

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TABAKASI İLE
BİRLİKTE 3-BOYUTLU ADACIK DOKUSUNUN SUBKUTAN NAKLİNİN
DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan Büşra ÖNCEL DUMAN

T.C
Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilemesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TABAKASI İLE
BİRLİKTE 3-BOYUTLU ADACIK DOKUSUNUN SUBKUTAN NAKLİNİN
DİYABETİK SIÇAN MODELİNDE ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Hazırlayan Büşra ÖNCEL DUMAN

T.C
Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilemesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

Danışman
Yrd.Doç.Dr. Ayla EKER SARIBOYACI

Destekleyen Kurum
Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

KOCAELİ
2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)




Tez adı: *Kenik iliği kapaklı mezenkimal kök hücre Tobakası ile Birlikte 3-Boyutlu Abakak Dokusunun Sektör Naklinin Diyabetik Sıçan Modelinde Etkinliğinin Araştırılması*

Tez yazarı: *Büşra Öncel Duman*

Tez savunma tarihi: *01.07.2014*

Tez Danışmanı: *Yard. Doç. Dr. Ayla Eker Sarıboyacı*

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

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Üye	<i>Prof. Dr. Erdal KARAÖZ</i>	
Üye	<i>Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI</i>	
Üye	<i>Yard. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI</i>	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

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

Prof. Dr. Tuncay Çolak
Enstitü Müdürü

Tezimi kök hücre çalışmalarından umut bekleyen tüm Tip 1 Diyabet hasta ve hasta yakınlarına atfediyorum...

ÖZET

Vücudumuzdaki hasarlı ya da kayıp doku ve organların onarımını hedefleyen doku mühendisliği, heyecan verici yaklaşımlarıyla yakın bir gelecekte insanoğlunun yaşam kalitesinin artırılmasına damgasını vuracağına benzemektedir. İnsanlardaki pek çok hastalık için bir tedavi stratejisi olarak ortaya çıkan hücre esaslı tedavinin amacı, hasar gören bir dokunun veya organın biyolojik işlevini yerine koymak, tamir etmek veya arttırmaktır. Bir hedef organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek kadar sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle, bu amaca ulaşılabilir.

Doku oluşumunda en son yaklaşım, hücreleri tek tek kullanmak yerine, in vivo ortamdakini taklit etmek amacıyla, hücreleri tabakalar halinde kullanarak dokuyu oluşturmaktır. Biyolojik ortamda parçalanıp yok olan biyo-bozunur polimerler, birinci nesil doku mühendisliği için anahtar rol oynarken; ikinci nesil doku mühendisliği için hücrelerin tabaka halinde üretimini sağlayan sıcaklık-duyarlı polimerler anahtar rol oynamaktadır.

Otoimmün bir hastalık olan tip 1 diyabet, pankreatik langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin tahribatı ile ortaya çıkmaktadır. Günümüze kadar, β -hücrelerinin yerine konmasını amaçlayan üç farklı strateji geliştirilmiştir; pankreas, adacık ve hücre transplantasyonu. Halen adacık hücrelerinin transplantasyonu için tercih edilen organ, karaciğerdir. Ancak immün problemler ve graft başarısızlığı ile sonuçlanır ve alıcıların büyük kısmını insülin bağımsız durumdan tekrar insülin bağımlı hale getirir. Adacık transplantasyonunun uzun ömürlü olması için çeşitli yöntemler konusunda çalışmalar sürmektedir. Bunlar arasında biyomühendislik yaklaşımları da kullanılarak adacık hücre tabakaları oluşturulup fonksiyonel adacık sistemleri inşa edilmesi ve bu sistemlerin ekstra hepatik alanlara transferi de yer almıştır. Örneğin subrenal, subkutan ve abdominal bölge transferleri gibi. Bu 3-B hücre tabakalarının, subkutan bölgede daha etkili bir şekilde varlığını sürdürdüğü rapor edilmiştir.

Bu nedenle biz de yaptığımız çalışmamızda, sıçandan izole ettiğimiz kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri (Kİ-MKH) ve β -hücrelerini, invitro sıcaklık-duyarlı kültür kapları [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm] üzerinde kültür ederek oluşturduğumuz 3-Boyutlu Beta Hücre Dokusunu, diyabetik sıçanların subkutan bölgesine transfer ederek “ekstra hepatik fonksiyonel bir adacık dokusu” inşa etmeyi ve MKH kullanımının buna etkisini analiz etmeyi amaçladık. Bu sayede biyomühendislik yöntemleri kullanarak oluşturduğumuz bu 3-Boyutlu Beta Hücre Tabakasının, diyabetik sıçanlarda normal glisemik indeksi sağlayıp sağlamadığını göstermeyi hedefledik. Ek olarak yeni inşa edilmiş bir adacık dokusu olarak bu 3-Boyutlu Beta Hücre Tabakasının, subkutan dokuya engrafman yapma ve devamlı fonksiyon gösterebilme yeteneğinde olup olmayacağını da saptamayı düşündük.

Anahtar Kelimeler: beta hücre, hücre-tabaka mühendisliği, kök hücre, tip 1 diyabet, PIPAAm.

ABSTRACT

Tissue engineering, which aims to repair and reconstruction of injured or lost organs, will most likely have an impact of increasing life quality of humans with exciting approaches. Cell based therapies emerge as an alternate strategy for many diseases which are targeting to repair, replace or increase function of an injured tissue or organ. This aim is accomplished via transferring enough number of defined cells at a certain quality to the targeted organ.

Latest approach of tissue generating is to construct cell layers instead of single cells in order to mimic in vivo environment better. Biopolymers, which are degraded and eliminated in vivo were the keys of first generation tissue engineering while temperature-responsive polymers, which allow formation of cell layers became the second generation. Temperature-responsive polymers are covalently grafted onto the dishes, allowing various types of cells to adhere and proliferate at 37°C. The cells spontaneously detach when the temperature is reduced below 32°C without the need for proteolytic enzymes.

Type I diabetes, which is an autoimmune disease emerges with the destruction of beta cells of pancreatic Langerhans islets. Three different therapeutical approaches were developed so far; pancreas transplantation, islet transplantation (allogenic and xenotransplantations) and cell based therapies (cell replacement and neogenesis). Liver is the preferable organ for islet transplantation. Therefore transplanting islets into the portal vascular system of liver is among major clinical treatments of type I diabetes. However immune rejections resulting with graft failure turns most of the receivers back to the insulin dependent patients.

Different strategies are still under development in order to increase longevity of transplants. Building functional islet systems via constructing beta cell layers using bioengineering approaches and transplanting these structures into the hepatic areas such as subrenal, subcutaneous and abdominal areas is among these strategies. These 3D cell layers were reported to last longer at the subcutaneous areas.

We first planned to construct 'functional 3D extra hepatic islet constructs' using bioengineering approaches and transplant the constructs into the subcutaneous areas of diabetic rats. In order to do this we will co-culture rat bone marrow isolated mesenchymal stem cells (rBM-MSCs) with pancreatic β cells on in vitro temperature-responsive culture dishes [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm]. Our aims in this study are to evaluate the effects of MSCs on this 3D constructs and to determine the efficiency of the system on amelioration of glysemic index of diabetic rats. We also aimed to evaluate engraftment of this new 3D beta cell constructs and their ability to function continuously.

Keywords: beta cell, cell sheet engineering, stem cell, type 1 diabetes PIPAAm.

TEŞEKKÜR

Tezim ve yüksek lisans çalışmalarım boyunca her sıkıntımı çözmem için bana yardımcı olan **Sayın Prof. Dr. Erdal Karaöz'e,**

Bugünlere gelmemde emeğinin büyük olduğunu düşündüğüm ve çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenerek, bana destek olan, tez konumun belirlenmesinde, çalışmamın planlanmasında ve sonuçlandırılmasında bilimsel ve manevi katkılarını esirgemeyen **Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayla Eker Sarıboyacı'ya,**

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Hocalarım **Sayın Yrd. Doç. Dr. Gülçin Gacar, Yrd. Doç. Dr. Gökhan Duruksu'ya,** ve çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sevgili **Dr. Ayça Aksoy, Tıbbi Lab. Teknisyeni Alparslan Okçu ve Bio. Gülay Erman'a,**

Uzmanlık eğitimim boyunca, birlikte büyük özveri ile nice zorluklar içinde çalıştığımız anabilim dalındaki değerli arkadaşlarım **Arş. Gör. Çiğdem İnci, Arş. Gör. Ayşegül Bağlar ve Bio. Cansu Subaşı'na,**

Verilerimin istatistiksel analizinin yapılmasında ve in vivo çalışmalarımda yanımda olan **Uzm. Zehra Seda Halbutoğulları ve Uzm. Özlem Sağlam'a,**

Tez çalışmalarım boyunca örneklerimin kesit alma aşamasında desteklerini esirgemeyen Osmangazi Üniversitesi Patoloji laboratuvarları şefi **Biyolog Yücel Okatalı'ya**

Deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için, maddi destek sağlayan **Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,**

Zorlu ve yıpratıcı bir süreç olan uzmanlık eğitimini sürekli desteği ile katlanabilir kılan ve her günüme ayrı bir renk katan sevgili eşim **Mehmet Gürkan Duman'a,**

Hayatımdaki tüm sıkıntılara karşı her zaman bana destek olan, bir işi başarabileceğimden bir an olsun şüphe etmeyen **annem, babam ve kardeşime**

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
İTHAF SAYFASI.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kök Hücreler	3
2.2. Kök Hücrele çeşitleri.....	5
2.2.1. Embriyonik Kök Hücre (EKH)	5
2.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	7
2.3. Tip 1 Diyabet.....	11
2.3.1. Epidemiyoloji.....	12
2.3.2. Otoimmunité	12
2.4. Doku Mühendisliği.....	13
2.4.1. Hücre Tabaka(Cell Sheet) Mühendisliği.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Hayvanlar	26
3.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (sKİ-MKH'lerin) İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu.....	27
3.2.1. sKİ-MKH'leri İzolasyonu ve Kültüre Hazırlanması.....	27
3.2.2. sKİ-MKH'lerin Karakterizasyonu	28
3.3. sKİ—MKH'lerin GFP ile işaretleme	31
3.3.1. Plazmid DNA İzolasyonu	31
3.3.2. GFP Gen Transformasyonu.....	31
3.4. Beta Hücrelerinin Kültür ve Karakterizasyonu	32
3.4.1. Sıcaklık Duyarlı Kültür Kaplarında Enzimsiz Kültürün Beta Hücreleri Üzerine Etkilerinin Hücre Canlılık ve Proliferasyon Analizi ile Belirlenmesi.....	32
3.4.2. Isı Değişimine Duyarlı Kültür Kabında Beta Hücre Kültürü.....	34
3.5. Sıçanlarda STZ ile Diyabetin İndüklenmesi ve Diyabetik Hayvan Modelinin Oluşturulması	35

3.6. Nakil İçin Sıçanlara Anestezi Uygulanması ve Hücre Tabakalarının Nakli	36
3.6.1. sKİ-MKH tabakalarının ve Beta hücrelerinin bir araya getirilmesi ve 3-boyutlu doku oluşturularak diyabetik hayvanlara transplantasyonu.....	36
3.6.2. Anestezi.....	38
3.6.3. Deri altı(Subkutan) Nakil.....	38
3.7. Transfer edilen dokunun Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	40
3.7.1. Tokluk Kan Şekeri Ölçümü	40
3.7.2. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi	40
3.7.3. Deri altı dokunun çıkarılması.....	41
3.8. Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler.....	41
4. BULGULAR	42
4.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu	42
4.1.1. Sıçan kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerin (sKİ-MKH) kültür ve karakterizasyonu.....	42
4.1.2. sKİ- MKH'lerin GFP ile işaretlenmesi	45
4.1.3. Beta Hücrelerinin Kültür ve Karakterizasyonu.....	45
4.2. Beta hücrelerinin ve sKİ-MKH tabakalarının nakli	50
4.2.1. sKİ-MKH tabakalarının nakli	51
4.2.2. Beta Hücrelerinin Nakli	52
4.3. Transfer Edilen Dokuların Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	52
4.3.1. Nakil Sonrası Sıçanların Ağırlık Ölçümü	52
4.3.2. Nakil Sonrası Sıçanların Tokluk Kan Şekeri Ölçümü	54
4.3.3. Nakil Sonrası 11.günde IPGTT (İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi) Uygulanması	56
4.4. Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler.....	58
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
KAYNAK.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CD:Cluster of differentiaition

CFU-F :(Colonyformingunitfibroblast)

dk:Dakika

dl:desilitre

DNA:Deoksiribonükleik asit

DM:diabetes mellitus

ESM:ekstrasellüler matriks:

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EKH:Embriyonik kök hücre

FCS:Fötal buzağı serumu

FBS:Fetal bovine serum

FITC: fluoresan izotiyosiyonat

GFP:Green flouresan protein

HLA:Human lokocyte antigen

IPGTT: Intraperitonal Glukoz Tolerans Testi

İHK: İmmunhistokimyasal

iF: İmmunfloresan

NSF:National Science Foundation

LCST:Low critic soluble temperature

L-DMEM:Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose

MEM : Minimum Essential Medium

MKH:Mezenkimal kök hücre

Mm:milmolar

ml:mililitre

PIPAAm: poly(N-isopropylacrylamide)

PDL:Periodontal ligament

P:Pasaj

PE: fikoeritrin

PBS:Phosphate Buffer Saline

PVDF: Polyvinylidene fluoride

STZ:Streptozocin

sKI-MKH:Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücresi

WST-1

μm : mikrometre

μl :mikrolitre

β -hücrelerinin:Beta hücreleri

3-B:Üç boyutlu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Embriyonik Kök Hücrelerin İn-Vitro Farklılaşmaları	6
Şekil 2.2. Mezengeneziz	9
Şekil 2.3. Tip 1 Diyabette Otoimmunité	13
Şekil 2.4. Doku Mühendisliği Teknikleri ile Hücrelerin Üretilip Yapı İskelelerine(scaffold) Ekilmesi	16
Şekil 2.5. Sıcaklık Duyarlı Kültür Kapları(PIPAAm) ile Hücrelerin Tabaka Halinde Elde Edilmesi	17
Şekil 2.6. Hücrelerin Sıcaklık Değişimi ile Enzim Kullanmadan Tabaka Olarak Kaldırılması	17
Şekil 2.7. Poly(N-İsopropylacrylamide)(PIPAAm) Kültür Kaplarının Çalışma Mekanizması	18
Şekil 2.8. Kornea Epitel Hüresinden PIPAAm kültür Kabı ile Korneal Epitel Hücre Tabakası Eldesi	19
Şekil 2.9. İnsandan İzole Edilen Periodontal Ligament Hücrelerinin Isı Duyarlı Kültür Kabında 37°C de Çoğaltıldıktan Sonra 20°C de İnkübasyonu Sonrası Hücre Tabakası Oluşturulup, Sıçan Periodontal Ligamenti Hasarlı Bölgesine Nakil Yapılması	20
Şekil 2.10. Mesaneden Alınan Düz Kas Hücrelerinden Hücre Tabakası Elde Edilerek Gastrik Flep Üzerine Yerleştirilmesi Sonucu Yeni Bir Mesane Oluşturulması	21
Şekil 2.11. Kalp Yamalarının Hücre Tabaka Teknolojisi ile Elde Edilmesi	22
Şekil 3.1. Sıçan Kİ-MKH'lerin Faz-Kontrast Mikroskopik Görünümleri	27
Şekil 3.2. Sıcaklık Duyarlı Kültür Kaplarında Hücrelerin Kültürü ve Enzim Kullanılmadan Sıcaklık Değişimi ile Kaldırılması	35
Şekil 3.3. Hücre Tabakalarının Sıcaklık Duyarlı Kaptan PVDF Destekleyici Membran İle Bir Tabaka Halinde Kaldırarak Transplantasyona Hazırlanması	37
Şekil 3.4. Beta Hücrelerinin Matrijel ile Homojenize Edilerek Nakil İçin Hazırlanması	37
Şekil 3.5. Subkutan Transplantasyon	39
Şekil 3.6. Matrijel İçerisindeki Beta Hücrelerinin Nakli	40
Şekil 4.1. Sıçan Kemik İliğinden İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Faz-Kontrast Mikroskopik Görüntüleri	42
Şekil 4.2. Sıçan Kemik İliğinden İzole Edilmiş MKH'lerin Akım Sitometri ile Analizi	43
Şekil 4.3. Sıçan Kemik İliğinden İzole Edilmiş MKH'lerin Karakteristiklerinin İmmunofloresan İşaretleme ile Analizi	44
Şekil 4.4. Sıçan Kemik İliğinden İzole Edilmiş MKH'lerin (P3) Farklılaşmaları ve Farklılaşma Sonrası İmmunofloresan ve Histokimyasal Analizleri	45

Şekil 4.5. Beta Hücre Hattına (BRIN BD 11) Ait Hücrelerin Kültürdeki Faz-Kontrast Mikroskopik Görüntüleri	46
Şekil 4.6. Beta Hücrelerinin Karakteristiklerinin İmmunofloresan İşaretleme ile Analizi	47
Şekil 4.7. Poly(N-İsopropylacrylamide) ve Polisitiren Kültür Kaplarında Kültür Edilen Beta Hücrelerinin Çoğalma ve Canlılık Kapasitesinin WST-1 Analizi ile Karşılaştırılması	48
Şekil 4.8. Polisitiren (kontrol) ve Poly(N-İsopropylacrylamide) (Deney Grubu) Kültür Kaplarında Kültür Edilen Beta Hücrelerinin Apoptoz Analizi	48
Şekil 4.9. Glukoz ile İndüklenmiş İnsülin Salgılayıcı Fonksiyon Analizi	49
Şekil 4.10. Kİ-MKH ve Beta Hücrelerinin Farklı Oranlarda Yapılmış Birlikte Kültür (Ko-Kültür) Görüntüleri	50
Şekil 4.11. Sıcaklık Duyarlı Kültür Kabında(PIPAAM) Kültür Edilen sKİ-MKH Hücre Tabakasının Taşıyıcı Membran ile Nakil İçin Hazırlanması	51
Şekil 4.12. sKİ-MKH'lerin Deri Altı Bölgesine Nakli	51
Şekil 4.13. Matrijel İçerisindeki Beta Hücrelerinin Nakil Görüntüleri	52
Şekil 4.14. Kontrol Grubu Günlere Göre Ağırlık Değişimi	53
Şekil 4.15. STZ'li Kontrol Grubu Günlere Göre Ağırlık Değişimi	53
Şekil 4.16. Beta Hücreleri Nakledilmiş STZ'li Sıçan Grubu Günlere Göre Ağırlık Değişimi	54
Şekil 4.17. Beta Hücreleri ve MKH nakledilmiş STZ'li Sıçan Grubu Günlere Göre Ağırlık Değişimi	54
Şekil 4.18. Nakil Gruplarında Günlere Göre Kan Glukozu Grafiği	56
Şekil 4.19. Nakil Sonrası 11. Günde Yapılan IPGTT Uygulamasının Analiz Grafiği	57
Şekil 4.20. Beta Hücre Nakli ve Beta-MKH Nakli Yapılan Gruplarda Deri Greftinin İmmunofloresan Antikor ile Boyanma Görüntüleri	59
Şekil 4.21. Deri Greftlerinde Damar Oluşumunun ve Beta Hücre Apoptozunun İmmunofloresan Boyama ile Gösterilmesi	60
Şekil 4.22. Deri greftinde Beta-MKH grubunda MKH'lerin Salgıladıkları Sitokinler Olan TGF β ve IL-6 Boyanması	60
Şekil 4.23. TGF β Sitokini Salgılayan MKH'lerin Greft Bölgesinde Gösterilmesi	61
Şekil 4.24. Hücre Tabakası Halinde Nakledilmiş MKH Tabakasının Deri Greftinde Nakil Bölgesindeki GFP Boyanması ile Gösterilmiştir	61
Şekil 4.25. GFP-MKH'lerin Tabaka Halinde Nakil Bölgesindeki Görüntüsü	62

Şekil 4.26. Matrigel İçerinde Nakledilen Beta Hücrelerinin Deri Altı Nakil Bölgesindeki Görüntüleri	63
Şekil 4.27. Nakil Bölgesindeki Greftin H-E Boyanmış Görüntüsü	64
Şekil 4.28. Nakil Bölgesindeki Beta Nakli Yapılan Greftin IF Boyanmış Görüntüsü	64
Şekil 4.29. Dört farklı Deney Grubunun Pankreas Adacıklarının IF Boyama Görüntüleri	65

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vücudumuzdaki hasarlı ya da kayıp organ ve dokuların onarımı ya da yeniden yapılandırılmasını hedefleyen doku mühendisliği, heyecan verici yaklaşımlarıyla yakın bir gelecekte insanoğlunun yaşam kalitesinin artırılmasına damgasını vuracağı benziyor. İşte bu yaklaşımların en sonuncusu, sıcaklığa duyarlı doku kültür kaplarında **hücreleri tabaka halinde üretmek** ve bu tabakaları uygun düzende birleştirerek doku oluşumunu gerçekleştirmektir. Mesane, kalp dokusu, diş çevre dokusu ve göz yüzeyleri gibi yumuşak doku ve organlar, hücre tabakalarının başarılı uygulama alanlarıdır.

Günümüze kadar, β -hücrelerinin yerine konmasını amaçlayan üç farklı strateji geliştirilmiştir; pankreas, adacık ve hücre transplantasyonu. Halen adacık hücrelerinin transplantasyonu için tercih edilen organ, karaciğerdir. Ancak immun problemler ve graft başarısızlığı ile sonuçlanır ve alıcıların büyük kısmını insülin bağımsız durumdan tekrar insülin bağımlı hale getirir. Adacık transplantasyonunun uzun ömürlü olması için çeşitli yöntemler konusunda çalışmalar sürmektedir. Bunlar arasında biyomühendislik yaklaşımları da kullanılarak adacık hücre tabakaları oluşturulup fonksiyonel adacık sistemleri inşa edilmesi ve bu sistemlerin ekstra hepatik alanlara transferi de yer almıştır. Örneğin subrenal, subkutan ve abdominal bölge transferleri gibi.(Okano, 2011). Bu 3-B hücre tabakalarının, subkutan bölgede daha etkili bir şekilde varlığını sürdürdüğü rapor edilmiştir.

Bu çalışmada Tip1 Diyabetin tedavisine alternatif olarak hücre-tabaka mühendisliği kullanılmıştır. Dolayısıyla diyabetin tedavisi için umut verici bir yöntemi kullanacağımız bu çalışmamızın sonuçları bu konuyla ilgili bilimsel veriye önemli bir katkı sağlayacağını öngörmekteyiz. Hazır satın alınan beta hücre hattı matrijel ile homojenize edilmiş, sıçandan izole edilen Kİ-MKH ise sıcaklık invitro sıcaklık-duyarlı kültür kapları [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm] üzerinde kültür edilerek oluşturulmuştur. Bu iki farklı hücre İn vitroda çoğalılıp STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanların sırtına nakledilerek bu bölgede bir adacık dokusu oluşturulması hedeflenmiştir. Bu sayede diyabetik halde olan sıçanlarda normal glisemik indeksin sağlanıp sağlanamayacağı gösterilmesi amaçlanmıştır. MKH kullanımının ise nakil dokusunun subkutan dokuya uzun süre tutunma ve devamlı fonksiyon gösterebilme yeteneğinde olup olmayacağını da saptanmaya çalışılmıştır. Bu sayede 3-B yapıya getirilip subkutan hücre implantları olarak çok az invazif bir yöntemle hastaya nakledilebilir duruma getirilip klinik olarak test edilebilecek hale gelecektir.

- Ayrıca bu yöntem sayesinde hücre kaynağı olarak kullanılacak hücrelerin hepsi değer kazanacaktır. Çünkü yöntem hangi hücre olursa olsun o hücrenin en fonksiyonel ve doğru korunmuş şekilde nakline izin verebilen bir yöntemdir. Hücre kaynağı ister insandan izole edilmiş matür beta hücreleri olsun ister herhangi bir invitro ortamda kök hücreden farklılaştırılarak üretilmiş beta hücreleri olsun hepsinin oldukça verimli bir şekilde naklini sağlayabilecektir.
- Yöntemin hücre naklinin kalitesini arttıran bir başka yönü ise nakledilen dokunun çok daha uzun süre fonksiyonunu ve canlılığını devam ettirebilmesi ve engrafman oranının yüksek olmasıdır.
- Ayrıca nakil yöntemine eklediğimiz ve daha önce hiç çalışılmamış olan bir basamak olan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre tabakasını, beta hücre tabakalarına ilave etmeyi planladığımız yöntem yine nakil yapılan hücrelerin canlılığı, proliferasyonu ve engrafmanını olumlu yönde değiştirerek çok daha uzun süre normal glisemik indeksin devam edebileceğini öngörmekteyiz.
- Şayet yapılacak deneyler sonucunda kullanacağımız hücre tabakalandırma ve sonucunda ekstrahepatik 3-B fonksiyonel adacık dokusu tekniği ile diyabetik hayvanlarda uzun süren normal bir glisemik indeks sağlayabilirsek, otoimmün bir hastalık olan tip 1 diyabetin radikal tedavisi amacıyla, şimdiye kadar denenmemiş beta hücre ve kök hücre esaslı deneysel tedavi yönteminin ilk kanıtlarını sunmuş olacağız. Dolayısıyla gelecekte, başta tip 1 olmak üzere tüm diyabet hastalarının radikal tedavisinde alternatif bir model geliştirilmiş olacaktır.
- Gerçekleştirilecek deneyler sonucunda, *in vitro* kültür koşullarında üretilen fonksiyonel olarak insülin üreten 3-B beta-hücre dokusu, diyabetik hayvanlara nakledilecektir. “Uluslararası Juvenil Diyabet Araştırma Vakfının (JDRF)” otoimmün bir hastalık olan tip I diyabetin radikal tedavisi için belirlediği yöntemlerden biri olan hücre ve kök hücre esaslı deneysel tedavi yöntemlerine katkı sağlanmış olacaktır.

Pankreas hasarlarının hücresel tedavisinin hücre-tabakalandırma yöntemiyle başarılması durumunda, halen dünyada 50’ye yakın merkezde allojenik nakil amaçlı kadavradan zaten başarıyla izole edilmekte olan adacıklar ve onlardan izole edilen beta-hücreleri, çalışmamızda olduğu gibi fonksiyonel 3-B adacık dokuları yapılarak ileride subkutan/derialtı implantlar şeklinde oldukça az invazif bir yöntemle hastaya nakledilebilecek duruma gelecektir. Çünkü hali hazırda uygulanmakta olan nakil

yönteminde nakledilecek adacık sayısı yetersiz kalmaktadır. Eğer hem 3-B’lu yapı ile hem de kök hücreler ile bu implantlar desteklenirse istenilen sayıya ulaşılabilecektir. Bu yöntemle, günümüzdeki adacık nakillerinde karşılaşılan sorunların çözümüne katkı sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücreler

Farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip hücrelerdir. 1960’lı yıllarda Kanada’lı bilim adamları Ernest A. McCulloch ve James E. Till yaptıkları çalışmayla insan kök hücreleri alanındaki çalışmalara öncü olmuşlardır.

Kök hücrelerin özellikleri;

- Uzun süre bölünebilmeli ve kendini yenileyebilmelidir.
- Farklılaşmamış olmalıdır.
- Özelleşmiş hücelere dönüşebilmelidir.

Bölünme ve farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler, üç çeşittir:

- Totipotent
- Pluripotent
- Multipotent.

Kök hücreleri, kendini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücelere farklılaşabilen, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun şartlar sağlandığında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran iki temel özellik bulunmaktadır;

Bölünüp, çoğalabilme (proliferasyon) ve kendini yenileyebilme (rejenerasyon): Tekli hücrelerden elden edilen embriyonik kök hücrelerinin 300-400 döngü boyunca çoğalabildikleri gösterilmiştir. Sonuçta meydana gelen hücrelerin özelleşmediği ve bu nedenle de bu hücrelerin uzun dönemde kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir. Hücrelerin bölünme kapasitelerini kromozomların uç kısmında bulunan ve “telomer” denilen DNA zincirleri belirler. Telomerler ne kadar uzunsa hücreler o kadar çok bölünebilirler. (Sudheer 2008). Telomerlerin uzun kalmasını sağlayan da “telomeraz enzimi” dir. Bir hücrede telomeraz enzimi ne kadar aktif ise telomer uzunluğu da o kadar

korunabilir. Kök hücreler çok yoğun telomeraz enzim aktivitesinden dolayı çok sayıda bölünebilirler.

Farklılaşabilme: İnsan ve memeli hayvanlardaki kök hücreleri birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunlar;

A-Totipotent: Tam bir bireyi oluşturabilecek kapasiteye sahip olan bu hücreler, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahiptir. Bu hücreler embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanmaktadır. Bu terim embriyonun 5. Gününe kadarki tüm blastomerler için geçerlidir (erken embriyonik dönem). Döllenen yumurta tek bir hücre olmakla birlikte, vücut sistemlerini meydana getirecek bütün hücreler bu tek hücreden çoğalırlar. Bu döllenmiş yumurta hücresine totipotent hücre denir. Totipotent kelime anlamı olarak her şey olma potansiyeline sahip anlamına gelmektedir. Döllenen birkaç saat sonra bu totipotent hücre iki eşit parçaya bölünür. Bu iki totipotent hücreden birisi alınıp uterusu implante edilirse, canlı gelişimi devam eder. Genetik olarak aynı olan tek yumurta ikizleri de bu şekilde oluşmaktadır. İki totipotent hücre bilinmeyen sebeplerle birbirinden ayrılıp, her ikisi tek başına gelişebilmektedir. (Sudheer 2008).

B-Pluripotent: Embriyonik gelişimde üç germ tabakasından köken alan ve yaklaşık 200 çeşit hücreye dönüşebilen hücrelerdir. Pluripotent hücreler, organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynaklık etmesine rağmen, yeni bir birey oluşturamazlar. Döllenenin 5. gününden itibaren ve birkaç hücre bölünmesinden sonra totipotent hücreler farklılaşmaya başlayarak blastosist denilen içi boş bir küreye dönüşürler. Blastosistte iki tip hücre vardır; biri dış tabaka (ektoderm), diğeri ise iç tabaka (endoderm) dir. Blastosistin dış tabakasından (throphoblast), yavrunun beslenmesi ve solunumunu sağlayacak plasenta ve koruyucu chorion kesesi gelişir. Blastosistin iç hücre tabakasından (nodus embriyonalis) göz, kalp, beyin, kaslar, kemikler vs gibi doku ve organlar gelişir. Ancak; bunun için endoderm ve ektodermin bir arada çalışması gerekir. Tek başına endodermden hiçbir canlı gelişemez. Blastosistin iç tabakasındaki hücre kümesi pluripotent'dir. Buradaki hücreler çeşitli doku ve hücre tiplerine dönüşebilirler. Pluripotent hücreler totipotent olmadığından plasenta oluşamaz ve dolayısı ile de canlı gelişimi olmaz. Blastosistin iç hücre tabakasından köken alan pluripotent kök hücrelerine embriyonik kök hücreleri (embryonic stem cell) de denilmektedir . (Sudheer 2008).

