

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

RAT PANKREATİK REJENERASYON
MODELLERİNDE ASİNODUKTÜLER METAPLAZİ
GÖSTEREN REJENERASYON ODAKLARINDA
NESTİN EKSPRESYONU

UZMANLIK TEZİ

DR. BAHADIR EGE

DANIŞMAN: PROF.DR. EMİN ERSOY

ANKARA 2006

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
Pankreas Embriyolojisine Kısa Bir Bakış	1
Pankreasın Rejenerasyon Kapasitesi Üzerine Mevcut Bulgular	4
Kök Hücre Kavramı ve Pankreatik Kök Hücreler	5
Kök Hücre Belirteçleri	8
Endokrin Hücre Diferansiasyonunda Transkripsiyon Faktörleri	8
Embriyonel Endokrin Hücre Diferansiasyonunda Rol Oynayan Büyüme Faktörleri	9
2. MATERYAL METOT	11
Cerrahi Girişimler	11
Parsiyel Pankreatektomi (PDx)	11
Pankreatik dukt ligasyonu (PDL)	12
İmmunhistokimyasal Yöntem	13
3. BULGULAR	15
4. TARTIŞMA	19
5. SONUÇ	23
6. ÖZET	24
7. KAYNAKLAR	25

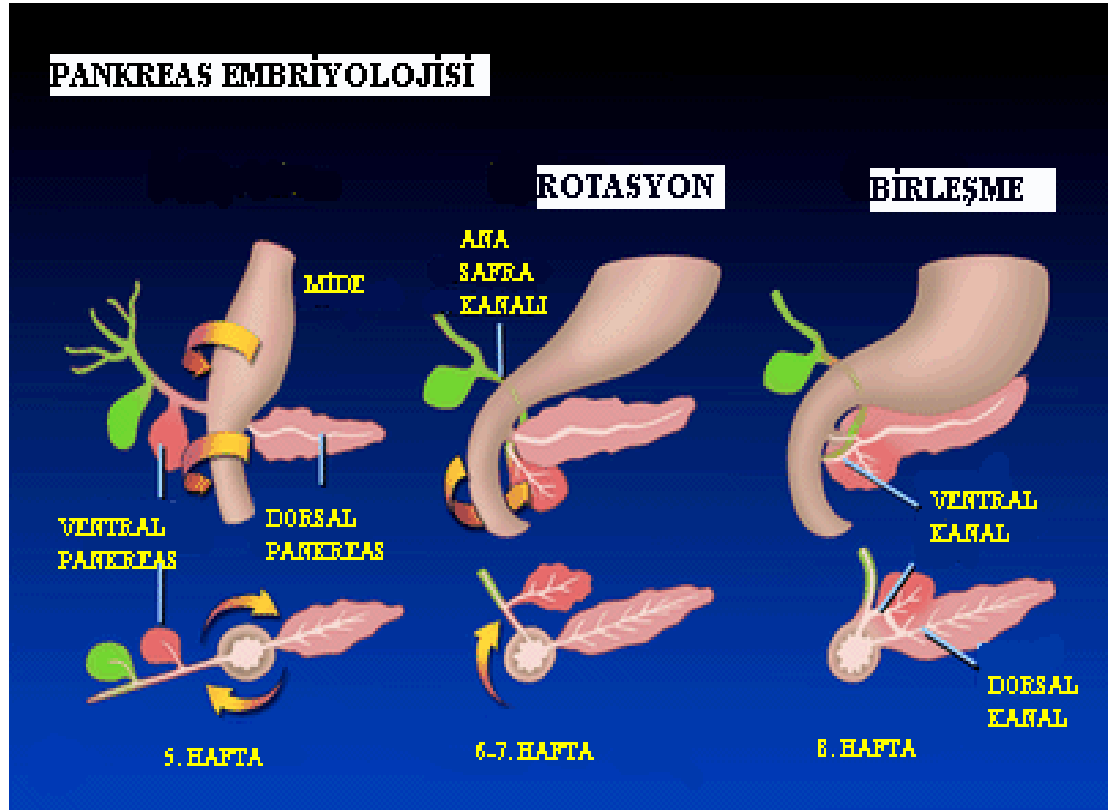
1. GİRİŞ

Pankreas Embryolojisine Kısa Bir Bakış

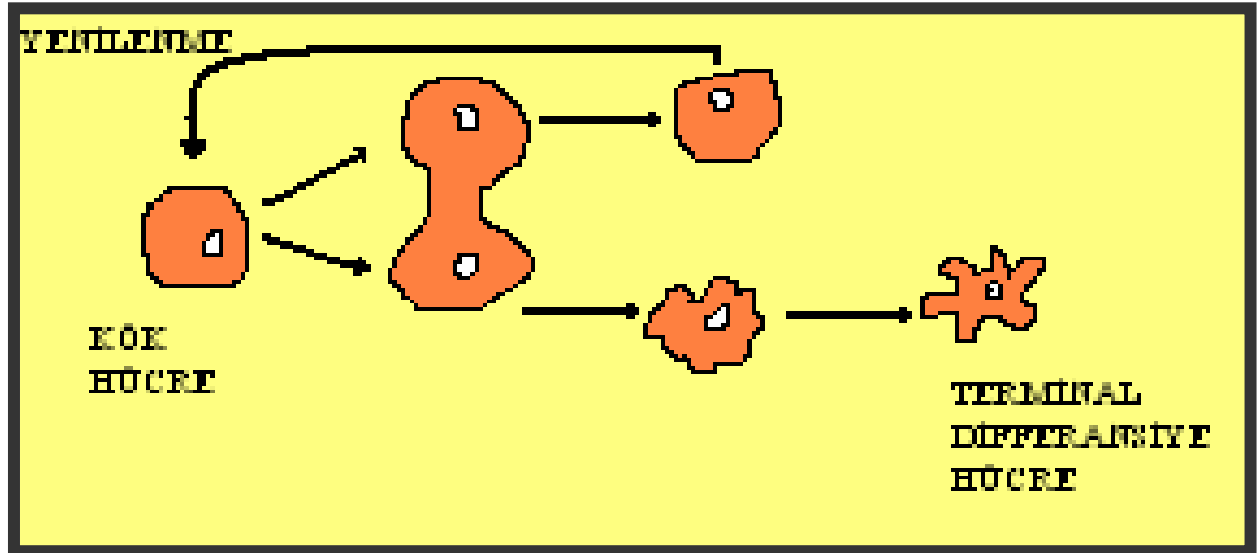
Pankreas primitif duodenumun iç yüzeyini döşeyen endodermden iki tomurcuk halinde gelişir (1). Dorsal pankreas tomurcuğu dorsal mezenter içinde yer alırken, ventral pankreas tomurcuğu koledoga çok yakın bir yerleşim gösterir. Duodenum sağa rotasyon yapıp, C şeklini alırken, ventral pankreas tomurcuğu ise tıpkı koledogun