

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREAS DOKUSU HÜCRE DIŞI MATRİKS PROTEİNLERİNİN
PANKREATİK BETA HÜCRE CANLILIĞI VE ÇOĞALMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Çiğdem İNCİ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü YönetmeliĐinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için ÖngördüĐü
BİLİM UZMANLIĐI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak HazırlanmıŐtır

Danışman
Prof.Dr. Erdal KARAÖZ

Destekleyen Kurum ve Proje Kodu: Kocaeli Üniversitesi Bilimsel AraŐtırma Projeleri-
Novo Nordisk (KOÜ-Novo Nordisk 2013/2)

KOCAELİ
2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

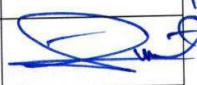


(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: **Pankreas Dokusu Hücre Dışı Matris Proteinlerinin
Pankreatik Beta Hücre Canlılığı ve Gөгelmesi Üzerine Etkisi**

Tez yazarı: **Çiğdem İnci**
Tez savunma tarihi: **01.07.2014**

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**

*İş bu çalışma Jürimiz tarafından **Hök. Hücre** Anabilim Dalı
Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.*

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Üye Prof. Dr. Erdal KARAÖZ	
Üye Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI	
Üye Yard. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU	

ONAY
Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

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

Prof. Dr. Tuncay Çolak
Enstitü Müdürü

ÖZET

Pankreas Dokusu Hücre Dışı Matriks Proteinlerinin Pankreatik Beta Hücre Canlılığı ve Çoğalması Üzerine Etkisi

Diyabet, glukoz ve yağ metabolizmasının hasar görmesi sonucu oluşan metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Tip-1 diyabet, beta hücrelerine karşı gelişen immün yanıt sonucu ortaya çıkmaktadır. Diğer yandan, beta hücrelerinden yetersiz insülin salınması ve insülin direnci sonucunda tip-2 diyabet oluşmaktadır. Tip-2 diyabetli hastalarda, beta hücreleri zamanla zarar görmekte ve sayıları kandaki glukoz seviyesini dengelemeye yetmemektedir. Bu nedenle, beta hücrelerinin yerine konması ve korunması her iki tip diyabetin etkin tedavisi için gerekmektedir. Bu amaçla, hücrenin çevresiyle iletişim kuracağı ve tutunacağı bir ortam sağlayarak *in vivo*'da hücreleri destekleyen mikroçevreye benzer bir ortamı oluşturan hücre dışı matriks proteinleri ile *in vitro*'da beta hücrelerinin canlılığının korunması ve çoğalmalarının indüklenmesi sağlanabilir. Çalışmamızda, pankreasta bulunan temel hücre-dışı matriks proteinlerinin *in vitro*'da beta hücre canlılığı, fonksiyonu ve çoğalması üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

BRIN-BD11 hücreleri, kollajen tip-1, kollajen tip-4, laminin, fibronektin, vitronektin, endokrin pankreas protein ekstraktı, kollajen tip-1 + vitronektin karışımı ve kollajen tip-1 + laminin karışımı kullanılarak kaplanan yüzeylerde kültüre edilerek canlılık ve fonksiyon testleri yapılmıştır.

Kollajen tip-4'ün beta hücreleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu tespit edilirken laminin, endokrin pankreas protein ekstraktı, kollajen tip-1 ile vitronektin karışımı ve kollajen tip-1 ile laminin karışımının hücre canlılığını desteklediği belirlenmiştir. Ayrıca, vitronektinin *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadelerini ve fibronektin ile kollajen tip-1 + vitronektin karışımının insülin salınımını artırarak hücrelerin fonksiyonlarını desteklediği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: beta hücresi, diyabet, hücre dışı matriks, mikroçevre, pankreas

ABSTRACT

The Effect of Pancreas Tissue Extracellular Matrix Proteins on Cell Viability and Growth of Pancreatic Beta Cells

Diabetes mellitus is defined as a metabolic disorder resulting from the deterioration of glucose and fat metabolism of body. Type-1 diabetes develops by formation of autoimmune response against beta cells. On the other hand, inadequate insulin secretion by beta cells in the setting of insulin resistance leads the development of type-2 diabetes. Beta cells in patients with type-2 diabetes are degenerated in times, and their number also declines steadily causing elevated blood sugars. Therefore, the replacement of pancreatic beta cells and their protection in both types of diabetes are required for permanent treatment. For this purpose, extracellular matrix proteins might provide a supporting niche for cells in culture similar to the in vivo microenvironment, which protects beta cells and induces both their viability and proliferation by providing cells an environment to communicate and to adhere. Therefore, in our study, the effect of major extracellular matrix proteins in pancreas on beta cell viability, functionality and proliferation in culture is aimed to investigate.

By culturing BRIN-BD11 cells on collagen type-1, collagen type-4, laminin, fibronectin, vitronectin, collagen type-1 + laminin mix, collagen type-1 + vitronectin mix and endocrine pancreas extract coated plates the most effective proteins for beta cell viability were determined.

Collagen type-4 was determined to have adverse effects on beta cell proliferation and viability in contrast to laminin, endocrine pancreas extract and protein mix groups. Increased insulin secretion levels showed that fibronectin and collagen type-1+ vitronectin mix also support beta cell functionality.

Keywords: beta cells, diabetes mellitus, extracellular matrix, microenvironment, pancreas

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım, bana yol gösteren, bu tezin oluşmasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen sayın bölüm başkanım, danışman hocam **Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**'e; çalışmamın her aşamasında bilgi, deneyim ve yardımlarını benden esirgemeyen, hocam **Yard. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya;

Eğitim sürem boyunca benimle değerli bilgilerini paylaşan ve desteklerini her zaman hissettiğim hocalarım **Yrd.Doç.Dr. Gülçin GACAR**'a ve **Yrd.Doç.Dr Ayla EKER SARIBOYACI**'ya;

Tüm bilgilerini içtenlikle paylaşan, yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım ve ablalarım **Uzm. Tıbbi Biyolog Zehra Seda Ünal**'a, **Uzm. Biyolog Özlem SAĞLAM**'a; **Biyolog Gülay ERMAN**'a;

Tecrübeleriyle bana yol gösteren ve manevi desteğini her zaman hissettiğim ağabeyim **Tıbbi Lab. Tek. Alparslan OKCU**' ya; yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, her anımda yanımda olan ve dostluklarını hiç unutmayacağım **Araş.Gör. Ayşegül BAĞLAR**'a; **Uzm. Biyolog Ayça AKSOY**'a; **Uzm. Biyolog İrem YILMAZ**'a; **Uzm. Biyolog Gizem TURAÇ**'a; **Biyolog Cansu SUBAŞI**'ya ve **Biyolog Büşra ÖNCEL**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bana sonsuz sevgilerini ve desteklerini sunan, maddi ve manevi desteklerini benden hiç eksik etmeyen, bugünlere gelmemi sağlayan canım **AİLEME** sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Pankreas	4
2.1.1 Pankreas Gelişimi	5
2.1.2 Ekzokrin Pankreas	5
2.1.3 Endokrin Pankreas	6
2.1.4 İnsülin Sentezi	7
2.1.5 İnsülin Salınımının Kontrolü	8
2.1.6 İnsülinin Hücreler Üzerindeki Metabolik Etkileri	10
2.2 Diyabet (Diabetes Mellitus)	11
2.2.1 Tip-1 Diyabet	12
2.2.2 Tip-2 Diyabet	13
2.2.3 Diyabetin Tedavisi	14
2.3 Mikroçevre	16
2.3.1 Hücre Dışı Matris (HDM)	17
2.3.2 Endokrin Pankreasta Hücre Dışı Matris Yapısı	19
3 GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Beta Hücrelerinin Kültürü	25
3.2 Çalışmada Kullanılacak Hücre Sayısının Ve Deney Süresinin Belirlenmesi	25
3.3 Endokrin Pankreas Protein Ekstraktının Hazırlanması	26

3.3.1	Sıçan Pankreasından Adacık İzolasyonu ve Karakterizasyonu	26
3.3.2	Endokrin Pankreastan Proteinlerin Eldesi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	27
3.4	Kültür Kaplarının Matriks Proteinleri ile Kaplanması	27
3.5	Etkin Protein Miktarının Belirlenmesi.....	28
3.6	Beta Hücre Canlılığının Ölçülmesi.....	29
3.7	Matriks Proteinlerinin Toksik Etkisinin Belirlenmesi	29
3.8	Fonksiyon Testleri	30
3.8.1	Gen İfade Analizleri	30
3.8.2	İnsülin Salınım Analizleri.....	31
4	BULGULAR	33
4.1	BRIN-BD11 Hücrelerinin Kültürü	33
4.2	Çalışmada Kullanılacak Hücre Sayısının ve Deney Süresinin Belirlenmesi.....	34
4.3	BRIN-BD11 Hücrelerinin Kültürü İçin Etkin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	35
4.4	BRIN-BD11 Hücrelerinin Matriks Proteinleri Üzerinde Kültürü	39
4.5	Matriks Proteinlerinin Hücreler Üzerinde Toksik Etkisinin Belirlenmesi	41
4.5.1	LDH Aktivitesinin Ölçülmesi.....	41
4.5.2	TUNEL Analizi	42
4.6	BRIN-BD11 Hücrelerinin Fonksiyon Analizleri.....	45
4.6.1	Gen İfade Seviyelerinin Analizi	45
4.7	Sıçan Pankreasından Adacık İzolasyonu ve Kültürü.....	51
4.8	Endokrin Pankreas Ekstraktının Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	52
4.9	Farklı Matriks Protein Karışımlarının Oluşturulması.....	53
4.9.1	Matriks Protein Karışımları Üzerinde BRIN-BD11 Hücrelerinin Kültürü ...	53
4.9.2	WST-1 Analizi.....	55
4.9.3	Gen İfade Seviyeleri	57
4.10.	İnsülin Salınım Düzeyleri.....	60
5	TARTIŞMA	63
7	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	70
	KAYNAKLAR DİZİNİ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADA	: Amerikan Diyabet Derneği
ASH	: Antijen Sunan Hücre
ATP	: Adenozin Trifosfat
Ca ²⁺	: Kalsiyum
Cbl	: Casitas B-lineage Lenfoma
cDNA	: Komplementer Deoksiribonukleik Asit
CO ₂	: Karbondioksit
DAPI	: 4' -6- Diamidino -2- fenilindol
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNAz	: Deoksiribonukleaz
ECL	: Entaktin- Kollajen Tip4- Laminin
ELİZA	: Enzim Bağlantılı İmmunsorbent Deneyi
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
Gab-1	: Guanozin Trifosfataz Aktive Edici Protein
GAD65	: Glutamik Asit Dekarboksilaz
GLUT-2	: Glukoz Taşıyıcı Protein Tip-2
GLUT-4	: Glukoz Taşıyıcı Protein Tip-4
Gly	: Glisin
HDM	: Hücre Dışı Matriks
H-DMEM	: Yüksek Glukozlu Dulbecco's Modified Eagle Medium
HLA	: İnsan Lökosit Antijen
IA-2	: Adacık Antijeni-2
IAA	: İnsülin Otoantikoru
IL-6	: İnterlökin-6
IRS	: İnsülin Reseptör Substrat
K ⁺	: Potasyum
LDH	: Laktodehidrogenaz
L-DMEM	: Düşük Glukozlu Dulbecco's Modified Eagle Medium
MAPK	: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MHC	: Büyük Doku Uygunluk Kompleksi
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinukleotit
NF-kB	: Nuklear Faktör Kappa B
nm	: Nanometre
OH	: Hidroksil
PBS	: Fosfat tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Potansiyel Hidrojen
PI-3	: Fosfatidil İnozitol-3 Kinaz
RGD	: Arjinin-Glisin-Aspartat

RNA	: Ribonukleik asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Besi Yeri
Shc	: Src Homolog 2 içeren Sitoplazmik Adaptör Protein
sn	: Saniye
TdT	: Terminal Deoksinukleotit Transferaz
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	: Suda Çözülebilir Tetrazolyum
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Pankreasın bölümleri.....	4
Şekil 2.2. Embriyonik dönemde pankreas gelişimi.....	5
Şekil 2.3. Preproinsülinin moleküler yapısı	8
Şekil 2.4. Fonksiyonel beta hücresinin ortamdaki glukoz miktarına yanıt oluşturma mekanizması	9
Şekil 2.5. Hücre dışı matriksin hücre davranışı üzerindeki etkileri	17
Şekil 2.6. A) Kollajenin moleküler yapısı, B) Kollajen polipeptidinin elektron mikroskopik görüntüsü.....	20
Şekil 2.7. A) Lamininin moleküler yapısı, B) Laminin polipeptidinin elektron mikroskopik görüntüsü.....	22
Şekil 2.8. Fibronektinin moleküler yapısı, bağlanma bölgeleri	23
Şekil 3.1. Yüzeysel farklı konsantrasyonlarda proteinler ile kaplanmış 96 kuyucuklu kültür kabının şeması, ECM Cell Culture Optimization Array (Millipore).	28
Şekil 4.1. Beta hücrelerinin kültürün 1., 2. ve 3. günlerinde morfolojik görüntüleri	33
Şekil 4.2. Farklı sayıda ekilen beta hücrelerinin üç gün boyunca yapılan WST-1 ölçümleri.	35
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda fibronektin proteini ile kaplanan yüzeysel iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.	36
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda kollajen tip-1 proteini ile kaplanan yüzeysel iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.	36
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda laminin proteini ile kaplanan yüzeysel iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.	36
Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda vitronektin proteini ile kaplanan yüzeysel iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.	37
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kollajen tip-4 proteini ile kaplanan yüzeysel iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi	38
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda ECL ile kaplanan yüzeysel iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi	38
Şekil 4.9. Matriks proteinleri üzerinde kültüre edilen beta hücrelerinin 2. günde morfolojik görüntüleri.....	41
Şekil 4.10. Matriks proteinleri üzerinde kültürü yapılan BRIN-BD11 hücrelerinin süpernatantlarında ölçülen LDH aktivitesinin, kontrol grubunda belirlenen LDH aktivitesi değerine oranları	42
Şekil 4.11. Matriks proteinleri üzerinde kültür edilen beta hücrelerinin TUNEL boyaması sonrasında hücre sayımı yapılarak belirlenen apoptotik hücre sayısı yüzde değerleri	43

Şekil 4.12. Fibronektin kaplı yüzeyde kültürü yapılan beta hücrelerinin morfolojik görüntüleri. Fibronektin kaplı yüzeylerde hücrelerde büyük vakuol yapılarının oluştuğu gözlenmiştir.	43
Şekil 4.13. Matriks proteinleri üzerinde kültürü yapılan beta hücrelerinin TUNEL boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. İnsan kollajen tip-4 üzerinde kültürü yapılan hücrelerde pozitif boyanmanın diğer gruplara oranla daha fazla olduğu gözlenmektedir.....	45
Şekil 4.14. Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin <i>ins1</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	46
Şekil 4.15. Fibronektinin beta hücrelerinin <i>ins1</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	46
Şekil 4.16. Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin <i>ins2</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.17. Fibronektinin beta hücrelerinin <i>ins2</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.18. Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin <i>gck</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	48
Şekil 4.19. Fibronektinin beta hücrelerinin <i>gck</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	48
Şekil 4.20. Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin <i>glut2</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 4.21. Fibronektinin beta hücrelerinin <i>glut2</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 4.22. Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin <i>mafA</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	50
Şekil 4.23. Fibronektinin beta hücrelerinin <i>mafA</i> geni ifadesi üzerindeki etkileri.....	50
Şekil 4.24. A) Sıçan pankreas adacıklarının zıt faz mikroskopi ile gözlemlenen morfolojik görünüşleri. B) DTZ boyaması sonucunda pozitif olduğu gözlenen adacıkların zıt faz mikroskopik görünüşleri.....	51
Şekil 4.25. BSA standartlarının OD değerleri ile oluşturulan standart eğri grafiği.	52
Şekil 4.26. Matriks karışımları ve endokrin pankreas protein ekstraktı üzerinde kültüre edilen beta hücrelerinin kültürün 2. gününde morfolojik görüntüleri	54
Şekil 4.27. Endokrin pankreas protein ekstraktı ve matriks protein karışımları ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi	55
Şekil 4.28. Endokrin pankreas protein ekstraktı üzerinde kültüre edilen beta hücrelerinin supernatantında ölçülen LDH aktivitesi.....	56

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabet, pankreasta bulunan Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun yetersizliği ya da insülin direncinin gelişmesi sonucu ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) raporlarına göre 2030 yılında, dünyada diyabet hastası sayısının üç yüz milyonu aşacağı ve bu hastalığın ölüm sebepleri arasında yedinci sırada olacağı öngörülmektedir (Alwan, 2010). Yaşam kalitesini önemli derecede düşüren hastalığın, neden olduğu ikincil komplikasyonlar nedeni ile mortalitesi yüksektir.

Temel olarak dört farklı sınıflandırması yapılan diyabetin en sık görülen formları tip-1 ve tip-2 diyabettir. Otoreaktif hücrelerin insülin salgılayan beta hücrelerine saldırması sonucunda bu hücrelerin zarar görmesi ve insülin üretememeleri ile tip-1 diyabet gelişmektedir. Hastalar, kandaki glukoz seviyesinin dengelenmesi için dışarıdan insülin almak zorundadır. Tip-2 diyabette ise pankreasta bulunan beta hücrelerinin ürettikleri insüline karşı direnç gelişmektedir. Oluşan hipergliseminin önüne geçmek için genellikle diyet ve egzersiz programları yeterli olsa da uzun dönemde tip-2 diyabetli hastalar da dışarıdan insülin almak zorunda kalabilmektedir. Her iki tip diyabet hastalarında da beta hücrelerinin zarar gördüğü ve sayılarının giderek azaldığı gözlenmektedir.

Günümüzde, diyabetin kesin ve etkin bir tedavisi yoktur. Uygulanan tedavi yöntemleri, kandaki glukoz seviyesinin düzenlenmesi amacı ile hastaların devamlı olarak insülin almalarına dayanmaktadır. Zarar gören beta hücrelerinin yerine konmasına ilişkin uygulanan yöntemler ise pankreas ya da adacık naklidir. Pankreas nakilleri, oldukça zorlu bir cerrahi girişim olduğundan genellikle böbrek nakilleri ile birlikte yapılmaktadır. Bu yöntem, hastaların iyileşmesini sağlasa da uygun verici bulunma olasılığını oldukça düşük olması ve gerektirdiği cerrahi müdahalenin zorlukları nedeni ile yaygın olarak kullanılamamaktadır. Adacık nakli ile ilgili çalışmalar ise ilk olarak 1970'li yıllarda fareler üzerinde yapılan denemeler ile başlamıştır. İlk yıllarda insanlarda başarı oranı düşük olsa da, 2000 yılında rapor edilen bir çalışmada farklı bir immün baskılama protokolü (Edmonton protokolü) eşliğinde yapılan adacık nakli sonucunda yedi hastada iyileşme gözlemlendiği rapor edilmiştir. Ancak, nakil yapılan hastalarda kısa dönemde iyileşme (insülin bağımsız hale gelebilme) görülse de bu başarı oranı hem düşüktür, hem de

uzun dönemde tedavinin etkisiz kaldığı görülmektedir. Bunun yanında, farklı merkezlerde uygulanan nakillerin başarı oranlarının her zaman aynı olmadığı görülmektedir. Nakil için izole edilen adacıklardaki canlı-işlevsel beta hücrelerinin oranının, değişken olması tedavinin başarısını etkileyen en önemli faktör olduğu düşünülmektedir. Bu yöntemlerin uygulanmasını sınırlandıran en önemli neden ise nakil için uygun, doku uyumu olan verici bulunma olasılığının çok düşük olmasıdır.

Oldukça yaygın görülen, hastaların yaşamını önemli ölçüde etkileyen ve aynı zamanda önemli bir maddi yükümlülük getiren diyabetin etkin bir tedavisinin bulunabilmesi amacıyla pek çok çalışma yapılmaktadır. Kök hücrelerin insülin üreten hücrelere farklılaştırılarak hastalara verilmesi, adacık nakilleri sırasında aynı zamanda mezenkimal kök hücreler aracılığı ile immün sistemin düzenlenmesi, nakledilen hücrelerin kapsülle çevrelenerek (enkapsüle edilerek) immün sistem hücrelerinden korunması üzerinde çalışan stratejilerden bazılarıdır. Beta hücrelerinin *in vitro* ortamda uzun süre canlılığının korunamaması, adacık nakillerinde izolasyon aşamaları sırasında bu hücrelerin zarar görmesi diyabet ile ilgili yapılan çalışmalarda aşılması gereken önemli bir sorundur.

Buldukları ortam (mikroçevre), hücre- hücre ve hücre- hücre dışı matriks (HDM) ile etkileşimleri hücrelerin canlılık ve fonksiyonlarını etkilemektedir. HDM, dokulara mekanik destek sağlamanın yanı sıra içeriğindeki proteinler ve polisakaritler aracılığı ile hücrelerin tutunmaları ve çevreleri ile etkileşimde bulunabilmelerini sağlayan bir ortam oluşturmaktadır. Hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak aktifleştirdikleri sinyal yolları aracılığı ile HDM yapısı, hücrelerin gen ifade profillerini değiştirmektedir. Enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla yapısı sürekli yenilenen ve değişen HDM, bu özellikleri ile etkileşimde buldukları hücrelerin farklı koşullara uyum sağlamasına da yardımcı olmaktadır.

Dokulara ve dokuların fonksiyonlarına göre farklılık gösteren HDM yapısındaki proteinler, hücrelerin *in vitro* koşullarda desteklenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Hücrelerin *in vivo* mikroçevresini taklit ederek geliştirilen kültür ortamları ile hücre davranışları kontrol edilmeye çalışılmaktadır. Bu doğrultuda, beta hücrelerinin *in vitro*'da canlılığının korunması, çoğalmalarının indüklenmesi ve fonksiyonlarının desteklenmesi için gereken kültür ortamının geliştirilmesi hedeflenen bu çalışmada endokrin pankreas yapısında bulunan matriks proteinleri kullanılmıştır. Kollajen tip-1, kollajen tip-4, laminin, fibronektin, vitronektin ve endokrin pankreastan elde edilen protein ekstraktı ile kaplanan

kültür kaplarında kültürü yapılan sıçan beta hücrelerinin çoğalmaları ve fonksiyonlarının bu proteinlerden ne yönde etkilendiklerinin belirlenmesi amacıyla gen ifade analizleri, çoğalma analizleri ve immün analiz yöntemlerinin kullanılması planlanmıştır.

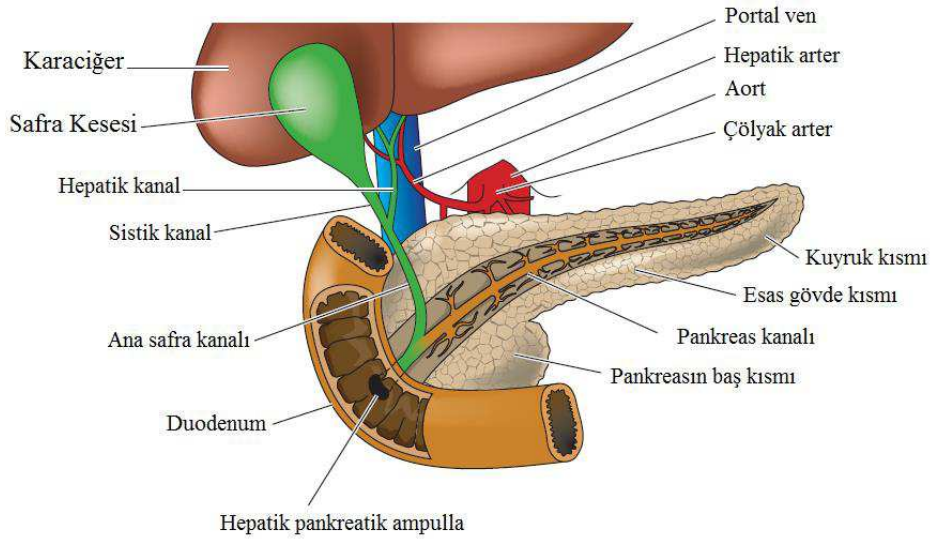
Gelecekte, adacık nakillerinin yanı sıra tekli beta hücre nakilleri sürecinde *in vitro* kültür aşamasında ve nakil sırasında bu hücrelerin en etkin şekilde desteklenmesini sağlayacak matriks bileşeninin bulunmasının bu tedavi süreçlerinin başarı oranlarını önemli ölçüde artıracığı düşünülmektedir. Bu çalışma, izolasyon ve kültür aşamalarında yaşanan hücre kayıplarını en az seviyeye indirmeye ve nakil sonrasında hücrelerin nakil bölgesinde daha uzun süre canlılığını sağlamaya yönelik çalışmalara katkı sağlayacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Pankreas

Pankreas, sahip olduğu endokrin ve ekzokrin fonksiyonlar ile sindirim sisteminde rol almakta ve kandaki glukoz seviyesinin dengelenmesini sağlamaktadır. İnce barsağın başlangıç bölümüne uzanan solit bir organ olan pankreas 4 bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.1.):

- Baş: Superior mezenterik arterin sağında duodenuma uzanan bölümdür.
- Boyun: Superior mezenterik arterin üzerinde vena porta ile temas eden bölümdür.
- Esas gövde: Aortun önünde, superior mezenterik arterin solunda yer alan bölümdür.
- Kuyruk: Dalağa doğru uzanan bölümdür.

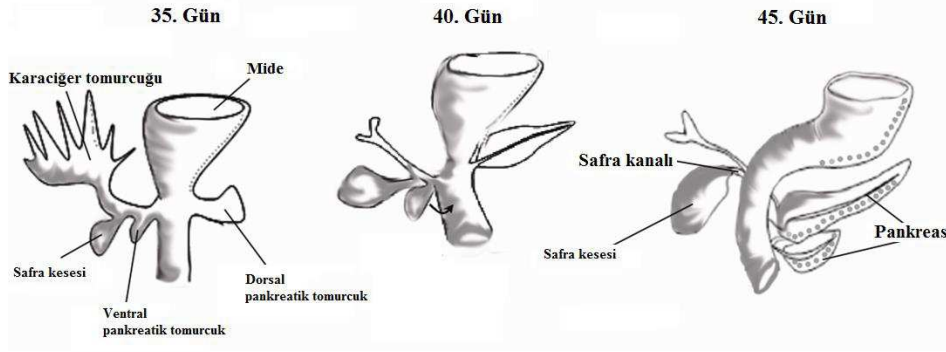


Şekil 2.1. Pankreasın bölümleri (Nair,2007).

