

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP 1 DİABETES MELLİTUS MODELİNDE LANGERHANS ADACIK VE
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TABAKALARININ MAKROKAPSÜLASYON
YOLUYLA KONAK SAVUNMA SİSTEMİNDEN KORUNARAK
FONKSİYONUNUN DEVAMLILIĞININ SAĞLANMASI**

Büşra ÖNCEL DUMAN

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

KOCAELİ

2021

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP 1 DİABETES MELLİTUS MODELİNDE LANGERHANS ADACIK VE
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TABAKALARININ MAKROKAPSÜLASYON
YOLUYLA KONAK SAVUNMA SİSTEMİNDEN KORUNARAK
FONKSİYONUNUN DEVAMLILIĞININ SAĞLANMASI**

Büşra ÖNCEL DUMAN

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

Danışman: Prof. Dr. Yusufhan YAZIR

Destekleyen Kurum
Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
Proje No: 2019/037
Etik Kurul Onay No: 1/3-2019

KOCAELİ
2021

KABUL VE ONAY

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Tip 1 Diabetes Mellitus Modelinde Langerhans Adacık ve Mezenkimal Kök Hücre Tabakalarının Makrokapsülasyon Yoluyla Konak Savunma Sisteminden Korunarak Fonksiyonunun Devamlılığının Sağlanması

Tez Yazarı: Büşra ÖNCEL DUMAN

Tez Savunma Tarihi: 23.06.2021

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yusufhan YAZIR

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.../.../2021

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Tip 1 Diabetes Mellitus Modelinde Langerhans Adacık ve Mezenkimal Kök Hücre Tabakalarının Makrokapsülasyon Yoluyla Konak Savunma Sisteminden Korunarak Fonksiyonunun Devamlılığının Sağlanması

Amaç: Diabetes Mellitus, dünya genelinde yaklaşık 347 milyon kişiyi etkileyen ve metabolik bozukluk ile karakterize bir hastalıktır. Bu hastalığının yaklaşık % 10'unu oluşturan Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) ise bağışıklık sisteminin, kan şekerini düzenlemek için gerekli olan insülini üreten beta hücrelerine saldırdığı otoimmün bir hastalıktır. Hastalık normalde günlük insülin enjeksiyonlarıyla tedavi edilmektedir. Uzun yıllardır süregelen araştırmalarda alternatif tedavi şekli olarak ise insülin üreten beta hücrelerinin pankreas, adacık veya hücre şeklinde naklini yapabilmek için, çeşitli yöntemler denenmektedir. Bu yöntemlerden olan adacık nakli, kan şekeri seviyesini birkaç yıla kadar normale döndürme yeteneğini gösteren bir cerrahi işlemdir, ancak bu nakilden sonra yabancı kabul edilen adacıklar konağın immun sistemi tarafından yok edilmektedir. İmmun atakların engellemesi ve nakledilen doku, organ veya hücrelerin nakil bölgesinde fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için doku reddinin engellenmesi gerekmektedir. Bu olumsuz durumun giderilmesi için şimdiye kadar, çeşitli hücre kapsülleme teknikleri geliştirilmiştir. Adacık makrokapsülleme, biyoyumlu bir polimerle kaplanarak bağışıklık sisteminden adacıkları korumak için tasarlanmış bir biyomedikal yeniliktir. Bu amaçla kullanılan polimerlerin biyoyumluluğu, kararlılığı ve geçirgenliği, başarılı bir klinik uygulama için ana faktörlerdendir. Aljinat hücre enkapsülasyonunun potansiyel klinik uygulaması son on yılda çok büyük ölçüde gelişmiştir. Aljinat besinlerin ve küçük proteinlerin nakil dokusu ile difüzyonunu sağlayarak atık ürünlerinde malzemedan çıkışına izin vermektedir. Bu nedenle çalışmamızda, hücre tabakası aljinat ile makrokapsüle edilip savunma sistemi hücrelerinden korunarak, hücre tabakasının daha uzun süre fonksiyonunun devamını sağlayacak en uygun hücresel tedavi yöntemi ve makrokapsül aygıtını tasarlamak amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamız in-vitro ve in-vivo olmak üzere iki adımda gerçekleştirildi. Mezenkimal kök hücreler (MKH) ve beta-hücreleri, sıcaklık-duyarlı kültür kabında ortak kültür edildi. Sonrasında hücre tabakasına aljinat ile kapsülleme işlemi yapıldı. Kapsülün mekanik dayanıklılığı ve hücreler üzerindeki etkileri analiz edildi. İn vivo deney grupları T1DM+Kapsül+Beta, T1DM+Kapsül+Beta+MKH, T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka

olarak belirlendi. Elde edilen graft diyabetik sıçanların dorsal subkutan bölgesine nakledilerek deney süresi boyunca kan-glukoz değerleri ve ağırlıkları takip edildi. 30. günde intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT) uygulandı ve insülin, c-peptid ELISA çalışıldı. Sıçanlar kurban edildi. Nakledilen graft histolojik takibe alındı ve immunohistokimyasal yöntemle analiz edildi.

Bulgular: T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubundakan glukozu, nakil sonrası hızlıca düştü ve 190 gün boyunca da aynı seviyelerde kaldı. T1DM+Kapsül+Beta, T1DM+Kapsül+Beta+MKH gruplarında beklenen normoglisemi değerine ulaşamadı. Ayrıca T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubunda ELISA analizi sonucunda c-peptid ve insülin seviyesinin, diğer gruplara kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu belirlendi. Greftin immunflouresan analizinde beta hücreleri insülin, c-peptid, PDX-1, Pax4 antikorları ile pozitif boyandı.

Sonuç: Gelecekte T1DM hastalarına uygulanan pankreatik adacık nakillerine alternatif bir tedavi yöntemi olarak sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında oluşturduğumuz adacık dokusuna benzeyen derialtı makrokapsül aygıtı elde edilmiştir. Hücre kapsüllemeye kullanılan çeşitli biyomalzemeler olmasına rağmen; doğal polimer olan aljinat makrokapsül uygulaması, hem daha fazla hücre içerecek hem bu hücreleri immun reaksiyonlardan koruyarak, hem de canlı organizma ile yüksek biyo-uyumluluk göstererek greftin uzun süreli sağ kalımını sağlamıştır. MKH tabakası ile desteklediğimiz makrokapsül grubunda daha uzun süreli normoglisemi sağlanması MKH lerin anti-apoptotik, immunsupresif ve immunmodülatör etkileri sayesinde olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızın bulguları değerlendirildiğinde T1DM hastalarında uzun vadeli hücresel tedavi sağlamak amacıyla, makrokapsüllerin içerisinde beta hücreleri ile birlikte MKH lerin bulunması en iyi ve uzun etkili tedavi yöntemi olmakla birlikte bu yöntemin kullanılacağı gelecekte yapılacak insan çalışmaları için zemin hazırlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tip1 Diabetes Mellitus, makrokapsül, mezenkimal kök hücre, aljinat, doku mühendisliği

ABSTRACT

Ensuring Continuity of Function by Using Macroencapsulation Technique Langerhans Islet and Mesenchymal Stem Cell Sheets Protection from Host Immune System in Type 1 Diabetes Mellitus Model

Objective: Diabetes Mellitus is a disease that affects approximately 347 million people worldwide and is characterized by a metabolic disorder. Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM), which accounts for about 10% of this disease, is an autoimmune disease in which the immune system attacks the beta cells that produce insulin necessary to regulate blood sugar. The disease is normally treated with daily insulin injections. In researches that have been going on for many years, various methods have been tried to transplant insulin-producing beta cells in the form of pancreas, islets or cells as an alternative treatment methods. One of these methods, islet transplantation is a surgical procedure that shows the ability to normalize blood sugar levels for up to a few years, but after this transplant, islets that are considered foreign are destroyed by the host's immune system. Tissue rejection must be prevented so that immune attacks can be prevented and the transplanted tissue, organ or cells can continue their functions in the transplanted area. Various cell encapsulation techniques have so far been developed to overcome this adverse situation. Tissue rejection must be prevented so that immune attacks can be prevented and the transplanted tissue, organ or cells can continue their functions in the transplanted area. Various cell encapsulation techniques have so far been developed to overcome this adverse situation. The biocompatibility, stability and permeability of the polymers used for this purpose are among the main factors for a successful clinical application. The potential clinical application of alginate cell encapsulation has improved enormously over the past decade. Alginate allows for the diffusion of nutrients and small proteins through the transport tissue, allowing waste products to exit the material. Therefore, in our study, it is aimed to design the most appropriate cellular treatment method and macrocapsule device that will ensure the continuation of the cell sheet function for a longer time by protecting the cell layer from the cells of the defense system by macroencapsulation with alginate.

Method: Our study was carried out in two steps, in-vitro and in-vivo. Mesenchymal stem cells (MSCs) and beta-cells were co-cultured in a temperature-responsive culture dish. Afterwards, the cell sheet was encapsulated with alginate. The mechanical strength of the

capsule and its effects on cells were analyzed. In vivo experimental groups were determined as T1DM + Capsule + Beta, T1DM + Capsule + Beta + MSC, T1DM + Capsule + Beta + MSC sheet. The obtained graft was transferred to the dorsal subcutaneous area of diabetic rats and blood-glucose values and weights were monitored during the experiment period. On the 30th day, intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed and insulin and c-peptide ELISA was studied. Rats were sacrificed. The transplanted graft was followed histologically and analyzed by immunofluorescence method.

Results: In the T1DM + Capsule + Beta + MSC sheet group, blood glucose dropped rapidly after transplantation and remained at the same levels for 190 days. The expected normoglycemia value could not be reached in the T1DM + Capsule + Beta, T1DM + Capsule + Beta + MSC groups. In addition, in the T1DM + Capsule + Beta + MSC layer group, ELISA analysis revealed that the c-peptide and insulin levels were significantly higher than the other groups. In the immunofluorescence analysis of the graft, beta cells were stained positively with insulin, c-peptide, PDX-1, Pax4 antibodies.

Conclusions: As an alternative treatment method to pancreatic islet transplants applied to T1DM patients in the future, an islet-like subcutaneous macrocapsule device that we created in temperature-responsive culture vessels was obtained. Although there are various biomaterials used in cell encapsulation; The application of alginate macrocapsules, which is a natural polymer, provided long-term survival of the graft by containing more cells, protecting these cells from immune reactions and showing high biocompatibility with the living organism. We think that the longer-term normoglycemia in the macrocapsule group supported by the MSC sheet is due to the anti-apoptotic, immunosuppressive and immunomodulatory effects of MSCs. When the findings of our study are evaluated, the presence of MSCs together with beta cells in macrocapsules is the best and long-lasting treatment method in order to provide long-term cellular therapy in T1DM patients, and it provides a basis for future human studies where this method will be used.

Keywords: Type 1 Diabetes Mellitus, macrocapsule, mesenchymal stem cell, alginate, tissue engineering

TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenerek bana destek olan, tez konumun belirlenmesinde, çalışmamın planlanmasında ve sonuçlandırılmasında bilimsel ve manevi katkılarını esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Yusufhan YAZIR 'a, tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım hocalarım, Sayın Doç. Dr. Gökhan DURUKSU, Dr. Öğr. Üyesi Z. Seda HALBUTOĞULLARI, Dr. Öğr. Üyesi Serap MERT, Doç. Dr. Meltem GÖKSEL ŞAHİN'e, uzmanlık ve doktora eğitimim boyunca birlikte büyük özveri ile çalıştığım, hem deneysel çalışmalarında hem de manevi olarak her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Arş. Gör. Ayşegül BAĞLAR' a, in vitro ve in vivo çalışmalarında desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Ahmet ÖZTÜRK ve Deren ASLAN'a, SEM analizini yapan doktora öğrencisi Attila ALKAN 'a, ayrıca Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) ailesinde çalışan ve eğitim gören tüm arkadaşlarıma, deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için maddi destek sağlayan Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, zorlu ve yıpratıcı doktora eğitimini sürekli desteği ile katlanabilir kılan ve her günüme ayrı bir renk katan sevgili eşim ve kızıma, hayatımın her anında her zaman bana destek olan, bir işi başarabileceğimden bir an olsun şüphe etmeyen canım annem, babam ve kardeşime

TEŞEKKÜR EDERİM

ORJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Tip 1 Diabetes Mellitus Modelinde Langerhans Adacık ve Mezenkimal Kök Hücre Tabakalarının Makrokapsülasyon Yoluyla Konak Savunma Sisteminden Korunarak Fonksiyonunun Devamlılığının Sağlanması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

23/06/2021

Büşra ÖNCEL DUMAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pankreasın Anatomisi.....	1
1.2. Pankreasın Genel Fizyolojik özellikleri	1
1.2.1. Ekzokrin pankreas	1
1.2.2. Endokrin pankreas.....	2
1.2.2.1. Endokrin pankreasın hormonları.....	3
1.2.3. Periferik Dolaşımda Glukoz Düzeyinin Ayarlanması.....	6
1.3. Tip 1 Diabetes Mellitus	9
1.3.1. Tip 1 Diyabetin Otoimmün Patogenezi.....	9
1.3.2. Genetik Faktörler.....	10
1.3.3. Beta Hücre İmmüntoleransının Bozulmasına Neden Olan Çevresel Faktörler	10
1.3.4. Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu.....	11
1.3.5. İnsülitis ve Beta Hücre Ölümü	11
1.3.6. Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikoları	12
1.4. T1DM Tedavi Yöntemleri.....	12
1.4.1. İnsülin İnfüzyonu	12
1.4.2. Pankreas Nakli.....	13
1.4.3. Adacık Nakli	14
1.4.4. Hücresel Tedaviler	15
1.5. Enkapsülasyon.....	16
1.5.1. Mikrokapsülasyon	16
1.5.2. Makrokapsülasyon	17
1.5.3. Ekstravasküler makrokapsül	18

1.5.4.	Kapsülasyon malzemeleri	18
1.5.5.	Kapsül por boyutu	20
1.6.	İnflamatuvar Yanıt	21
1.7.	Yabancı Cisim Yanıtı	21
1.8.	IBMR.....	21
1.9.	Nakil Bölgesi ve Hipoksi	22
1.10.	T1DM Tedavisinde Nakil Bölgeleri	22
1.10.1.	Portal Vein.....	24
1.10.2.	Böbrek Kapsülü Altı.....	24
1.10.3.	Dalak	25
1.10.4.	Pankreas	26
1.11.	Doku Mühendisliği	26
1.12.	Hücre Tabaka (Cell Sheet) Mühendisliği	27
1.13.	Diyabette Pankreatik Dokunun Hücre Tabakası Yöntemiyle in vitro Üretimi 29	
1.14.	Kök Hücre	30
1.14.1.	Mezenkimal Kök Hücreler (MKH).....	31
2.	AMAÇ	32
3.	YÖNTEM.....	33
3.1.	sAD-MKH'lerin Karakterizasyonu	34
3.1.1.	İmmunfenotipleme	34
3.1.1.1.	<i>Akım sitometrik analiz.....</i>	<i>34</i>
3.1.2.	sAD-MKH'lerin İn vitro Farkılaştırılması	35
3.1.2.1.	<i>Adipojenik farklılaşma</i>	<i>35</i>
3.1.2.2.	<i>Osteojenik farklılaşma.....</i>	<i>35</i>
3.1.2.3.	<i>Kondrojenik farklılaşma.....</i>	<i>35</i>
3.2.	Beta Hücrelerinin Kültür ve Karakterizasyonu	36
3.2.1.	İmmunositokimyasal Karakterizasyon:.....	36
3.2.1.1.	<i>İmmunflouresan işaretleme (İF).....</i>	<i>36</i>
3.2.2.	İn vitro İnsulin Salgılama Deneyi	37

3.3.	Isı Değişimine Duyarlı Kültür Kabında Beta ve MKH Ortak Kültürü ile Hücre Tabakalarının Eldesi	38
3.4.	Makrokapsülasyon Materyalinin Hazırlanması.....	38
3.5.	Makrokapsül Karakterizasyon Testleri	41
3.5.1.	Osmotik Dayanıklılığın Ölçülmesi.....	41
3.5.2.	Kapsülün Şişme Özelliklerinin Belirlenmesi	41
3.5.3.	Kapsül SEM Analizi.....	42
3.5.4.	Kapsül Reometre Analizi	42
3.5.5.	Mekanik Test.....	42
3.5.6.	FITC Dextran	43
3.6.	Aljinat Makrokapsülün Hücreler Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi.....	43
3.6.1.	WST-1 Testi	43
3.6.2.	Sitotoksosite Analizi	43
3.6.3.	Live/Dead Testi	44
3.6.4.	Metabolik Aktivite	44
3.6.5.	İn vitro İnsülin Salgılama Deneyi	44
3.7.	Hayvanlar	45
3.7.1.	Deney Grupları.....	45
3.8.	Sıçanlarda STZ Enjeksiyonu ve Diyabetik Hayvan Modelinin Oluşturulması.....	47
3.9.	Nakil.....	47
3.10.	Anestezi.....	47
3.11.	Nakil Edilen Kapsülün Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	48
3.11.1.	Tokluk Kan Şekeri ve Ağırlık Takibi.....	48
3.11.2.	İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi	48
3.12.	Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler	49
3.13.	İstatiksel Analiz	50
4.	BULGULAR	51
4.1.	Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu.....	51
4.1.1.	Sıçan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültür ve Karakterizasyonu.....	51
4.2.	Beta Hücrelerinin Kültür ve Karakterizasyonu	53

4.2.1.	İnsülin Salgılaşma Deneyi	54
4.2.2.	Beta ve Mezenkimal Kök Hücre Ortak Kültürü.....	55
4.3.	Isı Değişimine Duyarlı Kültür Kabında Mezenkimal Kök Hücrelerin Tabaka Halinde Eldesi.....	56
4.4.	Makrokapsül Materyalinin Hazırlanması.....	56
4.5.	Makrokapsül Karakterizasyon Testleri	59
4.5.1.	Osmotik Dayanıklılığın Ölçülmesi.....	59
4.5.2.	Kapsülün Şişme Özelliklerinin Belirlenmesi	60
4.5.3.	Kapsül SEM Analizi.....	61
4.5.4.	Kapsül Reometre Analizi	62
4.5.5.	Mekanik Test.....	63
4.5.6.	FITC DEXTRAN	64
4.6.	Aljinat Makrokapsülün Hücreler Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi.....	66
4.6.1.	WST-1 Testi	66
4.6.2.	Sitotoksosite Analizi	67
4.6.3.	Live/Dead Testi	68
4.6.4.	Metabolik Aktivite	70
4.6.5.	İn vitro İnsülin Salgılaşma Deneyi	70
4.7.	Nakil Edilen Kapsülün Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi	71
4.7.1.	Nakil Sonrası Sıçanların Ağırlık Ölçümü	71
4.7.2.	Nakil Sonrası Sıçanların Tokluk Kan Şekeri Ölçümü	72
4.7.3.	IPGTT (İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi) Uygulanması.....	73
4.7.3.1.	IPGTT sonrası kan şekeri düzeyi	73
4.7.3.2.	IPGTT sonrası serum C-peptid düzeyi.....	75
4.7.3.3.	IPGTT sonrası serum İnsülin düzeyi.....	75
4.8.	Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler.....	76
5.	TARTIŞMA	82
5.1.	Sınırlılıklar.....	90
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	91
7.	KAYNAKLAR.....	92
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	97

EKLER	103
EK-1. Etik Kurul Onayı	103
EK-2. Aljinat Makrokapsül Mekanik Test.....	104
EK-3. Aljinat Makrokapsül Mekanik Test Elastik Modül.....	105



SİMGELER VE KISALTMALAR

CD: Cluster of Differentiation
dk: Dakika
dl: Desilitre
DNA: Deoksiribonükleik Asit
DM: Diabetes Mellitus
ESM: Ekstrasellüler Matriks
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EKH: Embriyonik Kök Hücre
FCS: Fetal Calf Serum
FBS: Fetal Bovine Serum
FITC: Floresan İzotiyosiyonat
HLA: Human Lokocyte Antigen
IPGTT: İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi
İHK: İmmunhistokimyasal
IF: İmmunfloresan
NSF: National Science Foundation
NO: Nitrik Oksit
LCST: Low Critic Soluble Temperature
L-DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose
MEM: Minimum Essential Medium
MKH: Mezenkimal Kök Hücre
MHC: Major Histocompatibility Complex
mM: Milimolar
ml: Mililitre
PIPAAm: Poly (N-İsopropylacrylamide)
PDL: Periodontal Ligament
P:Pasaj
PE: Fikoeritrin
PBS: Phosphate Buffer Saline
PVDF: Polyvinylidene Fluoride
SEM: Scanning Electron Microscope
STZ: Streptozocin
sAT-MKH: Sıçan Adipoz Doku Mezenkimal Kök Hücresi
T1DM: Type 1 Diabetes Mellitus
WST-1: Water Solubility Tetrazolium
µm: Mikrometre
µl: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pankreas Anatomik Görüntüsü	1
Şekil 1.2. Pankreatik Adacıklarda Bulunan Hücre Çeşitleri	2
Şekil 1.3. Pankreas Beta Hücresinde İnsülin Sentez ve Sekresyonu.....	3
Şekil 1.4. İnsülin Proteinindeki Aminoasit Dizilimi	4
Şekil 1.5. İnkretin Etki Mekanizması	5
Şekil 1.6. Beta Hücresinden İnsülin Salgılama Mekanizması.....	8
Şekil 1.7. Beta Hücre Yıkımı.....	12
Şekil 1.8. Aljinat Kullanılarak Hazırlanmış İki Farklı Enkapsülasyon Şekli.....	18
Şekil 1.9. Aljinat Polimerinin Kimyasal Formunun Gösterimi.....	19
Şekil 1.10. Pankreas Adacıklarının Kapsülleme Yöntemiyle Bağışıklık Sistemi Hücrelerinden Korunması	20
Şekil 1.11. Sıcaklık Duyarlı Kültür Kapları (PIPAAm) ile Hücrelerin Tabaka Halinde Elde Edilmesi.....	28
Şekil 1.12. Çeşitli Doku ve Organ Hasarlarının Tedavisi İçin Sıcaklık Duyarlı Kültür Kapları (PIPAAm) İle Hücrelerin Tabaka Halinde Elde Edilmesi	29
Şekil 3.1. Elde Edilen Hücre Tabakası Aljinat Makrokapsül İçine Yerleştirilmesi ve Sıçanların Sırt Deri Altı Bölgesine Nakil Yapılması	33
Şekil 3.2. Hücrelerin 37 ⁰ C deki İnkübasyondan Alınarak 20 ⁰ C de 30 dk inkübasyona Bırakılması Sonrasında Tabaka Halinde Elde Edilmesi	38
Şekil 3.3. Agoraz Jelden ile Kuyucuklu Kalıp Elde Edilmesi.....	38
Şekil 3.4. Aljinatın İyon Yükü ile Ca ⁺² Çapraz Bağ Oluşturması	39
Şekil 3.5. Aljinatın 4 Farklı Konsantrasyonunun Hazırlanması.....	40
Şekil 3.6. Kapsül Kalıbı ve Kapsülün Hazırlanması.....	41
Şekil 3.7. İnstron Basma Cihazının Sabit Çene Kısımına Yerleştirilen Makrokapsülün Mekanik Dayanıklılık Analizi.....	42
Şekil 3.8. Anestezi Altındaki Sıçanlara Makrokapsül Nakli Uygulaması.	48
Şekil 3.9. Sıçan Kuyruk Lateral Bölgeden 21g X1 İnch Kelebek İğne Girilerek Kan Örneklerinin Alınması.....	49
Şekil 4.1. Sıçan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin 3.Pasaj İnvirt Mikroskop Görüntüleri.....	51
Şekil 4.2. Sıçan Adipoz Dokudan İzole Edilmiş MKH'lerin (P3) Osteojenik, Adipojenik ve Kondrojenik Farklılaşma Sonrası İmmunflouresan ve Histokimyasal Analizleri	52

Şekil 4.3. Sıçan Kemik İliğinden İzole Edilip Kültür Edilmiş (P3) MKH'lerin Akım Sitometri Analizi ile Belirlenen İmmunofenotipik Özellikleri	52
Şekil 4.4. BRIN BD 11 Beta Hücrelerinin İn Vitro Kültür Kabındaki Faz-Kontrast Mikroskop Görüntüleri.....	53
Şekil 4.5. Beta Hücrelerinin İmmunflouresan Mikroskop Görüntüleri.....	54
Şekil 4.6. Kültür Kabındaki Hücelere Eklenen Glukozun Çeşitli Konsantrasyonlarına Hücrelerin Verdiği Yanıt Karşılaştırılması	55
Şekil 4.7. Sıçan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre ve Beta Hücrelerinin Ortak Kültürünün Mikroskopik Görüntüleri.....	55
Şekil 4.8. Mezenkimal Kök Hücre ve Beta Hücrelerinin Ortak Kültürü.	56
Şekil 4.9. Alginat Kapsül Hazırlamak İçin Kullanılan Agaroz Kalıp Edilmesi.....	57
Şekil 4.10. Tasarlanan Makrokapsülün Görüntüsü. Beta, Beta+MKH, Beta+MKH Tabakasının Aljinat ile Kapsüle Edilmesi.....	58
Şekil 4.11. Makrokapsülün Stereo Mikroskop Görüntüsü. 10x X 1,25 Büyütme	58
Şekil 4.12. Hücre Tabakalarının Kapsül İçerisindeki Görüntüleri.....	58
Şekil 4.13. Makrokapsüllerin Sodyum Sitratta Bekletildikten Sonraki Görüntüleri.....	59
Şekil 4.14. Kapsüllerin 1. ve 7. gününde Çaplarının Ölçüm Sonucu.....	60
Şekil 4.15. Kapsüllerin İçinde Bulunduğu Besiyerinin 1. ve 7. gününde Hacimlerinin Ölçüm Sonucu.....	61
Şekil 4.16. Makrokapsüllerin Sem Görüntüsü	62
Şekil 4.17. Farklı Konsantrasyonlardaki Aljinatın Reometrik Analiz Verileri.....	63
Şekil 4.18. Makrokapsüllerin Mekanik Dayanıklılığını Test Etmek İçin Kullanılan İnstron Basma Cihazı.....	63
Şekil 4.19. Kapsüllerin Mekanik Test Uygulama Sonrası Uzama ve Basınç Gerinimi Grafikleri.....	64
Şekil 4.20. 4 kDA FITC Dextran İçin Mikroplaka Okuyucudaki Absorbans Değerleri.....	65
Şekil 4.21. 150 kDA FITC Dextran İçin Mikroplaka Okuyucudaki Absorbans Değerleri.....	65
Şekil 4.22. 4 kDA ve 150 kDA FITC Dextran ile İnkübe Edilmiş Aljinat Makrokapsülün Stereo Mikroskop Görüntüleri.....	66
Şekil 4.23. 4kDA ve 150 kDA FITC Dextran İle İnkübe Edilmiş Makrokapsüllerin Konfokal Mikroskop Görüntüleri.....	66
Şekil 4.24. Kapsül İçinde Bulunan Hücrelerin WST-1 Analiz Grafiği.....	67
Şekil 4.25. Alginat Makrokapsülünün Hücre Tabakası Üzerindeki Sitotoksik Etkileri.....	68

Şekil 4.26. kapsül+beta, kapsül+beta+MKH, kapsül+beta+ MKH Tabaka Gubunda Live/Dead Boyama Görüntüleri.	69
Şekil 4.27. kontrol+beta+MKH, kontrol+beta Gubunda Live/Dead Boyama Görüntüleri.	69
Şekil 4.28. Kapsüldeki Hücrelere İnvitro İnsülin Salgılayıcı Deneyi Verilerinin Grafiği ...	70
Şekil 4.29. Tüm Sıçan Gruplarında 190 Gün Boyunca Günlere Göre Ağırlık Değişimi....	71
Şekil 4.30. Nakil Sonrasında 190 Gün Boyunca Ölçülen Kan Glukoz Değerleri.....	72
Şekil 4.31. Kapsül Naklinden Sonra Sonra IPGTT Sonuçları	73
Şekil 4.32. Kapsül Naklinden Sonra Diyabetik Sıçanlarda C-Peptid Proteininin Serum Konsantrasyonları.....	74
Şekil 4.33. Kapsül Naklinden Sonra Diyabetik Sıçanlarda İnsülin Proteininin Serum Konsantrasyonları.....	75
Şekil 4.34. Nakil Bölgesindeki Greftin H-E Boyanmış Görüntüsü.	76
Şekil 4.35. Nakil Bölgesindeki Greftin 60. günde Çıkarılarak Kapsül İçindeki Hücrelerin Canlılıklarının Gözlemlendi.....	77
Şekil 4.36. Kapsül İçerisindeki Beta Hücrelerinin Hücre İmmunflouresan Antikor ile Boyama Live/Dead Boyama Görüntüleri.....	77
Şekil 4.37. Kapsül Greftlerinde Beta Hücre Apoptozunun (Active Caspase) İmmunflouresan Boyama İle Gösterilmesi.	78
Şekil 4.38. TGFβ Sitokini Salgılayan MKH lerin Greft Bölgesindeki Görüntüleri.....	79
Şekil 4.39. Farklı Deney Grubunun Pankreas Adacıklarının IF Boyama Görüntüleri.....	79

TABLÖLAR

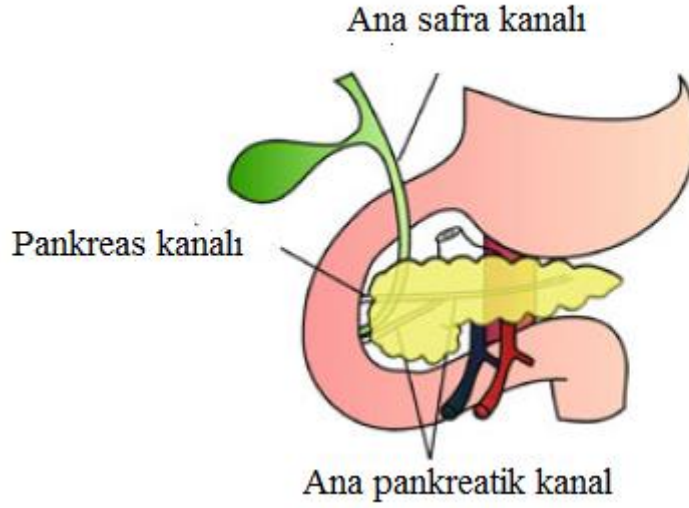
Tablo 3.1. İnvitro deney grupları.....	33
Tablo 3.2. Beta hücrelerini immunflouresan yöntemle karakterize etmek için kullanılan antikor paneli.....	37
Tablo 3.3. İn vivo deney grupları.....	45



1. GİRİŞ

1.1. Pankreasın Anatomisi

İnsanda pankreas langerhans adacıklarından oluşan 15 cm uzunluğunda bir organdır. Bu organ 3 bölümden oluşur: baş, gövde ve kuyruk olmak üzere. Etrafında karaciğer, mide, dalak ve böbrek yer almaktadır. Sıçanlarda da benzer şekilde etrafında mide, dalak, kalın bağırsak ve karaciğer yer alır. Pankreas organı ile ilişkili 3 kanal bulunmaktadır. Ana safra kanalı, pankreas kanalı ve ana pankreatik kanal olmak üzere 3 kanaldan oluşmaktadır (Şekil 1.1) (Leung, 2010).



Şekil 1.1. Pankreas anatomik görüntüsü (Leung, 2010)

Pankreas loblu bir organ olup ön ve arka bölümleri bulunmaktadır. Ön loba çölyak arter, arka lob mezenterik arter sayesinde kan akışı olmaktadır.

1.2. Pankreasın Genel Fizyolojik özellikleri

Pankreas ekzokrin ve endokrin pankreas olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır.

1.2.1. Ekzokrin pankreas

Ekzokrin pankreas total pankreasın % 85 ini oluşturmaktadır. Ekzokrin kısım asinus ve duktuslardan oluşur. Asinus kısımda sindirim enzimleri salgılanır. Duktuslarda ise salgıları taşımaktadır.

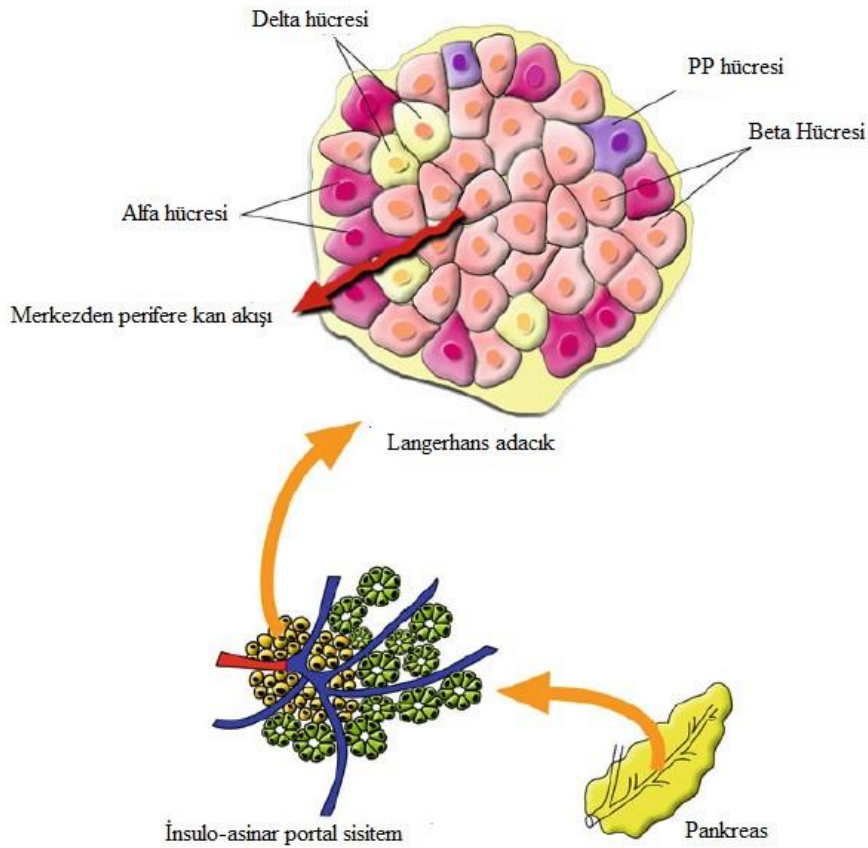
Ekzokrin pankreas çeşitli enzim grubu salgılamaktadır. Bunlar: amilaz, lipaz, kolipaz, tripsin, kimotripsin, elastaz gibi enzimlerdir. Ekzokrin pankreas salgılarının görevi sindirimin kolaylaştırılması ve sindirim kanalının korunmasıdır. Ekzokrin salgısı

gastrointestinal sistemin işleyişi ile bağlantılıdır. Tüketilen besinlerdeki karbonhidrat, yağ, protein, mineral, vitaminin ayrıştırılması ve bunların vücudun gerekli bölgelerinde depolanmasından sorumludur (Zhou ve ark., 2018).

1.2.2. Endokrin pankreas

İnsan pankresında yaklaşık 1 milyon Langerhans adacığı bulunmaktadır. Bu adacıkların çapı 100 mikron civarındadır ve endokrin pankreası oluştururlar. Endokrin pankreasta çeşitli hücre grupları bulunmaktadır. Bunlar: Alfa hücreleri, beta hücreleri, somatostatin hücreleri pankreatik polipeptid (PP) hücreleridir (Şekil 1.2).

Alfa hücrelerinden glukagon salgılanır ve bu hücre adacıkların %25 ini oluşturmaktadır. Beta hücrelerinden insülin, c peptid, proinsülin ve amilin salgılanmaktadır. Bu hücre grubu da total adacığın %60 ını oluşturmaktadır. Somatostatin ise delta hücrelerinden salgılanır ve adacığın %10 unu oluşturmaktadır. Son olarak adacıkta pankreatik polipeptid salgılayan PP hücreleri bulunmaktadır. Bu hücrelerin tümü tarafından salgılan bu hormonlar doğrudan kana karışmaktadır. Adacık içerisindeki kan akımı santraldan perifere doğru olmaktadır.



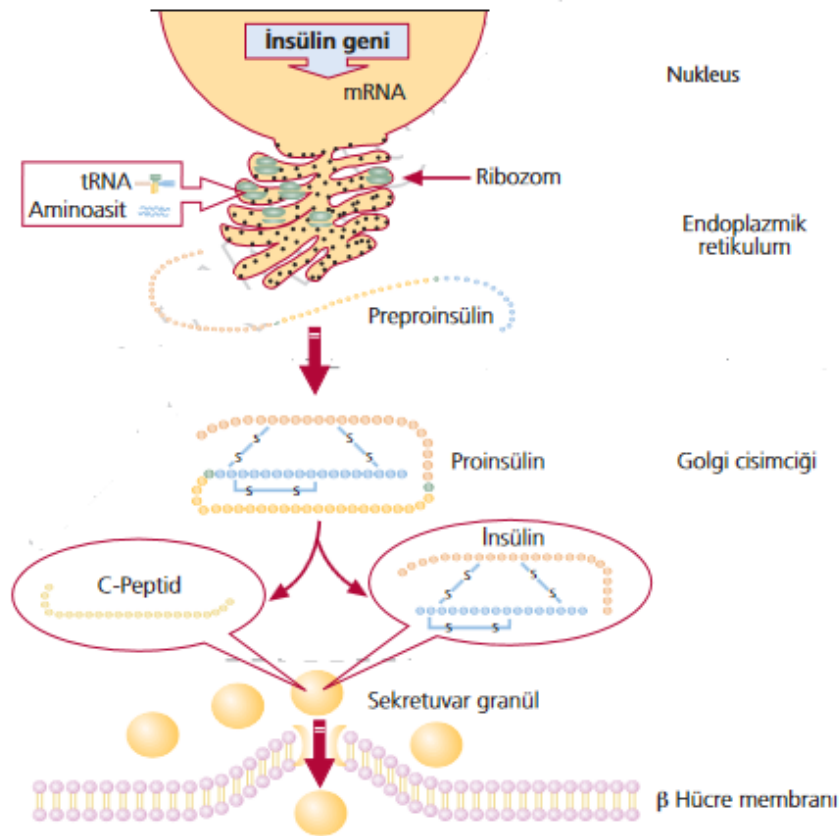
Şekil 1.2. Pankreatik adacıklarda bulunan hücre çeşitleri (Leung, 2010)

Endokrin pankreas insülin, glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeotid hormonları salgılayarak tüketilen besinlerin hücreler tarafından kullanılmalarını ve depolanmalarını sağlar (Zhou ve ark., 2018).

1.2.2.1. Endokrin pankreasın hormonları

İnsülin

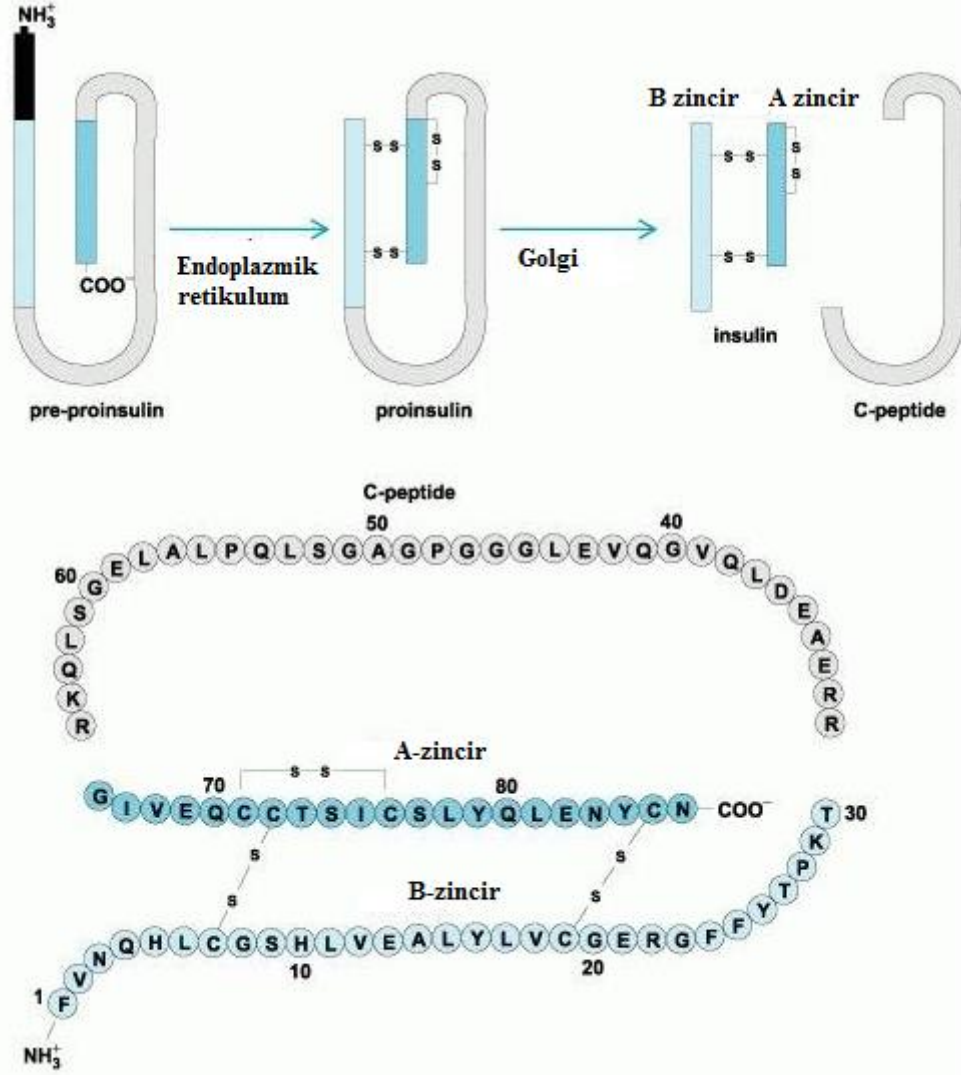
11. kromozomun kısa kolunda yer alan insan insülin geni bulunmaktadır. Preproinsülin [molekül ağırlığı (MA): 11500] önce proinsüline (MA:9000) daha sonra C-peptidin molekülden ayrılması ile insüline dönüşmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Pankreas beta hücresinde insülin sentez ve sekresyonu (İmamoğlu, 2009, s.4).

İnsülin iki polipeptid zincir içeren ve molekül ağırlığı (MA:5808) olan ve toplamda 51 aminoasitten oluşan A (21 aminoasit) ve B (30 aminoasit) dizisinden meydana gelmektedir (Şekil 1.4). A ve B dizileri arasında birbirlerine iki tane disülfid bağı bulunmaktadır. A dizisinde 6. ve 11. aminoasitleri birbirine bağlayan zincir içi (intrachain) disülfid bağı bulunmaktadır (Leung, 2010).

İnsülin salgılandıktan sonra kana karışır ve dolaşımında bulunan yarılanma süresi 3-5 dakikadır. Böbrek, plasenta ve karaciğerdeki insülinaz enzimleri ile katalizlenmektedir. İnsülin pankreastan dolaşıma katıldıktan sonra karaciğere gelir ve burada %50'si kandan temizlenmektedir. C-peptid de tıpkı insülin gibi, beta hücrelerinden salgılanır, 31 aminoasitten oluşur ve kandan temizlenmesi karaciğer ile sağlanır ve sonrasında böbreklerden atılmaktadır.

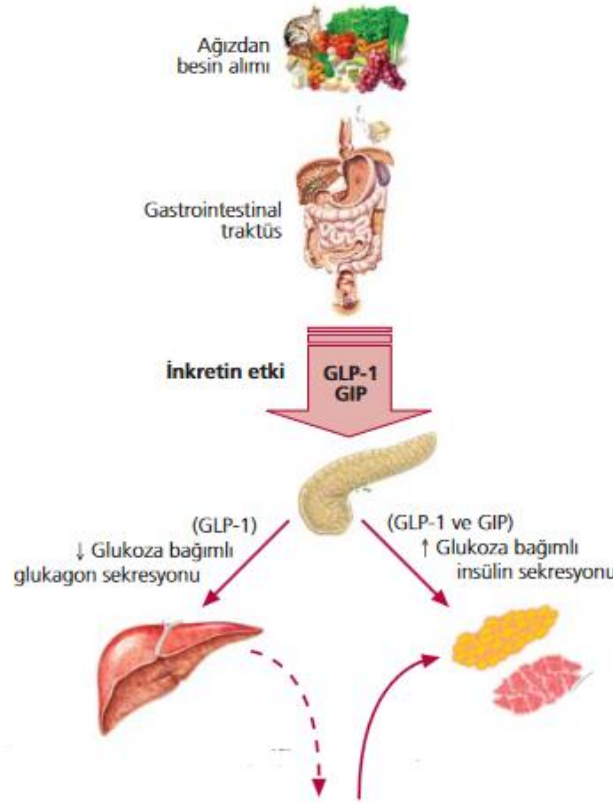


Şekil 1.4. İnsülin proteinindeki aminoasit dizilimi (Leung, 2010)

İnsan pankreası günde ortalama 40-50 ünite insülin üretmektedir. İnsan vücudunda bazal ve uyarılmış (prandiyal) olmak üzere iki farklı şekilde insülin salınımı olmaktadır. Bazal salgılama ekzojen uyarı olmaksızın (açlıkta) olan salgılanmadır. Uyarılmış salgılanma ise ağızdan besin alımına beta hücresinin insülin sekresyon yanıtıdır. İnsülin salgılanmasının en önemli uyarı glukozdur. Beslenme sonrasında kan glukozunda birden yükselme olmaktadır. Buna cevaben insülin salgılanmaya başlar. Fakat sonrasında kan glukozu hala

yüksek ise insülin ikinci kez tekrardan salgılanmaya başlar ve kan glukozu normale döndürülmeye çalışılır. İnsülin salgılamasının diğer uyarıları mannoz, lösin, vagal uyarılar ve sülfonilüre gibi ilaçlardır. Glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1), gastrik inhibitör peptid (GIB), kolesistokinin, sekretin ve gastrin gibi enterik hormonlar, beta adrenerjik uyarılar ve arjininglukozun uyardığı insülin salgılamasını arttırıcı özelliğe sahiptirler.

İnsülin salınımı; besinlerden alınan glukoz, aminoasit ve yağ asitlerinin emilimi ile kana karışması sonucu kandaki serumkonsantrasyonları tarafından belirlenmektedir. İnsülin salınımı aynı zamanda inkretinler adı verilen insülin sektire ettirici hormonlar tarafından da düzenlenmektedir (Şekil 1.5). Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve gastrik inhibitör polipeptid (GIP) intestinalinkretin etkiden sorumlu olan başlıca inkretin hormonlardır. GLP-1 ve GIP bu hormonlara duyarlı beta hücrelerinde glukoz yüklenmiş insülin salınımını indüklemek için büyük ölçüde katkı sağlanmaktadır. Bu iki peptid aynı zamanda pankreas beta hücre proliferasyonunu düzenlemektedirler. GLP-1 glukagonsekresyonu ve besin alımını inhibe ederken, GIP bu etkileri göstermemektedir (Zhou ve ark., 2018).