C-Multipotent: Pluripotent hücrelerden daha sınırlı sayıda hücre tipine dönüşebilen ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış hücrelerdir. Pluripotent kök hücreleri (Erişkin kök hücreler), biraz daha özelleşmiş olan multipotent kök hücrelerine dönüşürler. Kademe kademe farklılaşmalar geçiren pluripotent hücreler, daha özel hücreler haline gelirler. Örneğin; kan hücrelerini oluşturacak kök hücreleri; oksijen taşıyarak solunumda gerekli olan alyuvarlar, hastalık etkenleri ile savaşan akyuvarlar ve pıhtılaşmayı sağlayan trombositler gibi birbirinden farklı özelliklere sahip üç ana grupta farklılaşırlar. Deri kök hücreleri çeşitli tipteki deri hücrelerini, kas kök hücreleri de farklı tipteki kas dokularını meydana getirirler. İşte, bu özelliklere sahip kök hücrelerine multipotent kök hücreler denir. Sonuçta bir tek döllenen yumurtadan milyarlarca farklı hücre oluşur. Pluripotent kök hücreleri erken gelişim döneminde bulunur. Buna karşın multipotent kök hücreleri çocuklarda ve yetişkinlerde bulunabilmektedir. Örneğin insanın kemik iliğinde bulunan kan kök hücreleri hayati öneme sahiptir. Ömür boyu bu kök hücreleri çeşitli tipteki kan hücrelerine dönüşerek hayatın devamlılığını sağlarlar.(Sağsöz,2008)

Kök Hücreleri:

- Embriyonik kök hücreler
- Embriyonik olmayan kök hücreleri

Erişkin Kök Hücreleri

A.Hematopoetik Kök Hücreler

- 1.Kemik İliği Kök Hücreler
- 2.Periferik Kan Kök Hücreleri
- 3.Kordon Kanı kök Hücreler

B.Stromal Kök Hücreleri

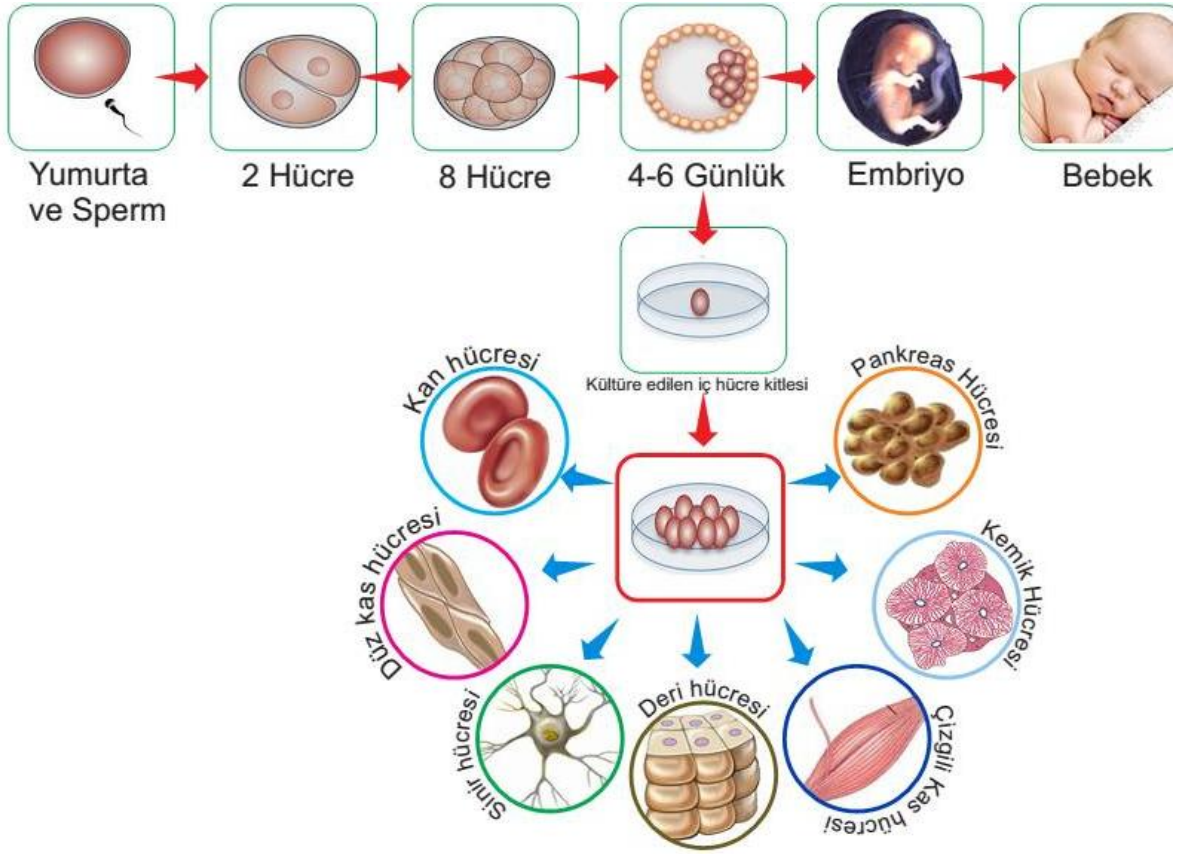
C.Organlardaki Kök Hücreler

- 1.Fötüs Kök Hücreleri
- 2.Kadavra Kök Hücreleri

2.2.Kök hücre çeşitleri

2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonik kök hücreleri: Erken dönemdeki memeli embriyosundaki kök hücrelerden elde edilmektedirler. Bu hücreler in vitro ortamda sınırsız ve farklılaşmadan çoğalma kapasitesine sahiptir ve pluripotenttirler. Embriyonik kök hücrelerin vücuttaki tüm dokulara kaynaklık edebileceği sadece farelerde tam olarak gösterilebilmiştir.(Sell,2004)



Şekil 2. 1.Embriyonik kök hücrelerin in-vitro farklılaşmaları

Birçok çalışmada insan embriyonik kök hücrelerinin in vitro ortamda farklılaştıkları gösterilmiştir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin, embriyonik doku gelişimindeki üç farklı tabakaya ait hücelere kaynaklık ettiği bildirilmiş ve embriyonik cisimler adı verilen hücre topluluklarını meydana getirdikleri gözlenmiştir. Kaufman ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada embriyonik kök hücrelerinin hematopoetik öncül hücelere farklılaşabileceği gösterilmiştir.(Kaufman 2001)

Embriyonik kök hücre serileri, sürekli çoğalabildikleri ve pluripotent özellikte olduklarından vücuttaki herhangi bir hücre tipi için yenilenebilir bir kaynak oluşturmaktadırlar. Brüstle ve ark. embriyonik kök hücre kaynaklı nöral öncül hücreleri, fetal sıçanın ventriküllerine implante etmişlerdir. Bu çalışmayla, tamamen in vitro ortamda üretilen sinir öncül hücrelerinin hücre göçüne ve farklılaşmasına rehberlik eden çevresel sinyallere cevap verebildiği ve merkezi sinir sistemindeki nöronal ve gliyal hücre serilerini tekrardan yerine koyma potansiyeline sahip olduklarını gösterilmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde embriyonik kök hücre naklinin erişkin merkezi sinir sistemindeki birincil ve ikincil demiyelinizasyon rahatsızlıklarının tedavisinde pratik bir yaklaşım olabileceği ifade edilmiştir. Embriyonik kök hücreleri, diğer vücut hücrelerine kıyasla çok

yüksek bir çekirdek-sitoplazma hacmine sahiptir ve belirgin bir pronükleus yapısı içerir. Bu hücreler, destek hücreleri üzerindeki kültürlerde üç boyutlu koloni oluştururlar. Embriyonik kök hücrelerin bir diğer önemli özelliği de, kanser hücrelerine benzer bölünebilme özelliğine sahip olmalarıdır ancak bu hücrelerden farklı olarak normal bir karyotip yapısına sahiptirler. Embriyonik kök hücreleri, ileri moleküler tanımlama teknikleri kullanılarak gösterilebilirler. İmmünolojik olarak tanımlanabilmeleri erken dönemde ekspresyon gösteren işaretleyiciler (SSEA-1, 3, 4, TRA-1-60 ve 81 vb) veya gen ürünlerinin yardımıyla (OCT-4, Alkalın Fosfataz vb.) yapılabilmektedir .(Sell,2004).

2.2.2.Embriyonik olmayan kök hücreler:

2.2.2.1.Erişkin kök hücreler (dokuya özgün kök hücre, postnatal kök hücre): Araştırmacılar henüz erişkin kök hücrelerinin embriyonik kök hücrelerinde olduğu gibi her çeşit dokuya kaynaklık edebileceği konusunda görüş birliğine varmış değildirlir. Erişkin bir kök hücreleri, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücredir. Bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Somatik kök hücre de denilen erişkin kök hücrelerinin esas görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır.

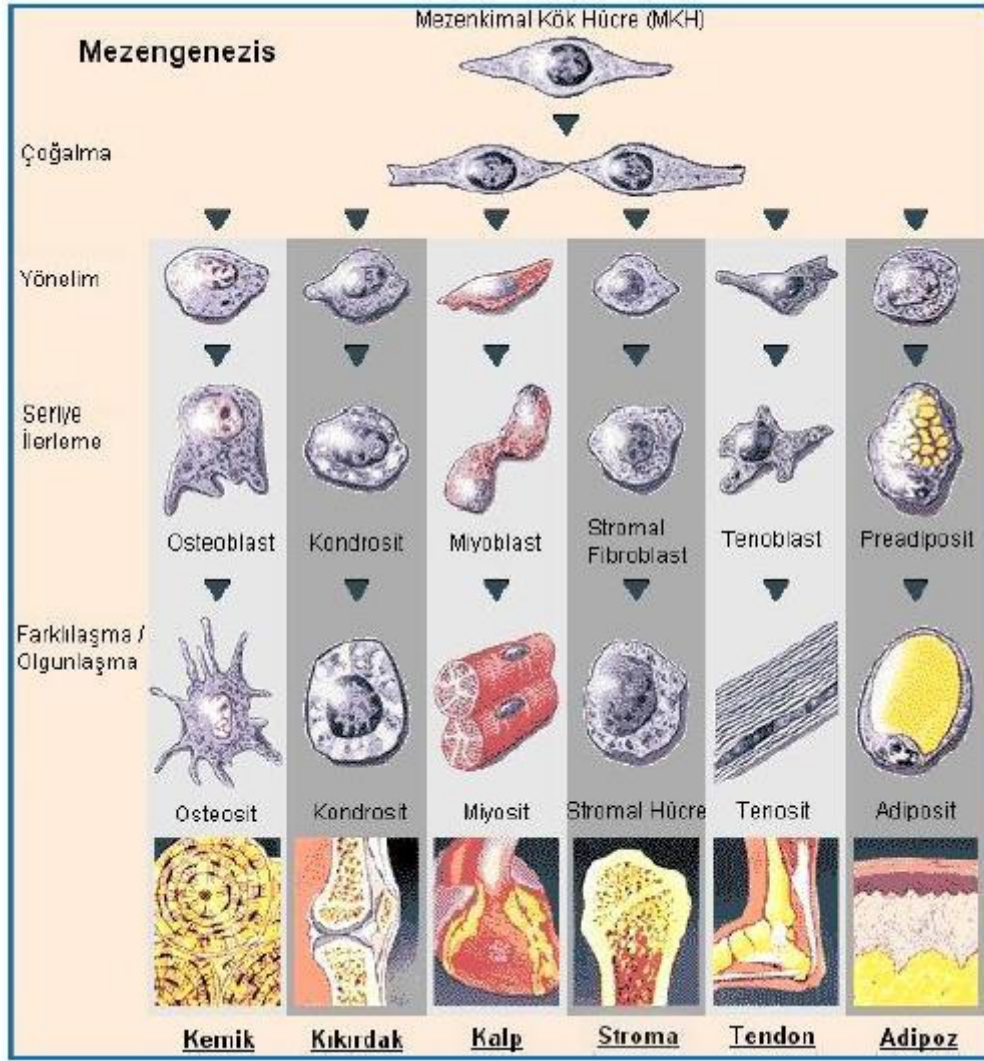
2.2.2.1.1.Hematopoetik kök hücreleri; Bu hücrelerin kaynağını kemiklerin merkezinde yerleşmiş olan kemikiliği oluşturur. Kemikiliği, hematopoetik, endotelyal ve mezenkimal kök hücrelerini de kapsayan farklı tipteki kök hücrelerini içerir. Hematopoetik kök hücreleri kanı, endotelyal kök hücreleri vasküler sistemi (arterler ve venler) ve mezenkimal kök hücreleri kemik, kıkırdak, kas, yağ ve fibroblastları oluşturmaktadır. Kemik iliği ve kanda bulunan kök hücrelerinin, kan hücreleri dışında kas, sinir, kemik, karaciğer ve damar hücrelerine de dönüşebildiği gösterilmiştir. Bu Kemikiliği stromal hücrelerine mezenkimal kök hücre de denir. Bu hücrelerin, in vitro ortamda kemik, kıkırdak, adiposit, miyosit ve kardiyomiyositlere farklılaştıkları gösterilmiştir. Kemik iliği stromal hücrelerinin, miyojenik farklılaşma ve erişkin organize kontraktıl protein oluşturduğu ve alıcı kardiyomiyositler ile gap junctionlar aracılığı ile ilişki kurduğu gösterilmiştir . Kemikiliği stromal hücrelerinin miyositler dışında endotel ve düz kas hücrelerine de farklılaştığı bildirilmiştir . (Brustle ,1997).

2.2.2.1.2.Mezenkimal Kök Hücreler; Mezenkimal kök hücreler (MKH), erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği

taşımaları, MKH'lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyelinin temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücrelerdir.

MKH'ler bağ dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücelere farklılaşabilir. Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerinde kökenini teşkil etmektedirler. Bu hücreler ilk kez Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, FCS (föetal buzağı serumu) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Yıllar sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan multipotent kök hücreler olduğu, her üç germ yaprağından köken alan hücelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur. Önceleri, CFU-F (Colonyformingunitfibroblast) ve "Kemik iliği stromalfibroblast"ları denilen bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/ stromal hücre olarak tanımlanmışlardır. CD73, CD54 (ICAM-1), CD105, CD39, CD49e ($\alpha 5$ -integrin) gibi belirteçleri ifade ederler. MKH'ler hematopoetik hücrelerin en önemli belirteci olan CD34+ ve CD45'i taşımazlar. Ek olarak MKH'ler HLA class-1'leri de taşırlar.

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, uygun mikro çevre koşullarında başta bağ doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyelidir. Caplan ve arkadaşlarının ardından çeşitli araştırmacılar in vitro koşullarda uygun uyaranlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir. İlerleyen zamanda MKH'lerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epitelooid hücelere dönüşüm olduğu gösterilmiştir. Farklılaşmanın transkripsiyon faktörlerini de içeren bir genetik kontrol mekanizması olduğu da gösterilmiştir.



Şekil 2.2:Mezengenezis.(Karaöz ve Ovalı,2004)

Yetişkin kök hücrelerin yeni hücre tedavilerinin geliştirilmesi konusunda gelecekte umut verici özelliklerinin olması dolayısıyla,mezenimal kök hücre sahasındaki araştırmacılar, bu hücrelerin tedavi amaçlı olarak kullanılmasının önünü açacak olan geniş yelpazedeki araştırmaların peşinden koşmuşlardır.

Mezenkimal kök hücrenin bir çok alanda klinik kullanım potansiyeli mevcuttur.

- kemik dokularının tamiri,
- osteoporoz,
- kıkırdak dokusu tamiri,
- dejeneratif nöron hastalıkları,
- kardiyak rejenerasyon,
- kemik iliği transpalantasyonları,
- konjenital genetik hastalıklar

bu alanların başlıcalarıdır.(Karaöz ve Ovalı,2004)

2.2.2.2.Fötal kök hücreler: 1998 yılında Gearhart ve ark.'nın çalışmaları sonucunda, 5-9 haftalık fetusun gonadal kıvrım ve mezenter bölgesindeki primordiyal germ hücrelerinin kültürlerinden elde edilmiştir. Fetustan elde edilen kök hücrelerin araştırma veya tedavide kullanımı uygun doku gruplarına ait fetus kaynaklarının oluşturulması gibi etik açıdan ciddi sorunlar doğurabilir. Ancak, kendiliğinden düşük yapmış kişilerde bu hücreler bağışlanarak araştırma ve tedavi amacıyla kullanılabilir. Gerekli fetus kaynağının az olması nedeniyle fetus kaynaklı germ hücreleri araştırmaları eski hızını kaybetmiştir. Fetustan elde edilen kök hücreler oldukça sınırlıdır (nöyral kök hücreleri, hematopoetik kök hücreler ve pankreas öncül hücreleri) . Günümüzde çeşitli kalıtsal hastalıklar fetal karaciğer kaynaklı kök hücre nakilleri ile tedavi edilmektedir .

2.2.2.3.Kadavra kök hücreleri: Araştırmacılar bu tip hücrelerden elde edilen yeni hücrelerin çoğalma hızlarının ölen kişilerin yaşıyla ters orantılı olduğunu bildirmektedir.(Sell,2004) Kök hücrelerinde bölünme şekilleri Kök hücreler, farklılaşmış hücreler oluşturmak için iki çeşit bölünme yaparlar.

1) Asimetrik bölünme (invariant ya da değişmez bölünme);

2) Simetrik bölünme (düzenleyici bölünme)

Asimetrik bölünmede kök hücre ikiye bölünerek bir kök hücre ve bir de ileride farklılaşacak olan progenitor hücre (PH) oluşturur. Bu bölünmeye bu nedenle simetrik olmayan bölünme denir. Çünkü simetrik bölünmenin Kök hücre → Kök hücre + Kök hücre şeklinde olması gerekir. Asimetrik bölünmede Kök hücre → Kök hücre + Progenitör hücre şeklinde gerçekleşir. Progenitör hücreler ileride bölünerek farklılaşmış hücrelere dönüşebilirler. Tek hücreli canlılarda ve omurgasızlarda, örneğin Drosophila yumurtalıklarında, asimetrik bölünme örnekleri görülmüştür.(Sağsöz,2008)

Simetrik bölünmede ise, Kök hücre → Kök hücre + Kök hücre ya da Kök hücre → Progenitör hücre + Progenitör hücre olacak şekilde bölünür. Kök hücre + Kök hücre mi, Progenitör hücre + Progenitör hücre mi olacağını şans belirler; fakat uygun ortalama alınır, bölünmeler sonucunda eşit sayıda kök hücre ve progenitör hücre olduğu görülür. Buna rağmen bu ikinci tip bölünmelerin sonucunda dokuda kök hücre ve progenitör hücre sayıları eşit değildir; buna “popülasyon asimetrisi” denir. Ortalama olarak eşit sayıda kök hücre ve progenitör hücre oluşmuşken dokuda kök hücre ve progenitör hücre sayılarının farklı oluşunun nedeni, doku gereksinimlerine göre kök hücre ve progenitör hücre bölünme hızlarının değişebilmesidir. Genellikle dokularda progenitör hücrelerin sayısı kök

hücrelerden çok daha fazladır. Memelilerin kendini yenileyebilen dokularının çoğu ikinci tip bölünme yapar ve popülasyon asimetrisi gösterir. Çok farklı olsalar da, bu iki bölünmede de geri kontrol (feedback) ve hücrelerarası etkileşim mekanizmaları söz konusudur. Hücre popülasyonlarının simetrik olmayışı çeşitli fizyolojik gereksinimlere yanıtı kolaylaştırır; bir yaralanmadan sonra kan ya da epidermis hücreleri gerektiğinde, daha çabuk oluşturulabilir

2.3.TİP 1 DİYABET

Tip 1 diabetes mellitus (DM) çocukluk yaş grubunda sık görülen T-hücrelerinin aracılık ettiği insülin üretiminde görev alan pankreasın beta hücrelerinin süregelen otoimmün veya otoimmün dışı nedenlerle haraplanması sonucu gelişen insülopeni ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. (Sperling,2003).Duyarlı bireylerde T ve B hücrelerinin aracılık ettiği immün sistemin anormal aktivasyonu sonucu gelişen bir insulitis tablosudur. Hastalar, mutlak veya göreceli bir insülin yetersizliği olduğundan ömür boyu insülin hormonunu dışardan (enjeksiyon yoluyla) almak zorundadırlar. Bu nedenle Tip 1 diyabet, İnsüline Bağımlı Diyabet (Insulin Dependent Diabetes Mellitus=IDDM) olarak da isimlendirilmektedir.Klinik bulgular, immünolojik bozuklukların ortaya çıkışından aylar-yıllar süren bir prodromal dönemi takiben ortaya çıkmaktadır. Diabetes mellitus (DM), pankreasın insülin sekresyonunun yetersizliği ve/veya dokuların insüline cevabının bozulmasıyla oluşan, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını etkileyen metabolik bir hastalık olup çeşitli düz kas yapılarının fonksiyonlarının bozulması DM'nin kronik komplikasyonları arasındadır. Diyabet hastaları mikro ve makro anjiyopati, ateroskleroz, konjestif kalp yetersizliği ve hipertansiyon dahil olmak üzere kardiyovasküler sistem hastalıklarına genellikle daha yatkındırlar. Kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranı diyabet hastalarında genel popülasyona göre üç kez daha yüksektir. DM'nin farmakolojik yönden tedavisi hipoglisemik ilaçlar ve insülin üzerine kurulmuştur. Bu terapötik ajanların yan etkilerinden dolayı günümüzde bitkisel ve sentetik tedavi yöntemlerine büyük bir ilgi başlamıştır .Ülkemizin çeşitli bölgelerinde diyabet tedavisi için geleneksel bitki tedavilerine başvurulduğu bilinmekte olup tıbbi bitkilerin hipoglisemik etkileri üzerinde de bilimsel çalışmalar yapılmaktadır.

Genel olarak toplumdaki diyabet vakalarının %10'unu tip 1 diyabet vakaları oluşturmaktadır. Çocukluk çağında tip 1 diyabet sıklığı ülkeler (bölgeler) arasında farklılık göstermekte ve her yıl 15 yaş altındaki 100.000 çocuktan 1-42'sinde diyabet gelişmektedir. Tip 1 diyabet genel olarak kuzey ülkelerinde daha sık görülmektedir. Otoimmunitenin

varlığına göre tip 1a ve tip 1b olarak ikiye ayrılmaktadır. İmmün kökenli Tip 1a, diyabetli olguların %90'nını oluşturur iken yine çocukluk yaş grubunda görülen otoimmün belirleyicileri negatif olan Tip 1b ise %10'luk kısmın oluşturmaktadır.(Abacı,2007)

2.3.1.Epidemiyoloji

Son 20 yıldaki epidemiyolojik çalışmalar, tip 1 DM görülme insidensinde ve prevalansında belirgin dramatik değişikliklerin ve dünya ülkeleri arasında belirgin farklılıkların olduğunu gösve dünya ülkeleri arasında belirgin farklılıkların olduğunu gösme yaşının da giderek 5 yaş altına indiği bildirilmektedir.Beş yaş civarındaki genel prevalansın 1/1430 olduğu saptanırken 16 yaşındaki prevalansın 1/360 olduğu saptanmıştır.Amerika'da, tip 1 DM prevalansının 1.7-2.5/1000 iken insidensinin 15-17/100000 arasında olduğu rapor edilmiştir. .(Abacı,2007)

Avrupa Diyabet Çalışma Grubu'nun (EURODAB) 1989-94 yılında yaptığı 44 Avrupa ve İsrail ülkesinin katıldığı çok merkezli insidens çalışmasında 15 yaş ve altında görülme insidensi 3.2/100000 olarak saptanmıştır. Çin'de ve Venazuela'da insidensi 0.1/100000 iken Sardinia'da 36.8/100000, Finlandiya'da ise 40/100000 olarak saptanmıştır. İsviçre, Norveç, Portekiz, İngiltere, Kanada ve Yeni Zelanda'daki insidensinin >20/100000 olduğu bildirilmektedir. Görülme insidensinin 10-14 yaş arası daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Türkiye'de 1996'da 19 bölgeyi kapsayan çok merkezli bir çalışmada 0-15 yaş arası diyabet insidensi 2.52/100000 olarak bulunmuştur

Dünyada, tip 1 DM'nin çocukluk yaş grubundaki artış insidensi %2.4 olarak bildirilmektedir . Tip 1 DM'nin 5 yaş altında görülme insidensinin arttığı ve bu artışın 0-4 yaş arasında %4.8-6.3 iken, 10-14 yaş arası %2.1-2.4 olduğu saptanmıştır. Tip 1 DM insidensi gerek topluluklar arasında, gerekse aynı topluluk içinde genetik ve çevresel faktörlerin etkisi nedeniyle bölgesel farklılıklar göstermektedir. .(Abacı,2007)

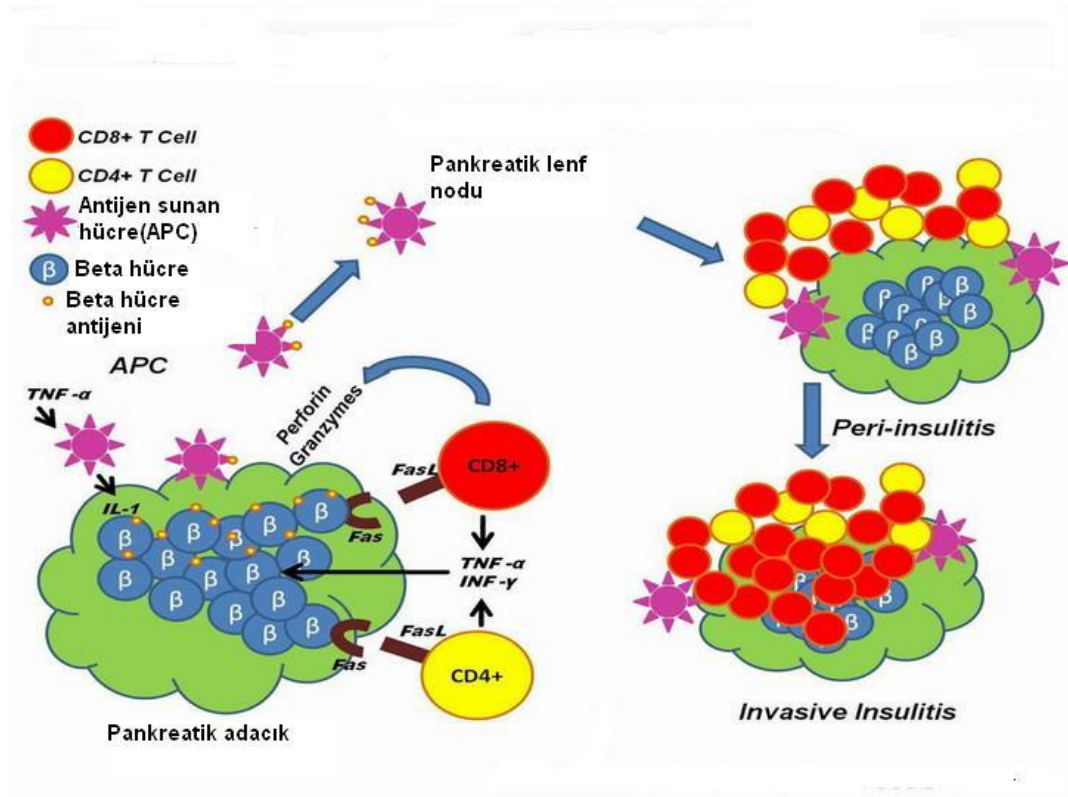
2.3.2.Otoimmunité

Genetik ve çevresel faktörler, pankreasın adacık hücreleri ne karşın otoimmün sürecin başlamasında tetikleyicidirler. Otoimmün süreç ile birlikte pankreasın adacık hücrelerinde süregelen ve yavaş progresyonlu yıkım ile birlikte insülin sekresyonu azalmaktadır. Ancak, hücreselel immün yanıtın tip 1 DM gelişimindeki rolü halen tartışmalıdır. Pankreasta ki mevcut adacık hücrelerinin %80-90'nın haraplanması durumunda diyabetin klinik bulguları ortaya çıkmaktadır . Küçük yaş grubundaki diyabetik hastalarda hiperglisemi semptomları ortaya çıktıktan sonraki ilk 3 yılda pankreatik beta

hücre yıkımı tamamlanırken, daha büyük yaş grubundaki bu sürecin 10 yılda tamamlandığı öne sürülmektedir.

Otoimmün kaynaklı tip 1 DM’de insülin sekresyonudaki azalma iki mekanizma ile olmaktadır. Bunlardan birincisi pankreasın beta hücrelerinin haraplanması iken diğer mekanizma ise ortamdaki sitokinlerin pankreasın beta hücrelerin den insülin sekresyonunu azaltmaları ile olmaktadır.

Tip 1 DM hastalarda otoimmün süreç dört fazda gerçekleşmektedir; 1-çevresel faktörlere maruziyet, 2- T hücrelerin uyarılması, 3- T hücrelerinin farklılaşması, 4- beta hücrelerinin haraplanmasıdır. .(Abacı,2007)



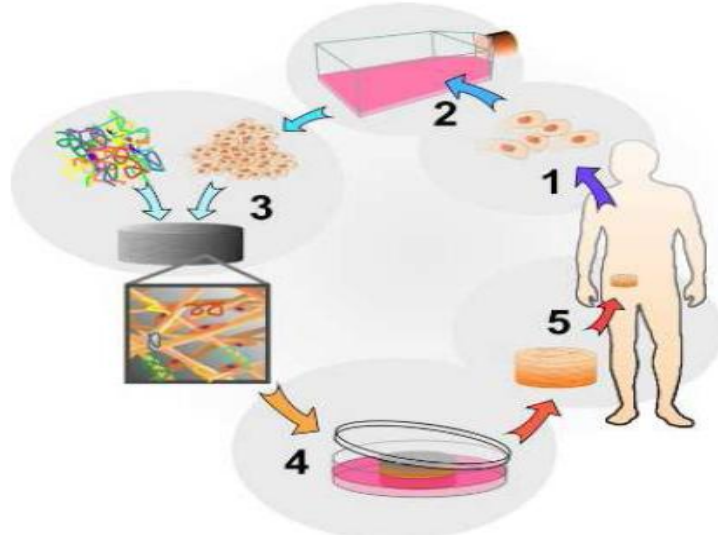
Şekil 2.3. Tip 1 diyabette otoimmünite (Kulkarni Lab)

2.4. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği” terimi ilk olarak 1987’de California Üniversitesi’nden (San Diego) Dr. Y.C. Fung tarafından NSF’nin (National Science Foundation) bir toplantısında dile getirilmiştir. Bilimsel çevrelerin “doku mühendisliği” konusuna odaklanmasında ise 2 makale çok etkili olmuştur. Bunlardan biri Nerem tarafından 1991’de “hücre mühendisliği” konusunda diğeri ise Langer ve Vacanti tarafından 1993’te Science dergisinde “doku mühendisliği” başlığı altında yayınlanmıştır.

Doku mühendisliği için değişik tanımlamalar yapılmaktadır. Ancak, en kabul gören tanım şu: Biyomalzeme, hücre ve biyosinyal moleküllerini tek başlarına veya birlikte kullanarak canlı dokuların tamiri veya yeniden yapılanması için biyoloji, kimya ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır. Bu tanıma göre doku mühendisliği için 4 yaklaşım mevcut. Birinci yaklaşım yeni dokunun oluşumu için yalnızca biyomalzeme kullanırken, “hücre nakli” olarak adlandırılan ikinci yaklaşım yalnızca hücreleri kullanarak tedaviyi gerçekleştirmeyi amaçlıyor. Hücreler, canlı dokulardan yalıtılan hücreler olabileceği gibi, genetik olarak işlem görmüş hücreler de (bu durum gen tedavisi olarak adlandırılır) olabilir. Üçüncü yaklaşım, biyomalzeme ile biyosinyal moleküllerini (yapışma ve büyüme faktörleri) kullanıyor. Dördüncü yaklaşım (ki, bu üzerinde en çok çalışılan yaklaşımdır) biyomalzeme, hücre ve biyo sinyal moleküllerinin üçünü bir arada kullanarak doku oluşturmayı hedefler.

Hücre üremesini yeni doku veya organları oluşturacak şekilde yönlendirmek ve gerekli mekanik desteği sağlamak için biyomalzemelerden 3-boyutlu doku iskeleleri (tissue scaffold) üretilir. Ayrıca gerçek doku mikroçevresindeki mekanik kuvvetlere benzer etkilerin sağlanabilmesi için çeşitli biyoreaktörler kullanılır. Dolayısıyla doku mühendisliği için 4 temel bileşenin gerekli olduğunu söyleyebiliriz: Doku iskelesi, işlevsel hücreler, biyosinyal moleküller ve dinamik kuvvetlerdir.



Şekil 2.4:Doku mühendisliği teknikleri ile hücrelerin üretilip yapı iskelelerine(scaffold) ekilmesi.

2.4.1.Hücre Tabaka(Cell Sheet) Mühendisliği

Vücudumuzdaki hasarlı ya da kayıp organ ve dokuların onarımı ya da yeniden yapılandırılmasını hedefleyen doku mühendisliği, heyecan verici yaklaşımlarıyla yakın bir gelecekte insanoğlunun yaşam kalitesinin artırılmasına damgasını vuracağı benziyor. İşte bu yaklaşımların en sonuncusu, sıcaklığa duyarlı doku kültür kaplarında **hücreleri tabaka halinde üretmek** ve bu tabakaları uygun düzende birleştirerek doku oluşumunu gerçekleştirmektir. Mesane, kalp dokusu, diş çevre dokusu ve göz yüzeyleri gibi yumuşak doku ve organlar, hücre tabakalarının başarılı uygulama alanlarıdır.(Okano,2004)

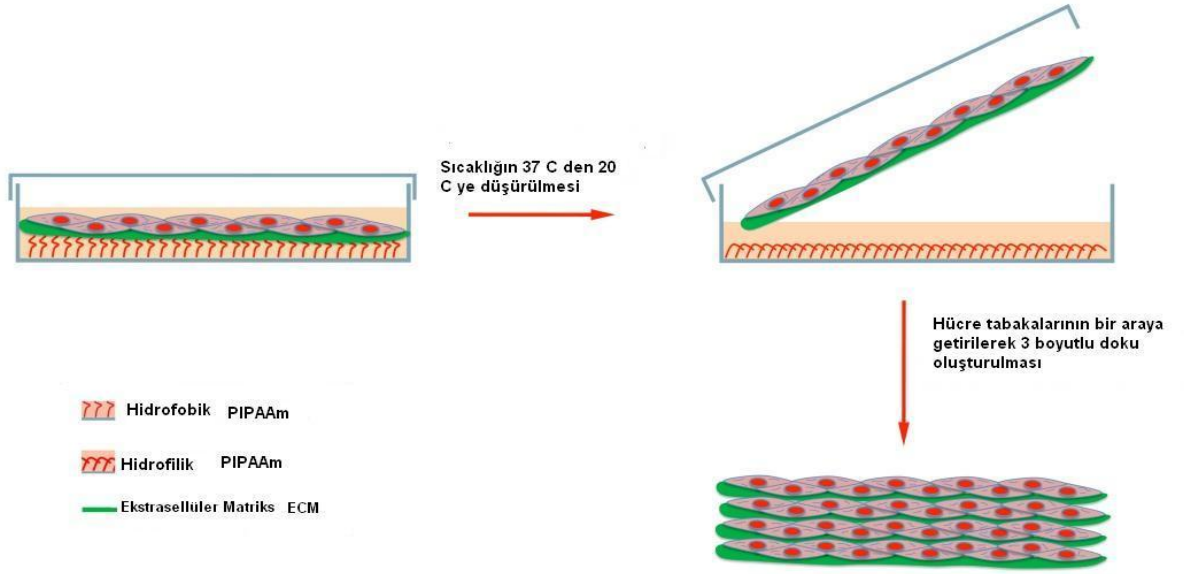
Doku mühendisliğinde çeşitli yaklaşımlar vardır. Doku hasarının küçük olduğu durumda, hastanın kendisinden ya da uygun bir vericiden izole edilen sağlıklı hücreler, hasarlı bölgeye doğrudan veya kapsüller içerisinde enjekte edilerek doku onarımı sağlanmaktadır. Küçük hasar durumundaki diğer bir yaklaşımsa, doku oluşumunu tetikleyen maddelerin, örneğin büyüme ve farklılaştırma faktörlerinin hasarlı bölgeye gönderilmesidir. Ancak, bu yaklaşımların her ikisi de ciddi kayıp veya hasar durumlarında çözüm olmaktan uzak kalmaktadır. Bu durumda, doku mühendisliğinin üçüncü ve en çarpıcı yaklaşımı ortaya çıkmaktadır. Sağlıklı hücreler, gerçek doku mikroçevresini taklit eden üç-boyutlu (3-B) bir yapı iskelesi üzerine yerleştirilmektedir (Okano 2012).Yapı iskelesi, çoğunlukla biyobozunur yapıda bir polimerden üretilmektedir ve doku hasarına uygun fiziksel ve geometrik biçimde, bilgisayar teknolojisine dayalı tekniklerle şekillendirilmektedir (Okano,2009). Ayrıca, hücre üremesi ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için, uygun faktörlerle zenginleştirilmektedir. Hücreler, yapı iskelesi üzerinde üreyip doku oluşumunu gerçekleştirirken, yapı iskelesi de parçalanıp yok olmaktadır.

Doku oluşumunda en son yaklaşım, hücreleri tek tek kullanmak yerine, in vivo ortamdakini taklit etmek amacıyla, “**hücre tabakalarını**” kullanarak doku oluşturmaktır. Bilindiği gibi, vücudumuzdaki organların tümü erken embriyonik dönemdeki üç farklı hücre tabakasının gelişimiyle oluşmuştur: endoderm, mezoderm ve ektoderm. Organ oluşumunda bu üç tabaka birbiriyle etkileşim halindedir. İlk olarak, Tokyo Kadınlar Tıp Üniversitesi’nden Okano ve grubu tarafından 2004 yılında öne sürülen “**hücre tabaka mühendisliği**”nin temeli de, yukarıdaki bu kuramsal bilgiye dayanmaktadır (Matsuda-2007). Doku hücrelerinin bir malzemeye etkileşiminde üç durum sözkonusudur. Bunlardan ilki, hücrelerin yüzeyle etkileşmediği, böylece hücre yapışmasının ve üremesinin gerçekleşmediği durumdur. Böyle malzemeler doku üretiminde kullanılamaz.