Pankreasta ekzokrin salgının toplanmasını sağlayan iki kanal sistemi vardır. Bu sistemin parçaları olan Wirsung kanalı (ana pankreatik kanal) ve Santorini kanalı (aksesuar kanal) duodenuma açılmaktadır.

2.1.1 Pankreas Gelişimi

Pankreas, duodenumdan gelişen dorsal ve ventral tomurcuklardan şekillenmektedir. Duodenum ve midenin rotasyonu ile ilişkili olarak dorsal ve ventral tomurcuk birleşmektedir (Şekil 2.2). Pankreasın büyük bir kısmı dorsal tomurcuktan gelişmektedir. Dorsal pankreas kanalın distali ve ventral kanalın birleşmesi ile Wirsung kanalı oluşmaktadır. Santorini kanalı ise dorsal pankreas kanalının proksimalinden gelişmektedir ancak bazen bu kanal tümüyle geriler ve gelişimin ileri aşamalarında gözlenmez.



Şekil 2.2 Embriyonik dönemde pankreas gelişimi (Sahu, 2011).

Pankreas kütesinin çoğu, kanal sistemleri aracılığıyla ince barsak ile bağlantı kuran ekzokrin hücrelerden oluşmaktadır. Fetal dönemin 3. ayında gelişen endokrin hücreler, daha çok merkezde konumlanmaktadır (Murtaugh, 2007).

2.1.2 Ekzokrin Pankreas

Asinus ve kanal sisteminden oluşan ekzokrin pankreas, enzim ve proenzimler salgılayarak sindirim sisteminde rol almaktadır (Martini, 2004). Sferik ya da tübüler formda bulunabilen asinusların yapısındaki asiner hücreler, oldukça gelişmiş bir endoplazmik retikulum sistemine sahip olup, tripsinojen, karboksipeptidaz, amilaz gibi sindirim enzimlerini sentezlemekte, depolamakta ve salgılamaktadır. Asinusları oluşturan tek sıralı hücreler birbirleri ile sıkı bağlantılar kurarak salgılarının hücreler arası bölgeye çıkmasını engellemektedir. Asinüslerin merkezinde konumlanmış olan sentroasiner

hücreler tarafından sentezlenen enzimler, zimogen granüllerde depolanmaktadır. Bu zimogen granüllerin miktarı ve içerikleri sindirimin fazına göre değişiklik göstermektedir. Duodenumdaki enteroendokrin hücreler tarafından salgılanan sekretin ve kolesistokinin hormonları ve parasempatik sistem ile kontrol edilen ekzokrin salgı duodenuma boşaltılmaktadır.

2.1.3 Endokrin Pankreas

Endokrin pankreas, insülin ve glukagon hormonlarını salgılayarak kandaki glukoz seviyesinin dengelenmesinde rol oynamaktadır. Yapısındaki Langerhans adacıkları adı verilen hücre kümelerinde glukagon salgılayan alfa (α) hücreleri, insülin salgılayan beta (β) hücreleri, somatostatin salgılayan delta (δ) hücreleri ve pankreatik polipeptit salgılayan F hücreleri olmak üzere dört farklı tipte hücre bulunmaktadır. Langerhans adacıkları pankreasın yaklaşık olarak %2'lik bölümünü oluşturmakla birlikte, pankreastaki kan akışının %15-20'lik bölümü adacıklara gitmektedir (Marieb, 2004; Stendahl et al. 2009). Böbrek glomerul yapısına benzer şekilde, damar ağı oldukça gelişmiş olan adacıklarda endokrin hücreler ile dolaşım sistemi arasında direkt alışveriş söz konusudur (Stendahl et al. 2009).

Adacıklarda bulunan hücrelerin %15-20'sini α -hücreleri oluşturmaktadır. Salgıladıkları glukagon hormonu, hiperglisemik etkisi bulunan 29 amino asitlik bir peptittir. Kandaki glukoz düzeyi düştüğünde salgılanan glukagon, portal dolaşıma katılır ve ilk etapta glikojenoliz ile karaciğerde depolanmış olan glikojenin yıkımını sağlayarak kandaki glukoz seviyesini artırır. Uzun süren açlık durumlarında ise karaciğerde glikojenogenezisi uyararak laktat ve aminoasitlerden glukoz üretimini sağlamaktadır.

β -hücreleri, adacıklardaki hücre popülasyonunun yaklaşık olarak %50-80'lik kısmını oluşturmaktadır ve adacıkların merkezinde konumlanmışlardır. β -hücreleri tarafından salgılanan insülin hormonu, 51 amino asitlik bir peptittir. Kandaki glukoz seviyesi yükseldiğinde salgılanmakta ve hipoglisemik etkisini üç şekilde gerçekleştirmektedir. İlk olarak, glukozun hücre içerisine alımını sağlayan ve hücre membranında yer alan glukoz taşıyıcı protein tip-4 (GLUT-4) taşıyıcı proteini insülin varlığında aktif duruma geçmektedir. Bu aktivasyon sonucunda, iskelet kası hücreleri başta olmak üzere periferel doku hücreleri glukozu hücre içerisine almaktadır. İkinci olarak, insülin karaciğer hücrelerinde glikojenogenezisi uyararak glukozun glikojen şeklinde

depolanmasını sağlamaktadır. Son olarak, glukagon hormonunun salgılanmasını baskılayarak karaciğerde gerçekleşen glikojenoliz ve glikoneogenezisi durdurmaktadır. Kandaki glukoz seviyesinin dengelenmesinde rol oynamanın yanı sıra insülin, yağ doku hücrelerinde trigliserit sentezini, karaciğer ve kas hücrelerinde protein sentezini uyarmaktadır.

Delta hücreleri α ve β hücrelerine oranla daha az sayıda (%5-10 oranında) bulunmaktadır. Salgıladıkları somatostatin hormonunun 14 ve 28 amino asitlik iki formu bulunmaktadır. Somatostatin, insülin ve glukagon hormonlarının salgılanmasını inhibe etmektedir.

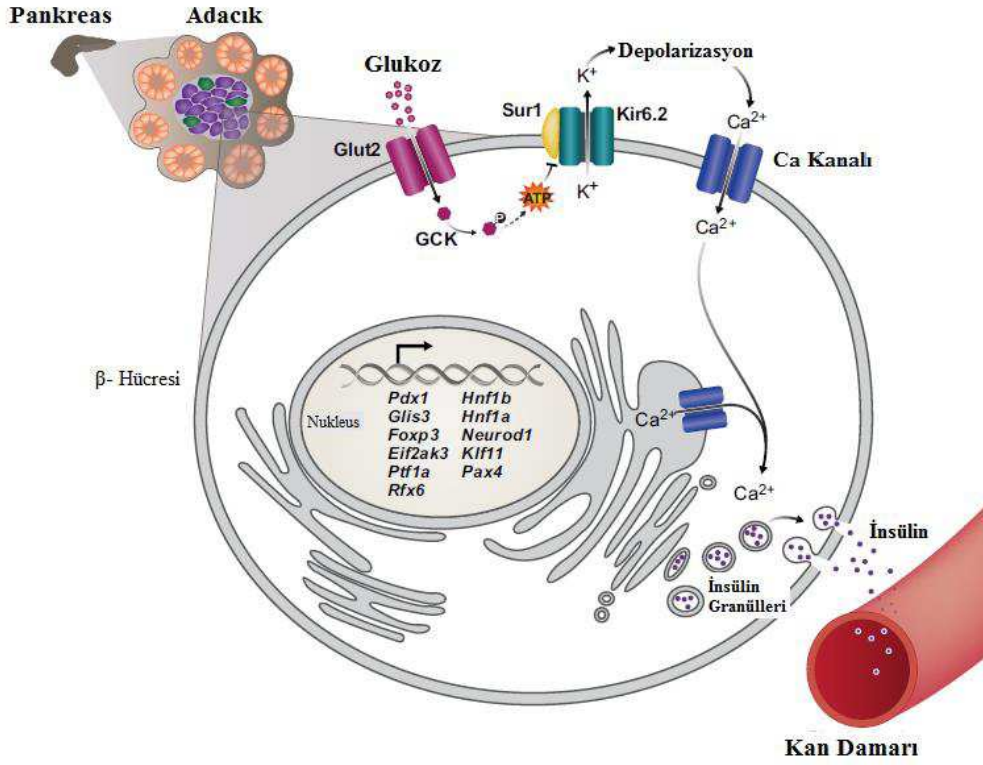
Pankreatik polipeptit salgılayan F hücreleri, total hücre popülasyonunun çok az bir kısmını oluşturmakla birlikte pankreasın boyun bölgesindeki hücrelerin yaklaşık %80'ini oluşturmaktadır. Pankreatik polipeptit 36 amino asit uzunluğundadır ve glukagon hormonunun salgılanmasını artırmaktadır. İnsülinin etkisi ile oluşan hipoglisemik dönemde serumda pankreatik polipeptit seviyesinin yükseldiği gözlenmiştir (Zandomeni et al. 1990). Somatostatin, pankreatik polipeptit sentezini inhibe etmektedir.

2.1.4 İnsülin Sentezi

İnsülin, 100'ü aşkın omurgalı türünde tanımlanmış polipeptit yapılı bir hormondur (Culina et al. 2013). Sentez mekanizmasının ilk ürünü olan preproinsülin, translasyon sonrası modifikasyonlar sonucunda insüline dönüştürülmektedir.

Beta hücrelerinin glukoz duyarlılığı hücrede iki mekanizmayı etkilemektedir:

- Glukozun hücre içerisine alınması ve metabolize edilmesi.
- İnsülinin salınması.



Şekil 2.4. Fonksiyonel beta hücrelerinin ortamdaki glukoz miktarına yanıt oluşturma mekanizması (Pagliuca and Melton, 2013).

Glukoz taşıyıcı protein-2 (GLUT-2), beta hücrelerinin glukozu hücre içerisine almasını sağlayan bir membran proteinidir. Glukoz hücre içerisine alındığında, glukokinaz tarafından fosforile edilerek glukoz-6-fosfata dönüştürülmektedir. Glukokinaz, glukozu karşı düşük afinite göstermekte, oluşturduğu ürün (glukoz-6-fosfat) tarafından ise inhibe edilmemektedir. Bu nedenle, glukokinaz bu yolda hız sınırlayıcı basamağı olmasına karşın, hücrenin ortamdaki glukozu karşı devamlı olarak yanıt verebilmesini sağlamaktadır. Fosforile edilen glukoz, glikolize uğrar ve sonuçta piruvat, NADH

(nikotinamid adenin dinükleotit) ve ATP (adenozin tri-fosfat) açığa çıkmaktadır. Hücre içinde ATP miktarının artması ile ATP-bağımlı potasyum (K^+) kanalları kapanarak membranda depolarizasyona neden olmaktadır. Voltaj-bağımlı kalsiyum (Ca^{2+}) kanalları depolarizasyon sonucunda açılmaktadır. Hücre içerisine kalsiyum alınması ve hücrenin kendi kalsiyum depolarının içeriğini sitoplazmaya salması ile insülin içeren salgı granülleri hücre membranı ile füzyona uğramakta ve insülin salgılanmaktadır (MacDonald et al. 2005).

2.1.6 İnsülinin Hücreler Üzerindeki Metabolik Etkileri

Beta hücrelerinden salgılandıktan sonra portal dolaşıma katılan insülin, karaciğer, kas ve yağ dokusu hücreleri başta olmak üzere hücrelerin membranında bulunan özgün reseptörlerine bağlanmaktadır. İnsülin reseptörü, ekstraselüler iki α ve transmembran iki β alt ünitelerinden oluşmaktadır. İnsülin α alt ünitelerine bağlandığında hücre içi reaksiyonlar başlamaktadır. Uyarılan β alt ünitelerinde, intrinsik tirozin kinaz aktivitesini takiben tirozin amino asitlerinde otofosforilasyon gerçekleşmektedir. Reseptörün β alt ünitesi ile ilişkili olan insülin reseptör substrat ailesi (IRS), Shc adaptör proteini, Gab-1 (GTPaz aktive edici protein) ve Cbl proteinleri fosforillenerek PI-3 kinaz yolağı (fosfatidil inozitol-3 kinaz) ve MAPK (mitojen aktive edici protein kinaz) yolağını aktifleştirmektedir. PI-3 kinazın fosfatidil inositol (PI) substratlarını fosforile etmesi ile başlayan reaksiyonların sonucunda sitozolde bulunan GLUT-4 taşıyıcı proteini hücre membranına doğru hareket etmektedir. Membrana yerleşen GLUT-4, glukozun hücre içerisine alınmasını sağlamaktadır.

2.2 Diyabet (Diabetes Mellitus)

Diabetes Mellitus (DM), karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara yol açan, kronik seyirli metabolik bir hastalıktır. DM, hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren, morbidite ve mortalitesinin yüksek olmasının yanı sıra ekonomik yükü yüksek bir hastalıktır. Hastalar, polidipsi (çok su içmek), polifaji (çok yemek yemek), poliüri (çok idrar yapmak), kilo kaybı, halsizlik, deri enfeksiyonu ve baş ağrısı gibi klinik belirtiler göstermektedir.

DM, insülin salınımı, etkisi ya da her ikisinde meydana gelen bozukluklar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Hiperglisemi ile karakterize olan DM, anjiyopati, kardiyomiyopati, nöropati, retinopati ve nefropati gibi ikincil komplikasyonlara neden olmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1999 yılında yayınladığı raporda DM için, tip-1, tip-2, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik diyabet tipleri olmak üzere 4 farklı sınıflandırma yapmıştır. Amerikan Diyabet Derneği (ADA) ise 2004 yılında bu sınıflandırmayı genişletmiştir (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Diyabetin sınıflandırılması (ADA, 2004).

- 1) **Tip-1 Diyabet:** İmmün Sistem Aracılı
İdiyopatik
- 2) **Tip-2 Diyabet**
- 3) **Diğer Spesifik Diyabet Çeşitleri:** Beta Hücre Fonksiyonunda Genetik Kusurlar
 - A. İnsülin Etkisinde Genetik Kusurlar
 - B. Ekzokrin Pankreas Hastalıkları
 - C. Endokrinopatiler
 - D. İlaç ve Kimyasal Ajanlar
 - E. Enfeksiyonlar
 - F. İmmün-Aracılı Diyabetin Az Görülen Formları
 - G. Diyabet ile İlişkili Genetik Sendromlar
- 4) **Gestasyonel Diyabet**

2.2.1 Tip-1 Diyabet

Tip-1 diyabet, pankreastaki beta hücrelerine karşı oluşan otoimmünite sonucunda meydana gelen insülin eksikliği ya da yetersizliği ile karakterizedir. Bu olguların çoğu 20 yaş öncesinde ortaya çıkmaktadır. Diyabet hastalarının yaklaşık %10'u tip-1 diyabetir ve dünyada yaklaşık olarak 320 milyon diyabet hastası olduğu düşünülmektedir (Ricordi et al. 2012). Beta hücrelerinin zarar görmesi sonucunda insülin sentezinde yetersizlik olduğundan bu tip diyabete insülin bağımlı diyabet de denmektedir. Hasta bireyler, düzenli olarak insülin almak zorundadır.

Hastalığın gelişiminde ilk aşamada, beta hücrelerine karşı uyarılmış olan $CD4^+$ ve $CD8^+$ T lenfositlerin, B lenfositlerin ve makrofajların adacıklara invazyonu (insülitis) gerçekleşmektedir. Otoimmün saldırının başlamasında genetik faktörlerin etkisi vardır. Ancak monozigotik ikizlerde, tip-1 diyabet hastası olmaları açısından kardeşlerin yaklaşık %30'unun uyumlu oldukları gözlenmiştir (Watkins, 2003). Tip-1 diyabetin başlangıcında etkili olduğu düşünülen 6. kromozomda bulunan HLA sınıf-II lokusu, tip-1 diyabetin başlangıcında etkili olduğu düşünülen en önemli bölge olmasının yanı sıra bu gen için genetik olarak yatkın olduğu belirlenen bireylerde diyabete yakalanma oranı %10'dan daha azdır (Knip and Siljander, 2008). Bu nedenle, genetik faktörlerin yanı sıra çevresel etmenlerin de otoreaktif hücrelerin beta hücrelerine saldırısının başlamasından ve ilerlemesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. İnsülitisi takip eden aşamada da hücre-aracılı ve hümorale etkiler ile beta hücrelerin yıkımı ve insülin üretiminin yetersiz kalması gerçekleşmektedir.

Hücre aracılı otoimmün yanıtta, iki farklı mekanizmadan bahsedilmektedir. İlk mekanizmaya göre, sitotoksik T lenfositleri ($CD8^+$) beta hücrelerinin membranında bulunan MHC molekülleri aracılığı ile bu hücreleri tanımaktadır. Bu durumda, söz konusu otoantijenlerin MHC-I molekülleri olduğu düşünülmektedir. Diğer mekanizmada ise hem $CD4^+$ hem de $CD8^+$ T lenfositleri, beta hücrelerini antijen sunan hücrelerin membranında bulunan MHC-II molekülleri aracılığı ile tanımaktadır. Otoreaktif T lenfositlerin uyarılması ile sonuçlanan bu antijen sunumunun pankreatik lenf nodüllerinde gerçekleştiği kabul edilmektedir. Bu iki aktivasyon modelinin sonucunda uyarılan T lenfositleri salgıladıkları sitokinler ve çözülebilir faktörler aracılığıyla, makrofajlar da hücre öldürücü (sitokoidal) etkileri ile beta hücrelerinin apoptoza gitmesine neden olmaktadır (Knip and

Siljander, 2008). Apoptoz, beta hücrelerinde Fas-Fas ligand, NF-kB (nuclear factor kappa B) ve MAPK (mitogen activated protein kinase) yollarının aktifleşmesi ile gerçekleşmektedir (Cernea and Dobreanu, 2013).

Tip-1 diyabetli hastalarda, antikor aracılı beta hücre yıkımı da görülmektedir. B lenfositleri, beta hücrelerine özgün bazı proteinlere karşı otoantikor üretmektedir. İnsülin otoantikoru (IAA), glutamik asit dekarboksilaz antikor (GAD65 A) ve protein tirozin fosfataz benzeri antikor (IA-2) tip-1 DM tanısında kullanılan antikorlardır.

Tip-1 diyabetin erken aşamalarında, beta hücre kitlesinin kaybı %50-80 oranındadır ve hastalarda glukoz tolerans bozukluğu gözlenmektedir. Bu aşamada %20-50 oranında insülin içeriği söz konusu olduğundan açlık kan şekeri normal seviyededir. Beta hücre yıkımının devam etmesiyle ileriki aşamalarda hücre kaybı %80'in üzerine çıkmaktadır ve klinik diyabet gözlenmektedir.

2.2.2 Tip-2 Diyabet

Tip-2 diyabet, beta hücrelerinde gerçekleşen işlev bozukluğu ya da periferik dokularda gelişen insülin direnci sonucunda glukozun hücre içine alınamaması, insülin etkinliğinin azalması ile ortaya çıkmaktadır. İnsülin direnci adı verilen bu durumda, beta hücreleri tarafından üretilen insüline karşı oluşturulan normal biyolojik yanıtta sorun oluşmaktadır. İnsülin direncinin gelişmesi, tip-1 diyabette olduğu gibi glukoz, lipid metabolizması ve kan basıncının dengelenmesinde sorunlara yol açmaktadır.

Tip-2 diyabetin gelişmesinde genetik faktörlerin yanı sıra bireylerin yaşam tarzı da önemli rol oynamaktadır. Hastaların çoğunda obezite görülmektedir. Genellikle bireylerin diyetlerine dikkat etmesi, kilo kaybı ve egzersiz yapmaları gibi önlemler ile hipergliseminin önüne geçilebilmektedir. Bu nedenle, tip-2 diyabet, insüline bağımlı olmayan diyabet olarak da adlandırılmaktadır.

Beta hücrelerindeki fonksiyon bozukluğu ve insülin direnci, insülin reseptör ve gen mutasyonları gibi genetik faktörler aracılığı ile gelişebilmektedir. Ancak, insülin direncinin en yaygın nedenleri, oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi, pankreastaki amiloid ve kas dokusundaki ektojik lipit depozisyonu, pankreas, karaciğer ve kas dokusundaki lipotoksosite ile glukotoksosite gibi bozukluklardır (Samuel and Shulman, 2012).

Yağ asitlerinin, piruvat dehidrogenaz enzimini inhibe ederek insülin aracılı glukoz alımı mekanizmasını bozduğu, yağ dokusu kaynaklı TNF- α sitokininin tirozin kinaz inhibisyonuna neden olduğu ve obezite olgularında artan IL-6 ifadesi sonucunda PI-3 kinaz aktivitesinin bozulduğu gösterilmiştir (Randle et al. 1963; Senn et al, 2002). Bu faktörlerin etkisi ile gelişen insülin direnci sonucunda hasta bireylerde hiperinsülinemi gelişmektedir.

Tip-2 diyabet hastalarında beta hücre sayısı, genetik faktörler nedeni ile sınırlı olabilmektedir. Geçici hiperglisemik farklılıklar beta hücrelerinin rejenerasyonunu uyarsa da uzun dönemde bu savunma mekanizması başarısız olmaktadır. Hastalarda meydana gelen beta hücre ölümü; glukotoksisite, doymuş yağ asitleri, lipoproteinler, leptin ve sitokinler aracılığı ile gerçekleşmektedir (Donath et al, 2005).

2.2.3 Diyabetin Tedavisi

Günümüzde diyabet hastalarına uygulanan tedavi yöntemleri, kandaki glukoz seviyesinin düzenlenmesini sağlamaya yöneliktir. Tip-2 diyabetli hastalarda yaşam tarzının düzenlenmesi, tip-1 diyabetli hastalarda ise dışarıdan insülin alınması sıklıkla uygulanan yöntemlerdir. Beta hücre hasarı ve ölümünün önüne geçmek ve diyabetin kesin olarak ortadan kalkmasına yönelik çalışmalar ise sınırlıdır.

Pankreas nakli, diyabet tedavisi için kullanılmakta olan yöntemlerden birisidir. İlk olarak 1966 yılında uygulanan yöntemle ilişkin denemeler ilerleyen yıllarda artarak devam etmiştir (Sutherland et al. 2001). İlk yıllarda, başarı oranı iyi olmasa da cerrahi tekniklerde, immün baskılayıcı ilaçlarda, nakil sonrası komplikasyonların tedavisinde kat edilen gelişmeler nakillerdeki başarıyı artırmıştır (Larsen, 2004).

Pankreas nakillerinin çoğu tip-1 diyabet hastalarına uygulanırken, operasyonların %78'i böbrek nakli ile birlikte yapılmaktadır. Bunun dışında yalnız pankreas ve böbrek naklini takiben pankreas nakli de uygulanmaktadır. Nakil edilecek olan pankreas, çoğunlukla kadavradan elde edilmektedir. Hayatta olan vericilerin pankreasının bir kısmının alınması ile gerçekleştirilen nakillere ise oldukça nadir (deneme aşamasında) rastlanmaktadır. Bu vericilerde ileride diyabet görülme riski olduğu belirtilmektedir (Larsen, 2004). Sistemik bir hastalık olan diyabet, hastalarda tüm organlarda ve dolaşım sisteminde hasara yol açmaktadır. Bu nedenle, nakil sonrası olası bir başarısızlık sistemik bir etki yaratacağından pankreas nakilleri, diğer solid organ nakillerine oranla daha riskli

görülmektedir. Pankreas nakillerinde en önemli kısıtlayıcı faktörler, uygun verici bulunma olasılığının çok düşük olması ve hastaların immün baskılayıcı ilaçlar kullanmak zorunda kalmasıdır.

Pankreatik Langerhans adacıklarının nakli ise daha az girişimsel bir tedavi yöntemidir. Enzimatik ve mekanik yöntemler ile izole edilen adacıklar portal vene yerleştirilerek nakil işlemi gerçekleştirilmektedir. Ancak, adacıkların izolasyon işlemleri ve nakil zamanına kadar kültür ortamında tutulmaları kayıplara yol açmaktadır. Bu nedenle, tek bir hasta için birden fazla verici pankreasına gereksinim duyulmaktadır. Bu durum, alıcıdaki immün yanıtın artmasına neden olmakta ve zaten yetersiz olan verici sayısı göz önüne alındığında adacık naklinin yaygın olarak uygulanamamasına neden olmaktadır. İmmün baskılayıcı ilaçların kullanılması, adacıkların kendi mikro çevresinde bulunmaması ve uygun verici sayısının az olması adacık nakillerindeki başarıyı kısıtlamaktadır. 2000 yılında steroid içermeyen bir immün baskılama protokolü eşliğinde yapılan pankreatik adacık nakli ile yedi hastanın bir yılın sonunda insülinden bağımsız hale geldiği, ancak uzun dönemde (5 yılın sonunda) hastaların tekrar insülin almaları gerektiği rapor edilmiştir (Shapiro, 2013). Edmonton protokolü adı verilen bu yöntem, immün sistemin baskılanması aşamasında steroidin beta hücrelerine olan toksik etkisini elimine ettiği için daha başarılı olmuştur (Takita et al. 2013).

Nakledilen adacıklardaki beta hücre kitlesinin oranı, tedavinin etkinliği açısından önem taşımaktadır. Farklı merkezlerde uygulanan bu yöntemlerin standart hale gelebilmesi için adacıklardaki canlı beta hücre oranının kullanılabilmesi düşünülmektedir (Keymeulen et al. 2006). İzolasyon basamakları ve kültür aşamasında meydana gelen kayıpların önüne geçilmesi, beta hücrelerinin canlılık ve fonksiyonlarının en üst düzeyde tutulabilmesi, söz konusu tedavi stratejilerinin başarı oranını yükseltecek unsurlardır.

