *J Mol Endocrinol.* 2008 Feb;40(2):37-45.
- Can A. Kök Hücre Türleri, Biyolojisi ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Tıp Kitapevi, Ankara, 2014.
- Cao XK, Li R, Sun W ve diğ. Co-combination of islets with bone marrow mesenchymal stem cells promotes angiogenesis. *Biomed Pharmacother.* 2016 Mar;78:156-64.
- Caralt M, Uzarski JS, Iacob S ve diğ. Optimization and critical evaluation of decellularization strategies to develop renal extracellular matrix scaffolds as biological templates for organ engineering and transplantation. *Am J Transplant.* 2015 Jan;15(1):64-75.
- Celton-Morizur S, Merlen G, Couton D ve diğ. Polyploidy and liver proliferation: central role of insulin signaling. *Cell Cycle.* 2010 Feb 1;9(3):460-6.
- Chen J, Ma Y, Wang Z ve diğ. Thrombin promotes fibronectin secretion by bone marrow mesenchymal stem cells via the protease-activated receptor mediated signalling pathways. *Stem Cell Res Ther.* 2014 Mar;5(2):36
- Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol.* 2004 Oct 15;10(20):3016-20.

- Chikada H, Ito K, Yanagida A ve diğ. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Mist1, Induces Maturation Of Mouse Fetal Hepatoblasts. *Sci Rep*. 2015 Oct 12;5:14989.
- Chiu LL, Radisic M. Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(2):226-41.
- Chun TH, Hotary KB, Sabeh F ve diğ. A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell*. 2006 May 5;125(3):577-91.
- Cirulli V, Baetens D, Rutishauser U ve diğ. Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J Cell Sci*. 1994 Jun;107 (Pt 6):1429-36.
- Cirulli V, Beattie GM, Klier G ve diğ. Expression and function of alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) integrins in the developing pancreas: roles in the adhesion and migration of putative endocrine progenitor cells. *J Cell Biol*. 2000 Sep 18;150(6):1445-60.
- Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA ve diğ. A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nat Genet*. 1998 Jul;19(3):292-6
- Cowan CM, Aalami OO, Shi YY ve diğ. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. *Tissue Eng*. 2005 Mar-Apr;11(3-4):645-58.
- Crabbé A, Liu Y, Sarker SF ve diğ. Recellularization of decellularized lung scaffolds is enhanced by dynamic suspension culture. *PLoS One*. 2015 May 11;10(5):e0126846.
- Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3233-43.
- D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S ve diğ. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2006 Nov;24(11):1392-401.
- Daoud J, Petropavlovskaja M, Rosenberg L ve diğ. The effect of extracellular matrix components on the preservation of human islet function in vitro. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(7):1676-82.
- Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST ve diğ. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*. 1994 Sep 8;371(6493):130-6.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller ve diğ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- Dudek RW, Lawrence IE Jr, Hill RS ve diğ. Induction of islet cytodifferentiation by fetal mesenchyme in adult pancreatic ductal epithelium. *Diabetes*. 1991 Aug;40(8):1041-8.
- Edamura K, Nasu K, Iwami Y ve diğ. Effect of adhesion or collagen molecules on cell attachment, insulin secretion, and glucose responsiveness in the cultured adult porcine endocrine pancreas: a preliminary study. *Cell Transplant*. 2003;12(4):439-46.
- Elbert DL. Bottom-up tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2011 Oct;22(5):674-80.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment In Culture Of Pluripotential Cells From Mouse Embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6
- Fan H, Liu H, Toh SL ve diğ. Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts on gelatin/silk fibroin hybrid scaffold. *Biomaterials*. 2008 Mar;29(8):1017-27.
- Field LL. Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia*. 2002 Jan;45(1):21-35.

Freeman I, Cohen S. The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. *Biomaterials*. 2009 Apr;30(11):2122-31.