Şekil 1.5. İnkretin etki mekanizması (İmamoğlu, 2009, s.6).

Katekolamin ve somatostatin gibi hormonlar ve diyazoksid, fenitoin, vinblastin ve kolşisin gibi ilaçlar insülin salgılanmasını inhibe ederler. Katekolaminler insülinin glukoz translokasyonuna etkisini azaltırken adenozin ve prostaglandinler artırmaktadır.

Glukagon

2. kromozomda yer alan glukagon geni 29 aminoasitten oluşan tek zincirli peptidtir (MA:3485). Langerhans adacıklarında yer alan alfa hücrelerinden 160 aminoasitten oluşan proglukagon olarak sentezlenmektedir (İmamoğlu, 2009, s.5-6). GLP-1'in beta hücresi için anti-apoptotik etkisi olduğu bilinmektedir. GLP-2 insülin salınımını stimüle etmez. Glukagonun dolaşımdaki yarı ömrü 3-6 dakikadır. Başlıca karaciğer ve böbrek tarafından kandan temizlenir (Leung, 2010).

Glukozun glukagon sekresyonunu inhibe ettiği bilinmektedir, ancak; bunu doğrudan mı yoksa insülin ve somatostatin salınımı yaptırarak dolaylı olarak mı gerçekleştirdiği bilinmemektedir. Glukagon depolanmış olan glikojenin yıkımını, karaciğerde aminoasit prekürsörlerinden glukoz yapımını ve serbest yağ asitinden keton oluşumunu sağlayarak gıda alımı olmayan dönemlerde hücrelerin beslenmesini sağlamaktadır (DiMeglio ve ark., 2018).

Somatostatin

3. kromozomun uzun kolunda yer alan Somatostatin geni ilk olarak preprosomatostatin olarak bulunmaktadır ve 116 aminoasitten oluşmaktadır. İlerleyen zamanlarda parçalanarak 14 aminoasitten oluşan somatostatin elde edilmektedir (MA:1640). Langerhans adacıklarının delta hücrelerinden salgılanmaktadır. Yarı ömrü 3 dakikadan daha azdır (Regnel ve ark., 2017).

Pankreatik polipeptid (PP)

PP (MA:4200) 36 aminoasitten oluşan bir moleküldür. PP'in fizyolojik etkisi net olarak bilinmemektedir (Regnel ve ark., 2017).

1.2.3. Periferik Dolaşımda Glukoz Düzeyinin Ayarlanması

Periferik dolaşımda glukoz düzeyinin ayarlanmasında baskın iki mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar dolaşıma glukoz girişi ve/veya periferik dokular tarafından glukozun dolaşımdan alınarak kullanılmasıdır. Birinci mekanizmadan glukozun barsaklardan absorpsiyonunun ve/veya hepatik glukoz üretim ve periferik dolaşıma verilmesinin düzenlenmesi söz konusudur. İkinci mekanizmada periferik yağ ve iskelet kas dokusu önemli rol oynamaktadır (Edgerton ve ark., 2017).

Glukoz, hücrelerin hemen hepsinde metabolizmasında çok önemli bir maddedir. Glukoz sadece enerji temin edilen bir madde olmayıp glikojen ve/veya trigliserid molekülü oluşturarak hücre içerisinde depo edilebilmektedir. Hücre membranları glukoz gibi polar

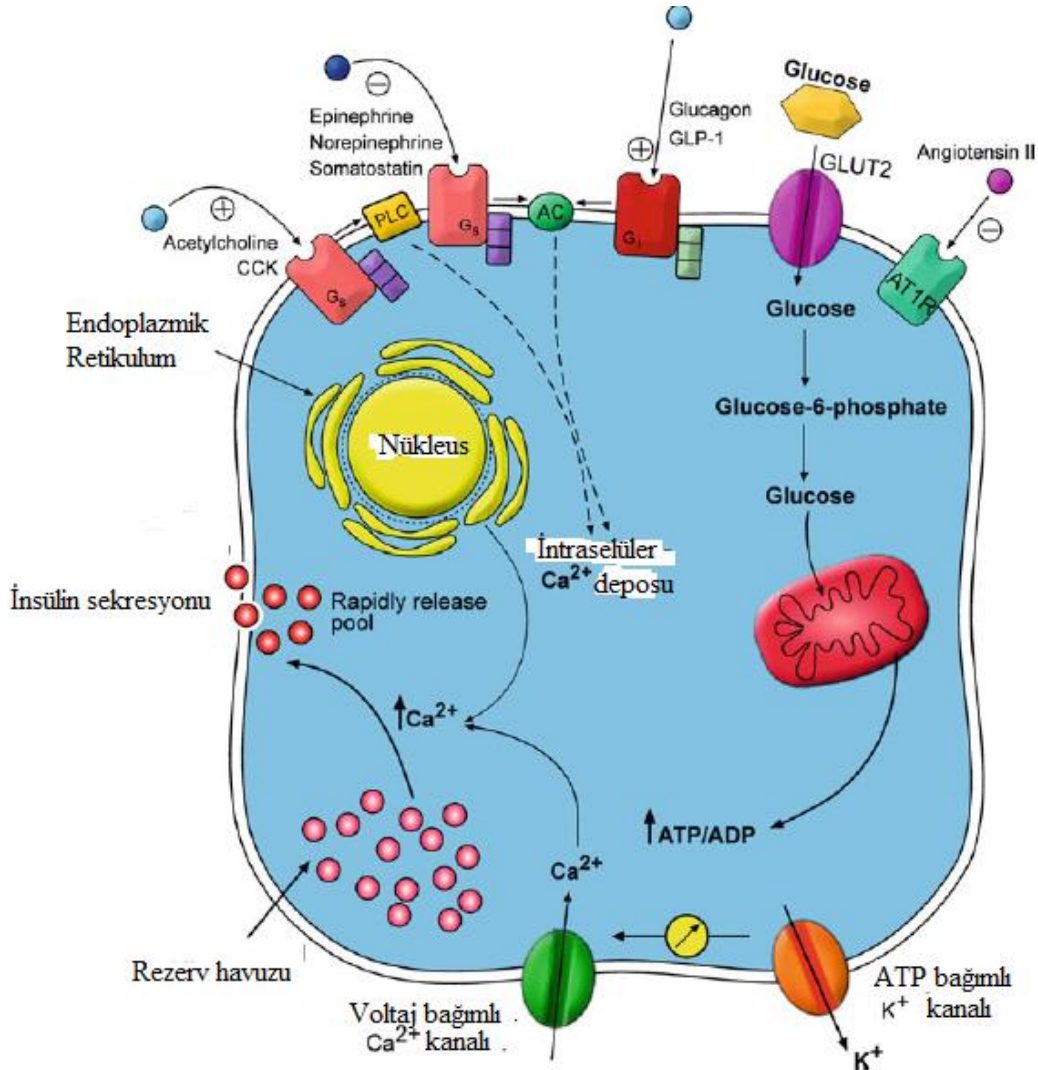
moleküllere geçirgen olmadıkları için bu tür maddelerin hücrelerin içerisine girmeleri taşıyıcı (trasporter) proteinler ile olmaktadır.

Memeli hücrelerinde “sodyum glukozco-transporter” ve “kolaylaşmış (facilitative) glukoztrasporter” olmak üzere iki tür glukoz taşıyıcısı bulunmaktadır. Sodyum glukozco-transporter ince barsak ve böbreğin proksimal tubulilerindeki fırçamsı kenarlı epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Sodyum glukozco-transporter’lar glukozu bir konsantrasyon gradiyentine karşı lümeninden ince barsak ve böbrek hücrelerine taşırlar. Sodyum transportu konsantrasyon gradiyenti yönündeki işlemin yerine getirilmesinde rol oynar. Sodyum gradiyenti sodyum/potasyum –adenosin three phosphatase (ATP’az) aracılığı ile aktif sodyum transportu sağlanarak devam ettirilir bu nedenle glukozun bu taşıma işleminde enerjiye (ATP) gereksinimi vardır (İmamoğlu, 2009, s.7).

Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları bütün hücrelerin yüzeylerinde vardır ve gradiyent konsantrasyonu yönünde hücre içerisinde kolaylaştırılmış difüzyon ile glukoz transportu sağlamaktadır. Kolaylaştırılmış difüzyon sistemi enerji gerektirmeyen, glukoz için taşıyıcı proteinler (GLUP) aracılığı ile olan pasif bir transport sistemidir. GLUT’lar plazma membranına yerleşmişlerdir ve hücre membranından 12 defa geçen bir zincir oluştururlar. Glukozu bağlar ve iki lipid tabaka arasından geçirerek hücre içerisine girmesini sağlarlar. Glukoz, konsantrasyon gradiyentinin durumuna bağlı olarak hücre içerisine girebilir veya çıkabilir. Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcılar ince bağırsak ve böbreğin proksimal tubulilerindeki fırçamsı kenarlı epitel hücrelerinde de vardır ve bu hücrelerde hücre içerisindeki glukozu periferik dolaşıma taşıma fonksiyonunu görürler. Dokulara göre farklı spesifik glukoz taşıyıcılar vardır. GLUT-1 daha çok pankreas beta hücreleri gibi uyarıya gerek olmayan dokularda bulunurken GLUT-4 hormonal (insülin) ve mekanik (İskelet kas kontraksiyonu) uyarılara yanıt veren dokularda bulunmaktadır (Edgerton ve ark., 2017).

İnsülin etkisi hedef hücre membranında yer alan reseptöre bağlanması ile başlamaktadır. Bu reseptör alfa ve beta sub ünitelerinden oluşmaktadır. İnsülin alfa subünitesine bağlanmaktadır. Glukoz girişi insülin etkisine bağlı olan hücrelerde; insülin hücre içerisinde bulunan glukoz taşıyıcılarının hücre membranına göç (translokasyon) etmesini arttırır. Burada özellikle GLUT-4 göçünde artış ön planda olmaktadır. İnsülin kendine özgü membran reseptörüne bağlandığında hücre içerisindeki glukoz taşıyıcılar hızla yaklaşık bir dakika içerisinde hücre membranında ekzositoz ve membranı eriterek kanal açma mekanizmalarına benzer fonksiyon görecektir şekilde hücre membranına göç ederler

(Şekil 1.6). Glukoz taşıyıcıları hücrenin dış kısmı ile de temasa geçerek glukoz transportunu arttıırırlar.



Şekil 1.6. Beta hücresinden insülin salgılama mekanizması (Leung, 2010)

İnsülin hücre membranındaki reseptörün alfa subünitesine bağlanmasına insülin reseptörünün beta subünitesinde bulunan üç adet tirozin artık molekülünü (tyrosine residue) fosforile ederek bunlara tirozinkinaz aktivitesi kazandırır. Hücre içerisinde fosforile olabilme özelliğine sahip tirozin artık molekülü olan birçok protein vardır. Tirozin artık molekülü protein kinaz veya protein fosfataz enzimlerini aktifleştirerek hücre içi biyolojik etkiye tetikleme rolü oynar. İnsülin reseptörünün beta subünitesindeki otofosforilizasyon insülin etkisinin anahtar rolündeki ilk adımdır. Bundan sonraki adımlar şelale (cascade) şeklinde protein kinaz veya protein fosfataz ile proteinlerin fosforilizasyonu ve hücre içi metabolik ve biyolojik aktivitelerin oluşturulmasıdır. İnsülin reseptörlerinde hücre içindeki en önemli madde insülin receptor substrate 1 (IRS-1) dir. IRS-1 tirozin ile fosforilize olduktan sonra (p85) ve Grb-2 adlı en az iki tip proteine bağlanır. P85; phosphaditylinositol

3-kinase (PI3-kinaz) aracılığı ile katalitik aktiviteyi artırır. Bu yolla GLUT'lar aracılığı ile hücre içerisinde glukoz girişini artırır. Grb-2; Sos ve Ras proteinleri aracılığı ile MAP kinaz aktivitesini artırır. İnsülin reseptör ve post reseptör anomalileri insülin etkinliğini belirlemektedir (Johnston ve ark., 2016).

İşlevi biten insülin reseptörlerinden ayrılır ve parçalanıp metabolize olur, glukoz taşıyıcıları da endositoza benzer bir mekanizma ile hızla hücre içerisine geç ederler ve glukoz transportu tekrar önceki bazal düzeyine döner.

İnsülin etkinliğini parakrin ve endokrin olarak göstermektedir. Salınan insülin A hücrelerine etki ederek parakrin yolla glukagon salınımını baskılar. Endokrin etkinliğini ise karaciğer, kas ve yağ dokusu üzerine göstermektedir (Johnston ve ark., 2016).

Sonuç olarak, pankreas, endokrin ve egzokrin fonksiyonları ile hücrelerin metabolik ihtiyaçlarını karşılayan vücuttaki en önemli organdır. Pankreasın anatomik ya da fonksiyonel bozuklukları başta diabetes mellitus olmak üzere pek çok hastalığa neden olmaktadır.

1.3. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM) immün sistem hücrelerinin kendi pankreatik beta hücrelerini yabancı olarak algılayıp yok etmesi ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Genellikle çocukluk döneminde ortaya çıkar ve ileri yaşlarda da görülebilmektedir. Her geçen yıl bu hastalık ile karşı karşıya kalan insan sayısı artmaktadır (İmamoğlu, 2009, s.39).Yapılan araştırmalar sonrasında T1DM vakalarının diyabet hastaları arasındaki görülme sıklığı %6 ile %11 olarak tespit edilmiştir.

T1DM'e sebep olan birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında yapılan sınıflandırma, immün aracılı ve idiyopatik olarak belirtilmektedir. Tip 1 diyabet B olarak adlandırılan idiyopatik diyabette beta hücrelerine immün sistem hücrelerinin saldırdığına dair bir bulgu yoktur. Fakat bu hastalarda kan şekeri ölçüm sonuçlarında insülin eksikliğine bağlı yüksek glukoz varlığı tespit edilmektedir. (Fujita ve ark., 2018).

Tip 1 diyabet A ise adacık doku kaybına bağlı olarak beta hücrelerinin yok olmasıdır. İmmün aracılı diyabettir ve bu hastalar insüline bağımlıdır. Tip 1 diyabetli hastaların %90' ından fazlası bu grupta yer almaktadır.

1.3.1. Tip 1 Diyabetin Otoimmün Patogenezi

T1DM patogenezinde temelde 2 durum öne çıkmaktadır. Bunlardan birincisi kişide genetik yatkınlık varsa çevresel faktörlerinde etkisiyle bir araya gelerek beta hücrelerini

hedef alan immün sistem hücrelerinin saldırılarıyla beta hücrelerinin yok edilmesi, ikincisi ise sonucunda inflamasyon meydana gelerek insülitis adı verilen olayların başlamasıdır.

Kişide T1DM klinik bulguları başlamadan önce immün sistem çoktan beta hücre yıkımına başlamıştır. Klinik bulguların ortaya çıkmasında çevresel faktörler önemli rol oynar. Ancak kişideki beta hücre sayısı %20 ye düştüğü zaman klinik semptomlar belirmeye başlamaktadır. Hastalığın ilk dönemlerinde enfeksiyon ve stres bulguları belirmeye başlar ve bu durumu genellikle insülin ihtiyacının artması takip etmektedir (Delveccio ve ark., 2017).

1.3.2. Genetik Faktörler

Genetik tabanlı bir hastalık olarak da belirtilen T1DM de anne ve babanın diyabetli olup olmadığı önem arz etmektedir. Bununla ilgili araştırma çalışmalarından alınan verilere göre, babanın diyabetli olması annenin diyabetli olması durumuna kıyasla çocuklara diyabeti aktarma olasılığının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Tek yumurta ikizleri ve çift yumurta ikizleri arasında yapılan karşılaştırmalı incelemelerde de hastalığın tek yumurta ikizlerinde daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (Redondo ve ark. 2008).

Yapılan genetik araştırmalar sonucunda tip 1 diyabet riski oluşturan 20 adet gen belirlenmiştir. IDDM-1 geninin özellikle T1DM hastalığının oluşumunda birinci derecede sorumlu gen olduğu tespit edilmiştir (İmamoğlu, 2009, s.40).

IDMM 1 geninin 6. kromozomun kısa kolu üzerinde (6p21. 3) HLA (human leucocyte antigen) bölgesinde bulunan Class II yüzey belirteci ile bağlantılı olduğu söylenmektedir. Bu MHC Class II yüzey belirteci, vücuttaki yabancı antijeni tanıyarak uyarılmakta ve CD 4 T hücre yüzey reseptörü ile birleşerek otoimmün olan T1DM hastalığını başlatmaktadır (DiMeglio ve ark., 2018).

IDDM 2 gen sembolü ile gösterilen kromozom 11 üzerindeki insülin geni (INS) VNTR (variable number of tandem repeats) belirtecinin insülin gen transkripsiyonu ile ilişkili genidir. Henüz tam olarak kanıtlanamamasına karşın IDDM12 T hücre fonksiyonu düzenleyicisi olan CTLA4 lokusudur (Noble, 2015).

1.3.3. Beta Hücre İmmüntoleransının Bozulmasına Neden Olan Çevresel Faktörler

T1DM genetik olduğu kadar aynı zamanda çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşabilecek bir hastalıktır. Normalde sağlıklı bir kişinin immün sistem hücreleri kendi hücrelerini tanır ve ona saldırmaz fakat bu hastalıkta beta hücrelerinin haraplanmasının

sebeplerinden biri de immün toleransın bozulmasıdır. İmmün toleransın bozulmasına virüsler, toksinler, dengesiz beslenme de neden olmaktadır (Rewers ve ark., 2016).

Virüsler beta hücresine saldırarak onu enfekte etmektedir. Böylece enfekte olmuş beta hücresi apoptoz ya da nekroza uğrayarak yok olmaktadır. Beta hücrelerini yok eden virüslere örnek olarak ensefalomyokardit virüsünü verebiliriz. Onun dışında Rubella virüs, Sitomegalovirüs ve kabakulak virüsleri de beta hücrelerinde haraplanmaya neden olmaktadır (Rewers ve ark., 2016).

Beta hücre haraplanmasına sebebiyet veren toksin maddelere örnek olarak ise streptozotosin (STZ), aloksan vakor (N-3 pyrimetil N nitrophenylurea) örnek verebiliriz (Rewers ve ark., 2016).

1.3.4. Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu

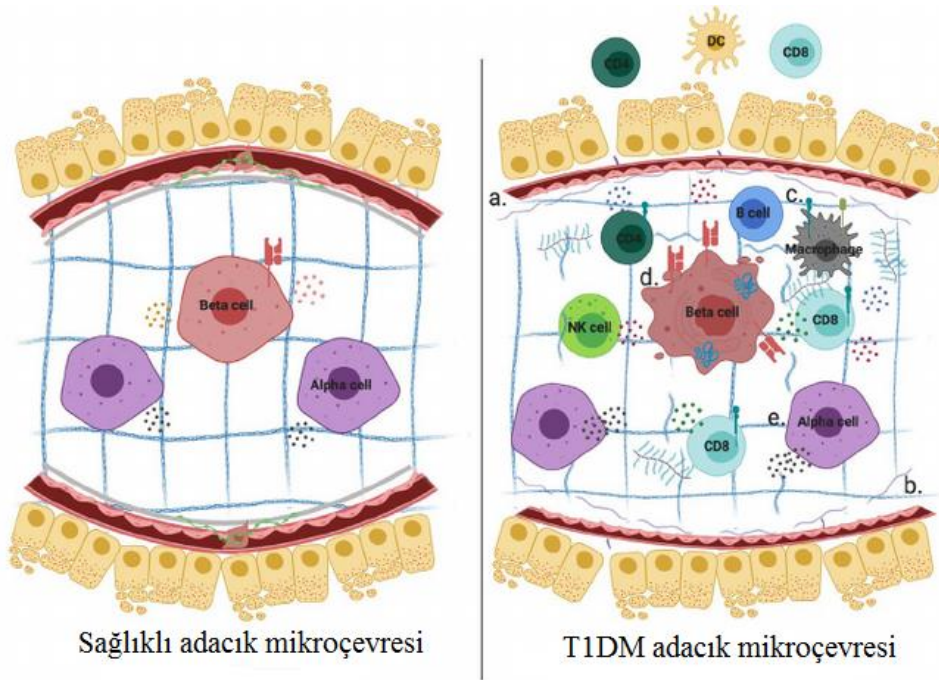
Çevresel föktörlerden olan toksin ya da virüs etkisiyle yıkıma uğrayan beta hücreleri kendini savunabilmek için bir takım sitokinler (IFN γ , IL6) salgılamaya başlar ve böylece immün sistem hücreleri uyarılmış olur. İlk olarak HLA Class II belirteci uyarılır ve harekete geçer. Bu sayede CD 8 sitotoksik T lenfositlerini aktive eder. Spesifik olmayan immün sistem hücre aktivitesi başlar.

Eğer kişide genetik olarak yatkınlık, yani beta hücre genlerinde mutasyon var ise MHC Class II belirteci aktive olur ve spesifik bir otoimmün reaksiyon gelişmeye başlar. Aktive T lenfositler ise IL-1 β , TNF- α , sitotoksik makrofajlar nitrik oksit (NO), TNF- β ve IFN- γ salınımı ile insülitisi başlatırlar (Eizirik ve ark., 2012).

1.3.5. İnsülitis ve Beta Hücre Ölümü

T1DM hastalarında ilk olarak pankreatik adacıkları makrofajlar, CD8+ sitotoksik T lenfositleri (TH1), NK (natural killer) hücreleri ve B lenfositleri ele geçirerek yıkıma uğratılmaktadırlar (Şekil 1.7). Beta hücrelerinin yıkımı ve diyabet gelişimi için T lenfositlerin her ikisi de (CD 4 ve CD 8) aktif olmak durumundadırlar (Eizirik ve ark., 2012).

İnsülitis adı verilen durum hücre içinde nitrik oksit (NO) yapımını hızlandırmaktadır. NO, DNA molekülünde bant kırılmalarına yol açarak hücre ölümüne ve apoptozise neden olmaktadır (Peters ve ark., 2019).



Şekil 1.7. Beta hücre yıkımı (Peters ve ark., 2019)

Bir kişide T1DM gelişmesi için adacıklardaki sağlıklı beta hücre sayısının %20 civarına inmesi gerektiğini belirtilmektedir. Bu tablo geliştiğinde bu hastalarda insülin sentezlene bilebirinci yıldan sonra C-peptid düzeyi sıfıra ulaşmaktadır. Böyle bir durumda bu hastalar dışarıdan insülin alımına muhtaç hale gelmektedir (Peters ve ark., 2019).

1.3.6. Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikorları

T hücreleri ile reaksiyona giren birçok beta hücre antijeni tanımlanmıştır. 69 kDa adacık hücre otoantijeni (ICA512), glutamik asit dekarboksilaz (GAD65 ve GAD67), protein tirozin fosfataz benzer antijenler (IA2 ve IA2b Phogrin) insülin, 38 kDa insülin-sekretuar granülleri, stres proteinleri (heat shock protein-hsp 65), henüz tam ayırıcı tanısı yapılamayan 155 kDa, 120 kDa, 50 kDa, 17 kDa, ağırlığında proteinler beta hücre antijeni olarak tespit edilmiştir. Bu antijenler otreaktif T lenfositlerin aktifleşmesine sebep olmaktadır (Tersey ve ark., 2012).

1.4. T1DM Tedavi Yöntemleri

1.4.1. İnsülin İnfüzyonu

Günümüzde T1DM nin tedavisine yönelik iki yöntem daha sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar insülin infüzyon tedavisi ve pankreas/adacık naklidir. İnsülin tedavisi, bir insülin pompası kullanılarak çok sayıda günlük enjeksiyon veya deri altına

insülin enjektörü ile infüzyon şeklinde uygulanır (Golden ve ark., 2012; Yardley ve ark., 2013). T1DM hastalarının yaşam kalitelerinin artırılması için günlük olarak kan şekeri seviyelerinin ölçülmesi ve hayatlarının geri kalanı boyunca günde birkaç kez bu glukoz seviyelerine yanıt olarak insülin enjeksiyonu yapması gerekmektedir. En uyumlu hastalarda bile sıkı glukoz kontrolünün sürdürülmesi zordur. Örneğin hastalar, kan şekeri seviyeleri, insülin / karbonhidrat oranı, karbonhidrat alımı, enjeksiyon sonrası fiziksel egzersiz yoğunluğu ve bireysel insülin duyarlılığı gibi çeşitli faktörleri hesaba katarak alması gereken insülin dozu hekim tarafından hesaplanmalıdır. Herhangi bir küçük yanlış hesaplama, hipoglisemi ve hiperglisemi ataklarına yol açarak yaşamı tehdit eden durumlara neden olabilir. Glukoz seviyelerindeki bu tehlikeli dalgalanmalar, diyabetik komplikasyonların birincil nedenidir. Hipoglisemi, bilişsel bozulma, bilinç kaybı, nöbetler ve ölüm ile sonuçlanabilmektedir. Hiperglisemi ise, böbrek yetmezliği, kalp krizi, felç, körlük, sinir hasarı ve diğer birçok hastalık gibi benzer şekilde yıkıcı komplikasyonlara yol açmaktadır (Cryer, 2012).

Yüksek glukoz seviyeleri, farklı diyabetik komplikasyonların ana nedenleri olduğu düşünülen gelişmiş glikasyon son ürünlerine yol açan çeşitli yapısal ve fonksiyonel proteinlerin glikasyonunu indükleyebilir.

Bütün bu durumlar göz önünde bulundurularak insülin enjeksiyonları ve insülin pompaları kullanımı yaşamın kalitesini arttıran teknolojiler olmasına rağmen, pankreas beta hücrelerinin fonksiyonlarını birebir taklit edemezler ve uzun vadeli komplikasyonları önleyemezler (Song ve Roy, 2016).

1.4.2. Pankreas Nakli

Pankreas nakilleri, günlük insülin alımına ihtiyaç duymadan normoglisemiye yeniden düzenleyerek T1DM için alternatif bir tedavi yöntemidir. 2004'ten 2008'e kadar gerçekleştirilen pankreas nakillerinde, tedaviye ek olarak immünsüpresif ilaç kullanımı ihtiyacı doğmuştur. Ayrıca hastaların bir kısmında (~% 73) pankreas nakli ile birlikte böbrek nakli yapılmıştır. 2000 yılından önce yapılan tek pankreas nakillerinde pankreas/böbrek nakillerine kıyasla daha fazla greft kaybı yaşandığı kayıt edilmiştir (Gruessner ve Sutherland, 2008).

Bu nakillerde greft kaybı sıklıkla meydana gelir çünkü bu hastalar yüksek bir tromboz riski altındadır. Greft trombozu olasılığını azaltmak için perioperatif dönemde heparin ve dipiridamol gibi antikoagülan ajanlarla tedavi gerekir, ancak bunlar kanama riskini artırır. 2000 yılından bu yana immünsüpresyondaki gelişmelerle birlikte, tüm nakil

kategorilerinde antikor indüksiyonu ve steroidden kaçınma temelli idame protokollerinin kullanımının, pankreas grefti hayatta kalma oranlarının % 85 ve% 52 olarak gösterildiği gibi, pankreas naklinin sonucunu büyük ölçüde iyileştirdiğini göstermiştir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda pankreas nakilleri, bir yıl sonra tüm hasta gruplarında % 80'den fazla greft sağkalım oranları ile insülin bağımsızlığını sağlayabilse de, bu yaklaşımın birçok dezavantajı vardır. İlk olarak, organ nakli donör sayısı ile sınırlandırılmıştır. ABD'de mevcut 8.000 vericiden yaklaşık 1.400'ü (% 16) potansiyel olarak yıllık organ nakli için uygundur. İkinci olarak, kardiyovasküler komplikasyonları hızlanan T1DM hastalarına, alta yatan kardiyovasküler hastalıkları ve artmış perioperatif komplikasyon riskleri nedeniyle bu kadar karmaşık bir operasyon önerilmemektedir (Song ve Roy, 2016).

1.4.3. Adacık Nakli

Adacık nakilleri için en önemli kaynak olan Edmonton Protokolünün zamanla çeşitli sınırlılıklara sahip olduğu belirlenmiştir. Belirtilen en önemli sınırlılıklardan biri donör yetersizliğidir. Bir hastayı tedavi etmek için 2-4 donörden kaliteli adacıklara ihtiyaç vardır (Markmann ve ark.,2003). Donörün vücut kitle indeksi, pankreasın boyutu, pankreas yüzey bütünlüğü gibi kontrol edilemeyen faktörlerin adacık kalitesine zarar verebileceği, adacık izolasyon işlemi sırasında adacık hasarı meydana gelmesi gibi sebepler nedeniyle, birden fazla donöre ihtiyaç vardır. Nakil yapılan adacıkların % 50 ile % 70'inin ani hipoksi ve enflamatuar yanıt nedeniyle nakil sırasında öldüğü bazı çalışmalarda kaydedilmiştir (Lehmann ve ark.,2007). Başarı ile tamamlanan nakillerde ise hastaların % 10'unun beş yıl sonra insüline bağımlı olmadığı rapor edilmiştir (Ryan ve ark., 2005).Bu hastaların daha da uzun yıllar insülin-bağımsız yaşamaları için tıpkı pankreas nakillerindeki gibi immünsüpresif ilaçlar kullanması gerekmektedir. Fakat bu immünsüpresif ilaçlar T1DM hastalarında böbrek fonksiyon bozukluğu ve nefrotoksisiteye yol açabilmektedir. Benzer şekilde karaciğerde yüksek metabolit konsantrasyonları gelişerek zamanla greft yetmezliğine neden olabilmektedir.

Bu nedenle, adacık nakilleri de, donör yetersizliği, immünsüpresif ilaçların uzun süreli kullanımından kaynaklanan greft hasarı ve hipoksiden kaynaklanan greft başarısızlığına neden olan yetersiz implantasyon bölgeleri nedeniyle hala büyük ölçüde sınırlılıklara sahiptir.

1.4.4. Hücresel Tedaviler

Tip 1 Diyabet pankreatik adacıklardaki beta hücrelerinin otoimmün yıkımının sonucudur ve diyabetik hastaların% 5-10'unu oluşturur. Kontrolü için ise hayat boyu sürecek insülin tedavisi gereklidir (Gabr ve ark., 2017). Günümüzde alternatif tedavi şekilleri olarak ise sağlıklı bir pankreas veya pankreatik adacık nakli uygulanmaktadır. Fakat kadavra ve donör yetersizliği nedeniyle yapılacak bu tedaviler sınırlı kalmaktadır. Ayrıca adacık ve pankreas nakilleri allojenik yapıldığı için tedavi sonrasında doku reddi gibi immun problemler ortaya çıkarak hastalar yeniden insülin bağımlı hale gelmektedir. Dışarıdan insülin bağımlılığının engellenerek hastaların yaşam kalitesi arttırmak için araştırmalar hücresel tedavilere doğru yönelmiştir (Kassem ve ark., 2016). Bu nedenle beta hücreleri için yeni kaynaklar veya insülin üreten hücreler tanımlanmalıdır. Birkaç grup, insan embriyonik kök hücrelerinin embriyoid cisimlerinde oluşan farklılaşmış türevler arasında beta hücrelerine benzeyen hücrelerin varlığına ilişkin kanıtlar bildirmiştir (Xin ve ark., 2016; Xu ve ark., 2017). Genetik indüksiyon veya genetik mühendislik yöntemleri ile beta olmayan hücrelerden üretilen insülin üreten hücreler de araştırılmıştır. Bu tekniklerden bazılarının güvenilir ve çoğaltılması zor olduğu kanıtlandığından, gelişim sırasında beta hücrelerinin oluşumunda yardımcı olan spesifik transkripsiyon faktörü kaskadlarının in vitro mezenkimal kök hücrelere (MKH) uygulanabilmesi test edilmeye başlamıştır.

MKH'lerden insülin üreten hücrelerin üretilmesi için literatürde geçen birçok protokolün bulunduğu dikkati çekmektedir. Genel olarak bu çalışmalarda benzer ve çok aşamalı in vitro farklılaşma prosedürleri kullanılarak çeşitli MKH kaynaklarından işlevsel insülin üreten hücreler başarıyla üretilmiştir (Yangve ark., 2017; Xin ve ark., 2016; Xu ve ark., 2017; Khorsandi ve ark., 2016).

Protokollerde ortak olarak tespit edilen, hücre farklılaşmasını teşvik etmek için, düşük glukozlu ortam yüksek glukozlu ortam ile değiştirilmiştir. Kök hücrelerin insülin üreten hücrelere farklılaştırılmasında yüksek glukozun önemli bir faktör olduğu bilinmektedir.

MKH ler hücresel tedaviler için potansiyel bir kaynak olarak görülmektedir. MKH ler plastisite özelliği sayesinde kaynaklandığı dokudan farklı birçok dokunun hücrelerine farklılaşabilme özelliği göstermektedir. Aslında, son birkaç yıl içinde, çeşitli türde hücreler, embriyonik kök hücreler (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPS), mezenkimal kök hücreler (MKH) de dahil olmak üzere insülin üreten hücrelere (IPC) farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Mu ve ark., 2017). Çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin farklılaşması, insülin üreten hücreleri elde ederek pankreatik endokrin fonksiyonu yeniden

oluşturmak için yeni ve umut verici bir strateji sağlamaktadır. EKH ler etik sorunlardan dolayı, IPS ler ise genetik manipülasyona maruz bırakıldığı için dezavantajlar içermektedir. MKH'ler ise EKH'ler gibi herhangi bir etik endişe uyarmamakta ve böylece biyomedikal uygulamalar ve hücre temelli terapötik yaklaşımlar için büyük bir potansiyel teşkil etmektedir. MKH'lerin çeşitli kaynakları arasında, doğumda rutin olarak atılan göbek bağı ve diğer ekstra embriyonik dokular bulunmaktadır. Ayrıca mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ dokusu, karaciğer hücreleri ve endometriyum gibi zengin dokularda da bulunmaktadır. Bunlardan, kemik iliği ve yağ dokuları, bulunabilirliği ve bolluğu ve dokümanlarının kapsamı açısından diğer kaynaklara göre farklı avantajlar sunmaktadır.

1.5. Enkapsülasyon

T1DM tedavisindeki mevcut nakil yöntemleriyle ilişkili yukarıda belirtilen eksiklikler göz önüne alındığında, araştırmacıların, donör eksikliği ve fonksiyonel bir pankreasın fizyolojik taklitiyle birlikte immünosupresyon zorluğunun üstesinden gelmeleri gerekmektedir. Zamanla immünsüpresiflere olan ihtiyacı ortadan kaldıracak bir yapay pankreasın geliştirilmesi için çekici bir strateji geliştirilmiştir. Bu strateji ise insülin salgılayan adacıkların yarı geçirgen bir zar içinde kapsüllenmesidir. Uygun yarı geçirgen zarın özellikleri, adacıkları konağın bağışıklık sisteminden koruyacak ve aynı zamanda besinlerin ve küçük moleküllerin (glukoz ve insülin dahil) geçişine izin verecek şekilde olmalıdır. Aynı zamanda gözeneklerden antikorlar ve lenfositler yani bağışıklık sistemi elemanlarının, kapsül içerisine girişine engel olmalıdır.

Başarılı immün izolasyon, potansiyel olarak zenojenik ve kök hücre kaynaklarından gelen hücrelerin, standart insan pankreas adacıklarına veya beta hücrelerine alternatif olarak kullanılmasına izin verecek ve böylece donör eksikliği problemini önemli ölçüde azaltacaktır. Adacıklar ve kök hücreler kullanılarak yöntemin kapsülleme metoduyla da birleştirilmesiyle laboratuvarında yapay pankreas geliştirilmesine imkan verebilecektir.

1.5.1. Mikrokapsülasyon

Kapsülasyon çalışmalarında öncelikli olarak çapı 400–800 µm arasında değişen mikrokapsüllenmiş adacıklar deney hayvanlarında uygulanmıştır. Adacıkların boyutları küçük olduğu için periton boşluğuna, subkutan olarak veya renal kapsülün altına küçük cerrahi işlemlerle nakil gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle 300-400 µm çapındaki küçük aljinat mikro kapsüller kullanılarak Calafiore ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ekografi ölçümü ve lokal anestezi altında hastalara intraperitoneal olarak implante edilmiş

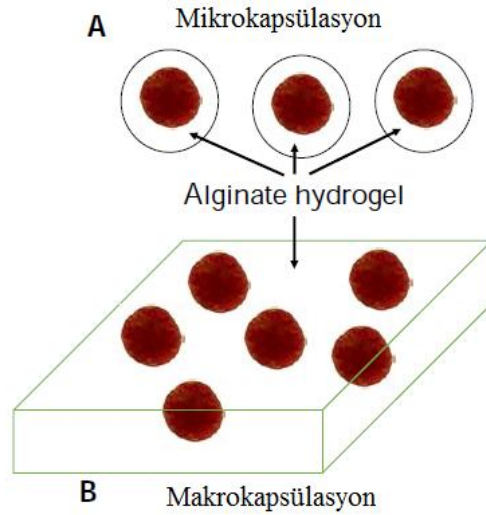
ve nakil sonrasında hastalarda insülin gereksinimi azaldığı ve klinik açıdan yöntemin uygulanabilir olduğu kayıt edilmiştir (Calafiore ve ark., 2006).

Mikrokapsülasyon uygulamalarında geniş yüzey alanı / hacim oranı, mikrokapsüllerin toplu halde nakli için avantajlıdır; bununla birlikte, bu teknolojinin belirli sınırlılıkları bulunmaktadır. En önemlisi büyük bir nakil alanına ihtiyaç vardır. Yapılan bir çalışmada günlük insülin ihtiyacını yeterince karşılamak için gerekli sayıda kapsülü, anında besin erişimi sağlayan uygun bir mikrovasküler yatağı, gerekirse mikrokapsülün çıkarılmasında zorluğu ve adacıkların hayatta kalma oranlarının yetersiz olduğu belirtilmiştir (Khanna ve ark.,2010; Levesque ve ark., 1992; Moya ve ark., 2010; Shin ve ark., 2013). Deney hayvanlarında ve insan deneklerinde mikrokapsül uygulamaları denenmesine rağmen, hücre kaynakları, implantın yeri ve vaskülarizasyon gibi zorluklar çözülememiştir (Elliott ve ark., 2005; Wang ve ark., 1997).

1.5.2. Makrokapsülasyon

Makrokapsülleme çalışmaları ilk olarak 1950'li yıllarda başlamıştır. Makrokapsülleme cihazları, yüksek akış hızı veya azaltılmış yüzey alanı için içi boş torba benzeri yapılar, polimerik hidrojel tabakalar veya düzlemsel membranlar gibi farklı geometrilere sahip olabilir. Taşıma mekanizmalarına göre ekstravasküler veya vasküler perfüzyon temelli sistemler olarak kategorize edilebilirler.

Yalnızca birkaç adacığın bir arada gruplandırıldığı mikrokapsüllemeden farklı olarak, makro kapsülleme stratejisinin büyük kapsül boyutu, daha fazla sayıda adacık kullanmayı gerektirir (Şekil 1.8) (Krishnan ve ark., 2014) ve bu nedenle implantasyon için böbrek kapsülleri gibi geleneksel alanlara meydan okur. Aynı zamanda vasküler perfüzyon makrokapsülleri kan pıhtılaşmasına ve tromboza neden olabilir. Buna rağmen, makrokapsüller implantasyon ve geri kazanmanın uygulanabilirliğini başarıyla göstermiştir (Jain ve ark., 1995; Suzuki ve ark., 1998). Başarılı bir makrokapsülleme cihazı, hücre kaynaklarının mevcudiyetine, kapsül malzemelerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ve hücreler ile dış ortamları arasındaki difüzyona bağlı olacaktır.



Şekil 1.1. Aljinat kullanılarak hazırlanmış iki farklı enkapsülasyon şekli. **A:** Mikrokapşülasyon **B:** Makrokapşülasyon (Krishnan ve ark., 2014).

1.5.3. Ekstravasküler makrokapşül

Ekstravasküler makrokapşüller kavramı, difüzyon taşıma ilkesine dayanmaktadır. Ekstravasküler cihazlar vasküler anastomoz gerektirmediğinden, ilgili cerrahi riskler vasküler perfüzyon cihazlarından çok daha düşüktür.

1.5.4. Kapşülasyon malzemeleri

Hidrojeller

Son yirmi yılda, makrokapşülleme için daha fazla biyouyumluluk elde etmenin bir yolu olarak hidrojellerin kullanımına artan bir ilgi olmuştur. Malzemenin hidrofilik doğası nedeniyle, çevreleyen sıvılar ve dokularla hemen hemen hiç ara yüzey gerilimi oluşturulmaz, bu nedenle protein adsorpsiyonunu ve hücre yapışmasını en aza indirir. Ayrıca, hidrojellerin mekanik özellikleri, istenen seçiciliği ve geçirgenliği elde etmek için çapraz bağlama yoluyla kolayca kontrol edilebilir, böylece düşük moleküler ağırlıklı besinlerin ve metabolitlerin hücrelere geçişine izin verilir.

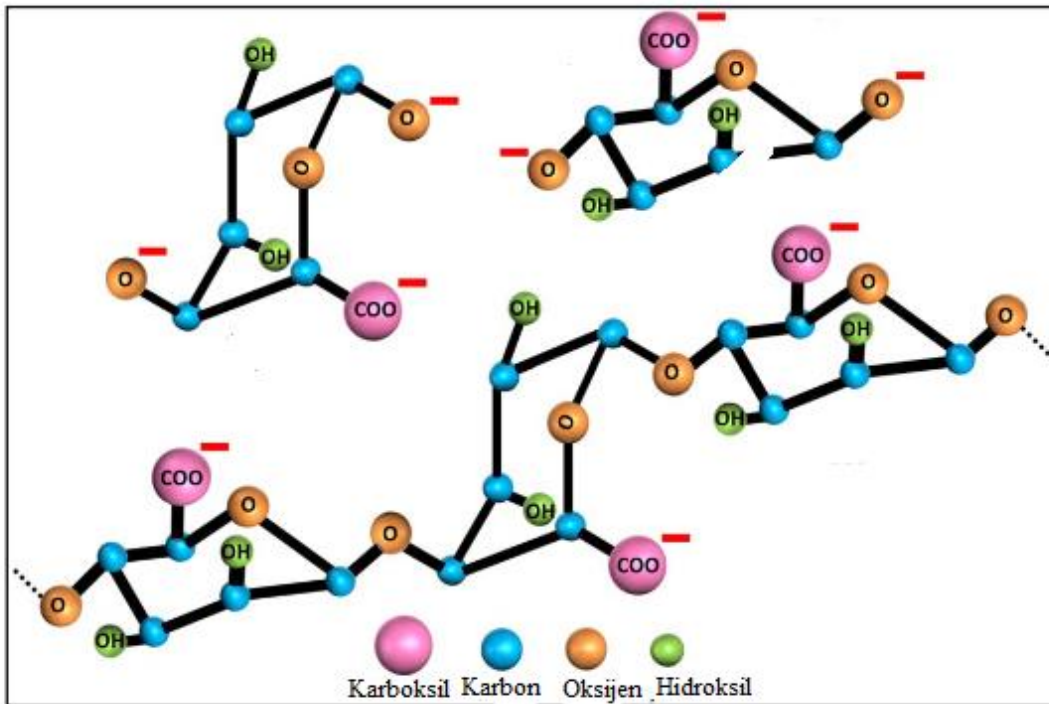
Akrilonitril ve sodyum metalil sülfonatın bir kopolimeri olan AN69, makrokapşülleme malzemesi olarak incelenen ilk hidrojellerden biridir (Kessler et al., 1991, 1995, 1997). Mekanik olarak güçlü destekle güçlendirilmiş poli (vinil alkol) (PVA) hidrojel makrokapşüller, diyabetik sıçanların karın boşluğuna implantasyondan bir ay sonra normoglisemiyi sağlayan çalışmalar vardır. Jain ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada alınan sonuçlarda, agarozdan yapılan makroboncukların, sıçanlara intraperitoneal naklinden yaklaşık 200 gün sonra fonksiyonel domuz adacıkları içerdiğini gösterilmiştir.

Makrokapsüllenmiş hidrojellerle ilişkili en ciddi sorunlardan biri, doku kümelerinin merkezi nekrozu nedeniyle nakledilen adacıkların yaşama kabiliyetinin kaybıdır. Adacık agregasyonunun hipoksiye neden olduğu ve 1-2 hafta içinde doku canlılığının kademeli olarak kaybedilmesine yol açtığı bildirilmiştir. İstenmeyen kümelenmeyi önlemek için, adacıklar genellikle kapsülmeden önce jel matrislerinde sabitleştirilir, önceki çalışmalarla gösterildiği gibi, hücre-matriks etkileşiminin de adacık canlılığını artırabilir.

Aljinat

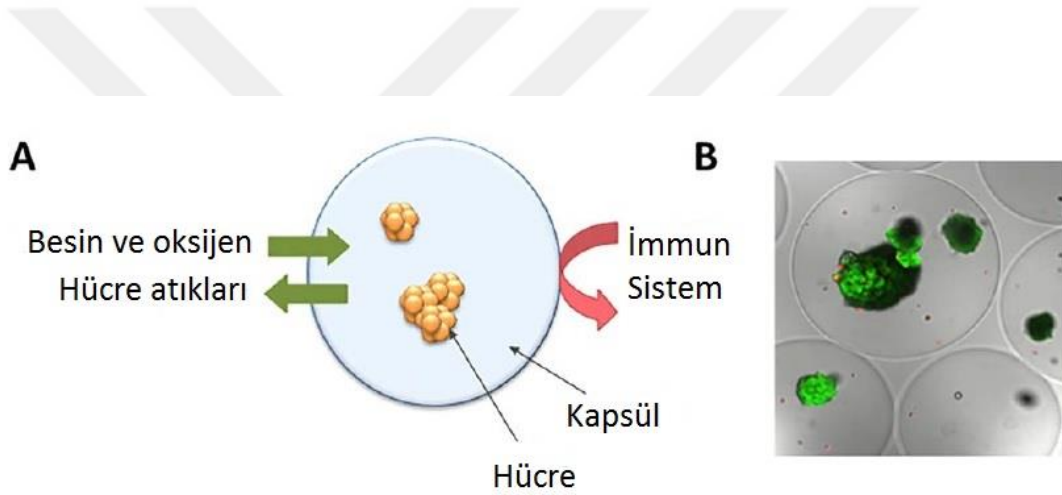
Pankreas adacıklarının aljinat kapsül kullanarak bağışıklık sisteminden korunması ilk olarak Lim ve Sun tarafından sıçanlarda gösterilmiştir (Lim ve Sun, 1980). Sonrasında yapılan çalışmalarda aljinata alternatif olarak kapsül malzemelerinin çeşitli varyasyonları önerilmiştir (Kessler ve ark., 1991). Bu malzemeler arasında agaroz, kitozan, jelatin, polietilen glikol, metakrilik asit, 2-hidroksietil metakrilat bulunmaktadır (Barkai ve ark., 2016) , ancak literatürdeki çalışmaların büyük çoğunluğu aljinata dayalıdır (Acarregui ve ark., 2017).

