

T. C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DENEYSEL TİP 1 DİABET OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİ İLE İNSÜLİN
TEDAVİSİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

GÖKÇEN GÖKÇE

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat TOSUN

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Tarafından 17.SAĞ.BİL.01 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2018-004

2018-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Programı çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: ... / ... /2018

Prof. Dr.Murat Tosun
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Artay Yağcı

Prof. Dr. Korhan Altunbaş

Üye

Üye

Tıp Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Gökçen GÖKÇE'nin ‘‘DeneySEL Tip 1 Diabet Oluşturulmuş Ratlarda Mezenşimal Kök Hücre Tedavisi İle İnsülin Tedavisinin Karşılaştırılması’’ başlıklı tezi .../.../..... günü saat ‘da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN

Enstitü Müdürü

Önsöz

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat TOSUN'a; Tez sürecimde Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ndeki çalışmalarına katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Hasan Hüseyin DEMİREL'e; Yüksek lisans eğitimim ve tez süreci içinde karşılaştığım soru ve sorunların çözümü için elinden gelen desteği gösteren, Yüksek lisans eğitimime ve laboratuvar uygulamalarım katkılarından dolayı Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğr. Gör. Dr. Esra ASLAN'a, desteği için, sabır ve sevgileri için en içten duygularıyla teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER	iiix
RESİMLER.....	ix
TABLolar.....	ixi
1. GİRİŞ	1
1.1. Pankreas.....	3
1.1.1. Pankreas Anatomisi	3
1.1.2. Pankreas Histolojisi.....	5
1.1.3. Pankreas Embriyolojisi	8
1.1.4. Pankreas Fizyolojisi	9
1.1.5. Pankreas’la ilgili hastalıklar	10
1.1.5.1. Tümoral bozukluklar.....	10
1.1.5.2. Pankreas’ın Endokrin bozuklukları	11
1.1.6. Kök Hücre Kavramı	16
1.1.6.1 Kök Hücre Çeşitleri	17
1.1.6.2. Kök hücrelerin klinikte uygulama alanları	20
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Etik Kurul	22
2.2. Kimyasal Maddeler	22
2.3. Deney Hayvanları.....	22
2.3.1. Deney Hayvanlarının Beslenmesi ve Saklanması	22
2.3.2. Deney Grupları	22
2.3.3. Deney protokolü	23
2.3.3.1. Ratları Diyabetize etme	23
2.3.3.2. İnsulin dozu hazırlama	23
2.3.3.3. MKH hücreleri eldesi.....	24
2.3.3.3.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Prosedürler	24
2.3.4. Deney Hayvanlarından Örneklerin Alınması	25
2.4. Histolojik Değerlendirme	25
2.4.1. Histolojik Takip	25
2.4.2. Histokimyasal Boyama	25
2.4.3. İmmunohistokimyasal Boyama.....	26
2.5. Preparatların Değerlendirilmesi ve Görüntü Analizi	27
2.6. Biyokimyasal Değerlendirme	28
3. BULGULAR.....	29

4. TARTIŞMA.....	39
SONUÇ.....	43
ÖZET.....	44
SUMMARY.....	45
KAYNAKLAR.....	46



SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AEC	: 3-amino-9-etilkarbozol
AKŞ	: Açlık Kan Şekeri
APG	: Açlık Plazma Glukozu
ASCs	: Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücreler
BM-MSC	: Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
°C	: Santigrad Derece
CD	: Farklılaşma Kümesi
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
cm	: Santimetre
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
DM	: Diyabetes Mellitus
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EASD	: Avrupa Diyabet Çalışma Birliği
EK	: Embriyonik Kök Hücreler
FBS	: Fetal Buzağı Serum
F-DMEM	: Dulbecco's Modifed Eagle's Medium
FGF 2	: Fibroblast Büyüme Faktörü 2
GAD	: Glutamik Asit Dekarboksilaz Enzimi
GDM	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
gl	: Glandula
GVHD	: Graft Versus Host Hastalığı
HKH	: Hematopetik Kök Hücreler
HLA	: Human Lökosit Antijeni
HRP	: Horsedish Peroksidaz
hsp 65	: Stres Proteinleri (heat shock protein)
IA-2A	: İnsülinoma İle İlişkili Otoantikorlar
IA-2β	: İnsülinoma İle İlişkili 2β Otoantikor
IAA	: İnsülin Otoantikorları
ICA-512	: Anti-tirozin Fosfataz Antikoru

ICAs	: Adacık Hücre Otoantikorları
IDDM1	: İnsülin Bağımlı Tip 1 Diyabet
IDF	: Uluslararası Diyabet Fedarasyonu
IGF	: Bozulmuş Açlık Glukozu
IGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
INS	: İnsülin
ISCT	: Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
IU	: İnternasyonal Unit
i.p	: Periton içi
L	: Lumbal
m	: Musculus
MKH	: Stromal (Mezenkimal) Kök Hücreler
M-MSCs	: Kas Kökenli Kök Hücreler
MODY	: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet
MS	: Multipl Skleroz
N	: Nervus
OGTT	: Oral Glikoz Tolerans Testi
P	: Fosfor
PBS	: Fosfat Buffered Salin
PDL-SCs	: Peridontal Ligament Kökenli Kök Hücreler
PDR	: Proliferatif Diyabetik Retinopati
PDX	: Duodenal homebax 1 Geni
PEN	: Pankreasın Endokrin Neoplazmları
P-MSCs	: Periosteum Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
SHH	: Sonic Hedgehog
SM-MSCs	: Sinoviyal Membran Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
SSCs	: Deri Kökenli Kök Hücreler
STZ	: Streptozosin
TB-MSCs	: Trabeküler Kemik Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
TGF- β	: Transforming Growth Faktör-Beta
TUE	: Terapötik Kullanım Muafiyeti

TURDEP	: Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalık Prevelansı
V	: Vena
VIP	: Vazoaktif İntestinal Polipeptid
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WJ-MSC	: Warton Jeli Kökenli Kök Hücreler
ZnT8A	: Çinko Transporter Antikorları



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Pankreasın Komşulukları	3
Şekil 1.2. Pankreas'ın Embriyonik Dönemde Gelişimi	8
Şekil 3.1. STZ Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri	29
Şekil 3.2. STZ+İNS Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri.....	29
Şekil 3.3. STZ+MKH Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri.....	30
Şekil 3.4. STZ+MKH+İNS Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri	30
Şekil 3.5. G1, G2, G3 ve G4 gruplarında İnsülin Değerleri.....	46



RESİMLER

Resim 1.1. Pankreas'ın histolojik görünümü. Hematoksilen-Eozin x20.....	5
Resim 1.2. Pankreas'ın asinus yapısının histolojik görünümü. Hematoksilen-Eozin x20.....	6
Resim 2.1. Deneklere intrapankreatik MKH enjeksiyonu	24
Resim 3.1. STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10).....	32
Resim 3.2. STZ ile diyabet oluşturulmuş ve İnsulin uygulanmış ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10).....	32
Resim 3.3. STZ ile diyabet oluşturulmuş ve MKH verilmiş ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10).....	33
Resim 3.4. STZ ile diyabet oluşturulmuş ve İnsulin ve MKH uygulanmış ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10)	33
Resim 3.5. STZ uygulanan gruptaki ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerini göstermek için yapılan GFP boyaması (anti-GFP primer antikor x10)	35
Resim 3.6. G2 gruptaki İnsulin verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerini göstermek için yapılan GFP boyaması (anti-GFP primer antikor x10)	35
Resim 3.7. G3 gruptaki MKH verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerinin stromada görünümü (anti-GFP primer antikor x10) (→ immüno pozitif hücreler).....	36
Resim 3.8. G3 gruptaki MKH verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerinin pankreasa yakın lenf nodunda görünümü (anti-GFP primer antikor x10) (→ immüno pozitif hücreler).....	36
Resim 3.9. G4 gruptaki İnsulin ve MKH verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerinin pankreas yapısındaki Langerhans adacıkları yapısında görünümü (anti-GFP primer antikor x10) (→immüno pozitif hücreler)	37

TABLÖLAR

Tablo 3.1. Gruplar arasında histolojik değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi.....	31
Tablo 3.2. İnsulin tablosu	37



1. GİRİŞ

Diyabet (DM) tüm dünyada milyonlarca insanı etkileyen, artan küresel yaygınlık ve insidansı olan hem endokrinolojik hem de metabolik bozukluktur (ADA, 2017). Multifaktöriyel ve kronik bir hastalık olması sebebiyle sağlık sistemi maliyetleri, hasta sakatlığı ve erken ölümle ilişkili kayıplardan kaynaklanan dolaylı maliyetler, bakımı için harcanan zaman, uzun vadeli mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar ve bunlarla ilişkili maliyet açısından değerlendirildiğinde büyük bir ekonomik yük oluşturur. Amerika’da 2016 yılı itibarıyla 86 milyon kişi prediyabet, 29 milyondan fazla kişi de diyabet hastası olarak açıklanmıştır ve bu durum tip 2 diyabet ve diğer kronik hastalıkları riskini artıran ciddi bir sağlık sorunudur. Diyabet, ABD’de 2013’te ölüm nedenleri arasında yedinci sıradadır (CDC, 2017). American Diabetes Association (ADA) verilerine göre 20 yaşın altında yaklaşık 208.000 Amerikalı diyabet tanısı almıştır ve bu oran nüfusun yaklaşık %0.25’ini oluşturmaktadır. 2008-2009 yılları arasında, gençlerde diyabet teşhisi konan yıllık insidansın tip 1 diyabetli hastalarda 18.436, tip 2 diyabetli hastalarda ise 5.089 olduğu tahmin edilmektedir (ADA, 2017).

Büyük bir sağlık sorunu olan DM tedavisiyle ilgili olarak değişik tedavi yöntemleri uygulanmakta ve geliştirilmekte olup, bunlar arasında pankreas adacık nakilleri, eksojen insülin uygulamaları ve kök hücre tedavileri bulunmaktadır. Son yıllarda üzerinde yapılan çalışmalarla alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülmekte olan kök hücre tedavisi büyük bir umut olarak görülmektedir. Kök hücrelerin vücudun hasarlı bölgelerinin yenilenmesinde bir kaynak oluşturarak, diyabet gibi kendini yenileme ve onarma kapasitesi olmayan hücrelerin kaybına bağlı olarak gelişen hastalıkların tedavisi için, çalışmalarının yapılabileceği ortaya konmuştur. Ancak nakledilen kök hücrelerin dokuda farklı hücrelere diferansiye olma potansiyeli, kök hücrelerin alıcı tarafından reddedilmesi, farklılaştırma protokollerinin çok yetersiz olması nedeniyle halen kök hücre tedavisi sadece umut veren bir tedavi olmaktan ileri gidememiş ama deneysel anlamda çok farklı çalışmalar yapılmıştır ve yapılmaktadır. DM tedavisinde temel amaç glisemik kontrolün sağlanması, akut komplikasyon gelişim riskinin azaltılması, mikrovasküler ve makrovasküler kronik

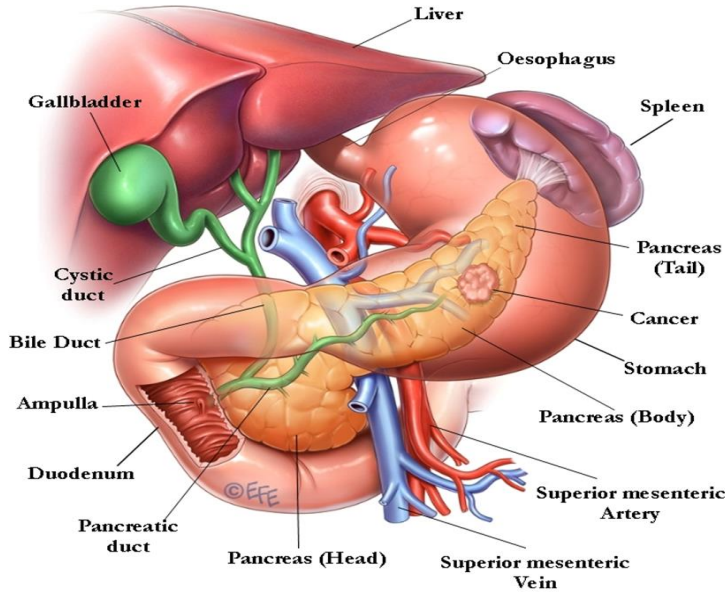
komplkasyonların önlenmesi, eşlik eden diğer sorunların düzeltilmesi ve böylelikle diyabetlide yaşam kalitesinin yükseltilmesidir (Nicholson, 2011).

Diyabet tedavisi çalışmaları ile ilgili yapmış olduğumuz literatür taramasında daha çok insulin tedavisinin başka antidiyabetiklerle kombine kullanımında elde edilen sonuçların karşılaştırılmış olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda çok daha az sayıda olmak üzere primer hücre kültür hatları kullanılmak suretiyle yapılmış kök hücre çalışmaları olduğu belirlenmiştir. Bu projemizde klasik Tip 1 DM tedavisinde kullanılan insulinin gerek tek başına gerekse mezenşimal kök hücrelerin intrapankreatik enjeksiyonu ile farelerin kliniklerinde hem biyokimyasal hem de histolojik anlamda ne tür değişiklikler yaptığını belirlemeyi amaçladık.

Bu çalışmanın intrapankreatik enjeksiyon yoluyla MKH verilmesi nedeniyle farklı konseptte bir çalışma olması nedeniyle başka çalışmalara fikir sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

1.1. Pankreas

1.1.1. Pankreas Anatomisi



Pankreas L 1-2 vertebra hizasında, retroperitoneal olarak transvers yerleşimli, düzgün ve lobüle yapıda, sarımtırak -hafif kırmızimsı renkte, uzunluğu ortalama 17-22 cm, genişliği 4 cm kalınlığı 1-1,5 cm, ağırlığı ortalama 90-100gr bir organ olup, baş, boyun, gövde, kuyruk ve

Şekil 1.1. Pankreasın Komşulukları

processus uncinatus adlı bir de aksesuar lobu ile birlikte anatomik olarak 5 bölümde incelenebilir. Bursa omentalis, mide ve colon transversum'un arka tarafında bulunur ve duodenum'un oluşturduğu kavsin içinden solda dalağa kadar transvers olarak uzanır. Önde sağdan sola doğru; transvers kolon ve transvers mezokolon, bursa omentalis ve mide ile, arkada sağdan sola doğru; koledok, v. porta hepatis ve v. lienalis, v. kava inferior, v. mezenterika superior, aort, sol böbrek ve dalak yer alır (Şekil 1.1).

1) Baş: Duodenum'un C harfine benzer kavsin içinde, V. Mesenterica superior'un sağında olup pankreasın en geniş bölümüdür. Alt kısmında aşağıya ve orta çizgiye doğru uzanan processus uncinatus denilen bir çıkıntısı bulunur.

2) Boyun: Pankreasın boyun kısmı, superior mezenterik damarların geçtiği alan ile portal venin başlangıcı arasındaki bölge olarak tanımlanabilir. Caput pancreatis ile corpus pancreatis bölümleri arasında yer alır ve pankreasın en kısa ve en dar bölümünü oluşturur.

3) Gövde: L1 ve L2 vertabralar hizasında, vücut orta hattının sol -yukarısında yer alan parça olup, prizmaya benzer şekilde üç yüze ve üç kenara sahiptir. Pankreas gövdesi arkada aorta, süperior mezenterik arterin başlangıç noktası, diyafragmanın sol kurusu, sol böbrek ve damarları, sol adrenal bez ve splenik venle ilişkilidir.

4) Kuyruk: Corpus pancreatis'in sol tarafa devamı şeklindedir. Tamamen periton ile kaplıdır. Şekli ve uzunluğu şahıslar arasında farklılık gösterir.

5) Unsinat çıkıntı: Pankreas başının solundan aşağı doğru uzanır, süperior mezenterik damarların arkasından, aorta ve inferior vena kavanın önünden devam eder.

