

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMMORTAL BETA HÜCRE HATTI KAYNAKLI  
MİKROVEZİKÜLLERİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN  
İNSÜLİN ÜRETEN HÜCRELERE FARKLILAŞMA  
POTANSİYELİNE ETKİSİ**

**Esra ALBAYRAK**

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

**BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2018



T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İMMORTAL BETA HÜCRE HATTI KAYNAKLI  
MİKROVEZİKÜLLERİN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN  
İNSÜLİN ÜRETEN HÜCRELERE FARKLILAŞMA  
POTANSİYELİNE ETKİSİ**

**Esra ALBAYRAK**

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

**BİLİM UZMANLIĞI TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU

KOCAELİ

2018

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
(Tez Onay Sayfası)

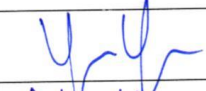
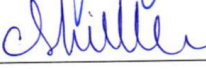

Tez Adı: İmmortal Beta Hücre Hattı Kaynaklı Mikroveziküllerin Mezenkimal Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeline Etkisi

Tez Yazarı: Esra ALBAYRAK

Tez savunma tarihi: 05.06.2018

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU

İş bu çalışmada jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı Jüri Üyeleri		İmzası
Ünvanı Adı Soyadı		
Üye	Doç. Dr. Yusufhan YAZIR	
Üye	Doç. Dr. Ayten TÜRKKANI	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.... / .... / 2018

Prof.Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ÖZET

### **İmmortal Beta Hücre Hattı Kaynaklı Mikroveziküllerin Mezenkimal Kök Hücrelerin İnsülin Üreten Hücrelere Farklılaşma Potansiyeline Etkisi**

**Amaç:** Ortak kültür yöntemi kullanılarak insan Wharton jeli (göbek bağı) kaynaklı mezenkimal kök hücre (iWJ-MKH)'lerin beta hücrelerinden salınan eksozomlar ile insülin sentezleyen beta benzeri hücrelere farklılaşması amaçlanmıştır. Diyabet, günümüzde toplumun her kesimini etkileyen ve henüz kesin bir tedavisi bulunamamış önemli bir sorundur. Bu hastaların %10'unu oluşturan Diabetes Mellitus Tip 1 hastalarında devamlı olarak gerçekleşen beta hücre yıkımı sonucunda insülin azlığı veya yokluğu oluşur. Glikoz homeostazının tekrar sağlanabilmesi için hücresel tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Kök hücrelerin farklılaşma özellikleri kullanılarak diyabet hastalığında kaybedilen beta hücrelerini yerine koyma, sıkça araştırılan konulardan birisidir. Kök hücrelerin farklılaşmaya yönlendirilmesinde, bulunduğu mikroçevrenin etkinliği birçok çalışmayla denenmiştir. Hücrelerden mikroçevrelere salgılanan veziküllerden biri olan eksozomların hücreler arası iletişimde rolü olduğu ve içeriğinde salgılandığı hücreye özgü gen transkripsiyon faktörlerinin ve proteinlerin bulunduğu gösterilmiştir.

**Yöntem:** Bu doğrultuda iWJ-MKH'ler çoğaltıldıktan sonra, kök hücre karakterizasyonu için adipojenik, osteojenik, kondrojenik hücre farklılaşma çalışması ve akış sitometri ile analiz edilmiştir. iWJ-MKH'ler kimyasal uyarıcılar ile endokrin hücre farklılaşmasına yönlendirilmiştir. Bu sürece ek olarak beta hücrelerinden elde edilen eksozomlar kimyasal olarak uyarılmış kök hücreler ile ortak kültüre alınmıştır. Hedgehog sinyal yolağının susturulması için GANT61 eksozomlar ile birlikte inkübe edilerek eksozomlar modifiye edilmiş ve hücrelerde aktif olan Hedgehog sinyal yolağı da bu modifiye eksozomların kültür ortamına eklenmesiyle susturulmuştur.

**Bulgular:** Hücreler 21 gün boyunca endokrin hücre farklılaştırma sürecine alınmış ve gen düzeyinde hücrelerin farklılaştığı gözlemlenmiştir. Kimyasal uyarı grubu ile Kimyasal uyarı + Eksozom grubu hücreleri karşılaştırılmış ve beta hücre belirteçlerinin gen

ekspresyonları açısında iki grup arasında belirgin bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Bu durum eksozomların kimyasal uyarıcıların varlığında hücre farklılaşması yönünde belirgin bir etkisinin olmadığını göstermektedir. GANT61 ile modifiye edilen eksozomların kullanımı sonucunda MKH'lerde Hedgehog sinyal yolağı susmuş ve GANT61 + Kimyasal uyarı + Eksozom grubu hücrelerde SHH1 ekspresyonu 4,17 kat düşmüştür. Susmanın gerçekleştiği hücre grubunda, susturulmamış hücre grubuna göre İnsülinin 1,8 kat ve Ngn3'ün 4,32 kat daha yüksek ifade edildiği belirlenmiştir ( $p<0,05$ ).

**Sonuç:** Bu çalışmada eksozomlar kimyasal bir inhibitörle modifiye edilerek kök hücrelerde Hedgehog sinyal yolağının susturulacağı ve bu yolağın etkisizleşmesiyle iWJ-MKH'lerinin endokrin hücrelere farklılaşması veriminin artırılacağı ortaya konmuştur.

**Anahtar kelimeler:**

Endokrin hücre; Eksozom; Farklılaşma; Hedgehog sinyal yolağı; İnhibisyon; Kök hücre

## ABSTRACT

### **The Effect of Immortal Beta Cell Line Microvesicles on Insulin-Producing Cell Differentiation of Mesenchymal Stem Cells**

**Aim:** It was aimed to differentiate human Wharton's jelly mesenchymal stem cells (hWJ-MSCs) by co-culture with exosomes derived from beta cells into insulin-secreting beta-like cells. Diabetes is a critical issue that affects every part of society today without any definitive treatment yet. In Diabetes Mellitus Type 1 patients, which constitute 10% of these patients, insulin deficiency or absence occurs as a result of continuous beta cell disruption. Cellular therapies are being developed to restore glucose homeostasis in this patients. Replacing beta cells lost in diabetes using the stem cells after the differentiation is one of the hot researched topics. During the commitment of stem cells to differentiate, the effect of micro-environment has been practicing in many studies. It has been shown that exosomes, one of the micro-vesicles secreted from the cells, play a role in intercellular communication and in the differentiation induction with their content of cell-specific transcription factors and proteins.

**Method:** In this direction, hWJ-MSCs were cultured, and the cells were characterized by the differentiation into adipogenic, osteogenic, chondrogenic cell lines and flow cytometry. hWJ-MSCs were committed to endocrine cell differentiation with chemical stimuli. In addition to this process, exosomes obtained from 1.1B4 beta cells were co-cultured with chemically stimulated stem cells. To silence the Hedgehog signal pathway, the exosomes were modified by incubation with GANT61. Exosomes with GANT61 was used to silence the hedgehog signal pathway, which was still active in hWJ-MSCs.

**Results:** The cells at 21th day of the endocrine differentiation were collected and differentiation was confirmed by gene expression analyses. Compared with the chemical stimulant group, the chemical stimuli + exosomal group cells were compared and there was

no significant difference between them in terms of gene expression of beta cell markers ( $p > 0,05$ ). This suggests that exosomes did not have a significant effect on cell differentiation in the presence of chemical stimulants. In the exosomes modified with GANT61, the hedgehog signal pathway in MSCs was inactivated and the expression of SHH1 in GANT61+Chemical stimulation+Exosomal group cells decreased by 4.17 fold. It was determined that insulin expression increased by 1.8 times and Ngn3 expression was improved by 4.32 times compared to that in the non-silent group ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion:** In this study, exosomes were modified with a chemical inhibitor, and Hedgehog signaling pathway in stem cells was achieved to be silenced, and the differentiation efficiency of hWJ-MSCs into endocrine cells could be improved by inactivating this pathway.

**Key Words:**

Endocrine cells; Exosomes; Differentiation; Hedgehog signaling pathway; Inhibition; Stem cell



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini, önerilerini ve anlayışını hiç esirgemeyen, bana her konuda yardımcı olan başta bölüm başkanı hocam Sayın Doç. Dr. Yusufhan YAZIR'a, tez danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her türlü olumsuz duruma anlayışla ve arkadaşça yaklaşarak çözüm bulabilen, harcadığı tüm emekler için danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Gökhan DURUKSU'ya;

Güler yüzü ile bilgilerini bizimle paylaşan Sayın Dr. Öğretim Üyesi Gülçin GACAR'a, bizlerle bilgilerini paylaşmaktan çekinmeyen Dr. Öğretim Üyesi Zehra Seda ÜNAL HALBUTOĞULLARI'na;

Bilgi birikimini ve tecrübelerini her daim benimle paylaşan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, halen beraber çalıştığım hocam Sayın Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e bana yaptıkları tüm katkılardan dolayı sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

KÖGEM Laboratuvarlarında beraber öğrenip beraber çalıştığımız, birbirimize her zaman destek olduğumuz Ahmet ÖZTÜRK, Ceren ÖZEL, Babek MAHALZADE, Nilbeste BEKİROĞLU, Merve ÇEB GÖRGÜÇ'e, İrem YILMAZ BAŞARAN'a, Cansu SUBAŞI DEMİR'e, Gizem TURAÇ KARAKURT'a, Çiğdem İNCİ AYDEMİR'e ve Gülay ERMAN'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Ellerinden gelenin fazlasını yapıp benim bu günlere gelmemi sağlayan, güvenlerini her zaman hissettiren, doğru bildiğim yolda gitmemi destekleyen babam Birol ALBAYRAK, annem Sema ALBAYRAK ve ablam Ezgi ALBAYRAK UZUN'a tüm kalbimle sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

24 / 05 / 2018

Esra ALBAYRAK

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
ÇİZİMLER DİZİNİ .....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Kök Hücreler.....	5
1.2.1. Kök Hücre Çeşitleri .....	7
1.3. Pankreas Gelişimi .....	12
1.4. Diyabet.....	14
1.4.1. Diyabetin Tedavisi ve Kök Hücreler .....	15
1.5. Eksozom.....	17
1.6. GANT61 .....	21
2. AMAÇ.....	21
3. YÖNTEM.....	22
3.1. İnsan Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu .....	22
3.2. İnsan Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu.....	23
3.2.1. iWJ-MKH'lerin İmmünfloresan Analizi .....	23
3.2.2. iWJ-MKH'lerin Akış Sitometri ile Analizi .....	23
3.2.3. iWJ-MKH'lerin <i>In Vitro</i> Farklılaştırılması.....	24
3.3. 1.1 B4 Beta Hücre Hattı Kültürü .....	25
3.4. Eksozomların İzolasyonu.....	26
3.5. Eksozom Karakterizasyonu .....	26
3.5.1. Eksozom Protein Konsantrasyonu.....	26
3.5.2. Eksozomların Akış Sitometri ile Karakterizasyonu .....	26
3.5.3. Eksozomlardan RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....	27
3.6. Eksozomların GANT61 ile Modifikasyonu.....	27
3.7. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	27

3.8.	Endokrin Hücre Farklılaşması .....	28
3.9.	Kök Hücreler ile Eksozomların Ortak Kültürü .....	29
3.9.1.	Hücre Morfolojileri.....	29
3.9.2.	İmmünfloresan Boyamalar .....	30
3.9.3.	Gen Ekspresyon Analizleri.....	30
3.10.	İstatistiksel analiz.....	32
4.	BULGULAR .....	33
4.1.	İzole Edilen iWJ-MKH'ler ve Karakterizasyonu .....	33
4.2.	1.1 B4 Beta Hücre Hattı Kültürü .....	37
4.3.	Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu .....	38
4.4.	Ortak Kültür Sonuçları.....	40
4.4.1.	Mikroskopi Görüntüleri.....	40
4.4.2.	İmmün Floresan Boyamalar .....	41
5.	TARTIŞMA .....	46
6.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	50
	ÖZGEÇMİŞ.....	62
	EKLER .....	65

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALS: Amyotrofik Lateral Skleroz

ASMA: Alfa Smooth Muscle Actin

CD: Cluster of Differentiation

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

DM: Diabetes Mellitus

DMD: Duchenne Musküler Distrofi

EGF: Epidermal Growth Factor

EV: Ekstraselüler Vezikül

EKH: Embriyonik Kök Hücre

FBS: Fetal Bovine Serum

GATA4: GATA Binding Protein 4

GVHD: Graft versus Host Disease

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

HKH: Hematopoietik Kök Hücre

IVF: *in vitro* Fertilizasyon

iWJ-MKH: İnsan Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

Ngn3: Neurogenin 3

MVE: Multiveziküler Endozom

Pax4: Paired Box Gene 4

PBS: Fosfat Salin Tamponu

P/S: Penisilin / Streptomisin

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pdx1: Pancreatic and Duodenal Homeobox Gene 1

SSEA-3: Stage-Specific Embryonic Antigen-3

SSEA-4: Stage-Specific Embryonic Antigen-4

SHH: Sonic Hedgehog

Sox9: Sry (Sex-Determining Region Y)-Box 9

TERT: Telomerase Reverse Transcriptase

uPKH-iPS: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre/Induced Pluripotent Stem Cell

## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1	Diyabetin tedavisinde kök hücre esaslı yaklaşımlar.....	3
Çizim 1.2.	Kök hücre sınıflandırması.....	7
Çizim 1.3.	Pankreas embriyolojisinde moleküler yollar.....	13
Çizim 1.4.	Mikroveziküller, multiveziküler endozomlar ve eksozomların şematik görünümü.....	18
Çizim 1.5.	Plazma membranı kaynaklı mikroveziküller (a), eksozomlar (b), CD63 pozitif olan eksozom ve mikroveziküller (c).....	19
Çizim 1.6.	Eksozom-hücre etkileşimi.....	20
Çizim 4.1.	İnsan Wharton jeli kaynaklı kök hücrelerin akış sitometri ile analizi.....	33
Çizim 4.2.	iWJ-MKH'lerin kök hücre belirteçlerinin boyama sonuçları.....	34
Çizim 4.3.	iWJ-MKH'lerin adipojenik hücre farklılaşma çalışması.....	35
Çizim 4.4.	iWJ-MKH'leri osteojenik hücreye farklılaştırma çalışması.....	36
Çizim 4.5.	iWJ-MKH'lerinin kondrojenik hücre farklılaştırma çalışması.....	36
Çizim 4.6.	1.1 B4 beta hücre hattı mikroskop görüntüleri.....	37
Çizim 4.7.	1.1 B4 beta hücre hattı mikoplazma kontrolü için DAPI ile boyama görüntüsü.....	38
Çizim 4.8.	Eksozomların akış sitometri ile karakterizasyonu.....	39
Çizim 4.9.	İzole edilen eksozomların RNA içeriklerinin analizi.....	40
Çizim 4.10.	1.1 B4 hücre hattı kaynaklı eksozomlar ile ortak kültüre alınan iWJ-MKH'lerin mikroskop görüntüleri.....	41

<b>Çizim 4.11.</b> Kimyasal farklılaşma ve 1.1 B4 hücre hattı kaynaklı eksozomlar ile ortak kültüre alınan iWJ-MKH'lerin mikroskop görüntüleri.....	41
<b>Çizim 4.12</b> Ortak kültür sonrası İnsülin, Pdx1, Pax4 ve Ngn3 boyama sonuçları.....	42
<b>Çizim 4.13.</b> Ortak kültür sonrasında beta hücre belirteçlerinin gen ifade analizi.....	43
<b>Çizim 4.14.</b> GANT61 ile modifiye eksozomlarla ortak kültür sonrasında beta hücre belirteçlerinin gen ifade analizi.....	45



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Deney grupları tablosu.....	28
<b>Çizelge 3.2.</b> Real Time PCR için kullanılan primerler ve dizileri.....	31





# 1. GİRİŞ

## 1.1. Genel Bilgiler

Diyabet, pankreasın yeteri kadar insülin üretememesi ya da üretilen insülinin etkin bir biçimde kullanılamaması sonucu oluşan kronik bir hastalıktır. 2005 ve 2030 yılları arasında diyabete bağlı ölümlerin iki katına çıkacağını öngören Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) verilerine göre yaklaşık 347 milyon insan diyabet hastasıdır. Sinir sistemi ve kan damarları başta olmak üzere vücutta bulunan birçok doku ve organı olumsuz etkileyen bu hastalığın, kesin tedavisi bulunamamıştır.

Pankreatik adacıklardaki beta hücrelerinden salgılanan ve kan glikoz seviyesini dengede tutan hormon olan insülinin üretimi, beta hücrelerinin otoimmün nedenlerle yıkımı sonucu azalmaktadır. Bunun sonucu oluşan hiperglisemi ve hipergliseminin vücutta yol açtığı çeşitli rahatsızlıklar ile seyreden bu hastalık, tip 1 diyabet olarak adlandırılmaktadır. Tip 1 diyabetli hastalar, hayatlarını sağlıklı ve kaliteli sürdürebilmek için dışardan insülin alımına ihtiyaç duyarlar. Ancak bu durum bir tedavi değil, hastalığın belirtilerini azaltmak amacıyla yapılan bir takviyedir. Tip 2 diyabet ise, insülin direnciyle oluşabildiği gibi beta hücrelerinin fonksiyon kaybıyla da oluşabilir. Tip 2 diyabet hastalarının dışarıdan insülin almalarına gerek yoktur, diyetlerine dikkat ederek hastalık belirtilerini azaltabilirler.

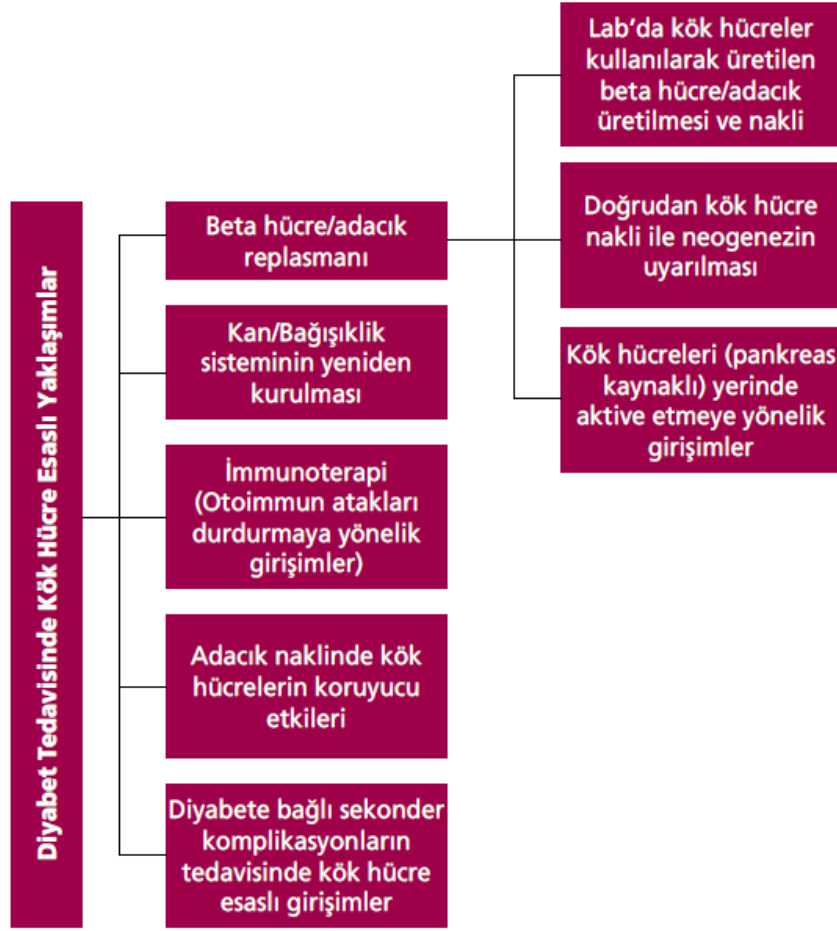
Tedavisi olmayan ve yaygın görülen hastalıklardan biri olan tip 1 diyabetin, hastalık belirtilerini azaltmak için hastalar dışarıdan insülin almaktadırlar. Günümüzde tip 1 diyabetin tedavisi için, beyin ölümü gerçekleşmiş donörlerden pankreas nakli ve adacık nakli gerçekleştirilmektedir.

İlk olarak 1966 yılında yapılan pankreas nakli ameliyatı, ciddi ve ağır bir ameliyattır ve ameliyata bağlı ölüm riski %10-15'tir. Ayrıca organ reddini engellemek için sürekli immün baskılayıcı ilaç kullanımı gerekmektedir. Kullanılan bu ilaçlar, hastanın enfeksiyona yakalanma riskini artırdığı gibi ciddi organ hasarı da yapabilir. Ancak böbrek yetmezliği olan tip 1 diyabet hastalarında tüm pankreas nakli ile böbrek naklinin de yapılması kan glikoz seviyesinin kontrol altına alınmasında oldukça etkilidir (Shapiro 2012).

Adacık naklinde ise pankreas kollajenaz enzimi ile muamele edilir ve Ricordi Odası (Ricordi Chamber) denilen sistemle bu adacıklar saflaştırılarak karaciğer portal veninden hastaya nakledilir (Ricordi ve diğ. 1988, Bruni ve diğ. 2014). Çoğu durumda hastaların yeterli işlevsel adacığa sahip olması için adacık naklini iki ya da daha fazla kez tekrarlamak gerekmektedir (Shapiro 2012). Aynı zamanda hastalara nakledilen bu yeni adacıklar immün ataklara uğrayıp yok edilebilirler. Adacık naklinde hastalar pankreas naklinde olduğu gibi immün baskılayıcı ilaçlar almaktadırlar ve buna rağmen nakledilen adacıkların %60'ı çeşitli stres faktörlerinin ve baskılayıcı ilaçların etkisiyle apoptoza gitmektedir (Johnson ve diğ. 2009, Emamaullee ve Shapiro 2006, Emamaullee ve Shapiro 2007).

Bu uygulamalar için gerekli donör sayısının az olması ve kullanılan tedavi yöntemlerinin yan etkilerinin ciddi sonuçlar doğurması nedeniyle yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır. Hastalığın önlenmesi için yapılan çalışmaların amacı otoimmün reaksiyonu azaltmak ve böylece beta hücrelerini belirli bir seviyede tutmaktır. Diyabetin tam tedavisi için Langerhans adacıklarında bulunan ve otoimmün ataklar sonucu kaybedilen beta hücrelerinin yerine konması gerekmektedir.