duodenuma giriş deliği gibi arkaya göçeder (Şekil 1). Sonuçta ventral tomurcuk dorsal tomurcugun hemen altında ve arkasında yer alır. Daha sonra, dorsal ve ventral pankreas tomurcuklarının parankim ve kanal sistemleri birbiriyle birleşir. Ventral tomurcuk unsinat uzantıyı ve pankreas başının inferior parçasını oluşturur. Bezin geri kalan kısımları dorsal tomurcuktan gelişir. Ana pankreas kanalı (Wirsung) dorsal pankreas kanalının distali ve ventral pankreas kanalının tümünün birleşmesiyle meydana gelir. Dorsal pankreas kanalının proksimal kısmı ya tümüyle oblitere olur veya aksesuar pankreas kanalı (Santorini) adı verilen küçük bir kanal halinde kalır. Ana pankreas kanalı, koledokla birlikte duodenuma majör papilla yoluyla açılır. Olguların %10'unda Santorini minör papilladan duodenuma açılır (2).

Pankreas adacıkları (Langerhans adacıkları) fetal yaşamın 3. ayında pankreasın parankimatöz dokusundan gelişerek tüm pankreas içine dağılır. İnsülin salgısı fetal yaşamın 5. ayında başlar (3). Heterotopik pankreas dokusu, özefagus alt ucundan, primer barsağın alt ucuna kadar herhangi bir lokalizasyonda yer alabilir. En sık mide mukozası ve Meckel divertikülü içinde bulunur(4). Heterotopik pankreas dokusu pankreasa özgü tüm histolojik özellikleri gösterebilir.

