

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREATİK ADACIK MİKRO ÇEVRESİNDE KÜLTÜRE
EDİLEN FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN İNSÜLİN
ÜRETEN HÜCRELERE FARKLILAŞMA POTANSİYELİ**

İrem YILMAZ

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

KOCAELİ

2013

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREATİK ADACIK MİKRO ÇEVRESİNDE KÜLTÜRE
EDİLEN FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN İNSÜLİN
ÜRETEN HÜCRELERE FARKLILAŞMA POTANSİYELİ**

İrem YILMAZ

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

Danışman: Yard. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI

Destekleyen Kurum ve Proje Kodu: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
(TÜBİTAK)-111S296

KOCAELİ

2013

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: PANKREATİK ADACIK MİKRO ÇEVRESİNDE KÜLTÜRE EDİLEN FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN İNSÜLİN ÜRETEN HÜCRELERE FARKLILAŞMA POTANSİYELİ

Tez yazarı: İrem YILMAZ

Tez savunma tarihi:

Tez Danışmanı:Yard. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Prof. Dr. Erdal KARAÖZ	
ÜYE:	Doç Dr. Eray ÇALIŞKAN	
ÜYE(DANIŞMAN):	Yard. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI	
ÜYE:		
ÜYE:		

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../2013

Prof.Dr. Tuncay ÇOLAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Pankreatik Adacık Mikro Çevresinde Kültüre Edilen Fare Embriyonik Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücelere Farklılaşma Potansiyeli

Sunulan tez çalışmasında fare embriyonik fibroblastların üzerinde büyütülen fare embriyonik kök hücrelerinin (fEKH) fare pankreatik adacıkları ile aynı mikro-çevrede kültüre edilmesi sonucu bu hücrelerin insülin üreten hücelere farklılaşma potansiyellerinin gözlenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada, fEKH'lerinin insülin üreten hücelere farklılaşmasının başarılması durumunda, otoimmün bir hastalık olan tip 1 diyabetin radikal tedavisinde, şimdiye kadar denenmemiş kök hücre esaslı deneysel tedavi yönteminin ilk kanıtlarının gösterilebileceği düşünülmüştür.

Çalışmada fare embriyonik kök hücrelerinin besleyici tabakalar üzerinde uzun süreli kültürü sağlanmış, enzimatik yollarla elde edilen fare pankreatik adacıkları ile aynı mikro-çevreye koyularak insülin üreten hücelere farklılaşma potansiyelleri üzerine yoğunlaştırılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında fEKH'ler besleyici tabakalar üzerinde kültüre edilmiş, karakterizasyonu yapılmış ve aynı zamanda fare pankreatik adacıkları izole edilerek depolanmıştır.

İkinci kısımda ise fEKH'lerinin fare pankreatik adacıkları ile ortak kültürü gerçekleştirilmiştir. Bir sonraki aşamada ise ortak kültür sonucu hücrelerdeki farklılıklar analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, fare pankreasından izole edilmiş adacıklar ile aynı mikro-çevrede kültüre edilen fEKH'lerinden insülin üreten hücre farklılaşması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Böylece otoimmün bir hastalık olan tip 1 diyabetin radikal tedavisinde, şimdiye kadar denenmemiş kök hücre esaslı deneysel tedavi yönteminin ilk kanıtları gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fare embriyonik kök hücre, Pankreatik adacık, insülin üreten hücreler, farklılaşma potansiyeli.

ABSTRACT

Insulin Producing Cell Differentiation Potential Of Mouse Embryonic Stem Cells Cultured in Pancreatic Islet Microenvironment

In this thesis, mouse embryonic stem cells (mESCs) cultured with mouse embryonic fibroblasts, co-cultured with mouse pancreatic islets. The aim is to differentiate mESCs to insulin producing cells with co-culture techniques. If the results will make satisfied, differentiated cells could use for diabetes mellitus type 1. Replacement of insulin producing cells represents an almost ideal treatment for patients with diabetes mellitus type 1

Insulin producing cells generated from embryonic stem cells represent an attractive alternative.

The study on the long-term culture of mouse embryonic stem cells on feeder layers, put your mouse pancreatic islets, the insulin-producing cells in the same microenvironment focused on differentiation potentials.

The first step in this thesis mESCs cultured for long terms and characterized. At the same time mouse pancreatic islets isolated and deposited.

In the second part of the study, mouse pancreatic islets and mouse embryonic stem cells cultured in the same micro-environment. The last step was, analyzed the differentiated cells which cultured in the same microenvironment with mouse pancreatic islets.

As a result, the cells which cultured on the same microenvironment with mouse islets differentiated to insulin producing cells successfully. In this way, the radical treatment of Type 1 diabetes, which is an autoimmune disease, has shown.

Keywords: Pancreatic islet, Mouse embryonic stem cells, insulin producing cells, differentiation potential.

TEŞEKKÜR

Çalışma konumu belirleyerek bana yeni ufuklar açan, beni her zaman destekleyen veyardımlarını esirgemeyen, her türlü bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan bölüm başkanım sayın hocam, **Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**'e; çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen hocam **Yrd. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI**'ya;

Eğitim sürem boyunca gerek bilimsel gerek manevi anlamda büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm hocam, **Yard. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya; hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen hocam **Yard. Doç. Dr. Gülçin GACAR**'a; deneyimleriyle bana destek veren **Uzm. Biyolog Arzu TAŞ ÇAPUTÇU**'ya;

Tüm bilgilerini içtenlikle paylaşan, beni her zaman destekleyen çalışma arkadaşlarım ve ablalarım **Uzm. Tıbbi Biyolog Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**'na, **Uzm. Biyolog Özlem SAĞLAM**'a ve **Biyolog Gülay ERMAN**'a; yüksek lisans eğitimim boyunca gördüğüm yardımlarını ve arkadaşlıklarını hiç unutmayacağım **Araş. Gör. Çiğdem İNCİ**'ye ve **Biyolog Ayşegül BAĞLAR**'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda ve sosyal anlamda sonsuz desteklerini her zaman hissettiğim, tecrübe ve sıcaklıklarıyla her zaman yanımda olan ağabeyim **Tıbbi Lab. Tek. Alparslan OKCU**'ya, hayatım boyunca gerek bilimsel olarak gerekse sıcacık dostluklarıyla her anımda yanımda olacaklarından emin olduğum canım arkadaşlarım **Uzm. Biyolog Ayça AKSOY**'a ve **Biyolog Cansu SUBAŞI**'ya; lisans eğitimimden bu yana hayatımda önemli bir yeri olan hem bilimsel hem sosyal alandaki sonsuz desteği ile beni asla yalnız bırakmayan ve bırakmayacak olan sevgili arkadaşım **Biyolog Gizem TURAÇ**'a tüm kalbimle sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, 111S296 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Hızlı Destek Fonu'na teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini benden hiç eksik etmeyen büyük özveri ve sabırla 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.....	3
2.1. Kök Hücreler	3
2.2. Kök Hücre Çeşitleri.....	3
2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler.....	7
2.2.2. Embriyonik Kök Hücreler	8
2.3. EKH'lerin <i>in-vitro</i> Kültürleri	10
2.4. Diyabet	12
2.5. <i>In-vivo</i> pankreas gelişimi	14
2.5.1. Pankreasın Histogenezi.....	15
2.5.2. Pankreasın Moleküler Düzenlenmesi	16
2.6. Diyabet ve Kök Hücreler.....	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Kültürü	23
3.1.1. EKH'lerin Büyütüleceği Orta Petrilerin Jelatin ile Kaplanması	23
3.1.2. Besleyici Tabakanın Hazırlanması.....	23

3.1.3. Besleyici Tabakaların Üzerinde fEKH Kültürü	24
3.1.4. EKH'lerin Enzimatik Pasajı	25
3.1.5. EKH'lerin Dondurulması ve Saklanması	25
3.1.6. fEKH'lerin Çözme İşlemi	26
3.2. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Karakterizasyonu.....	26
3.2.1. fEKH'lerin İmmünohistokimyasal Analizi	26
3.2.1.1. fEKH'lerin Yüzey Antijen Profili	26
3.2.1.2. fEKH'lerin Alkalen Fosfataz Ekspresyon Analizi	26
3.3. fEKH'lerin <i>in vitro</i> Farklılaşma Analizleri	27
3.3.1. fEKH'lerinden Embriyoid Cisimcik Oluşturulması.....	27
3.4. Fare Pankreasından Langerhans Adacıklarının (PA) İzolasyonu ve Hücrelerin Karakterizasyonu	27
3.4.1. Fare Pankreas Adacıklarının İzolasyonu.....	27
3.4.2. Fare Pankreas Adacıklarının ve Hücrelerin Karakterizasyonu	28
3.5. Farklılaştırma Yöntemleri	29
3.5.1. fEKH'lerin <i>in-vitro</i> Koşullarda Kimyasal Yolla İnsülin Üreten Hücreye Farklılaştırılması.....	29
3.5.2. fEKH'lerin <i>in-vitro</i> Koşullarda Adacık Mikroçevresinde İnsülin Üreten Hücreye Farklılaştırılması.....	29
3.6. Farklılaştırma Sonrası Gerçekleştirilen Karakterizasyon Çalışmaları	29
3.6.1. İmmünohistokimyasal Analizler	29
3.6.2. Gen Ekspresyon Analizleri.....	30
3.6.3. fEKH Kaynaklı İnsülin Üreten Hücrelerin Fonksiyonel Çalışmaları	31
4. BULGULAR	32
4.1. Besleyici Tabakaların Hazırlanması.....	32
4.2. Besleyici Tabakaların Üzerine fEKH Kültürü	34
4.3. fEKH'lerin Karakterizasyonu	38
4.3.1. İmmünohistokimya.....	38

4.3.2. Alkalen Fosfataz Analizi	40
4.4. Embriyoid Cisimcik Oluşumu.....	40
4.5. Adacıklarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu	42
4.6. fEKH'lerin Kimyasal ve Adacık Mikroçevresinde Farklılaştırma Çalışmaları	45
4.6.1. fEKH'lerin <i>in-vitro</i> Koşullarda Kimyasal Yolla İnsülin Üreten Hücreye Farklılaştırılması.....	45
4.6.2. fEKH'lerin Langerhans Adacıkları ile İndirekt Ko-Kültürü	48
4.7. fEKH'lerin Farklılaştırma Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları.....	52
4.7.1. İmmunohistokimya.....	52
4.7.2. Gen Ekspresyon Analizleri	59
4.7.3. Fonksiyon Çalışmaları.....	63
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR DİZİNİ	74
ÖZGEÇMİŞ	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AB: Avrupa Birliği
ALP: Alkalen fofstotaz
a-SMA: alfa-düz kas aktin
bFGF: human basic Fibroblast Growth Factor
CO₂: Karbondioksit
dak: dakika
DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
DTZ: dithiozone
EC: Embriyoid cisimcik
ECM: Ekstraselüler matriks
EG hücre : Embriyonik germ hücre
EKH: Embriyonik Kök Hücre
FBS: Fetal Sığır Serumu
FCS : Fetal dana Serumu
FDA-PI (Floresan diasetat-Propidyum iyodür)
fEF: fare Embriyonik Fibroblast
fEKH: fare Embriyonik Kök Hücre
HBSS: Hank's Buffered Salt Solution
IVF : In vitro fertilizasyon
iEKH: insan Embriyonik kök hücre
İHK: iç hücre kitlesi
L: litre
LIF : Lökemi İnhibitör Faktör
MEF: Mouse embryonic fibroblast
MKH: Mezenkimal Kök Hücre
ml: mililitre
mm: milimetre
mM: milimolar
Oct-4: Germline- specific transcription factor
PA: Pankreatik adacık
PBS: Fosfat tamponu
Pdx-1: pankreatik duodonal homeobox faktör-1
PFA: Paraformaldehit
SSEA-1: Stage Secific Embryonic Antigen-1
uPKH: uyarılmış pluripotent kök hücre
YFP: Yeşil floresans proteini
µm: mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Asılı damla yöntemi ve süspansiyon kültüre alınarak elde edilen EC'lerin görüntüleri	11
Şekil 2.2. İnsülin salınımının insan vücudunda normal metabolizması	13
Şekil 2.3. <i>In-vivo</i> pankreasın moleküler düzenlenmesi	17
Şekil 2.4. Çalışmada kullanılan ko-kültür ortamını oluştururken kullanılan porlu yapıdaki membrana sahip ayraçlar (inserts), adacıklar ve EKH'lerin şematik çizimi.....	22
Şekil 4.1: Mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblastlarının jelatin kaplı kültür kaplarındaki morfolojileri zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	32
Şekil 4.2. fEF'lerin mitotik aktivitesinin durdurulması için 10 mg/ml Mitomisin C uygulanması sonrası hücre siklusu analizi	33
Şekil 4.3: fEF'lerin mitotik aktivitesinin durdurulması için Gama ışınması yönteminin uygulanması sonrası hücre siklusu analizi	33
Şekil 4.4: fEKH'lerinin kültürün 1. gününde EKH'ye özgü koloni oluşturma şekilleri ve hücrelerin sınırları zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	35
Şekil 4.5: fEKH'lerinin kültürün 2. gününde kolonilerin büyüdüğü zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	36
Şekil 4.6: fEKH'lerinin kültürün 3. gününde kolonilerin birbirlerine yaklaştıkları zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	37
Şekil 4.7: fEKH'lerin pasaj 40'ta besleyici tabaka üzerinde farklılaşmadan kaldığı ve morfolojilerinin korunduğu zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	37
Şekil 4.8: Nanog, Oct-4, Sox-2 ve α -SMA için immün boyanmış fEKH'lerinin pozitif reaksiyonları	39
Şekil 4.9: fEKH kolonilerinde ALP aktivitesi	40
Şekil 4.10: Asılı damla yöntemi ile oluşturulmuş EC'ler	41
Şekil 4.11: Süspansiyon kültürü yöntemiyle elde edilen EC'ler zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	41
Şekil 4.12: Fare pankreasından izole edilmiş ve stereo mikroskop altında mikro pipetle seçilen Langerhans adacıklarının morfolojileri	42
Şekil 4.13: DTZ ile boyanmış adacıkların zıt faz mikroskop görüntüleri	43

Şekil 4.14: Adacıkların canlılığını gösteren FDA-PI boyamaları.....	44
Şekil 4.15: Kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınmadan önce EC'lerin kültür kabının tabanına yapıştığı ve yayıldığı zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	45
Şekil 4.16: <i>In vitro</i> koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınan EC'lerin çeşitli günlerdeki morfolojik değişimleri zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	48
Şekil 4.17: Ko-kültür öncesi EC'lerin kültür kabının tabanına yapıştığı ve yayıldığı zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	48
Şekil 4.18: İnsertler üzerine yerleştirilmiş fare adacıkları ve insert altında kültür kabının tabanına yapışan EC'ler zıt faz mikroskobundaki görüntüleri	49
Şekil 4.19: Adacıklarla doğrudan olmayan ortak kültüre alınan EC'lerin farklı günlerdeki morfolojik değişimlerinin zıt faz mikroskobik görünümüleri	52
Şekil 4.20: fEKH'lerden elde edilen EC'lerde insülin, PDX1 ve SSEA1 ekspresyonları	53
Şekil 4.21: fEKH'lerin <i>in vitro</i> koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda SSEA1 ve insülin ile boyanması	54
Şekil 4.22: fEKH'lerin <i>in vitro</i> koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda insülin ve PDX1 ile boyanması	55
Şekil 4.23: fEKH'lerin <i>in vitro</i> koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda c-peptid ve PDX1 ile boyanması	56
Şekil 4.24: fEKH'lerin <i>in vitro</i> koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması yoluyla farklılaşmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda SSEA1 ve insülin ile boyanması	57
Şekil 4.25: fEKH'lerin <i>in vitro</i> koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması yoluyla farklılaşmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda insülin ve PDX1 ile boyanması	58
Şekil 4.26: fEKH'lerin <i>in vitro</i> koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması yoluyla farklılaşmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda C-peptid vePDX1 ile boyanması	59
Şekil 4.27: fEKH'lerin insülin üreten hücrelere farklılaştırılmasının 21. gününde gen ekspresyon analizleri	60
Şekil 4.28: fEKH'lerin insülin üreten hücrelere farklılaştırılmasının 30. gününde gen ekspresyon analizleri	61

Şekil 4.29: fEKH'lerin kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılması ile farklılaştırılmasının 21. ve 30. günlerinde Real-Time PCR ile karşılaştırmalı gen ekspresyon analizleri	62
Şekil 4.30: fEKH'lerin ko-kültür ile farklılaştırılmasının 21. ve 30. günlerinde Real-Time PCR ile karşılaştırmalı gen ekspresyon analizleri	63
Şekil 4.31: fEKH'lerin ko-kültür ile farklılaştırma sonrası 30. günde glikoza bağımlı insülin salınımının ELIZA analizi	64
Şekil 4.32: fEKH'lerin kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılması ile farklılaştırılması sonrası 30. günde glikoza bağımlı insülin salınımının ELIZA analizi	64
Şekil 4.33: EKH'lerin farklılaştırma sonrası uyarılma indeksleri	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1: Besleyici tabaka hücrelerinin besiyeri hazırlanması	24
Çizelge 3.2: fEKH'lerin besleyici tabaka üzerinde kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri .	25
Çizelge 3.3: Real time PCR ile insülin üreten hücelere özgü belirteçler ve fonksiyonları	30
Çizelge 4.1: Mitomisin C ve gama ışınma ile mitotik aktivitesi durdurulmuş hücrelerin hücre siklus analizleri.....	34

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı ve uzun ömürlü hayatların yaşanmasını sağlamak amacıyla insanlar tarih boyunca hastalıklara çare bulmaya çalışmışlardır. Tıp alanındaki yeni gelişmelerle çalışmalar farklı boyutlar almış ve yeni yöntemler keşfedilmeye başlanmıştır. Son günlerin en çok konuşulan, geleceğin tedavi yöntemi gözüyle bakılan “kök hücreler”, tedavisi henüz kesin olarak bulunamayan birçok hastalık için de umut vericidir.

Kök hücrelerin bu kadar umut verici olarak gözükmeleri, onların diğer vücut hücrelerinden; uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme, özelleşmemiş farklı hücre tiplerine farklılaşabilme ve hasarlı dokularda dokunun işlevinin tekrardan yerine getirilmesini sağlama yetenekleri ile ayrılmalarından dolayıdır. Temel olarak kök hücreleri iki ana grupta toplayabiliriz; embriyonik kök hücreler (EKH) ve erişkin kaynaklı stromal ya da mezenkimal kök hücreler (MKH).

EKH'ler neredeyse limitsiz proliferasyon özelliği ve germ tabakalarının tüm hücre türevlerine farklılaşabilme özelliği ile tanımlanırlar. Kök hücrelerin keşfinden sonra, özellikle EKH'lerin bu özelliklerinden dolayı, insanlara tedavisi henüz kesin olarak bulunamayan birçok hastalık umut verici duruma gelmiştir. Günümüzde birçok insanın yakalandığı diyabet, henüz tam olarak tedavisi bulunamamış olan hastalıklardan biridir.

Diyabet, kandaki şekerin anormal şekilde yüksek olduğu bir hastalıklar grubu olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde tüm dünyada yaklaşık olarak 240 milyon insanı etkilemekle birlikte bu sayı artmaya devam etmektedir. Ülkemizde ise 2,6 milyon diyabetli ve 2,4 milyon diyabet adayı olmak üzere toplam 5 milyon kişilik bir popülasyonu ilgilendiren bir sağlık sorunudur ve pluripotent özellikteki EKH'ler rejeneratif tedavilerde kullanılmak üzere pankreatik hücreler için de potansiyel sınırsız kaynaktır.

Esas olarak farelerin pankreasından elde edilmiş olan Langerhans adacıklarından sentezlenen eriyebilir moleküller ile ko-kültürde bulunan fare EKH kaynaklı embriyoid cisimcikler (EC) üzerinde indüksiyon yaparak, işlevsel adacık hücrelerine (insülin, glukagon, pankreatik polipeptit ve somatostatin salgılayan hücrelere) farklılaşmalarını

amaçlayan bu tezde fEKH'lerinin fare pankreas adacıkları ile doğrudan olmayan/indirekt (hücre-adacık teması olmaksızın) ko-kültürün fEKH'lerin adacık hücrelerine farklılaşma potansiyeli üzerindeki etkilerini immunofenotipik, immunogenetik, ve fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmesinin yer alması planlanmıştır.

Pankreas hasarlarının hücresel tedavisinin ko-kültür denemeleriyle başarılması durumunda, halen dünyada 50'ye yakın merkezde allojenik nakil amaçlı kadavradan zaten başarıyla izole edilmekte olan adacıklar, kök hücre ile ko-kültür çalışmalarında kullanılabilir. Çünkü hali hazırda uygulanmakta olan nakil yönteminde nakledilecek adacık sayısı yetersiz kalmaktadır. Eğer kök hücreden farklılaştırma yöntemleri geliştirilirse istenilen sayıya ulaşılabilir. Uzun dönemde ise, daha ileri moleküler düzeydeki araştırmalar gerçekleştirilerek bu kök hücrelerin farklılaşma süreçlerinde rol oynayan sinyal moleküllerinin ve yolaklarının açığa çıkarılmasıyla laboratuvarında kök hücreden doğrudan farklılaştırma sağlanabilir.

Deneyin ilk aşamasında EKH'ler fare embriyonik fibroblastları (fEF) üzerinde ve Lösemi İnhibitör Faktör (LIF) varlığında kültüre edilerek çoğaltılıp, ilerleyen pasajlarla pluripotent hücre özelliklerini korumaları sağlanmıştır. İkinci aşamada, EKH'lerin *in vitro* koşullarda adacık mikroçevresinde (ko-kültür tekniği ile) insülin benzeri hücrelere farklılaşması incelenmiştir. Bu tekniklerin kullanılmasındaki asıl amaç *in-vivo* gelişim sürecini *in-vitro*'da taklit ederek farklılaşmanın gerçekleşmesini sağlamaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kök Hücreler

Kök hücreler, vücudumuzdaki farklı özelleşmiş hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip, kendini yenileyebilen ve sınırsız çoğalma kapasitesi bulunan öncül hücrelerdir (Hayes, 2006). Bu hücrelerde, her bölünme sonucunda kısalan telomer adı verilen Deoksiribonükleik asit (DNA) bölgelerini (insanda TTAGGG) kendi Ribonükleik asit (RNA) kalıbını kullanarak ifade eden, telomerciz enzim aktivitesi yüksektir. Bu durum onlara bölünmelerinin teorik olarak sınırsız olması özelliği kazandırır. Bunun aksine, söz konusu enzim, vücut hücrelerinde aktif olmadığı için, belli bir bölünmeden sonra vücut hücreleri canlılığını yitirecektir (Yui et al., 1998, Karaöz ve Ovalı, 2004).

Farklılaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneğinin yanı sıra; tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

2.2.Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler esas itibarıyla iki farklı kaynaktan elde edilirler. Bu kaynaklar embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler olarak belirtilebilir (Karaöz ve Ovalı, 2004). Embriyonik kök hücreler başlı başına bir grubu oluştururken embriyonik olmayan kök hücreler elde edildikleri kaynaklar açısından farklı gruplara ayrılmaktadır.

Diğer vücut hücrelerinden uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme, özelleşmemiş farklı hücre tiplerine farklılaşabilme ve hasarlı dokularda dokunun işlevinin tekrardan yerine getirilmesini sağlama yetenekleri ile diğer vücut

hücrelerinden ayrılan kök hücreler, temel olarak iki ana grupta (embriyonik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler) toplansalar da bu hücreler çeşitli farklılaşma potansiyellerine göre de sınıflandırılabilirler.

Totipotent hücreler embriyoyu ve ekstra-embriyonik dokular olarak adlandırılan embriyoya ait embriyonik membran ve dokuları oluşturma yeteneğindedirler. Yani totipotent kök hücreler vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilen ve bir organizmayı meydana getirebilen hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler de vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilen ancak bir organizmayı meydana getirebilecek yeteneğe sahip olmayan hücrelerdir. Çünkü bu kök hücreler ekstra-embriyonik yapıları oluşturamazlar. Pluripotent kök hücrelere verilebilecek örnekler **embriyonik kök hücreler (EKH'ler)** ve uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPKH'ler)' dir.

uPKH adı verilen hücreler, somatik olan hücrelere 'Yamanaka faktörleri' adı verilen Oct4, Sox2, c-Myc ve Klf4 adlı genlerin aktarılmasıyla somatik hücrelere pluripotentlik özelliğinin kazandırılmasıyla oluşur (Takahashi et. al, 2006). Bu hücreler aynı embriyonik kök hücrelere benzemektedir. Etik tartışmalar nedeniyle EKH'lere alternatif olarak kullanılmanın yanında bazı hastalıklar için de umut vaat etmektedirler.

Sperm ve yumurta hücresi birleştikten sonra oluşan totipotent hücre, -zigot-bölünerek yine totipotent blastomerleri oluşturur ve embriyo gelişimine devam eder. Daha sonra, içi boşluklu (blastosöl) sferi oluşturup blastosist denilen aşamaya büyümeye başlar. Blastosistte, embriyoların oluşturduğu iç hücre kitlesi (İHK) adı verilen yapı, vücudun 3 germ tabakasını oluşturur (ektoderm, endoderm ve mezoderm) (Wang, 2002). İHK daha sonra embriyoyu meydana getirir ve İHK, EKH kaynağıdır. EKH'ler vücuttaki tüm hücreleri üretebilir. Ancak fonksiyonel ve tam bir organizmayı kendi kendine oluşturamazlar (Wide Potential, 2004).

Diğer bir grup ise multipotent kök hücrelerdir ki bu hücreler sınırlı hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir (Wang, 2002). Bu hücreler buldukları dokuya özgü hücrelere ve sınırlı farklı doku hücrelerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (Gritti A 2002, Vatz 2002). Multipotent kök hücreler yani diğer bir deyişle erişkin kök hücreler tüm dokularda

bulunur. Bu hücreler de diğer kök hücreler gibi kendi kendilerini yenileyebilirler (Wang, 2002).

Son olarak unipotent yani progenitör hücreler sayılmaktadır ki bu hücreler de sadece çok özel hatlara farklılaşma eğilimde olan hücrelerdir (Gerecht-Nir, 2003, Gardner R.L. 2002).

EKH'ler, blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent hücrelerdir ve ilk olarak 3,5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (Evans ve Kaufmann 1981 ve Martin 1981). EKH'ler pluripotent hücre olarak tanımlanmaktadırlar EKH'ler tüm vücut hücrelerine farklılaşabilmesine rağmen embriyonun zarlarını meydana getiren trofoektoderm hücrelerine farklılaşamaz (Smith G.A, 2001). EKH'ler, alıcı blastosistlere transfer edildiklerinde pluripotent özelliklerini korurlar ve organizmanın primitif üç katmanına ait (endoderm, mezoderm ve ektoderm) hücelere ve hatta germ hücrelerine de farklılaşabilirler (Stravidis ve Smith 2003; Keller 1995). Bu hücreler embriyoya geri verildiklerinde eşey hattı da dahil olmak üzere tüm dokuların oluşumuna katılarak kimerik canlıların oluşumunu sağlarlar (Arat S 1997 ve 2000, Cetinkaya 2004).

EKH'ler morfolojik olarak bu hücreler bol sitoplazmalı ve büyük çekirdekli yapılara sahiptirler. Bu hücrelerin temelde karakteristik özellikleri, pluripotent farklılaşma kapasiteleri ve alkalen fosfataz enzim aktivitelerinin yüksek oluşu. Oct3/4 ve Sox2 gibi pluripotensi genlerinin ifadesi (Yu and Thomson, 2006) ve hücre sikluslarında kısa G1 fazına sahip olmalarıdır (Rohwedel 1996, Guan 1998).

EKH'ler birçok hastalığa çare olma potansiyeline rağmen EKII araştırmaları başta etik olmak üzere, din ve politik nedenlerden dolayı yasal olarak kısıtlama ve sınırlamalar ile karşı karşıyadır. Çünkü bazı toplumlarda EKH elde etmek embriyoyu hasarlamak ve hatta embriyoyu öldürmek olarak anlaşılmaktadır (Friedrich, 2004).