Günümüzde tedavisi henüz bulunamamış diyabet ve benzeri diğer hastalıklar için geliştirilen hücresel tedavi ve kişiye özel tedavi yöntemlerinde hastalar için umut verici gelişmeler olmuştur. Yapılan bilimsel araştırma ve deneylerde olumlu sonuçlar alınmış, insan pankreatik adacıklarında kök hücre varlığı kanıtlanmış (Eberhardt ve diğ. 2006) ve insan vücudunda bulunan farklı hücrelerden beta benzeri hücre elde edilmiştir (Zhu ve diğ. 2016, Prabakar ve diğ. 2012, Phadnis ve diğ. 2011, Okura ve diğ. 2009, Lock ve Tzanakakis 2007).



**Çizim 1.1.** Diyabetin tedavisinde kök hücre esaslı yaklaşımlar. İmamoğlu ve diğ. (2015 s.616)'dan alınmıştır.

Hücrel tedavi yaklaşımlarından biri olan kök hücre tedavileri, klinikte birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Zhang ve diğ. 2006, Kharaziha ve diğ. 2009, Tyndall 2012). Diyabetin tedavisi için de çeşitli kök hücre aracılı tedavi yaklaşımları bulunmaktadır (Çizim 1.1). Diyabetin tedavisinde kaybedilen beta hücrelerini yerine koymanın yanı sıra devam eden otoimmün atakları da engellemek gerekmektedir. Bu nedenle kök hücrelerin immün baskılayıcı ve immün düzenleyici etkilerinden yararlanılabileceği düşünülmektedir (İmamoğlu ve diğ. 2015 s.616). Farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreleri, laboratuvar ortamında adacık veya beta hücrelerine farklılaştırmak da hücrel tedavi yaklaşımlarından biri olarak değerlendirilmektedir.

Kök hücrelerin farklılaşma özellikleri kullanılarak diyabet hastalığında kaybedilen beta hücrelerini yerine koyma, tedavi yaklaşımlarından birisidir. Kök hücrelerin

farklılaşmaya yönlendiğinde ise bulunduğu mikroçevrenin etkinliği birçok çalışmayla kanıtlanmış ve *in vitro* ve *in vivo* olarak denenmiştir (Discher ve diğ. 2009, Yılmaz ve diğ. 2015). Mikroçevre, hücreler üzerindeki etkisini, hücrelerden salgılanan sitokinler ve veziküller aracılığı ile parakrin olarak gösterir. Hücrelerden mikroçevrelerine salgılanan veziküllerden biri olan eksozomlar, son zamanlarda üzerinde en çok durulan mikroveziküllerdendir. Hücreler arası iletişimde rolü olduğu birçok çalışmayla kanıtlanan ve içeriğinde salgılandığı hücreye özgü gen transkripsiyon faktörleri ve proteinler bulunan eksozomlar, *in vitro* deneylerde sıkça kullanılmaktadır (They ve diğ. 2002, Valadi ve diğ. 2007, Mathivanan 2012, Urbanelli ve diğ. 2013).

Eksozomların mikroçevredeki hücreler üzerindeki etkisi *in vitro* çalışmalarla araştırılmış ve önemli sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle antijen sunma sırasında eksozomların etkin görev aldığı kanıtlanmıştır (Nolte-t Hoen ve diğ. 2009). Eksozomların taşıdığı mRNA'ların kodladığı proteinler, alıcı hücre sitoplazmasında gözlenmiştir. Taşınan mRNA'ların fonksiyonel olması, böylece alıcı hücrenin protein ürünlerini düzenlenmesi, eksozomların hücre-hücre iletişimde yeni bir araç olabileceğini göstermektedir (Valadi ve diğ. 2007, Montecalvo ve diğ. 2011).

## 1.2. Kök Hücreler

Kök hücreler, yenileyici (rejeneratif) ve tamir edici (reparatif) tıp alanında, hasarlı doku veya organın fizyolojik işlevini yerine getirmesine yardımcı olmak için kullanılan hücre tiplerinden biridir. Hasarlı bölgeyi onarabilecek sayıda ve kalitede yönlendirilmiş veya yönlendirilmemiş kök hücre nakledilmesi ya da nakledilen kök hücrelerin o bölgedeki diğer hücre ve kök hücrelere rehberlik yapması sayesinde olumlu sonuçlar alınmaktadır (Karaöz ve Ovalı 2004).

Kök hücreleri diğer somatik hücrelerden ayıran önemli özellikler yüksek bölünme kapasiteleri, kendilerini yenileyebilmeleri ve farklılaşmalarıdır. Kök hücrelerin yüksek bölünme kapasitelerini telomeraz enzimi sağlamaktadır. Telomerler, kromozomların uçlarında bulunan ve kromozom uçlarının yapısal bütünlüğünü koruyan, diğer kromozomlarla birleşmeyi (füzyon) ya da kendi üzerinde katlanarak halkasal bir kromozom oluşmasını (ring kromozomu) engelleyen tekrarlanan DNA dizileridir. İnsan kromozomlarındaki telomerler 3'-TTAGGG-5' şeklinde sıralı binlerce bazdan oluşur.

Hücre bölünmeleri sırasında, DNA'nın 3' ucunda 50-200 nükleotitlik kayıp yaşanmaktadır. Bölünmeler arttıkça kayıplar da artmakta ve kromozom uçlarındaki kısalma ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Yapısında telomeraz tersine transkriptaz (TERT) ve telomer RNA'sı bulunan ribonükleoprotein yapısındaki telomeraz enzimi, telomer bölgelerini uzatarak kayıp oluşmasını engellemektedir.

Somatik hücrelerde bu enzim aktif olmadığı için her hücre bölünmesi ile telomer kısalır ve hücre bölünme özelliğini kaybeder. Ancak insan germ, tümör ve embriyonik hücrelerinde telomeraz enzim aktivitesi bulunmuştur ve bu enzimin hücrelerin yenilenme, çoğalma kapasitelerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Kök hücreler de somatik hücrelerden farklı olarak telomeraz enzim aktivitesine sahiptir ve bu enzim sayesinde uzun süre bölünme özelliklerini koruyarak çoğalır ve kendilerini yenilerler (Kong ve diğ. 2014).

Kök hücrelerin ana özelliklerinden birisi, herhangi bir dokuya ait özelleşmiş yapıya sahip olmamasıdır. Bunun yanı sıra kalp kası, sinir hücresi ve benzeri özelleşmiş işlevsel vücut hücrelerine kaynaklık edebilirler (İnan ve Özbilgin 2009). Kök hücreler farklılaşma yetenekleri açısından üç gruba ayrılır ve totipotent, pluripotent ve multipotent olarak adlandırılırlar.

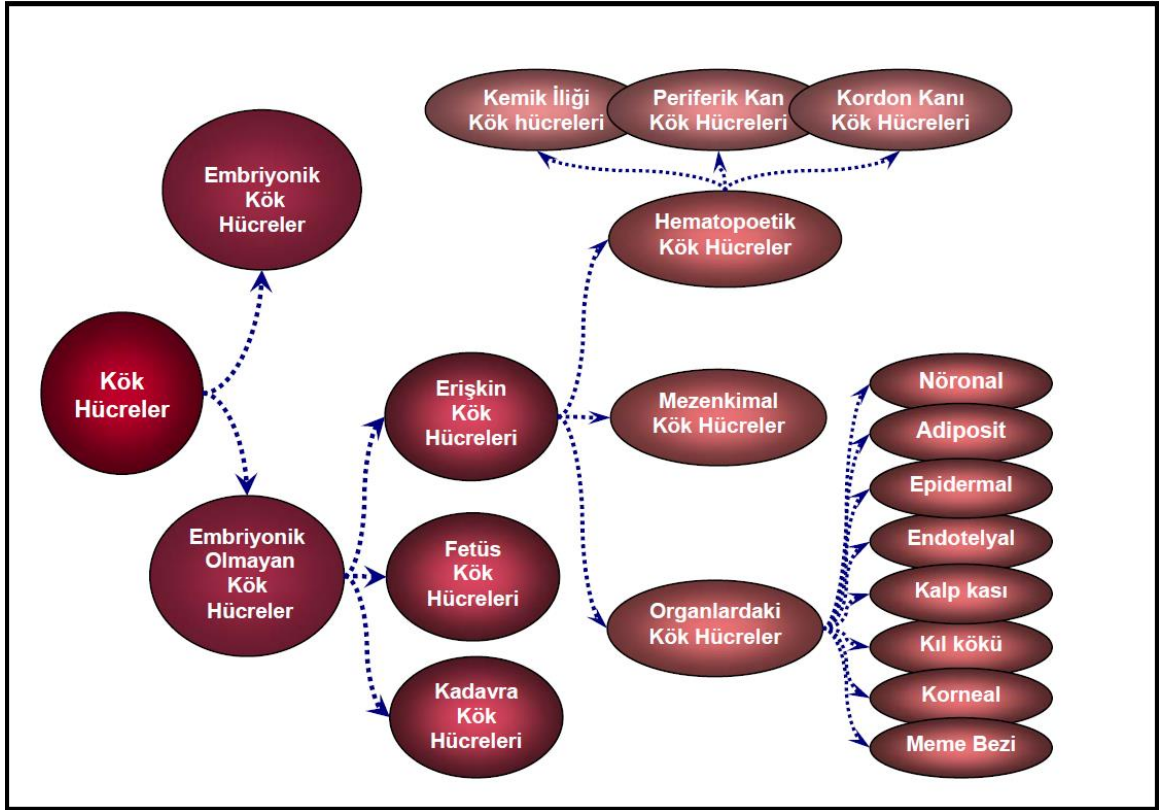
Embriyoyu ve embriyo dışı doku, organ ve membranların hepsini oluşturabilecek kapasitedeki embriyonel hücreye totipotent kök hücre denilmektedir (De Los Angeles ve diğ. 2015). Bölünmeler geçiren zigotta 8 hücreye kadar tüm blastomerler totipotenttir. Segmentasyon süresince sitoplazma büyümesi olmadan bölünmelere devam eden embriyo, blastosist adı verilen yapıyı oluşturur. Blastosistin içinde bulunan iç hücre kütesinden elde edilen hücreler ise pluripotent kök hücreler olarak adlandırılır ve üç germ tabakası olan endoderm, mezoderm ve ektoderm tabakalarına ve bu tabakalardan köken alan vücut hücrelerine (yaklaşık 270 çeşit) kaynaklık ederler. Ancak tam bir embriyo oluşturamazlar. Embriyonik germ hücreleri, embriyonik karsinoma hücreleri ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler de pluripotent kök hücre grubuna girerler (Mitalipov ve Wolf 2009).

İlerleyen evrelerde hücreler pluripotensi özelliklerini kaybederek multipotent kök hücrelere dönüşürler. Multipotent kök hücreler ait oldukları dokunun hücre türlerine farklılaşabildikleri gibi farklı dokulara ait hücrelere de farklılaşabilmektedir (Eguizabal ve diğ. 2013).



### 1.2.1. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre; blastosistin iç kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Embriyonik olmayan kök hücreler ise erişkin kök hücreler, fetal kök hücreler ve kadavradan elde edilen kök hücreler olarak gruplandırılırlar (Çizim 1.2.) (İnan ve Özbilgin 2009)



Çizim 1.2. Kök hücre sınıflandırması. İnan ve Özbilgin (2009)'den alınmıştır.

### 1.2.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

Pluripotent hücreler olan embriyonik kök hücreler (EKH) ilk olarak 3,5 günlük fare blastosistinin iç hücre kitlesinden elde edilmiştir (Evans ve Kaufmann 1981). Embriyonik kök hücreler üç germ tabakasına (endoderm, mezoderm ve ektoderm) ve bu tabakalardan gelişen tüm hücrelere farklılaşabilmelerine rağmen, trofoektoderm gibi embriyo dışı yapıları oluşturmazlar. Embriyonik kök hücreler iç hücre kitlesi çıkartılmış blastosistlere nakledildiklerinde pluripotensi özelliklerini koruyarak üç germ tabakası ve eşey hücrelerine farklılaşabilmektedir.

Primat embriyonik kök hücre hattının izole edilmesinin (Thomson ve diğ. 1995) ardından, ilk insan embriyonik kök hücre hattı, *in vitro* fertilizasyon (IVF) kliniğinden bağışlanan embriyolardan elde edilmiştir (Thomson ve diğ. 1998). Bu gelişmelerin ardından birçok embriyonik kök hücre hattı elde edilmiştir.

Nükleositol plazma oranı yüksek olan embriyonik kök hücreler, yüksek farklılaşma potansiyeline sahiptir ve alkalen fosfataz aktivitesi gösterirler. İnsan embriyonik kök hücreleri SSEA-3 (stage-specific embryonic antigen-3), SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4), TRA-1-60 ve TRA-1-81 yüzey belirteçlerini taşırlar ve Oct4, Sox2, NANOG gibi genleri eksprese ederler (Oluseun ve diğ. 2007).

Embriyonik kök hücreler, ağır kombine immün yetmezliği (SCID) olan ya da atimik olan farelere enjekte edildiğinde teratom oluştururlar. Bu teratomlar bağırsak epiteli gibi endoderm kökenli, kıkırdak ve kemik gibi mezoderm kökenli ve nöral epitelyum gibi ektoderm kökenli yapıları barındırır (Thomson ve diğ. 1998).

### Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Embriyonik kök hücrelerin keşfedilmesi, izole edilmesi ve kültüre edilebilmeleri biyoloji alanında yüzyılın en büyük buluşu olarak görülmektedir. Embriyonik kök hücreler teorik olarak vücutta bulunan her hücre türüne farklılaşma potansiyelleri ve yüksek bölünme kapasiteleri sayesinde hastalık araştırmalarında tercih edilen kök hücreler arasındadır.

İnsan embriyonik kök hücreleri fertilize olmuş bir oositin 5.gününde oluşan blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilir. Embriyonik kök hücrelerin, insan hayatını zorlaştıran hastalıkların araştırılmasında kullanılması düşünülürken, bir embriyonun imha edilmesiyle elde edilmesi etik sorunları gündeme getirmiştir. Canlıların en temel hakkı yaşama hakkıdır. Bu nedenle araştırma amacıyla yaşama olasılığı olan bir canlının hayatına son vermek çeşitli kesimler tarafından eleştirilmiş ve etik bulunmamıştır. 2002 yılından önce, IVF kliniklerinde yardımcı üreme teknikleri ile üretilen ve kullanılmayan fazla embriyolardan elde edilen embriyonik kök hücrelerin kullanımı bazı ülkelerde serbestti. Ancak araştırma amacıyla embriyo üretmek, Avrupa Konseyi bünyesinde hazırlanan Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesince yasaklanmıştır. Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı 19.9.2005 tarihli bir genelgeyle, bakanlıkta sürdürülen hukuki çalışmalar sonuçlanıncaya kadar embriyonik kök hücre araştırmalarının, kamu ve özel kurum ve kuruluşlar ile üniversiteler bünyesinde yapılmaması gerektiğini duyurmuştur (Çoban 2009). Embriyonik kök hücre çalışmalarının bu şekilde kısıtlanması araştırmacıları farklı çözümler bulmaya itmiştir. Bu sorunları aşmanın yollarından birisi de laboratuvar ortamında pluripotent kök hücreler üretmektir.

Somatik hücreler, embriyonik kök hücrelerle füzyon yapılarak ya da çekirdek materyali oositlere nakledilerek geri programlanabilirler (Wilmot ve diğ. 1997, Cowan ve diğ. 2005). Oct 3/4, c-Myc, Sox2 ve Klf4 gibi transkripsiyon faktörleri erken dönem embriyolarda ve embriyonik kök hücrelerde pluripotensinin devamında işlev gören faktörlerdir. Bu faktörler pluripotensinin devamında rol aldığı gibi somatik hücreleri pluripotensi kazanmaları yönünde de indükleyebilirler (Takahashi ve Yamanaka 2006).

Shinya Yamanaka ve ekibi 2006 yılında, embriyonik kök hücrelerde pluripotensinin devamı için gerekli olduğu bilinen 24 faktör arasından Oct 3/4, c-Myc, Sox2 ve Klf4'ten oluşan faktör kombinasyonunu fare embriyonik ya da erişkin fibroblastlarına aktararak uyarılmış/indüklenmiş pluripotent kök hücreler (uPKH-iPSCs) elde etmişlerdir. Bu hücrelerle yapılan analizlerde, embriyonik kök hücrelere benzer morfoloji ve moleküler özellikler gösterdiği ve immün sistemi baskılanmış ya da atimik olan farelere subkutan olarak nakledildiğinde üç germ tabakasına ait dokular içeren tümör yapısının oluştuğu gözlenmiştir. iPS hücreleri blastokist içine enjekte edildiğinde embriyo oluşumuna katkıda

bulunmuştur. Bu sonuçlar pluripotent kök hücrelerin, birkaç transkripsiyon faktörü ile fibroblastlardan elde edilebildiğini göstermiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006).

### **1.2.1.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler**

Embriyonik olmayan kök hücreler erişkin kök hücreler, fetüs kök hücreleri ve kadavra kök hücreleri olmak üzere üç ana gruba ayrılır ve multipotent özelliktedir. Erişkin kök hücreler ise;

1. Hematopoietik kök hücreler
2. Mezenkimal kök hücreler
3. Organlardaki kök hücreler şeklinde sınıflandırılmaktadır (Karaöz ve Ovalı 2004).

Erişkin kök hücreler, diğer kök hücreler gibi uzun süre çoğalma ve farklı hücre türlerine veya öncülerine farklılaşma potansiyelleri vardır. Ektoderm, mezoderm ve endoderm kaynaklı doku hücrelerine dönüşme potansiyellerinin var olmasının yanı sıra, embriyonik kök hücrelerde olduğu gibi teratom oluşturma riskinin ve etik sorunlarının olmaması nedeniyle yenileyici tıpta sık olarak kullanılmaktadır.

Hematopoietik kök hücreler (HKH), çoğunlukla kemik iliğindeki nişlerde yerleşik olarak ve az miktarda periferik kanda bulunan, kendilerini yenileyebilen ve kan dokusunun tüm hücre türlerine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Hematopoietik kök hücreler (CD: Cluster of Differentiation) CD34, CD45 ve CD14 yüzey belirteçlerini taşırlar (Karaöz ve Ovalı 2004).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) farklılaşma yeteneği dâhilinde birçok hücre türüne farklılaşabilen, fibroblastik morfolojiye sahip multipotent kök hücrelerdir. İlk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin kültürü sırasında elde edilmiştir ve 1970 yılında Friedenstein tarafından tanımlanmıştır (Friedenstein ve diğ. 1966, Friedenstein ve diğ. 1970). Kemik iliği dışında yağ doku, kordon kanı, sinoviyal sıvı, dental pulpa, göbek bağı matriksi, kıl kökü gibi birçok doku ve organdan elde edilebilmektedir (Karaöz ve Ovalı 2004).

Laboratuvar ortamında çeşitli dokulardan izole edilebilen mezenkimal kök hücrelerin; plastik yüzeye yapışmaları, koloni oluşturmaları, CD13, CD29, CD44, CD46,

CD73, CD90, CD105, CD166, MHC Sınıf I (HLA A-B-C) düşük pozitif; CD3, CD8, CD14, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117, MHC Sınıf II negatif olmaları, kollajen I, kollajen IV, laminin ve fibronektin gibi matriks proteinleri sentezlemeleri, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma eğilimi göstermeleri karakteristik özellikleri olarak kabul edilmektedir (Pittenger ve diğ. 1999, Wang ve diğ. 2004, Dominici ve diğ. 2006, Karaöz ve diğ. 2009, Akiyama ve diğ. 2012).

Kan doku, kas doku, deri dokusu, incebağırsak epiteli, kıl folikülü gibi yapılarda bulunan kök hücreler ise ihtiyaç halinde çoğalarak ya da gerekli hücre türüne farklılaşarak, vücuttaki yapım ve yıkım olaylarını dengede tutarlar (Blanpain ve Fuchs 2009, Biteau ve diğ. 2011).

Kolay izole edilebilmeleri, *in vitro* ortamda kolay yönlendirilebilmeleri, anti inflamatuvar ve rejenerasyon özelliklerinin yanı sıra ve mezenkimal kök hücrelerin MHC sınıf II antijeni taşıyamaları, dolayısıyla immün yanıt oluşturmamaları bu hücreleri klinik kullanıma uygun bir hale getirmektedir (Noël ve diğ. 2007, Gebler ve diğ. 2012).

Kök hücreler, günümüzde tedavisi mümkün olmayan tip 1 diyabet ve multiple skleroz (MS) gibi otoimmün hastalıklarda, Duchenne Musküler Distrofi (DMD) gibi genetik tabanlı hastalıklarda, kesin nedeni bilinmeyen amyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığında, Alzheimer ve Parkinson gibi nöro-dejeneratif hastalıklarda, Graft versus Host hastalığında (GVHD), kalp, böbrek, karaciğer gibi çeşitli organ yetmezliklerinde ve omurilik hasarı sonucu ortaya çıkan felç durumlarında kullanılmak üzere umut ışığı olmuştur (Kang ve diğ. 2005, Rosa ve diğ. 2007, Voltarelli ve diğ. 2007, Centeno ve diğ. 2008, Yousef ve diğ. 2009, Rebeiro ve Moore 2016).