İkincisi, malzemeyle hücreler arasında fizikokimyasal etkileşimlerin olduğu ve bunun sonucunda da “geri dönüşümlü hücre yapışmasının (pasif yapışma)” gerçekleştiği durumdur. Son tür etkileşimse “aktif hücre yapışması”dır. Pasif yapışma sonrasında gerçekleşen bu olayda, hücreler malzeme yüzeyine yapışır, yayılır ve ürerler (Yang,2007). Bu yüzeylerden hücreleri koparmak için, tripsin ve dispaz gibi protein zincirlerini kıran (proteolitik) enzimler kullanmak gerekir. Bu enzimler, hücre adezyon/yapışma moleküllerini ve hücreler arasındaki matriksi (ekstrasellüler matriks:ESM) hücrelerden ayırırlar. Sonuç olarak, bu işlem sonrasında tek tek hücreler elde edilir. Tabaka halinde hücre üretebilmek için ise araştırmacılar proteolitik enzimleri kullanmadan hücreleri malzeme yüzeyinden kaldıracak yöntemleri aramışlar ve sıcaklık-duyarlı polimerlerin özelliklerini bu yönde kullanmanın mümkün olabileceğini göstermişlerdir.

Biyolojik ortamda parçalanıp yok olan “biyo- bozunur polimerler” birinci nesil doku mühendisliği için anahtar rol oynarken, ikinci nesil doku mühendisliği için, hücrelerin tabaka halinde üretimini sağlayan “sıcaklık-duyarlı polimerler” anahtar rol oynamaktadır. Araştırma sonuçlarına göre, sıcaklık-duyarlı polimerler arasında en çok poli(N-izopropil akrilamid) tercih edilmiştir (Yamato,2007). Poli (N-izopropil akrilamid), en düşük kritik çözünme sıcaklığı (LCST) olan 32°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda, yapısındaki suyu kaybederek büzülür. 32°C'nin altındaki sıcaklıklardaysa yapısına tekrar su alarak şişme özelliği gösterir. “Biyonano yüzey teknolojisi” kullanılarak, organik malzemelerin yüzeyine elektron bombardımanıya herhangi bir polimeri kaplamak mümkündür. Bu teknolojiyle polimer, nanometre kalınlığında ve pürüzsüz bir şekilde plastik malzemeler üzerine kaplanabilir. Okano ve grubu çalışmalarında, bu teknolojiyi kullanarak, polistiren doku kültür kaplarının yüzeyini poli(N-izopropilakrilamid) ile kaplamışlardır. 20 nanometre kalınlıktaki bu polimer tabakası, ortam sıcaklığında değiştirilmesiyle hücrelerin kap yüzeyine yapışmasına ve yüzeyden kopmasına izin vermiştir. 37°C'de, yani pek çok hücrenin üreyebildiği sıcaklıkta, kültür kabının yüzeyi hidrofobiktir; yani su moleküllerini iter. Bu sıcaklıkta hücreler yüzeye yapışır, yayılır ve çoğalırlar. Hücre üremesi tamamlandığında, yani kap yüzeyinin tamamı hücrelerle kaplandığında, sıcaklık 32°C'nin altına düşürülür ve yüzey hidrofilik (suyu seven) hale gelir. Böylelikle, şişen yüzey üzerinden herhangi bir enzime gerek duyulmadan hücreler kaldırılabilir. Hücre-hücre bağlantıları ve hücreler arası matriks (ECM) bozulmadığı için, hücreler tabaka halinde elde edilebilir. Canlı olan bu hücre tabakası, diğer bir kültür kabına ya da vücut içerisindeki doku yüzeyine aktarılabilir. Ayrıca, hücre tabakaları birbiri üzerine yerleştirilerek 3-B yapı halinde de elde edilebilirler. Bu yöntem,

farklı hücre tabakalarını birleştirerek yeni bir organ oluşturmaya izin veren şu andaki tek yöntemdir(Yamato,2004-Okano,2010).



Şekil 2.5.Sıcaklık duyarlı kültür kapları(PIPAAm) ile hücrelerin tabaka halinde elde edilmesi.(Yamato ve Okano,2004)

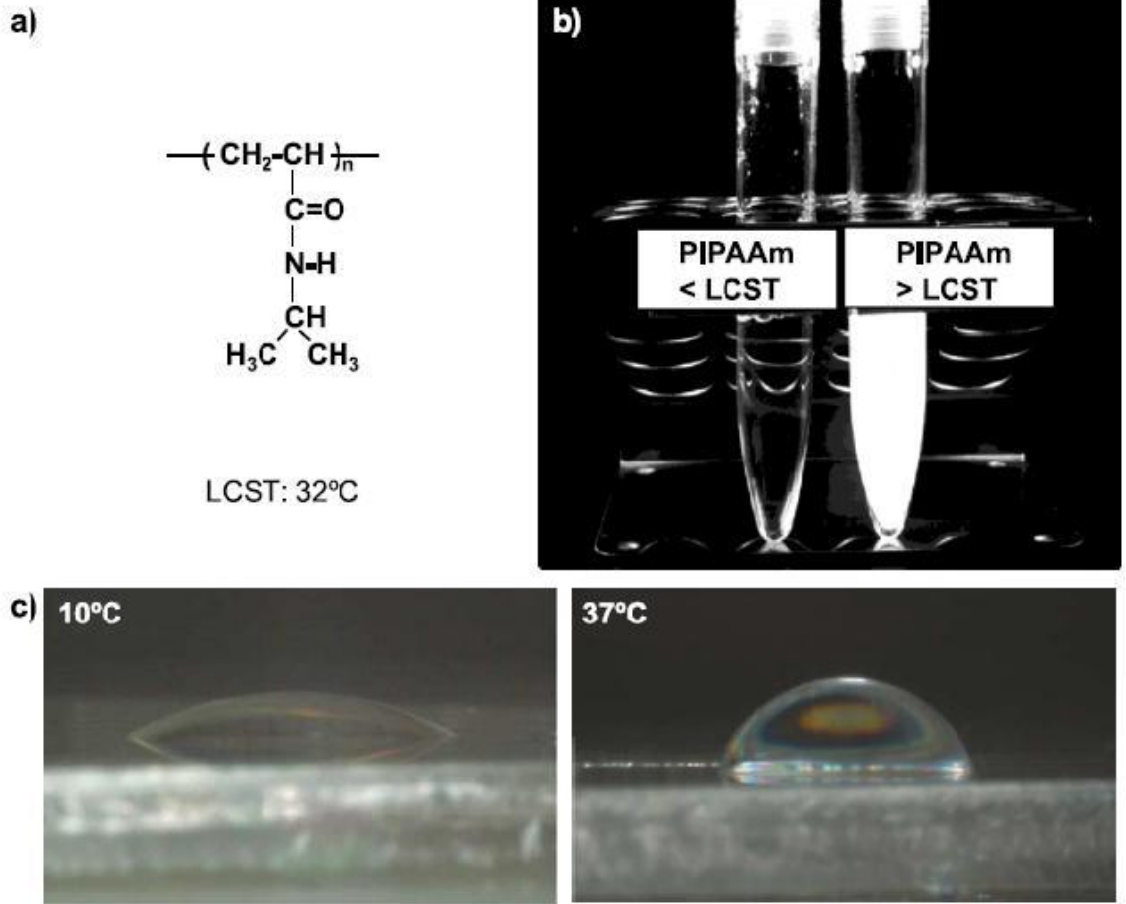


Şekil 2.6.Hücrelerin sıcaklık değişimi ile enzim kullanmadan tabaka olarak kaldırılması. (Yamato ve Okano,2004)

2.4.1.1.Poly(N-İsopropylacrylamide) Kültür Kapları:

Poly(N-İsopropylacrylamide) (PIPAAm) polimeri tıpkı kloroform,aseton,metanol ve alkol gibi organik sıvı bir çözücüdür. 20 nanometre kalınlıktaki bu polimer tabakası, ortam sıcaklığında değiştirilmesiyle hücrelerin kap yüzeyine yapışmasına ve yüzeyden kopmasına izin vermiştir. 37°C'de, yani pek çok hücrenin üreyebildiği sıcaklıkta, kültür kabının yüzeyi hidrofobiktir; yani su moleküllerini iter. Bu sıcaklıkta hücreler yüzeye yapışır, yayılır ve çoğalırlar. Hücre üremesi tamamlandığında, yani kap yüzeyinin tamamı hücrelerle kaplandığında, sıcaklık 32°C'nin altına düşürülür ve yüzey hidrofilik (suyu

seven) hale gelir. Böylelikle, şişen yüzey üzerinden herhangi bir enzime gerek duyulmadan hücreler kaldırılabilir. Doku mühendisliği hasarlı doku ve organların tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Nakil sonrası enflamasyonun önlenmesi ve yüksek hücre yoğunluğunun sağlanmasında hala yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Poly(N-İsopropylacrylamide) ile kaplanan kültür kabı yüzeyleri hücrelerin yüzeyden kaldırılması için kolay ve başarılı bir yöntem olmuştur. (Kikuchi ve Okano,2004)



Şekil2.7. Poly(N-İsopropylacrylamide)(PIPAAm) kültür kaplarının çalışma mekanizması.

(Kikuchi ve Okano,2004)

2.4.1.2.Hücre Tabakaları ile Üretilmiş Dokuların Kullanıldığı in vivo Hayvan Modelleri ve Klinik Uygulamalar

Sıcaklık-duyarlı kültür kaplarından kaldırılan epidermal hücre tabakaları, bu konudaki ilk klinik uygulamadır. Sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında hazırlanan insan epidermal hücre tabakaları daha az kırılabilir olup, dispaz enzimiyle yüzeyden kaldırılan benzeri hücre tabakalarına göre, yaralara çok daha iyi yapışma özelliği göstermiş durumdadır.

Kornea epitel hücre tabakalarının in vitro üretimi

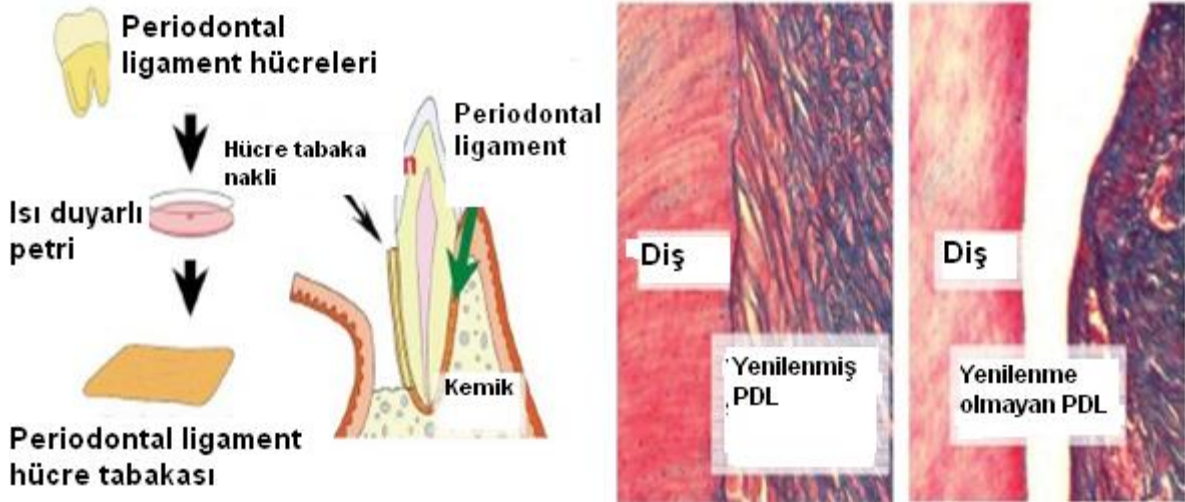
Hücre tabakaları, göz yüzeyinin yeniden yapılanmasında da kullanılmaktadır. Kornea'daki (saydam tabaka) epitel kök hücreleri, kornea ve konjunktiva (göz zarı) arasındaki sınırdaki limbus'ta yerleşmiş durumdadır. Alkali yanıkları gibi göz travmaları ve Stevens-Johnson sendromu gibi ağrılı göz hastalıkları, limbus'ta kök hücre eksikliği nedeniyle kornea'da opaklaşmaya ve görüntü kaybına neden olur. Bu durumda kornea nakli gerekmektedir. Ancak, verici bulmak önemli bir sorundur. Doku mühendisliğinin ürettiği çözüm ise, limbus kök hücrelerini izole etmek ve sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında, 37°C'de çoğaltmaktır. Böylece oluşan kornea epitel hücre tabakaları, sıcaklık 20°C'ye düşürüldüğünde kap yüzeyinden kolaylıkla ayrılmaktadır. Bu tabakalar şeffaf ve dikiş gerekmeksizin korneaya kolaylıkla yapışmaktadır. Tek bir hasta için 2x2 mm boyutlarında doku parçası yeterli olmakta ve tüm vakalarda kornea tabakasının naklinden sonra, görüşün anlamlı bir biçimde berraklaştığı görülmüştür. Tek bir vericinin gözünden alınan kök hücreleriyle hazırlanan hücre tabakalarının 20'den fazla hasta için yeterli olabileceği sonucuna varılmıştır. Araştırmacılar halen kornea endotel hücre tabakaları ve retina (ağ tabaka) pigmentli epitel hücre tabakalarının, hayvanlara nakli üzerinde çalışmaktadır. Başarı sağlandığı takdirde, optik şeffalık açısından sorun yaratan biyobozunur polimer iskeletlerin, göz dokusu yapılanmasında kullanımına gerek kalmayacaktır.(Yamato,2002-Okano 2004)



Şekil:2.8.Kornea epitel hücrelerinden PIPAAm kültür kabı ile korneal epitel hücre tabakası eldesi (Nishida,2004)

Periodontal ligamentin yeniden yapılandırılması

“Periodontal ligament”; dişi diş yuvasına tespit eden kollajen liflerden oluşmuş bağ dokusudur. Geniş anlamda dişi saran ve ona destek sağlayan çevre doku ve oluşumların tümü, “periodontium” olarak adlandırılmaktadır. Diş çevresindeki (periodontal) hastalıklar, eskiden beri bilinen yaygın hastalıklardır. Bunlar periodontium’un iltihaplanması, nefesin pis kokması ve diş kayıpları gibi acı verici şikayetlere neden olmaktadır. Geleneksel tedavi yöntemleriye, diş çevresindeki dokunun yeniden yapılandırılması için yetersiz kalıyor. Hücre tabaka mühendisliği, bu sorunların çözümü için diş eti çevresine uygulanmış bulunuyor. Bu çalışma için sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında insan periodontal ligament hücre tabakaları üretilmiş ve sıçanlara nakledilmiştir. Çalışmada boşluk içerisine yapışmış fibriller ve diş kökünü çevreleyen ince kemik tabakaya benzeyen hücresel içerikli doku benzeri periodontal ligament tanımlanmıştır. Oluşan fibrillerin doğal periodontal ligament fibrillerin aynısı olduğunu görmüşlerdir. Ulaşılan sonuçlar, bu tekniğin diş çevresinin yapılandırılması nda yararlı olabileceğini göstermektedir.(Okano,2004)

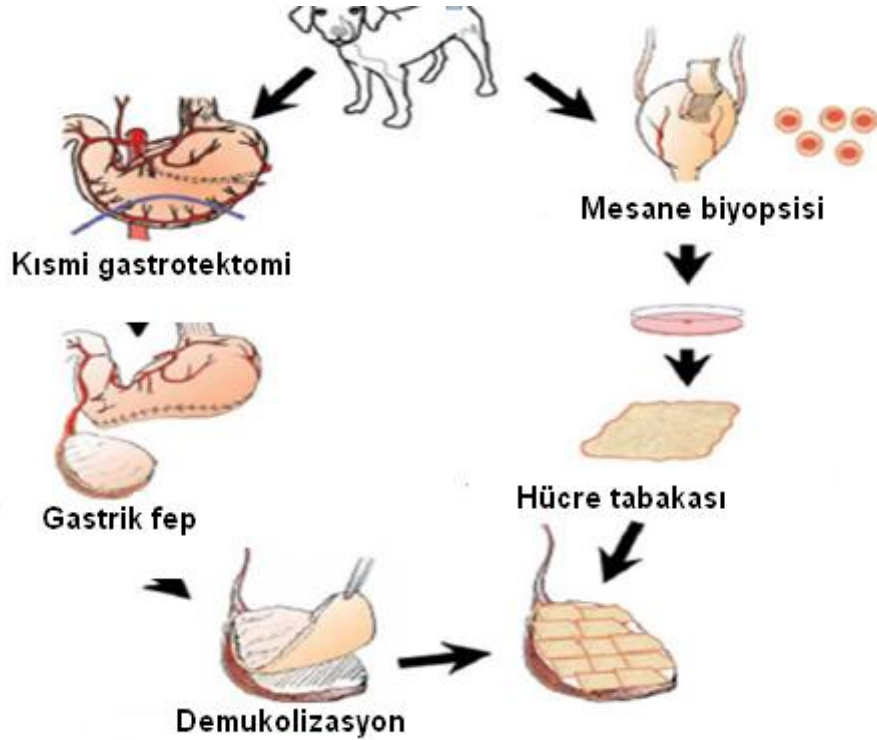


Şekil 2.9. İnsandan izole edilen periodontal ligament hücrelerinin ısı duyarlı kültür kabında 37°C de çoğaltıldıktan sonra 20°C de inkübasyonu sonrası hücre tabakası oluşturulup, sıçan periodontal ligamenti hasarlı bölgesine nakil yapılması. (Okano,2004)

Mesaneinin in vitro üretimi

Taş oluşması, böbreklerden idrar kanalı (üretra) dış deliğine kadar uzanan idrar yollarını içine alan sistemin enfeksiyonu ve elektrolit dengesizliği gibi durumlar, mesane içinde ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bununla ilgili bir çalışmada ise mide-bağırsak kanalı mukozasından alınmış bir parça kültürde çoğaltılmış idrar yolu hücre tabakaları

kullanılarak yeni bir mesane oluşturulmaya çalışılmıştır. Bir köpeğe uygulanan bu yöntemde, mide-bağırsak kanalı mukozasından alınan parçanın içindeki tabaka (mukoza), sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında üretilen idrar yolu hücre tabakalarıyla yenilenmiştir. Çalışmada, idrar yolu hücreleri kültürlenmiş ve sıcaklığın azalmasıyla bu kaplardan bozulmamış halde elde edilmiştir. Bozulmamış sağlam idrar yolu hücre tabakaları, daha sonra mukoza tabakası çıkartılmış doku parçacıkları içerisine yerleştirilmiştir. Bu hücre tabakalarının, herhangi başka bir işleme gerek duyulmadan, mukozası alınmış dokulara kendiliğinden yapıştıkları gözlemlenmiştir. Daha sonra, köpeğe yeniden yerleştirilen yeni mesane, üç hafta sonra incelendiğinde doğal idrar yolu hücreleriyle aynı epitel doku hücrelerinin oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu ürolojik çalışmada, sıcaklık-duyarlı kültür kaplarından elde edilen hücre tabakalarının, cerrahi olarak yeniden doku oluşumu için son derece uygun oldukları sonucuna varılmıştır. (Shiroyanagi,2003)

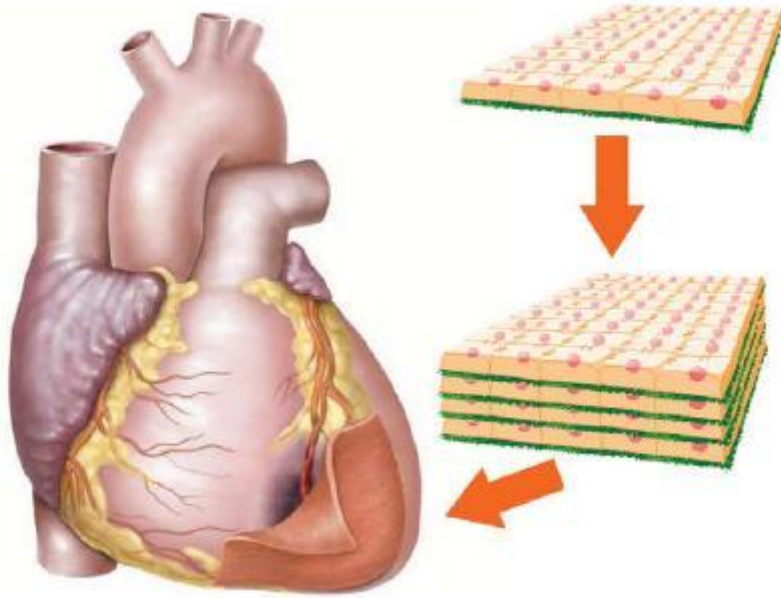


Şekil 2.10. Mesaneden alınan düz kas hücrelerinden hücre tabakası elde edilerek gastrik fep üzerine yerleştirilmesi sonucu yeni bir mesane oluşturulması. (Shiroyanagi,2003)

Kalp yamalarının in vitro üretimi

İki boyutlu hücre tabakasıyla yapılan çalışmalara ek olarak, üç boyutlu hücre tabakalarının ele alındığı kalp dokusu mühendisliği de başarıyla uygulanmış durumdadır. Zayıflamış kalbin onarılmasında hücre nakli, yakın zamanda çalışılan yöntemlerden biridir. Bu yöntem ek olarak, kalp kası hücre tabakaları biraraya getirilerek, üç boyutlu yamalar

elde edilmektedir. Kalp dokusu mühendisliğinin, doku destek malzemesi olarak kullanılan biyobozunur polimerle uygulaması da bulunmaktadır. Bununla birlikte, doku iskelelerinin bükülmez ve hacimli özellikleri, kalp kası hücrelerinin dinamik atımlarına engel olmaktadır. Kalp kası hücre tabakalarının biraraya getirilmesi sonucu oluşan üç boyutlu kalp yamalarının eşzamanlı olarak attığı gözlemlenmiştir. Hücreler oluşturulan bu 3-B kalp yamalarında bölünme ve fonksiyonlarını gerçekleştirmiştir. Yeni doğan sıçanda kalp kası hücreleri tabakaları, sıcaklığın azaltılması sonucu sıcaklık-duyarlı kültür kaplarından elde edilmiş ve daha sonra bunlar kalp üzerine gömülerek yama yapılmıştır. Biraraya getirilen dört kas hücre tabakasının da attığı, gözle görülmüş bir sonuçtur (Okano,2007-Imran 2005).



Şekil 2.11. Kalp yamalarının hücre tabaka teknolojisi ile elde edilmesi. (Yamato ve Okano,2004)

Diyabette pankreatik dokunun in vitro üretimi

Adacık transplantasyonunun uzun ömürlü olması için çeşitli yöntemler konusunda çalışmalar sürmektedir. Bunlar arasında biyomühendislik yaklaşımları da kullanılarak adacık hücre tabakaları oluşturulup “fonksiyonel adacık sistemleri” inşa edilmesi ve bu sistemlerin ekstra hepatik alanlara transferi de yalnızca iki çalışmada yer almaktadır. Örneğin subrenal, subkutan ve abdominal bölge transferleri gibi. Bu 3-B hücre tabakalarının, subkutan bölgede daha etkili bir şekilde varlığını sürdürdüğü yukarıda da

bahsettiğimiz gibi çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Bunun nedeni adacık hücre/sistem transplantasyonunun bu bölgede bulunan doku sistemlerinin karakteri nedeniyle minimal invazif etki göstermesidir.

Diyabet, kandaki şekerin anormal şekilde yüksek olduğu bir hastalıklar grubu olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde tüm dünyada yaklaşık olarak 240 milyon insanı etkilemekle birlikte bu sayı artmaya devam etmektedir. Ülkemizde ise, 2.6 milyon diyabetli ve 2.4 milyon diyabet adayı olmak üzere toplam 5 milyon kişilik bir popülasyonu ilgilendiren bir sağlık sorunudur(38). Otoimmün bir hastalık olan tip 1 diyabet, pankreatik langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin tahribatı ile ortaya çıkmaktadır. İnsulitis adı da verilen otoimmün hastalığın ilk aşamasında adacıklar dendritik hücreler, makrofajlar, B hücreleri, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreleri tarafından istila edilirler. Sonuçta, pankreasın insülin üreten hücrelerinin kaybı söz konusu olduğu için, insülin yetersizliği nedeniyle glikoz hücrelere giremez ve kanda birikir. Tip I diyabetin kesin tedavisi için, Uluslar arası Juvenil Diyabet Araştırma Vakfının (JDRF) da belirttiği gibi iki önemli husus vardır; bunlardan birincisi, haraplanmış adacık hücrelerinin yerine konması (replasmanı) ve bu amaçla alternatif kaynakların bulunmasıdır. İkincisi ise, bu transplantasyon işleminden sonra yaşam boyunca immun sistemi baskılayan (immunosüpresif) ilaçlar kullanılmaksızın tedavinin sağlanmasıdır. Yani, kalıcı replasmanın sağlanması gerekmektedir. Günümüze kadar, β -hücrelerinin yerine konmasını amaçlayan üç farklı strateji geliştirilmiştir; pankreas transplantasyonu, adacık transplantasyonu (allojenik ve kseno-transplantasyonlar) ve hücre esaslı tedavi (hücre replasmanı ve adacık neogenezi). Pankreas ve adacık nakilleri için yeterince donör bulunamaması, bu alanda çalışan araştırmacıların farklı kaynaklardan adacık hücrelerinin üretilmesine yönelik çalışmalara üzerine yoğunlaşmalarına neden olmuştur (Shimizu et al,2009-Okano et al.2011).

Hücre temelli terapilerde, Tip 1 diyabetin tedavisi için pankreatik adacıkların kullanıldığı yeni yaklaşımlar, ortaya çıkmıştır. Halen adacık hücrelerinin transplantasyonu için tercih edilen organ, karaciğer olmaktadır. Tip1 diabet mellitusun majör klinik tedavilerinden birisinde karaciğerdeki portal vaskular sistem içine adacık hücrelerinin transplantasyonu gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yaklaşımın donör sıkıntısı nedeniyle sınırlı olduğundan yukarıda da bahsetmiştik. Ek olarak transplantasyondan sonra yeni transfer edilen adacık hücreleri, otoimmün ataklar ile yeniden hasar görmektedir. Sonuç olarak alıcıların büyük bir kısmı, nakil sonrası elde ettikleri insülin-bağımsız durumu kaybedip tekrar insülin-bağımlı hale gelmektedir. Adacıkların portal infüzyonunun,

komplifikasyonların sayısı ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir. Bu durum, kan aracılı anti-inflamatuar reaksiyonları tamamlayıcı kaskad aktivasyonu ve lokosit infiltrasyonunu kapsamaktadır. Sonuçta bu immün ilişkili problemler, graft başarısızlığı ile sonuçlanır ve alıcıların büyük kısmını insülin bağımsız durumdan tekrar insülin bağımlı hale getirir(Okano et al.2004).

Adacık transplantasyonunun uzun ömürlü olması için çeşitli yöntemler konusunda çalışmalar sürmektedir. Bunlar arasında biyomühendislik yaklaşımları da kullanılarak adacık hücre tabakaları oluşturulup “fonksiyonel adacık sistemleri” inşa edilmesi ve bu sistemlerin ekstra hepatik alanlara transferi de yer almaktadır. Örneğin subrenal, subkutan ve abdominal bölge transferleri gibi. Bu 3-B hücre tabakalarının, subkutan bölgede daha etkili bir şekilde varlığını sürdürdüğü yukarıda da bahsettiğimiz gibi çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Bunun nedeni adacık hücre/sistem transplantasyonunun bu bölgede bulunan doku sistemlerinin karakteri nedeniyle minimal invazif etki göstermesidir.

Transplantasyon bölgesinin prevaskülerize edilmesi yada hücrelerin dış bölgelere tutunması için tek tek hücre transplantasyonu yerine sentetik polimer hücre iskelesi/scaffold kullanılması şeklindeki yaklaşımlar, transplantasyon sonrası, adacık hücrelerinin subkutan bölgeye infüzyonunu sağlar ve bu da hücrelerin bölünme ve fonksiyonlarını devam ettirebildiğini/canlılığını göstermektedir. Yapı iskelesi ve hücre tabakası kullanılmadığında, transplante edilen adacık hücrelerinin engrafmanının tam olmamasına ve zayıf kalmasına neden olur. Yapı iskelesi ve hücre tabakası uygulamalarının adacık hücrelerinin engrafmanını ya da canlılığını destekleyip desteklemediği ve klinikte kullanıma uygun olup olmadığı konusu ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir.

Bu sebeple çeşitli laboratuvarlarda geliştirilen yöntemlerden birisi “hücre tabaka/cell sheet teknolojisi”dir. Bu teknoloji tek tek dağınık halde bulunan hücrelerin, ince, devamlı ve bitişik bir tek tabakalı (monolayer) hale gelmelerini sağlamaktadır. Hücre tabakası/cell sheet halinde bulunan hücreler, birbirleriyle iletişim yapabilirler ve transplantasyondan sonra fizyolojik parametrelerdeki değişimleri hisseden ve fark edebilen basit ve temel bir biyolojik sistem olarak hareket edebilirler. Hücre tabakaları/cell sheet kullanılan doku mühendisliği çalışmalarında daha önce oral mukoza hücreleri, karaciğer hücreleri, kardiomyositler ve son zamanlarda da adacık hücreleri gibi kaynaklar kullanılmıştır. Bu yeni hücre tabaka/cell sheet 3 boyutlu dokuların oluşturulmasına izin veren çok tabakalı hücre oluşumunu sağladığı için ayrı ayrı ve dağınık haldeki hücre kümelerine göre çok

daha avantajlıdır. Bu da, hücre tabakası/cell sheet kullanıldığında terapötik yaklaşımların önemli özelliği olan canlılık ve fonksiyonelliğin sağlanabildiğini göstermektedir.

Biz de çalışmamızda sıçandan izole edeceğimiz MKH ve β -hücrelerini invitro sıcaklık-duyarlı kaplar poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm üzerinde kültür ederek oluşturacağımız 3-Boyutlu Beta Hücre Dokusunu, diyabetik sıçanların subkutan bölgesine transfer ederek “ekstra hepatik fonksiyonel bir adacık dokusu” inşa etmeyi ve MKH kullanımının buna etkisini analiz etmeyi amaçlamaktayız. Bu sayede biyomühendislik yöntemleri kullanarak oluşturacağımız bu 3-Boyutlu Beta Hücre Tabakasının, diyabetik sıçanlarda normal glisemik indeksi sağlayıp sağlamadığını göstermeyi hedefledik. Ek olarak yeni inşa edilmiş bir adacık dokusu olarak, subkutan dokuya engrafman yapma ve devamlı fonksiyon gösterebilme yeteneğinde olup olmayacağını da saptamayı düşünmekteyiz.

Çalışmamızda ilk olarak in vitro ortamda beta hücreleri ve mezenkimal kök hücreler, sıcaklık-duyarlı kültür kaplarına ekilecektir. Bu kültür kapları sayesinde hem beta hücreleri hem de MKH'ler, bir tabaka halinde elde edilebilecektir. Hücreleri tek tek elde etmek yerine bizim çalışmamızda olduğu gibi tabaka halinde elde etmek, hem beta hücrelerine minimal invazif bir manipulasyon uygulanmasını hem de hücreler arası bağlantıların ve hücrelerarası matriksin in vivo'ya en yakın şekilde korunmasını sağlayacaktır. Çalışmamızda bu Beta hücre tabakaları, transplantasyon sırasında üst üste yerleştirilerek 4 katlı hücre tabakası elde edilecek ve bu sayede 3 boyutlu hale getirilebilecektir. Aynı zamanda çalışmamızda in vitro ortamda da ekstra hepatik fonksiyonel bir 3-B'lu adacık dokusu elde etmiş ve etkinliğini STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda test etmiş olacağız. MKH'lerin, ileri düzeyde farklılaşmış Beta hücreleri üzerindeki destekleyici etkisinden de faydalanmak amacıyla deneyimizde oluşturmayı planladığımız fonksiyonel 3-B'lu ekstra hepatik adacık dokusunu inşa ederken diğer çalışmalardan farklı olarak Kİ-MKH'lerden oluşan bir tabaka daha ilave edip bunun etkinliğini de yalnızca Beta hücresi transfer edilenlerle karşılaştırarak ortaya koymayı amaçlamaktayız.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Hayvanlar

Çalışmamızın bu bölümünde pankreatik adacık donörü ve transplante ettiğimiz greftin alıcısı olarak Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden (DETAB) temin ettiğimiz hayvanların transfer sonrası büyüme etkisini elemine etmek için en az 8 haftalık, 200-260 gr ağırlığında toplam 90 adet Wistar Albino cinsi,kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (Kİ-MKH) izolasyonu için erkek, doku nakli için ise 6 dişi sıçan kullanılmıştır.

Deney planı

Çalışmada kullanılacak hayvanlar, Tablo 1’deki gibi 4 deney grubuna ayrılmıştır.

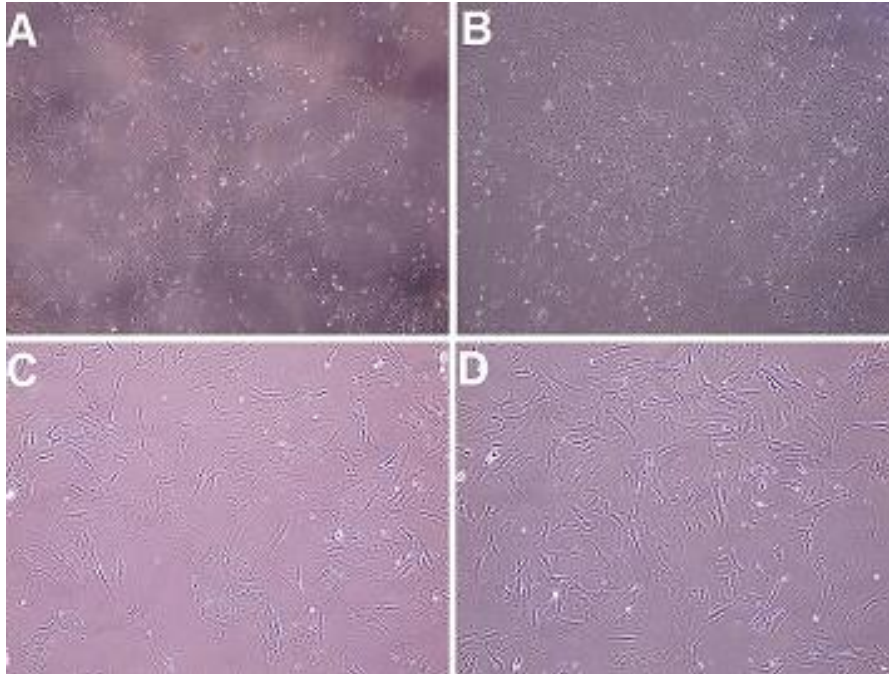
Gruplar	Diyabetik Hayvan modeli	Doku transferi
Grup I Negatif Kontrol (n=6)	Sağlam Sahte-operasyon kontrol: STZ-deney grubu ile aynı koşullarda enjeksiyon yapıldı ancak STZ yerine subkutan olarak eşit hacimde %0.9’luk serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Bu grup deney gruplarındaki ölçümlerdeki değişimlerin enjeksiyondan kaynaklanmadığını gösterdi.)	Doku transferi yapılmadı
Grup II Pozitif Kontrol (n=6)	STZ-indüklenmiş diyabetik Subkutan olarak STZ enjeksiyonu yapıldı.	Doku transferi yapılmadı Sahte-operasyon kontrol: Nakil yapılan deney grubu ile aynı cerrahi işlem yapıldı ancak doku nakli yapılmadı.Dorsal bölgedeki deri kaldırılıp transfer yapılmadan kapatıldı.Bu grup deney gruplarındaki ölçümlerdeki değişimlerin cerrahi operasyondan kaynaklanmadığını gösterdi.
Grup III (n=6)	STZ-indüklenmiş diyabetik Subkutan olarak STZ enjeksiyonu yapıldı.	Doku transferi yapıldı Matrigel içine gömülmüş beta hücresi
Grup IV (n=6)	STZ-indüklenmiş diyabetik Subkutan olarak STZ enjeksiyonu yapıldı.	Doku transferi yapıldı Matrigel içine gömülmüş Beta hücresi + Taşıyıcı membrana yüklenmiş Kİ-MKH (tek tabakalı).

