

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOKRİN PANKREAS ORGANOİD YAŞLANMA MODELİNDE
MİTOKONDİRİ HASARININ İNCELENMESİ**

Deren ASLAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ

2021

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOKRİN PANKREAS ORGANOİD YAŞLANMA MODELİNDE
MİTOKONDİRİ HASARININ İNCELENMESİ**

Deren ASLAN

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi- Proje No: TYL-2020-2191

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Onay Belge No: KÜ GOKAEK-2020/2.20

KOCAELİ

2021

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Endokrin Pankreas Organoid Yaşlanma Modelinde Mitokondri Hasarının İncelenmesi

Tez Yazarı: Deren ASLAN

Tez Savunma Tarihi: 24.06.2021

Tez Danışmanı: Doç Dr. Gökhan DURUKSU

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

Onay

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

.... /.... /2021

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

ÖZET

Endokrin Pankreas Organoid Yaşlanma Modelinde Mitokondri Hasarının İncelenmesi

Amaç: In vitro koşullarda senesens (hücre yaşlanması) uyarılmış Pax4 ve MafA pozitif sıçan pankreatik adacık mezenkimal kök hücrelerin (MafA⁺/Pax4⁺ sPA-MKH) kullanılmasıyla geliştirilen organoid modelinde mitokondri hasarının incelenmesi bu tez çalışmasında amaçlanmıştır.

Yöntem: In vitro koşullarda MafA⁺/Pax4⁺ sPA-MKH 'ler için üç farklı hücre yaşlanma modeli (konjugatif yaşlanma, replikatif yaşlanma ve oksidatif yaşlanma) kullanılarak hücrelerde senesens fenotipini en iyi geliştiren model uygulanmıştır. Hücreler matrijel içerisine gömülerek başarılı bir şekilde pankreas adacık organoidleri geliştirilmiştir. Organoid modelindeki hücreler pankreatik adacık hücrelerine farklılaştırılarak alfa-, beta-, delta- ve polipeptit hücre belirteçleri sitokimya, immün floresan, gen ekspresyonu ve ELISA yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Model sonrası hücrelerdeki mitokondri sayıları ve mitokondri hasarının belirlenebilmesi için MitoTracker ve TMRM boyamaları gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Hücre proliferasyonundaki azalma ve beta-galaktosidaz aktivitesindeki artışa göre konjugatif yaşlanma modelinin kök hücreler için en uygun model olduğu belirlenmiştir. Organoid yaşlılık modeli yaşlandırma süreci sonrasında MafA⁺/Pax4⁺ sPA-MKH 'leri kullanılarak geliştirilmiştir. Senesens fenotipinin organoidlerde validasyonu ve endokrin hücre farklılaşmasının uyarılması sonrasında organoid modeli ile 2-boyutlu kültürü karşılaştırılmış ve insülin gen ekspresyonu ve hücre dışına sekresyonunda artış gözlemlenmiştir. Dithizone boyaması sonucunda organoidler pozitif boyanarak pankreas adacık karakterinde olduğu görülmüştür. Glut-2 ve Glukokinaz gibi beta hücrelerinin glukoz taşıma mekanizmasının önemli molekülleri incelenmiş ve yaşlılık organoid modelinde daha zayıf ifade edildikleri gözlemlenmiştir. Organoid yaşlanma modelinde ise kontrole göre insülin salınımı gibi beta hücre belirteçlerinde de azalma olduğu gözlemlenmiştir. Organoid kültürlerinde senesens fenotipinin devam ettiği ve kontrole karşılaştırıldığında organoid modelinde mitokondri hasarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Kök hücre için konjugatif yaşlandırmanın yaşlandırma modelleri içerisinde en iyisinin olduğu ve ileri kültür aşamalarında bu fenotipin değişmediği gösterilmiştir.

MafA⁺/Pax4⁺ sPA-MKH 'lerinden pankreas adacık organoidleri geliştirilmiş ve adacık hücre belirteçlerini ifade ettiği belirlenmiştir. Organoid kültürlerinde senesens hücrelerinin terminal farklılaşmaya daha hızlı gitmesinin yanında insülini daha az salgıladığı, mitokondri membran potansiyelinin bozulduğu ve hücrelerde oksidatif stresin arttığı gözlemlenmiştir. Yaşlılık fenotipi gösteren organoidlerin tip 2 diyabetin erken dönemindeki süreçlerinde gözlemlenen belirteçleri taşıdığı belirlenmiştir. Erişkin kök hücreler kullanılarak pankreas adacık organoidleri bu çalışmada geliştirilmiş olup bu modelin kullanılmasıyla tip 2 diyabetin erken dönemindeki süreçlerin daha iyi anlaşılması sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler:

Mezenkimal kök hücre, organoid, endokrin pankreas, mitokondri hasarı, yaşlanma

ABSTRACT

Investigation of Mitochondrial Damage in Endocrine Pancreatic Organoid Aging Model

Objective: The aim of this thesis study was to investigate mitochondrial damage in an organoid model developed in vitro using Pax4 and MafA positive rat pancreatic islet mesenchymal stem cells (MafA⁺/ Pax4⁺ rPI-MSCs) induced senescence (cell aging).

Method: Using three different cell aging models (conjugative aging, replicative aging and oxidative aging) for MafA⁺/ Pax4⁺ rPI-MSCs under in vitro conditions, the model that best develops the senescence phenotype in cells was applied. Pancreatic islet organoids have been successfully generated by embedding cells in matrigel. The cells in the organoid model were differentiated into pancreatic islet cells and alpha-, beta-, delta- and polypeptide cell markers were examined using cytochemistry, immune fluorescence, gene expression and ELISA methods. After generating the model, MitoTracker and TMRM stainings were performed to determine the number of mitochondria and mitochondrial damage in the cells.

Results: With respect to the significant decrease in cell proliferation and the increased beta-galactosidase activity, it was determined that the conjugative aging model is the most applicable model for stem cells. The aging organoid model was developed using MafA⁺/ Pax4⁺ rPI-MSCs after the aging process. After the validation of senescence phenotype in organoids and the induction of endocrine cell differentiation, the improvement in both insulin gene expression and its extracellular secretion was observed in the organoid model compared to the 2-dimensional culture. As a result of dithizone staining, organoids were stained positively, which indicates that the organoids possess pancreatic islet character. Critical molecules of glucose transport mechanism in beta cells, such as Glut-2 and Glucokinase, were examined and it was found that they were expressed more weakly in the organoid aging model. In the organoid aging model, it was also observed that there was a decrease in beta cell markers, like insulin secretion, compared to the control. The senescence phenotype was observed to continue still in organoid cultures and the elevated level of mitochondrial damage was detected in the organoid model compared to the control.

Conclusions: The conjugative aging for stem cells was proven to be the best aging model, and this phenotype does not altered in the later stages of the culture. Pancreatic islet organoids were developed from MafA⁺/ Pax4⁺ rPI-MSCs and it was determined that they express islet cell markers. Besides the senescence cells underwent terminal differentiation

in higher number in organoid cultures, it has been observed that insulin is secreted less, mitochondrial membrane potential was impaired, and oxidative stress increased in cells. The organoids showing senescence phenotype carry the markers observed in the early stages of type 2 diabetes. Pancreatic islet organoids using adult stem cells were developed in this study, by using this model, a better understanding of the early stages of type 2 diabetes might be achieved.

Keywords:

Mesenchymal stem cell, organoid, endocrine pancreas, mitochondrial damage, aging



TEŞEKKÜR

Tez sürecim boyunca her koşulda bana destek olan, çalışma konumu belirlemede ve yürütmede beni her zaman destekleyerek, multidisipliner bir bakış açısıyla araştırma yapma olanağı sağlayan eğitim sürem boyunca hem bilimsel hem de manevi anlamda büyük desteğini ve yardımlarını esirgemeyen çok kıymetli danışman hocam **Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca KÖGEM ailesinin bir ferdi olmaktan gurur duyduğum ve bu aileye dahil olmama vesile olan ve desteklerini esirgemeyerek özgün disiplin anlayışını kazandıran değerli bölüm başkanım **Prof. Dr. Yusufhan YAZIR**'a tüm katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve birikimlerini sunan ve yüreklendiren hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**, **Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR** ve **Dr. Öğr. Üyesi Serap MERT**'e değerli katkıları için teşekkür ederim.

Güzellikle hatırlayacağım anıları paylaştığımız sevgili çalışma arkadaşlarım ve dostlarım; **Onur ÖZCAN**, **Ayşegül AÇIKSARI**, **Büşra ÖNCEL DUMAN**, **Candan ALTUNTAŞ**, **Gül Sinemcan KABATAŞ**, **Floriya YULDAŞEVA**, **Ahmet ÖZTÜRK**, **Canan TUĞ ÖZTÜRK**, **Kâmil Can KILIÇ** ve **Tülin BURHANOĞLU**'na teşekkür ederim.

Beni sevgiyle büyütüp bu günüme getiren, hayat boyu maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, aldığım her kararda koşulsuz arkamda duran; başta canım annem **Güldeniz ASLAN**, sevgili babam **Asım ASLAN** ve biricik kardeşim **Berat ASLAN**'a sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam süresince kriyo mikrotom cihazını kullanma imkânı tanıyan Sayın **Doç. Dr. Ayşe KARSON**'a teşekkür ederim.

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: TYL-2020-2191.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum “**Endokrin Pankreas Organoid Yaşlanma Modelinde Mitokondri Hasarının İncelenmesi**” 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) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

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

Deren ASLAN

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Kök Hücre.....	2
1.2.1. Kök Hücre Çeşitleri	3
1.2.2. Kök Hücre ve Yaşlanma.....	8
1.2.3. Kök Hücre ve Mitokondri Hasarının Oluşumu	10
1.3. Tip 2 Diyabetes Mellitus.....	12
1.4. Pankreas	14
1.5. Doku Mühendisliği	18
1.5.1. Organoid	19
1.6. Matrijel.....	21
2. AMAÇ	23
3. YÖNTEM.....	24
3.1. Pax4 ⁺ /MafA ⁺ Genleri Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması	24
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	25
3.2.1. 2-Boyutlu Yaşlanma Modellerinin Geliştirilmesi	26
3.3. 2-Boyutlu Deney Gruplarının Gen Ekspresyon Analizi	29
3.3.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	29
3.3.2. Kantitatif Ters Transkriptaz -Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	30
3.4. Organoid Kültürü ve Organoid Hücrelerinin Analizleri.....	32
3.4.1. Organoid Kültürü.....	32
3.4.2. Organoid Gömme İşlemi	34
3.4.3. Organoid Kriyo Kesit Alma İşlemi	35
3.4.4. Histokimyasal ve İmmün floresan Boyama.....	35

3.4.5. Live-Dead ve PKH26 Boyaması (Canlı-Ölü ve Hücre Çoğalmas1 Boyama Tayini)	36
3.4.6. Dithizone (DTZ) Boyaması ile Pankreas Kaynaklı Adacıkların Gösterilmesi..	37
3.4.7. Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi Yöntemiyle İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi	37
3.4.8. Mitokondri İzolasyonu ve Transferi	38
3.4.9. Glukoz ile Uyarılmış İnsülin Sekresyon (GSIS) Analizi	39
3.4.10. Organoid Modelinde Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi.....	39
3.4.11. Organoid Modelinde Total Mitokondri Miktarının Belirlenmesi	40
3.4.12. 3-Boyutlu Organoid Deney Gruplarının Gen Ekspresyon Analizi.....	40
3.5. İstatiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Pax4 ⁺ /MafA ⁺ Genleri Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması	44
4.2. X-Gal Boyama Analizi	48
4.3. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi	54
4.4. TMRM Boyamasının Akım Sitometri ile Gösterimi	57
4.5. 2-Boyutlu Hücrelerin Gen Ekspresyon Analizi	60
4.6. Organoid Kültürü ve Organoid Hücrelerinin Analizleri	69
4.7. Kriyo Kesit Alınan Organoidlere Histokimyasal Boyama Analizi	72
4.8. Organoid TMRM ve Mitotracker Boyama Analizi	73
4.9. Live-Dead ve PKH26 Boyama Analizi	76
4.10. Dithizone (DTZ) Boyama Analizi	77
4.11. Organoidlerin Birim Alana ve Adacık Başına Düşen Ortalama Hücre Sayısı	78
4.12. ELISA Analizi	80
4.13. İmmünfloresan Boyama.....	81
4.14. 3-Boyutlu Organoid Deney Gruplarının Gen Ekspresyon Analizi.....	85
5. TARTIŞMA	91
5.1. Sınırlılıklar	105
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	107
7. KAYNAKLAR.....	108
8. ÖZGEÇMİŞ.....	117
EKLER	118
EK.1 Etik Kurul Onayı	118

SİMGELER VE KISALTMALAR

2B: İki Boyutlu

3B: Üç Boyutlu

ACT- β : Beta Aktin

BSA: Bovine serum Albumin

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

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

Dithizone: 1,5-diphenylthiocarbazone

DM: Diabetes Mellitus

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DUOX-1: Dual oksidaz-1

ECM: Hücre Dışı Matriks

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

ELISA: Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi

FBS: Fetal Sığır Serumumu

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

FITC: Fluoresan İzotiyosiyonat

GCG: Glukagon

GCK: Glukokinaz

GLUT-2: Glucose transporter 2

GSIS: Glukozla Uyarılan İnsülin Salgısı

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

HE: Hematoksilen-Eozin

HO: Heme Oksijenaz 1

HRP: Horseradish Peroksidaz

IF: İmmünfloresan

IGF-1: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1

ITS: Insulin-Transferrin-Selenium

İns-1: İnsülin-1

İns-2: İnsülin-2

Ki67: Hücre Proliferasyon

MafA: Muskuloaponevrotik Fibrosarkoma Onkogen Homolog A

MCT-4: Monokarboksilat Transporter 4

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

NOD2: Nükleotid Bağlama Oligomerizasyon Alanı 2

Nox4: NADPH Oksidaz 4

Nrf2: Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör

OD: Optik Yoğunluk

OXPHOS: Oksidatif Fosforilasyon

p38 α : Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz

Pax4: Paired Box Gene 4

PBS: Fosfat Tamponlu Salin Çözeltisi

Pdx-1: İnsülin Promotör Faktör 1

PPy: Pankreatik Polipeptid

qRT-PCR: Kantitatif Geri Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAGE: İleri Glikasyon Son Ürün Reseptörü

RNA: Ribonükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RT-PCR: Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SHE: Standart Hidrojen Elektrot

SOD1: Süper Oksit Dizmutaz 1

SST: Somatostatin

T1DM: Tip 1 Diabetes Mellitus

T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

TBM: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TGF β : Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1

TMRM: Tetrametil rodamin metilester

TOMM20: Mitokondriyal Dış Membran Translokator

VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

WST-1: Suda Çözünür Tetrazolium Tuzu 1

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Kök Hücre Sınıflandırma Diagramı.....	4
Şekil 1.2. Multipotent hücrelerin farklılaşmalarını gösteren şema	6
Şekil 1.3. Yaşlanmanın kök hücreye olan etkisini gösteren şema (Laugi, 2020).....	12
Şekil 1.4. İnsülin için immünohistokimyasal boyama.	15
Şekil 1.5. Glukagon için immünohistokimyasal boyama.....	15
Şekil 1.6. İnsan adacık ve sıçan adacık türlerinin ventral ve dorsal adacıkların oranı arasındaki farkı gösteren diyagram.	16
Şekil 1.7. İnsülin salgı reseptörleri.....	18
Şekil 1.8. Organoid kültürün gelişmesini gösteren zaman çizelgesi.	20
Şekil 3.1. Pax4 ⁺ /MafA ⁺ Genleri Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması.....	25
Şekil 3.2. Yaşlanma in vitro modeli geliştirme ve mitokondri hasarı belirleme çalışmasının deney planı.....	26
Şekil 3.3. 2-boyutlu sPA-MKH hücrelerinden 3-boyutlu organoid yapısının oluşturulması	33
Şekil 3.4. Oluşturulan 3-boyutlu organoid modelini gömme, dondurma ve kesit alma	34
Şekil 3.5. Sandviç ELISA testinin çalışma prensibi.....	38
Şekil 4.1. Pax4 ⁺ /MafA ⁺ geni aktarılmış pankreatik adacık mezenkimal kök hücre Pasaj 7 kültür morfolojisi.....	44
Şekil 4.2. Pax4 ⁺ /MafA ⁺ geni aktarılmış pankreatik adacık mezenkimal kök hücre Pasaj 7 hücrelerine 28 gün boyunca besiyer değişimi yapılarak epitel benzeri hücre morfolojisinin gösterimi.	45
Şekil 4.3. Pax4 ⁺ /MafA ⁺ geni aktarılmış pankreatik adacık mezenkimal kök hücre Pasaj 15 hücrelerinin hücre morfolojisinin gösterimi.....	46
Şekil 4.4. Sıçan pankreatik adacık kaynaklı Pax4 ⁺ /MafA ⁺ genleri aktarılmış mezenkimal kök hücrelerinin kültür edilmiş (P7) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immünofenotipik özellikleri.....	47
Şekil 4.5. Sıçan pankreatik adacık kaynaklı Pax4 ⁺ /MafA ⁺ genleri aktarılmış mezenkimal kök hücrelerinin kültür edilmiş (P15) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immünofenotipik özellikleri.....	47

Şekil 4.6. Sıçan pankreatik adacık kaynaklı Pax4 ⁺ /MafA ⁺ genleri aktarılmış mezenkimal kök hücrelerinin kültür edilmiş (P7-28) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immünofenotipik özellikleri.	48
Şekil 4.7. Oksidatif hücre yaşlanmasının X-gal boyaması (24 saat).	49
Şekil 4.8. Oksidatif yaşlanmanın X-gal boyama skoru (24 saat)..	50
Şekil 4.9. Oksidatif hücre yaşlanmasının X-gal boyaması (72 saat)..	53
Şekil 4.10. Oksidatif yaşlanmanın X-gal boyama skoru (72 saat).	54
Şekil 4.11. Konjugatif ve replikatif hücre yaşlanmasının X-gal boyaması.	51
Şekil 4.12. Konjugatif ve replikatif hücre yaşlanmasının X-gal boyama skoru.	52
Şekil 4.13. Konjugatif yaşlandırma (P7-28) ve replikatif yaşlandırma (P15) gruplarına takiben yapılan canlılık analizi.	55
Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ uygulamasına takiben 24. saatte yapılan canlılık analizi.	56
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ uygulamasına takiben 72. saatte yapılan canlılık analizi.	57
Şekil 4.16. Kültür ortamında konjugatif yaşlanma (P7-28) ve replikatif yaşlanma (P15) sonrası hücrelere yapılan TMRM boyaması sonrası mitokondri membran potansiyeli analizi.	58
Şekil 4.17. 30 dk kültür ortamında H ₂ O ₂ uygulanmış olan P7 hücrelerinin 24. saatte yapılan TMRM boyaması sonrası mitokondri membran potansiyeli analizi.	59
Şekil 4.18. 30 dk kültür ortamında H ₂ O ₂ uygulanmış olan P7 hücrelerinin 72. saatte yapılan TMRM boyaması sonrası mitokondri membran potansiyeli analizi.	60
Şekil 4.19. Belirli dozlarda H ₂ O ₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; İnsülin gen ekspresyonu analiz grafiği.	61
Şekil 4.20. Belirli dozlarda H ₂ O ₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; Ki67 gen ekspresyonu analiz grafiği.	61
Şekil 4.21. Belirli dozlarda H ₂ O ₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; TGFβ1 ve p38α gen ekspresyonu analiz grafiği.	62
Şekil 4.22. Belirli dozlarda H ₂ O ₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; Nrf2 gen ekspresyonu analiz grafiği.	63
Şekil 4.23. Belirli dozlarda H ₂ O ₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; RAGE, SOD1 ve HO1 gen ekspresyonu analiz grafiği.	64
Şekil 4.24. Belirli dozlarda H ₂ O ₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; Nox4 ve NOD2 gen ekspresyonu analiz grafiği.	65

Şekil 4.25. İnsülin gen ekspresyon analizi- Pdx-1, Glut-2 ve Glukokinaz gen ekspresyon analizi.	66
Şekil 4.26. Glukagon gen ekspresyon analizi- Tomm20, Nrf2 ve MCT-4 gen ekspresyon analizi.	67
Şekil 4.27. Ki67 gen ekspresyon analizi- TGFβ1 ve p38α gen ekspresyon analizi.	67
Şekil 4.28. RAGE, SOD1 ve HO1 gen ekspresyon analizi- Sst1 ve PPy gen ekspresyon analizi	68
Şekil 4.29. NOD2, Nox4 ve Duox1 gen ekspresyon analizi.	69
Şekil 4.30. Matrijel ile kaplama yapılan sPA-MKH Pax4 ⁺ /MafA ⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 3. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.....	70
Şekil 4.31. Matrijel ile kaplama yapılan sPA- MKH Pax4 ⁺ /MafA ⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 5. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.....	70
Şekil 4.32. Matrijel ile kaplama yapılan sPA- MKH Pax4 ⁺ /MafA ⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 7. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.....	71
Şekil 4.33. Matrijel ile kaplama yapılan sPA- MKH Pax4 ⁺ /MafA ⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 14. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.....	72
Şekil 4.34. Matrijel ile kaplama yapılan sPA- MKH Pax4 ⁺ /MafA ⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 21. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü.....	72
Şekil 4.35. P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinden 21. günün sonunda alınan kriyo kesitlerde HE boyaması.	73
Şekil 4.36. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 ve P7-28 örneklerinin mitokondriyal transmembran potansiyel seviyesinin TMRM boyaması ile gösterilmesi. ..	74
Şekil 4.37. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 (A) ve P7-28 (B) örneklerinin mitokondriyal transmembran potansiyel seviyesinin TMRM boyaması ile konfokal mikroskopta gösterilmesi.....	74
Şekil 4.38. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 ve P7-28 örneklerinin mitotracker boyası ile hücrelerdeki mitokondriyi işaretleyerek, plazma membranında pasif olarak yayılan ve aktif mitokondride biriken Mitotracker problemlerinin kırmızı floresan işaretleyici ile gösterilmesi.	75
Şekil 4.39. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 ve P7-28 örneklerinin mitotracker boyası ile hücrelerdeki mitokondriyi işaretleyerek, plazma membranında pasif olarak yayılan ve aktif mitokondride biriken Mitotracker problemlerinin kırmızı floresan işaretleyici ile konfokal mikroskopta gösterilmesi.....	75

Şekil 4.40. 21. günün sonunda kültürü sonlanan P7 ve P7-28 gruplarının Live-Dead boyama görüntüleri.	76
Şekil 4.41. 21. günün sonunda kültürü sonlanan P7 ve P7-28 gruplarının PKH26 boyama görüntüleri.	77
Şekil 4.42. P7 ve P7-28 organoidlerinin Dithizone boyama stereo mikroskop görüntüleri.	78
Şekil 4.43. 21. günün sonunda kültürü sonlanan kriyo kesit sonrası DAPI boyaması yapılan organoid model grupları için manuel olarak hücre sayısı belirlenerek birim alana düşen hücre oranı grafiği.	79
Şekil 4.44. 21. günün sonunda kültürü sonlanan kriyo kesit sonrası DAPI boyaması yapılan organoid model grupları için manuel olarak hücre sayısı belirlenerek adacık başına düşen ortalama hücre sayılarının hesaplama grafiği.	79
Şekil 4.45. P7 ve P7-28 deney gruplarının İnsülin ELISA analizi.	80
Şekil 4.46. P7 ve P7-28 deney gruplarında birim hücre başına salgılanan insülin miktarı ve GSIS analizi.	81
Şekil 4.47. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde Glut2 ve somatostatin boyaması.	82
Şekil 4.48. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde glukagon ve Gck boyaması.	83
Şekil 4.49. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde insülin boyaması.	84
Şekil 4.50. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde insülin boyaması.	84
Şekil 4.51. Organoidlerde insülin gen ekspresyon analizi.	85
Şekil 4.52. Organoidlerde Pdx-1, Glut-2 ve Glukokinaz gen ekspresyon analizi.	86
Şekil 4.53. Organoidlerde Glukagon gen ekspresyon analizi.	86
Şekil 4.54. Organoidlerde TOMM20, Nrf2 ve MCT-4 gen ekspresyon analizi.	87
Şekil 4.55. Organoidlerde Ki67 gen ekspresyon analizi.	88
Şekil 4.56. Organoidlerde TGF β 1, p38 α gen ekspresyon analizi.	88
Şekil 4.57. Organoidlerde RAGE, SOD1 ve HO1 gen ekspresyon analizi.	89
Şekil 4.58. Organoidlerde Somatostatin ve Pankreatik Polipeptit gen ekspresyon analizi.	90
Şekil 4.59. Organoidlerde NOD2, Nox4 ve Duox-1 gen ekspresyon analizi.	90

TABLÖLAR

Tablo 3.1. sPA-MKH'lerin çoğaltılmasında kullanılan besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.....	25
Tablo 3.2. Yaşlanma modelinin deney grupları.....	26
Tablo 3.3. qRT-PCR analizi için kullanılan genler ve primerlerinin baz dizilimleri.	31
Tablo 3.4. İn vitro Organoid Yaşlanma Modeline Göre Yaşlanmış Hücre ve Genç Hücre Tanımları	33
Tablo 3.5. Blok Serum, primer antikor ve sekonder antikor tablosu.....	36
Tablo 3.6. Organoid qRT-PCR analizi için kullanılan genler ve primerlerinin baz dizilimleri.	42



1. GİRİŞ

1.1.Genel Bilgiler

Diabetes mellitus, insülin eksikliği ya da var olan insülinin etkisizliği nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, kan glukoz homeostazının bozulduğu ve sürekli tıbbi bakım gerektiren kronik bir metabolik bozukluktur (Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2018). Diyabet, endokrin pankreasın işlevsizliğinden kaynaklanan bir hastalıktır. Bu hastalık, esas olarak otoimmün yıkım (tip 1 diabetes mellitus) veya insülin direnci /gluko lipo toksisitesine (tip 2 diabetes mellitus) bağlı olarak pankreas β hücrelerinin kaybı veya işlev bozukluğu ile gelişir (DeFronzo, 2015; Katsarou, 2017). Diyabet tedavisinde, kök hücre çalışmalarının getirdiği umut, pankreasta insülin salgılama görevi yapan beta-adacık hücrelerinin yedeklenmesi sonucu oluşmaktadır.

Hücre farklılaşması ve pluripotent kök hücrelerin veya doku türevli progenitör hücrelerin kendi kendine organizasyonu yoluyla oluşturulan ve destekleyici stromal elementler içerebilen 3B hücre kültürü sistemi organoidlerdir (Kratochvil ve ark., 2019). Organoidler, primer dokulardan, pluripotent kök hücrelerden (iPSC) veya embriyonik kök hücrelerden uygun fiziksel ve biyokimyasal işaretler kullanılarak üretilir (Clevers, 2016). Fizyolojik bağlamda kültüre edilmiş insan hücrelerine dayanan organoidler, mekansal organizasyon ile çoklu etkileşimde bulunan hücre tiplerini oluşturma avantajına sahiptir (Zhang ve ark., 2018). Genom, yaşla birlikte genetik ve epigenetik değişikliklerin kazanımına yol açan çeşitli mekanizmalarla zarar görebilir. DNA hasarı onarım yollarını aktive eder ancak aynı zamanda mutasyonları, apoptoz veya yaşlanmayı tetikleyebilir (Hu ve ark., 2018).

Glikasyon, oksidasyon ve yanlış katlanma, yaşlanma sırasında proteinlerin moleküler hasarları arasındadır. Özellikle, kollajen, elastin ve kristalin gibi hücre dışı matriks proteinleri, enzimatik olmayan glikasyonlara karşı hassastır ve bu, hücre dışı matriksin fiziksel özelliklerinin değişmesine yol açar (Hu ve ark., 2018). Bu nedenle yapılacak olan çalışmada matrijel kullanarak elastik bir yapı oluşturulması amaçlanmaktadır.

Organoid modelleri birtakım çalışmalarda, ör. gelişimsel biyoloji, hastalık modellenmesi veya ilaç testi, büyük bir öneme sahiptir. Organizmalar yaşlandıkça, mitokondrinin yapısı ile fonksiyonları arasındaki ilişkinin bozulmasına yol açan birtakım moleküler değişiklikler meydana gelmektedir. (Phillip, 2019). Organoid kültürü sırasında kök hücreler, olgun dokunun yapısını ve işlevini taklit edecek şekilde kompleks hücresel yapıları oluşturmaktadır. Bu doğrultuda hücreler toplanır ve farklılaşır (Dutta, Heo, Clevers, 2017; McCauley ve Wells, 2017)

Yaşlanma, modern biyolojide temel bir sorun olmaya devam etmektedir. Hücresel ölçekte yaşlanma üzerine birtakım teoriler olmasına rağmen, gözle görülemeyen bozuklukların, dokuların, organların ve nihayetinde organizmanın gözle görülebilen etkileri hakkında bilimiz sınırlıdır (Acun, Vural, Zorlutuna, 2017). Yaşlanma, zamanla hücresel hasarın birikmesinin önemli sebeplerinden biri olarak görülür (López-Otín, Blasco, Partridge, Serrano, Kroemer, 2013). Organizmalar yaşlandıkça, mitokondri yapısı ve fonksiyon ilişkisinde bütünlüğün azalmasına yol açan spesifik değişiklikler meydana gelir (Lopez-Otin ve ark., 2013; Sahin, 2012).

Bu çalışmada odaklanılan konu in vitro hücre yaşlanma modeli olarak organoidin geliştirilmesi ve böylece yaşlanma sürecinin organoid üzerinde incelenmesidir. Kök hücrelerin endokrin hücreye doğru farklılaşması sağlanarak insulin salgılayan β benzeri hücrelerin eldesiyle yaşlanmanın β hücreleri ve dolayısıyla pankreas adacıkları üzerindeki etkilerinin kültür ortamında incelenmesi bu çalışmanın kapsamı içerisinde. Geliştirilecek olan in vitro yaşlanma modelinde pankreas adacıkları organoid tekniğiyle oluşturulup geliştirilecektir. Kültür sırasında bu adacıkların işlevlerinin incelenmesiyle tip 2 diyabet gelişiminin patolojik göstergeleri de incelenecektir. Böylece yaşlanma ile tip 2 diyabet arasında in vitro koşullarda nasıl bir ilişkinin olduğu çalışma kapsamında incelenmesi planlanmaktadır.

1.2.Kök Hücre

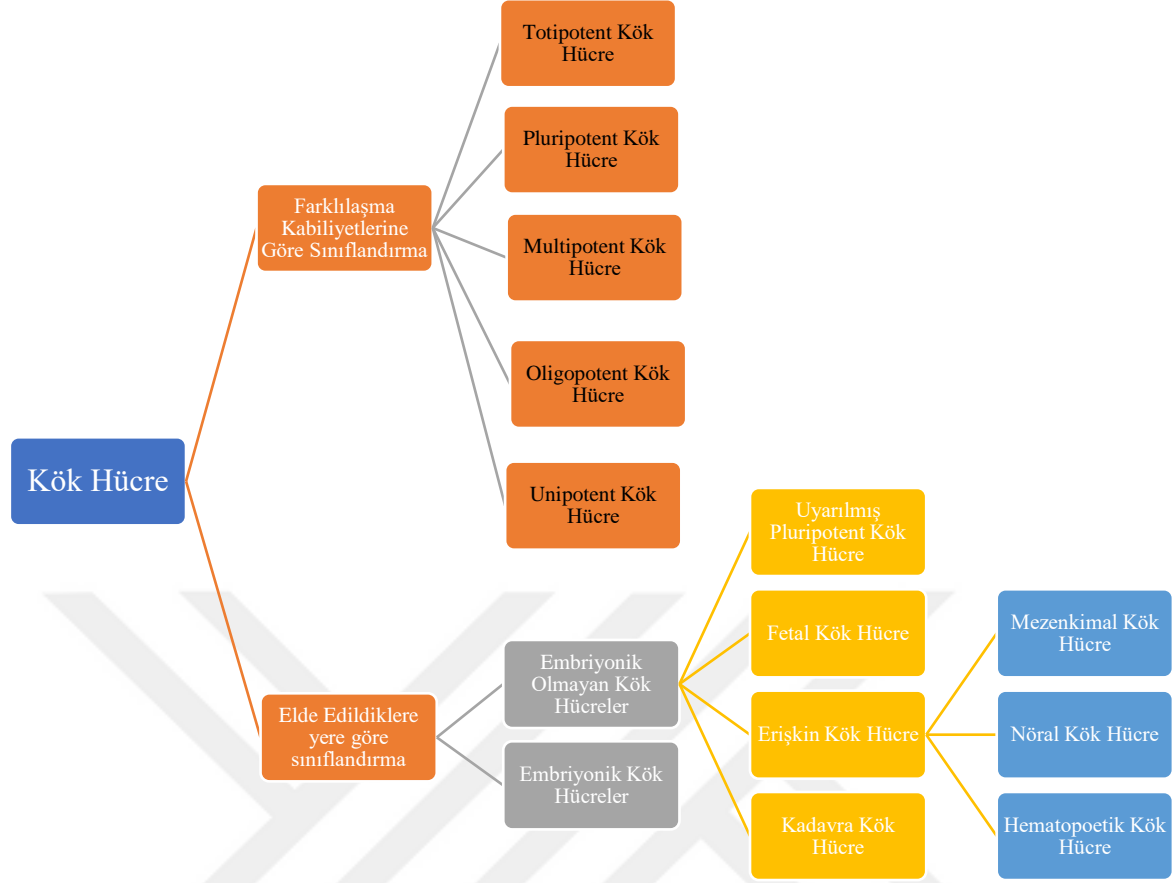
Kök hücreler canlı vücudunda, kendini yenileyebilen ve vücudun gereksinimine uygun farklı hücre tiplerine yönelebilen yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanır. Farklılaşmamış olan bu hücreler, diğer hücrelerin aksine başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşır, kendini yenileme yeteneği ile tek bir hücreden birden fazla hücre dizisine farklılaşabilme yeteneğine de sahiptirler (Okarma, 1998).

Kök hücreler, genler aracılığıyla aldıkları sinyale göre çoğu dokunun temel yapısını meydana getirebilmelerine rağmen, spesifik bir göreve sahip olan (Örneğin; sinir hücresi, kas hücresi, salgı epitel hücreleri vb.) özelleşmiş hücrelerin fonksiyonunu yerine getiremezler. Telomeraz enzim aktivitesi aracılığı ile kök hücrelerin sınırsız bölünme yetenekleri oluşmaktadır. Hücrelerin bölünme yeteneğini sınırlayan DNA sarmalının uç bölgesinde telomer zinciri bulunmaktadır. Kök hücrelerde ise telomer zinciri oldukça uzun ve buna bağlı olarak telomeraz enzim aktivitesi yüksektir. Böylece, kök hücreler kendi kendine replikasyon göstererek çok uzun süre çoğalabilirler (Aragona ve ark., 2000).

Kök hücreyi diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri de farklılaşma kapasitelerinin yüksek oluşudur. Çok hücreli organizmaları meydana getirmek amacıyla bir araya gelmiş hücrelerin, spesifik bir yapı kazanmak ve özgün görevleri üstlenmek üzere geçirdikleri bir dizi değişim ‘‘Farklılaşma’’ olarak tanımlanır. Kök hücreler farklılaşma potansiyeli ile organizmadaki yapım ve onarım olaylarında önemli görevlere sahiptirler (Huang ve ark., 2013).

1.2.1. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler kendi kendilerini yenileyebilen ve uygun kültür ortamlarında farklı hücrelere farklılaşabilme potansiyeli olan özelleşmemiş öncül hücrelerdir. Farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırıldığında totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent; elde edildikleri kaynağa göre sınıflandırıldığında ise embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak adlandırılırlar (Can, 2014).



Şekil 1.1. Kök Hücre Sınıflandırma Diagramı.

1.2.1.1. Totipotent Kök Hücre

Zigot, canlının yapısındaki bütün hücelere farklılaşma yeteneğinde olan ilk embriyonik kök hücredir ve bu hücelere herşeyi yapabilme kabiliyetinde olan “totipotent hücre” denir (Totus- tam, bölünmemiş; potentia-güç anlamındadır). Zigotun bölünmesiyle oluşan blastomer olarak tanımlanan tüm hücreler için de totipotent özellik geçerlidir (Morgani ve ark., 2013).

Kök hücreler farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırıldığında ilk önümüze çıkan totipotent kök hücredir. Embriyoda ilk 4 gün içinde bulunan hücreler değişme yetenekleri en fazla olan hücrelerdir. Tüm canlı vücudunu oluşturabilir, yani her türlü doku ve organa dönüşme yetenekleri vardır. Bu nedenle totipotent olarak nitelendirilirler (Can, 2008; Fortier, 2005).

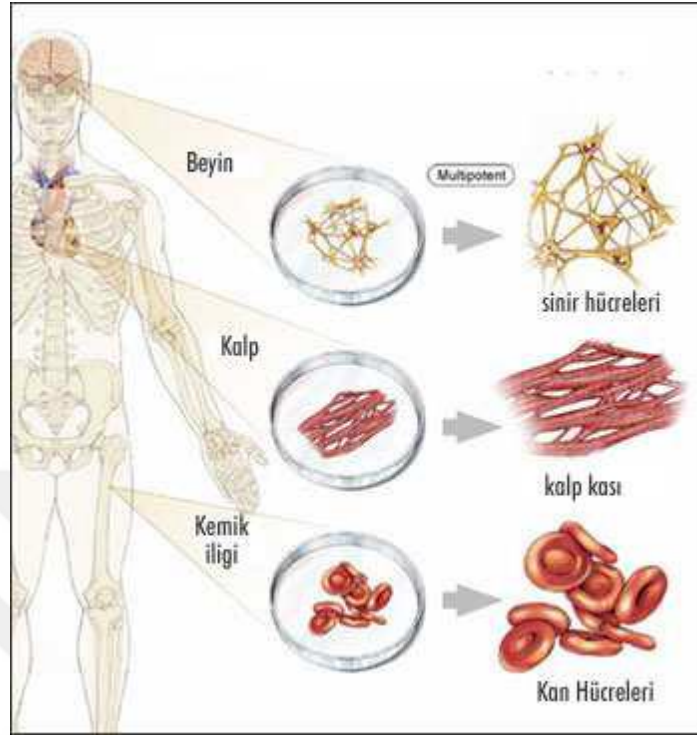
1.2.1.2. Pluripotent Kök Hücre

Fertilizasyonun 5. gününden itibaren, totipotent hücreler değişim göstererek, endoderm ve ektoderm tabakalarını oluştururlar. Yeni oluşan bu yapıya “blastosist” adı verilir. Blastosistin ektoderminden, embriyonun beslenmesi ve solunumunu sağlayacak olan plasenta ile yavruyu saran koryon kesesi gelişirken, endoderm tabakasından göz, kalp, beyin gibi iç organlar ile kaslar ve kemikler gelişir (Brink ve ark., 2008). Bu dönemde kök hücreler pluripotent özelliğindedir. Pek çok doku ve organ gelişmesinde rol alırlar. Fakat bir canlıyı tümüyle oluşturamazlar (Can, 2008; Fortier, 2005). Blastosistin endodermindeki hücreler pluripotent kök hücreler sınıfına aittir. Bu hücreler erken gelişim döneminde bulunurlar ve organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturarak vücudun herhangi bir tür hücresine dönüşme yeteneğine sahiptirler. Pluripotent kök hücrelere aynı zamanda embriyonik kök hücreler de denilmektedir (Thomson ve ark., 1998). Pluripotent kök hücre embriyonun üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektoderme ait hücrelere farklılaşabilme yeteneğindeki hücrelerdir. Bu hücrelerin sahip oldukları farklılaşma potansiyeli ile ekstra embriyonik tabakalar hariç bir canlıyı tümünden oluşturabilecekleri kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda erken dönem insan embriyolarından alınan hücreler ile fetüs dokusunda gonat kaynaklı hücrelerin pluripotent kök hücre oldukları gösterilmiştir (Mitalipov ve Wolf, 2009).

1.2.1.3. Multipotent Kök Hücre

Multipotent kök hücreler (MKH), diğer kök hücreler ile benzer ana karakterlere sahiptir. Diğer kök hücreler gibi, çok potansiyelli kök hücreler de uzun süre kendi kendini yenileme yeteneğine sahip olan ve belirli eylemlerle belirli hücrelere yol açan farklılaşmamış hücrelerdir. MKH, gelişme, doku iyileşmesi ve savunma prosedüründe önemli bir anahtar görevi görür (Mundra, Gerling, Mahato, 2013; Murphy, Moncivais, Caplan, 2013). Multipotent kök hücre içerisinde yer aldığı germ tabakasına ait hücre ve doku gruplarına farklılaşabilme özelliği gösteren hücrelerdir. Örneğin kan kaynaklı (hematopoietik) kök hücreler sadece kan hücrelerine farklılaşma göstermektedirler (Şekil 1.2) (Sarugaser, Hanoun, Keating, Stanford, ve Davies, 2009). Anne karnında büyüyen bebek, gebelik boyunca doku ve organların hızla büyümeye başlaması ile doğum sonrasına hazırlanır. Bu dönemde bulunan kök hücreler değişim yeteneklerini kısmen kaybederler ve bu kök hücrelerin farklılaşması daha sınırlı sayıdadır. İnsan vücudunda sadece birkaç hücre türüne dönüşebilen hücrelerdir. Laboratuvar ortamında gerekli koşullar ve sinyaller sağlandığında

daha fazla hücre türüne dönüşebilmeleri mümkündür. Bu hücreler multipotent olarak nitelendirilir (Can, 2008; Fortier, 2005).



Şekil 1.2. Multipotent hücrelerin farklılaşmalarını gösteren şema

Mezenkimal kök hücreler

Yetişkin mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik onarımında hücre ve hücre bazlı gen terapisi için en umut verici araçlardan biri olarak kabul edilir (Gafni ve ark., 2004). Mezenkimal kök hücre, erişkin vaziyette kök hücre olup dokularda destek bölümü olarak bilinen stroma hücrelerinin de temelini oluşturmaktadır. MKH, hücrelerin bağ dokularında bulunur. Bu kök hücreler bulunduğu dokudan hasarlı bir dokuya geçebilmektedir. Kök hücreler hasarlı olan dokularda doku tamirini gerçekleştirirler. Mezenkimal kök hücre olarak tanımlanan bu kök hücrenin keşfi ilk olarak kanda farklılaşabilen öncü bir hücre olarak keşfedilmiştir.

Mezenkimal kök hücreler her ortamda farklılaşma özelliklerine sahiptir. Akciğer, mide ve kemik dokusundaki MKH ortamdaki farklı koşullar nedeniyle görünüm olarak farklılık kazanırlar. Yetenekleri kesin değildir ve buldukları her ortama göre de yetenekleri değişebilmektedir. Herhangi bir doku da hasar tespit edildiği takdirde ise başka dokularda da hasar varsa tespit edilebilmektedir. Mezenkimal kök hücreler başka bir dokuda hasar

oluşması durumunda diğer dokuya geçer ve bu dokuda oluşan hasarı düzeltmeye ve onarmaya başlar. Mezenkimal kök hücreler nasıl bir uygulama olduğu ise bağ doku kökenli hücrelerle birçok farklı doku hücresinde farklılaşma ile çözünebilen faktörler salgılayarak doku ve organ birleşmesine yardımcı olarak birçok durumu da lehine çevirerek hem gen aktarımında kolaylık sağlar hem de kalıtsal hastalıklarda birçok alanda oldukça yüksek uygulanma potansiyeli vardır.

1976 ilk kez yılında fetal buzağı serumu kullanılarak kemik iliği kültüründe adezyon yeteneği gösteren, morfolojik yapıları fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin kemik ve yağ hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir (Friedenstein, Gorskaja, Kulagina, 1976). Bu hücrelerin sonradan yapılan çalışmalarla hematopoietik pluripotent kök hücreler olmadığı belirlenmiş ve MKH olarak adlandırılmışlardır (Andrades ve ark., 2011).

MKH ayrımını yapabilmek için kullanılan temel özellikler;

1. MKH'ler standart kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilen hücrelerdir,
2. MKH'ler yüzeylerinde CD105, CD73 ve CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmelerine rağmen, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR gibi tipik belirteçleri eksprese etmezler,
3. *In vitro* ortam koşullarında osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara hücrelerine farklılaşabilirler (Dominici ve ark., 2006).

Kaynaklarına bakılmaksızın, farklılaşmamış MKH'ler, fibroblast benzeri morfolojiye ve kendi kendilerini kopyalama kabiliyetine sahip hücrelerdir. Dolayısıyla potansiyel olarak, doku ve organ rejenerasyonu için yeterli sayılara ulaşmak üzere çoğaltılabilirler (Satija ve ark., 2007).

MKH'ler kültür ortamında çoğalırken ortama bazı büyüme ve transkripsiyon faktörleri eklenmezse çoğalmaya devam etmekte ama farklılaşma görülmemektedir. Farklılaşma sırasında aktive olacak transkripsiyon programlarını belirleyen ve etkileyen içsel ve dışsal faktörler önemlidir (Mitalipov ve Wolf, 2009).

1.2.1.4. Oligopotent Kök Hücre ve Diğerleri

Oligopotent kök hücreler kendi kendini yenileyebilir ve yalnızca yakından ilişkili hücre tiplerine farklılaşabilir. Hem miyeloid hem de lenfoid soylara farklılaşabilen hematopoietik kök hücreler, oligopotent kök hücrelerin bir örneğidir.

Bunun dışında, iki hücre türü olan hepatosit ve kolanjiosit hücrelerine farklılaşabilen hücrelere bipotent (Chikada, Ito, Yanagida, Nakauchi, Kamiya 2015), tek bir hücre türüne farklılaşabilen hücrelere ise unipotent kök hücreler denmektedir. Unipotent kök hücreler en az etkili olanlardır. Örnek olarak kas kök hücreleri verilebilir. Kendilerini yenileyebilir ve yalnızca bir hücre türüne farklılaşabilirler (Ilic ve Polak, 2011).