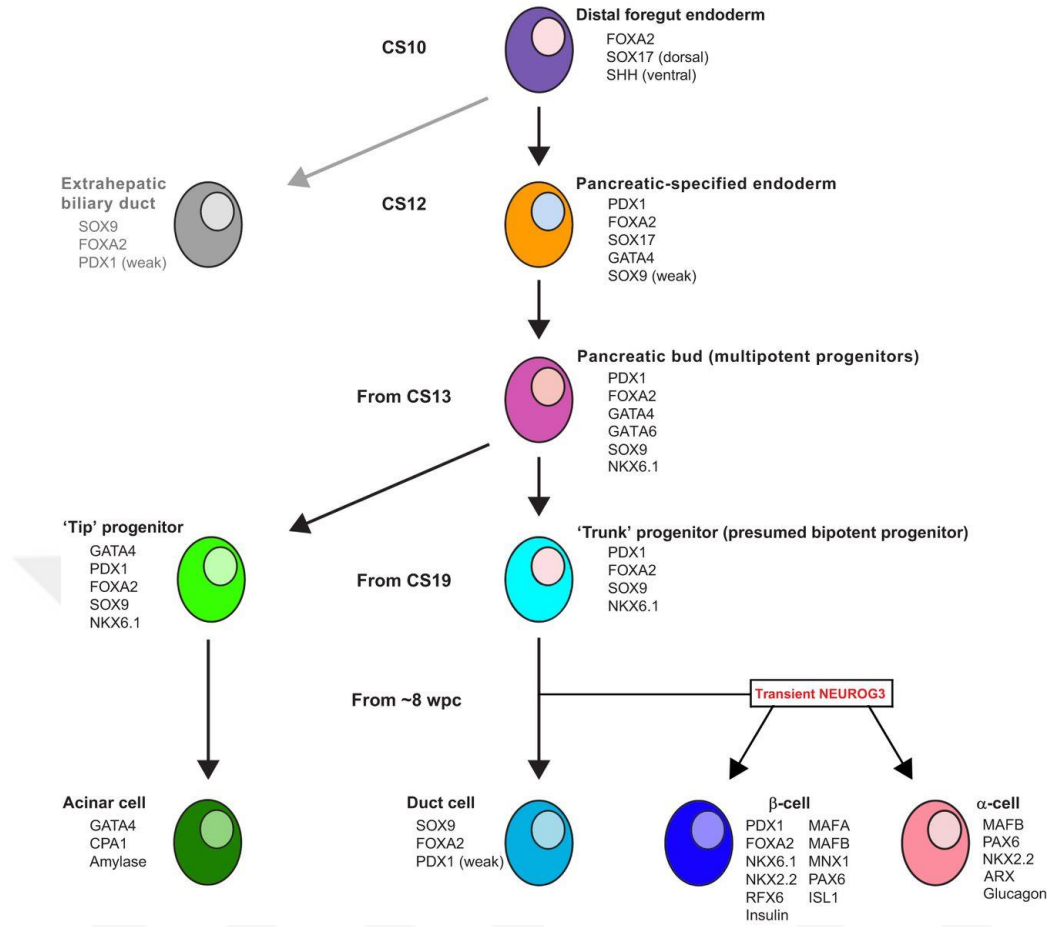
### 1.3. Pankreas Gelişimi

Embriyonik aşamada memeli pankreası, ön bağırsağın distal ucunda iki tomurcuk halinde gözlenmeye başlar. Embriyodaki rotasyon hareketi sonucu ventral tomurcuk dorsal tomurcuğun altına gelir ve tomurcukların parankimleri birleşir. Pankreas başının inferioru ve usinat çıkıntı ventral tomurcuktan oluşur. Wirsung kanalı (ana pankreas kanalı) ise dorsal pankreas kanalının distali ile ventral kanalın birleşmesinden oluşur. Dorsal pankreas kanalının proksimali ise bazı durumlarda aksesuar pankreas kanalını (Santorini kanalını) oluşturur, bazı durumlarda ise gerileyerek yok olur. Wirsung kanalı koledok kanalı (ana safra kanalı) ile birleşerek papilla majörden, Santorini kanalı ise papilla minörden duodonuma açılır.

Birleşen dorsal ve ventral tomurcukların endodermi tübüler bir ağ oluşturur. Bu tübüllerin uçlarında bulunan hücre kümelerinde asinuslar gelişmeye başlar. Langerhans adacıkları, gelişimin 3. ayında tübüllerden ayrılan bir grup hücreden oluşur ve asinuslar arasında uzanır. Somatostatin ve glukagon salgılayan hücreler, insülin salgılayan hücrelerden daha önce gelişirler. İnsülin salgılanması ise fetal dönemde 10. haftada başlar.

#### Pankreas Gelişiminin Moleküler Prensipleri

Memeli canlılar üzerinde yapılan çalışmalar, embriyonik gelişmenin bir çok aşamasında olduğu gibi dorsal pankreas tomurcuğunun oluşması için de SHH (Sonic Hedgehog) ekspresyonunun olması gerektiğini göstermiştir. SHH ekspresyonu ise önemli bir transkripsiyon faktörü olan Pdx1'in (pancreatic and duodenal homeobox gene 1) ekspresyonu için gereklidir (Jørgensen ve diğ. 2007, Pan ve Wright 2011). İnsan embriyolarında pankreasın ilk kanıtları olarak SHH ekspresyonu 25-27. günlerde gözükürken, Pdx1 ekspresyonu ise 29-31. günlerde gözlenebilir. Dorsal ve ventral pankreas tomurcukları, 30-33. günlerde SOX9 (SRY (sex-determining region Y)-box 9) ve GATA4 (GATA binding protein 4) ile işaretlenebilir (Shaw-Smith ve diğ. 2014). Bu süreç içinde pankreasta proliferatif progenitör hücrelerin sayısında artış gözlenir. Yaklaşık 45. günde, SOX9+ / NKX6.1+ iken pankreatik progenitör hücrelerde farklılıklar gözlenir. SOX9'un asinar hücrelerde kaybolması 10 ile 14. haftalarda gerçekleşir (Çizim 1.3.).



**Çizim 1.3.** Pankreas embriyolojisinde moleküler yollar. Jennings ve diğ. (2015)'den alınmıştır.

Farklı grupların yaptıkları çalışmalarda insan pankreas gelişiminde proliferasyonun zamanla azaldığı, sadece merkeze uzak olan periferel bölgeyle sınırlı kaldığı gösterilmiştir. Gen ontoloji analizleri asinar hücre farklılaşmasında, 37. ve 45. günler arasında, WNT sinyallerinin önemini ortaya koymuştur. Aynı zamanda EGF'nin (epidermal growth factor) endokrin hücre farklılaşmasını inhibe ettiği belirlenmiştir.

Embriyonik gelişim sırasında, ilk gelişen ve baskın olan adacık hücrelerinden fetal  $\beta$  hücrelerinin oluştuğu dönemde, Ngn3 (neurogenin 3) ekspresyonunda hızlı bir artış gözlenirken SHH yolağının sessiz olması gerekmektedir. Hücrelerde Ngn3 artışı olduğunda SOX9 ekspresyonu gözlenemez. İlk üç ayın sonlarına doğru Ngn3 ekspresyonunda artış görülür fakat 35. haftadan sonra fetusta Ngn3 gözlenmez.

Bihormonal olan insülin<sup>+</sup> / glukagon<sup>+</sup> endokrin progenitör hücrelerde, olgunlaşan beta hücrelerinin çekirdeklerinde bulunan ve beta hücreleri için çok önemli olan

transkripsiyon faktörü MafA'nin ekspresyonu, progenitör hücrelerin beta hücre yönünde farklılaşmasını sağlar.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda monohormonal beta hücresi elde etmek için hücrelerin Pdx1<sup>+</sup>, NKX6.1<sup>+</sup> ve MafA<sup>+</sup> olması gerektiği belirlenmiştir.

Beta hücre kümeleri 10. haftada damarlanmaya başlar ve 12-13. haftalarda adacıklarda  $\alpha$  hücreleri,  $\delta$  hücreleri ve  $\gamma$  hücreleri görülmeye başlar (Jennings ve diğ. 2015).

#### 1.4. Diyabet

Pankreas, endokrin ve ekzokrin olmak üzere iki ana bölümden oluşan bir salgı organıdır. Endoderm tabakasından gelişen pankreas, dorsal ve ventral tomurcukların birleşmesinden köken alır. Sağlıklı bir yetişkinde yaklaşık 3 milyon Langerhans adacığı bulunmaktadır ve pankreasın %1-2'si Langerhans adacığından oluşur.

Sindirim sistemi için enzim salgılayan ekzokrin hücreler ve Langerhans adacıklarında bulunan, kana hormon salgılayan endokrin hücreler, pankreasın iki ana hücre tipini oluşturmaktadır. 3.000 ile 4.000 arasında hücre bulunduran Langerhans adacıklarında, insülin salgılayan beta ( $\beta$ ) hücreleri %60 oranında, glukagon salgılayan alfa ( $\alpha$ ) hücreleri %30 oranında, somatostatin salgılayan delta ( $\delta$ ) hücreleri %10'dan az, pankreatik polipeptit salgılayan gama ( $\gamma$ ) hücreleri %5'den az bulunmaktadır (Brissova ve diğ. 2005, Cabrera ve diğ. 2006, Ionescu-Tirgoviste ve diğ. 2015).

İnsülinin sentezlenip salındığı ilk yapısı preproinsülin olarak adlandırılır. Bu yapının granüllü endoplazmik retikuluma girebilmesi için yapısal olarak kesilmesi gerekir. Kesim işleminden sonra oluşan proinsülin Golgi cisimciğine geçtiğinde, C-peptit kısmı kesilerek veziküle alınır. Oluşan insülin salınırken veziküle alınan bu C-peptitler de salınır.

Langerhans adacıklarında bulunan bu hücreler vücut homeostazını ve kan normoglisemisini sağlarlar. Kanda şeker oranı arttığı zaman kana insülin salınımı gerçekleşir. İnsülin hormonu kanda bulunan glikozun hücrelere alınmasını sağlar. Ayrıca yağ ve protein metabolizması üzerinde de etkisi vardır. İnsülin salınımının yetersiz olduğu ya da vücutta insülin direncinin olduğu durumlarda ise hiperglisemi ortaya çıkar.



Hiperglisemi sonucunda göz, kalp, böbrek gibi organlarda ve sinir sisteminde hasar oluşur. Bu hastalığa Diabetes Mellitus (DM) denilmektedir (Ashcroft ve Rorsman 2012).

İnsülin hormonunun yokluğu sonucu oluşan diyabete Tip 1 diyabet, insülin direnci sonucu oluşan diyabete Tip 2 diyabet denilmektedir. Tip 1 diyabet bir otoimmün hastalıktır. Bağışıklık sistemi hücreleri pankreastaki beta hücrelerini yabancı olarak algılayarak yıkıma uğratırlar. Bunu sonucunda insülin ya hiç salgılanamaz ya da çok az miktarda salgılanır ve kanda glikoz birikir. Hastalığın belirtileri çocukluk yaşlarında ortaya çıkar. Tedavisi için kayıp yaşanan hücrelerin yerine yenisi konmalı ya da otoimmün sistemin bu hücreler üzerindeki olumsuz etkisi önlenmelidir. Obezite ve yaşlılıkla ortaya çıkabilen tip 2 diyabet ise, insülin direnci veya beta hücrelerinin fonksiyon kaybı sonucu gelişir. Tip 2 diyabet hastaları dışarıdan insülin almaya ihtiyaç duymazlar. Sadece aldıkları besinlere dikkat etmeleri gerekmektedir.

#### **1.4.1. Diyabetin Tedavisi ve Kök Hücreler**

Günümüzde modern tıp tarafından tedavi edilemeyen birçok hastalık için hücresel tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Hastalık sebebiyle doku ve organlarda oluşan hasarı gidermek, bu doku ve organlara işlevlerini geri kazandırmak suretiyle tam bir iyileşme sağlanabilir. Hasarlı hedef organa, sağlıklı bir biçimde çalışmasını sağlamaya yetecek kadar hücre transferi ile bunu yapmak mümkündür.

Tedavisi olmayan hastalıklardan biri olan Diabetes mellitus, dünya genelinde pek çok insanın hayatını tehdit etmekte ve yaşam kalitesini düşürmektedir. Tip 2 diyabet sağlıklı bir diyet ve düzenli egzersizlerle kontrol altına alınabilir olsa da, tip 1 diyabet için böyle bir durum söz konusu değildir. Otoimmün bir hastalık olan tip 1 diyabette, var olan hastalık belirtilerini azaltmak için, dışarıdan insülin takviyesi yapılmaktadır. Kan şekeri düzeyini normal sınırlarda tutmak, sürekli kontrol etmek zordur ve zamanla kanda artan glikoz kalp, gözler, kan damarları, sinir sistemi ve böbrekler gibi birçok doku ve organda hasar oluşmasına neden olur. Aynı zamanda kan glikoz düzeyini sürekli düşük tutmak için alınan çok miktarda insülin ise ölümcül olabilir.

Tip 1 diyabetin tedavisi için bir vericiden izole edilerek alınmış adacık hücreleri ya da pankreasın tamamı transplante edilebilir. Tüm pankreas nakli, riski yüksek ve ağır bir ameliyattır. Adacık nakli, tüm pankreas nakline göre daha çok tercih edilen göreceli olarak

daha kolay olan bir yöntemdir. Klinik olarak kullanılan bir yöntem olmasına rağmen nakil için uygun sayıda ve kalitede beta hücresi ya da adacık elde etmek zordur. Nakil işlemi için hasta immün baskılayıcı tedaviler de görür. Dolayısıyla bağışıklık sistemi zayıflar. İmmün baskılayıcı tedavi kullanılsa bile yeni gelen adacıkların reddedilme ihtimali vardır ve tedavinin tekrarı gerekebilir (Johnson ve diğ. 2009, Shapiro 2013). Araştırmacılar bu sorunların önüne geçebilmek ve kalıcı çözümler bulabilmek için hücrel tedavilere yönelmişlerdir. Hücrel tedaviler alanında, özelliklerinden dolayı kök hücreler, çalışılan ve kullanılan hücrelerin başında gelmektedir. *In vitro* ortamlarda, kök hücrelerin insülin üreten beta hücrelerine farklılaşabilmesi, diyabet tedavisi için umut olmuştur (Ricordi ve diğ. 2012).

Kök hücreler, kendilerini yenileyebilen, yüksek çoğalma kapasitesine sahip, farklı doku ve organların hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir ve bağışıklık baskılayıcı ve enflamasyon giderici etkileri vardır. Buna ek olarak, mekanizması tam olarak anlaşılmasa da, kök hücrelerin hasarlı veya kanserli bölgeye göç etme kapasitesi de vardır (Kim ve Cho 2013).

Kök hücrelerin, hasarlı dokuda hücre eksikliğini tamamlamasının yanı sıra, hasarlı bölgeyi salgıladıkları sitokinler ile apoptozdan koruma, o bölgedeki kök hücreleri uyarma ve damar oluşumunu sağlama gibi özellikleri vardır. Bu farklı ve kendine özgü özelliklerinden dolayı kök hücreler, geleneksel tedavi yöntemleri ile tedavi edilemeyen bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Karaöz ve İnci 2014).

İlk hücrel tedavi tek yumurta ikizleri arasında yapılan kemik iliği nakli ile gerçekleştirilmiştir. Kemik iliğinde bulunan kök hücrelerin, lösemi hastalarında hematopoezi sağlamaları ile başarılı sonuç alınmıştır (Thomas ve diğ. 1959). Bu başarılı sonucun ardından kök hücreye dayalı tedavi yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır.

Kök hücrelerin tedavi amaçlı kullanımında uygulama biçimlerinde farklılıklar vardır. Bu farklılıklar; multipotent kök hücrelerin *in vitro* ortamda çoğaltılıp hastaya nakledilmesi, pluripotent kök hücrelerin *in vitro* ortamda farklılaştırılarak hastaya nakledilmesi ve kök hücreler ile doku mühendisliği alanının ortak çalışmasıyla geliştirilen yapıların hastaya nakledilmesi gibi sınıflandırılabilir (Amoh ve diğ. 2008; Meyer ve diğ. 2011; Liu ve diğ. 2013).

Kök hücreleri farklılaştırmak için birden fazla yöntem kullanılabilir. Besi ortamına eklenen kimyasallar, gen aktarım yöntemleri ve ko-kültür çalışmalarıyla bu alanda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

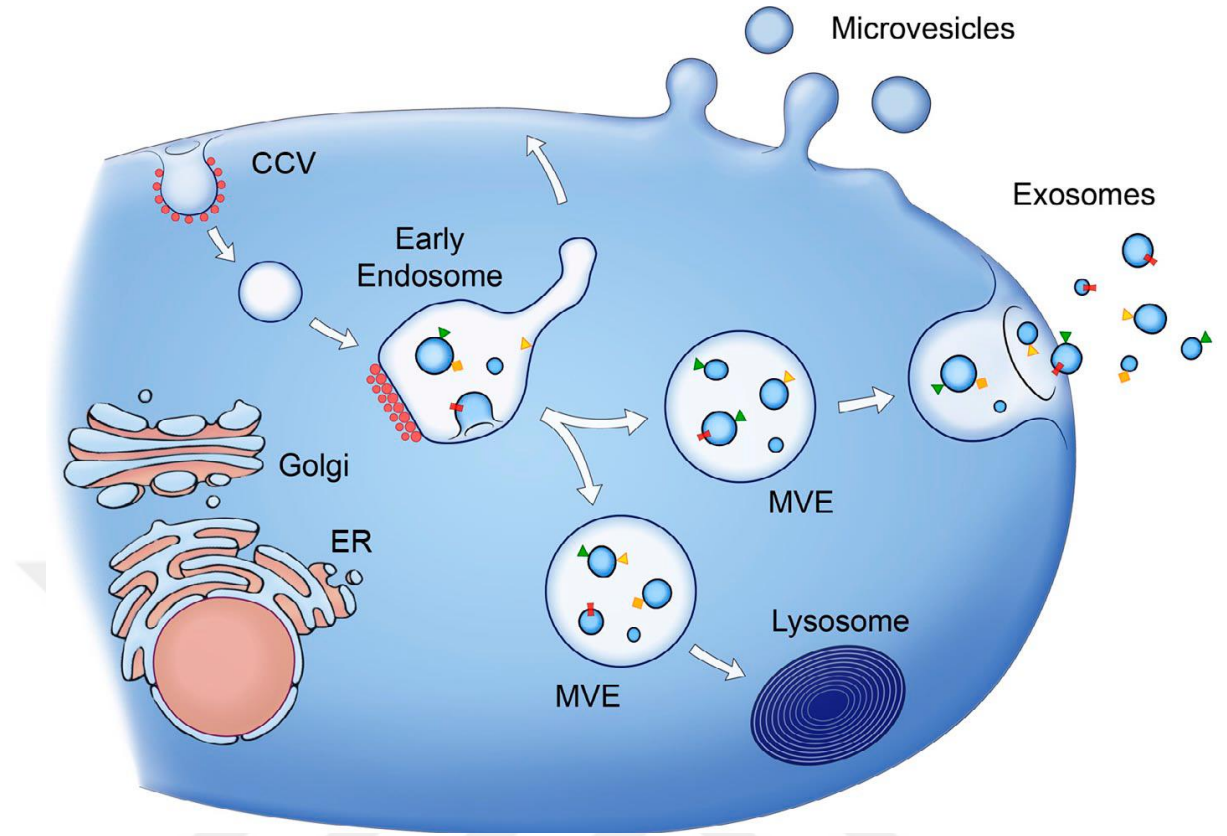
Kök hücrelerin insülin salgılayan beta hücrelerine farklılaştırılması amacıyla laboratuvar ortamlarında birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler diyabet hastalığı için tedavi geliştirmenin yanı sıra embriyonik aşamadaki beta hücre farklılaşmasının daha iyi anlaşılmasını da sağlamaktadır.

### **1.5. Eksozom**

Hücreler arasındaki iletişim direkt hücre-hücre teması ile sağlanabildiği gibi, hücrelerden salgılanan moleküller ile de sağlanabilir. Bunlara ek olarak 3. bir haberleşme mekanizması olarak ekstraselüler veziküllerin (EV) varlığı son 20 yıl içerisinde ortaya çıkmıştır. Bu duruma, apoptoz sırasında hücrelerden salınan apoptotik veziküller örnek olarak verilebilir (Hristov ve diğ. 2004).

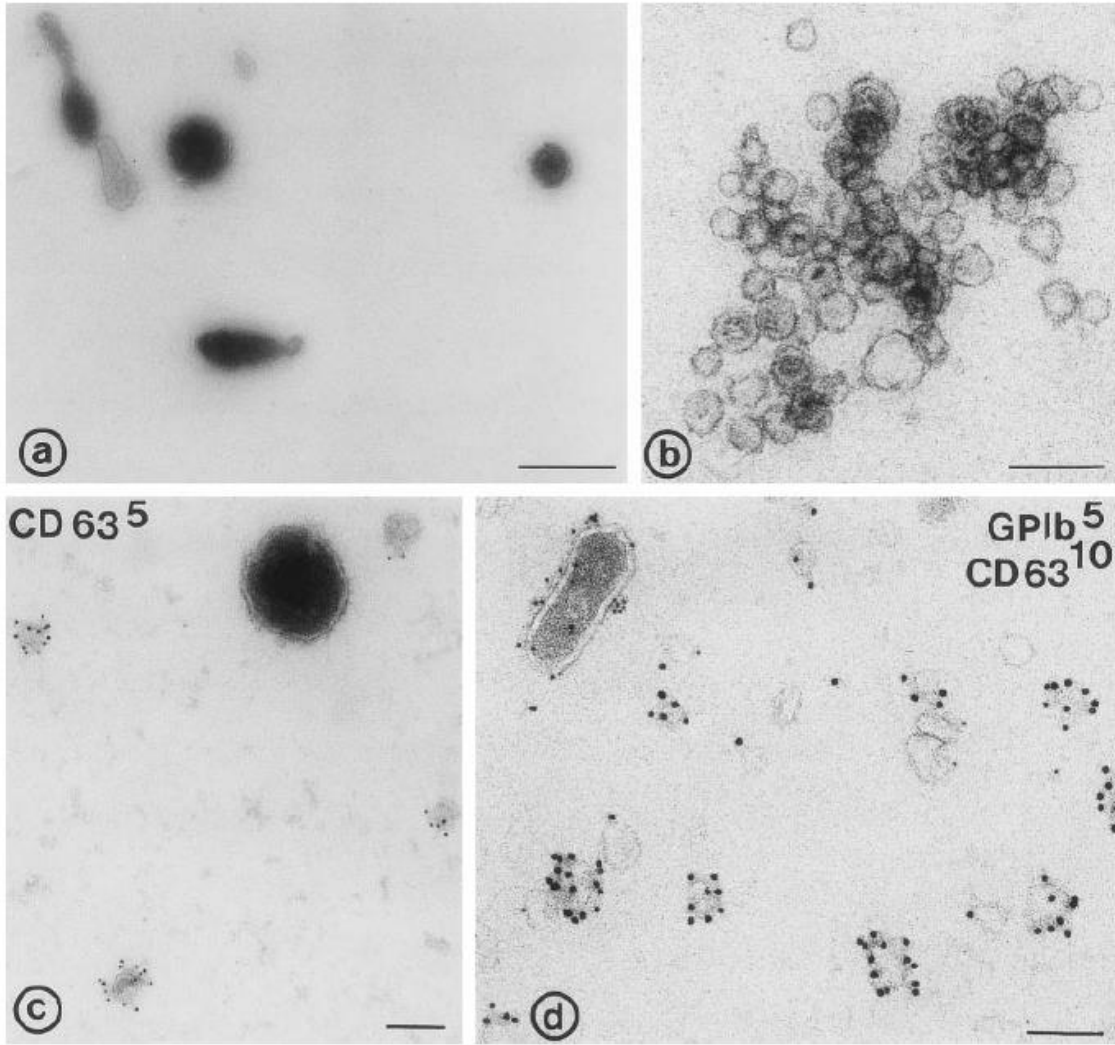
Hücreler mikroçevrelerine (ekstraselüler matrikse), membranla kaplı veziküller salgırlar (Çizim 1.4). İçeriğinde proteinler, lipidler ve RNA bulunan bu ekstraselüler veziküller hücreler arası iletişimde araç olarak kullanılırlar (They ve diğ. 2002, Valadi ve diğ. 2007, Yu ve diğ. 2014). Salgılanan bu veziküller hücre-hücre teması olmaksızın farklı ve uzakta bulunan hücreleri etkileyebilirler. Ancak EV oluşumunun moleküler mekanizması ve nasıl paketlenildiği konuları tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu veziküllerden mikroveziküller, eksozomlar, ektozomlar, salgılanan veziküller ve mikropartiküller gibi farklı isimlerle bahsedilmiştir.