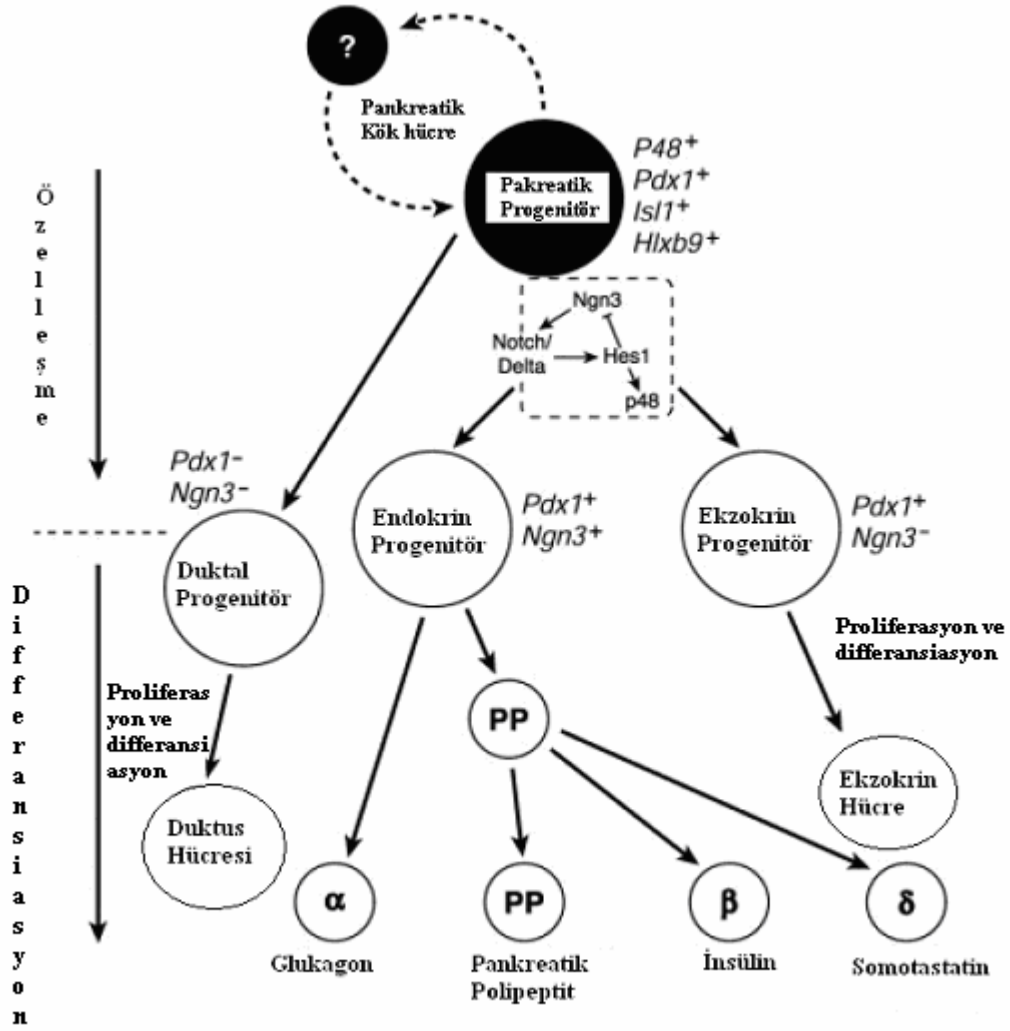
Pankreasın moleküler embriyolojisi organizmanın tüm diğer dokularında olduğu gibi karmaşık ancak şaşmaz bir kontrol altındadır. Pankreası oluşturacak hücrelerde farklılaşmayı belirleyen ilk hormon Pancreatic/duodenal homeobox-1 (PDX-1)'dir. PDX-1 etkisiyle endodermden farklılaşan hücre yığınları, endokrin veya ekzokrin hücrelere farklılaşmayı belirleyen faktörlerin etkisi altına girer. Bu aşamada Notch sistemi ve Neurogenin-3 (ngn-3) etkileşimi belirleyici olur. Endokrin farklılaşmaya yönelen hücrelerden ngn-3 etkisiyle delta ve serrate adı verilen proteinler salgılanır. Bu iki aktif protein komşu hücrelerdeki spesifik reseptörlere bağlanarak Notch sistemini aktive ederler. Notch sisteminin etkin molekülü olan HES-1, ngn-3'ün efektör molekülü olan NeuroD'yi bloke eder ve hücrenin endokrin diferansiasyonu engellenerek ekzokrin fonksiyon gören hücre olması sağlanır (5) (Şekil 2).