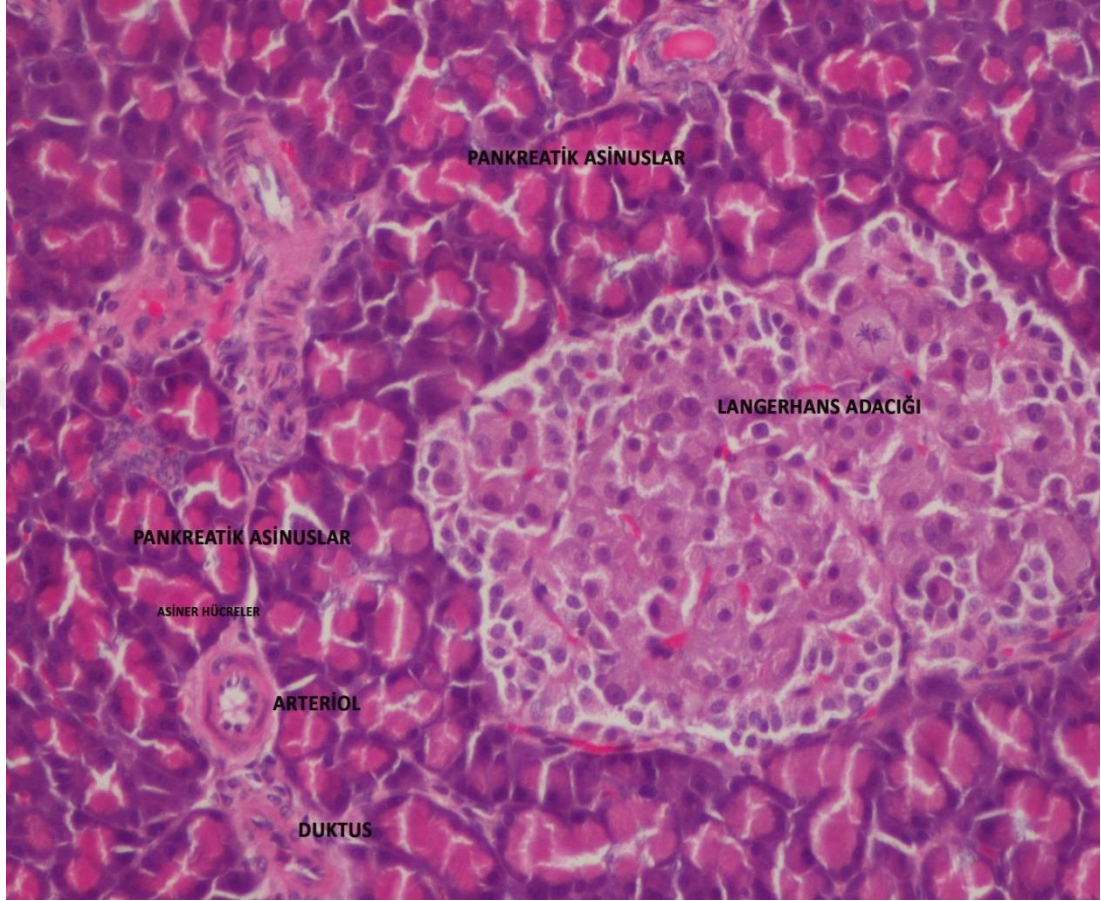
Pankreatik Kanallar, Pankreas ekzokrin salgısını pars descendens duodeni'ye ductus pancreaticus ve ductus pancreaticus accessorius denilen iki kanal vasıtası ile boşaltır. Duktus pankreatikus majör (Wirsung kanalı), kuyruk bölümünden başlar ve yolu boyunca birçok dallar alarak caput pancreatis'e kadar gelir ve papilla duodeni major'a açılırlar. Duktus pankreatikus accessorius (Santorini kanalı), 5-6 cm uzunluğunda pankreasın ikinci kanalı olup %4-10 oranında görülür. Pankreas başının üst bölümünü drene eder, papilla duodeni minör üzerinden duodenuma açılır.

Duodenal Papilla (Vater Papillası), Duodenal papilla koledokun intramural parçasının uç kısmıdır. Duodenumun 2. kıtasının posteromedial devamındadır.

Pankreasın İnnervasyonu; Pankreasın sempatik ve parasempatik innervasyonu vardır. Pankreas sekresyonu doğrudan vagusun parasempatik etki ile uyarılması sonucunda veya mideden asit salınımının artmasına bağlı olarak dolaylı olarak gerçekleşir. Çöliak ganglion sempatik ve parasempatik innervasyonun merkezidir. Parasempatik etki pankreas ekzokrin salgısını arttırırken, sempatik etki azaltır. Somatostatin, glukagon, pankreatik polipeptid tarafından inhibe olur.

1.1.2. Pankreas Histolojisi

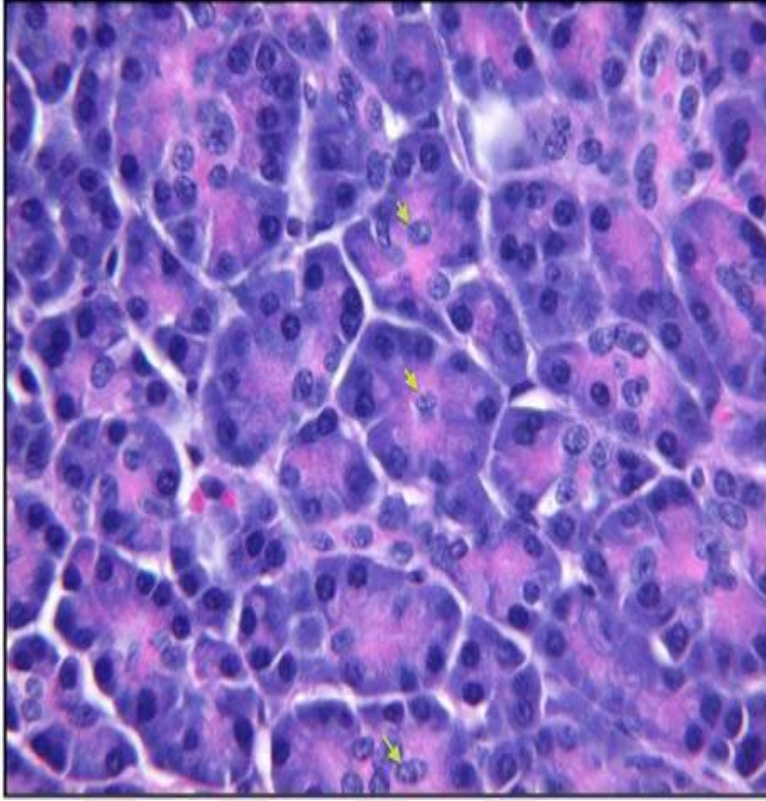
Pankreas hem endokrin hem de ekzokrin salgı yapan bir bezdir. Ekzokrin bölümü sindirim enzimleri salgılar, ductus pancreaticus aracılığıyla duodenum'a boşaltır.



Resim 1.1. Pankreas'ın histolojik görünümü. Hematoksilen-Eozin x20

Endokrin bölüm ise ekzokrin bezler arasına dağılmış bulunan Langerhans adacıkları'ndan oluşur ve tüm bezin %2'lik bir kısmını yapar (Resim 1.1). Pankreas dıştan zayıf bir kapsülle ile sarılmıştır. Kapsülden ayrılan ince septumlar organı lob ve lobcuk'lara ayırır. Kuyruktan başlayıp baş kısmına doğru salgılayan hücrelerin tüm özelliklerini gösterir. Zimogen granüllerin miktarı ve içeriği sindirim fazına bağlı olarak değişir. Asinusun merkezinde yassı şekilli sentro asiner hücreler bulunur, bunlar ilk akıtıcı kanal olan duktus intercalated'lerin başlangıcını yapan hücrelerdir (Resim 1.2). Sentro asiner hücreler ergastoplazma ve sekret granülleri içermezler. Korpus glandula (asinus) çok uzun olan ductus intercalated ile devam

eder, pars striata bulunmaz. İntercalad ductuslar lobcuklar arası birleşerek interlobuler ductusu



Resim 1.2. Pankreas'ın asinus yapısının histolojik görünümü.
Hematoksilen-Eozin x20

yaparlar. Bunlar birleşerek Wirsung ve Santorini kanallarını meydana getirirler. Bu kanallar prizmatik hücrelerle döşelidir. Doğrudan duodenuma açılırlar ya da karaciğer ve safra kesesinden gelen kanal (ductus choledokus) ile birleşerek, Vater'in hepatopankreatik papilla'sı adı verilen

(diğer adı; diverticulum duodeni) yerde duodenuma açılırlar. Papillanın etrafında duodenumun düz kasından oluşan büzücü bir tabaka (Oddi sfinkteri) bulunur. Bu sfinkterin görevi duodenuma akan safra ve pankreas salgısını kontrol etmektir. Pankreas enzimleri barsaklardaki sindirim işlemi için çok gereklidir. Üretilen başlıca enzimler; tripsinojen, kimotripsinojen, karboksipeptidaz, ribonukleaz, deoksiribonukleaz, lipaz, fosfolipaz A, triasilgliserol, elastaz ve amilaz'dır. Üretilen bu enzimlerin çoğu asiner hücrelerin sitoplazması içinde proenzim olarak depo edilir, bunlar ancak salgılandıktan sonra, duodenum içinde aktifleşirler. Bu durum pankreasın enzimlerin eritici etkisinden korunmasını sağlar. Başlıca iki hormon tarafından kontrol edilir. Bunlar duodenum mukozasındaki enteroendokrin hücreler tarafından üretilen sekretin ve kolekistokinin'dir. Sekretin pankreas kanal hücrelerindeki reseptörlere, kolekistokinin ise; bez gövdesi hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak işlevlerini yerine getirir. N. vagus'un uyarılması da pankreas

salgısını artırır. Önce sekretin'in etkisiyle pankreas kanal hücreleri (bilhassa duktus interkalated hücreleri); bikarbonattan zengin, enzim aktivitesi yönünden fakir bol bir sıvı salgırlar. Kanal hücreleri tarafından salgılanan bu salgı (duodenum submukozasındaki Brunner bezlerinin alkali salgısıyla birlikte) asidik kimusu nötralize eder. Daha sonra kolekistokinin etkisiyle bez gövdesinde yapılan enzimden zengin salgı duodenuma boşaltılır. Endokrin pankreas'ı Langerhans adacıkları (insula pancreaticus) adı verilen değişik boyutlardaki hücre grupları oluşturur. Hematoksilen eozin boyamasında endokrin hücre grupları daha koyu boyanan ekzokrin pankreas bölümüne göre soluk görünümleriyle ayırt edilirler.

Bu endokrin hücrelerin özellikleri ve fonksiyonları şöyledir:

- 1) α hücreleri: Langerhans adacığı hücre popülasyonunun %15-20'sini oluştururlar, çoğunlukla adacıkların periferinde bulunan bu hücreler glukagon hormonu salgırlar, bu hormon kan şekeri düzeyinde bir azalma olduğı zaman salgılanır ve kan şekeri düzeyini yükseltir. Glukagon ayrıca karaciğer hücrelerinden hepatik lipaz'ı stimüle ederek yağ hücrelerinden yağların mobilize olmasını da sağlar.
- 2) β hücreleri: %60-80'ini yaparlar, adacığın orta kısımlarında yerleşiktirler, α hücrelerinden daha büyüktürler. Beta hücreleri insülin hormonu salgırlar. Kan şekeri düzeyinde bir artış insülin salınımını stimüle eder. Karaciğerde, iskelet kası, kalp kası hücrelerinde ve yağ dokusunda kan şekerinin glikoza dönüştürülerek depolanmasını ve böylece kan şekeri düzeyinin düşmesini sağlar.
- 3) δ hücreleri: Az (%5-10) sayıda, periferik yerleşimlidirler, somatostatin hormonu salgırlar. Bu hormon; insülin ve glukagon salınmasını parakrin bir şekilde inhibe eder, ekzokrin pankreas enzimlerinin salınmasını, mide pariyetal hücrelerinden HCl salınmasını, enteroendokrin hücrelerden gastrin salınmasını, safra kesesinin kasılmasını inhibe eder. Somatostatin hipotalamusta da üretilir ve ön hipofizden büyüme hormonu salınımını inhibe eder.
- 4) F hücreleri (ya da PP hücreleri): Pankreatik polipeptid salgırlar. Bu salgı; somatostatin salgılanmasını inhibe eder, pankreasın dış salgısını inhibe eder, safra

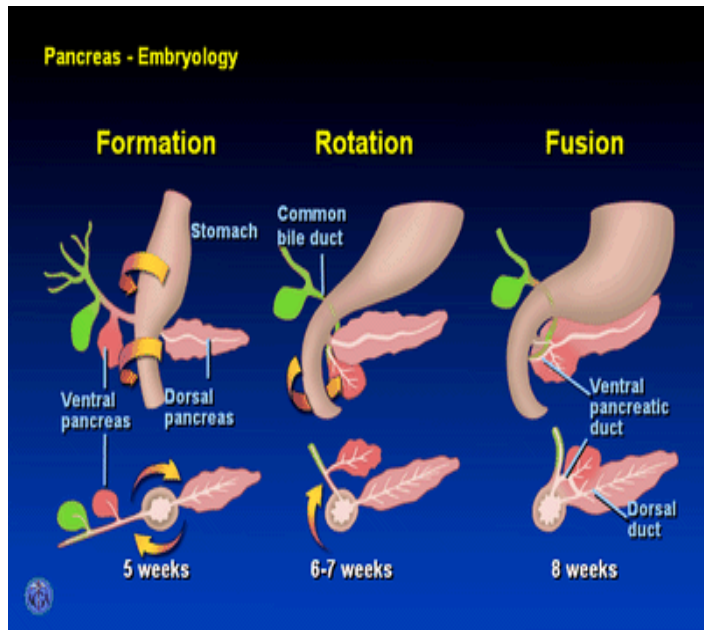
kesesinin gevşemesine neden olarak duodenuma boşaltılan safra salgısının azalmasını sağlar.

5) D-1 Hücreleri: Vazoaktif intestinal polipeptid (VIP) salgırlar, barsakların motilitesini ve sekresyon aktivitesini etkileyerek pankreas dış salgısını stimüle ederler.

6) EC Hücreleri: Secretin, motilin, substance-P gibi maddeler salgırlar, sekretin lokal olarak bikarbonat salınımını ve pankreas enzimlerini teşvik eder, motilin mide ve barsak hareketlerini artırır, substance-P ise nörotransmitter özelliklere sahiptir.

1.1.3. Pankreas Embriyolojisi

Pankreas, fetal hayatın dördüncü haftasında ön barsağın kaudal kısmından ve iç yüzünü döşeyen endodermiden köken alan arka ve ön pankreas tomurcuklarından gelişir. Arka pankreas tomurcuğı dorsal mezenterin içinde iken ön pankreas tomurcuğı ise koledokun yakınındadır. Her iki çıkıntı da sağa döner, bu hareketiyle ön tomurcuk, arka tomurcuğun hemen altına ve arkasına gelir, böylece ventral pankreasın çıktığı noktanın yanında tomurcukların parankim ve kanal sistemleri kaynaşarak birleşir. Daha sonra duodenum döndükçe pankreas da sola kayar.



Şekil 1.2. Pankreas'ın embriyonik dönemde gelişimi

Erişkinde sadece başın kaudal kısmı ve processus uncinatus ön pankreas kaynaklıdır. Başın kranial parçası, gövdenin tümü ve kuyruk arka pankreas çıkar. Arka pankreas kanalının distalinin büyük kısmı ön pankreas kanalının tamamı ile birleşir ve ana pankreas kanalını (Wirsung) oluşturur.

Arka pankreas kanalının proksimal kısmı ya tümüyle oblitere olur ya da küçük bir kısım aksesuar kanal (Santorini) olarak kalır. İnsanların %5-10'unda ventral ve dorsal pankreas kanalları birleşmez ve duodenuma ayrı ayrı açılır ve pankreas bölgelerinin çoğu Santorini kanalı ile minor papillaya açılır. Sadece ventral pankreasın küçük bir kısmı safra kanalı ile ortak olarak papilla vateriye açılır (Şekil 1.2) (Slack, 1995).

Pankreas gelişiminin molekül denetimi, dorsal aorta endoteli ve notokord tarafından yapılan fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF 2) ve transforming growth faktör-beta (TGF-b) ailesinin bir üyesi olan aktivin barsak endoderminde SHH ekspresyonunu baskılar. Böylece pankreas tomurcuğunun gelişmesini sağlar. Ön tomurcuk visseral mezodermden gelişir, pankreatik ve duodenal homeobox 1 (PDX) geninin ekspresyonu artar. Pankreasın endokrin hücrelerinin oluşumu bir çift PAX-4 ve homeobox gen ekspresyonu sayesinde gerçekleşmektedir. Her iki geni eksprese eden hücreler β , δ ve F hücreleri, sadece PAX 6 eksprese edenler ise α hücrelerine dönüşür.

1.1.4. Pankreas Fizyolojisi

Pankreas ekzokrin ve endokrin salgı yapan karma bir bezdir. Büyük bir kısmını oluşturan asini bölümü sindirim enzimlerinin yapım ve salgılanmasından sorumlu iken, diğer bölümü Langerhans adacıklan adı verilen endokrin hücre gruplarından oluşur ve glukoz metabolizmasında önemli rol oynayan insülin ve glukagon salgılanır. Pankreasın sindirim sıvısı incebarsağın üst bölümündeki kimusun uyarısıyla salgılanır, salgılanan proteolitik enzimler tripsin, kimotripsin, karboksipeptidaz ve elastazdır. Bu enzimler inaktif tripsinojen, kimotripsinojen, prokarboksipeptidaz ve proelastaz olarak salgılanırlar ve barsağa dökülene kadar inaktif haldedirler. Duodenum mukoza hücrelerinden salgılanan enterokinaz tripsinojenin tripsine dönüşümünde rol oynar, tripsin de kimotripsinojeni aktif kimotripsine dönüştürür. Karbonhidratlar, pankreatik amilaz tarafından sindirilir. Pankreatik lipaz, kolesterol esteraz ve fosfolipaz yağ sindiriminde, ribonükleaz ve deoksiribonükleaz ise nükleik asitlerin yıkımında rol oynayan enzimlerdir. Bikarbonat iyonları ve su salgıda bulunan diğer iki önemli komponentdir.

Pankreas salgısının düzenlenmesi hem sinirsel hem de hormonal yol ile olur. Sinirsel yol vagus ile, hormonal yol ise sekretin ve kolesistokinin aracılığı ile başlar. Sekretin ile pankreastan bol miktarda bikarbonat ve su salgılanır iken kolesistokinin ile sindirim enzimleri salgılanır. Diğer nörokrin ajanlar asetilkolin, vazoaktif intestinal polipeptid, gastrin salgılatıcı peptid, substant P olarak sayılabilir. Pankreasın ekzokrin salgısının inhibisyonu ise somatostatin tarafından sağlanır.