Hücrelerden salınan EV'lerden biri olan eksozomlar, multiveziküler endozomların (MVE) hücre membranı ile birleşerek ekstraselüler matrikse saldıkları içerikte bulunurlar. Eksozomlar ile mikroveziküller boyut, protein içeriği, morfoloji ve yoğunluk bakımından farklılıklar gösterirler (Raposo ve Stoorvogel 2013). Boyutları 30-100 nm olan, birçok hücre türü tarafından salgılanan ve kan, idrar, tükürük, meme sütü, serebrospinal sıvı gibi vücut sıvılarında da bulunan eksozomların içeriğinde, protein ve lipidin yanı sıra mRNA, miRNA gibi nükleik asitler de bulunur (Urbanelli ve diğ. 2013, Svensson ve diğ. 2013).



**Çizim 1.4.** Mikroveziküller, multiveziküler endozomlar ve eksozomların şematik görünümü. Raposo ve Stoorvogel (2013)'den alınmıştır.

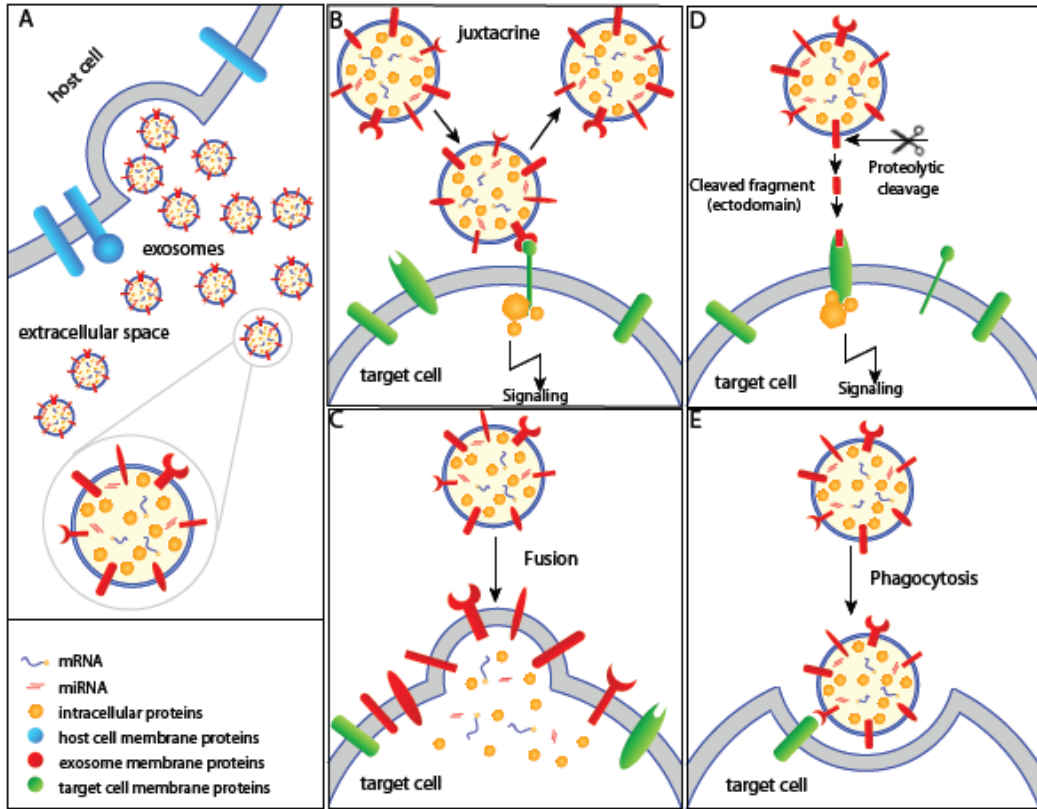
Mikroveziküller ve apoptoz sırasında oluşan apoptotik veziküller şekil olarak heterojenite göstermektedir. Ancak eksozomların hatları belirli bir yuvarlak oldukları elektron mikroskopisiyle belirlenmiştir (Çizim 1.5).



**Çizim 1.5.** Plazma membranı kaynaklı mikroveziküller (a), eksozomlar (b), CD63 pozitif olan eksozom ve mikroveziküller (c), sol üstteki mikrovezikülde, eksozomlara oranla, GPIb pozitifliği CD63 pozitifliğinden daha yüksektir (d) Heijnen ve diğ. (1999)'den alınmıştır.

Eksozomların membranlarında, tüm çok hücreli ökaryotik canlılarda olduğu gibi, tetraspanin adı verilen membran proteinleri bulunmaktadır. CD63, CD81 ve CD9 gibi tetraspaninlerin eksozom membranlarında bulunduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Escola ve diğ. 1998, They ve diğ. 1999, Camussi ve Quesenberry 2013, Azmi ve diğ. 2013). Ayrıca eksozom membranında, diğer plazma membranlarına oranla yüksek oranda kolesterol, bir fosfolipid türü olan sfingomiyelin ve bir lipid türü olan heksosilseramit bulunmaktadır (Brouwers ve diğ. 2012).

Eksozomlar ile hedef hücreler arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamış olsa da olası 4 mekanizma vardır. Eksozomlar hedef hücre ile direkt kontak (juxtacrine şeklinde) kurabilir, hedef hücre membranı ile eksozom membranı kaynaşabilir ve eksozom içeriği hücre sitoplazmasına transfer edilebilir, ya da eksozom yüzeyindeki membran proteinleri proteaz enzimi tarafından bölünebilir ve ayrılan protein parçası bir ligand gibi hücre yüzeyindeki reseptörü uyarabilir ve son olarak antijen sunan hücrelerde olduğu gibi fagositoz yoluyla hücre içine alınabilir (Mathivanan 2012) (Çizim 1.6.).



**Çizim 1.6.** Eksozom-hücre etkileşimi. Mathivanan (2012)'den alınmıştır.

Yapılan çalışmalar eksozomların hücreler arası iletişimde adeta bir taşıyıcı gibi rol aldığını göstermektedir ve eksozomların araştırmacılar tarafından, çalışmak istedikleri hedef hücelere ulaşmak için araç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Johnsen ve diğ. 2014, Ha ve diğ. 2016, Ramachandran ve Palanisamy 2012)

## 1.6. GANT61

Kök hücrelerin önemli özelliklerinden olan proliferasyon (çoğalma) ve diferansiyasyon (farklılaşma) birbirleri ile ters orantılıdır. Farklılaşmaya başlayan kök hücrelerin proliferasyonları yavaşlamaya başlar (Ruijtenberg S ve van den Heuvel S. 2016). Farklılaşma sürecine giren hücreleri etkileyen birçok sinyal yolağı bulunmaktadır. Bunlardan biri de embriyonik aşamada da çok önemli olan SHH yolağıdır. Bu yolağın susturulması hücrelerin proliferasyon yeteneğini azaltır. Hücre çoğalmasını azaltarak farklılaşmayı indüklemek için SHH yolağının susturulmasının bir yolu da GANT61 inhibitörünü kullanmaktır (Kurebayashi ve diğ. 2017).

Gli-1 ve Gli-2 proteinlerini hedef alan GANT61 ile yapılan ilk çalışmalarda, bu molekülün kanser hücreleri üzerindeki etkisi *in vivo* çalışmalarla araştırılmış ve tümör yapısını küçülttüğü, kanser kök hücrelerinin çoğalmasını azalttığı gözlenmiştir (Wickström ve diğ. 2013, Miyazaki ve diğ. 2016).

Genetik bilgi transferinde kullanılan eksozomlar (Lee ve diğ. 2012, Wahlgren ve diğ. 2012) aynı zamanda GANT61 molekülü için taşıyıcı birer araç olarak kullanılıp, kanser hücreleri üzerinde çalışılmış ve hücrelerin çoğalmasının yavaşladığı gözlenmiştir (Guan ve diğ. 2009).

## 2. AMAÇ

Bu tez çalışmasında, mezenkimal kök hücrelerin, insülin sentezleyen beta benzeri hücrelere farklılaşmasında eksozomların etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Beta benzeri hücre farklılaşması farklı yöntemlerle denenmiş olmasına rağmen eksozomların bu farklılaşmaya etkisi araştırılmamıştır. İnsülin sentezleyebilen beta benzeri hücre elde etmenin yanı sıra, eksozomların, salgılandıkları hücreye özgü proteinler ve transkripsiyon faktörleri içerdiğinden, kök hücreleri farklılaştırmak için kullanılmasının etkili bir

yaklaşım olacağı düşünülmektedir (Blanc ve diğ. 2005, Takeda ve Xu 2015, Huang ve diğ. 2016, Narayanan ve diğ. 2016).

### **3. YÖNTEM**

#### **3.1. İnsan Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu**

Bu tez çalışmasında kullanılan kök hücreler, etik kurul onayı alınarak izole edilen insan Wharton jeli kaynaklı kök hücrelerdir (KOU-KAEK 2015/240). Doğumla birlikte kesilen göbek kordonunun 15-20 cm kadarı %5 penisilin/streptomisin (P/S) (Gibco) antibiyotiği ve fosfat tamponu (PBS) (Gibco) içeren doku nakil solüsyonuna alındı. Gelen doku örneği petri kabı içerisinde %5 penisilin/streptomisin içeren solüsyon (PBS) ile yıkandı. Yeni bir petri kabına alınan göbek kordonu, içinde bulunan iki adet arter ve bir adet venden bisturi ve pens yardımıyla ayrıldı. Dokunun bir kısmı eksplant kültür için ayrılırken diğer bir kısmı enzimatik izolasyon için bisturi ile küçük parçalara ayrıldı. Doku parçaları (2 mg/ml) kollajenaz (Gibco) içeren deney tüpüne alındı. Deney tüpleri 37°C çalkalamalı su banyosuna konuldu. Dokunun erime durumu takip edilerek 1-2 saat inkübasyonu yapıldı. Süre sonunda enzim aktivitesini durdurmak için deney tüpüne Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) içeren HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (Gibco) solüsyonu eklendi. Doku, 400g'de 10 dakika (dk) santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pelet P/S (%1) ve FBS (%10) içeren DMEM (Gibco) besi yeri ile sulandırılarak tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonucu oluşan pelet, yoğunluğuna göre T25 ya da T75 kültür kabına %1 P/S, %10 FBS içeren DMEM besi yeri ile ekildi. Flasklar 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeriği olan inkübatöre kaldırıldı.

Eksplant kültür için ayrılan göbek kordonu mins edilmeden ufak parçalara ayrıldı. 60 mm petri kabına alınan dokular kurumaları için yaklaşık 5 dk bekletildi. Yeterli süre geçtikten sonra dokuları kaldırmadan üzerlerine %1 P/S, %10 FBS içeren DMEM besi yeri eklendi ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeriği olan inkübatöre kaldırıldı.



## **3.2. İnsan Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu**

Eksplant kültür ve enzimatik izolasyon yöntemleriyle elde edilen ve kültür kabına yapışarak çoğalan insan Wharton Jeli mezenkimal kök hücrelerinin (iWJ-MKH) morfolojileri zıt faz mikroskobu ile incelenerek kontrol edildi. iWJ-MKH'lerinin kök hücre özelliğinde olduğunu göstermek amacıyla karakterizasyon çalışmaları yapıldı. MKH'ler, *in vitro* farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi için adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşmaya alındı. İmmünfenotipik özelliklerin belirlenmesi için ise immünfloresan boyamalar ve akış sitometri analizi yapıldı.

### **3.2.1. iWJ-MKH'lerin İmmünfloresan Analizi**

İmmünfloresan analizler için P3'e getirilen hücreler, poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture Chamber slide 8-well) her kuyuda  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekildi. Kültür kabına tutunması için bir gece inkübatörde bekletildi.

Boyama çalışmaları için odacıkların tabanına yapışan hücreler  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içeren PBS (İnvitrogen) ile yıkandıktan sonra metanol ile 10 dk,  $-20^{\circ}C$ 'de tespit edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra %1,5 normal blok serum (Santa Cruz Biotechnology) içeren PBS'de 30 dk inkübe edildi. Vimentin (Santa Cruz Biotechnology), Fibronektin (Santa Cruz Biotechnology), CD44 (Santa Cruz Biotechnology), ASMA (Alfa smooth muscle actin) (ThermoFisher Scientific) gibi MKH'lerin sentezlediği belirteçler için, primer antikolar uygun oranlarda Antibody Diluent (İnvitrogen) dilue edildikten sonra fiske edilen hücrelere eklenerek  $4^{\circ}C$ 'de gece boyu bekletildi. Daha sonra 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilen hücreler PBS ile yıkandı. Floresan işaretli olan sekonder antikolar (fluoresan izotiyosiyonat-FITC, Texas Red-TR) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Nükleer boya ve kapatma medyumunu olan DAPI (UltraCruz Mounting Medium-Santa Cruz Biotechnology) ile kapatıldıktan sonra floresan mikroskopta fotoğraflandı.

### **3.2.2. iWJ-MKH'lerin Akış Sitometri ile Analizi**

Akış sitometri analizi için hücreler P3'te kaldırıldı ve  $2 \times 10^6$  hücre PBS içine alınarak ayrıldı. MKH yüzey belirteçlerinin monoklonal antikolarından (CD44, CD90, CD73,

CD105) (Becton Dickinson) ve uygun izotip kontrollerinden 20 µl eklenerek, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 45 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücrelerin üzerine yıkama solüsyonu olarak kullanılan, %0.1 sodyum azit içeren PBS eklenerek 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Oluşan pelet 400 µl yıkama solüsyonu (Becton Dickinson) ile sulandırıldı. Hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutuldu ve BD Cell Quest TM programı ile analizi gerçekleştirildi. Analiz işleminin sonucunda işaretlenerek bakılan yüzey belirteçlerinde %90 ve üzeri ekspresyon olanlar pozitif olarak kabul edildi.

### 3.2.3. iWJ-MKH'lerin *In Vitro* Farklılaştırılması

#### Adipojenik Farklılaştırma

MKH'ler P3'te iken 6 kuyucuklu kültür kabına cam slaytlar üzerine, her bir kuyucuğa  $2 \times 10^5$  hücre gelecek şekilde ekildi. Hücreler %70-80 konfluensiye ulaştıktan sonra adipojenik farklılaşmayı uyarmak için; %1 P/S, %10 FBS, 200 µM indometasin (Sigma-Aldrich),  $10^{-6}$  M deksametazon (STEMCELL Technologies), 0,5 mM izobutilmetilksantin (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml insülin (Sigma-Aldrich) içeren DMEM kültür medyumunda, medyum her 3. günde değiştirilmek üzere, kültüre edildi. Adipojenik farklılaşma besi yerinde, 4 hafta kültür edilen hücreler, bu süre boyunca mikroskopta lipid vakuolleri oluşumu açısından kontrol edildi. Lipid vakuollerini saptamak için Oil Red O (Sigma-Aldrich) histolojik boyaması yapıldı. PBS ile yıkanan hücreler 15 dk, %4 paraformaldehit (Merck) ile tespit edildi. Sonrasında PBS ve distile su ile yıkanan hücreler %60 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

Hücreler %0,0018 gr/ml Oil Red O boyasında 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra PBS ile yıkandı ve çekirdek boyaması yapılarak mikroskop altında görüntülendi.

#### Osteojenik Farklılaştırma

Kültür kabı içerisine konulan cam slaytlar üzerine ekilen  $2 \times 10^5$  hücreler %70-80 konfluensiye ulaştıktan sonra osteojenik farklılaşmaya alındı. Osteojenik farklılaşmanın

indüklenmesi için; %1 P/S, %10 FBS, 0,05 µM askorbat-2-fosfat (STEMCELL Technologies), 100 nM deksametazon (STEMCELL Technologies), 10 mM β-gliserofosfat (Sigma-Aldrich) içeren DMEM kültür medyumunu kullanıldı. Osteojenik farklılaşmanın saptanması için kültürün 3. haftasında Alizarin Red-S (Fluka) boyaması yapıldı. Tespit işlemi için hücreler PBS ile yıkandı ve %70'lik etil alkol ile 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra pH aralığı 4,1-4,3 olan %2'lik Alizarin Red-S ile 45 saniye boyanan hücreler ve mikroskopta görüntülendi.

### **Kondrojenik Farklılaştırma**

Kondrojenik farklılaşma için StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco) kullanıldı. P3'teki MKH'ler 60 mm petri kaplarına,  $1 \times 10^5$  hücre/100 µl olacak şekilde ekildi. Damla formları bozulmadan inkübatöre kaldırıldı. Hücreler tutunduktan sonra farklılaşma medyumunu eklendi. Farklılaşma medyumunu, 9 ml StemPro® Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium'a 1 ml StemPro® Chondrogenesis Supplement ve %1 P/S eklenerek hazırlandı. Kültür 14 gün devam ettirildi ve bu süre sonunda farklılaşma sonlandırıldı. Hücreler %1 paraformaldehit ile 10 dk oda sıcaklığında tespit edildi ve distile su ile yıkama yapıldıktan sonra %1'lik Alcian Blue (Sigma-Aldrich) ile 30 dk oda sıcaklığında boyandı. Tekrar distile su ile yıkandıktan sonra çekirdek boyaması yapıldı ve mikroskopik analiz yapıldı.

### **3.3. 1.1 B4 Beta Hücre Hattı Kültürü**

1.1 B4 hücreleri %1 P/S ve %10 FBS içeren RPMI (Lonza) besi yerinde kültüre edildi. Hücreler kültür kabında %90 konfluensiye ulaştığında, hücrelerden salınan eksozomların izolasyonu için serum içermeyen besi yerine alındı. Serumsuz besi yerinde bir gün bekletilen hücrelerin besi yerleri toplandı. Toplanan besi yerleri eksozom izolasyonu için bekletilmek üzere -80°C'deki buzdolabına kaldırıldı. Hücreler serum içeren besi yerine alındı. Bu işlem hücreler %100 konfluensiye ulaşana kadar tekrarlandı ve serumsuz besi yerleri toplanarak -80°C'deki buzdolabına kaldırıldı.

### **3.4. Eksozomların İzolasyonu**

Eksozom izolasyonu ultrasantrifüj yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Beta hücre hattı kültüründen toplanan serumsuz besi yerleri, ölü hücreler ve hücre döküntülerinden arındırılması için ön santrifüj işlemine tabi tutuldu. Toplanan besi yerleri 1000g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant toplandı ve 4°C'de 5000g'de 20 dk santrifüj edildi. Toplanan süpernatant ultrasantrifüj tüpüne alındı ve ultrasantrifüjde (Beckman Coulter Optima MAX-XP) +4°C'de 100.000g'de 6 saat santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüplerin tabanında toplanan eksozomlar dikkatli bir şekilde toplandı. Eksozomlar karakterizasyon işlemleri için ayrıldıktan sonra -80°C'de saklandı.

### **3.5. Eksozom Karakterizasyonu**

#### **3.5.1. Eksozom Protein Konsantrasyonu**

Eksozomların protein konsantrasyonu QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich) ile ölçüldü. Kit içeriğinde bulunan QuantiPro Buffer QA, QuantiPro Buffer QB, Copper(II) sulfat Pentahydrate 4% Solution ve Protein Standard Solution önerilen oranlarda hazırlandı. 96 kuyucuklu kültür kabında, deney yapılacak her kuyuya 100'er µL hazırlanan tampon solüsyondan konuldu. Boş kuyu ve örnek eklenecek kuyu hariç diğer kuyulara protein standartları sıralı şekilde konuldu. En son olarak örnekler yüklenerek 1 saat süreyle 60°C'de inkübe edildi. Süre sonunda SpectraMax 190 Microplate Reader spektrofotometre (Molecular Devices) ile ölçüm yapıldı.

#### **3.5.2. Eksozomların Akış Sitometri ile Karakterizasyonu**

Eksozomların kendilerine özgü olan yüzey belirteçlerinin belirlenmesi için akış sitometri analizi yapıldı. Eksozom içeren deney tüplerine, eksozom yüzey belirteçleri olarak kabul edilen CD9, CD63 ve CD81 monoklonal antikörlerinden (eBioscience) ve

uygun izotip kontrollerinden 20 µl eklenerek oda sıcaklığında, karanlık ortamda 45 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra eksozomların üzerine yıkama solüsyonu olarak kullanılan, %0.1 sodyum azit içeren PBS eklenerek 2000g'de 30 dk santrifüj edildi. Oluşan pelet 400 µl yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Eksozom süspansiyonu FACS Calibur (BD Biosciences) akış sitometri cihazında okutuldu ve BD CellQuest programı ile analizi gerçekleştirildi.