1.2.2. Kök Hücre ve Yaşlanma

Hücre yaşlanma (senesens) ilk kez 1961 yılında insan diploid fibroblastlarının kültürde sınırlı sayıda hücre bölünmesinin gözlemlenmesi ile ortaya çıkmıştır (Hayflick ve Moorhead, 1961). Daha sonra, birincil kültürdeki çoğu normal hücre türünün, nihayetinde replikatif yaşlanma adı verilen bir büyümeyi durdurma durumuna girdiği bulunmuştur (Cristofalo, Lorenzini, Allen, Torres, Tresini, 2004). Bu durum, telomeraz aktivitesinin yokluğunda, DNA'nın son replikasyon durumuna girmesi sonucunda telomer kısalmasının meydana gelmesi ile ilişkilidir (Harley, Futcher, Greider, 1990). Yaşlanma ile hücre çoğalma döngüsü durdurulur ve hasarın sonraki nesillere aktarılması engellenir (Matsumura, Zerrudo, & Hayflick, 1979). Bu hücreler morfolojik olarak bir değişikliğe uğrar, şekil olarak genişler ve düzleşir ve ayrıca beta-galaktosidaz (senescence associated beta galactosidase, SA-b-gal) ile ilişkili yaşlanmayı ifade eder (Dimri ve ark., 1995). Moleküler düzeyde yaşlanma, çok sayıda genin ekspresyonundaki değişikliklerle ilişkilidir (Dierick ve ark., 2002; Krtolica ve Campisi, 2002). Dikkat çekici bir şekilde, hücre döngüsü regülasyonunda yer alan iki yol, p53 yolu ve retinoblastoma (Rb) yolu, replikatif yaşlanmada önemli roller oynar (Campisi, 2005). Artık, replikatif yaşlanmanın, hücre yaşlanma adı verilen daha yaygın bir tepkinin yalnızca bir örneği olduğu açıktır. Çalışmalar, yaşlanan fenotipin erken geçiş hücrelerinde DNA hasarına neden olan (Chen ve ark., 2004; Di Leonardo, Linke, Clarkin, Wahl, 1994) veya heterokromatini bozan maddeler (Ogryzko, Hirai, Russanova, Barbie, Howard, 1996) veya güçlü mitojenik sinyaller (Dimri, Itahana, Acosta, Campisi, 2000; Serrano, Lin, McCurrach, Beach, Lowe, 1997) tarafından erken indüklenebileceğini

göstermiştir. DNA hasarı üretebilen güçlü süreçlerden biri de oksidatif strestir. Bu erken yaşlanma biçimleri genellikle birkaç gün gibi kısa bir süre içinde indüklenir ve önemli telomer kısalması eşlik etmez (Ben-Porath ve Weinberg, 2004). Bununla birlikte, erken yaşlanma, hafif oksidatif strese maruz bırakılarak telomere bağımlı bir şekilde de sağlanabilir (Duan, Duan, Zhang, Tong, 2005; von Zglinicki, Saretzki, Döcke, Lotze, 1995). Bunun nedeni, hafif oksidatif stresin telomerik bölgelerde tek iplik kırılmalarına neden olması ve bunun sonucunda telomer kısalmasının hızlanmasına neden olmasıdır (von Zglinicki, Pilger, Sitte, 2000; von Zglinicki, 2002).

Oksidatif stresin neden olduğu hücrel yaşlanma, yaşlanma araştırmaları için mükemmel bir in vitro model olarak kabul edilmiştir. Yaşlanmanın serbest radikal teorisi, normal aerobik metabolizma sırasında üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) biyomoleküllere zarar verdiğini ve bunun da doku fonksiyonlarının azalmasına ve yaşlanmaya neden olduğunu öngörür (Harman, 2001). ROS, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi oksijen merkezli serbest radikallerin yanı sıra hidrojen peroksit ve singlet oksijen gibi diğer reaktif radikal olmayan türlerdir (Dröge, 2002). Hidrojen peroksit, ultraviyole (UV) ışığa, tert-butilhidroperoksite ve hiperoksiye maruz kalma dahil olmak üzere erken yaşlanmayı indüklemek için çeşitli oksidatif stresler kullanılmıştır; bunlardan en yaygın olanı hidrojen peroksittir (Chen ve Ames, 1994).

Yaşlanma, mekanizmaları hücrel düzeyde iyi anlaşılmiş birçok moleküler etkileşimin sonucu olarak gelişen bir süreçtir. Bu çapraz etkileşimlerin sonucunda yaşlanma süreci yaşanmakta ve sonunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ancak insan gibi gelişmiş, karmaşık canlıların yaşlanma sonucu gerçekleşen ölümlerinin altında yatan gerçek sebep dokulardaki hücre sayılarındaki düşüşten çok sistemik problemlerden kaynaklanmaktadır. Organizmada görülen yaşlanma, zamana bağılı olarak gelişen ve doku/organların işlevselliklerindeki bozulma süreci olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, yaşlanmanın sadece hücrel düzeyde tanımlanarak sınırlandırılması, organizmadaki yaşlanma süreçlerini ve yaşa bağılı hastalıkların patolojisinin anlaşılmasında eksikliğe yol açmaktadır. Yaşlanma kompleks canlılarda gözlemlenen evrensel bir durum olup karmaşıklık derecesi arttıkça yaşlanmanın etkileri de artar, buna karşın organizma daha basit sistemlerden meydana geldiğinde yaşlanma süreçlerinin daha az etkili olduğunu görmekteyiz. Temel yapılara sahip denizanası ve sünger gibi basit canlılar ise yaşlanmamaktadır. Organizmanın yaşlanması ve hücrel yaşlanma süreçleri farklı da olsa teorikte hücrelerin genç kaldığı bir ortamda

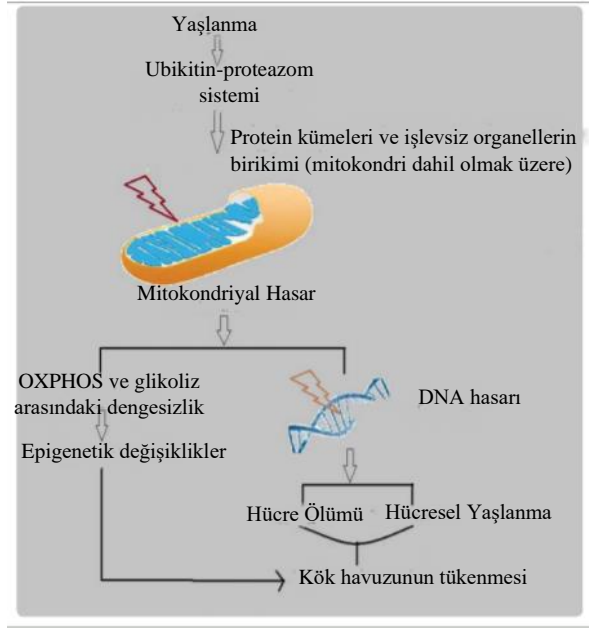
dokuların ve böylece canlıların da genç kalması gerekmektedir. Ancak çevresel faktörler durumu değiştirmekte ve yaşlılık denilen süreç bir tepkinin sonucu olarak oluşan bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaşlanmaya dair birçok görüş olsa da hücrel yaşlanma daha basit tanımlanmakta ve hücre çoğalması ve hücrelerin kendini yenilenme kapasitesinde azalma, telomerlerin kısalması, artan sayıda mutasyonların birikmesi ve reaktif moleküllerin oluşması hücrel yaşlanma sürecinde gözlemlenmektedir (Allsopp ve ark., 1992; Dimri ve ark., 1995; Harman, 2003; Michikawa, Mazzucchelli, Bresolin, Scarlato, Attardi, 1999; Oh, Lee, Wagers, 2014). Bu etkilerden en önemlisi, yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) oluşumu ile yaşlanan fibroblastların tümör progresyonunu destekleyecek şekilde proinflamatuvar özellik kazanmasıdır. Yaşlanma sadece proliferasyonun durdurulması ile sınırlı değildir. Yaşlanan hücreden salınan interlökinler, inflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri çevre hücrelerin çeşitli reseptörlerini ve dolayısıyla sinyal yollarını etkileyerek tip 2 diyabet, ateroskleroz ve kanser dâhil pek çok patolojiye yol açabilirler. SASP komşu hücrelerin proliferasyon, migrasyon, invazyon ve metastazını destekleyebilir ve kök hücrelerin farklılaşmasını engelleyebilir. Genel olarak organizmada gerçekleşen yaşlanma ise hücre ve dokularda zaman içerisinde hasarların artması, hücrel ve organ düzeyinde işlev bozukluklarının oluşması ve bunların sonucu olarak ölümlerle sonuçlanacak süreçlerin başlamasına ve sistemik hastalıkların oluşmasına yol açarlar (Gkogkolou ve Böhm, 2012; Strait ve Lakatta, 2012).

1.2.3. Kök Hücre ve Mitokondri Hasarının Oluşumu

Yetişkinlerde, dokuya özgü kök hücreler doku homeostazını korur ve doku hasarından sonra rejenerasyon için kararlı progenitörler sağlar. Kök hücre havuzunu korumak ve dokuya özgü hücre farklılaşması sağlamak için, kök hücreler kendi kendini yenileme sürecinden geçmelidir. Kök hücrelerin korunması ve doku yenilenmesi arasındaki denge, büyüme faktörleri, hücre dışı ortam, hücre-hücre sinyalleri, hücrel metabolizma vb. birçok farklı faktör tarafından hassas bir şekilde düzenlenmiş olan hücre kaderi kararlarının sürdürülmesine dayanır. Kendi kendini yenileme pahasına hücre soyuna bağlılığa yönelik bir dengesizliğin belirli koşullar altında, örneğin hastalıkta veya yaşlanma sırasında zararlı etkileri olabileceği artık iyi bilinmektedir. Zamanla, kök hücreler kronolojik ve replikatif yaşlanmaya yanıt olarak esnekliğini giderek kaybeder. Bunun doku işlevinin sürdürülmesi için önemli sonuçları vardır; daha yavaş yara iyileşmesi, kas güçsüzlüğü, azalmış bağışıklık ve dokuya özgü kök hücre aktivitesindeki değişikliklerin bir sonucu olarak yaşla birlikte ortaya çıkar (Signer ve Morrison, 2013; Van Zant ve Liang, 2003).

Yaşlanma sırasında kök hücre fonksiyonunda genel bir düşüşe rağmen, kök hücre fenotipindeki spesifik değişiklikler, yerel doku nişine bağlıdır. Mitokondri, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla ATP üreten biyoenerjetik organellerdir; bu, NADH ve FADH₂ eşdeğerlerinin indirgenmesiyle yürütülen bir süreçtir. Mitokondrinin kök hücre aktivitesine aracılık etmedeki önemi, birçok kök hücre türündeki görece düşük mitokondri sayısı ve enerji için glikolize olan bağımlılıkları nedeniyle büyük ölçüde ihmal edilmiştir (Rafalski, Mancini, Brunet, 2012).

Ubikitin-proteazom sistemi, hücredeki ana protein yıkım sistemidir. Özellikle proteazom, anormal proteinleri temizlemeye ve kısa ömürlü proteinleri bozmaya yardımcı olur. Proteazom aktivitesinde yaşa bağlı bir azalma, oksidatif olarak modifiye edilmiş proteini uzaklaştırmak için hücresel kapasiteyi zayıflatır ve farklı hastalıklara neden olur (Kitajima ve ark., 2018). Mitokondriyal disfonksiyon, Oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ve glikoliz arasındaki dengesizliği tetikler. ATP sentezi mitokondri ile ilişkilidir. OXPHOS'da, protein komplekslerinden elektron almak için oksijene ihtiyaç vardır. Bu, daha fazla elektron ve yüksek enerjili molekülün geçmesine izin verir ve ATP üretmek için hidrojen pompalamasını sürdürür. Oksijenimiz tükendiğinde ve laktik asit ürettiğimizde fermantasyon gerçekleşir. Fermentasyon, ATP üretmek için sitrik asit döngüsü ve OXPHOS'un yerini alarak glikolizden sonra başlar (Bonora ve ark., 2012). Bunlar, hem mitokondriyal DNA hem de nükleer genomik DNA tarafından kontrol edilerek, şekilde gösterildiği gibi epigenetik değişikliklere yol açar. DNA, hücrenin özel işlevleri yerine getirmek için ihtiyaç duyduğu tüm bilgileri içerir, bu nedenle DNA hasarı, kök havuzunun tükenmesini tetikleyen hücresel yaşlanmaya ve ölüme yol açar.



Şekil 1.3. Yaşlanmanın kök hücreye olan etkisini gösteren şema (Laugi, 2020)

Son bulgular mitokondrinin ister sağlıklı dokuda ister yaşlanma ve hastalık sırasında kök hücre kaderini ve işlevini nasıl etkilediğini ortaya koymuştur (Ansó ve ark., 2017; Buck ve ark., 2016; Jin ve ark., 2018; Katajisto ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2016). Enerji üretme rollerinin yanı sıra, mitokondrinin bir sinyal verme işlevi vardır ve mitokondrideki çeşitli stres biçimleri, diğer hücresel bölgeleri etkileyen ve kök hücre aktivitesini ve işlevini etkilediği bilinen reaktif oksijen türleri (ROS) gibi retrograd (geriye dönük) sinyaller oluşturabilir. (Sun ve ark., 2016). Mitokondri ayrıca trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, yağ asidi β -oksidasyonu ve tek karbon döngüsü gibi birkaç önemli metabolik yolu da bölümlere ayırır. Bu yolların ürettiği metabolitler, en azından hücre bölünmesi sonrasında dokularda retrograd sinyaller olarak da hareket edebilir (Hirschev ve Zhao, 2015). Mitokondri, kök hücre aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığından, kök hücre mitokondriyal fonksiyonundaki bir düşüşün, kök hücre fonksiyonundaki yaşa bağlı bozulmanın ve birden fazla farklı dokuda kendi kendini yenilemenin temelini oluşturabileceği sonucu çıkar.

1.3. Tip 2 Diyabetes Mellitus

Tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) halk arasında diyabet ya da şeker hastalığı adıyla bilinen önemli evrensel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. T2DM, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasının düzensizliği ile karakterize edilir ve bozulmuş insülin salgılanmasına, insülin direncine veya her ikisinin de eksikliğine yol açan bir hastalıktır. Üç ana diyabet tipinden T2DM tüm vakaların %90'ından fazlasını oluşturur, tip 1 diyabetes

mellitus (T1DM) veya gestasyonel diyabetten çok daha yaygındır. Genellikle ana nedeni iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusunda önceden var olan insülin direncinin bir arka planında pankreatik β - hücreleri tarafından giderek azalan insülin sekresyonudur. Son birkaç on yıl içinde, T2DM'nin gelişimi ve ilerlemesi hakkındaki araştırmalar hızla gelişmesi beklenmektedir (Defronzo, 2009).

Tip 2 diyabet en yaygın diyabet türüdür. Tip 2 diyabette vücut insülin üretebilir ancak bu yeterli değildir veya vücut insülin etkilerine (insülin direnci olarak da bilinir) yanıt veremez ve bu da kanda glukoz birikmesine yol açar. Tip 2 diyabetli birçok insan hastalıklarının uzun süre farkında değildir, çünkü semptomların ortaya çıkması veya tanınması yıllar alabilir, bu süre zarfında vücut aşırı kan şekeri nedeniyle zarar görür. Genellikle diyabet komplikasyonları zaten geliştiğinde teşhis edilir.

Uluslararası Diyabet Federasyonu 2013 yılında dünya çapında 20-70 yaş arası 382 milyon yetişkinin T2DM'ye sahip olduğunu ve etkilenenlerin %80'inin düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşayanların olduğunu belirlemiştir. Bu sayının 2035 yılına kadar 592 milyona yükselmesi beklenmektedir.

Tip 2 diyabet geliştirmenin nedenleri hala bilinmemekle birlikte, birkaç önemli risk faktörü vardır. Bunlar;

- obezite,
- zayıf beslenme
- fiziksel hareketsizlik
- ilerleyen yaş
- aile diyabet öyküsü
- etnik köken
- hamilelik sırasında doğmamış çocuğu etkileyen yüksek kan şekeri.

Tip 1 diyabet hastalarının aksine, tip 2 diyabet hastalarının çoğunluğu hayatta kalmak için genellikle günlük dozda insüline ihtiyaç duymaz. Birçok insan durumlarını sağlıklı bir diyet ve artan fiziksel aktivite veya ilaç ile sağlayabilir (Hunt ve Schuller, 2007).

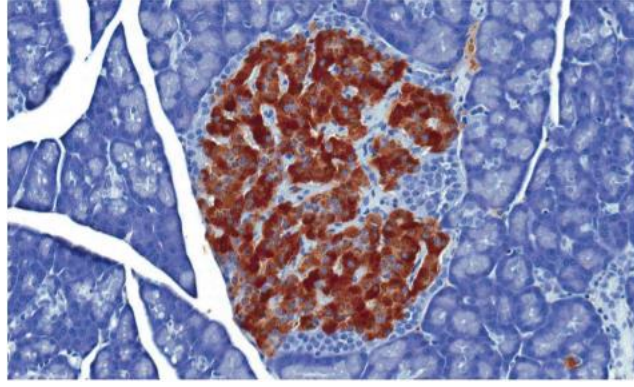
T2DM, genetik ve çevresel faktörleri içeren çok faktörlü bir hastalıktır. Patofizyolojik değişiklikler, hücre disfonksiyonu, insülin direnci ve kronik inflamasyon ile karakterize edilir, bunların hepsi kan şekeri seviyelerinin kontrolünü aşamalı olarak engeller, mikro ve makrovasküler komplikasyonların gelişmesine yol açar (DeFronzo, 2009; DeFronzo, 2010).

Diabetes mellitus'un hücre ile tedavi stratejisinde, büyük bir sağlık sorunu olan DM'nin kök hücrelerle tedavisi büyük bir umut kapısı olarak görülmektedir. 1978 yılında ilk nakilden bu yana 12.000' in üzerinde pankreas nakli yapılmıştır ve her yıl bu sayıya 1000 yeni nakil eklenmektedir. Tüm organın nakli büyük bir cerrahi işlem gerektirdiği için organın sadece %1-2'sini oluşturan adacıkları nakletmek çok daha akıllıca olabilir. On yıldan fazla süren çalışmalar ve başarısızlıklara rağmen ilk adacık nakli protokolü (Edmont protokolü) 2000 yılında yayınlanmıştır (Shapiro ve ark., 2000).

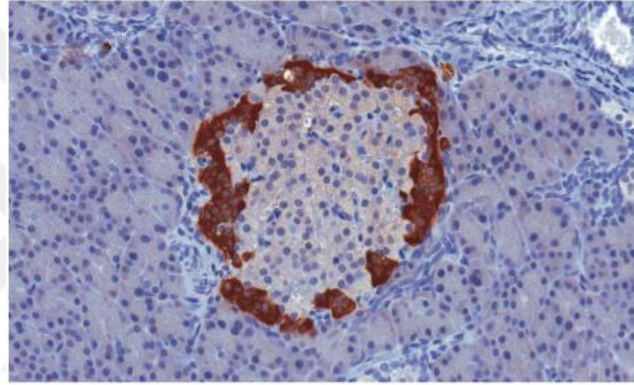
1.4.Pankreas

Pankreas, endoderm adı verilen üç germ tabakasının en iç kısmında gelişir ve salgılamış olduğu yaşamsal organlar sayesinde omurgalı canlıların sindirim ve endokrin sisteminde yer alan bez şeklindeki bir organdır. Embriyoda bağırsak tüpü oluştuktan sonra, mideye dönüşen bölümün altında birkaç tomurcuk büyür. Bu tomurcuklar karaciğer, safra kesesi ve pankreas temellerini oluşturmak için uzar ve dallanır (Spooner, Walther, & Rutter, 1970). Pankreas insanda midenin arkasında, karın boşluğunda (abdominal boşluk) yer alırken, sıçanlarda daha çok mide, duodenum ve dalağın altında bulunduğu görülür. İnsülin, glukagon, somatostatin, pankreatik polipeptit gibi çok önemli hormonların üretildiği endokrin kısma sahiptir (Şekil 1.4-Şekil 1.5) (Lippincott, Williams, Wilkins, 2014).

Pankreasın iki işlevi vardır: İlk işlevi sindirim elemanı olarak besinlerin ince bağırsakta sindirilmesine ve emilmesine yardımcı olan karbonhidrat, lipid ve proteinleri parçalayıcı enzimler sayesinde daha küçük parçalarına ayırarak, pankreas özsuyu salgılama görevi bulunur. İkincisi, adacık hücreleri tarafından salgılanan peptitler, metabolizmada rol oynayan diğer organlara sinyal gönderir (Rahier, Goebbels, Henquin, 1983).



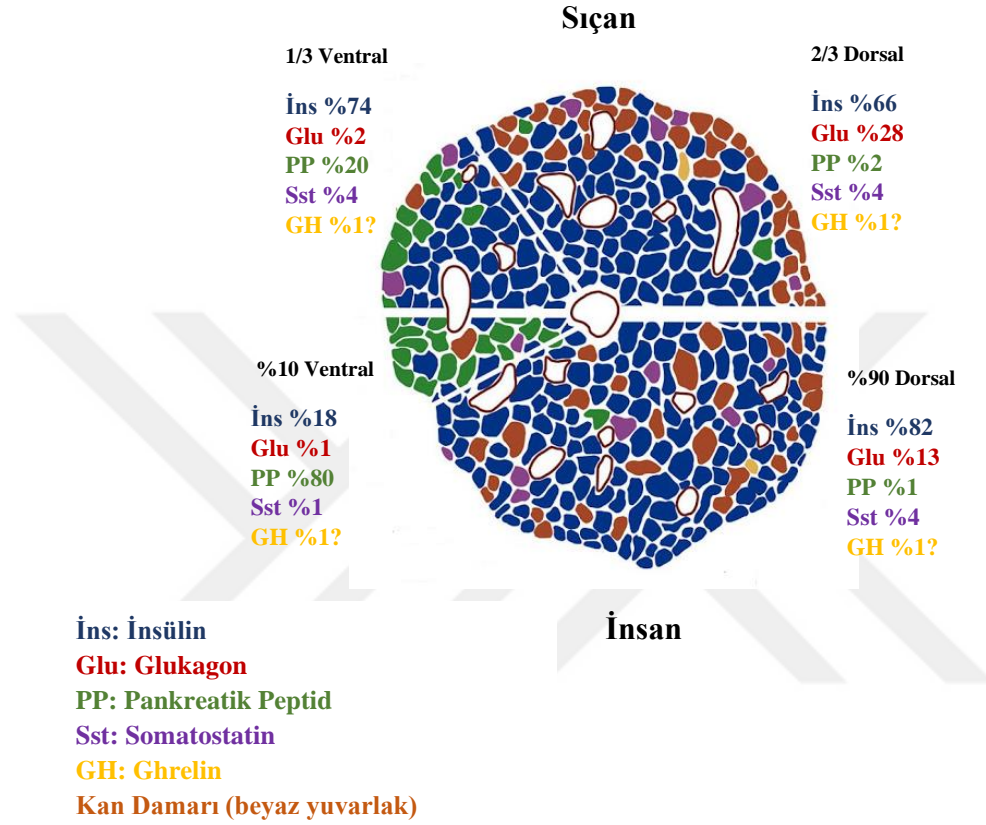
Şekil 1.4. İnsülin için immünohistokimyasal boyama (İnsan). Koyu granüllere sahip insülin pozitif β hücreleri adacıkların çoğunu kaplar; pozitif olmayan α (alfa hücresi) veya δ (delta hücresi) hücreleri çevrenin yakınındadır (Courtesy of M. Hoenerhoff).



Şekil 1.5. Glukagon için immünohistokimyasal boyama (İnsan). Koyu renklendirici granüllere sahip glukagon pozitif α hücreleri, adacık çevresinde bulunur (Courtesy of M. Hoenerhoff).

Langerhans'ın pankreas adacıkları, 1869'da Paul Langerhans tarafından 21 yaşında keşfedildi (Sakula, 1988). Langerhans adacıkları tarafından üretilen hormonlar, metabolik substrat (şeker, yağ asitleri, bazı amino asitler vb.) homeostazının düzenlenmesinde önemli rollere sahiptir. İnsülin, metabolik substratların depolanmasını teşvik etmekten sorumlu olan anabolik hormondur ve metabolik depoların mobilizasyonu ve oksidasyonunu teşvik etmek için glukagonun katabolik (yıkım) etkilerine karşıdır. Adacık hormonlarının metabolik etkileri, farklı fizyolojik koşullar altında salgılanmalarını etkileyen faktörlerle birlikte çalışır. İnsülin salgısı, amino asitlerin ve yağ asitlerinin ve α hücrelerinde ve sindirim sisteminde üretilen hormonların etkisiyle güçlendirilen, glukozla uyarılan insülin salgısı (GSIS) olarak adlandırılan glukoz konsantrasyonlarında yemek sonrası bir artışla güçlü bir şekilde aktive edilir. Glukagon salgısı, glukoz ve insülindeki yükselmelerle bastırılır, ancak

aynı zamanda açlık ile seviyeleri yükselen amino asitler ve yağ asitleri tarafından da uyarılır. Somatostatin, hem glukagon hem de insülin sekresyonunun bir parakrin baskılayıcısı olarak işlev görür (Brazeau ve ark., 1973; Rorsman ve Huising, 2018).



Şekil 1.6. İnsan adacık (Stefan ve ark., 1982) ve sıçan adacık (Baetens, Malaisse-Lagae, Perrelet, Orci, 1979) türlerinin ventral ve dorsal adacıkların oranı arasındaki farkı gösteren diyagram.

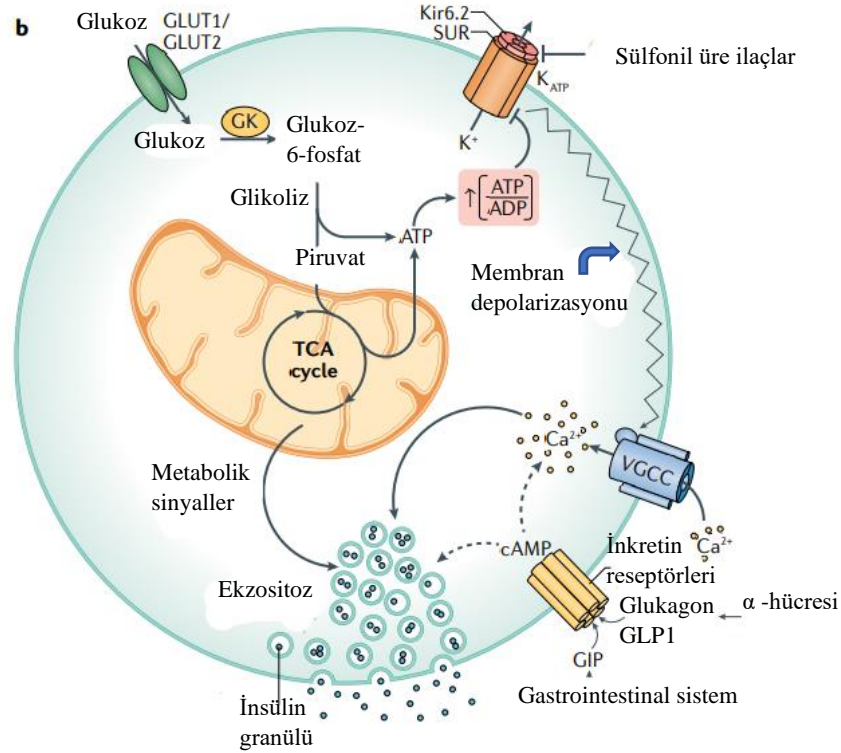
Endokrin pankreas, pankreas boyunca ayrı ayrı dağılmış ve farklı endokrin hücrelerinin bir araya gelmesiyle oluşmuş, Langerhans adacıkları olarak adlandırılan hücre gruplarından oluşur. Normal bir yetişkin sıçanda adacıklar toplam pankreas dokunun yaklaşık %1-2'sini oluşturur ve çapı 100-200 µm arasındadır. Pankreasın endokrin ve ekzokrin bileşenleri farklı metabolik aktivitelere katılır. Endokrin pankreasın ana işlevi, kan glukozunun düzenlenmesinde görev alırken ekzokrin pankreasın işlevi sindirim enzimlerinin üretimidir (Mense ve Rosol, 2018). İnsan ve kemirgenlerde bulunan adacık kompozisyonları benzer olmasına karşın adacıkta bulunan hücre oranları türler arasında belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Diğer kemirgenlerdeki hücre tipi oranları farede bulunan hücre tipi oranlara

çok yakındır. Fareler insanlara kıyasla daha fazla insülin ve daha az glukagon hücresine sahiptir. Fare adacıklarında adacığın çepere yakın bölgedebeta hücresi yoğun bir şekilde bulunurken glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptit gibi diğer hücre tipleri beta hücresinin çevresinde sıralı bir dizilim gösterir. İnsanlarda bu hücre tipleri ise rastgele bir dağılım göstermiştir (Brissova ve ark., 2005; Cabrera ve ark., 2006). Kadınlara kıyasla erkeklerde pankreatik polipeptit hücrelerinin sayısında önemli bir yükseklik gözlenmiştir. Bu nedenle, pankreas hücrelerinin çoğu öğün sindiriminde çalışırken, adacık hücrelerinin küçük ama önemli bir azınlığı, metabolizmayı düzenlemek ve özellikle kan şekeri dalgalanmalarını önlemek için diğer ortak çalıştıkları organlara sinyaller gönderir (Stefan ve ark., 1982).

İnsülin Salgısına Genel Bakış

İnsülin salgılanması için birincil fizyolojik uyarı, yemek sonrası durumda ortaya çıkan dolaşımdaki glukoz konsantrasyonundaki ani artıştır. β -hücresinin uyarıcı glukozla maruz kalması, sadece insülin salgılanması üzerinde içsel bir aktive edici etkiye sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda glukozla uyarılan insülin sekresyonunu (GSIS) güçlendiren birkaç maddenin eşzamanlı etkisi için de gereklidir. İnsülin salgılanmasının glukoz tarafından doğrudan uyarılması, "tetikleyici" bir yol ve "güçlendirici" bir yol içerir (Henquin, 2009). Tetikleme yolu, ATP üretmek için glukoz metabolizmasını, membran depolarizasyonuna neden olmak için ATP'ye duyarlı potasyum (K_{ATP}) kanallarının kapatılmasını ve bunun sonucunda voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının aktivasyonunu içeren biyokimyasal sinyallerle etkinleştirilir (Ashcroft, Harrison, Ashcroft, 1984; Cook ve Hales, 1984). Tetikleme fazı sırasında hücre içi Ca^{2+} seviyelerinde ortaya çıkan keskin artış insülinin içinden geçtiği bir membran füzyon gözeneginin oluşumunu kolaylaştıran tetramerik bir protein kompleksi tarafından plazma membranına lokalize edilen hücre dışına 'kolayca salınabilir' bir insülin salgılama granül havuzunun ekzositozunu aktive eder (Gaisano, 2017). Tetikleme yolu, insülin salgılanmasının "ilk aşaması" olarak adlandırılan ve insülin salgılanmasında keskin bir tepe noktası ve ardından bir glukoz uyarısından sonraki ilk 10-20 dakika içinde meydana gelen düşüşten büyük ölçüde sorumludur. Güçlendirme yolu, insülin salgılanmasının, bir öğünün emilim sonrası tüm fazı boyunca daha düşük ancak sürekli bir hızda devam etmesine izin veren, birkaç saati kapsayan, aynı zamanda insülin salgılanmasının 'ikinci aşaması' olarak da adlandırılan bir süre olan ikincil bir uyarı neden olur. Güçlendirme yolu, maksimal hücre içi Ca^{2+} seviyeleri varlığında bile aktive edilir ve büyük ölçüde K_{ATP} kanalından

bağımsız mekanizmalar tarafından yürütülür. Tetikleme yolu, plazma zarı ile ilişkili 'başlatılmış' veya kolayca salınabilir insülin içeren granüllerin yaklaşık %1'inin salınmasına neden olurken, amplifiye etme fazı, hazırlanmış granüllerin salınmasına neden olmaya devam ederken, aynı zamanda bir hücre yüzeyine hücre içi depolama havuzu, serbest bırakılabilir (Gaisano, 2017).



Şekil 1.7. İnsülin salgı reseptörleri (Campbell ve Newgard, 2021).

1.5. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, rejeneratif tıp çalışmalarının yapılmasına ve sürdürülebilir olmasına imkân sağlayan disiplinlerarası bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Rejeneratif tıp çalışmalarının kapsamı kaybolan ya da zarar gören dokunun doğal yapısına ve fonksiyonuna en yakın ve en uygun olacak modelin geliştirilmesi şeklinde ifade edilir. Geliştirilen bu model, uygulandığı dokuyu onarma özelliği göstermeli veya hasarlı yapı ile yer değiştirmeye uygun özellikte olmalıdır (Glotzbach, Wong, Gurtner, Longaker, 2011). 1993 yılında Langer ve Vacanti tarafından çığır açan bir makale ile doku mühendisliğinin tanımı yapılmıştır. Bu tanıma göre doku mühendisliği; kaybedilmiş veya hasarlı dokuların

işlevlerini yerine getiren, sürdürülebilir kılan ve yeniden modellemeyi hedefleyen disiplinlerarası bir uygulama alanıdır (Langer ve Vacanti, 1993).

MKH uygun sinyaller altında hedef doku ve/veya organ yapısına farklılaşabilme yetenekleri ile doku ve/veya organ rejenerasyonunu içeren doku mühendisliği çalışmalarında potansiyel kaynak olarak tercih edilirler. MKH'lerin gerek in vivo ortamda hedef doku ve/veya organ yapısına yönelik olarak gerekse biyomateryal ile birlikte in vitro koşullarda bir yapı iskelesi şeklinde kullanılması hücrelerin taşıdığı bu yüksek potansiyel ile ilişkilidir (Khademhosseini ve Langer, 2016).

Ekstrasellüler matriks (ECM), doku ve organlarda bulunan mevcut hücreler tarafından salgılanır. Bu yapı, hedeflenen dokuya yönelik doku mühendisliği çalışmalarında uygun iskele yapısının oluşturulması, hücrelerin ve biyosinyal moleküllerinin yerleşim göstermesi açısından destek ortamı olarak model oluşturmaktadır. Doku mühendisliğinde hedefe yönelik kullanılan biyomalzeme ECM yapısını taklit eden iskele yapısı yerine geçmektedir. ECM, özellikle dokuya ait onarım ve yenilenmeye yönelik potansiyel taşıması ile doku iskelesi modellemede taklit edilmesi hedeflenen bir yapıdır. Böylece hücrelere yerleşim, farklılaşma ve proliferasyon için uygun ortam sağlanmış olur (Yi, Ding, Gong, Gu, 2017).

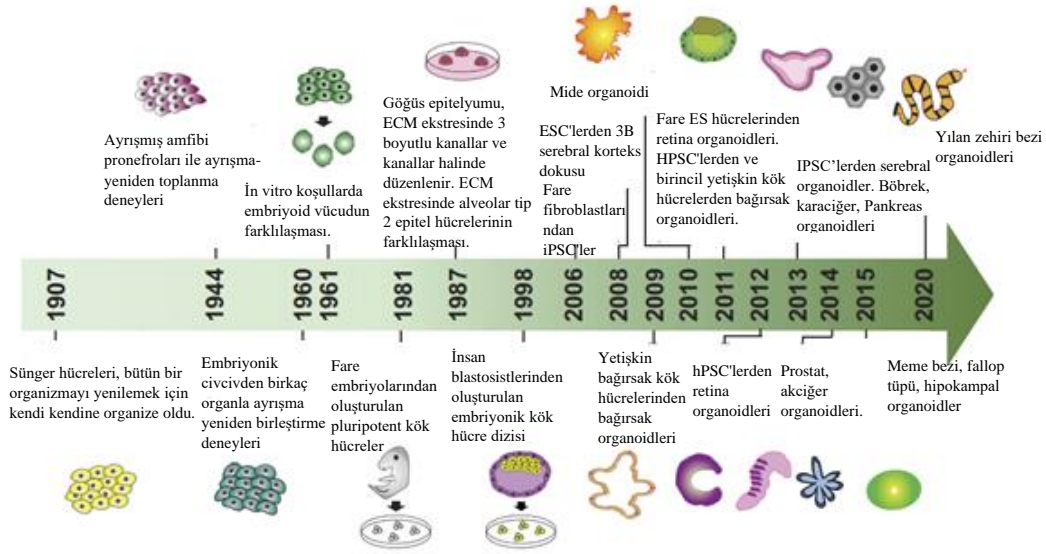
1.5.1. Organoid

Organoid terimi ilk olarak doku benzeri yapılarla farklılaşmış hücreler içeren hücre yığınları şeklinde tanımlanmıştır (Clevers, 2016). Sferoid tanımıyla örtüşen bu tanım değişmiş ve günümüzde organoidler kök hücrelerden veya organ progenitörlerinden çoğalarak farklılaşan, kendi kendine organize olan, organa özgü hücre tiplerinden ve doku/organın en az bir işlevini taklit eden 3-B yapılar şeklinde tanımlanmaktadır (Lancaster ve Knoblich, 2014).

Çoğunlukla epitel dokulardaki organlardan alınan mekanik ve enzimatik sindirim ile stromadan ayrılan küçük doku parçaları, organ benzeri bir yapı üretmek için farklı 3B jeller kullanılarak üretilmektedir (Simian ve ark., 2001).

Organoidler üzerinde çalışan bilim adamları tarafından geliştirilen kültür koşulları son 10 yılda kök hücre alanında bildirilen önemli ilerlemelere katkıda bulunmuştur Organoidleri üretmek ve bunları kültürde tutmak için kullanılan yöntemlerden bağımsız olarak, bu

gelişmeler insan gelişimi ve hastalığını incelemek için gelişmiş model sistemlerini temsil eder (Lancaster ve ark., 2013).



Şekil 1.8. Organoid kültürünün gelişmesini gösteren zaman çizelgesi (Corrò, Novellademunt, Li, 2020).

Kök hücre teknolojileri hastalık gelişimi modellemek ve mekanizmalarını analiz etmek ve potansiyel terapiler geliştirmek için ümit vaat etmektedir. Yakın zamana kadar, kök hücre yöntemlerinin çoğu, bir organın hücre tiplerinin tamamı yerine, kök hücre türevi hücre türlerinin saf popülasyonlarına odaklanmıştır. Bununla birlikte, bu organoid adı verilen gelişmekte olan dokuların üç boyutlu kültürlerinin gelişmesiyle değişmeye başlamaktadır (Baldan, Houbracken, Rooman, Bouwens, 2019).

Organoid kültürü sırasında kök hücreler olgun dokunun yapısını ve işlevini taklit eden karmaşık hücresel yapılarla sonuçlanan biyofiziksel işaretlere cevap olarak toplanır ve farklılaşır (Dutta ve Ark., 2017; McCauley ve Wells, 2017). Genel olarak organoidlerin oluşturulmasındaki hedef bunlarla sınırlı kalmamakla beraber organ gelişimini incelemek, ilaç taraması yapmak, hastalıkları modellemek veya toksisite testleri için bir araç olarak kullanmaktır. Yaşlanma modern biyolojide temel bir sorun olmaya devam etmektedir. Hüresel ölçekte yaşlanma üzerine birtakım teoriler olmasına rağmen, mikroskopik başarısızlıkların dokuların, organların ve nihayetinde organizmanın makroskopik başarısızlıklarına nasıl geçtiği hakkında neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir (Acun ve ark.,

2017). Yaşlanma, zamanla hücresel hasarın birikmesinin bir sonucu olarak geniş ölçüde tutulur (López-Otín ve ark., 2013). Organizmalar yaşlandıkça, mitokondriyal yapı fonksiyon ilişkisinde bütünlüğün azalmasına yol açan spesifik değişiklikler meydana gelir (López-Otín ve ark. 2013; Sahin ve Depinho, 2012). Organoidler kendi kendilerini yenileyebilen, organ işlevi gösterebilen, doğrudan doku veya kök hücrelerden elde edilen üç boyutlu hücre gruplarıdır. Organoidler yapısal ve işlevsel olarak elde edildikleri dokuyla benzerlik gösterir. Ancak organoidlerde kendini yenileyebilen kök hücre grupları bulunur ki bu kök hücreler organizmadaki kök hücreler gibi diğer hücre türlerine dönüşebilir (Hachitanda ve Tsuneyoshi, 1994; Xinaris ve ark., 2012). Organoidler, biyolojik benzerlik açısından yani organizmayı taklit etme konusunda diğer kültür yöntemlerinden daha gelişmiştir. Bu hücre grupları dondurularak biyolojik bankalarda saklanabilir. Bu yöntem sayesinde kök hücrelerin sınırsız biçimde kendini yenileme ve diğer hücre türlerine dönüşme özelliğinden faydalanılabilir (Lancaster ve Knoblich, 2014).

Pankreas, metabolizma enzimlerini salgılayan kanal hücreleri ve asinar hücreleri gibi ekzokrin yapılardan ve ayrıca kan şekeri homeostazını kontrol eden α , β , γ ve δ hücrelerinden oluşan adacıklar olarak bilinen endokrin bileşenlerinden oluşur. Pankreas doku mühendisliği alanında hem normal hem de patolojik ekzokrin kanal yapılarının organoid modelleri iyi oluşturulmuştur (Boj ve ark., 2015; Hohwieler ve ark., 2017). Bu organoidler, duktal hücrelerin özelliklerini ve güçlü bir proliferasyon kapasitesi gösterdi. Ek olarak bir grup, asinar hücrelerin 3B süspansiyon kültürü ile progenitör benzeri hücrelere ayrıştırılabileceğini bildirdi (Ashcroft, Harrison, Ashcroft, 1984). Bununla birlikte, bu progenitör benzeri hücrelerin asinar hücrelere geri farklılaştırılıp farklılaştırılmayacağı belirsizliğini koruyor.

1.6. Matrijel

Hücreler için yapısal bir destek görevi gören belirli bir ekstraselüler matriks çoğu epitel ve endotel tabakasında büyük miktarlarda hücre dışı matris (ECM) proteinleri üreten, kanserli bir doku olan fare Engelbreth, Holm ve Swarm (EHS) sarkomundan izole edilen matrijel'in kökeni 40 yılı aşkın bir süreye dayanmaktadır (Orkin ve ark., 1977). Engelbreth, Holm ve Swarm (EHS) adlı 3 araştırmacı tarafından bulunan, EHS tümörü olarak adlandırılan bu hücre zarı üreten tümörden elde edilmektedir. Matrijel'in dört ana temel bileşenleri olan laminin (~%60), kollajen IV (~%30), entaktin (~%8) ve heparin sülfat proteoglikan perlekan (~%2-3) membran ECM proteinini oluşturmaktadır (LeBleu,

Macdonald, Kalluri, 2007). Bazal membran bileşenlerinin karışımı olan, matrijel 4 °C'de sıvı formdayken, 37 °C'de bir jel oluşturmak üzere polimerleşir; bu sırada entaktin, laminin ve kolajen IV arasında bir hidrojel suyla şişmiş, çapraz bağlı bir ağ oluşturma görevi görür. Matrijel'in kendi kendini yenileme ve pluripotensi sürdürme kabiliyeti nedeniyle kök hücre kültürü için optimal bir matriks olduğu gösterilmiştir (Vukicevic ve ark., 1992). Doğal biyoaktivitesi sayesinde matrijel, farklı hücre tipleri çeşitli uygulamalar için kullanılmıştır. Elastik bir yapıda olan matrijel; mezenkimal kök hücreler, insan pluripotent kök hücreleri, nöronlar ve kardiyomiyositler gibi hücreleri kültüre etmekve 3 boyutlu yapıyı elde etmek için kullanılmıştır (Kubota, Kleinman, Martin, Lawley, 1988).



2. AMAÇ

Pankreas adacık kökenli erişkin kök hücre hattının kültüründe yaşlandırma modeli için uygun yöntemin geliştirilmesi ve bu hücrelerin kullanılmasıyla 3B kültür ortamındaki organoidlerde mitokondri hasarının incelenmesi bu çalışmada amaçlanmıştır.

Kök hücrelerin endokrin hücreye doğru farklılaşması sağlanarak insülin salgılayan β benzeri hücrelerin eldesiyle yaşlanmanın β hücreleri ve dolayısıyla pankreas adacıkları üzerindeki etkilerinin kültür ortamında incelenmesi bu çalışmanın kapsamı içerisindedir. Geliştirilecek olan in vitro yaşlanma modelinde pankreas adacıkları organoidleri oluşturulacaktır.

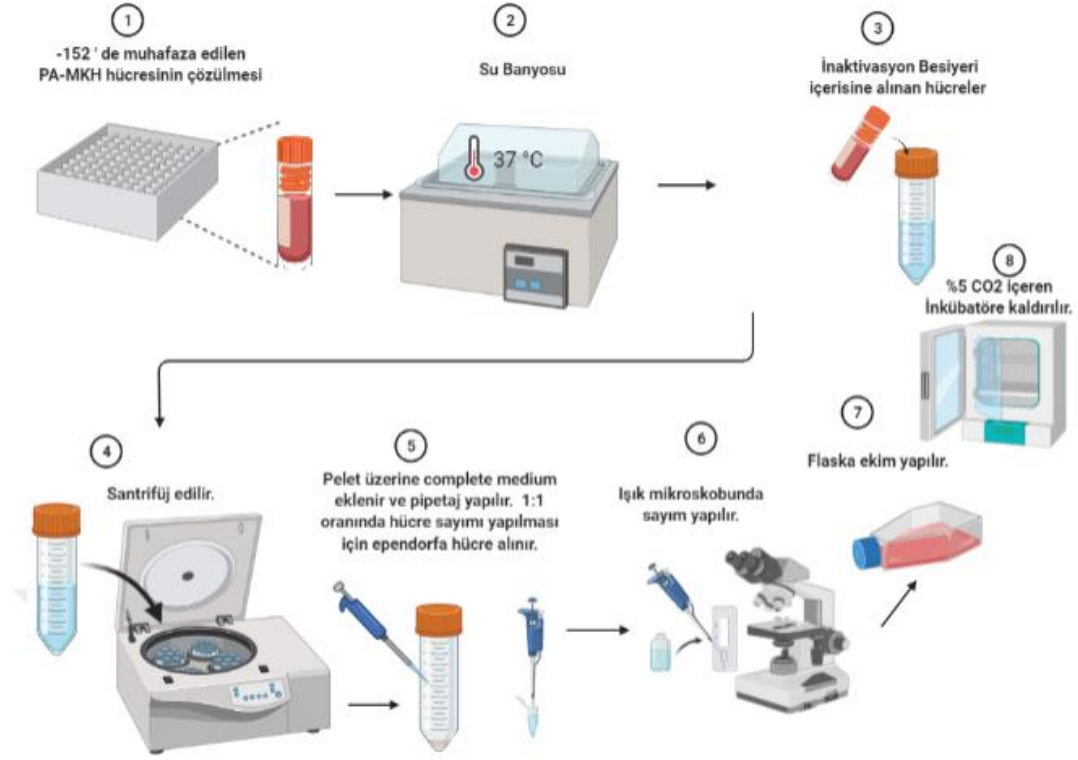
Organoid kültürü tekniği kullanılarak pankreas adacık benzeri yapılar elde edilmesiyle bu yaşlanma modelinde yaşlanma süreçlerinin in vitro ortamda izlenebilmesi olanağı sağlanacaktır. Bu modelin validasyonu sonrasında sonraki ilaç çalışmaları için canlı hayvan çalışmalarından bağımsız in vitro ortamda farklı çalışmaların geliştirilmesi çalışmanın ulaşılmak istenen uzun süreli hedefidir.