Pankreasın bir diğer önemli fonksiyonu ise kan şekeri seviyesinin düzenlenmesini sağlayan endokrin fonksiyonudur. Tüm pankreasın %1'ini kapsar ve yuvarlak, sıkı, damarlanması fazla, bağ dokusu az olan adacıklar şeklindeki Langerhans adacıklarından oluşur. Pankreasda yaklaşık 1.000.000 adacık vardır, çapı 0.1- 0.2 mm olup, endodermal orjinlidir. Adacıkların yapısına bakıldığında glukagon salgılayan α hücreleri (%20), insülin salgılayan β hücreleri (%68), somatostatin salgılayan δ hücreleri (%10), PP (pankreatik polipeptid hücreleri) (%2), serotonin hücreleri endokrin fonksiyonu yerine getirirler (Guyton, 2017).

1.1.5. Pankreas'la ilgili hastalıklar

1.1.5.1. Tümöral bozukluklar

Pankreasta görülen tümöral endokrin bozukluklar arasında Konjenital Anomaliler, DM, Pankreasın Endokrin Neoplazmları (PEN) ve Az Differansiye Endokrin Tümörler görülmektedir.

- **Nesidiadisplazi;** Konjenital Anomalilerden olan küçük, düzensiz dağılımlar gösteren adacık hücre topluluklarının sayısı artmıştır. Beta hücrelerinin nükleus büyüklükleri ve DNA içeriğinde artış görülür.
- **Nesidioblastozis;** konjenital adacık hiperplazisi, adacıklarda büyüme ve insülin salgılayan hücrelerde hipertrofi görülür.
- **Pelioziste;** yalnızca adacıkların damar yapılarında konjesyon ve dilatasyon vardır.
- **Pankreasın Endokrin Neoplazmları (PEN);** pankreas tümörlerinin %1'ini oluşturur, pankreasın endokrin hücrelerinden köken alır, çoğunluğu iyi diferansiyedir.

- **İnsülinoma;** Bütün pankreatik neoplazmların %35-40'nı oluşturur, sıklıkla gövde, kuyrukta lokalizedir.
- **Gastrinoma;** Malign gastrinomalar bütün pankreatik endokrin tümörlerin %20' sini oluşturur. 3/4'ü glandın baş kısmın da lokalizedir.

Bunların dışında **Vipoma**, bütün pankreatik tümörlerin %5-10'nunu oluştururlar, gövde ve kuyruk kısmında lokalizedirler. **Glukoganoma**, %80 maligndir. Fonksiyonel tümörlerin %10'nunu, bütün endokrin tümörlerin %5'ini oluştururlar. **Somatositatinoma**, %75'i maligndir. 3/5'i baş kısmında lokalizedir. **Az Differansiye Endokrin Tümörler** ise, küçük hücreli karsinomlardır. Genellikle pankreas başı yerleşimlidir ve çevreye infiltratiftir.

1.1.5.2. Pankreas'ın Endokrin bozuklukları

Pankreas'ın endokrin bozuklukları içinde en yaygın bilinen ve tezimizin konusunu da oluşturan hastalık Diyabetes Mellitus'tur.

Diyabetes Mellitus'un Tanımı;

Amerikan Diyabet Birliği (2004) "American Diabetes Association" (ADA) tanımlamasına göre Diyabet (DM), insülin hormonunun sekresyonundaki ve/veya etkisindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozuklukla karakterize, sürekli tıbbi bakım gerektiren, kronik bir metabolizma hastalığıdır. (Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu, 2009) Klasik semptomları çok su içme "polydypsia", çok sık idrara çıkma "polyuria" ve kilo kaybıdır. Bazen bulanık görme ve çok yemek yeme "polyphagia" da bu semptomlara eşlik eder. (Aguayo-Mazzucato, 2010) Tedavi ile kontrol sağlanamadığı takdirde hiperglisemi akut komplikasyonlar ile ölüme yol açabilir, uzun dönemde mikrovasküler ve makrovasküler kronik komplikasyonlar sonucunda gelişen, körlük, felç, nöropati, böbrek yetmezliği, kalp hastalığı ve amputasyonları kapsayan diyabet problemleri hastaların yaşam kalitesini bozar (Mancio, 2015).

Diyabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi;

Tüm dünyada Diyabetes Mellitus prevalansında son yıllarda görülen belirgin artışın yakın gelecekte de devam edeceği tahmin edilmektedir. Uluslararası Diyabet

Federasyonu (IDF) verilerine göre 2013 yılı itibari ile dünyadaki diyabetli hasta sayısı 382 milyon iken bu sayının 2035 yılında %55 oranında artarak 592 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Ülkemizde yapılan TURDEP-II çalışmasında diyabet sıklığının %13,7'ye ulaştığı ve son 12 yılda diyabet oranının %90 arttığı saptanmıştır. (TURDEP-II Çalışması (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre 2030 yılında diyabetin ölüm nedenleri içinde 7. sırada olacağı tahmin edilmektedir (CDC, 2017).

Diyabetes Mellitus'un Tanısı

Diyabet için 2003 ve 2010 yılında yapılan revizyonlar sonucunda 4 tanı kriteri şu şekildedir: (TUE Physician Guidelines Information to Support the Decisions of TUE Committees Diabetes Mellitus, 2015).

- Açlık plazma glukozu (APG) 126 mg/dl'den büyük veya eşit olmalıdır. Açlık en az 8 saat süreyle gıda alımının olmadığı süreyi belirtmektedir.
- 75 gr glukozla yapılan oral glikoz tolerans testinin (OGTT) 2. saatinde plazma glikozunun 200 mg/dl'den büyük veya eşit olması
- Diyabet klasik semptomları ve rasgele ölçülen plazma glikozunun 200 mg/dl'den büyük veya eşit olması. Rasgele kelimesi günün herhangi bir saatini, diyabet Klasik semptomları da poliüri, polidipsi, polifaji veya iştahsızlık, halsizlik, çabuk yorulma, ağız kuruluğu, noktüri gibi semptomları kastetmektedir.
- Standardize metotlarla ölçülmüş glikozillenmiş hemoglobin A1c düzeyi %6.5'ten büyük veya eşit (≥ 48 mmol/mol) olmalıdır.

Fruktozamin testi glikozillenmiş albuminin seviyesini ölçer. (Hom, 1998; Mealey ve Oates 2006) Diyabetes mellitus etiyolojisi göz önünde bulundurularak A.D.A. tarafından şu şekilde sınıflandırılmıştır (ADA, 2017).

Diyabetes Mellitus'un Sınıflandırması

1. Prediyabet

Daha önce "Sınırdaki Diyabet" ya da "Latent Diyabet" diye anılan IGT ve IFG artık "Prediyabet" olarak kabul edilmektedir. Her ikisi de diyabet ve kardiyovasküler hastalık için önemli risk faktörleridir. ADA ve EASD 2007 yılında yayınlanan son konsensus raporlarında, 2003 yılındaki revizyona uygun olarak normal APG üst sınırının 100 mg/dl olmasını ve IFG/IGT kriterlerinin ve bu bozukluklar için kullanılan „Prediyabet“ terimin değişmemesi gerektiğini savunmaktadır.

2. Tip 1 Diyabetes Mellitus

Juvenil başlangıç diyabet olarak da bilinen Tip 1 diyabet, Langerhans adacıkları olarak adlandırılan, pankreasın insülin üreten β hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanır. Yaşa bağlı olarak β hücre kitlesinin %40-85'inde kayıp görülür. Sonuç olarak, insülin yokluğunda, glikoz hücrenin içine giremez ve kanda birikir. Hastalığın gelişmesine güçlü bir genetik yatkınlık geçmişi sahiptir ancak henüz tam olarak anlaşılamayan çevresel faktörlerin onun başlangıcını tetiklediği düşünülmektedir. β hücrelerinin ablasyonunun bir sonucu olarak, kan şekeri seviyelerini kontrol etmek için insülin uygulaması gereklidir. Tip 1 diyabetliler günde birçok kez insülin kullanmalı ve kan şekeri konsantrasyonlarını tam yaşamları boyunca günde 3-4 kez test etmelidir. Hayat kurtarıcı olmasına rağmen, bu müdahale vasküler dejenerasyon, körlük ve böbrek yetmezliği gibi uzun vadeli komplikasyonları önlemek için yetersizdir. Bu nedenle, alternatif yaklaşımlar aramak son derece klinik önem taşımaktadır (Bonner ve ark., 2000; Domínguez-Bendala ve ark., 2011). Mutlak insülin eksikliği vardır. Hastaların %90'ında otoimmün (tip 1A), %10 kadarında nonimmün (tip1B) β hücre yıkımı vardır (Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu, 2009).

- a. **Tip 1A diyabet:** Riskli doku grubu yatkınlığı zemininde çevresel tetikleyici faktörler (virus, toksin, emosyonel stres vs.) ile tetiklenen otoimmünitenin pankreas β hücrelerini harap etmesi sonucu aşağıdakilerden bir veya daha fazlasının varlığı, Tip 1 başlangıcının öngörücüleri olarak değerlendirilir (Diabetes Care, 2016; Fakhfakh, 2011). Bunlar, Adacık hücre otoantikorları

(ICAs), insülin otoantikorları (IAA), Glutamik asit dekarboksilaz enzimine (GAD) karşı otoantikorlar, tirozin fosfatazları IA-2 ve IA-2 beta'ya karşı otoantikorlar ve ZnT8 (çinko transporter antikorları)'dır.

- b. **Tip 1B diyabet:** Otoimmünite dışındaki bazı nedenlerden dolayı mutlak insülin eksikliği sonucu gelişir. Otoantikorlar saptanmaz, nadir görülür. (Ichinose, 2007) Tip 1 diyabetin kalıtımı Non-Mendelian'dır, en güçlü yatkınlık genleri 6p21.3 kromozomunda HLA (Human Lökosit Antijeni) bölgesinde lokalizedir (IDDM1) ve özellikle HLA-DQB1, DRB1 ve DQA1'in diyabetle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bluestone ve ark., 2010).

Kesin olarak ilişkilendirilememekle birlikte birçok çevresel faktörün genetik olan kişilerde otoimmün süreci tetiklediği öne sürülmüştür; virüsler (ensefalomiyokardit virüsü, Rubella virüsü, Retrovirüs, Reovirüs Tip 1,3, sitomegalovirus, Kabakulak virüsleri), bakteriyel bazı toksinler (Streptozotosin (STZ), Alloxan, Vacor), nitrosamin türevleri, nitritler ve diyetin (emzirme ömrünün kısaltılması, inek sütüne erken giriş, malnutrisyon) rol aldığı belirtilmiştir (Filippi ark., 2008; Weintrob ve ark., 2001).

3. Tip 2 Diyabet

Tüm DM tiplerinin %90-95'ini oluşturur. (International Diabetes Federation, 2014) İnsülinin yetersizliğine ve/veya insülinin etkilediği reseptörlerin bozukluğuna bağlı gelişmektedir. Genetik yatkınlığın yanında ilerlemiş yaş, fazla kilo alımı ve hareketsizlik diyabete yakalanma riskini arttırmaktadır (Potdar ve ark., 2016; Nolan ve ark., 2011).

4. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Gebelik diyabeti, gebeliklerin%7'sinde görülen ve hem anne hem de fetusta potansiyel risk oluşturan bir durumdur. (Hasdemir ve ark., 2014) Gebeliğin genellikle ikinci ve üçüncü trimesterde gelişir. Patogeneizde insülin direncinin artması sorumludur (Ben-Haroush ve ark., 2004).

5. Diğer spesifik diyabet tipleri

β -hücre fonksiyonlarının genetik defekti (Monogenik diyabet formları), insülin etkisindeki genetik defektler, pankreasın ekzokrin doku hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç veya kimyasal ajanlar, immun aracılıklı nadir diyabet formları ve diyabetle ilişkili genetik sendromlar (Monogenik diyabet formları)'dır.

Otoimmün Diyabet: β hücrelerinin doğal yapısı genetik ve çevresel faktörlerle bozulur, sitokin ya da antijenik peptitleri salgılayarak immün sistem elemanlarını uyarır, HLA Class I molekülleri hipereksprese olur. CD8+ sitotoksik T lenfositleri aktive olur ve β hücrelerine karşı nonspesifik immün aktivasyonu başlatır, meydana gelen insülitis β hücre ölümü ile sonlanır. (Bluestone ve ark., 2010) Son yıllarda otoimmün T hücreleri ile reaksiyona giren bir çok β -hücre antijeninin ayırıcı tanısında klinik kullanımda en yaygın olarak kullanılan otoantikorlar “adacık hücresi sitoplazmik otoantikorları (ICA), “glutamik asid dekarboksilaza karşı antikorlar(Anti-GAD ya da GADA), “insülin otoantikorları (IAA), “anti-tirozin fosfataz antikorları(ICA-512 veya IA-2A; insülinoma ile ilişkili otoantikorlar)”, “anti-fogrin antikorları (IA-2 β ; insülinoma ile ilişkili 2 β otoantikor)” ve son zamanlarda tanımlanan “çinko transporter antikorları (ZnT8A)” ve stres proteinleri (heat shock protein-hsp 65)'dir (Salman ve ark., 2011; Schranz ve ark., 2004; Paronen ve ark., 2004).

Diyabetes Mellitus Komplikasyonları

Diyabetin akut komplikasyonları hipoglisemi, diyabetik ketoasidoz, hiperglisemik non-ketotik koma iken, diyabetin kronik komplikasyonları nefropati, retinopati, kardiyovasküler semptomlar ve seksüel bozukluklardır (Pileggi ve ark., 2001; Couri ve ark., 2006; Katuchova ve ark., 2012; Paek ve ark., 2014). **Hipoglisemi**, Diyabetin en sık görülen komplikasyonudur. İnsülin ile tedavi edilen hastalarda görülür. Kan glukoz düzeyi 70 mg/dl civarına indiğinde hipoglisemik adrenerejik semptomlar (terleme, taşikardi, anksiyete, solukluk, bulantı ve açlık hissi) hissedilmeye başlar (ADA 2017). **Diyabetik Ketoasidoz (DKA)**, insülin ile kontra insüler hormonlar (glukagon, katekolaminler, kortizol ve büyüme hormonu) arasındaki oranın, insülin aleyhine değişmesi sonucu oluşan, diyabetin akut ve metabolik bir

komplikasyonudur (Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu, 2009).

1.1.6. Kök Hücre Kavramı

Kök hücrelerin özellikleri arasında sınırsız çoğalabilme, kendilerini yenileyebilme, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilme, hasarlı dokuya verildiğinde dokuyu onarabilme vardır. (Bose ve ark., 2014) Rejeneratif tıpta birçok hücre tipine farklılaşarak çoğalabilmeleri, çok miktarda bulunmaları, kolay elde edilebilmeleri, güvenli ve etkin şekilde alıcılara nakledilebilmeleri nedeniyle tercih edilmektedir (fKatuchova ve ark., 2015).

Farklılaşma kapasitelerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olarak adlandırılır. Totipotent kök hücreler, bir organizmayı oluşturma kapasitesine sahip hücrelerdir ve göbek kordonu, amniyon kesesi, Wharton jeli ve plasentayı oluşturarak pluripotent, multipotent ve unipotent özellik gösterebilirler. Pluripotent kök hücreler, tüm germ yapraklarına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait dokular oluşturabilirler fakat bir organizmayı oluşturacak yetenekleri yoktur. Multipotent kök hücreler, farklılaşması daha sınırlı sayıda olup insan vücudunda sadece birkaç hücre türüne dönüşebilir. Unipotent hücreler, tek bir hücre grubuna farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir (Fortier, 2005; Can, 2008).

Kök hücrelerin başlıca üç temel özelliği vardır.

- 1) Self-renewal (kendini yenileyebilme): Özelleşmeden çoğalarak, organ ve dokulara özgü öncü hücrelere dönüşebilmekte ve bölünme esnasında bir yandan öncü hücreye farklılaşacak olan hücreyi üretirken diğer yandan kendi yedeğini almaktadırlar. En önemlisi asimetrik hücre bölünmesi olmakla birlikte mikro çevre (niş), hücre-hücre temasları, adezyon molekülleri, hücreler arası bağlantı kompleksleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri ve sinyal yolları hücre kaderini belirler (Can, 2008).
- 2) Plastisite (farklılaşma): Olgun bir hücre olmak için gerçekleşen biyokimyasal ve fenotipik olayların tümüdür ve gerçekleşmesinde gen ifadesinin yönlendirmesi ya da kendi programı rol oynar. Plastisite bir hücrenin köken aldığı dokudan başka

bir dokuya farklılaşabilme özelliğidir (Şahin ve ark., 2005). En önemli mekanizma epigenetik kontroldür ve bunları birbirinden ayıran etken gen ifadesidir. Kök hücre, öncül hücre ya da özelleşmiş hücre mi olacağı buna bağlıdır. DNA ve histon metilasyonunun rolü önemlidir (Can, 2008; Rossant, 2008; Santos F ve ark., 2002).

- 3) Pluripotensi (köklülük): Üç germ yaprağı ve türevlerine farklılaşabilme yeteneğidir. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları veya hücre-hücre yapışma belirteçleri kullanılarak kök hücre tipi belirlenebilir. Bu belirteçlerden birçoğu farklılaşma kümeleri (Clusters of differentiation; CD) olarak bir başlık altında toplanmıştır (Weissman, 2000; Cavaleri ve ark., 2009).

1.1.6.1 Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynağına göre embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak ikiye ayrılırlar. Embriyonik kök hücreler, embriyonun erken gelişim sürecinde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir. Embriyonik olmayan kök hücreler ise; erişkin kök hücreler, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, göbek kordonu ve plasenta kök hücreleridir (Can, 2014).

1) Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Blastokist aşamasındaki embriyonun iç hücre kitlesinde yer alan, pluripotent karakterde, farklılaşmadan sınırsız bölünebilme kapasitesindedir (Can, 2014; Kirschstein, 2001).