Tablo 1. Deney ve kontrol gruplarının düzenlenmesi

3.2.Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (sKİ-MKH'lerin) İzolasyonu, Kültürü Ve Karakterizasyonu

3.2.1.sKİ-MKH'lerin izolasyonu ve kültüre hazırlanması:

Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu için servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülen sıçanların femurları uygun steril şartlarda çıkartıldı. Femurun etrafındaki yumuşak dokular çıkartıldıktan sonra hava akımlı steril kabinde uygun kesiler yapılarak kemik iliği içerikleri L-DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose) medyum içeren petri tabaklarında toplandı. Toplanan kemik iliği içerikleri santrifüj edildikten sonra iki kez daha yıkama işleminden geçirildi ve sonra %10 FBS, %1 penisilin ve streptomisin içeren L-DMEM'de T75 flasklarında kültüre edildiler. (yaklaşık 1.2×10^8 hücre). 72 saat sonra yüzen tüm hücreler atıldı ve yeni medyum ilavesi yapıldı. Haftada iki kez olmak üzere bu işlem tekrarlandı ve flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) (ki yaklaşık olarak 14-25. günler arasında) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edildiler ve bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirildi (Şekil 1). Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlandı ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlandı.



Şekil 3.1. Sıçan Kİ-MKH'lerin P0-4. gün (A), P0-5.gün (B), P2-4. gün (C) ve P3-4. gündeki faz-kontrast mikroskopik görünüşleri (Orijinal büyütme, A-B:X40; C-D:X200).

3.2.2.sKİ-MKH'lerin Karakterizasyonu

Sıçan kemik iliğinden elde edilen MKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edildi ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelendi. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analiz ve immünsitokimyasal işaretleme (İmmunhistokimyasal İşaretleme (İHK) ve İmmunfloresan İşaretleme (İF) çalışmaları gerçekleştirildi. Gen ekspresyonları RT-PCR ile belirlendi. sKİ-MKH'ler *in vitro* farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için; adipojenik, osteojenik, nörojenik ve farklılaşmaya alındı.

3.2.2.1.İmmunfenotipleme

3.2.2.1.1.Akım sitometrik Analiz

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P5'e kadar) ve *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon(enzimde bekletme) işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 8×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar (CD45, CD3,CD90, CD29, CD11b, CD44, CD71, CD106, CD73) ve uygun izotip kontrollerinden 10 µl eklenerek inkübe edildi (oda ısısında-karanlıkta-45 dak.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akım sitometri cihazında okutuldu ve analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirildi.

3.2.2.1.2.İmmünsitokimyasal İşaretleme:

sKİ-MKH'lerin immünsitokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P3'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber-slide-8 well (24/pk) ekilen 2×10^5 hücre/kuyucuk ile gerçekleştirildi. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından İHK ve İF teknikler kullanılarak Tablo 2'deki antikor paneli çalışıldı.

Primer Antikor	Sekonder Antikor	Reaktivite	Uygulama	Kaynak	Katalog #
Actin (C-2)	Mouse	R	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-8432
Desmin	Rabbit	R	IF,IHC	Abcam	ab8592
Fibronectin (EP5)	Mouse	R	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-8422
Map IIa,b (Ab-2)	Mouse	R	IF,IHC	Thermo Scientific	MS-249-S
Nestin R	Mouse	R	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-33677
SPARC (H-90)	Rabbit	R	IF	Santa Cruz Biotechnology	Sc-25574
β - tubulin	Mouse	R	IF	Chemicon International	MAB3408
Vimentin (C-20)	Goat	R	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-7557
BMP2	Goat	R	IF,IHC	Santa Cruz Biotechnology	sc-7557

Tablo 3.1: IF/IHC antikor paneli.

3.2.2.1.2.1. İmmunohistokimyasal İşaretleme (İHC)

İmmunohistokimyasal çalışmalarda, Ultravision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) ve ABC Staining System (for use goat primary antibodies) immunohistokimya kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler PBS'le yıkandıktan sonra metanolle 10 dk. fikse edildi. PBS (İnvitrogen) ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok (Normal Sera) serum içeren PBS'de 30dk. inkübe edilerek verilen uygun dilüsyon oranlarında hazırlanan primer antikorlar eklenip oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkama işleminden sonra immunohistokimyasal kit prosedürü aynen uygulanıp son aşamada AEC kromojenle (AEC (RED) Substrat Kit) enzim kompleksi görünür hale getirildi, Hematoxylin, Gill's Formulation 2 ile çekirdek zıt boyaması gerçekleştirilip kurutulan preparatlar Crystal Mounting Medium ile kapatılıp Leica DMI 4000 Microsystems ışık mikroskopunda analiz edilip görüntülendi (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır).

3.2.2.1.2.2.İmmunfloresan İşaretleme (İF)

Hücreler metanolle fikse edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30dk. inkübe edildi ve Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilue edilen primer antikolar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3X2dk yıkama işleminden sonra immunfluoresans çalışmaları için uygun floresans (FITC, TR) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edildi, son aşama nükleer boya içeren kapatma medyumunu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapattı. Floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

3.2.2.2.sKİ-MKH'lerin in vitro farklılaştırılması

Adipojenik farklılaşma:

Kültür kabının cm^2 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen MKH'leri; içinde %10 FBS, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 10^{-6} M dexamethasone, 10 μ g/ml insulin, 200 μ M indomethacin ve 1% penisilin- streptomisin bulunan MEM kültür medyumunda iki hafta kültüre edildi ve kültür sonrası hücre içi biriken lipidler, Oil Red O histolojik boyaması IF/IHC ile çalışılarak tespit edildi.

Osteojenik farklılaşma:

Kültür kabının cm^2 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen MKH'leri; 100 nM dexamethasone, 0.05 μ M ascorbate-2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, %1 penisilin- streptomisin ve %10 FBS içeren MEM kültür medyumunda 4 hafta boyunca kültüre edildi. Ayrıca osteojenik farklılaşma Alizarin Red S histolojik boyaması, IF/IHC ile gösterildi.

Nörojenik farklılaştırma:

Kültür kabının cm^2 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen MKH'leri; %10 fetal bovine serum, 10 ng/ml basik fibroblast büyüme faktörü, 10 ng/ml epidermal büyüme faktörü, 10 ng/ml Brain derived neurotrophic factor, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine ve %1 penisilin-streptomisin içeren düşük glikozlu DMEM kültür medyumunu içinde 24-72 saat kültür edildi. Nörojenik farklılaşma IF yöntemiyle gösterildi.

3.3.sKİ-MKH'lerin GFP Transdüksiyonu ile İşaretlenmesi

3.3.1.Plazmid DNA İzolasyonu

Yüksek kalitede plazmid DNA izolasyonu, ayırma ve saflaştırma işlemleri sonrasında *E.coli* 'den toksik lipopolysakkaritler gelmemesi için EndoFree Plazmid Maxi Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Seçici katı besi ortamından yeni çoğalmış tek bir koloni alındı ve 2-5 ml uygun antibiyotik içeren LB broth (Luria Bertani) sıvı besi ortamına ekilerek 8 saat boyunca 300 dak/dev ve 37 °C 'de çoğaltıldı. 250 ml seçici LB ortamı 1 ml içerisinde bakteri çoğalmış ortam ile inoküle edildi ve aynı koşullarda 12-16 saat bekletildi. Hücreler 6000xg hızda 15 dakika boyunca 4 °C 'de döndürülerek toplanacak ve 10 ml P1 tampon çözeltisi içerisinde homojen hale getirip oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmeden önce 10 ml Tampon P2 eklenip sertçe 4-6 kez ters çevrilerek karıştırıldı. 10 ml buzda soğutulmuş P3 tamponu eklenerek 4-6 kez ters çevrilip karışım QIAfilter şırıngasına aktarılacak ve 10 dakika bekletildikten sonra filtreden geçirilerek 50 ml tüp içerisine aktarılıp 2,5 ml ER tamponu eklendi ve 30 dk buzda bekletildi. 10 ml QBT tampon çözeltisi ile önceden dengelenmiş QIAGEN-tip 500 kolonuna karışım eklenip süzülmesi beklenildi. 2 kez kolon 30 ml QC tamponu ile yıkanacak ve 15 ml QN tamponu içerisinde DNA çözüldü. Plazmid DNA 'sı 10,5 ml izopropanol eklenerek 4 °C 'de, 30 dakika boyunca asgari 15,000xg hızla çöktürüldü, DNA 5 ml endotoksin içermeyen %70 etanol içerisinde yıkanıp 10 dk asgari 15,000xg hızla çöktürüldü. Yıkanmış plazmid DNA 'sı oda sıcaklığında 5-10 dakika kurutulduktan sonra endotoksin içermeyen TE tamponu içerisinde istenilen hacimde çözüldü.

3.3.2.GFP Gen Transformasyonu:

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemini temel alan Neon Transfection Sistemi, 10 µl Neon Kit ve 100 µl Neon Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Yüksek kalitede (endotoksin içermeyen) plazmid DNA 'sı 1–5 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlanacak, MKH'ler ise deneyin olacağı günde % 70-90 konfluente ulaşacak şekilde (transfeksiyon başına $0,5-1 \times 10^6$ hücre) çoğaltıldı. Deney gününde hücreler kültür kabından kaldırıldı ve Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS'le yıkanıp, 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edilip "Resuspension Buffer R" tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1 ml başına $1,0 \times 10^7$ hücre olacak şekilde hazırlandı. 6 kuyucuklu kültür kapları içerisine 2 ml serum içeren, seçici antibiyotik içermeyen (penisilin içerebilir, eğer seçici değil ise) uygun besiyeri eklenip ve 37°C 'de 5% CO₂ sirkülizasyonu olan nemli ortamda inkübe edildi (Transfeksiyon parametreleri daha önceden optimize edildiği değerlere ayarlanacak). Steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine transfeksiyon başına 2- 4 µg plazmid DNA 'sı ve plazmid DNA 'sı bulunan tüp içerisine transfeksiyon başına DNA ile birlikte 10 µl olacak

miktarda hücre aktarılıp Neon™ Pipeti ile yavaşça tip içerisine 10 µl DNA-hücre süspansiyonunun çekilecek ve ucundaki hücre-DNA karışımı ile birlikte Neon™ Pipet İstasyonu içerisinde bulunan ve 3 ml elektrolit tamponu eklenmiş tüpe yerleştirildi. Belirtilen ayarlarda sistem elektrik akımını (atımını/şokunu) uygulanıp, gen aktarılmış hücreler hemen önceden ısıtılmış serum içeren ama seçici antibiyotik içermeyen besi ortamına aktarıldı, hücreler 37°C 'de nemlendirilmiş CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Transformasyon sonrası 3. günde (transient/geçici ekspresyon) ortam değiştirilerek besi ortamı tazelendi, ancak bu noktadan itibaren seçici antibiyotik (pGFP için G418, Kat. No. 11811-098) eklenecek. Kalıcı olarak gen ekspresyonu isteniyorsa 2-3 ay (5-10 pasaj) boyunca hücreler antibiyotik direncine göre seçildi.

3.4.Beta Hücrelerinin Kültür ve Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan beta hücreleri (BRIN BD11) hücre bankasından alındı. Bu hücreler insülin salgılayan ve NEDH sıçan pankreatik adacıkları ile RINm5F(NEDH sıçan insülinomadan elde edilen hücre hattı) in elektrofüzyonu ile elde edilmiş hücre hattıdır.Bu hücrelerin nakil için uygunluğunu test etmek için çeşitli karakterizasyonlar yapıldı.

3.4.1.Sıcaklık Duyarlı Kültür Kaplarında Enzimsiz Kültürün Beta Hücreleri Üzerine Etkilerinin Hücre Canlılık ve Proliferasyon Analizi ile Belirlenmesi

3.4.1.1.WST-1 Testi

Sıcaklık duyarlı kültür kaplarında enzimsiz kültür sonrası beta hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonlarını tespit etmek için kültürün 2.gününde bu test uygulandı.Canlı ve apoptozisin erken evresindeki hücrelerin mitokondriyonları aracılığıyla WST-1 solüsyonuyla oluşturduğu reaksiyonda WST-1'in tetrazolium halkası, hücrelerin mitokondriyonlarında bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak turuncu renkli formazan kristalleri oluşturmakta iken, ölü hücreler formazan kristalleri oluşturmamaktadır.Oluşan renk spektrofotometrik yöntemle (ELISA mikro-plaka okuyucuda) 480 nm'de ölçüldü.Beta hücreleri kültürün 1. ve 4. günlerinde WST-1 testine alındı. 6-kuyucuklu playtlere hücreler 12.5×10^4 olacak şekilde ekildi. Test günlerinde (1.ve 4.gün) hücreler toplanıp 96-kuyucuklu playtlere ekildi. 0.5 mg/ml WST-1 eklenerek 4 saat süreyle inkübe edildi (%5 CO₂, 37⁰C de).İnkübasyon sonrası absorbans değerleri 480 nm'de monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi.(tüm testler üç kez tekrarlandı).

3.4.1.2. İn vitro İnsülin Salgılama Deneyi

Glukoz-bağımlı insülin salınımını belirleyebilmek için bir dizi deney gerçekleştirildi. Beta hücreleri in vitro ortamda, besiyerine eklenen glukozla bağlı olarak, yine besiyerine insülin salgılayıp/salgılamadıklarını test etmek için iki farklı glukoz konsantrasyonuna maruz bırakıldı ve toplanan besiyerinde insülin tayini yapıldı. İnsülin salgılatma analizine başlamadan önce beta hücre popülasyonu, insülin içermeyen besiyerinde 48 saat kültür edilip, besiyerinden insülin tamamen uzaklaşınca kadar periyodik olarak 3 kez PBS ile yıkandı. Kuyucuklara %0.5 BSA içeren serumsuz L-DMEM (düşük glukoz içerikli; 5.5 mmol/L) eklenecek ve hücreler 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi.

Laminin kaplı 6 well plate PIPAAm plate içerisindeki hücreler 2 gün boyunca çoğalmaya bırakıldı. Yapışan hücreler 37 C de RPMI1640 medyumuna ile 3.3 mM glukoz eklenip tekrar 37° C de inkübasyona bırakıldı.Sonra medyum değişimi yapıldı 20 mM glukoz içeren besiyeri eklendi ve 60 dakika beklendi.Süre bitiminde süpernatant toplandı ve son olarak 3.3 mM glukoz eklenip tekrar 37° C de 60 dakika inkübasyona bırakıldı her adımda toplanan besiyeri analiz edilinceye kadar -20° C de saklandı. Pankreasın endokrin kısmı olan Langerhans adacıklarının sentezlediği peptid hormonlardan insulin (beta hücreleri) (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Milipore EZRMI-13K) toplanan süpernatatlardan ELISA yöntemi ile analiz edildi. Bunun için üretici firmanın önerdiği prosedürler izlendi ve hormon düzeyleri monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi.

3.4.1.3.Beta Hücrelerinin Apoptoz Deneyi

Sıcaklık duyarlı kültür kabına 1×10^5 beta hücresi ekildi 2 gün kültür edildikten sonra üzerindeki besiyeri çekildi.Kültür kabına yapışan ve çoğalmış hücreler üzerine lizis eklendi. Roche daignostic mannheim (Germany) kiti kullanılarak ELISA yöntemi ile analiz edildi.Apoptoz düzeyleri monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi.

3.4.1.4.Beta Hücrelerini İmmünohistokimyasal İşaretleme:

Hücreler metanolla fiske edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30dk. inkübe edildi ve Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilue edilen primer antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. Bu antikorlar

İnsülin, Maf A, Pax-4, Ki-67, Glut-2, c-peptid (Santacruz Biotechnology) PBS ile 3X2dk yıkama işleminden sonra immunfluoresans çalışmaları için uygun floresans (FITC, TR) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30dk. inkübe edildi, son aşama nükleer boya içeren kapatma medyumunu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

3.4.2 Isı Değişimine Duyarlı Kültür Kabında Beta Hücre Kültürü

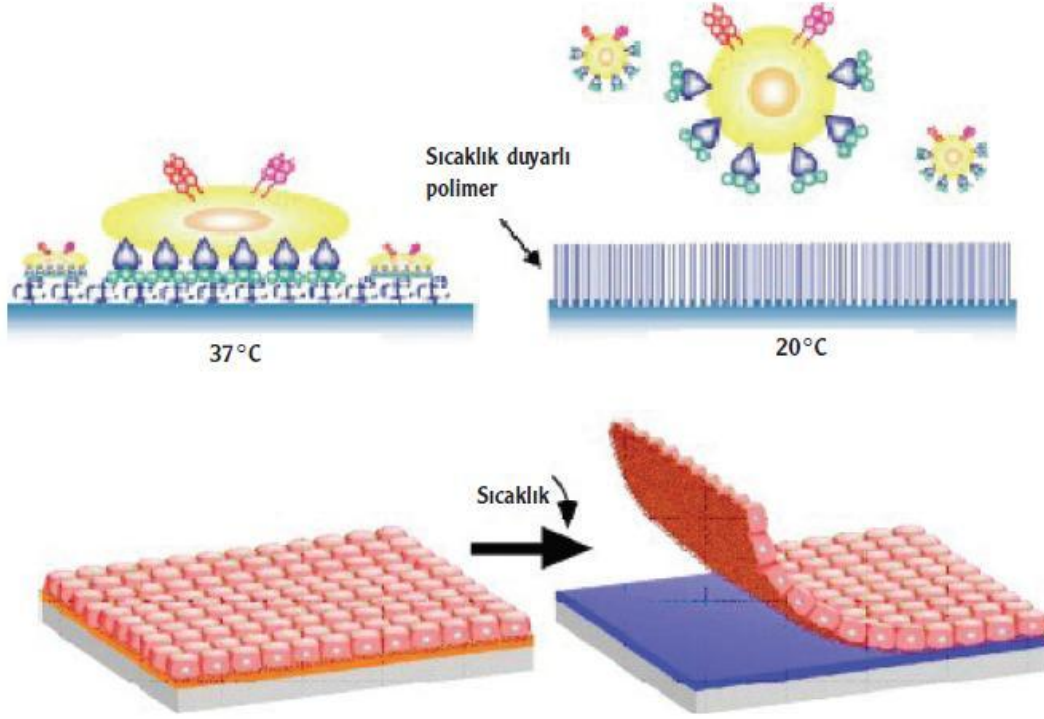
3.4.2.1. Isı Değişimine Duyarlı Kültür Kaplarının Laminin ile Kaplanması

Laminin, (Santacruz Biotechnology) serumsuz kültür medyumunu ile dilüe edildi. 35 mm'lik kültür kabı için $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ konsantrasyonda laminin hazırlanıp eklendi. En az kültür kabının yüzeyini kaplayacak kadar (0.5 ml) dilüe edilmiş laminin eklendi. Oda ısısında 1 saat bekletildi.

İzole edilen hücrelerin kültürü için 35 mm'lik 6 kuyucuklu Upcell (UpCell, CellSeed, Inc., Tokyo, Japan) kültür kabı kullanıldı. Bu kültür kabının ısı değişimine cevap verebilen polimer olan poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) yapısında olması özelliğinden faydalanıldı.

Hücreler kültür kabına ekilmeden önce kültür kabı laminin ile kaplandı. Satın alınan beta hücreleri (BRIN BD11), 35mm'lik bu kültür kabına, $0,57 \times 10^6$ hücre/ cm^2 konsantrasyonda olacak şekilde ekildi. Besiyeri içine RPMI 1640 (Invitrogen), %10 FBS (Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich) konuldu. 2 gün boyunca çoğalması beklendi ve daha sonra PIPAA m kültür kabındaki bu hücreler, 37°C deki inkübasyondan alınarak 20°C de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Hücreler tabaka halinde elde edilemedi.

Beta hücrelerini tabaka haline getirebilmek için çeşitli yöntemler denendi, 35 mm'lik 6 kuyucuklu Upcell kültür kabına beta hücreleri sKİ-MKH ile birlikte farklı oranlarda ekildi 1-1, 1-2, 1-4 ve 1-5 beta- sKİ-MKH olarak değişik MKH oranları denendi.



Şekil 3.2.: Sıcaklık duyarlı kültür kaplarında hücrelerin kültürü ve enzim kullanılmadan sıcaklık değişimi ile kaldırılması (Okano,2004)

3.5.Sıçanlarda STZ ile Diyabetin İndüklenmesi ve Diyabetik Hayvan Modelinin Oluşturulması

Streptozotosin (STZ) ile beta-hücre hasarına bağlı deneysel diyabet oluşturularak ve dişi sıçanlara kök hücre eklenmiş ve eklenmemiş beta hücre membranlarının transferinin diyabete bağlı gelişen parametrelere olası etkileri çeşitli yöntemlerle gösterildi..

Diyabet indüksiyonu yapılacak tüm dişi hayvanlara (n=3) tek doz intraperitoneal 65 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde uygulandı. Ph'sı 4.5 olan citrate buffer'da çözülmüş streptozotocin (STZ) (Sigma, St Louis, MO, USA) olarak enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara (n=3) eşit hacimlerde yalnızca sitrat buffer aynı koşullarda ve şekilde verildi. Tranplantasyondan önce, diyabetin oluşup oluşmadığı, 3 gün boyunca günde 1 kez hayvanlarda hipergliseminin ($250 \geq \text{mmol/l}$) varlığı ile konfirme edildi. Diyabet indüksiyonundan 3 gün sonra, taşınabilir glukometre cihazı ile (Medisense Precision QID; Abbott Laboratories, Bedford, MA, USA) kan glukoz düzeylerini belirlemek için ratın kuyruk ucundan kan alındı. Yapılacak ölçümler sonucunda, tokluk kan şekeri 250 mg/dL'nin üzerinde olanlarda STZ'ye bağlı beta-hücre hasarının sonucu olarak diyabetin geliştiği kabul edildi ve deneye alındı.

3.6. Nakil İçin Sıçanlara Anestezi Uygulanması ve Hücre Tabakalarının Nakli:

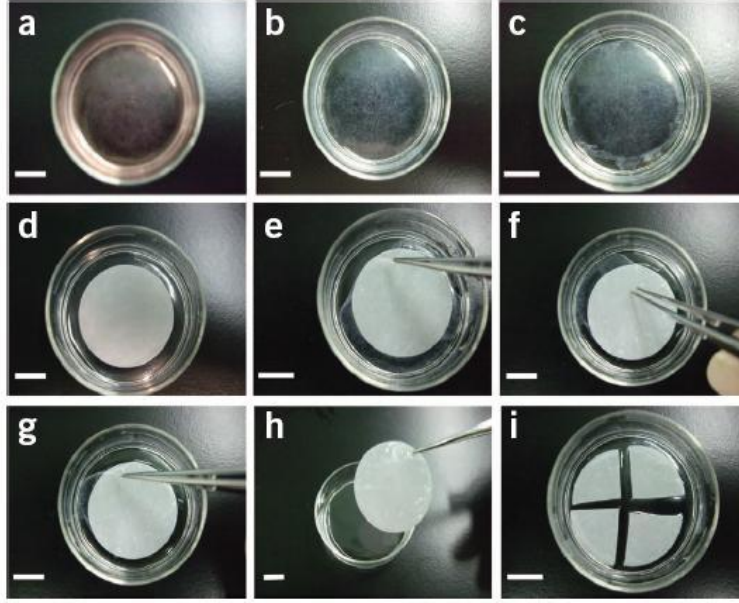
3.6.1.sKİ-MKH tabakalarının ve Beta hücrelerinin bir araya getirilmesi ve 3-boyutlu doku oluşturularak diyabetik hayvanlara transplantasyonu

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi'nden (DETAB) temin edilecek olan en az 8 haftalık 200-260 gr ağırlığında nakil yapılacak 12 adet Wistar Albino cinsi erişkin dişi sıçanlar kullanıldı ve proje süresince hayvanların barındırılması ve bakımları bu ünite de sağlandı.

3.6.1.1. sKİ-MKH tabakalarının transplantasyona hazırlanması:

STZ enjeksiyonundan 3 gün sonra kan şekeri ölçümü sonucu diyabetik olduğu tespit edilen sıçanlarda nakil yapılacağına karar verilerek aynı gün içerisinde hücreler nakil için hazırlandı.sKİ-MKH ler hayvan başına 8×10^6 olacak şekilde 2 katlı tabaka olarak hazırlandı.Böylece 3B lu MKH tabakası elde edilmiş oldu. sKİ-MKH ler ısı duyarlı kültür kaplarına (PIPAAm) nakil gününden 2 gün önce ekildi. Nakil gününde ise aşağıda belirtilen işlemler sırasıyla uygulandı

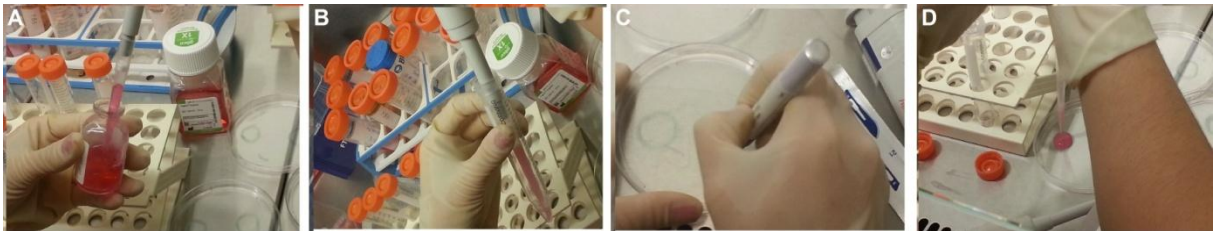
- 1) Altı-gözlü ısı duyarlı petrideki hücreler, CO₂ inkübatörden çıkarıldı. (**Şek. 3a**).
- 2) Isı duyarlı kültür petrisinin her bir gözünde 4×10^6 MKH bulunan medyumunun tamamı aspire edilerek 2 kez PBS ile yıkandı (**Şek. 3b**).
- 3) Her bir göze 500 µl PBS, hücre tabakalarının üzerine eklendi.(**Şek. 3c**).
- 4) PVDF membran (taşıyıcı membran), her bir göze, gözlerin ortasına gelecek şekilde beta-hücre tabakasının üstüne yerleştirildi.(**Şek. 3d**).
- 5) Dikkatli bir şekilde forceps ile hücre tabakasının etrafına iyice bastırılarak destekleyici membrana tutunması sağlandı. (**Şek. 3e-g**).
- 6) PVDF membran tarafından kaplanmayan ve kenarda kalan hücre tabakası pens yardımı ile PVDF membran üzerine doğru katlandı (**Şek. 3e-g**).
- 7) PVDF membrana tutunmuş olan tüm hücre tabakası, pens ile kaldırılıp 60 mm çapındaki petriye alındı. (**Şek. 3h**).
- 8) 2 tabakalı MKH oluşturulacağı için 1-7 arasındaki işlemler diğer gözdeki hücreler içinde uygulandı. PVDF membrana tutunmuş olan 2. hücre tabakası, pens ile kaldırılıp 60 mm çapındaki petri üzerindeki diğer tabaka üzerine alındı. (**Şek. 3i**).



Şekil 3.3.Hücre tabakalarının sıcaklık duyarlı kaptan PVDF destekleyici membran ile bir tabaka halinde kaldırılarak transplantasyona hazırlanması.(Okano, 2011)

3.6.1.2.Beta Hücrelerinin bir araya getirilmesi ve 3-boyutlu doku oluşturularak diyabetik hayvanlara transplantasyonu için hazırlanması

Beta Hücreleri sıcaklık duyarlı kültür kabında 2 gün kültür edildikten sonra enzimatik olarak kültür yüzeyinden kaldırılıp falkon tüp içerisinde toplandı. 9×10^6 Hücre 1800 rpm de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak pelet elde edildi. Pelet üzerine 500 ml matrigel (BD) eklendi,(Matrijel 4 C de sıvı 37 C de jel haline gelen bir madde) ve 100 lük petri kabı işaretleyici kalem(Matrijelin damlacık formunda dağılmadan kalmasını sağlamak için kullanıldı.) ile 1 cm çapında daire şeklinde işaretlendi.Matrijel ile homejenize edilmiş beta hücreleri bu daire içerisine 500 ml olacak şekilde konuldu. Petri kabı 37 C lik inkübatörde 30 dk beklendikten sonra nakil için hazır hale getirildi



Şekil 3.4.Beta hücrelerinin matrijel ile homejenize edilerek nakil için hazırlanması.**A-B.**Pelet haline getirilmiş Beta hücrelerinin üzerine matrijel eklenmesi.**C-**Petri kabının işaretleyici kalem ile daire çizilerek işaretlenmesi.**D-**Hücrelerin işaretlenen daire içine pipet ile aktarılması.

3.6.2.Anestezi

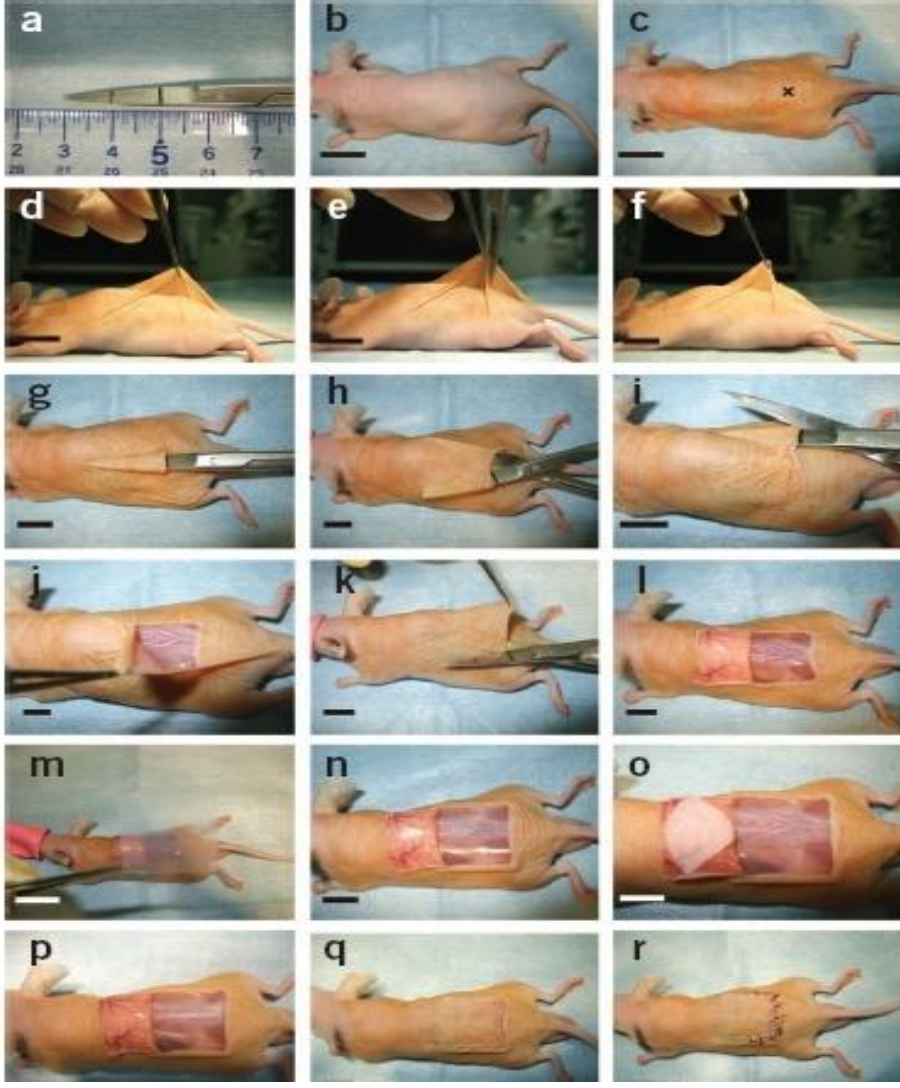
Deney hayvanlarına 5 mg/kg ksilazin hidroklorid ve 35 mg/kg ketamin hidroklorit intramuskuler olarak uygulandı. Anestezi derinliği palpebra, kornea refleksi, çene ve iskelet kası tonusu ile izlendi.