Edmonton protokolü uygulanarak adacık nakli yapılan hastalar, kısa dönemde insülinden bağımsız hale gelmelerinin ardından 5 yılın sonunda tekrar insülin almak zorunda kalmışlardır. Uzun dönemde tedavinin etkisiz kalmasının, adacık izolasyonu sırasında HDM yapısının bozulmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir (Orlando et al. 2014; Stendahl et al. 2009). HDM yapısının bozulması, adacıkların hayatta kalma oranını, dokuya yerleşmesini, yeniden damar yapısının oluşmasını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle, söz konusu nakillerde uzun dönemde başarı oranını artırmak için HDM ile adacıkların desteklenmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, endokrin pankreastaki matriks

yapısının tanımlanması ve bu proteinlerin beta hücrelerinin canlılığı ve fonksiyonları üzerindeki etkisinin belirlenmesi gerekmektedir.

Tip-1 diyabet hastalarına yapılan nakil işlemlerinde verici kaynaklı beta hücrelerinin de immün saldırılara uğramasını engellemek amacı ile farklı yöntemler geliştirilmektedir. Verilen hücrelerin kapsülle çevrenmesi (enkapsülasyonu) ve immün sistemi baskılama özellikleri olan mezenkimal kök hücrelerin de nakil sırasında hastaya verilmesi üzerinde çalışılan yöntemlerdir (Hussain and Theise 2004, Robles et al. 2013).

2.3 Mikroçevre

Hücrelerin farklılaşma, göç, çoğalma ve apoptoza gitme gibi pek çok önemli özelliği dışarıdan aldığı sinyaller doğrultusunda gen ifade profilinde yapılan düzenlemeler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Buldukları mikroçevre ile etkileşimleri, hücrelerin kaderinin belirlenmesinde rol oynamaktadır. Mikroçevreyi oluşturan HDM yapısı, büyüme faktörleri ve diğer hücreler dokuya özgün mekanik özellikleri kazandırmanın yanında hücrelerin devamlı çevresiyle iletişim halinde olmasını sağlamaktadır.

Söz konusu etkileşimler dokulara ve fonksiyonlarına göre farklılıklar göstermektedir. Bağ dokusunda hücre- hücre dışı matris ilişkisi daha baskındır ve mekanik strese bu özellikleri önemlidir. Epitelyal dokuda ise hücre- hücre ilişkisinin daha baskın olduğu görülmektedir.

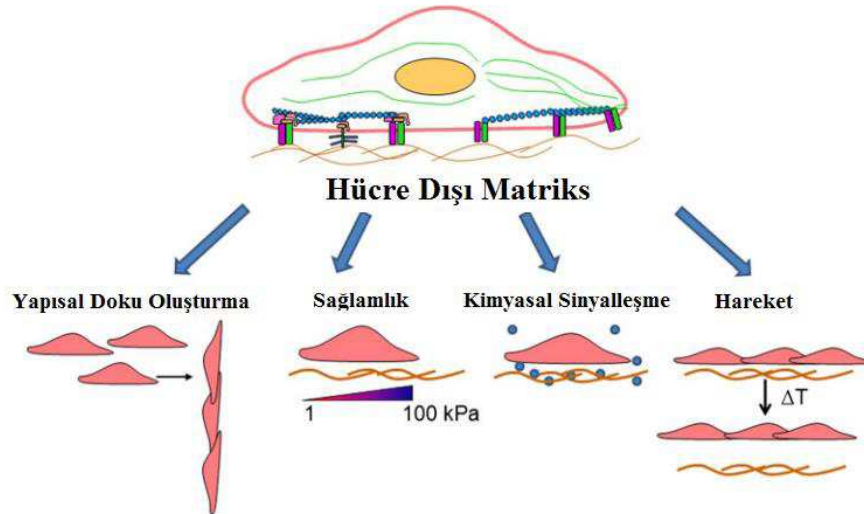
Hücre- hücre etkileşiminin doku ve hücrelerin organizasyonunun sağlanmasında önemli yeri vardır. Hücrelerin özellikle embriyonik dönemde, kendileri ile aynı dokuya ait hücreler ile adezyonu bu etkileşimlerin seçici olduklarını göstermiştir (Gilbert, 2000). Epitel hücreleri, aralarındaki sıkı bağlantı (tight junctions) bölgeleri sayesinde dokuların farklı bölümleri arasında set oluşturmakta ve seçici geçirgenlik sağlamaktadır. Hücreler arasındaki oluklu bağlantı (gap junctions) bölgeleri ise hücreler arasında küçük molekül alışverişi sağlamaktadır.

HDM ise direkt hücre membranında bulunan reseptörler ile etkileşimde bulunarak ya da büyüme faktörleri aracılığı ile hücrelerin fonksiyonlarını ve metabolizmalarını düzenlemektedir.

2.3.1 Hücre Dışı Matriks (HDM)

Hücre dışı matriks, hücreler tarafından salgılanan farklı proteinlerden ve karbonhidratlardan oluşan kompleks bir yapıdır. Dokularda sağladığı mekanik desteğin yanı sıra hücrelerin fonksiyonları üzerinde de oldukça etkindir (Şekil 2.5). En önemli özellikleri hücrelerin tutunacağı bir ortam oluşturmalarıdır. Epitel hücrelerinde, matriks ile olan bağlantıları yok olduğunda anoikis adı verilen bir çeşit programlı hücre ölümü (apoptoz) gözlenmektedir. Aynı şekilde pankreatik adacık hücrelerinin de içinde bulunduğu pek çok hücre tipinde tutunma ile canlılık arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (Hammar et al. 2004).

HDM yapısı enzimatik ve enzimatik olmayan olaylar sonucunda sürekli yenilenmekle birlikte içeriğindeki proteinlerin çeşitleri ve oranları, dokulara ve dokuların fonksiyonlarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin; matriks bileşenleri diş ve kemiklerde sert bir yapı oluştururken korneada şeffaf ince bir yapı oluşturmaktadır. (Alberts et al. 2007) HDM içeriğindeki farklılıklar, dokuya özgül fiziksel, biyokimyasal ve biyomekanik özelliklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Sert ve gözenekli HDM yapısı hücrelerin yapışma ile ilişkili fonksiyonlarını, hücre bölünmesini, doku polaritesini ve hücre göçünü etkilemektedir (Gattazzo et al. 2014).



Şekil 2.5. Hücre dışı matriksin hücre davranışı üzerindeki etkileri (Huang and Li, 2011).

HDM, temel olarak proteoglikanlar ve fibröz proteinlerden oluşmaktadır. Dokulardaki hücreler arası boşluğun büyük kısmı proteoglikanlar tarafından doldurulmaktadır. Yapısal olarak destek olma, hidrasyon, proteinler arasında köprü benzeri yapılar oluşturma ve mekanik dirençlilik gibi özellikleri ile proteoglikanlar, HDM yapısında çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Fibröz proteinler ise genellikle kollajen, fibronektin ve lamininden oluşmaktadır (Frantz et al, 2010).

HDM, hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ya da çeşitli büyüme faktörleri aracılığı ile hücre davranışını etkilemektedir. Hücre-hücre dışı matriks etkileşimleri kadherin ve integrinler aracılığı ile gerçekleşmektedir. Integrinler, hücre iskeleti ile HDM arasında köprü görevi gören transmembran proteinlerdir. Heterodimer yapıdaki integrinler, α ve β alt ünitelerinden oluşmaktadır. 18 farklı α , 8 farklı β alt ünitesi tanımlanmıştır (Hynes, 2002). Bu farklı alt ünitelerin oluşturduğu 20'den fazla çeşidi olan integrinlerin, bazıları yalnızca tek bir protein ile etkileşimde bulunabilirken, çoğu birden fazla HDM proteinini tanımaktadır (Çizelge 2.2). Integrinler, genellikle kısa peptid motifler aracılığı ile proteinlere bağlanabilmektedir ve bu işlemde her iki alt birim de görev almaktadır. RGD dizisi, arjinin-glisin-aspartat aminoasitlerinden oluşmaktadır ve çoğu integrin bu diziyi tanımaktadır.

Çizelge 2.2. Matriks proteinlerinin etkileşimde bulunduğu integrin çeşitleri

Kollajen tip-1	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 10\beta 1, \alpha 11\beta 1$	Jokinen et al, 2004
Kollajen tip-4	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1$	Vandenberg et al, 1991
Laminin	$\alpha 1\beta 1, \alpha 2\beta 1, \alpha 3\beta 1, \alpha 6\beta 1, \alpha 7\beta 1, \alpha 6\beta 4$	Belkin and Stepp, 2000
Fibronektin	$\alpha 3\beta 1, \alpha 4\beta 1, \alpha 4\beta 7, \alpha 5\beta 1, \alpha 8\beta 1, \alpha v\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5, \alpha v\beta 6, \alpha IIb\beta 3$	Johansson et al, 1997
Vitronektin	$\alpha v\beta 1, \alpha v\beta 3, \alpha v\beta 5, \alpha IIb\beta 3$	Horton, 1997

Dokularda temel olarak bazal lamina ve ara (interstisyel) matriks olmak üzere iki çeşit HDM yapısı bulunmaktadır. Doku bütünlüğün sağlanmasında önemli yeri olan bazal lamina, epitel ve endotel hücreleri ile doku hücrelerini birbirinden ayıran tabaka görevi görmektedir. Aynı zamanda, böbrek glomerul yapısında olduğu gibi endotel ve epitel hücreleri arasında seçici bir filtrasyon gerçekleştirmektedir. Yapısında kollajen tip-4 ve laminin proteinleri, entaktin ve heparan sülfat proteoglikanlar bulunmaktadır.

İnterstisyel matriks ise, bağ dokusunun temel özelliği olan hücreler arası boşluğun doldurulması işlevini yerine getirmektedir. Kollajen tip-1, tip-3 ve fibronektinin içinde bulunduğu pek çok proteini içermektedir (Karsdal et al, 2012). Ayrıca, yapısında bulunan tenaskin ve proteoglikanlar, doku hidrasyonunu, sitokin ve büyüme faktörlerinin hücreler ile etkileşimini ve proteinler arasındaki çapraz bağların kurulmasında görev alarak matriksin bütünlüğünü sağlamaktadır.

2.3.2 Endokrin Pankreasta Hücre Dışı Matriks Yapısı

Endokrin salgı yapan pankreas adacıklarında oldukça yoğun bir damarlanma ağı olduğu gözlenmektedir. İnsan pankreas adacıklarında, endotelial bazal laminanın yanı sıra endokrin hücrelerin etrafını saran kapsül benzeri ikinci bir bazal lamina yapısı bulunmaktadır (Otonkoski et al, 2008). Kemirici pankreas adacıklarında ise, yalnızca endotelial bazal lamina yapısı hücrelerin çoğalma ve fonksiyonlarını desteklemektedir. Kemiricilerde, endokrin pankreasta adacıklar, vasküler endotelial bazal lamina ile doğrudan etkileşim halindedir. Endotelial bazal lamina, adacıklara vasküler destek sağlamanın yanı sıra endotelial hücrelerin de tutunacağı matriks yapısını oluşturmaktadır.

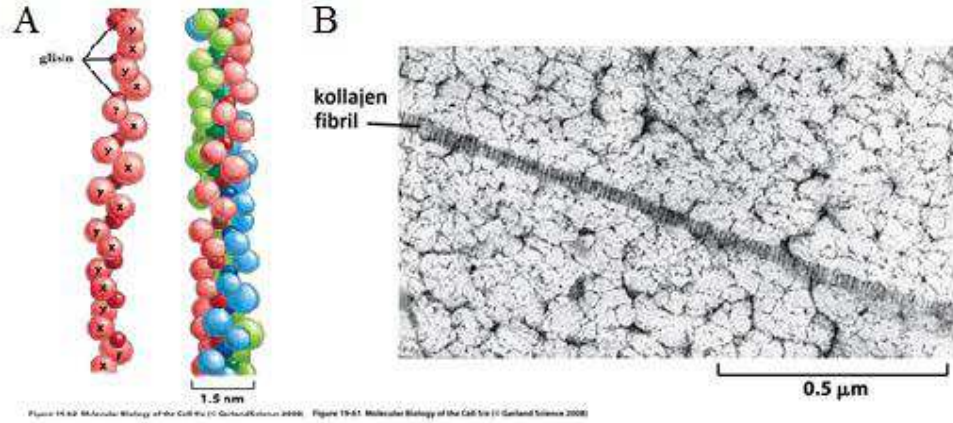
HDM ile etkileşimlerinin, adacıkların canlılığı, hücre çoğalması ve insülin salınımı miktarlarını etkilediği ayrıca, adacık morfolojisinin korunmasına yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Fetal dönemde ise beta hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde ve hücre göçünde matriks etkileşimleri rol oynamaktadır (Stendahl et al, 2009).

Endokrin pankreas matriksinde tanımlanan proteinler; kollajen, laminin, fibronektin ve vitronektindir:

2.3.2.1 Kollajen

Kollajen, sarmal şeklinde bir yapı oluşturan üç polipeptit zincirden meydana gelmektedir. Bu alt birimlerin (α zincirleri) oluşturduğu fibriler yapılar, dokulara özgün olarak yerleşim göstermektedir. Kollajen fibrilleri dokularda mekanik destek sağlamanın yanı sıra hücre büyümesi, yapışması, farklılaşması ve yara iyileşmesinde de görev almaktadır.

İnsan adacıklarında, kollajen tip I, tip II, tip III, tip IV, tip V, tip VI proteinleri HDM yapısında tanımlanmıştır (Stendahl et al. 2009). Kollajen tipleri, alt birimlerini oluşturan α zincirlerindeki farklılıklara göre sınıflandırılmaktadır.



Şekil 2.6. A) Kollajenin moleküler yapısı, B) Kollajen polipeptidinin elektron mikroskopik görüntüsü (Alberts et al. 2007).

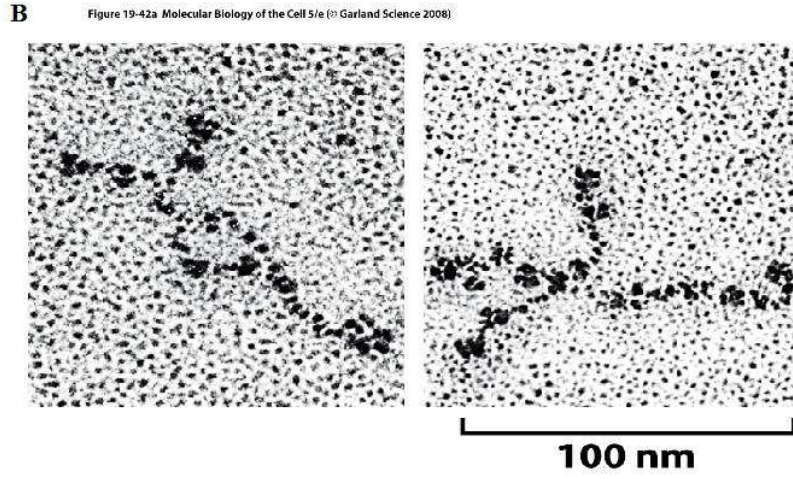
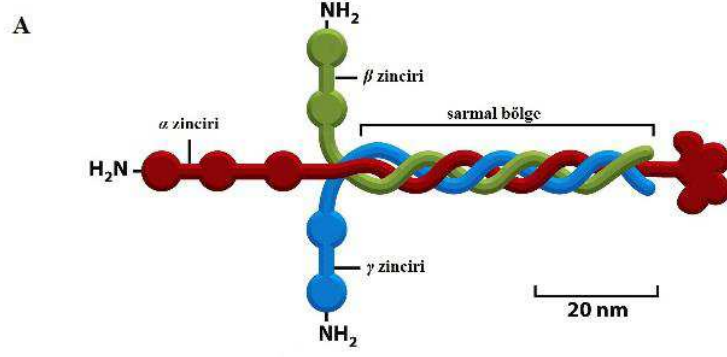
Kollajen tip-4, adacıklarda bazal laminanın yapısında baskın olarak bulunan proteindir. Yapısındaki peptit zincirlerindeki amino asit diziliminin Gly-X-Y tekrarlarından oluştuğu görülmektedir (Şekil 2.6.). Erken gelişim döneminde pankreatik kanalın öncül dokularında da tanımlanmıştır (Cirulli et al, 2000). Kollajen tip-4'ün adacıkların hayatta kalmasını kollajen tip-1'e oranla daha iyi desteklediği belirtilse de kollajen tip-1'in izole edilen beta hücrelerinden insülin sentez ve salınımını desteklemekte daha etkin olduğu rapor edilmiştir (Pinkse et al, 2006).

Beta hücrelerinin membranında bulunan $\alpha 1\beta 1$ integrinin kollajen ile etkileşimi sağlayan esas reseptör olduğu bildirilmiştir (Kaido et al,2004).

2.3.2.2 Laminin

Laminin, üç polipeptit zincirden (α , β ve γ zincirleri) meydana gelen heterotrimerik yapıda bir glikoproteindir (Şekil 2.7.). Polipeptit zincirlerden ikisi diğer laminin proteinlerine, diğeri (α zinciri) ise hücre membranındaki reseptörlere bağlanmaktadır. Günümüzde yaklaşık olarak 12 ayrı izoformu tanımlanmıştır (Erickson and Couchman, 2000). Embriyonik gelişim ve plasentanın oluşturulmasına katkı sağladığı bilinen laminin proteininin, $\alpha 5$ zinciri ile ilişkili genin susturulduğu fare modelinde, hayvanların embriyonik dönemde öldüğü, böbrek, göz, diş ve akciğer gelişiminde sorun olduğu gözlenmiştir (Islam, 2010).

İnsan ve sıçan pankreatik adacıklarında laminin-332 formunun bulunduğu ve bu proteinin α hücreleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Parnaud et al, 2006). Ayrıca, insan adacıklarında bazal lamina yapısında pek çok laminin izoformu bulunmaktadır (Virtanen et al, 2008).



Şekil 2.7. A) Lamininin moleküler yapısı, **B)** Laminin polipeptitinin elektron mikroskopik görüntüsü (Alberts et al. 2007).

Laminin, bazal laminanın yapısında kollajen tip-4 ile birlikte bulunmaktadır. Ancak, beta hücrelerinin reseptör yapısı incelendiğinde hücrelerin daha çok laminin ile ilişkili bağlanma bölgelerine sahip oldukları görülmüştür (Kaido et al, 2006). Laminin-411 ve laminin-511 izoformları beta hücrelerinin çoğalmasında ve insülin geninin ifadesinde oldukça önemli olduğu bildirilmiştir (Islam, 2010). Laminin-5 izoformu ve bu proteinin etkileşimde bulunduğu $\beta 1$ integrininin antikör aracılığı ile baskılanması sonucunda beta hücrelerinde glukoza duyarlı olarak insülin salgılama miktarında düşüş olduğu rapor edilmiştir (Parnaud et al, 2006).

2.3.2.3 Fibronektin

Fibronektin, HDM yapısında yaygın olarak bulunan, yüksek moleküler ağırlıklı bir proteindir. Embriyogenezde, yara iyileşmesinde ve kan pıhtılaşması gibi fizyolojik süreçlerde görev almaktadır. Salgilandıkları hücre çeşidine ve ortamdaki büyüme faktörlerine bağlı olarak pek çok kırılma (splicing) varyantı bulunmaktadır. Yapısındaki RGD dizisi aracılığı ile hücre membranındaki integrinlere bağlanmaktadır. Ayrıca, kollajen, fibrin ve heparin için de bağlanma bölgeleri taşımaktadır (Şekil 2.8).

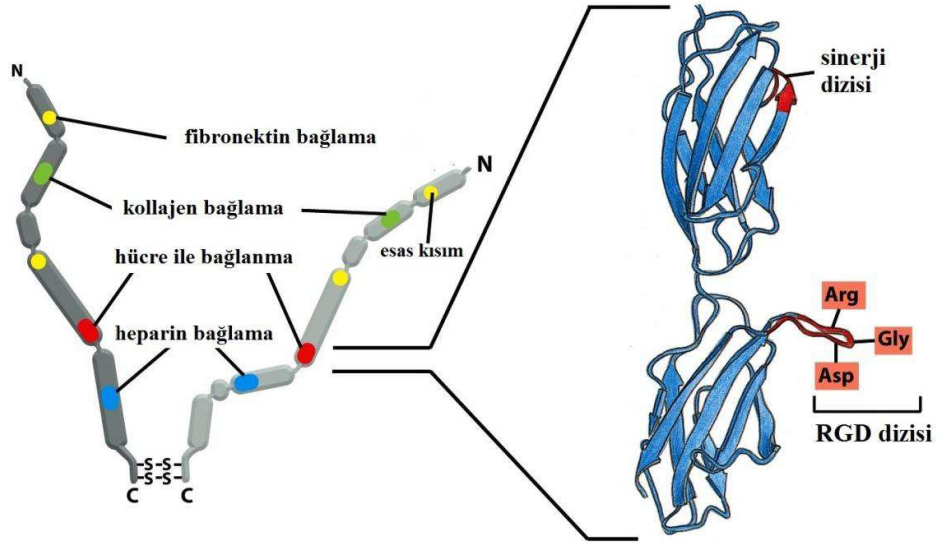


Figure 19-72bc Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Şekil 2.8. Fibronektinin moleküler yapısı, bağlanma bölgeleri (Alberts et al. 2007).

Adacık yapısında genellikle damarların olduğu bölümlerde ve kanal yapısında bulunmaktadır, laminin ve kollajen proteinleri ile etkileşim halindedir. Gelişim döneminde endokrin hücrelerin organizasyonunda görev almaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinine ait gen ifadesini artırıcı etki göstererek hücre canlılığı üzerinde etki gösterdiği düşünülmektedir (Lee et al. 1998). Adacık nakillerinde etkinliği artırmak için kullanılabilceği bildirilmiştir. Nakil öncesinde 48 saat fibronektin kaplı yüzeylerde kültürde bekletilen adacıkların nakil sonrasında kandaki glukoz seviyesini düşürmede daha etkin olduğu bildirilmiştir (Hamamoto et al, 2003).

2.3.2.4 Vitronektin

Vitronektin, hem plazmada hem de HDM yapısında bulunan bir proteindir. Yapısındaki üç farklı bölümden birindeki RGD dizisi aracılığı ile integrinler ile etkileşime girmektedir. Anjiyogenik yollarda ve hücre göçünde etkili bir proteindir (Friedlander et al. 1995).

Pankreas yapısında embriyonik gelişim döneminde bulunurken, erişkin dönemde pankreas HDM yapısında vitronektin bulunmamaktadır (Stendahl et al, 2009). Fetal dönemde beta hücrelerinin göçünde rol almaktadır.

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Beta Hücrelerinin Kültürü

Çalışmada, sıçan beta hücresi: RINm5F hibrit hücre hattı BRIN-BD11 hücreleri kullanılmıştır.

BRIN-BD11 hücreleri, $2-4 \times 10^4$ olacak şekilde alana ekilerek 37°C 'de, %5 CO_2 koşullarında RPMI 1640 besi yerinde kültüre edilmiştir. Standart besi yeri içeriği %10 FBS (fetal sıçır serumu), %1 penisilin-streptomisin ve 2mM glutamin içeren RPMI 1640'tır.

Hücreler, kültür kabının yüzeyini %60-70 oranında kapladığında (yaklaşık 3. ya da 4. günde) %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırılarak besi yerinde sulandırılmıştır. Hücre sayımı için, bu karışımdan alınan küçük miktardaki örnek, 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılmış ve Thoma Lamı kullanılmıştır. Hücreler, $2-4 \times 10^4$ hücre/ cm^2 olacak şekilde kültür kaplarına paylaştırılıp çoğaltılarak gerekli hücre sayısına ulaşılmıştır.

3.2 Çalışmada Kullanılacak Hücre Sayısının Ve Deney Süresinin Belirlenmesi

Hücreler çoğaltıldıktan sonra yapılacak olan deneylerin sürelerini ve kullanılacak hücre sayısını belirlemek amacıyla optimizasyon çalışması yapılmıştır. 96 kuyucuklu kültür kaplarına farklı sayıda hücreler (10000, 20000, 50000, 75000 ve 100000 hücre) ekilmiş, 1. gün 2. gün ve 3.gün sonunda hücrelerin canlılık oranlarının karşılaştırılması amacıyla WST-1 (Water-Soluble Tetrazolium) solüsyonu (Roche) kullanılmıştır.

WST-1 analizi için, kültür kaplarındaki besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra 1 kez Phosphate buffered saline (PBS, fosfat tamponu) ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Ardından kuyucuklara %10 oranında WST-1 solüsyonu içeren besi yeri eklenmiştir. İnkübasyon, üç saat boyunca 37°C , %5 CO_2 ve nemli ortamda gerçekleştirildikten sonra canlı hücrelerin oluşturduğu formazan boyasının miktarı spektrofotometrede 480 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.3 Endokrin Pankreas Protein Ekstraktının Hazırlanması

Endokrin pankreas matriksinde bulunan proteinler kollajen, laminin, fibronektin ve vitronektindir. Çalışmada, bu proteinlerin yanı sıra henüz tanımlanmamış proteinlerin olma olasılığı göz önünde bulundurularak endokrin pankreastan elde edilen protein ekstraktı da kullanılmıştır. Böylece, baskın olarak bulunan bu dört proteinin dışında az miktarda bulunan proteinlerin ya da farklı protein kompozisyonlarının beta hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

3.3.1 Sıçan Pankreasından Adacık İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Sıçan pankreasından adacık izolasyonu için, 200-260 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi erişkin erkek sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 1ml/100g intraperitoneal nembotal enjeksiyonu ile anestezide alındıktan sonra ön karın duvarı sternuma kadar açılmıştır. Serum içermeyen HBSS ile hazırlanan kollajenaz P (1mg/ml, Roche) enzimi kanül yardımı ile duodenuma yakın bir bölgeden klamplenen koledok kanalına verilmiştir. Enzim solüsyonu ile şişirilen pankreas, duodenum, ince barsaklar, mide ve dalaktan disekte edilerek buz üzerine alınmıştır.