Freiman A, Shandalov Y, Rozenfeld D ve diğ. Adipose-derived endothelial and mesenchymal stem cells enhance vascular network formation on three-dimensional constructs in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Jan 11;7:5

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.

Friedman R, Betancur M, Boissel L ve diğ. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Dec;13(12):1477-86.

Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF ve diğ. Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Insulin-Producing Cells: Evidence for Further Maturation In Vivo. *Biomed Res Int*. 2015;2015:575837.

Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012 Feb;18(2):128-34.

Ghaedi M, Calle EA, Mendez JJ ve diğ. Human iPS cell-derived alveolar epithelium repopulates lung extracellular matrix. *J Clin Invest*. 2013 Nov;123(11):4950-62

Goh SK, Bertera S, Olsen P ve diğ. Perfusion-decellularized pancreas as a natural 3D scaffold for pancreatic tissue and whole organ engineering. *Biomaterials*. 2013 Sep;34(28):6760-72.

Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):635-8.

Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M ve diğ. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 15;97(4):1607-11

Guenou H, Nissan X, Larcher F ve diğ. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet*. 2009 Nov 21;374(9703):1745-53.

Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*. 2005 Mar;146(3):1025-34.

Habener JF, Stoffers DA. A newly discovered role of transcription factors involved in pancreas development and the pathogenesis of diabetes mellitus. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998 Jan-Feb;110(1):12-21.

Hammar EB, Irminger JC, Rickenbach K e diğ. Activation of NF-kappaB by extracellular matrix is involved in spreading and glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta cells. *J Biol Chem*. 2005 Aug 26;280(34):30630-7. Epub 2005 Jun 30.

Hang Y, Stein R. MafA and MafB activity in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2011 Sep;22(9):364-73.

Heremans Y, Van De Castele M, in't Veld P ve diğ. Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol*. 2002 Oct 28;159(2):303-12.

Hu He KH, Lorenzo PI, Brun T ve diğ. In vivo conditional Pax4 overexpression in mature islet β -cells prevents stress-induced hyperglycemia in mice. *Diabetes*. 2011 Jun;60(6):1705-15.

- Huang JI, Kazmi N, Durbhakula MM ve diğ. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res.* 2005 Nov;23(6):1383-9.
- Hughes SJ, Clark A, McShane P ve diğ. Characterisation of collagen VI within the islet-exocrine interface of the human pancreas: implications for clinical islet isolation? *Transplantation.* 2006 Feb 15;81(3):423-6.
- Iynedjian PB, Jotterand D, Nospikel T ve diğ. Transcriptional induction of glucokinase gene by insulin in cultured liver cells and its repression by the glucagon-cAMP system. *J Biol Chem.* 1989b Dec 25;264(36):21824-9.
- Iynedjian PB, Pilot PR, Nospikel T ve diğ. Differential expression and regulation of the glucokinase gene in liver and islets of Langerhans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989a Oct;86(20):7838-42.
- Iynedjian PB. Molecular physiology of mammalian glucokinase. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jan;66(1):27-42.
- Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J ve diğ. Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol.* 2000 Jun;20(12):4445-54.
- Jafarian A, Taghikani M, Abroun S ve diğ. The Generation of Insulin Producing Cells from Human Mesenchymal Stem Cells by MiR-375 and Anti-MiR-9. *PLoS One.* 2015 Jun 5;10(6):e0128650.
- Jiang FX, Cram DS, DeAizpurua HJ ve diğ. Laminin-1 promotes differentiation of fetal mouse pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 1999 Apr;48(4):722-30.
- Jiang FX, Naselli G, Harrison LC. Distinct distribution of laminin and its integrin receptors in the pancreas. *J Histochem Cytochem.* 2002 Dec;50(12):1625-32.
- Jiang WC, Cheng YH, Yen MH ve diğ. Cryo-chemical decellularization of the whole liver for mesenchymal stem cells-based functional hepatic tissue engineering. *Biomaterials.* 2014 Apr;35(11):3607-17.
- Johnson JD, Bernal-Mizrachi E, Alejandro EU ve diğ. Insulin protects islets from apoptosis via Pdx1 and specific changes in the human islet proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 19;103(51):19575-80
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T ve diğ. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature.* 1994 Oct 13;371(6498):606-9.
- Kaido T, Yebra M, Cirulli V ve diğ. Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells: effect on insulin content, secretion, and gene transcription. *Diabetes.* 2006 Oct;55(10):2723-9.
- Kakleas K, Soldatou A, Karachaliou F ve diğ. Associated autoimmune diseases in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Autoimmun Rev.* 2015 Sep;14(9):781-97.
- Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D ve diğ. PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. *Endocr J.* 2008 May;55(2):235-52.
- Kaneto H, Miyatsuka T, Kawamori D ve diğ. Pleiotropic Roles of PDX-1 in the Pancreas. *Rev Diabet Stud.* 2007 Winter;4(4):209-25.
- Karaoz E, Ayhan S, Gacar G ve diğ. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytherapy.* 2010a May;12(3):288-302.