3. YÖNTEM

Tez çalışması deneysel yöntemlerle Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarlarında yapılmıştır. Tezin etik kurul onayı Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan (EK-1) alınmıştır.

3.1. Pax4⁺/MafA⁺ Genleri Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması

Bu çalışmada Ayşegül (Bağlar) Açıksarı 'nın tez çalışmasında elde edilen Pax4⁺/MafA⁺ genleri aktarılmış sıçan pankreas adacık mezenkimal kök hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan kök koleksiyonundan temin edilmiştir. Bu hücrelerin karakterizasyonu yapılmış ve mezenkimal hücre özelliği taşıdığı gösterilmiştir (Açıksarı vd., 2017). Endokrin pankreas mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu için etik kurul kararı (20.02.2020 tarihli KÜ GOKAEK 2020/2.20 nolu karar) daha önceden alınmıştır. Kriyo dondurucuda saklanmış hücreler gerekli işlemler yapılarak çözüldükten sonra içerisinde %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisillin-streptomisin, %1 glutamax ve RPMI-1640 bulunan kültür besiyeri ile T175 kültür kabına ekim yapıldı. Hücreler kültür kabında %70-80 oranında konfluense (yoğunluk) ulaştıklarında, Ca⁺² Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkama sonrası, %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırıldı. 37°C'de ~5 dakika inkübe edilen hücreler %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyer içeriği ile tripsin aktivitesi durduruldu ve hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarıldı (Tablo 3.1). 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant ile tripsin uzaklaştırıldı. Falkon tüpte kalan hücre pelleti sPA-MKH besiyeri ile homojenize edildi ve hücre süspansiyonundan alınan örnek, tripan mavisi ile 1:1 oranda karıştırılarak hücre sayım cihazında (BIO-RAD TC20) ve Thoma Lamında hücre sayımı yapıldı. Hücreler pasajlanıp yeterli sayıda hücre elde edilinceye kadar kültüre edildi. Hücrelerin morfolojileri günlük olarak mikroskop altında incelenip, takip edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Pax4⁺/MafA⁺ Genleri Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması

Tablo 3.1. sPA-MKH'lerin çoğaltılmasında kullanılan besiyeri içeriği ve miktar/oran tablosu.

sPA-MKH Besiyeri Bileşenleri	Miktar/Oran
RPMI-1640 (Sigma)	1x
FBS (Gibco)	% 10
Pen/Strep (Capricorn)	% 1
Glutamax (Gibco)	% 1

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada esas olarak pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılarak deney gruplarının oluşturulmasında; P7 kontrol grubu, P7 hücresinin kültür ortamında pasaj atılarak P15'e getirilerek yaşlandırılması, P7 hücresinin kültür ortamında pasaj atılmadan 28 gün boyunca besiyeri değişimi yapılarak yaşlandırılması ve kültüre edilen P7 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ uygulaması yapılarak yaşlandırma modeli oluşturuldu (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Yaşlanma modelinin deney grupları.

	Deney Grupları	Grup İçeriği
1. Grup	Kontrol	Erken Pasaj (P7)
2. Grup	Konjugatif (Kronolojik) Yaşlanma	28 gün sürekli besiyeri değişimi
3. Grup	Oksidatif Yaşlanma	H ₂ O ₂ uygulaması
4. Grup	Replikatif Yaşlanma	Geç Pasaj (P15)



Şekil 3.2. Yaşlanma in vitro modeli geliştirme ve mitokondri hasarı belirleme çalışmasının deney planı.

3.2.1. 2-Boyutlu Yaşlanma Modellerinin Geliştirilmesi

Kontrol grubu olarak sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (P7) kullanılmıştır.

Konjugatif (kronolojik) yaşlanma için in vitro koşullarda sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı kullanılarak 28 gün boyunca pasaj atlamadan besiyer değişimi yapılmış ve bu hücreler kronolojik yaşlılık modelinde kullanılmıştır.

Sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı kullanılarak 1,25 µM, 2,5 µM ve 5 µM'lık H₂O₂ çözeltisine 30 dk 37 °C'de maruz bırakılarak, hücrelerde oluşan oksidatif stres ile yaşlılık modeli oluşturulmuştur.

Replikatif yaşlanma modeli için sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre hattı kullanılarak hücre kültürü sonrasında tripsin kullanılarak kaldırılan hücreler tekrar ekilerek ardaşık 15 pasaj yapılan hücreler yaşlılık modeli oluşturulmuştur (Şekil 3.2).

3.2.1.1. Konjugatif, Replikatif ve Oksidatif Stres Uygulanan Hücrelere WST-1 Canlılık Testi

WST-1, stabil tetrazolyum tuzu olan hücre proliferasyonu/canlılığı ile doğru orantılı olarak formazan kristallerinin çözünmesi ile kültür ortamında turuncu bir renk değişiminin optik yoğunluk (OD) ölçümüne dayanan kolorimetrik bir testtir. Deney gruplarında WST-1 analizini gerçekleştirmek için her bir deney grubu için 15×10^3 hücre ekimi yapılarak konjugatif, replikatif ve oksidatif stres uygulanan hücrelerin her biri için üçer tekrarlı olacak şekilde 96-kuyucuklu plakalara ekildi. Kör okuma olarak hücre içermeyen ancak WST-1 reaktifli besiyeri içeren kuyucuğun kullanıldığı deney planında besiyeri tamamen uzaklaştırılarak, kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra, %10 WST-1 reaktifi (Roche Diagnostics, Almanya) içeren RPMI-1640 besiyeri ile değiştirildi. Kültür ortamında 37 °C 'de ve %5 CO₂ ortamında 2 saat boyunca inkübe edildi. Örneklerin absorbans değerleri, mikropılaka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.2.1.2. X-gal Boyama ve Skorlama

2-boyutlu kültür aşamasındaki deney grupları için X-gal boyaması yaşlılık morfolojisinin oluştuğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesindeki artışın ölçümünü (Senescence Cells Histochemical Staining Kit, Sigma) göstermek için standart protokol izlenerek gerçekleştirildi. Kronolojik, oksidatif, replikatif yaşlanma modellerinde ve kontrol deney grubu 96 kuyucuklu plaka içerisine 15.000 hücre ekimi yapıldıktan sonra hücrelerin kuyucuklara yapışması için CO₂'li ortamda 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Yapışan hücrelerin kuyucuk içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak ortam 2 kere 1x PBS ile yıkandı. 1x Fiksasyon tamponu eklenerek oda sıcaklığında 6-7 dakika inkübe edildi. Fiksasyon sırasında boyama solüsyonu hazırlandı. Boyama kiti içerisinde bulunan Staining solution, Reagent B, Reagent C ve X-gal solution, distile su içerisine eklenip vorteks yöntemiyle homojen bir karışım haline gelmesi sağlandı. Fiksasyon sonrası kuyucuklar 1× PBS ile 3

kere yıkandı. Boyama karışımı eklendi. Plaka'nın kurumasını önlemek için parafilm ile kaplanarak ve CO₂ 'siz ortamda 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. Örnekler faz-kontrast mikroskopta (Olympus IX71, Japonya) incelenerek fotoğraflandı. Fotoğraflanan örneklerin birden fazla gözlemci tarafından manuel olarak sayıldı ve 0-4 arası bir ölçek kullanılarak skorlandı (Kavanagh ve ark., 2021). Yaşlanma gösteren hücrelerin koyu mavi renk boyama göstermesi pozitif boyama olarak sonuçlanırken, yaşlanma belirtisi göstermeyen hücrelerin beyaz/sarı renk bir boyama göstermesi negatif boyama olarak sonuçlandı.

3.2.1.3. TMRM Boyamasının Akım Sitometri ile Gösterimi

TMRM (Tetrametil rodamin metilester), mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri ölçmek için kullanılan, elektrostatik çekim ile hücrelere bağlanmayan ve negatif yüklü mitokondride birikerek geçirgen bir özellikte olan katyonik floresan boyadır (Floryk ve Houstěk, 1999; Scaduto ve Grotyohann, 1999). Deney grupları kronolojik yaşlanma (besiyer değişimi yapılarak 28 gün boyunca kültür edilmesi), oksidatif stres ile yaşlanma (H₂O₂ uygulaması), replikatif yaşlanma (ileri pasaj) ve kontrol grubunun 24 kuyucuklu plaka içerisine 15.000 hücre ekimi yapıldıktan sonra hücrelerin kuyucuklara yapışması için CO₂'li ortamda 37 °C'de 1 gece boyunca inkübe edildi. 24 kuyucuklu plaka içerisinden besiyeri uzaklaştırılarak oksidatif stres uygulanması gereken grup için H₂O₂ dozları ayarlanarak 24 saat ve 72 saat için deney grubu oluşturuldu. Ortam 2 kere Ca⁺² Mg⁺² içermeyen PBS ile yıkandıktan sonra, DMSO içerisinde çözülen TMRM boyası stok solüsyonundan 1:1000 oranında Ca⁺² Mg⁺² içermeyen PBS ile dilüe edilerek karanlık ortamda hazırlandı. 24 kuyucuklu plaka içerisine koyulan TMRM boyası CO₂'li ortamda 37 °C'de 30 dk boyunca inkübe edildi. Ortamdan boya uzaklaştırılarak DPBS ile kuyucuklar yıkandı ve %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırıldı. 37°C'de ~5 dakika inkübe edilen hücrelerin DPBS ile tripsin aktivitesi durduruldu ve hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarıldı. 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant dökülerek tripsin uzaklaştırıldı. Falkon tüpte kalan hücre pelleti DPBS ile homojenize edildi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Hücre pelleti DPBS ile sulandırılarak akım sitometrisinde 488nm-588nm FL-2 kapısında okutma yapıldı.

3.3. 2-Boyutlu Deney Gruplarının Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyon analizi için -80°C soğutucuda muhafaza edilen deney gruplarına ribonükleik asit (RNA) izolasyonu, komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri gerçekleştirildi.

3.3.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Deney grupları için ön hazırlık yapıldı. Hücreler %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırıldı. Her deney grubu için $\sim 5 \times 10^4$ hücre eppendorf tüpüne alındı. 1600 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası süpernatant kısmı atılıp, 1000 μl PBS ile pipetaj yapılarak homojenize hale getirildi. Hücre süspansiyonu tekrar santrifüj edilerek, süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. -80°C soğutucuda muhafaza edildi.

NucleoSpin RNA ticari (MACHEREY-NAGEL) kiti ile RNA izolasyonu standart protokolün önerildiği şekilde yapıldı. Ortamda RNAz kontaminasyonunun oluşmaması için oksijenli su ile temizlendi. Deney grupları pellet halinde -80°C soğutucudan alınarak, 350 μl lizis tamponu ilave edilerek hücrelerin parçalanması için pipetaj yapıldı ve vortekslendi. 11.000 $\times\text{g}$ 'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtrelili spin tüpler alınarak, tüp üzerindeki filtrelili tüp atılıp eppendorf tüpünün içerisine %70'lik 350 μl etanol ilave edildi, pipetaj yapılarak filtrelili tüplere aktarıldı. 11.000 $\times\text{g}$ 'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtreden eppendorfa süzülen sıvı kısım döküldü, filtrelili tüpün içerisine 350 μl MDB solüsyonu koyularak, 11000 $\times\text{g}$ 'de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası eppendorftaki sıvı kısım döküldü, filtreler yeni tüplere aktarılıp 3 kez yıkama işlemi yapıldı. Son olarak, kolonda kalan RNA'nın alt tüpe inmesi için 40 μl RNase-free H_2O eklendi. 11000 $\times\text{g}$ 'de 1 dakika süreyle santrifüj edilerek RNA saf hali eppendorf tüpüne alındı. RNA konsantrasyonlarının kalitesi picodrop spektrofotometre ile ölçüldü. Kalan total RNA örnekleri -80°C soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edildi.

Elde edilen total RNA'lardan OligodT primerler kullanılarak Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile komplementer DNA (cDNA) elde edildi. cDNA sentez kiti (Blirt, TRANSCRIPTME RNA Kit) kullanılarak, standart protokolün önerildiği şekilde yapıldı. 0,2 ml'lik eppendorf tüpü içerisine 10 μl 2x RT Master Mix ve 2 μl TRANSCRIPTME

Enzyme Mix koyuldu. Total RNA örneklerinden 8 µg olacak şekilde eppendorf tüpü içerisine aktarıldı, toplam hacim 20 µl olacak şekilde eklendi. 25°C’de 10 dakika süreyle PCR cihazında (TaKaRa Biotechnology, Japonya) inkübe edildi. Bu süreçte primerlerin ısı ile denatüre olan RNA örneklerine bağlanması sağlandı. Süre sonunda örnekler 50°C’de 30 dakika uzama reaksiyonu ve hemen ardından 85°C’de 5 dakika süreyle enzimin inaktivasyonu sağlandı. Sentezlenen cDNA örnekleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kurulancaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi.

3.3.2. Kantitatif Ters Transkriptaz -Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Konjugatif yaşlanma, replikatif yaşlanma ve oksidatif stres uygulanan deney gruplarını gen ekspresyonu ile göstermek için cDNA sentez kiti kullanılarak (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda analizi yapıldı. MafA ve Pax4 gen aktarımı yapılan hücrelerin primerleri; insülin 1, insülin 2, Glukokinaz, Glut-2 ve Pdx-1 gibi çeşitli beta hücre primerleri, alfa hücre belirteci Glukagon genine ait primerler, delta hücre belirteci olan Somatostatin genine ait primerler, oksidatif stres belirteci olan RAGE, p38α, SOD1, HO1 ve NOD2 genine ait primerler, mitokondri hasar belirteci olan Tomm20, MCT-4, NOX4, NRF2 ve Duox-1 genine ait primerler, hücrel proliferasyonla ilişkili nükleer bir protein olan Ki67 genine ait primerler ve housekeeping gen olarak beta aktin genlerine ait primerler, (Tablo 3.3) kullanılarak her bir grup için belirli miktarlarda master mix (Jenabioscience), cDNA ve distile sudan oluşan bir karışım hazırlanarak 96 kuyucuklu PCR plakalarına yüklendi. Ters Transkriptaz PCR (LightCycler-II 480, Roche, Mannheim, Almanya) cihazında, ilgili DNA parçalarının çoğalması ölçülerek ve elde edilen Cp sonuçları doğrultusunda housekeeping gene (beta aktin) ve kontrole (P7 hücreleri) oranlanarak ekspresyon analizleri yapıldı.

Tablo 3.3. qRT-PCR analizi için kullanılan genler ve primerlerinin baz dizilimleri.

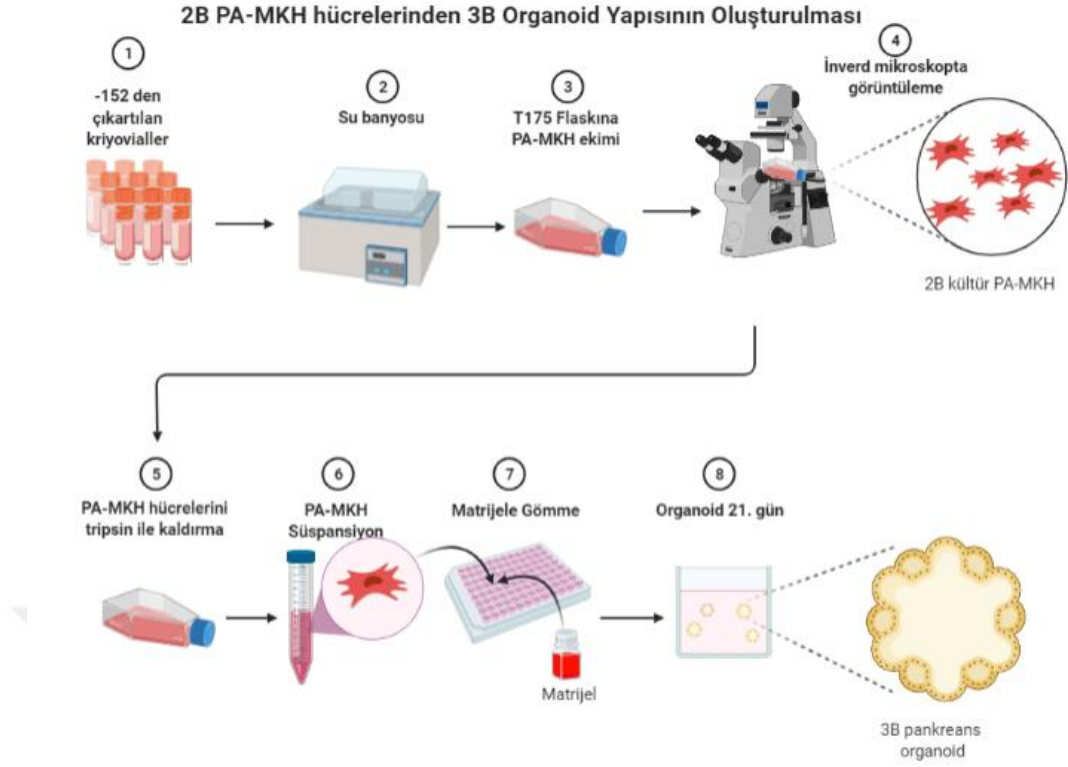
Primerler	Açık İsim	Primer Baz Dizilimi (5'→3')
ACT-β (Referans gen)	Beta Aktin	F- agagaagctgtgctatgttg R- gtactcctgcttgctgatcc
İns-1	İnsülin-1	F- gaccttggcactggagggtt R- ccagttggttagagggagcag
İns-2	İnsülin-2	F- cgaagtggaggaccaca R- tgctggtgcagcactgat
p38α	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz	F-ggggcagatctgaacaacat R-gagccagtcctcaaatccaga
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1	F- gactctccactgcaagaccat R- gggtagactctttggcgtagtag
RAGE	İleri Glikasyon Son Ürün Reseptörü	F-ctacctattcctgcagcttc R-ctgatgttgacaggagggttcc
SOD1	Süper Oksit Dizmutaz 1	F-cggatgaagagaggcatgtt R-cacctttgcccagtcctct
HO1	Heme Oksijenaz 1	F-ggtgtccagggaggctttaag R-gtgcagctcctcagggagtag
NOD2	Nükleotid Bağlama Oligomerizasyon Alanı 2	F-ttctgccttacgagggttactctct R-atggtcctcagcttagcagtgaaac
NOX4	NADPH Oksidaz 4	F-atgttgggcctaggattgtg R-gagaagttcagggcggtcac
NRF2	Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör	F-gtcagctactcccaggttgc R-ccaaactgtctcatgtcct
Ki67	Hücre Proliferasyon	F-gcagacaagccttcagcagtaa R-tggtaccattgtcatcaatttcagt
Pdx-1	İnsülin Promotör Faktör 1	F- cgtagtagcgggacaacga R- ctctcgtcccaggttac
GLUT2	Glucose transporter 2	F- cactgctgagatgctcttcg R- aaactcagccaccatgaacc
GCK	Glukokinaz	F- gctaagcttatggctatggatactacaaggtg R-ggatcctcactgggccagcatg
DUOX-1	Dual oksidaz-1	F- agttcctggacatcctggtg

		R- gtcagctcctccttgctctg
GCG	Glukagon	F- ggtgaaaggccgaggaag R- gagaaggatccatcagcatgt
SST-1	Somatostatin	F- ctggagcctgaggatttgc R- ctgcagctccagcctcat
PPy	Pankreatik Polipeptid	F- cgggtacattggctccag R- actcgtcaggacacaggat
TOMM20	Mitokondriyal Dış Membran Translokator	F- aaacagaagcttgccaagga R- catctggaacactgggtggtg
MCT-4	Monokarboksilat Transporter 4	F- cttgctccttagccaccac R- gaaactggcaagtcccaaaa

3.4. Organoid Kültürü ve Organoid Hücrelerinin Analizleri

3.4.1. Organoid Kültürü

Organoid oluşturma öncesinde hücreler 96-kuyucuklu hidrofobik yüzeye sahip hücre tutunmasına izin vermeyen (Nunclon Sphera, Thermo) kültür plakalarda her bir kuyucuğa 15 µL matrijel (BD Bioscience) + hücre koyularak 2 saat boyunca 37 °C'de polimerleşmesi beklendi (Tablo 3.4.). Hücrelerin, organoid kültürü farklılaşma besiyeri (DMEM/F12 + %1 Pen-Strep, %2 B27, %1 ITS, 50 ng/mL EGF, 2 µg/mL heparin, 10 ng/mL FGF2 ve 5 ng/mL VEGFA) içerisinde 21 gün boyunca kültüre edildi (Wang vd., 2020). Her üç günde bir besiyer ortamı değiştirildi. 21 günün sonunda organoidlerin kültür işlemi sonlandırıldı (Şekil 3.3).



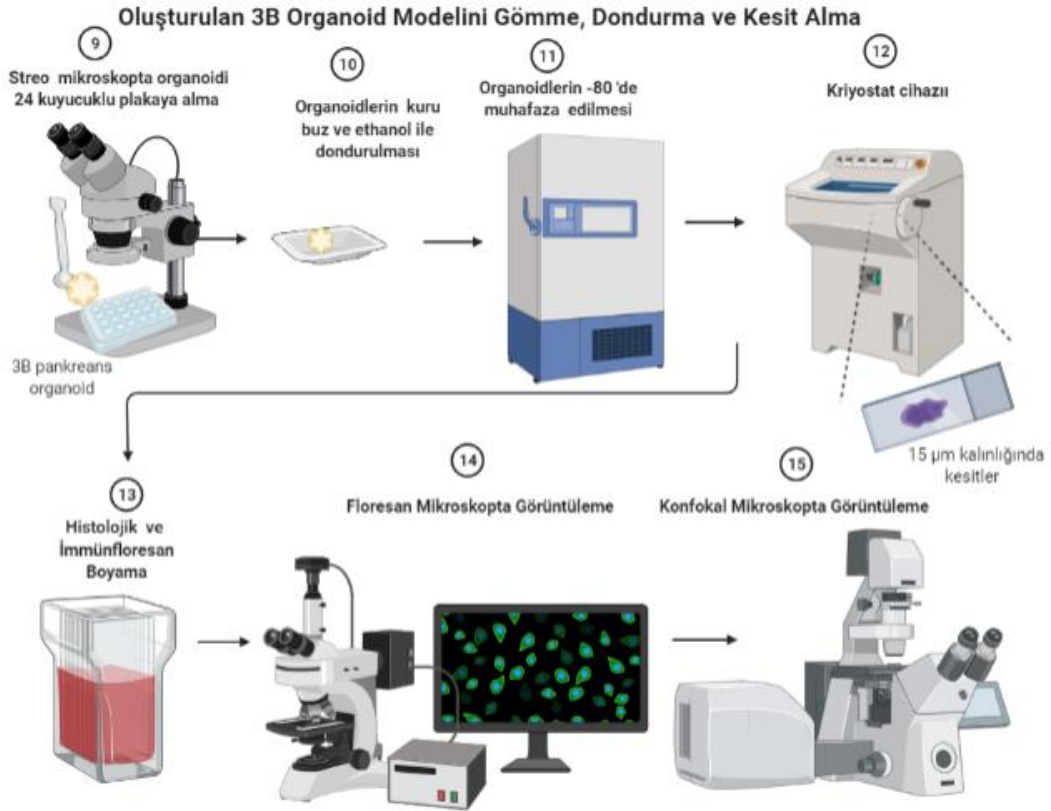
Şekil 3.3. 2-boyutlu sPA-MKH hücrelerinden 3-boyutlu organoid yapısının oluşturulması

Tablo 3.4. İn vitro Organoid Yaşlanma Modeline Göre Yaşlanmış Hücre ve Genç Hücre Tanımları

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak
Genç Hücre (P7)	İşlem Görmemiş Hücre	Hücre + Matrijel	Organoid Besiyeri ve Organoid Farklılaştırma Besiyeri
Yaşlı Hücre (P7-28)	Kronolojik Olarak Yaşlandırılmış Hücre	Hücre + Matrijel	Organoid Besiyeri ve Organoid Farklılaştırma Besiyeri

3.4.2. Organoid Gömme İşlemi

Kültüre edilmiş organoidler stereo mikroskop (Leica) altında 24 kuyucuklu plaka içerisinde alındıktan sonra 2 kez PBS yıkanarak %4 paraformaldehit içerisinde 20 dk 4 °C'de fikse edildi. Fiksasyon sonrası 3 kez PBS ile yıkanarak 1ml %30 Sükroz çözeltisi içerisinde 1 gece boyunca 4 °C'de bekletildi. Kuyucuklardan %30 Sükroz çözeltisi %10 Sükroz/%7,5 Jelatin gömme solüsyonu ile değiştirilerek 15 dk 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Doku takibinde kullanılan kaset içerisinde yağlı kâğıt serilip üzerine 2 ml %10 Sükroz/%7,5 Jelatin gömme solüsyonu ile kaplanıp 15 dk 4 °C'de polimerleşmesi beklendi. Gömme solüsyonu içerisinde 15 dk 37 °C'ye alınan organoidler spatül yardımı ile 24 kuyucuklu plakadan alınarak metal kaset içerisinde bulunan gömme solüsyonu içerisinde koyularak tekrardan 4 °C'e kaldırıldı. Bekleme sürecinde Jel yapının hızlı donması için kuru buz içerisinde %99,5 etanol koyularak sıcaklığın -60'a düşmesi sağlandı. Donma işleminin ardından organoidler yağlı kâğıt ve alimünyum folyo ile sarılarak -80°C soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Oluşturulan 3-boyutlu organoid modelini gömme, dondurma ve kesit alma

3.4.3. Organoid Kriyo Kesit Alma İşlemi

Dondurma yöntemi, ortaya çıkan morfolojinin kalitesi için kritik öneme sahiptir. Genellikle hızlı fiksasyon, üstün morfolojik koruma sağlar. -80°C soğutucuda muhafaza edilen organoidler için kriyostat cihazında (Leica CM1520) kesit alınması için ön hazırlık yapıldı. Organoidlerden kriyostat cihazı ile -20 °C'de 15 µm kalınlığında kesilen kesitler pozitif şarjlı ve normal lamlara alındı (Şekil 3.4).

3.4.4. Histokimyasal ve İmmün floresan Boyama

Histolojik analizler için normal lama alınan kriyo-kesitler alkol serileri ile sırasıyla %100'lük etil alkolde, %96'lık etil alkolde, %90'lık etil alkolde ve %70'lik etil alkolde 4'er dakika bekletildi. Alkol serilerinden sonra, Hematoksilen boyasında 5 dk beklendikten sonra çeşme suyu altında boyanın akması sağlandı. Mordanlama solüsyonu içerisinde 15 sn, %100'lük etil alkol içerisinde 1 dk, Eozin boyasında 3 dk bekletildi. Sırasıyla %70'lük etil alkolde, %90'lık etil alkolde, %96'lık etil alkolde ve %100'lik etil alkolde hızlı geçiş yapıldı. Alkolün uçması için beklenildi. Entellan ile kapatma işlemi yapıldı. Floresan mikroskobu (Leica DMI 4000 Microsystems) ile görüntüleme yapıldı.

Deney gruplarından pozitif şarjlı lama alınan 15 µm kalınlığında kriyo kesitler immün floresan Boyama için %96'lık alkolde 2 kere 10 dakika tutulduktan sonra kesitlerin antijen açığa çıkarma işlemi için ısıtılmış trisodyumsitrat çözeltisinde (pH 6.0) 20 dakika 200 W mikrodalgaya maruz bırakıldı. Oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakılan kesitler, %0,1'lik Triton-X 100 (Merck) ile 10 dk permeabilizasyon işlemi yapılarak hücre membranındaki lipidleri çözerek antikorlara geçirgen hale getirilmesi sağlandı. PBS ile 2 kere 5 dakika yıkandıktan sonra protein blokaj (Abcam) solüsyonunda 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Organoid kesitleri gece boyunca İnsülin, Pdx-1, Glukagon, Glukokinaz (GCKR), Somatostatin, Glut2 primer antikor (Tablo 3.5) ile 4 °C'de 16 saat boyunca muhafaza edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan örnekler floresan boya eklenmiş uygun sekonder antikorlar ile 37°C'de 90 dakika inkübe edilerek işaretlendi. Bağlanmayan antikorların uzaklaştırılması için önce PBS sonra dH₂O ile yıkama yapıldıktan sonra, son aşama olarak, nükleer boya içeren kapatma medyumunu DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (UltraCruz Mounting Medium for 61 fluorescence with DAPI) ile boyanmış organoidler kapatıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı (Şekil 3.4).

Tablo 3.5. Blok Serum, primer antikor ve sekonder antikor tablosu

Antikor Adı	Katalog Numarası	Firma
Anti-İnsülin	Ab181547	Abcam
Anti-Pdx-1	Sc-25403	Santa Cruz
Anti-Glukokinaz Reseptörü	Sc-6340	Santa Cruz
Anti-Glut-2	Sc-7580	Santa Cruz
Anti- Somatostatin	Sc-7819	Santa Cruz
Anti-Glukagon	Sc-7779	Santa Cruz
Goat Anti-rabbit IgG-FITC	Sc-2012	Santa Cruz
Goat Anti-rabbit Alexa-Flour 555	Ab150082	Abcam
Goat Anti-rabbit Alexa-Flour 647	Ab150083	Abcam
Donkey Anti-goat IgG-FITC	Sc-2024	Santa Cruz

3.4.5. Live-Dead ve PKH26 Boyaması (Canlı-Ölü ve Hücre Çoğalması Boyama Tayini)

Kültürü sonlanmış olan organoidlerin canlı-ölü hücre tayinini belirlemek için, besiyeri ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra spatül yardımıyla 24 kuyucuklu plaka içerisine alındı. DPBS ile ortam 2 kez yıkandı. Live-dead (Molecular Probes) kiti içerisinde bulunan 5 µl calcein AM (component A) ve 20 µl ethidium homodimer-1 (component B), 10 ml DPBS içerisine eklenip vorteks yöntemiyle homojen bir karışım haline gelmesi sağlandı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra örnekler floresan mikroskopta incelenerek fotoğraflandı.

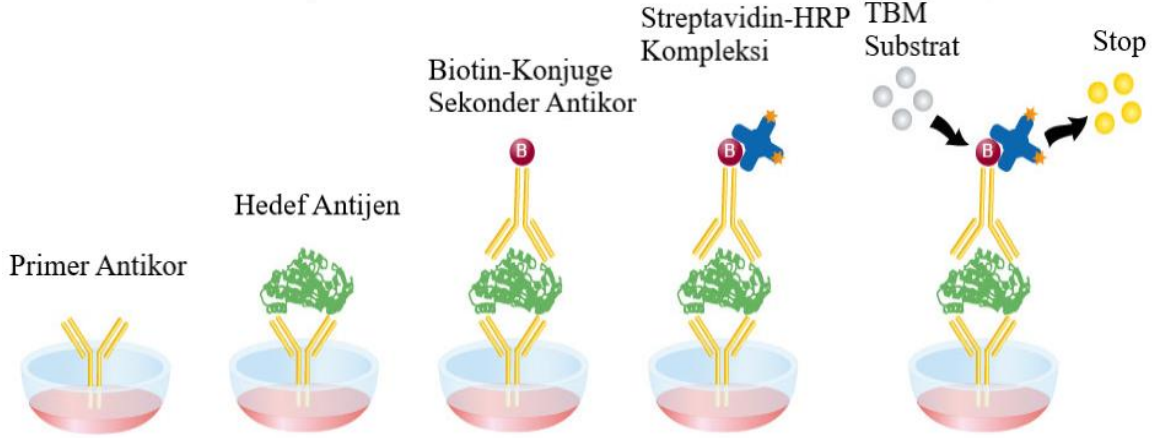
PKH26 (Sigma Aldrich) boyaması hücre membranı kırmızı veya yeşil floresan işaretleme olarak kullanılan bir boyadır. Bu lipofilik membran boyası, flow sitometri ile heterojen hücrelerde hücre çoğalmasını belirlemek için kullanılırken, homojen hücrelerde hücre canlılığını göstermek için yaygın olarak kullanılır. Kültürü sonlanan organoidlerin besiyeri çekilerek DMEM-F12 besiyeri ile 2 kere yıkandı. PKH26 solüsyonu kit içerisinde bulunan Diluent C ve PKH26 boyası 1:250 oranında dilüe edilip homojen bir karışım haline gelmesi için vorteksledi. Oda sıcaklığında 3 dk boyunca inkübasyonu sağlandı. Boyamayı durdurmak için %1 BSA (Bovine serum Albumin) ve DMEM-F12 muamele edildi. Örnekler floresan mikroskopta incelenerek fotoğraflandı.

3.4.6. Dithizone (DTZ) Boyaması ile Pankreas Kaynaklı Adacıkların Gösterilmesi

İn-vitro ortamda kültürü sonlanan organoidlerin pankreas adacığı saflığını değerlendirmek için dithizone (1,5-diphenylthiocarbazone) boyaması yapıldı. Dithizone, adacıkların beta hücrelerinde bulunan çınko iyonlarını bağlar ve bu nedenle adacıkları kırmızıya boyar. Organoidler 24 kuyucuklu plaka içerisine spatül yardımı ile alınıp 2 kez PBS ile yıkandı. Tartım cihazında 100 mg dithizone (Merck) boyası tartılarak 5 ml DMSO içinde çözdürülmesi sağlandı. Hazırlanan stok solüsyonu içerisinden 10 µl alınıp 1 ml PBS ile sulandırılarak boyama solüsyonu hazır hale getirildi. Organoid üzerine koyulan boya 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası organoidler HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) ile yıkandı. Organoidler stereo mikroskopta incelenerek fotoğraflandı.

3.4.7. Enzim Bağlı İmmunosorbent Analizi Yöntemiyle İnsülin Seviyesinin Belirlenmesi

Organoid kültürü sonrası elde edilen deney gruplarının hücre kültürü süpernantantlarından alınan örnekler "Sandviç ELISA" yöntemine uyumlu Rat Insulin ELISA ticari kit (Elabscience) kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, hücrelerdeki antijen-antikor ilişkisini göstererek, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesinin temelinde dayanarak insülin salgılama seviyelerinin belirlenmesi ve kıyaslanması amacıyla üreticinin sunduğu protokole uyularak protein miktar tayini gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. Sandviç ELISA testinin çalışma prensibi (Leinco.com, Nisan 2021)

Sandviç ELISA testinin çalışma prensibi (Şekil 3.5); hedef proteine özgül primer monoklonal insülin antikoruna ile kaplı kuyucuklara hazırlanan standart dilüsyonlar ve örnekler yüklendi. İnkübasyon sürecinde hedef proteinler (antijenler) insülin primer antikoruna bağlandı. Yıkama işlemiyle, örnekteki hedef molekül haricindeki diğer moleküller uzaklaştırıldı. Hedef proteine özgü biotin-konjuge sekonder antikor solusyonu ilave edilerek, bir epitoptan primer antikora bağlanan hedef proteinler diğer epitop(lar)tan da sekonder antikora bağlanmış oldu. Yıkama işlemi sonrası serbest (bağlanmamış) sekonder antikorlar uzaklaştırıldı. Streptavidin-Yabanturba 'Horseradish' Peroksidaz (HRP) solusyonu ilave edildi. İnkübasyon sürecinde avidin-biotin kompleksi ile birlikte sekonder antikor-HRP konjugatı oluşturuldu. Yıkama işlemiyle, konjugat oluşturmamış bağlanmamış HRP uzaklaştırıldı. HRP substratı olan 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TBM) substrat solusyonu ilave edildi. HRP'nin TMB ile olan enzim reaksiyonu sonucu, hedef proteinin miktarıyla doğru orantılı olarak mavi renk değişimi gerçekleşti. İnkübasyon süresi sonunda "Stop" solusyonu ilave edilerek sarı renk değişimi ile reaksiyon durduruldu. Plaka, mikropilaka okuyucuda (Versamax, ABD) 450 nm absorbans değeri ile ölçüldü. Örneklerin protein konsantrasyonları; ölçülen absorbans değerleri, standart eğrisi ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.4.8. Mitokondri İzolasyonu ve Transferi

P7 ve P7-28 hücreleri çalışmada kullanılmıştır. Eppendorf tüpü içerisinde 1×10^6 hücre $300 \times g$ 'de santrifüj sonrası elde edilen pelet Standart Hidrojen Elektrot (SHE) tamponu (0,25 M sukroz, 20 mM HEPES (pH 7.4), 2 mM EGTA, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ ve %0,1 BSA) içinde insülin enjektörü kullanılarak homojenize edilmiştir. Hücre kalıntılarını

ortamdan uzaklaştırmak için 4 °C 'de 3 dakika boyunca 1100×g 'da santrifüj edildi. Süpernatant alınarak temiz eppendorf tüpü içine koyuldu ve mitokondriyi çöktürmek için 4°C 'de 15 dakika 12.000 ×g 'de santrifüj edildi. Elde edilen mitokondri peleti, 500 ul SHE tamponu içinde yeniden süspansiyon edildi ve tekrar 12.000 ×g 'de 10 dakika boyunca 4 °C 'de santrifüj edildi. İzole edilmiş mitokondrinin protein eşdeğerini belirlemek için bikinkoninik asit analizi yapılmıştır (Kim, Hwang, Yun, Lee, Choi, 2018). Çalışmada %1 bikinkoninik asit çözeltisine %0,05 CuSO₄ eklenmiş tampon çözelti 5 µl mitokondri izolatına eklenerek 50 °C 'de 30 dk inkübe edilmiştir. 562 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümler yapılarak analiz işlemi gerçekleştirilmiştir.

Mitokondri organoid içindeki hücrelere aktarmak için ScreenFectA kiti (InCella, Eggenstein, Leopoldshafen, Almanya) kullanılarak organellere aktarılmıştır. 2,2 µg protein eşdeğerinde mitokondri 10 µl dilüsyon tampon çözeltisi içerisinde sulandırılmıştır. 10 µl kompleks içerisinde 8-10 kez hızlıca pipetlenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk boyunca mitokondri-katyonik kompleks oluşması için beklendi. Elde edilen kompleksin tamamı 96 kuyucuklu plaka içerisindeki tek bir organoide eklenmiştir. 24 saat sonra besi yeri yenilenecek şekilde 48 saat boyunca 37 °C 'de inkübasyona devam edilmiştir.

3.4.9. Glukoz ile Uyarılmış İnsülin Sekresyon (GSIS) Analizi

Mitokondri transferi yapılan organoid gruplarının, glukoz ile uyarılmış insülin sekresyonu (GSIS) analizi ile izole edilen mitokondrilerin hücre fonksiyonunun gösterilmesini test etmek için P7, P7-28 ve P7-28+Mitokondri deney gruplarını in-vitro ortam içerisindeki insülin salgıları için normal besi yeri (2,5 mM glukoz) ve yüksek glukoz besi yeri (27,5 mM glukoz) olmak üzere iki farklı glukoz konsantrasyonu ile insülin yanıtı tayin edildi. 3 ayrı deney grubundan alınan süpernatantlardan insülin tayini ELISA yöntemiyle yapıldı.

3.4.10. Organoid Modelinde Mitokondri Membran Potansiyelinin Belirlenmesi

Elektrostatik çekim kuvveti ile hücrelere bağlanmayarak, negatif yüklü mitokondride biriken geçirgen özellikte katyonik floresan bir boya olan Tetrametil rodamin metilester (TMRM), organoidlerden kriyostat cihazı ile -20 °C 'de 15 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lama alındıktan sonra alkol serileri ile sırasıyla %100'lük etil alkolde, %96'luk etil alkolde, %90'luk etil alkolde ve %70'luk etil alkolde 4'er dakika bekletilerek yapılarındaki su miktarı uzaklaştırıldı. Alkol sonrası lamalar PBS içesine alınarak örnekler PapPen ile

yuvarlak içine alındı. TMRM (ChemCruz) boyası, DMSO içerisinde çözülerek 100 µM stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon içerisinde final konsantrasyon 10 µM olacak şekilde uygun miktar alınıp PBS ile dilüe edilerek boyama solüsyonu elde edildi. Hazır olan boya karanlık ortamda örnek üzerine damlatılarak 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler boya uzaklaştırılarak yıkama olmadan kapatma medyumu DAPI ile kapatıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

3.4.11. Organoid Modelinde Total Mitokondri Miktarının Belirlenmesi

Mitokondri zar potansiyeline bağlı canlılığı belirlemek ve hücrelerdeki mitokondri sayısını ve dağılımını tespit etmek için mitokondriyumdaki tiyol gruplarına bağlanarak mitokondri içerisinde birikim gösteren floresan bir boya olan Mitotracker red, organoidlerden kriyostat cihazı ile -20 °C'de 15 µm kalınlığındaki kesitler pozitif şarjlı lama alındıktan sonra alkol serileri ile sırasıyla %100'lük etil alkolde, %96'lık etil alkolde, %90'lik etil alkolde ve %70'lik etil alkolde 4'er dakika bekletilerek yapılarındaki su miktarı uzaklaştırıldı. Alkol sonrası lamlar PBS içesine alınarak örnekler PapPen ile yuvarlak içine alındı. Mitotracker red boyası, DMSO içerisinde çözülerek 500 µM stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon içerisinde final konsantrasyon 500 nM olacak şekilde uygun miktar alınıp PBS ile dilüe edilerek boyama solüsyonu elde edildi. Hazır olan boya karanlık ortamda örnek üzerine damlatılarak 30 dakika 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örnekler boya uzaklaştırılarak yıkama olmadan kapatma medyumu DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) ile kapatıldı. Örnekler floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

3.4.12. 3-Boyutlu Organoid Deney Gruplarının Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyon analizi için -80°C soğutucuda muhafaza edilen organoid deney gruplarına ribonükleik asit (RNA) izolasyonu, komplementer deoksiribonükleik asit (cDNA) sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri gerçekleştirildi.

3.4.12.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

İn-vitro ortamda 21 günlük kültürü sonlanan 3 boyutlu organoid deney modeli üzerine, 300 µl PBS koyularak yıkama işlemi yapıldı ve PBS ortamdan uzaklaştırılarak deney grupları -80°C soğutucuda muhafaza edildi.

NucleoSpin RNA ticari (MACHEREY-NAGEL) kiti ile RNA izolasyonu standart protokolün önerildiği şekilde yapıldı. Kalan total RNA örnekleri -80°C soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edildi.

Elde edilen total RNA'lerden OligodT primerler kullanılarak Revers Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile komplementer DNA (cDNA) elde edildi. cDNA sentez kiti (Blirt, TRANSCRIPTME RNA Kit) kullanılarak, standart protokolün önerildiği şekilde yapıldı. Sentezlenen cDNA örnekleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kuruluncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.4.12.2. Kantitatif Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

İn-vitro deney gruplarını gen ekspresyonu ile göstermek için cDNA sentez kiti kullanılarak (Power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) kantitatif ters transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonunda analizi yapıldı. MafA ve Pax4 gen aktarımı yapılan hücrelerin primerleri; İnsülin 1, İnsülin 2, Glukokinaz, Glut-2 ve Pdx-1 gibi çeşitli beta hücre primerleri, alfa hücre belirteci glukagon genine ait primerler, delta hücre belirteci olan somatostatin genine ait primerler, oksidatif stres belirteci olan RAGE, p38α, SOD1, HO1 ve NOD2 genine ait primerler, mitokondri hasar belirteci olan Tomm20, MCT-4, NOX4, NRF2 ve Duox-1 genine ait primerler, hücre proliferasyonu ile ilişkili nükleer bir protein olan Ki67 genine ait primerler ve housekeeping gen olarak beta aktin genlerine ait primerler, (Tablo 3.6) kullanılarak her bir grup için belirli miktarlarda master solüsyonu , cDNA ve distile sudan oluşan bir karışım hazırlanarak 96 kuyucuklu PCR plakalarına yüklendi. Ters Transkriptaz PCR (LightCycler-II 480, Roche) cihazında, ilgili DNA parçalarının çoğalması ölçülerek ve elde edilen Cp sonuçları doğrultusunda housekeeping gene (beta aktin) ve kontrole (P7 hücreleri) oranlanarak ekspresyon analizleri yapıldı.

Tablo 3.6. Organoid qRT-PCR analizi için kullanılan genler ve primerlerinin baz dizilimleri.