Çıkarılan pankreaslar, 15-18 dk çalkalamalı su banyosunda tutularak kollajenaz P enziminin aktifleşmesi sağlanmıştır. Sindirim işlemi tamamlandıktan sonra enzimin inaktivasyonu için serum içeren besi yeri ile 1300 rpm'de 3 dakika yıkama gerçekleştirilmiştir. Supernatantı atılan pelet HBSS ile sulandırılıp homojenize edildikten sonra ekzokrin pankreas ve yağ fasiya gibi doku parçalarının uzaklaştırılması amacıyla 400µm por çapına sahip çelik süzgeçten geçirilmiştir. Süzme işlemi takiben yapılan yıkama işleminden sonra gradient yöntemi kullanılarak saflaştırma işlemine geçilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pelet Histopaque 1077 ile sulandırılıp homojenize edilmiştir. Üzerine serum içermeyen HBSS 1:1 oranında yayıldıktan sonra 2400 rpm'de 20 dk santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan bulutsu tabaka toplanarak serum içeren HBSS ile 1300 rpm'de 3 dk yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Supernatantın atılmasından sonra pelet 35 ml HBSS ile homojenize edilmiş ve 4 dakikalık sedimantasyona bırakılmıştır. Sıvı

üzerinden 10 ml alınıp atıldıktan sonra tekrar 10 ml HBSS eklenmiştir. Sedimentasyon işlemi 4 kez tekrarlandıktan sonra solüsyondan, stereo mikroskop altında adacıklar toplanmıştır. Beta hücrelerinin mitokondrilerinde bulunan çinkoya bağlanan dithiozone (DTZ) ile boyama yapılarak elde edilen adacıkların karakterizasyonu yapılmıştır.

Elde edilen adacıklar, işlenmemiş (süspansiyon) kültür kaplarında %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besi yerinde iki gün boyunca 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre edilmiştir. Süre sonunda PBS ile iki kere yıkama işleminden geçirilen adacıklar, ekstrakt hazırlanacağı zaman kullanılmak üzere -80°C'de dondurularak saklanmıştır.

3.3.2 Endokrin Pankreastan Proteinlerin Eldesi ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çözülen pankreas adacıkları, 150 µl PBS ile homojenize edildikten sonra insülin enjektöründen 15-20 kez geçirilerek parçalanmıştır. Elde edilen solüsyonun protein konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla SMART™ BCA protein assay kit kullanılmıştır. Peptit bağları ve dört amino asit (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) ile etkileşime girerek renk değişimine neden olan BCA (bikinkoninik asit) solüsyonu hazırlanarak endokrin pankreas ekstraktının üzerine eklenmiştir. İnkübasyon, 37°C'de 30 dakika gerçekleştirildikten sonra örneğin oda ısısına gelmesi beklenmiştir. Renk değişimi 562 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür. Kit içeriğindeki BSA standartları kullanılarak oluşturulan standart eğri yardımı ile örneğin protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

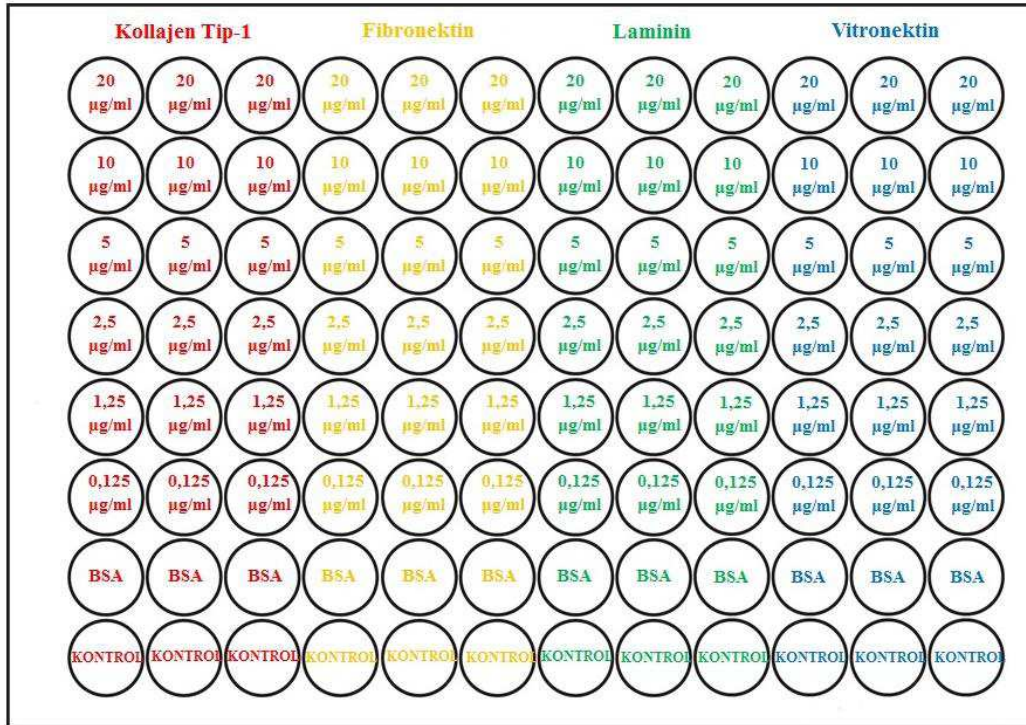
3.4 Kültür Kaplarının Matriks Proteinleri ile Kaplanması

Kültür kapları, belirlenen konsantrasyonlardaki kollajen tip-1 (Millipore), vitronektin (Millipore), laminin (Millipore), fibronektin (Corning), Kollajen tip-4 (Millipore) ve ECL (entaktin- kollagen tip-4-laminin) ile 2 saat 37°C'deki inkübatörde bekletilerek yüzeylerinin kaplanması sağlanmıştır. Kullanılan endokrin pankreas ekstraktının konsantrasyonunun düşük olması göz önüne alınarak kaplama süresi 12 saat

olarak uygulanmıştır. Sürenin sonunda matriks solüsyonları çekildikten sonra fosfat tampon (PBS) ile bir kez yıkama gerçekleştirilmiş ve hücre ekimi yapılmıştır.

3.5 Etkin Protein Miktarının Belirlenmesi

Kaplanması gereken proteinlerin en uygun konsantrasyonun bulunması amacı ile hücreler önceden kaplanmış olan 96 kuyucuklu kültür kaplarında 2 gün boyunca FBS içermeyen besi yerinde kültüre edilmiştir. Deneyde kollajen tip-1, vitronektin, laminin ve fibronektin proteinlerinin etkin protein miktarlarının belirlenmesi amacı ile ECM Cell Culture Optimization Array (Millipore) içeriğindeki yüzeyi kaplanmış 96 kuyucuklu kültür kabı kullanılmıştır. Her protein için 0,125-20µg/ml olacak şekilde gradient oluşturulmuştur. Kollajen tip-4 ve ECL (entaktin- kollajen tip-4-laminin) matriks (Millipore) için ise aynı konsantrasyon gradienti kullanılarak 96 kuyucuklu kültür kabı kaplanmış ve hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Yüzeyi farklı konsantrasyonlarda proteinler ile kaplanmış 96 kuyucuklu kültür kabının şeması, ECM Cell Culture Optimization Array (Millipore).

3.6 Beta Hücre Canlılığının Ölçülmesi

Çeşitli konsantrasyonlarda proteinler ile kaplanmış kültür kaplarında 2 gün inkübe edilen hücrelerin canlılığının ölçülmesi için WST-1 analizi yapılmıştır.

Apoptoza uğrayan hücrelerin tespit edilmesi için ise parçalanmış DNA fragmentlerinin incelenmesi amacıyla kullanılan ApopTag® Fluorescein Direct In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore) ile analiz yapılmıştır. Matriks proteinleri ile kaplanan 8 kuyucuklu lamlara hücre ekimi yapılmış ve kültür 2 gün süre ile devam ettirilmiştir. Ardından fiksasyon işlemi için besi yeri uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine %1 paraformaldehit içeren PBS eklenerek 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Yıkama işlemleri gerçekleştirildikten sonra fiksasyonun ikinci aşamasında 2:1 oranında soğuk etanol:asetik asit karışımı ile muamele edilen hücreler 5 dk -20°C'de bekletilmiş ve tekrar PBS ile yıkama yapılmıştır. Örneklerin üzerine floresan işaretli nukleotitleri içeren tampon çözeltisi eklenerek oda ısısında en az 10 saniye bekletilmiştir. Ardından terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) enzimini içeren çalışma solüsyonu eklenmiş ve 1 saat 37°C'de inkübasyon yapılmıştır. TdT enzimi, işaretli nukleotitlerin apoptotik hücrelerde bulunan DNA fragmentlerinin serbest 3'OH uçlarına bağlanmasını sağlamaktadır. İnkübasyon süresinin sonunda reaksiyon, durdurucu solüsyon ile durdurulmuştur. Lamalar nukleus boyası (DAPI) içeren kapatma medyumunu (Ultra Cruz Mounting) ile kapatılarak floresan mikroskopta (Leica DMI 4000B Microsystems) görüntüleme yapılmıştır.

3.7 Matriks Proteinlerinin Toksik Etkisinin Belirlenmesi

Proteinlerin, hücreler üzerindeki toksik etkisini belirlemek amacıyla laktodehidrogenaz (LDH) aktivitesi ölçülmüştür. Hücre içinde bulunan LDH enziminin hücre dışı ortamda belirlenmesi hücre ölümü ya da hücrelerin zarar görmüş olduğunun göstergesidir (Drent et al. 1996).

LDH aktivitesinin ölçümü için Roche Applied Science Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} kullanılmıştır. 2 gün boyunca matriks proteinlerinin üzerinde kültürü devam eden beta hücrelerinin besi yerinden 100µl alınarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmış, üzerine 100µl boya ve katalizör içeren reaksiyon karışımı eklenmiştir. İnkübasyon, 15 dk 37°C'de gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonun durdurulması için 50 µl durdurma solüsyonu

eklendikten sonra spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.8 Fonksiyon Testleri

Farklı matriks proteinlerinin, BRIN-BD11 hücrelerinin fonksiyonları üzerindeki etkilerini analiz etmek amacı ile hücrelerin fonksiyon ile ilişkili gen ifade seviyeleri ve glikoza duyarlı insülin salgılama miktarları ölçülerek karşılaştırılmıştır.

3.8.1 Gen İfade Analizleri

Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin fonksiyonlarına olan etkisinin belirlenmesi amacıyla Real Time PCR analizi ile *ins1*, *ins2*, *gck*, *glut2*, *mafA* genlerinin ifadeleri karşılaştırılmıştır.

Matriks proteinleri üzerinde kültürün 2.ci gününde hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra RNA İzolasyon kiti (Roche) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. PBS içerisinde bulunan hücreler, lizis tamponu ile parçalandıktan sonra kolondan geçirilmiş ve kolona tutunan RNA'dan DNaz enzimi aracılığıyla DNA parçaları uzaklaştırılmıştır. Tris tampon çözeltisi (10 mM, pH 8.5) içerisinde çözünen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Picodrop cihazı ile ölçülmüştür. İzole edilen RNA örneklerinden 1 µg RNA alınarak cDNA çevrimi gerçekleştirilmiştir. cDNA çevrimi için Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılmıştır.

Matriks proteinlerinin, BRIN-BD11 hücrelerinin fonksiyonları ile ilişkili genlerin ifadelerini nasıl etkilediğini belirlemek amacı ile Real Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Primerler, *ins1*, *ins2*, *gck*, *glut2*, *mafA* genlerine özgün kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Referans gen olarak *gapDH* kullanılmıştır. PCR koşulları; 95°C'de 10 dk enzim aktivasyonu sonrasında 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 1,5 dakika uzama (45 siklus) şeklinde uygulanmıştır. Sonuçlar kullanılan Real-Time PCR cihazına (Lightcycler 480, Roche) ait yazılım ile analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1. Real Time PCR analizi için kullanılan primer dizileri.

Gen İsmi	Primer Dizisi
G3PDH_r	TGGAATTGTGAGGGAGATGCT
G3PDH_f	AGAGAGAGGCCCTCAGTTGCT
Gck_r	GGATCCTCACTGGGCCAGCATG
Gck_f	GCTAAGCTTATGGCTATGGATACTACAAGGTG
MafA_r	GGATCCTCACATGAAAAATTCGGGAGAG
MafA_f	GCAAGCTTATGGCTTCAGAACTGGC
Ins1_r	CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG
Ins1_f	GACCTTGGCACTGGAGGTT
Glut2_r	TGCCCTTAGTCTTTTCAAGC
Glut2_f	AAAGCCCCAGATACCTTTACCT
Ins2_r	TGCTGGTGCAGCACTGAT
Ins2_f	CGAAGTGGAGGACCCACA

3.8.2 İnsülin Salınım Analizleri

Beta hücrelerinin en iyi etkileşimde bulunduğu hücre dışı proteinler hücre çoğalması ve gen ifade seviyelerine dayanarak belirlendikten sonra, bu proteinler ile kaplanan kültür kaplarında 24 saat kültürde tutulan hücrelerin farklı glukoz miktarlarına karşı insülin salınımları ELİZA yöntemi ile ölçülerek karşılaştırılmıştır.

Hücreler üç farklı glukoz konsantrasyonunda 8 saat kültürde bekletilerek insülin salınımları karşılaştırılmıştır. Deneyde, glukoz içerikleri farklı L-DMEM (5,5 mmol/L), 1640 (11mmol/L olan RPMI) ve H-DMEM (25mmol/L) besi yeri kullanılmıştır. Beta hücreleri FBS içeren besi yerinde ekildikten sonra yapışmaları beklenmiş, ardından hazırlanan besi yerleri eklenerek 8 saat 37°C’de kültüre devam edilmiştir. Düşük glukoz miktarı BRIN-BD11 hücrelerinin glukoz duyarlılığını etkilediği için, her besi yeri için ayrı kuyucuk ekilmiştir (McClenaghan et al, 1996). Sürenin sonunda süpernatantlar ve kaldırılan hücreler toplanarak -80°C’de dondurulmuştur.

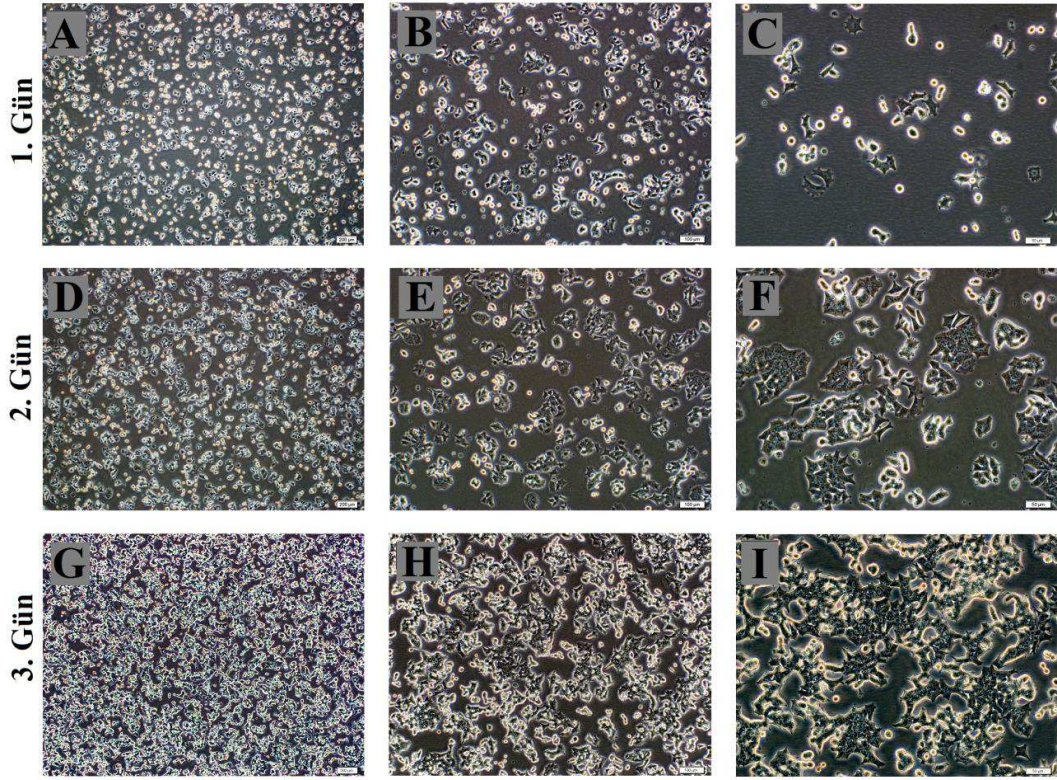
İnsülin miktarının ölçümü için Rat/Mouse Insulin ELISA Kit (Milipore EZRMI-13K) kullanılmıştır. Örnekler ve kit içeriğindeki tüm sıvılar, ölçüm yapılacağı zaman oda sıcaklığında getirilmiştir. ELİZA kuyucuklarına tampon çözeltisi (assay buffer), örnekler ve işaretli insülin antikoruna içeren tampon (detection buffer) eklendikten sonra 2 saat süre ile oda sıcaklığında, çalkalayıcı üzerinde inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sonrasında

kuyucuklara yıkama işlemleri uygulanmış, enzim solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında, 30 dk çalkalayıcı üzerinde inkübasyon yapılmıştır. Sürenin sonunda tekrar yıkama işlemleri uygulandıktan sonra substrat solüsyonu eklenerek karanlıkta 5-20 dk bekletilmiştir. Durdurucu solüsyon ile reaksiyon durdurulduktan sonra spektrofotometrede 590 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. Saklanan hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Ölçülen insülin absorbans değerleri DNA miktarlarına bölünerek hücre başına salgılanmış olan insülin miktarları belirlenerek karşılaştırma yapılmıştır.

4 BULGULAR

4.1 BRIN-BD11 Hücrelerinin Kültürü

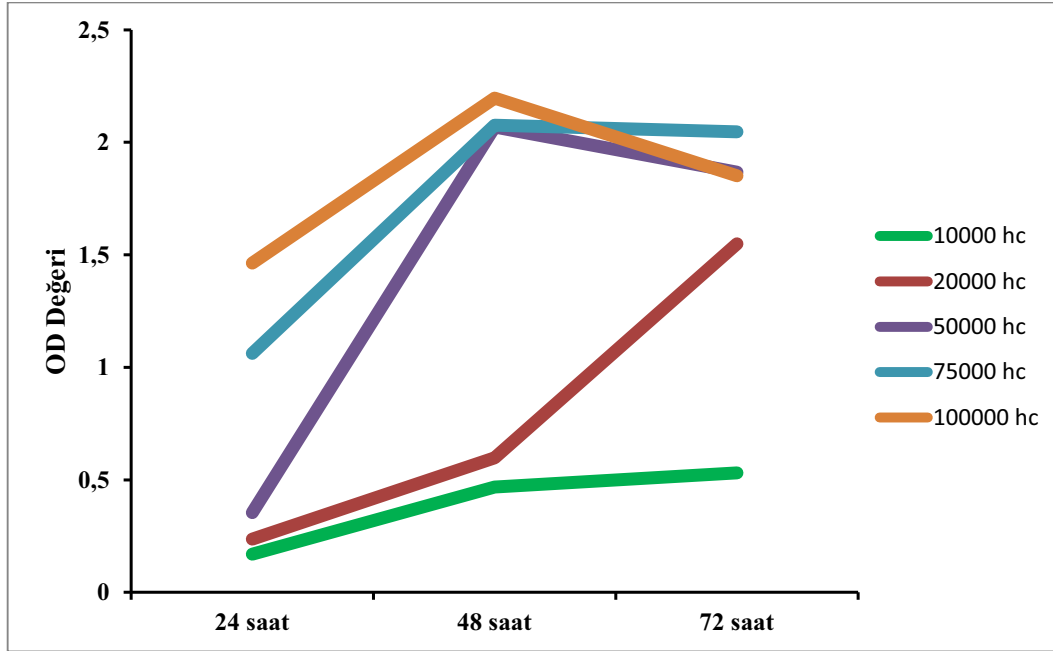
BRIN-BD11 hücreleri, yüzeyi matriks proteinleri ile kaplanmamış kültür kaplarında kültür edilerek çoğaltılmıştır. Üç günde bir pasaj yapılarak hücrelerin morfolojileri faz-kontrast mikroskopi ile izlenmiştir.



Şekil 4.1. Beta hücrelerinin kültürün 1., 2. ve 3. günlerinde morfolojik görüntüleri (Bar çubukları: A, D ve G 200 nm; B, E ve H 100 nm; C, F ve I 50 nm).

4.2 Çalışmada Kullanılacak Hücre Sayısının ve Dene Süresinin Belirlenmesi

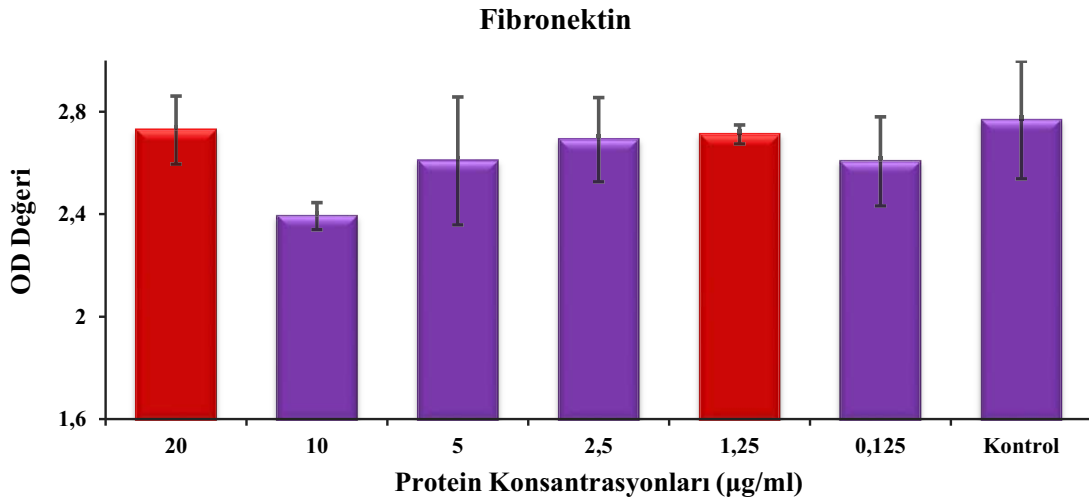
Farklı sayılarda ekimi yapıla beta hücrelerinin üç gün boyunca WST-1 analizi ile canlılık oranları ölçülmüştür. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda 48 saatin sonunda hücre sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle deneylerin 48 saat süre kültür sonucunda yapılması planlanmıştır. Hücre sayısı olarak da 96 kuyucuklu kültür kabı (0,32 cm²) için 20000 hücre ekilmesi uygun bulunmuştur.



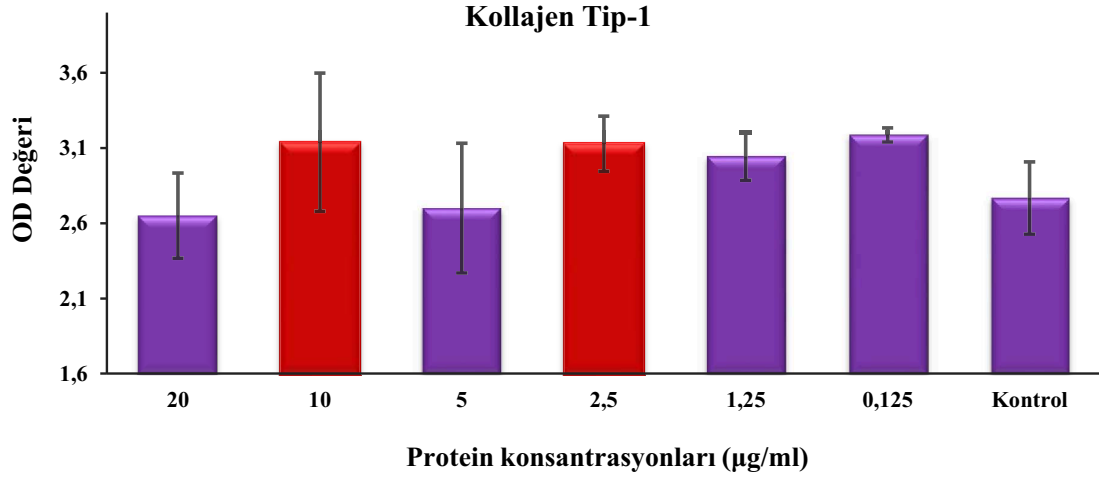
Şekil 4.2. Farklı sayıda (10^4 , 2×10^4 , 5×10^4 , $7,5 \times 10^4$, 10^5 hücre) ekilen beta hücrelerinin üç gün boyunca yapılan WST-1 ölçümleri.

4.3 BRIN-BD11 Hücrelerinin Kültürü İçin Etkin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

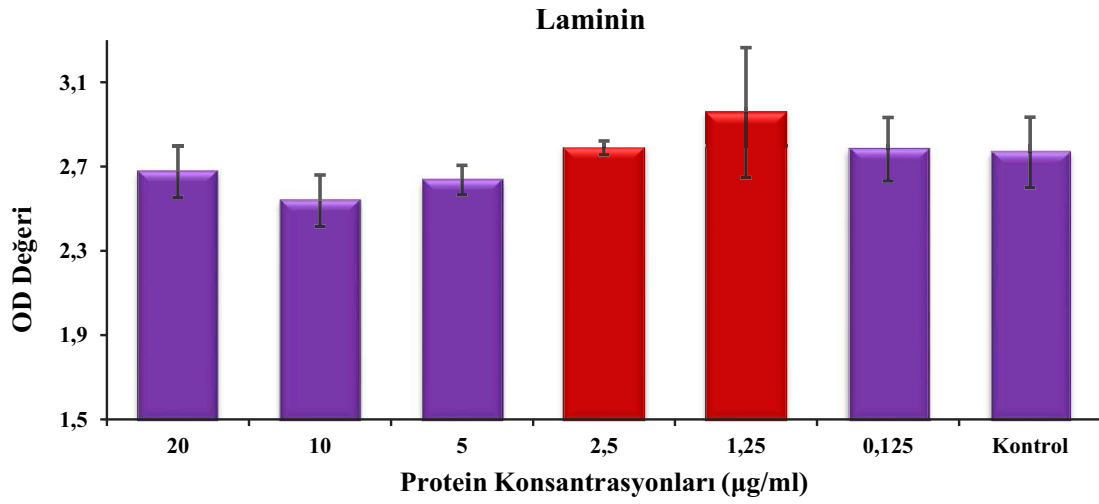
Kültür kapları, farklı konsantrasyonlarda kollajen tip-1 ve tip-4, vitronektin, laminin, fibronektin ve ECL matriks proteinleri ile kaplanarak 2 gün süre ile BRIN-BD11 hücrelerinin kültüründe kullanılmıştır. Sürenin sonunda WST-1 analizi ile hücrelerin canlılık oranları, yüzeyi kaplanmamış kontrol kuyucuğundaki canlılık oranı ile karşılaştırılarak her protein için iki adet etkin protein konsantrasyon değeri belirlenmiş ve bu değerler göz önüne alınarak fonksiyonel analizlere devam edilmiştir.