2) Embriyonik Olmayan Kök Hücreler (Yetişkin Kök Hücreler)

Hematopoetik ve mezenkimal kök hücre (MKH)'ler en çok çalışılanlar olup multipotent özellikte, kas ve iskelet sistemi, kalp ve damar sistemi, sinir sistemi, sindirim sistemi, epitel doku, testis ve ovaryum kök hücreleri unipotent özellikteki diğer yetişkin kök hücrelerdir (Can, 2014).

2.1. Hematopetik kök hücreler (HKH)

Kendi kendine yenileyebilme ve bütün matür kan hücrelerine farklılaşabilme özellikleri vardır. Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı ve fetal karaciğerden elde edilebilirler. Yüzey belirteçleri başlıca, CD34, CD14, CD45 ve CD133'dür (Wang ve ark., 1997; Müller-Sieburg ve ark., 2002).

2.2. Stromal (Mezenkimal) kök hücreler (MKH)

Erişkin vaziyette kök hücre olup hücrelerin bağ dokularında bulunur. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi farklı hücrelere dönüşebilme, plastik yüzeye yapışması ve in vitro çoğalabilmesi, stromal karakterindeki yüzey antijenlerini taşıması ve multipotent farklılaşma (adipojenik, kondrojenik ve osteojenik) kapasitesine sahip olması nedeniyle MKH denilmektedir (Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011; Kim ve ark., 2012; Baer ve Geiger, 2012; Kirschstein, 2001). Farklılaşma ile çözünebilen faktörler salgılayarak doku ve organ birleşmesine yardımcı olarak gen aktarımını sağlar. Hasarlı doku tarafından salgılanan sitokinlere doğru hareket ederek immünmodülatör, antiapoptotik, antiinflamatuvar ve angiogenik rol oynarlar (Dominici ve ark., 2012; Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011; Li ve ark., 2014). 2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT)'nin fikir birliğiyle MKH olarak sınıflandırmak için; hücrelerin kültür ortamında plastik yüzeye tutunabilmeleri, yüzeylerinde CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) ve CD90 gibi hematopoetik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederlerken, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR (insan lökosit antijeni-DR) gibi tipik hematopoetik belirteçleri eksprese etmemeleri, in vitro ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri gerekmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım açısından avantajları; ilgili doku hücrelerinin gelişim ve fonksiyonuna stromal destek ile katkı sağlamaları, yüksek farklılaşma özelliğiyle hasarlı hücre ile füzyon yeteneği olması, çözünebilen faktörler (Ünal ve ark., 2008) ile hücre/doku tamiri, migrasyon özellikleri ile hasarlı dokuya ulaşabilme, çoğunlukla immünsüpresif/non-immünojenik özellikte olmaları, gen transferi kolaylığı nedeniyle gen tedavisi için uygun olmaları, enzimler (ör.

Lizozomal enzim) salgılayarak kalıtsal hastalıklardaki enzim defektlerinin yerine koyulabilme potansiyeli iken,

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım açısından en önemli dezavantajları; sayılarının çok az olması nedeniyle *in vitro* kültür ortamında haftalarca süren kültürlerde çoğaltılması, ciddi bir teknoloji, alt yapı, deneyim gerektirmesi ve maliyetinin fazla olmasıdır. Bu işlem için gerekli tüm *in vitro* işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda iyi üretim uygulamaları nedeniyle az sayıda merkezde klinik kullanıma uygun mezenkimal kök hücre üretimi yapılmaktadır ve literatürde bildirilen hasta sayısı oldukça azdır (Dominguez-Bendela ve ark., 2012; Ankrum ve ark., 2010).

En çok kullanılan MKH kaynakları; Kemik İliği Kökenli Kök Hücreler (BM-MSC), Adipoz Doku Kökenli Kök Hücreler (ASCs), Warton Jeli Kökenli Kök Hücreler (WJ-MSCs), Kas Kökenli Kök Hücreler (M-MSCs), Deri Kökenli Kök Hücreler (SSCs), Periosteum Kökenli Kök Hücreler (P-MSCs), Sinoviyal Membran Kökenli Kök Hücreler (SM-MSCs), Trabeküler Kemik Kökenli Kök Hücreler (TB-MSCs), Peridontal Ligament Kökenli Kök Hücreler (PDL-SCs)'dir.

Organlarda yerleşik kök hücreler: Bulundukları dokuda hücre ölümü veya doku hasarı meydana geldiğinde kısmen dokuyu tamir ederler. Beyin, spinal kord, diş kökü, kan damarları, çizgili kas, derinin epitel tabakası, sindirim sistemi, kornea, retina, karaciğer ve pankreas örnek olarak verilebilir.

Kanser Kök Hücreleri: Çeşitli kanser hücresi tiplerinde, hücrelerin, kök hücrelerde de bulunan yüzey belirteçlerine sahip oldukları gösterilmiştir. Kanser hücrelerinin kök hücreler ile olan benzerlikleri, asimetrik hücre bölünmesi özelliği göstermeleri, kendini yenileme için kullanılan Wnt, Sonic Hedgehog (SHH), Notch gibi ortak sinyal yollarına sahip olmaları, benzer transkripsiyon faktörleri (Oct-4, Nanog, Sox2, Nodal, Klf4 gibi) eksprese etmeleri, ilaçlara karşı direnç göstermeleri, metastaz ve belirli bir bölgeye yerleşme ile ilgili ortak yüzey reseptörlerine (CXC4, CD133, c-kit, c-met) sahip olmaları şeklinde özetlenebilir. Kök hücrelerin kendini yenileme ve asimetrik bölünme özellikleri, kanser hücresindeki telomeraz aktivitesindeki artışla birleşince hücrelerin malign karakter kazanıp göç etmeleri

(metastaz), apoptozu engellemeleri, hücre zarındaki taşıyıcı mekanizmaları değiştirmeleri ve tutunmadan büyüebilmeleri gibi nitelikler belirginleşir ki bunlar kanser tümör hücrelerinin de özellikleridir. Bunların yanı sıra özellikle embriyonik kök hücrelerde varlığı bilinen bazı hücre sinyal yollarının ve bunlarda rol alan proteinlerin bazı kanser türlerindeki aşırı düzeye eriştiği veya bozulduğu ortaya çıkarılmıştır.

1.1.6.2. Kök hücrelerin klinikte uygulama alanları

Mezenkimal kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline sahip olma özellikleri nedeniyle 1990 yılından beri klinik kullanıma uygunluğuyla ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kanserli hastalarda kemik iliğini desteklemesi amacıyla klinikte kullanılan MKH'ler daha sonra Graft Versus Host Hastalığı (GVHD), Crohn hastalığı başta olmak üzere organ nakillerinde, akut ve kronik böbrek yetmezliğinde, tip 2 diyabet, osteoartrit, MS gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Konu ile ilgili deneyimler arttıkça tedaviler üzerine etkilerinin artması beklenmektedir (Gorabi ve ark., 2016; Li ve ark., 2015; Brooke ve ark., 2007).

Erken başlangıç yaşından dolayı "juvenil diyabet" olarak adlandırılan Tip 1 diyabet (T1D), pankreastaki insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün yıkımından kaynaklanan diyabetes mellitus türüdür ve toplam diyabetik popülasyonun %5-10'unu etkiler. Günümüzde tedavide ilk olarak tercih edilen pankreas nakli, nakil bekleyen hasta sayısı fazlalığı ve verici pankreasın sınırlı tedarikinden dolayı sınırlıdır. T1D'nin baskın tedavisi olan insülin enjeksiyonu, hiperglisemiye iyileştirmek için etkili olmakla birlikte otoimmüniteyi azaltmak ve kaybedilen adacıkları yenilemek için etkililiği değildir. Son yıllardaki araştırmalar MKH'lerin implantasyonunun insülin üreten hücrelere direkt transdiferentasyon yoluyla değil, parakrin etkileri yoluyla glikoz seviyelerini düşürdüğünü göstermiştir. Bu nedenle, bu hücreler pankreatik adacıklar ile kotransplantasyon sonrası şeker hastalığını kontrol etmek için pro-anjiyojenik ve immünomodülatör etkiler kullanabilirler. MKH'ler, kemik iliğinde, yağ dokusunda, göbek kordonu kanı ve birçok diğer dokuda bulunan yetişkin kök hücrelerinin türüdür. Kendini yenileme potansiyeli ve

transdifferentasyon kabiliyeti olan MKH'ler, in vitro olarak genişletilebilir ve nispeten daha az çabayla çeşitli hücre soylarına yönlendirilebilir.

MKH'ler, iyi tanımlanmış hipoimmunojenisite ve immün modölatör etki gösterirler. Tüm bu özellikler MKH'leri Tip 1 Diyabet tedavisinde cazip kılmaktadır (Brooke ve ark., 2007; Li ve ark., 2015; Madec ve ark., 2009; Ankrum ve ark., 2010). Ancak günümüzde halen diyabet tedavisine yönelik MKH nakli çalışmaları deneysel aşamadadır ve elde edilen sonuçlar, metabolik işleyişi çok yönlü olan diyabet için yeterli görülmemekte, çeşitli fizyolojik unsurlar değerlendirilerek daha çok veri ile karşılaştırılması gerektirmektedir.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Etik Kurul

Çalışmamız kapsamında öncelikle Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan (AKÜHADYЕК) 49533702/169 sayı numaralı etik çalışma onayı alındı.

2.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda Xylene, Saf Alkol, %90 Alkol, %80 Alkol, %70 Alkol, Harris Hematoksilen ve PBS Tablet SIGMA-ALDRICH'den; Eosin Y, Sitrat Buffer, Ultra V Block, Primer Antibody Enhancer, HRP Polymer, AEC Single Solution ve Su Bazlı Kapatma Solusyonu THERMO-SCIENTIFIC'den; Hidrojen Peroksit ve Mayers Hematoksilen ADR'den; PAS Kit ve Entellan MERCK'den; Anti-GFP Antikor ABCAM(ab290) Firmasından temin edilmiştir.

2.3. Deney Hayvanları

2.3.1. Deney Hayvanlarının Beslenmesi ve Saklanması

Çalışmamızda ağırlıkları 250-300 gm arasında değişen toplam 24 adet Wistar - Albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar $21\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %45-55 nem olan ortamda 12/12 ışık siklusu göz önünde bulundurularak polikarbon kafeslerde Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde beslendi ve büyütüldü.

2.3.2. Deney Grupları

Bu hayvanlar öncelikle her grupta 6 hayvan olacak şekilde aşağıdaki gösterildiği üzere 4 gruba ayrılmıştır;

Grup 1. STZ Grubu (Diabetes Mellitus Oluşturulan) (n=6)

Bu gruptaki hayvanlara Streptozocin metodu ile diyabet modeli oluşturmak için kullanılan metod uygulanmak suretiyle hayvanlar diyabetize edildi.

Grup 2. STZ+İnsülin (i.p) Uygulama Grubu (n=6)

Diyabetize edilmiş ratlara 0,5 IU/kg insülin dozu i.p. uygulanan grup

Grup 3. STZ+GFP İşaretli MKH (i.p) (n=6)

Diyabetize edilmiş ratlara MKH 1 milyon hücre/1ml miktarda MKH intrapankreatik olarak uygulanan grup

Grup 4. STZ+İnsülin (i.p) +GFP İşaretli MKH (i.p) (n=6).

Diyabetize edilen hayvanlara hem 1 milyon hücre/1ml MKH intrapankreatik, hem de 0,5 IU/kg insülin dozu i.p. İnsulin eşzamanlı uygulanan grup.

2.3.3. Deney protokolü

2.3.3.1. Ratları Diyabetize etme

Çalışmada ratlarda diabet oluşturmak için Streptozosin (STZ) protokolü kullanıldı (Ventura-Sobrevilla J ve ark.2011). Bu protokole göre taze ve buz üzerinde hazırlanmış Sitrat tampon içerisinde 50 mg/mL streptozotosin (STZ) olacak şekilde STZ tartılıp çözündürülerek, ratlara ağırlıklarına uygun olacak hacimlerde 50 mg/kg dozunda periton içi (İP) yolla tek doz uygulandı. Diyabet olduğu 22 gün boyunca her gün kuyruk kanı ölçümü ile ispatlandıktan sonra gruplar oluşturuldu. Hayvanlar uygun koşullarda saklandı ve beslendikten sonra çalışmada 4 grup oluşturuldu. Diyabet oluştuğunu ispat etmek için Streptozosin verildikten sonra her gün kuyruk veninden ölçülen kan glukoz seviyesi 200-300 mg/dL'den büyükse bu sıçanlar diyabetik kabul edildi. Aşağıda STZ uygulanan grupta yer alan ratların kan glikoz seviyesindeki değerler verilmiştir.

2.3.3.2. İnsulin dozu hazırlama

Deney süresince diyabet oluşturulmuş ratlarda hızlı etkili insülin (humalog) 1 ml (100 IU) alınarak, 199 ml serum fizyolojik içerisinde çözülerek her mililitresinde 0,5 IU insülin bulunan çözelti hazırlandı ve her bir ratın o anki ağırlığı belirlendikten sonra ratlara i.p. yolla 0,5 IU/kg dozunda uygulandı.

2.3.3.3. MKH hücreleri eldesi

Çalışmada KÖGEM araştırma ve uygulama merkez laboratuvarlarında lentiviral uygulama ile GFP işaretlemesi yapılmış Mezenkimal kök hücre hattı satın alındı.

2.3.3.3.1. Hücre Kültürü ve Deneysel Prosedürler

Hücre hattı %10 FBS (Fetal Buzağı Serum), 100 ünite / ml penisilin ve 100 ug / ml streptomisin ile destekli DMEM: F12 ile hazırlandı ve 37 °C' de %5 CO2 ortamında inkübe edildi. MKH hücreleri 75 cm2 flasklara ekildi ve deneylerden 1-2 gün önce büyümeye bırakıldı. Konfluans oranı %70-80 elde edildiğinde, kültür ortamı, 20 µM BaP (C₂₀H₁₂>%96 saf) içeren yeni bir taze medyum ile 48 saat süreyle değiştirildi. BaP ilk önce sülfoksit (DMSO) içinde çözülür ve daha sonra DMSO'nun final konsantrasyonu %0.1'den daha az olacak şekilde kültür ortamına eklendi. Medyum, BaP'ın sabit konsantrasyonunu korumak için günlük olarak değiştirildi. Tripkan Blue testi ile hücre viabilitesi ölçüldü. MKH hücreleri ise hayvanların diyabetize olduğu kesinleştikten sonraki gün 600.000 hücre olacak şekilde i.p olarak tek dozda verildi (Resim 2.1).



Resim 2.1. Deneklere intrapancreatik MKH enjeksiyonu

2.3.4. Deney Hayvanlarından Örneklerin Alınması

Deney sonunda gruptaki hayvanlar dekapite edildi. Biyokimyasal analiz ve parametrik değerlendirme için ratlardan kan alınarak, kan glukoz ve insülin düzeyleri AKÜ Tıp Fakültesi Biyokimya AD laboratuvarlarında analiz edildi. Pankreas dokusu çıkartıldıktan sonra histokimyasal olarak Hematoksilen Eozin, immunohistokimyasal olarak GFP boyaması yapıldı. Bu sayede MKH dağılımı da takip edilebildi.

2.4. Histolojik Değerlendirme

2.4.1. Histolojik Takip

Alınan pankreas %10 Nötral Formalin içine konularak 3 fikse edildi. Sırasıyla %70, %80, %90'lık alkollerde ve 2 kez saf alkolde 45'er dakika, sonrasında Xylene solüsyonunda 15 dakika. ve 30 dakika, sıvı parafinde 2 kez 1 saat bekletildi. Parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerden rutin boyama için normal lam üstüne, immunohistokimyasal incelemeler için polilizinli lam üzerine kesitler alındı. Normal lamlara alınan kesitler deparafinize edildikten sonra genel değerlendirme için Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Polilizinli lamlar üzerine alınan kesitler GFP ile immunohistokimyasal olarak boyandı. Boyanan kesitler ışık mikroskobu altında incelendi.

2.4.2. Histokimyasal Boyama

Elde edilen kesitlerde dokular genel histolojik değerlendirme için Hematoksilen Eozin boyaması ile boyandı.

1. Deparafinizasyon

- Dokular parafinden arınması için 65 °C lik etüvde 1 gece bekletildi.
- Ertesi sabah 2 saat Xylene solüsyonunda bekletilerek preparatlar temizlendi.

2. Rehidratasyon

- Saf alkolde 1 dakika
- %90 alkolde 1 dakika
- %80 alkolde 1 dakika

- %70 alkolde 1 dakika
 - Çeşme suyunda yıkama
3. Boyama
 - Hematoksilen 3 dakika
 4. Akarsuda bolca yıkandı
 5. Boyama
 - Eozin 2 dakika
 6. Dehidratasyon
 - %70 alkolde yıkama
 - %80 alkolde yıkama
 - %90 alkolde yıkama
 - Saf alkolde yıkama
 7. Xylene solüsyonunda bekletildi
 8. Entellan ile kapatıldı.

2.4.3. İmmunohistokimyasal Boyama

1. Deparafinizasyon
 - a. Dokular parafinden temizlenmeleri için 65 °C lik etüvde 1 gece bekletildi.
 - b. Ertesi sabah 2 saat Xylene solüsyonunda bekletilerek preparatlar temizlendi.
2. Rehidratasyon
 - a. Saf alkolde 2 kez, 5 dakika
 - b. %90 alkolde 5 dakika
 - c. %80 alkolde 5 dakika
 - d. %70 alkolde 5 dakika
 - e. Distile suda yıkama 5 dakika
3. Antijen Retrieval:
 - a. Antikorların alındığı firmanın önerileri doğrultusunda lamalar sitrat buffer (pH 6.0) ile mikrodalgada 26 dakika kaynatıldı.
 - b. Sitrat buffer içinde dışarıda 20 dakika soğutuldu.
4. PBS ile 3 kez yıkandı.