Aljinat yosunlardan elde edilen ve toksik olmayan, düşük bir immünojenik profil gösteren yapısal bir polisakkarittir. Fizyolojik koşullarda kalsiyum gibi iki değerlikli iyonlarla jel oluşturmanın eşsiz özelliğine sahiptir (Şekil 1.9) (Rastogi ve ark., 2019)



Şekil 1.2. Aljinat polimerinin kimyasal formunun gösterimi (Rastogi ve ark., 2019).

Aljinat jelin sağladığı pek çok avantaj bulunmaktadır, bu avantajları özetleyecek olursak; 1-Dayanıklılık: Kalsiyum ile aljinat arasındaki çapraz bağlar, saline çözeltisi vb. ortamlarda dayanıklı olmasını sağlar. 2-Kapsülasyon yöntemiyle kontrollü difüzyon: İstenilen moleküllerin (besin, insulin, ilaç) salımı için yeterince geçirgen, fakat immün sistem için bariyer özelliği bulunur. 3-Biyouyumluluk: poli-*L*-lisin (PLL) gibi biyouyumlu bir polimer ile elde edilen kapsül kaplanarak da biyouyumluluğu ve mekanik dayanıklılığı artırılmaktadır. 4-İstenen boyutlarda kapsül eldesi: Enkapsülasyon teknikleriyle mikro ve makro boyutta partikül hazırlanabilmektedir (Şekil 1.10) (Acarregui ve ark., 2017). Aljinat vücut ortamında parçalanmaması, hücrelerin kapsül içerisinde işlevlerini devam ettirmeleri ve toksik olmayan polimer olması gibi özellikleri sayesinde immün sistem ataklarından korunma amaçlı uygun bir polimer olarak bilinmektedir.



Şekil 1.3. Pankreas adacıklarının kapsülleme yöntemiyle bağışıklık sistemi hücrelerinden korunması (Strand vd., 2017)

1.5.5. Kapsül por boyutu

Herhangi bir biyo-yapay kapsülleme cihazının başarısı için uygun gözenek boyutunun seçilmesi çok önemlidir. Son derece küçük bir gözenek boyutu, düzlemsel cihazın adacık içeren iç boşluğundan içeri doğru besin ve oksijen difüzyonunu ve dışarı giden insulin ve metabolit difüzyonunu engelleyebilir. Aksine, özellikle büyük bir gözenek boyutu, istenmeyen immüoglobulinlerin ve diğer sitotoksik kemokinlerin bu boşluğa girmesine yol açarak hücre yıkımına yol açabilir. Bu nedenle, işlevsel bir adacık kapsülleme cihazının tasarlanmasında en önemli kriter uygun gözenek boyutudur. Colton ve arkadaşları 0,1 mm ile 0,6 mm arasında değişen gözenek boyutlarına sahip cihazı diyabetik sıçanlara intraperitoneal olarak nakledip karşılaştırmışlar. 0,1 veya 0,2 mm gözenek boyutuna sahip cihaz en az 3 ay boyunca normoglisemi sağlarken, daha büyük gözenek boyutlarına sahip

olan cihaz da, nakilden sonra 3 hafta süreli bir normoglisemi sağlandığını açıklamıştır (Colton ve Avgoustiniatos, 1991)

1.6. İnflamatuvar Yanıt

Nakil bölgesindekapsüllü veya kapsülsüz adacıkların implantasyonundan hemen sonra adacık hücrelerine zarar vermek için sitokinler, serbest radikaller ve NO üreten aktive makrofajların aracılık ettiği spesifik olmayan enflamatuvar yanıtlar oluşur. Enflamatuvar yanıt metabolik olarak çok aktiftir ve bu nedenle ortamda bulunan oksijen hızla tüketilir, bu da adacıklar için mevcut oksijen miktarını daha da düşürerek hipoksi ve ölümle sonuçlanır (Song ve Roy, 2016).

1.7. Yabancı Cisim Yanıtı

İmplant edilmiş biyomalzemelere yabancı cisim yanıtı, materyal yüzeyinde proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonu ile nötrofillerin ve makrofajların ilk görevlendirilmesi olarak tanımlanabilir; bu durumda makrofajlar, yabancı cisim dev hücreleri ve fibroblastlar tarafından malzemenin aşırı büyümesine yol açar. İmmünoizolasyon cihazlarına verilen yabancı cisim tepkilerinin yoğunluğu, nakil alanına ve yüzey yükü ve kimyası, gözeneklilik, pürüzlülük ve implant boyutu gibi malzeme özelliklerine bağlıdır. İmplant edilen kapsüllerin aşırı büyümesi, hücrelere besin taşınmasını engeller ve hücre yıkımına ve greft başarısızlığına yol açan hipoksiye ve nekroza neden olur. İmmünoizolasyon materyallerinin biyoyumluluğu, yüksek oranda saşıştırılmış materyaller kullanılarak veya kapsül yüzeyinde kan damarı büyümesini teşvik eden TheraCyte cihazı ile gösterildiği gibi alternatif bir yabancı cisim tepkisi oluşturarak geliştirilebilir (Song ve Roy, 2016).

1.8. IBMR

Yukarıda bahsedilen immün yanıt ile ilişkili zorluğa ek olarak, nakledilen kapsüller başka bir büyük engelle karşı karşıyadır çünkü vasküler perfüzyon cihazlarının implantasyonu damar duvarlarına zarar verir, bu da önemli trombosit yapışması ve aktivasyonu ve kan pıhtılaşmasına neden olur. Anında kan aracılı inflamasyon reaksiyonu (IBMR), trombosit tüketimini, tamamlayıcı aktivasyonu ve pıhtılaşma kademesinin başlatılmasını içeren akut greft reddi için ortaya çıkan başka bir yanıtıdır. Kanla doğrudan temas, trombomodulin konjugasyonu ve heparin ve varfarin gibi antikoagülasyon ajanlarının konjugasyonu, düşük moleküler ağırlıklı dekstran sülfat kullanımı ve adenoviral tamamlayıcı düzenleyici faktörlerin transdüksiyonu gibi genetik modifikasyonların bir

sonucu olarak akut reddi önlemek için (CD55, CD59) çeşitli araştırmacılar tarafından araştırılmıştır (Schmidt ve ark., 2003; van der Windt ve ark., 2007)

1.9. Nakil Bölgesi ve Hipoksi

Nakledilen adacıkların fonksiyonlarının kaybı birçok nedenden kaynaklanmaktadır. Bunlar: yeniden inervasyon olmaması, zayıf damarlanmaya bağlı kronik hipoksi, erken apoptoz, insülin üreten hücrelerde rejenerasyon eksikliği, proinşamatuar ortam, pıhtılaşma ve tromboz, vasküler perfüzyon cihazları ve kapsülleme membranının mekanik arızası gibi nedenlerdir. Adacıklar nakledildiğinde, çoğu damarlanma gelişmeden önce hipoksi nedeniyle ilk birkaç gün içinde ölmektedir. Hücre nekrozu, adacıklar dokunun difüzyon sınırının ötesine (en yakın kan damarlarından > 150–200 µm uzağa) yerleştirildiğinde meydana gelmektedir. Vaskülarizasyon, nakilden sonra yalnızca 7-10 gün içinde gerçekleşir (Johansson ve ark., 2009; Moya ve ark., 2010). Bu gecikmiş ve yetersiz vaskülarizasyon, düşük oksijen gerilimi yaratarak hücre ölüm ve greft başarısızlığına sebep olmaktadır.

Ekstravasküler mikrokapsüller, yeterli miktarda insülin üreten adacık kitlesini barındırmak için büyük hacimler gerektirir ve bu nedenle, büyük vasküler yataklara sahip yerler tercih edilir. Periton boşluğu, transplante edilebilen kapsüllenmiş adacıkların hacmi üzerinde daha az kısıtlama sağlar ve prosedür subkutan implantasyona kıyasla invaziv olabilir. Böbrek kapsülü daha iyi bir damar ağı sunar, ancak alan oldukça sınırlıdır. Epididimal yağ yastığı gibi subkutan doku vaskülarizasyona yakındır, ancak nakil için geniş bir yüzey alanı gerekebilir. Diğer olası yerler omentum, kas ve göz içi bölgelerini içerir, ancak vaskülarizasyon ve alan sınırlaması ekstravasküler makrokapsüllerin implantasyonunu elverişsiz hale getirir (Song ve Roy, 2016).

1.10. T1DM Tedavisinde Nakil Bölgeleri

Yapılan birçok çalışmada klinik adacık nakillerinin yüzde 90'ının, portal ven içine infüzyon yoluyla gerçekleştirildiğini ve karaciğerde daha sonra embolizasyonun gerçekleştiği bildirilmektedir. Karaciğer bölgesi son derece iyi karakterize edilmiş olmasına rağmen, nakil sırasında veya kısa bir süre sonra adacıkların birçoğu kaybedildiği için, bu bölge uygun değildir.

Çoğu alıcı, portal ven adacık nakli sonrası insülin bağımsız hale gelir ama sonuç uzun süreli değildir. Belli bir süre sonra hasta tekrar insülin enjeksiyonlarına devam etmektedir. Karaciğer çift damar ve venöz vasküler beslenmenin avantajına sahip olsa da,

parankimal oksijen geçirgenliđi pankreasinkinden daha dūřüktür. Ayrıca, karaciđer bölgesi hemoraji ve tromboz gibi komplikasyonlara sebep olmaktadır (Alejandro ve ark., 1986).

Bu alandaki birçok araştırmacı, adacık nakli ve işlevini optimize etmek, gerekli implantasyon kütlesini azaltmak ve immünojeniteyi azaltmak için alternatif yöntemler araştırmışlardır.

Optimal bir alanın seşilmesinin önemi, nakil başarisının nakil bölgesi ile net bir şekilde bağlantılı olduğu birçok küçük hayvan modelinden açıkça anlaşılmıştır. Nakillerin metabolik, immünolojik ve teknik yönleri göz önünde bulundurularak, küçük ve büyük hayvan modeli araştırmalarında ve klinik verilerde çeşitli bölgeler gözden geçirilmiştir. Her bir alanın yararları ve dezavantajları, klinik kullanım için hangisinin en uygun olduğuna karar vermek ve gelecekteki araştırmayı yönlendirmek amacıyla önemlidir.

Nakil öncesi adacık izolasyonu işlemi, iskemik ve mekanik yaralanmalara yol açarak, adacıkları nakil sonrası streslere daha duyarlı hale getirmektedir. Adacıkların metabolik olarak aktiftir ve fizyolojik Ph 5 olan bir ortamda oksijen, glukoz ve diğer metabolitler varlığında yaşamını sürdürür. Nakledilen pankreatik adacıkların revaskülarizasyonu anında olmadığından, iyi bir vasküler kaynağa yakınlık önemlidir. İzole edilmiş adacıkların çoğu 50-100 um çapındadır ve nakledilmiş adacığın difüzyon kapasitesi sınırlıdır. İdeal olarak, adacıklar yüksek oksijen kaynağı olan bir alana transplante edilmelidir (Merani ve ark., 2008).

Bir endokrin doku olarak, pankreatik adacıkların yüksek glukozlu ortamı algılama ve a tepki verme çalışmalarını yürütmek için ek çevresel faktörler gerekmektedir. Örnek olarak kan şekeri düzeylerine gerçek zamanlı erişim, nakledilmiş adacık işlevi için gereklidir. Dahası, endokrin hormon olan insülinin uygun bir teslimat yolu izlemesi gerekmektedir. Pankreatik adacıklar portal ven içine insülin salınımı yapar ve karaciğer ve kas insülin salınım mekanizmasının birincil alanları olarak bilinir. Bu şekilde, adacıkların karaciğere ile ilişkili bir alana nakledilmesi mantıklı görünmektedir (Petruzzo ve ark., 2006). Bununla birlikte, tüm pankreas nakillerinde yapılan araştırmalar, bu teorinin nakledilen organın portal venöz drenajının sistemik drenaja karşı hiçbir metabolik yarar sağlamadığı durumlarda uygulamaya dönüşmediğini göstermektedir. Bazıları, sistemik insülin seviyelerini düzenlemede karaciğerin önemli bir rol oynadığını ve salgılanan insülinin fizyolojik portal uygulamasının glisemik kontrolün sağlanmasında önemli olduğunu savunur (De Vos ve ark., 1998). İnsülin intraperitonel infüzyonunun geciken sistemik dağılımı ve azalan endokrin fonksiyonu ile sonuçlanması dikkat çekicidir.

Nakledilen adacık erken enflamatuvar reaksiyonu en aza indiren ve uzun süreli sağkalımı destekleyen bir bölgede barındırılmalıdır. Cerrahi açıdan bakıldığında, ideal alan potansiyel implantasyon komplikasyonlarını en aza indirmek için kolay erişilen bir bölge tercih edilmelidir. En az sayıda adacık gerektiren bir nakil bölgesi, çok sayıda donör gereksinimini azaltacaktır. Ayrıca uygun bölge seçimi hastanın nakil sonrasında oral immünoşüpresif ilaç tedavisi alımını ve aynı zamanda gerektiğinde radyolojik inceleme yapılabilmesini kolaylaştırıcı olmalıdır (Merani ve ark., 2008).

1.10.1. Portal Vein

İntraportal adacık nakli, ya laparotomi sırasında bir mezenterik venöz yetmezliğin kanülasyonu ile ya da şoroskopi ve ultrasonografik rehberlik kullanılarak perkütan olarak yapılabilir. Adacıklar tipik olarak, portal ven trombozu riskini azaltmak için 70 ünite / kg heparin ile takviye edilmiş 200 ml transplant ortamını içeren bir kapalı infüzyon torbasından infüze edilir. Sıçanlarda, diyabeti tersine çevirmek için çok az sayıda (yaklaşık 550) otolog intraportal adacık gereklidir; 770 intraperitoneal adacık kan glukoz seviyelerini kısmen azaltır, ancak 890 kadar deri altı adacıklar diyabetik değişkenlerden hiçbirini değiştirmez. Karaciğer bölgesi hipergliseminin tersine çevrilmesinde en az sayıda adacık gerektirdiğinden, en uygun bölge olduğu ve diğer implantasyon yerlerinin karşılaştırılmasında standart haline geldiği düşünülmektedir. IBMIR kaynaklı hücre ölümü, aynı zamanda adacıkların portal dolaşımına girmesinin bir sonucudur. Adacıkların yüzeyinde doku faktörü ifadesi ile tetiklenen bir süreç olan IBMIR'ı azaltma stratejileri arasında nikotinamid, düşük molekül ağırlıklı dekstran sülfat, trombin inhibitörü ve adacıkların heparin kaplaması yer alır. Bununla birlikte, IBMIR, bir vasküler bölgeye nakilden sonra beta hücrelerinin işlevinde, özellikle doğuştan gelen bağışıklık yanıtının aktivasyonunun, eşit olarak sorunlu adaptif bağışıklık yanıtının bilinen bir tetikleyicisi olduğu için, kritik bir engel olarak kalmaktadır. Portal bölge klinik adacık nakli için ilk akla gelen uygun bölge olsa bile, daha uygun bir alanın araştırılmasına devam edilmesi gerekmektedir (Merani ve ark., 2008).

1.10.2. Böbrek Kapsülü Altı

Böbrek kapsül altı bölgesi en çok kemirgenlerde kullanılmaktadır. Kullanımı nispeten kolaydır, gün içinde diyabetin normale dönmesiyle sonuçlanır. Erişkin sıçan modelinde, normal endokrin kitlenin% 12-5 ve 25'inde, normogliseminin korunması için renal subkapsüler bölgede gereklidir. Bu alanın, karaciğer ve dalaktan üstün olduğu

söylenmektedir. Ancak, böbrek kapsülü nispeten zayıf bir kan kaynağına sahiptir ve adacıklar için oksijen açısından zengin bir mikro çevre sağlamaz. Böbrek korteksinin oksijen kapasitesi sadece 15 mm Hg dir. Pankreas adacıkları ile karşılaştırıldığında bu bölgede, yaklaşık 40 mm Hg'lik bir oksijen kapasitesivardır. Fare böbrek kapsülünün altına transplante edilen adacıklarda, oksijen kapasitesi yaklaşık 6 mm Hg'dir (nakilden 1 ila 9 ay sonra); diyabetik farelere transplante edilmiş adacıklarda daha da düşüktür (2 mm Hg). Bu veriler, bölgenin adacıklara sadece sınırlı oksijen sağladığını göstermektedir. Çok sayıda çalışma, böbrek kapsülü altı intraportal bölgelere göre karşılaştırmıştır. Bunun için çeşitli küçük ve büyük hayvan modelleri kullanılmıştır. Sonuçların modelden modele değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmacıların bildirimlerine göre, 250 adacık farelerde böbrek kapsülü altı bölgesinde streptozotosin kaynaklı diyabeti tersine çevirmek için yeterli iken, intraportal bölgede 600-800'e ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Subkapsüler alanın farelerdeki üstünlüğü, muhtemelen farelerden izole edilen adacıkların insanlardan daha büyük (ve potansiyel olarak daha az parçalanmış) olduğu sonucuyla ilgili olabilir. Genel olarak, böbrekkapsül altı bölgesi, nefrektomi ile eksplant gibi teknik manipülasyonlara izin verdiği için farelerde deneysel bir model olarak iyi bir şekilde hizmet etmektedir. Bununla birlikte, şu anda klinik uygulama için dikkate değer bir önemi yoktur (Merani ve ark., 2008).

1.10.3. Dalak

Teorik olarak, dalağa transplante edilen adacıklar, iyi bir vasküler besleme ve insülinin splenik damara fizyolojik olarak verilmesi ile birlikte, doğal pankreasınkine benzer bir ortama maruz kalacaktır. Dalak bölgesine nakil en az iki teknikle sağlanabilir. İlk olarak, serbest adacıklar doğrudan dalağa enjekte edilebilir. İkincisi, adacıklar dalak içine, splenik pedikülü kenetledikten sonra splenik bir damar bağımlılığı içine sokarak verilebilir. Bir köpek ototransplant modelinde, vasküler hepatik ve splenik bölgelerde, yaklaşık 4500 adacık / kg'lık bir minimum adacık sayısı normoglisemi sağlamıştır. Dalak, adacık nakli için metabolik olarak uygun bir alan olmasına rağmen, köpekler ve primatlar dahil olmak üzere büyük hayvan modellerinde bile, karaciğere göre herhangi bir özel avantajı yoktur. Gerçekten de, hemoraji riski ve dalakta nakil dokuya lenfositlerin daha kolay erişmesi, onu adacık nakli için yer olarak kötü bir seçim haline getirmektedir (Merani ve ark., 2008).

1.10.4. Pankreas

Adacıkların asıl yuvası olmasına rağmen, pankreasın bölgesi nakilleri için şaşırtıcı şekilde az sayıda araştırma vardır. Farelerle yapılan bir çalışmada pankreatik alanın karaciğer bölgesinden daha üstün olduğu belirtilmiştir (Lau ve ark., 2007).

Sıçan pankreasında sadece 500 adacık nakli yeterli olurken böbrek kapsülü altına 3200 intraportal alana ise 2000 adacık gerektiği bildirilmiştir (Stagner ve ark., 2007). Pankreatik alan, yüksek oksijen içeriği ve fizyolojik glukoz hissi ve insülin salınımı gibi bazı çekici özelliklere sahiptir. Bu tekniğin klinik uygulamasındaki engeller, prosedürün nispeten invazif olması, bu bölgedeki tip 1 diyabetin nüksetmesi ile ilgili beklenen kanıtları ve klinik ototransplantasyondaki yetersizlik sebebiyledir (Merani ve ark., 2008).

1.11. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, hasarlı bir doku ve ya organın laboratuvar koşullarında üretilip, hasarlı bölgenin onarılmasını amaçlamaktadır. Bunun için gerekli olan şeyler hücreler, yapı iskelesi ve biyomoleküllerdir. İzole edilen hücreler bir yapı iskelesi üzerine ekilerek gerekli biyomoleküllerin de desteği ile invitroda geliştirildikten sonra klinik çalışmalara geçilmektedir. Bu amaçla kullanılan hücreler otolog, allojenik veya zenojenik olarak elde edilebilmektedir. Üç farklı kaynaktaki hücrelerinde hastalık tedavisinde kullanılması uygundur. Otolog hücre kaynakları doku reddi için bir avantaj sağlamaktadır. Fakat otolog nakil her hastalığın hücresel tedavisi için uygun değildir. Örneğin T1DM tedavisinde adacık nakli tedavisi planlandığında bu işlem için kesinlikle bir donöre ihtiyaç duyulur. Allojenik nakiller hücresel tedavilerde daha sıklıkla uygulanabili potansiyel tedavilerdir. Dezavantajı ise sınırlı donör ve bağışıklık sistemi reddidir. Zenojenik nakiller de ise sıklıkla immun problemler ortaya çıkabilir. Bu sebeple artık günümüzde doku mühendisliği ile yapılacak tedavilerde hücre kaynağı olarak mezenkimal kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler ya da hibrit hücre hatları kullanılmaktadır.

Hücre kaynağı belirlendikten sonra sıra uygun bir yapı iskelesi belirlemeye gelmektedir. Doku mühendisliğinde doğal ve yapay yapı iskelesi olmak üzere 2 seçenek mevcuttur. Yapay olarak kullanılan yapı iskelesi malzemelerinin başında polilaktik ko-glikolik asit (PLGA), polikaprolakton (PCL), poliglikolik asit (PLG), polilaktik asit (PLA) gibi polimerler gelmektedir. Doğal polimerler arasında ise özellikle kollojen, hiyalüronik asit, aljinat, kitosan sıklıkla tercih edilmektedir.

Doğal polimerler canlı vücut ile daha uyumluluk gösterdiği için yapay polimerlere kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Yapay polimerler biyoyumluluk göstermelidir ki

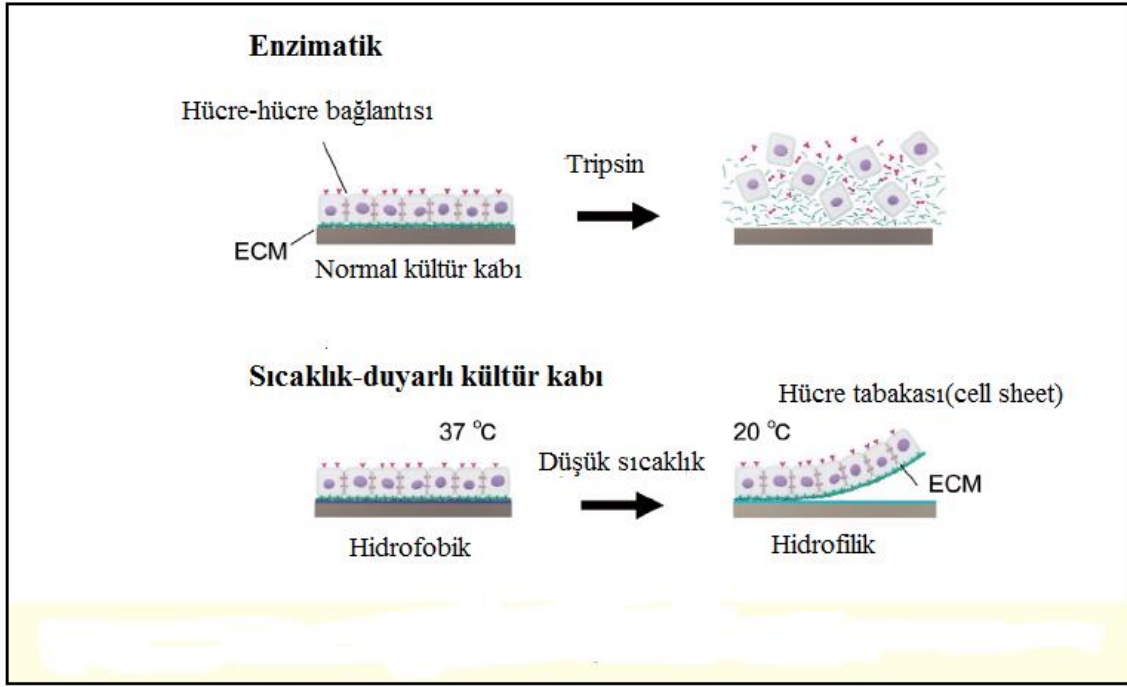
vücuda implante edildiğinde uzun süreler bozunmadan ve immün ataklara maruz kalmadan görevlerini gerçekleştirebilsinler.

Doğal ve yapay polimerlerin ortak ve önemli fonksiyonları ise: hücrelerin tutunması ve yaşamasına izin verecek şekilde canlı organizmayı birebir taklit edebilen 3 boyutlu yapı kazanmasıdır. Bu yapı hücrelerin ekstraselülmatriks oluşturmasını sağlaması, yeterli mekanik destek sağlaması ve biyomoleküllerin salınımına izin vermesi gereklidir. Diğer önemli noktalar ise malzemenin porlu yapıda olması sayesinde besin ve oksijen giriş çıkışına izin vermesi, biyoyumlu ve çözülebilir olmasıdır. Fakat çözülen malzemelerde çözünme sonrası oluşan ürünlerinde immün sistem tarafından enflamasyona yol açmaması gerekmektedir. Bütün bu koşullar sağlandığında bu malzemeler ile pek çok hastalığın tedavisini sağlamak mümkündür. Ortopedi, plastik cerrahi, kardiyoloji ve diyabet alanlarında çalışmalara devam etmektedir. Özellikle bizim çalışmamızda da olduğu gibi doku mühendisliği teknikleriyle T1DM tedavisinde yapay pankreas ya da fonksiyonel adacık sistemleri geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir.

1.12. Hücre Tabaka (Cell Sheet) Mühendisliği

Doku mühendisliği çalışmalarında 3 boyutlu yapılar elde etmek için kullanılan yapı iskeleleri hücrelere tıpkı invivodaki ekstraselülmatriks gibi bir destek sağlamaktadır. Nakledilen yapı iskelesi bir süre sonra bozunarak vücut içinde enflamasyona neden olabilmektedir. Bu da nakledilen hücrelerin fonksiyon kaybına uğramasına sebep olmaktadır. Bu dezavantaj gözönünde bulundurularak yapı iskelesi kullanılmadan doku ve organ onarımı yöntemi geliştirilmiştir (Okano ve ark.,2003).

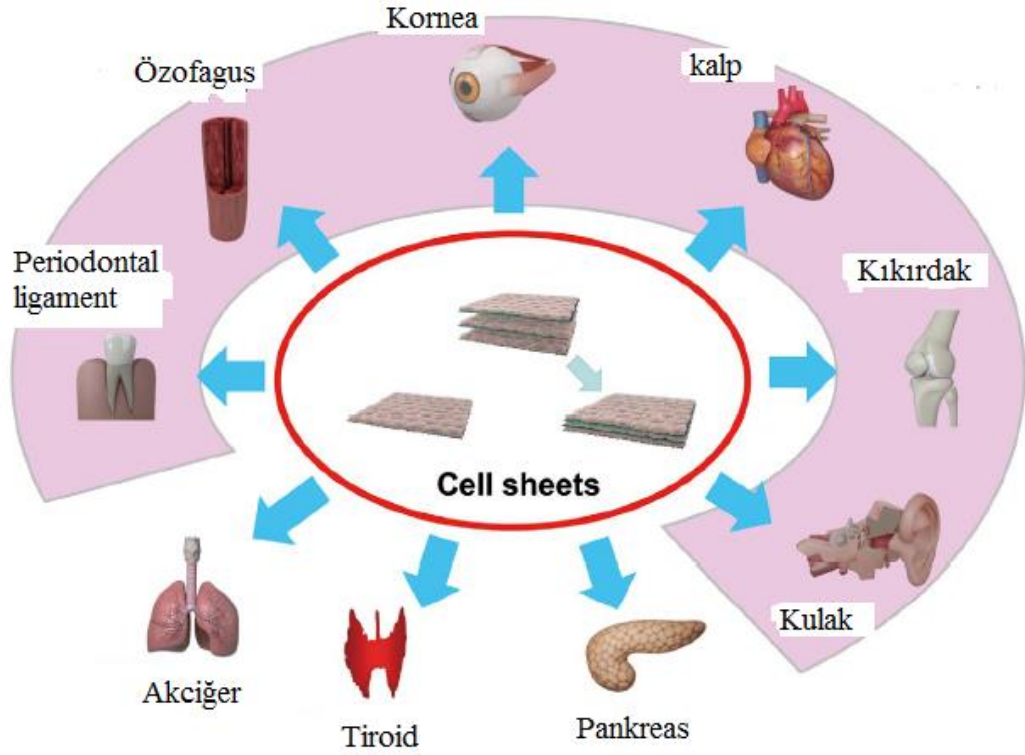
Sıcaklık-duyarlı bir polimer olan poli (N-izopropil akrilamid) (PIPAAm) kullanılarak kültür kaplarının yüzeyi bu polimer ile kaplanmıştır. Polimerin özelliği 32⁰C nin üstündeki sıcaklıklarda yapısındaki suyu kaybederek büzülür, 32⁰C nin altındaki sıcaklıkta ise yapısına tekrar su alarak şişer. Bu sayede bu kapta ekili olarak bulunan hücreler 37⁰ C de kültür ortamı şartlarında hücre kabının yüzeyine tutunmaktadır. Sıcaklık 32⁰C nin altına düşürüldüğünde kültür kabının yüzeyi hidrofildir ve su alarak şişer böylece hücreler hiçbir enzime gerek kalmadan tabaka halinde kültür kabının yüzeyinden kalkarlar (Şekil 1.11).



Şekil 1.4. Sıcaklık duyarlı kültür kapları (PIPAAm) ile hücrelerin tabaka halinde elde edilmesi.(Shimizu, 2013)

Bu yöntemin avantajı enzim kullanılmamasıdır. Normal şartlarda hücreler kültür kabının yüzeyinden kaldırılırken tripsin, akutaz gibi enzimler kullanılmaktadır. Bu enzimler ekstraselülmatriksi parçalamakta ve hücreyi strese maruz bırakıp apoptoza sürüklemektedir. Bu da nakil için hazırlanan hücrelerin bu aşamada canlılık ve fonksiyonlarını olumsuz etkilediğinden nakil sonrasında bu hücrelerden tam verim alınamamasına neden olur.

Hücre tabaka yönteminde enzim kullanılmadığı için hücrelerin ekstraselüler matriks yapısı korunur, hücreler strese maruz kalmazlar ve nakillerden daha verimli bir şekilde sonuç alınmaktadır. Bu uygulama ile kalp, mesane, periodontal ligament, ortopedi (Gültekin ve ark., 2020), kulak-burun-boğaz (Topdağ ve ark., 2019) alanlarında başarılı çalışmalar yapılmıştır (Şekil 1.12). Diyabet alanında ise hücre tabaka mühendisliği çalışmaları yeni bir soluk getirmiştir. Adacıkların kültür ortamında enzim ile parçalandıktan sonra PIPAAm kültür kabına ekilesiyle adacık hücre tabakaları elde edilmiş çalışmalar mevcuttur (Saito ve ark., 2011; Hirabaru ve ark., 2015; Fujita ve ark., 2018).



Şekil 1.5. Çeşitli doku ve organ hasarlarının tedavisi, için sıcaklık duyarlı kültür kapları (PIPAAm) ile hücrelerin tabaka halinde elde edilmesi (Shimizu, 2013).

1.13. Diyabette Pankreatik Dokunun Hücre Tabakası Yöntemiyle in vitro Üretimi

T1DM nin tedavisi geçmişten günümüze kadar pek çok yöntem denenmiştir. Başta pankreas nakli olmak üzere, adacık nakli ve hücre nakiller olarak yöntemler geliştirilmiştir. Pankreas ve adacık nakillerinde doku reddi gibi sorunlar ortaya çıktığı için araştırmacılar özellikler adacık nakiller için kapülleme methodu geliştirilmesiyle büyük ölçüde immün sistem hücrelerinin saldırılarından nakil dokusunun korunarak canlılığının devam edilmesi sağlanmıştır. Fakat sorun sadece bu adacıkların immün sistem ataklarından korunmasıyla kalmayıp daha uzun süreli fonksiyonlarının devamının sağlanması ve hücrelerin nakle hazırlık aşamalarında strese maruz kalmalarını büyük oranda azaltmak için yeni bir method ortaya atılmıştır. Hücre tabaka mühendisliği sayesinde adacıklar çok daha fazla sayıda ve hazırlık açamasında stres faktörlerine maruz kalmadan nakledilebilir hale getirilmektedir. Okano ve grubu tarafından geliştirilen bu sistem sayesinde üç boyutlu adacık dokuları kültür ortamında geliştirilebilmiştir. İlk olarak Saito ve arkadaşları pankreatik adacıkları sıcaklık duyarlı kültür kabına ekip tabaka halinde elde etikten sonra sıçanların deri altına yerleştirip 60 günlük normoglisemi sağlamayı başarmışlardır (Saito ve ark., 2011). Sonrasında daha

uzun ve etkili tedavi geliştirmek amacıyla Hirabaru ve arkadaları tarafından aynı yöntem kullanılarak adacıklarla birlikte kùltür ortamına mezenkimal kök hücreler de eklenerek 84 gün boyunca sıçanlarda normoglisemi sağlamayı başarmışlardır (Hirabaru ve ark., 2015).

Bu çalışmalardaki dezavantaj adacık kullanılmasıdır. Adacık donörü bulmanın zorluklarından ve T1DM hastasında normoglisemi sağlamak için çok fazla adacık gerekli olduğundan bahsetmiştik. Pankreas ve adacık nakillerindeki donör yetersizliği araştırmacıları farklı kaynaklarda insülin salgılayan beta benzeri hücre elde etmeye yöneltmiştir. Beta hücre hatları hücre tabaka mühendisliği çalışması için uygun bir kaynaktır. İlk defa bizim çalışmamızda kullanılmıştır. Beta hücreleri ve MKH ler sıcaklık duyarlı kültr kabına ekilerek tabaka halinde kaldırılıp 3 boyutlu adacık benzeri doku inşa edilebilmiştir. Bu sistem sayesinde donör bulma güçlüğü açılarak kolay elde edilebilir ve potansiyel bir kaynak olan beta hücre hatları hücre tabaka mühendisliğinin uygulama alanlarında yer almalıdır.

1.14. Kök Hücre

Kök hücreler canlı bir organizmayı oluşturan sınırsız bölünme ve çoğalma yeteneğine sahip hücrelerdir. Asimetrik bölünme özellikleri vardır. Asimetrik olarak ikiye bölünen bir kök hücrede hücreden biri kendini yenileyebilme ve sınırsız çoğalma özelliğine sahipken diğer hücre ise farklılaşma yeteneğinde olup vücudun tüm doku ve organlarına dönşebilme potansiyeline sahiptir. Bu özellikleri sayesinde hücresel tedavi ve rejeneratif tıp uygulamalarında sıklıkla tercih edilen bir kaynak haline gelmişlerdir.

Vücudumuzdaki tüm doku ve organlarda kök hücreler bulunur. Bu sebeple kolay ulaşılabilir ve kolay elde edilebilirler. İki farklı kaynaktan elde edilebilirler. 1- Embriyonik kök hücreler 2- Embriyonik olmayan kök hücrelerdir. Embriyonik olmayanlar kendi içinde sınıflandırılır: Erişkin kök hücreler, fetüs kök hücreleri, kadavra kök hücreleri, göbek kordonu ve plesenta kök hücreleri.

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre de sınıflandırılmaktadır: Totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent ve oligopotent olmak üzere. Totipotent hücre organizmanın tamamını oluşturma gücüne sahiptir ve örnek olarak zigotu verebiliriz. Pluripotent kök hücre ise üç germ tabakasından (endoderm, mezoderm, ektoderm) köken alan tüm hücrelere farklılaşma özelliğindedir. Yetişkin ve fetal hücre tiplerini oluşturabilirler fakat tüm organizmayı oluşturamazlar. Multipotent kök hücrelerin ise farklılaşma potansiyelleri daha sınırlıdır. Laboratuvarda uygun koşullar sağlandığında pek çok matür

hücreye dönüşebilirler. Bunun için en potansiyel kaynak mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). Hematopoetik hücrelerde bu sınıfa dahil edilmiştir.

1.14.1. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal kök hücreler bağ dokunun ana hücreleridir. Kemik, yağ, kıkırdak, nöron, beta, kas hücrelerine farklılaşabilirler. MKH ler özellikler hücrel tedavilerde en sık tercih edilen kök hücre türüdür. Kolay elde edilen bir kaynaktır, özellikle adipoz doku ve kemik iliğinden elde edilen MKH leri buna örnek verebiliriz. MKH leri karakterize etmemizi sağlayan yüzey belirteçleri bulunmaktadır. Bunlardan CD44, CD54, CD90, CD 106, MHC Class I gibi belirteçler MKH lerde pozitifdir. CD 45, CD34, MHC Class II belirteçleri yönünden ise negatiftir (Karaöz ve ark., 2011).

MKH ler tıpın pek çok alanında araştırma çalışmalarında kullanılmaktadır. Plastik cerrahi, ortopedi, kardiyovasküler hastalıklar, immün sistem hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklarda tercih edilmektedir.

Bu kadar potansiyel bir kaynak olmasının sebebi kök hücrelerin anti-apoptotik, anti-inflamatuar, immunmodulatör, anjiyojenik özelliklerinin olmasıdır. Bizim çalışmamızda da MKH lerin immunmodulatör ve anti-apoptotik özelliklerinden faydalanılmıştır.

2. AMAÇ

Bu çalışmada amaç yapılan hücre tabakası naklinin uzun ömürlü olmasının sağlanmasıdır. Aynı zamanda sıçan Tip 1 Diabetes Mellitus modelinin allojenik/zenojenik hücrel tedavisinde hücre tabakalandırma yöntemi ile elde edilen greftin aljinat ile kapsüle edilerek derialtı implantlar şeklinde nakledilmesi, nakledilen greftin kapsül sayesinde immun ataklardan korunarak uzun süre canlılık ve fonksiyonunun devamlılığının sağlanması ve MKH nin greftin fonksiyonlarını nasıl etkilediğini araştırmaktır.

Yapılan kaynak taramasında sıcaklık-duyarlı kaplar [poly(N-isopropylacrylamide)-PIPAAm] üzerinde çeşitli hücreler kullanılarak pek çok hastalık modelinde hücre tabakaları elde edilmiştir. Ancak elde edilen tabakaların ilk kez bizim çalışmamızda aljinat ile makrokapsüle edilerek immun sistemden korunması amaçlanmıştır. Hücre tabakaları kullanılarak yapılan çalışmaların hiç birinde kapsülasyon yapıldığı görülmemiştir. Dolayısıyla planladığımız bu çalışma özgün değeri olan bir konuya sahiptir. Bu sayede, çalışmamızın tüm sonuçları doku mühendisliği konusunda evrensel bilime katkı sağlayacak nitelikte olacaktır.

Yöntemin hücre naklinin kalitesini arttıran bir başka yönü de oluşturulacak olan makroenkapsülasyon içindeki adacık hücrelerinin tabaka halinde olması sebebiyle hücrelerin birbiri ile daha iyi iletişim kurarak ekstraselüler matriks yapılarının bozulmamasıdır. Elde edilen beta+ MKH tabakasının makrokapsülasyon ile immun ataklardan korunması sağlamakla birlikte bu grefti yüksek miktarına bağlı glukotoksisiteden de koruyarak canlılık ve fonksiyonunun uzun süreli devamının sağlanması hedeflenmiştir.

Oluşturulan 3 boyutlu yapılarda in-vivodakine benzer şekilde canlılık ve sağkalımın artması için besin ve oksijen geçişini desteklemek için MKH lerin endotel hücrelerine farklılaşarak vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), transforme edici büyüme faktörü (TGFB) gibi anti-apoptotik ve anjiyojenik sitokinler salgılayarak adacık greftine olumlu etkilerinden faydalanılmıştır. Hipoksi durumlarında VEGF nin artarak dokudaki iskemiye azalttığı bilinmektedir. Pankreas hasarlarının hücrel tedavisi, hücre-tabakalandırma yöntemiyle beta ve MKH lerin üç boyutlu hale getirilerek makroenkapsülasyon yapılması ile ileride subkutan/derialtı implantlar şeklinde oldukça az invazif bir yöntemle hastaya nakledilebilecek duruma gelecektir. Bu şekilde implantlar allojenik olsa dahi otoimmün ataklardan korunarak uzun süreli sağ kalım ve hedef bölgeye yerleşme gösterecektir.

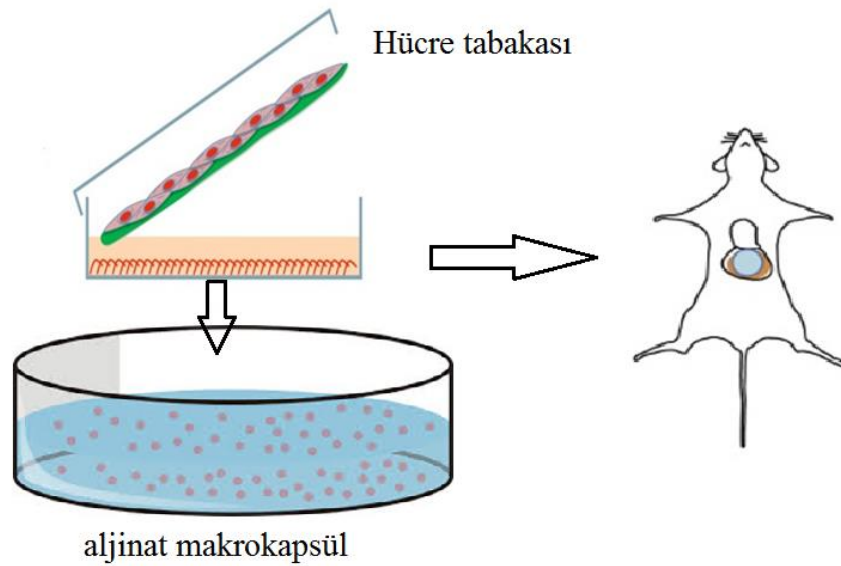
3. YÖNTEM

Çalışmamız *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere 2 basamakta gerçekleştirildi. Kullanılan *in vitro* ve *in vivo* yöntemler kendi içinde sınıflandırılarak planlandı (Tablo 3.1) ve uygulandı. *In vitro* deney grupları aşağıdaki gibidir.

Tablo 3.1. *In vitro* deney grupları

Deney Grubu	Yapılan Analiz
kontrol+beta	Wst-1, İnsülin salgılama, live/dead, metabolik aktivite
kontrol+beta+MKH	Wst-1, İnsülin salgılama, live/dead, metabolik aktivite
kapsül+beta	Wst-1, İnsülin salgılama, live/dead, metabolik aktivite
kapsül+beta+MKH	Wst-1, İnsülin salgılama, live/dead, metabolik aktivite
kapsül+beta+MKH tabaka	Wst-1, İnsülin salgılama, live/dead, metabolik aktivite

Çalışmanın özeti genel hatlarıyla hücre tabakası elde edilerek aljinat içine gömülüp makrokapsülleme yapıldı ve sıçanların sırt deri altı bölgesine nakledildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Elde edilen hücre tabakası aljinat makrokapsül içine yerleştirilmesi ve sıçanların sırt deri altı bölgesine nakil yapılması

3.1. sAD-MKH'lerin Karakterizasyonu

Çalışmamızda kullanılan sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (sAD-MKH) KÖGEM de bulunan hücre koleksiyonundan temin edildi. Daha önceden izolasyon ve karakterizasyonları tamamlanan ve pasaj 3 de dondurulan hücreler invitro deney başladığı gün -152^0 C lik dondurucudan çıkarılarak çözüldü ve karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

Sıçan adipoz dokudan elde edilen MKH'ler öncelikli olarak çözme işlemi için -152^0 C lik dondurucudan çıkarıldıktan sonra hızlıca 37^0 C lik su banyosunda çözünmesi beklendi. Sonrasında hücreler bir falkon tüpe aktarılıp ardışık olarak 2 kez 1600 rpm de 5dk santrifüj edildi. Böylece hücreler dondurma solüsyonundaki DMSO dan uzaklaştırıldı. Süre bitiminden sonra elde edilen hücre peletinden 20 µl örnek alınarak Trypan Blue ile boyandı ve BIO-RAD TC20 (California, ABD) otomatik hücre sayım cihazında hücre canlılığı belirlendi. % 89 oranında canlı olan hücreler kültüre alındı. % 10 FBS (Invitrogen, GIBCO, Grand Island, NY, USA), % 1 penisilin ve streptomisin (Invitrogen, GIBCO) içeren L-DMEM'de (Invitrogen, GIBCO) T175 flasklarında (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) kültüre edildi. Çalışma süresince zıt faz mikroskopu ile incelendi. Çözme sonrasında MKH belirteçlerini koruyup korumadığını değerlendirmek ve immunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analiz yapıldı. sAD-MKH'lerin *in vitro* farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için ise; adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmaya alındı.

3.1.1. İmmunfenotipleme

3.1.1.1. Akım sitometrik analiz

Analizler, her pasaj işlemi sonrasında (P1'den P5'e kadar) ve *FACS Calibur* akım sitometri cihazı ile yapıldı. Hücreler tripsin enziminde bekletilerek kültür kabından kaldıran hücreler trypan blue ile boyanıp otomatik hücre sayım cihazında sayıldı. 8×10^6 hücre peletinin üzerine PBS eklenerek pipetaj yapıldı. Her bir deney tüpüne 100 µl hücre süspansiyonu aktarıldı ve karakterize edilerek MKH yüzey belirteçine özel floresan işaretli antikolar ile inkübe edildi. Bunun için kullanılan antikolar: (FITC) ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikolar, CD45 (BD Biosciences 555482), CD90 (BD 555596), CD29 (BD 555443), CD54 (BD 347977), CD106 (BD 561679), MHC Class I (BD555553), MHC Class II (BD 555560) ve izotip kontrollerinden 10 µl hücrelere eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde yıkama

solüsyonu (% 0,1 sodyum azid içeren PBS) eklendi ve santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) akım sitometri cihazında okutuldu ve analizi *BD Cell Quest TM software* programı ile gerçekleştirildi (Karaoz ve ark., 2009)

3.1.2. sAD-MKH'lerin İn vitro Farklaştırılması

3.1.2.1. Adipojenik farklılaşma

6 kuyucuklu kültür kabına 100.000 MKH ekildi. İçinde %10 FBS, 0,5 mM isobutyl-methylxanthine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 10^{-6} M dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insulin (Invitrogen, GIBCO), 200 µM indomethacin (Sigma-Aldrich), ve 1% penisilin- streptomisin bulunan LDMEM kültür medyumunda iki hafta kültür süreci uygulandı ve kültür sonrasında hücre içinde oluşan lipidler, Oil Red O (Sigma-Aldrich) ile boyanarak pozitifliği flouresan mikroskopik (Leica DMI 4000 Microsystems) incelemelerle gösterildi (Karaoz ve ark., 2009).