Embriyonik olmayan kök hücreleri kaynaklarına göre birçok farklı grupta sınıflandırmak mümkündür:

- a) Erişkin kök hücreleri (Doku özgün kök hücre, postnatal kök hücre)
- b) Fetüs kök hücreleri
- c) Kadavradan elde edilen kök hücreler
- d) Partenot hücreleri (Partenogenezis)
- e) Göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri (Karaöz, Ovalı, 2004)

Erişkin kök hücrelerinin, diğer tüm kök hücreler gibi iki önemli özelliği vardır. Birincisi, uzun süre kendilerini kopyalayabilme özelliğine sahiptirler. Erişkin dokulardaki öncü ve özelleşmiş hücrelere farklılaşma yeteneğindedirler. Daha çok elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri vardır ve multipotent kök hücrelerdir (İnan S., Özbilgin K. 2009). Erişkin kök hücreler, EKH'lerde var olan teratom oluşturma riski, etik sorunların olmaması ve dokuya özgü olabilmesi nedeniyle, yenileyici tıpta tedaviye yönelik araştırmalarda çok sık olarak tercih edilmektedir.

Erişkin kök hücreler; hematopoietik kök hücreleri, stromal kök hücreler (mezenkimal kök hücreleri), organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri şeklinde sınıflandırabilmektedir (Karaöz, Ovalı, 2004).

Hematopoietik kök hücreleri, erişkin insanlardan izole edilebilen az sayıdaki kök hücrelerden biridir. Esas itibarıyla, kemik iliğinde yerleşik olan hematopoietik kök hücreleri normalde fetüsün karaciğerinde, dalağında, göbek kordonunda, plasentada ve erişkin periferik kanında bulunurlar. Bugün için hematopoietik kök hücrelerle ilişkili araştırmalar; kemik iliği, periferik kan ve kordon kanı kök hücreleri üzerinde yoğunlaşmışlardır (Karaöz, Ovalı, 2004).

Organ veya dokuya özgü hücreleri gerektiğinde oluşturmak veya oluşmasına destek vermek için organ veya dokuların çeşitli kısımlarına yerleşmiş öncül hücrelerdir. Bu hücrelere en belirgin örnekler, çizgili kasta bulunan ve suskun halde bulunarak gerektiğinde hasar gören kas liflerini onaran satellit hücreleri ile pankreastaki insülin üreten Langerhans adacıklarında bulunan adacık kök hücreleridir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Meyer et al. 2009). Bazı durumlarda, özellikle kemik iliği kök hücrelerinin mobilizasyonu temeline dayanan yöntemlerin kullanılması invazif olmayan bir seçenek sağlamaktadır. Bunun yanında, son zamanlarda doku ya da organlardaki (beyin gibi) kök hücrelerini aktive edebilmek için dışarıdan büyüme faktörleri ve hormonlar vermenin olumlu sonuçları bildirilmiştir (Oberpriller, 1991).

2.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlanmıştır (Fridenshtein, 1982). MKH'lerin ana kaynağı kemik iliği olmakla beraber birçok dokudan izole edilebileceği bilinmektedir. Bu dokuların başlıcaları, dental pulpa, sinovial sıvı, adet kanı ve yağ dokuları, kordon kanı ve matriksidir. Bu hücreler buldukları dokularda, 'Mezengenezis hipotezi'ne göre çoğalma, yönelim, seviye ilerleme, farklılaşma aşamalarından geçerek ilgili hücre tipine farklılaşırlar. Böylece vücutta doku onarımının başrol oyuncularını olarak görev alırlar (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Kemik iliğindeki mezenkimal öncüllerin sadece mezenkimal öncül hücreler için değil, aynı zamanda kemik iliğinde bulunan hemetopoetik öncüllerin ve mezenkimal kökenli olmayan diğer stromal hücrelerin gelişimi için de uyarıcı / düzenleyici sinyaller üreten stromal bir mikro çevrenin oluşumuna ve işlev görmesine katkı sağladığına ilişkin bulguları teşkil etmektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

MKH'lerde karakteristik özellik olarak yüzeye yapışabilir olma, kolonizasyon gösterme, yüzey antijen ekspresyonu ve osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşma eğilimi sayılabilir. Hücrelerin izolasyon ve kültürünün kolay olması ayrıca yüksek *ex vivo* potansiyelinin olması bu hücreleri tedavi edici bir araç haline getirmektedir. Bunun yanı sıra tüm dokularda, destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler.

MKH'lerin kesin bir yüzey belirteçleri olmamakla birlikte bu hücreler klinik veya araştırma amaçlı kullanılmadan önce akım sitometrisi yöntemiyle mutlaka CD 13, CD 29, CD 44, CD 90, CD 73, CD 105, CD 46, CD 166, HLA ABC pozitif; CD 3, CD 8, CD 11b, CD 14, CD 15, CD 19, CD 33, CD 34, CD 45, CD 117 ve HLA-DR negatif olmaları açısından karakterize edilmelidir (Dominici et al., 2006).

MKH'ler bugün, özellikle immunoregülatör özellikleri ve rejenerasyon kapasiteleri nedeniyle klinik kullanıma girmeleriyle Avrupa Birliği (AB) tıp ajansı tarafından İlaç Hücre (Cell Drug) kapsamına alınmıştır (Sensebe, 2008). MKH'lerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikro-çevre koşullarında, başta bağlayıcı doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır.

Çok sayıda yeni çalışma MKH'lerin mezodermin dışında kalan endotel, nöroektoderm ve endoderm dahil olmak üzere çok çeşitli hücrelerin karakterlerini kazanabileceklerini bildirmektedir. MKH'lerin kullanıldığı tüm çalışmalarda *in vitro* olarak çok sayıda pasajdan geçirilerek kültürü yapılmış hücreler kullanıldığı için bu çalışmalar, plastisitesi olan hücrelerde kendini yenileme özelliğinin de olduğunu göstermektedir (Weissman, 2000).

2.2.2.Embriyonik Kök Hücreler

Pluripotent kök hücreler vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip olduklarından farklılaşma çalışmaları için önemli bir yere sahiptirler. Memeli embriyosundan üç farklı pluripotent kök hücre hattı yayınlanmıştır. Bunlar: Embriyonik karsinoma, embriyonik kök ve embriyonik germ hücreleridir (Boheler 2002).

Bilim insanlarının 1964 yılında embriyonik karsinoma hücrelerini bulmalarının ardından, bu hücrelerin kök hücrelere benzer özellikler göstermesinin fark edilmesiyle 1981 yılında ilk kez 3,5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden '**fare embriyonik kök hücreler (fEKH'ler)**' izole edilmiştir (Evans&Kaufmann 1981 ve Martin 1981). *In vitro* koşullarda embriyoların yetiştirilmesinin gelişmesiyle EKH'lerin embriyolardan elde

edilmesi daha da gelişmiştir (Gail R. Martin). Elde edilen bu hücreler besleyici tabakalar üzerinde yetiştirilerek zamanla fEKH'lerin kültüründe belli bir düzeye gelen bilim adamlarından James Thomson (University of Wisconsin-Madison) 1998 yılında ilk kez geliştirdiği teknikle **'insan embriyonik kök hücreleri (iEKH)**'ni izole etmiş ve bunların *in vitro* koşullarda kültürünü sağlamıştır.

Bu gelişimden sonra birçok laboratuvar tarafından izolasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve günümüzde NIH insan embriyonik kök hücre kütüphanesince kabul edilen ve araştırmalar için kullanıma uygun olarak kabul edilen 211 adet farklı iEKH hattı mevcuttur (http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm).

iEKH'lerinin keşfinden sonra çeşitli etik sebeplerden dolayı Türkiye'nin de içinde bulunduğu çeşitli ülkelerde iEKH'leri ile çalışılması yasalarca yasaklanmıştır. Bu nedenle bu tez çalışması fEKH'ler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

EKH'lerin *in vitro* kültür ortamında koloniler oluşturarak gelişme gösterdikleri görülmüştür. Bu hücrelerin kültür ortamında ektoderme, endoderme ve mezoderme farklılaşma gösterdikleri ancak trofoektoderme farklılaşmadıkları görülmüştür (Edwards, 2002). Bu da EKH'lerden tam bir organizma oluşamayacağını kanıtlar.

fEKH hatlarının kültür ortamında yetiştirilmesi geliştikçe bu hücrelerin bazı ortak özellikler gösterdiği belirlenmiştir. fEKH'leri erken blastosist sürecine ait bazı genleri eksprese etmektedirler. EKH'lerin ortak özellikleri:

Pluripotent farklılaşma kapasitesi

Alkalın fosfataz ekspresyonu

SSEA-1 ve SSEA-3 ekspresyonu (Krupnick et al., 1994)

"POU domain transcription factor" Oct 3/4 ekspresyonu (Rosner et al., 1990; Scholer et al., 1990)

"Homeobox domain transcription factor" SOX-2 ekspresyonu (Yuan et al., 1995)

Hücre sikluslarında kısa G1 fazına sahip olmalarıdır.

2.3.EKH'lerin *in-vitro* Kùltürleri

EKH kùltüründe iki ana yöntem mevcuttur. Bu hücrelerin farklılaşmadan uzun süreli kùltürü, besleyici tabakalar üzerinde yada besleyici tabaka olmaksızın sürdürülebilmektedir (Smith and Hooper, 1987; Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Bunlardan birincisi mitotik aktivitesi durdurulmuş besleyici tabaka üzerinde EKH kùltürüdür. EKH'ler *in vitro* şartlarda besleyici hücre tabakası ve bazı önemli sitokinlerin varlığında farklılaşmadan uzun süre pasajlanabilmektedirler. Burada besleyici tabaka olarak en çok fare embriyonik fibroblastları (fEF) (Mouse embryonic fibroblast; MEF) kullanılmaktadır. Bu yaklaşımda besleyici tabaka, EKH'lerin gelişimleri ve farklılaşmadan büyümeleri için onlara mikro-çevre oluşturur. Besleyici tabaka hücreleri Gremlin, Aktivin A, TGFb gibi önemli çözünebilir molekül kokteyli olarak görev almaktadır. Bu hücreler sitokin karışımı ve çok özel hücre-hücre iletişimleri ile EKH'lerin uzun süre zarfları boyunca farklılaşmadan büyüme ve çoğalmasını sağlarlar (Fleischmann et al 2009).

Özellikle iEKH'lerde fare besleyici tabakasından kaynaklanabilecek patojen aktarımını engellemek amacıyla son zamanlarda insan sünnet derisi fibroblastları da besleyici tabaka olarak kullanılmaya başlanmıştır. fEKH'lerinin de bu besleyici tabakalar üzerinde ve Leukemia inhibitory factor (LIF) varlığında uzun süre farklılaşmadan kaldıkları gösterilmiştir (Rippon ve Bishop 2004). LIF/STAT3 sinyali hücre hattının kendini yenilemesini ve pluripotensi özelliğini korumasını sağlar (Cartwright et al., 2005, Matsuda et al., 1999, Niwa et al., 1998). Besleyici tabakalar ve LIF kùltür ortamından uzaklaştırıldığında EKH'ler kendiliğinden olarak farklılaşırlar (Keller 1995, Bain 1995).

Gelecekte olası tedavi yöntemlerinden biri olarak görülen kök hücre tedavilerinde insanlarda klinik uygulamaların gerçekleşebilmesi için hücre kùltüründe hayvan kaynaklı bileşenlerin olmaması gerekmektedir. Bu gereksinimden yola çıkılarak EKH'lerin üzerinde tutunarak gelişimlerini sürdürdükleri ve besleyici tabaka olarak adlandırılan hücrelerin salgıladıkları sinyalleri içeren ve bu besleyici tabakaya ihtiyaç duyulmasını ortadan kaldıran yöntemler geliştirilmiştir. Bu sistemlere "besleyici tabakasız (feeder free) sistemler" adı verilmektedir (Boheler 2009).

Besleyici tabakasız sistemlerde EKH'lerin tutunmasını sağlamak amacıyla kültür kapları matrijel (soluble basement membrane extract of the Engelbreth–Holm–Swarm mouse tumor), laminin ve fibronektin adı verilen organik karışımlarla kaplanmaktadır. Bu yöntemde fEF üzerinden alınan EKH'ler öncelikle fEF kondisyonlanmış besiyeri varlığında besleyici tabakasız sisteme geçirilir ve LIF tek başına yetersiz kalacağından dolayı besiyerine ek olarak bFGF ve diğer gerekli kimyasallar konulur.

EKH'ler süspansiyon kültürlerinde üç boyutlu hücre agregatları oluştururlar ve bu üç boyutlu yapı, embriyoid cisimcik (EC) olarak adlandırılır (Bain 1995, Frachierd 1995, Keller 1995). EC'ler incelendiğinde farklılaşmış ve farklılaşmamış hücre gruplarından oluşan bir yapı olduğu görülür. Bu yapının dış yüzeyindeki endodermal hücreler ve içindeki boşluk ile 6 günlük bir embriyoya benzediği gösterilmiştir (O'Shea 1999). EC'ler üç germ yaprağına ait hücrelerin tümünü içerir (Rippon ve Bishop 2004, Itskovitz-Eldor 2000).

EC, pluripotent kök hücrelerin besleyici tabakadan ayrılıp bakteriyolojik kültür kaplarına alınması sonrası agregatlar oluşturmasıyla ya da asılı damla yönteminin (Hanging drop) uygulanmasıyla meydana gelir.



Şekil 2.1: Asılı damla yöntemi ve süspansiyon kültürüne alınarak elde edilen EC'lerin görüntüleri (www.nature.com/nprot/journal/v6/n7/covers/index.html)

EC'ler *in vivo*'da teratom tümörlerinden meydana gelmektedir (Stevens, 1960). *In vitro*'da ise ilk kez teratokarsinoma hücrelerinden elde edilmiştir (Martin et al., 1977). Daha sonrasında fEKH'lerden (Doetschman et al., 1985; Keller, 1995; Leahy et al., 1999)

ve uPKH'lerden elde edilmiştir (Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007, Rust et al., 2006; Thomson et al., 1998; Yu et al., 2007).

Günümüzde iEKH ve uPKH'lerinden EC oluşumu genellikle farklılaşma protokollerinde ilk sıradadır (Murry and Keller, 2008). EC oluşumuyla artık EKH'ler pluripotent özelliklerini yavaş yavaş kaybeder ve farklılaşmaya başlar. Bu süreçte istenilen kimyasallar besiyerine eklenecek EKH'lerin istenilen yönde farklılaşması sağlanabilmektedir.

Kök hücrelerin keşfinden sonra, özellikle EKH'lerin tüm bu özelliklerinden dolayı, EKH'ler insanlara tedavisi henüz kesin olarak bulunamayan birçok hastalık için umut verici duruma gelmiştir. Günümüzde birçok insanın yakalandığı diyabet olarak adlandırılan şeker hastalığı da henüz tam olarak tedavisi bulunamamış olan hastalıklardan biridir.

2.4.Diyabet

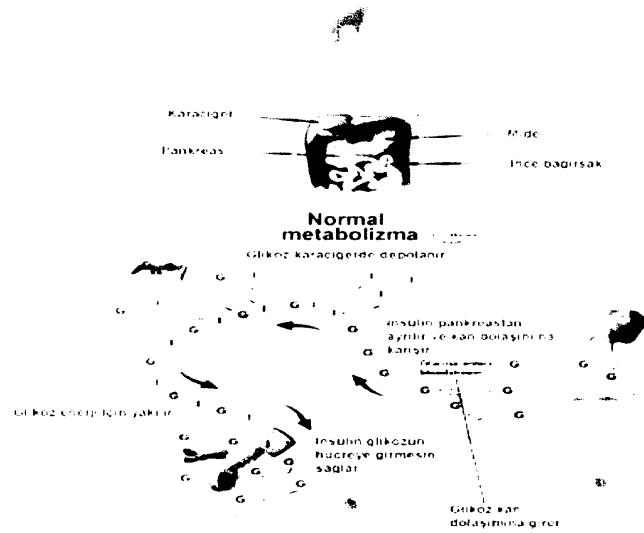
Diyabet, kandaki şekerin anormal şekilde yüksek olduğu bir hastalıklar grubu olarak tanımlanmaktadır. Günümüzde tüm dünyada yaklaşık olarak 240 milyon insanı etkilemekle birlikte bu sayı artmaya devam etmektedir. Ülkemizde ise 2,6 milyon diyabetli ve 2,4 milyon diyabet adayı olmak üzere toplam 5 milyon kişilik bir popülasyonu ilgilendiren bir sağlık sorunudur. Pankreasın hormonal salgı birimleri olan Langerhans adacıklarından salgılanan insülin polipeptit yapılı ve vücuttaki karbonhidrat dengesinin sağlanmasında glukagon ile birlikte rol alan bir hormondur. Kan şekerini düşürücü etki yapar. Karbonhidrat dengesinin sağlanmasının yanında karbonhidrat metabolizması ile ilişki içinde bulunan yağ ve protein metabolizmaları üzerinde de önemi vardır. İnsülin, kandaki şeker oranını kontrol eder. İnsanların bir şeyler yeme ve içmesiyle, yiyecekler şekerin de içinde bulunduğu küçük moleküllere parçalanır. Vücut, şekere normal fonksiyonları için ihtiyaç duyar. Şeker kan dolaşımında absorbe edilir ve pankreası insülin salgılaması için uyarır. Salgılanan insülin, şekerin kan içerisinden çıkarak hücrelere girmesini sağlar. Şeker, hücre içerisinde enerjiye dönüştürülür. Eğer vücut yeterli insülin salgılayamazsa, kandaki fazla şeker bazı belirtilere ve istenmeyen durumlara neden olur.

Böylece diyabet gelişir. Bu hormonun tam yokluğu diyabetin 1. tipine, insüline karşı direnç ise 2. tip diyabete yol açar (Bell 1980, Jang 2007, Chang 2009).

Tip 1 diyabet bir oto-immün hastalıktır. Vücudun bağışıklık sistemi, pankreastaki insülin üreten β -hücrelerini yabancı olarak algılayıp tahrip eder. Sonuçta pankreasın insülin üreten hücrelerinin kaybı söz konusu olduğu için, insülin yetersizliği nedeniyle glikoz hücrelere giremez ve kanda birikir. Bu tip diyabette, pankreas ya hiç insülin salgılayamaz, ya da çok az insülin salgılar. Genellikle çocukluk yaşlarında belirtileri başlamaktadır.

İkinci tip olan tip 2 diyabette ise, pankreas insülini normal şekilde salgılar ancak vücut bunu verimli bir şekilde kullanamaz. Çünkü vücut hücreleri insülin etkilenmesi için dirençlidir.

Bu doğrultuda endüstriyel olarak üretilmiş olan insülin, tip 1 diyabette ve başka ilaçların yetersiz kaldığı tip 2 diyabet vakalarında ilaç olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.2: İnsülin salınımının insan vücudunda normal metabolizması (<https://www.google.com.tr/search?q=insanda+ins%C3%BClin+sekresyonu&um=1&ie=UTF8&hl=tr&tbm=isch&source=og&sa=N&tab=wi&ei=qwimUaawBsSwhAf3nIC4Bg&biw=1536&bih=776&sei=rwimUcrXCpSYhQelk4HABg>)

Tip 1 diyabetin kesin tedavisi için 'Uluslararası Juvenil Diyabet Araştırma Vakfı (JDRF)'nin belirttiği iki önemli husus vardır:

1) Haraplanmış adacık hücrelerinin yerine konması (replasmanı) ve bu amaçla alternatif kaynakların bulunmasıdır.

2) Transplantasyon işleminden sonra yaşam boyunca bağışıklık sistemi baskılayıcı (immunosüpresif) ilaçlar kullanılmaksızın tedavinin sağlanmasıdır. Yani kalıcı replasmanın sağlanması gerekmektedir.

Günümüze kadar β -hücrelerinin yerine konmasını amaçlayan üç farklı strateji geliştirilmiştir; pankreas nakli, adacık nakli (allojenik ve kseno-transplantasyonlar) ve hücre esaslı tedavi (hücre replasmanı ve adacık neogenezi). Pankreas ve adacık nakilleri için yeterince donör bulunamaması, bu alanda çalışan araştırmacıların farklı kaynaklardan adacık hücrelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar üzerine yoğunlaşmalarına neden olmuştur. Bu gereksinim sonucu kök hücreler diyabet için son yıllarda en umut verici kaynak haline gelmiştir.

Kök hücrelerden insülin salgılayan hücre elde edilmesi üzerine yapılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin hepsinde temel alınan, *in-vivo*'daki pankreas ve β hücre gelişimidir.

2.5. *In vivo* Pankreas Gelişimi

Duedonumun iç yüzünü döşeyen endodermden köken alan iki adet tomurcuktan gelişir: Dorsal ve ventral pankreas tomurcuğu. Duedonum, sağa doğru dönüp C şeklini alırken ventral tomurcuk distal tomurcuğun hemen altına ve arkasına gelir.

Bir süre sonra dorsal ve ventral parçalar kaynaşır ve birleşirler. Ventral parçadan unsinat çıkıntı ve pankreas başının inferior parçası oluşur. Bezin kalan kısımları dorsal tomurcuktan gelişir. Ana pankreas kanalı (Wirsung), dorsal pankreas kanalının distalinin,

ventral pankreas kanalının tamamıyla birleşmesinden oluşur. Dorsal pankreas kanalının proksimali ise ya tamamıyla geriler ya da aksesuar pankreas kanalı (Santorini) adını alan küçük bir kanal halini alır Ana pankreas kanalı, major papilladan; aksesuar kanal ise eğer varlığını sürdürürse minör papilladan, duodenuma açılır. Fetal yaşamın 3. ayında pankreasın parankimasından pankreas adacıkları gelişir ve organa dağılırlar. İnsülin salgısı, 5 ay civarında başlar.

2.5.1. Pankreas Histogenezi

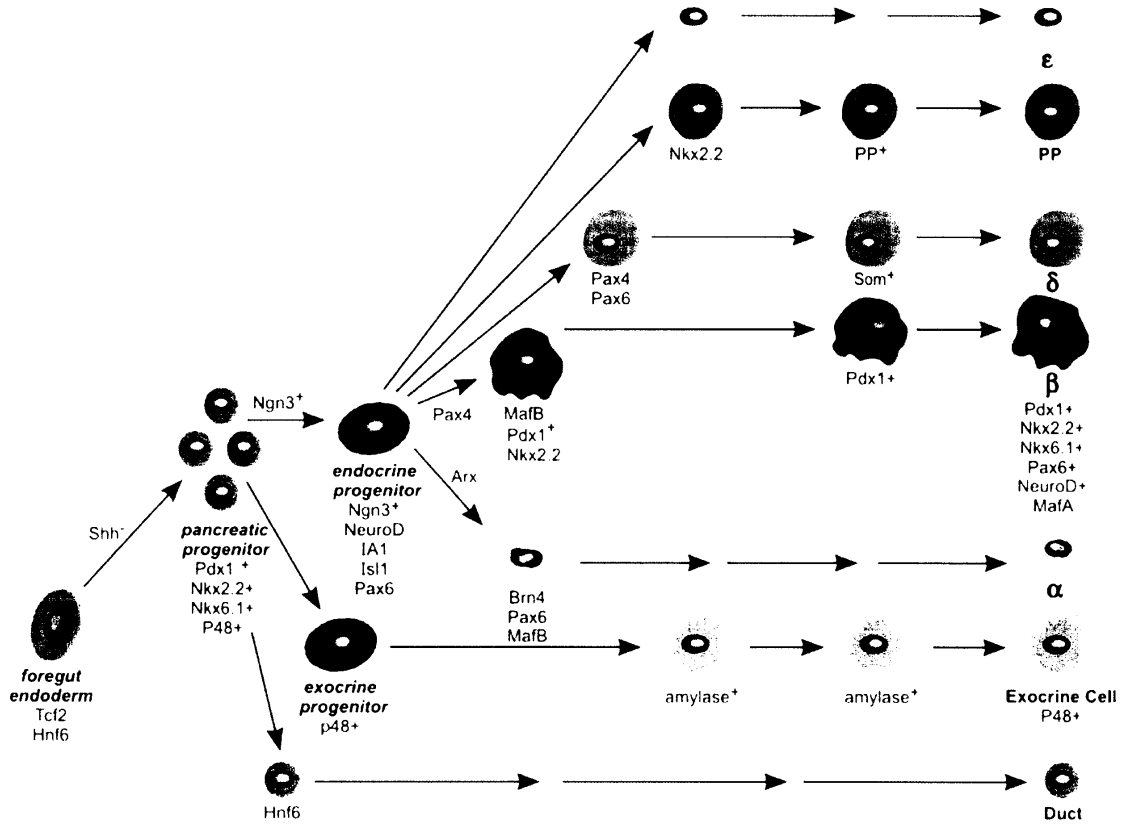
Pankreasın parenkimi, pankreas tomurcuklarının endoderminin tübüler bir ağ oluşturması ile gelişir. Erken fetal dönemde bu tübüllerin (duktus taslağı) uçları çevresindeki hücre kümelerinden asinuslar gelişmeye başlar. Langerhans adacıkları, bu tübüllerden ayrılan bir grup hücre tarafından oluşturulur; kısa bir süre sonra da asinuslar arasında uzanır. Bu adacıklardan insülin salgılanması erken fetal dönemde 10. haftada başlar. Glukagon ve somatostatin içeren hücreler, insülin hücrelerinden daha önce gelişir. Fetal plazmada glukagon 15. haftada saptanmıştır. Pankreasın bağ dokusu örtüsü ve interlobüler septumlar, etraftaki splenik mezenşimden gelişir.

In vivo pankreas gelişimine bakıldığında 4. haftadan itibaren kıvrılmaya başlayan embriyonun, bu kıvrılmasının sonuçlarından birisi de primitif barsak oluşu olarak görülür ve primitif barsak kranialde orofaringeal membran, kaudalde kloakal membranla kapalıdır. Embriyonun sefalik-kaudal yönde katlanması sonucu ön barsak ve son barsak, lateral katlanması sonucu ise orta barsak gelişir. Bu ilkel barsak, vitellüs kesesi ile ilişkisini sürdürür ve vitellüs kesesinin içini endoderm döşer. Sindirim kanalı epitel ve bezlerinin çoğu endodermden, kranial kısım ağız taslağı ektodermden, kaudal kısım ise anal kanal ektoderminden gelişir. Pankreasın gelişimi de ön barsağın kaudalinden gelişen ventral ve dorsal tomurcuklardan şekillenir. Bu tomurcuklar gelişirken midenin ve duodenumun rotasyonuna bağlı olarak ventral tomurcuk, dorsal tomurcuğa yapışır ve dorsal tomurcuk pankreasın büyük bir kısmını oluşturur.

2.5.2. Pankreasın Moleküler Düzenlemesi

Embriyogenez sürecinde pankreas, başlangıçta duodenumun iç yüzünü döşeyen endodermden ayrılan ventral ve dorsal tomurcuklar olarak adlandırılan iki şişkinlikten gelişir. Duodenumun sağa dönüşü ile birlikte ventral tomurcuk arkaya doğru hareket eder ve dorsal tomurcuğun arka alt bölümüne yerleşir. Bu süreçte iki tomurcuğun parankim dokusu ve kanalları birleşir. Ventral tomurcuktan kanca biçiminde arka-alt yana yönelen çıkıntı (processus uncinatus) ve pankreas başının alt bölümü gelişirken dorsal tomurcuk diğer bölümleri oluşturur. Dorsal tomurcuk kanalının distali ve ventral tomurcuk kanalının tamamı ana pankreas kanalını (Wirsung) yapar. Ana pankreas kanalı koledok kanalı ile birlikte duodenuma açılır. Dorsal tomurcuk kanalının proksimal kısmı bazen tümüyle kaybolur ya da aksesuar pankreas kanalı (Santorini) olarak ana kanaldan ayrı duodenuma açılır. Bazı durumlarda ise, her iki tomurcuk kanalı kaynaşmadan ayrı ayrı duodenuma açılabilir. Farelerde embriyonel 8,5 günde, notokord (dorsal) ve kardiak (ventral) mezodermden gelen sinyaller ile primitif bağırsak endoderminden pankreas oluşumunu başlatmak için Shh (Sonic encoding) ve Ihh (encoding Indian Hedgehog) genleri eksprese edilir (Hebrok M., 2003). Dorsal pankreasın farklanması, pankreas spesifik heterotrimerik transkripsiyon faktör Ptf-1'in 48-kDa helix-loop-helix DNA-bağlayıcı alt ünitesince kodlanan Ptf1a'nın (Kawaguchi Y., 2002) ve homeobox transkripsiyon faktör Hb9'un (Hlxb9 geni tarafından kodlanan) salınımına bağlıdır (Deutsch G., 2001). Bu genlerin salınımını ise pankreatik duodonal homeobox faktör-1 (Pdx-1) salınımı izler (**Şekil 2.3**).