5. 12 dakika %3 Metanol+Hidrojen peroksitte bekleterek preparatlardaki peroksidaz aktivitesinin kaldırılması sağlandı.
6. PBS ile 2 kez yıkandı.
7. Hidrofobik kalem (PAPPEN) ile dokuların çevresini çizildi.
8. Sekonder HRP kit içindeki Protein blok damlatılıp oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Zemin boyamasının giderilmesi sağlandı.
9. PBS ile 1 kez yıkandı.
10. İşaretleme
11. Primer antikor 1:50 oranda sulandırıldı ve lamaların üzerine damlatıldı.
12. Buzdolabında 1 gece inkübe edildi.
13. Ertesi sabah alınarak oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.
14. PBS ile 3 kez yıkandı.
15. Antijen Antikor Reaksiyonunu belirleme
16. HRP conjugate damlatılıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
17. PBS ile 4 kez yıkandı.
18. Renklendirme
19. AEC single solüsyon damlatılıp oda sıcaklığında 10-12 dakika bekletildi.
20. Distile suda bekletildi.
21. Zıt Boyama
22. Mayers Hematoksilen'de 25 saniye bekletilerek zıt boyama yapıldı.
23. Çeşme suyu ile 2 kez yıkandı.
24. Su bazlı kapatma solüsyonu ile kapatılması.

2.5. Preparatların Değerlendirilmesi ve Görüntü Analizi

Histokimyasal olarak Hematoksilen Eozin ile boyanan preparatlarda tüm gruplarda ışık mikroskobu altında genel histolojik değerlendirme yapıldı. Ancak bilindiği üzere 1 kesitteki pankreas dokusu büyüklüğü deneyde rat kullanılması nedeniyle küçük olduğu için Langerhans adacık sayısı istatistiksel olarak karşılaştırılma yapılabilme değerlerinin çok altında kaldığı için istatistiksel olarak değerlendirme yapılmayıp sadece genel histolojik özellikler değerlendirildi. Bu amaçla dokulardaki infiltratif hücre göçü, ödem, dejeneratif hücre varlığı/oranı ve neovaskülarizasyon değerlendirildi.

İmmunohistokimyasal boyamada ise pankreas yapısında bulunan GFP işaretli mezenşimal kök hücrelerin pankreas içi dağılımları incelenerek yapılan enjeksiyon sonucu verilen MKH'lerin pankreas içinde yerleşik olup olmadıkları teyit edildi.

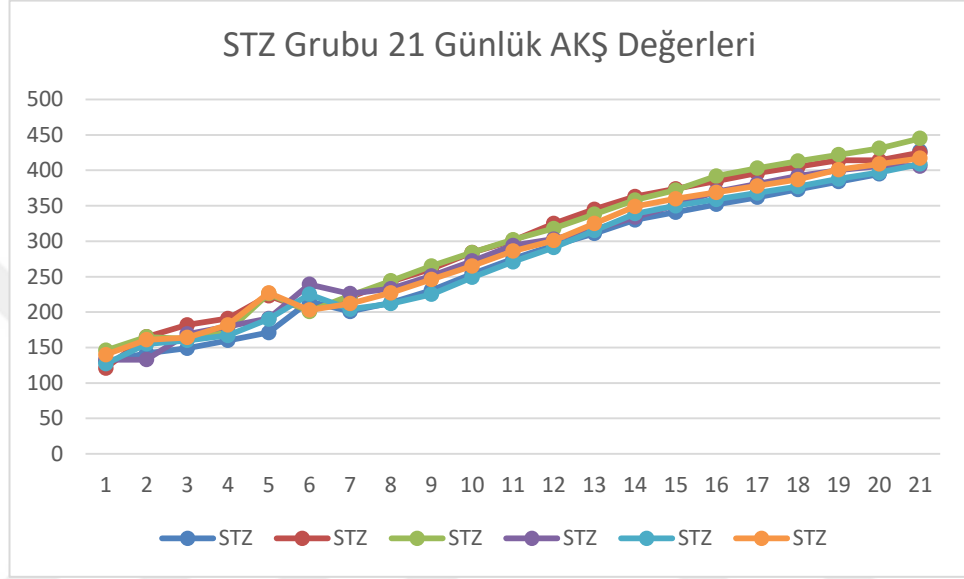
2.6. Biyokimyasal Değerlendirme

Biyokimyasal olarak tüm gruplarda kan glukoz değerleri Roche/Hitachi cobas c kit ve kan insülin düzeyleri ECLIA (Electrokemilüminesans immünolojik testi) Elecsys, cobas e kit sistemleri ile invitro olarak değerlendirildi.

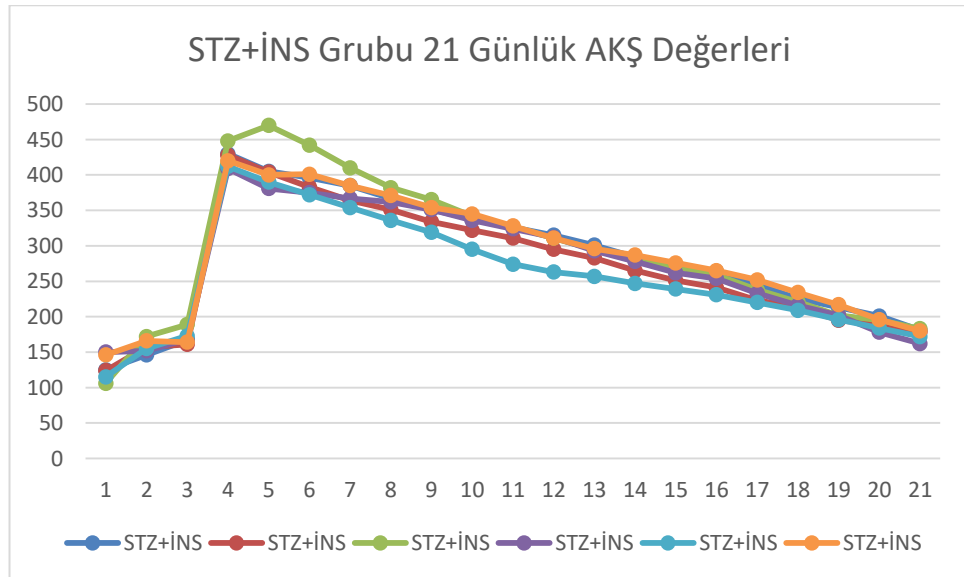


3. BULGULAR

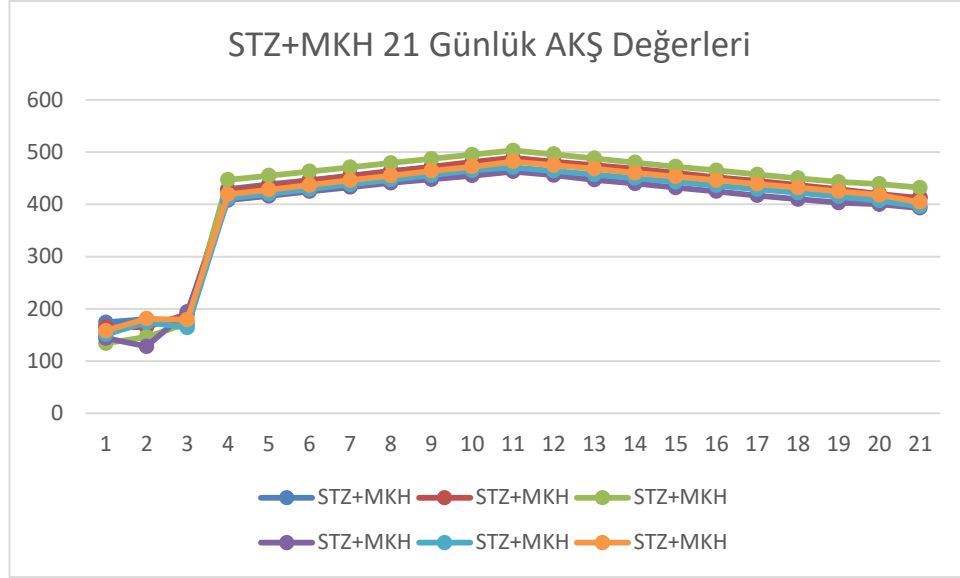
Ratların diyabetize edilmesi ve sonrasında tedavi uygulamaları işlemlerinde her grupta kuyruk kanından alınan kan örneklerinde yapılan günlük AKŞ değerlendirilmesinde aşağıdaki değerler elde edildi.



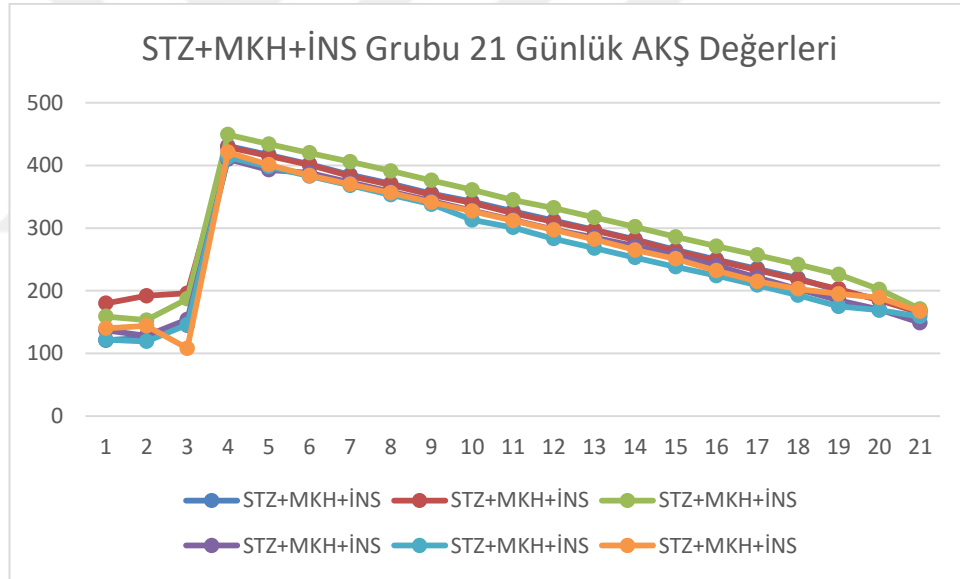
Şekil 3.1. STZ Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri



Şekil 3.2. STZ+İNS Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri



Şekil 3.3. STZ+MKH Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri



Şekil 3.4. STZ+MKH+İNS Grubu 21 Günlük AKŞ Değerleri

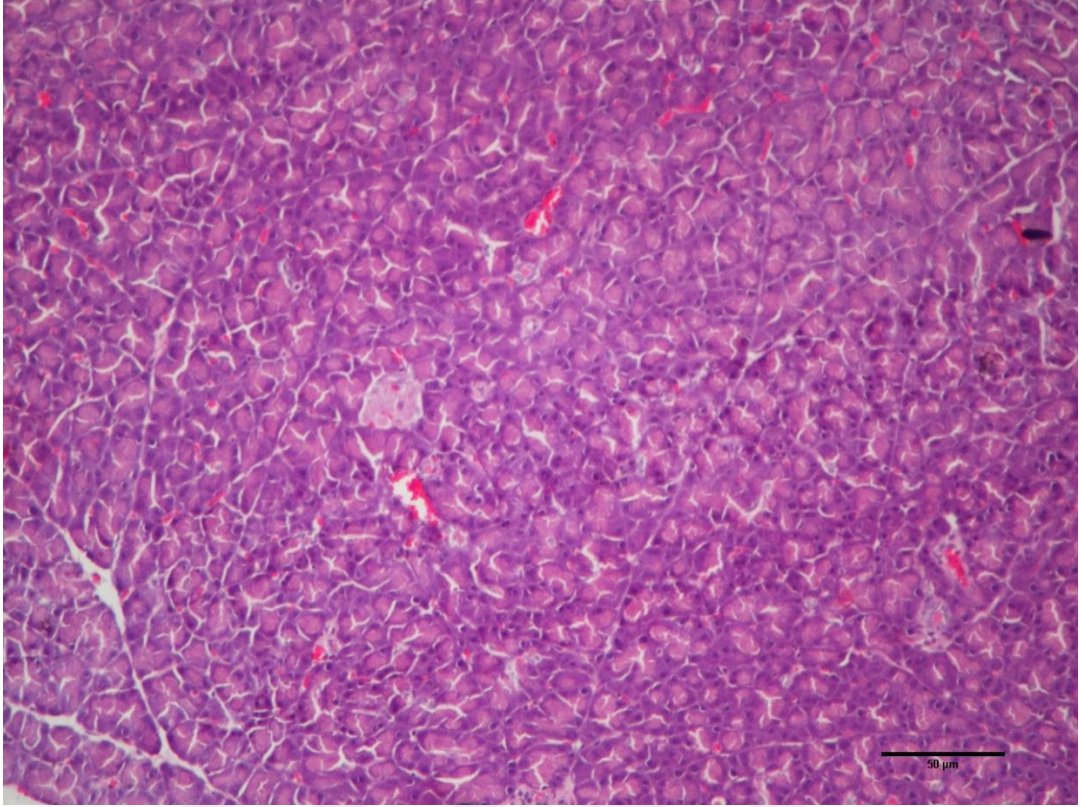
Hematoksilen Eozin ile boyanan pankreas dokusunun histolojik inceleme sonucu kesitler ayrı ayrı ışık mikroskobu altında değerlendirildiğinde STZ ile diyabet oluşturulmuş diyabetik gruptaki ratların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında diyabetik grupta Langerhans adacıklarının daha küçük ve sayısının daha az olduğu tespit edildi (Resim 3.1).

İnsülin verilen diyabetik ratların değerlendirilmesinde ise STZ kaynaklı diyabetik grup ile karşılaştırıldığında, adacık sayısında değişim olmadığı parankim üzerinde belirgin dikkati çeken bir yapısal düzelme olmadığı az sayıda yeni damar oluşumu olduğu tespit edildi (Resim 3.2).

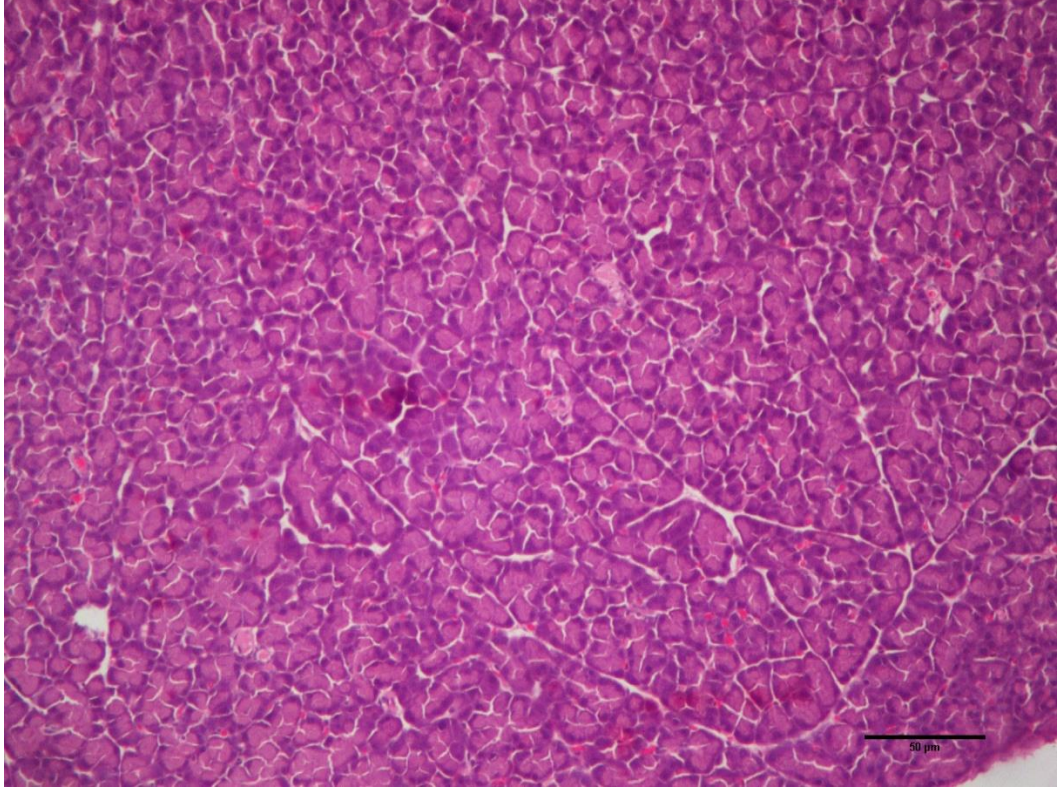
Sadece MKH verilen G3 grubu diyabetize ratlarda ise pankreas için az sayıda olsada stromanın yapısında belirgin bir değişiklik olmadığı adacık hücrelerinin hala küçük ve az sayıda olduğu diğer yandan olumlu bulgu olarak sadece yeni damar oluşumlarının G2 grubuna göre daha belirgin olduğu görüntülendi (Resim 3.3). Bununla birlikte, hem MKH verilen hemde İnsulin uygulanan diyabetize ratların pankreas dokularının incelenmesinde stromanın nispeten daha homojen olduğu neovaskülarizasyonun nispeten daha artmış olduğu ve Langerhans adacıklarının gerek yapısının ve gerekse hücresel yapılanmasının diğer gruplara göre daha iyi olduğu gözlemlendi (Resim 3.4). Yapılan incelemede nekrotik dejeneratif asiner hücreler veya adacık hücre olmadığı ve asinus yapısında ödemin azaldığı ve neovaskülarizasyonun belirginleştiği gözlemlendi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Gruplar arasında histolojik değişikliklerin semikantitatif değerlendirilmesi