3.6.3.Derialtı(Subkutan) Nakil

3.6.3.1.sKİ-MKH Nakli

Diyabetik (Grup IV) hayvanlara transfer için genel anestezi altında sol dorsal deri bölgelerindeki subkutan bölgeye U şeklinde bir kesi (2x2 cm) açıldı. Böylece destekleyici membran üzerinde tabaka halinde bulunan hücreler, deri altı bölgesine aseptik koşullarda uygun cerrahi yöntemler kullanılarak transplante edildi. 1 dakika tutunma periyodunu bekledikten sonra, destekleyici membran hücre tabakasından dikkatlice ayrılarak uzaklaştırıldı. Hemen ardından 2nci bir hücre tabakası transplante etmek için bir başka hücre içeren membran daha ilk hücre tabakasının üzerine yerleştirilip tutunması için 1 dakika beklendi. Daha önceki hücre sayım analizlerimizden bu iki hücre tabakasındaki toplam hücre sayısının yaklaşık 8×10^6 sKİ-MKH hücresi olduğunu belirlemiştik. Açılan flep, transfer ettiğimiz 2 katlı beta hücre membranlarının üzerine forseps ile yavaşça geri çekilerek kapatıldı ve bu kapak suture edildi. Transplantasyonda her bir hayvan için 8×10^6 sKİ-MKH hücresi kullanıldı Nakilin yapılışı sırasıyla aşağıdaki gibidir:

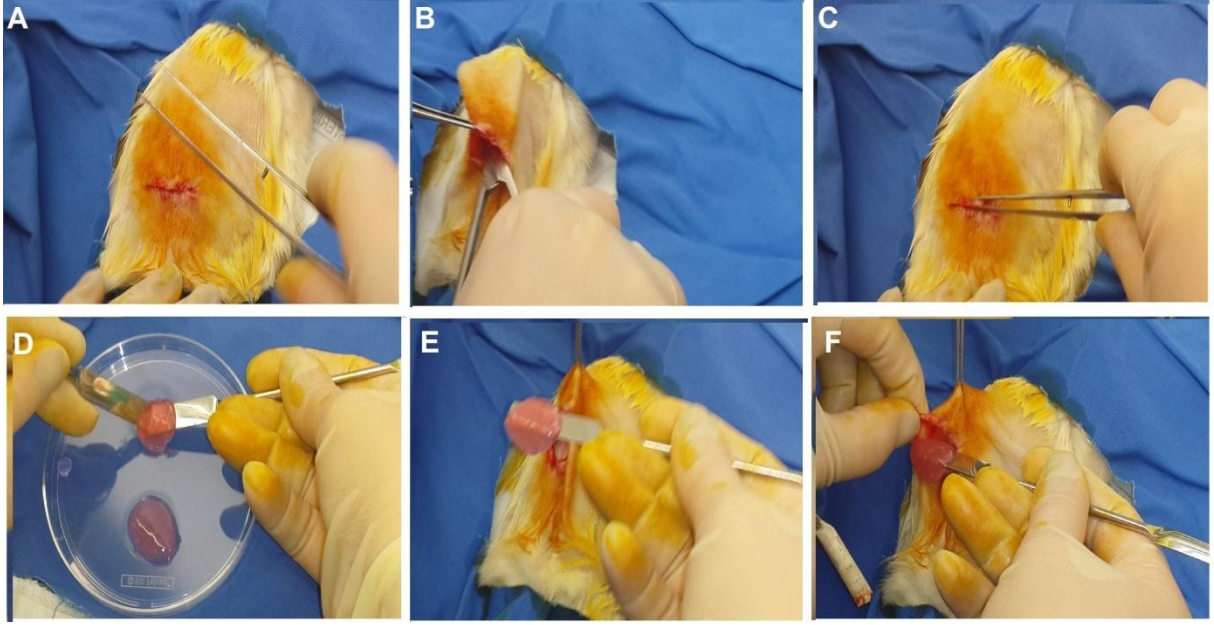
- 1.Anestezi altındaki sıçanın dorsal bölgesi %70'lik alkol ile sterilize edildi
- 2.Dorsal bölgedeki deri merkez kısmından forseps ile tutulup 10 mm havaya kaldırıldı ve deriye makas ile insizyon atıldı. (**Şek. 5d-2f**).
- 3.İnsizyon bölgesinden makas ile girilip makasın ucu açılarak derinin açılması sağlandı (**Şek. 5g, h**).
- 4.Açılan deri flebi U şeklinde bir kesi haline getirildi (**Şek. 5m-o**).
- 5.Kesilen bölgeye (subkutan dokuya) hücre tabakaları taşıyıcı membran ile yerleştirildi ve 1 dk subkutan dokuya engrafman yapması için beklendi.(**Şek. 5p, r**).
- 6.Açılan deri flebi tekrar geri kapatıldı ve dikiş atıldı (**Şek. 5r-u**).



Şekil 3.5. Subkutan transplantasyon:Anestezi altındaki sıçanın dorsal bölgesi %70'lik alkol ile sterilize edildi.(a-c). Dorsal bölgedeki deri merkez kısmından forseps ile tutulup 10 mm havaya kaldırıldı.(d). Deriye makas ile insizyon atıldı.(d-2f). İnsizyon bölgesinden makas ile girilip makasın ucu açılarak derinin açılması sağlandı.(g-h). Açılan deri flebi U şeklinde bir kesi haline getirildi (m-o). Kesilen bölgeye (subkutan dokuya) hücre tabakaları destekleyici membran ile yerleştirildi ve 1 dk subkutan dokuya engrafman yapması için beklendi (p, r). Flep tekrar geri kapatıldı.(r-u). (*Transplantation* Volume 92, Number 11).

3.6.3.2.Beta Hücrelerinin Transplantasyonu

Beta Hücreleri matrijel ile homojenize edilerek 37°C lik inkübatörde 30dk bekletildi.Süre bitiminde matrijel jel formunu kazandı ve nakil için uygun hale geldi. Genel anestezi altındaki sıçanın sol dorsal deri bölgesindeki subkutan bölgeye düz şeklinde bistüri ile insüzyon bir kesi (2 cm) atıldı. İnsizyon bölgesinden makas ile girilip makasın ucu açılarak derinin açılması sağlandı. Kesilen bölgeye (subkutan dokuya) matrijel içerisindeki beta hücreleri yerleştirildi. Açılan deri flebi tekrar geri kapatıldı ve dikiş atıldı.



Şekil 3.6. Matrijel içerisindeki beta hücrelerinin nakli: **A-** Deriye makas ile insizyon atılması. **B-** İnsizyon bölgesinden makas ile girilip makasın ucu açılarak derinin açılması. **C-** Dorsal bölgedeki deri merkez kısmından forseps ile tutulup 10 mm havaya kaldırılması. **D-** İşaretlenen daire içerisindeki matrijelin metal çubuk ile nakil alanına taşınması. **E-** **F.** Matrijel içerisindeki beta hücrelerinin subkutan bölgeye yerleştirilmesi.

3.7. Transfer edilen dokunun Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi

3.7.1. Tokluk Kan Şekeri Ölçümü

Nakil den sonra 3. günden itibaren Periyodik olarak kuyruktan alınan kan örneği ile tokluk kan şekeri ölçüldü (Accu-chek Performa Roche). 3,5,6,7,8 ve 11. günlerde de tokluk kan şekeri ile birlikte sıçanların ağırlıkları da ölçüldü. 12 alıcı sıçanda de hem 11.gün dorsal çevredeki ve nakil yapılan bölgedeki subkutan adacık dokuları çıkarıldı.

3.7.2. Intraperitoneal Glukoz Tolerans Testi

Transfer ettiğimiz yeni-adacık dokularının fonksiyonu, in-vivoda IPGTT (Intraperitoneal Glukoz Tolerans Testi) ile 11 günde ölçüldü. Bu testin yapılış şekli: 16 saat aç bırakılan sıçana intraperitoneal olarak glukoz solüsyonu verildi. (1mg/g body weight) ve değişik saatlerde ölçümleri yapıldı. 30.dk, 60.dk ve 120. dk larda sıçanın kuyruk veninden kan örneği alınarak glukometre cihazı ile ölçüldü.

3.7.3.Deri altı dokunun çıkarılması

Nakilden sonra 11. günde dorsal çevredeki ve nakil yapılan bölgedeki subkutan adacık dokuları çıkarıldı. Nakil bölgesindeki deri ile birlikte kas dokusunda alındı.Bu dokular %10 formalin bulunan kaplara konuldu.

Deney gruplarındaki sıçanlardan pankreasları alındı. Pankreasın kloedok kanalına kanül ile girilerek içine %10 formalin enjekte edilerek doku şişirildi ve etrafındaki dokulardan sıyrılarak çıkartıldı.

3.8.Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler

11.günde nakil bölgesindeki subkutan dokular alındı ve %10 formalin ile fikse edildi. Pankreas dokuları ise; karın ön duvarı sternuma kadar uygun cerrahi teknikler ile açıldıktan sonra koledok kanalının duodenuma giren kısmı sabitlenip ve 23 g kanül yardımıyla 8-10 ml formalin solüsyonu enjekte edilerek alındı. Örnekler parafine gömüldü ve 5µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilin-eosin ve immunohistokimyasal boyama yapıldı. Immunohistokimyasal ve histolojik analiz için kesitlere önce deparaffinizasyon işlemi uygulanarak parafin uzaklaştırıldı. Bunun için 70°C lik etüvde 30 dakika bekletilen parafin kesitler önce ksilen de 5 dakika 3 er kez bekletildi.Devamında 1 dk saf alkol ve 1 dk %96 lık alkol serilerinden geçirilerek parafin uzaklaştırılmış oldu. Antijen retrieval işlemi tamamlandıktan sonra antibody diluent ile uygun oranlarında dilue edilen anti-rat insulin antikoru (Santa Cruz Biotechnology) ve GFP (Santa Cruz Biotechnology) PECAM-1 active caspase,TGFβ IL-6 antikoru ile subkutan nakil bölgesi dokuları+4⁰C de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Pankreas dokuları ise anti-mouse PCNA(Millipore) ve anti-rat insulin antikoru (Santa Cruz Biotechnology) ile inkübasyona bırakıldı.Ertesi gün PBS ile 3X2dk yıkama işleminden sonra immunfluoresan çalışmalar için uygun fluoressan (FITC, TR) işaretli sekonder antikor Alexa-Fluor-594-konjuge anti-rabbit immunoglobulin(Invitrogen) ve Alexa-Fluor-488-konjuge anti-goat immunoglobulin antikoru kullanıldı. Bu işlemde oda sıcaklığında 30dk. inkübe edildi, son aşama nükleer boya içeren kapatma medyumu (UltraCruz Mounting Medium for flouresence with DAPI) ile kapatıldı.Fluoressan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

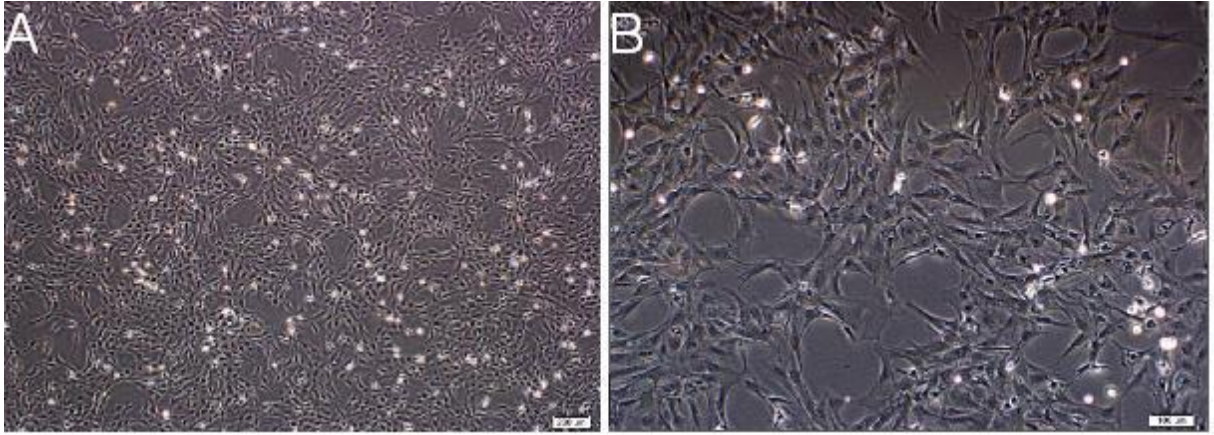
Hematoksilen-Eosin boyaması yapılan deri grefti ve pankreas doku kesitleri Crystalmaunting medium ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı.

4-BULGULAR

4.1.Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

4.1.1.Sıçan kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerin (sKİ-MKH) kültür ve karakterizasyonu

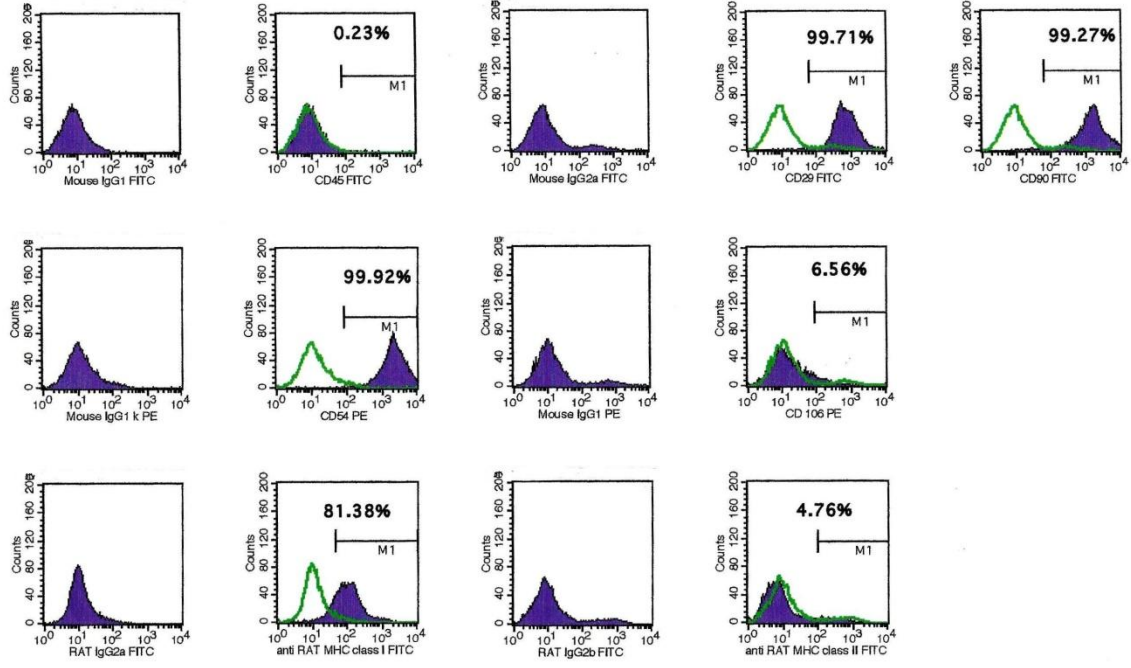
Sıçan kemik iliğinden izole edilen hücrelerin kök hücre olup olmadığını kanıtlamak için ışık mikroskopunda morfolojik incelemenin yanı sıra akım sitometrisi yöntemiyle kök hücre belirteçleri taşıyıp taşımadıklarına bakıldı. Ayrıca yağ ve kemik farklılaşmaları yapılarak bir kök hücre özelliği olan farklı hücre tiplerine dönüşebilme karakteristiği taşıyıp taşımadıkları belirlendi.



Şekil 4.1.Sıçan kemik iliğinden izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerin kültürü sırasında 3.pasajdaki (P3) faz-kontrast mikroskobik görüntüleri (Ölçüm çubukları: A-200 μm ve B-50 μm).

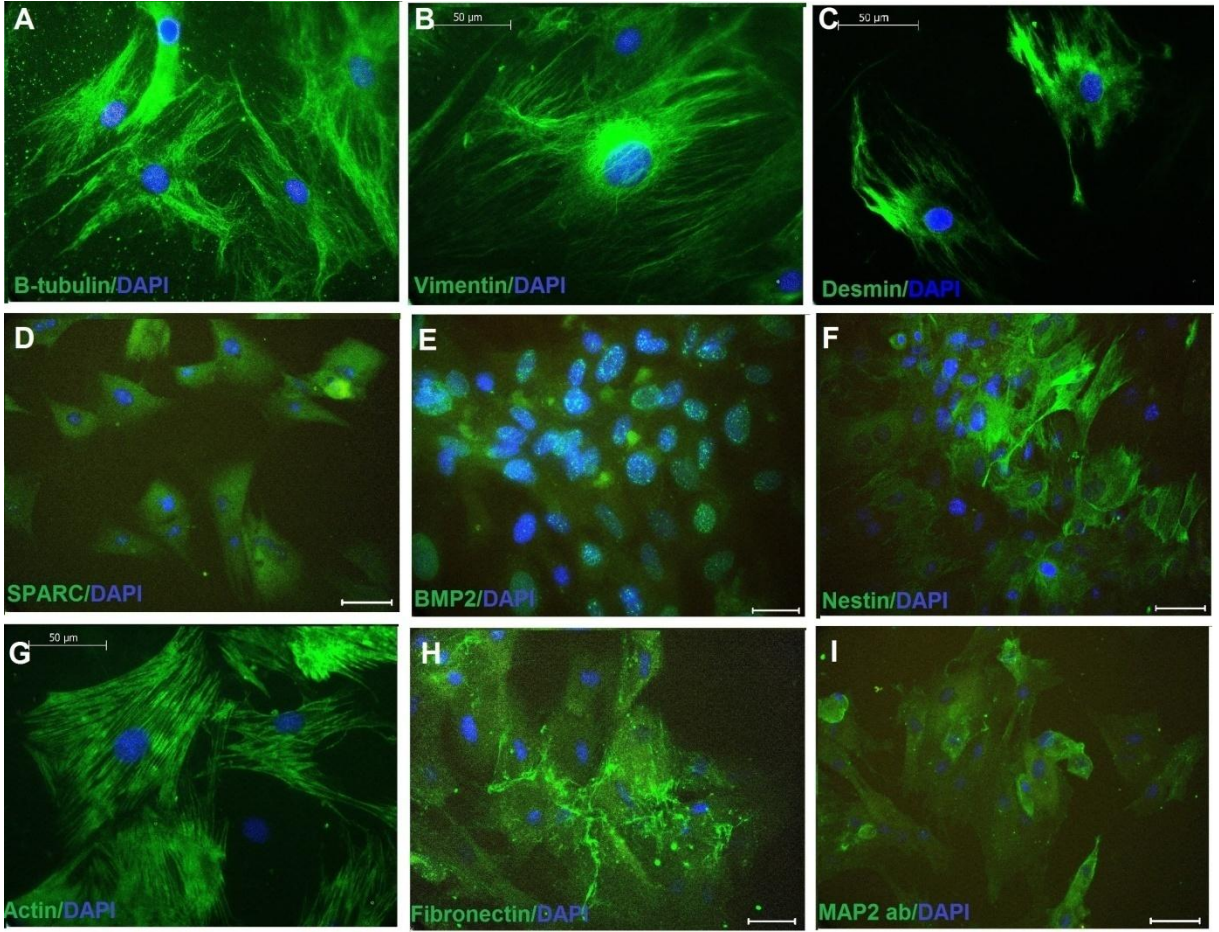
İzole edilen Kİ-MKH'lerin, kültürün 10. gününde daha çok kısa ve yuvarlak bir morfolojiye sahip oldukları ve MKH davranışlarından biri olan koloni oluşturmayı gerçekleştirdikleri gözlemlendi (Şekil 4.1.A). İlerleyen pasajlarda ise giderek uzun ve ince bir şekil alarak, normal MKH görünümleri kazandıkları gösterildi (Şekil 4.1.B).

Yapılan akım sitometri analizi sonucunda, Kİ-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC yönünden pozitif; CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR açısından negatif oldukları gösterildi.



Şekil 4.2. Sıçan kemik iliğinden izole edilip kültür edilmiş (P3) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immunofenotipik özellikleri. sMKH'ler; CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC belirteçleri yönünden pozitif; CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR belirteçleri açısından negatif olarak gözlemlendi.

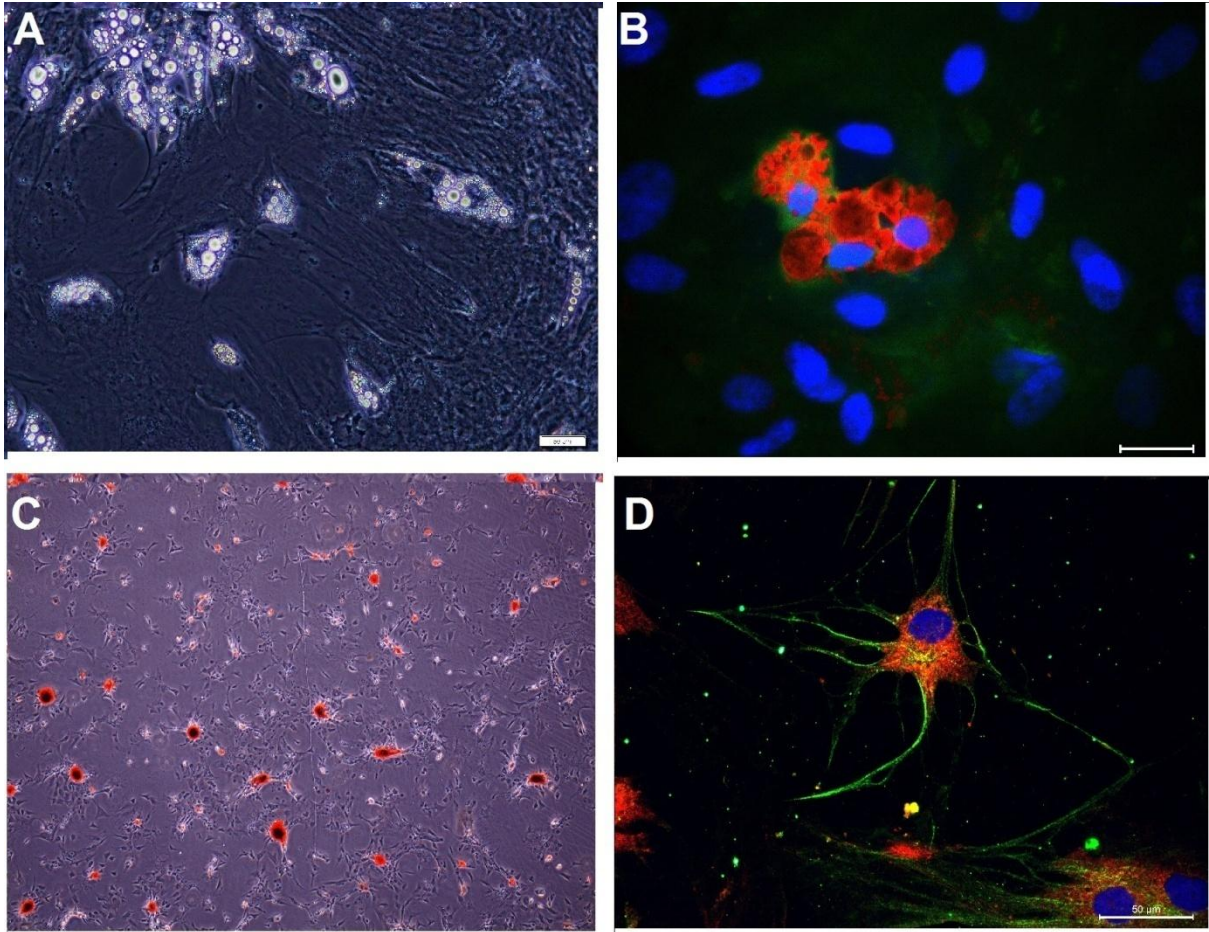
sKİ-MKH'ler immünfloresan olarak çeşitli MKH belirteçleri ile işaretlendi ve pozitif oldukları flouresan mikroskopta incelenerek gösterildi. Hücre çekirdekleri DAPI ile gösterildi



Şekil 4.3. Sıçan kemik iliğinden izole edilmiş MKH'lerin karakteristiklerinin immunofloresan işaretleme ile analizi: **A-** B-TUBULİN (yeşil), **B-** VİMENTİN (yeşil), **C-** DESMİN (yeşil), **D-** SPARC (yeşil), **E-** BMP2 (yeşil), **F-** NESTİN (yeşil), **G-** ACTİN (yeşil), **H-** FİBRONEKTİN (yeşil), **I-**MAP2 ab (yeşil). Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi (Ölçüm çubukları, 50 μ m).

Kİ-MKH'lerin 28 günlük kültürün sonunda sabitlenerek Oil Red O ile boyandığında, deney grubunda oluşan yağ veziküllerinin Oil Red O boyası ile kırmızı renk verdiği (Şekil 4.3.B), herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan Kİ-MKH'lerin ise adipojenik farklılaşma yoluna gitmediği ve dolayısıyla da Oil Red O boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.3.A).

Kİ-MKH'lerin 28 günlük kültürün sonunda sabitlenerek Alizarin Red ile boyandığında, deney grubunda oluşan kalsiyum fosfat nodüllerinin Alizarin Red boyasının kemik nodüllerine özgü rengi olan kırmızıya boyandığı saptandı (Şekil 4.3.C). Nörojenik bir farklılaşma besiyeri uygulanan Kİ-MKH'lerin ise Nestin-cfos ikili boyamasında bu nörojenik belirteçler pozitif gösterildi.



Şekil 4. 4. Sıçan kemik iliğinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) farklılaşmaları ve farklılaşma sonrası immunofluoresan ve histokimyasal analizleri: **A-** Adipojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş MK-MKH'lerin faz-kontrast mikroskopundaki görünüşleri. Adipojenik yönde farklılaşan hücrelerin sitoplazmalarında yağ vakuelleri belirgin olarak izlenmektedir (Ölçüm çubuğu, 50 μ m). **B-** Adipojenik yönde farklılaşmış hücrelerin Oil red-O ile boyanmış yağ vakulleri (Oil Red O Boyaması) (Ölçüm çubuğu, 50 μ m), **C-**Osteojenik farklılaşma kırmızı ile boyanmış ekstrasellüler matrikste kalsiyum birikimi (Alizerin Red-S Boyaması) (Ölçüm çubuğu, 200 μ m). **D-** Nörojenik farklılaşma sonrası hücrelerde, nörojenik hücelere spesifik NESTİN ve C-FOS pozitif olarak izlenmektedir (NESTİN: Yeşil, C-FOS: Kırmızı) (Ölçüm çubuğu, 50 μ m).

4.1.2.sKİ-MKH'lerin GFP ile işaretlenmesi

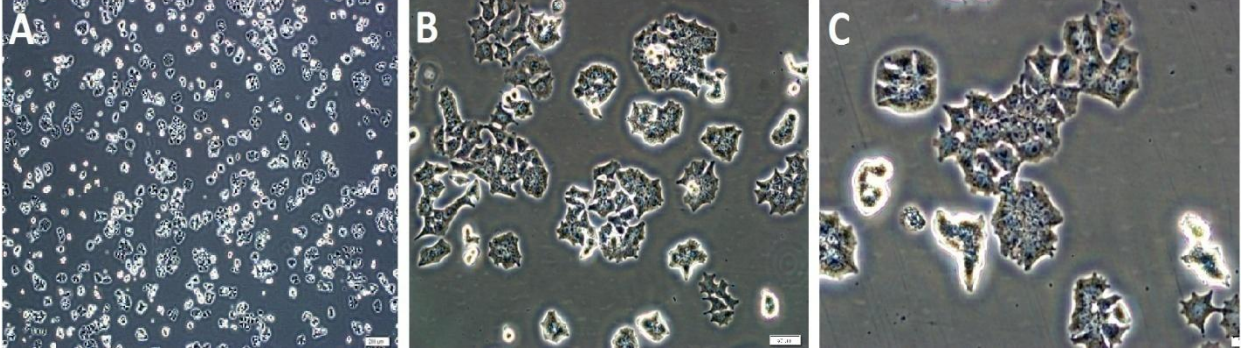
sKİ-MKH lar P3 ten sonra GFP ile işaretlendi ve nakil için çoğaltılmaya devam edildi.

4.1.3.Beta Hücrelerinin Kültür veKarakterizasyonu

4.1.3.1.Beta Hücrelerinin Karakterizasyonu

Satın alınan beta hücrelerinin (BRIN BD11) canlılık ,çoğalma ve nakil için uygunluğunu kanıtlamak için ışık mikroskopunda morfolojik inceleri yapıldı. Bunun yanı immunfloresan boyama yapılarak beta hücre belirteçleri taşıyıp taşımadıklarına bakıldı. Ayrıca nakil öncesi in vitroda bu hücrelerin değişen glukoz oranlarına karşı insülin salgılama kapasitelerini ölçme amaçlı insülin salgılama deneyi yapıldı.Hücrelerin kültür

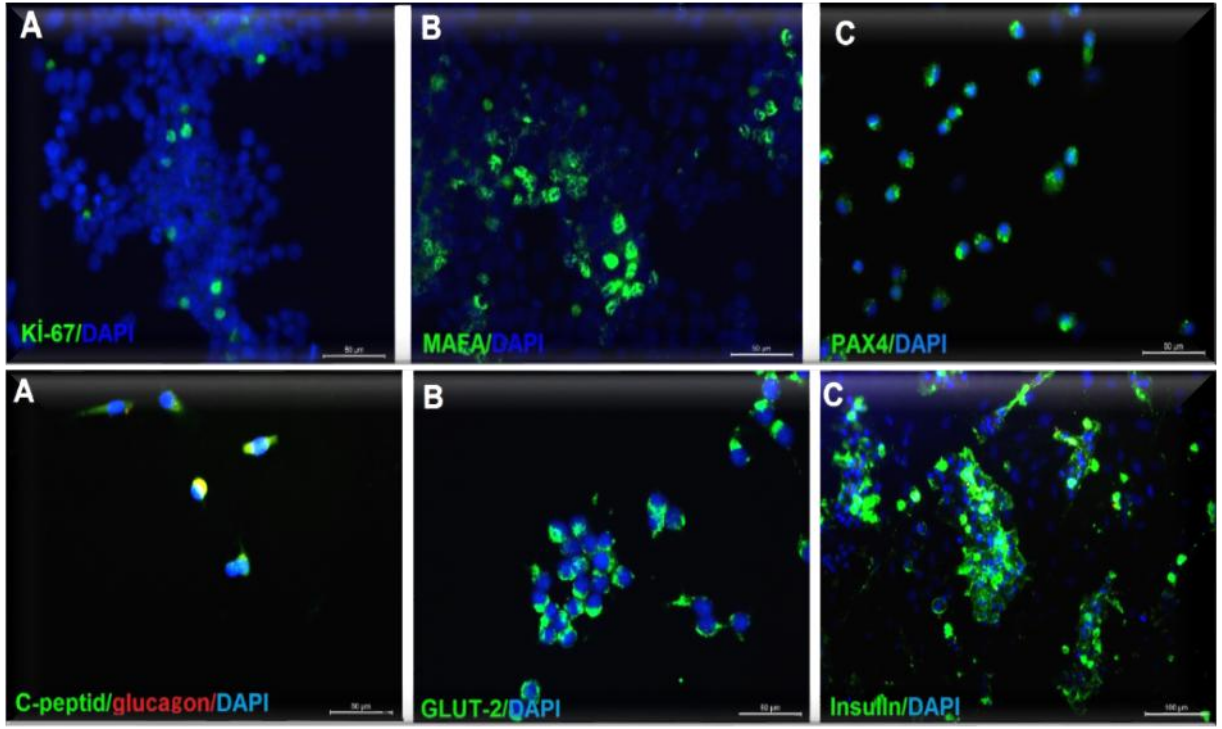
ortamında apoptoz(programlanmış hücre ölümü) düzeyleri için ELISA apoptoz kiti çalışılarak 2 gün kültür sürecindeki apoptoz düzeyleri belirlendi.



Şekil 4.5: Beta hücre hattına (BRIN BD 11) ait hücrelerin kültürdeki faz-kontrast mikroskopik görüntüleri. Beta hücreleri, epiteliyal hücrelere özgü poligonal şekilli ve kısa uzantıları olan hücreler olarak izlendi ve kültürde proliferasyon sonrası koloni oluşumları gözlemlendi (Ölçüm çubukları **A-** 200 μm **B-** 50 μm , **C-** 20 μm).

Beta hücrelerinin T175 kültür kabına ekildikten 2 gün sonraki yüzeye tutunma görüntüleri incelendiğinde, birbirleri ile koloni oluşturdıkları gözlemlendi fakat hücreler ekildikten günler sonra yüzeyin tamamını kaplamadıkları görüldü. Kültürde hızlı çoğaldıkları fakat 3. günde kontrol edildiklerinde çoğu hücrenin yüzeyden kalktığı gözlemlendi.

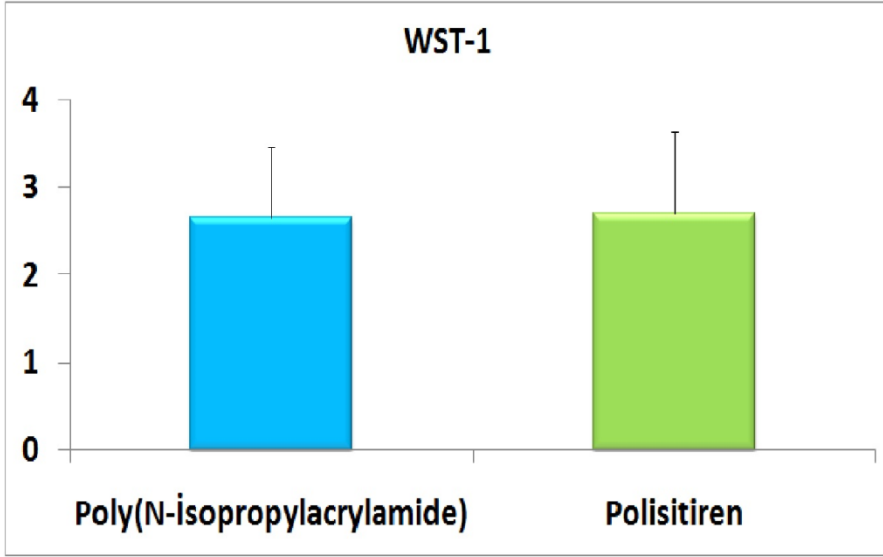
Beta hücrelerinin karakterizasyonu için yapılan immünfloresan boyamalarda 8 kuyucuklu lamlara eklen beta hücreleri kendine özgü işaretleyiciler ile boyanarak hücrelerin pozitif oldukları gösterildi.



Şekil 4.6. Beta hücrelerinin karakteristiklerinin immunfloresan işaretleme ile analizi. **A-** Kİ-67 (Yeşil), **B-** MAF-A (Yeşil), **C-** PAX-4 (Yeşil), **D-** C-PEPTİT (Yeşil), GLUKAGON (Kırmızı), **E-** GLUT2 (Yeşil), **F-** İNSÜLİN (Yeşil). Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi (Ölçüm çubukları, 50 μ m).