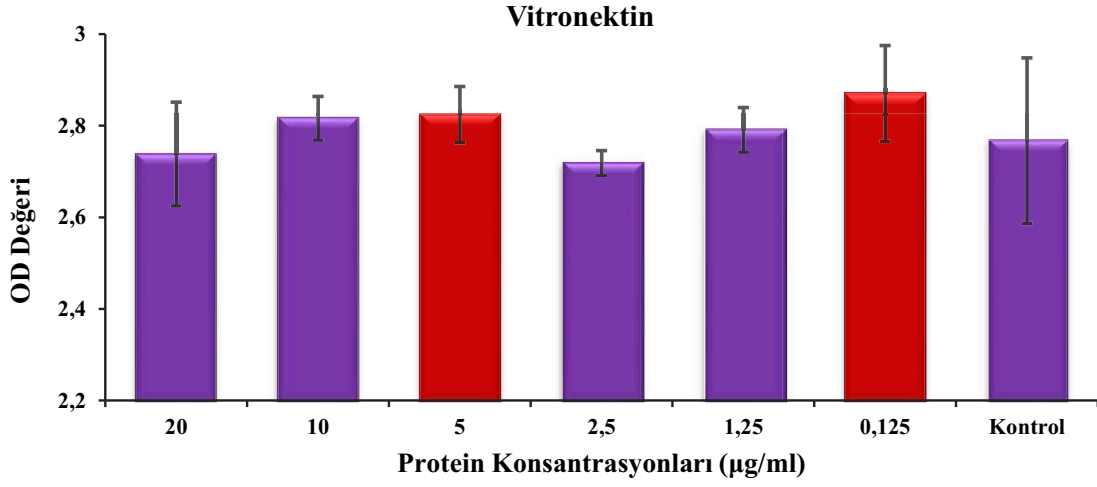
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda fibronektin proteini ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.



Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda kollajen tip-1 proteini ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda laminin proteini ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.

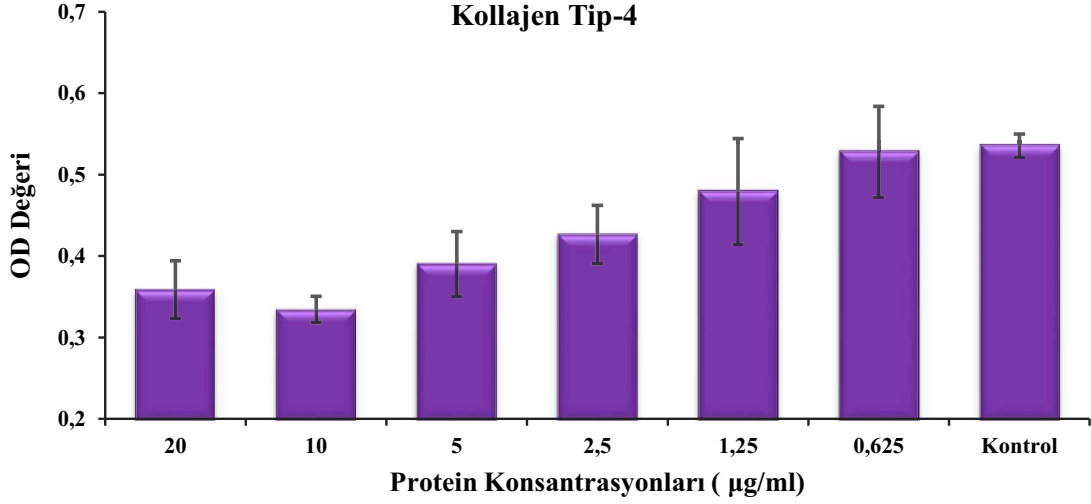


Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlarda vitronektin proteini ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi.

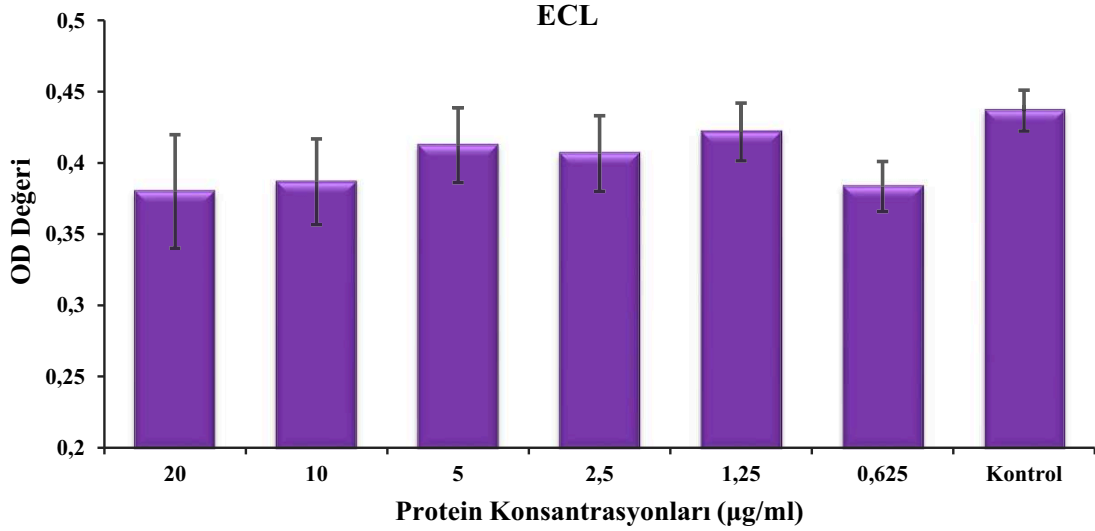
Çizelge 4.1. Her protein için belirlenen etkin protein konsantrasyonu ve p değerleri.

Kollajen tip-1	10 µg/ml	$p > 0,05$	2,5 µg/ml	$p > 0,05$
Fibronektin	20 µg/ml	$p > 0,05$	1,25 µg/ml	$p > 0,05$
Laminin	2,5 µg/ml	$p > 0,05$	1,25 µg/ml	$p \leq 0,01$
Vitronektin	5 µg/ml	$p > 0,05$	0,125 µg/ml	$p > 0,05$

Kollajen tip-1, fibronektin, laminin ve vitronektin proteinleri için çoğalmanın yüksek olduğu ikişer konsantrasyon değeri seçilmiştir (Çizelge 4.1). Ancak, kollajen tip-4 ve ECL matriks için yapılan deneyde çoğalma miktarlarının kontrol gruplarından düşük olduğu gözlemlendiği için fonksiyon deneylerinde bu proteinler kullanılmamıştır.



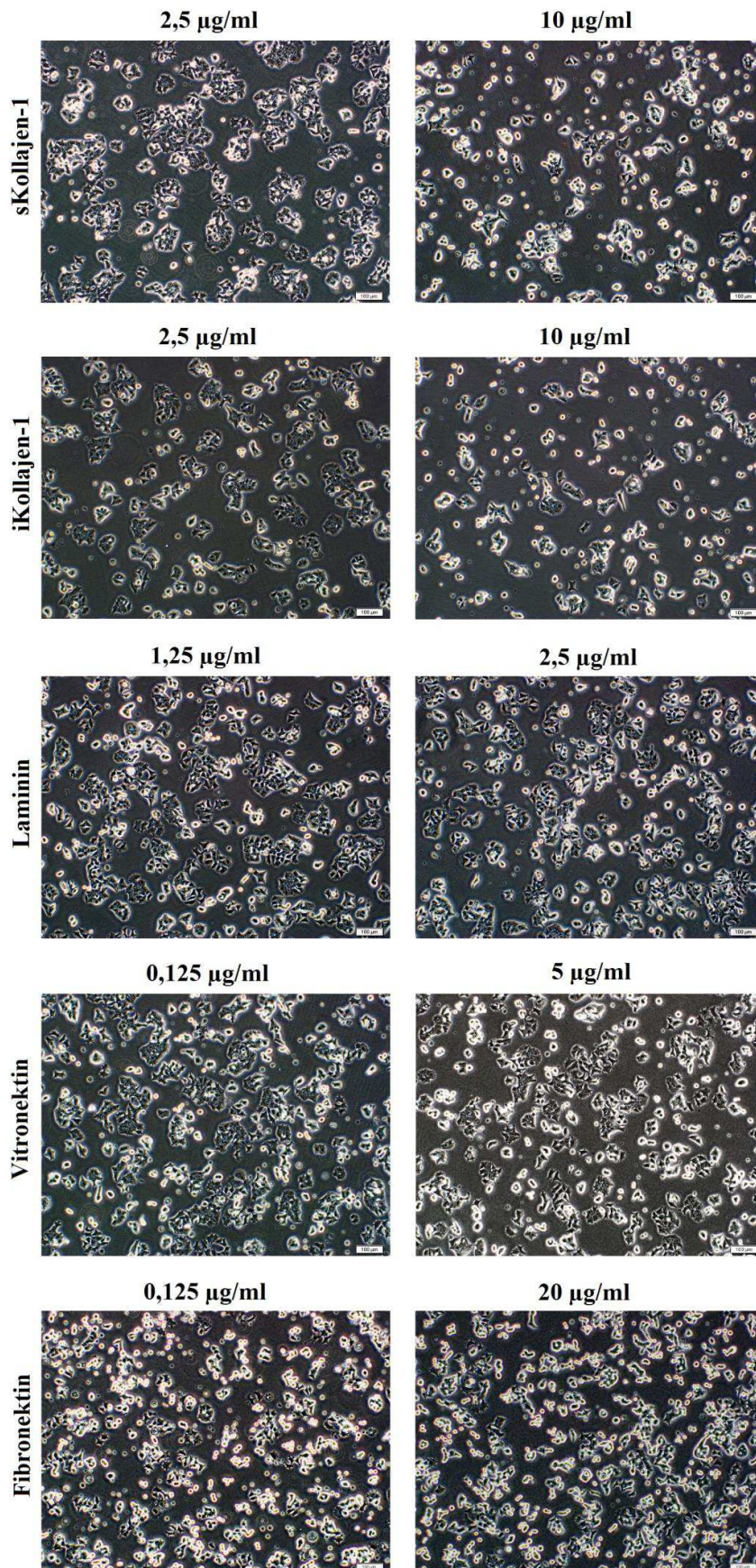
Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda kollajen tip-4 proteini ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi (20µg/ml: $p \leq 0,01$; 10 µg/ml: $p \leq 0,001$; 5 µg/ml: $p \leq 0,05$; 2,5µg/ml: $p \leq 0,05$).



Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda ECL ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi (20µg/ml: $p \leq 0,05$; 10 µg/ml $p \leq 0,01$; 5 µg/ml: $p \leq 0,01$; 2,5µg/ml: $p \leq 0,01$; 1,25µg/ml: $p \leq 0,01$; 0,625µg/ml: $p \leq 0,01$).

4.4 BRIN-BD11 Hücresinin Matriks Proteinleri Üzerinde Kültürü

Canlılık analizi (WST-1) sonucunda belirlenen konsantrasyonlarda insan kollajen tip-1, sıçan kollajen tip-1, laminin, fibronektin ve vitronektin ile kaplanan kültür kaplarında kültürde 2 gün bekletilen beta hücrelerinin morfolojik takipleri zıt-faz mikroskopi ile yapılmıştır. Çoğalma miktarlarında farklılıklar olduğu gözlenmiş ancak, hücrelerin morfolojilerinin benzer olduğu tespit edilmiştir.



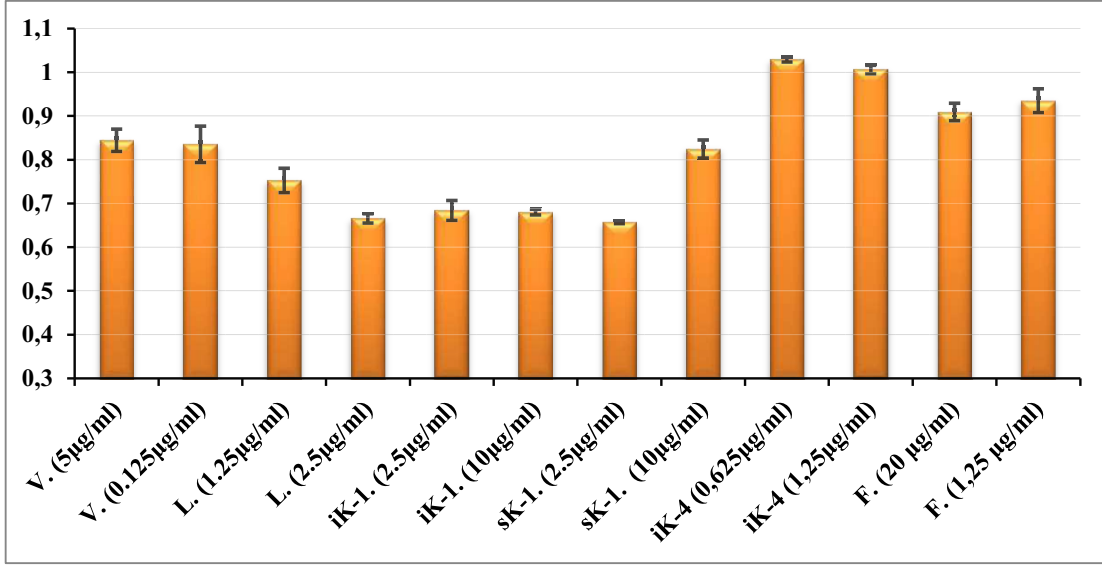
Şekil 4.9. Matriks proteinleri üzerinde kültüre edilen beta hücrelerinin 2. günde morfolojik görüntüleri (Bar çubukları: 100nm).

4.5 Matriks Proteinlerinin Hücreler Üzerinde Toksik Etkisinin Belirlenmesi

Matriks proteinlerinin kültür ortamında beta hücrelerinin üzerinde toksik etkisini test etmek amacıyla hücre süpernatantlarında LDH aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Parçalanmış DNA fragmentlerinin incelenmesini sağlayan TUNEL boyaması ile hücrelerdeki apoptoz oranı gösterilmiştir.

4.5.1 LDH Aktivitesinin Ölçülmesi

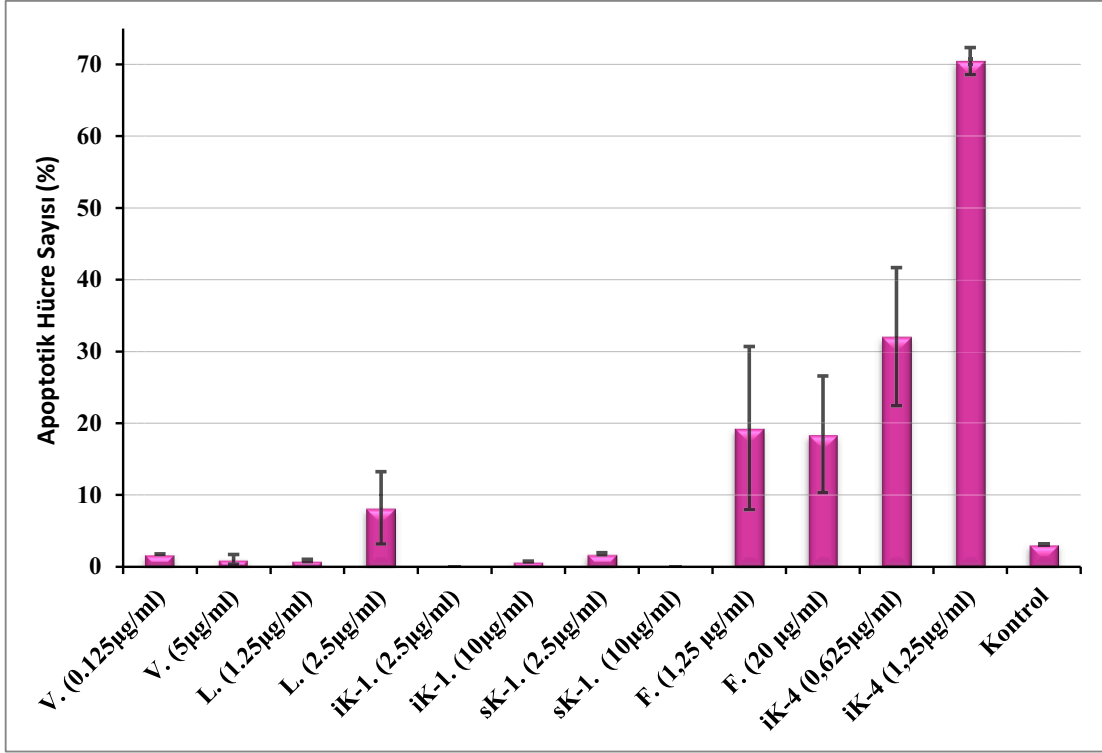
Matriks proteinleri (insan kollajen tip-1, sıçan kollajen tip-1, laminin, fibronektin ve vitronektin) üzerinde kültürü yapılan BRIN-BD11 hücrelerinin süpernatantlarında LDH aktivitesi ölçülmüştür. Analiz sonucunda, insan kollajen tip-1, sıçan kollajen tip-1, laminin, vitronektin ve fibronektin için LDH aktivitesinin kontrol grubunun altında kaldığı belirlenmiştir. WST-1 analizi sonucunda çoğalmanın diğer konsantrasyon değerlerine göre yüksek olduğu gözlenen iki konsantrasyonda (0,625 µg/ml ve 1,25 µg/ml) kollajen tip-4 kaplı yüzeylerde yapılan kültür sonrasında besiyerinde LDH aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p \leq 0,05$) arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.10). Toksik etki gözlenen kollajen tip-4 fonksiyon testlerinde kullanılmamıştır.



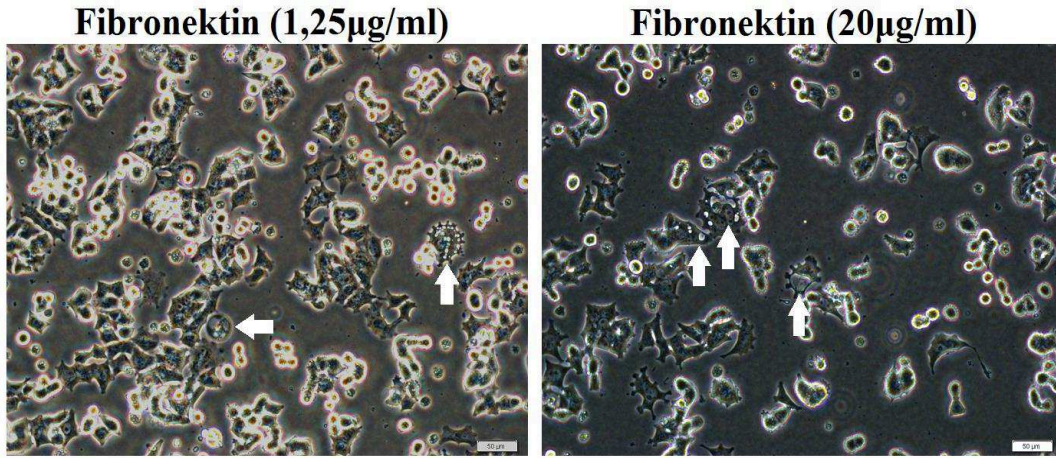
Şekil 4.10. Matriks proteinleri üzerinde kültürü yapılan BRIN-BD11 hücrelerinin süpernatantlarında ölçülen LDH aktivitesinin, kontrol grubunda belirlenen LDH aktivitesi değerine oranları (**V.** Vitronektin, **L.** Laminin, **iK-1** İnsan kollajen tip-1, **sK-1** Sıçan kollajen tip-1, **iK-4** İnsan kollajen tip-4, **F.** Fibronektin).

4.5.2 TUNEL Analizi

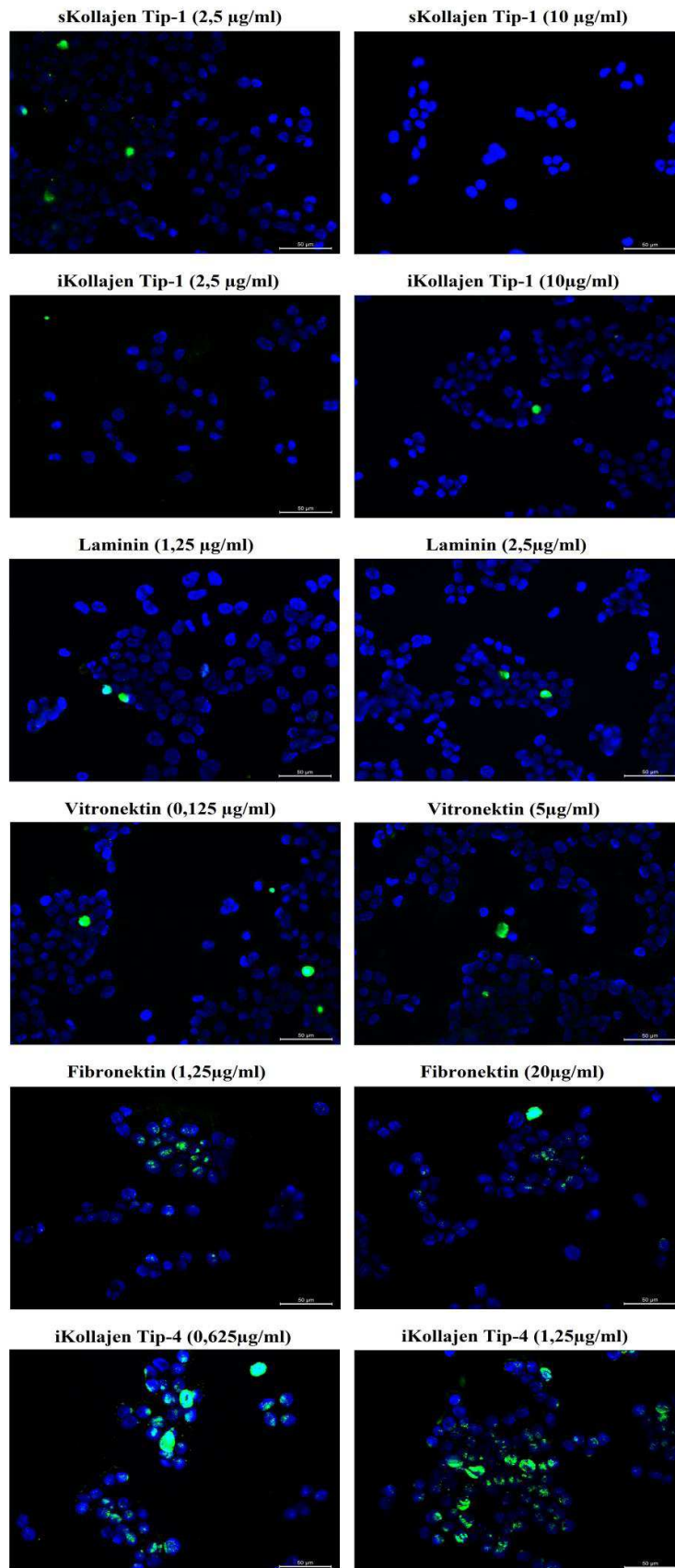
TUNEL boyaması sonrasında hücre sayımı yapılarak, insan kollajen tip-1, sıçan kollajen tip-1, laminin ve vitronektin protein gruplarında apoptoz oranının %8'in altında olduğu tespit edilmiştir. Fibronektin üzerinde kültüre edilen BRIN-BD11 hücrelerinde ise apoptoz oranının %20'ye yakın olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, zıt faz mikroskopi ile yapılan incelemede fibronektin kaplı yüzeylerde kültürü yapılan beta hücrelerinde nekrotik hücrelerde olduğu gibi büyük vakuol yapılarının oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.12.). LDH aktivitesi ölçümü sonucunda toksik etki gösterdiği belirlenen insan kollajen tip-4 proteini üzerinde kültürü yapılan beta hücrelerinde apoptoz oranının 0,625 µg/ml için %32, 1,25µg/ml için %70 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.11.).



Şekil 4.11. Matris proteinleri üzerinde kültür edilen beta hücrelerinin TUNEL boyaması sonrasında hücre sayımı yapılarak belirlenen apoptotik hücre sayısı yüzde değerleri (V. Vitronektin, L. Laminin, **iK-1.** İnsan kollajen tip-1, **sK-1.** Sıçan kollajen tip-1, **iK-4.** İnsan kollajen tip-4, F. Fibronektin) (iK-4 0,625µg/ml: $p \leq 0,01$; iK-4 1,25µg/ml: $p \leq 0,01$).



Şekil 4.12. Fibronektin kaplı yüzeyde kültürü yapılan beta hücrelerinin morfolojik görüntüleri. Fibronektin kaplı yüzeylerde hücrelerde büyük vakuol yapılarının oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 4.13. Matriks proteinleri üzerinde kültürü yapılan beta hücrelerinin TUNEL boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi. İnsan kollajen tip-4 üzerinde kültürü yapılan hücrelerde pozitif boyanmanın diğer gruplara oranla daha fazla olduğu gözlenmektedir (Bar çubukları: 50nm).

4.6 BRIN-BD11 Hücrelerinin Fonksiyon Analizleri

Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin fonksiyonları üzerindeki etkisini görmek amacıyla Real Time metoduyla *ins1*, *ins2*, *glut2*, *gck* ve *mafA* gen ifade seviyelerine ve ELİZA yöntemi ile farklı glukoz konsantrasyonlarında insülin salınım miktarlarına bakılmıştır.