Primerler	Açık İsim	Primer Baz Dizilimi (5'→3')
Act-β	Beta Aktin	F- agagaagctgtgctatgttg R- gtactcctgcttgctgatcc
İns-1	İnsülin-1	F- gaccttggcactggaggtt R- ccagttgtagagggagcag
İns-2	İnsülin-2	F- cgaagtggaggaccaca R- tgctggtgcagcactgat
p38α	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz	F-ggggcagatctgaacaacat R-gagccagtcctcaaatccaga
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1	F- gactctccacctgcaagaccat R- gggtgacttctttggcgtagtag
RAGE	İleri Glikasyon Son Ürün Reseptörü	F-ctacctattcctgcagcttc R-ctgatgttgacaggagggttcc
SOD1	Süper Oksit Dizmutaz 1	F-cggatgaagagaggtatgtt R-cacctttgccaagtcctct
HO1	Heme Oksijenaz 1	F-ggtgtccagggaaggtttaag R-gtgcagctcctcagggaagtag
NOD2	Nükleotid Bağlama Oligomerizasyon Alanı 2	F-ttctgccttacgagggttactctct R-atggtcctcagcttagcagtgaa
NOX4	NADPH Oksidase 4	F-atgttggcctaggatttg R-gagaagttcagggcgttcac
NRF2	Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör	F-gtcagctactcccaggttgc R-ccaaactgtcctcatgtcct
Ki67	Hücre Proliferasyon	F-gcagacaagccttcagcagtaa R-tggtaccattgtcatcaatttcagt
Pdx-1	İnsülin Promotör Faktör 1	F- cgtagtagcgggacaacga R- ctctcgccccaggttac
GLUT-2	Glucose transporter 2	F- cactgctgagatgctcttcg

		R- aaactcagccaccatgaacc
Gck	Glukokinaz	F- gctaagcttatggctatggatactacaaggtg R-ggacacctcactgggccagcatg
DUOX-1	Dual oxidaz-1	F- agttcctggacatcctgggtg R- gtcagctcctccttgctctg
Gcg	Glukagon	F- ggtgaaaggccgaggaag R- gagaaggatccatcagcatgt
Sst-1	Somatostatin	F- ctggagcctgaggatttgc R- ctgcagctccagcctcat
PPy	Pankreatik Polipeptid	F- cgggtacattggctccag R- actcgctcaggacacaggat
TOMM20	Mitokondriyal Dış Membran Translokator	F- aaacagaagcttgccaagga R- catctggaacactgggtggtg
MCT-4	Monokarboksilat Transporter 4	F- cttgctcctttagccaccac R- gaaactggcaagtcccaaaa

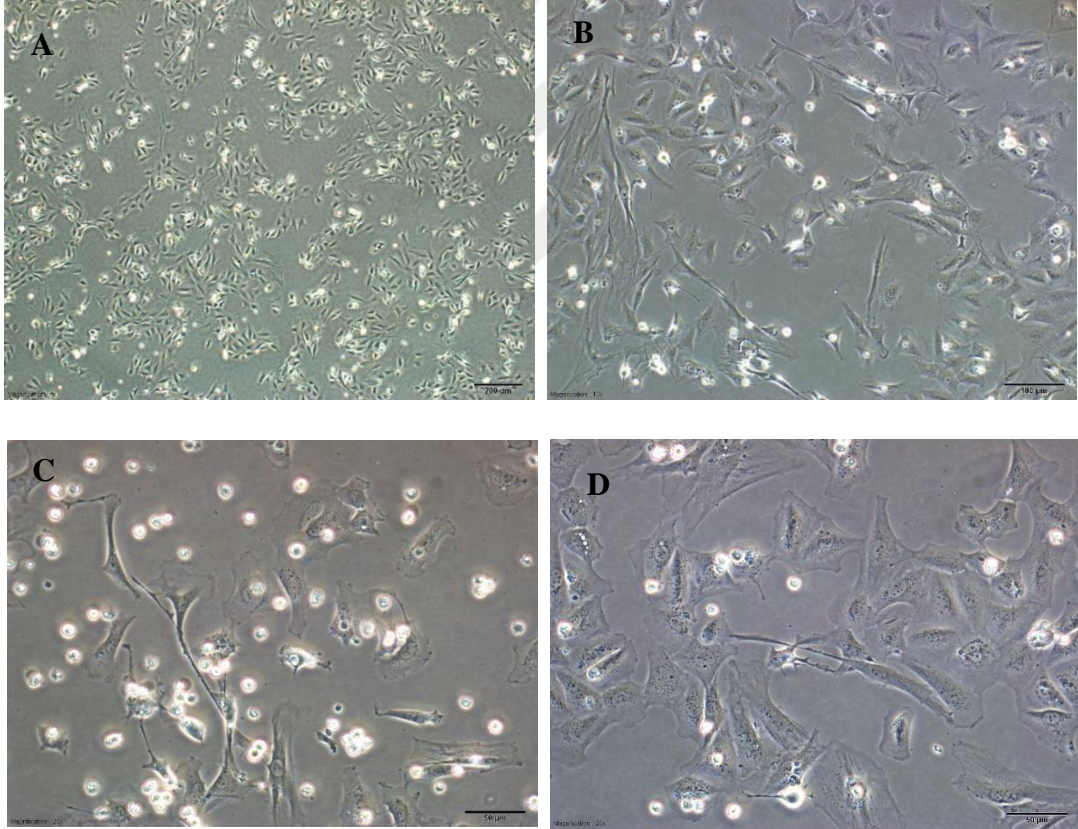
3.5. İstatiksel Analiz

Sonuçların istatistiksel analizlerinde SPSS 10.0 (SPSS, Chicago, ABD) programı kullanılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman-Keuls metodu ile test edilmiştir. Her deney grubu en az üç tekrardan oluşmaktadır. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p < 0.05$ olduğunda anlamlı ve $p < 0.01$ olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Pax4⁺/MafA⁺ Genleri Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelerinin Kültürü ve Çoğaltılması

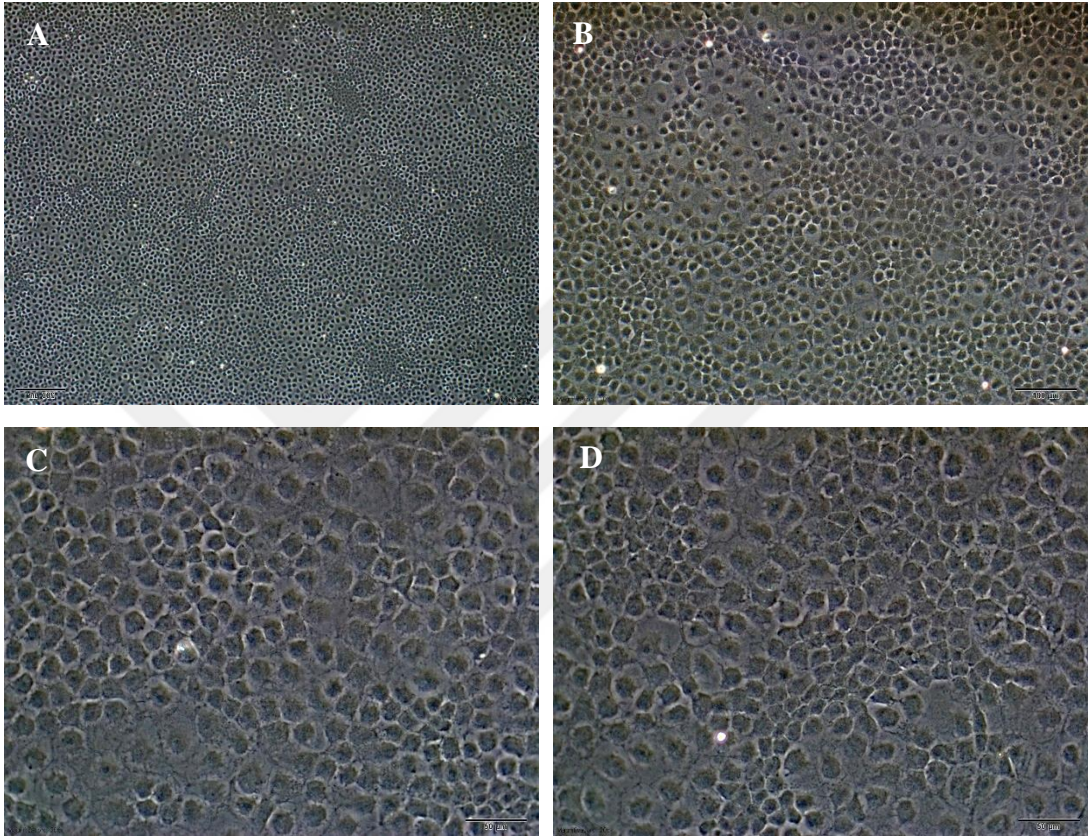
Sıçan pankreatik adacık kaynaklı hücrelerin -150 °C'de dondurularak saklanan 6. pasajdaki Pax4⁺/MafA⁺ hücreler çözüldükten sonra sonra fetal sığır serumu (FBS) (%10), penisilin/streptomisin (%1), Glutamax (%1), RPMI 1640 besiyerinde 37 °C 'de, %5 CO₂ ile kültür koşullarında çoğaltılmak üzere inkübatöre alındı. Her 3 günde bir hücrelerin besi yeri değiştirildi. Kültür kabında %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlama işlemi %0,25 tripsin kullanılarak yapıldı. Faz-kontrast mikroskopuyla hücreler gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Pax4⁺/MafA⁺ geni aktarılmış pankreatik adacık mezenkimal kök hücre Pasaj 7 kültür morfolojisi. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (A), 100 µm (B) ve 50 µm (C, D)).

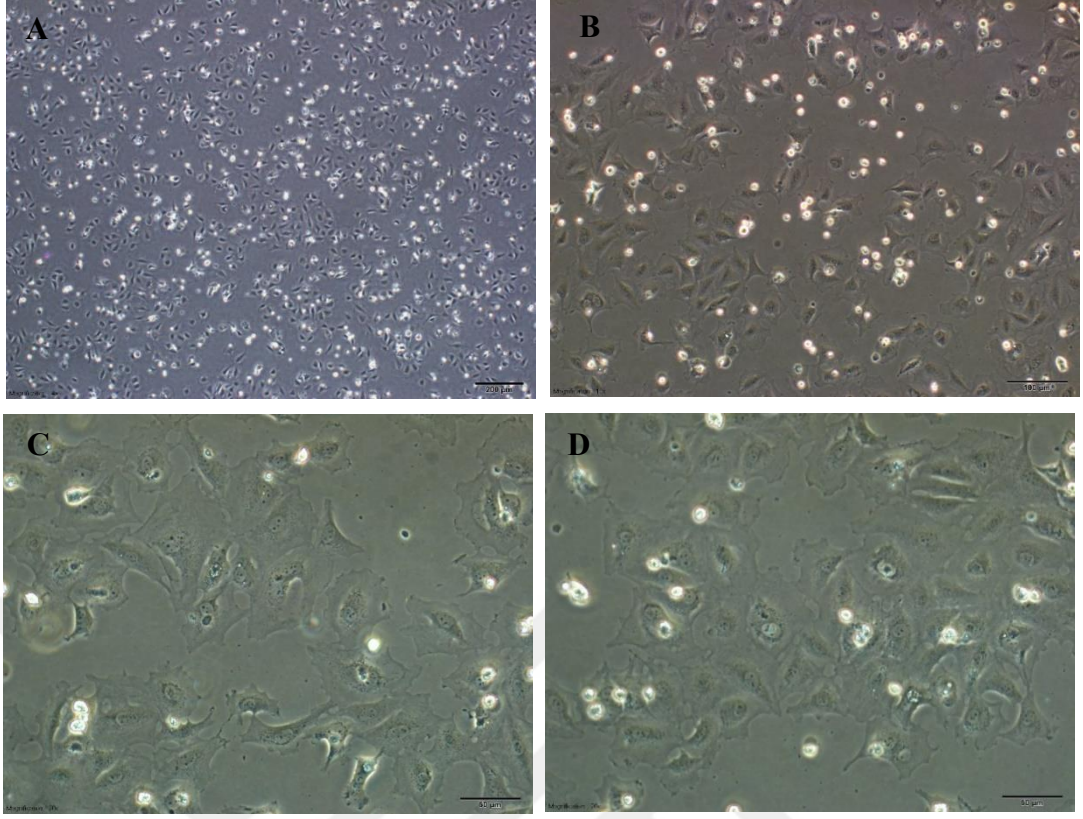
7. pasajdaki hücrelere konjugatif yaşlandırma yapılması için 28 gün boyunca besiyer değişimi yapılarak morfolojik yapısının değişimi gözlemlendi. Faz-kontrast mikroskopuyla

yapılan incelemelerde 7. pasajdaki hücrelerin uzun ince bir ağ yapısı oluşturma eğiliminde oldukları gözlemlenirken, 7. pasaj kullanılarak kronolojik olarak 28 gün boyunca kültürüne devam edilen hücrelerin daha çok kısa, yassılaştırmış ve hücre yapısı değişerek epitel görünüme sahip bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Pax4⁺/MafA⁺ geni aktarılmış pankreatik adacık mezenkimal kök hücre Pasaj 7 hücrelerine 28 gün boyunca besiyer değişimi yapılarak epitel benzeri hücre morfolojisinin gösterimi. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (A), 100 µm (B) ve 50 µm (C, D)).

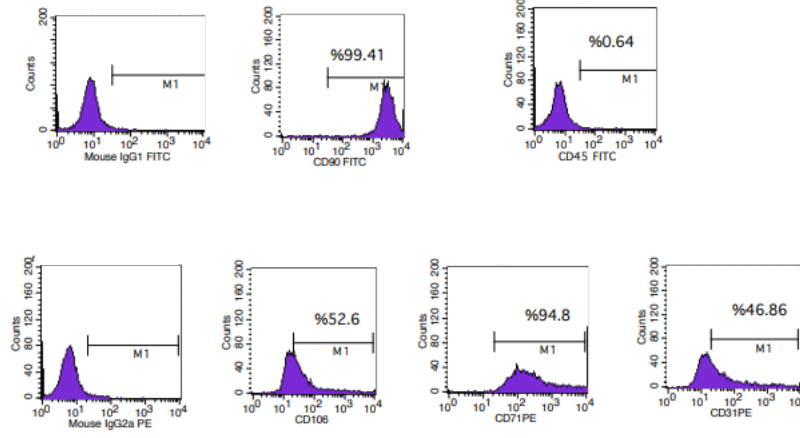
7. pasajdaki hücrelere replikatif yaşlandırma yapılması için pasaj atlatılarak 15. pasajdaki morfolojik yapısının değişimi gözlemlendi. Faz-kontrast mikroskopuyla yapılan incelemelerde 15. pasajdaki hücrelerin mezenkimal kök hücre ve epitel hücre görünüme sahip bir morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Pax4⁺/MafA⁺ geni aktarılmış pankreatik adacık mezenkimal kök hücre Pasaj 15 hücrelerinin hücre morfolojisinin gösterimi. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (A), 100 µm (B) ve 50 µm (C, D)).

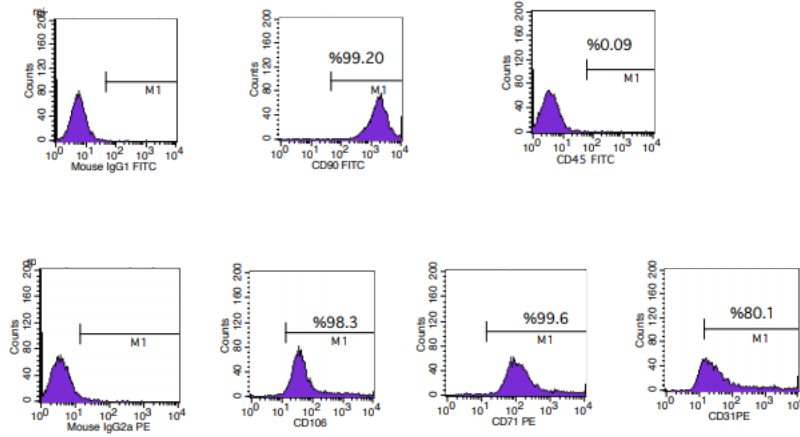
Hücrelerin kök hücre olup olmadığını kanıtlamak için faz-kontrast mikroskopunda morfolojik incelemenin yanı sıra akım sitometrisi (hücre sayar) yöntemiyle kök hücre belirteçleri taşıyıp taşımadıkları incelendi.

Yapılan akım sitometri analizi sonucunda, sPA-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD71, CD90, CD106 ve CD31 değerleri P7 için sırasıyla %94,8, %99,41, %52,6 ve %46,86; CD45 değerleri P7 için %0,64 olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).



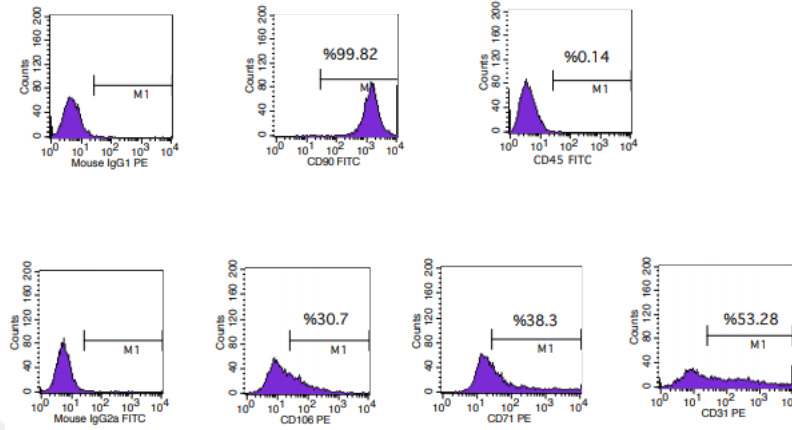
Şekil 4.4. Sıçan pankreatik adacık kaynaklı Pax4⁺/MafA⁺ genleri aktarılmış mezenkimal kök hücrelerinin kültür edilmiş (P7) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immünofenotipik özellikleri. sPA-MKH'ler; CD71, CD90, CD106 ve CD31 yönünden pozitif; CD45 negatif gözlemlendi.

Yapılan akım sitometri analizi sonucunda, sPA-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD71, CD90, CD106 ve CD31 değerleri P15 için sırasıyla %99,6, %99,20, %98,3 ve %80,1; CD45 değerleri P15 için %0,09 olarak bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Sıçan pankreatik adacık kaynaklı Pax4⁺/MafA⁺ genleri aktarılmış mezenkimal kök hücrelerinin kültür edilmiş (P15) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immünofenotipik özellikleri. sPA-MKH'ler; CD71, CD90, CD106 ve CD31 yönünden pozitif; CD45 açısından negatif gözlemlendi.

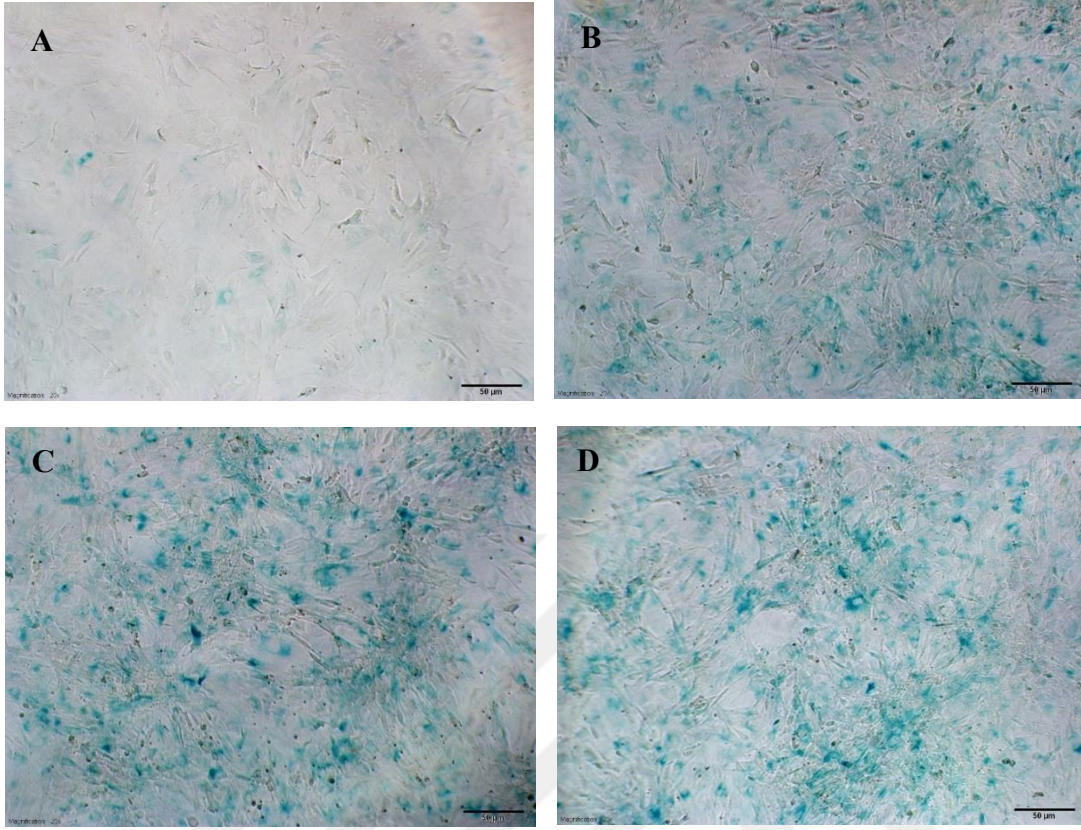
Yapılan akım sitometri analizi sonucunda, sPA-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD71, CD90, CD106 ve CD31 değerleri P7-28 için sırasıyla %38,3, %99,82, %30,7 ve %53,28; CD45 değerleri P7-28 için %0,14 olarak bulunmuştur (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Sıçan pankreatik adacık kaynaklı Pax4⁺/MafA⁺ genleri aktarılmış mezenkimal kök hücrelerinin kültür edilmiş (P7-28) MKH'lerin akım sitometri analizi ile belirlenen immünofenotipik özellikleri. sPA-MKH'ler; CD71, CD90, CD106 ve CD31'yonünden pozitif; CD45 açısından negatif gözlemlendi.

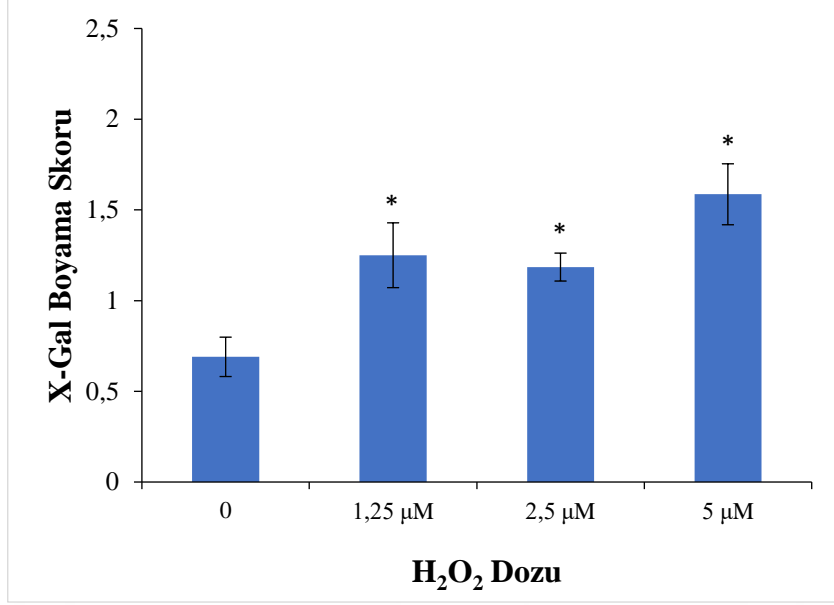
4.2. X-Gal Boyama Analizi

Yapılan X-gal boyama analizinde; Oksidatif stres uygulanan kontrol grubunda çok az derecede boyama gözlemlenmiştir. 24. saat sonunda kontrol grubuna kıyasla 1,25 μ M, 2,5 μ M ve 5 μ M farklı H₂O₂ konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde yoğun mavi renk boyanmasının meydana geldiği hücrede yaşlılık morfolojisinin oluştuğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesinde artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).



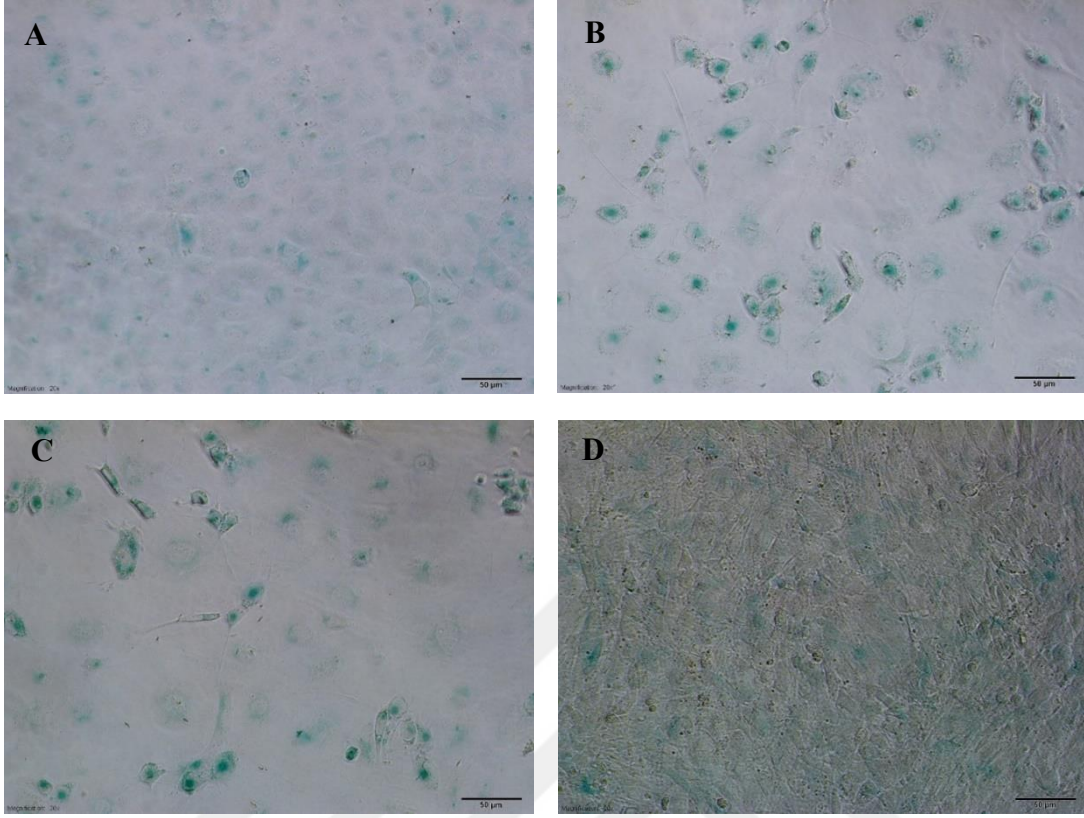
Şekil 4.7. Oksidatif hücre yaşlanmasının X-gal boyaması (24 saat). Gen aktarılmış olan pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin belirli dozlarda H₂O₂ uygulanması (24 saat) X-gal boyaması ile görüntülenmiştir. X-gal (mavi) boyaması hücrelerin yaşlanmaya olan tepkisini göstermektedir. (A: Kontrol grubu, B: 1,25 μM, C: 2,5 μM, D: 5 μM) (Ölçüm çubuğu: 50 μm)

P7 grubu ile kıyaslandığı zaman 1,25 μM H₂O₂ uygulanan grupta yaşlılık morfolojisinin olduğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesinde 2 kat artış, 2,5 μM H₂O₂ uygulanan grupta 1,8 kat artış ve 5 μM H₂O₂ uygulanan grupta ise 2,5 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).



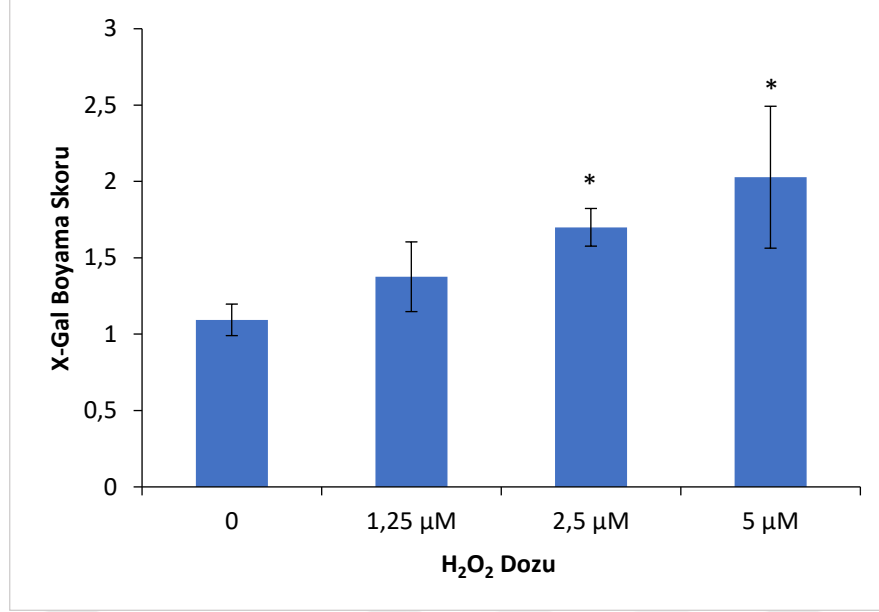
Şekil 4.8. Oksidatif yaşlanmanın X-gal boyama skoru (24 saat). Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ uygulanması sonrasında 24. saatte X-gal boyaması yapılan ve skora yöntemi ile maviye boyanan hücreler manuel olarak sayılarak 0-4 arasında numaralandırılmıştır. (0= Boyanmamış hücre, 4=Yoğun mavi boyanmış hücre). (*, P<0,05)

72. saat sonunda kontrol grubuna kıyasla 1,25 µM, 2,5 µM ve 5 µM farklı H₂O₂ konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde yoğun mavi renk boyanması gözlemlendiği, hücrede yaşlılık morfolojisinin olduğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesinde ve hücre proliferasyon seviyesinde önemli derecede bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).



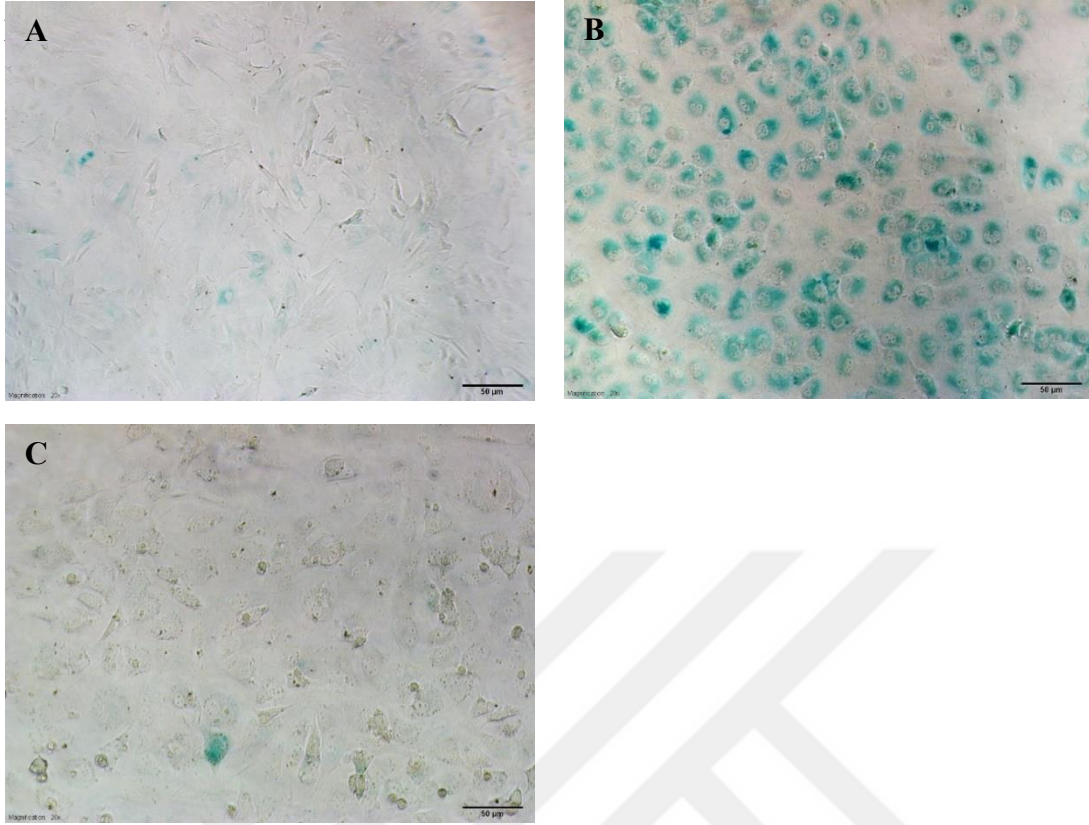
Şekil 4.9. Oksidatif hücre yaşlanmasının X-gal boyaması (72 saat). Gen aktarılmış olan pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin belirli dozlarda H₂O₂ uygulanması sonrası (72 saat) hücrelerin yaşlanmasına olan etkisi X-Gal boyaması ile görüntülenmiştir. X-gal (mavi) boyaması hücrelerin yaşlanmaya olan tepkisini göstermektedir. (A: Kontrol grubu, B: 1,25 µM, C: 2,5 µM, D: 5 µM) (Ölçüm çubuğu: 50 µm)

Kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman 1,25 µM H₂O₂ uygulanan grupta yaşlılık morfolojisinin olduğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesinde 1,3 kat artış, 2,5 µM H₂O₂ uygulanan grupta 1,6 kat artış ve 5 µM H₂O₂ uygulanan grupta ise 2 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



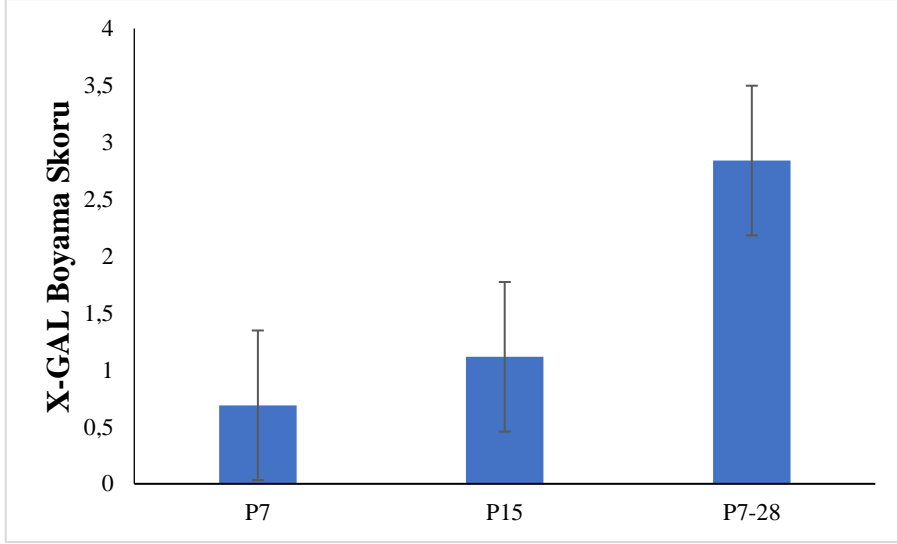
Şekil 4.10. Oksidatif yaşlanmanın X-gal boyama skoru (72 saat). Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ uygulanması sonrasında 72. saatte X-gal boyaması yapılan ve skorlama yöntemi ile maviye boyanan hücreler manuel olarak sayılarak 0-4 arasında numaralandırılmıştır. (0= Boyanmamış hücre, 4=Yoğun mavi boyanmış hücre). (*, P<0,05)

P7 hücresine kıyasla P7-28 hücresinin morfolojik yapısının değişmesi sonucunda hücrede ileri derecede boyanma gözlemlenmiş olup yaşlılık morfolojisinin oluştuğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesindeki artışın önemli derecede arttığı gözlemlenmiştir. P15 hücresinde ise yaşlılık morfolojisi elde edilememiş olup herhangi bir boyanma gözlenmemiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Konjugatif ve replikatif hücre yaşlanmasının X-gal boyaması. Gen aktarılmış olan pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin P7-28 ve P15 hücrelerin yaşlanmasına olan etkisi X-gal boyaması ile görüntülenmiştir. X-gal (mavi) boyaması hücrelerin yaşlanmaya olan tepkisini göstermektedir. (A: P7 (Kontrol), B: P7-28, C; P15) (Ölçüm çubuğu: 50 µm)

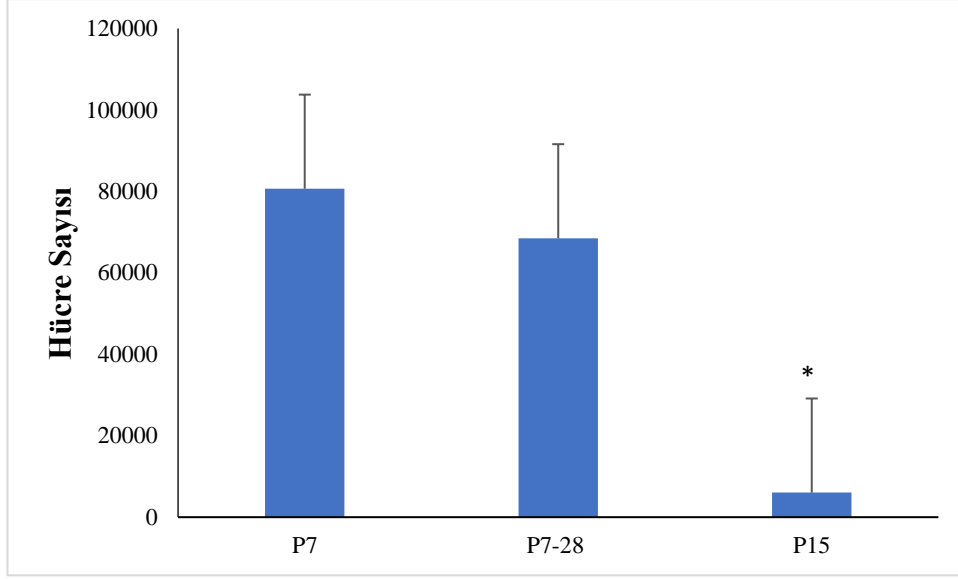
P7 ile kıyaslandığı zaman P15 hücrelerinde yaşlılık morfolojisinin olduğu beta-galaktosidaz enzim aktivitesinde 1,5 kat artış gözlemlenirken, P7-28 hücrelerinde ise 4 kat önemli derecede bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Konjugatif ve replikatif hücre yaşlanmasının X-gal boyama skoru. P7-28 ve P15 gruplarında maviye boyanan hücreler manuel olarak sayılarak 0-4 arasında skorlama yöntemi ile numaralandırılmıştır. (0= Boyanmamış hücre, 4=Yoğun mavi boyanmış hücre).

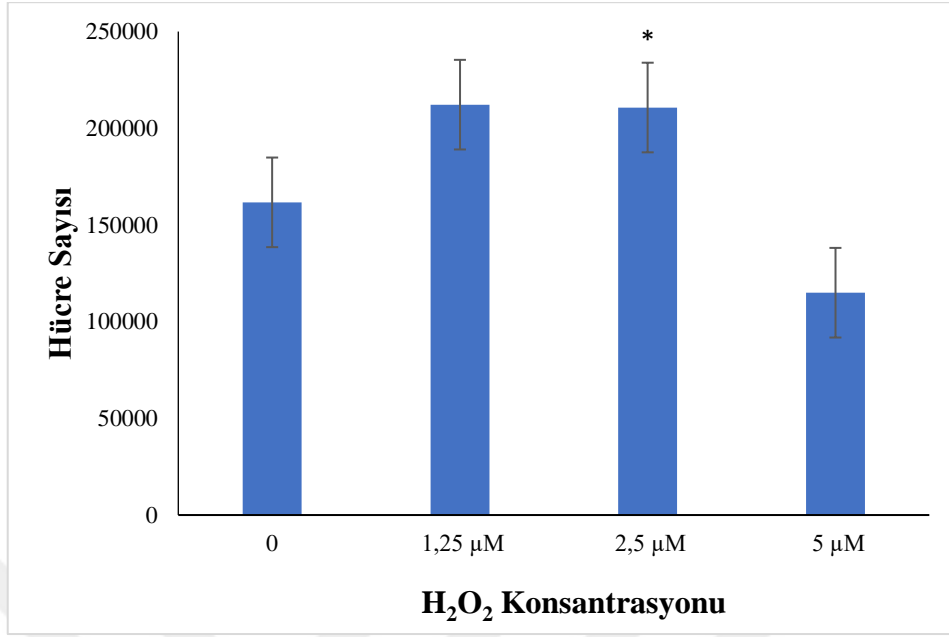
4.3. WST-1 Canlılık ve Proliferasyon Analizi

Gen aktarılmış olan pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin konjugatif yaşlandırma (P7-28) P7 hücresine kıyasla, canlılık ve proliferasyonunda 1,20 kat azalma gözlemlenmiştir. Replikatif yaşlandırma (P15) yapılan grupta ise hücre canlılık ve proliferasyonu ile P7 hücresi kıyasla 13,5 kat azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).



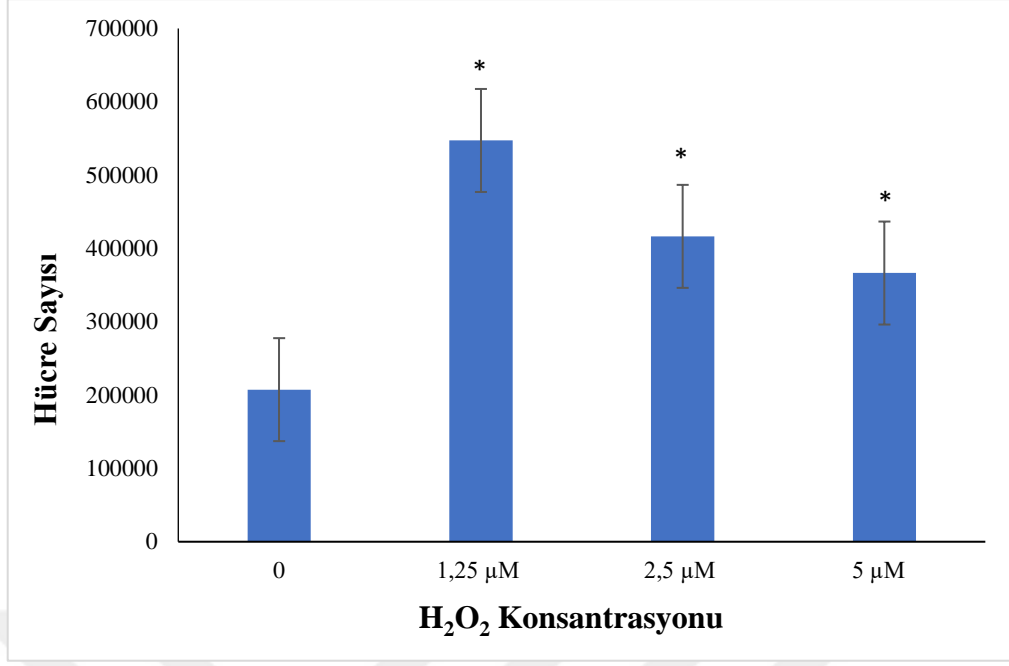
Şekil 4.13. Konjugatif yaşlandırma (P7-28) ve replikatif yaşlandırma (P15) gruplarına takiben yapılan canlılık analizi. (*, $P < 0.05$)

Gen aktarılmış olan pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin belirli dozlarda 30 dk H_2O_2 uygulanması sonrasında 24. saatte yapılan canlılık analizinde P7 grubu ile kıyaslandığı zaman 1,25 μM ve 2,5 μM H_2O_2 uygulanan grupta hücre canlılık ve proliferasyonunda 1,5 kat artış gözlemlenirken, 5 μM H_2O_2 uygulanan grupta hücre canlılık ve proliferasyonunda ise 1,40 kat azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ uygulamasına takiben 24. saatte yapılan canlılık analizi. (*, P<0,05)

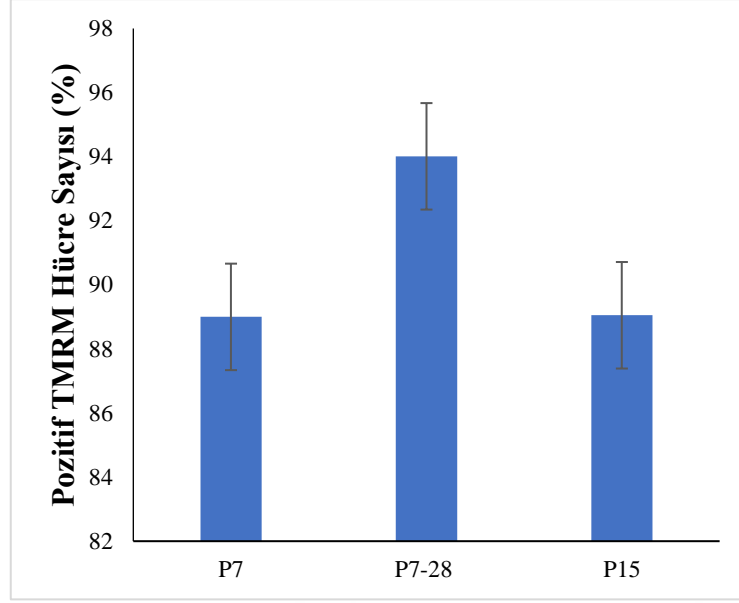
Gen aktarılmış olan pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin belirli dozlarda 30 dk H₂O₂ uygulanması sonrasında 72. saatte yapılan canlılık analizinde kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman 1,25 µM H₂O₂ uygulanan grupta hücre canlılık ve proliferasyonunda 2,6 kat, 2,5 µM H₂O₂ uygulanan grupta 2 kat ve 5 µM H₂O₂ uygulanan grupta ise 1,8 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ uygulamasına takiben 72. saatte yapılan canlılık analizi. (*, P<0,05)

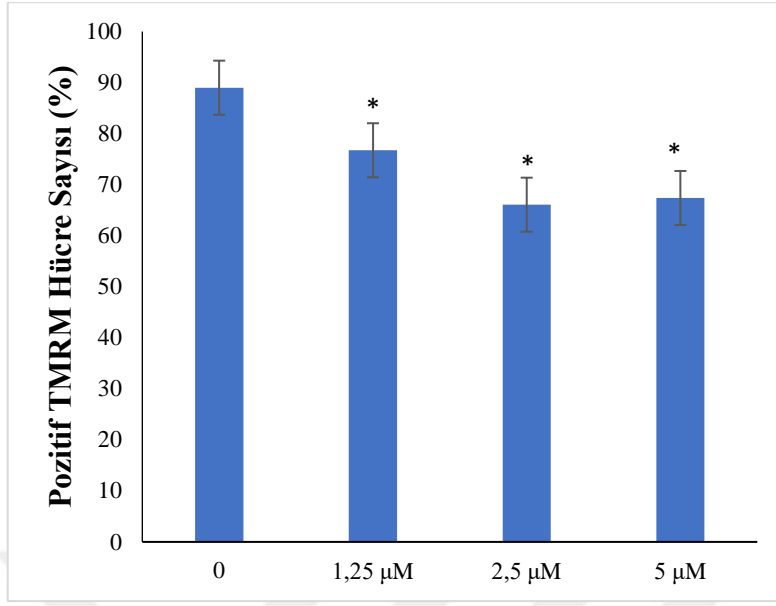
4.4. TMRM Boyamasının Akım Sitometri ile Gösterimi

Yapılan TMRM (Tetrametil rhodamin metil ester) boyama akım sitometrisi sonuç analizinde hücre mitokondri membran potansiyellerinde, konjugatif yaşlanma (P7-28) ve replikatif yaşlanma (P15) sonucunda meydana gelen değişimlerin flow sitometrik analizinde P7 kontrol grubu olan sağlıklı hücrelerin, P7-28 grup ile kıyaslandığında hücrelerin mitokondri membran potansiyelindeki değişim sonucunda daha fazla boyama gözlemlenirken, P15 grubunda kontrole kıyasla değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.16). P7-28 grubunda gözlemlenen artış istatistiksel analiz sonucunda artışın kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı olmadığı görülmüştür.