3.1.2.2. Osteojenik farklılaşma

6 kuyucuklu kültür kabına (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) 100.000 MKH ekildi. 100 nM dexamethasone, 0,05 µM ascorbate-2-phosphate(Wako Chemicals, Richmond, VA, USA), 10 mM β-glycerophosphate (Sigma-Aldrich), %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS bulunan LDMEM kültür medyumunda 4 hafta süresince kültüre edildi. Farklılaşmayı karakterize etmek için Alizarin Red S (Sigma-Aldrich) ile boyandı ve sonrasında mikroskopik olarak incelendi (Karaoz ve ark., 2009).

3.1.2.3. Kondrojenik farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma işlemi için mikropellet solüsyon kültür tekniği kullanıldı. Bu tekniğin prensibi şu şekildedir: 5×10^6 adet hücre pelleti, 15 ml'lik konik tabanlı tüpte ve 10×10^6 adet hücre pelleti ise 10 mm'lik tek kuyucuklu petrinin ortasına küçük damlacık halinde koyularak 37°C de 2 saat kültür edildi. Süre bitiminde hücreler, 10 ng/ml transforming growth factor-β1 (TGF-β1; Biosource PHG0021), 50 µg/ml ascorbate-2-phosphate (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA), 0,1 µM dexamethazone (Sigma-Aldich, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), 100µg/ml sodium pyruvate (Sigma-Aldich, St. Louis, MO, USA), 40 µg/ml proline (*Merck*, Darmstadt, *Germany*), 50 mg/ml ITS premix (BD-Biosciences, Bedford, MA), 1% antibiyotik/antimikotik (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) içeren HDMEM (yüksek glukoz) kültür medyumunu (Gibco-

BRL, Grand Island, NY, USA) ile 2 hafta kültürde bekletildi. 2 haftalık kültür sonrası petrideki hücre peletine Alcian Blue boyaması yapıldı. Görüntüleri alındıktan sonra tüpteki pelet ile birlikte %4 paraformaldehit ile fikse edilerek ve parafine gömüldü ve 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitler histokimyasal olarak tekrar alcian blue (Sigma-Aldich) ile boyandı ve mikroskopta incelendi (Karaoz ve ark., 2009).

3.2. Beta Hücrelerinin Kültür ve Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan beta hücreleri (BRIN BD11) hücre bankasından alındı. Bu hücreler insülin salgılayan ve NEDH sıçan pankreatik adacıkları ile RINm5F(NEDH sıçan insülinomadan elde edilen hücre hattı) in elektrofüzyonu ile elde edilmiş hücre hattıdır. Bu hücreler RPMI (Invitrogen, GIBCO), %10 FBS (fetal bovine serum), %1 penicilin-streptomycin kültürde çoğaltılarak deneye alındı. Öncesinde beta hücrelerine canlılık, karakterizasyon ve fonksiyonelliğini görmek için bir takım analizler yapıldı.

3.2.1. İmmunositokimyasal Karakterizasyon:

Beta hücrelerinin immunositokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P3'de poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür lamına (Culture-Chamber-slide-8 well (24/pk) (BD Biosciences) ekilmiş 2×10^5 hücre/kuyucuk ile gerçekleştirildi. Hücrelerin tutunması için bir gece inkübatörde bekletildi. Sonrasında immunflouresan teknikler kullanılarak beta hücre belirteci olan antikorla ile boyandı.

3.2.1.1. İmmunflouresan İşaretleme (İF)

Beta hücreleri metanolle fikse edildi ve PBS (phosphate buffer saline) (İnvitrogen, Gibco) ile yıkandıktan sonra PBS içinde %1,5 normal blok serum (Abcam) hazırlandı ve hücreler üzerine eklenerek 30 dk. inkübe edildi. Sonrasında nükleer lokalize olan antikorlar için kuyucuklara triton X (Merck, Darmstadt, Germany) eklendi ve 7 dk. inkübe edildi. Primer antikorlar antibody diluent (Santacruz Biotechnology) ile kullanım klavuzlarında belirtilen dilüsyon oranları göz önünde bulundurularak hazırlandı. Hücreler eklenerek 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Süre bitiminde PBS ile yıkandı ve işleminden sonra immunflouresan çalışmalar için uygun flouresan işaretli sekonder antikorla 37 C'de, 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda PBS ve distile su ile yıkanan örnekler nükleer boya içeren kapatma medyumunu (UltraCruz Mounting Medium for flouresence with DAPI) ile kapatıldı. Fluoresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) tarama yapılarak görüntüleri alındı. Primer antikorlar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 3.2). (r:rabbit)

Tablo 3.2. Beta hücrelerini immunflouresan yöntemle karakterize etmek için kullanılan antikor paneli.

Antikor	Reaktivite	Uygulama	Antikor	Reaktivite	Uygulama
İnsulin (Abcam, ab181547)	r	IF,IHC	Maf A (SantaCruz, sc-66958)	r	IF,IHC
Pax4 (SantaCruz, sc-98942)	r	IF	C-peptid (Abcam, ab7817)	r	IF,IHC

3.2.2. İn vitro İnsulin Salgılama Deneyi

Glukoz-bağımlı insülin salınımını belirleyebilmek için bir dizi deney gerçekleştirilmiştir. Beta hücreleri ve kontrol grubu olarak sıçan pankreatik langerhans adacıkları in vitro ortamda besiyerine eklenen glukozu bağı olarak, yine besiyerine insülin salgılayıp/salgılamadıklarını test etmek için iki farklı glukoz konsantrasyonuna maruz bırakıldı ve toplanan besiyerinde insulin proteini tayini yapıldı. İnsülin salgılatma analizine başlamadan önce hücreler ve adacıklar, insülin içermeyen besiyerinde 48 saat kültüre edilip, besiyerinden insülin tamamen uzaklaşmaya kadar periyodik olarak 3 kez PBS ile yıkandı. Kuyucuklara % 0,5 BSA içeren serumsuz L-DMEM (düşük glukoz içerikli; 2,5 mmol/L) eklenerek ve hücreler 2 saat süreyle 37 °C’de inkübe edildi. Süre bitiminde süpernatant toplanarak yüksek glukoz içeren besiyeri (27,5 mmol/L) eklenip tekrar 37° C de 120 dakika inkübasyona bırakıldı. Pankreasın endokrin kısmı olan Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin sentezlediği peptid hormonlardan olan insulin, toplanan süpernatatlardan Rat Ins1 Insulin ELISA (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) kiti kullanılarak analiz edildi. Bunun için üretici firmanın önerdiği prosedürler izlenerek ve hormon düzeyleri monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi. Okunan veriler Student’t-test ile değerlendirildi (Kassem ve ark., 2016).

3.3. Isı Değişimine Duyarlı Kültür Kabında Beta ve MKH Ortak Kültürü ile Hücre Tabakalarının Eldesi

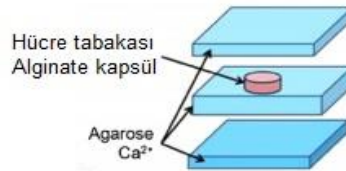
Beta ve mezenkimal kök hücreler yeterli sayıda çoğaltıldıktan sonra mezenkimal kök hücreler 6 kuyucuklu Upcell (UpCell, CellSeed, Inc. Tokyo, Japan) kültür kabına bir göze 9×10^6 olacak şekilde ekildi. Beta hücreleride aynı sayıda mezenkimallerle birlikte ekilerek 1 gün boyunca çoğalması beklendikten sonra poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) kültür kabındaki bu hücreler, 37°C deki inkübasyondan alınarak 20°C de 30 dk inkübasyona bırakıldı. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında hücreler, enzimatik reaksiyona gerek kalmadan ve tek-hücre süspansiyonu yerine tabaka halinde kültür kabından kaldırıldı (Yomato ve Okano, 2009) (Şekil 3.2.). Sonrasında elde edilen tabaka aljinat ile enkapsüle edildi.



Şekil 3.2. Hücrelerin 37°C deki inkübasyondan alınarak 20°C de 30 dk inkübasyona bırakılması sonrasında tabaka halinde elde edilmesi (Yomato ve Okano, 2009).

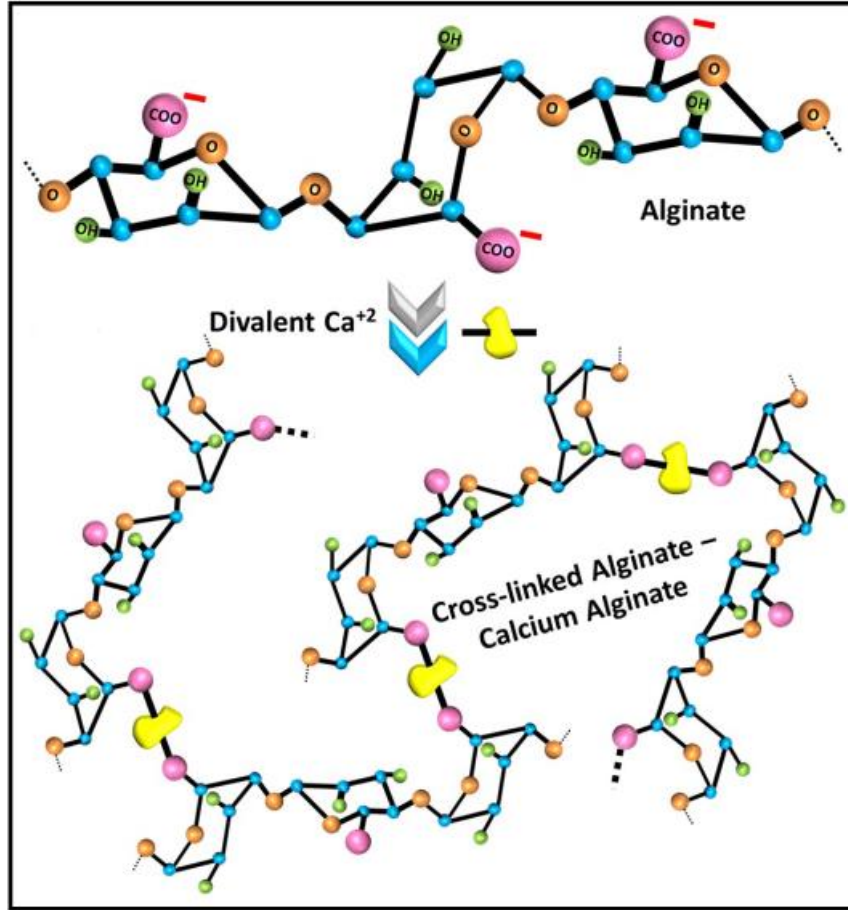
3.4. Makrokapsülasyon Materyalinin Hazırlanması

Aljinat makrokapsüller, agaroz jelden kuyucuklu kalıp elde edildikten sonra bu kalıbın üzerindeki kuyucuklara sodyum aljinat çözeltisi eklenerek hazırlandı (Şekil 3.3) (Hwang ve ark., 2010).



Şekil 3.3. Agoraz jelden ile kuyucuklu kalıp elde edilmesi (Hwang ve ark., 2010).

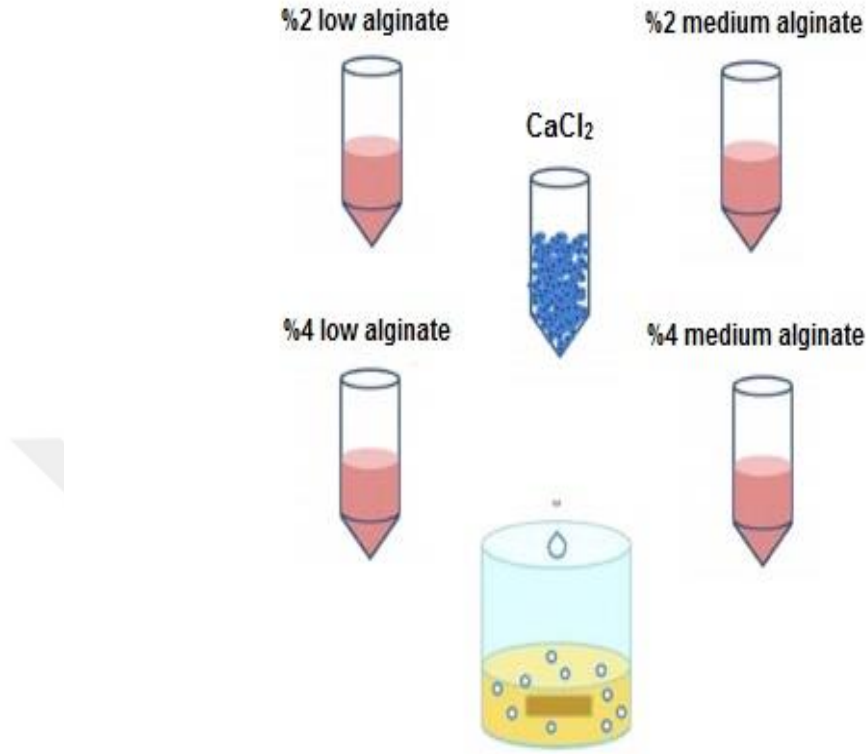
Agaroz jel kalıbı elde etmek için 100 ml %1 lik agaroz hazırlandı. Hazırlanan agaroz içerisine %2 CaCl_2 eklendi. Burada agaroz çözeltinin içine eklenen CaCl_2 sayesinde, aljinatın iyon yükü ile Ca^{+2} çapraz bağ oluşturması hedeflendi (Şekil 3.4) (Rastogi ve ark., 2019).



Şekil 3.4. Aljinatın iyon yükü ile Ca⁺² çapraz bağ oluşturması (Rastogi ve ark., 2019).

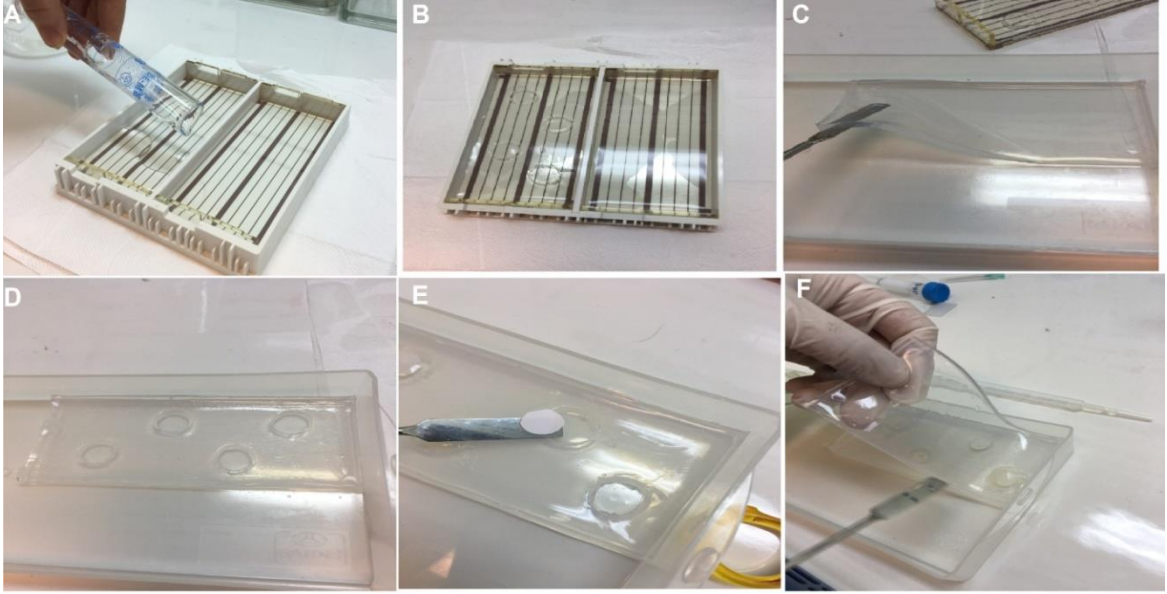
Mikrodalga fırında sıcaklık ile homejen bir karışım elde edildi ve soğutuldu. Elde edilen kalıp malzemesi derinliği 1,3cm olan kaba dökülerek 5mm kalınlığında ilk kat agaroz kalıp elde edilirdi (Şekil 3.5). Sonrasında aynı kalıptan bir tane daha hazırlanarak üzerinde 0,4 cm çapında yuvarlak kuyucuklar oluşturuldu. Aljinatın en dayanıklı formunu oluşturmak üzere farklı konsantrasyonlarda hazırlanan aljinat karışımları hazırlandı. % 2 low aljinat, % 4 low aljinat, % 2 medium aljinat, % 4 medium gibi farklı konsantrasyonlardaki aljinat karışımları için aljinat tartıldıktan sonra distile su eklenerek vorteks işlemi ile homojen bir karışım haline gelmesi sağlandı.

Kuyucuklu kalıp ilk kalıbın üzerine yerleştirildikten sonra kuyucuğun içerisine 60 µl aljinat eklendi sonra hücre tabakası kuyucuğa yerleştirildi ve üzerine 20 µl besiyeri kondu. Sonrasında 60 µl aljinat tekrar eklendi.



Şekil 3.5. Aljinatın 4 farklı konsantrasyonunun hazırlanması (Hwang ve ark., 2010).

Tabaka üzerine sodyum aljinat eklendikten sonra üzerine diğer agaroz kalıp yerleştirilerek (Şekil 3.6) 37⁰ C de 30 dk boyunca inkübe edilip kalıptabulunan Ca iyonlarının aljinatta bulunan Na iyonları ile çapraz bağ yaparak makrokapsülün dayanıklı formu elde edildi. Bunun için en dayanıklı form olarak % 2 low aljinat konsantrasyonu kullanıldı. Kapsüllerin üretiminde kullanılan tüm malzemeler otoklav ve UV ile sterilize edildi ve sonrasında aljinat solüsyonu 0,22 µm (Minisart) lik filtreden de geçirilerek steril kapsül haline getirildi.



Şekil 3.6. Kapsül kalıbı ve kapsülün hazırlanması. **A:** 100 ml lik agoroz jelin kabın içerisine dökümü. **B-C-D:** Alt kat agoroz kalıp ve orta kat kuyucuklu agoroz kalıp dökümü. **E:** Kutucuğa aljinat eklenmesi ve hücre tabakasının yerleştirilmesi. **F:** En dış kalıbın aljinat kapsül üzerine kapatılması.

3.5. Makrokapsül Karakterizasyon Testleri

3.5.1. Osmotik Dayanıklılığın Ölçülmesi

Aljinat makrokapsüllerin ozmotik direnci 1 ve 7. günde kültür besiyeri ile muamele edilerek makrokapsüllerin çapının artmasıyla belirlendi. Makrokapsüller 6 kuyucuklu gözde 7 gün inkübe edildi. Kısaca, 100 μ L makrokapsüller 900 μ L PBS ile karıştırıldı ve 6 kuyucuklu bir plakaya yerleştirildi. Plakalar 500 rpm'de çalkalanırken 1 saat 37 ° C'de inkübe edildi. Daha sonra, her bir kuyucuktan süpernatantlar çıkarılarak, 800 μ L sitrat çözeltisi eklendi ve 24 saat 37° C'de inkübe edildi. Son olarak, makrokapsül / numune çapı ölçüldü. Sonuçlar D_f / D_i olarak ifade edildi. Her örnek için üç bağımsız deney gerçekleştirildi (Hernandez ve ark., 2017).

3.5.2. Kapsülün Şişme Özelliklerinin Belirlenmesi

6 kuyucuklu kültür kabına koyulan makrokapsüller 7 gün boyunca hücre kültür besiyerinde (RPMI) bekletildi. Kültür kabının içine 400 μ l besiyeri kondu. 1.ve 7. günde kalan besiyeri miktarı otomatik pipet yardımıyla ölçüldü. Hidrojel formunda olan aljinat kapsüllerin şişme özellikleri kültürün 1 ve 7. gününde besiyerinden çıkartılıp ilk ve o günkü çaplarının metre ile ölçülmesiyle değerlendirildi (Hernandez ve ark., 2017).

3.5.3. Kapsül SEM Analizi

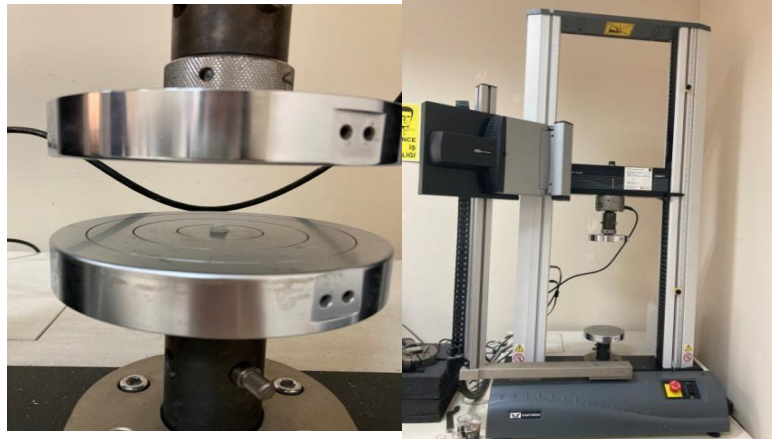
Makrokapsül malzemesinin hücretsiz halinde malzemenin yüzey ve por özelliklerini belirlemek için SEM (taramalı elektron mikroskobu) görüntülemesi yapıldı. Örnek % 2 gluteraldehit ile fiksasyonunu takiben % 1 osmiyum tetroksitte inkübe edildikten sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon yapıldı. Sonrasında desikatör de 24 sa bekletilerek kurutma işlemi gerçekleştirildi. Makrokapsül örnekleri Au/Pd ile kaplanarak JEOL JSM 6060 SEM cihazında görüntülendi (Hernandez ve ark., 2017)

3.5.4. Kapsül Reometre Analizi

Tüm çözeltilerden (% 2 low aljinat, % 4 low aljinat, % 2 medium aljinat, % 4 medium aljinat) viskozite 40 mm düz plaka geometrisi ile Antoon paar reometresinde değerlendirildi. Viskozite davranışı 20 ° C'de 0,01 ila 100 Hz frekans aralığındaki dinamik kesme ölçümleri ile reometre platformuna 500 µL'lik bir damlada belirlendi. Üst plaka ve numune arasındaki boşluk ayarlanarak ölçüm yapıldı (Hernandez ve ark., 2017).

3.5.5. Mekanik Test

Çekme, basma, darbeye karşı kapsülün mekanik özelliklerini değerlendirmek için bu test uygulandı. Kapsüllerin (4,6 mm çapında) sıkıştırma testi, % 0,5 kapasiteli ve 0,005 mm/min sıkıştırma aralığında 0,02 N dan 30 kN a kadar kuvvet uygulayabilen Instron Basma Cihazı ile yapıldı (Şekil 3.7.). Cihazın alt çenesi sabit olup üst çene hareketli bölmeden oluşan ve sabit hızla aşağı yukarı hareket eden sistem özelliği kullanıldı. Yıkıma kadar kapsüllere yük uygulandı. Malzemenin akma noktası tespit edildi. Her jel grubundan üç örnek test edildi.



Şekil 3.7. Instron basma cihazının sabit çene kısmına yerleştirilen makrokapsülün mekanik dayanıklılık analizi

3.5.6. FITC Dextran

Bu deney 2 farklı yöntem ile uygulandı:

1- 6 kuyucuklu kültür kabında bulunan hücre tabakalı kapsüller üzerine 4 kDa ve 150 kDa FITC dextran (Sigma Aldrich) çözeltisi eklendi ve 24, 48, 72 sa sonunda kapsüllerin görüntüleri stereo mikroskopta (Leica) incelendi (Waeaver ve ark., 2018).

2- İkinci yöntem de ise 6 kuyucuklu kültür kaplarındaki kapsül içinden alınan örnekler 96 kuyucuklu kaba aktarılarak absorbands değerleri $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ de monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi. Veriler student's t-test ile analiz edildi (Kaiser ve ark., 2015).

3.6. Aljinat Makrokapsülün Hücreler Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi

3.6.1. WST-1 Testi

Kültürdeki makrokapsülün 1, 7 ve 14. gününde bu test uygulandı. Canlı ve apoptozisin erken evresindeki hücrelerin mitokondriyonları aracılığıyla WST-1 (Roche) solüsyonuyla oluşturduğu reaksiyonda WST-1'in tetrazolium halkası, hücrelerin mitokondriyonlarında bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak turuncu renkli formazan kristalleri oluşturmakta iken, ölü hücreler formazan kristalleri oluşturmamaktadır. Test günlerinde kapsül bulunan kuyucuklara 0,5 mg/ml WST-1 eklenerek 2 saat süreyle inkübe edildi. (% 5 CO₂, 37⁰C de).İnkübasyon sonrası absorbands değerleri 480 nm'de monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi (Hakkı ve ark., 2015).

3.6.2. Sitotoksisite Analizi

Makrokapsül örneklerinin hücrelere toksik etkinin olup olmadığının belirlenmesi için LDH (laktat dehidrogenaz) (Roche) testi toksisite oranları (%) belirlendi. İçerisinde hücre tabakası bulunan makrokapsül örnekleri üzerine reaksiyon karışımı eklenip 30 dk. inkübasyondan sonra, stop solüsyonu eklenip 480 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucuda okutuldu. Deney 1, 7 ve 14 günlerde tekrarlandı. Veriler Student's t-test ile analiz edildi (Hakkı ve ark., 2015).

3.6.3. Live/Dead Testi

Kapsül içindeki hücre tabakasının canlılık düzeyini belirlemek için WST-1 testine ek olarak 14. günde live/dead (Thermo fisher) test uygulandı. Live dead boyasını hazırlamak için 10 ml PBS içerisine 20 µl Ethidium Bromide, 5 µl Calcein AM eklendi. Sonrasında kapsül mekanik olarak ikiye ayrılıp tabaka içerisinden çıkarıldı boya hücre tabakalarının üzerine eklendi ve 25⁰ C de 30 dk inkübe edildi. Süre bitiminde tabaka lamın üzerine koyulup konfokal mikroskopta (Leica DMI8) inceleme yapıldı. Kapsüllü ve kapsülsüz hücre tabakaları karşılaştırmalı olarak incelendi (Waeaver ve ark., 2018).

3.6.4. Metabolik Aktivite

Adenozin trifosfat (ATP), hücrelerde enerji taşıyıcısı olarak kullanılan bir koenzimdir ve hücrelerin ATP değeri, hücre işlevselliklerinin iyi bir ölçüsü olarak kabul edilir. Metabolik aktivite, ATP Syntase Spesifik Activity Microplate Assay Kit (Abcam) kullanılarak belirlendi. Üretici tavsiyelerini takiben kapsülleme sonrası 1, 7 ve 14. günlerde ATP sentez testi için, kültürdeki makrokapsüllerin içinde bulunduğu süpernatantlar toplandı ve 96 kuyucuklu bir plaka içinde yerleştirildi. Absorbans, 405 nm'de Versamax plaka okuyucuda okundu. Her durum için üç bağımsız test analiz edildi (Chen ve ark., 2016)

3.6.5. İn vitro İnsülin Salgılayma Deneyi

Kapsül içindeki hücre tabakasının canlılık ve fonksiyonunu glukoz-bağımlı insülin salınımını deneyi ile belirlendi. Kapsüllü hücre tabakası ve kontrol grubu olarak kapsülsüz hücre tabakası 6 kuyucuklu kültür kabı içinde besiyerine eklenen glukozla bağlı olarak, yine besiyerine insülin salgılayıp/salgılamadıklarını test etmek için 1, 7 ve 14. günlerde iki farklı glukoz konsantrasyonuna maruz bırakıldı ve toplanan besiyerinde insulin proteini tayini yapıldı. İnsülin salgılatma analizine başlamadan önce hücre tabakaları, insülin içermeyen besiyerinde 48 saat kültüre edilip, besiyerinden insülin tamamen uzaklaşmaya kadar periyodik olarak 3 kez PBS ile yıkandı. Kuyucuklara % 0,5 BSA içeren serumsuz L-DMEM (düşük glukoz içerikli; 2,5 mmol/L) eklenerek ve hücreler 2 saat süreyle 37⁰C'de inkübe edildi. Süre bitiminde süpernatant toplanarak yüksek glukoz içeren besiyeri (27,5 mmol/L) eklenip tekrar 37⁰ C de 120 dakika inkübasyona bırakıldı. Pankreasın endokrin kısmı olan Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin sentezlediği peptid hormonlardan olan insulin, toplanan süpernatantlardan Rat Ins1 Insulin ELISA (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) kiti kullanılarak analiz edildi. Bunun için üretici firmanın önerdiği prosedürler izlenerek ve hormon düzeyleri monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular

Device, USA) tespit edildi. Okunan veriler Student' t-test ile değerlendirildi (Ohashi ve ark., 2011).

3.7. Hayvanlar

Çalışmamızın bu bölümünde nakil işlemlerini gerçekleştirmek üzere gerçekleştirmek için en az 8-10 haftalık, 250-300 gr ağırlığında 42 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Greftin alıcısı olarak kullandığımız sıçanlar Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden (DETAB) temin edildi.

3.7.1. Deney Grupları

Çalışmada kullanılan hayvanlar, Tablo 3.3'deki gibi 7 deney grubuna ayrıldı.

Tablo 3.3. İn vivo deney grupları.

Deney Grupları	T1DM Hayvan Modeli	Makrokapsül Nakli
Kontrol (Sağlıklı) (n=6)	Sağlıklı	Makrokapsül nakli yapılmadı Sağlıklı hayvan kan şekeri gözlemlenen grup. STZ-deney grubu ile aynı koşullarda enjeksiyon yapıldı ancak STZ yerine subkutan olarak eşit hacimde sitrat buffer enjeksiyonu yapıldı. Bu grup deney gruplarındaki ölçümlerdeki değişimlerin enjeksiyondan kaynaklanmadığını gösterdi.
Kontrol+ Kapsül (n=6)	Sağlıklı	Makrokapsül nakli yapıldı Nakil yapılan deney grubu ile aynı cerrahi işlem yapıldı ancak hücreli kapsül nakli yapıldı. Bu grup deney

		gruplarındaki ölçümlerdeki değişimlerin cerrahi işlemden kaynaklanmadığını gösterdi.
T1DM (n=6)	STZ enjeksiyonu-diyabetik İntraperitoneal olarak STZ enjeksiyonu yapıldı	Makrokapsül nakli yapılmadı Diyabetli ve tedavi edilmeyen hayvankanşekeri gözlemlenen grup
T1DM+ Kapsül (n=6)	STZ enjeksiyonu-diyabetik İntraperitoneal olarak STZ enjeksiyonu yapıldı	Makrokapsül nakli yapıldı Nakil yapılan deney grubu ile aynı cerrahi işlem yapıldı ancak hüresiz kapsül nakli yapıldı. Bu grup deney gruplarındaki ölçümlerdeki değişimlerin cerrahi işlemden kaynaklanmadığını gösterdi.
T1DM+ Kapsül+ Beta (n=6)	STZ enjeksiyonu-diyabetik İntraperitoneal olarak STZ enjeksiyonu yapıldı	Makrokapsül nakli yapıldı Kapsüle edilmiş beta hüresi
T1DM+Kapsül+Beta+MKH (n=6)	STZ enjeksiyonu-diyabetik İntraperitoneal olarak STZ enjeksiyonu yapıldı	Makrokapsül nakli yapıldı Kapsüle edilmiş Beta+MKH
T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka (n=6)	STZ enjeksiyonu-diyabetik İntraperitoneal olarak STZ enjeksiyonu yapıldı	Makrokapsül nakli yapıldı Kapsüle edilmiş Beta+MKH tabakası

3.8. Sıçanlarda STZ Enjeksiyonu ve Diyabetik Hayvan Modelinin Oluşturulması

Deney gruplarındaki tüm sıçanların STZ enjeksiyonu öncesinde ağırlıkları ölçüldü ve ortalama ağırlığa göre uygulanacak STZ miktarı tayin edildi.

Kimyasal olarak T1DM modeli oluşturulacak tüm erkek hayvanlara (n=6) 60 mg/kg vücut ağırlığı olacak şekilde Ph'sı 4,5 olan citrate buffer'da çözülmüş streptozotocin (STZ) (Sigma, St Louis, MO, USA) tek doz intraperitonel olarak enjekte edildi. Kontrol grubu hayvanlara ise (n=6) eşit hacimlerde yalnızca sitrat buffer verildi. STZ enjeksiyonu uygulandıktan 2 gün sonra, kan düzeylerini belirlemek için sıçanların kuyruk ucuna kesi atılarak venden kan alındı ve glukometre cihazı ile (Abbott, Optimum Neo FreeStlye, USA) ile ölçüldü. Yapılan ölçümler sonucunda, açlık kan şekeri 250 mg/dL'nin üzerinde olan sıçanlarda STZ'ye bağlı beta-hücre yıkımının sonucu olarak diyabetin geliştiği kabul edildi ve deneye alındı (Fujita ve ark., 2018).

3.9. Nakil

8-10 haftalık, 250-300 gr ağırlığında 30 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçana sırt bölgesi tıraşlandıktan sonra deri altına kapsül nakli yapıldı (Şekil 3.7). Nakil sonrasında sıçanlara intraperitonel olarak tek doz serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı. Çalışma süresince hayvanların beslenmeleri ve bakımları Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Birimi (DETAB) tarafından sağlandı.

3.10. Anestezi

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

Anestezi uygulaması başarılı olan sıçanların sırt bölgesindeki tüyler tıraş edilerek aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı (Şekil 3.8):

1. Anestezi altındaki sıçanın dorsal bölgesi % 70'lik alkol ile sterilize edildi
2. Dorsal bölgedeki deri merkez kısmından forseps ile tutulup 2 cm havaya kaldırıldı ve deriye makas ile insizyon atıldı. (A)
3. İnsizyon bölgesinden makas ile girilip makasın ucu açılarak derinin açılması sağlandı (A).
4. Açılan deri şebi U şeklinde bir kesi haline getirildi (B).
5. Kesilen bölgeye (subkutan dokuya) kapsül yerleştirildi ve suture edildi (B-C).



Şekil 3.8. Anestezi altındaki sıçanlara makrokapsül nakli uygulaması.

3.11. Nakil Edilen Kapsülün Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi

3.11.1. Tokluk Kan Şekeri ve Ağırlık Takibi

Nakil işleminden 2 gün sonra periyodik olarak kuyruk ucuna kesi atılıp glukometre cihazı ile kan şekeri ölçümü yapıldı. Kan şekerinin ölçüldüğü günlerde aynı zamanda sıçanların ağırlıkları da takip edildi. Deneyin son gününe kadar bu işlemler uygulandı.

3.11.2. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi

Nakil sonrasında 2, 16 ve 30. günlerde sıçanlara intraperitoneal olarak 2 mg/g vücut ağırlığı olacak şekilde glukoz enjeksiyonu yapıldı. Glukoz suda çözülerek 500 er µl hacminde sıçanlara enjekte edildi. Glukoz yüklemesinden önce hayvanlar 16 saat aç bırakıldı.

Enjeksiyondan sonra 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kuyruk ucundan glukometre cihazı ile kan şekeri ölçümü yapıldı ve değerler istatistiksel açıdan değerlendirildi (Fujita ve ark., 2018).

Aynı zamanda glukoz yüklemesinin 60. dakikasında sıçanların kuyruk veninden 500 µl kan örnekleri alınarak serumları elde edildi. Bunun için sıçanların baş ve gövde hareketleri kısıtlanarak tutuldu. Kuyruk veninin dilate edilerek net görülmesi için kuyruk ucu 5-8 dakika 37⁰ C lik suda bekletildi ve sonrasında ksilol ile friksiyon yapılarak daha net görülmesi sağlandı. Aşağıdaki görseldeki sistem ile kuyruk lateral bölgeden 21 gx1 inch kelebek iğne girilerek başarılı bir şekilde kan örnekleri toplandı (Şekil 3.9). Toplanan örnek EDTA lı biyokimya tüplerine aktarıldı ve tüpler 5-6 kez alt üst edildi. Buz aküsü ile

laboratuvara ulaştırıldı. Kan örnekleri 4⁰ C de 1500xg de 10 dk santrifüj edildi.



Şekil 3.9. Sıçan kuyruk lateral bölgeden 21g x1 inch kelebek iğne girilerek kan örneklerinin alınması.

Alınan kan örneklerinden serum elde edildi. Serum örneklerinden insulin proteini, Rat Ins1 Insulin kiti, (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) ve rat c-peptid kiti (YL Biont, Shanghai) ile ELISA yöntemi uygulanarak tayin edildi. Bunun için kitlerdeki üretici firmanın önerdiği prosedürler izlenerek ve protein düzeyleri monokromatör sistemli mikrolaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi. Her gruptan 3 er örnek Student's t-test ile değerlendirildi.

3.12. Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler

60. günde nakil bölgesindeki subkutan dokular alındı ve %10 formalin ile fikse edildi. Deneyin 60. ve son gününde nakil bölgesindeki greft dokusu çıkarılarak live/dead boyama yapıldı. Hazırlanan örnekler konfokal mikroskopunda görüntülendi. Böylece kapsül içindeki hücrelerin canlılık analizi yapıldı.

Pankreas dokuları ise; karın ön duvarı sternuma kadar uygun cerrahi teknikler ile açıldıktan sonra koledok kanalının duodenuma giren kısmı sabitlenip ve 23 g kanül yardımıyla 8-10 ml formalin solüsyonu enjekte edilerek alındı.

Örnekler parafine gömüldü ve 5µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksil-eosin ve immunohistokimyasal boyama yapıldı. İmmunohistokimyasal ve histolojik analiz için kesitlere önce deparafinizasyon işlemi uygulanarak parafin uzaklaştırıldı. Bunun için 70°C lik etüvde 30 dakika bekletilen parafin kesitler önce ksilen de 5 dakika 3 er kez bekletildi. Devamında 1 dk saf alkol ve 1 dk % 96 lık alkol serilerinden geçirilerek parafin uzaklaştırılmış oldu. Antijen retrieval işlemi tamamlandıktan sonra antibody diluent ile uygun oranlarında dilue edilen insulin antikoru (Abcam) ve c- peptid (Abcam), PDX-1 (Santa Cruz Biotechnology), Glut-2 (Santa Cruz Biotechnology), active-caspase, TGFβ (Santa Cruz Biotechnology), IL-6 (Santa Cruz Biotechnology), antikoru ile subkutan nakil

bölgesi dokuları+4⁰C de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Pankreas dokuları ise glukagon ve insulin antikoru ile inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün PBS ile 3x2 dk yıkama işleminden sonra immunflouresan çalışmalar için uygun flouresan (FITC, TR) işaretli sekonder antikor Alexa-fluor-594-konjuge anti-rabbit immunoglobulin (Invitrogen) ve Alexa-Fluor-488-konjuge anti-goat immunoglobulin antikoru kullanıldı. Bu işlemde oda sıcaklığında 30dk. inkübe edildi, son aşama nükleer boya içeren kapatma medyumu (UltraCruz Mounting Medium for flouresence with DAPI) ile kapatıldı. Fluoresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı. Hematoksilen-Eosin boyaması yapılan deri grefti ve pankreas doku kesitleri Crystalmaunting medium ile kapatıldı ve ışık mikroskobunda incelenerek fotoğraflandı.

3.13. İstatiksel Analiz

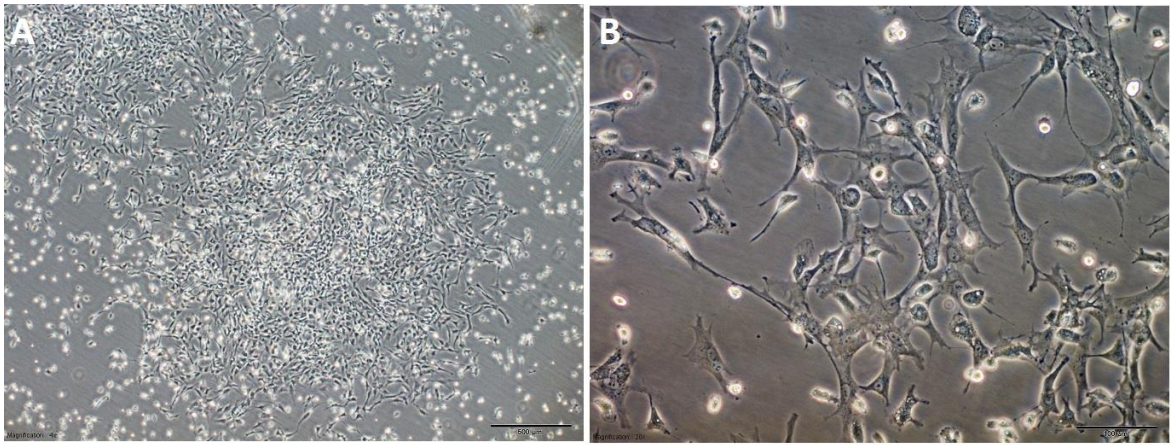
İnvitro deneyler 3, in vivo deneyler 6 tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar standart sapma (+SD) göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır. Deney ve kontrol grupları arasındaki farklar için $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir. $P < 0,01$ ve $p < 0,001$ değerleri ileri ve çok ileri derecede anlamlılık için kullanılmıştır. Grafikler üzerinde ifadesi yıldızlarla belirtilmiştir (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

4.1.1. Sıçan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültür ve Karakterizasyonu

Sıçan adipoz dokusundan izole edilen hücrelerin kültüre alındıktan sonraki 7. gününde koloni oluşturdıkları gözlemlendi (Şekil 4.1A). Bu hücrelerin kök hücre olup olmadığını kanıtlamak için kültürde 3. pasaja kadar ilerledikten sonra karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

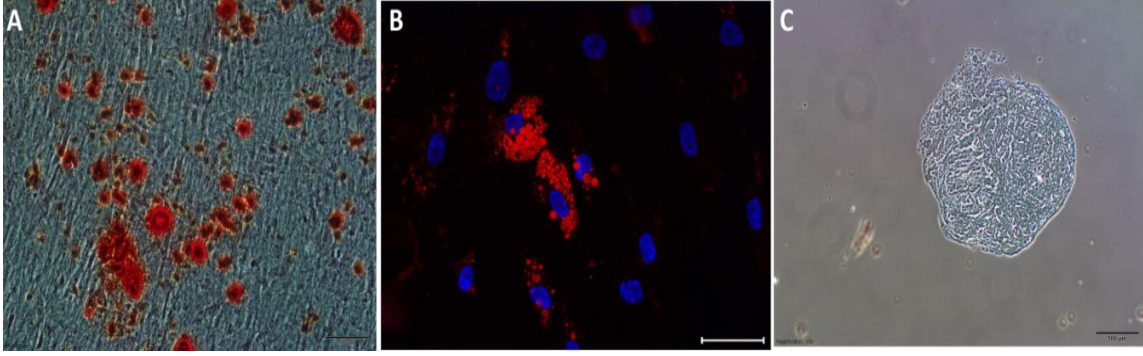


Şekil 4.1. Sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 3.pasaj invert mikroskop görüntüleri. **A:** Hücrelerin koloni oluşturdıkları görülmektedir. (Ölçüm çubukları A: 500 µm, B:100 µm)

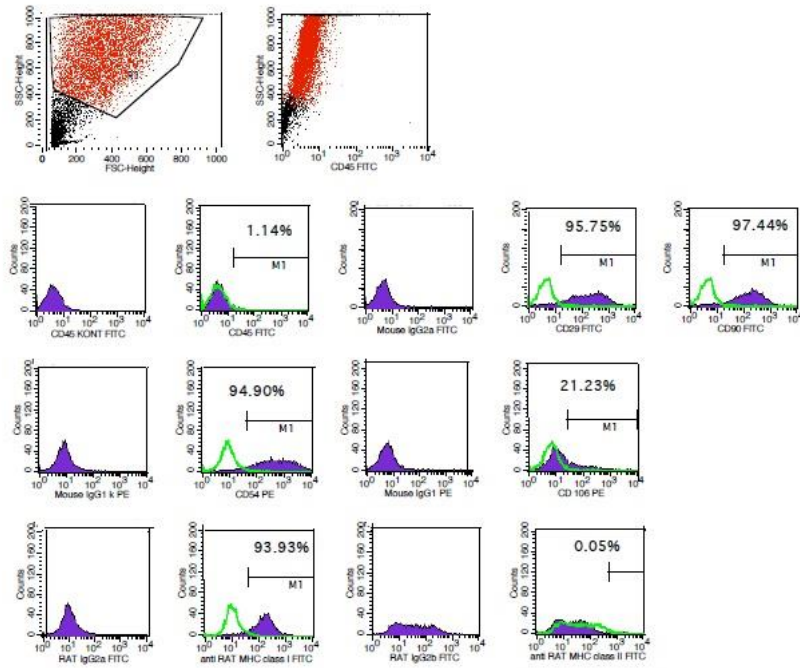
Bu amaçla hücreler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik olmak üzere farklılaştırma besiyerlerine alındı. Adipojenik farklılaşmaya alınan hücrelerde yağ vezikülü oluşumuna bağlı olarak 21 gün sonunda Oil red O boyası ile boyandığında kırmızı renk verdiği görüldü (Şekil 4.2B).

Osteojenik farklılaşmaya alınan deney grubunda 28 gün sonra Alizarin Red S boyaması yapıldığında, oluşan kalsiyum nodüllerinin kırmızıya boyandığı saptandı (Şekil 4.2A).

Kondrojenik farklılaşma besiyeri uygulanan sAD-MKH hücrelerinin 30 gün sonrasında Alcian Blue ile boyandığında mavi renk oluşumu gözlenerek kondrosit hücrelerine farklılaştığı tespit edildi (Şekil 4.2C)



Şekil 4.2. Sıçan adipöz dokudan izole edilmiş MKH'lerin (P3) osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma sonrası immunflouresan ve histokimyasal analizleri: **A:** Osteojenik farklılaşma kırmızı ile boyanmış ekstrasellüler matrikste kalsiyum birikimi (Alizerin Red-S Boyaması) (Ölçüm çubuğu, 50 μm). **B:** Adipojenik farklılaşmış hücrelerin Oil red-O ile boyanmış yağ vakulleri (Oil Red O Boyaması) (Ölçüm çubuğu, 50 μm), **C:** Kondrojenik farklılaşma sonrası hücrelerde, Alcian Blue boyaması sonucu pozitif bölgeler görüldü. (Ölçüm çubuğu, 100 μm).