Gastrointestinal sistemin iç yüzünü kaplayan epitel, hepatositler, ve pankreasın ekzokrin ve endokrin hücreleri endodermden gelişir. Bezlerin stroması barsağı çevreleyen visseral mezodermden gelişir. Barsak duvarının epitelial mezenkimal etkileşimi, barsakta eksprese olan SHH tarafından düzenlenir.



Şekil 2.3: *In-vivo* pankreasın moleküler düzenlenmesi (Deutsch G., 2001).

2.6. Diyabet ve Kök Hücreler

İnsanlardaki pek çok hastalık için bir tedavi stratejisi olarak gündemde olan hücresel tedavinin amacı, hasar gören bir dokunun veya organın biyolojik işlevini yerine koymak, tamir etmek veya genişletmektir. Hasarlı bir hedef organa, o organın işlevini eski haline getirmeye yetecek kadar sayı ve kalitede izole edilmiş ve karakterize edilmiş olan hücrelerin transferi ile bu amaca ulaşılabilir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda kullanılan hücrelerin başında kök hücreler gelmektedir. Şimdiye kadar deneysel olarak farklı kaynaklardan (embriyon ve başta kemik iliği kökenli olmak üzere diğer doku ve organlardan) elde edilen kök hücreler deneysel tip 1 diyabet modellerinde kullanılmıştır.

Dokuya özgün kök hücrenin, kaynaklandığı dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine “erişkin kök hücre plastisitesi” denmektedir. Kök hücre plastisitesini açıklamak için gerçekleştirilen çalışmalar, kök hücre akıbetinin özgün gen

ekspresyon programlarını baskılamak ya da aktive etmek için moleküler anahtarlar olarak işlev gören transkripsiyon faktörleri tarafından tanımlandığını ve bunların da çevreden aldıkları sinyallere bağlı olarak hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ve/veya inhibisyonuyla yönlendirildiğini göstermiştir. 1997'den günümüze kadar gerçekleştirilen birçok araştırma, erişkin-doku özgün kök hücrelerinin *in vitro* koşullarda uygun sinyaller altında veya *in vivo* olarak kendi mikro-çevrelerinden uzaklaştırıldıklarında ve yeni bir genetik programı etkinleştiren sinyalleri yayan farklı bir mikro-çevre ya da yatağa yerleştirildiklerinde, yeni mikro-çevrelere yanıt olarak uygun hücre çeşitlerini üretmek için genomik olarak yeniden programlanabileceğini göstermiştir. Buradan yola çıkarak erişkin kök hücreler gibi EKH'lerin de aynı yöntemle farklılaşabilecekleri düşüncesi gelişmiştir.

In vivo koşullarda elde edilen başarılı sonuçlar sayesinde, son zamanlarda kök hücrelerin istenilen hücre çeşidine farklılaşmasını uyuracak *in vitro* koşulların sağlanması için hedef hücre çeşidinin mikro-çevresini taklit etmeye yönelik girişimler denenmektedir. Bu amaçla kök hücreler, kültür koşullarında arzulanan hücre çeşidinin mikro-çevresinin özgün hücreleri, doku/organ parçacıkları (ekstraktlar), hücre dışı matriks elemanları veya biyo-eriyebilir materyaller ile ko-kültüre edilmekte ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

Kültür koşullarının içeriğini değiştirerek gerçekleştirilen araştırmaların sonuçları, EKH'lerinin β hücre replasmanı için potansiyel kök hücre kaynağı olabileceğini göstermiştir (Chen 1997, Horsch 1997). Bunun üzerine bilim adamları *in-vivo* gelişimi taklit edecek yöntemler geliştirerek yeni farklılaşma prosedürleri geliştirmeye başlamıştır.

Bunlardan biri besiyeri içeriğini değiştirerek hücrelerin istenilen yönde farklılaşmasını sağlamaktır. Besiyeri içeriği değişimiyle hücrelerin β hücrelerine indüklenmesinde en çok kullanılan kimyasallardan biri 'Exendin 4'dür (Xu 1999).

Exendin 4, GLP-1 analogudur ve *in vivo*' da ve izole edilmiş adacıklarda doza bağlı insülin salınımı artırır ve glikoza bağımlılık gösterir (Buse 2004 ve Lupi 2008). Exendin 4 ya da GLP-1'in fazla ekspresyonu *in vivo*' da fetal pankreatik dokunun, pankreatik progenitörlerin ya da intestinal kök hücrelerin insülin salgılayan hücrelere

farklılaşmasını sağlar ve aynı zamanda hiperglisemiyayı da iyileştirir (Liu 2007 ve Liu 2010).

In vitro Exendin 4 çalışmaları Aktivin B ile kombine bir şekilde olmaktadır. Bu kombinasyon fEKH'lerde insülin üreten hücelere farklılaşmasını ve özellikle insülin 1 gen ekspresyonunun güçlü olmasını sağlamaktadır. Ancak insülin sekresyonu tam olarak gerçekleştirilememektedir.

Genellikle bir kaç basamaktan oluşan farklılaşma prosedürleri farklılaştırma çalışmalarında kullanılmaktadır. Bunun asıl amacı *in-vivo*'daki gelişimi sırasıyla takip etmeye çalışmaktır. Bu yüzden çalışmaların basamakları şu şekilde sıralanmaktadır:

- 1) Definitif Endoderme yönelme
- 2) Primitif ön bağırsak yönünde farklılaşma
- 3) Posterior ön bağırsak yönünde farklılaşma
- 4) Pankreatik endoderm ve adacık progenitör hücreleri
- 5) İnsülin salgılayan hücreler

Farklılaştırma amacıyla gerçekleştirilen çalışmaları; *in-vivo* ve *in-vitro* olmak üzere 2 ana başlık altında toplamak mümkündür. *In vivo* çalışmalarda, araştırmacılar çeşitli kaynaklardan elde edilen verici hücrelerine çeşitli vektörler kullanarak yeşil floresans proteinden (YFP) sorumlu bir "reseptör geni" yerleştirmişlerdir. Bu geni eksprese eden hücreler, parlak yeşil renk veren bir proteinin üretilmesini sağlar ve hücre klonlarını izlemek ve tanımlamak için kullanılabilmiştir. Ya da alternatif olarak YFP eksprese eden transgenik verici farelerden elde edilen kök hücreler bu transgeni içermeyen diyabetik alıcılara nakledilip akıbetleri izlenmiştir.

Bu yöntemlerle gerçekleştirilen araştırmalarda alıcının pankreaslarında YFP+ β hücreleri izlenmiş ve normogliseminin farklı zaman dilimleri süresince sağlandığı rapor edilmiş olsa da, benzer deneylerin başarısız sonuçları rapor edilmiştir.

Kök hücrelerin insülin salgılayan hücrelere farklılaşmasının uyarılması amacıyla gerçekleştirilen *in-vitro* çalışmalarda ise, genellikle kültür koşullarının modifikasyonlarına yönelik girişimler ve hücrelerin farklılaşmasında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin ektopik transfeksiyonu gibi genomu değiştirmeye yönelik stratejiler denenmiştir. Sonuçta, farklılaşmış ve farklılaşmamış kök hücrelerin diyabetik hayvanlara nakli ve diyabetik tablonun izlenmesiyle birlikte pankreasta verici kökenli hücrelerin takibini içeren deneysel yöntemler gerçekleştirilmiştir.

Kültür koşullarının içeriğini değiştirerek gerçekleştirilen araştırmaların sonuçları, kök hücrelerin β hücre replasmanı için potansiyel kaynak olabileceğini göstermiştir. Örneğin, Chen ve ark. Wistar sıçanlarının kemik iliğinden izole ettikleri MKH'leri kültürde insülin-benzeri hücrelere farklılaşmak üzere (10 mmol/L nikotinamid+1 mmol/L beta-merkaptotanol+200 ml/L FSC içeren L-DMEM'de 24 saat süreyle ön-uyarı, takiben 10 mmol/L nicotinamide+1 mmol/L, beta-mercaptopethanol içeren serumsuz H-DMEM solüsyonunda 10 saat süreyle) uyarılmışlar ve diyabetik sıçan modellerinde *in vivo* işlevlerini test etmişlerdir. Sonuçta, bu hücrelerin kültürde adacık benzeri hücrelere özgün immunofenotipik (insülin ve nestin immunoreaksiyonu) ve immungenetik (insülin-1 mRNA ekspresyonu) belirteçlerle insülin salgılayan hücrelere veya β -benzeri hücrelere farklılaştıkları tespit edilmiş ve diyabetik sıçanlara nakledildiklerinde kan şekerlerini regüle edebildiği bildirilmiştir (istatistiksel sonuç yok).

İkinci grup çalışmada ise, kültürün değişik evrelerinde organogenezis sürecinde beta hücrelerin gelişmesi ve farklılaşmasında işlev gören transkripsiyon faktörlerinin ekzojen olarak MKH'lere aktarımı denenmiştir. Bu sistemlerin kullanılmasındaki amaç farklılaşmanın arzu edilen hücre dizisi yönünde uyarılmasını sağlamak ve daha fazla sayıda ve işlevsel somatik hücreyi elde etmektir. İnsan kemik iliği kökenli MKH'lerine çeşitli viral vektörler kullanılarak insülin PDX-1 ve rekombinant adeno-ilişkili virüs (furin-ayrılabilir insan preproinsülin geni içeren) transdukte edilmiş, *in vitro* endokrin pankreas ya da β hücrelerine doğru farklılaşma oranlarının arttığı ve streptozotosin-diyabetik kemiricilere nakli sonrasında kan glikoz düzeylerinin normaleştiği gözlenmiştir. Ancak, gen transfeksiyonları için viral vektörlerin kullanılması nedeniyle tümoral oluşumların ortaya çıkabilme olasılığı ve sürekli ekspresyon veya over-ekspresyonların sonucunda

istenmeyen hücre dizilerine farklılaşma olasılığı nedeniyle bu tür yöntemlere kuşkuyla yaklaşmaktadır.

Çeşitli yöntemlerle yapılan farklılaştırma çalışmalarının sonuçlarında, tam olarak fonksiyonel olmasa da bu hücrelerin kültürde adacık benzeri hücrelere özgün immunofenotipik (insülin ve nestin immunoreaksiyonu) ve immungenetik (insulin-1 mRNA ekspresyonu) belirteçlerle insülin salgılayan hücrelere veya β benzeri hücrelere farklılaştıkları tespit edilmiş ve diyabetik sıçanlara nakledildiklerinde kan şekerlerini regüle edebildiği bildirilmiştir.

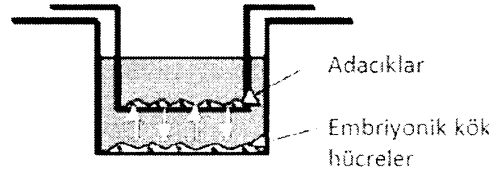
Banerjee ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada ise fEKH'lerden pankreatik farklılaştırma için ko-kültür tekniğinden faydalanılmıştır. Bu çalışma EKH'lerden pankreatik adacık hücrelerine, endokrin hücrelere ya da β hücrelerine, ko-kültür tekniği ile farklılaştırma yapılan ilk ve tek çalışmadır. Bu çalışmada farklılaşma basamaklar halinde gerçekleştirilmiş ve ilk basamakta *in vivo*'daki pankreatik gelişimi temel alarak karaciğer hepatositleri ile ko-kültür yapılmış, ikinci basamakta besiyeri içeriğine indükleyiciler eklenmiş son basamakta ise endotel hücreleri ile ko-kültür yapılmıştır.

Kök hücreler, birçok özellikleriyle β hücrelerinin *in vitro* gelişimini anlamada iyi bir örnektir (Holland 2005). Ancak EKH'lerden ve uPKH 'lerden fonksiyonel insülin salgılayan hücrelerin oluşumu henüz tam olarak gerçekleştirilememiştir. Yapılan çalışmalarda embriyonik gelişimde eksprese olan geniş çeşitlilikteki transkripsiyon faktörlerinin ve hücre gelişimiyle ilgili genlerin, (Pdx1, Ngn3, NeuroD, MafA, MafB, Gata4, Gata6, Ptf1a ve Pax4 β) hücrelere salgılanması ve ekspresyonu sağlanmaya çalışılmaktadır. Pdx1, pankreatik gelişimde önemli bir kontrol edicidir ve embriyo gelişimi boyunca β hücre farklılaşması ve erişkinde β hücre fonksiyonunun sağlanmasında önemlidir. Pdx1 pozitif multipotent pankreas progenitörleri endokrin, asinar ve kanal (duct) hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptir (Gu 2002 ve David 2012).

Kök hücre mikro-çevrelerinin, kendini yenileme ve kök hücre akıbetinin yönlendirilmesindeki rollerinin anlaşılması, hastalıklı doku ve organların yenilenmesinde kullanılması, düşünülen kök hücre esaslı tedavi protokollerini uygulama yolunda önemli

adım olmuştur. Deneysel *in vivo* hayvan çalışmalarında, birçok doku ve organlarda kök hücrelerin akıbetini yönlendirmede rol oynayan mikro-çevre elemanları tanımlanmaya çalışılmıştır.

Farklı hücre tiplerini aynı kültür ortamına alarak aralarında etkileşimlerle farklılaştırma çalışmaları geliştirilmiştir. Ko-kültür adı verilen bu teknikle farklılaşmaya alınan hücrelerde, hücre farklılaşmaları daha iyi sonuçlanmaktadır. Üstelik ko-kültürü yaparken istediğimiz iki farklı hücre kaynağını ya da doku ekstraktlarını birbirleriyle temas edecek şekilde aynı kültür kabına koyabilmek (direkt ko-kültür) ya da birbirleriyle temasını engelleyerek (araya kullanılan hücre ya da elemanların boyutlarına uygun olarak değişik boyutta porları olan membranlar; insertler koyarak) aynı kültür kabına koyabilmek (indirekt ko-kültür) gibi iki farklı ortamı test etme olanağı sağlamaktadır (**Şekil 2.4**). İkinci ko-kültür ortamı aynı zamanda istenilen süre boyunca birlikte kültür edilen hücre ve yapıları birbirlerine karışmadıkları için istenildiği zaman tekrar birbirinden ayırarak bu hücreleri saf bir şekilde elde edip çeşitli analiz yöntemlerini yapma imkanı sağlar.



Şekil 2.4: Çalışmada kullanılan ko-kültür ortamını oluştururken kullanılan porlu yapıdaki membrana sahip ayraçlar (inserts), adacıklar ve EKH'lerin şematik çizimi.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Fare Embriyonik Kök Hücrelerinin Kültürü

3.1.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Büyütüleceği Kültür Kaplarının Jelatin ile Kaplanması

Kültür kapları EKH kültürüne başlanmadan önce %0,1'lik jelatin çözeltisi ile 20 dakika inkübatörde bekletilerek kaplanmıştır. Hazırlanan besleyici tabakanın kültür kabına ekiminden hemen önce jelatin solüsyonu çekilerek ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Besleyici Tabakanın Hazırlanması

Süper ovulasyonu sağlanmış dişi farelerin uygun sayıda erkek fare ile çiftleştirilmesi sağlanmıştır. Fareler gebeliğin 13,5. gününde sakrifiye edilerek embriyolar uterusdan toplanmış, başları ve visseral organları disseksiyon mikroskobu altında çıkarıldıktan sonra, %5-10 oranında penisilin-streptomisin içeren fosfat tampon (PBS) ile yıkayıp küçük parçalara (1 mm²'lik) ayrılmıştır. Tüm parçalar 10-20 dakika %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu içerisinde bekletilip, elde edilen hücreler %10 fetal sığır serumu (FBS), % 1 L-glutamin (200mM) ve penisilin-streptomisin içeren DMEM içerisinde jelatinle kaplı kültür kaplarında kültüre edilmiştir. Her bir fetustan elde edilen hücreler bir T 25 kültür kabına ekilmiştir.

Hücreler, kültür kabının yüzeyini %70 oranında kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasajlanarak T 75 kültür kaplarına aktarılarak gerekli sayı elde edilinceye kadar kültüre edilmiştir. Fibroblastların mitotik aktivitesini durdurmak için uygulanan Mitomisin C ve Gama ışınlaması yöntemlerinin ikisi de denenerek sonuçlar hücre siklusu analizi ile yorumlanmıştır. Sonuçlara göre gama ışınlamasının daha etkin olduğu gözlenmiştir. Bu yüzden mitotik aktivitenin durdurulması için hücreler %0,25'lik tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldıktan sonra 'Gamma Cell' cihazında 40 dak. boyunca 3000 Rad gama ışınına maruz bırakılmıştır. Daha sonra 1500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilip, elde edilen pelet fEF'ler

için uygun besiyeri ile sulandırılarak hücreler thoma lamında sayılmıştır. Hücreler 35 mm'lik kültür kaplarına 5×10^5 , 60 mm'lik kültür kaplarına ise 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilip fEF besiyerinde kültüre edilmiştir. Hazırlanan fEF besiyeri bir hafta içerisinde kullanılmıştır. fEF'ler bir haftadan uzun süre kullanılmamış, bir haftadan sonra yeni fEF besleyici tabakalar oluşturulmuştur.

Çizelge 3.1: Besleyici tabaka hücrelerinin besiyeri hazırlanması

MEF besiyeri bileşenleri	Kullanılan Miktar
DMEM/F12+ Glutamax	%88
FBS	%10
NEAA	%1
PS	%1

3.1.3. Besleyici Tabakaların Üzerinde fEKH Kültürü

Çalışmada ticari olarak satın alınan R1 fEKH hattı kullanılmıştır.

Hücreler, 60 mm'lik kültür kaplarına hazırlanan besleyici tabakalar üzerine 5 ml EKH besiyerinde 2×10^6 sayıda ekilmiştir. Bu hücreler çalışma boyunca kullanılacak olan stok hücreleri oluşturmuştur. fEKH'lerin besiyerleri her gün değiştirilerek hücreler gün aşırı enzimatik olarak tripsin ile pasajlanmıştır. fEKH kültüründe kullanılan besiyeri bileşimi aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 3.2: fEKH'lerin besleyici tabaka üzerinde kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri

EKH besiyeri bileşenleri	Kullanılan Miktar
H-DMEM (yüksek glikozlu DMEM)	%85
HyClone FBS	%15
L-Glutamin	200mM
β -mercaptoetanol	0,1mM
NEAA	100X
Primocin	%0,2
LIF	10ng/ml

3.1.4. fEKH'lerin Enzimatik Pasajı

fEF üzerinde kültüre edilen fEKH'ler Ca^{++} Mg^{++} içermeyen PBS ile 2 kez yıkanmış, ardından %0,25'lik tripsin/EDTA solüsyonu kuyucuklara konulmuştur. Hücreler %5 CO_2 'li 37°C inkübatörde 3-4 dakika bekletildikten sonra üzerlerine FBS içeren H-DMEM besiyeri eklenerek tripsinin inaktive olması sağlanmıştır. Tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler 270 g'de 5 dk. santrifüj edilip ardından sayılarak gerekli miktarda hücre kültür kaplarına ekilmiş ve kalan hücreler dondurulmuştur.

3.1.5. fEKH'lerin Dondurulması ve Saklanması

fEKH'ler enzimatik pasajlama sonucu kaldırıldıktan sonra depo olacak hücreler 270 g' de 5 dk. santrifüj edilmiş ve pelet üzerine 500 μ l fEKH besiyerine ek olarak 500 μ l dondurma besiyeri (%40 FBS+ %10 DMSO) eklenerek Mr. Frosty'e koyulmuş, -80°C'de bir gece bekletildikten sonra sıvı azot tanklarına transfer edilmiştir.

3.1.6. fEKH'lerin Çözme İşlemi

fEKH'ler hızlı bir şekilde 37°C'deki su banyosunda çözülerek EKH besiyeri ile yıkanmış ve ileri kültür amaçlı olarak daha önceden hazırlanmış fEF besleyici tabakası içeren kültür kaplarına alınmıştır.

3.2. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

3.2.1. fEKH'lerin İmmunohistokimyal Analizi

3.2.1.1. fEKH'lerin Yüzey Antijen Profili (Oct4-SSEA1-Nanog-Sox 2 Boyamaları)

fEKH'ler 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına, altlarında besleyici tabaka varlığında ekilip 2 gün boyunca kültüre edilmiştir. İkinci günün sonunda hücreler Ca^{++} Mg^{++} (+) PBS ile yıkandıktan sonra %4'lük paraformaldehit (PFA) ile 20dk. oda ısısında bekletilerek tespit edilmiştir. Çekirdek içi lokasyonu olan boyamalar için Triton X/ Tween 20 karışımı 7 dk. hücrelere uygulanmıştır. Ardından hücreler primer antikörlere uygun blok solüsyonlar ile 30 dk. muameleye bırakılmış ve pluripotentlik belirteçleri olan Oct4, Nanog, Sox2 ve SSEA1 primer antikörları ile bir gece +4°C'de bekletilmiştir. Ertesi gün hücreler oda ısısında 2 saat bekletildikten sonra, primer antikörlere uygun sekonder antikörlar ile muamele edilmiştir. Hücreler en son çekirdek belirteci olan DAPI ile kapatılarak floresan mikroskopta fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.1.2 fEKH'lerin Alkalen Fosfataz Ekspresyon Analizi

fEKH'ler fEF besleyici tabakası ile birlikte 35 mm'lik kültür kaplarında 10^5 hücre olacak şekilde ekilip 2 gün boyunca fEKH besiyerinde kültüre edilmiştir. İkinci gün sonunda hücreler 'Millipore Alkalen Fosfataz Kit'i kullanılarak tespit edilmiş ve boyanmıştır.

3.3. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin *in vitro* Farklılaşma Analizleri

3.3.1. fEKH'lerinden Embrioid Cisimcik Oluşturulması

fEKH'ler tripsin ile muamele edilerek plastik kültür kabı yüzeyinden kaldırılıp tek hücre süspansiyonu haline getirilmiştir. Ortamdan fEF besleyici tabakasının uzaklaştırılması için, daha önceden jelatinle kaplanmış 100 mm'lik kültür kaplarına hücre süspansiyonu ekilmiş ve hücreler %5 CO₂'li 37°C inkübatörde 20 dak. inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler besiyeri ile birlikte toplanıp 15 ml'lik konik tabanlı tüpe alınarak, 270 g' de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelet, 1 ml besiyeri ile sulandırılıp thoma lamı üzerinde tripan-mavisi solüsyonu ile 1:1 oranında sulandırılarak sayılmıştır. 20 dk'lık inkübasyon sonucunda fEF hücreleri tabana yapışmıştır. Yüzen hücreler yani fEKH'ler dikkatlice toplanıp yapışıcı olmayan bakteriyolojik kültür kaplarına ekilmiştir. Deneyin bu aşamasında bakteriyolojik kültür kabının kullanılmasının amacı hücrelerin yüzeye yapışmasını engelleyerek birbirleri ile birleşmelerini sağlamaktır. Böylece hücreler birbirleri ile birleşerek EC'leri oluşturmuştur.

3.4. Fare pankreasından Langerhans Adacıklarının (PA) İzolasyonu ve Hücrelerin Karakterizasyonu

3.4.1. Fare Pankreas Adacıklarının İzolasyonu

Fareler, servikal dislokasyon ile öldürüldükten sonra fare, karın derisi arka bacaklarının arasından göğüs kafesinin bitimine kadar kesilmiştir. Midenin yaklaşık 2 cm ilerisinde yer alan duodenum bulunarak, koledok kanalı görünür hale getirilmiştir. Koledok kanalı, duodenuma mümkün oldukça yakın bir yerinden klamplenmiştir. Karaciğer, göğüs kafesine doğru yatırılmıştır. Koledok kanalı, altındaki yağ tabakasından ince uçlu bir pens yardımı ile ayrılmıştır. Karaciğere yakın ucundan koledok kanalına 30G'lik bir kanül ile girilerek kollajenaz P enzimi (1 mg/ml) verilmiştir. Yavaş yavaş pankreasın şişmesi gözlenmiştir. Şişerek belirgin hale gelen pankreas, sırasıyla duodenum, ince barsaklar, mide ve dalaktan dissekte edilerek 50 ml'lik konik tabanlı tüpe alınmıştır.

Toplanan pankreaslar 15-18 dakika boyunca çalkalamalı su banyosunda tutularak enzimin aktif hale gelmesi sağlanmıştır. Süre sonunda enzimi inaktive etmek için pankreasların üzerine serumsuz HBSS konularak 1300 rpm'de 3 dakika yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatant kısmı atılarak kalan pelet iyice homojen hale getirilip üzerine 35 ml HBSS eklenmiştir. Pankreas, por çapı 419,1 µm olan çelik süzgeçten geçirilerek süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Altta biriken sıvı HBSS ile 50 ml'ye tamamlanarak yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Santrifüj sonunda oluşan süpernatant atılarak kalan pelet 'Histopaque 1077' ile homojen hale getirilip üzerine serumsuz HBSS 1:1 oranında yayılmış ve 2400 rpm'de 20 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan bulutsu tabakadan elde edilen adacıklar pastör pipeti ile toplanarak ayrı bir 50 ml'lik konik tabanlı tüpe toplanmıştır. Tüp, serum eklenmiş HBSS ile 50 ml'ye tamamlanıp 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Süpernatantın atılmasından sonra pelet iyice pipetajlanıp 35 ml HBSS ile tamamlanmış ve 4 dakikalık sedimantasyona bırakılmıştır. Süre sonunda sıvı üzerinden 10 ml alınıp atılmış ve tekrar 10 ml HBSS ile 35 ml'ye tamamlanmıştır. Ardından sedimantasyon işlemi tekrarlanmıştır. Bu işlem 4 kez tekrarlanarak en son elde edilen 25 ml'lik solüsyondan 10 ml, 10 ml ve 5 ml'lik 3 grupta solüsyon toplanarak 60mm'lik kültür kaplarına alınmış ve stereo mikroskop altında adacıklar toplanmıştır.

3.4.2.Fare Pankreas Adacıklarının ve Hücrelerin Karakterizasyonu

Elde edilen adacıkların karakterizasyonu için, adacıklara özgün dithiozone (DTZ) boyaması kullanılmıştır. DTZ, beta hücrelerinin mitokondriyonlarındaki çinko (Zn)'ya bağlanarak kırmızı renk vermektedir. Canlılık testi için, FDA-PI (Floresan diasetat-Propidyum iyodür) floresans boyamaları gerçekleştirilmiştir.

3.5. Farklılaştırma Yöntemleri

3.5.1. fEKH'lerin *in vitro* Koşullarda Kimyasal Yolla İnsülin Üreten Hücreye Farklılaştırılması

Besleyici tabaka üzerinde kültüre edilen EKH'lerden süspansiyon kültür yöntemi ile 3 gün boyunca EC oluşumu sağlanmıştır. 3. günün sonunda EC'ler 3 gün boyunca H-DMEM, %15 FBS, 50µg/ml askorbik asit içeren besiyerinde süspanse şekilde kültüre edilmiştir. EC'ler 3. günün sonunda jelatinle kaplanmış kültür kaplarına ekilerek 1 gün boyunca yapışmaları beklenmiştir. Ardından hücrelerin besiyeri DMEM/F-12,%15 FBS olarak değiştirilerek 5 gün boyunca kültüre edilmiştir. 5.günün sonunda aynı besiyerine 10mmol/l nikotinamid, 10nmol/l Exendin 4 eklenerek 7 gün boyunca hücreler kültüre edilmiştir.