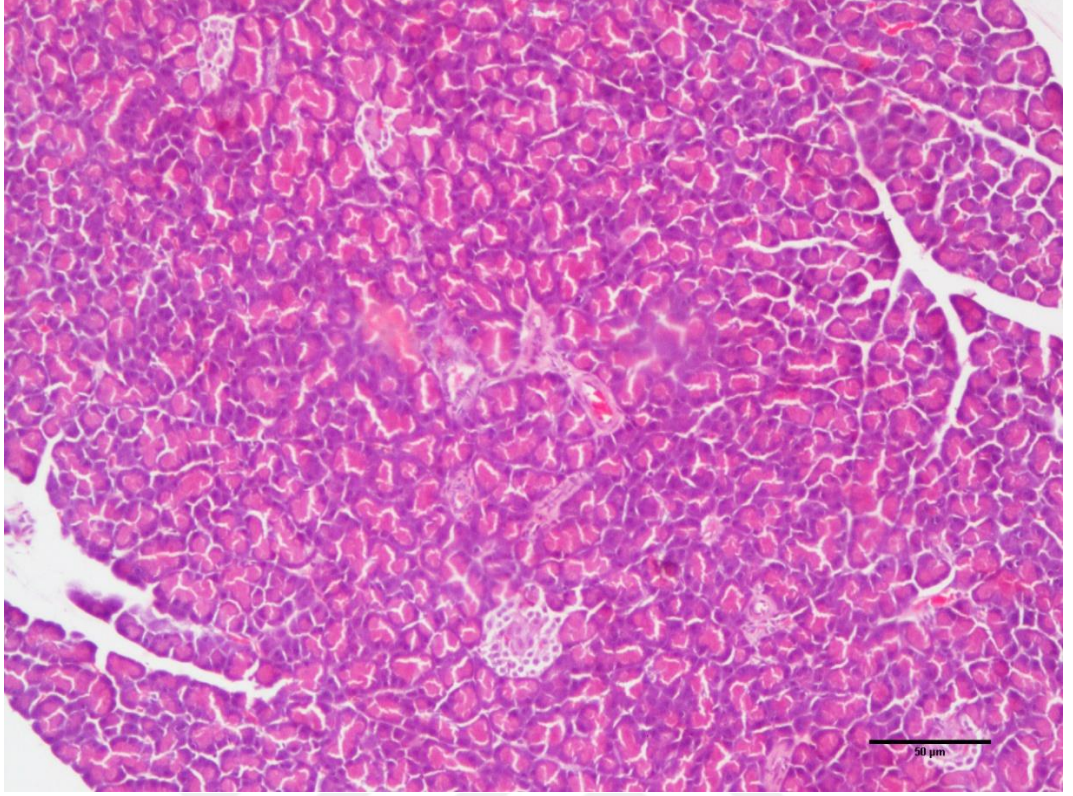
	Ödem	Neovaskülarizasyon	İnflamatuar hücre göçü	Nekrotik hücre varlığı	Toplam
G1 STZ grubu	+	-	+	-	2
G2 STZ+INS grubu	+	+	-	-	2
G3 STZ+MKH grubu	+	++	-	-	3
G4 STZ+MKH+INS grubu	+	+++	-	-	4



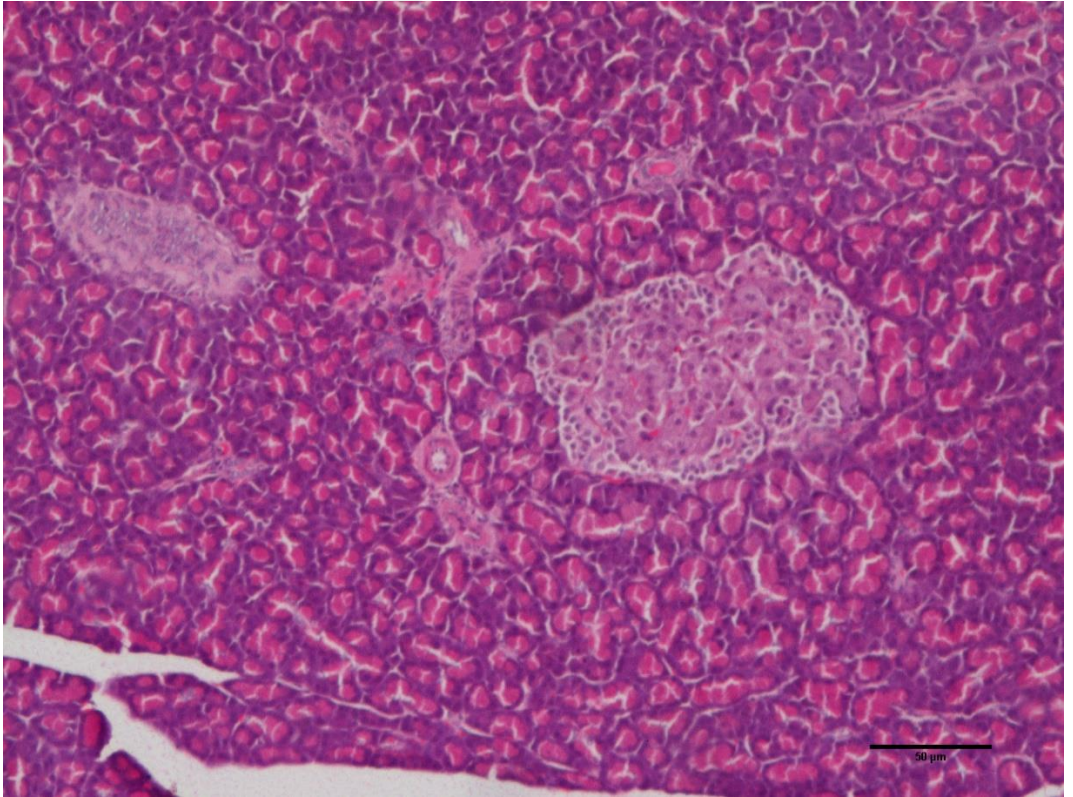
Resim 3.1. STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10)



Resim 3.2. STZ ile diyabet oluşturulmuş ve İnsulin uygulanmış ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10)



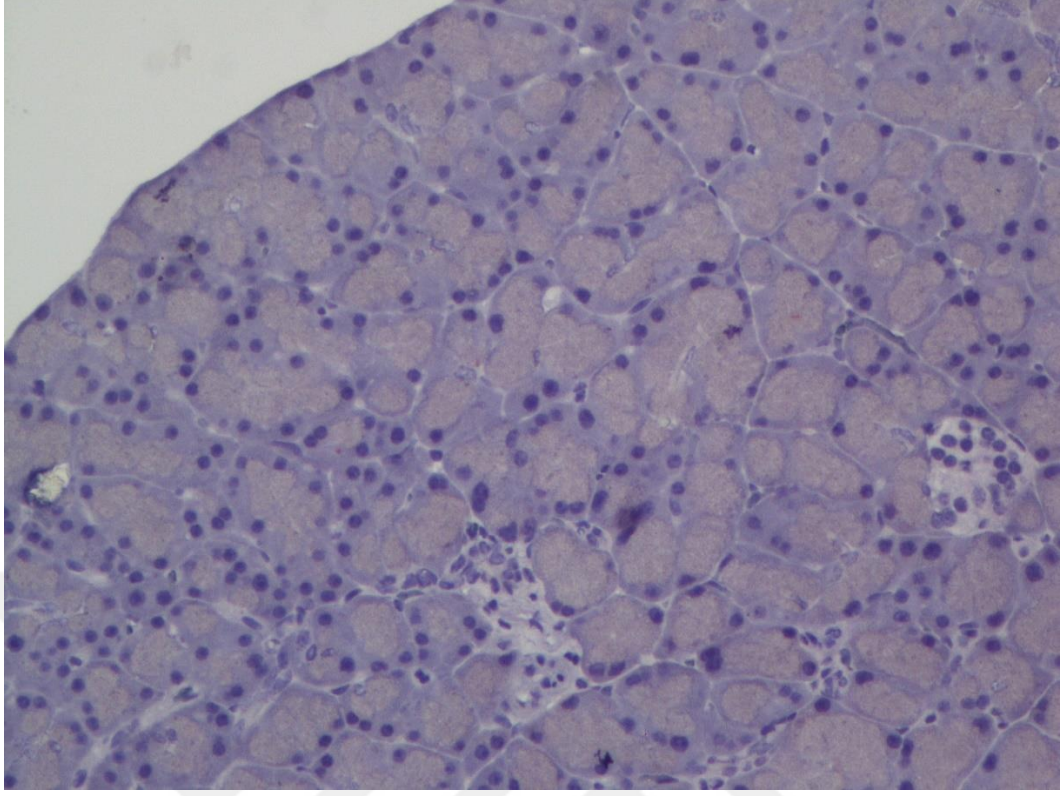
Resim 3.3. STZ ile diyabet oluşturulmuş ve MKH verilmiş ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10)



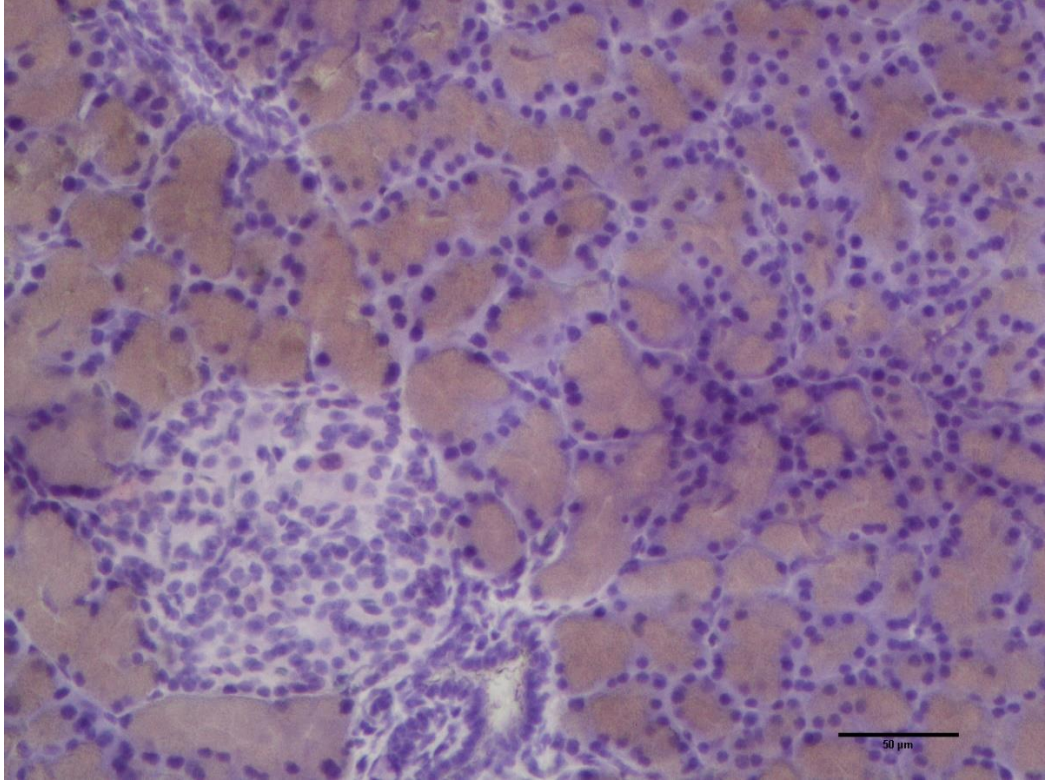
Resim 3.4. STZ ile diyabet oluşturulmuş ve İnsulin ve MKH uygulanmış ratlarda pankreas dokusunun görünümü (Hematoksilen Eozin. X10)

Anti-GFP antikorlar ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonucu elde edilen GFP işaretli MKH hücrelerinin boyanmasında ise STZ ile diyabet oluşturulmuş G1 grubu ratlarda (Resim 3.5) ve sadece insülin ile tedavi gören diyabetik ratların olduğu G2 grubunda hiçbir GFP işaretli MKH'ye (Resim 3.6) rastlanmadı ki zaten bu gruplara hücre enjeksiyonu yapılmadığı için bu normal bir bulgu olarak kabul edildi. Zaten çalışmada olası bir teknik hatanın kontrolü için bu gruptakiler, beklenmemesine karşın, GFP boyaması ile diğer gruplarla eş zamanlı boyandı. Grup 3'te yer alan ve MKH uygulanan hayvanların pankreas dokularının incelenmesinde ise stromada yayılmış halde GFP işaretli MKH'ler gözlemlendi (Resim 3.7). Diğer yandan pankreasa yakın lenf nodlarında da hücrelerin bir kısmının mevcut olduğu gözlemlendi (Resim 3.8). Dolayısıyla intrapankreatik enjeksiyonun insülin enjektörünün boyutu gözönüne alındığında doğru batın lojuna yapıldığına karar verildi. İnsülin ve MKH uygulanan diyabetik ratlarda ise Langerhans adacıkları içinde GFP işaretli MKH'ler gözlemlendi (Resim 3.9).

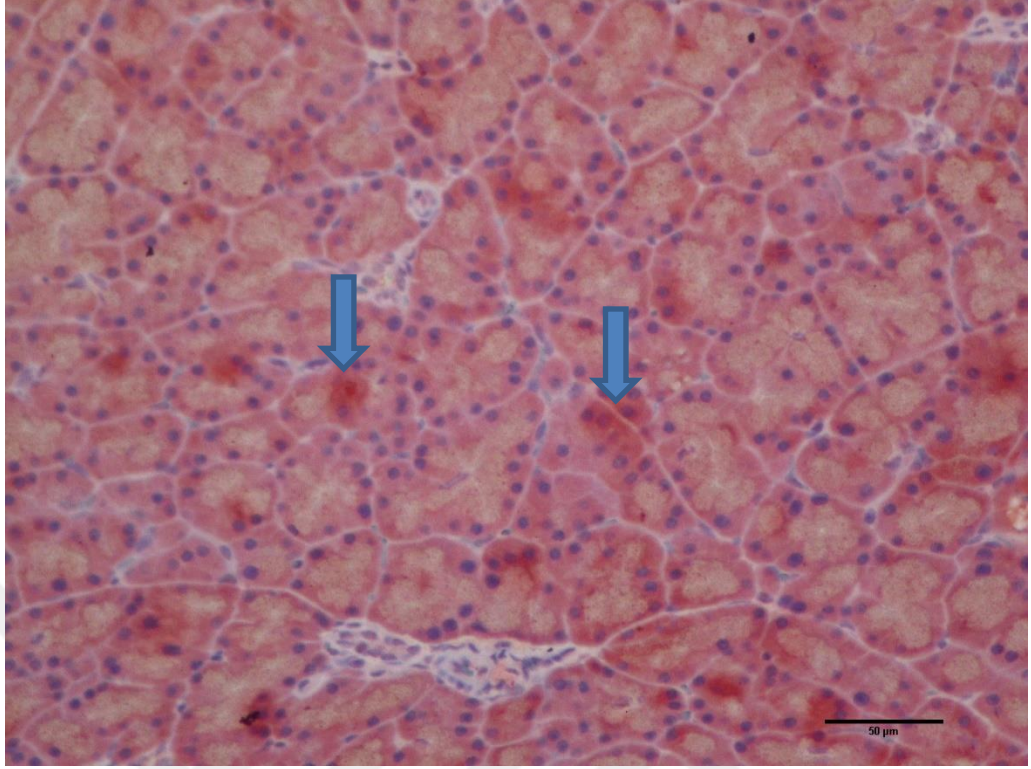
Diğer yandan Grup 4'te yer alan ratlarda neovaskülarizasyonun belirgin olması, Langerhans adacıklarının daha iri olup düzenli bir hücre yapılanmasına sahip olması verilen hücrelerin istenen bölgelere yerleşip hücresel anlamda olumlu rejenerasyon oluşturduğunu ve pankreas dokusunda reperasyon oluşturduğunu ortaya koymuştur (Resim 3.10). Bununla birlikte, kan şekeri değerlerinde düşmenin sadece insülin uygulanan gruplarda olması ama MKH uygulanan grupta olmaması ve yatay seyir göstermesi dokularda rejenerasyon ve reperasyonuna bağlı bir kan şekeri düşüklüğünün MKH bağımlı olmadığını ve insülin bağımlı olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca Tablo 3.2'deki veriler eşliğinde insülin seviyeleri değerlendirildi. STZ grubunda serum insülin düzeylerinde anlamlı bir azalma gözlemlenirken, MSC ile tedavi edilen grupta serum insülin düzeylerinde bir değişiklik gözlemlenmedi. Bu bakımdan değerlendirilme yapıldığında çalışmanın sonucu olarak; diyabetik ratlarda MKH hücreleri sadece stromal hücrelerde ve adacık yapılanmasında olumlu yönde katkı yapmasına karşın, insülin düzeyinde değişikliğe neden olmadığını ortaya koymuştur.