4.1.3.1.1. Beta hücrelerinin sıcaklık duyarlı kültür kabı üzerindeki canlılıklarının belirlenmesi: WST-1 Testi

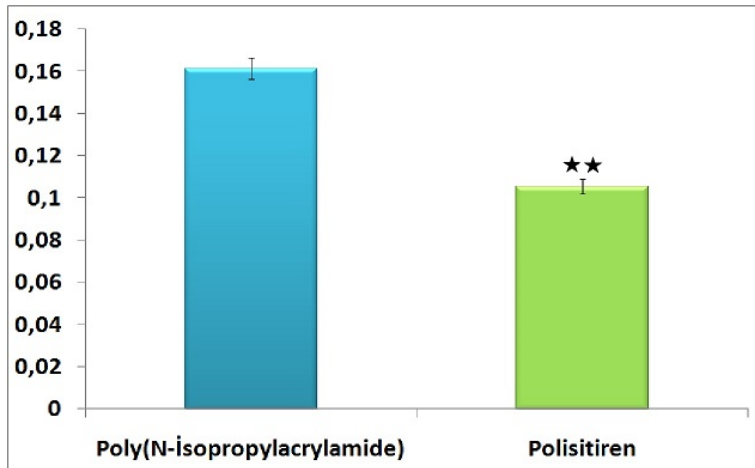
Sıcaklık duyarlı kültür kaplarında enzimsiz kültür sonrası beta hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonlarını tespit etmek için kültürün 2. gününde bu test uygulandı. 6-kuyucuklu playtlere hücreler 12.5×10^4 olacak şekilde ekildi Enzim kullanmadan 37°C lik inkübatörden 20°C lik ısıya alınan hücreler 30 dk beklenerek kültür kabından kalkması sağlandı. Test gününde(2. Gün) hücreler toplanıp 96-kuyucuklu playtlere ekildi. Kontrol grubu olarak polisitiren kaplı kültür kapları kullanıldı Bu kültür kabındaki hücreler tripsin (Gibco) ile kaldırıldı. Deney sonunda absorbans değerleri 480 nm 'de monokromatör sistemli mikropłaka okuyucuda okunduktan sonra yapılan analizde birbirine eş değerde sonuçlar çıktığından anlamlılık görülmedi. İki farklı kültür kabında kültür edilen beta hücrelerinin kültürün 2. Gününde canlılık oranlarının aynı olduğu tespit edildi.



Şekil 4.7. Poly(N-İsopropylacrylamide) ve Polisitiren kültür kaplarında kültür edilen beta hücrelerinin 2 gün süre ile kültürü sonundaki çoğalma ve canlılık kapasitesinin WST-1 analizi ile karşılaştırılması. Gruplar arasında fark gözlenmedi ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$).

4.1.3.1.2. Apoptoz Deneyi

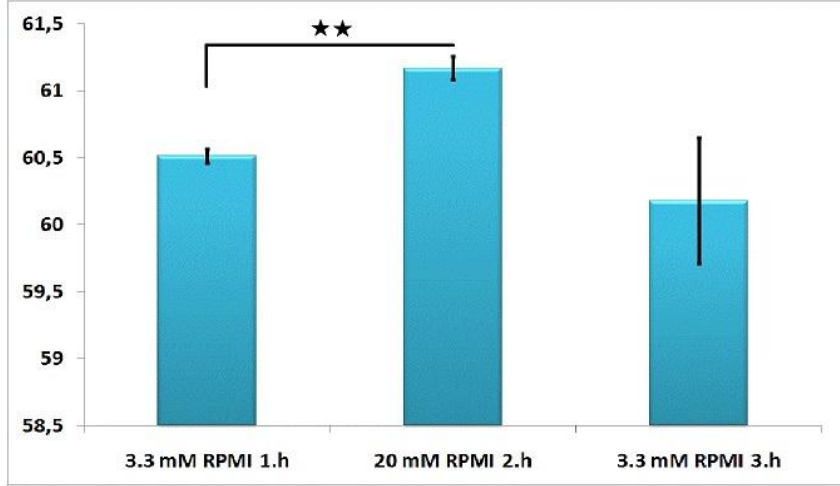
Beta hücrelerinin 2 günlük kültür sürecinde apoptoz düzeyini belirlemek için uygulanan apoptoz deneyi sonrasında kontrol grubu(Polisitiren) ve deney grubu(Poly(N-İsopropylacrylamide) student't testi ile karşılaştırıldığında sonuç $**p<0.01$ olduğundan apoptozun polisitiren kaplı kültür kabında anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi.



Şekil 4.8 Polisitiren (kontrol) ve Poly(N-İsopropylacrylamide) (deney grubu) kültür kaplarında kültür edilen Beta hücrelerinin apoptoz analizi. 2 gün kültür sonrasında kontrol grubunda deney grubuna göre apoptozun anlamlı dercede daha fazla olduğu belirlendi ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$).

4.1.3.1.3.İnsülin Salgılama Deneyi

Sıcaklık duyarlı kültür kabındaki beta hücrelerinin besiyerine düşük ve yüksek konsantrasyonlarda glukoz eklenerek,değişen glukoz oranlarına verdiği insülin yanıtı tespit edildi.Glukoz miktarı arttırıldığında buna cevaben insülin miktarında artma görüldü. Glukoz miktarı azaltıldığında ise cevap olarak insülin salgısının azaldığı tespit edildi.



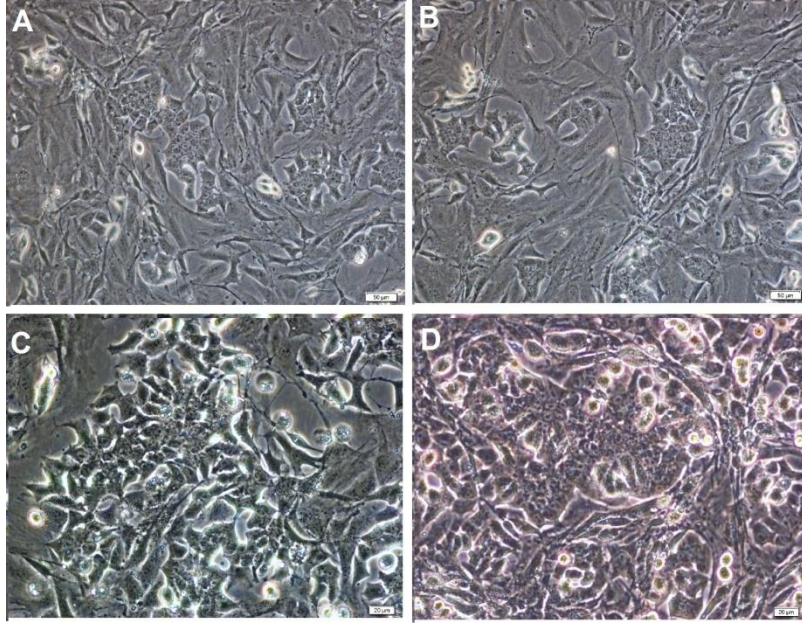
Şekil 4.9.Glukoz ile indüklenmiş insülin salgılama fonksiyon analizi. Besiyerine eklenen glukozun çeşitli konsantrasyonlarına her iki kültür kabındaki beta hücrelerinin insülin salgılayarak verdiği cevap açısından karşılaştırıldı. 3.3 mM glukozdan 20 mM glukozla geçildiğinde hücrelerin insülin salgısı $**P<0.01$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir. ($n=3$, ortalama±SS, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$).

4.1.3.2.İsı Değişimine Duyarlı Kültür Kabında Beta Hücre Kültürü

Nakil için hazırlanan beta hücrelerinin 2gün kültür periyodu sonunda tabaka haline gelmesi beklendi. Beta hücreleri 37°C lik inkübatörden 20°C lik ısıya alındıktan sonra hücreler 30 dk inkübasyon sonrasında kültür kabından tabaka halinde kalkmadığı görüldü.

Beta hücrelerinin hem T175 kültür kaplarında (polisitiren) hem de PIPAAm kültür kaplarında çoğaltılma aşamasında bu hücrelerin kültür kabının yüzeyinin tamamını kaplamadığı (konfluent olmadığı) mikroskopik olarak gözlenmişti. Bu durum hücrelerin epitelyal karakterde olması ve koloni yapısında (monolayer) kümeler yapmasından kaynaklanmaktadır. Kültürdeki süre arttırıldığında da, fibroblastik hücrelerde olduğu gibi konfluensiyi sağlayamadılar. Bu yüzden PIPAAm kültür kaplarında hücrelerin bir membran oluşturarak kalkması ve bu membranın nakil yapılabilmesini sağlamak için PIPAAm kültür kabında hücreler sKİ-MKH'ler ile homojenize edilerek külür kabına ekildi. Buradaki amaç MKH'lerin besleyici tabaka (feeder layer) gibi davranarak

fibroblastik tipte oldukları için membran oluşumunun desteklenmesiydi. Tabaka oluşması için gereken hücre sayısının optimizasyonu yapıldı. Beta hücrelerinin kültürünün MKH gibi destekleyici hücre grubu ile hücrelerin canlılık ve çoğalma açısından da daha başarılı olduğu gözlemlendi. Besleyici hücre tabakasına ihtiyaç duyan embriyonik kök hücreler gibi beta hücrelerinin de başarılı kültürü için destekleyici hücre hattına gereksinimi olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 4.10. Kİ-MKH ve beta hücrelerinin farklı oranlarda yapılmış birlikte kültür (ko-kültür) görüntüleri. Beta hücreleri tüm oranlarda çoğalma ve proliferasyon açısından MKH'siz kültürlerle oranla daha verimliydi. **A**-1:1 oranında Beta-MKH (ölçüm çubuğu, 50 μ m), **B**-1:2 oranında Beta-MKH (ölçüm çubuğu, 50 μ m), **C**-1:3 oranında Beta-MKH (ölçüm çubuğu, 20 μ m), **D**-1:4 oranında Beta-MKH (ölçüm çubuğu, 20 μ m).

4.2. Beta hücrelerinin ve sKİ-MKH tabakalarının nakli

Beta Hücrelerinin ve sKİ-MKH tabakalarının diyabetik sıçan modeline 2 aşamalı olarak nakli yapıldı.

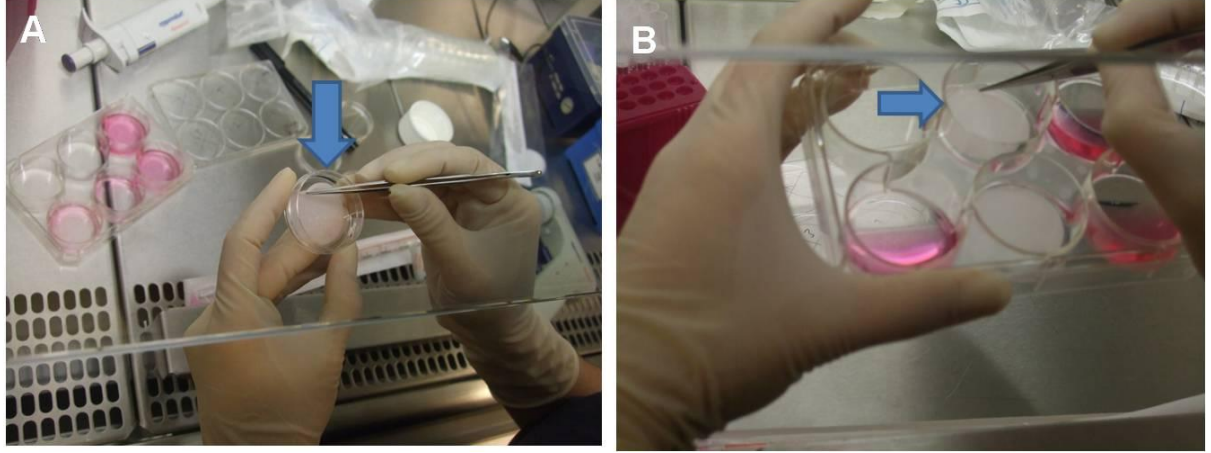
İlk aşamada sıçanın dorsalde deri altı bölgesine U şeklinde kesi açıldı. PIPAAm kültür kabında ısı farkıyla kaldırılan hücre tabakaları taşıyıcı membran ile nakil bölgesine yerleştirildi. 1 dk bekleddikten sonra taşıyıcı membran kaldırılarak MKH tabakasının nakil bölgesine yerleşmesi sağlandı.

İkinci aşamada ise beta hücreleri nakil bölgesine yerleştirildi. MKH ların nakli sırasında U şeklinde açılan deri beta hücre nakli öncesi kesinin iki yanı kapatıldı ve tek bir açık bölge bırakıldı. Matrijel içerisinde bulunan beta hücreleri nakil bölgesine yerleştirildi

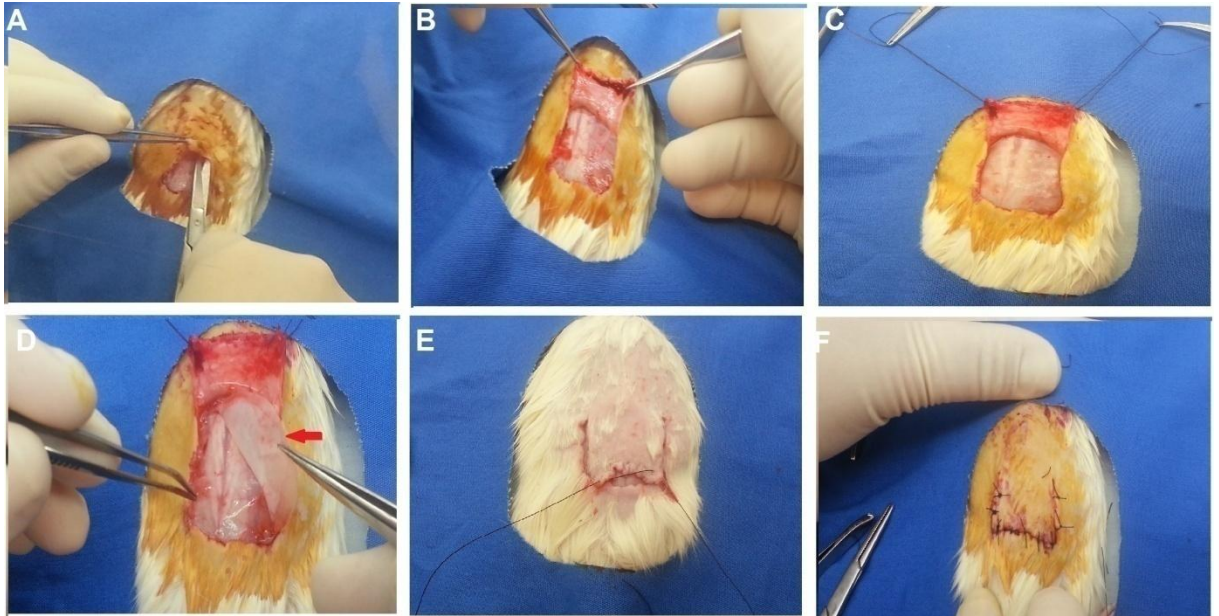
ve dikiş atıldı.

4.2.1.sKİ-MKH tabakalarının nakli

sKİ-MKH hücre tabakası elde edildikten sonra taşıyıcı membran ile hedef bölgeye nakil yapıldı.



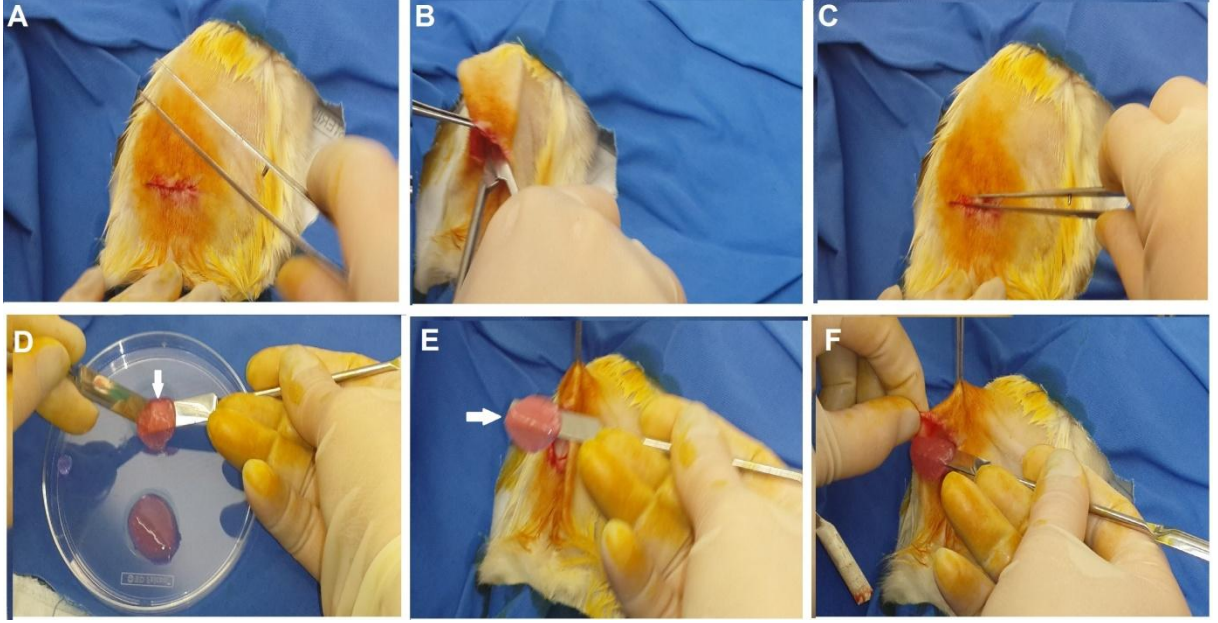
Şekil 4.11. Sıcaklık duyarlı kültür kabında(PIPAAM) 2 gün süreyle kültür edilen sKİ-MKH hücre tabakasının taşıyıcı membran ile nakil için hazırlanması. **A-B:** Kültür kabı içindeki hücrelerin taşıyıcı membran ile tabaka halinde kaldırılması (**Ok:** taşıyıcı membran).



Şekil 4.12.sKİ-MKH ların deri altı bölgesine nakli.**A-C:**Sıçan dorsal bölgesinin U şeklinde açılması.**D:** sKİ-MKH tabakasının taşıyıcı membran ile deri altı bölgeye nakledilmesi.(Taşıyıcı membran şekil D de kırmızı ok ile gösterilmiştir.)

4.2.2. Beta Hücrelerinin Nakli

Beta hücreleri matrijel le homojenize edilerek 3-B lu beta hücre dokusu oluşturuldu. Nakil bölgesindeki sKI-MKH tabakasının üzerine yerleştirildi.



Şekil 4.13. Matrijel içerisindeki beta hücrelerinin nakil görüntüleri. **A-C:** Nakil derialtı bölgesinin açılması. **D-F:** Matrijel içerisindeki beta hücrelerinin deri altı bölgesine yerleştirilmesi. (Matrijel Şekil D ve E de beyaz ok ile gösterilmiştir.)

4.3. Transfer Edilen Dokuların Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi

4.3.1. Nakil Sonrası Sıçanların Ağırlık Ölçümü

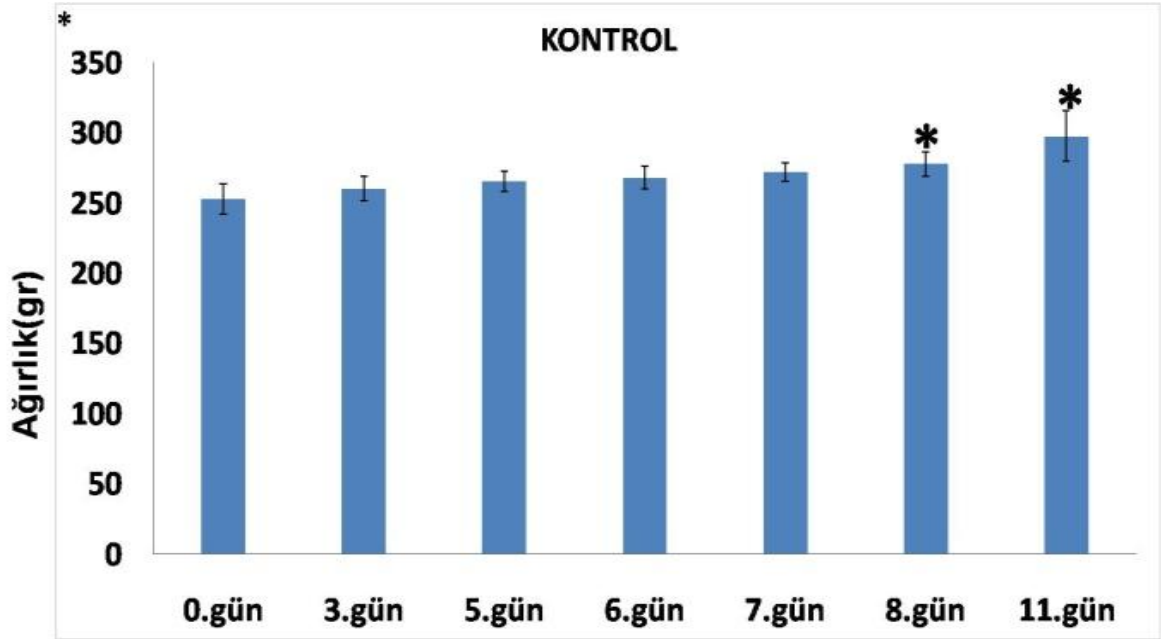
Sıçanların nakilden sonra 3. günden itibaren ağırlıkları ölçüldü. 5,6,7,8 ve 11. Günlerde ağırlık ölçümleri devam etti. Diyabete bağlı olarak ağırlıklarında değişim olup olmadığı studen't testi ile analiz edildi.

Sağlıklı kontrol grubunda ilerleyen günlerde beslenmeye bağlı olarak ağırlıkta düzenli artış görüldü 8. ve 11. günlerde artış gözlemlendi. (*P<0,05) olduğundan anlamlı kabul edildi.

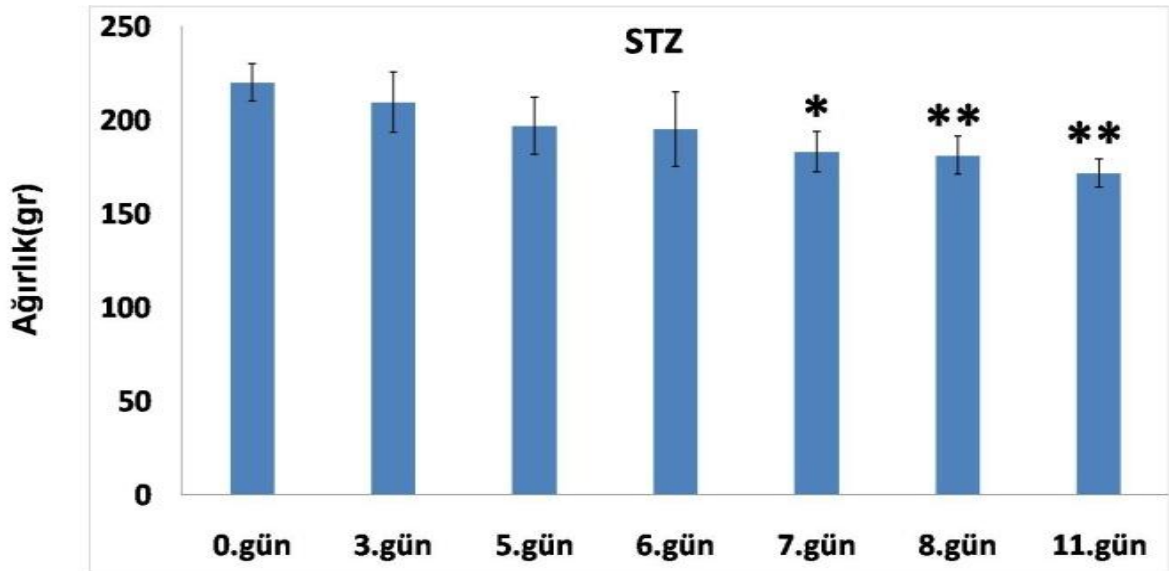
STZ enjeksiyonu yapılmış kontrol grubunda diyabete bağlı olarak 7.günden itibaren ağırlığında belirgin bir azalış gözlemlendi. 7,8 ve 11. günlerde sırasıyla (*P<0,05), (**P<0.01) olduğundan anlamlı kabul edildi.

Beta hücre nakli yapılmış diyabetli sıçan grubunda naklin sonuncu gününde ağırlıkta azalma görüldü fakat istatistiksel açıdan anlam göstermediği tespit edildi.

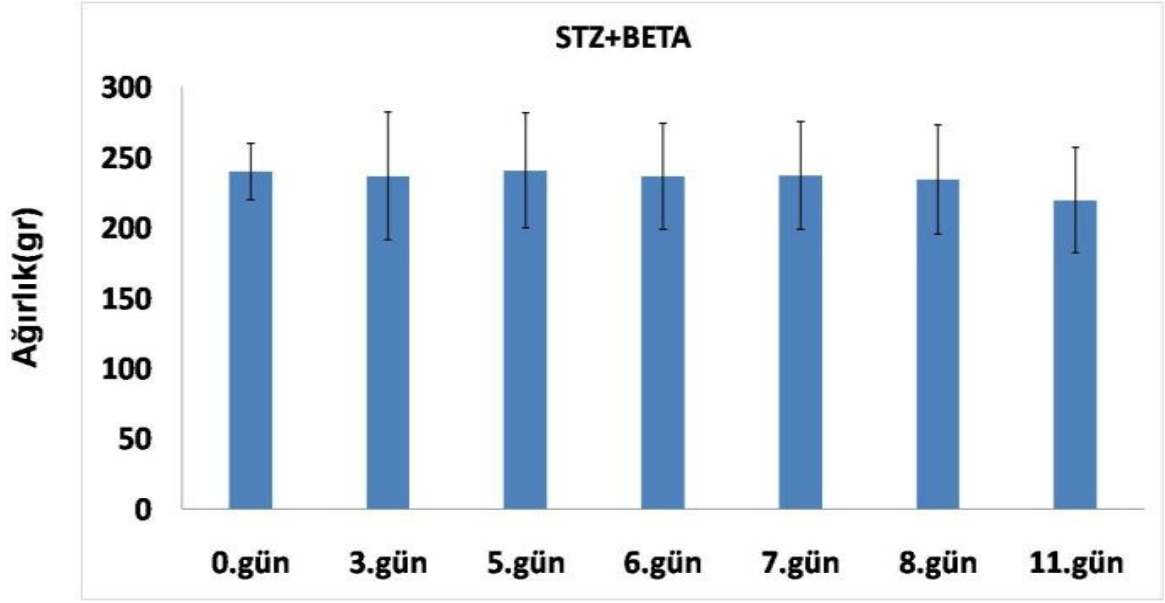
Beta hücresi ile birlikte MKH nakli yapılmış olan grupta 7. güne kadar ağırlıkta azalma görüldü.7. ve 8. günlerde tekrar ağırlık artışı olduğu tespit edildi.Fakat istatistiksel açıdan anlamlı görülmedi.



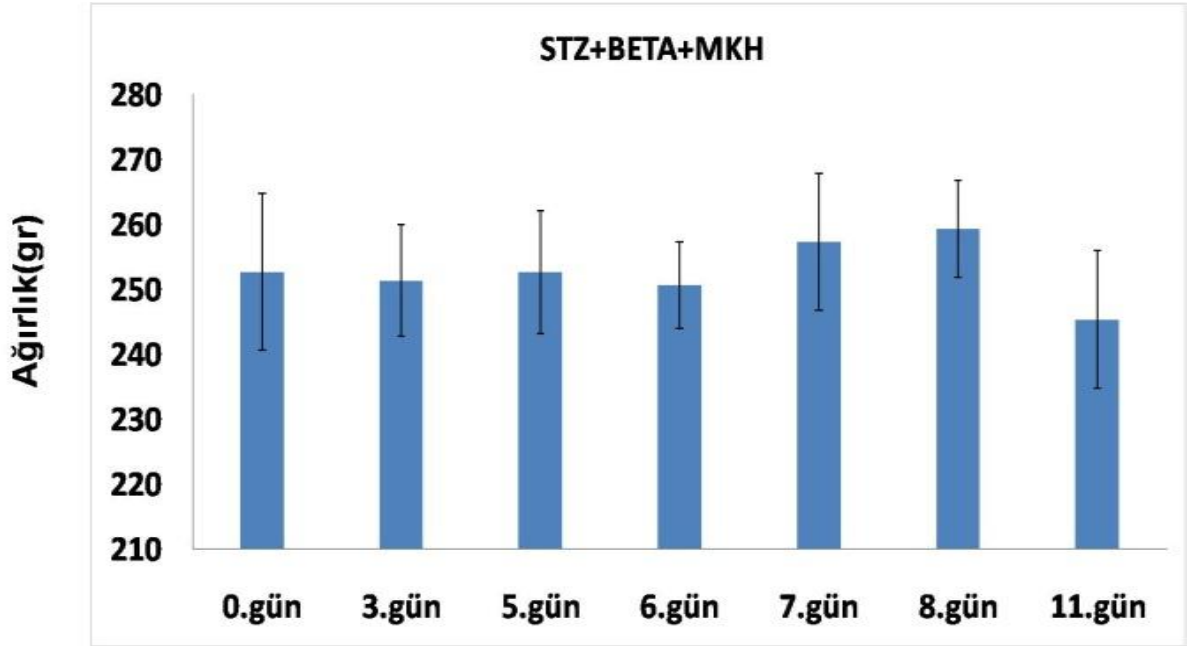
Şekil 4.14. Kontrol grubu günlere göre ağırlık değişimi. 8 ve 11. günlerde anlamlı artış görülmekte (* $P<0,05$). ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).



Şekil 4.15. STZ li Kontrol grubu günlere göre ağırlık değişimi.7, 8 ve 11. günlerde anlamlı azalış (** $P<0,01$) görülmekte (* $P<0,05$). ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).



Şekil 4.16. Beta hücresi nakledilmiş STZ li sıçan grubu günlere göre ağırlık değişimi. (n=3, ortalama±SS, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).



Şekil 4.17.: Beta hücresi ve MKH nakledilmiş STZ li sıçan grubu günlere göre ağırlık değişimi. (n=3, ortalama±SS, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

4.3.2. Nakil Sonrası Sıçanların Tokluk Kan Şekeri Ölçümü

STZ enjeksiyonu yapıldıktan 3 gün sonra STZ ye bağlı beta hücrelerinin haraplanması ile kan şekerinin yükseldiği kuyruk veninden alınan kan örneğinin glukometre cihazı ile ölçülmesi sonucu tespit edildi. Tokluk kan şekeri 250 mg/dL'nin

üzerinde olanlarda STZ'ye bağlı beta-hücre hasarının sonucu diyabetoluştugu kabul edildi.

Nakilden sonra 3.gününden itibaren nakil gruplarından 5,6,7,8 ve 11. günlerde kuyruk veninden alınan kan örneğinden tokluk kan şekeri glukometre cihazı ile ölçüldü.Sağlıklı kontrol grubu,STZ li kontrol grubu, sadece beta hücresi verilmiş,beta hücresi ve MKH verilmiş deney grupları 0,3,5,6,7.8 ve 11. günlerdeki değişimler birbiri ile karşılaştırılarak incelendi.

Yapılan analizlerde ölçüm yapılan günlerin her birinde gruplar arası karşılaştırma yapıldı.

Yapılan analizlerde oluşturulan grafikte deney grupları arasında nakil yapılmadan önceki tokluk kan şekeri, nakilden sonraki 3 ve 8. günlerdeki tokluk kan şekeri değerleri ile karşılaştırılarak spss analizi yapıldı.Aynı zamanda 8. Günde 4 deney grubu birbiri ile karşılaştırılarak incelendi.Beta-MKH grubu nakil öncesinde 0. günün, nakil sonrası 3. ve 8. günlerdeki karşılaştırılması sonucu günler arası kan şekeri değeri değişimi $**p<0,01$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir.8. günde 4 farklı deney grubu birbiri arasında karşılaştırmalı olarak incelendiğinde,sağlıklı kontrol grubuna göre Beta nakli yapılan grup arasındaki değişim $**p<0,01$ olduğundan,Beta-MKH nakli yapılan grup ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki değişim $**p<0,01$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir.Beta grubu ile Beta-MKH grubu arasındaki analiz sonucu $*p<0,01$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir.

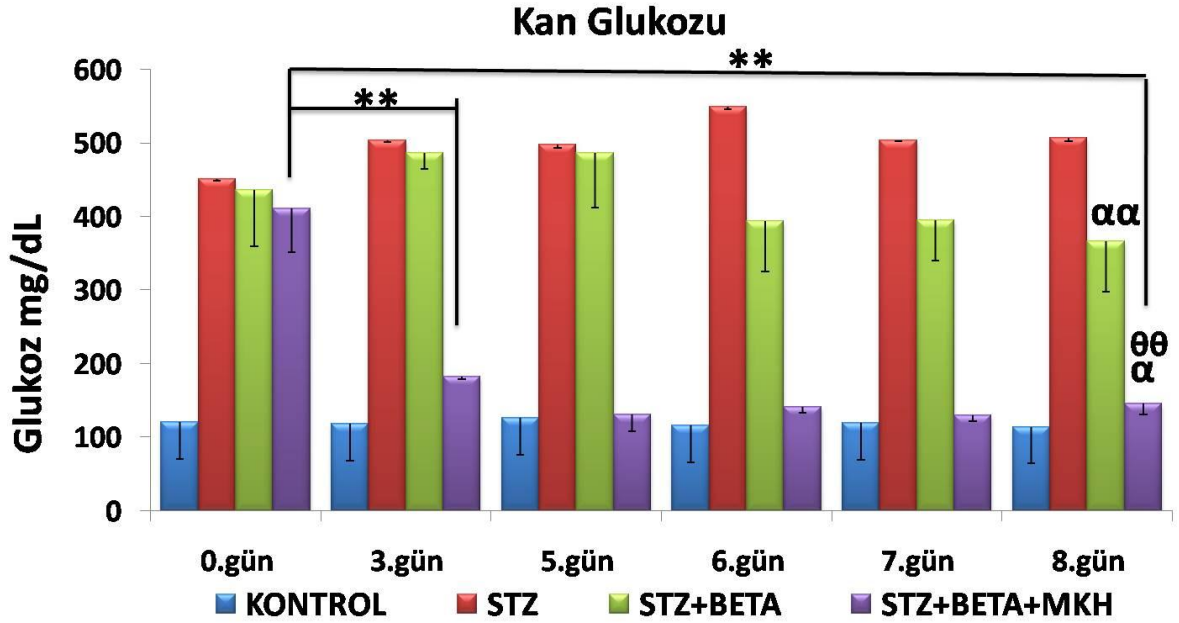
Nakil sonrası, Beta-MKH nakli yapılan grubun sadece Beta nakli yapılan gruba göre kan şekerinde anlamlı bir düşüş olduğu tespit edildi.

Nakil öncesinde Beta-MKH grubunda tokluk kan şekeri değeri 411 mg/dl iken bu değer 3. Günde 183mg/dl olarak ölçülmüştür. 8 günde ise bu değer 146mg/dl olarak ölçülmüştür.

Nakil öncesinde Beta grubunda tokluk kan şekeri değeri 436 mg/dl iken,3. Günde bu değer 487 mg/dl, 8 günde ise 366 mg/dl olarak ölçülmüştür

STZ enjeksiyonu yapılmış nakil yapılmayan grupta 0. günde kan şekeri 450 mg/dl, 3. Günde 504 mg/dl, 8. Günde 506 mg/dl ölçülmüştür.