3.5.2. fEKH'lerin *in vitro* Koşullarda Adacık Mikroçevresinde İnsülin Üreten Hücreye Farklılaştırılması

fEKH'ler süspansiyon kültürlerinde EC haline getirildikten sonra jelatinle kaplanmış kültür kaplarına ekilerek 1 gün boyunca yapışmaları beklenmiştir Hücrelerin yapışmasının ardından 12 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 5-6, 6 kuyucuklu kültür kaplarına kuyucuk başına 10-12 adacık gelecek şekilde ara bölümler (insertler) üzerine adacıklar konularak ko-kültürler başlatılmıştır. Ko-kültür boyunca besiyeri, %15 FBS içeren 1:1 oranında H-DMEM/RPMI olacak şekilde kullanılmıştır. Her gün besiyeri değişimi yapılarak hücreler 1 ay boyunca ortak mikro-çevrede kültüre edilmiştir.

3.6. Farklılaştırma Sonrası Gerçekleştirilen Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. İmmunohistokimyasal Analizler

Farklılaştırmaya alınan fEKH'ler, PA'lara özgü belirteçler açısından analiz edilerek, farklılaşmanın düzeyini belirlemek amacıyla immunohistokimyasal analizler

gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, SSEA1, PDX1, insülin ve c –peptid immunofloresans boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Farklılaştırılmış fEKH'lerin immunohistokimyasal yöntemle işaretlenmesi için her ko-kültürü işleminden sonra hücreler PBS ile yıkanmış, paraformaldehit (PFA) ile 20 dakika oda ısında tespit edilmiştir. Hücreler fiksasyon işleminden sonra PBS ile yıkanmış ve % 1,5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dak. inkübe edilip; uygun dilasyon oranlarında hazırlanan SSEA1, PDX1, insülin ve C-peptid primer antikoları hücrelere eklenmiştir. +4°C'de 1 gece ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildikten sonra hücreler PBS ile 3 kez yıkanmış ve uygun floresans işaretli sekonder antikolarla oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Son aşamada, çekirdek zıt boyaması için DAPI kullanılarak, sonuçlar floresan mikroskopta incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

3.6.2. Gen Ekspresyon Analizleri

fEKH'leri iki farklı yöntem ile insülin üreten hücreler yönünde farklılaştırıldıktan sonra insülin üreten hücrelere özgün belirteçler kullanılarak analiz edilerek farklılaşmanın düzeyi belirlenmeye çalışılmıştır. İnsülin üreten hücrelere özgü belirteçler aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 3.3: Real time PCR ile insülin üreten hücrelere özgü belirteçler ve fonksiyonları

Gen Adı	Fonksiyonu
GATA-4	Embriyonik ve ekstra-embriyonik (visseral) endoderm belirteci
insülin	β hücre belirteci
glucose transporter-2 (GLUT 2).	β hücre belirteci
Pancreatik transkripsiyon faktörü PDX-1	Pankreatik endoderm belirteci
Nkx6.1	İnsülin ekspresyonunda önemli rol oynar

β hücrelerinin farklılaşması sırasında hücrelerin MafB⁺, MafA⁻, Ins⁺ ekspresyonu farklılaşmanın ara (intermediate) aşaması belirteci iken; MafB⁻, MafA⁺, Ins⁺ ekspresyonu ise olgunlaşma (matür) aşama belirteçidir.

Elde edilen hücrelerin total RNA izolasyonları, RNA İzolasyon Kiti ile izole edilmiştir. İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu picodrop spektrofotometre ile ölçülerek ve 1 µg total RNA olacak şekilde cDNA sentez kiti ile cDNA'ya çevrim gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin amplifikasyonunda genlerimize özgü prob ve primeri içeren kitlerin kullanımıyla (Thermo Scientific Solaris qPCR gene expression assays) ve LightCycler 480-II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) real-time PCR cihazında eşit miktarda cDNA kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primer ve prob lar üretici firmanın önerdiği şekilde daha önceden standardize edildiği gibi kullanılmıştır. PCR koşulları; 95°C'de 10 dakika enzim aktivasyonu takibinde 45 siklus, 95°C'de 10 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye annealing ve 72°C'de 1 saniye uzama şeklinde uygulanmıştır. Sonuçlar Roche Light Cycler 480 yazılımıyla analiz edilmiştir.

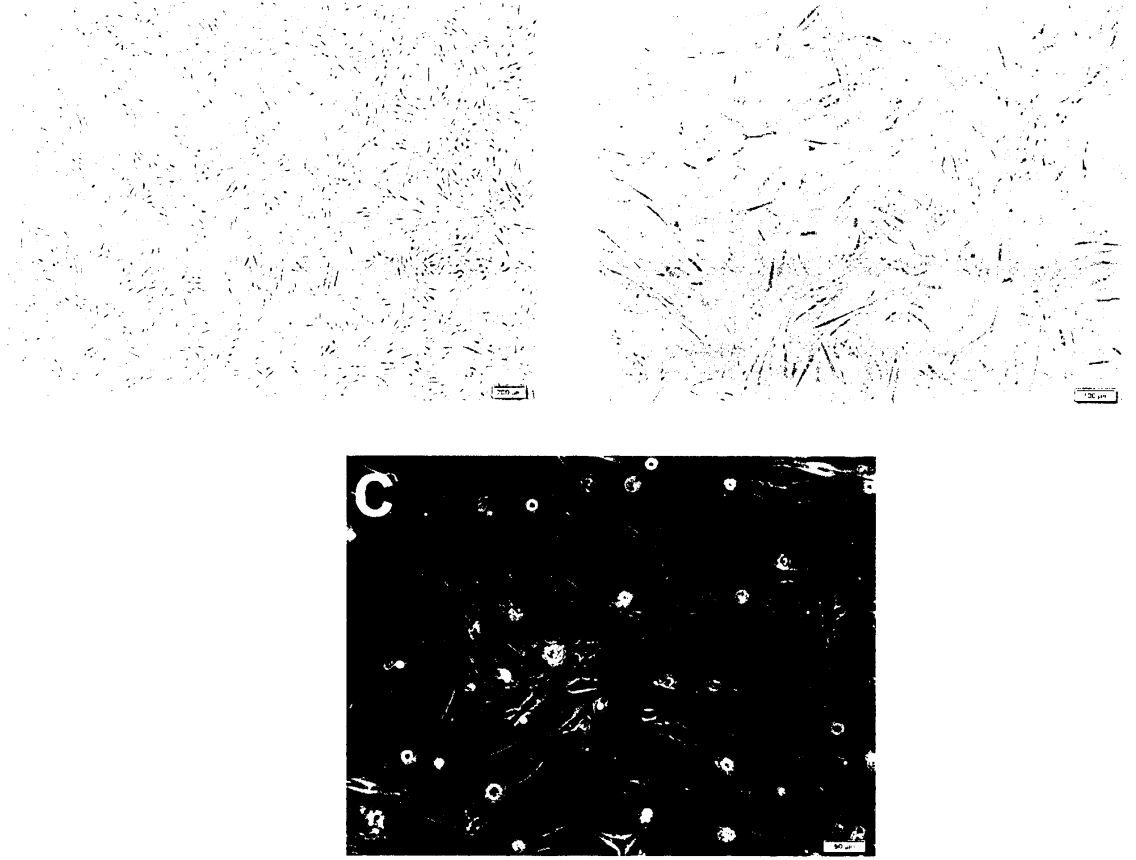
3.6.3. fEKH Kaynaklı İnsülin Üreten Hücrelerin Fonksiyonel Çalışmaları

Glikoz-bağımlı insülin salınımını belirleyebilmek için farklılaşmış fEKH'lerin *in vitro* ortamda, besiyerine eklenen glikoza bağlı olarak insülin salgılayıp/salgılamadıklarını test etmek için iki farklı glikoz yoğunluğuna maruz bırakıldıktan sonra besiyerinde insülin tayini yapılmıştır. İnsülin salgılama analizine başlamadan önce hücreler PBS ile yıkanmış ardından insülin içermeyen besiyerinde 2 saat kültüre edilip insülinin tamamen ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Süre sonunda %1 BSA içeren L-DMEM (glikoz miktarı: 5,5 mmol/L) eklenmiş ve hücreler 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmiştir. Süpernatant, bazal insülin sekresyonu analizi için toplanıp -20 °C'de analiz zamanına kadar dondurularak saklanmıştır. Daha sonra hücreler, yine 1 saat süreyle H-DMEM (glikoz miktarı: 25 mmol/L) besiyerinde %1 BSA varlığında kültüre edilmiştir. Sürenin sonunda süpernatantlar, glikoz ile uyarılmış insülin salınımını belirlemek için toplanıp dondurularak analiz zamanına kadar saklanmıştır. Farklılaşmış ve farklılaşmamış fEKH'lerinden salınan glikoz ile uyarılan immunoreaktif insülin miktarını belirlemek için fare insülin ELISA kiti (Rat/Mouse Insulin ELISA Kit, Milipore EZRMI-13K) kullanılmıştır.

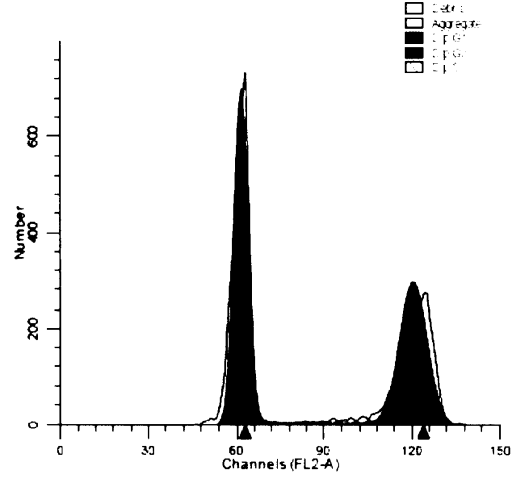
4.BULGULAR

4.1. Besleyici Tabakanın Hazırlanması

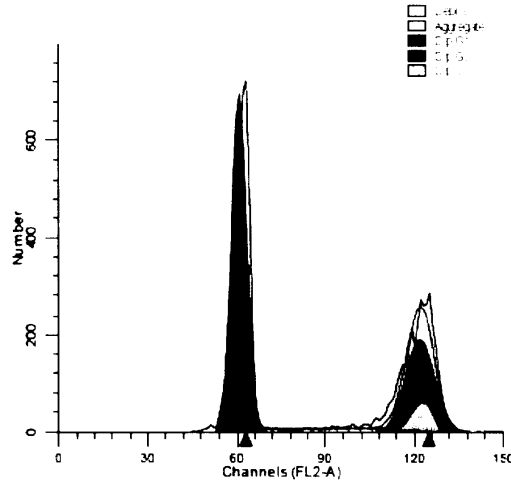
fEKH'lerin uzun süreli farklılaşmadan kültüre edilebilmesi için besleyici tabaka olarak fare embriyonik fibroblastları kullanılmıştır. Bunun için gama ışınması yöntemi kullanılarak fibroblastların mitotik aktivitesi durulmuştur. Bu hücreler, %0,1'lik jelatin ile kaplanmış kültür kaplarına besleyici tabaka hücreleri ekilmiş ve ekiminden 1 gün sonra bu hücreler fEKH kültürü için hazır hale gelmişlerdir (**Şekil 4.1**). Hazırlanan besleyici tabaka, en fazla bir hafta kullanılmıştır.



Şekil 4.1: Mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblastlarının jelatin kaplı kültür kaplarındaki morfolojileri zıt faz mikroskopunda izlenmektedir (Bar çubukları: A-200 μ m, B-100 μ m, C-50 μ m).



Şekil 4.2. fEF'lerin mitotik aktivitesinin durdurulması için 10 mg/ml Mitomisin C uygulanması sonrası hücre siklusu analizi.



Şekil 4.3: fEF'lerin mitotik aktivitesinin durdurulması için Gama ışınması yönteminin uygulanması sonrası hücre siklusu analizi.

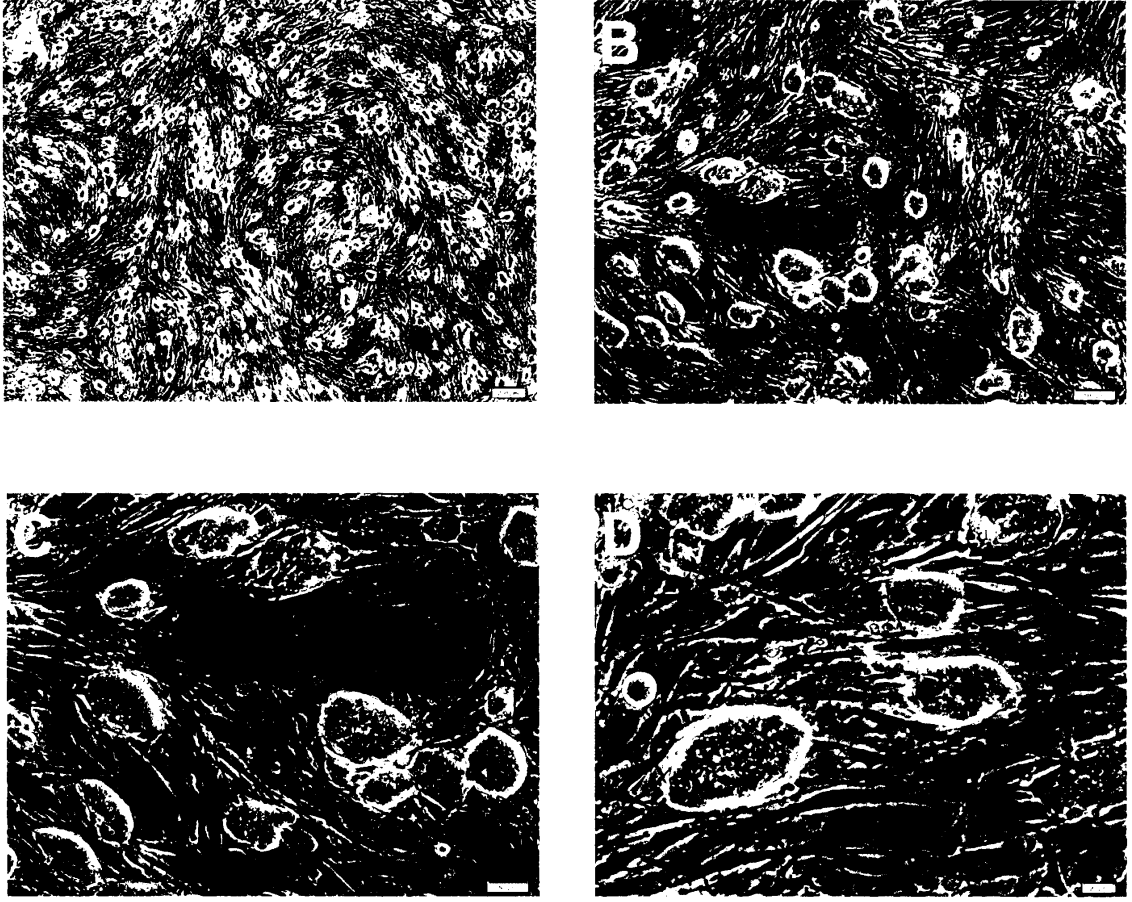
Çizelge 4.1: Mitomisin C ve gamma ışınma ile mitotik aktivitesi durdurulmuş hücrelerin hücre siklus analizleri.

	Mitomisin C	Gama Işını
G1	52,17	60,01
S	4,92	6,88
G2	42,92	33,11

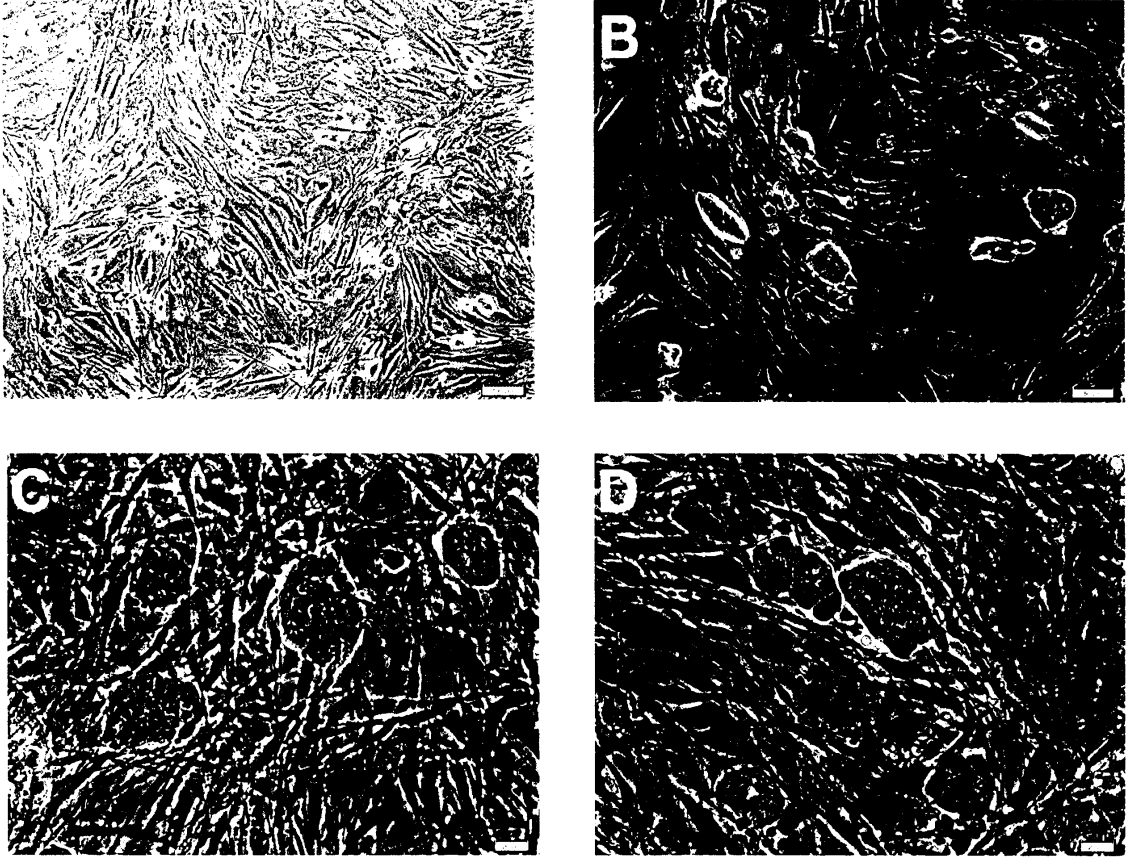
Hücre siklusu analizinde Mitomisin C uygulanarak mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblastların % 52,17'si G1 fazında, % 4,92'si S fazında, % 42,92'si G2 fazında olarak gözlenmiştir. Hücre siklusu analizinde, Gama ışını uygulanarak mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblastların % 60,01'i G1 fazında, % 6,88'i S fazında, % 33,11'i G2 fazında gözlenmiştir.

4.2. Besleyici Tabakaların Üzerine fEKH Kültürü

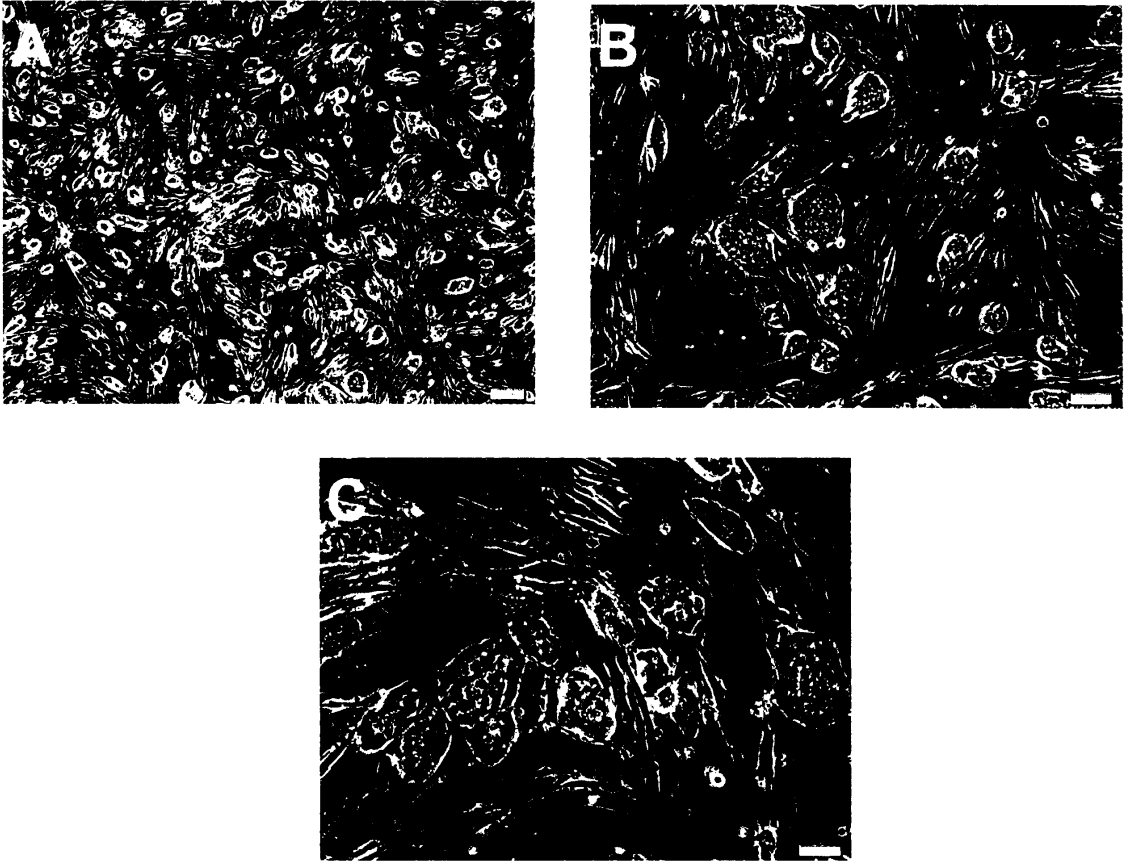
EKH'ler fare embriyonik fibroblastları (fEF) üzerinde kültüre edilmiş ve hücreler farklılaşmadan uzun süre pasajlanmıştır. Hücrelerin morfolojileri günlük olarak mikroskop altında takip edilmiştir. Hücreler uzun pasajlar süresince EKH'ye özgü koloni oluşturma şekillerini korumuş ve hücrelerin sınırları belirgin bir şekilde izlenmiştir (**Şekil 4.4-6**). Bu bulgu da fEKH'lerin besleyici tabaka üzerinde uzun süreler boyunca farklılaşmadan kaldığını göstermektedir (**Şekil 4.7**). Kolonilerin büyüyerek birbirlerine yaklaşması ve teması ile EKH'lerin farklılaşmasının engellenmesi amacıyla, günlük morfolojik takiplerde koloni boyutları göz önüne alınarak hücreler pasajlanmıştır



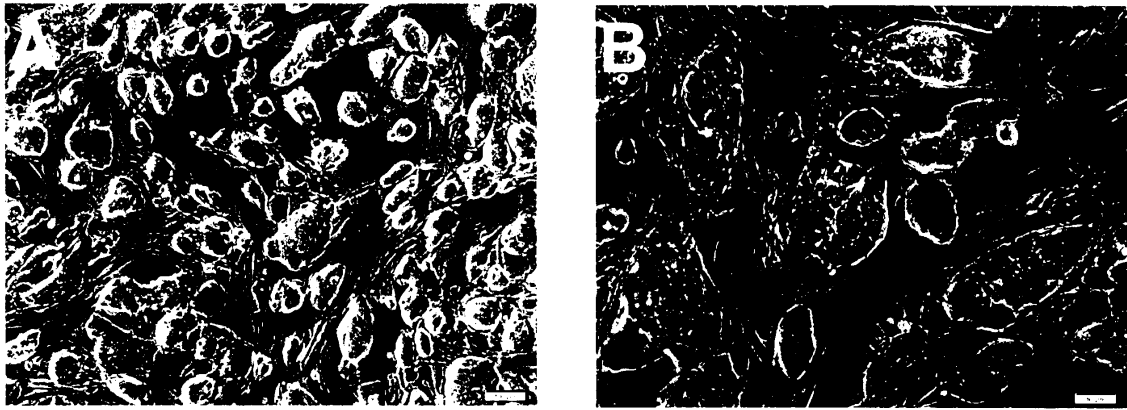
Şekil 4.4: fEKH'lerinin kültürün 1. gününde EKH'ye özgü koloni oluşturma şekilleri ve hücrelerin sınırları zıt faz mikroskopunda izlenmektedir (Bar çubukları: A-200 µm, B-100 µm, C-50 µm, D-20 µm).



Şekil 4.5: fEKH'lerinin kültürün 2. gününde kolonilerin büyüdüğü zıt faz mikroskopunda izlenmektedir (Bar çubukları: A-100 µm, B-50 µm, C ve D-20 µm).



Şekil 4.6: fEKH'lerinin kültürün 3. gününde kolonilerin birbirlerine yaklaştıkları zıt faz mikroskopunda izlenmektedir (Bar çubukları: A-200 μm , B-100 μm , C-50 μm).

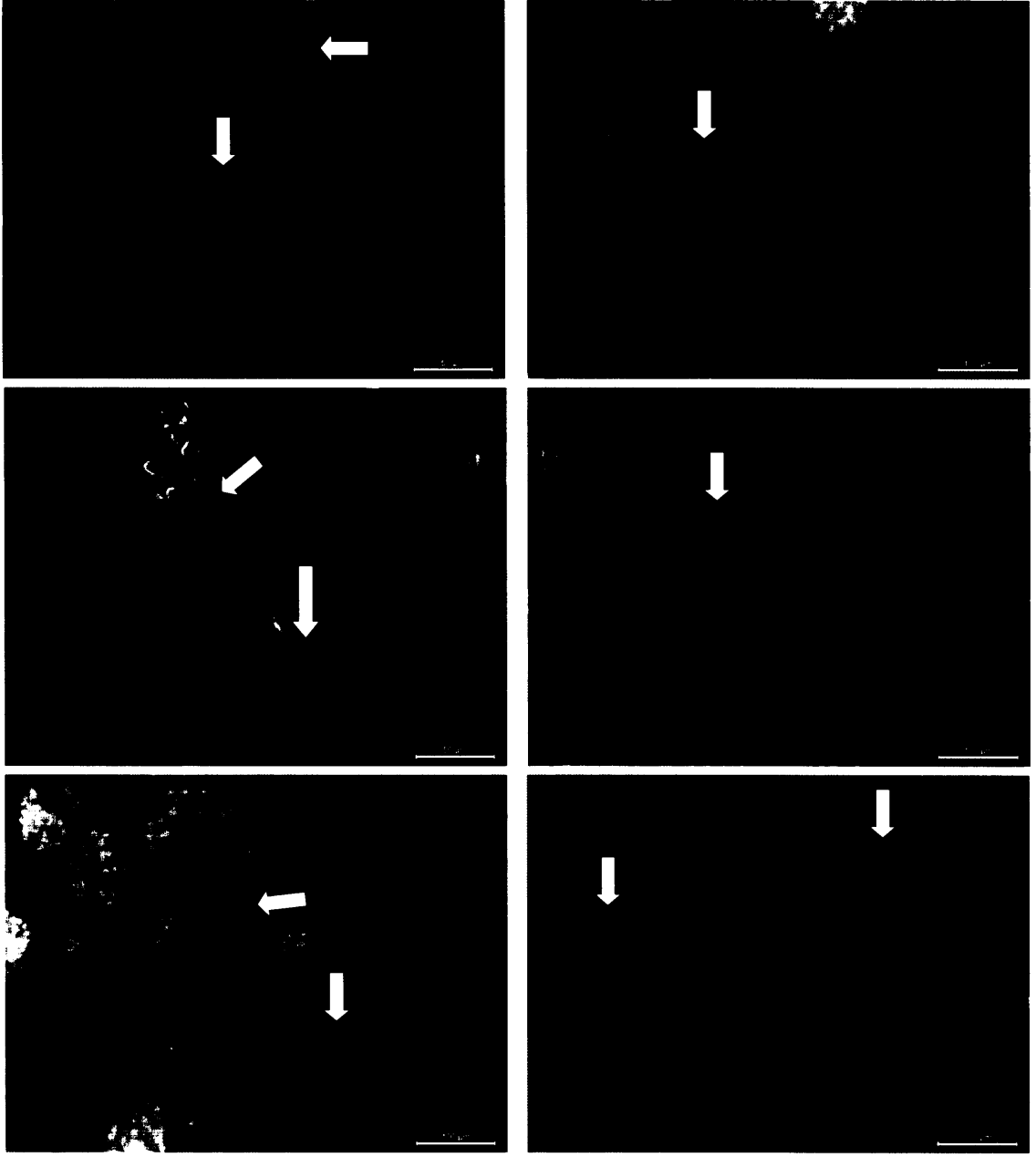


Şekil 4.7: fEKH'lerin pasaj 40'ta besleyici tabaka üzerinde farklılaşmadan kaldığı ve morfolojilerinin korunduğu zıt faz mikroskopunda izlenmektedir (Bar çubukları: A-100 μm , B-50 μm).