- Karaoz E, Okcu A, Ünal ZS ve diğ. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells efficiently differentiate into insulin-producing cells in pancreatic islet microenvironment both in vitro and in vivo. *Cytherapy*. 2013 May;15(5):557-70.
- Karaoz E, Okçu A, Sağlam O ve diğ. Pancreatic islet derived stem cells can express co-stimulatory molecules of antigen-presenting cells. *Transplant Proc*. 2010b Nov;42(9):3663-70.
- Karaoz E., Ovalı E. Kök Hücreler. Türkiye: Derya Kitabevi. 2004.
- Katoonizadeh A, Poustchi H. Adult Hepatic Progenitor Cell Niche: How it affects the Progenitor Cell Fate. *Middle East J Dig Dis*. 2014 Apr;6(2):57-64.
- Khorsandi L, Nejad-Dehbashi F, Ahangarpour A ve diğ. Three-dimensional differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Tissue Cell*. 2015 Feb;47(1):66-72.
- Kim SY, Kim YR, Park ve diğ. Characterisation of insulin-producing cells differentiated from tonsil derived mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2015 Jul-Oct;90(1-3):27-39.
- Koivunen E, Wang B, Dickinson CD ve diğ. Peptides in cell adhesion research. *Methods Enzymol*. 1994;245:346-69.
- Kong F, Zheng C, Xu D. Telomerase as a "stemness" enzyme. *Sci China Life Sci*. 2014 Jun;57(6):564-70.
- König J, Weiss G, Rossi D ve diğ. Placental mesenchymal stromal cells derived from blood vessels or avascular tissues: what is the better choice to support endothelial cell function? *Stem Cells Dev*. 2015 Jan 1;24(1):115-31.
- Kramer RH. Characterization of laminin-binding integrins. *Methods Enzymol*. 1994;245:129-47.
- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008 Aug 22;134(4):657-67.
- Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E ve diğ. Secretion Of Immunoregulatory Cytokines By Mesenchymal Stem Cells. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):552-70.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6.
- Lee SY, Kim HJ, Choi D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation. *Int J Stem Cells*. 2015 May;8(1):36-47.
- Leite AR, Corrêa-Giannella ML, Dagli ML ve diğ. Fibronectin and laminin induce expression of islet cell markers in hepatic oval cells in culture. *Cell Tissue Res*. 2007 Mar;327(3):529-37.
- L'Heureux N, Dusserre N, König G ve diğ. Human tissue-engineered blood vessels for adult arterial revascularization. *Nat Med*. 2006 Mar;12(3):361-5.
- Li L, Li F, Gao F ve diğ. Transplantation of mesenchymal stem cells improves type 1 diabetes mellitus. *Cell Tissue Res*. 2016 May;364(2):345-55.
- Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980 Nov 21;210(4472):908-10.
- Lock LT, Tzanakakis ES. Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Eng*. 2007 Jul;13(7):1399-412.
- Lu TY, Lin B, Kim J ve diğ. Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nat Commun*. 2013;4:2307.