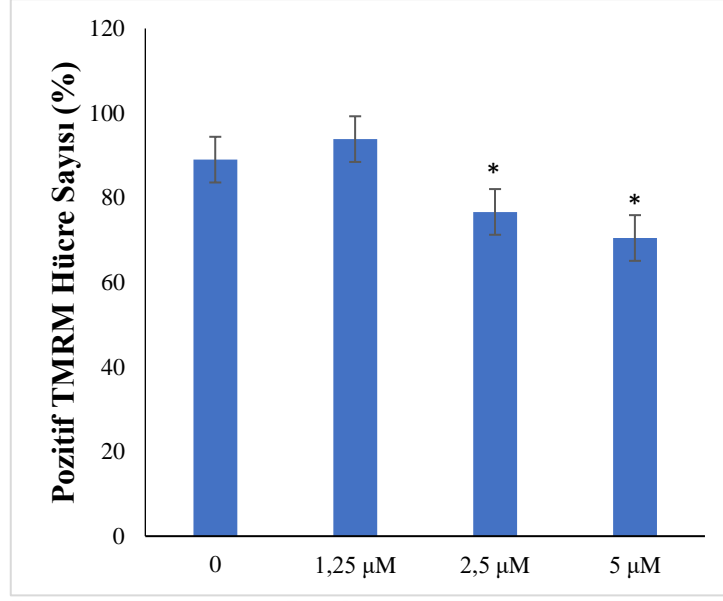
Şekil 4.16. Kültür ortamında konjukatif yaşlanma (P7-28) ve replikatif yaşlanma (P15) sonrası hücelere yapılan TMRM boyaması sonrası mitokondri membran potansiyeli analizi.

Yapılan TMRM boyama akım sitometrisi sonuç analizinde hücre mitokondri membran potansiyelerinde, belirli dozlarda uygulanan H_2O_2 konsantrasyonlarında meydana gelen potansiyel değişimlerin flow sitometrik analizinde, H_2O_2 uygulanmış gruba kıyasla kontrol grubunun membran potansiyelinde 24. saatte daha fazla boyanma gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Kültür ortamında 30 dakikak kültür ortamında H₂O₂ uygulanmış olan P7 hücrelerinin 24. saatte yapılan TMRM boyaması sonrası mitokondri membran potansiyeli analizi. (*, P<0,05)

Yapılan TMRM boyama akım sitometrisi sonuç analizinde hücre mitokondri membran potansiyellerinde, belirli dozlarda uygulanan H₂O₂ konsantrasyonlarında meydana gelen potansiyel değişimlerin flow sitometrik analizinde, kontrol grubuna kıyasla 1,25 µM H₂O₂ uygulanmış grubun mitokondri membran potansiyelinde 72. saatte daha fazla boyanma gözlemlenmiştir. 2,5 µM ve 5 µM H₂O₂ uygulanmış grupta mitokondri membran potansiyelinde ise kontrole kıyasla daha az boyama gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

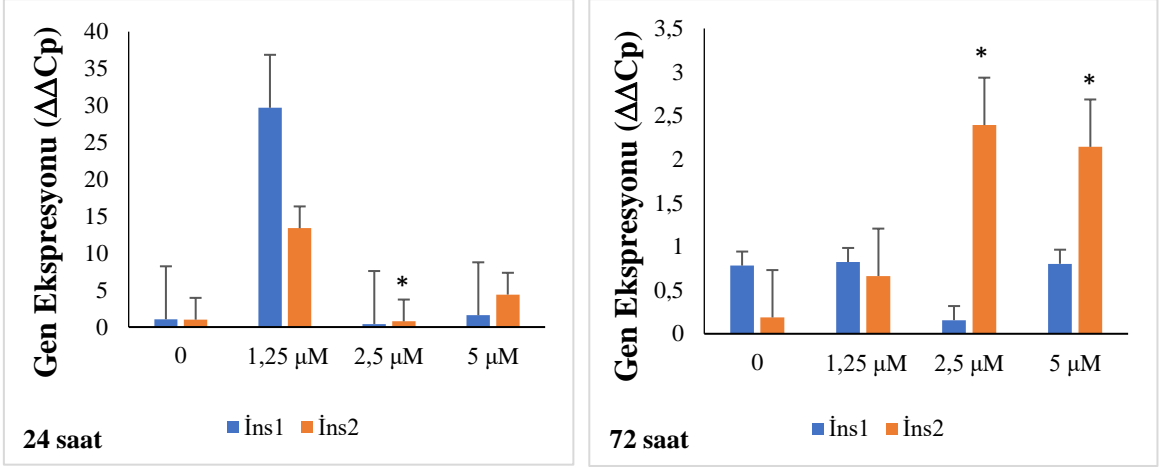


Şekil 4.18. Kültür ortamında 30 dakika H₂O₂ uygulanmış olan P7 hücrelerinin 72. saatte yapılan TMRM boyaması sonrası mitokondri membran potansiyeli analizi. (*, P<0,05)

4.5. 2-Boyutlu Hücrelerin Gen Ekspresyon Analizi

24. saat sonunda İnsülin ekspresyon seviyesi ile ilişkili ifade profilleri incelendiğinde farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 µM grubun İnsülin 1 ve İnsülin 2 ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlendiği, 2,5 µM grubun İnsülin 1 ve İnsülin 2 ekspresyon seviyesinde azalma olduğu ve 5 µM gruptaki İnsülin 1 ve İnsülin 2 ekspresyon seviyesinde ise çok az artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).

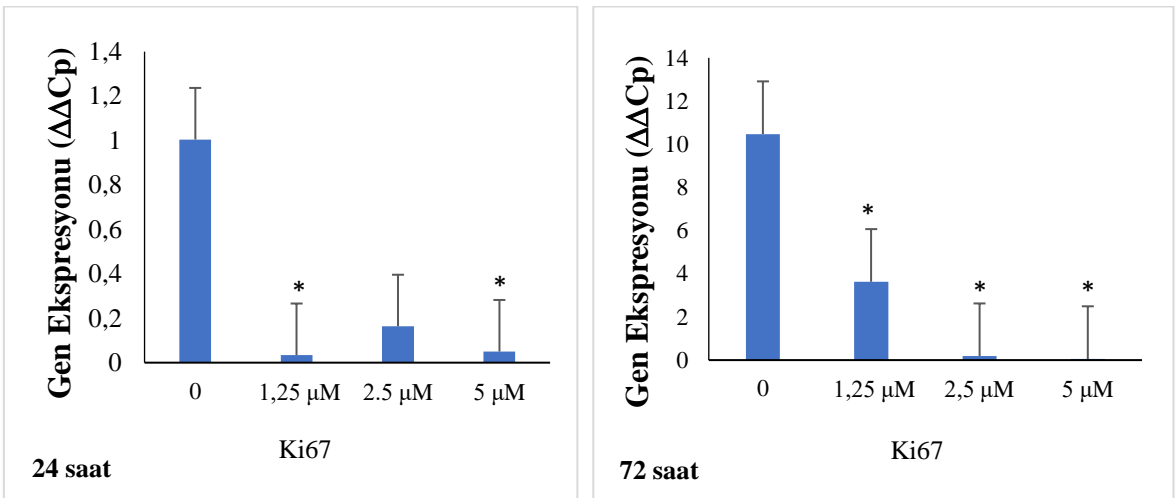
72. saat sonunda ise İnsülin ekspresyon seviyesi ile ilişkili ifade profilleri incelendiğinde farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 µM grubun İnsülin 1 ekspresyon seviyesinin değişim gözlemlenmediği ve İnsülin 2 ekspresyon seviyesinde artış olduğu, 2,5 µM grubun İnsülin 1 ekspresyon seviyesinde azalma olduğu ve İnsülin 2 seviyesinde artış olduğu, 5 µM gruptaki İnsülin 1 ekspresyon seviyesinde ise değişim gözlemlenmediği ve İnsülin 2 seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Belirli dozlarda H₂O₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; insülin gen ekspresyonu analiz grafiği. (*, P<0.05)

24. saat sonunda hücre proliferasyonu ile ilişkili nükleer bir protein olan Ki67 ekspresyon seviyesine ait genlerin ifade profilleri incelendiğinde farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 μM, 2,5 μM, 5 μM hücre gruplarının ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.20).

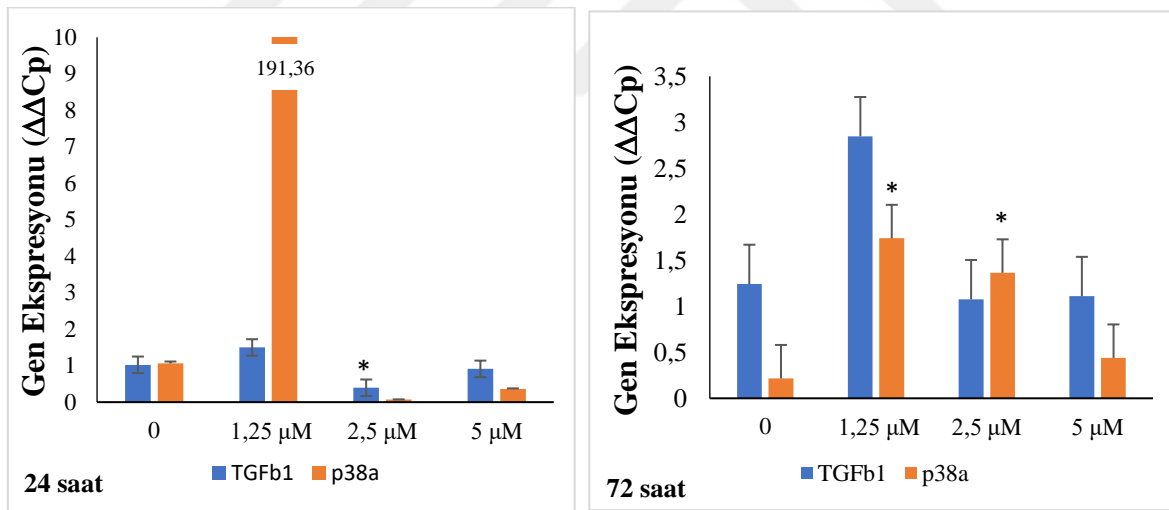
72. saat sonunda ise hücre proliferasyonu ile ilişkili nükleer bir protein olan Ki67 ekspresyon seviyesine ait genlerin ifade profilleri incelendiğinde farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 μM, 2,5 μM, 5 μM hücre gruplarının ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Belirli dozlarda H₂O₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; Ki67 gen ekspresyonu analiz grafiği. (*, P<0,05)

24. saat sonunda TGFβ1 ekspresyon seviyesinin p38α yolunu düzenleme görevine ilişkin yapılan ekspresyon analizinde bu genlerinin ifade profilleri incelendiğinde farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 μM grupta TGFβ1 ve p38α ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlendiği, 2,5 μM grubun TGFβ1 ve p38α ekspresyon seviyesinde azalma olduğu ve 5 μM gruptaki TGFβ1 ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmezken, p38α ekspresyon seviyesinde ise azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).

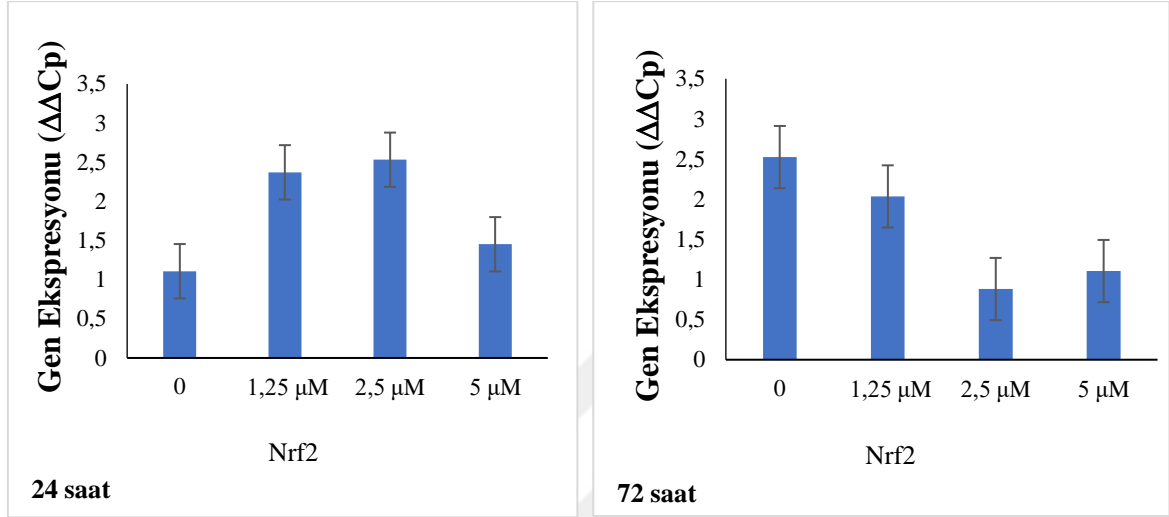
72. saat sonunda ise TGFβ1 ekspresyon seviyesinin p38α yolunu düzenleme görevine ilişkin yapılan ekspresyon analizinde bu genlerinin ifade profilleri incelendiğinde farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 μM grupta TGFβ1 ve p38α ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlendiği, 2,5 μM grubun TGFβ1 ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmezken, p38α ekspresyon seviyesinde artış gözlemlendiği ve 5 μM grupta ise TGFβ1 ekspresyon seviyesinde değişim gözlemlenmezken, p38α ekspresyon seviyesinde ise daha az bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Belirli dozlarda H₂O₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; TGFβ1 ve p38α gen ekspresyonu analiz grafiği. (*, P<0,05)

24. saat sonunda Nrf2 geninin mitokondri üzerindeki etkisinin ifade profili incelendiğinde, farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 μM grupta Nrf2 geninin ekspresyon seviyelerinde artış olduğu, 2,5 μM grubun Nrf2 geninin ekspresyon seviyesinde en fazla artışın gözlemlendiği ve 5 μM grupta ise Nrf2 geninin ekspresyon seviyesinde çok az bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).

72. saat sonunda ise Nrf2 geninin mitokondri üzerindeki etkisinin ifade profili incelendiğinde, farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 µM grupta Nrf2 geninin ekspresyon seviyelerinde azalma olduğu, 2,5 µM grubun Nrf2 geninin ekspresyon seviyesinde en fazla azalmanın gözlemlendiği ve 5 µM grupta ise Nrf2 geninin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).

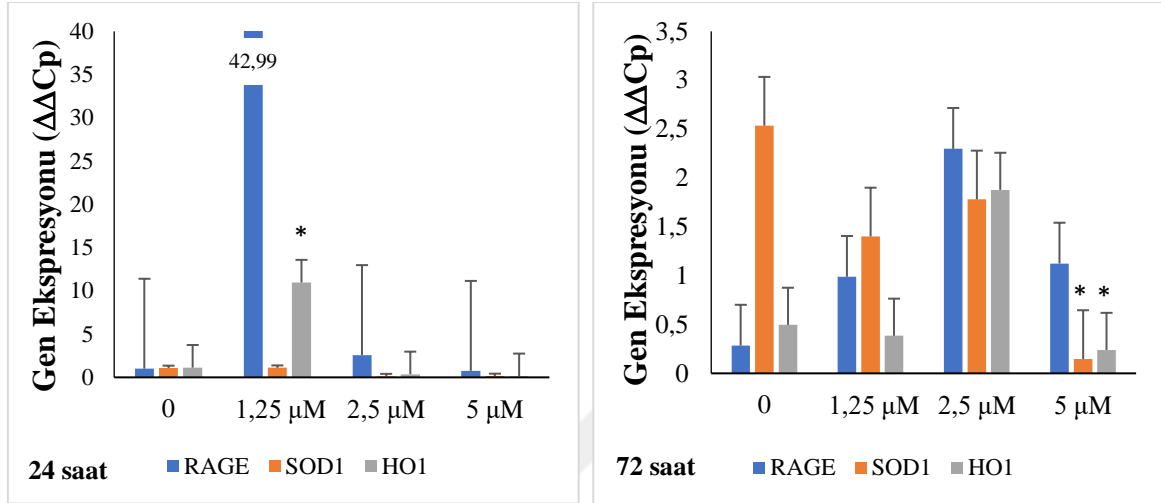


Şekil 4.22. Belirli dozlarda H₂O₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; Nrf2 gen ekspresyonu analiz grafiği.

24. saat sonunda oksidatif stres ile ilişkili olarak RAGE, SOD1 ve HO1 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 µM grubun RAGE geninin ekspresyon seviyesinde çok fazla seviyede artış olduğu, SOD1 geninin ekspresyon seviyesinde ise değişim gözlemlenmediği ve HO1 geninin ekspresyon seviyesinde artış olduğu gözlemlenmiştir. 2,5 µM grubun RAGE geninin ekspresyon seviyesinde çok az artış olduğu, SOD1 geninin ekspresyon seviyesinde ise azaldığı ve HO1 geninin ekspresyon seviyesinde ise azalma olduğu gözlemlenmiştir. 5 µM gruptaki RAGE, SOD1 ve HO1 geninin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).

72. saat sonunda oksidatif stres ile ilişkili olarak RAGE, SOD1 ve HO1 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 µM grubun RAGE geninin ekspresyon seviyesinde artış olduğu, SOD1 geninin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu ve HO1 geninin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. 2,5 µM grubun RAGE geninin ekspresyon seviyesinde en fazla artışın olduğu, SOD1 geninin ekspresyon seviyesinin arttığı ve HO1

geninin ekspresyon seviyesinde ise artış olduğu gözlemlenmiştir. 5 µM gruptaki RAGE geninin ekspresyon seviyesinde artışın olduğu, SOD1 geninin ekspresyon seviyesinin azalma olduğu ve HO1 geninin ekspresyon seviyesinde ise azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.23).

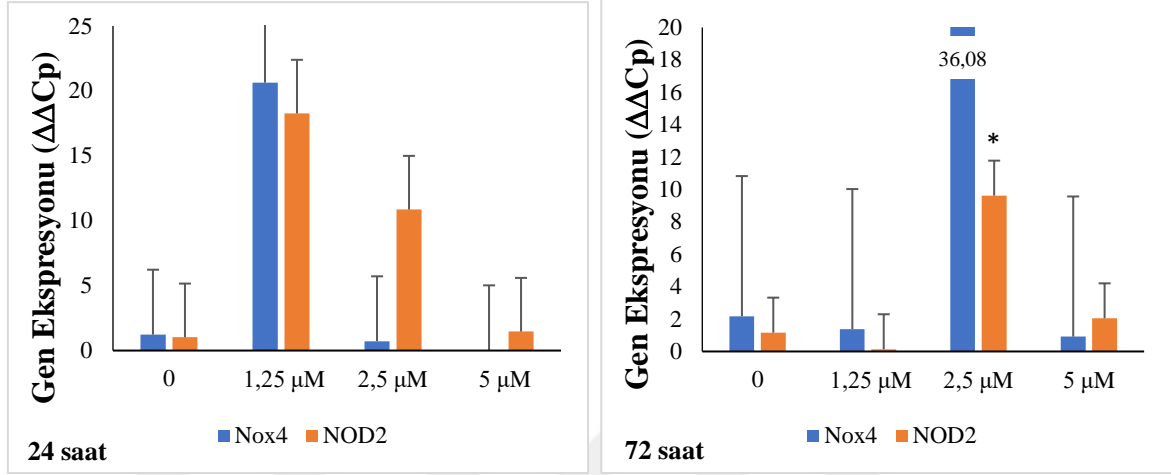


Şekil 4.23. Belirli dozlarda H₂O₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; RAGE, SOD1 ve HO1 gen ekspresyonu analiz grafiği. (*, P<0,05)

24. saat sonunda protein kodlamasından sorumlu olan NOD2, reaktif oksijen üretiminden (ROS) sorumlu Nox4 genlerinin ekspresyonu analizinde ifade profilleri incelendiğinde, farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 µM grubun Nox4 geninin ekspresyon seviyesinde çok fazla seviyede artış olduğu, NOD2 geninin ekspresyon seviyesinde en fazla artışın gözlemlendiği, 2,5 µM grubun Nox4 geninin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu, NOD2 geninin ekspresyon seviyesinde artış meydana geldiği, 5 µM gruptaki Nox4 geninin ekspresyon seviyesinde çok fazla azalma meydana geldiği, NOD2 geninin ekspresyon seviyesinde ise artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.24).

72. saat sonunda ise protein kodlamasından sorumlu olan NOD2, reaktif oksijen türevlerinin üretiminden (ROS) sorumlu Nox4 genlerinin ekspresyonu analizinde ifade profilleri incelendiğinde, farklı dozlarda H₂O₂ uygulanan hücre grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında 1,25 µM grubun Nox4 geninin ekspresyon seviyesinde azalma olduğu, NOD2 geninin ekspresyon seviyesinde en fazla azalmanın gözlemlendiği, 2,5 µM grubun Nox4 geninin ekspresyon seviyesinde en fazla artışın olduğu, NOD2 geninin ekspresyon seviyesinde en fazla artışın meydana geldiği, 5 µM gruptaki Nox4 geninin ekspresyon

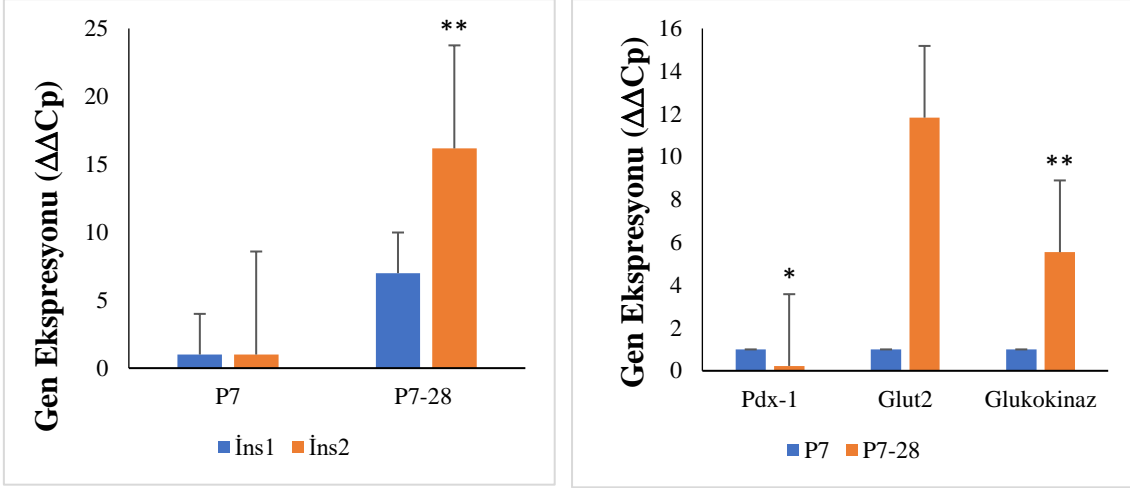
seviyesinde azalma meydana geldiği, NOD2 geninin ekspresyon seviyesinde ise çok az bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Belirli dozlarda H₂O₂ uygulanan 24. ve 72. saat grubunun; Nox4 ve NOD2 gen ekspresyonu analiz grafiği. (*, P<0,05)

İnsülinin ekspresyon seviyesi ile ilişkili ifade profilleri incelendiğinde P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla insülin 1 ve insülin 2 ekspresyon seviyesinde sırasıyla 7-16,17 kat ileri derecede bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.25).

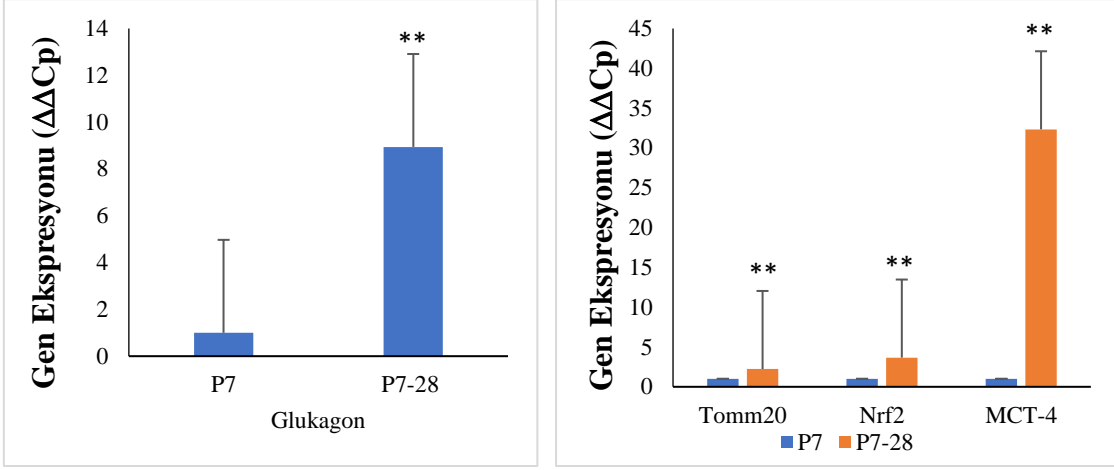
Pdx-1, Glut-2 ve Glukokinaz genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla Pdx-1 ekspresyon seviyesinde 4,60 kat azalma gözlemlenmiştir. Glut-2 ekspresyon seviyesinde 12 kat artış gözlemlenirken, Glukokinaz ekspresyon seviyesinde ise 6 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. İnsülin gen ekspresyon analizi- Pdx-1, Glut-2 ve Glukokinaz gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan tek hücre kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act-β kullanılmıştır. (*, P<0.05; **, P<0.01)

Pankreastaki α-hücrelerince üretilen ve insülin hormonu ile ters etkiye sahip olan glukagonun ekspresyon seviyesi ile ilişkili ifade profilleri incelendiğinde P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla glukagon ekspresyon seviyesinde 9 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.26).

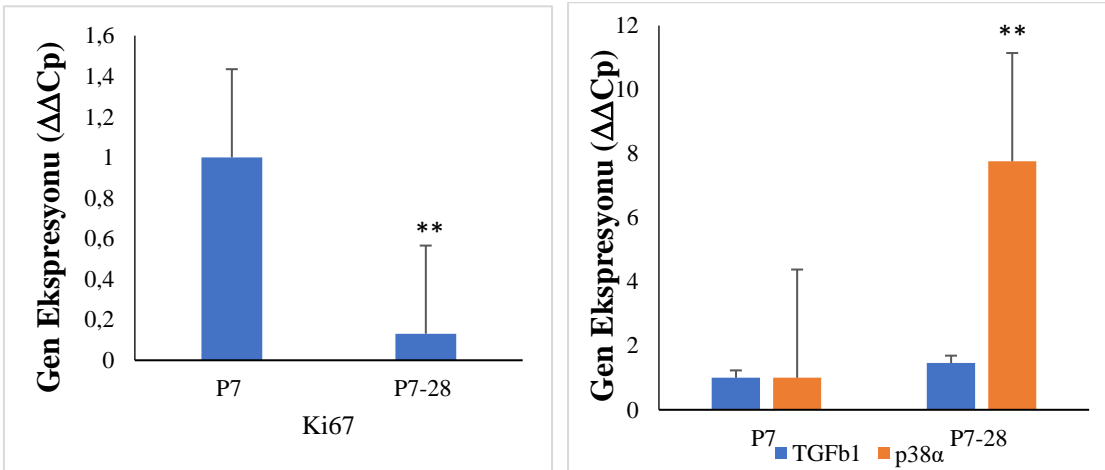
Gen ekspresyonu analizinde grupların mitokondri üzerindeki etkisini inceleyebilmek için TOMM20, Nrf2 ve MCT4 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla TOMM20 ekspresyon seviyesinde 2,25 kat artış, Nrf2 ekspresyon seviyesinde 3,70 kat artış ve MCT-4 ekspresyon seviyesinde ise 32,50 kat bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Glukagon gen ekspresyon analizi- Tomm20, Nrf2 ve MCT-4 gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan tek hücre kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Actβ kullanılmıştır. (**, P<0,01)

Hücre proliferasyonu ile ilişkili nükleer bir protein olan Ki67 ekspresyon seviyesine ait genlerin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla Ki67 ekspresyon seviyesinde 7,70 kat bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.27).

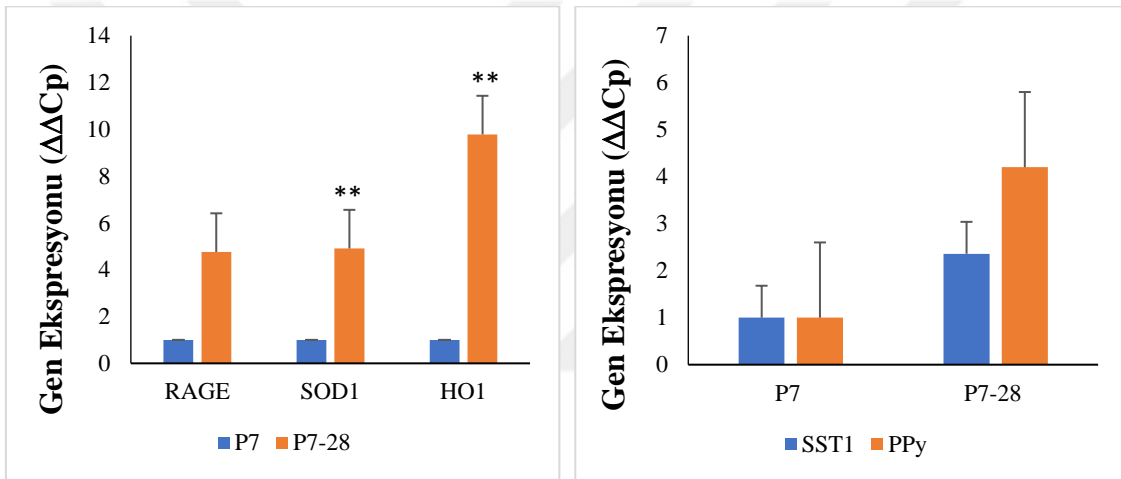
TGFβ1 ekspresyon seviyesinin p38α yolunu düzenleme görevine ilişkin yapılan ekspresyon analizinde bu genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla TGFβ1 ekspresyon seviyesinde 1,50 kat artış gözlemlenirken, p38α ekspresyon seviyesinde 7,80 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Ki67 gen ekspresyon analizi- TGFβ1 ve p38α gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan tek hücre koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act-β kullanılmıştır. (**, P<0,01)

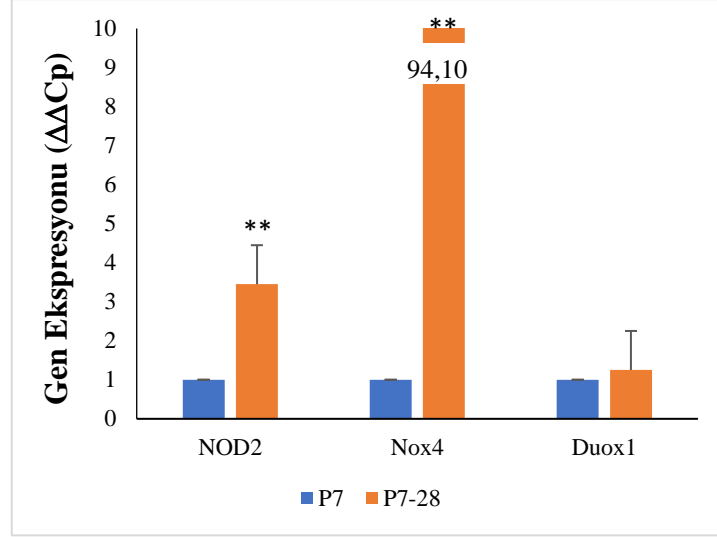
Gen ekspresyonu analizinde oksidatif stres ile ilişkili olarak RAGE, SOD1 ve HO1 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla RAGE ekspresyon seviyesinde 4,80 kat artış, HO1 ekspresyon seviyesinde 10 kat ileri derecede bir artış ve SOD1 ekspresyon seviyesinde ise 5 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.28).

δ -hücrelerince üretilen somatostatinin ve ağırlıklı olarak Langerhans adacıklarında ve asinar hücreler arasında bulunan pankreas polipeptid genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla Sst ekspresyon seviyesinde 2,40 kat artış gözlenirken, PPy ekspresyon seviyesinde 4,20 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. RAGE, SOD1 ve HO1 gen ekspresyon analizi- Sst1 ve PPy gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act β kullanılmıştır. (**, P<0,01)

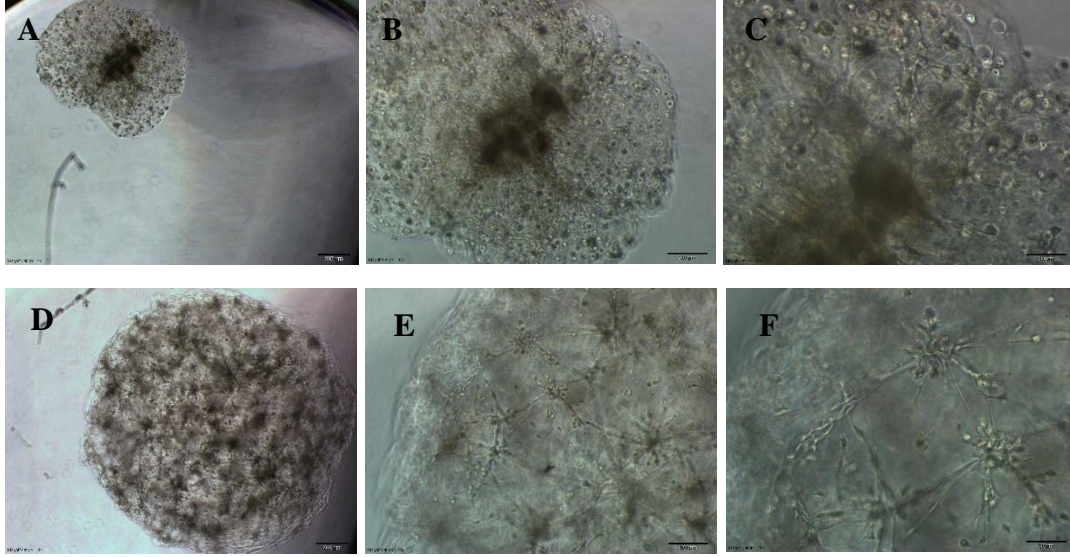
Protein kodlamasından sorumlu olan NOD2, reaktif oksijen türevlerinin üretiminden (ROS) sorumlu Nox4 ve ROS tarafından indüklenen Duox1 genlerinin ekspresyonu analizinde ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 hücre grubunda P7 hücre grubuna kıyasla NOD2 ekspresyon seviyesinde 3,50 kat artış, Nox4 ekspresyon seviyesinde 94 kat ileri derecede artış ve Duox1 ekspresyon seviyesinde ise 1,25 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. NOD2, Nox4 ve Duox1 gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan tek hücre koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act β kullanılmıştır. (** P<0,01)

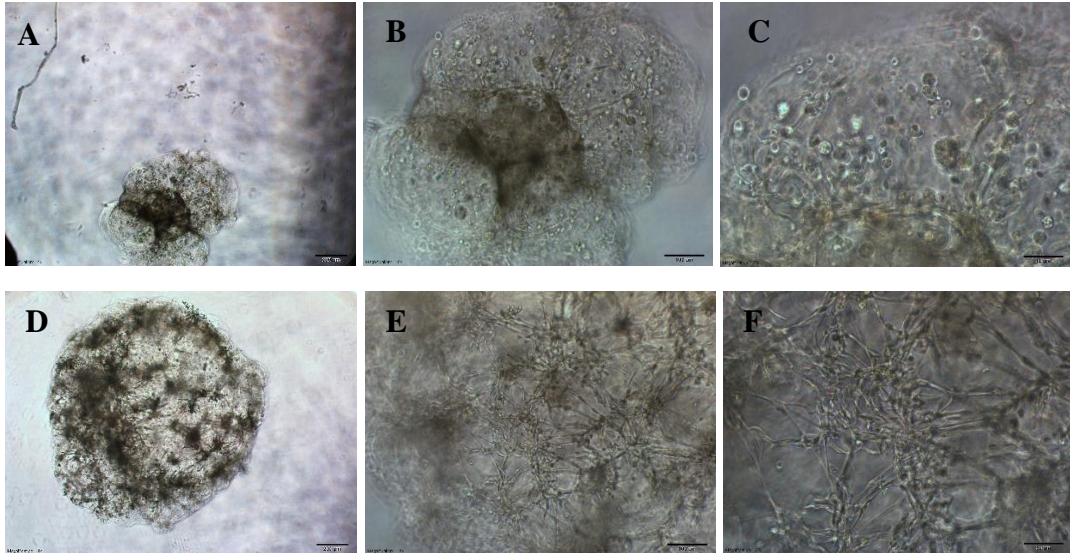
4.6. Organoid Kültürü ve Organoid Hücrelerinin Analizleri

İn-vitro ortamda kültüre edilen tek hücre süspansiyonu formundaki hücreler matrijel ile karıştırılarak 96 kuyucuklu hidrofobik yüzeye sahip hücre tutunmasına izin vermeyen kültür plakalarda, organoid farklılaştırma besiyeri eklenerek organoidlerin oluşumları faz-kontrast mikroskop altında gözlemlendi. 21 gün boyunca organoidler izlendi. 3. gün sonunda P7 ve P7-28 organoid modelinde hücre-hücre bağlantılarının saptanması ve organoid benzeri yapı oluşturarak küresel lümen yapısı şeklini aldıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.30).



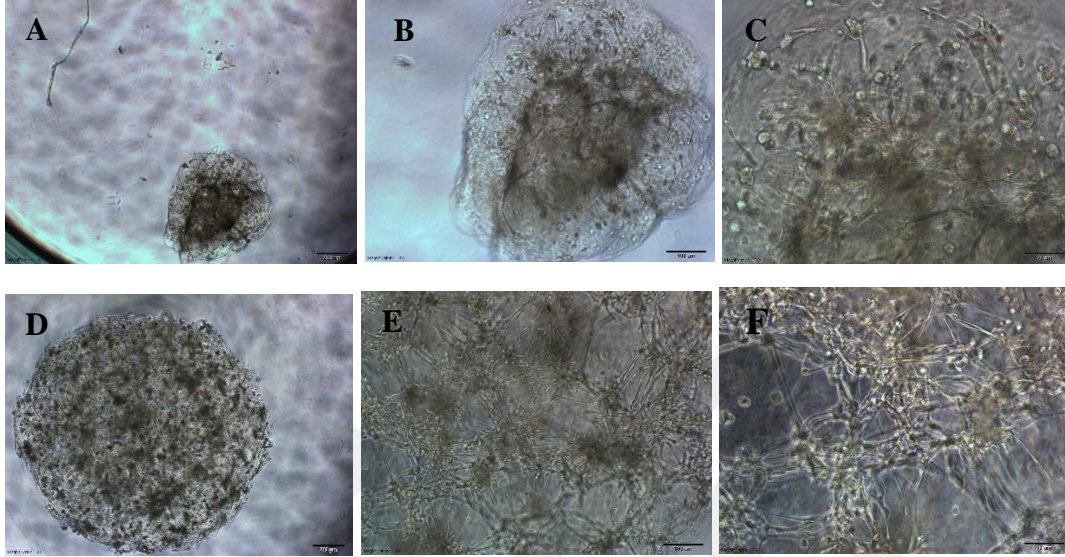
Şekil 4.30. Matrijel ile kaplama yapılan sPA-MKH Pax4⁺/MafA⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 3. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü. (a,b,c) P7 organoid modeli, (d,e,f) P7-28 organoid modeli. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (a-d), 100 µm (b-e), 50 µm (c-f)).

5. gün sonunda P7 ve P7-28 organoid modelinde kök hücrelerin yoğun faaliyetleri sonucu; P7 organoid modeline kıyasla, P7-28 organoid modelinin daha fazla hücre-hücre bağlantılarının sıkı bir biçimde kendi-kendine organize olmuş hücre yapılarının oluştuğu faz-kontrast mikroskop altında gözlemlendi (Şekil 4.31).



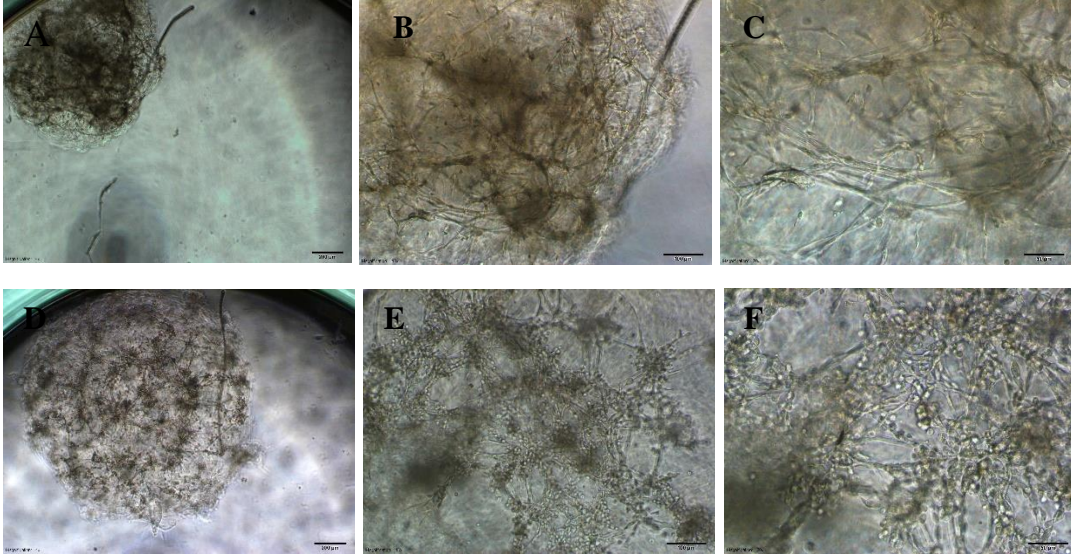
Şekil 4.31. Matrijel ile kaplama yapılan PA- MKH Pax4⁺/MafA⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 5. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü. (a,b,c) P7 organoid modeli, (d,e,f) P7-28 organoid modeli. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (a-d), 100 µm (b-e), 50 µm (c-f)).

7. gün sonunda P7 ve P7-28 organoid modelinde; farklılaşma sürecindeki organoid modellerinin morfolojik değişimlerinin P7 organoid modeline kıyasla, P7-28 organoid modelinde daha belirgin olduğu ve daha fazla hücre-hücre bağlantılarının sıkı bir biçimde kendi-kendine organize olmuş hücre yapılarının olduğu faz-kontrast mikroskop altında gözlemlendi (Şekil 4.32).

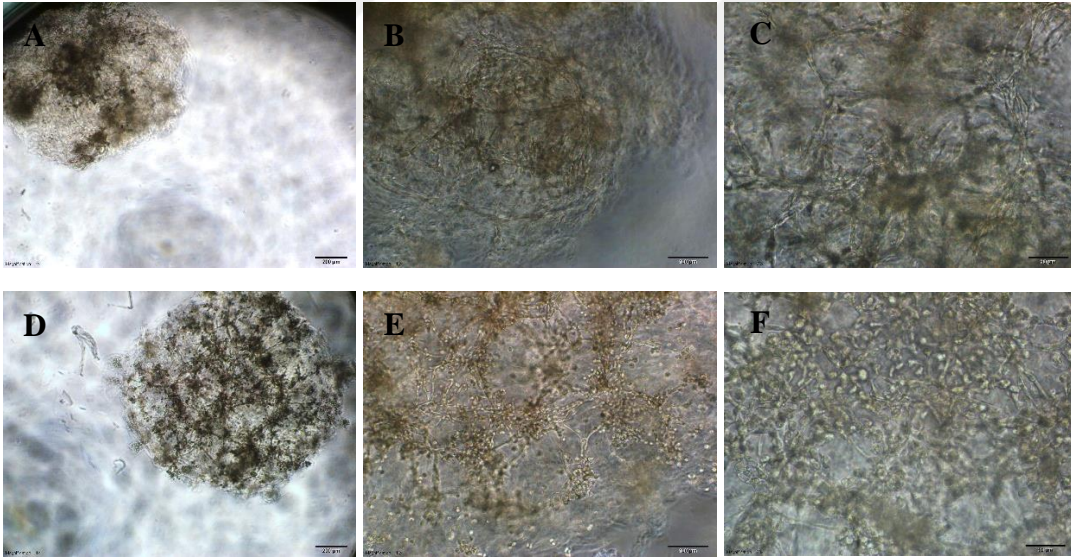


Şekil 4.32. Matrijel ile kaplama yapılan sPA-MKH Pax4⁺/MafA⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 7. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü. (a,b,c) P7 organoid modeli, (d,e,f) P7-28 organoid modeli. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (a-d), 100 µm (b-e), 50 µm (c-f)).