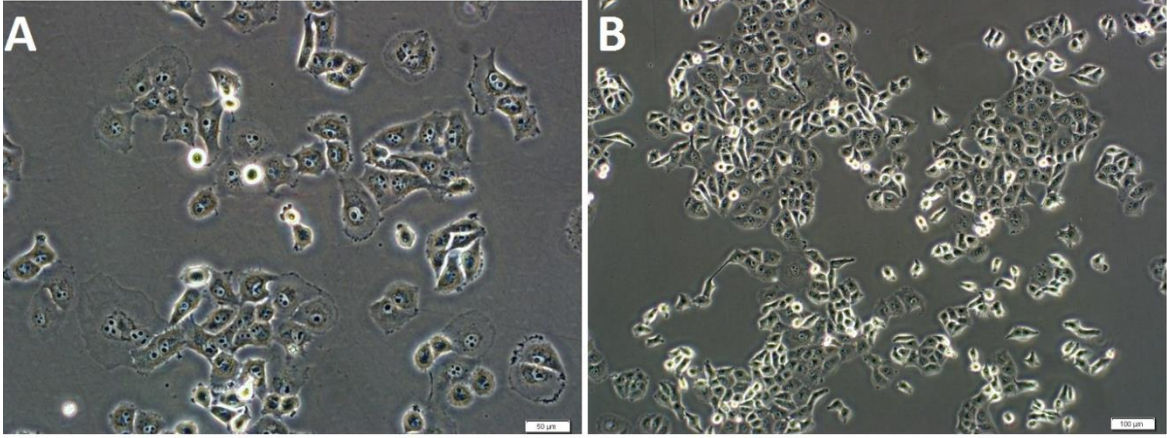


Şekil 4.3. Sıçan kemik iliğinden izole edilip kültür edilmiş (P3) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immunofenotipik özellikleri. sMKH'ler; CD29, CD54, CD90, MHC class I belirteçleri yönünden pozitif; CD45, CD106, MHC class II belirteçleri açısından negatif olarak analiz edildi.

Yapılan akım sitometri analizi sonucunda, sAD-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD29, CD54, CD90, MHC class I yönünden pozitif; CD45, CD106, MHC class II açısından negatif oldukları gösterildi (Şekil 4.3).

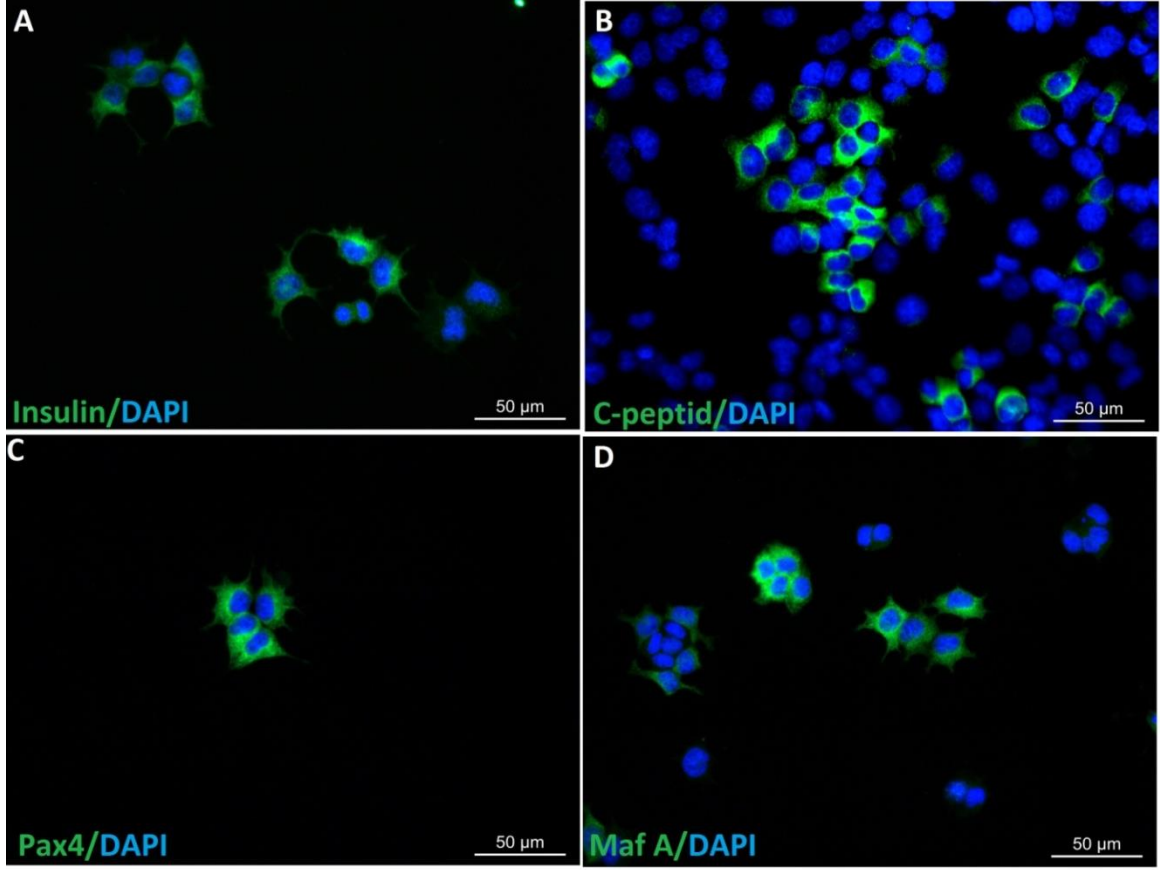
4.2. Beta Hücrelerinin Kültür ve Karakterizasyonu

Beta hücreleri çözüldükten sonra kültürde invert mikroskobunda poligonal şekilli ve kısa uzantıları olan hücreler olarak izlendi ve koloni oluşturdıkları görüldü (Şekil 4.4) Bu hücrelerin bölünme kapasitelerinin fazla olduğu kültürdeki pasaj süresinin 2 günde bir olmasıyla tespit edildi. Hücrelerin sayısının çok fazla olmasına rağmen kültür kabının yüzeyinin tamamını kaplamadıkları tespit edildi. Hücreler çözüldükten sonra trypan blue ile boyanıp otomatik hücre sayım cihazında sayıldığında canlılık oranı % 92 olarak ölçüldü.



Şekil 4.4. BRIN BD 11 beta hücrelerinin in vitro kültür kabındaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri. Hücrelerin koloni oluşturma eğiliminde oldukları, poligonal şekilli ve kısa sitoplazmik uzantılarının oldukları görüldü. (Ölçüm çubukları, A: 50 µm, B:100 µm).

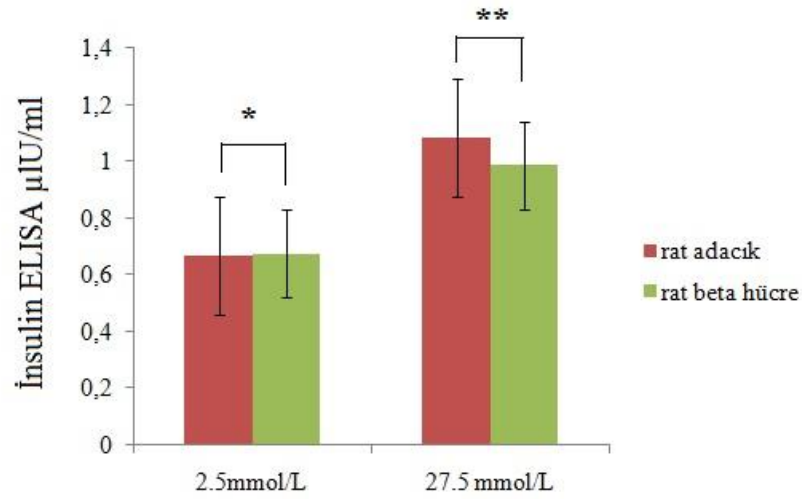
Beta hücrelerini karakterize etmek için ekilen 8 kuyucuklu lamlarda yapılan immünoşouresan boyama sonuçlarında İnsulin, C-peptid, Pax4, MafA belirteçlerinin pozitif olduğu görüldü.



Şekil 4.5. Beta hücrelerinin immunflouresan milroskop görüntüleri. Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi. **A:** Insulin (Yeşil), **B:** C-peptid (Yeşil), **C:** Pax4 (Yeşil), **D:** MafA (Yeşil), (Ölçüm çubukları, 50 μ m)

4.2.1. İnsülin Salgılama Deneyi

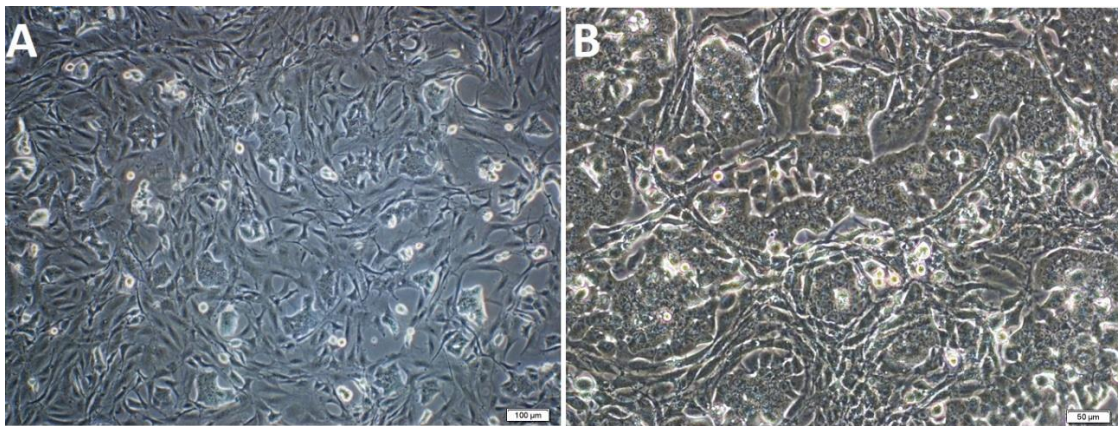
Beta hücrelerinin çözülmesi sonrasında fonksiyonelliğini test etme amaçlı uygulanan insülin salınım deneyinde hücrelerin besiyerine düşük ve yüksek konsantrasyonlarda glukoz eklendi. Yüksek glukozu maruz kalan hücrelerde insülin sentezinde artma görüldü. Düşük glukozlu besiyerinde ise insülin salgısındaki azalma hücrelerin besiyerinden alınan örneklerde ELISA yöntemi ile insülin protein analizi yapılarak tespit edildi. Gruplar farklı konsantrasyonlarında kendi arasında kıyaslandı (Şekil 4.6). Kontrol grubu olan rat adacıkta düşük glukozdan yüksek a geçişte beklenen şekilde insülin salınımında artış görüldü ve student't testi sonucu anlamlı kabul edildi. (* $P < 0,05$). Rat beta hücrelerinin de adacıklara benzer şekilde yükselen glukoz miktarına cevaben adacıklara kıyasla anlamlı bir şekilde insülin salınımı gerçekleştirdiği tespit edildi. (** $P < 0,01$).



Şekil 4.6. Kültür kabındaki hücelere eklenen glukozun çeşitli konsantrasyonlarına hücrelerin verdiği yanıt karşılaştırıldı. 2,5 mmol/L glukozdan 27,5 mmol/L glukozla geçildiğinde hücrelerin insülin salgısı * $P < 0,05$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir. ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4.2.2. Beta ve Mezenkimal Kök Hücre Ortak Kültürü

Beta ve mezenkimal kök hücreler aynı sıcaklık duyarlı kültür kabında 1:1 oranında kültüre edilerek tabaka halinde elde edildi (Şekil 4.7). MKH ler beta hücrelerine bir destekleyici hücre etkisi yaratarak bu iki hücre grubunu tabaka halinde elde etmemizi sağladı. Beta hücreleri invivo ortamda adacık içerisinde çeşitli hücre grupları ile birlikte yer aldığı için MKH ile uyum göstererek başarılı bir kültür süreci takip edildi.

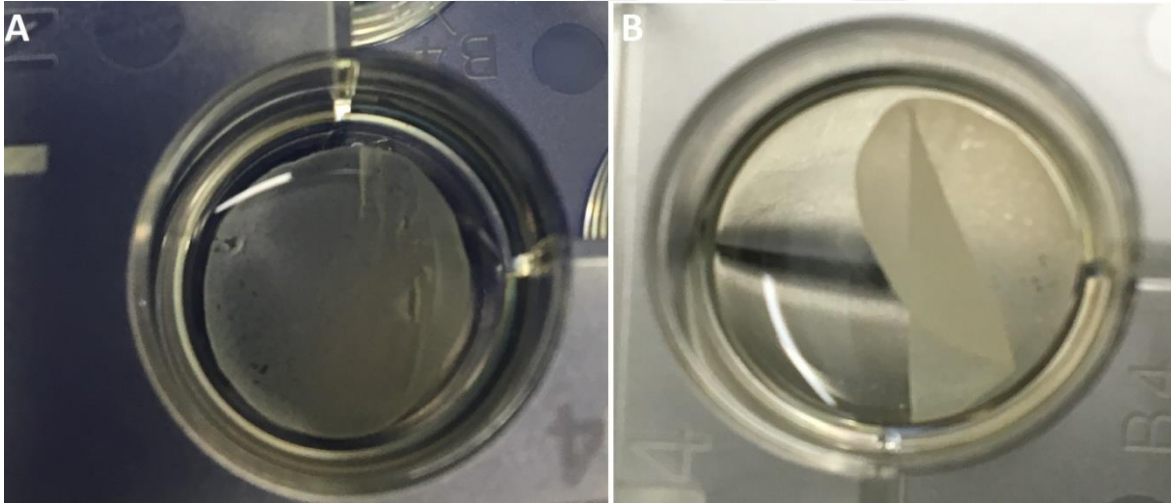


Şekil 4.7. Sıçan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre ve beta hücrelerinin ortak kültürünün mikroskopik görüntüleri. (Ölçüm çubuğu: A: 100µm, B: 50µm)

4.3. Isı Değişimine Duyarlı Kültür Kabında Mezenkimal Kök Hücrelerin Tabaka Halinde Eldesi

Çözülen mezenkimal kök hücrelerin kültürü için 6 kuyucuklu Upcell (UpCell, CellSeed, Inc. Tokyo, Japan) kültür kabı kullanıldı. Bu kültür kabının ısı değişimine cevap verebilen polimer olan poly(N-isopropylacrylamide) (PIPAAm) yapısında olması özelliğinden faydalanıldı.

Mezenkimal kök hücreler 6 kuyucuklu Upcell kültür kabına bir göze 9×10^6 olacak şekilde ekildi. Beta hücreleride aynı sayıda MKH lerin üzerine birlikte ekilerek 1 gün boyunca çoğalması beklendi. Sonrasında PIPAA m kültür kabındaki bu hücreler, $37^{\circ}C$ deki inkübasyondan alınarak $20^{\circ}C$ de 30 dk inkübasyona bırakıldı. 30 dakikalık inkübasyon sonrasında hücreler, enzimatik reaksiyona gerek kalmadan ve tek-hücre süspansiyonu yerine tabaka halinde kültür kabından başarılı bir şekilde kaldırıldı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Mezenkimal kök hücre ve beta hücrelerinin ortak kültürü. $37^{\circ}C$ deki inkübasyondan alınarak $20^{\circ}C$ de 30 dk inkübasyona bırakılması sonrasında tabaka halinde eldilen görüntüleri. **A:** Tabaka halindeki henüz kültür kabından kalkmamış görüntüsü. **B:** Kültür kabından tabaka formunda kalkmış Beta+MKH tabaka görüntüsü.

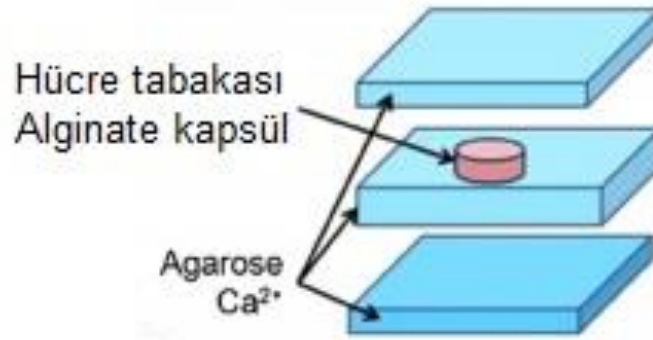
4.4. Makrokapsül Materyalinin Hazırlanması

Agaroz jel kalıbı elde etmek için %1 lik agaroz hazırlandı. Hazırlanan agaroz içerisine %2 $CaCl_2$ eklendi. Elde edilen kalıp malzemesi derinliği 1,3 cm olan kaba dökülerek 5 mm kalınlığında ilk kat agaroz jel kalıp elde edildi. Sonrasında aynı kalıptan bir tane daha hazırlanarak üzerinde 1,5 cm çapında yuvarlak kuyucuklar oluşturuldu. Kuyucuklu kalıp ilk kalıbın üzerine yerleştirildikten sonra kuyucuğa aljinat eklendi ve ayrı ayrı beta, beta+MKH, beta+MKH tabakası kuyucuğa yerleştirildi (Şekil 4.9). Tabaka üzerine sodyum aljinat eklendikten sonra üzerine diğer agaroz kalıp yerleştirilerek 1-2 saat boyunca kalıptabulunan Ca^{+2} iyonlarının aljinatta bulunan Na^{+1} iyonları ile çapraz bağ yaparak

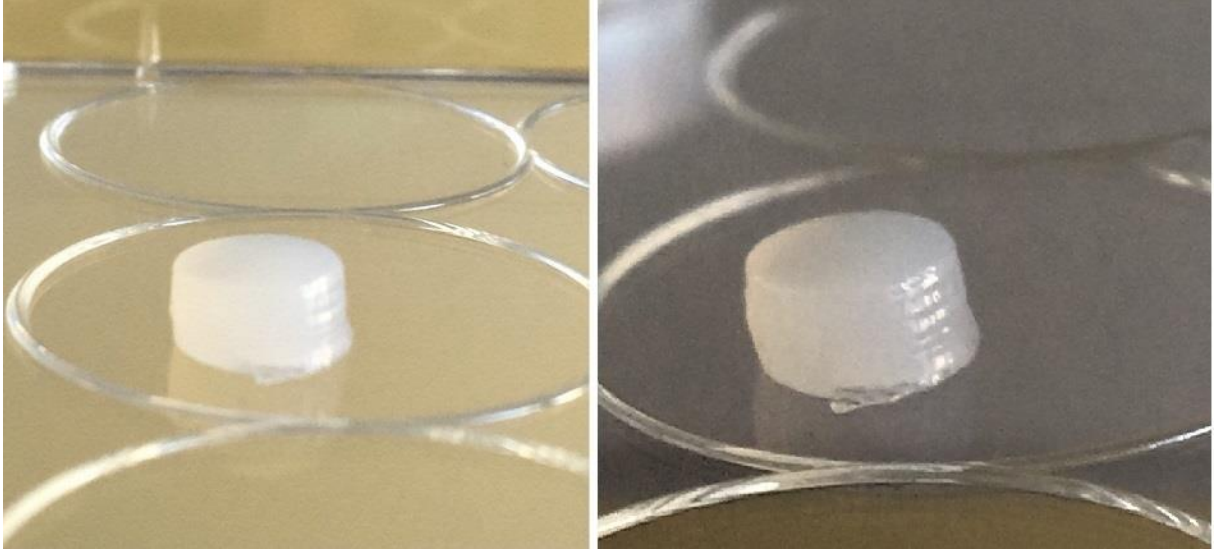
makrokapsülün yapısı elde edildi. Daha sonrasında belirlenmiş olan farklı aljinat oranları (% 2 low aljinat, % 4 low aljinat, % 2 medium aljinat, % 4 medium aljinat) kıyaslanarak makrokapsülasyon yapılacak en uygun aljinat miktarı belirlenerek optimize edildi. Bu miktar % 2 lik low viskoz aljinat olarak belirlendi. Bu konsantrasyonda kapsüllerin invitro kültür besiyerinde 14 günlük süreçte daha kompakt ve dayanıklı yapıda kaldığı gözlemlendi.

Bu tekniğin yaklaşık olarak aynı boyutlarda standart ölçülerde kapsül geliştirilmesine olanak verdiği tespit edildi. Ortalama ölçüleri 7,3 mm çap ve 4,63 mm yükseklik olan kapsüller elde edildi (Şekil 4.10, 4.11, 4.12).

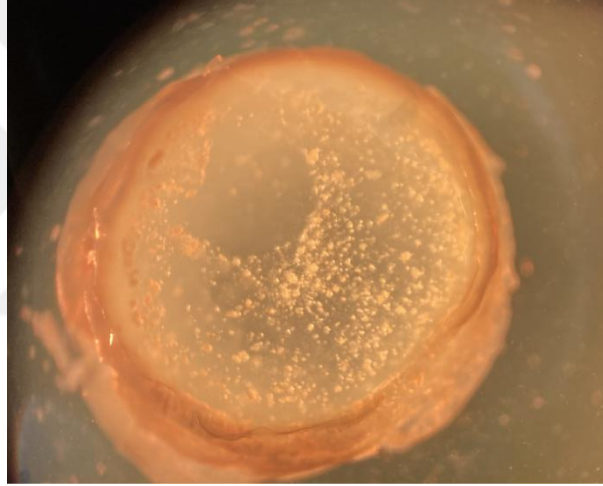
Kapsüllerin yapımında kullanılan aljinatın farklı konsantrasyonlarının hazırlanması sonrasında invitro kültür koşullarında en fazla dayanıklılık gösteren grup ile deneye devam edildi (% 2 low aljinat).



Şekil 4.9. Alginat kapsül hazırlamak için kullanılan agaroz kalıp edilmesi (Hwang ve ark., 2010).



Şekil 4.10. Tasarlanan makrokapsülün görüntüsü. Beta, beta+MKH, beta+MKH tabakasının aljinat ile kapsüle edilmesi.



Şekil 4.11. Makrokapsülün stereo mikroskop görüntüsü. 10X x 1,25 büyütme

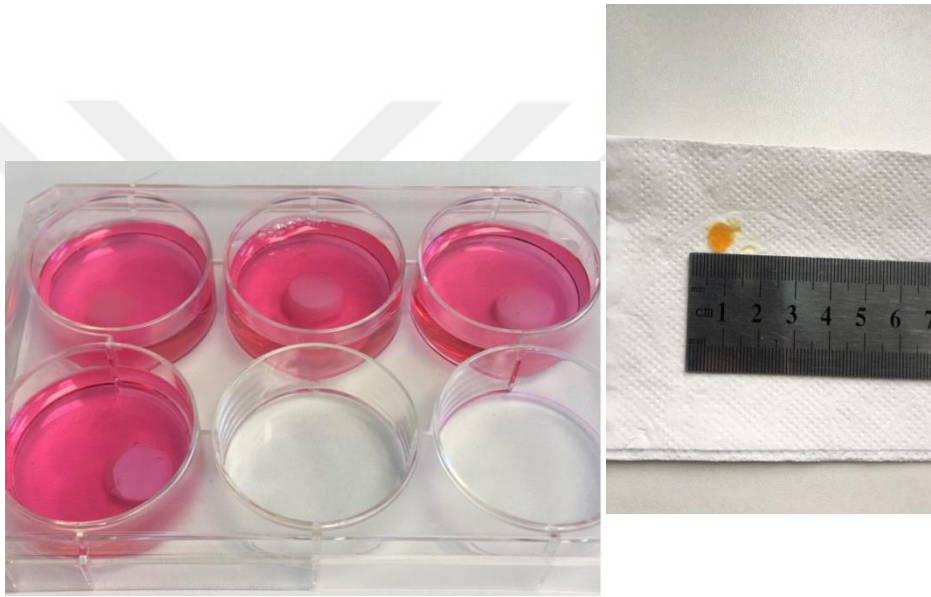


Şekil 4.12. Hücre tabakalarının kapsül içerisindeki görüntüleri.

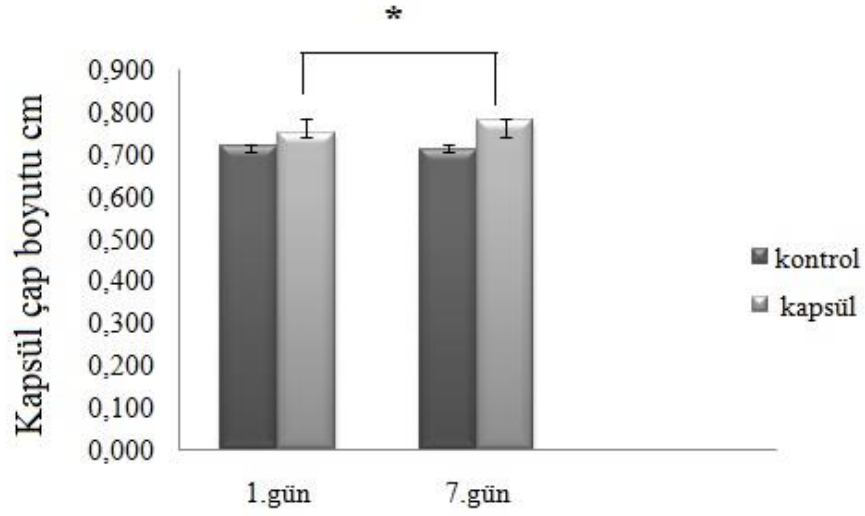
4.5. Makrokapsül Karakterizasyon Testleri

4.5.1. Osmotik Dayanıklılığın Ölçülmesi

Aljinat polimerinin % 2 lik low konsantrasyonunun in vitro ortamda kültürde 7 gün boyunca bozunmadan yapısını koruduğu tespit edildi. Kapsül çap boyutu kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kapsül çapında artış görüldü $*P<0,05$ olarak analiz edildi (Şekil 4.13, 4.14). Çap boyutu 0,75 cm den 0,78 cm ye artış gösterdi. ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$).



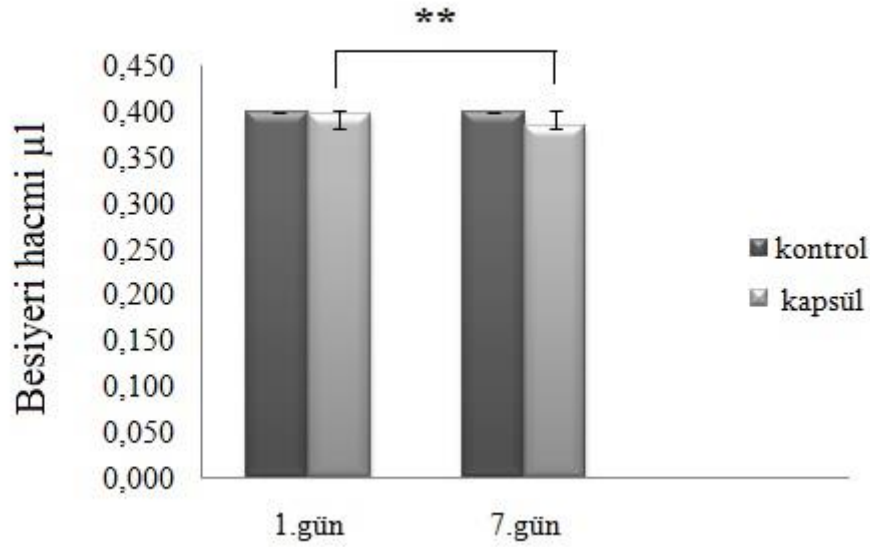
Şekil 4.13. Makrokapsüllerin sodyum sitratta bekletildikten sonraki görüntüleri.



Şekil 4.14. Kapsüllerin 1. ve 7. gününde çaplarının ölçüm sonucu. Kapsüllerin hidrojel özelliğinde olması sebebiyle zamanla kültürdeki besiyeri hacminde azalmaya bağlı olarak kapsül çapında artış olduğu tespit edildi. (Kontrol: Besiyersiz kültür kabındaki kapsül, Kapsül: Besiyeri içinde bulunan kapsül) . ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$).

4.5.2.Kapsülün Şişme Özelliklerinin Belirlenmesi

Aljinat makrokapsüllerin şişme özellikleri, kapsüllerin 7 gün boyunca kültür besiyerinin içinde sıvı tutma kapasitesi ve buna bağlı olarak hacminde meydana gelen değişiklik açısından değerlendirildi. Kültür kabına başlangıçta 400 μ l besiyeri varken kontrol grubuna kıyasla kapsül bulunan kültür kabında besiyeri hacminin 384 e indiği tespit edildi (Şekil 4.15). Kapsül hacmi 1 ve 7. günde student's t test ile analiz edildi. $**P<0,01$ olduğundan anlamlı kabul edildi.

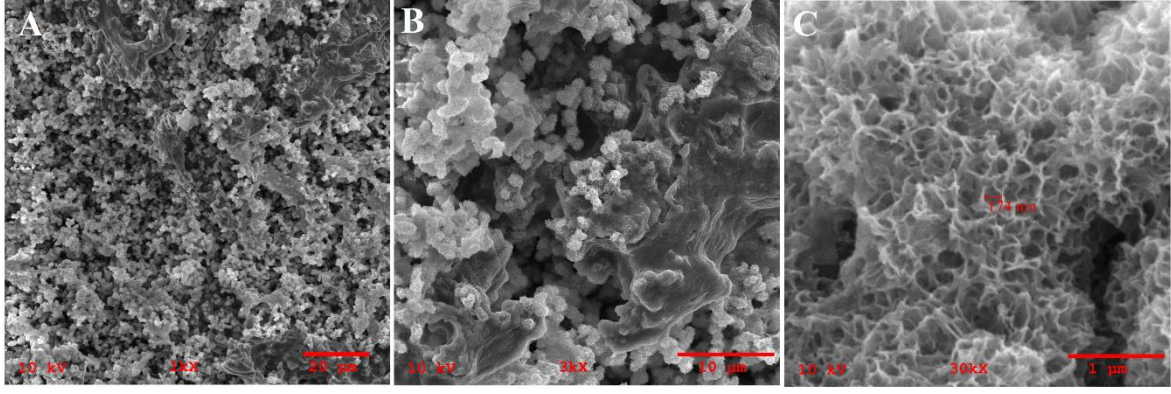


Şekil 4.15. Kapsüllerin içinde bulunduğu besiyerinin 1. ve 7. gününde hacimlerinin ölçüm sonucu. Kapsüllerin hidrojel özelliğinde olması sebebiyle zamanla kültürdeki besiyeri hacminde azalma tespit edildi.(Kontrol: İçinde kapsül olmayan besiyerli kültür kabı, Kapsül: Besiyeri içinde bulunan kapsül) . ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$).

4.5.3.Kapsül SEM Analizi

Kapsül malzemesinin hücreli halinde malzemenin yüzey ve por özelliklerini belirlemek için SEM (taramalı elektron mikroskobu) görüntülemesi yapıldı. Örnekler %2 glutraldehit ile fiksasyonunu takiben % 1 osmiyum tetroksitte inkübe edildikten sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrasyon yapıldı. Sonrasında desikatör de 24 sa bekletilerek kurutma işlemi gerçekleştirildi. Makrokapsül örnekleri Au/Pd ile kaplanarak JEOL JSM 6060 SEM cihazında görüntülendi.

Kapsüllerin gözenekli ve lifli mikroyapısını, gözenek boyutu dağılımını ve iskelelerin yüzey topografisini görselleştirmek için taramalı elektron mikroskobu kullanıldı. Kapsüllerin yapılan inceleme sonucu taşıdıkları por çapının 0,174-1 μ m olduğu tespit edildi (Şekil 4.16). Bu por çapının çalışmamızın sonuçlarından beklediğimiz şekilde, insülin proteinin pordan çıkışına uygun olduğunu, immun sistem hücrelerinden olan T lenfositlerin, onların salgıladıkları sitokinlerin ve B lenfositlerin ürettikleri antikorların ise kapsül içine giremeyeceğini gösterdi.

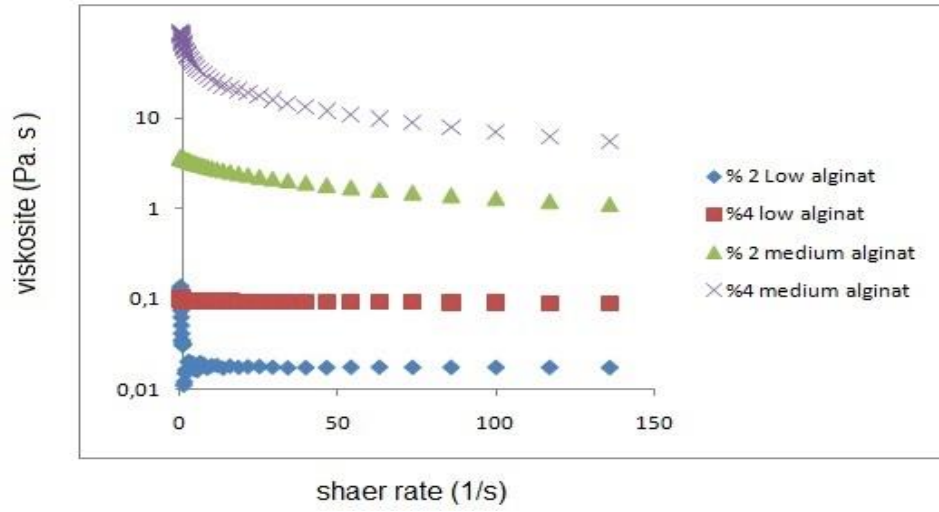


Şekil 4.16. Makrokapsüllerin SEM görüntüsü. (Ölçüm çubuğu A:20 µm, B:10 µm, C: 1µm)

İmmünoizolasyon cihazlarına verilen yabancı cisim tepkilerinin yoğunluğu, nakil alanına ve yüzey yükü ve kimyası, gözeneklilik, pürüzlülük ve implant boyutu gibi malzeme özelliklerine bağlıdır. İmplant edilen kapsüllerin aşırı büyümesi, hücelere besin taşınmasını engeller ve hücre yıkımına ve greft başarısızlığına yol açan hipoksiye ve nekroza neden olur. İmplant edilmiş biyomalzemelere yabancı cisim yanıtı, materyal yüzeyinde proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonu ile nötrofillerin ve makrofajların ilk görevlendirilmesi İmplant edilmiş biyomalzemelere yabancı cisim yanıtı, materyal yüzeyinde proteinlerin spesifik olmayan adsorpsiyonu ile nötrofillerin ve makrofajların ilk görevlendirilmesi olarak tanımlanabilir; bu durumda makrofajlar, yabancı cisim dev hücreleri ve fibroblastlar tarafından malzemenin aşırı büyümesine yol açar. Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz makrokapsül hem por boyutu hemde büyüklük açısından, emsal çalışmalardaki gibi başarılı sonuçlara ulaşmamızı sağlamıştır.

4.5.4. Kapsül Reometre Analizi

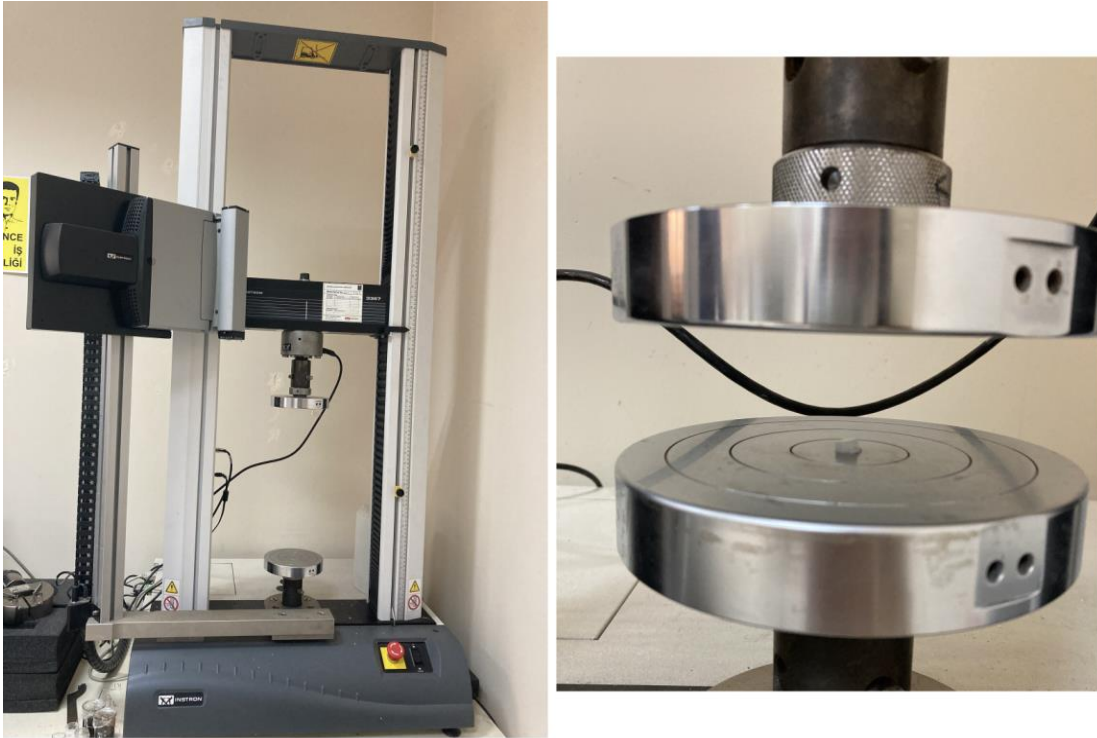
Tüm çözeltilerden (% 2 low aljinat, % 4 low aljinat, % 2 medium aljinat, % 4 medium aljinat) viskozite 40 mm düz plaka geometrisi ile Antoon paar reometresinde değerlendirildi. Viskozite davranışı 20 ° C'de 0,01 ila 100 Hz frekans aralığındaki dinamik kesme ölçümleri ile reometre platformuna 500 µL'lik bir damlada belirlenmiştir. Üst plaka ve numune arasındaki boşluk ayarlandı. Verilerin incelenmesi sonucunda 4 farklı malzemede artan shear strese bağlı olarak viskozitede azalma görülmüştür (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Farklı konsantrasyonlardaki aljinatın reometrik analiz verileri.

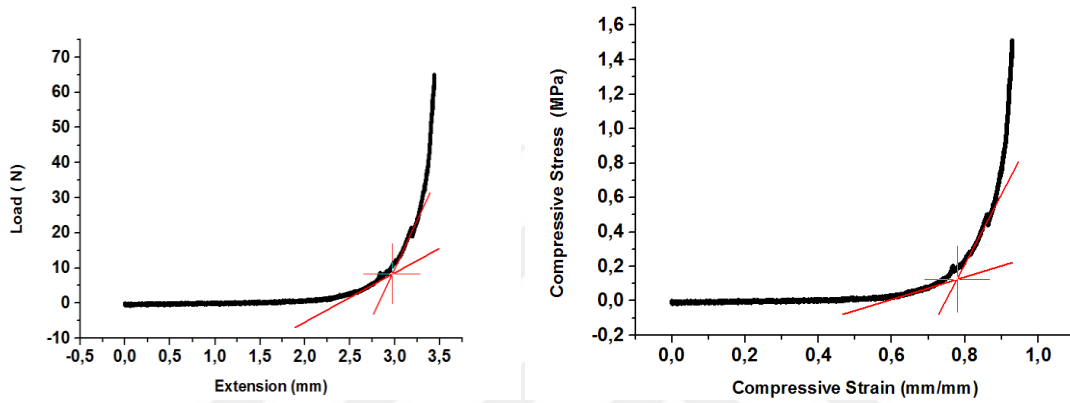
4.5.5. Mekanik Test

Kapsüllerin elastik modüllerini araştırmak için mekanik sıkıştırma testi uygulandı. Kapsüllerin basınç dayanımları, kapsüller ezilinceye kadar yük uygulanarak gerilme-gerinim eğrisinden belirlendi. Kapsüllerin elastik modülleri EK-3 te belirtilerek uzama (mm) ile kuvvetten oluşturulan gerilim-gerinim eğrisinin doğrusal kısmının eğiminden sırasıyla 8,9 N olarak ölçüldü (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Makrokapsüllerin mekanik dayanıklılığını test etmek için kullanılan İnstron basma cihazı. Alt ve üst çeneden oluşan cihazda kapsül alt çeneye yerleştirilmiştir.

Yapılan analiz sonrasında akma noktası belirlenen örneğin, bu noktadan sonra elastik deformasyon bölgesinden çıkıp plastik deformasyon bölgesine geçtiği tespit edildi. Artık bu noktadan sonra uygulanan yükü kaldırdığımızda dahi kapsül eski şekline geri dönmeyeceği belirlendi. Hücreli ve boş kapsülün şekil değiştirme yüzdeleri EK-2 de belirtilmiştir. Kapsül yüksekliği başlangıçta 4,63 mm olup plastik deformasyona geçtiği noktadaki yüksekliği 1,20 mm ölçüldü. Bu plastik deformasyon noktası 8,9 N kuvvet olarak belirlendi (Şekil 4.19). Kapsülün 8,9 N luk kuvvetten sonra plastik deformasyon noktasına ulaşmış kalıcı şekil değişikliğine uğradığı tespit edildi.



Şekil 4.19. Kapsüllerin mekanik test uygulama sonrası uzama ve basınç gerinimi grafikleri. Uzama grafiği, kapsülün 8,9 N luk kuvvet sonrasında plastik deformasyona geçiş bölgesi

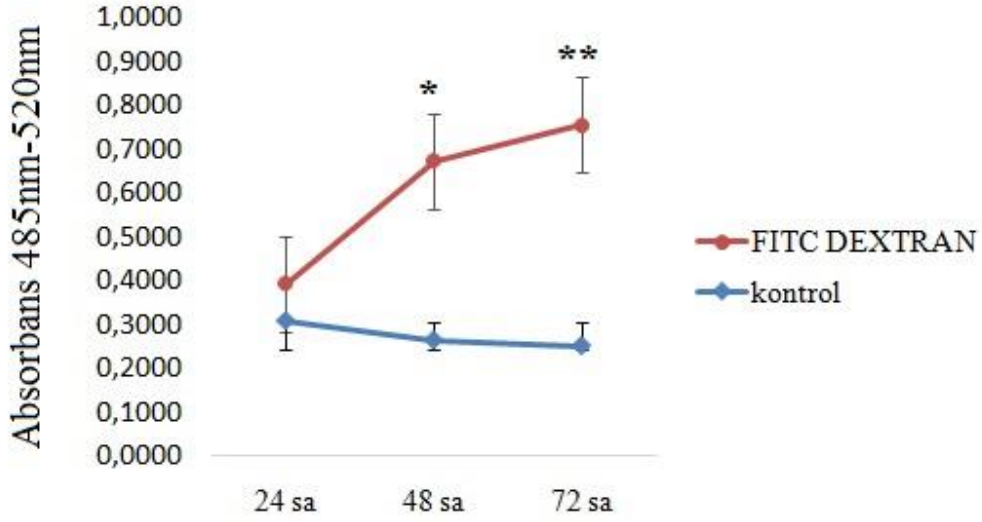
4.5.6. FITC DEXTRAN

Kapsüllerin elde edilen por çaplarının immun sistem hücrelerinin içeri girmesine izin vermemesi, aynı zamanda kapsül içerisindeki beta hücrelerinden sentezlenen insülin proteininin dolaşıma katılmak üzere kapsül içerisinden dışarı çıkmasını test etmek için FITC DEXTRAN geçirgenlik deneyi uygulandı. İçinde hücre tabakası ve besiyeri bulunan kapsüller kuyucuklarda 24, 48 ve 72 sa boyunca bekletildi. Süre bitiminde kapsül içinden alınan besiyeri örnekleri 96 kuyucuklu plakaya konarak deney boyunca 24, 48 ve 72. saatlerde örneklerden $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$ dalga boylarında mikropilaka okuyucuda okuma yapıldı. 4 kDA ve 150 kDA moleküler ağırlığında olmak üzere iki farklı FITC DEXTRAN kullanıldı. 4 kDA ile insülin proteininin kapsül porlarından dışarı çıkıp çıkmayacağı tespit edildi. 150 kDA ise immun sistem hücreleri, sitokin ve antikorların pordan içeriye girip girmemesi açısından analiz edildi.

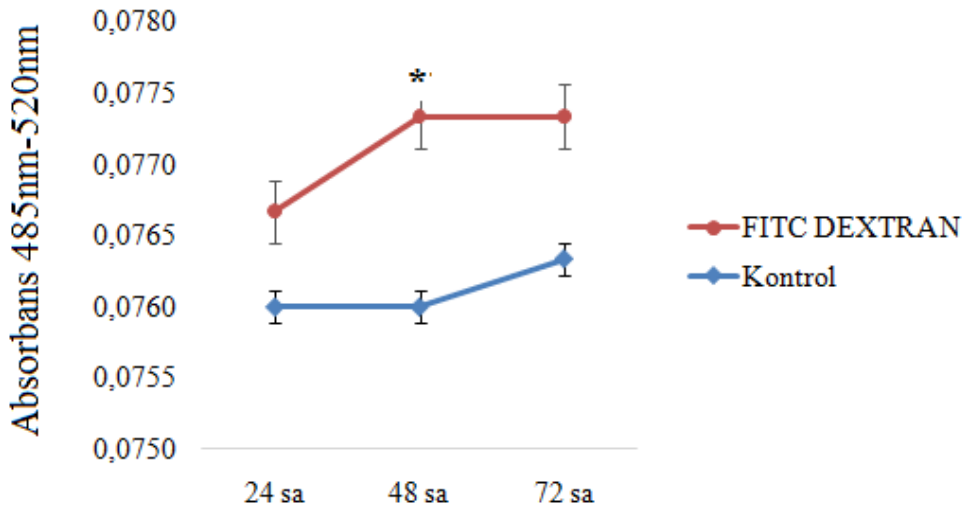
4kDA FITC DEXTRAN 24, 48, 72 saat süreler sonunda absorbans değerinin giderek arttığı ve böylece dextranın kapsülden içeriye girdiği tespit edildi (Şekil 4.20).

150 kDA absorbans değerinde anlamlı bir artış olmadığı ve böylece dextranın kapsül porlarından içeriye giremediği tespit edildi (Şekil 4.21).

4 kDA ve 150 kDA FITC DEXTRAN ile inkübe edilmiş aljinat makrokapsülün stereo mikroskop görüntülerinde 2 gruptaki hücreler ve kapzül malzemesi aljinat gözlemlendi. 4 kDA grubundaki kapsüllerin FITC dextranın kapsül içine girmesiyle daha çok boyandığı tespit edildi (Şekil 4.22). Aynı zamanda kapsüller konfokal mikroskopta incelendi ve ışımaya verdiği tespit edildi (4.23).