- Lu Y, Jin X, Chen Y ve diğ. Mesenchymal stem cells protect islets from hypoxia/reoxygenation-induced injury. *Cell Biochem Funct.* 2010 Dec 2;28(8):637-43.
- Lucas-Clerc C, Massart C, Campion JP ve diğ. Long-term culture of human pancreatic islets in an extracellular matrix: morphological and metabolic effects. *Mol Cell Endocrinol.* 1993 Jul;94(1):9-20.
- Ma J, Chen M, Wang J ve diğ. Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX1) functions as a tumor suppressor in gastric cancer. *Carcinogenesis.* 2008 Jul;29(7):1327-33.
- MacArthur BD, Oreffo RO. Bridging the gap. *Nature.* 2005 Jan 6;433(7021):19.
- Macfarlane WM, Smith SB, James RF ve diğ. The p38/reactivating kinase mitogen-activated protein kinase cascade mediates the activation of the transcription factor insulin upstream factor 1 and insulin gene transcription by high glucose in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 1997 Aug 15;272(33):20936-44.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S ve diğ. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999 Mar;103(5):697-705.
- Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(1):1-11.
- Martinez-Hernandez A, Delgado FM, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. *Lab Invest.* 1991 Feb;64(2):157-66.
- Martinez-Hernandez A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCl4-induced cirrhosis. *Lab Invest.* 1985 Aug;53(2):166-86.
- Mazza G, Rombouts K, Rennie Hall A ve diğ. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci Rep.* 2015 Aug 7;5:13079.
- Melloul D, Ben-Neriah Y, Cerasi E. Glucose modulates the binding of an islet-specific factor to a conserved sequence within the rat I and the human insulin promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 1;90(9):3865-9.
- Mendez JJ, Ghaedi M, Steinbacher D ve diğ. Epithelial cell differentiation of human mesenchymal stromal cells in decellularized lung scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2014 Jun;20(11-12):1735-46.
- Meshorer E, Yellajoshula D, George E ve diğ. Hyperdynamic Plasticity Of Chromatin Proteins In Pluripotent Embryonic Stem Cells. *Dev Cell.* 2006 Jan;10(1):105-16
- Meyer T, Bühler C, Czub S ve diğ. Selection of donor pigs for pancreatic islet transplantation may depend on the expression level of connective tissue proteins in the islet capsule. *Transplant Proc.* 1998(b) Aug;30(5):2471-3.
- Meyer T, Chodnewska I, Czub S ve diğ. Extracellular matrix proteins in the porcine pancreas: a structural analysis for directed pancreatic islet isolation. *Transplant Proc.* 1998(a) Mar;30(2):354.
- Meyer T, Czub S, Chodnewska I ve diğ. Expression pattern of extracellular matrix proteins in the pancreas of various domestic pig breeds, the Goettingen Minipig and the Wild Boar. *Ann Transplant.* 1997;2(3):17-26.
- Midha R, Munro CA, Dalton PD ve diğ. Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg.* 2003 Sep;99(3):555-65.
- Milanesi A, Lee JW, Li Z ve diğ. β -Cell regeneration mediated by human bone marrow mesenchymal stem cells. *PLoS One.* 2012;7(8):e42177.
- Miralles F, Czernichow P, Scharfmann R. Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development.* 1998 Mar;125(6):1017-24.

- Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, Pluripotency And Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2009;114:185-99.
- Mouillet JF, Ouyang Y, Coyne CB ve diğ. MicroRNAs in placental health and disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2015 Oct;213(4 Suppl):S163-72.
- Nahon JL, Tratner I, Poliard A ve diğ. Albumin and alpha-fetoprotein gene expression in various nonhepatic rat tissues. *J Biol Chem.* 1988 Aug 15;263(23):11436-42.
- Naito M, Hasegawa G, Takahashi K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc Res Tech.* 1997 Nov 15;39(4):350-64.
- Nakayama KH, Lee CC, Batchelder CA ve diğ. Tissue specificity of decellularized rhesus monkey kidney and lung scaffolds. *PLoS One.* 2013 May 22;8(5):e64134.
- Neshati Z, Matin MM, Bahrami AR ve diğ. Differentiation of mesenchymal stem cells to insulin-producing cells and their impact on type 1 diabetic rats. *J Physiol Biochem.* 2010 Jun;66(2):181-7.
- Noël D, Djouad F, Bouffi C ve diğ. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma.* 2007 Jul;48(7):1283-9.
- Noguchi H. Pancreatic stem/progenitor cells for the treatment of diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2010 Summer;7(2):105-11.
- Oberg-Welsh C. Long-term culture in matrigel enhances the insulin secretion of fetal porcine islet-like cell clusters in vitro. *Pancreas.* 2001 Mar;22(2):157-63.
- Oberpenning F, Meng J, Yoo JJ ve diğ. De novo reconstitution of a functional mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 1999 Feb;17(2):149-55.
- Odom DT, Zizlsperger N, Gordon DB ve diğ. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science.* 2004 Feb 27;303(5662):1378-81.
- Ong WK, Sugii S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013 Jun;45(6):1083-6.
- Onturk, H. and H. Ozbek. Carried out of experimental diabetes and the measurement of glycemic activity. *General Medicine Journal* 17.4 (2007): 231-236.
- Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B ve diğ. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84
- Ott HC, Clippinger B, Conrad C ve diğ. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* 2010 Aug;16(8):927-33.
- Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK ve diğ. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a abioartificial heart. *Nat Med.* 2008 Feb;14(2):213-21.
- Parnaud G, Hammar E, Rouiller DG ve diğ. Blockade of beta1 integrin-laminin-5 interaction affects spreading and insulin secretion of rat beta-cells attached on extracellular matrix. *Diabetes.* 2006 May;55(5):1413-20.
- Petersen HV, Serup P, Leonard J ve diğ. Transcriptional regulation of the human insulin gene is dependent on the homeodomain protein STF1/IPF1 acting through the CT boxes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Oct 25;91(22):10465-9.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2896-902.