14-21. gün sonunda P7 ve P7-28 organoid modelinde ise; P7 organoid modelinde hücre-hücre arası bağlantıların daha net görüldüğü gözlemlenmiştir. P7-28 Organoid modelinde hücre-hücre arası bağlantıların daha sıkı olduğu gözlemlenmiştir. P7 ve P7-28 organoid modelinde hücrelerin düzenli bir şekilde bir araya geldikleri ve hücre proliferasyonunda bir artış olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.33., Şekil 4.34).



Şekil 4.33. Matrijel ile kaplama yapılan sPA-MKH Pax4⁺/MafA⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 14. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü. (a,b,c) P7 organoid modeli, (d,e,f) P7-28 organoid modeli. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (a-d), 100 µm (b-e), 50 µm (c-f)).

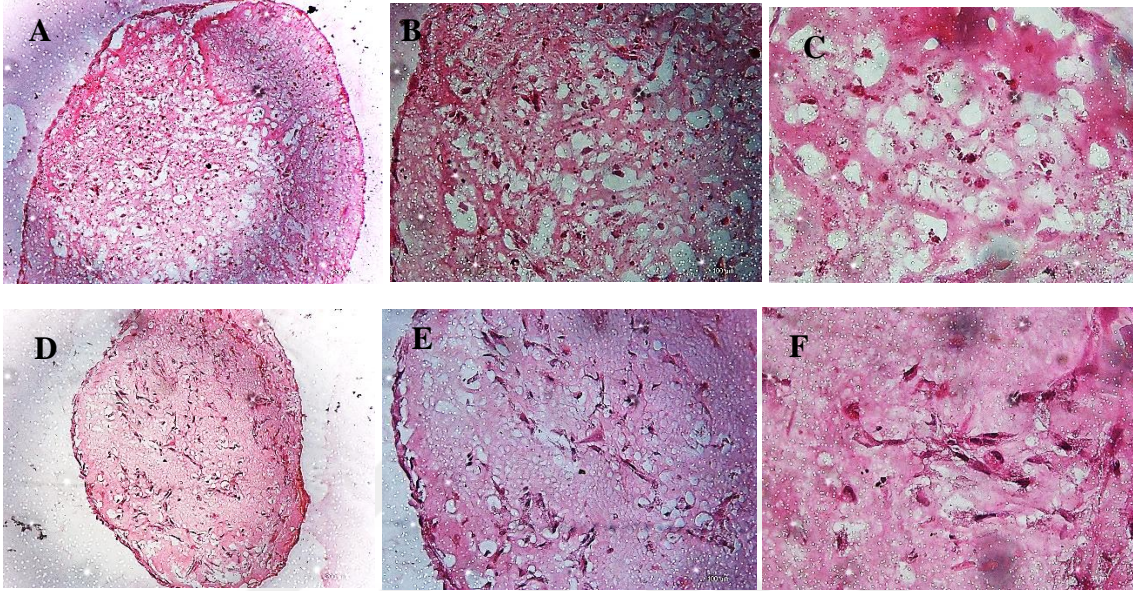


Şekil 4.34. Matrijel ile kaplama yapılan sPA-MKH Pax4⁺/MafA⁺ P7 ve P7-28 oluşan Organoid benzeri yapıların 21. gün faz-kontrast mikroskop görüntüsü. (a,b,c) P7 organoid modeli, (d,e,f) P7-28 organoid modeli. (Ölçüm çubuğu: 200 µm (a-d), 100 µm (b-e), 50 µm (c-f)).

4.7. Kriyo Kesit Alınan Organoidlere Histokimyasal Boyama Analizi

P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modeli hem hematoksilin-eozin (HE) ile histokimyasal yöntemlerle boyanarak incelendi.

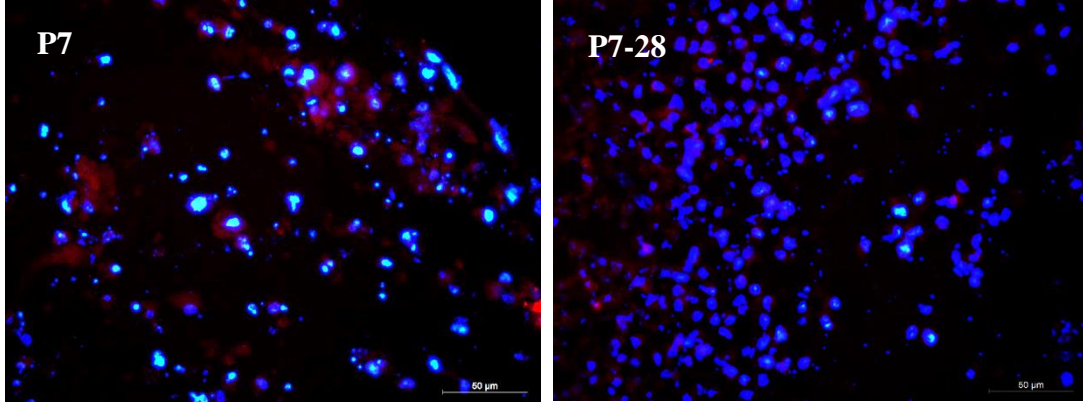
Histolojik değerlendirmelerde HE ile boyanan P7 organoid modeli ile P7-28 organoid modeli karşılaştırıldığında P7-28 organoid modelinin hücre sayısının oldukça fazla olduğu ve hücre çeperi ve merkezde yoğun hücre olduğu görülmektedir (şekil 4.35).



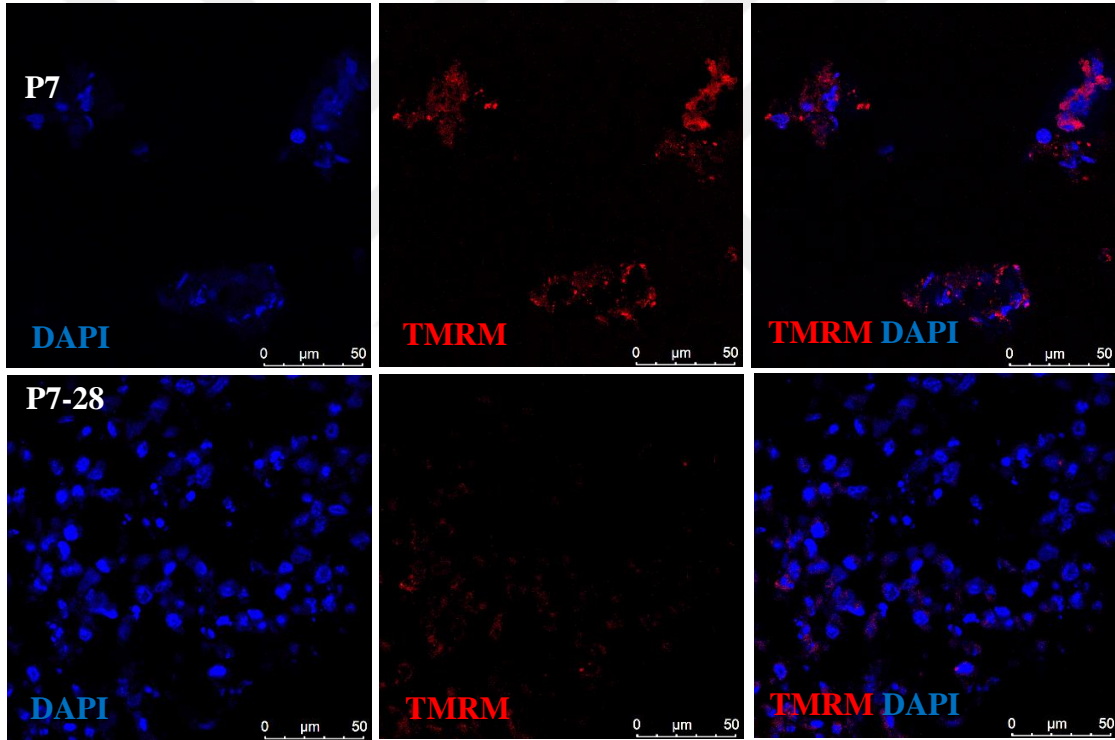
şekil 4.35. P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinden 21. günün sonunda alınan kriyo kesitlerde HE boyaması. (a,b,c) P7 organoid modeli kriyo kesit HE boyaması, (d,e,f) P7-28 organoid modeli HE boyaması ile karşılaştırıldığında P7-28 hücre sayısının oldukça fazla olduğu ve hücre çeperi ve merkezde yoğun hücre olduğu görülmektedir. (lm çubuğu: 200 μm (a-d), 100 μm (b-e), 50 μm (c-f)).

4.8. Organoid TMRM ve Mitotracker Boyama Analizi

Kriyo kesit sonrası P7 ve P7-28 gen aktarılmış pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri ölçmek için yapılan TMRM boyama analizi sonucunda P7 kontrol grubunda mitokondri membran potansiyel seviyesinde merkez ve hücrenin dış kısmında ileri derecede boyanma gözlemlenmiştir. P7 kontrol grubunda çekirdek morfolojileri iyi durumda olup eşit miktarda dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. P7-28 grupta mitokondri membran potansiyel seviyesinde korteks kısmında artış gösterirken, merkez çevresinde az bir boyanma gözlemlenmiştir. P7-28 grupta çekirdek morfolojinin yapısının bozulduğu ve hücrenin dış kısmında yoğun dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle P7 kontrol grubunda P7-28 gruba kıyasla daha fazla mitokondri artışı gözlemlenirken bu durum mitotracker boyaması ile desteklenmiştir (şekil 4.36., şekil 4.37).



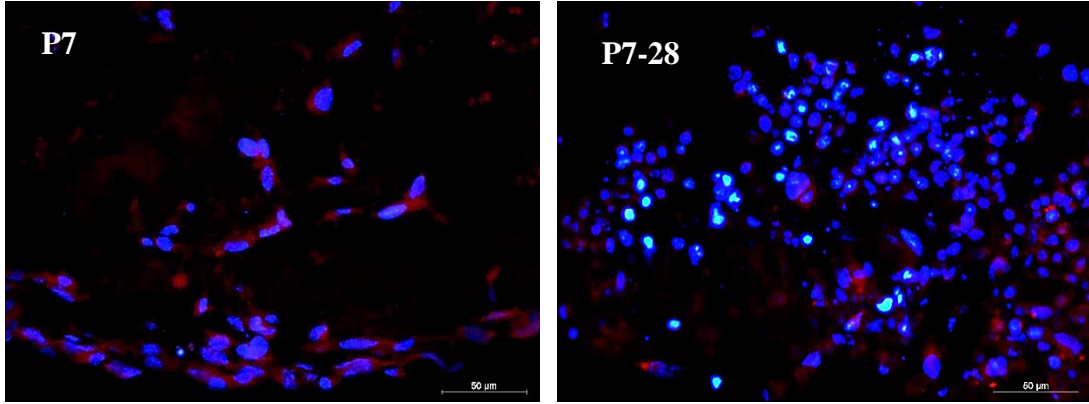
Şekil 4.36. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 ve P7-28 örneklerinin TMRM ile boyanma sonuçları. Hücre çekirdeklerini boyamak için DAPI (mavi) kullanılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm)



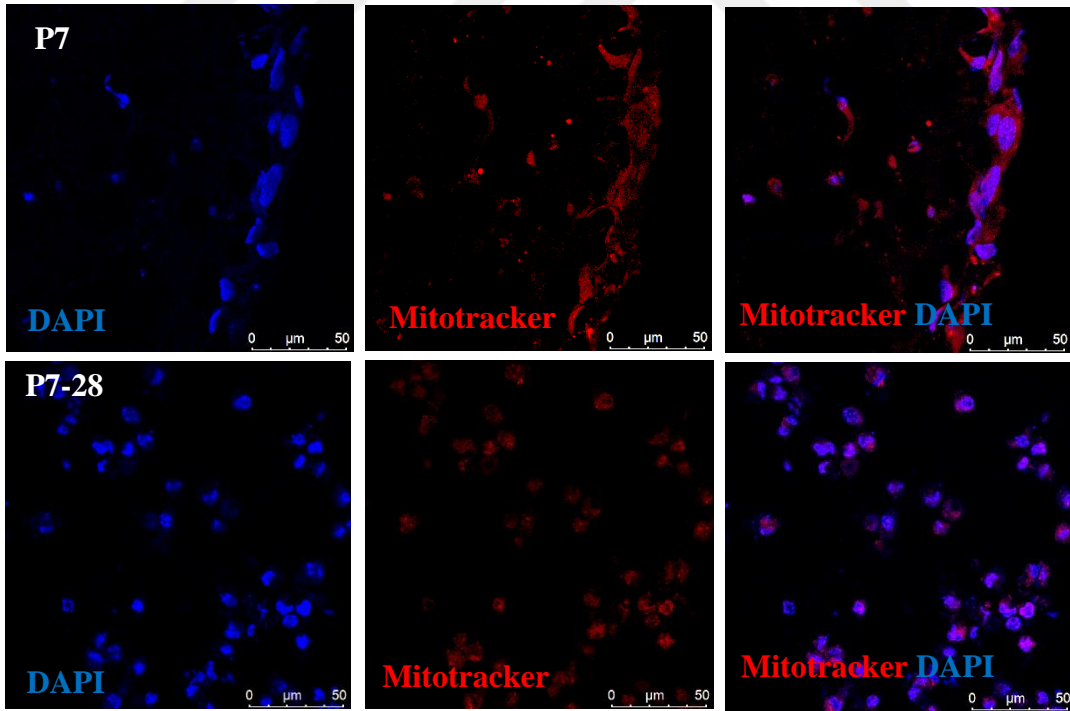
Şekil 4.37. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 (A) ve P7-28 (B) örneklerinin TMRM boyaması ile konfokal mikroskopta gösterilmesi. Hücre çekirdeklerini boyamak için DAPI (mavi) kullanılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm)

Yapılan Mitotracker boyama analizi sonucunda P7 kontrol grubunda mitokondriyal aktivitenin daha yüksek olduğu ve boyamanın merkez ve plazma membranını kısmında eşit bir şekilde dağıldığı gözlemlenmiştir. P7 kontrol grubunda çekirdeklerin plazma membranı kısmında yoğun olarak sıralandığı görülmüştür. P7-28 grubunda mitokondriyal aktivite seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir. Merkez etrafında boyanma olmadığı gözlemlenirken,

boyanmanın hücrenin plazma membranında yoğun olduğu ve çekirdeklerin hücrenin merkezi etrafında yoğunlaştığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.38, Şekil 4.39).



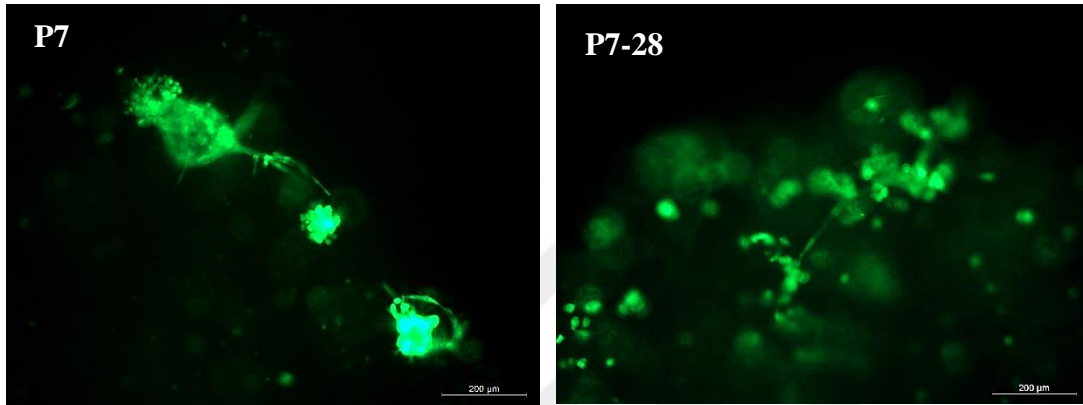
Şekil 4.38. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 ve P7-28 örneklerinin mitotracker boyası ile boyanması. Hücrelerdeki mitokondriyi işaretleyerek, plazma membranında pasif olarak yayılan ve aktif mitokondride biriken Mitotracker problemlarının kırmızı floresan işaretleyici ile gösterilmesi. Hücre çekirdeklerini boyamak için DAPI (mavi) kullanılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm)



Şekil 4.39. 21. günün sonunda alınan kriyo kesit sonrası P7 ve P7-28 örneklerinin mitotracker boyası ile boyanması. Hücrelerdeki mitokondriyi işaretleyerek, plazma membranında pasif olarak yayılan ve aktif mitokondride biriken Mitotracker problemlarının kırmızı floresan işaretleyici ile lazer taramalı konfokal mikroskopta (Leica TCS SP8) gösterilmesi. Hücre çekirdeklerini boyamak için DAPI (mavi) kullanılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm)

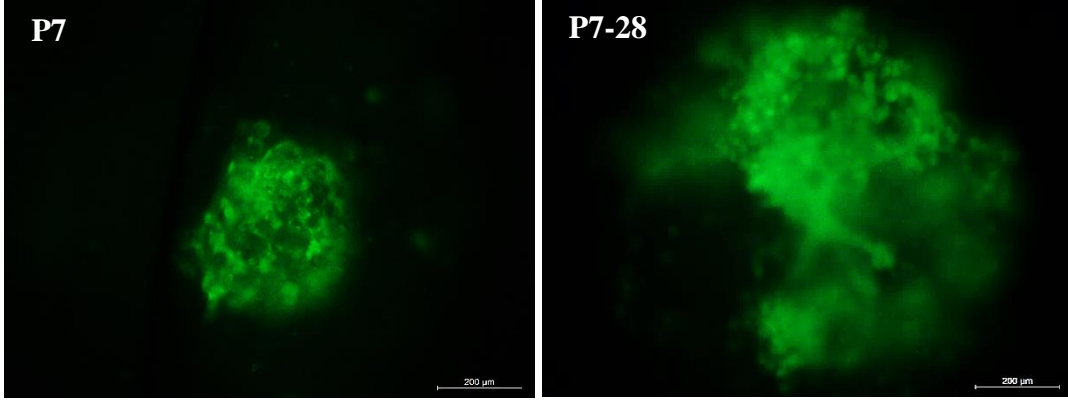
4.9. Live-Dead ve PKH26 Boyama Analizi

Yapılan Live-dead boyaması 21. günün sonunda kültürü sonlanmış olan organoidlerin canlı-ölü hücre tayinini belirlemek için calcein AM ile canlı hücreler yeşil renge boyanırken, ethidium homodimer-1 ile ölü hücreler kırmızı renge boyanmaktadır. P7 ve P7-28 olan organoid modellerinde yapılan boyama analizi sonucunda hücrelerin calcein AM ile yeşil renk ile boyandığı ve hücrelerin canlı olduğu gözlemlenmiştir. Organoid modellerinin her iki grubu için ethidium homodimer-1 ile kırmızı ölü hücreye rastlanmamıştır (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. 21. günün sonunda kültürü sonlanan P7 ve P7-28 gruplarının Live-Dead boyama görüntüleri. (Ölçüm çubuğu: 200 µm)

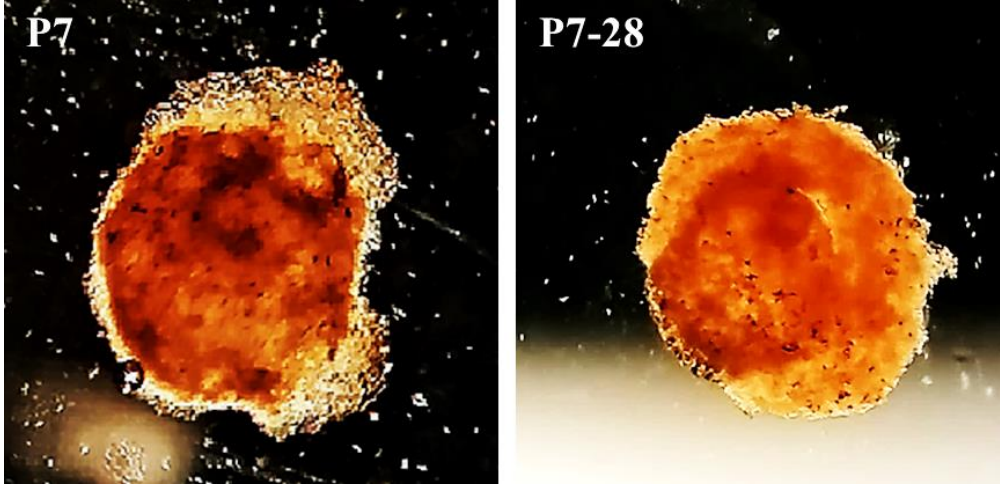
21. günün sonunda kültürü sonlanmış olan organoidleri lipofilik membran boyası olan PKH26 ile yapılan boyama sonrasında, live-dead boyamasını desteklemesi açısından PKH26 boyaması P7 ve P7-28 olan organoid modellerinde yapılan boyama analizi sonucunda organoid modelindeki hücre membranını floresan olarak işaretleyerek yeşil renk ile boyandığı ve organoidlerin canlı olduğu gözlemlenmiştir. Organoid modellerinin her iki grubu için kırmızı renk ile boyanan ölü hücrelere rastlanmamıştır (Şekil 4.41).



Şekil 4.41. 21. günün sonunda kültürü sonlanan P7 ve P7-28 gruplarının PKH26 boyama görüntüleri. (Ölçüm çubuğu: 200µm)

4.10. Dithizone (DTZ) Boyama Analizi

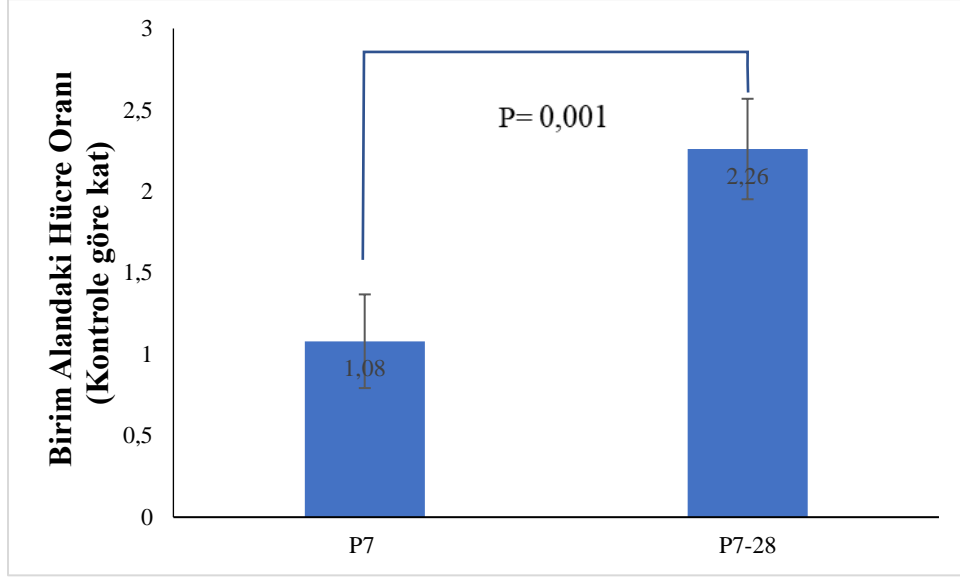
Yapılan dithizone boyama sonrası P7-28 organoid modelindeki adacık hücrelerindeki saflığı değerlendirmek için endokrin farklılaşma sonrası insülin granüllerinin içerisindeki çinko elementi ile oluşan bağ sonucunda kahverengi-kırmızı renk oluşumu gözlemlenmektedir. P7 organoid modelinde ise adacık hücrelerindeki saflık endokrin farklılaşma sonrası insülin granüllerinin içerisindeki çinko elementi ile oluşan bağ sonucunda organoidin merkezi etrafında daha çok kahverengi-kırmızı renk oluşumu gözlemlenirken, hücre çeper kısmında pankreas adacık hücresi bulunmadığı için sarı renk oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4.42).



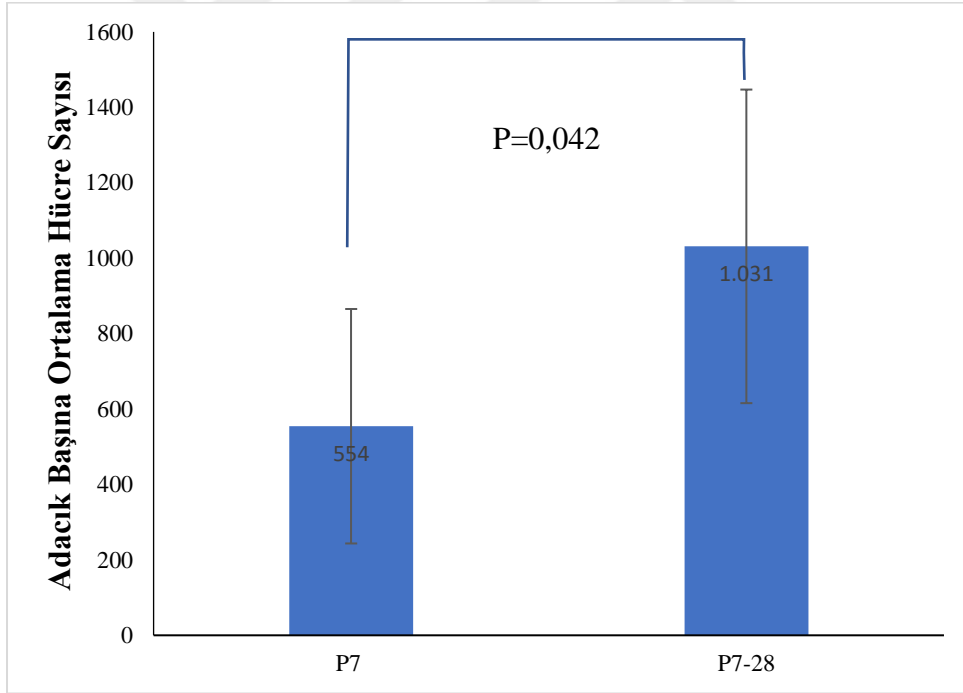
Şekil 4.42. P7 ve P7-28 organoidlerinin Dithizone boyama stereo mikroskop görüntüleri. 21. günün sonunda organoidler boyanmıştır. Pankreas adacıklarının Dithizone boyanmasına benzer olarak organoidlerdeki magnezyum iyonu ile Dithizone boyası etkileşime geçerek organoidler kiremit kırmızısı görünümünü almışlardır. (Büyütme oranı: $\times 12,5$)

4.11. Organoidlerin Birim Alana ve Adacık Başına Düşen Ortalama Hücre Sayısı

Kriyo kesit sonrası DAPI boyaması yapılan organoid model grupları için birim alana düşen hücre sayısı ve adacık başına düşen ortalama hücre sayıları hesaplanmıştır. Yapılan hesaplama sonucuna göre P7-28 Organoid modelinin P7 kontrol grubu organoid modeline kıyasla birim alana düşen hücre sayısında 2 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.43). Adacık başına düşen ortalama hücre sayısına ise P7-28 organoid modelinin P7 kontrol grubu organoid modeline kıyasla adacık sayısında anlamlı seviyede bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.44).



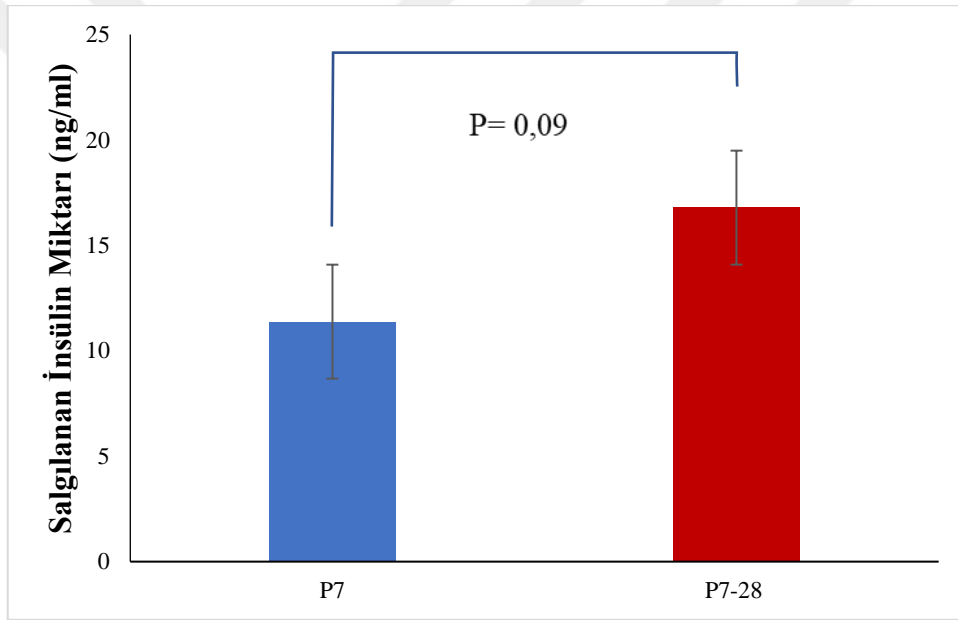
Şekil 4.43. 21. günün sonunda kültürü sonlanan kriyo kesit sonrası DAPI boyaması yapılan organoid model grupları için manuel olarak hücre sayısı belirlenerek birim alana düşen hücre oranı grafiği.



Şekil 4.44. 21. günün sonunda kültürü sonlanan kriyo kesit sonrası DAPI boyaması yapılan organoid model grupları için manuel olarak hücre sayısı belirlenerek adacık başına düşen ortalama hücre sayısı.

4.12. ELISA Analizi

Pax4+/ MafA+-sPA-MKH matrijel ile kültür ortamında 3B organoid modeli oluşturulan deney gruplarından organoid farklılaştırma besi yeri (DMEM-F12+FBS+Pen/Strep+B27+EGF+ITS+Heparin+FGF+VEGF α) içerisinde 28 gün boyunca kültüre edilmiştir. Her 3 günde bir taze besiyeri eklenerek deney gruplarının kültür ortamından alınan örnekler Rat İnsülin ELISA ticari kit (Elabscience) ile insülin salgılama seviyesi ölçüldü. İnsülin ELISA analizinde P7 grubuna kıyasla P7-28 grubunda 1,5 kat seviyesinde anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 4.45). Ancak burada ölçülen insülin miktarı hücre sayısına göre normalize edilmemiş değerlerdir.

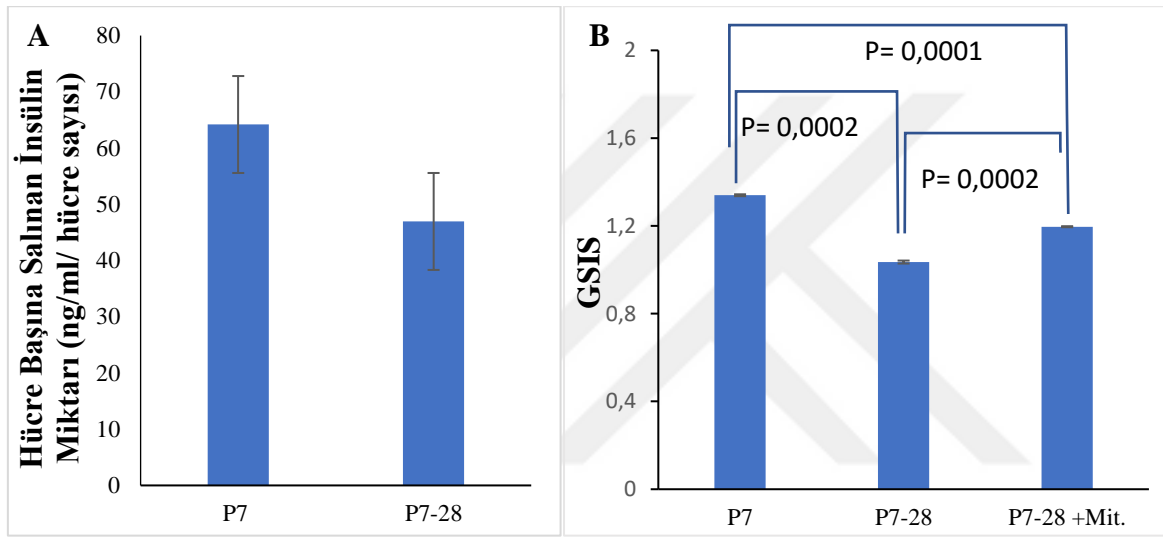


Şekil 4.45. P7 ve P7-28 deney gruplarının İnsülin ELISA analizi. (P7 ve P7-28 arasındaki fark $p < 0,05$ 'ten yüksektir.)

P7 ve P7-28 deney gruplarında adacıklarda toplam hücre sayısı belirlendikten sonra ELISA ile ölçülen ve adacıklardan salınan insülin miktarı adacıklarda bulunan hücre sayısına bölünerek ortama salgılanan insülin miktarı normalize edilmiştir. P7 deney grubundaki birim hücre başına salgılanan insülin miktarına kıyasla P7-28 deney grubundaki birim hücre başına salgılanan insülin miktarında ise 1,36 kat azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.46-A).

Yükselen glukoz miktarına karşı salgılanan insülin miktarının düşük glukoz içeren ortamda salgılanan insüline oranını gösteren GSIS deneyinde P7 organoid hücrelerinin GSIS

cevabı $1,340 \pm 0,004$ iken P7-28 organoid hücrelerinin cevabı $1,035 \pm 0,007$ olmuştur (Şekil 4.46-B). Yaşlılık organoid modelinde daha az insülin salınımı gerçekleşirken genç hücrelerde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu düşüşün yaşlılıktan dolayı hasarlanan mitokondrilerden kaynaklandığını göstermek için P7 hücrelerinden sağlıklı mitokondriler izole edilerek P7-28 organoid modeli hücrelerine aktarılmıştır. GSIS değeri hesaplandığında değer $1,196 \pm 0,002$ değerine çıktığı gözlemlenmiştir. Bu durum P7-28 modeli oluşturulurken uyarılmış olan yaşlılık fenotipini geriye döndüğü, P7 organoid hücrelerine yakın GSIS değerine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.46-B).



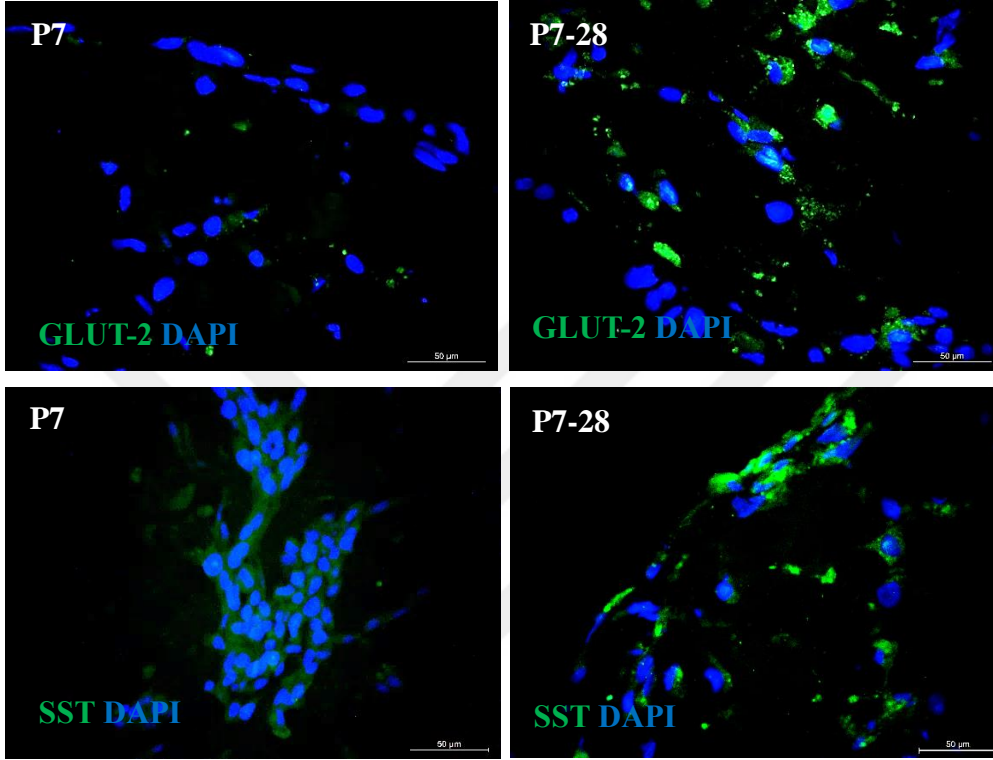
Şekil 4.46. P7 ve P7-28 deney gruplarında birim hücre başına salgılanan insülin miktarı (A)yükselen glukoz miktarına karşı salgılanan insülin miktarının düşük glukoz içeren ortamda salgılanan insüline oranını gösteren GSIS analizi (B).

4.13. İmmüno Floresan Boyama

ELISA ile elde edilen bulguları doğrulamak amacıyla kültür sonunda paraformaldehit ile fiksasyonu yapılan P7 ve P7-28 organoid modellerinden alınan kriyo kesitlerde İnsülin, Pdx-1, Glukagon, Glukokinaz (Gck), Somatostatin, Glut-2 boyamaları immün floresan olarak yapılmıştır.

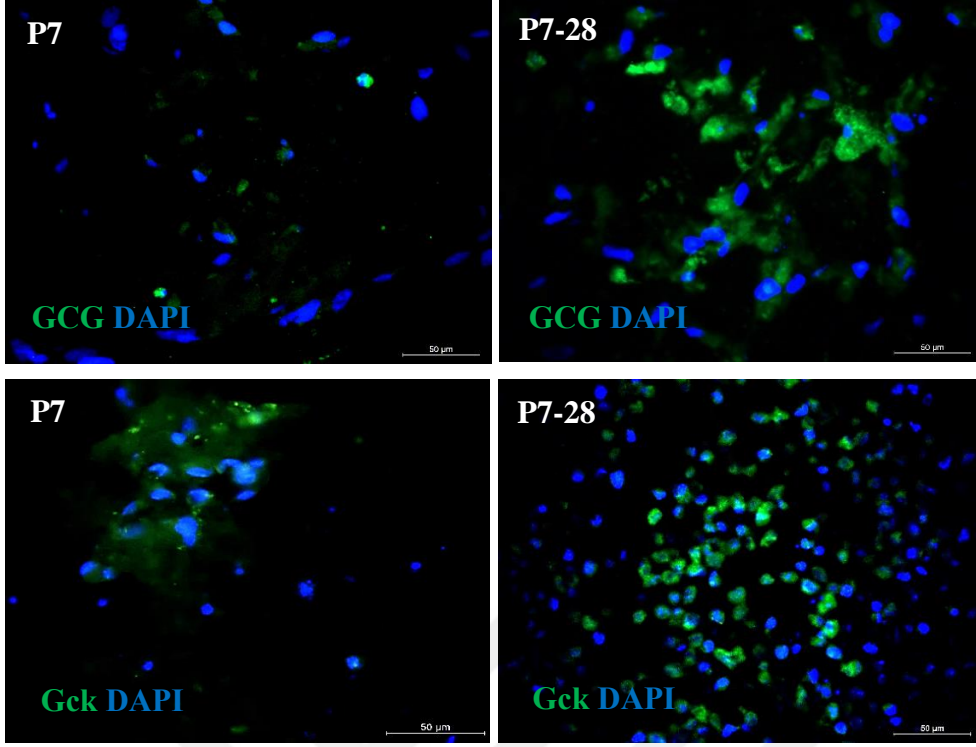
P7 ve P7-28 organoid modellerinden alınan kriyo kesitlerde; β -hücrelerindeki glikoz sensörünün bir parçası olarak işlev gören Glut-2 ve δ -hücre farklılaşmasını değerlendirmek için yapılan immün floresan boyamada; P7 organoid modelinin Glut-2 antikor boyamasında plazma membranında pozitifliğe çok az rastlanılmış olmasına rağmen, P7-28 organoid modelinde ise plazma membranında daha yoğun pozitif boyanma gözlemlenmektedir (Şekil

4.47). P7 organoid modelinin somatostatin boyamalarında hücre çeperinde pozitifliğe çok az rastlanılmış olmasına rağmen, P7-28 organoid modellerinden ise somatostatin ile pozitif boyanan hücre çeperi etrafında lokalize olmuş daha yoğun pozitif boyanma gözlemlenmektedir (Şekil 4.47).



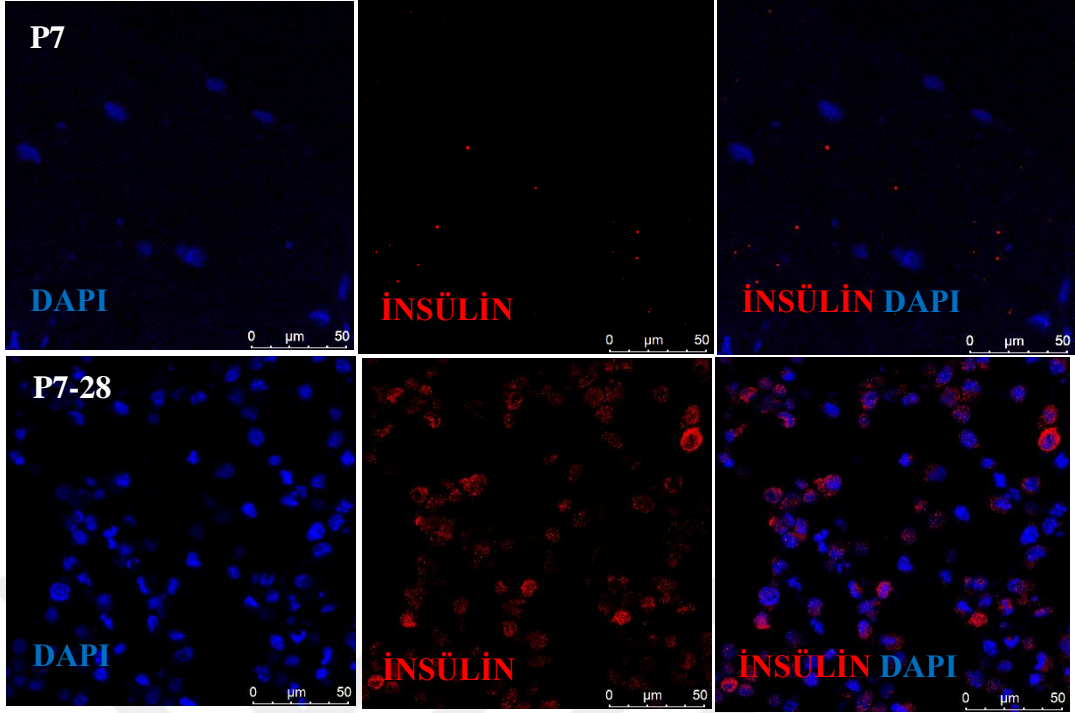
Şekil 4.47. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde Glut-2 ve somatostatin boyaması. Glut-2 (yeşil), somatostatin (yeşil) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm).

P7 ve P7-28 organoid modellerinden alınan kriyo kesitlerde; α -hücre ve glukokinaz reseptörü farklılaşmasını değerlendirmek için Glukagon (GCG) ve Glukokinaz (Gck) boyaması immün floresan olarak yapılmıştır. P7 organoid modelinde anti-glukagon pozitif hücre sayısında çok nadir pozitiflikler göze çarparken, P7-28 organoid modelinde anti-glukagon boyaması sonucunda hücre çeperi etrafında gözle görülür pozitif hücre sayısında bir artış gözlenmektedir. (Şekil 4.48). Gck antikoruyla boyamalarda ise P7 organoid modelinde çok nadir pozitiflikler gözlemlenirken, P7-28 organoid modelinde Gck boyaması sonucu hücre çeperinde gözle görülür pozitif boyanma gözlemlenmektedir (Şekil 4.48). Bu sonuçlar P7-28 organoid model içindeki hücrelerin çok sayıda α -hücrelerine farklılaşmış olabileceğine işaret etmektedir.

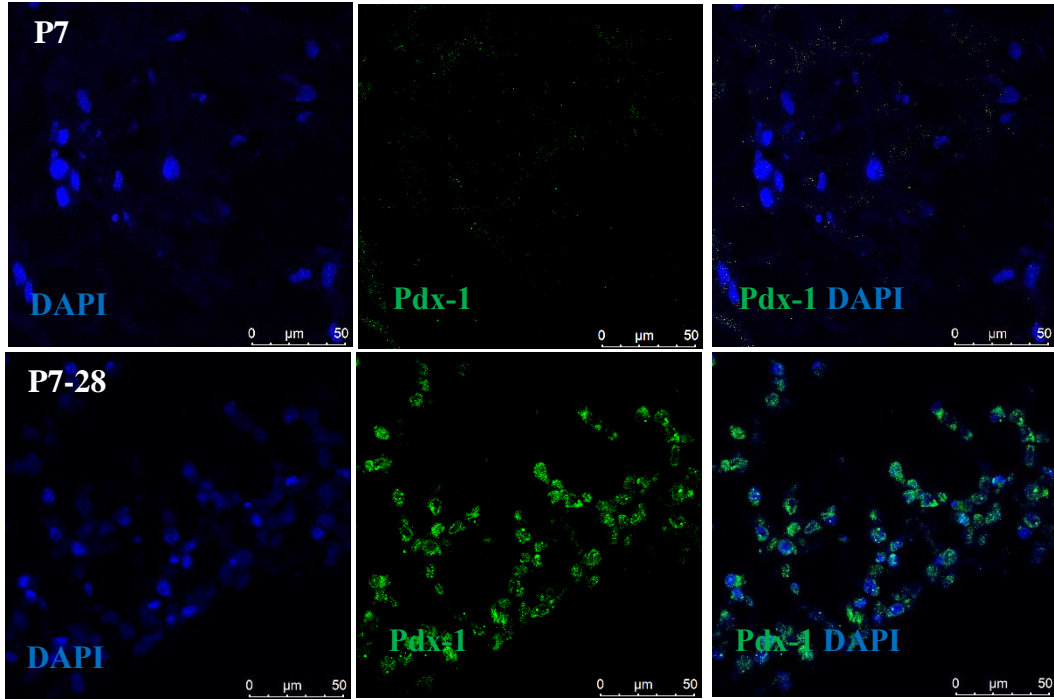


Şekil 4.48. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde Glukagon (GCG) ve Glukokinaz (Gck) boyaması. GCG (yeşil), Gck (yeşil) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm).