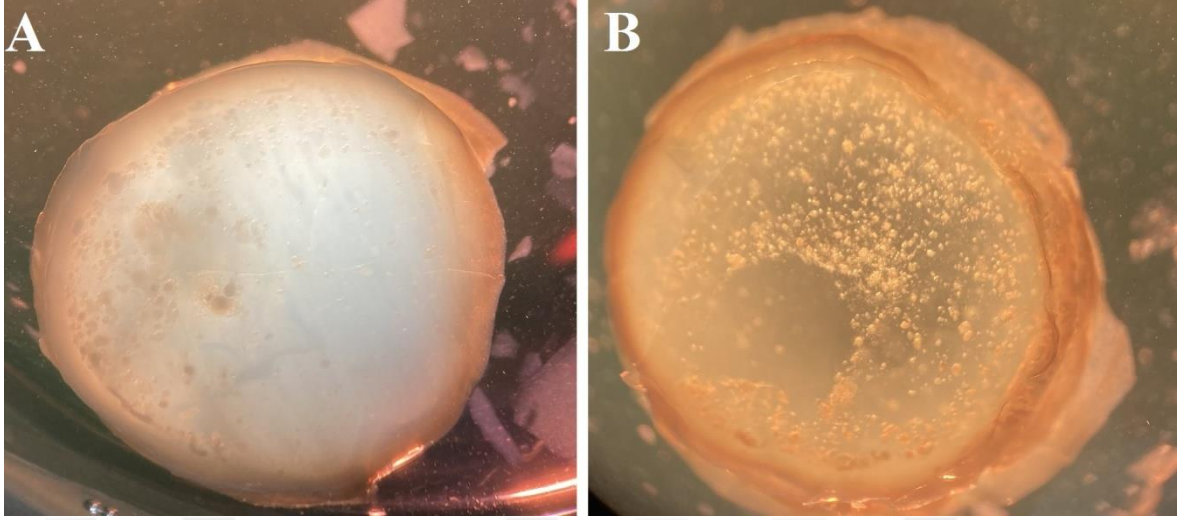


Şekil 4.20. 4kDA FITC DEXTRAN için mikropilaka okuyucu daki absorbans değerleri. 48. ve 72. Saatlerde absorbans değeri artarak dextranın porlardan içeriye girdiği anlamlı olarak değerlendirildi ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

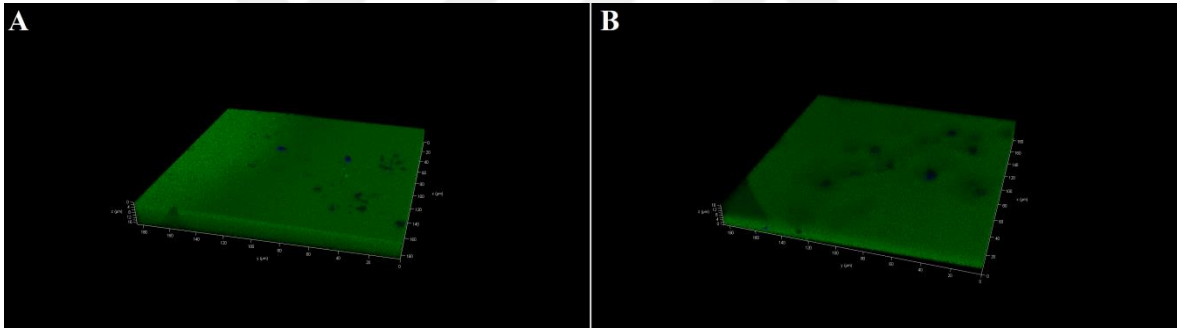


Şekil 4.21. 150 kDA FITC DEXTRAN için mikropilaka okuyucu daki absorbans değerleri. 48. ve 72. Saatlerde absorbans değerinde anlamlı bir artış gözlenmedi böylece dextranın

porlardan içeriye giremediği tespit edildi ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$).



Şekil 4.22. 4 kDA ve 150 kDA FITC DEXTRAN ile inkübe edilmiş aljinat makrokapsülün stereo mikroskop görünümleri. **A:** 150 kDA **B:** 4 kDA



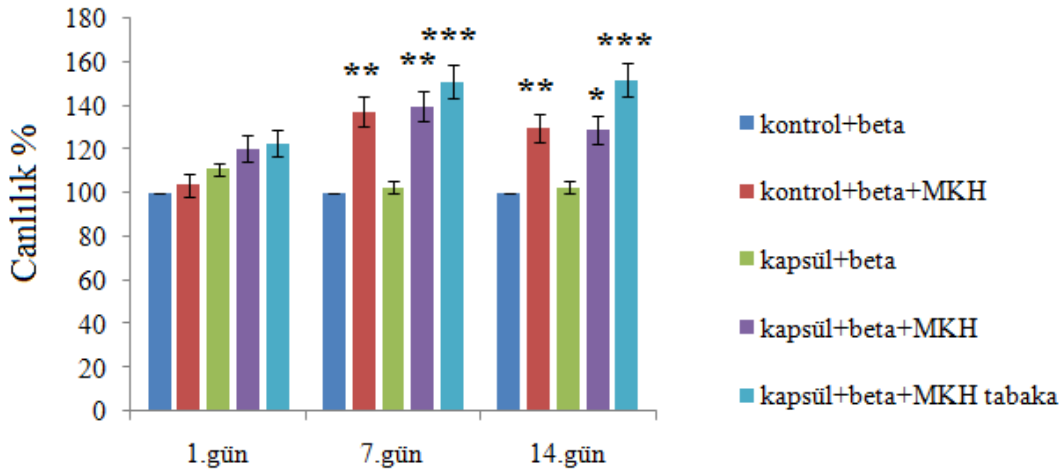
Şekil 4.23. kDA ve 150 kDA FITC DEXTRAN ile inkübe edilmiş makrokapsüllerin konfokal mikroskop görünümleri. Aljinat makrokapsül içerisinde hücre tabakası bulunmaktadır. Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi. **A:** 150 kDA **B:** 4 kDA

4.6. Aljinat Makrokapsülün Hücreler Üzerindeki Etkisinin Analiz Edilmesi

4.6.1. WST-1 Testi

Kültür kabı içerisinde bulunan kolesteatom dokusuna %10 WST-1 eklenerek 2 saat inkübe edilmiştir. (%5 CO₂, 37°C de). İnkübasyon sonrası medyum içerikleri toplanarak absorbands değerleri 450 nm’de monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (VersaMax, Molecular Device, USA) tespit edildi. Tüm testler üç kez tekrarlandı. Okuma sonrası elde edilen veriler student’t testi ile analiz edildi. Kapsül içindeki hücre tabakasının canlılığı 14 gün boyunca belirli günlerde test edildi (Şekil 4.24). Kapsülün sahip olduğu porlardan besin ve oksijen alımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği in vitroda belirlendi. Hücreli tüm deney

gruplarında aynı sayıda hücreler ile deney tasarlandı. Kontrol+beta, kontrol+ beta+MKH, kapsül+beta, kapsül+beta+MKH, kapsül+beta+MKH tabaka grupları kültürün 1, 7 ve 14. günlerinde WST-1 testine alındı. Gruplar 1,7 ve 14. gün için karşılaştırmalı olarak incelendi. Deneyin 7. ve 14. günlerinde canlılık ve proliferasyonda kontrol+ beta+MKH, kapsül+beta+MKH ve kapsül+beta+MKH tabaka grubunda anlamlı bir artış tespit edildi (** $P<0,01$, *** $P<0,001$). Böylelikle MKH bulunan gruplarda canlılık ve proliferasyon artışının MKH bulunmayanlara kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi. Farklı olarak kapsül+beta+MKH tabaka grubunda diğer tüm gruplara kıyasla daha fazla canlılık oranında artış gözlemlendi. Kontrol+beta ve kapsül+beta grubunda yapılan istatistiksel analize anlamlı bir değişim gözlenmedi. Kontrol ve kapsüllü grupların tamamında ise hücreler canlı ve proliferatif olarak ölçüldü. Kapsül içine besin ve oksijen girişi porlar aracılığı ile büyük ölçüde sağlandığı ve böylece kapsüllenmiş hücrelerin de canlı kalabildiği tespit edildi. ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

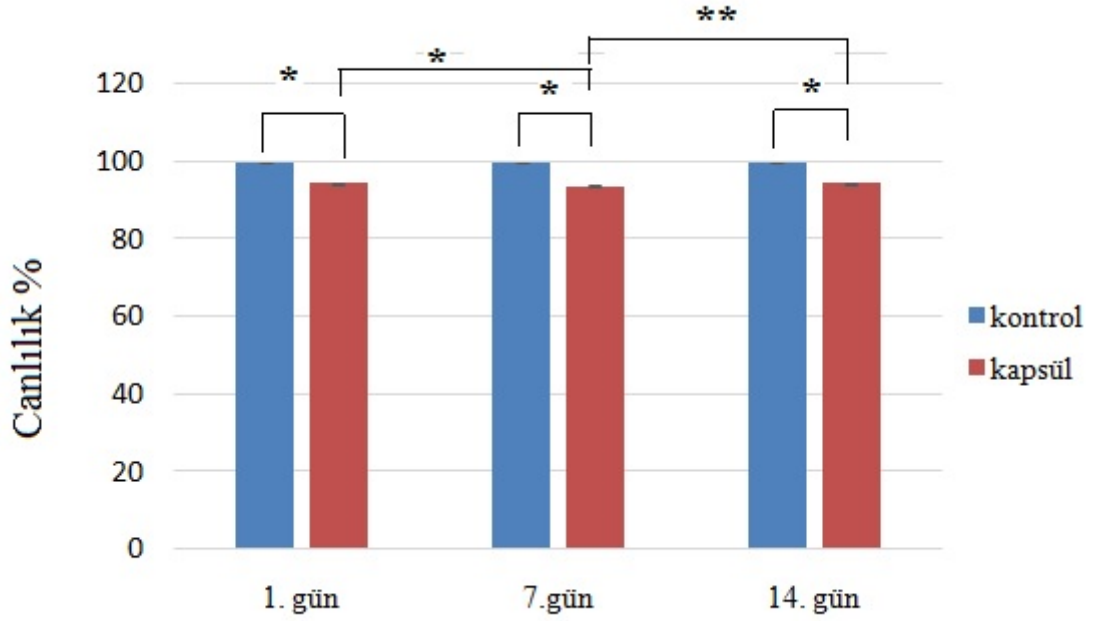


Şekil 4.24. Kapsül içinde bulunan hücreler kapsül geçirgenliği sayesinde içinde bulunduğu besiyerinden besin ve oksijen alımını tıpkı kapsülsüz gruplardaki gibi başarılı bir şekilde gerçekleştirerek canlılığını devam ettirdi. Tüm gruplardaki 7 ve 14. günler karşılaştırıldı. ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

4.6.2. Sitotoksosite Analizi

Makrokapsül örneklerinin hücrelere toksik etkinin olup olmadığının belirlenmesi için LDH (laktat dehidrogenaz) testi toksisite oranları (%) belirlendi. Örnekler üzerine reaksiyon karışımı eklenip 30 dk. inkübasyondan sonra, stop solüsyonu eklenip 450nm dalga

boyunda mikroplaka okuyucuda okutuldu. Örnekler 1, 7 ve 14 günlerde yapılan testler sonucunda Canlılık yüzdesi kapsül grubunda 1. günde % 94,61, 7. günde % 93,75 ve 14.günde % 94,43 olarak hesaplandı. Gruplar 1, 7 ve 14. günlerde kendi aralarında kıyaslandı (Şekil 4.25).Sonucunda canlılık oranında $*P<0,05$ olarak anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi. 1. günden 7. güne kapsül grubunda $*P<0,05$, 7. günden 14. güne $**P<0,01$ olarak analzi edildi. Kapsül malzemesi olan aljinatın hücreler üzerine toksik etkisinin fazla olmadığı belirlendi.

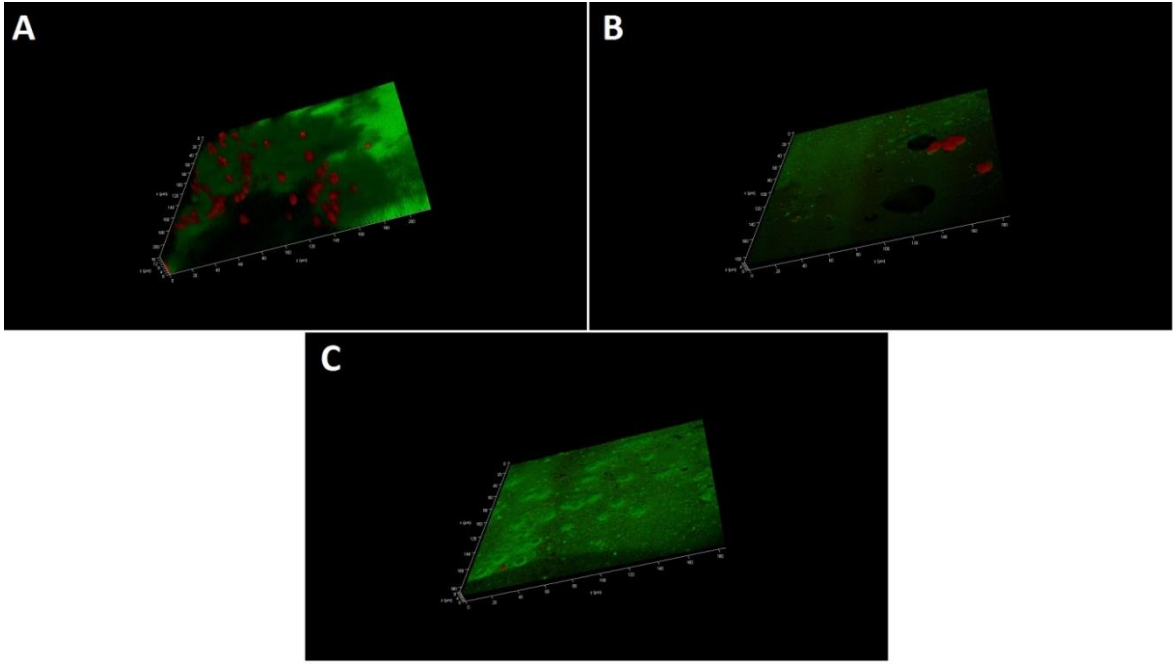


Şekil 4.25. Alginat makrokapsülünün hücre tabakası üzerindeki sitotoksik etkileri. Gruplar 1, 7 ve 14. günlerde kendi aralarında kıyaslandı. ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$).

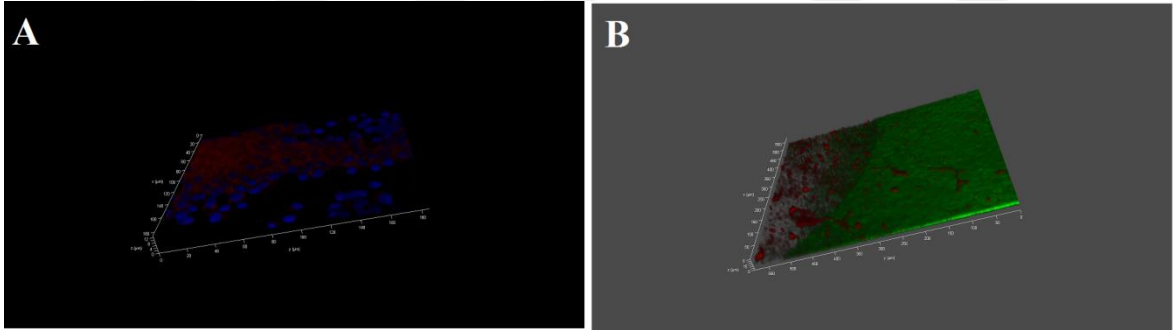
4.6.3. Live/Dead Testi

Kapsül içindeki hücre tabakasının canlılık düzeyini belirlemek için WST-1 testine ek kültürün olarak 7. gününde live/dead (thermo fisher) test uygulandı. Kapsül mekanik olarak ikiye ayrılıp tabaka içerisinden çıkarıldı ve live/dead boyası ile inkübe edildi. Süre bitiminde tabaka lamın üzerine konfokal mikroskopta (Leica) inceleme yapıldı. kapsül+beta, kapsül+beta+MKH, kapsül+beta+MKH tabakagrupları kendi içinde karşılaştırıldığında kontrol+beta grubunda MKH li gruplara kıyasla daha fazla hücrede kırmızı renk boyanma gözlemlendi. kapsül+beta+MKH, grubunda belirli bölgelerde ölü hücrelere rastlandı. Canlı hücre alanı ölü hücre alanına kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi. kapsül+beta+ MKH tabaka grubunda en az sayıda hücrede kırmızı boyanma gözlemlendi (Şekil 4.26). Bu gruptaki hücrelerin canlılıkları daha yüksek olarak tespit edildi. kontrol+beta grubunda ölü hücrelerin

görüldüğü ve kontrol+beta+MKH grubunda da ölü ve canlı hücrelerin görüldüğü tespit edildi (Şekil 4.27).



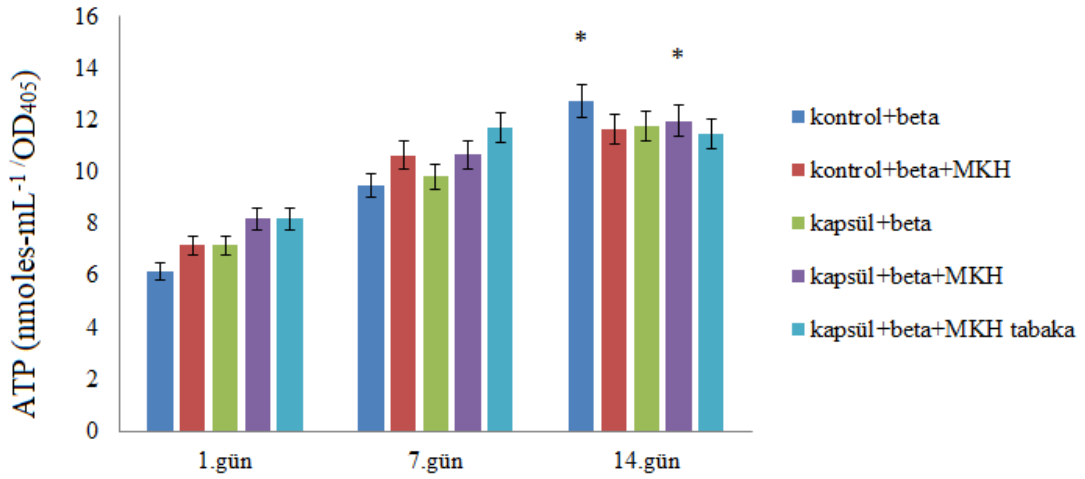
Şekil 4.26. A: kapsül+beta, **B:** kapsül+beta+MKH, **C:** kapsül+beta+ MKH tabaka gubunda live/dead boyama görüntüleri. Ölü hücreler kırmızı renk görüntülendi. Canlı hücreler ise yeşil renk ışımaya verdi.



Şekil 4.27. A: kontrol+beta+MKH, **B:** kontrol beta gubunda live/dead boyama görüntüleri. Ölü hücreler kırmızı renk görüntülendi. Canlı hücreler ise yeşil renk ışımaya verdi.

4.6.4. Metabolik Aktivite

Metabolik aktivite, ATP Syntase Specific Activity Microplate Assay Kit (Abcam) kullanılarak belirlendi. Üretici tavsiyelerini takiben kapsülleme sonrası 1, 7 ve 14. günlerde ATP sentez testi için, kültürdeki makrokapsüllerin içinde bulunduğu süpernatantlar toplandı ve 96 kuyucuklu bir plaka içinde yerleştirildi. Absorbans, 405 nm'de Versamax plaka okuyucuda okundu. Her durum için üç bağımsız test analiz edildi ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$). Kontrol grupları 1, 7 ve 14. günlerde kapsül grupları ile karşılaştırmalı olarak incelendi (Şekil 4.28). Deneyin ilerleyen günlerinde kapsüllemiş hürelere kapsül por çapından invitro ortamdaki besin ve oksijen girişinin gerçekleşmesi sayesinde tıpkı kontrol (kapsülsüz) gruplardaki gibi metabolik aktivitelerden olan canlılık ve fonksiyonlatını devam ettirebildikleri tespit edildi.



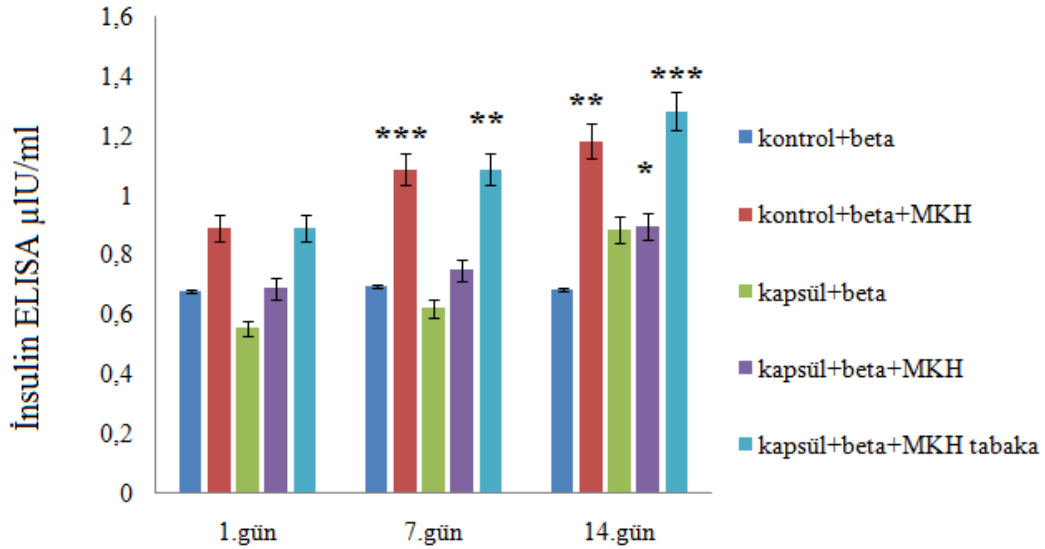
Şekil 4.28. İn vitro deney gruplarındaki hücrelerin kültür boyunca kapsüllü ve kapsülsüz ortamda ölçülen ATP sentez değerleri. ($n=3$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$).

4.6.5. İn vitro İnsülin Salgılaşma Deneyi

Beta ve MKH tabakasının canlılığının ve işlevinin korunması, makrokapsül tasarımımızın merkezi bir özelliğidir. Bu nedenle kültürde 14 gün boyunca kapsüllemiş beta+MKH tabakasının işlevini sürdürüp sürdürmediğini değerlendirildi.

Kapsülün sahip olduğu porlardan besin ve oksijen alımının başarılı bir şekilde gerçekleştiği in vitroda belirlendi. Hücreli tüm deney gruplarında aynı sayıda hücreler ile

deney tasarlandı. Kapsülsüz beta, kapsülsüz beta+MKH, kapsül+beta, kapsül+beta+MKH, kapsül+beta+MKH tabaka grupları kültürün 1, 7 ve 14. günlerinde insulin salgılama testine alındı. Gruplar 1,7 ve 14. gün için karşılaştırmalı olarak incelendi (Şekil 4.29). Deneyin 7. ve 14. günlerinde değişen glukoz miktarlarına cevaben insülin salınımında, kapsülsüz beta+MKH ve kapsül+beta+MKH tabaka grubunda anlamlı bir artış tespit edildi (** $P<0,01$, *** $P<0,001$). Böylelikle MKH bulunan insulin salgısı artışının MKH bulunmayanlara kıyasla daha fazla olduğu tespit edildi. Kapsülsüz ve kapsüllü grupların tamamında hücrede insulin üretimi devam ettiği belirlendi. Bu insülin proteininin kapsül porlarından çıkıp besiyerine geçmesi por boyutunun istediğimiz ölçüde olduğunun göstergesi olarak tespit edildi. Kapsül içine besin ve oksijen girişi porlar aracılığı ile büyük ölçüde sağlandığı ve böylece kapsüllenmiş hücrelerin de canlı kalabildiği buna bağlı olarak değişen glukoz konsantrasyonlarına maruz kalsalar dahi yanıt olarak insulin salgısı yapabildikleri tespit edildi. ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).



Şekil 4.29. Besiyerine eklenen glukozun çeşitli konsantrasyonlarına hücrelerin insülin salgılayarak ve verdiği yanıt karşılaştırmalı incelendi. ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

4.7. Nakil Edilen Kapsülün Terapotik Etkisinin Değerlendirilmesi

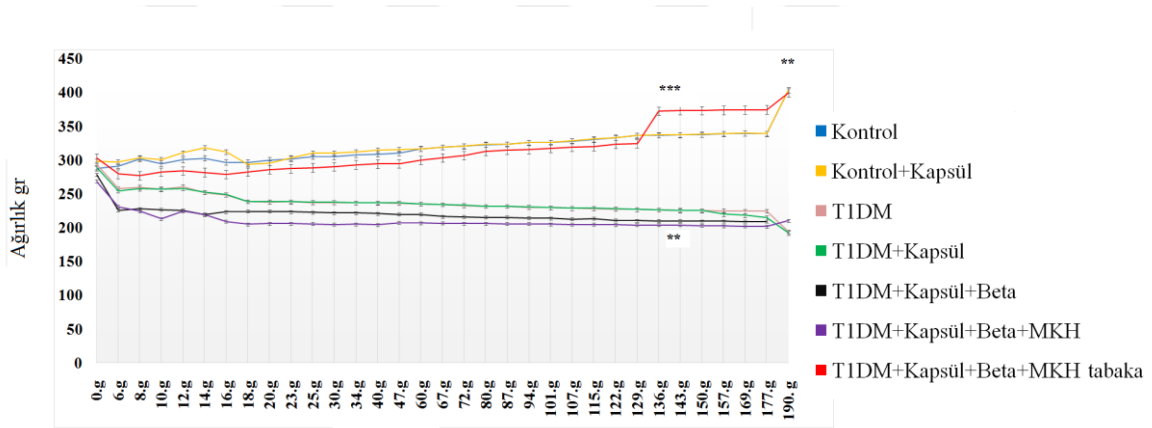
4.7.1. Nakil Sonrası Sıçanların Ağırlık Ölçümü

Sıçanların nakilden sonra 2. günden itibaren ağırlıkları ölçüldü. 190 gün boyunca gün aşırı ağırlık ölçümü yapıldı. Tartım sonucunda diyabete ve uygulanan tedaviye bağlı

olarak değişim olup olmadığı studen't testi ile analiz edildi (Şekil 4.30).

Kontrol, kontrol kapsül ve T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubunda ilerleyen günlerde beslenmeye bağlı olarak ağırlıkta düzenli artış görüldü. 136. günde T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubunda ağırlık artışı hızlandı ve $***P<0,001$ olduğundan anlamlı bir artış olarak tespit edildi. T1DM+Kapsül+Beta ve T1DM+Kapsül+Beta+MKH gruplarında ise tedaviye beklenen yanıt gelişmemesi sebebiyle kan şekeri normale dönmediği için beslenmeye rağmen ağırlıklarında azalma görüldü. 136. günde T1DM+Kapsül+Beta+MKH grubunda $***P<0,001$ anlamlı bir azalma görüldü.

T1DM ve T1DM+ Kapsül grubunda diyabete bağlı olarak ilerleyen günlerde deneyin son gününe kadar ağırlıklarda azalma devam etti fakat istatistiksel olarak anlam ifade etmediği tespit edildi.



Şekil 4.30. Tüm gruplarda 190 gün boyunca günlere göre ağırlık değişimi. ($n=6$, ortalama \pm SS, $*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$). Subkutan bölgeye nakil sonrasında gruplar arasında tedaviye cevap verenlerde ağırlık artışı görülmekte. T1DM nin tedavi edilmesi gruplarda ise ağırlık kaybı görülmektedir.

4.7.2. Nakil Sonrası Sıçanların Tokluk Kan Şekeri Ölçümü

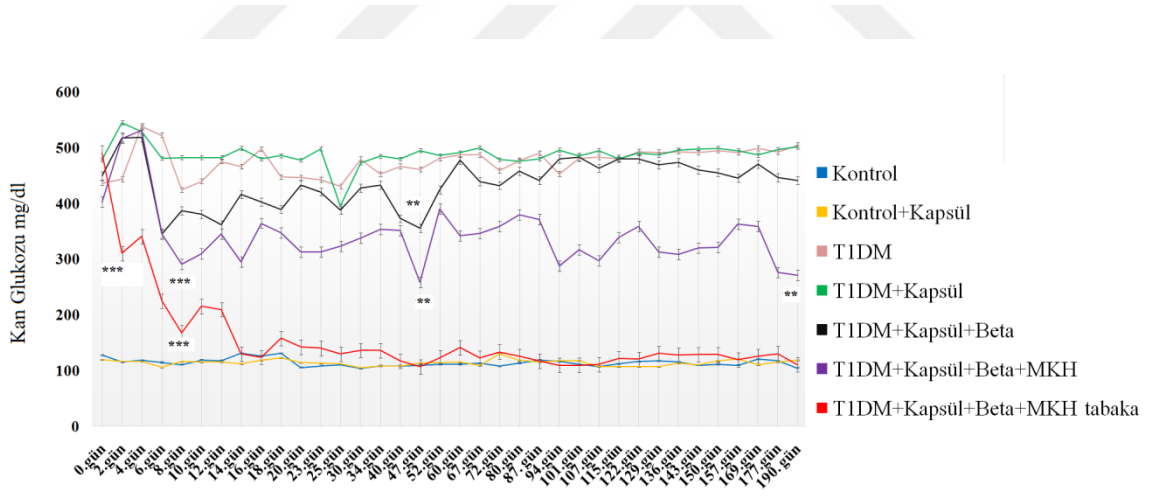
STZ enjeksiyonu yapıldıktan 3 gün sonra beta hücre hasarına bağlı olarak kan şekerinin yükseldiği kuyruk veninden alınan kan örneğinin glukometre cihazı ile ölçülmesi sonucu tespit edildi. Tokluk kan şekeri 250 mg/dl'nin üzerinde olanlarda STZ'ye bağlı beta hücre hasarının sonucu diyabet olduğu kabul edildi. Tüm deney grupları T1DM ve kontrol (sağlıklı) grupları ile karşılaştırıldı (Şekil 4.31).

Sıçanlara yapılan nakil sonrası 2.günden itibaren tüm gruplardan 190 gün boyunca

kuyruk veninden alınan kan örnekleri tokluk kan şekeri glukometre cihazı ile ölçüldü. T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubunda 2. günde belirgin bir şekilde 490 mg/dl den 310 mg/dl' ye düştü. İstatiksel açıdan değerlendirildiğinde $***P<0,001$ olduğundan anlamlı kabul edildi. Bu grubun kan şekeri 6. günde 225 mg/dl 8. günde ise 168 mg/dl ölçülerek normoglisemi değerine ulaşıldı. 14. Günde ise bu değer 129 mg/dl ölçüldü ve istatiksel açıdan analiz edildiğinde $***P<0,001$ olarak anlamlı kabul edildi. İlerleyen 190 gün boyunca yapılan rutin ölçümlerde kan u normoglisemik değerlerde seyretti.

T1DM+Kapsül+Beta+MKH grubunda ise 2. günde 402 mg/dl olarak ölçülen kan şekeri 4. günde 531 mg/dl ye çıkmış olup 8. günde 291 mg/dl ($***P<0,001$) ölçülmüştür. 190 gün sonunda en fazla 271 mg/dl ye ($***P<0,001$) düştüğü tespit edilmiştir. Bu grupta istenilen normoglisemi hedefine ulaşılamamıştır.

T1DM+Kapsül+Beta grubu 2. günde 517 mg/dl ölçülmüş olup 190 gün boyunca kan şekeri 400-450 mg/dl aralığında seyretmiştir. T1DM grubu ile benzer şekilde kan değeri olup normoglisemi sağlanamamıştır.



Şekil 4.31. Nakil sonrasında 190 gün boyunca ölçülen kan glukoz değerleri. Nakilden sonra özellikle T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabakası grubunda belirgin bir şekilde 2. günde kan u düşüşe geçmiştir. ($***P<0,001$). Diğer nakil yapılan deney gruplarında ise normoglisemiye ulaşılmamıştır.

4.7.3. IPGTT (İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi) Uygulanması

4.7.3.1. IPGTT sonrası kan şekeri düzeyi

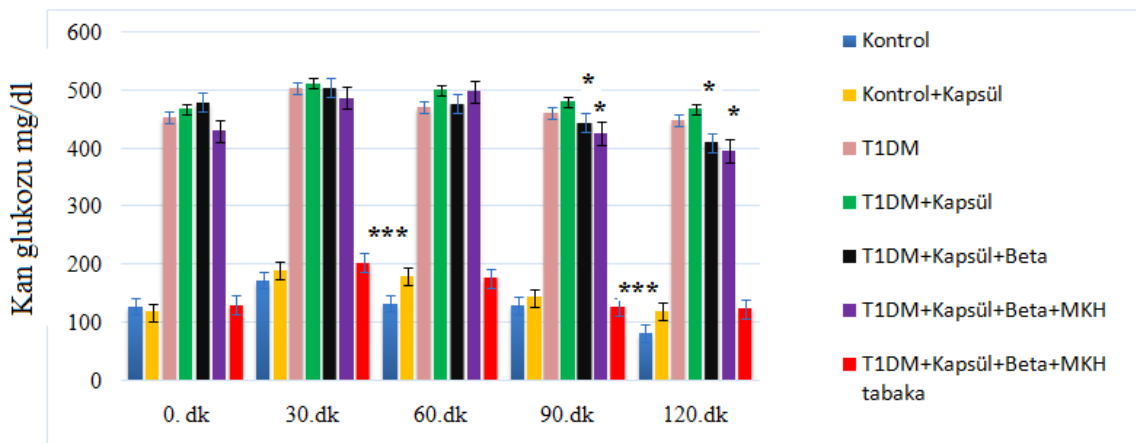
Diyabetik farelerde nakledilen adacık hücre tabakalarının glukoz yanıt kabiliyetini değerlendirmek için nakil sonrası 2, 16 ve 30. günlerde aç olan sıçanlara intraperitoneal olarak

glukoz yüklemesi sonrasında 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kuyruk veninden alınan kandan glukometri cihazı ile yapılan ölçümlerin karşılaştırmalı analizi yapıldı (Şekil 4.32).

T1DM+Kapsül+Beta+MKH, T1DM+Kapsül+Beta grubunda hücre nakli yapılmamış diyabetik sıçanlarda olduğu gibi, glukoz uygulamasından sonra kan şekeri seviyesi sürekli olarak yüksek kaldı (>400 mg/dl).

T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubunda ise, kan şekeri seviyesi glukoz uygulamasından 30 dakika sonra maksimuma (198 mg/dL) ulaştı ve daha sonra yavaş yavaş yaklaşık olarak normal seviyelere düştü (127 mg/dl). 120. dk da kontrol (sağlıklı) grubu sıçanlarınkine benzer bir değer gösterdi ve bu da T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubuna nakledilen beta- MKH hücre tabakalarının fonksiyonel olduğunu ve glukoz uygulamasına yanıt olarak normoglisemi elde etmek için yeterli miktarda insülin salgılayabildiğini gösterdi.

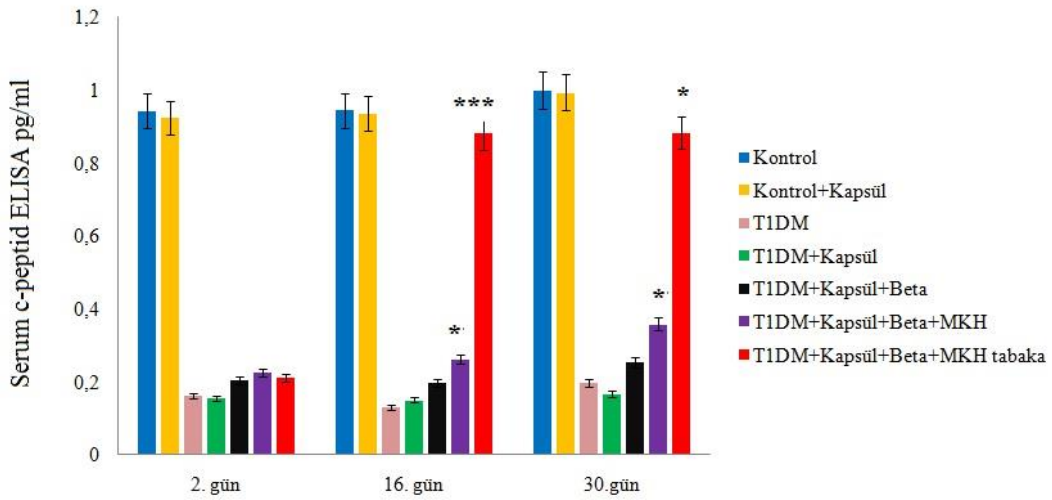
Gruplar ölçülen dakikalarda kontrol grubuna göre karşılaştırılması yapıldı. 90. dakikada T1DM+Kapsül+Beta, T1DM+Kapsül+Beta+MKH, T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubu arasındaki karşılaştırmalı analizde * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ olduğundan anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 4.32. Kapsül naklinden sonra IPGTT sonuçları. Sıçanlara 30.günde yapılan intraperitoneal glukoz yüklemesi sonrasında 120. dakikaya kadar izlendi. Kuyruk veninden alına kan örneği glukometre ile 30, 60, 90, 120. dakikalarda ölçüldü. Veriler student't test ile analiz edildi ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

4.7.3.2. *IPGTT sonrası serum C-peptid düzeyi*

Glukoz yükleme testinden sonra yapılan analizlerde 16.ve 30. günlerde T1DM+Kapsül+Beta, (0,202 pg/ml T1DM+Kapsül+Beta+MKH (0,225 pg/ml, grubundaki sıçan C-peptid seviyeleri, T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka (0,883 pg/ml) grubununkinden anlamlı derecede düşüktü. Bu sonuçlar, MKH nin tabaka halinde olduğu gruplarda, insülin sekresyonu ve daha sonra normogliseminin elde edilmesi açısından yalnız beta hücresi ve tabaka halinde olmayan (dağınık) beta-MKH gruplarından çok daha etkili olduğunu açıkça gösterdi (Şekil 4.33).

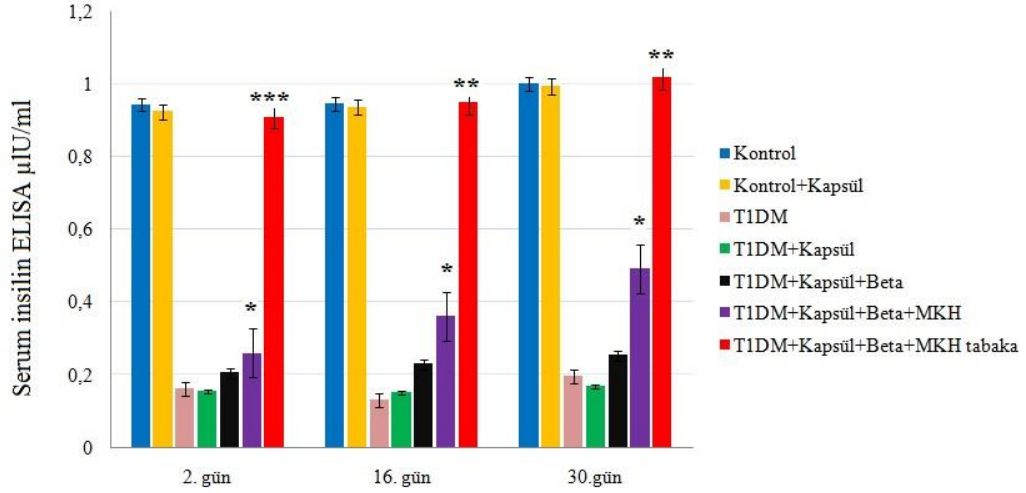


Şekil 4.33. Kapsül naklinden sonra diyabetik sıçanlarda c-peptid proteininin serum konsantrasyonları. Nakilden sonra 2, 16 ve 30. günlerde IPGTT uygulaması sonrasında kuyruk veninden toplanan kan örneklerinden ELISA yöntemi ile c-peptid proteini tayini gerçekleştirildi ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

4.7.3.3. *IPGTT sonrası serum İnsülin düzeyi*

Tedaviye yanıt vermeyen T1DM+Kapsül+Beta, T1DM+Kapsül+Beta+MKH ve T1DM gruplarında serum insülin konsantrasyonu 0,251 μ U/ml olarak düşüktü.

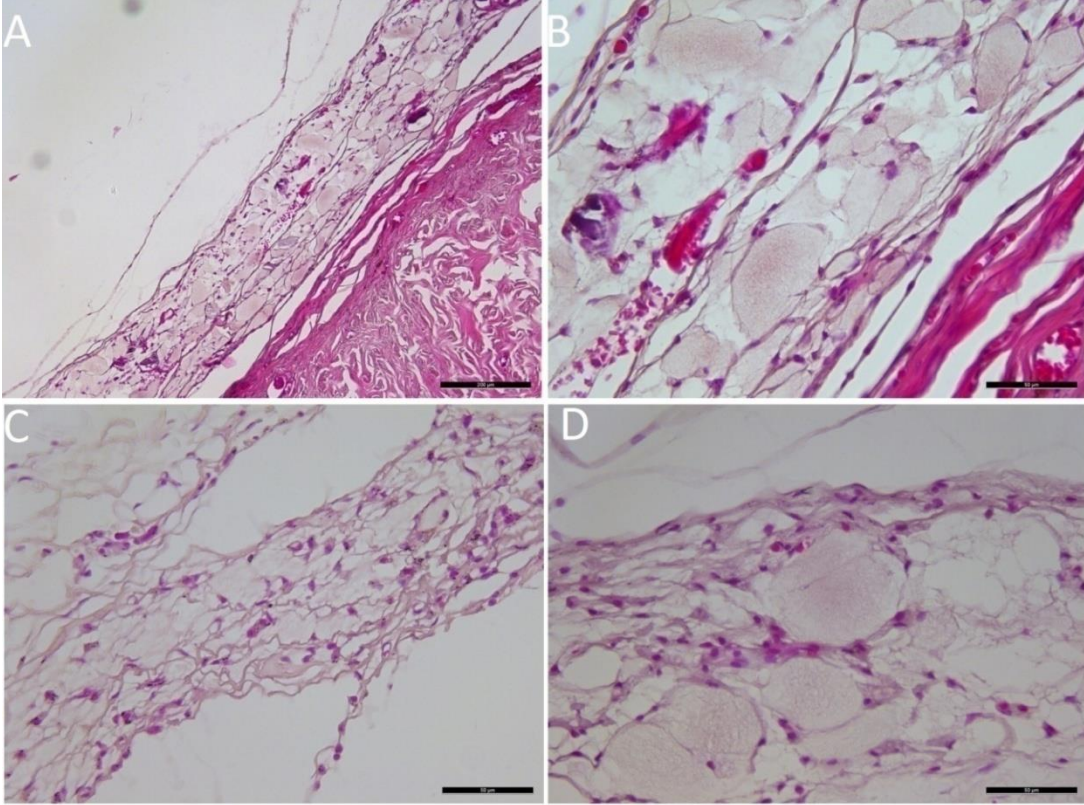
T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubunda, serum insülin seviyesi, nakilden sonra kontrol (sağlıklı) sıçanlarınkine (1,04 μ U/ml) benzer bir seviyeye anlamlı olarak yükseldi. 16. ve 30. günlerde serum insülin konsantrasyonları sırasıyla 1,06 μ U/ml ve 1,16 μ U/ml olarak tespit edildi. T1DM+Kapsül+Beta, T1DM+Kapsül+Beta+MKH grubunda ise, transplant öncesi seviyeye kıyasla serum insülin konsantrasyonunda bir değişiklik göstermedi. Bu gruplarda insülin seviyeleri transplantasyondan sonra en az 30 gün boyunca sürekli olarak düşük kaldı (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Kapsül naklinden sonra diyabetik sıçanlarda insülin proteininin serum konsantrasyonları. Nakilden sonra 2, 16 ve 30. günlerde IPGTT uygulaması sonrasında kuyruk veninden toplanan kan örneklerinden ELISA yöntemi ile insülin proteini tayini gerçekleştirildi ($n=3$, ortalama \pm SS, * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$).

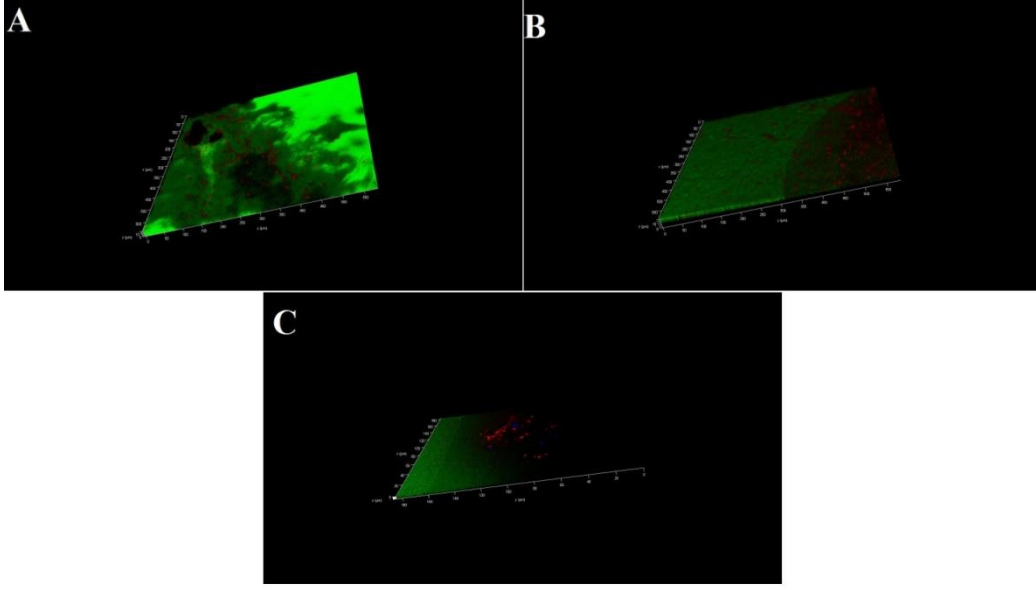
4.8. Histolojik ve İmmunohistokimyasal Analizler

60. günde nakil bölgesindeki subkutan dokular alındı. Deri greftleri kesilerek formalin içerisine konuldu. Hematoksilen-eosin boyaması sonucunda greftlerin içerisindeki hücrelerin görüntüleri ışık mikroskopunda incelendi. Beta ve MKH ler hematoksilen ile mavi renge boyandı. Aljınatın homojen yapısı ise eozin ile pembe renk görüntüldü (Şekil 4.35).