Sağlıklı kontrol grubunun kan şekeri 0. günde 120 mg/dl, 3. günde 118 mg/dl, 8 günde 114 mg/dl olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.18. Nakil yapılmadan önce ve nakilden sonraki 3, 5, 6, 7, 8 ve 11.günlerde tokluk sağlıklı kontrol, STZ li kontrol, Beta nakli ve Beta+MKH nakli yapılmış gruplardaki kan glukoz düzeyleri. Nakilden sonraki 3.günde; sağlıklı kontrol, STZ li kontrol ve Beta nakli yapılan gruplarda kan glukoz düzeyinde azalma gözlenmezken, Beta+MKH nakli yapılmış grupta nakil öncesi ile karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma (** $P < 0.01$) gözlemlendi. Nakilden sonraki 8.günde (deneyin son gününde) ise; nakil öncesi ile karşılaştırıldığında yine sadece Beta+MKH nakli yapılmış grupta kan glukoz düzeyinde anlamlı bir azalma (** $P < 0.01$) gözlemlendi. Nakil sonrası deneyin son günü (8.gün) nakil yapılan gruplar, kontrol grupları ile kan glukoz düzeyi açısından karşılaştırıldığında; yalnızca Beta hücresi nakledilen gruba göre Beta+MK hücre nakledilen grupta glukoz düzeyi daha fazla azalma gösterdi ($P < 0.01$). ($n=6$, ortalama \pm SS).

4.3.3.Nakil Sonrası 11.günde IPGTT (İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi) Uygulanması

Nakil sonrası 11. günde aç olan sıçanlara intraperitoneal olarak glukoz yüklemesi sonrasında 30,60 ve 120. dakikalarda kuyruk veninden alınan kandan glukometri cihazı ile yapılan ölçümlerin karşılaştırmalı analizi yapıldı

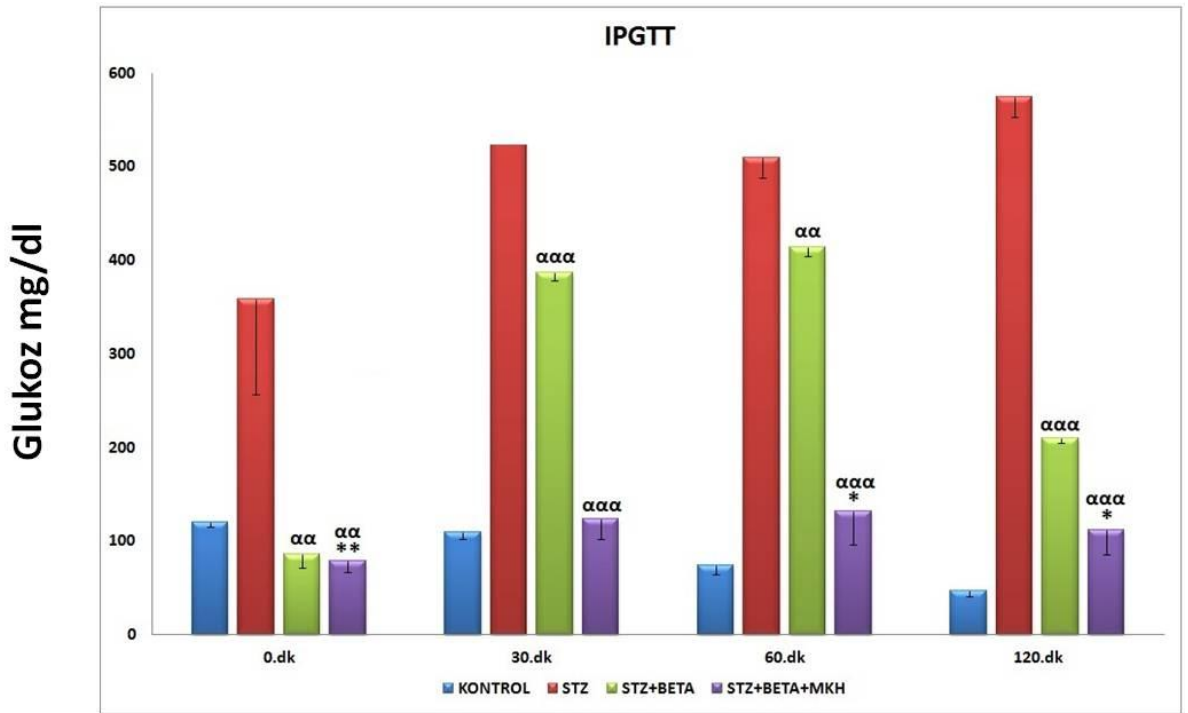
Beta nakli yapılan grupta glukoz verilmeden önce açlık kan şekeri 85 mg/dl, glukoz yüklemesi yapıldıktan sonra 30. dakikada kan şekeri 379 mg/dl, 60.dakikada 423 mg/dl, 120. dakikada 205 mg/dl olarak ölçülmüştür.

Beta-MKH nakli yapılan grupta glukoz verilmeden önce açlık kan şekeri ise 78 mg/dl, glukoz yüklemesi yapıldıktan sonra 30. dakikada kan şekeri, 30. dakikada 123 mg/dl, 60. dakikada 132 mg/dl, 120. dakikada 111 mg/dl olarak ölçülmüştür.

Gruplar ölçülen dakikalarda kendi aralarında spss analizi ile karşılaştırılması yapıldı. 60.dakidada Beta ve Beta-MKH grubu arasındaki karşılaştırmalı analizde $\alpha p < 0.001$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir.

Beta ve Beta-MKH grubu arasındaki 120. Dakikadaki karşılaştırmada $\alpha p < 0.01$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir.

Bu sonuçlara göre sıçanlarda kanda artan glukoz seviyesine cevaben nakledilen beta ve MKH hücrelerinin yanıt oluşturduğu ve insülin salgılayarak kan glukozunu düşürmeye çalıştığı tespit edildi.



Şekil 4.19. Nakil sonrası deneyin son günü (8.gün) tüm gruplara yapılan intraperitoneal glukoz tolerans testi sırasında ölçülen kan glukoz düzeyleri. Gruplar kan glukoz düzeyi ölçülen dakikalarda kendi aralarında istatistiksel analiz ile karşılaştırıldı. 60.dakidada yalnızca Beta hücresi nakledilen gruba göre, Beta ve MKH nakledilen gruptaki kan glukoz düzeyinin, çok daha fazla azalma gösterdiği belirlendi ($^{aaa}p < 0.001$). Aynı gruplar 120.dakikada karşılaştırıldığında da yine Beta ve MKH nakledilen gruptaki kan glukoz düzeyinin, daha fazla azalma gösterdiği belirlendi ($^{aa}p < 0.01$). ($n=6$, ortalama \pm SS).

4.4. Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler

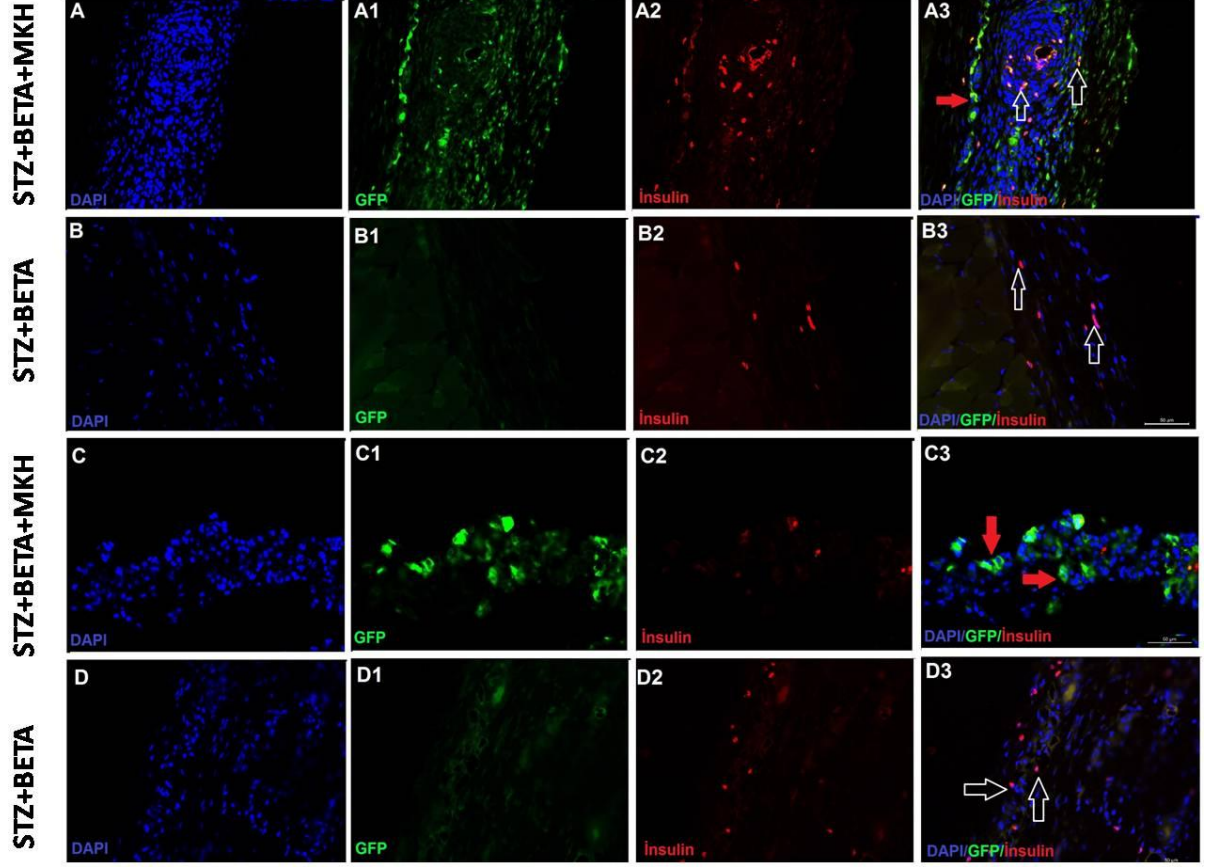
11.günde nakil bölgesindeki subkutan dokular alındı.Deri greftleri kesilerek formalin içerisinde konuldu. Pankreas dokuları ise formalin enjeksiyonu ile şişirilerek alındı.

Deri greftlerinde beta hücresi nakledilmiş ve beta-MKH nakledilmiş gruplarda immünfloresan boyama yapıldı.

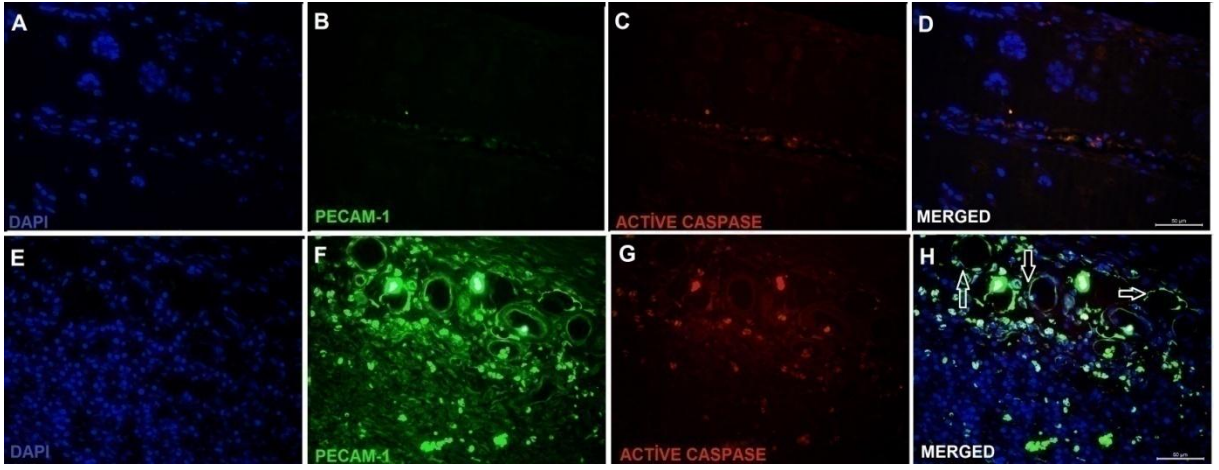
Beta hücre nakli yapılan grupta beta hücrelerini gösterebilmek için deri grefti insülin boyandı beta hücrelerinin nakil bölgesine başarılı bir şekilde yerleştiği pozitif boyanarak gösterildi.

Beta-MKH nakli yapılan grupta beta hücreleri ve tabaka halinde nakledilen GFP işaretli MKH hücreleri insülin ve GFP boyandı.Bu hücrelerin nakil bölgesinde pozitif olduğu gösterildi.MKH lerin nakil bölgesinde damar oluşturduğunu göstermek için PECAM-1 boyandı pozitif görüldü ve MKH ların beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği,grefti koruduğu ve hücreleri apoptozdan koruduğunu göstermek için active caspase boyandı ve hücrelerde boyanmadığı negatif olduğu gösterildi.

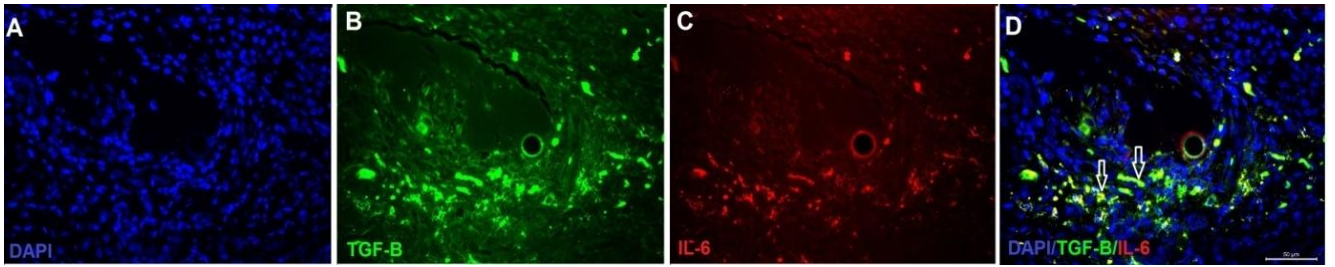
MKH ların salgıladığı sitokin ve büyüme faktörlerinin nakil bölgesindeki beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği,grefti koruduğu ve hücrelerin apoptozunu engellediğini göstermek için TGF β VE IL-6 boyandı ve hücrelerde pozitif olduğu gösterildi.Beta hücre nakli yapılan grupta ise TGF β negatif olarak görüldü.



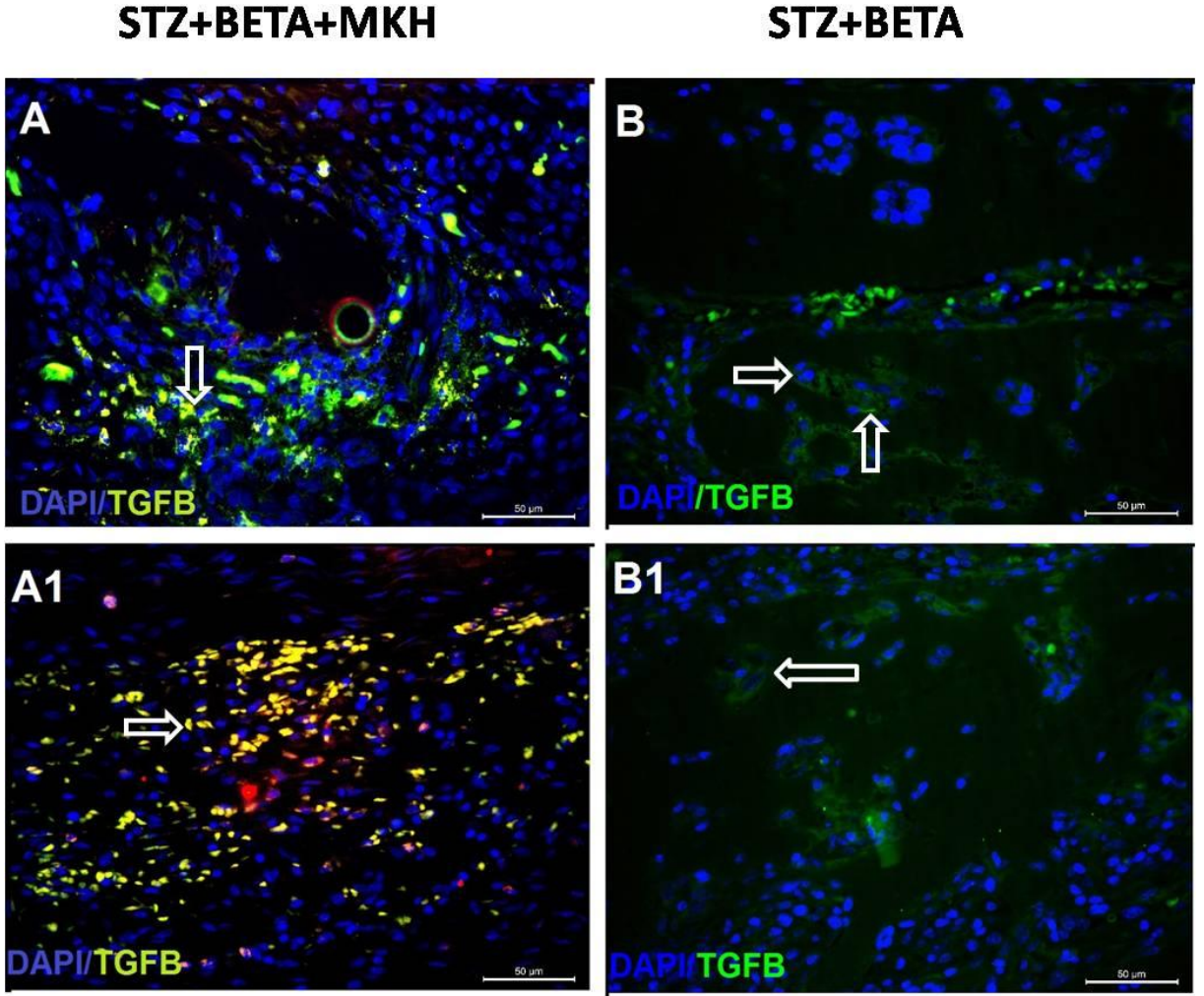
Şekil 4.20. Beta hücre nakli ve Beta+MKH nakli yapılan gruplarda deri greftinin immunfloresan antikor ile boyanma görüntüleri. **A-A3, C-C3:** Beta-MKH grubunda MKH hücreleri GFP (Yeşil) ile Beta hücreleri ise İNSÜLİN (Kırmızı) ile işaretlendiğinde nakledilen greftte her iki hücrenin de bulunduğu gösterildi. **B-B3, D-D3:** Beta hücrelerinin İNSÜLİN (Kırmızı) ile işaretlendiği yalnızca Beta hücresi nakledilen grupta ise MKH hücreleri gözlenmedi. **Beyaz oklar:** beta hücresi, **kırmızı ok:** MKH. (Ölçüm çubukları, 50 μm).



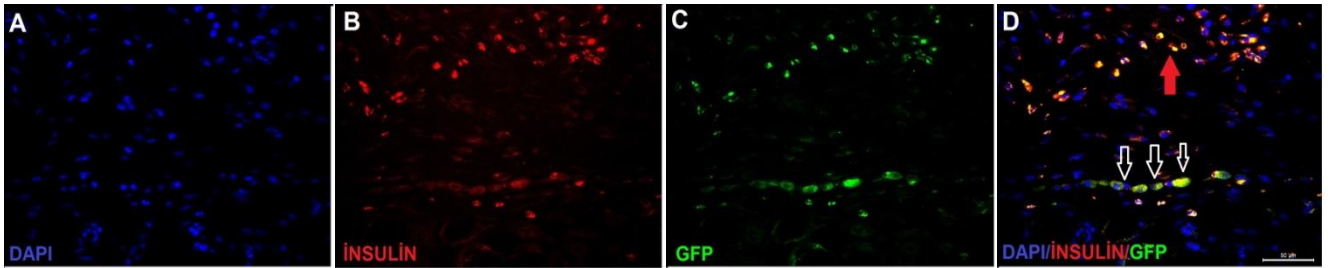
Şekil4.21. Deri greftlerinde damar oluşumu (PECAM-1) ve beta hücre apoptozunun (Active caspase) immünfloresan boyama ile gösterilmesi. **A-D:**Beta hücre grubunda PECAM-1 (Yeşil) Active caspase (Kırmızı) boyaması. PECAM-1 negatif, active caspase pozitif görülmektedir. **E-H:** Beta-MKH grubunda PECAM-1 (Yeşil) Active caspase (Kırmızı) boyaması. PECAM-1 damar oluşumunu göstermektedir (Beyaz oklar pozitif boyamayı göstermektedir), active caspase negatif görülmektedir. (Ölçüm çubukları, 50 μm).



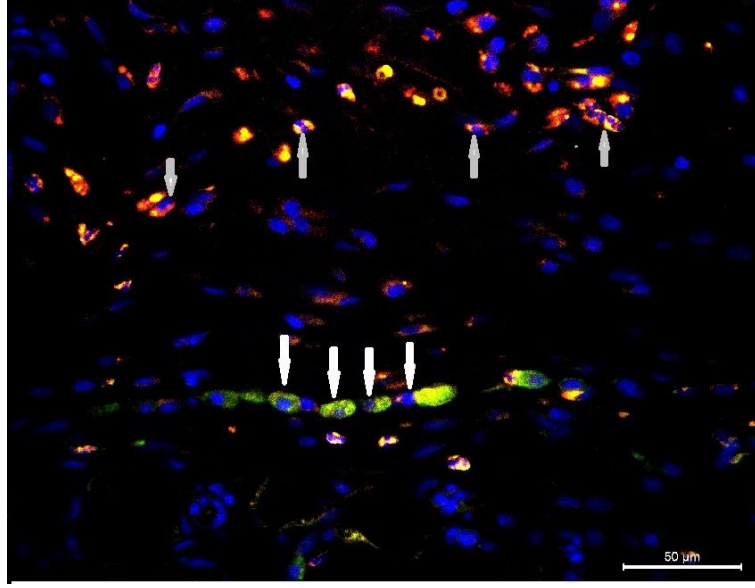
Şekil 4.22. Deri greftinde Beta-MKH grubunda MKH lerin salgıladıkları sitokinler olan TGF β (Yeşil), IL-6 (Kırmızı) boyaması. **D:** Beyaz oklar pozitif TGF β boyamasını göstermektedir. (Ölçüm çubukları, 50 μm).



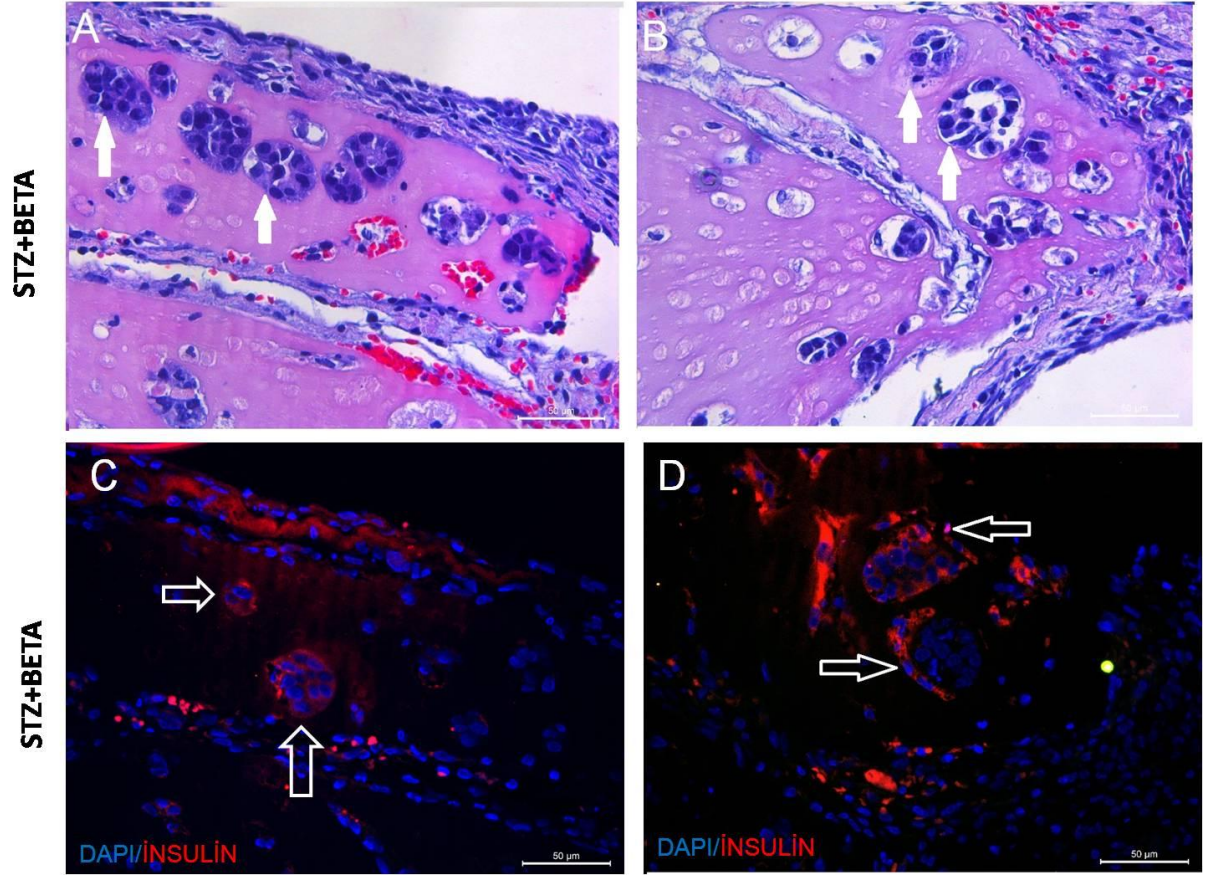
Şekil 4.23. TGF β sitokini salgılayan MKH ların greft bölgesinde gösterilmesi. **A-A1:** Beta-MKH nakledilen grubun greft örneği TGF β (Yeşil) pozitif görülmektedir. **B-B1:** Beta hücre nakli yapılan grupta TGF β (Yeşil) negatif görülmektedir Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi (Ölçüm çubukları, 50 μ m).



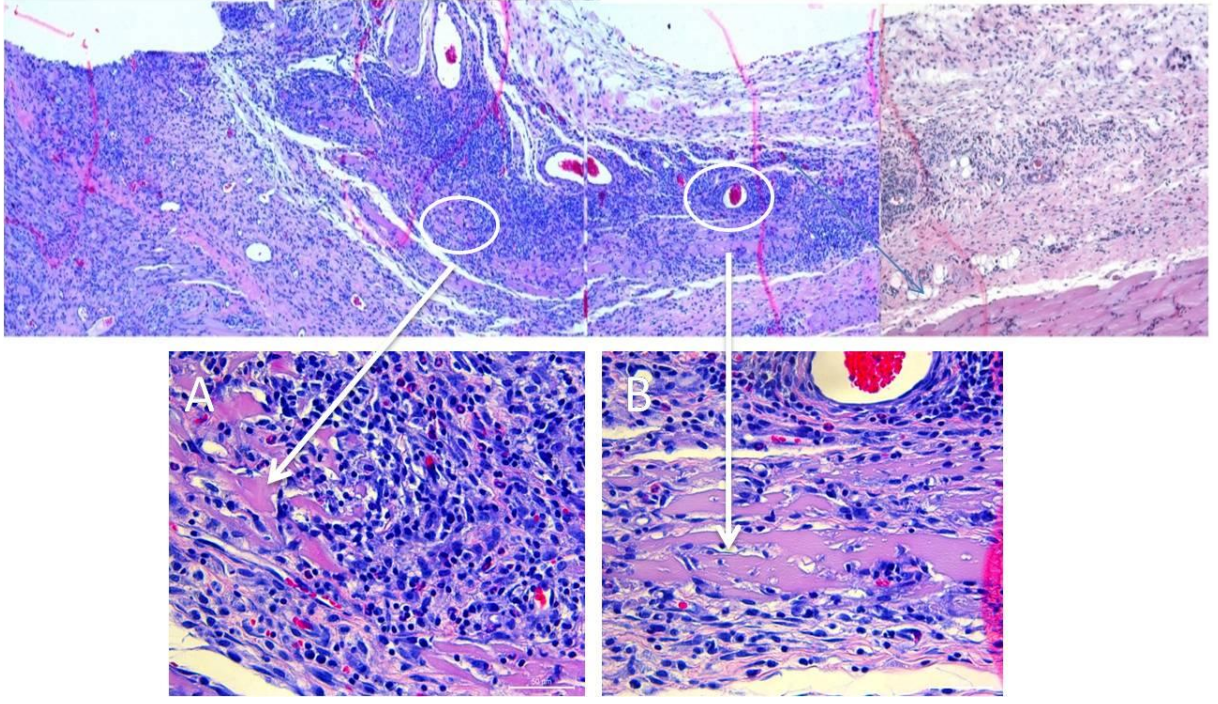
Şekil 4.24. Hücre tabakası halinde nakledilmiş MKH tabakasının deri greftinde nakil bölgesindeki GFP (Yeşil) boyaması ile gösterilmiştir. **D:** MKH hücre tabakası beyaz okla gösterilmiştir. Kırmızı ok ile gösterilen pozitif olarak İnsülin (Kırmızı) ile boyanan beta hücresini göstermektedir. (Ölçüm çubukları, 50 μ m).



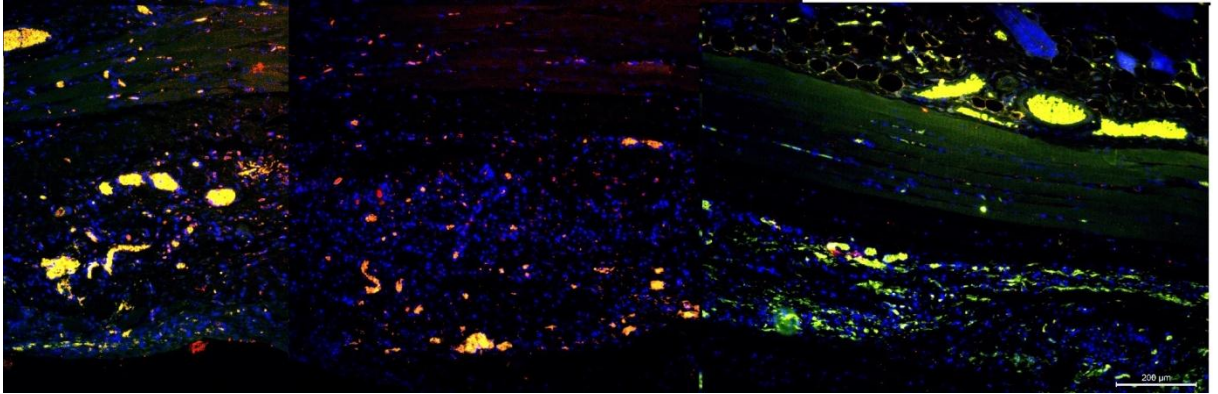
Şekil 4.25. Şekil 4.23'ün daha büyük büyütmedeki görünümü. GFP ile işaretlenmiş ve tabaka halinde nakledilmiş MKH'lerin tabaka halinde nakil bölgesindeki görüntüsü (Beyaz oklar: MKH tabakası). Gri oklar pozitif olarak İnsülin (Kırmızı) ile boyanan beta hücrelerini göstermektedir. (Ölçüm çubukları, 50 μm).



Şekil 4.26. Matrigel içerisinde nakledilen Beta hücrelerinin deri altı nakil bölgesindeki görüntüleri. **A-B:** Matrijel içerisinde koloni halinde bulunan beta hücreleri. (Hemotoksilen-Eosin boyaması. Beyaz okla gösterilen bölge matrigel ve içerisindeki beta hücreleri görülmektedir). **C-D:** Aynı nakil bölgesinin IF görüntüleri. İnsülin (Kırmızı) ile işaretlenmiş Beta hücreleri. (Ölçüm çubukları, 50 μ m).

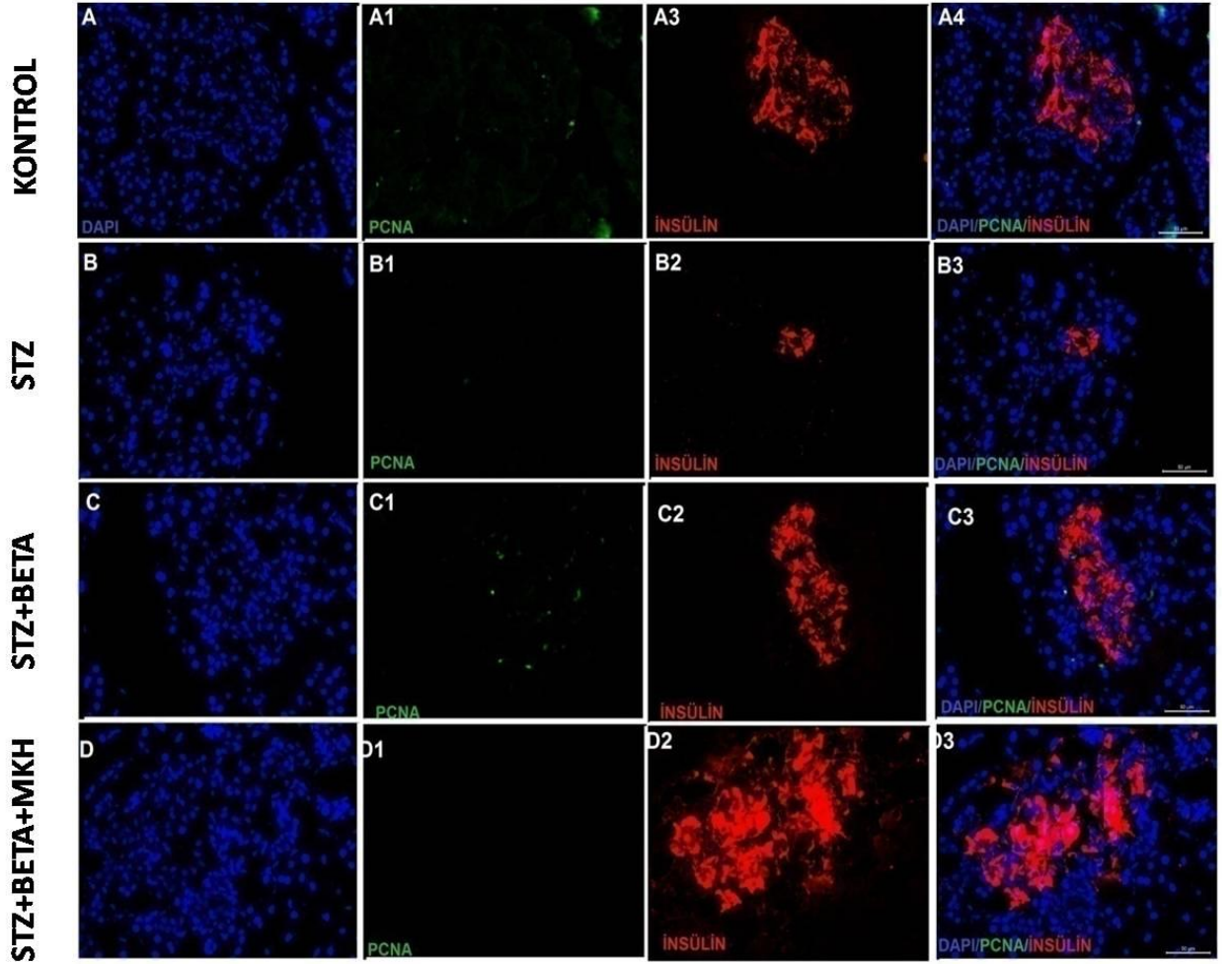


Şekil 4.27. Nakil bölgesindeki greftin H-E boyanmış görüntüsü. **A-B:** Nakledilen matrigel içindeki Beta hücreleri daha büyük büyütmede görülmekte. Ok ile homojen eozinofilik yapıda matrijel gösterildi. (Ölçüm çubukları, 50 μm).