4.3. fEKH'lerin Karakterizasyonu

4.3.1. İmmunohistokimya

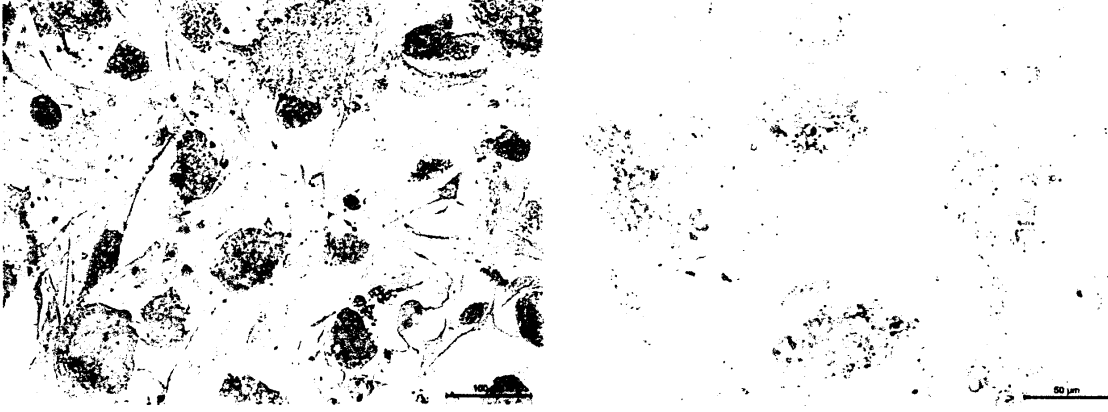
fEKH'ler pluripotensi belirteçleri olan Nanog, Oct4 ve SSEA1 antikoları ile boyanmış ve pozitiflik göstermişlerdir (**Şekil 4.8**). Böylece hücrelerin uzun süreli pasajlanmalarının ardından pluripotensi özelliklerini korudukları gösterilmiştir.



Şekil 4.8: Nanog, Oct-4, Sox-2 ve a-SMA (alfa-düz kas aktin)için immun boyanmış fEKH'lerinin pozitif reaksiyonları izlenmektedir. SSEA1 ekspresyonu EKH'lerde membransı immunoreaktivite göstermektedir (oklar). Oct-4'un ekspresyon dağılımı nukleer iken Nanog hem nukleer hem de sitoplazmik olarak izleniyor (oklar) (Bar çubukları: A-100 µm, B-50 µm, C ve D-20 µm).

4.3.2. Alkalen Fosfataz Analizi

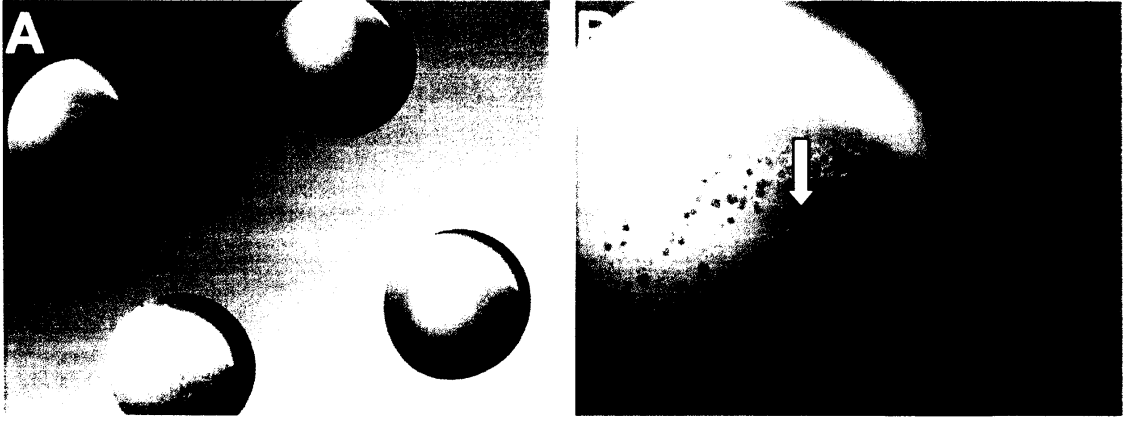
Besleyici hücre tabakası üzerinde kültüre edilen EK hücre kolonilerinin tamamı alkalen fosfotaz (ALP) aktivitesi göstermişken, fEF'leri göstermemiştir (**Şekil 4.9**).



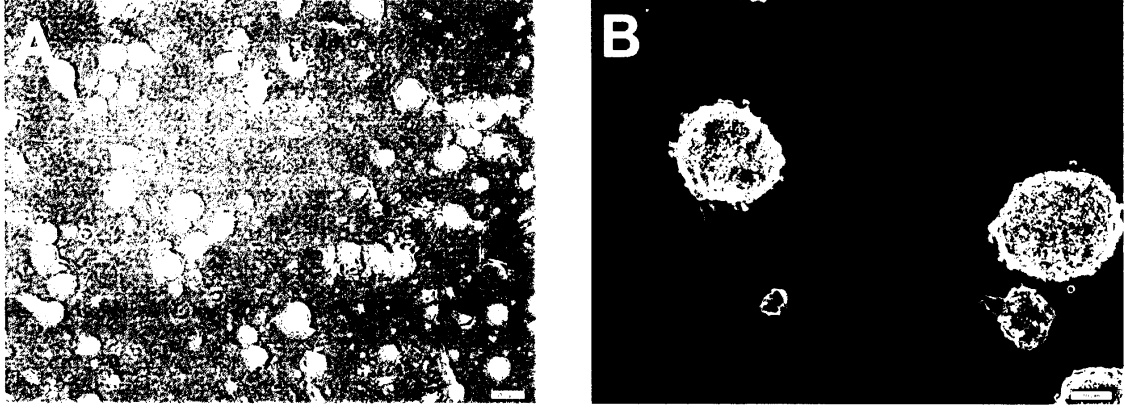
Şekil 4.9: fEKH kolonilerinde ALP aktivitesi ışık mikroskopunda pozitif olarak izlenmektedir (Bar çubukları: A-100 μm , B-50 μm).

4.4. Embriyoid Cisimcik Oluşumu

fEKH'ler farklılaştırmaya alınmadan önce asılı damla (Hanging Drop) (**Şekil 4.10**) ve süspansiyon kültürü (**Şekil 4.11**) yöntemleri kullanılarak EC oluşumu sağlanmıştır.



Şekil 4.10: Asılı damla yöntemi (A) ile oluşturulmuş EC'lerin (B) stereo mikroskop görüntüleri izlenmektedir (Orijinal büyütme:X10).

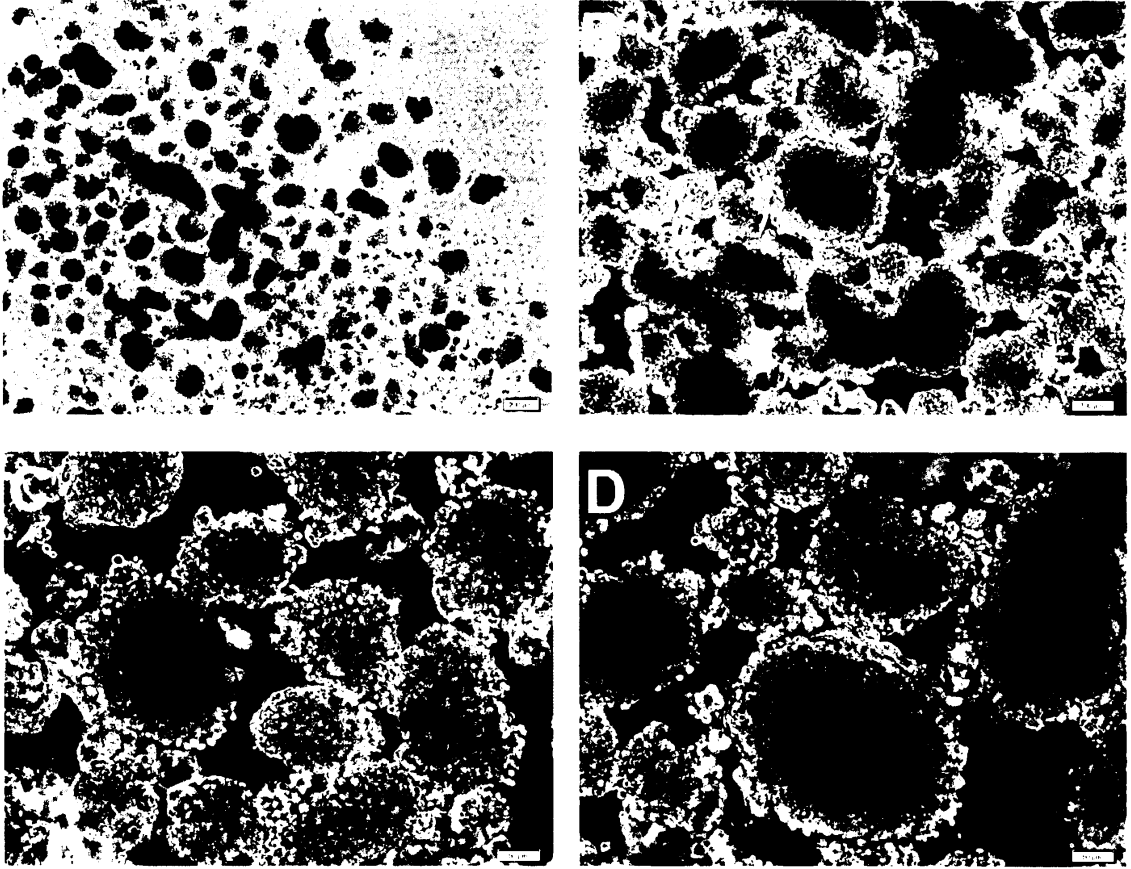


Şekil 4.11: Süspansiyon kültürü yöntemiyle elde edilen EC'ler zıt faz mikroskobundaki izlenmektedir (Bar çubukları: A-200 μm , B-50 μm).

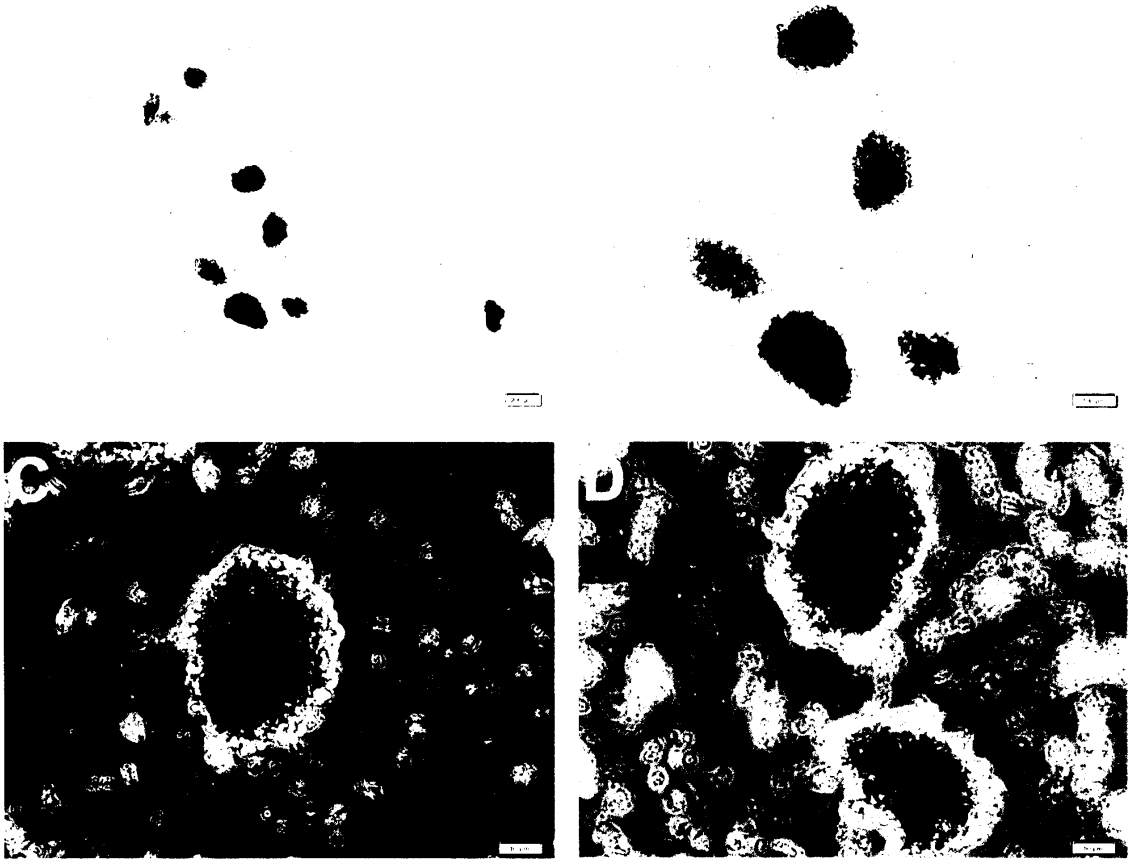
Hücreler süspansiyon kültürlerinde bir araya gelerek EC'leri oluşturmuştur. EC'ler 3 günlük süspansiyon kültürlerinden sonra %0,1'lik jelatinle kaplanmış kültür kaplarına alınarak adherent kültürleri sağlanmıştır.

4.5. Adacıklarının İzolasyonu ve Karakterizasyonu

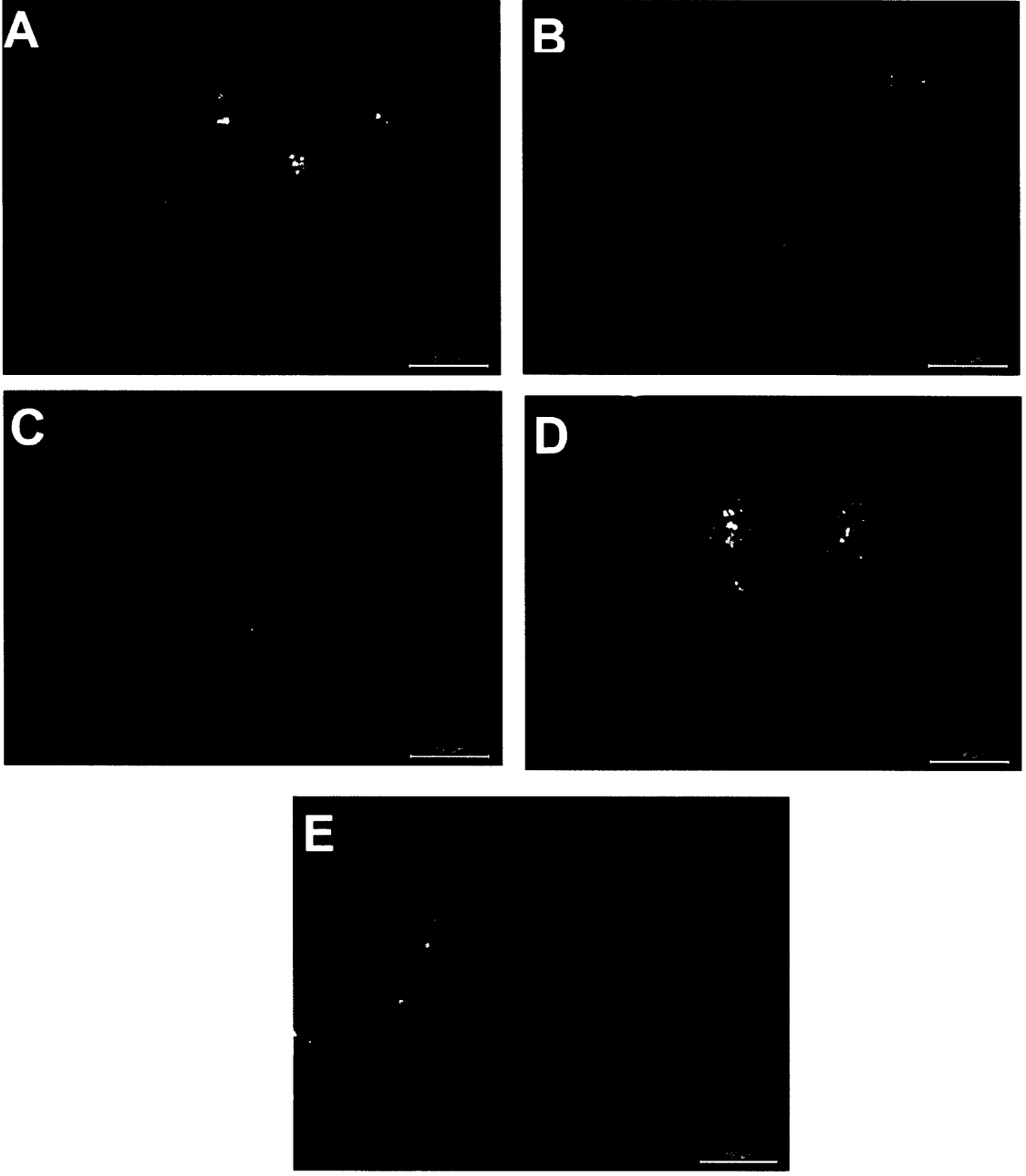
Fare pankreasından izole edilmiş adacıklar stereo mikroskop altında sayılmıştır (Şekil 4.12). Elde edilen adacıkların karakterizasyonu için, adacıklara özgün dithiyozone (DTZ) boyaması kullanılmıştır. DTZ, beta hücrelerinin mitokondriyonlarındaki çinko (Zn)'ya bağlanarak kırmızı renk vermektedir. DTZ ile boyanarak pozitif olduğu belirlenmiş (Şekil 4.13); Canlılık testi için, FDA-PI (Floresan diasetat-Propidyum iyodür) floresans boyamaları gerçekleştirilmiştir. Floresans mikroskoptaki incelemelerde FDA pozitif hücreler yeşil (canlı), PI pozitif hücreler kırmızı (ölü) olarak izlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.12: Fare pankreasından izole edilmiş ve stereo mikroskop altında mikro pipetle seçilen Langerhans adacıklarının morfolojileri A: Stereo mikroskop görüntüleri, B, C ve D: Zıt faz mikroskop görüntüleri izlenmektedir (Bar çubukları: A-200 μm , B-100 μm , C ve D-50 μm).



Şekil 4.13: DTZ ile boyanmış adacıkların zıt faz mikroskop görüntüleri pozitif olarak izlenmektedir (Bar çubukları: A-200 μm , B-100 μm , C ve D-50 μm).

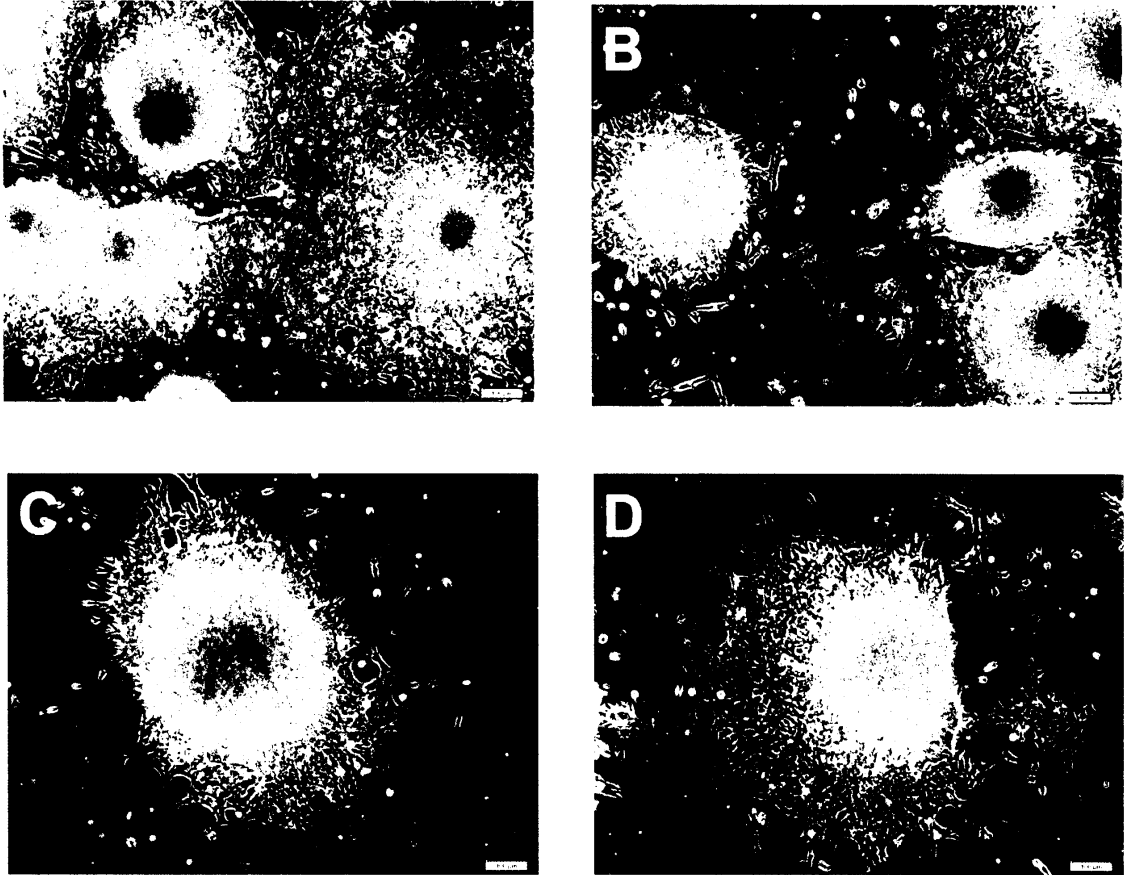


Şekil 4.14: Adacıkların canlılığını gösteren FDA (canlı-yeşil) PI (ölü-kırmızı) (Bar çubukları: A, B, D-200 μm , C ve E-200 μm).

4.6. fEKH'lerin Kimyasal ve Adacık Mikroçevresinde Farklılaştırma Çalışmaları

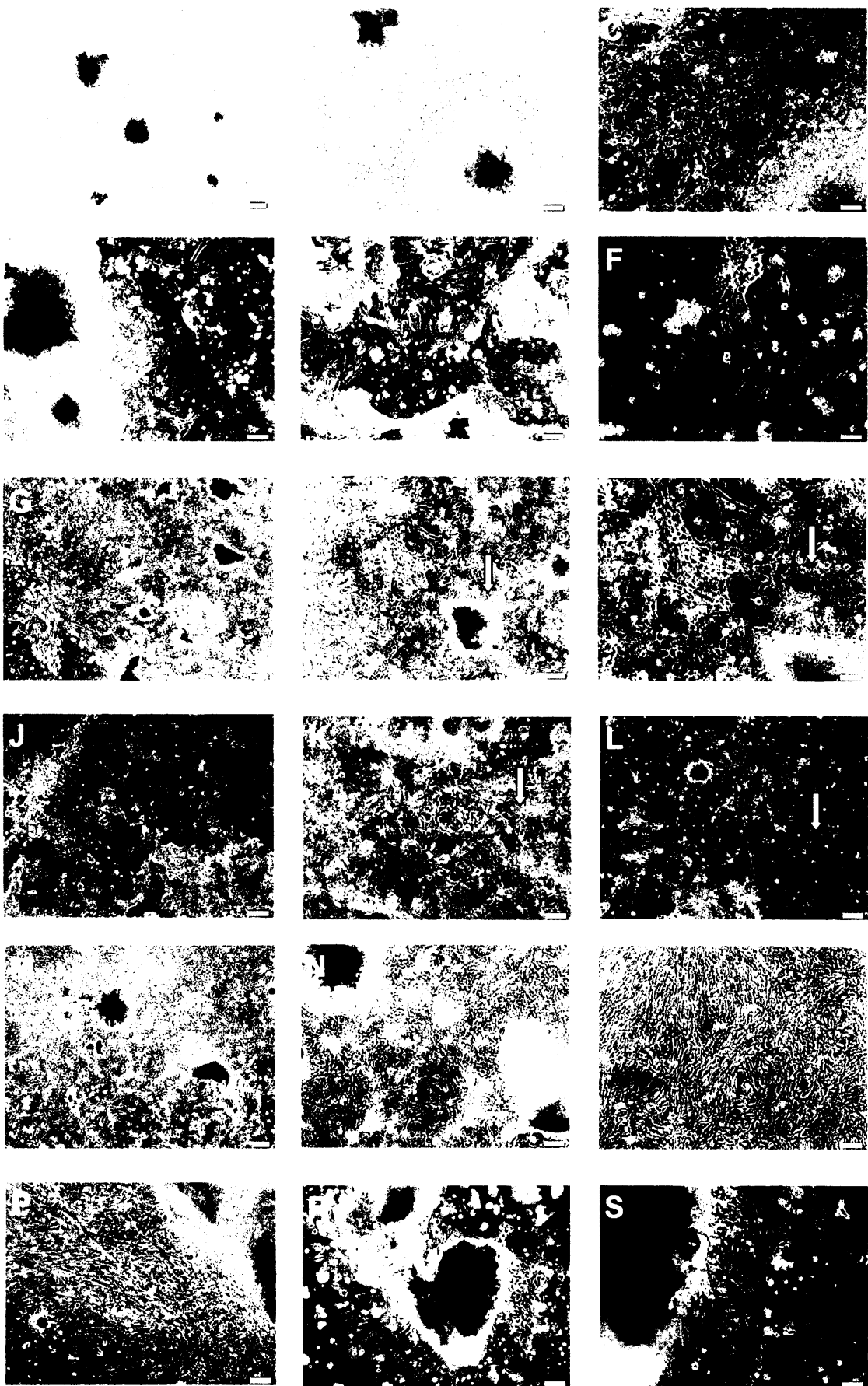
4.6.1. fEKH'lerin *in vitro* Koşullarda Kimyasal Yolla İnsülin Üreten Hücreye Farklılaştırılması

Süspansiyon kültürlerinde 3 gün boyunca bekletilen EC'ler 3.günün sonunda jelatin kaplı kültür kaplarına alınmış ve 1 gün beklenerek kültür kabı yüzeyine yapıştıkları gözlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınmadan önce EC'lerin kültür kabınının tabanına yapıştığı ve yayıldığı zıt faz mikroskopta izlenmektedir (Bar çubukları: A, B,D-100 µm, B-50 µm).