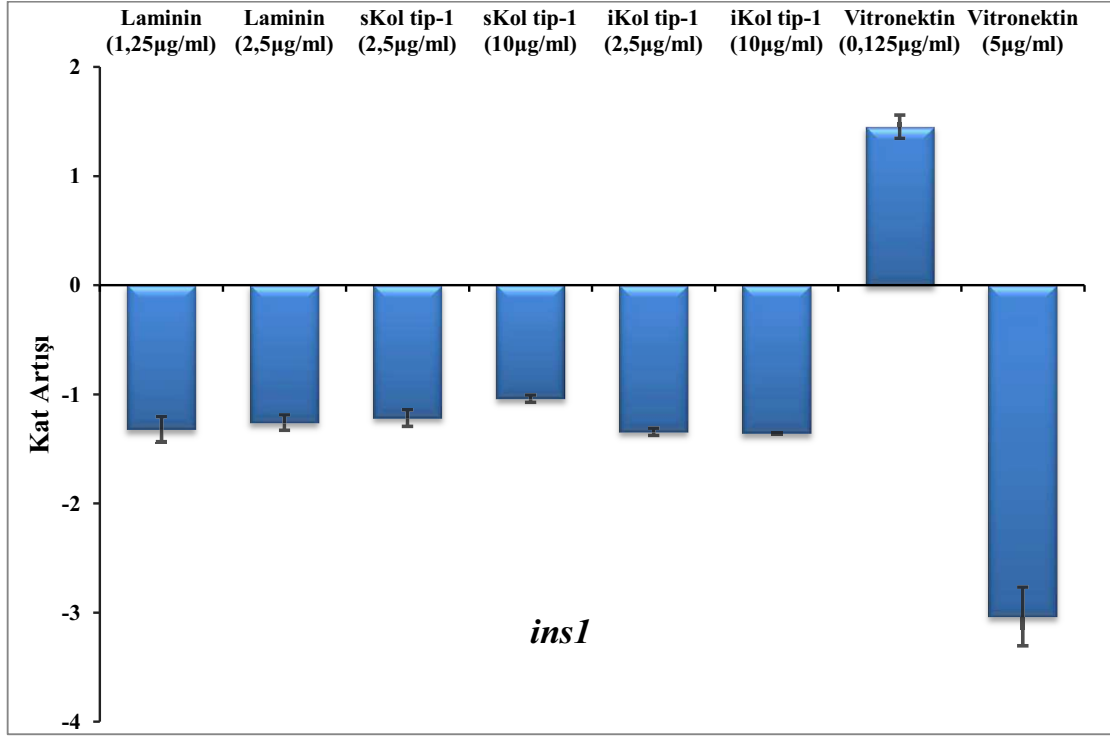
4.6.1 Gen İfade Seviyelerinin Analizi

Fonksiyonla ilişkili *ins1*, *ins2*, *glut2*, *gck* ve *mafA* gen ifade seviyelerine bakılarak matriks proteinlerinin beta hücreleri üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Kültürün 2. gününün sonunda yapılan analizler sonucunda yalnızca vitronektinin (0,125 µg/ml) *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadelerini artırdığı belirlenmiştir. Vitronektin (0,125 µg/ml) beta hücrelerinde *glut2*, *gck* ve *mafA* genlerinin ifadelerini de artırmıştır. Vitronektin yüksek konsantrasyonlarda (5µg/ml) kullanıldığında ise *glut2* ve *mafA* genlerinin ifadelerini artırırken *ins1*, *ins2* ve *gck* genlerinin ifadelerinin azaltmıştır.

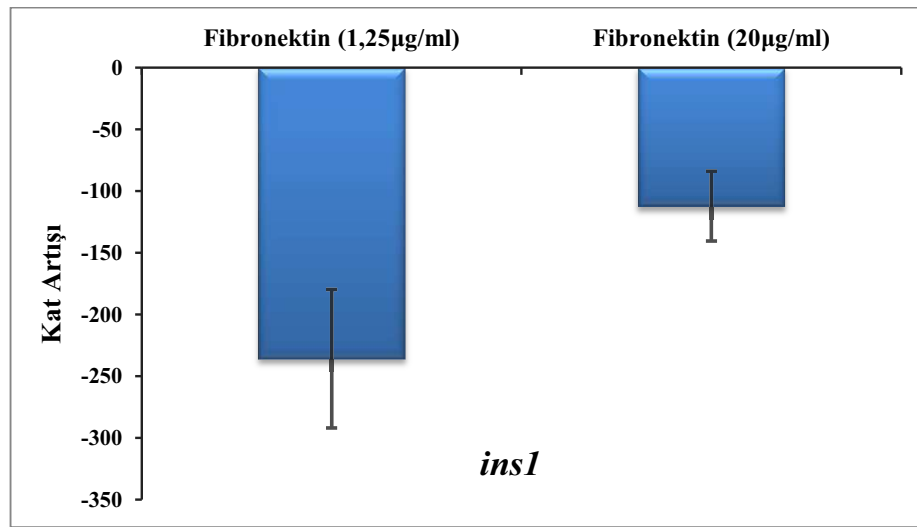
Çalışmada hem insan kollajen tip-1 hem de sıçan kaynaklı kollajen tip-1 kullanılmıştır. Sıçan kollajen tip-1 (10µg/ml), hücrelerde *gck* ve *mafA* genlerinin ifadelerini düşürürken diğer kollajen tip-1 gruplarında bu genlerin ifadesinin arttığı gözlenmiştir. İnsan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) ise *glut2* ifadesini düşürmüş, diğer kollajen tip-1 gruplarında *glut2* ifadesi artmıştır.

Laminin ile kaplı yüzeylerde devam eden kültürlerde beta hücrelerinin *gck* ve *mafA* genlerinin ifadelerinin arttığı, *ins1*, *ins2* ve *glut2* genlerinin ifadelerinin azaldığı belirlenmiştir.

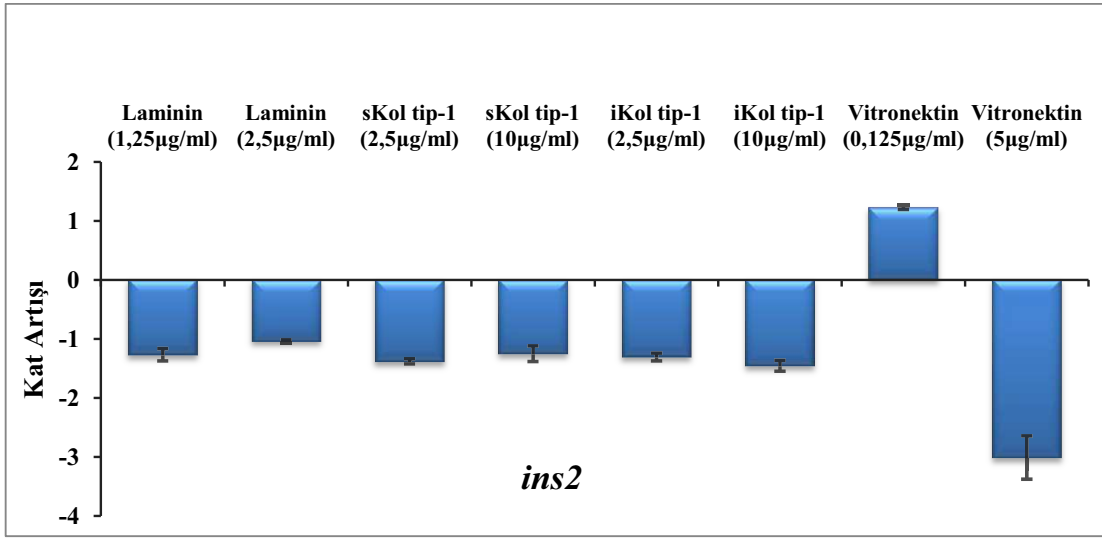
Fibronektin proteininin beta hücreleri üzerindeki etkilerine bakıldığında ise *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadelerinde ileri derecede anlamlı bir düşüş olduğu tespit edilmiştir. Fibronektinin her iki konsantrasyon değerinde de *gck*, *glut2* ve *mafA* genlerinin ifadeleri artmıştır.



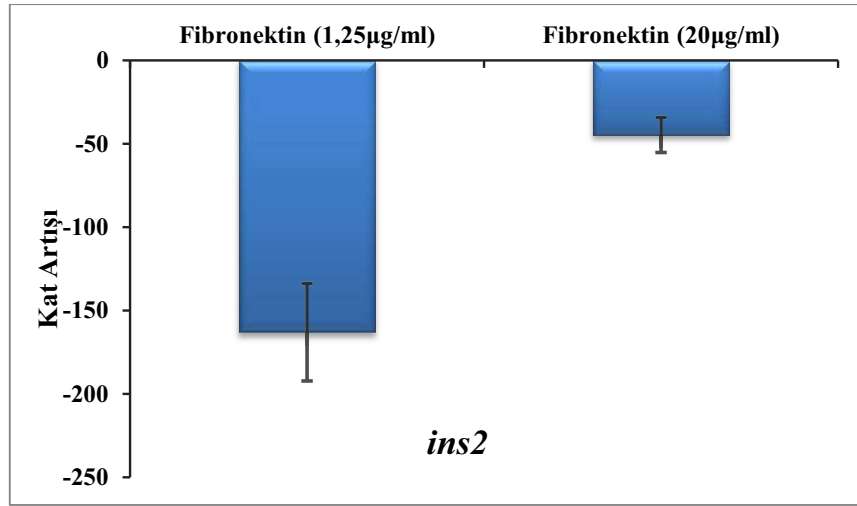
Şekil 4.14. Matris proteinlerinin beta hücrelerinin *ins1* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



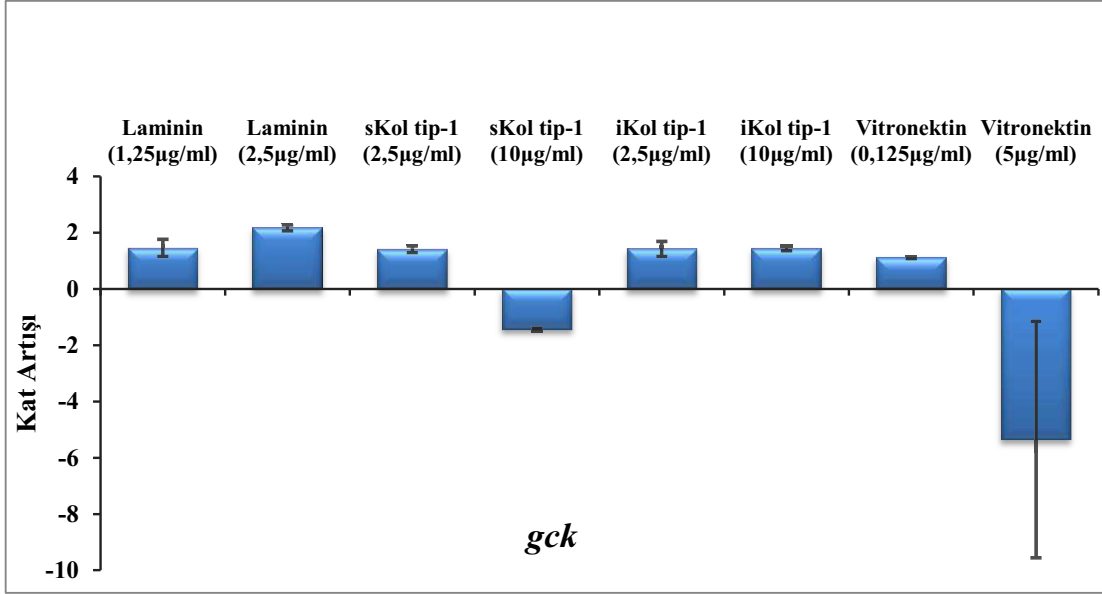
Şekil 4.15. Fibronektinin beta hücrelerinin *ins1* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



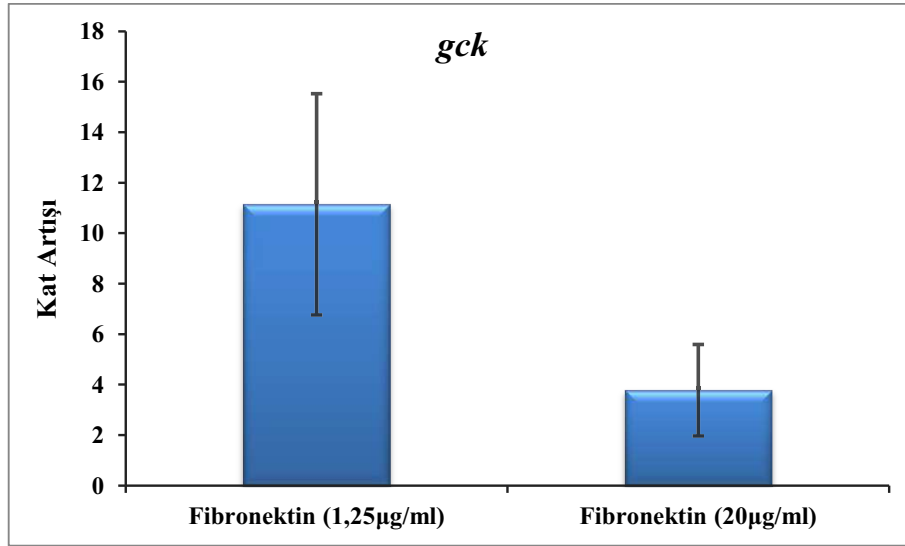
Şekil 4.16. Matris proteinlerinin beta hücrelerinin *ins2* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



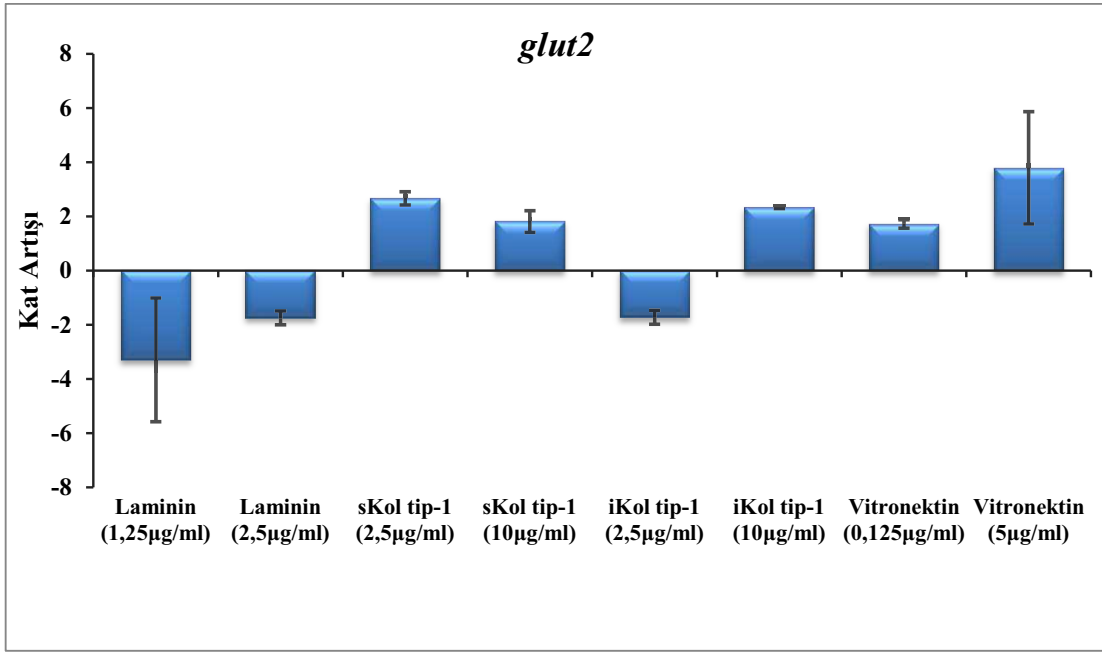
Şekil 4.17. Fibronektinin beta hücrelerinin *ins2* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



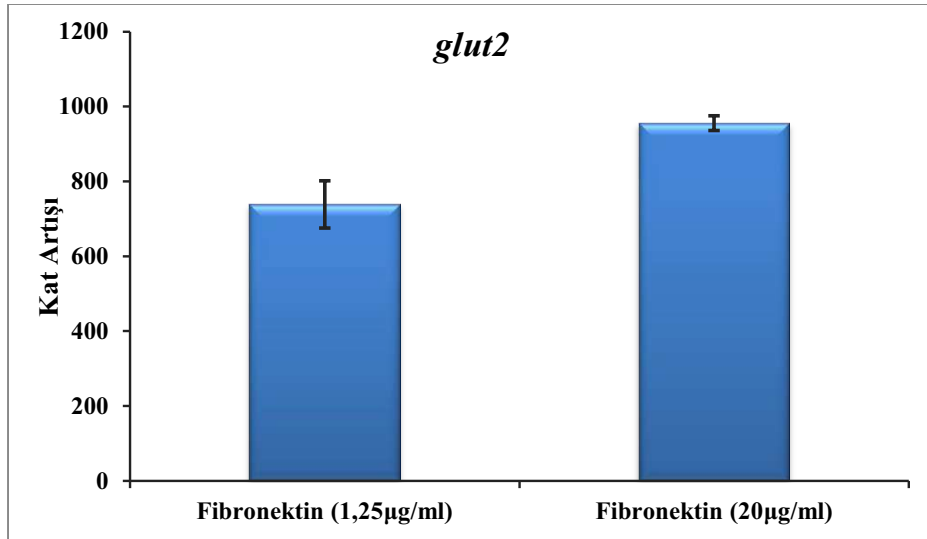
Şekil 4.18. Matris proteinlerinin beta hücrelerinin *gck* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



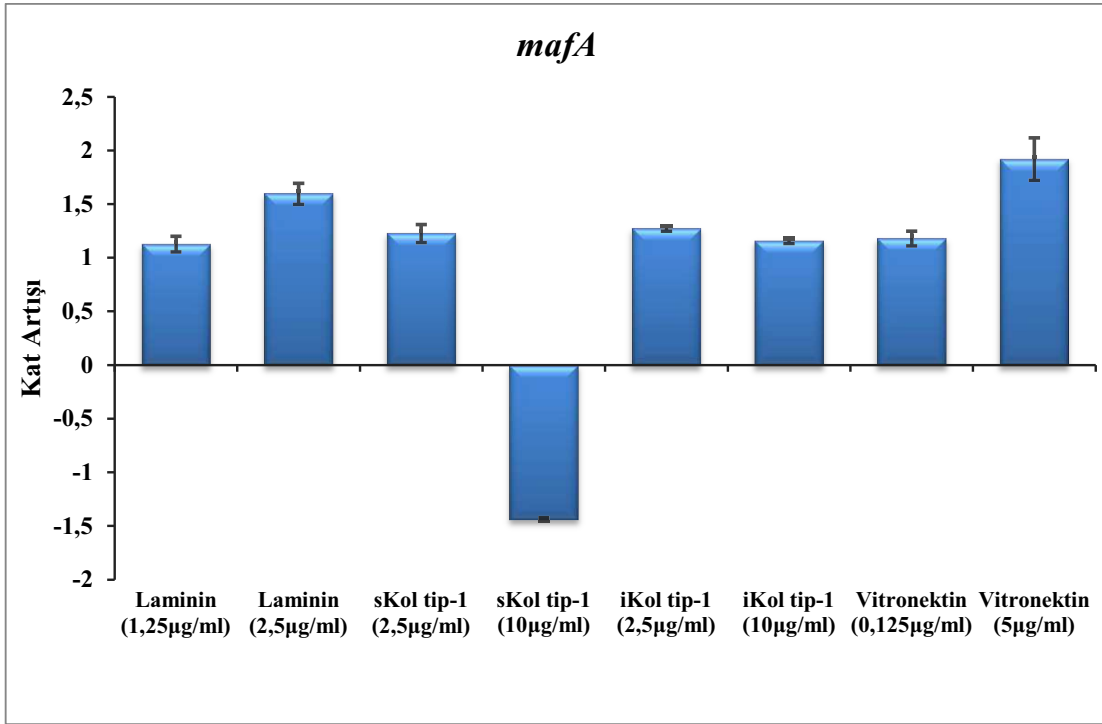
Şekil 4.19. Fibronektinin beta hücrelerinin *gck* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



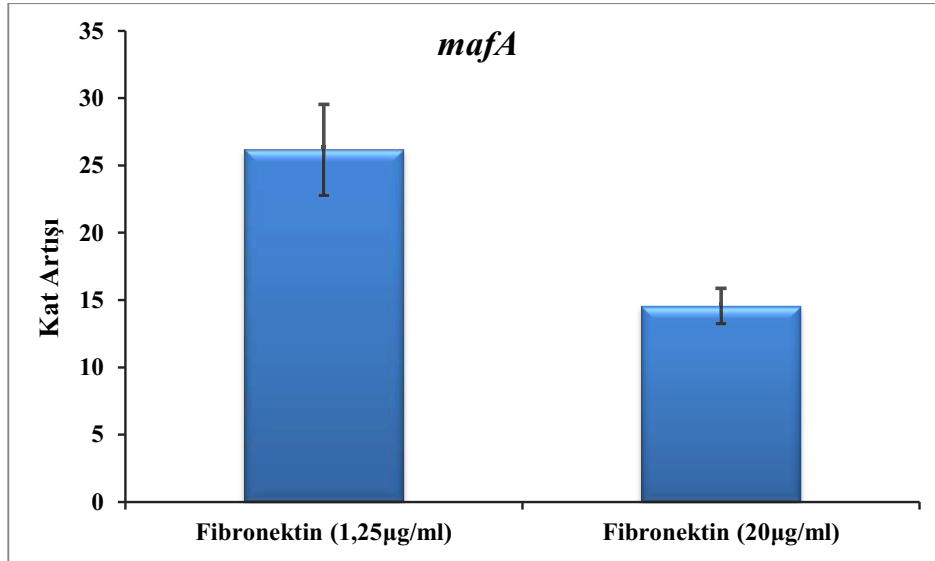
Şekil 4.20. Matris proteinlerinin beta hücrelerinin *glut2* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



Şekil 4.21. Fibronektinin beta hücrelerinin *glut2* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



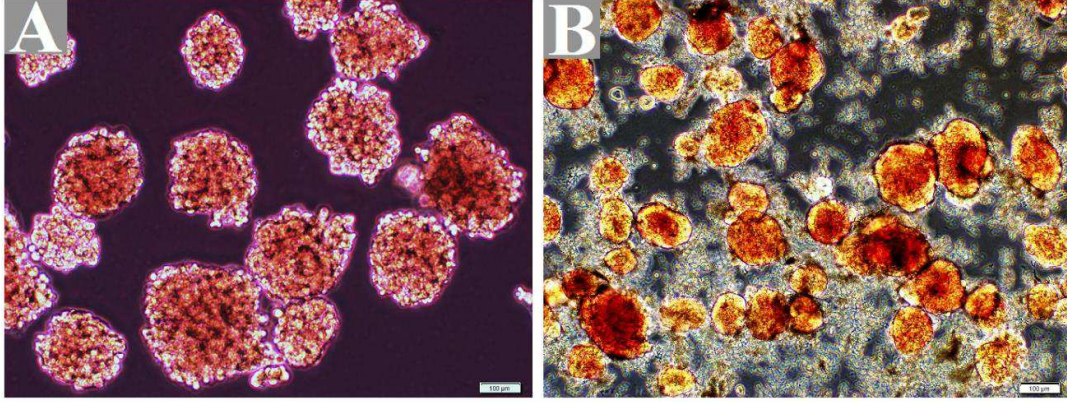
Şekil 4.22. Matris proteinlerinin beta hücrelerinin *mafA* geni ifadesi üzerindeki etkileri.



Şekil 4.23. Fibronektinin beta hücrelerinin *mafA* geni ifadesi üzerindeki etkileri.

4.7 Sıçan Pankreasından Adacık İzolasyonu ve Kültürü

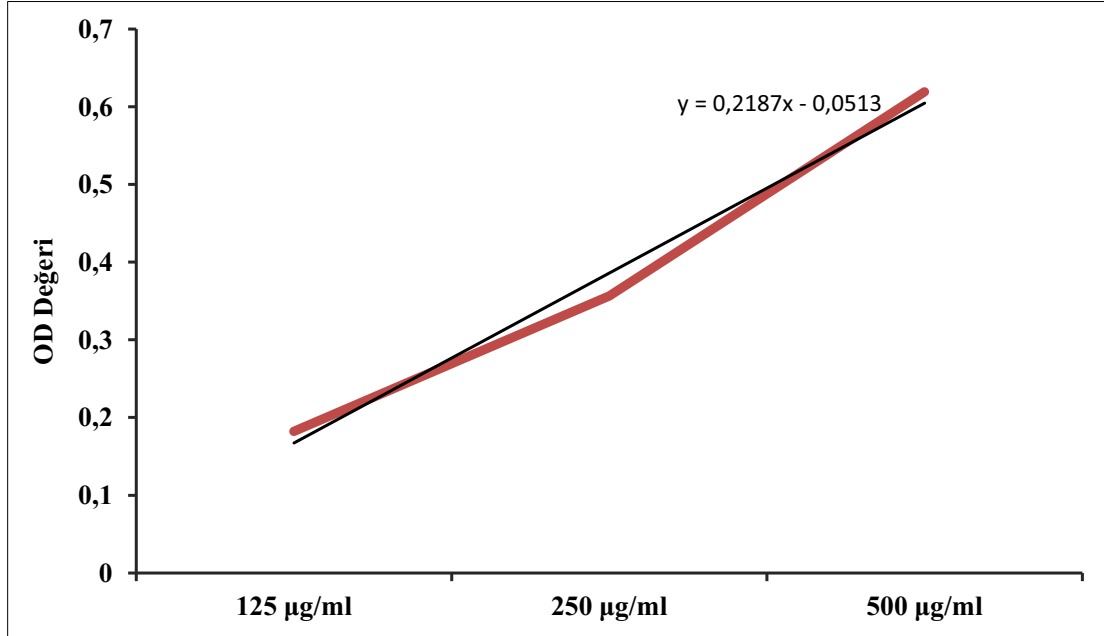
Sıçan pankreasından elde edilen adacıklar stereo mikroskop altında toplanmıştır. Karakterizasyon için yapılan DTZ boyaması sonucunda pozitif olduğu gözlenen adacıklar dondurularak -80°C’de saklanmıştır.



Şekil 4.24. A) Sıçan pankreas adacıklarınının zıt faz mikroskopi ile gözlemlenen morfolojik görünüşleri. **B)** DTZ boyaması sonucunda pozitif olduğu gözlenen adacıkların zıt faz mikroskobik görünüşleri. (Bar çubukları: 100nm).

4.8 Endokrin Pankreas Ekstraktının Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Pankreatik adacıklardan mekanik parçalama ile elde edilen protein ekstraktındaki protein konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan BCA analizinde BSA standartları kullanılarak standart eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 4.25. BSA standartlarının OD değerleri ile oluşturulan standart eğri grafiği.

Standart eğri ile yapılan analiz sonucunda OD değeri 0,048 olan endokrin pankreas ekstraktının protein konsantrasyonunun 0,45 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan diğer proteinlere göre konsantrasyonunun düşük olduğu belirlenen ekstraktın kültür kaplarını kaplama süresi 12 saate uzatılmıştır.