### **3.5.3. Eksozomlardan RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi**

1.1 B4 beta hücre hattı kaynaklı eksozomların, içerdiği mRNA'larını mezenkimal kök hücrelere aktardığını ve farklılaşmayı etkilediğini gösterebilmek için eksozomlardan total RNA izolasyonu yapıldı. Bu işlem Total Eksozom RNA İzolasyon Kiti (Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit. Invitrogen) ile yapıldı ve elde edilen RNA'ların saflığı ve miktarı Pikodrop cihazıyla ölçüldü. Ardından RNA'lardan cDNA elde edilmesi gerçekleştirildi.

### **3.6. Eksozomların GANT61 ile Modifikasyonu**

1.1 B4 beta hücrelerinden elde edilen eksozomlar (1000 µg/50 µl) GANT61 (100 nM, DMSO) ile 1:1 oranında karıştırılarak 4°C'de 1 gece bekletildi. Sonra modifiye eksozomlar yeniden izole edilerek eksozomların içerisine difüze olmayan GANT61 ortamdan uzaklaştırıldı. Eksozomlar sonra -80°C'de saklandı.

### **3.7. Deney Gruplarının Oluşturulması**

Tez çalışmasında, beta hücre hattı kaynaklı eksozomların, Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin insülin üreten hücrelere farklılaşma potansiyeline etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla dört farklı deney grubu oluşturulmuştur. 6

kuyucuklu kültür kaplarına ekilen hücreler standart kültür besi yerinde kültüre edildi ve bu grup kontrol grubu olarak adlandırıldı. Diğer bir grupta hücreler, Nicotinamide ve Exendin-4 içeren besi yeri ile kültüre edildi ve böylece klasik kimyasal farklılaşma metodu incelendi. Deney grubunda ise kimyasal farklılaşma indüklenmiş ancak farklılaşma işlemine eksozomların katkısıyla devam edilmiştir. Kimyasal uyararla farklılaşma ve kimyasal+eksozom etkisi ile farklılaşma metotları karşılaştırılmış ve eksozom etkisi incelenmiştir (Çizelge 3.1.). Son olarak eksozomlar GANT61 (Santa Cruz Biotechnology) ile modifiye edilerek eksozomların içerisine Hedgehog sinyal yolağını susturacak ilacın difüzyonla girmesi sağlanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Deney grupları tablosu

<b>Deney Grupları</b>	<b>Kültür Besi Yeri</b>	<b>Farklılaşma Türü</b>
<b>Grup 1 (Kontrol)</b>	Standart kök hücre kültür besi yeri	Farklılaşma yok
<b>Grup 2 (Kimyasal Uyarıcı)</b>	Endokrin farklılaşmayı uyaran besi yeri	Kimyasal uyararla
<b>Grup 3 (Eksozom)</b>	Endokrin farklılaşma besi yerine eksozom eklentisi	Kimyasal + Eksozom ile
<b>Grup 4 (Eksozom + GANT61)</b>	Endokrin farklılaşma besi yerine GANT61 ile modifiye eksozom eklentisi	Kimyasal + Modifiye Eksozom ile

### **3.8. Endokrin Hücre Farklılaşması**

Hücreleri endokrin hücre yönünde farklılaşmaya uyarmak için kuyucuk başına 150.000 hücre olacak çizimde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Farklılaşma ortamı için DMEM:F12 içeren ortama EGF (Epidermal growth factor, 25 ng/ml), Nicotinamide (10mM), Activin-A (2nM), Activin-B (100 ng/ml), Exendin-4 (10 nM), HGF

(Hepatocyte growth factor, 100 pM), Pentagastrin (10 nm), FBS (%10) ve Penicilin/streptomisin (%1) eklendi. Sonra hücreler 37°C, %5 CO<sub>2</sub> kontrollü atmosfer kültür koşullarında 21 gün inkübe edildi.

### **3.9. Kök Hücreler ile Eksozomların Ortak Kültürü**

Deneyin kontrol grubu olarak Grup 1 oluşturuldu ve insan Wharton jeli kaynaklı hücreler standart ortamda kültüre edildi.

Deney gruplarından Grup 2’de ise kök hücreler standart farklılaştırma besi yeri ile muamele edildi.

3.grupta insan Wharton jeli kaynaklı kök hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına cam slaytlar üzerine ekildi. Hücreler tutunduktan sonra farklılaştırma besiyerine ek olarak 1.1 B4 hücre hattı kaynaklı eksozomlar ile ortak kültür işlemine geçildi. Her kuyuya 100µg eksozom gelecek şekilde, her üç günde bir besi yeri değiştirilerek kültüre devam edildi. Hücreler her gün morfolojik değişim açısından mikroskopta kontrol edildi.

Deneyin 4.grubunda ise farklılaşma besiyerine katılan eksozomlar GANT61 ile muamele edildi. Böylelikle GANT61’in ve gen susturmanın farklılaşma üzerine etkisi incelenmiş oldu.

Ortak kültür sonrası hücrelerin kazandığı özellikleri belirlemek için çeşitli analizler yapıldı. Kültür sırasında ve sonrasında morfolojik değişim mikroskopta incelendi ve görüntülendi. Beta hücre belirteçleri açısından gen ekspresyon analizleri yapıldı. Farklılaşma potansiyeli immünfloresan işaretleme ile görüntülendi.

#### **3.9.1. Hücre Morfolojileri**

Ortak kültüre alınan hücreler her 2-3 günde bir kültür ortamı değiştirilmeden önce mikroskop altında incelendi. Işık mikroskobu altında hücre morfolojilerindeki değişimler gözlenip kayıt edildi.

### 3.9.2. İmmünfloresan Boyamalar

Farklılaşma mediumuna ve ortak kültüre alınan hücreler, beta hücre belirteçlerinden olan insülin, Ngn3, Pdx1 açısından immünfloresan işaretleme ile boyandı. Böylece deney grubu ve kontrol grubu arasındaki fark incelendi. Cam slaytlardaki hücre grupları PBS ile yıkanarak %70 metanolle fikse edildi. Belirlenen primer antikora uygun seçilen normal blok serumdan %1,5 hazırlanarak 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Antibody Diluent ile hazırlanan primer antikordaki 4°C’de gece boyunca bekletildi. Ertesi gün 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve PBS ile yıkandı. Uygun floresan (FITC, TR) işaretli sekonder antikolarla 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Nükleer boya içeren kapatma medyumu (DAPI) ile kapatıldıktan sonra Fluoresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelendi ve fotoğraflandı.

### 3.9.3. Gen Ekspresyon Analizleri

Ortak kültüre alınan hücrelerin ekspresyon profilinde oluşan değişiklikleri incelemek için Real Time-PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi yapıldı.

#### 3.9.3.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Toplam RNA izolasyonu için GeneJET RNA Purification Kit (Thermo) kullanılmıştır. Hücreler ( $1 \times 10^6$ ) toplandıktan sonra 300 µl 1,5 mM β-mercaptoetanol içeren liziz solüsyonu içerisinde enjektör (30G) yardımıyla parçalandı. 2:1 oranında etanol ile karıştırılarak 8000g ‘de 5 dak. santrifüj edildi. Daha sonra örnekler kit içerisinde bulunan kolona yüklenerek 8000g ‘de 1 dak santrifüj edildi. Kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonları kullanılarak önce 700 µl sonra 600 µl ve 250 µl solüsyon kolondan 8000g ‘de 1 dak santrifüj yardımıyla geçirilerek kolon yıkandı. Sonra örnekler boş olarak 12000g ‘de 2 dak santrifüj edildi. En son aşamada 50 µl RNA içermeyen distile su kullanılarak RNA kolondan çözüldü.

Temiz bir tüpte toplanan RNA’nın konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Picodrop kullanıldı. 260 nm ve 280 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek  $A_{280/260}$  oranı ile örneğin saflığı ve konsantrasyonu belirlendi. İzole edilen RNA’lar inceleninceye kadar -80°C’de muhafaza edildi.

cDNA sentezi için Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) tercih edildi ve işlemlerde 1 µg RNA kullanıldı. Önce RNA oligo dT ile karıştırılarak 65°C’de



10dk boyunca primerlerin bağlanması sağlandı. RNA'nın bağlı kalması için buza alınarak reverse transkriptaz içeren karışım reaksiyona eklendi. 55°C'de 30 dk ve 85°C'de 5 dk bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi ve sonra sentezlenen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

### 3.9.3.2. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)

Reaksiyonlarda her gen için özgün primerler kullanıldı (Çizelge 3.2.). SYBR içeren master solüsyonu (ABI, Thermo) ile reaksiyon kuruldu. Real-Time PCR cihazı (Lightcycler480-II, Roche) ile DNA parçalarının çoğalması ölçüldü. Kontrol grubu hücrelerinin ekspresyonlarına göre deney gruplarındaki hücrelerin gen ifadeleri katlar şeklinde ifade edildi.

**Çizelge 3.2.** Real Time PCR için kullanılan primerler ve dizileri

Primerler	Açık Adları	Sekanz (5'-3')
Ins	Insulin	AGCCTTTGTGAACCAACACC GCTGGTAGAGGGAGCAGATG
Pdx1	Pancreatic duodenal homeobox 1	CCTTTCCCATGGATGAAGTC TTCAACATGACAGCCAGCTC
Pax4	Paired box gene 4	GTGAGGGTCTGGTTTTCCAA AGGTGGGGTGTCACTCAGAC
Ngn3	Neurogenin 3	TTCGCCACAACACTACATCTG GGGAGACTGGGGAGTAGAGG
SHH1	Sonic Hedgehog 1	TTAAATGCCTTGGCCATCTC TTTCACAGAGCAGTGGATGC
GAPDH	Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase	AGAGAGAGGCCCTCAGTTGCT TGGAATTGTGAGGGAGATGCT

### 3.10. İstatistiksel analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (Chicago, ABD) programı ile yapılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edilmişlerdir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark  $p<0,05$  olduğunda anlamlı olarak ifade edilmiştir.



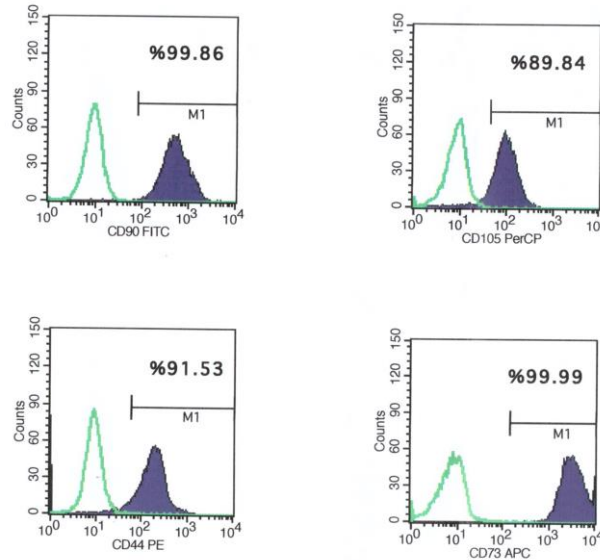
## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, beta hücre hattından elde edilen eksozomlar ile insülin üreten beta benzeri hücre elde edilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada KÖGEM laboratuvarlarında izole edilip çoğaltılan insan Wharton jeli kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Kök hücreler göbek kordonundan enzimatik ve eksplant izolasyon yöntemleri ile elde edilmiştir. Elde edilen kök hücrelerin adipojenik, osteojenik, kondrojenik hücre tiplerine farklılaştığı gösterilmiş, immün boyamalar ve akış sitometri yöntemi ile karakterizasyonları yapılmıştır.

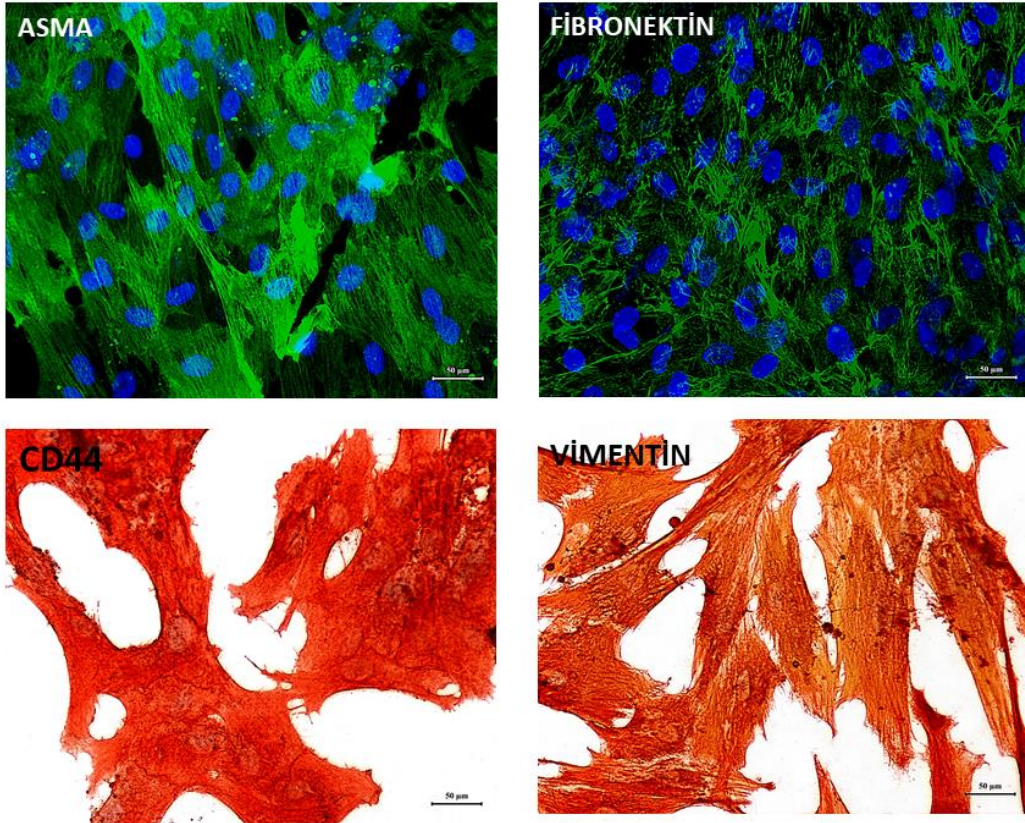
### 4.1. İzole Edilen iWJ-MKH'ler ve Karakterizasyonu

Tez çalışmasında kullanılmak üzere izole edilen hücrelerin kök hücre özelliği taşıdığı farklılaşma çalışmaları, yüzey belirteç analizleri ve boyamalar ile gösterilmiştir.



**Çizim 4.1.** İnsan Wharton jeli kaynaklı kök hücrelerin akış sitometri ile analizi

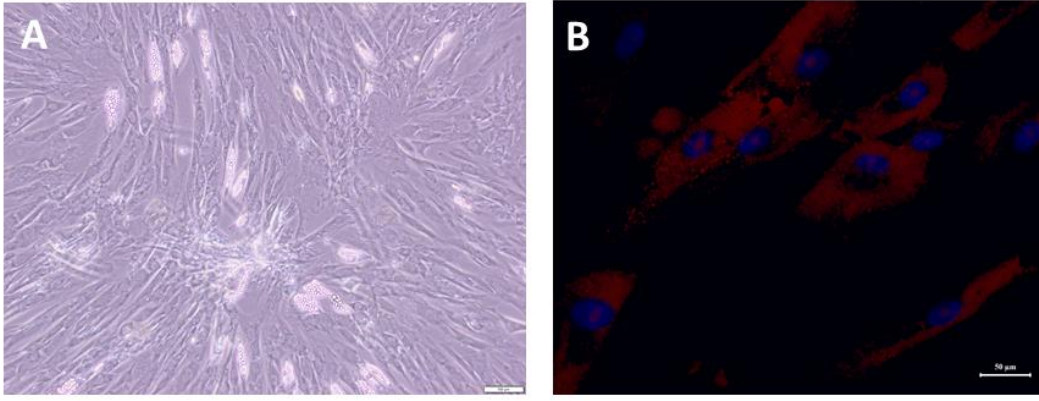
Yapılan akış sitometri analizinde bakılan yüzey belirteçlerinden CD44, CD73, CD90, CD 105 sırayla %91.53, %99.99, %99.86, %89.84 oranlarında bulunmuştur (Çizim 4.1). Analiz sonucu, hücrelerin kök hücre belirteçlerini gerekli oranlarda taşıdığını göstermiştir.



**Çizim 4.2.** iWJ-MKH'lerin kök hücre belirteçlerinin boyama sonuçları. Hücre çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Ölçek çubuğu: 50 µm.

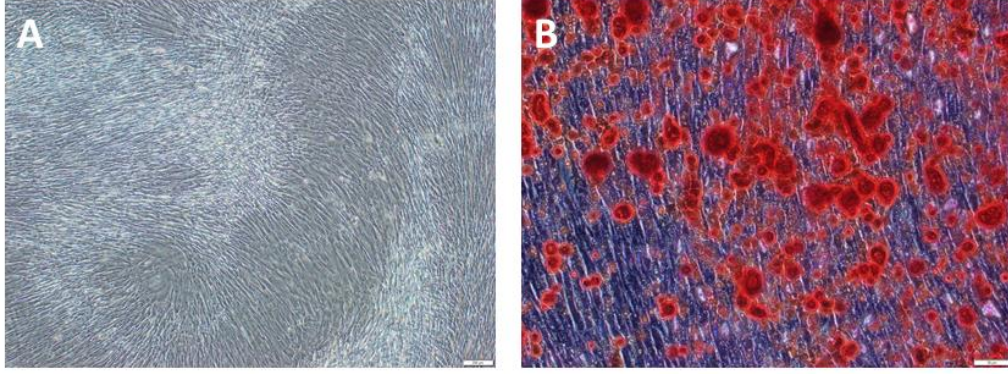
İnsan Wharton jeli kaynaklı hücrelerin, kök hücre özelliği taşıdığını göstermek için; hücreler Vimentin, ASMA, Fibronectin ve CD44 belirteçleri ile işaretlenmiştir. Boyamaların sonucunda pozitif sonuç alınmış ve hücrelerin kök hücre özelliği taşıdığı gösterilmiştir. (Çizim 4.2.).

Kök hücre özelliklerinin belirlenmesinde bir diğer yöntem ise farklılaşma yeteneklerinin incelenmesidir. Bu sebeple kök hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücre hatlarına farklılaşabilme potansiyelleri incelenmiştir (Çizim 4.3., 4.4., 4.5.). iWJ-MKH'ler, kimyasal yöntemler ile adipojenik hücre farklılaşmasına alınmıştır ve morfolojik olarak değişimi gözlenmiştir (Çizim 4.3. A). Farklılaşma işlemi dört hafta devam ettirilmiş ve hücrelerin sitoplazmasında yağ damlacıklarının oluşumu gözlenmiştir. Hücreler fikse edilip Oil Red O ile boyanmış ve hücrelerin adipojenik hücreye başarılı bir şekilde farklılaştığı gösterilmiştir (Çizim 4.3. B).



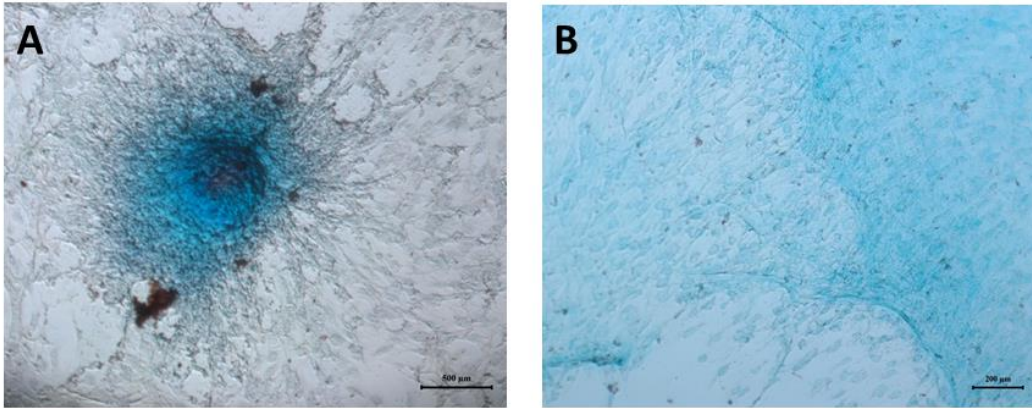
**Çizim 4.3.** iWJ-MKH'lerin adipojenik hücre farklılaşma çalışması. Hücrelerin sitoplazmasında yağ tanecikleri oluşumu Oil Red O ile muamele edilerek gözlenmiştir (A, B). Gözlenen kırmızı boyanma adipojenik farklılaşmaya işarettir. Hücre çekirdekleri DAPI ile mavi renkte boyanmıştır. Ölçek çubuğu: A 100  $\mu\text{m}$ ; B 50  $\mu\text{m}$ .

Kök hücreler osteojenik farklılaşmaya alınarak farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir. Farklılaşma sürecinde hücrelerin içerisinde kalsiyum nodüllerinin oluştuğu gözlenmiştir (Çizim 4.4. A) ve bu nodüller Alizerin Red-S ile boyanmıştır (Çizim 4.4 B). Boyanmanın pozitif olması iWJ-MKH'lerin osteojenik hücrelere farklılaşabildiğini göstermiştir.



**Çizim 4.4.** iWJ-MKH'leri osteojenik hücreye farklılaştırma çalışması. Hücrelerde kalsiyum nodüllerinin olduğu Alizerin Red-S boyaması ile gözlenmiştir. Ölçek çubuğu: A 200  $\mu\text{m}$ ; B 50  $\mu\text{m}$ .

Kök hücrelerin karakterizasyonunda kondrojenik farklılaşma çalışması da yapılmıştır. Farklılaşma sonrası fikse edilen hücreler Alcian Blue ile boyanarak hücrelerde oluşan glikozaminoglikanların gözlenmesi sağlanmıştır (Çizim 4.5.).