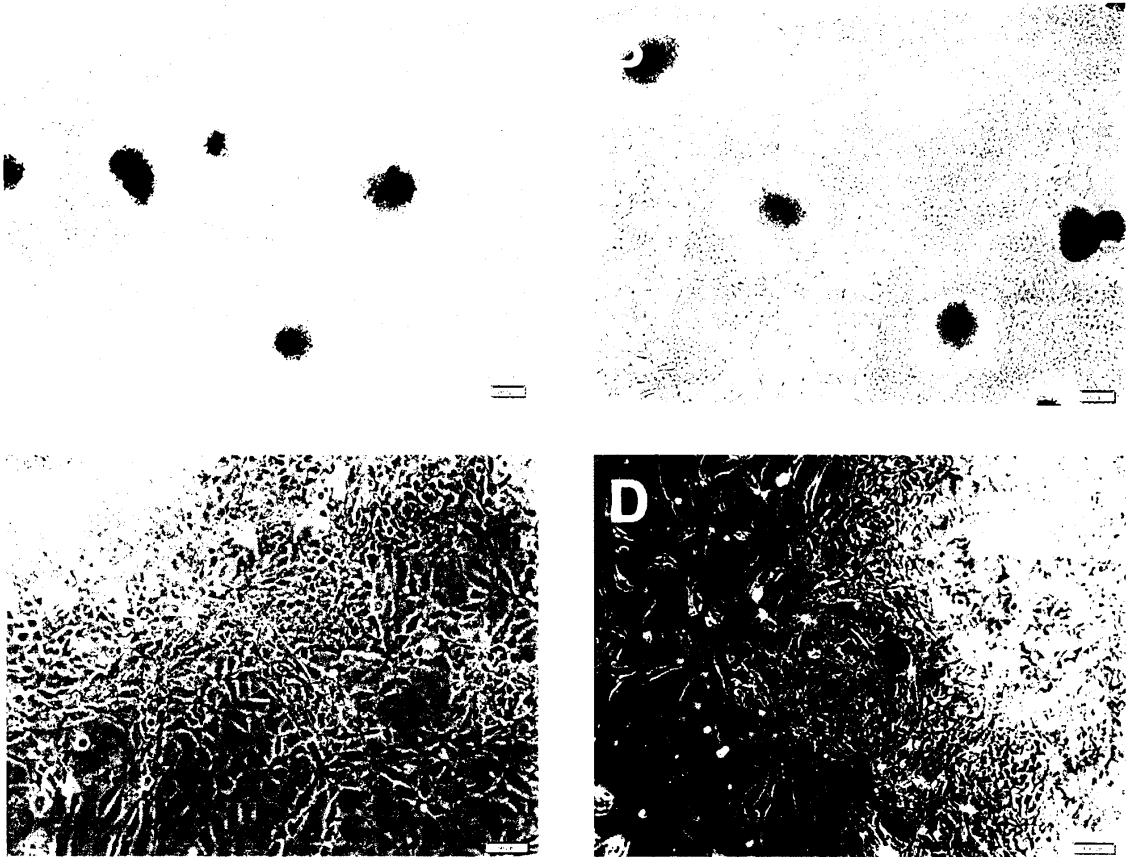
Ardından hücreler kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırmak amacıyla kültüre edilerek 1 ay boyunca morfolojileri günlük olarak takip edilmiş, günler arası karşılaştırma yapılmıştır. Hücrelerin kültürününün 7. gününde morfolojilerinde epitelial hücre benzeri hücreler görülmeye başlanmıştır (**Şekil 4.16 G-I okla gösterilmiştir**). Epitelial morfolojideki hücreler kültürün 14. gününde de gözlenmeye devam etmiştir (**Şekil 4.16 J-L okla gösterilmiştir**). 21. günde mevcut epitelial morfoloji kaybolmaya başlamış (**Şekil 4.16 M-O**) ve kültürün 30. gününde adherent kültürlerindeki EC'lerden yeni hücrelerin çıkmaya başladığı görülmüştür (**Şekil 4.16 P-S**).



Şekil 4.16: *In vitro* koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınan EC'lerin çeşitli günlerdeki morfolojik değişimleri zıt faz mikroskopta izlenmektedir (A, B, C: 1.gün; D, E, F: 3.gün; G, H, I: 7.gün; J, K, L: 12.gün; M, N, O: 26.gün, P, R, S: 30.gün) (Bar çubukları: A, G, M-200 µm, B, D, E, H, J, K, L, N, O, P, R-100 µm, C, F, I, S-50 µm).

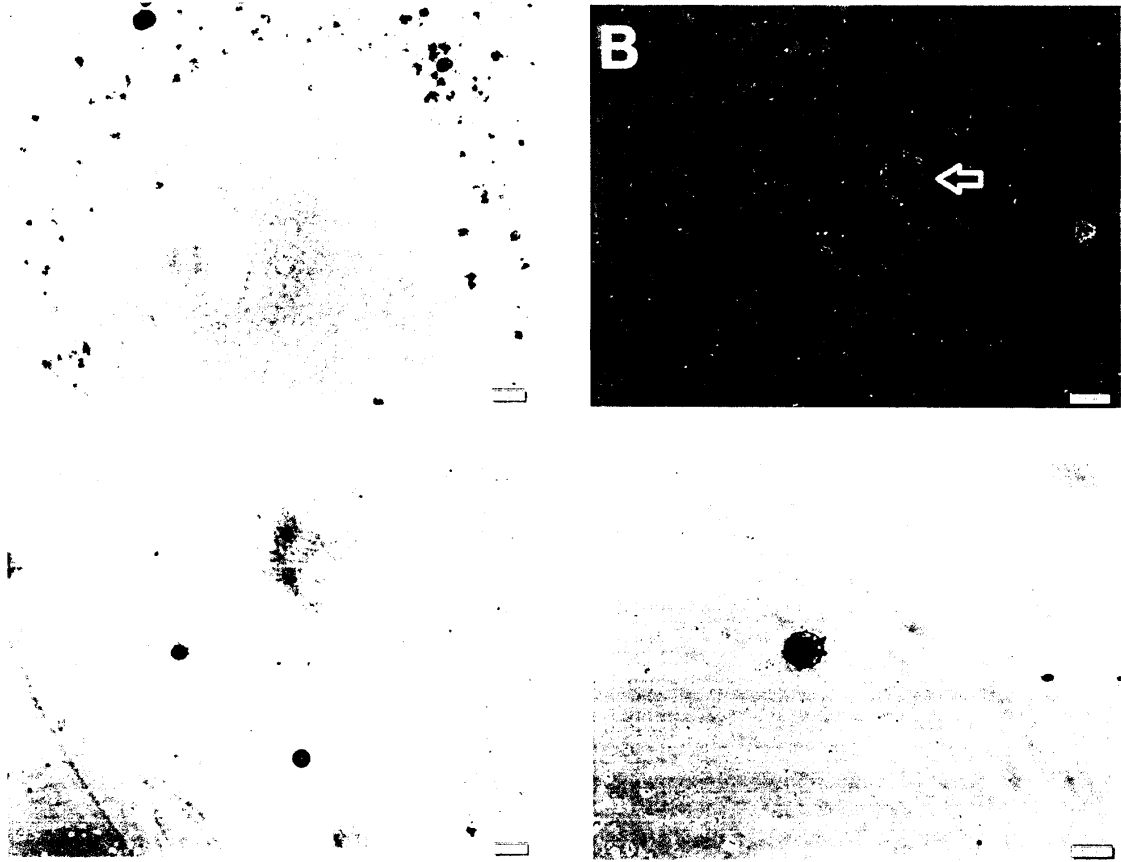
4.6.2. fEKH'lerin Langerhans Adacıkları ile İndirekt Ko-Kültürü

Süspanse kültürlerinde 3 gün boyunca bekletilen EC'ler 3.günün sonunda jelatin kaplı kültür kaplarına alınmış ve 1 gün beklenerek kültür kabı yüzeyine yapışıkları gözlenmiştir (Şekil 4.17).



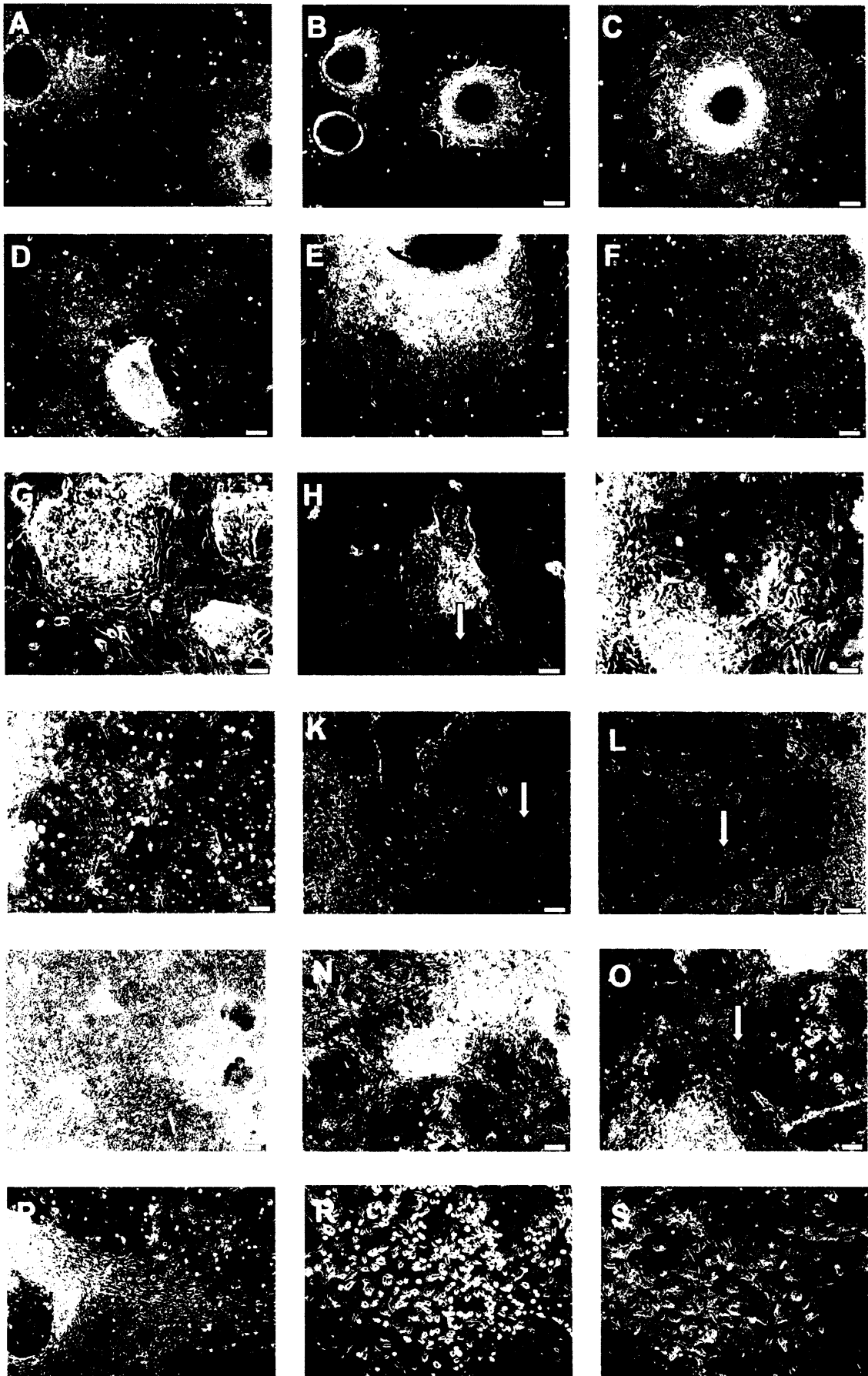
Şekil 4.17: Ko-kültür öncesi EC'lerin kültür kabının tabanına yapıştığı ve yayıldığı zıt faz mikroskopta izlenmektedir (Bar çubukları: A, B, D-200 µm, C-50 µm).

Hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışmasından sonra 0,4µm por çapındaki insertler 12 kuyucuklu kültür kapları üzerlerine yerleştirilmiş ve bunların üzerine adacıklar ekilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: İnsertler üzerine yerleştirilmiş fare adacıkları (okla gösterilmiştir) ve insert altında kültür kabının tabanına yapışan EC'ler (daire içerisinde gösterilmiştir) zıt faz mikroskopta izlenmektedir (Bar çubukları: A, C-200 µm, B, D-100 µm).

Hücreler adacıklar ile 1 ay boyunca ko-kültüre edilerek morfolojileri günlük olarak takip edilmiş, günler arası karşılaştırma yapılmıştır. Hücrelerin kültürününün 7. gününde morfolojilerinde epiteliyal hücre benzeri hücreler görülmeye başlanmıştır (**Şekil 4.19 G-I okla gösterilmiştir**). Epiteliyal morfolojideki hücreler kültürün 14. gününde de gözlenmeye devam etmiştir (**Şekil 4.19 J-L okla gösterilmiştir**). 21. günde mevcut epiteliyal morfoloji devam ederken (**Şekil 4.19 M-O**) kültürün 30. Gününde farklılaşmış hücre morfolojileri devam ederken; bunun yanında bir kısım hücrelerin ölmeye başladığı görülmüş, aynı zamanda adherent kültürlerindeki EC'lerden yeni hücrelerin çıkmaya başladığı görülmüştür (**Şekil 4.19 P-S yıldız ile gösterilmiştir**).



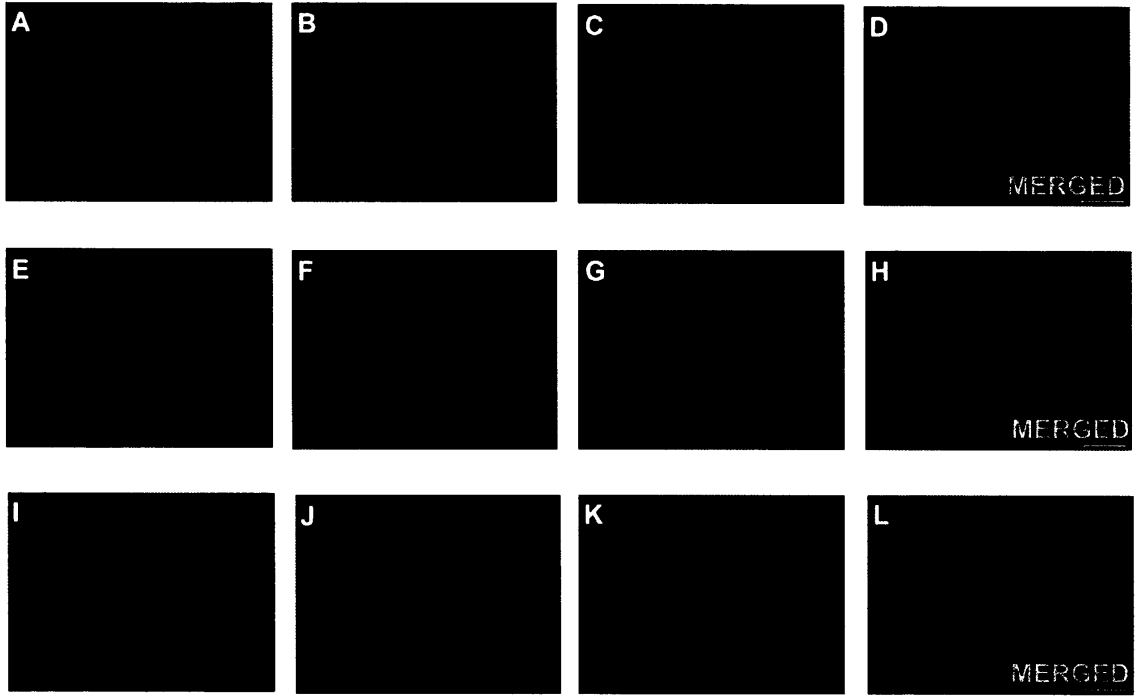
Şekil 4.19: Adacıklarla doğrudan olmayan ortak kültüre alınan EC'lerin farklı günlerdeki morfolojik değişimlerinin zıt faz mikroskopik görünümü izlenmektedir (Bar çubukları: M-200 µm, A, B, C, D, E, F, J, O, P, R-100 µm, G, H, I, K, L, S-50 µm).

Adacıkların insertler üzerine koyulmasından sonra 1 ay boyunca kültür devam ettirilmiştir. Hücreler 7., 14., 21. ve 30.günlerde ortamdan alınarak farklılaştırma analizleri için tespit edilmiştir.

4.7.fEKH'lerin Farklılaştırma Sonrası Karakterizasyon Çalışmaları

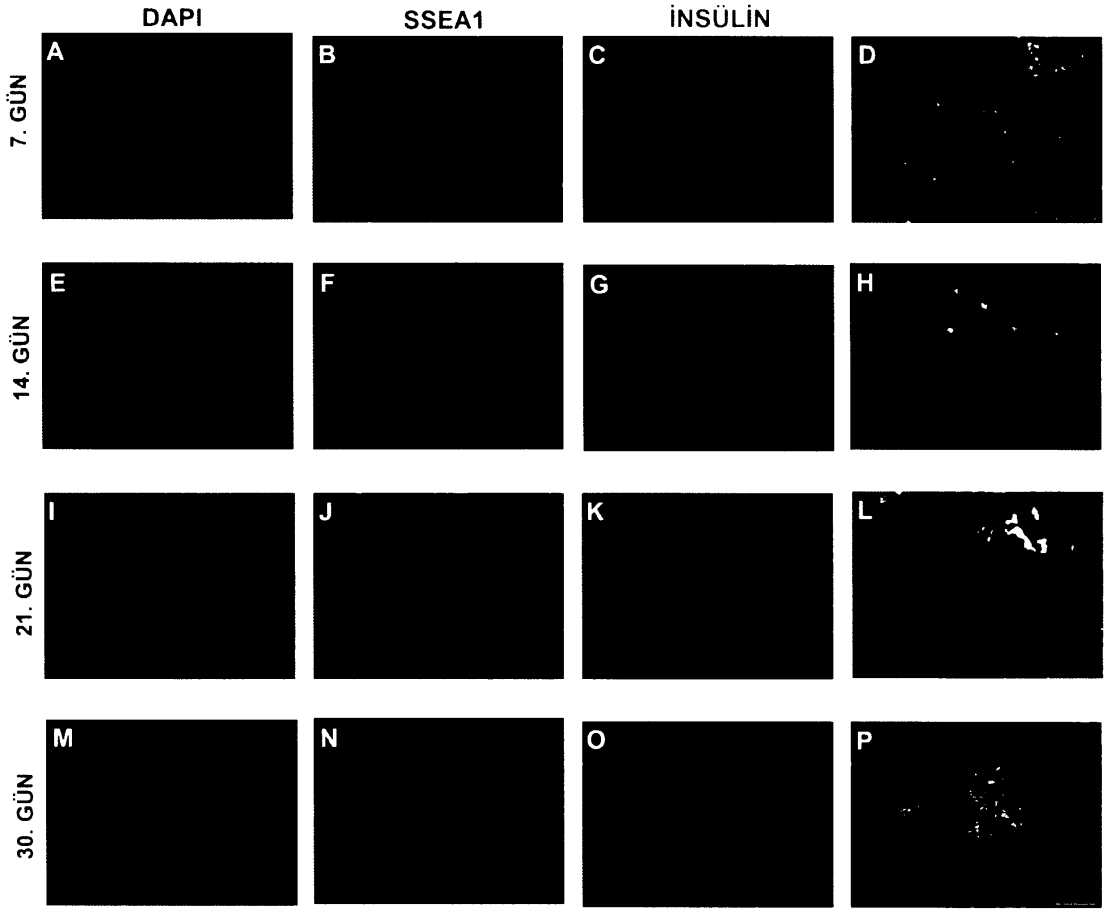
4.7.1. İmmunohistokimya

Kontrol amacıyla (insülin üreten hücre yönünde farklılaştırılmamış) fEKH kaynaklı EC'lerin adherent kültürlerinde hücreleri pluripotensiyi gösteren belirteçlerden biri olan SSEA1 için pozitif olarak immunreaksiyon vermiştir (**Şekil 4.20 B ve D**). Bununla birlikte, insülin üreten hücrelere özgün olan insülin (**Şekil 4.20 C,D,F ve H**) ve PDX1 (**Şekil 4.20G,H,K ve L**) için ise negatif immunreaktivite izlenmiştir.



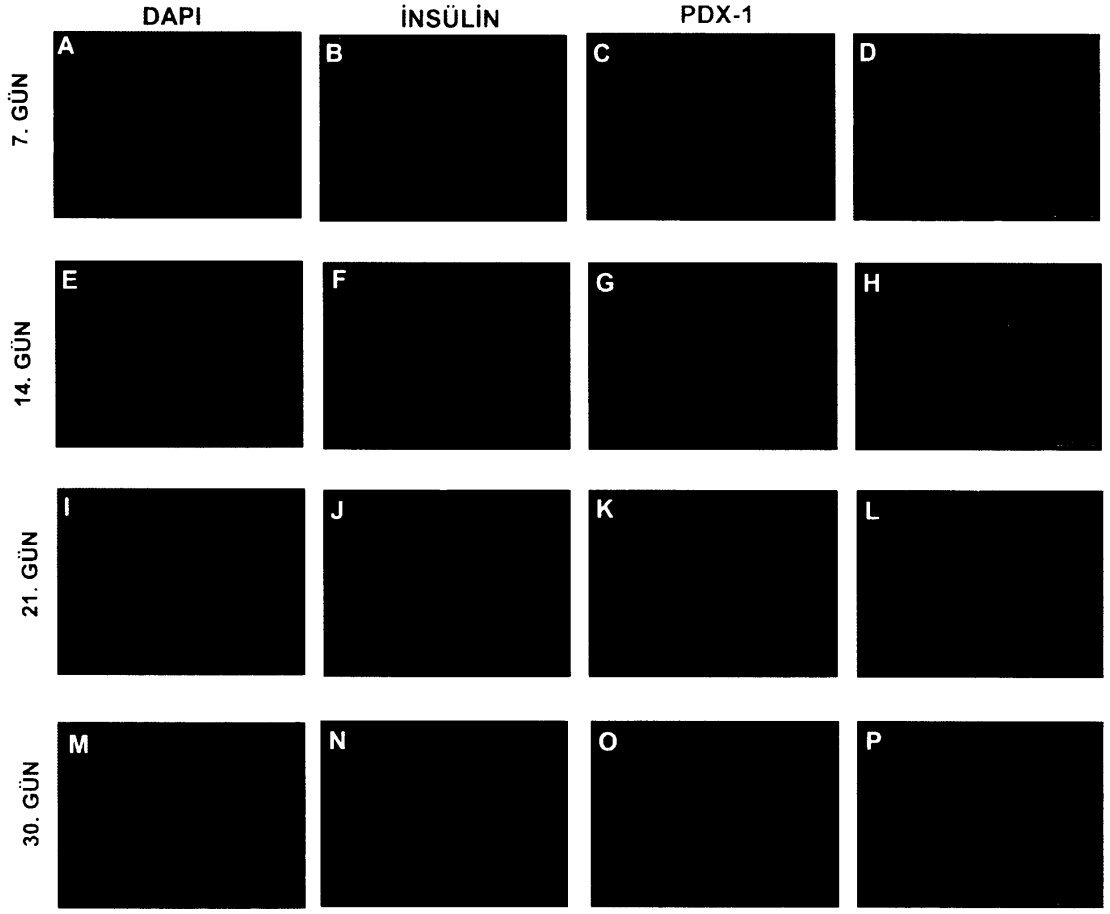
Şekil 4.20: fEKH'lerden elde edilen EC'lerde insülin (negatif), PDX1 (negatif) ve SSEA1(pozitif) ekspresyonları fuloresans mikroskopta gözlenmektedir (Bar çubukları: D, H, L-200 µm).

Farklılaşma kültürlerinde (kimyasal uyarım) 7., 14., 21. (Şekil 4.21 A-D) ve 30. (Şekil 4.21 E-H) günlerde EC kaynaklı hücreler SSEA1 ve İnsülin için immunboyamaya alınmışlardır. Kimyasal uyarımla farklılaştırmaya yönlendirilen EKH'ler 7. ve 14. günlerde insülin yönünden zayıf ya da negatif immunreaksiyon göstermişlerdir. Şekil 24D'de görüldüğü üzere, farklılaşmanın 21.gününde, EC'lerden kaynaklanan hücrelerin bir kısmı insülin için pozitif reaksiyon göstermeye başlamıştır. Bununla birlikte, kültürde farklılaşmamış SSEA1 pozitif hücreler çoğunlukta olarak izlenmiştir. Farklılaşma kültürünün 30. gününde ise, önceki sürecin aksine insülin pozitif hücrelerin belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Buna karşılık, SSEA1'i eksprese eden hücre yoğunluğunda önemli azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.21 E-H).

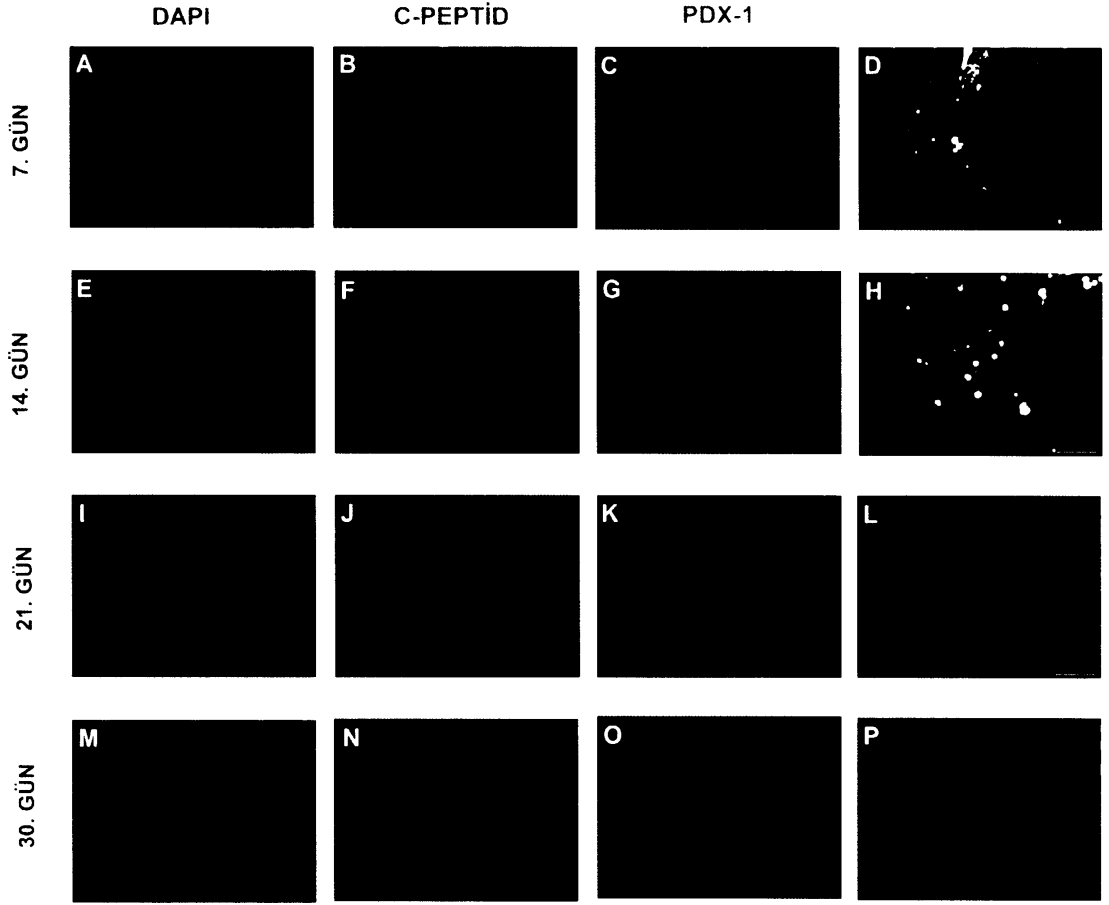


Şekil 4.21: fEKH'lerin *in vitro* koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda SSEA1 (yeşil) ve insülin (kırmızı) ile boyanması immunfloresans olarak izlenmektedir (Bar çubukları: D, H, L-50 µm,P-200 µm).

Hücreler, insülin ve PDX1 ile ikili boyandıklarında ise, 7., 21. ve 30.günlerinde insülinin pozitif ancak PDX1'in negatif olduğu görülmüştür (**Şekil 4.22**). C-peptid ve PDX1 ikili boyamalarında hücrelerde 7. ve 14. günlerde her ikisinin de pozitif olduğu görülmüştür (**Şekil 4.23**).