4.9 Farklı Matriks Protein Karışımlarının Oluşturulması

Canlılık ve fonksiyon analizleri sonucunda diğer gruplardan daha etkin bulunan insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml), laminin (2,5 µg/ml), vitronektin (0,125 µg/ml) proteinleri karıştırılarak hücreler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Proteinler aşağıda belirtildiği oranlarda karıştırılmıştır:

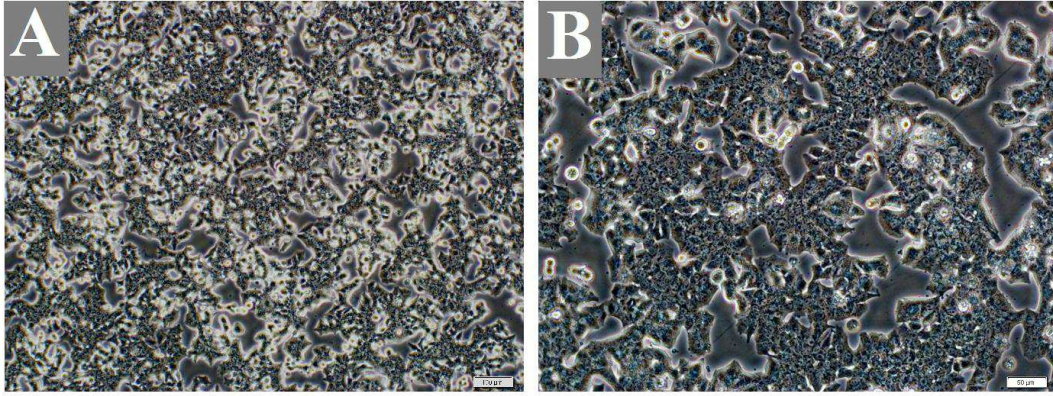
- %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml)
- %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)

Aynı zamanda, pankreas adacıklarından elde edilen protein ekstraksiyonu ile kaplanan yüzeylerde beta hücrelerinin kültürü iki gün boyunca sürdürülerek analiz yapılmıştır.

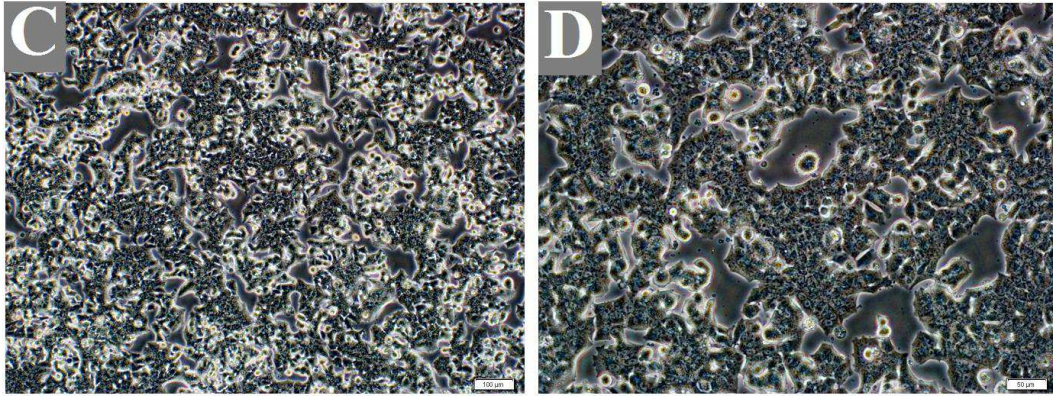
4.9.1 Matriks Protein Karışımları Üzerinde BRIN-BD11 Hücrelerinin Kültürü

Protein karışımları ve endokrin pankreas protein ekstraktı ile kaplanan yüzeylerde uygun şartlarda kültüre edilen beta hücrelerinin morfolojik takipleri zıt-faz mikroskopi ile yapılmıştır. Proteinlerin tek başına kullanıldığı kültüre oranla karışımlar üzerinde hücre çoğalmasının daha fazla olduğu, beta hücrelerinin kültür kabı tabanına daha çok yayılma eğilimi gösterdiği gözlenmiştir.

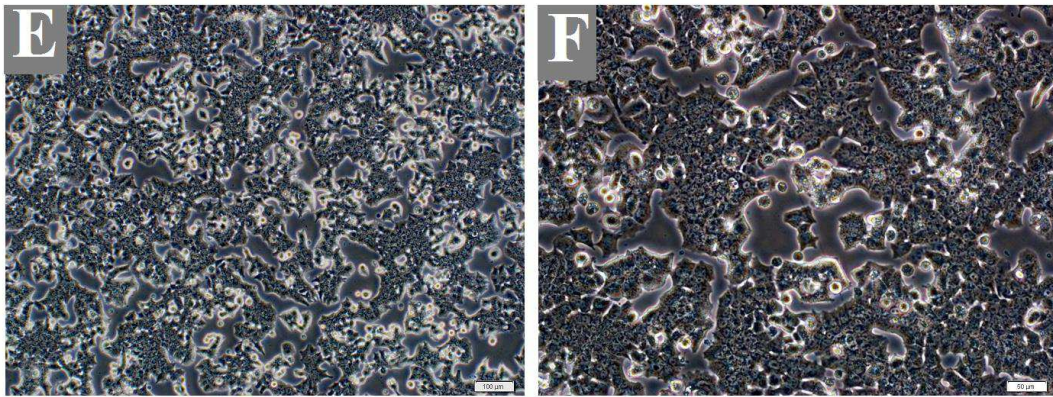
iKollajen Tip-1 + Laminin



iKollajen Tip-1 + Vitronektin



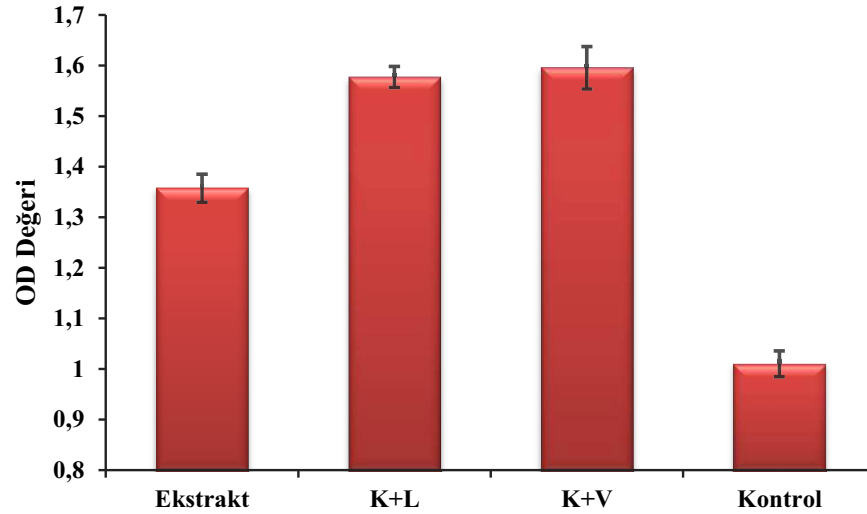
Endokrin Pankreas Protein Ekstraktı



Şekil 4.26. Matriks karışımları ve endokrin pankreas protein ekstraktı üzerinde kültüre edilen beta hücrelerinin kültürün 2. gününde morfolojik görüntüleri (Bar çubukları: A,C ve E 100nm, B, D ve F 50nm).

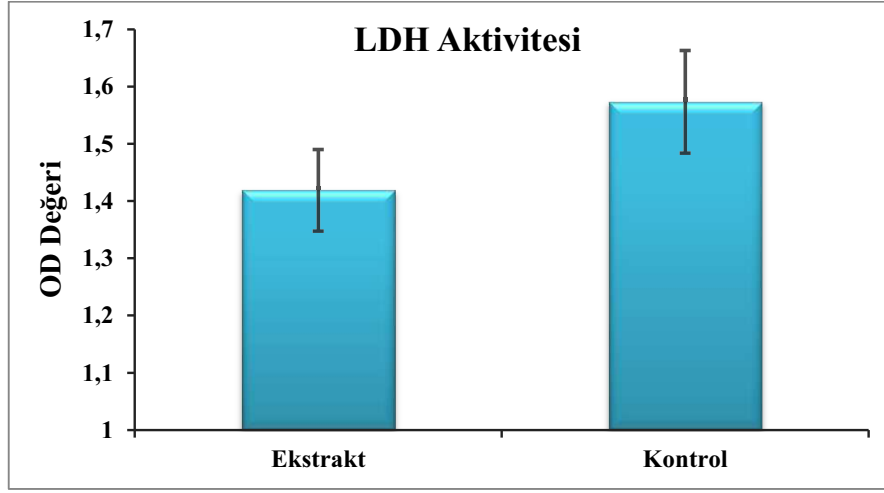
4.9.2 WST-1 Analizi

Hazırlanan protein karışımlarının ve protein ekstraktının beta hücrelerinin canlılığını/çoğalmasını in vitro’da nasıl etkilediklerini belirlemek amacıyla WST-1 analizi yapılmıştır. Üç örneğin arasından hücreleri en çok destekleyen proteinlerin insan kollajen tip-1 ve vitronektin karışımı olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan diğer iki protein grubunda da hücre canlılığının kontrol grubuna göre yüksek olduğu ($p \leq 0,001$) gözlenmiştir.

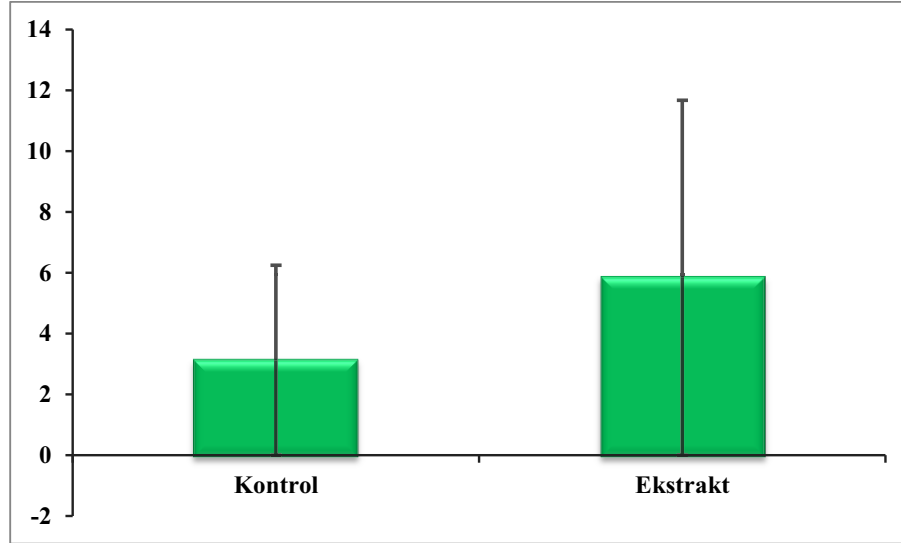


Şekil 4.27. Endokrin pankreas protein ekstraktı ve matriks protein karışımları ile kaplanan yüzeylerde iki gün boyunca kültüre edilen beta hücrelerinin WST-1 analizi (**K+L:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); **K+V:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).

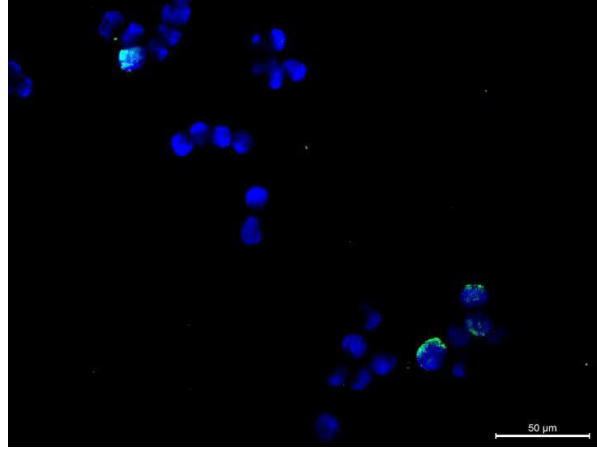
Endokrin pankreas protein ekstraktının hücreler üzerinde toksik etkisinin olup olmadığını test etmek amacıyla LDH aktivitesi ölçümü ve TUNEL boyaması yapılmıştır. LDH aktivitesinin protein ekstraktı üzerinde kültürü yapılan beta hücrelerinde kontrol grubuna oranla daha düşük olduğu ancak, bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. TUNEL boyaması sonucunda ise bu hücrelerde apoptoz oranının %7,23 olduğu belirlenmiştir. Diğer matriks proteinleri için LDH aktivitesi ölçümü ve TUNEL boyaması yapıldığı için protein karışımlarında bu analizler tekrar edilmemiştir.



Şekil 4.28. Endokrin pankreas protein ekstraktı üzerinde kültüre edilen beta hücrelerinin supernatantında ölçülen LDH aktivitesi.



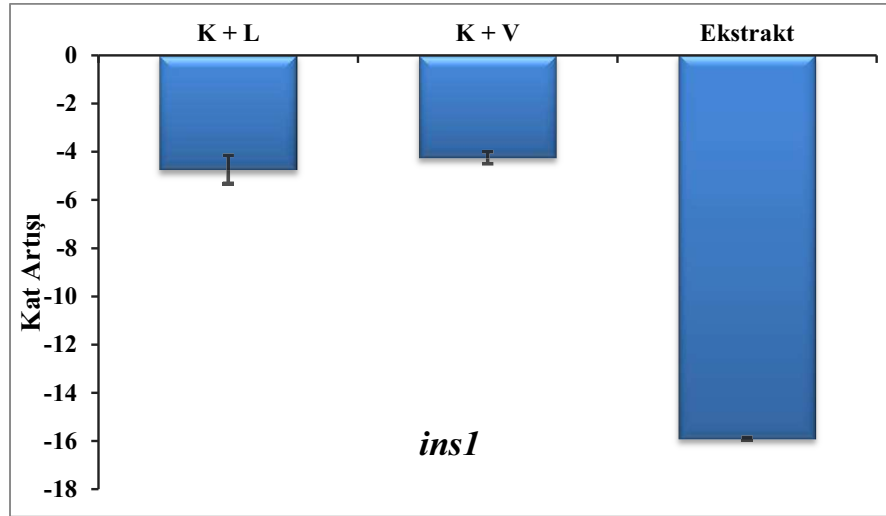
Şekil 4.29. Endokrin pankreas protein ekstraktı üzerinde kültür edilen beta hücrelerinin TUNEL boyaması sonrasında hücre sayımı yapılarak belirlenen apoptotik hücre sayısı yüzde değerleri.



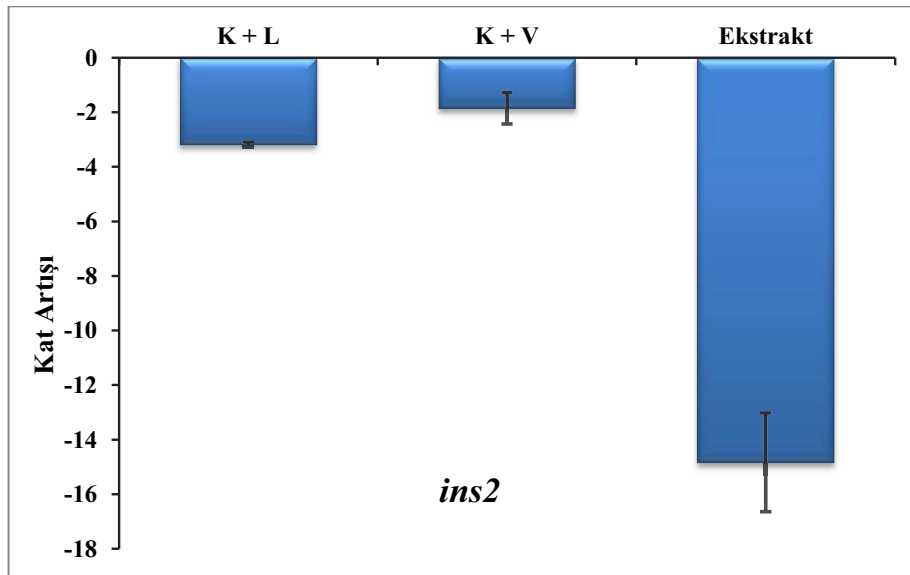
Şekil 4.30. Endokrin pankreas protein ekstraktı üzerinde kültür edilen beta hücrelerinin TUNEL boyamasının floresan mikroskopi ile görüntülenmesi (Bar çubuğu: 50nm).

4.9.3 Gen İfade Seviyeleri

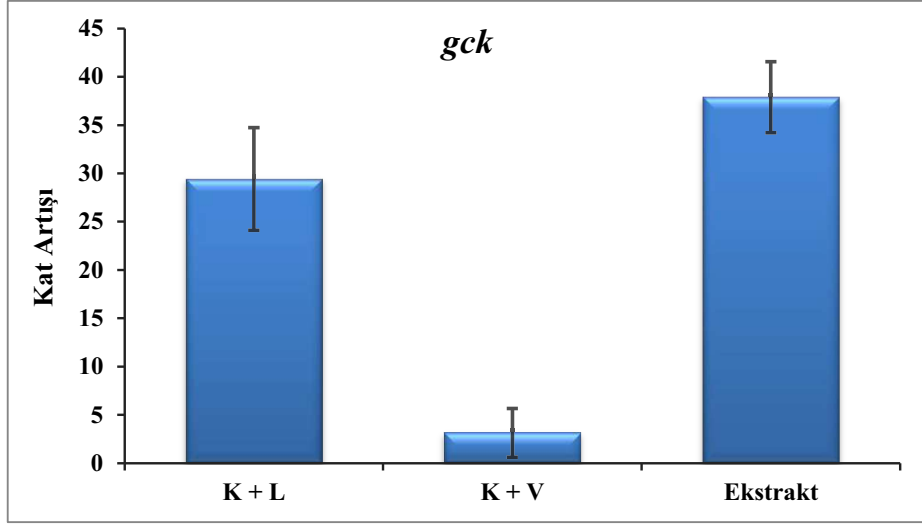
İnsan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) ve laminin (2,5 µg/ml) ile insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) ve vitronektin (0,125 µg/ml) karışımları ve endokrin pankreas protein ekstraktının beta hücrelerinin fonksiyon ile ilişkili genlerin ifadesi üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla real time PCR analizi yapılmıştır. Protein karışımları ve protein ekstraktının *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadelerini düşürürken, *glut2*, *gck* ve *mafA* genlerinin ifadelerini arttırdığı belirlenmiştir.



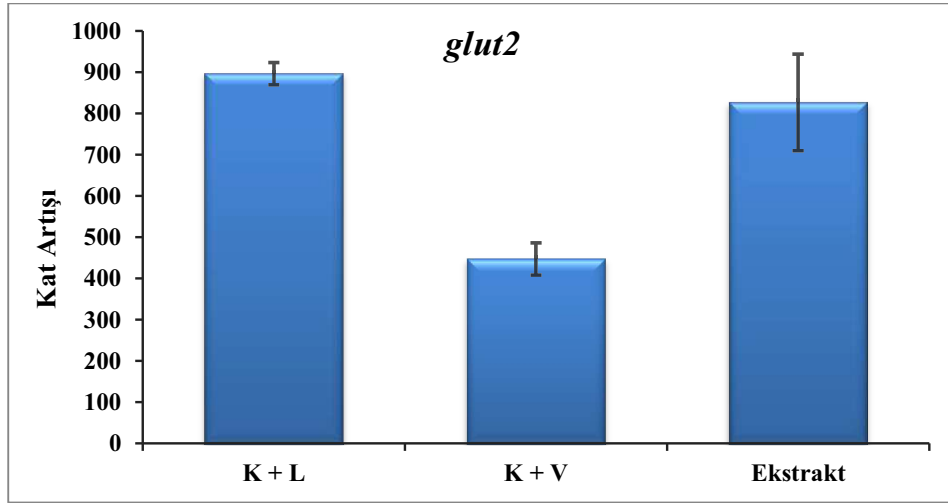
Şekil 4.31. Protein karışımlarının beta hücrelerinin *ins1* geni ifadesi üzerindeki etkileri (K+L: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); K+V: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).



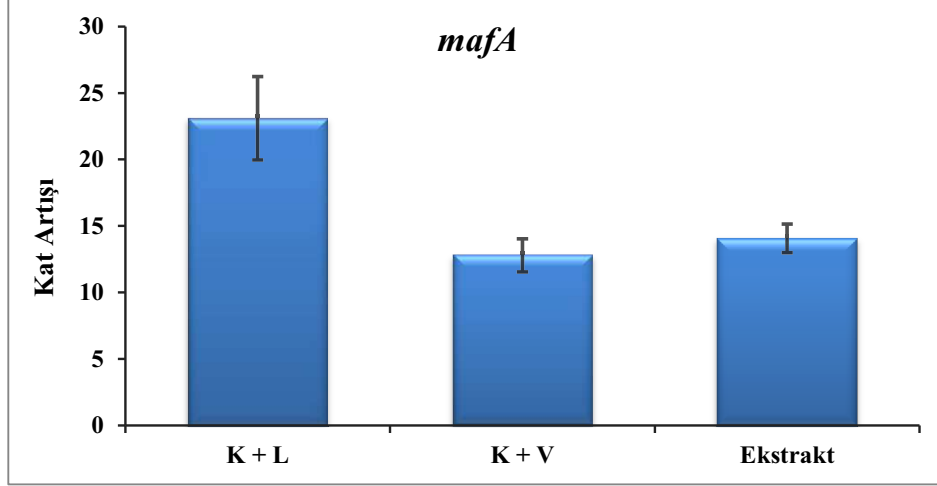
Şekil 4.32. Protein karışımlarının beta hücrelerinin *ins2* geni ifadesi üzerindeki etkileri (K+L: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); K+V: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).



Şekil 4.33. Protein karışımlarının beta hücrelerinin *gck* geni ifadesi üzerindeki etkileri (K+L: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); K+V: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).



Şekil 4.34. Protein karışımlarının beta hücrelerinin *glut2* geni ifadesi üzerindeki etkileri (K+L: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); K+V: %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).



Şekil 4.35. Protein karışımlarının beta hücrelerinin *mafA* geni ifadesi üzerindeki etkileri (**K+L:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); **K+V:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).

4.10. İnsülin Salınım Düzeyleri

Yapılan analizler sonucunda beta hücrelerini en fazla desteklediği düşünülen proteinler ile yapılan kültür supernatantlarında ELİZA yöntemi ile insülin seviyesi ölçülmüştür. Deneyde vitronektin (0,125µg/ml), fibronektin (1,25µg/ml), insan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) + laminin (2,5µg/ml) ve insan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) + vitronektin (0,125µg/ml) kullanılmıştır.

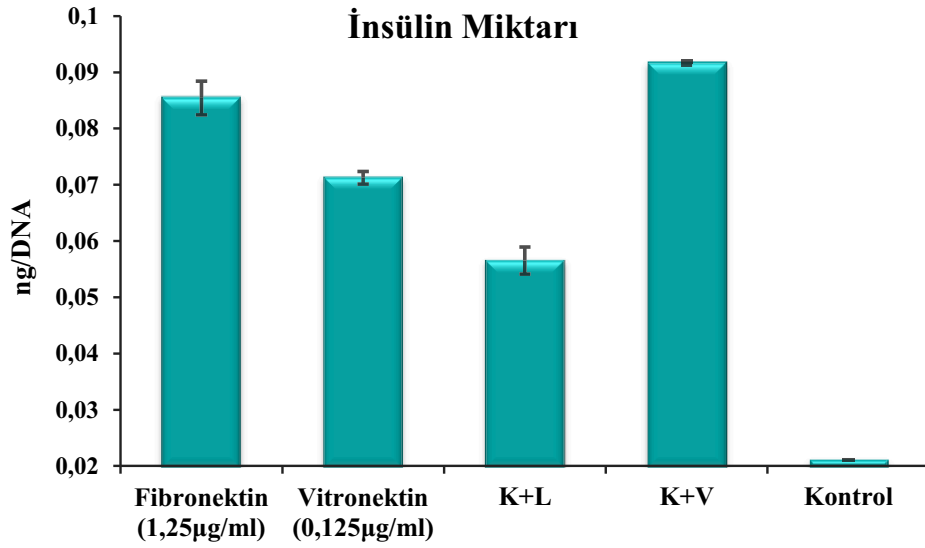
Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren besi yeri kullanılarak yapılan analizler sonucunda, 5,5 mM glukoz içeren ortamda kullanılan tüm proteinlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, insülin salınımını artırdığı tespit edilmiştir ($p \leq 0,001$). Ayrıca, kollajen tip-1 + vitronektin karışımının beta hücrelerinde insülin salınımını, vitronektin ve kollajen + laminin karışımından daha iyi desteklediği belirlenmiştir ($p \leq 0,01$).

Glukoz içeriği 11 mM olan besiyerine bakıldığında ise kollajen tip-1 + laminin karışımı dışındaki proteinler insülin salınımını artırmıştır ($p \leq 0,001$).

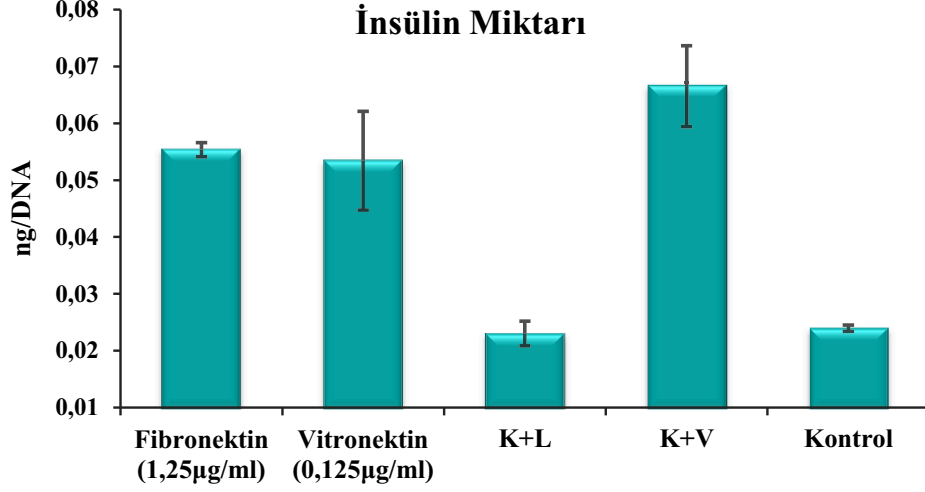
Bunun yanı sıra, 25 mM glukoz içeren besi yeri kullanıldığında kontrol grubunda tespit edilen insülin miktarının deney gruplarından daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu

düşüşün fibronektin dışında kullanılan diğer proteinlerde istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0,05$).