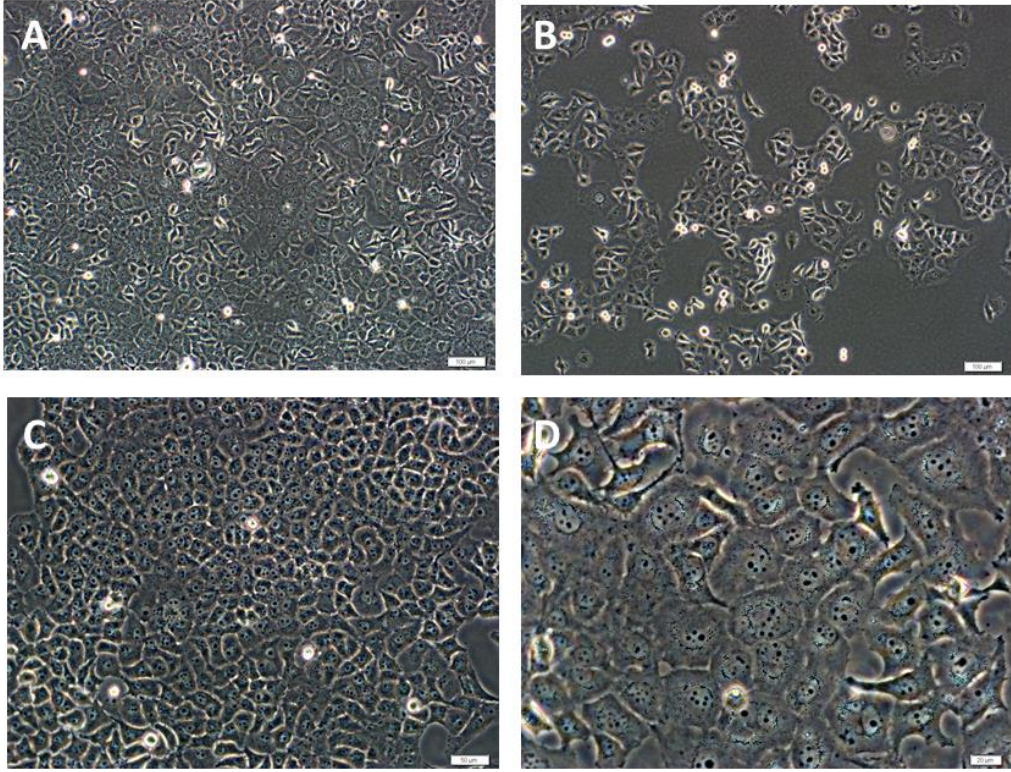


**Çizim 4.5.** iWJ-MKH'lerinin kondrojenik hücre farklılaştırma çalışması. Alcian Blue boyaması sonucu hücrelerin (A) kontrol grubuna (B) kıyasla kondrojenik yönde farklılaştığı gösterilmiştir. Ölçek çubuğu: A 500  $\mu\text{m}$ ; B 200  $\mu\text{m}$ .

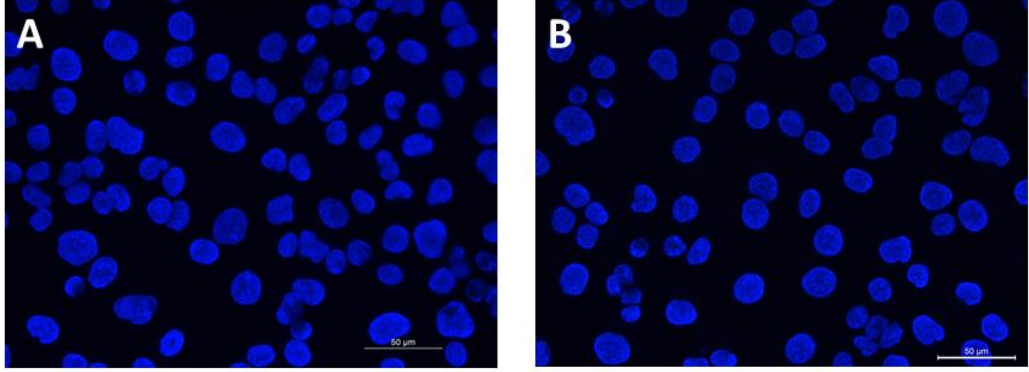
Karakterizasyon çalışmaları sonrasında hücrelerin, kök hücre özelliklerini gösterdiği kanıtlanmış ve tez çalışmasının devamında kullanılmıştır.

#### 4.2. 1.1 B4 Beta Hücre Hattı Kültürü

1.1 B4 beta hücre hattı kültürü %10 FBS ve %1 P/S içeren RPMI besi yeri ile gerçekleştirilmiştir. %70 konfluensiye ulaşan hücreler pasajlanarak çoğaltılmış ve deneyler için gerekli sayıya ulaşılan kadar kültüre devam edilmiş (Çizim 4.6.), hücre hattının mikoplazma kontaminasyon kontrolleri DAPI boyaması ile yapılmıştır (Çizim 4.7.).



**Çizim 4.6.** 1.1 B4 beta hücre hattı mikroskopi görüntüleri. Ölçek Çubuğu; A,B 100  $\mu\text{m}$ ; C 50  $\mu\text{m}$ ; D 20  $\mu\text{m}$ .



**Çizim 4.7.** 1.1 B4 beta hücre hattı mikoplazma kontrolü için DAPI ile boyama görüntüsü. Ölçek Çubuğu: A-B 50 µm.

### 4.3. Eksozom İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Eksozom izolasyonu için, beta hücreleri, kültür kabında yaklaşık %90 konfluensiye ulaşıncaya serum içermeyen besi yerine alınmıştır. Ertesi gün besi yeri toplanarak normal besi yeri eklenmiştir. Hücreler %100 konfluensiye ulaşana kadar bu işlem devam ettirilmiş ve toplanan besi yerleri -80°C’de saklanmıştır. Yeterli besi yeri elde edildiğinde, besi yeri hücre artıkları ve ölü hücrelerden arındırılmak için ön santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Besi yerleri 1000g’de 10 dk ve 5000g’de 20 dk santrifüj edilmiştir. Ultrasantrifüj işlemi için ultrasantrifüj tüplerine alınan besi yerleri 100.000g’de 6 saat santrifüj edilmiştir. Oluşan eksozom peleti dikkatlice alınmış ve analizler için -80°C’de saklanmıştır. Aynı yöntem kullanılarak iWJ-MKH’lerinin eksozomları izole edilmiştir.

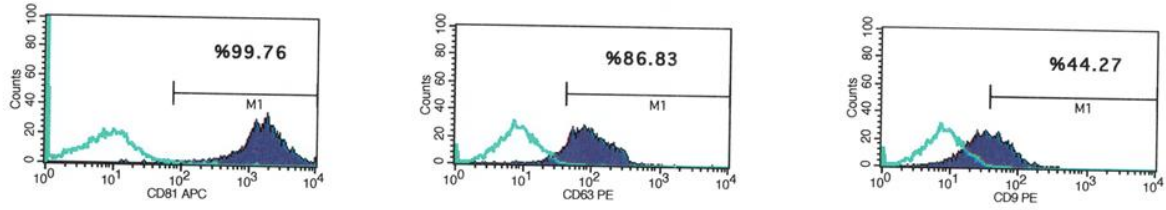
BCA Assay yöntemi ile elde edilen eksozomların protein miktarı ölçülmüş ve toplamda 15.000µg/ml eksozom elde edilmiştir.

Eksozomların akış sitometri analizi için deney tüplerine, CD9, CD63 ve CD81 monoklonal antikoları ve uygun izotip kontrolleri 20 µl olarak eklenmiştir ve oda sıcaklığında, karanlık ortamda 45 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yıkama



solüsyonu eklenerek 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan pellet 400 µl yıkama solüsyonu ile sulandırılmış ve FACS Calibur cihazında okutulmuştur.

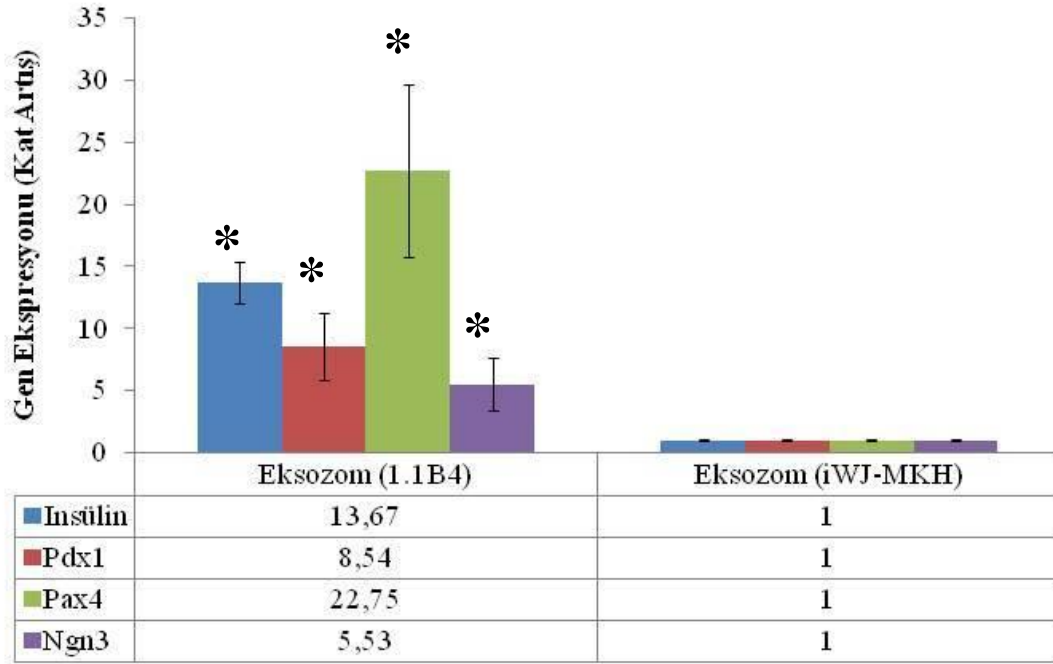
Analiz sonucunda CD61 %99,76, CD63 %86,83 ve CD9 %44,27 olarak bulunmuştur. (Çizim 4.8.).



**Çizim 4.8.** Eksozomların akış sitometri ile karakterizasyonu

1.1 B4 beta hücre hattı kaynaklı eksozomların, içerdiği mRNA'larını mezenkimal kök hücelere aktardığını ve farklılaşmayı etkilediğini gösterebilmek için eksozomlardan total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu işlem Total Eksozom RNA İzolasyon Kiti (Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit. Invitrogen) ile yapıp, elde edilen RNA'ların saflığı ve miktarı Pikodrop cihazıyla ölçülmüştür. Daha sonra Real-Time PCR yapılarak gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiş, iki farklı hücre kaynağından elde edilen eksozomların gen ekspresyon profilleri beta hücre belirteçleri açısından karşılaştırılmıştır (Çizim 4.9.).

Eksozomlarda İnsülin, Pdx1, Ngn3 ve Pax4 genleri incelenmiş ve iWJ-MKH eksozomlarına göre 1.1 B4 eksozomları, bu genlerin RNA'larını belirgin olarak daha yüksek ifade ettikleri bulunmuştur ( $p < 0,05$ ). En yüksek ifade 22,75 kat fazla ile Pax4 geninde olduğu hesaplanmıştır. Ayrıca İnsülin geni RNA'sı kök hücreye göre 1.1 B4 hücrelerin eksozomlarında 13,67 kat daha fazla ifade edilmiştir.

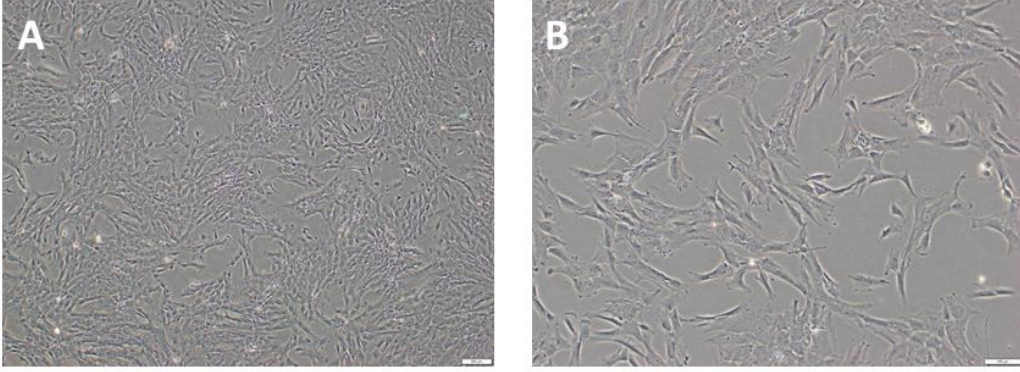


**Çizim 4.9.** İzole edilen eksozomların RNA içeriklerinin analizi. 1.1 B4 ve iWJ-MKH ‘lerden elde edilen eksozomların RNA içerikleri izole edildikten sonra beta hücre belirteçleri açısından incelenmişlerdir. Analizler GAPDH gen ekspresyonuna göre gerçekleştirilmiş olup hesaplamalar iWJ-MKH ‘lerden elde edilmiş eksozomlara göre kat değişimler olarak ifade edilmiştir. (\*, P <0,05)

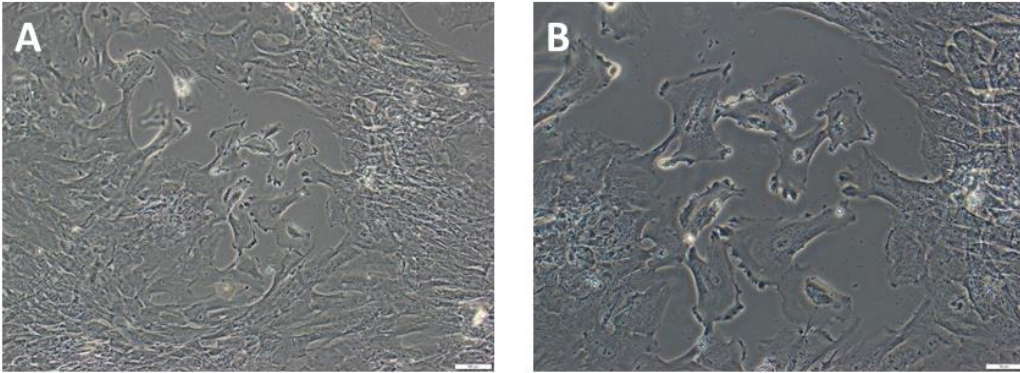
#### 4.4. Ortak Kültür Sonuçları

##### 4.4.1. Mikroskopi Görüntüleri

Kimyasal farklılaştırma ve eksozomlar ile ortak kültür sonrasında hücrelerin morfolojik olarak belirgin bir değişime uğramadığı ve epitel karakter kazanmadığı gözlemlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin kimyasal farklılaşma süreci sonrasında (5-6 hafta), hücrelerin migrasyon yeteneklerinde düşme ve nukleus/sitoplazma oranında yükselme bulguları bu çalışmada gözlemlenmemiştir (Çizim 4.10.).



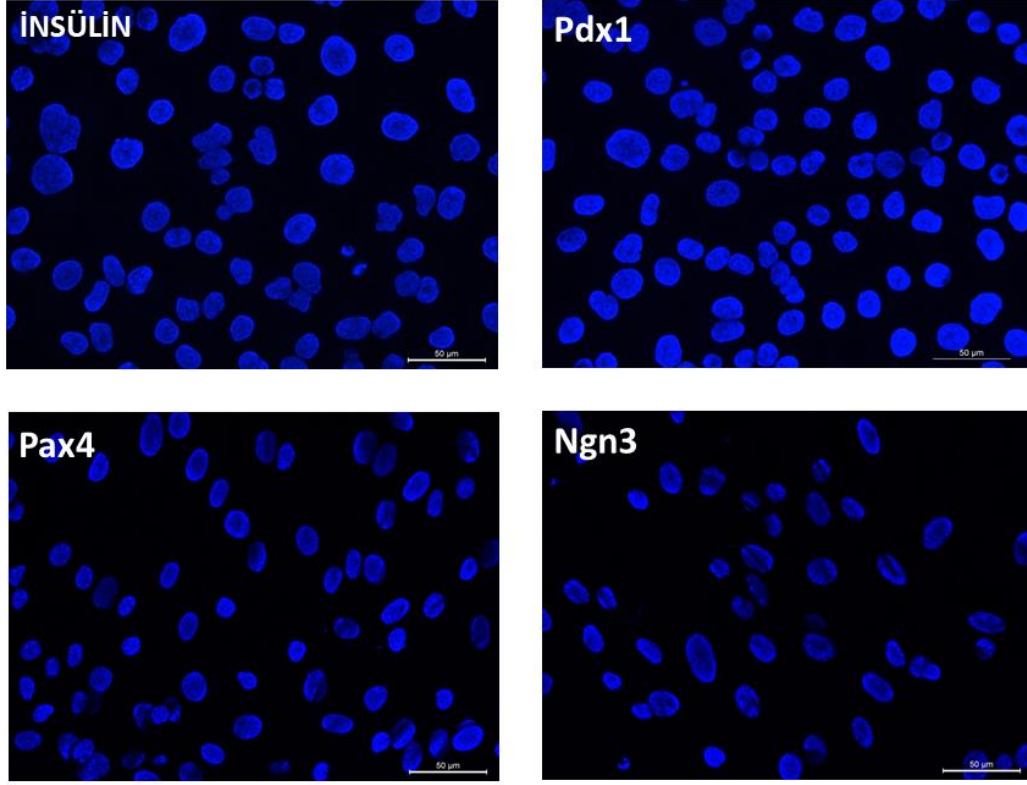
**Çizim 4.10.** Kimyasal farklılaştırmaya alınan iWJ-MKH'lerin mikroskop görüntüleri. Ölçek Çubuğu; A 200 µm, B 100 µm.



**Çizim 4.11.** Kimyasal farklılaşma ve 1.1 B4 hücre hattı kaynaklı eksozomlar ile ortak kültüre alınan iWJ-MKH'lerin mikroskop görüntüleri. Ölçek Çubuğu; A 100 µm, B 50 µm.

#### 4.4.2. İmmün Floresan Boyamalar

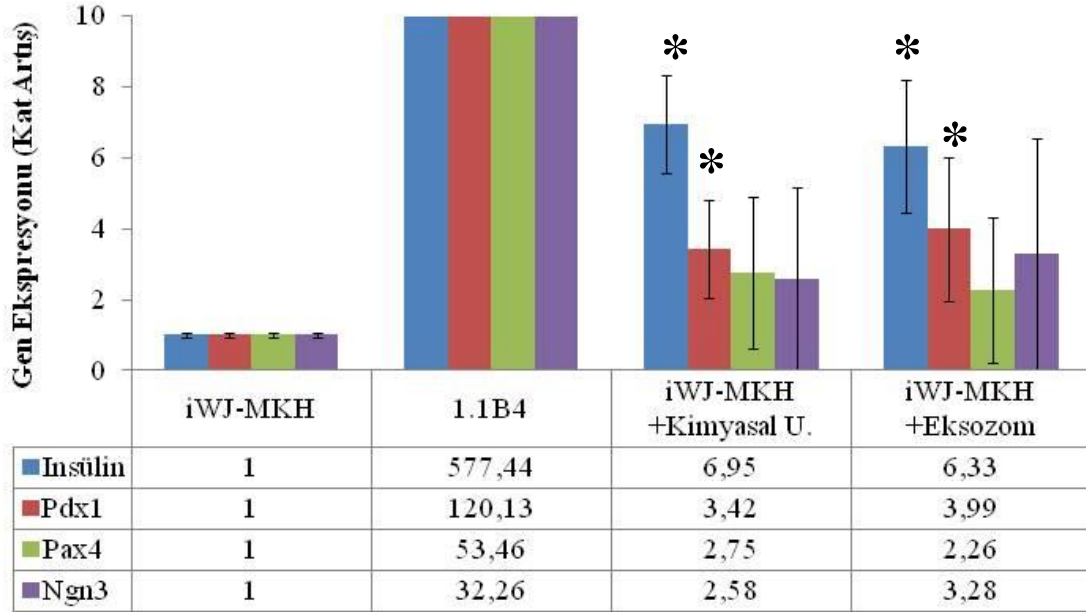
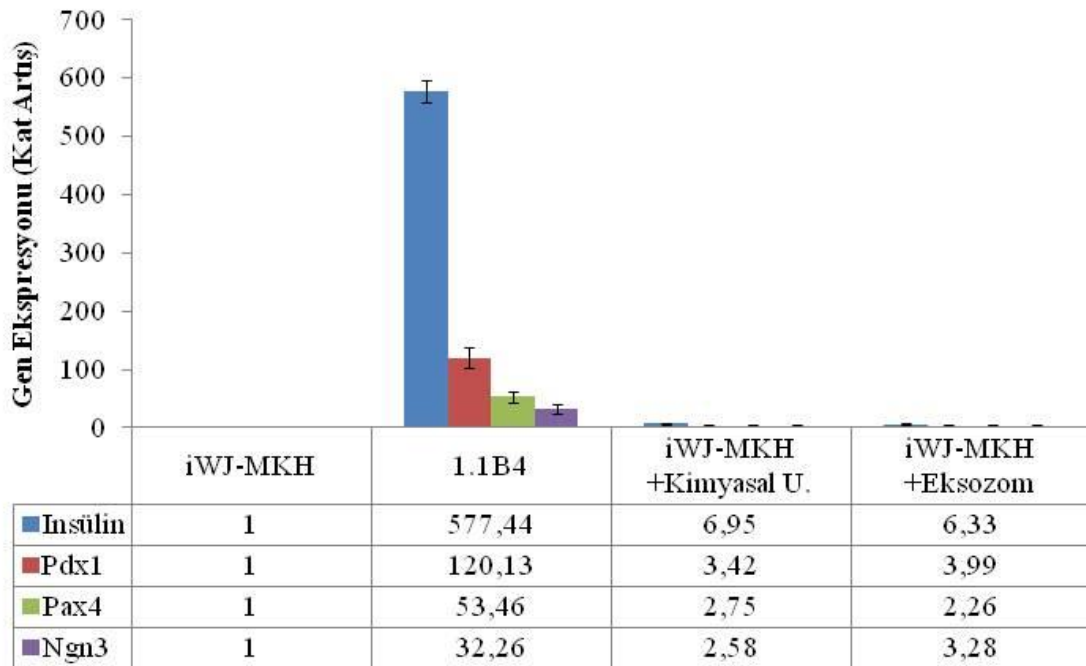
Ortak kültür sonrasında, kök hücrelerin morfolojik olarak belirgin bir değişime uğramaması ve epitel karakter kazanmamasının yanı sıra İnsülin, Pdx1, Pax4 ve Ngn3 belirteçleri için yapılan immünfloresan boyamalarda da pozitif sonuç alınamamıştır (Çizim 4.12.).