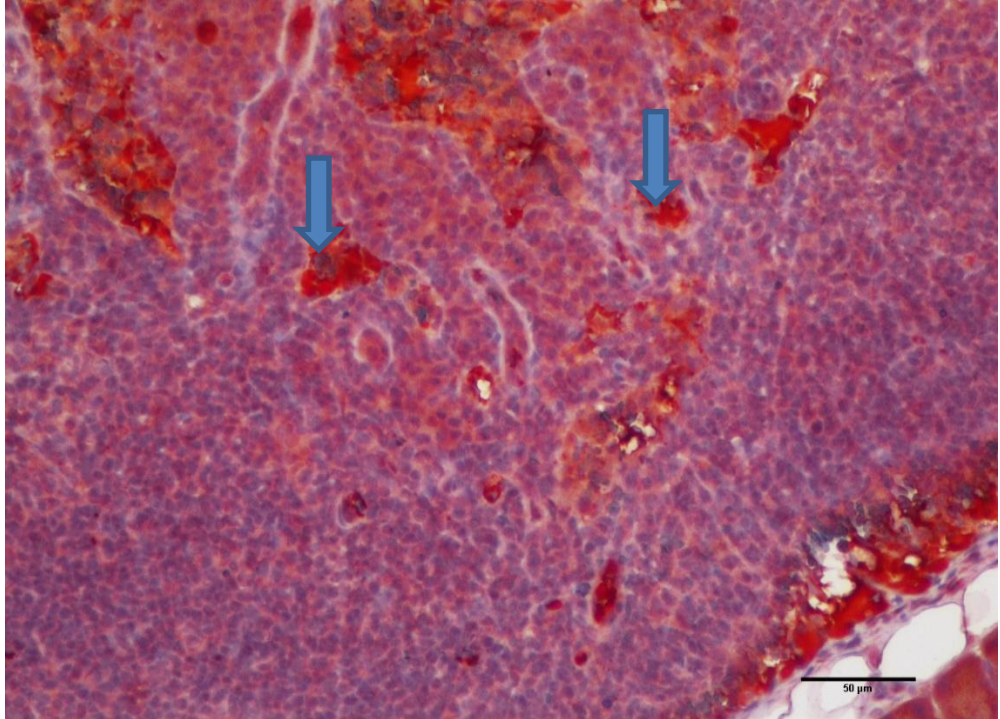
Resim 3.5. STZ uygulanan gruptaki ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerini göstermek için yapılan GFP boyaması (anti-GFP primer antikor x10)



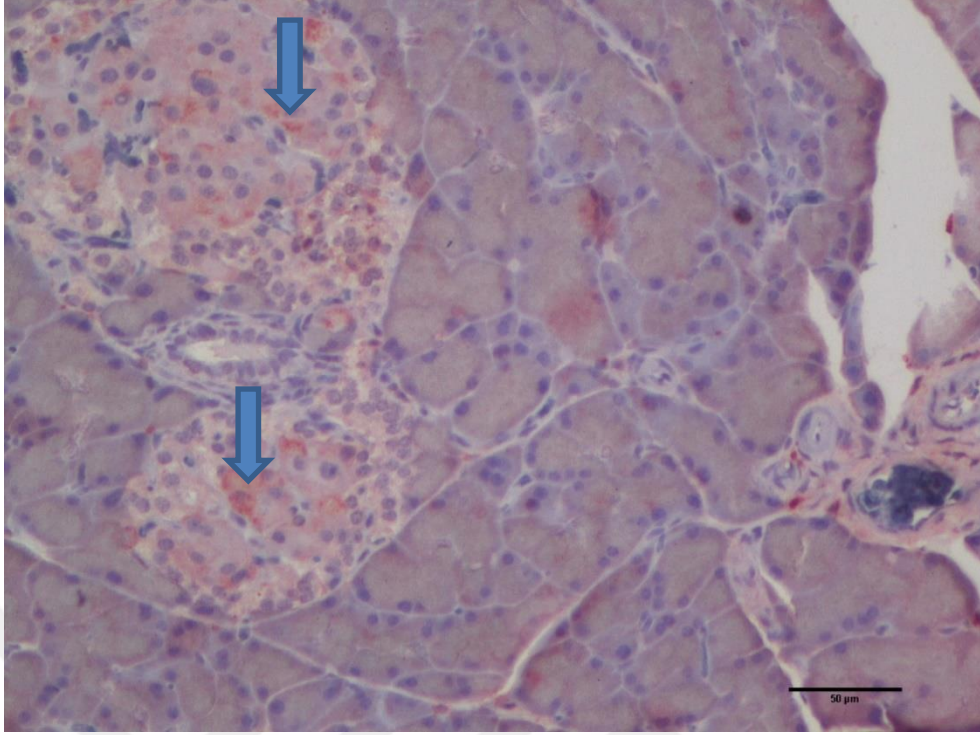
Resim 3.6. G2 gruptaki İnsulin verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerini göstermek için yapılan GFP boyaması (anti-GFP primer antikor x10)



Resim 3.7. G3 gruptaki MKH verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerinin stromada görünümü (anti-GFP primer antikor x10) (→ immüno pozitif hücreler)



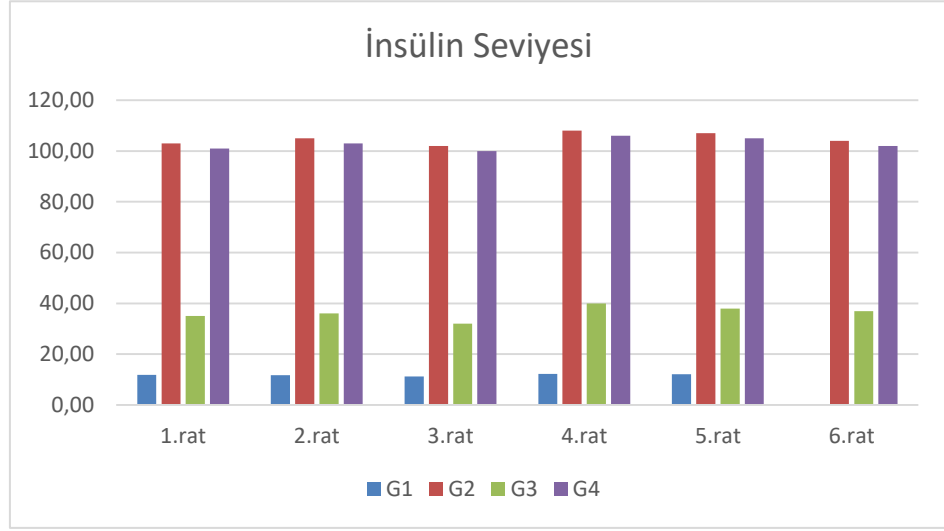
Resim 3.8. G3 gruptaki MKH verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerinin pankreasa yakın lenf nodunda görünümü (anti-GFP primer antikor x10) (→ immüno pozitif hücreler)



Resim 3.9. G4 gruptaki İnsulin ve MKH verilen diyabetize ratlarda GFP işaretli MKH hücrelerinin pankreas yapısındaki Langerhans adacıkları yapısında görünümü (anti-GFP primer antikor x10) (→immünopozitif hücreler)

Tablo 3.2. İnsulin tablosu

	1.rat	2.rat	3.rat	4.rat	5.rat	6.rat
G1	11,80	11,70	11,20	12,20	12,10	12,0
G2	103	105	102	108	107	104
G3	35	36	32	40	38	37
G4	101	103	100	106	105	102



Şekil 3.5. G1, G2, G3 ve G4 gruplarındaki serum İnsulin seviyeleri

5. TARTIŞMA

Diyabet (DM), insülinin eksikliği ya da etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli bakım gerektiren, kronik metabolizma hastalığıdır. Juvenil başlangıçlı diyabet olarak da bilinen Tip 1 Diyabet, pankreastaki insülin üreten β hücrelerin immün aracılı yıkımı sonucu oluşur ve β hücre tahribatı geri dönüşümsüzdür. Sonuç olarak, normalde insülin üreten pankreasın adacık hücreleri yok edilir, glikoz hücrelere giremez ve kanda glikoz birikir (Beati ve ark., 1997). Kandaki glukoz seviyesinin anormal derecedeki yüksek miktarı kalıcı görme bozukluğu, felç, nöropati, böbrek yetmezliği, kalp hastalığı ve amputasyonları kapsayan diyabet komplikasyonlarının çoğundan sorumludur (Chen ve ark., 2004). Diyabetin görülme sıklığının artışı ve yol açtığı yüksek maliyet, akut ve kronik dönemde oluşturduğu mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları göz önünde bulundurulduğunda, gün içerisinde glisemik kontrol sağlanmalı ve hastalık iyi tedavi edilmelidir. Tip 1 Diyabetin günümüzde kesin bir tedavisi olmaması ile birlikte en yaygın kullanılan klinik tedavi uygulaması ekzojen kaynaklı insülin replasmanıdır (Bellin ve ark., 2012). İnsülin tedavisine rağmen, hastada insulin direncinin artması ve uzun süreli insülin kullanımına rağmen kan şekerinin kontrolünün tam olarak sağlanamamasına bağlı geç diyabetik komplikasyonların gelişmesi, morbidite ve mortalite oranlarını arttırmaktadır. Bu nedenle hastalığın tedavisi için günümüzde alternatif tedaviler araştırma ihtiyacı bulunmaktadır. Bu uygulamalar içinde pankreas adacık nakilleri, ekzojen insülin uygulamaları ve kök hücre tedavileri bulunmaktadır. Son yıllarda üzerinde yapılan çalışmalarla alternatif bir tedavi yöntemi olarak düşünülmekte olan kök hücre tabanlı yerine koyma tedavileri yer almaktadır. Araştırmacılar adacıklarda β hücrelerinin rejeneratif potansiyelinin artırılmasıyla otoimmün β hücre hasarını karşılayabileceğini ve sonuçta Tip 1 Diyabetin tedavisi için alternatif bir model olabileceğini düşünmektedirler (Lechner 2002; Banerjee, 2003). Farklı stratejiler izlenilmesine rağmen bu çalışmalarda ortak amaç diyabetik hayvan modellerinde intrapancreatik ya da adacıklarda kök veya öncül hücrelerinin varlığının devam ettiğini göstermek, bu öncül veya kök hücrelerin değişen koşullara yanıt olarak intrapancreatik β hücre rejenerasyonuna katkı sağlayıp sağlamadıklarını test etmek

ve β hücre rejenerasyonunun ya da neogenenezin diyabet tablosuna olası etkilerini araştırmaktır. Osteositlere, adipositlere ve kondrositlere mezodermal soyuna özgü farklılaşan erişkin kök hücreler olan MKH'lerin izolasyon, hipo-immünojenisite ve immünomodülatör özellikleri, yetişkin kök hücre bazlı tedavi için ideal bir aday ve bunların gen taşıyıcıları olarak kullanılmasını sağlar. MKH'lerin immünomodulatorler olarak kullanımı hücre / organ nakli, doku onarımı, otoimmün hastalıklar ve GVHD önlenmesinde araştırılmıştır. Bugüne kadar yapılan diyabetik hayvan modeli çalışmalarında MKH (Ezquer ve ark., 2012; Wu ve ark., 2014; Ezquer ve ark., 2008), stellat hücresi (Zhang ve ark., 2014), nöralcrest (Grapensparr ve ark., 2015) gibi farklı hücrelerle birlikte adacık hücrelerinin böbrek kapsülü, portal ven, omentum gibi farklı vücut bölgelerine nakilleri yapılmış, adacık hücre kitlesini destekleyici özellikte biyoyumlu doku iskeleti (scaffold) kullanılmıştır (Coronel ve Stabler, 2013). Ayrıca embriyonik kök hücre ve indüklenmiş pluripotent kök hücre kökenli beta hücrelerinin in-vitro ortamda üretilmesine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Pagliuca ve ark., 2014; Rezania ve ark., 2014). MKH ile adacık hücresinin birlikte yapıldığı transplantasyon çalışmalarında, MKH'lerin çeşitli büyüme faktörlerini salgıladığı, salgılanan bu faktörlerin kanlanmayı artırdığı, MKH'lerin beta hücre proliferasyonunu uyardığı, greftin apoptosisini azalttığı, immün hücrelerin greftin infiltrasyonuna aktivasyonunu ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını engellediği ortaya konmuştur (Mahgoub ve ark., 2004; Figliuzzi ve ark., 2009; Mundra ve ark., 2013). Ancak MKH'lerle ilgili bir diğer önemli sorun, büyüme ve farklılaşma arasındaki hassas dengeyi korumaktır. İyi proliferen olan hücreler, insülini verimli bir şekilde üretemediği gibi ve insülin üretenler, iyi çoğalamayabilir (Levine, 2001). Ayrıca bazı çalışmalarda kök hücre tedavisi alan ratlarda, malign transformasyonların gözlemlenmesi ve kök hücrelerin alıcı tarafından reddedilmesi gibi durumlar nedeniyle insanlarda kök hücre tedavisinin tamamen güvenli olduğunu söyleyemeyiz (Daştan ve ark., 2009). Kök hücrelerinin nakil sonrası erken dönemde yetersiz oksijenlenmesi, besin kaynağının azalması, zayıf damarlanma profili, immün cevap gibi olumsuz şartların oluşturduğu hücresel stres sonucu kaybedilmesi (Miao ve ark., 2006) nedeniyle birçok nakil modelleri geliştirilmiştir.

Kök hücre uygulamak suretiyle yapılan deneysel DM tedavi çalışmalarında farklı metodolojiler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda farklı kaynaklı kök hücreler (MKH, β hücre, α hücre transplantları) yanında total Langerhans adacık nakilleride yapılmıştır. Bu çalışmalarda genelde hücrelerin veriliş yoluyla organa veya adacık içine damarsal kaynaklı veya mikrocerrahi ile olmuştur. Ancak çalışmamızda farklı bir yaklaşım gösterip satın aldığımız işaretli kök hücreleri direkt intrapankreatik inokülasyonla rat vücuduna aktardık. Bu farklı yaklaşımda tartışma konularımız içinde değerlendirilmiş bir parametredir. Çalışmamızın ana ögesi olan “DM’li ratlarda, MKH hücrelerinin direkt inokülasyonla gerek tek başına ve gerekse insülinle kombine uygulanmasının sonuçları” literatürdeki çalışmaların metodolojisi ve sonuçları ile karşılaştırıldığında çalışmamızda belli bir takım limitasyonlar ve elde edilen değerlerde istenen etkinin alınamadığı görülmektedir. Örneğin insülin uygulanan ratlarda insülin etkisine bağlı AKŞ’de düşüş gayet net ve düzenli olmasına karşın (Şekil 4) sadece MKH uygulanan gruplarda AKŞ değerinde düşüş gözlenmemesi (Şekil 5) ve bunların yanında hem MKH hemde İnsülin uygulanan gruplarda (Şekil 6) AKŞ’deki düşüşün sadece insülin uygulanan gruplardaki kan örneklerinde elde edilen AKŞ eğrisine paralellik göstermesi çalışmada kullanılan MKH’lerin tedaviye etkinliğinin olmadığını göstermektedir. Aslında bu çalışmada kaynak sıkıntısı nedeniyle sadece tek doz MKH uygulandığı için daha gerçekçi sonuçları elde etmek için farklı dozlarda MKH uygulanan gruplar oluşturulması gerçekte daha sağlıklı sonuçlar almamıza fırsat sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz hali hazırdaki bulgular daha sonra yapmayı planladığımız daha kapsamlı bir çalışma için zemin teşkil edecektir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; sonuçları anlamlı olan kök hücre nakil denemelerinde MKH uygulama sonrası pankreas dokusunda yeni damar oluşumunda artış olması önemli bir kriter olarak kabul edilmiştir. Bizim çalışmamızda da bilhassa MKH ve INS uygulanan grupta neovaskülarizasyonun belirgin derecede artması bu çalışmalardan elde edilen bulguları destekler niteliktedir. Miao ve ark yaptığı çalışmada hipoksi gibi stres altında kalan greftlerde doku tutma riskinin az olduğunu göstermişlerdirki, vaskülarizasyonun az olması dokunun stres altına girmesine neden olacağı için bu klinik tabloya neden olacaktır. Ancak çalışmamızda vaskülarizasyonun fazla olması çalışmamızın deneysel anlamda

başarılı olduğunu göstermektedir. Ayrıca deney sırasında kullandığımız MKH'lerin pankreas içinde olup olmadıklarını kesin olarak belirlemek amacıyla deney öncesinde kullanılacak MKH hücrelerinin GFP ile işaretlenmesi ve sonrasında inoküle edilmesi bizim için büyük katkılar sağlamıştır. Yaptığımız GFP immun boyamasıyla şekillerde görüldüğü üzere verdiğimiz hücrelerin kesinlikle pankreas içinde olduğunu görmekteyiz. Hatta bu hücrelerin pankreas yanında çevre lenf nodlarında da olması bize verilen dozun aslında yeterli olduğunu da düşündürmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların bu nedenlerle güvenilir olup yaptığımız işlemlerin doğru sonuçlarını aldığımızı düşünmekteyiz.

Diğer yandan MKH ve INS uygulanan Grup 4 hayvanlarda pankreas dokusunda belirgin histopatolojik iyileşme görülmesi langerhans adacık sayısında ve hacminde artış olması langerhans adacıklarında farklı morfolojilerde hücrelerin mevcut olduğunun belirlenmesi bizim için MKH uygulamasının INS verilmesi ile desteklenmesi durumunda daha efektif bir doku iyileşmesi olduğunu göstermektedir. Ancak sadece MKH uygulanan hücrelerde bu tarz etkinin olmaması bize MKH etkisinin potansiyalize edilmesi zorunluluğunu göstermektedir. Diğer yandan verdiğimiz GFP işaretli MKH'ların pankreas doku rejenerasyon ve reperasyonuna katkıda bulunduğunu gözlemlesekte, elde edilen AKŞ değerleri bu iyileşme sürecinde yeni sağlıklı morfolojiler gösteren ama insulin salgısı yapmayan hücreler oluştuğunu düşündürmektedir. Çünkü insülin olmayan gruplarda AKŞ değeri etkilenmemektedir. Zaten morfolojik olarak pankreas içinde sağlıklı hücreler görsekte bunların ne tür hücreler olduklarını ortaya koymak için ileri boyama teknikleri gereksinimi olduğu muhakkaktır. Bilindiği üzere MKH'ler diferensiyasyon yeteneği yüksek hücreler olduğu için pankreas içinde başka tip hücrelerde farklılaşmış olabilirler.