P7 ve P7-28 organoid modellerinden alınan kriyo kesitlerde; β -hücre ve transkripsiyon faktörü olan Pdx-1'in farklılaşmasını değerlendirmek için yapılan immün floresan olarak; P7 organoid modelinin insüline karşı antikor boyamasında pozitifliğe çok rastlanılmamış olmasına rağmen, P7-28 organoid modellerinden ise hücre merkezinde daha yoğun pozitif boyanma gözlemlenmektedir (Şekil 4.49). Bir transkripsiyon faktörü olan Pdx-1'in ise çekirdekte lokalize olması beklenmektedir. P7 organoid modelinin Pdx-1 boyamalarında pozitifliğe çok rastlanılmamış olmasına rağmen, P7-28 organoid modellerinden ise Pdx-1 ile pozitif boyanan hücre çeperi etrafında lokalize olmuş hücre kümelerine rastlanmaktadır (Şekil 4.50).



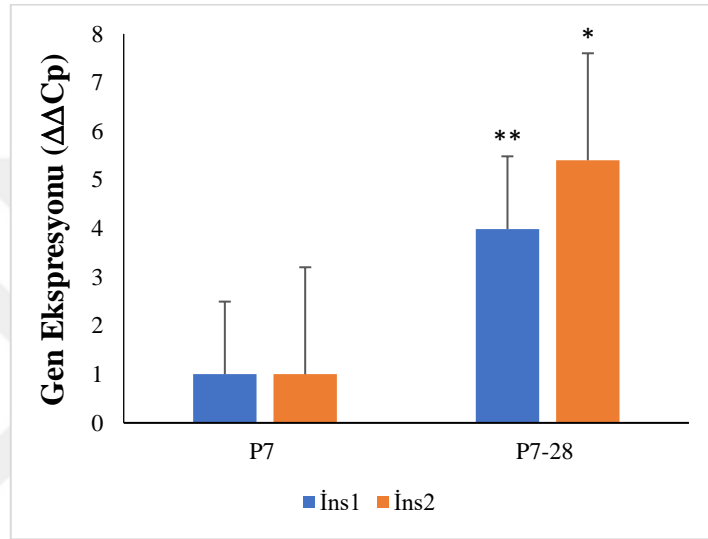
Şekil 4.49. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde insülin boyaması. İnsülin (kırmızı) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm)



Şekil 4.50. 21. gün sonunda P7 organoid modeli ve P7-28 organoid modelinde insülin boyaması. Pdx-1 (yeşil) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları DAPI (mavi) ile yapılmıştır. (Ölçüm çubuğu: 50 µm).

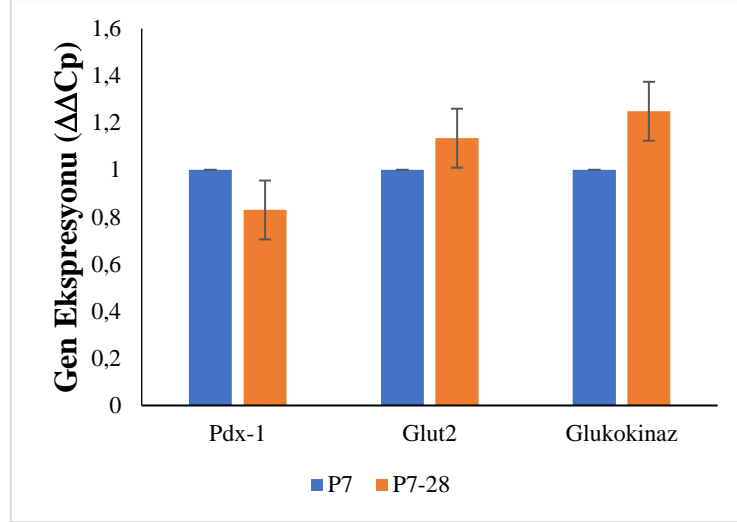
4.14. 3-Boyutlu Organoid Deney Gruplarının Gen Ekspresyon Analizi

Gen ekspresyon seviyesi analizinde ifade edilen İnsülin, pankreas adacıklarının beta hücreleri tarafından üretilen bir peptid hormondur. İnsülinin ekspresyon seviyesi ile ilişkili ifade profilleri incelendiğinde P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla İnsülin 1 ve İnsülin 2 ekspresyon seviyesinde sırasıyla 4,0 ve 5,4 kat bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.51).



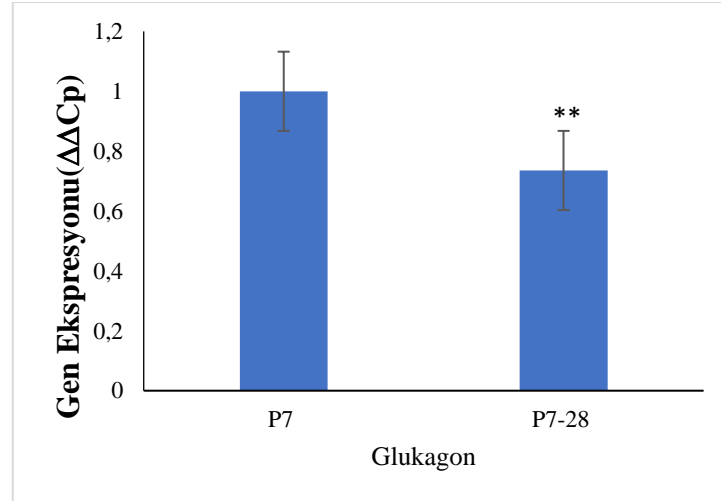
Şekil 4.51. Organoidlerde insülin gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Actβ kullanılmıştır. (*, P<0,05; **, P<0,01)

Yükselen ve azalan glukoz oranına göre, hücre metabolizmasını düzenlemesi sebebiyle karbonhidrat metabolizmasında önemli bir yer tutan glukokinaz ve kemirgenlerin pankreas β hücrelerinde glukoz sensörünün bir parçası olarak işlev gören Glut-2 ekspresyon seviyesi Pdx-1 ekspresyonu ile birlikte değerlendirilmiştir. Pdx-1, insülin ile birlikte ortak eksprese olan, β-hücre olgunlaşması, pankreasın gelişimi ve farklılaşması için gerekli erken belirteç transkripsiyon faktörüdür. Pdx-1, Glut-2 ve Glukokinaz genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla Pdx-1 ekspresyon seviyesinde 1,21 kat azalma gözlemlenmiştir. Glut2 ekspresyon seviyesinde 1,15 kat artış gözlemlenirken, Glukokinaz ekspresyon seviyesinde ise 1,25 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.52).



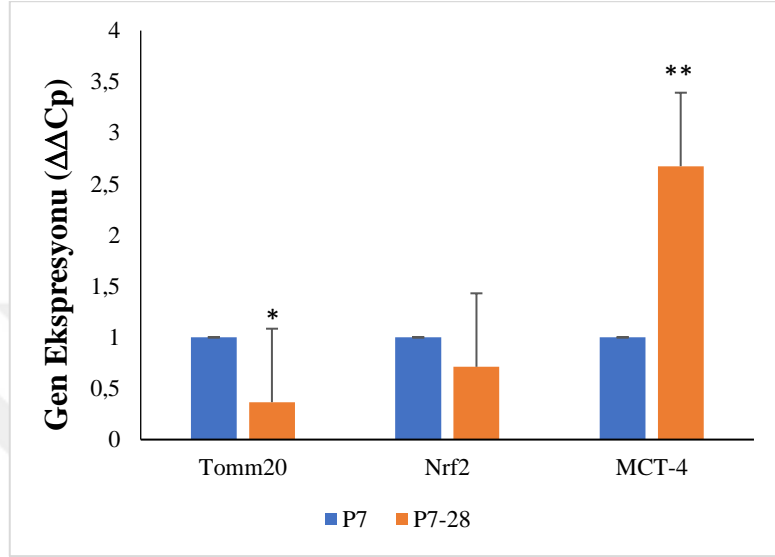
Şekil 4.52. Organoidlerde Pdx-1, Glut-2 ve Glukokinaz gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act β kullanılmıştır.

Pankreastaki α -hücrelerince üretilen ve insülin hormonu ile ters etkiye sahip olan glukagonun ekspresyon seviyesi ile ilişkili ifade profilleri incelendiğinde P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla glukagon ekspresyon seviyesinde 1,40 kat azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.53).



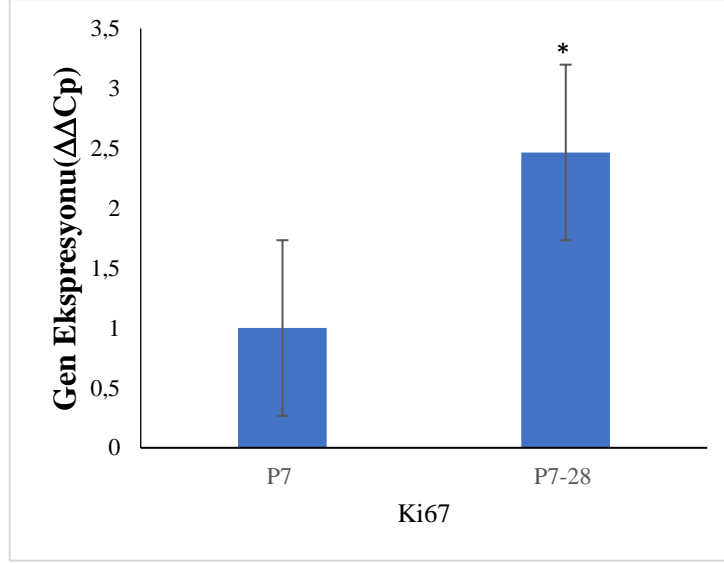
Şekil 4.53. Organoidlerde Glukagon gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act β kullanılmıştır. (**, P<0,01)

Gen ekspresyonu analizinde grupların mitokondri üzerindeki etkisini inceleyebilmek için TOMM20, Nrf2 ve MCT-4 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla TOMM20 ekspresyon seviyesinde 2,80 kat azalma gözlemlenirken, Nrf2 ekspresyon seviyesinde 1,40 kat azalma gözlemlenmiştir. MCT-4 ekspresyon seviyesinde ise 2,70 kat bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.54).



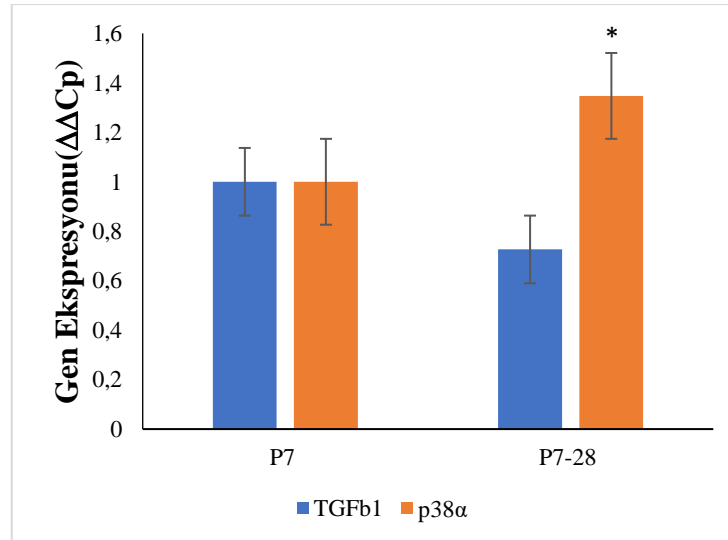
Şekil 4.54. Organoidlerde TOMM20, Nrf2 ve MCT4 gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act β kullanılmıştır. (*, P<0,05; **, P<0,01)

Hücrel proliferasyonla ilişkili nükleer bir protein olan Ki67 ekspresyon seviyesine ait genlerin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla Ki67 ekspresyon seviyesinde 2,50 kat bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.55).



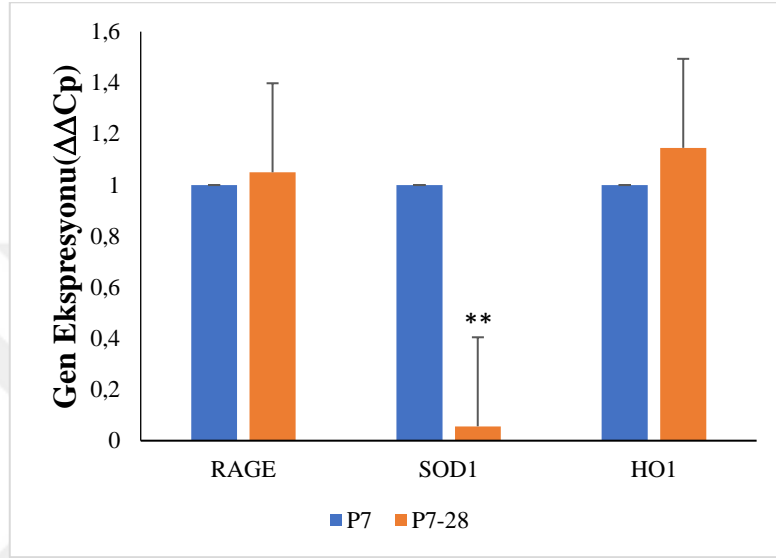
Şekil 4.55. Organoidlerde Ki67 gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act-β kullanılmıştır. (*, P<0,05)

TGFβ1 ekspresyon seviyesinin p38α yolunu düzenleme görevine ilişkin yapılan ekspresyon analizinde bu genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla TGFβ1 ekspresyon seviyesinde 1,40 kat azalma gözlemlenirken, p38α ekspresyon seviyesinde 1,40 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.56).



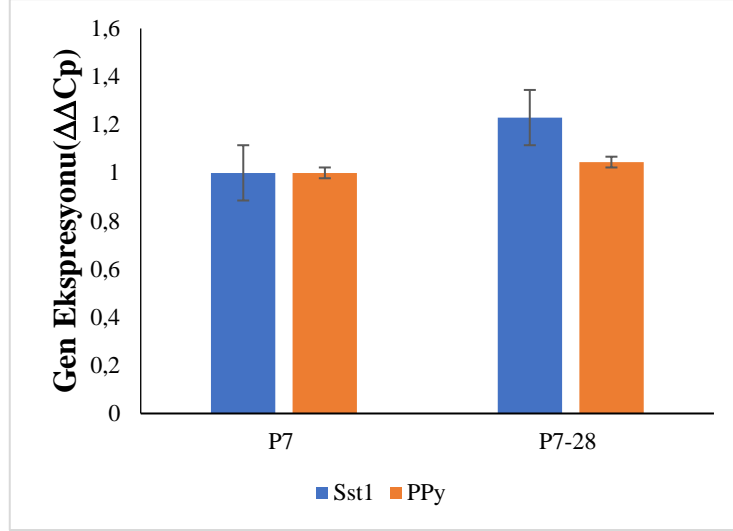
Şekil 4.56. Organoidlerde TGFβ1, p38α gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act-β kullanılmıştır. (*, P<0,05)

Gen ekspresyonu analizinde oksidatif stres ile ilişkili olarak RAGE, SOD1 ve HO1 genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla RAGE ekspresyon seviyesinde 1,04 kat artış gözlemlenirken, HO1 ekspresyon seviyesinde 1,14 kat artış gözlemlenmiştir. SOD1 ekspresyon seviyesinde ise 20 kat ileri seviyede bir azalma gözlemlenmiştir (Şekil 4.57).



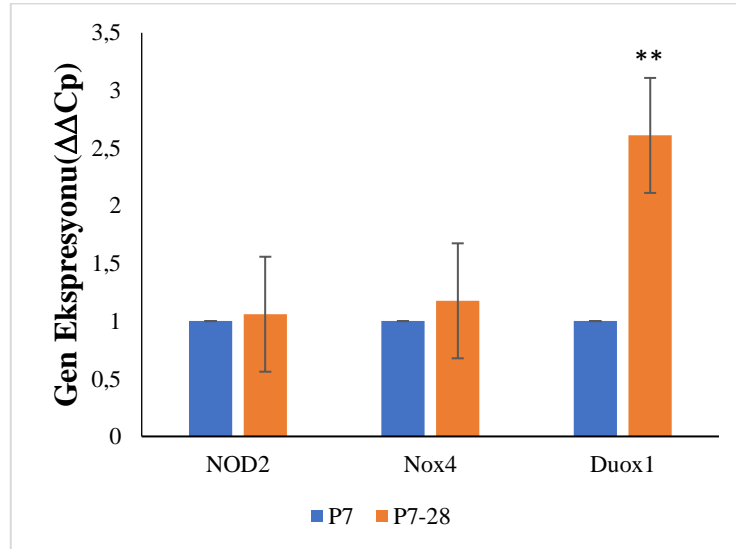
Şekil 4.57. Organoidlerde RAGE, SOD1 ve HO1 gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Act β kullanılmıştır. (**, P<0,01)

δ -hücrelerince üretilen somatostatinin ve ağırlıklı olarak Langerhans adacıklarında ve asinar hücreler arasında bulunan pankreas polipeptid genlerinin ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla Sst ekspresyon seviyesinde 1,22 kat artış gözlenirken, PPy ekspresyon seviyesinde 1,04 kat artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.58).



Şekil 4.58. Organoidlerde Somatostatin ve Pankreatik Polipeptit gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Actβ kullanılmıştır.

Protein kodlamasından sorumlu olan NOD2, reaktif oksijen üretiminden (ROS) sorumlu Nox4 ve ROS tarafından indüklenen Duox1 genlerinin ekspresyonu analizinde ifade profilleri incelendiğinde, P7-28 organoid model grubunda P7 organoid modeline kıyasla NOD2 ekspresyon seviyesinde 1,05 kat artış, Nox4 ekspresyon seviyesinde 1,20 kat artış ve Duox1 ekspresyon seviyesinde ise 2,60 kat ileri seviyede bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. Organoidlerde NOD2, Nox4 ve Duox1 gen ekspresyon analizi. Pax4 ve MafA genleri aktarılmış hücrelerle yapılan organoid kültür koşullarındaki gen ekspresyonlarının ekspresyon seviyesi saptanmıştır. Referans gen olarak Actβ kullanılmıştır. (**, P<0,01)

5. TARTIŞMA

Günümüzde, obezitenin artması nedeniyle diabetes mellitus prevalansı dramatik bir şekilde artmaktadır. Hastalığın en sık görülen şekli olan tip 2 diabetes mellitus, pankreas beta hücrelerinden hatalı insülin salgılanması ve periferik insülin direnci ile karakterizedir (Poitout ve Robertson, 2002; Unger, 2003).

Daha önce Kök Hücre Anabilim Dalımızda ektopik olarak MafA ve Pax4 genleri aktarılmış pankreas adacık kaynaklı mezenkimal kök hücreler (Bağlar, 2014) kullanılarak, 3 boyutlu organoid kültürü tekniği ile hücrelerin matrijel içerisine gömülmesiyle pankreas adacık benzeri yapılar elde edilmiştir. Çalışmamızda procr+ hücreler kullanılmamış olup Wang ve ark. yapmış olduğu çalışmada erişkin kök hücre modifikasyonu procr+ hale getirilerek kullanılan adacık hücreleri ve endotel hücrelerinin izolasyonu sonrası elde edilen hücrelerin matrijele gömülmesiyle pankreatik adacık organoidlerinin oluşturulduğu bildirilmiştir. Wang ve ark. yapmış olduğu çalışmada, 1×10^5 hücreyle oluşturdukları 3-boyutlu yapı olan organoid modeli maturasyon yöntemi ile küçük doku parçaları halinde 15 pasaj atlatılarak ortamdaki matrijeli uzaklaştırılmıştır. Analizler sonucunda 3 boyutlu yapının bozulmadığı görülmüştür.

Çalışmamızda Pax4⁺/MafA⁺ geni aktarılmış pankreas adacık kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden organoid kültürü tekniği ile pankreas adacık benzeri yapılar elde edilmiştir. Bu yapıların in vitro ortamda yaşlanma modelini taklit etmesi için konjugatif yaşlandırma yaklaşımı ile yaşlandırılan hücrelerin matrijel içerisine gömülerek 3 boyutlu yapılar (organoidler) elde edilmiştir.

Pankreas, üç ana hücresel bileşenden oluşur: endokrin adacıklar, ekzokrin, asin ve kanallar. Langerhans adacıklarının pankreas β hücreleri, insanlarda ve hemen hemen tüm diğer omurgalılarda insülin üreten tek hücrelerdir. Sıçanda, adacık, β hücrelerinin α , δ ve PP hücrelerinin bir örtüsüyle çevrili bir çekirdek oluşturduğu küresel yapılar halinde düzenlenmiştir. Çalışmamızda bu oluşum içerisinde olması bekledik ama elde ettiğimiz organoidlerde biz bunu gözlemedik. İnsülin, glukagon ve somatostatin organoid yapısı içerisinde aynı insan pankreas adacıklarındaki dağılımda olduğu gibi homojen bir dağılım gösterdiğini gözlemledik. Wang ve ark. yapmış olduğu çalışma ile benzer sonuçlar alınarak, sıçan kökenli organoidlerde β , α , δ ve PP homojen bir dağılım oluşturduğu gözlemlenmiştir.

Erişkin kök hücrelerle elde edilen organoid modelinin bir özelliğinden kaynakladığı düşünülmektedir. Bu hücreler sırasıyla insülin, glukagon, somatostatin ve pankreas polipeptidi (PP; PPy) üretir (Pan ve Wright, 2011). Oluşturulan 3-boyutlu organoid modelinden alınan kesit sonrası IF boyama yapılan β , α , δ boyamasının pozitif olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan gen ekspresyon analizi sonucunda β , α , δ ve Ppy hücrelerinin modelde olduğunu gözlemledik. β hücreleri, diyabet gelişimi için bir predispozan (olasılığı artıran) faktör olan sınırlı bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir (Hardikar, 2016).

Adacık hormonları (insülin, glukagon, somatostatin), metabolitlerin aracılık ettiği salgı tepkilerini modüle etmek için β , α ve δ hücreleri kendi aralarında etkileşime girerler (Samols, Weir, Bonner, 1983). İnsülin salgılanması ağırlıklı olarak kan glukoz seviyeleri tarafından kontrol edilmesine rağmen, glukagon ve somatostatin sırasıyla glukoz aracılı insülin salgılama tepkilerini uyarır ve inhibe eder (Schebalin, Said, Makhlouf, 1977). Çalışmada beta hücre farklılaşmasının yanında aynı zamanda organoidlerin endokrin farklılaşma ile birlikte somatostatin ve PPy hücre komponentlerinin oluşturduğu ve adacık hücrelerinde farklılaştığı gözlemlendi. Glukagon miktarı 2 boyutlu hücrelere göre organoid modelinde daha az sayıda pozitif hücre elde edilmiştir. Yapılan gen ekspresyon analizi ile desteklenmiştir. İmplante edildiğinde bu organoidlerin gerçek fizyolojik ortamlarda bir adacık gibi davranacağı yönünde kuvvetli in vitro bulgular elde edilmiştir. Elde ettiğimiz organoidler sadece beta hücre sferoidi olmasından ziyade diğer pankreas adacık hücrelerini de içeren gerçek anlamda bir pankreas adacık organoidi olduğu gösterilmiştir.

Sıçan pankreas adacığında insülin immün boyamasının merkezde daha yoğun, glukagon ve somatostatin boyamasının ise adacık çeper kısmında daha yoğun olması beklenmektedir. Hem Wang'ın çalışmasında hem de çalışmamızda sıçan pankreas adacık organoidinde beklediğimiz dağılım gözlemlenmemiştir. Her iki çalışmada insülin immün boyaması çeper kısmında daha yoğun gözlemlenmişken merkez kısmında glukagon ve somatostatin boyamalarının daha yoğun olduğu görülmüştür. Her iki çalışmada ortak faktör olan erişkin hücrelerin organoid oluşturulmasında kullanılması, farklılaşma ve hücrelerin adacıklar içerisindeki dağılımlarını etkilediği düşünülmektedir (Wang ve ark., 2020).

Wang ve ark. yapmış olduğu çalışmada, organoidler oluşturulduktan sonra farklılaşmamış kontrol organoidleri farklılaştırılmış olanlarla karşılaştırıldığında insülin boyamasında artış ve glukagon ile somatostatin boyamasında azalma görülmüştür. İnsülin ve glukagon boyamalarında çalışmamız Wang ve ark. yaptığı çalışma ile benzerlikler

göstermektedir. Ancak örneklerimizin somatostatin boyamasında daha fazla pozitif boyanma gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2020).

Adacık beta hücrelerinde, glukokinaz aktivitesi, artan glukoz seviyesine yanıt olarak insülin salgılanması için temel bir kontrol görevi görür. Glukoz-6-fosfat tüketildikçe, artan miktarlarda ATP, insülin salınımı ile sonuçlanan bir dizi işlemi başlatır. Hüresel solunumun artmasının sonuçlarından biride, NADH ve NADPH konsantrasyonlarında yükselmez. Beta hücrelerinin redoks durumundaki bu değişim, hücre içi kalsiyum seviyelerinin yükselmesine, K_{ATP} kanallarının kapanmasına, hücre zarının depolarizasyonuna, insülin salgılayan granüllerin zarla birleşmesine neden olur. Çalışmamızda Glukokinaz boyamasında kontrol grubunda insülin boyamasında da az boyanma gözlemlendiği için glukokinaz boyanmasının az boyanmasını destekleyici niteliktedir. P7-28 grubunda artan insülin boyaması olduğu için glukokinaz boyanmasında hücre çeperinde gözle görülür biçimde pozitif boyanma gözlemlenmiştir. Diğer bir hücre içi glukoz taşıma mekanizmasının ögesi olan Glut-2 incelendiğinde, kontrol (P7) organoidlerinin merkezinde Glut-2 boyaması az gözlemlense de P7-28 grubunda sadece hücre sitoplazmasında değil, aynı zamanda hücre zarı etrafında da pozitif boyanma gözlemlenmiştir (Tomita, 1999).

Beta hücrelerinin insülin sentezi için Pdx-1 oldukça önemli bir proteindir. Pdx-1, pankreatik gelişim için önemli olan bir transkripsiyon faktörü olmakla birlikte β -hücre olgunlaşmasında da aktif roller üstlenmektedir. Pdx-1 knockout fare embriyolarında pankreatik tomurcukların oluştuğu ancak pankreas gelişiminin olmadığı bildirilmiştir (Jonsson ve ark., 1994). Gelişen β -hücresinde Pdx-1, NKX6.1 ve insülin birlikte ifade olur. Bizim çalışmamızda Pdx-1 boyamasında kontrol grubunda pozitif boyanma çok az gözlemlenirken, P7-28 grubunda Pdx-1 boyaması pozitif hücre çeperi etrafında lokalize olmuş hücre kümeleri gözlemlenmiştir.

Hücre tedavisi, geleneksel diyabet tedavilerine potansiyel bir terapötik alternatif olarak kabul edilir. Adacık ve tam pankreas transplantasyonları, β hücrelerini yenileyerek glukoz homeostazını geri yükleyebilir (Lysy ve ark., 2013). Elde ettiğimiz adacıklarda insülin miktarını ölçüldüğünde insülinin sentezlendiği ve hücre dışına salgılandığı gözlemlenmiştir. Normal glukozlu ortam içerisinde bakıldığında organoid modelinde 2-boyutlu hücre yapısına göre daha fazla insülin salgıladığını gözlemledik. Organoid modelinde elde edilen insülin salgısı normal adacıkların beta hücrelerindeki insülin seviyesine kıyasla 1,5 kat artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Wang ve ark. yapmış olduğu

çalışmada olduğu gibi insülin ELISA ile hücrelerce sentezlenen insülin miktarını da nicel olarak belirlenmiştir (Wang ve ark., 2020). Bu organoidlerde yapıların boyutları ve içerdikleri hücre sayısının farklı olması nedeniyle salgılanan insülin miktarı normalize edilmiştir. Eşitleme öncesinde ortama salınan insülin miktarı az iken eşitleme sonrasında birim hücre başına salgılanan insülin miktarının P7 grubunda yaşlanma grubuna göre daha fazla olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, P7-28 organoid modelinde boyut ve hücre sayısı dikkate alınmadığında daha fazla insülin salgılanırken hücre başına salgılanan hücre miktarı normalize edildiğinde P7-28 grubunun P7'ye göre daha az insülin salgıladığı hesaplanmıştır. İnsülin miktarının azalmış olması β hücresinin kendi kapasitesinin de azaldığını göstermektedir. Bu durumda hücrenin yaşlandığını ve tip 2 diyabetine benzer durumun ortaya çıktığını desteklemektedir. Ortama salgılanan insülin miktarının azalmasından dolayı yaşlanma ile birlikte insülin salgısı gibi β hücresi fonksiyonunu yerine getirmesindeki zayıflık organoidlerin tip 2 diyabet modelini kısmen taklit ettiğini göstermektedir. Yükselen glukoz konsantrasyonuna karşı cevap olarak salgılanan insülin miktarı ölçüldüğünde yaşlandırılmış organoid (P7-28) modelinin cevabı genç organoid (P7) modeline göre düşme gözlemlenmiştir. Bu düşüş İnsülin, Glut-2 ve Glukokinaz gen ekspresyon düzeyindeki azalışla paralellik gösterdiği görülmüştür. Beklendiği gibi yaşlanma ile birlikte beta hücrelerinin glukozu karşı duyarlılığı düşerek daha az insülin salgıladıkları GSIS deneyi ile gösterilmiştir. İnsülin cevabındaki azalış ile yaşlanma arasındaki ilişkiyi açıklayabilmek için genç sPA-MKH Pax4⁺/MafA⁺ hücrelerinden (P7) mitokondri izolasyonu yapılarak yaşlılık organoid modeli hücrelerine aktarılmıştır. Süreç sonunda GSIS ölçüldüğünde düşük olan glukozu karşı insülin sekresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir. Bu sonuç bize organoid yaşlanma modelinin beklendiği gibi hem insülin salınımında azalma hem de GSIS değerinde düşme gözlemlenerek yaşlılık fenotipini gösterdiği ortaya konmuştur. Bu yaşlılık fenotipinin de genç hücrelerden elde edilen mitokondri transferi ile kısmen geriye döndürülebildiği gösterilmiştir (Kim ve ark., 2018).

Çalışmamızda erişkin kök hücrelerden pankreas adacık organoidleri elde edilmiştir. Literatür ile karşılaştırıldığında var olan sonuçlarla benzer organoid yapılarının elde edildiği insülin salgıladığı normal bir organoid morfolojisinde gözlemlenen hücrelerin taşıdığı belirlenmiştir. Bizim çalışmamızın diğer bir amacı da organoid elde ettikten sonra yaşlılık modeli oluşturup diyabet hastalığında kullanılıp kullanılmayacağını belirlemesidir. Bu anlamda hücrelerin yaşlanma modeli izlenmiştir. Hücre yaşlanma modeli oluşturulduktan

sonra X-gal boyaması ile beta-galaktosidaz enzim aktivitesiyle hücrede yaşlılık modelinin validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Serbest radikallerin / Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) üretimi ile antioksidanlar arasındaki bir dengesizlik olarak tanımlanan oksidatif stres, DNA hasarına ve hücrel yaşlanmaya önemli ölçüde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yaşlanmanın serbest radikal veya oksidatif stres teorisine göre, oksidatif stres hücrel antioksidan savunma sistemleri ROS'a karşı koyamadığında ortaya çıkar ve onları bazal seviyelerine geri getirir. Bu nedenle, hidrojen peroksit (H_2O_2) tedavisi, oksidatif strese hücrel duyarlılığı değerlendirmek için yaygın olarak bir model olarak kullanılır. Her ne kadar sMKH'ler oksidatif stresi verimli bir şekilde idare ediyor gibi görünsede, yine de H_2O_2 'ye maruz kaldıklarında in vitro olarak erken yaşlanmaya maruz kalırlar (Facchin ve ark., 2018).

Yaşlanmayla ilişkili beta-galaktosidaz (SA-gal) aktivitesinin lizozomal enzimin bolluğundaki bir artıştan kaynaklandığını ve muhtemelen yaşlanmış hücrelerde gözlenen artan lizozomal biyogenez ile bağlantılı olduğu gösterildi (Kurz, Decary, Hong, Erusalimsky, 2000). Artan sayıda lizozom ve yüksek lizozomal aktivite, yıllarca replikatif yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir. 2006 yılında Lee ve ark., SA-gal aktivitesinin lizozomal kökenini doğruladı ve bunun klasik lizozomal enzimi kodlayan gen olan GLB1'in artan ekspresyonundan kaynaklandığını gösterdi. X-gal'a yönelik enzim aktivitesinin varlığı da çalışmamızda yaşlılık fenotipini gösteren temel bir belirteç olarak kullanılmıştır (Debacq-Chainiaux, Erusalimsky, Campisi, Toussaint, 2009; Lee ve ark., 2006).

Tez çalışmasında yaşlılık modeli oluşturulması hedeflendiğinden hangi yaklaşımın daha etkili olduğunu göstermek için 3 farklı yaşlanma metodu izlenmiştir: (1) Oksidatif stres ile yaşlanma modeli; (2) Replikatif yaşlanma ve (3) Konjugatif yaşlanma modeli. Oksidatif stres çok kullanılan bir metod olup bu metodun kendisi H_2O_2 farklı dozda hücreye uygulanmasıyla hücre üzerinde X-gal miktarındaki artışa bakılarak hücrede yaşlandırma modeli oluşturulmuştur.

Bu çalışmada, X-gal boyaması (SA β -Gal test) sonuçları karşılaştırıldığında, P7 (kontrol) hücresi için 2B kültür aşamasındayken hücre proliferasyonunun artması sonucunda konfluensiye ulaşıp sıkışan hücreler nedeniyle boyanmanın olduğu düşünülmektedir. sPA-MKH hücrelerinin farklı konsantrasyonlarda 30 dk H_2O_2 uygulanması sonrasında 24. ve 72. saatte yapılan beta-galaktosidaz enzim aktivitesindeki değişiklikleri skorlama yöntemi ile

maviye boyanan hücreler manuel olarak sayılarak 0-4 arasında numaralandırılmıştır (Kavanag ve ark., 2021). Bu amaçla, oksidatif stres uygulanan P7 hücrelerinde gözlemlenen SA β -Gal aktivite artışı hem H₂O₂ konsantrasyonuna hem de maruz kalma süresine bağlı olarak her iki grup içinde aynı doz maksimum seviyede etkinlik gösterdi. Bu sebeple 24. saat sonunda 5 μ M H₂O₂ ile maksimuma ulaşırken, 72. saat sonunda 5 μ M H₂O₂ ile en büyük artışı gösterdi. Bu sonuç, 72. saatte H₂O₂ konsantrasyonlarıyla muamele edilen hücrelerin hücre canlılığının azalmasıyla tutarlıdır. Özellikle, daha yüksek yaşlanma etkisi 72. saatte belirgindi. Farklı deneysel zamanlarda tekrar edilmesine rağmen kendi içerisinde tutarlı sonuçlar elde edilmiş olup literatürdeki diğer araştırmalarda da benzer bir eğilim görüldü. Doza bağlı olarak hücrede ROS miktarının X-gal boyamasındaki artışı ile birlikte yaşlılığında artmış olduğunu gözlemlendi (Facchin ve ark., 2018).

Oksidatif stres, yaşlandırma modelinde çok kullanılan bir yaklaşım olmasına karşın aynı zamanda bu yaşlandırma modeli hücreyi apoptoza yönlendirmek içinde de kullanılan bir metottur. Dolayısıyla hücrenin apoptoza yönlendirilmesiyle yaşlandırma modeli oluşturulması yaşlılık modelleri üzerinde kısıtlılık oluşturmaktadır. Bu sebeple X-gal boyaması ve hücre çoğalması yöntemleri kullanılarak diğer yaşlandırma modelleri oksidatif stresin etkileri yapılan çalışmada karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak diğer yaşlılık modellerinin hücrenin yaşlandırılmasında daha iyi olabileceği düşünülmüştür.

Kök hücrede telomeraz enzim aktivitesi az olduğundan, Acun ve ark. yapmış olduğu çalışmada yeni doğan sıçan kardiyak fibroblast hücreleri kullanıldığı için oluşturulan replikatif yaşlanma modeli iyi sonuç vermiştir. Çalışmamızda kullanılan sPA-MKH oluşturulan replikatif yaşlanma, Acun ve ark. somatik hücrelerde kullanarak oluşturmuş olduğu replikatif yaşlanma kadar iyi sonuç vermediği gözlemlenmiştir. Bu nedenle bu hücreleri yaşlanma modeli olarak kullanılmayacağı belirlenmiştir. Literatürde çoğunlukla yaşlanma modeli oluşturmada oksidatif stres üzerine gidilmiş; bu yaşlanma modelini kullanılmadığında çoğunlukla replikatif yaşlanma modelini kullanmıştır. Ancak kök hücre gibi köklülük özelliği olan hücrelerde çok az da olsa telomeraz enzim aktivitesi vardır. Bu yüzden de çalışmamızda oluşturulan ve telomerin kısalmasını temel alan replikatif yaşlanma modelinin kök hücreler için uygun bir hücre yaşlanma modeli olmadığı gösterilmiştir. X-gal boyaması sonucu ile negatif bir boyanma (yaşlanma fenotipinin olmadığı) gözlemlenmiştir. Yaşlandırma modellerinin değerlendirilmesinde temel aldığımız iki kriter olan hücre

çoğalmasındaki azalış ve beta-galaktosidaz aktivitesindeki artış gösterilmiştir. Sonuçlara göre en etken modelin konjugatif yaşlandırma olduğu belirlenmiştir (Acun ve ark., 2017).

Kavanagh ve ark. çalışmasında sıçandan izole edilen adipoz hücreleri kullanılarak replikatif yaşlandırma yapılan hücrelere X-gal boyaması yapılmış ve yaşlanmanın, p53-p21 ve pRB yolakları, proinflatuar sitokinlerin salgılanması, profibrotik faktörler ile yerel ve sistemik ortamları olumsuz etkileyen büyüme faktörleri yoluyla esas olarak geri dönüşü olmayan replikatif yaşlanma ile karakterize edilen bir hücre durumu olduğu bulunmuştur. SA-gal boyama, proliferatif olmayan adipoz hücre yaşlanması ile ilişkilidir ve yaşlanan hücrelerin lizozomlarında artan pH'a bağlı hidrolaz aktivitesini yansıtır (Kavanagh ve ark., 2021).

P7-28 ve P15 gruplarında maviye boyanan hücreler manuel olarak sayılarak 0-4 arasında skorlama yöntemi ile numaralandırılmıştır (Kavanagh ve ark., 2021). Çalışmamızda replikatif yaşlanma (P15) sonucunda popülasyonun çoğalma kapasitesinde kademeli olarak bir azalma söz konusudur (Cristofalo, Lorenzini, Allen, Torres, Tresini, 2004). Çalışmamızda replikatif yaşlanma sonucu hücrelerin çoğalma kapasitesinde azalma görüldüğü ve X-gal boyamasının sonuç vermediği gözlemlenmiştir. Bu durum yaşlanmadan çok sitostatik bir durumun geliştiğini göstermektedir.

p53 ve p16^{Ink4a} yolları dahil olmak üzere hücre yaşlanmaya yol açtığı bildirilmiş birkaç sinyal yolu vardır (Childs, Baker, Kirkland, Campisi, van Deursen, 2014). Bu yolların her ikisi de hücre stresörlere yanıt olarak aktive olur ve hücre döngüsü inhibisyonuna yol açar. p53, sikline bağımlı kinaz 2'yi (Cdk2) devre dışı bırakan p21'i etkinleştirir. Cdk2 olmadan, retinoblastoma proteini (pRB) aktif, hipofosforile formunda kalır ve önemli bir hücre döngüsü düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü E2F1'e bağlanır (Ben-Porath ve Weinberg, 2005). Bu, E2F1'in transkripsiyonel hedeflerini bastırarak G1 fazından sonra hücre döngüsünün durmasına yol açar. Bizim çalışmamızda hücre siklusunu durdurmak için üçüncü yaşlanma modeli olan konjugatif yaşlanmada bu durum gözlemlenmiştir.

p21, p53 ve retinoblastoma (RB) Ink4a ailesine bağlı olan proteinlerdir. Bu proteinlerin hücre içerisindeki fonksiyonu hücre siklusunu durdurma görevi vardır. Hücre siklusu görevini durdurmak için biz çalışmamızda üçüncü yaşlanma modeli olan konjugatif yaşlanma modelini oluşturduk. Her kök hücre ile konjugatif yaşlandırma yapılamamaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan sPA-MKH'nin bir özelliği olarak konfluensi oluştuğunda

hücre çoğalmasının durduğu ve hücrelerin çok katmanlı hücre yapıları oluşturmadığı için hücrelerimiz konjugatif yaşlanma modeli için uygundur. Bu yöntemin temel dayanağı hücre-hücre teması sonrasında kültür ortamında gerçekleşen Hippo sinyal yolağının aktivasyonudur. Hücre-hücre teması sonrasında gerçekleşen FAT4 aktivasyonu sonrasında YAP/TAZ kompleksi hücre içi süreçleri birçok aşamada etkileyerek beta-katenin aracılığı (konanikal) Wnt Sinyal yolağını baskılamakta ve kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını inhibe etmektedir. Wnt yolağının farklılaşmanın erken dönemindeki inaktivasyonu pankreatik primordium yapılarının oluşmasını engelleyeceğinden yaşlanmanın kök hücrelerin farklılaşma verimlerine etkisi olumsuz olacaktır. Bu açıdan bakıldığında çalışmamızda P7-28 grubunun normalize edilmiş insülin salgısının kontrol grubuna göre düşük olması açıklanabilir (Mo, Park, Guan, 2014; Piccolo, Dupont, Cordenosi, 2014).

Çalışmamızda yaşlandırma modelinin geliştirildiği, hücrelerde gerçekleştirilen X-gal boyaması ve analizleriyle doğrulandı. Yaşlılığı gösteren bir diğer bir analiz ise hücre çoğalmasının üzerine yapılan ölçümlerdir.

Yaşlanmayla ilgili bir diğer önemli soru, farklı yöntemlerle oluşturulmuş stres sonucunda yaşlanmış hücrelerin proliferasyonunun stres uygulanmamış genç hücrelerin proliferasyonu arasında bir farkın oluşup oluşmadığıdır. Bu çalışmada, P7 hücrelerine farklı konsantrasyonda H₂O₂ uygulaması sonrasında değişen hücre proliferasyonu verilerinin oksidatif stres birikiminin yaşlanmada önemli bir faktör olduğunun öne sürüldüğü literatürdeki diğer çalışmalardaki sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür (Cadenas ve Davies, 2000; Terman ve Brunk, 2006).

Çalışmamızda P7-28 ve P15 hücrelerinin canlılık ve proliferasyon analizinde azalma olduğu Acun ve ark. yapmış olduğu çalışma ile desteklenmiştir. Genç hücrelerden oluşan kontrol grubu daha zayıf yaşlanma belirtileri gösterirken yaşlandırılmış hücrelerin hücre proliferasyonundaki yavaşlamanın hücrelerdeki hasardan kaynaklandığı bu çalışmada gösterilmiştir (Acun ve ark., 2017).

İkinci hedefimiz olan yaşlandırma modeli için en iyi yaşlanma modelinin konjugatif yaşlanma olduğunu gösterdik. Yaşlanma modelinin bir parçası olarak da mitokondri hasarı incelenmiştir. Mitokondri hasarının incelenmesinde kullandığımız metodlar olan TMRM ve

mitotracker boyamasıyla bozulmamış membran potansiyeline sahip mitokondriler ile hücrelerdeki total mitokondri belirlenmiştir.

Hücreye nüfuz eden bir floresan boya olan TMRM, mitokondrideki membran potansiyeline bağlı olarak aktif mitokondride birikir (Scaduto ve Grotyohann, 1999). Ancak akış sitometrisi ile hücrelerde gösterilen TMRM boyamasının yoğunluğu mitokondriyal hacmi tam olarak yansıtmayabilir. Metod hücre başına toplam floresan yoğunluğunu ölçer. Ancak mitokondriyal boyaların mitokondriye dağılımı mitokondrideki membran potansiyeline bağlı olmasından dolayı bir TMRM ölçümüne kritik etkinin mitokondrideki membran potansiyelinden mi yoksa mitokondriyal hacimden mi kaynaklandığını ayırt edilmesi zordur (Bonora, Ito, Morganti, Pinton, 2018). Çalışmamızda tek hücre halindeki gruplara TMRM boyaması yapılarak akım sitometrisinde sonuçlar analiz edilmiştir. TMRM boyanmasının artması hücrelerdeki sağlıklı mitokondrileri göstermektedir. TMRM boyaması azaldıkça mitokondri hasarının varlığına işaret eder. Kontrol grubuna kıyasla H_2O_2 ile oksidatif stres uygulanan hücrelerde (24. Saat) TMRM analizi sonucunda $2,5 \mu M$ H_2O_2 uygulanmış grubun mitokondri membran potansiyelinde en az boyanma gözlemlendiğinden dolayı en fazla hasarın bu dozda olduğu gösterilmiştir. TMRM (72. Saat) boyanmasının analizinde kontrol grubuna kıyasla $1,25 \mu M$ H_2O_2 uygulanmış grupta mitokondri membran potansiyelinde en fazla boyanma gözlemlenmiştir. Bu durumda oksidatif stres uygulanan hücrelerde 72. saat sonrasında mitokondri hasarı oluşan hücrelerdeki mitokondrilerin kendini iyileştirmeye gittiği ve mitokondride hasar seviyesinin en aza indirildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla replikatif yaşlandırmanın mitokondri üzerinde olumsuz bir etki oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Konjugatif yaşlandırmada ise mitokondri hasarı oluşmadığı, aksine mitokondride iyileşme olduğu gözlemlenmiştir. Bu yaşlandırma modelinde hücre çoğalması durduğundan, hücre sitoplazmasında ROS birikerek bu artan ROS miktarı ile hücrenin yaşlanması gerçekleşmektedir. Aynı zamanda ortamda biriken ROS miktarı da hücrenin mitokondrisine hasar vermesi beklenmektedir. Dolayısıyla mitokondride sağlıklı mitokondri miktarını gösteren TMRM'nin kontrole göre daha az olması gerekirdi. Konjugatif yaşlandırma hücre çoğalması durduğu andan itibaren hücrenin metabolik hızı da hücrenin kendisi gibi yavaşlamakta ve hücre çoğalması durduğundan itibaren ROS miktarı üretimi de azaldığı için mitokondri hasarı azalmaktadır. Dolayısıyla çoğalan hücrelerin üretimi daha az hasarlı mitokondrileri oluşturmaya başladığı gözlemlenmiştir. 2 boyutlu kültürde yüzeye temas eden hücre sayısı fazla olduğu için hücre sitoplazmasında ROS seviyesi migrasyon sonucu

azalmaktadır. Bu sebepten dolayı konjugatif yaşlanmada mitokondri hasar beklenenden az gerçekleşmiştir.