**Çizim 4.12** Ortak kültür sonrası İnsülin, Pdx1, Pax4 ve Ngn3 boyama sonuçları. Ölçek çubuğu: 50 µm

#### 4.5. Gen Ekspresyon Analizleri

Real-Time PCR analizleri sonucunda iWJ-MKH'leri düşük oranda beta hücre belirteçlerini ifade etmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan 1.1 B4 hücre hattı ile karşılaştırıldığında iWJ-MKH'lerinin insülin, Pdx1, Pax4 ve Ngn3 genleri sırasıyla 577,44, 120,13, 53,46, 32,26 kat daha az eksprese edilmiştir (Çizim 4.13. B).

**A****B**

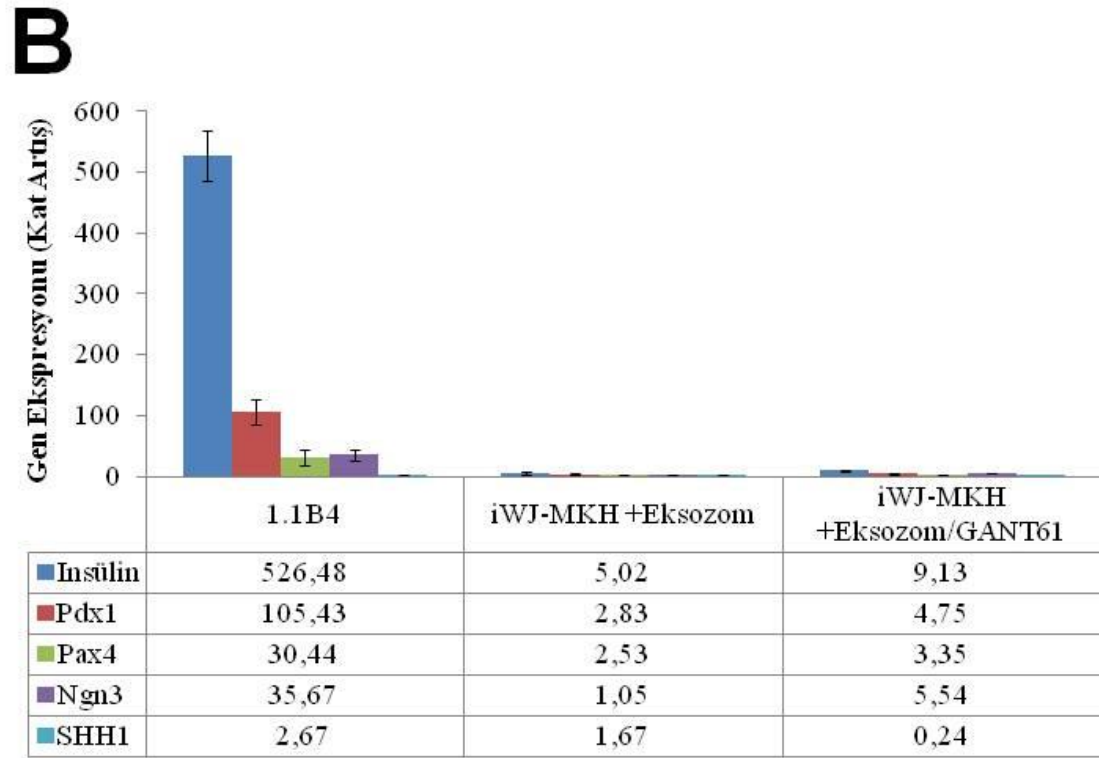
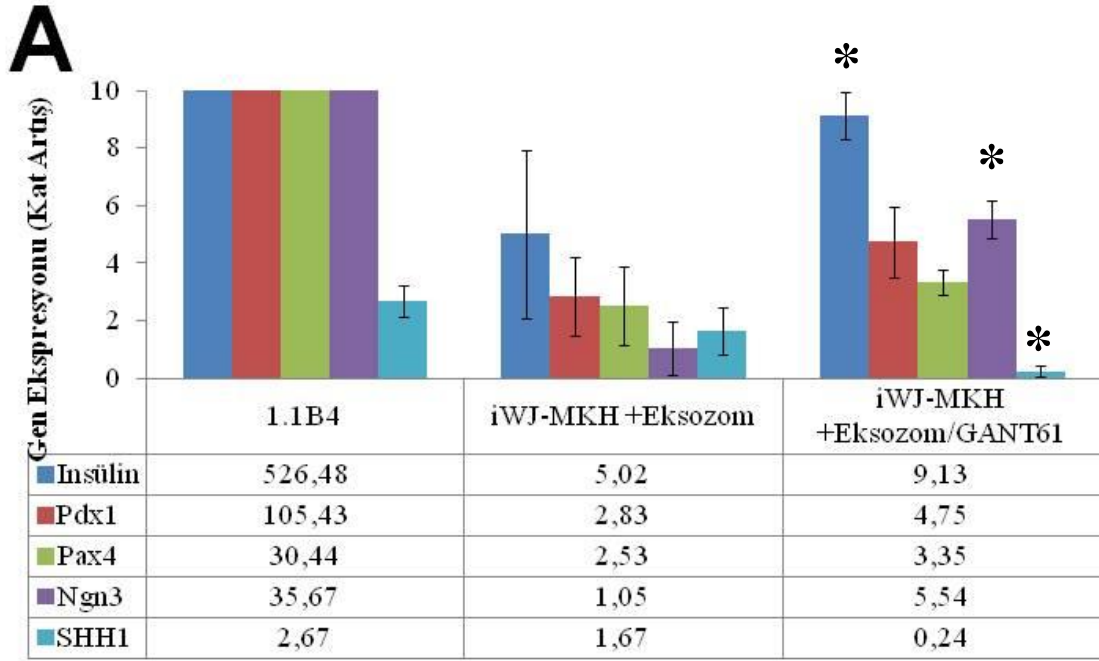
**Çizim 4.13.** Ortak kültür sonrasında beta hücre belirteçlerinin gen ifade analizi. Analizler GAPDH gen ekspresyonuna göre gerçekleştirilmiş olup hesaplamalar iWJ-MKH 'lere göre kat değişimler olarak ifade edilmiştir. Kök hücre verileri ilk panelde (A) ve 1.1 B4

hücrelerinin beta hücre belirteçlerinin yüksek ifadeleri (B) panelinde gösterilmiştir. (\*,  $P < 0,05$ )

Kimyasal uyarı grubu ile kimyasal uyarı + eksozom grubu hücrelerinin gen ekspresyon profilleri arasında belirgin bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ; Çizim 4.13. A). Bu durum eksozomların kimyasal uyarıcıların varlığında hücre farklılaşması yönünde belirgin bir etkinlik farkı yaratmadığını göstermektedir.

Farklılaşma sürecini etkileyen birçok sinyal yolağının olduğu bilinmektedir ve bunlardan biri de Hedgehog sinyal yolağıdır. Bu yolağın, pankreas endoderm ve ileride beta hücre farklılaşmasında sessiz olması gerektiği literatürde yer almıştır. İlk aşamada doğrudan beta hücre eksozomlarının MKH'leri farklılaşma yönünde yeterince etkilememesi Hedgehog sinyal yolağının MKH'lerde etkin olması olabileceği düşünülmüştür. Bu gerekçelerle eksozomlar GANT61 ile modifiye edilerek eksozom aktarımı sonrasında MKH'lerde bu sinyal yolağının susması hedeflenmiştir. 1.1 B4 hücrelerinde ve kimyasal uyarı + eksozom grubu iWJ-MKH'lerde Sonic Hedgehog 1 (SHH1) gen ifadesinin iWJ-MKH'lerine göre 2,67 ve 1,67 kat yüksek olduğu görülmüştür (Çizim 4.14). GANT61 inhibitörünün kullanılması sonucunda bu sinyal yolağının sustuğu ve kimyasal uyarı + eksozom grubu iWJ-MKH'lerinde var olan 1,67 kat artışın 0,24 kat oranına, bir diğer deyişle 4,17 kat ( $1/0,24$  kat) azaldığı belirlenmiştir.

Susmanın gerçekleştiği hücre grubunun beta hücre belirteçleri incelendiğinde GANT61'in kullanılmadığı hücre grubuna göre insülin 1,8 kat ve Ngn3 4,32 kat daha yüksek ifade edildiği görülmüştür. Bu artış GANT61 kullanılarak eksozomlar aracılığıyla gerçekleştirilen insülin salgılayan beta benzeri hücre üretilmesinin başarılı olduğunu göstermektedir. Bu basamakta endokrin hücre farklılaşması için kimyasal uyarıcıların yanında GANT61'in etkin bir şekilde kullanılacağı gösterilmiştir.



**Çizim 4.14.** GANT61 ile modifiye eksozomlarla ortak kültür sonrasında beta hücre belirteçlerinin gen ifade analizi. Analizler GAPDH gen ekspresyonuna göre gerçekleştirilmiş olup hesaplamalar iWJ-MKH'lere göre kat değişimler olarak ifade edilmiştir. Kök hücre verileri (A) panelinde ve 1.1 B4 hücrelerinin beta hücre belirteçlerinin yüksek ifadeleri (B) panelinde gösterilmiştir. (\*, P < 0,05)

## 5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında beta hücre hattından elde edilen eksozomlar kullanılarak kök hücrelerin beta hücre yönünde farklılaşması amaçlanmıştır. Beta hücre hattından ve Wharton jelinden elde edilen eksozomlar ile kurulan deneyde, eksozomların kök hücre farklılaşması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu yaklaşımlar ile kök hücrelerin ortamda bulunan eksozomlara nasıl tepki verdiği ve eksozom varlığının farklılaşmaya olan katkısı incelenmiştir.

Langerhans adacıkları içinde yer alan pankreatik beta hücrelerinin koordine aktivitesi kan glikoz seviyelerinin sıkı kontrolü ve hipo veya hipergliseminin zararlı etkilerinin önlenmesi açısından önemlidir. Bu koordinasyon doğrudan hücre-hücre teması ile elde edilebildiği gibi hücre adezyon molekülleri veya gap bağlantıları (junction) ve parakrin veya otokrin fonksiyonları sağlayan çeşitli sinyal moleküllerinin salınması yoluyla da sağlanabilir (Jain ve Lammert 2009; Rutter ve Hodson 2015).

Beta hücrelerinden salınan eksozomların içeriklerinin değiştirilmesi için birtakım çalışmalar yayınlanmıştır. Farklı yaklaşımlar kullanılabilmesi gibi, bunlardan en sık tercih edileni, hücrelerin farklı bir ortama sokularak, örneğin stres ya da apoptotik koşulların sağlanması, hücreden salgılanan eksozomların içeriği değiştirilmesidir. Bir beta hücre hattı olan MIN6B1, pre-diyabetik ve diyabetik durumlarda salgılanan sitokinlerce kültüre edilmiş ve miRNA profilleri böylece değiştirilmiştir (Guay ve diğ. 2015). Normal beta hücreleriyle ortak kültürü sonrasında hücrelerin insülin salgısı değişmemiş ama apoptoza giden hücre sayıları artmıştır. Başka bir çalışmada beta hücre hattı, INS1, düşük konsantrasyondaki sitokinlerce uyarılmış ve bu hücrelerin eksozomlarının sitokinlerce apoptoz uyarılmış diğer beta hücreleri üzerinde apoptozdan koruyucu etkileri ortaya konmuştur (Zhu ve diğ. 2014).

Eksozomlar ortama salındığında taşıdıkları genetik materyalle (mRNA, miRNA, pre-miRNA ve kodlanmayan RNA) alıcı hücrelerle üç farklı yoldan iletişime geçerler: hücreye endositoz ile alınıp, vezikülün doğrudan hücre membranı ile bütünleşmesi veya lipid-ligand ilişkisiyle hücre yüzeyine bağlanması (Keshtkar ve diğ. 2018). Eksozomlar sadece genetik bilginin aktarılmasında değil aynı zamanda hücre fonksiyonlarını hızlıca etkileyecek hücreye özgü proteinlerin taşınmasında da etkindirler. Tez çalışmasının konusu



olan ve mezenkimal kök hücrelerin eksozomlar ile beta hücre benzeri hücrelere farklılaştırılmasıyla ilgili bir yayın şu ana kadar rastlanmamıştır. Ancak pluripotent kök hücreler ve pankreatik adacık kaynaklı eksozomlar kullanılarak denenmiştir (Jacobson ve Tzanakakis 2017). İlgili çalışmada pluripotent kök hücrelere eksozomlar aracılığıyla miRNA-186 and miRNA-375 aktarıldıktan sonra pankreas hücrelerine özgü genlerin (INS, NGN3, GLUT2, PAX4, PAX6, NKX6-1, PDX1 ve GCG) ifadelerinde artış gözlemlenmiştir (Shaer ve diğ. 2014). Pankreatik adacık eksozomlarıyla pluripotent kök hücreler ortak kültüre alındığında morfolojik olarak epitel karakter kazandıkları, İnsülin ve NGN3 ile pozitif boyandıkları ve hücrelerdeki çinko içeren granüllerin dithiozonla gösterildiği ilgili çalışmada bildirilmiştir.

Ancak her şeye rağmen göz önünde bulundurulması gereken bazı zorluklar mevcuttur. Farklılaşma süreci ne kadar başarılı olursa olsun tip-1 diyabet hastası bireye nakil yapıldığında hastanın immün sistemi nakli yapılan farklılaşmış hücrelere saldırmaya devan edecek ve insülin salgılayan hücrelerin sayılarında düşmeler belli bir süre sonra tekrar yaşanacaktır (Calafiore ve diğ. 2006). Bu yüzden enkapsülasyon gibi hücrelerin immün sistemden korunabilecekleri yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Fetal dönemde pankreasın gelişimi sırasında notokord, activin ve FGF2 salgılayarak Sonic Hedgehog (SHH) ifadesini baskılayarak pankreas endoderm farklılaşmasını yönlendirmektedir (Hebrok ve Ark. 2000). Ancak eksozomların içerisinde bulunan epidermal büyüme faktörü (EGF) farklılaşmaya yönlendirilmiş hücre sayısını artırsa da Hedgehog sinyal yolağını aktive ederek endokrin hücre farklılaşmasını baskılamaktadır (Jacobson ve Tzanakakis 2017). Tez çalışmasında kullandığımız GANT61 EGF etkisini azaltmayarak Hedgehog sinyal yolağını baskılamış ve kök hücreleri endokrin hücre farklılaşması yönünde desteklemiştir.

GANT61, Gli-1 ve Gli-2 proteinlerini hedef alan bir inhibitördür. Bu iki proteinin transkripsiyonunu engelleyerek hücre içi önemli sinyal yollarından Hedgehog yolağı susturulur ve böylece hücrenin proliferasyonu sınırlandırılmış olur. TNF aracılığı ile NFκB aktivasyonu, glukokortikoid reseptörü gen transaktivasyonu ve Ras-Raf-Mek-Mapk kaskadı (MAPK sinyal yolağı) üzerindeki etkisi gözlemlenmediğinden spesifik olarak Hedgehog sinyal yolağını susturmaktadır (Lauth ve diğ. 2007). İlk gerçekleştirilen çalışmaların meme, kolon, lösemi, prostat ve akciğer kanserleri başta olmak üzere birçok

farklı kanser hücreleri üzerine yoğunlaştığı görülmektedir (Desch ve diğ. 2010; Mazumdar ve diğ. 2011). Kanser hücrelerinde apoptoza yönlendirdiği (LD50 = 30 µM) ama somatik hücreler üzerinde toksik dozun çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Pan ve diğ. 2012). Hücre içi sinyal yolağı incelendiğinde, sadece hücre çoğalmasında değil Hedgehog'un birçok hücre fonksiyonunda işlevsel olduğu görülmektedir. Kanser kök hücrelerinin çoğalmasını durdurmasının yanında, hücrelerin pluripotensilerinin azaldığı ve farklılaşmaya yönlendiğini gözlemlenmiştir (Kurebayashi ve diğ. 2017). İnhibisyon ve doz çalışmalarında GANT61'in Hedgehog sinyal yolağı için IC50 değeri 5 µM olarak bulunmuştur (Lauth ve diğ. 2007). Deneysel hayvan çalışmalarında GANT61'in NUDE fareler üzerinde uygulanan 50mg/kg dozu nöroblastoma tümör kitlesini 12. günde %63 oranında küçülttüğü gözlemlenmiştir (Wickström ve diğ. 2013). Pankreas kanser kök hücrelerinin (CD133+) sayısının azaltılmasına yönelik başka bir *in vivo* çalışmada GANT61'in farelere verilmesiyle (40 mg/kg/gün, i.p.) başarılı sonuçlara ulaşılabileceği gösterilmiştir (Miyazaki ve diğ. 2016).

Mezenkimal kök hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda, kök hücrelerden salınan eksozomların osteosarkom (MG63) ve gastrik kanser (SGC7901) hücrelerinin proliferasyonunu artırdığı ve bunu kanser hücrelerinde Hedgehog sinyal yolağını uyarmasıyla gerçekleştirdiği bulunmuştur (Qi ve diğ. 2017). İlgili çalışmada kök hücrelerden salgılanan eksozomlar (400 µg/ml) 10 µM GANT61 ile birlikte hücrelerle kültüre edilmiş ve kanser hücrelerinin proliferasyonunun GANT61 varlığında hızlanmadığı, diğer bir deyişle kök hücrelerin kanser destekleyici etkisinin ortadan kalktığı bulunmuştur. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması üzerine çalışmalarda 5 µM GANT61 dozunun etkili olduğu gösterilmiştir (Guan ve diğ. 2009). İlgili çalışmada Hedgehog sinyal yolağının kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği ve GANT61'in kullanılmasıyla osteojenik farklılaşma veriminin düştüğü gösterilmiştir. Guan ve arkadaşları aynı zamanda 5 µM GANT61'in Hedgehog sinyal yolağına etkisinin hücre kültüründe yüksek glikoz (25 mM) ortamının kullanılmasına benzer olduğunu da göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda kök hücrelerin beta hücrelerine daha iyi farklılaşabilmesi için yüksek glikoz ortamı kullanılmaktadır. Ancak hücrelerin bazal metabolizması da devamlı ortamdan glikozu kendisi için kullandığından, yüksek glikoz (25 mM) seviyesi düşmektedir. 3-4 günde bir yenilenen farklılaşma ortamında bu, dalgalanmaya yol açmakta

ve Hedgehog sinyal yolağı devamlı olarak baskılanmadığından beta hücre farklılaşmasında istenen verim elde edilememektedir. GANT61'in kültür ortamına eklenmesiyle Hedgehog sinyal yolağının inhibisyonunda devamlılığın sağlanması ve bunun sonucunda daha verimli beta (benzeri insülin salgılayan) hücre farklılaşmasını hedeflenmiştir.

Eksozomların kullanılmasıyla mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırmaya yönlendirme işlemleri daha önceden denenmiştir. Osteojenik farklılaşmaya yönlendirilmiş MKH'lerden eksozomlar toplanarak tekrar MKH'lerle birlikte ortak kültüre edilmiştir (Wang ve diğ. 2018). Süreç sonunda eksozomların değiştirilmiş mikroRNA profilleri ile farklılaşmanın erken ve geç aşamalarındaki genetik belirteçlerin daha iyi ifade edildikleri gösterilmiştir. Eksozomal mikroRNA'ların, osteojenik farklılaşmanın geç evresinde erken evresinden farklı olarak eksprese edilerek farklılaşma verimini etkilediği bildirilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında farklılaşmada öncelikle eksozomlar kullanılmış ancak farklılaşma verimi zayıf kalmıştır. GANT61 kullanılarak verim artırılmış olsa da yeterli kalmamıştır. Bunun sebeplerden biri de kullanılan eksozom dozunun yetersiz kalmış olmasıdır. Doz optimizasyonu yapılarak daha iyi bir farklılaşma sonucu elde edilebilir. Tez çalışmasında eksozomların farklılaştırmada etkin olabileceği, eksozomların ilaç ile modifiye edilerek daha iyi sonuçların alınabileceği gösterilmiştir. KÖGEM'de gerçekleştirilen benzer çalışmalarda kimyasal farklılaşma sürecinin yetersiz kaldığı gösterilmiştir (Açıksarı ve diğ. 2017). Transkripsiyon faktörlerinin hücre içerisinde ifade edilmesiyle başarılı sonuçlar alınmış olsa da çevresel faktörlerin düzenlenmesiyle PDX1 ifadesi beta hücrelerinin %30'una kadar MKH'lerde iyileştirilmiştir (Öztürk, 2016). Eksozomlar yalnız hücre sinyal yollarını etkilediğinden etkisi sınırlı kalmıştır ve gen aktarımına alternatif bir yaklaşım olarak kullanılabilir. Açıksarı'nın çalışmasında elde edilen bulgular daha kuvvetli bir farklılaşmayı gösterse de eksozom miktarının artırılması ve Hedgehog sinyal yolağının susturulmasıyla MKH'lerin beta benzeri insülin salgılayan hücrelerin eldesinde klinik olarak uygulanabilir daha güvenli bir yaklaşım bu tez çalışmasında önerilmiştir.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ortak kültür yöntemiyle iWJ-MKH'lerinin beta hücrelerinden salınan eksozomlar ile insülin sentezleyen beta benzeri hücrelere farklılaşması amaçlanmıştır. Yapılan araştırmaların sonucunda şu sorunun cevabı aranmıştır: Beta hücrelerinden salınan eksozomların kültür ortamına eklenmesiyle iWJ-MKH'leri beta hücre benzeri insülin salgılayan hücrelere farklılaştırılabilir mi?

iWJ-MKH'leri KÖGEM hücre koleksiyonundan elde edilmiş ve bu hücreler çoğaltılarak karakterize edilmiştir. Bu hücrelerin çözüldükten sonra bile mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerini taşıdıkları akış sitometri analizi ile gösterilmiştir. Farklılaştırma deneyi ile bu hücrelerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma süreçlerini başarıyla tamamladıkları gösterilmiştir. Böylelikle bu hücrelerin çözüldükten sonra bile mezenkimal kök hücre karakterini taşıdıkları gösterilmiştir.