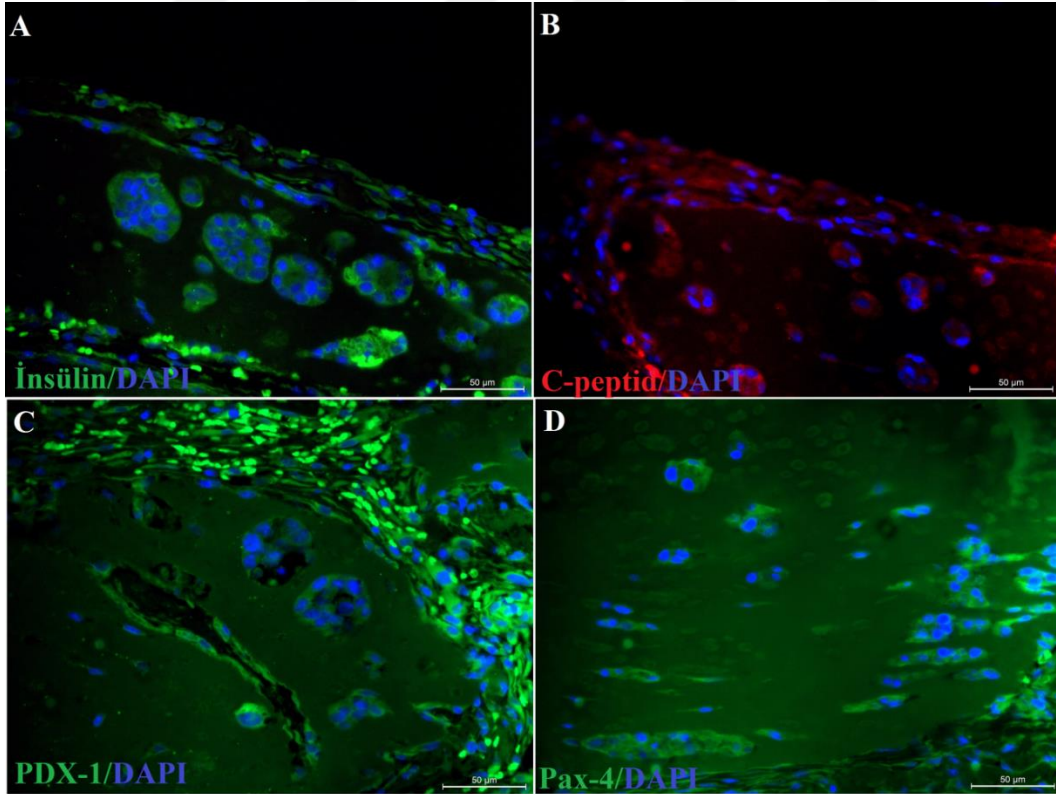


Şekil 4.35. Nakil bölgesindeki greftin H-E boyanmış görüntüsü. **A-B:** Nakledilen makrokapsül içindeki hücreleri daha büyük büyütmede görülmekte. **C-D:** Aljinat içerisindeki hematoksilen ile boyanmış beta ve MKH görülmekte. Homojen eozinofilik yapıda matrijel görülmektedir. (Ölçüm çubukları, A: 200 μm , B-C-D: 50 μm).

Nakil bölgesinden çıkarılan kapsül içerisinde hücre tabakasının canlılık durumunu incelemek için live/dead boyaması yapıldı. Bu dokular çıkarıldığı gibi fikse edilmeden laboratuvara ulaştırılıp direk live/dead boyası ile boyandı ve konfokal mikroskopta analiz edildi. T1DM+Kapsül+ Beta, T1DM+Kapsül+ Beta+MKH, T1DM+Kapsül+ Beta+MKH tabaka gruplarının her birinde ölü hücreler kırmızı, canlı hücreler ise yeşil görüntüledi. T1DM+Kapsül+ Beta+MKH tabaka grubunda diğer gruplara kıyasla daha az alanda ölü hücreye rastlandı (Şekil 4.36).



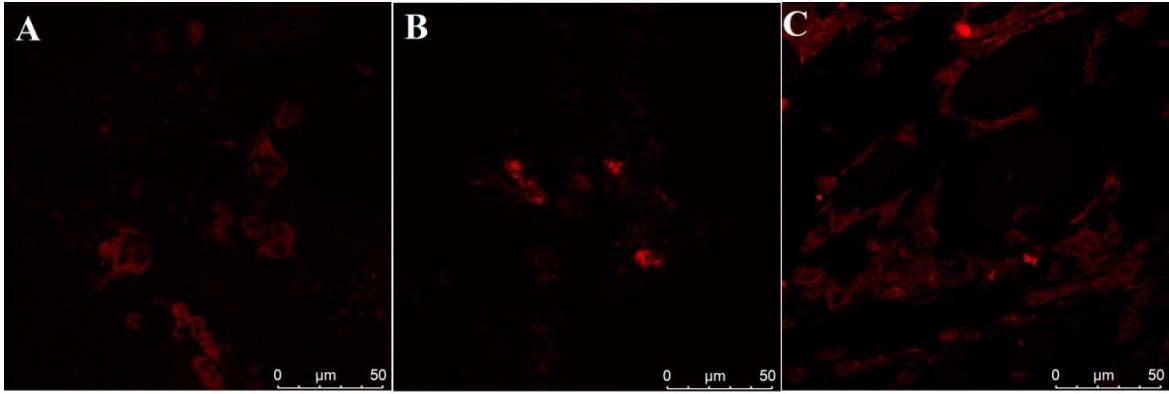
Şekil 4.36. Nakil bölgesindeki greft 60. günde çıkarılarak kapsül içindeki hücrelerin canlılıkları gözlemlendi. Konfokal mikroskop ile 3-boyutlu olarak incelendi ve görüntüler 3-boyutlu fotoğraflandı. Kırmızı ölü hücreler, Ethidium bromür ile boyandı. Yeşil canlı hücreler Calcein AM ile boyandı. **A:** T1DM+Kapsül+ Beta, **B:** T1DM+Kapsül+ Beta+MKH, **C:** T1DM+Kapsül+ Beta+MKH tabaka



Şekil 4.37. Kapsül içerisindeki beta hücrelerinin hücre immünflouresan antikor ile boyanma görüntüleri. **A:** İnsülin (Yeşil), **B:** C- peptid (Kırmızı) , **C:** PDX-1 (Yeşil), **D:** Pax-4 (Yeşil). Çekirdekler DAPI (Mavi) ile boyandı. (Ölçüm çubukları, 50 μm).

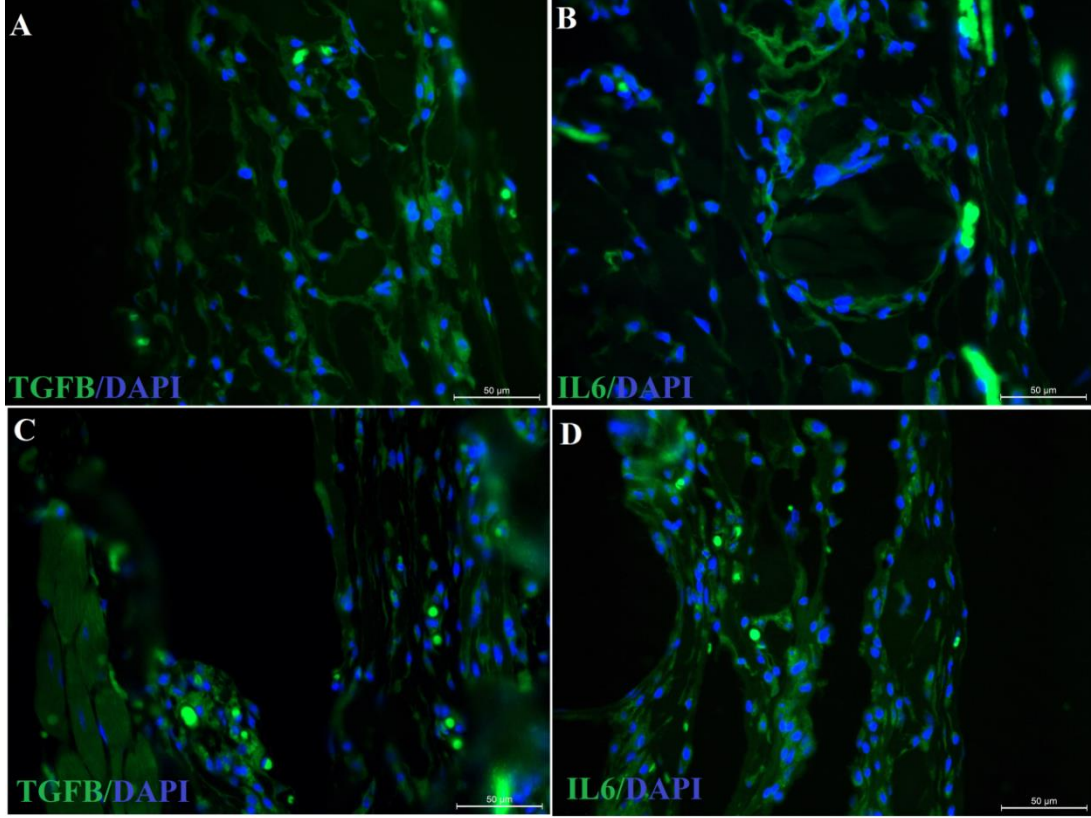
Aynı zamanda kapsül içindeki beta hücrelerinin 60 gün sonrasındaki durumunu gözlemek için insülin, c-peptid, PDX-1, Pax-4 boyaması yapıldı flouresan mikroskopta görüntülendi. İnsülin, c-peptid, Pax-4, PDX-1 pozitif boyandı (Şekil 4.37).

MKH ların beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği, grefti koruduğu ve hücreleri apoptozdan koruduğunu göstermek için T1DM+Kapsül+Beta grubunda, T1DM+Kapsül+Beta+MKH ve T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubuna kıyasla dahafazla alanda active-caspase pozitif alan görüldü (Şekil 4.38).

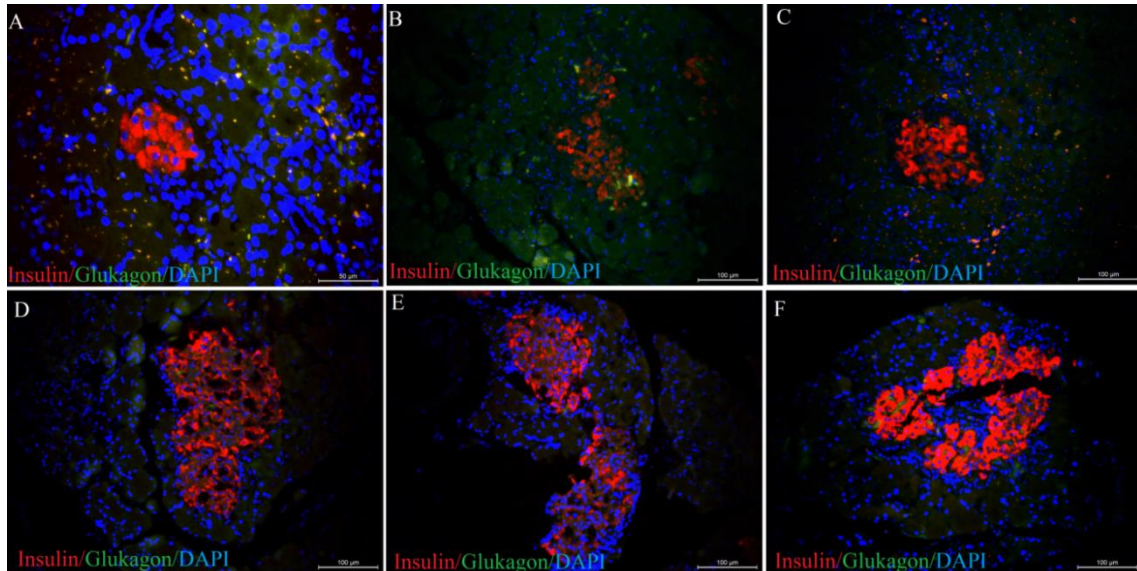


Şekil 4.38. Kapsül greftlerinde beta hücre apoptozunun (Active caspase) immünflouresan boyama ile gösterilmesi. **A:** T1DM+Kapsül+Beta **B:** T1DM+Kapsül+Beta+MKH ve **C:** T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubu. Active caspase (Kırmızı). (Ölçüm çubukları, 50 μm).

T1DM+Kapsül+Beta+MKH ve T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka grubunda MKH ların salgıladığı sitokin ve büyüme faktörlerinin nakil bölgesindeki beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği, grefti koruduğu ve hücrelerin apoptozunu engellediğini göstermek için TGF β ve IL-6 boyandı ve hücrelerde pozitif olduğu gösterildi (Şekil 4.39).



Şekil 4.39. TGFβ sitokini salgılayan MKH ların greft bölgesinde gösterilmesi. **A-B:** T1DM+Kapsül+Beta+MKH, TGFβ VE IL-6 (Yeşil) pozitif görülmektedir. **C-D:** T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka. TGFβ VE IL-6 (Yeşil) pozitif görülmektedir. Çekirdekler DAPI (mavi) ile işaretlendi (Ölçüm çubukları, 50 μ m).



Şekil 4.40. 6 Farklı deney grubunun pankreas adacıklarının IF boyama görüntüleri. **A:** T1DM+Kapsül+Beta **B:** T1DM+Kapsül+Beta+MKH ve **C:** T1DM+Kapsül+Beta+MKH tabaka **D:** Kontrol **E:** Kontrol+kapsül **F:** T1DM grubu. Glukagon (Yeşil) pozitif, İnsülin (Kırmızı) pozitif görülmekte. (Ölçüm çubukları, 50 μ m).

Nakilden sonra 60. günde deney gruplarından alınan pankreas dokularında IF boyama yapıldı ve kesitlerde adacık görüntüleri tarandı. Kontrol grubu adacığının boyutu diğer deney gruplarının adacık boyutu ile karşılaştırıldığında farklılıklar görüldü (Şekil 4.40).

5. TARTIŞMA

Tip 1 Diyabet pankreatik adacıklardaki beta hücrelerinin otoimmün yıkımının sonucudur ve diyabetik hastaların% 5-10'unu oluşturur. Kontrolü için ise hayat boyu sürecek insülin tedavisi gereklidir. Günümüzde alternatif tedavi şekilleri olarak ise sağlıklı bir pankreas veya pankreatik adacık nakli uygulanmaktadır. Fakat kadavra ve donör yetersizliği nedeniyle yapılacak bu tedaviler sınırlı kalmaktadır. Dışarıdan insülin bağımlılığının engellenerek hastaların yaşam kalitesi arttırmak için araştırmalar hücresele tedavilere doğru yönlendirilmiştir. Bu nedenle insülin salınımı yapacak hücreler için yeni kaynaklar veya insülin üreten hücreler tanımlanmalıdır. Çalışmamızda insülin üreten beta hücre hattı kullanılarak, adacık kullanılan çalışmalara (Obokata ve ark., 2011; Saito ve ark.2011; Hirabaru ve ark., 2015; Fujita ve ark., 2018) kıyasla daha kolay elde edilebilir bir hücre kaynağı tercih edilmiştir. Çünkü adacık için yeterli donör bulunsa dahi bunların izolasyonları sırasındaki zorluklar sebebiyle potansiyel bir kaynak olarak görülmemelidir.

Pankreas nakli 50 yılı aşkın bir süredir uygulanmaktadır ve son dönemlerde hastalarda böbrek yetmezliği geliştiği kayıt altına alınmıştır (Keanan ve ark., 2011) Deneyimli nakil merkezlerinde eş zamanlı böbrek ve pankreas nakli, 5 yılı aşkın bir süre boyunca %80'e varan insülin bağımsızlığı şansı sunabilmekteydi, ancak önemli cerrahi risk ve immünosupresyon gerekliliği sebebiyle günümüzde hem hastalar hem de hekimler için ciddi problemler teşkil etmektedir.

Adacık nakli ise, portal ven yoluyla karaciğere infüze edilen donör adacıkları ile daha düşük riskli bir prosedürdür. Ryan ve arkadaşlarının steroid içermeyen bir Edmonton Protokolü kullanarak çığır açan çalışması, adacık transplantasyonunun insülin bağımsızlığına ulaşabileceğini göstererek başarılı ve düşük riskli hücre bazlı bir terapi örneği sunmuştur (Ryan ve ark., 2005). Fakat, adacık nakli alıcılarının yalnızca bir kısmı kalıcı insülin bağımsızlığına ulaşmıştır. Ayrıca, bağımsızlığın baskılanmasıyla ilişkili morbidite ve donör adacık teminindeki kısıtlamalar, adacık naklinden yararlanabilecek insan sayısını kısıtlamaktadır. Şu anda, adacık nakli, şiddetli hipoglisemik ataklarına sahip olmayan küçük bir hasta grubunda kullanılmaktadır. İnsülin bağımsızlığı sağlanmasa bile, minimal adacık nakli fonksiyonu ile hayatı tehdit eden ciddi hipoglisemi önlenmektedir (Khrisnan ve ark., 2014)

Tip 1 diyabet için potansiyel bir tedavi olarak hücre tedavisi, büyük bir ilgi alanı olmaya devam etmektedir. İnsan embriyonik kök hücrelerinden fonksiyonel ve glukozaya duyarlı beta hücreleri veya canlı donörlerden indüklenmiş pluripotent kök hücreler üretmek

için protokoller üzerinde önemli çabalar harcanmıştır (Vegas ve ark., 2017). Bu yaklaşım fonksiyonel insülin salgılanmasına izin verecek, ancak immünosupresyon ihtiyacını ortadan kaldıracak yarı geçirgen bir cihazda kullanılarak sınırsız bir beta hücre kaynağı ile prelinik ve klinik çalışmalar için umut ışığı olmuştur. Bu doğrultuda yapılan çalışmalarda birkaç küçük molekülün, büyüme faktörlerinin, hormonların ve besinlerin orta düzeyde beta hücresi neogenezi ve proliferasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Mu ve ark., 2017). Yine bir diğer çalışmada insan embriyonik kök hücrelerinden insülin üreten beta benzeri hücreler elde edilerek sıçanlara nakli sonrasında 174 gün normoglisemi sağlanabilmiştir (Vegas ve ark., 2016). Fakat embriyonik kök hücrelerin kullanımının etik problemler nedeniyle sınırlı ve bazı ülkelerde yasak olması çalışma potansiyelini olumsuz etkilediği düşünülerek bizim çalışmamızda beta hücre hattı tercih edilmiştir. Adacık nakilleri ise geçmişten günümüze kadar pek çok çalışmada ilk akla gelen hücre olmakla birlikte günümüzde ve gelecekte önündeki donör kısıtlılığı gibi sebepler nedeniyle ne yazık ki potansiyel hücre kaynağı olarak görülmemelidir. Bununla birlikte, adacık nakillerinin hayvan deneylerinde de normoglisemi sağlamada fazla sayıda adacık gerekli olduğu için tekrarlanması zor olmaktadır.

Ayrıca adacık ve pankreas nakilleri allojenik yapıldığı için tedavi sonrasında doku reddi gibi immun problemler ortaya çıkarak hastalar yeniden insülin bağımlı hale gelmektedir. Adacıkların konakçının bağışıklık sistemi tepkisinden korunması için, hücre enkapsülasyonu umut verici bir alternatiftir. Bu enkapsülasyon teknolojisi, adacıkların gömülü olduğu bir matriksten oluşan fiziksel bir bariyer üzerine kuruludur ve kullanılan malzeme ve tasarlanan por boyutları küçük moleküllere (besin maddeleri, oksijen ve peptitler) geçirgen olup, ancak antikorlara ve bağışıklık hücrelerine geçirgen olmadığı pek çok çalışmada belirtilmiştir. (Strandve ark.,2017).

Pankreas adacıklarının aljinat kapsül kullanarak bağışıklık sisteminden korunması ilk olarak Lum ve Sun tarafından sıçanlarda gösterilmiştir (Lim ve ark.,1980). Hücre kapsüllemeye kullanılan çeşitli biyomalzemeler olmasına rağmen; doğal polimer olan aljinat makrokapsül uygulaması, hem daha fazla hücre içermesi hem bu hücreleri immun reaksiyonlardan koruyabilmesi, hem de canlı organizma ile yüksek biyo-uyumluluk göstererek greftin uzun süreli sağ kalımını sağlamıştır. Biz de çalışmamızda aljinat kullanarak istediğimiz por boyutlu kapsül dizayn edip, antikor ve immün sistem hücrelerinin giremediği, fakat besin, oksijen ve insülin giriş çıkışının başarılı bir şekilde gerçekleştiği kapsül yapısını in vitro ve in vivo analizlerde gözlemledik. İn vitroda kapsül içerisindeki hücrelerin canlılık ve fonksiyonu için uygulanan analizlerde, aljinatın hücreler bir toksik

etki olmadığı diğer çalışmalarda olduğu gibi kanıtlanmıştır (Weaver ve ark.,2018). Deri altına yerleştirdiğimiz kapsülün darbeye dayanıklı ve aynı zamanda biyouyumlu bir polimer olan aljinat seçilmiştir. Belirli bir kuvvet uygulama noktasına kadar esneyebilen, bırakıldığında ise çok kısa bir sürede eski haline tekrar dönebilen elastik bir karakteristiğe sahiptir. Ayrıca elastik modülü, literatürde yer alan ve jel formundaki bir doğal yapı iskelesinin gösterildiği çalışmadaki iskelenin elastik modülüne yakın bir değerde bulunmuştur (Korurer ve ark.,2014) .Öte yandan, WST-1 analiz sonuçlarına göre, kapsül içerisinde yer alan hücre tabakalarının canlılık ve üzerindeki hücre proliferasyon hızı 14.günlük kültür sürecinde artmaya devam etmiştir.

Günümüzde hücre kapsüllemeye kullanılan cihazlar genel olarak makro ölçekli, mikro ölçekli ve nano ölçekli cihazlar olarak sınıflandırılabilir, bunlar vücudun herhangi bir yerinde intravasküler veya ekstravasküler bölgelere implante edilir. Makrokapsüllerde hedeflenen hücre kaynağı mikrokapsüldeki gibi tek tek değil toplu halde çok sayıda hücreniye tek sferde işlem yapma imkanı sunmaktadır (Şekil 1.8). Çalışmamızda hücre tabakası kullandığımız için makro boyutta bir yapıyı ancak makrokapsülleme yaparak immün sistem hücrelerinden ve antikorlardan korumayı başardık.

İntravasküler cihazlar, içi boş biyouyumlu tüpler içinde kapsüllenmiş adacıklar veya alıcının vasküler sistemine bağlı lifler içerir. Ekstravasküler makrokapsüllere göre, besin ve oksijene daha iyi erişim, glikozdaki değişikliklerin anında tanınması ve kan akışının kolaylaştırdığı daha yüksek difüzyon gibi çeşitli avantajlar sunarlar. Bununla birlikte, anastomoz bölgelerinde trombüs geliştirme eğilimleri ile sistemik antikoagülasyon ihtiyacı, klinik adacık transplantasyonunda yaygın kullanım için onları zayıf adaylar haline getirmektedir.

Ekstravasküler makroenkapsülasyon cihazlarıyla ilgili araştırmalar istikrarlı bir hızla ilerlemektedir. İmplant edilebilir intravasküler cihazlarda görülen hemorajik komplikasyonlar ekstravasküler implantlarda görülmez ve sonuç olarak bu cihazlar daha kapsamlı olarak incelenmiştir. Morfolojilerine göre genel olarak boru şeklindeki ve düzlemsel cihazlar olarak sınıflandırılabilirler. Bizim çalışmamızda da elde ettiğimiz makrokapsül hem por boyutu hemde büyüklük açısından, emsal çalışmalardaki gibi başarılı sonuçlara ulaşmamızı sağlamıştır (Weaver ve ark. 2018).

İçi boş fiber cihazlar ise enjekte edilebilir, kolayca geri alınabilir, dayanıklı ve deri altı implantasyon için kolayca uyarlanabilir. Bununla birlikte, in vivo transplantasyondan sonra hasara karşı oldukça hassastırlar ve yaygın uygulanabilirliklerini sınırlayan tam insülin bağımsızlığını elde etmek için büyük dozda adacıklar gerektirirler.

Enkapsülasyon çalışmaları ilk olarak mikro boyutta tasarlanmıştır. Mikroenkapsülasyon olarak adlandırılan bu uygulamalarında geniş yüzey alanı / hacim oranı, mikroenkapsüllerin toplu halde nakli için avantajlı olmuştur fakat bununla birlikte, bu teknolojinin belirli sınırlılıkları bulunmaktadır. En önemlisi büyük bir nakil alanına ihtiyaç vardır. Günlük insülin ihtiyacını karşılamak için yeterli sayıda kapsül varlığı, hızlı besin erişimi sağlayan uygun bir mikrovasküler bölge, gerekirse mikroenkapsülün çıkarılmasındaki zorluğu ve adacıkların hayatta kalma oranlarının yetersiz olduğu gibi sınırlılıklar bazı çalışmalarda belirtilmiştir (Khanna ve ark., 2010; Levesque ve ark., 1992; Moya ve ark., 2010; ve ark., 2013). Deney hayvanlarında ve insan deneklerinde mikroenkapsül uygulamaları denenmesine rağmen, hücre kaynakları, implantın yeri ve vaskülarizasyon gibi zorluklar çözülememiştir. (Elliott ve ark.,2005; Wang ve ark., 1997). Mikroenkapsülün deneysel çalışmalarında, böbrek kapsül altı, karaciğer portal ven gibi bölgelere nakil işlemleri yapılmıştır. Karaciğer portel veni invaziv bir girişim ve böbrek altı kapsülü oksijen kaynağı açısından zayıf bir mikroçevreye sahiptir.

Çalışmamızın kritik noktalarından biri de kapsül malzemesinin biyouyumlu, mekanik olarak dayanıklı, por büyüklüğü açısından iyi optimize edilmiş olması gerekmektedir. Yapılan araştırmalar sonrasında aljinatın üstün biyouyumluluğu, hidrofilikliği, basit jelleşme süreci, kararlı mimarisi, bol bulunabilirliği, göreceli tedarik kolaylığı, düşük üretim maliyetleri ve in vivo uzun süreli stabilitesi nedeniyle mikroenkapsülasyonda kullanım için büyük ölçüde tercih edilmiştir. Aljinat mikroenkapsülleme, her adacığın ayrı ayrı bir aljinat mikroenkapsül içine alındığı bir tekniktir. Aljinat, biyouyumlu cihazın birden fazla adacık içerebildiği makroenkapsülasyonda da kullanılmıştır. Aljinat hidrojellerinde mannuronat ve guluronat zincirlerinin uzunluğu ve dizisi ile mannuronatın guluronata oranının (M:G oranı) aljinatın mekanik mukavemetini, elastikiyetini, dayanıklılığını, geçirgenliğini ve şişme özelliklerini belirlediği gösterilmiştir. Ayrıca daha iyi bir stabiliteye ve mekanik güce sahiptirler, nakil sonrasında, hücresel aşırı büyüme, daha fazla antijenite ve kapsülleri çevreleyen yoğun bir fibrotik aşırı büyüme ile sonuçlanan makrofaj aktivasyonu ile sonuçlanır. Çalışmamızın en büyük hedefi sıçanlarda uzun süreli normoglisemi sağlamak olduğu için antijenite, makrofaj aktivasyonu, fibroz doku oluşumu sebepleriyle erken dönemde geft kaybı olmaması için sadece aljinat malzemesi kullanarak hedefimize büyük oranda ulaştık.

Aynı zamanda bir biyo-yapay kapsülleme cihazının başarısı için uygun gözenek boyutunun seçilmesi hayati önem taşımaktadır. Aşırı derecede küçük bir gözenek boyutu, düzlemsel cihazın adacık içeren iç boşluğundan içeri doğru besin ve oksijen difüzyonunu ve

dışarı doğru insülin ve metabolit difüzyonunu engelleyebilir. Aksine, özellikle büyük bir gözenek boyutu, istenmeyen immünoglobulinlerin ve diğer sitotoksik kemokinlerin bu boşluğa girmesine izin vererek hücre yıkımına yol açabilir. Bu nedenle, işlevsel bir kapsülleme cihazı tasarlamada en önemli kriter uygun gözenek boyutudur. Çalışmamızda elde ettiğimi makrokapsül por boyut 6,92 µm olup kapsülün içine immün sitem hücreleri ve IgG girişini önlemek için gerekli seçici geçirgenliği göstermiştir.

Ek olarak, aljinat bileşimindeki çeşitli kimyasal değişikliklerin biyouyumluluğu üzerinde olumlu ya da istenmeyen etkileri vardır. Aljinat sentezinde kimyasal özelliklerini değiştirme tekniği olarak çok değerlikli katyonların (Ca^{+2} , Fe^{+3} , Ba^{+2}), polikasyonların (poli-L-lisin veya poli-L-ornitin) ve poli-elektrolitlerin kullanımı kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Strand ve ark., 2017; Krishnan ve ark., 2014). APA (aljinat-poli-L-lisin-aljinat) kapsülleri, yüksek derecede bir geçirgenlik sağlayarak, yani antikorların mikrokapsüllere girmesini seçici olarak bloke etmektedir.

Çalışmalar ayrıca, makro yada mikrokapsüllerde membran difüzyonunun ve geçirgenliğinin, konak savunmasına maruz kaldıktan sonra değişebileceğini de göstermiştir (Kessler ve ark., 2014). Yapılan bir çalışmada da adacık hücreleri VEGF proteini ile kaplanmış poli etilen glikol (PEG) makrokapsülüne yerleştirilerek sıçanların subkutan ve omentum bölgesine nakledilmiştir (Weaver ve ark., 2018). Kessler ve grubunun çalışmasında in vivo konakçı ortamını taklit etmek amacıyla in vitro doku kültüründen önce kapsülleme cihazına bir protein kaplamanın uygulandığı deneylerde glukoz ve insülinin kapsülün geçirgenliği değerlendirilmiştir. Sonrasında sıçanlarda intraperitoneal olarak implante edilen ve implantasyondan bir hafta sonra alınan kapsüllerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. İn vivo implante edilen kaplanmamış cihazda hiçbir hücrel enflamasyon veya nekroz, hücre yapışması veya fibrin birikintileri kaydedilmemiştir. Bununla birlikte, in vivo implante edilmiş membranlar üzerine protein adsorpsiyonu, in vitro protein kaplı membran üzerine absorbe edilen miktardan daha fazla olduğu kayıt edilmiştir. Glukoz ve insülin difüzyon oranlarının kaplanmışlarda kaplanmamış implantlara kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu, bu da protein kaplamanın in vivo geçirgenlikteki düşüşün bir nedeni olabileceğini göstermiştir.

Aljinat kullanılarak elde edilen greftin etkili bir şekilde insulin salınımını gerçekleştirmesi için önemli olan noktalardan biride nakil bölgesidir. Uluslararası adacık nakli kayıtlarına göre, klinik adacık transplantasyonlarının yüzde 90'ının, portal ven içine infüzyon yoluyla gerçekleştirildiği ve karaciğerde daha sonra embolizasyonun gerçekleştiği bildirilmektedir (Merani ve ark.,2008). Karaciğer bölgesi son derece iyi karakterize edilmiş

olmasına rağmen, transplantasyon sırasında veya kısa bir süre sonra adacıkların birçoğu kaybedildiği için, bu durum optimal değildir (Ryan ve ark.,2005). Çoğu alıcı, portal ven adacık transplantasyonu sonrası insülin bağımsızlığına ulaşır, ama sonuç uzun süreli değildir. Hasta en sonunda insülin enjeksiyonlarına devam etmektedir. Karaciğer çift damar ve venöz vasküler beslenmenin avantajına sahip olsa da, parankimal oksijen gerginliği pankreasinkinden daha düşüktür. Ayrıca, karaciğer bölgesi hemoraji ve tromboz gibi prosedürle ilişkili komplikasyonlarla ilişkilidir. Bu alandaki birçok araştırma, adacık nakli ve işlevini optimize etmek, nakil için gerekli olan adacık miktarı ve immünojeniteyi azaltmak için alternatif sahalara izlemiştir (Merani ve ark.,2008). Bu nedenle nakledilen pankreatik adacıkların revaskülarizasyonu anında olmadığından, iyi bir vasküler kaynağa yakınlık önemlidir.

Cerrahi açıdan bakıldığında, ideal alan potansiyel implantasyon komplikasyonlarını en aza indirmek için kolay erişime izin vermelidir. En az sayıda adacık gerektiren bir transplant bölgesi, yüksek transplant hacmine olan ihtiyacı azaltmak veya çok sayıda donör ve infüzyon için avantajlı olacaktır. Bu nedenle çalışmamızda nakil bölgesi olarak subkutan (derialtı) alanın uygun olacağına karar verilmiştir. Subkutan bölge iyi bir vasküler kaynak olmakla birlikte adacık nakil bölgesi olarak yeni çalışma alanıdır ve nakledilen dokunun izleme kolaylığına (radyolojik görselleştirme veya biyopsi) iyi erişimi de yararlı olacaktır. Literatürde yer alan bir çalışmada nakil bölgesi olarak karaciğer yüzeyine hücre tabakaları yerleştirilmiştir (Fujita ve ark.,2018). Fakat bu yöntem subkutan bölgeye kıyasla çok daha invaziv bir girişim olduğu için bizim çalışmamızda uygun görülmemiştir. Çalışmamızda makrokapsülün nakledilen bölgeye engraftman sağlama potansiyeli göz önüne alındığında vasküler bölgelerin yoğun olduğu alan olarak subkutan bölgede iyi sonuçlar alınmıştır.

Nakil bölgesinin nerede olduğu büyük ölçüde çalışma için önemli olmakla birlikte bizim için önemli olan başka bir hususta nakledilen hücre bütünlüğünün korunması ve hücrelerin apoptoza uğramaması gibi kriterlerdir. Bu sebeple çalışmamızda hücre-tabaka mühendisliği prensibinden yola çıkarak beta+MKH hücre tabakaları oluşturulup fonksiyonel adacık benzeri sistemlerindizayn edilmesi ve bu sistemlerin subkutan bölgeye transferi yer almıştır. Hücre tabaka sistemlerinin diyabetin tedavisi için kullanıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Abdominal, subrenal, subkutan ve bölge transferleri gibi (Obokata ve ark.,2011; Saito ve ark., 2011, Hirabaru ve ark., 2015; Fujita ve ark., 2018). 3-B lu bu hücre tabakalarının, subkutan bölgede canlılığını koruyarak etkn olduğu ve normoglisemi sağladığı rapor edilmiştir (Obokata ve ark.,2011; Saitove ark., 2011). Fakat subkutan bölge çalışmalarında adacık nakli ile sıçanlarda normoglisemi en fazla 60 gün sağlanmıştır (Saito

ve ark.,2011). Başka bir çalışmada ise abdominal bölgede 84 gün normoglisemi sağlanmıştır (Hirabaru ve ark., 2014). Bu çalışmaların esikliği nakledilen grefti immün ataklardan koruyacak bir uygulamanın olmamasıdır. Bizde bu eksiklikten yola çıkarak hücre tabakalarını makrokapsüle ederek grefti immün ataklardan koruyup sıçanlarda daha uzun süreli normoglisemi sağlamayı hedefledik.

MKH ler hücresele tedaviler için potansiyel bir kaynak olarak görülmektedir. MKH ler plastisite özelliği sayesinde kaynaklandığı dokudan farklı birçok dokunun hücrelerine farklılaşabilme özelliği göstermektedir. Çalışmamızda beta hücreleri ve izole ettiğimiz sAD-MKH ler birlikte sıcaklık-duyarlı kültür kaplarında kültüre edilerek [poly (N-isopropylacrylamide)- PIPAAm] tabaka şeklinde oluşturulmuştur. Bu sayede hücrelerin invivodaki nişlerinde olduğu gibi birbiri ile temas halinde olduğu, aynı zamanda da hücre-hücre ve hücre-yüzey etkileşiminde ECM yapısı korunduğu için kapsül içinde canlılıkları daha uzun sürmüştür. Ayrıca bu yöntem geleneksel yöntemlerle hücreleri kaldırmak için kullanılan enzimlerin hücre yapısına verdiği zararlı etkilerin de elenmesini sağlamıştır. (Hirose ve ark., 2000; Okano ve ark., 1993). Ayrıca bir hücre tabakasının makrokapsüle edilerek nakledilme çalışması literatürde bir ilktir.

Çalışmamızda nakil sonrası 190 gün takip süresi boyunca alınan tokluk kan örneklerinde kan glukozunun normal seviyeye düştüğü gösterilmiştir. Fakat deney grupları karşılaştırıldığında Beta-MKH grubunun kan glukoz seviyesinin, Beta nakli grubuna göre sağlıklı kontrol grubuna daha yakın olduğu gösterilmiştir. Bu da elde ettiğimiz 3B lu adacık dokularının sistemik sirkülasyonun içine insulin sekresyonu ve insulin üretim yeteneğinin olduğunu göstermiştir. 3B'lu adacık dokularının fonksiyonelliği IPGTT (intraperitoneal glukoz tolerans testi) ile gösterilmiştir. Sıcaklık duyarlı kaplar ile yapılan beta hücresi yada diğer hücre kültür ve nakil çalışmalarında, hücreler arası bağlantı komplekslerinin korunması ve in vitro ortamda da olsa oluşan ekstrasellüler matriksin bozulmaması, hücrelerin morfolojik olarak sağlıklı olmalarının yanı sıra fonksiyonelliklerine de katkı sağlamıştır (Ohashi ve ark., 2007; Hirose ve ark., 2000).

MKH ların salgıladığı sitokin ve büyüme faktörlerinin nakil bölgesindeki beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği, grefti koruduğu ve hücrelerin apoptozunu engellediğini göstermek için TGF β VE IL-6 boyanmış ve hücrelerde pozitif olduğu görülmüştür (Poll ve ark.,2008). Yalnızca beta hücre nakli yapılan grupta ise TGF β negatif olarak görülmüştür. MKH ların salgıladığı sitokin ve büyüme faktörleri TGF β ve IL-6, MKH ların en önemli özelliklerinden olan anti-apoptotik, anti-inflamatuar özellikleri sayesinde grefti koruyup beta hücrelerinin apoptozunu engellemesi ile açıklanabilir (Live ark., 2013).

MKH ların beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği, grefti koruduğu ve hücreleri apoptozdan koruduğu active caspase ile immunofluoresan analizle gözlemlendi. Bu sonuçlarımız da diğer hücre tabaka çalışmalarının sonuçları ile uyumludur.(Noort ve ark., 2002; Rossignol ve ark., 2009)

Ek olarak Beta nakli ve Beta-MKH nakli yapılan grupta pankreas dokuları incelenmiş ve adacıklardaki INSÜLIN ifadesi her iki dokuda da gözlenmiştir. Fakat Beta-MKH grubundaki adacık boyutunun Beta grubundaki adacık boyutuna göre daha büyük olması MKH lerin beta hücrelerinin apoptozunu engellediği ve proliferasyonunu arttırdığı düşünülebilir.

Klinik, biyokimyasal ve histolojik olarak karakterize edilen aşırı uzun süreli insüline bağımlı diyabetik hastalardan oluşan büyük bir grup üzerinde yapılan çalışmada, bu tip 1 diyabetik hastaların çoğunda nakil hücrelerinin 50 yıl sonra bile kaldığına dair şaşırtıcı bir bulgu sağlamıştır. Bu çalışmada sunulan veriler, uzun süreli otoimmün ve metabolik stres altında bile pankreas hücrelerinin yenilenebileceğini açıkça desteklemektedir (Keenan ve ark., 2010). Bu nedenle beta hücrelerin yenilenmesi için uyarı ile birlikte otoimmün stresin iyileştirilmesi, tip 1 diyabetli önemli sayıda hastada endojen insülin üretimini iyileştirmek için uygun bir yaklaşım olabilir. Beta hücrelerindeki endoplazmik retikulum stresi, mRNA eklemesindeki değişiklikler ve protein translasyonu ve katlanmasındaki hatalarla da ilişkilendirilmiştir; sonuçtaki protein ürünleri, potansiyel immünojenik neoantijenler olarak önerilmiştir. Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında, tip 1 diyabetli kişilerde hastalık süresi ile azalmaya devam eden azalmış pankreas ağırlığı ve hacmi vardır. Bu bulgu, gelişimsel kusurlar veya parakrin kaybına yanıt olarak pankreas atrofisi ve insülin veya kronik inflamasyonun büyüme öncesi etkileri veya hatta otoimmün aracılı ekzokrin yıkımı ile açıklanabilmektedir (Krishnan ve ark., 2013).

Özetle çalışmamızdaki en önemli özellik beta hücresinin MKH ile birlikte nakledilmesi sıçanlarda kan glukozunun normal seviyeye gelmesinde sadece beta hücre nakline göre daha başarılı olduğudur. Beta hücrelerini sıcaklık duyarlı kaplarla kültür edip hücre tabakası halinde nakil yapan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak pankreatik adacıklar enzimatik olarak parçalanıp tek hücre süspansiyonu yapılmış ve elde edilen tüm hücre grubu sıcaklık duyarlı kaplara ekilmiş olan çalışmalar mevcuttur. Bilindiği gibi pankreatik adacıkların %80'ini beta hücreleri oluştururken %20'sini adacığın diğer endokrin hücreleri, vasküler ve stromal hücreler oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmalarda beta hücrelerine destek olarak özellikle vasküler ve stromal hücreler bulunduğu için beta hücreleri nakil sonrasında morfolojik ve fonksiyonel olarak desteklenebilmiştir. Bizim

çalışmamızdaki hedeflerimizden birisi olan in vitro ortamda üretilmiş beta hücreleri yada insülin salgılayan hücrelerin diyabetik hayvanlara nakledilmesi ve verimliliğinin artırılması idi. Çünkü in vitroda üretilen bu hücreler adacığın kendisinin bir bütün olarak yada parçalanarak hücre süspansiyonu halindeki beta hücrelerinin desteğini sağlayan hücrelerden yoksun olmaktadır. Bu yüzden in vitro ortamda üretilen beta hücrelerine destek olarak MKH kullandık. Bu sayede adacığın stromal ve vasküler hücrelerinin yerine geçecek ve kök hücre olduğu için de onlardan daha fazla beta hücrelerine destek olabilecek olduğunu düşündüğümüz MKH'ler, sonuçlarımıza göre diyabetik hayvanlarda kan glukoz düzeyini yalnızca Beta hücre nakledilen gruba göre anlamlı bir şekilde daha fazla düşürebildi.

MKH lerle desteklediğimiz makrokapsül grubunda daha uzun süreli normoglisemi sağlanması MKH lerin anti-apoptotik, immunsupresif ve immunmodülatör etkileri sayesinde olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızın bulguları değerlendirildiğinde T1DM hastalarında uzun vadeli hücresel tedavi sağlamak amacıyla, subkutan bölgede ekstrasvasküler aljinat makrokapsüllerin içerisinde beta hücreleri ile birlikte MKH lerin bulunması en iyi ve uzun etkili tedavi yöntemi olmakla birlikte bu yöntemin kullanılacağı gelecekteki insan çalışmaları için zemin hazırlamaktadır.

5.1. Sınırlılıklar

Çalışmamızda 190 günlük bir normoglisemi sıçamlarda başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Hedefimiz en az 1 yıl süreli bu etkiyi gözlemlemektir. Uyguladığımız hücresel tedavi metodunda hedef hücremiz beta hücresi olup onun devamlı olarak çoğalmasını sağlamak, apoptozunu engellemek ve böylece daha da uzun süreli normoglisemiye ulaşmaktaki en önemli noktadır. Çünkü geliştirilen yöntemde sürekli insülin salınımını sağlamak için idame doz hücre nakli uygulaması yapılmamıştır. Bunun klinik aşaması da göz önüne aldığımızda belirli aralıklarla ek doz uygulaması hem maliyetli hem de hastaya minimalde olsa invaziv bir girişim uygulamaktır. Bu yüzden kapsül içerisindeki beta hücrelerinin proliferasyonunu indükleyecek bir ajana gereksinim vardır.

Bu ajan rekombinant bir protein olabilir. Önemli olan nokta bu ajanın kapsül içerisinde kontrollü salınımını sağlamaktır. Hücreler ile aynı ortama eklenecek bir protein, hücreler tarafından kullanılarak tüketilir. Bu protein kullanımının hücre tarafından devamlılığını sağlamak ancak proteinin partikül içine yerleştirilmesi ile gerçekleştirilebilir. Partikül uygulamaları bir proteinin kontrollü salınımını sağlayarak hücre tarafından hızlıca tüketilmesini engelleyebilir. Bizim çalışmamız için bu istenen bir durumdur. Bu amaçla kontrollü ilaç salımını deneyi planlanıp in vitro ve in vivo çalışmalar planlanmalıdır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda oluşturmada en etkin makrokapsül tasarlama ve uzun süreli normoglisemi sağlama hedefimiz proje sonunda başarıya ulaşmıştır.

Çalışmamızın kliniğe yansımaları düşünürsek nakil bölgesi olarak hastaya en az invaziv girişim yapılacak en uygun bölge deri altı bölgesinde kapsüller başarılı bir şekilde sağkalım göstermiştir. Elde ettiğimiz kapsül malzemesinin biyouyumlu olması ve mekanik dayanıklılık açısından maksimum performans göstermesi çalışmamızda iyi bir yol katettiğimizin göstergesidir. Ayrıca deri altı bölgesi damarlanma açısından gayet potansiyel bir bölge olup kapsül içindeki hücrelerimizin beslenmesi ve oksijenlenmesi sağlanabilmiştir. Böylece kapsül içindeki hücreler 190 gün boyunca canlı kalabilmiş ve fonksiyon gösterebilmiştir.

Beta ve MKH lerin tek tek süspansiyon halinde nakledildiğinde hedef bölgede, tabaka halinde nakledilene kıyasla daha çok apoptoza uğradığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle biz çalışmamızda adacıkların ve MKH lerin cell sheet (hücre tabakası) teknolojisi kullanılarak tabaka halinde nakledilmesi ile oluşturduğumuz 3 Boyutlu makroenkapsüle edilmiş dokunun sağkalımı ve insülin salgılaya potansiyelinin tek tek adacık kapsülünün nakline kıyasla daha başarılı olduğunu gözlemledik.

Pankreas hasarlarının hücresele tedavisi, hücre-tabakalandırma yöntemiyle beta ve MKH lerin üç boyutlu hale getirilerek makroenkapsülasyon yapılması ile ileride subkutan/derialtı implantlar şeklinde oldukça az invazif bir yöntemle hastaya nakledilebilecek duruma gelecektir. Bu şekilde implantlar allojenik olsa dahi otoimmün ataklardan korunarak uzun süreli sağ kalım ve hedef bölgeye yerleşme gösterecektir.