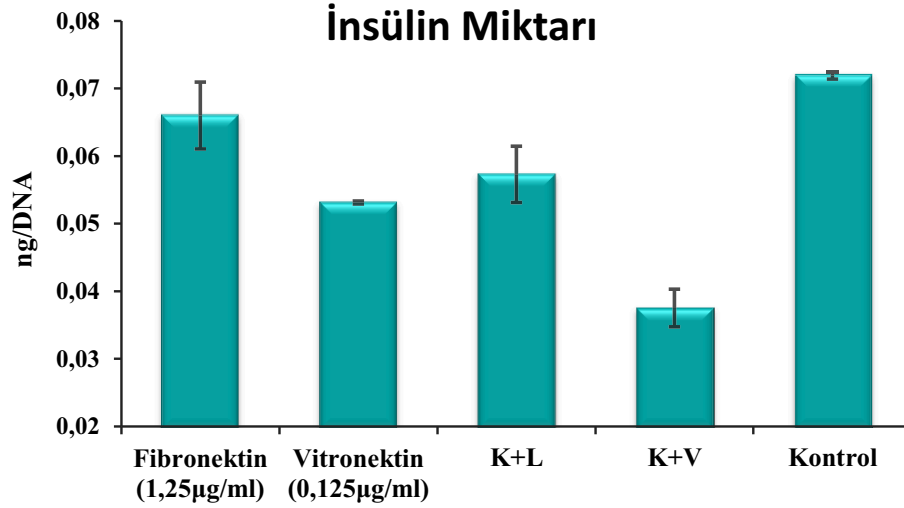
Kollajen tip-1 + vitronektin karışımı ile kaplı yüzeylerde kültüre edilen beta hücrelerinden salgılanan insülin miktarının 5 mM ve 11 mM glukoz konsantrasyonunda diğer gruplardan yüksek olduğu gözlenirken, 25 mM glukoz konsantrasyonunda tüm gruplardan daha düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.36. Matriks proteinlerinin 5,5mM glukoz içeren besi yerinde salgıladıkları insülin seviyeleri (ng/DNA) (**K+L:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); **K+V:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).



Şekil 4.37. Matriks proteinlerinin 11mM glukoz içeren besi yerinde salgıladıkları insülin seviyeleri (ng/DNA) (**K+L:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); **K+V:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).



Şekil 4.38. Matriks proteinlerinin 25mM glukoz içeren besi yerinde salgıladıkları insülin seviyeleri (ng/DNA) (**K+L:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 laminin (2,5 µg/ml); **K+V:** %50 insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml) + %50 vitronektin (0,125 µg/ml)).

5 TARTIŞMA

Diyabet hastalığının tanımına ilk olarak, milattan önce 1500'lü yıllara ait Mısır'da bulunan papirüslerde rastlanmaktadır. Aşırı kilo kaybı ve poliürinin tarif edildiği hastalığın, tip-1 diyabet olduğu düşünülmektedir. Sonraki yıllarda, hastaların idrarında şeker olduğunun tespit edilmesi, karaciğerde glikojen depolarının artması gibi tanımlamalar yapılmıştır. Oskar Minkowski'nin 1889 yılında, pankreatektomi uygulanan hayvanlarda diyabet geliştiğini gözlemlemesi üzerine diyabetin gelişiminden pankreasın sorumlu olduğu belirlenmiştir (Luft, 1989). 1922 yılında pankreastan insülinin izole edilmesinin başarılmasına kadar hastalığın hiçbir tedavisi olmadığı düşünülmekteydi (Simoni et al. 2002). 1973 yılında elde edilen saf insülin ise günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen insülinin öncüsü olmuştur (Bruni et al. 1973).

Günümüzde hastalara uygulanmakta olan en yaygın tedavi yöntemi tip-1 diyabet hastaları için dışardan insülin alımı, tip-2 diyabetli hastalar için ise diyet ve egzersiz programlarının uygulanmasıdır. Tip-2 diyabet hastalarının da zamanla insülin alma gereksinimlerinin ortaya çıktığı gözlenmektedir (Kahn, 2003). Uygulanan bu tedavinin hastaların yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürmesi ve getirdiği maddi yükümlülüğün yüksek olması diyabetin kesin olarak tedavi edilebilmesi için farklı yöntemlere gereksinim duyulmasına neden olmuştur.

Pankreas nakillerinde genellikle başarılı sonuçlar elde edilse de gerektirdiği cerrahi operasyonun zorlu olması, başarısızlık durumunda sistemik bir etkinin görülmesi ve uygun verici bulunamaması gibi nedenler yöntemin yaygın olarak kullanılmasına engel olmaktadır. Adacık nakilleri ise daha az girişimsel bir yöntem olmasına karşın alınan sonuçlar uzun dönemde hastaların tekrar insüline gereksinim duyduğunu göstermiştir. Pankreastan adacık izolasyonu sırasında hücrelerin zarar görmesi ve nakil edilen adacıklardaki canlı ve fonksiyonel beta hücre oranının değişken olması yöntemin uzun dönemde başarısını sınırlandırmaktadır. Adacık izolasyonu aşamaları sırasında HDM yapısını bozulmasının, adacıkların hayatta kalma oranını ve dokuya yerleşerek burada fonksiyonlarını devam ettirebilmelerini engellediği düşünülmektedir (Orlando et al. 2014, Stendahl et al. 2009). Beta hücrelerinin, 804G hücrelerinden elde edilen matriks ile kaplı yüzeylerde kültüre edildiklerinde gen ifade profillerinin değiştiği, hücrelerin hayatta kalma oranının arttığı bildirilmiştir (Hammar et al. 2004). Ayrıca, kollajen tip-1, kollajen tip-4,

fibrinojen, fibronektin, laminin ve vitronektin proteinlerinin beta hücrelerin *in vitro*'da hayatta kalma oranlarını artırdığı ve enkapsüle edilen hücrelerde apoptoz oranının düştüğü belirlenmiştir (Weber et al. 2008).

İki boyutlu kültür sistemlerinin yanı sıra üç boyutlu kültür sistemlerinde de HDM proteinlerinin hücreler üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Fibronektin kaplı yüzeylere ekilen beta hücrelerinin üzerine ikinci bir fibronektin tabakası eklendiğinde, dorsal etkileşimin hücre iskeletinde değişimlere yol açtığı ancak, çoğalma üzerinde olumsuz bir etki gösterdiği tespit edilmiştir (Ballester-Beltrán et al. 2014). Pankreas HDM yapısına ait faktörler kullanılarak hazırlanan mikroboncuk sistemlerinde devam ettirilen kültürlerde ise, beta hücrelerinin canlılık oranlarının ve fonksiyonlarının arttığı bildirilmiştir (Li et al. 2013).

Beta hücrelerinin yerine konma tedavilerinde kullanılması amacıyla üzerinde çalışılan bir diğer yöntem ise, kök hücrelerden insülin üreten hücrelerin elde edilmesidir. Nakiller için uygun verici sayısının kısıtlı olması nedeniyle farklı kaynaklardan elde edilen bu hücrelerin kullanılabilmesi önemli bir avantaj olacaktır. Kök hücrelerin farklılaşmaları mikroçevrelerindeki diğer hücreler, sitokinler ve HDM ile etkileşimleri sonucunda gerçekleşmektedir (Huang and Li, 2011; Rodrigues et al. 2010). Pankreatik adacık mikroçevresinde kültüre edilen adipoz doku ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin insülin üreten hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir (Karaöz ve ark. 2013). Kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ise HDM ile desteklendiği kültür koşullarında insülin üreten hücrelere farklılaşabildikleri, matriks ile desteklenmediğinde ise farklılaşmanın erken aşamalarda durduğu bildirilmiştir (Gao et al. 2008). Bu nedenle, kök hücre esaslı tedavi yöntemlerinde de hücrelerin gereksinim duydukları mikroçevrenin sağlanabilmesi amacıyla HDM proteinlerinin kullanılmasının başarı oranını artırdığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, *in vitro*'da beta hücrelerinin canlılığını ve fonksiyonlarını desteklemek için kullanılmak üzere en uygun matriks bileşeninin saptanabilmesi amacıyla bu proteinlerin hücre davranışına etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan sıçan pankreatik beta hücre hattı BRIN-BD11 hücrelerinin, yapılacak olan analizlerden önce ne kadar süreyle kültürde tutulacağı ve deneylere kaç hücre ile başlanacağını belirlemek üzere farklı hücre sayılarında ekim yapılarak üç gün canlılık analizi yapılmıştır. Beta hücrelerinin canlılık oranlarının ikinci günden sonra düşmeye başladığı, yalnızca 20000 hücre/0,32 cm² sayısı ile kültüre başlandığı takdirde

hücre sayısında üç gün boyunca artış olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, daha sonra yapılan tüm analizlerde bu hücre sayısı kullanılmış ve 48 saat sonunda deneyler sonlandırılmıştır.

BRIN-BD11 hücrelerinde insan kollajen tip-1, sıçan kollajen tip-1, insan kollajen tip-4, laminin, fibronektin, vitronektin ve ECL'nin hücre çoğalması üzerindeki etkisi incelenmiştir. Kullanılan proteinlerden yalnızca laminin (1,25µg/ml) kaplı yüzeylerde beta hücrelerinin canlılık oranının anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p \leq 0,01$). İnsan beta hücreleri ile yapılan bir çalışmada yalnızca çoğalan beta hücrelerinin *in vitro* ortamda laminin 511 proteini ile etkileşime geçtiği, bu proteinin beta hücrelerinde gözlemlenen epitelyal-mezenkimal geçiş mekanizmasını da kısmen engellediği belirlenmiştir (Banerjee et al. 2012). Bu nedenle, beta hücrelerinin kültür koşullarında çoğaltılması amacıyla lamininin kullanılabilmesi düşünülmektedir.

Çalışmamızda, kollajen tip-4 ve ECL kaplı yüzeylerde kültürü devam eden hücrelerde canlılık oranının, kontrol grubuna (matriks proteinlerinin kullanılmadığı kültür koşulları) göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Kollajen tip-4'ün, bazal membran yapısında bulunmasına rağmen hücrelerin tutunmasını beklendiği gibi desteklemediği gözlenmiştir. Kollajen tip-4'ün en yüksek canlılık gözlenen iki konsantrasyon değeri (0,625 µg/ml ve 1,25 µg/ml) için ayrıca toksisite testleri yapılmıştır. Analizler sonucunda, kollajen tip-4 kaplı yüzeylerde yapılan kültür sonucunda LDH aktivitesinin yüksek olduğu ($p \leq 0,05$) ve apoptoz oranının kontrol grubuna göre arttığı ($p \leq 0,01$) belirlenmiştir. Beta hücre membranında bulunan reseptör kompozisyonuna bakıldığında, bu hücrelerin bazal laminada bulunan laminin proteini ile daha çok etkileşim halinde oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kaido et al. 2006). Ayrıca kollajen tip-4 ile kültüre edilen beta hücrelerinin insülin salınım miktarlarının düştüğü de bildirilmiştir (Kaido et al. 2006, Stendahl et al. 2009). Bu nedenle, çalışmanın ileri aşamalarında kollajen tip-4 ve ECL kullanılmamıştır.

Kollajen tip-1 için çoğalmanın daha yüksek olduğu tespit edilen, 10 µg/ml ve 2,5 µg/ml konsantrasyon değerleri seçilmiştir. Ayrıca, çalışmada hem insan kollajen tip-1 hem de sıçan kollajen tip-1 proteinleri kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Her iki proteinde de hücrelerin supernatantında ölçülen LDH aktivitesinin düşük, apoptoz miktarının ise %2'nin altında olduğu belirlenmiştir. Kollajen tip-1'in beta hücrelerinin canlılığını *in vitro*'da desteklediği belirlenmiştir. Beta hücrelerinin fonksiyonu üzerindeki etkisine bakıldığında, konsantrasyon değerlerine ve kollajenin kaynağına göre gen ifade

profillerinde farklı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Sıçan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) kaplı yüzeyler hücrelerde *gck*, *glut2* ve *mafA* gen ifadelerini artırmış, aynı protein 10 µg/ml konsantrasyonunda kullanıldığında ise yalnızca *glut2* geninin ifadesini artırdığı belirlenmiştir. İnsan kollajen tip-1 için ise, hücrelerde *gck* ve *mafA* genlerinin ifadesi artmış, *glut2* geninin ifadesi ise yalnızca 10 µg/ml oranında kullanıldığında yüksek olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarda benzer şekilde kollajen tip-1 kullanılan kültürlerde, beta hücrelerinde insülin salınımında düşüş olduğu ve proteinin hücrelerin fonksiyonunu etkin bir şekilde desteklemediği bildirilmiştir (Edamura et al. 2003). Kollajen tip-1, kollajen tip-3 ve kollajen tip-4 ile karıştırılarak kullanıldığında ise sıçan pankreatik adacıklarının canlılığını desteklediği ancak insülin geni ifadesini etkilemediği tespit edilmiştir (Nagata et al. 2002).

Laminin, 2,5 µg/ml ve 1,25 µg/ml konsantrasyonlarında kullanılmıştır. TUNEL boyamaları ve LDH aktivitesi ölçümü sonucunda lamininin beta hücreleri üzerinde toksik etkisi olmadığı anlaşılmıştır. Hücrelerin gen ifade profillerine bakıldığında, *gck* ve *mafA* genlerinin ifadelerinin artarken, *ins1*, *ins2* ve *glut2* genlerinin ifadeleri azalmıştır. Laminin ile yapılan pankreatik endokrin hücre kültüründe 4 hafta sonunda insülin pozitif hücre sayısında artış tespit edildiği bildirilmiştir (Edamura et al. 2003). Ancak çalışmamızda, insülin geni ifadesinde artış tespit edilmemiştir.

Vitronektin fetal dönemde pankreatik adacıkların yapısında bulunan bir proteindir (Cirulli et al. 2000). Ancak, fetal ve erişkin beta hücrelerinin bu matriks proteinine aynı oranda tutunduğu tespit edilmiştir (Kaido et al. 2004). Çalışmamızda, vitronektin için seçilen iki konsantrasyon değeri (5 µg/ml ve 0,125 µg/ml) toksisite analizlerinde benzer sonuçlar vermiştir ve beta hücrelerini *in vitro*'da destekledikleri belirlenmiştir. Ancak, gen ifade profillerine bakıldığında vitronektin 0,125 µg/ml oranında kullanıldığında *ins1*, *ins2*, *glut2*, *gck* ve *mafA* genlerinin hepsinin ifadesinde artış olurken 5 µg/ml oranında hücrelerde yalnızca *glut2* ve *mafA* gen ifadelerinde artış olduğu tespit edilmiştir.

Fibronektin kaplı yüzeylerde (20 µg/ml ve 1,25 µg/ml) devam eden kültürlerde, laminin ve kollajen tip-1 matriks proteinlerine göre daha yüksek LDH aktivitesi ve %20'ye yakın apoptoz oranı olduğu tespit edilmiştir. Ancak, toksisite testlerinde bu değerlerin kontrol grubunun altında kaldığı gözlenmiştir. Fibronektin, beta hücrelerinin kültür ortamında tutunmaları ve çoğalmalarını kullanılan diğer proteinler kadar desteklememiş, ancak matriks proteinlerinin kullanılmadığı mikroçevre ile karşılaştırıldığında hücrelerin

adezyonunu sağladığı belirlenmiştir. Beta hücrelerinin gen ifade düzeyi üzerindeki etkilerine bakıldığında *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadelerinde ileri derecede anlamlı bir düşüş olduğu, *gck*, *glut2* ve *mafA* genlerinde ise artış olduğu belirlenmiştir. Özellikle *glut2* geninin ifadesinde, 20 µg/ml grubunda 950 kat ve 1,25 µg/ml grubunda 730 kat artış olduğu tespit edilmiştir.

Matriks proteinleri ile yapılan analizler sonucunda insan kollajen tip-1 (2,5 µg/ml), laminin (2,5 µg/ml) ve vitronektin (0,125 µg/ml) proteinlerinin beta hücrelerinin canlılığını ve foksiyonlarını diğer proteinlerden daha iyi desteklediği belirlenmiştir. Laminin, 1,25 µg/ml oranında kullanıldığında beta hücrelerinin canlılığını daha iyi desteklese de hücrelerde fonksiyon ile ilişkili genlerin ifadelerini daha çok artıran 2,5 µg/ml konsantrasyon değerinin kullanılması uygun bulunmuştur. Seçilen matriks proteinlerinin karışımlarının beta hücre kültüründe daha verimli sonuçlar alınmasını sağlayabileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda endokrin pankreas yapısında bulunan tüm proteinlerin beta hücreleri üzerindeki etkilerini görebilmek, *in vivo*'ya en yakın mikroçevreyi sağlayabilmek amacıyla pankreatik adacıklardan protein ekstraktı elde edilerek analizler yapılmıştır. Protein ekstraktının hücreler üzerinde toksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Beta hücrelerinin protein karışımları ve endokrin pankreas protein ekstraktı ile kaplanan yüzeylerde canlılık oranlarına bakıldığında, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış ($p \leq 0,001$) olduğu belirlenmiştir. Kollajen tip-1 ve vitronektin proteinleri tek başına kullanıldığında hücrelerin çoğalmasını desteklememekte ancak 1:1 oranında karıştırıldığında beta hücrelerinde canlılık oranlarını önemli derecede artırmaktadır. Gen ifade profilinde ise, bu örneklerde *ins1* ve *ins2* genlerinde düşüş görülürken *gck*, *glut2* ve *mafA* genlerinde artış tespit edilmiştir.

Ortamdaki glukoz miktarı ve hormonlar tarafından düzenlenen *glut2* geni, beta hücrelerinden insülin salınımını düzenlemektedir (Leturque et al. 2009). Fibronektin (20µg/ml), kollajen tip-1 + vitronektin karışımı, kollajen tip-1 + laminin karışımı ve endokrin pankreas protein ekstraktı hücrelerde *glut2* ifadesini tek başına kullanılan diğer proteinlere göre daha fazla desteklemiştir ($p \leq 0,05$).

Yalnızca beta hücrelerinde ve göz hücrelerinde ifadesi olan *mafA* geni, beta hücrelerinde glukoz ile düzenlenmekte ve insülin genini aktifleştiren faktör olarak görev yapmaktadır (Kataoka et al. 2002). Kollajen tip-1 + laminin karışımının kullanıldığı kültür

koşullarında hücrelerde *mafA* geninin ifadesi diğer deney gruplarına göre daha fazla artış göstermiştir.

Glukoza duyarlı insülin salınımı mekanizmasında etkili olan *gck* genine ait iki promotor bölgesinden biri glukoz diğeri ise insülin ve glukagon tarafından düzenlenmektedir (Ijnedjian, 2009). Beta hücrelerinde etkin promotor bölgesi ise glukoz aracılığı ile düzenlenmektedir, ancak sıçanlarda yüksek glukoz seviyesi (30mM), *gck* geninin ifadesini değiştirmemekte, sabit durumda tutulmasını sağlamaktadır (Bae et al. 2010). Kollajen tip-1 + laminin karışımının *gck* gen ifadesini kullanılan diğer matriks proteinlerinin hepsinden daha fazla artırdığı belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

Matriks proteinlerinin hücrelerin fonksiyonları üzerindeki etkilerinin tespit edilmesi amacıyla yapılan insülin salınım testinde, *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadesini artırdığı tespit edilen vitronektin (0,125µg/ml), glukoz duyarlı insülin salınım mekanizmasında etkili olan *mafA* geninin ifadesini 26 kat artıran fibronektin (1,25µg/ml) proteinleri tek başlarına kullanılmıştır. Ayrıca, hazırlanan insan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) + laminin (2,5µg/ml) ve insan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) + vitronektin (0,125µg/ml) karışımları ile kaplı yüzeylerde hücrelerin salgıladıkları insülin miktarları ölçülmüştür. Fibronektin (1,25µg/ml) ve kollajen tip-1 + vitronektin karışımının 5mM glukoz içeren besi yerinde beta hücrelerinde insülin salgısını artırdığı belirlenmiştir ($p \leq 0,01$). Glukoz konsantrasyonu 11 mM olan besi yerinde devam eden kültür sistemlerinde yapılan analizlerde ise kollajen tip-1 + laminin karışımı dışındaki üç protein grubunda beta hücrelerinden salınan insülin miktarının arttığı gözlenmiştir ($p \leq 0,05$). Yüksek glukoz konsantrasyonunda (25mM) kültür edilen beta hücrelerinde protein kaplı yüzeyler kullanıldığında salgılanan insülin miktarı, düşük glukoz konsantrasyonlarındaki değerler ile aynı seviyelerde iken kontrol grubunda artış gösterdiği için insülin salınımının (25mM glukoz içerisinde) kontrol grubuna göre azaladığı belirlenmiştir. Hücreler deney gruplarında glukoz duyarlı insülin salınımı göstermemişlerdir.

Yenidoğan sıçanlarda fibronektinin insülin salınımını desteklediği bildirilmiştir (Homo-Delarche, 2001). 2006 yılında yayınlanan bir çalışmada ise vitronektin proteininin beta hücrelerinden insülin salınımını negatif yönde etkilediği bildirilmiştir (Kaido et al. 2006). Fibronektinin, üç boyutlu kültür sistemlerinde beta hücrelerinin insülin salınım miktarını etkilemediği rapor edilmiştir (Weber et al. 2008) Başka bir çalışmada ise fibronektin eklentisi yapılan süspansiyon kültürlerde adacıkların canlılık oranını ve insülin

salınımını artırdığı bildirilmiştir (Wang and Rosenberg, 1999). Çalışmamızda, *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadelerinin yalnızca vitronektin ile etkileşimde olan beta hücrelerinde anlamlı derecede arttığı gözlenmiş, salgılanan insülin miktarının ise fibronektin ve kollajen tip-1 + vitronektin karışımı ile kaplı yüzeylerde devam eden kültür ortamında anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, *in vivo* mikroçevreye en yakın olacağı ve beta hücrelerini en iyi destekleyeceği düşünülen endokrin pankreas protein ekstraktı hücre fonksiyonunun desteklenmesi açısından beklenildiği kadar etkin bulunmamıştır. Bunun nedeninin, kullanılan ekstraktın protein miktarının düşük olması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, kültür çalışmalarında matriks proteinlerinin (kollajen tip-1, laminin, fibronektin, vitronektin ve endokrin pankreas ekstraktı) ve protein karışımlarının beta hücrelerinin canlılıklarını ve fonksiyonlarını desteklediği belirlenmiştir. Kollajen tip-4 ve ECL matriksinin ise hücreler üzerindeki etkilerinin negatif yönde olduğu tespit edilmiştir. Kullanılan matriks proteinlerinin farklı konsantrasyonları beta hücrelerinin canlılığını değişik şekilde etkilemektedir. Laminin, 1,25 µg/ml oranında kullanıldığında sıçan pankreatik beta hücrelerinin canlılığını anlamlı derecede artırmaktadır. İnsan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) + laminin (2,5µg/ml), insan kollajen tip-1 (2,5µg/ml) + vitronektin (0,125µg/ml) karışımları ve endokrin pankreas ekstraktı ise, bu hücrelerin canlılık oranlarını ileri derecede anlamlı olarak artırmaktadır. Matriks yapısında yüksek miktarda bulunan, mekanik destek sağlayan kollajen tip-1 proteini ile yapılan karışımların *in vivo* mikroçevreye daha yakın bir ortam oluşturulmasına katkı sağladığı, bu nedenle beta hücrelerinin kültür kabına yapışma ve çoğalma miktarlarının arttığı düşünülmektedir.

Matriks proteinlerinin beta hücrelerinin fonksiyonları üzerindeki etkilerine bakıldığında ise fibronektin (1,25µg/ml) ve kollajen tip-1 (2,5µg/ml) + vitronektin karışımının (0,125µg/ml) insülin salınımını en iyi destekleyen proteinler olduğu tespit edilmiştir.

6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, farklı matriks proteinlerinin ve protein karışımlarının sıçan beta hücreleri üzerindeki etkileri; canlılık, toksisite, gen ifade profili ve fonksiyon açısından incelenmiştir. Kollajen tip-1, vitronektin, laminin ve fibronektin proteinlerinin ve endokrin pankreas ekstraktının beta hücrelerinin adezyonunu sağladığı ve toksik etkiye neden olmadığı tespit edilmiştir. Vitronektinin (0,125µg/ml) *ins1* ve *ins2* genlerinin ifadelerini artırdığı ve fibronektin ile kollajen tip-1 + vitronektin karışımının insülin salınımını artırarak hücrelerin fonksiyonunu desteklediği gözlenmiştir.

Çalışma çıktıları göz önüne alındığında, özellikle adacık nakilleri gibi tedavi yöntemlerinde izolasyon ve kültür aşamalarında matriks proteinlerinin kullanılması ile adacıkların canlılık ve fonksiyonlarının artırılmasının mümkün olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, diyabetin oluşum mekanizmalarının tanımlanması, farklı tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve beta hücrelerinin uzun süreli kültürünün yapılabilmesine yönelik yapılan araştırmalarda matriks proteinlerinin kullanılmasının önemi gösterilmiştir.

Bundan sonraki çalışmalarda ise *in vitro* kültür koşulları matriks proteinleri kullanılarak geliştirilmeye çalışılacaktır. Protein karışımlarının kültürde daha etkin olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle üçlü protein karışımları denenerek beta hücreleri üzerindeki etkileri araştırılacaktır. Ayrıca endokrin protein ekstraktının eldesi için daha fazla sayıda adacıktan yararlanılması ve protein konsantrasyonu artırılarak hücreler üzerindeki etkilerinin tekrar araştırılması planlanmaktadır. Beta hücrelerine *in vivo*'ya en yakın mikroçevrenin sağlanabilmesi ve matriks proteinlerinin etkilerinin daha ileri düzeyde gözlenebilmesi amacıyla üç boyutlu kültür sistemleri kurulacaktır.

Diyabetik fareler üzerinde

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: systemdic

STACK:

false