Mitokondri hasarı 3 boyutlu organoid modellerinde de incelenmiştir. Hücre matrijel içerisine gömülü olduğundan matrijel içerisinde sıkışıp kalan hücrelerin yüzey ile teması azaldığı için organoid içerisindeki hücrelerde diffüze olamayan ROS'ların seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Bu sebeple organoidlerin mitokondrilerinde hasar ortaya çıktığı gözlemlendi. Çalışmamızda 3-boyutlu organoid modeli oluşturulduktan sonra yapılan TMRM boyamasında konjugatif yaşlanma modeli oluşturduğumuzda P7-28 grubunda 21. günün sonunda ROS miktarının arttığı ve mitokondri hasarının meydana gelmiştir. Bu nedenle hücrelerde boyanmanın çok az olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda ise ROS miktarının çok az seviyede olduğu ve sonucunda mitokondri hasarı oluşmayarak boyanmanın pozitif olduğu gözlemlenmiştir.

Hücrelerdeki bütün mitokondrilerin varlığını göstermek için total mitokondri seviyesini ölçen MitoTracker Green boyası, lazer taramalı konfokal mikroskopi (Leica TCS SP8) ve akış sitometrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu boyanın, sistein kalıntılarının serbest tiyol grupları ile reaksiyona girerek mitokondriyal proteinlere kovalent olarak bağlanması sonucu mitokondriyal matrikste seçici olarak birikir (Presley, Fuller, Arriaga, 2003).

Kesitlerin boyama sonrasında P7-28 hücre mitokondrilerindeki ışımının, kontrole kıyasla daha az olduğu yani P7-28 grubun konjugatif yaşlanma sonucunda stres ortamı oluşturarak ROS miktarının birikmesi sonucunda mitokondri sayısının daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubu hücrelerinin mitokondrilerinin fazla ışımaya yaptığı yani mitokondri sayısının P7-28 olan gruba kıyasla daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Mitotracker boyaması sonrasında gözlemlenen, azalan mitokondri sayıları hücrelerin mitokondrilerinde hasara bağlı bir kaybın yaşandığını işaret etmekte olup ve bu hasar sonrasında P7-28 grubu hücrelerinin TMRM ile daha az boyanması durumu gerçekleşmiştir. 2B kültür sistemlerinde belirgin bir mitokondri hasarı görülmezken 3B sistemlerde P7-28 organoid grupta mitokondri hasarı görülmektedir. İnsülin ölçümleri dikkate alındığında 3B kültürlerde insülin miktarının da hücre başına azaldığı belirlenmiştir. Ancak yaşlanma ile birlikte P7-28 organoid grubunda hücre sayısı kontrole göre daha hızlı artmakta ve bunun

sonucu olarak ortama salınan insülin miktarının birim hacimde daha fazla olmasına yol açmıştır.

3B kültür sırasında organoid yapılarının çok büyümesinden dolayı bu yapıların merkezleri yeteri kadar besi yeri ve oksijen alamadığından dolayı nekrotik bölgeler oluşabilir. Bu ölü bölgeler farklılaşmayı engelleme potansiyeline sahip olup organoid kültürü için istenmemektedir. Geliştirdiğimiz organoidlerde nekrotik merkezin oluşmadığını göstermek için 21. Gün sonunda organoidler live/dead boyası ile boyanmıştır. Sonuçta elde ettiğimiz organoidlerin hiçbirinde belirgin bir nekrotik bölge görülmemiş ve organoidlerin sağlıklı olduğu belirlenmiştir. Literatürde diğer bir çalışma olan Kakni ve ark. çalışmasında matrijel içerisine gömülen 3 boyutlu bağırsak organoidlerine yapılan live/dead boyamasında organoidin boyutundaki büyüme ile paralel olarak 7. gün sonunda %22, 10. gün sonunda %28 ve 13. gün sonunda %40'lık ölü hücre sayısında artışıdır (Kakni ve ark., 2020). Literatürde Votanopoulos ve ark. yaptığı çalışmada ise hastaya özgü bağışıklıkla güçlendirilmiş organoidlerin immünoterapi taraması için kültürde 7. günün sonunda yapılan live/dead boyama sonrası boyutları küçük olan organoidlerin ağırlıklı olarak canlı hücreler içerdiği gösterilmiştir (Votanopoulos ve ark., 2020). Çalışmamızda elde edilen pankreas adacık organoid modeline 21. Günün sonunda yapılan boyama sonucunda organoidlerin boyutları nekrotik merkezlerin oluşmasını yol açmayacak kadar küçük oldukları gözlemlenmiş olup organoidlerde ölü hücreye rastlanılmadığı görülmüştür. Geliştirilen organoid kesitlerinde hücre sayımı gerçekleştirilerek organoidin içerisindeki tahmini hücre sayısı Weibull dağılımı kullanılarak hesaplanmıştır (Jo, Choi, Koh, 2007).

Literatürde adacık içerisinde bulunan hücre sayısının 10-100.000 arasında değiştiği bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz organoidlerin içerisindeki tahmini hücre sayısı kontrol grubu için 500 ve p7-28 için yaklaşık 1000 hücre olarak hesaplanmış ve bu sayının literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Çok fazla büyümemiş bu organoid yapılarının kültür sırasında kedisinin çoğalmasını sınırlayarak organoid boyutunun daha da fazla artmamasına yol açmıştır. Bu durum nekrotik merkezlerin oluşmasını engellemiştir.

PKH26 boyaması hücrelerde hücre canlılığını ve sitoplazmik membranın bütünlüğünün korunduğunu göstermek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Elde ettiğimiz organoidler PKH26 ile boyanarak hücre canlılığı ve membran bütünlüğünün her iki grupta korunduğu 21. gün inkübasyonu sonrasında gösterilmiştir.

Çalışmamızda 3-boyutlu organoid modelleri pankreas adacık histolojik boyası olan dithizone boyasıyla boyanmıştır. Bu boyama, pankreas adacık hücrelerinde bulunan çinko başta olmak üzere metal iyonlarına bağlanan kükürt içeren bir bileşik olan dithizone boyasını temel almaktadır. Boyama sonrasında çinko içeren lokasyonlar parlak kırmızı renk ile boyanır (Raikwar ve ark., 2015). Boyama sonrasında kontrole kıyasla P7-28 organoidlerde kırmızı-kahverengi boyamasının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. P7-28 organoid modelinde insülin salgılayan hücrelerin terminal farklılaşmaya giderek olgun pankreas adacıklarının geliştiği boyamayla ortaya konmuştur.

Organoidlerde gen ekspresyon analizi ile iki temel nokta aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bunlardan ilki elde ettiğimiz organoidlerin ne ölçüde pankreas adacıklarına benzediğinin gösterilmesi, ikincisi ise yaşlandırma modeline ne kadar organoid kültüründe taklit edebildiğimizi ortaya konmasıdır.

Gen ekspresyon seviyesi analizinde ifade edilen insülin, pankreas adacıklarının beta hücreleri tarafından üretilen bir peptid hormonudur (Voet, 2011). İnsülin ekspresyonu incelendiğinde kontrol organoidine göre P7-28 grubu organoidlerinin daha fazla insülin ekspresyonu gerçekleştirdiği görülmüştür. 2B kültürde P7-28 grubunun kontrole göre yaklaşık 11 kat daha fazla insülin ekspresyonu (ins1+ins2) gerçekleştirmişken 3B organoid kültüründe bu ekspresyon kontrol grubuna göre P7-28 grubunun yaklaşık 5 kat daha fazla insülin eksprese ettiği hesaplanmıştır. Bu durum 3B kültürlerde yaşlandırma modeli olarak geliştirilmiş organoid'te insülin sentezinin yavaşlaması olarak yorumlanmıştır. Bu durum ELISA ölçümü ile paralellik göstermektedir.

İnsülin miktarı P7-28 ELISA ile ölçüldüğünde daha az miktarda olduğu görülmüştür. Pdx-1, insülin ile birlikte ortak eksprese olan, β -hücre olgunlaşması, pankreasın gelişimi ve farklılaşması için gerekli erken belirteç transkripsiyon faktörüdür. İnsülin ekspresyonuna benzer şekilde Pdx-1'in kontrol grubuna göre P7-28 grubu organoidlerinde daha az eksprese edildiği görülmüştür. 2B kültürdeki Pdx-1 gen ekspresyonu yaşlandırma modeli hücrelerinde heterojen karakterde de olsa düşme gözlemlenmiştir. Pdx-1 gen ekspresyonundaki bu düşüş insülin sentezindeki bozulmayı göstermektedir. Aynı zamanda bu durum tip 2 diyabet modeline benzer bir şekilde insülin salgısında bir bozukluk olduğunu göstermektedir.

Beta hücrelerinin sitoplazmasında bulunan glukokinaz, insülin salgılama granülleri ve mitokondri ile ilişkilidir (Arden, Harbottle, Baltrusch, Tiedge, Agius, 2004).

Yükselen ve azalan glukoz oranına göre, hücre metabolizmasını düzenlemesi sebebiyle karbonhidrat metabolizmasında önemli bir yer tutan glukokinaz ve kemirgenlerin pankreas β hücrelerinde glukoz sensörünün bir parçası olarak işlev gören Glut-2 gen ekspresyon seviyesinde artış gözlemlenmesi istenmeyen bir durumdur. İnsülin gen ekspresyonunda olduğu gibi Glut-2 ve Glukokinaz'ın gen ekspresyonu 2B kültürde kontrole göre çok daha yüksek iken organoid kültüründe bu genlerin ekspresyonları kontrol grubu hücrelerin seviyesine inmiştir. Hem insülin hem de Glut-2 ve Glukokinaz'ın organoid kültüründe seviyelerinin 2B kültüre göre ciddi azalması bu hücrelerin yaşlanmaya bağlı olarak hücre dejenerasyonunu işaret etmektedir.

Naiv adacıklar yalnız beta hücrelerinden oluşmayıp diğer hücreler olan alfa, delta ve PPy hücrelerinden de oluşmaktadır. 2B kültürde hücrelerdeki glukagon ekspresyonu P7-28'de yaşlılık 9 kat artmışken yaşlandırma modeli organoidlerde bu ekspresyon yaklaşık 1,3 kat azalma görülmüştür. Halbuki insülin ekspresyonundaki azalış glukagon ekspresyonu seviyesini artırıcı etki yaratması beklenirken, 3B kültürlerde 2B kültürlerdekine aksine azalma gözlemlenmiştir. Glukagon seviyesindeki bu düşüş insülinle bağlantılı olmayıp adacıklardan salgılanan diğer bir hormon olan somatostatinin ekspresyonundaki artış ile ilişkili olabilir. Henquin ve ark. makalesinde insülin, glukagon ve somatostatin seviyelerinin hem yaşlanmada hem de tip 2 diyabette azaldığı vurgulanmıştır (Henquin, Ibrahim, Rahier, 2017). Çalışmamızda somatostatin ekspresyon seviyesi az artmış olmasına karşın bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu durum organoid kültürü P7-28 grubunda yaşlılık fenotipinin oluştuğu yönünde yorumlanmıştır. Polipeptid gen ekspresyonu gruplar arasında bir farklılık göstermemiştir.

Doğrudan mitokondri aktivitesini gösteren Tomm20 seviyesinin azalması mitokondrilerdeki hasarı göstermektedir. Aynı zamanda MCT-4 gen ekspresyon seviyesinin artış organoid kültürü P7-28 grubu hücrelerindeki mitokondri hasarının gerçekleştiğini desteklemektedir. 2B kültürde kontrol grubunda Tomm20 seviyesi anlamlı bir derecede değişmezken bu hücrelerde de MCT-4 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. İstatistiksel anlamlı olmasa da Nrf2 miktarında azalma olması Tomm20 ile ilişkili olduğundan iki genin de seviyesinin düşmesi mitokondride hasar olduğunu desteklemektedir. P7-28 grubundaki Tomm20 ve Nrf2 seviyelerinde azalma meydana gelirken MCT-4 seviyesi artmıştır. Bu

durum elde edilen yaşlılık modelinde mitokondri hasarının meydana geldiğini destekler niteliktedir (Blesa, Prieto-Ruiz, Hernández, Hernández-Yago, 2007).

P7-28 organoid kültür grubunda Ki-67 gen ekspresyon analizinde hücre çoğalmasındaki artışın gözlemlendiği gösterilmiştir. Halbuki 2B kültürde P7-28 grubu hücreleri WST-1 sonuçlarına paralel olarak hücre çoğalmaları yavaşlamıştır. Organoid P7-28 grubunda gözlemlenen Ki67'deki artış beklenmeyen bir bulgu olup hücrelerin çoğaldığını göstermektedir. Ancak bu çoğalan hücreler insülin sekresyonu düşük dejenere hücrelerden oluştuğu için bu açıdan tip 2 diyabet patolojine benzemektedir.

Hücre stres belirteci olan p38 α (MAPK)' in gen ekspresyon seviyesindeki artış P7-28 organoid grubunda yaşlılık fenotipinin gerçekleştiği ve hücrenin stres altına girdiğini göstermektedir. Benzer şekilde 2B P7-28 grubu hücrelerinde p38 α seviyesinde artış oluştuğu gözlemlenmiş ve hücrenin strese girmesi yaşlanmayı destekleyici niteliktedir.

P7-28 grubunda RAGE ve HO1 seviyelerinde istatistiksel olarak belirgin bir artış görülmesede, SOD1 miktarının azalması oksidatif strese maruz kaldığı ve ROS miktarının arttığını göstermektedir. Bu durum organoid yaşlanma modelini elde ettiğimizi doğrular niteliktedir. P7-28 grubunda Duox-1 seviyesinde artış gözlemlenmiştir. Bu durum modelde oksidatif stres oluştuğunu gösterir.

Yapılan literatür taramasında Nox-4 seviyesindeki artışın oksidatif stres ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğundan kaynaklandığı tespit edilmiş olup, çalışmamızda Nox-4 seviyesindeki artış çok belirgin olmasada artış gözlemlendiği belirlenmiştir (Vendrov ve ark., 2015).

5.1. Sınırlılıklar

Bu çalışmada organoid geliştirmek için matrijel kullanılmıştır. Matrijel bir protein matriks yapısına sahip olmasından dolayı yapısı içerisinde başlıca hormon ve sitokinler olmak üzere birçok yüksek moleküler ağırlığa sahip moleküllerin difüzyonunu engelleyebilme kapasitesi bulunmaktadır. Matrijelin proteini tutma özelliği immün boyamalar sırasında antikorun geçirgenliğine izin vermemesi, SASP ve insülin moleküllerinin matrijel içerisinde depolaması ölçümlerde sıkıntı yaratmış ve bu yüzden de standart sapmalarının yüksek olması ile sonuçlanmıştır.

Wang ve ark. yapmış olduğu çalışmada maturasyon yöntemi ile organoidler küçük parçalar haline getirilerek 15 pasaj atlatılarak ortamdan matrijeli uzaklaştırılmıştır. Bu çalışmada yaşlandırma modeli çalışıldığından değişken sayısını en aza indirmek için konjugatif yaşlanma modeli grupta pasaj işlemleri sınırlandırılmıştır. Ancak bunun sonucu olarak matrijel uzaklaştırılamamıştır.

Erişkin kök hücreler organoid oluşturulmada kullanıldığı için çok yavaş çoğalma hızı göstermiştir. Pluripotent kök hücrelerin çok daha hızlı çoğaldığı için bu hücrelerden türetilen organoidler çok kısa bir süre içerisinde gelişirken çalışmamızda kullanılan hücreler yavaş çoğaldığından organoidler hızlı gelişmemekte ve analiz edilebilecek büyüklükteki organoidler ancak 21. günün sonunda elde edilmiştir. Organoidin elde ediliş hızındaki yavaşlılık bir sınırlılıktır.

İmmün boyama ve histolojik analizler için organoidlerin kesit alınması gerektiğinden önce organoidler alkol serilerinden geçirilerek doku takibi yapılmış sonra parafine gmlmştir. Ancak kesit alındığında organoidler yapısal olarak bozulduğu için parafin bloklarından başarılı kesitler alınamamıştır. Bu sebeple yöntem değiştirilerek literatürde de yer alan kriyo kesit yöntemi ile kesitler alınmıştır. Ancak bu yöntem değişikliği sonucunda immün boyamada kullanılması n görülen bazı antikorların yöntemle uyumlu olmadığı görülmüş ve örnekler ilgili antikor ile boyanmamıştır.

Çalışmamızda kullanılan hücreler kök hücre özelliği gösterdiği için çok az da olsa telomeraz enzim aktivitesi bulunmaktadır. Telomerin hedef aldığı replikatif yaşlanmada kök hücrelerin telomer bölgeleri kritik düzeyde kısalmadığı için yaşlanma fenotipi kök hücrelerde oluşmamaktadır. Konjugatif yaşlandırma sırasında hücrelerin farklılaşması, telomeraz enzim aktivitesini kaybettiği için hücre yaşlanmaya gitmektedir. Hücrelerdeki

temleraz aktivitesini ölçmek için çok sayıda hücreye ihtiyaç olduğu için organoid modeli oluştururken hücre sayımız kısıtlı olduğu için telomeraz enzim aktivitesi ölçülememiştir. Organoid geliştirilmesi sırasında 21 gün organoid kültüründe farklılaşma gerçekleştirilmiştir. Ancak literatürde yer alan konu ile ilgili bazı makalelerde bu kültür süresinin 3 aya kadar uzatıldığı görülmüştür. Bu sürecin hücrelerin farklılaşmasını olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir. Ancak yaşlandırma modelinde pasaj atlatılamadığı için ilgili makalelerdeki hücre gruplarının uzun süre kültürü bizim çalışmamızda gerçekleştirilememiştir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bizim bu çalışmadaki amacımız in vitro koşullarda Pax4 ve MafA (musculoaponeurotic genleri aktarılmış sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MafA+ /Pax4+ -sPA-MKH) kullanılarak elde edilen 3B yaşlılık organoid modelinde mitokondri hasarının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız sonucunda 3 farklı yaşlanma modeli geliştirildi. En iyi yaşlanma modelinin konjugatif yaşlanma modeli olduğunu gözlemlendi. Bu yaşlandırma modeli ile organoid modeli oluşturuldu. Organoid modeli içerisinde mitokondri hasarının olduğu ve insülin miktarının azaldığı gözlemlendi. Yaşlılık modeli olarak kullanılabilir bir model olduğu ortaya çıktığı belirlendi. Ancak tip 2 diyabette beklemiş olduğumuz patolojiden çok tip 2 diyabetin gelişimi sırasında gözlemlenen bir patoloji olduğu ortaya çıktı bu durum da en azından yaşlılık modelinin çalıştığını gösteren bir ifade olabilme potansiyeline sahip olduğunu göstermiş olduk.

Geliştirilen bu organoid modellerinin etkinliklerinin değerlendirilmesi yalnız in vitro ortamlarda gerçekleştirilmiştir. Canlı hayvanların kullanılmasıyla yapılacak olan in vivo çalışmalar hem geliştirmiş olduğumuz organoidlerin fonksiyonel pankreas adacık organoidi olduğunu gösterilmesinde çok faydalı olacaktır.

Pankreas adacık organoidlerinin işlevselliği testinde birtakım sorunlarla karşılaşmıştır. Matrijelin kullanılması nedeniyle insülin matriks içerisine tutuklanmış ve bunun sonucu olarak salınım testi gerçekleştirilememiştir. İleride yapılacak çalışmalarla matrijel yerine kullanılabilir insülin gibi proteini difüzyonunu engellemeyen farklı matrikslerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Acun, A., Vural, D. C., & Zorlutuna, P. (2017). A Tissue Engineered Model of Aging: Interdependence and Cooperative Effects in Failing Tissues. *Scientific reports*
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., & Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10114–10118.
- Ansó, E., Weinberg, S. E., Diebold, L. P., Thompson, B. J., Malinge, S., Schumacker, P. T., Liu, X., Zhang, Y., Shao, Z., Steadman, M., Marsh, K. M., Xu, J., Crispino, J. D., & Chandel, N. S. (2017). The mitochondrial respiratory chain is essential for haematopoietic stem cell function. *Nature cell biology*, 19(6), 614–625.
- Aragona M., Maisano R., Panetta S., Giudice A., Morelli M., La Torre I., La Torre F., (2000). Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis, *Int J Oncol*, 17, 981–989.
- Arden, C., Harbottle, A., Baltrusch, S., Tiedge, M., & Agius, L. (2004). Glucokinase is an integral component of the insulin granules in glucose-responsive insulin secretory cells and does not translocate during glucose stimulation. *Diabetes*, 53(9), 2346–2352.
- Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., & Ashcroft, S. J. (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature*, 312(5993), 446–448.
- Baetens, D., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., & Orci, L. (1979). Endocrine pancreas: three-dimensional reconstruction shows two types of islets of langerhans. *Science (New York, N.Y.)*, 206(4424), 1323–1325.
- Bağlar A. (2014). Mezenkimal kök hücrelerden pankreas adacık beta hücrelerine benzer insülin salgılayan hücrelerin rekombinant DNA teknolojisi ile eldesi. Yüksek lisans tezi. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Baldan, J., Houbracken, I., Rooman, I., & Bouwens, L. (2019). Adult human pancreatic acinar cells dedifferentiate into an embryonic progenitor-like state in 3D suspension culture. *Scientific reports*, 9(1), 4040.
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2004). When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation*, 113(1), 8–13.
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(5), 961–976.
- Boj, S. F., Hwang, C. I., Baker, L. A., Chio, I. I., Engle, D. D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvisé, M., Tiriác, H., Spector, M. S., Gracanin, A., Oni, T., Yu, K. H., van Boxtel, R., Huch, M., Rivera, K. D., Wilson, J. P., Feigin, M. E., Öhlund, D., Handly-Santana, A., ... Tuveson, D. A. (2015). Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*, 160(1-2), 324–338.
- Bonora, M., Ito, K., Morganti, C., Pinton, P., & Ito, K. (2018). Membrane-potential compensation reveals mitochondrial volume expansion during HSC commitment. *Experimental hematology*, 68, 30–37.e1.
- Bonora, M., Patergnani, S., Rimessi, A., De Marchi, E., Suski, J. M., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Missiroli, S., Poletti, F., Wieckowski, M. R., & Pinton, P. (2012). ATP synthesis and storage. *Purinergic signalling*, 8(3), 343–357.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., & Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science (New York, N.Y.)*, 179(4068), 77–79.

- Brink, T. C., Sudheer, S., Janke, D., Jagodzinska, J., Jung, M., & Adjaye, J. (2008). The origins of human embryonic stem cells: a biological conundrum. *Cells, tissues, organs*, 188(1-2), 9–22.
- Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D. M., & Powers, A. C. (2005). Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 53(9), 1087–1097.
- Buck, M. D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R. I., Curtis, J. D., Chang, C. H., Sanin, D. E., Qiu, J., Kretz, O., Braas, D., van der Windt, G. J., Chen, Q., Huang, S. C., O'Neill, C. M., Edelson, B. T., Pearce, E. J., Sesaki, H., Huber, T. B., Rambold, A. S., & Pearce, E. L. (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*, 166(1), 63–76.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., & Caicedo, A. (2006). The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2334–2339.
- Cadenas, E., & Davies, K. J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*, 29(3-4), 222–230.
- Campbell, J. E., & Newgard, C. B. (2021). Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(2), 142–158.
- Campisi J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120(4), 513–522.
- Can A. (2008). A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turkish journal of haematology: official journal of Turkish Society of Haematology*, 25(2), 57–59.
- Can A. (2014). Kemik İliği ve Kordon Kanı Kök Hücreleri, Kök Hücre Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevi, p.327-426.
- Chen, J. H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S. E., Williams, G. H., & Hales, C. N. (2004). Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 279(47), 49439–49446.
- Chen, Q., & Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(10), 4130–4134.
- Chikada, H., Ito, K., Yanagida, A., Nakauchi, H., & Kamiya, A. (2015). The basic helix-loop-helix transcription factor, Mist1, induces maturation of mouse fetal hepatoblasts. *Scientific reports*, 5, 14989.
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO reports*, 15(11), 1139–1153.
- Clevers, H. (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165, 1586–1597.
- Clevers, H. 2016. Modeling development and disease with organoids. *Cell*. 165:1586–1597. [http://dx .doi.org /10 .1016 /j .cell .2016 .05 .082](http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082).
- Cook, D. L., & Hales, C. N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature*, 311(5983), 271–273.
- Corrò, C., Novellademunt, L., & Li, V. (2020). A brief history of organoids. *American journal of physiology. Cell physiology*, 319(1), C151–C165.
- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., & Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mechanisms of ageing and development*, 125(10-11), 827–848.

- Cristofalo, V. J., Lorenzini, A., Allen, R. G., Torres, C., & Tresini, M. (2004). Replicative senescence: a critical review. *Mechanisms of ageing and development*, 125(10-11), 827–848.
- Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., & Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature protocols*, 4(12), 1798–1806.
- DeFronzo R. A. (2009). Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4), 773–795.
- DeFronzo R. A. (2010). Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*, 53(7), 1270–1287.
- DeFronzo, R. A. et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1, 15019 (2015).
- Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K., & Wahl, G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & development*, 8(21), 2540–2551.
- Dierick, J. F., Kalume, D. E., Wenders, F., Salmon, M., Dieu, M., Raes, M., Roepstorff, P., & Toussaint, O. (2002). Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence. *FEBS letters*, 531(3), 499–504.
- Dimri, G. P., Itahana, K., Acosta, M., & Campisi, J. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Molecular and cellular biology*, 20(1), 273–285.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. j., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47–95.
- Duan, J., Duan, J., Zhang, Z., & Tong, T. (2005). Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37(7), 1407–1420.
- Dutta, D., Heo, I., & Clevers, H. (2017). Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends in molecular medicine*, 23(5), 393–410.
- Facchin, F., Bianconi, E., Romano, M., Impellizzeri, A., Alviano, F., Maioli, M., Canaider, S., & Ventura, C. (2018). Comparison of Oxidative Stress Effects on Senescence Patterning of Human Adult and Perinatal Tissue-Derived Stem Cells in Short and Long-term Cultures. *International journal of medical sciences*, 15(13), 1486–1501.
- Floryk, D., & Houstěk, J. (1999). Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is suitable for cytofluorometric measurements of mitochondrial membrane potential in cells treated with digitonin. *Bioscience reports*, 19(1), 27–34.
- Fortier L. A. (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Veterinary surgery: VS*, 34(5), 415–423.

- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., & Kulagina, N. N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, 4(5), 267–274.
- Gafni, Y., Turgeman, G., Liebergal, M., Pelled, G., Gazit, Z., & Gazit, D. (2004). Stem cells as vehicles for orthopedic gene therapy. *Gene therapy*, 11(4), 417–426.
- Gaisano H. Y. (2017). Recent new insights into the role of SNARE and associated proteins in insulin granule exocytosis. *Diabetes, obesity & metabolism*, 19 Suppl 1, 115–123.
- Gkogkolou, P., & Böhm, M. (2012). Advanced glycation end products: Key players in skin aging?. *Dermato-endocrinology*, 4(3), 259–270.
- Glotzbach, J. P., Wong, V. W., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2011). Regenerative medicine. *Current problems in surgery*, 48(3), 148–212.
- Hachitanda, Y., & Tsuneyoshi, M. (1994). Neuroblastoma with a distinct organoid pattern: a clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Human pathology*, 25(1), 67–72.
- Hardikar, A.A. (2016). Pancreatic Islet Biology, First Edition (Springer International Publishing).
- Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458–460.
- Harman D. (2001). Aging: overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 1–21.
- Harman D. (2003). The free radical theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*, 5(5), 557–561.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 25, 585–621.
- Henquin J. C. (2009). Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia*, 52(5), 739–751.
- Henquin, J. C., Ibrahim, M. M., & Rahier, J. (2017). Insulin, glucagon and somatostatin stores in the pancreas of subjects with type-2 diabetes and their lean and obese non-diabetic controls. *Scientific reports*, 7(1), 11015.
- Hirschey, M. D., & Zhao, Y. (2015). Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 14(9), 2308–2315.
- Hohwieler, M., Illing, A., Hermann, P. C., Mayer, T., Stockmann, M., Perkhofer, L., Eiseler, T., Antony, J. S., Müller, M., Renz, S., Kuo, C. C., Lin, Q., Sandler, M., Breunig, M., Kleiderman, S. M., Lechel, A., Zenker, M., Leichsenring, M., Rosendahl, J., Zenke, M., ... Kleger, A. (2017). Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. *Gut*, 66(3), 473–486.
- Huang, S. J., Fu, R. H., Shyu, W. C., Liu, S. P., Jong, G. P., Chiu, Y. W., Wu, H. S., Tsou, Y. A., Cheng, C. W., & Lin, S. Z. (2013). Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell transplantation*, 22(4), 701–709.
- Hunt, K. J., & Schuller, K. L. (2007). The increasing prevalence of diabetes in pregnancy. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 34(2), 173–vii.
- Ilic, D., & Polak, J. M. (2011). Stem cells in regenerative medicine: introduction. *British medical bulletin*, 98, 117–126.
- Jennifer L. Hu et al. 2018. Opportunities for organoids as new models of aging, *Journal Of Cell Biology*.

- Jin, G., Xu, C., Zhang, X., Long, J., Rezaeian, A. H., Liu, C., Furth, M. E., Kridel, S., Pasche, B., Bian, X. W., & Lin, H. K. (2018). Atad3a suppresses Pink1-dependent mitophagy to maintain homeostasis of hematopoietic progenitor cells. *Nature immunology*, *19*(1), 29–40.
- Jo, J., Choi, M. Y., & Koh, D. S. (2007). Size distribution of mouse Langerhans islets. *Biophysical journal*, *93*(8), 2655–2666.
- Jonsson J, Carlsson L, Edlund T ve diğ. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 1994 Oct 13;371(6498):606-9.
- Kakni, P., Hueber, R., Knoops, K., López-Iglesias, C., Truckenmüller, R., Habibovic, P., & Giselbrecht, S. (2020). Intestinal Organoid Culture in Polymer Film-Based Microwell Arrays. *Advanced biosystems*, *4*(10), e2000126.
- Katajisto, P., Döhla, J., Chaffer, C. L., Pentimikko, N., Marjanovic, N., Iqbal, S., Zoncu, R., Chen, W., Weinberg, R. A., & Sabatini, D. M. (2015). Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science (New York, N.Y.)*, *348*(6232), 340–343.
- Katsarou, A. et al. Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Prim.* *3*, 17016 (2017).
- Kavanagh, K., Sherrill, C., Ruggiero, A., Block, M., Vemuri, R., Davis, M., & Olivier, A. (2021). Biomarkers of senescence in non-human primate adipose depots relate to aging. *GeroScience*, *43*(1), 343–352.
- Kavanagh, K., Sherrill, C., Ruggiero, A., Block, M., Vemuri, R., Davis, M., & Olivier, A. (2021). Biomarkers of senescence in non-human primate adipose depots relate to aging. *GeroScience*, *43*(1), 343–352.
- Kavanagh, K., Sherrill, C., Ruggiero, A., Block, M., Vemuri, R., Davis, M., & Olivier, A. (2021). Biomarkers of senescence in non-human primate adipose depots relate to aging. *GeroScience*, *43*(1), 343–352.
- Khademhosseini, A., & Langer, R. (2016). A decade of progress in tissue engineering. *Nature protocols*, *11*(10), 1775–1781.
- Kim, M. J., Hwang, J. W., Yun, C. K., Lee, Y., & Choi, Y. S. (2018). Delivery of exogenous mitochondria via centrifugation enhances cellular metabolic function. *Scientific reports*, *8*(1), 3330.
- Kitajima, Y., Suzuki, N., Nunomiya, A., Osana, S., Yoshioka, K., Tashiro, Y., Takahashi, R., Ono, Y., Aoki, M., & Nagatomi, R. (2018). The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells. *Stem cell reports*, *11*(6), 1523–1538.
- Krtolica, A., & Campisi, J. (2002). Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *34*(11), 1401–1414.
- Kubota, Y., Kleinman, H. K., Martin, G. R., & Lawley, T. J. (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *The Journal of cell biology*, *107*(4), 1589–1598.
- Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*, *113* (Pt 20), 3613–3622.
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science (New York, N.Y.)*, *345*(6194), 1247125.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, *501*(7467), 373–379.
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, *260*(5110), 920–926.

Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R. (2009). *Essentials of Stem Cell Biology* (Elsevier, San Diego, CA, ed. 2,

Laugi H. Reprogrammed Stem Cells and Ageing Suppression. *Int J Stem Cells Res.* 2020; 4(1): 006-008

LeBleu, V. S., Macdonald, B., & Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 232(9), 1121–1129.

Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell*, 5(2), 187–195.

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194–217.

Lysy, P. A., Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. (2013). Making β cells from adult cells within the pancreas. *Current diabetes reports*, 13(5), 695–703.

Matsumura, T., Zerrudo, Z., & Hayflick, L. (1979). Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA synthesis and morphology. *Journal of gerontology*, 34(3), 328–334.

McCauley, H. A., & Wells, J. M. (2017). Pluripotent stem cell-derived organoids: using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development (Cambridge, England)*, 144(6), 958–962.

Mense, M. G., & Rosol, T. J. (2018). *Endocrine Pancreas. Boorman's Pathology of the Rat*, 695–704.

Michael J. Kratochvil et. al. Engineered materials for organoid systems, *Nature* September, 2019.

Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., & Attardi, G. (1999). Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science (New York, N.Y.)*, 286(5440), 774–779.

Mitalipov, S., & Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 114, 185–199.

Mo, J. S., Park, H. W., & Guan, K. L. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO reports*, 15(6), 642–656.

Morgani, S. M., Canham, M. A., Nichols, J., Sharov, A. A., Migueles, R. P., Ko, M. S., & Brickman, J. M. (2013). Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell reports*, 3(6), 1945–1957.

Mundra, V., Gerling, I. C., & Mahato, R. I. (2013). Mesenchymal stem cell-based therapy. *Molecular pharmaceutics*, 10(1), 77–89.

Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Experimental & molecular medicine*, 45(11), e54.

Ogryzko, V. V., Hirai, T. H., Russanova, V. R., Barbie, D. A., & Howard, B. H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Molecular and cellular biology*, 16(9), 5210–5218.

Oh, J., Lee, Y. D., & Wagers, A. J. (2014). Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature medicine*, 20(8), 870–880.

Okarma T., 1998. Human primordial stem cells, *Hastings Cent Rep*, 104, 30.

Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Valentine, T., & Swarm, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *The Journal of experimental medicine*, 145(1), 204–220.

- Pan, F. C., & Wright, C. (2011). Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 240(3), 530–565.
- Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews*, 94(4), 1287–1312.
- Poitout, V., and Robertson, R. P. (2002) *Endocrinology* 143, 339–342
- Presley, A. D., Fuller, K. M., & Arriaga, E. A. (2003). MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 793(1), 141–150.
- Rafalski, V. A., Mancini, E., & Brunet, A. (2012). Energy metabolism and energy-sensing pathways in mammalian embryonic and adult stem cell fate. *Journal of cell science*, 125(Pt 23), 5597–5608.
- Rahier, J., Goebbels, R. M., & Henquin, J. C. (1983). Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia*, 24(5), 366–371.
- Raikwar, S. P., Kim, E. M., Sivitz, W. I., Allamargot, C., Thedens, D. R., & Zavazava, N. (2015). Human iPS cell-derived insulin producing cells form vascularized organoids under the kidney capsules of diabetic mice. *PLoS one*, 10(1), e0116582
- Rodemann, H. P., Bayreuther, K., Francz, P. I., Dittmann, K., & Albiez, M. (1989). Selective enrichment and biochemical characterization of seven human skin fibroblasts cell types in vitro. *Experimental cell research*, 180(1), 84–93.
- Rorsman, P., & Huisin, M. O. (2018). The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 14(7), 404–414.
- Ross MH, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas. Lippincott Williams & Wilkins. Çev. Barış Baykal, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.
- Sahin E, DePinho RA. 2012. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:397–404.
- Sakula A. (1988). Paul Langerhans (1847-1888): a centenary tribute. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 81(7), 414–415.
- Samols, E., Weir, G. C. & Bonner-Weir, S. (1983) in *Glucagon II*, ed. Lefebvre, P. J. (Springer, Berlin), pp. 133-174.
- Sarugaser, R., Hanoun, L., Keating, A., Stanford, W. L., & Davies, J. E. (2009). Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS one*, 4(8), e6498.
- Satija, N. K., Gurudutta, G. U., Sharma, S., Afrin, F., Gupta, P., Verma, Y. K., Singh, V. K., & Tripathi, R. P. (2007). Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. *Stem cells and development*, 16(1), 7–23.
- Scaduto, R. C., Jr, & Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal*, 76(1 Pt 1), 469–477.
- Scaduto, R. C., Jr, & Grotyohann, L. W. (1999). Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophysical journal*, 76(1 Pt 1), 469–477.
- Schebalin, M., Said, S. I. & Makhlof, G. M. (1977) *Am. J. Physiol.* 232, E197-E200.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593–602.

- Signer, R. A., & Morrison, S. J. (2013). Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. *Cell stem cell*, 12(2), 152–165.
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., & Bissell, M. J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development (Cambridge, England)*, 128(16), 3117–3131.
- Spooner, B. S., Walther, B. T., & Rutter, W. J. (1970). The development of the dorsal and ventral mammalian pancreas in vivo and in vitro. *The Journal of cell biology*, 47(1), 235–246.
- Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., & Unger, R. H. (1982). Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes*, 31(8 Pt 1), 694–700.
- Stefan, Y., Orci, L., Malaisse-Lagae, F., Perrelet, A., Patel, Y., & Unger, R. H. (1982). Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans. *Diabetes*, 31(8 Pt 1), 694–700.
- Strait, J. B., & Lakatta, E. G. (2012). Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure. *Heart failure clinics*, 8(1), 143–164.
- TEMĐ Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. TEMĐ Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu-2018, 10. Baskı Ankara, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2018.
- Terman, A., & Brunk, U. T. (2006). Oxidative stress, accumulation of biological 'garbage', and aging. *Antioxidants & redox signaling*, 8(1-2), 197–204.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147.
- Tomita T. (1999). Immunocytochemical Localization of Glucose Transporter-2 (GLUT-2) in Pancreatic Islets and Islet Cell Tumors. *Endocrine pathology*, 10(3), 213–221.
- Toussaint, O., Houbion, A., & Remacle, J. (1992). Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture. *Mechanisms of ageing and development*, 65(1), 65–83.
- Unger, R. H. (2003) *Endocrinology* 144, 5159–5165
- Van Zant, G., & Liang, Y. (2003). The role of stem cells in aging. *Experimental hematology*, 31(8), 659–672.
- Vendrov, A. E., Vendrov, K. C., Smith, A., Yuan, J., Sumida, A., Robidoux, J., Runge, M. S., & Madamanchi, N. R. (2015). NOX4 NADPH Oxidase-Dependent Mitochondrial Oxidative Stress in Aging-Associated Cardiovascular Disease. *Antioxidants & redox signaling*, 23(18), 1389–1409.
- Voet D, Voet JG (2011). *Biochemistry* (4th ed.). New York: Wiley.
- Von Zglinicki T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 339–344.
- Von Zglinicki, T., Pilger, R., & Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free radical biology & medicine*, 28(1), 64–74.
- Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Döcke, W., & Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence. *Experimental cell research*, 220(1), 186–193.
- Votanopoulos, K. I., Forsythe, S., Sivakumar, H., Mazzocchi, A., Aleman, J., Miller, L., Levine, E., Triozzi, P., & Skardal, A. (2020). Model of Patient-Specific Immune-Enhanced Organoids for Immunotherapy Screening: Feasibility Study. *Annals of surgical oncology*, 27(6), 1956–1967.
- Vukicevic, S., Kleinman, H. K., Luyten, F. P., Roberts, A. B., Roche, N. S., & Reddi, A. H. (1992). Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in

interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Experimental cell research*, 202(1), 1–8.

Wang, D., Wang, J., Bai, L., Pan, H., Feng, H., Clevers, H., & Zeng, Y. A. (2020). Long-Term Expansion of Pancreatic Islet Organoids from Resident Procr⁺ Progenitors. *Cell*, 180(6), 1198–1211.e19.

Xinaris, C., Benedetti, V., Rizzo, P., Abbate, M., Corna, D., Azzollini, N., Conti, S., Unbekandt, M., Davies, J. A., Morigi, M., Benigni, A., & Remuzzi, G. (2012). In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 23(11), 1857–1868.

Yi, S., Ding, F., Gong, L., & Gu, X. (2017). Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Current stem cell research & therapy*, 12(3), 233–246.

Zhang, B. Y., Korolj, A., Lai, B. F. L. & Radisic, M. Advances in organ- on-a- chip engineering. *Nat. Rev. Mat.* 3, 257–278 (2018).

Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., D'Amico, D., Ropelle, E. R., Lutolf, M. P., Aebbersold, R., Schoonjans, K., Menzies, K. J., & Auwerx, J. (2016). NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6292), 1436–1443.






8. ÖZGEÇMİŞ

<u>Kişisel Bilgiler</u>	
Adı Soyadı	Deren ASLAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Kocasinan/KAYSERİ 02/12/1996
İletişim Adresi	Orhan Mah. Damla sok. FND Smart Side 2 C Blok No:15 Kat:3 Daire:14 İzmit/KOCAELİ
Telefon	0506 163 92 73
E-posta	derennaslannn@gmail.com
Eğitim Bilgileri (Tarih Sırasına Göre)	09/2018-Devam ediyor Yüksek Lisans Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı Kocaeli/TÜRKİYE 09/2014-06/2018 Lisans Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Afyonkarahisar/TÜRKİYE 09/2010-06/2014 Lise Kocasinan Anadolu Lisesi, Kayseri/TÜRKİYE
Mesleki Deneyim/ İşyeri Bilgileri	-
Yabancı Dil Bilgileri	İngilizce
Üye Olduğu Mesleki / Sosyal Kuruluşlar	Kök Hücre ve Hücresel Tedaviler Derneği
<u>Bilimsel Etkinlikler</u>	
Makaleler*	-
Projeler	2018-2020 Tübitak-1001- İn-vitro sisplatin stresine maruz bırakılan böbrek mikroçevresi ile indüklenen Wharton Jeli kaynaklı mezenkimal kök hücre eksozomlarının sisplatin nefrotoksitesisi üzerine iyileştirici etkilerinin araştırılması- (Bursiyer Öğrenci)
Bildiriler	06-10 December 2020- 9th international molecular biology and biotechnology congress (Sözlü Bildiri)
Ödüller	-
Diğer	-

EKLER

EK.1 Etik Kurul Onayı

	<p style="text-align: center;">T.C. KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ</p> <p style="text-align: center;">GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</p>	 			
Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ			
	Telefon	0262 303 74 50			
	Faks	0262 303 74 63			
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr			
Başvuru Bilgileri	Araştırmanın Adı	Endokrin Pankreas Organoid Yaşlanma Modelinde Mitokondri Hasarının İncelenmesi			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2020/46			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Dr. Öğretim Üyesi Gökhan DURUKSU			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Biyoteknoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM)			
	Destekleyici	TÜBİTAK-KÜ BAPB			
	Araştırmanın Türü	Yüksek Lisans Tezi			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>
Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama	
	Başvuru Dilekçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Başvuru Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Araştırmanın Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Hücre veya doku kültürü çalışması	
	Araştırma Protokolü	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Araştırma Bütçesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Literatür Örneği	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Taahhütname	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	İzin Belgeleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Özgeçmişler	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>			
KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu		Belge Kodu Onay formu	Rev. Tarihi / No.su: 12.02.2020/KOGDEK01.5	Sayı 1/3	

EK.1 Etik Kurul Onayı (Devamı)

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2020/22	Proje No: 2020/46	Tarih: 15/11/2020			
	Dr. Öğretim Üyesi Gökhan DURUKSU sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*					
Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi					
Etik Kurul Üyeleri						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Toplantıda Bulunma	İmza
Prof. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yusufhan YAZIR Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ceyla ERALDEMİR Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Çiğdem VURAL Üye	Patoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Evren DEMİRSOY Üye	Dermatoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Nurettin Özgür DOĞAN Üye	Acil Tıp	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Cem CERİT Üye	Psikiyatri	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Enver Alper SİNANOĞLU Üye	Ağız Diş Ve Çene Radyolojisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Aslıhan AKPINAR Üye	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
* Gereke ve öneriler:						
KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu				Belge Kodu	Revizyon / No. say	Sayfa
				Onay formu	12.02.2020/KÜGOKAEK013	2/2

Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen şekilde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun şekilde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalandı (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 bildirimler eklendi.
- Teze ait intihal raporu eklendi.

..... / / 2021

Yazar

İmza

..... / / 2021

Danışman

İmza