Bu sonuçlar, otoimmün hayvan modelleri ve tip 1 diyabet için uzun vadeli replasman tedavisi sağlamak amacıyla bu formülasyonların kullanılacağı gelecekteki insan çalışmaları için zemin hazırlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

Acarregui, A., Cirizaa, J. (2017). Characterization of an encapsulated insulin secreting human pancreatic beta cell line in a modular microfluidic device. *Journal of Drug Targeting*. 26(1), 36-44. doi: 10.1080/1061186X.2017.1334208

Alejandro, R., Cutfield, R.G., Shienvold, F.L., Polonsky, K.S., Noel, J., Olson, L. (1986). Natural history of intrahepatic canine islet cell autografts. *J Clin Invest*; 78, 1339–1348. doi 10.1172/JCI112720

Barkai, U., Rotem, A., Vos, P. (2016). Survival of encapsulated islets: more than a membrane story. *World J Transplant*. 6(1), 69-90. doi: 10.5500/wjt.v6.i1.69

Bennet, W., Groth, C.G., Larsson, R., Nilsson, B., Korsgren, O. (2000). Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes. *Ups J Med Sci* 105, 125–133. doi: 10.1517/03009734000000059

Calafiore, R., Basta, G., Luca, G., Lemmi, A., Montanucci, M.P., Calabrese, G., Racanicchi, L., Mancuso, F., Brunetti, P. (2006). Microencapsulated pancreatic islet allografts into non immunosuppressed patients with type 1 diabetes - First two cases. *Diabetes Care*. 29(1), 137–138. doi: 10.2337/diacare.29.1.137

Chen, W., Shu, Z., Gao, D., Shen, A. (2016). Sensing and sensibility: single-islet-based quality control assay of cryopreserved pancreatic islets with functionalized hydrogel microcapsules, *Adv. Healthcare Mater*. 5(2), 223-31. doi: 10.1002/adhm.201500515

Colton, C.K., Avgoustiniatos, E.S. (1991). Bioengineering in development of the hybrid artificial pancreas. *J Biomech Eng*. 113(2), 152–170. doi: 10.1115/1.2891229

Cryer, P.E., (2012). Minireview: glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology*. 153(3), 1039–1048. doi: 10.1210/en.2011-1499

Delvecchio, M., Mozzillo, E., Salzano, G. (2017). Monogenic diabetes accounts for 6.3% of cases referred to 15 Italian pediatric diabetes centers during 2007 to 2012. *J Clin Endocrinol Metab*. 102(6), 1826-1834. doi: 10.1210/jc.2016-2490

De Vos, P., De Haan, B.J., Vegter, D., Hillebrands, J.L., Strubbe, J.H., Bruggink, J.E. (1998). Insulin levels after portal and systemic insulin infusion differ in a dose dependent fashion. *Horm Metab Res*. 30, 721–725. doi: 10.1055/s-2007-978966

De Vos P, Vegter D, De Haan BJ, Strubbe JH, Bruggink JE, Van Schilfgaarde R. (1996). Kinetics of intraperitoneally infused insulin in rats. Functional implications for the bioartificial pancreas. *Diabetes* 45: 1102–1107

DiMeglio, L.A., Evans-Molina, C., Oram, R.A. (2018). Type 1 diabetes. *The Lancet*. 391: 2449–62. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5

Edgerton, D.S., Kraft, G., Smith, M., Farmer, B., Williams P.E. (2017). Insulin's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion. *JCI Insight*. 2(6), e91863. doi: 10.1172/jci.insight.91863

Eizirik, D.L., Sammeth, M., Bouckenooghe, T. (2012). The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines. *PLoS Genet*. 8(3), e1002552. doi: 10.1371/journal.pgen.1002552

Elliott, R.B., Escobar, L., Tan, P.L., Garkavenko, O., Calafiore, R., Basta, P., Vasconcellos, A.V., Emerich, D.F., Thanos, C., Bambra, C. (2005). Intra-peritoneal alginate-encapsulated neonatal porcine islets in a placebo-controlled study with 16 diabetic cynomolgus primates. *Transplant Proc*. 37(8), 3505–3508. doi: 10.1016/j.transproceed.2005.09.038

- Fujita, I., Utoh, R., Yamamoto, M., Okano, T., Yamato, M. (2018). The liver surface as a favorable site for islet cell sheet transplantation in type 1 diabetes model mice. *Regenerative Therapy*. 8, 65-72 doi: 10.1016/j.reth.2018.04.002
- Gabr, M.M., Zakaria M.M. (2017). From human mesenchymal stem cells to insulin-producing cells: comparison between bone marrow and adipose tissue-derived cells. *Biomed Res Int*. 2017:3854232. doi: 10.1155/2017/3854232
- Gruessner, A.C., Sutherland, D.E. (2008). Pancreas transplant out comes for united states (US) cases as reported to the united network for organ sharing (UNOS) and the international pancreas transplant registry (IPTR). *ClinTranspl*. 45–56. [PubMed: 19708445]
- Gültekin, A., Ağirdil, Y., Öncel Duman, B., Subaşı, C., Karaöz, E. (2020). Comparison of mesenchymal stem cell sheets and chondrocyte sheets in a rabbit growth plate injury model. *Turk J Med Sci*.50(4), 1082-1096. doi: 10.3906/sag-1902-228
- Hakki, S.S., Kayis, S.A., Hakki, E.E., Karaoz, E. (2015). Comparison of mesenchymal stem cells isolated from pulp and periodontal ligament. *J Periodontol*. 86(2):283-91. doi: 10.1902/jop.2014.140257
- Hernandez, A.C., Burgo L.S. (2017). Alginate microcapsules incorporating hyaluronic acid recreate closer in vivo environment for mesenchymal stem cells. *Mol. Pharmaceutics*. 14, 2390–2399. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00295
- Hirabaru, M., Kuroki, T., Adachi, T., Kitasato, A., Ono, S., Tanaka, T., Matsushima, H. Takatsuki, M., Okano, T., Eguchi, S. (2015). A method for performing islet transplantation using tissue-engineered sheets of islets and mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering: Part C*. (12), 1205-15. doi:10.1089/ten.tec.2015.0035
- Hirose, M., Kwon, O.H., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. (2000). Creation of designed shape cell sheets that are noninvasively harvested and moved onto another surface. *Biomacromolecules* 1(3), 377-81. doi: 10.1021/bm0002961
- Hwang, C.M., Sant S., Masaeli, M., Kachouie, N., Zamanian, B., Lee, S.H., Khademhosseini, A. (2010). Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering. *Biofabrication*. (3), 035003. doi:10.1088/1758-5082/2/3/035003
- Jain, K., Yang, H., Cai, BR., Haque, B., Hurvitz, AI., Diehl, C., Miyata, T., Smith, BH., Stenzel, K., Suthanthiran, M., Rubin, AL. (1995). Retrievable, replaceable, macroencapsulated pancreatic islet xenografts. Long-term engraftment without immunosuppression. *Transplantation*. 59(3), 319–324. [PubMed: 7871558]
- Johansson, A., Olerud, J., Johansson, M., Carlsson, P.O. (2009). Angiostatic factors normally restrict islet endothelial cell proliferation and migration: implications for islet transplantation. *Transpl Int*. 22(12), 1182–1188. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00939.x
- Johnston, N.R., Natalie, R., Johnston, R.K., Mitchell, E.H., Francesca, S., Jorge F., Lorenzo P. (2016). β Cell hubs dictate pancreatic islet responses to glucose. *Cell Metab*. 24(3), 389-401. doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.020
- Kaiser, M., Pereira, S., Pohl, L., Ketelhut, S., Kemper, B., Gorzelanny, C., Galla, H.J., Moerschbacher, B. M., Goycoolea F. M. (2015). Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. *Scientific Reports*. 5:10048. doi: 10.1038/srep10048
- Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarıboyacı, A.E., Kaymaz, F. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and Cell Biology*. 132(5), 533. doi: 10.1007/s00418-009-0629-6
- Kassem, D.H., Kamal, M.M. (2016). Exendin-4 enhances the differentiation of wharton’s jelly mesenchymal stem cells into insulin-producing cells through activation of various β -cell markers. *Stem Cell Research & Therapy*. 7(1), 108. doi: 10.1186/s13287-016-0374-4
- Kessler, L., Pinget, M., Aprahamian, M., De Jardin, P., Damge, C. (1991). In vitro and in vivo studies of the properties of an artificial membrane for pancreatic islet encapsulation. *Horm Metab Res*. 23(7), 312–317. doi: 10.1055/s-2007-1003685

- Kessler, L., Legeay, G., Jesser, C., Damge, C, Pinget, M. (1995). Influence of corona surface treatment on the properties of an artificial membrane used for Langerhans islets encapsulation: permeability and biocompatibility studies. *Biomaterials*. 16(3), 185–191. doi: 10.1016/0142-9612(95)92116-n
- Kessler, L., Legeay, G., West, R., Belcourt, A., Pinget, M. (1997). Physicochemical and biological studies of corona-treated artificial membranes used for pancreatic islets encapsulation: mechanism of diffusion and interface modification. *J Biomed Mater Res*. 34(2), 235–245. doi: 10.1002/(sici)1097-4636(199702)34:2<235::aid-jbm13>3.0.co;2-h
- Khorsandi, L., Saremy, S. (2016). Effects of exendine-4 on the differentiation of insulin producing cells from rat adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell J Summer*. 16(2), 187-94. PMID: 24567935
- Korurer, E., Kenar, H., Doger, E., Karaoz, E. (2014). Production of a composite hyaluronic acid/gelatin blood plasma gel for hydrogel-based adipose tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 102(7), 2220-9. doi: 10.1002/jbm.a.34901
- Khanna, O., Moya, M.L., Opara, E.C., Brey, E.M. (2010). Synthesis of multi layered alginate microcapsules for the sustained release of fibroblast growth factor-1. *J Biomed Mater Res A*. 95(2), 632–640. doi:10.1002/jbm.a.32883
- Krishnan, R., Alexander, M., Robles, L., Foster III, CE., LakeY, RT., (2014). Islet and stem cell encapsulation for clinical transplantation. *The Review of Diabetic Studies*. 11(1), 84-101. doi: 10.1900/Rds.2014.11.84
- Lau, J., Mattsson, G., Carlsson, C., Nyqvist, D., Kohler, M., Berggren, P.O. (2007). Implantation site-dependent dysfunction of transplanted pancreatic islets. *Diabetes*. 56. 1544–1550. doi: 10.2337/db06-1258
- Lehmann, R., Zuellig, R.A., Kugelmeier, P., Baenninger, P.B., Moritz, W., Perren, A., Clavien, P.A., Weber, M., Spinas, G.A. (2007). Superiority of small islets in human islet transplantation. *Diabetes*. 56(3), 594– 603. doi.10.2337/db06-0779
- Leung, P.S. (2010). The renin-angiotensin system: current research progress in the pancreas. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 690. doi:10.1007/978-90-481-9060-7_1
- Levesque, L., Brubaker, P.L., Sun, A.M. (1992). Maintenance of long-term secretory function by microencapsulated islets of langerhans. *Endocrinology*. 130(2), 644–650. doi:10.1210/endo.130.2.1370793
- Li, P., Li S.H. , Wu, J., Zang, W.F., Dhingra, S. (2013). Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege *J. Cell. Mol. Med*. 17(9):1136-45. doi: 10.1111/jcmm.12092
- Lim, F., Sun, AM. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 210(4472), 908–910. doi: 10.1126/science.6776628
- Markmann, J.F., Deng, S., Huang, X., Desai, N.M., Velidedeoglu, E.H., Liu, C., Frank, A., Markmann, E., Palanjian, M., Brayman, K., Wolf, B., Bell, E., Vitamaniuk, M., Doliba, N., Matschinsky, F., Barker, C.F., Naji, A. (2003). Insulin independence following isolated islet transplantation and single islet tin fusions. *AnnSurg*. 237(6), 741–749. doi:10.1097/01.SLA.0000072110.93780.52
- Merani, S., Toso, C., Emamaullee, J., Shapiro, A. M. J. (2008). Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation. *British Journal of Surgery*. 95, 1449–1461. doi: 10.1002/bjs.6391
- Moya, M.L., Garfinkel, M.R., Liu, X., Lucas, S., Opara, E.C., Greisler, H.P., Brey, E.M. (2010). Fibroblast growth factor-1 (FGF-1) loaded microbeads enhance local capillary neovascularization. *J Surg Res*. 160(2), 208–212. doi: 10.1016/j.jss.2009.06.003
- Mu, X.P., Ren L.Q., Yan, H.W. (2017). Enhanced differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells into insulin-producing cells in vitro. *J Diabetes Investig*. 8(1):34-43. doi: 10.1111/jdi.12544

- Noble, J.A. (2015). Immunogenetics of type 1 diabetes: a comprehensive review. *J Autoimmun.* 64:101-12. doi: 10.1016/j.jaut.2015.07.014
- Noort, W.A., Kruger, M., Bezooijen, R.L., Willemze, R., Fibbe, W.E. (2002). Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells in NOD/SCID mice. *Experimental Hematology.* 30(8), 870-8. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00820-2
- Ohashi, K., Yokoyama, T., Yamato, M. (2007). Engineering functional two and three-dimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. *Nat Med.* 13(7), 880-5. doi: 10.1038/nm1576
- Okano, T., Yamada, N., Sakai, H., Sakurai, Y. (1993). A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res.* 27(10), 1243-51. doi: 10.1002/jbm.820271005
- Obokata, H., Yamato, M., Tsuneda, S., Okano, T. (2011). Reproducible subcutaneous transplantation of cell sheets into recipient mice. *Nature Protocols.* 6(7), 1053-9. doi:10.1038/nprot.2011.356.
- Peters, L., Posgai, A., Brusk, T. M. (2019). Islet-immune interactions in type 1 diabetes: the nexus of beta cell destruction. *Clinical and Experimental Immunology*, 198, 326–340. doi:10.1111/cei.13349
- Petruzzo, P., Badet, L., Lefrancois, N., Berthillot, C., Dorel, S.B., Martin, X. (2006). Metabolic consequences of pancreatic systemic or portal venous drainage in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Diabet Med.* 23, 654–659. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01891.x
- Poll, D., Parekkadan, B., Cho, C.H., Berthiaume, F., Nahmias, Y., Tilles, A.W., Yarmush, M. L. (2008). mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology.* 47(5), 1634-43. doi: 10.1002/hep.22236
- Rastogi, P., Kandasubramanian, B. (2019). Review of alginate-based hydrogel bioprinting for application in tissue engineering. *Biofabrication.* 11(4), 042001. doi:10.1088/1758-5090/ab331e
- Redondo, M.J., Jeffrey, J., Fain, P.R., Eisenbarth, G.S., Orban, T. (2008). Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. *N Engl J Med.* 359(26), 2849-50. doi: 10.1056/NEJMc0805398
- Regnell, S.E., Lernmark, A. (2017). Early prediction of autoimmune (type 1) diabetes. *Diabetologia.* 60:1370–1381. doi:10.1007/s00125-017-4308-1
- Rewers, M., Ludvigsson, J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet.* 387(10035), 2340–2348. doi:10.1016/S0140-6736(16)30507-4
- Rossignol, J., Boyer, C., Thinard, R., Remy, S., Dugast, A.S., Dubayle, D., Dey, N.D., Boeffard, F., Delecrin, J., Heymann, D., Vanhove, B., Anegon, I., Naveilhan, P., Dunbar, G.L., Lescaudron, L. (2009). Mesenchymal stem cells induce a weak immune response in the rat striatum after allo or xenotransplantation. *J Cell Mol Med.* 13(8B), 2547-58. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00657.x
- Ryan, E.A., Paty, B.W., Senior, P.A., Bigam, D., Alfadhli, E., Kneteman, N.M., Lakey, J.R., Shapiro, A.M. (2005). Five year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes.* 54(7), 2060–2069. doi: 10.2337/diabetes.54.7.2060
- Schmidt, P., Goto, M., Le Mauff, B., Anegon, I., Korsgren, O. (2003). Adenovirus-mediated expression of human CD55 or CD59 protects adult porcine islets from complement-mediated cell lysis by human serum. *Transplantation.* 75(5), 697–702. doi: 10.1097/01.TP.0000053249.39753.D6
- Saito, T., Ohashi, K., Okano T. (2011). Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation.* 92(11), 1231-6. doi: 10.1097/TP.0b013e3182375835
- Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., Okano, T. (2003). Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials.* 24,2309–2316. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00110-8
- Shin, S., Shin, J.E., Yoo, Y.J. (2013). Attachment of alginate microcapsules onto plasma-treated PDMS sheet for retrieval after transplantation. *Biotechnol Appl Biochem.* 60(6), 617–622. doi: 10.1002/bab.1124

- Song, S., Roy, S. (2016). Progress and challenges in macroencapsulation approaches for type 1 diabetes (T1D) treatment: cells, biomaterials, and devices. *Biotechnol Bioengineering*. 113(7), 1381–1402. doi:10.1002/bit.25895
- Stagner, J.I., Rilo, H.L., White, K.K. (2007). The pancreas as an islet transplantation site. Confirmation in a syngeneic rodent and canine autotransplant model. *JOP*, 8, 628–636
- Strand, B.L., Coron, A.E., Skjak-Braek, G. (2017). Current and future perspectives on alginate encapsulated pancreatic islet. *Stem Cells Translational Medicine*. 6, 1053–1058. doi: 10.1002/sctm.16-0116
- Suzuki, K., Bonner-Weir, S., Trivedi, N., Yoon, K.H., Hollister-Lock, J., Colton, C.K., Weir, G.C. (1998). Function and survival of macroencapsulated syngeneic islets transplanted into streptozocin-diabetic mice. *Transplantation*. 66(1), 21–28. doi: 10.1097/00007890-199807150-00004
- Tersey, S.A., Nishiki, Y., Templin, A.T. (2012). Islet β -cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *Diabetes*. 61(4), 818–27. doi: 10.2337/db11-1293
- Topdag, M., Karaoz, E., Kara, A., M.D., Subasi, C., Duman, B.Ö. (2019). Comparative analysis of the healing effects of the transplanted cell sheets to the experimentally injured maxillary sinuses. *J. Craniofac Surg*.30(7), 2285–2292. doi: 10.1097/SCS.00000000000005638
- van der Windt, D.J., Bottino, R., Casu, A., Campanile, N., Cooper, D.K. (2007). Rapid loss of intraportally transplanted islets: an overview of pathophysiology and preventive strategies. *Xenotransplantation*. 14(4), 288–297. doi: 10.1111/j.1399-3089.2007.00419.x
- Vegas, A.J, Veisoh, O., Gürtler, M., Chen, M., Anderson, D.G. (2016). Long -term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell–derived beta cells in immune-competent mice. *Nature Medicine*. 22(3):306–11. doi:10.1038/nm.4030
- Wang, T., Lacik, I., Brissova, M., Anilkumar, A.V., Prokop, A., Hunkeler, D., Green, R., Shahrokhi, K., Powers, A.C. (1997). An encapsulation system for the immunoisolation of pancreatic islets. *Nat Biotechnol*. 15(4), 358–362. doi: 10.1038/nbt0497-358
- Weaver, J.D., Headen, D.M., Hunckler, M.D., Coronel, M.M., Stabler, C.L., Garcia, A.J. (2018). Design of a vascularized synthetic poly (ethylene glycol) macroencapsulation device for islet transplantation. *Biomaterials*. 172, 54–65. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.047
- Xin, Y., Jiang, X., Wang, Y. (2016). Insulin-Producing cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro ameliorate streptozotocin-induced diabetic hyperglycemia. *PLoS One*. 11(1), e0145838. doi: 10.1371/journal.pone.0145838.
- Xu, L., Xu, C., Zhou, S. (2017). PAX4 promotes pdx1-induced differentiation of mesenchymal stem cells into insulin-secreting cells, *Am J Transl Res*. 9(3), 874–886. PMID: 28386318
- Yardley, J.E., Iscoe, K.E., Sigal, R.J., Kenny, G.P., Perkins, B.A., Riddell, M.C., (2013). Insulin pump therapy is associated with less post-exercise hyperglycemia than multiple daily injections: an observational study of physically active type 1 diabetes patients. *Diabetes Technol Ther*. 15(1), 84–88. doi:10.1089/dia.2012.0168
- Yang, X.F., Chen, T. (2017). Immunogenicity of insulin-producing cells derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Exp Ther Med*. 13(4), 1456–1464. doi: 10.3892/etm.2017.4096
- Yılmaz, M.T. (2009). Tip 1 Diabetes Mellitus. İmamoğlu, Ş. (Ed.), Ersoy, Ö.E. *Diabetes Mellitus Multidisipliner Yaklaşımla Tanı, Tedavi ve İzlem*. İstanbul: Deomed Medikal Yayıncılık.
- Yamato, M., Hannach, I.E., Okano T. (2009). Cell sheet technology and cell patterning for biofabrication, *Biofabrication*. (2), 022002. doi: 10.1088/1758-5082/1/2/022002
- Zhou, Q., Melton D.A. (2018). Pancreas regeneration. *Nature* 557:351–358. doi: 10.1038/s41586-018-00880

8. ÖZGEÇMİŞ

<u>Kişisel Bilgiler</u>	
Adı Soyadı	Büşra ÖNCEL DUMAN
Doğum Yeri ve Tarihi	İzmit- 03.06.1987
İletişim Adresi	Uzunçiftlik Mh. Rauf Denктаş Cd. 41 Nolu Blok D:11 Kartepe/ KOCAELİ
Telefon	0543 426 6094
E-posta	busraoncel@gmail.com
Eğitim Bilgileri	<p>2001-2005: Lise, İzmit Lisesi, Yabancı Dil Ağırlıklı, Fen Bilimleri, İzmit/KOCAELİ</p> <p>2006-2010: Lisans, Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bursa/TÜRKİYE</p> <p>2011-2014: Yüksek Lisans, Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı Kocaeli/TÜRKİYE</p> <p>2014-Halen: Doktora, Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı Kocaeli/TÜRKİYE</p>
Mesleki Deneyim/İş Yeri Bilgileri	<p>2017-2021:Araştırma Görevlisi, Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p> <p>2021-Halen: Öğretim Görevlisi, Kocaeli Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Avrupa MYO</p>
Yabancı Dil Bilgileri	ÜDS: 68.750-2012, YÖKDİL: 60- 2019
Üye Olduğu Mesleki/Sosyal Kuruluşlar	
<u>Bilimsel Etkinlikler</u>	
Makaleler	<p>1- Kara Ahmet, Öncel Duman Büşra, Yazır Yusufhan, Yılmaz Mahmut Sinan, Halbutoğulları Zehra Seda, Demir Deniz, Kara Rabia Öztaş, Bayraktar Hakan, Güven Mehmet (2019). Evaluation of the Effect of Diclofenac Sodium and 5-Fluourasil in a 3D Cholesteatoma Cell Culture Model. Otology Neurotology, 40(8), 1018-1025., doi: 10.1097/MAO.0000000000002297 (Yayın No: 5161663) (Q1)</p> <p>2- Topdağ Murat, Karaöz Erdal, Kara Ahmet, Subaşı Cansu, Öncel Duman Büşra, Demir Necdet, Konuk Esmâ, Öztürk Murat, İseri Mete (2019). Comparative Analysis of the Healing Effects of the Transplanted Cell Sheets to the Experimentally Injured Maxillary</p>

	<p>Sinuses. Journal of Craniofacial Surgery, 30(7), 2285-2292., doi: 10.1097/SCS.0000000000005638 (Yayın No: 5135469) (Q1)</p> <p>3- Alper Gültekin, Yücel Ağirdil, Büşra Öncel Duman, Cansu Subaşı, Erdal Karaöz (2020). Comparison of Mesenchymal Stem Cell Sheets and Chondrocyte Sheets in a Rabbit Growth Plate Injury Model, Turk J Med Sci. 2020 Apr 14. doi: 10.3906/sag-1902-228. (Q3)</p>
Projeler	<p>1-Nano/Mikrofibröz Polimerik Taşıyıcılar Üzerinde Damar Ağına Sahip Kök Hücre Temelli Kalp Kası Grefti Geliştirilmesi, -Tübitak 1001, Bursiyer: Öncel Duman Büşra, 01/10/2011-01/04/2014 (Ulusal)</p> <p>2-Farklı Yapıdaki Pulpa Kapaklama Ajanlarının, Diş Pulpası Kökenli Mezenşimal Kök Hücreleri Üzerinde Odontojenik Farklılaşma Açısından Etkisi, -Tübitak 3501, Bursiyer: Öncel Duman Büşra, 15/04/2011- 15/04/2013 (Ulusal)</p> <p>3-Farklı Dokulardan İzole Edilen Mezenşimal Kök Hücrelerin Migrasyonunun Kıyaslanması: Basic-Fibroblast Growth Factor (B-FGF FGF2) Ve Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1)'in Hücrelerin Migrasyonuna Etkisi, -Tübitak 1001, Bursiyer: Öncel Duman Büşra, 15/04/2013- 15/04/2015 (Ulusal)</p> <p>4-Sıçandaki Tam Kat Doku Kaybı Modelinde, Kısmi Katlı Deri Grefti(KKDG) Ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) Geni Transfekte Edilmiş Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre (VGTE-ADKH) Kombine Kullanımının Kontraksiyon Ve Deri Greftleri Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi. 10/01/2014-01/06/2014 (Ulusal)</p> <p>5-Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tabakası İle Birlikte 3-Boyutlu Adacık Dokusunun Subkutan Naklinin Diyabetik Sıçan Modelinde Etkinliğinin Araştırılması. Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, 01/2013-01/01/2014 (Ulusal)</p> <p>6- Deneysel Nazal Mukoza Hasarı Sonrası Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Ve Nazal Mukoza Hücreleriyle Oluşturulan Hücre Tabakalarının Maksiller Sinüslere Aktarılmasının İyileştirici Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi, -Tübitak 1001, Bursiyer: Öncel Duman Büşra, 15/03/2014 - 15/03/2016 (Ulusal)</p> <p>7-Tavşanlarda Deneysel Büyüme Plağı Hasar Modelinde Mezenkimal Kök Hücre Ve Kondrosit Uygulamasının Tedavi Edici Etkinliğinin Karşılaştırılması Olarak İncelenmesi. TÜBİTAK-114S152,SBAG-3001 15/08/2014-15/08/2016 (Ulusal)</p> <p>8-Tip 1 Diabetes Mellitus Modelinde Langerhans Adacık Ve Mezenkimal Kök Hücre Tabakalarının Makrokapsülasyon Yoluyla Konak Savunma Sisteminden Korunarak Fonksiyonunun Devamlılığının Sağlanması, Diğer (Ulusal), Araştırmacı: Öncel Duman Büşra, Kocaeli Üniversitesi, 14/04/2019 (Devam Ediyor) (Ulusal)</p> <p>9- Tip 1 Diyabetli Hastaların Mezenkimal Kök Hücrelerinden Elde Edilen Zenginleştirilmiş Ekzozomlarının Beta Hücreleri Üzerine Anti-Apoptotik Etkisinin Karşılaştırılması Olarak İncelenmesi. TÜBİTAK-115S241,SBAG-1001 01/03/2016-01/02/2017 (Ulusal)</p>

	10- Kolesteatom Hücre Kültüründe Diklofenak Sodyum ve 5-Fluourasil'in Etkisinin Değerlendirilmesi TÜBİTAK 1001
Bildiriler	<p>1-Öncel Duman Büşra, Erman Gülay, Duruksu Gökhan, Gacar Gülçin, Aksoy Ayça, Karaöz Erdal (2011). FACS Analyses of Human Adult Stem Cells from Various Tissues: Identification of Distinctive, Immunophenotypic Markers. 1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research And Application Conference (/Poster) (Yayın No:6064271)</p> <p>2-Kara Ahmet, Yazır Yusufhan, Öncel Duman Büşra, Güven Mehmet, Yılmaz Mahmut Sinan, Demir Deniz (2018). 3D Cholesteatoma Culture Model with Cell Sheet Technology. AA0- HNSF Annual Meeting 2018 (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:5218837)</p> <p>3- Polat Selen, Yazır Yusufhan, Öncel Duman Büşra, Duruksu Gökhan (2018). Comparison of Pluripotency Capacity Between Pericytes and Mesenchymal Stem Cells. 4th International Congress on Applied Biological Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4578997)</p> <p>4- Yazır Yusufhan, Öncel Duman Büşra, Okçu Alparıslan, Duruksu Gökhan, Polat Selen (2018). Comparison of Pluripotency Capacity Between Pericytes and Mesenchymal Stem Cells. 4th International Congress On Applied Biological Sciences (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4376314)</p> <p>5- Öncel Duman Büşra, Yazır Yusufhan, Polat Selen, Halbutoğulları Zehra Seda, Açıkırsarı Ayşegül, Duruksu Gökhan (2018). Effects of Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript (CART) on The Differentiation of Insulin Producing Cells From Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. 4th International Congress On Applied Biological Sciences (Özet Bildiri/Poster) (Yayın No:4376304)</p> <p>6- Ağırdil Yücel, Gültekin Alper, Öncel Duman Büşra, Subaşı Cansu, Karaöz Erdal (2017). Comperative Evaluation of Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cell and Chondrocyte Application in Experimental Growth Plate Injury Model in Rabbits. 38th SICOT Orthopaedic World Congress (/Sözlü Sunum) (Yayın No:6064387)</p> <p>7- Öncel Duman Büşra, Eker Sarıboyacı Ayla (2015). Investigation of The Subcutaneous Transplantation Efficiency of 3-D Cell Construct of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell and Beta Cell Sheets on Type 1 Diabetic Rat Model. European Biotechnology Congress (/Poster)(Yayın No:6064305)</p> <p>8- Öncel Duman Büşra, Eker Sarıboyacı Ayla, Karaöz Erdal (2014). Studying the Efficiency of Subcutaneous Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Sheet With 3-D Islet Tissue In Diabetic Rat Model. Frontiers In Medical Sciences: Diabetes, Cancer and Their Connection (/Poster) (Yayın No:6064287)</p> <p>9-Kara Ahmet, Topdağ Murat, Karaöz Erdal, Subaşı Cansu, Öncel Duman Büşra, Demir Necdet, Konuk Esmâ, Öztürk Murat, İseri Mete (2019). Transplante Hücre Tabakalarının Deneysel Hasarlandırılmış Maksiller Sinüs Mukozası Üzerine Etkisinin İncelenmesi. 15 türk Rinoloji, 7. Ulusal Otoloji Nörotoloji,3. Ulusal Baş Boyun Cerrahisi Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5183395)</p>

	<p>10- Kara Ahmet, Öncel Duman Büşra, Yazır Yusufhan, Yılmaz Mahmut Sinan, Halbutoğulları Zehra Seda, Demir Deniz, Kara Rabia Öztaş, Bayraktar Hakan, Güven Mehmet (2019). Kolesteatom Hücre Kulturunde Diklofenak Sodyum ve 5-Flourasil'in Etkisinin Degerlendirilmesi. 15 türk Rinoloji, 7. Ulusal Otoloji Nörotoloji, 3. Ulusal Baş Boyun Cerrahisi Kongresi (Özet Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:5183391)</p> <p>11- Öncel Duman Büşra, Eker Sarıboyacı Ayla, Karaöz Erdal (2015). Beta Hücre ve Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tabakası Kullanılarak Oluşturulmuş 3-Boyutlu Dokunun Subkutan Naklinin Tip 1 Diyabet Sıçan Modelinde Etkinliğinin Araştırılması. 51. Ulusal Diyabet Kongresi (/Sözlü Sunum) (Yayın No:6064303)</p> <p>12- Öncel Duman Büşra, Eker Sarıboyacı Ayla, Karaöz Erdal (2014). Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tabakası İle Birlikte 13-Boyutlu Adacık Dokusunun Subkutan Naklinin Diyabetik Sıçan Modelinde Etkinliğinin Araştırılması. 16.Ulusal İç Hastalıkları Kongresi (/Sözlü Sunum) (Yayın No:6064300)</p> <p>14- Öncel Duman Büşra, Eker Sarıboyacı Ayla, Karaöz Erdal (2014). Sıcaklık Duyarlı Poly (N-İsopropylacrylamide) Kültür Kaplarında in vitro Kültür Edilen Beta Hücre Tabakasının Proliferasyon, Apoptoz, İmmunfenotip ve Endokrin Salgılaşma İşlev Özelliklerinin İncelenmesi. 1.Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi (/Poster) (Yayın No:6064278)</p> <p>15- Öncel Duman Büşra, Erman Gülay, Duruksu Gökhan, Okçu Alpaslan, Gacar Gülçin, Karaöz Erdal (2011). Farklı dokulardan izole edilmiş insan mezenkimal kök hücrelerinin FACS kullanılarak immünfenotipik özelliklerinin tanımlanması. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi (/Poster)(Yayın No:6064263)</p> <p>16- Büşra Öncel Duman, Yusufhan Yazır, Ahmet Öztürk, Z.Seda Halbutoğulları, Serap Mert (2021). Protection of the Cell Sheet Pleced in 'Alginate Macrocapsule Containing CART Peptide Nanoparticle' from the Host Immun System After Transplantation to Diabetic Rat. 1. International Health Sciences and Biomedical Congress. (Sözlü Bildiri)</p>
Ödüller	<p>Frontiers In Medical Sciences:Diabetes, Cancer and Their Connection,July 6-8th 2014, Marma Convention Center Maltepe University,Istanbul/Turkey, Poster Bildiri Ödülü 1.si</p> <p>Duman BO,Sarıboyacı AE,Karaoz E,Studying the Efficiency of Subcutaneous Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Sheet With 3-D Islet Tissue In Diabetic Rat Model.</p>
Diğer	<p><u>BİDEB Desteği</u></p> <p>Etkinlik Destepleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2224-A Yurt Dışı Bilimsel Etkinliklere Katılma Desteği Programı, Başvurusunu Geri Çekti (Pandemi sebebiyle), 2019 - 6, 16.04.2020 - 18.04.2020.</p> <p><u>Düzenlenen Kurslar</u></p> <p>XXVI. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök hücre</p>

izolasyonkarakterizasyon, Kocaeli Üniversitesi, Kurs, 10.06.2019 - 14.06.2019 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

XXV. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök hücre izolasyon karakterizasyon, Kocaeli Üniversitesi, Kurs, 02.04.2018 -06.04.2018 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

XXIV. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök hücre izolasyon karakterizasyon, Kocaeli Üniversitesi, Kurs, 19.02.2018 -23.02.2018 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

XXIII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök hücre izolasyon karakterizasyon, Kocaeli Üniversitesi, Kurs, 02.10.2017 -06.10.2017 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

XXII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök hücre izolasyon karakterizasyon, Kocaeli Üniversitesi, Kurs, 03.07.2017 -07.07.2017 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

XXI. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök hücre izolasyon karakterizasyon, Kocaeli Üniversitesi, Kurs, 17.10.2016 -21.10.2016 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

XX. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök hücre izolasyon karakterizasyon, Kocaeli Üniversitesi, Kurs, 07.12.2015 -11.12.2015 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

XIX. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları, Kök Hücre izolasyon karakterizasyon, Kocaeli ÜniversitesiKOCAELİ ÜNİVERSİTESİ, Kurs, 16.11.2015 -20.11.2015 (Ulusal) (Kurs Düzenleme Kurulu)

Katılımlı Kongreler

1. Uluslar arası Biyoloji Toplulukları Kongresi, 16-18 Nisan 2009
2. Uluslar arası Biyoloji Toplulukları Kongresi, 16-18 Nisan 2010
1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya.
- 1-1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Application Conference, 7-9 Ekim, 2011, Kayseri/TÜRKİYE.
- III. Kök Hücre Sempozyumu, 30 Kasım-1Aralık 2012, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- 1.Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Kongresi, 20-23 Mart 2014, Kocaeli
- Beta Cells in Health and Disease, Mayıs 21-22 2014, Kocaeli Üniversitesi
- Frontiers In Medical Sciences:Diabetes, Cancer and Their Connection, July 6-8th 2014, Marma Convention Center Maltepe University,Istanbul/Turkey

<p>16. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, s19-20, 15-19 Ekim 2014-Belek Antalya.</p> <p>51. Ulusal Diyabet Kongresi, 22-26 Nisan 2015-Beldibi Antalya.</p> <p>European Biotechnology Congress 7-9 May 2015-Bucharest/Romania.</p> <p>4th International Congress on Applied Biological Sciences, Nisan 2018, Eskişehir</p> <p>International Health Sciences and Biomedical Congress, 23-24 Ocak 2021, Ankara</p> <p><u>Katılımlı Kurslar</u></p> <p>1-Uludağ Üniversitesi Biyoloji Topluluğu Bilimsel Poster Hazırlama Eğitimi, 23 Ekim 2009, Bursa</p> <p>2-Uludağ Üniversitesi Kariyer Günleri 09, Mayıs 2010, Bursa</p> <p>3-18.Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu,5-9 Kasım-2012,Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli</p> <p>4-3rd Geneocell Summer School, 9-15 Eylül2013,Kocaeli</p> <p>5-Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kursu,9-19 Nisan 2012,Kocaeli Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi.</p> <p>6-TÜBA 3. Uluslararası Kök Hücre Kursu ‘Hematolojik Onkolojide İnovatif Hücre Tedaviler’, 19-22 Mayıs 2016, Antalya</p> <p><u>Sertifikalar</u></p> <p>1-Deney Hayvanları Kullanımı Sertifikası, Deney hayvanları üzerinde yapılacak araştırmalarda hayvanların kullanım teknikleri, Kocaeli Üniversitesi, Sertifika, 03.12.2012 -14.12.2012 (Ulusal)</p> <p>2Pedagojik Formasyon Sertifikası, Pedagojik Formasyon Eğitimi, Uludağ Üniversitesi, Sertifika, 06.07.2010 -21.01.2011 (Ulusal)</p>
--

EKLER

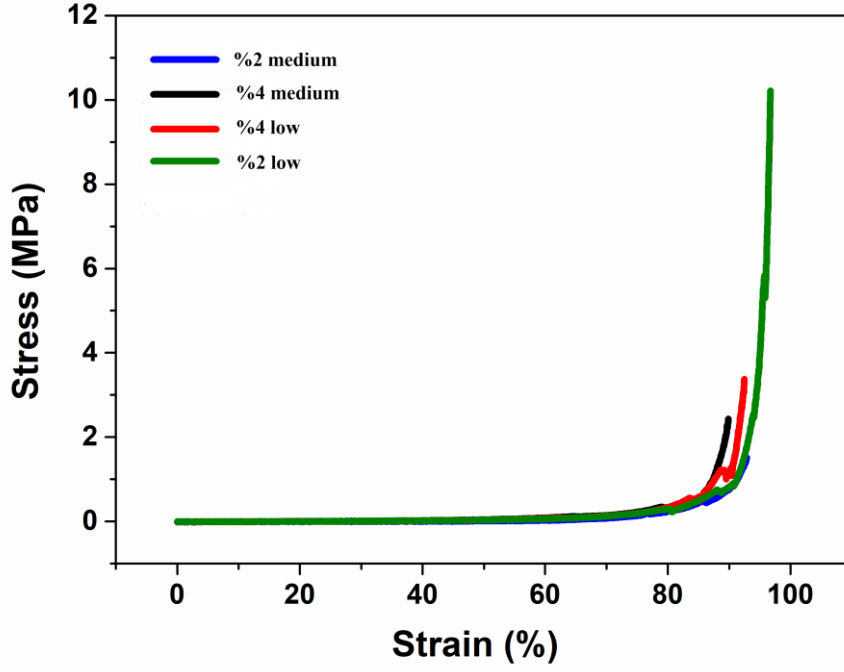
EK-1. Etik Kurul Onayı

T.C. KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ		HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
PROJE NO: 2019/2	ARAŞTIRMANIN ADI	Tip 1 Diabetes Mellitus Modelinde Langerhans Adacık ve Mezenkimal Kök Hücre Tabakalarının Makrokapsülasyon Yoluyla Konak Savunma Sisteminden Korunarak Fonksiyonunun Devamlılığının Sağlanması	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI DURUMU/ADI KURUMU	Doç.Dr.Yusuhan YAZIR / Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Arş.Gör.Bugra ÖNCEL DUMAN	
DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	x	
KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda bahçurü bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayananak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararla verilmiştir. KARAR NO: KOU HADYEK 1/3 - 2019 KARAR TARİHİ: 24.01.2019		
ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTEYEA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>Jehun</i>
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>M.Şahin</i>
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Raporör	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>C.Özer</i>
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>T.Ütkan</i>
Dr.Öğr. Üyesi Sabri ÇORA Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Dr.Öğr. Üyesi Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>F.Üçkan</i>
Prof. Dr. Zafer ÇANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>Z.Çantürk</i>
Prof. Dr. Melide YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embryoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>M.Yılmaz</i>
Prof. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	KOU Tıp Fakültesi Biyostatistik ve Tıbbi Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>C.Baydemir</i>
Doç. Dr. Gürler AKPINAR Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	<i>G.Akpınar</i>
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hekimliği Deneysel Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

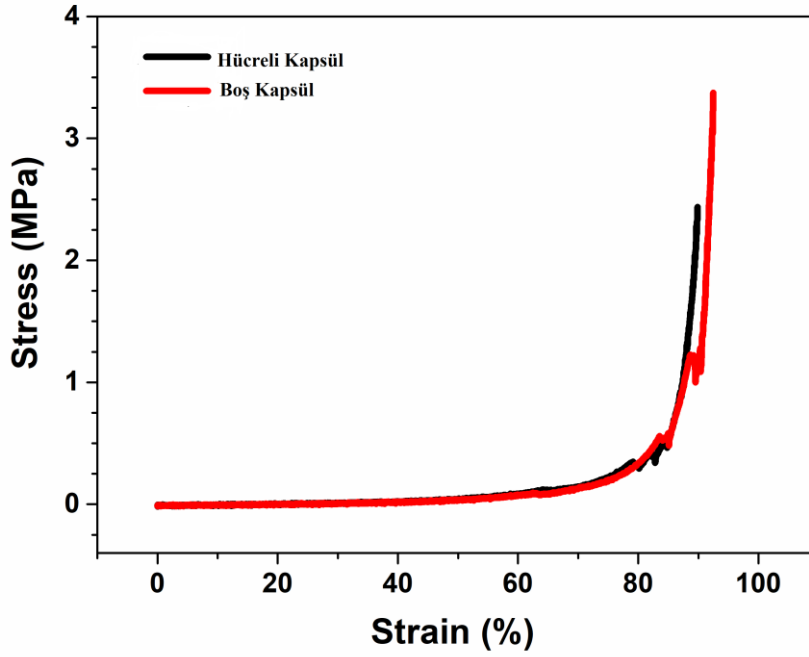
Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Sekreterliği, Unutkupe Yarıyolu, Etilo İnterbul Yolu 103te, 41380 Unutkupe / EDNİT
Tıkın 0532 395 30 30 / 395 30 30 / 395 30 30

EK-2. Aljinat Makrokapsül Mekanik Test

Farklı konsantrasyonlardaki aljinatın basma deneyi sonrası şekil değiştirme yüzdesi

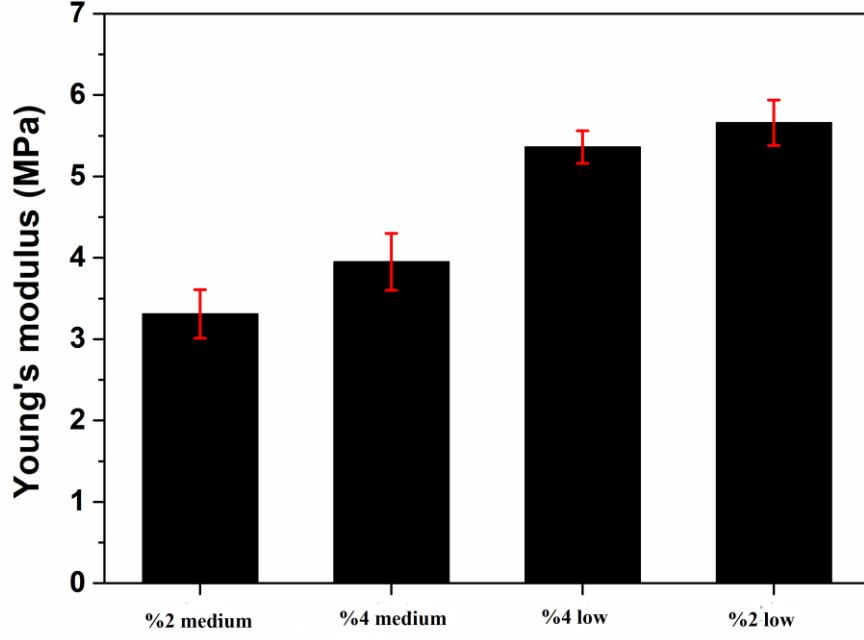


Hücreli ve boş makrokapsülün basma deneyi sonrası şekil değiştirme yüzdesi

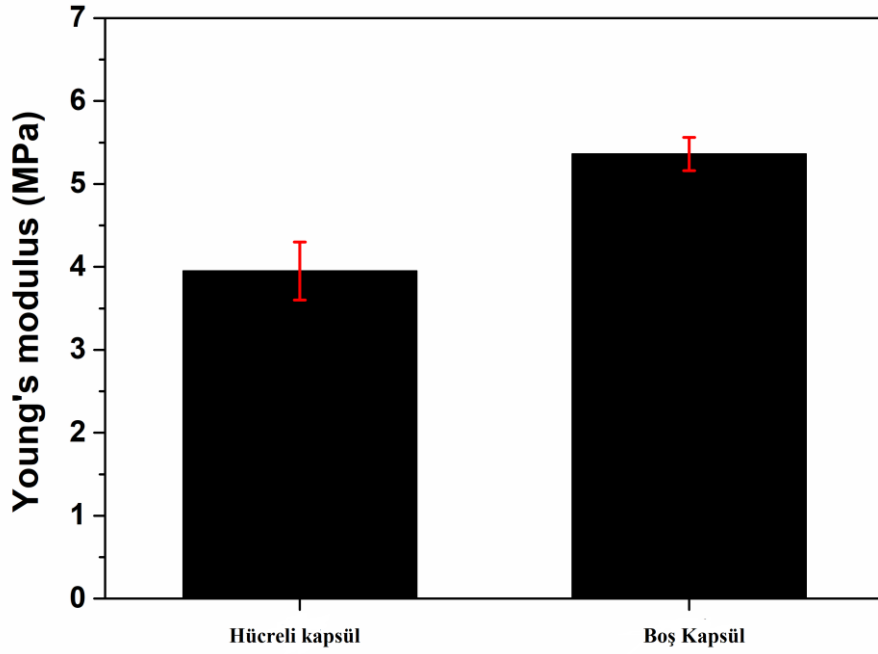


EK-3. Aljinat Makrokapsül Mekanik Test Elastik Modül

Farklı konsantrasyonlardaki aljinatın elastikiyeti



Hücreli ve boş makrokapsülün elastikiyeti



Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen şekilde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun şekilde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Romen rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde yazıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde yazıldı.
- Ana metin satır aralığı 1,5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar alfabetik sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.
- Lisansüstü eğitim sırasında yapmış olduğu yayınlar ve bildiriler eklendi.
- Teze ait intihal raporu eklendi.

..... / 07 / 2021

Prof. Dr. Yusufhan YAZIR

..... / 07 / 2021

Büşra ÖNCEL DUMAN