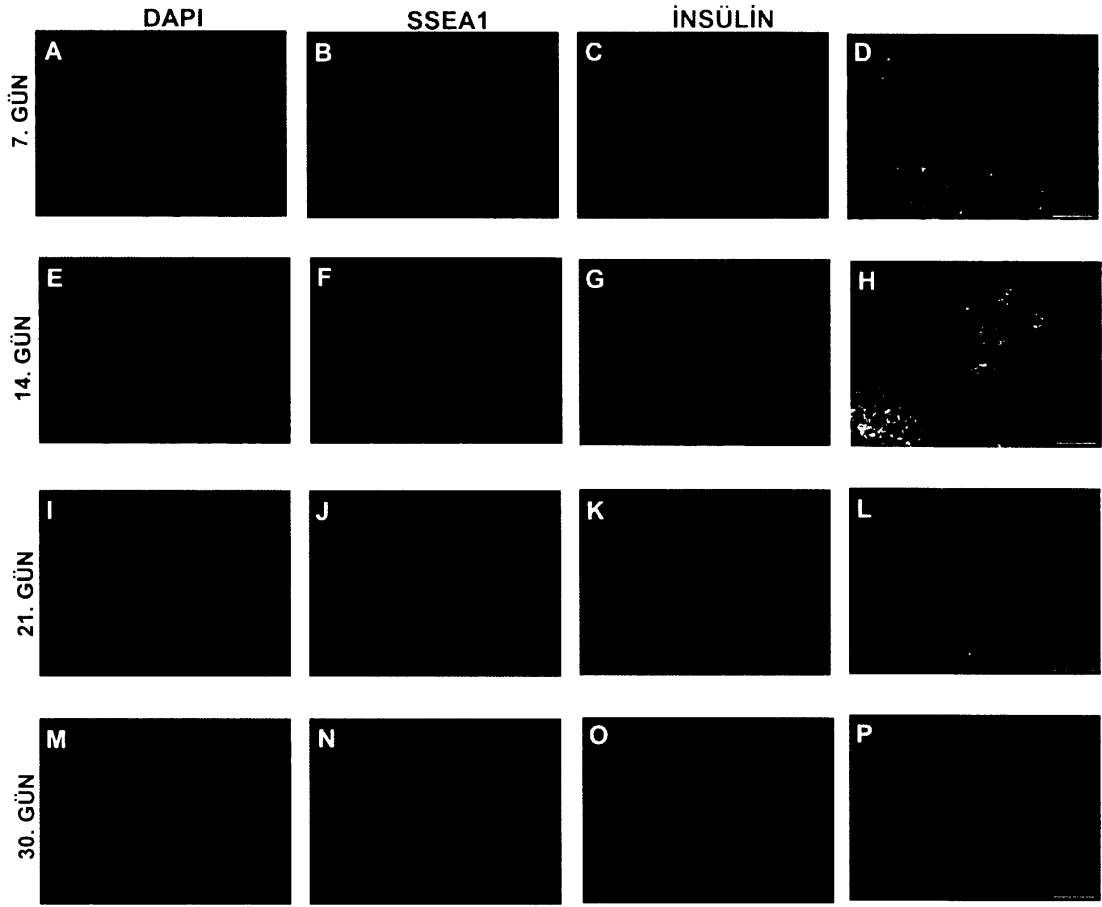


Şekil 4.22: FEKH'lerin *in vitro* koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda insülin (yeşil) ve PDX1 (kırmızı) ile boyanması immunfloresans olarak izlenmektedir (Bar çubukları: D, H, L, P-50 µm).

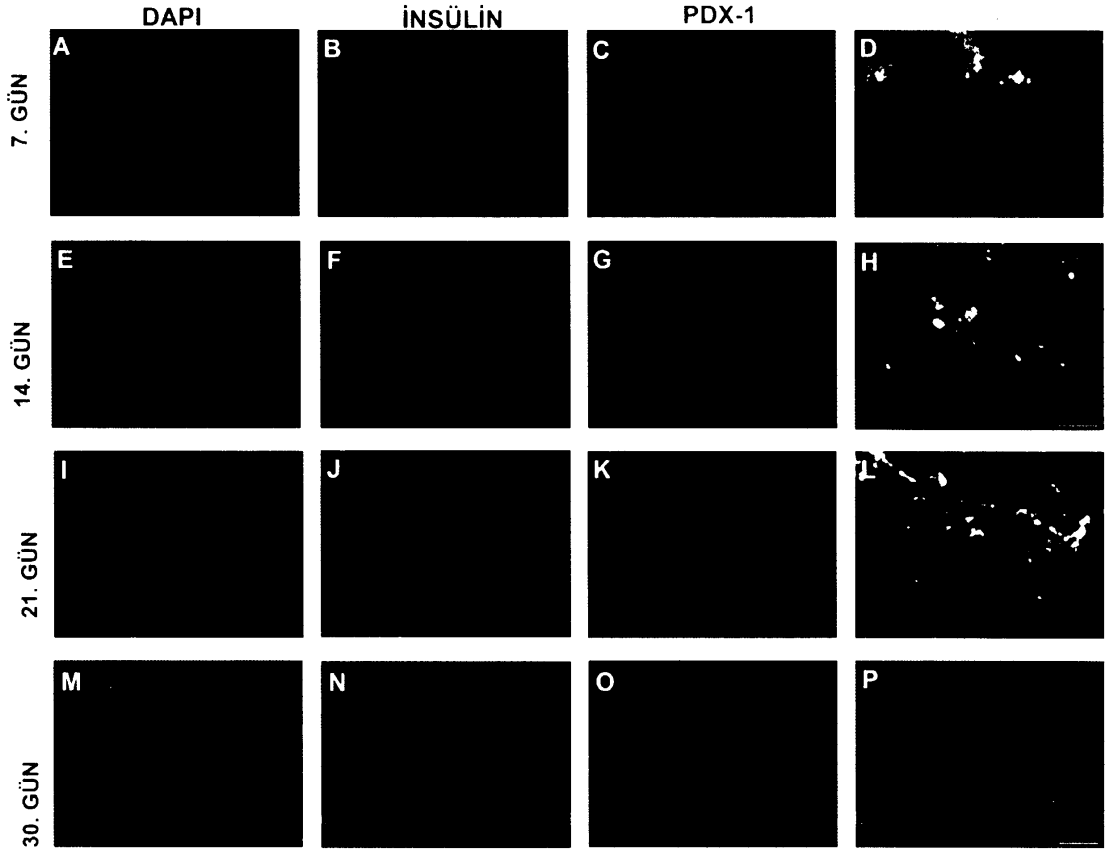


Şekil 4.23: fEKH'lerin *in vitro* koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılması yöntemi ile farklılaşmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda c-peptid (yeşil) vePDX1 (kırmızı) ile boyanması immunfloresans olarak izlenmektedir (Bar çubukları: D, H, L, P-50 µm).

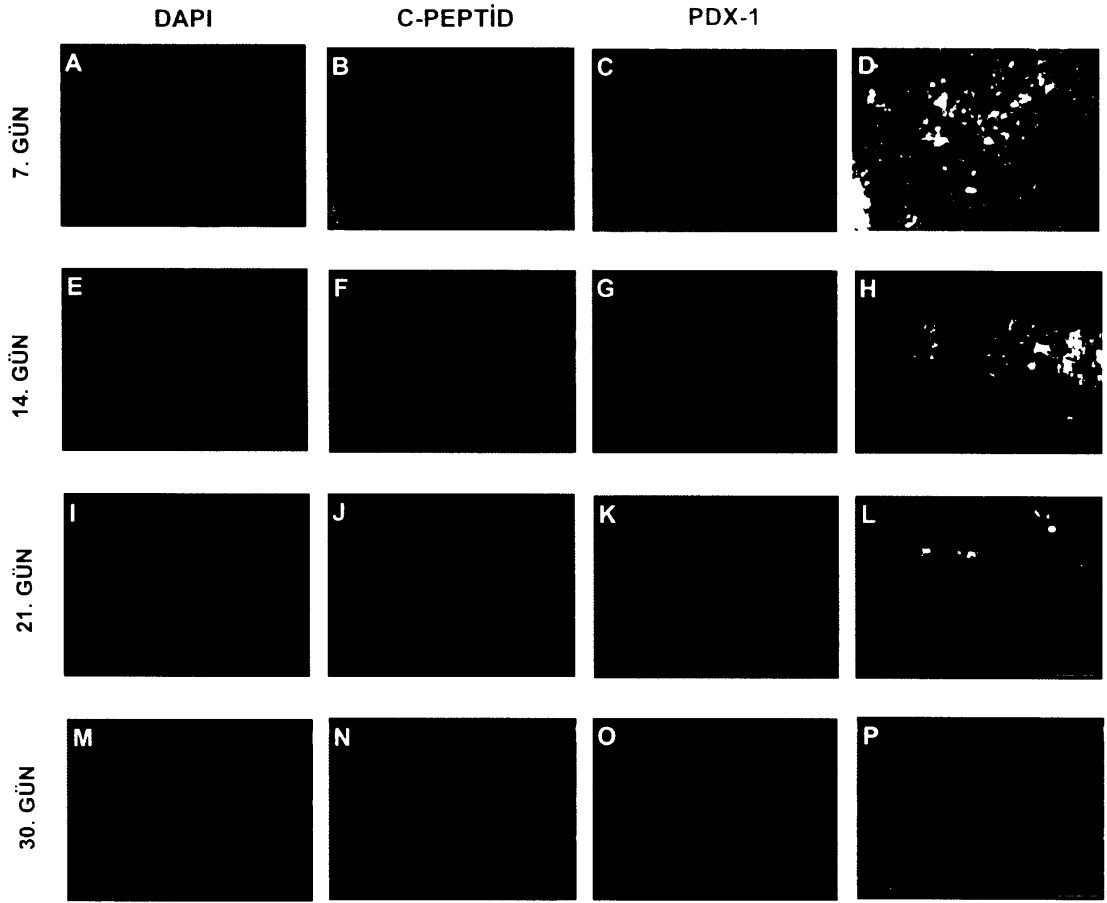
fEKH'lerin *in vitro* koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması yoluyla farklılaşmaya alınan hücrelerde 7.ve 14.günlerde SSEA-1 ekspresyonunun kuvvetli olduğu (Şekil 4.24 B ve F) ancak bu ekspresyonun ilereleyen günlerde azaldığı (Şekil 4.24 J ve N) görülmüştür. İnsülin ekspresyonunun ise özellikle 21. ve 30. günlerde kuvvetli bir şekilde arttığı izlenmiştir (Şekil 4.25 J ve N). PDX1 ekspresyonu ise günler arası farklılık göstermiştir (Şekil 4.25-26). C-peptid ekspresyonu ise insülin ile benzer şekilde kuvvetli bir şekilde izlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.24: fEKH'lerin *in vitro* koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması yoluyla farklılaşmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda SSEA1 (yeşil) ve insülin (kırmızı) ile boyanması immunfloresans olarak izlenmektedir (Bar çubukları: D, H, L, P-200 μ m).



Şekil 4.25: fEKH'lerin *in vitro* koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması yoluyla farklılaşmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda insülin (yeşil) ve PDX1 (kırmızı) ile boyanması immunfloresans olarak izlenmektedir (Bar çubukları: D, H, L, P-50 µm).



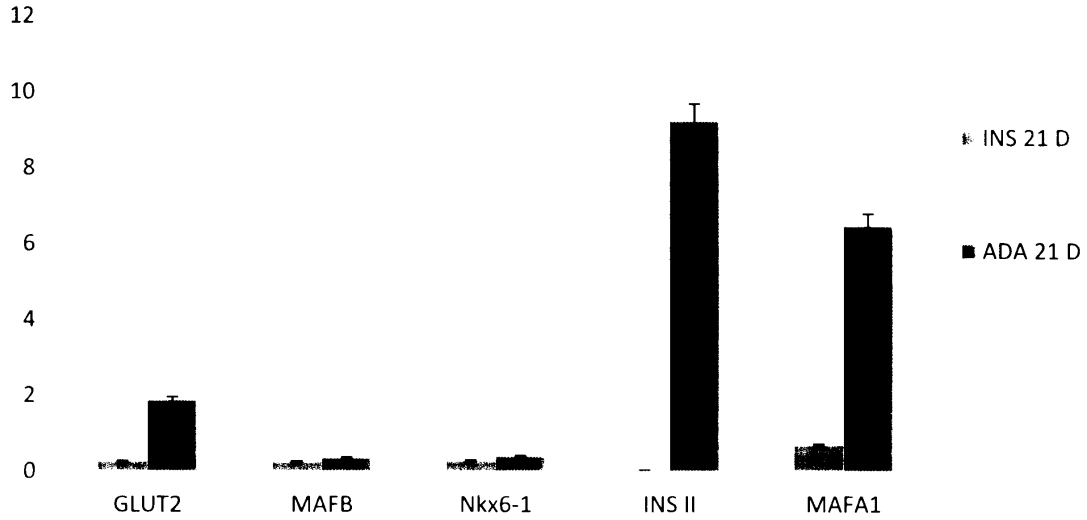
Şekil 4.26: fEKH'lerin *in vitro* koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması yoluyla farklılaşmaya alınan hücrelerin farklılaşmanın çeşitli günleri sonunda C-peptid (yeşil) ve PDX1 (kırmızı) ile boyanması immunfloresans olarak izlenmektedir (Bar çubukları: D, H, L, P-50 µm).

4.7.2. Gen Ekspresyon Analizleri

Kimyasal indüksiyon ve adacık mikroçevresinde kültür sonucu farklılaşmış EKH'lerde insülin üreten hücrelere özgün GLUT 2, MafA, MafB, Nkx6-1 ve Ins 2 gibi bazı gen ve transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon düzeyleri real time PCR ile analiz edilmiştir.

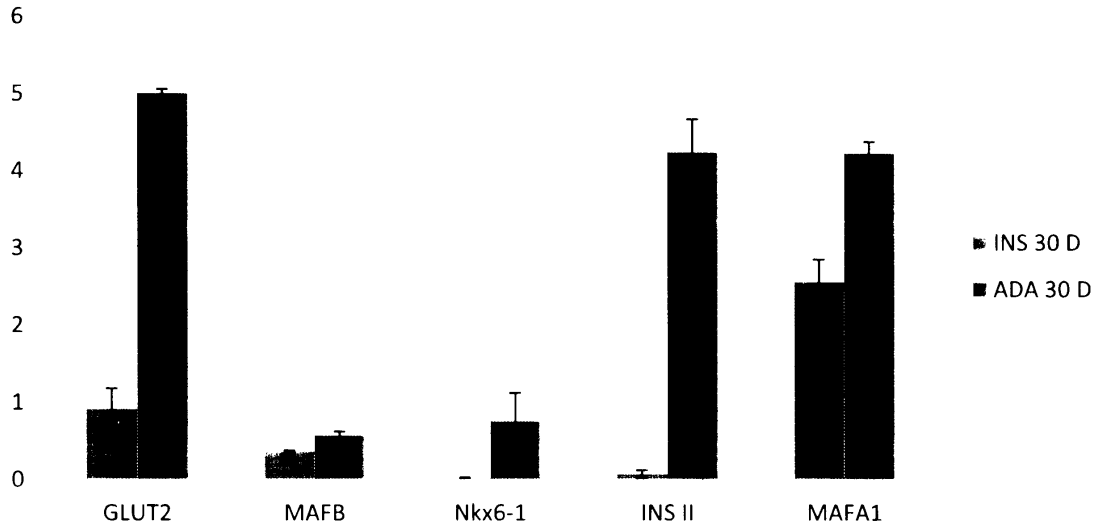
Farklılaştırmanın 21. gününde gerçekleştirilen analizlere göre; adacık mikroçevresinde ko-kültüre edilen farklılaşmış EKH'lerin GLUT2, NKX6-1 ve insülin2 gen ifadelerinin kimyasal yolla farklılaştırılmış hücrelere oranla anlamlı düzeyde yüksek

eksprese edildikleri tespit edilmiştir ($p<0.001$). Ayrıca, adacıklar ile ortak kültüre edilmiş farklılaşmış EKH'lerde MafB gen ifadesinin yükselişinin ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) ve MafA gen ifadesinin ise çok ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27: fEKH'lerin insülin üreten hücelere farklılaştırılmasının 21. gününde gen ekspresyon analizleri izlenmektedir (GLUT2: $p\leq 0,05$; MafB: $p\leq 0,01$; NKX6-1: $p\leq 0,05$; Ins 2: $p\leq 0,05$; MafA: $p\leq 0,001$).

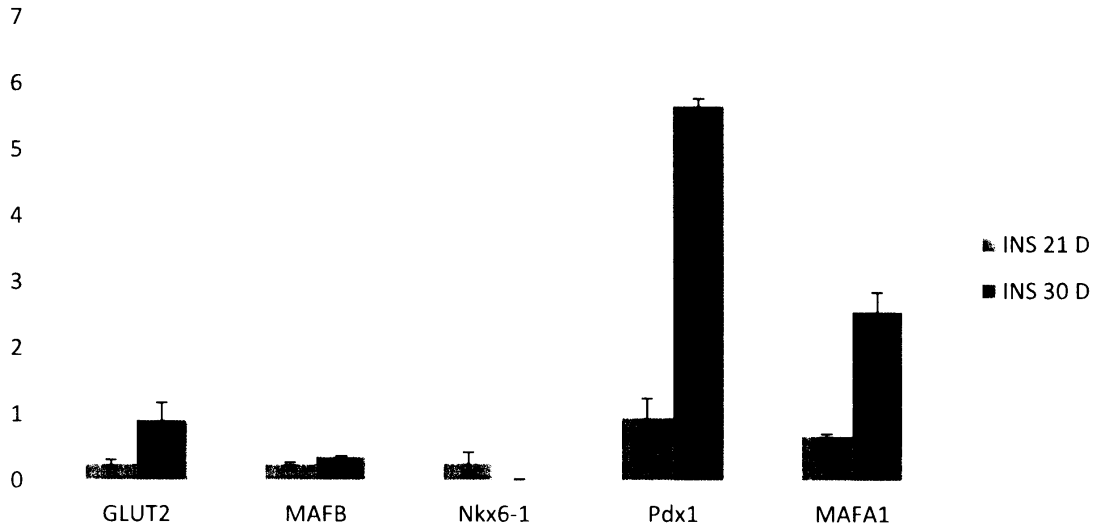
Farklılaştırmanın 30. günündeki analizlere göre; adacıklar ile ko-kültür ortamına alınan hücelerde diğer yonteme göre NKX6-1 gen ifadesindeki yükselişin anlamlı; MafB gen ifadesindeki yükselişin ileri derecede anlamlı; GLUT2, insülin2 ve MafA gen ifadelerindeki yükselişin ise çok ileri derecede anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.28).



Şekil 4.28: fEKH'lerin insülin üreten hücelere farklılaştırılmasının 30. gününde gen ekspresyon analizleri izlenmektedir (GLUT2: $p \leq 0,001$; MafB: $p \leq 0,01$; NKX6-1: $p \leq 0,05$; Ins 2: $p \leq 0,001$; MafA: $p \leq 0,001$).

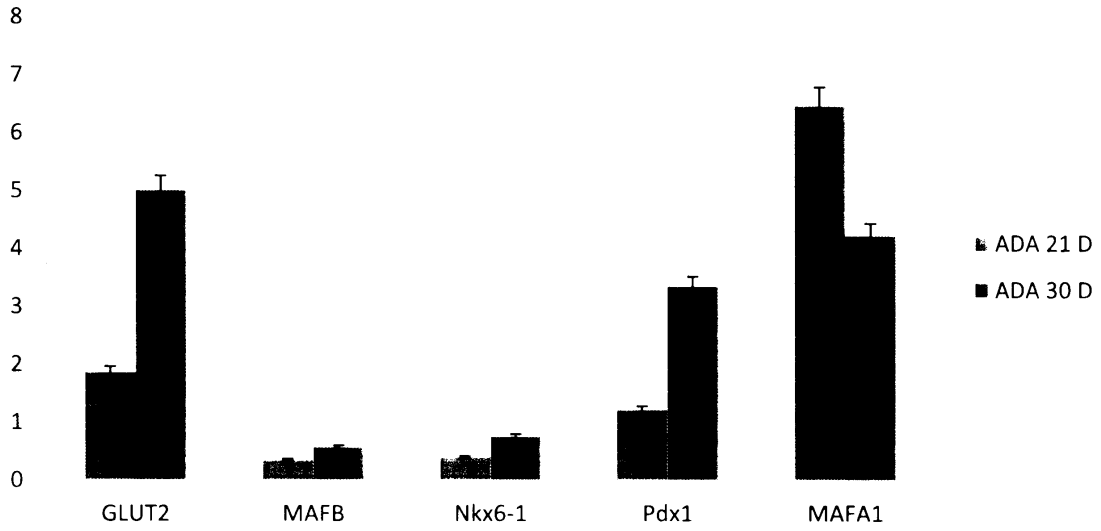
Gen ekspresyon analizlerini 2 yöntem arasında kıyaslamının yanında, yöntemleri kendi aralarında kıyaslamak amacıyla farklılaştırmanın 21. ve 30. günlerindeki hücelerde GLUT 2, MafA, MafB, Nkx6.1 ve PDX1 gen ifadelerine bakılmıştır.

In vitro koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücelere farklılaştırılmanın 30. günündeki GLUT2, MafB gen ifadelerinin 21. gündeki ifadelerine göre anlamlı derecede arttığı; PDX1 ve MafA gen ifadelerinin ise çok ileri derecede anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (**Şekil 4.29**).



Şekil 4.29: fEKH'lerin kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılması ile farklılaştırılmasının 21. ve 30. günlerinde Real-Time PCR ile karşılaştırmalı gen ekspresyon analizleri izlenmektedir (GLUT2: $p \leq 0,05$; MafB: $p \leq 0,05$; NKX6-1: $p \leq 0,05$; PDX1: $p \leq 0,001$; MafA: $p \leq 0,001$).

Adacıklar ile ko-kültür yöntemiyle farklılaştırmanın 30. günündeki GLUT2 gen ifadesinin 21. gündeki ifadesine göre anlamlı derecede; MafB ve PDX1 gen ifadelerinin ise ileri derecede; NKX6-1 gen ifadelerinin ise çok ileri derecede anlamlı bir şekilde yüksek olduğu görülmüştür. Bunun aksine farklılaşmanın 21. gününde 30. gününe göre MafA gen ifadesinin çok ileri derecede yüksek olduğu görülmüştür (**Şekil 4.30**).



Şekil 4.30: fEKH'lerin ko-kültür ile farklılaştırılmasının 21. ve 30. günlerinde Real-Time PCR ile karşılaştırmalı gen ekspresyon analizleri izlenmektedir (GLUT2: $p \leq 0,05$; MafB: $p \leq 0,01$; NKX6-1: $p \leq 0,001$; PDX1: $p \leq 0,01$; MafA: $p \leq 0,001$).

4.7.3. Fonksiyon Çalışmaları

Farklılaşmanın son günü olarak kabul edilen 30. günde, farklılaşmaya alınan hücreler yüksek ve düşük glikoza maruz bırakıldıktan sonra yapılan ELIZA analizinde hem kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılması ile farklılaşmaya alınan, hem de adacık ko-kültürü yöntemiyle farklılaştırılan hücrelerde glikoz artışına bağlı olarak ileri derecede anlamlı bir şekilde insülin salınımının arttığı görülmüştür (Şekil 4.31 ve Şekil 4.32).



Şekil 4.31: fEKH'lerin ko-kültür ile farklılaştırma sonrası 30. günde glikoza bağımlı insülin salınımının ELIZA analizi izlenmektedir ($p \leq 0,001$).



Şekil 4.32: fEKH'lerin kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılması ile farklılaştırılması sonrası 30. günde glikoza bağımlı insülin salınımının ELIZA analizi izlenmektedir ($p \leq 0,001$).

Her iki gruptaki hücrelerin en yüksek çıkan sonucun en düşük çıkan sonuca bölünmesiyle gruplara ait uyarılma indeksleri elde edilmiştir.

$$\text{Uyarılma İndeksi} = \frac{\text{En yüksek çıkan değer}}{\text{En düşük çıkan değer}}$$

In vitro koşullarda adacık mikroçevresinde insülin üreten hücreye farklılaştırılması ile farklılaşmaya alınan hücrelerde uyarılmanın çok anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: EKH'lerin farklılaştırma sonrası uyarılma indeksleri izlenmektedir ($p \leq 0,01$).

5.TARTIŞMA

Kök hücrelerin istenilen hücre hattına doğru farklılaşmasını sağlamanın çeşitli yolları bulunmaktadır. Bunlardan biri besi yerinin içeriğini değiştirerek hücrelerin bu yolda farklılaşmasını sağlamak (Gonez ve ark., 2010; Banerjee ve ark., 2011), diğer bir yöntem gen transfeksiyonu ile tetikleyici bir genin aktarımıyla hücrelerin farklılaşmasını sağlamak ve son olarak da birlikte kültür (ko-kültür) tekniklerini kullanmaktır. Ko-kültür teknikleri hücrelerin aynı ortama konmasıyla gerek hücre-hücre temaslı ve parakrin etkileşimle gerekse hücrelerin salgıladıkları sitokinler yoluyla hücre teması olmayan yalnızca parakrin etkileşim ile hücre farklılaşması temeline dayanan bir tekniktir.

Kök hücre mikro-çevrelerinin, kendini yenileme ve kök hücre akıbetini yönlendirilmesindeki rollerinin anlaşılması, hastalıklı doku ve organların yenilenmesinde kullanılması düşünülen kök hücre esaslı tedavi protokollerini uygulama yolunda önemli adım olmuştur. Deneysel in vivo hayvan çalışmalarında birçok doku ve organlarda kök hücrelerin akıbetini yönlendirmede rol oynayan mikro-çevre elemanları tanımlanmaya çalışılmıştır. Ko-kültür çalışmalarında kök ya da öncül hücrelerinin özgün hücrelere farklılaşmasının uyarılmasının yanında kültürdeki diğer hücre çeşidinin canlılığı ve proliferasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Baffour ve ark. (Baffour ve ark., 2006), insan kardiyomiyositleri ve iskelet miyoblastlarını KG-MKH'ler ko-kültüre etmişler ve MKH'lerden salgılanan büyüme faktörlerinin miyoblastların proliferasyonunu indüklediğini saptamışlardır. Ayrıca, kan sisteminin yeniden kurulması için gerçekleştirilen kemik iliği ve kordon kanı kökenli hematopoietik kök hücreleri nakil öncesi ex-vivo ekspansiyonu amacıyla MKH'ler ile ko-kültüre edilmişler ve canlılık ve proliferasyon oranlarında anlamlı artışlar saptamışlardır (Koh ve ark., 2005). Son olarak, fare, sıçan ve domuz pankreas adacıkları insan adacık-kökenli fibroblast hücre dizisi (MNNK-1) ile ko-kültüre edildiklerinde adacıkların insülin salgılama ve morfolojilerinin devamlılığında anlamlı olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Tüm bu kanıtlar doğrultusunda, esas olarak farelerin pankreasından elde edilmiş olan Langerhans adacıklarından sentezlenen eriyebilir moleküller ile ko-kültürde bulunan fEKH kaynaklı EC'ler üzerinde indüksiyon yaparak, işlevsel adacık hücrelerine (insülin, glukagon, pankreatik polipeptit ve somatostatin salgılayan hücrelere) farklılaşmalarının sağlanabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla tez

çalışmasının konu ve kapsamında fEKH'lerinin fare pankreas adacıkları ile doğrudan olmayan/indirekt (hücre-adacık teması olmaksızın) ko-kültürün fEKH'lerin adacık hücrelerine farklılaşma potansiyeli üzerindeki etkilerini immunogenetik, immunofenotipik ve fonksiyonel çalışmalar ile gösterilmesinin yer alması planlanmıştır. Ayrıca fEKH'lerin insülin üreten hücrelere farklılaşmasında kullanılan indüktörler ile gerçekleştirilen farklılaşma ile karşılaştırılması da amaçlanmıştır. Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda öncelikle EKH'lerin üzerinde çoğaltıldığı fEF'ler uzun pasajlar sonucu çoğaltılmış ve ardından gama ışınması yöntemi ile mitotik aktiviteleri durdurulmuştur. Burada gama ışınmasının tercih edilmesinin sebebi mitomisin C'ye göre daha yüksek oranda hücrenin G1/S safhasında kalmasının sağlanmış olmasıdır. Ardından fEKH'ler çoğaltılmış ve bu hücrelerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. fEKH'lerin karakterizasyonu için immunohistokimyasal analizlerini gerçekleştirmek için OCT4, Nanog, Sox2, SSEA1 ile immunofloresan işaretlenmesi sonucunda fEKH kolonilerindeki hücrelerin OCT4, Nanog, Sox2 ve SSEA1 ekspresyonu gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca kolonilerdeki hücreler, alkalen fosfataz ekspresyonu da göstermiştir. Bu hücreler gerek bu tez çalışmasında gerekse gelecekteki diğer fEKH çalışmalarında kullanılmak üzere pluripotent özellikleri korunarak çoğaltılmış ve depolanmıştır. Farklılaştırma prosedürlerine başlamadan önce fEKH'lerden öncelikle EC'ler oluşturulmuş ve ardından bu cisimcikler jelatin kaplı kültür kaplarına ekilerek yapışkan kültürleri sağlanmıştır. Tezin ana farklılaştırma prosedüründe pankreatik adacık hücrelerine farklılaştırma aşamasını gerçekleştirmek için öncelikle fare pankreaslarından enzimatik yöntemle adacıklar izole edilmiş elde edilen yapıların adacık olduğu kanıtlanmış ve adacıkların canlılıklarına bakılmıştır. Canlılık yönünden olumlu sonuç veren adacıklar yapışkan kültürlerindeki EC'lerin üzerindeki insertler üzerine yerleştirilerek ortak kültürleri gerçekleştirilmiştir. Buradaki asıl düşünce adacıkların dışarı salgıladıkları sitokinlerin fEKH'leri etkileyerek bu hücrelerin insülin üreten β benzeri hücrelere farklılaşmasını sağlamaktır. Ortak mikro-çevrede bulunan hücrelerin etkileşimleriyle farklılaşmasının gerçekleşmesi beklenmiştir. Aynı zamanda farklılaşma prosedürlerinde sıkça karşılaşılan besiyeri değişimi ile hücreleri farklılaşmaya indükleme yöntemi de tez kapsamında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılmanın yanında karşılaştırma yapmak açısından da bu yöntem değerlendirilmiştir.