- Pinkse GG, Bouwman WP, Jiawan-Lalai R ve diğ. Integrin signaling via RGD peptides and anti-beta1 antibodies confers resistance to apoptosis in islets of Langerhans. *Diabetes*. 2006 Feb;55(2):312-7.
- Puelacher WC, Mooney D, Langer R ve diğ. Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers and chondrocytes. *Biomaterials*. 1994 Aug;15(10):774-8.
- Rafiq I, Kennedy HJ, Rutter GA. Glucose-dependent translocation of insulin promoter factor-1 (IPF-1) between the nuclear periphery and the nucleoplasm of single MIN6 beta-cells. *J Biol Chem*. 1998 Sep 4;273(36):23241-7
- Raikwar SP, Kim EM, Sivitz WI ve diğ. Human iPS cell-derived insulin producing cells form vascularized organoids under the kidney capsules of diabetic mice. *PLoS One*. 2015 Jan 28;10(1):e0116582.
- Reddel RR. Alternative Lengthening Of Telomeres, Telomerase, And Cancer. *Cancer Lett*. 2003 May 15;194(2):155-62.
- Redondo MJ, Yu L, Hawa M ve diğ. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia*. 2001 Mar;44(3):354-62.
- Reilly GC, Engler AJ. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *J Biomech*. 2010 Jan 5;43(1):55-62.
- Ricordi C, Inverardi L, Domínguez-Bendala J. From cellular therapies to tissue reprogramming and regenerative strategies in the treatment of diabetes. *Regen Med*. 2012 Nov;7(6 Suppl):41-8.
- Ris F, Hammar E, Bosco D ve diğ. Impact of integrin-matrix matching and inhibition of apoptosis on the survival of purified human beta-cells in vitro. *Diabetologia*. 2002 Jun;45(6):841-50. Epub 2002 May 8.
- Ritz-Laser B, Estreicher A, Gauthier BR ve diğ. The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6. *Diabetologia*. 2002 Jan;45(1):97-107.
- Roberts AB. Transforming growth factor-beta: activity and efficacy in animal models of wound healing. *Wound Repair Regen*. 1995 Oct-Dec;3(4):408-18.
- Rojkind M, Gatmaitan Z, Mackensen S ve diğ. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol*. 1980 Oct;87(1):255-63.
- Ross EA, Williams MJ, Hamazaki T ve diğ. Embryonic stem cells proliferate and differentiate when seeded into kidney scaffolds. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Nov;20(11):2338-47.
- Ross MH, Pawlina W. *Histoloji konu anlatımı ve atlas*. Lippincott Williams & Wilkins. Çev. Barış Baykal, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
- Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji (2. Baskı)*. İstanbul Tıp Kitapevi, İstanbul, 2016.
- Rother KI. Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med*. 2007 Apr 12;356(15):1499-501.
- Sabetkish S, Kajbafzadeh AM, Sabetkish N ve diğ. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix liver scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Apr;103(4):1498-508.
- Sariboyaci AE, Demircan PC, Gacar G ve diğ. Immunomodulatory properties of pancreatic islet-derived stem cells co-cultured with T cells: Does it contribute to the pathogenesis of type 1 diabetes? *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Mar;122(3):179-89.
- Schuetz EG, Li D, Omiecinski CJ ve diğ. Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol*. 1988 Mar;134(3):309-23.

- Sell S, Ruoslahti E. Expression of fibronectin and laminin in the rat liver after partial hepatectomy, during carcinogenesis, and in transplantable hepatocellular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1982 Nov;69(5):1105-14.
- Shaer A, Azarpira N, Vahdati A ve diğ. Differentiation of human-induced pluripotent stem cells into insulin-producing clusters. *Exp Clin Transplant.* 2015 Feb;13(1):68-75.
- Snykers S, De Kock J, Rogiers V ve diğ. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells.* 2009 Mar;27(3):577-605.
- Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE ve diğ. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med.* 2013 May;19(5):646-51.
- Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med.* 2011 Aug;17(8):424-32.
- Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M ve diğ. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature.* 1997 Mar 27;386(6623):399-402.
- Soto-Gutierrez A, Wertheim JA, Ott HC ve diğ. Perspectives on whole-organ assembly: moving toward transplantation on demand. *J Clin Invest.* 2012 Nov;122(11):3817-23.
- Soto-Gutierrez A, Zhang L, Medberry C ve diğ. A whole-organ regenerative medicine approach for liver replacement. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Jun;17(6):677-86.
- Spence JR, Lange AW, Lin SC ve diğ. Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell.* 2009 Jul;17(1):62-74.
- Stoffers DA, Thomas MK, Habener JF. Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression. *Trends Endocrinol Metab.* 1997 May-Jun;8(4):145-51.
- Suzuki Y, Taga H, Ishizuka H ve diğ. Immunohistochemical study of alpha-fetoprotein in rat embryos during ontogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1983;417:224-39.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M ve diğ. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from Mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76
- Tallone T, Realini C, Böhmeler A ve diğ. Adult Human Adipose Tissue Contains Several Types Of Multipotent Cells. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011 Apr;4(2):200-10.
- Tang XL, Xiao R, Wang YX ve diğ. Neurogenin 3 and Paired box gene 4 promote PDX1-induced differentiation of mesenchymal stem cells into pancreatic secretory cells. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2011 Jun 18;43(3):421-6.
- Thakkar UG, Trivedi HL, Vanikar AV ve diğ. Insulin-secreting adipose-derived mesenchymal stromal cells with bone marrow-derived hematopoietic stem cells from autologous and allogenic sources for type 1 diabetes mellitus. *Cytotherapy.* 2015 Jul;17(7):940-7.
- Thanasegaran S, Cheng Z, Ito S ve diğ. No immunogenicity of IPS cells in syngeneic host studied by in vivo injection and 3D scaffold experiments. *Biomed Res Int.* 2013;2013:378207.
- Thomas FT, Contreras JL, Bilbao G ve diğ. Anoikis, extracellular matrix, and apoptosis factors in isolated cell transplantation. *Surgery.* 1999 Aug;126(2):299-304.
- Thorsdottir I, Ramel A. Dietary intake of 10- to 16-year-old children and adolescents in central and northern Europe and association with the incidence of type 1 diabetes. *Ann Nutr Metab.* 2003;47(6):267-75.