SONUÇ

Sonuç olarak Tip 1 diyabet oluşturulan ratlarda MKH hücrelerinin intrapankreatik enjeksiyonu pancreas dokusunda tek başına anlamlı bir morfolojik değişiklik yapmamasına karşın insulinle birlikte verilmesinin dokuda belirgin rejeneratif ve reperatif etkilere sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle MKH hücrelerinin intrapankreatik uygulanmasında tedaviye katkı olabileceğini düşünmek yanlış olmayacaktır kanaatindeyiz. Bu hem öncül hemde tez çalışmasının önemli limitasyonu olan sadece 21 günlük tedavi uygulamanın sonraki çalışmalarda daha uzun sürelerle çıkartılmak suretiyle daha sağlıklı sonuçlar alınabileceğini düşünmekteyiz. Elde edilen bulgulara göre MKH'lerin 21 günlük süreç içinde sadece parankimal ve daha az oranda Langerhans adacıklarında iyileşme yapması MKH'lerin organa uygulama yolunun da gözden geçirilmesi gerekliliğini doğurmaktadır. Tüm veriler gözönüne alındığında MKH'lerin intrapankreatik uygulanmasında doku rejenerasyon ve reperasyonuna katkıda bulunduğu ancak hormonal iyileşmeye katkısı olmadığını düşünmekteyiz.

ÖZET

Deneyssel Tip 1 Diabet Oluşturulmuş Ratlarda Mezenşimal Kök Hücre Tedavisi ile İnsülin Tedavisinin Karşılaştırılması

Beta hücre harabiyetiyle karakterize diyabet dünya çapında mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinin başında gelmektedir. Günümüzde en yaygın klinik tedavi uygulaması olarak ekzojen kaynaklı insülin replasmanı kullanılmaktadır. Bununla birlikte uzun süreli insülin kullanımının meydana getirdiği komplikasyonlar nedeniyle alternatif tedavi şekilleri araştırılmaktadır. MKH tedavisi bu uygulamalar içinde üzerinde çalışılan yöntemlerden birisidir. Ancak kök hücre uygulaması sonrasında multifaktöriyel olumsuz şartların oluşturduğu hücresel stres nedeniyle meydana gelen hücre kaybı kök hücre tedavisi modellerinin geliştirilmesine yönelik bir araştırma alanının doğmasına neden olmuştur. Çalışmamızda MKH'lerin erkek albino sıçanlarında Streptozotosin ile indüklenen diyabet üzerindeki etkisini, potansiyel terapötik etkisini ve insan hastalıklarında olası uygulamalarını keşfetmeyi amaçladık.

Bu araştırmada 24 erkek Wistar albino cinsi rat (250 - 300 gram) kullanıldı. Dört gruba ayrıldı: Grup 1 (Diyabetik grup), Grup 2 (İnsülin tedavisi alan diyabetik grup), Grup 3 (MKH ile tedavi edilen diyabetik grup) ve Grup 4 (MKH ve İnsülinle tedavi edilen diyabetik grup). Diyabet modeli, STZ'nin (50 mg / kg) intraperitoneal enjeksiyonu ile oluşturuldu. MKH, Grup 3 ve Grup 4'te sıçan pankreasına intrapankreatik olarak tek seferde enjekte edildi ve üç hafta sonra bütün deney grupları sakrifiye edildi. Deney süresince tüm deneklerin kan glikoz ve insulin seviyeleri ölçüldü.

Sonuç olarak MKH tedavisi istatistiksel olarak anlamlı olmamasına karşın Tip 1 diyabet oluşturulan ratlarda dokusal düzeyde önemli rejeneratif yeteneklere sahipti. Fonksiyonel anlamda bu etkinliğinin de olduğu gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında MKH tedavisinin sağlıklı pankreas morfolojisinin kazanılmasında ve Tip 1 Diyabet tedavisinde ek bir tedavi uygulaması olarak kullanılabileceği düşünüldü. Tip 1 diyabet vakalarında histopatolojik iyileşme yönünde katkı yapmasına karşın bu etkinin vücut için daha efektif olması için ek bir moleküle ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızın sonuçları bu molekülün erken kısa dönemde insülin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücreler, Streptozotosin, Diyabetik Rat, İnsülin

SUMMARY

The Comparison of Mesenchymal Stem Cell Therapy and Insulin Therapy in the Experimental Type 1 Diabetic Rats

Diabetes characterized by beta cell destruction is one of the most important causes of mortality and morbidity worldwide. Today, exogenous insulin replacement is the most common clinical treatment. However, alternative treatment modalities are investigated due to complications caused by prolonged use of insulin. MCH therapy is one of the methods studied in these applications. However, cell loss resulting from cellular stress caused by multifactorial adverse conditions after stem cell administration has led to the emergence of a research area for the development of stem cell therapy models. In our study, we aimed to explore the effect of MSCs on Streptozotocin-induced diabetes in male albino rats, their potential therapeutic effect and possible applications in human diseases.

In this study, 24 male Wistar albino rats (250 - 300 grams) were used. It was divided into four groups: Group I (Diabetic group), Group 2 (Diabetic group receiving insulin therapy), Group 3 (MDC-treated diabetic group) and Group 4 (MSC and Insulin-treated diabetic group). The model of diabetes was generated by intraperitoneal injection of STZ (50 mg / kg). MSCs were injected intrapancreatically in the rat pancreas in Group 3 and Group 4 at one time and all experimental groups were sacrificed three weeks later. Blood glucose and insulin levels of all subjects were measured during the experiment.

In conclusion, although the treatment of MCD was not statistically significant, it had significant regenerative abilities at the textural level in rats with Type 1 diabetes. In the light of these results, it was thought that MSC treatment could be used as an additional treatment in the treatment of Type 1 Diabetes and in obtaining healthy pancreatic morphology. We believe that there is a need for an additional molecule to make this effect more effective for the body, although it contributes to histopathological recovery in patients with type 1 diabetes. The results of our study indicate that this molecule is early short-term insulin.

Key Words: Mesenchymal Stem Cells, Streptozotocin, Diabetic Rat, Insulin

KAYNAKLAR

- AGUAYO-MAZZUCATO, C, BONNER-WEIR, S, (2010). Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 6: 139-148.
- American Diabetes Association Clinical Practice Recommendations, (2004). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 26 (S5). Retrieved June 2017, from <http://www.diabetes.org/diabetescare/>
- American Diabetes Association, (2016). *Diabetes Care*. 39: 13-22.
- American Diabetes Association: Statistics about Diabetes, (2013) . Last Edited: April 5, 2017 www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/#sthash.tqULootJ.dpuf
- ANKRUM, J, KARP, J,M,. (2010). Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 16:203-209.
- BAER, P.C., GEIGER, H., (2012). Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*. 2012:812693.
- BANERJEE S, (2003). Prevention of diabetes. *J Indian Med Assoc*. 101: 698-699.
- BEATTIE, G.M., et al., (1997). Functional beta-cell mass after transplantation of human fetal pancreatic cells: differentiation or proliferation? *Diabetes*. 46: 244–248.
- BELLIN, M.D., et al., (2012). Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. *Am J Transplant*, 12: 1576–1583.
- BEN-HAROUSH, A, YOGEV, Y, HOD, M, (2004). Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 21:103-113.
- BLUESTONE, J.A., HEROLD, K, EISENBARTH, G, (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 7293: 1293-1300

- BLUESTONE, J.A., HEROLD, K, EISENBARTH, G,. (2010). Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 7293:1293-1300.
- BONNER-WEIR, S, (2000). Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol*. 24 :297-302.
- BONNER-WEIR, S, (2000). Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*. 141: 1926-1929. Review.
- BOSE and SHENOY, (2014). *J Stem Cell Res Ther* 4: 2
- BROOKE G, et al., (2007) Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol*. 18:846-858.
- CAN A, (2008). A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turk J Haematol*. 25: 57-59.
- CAN A, (2009). Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. TÜBA, Ankara
- CAN, A, (2014). Kök Hücre, Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 327-426.
- Cancer Prevention and Control : Diabetes 2017 ; Accessed May 2017 www.cdc.gov/diabetes/data/center/slides.html
- CAVALERI, F, SCHÖLER, H, (2009). Molecular Basis of Pluripotency. In: Lanza R, editor. *Essential of Stem Cell Biology*. San Diego: Academic Press; 2009. p. 39-60.
- Centers for Disease Control and Prevention, (2017). *Cancer Prevention and Control: Diabetes*.
- CHEN, L.B., JIANG, X.B., YANG, L, (2004). Differentiation of rat marrow mesenchymal Clinical science scientific reports; Inhibition of experimental diabetic cataract by topical administration of RS- verapamil hydrochloride: *Br J Ophthalmol* 88:44-47.
- CHOI, J.B., et al., (2003). Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 46: 1366–1374.

- CORONEL, M.M., STABLER, C.L., (2013). Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Current Opinion in Biotechnology*. 24: 900–908.
- COURICEB, FOSS, M.C., VOLTARELLIJC, (2006) Secondary prevention of type 1 diabetes mellitus: stopping immune destruction and promoting β -cell regeneration. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39: 1271-1280.
- DAŞTAN, A, GÜNAL, G, İLDOĞAN, L, SOMUNCU, G, (2009). Kök Hücre Teknolojisi.
- Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği-2009
- Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu, (2009). *Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği*.
- Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu, (2009). Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
- DOMÍNGUEZ-BENDALA, J, LANZONI, G, INVERARDI, L, RICORDI, C, (2012) Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Transl Med*. 1: 59-63.
- DOMINICI, M, et al., (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315-317.
- EZQUER, F, et al., (2012). The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. *Stem Cells*. 30: 1664-1674.
- EZQUER, F.E., et al., (2008). Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14: 631–640.

- FIGLIUZZI, M, et al., (2009). Bone marrow–derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplantation Proceedings*. 41: 1797–1800.
- FILIPPI, C.M., VON HERRATH, M.G., (2008). Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes*. 57: 2863-2871.
- FORTIER L.A., (2005). Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg*. 34: 415-423.
- GRAPENSPARR, L, et al., (2015). Co-transplantation of human pancreatic islets with postmigratory neural crest stem cells increases β -cell proliferation and vascular and neural regrowth. *Clin Endocrinol Metab*: 100: 583-590.
- Guyton Fizyoloji, (2017), 13. Baskı
- HARTING, M.T., JIMENEZ, F, COX, C.S., (2009). Isolation of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) from Green Fluorescent Protein Positive (GFP⁺) Transgenic Rodents: The Grass Is Not Always Green(er). *Stem Cells and Development*. 18:127-135.
- HOM, F.G., ETTINGER, B, LIN, M.J., (1998). Comparison of serum fructosamine vs glycohemoglobin as measures of glycemic control in a large diabetic population. *Acta Diabetol*. 35: 48-51.
- ICHINOSE, K, KAWASAKI, E, EGUCHI, K, (2007). Recent advancement of understanding pathogenesis of type 1 diabetes and potential relevance to diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 27: 554-564.
- International Diabetes Federation (2014). IDF Diabetes Atlas update poster, 6th ed.
- PRAVIN, D. POTDAR, MAYURI, B, CHAUDHARI, (2011). Cellular, Molecular and Therapeutic Advances in Type 2 Diabetes Mellitus. 1758-1907.
- KATUCHOVA J, et al., (2015) Mesenchymal stem cells in the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Endocr Pathol*. 26: 95-103.

- KIM, M.J., et al. (2012). Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of Ageing and Development*. 133: 215–225.
- KIRSCHSTEIN RL. (2001). Stem cells: scientific progress and future research directions. *National Institutes of Health, Washington: Department of Health and Human Services*.
- LECHNER, A, et al., (2004). No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. *Diabetes*. 53:616–623.
- LEVINE, F, (2001). Cell-cell contact act in synergy to promote d-cell development in a human pancreatic endocrine precursor cell line. *Mol. Endocrinol*. 14: 814–822.
- LI, L, et al., (2016). Transplantation of mesenchymal stem cells improves type 1 diabetes mellitus. *Cell Tissue Res*. 364: 345-355.
- MADEC, A.M., et al., (2009). Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia*. 52:1391-1399
- MAHGOUB, M.A., et al., (2004). Neovascularization of the amniotic membrane as a biological immune barrier. *Transplant Proc*, 36:1194-1198.
- MÂNCIO, R.D., MINATEL, E, DE ALMEIDA CARDOSO, M, ALI KHAN, B, JOSÉ CALDEIRA, E, (2015). The immunomodulation to diabetes control: New proposals for the reversion of this disease. *Diabetes Metab Syndr*. 9: 210-212.
- MATUR, İ, SOLMAZ, S, (2011). Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- MEALEY B.L., OATES T.W., (2006). Diabetes mellitus and periodontal diseases. *J Periodontol*. 77: 1289-1303. Review
- mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem Cells Dev*. 20: 1297-1308.
- MIAO, G, et al., (2006). Dynamic production of hypoxia-inducible factor-1alpha in early transplanted islets. *Am J Transplant*. 6: 2636-2643.

- MIN, L, et al., (2011). Comparative proteomic analysis of cellular response of human airway epithelial cells (A549) to benzo(a)pyrene. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 21: 374–82.
- MÜLLER-SIEBURG, C.E., et. al., (2002). Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. 100: 1302-1309.
- MUNDRA, V, GERLING, C.I., MAHATO, I.R., (2013). Mesenchymal stem cell-based therapy. *Molecular pharmaceutics*. 10: 77–89.
- NICHOLSON, G, HALL, G. M., (2011). Diabetes mellitus: new drugs for a new epidemic. *British Journal of Anaesthesia*. 107: 65–73
- NOLAN, C. J., DAMM, P., PRENTKI, M, (2011). Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, 378, 169-181.
- PAEK, H.J., KIM, C, WILLIAMS, S.K., (2014). Adipose stem cell-based regenerative medicine for reversal of diabetic hyperglycemia. *World J Diabetes*. 5: 235-243.
- PAGLIUCA, F.W., et al., (2014). Generation of functional humanpancreatic b cells in vitro. *Cell*. 159: 428-39.
- PARONEN, J, EISENBARTH G.S., (2004). Immunopathogenesis type 1 Diabetes in Western society. In: DeFronzo RA, Ferrannini E, Keen H, Zimmet H(eds) *International Textbook of Diabetes Mellitus*.Vol 1, Ch 27. John Wiley&Sons, Ltd
- PILEGGI, A, RICORDI, C, ALESSIANI, M, INVERARDI, L, (2001). Factors influencing islet of langerhans graft function and monitoring. *Clinica Chimica Acta*. 310:3-16.
- RA J.C., et al., (2011). Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived
- RA J.C., et al., (2011). Stem cell treatment for patients with autoimmune disease by systemic infusion of culture-expanded autologous adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*, 9:181.

- RAOUIA, FAKHFAKH, (2011). Serological Auto Antibodies and Prediction of Type 1 Diabetes. *Genetic Markers*
- REZANIA, A, et al., (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*.
- ROSSANT J. (2008) Stem cells and early lineage development. *Cell*. 132: 527-531.
- ŞAHİN, F, SAYDAM, G, OMAI, S.B., (2005). Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 15:48-56.
- SANTOS, F, HENDRICH, B, REIK, W, DEAN, W, (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 241:172-182.
- SCHRANZ D.B., LERNMAK, A, (2004). Immunology in diabetes: An update. *Diabetes*. 53: 267-275.
- SERPİL, SALMAN, ILHAN, SATMAN, (2011). Diyabete Özgü Antikorlar ve Klinik Pratikte Kullanımları. *Türk Jem* 15: 8-12
- SLACK J.M.W., (1995). Developmental biology of pancreas. *Development* 121:1569-1580
- SOLMAZ HASDEMİR, P, TERZİ, H, KOYUNCU F.M., (2014). Recent advances in the diagnosis and management of gestational diabetes. *Türk J Obstet Gynecol*. 11:181-185.
- SWENSON, E.S., et al., (2007). Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. *Stem Cells*. 25: 2593–2600.
- THOMSON, J.A., et al., (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Sciences*. 5391:1145
- TUE Physician Guidelines Medical Information to Support the Decisions of TUE Committees Diabetes Mellitus, (2015). *AACE/ACE Guidelines ENDOCRINE PRACTICE*. Vol:21
- TURDEP-II Çalışması (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II 2010)

- ULASLI, S.S., et al. (2013). Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 14: 6159–6164.
- ÜNAL, Ş, UÇKAN, ÇETINKAYA, D, (2008). Mezenkimal kök hücrelerin pediatrik klinik uygulama alanları. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 1: 57-61.
- VENTURA-SOBREVILLA, J, et al., (2011). Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice. *Proc West Pharmacol Soc*. 54:5–9.
- WANG, J.C., DOEDENS, M, DICK, J.E., (1997). Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. *Blood*. 89: 3919-3924.
- WANG, S, QU, X, ZHAO, R.C., (2012). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 5:19.
- WEINTROB N, et al., (2001). Type 1 diabetes environmental factors and correspondence analysis of HLA class II genes in the Yemenite Jewish community in Israel. *Diabetes Care*. 24:650–653.
- WEISSMAN I.L., (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100:157-168.
- WU, H, MAHATO, R.I. (2014). Mesenchymal stem cell-based therapy for type 1 diabetes. *Discov Med*. 17:139-143.
- ZHANG ZY, et al., (2014). Hepatic stellate cells induce immunotolerance of islet allografts. *Transplant Proc*, 46:1594-1600.