Şekil 4.28. Nakil bölgesindeki Beta nakli yapılan greftin IF boyanmış görüntüsü. (Ölçüm çubukları, 50 μm).

Nakilden sonra 11. günde deney gruplarından alınan pankreas dokularında IF boyama yapıldı ve kesitlerde adacık görüntüleri tarandı. Sağlıklı kontrol grubu adacığının boyutu diğer 3 deney grubu adacık boyutu ile karşılaştırıldığında farklılıklar görüldü. STZ enjeksiyonundan sonra adacık dokusundaki beta hücrelerinin haraplanması sonucu adacık boyutunun küçüldüğü tespit edildi. Beta hücre nakli yapılan grupta nakilden sonra tedaviye cevaben iyileşmenin görülmesi sonucu adacık boyutunun nakil yapılmayan kontrol grubuna göre daha büyük olduğu görüldü. Beta ve MKH nakli yapılan grupta ise sadece beta nakli yapılan gruba göre adacık boyutunun daha büyük olduğu tespit edildi. Bu grupta MKH lerin anti-apoptotik özelliği ve hasar bölgesine göç ederek o bölgeyi koruma etkisi olduğu düşünülerek adacıktaki beta hücrelerini proliferasyon ve canlılığını koruduğu tespit edil



Şekil 4.29.4 farklı deney grubunun pankreas adacıklarının IF boyama görüntüleri. **A-A3:** Sağlıklı kontrol grubu pankreas PCNA (Yeşil) negatif, İnsülin (Kırmızı) pozitif görülmekte. **B-B3:** STZ li kontrol grubu. **C-C3:** Beta hücresi nakledilmiş grup. **D-D3:** Beta ve MKH nakledilmiş grup. (Ölçüm çubukları, 50 μ m).

5.TARTIŞMA

Günümüze kadar, β -hücrelerinin yerine konmasını amaçlayan üç farklı strateji geliştirilmiştir; pankreas, adacık ve hücre transplantasyonu. Halen adacık hücrelerinin transplantasyonu için tercih edilen organ, karaciğerdir. Ancak immun problemler ve graft başarısızlığı ile sonuçlanır ve alıcıların büyük kısmını insülin bağımsız durumdan tekrar insülin bağımlı hale getirir. Adacık transplantasyonunun uzun ömürlü olması için çeşitli yöntemler konusunda çalışmalar sürmektedir. Bunlar arasında biyomühendislik yaklaşımları da kullanılarak adacık hücre tabakaları oluşturulup fonksiyonel adacık sistemleri inşa edilmesi ve bu sistemlerin ekstra hepatik alanlara transferi de yer almıştır. Örneğin subrenal, subkutan ve abdominal bölge transferleri gibi (Okano, 2011). Bu 3-B hücre tabakalarının, subkutan bölgede daha etkili bir şekilde varlığını sürdürdüğü rapor edilmiştir.

Bu çalışmada Tip1 Diyabetin tedavisine alternatif olarak hücre-tabaka mühendisliği kullanılmıştır. Dolayısıyla diyabetin tedavisi için umut verici yöntemlerden kullandığımız bu çalışmamızın sonuçlarının bu konuyla ilgili bilimsel veriye önemli bir katkı sağladığını düşünmekteyiz. Çalışma için hazır satın alınan beta hücre hattı matrijel ile homojenize edilmiş, sıçandan izole edilen Kİ-MKH ise sıcaklık invitro sıcaklık-duyarlı kültür kapları [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm] üzerinde kültür edilerek oluşturulmuştur.

Çalışmamızda kullandığımız hücre tabakalarından 3B'lu adacık dokusu yaklaşımının en önemli özelliği, in vitro ortamda ısıya cevap veren PIPAAm (Poly N-isopropylacrylamide) kültür kabının kullanılmasıdır (Okano et al.2011, Narang 2006). Bu yöntem proteolitik enzim kullanmaksızın, hücrelerin kültür edildiği inkübatör sıcaklığından ($32C^0$ 'nin üstünde yaklaşık olarak $37C^0$ 'de) daha düşük sıcaklıkta ($32C^0$ 'nin altında) hücre tabakalarının kolaylıkla kültür kabından kalkmasına izin vermektedir (Cheng 2005, Fritschy 1991). Bu hücre kültür kabının yapısını oluşturan polimer, hidrofilik formdan hidrofobik forma geçerek hücrelerin kabın tabanından kalkmasını sağlamaktadır. Bu kültür kapları, tek katlı hücre tabakalarının doğal intraselüler bağlantı ve intraselüler mikroyapısını koruyarak aynı zamanda da normal hücre fonksiyon özelliğini de koruyarak hücrelerin toplanmasını sağlamaktadır. Ayrıca hücreleri kaldırmak için kullanılan enzimlerin hücre yapısına verdiği zarar etkilerin de elenmesini sağlamaktadır (Hirose 2000, Okano 1993).

Çalışmamızda 3B'lu yapıyı oluşturduğumuz bu iki farklı hücre, in vitroda çoğaltılıp STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanların sırt bölgesindeki deri altına nakledilerek bu bölgede bir adacık dokusuna benzeyen derialtı greft oluşturulmuştur. Bu sayede diyabetik sıçanlarda, normal glisemik indeks sağlanabilmiştir. Bu sayede genellikle karaciğere yapılan nakillerden farklı olarak daha kolay ve daha az invazif olan bir nakil bölgesi kullanılmıştır (Blomeier 2006, Parnaud 2006, Arkhammar 1998). MKH kullanımının ise nakil dokusunun subkutan dokuya uzun süre tutunma ve devamlı fonksiyon gösterebilme yeteneğinde olduğunun tespit edilmesi ise literatürde bir ilk olmuştur. Bu sayede adacık dokuları 3-B yapıya getirilip subkutan hücre implantları olarak çok az invazif bir yöntemle hastaya nakledilebilir duruma getirilip klinik olarak test edilebilecek hale gelecektir. Diyabetin tedavisi için kullanılan adacık, beta hücre yada kök hücre nakillerinde nakil yapılacak bölge olarak pankreas ve karaciğer (hepatopankreatik bölge) bölgesi tercih edildiğinde dezavantajlar gözlenmiştir. Karaciğer bölgesine yapılacak nakil invazif bir girişim olduğu için alternatif olarak subrenal, subkutan ve abdominal bölgelere nakiller gündeme gelmiştir. Çalışmamızda hücre-tabaka mühendisliği kullanarak oluşturduğumuz greftleri, nakil bölgesi olarak deri altı/subkutan bölgeye nakletmeyi hedeflendi. Amacımız hasarlı pankreası rejenere ederek insülin üretimini düzenlenmesi değildi. Aksine hepatopankreatik bölgeye göre daha az invazif bölge olan subkutan bölgeye greftin yerleştirilip (hasarlı pankreasın yapamadığı fonksiyonu) insülin salgısının bu yolla düzenlenmesi hedeflendi. Her iki hücreyi de kullanarak oluşturduğumuz greftin deri altına kolaylıkla yerleştirilebildiğini gözledik. Daha önce bir grup tarafından yapılan ve sadece beta hücresi kullanılan greftlerde de derialtı bölgenin uygun ve daha az invazif bir bölge olduğu rapor edilmişti (Okano,2011). Bizim çalışmamızda farklı olarak matür ve ileri derecede farklılaşmış hücreler olan beta hücrelerinden oluşan greftlere ek olarak mezenkimal kök hücre eklendi. Mezenkimal kök hücre ve beta hücresi birlikte verilen grupta ise, kök hücre eklenmemiş yalnızca beta hücresi bulunan gruba göre grefti oluşturan hücrelerin canlılık ve morfolojik olarak daha iyi düzeyde olduğu ve fonksiyonel olarak da kan glikoz düzeyini ayarlama da daha etkin bir insülin salgısı gerçekleştirebildiği belirlendi. Greftin deri altına yerleştirilmesi, hem glikoz düzeyinin düzenlenebilmesi için gerekli hepatopankreatik olmayan insülin salgısının yeterli miktarı sağlayabildiği hemde greftin zamanla fonksiyonunun azalması yada kaybedilmesi durumunda yeni greftin daha kolaylıkla yeniden nakledilebileceği avantajını sağladığı gözlemlendi.

Ayrıca kültür kaplarını kültüre başlamadan kapladığımız lamininin kültürdeki Beta hücrelerini canlılığına, tutunmasına, proliferasyonuna, olumlu etkisini gösteren pek çok çalışmada rapor edilmiştir (Bosco 2000, Hammar 2004).

Çalışmamızda nakil sonrası 11 gün takip süresi boyunca alınan tokluk kan örneklerinde kan glukozunun normal seviyeye düştüğü gösterilmiştir. Fakat deney grupları karşılaştırıldığında Beta-MKH grubunun kan glukoz seviyesinin, Beta nakli grubuna göre sağlıklı kontrol grubuna daha yakın olduğu gösterilmiştir. Bu da elde ettiğimiz 3B lu adacık dokularının sistemik sirkulasyonun içine insulin sekresyonu ve insulin üretim yeteneğinin olduğunu göstermiştir. 3B'lu adacık dokularının fonksiyonelliği IPGTT (intraperitoneal glukoz tolerans testi) ile gösterilmiştir. Sıcaklık duyarlı kaplar ile yapılan beta hücresi yada diğer hücre kültür ve nakil çalışmalarında, hücreler arası bağlantı komplekslerinin korunması ve in vitro ortamda da olsa oluşan ekstrasellüler matriksin bozulmaması, hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olmalarının yanı sıra fonksiyonelliklerine de katkı sağlamıştır (Ohashi 2005, Hirose 2000).

Bu mühendislik ürünü adacık dokularının hassaslığı ve insulin salgılaması, transplante edilen dokuyu çevreleme ve yüksek damar ağı formasyonunu kazandırmıştır (Yokoyama, 2006). Bu da Beta-MKH nakli yapılan gruplarda MKH lerin 11 günlük süreçte greft bölgesinde PECAM-1 proteinini pozitif ifade etmesiyle açıklanabilir.

Alıcı diyabetik sıçandan alınan greft bölgesinde yapılan histolojik ve immünohistokimyasal kesit incelemelerinde MKH nakli yapılan grupta beta hücreleri ve tabaka halinde nakledilen GFP işaretli MKH hücreleri, insülin ve GFP antikorları ile işaretlendi. Dolayısıyla bu hücrelerin nakil bölgesinde insülin (beta hücreleri) ve GFP (mezenkimal kök hücreler) pozitif hücreler gözlenebildi. Tabaka halinde nakledilen MKH'lerin nakil bölgesine başarılı bir şekilde yerleştiği ve canlılığını devam ettirebildiği GFP ile gözlemlendi. MKH'lerin nakil bölgesinde anjiogenezi başlattığı ve yeni damar oluşumları, PECAM-1 ve GFP'yi aynı anda pozitif gösteren endotel hücreleri belirlenerek görüldü. Yalnız Beta hücresi nakledilen gruba göre, MKH'lerin beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği, grefti koruduğu ve hücreleri apoptozdan koruduğu, active caspase ile apoptoz düzeyleri karşılaştırılarak gözlemlendi. Bu sonuçlarımız da diğer hücre tabaka çalışmalarının sonuçları ile uyumludur (Willy 2002, Rossignol 2009).

MKH'lerin salgıladığı sitokin ve büyüme faktörlerinin nakil bölgesindeki beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği, grefti koruduğu ve hücrelerin apoptozunu

engellediğini göstermek için mezenkimal kök hücrelerden salgılandığı ve koruyucu etkileri bilinen sitokin ve büyüme faktörlerinden seçtiğimiz TGFβ ve IL-6 antikoru ile işaretlendiğinde greft bölgesindeki hücrelerde daha yoğun pozitif olduğu görülmüştür. (Daan,2008). Yalnızca beta hücre nakli yapılan grupta ise TGFβ'nın negatif, IL-6'nın ise daha az hücrede pozitif olduğu görüldü.

Ek olarak Beta nakli ve Beta-MKH nakli yapılan grupta pankreas dokuları incelenmiş ve adacıklardaki İNSÜLİN ifadesi her iki dokuda da gözlenmiştir. Fakat Beta-MKH grubundaki adacık boyutunun Beta grubundaki adacık boyutlarında çok belirgin olmayan artış ve eozinofilik alanların daha azalmış olduğu MKH'lerin beta hücrelerinin apoptozunu engellediği ve proliferasyonunu arttırdığı düşünülebilir.

Bu nedenle çalışmamızın en önemli özelliği olan beta hücrelerinin MKH ile birlikte nakledilmesi, sıçanlarda kan glukozunun normal seviyeye gelmesinde sadece beta hücre nakline göre daha başarılı olduğudur. Beta hücrelerini sıcaklık duyarlı kaplarla kültür edip hücre tabakası halinde nakil yapan yalnızca iki çalışma bulunmaktadır (Okana et al.2011). Ancak bu çalışmalarda pankreatik adacıklar enzimatik olarak parçalanıp tek hücre süspansiyonu yapılmış ve elde edilen tüm hücre grubu sıcaklık duyarlı kaplara ekilmiştir. Bilindiği gibi pankreatik adacıkların %80'ini beta hücreleri oluşturken %20'sini adacığın diğer endokrin hücreleri, vasküler ve stromal hücreler oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmalarda beta hücrelerine destek olarak özellikle vasküler ve stromal hücreler bulunduğu için beta hücreleri, nakil sonrasında morfolojik ve fonksiyonel olarak desteklenebilmiştir. Bizim çalışmamızdaki hedeflerimizden birisi; çeşitli yollarla in vitroda üretilmiş beta hücrelerinin (yada insülin salgılayan hücrelerin), diyabetik hayvanlara nakledilmesinde verimliliğinin artırılması idi. Çünkü in vitroda üretilen bu tip hücreler, adacığın kendisinin bir bütün olarak yada parçalanarak hücre süspansiyonu haline getirilen beta hücrelerinin desteğini sağlayan hücrelerden yoksundur. Bu yüzden in vitro ortamda üretilen beta hücrelerine destek olarak MKH kullandık. Bu sayede adacığın stromal ve vasküler hücrelerinin yerine geçecek ve kök hücre olduğu için de onlardan daha fazla beta hücrelerine destek olabilecek olduğunu düşündüğümüz MKH'ler, sonuçlarımıza göre diyabetik hayvanlarda kan glukoz düzeyini yalnızca Beta hücre nakledilen gruba göre anlamlı bir şekilde daha fazla düşürebildi. Sonuçlarımıza göre greftin canlılığını, proliferasyonunu desteklediği gibi fonksiyonel olarak insülin salgılamasına da destek sağladığını gözledik. MKH ların salgıladığı sitokin ve büyüme faktörleri TGFβ ve IL-6, MKH'lerin en önemli özelliklerinden olan anti-apoptotik, anti-inflamatuar özellikleri

sayesinde grefti koruyup beta hücrelerinin apoptozunu engellemesi ile açıklanabilir (Peng, 2013, Demircan, 2011).

Ayrıca bu yöntem sayesinde hücre kaynağı olarak kullanılacak hücrelerin hepsi değer kazanacaktır. Çünkü yöntem hangi hücre olursa olsun o hücrenin en fonksiyonel ve doğru korunmuş şekilde nakline izin verebilen bir yöntemdir. Hücre kaynağı ister insandan izole edilmiş matür beta hücreleri olsun ister herhangi bir invitro ortamda kök hücreden farklılaştırılarak üretilmiş beta hücreleri olsun hepsinin oldukça verimli bir şekilde naklini sağlayabilecektir. Yöntemde MKH kullanımını sayesinde hücre naklinin kalitesini arttıran bir başka yönü ise nakledilen dokunun çok daha uzun süre fonksiyonunu ve canlılığını devam ettirebilmesi ve engrafman oranının yüksek olmasıdır. Nakil yöntemine eklediğimiz ve daha önce hiç çalışılmamış olan bir basamak olan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre tabakasının, beta hücre tabakalarına ilave edilmesi; yine nakil yapılan hücrelerin canlılığı, proliferasyonu ve engrafmanını olumlu yönde değiştirerek daha uzun süre normal glisemik indeksin devam ettirilebildiğini çalışmamızda göstermiş olduk.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bağıışıklık sisteminin insülin üreten β -hücrelerine hasar verdiği Tip I diyabet sıçan modelinde, pankreastan izole ettiğimiz Beta hücrelerini, doku mühendisliğı yaklaşımı ile hücre tabakaları haline getirip ve bu tabakalardan 3-B'lu bir ekstra hepatik fonksiyonel adacık dokusu oluşturup diyabetik sıçanlara transfer ederek, β -hücre replasmanını sağlamayı ve MKH'lerin oluşturduğumuz 3-B'lu adacık dokusuna etkisini de incelediğimiz planladığımız çalışmamızın, doku mühendisliğı ile diyabetin tedavisine yönelik çalışmalara önemli katkılar sağlayacağını öngörmekteyiz.

Ayrıca çalışmamızda doku mühendisliğı yaklaşımı ile sıcaklık-duyarlı kaplar [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm] üzerinde ürettiğimiz "3-B'lu bir ekstra hepatik fonksiyonel adacık dokusunu" diyabetik hayvan modeli oluşturacağımız sıçanlara transfer ederek doku mühendisliğı, diyabetin hücresel tedavisi ve kök hücre konusundaki in vivo hayvan modeli çalışmalarına da çok önemli katkılar sağlanabileceğı görüşündeyiz.

Yapılan kaynak taramasında Langerhans adacıklarından izole edilen Beta hücrelerinin sıcaklık-duyarlı kaplar [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm] üzerinde in vitro kültürde 3-boyutlu ekstra hepatik fonksiyonel adacık dokusu oluşturup diyabetik hayvanlara transfer ederek etkinliğini test eden yalnızca aynı grup tarafından yapılmış iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda doku mühendisliğı ile 2 tabakadan oluşan bir 3-boyutlu ekstra hepatik fonksiyonel adacık dokusu oluşturulmuştur. Biz ise çalışmamızda bundan farklı olarak 3 tabakadan oluşan bir doku inşa etmeyi planladık. 3 tabakadan oluşan 3-boyutlu ekstra hepatik fonksiyonel adacık dokusu kullanarak diyabetik sıçan modelinde tedavi etkinliğini test eden bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışma özgün değeri olan bir konuya sahiptir. Bu sayede, çalışmamızın tüm sonuçları doku mühendisliğı konusunda evrensel bilime katkı sağlayacak nitelikte olacaktır.

Yine yapılan kaynak taramasında Langerhans adacıklarından izole edilen Beta hücrelerinden sıcaklık-duyarlı kaplar [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm] üzerinde in vitro kültürde 3-boyutlu ekstra hepatik fonksiyonel adacık dokusu oluşturan yukarıda bahsettiğimiz çalışmalarda yalnızca beta hücreleri kullanılmıştır. Biz bu çalışmalardan farklı olarak beta hücre dokusuna ek olarak KI-MKH'lerden oluşturduğumuz hücre tabakasını ekledik. Kaynak taraması sonucuna göre doku mühendisliğı ile 3-boyutlu ekstra hepatik fonksiyonel adacık dokusu inşa edilirken MKH kullanan yada ilave eden başka bir çalışma bulunmamıştır. Dolayısıyla planladığımız bu çalışma, özgün değeri olan bir

konuya sahiptir. Bu sayede, çalışmamızın tüm sonuçları kök hücre kullanan doku mühendisliği çalışmaları konusunda evrensel bilime katkı sağlayacak nitelikte olacaktır.

Ayrıca çalışmamızdan elde edeceğimiz başarılı sonuçlara koşut olarak pankreas-karaciğer dışında farklı bir bölgede fonksiyonel bir adacık oluşturulduğunda, klinikte diyabet tedavisinde uygulama alanı bulabilecektir. Elde etmeyi planladığımız dokuyu, doğrudan pankreas-karaciğer bölgesine transfer etmek yerine subkutan olarak transfer çok daha az invazif bir yöntemdir. Bu dokunun, ileride enkapsüle edilerek rahatlıkla çok az bir invazif yöntem ile deri altına yerleştirilebilen bir preparat/chip haline getirileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Arkhammar POG, Terry BR, Kofod H, Thastrup O. Pancreatic islets cultured on extracellular matrix: an excellent preparation for microfluorometry. *Methods Cell Sci* 1998;19:255–68

Ayhan Abacı, Ece Böber, Atilla Büyükgebiz *Tip 1 Diyabet, Güncel Pediatri* 2007; 5: 1-10

Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, Nanostructured designs of biomedical materials: application of cell sheet engineering to functional regenerative tissues and organs. *J. Controlled Release*

Akiyama Y, Kushida A, Yamato M, et al. Surface characterization of poly(N-isopropylacrylamide) grafted tissue culture polystyrene by electron beam irradiation, using atomic force microscopy, and X-ray photoelectron spectroscopy. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7: 796.

Anna Milanesi, Jang-Won Lee, Zhenhua Li, et al. Beta-Cell Regeneration Mediated by Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. August 2012 Volume 7 Issue 8 e42177.

Assady S, Maor G, Amit M, et al. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691

Blomeier H, Zhang X, Rives C, et al. Polymer scaffolds as synthetic microenvironments for extrahepatic islet transplantation. *Transplantation* 2006; 82: 452.

Bosco D, Meda P, Halban PA, Rouiller DG. Importance of cell–matrix interactions in rat islet b-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin. *Diabetes* 2000;49:233–43.

Cheng Y, Zhang JL, Liu YF, Li TM, Zhao N. Islet transplantation for diabetic rats through the spleen. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4:203–6.

Daan van Poll, Biju Parekkadan, Cheul H. Cho, Francois Berthiaume, Yaakov Nahmias, Arno W. Tilles, and Martin L. Yarmush. Mesenchymal Stem Cell–Derived Molecules Directly Modulate Hepatocellular Death and Regeneration In Vitro and In Vivo. *HEPATOLOGY* 2008;47:1634-1643.

Dufour JM, Rajotte RV, Zimmerman M, et al. Development of an ectopic site for islet transplantation, using biodegradable scaffolds. *Tissue Eng* 2005; 11: 1323

Dufour JM, Rajotte RV, Kin T, Korbitt GS. Immunoprotection of rat islet xenografts by cotransplantation with sertoli cells and a single injection of antilymphocyte serum. *Transplantation* 2003; 75: 1594

Fritschy WM, van Straaten JF, de Vos P, Strubbe JH, Wolters GH, van Schilfgaarde R. The efficacy of intraperitoneal pancreatic islet isografts in the reversal of diabetes in rats. *Transplantation* 1991;52:777–83

Goro Ebihara, Masato Sato, Teruo Okano, Masayuki Yamato, et al. Cartilage repair in transplanted scaffold-free chondrocyte sheets using a minipig model. *Biomaterials* 33 (2012) 3846-3851.

Hakan SAĞSÖZ, M. Aydın KETANİ, Kök Hücreler, Dicle Üniv Vet Fak Derg 2008: 1 (2): 29 – 33

Hammar E, Parnaud G, Bosco D, Perriraz N, Maedler K, Donath M, et al. Extracellular matrix protects pancreatic b-cells against apoptosis: role of short- and long-term signaling pathways. *Diabetes* 2004;53:2034–41.

Hirose M, Kwon OH, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* 2000;1:377–81.

Haruko Obokata, Masayuki Yamato, Satoshi Tsuneda & Teruo Okano. Reproducible subcutaneous transplantation of cell sheets into recipient mice. *Nature protocols*; VOL.6 NO.7;2011;1053

Hironobu Takahashi, Masamichi Nakayama, Teruo Okano, et al. Anisotropic cell sheets for constructing three-dimensional tissue with well-organized cell orientation. *Biomaterials* 32 (2011) 8830-8838.

Imen Elloumi Hannachi, Masayuki Yamato and Teruo Okano. Cell sheet technology and cell patterning for biofabrication.. *Biofabrication* 1 (2009) 022002 (13pp)

Imran A.Memon, Yoshiki Sawa, Norihide Fukushima, et al. Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* Volume 130, Number 5

Itoga K, Yamato M, Kobayashi J, et al. Cell micropatterning using photopolymerization with a liquid crystal device commercial projector. *Biomaterials* 2004; 25: 2047.

I. Elloumi-Hannachi, M. Yamato & T. Okano. Cell sheet engineering: A unique nanotechnology for scaffold-free tissue reconstruction with clinical applications in regenerative medicine. *Blackwell Publishing Ltd Journal of Internal Medicine* 2009 267; 54–70

Jeffrey D. Carter, Stacey B. Dula, et al. A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment. *Biological Procedures Online*, Volume 11, Number 1.

Kyungsook Kim, Kazuo Ohashi, Teruo Okano. Preserved liver-specific functions of hepatocytes in 3D co-culture with endothelial cell sheets. *Biomaterials* 33 (2012) 1406-1413.

Masamichi Nakayama, Teruo Okano and Françoise M. Winnik. Poly(N-isopropylacrylamide)-based Smart Surfaces for Cell Sheet Tissue Engineering. *Material Matters* 2010, 5.3, 56.

Masayuki Yamamoto and Teruo Okano. Cell Sheet Engineering Volume 7. Issue 5. May 2004, Pages 42-47. *Materials Today*.

M. Banerjee & T. Otonkoski. A simple two-step protocol for the purification of human pancreatic beta cells. *Diabetologia* (2009) 52:621–625

Narang AS, Mahato RI. Biological and biomaterial approaches for improved islet transplantation. *Pharm Res* 2006;23:1970–82

Noriaki Matsuda, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamamoto, and Teruo Okano. Tissue Engineering Based on Cell Sheet Technology *Adv. Mater.* 2007, 19, 3089–3099.

Ohashi K, Yokoyama T, Yamato M, et al. Engineering functional two and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med* 2007; 13: 880

Ohki T, Yamato M, Murakami D, et al. Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 2006;55: 1704.

Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 1993;27:1243–51

Parnaud G, Hammar E, Rouiller DG, Armanet M, Halban PA, Bosco D. Blockade of beta1 integrin-laminin-5 interaction affects spreading and insulin secretion of rat b-cells attached on extracellular matrix. *Diabetes* 2006;55:1413–20.

Peakman M, McNab GL, Heaton ND, et al. Development of techniques for obtaining monodispersed human islet cells. *Transplantation* 1994;57: 384.

Peng Li, Shu-Hong Li, Jun Wu, Wang-Fu Zang, Sanjiv Dhingra, Lu Sun, Richard D. Weisel, Ren-Ke Li. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 17, No 9, 2013 pp. 1136-1145

Pileggi A, Molano RD, Ricordi C, et al. Reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation into a subcutaneous, neovascularized device. *Transplantation* 2006; 81: 1318.

Rossignol J, Boyer C, Thinard R, Remy S, Dugast AS, Dubayle D, Dey ND, Boeffard F, Delecrin J, Heymann D, Vanhove B, Anegon I, Naveilhan P, Dunbar GL, Lescaudron L. Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med.* 2009 Aug;13(8B):2547-58. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00657.x.

Roep BO, Stobbe I, Duinkerken G, et al. Auto- and alloimmune reactivity to human islet allografts transplanted into type 1 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48: 484.

Sachiko Sekiyac, Jun Kobayashic, Guoping Chena,b, Teruo Okano. Cellular control of tissue architectures using a three-dimensional tissue fabrication technique. *Biomaterials* 28 (2007) 4939–4946

Shimon Efrat, Susanne Lindet, Hans Kofod, et al. Beta-cell lines derived from transgenic mice expressing a hybrid insulin gene oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988).

Shimizu H, Ohashi K, Utoh R, et al. Bioengineering of a functional sheet of islet cells for the treatment of diabetes mellitus. *Biomaterials* 2009; 30: 5943.

Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Yuki Isoi, Kazuhiko, et al. Fabrication of Pulsatile Cardiac Tissue Grafts Using a Novel 3-Dimensional Cell Sheet Manipulation Technique and Temperature-Responsive Cell Culture Surfaces. *Circ Res.* 2002;90:e40-e48.

Teruo Okano Takahiro Saito, Kazuo Ohashi, Reversal of Diabetes by the Creation of Neo-Islet Tissues Into a Subcutaneous Site Using Islet Cell Sheets. *Transplantation* • Volume 92, Number 11.

Tsuda Y, Shimizu T, Yamato M, et al. Cellular control of tissue architectures using a three-dimensional tissue fabrication technique. *Biomaterials* 2007; 28: 4939

Teruo Okano, Yuji Haraguchi, Tatsuya, Akihiko Kikuchi, Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation.

V. Hadjivassiliou, I.C. Green. Immunomagnetic purification of beta cells from rat islet Langerhans. *Diabetologia* (2000) 43:1170–1177

Y. Shiroyanagi, M. Yamato, Y. Yamazaki, H. Toma And T. Okano. Urothelium regeneration using viable cultured urothelial cell sheets grafted on demucosalized gastric flaps. *Bju International*: (2004):1069-1075

Yokoyama T, Ohashi K, Kuge H, Kanehiro H, Iwata H, Yamato M, et al. In vivo engineering of metabolically active hepatic tissues in a neovascularized subcutaneous cavity. *Am J Transplant* 2006;6:50–9.

Yang J, Yamato M, Shimizu T, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials* 2007; 28: 5033.

Yefang Zhoua, Fulin Chenb, Saey Tuan Hob, Maria Ann. Combined marrow stromal cell-sheet techniques and high-strength biodegradable composite scaffolds for engineered functional bone grafts. *Biomaterials* 28 (2007) 814–824

Yoshiyuki Kawakami, Hiroo Iwata, Yuan J. Gu, Masaaki Miyamoto, et al. Successful Subcutaneous Pancreatic Islet Transplantation Using an Angiogenic Growth Factor–Releasing Device. *Pancreas* Vol. 23, No. 4, pp. 375–381

Yuki Isoi, Akihiko Kikuchi, Teruo Okano, et al. Novel approach for achieving double-layered cell sheets co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes.

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; 163: 181.

Willy A Noort, Alwine B Kruisselbrink, Pieterella S in't Anker, Marjolein Kruger, Rutger L van Bezooijen, Roelf A de Paus, Mirjam H.M Heemskerk, Clemens W.G.M Löwik, J.H. Frederik Falkenburg, Roel Willemze, Willem E Fibbe. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology*. Volume 30, Issue 8, August 2002, Pages 870–878.

ÖZGEÇMİŞ

Ad: Büşra

Soyad: Öncel Duman

Doğum tarihi: 03.06.1987

Doğum yeri:Kocaeli/Türkiye

Medeni Hal:Evli

Adres: Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi,Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı Tıp Fakültesi. Morfoloji Binası 1.Kat 41380 Umuttepe-İzmit/Kocaeli/ TÜRKİYE

İletişim: 0262 303 86 85

E-posta:busraoncel@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

2011-2014:Yüksek Lisans

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilimdalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı
Kocaeli/TÜRKİYE

2006-2010: Lisans

Uludağ Üniversitesi,Fen-Edebiyat Fakültesi,Biyoloji Bölümü,Bursa/TÜRKİYE

BİLGİSAYAR BECERİLERİ

Microsoft Office

Mat Lab

Joomla

Photo Shop

SPSS

KONUŞMA BECERİLERİ

Anadil: Türkçe

İngilizce: Okuma: 9/10, Yazma: 9/10, Konuşma: 8/10

ÇALIŞTIĞI PROJELER

04/2013-10/2015: Farklı Dokulardan İzole Edilen Mezenşimal Kök Hücrelerin Migrasyonunun Kıyaslanması: Basic-Fibroblast Growth Factor (B-FGF; FGF2) Ve Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)'İN Hücrelerin Migrasyonuna Etkisi. TÜBİTAK-112S587, SBAG 1001 (Bursiyer)

04/2011-04/2013 : Effect of the Pulp Capping Agents with Different Structure on the Odontogenic Differentiation of Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells. TUBİTAK-110S483, SBAG 1001 (Scholarship).

15/03/2014-15/03/2016: Deneysel Nazal Mukoza Hasarı Sonrası Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve Nazal Mukoza Hücreleriyle Oluşturulan Hücre Tabakalarının Maksiller Sinüslere Aktarılmasının İyileştirici Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. TÜBİTAK-113S871, SBAG 1001.

20/04/2014-20/12/2014 :Tavşanlarda Deneysel Büyüme Plağı Hasar Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Ve Kondrosit Uygulamasının Tedavi Edici Etkinliğinin Karşılaştırılması Olarak İncelenmesi.TÜBİTAK-SBAG 3001.

10/01/2014-01/06/2014:Sıçandaki Tam Kat Doku Kaybı Modelinde, Kısmi Katlı Deri Grefti(KKDG) Ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Geni Transfekte Edilmiş Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (VGTE-ADKH) Kombine Kullanımının Kontraksiyon Ve Deri Greftleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.

01/2013-01/01/2014:Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tabakası İle Birlikte 3-Boyutlu Adacık Dokusunun Subkutan Naklinin Diyabetik Sıçan Modelinde Etkinliğinin Araştırılması. Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi.

POSTER SUNUMLARI

1- Duman BO,Sariboyaci AE,Karaoz E Sıcaklık Duyarlı Poly(N-İsopropylacrylamide) Kültür Kaplarında *in vitro* Kültür Edilen Beta Hücre Tabakasının Proliferasyon, Apoptoz, İmmunfenotip ve Endokrin Salgılama İşlev Özelliklerinin İncelenmesi.**1.Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücre Tedaviler Kongresi,20-23 Mart,Kocaeli**

2- Duman BO,Sariboyaci AE,Karaoz E,Studying the Efficiency of Subcutaneous Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Sheet With 3-D Islet Tissue In Diabetic Rat Model, **Frontiers In Medical Sciences:Diabetes, Cancer and**

Their Connection, July 6-8th 2014, Marma Convention Center Maltepe University,Istanbul/Turkey

ÖDÜLLER

1- Frontiers In Medical Sciences:Diabetes, Cancer and Their Connection, July 6-8th 2014, Marma Convention Center Maltepe University,Istanbul/Turkey, Poster Bildiri Ödülü 1.si

Duman BO,Sariboyaci AE,Karaoz E,Studying the Efficiency of Subcutaneous Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Sheet With 3-D Islet Tissue In Diabetic Rat Model.