- Ueda H, Howson JM, Esposito L ve diğ. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003 May 29;423(6939):506-11.
- Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H ve diğ. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*. 2010 Jul;16(7):814-20.
- Van Deijnen JH, Hulstaert CE, Wolters GH ve diğ. Significance of the peri-insular extracellular matrix for islet isolation from the pancreas of rat, dog, pig, and man. *Cell Tissue Res*. 1992 Jan;267(1):139-46.
- Van Deijnen JH, Van Suylichem PT, Wolters GH ve diğ. Distribution of collagens type I, type III and type V in the pancreas of rat, dog, pig and man. *Cell Tissue Res*. 1994 Jul;277(1):115-21.
- Van den Driessche A, Eenkhoorn V, Van Gaal L ve diğ. Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review. *Neth J Med*. 2009 Dec;67(11):376-87.
- Virtanen I, Banerjee M, Palgi J ve diğ. Blood vessels of human islets of Langerhans are surrounded by a double basement membrane. *Diabetologia*. 2008 Jul;51(7):1181-91.
- Waeber G, Thompson N, Nicod P ve diğ. Transcriptional activation of the GLUT2 gene by the IPF-1/STF-1/IDX-1 homeobox factor. *Mol Endocrinol*. 1996 Nov;10(11):1327-34.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A ve diğ. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 Nov;33(11):1402-16.
- Wang J, Elghazi L, Parker SE ve diğ. The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol*. 2004 Feb 1;266(1):178-89.
- Wang R, Li J, Lyte K ve diğ. Role for beta1 integrin and its associated alpha3, alpha5, and alpha6 subunits in development of the human fetal pancreas. *Diabetes*. 2005 Jul;54(7):2080-9.
- Wang RN, Paraskevas S, Rosenberg L. Characterization of integrin expression in islets isolated from hamster, canine, porcine, and human pancreas. *J Histochem Cytochem*. 1999 Apr;47(4):499-506.
- Wang RN, Rosenberg L. Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship. *J Endocrinol*. 1999 Nov;163(2):181-90.
- Watada H, Kajimoto Y, Kaneto H ve diğ. Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996(a) Dec 24;229(3):746-51.
- Watada H, Kajimoto Y, Miyagawa J ve diğ. PDX-1 induces insulin and glucokinase gene expressions in alphaTC1 clone 6 cells in the presence of betacellulin. *Diabetes*. 1996(b) Dec;45(12):1826-31.
- Watson CJ. The current challenges for pancreas transplantation for diabetes mellitus. *Pharmacol Res*. 2015 Aug;98:45-51.
- Weber LM, Hayda KN, Anseth KS. Cell-matrix interactions improve beta-cell survival and insulin secretion in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A*. 2008 Dec;14(12):1959-68.
- Wong RS. Extrinsic factors involved in the differentiation of stem cells into insulin-producing cells: an overview. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:406182.
- Xu X, D'Hoker J, Stangé G ve diğ. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*. 2008 Jan 25;132(2):197-207.
- Yi HS, Jeong WI. Interaction of hepatic stellate cells with diverse types of immune cells: foe or friend? *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Aug;28 Suppl 1:99-104.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K ve diğ. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20