Beta hücrelerinin yüksek oranda, 15 mg/ml, mikrovezikül salgıladıkları görülmüştür. Bu mikroveziküller karakterize edilerek CD9, CD63 ve CD81 yüzey belirteçlerini taşıdıkları gösterilmiş ve eksozom oldukları ortaya konmuştur. Eksozomların taşıdıkları genetik materyal PCR ile incelendiğinde beta hücre belirteçlerinin RNA dizilerini taşıdıkları belirlenmiştir.

Bu eksozomlar, iWJ-MKH'lerle birlikte ortak kültür yapılarak, farklılaşmayı destekleyen kimyasal uyarıcıların varlığında, kök hücrelerin beta benzeri endokrin hücreye farklılaşma potansiyeline etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgularda eksozomların hücreleri farklılaşma yönünde uyardıkları ama gerçek anlamda hücrelerde morfolojik değişimlere yol açmada yeterli olmadıkları anlaşılmıştır. Endokrin farklılaşma için ortama eklenen kimyasal karışımın ortamda baskın bir konumda olduğu kimyasal uyarının varlığında eksozomun farklılaşma üzerindeki etkisinin olmadığı görülmüştür.

Beta hücrelerinden salgılanan eksozomların endokrin hücre farklılaşmasını baskılayan Hedgehog sinyal yolağını uyarın transkripsiyon faktörü, Sonik Hedgehog (SHH) 'u taşıdıkları belirlenmiştir. GANT61 kullanılarak eksozomlar modifiye edilmiş ve eksozomların GANT61 gibi bir inhibitör etkiye sahip ilacın lipozom paketlenmesine

benzer biçimde eksozomların içerisine paketlenmesi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde GANT61'in hücrelere taşınabileceği gösterilmiştir.

GANT61 yüklenmiş beta hücre kaynaklı eksozomların, kimyasal uyarı sürecinde iWJ-MKH'lerini eksozom içermeyen hücre grubuna göre, daha yüksek verimde beta hücreye yönlendirdiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak iWJ-MKH'lerinin beta hücrelerinden elde edilen eksozomlarıyla ortak kültüründe, GANT61 gibi bir inhibitör ile Hedgehog sinyal yolağının susturulmasının daha verimli beta benzeri insülin salgılayan hücre elde edilmesinde kullanılabileceği bu çalışmada gösterilmiştir. Ancak GANT61 yüklü olan ya da olmayan eksozomların tek başlarına mezenkimal kök hücrelerin endokrin hücrelere farklılaşmasına yönlendirmeye yeterli olmadıkları ortaya konmuştur.

## KAYNAKLAR

Açıksarı A., Duruksu G., Karaoz E. Improved insulin-secreting properties of pancreatic islet mesenchymal stem cells by constitutive expression of Pax4 and MafA. *Turk J Biol* 2017; 41: 979-991.

Akiyama K, You YO, Yamaza T. Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem Cell Research & Therapy*. 2012; 3(5): 40.

Amoh Y, Li L, Katsuoka K, ve diğ. Multipotent hair follicle stem cells promote repair of spinal cord injury and recovery of walking function. *Cell Cycle*. 2008; 7(12): 1865-9.

Ashcroft FM ve Rorsman P. Diabetes Mellitus and the  $\beta$  Cell: the last ten years. *Cell*. 2012; 148(6): 1160-71.

Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev*. 2013; (32): 623-642.

Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H. Maintaining tissue homeostasis: dynamic control of somatic stem cell activity. *Cell Stem Cell*. 2011; 9(5): 402-411.

Blanc L, De Gassart A, Géminard C ve diğ. Exosome release by reticulocytes - an integral part of the red blood cell differentiation system. *Blood Cells Mol Dis*. 2005; 35(1): 21-6.

Blanpain C ve Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10(3): 207-217.

Brissova M, Fowler MJ, Nivholson WE ve diğ. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53(9): 1087-97.

Brouwers JF, Aalberts M, Jansen JWA ve diğ. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. *Proteomics*. 2013; 10(11): 1660-6.

Bruni A, Gala-Lopez B, Pepper AR ve diğ. Islet cell transplantation for the treatment of type 1 diabetes: recent advances and future challenges. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2014; 7: 211-23.

Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS ve diğ. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(7): 2334-9.

Calafiore R, Basta G, Luca G, Lemmi A, Racanicchi L, Mancuso F, Montanucci MP, Brunetti P. Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc.* 2006; 38(4): 1156-7.

Camussi G ve Quesenberry PJ. Perspectives on the potential therapeutic uses of vesicles. *Exosomes Microvesicles.* 2013; 1(6).

Centeno CJ, Busse D, Kisiday J ve diğ. Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells. *Med Hypotheses.* 2008; 71(6): 900-8.

Cowan CA, Atienza J, Melton DA ve diğ. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* 2005; 309(5739): 1369-73.

Çoban A. Türkiye’de İnsan Embriyosu Üzerinde Araştırma Yapmanın Hukuki Sorunları. *Türkiye Barolar Birliği Dergisi.* 2009; 86: 204-48.

De Los Angeles A, Ferrari F, Xi R ve diğ. Hallmarks of Pluripotency. *Nature.* 2015; 525, 469-478.

Desch P, Asslaber D, Kern D ve diğ. Inhibition of GLI, but not Smoothed, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Oncogene.* 2010 Sep 2; 29(35): 4885-95.

Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science.* 2009; 324(5935): 1673-77.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I ve diğ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4):315-7.

Eberhardt M, Salmon P, von Machc MA ve diğ. Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 345(3): 1167-76.

Eguizabal C, Montserrat N, Veiga A ve diğ. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: Future directions in regenerative medicine. *Semin Reprod Med.* 2013; 31(01): 82-94.

Emamaullee JA, Shapiro AM. Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation. *Cell Transplant*. 2007; 16(1): 1-8.

Emamaullee JA, Shapiro AM. Interventional strategies to prevent beta-cell apoptosis in islet transplantation. *Diabetes*. 2006 Jul;55(7): 1907-14.

Escola JM, Kleijmeer MJ, Stoorvogel W ve diğ. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*. 1998; 273(32): 20121-7.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292, 154-56.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; (4):393-403.

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Development*. 1966; 16: 381-390.

Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012; 18(2): 128-34.

Guan CC, Yan M, Jiang XQ ve diğ. Sonic Hedgehog alleviates the inhibitory effects of high glucose on the osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2009 Dec; 45(6): 1146-52.

Guay C, Menoud V, Rome S, Regazzi R. Horizontal transfer of exosomal microRNAs transduce apoptotic signals between pancreatic beta-cells. *Cell Commun Signal*. 2015; 13: 17.

Ha D, Yang N, Nadithe V. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2016; (6)4: 287-96.

Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 2000; 127(22): 4905-13.



Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer ve diğ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and – granules. *Blood*. 1999; 94: 3791-99.

Hristov M, Wolfgang E, Linder S ve diğ. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004; 104: 2761-6.

Huang CC, Narayanan R, Alapati S ve diğ. Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. *Biomaterials*. 2016; 111: 103-15.

Ionescu-Tirgoviste C, Gagniuc PA, Gubceac E ve diğ. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific Reports*. 2015; 5.

İmamoğlu Ő, Satman İ, Akalın S, Salman S ve Yılmaz C (Ed) Geçmişten geleceğe diabetes mellitus. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Bayt Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım Ltd. Őti. Ankara 2015.

İnan S, Özbilgin K. Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım *Sağlıkta Birikim Dergisi*. 2009; 1(5): 57-65 *J Biol Chem*. 2013; 288(24): 17713-24.

Jacobson EF, Tzanakakis ES. Human pluripotent stem cell differentiation to functional pancreatic cells for diabetes therapies: Innovations, challenges and future directions. *J Biol Eng*. 2017; 11: 21.

Jain R ve Lammert E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes Metab*. 2009; 11(S4): 159–67.

Jennings RE, Berry AA, Strutt JP ve diğ. Human pancreas development *Development*. 2015; 142: 3126-37.

Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN ve diğ. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles — Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2014; 1846(1): 75-87.

Johnson JD, Ao Z, Ao P ve diğ. Different effects of FK506, rapamycin, and mycophenolate mofetil on glucose-stimulated insulin release and apoptosis in human islets. *Cell Transplantation*. 2009; 18(8): 833-45.

Jørgensen MC, Ahnfelt-Rønne J, Hald J ve diğ. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev.* 2007; 28(6): 685-705.

Kang KS, Kim SW, Oh YH ve diğ. A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy.* 2005; 7(4): 368-73.

Karaöz E ve İnci Ç. Tedavide kullanılan kök Hücreler, kaynakları ve eldesi. *Türkiye Klinikleri J Med Oncol.* 2014; 7(3): 7-16.

Karaöz E ve Ovalı E. Kök Hücreler. Türkiye: Derya Kitabevi. 2004.

Karaöz E, Aksoy A, Ayhan S ve diğ. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: Ultra structural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* 2009; 132(5): 533-46.

Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 63.

Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B ve diğ. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: A phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21(10): 1199-205.

Kim N ve Cho SG. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med.* 2013; 10(28): 387-402.

Kong F, Zheng C ve Xu D. Telomerase as a "stemness" enzyme. *Sci China Life Sci.* 2014; 57(6): 564-70.

Kurebayashi J, Koike Y, Ohta Y ve diğ. Anti-cancer stem cell activity of a Hedgehog inhibitor GANT61 in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Sci.* 2017 May; 108(5): 918-930.

Lauth M, Bergström A, Shimokawa T ve diğ. Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 15; 104(20): 8455-60.

Lee Y, EL Andaloussi S ve diğ. Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Human Molecular Genetics* 2012; 2(R1): R125–R134.

Liu G, Zhang Y, Liu B ve diğ. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold *Biomaterials*. 2013; 34(11): 2655-64.

Lock LT ve Tzanakakis ES. Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes *Tissue Eng*. 2007; 13(7): 1399-412.

Mathivanan S. Exosomes and shedding microvesicles are mediators of intercellular communication: how do they communicate with the target cells? *Biotechnology & Biomaterials*. 2012; 2:4.

Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T ve diğ. Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 2011 Feb 1; 71(3): 1092-102.

Meyer JS, Howden SE, Wallace KA ve diğ. Opticvesicle-like structures derived from human pluripotent stemcells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *StemCells*. 2011; 29(8):1206-18.

Mitalipov S ve Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009; 114: 185-99.

Miyazaki Y, Matsubara S, Ding Q ve diğ. Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by Hedgehog/GLI inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition. *Mol Cancer*. 2016 Jun 27; 15(1): 49.

Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ ve diğ. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes *Blood*. 2012; 119(3): 756-66.

Narayanan R, Huang CC ve Ravindran S. Hijacking the cellular mail: exosome mediated differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*. 2016, 11.

Noël D, Djouad F, Bouffi C ve diğ. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma*. 2007; 48(7): 1283-9.

Nolte-t Hoen ENM, Buschow SI, Anderton SM ve diğ. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood*. 2009; 113(9): 1977-81.

Okura H, Komoda H, Fumimoto Y ve diğ. Transdifferentiation of human adipose tissue-derived stromal cells into insulin-producing clusters. *J Artif Organs*. 2009; 12(2): 123-30.

Oluseun A, Behrouz A, Lars AR ve diğ. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology*. 2007; 25(7), 803-16.

Öztürk A. Hücreden Arındırılmış Karaciğer Dokusuna MafA+ Erişkin Mezenkimal Kök Hücrelerin İnfiltrasyonu ile Endokrin Pankreas Benzer İşlevine Sahip Doku Üretimi. Kocaeli Üniversitesi (Tez çalışması) 2016.

Pan D, Li Y, Li Z ve diğ. Gli inhibitor GANT61 causes apoptosis in myeloid leukemia cells and acts in synergy with rapamycin. *Leuk Res*. 2012 Jun; 36(6): 742-8.

Pan FC ve Wright C. Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland. *Dev Dyn*. 2011; 240(3): 530-65.

Phadnis SM, Joglekar MV, Dalvi MP ve diğ. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. *Cytotherapy*. 2011; 13(3): 279-93.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC ve diğ. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143-7.

Prabakar KR, Dominguez-Bendala J, Molano RD ve diğ. Generation of glucose-responsive, insulin-producing cells from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*. 2012; 21(6): 1321-39.

Qi J, Zhou Y, Jiao Z ve diğ. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth through hedgehog signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017; 42(6): 2242-2254.

Ramachandran S ve Palanisamy V. Horizontal transfer of RNAs: Exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012; 3(2): 286-93.

Raposo G ve Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; 200(4): 373-83.

Rebeiro P ve Moore J. The role of autologous haemopoietic stem cell transplantation in the treatment of autoimmune disorders. *Intern Med J*. 2016; 46(1): 17-28.

Ricordi C, Inverardi L ve Domínguez-Bendala J. From cellular therapies to tissue reprogramming and regenerative strategies in the treatment of diabetes. *Regen Med*. 2012; 6: 41-8.

Ricordi C, Lacy PE, Finke EH ve diğ. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988; 37(4): 413-20.

Rosa SB, Voltarelli JC, Chies JAB ve diğ. The use of stem cells for the treatment of autoimmune diseases. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40(12): 1579-97.

Ruijtenberg S ve van den Heuvel S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle*. 2016; 15(2): 196-212.

Rutter GA ve Hodson DJ. Beta cell connectivity in pancreatic islets: a type 2 diabetes target? *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72: 453–67.

Shaer A, Azarpira N, Karimi MH. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into insulin-like cell clusters with miR-186 and miR-375 by using chemical transfection. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014; 174(1): 242–58.

Shapiro AM. Islet transplantation in type 1 diabetes: Ongoing challenges, refined procedures, and long-term outcome. *Rev Diabet Stud*. 2012; 9(4): 385-406.

Shaw-Smith C, De Franco E, Lango Allen H ve diğ. GATA4 mutations are a cause of neonatal and childhood-onset diabetes. *Diabetes*. 2014; 63(8): 2888-94.

Svensson KJ, Christianson HC, Wittrup A ve diğ. Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 53(24): 2262-9.

Takahashi K ve Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126(4): 663-76.

Takeda YS ve Xu Q. Neuronal differentiation of human mesenchymal stem cells using exosomes derived from differentiating neuronal cells. *PLoS One*. 2015; 10(8): e0135111.

Théry C, Regnault A, Garin J ve diğ. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*. 1999; 147(3): 599-610.

Théry C, Zitvogel L ve Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(8): 569-79.

Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH ve diğ. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959; 38(10 Pt 1-2): 1709-16.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS ve diğ. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282(5391): 1145-47.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG ve diğ. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(17): 7844-48.

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Geçmişten Geleceğe Diabetis Mellitus 2015 Prof.Dr. - Prof. Dr. Şazi İMAMOĞLU İlhan SATMAN

Tyndall A. Application of autologous stem cell transplantation in various adult and pediatric rheumatic diseases. *Pediatr Res.* 2012; 71(4 Pt 2): 433-8.

Urbanelli L, Magini A, Buratta S ve diğ. Signaling pathways in exosomes biogenesis, secretion and fate. *Genes (Basel).* 2013; 4(2): 152-170.

Valadi H, Ekström K, Bossios A ve diğ. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(6): 654-59.

Voltarelli JC, Couri CE, Stracieri AB ve diğ. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *JAMA.* 2007; 297(14): 1568-76.

Wahlgren J, De L. Karlson T, Brisslert M ve diğ. Plasma exosomes can deliver exogenous short interfering RNA to monocytes and lymphocytes. *Nucleic Acids Research,* 2012; 40(17): e130.

Wang HS, Hung SC, Peng ST ve diğ. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004; 22(7): 1330-7.

Wang X, Omar O, Vazirisani F, Thomsen P, Ekström K. Mesenchymal stem cell-derived exosomes have altered microRNA profiles and induce osteogenic differentiation depending on the stage of differentiation. *PLoS ONE* 2018; 13(2): e0193059.

Wickström M, Dyberg C, Shimokawa T ve diğ. Targeting the Hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Int J Cancer*. 2013; 132(7): 1516-24.

Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J ve diğ. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385: 810-13.

Yılmaz İ, Sarıboyacı AE, Subaşı C ve diğ. Differentiation potential of mouse embryonic stem cells into insulin producing cells in pancreatic islet microenvironment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2015; 124(2): 120-9.

Yousef M, Schannwell CM, Köstering M ve diğ. The balance study: clinical benefit and long-term outcome cells. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.

Yu B, Zhang X ve Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; (15)3: 4142-57.

Zhang S, Ge J, Sun A ve diğ. Comparison of various kinds of bone marrow stem cells for the repair of infarcted myocardium: Single clonally purified non-hematopoietic mesenchymal stem cells serve as a superior source. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006; 99(4): 1132-47.

Zhu Q, Kang J, Miao H, Feng Y, Xiao L, Hu Z, et al. Low-dose cytokine-induced neutral ceramidase secretion from INS-1 cells via exosomes and its anti-apoptotic effect. *Febs J*. 2014;281:2861–70.

Zhu S, Russ HA, Wang X ve diğ. Human pancreatic beta-like cells converted from fibroblasts. *Nature Communications*. 2016; 7:10080.

## ÖZGEÇMİŞ

### Bireysel Bilgiler

**Adı Soyadı:** Esra ALBAYRAK

**Doğum yeri ve tarihi:** İstanbul-09.03.1991

**Uyruğu:** T.C.

**Medeni Durumu:** Bekar

**Çalıştığı kurum:** Liv Hospital

**İletişim Adresi:** Ahmet Adnan Saygun Cad., Canan Sokak No:5, 34340 Ulus / Beşiktaş/İstanbul

**Telefon:** 05318516134

**E-posta adresi:** albayrak.es@hotmail.com

### Eğitimi (tarih sırasına göre):

08/2013- Devam ediyor

#### Yüksek Lisans

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

09/2009-06/2013

#### Lisans

Marmara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul/TÜRKİYE

09/2005-06/2009

#### Lise

İstanbul Atatürk Anadolu Lisesi, İstanbul/TÜRKİYE

### Mesleki Deneyimi

02/2018 – Halen

#### Üretim Sorumlusu



Liv Hospital Rejeneratif Tıp Kök Hücre  
Üretim Merkezi  
Ulus/Beşiktaş/İstanbul

02/2016 – 02/2018

**Üretim Elemanı**

Liv Hospital Rejeneratif Tıp Kök Hücre  
Üretim Merkezi  
Ulus/Beşiktaş/İstanbul

12/2015 - 02/2016

**Kalite Kontrol Elemanı**

Liv Hospital Rejeneratif Tıp Kök Hücre  
Üretim Merkezi  
Ulus/Beşiktaş/İstanbul

**Yabancı dili:** İngilizce

**Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar**

Kök Hücre ve Hücrel Tedaviler Derneği

Türkiye Biyologlar Derneği

**Bilimsel Etkinlikler**

**Aldığı burslar**

Deneysel Nazal Mukoza Hasarı Sonrası Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Ve Nazal Mukoza Hücreleriyle Oluşturulan Hücre Tabakalarının Maksiller Sinüslere Aktarılmasının İyileştirici Etkilerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi (TÜBİTAK, Proje No: 113S871).

Farklı Dokulardan İzole Edilen Mezenşimal Kök Hücrelerin Migrasyonunun Kıyaslanması: Basic Fibroblast Growth Factor (B-Fgf;Fgf2) ve Stromal Cell-Derived Factor-1 (Sdf-1) in Hücrelerin Migrasyonuna Etkisi (TÜBİTAK, Proje No: 112S587)

## **Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Poster Bildirileri**

Karaoz E, Subasi C, **Albayrak E**, İnci C, Fayda M, Akat A. Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes do not Promote the Proliferation of Cancer Cells. Chemical Approaches To Targeting Drug Resistance In Cancer Stem Cells, Cost Action Cm1106, 4th Workshop, P7, Chioggia (Ve), Grassi Palace, 10 - 11 March, 2016, Italy



## EKLER

### EK1. Etik Kurul Onay Formu

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 9/14	Proje No: KOU KAEEK 2015/240	Tarih: 28.07.2015
	Yrd. Doç. Dr. Gökhan Duruksu sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen Klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

#### ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420), Hasta Hakları Yönetmeliği Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmelik ( 8 Mayıs 2014/ 28994), Helsinki Bildirgesi (2008), İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu (Nisan 2013),ICH/GCP-Guideline for Good Clinical Practice (10 Haziran 1996)İnsan Denekleri İçeren Biyomedikal Araştırmaların Uluslar arası Rehber Kuralları (CIOMS, 2002), Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulduğuna Dair Kanun (10 Mart 2011/6212), Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesi (4 Nisan 1997), Ek Madde -10 (6 Nisan 2011, 6225 ) Resmi Gazetede 13.04.2013 tarih ve 28617 sayılı ile yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik ( 25 Haziran 2014/29041 )
---------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: PROF. DR. NERMİN ERSOY

#### ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Nermin ERSOY Başkan	Tıp Tarihi ve Etik	KOU Tıp Fak. Tıp Tarihi ve Etik AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Nermin</i>
Prof. Dr. Dilek URAL Başkan Yrd.	Kardiyoloji	KOU Tıp Fak. Kardiyoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Dilek</i>
Prof. Dr. B. Faruk ERDEN Üye	Farmakoloji	KOU Tıp Fak. Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>B. Faruk</i>
Prof. Dr. Gülcan TÜRKER Üye	Pediyatri	KOU Tıp Fak. Çocuk Sağ. ve Hst.AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Gülcan</i>
Prof. Dr. Yavuz GÜRKAN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	KOU TF Anesteziyoloji ve Reanimasyon	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Yavuz</i>
Prof. Dr. Hale M. KIR Üye	Biokimya	KOU Tıp Fak. Biokimya AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Hale</i>
Doç. Dr. Ayşe KARSON Raportör	Fizyoloji	KOU Tıp Fak. Fizyoloji AD	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Ayşe</i>
Uzm. Dr. Murat GÜVEN Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Derince Eğt. ve Arş. Hastanesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Murat</i>
Uzm. Dr. Berna A. ŞERİFİ Üye	Halk Sağlığı	İzmit 1 Nolu AÇSAP	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Berna</i>
Ersayın IŞIK Üye	Avukat	Kocaeli Barosu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Ersayın</i>
Yasemin ÜLSOY Üye	Hasta Hakları Temsilcisi	Ev Hanımı	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Yasemin</i>
Yrd. Doç. Dr. Önjen TAK	Danışman Diş Hekimi	KOU . Diş Hekimliği Fak.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Önjen</i>

\* :Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Değerlendirme Formu  
28 Nisan 2009 Versiyon No:1

2

## **EK2. Tez Denetleme Listesi**