Exendin 4 GLP-1 analogudur ve *in vivo*'da ve izole edilmiş adacıklarda doza bağılı insülin sekresyonunu artırır ve glikoza bağımlılık gösterir (Buse 2004).

Exendin 4 ya da GLP-1'in fazla ekspresyonu *in vivo*'da fetal pankreatik dokunun, pankreatik progenitörlerin ya da intestinal kök hücrelerin insülin salgılayan hücrelere farklılaşmasını sağlar ve aynı zamanda hiperglisemiyayı iyileştirir (Liu 2007, Liu 2010, Movassat 2010).

In vitro Exendin 4 çalışmaları aktivin B ile kombine bir şekilde olmaktadır. Bu kombinasyon fEKH'lerde insülin üreten hücrelere farklılaşmasını ve özellikle insülin 1 gen ekspresyonunun güçlü olmasını sağlamaktadır. Ancak insülin sekresyonu tam olarak gerçekleştirilememiştir (Ku 2004).

Bunun nedeni kullanılan Exendin 4 konsantrasyonunun çok düşük olması (örneğin 0,1 nmol/L) olabilir. Bunun yanında hücrelerin farklılaştırma prosedürü boyunca yüksek glikoz varlığında (17,7-25mmol/L) kültüre edilmesi olabilir. Bu yüzden Exendin 4 yoğunluğu Li ve ark. çalışmasındaki gibi 10nmol/l olarak kullanılmıştır.

Yapılan farklılaştırma indüksiyonlarından sonra elde edilen hücreler, farklılaşmanın düzeyini ortaya koyabilmek için hücrelerin pankreatik adacık hücresi/ β hücresi belirteçlerini gösterip göstermediğini gözlemek için antikorlarla immunhistokimyasal olarak işaretlenerek sonuçlar iki yöntem arasında karşılaştırılmıştır.

Farklılaşma deneylerinin kontrol grubunda (farklılaşma yöntemlerinin hiç biri uygulanmayan) ise kültürün sonunda analize alınan hücreler, SSEA1 pozitif, insülin, PDX-1, C-peptid ile immunofluoresan işaretlendiğinde negatif ekspresyon göstermişken, fEKH'lerin pankreatik adacıklar ile ko-kültürü farklılaştırılmasının 7. gününde analize alınan farklılaşmakta olan hücreler, beta hücrelerine özgü bir belirteç olan ve Pankreatik transkripsiyon faktörü PDX-1, insülin ve C-peptid ile immunofluoresan işaretlendiğinde, bu antikorların pozitif ekspresyonu göstermiştir. Aynı belirteçler, farklılaşmanın 20.ve 25. günlerinde de analize alınan farklılaşmakta olan hücreler, insülin ve PDX-1 pozitif ekspresyon gösterdi. insülin, C-peptid ve PDX1 pozitif hücrelerin sayısı, farklılaşmanın 14.gününde artış görülmüştür. Aynı zamanda EKH yüzey belirteçlerinden biri olan ve

hücreler farklılaştıkça ekspresyonu azalan SSEA-1 belirteci de hücrelerde pozitiflik farklılaşmanın ilerleyen günlerinde pozitiflik azalma göstermiştir.

Ek olarak fEKH'lerin farklılaştırma sonrası real-time PCR ile gen ekspresyon analizlerinde, monolayer tarzda kültür ile pankreatik adacıklarla ko-kültürünün sonrasında, farklılaşan hücrelerin GATA4, Glut2, PDX1, Nkx6.1 ve MafB gen ekspresyonlarını karşılaştırıldığında, adacık ko-kültüründe β hücre belirteci olan PDX1 ekspresyonlarının kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılması sonucundaki hücelere göre artış gösterdiği izlenmiştir.

Pankreatik farklılaşma sürecinde en önemli transkripsiyon faktörlerinden biri olan PDX1, tez çalışmasında kritik bir yere sahiptir. PDX1 pankreatik farklılaşma yoluna giren tüm hücrelerde pozitifdir. Pankreatik progenitör hücrelerde PDX1 ekspresyonunun görülmesi bizim deney grubumuz olan ko-kültür ile farklılaştırmada, farklılaşmaya alınan hücrelerin pankreatik farklılaşma yoluna girdiğini göstermektedir. Ancak bu ekspresyon, farklılaşan hücrelerin kesinlikle insülin üreten beta hücresine doğru farklılaştığının bir göstergesi olamaz. Bu yolda farklılaşmaya başlayan hücreler duct hücresine, asinar hücelere, α hücresine ve beta hücresine farklılaşabilir. *In vitro* koşullarda kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmada PDX1 pozitifliği gösteren farklılaşmış hüceler, β hücelerine farklılaşmak için özel olarak indüklenmekteyken; adacıklar ile ko-kültüre konulan hüceler için bunu tam olarak söylemek zordur. Çünkü adacıklar içerisinde β hücelerinin yanında, α hüceleri, pankreatik polipeptit hüceleri ve delta hüceleri de bulunmaktadır. Buna ek olarak Langerhans adacıklarının izolasyonu sırasında mümkün oldukça elemine edilmeye çalışılan ekzokrin kısımda da duct hüceleri ve asinar hüceler istenmeden az sayıda olsa da kültür ortamında bulunmaktadır. β hücresi dışındaki hücelerin sayıları az olsa da kültür ortamında bulunmaları farklılaşmaya alınan fEKH'leri etkilediği düşünülebilir.

Dikkati çeken diğer bir nokta farklılaşmaya alınan hücelerin her kuyucukta sayıca farklı oranda bulunması, buna bağlı olarak da IF boyamalarına göre pozitiflik oranlarının farklılık göstermiş olmasıdır. Bunun nedeni olarak da ko-kültür ortamına kuyucuk başına 6 adet adacık konulmasına rağmen konulan adacıkların boyutlarının farklı olması ve konulan adacıkların uzun süre canlılıklarının eşit sayıda devam edememesi

olarak değerlendirilebilir. Buna ek olarak farklılaşmaya alınan fEKH'ler öncelikle kuyucuk başına 40.000 hücre gelecek şekilde EC oluşumu yapılmaya çalışılsa da elde edilen EC'lerin boyutları istemsiz olarak farklılık göstermiştir. Bu da doğal olarak adherent kültürlerinde EC'lerden kaynaklanan hücre sayısını etkilemiştir. Doğal olarak her kuyucukta tam olarak eşit sayıda hücre ile farklılaşmaya başlanamamıştır. Bu da her iki yöntemle farklılaşmada sonuçları etkilediği düşünülmektedir.

Ko-kültür yöntemiyle farklılaşmanın sonucunda son gün olarak kabul edilen 30. günde, kültür ortamında birçok hücrenin öldüğü veya ölüme gittiği, morfolojik olarak farklılaşmış olarak görülen hücreler ve aynı zamanda hali hazırda hala canlılığını koruyan EC'lerden hücre çıkışının devam ettiği görülmektedir. Çok heterojen olan bu kültür ortamında farklılaşmış olan hücrelerin artık ölüme gittiği yorumlanmıştır. Özellikle 21. günden sonra başlayan hücre ölümlerinden çıkarılacak sonuç, ko-kültür metodunda adacıklardan gelen sinyaller, EC'lerden yeni çıkan hücreleri farklılaştırmak üzere etkili olurken, mevcut ortam farklılaşmış hücrelerin canlılığını uzun süre sürdürebilmek için yeterli gelmemektedir.

Elde edilen morfolojik elderler, IF boyamalar ve Real Time PCR ile gen ekspresyonu sonuçlarından yola çıkarak adacıklar ile ko-kültür yönteminin en iyi sonuçları 14.-21. günler arasında verdiği görülmektedir.

Son olarak fEKH'lerin adacıklarla ko-kültür ile farklılaşması yapılan grupta, farklılaşmakta olan hücrelerin besi yeri süpernatantlarından glikoza karşı insülin salınımı miktarını belirlemek için ELIZA analizi yapılmıştır. Her iki farklılaştırma yönteminde de insülin salınımı miktarında artış görülmüştür. Bu artışların gruplar arasında karşılaştırılması amacıyla her iki grubunda uyarılma indeksleri alınmış ve sonuçlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar ko-kültür yöntemi ile farklılaşmaya alınan hücrelerde kimyasal yolla insülin üreten hücreye farklılaştırılmasıyla farklılaşmaya alınan hücrelerin insülin salınımına göre daha fazla artmıştır.

Sonuçta adacıklar ile ko-kültür ile farklılaştırmaya alınan hücrelerin, kültürde adacık benzeri hücrelere özgün immunofenotipik ve genotipik belirteçlerle insülin salgılayan hücrelere veya β -benzeri hücrelere farklılaştıkları gözlenmiştir. Çalışmadan elde

edilen sonuçlar, adacık ko-kültürünün diğer çalışmalardan farklı olarak tek başına bir pankreatik adacık hücre/ β -hücre farklılaşma indüktörü olduğu ve pozitif kontrol grupları olarak ya da bugüne kadar yapılmış farklılaştırma yöntemleri olarak diğer yöntemlerle verimlilik ve farklılaşma aşaması açısından bazen daha fazla verimli olabildiği ya da en az onlar kadar hücre farklılaşması sağlayabildiğini göstermiştir. Ayrıca diğer farklılaştırma yöntemlerine göre daha az iş gücü ve malzeme içeren bir kültür sistemidir.

6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırmanın sonuçlarından yola çıkarak adacık mikro-çevresinde kültüre edilen fEKH'lerin farklılaşma açısından en azından diğer farklılaştırma yöntemleri ile eş değer olduğu görülmüştür. Aynı zamanda çalışmanın çıktıları evrensel bilime katkı sağlayacaktır. Çalışma süresince elde edilen bilimsel bilgi, beceri ve tecrübeler; çeşitli kurs, kongre, panel, sempozyumlara önemli katkılar sağlamıştır ve sağlayacaktır.

Adacık mikro-çevresinde farklılaşmaya alınan EKH'lerin gerek insülin ekspresyonu gerekse insülin sekresyonu bakımından indüksiyon ile farklılaştırma yöntemine göre daha fazla olduğu görülmesinden dolayı, bu tez çalışmasının deney grubunu oluşturan ko-kültür yöntemi ile EKH'lerden insülin üreten hücrelere farklılaştırma yöntemlerine bir yenisini eklediğimiz sonucunu vermektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda ko-kültür ile farklılaşma yöntemi daha da geliştirilmeye çalışılacaktır. 30 günlük farklılaştırma prosedüründe kültür ortamına konulan adacıkların ölümlerine bağlı olarak deney sonuçlarının etkilenmemesi amacıyla adacıklar, aynı sayıda olmak üzere, her hafta tazelenmelidir. Buna ek olarak farklılaştırmanın ilk basamağı olan EC oluşumundan sonra her kuyucuğa ekilen EC ve EC'lerden kaynaklanan hücrelerin sayılarının eşit olmasını sağlamak amacıyla EC'ler adherent kültürlerine alınmadan önce enzimatik yöntemlerle tek hücre süspansiyonu haline getirilerek her kuyucuğa eşit sayıda hücre ekimi yapılabilir.

Ko-kültür yönteminin en iyi sonuçları 14. ve 21. günler arasında verdiği görülmüştür. Bundan yola çıkarak bu konudaki diğer çalışmalar özellikle bu günler üzerine yoğunlaşarak gerekirse her gün farklılaşma analizleri tekrarlanarak, farklılaşmanın en uygun günü belirlenmeye çalışılabilir. Uygun gün belirlendikten sonra farklılaşan hücreler ko-kültür ortamından alınarak β hücrelerine uygun bir kültür ortamında kültüre edilerek, elde edilen farklılaşmış hücrelerin daha uzun süreler boyunca kültüre edilmesi sağlanabilir.

Bu çalışmaların sonucunda elde edilen hücreler diyabetik fareler üzerinde *in-vivo* deneyler için kullanılarak yeni sonuçlar elde edilebilir. Tüm bu sonuçlara dayanarak bu

yeni insülin farklılaştırma yöntemi daha da geliştirilerek, günümüzde çaresi henüz bulunamamış olan diyabet hastalığı için daha da umut verici sonuçlar bilim dünyasına sunulabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Andrew M. Holland, L. Jorg, (2005) Conditional Expression Demonstrates the Role of the Homeodomain Transcription Factor Pdx1 in Maintenance and Regeneration of Cells in the Adult Pancreas. *Diabetes*, Vol. 54
- Arat S, Gibbons J, Rzucidlo JS, Respass DS, Tumlin M, Stice S. 2002; In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol. Reprod.*, 66 : 1768-1774
- Arat S., (1997) Production of chimeric mouse by injection of embryonic stem cells to morula from out bred mouse. *Turk Jour Vet Anim Sci.*, 21 : 431-37
- Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki K.L., Tzukerman M. (2001) Insulin Production by Human Embryonic Stem Cells. *Diabetes*, Vol.: 50
- Bell, G.I., Swain, W F., Pictet, R., Cordell, B., Goodman, M.H., William J. R. (1979). Nucleotide Sequence of a c-DNA Clone Encoding Human Preproinsulin. *Nature*, 282, 525–527
- Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.T., Anisimov, S.V., Wobus, A.M. (2002) Blastocyst-derived Embryonic Stem Cell Lines: Formation of Visceral Yolk Sac, Blood Islands and Myocardium. *Circ Res.*, 91(3):189-201.
- Boheler, K.R. (2010) Pluripotency of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells for Cardiac and Vascular Regeneration. *Thromb Haemost.*;104(1):23–29.
- Buse, J.B., Henry, R.R., Han, J., Kim, D.D., Fineman, M.S., Baron, A.D. (2004) Effects of Exenatide (exendin-4) on Glycemic Control Over 30 Weeks in Sulfonylurea-treated Patients with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 27: 2628–2635.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., Dalton, S., (2005) LIF/STAT3 Controls ES Cell Self-renewal and Pluripotency by a Myc-dependent Mechanism. *Development*, 132, 885-896
- Cell therapy using human embryonic stem cell has wide Potential. (2004). Obesity, Fitness, and Wellness Week. from Health Source Consumer Edition database.
- Cetinkaya, G., Arat, S., Odaman Mercan, H., Onur, M.A., Tumer, A. (2005) Culture of murine embryonic stem cells on NMPF discs. *Reproduction, Fertility and Development* 17 (1,2) : 235
- Cetinkaya, G. (2004) Fare embriyonik kök hücrelerin NWPF disklerde üretilmesi ve kültürasyonu. Yüksek Lisans Tez Çalışması. Hacettepe üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü.
- Chen, Y.E., Drucker, D.J. (1997) Tissue specific expression of unique mRNA that encode pro-glucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. *J Biol Chem*, 272:4108–4115
- Chong, C.R., Chabner, B.A. (2009) Mysterious metformin. *Oncologist*, 14(12):1178-1181.
- Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*, 9:2635–2645
- Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., Zaret, KS. (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development*;128: 871–881.

- Dominici, M., Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, Vol. 8, No. 4, 315-317.
- Thomas, C., Doetschman, H, Eistetter, M., Katz, W., Kemler, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Embryol. exp. Morph.* 87, 27-45.
- Ersoy, B., Ozbilgin, K., Kasirga, E., Inan, S., Coskun, S., Tuglu, I. (2009) Effect of growth hormone on small intestinal homeostasis relation to cellular mediators IGF-I and IGFBP-3. *World J Gastroenterol*, 15(43):5418-24
- <http://www.nature.com/nprot/journal/v6/n7/covers/index.html>
- Evans, M.J., Kaufman, H.M. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*.292, 154-156.
- Evans M, Kaufman M (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292 (5819): 154–6
- Fleischmann, K.R., Oard, D. W., Cheng, A.S., Wang, P., Ishita, E. (2009) Automatic classification of human values: Applying computational thinking to information ethics. Proceedings of the 72nd Annual Meeting of the American Society for Information Science and Technology (ASIS&T), Vancouver, BC, Canada
- Fridenshtein, A. (1982) Stromal Bone Marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Pathol*, 44: 3-11.
- Friedrich, M.J. (2004). Researchers make the case for human embryonic stem cell research. *JAMA*, 292(7). from ProQuest Direct database.
- Bain, G., Kitchens, D., Yao, M., Huettner, J.E., Gottlieb, D.I. (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168:342-357
- Gang, X., Doris, A., Stoffers, J., Habener, F., Weir, S. (1999) Exendin-4 Stimulates Both b-Cell Replication and Neogenesis, Resulting in Increased b-Cell Mass and Improved Glucose Tolerance in Diabetic Rats. *Diabetes*, 48 :2 2 7 0–2276,
- Gardner, R.L. (2002) Stem cells: potency, plasticity and public perception. *J. Anat.* 200, pp277–282.
- Gerecht, S., Itskovitz, J. (2004) The promise of human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*:18(6):843-52.
- Gritti, A., Bonfanti, L., Doetsch, F., Caille, L., Alvarez, A., Lim, D.A., Galli, R., Verdugo, J.M., Herrera, D.G., Vescovi, A.L. (2002) Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci.*, 15;22(2):437-45.
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D.A. (2002) Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3 cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 129:2447–2457
- Rippon, H.J., A. E. Bishop (2004). Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 0960-7722 37, 23–34
- Hayes, R. (2006) *Stem Cells and Public Policy*, 4-5. USA The Century Foundation Press.
- Hebrok, M. (2003) Hedgehog signalling in pancreas development. *Mech Dev*:120: 45–57.
- Horsch, D., Goke, R., Eissele, R., Michel, B., Goke, B. (1997) Reciprocal cellular distribution of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) immunoreactivity and GLP-1 receptor mRNA in pancreatic islets of rat. *Pancreas* 14:290–294

http://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm)

<https://www.google.com.tr/search?q=insanda+ins%C3%BClin+sekresyonu&um=1&ic=UTF8&hl=tr&tbm=isch&source=og&sa=N&tab=wi&ei=qwimUaawBsSwhAf3nIC4Bg&biw=1536&bih=776&sci=rwimUcrXCpSYhQelk4HABg>

Junying, Y., Maxim, A., Vodyanik, K., Smuga-Otto, J., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, S., Thomson, J.A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells, (2007) *SCIENCE VOL 318* 21

Banerjee, I. Sharma, N., Yarmush, M. (2011) Impact of co-culture on pancreatic differentiation of embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5: 313–323. Wiley Online Library wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/term.317

Hanna, J., Wernig, J.M., Markoulaki, S., Sun C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., Jaenisch R. (2007) Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin *SCIENCE VOL 318*

O'Shea, K.S. (1999) Embryonic stem cell models of development of cells for transplantation and gene therapy. *Anat. Rec. (New Anat.)*:257:32–41, 1999 Wiley-Liss, Inc.

Karaöz, E., Ovalı, E. (2004) *Kök Hücreler*, 1-15. Türkiye: Derya Kitapevi

Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, R., MacDonald, MRJ. (2002) The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet*; 32:128–134.

Keller, G.M. (1995) *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Current Opinion Cell Biol.*;7:862–869.

Kim, B.J., Carlson, O.D., Jang, H.J., Elahi, D., Berry, C., Egan, J.M. (2005) Recombinant, Nonglycosylated Human Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (IGFBP-3) Is Degraded Preferentially after Administration to Type II Diabetics, Resulting in Increased Endogenous Glycosylated IGFBP-3. *J Clin Endocrinol Metab* 90:6665–6671.

Kramer, J., Hegert, C., Guan, K., Wobus, AM., Müller, PK., Rohwedel, J. (2000) Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev*:92:193e205.

Krupnick, J.G., Damjanov, I., Damjanov, A., Zhu, Z.M., Fenderson, BA. (1994) Globo-series carbohydrate antigens are expressed in different forms on human and murine teratocarcinoma-derived cells. *Int J Cancer* 59(5):692-8.

Leahy, A., Xiong, J.W., Kuhnert, F., Stuhlmann, H. (1999) Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* 284:67–81.

Martin, G. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (12): 7634–8

Martin, G.R. (1981) Isolation of a Pluripotent Cell Line From Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Developmental Biology*. Vol 78, 12 7634-7638.

Martin, G.R., Wiley, L.M., Damjanov, I. (1977). The development of cystic embryoid bodies in vitro from clonal teratocarcinoma stem cells. *Dev Biol*. 61, 230-244.

Meyer, U., Meyer, T., Handschel, J., Wiesmann, HP. (2009) *Muscle Tissue Engineering: Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin Heidelberg Springer.

Murry, CE., Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132, 661–680.

Nie, J., Jonsdottir, GA, Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I., Thomson, JA. (2007) Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. / www.sciencexpress.org /Page 1 / 10.1126/science.1151526

- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.*, 12(13):2048-60.
- Oberpriller, JO., Oberpriller, JC. (1991) Cell division in adult newt cardiac myocytes. The developmental and regenerative potential of cardiac muscle. *Hardwood, New York*, pp 293-311.
- Pedro, A., Alistair, G., Weyden, L., Kristiansen, G., Li, A., Sarver, A.L, Kevin A., Silverstein, T., Grützmann, R., Aust, D., Rümmele, P., Knösel, T., Herd, C., Stemple, DL., Kettleborough, R., Brosnan, JA., Li, A., Morgan, R., Lodewyk F. A. Wessels, Stephen A. Wood, Christine A. Iacobuzio-Donahue, Christian Pilarsky, David A. Largaespada, David J. Adams, David A. Tuveson, (2012) The deubiquitinase USP9X suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature* 486, 266–270 issue 1402
- Phillips, B.W., Hentze, H., Rust, W.L., Chen, Q.P., Chipperfield, H., Tan, E.K., Abraham, S., Sadasivam, A., Soong, P.L., Wang, S.T., (2007) *Stem Cells Dev.* 16, 561–578.
- Lupi, R., Mancarella, R., Del Guerra, S., Bugliani, M., Boggi, U., Mosca, F., Filippini, F., Marchetti, P. (2008) Effects of exendin-4 on islets from type 2 diabetes patients. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 10, 514–522
- Xu, R., Chen, X., Li, D., Li, R., Addicks, G., Glennon, C., Zwaka, T., Thomson, JA. (2002) BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast *Nature Biotechnology* 20, 1261-1264.
- Rippon, H.J., Bishop, A.E. (2004); Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 37:23-34
- Rogister, B., Ben-Hur, T., Dubois-Dalcq, M. (1999) From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Mol. Cell Neurosci.* (4-5) : 287-300
- Rohwedel, J., Kleppisch, T., Pich, U., Guan, K., Jin, S., Zuschratter, W., (1998) Formation of postsynaptic-like membranes during differentiation of embryonic stem cells in vitro. *Exp Cell Res*;239:214e25.
- Rohwedel, J., Sehlmeier, U., Shan, J., Meister, A., Wobus, AM. (1996) Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ (EG) cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. *Cell Biol Int*;20:579e87.
- Rosner, M.H., Viganò, M.A., Ozato, K. et al. (1990) A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345, 686–692
- Schöler, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewohld, H., Gruss, P. (1990) Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* (7):2185-95.
- Sensebe, L. (2008) Clinical grade production of mesenchymal stem cells. *Bio-Med Mat Eng.* 18: 3-10.
- Slack, JMW., (1995) Developmental biology of pancreas. *Development*, 121:1569-1580.
- Smith, A.G., (2001) Embryo-derived stem cells : of mice and men. *Annu.Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 435-462
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., Rogers, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688–690.
- Smith, A.G., Hooper, M.L. (1987) Buffalo rat liver cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 121:1–9.
- Stavridis, M.P., Smith, A.G. (2003) Neural differentiation of mouse embryonic stem cells, *Biochemical Society* 31(1) :45-49
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, Vol 126, 4 1283-663-676

Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Talbot, N.C., Caperna, T.J., Edwards, J.L., Garrett, W., Wells, K.D., Ealy, A.D. (2000) Bovine blastocyst-derived trophectoderm and endoderm cell cultures: interferon tau and transferrin expression as respective in vitro markers. *Biol Reprod* 62: 235–247

Vats, A., Tolley, N.S., Polak, J.M., Buttery, L.D.K., (2002) Stem cells: sources and applications *Clin. Otolaryngol*, 27, 227–232

Wang, C. (2002). Stem cells http://www.accessscience.com/server-java/Arknoid/science/AS/Encyclopedia/8/80/Est_800100_frameset.html

Liu, W., Jin, H., Lee, K., Xie, S., Baek H., Park, T. (2011) Neuroprotective effect of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist, synthetic exendin-4, in streptozotocin-induced diabetic rats. *British Journal of Pharmacology* Volume 164, Issue 5

Weissman IL. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 287:1442–1446.

Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., Gough, N.M. (1988) Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684–687.

Wilson, M.E., Scheel, D., German, M.S. (2003) Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev*; 120:65–80.

Song, W., Schreiber, W., Zhong, E., Liu, F., Benjamin, D., Kornfeld, F., Fredric E. Wondisford, and Mehboob A. Hussain. (2008) Exendin-4 Stimulation of Cyclin A2 in Cell Proliferation. *Diabetes* 57:2371–2381.

Yui J., Chiu C.P., Lansdorp P.M. (1998) Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood*, 91(9), 3255–3262.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: İrem YILMAZ

Doğum yeri ve tarihi: Bursa-28.12.1988

Uyruğu: TC

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi: Hüdavendigar Mah. Bend Cad. 370 Sok. No:5 Osmangazi/BURSA

Telefonu: 0533 5736321

E-posta Adresi: iremyilmaz88@gmail.com

Eğitimi (tarih sırasına göre)

09/2010 – 07/2013

Yüksek Lisans

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

06/2012 - 12/2012

Misafir Araştırmacı

Northwestern University, Ann & Robert H. Lurie Children's Hospital of Chicago Research Center, iPS and Human Stem Cell Core Facility, Chicago/IL/USA

09/2006 – 06/2010

Lisans

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü- Zooloji Opsiyonu
İzmir/TÜRKİYE

09/2003 – 06/2006

Lise

Milli Piyango Anadolu Lisesi
Bursa/TÜRKİYE

Yabancı dili: İngilizce

Bilimsel Etkinlikler

Seçilmiş yayınlar: BMP-2, -6, and -7 Differently Regulate Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells (Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials – In Press)

Aldığı burslar: Pankreatik Adacık Mikroçevresinde Kültüre Edilen Fare Embriyonik Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli (TÜBİTAK Proje No: 111S296)

Projeleri: Pankreatik Adacık Mikroçevresinde Kültüre Edilen Fare Embriyonik Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeli (TÜBİTAK Proje No: 111S296)