Zhao Y, Mazzone T. Human Cord Blood Stem Cells And The Journey To A Cure For Type 1 Diabetes. *Autoimmun Rev*. 2010 Dec;10(2):103-7

Zhou Q, Brown J, Kanarek A ve diğ. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2008 Oct 2;455(7213):627-32.



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Ahmet ÖZTÜRK

Doğum yeri ve tarihi: Vakfikebir/TRABZON 20/08/1991

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi

İletişim adresi: Serdar Mah. İstanbul Karayolu Cad. Barbaros Apt. No:154 Daire:12
izmit/KOCAELİ

Telefon: 0505 821 80 35

E-posta adresi: ahmet.ztrk@windowslive.com

Eğitimi (tarih sırasına göre):

09/2013-Devam ediyor

Yüksek Lisans

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı-
Kocaeli/TÜRKİYE

10/2009-06/2013

Lisans

Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Erzurum/TÜRKİYE

11/2008-06/2009

Lise

Onur Ateş Anadolu Lisesi, Samsun/TÜRKİYE

Mesleki Deneyimi

03/2016- Devam ediyor

Araştırma Görevlisi

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı- Kocaeli/TÜRKİYE

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Derneği

Bilimsel Etkinlikler

Aldığı burslar

Metastatik Osteosarkom Hayvan Modelinde Bmp2 Salgılayan Mezenkimal Kök Hücrelerin İntravenöz Uygulama Sonrası Vücutta Dağılımı Ve Osteosarkom Hücrelerinin Diferansiasyon Ve Çoğalmaları Üzerine Etkileri (TÜBİTAK, Proje No: 113S728).

Genetik Absans Epilepsili WAG/Rij Sıçanlarda Kardiyovasküler Değişiklikler Üzerinde Kök Hücre Tedavisi ve Klasik Tedavinin Etkilerinin Araştırılması Projeleri (TÜBİTAK, Proje No: 114S481).

Yayınlar

Ozturk A, Duruksu G. European Biotechnology Congress Location: Bucharest, ROMANIA Date: MAY 07-09, 2015 JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY Volume: 208 Supplement: S Pages: S119-S119 Published: AUG 20 2015 (Abstract).

Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Poster Bildirileri

Ozturk A, Duruksu G. Development of Insulin Producing Tissue by Recellularization of Whole Liver with MafA+/Pax4+ Pancreatic Islet Stem Cells (PIMSCs) (European Biotechnology Congress), 07-09 May 2014, Bucharest/ROMANIA.

Ozturk A, Duruksu G, Baglar A, Yazir Y. Decellularized Liver Protein Matrix Enhances the Differentiation Potential of Pancreatic Islet Stem Cells into Beta-like Cells (TERMİS-EU), 28 June-1 July 2016, Uppsala/SWEDEN



EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Formu



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2015/41	ARAŞTIRMANIN ADI	Pankreas Adacık kaynaklı MafA+/Pax4+ Kök Hücrelerin Kullanılmasıyla Desellülerize Karaciğer Doku İskelesinin İnsülin Salgılayan Doku Parçasına Dönüştürülmesi
	BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU /KOU KÖGEM

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	x
------------------------------	--------------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararna varılmıştır.	
	KARAR NO: KOU HADYEK 11/4 -2015	KARAR TARİHİ: 12 .11.2015

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOU Deney Hayvanları Araştırma Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input checked="" type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

EK 2. Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program,yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak çizimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

11/07/2016

Yrd Doç. Dr.Gökhan Duruksu