Şekil 1: Pankreasın embriyonal gelişimi.



Şekil 3: Kök hücrenin özellikleri.



Andrew M. Holland, *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 13–27.

Şekil 2: Pankreası oluşturacak hücrelerde farklılaşmayı belirleyen hormonal faktörler.

Pankreasın Rejenerasyon Kapasitesi Üzerine Mevcut Bulgular

Yetişkin pankreası, gebelik ya da obezite gibi insüline gereksinimin arttığı fizyolojik durumlarda insülin ihtiyacını β hücrelerinin fonksiyonel kapasitesini ve/veya sayısını artırarak karşılar. Pankreatik β hücrelerinin rejenerasyon kabiliyeti deneysel diyabette ve pankreas hasarı oluşturulan hayvan modellerinde gösterilmiştir (5, 6). Pankreas dokusunun rejenerasyonundan sorumlu hücrelerin tipi ve orijini hakkında görüş birliği yoktur ve bu konuyla ilgili çalışmalar devam etmektedir. Aydınlatılmayı bekleyen önemli bir konu rejenerasyonu başlatan ve yöneten sinyallerin ne olduğu, kısaca rejenerasyonun mekanizmasıdır (7, 8).

Pankreas rejenerasyonunun incelendiği çeşitli çalışmalarda pankreas hasarı kimyasal ajanlar ya da cerrahi yöntemler kullanılarak sağlanmıştır. Kullanılan kimyasal ajanlar serülein (9), alloksan (10) ve streptozosindir (11). Cerrahi girişimler %90 pankreatektomi, pankreatik duktus ligasyonu ve selofan “wrapping” yöntemidir (12, 13, 14, 15). Bu modellerin her birinde de progenitor hücrelerde artış gözlenmiştir.

Yapılan bazı çalışmalarda, endokrin ve ekzokrin hücrelerin duktal hücrelerden geliştiği gösterilmiştir (16, 17). Rejenerasyonu oluşturan bu transisyonel hücrelerde duktal belirteçlerle birlikte endokrin ve ekzokrin belirteçlerin bulunması bu görüşü desteklemiştir (18, 19). Ayrıca pankreatit ve diğer pankreatik rejenerasyon modelleriyle oluşturulan asiner ve duktuler hücre rejenerasyonlarında asiner hücrelerin dedifferansiye oldukları gösterilmiştir (8, 20, 21, 22). Bu diferansiasyon potansiyeli olan asiner hücrelerin seçiminde apoptozisin önemli rol oynadığı saptanmıştır.

Bonner-Weir ve arkadaşları pankreatik duktus hücrelerini stromasından izole ederek primer kültürler yaptıklarında, bu hücrelerin kısa sürede proliferasyon gösterdiklerini gösterdiler (23). Bu bulgular, in vivo ortamda duktal gelişmeyi engelleyen lokal etkili matriks komponentleri ve TGF- β gibi soluble faktörlerin etkin olduğunu düşündürmektedir (24). Parsiyel pankreatektomi sonrasında da pankreatik duktuslarda hızlı bir gelişme gözlenir. Bu fazda geçici bir süreliğine duktus hücrelerinden transkripsiyon proteini olan PDX-1/IDX-1 salınımı gözlenir (14, 17, 24).

Fetal hayatta adacık hücreleri pankreasın %20-30'unu oluştururken, yetişkin çağda bu oran %2-3'e geriler. Bunun nedeni asiner yapıların gelişerek pankreasın büyük çoğunluğuna egemen olmasıdır. Ancak yaşam süresince adacık hücrelerinin sayısı 3-4 kat artmaktadır ve β hücreleri mevcut kitlesinin %3'ü kadar tekrar üretilmektedir.

Kök Hücre Kavramı ve Pankreatik Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşmamış durumda olan, pluripotent özellikli hücrelerdir. Bu hücreler özelleşmiş hücrelere diferansiye olma potansiyeli gösterirler. Kök hücreler embriyonik kök hücre (EK) ve yetişkin kök hücreler olarak ikiye ayrılır. Yetişkin Kök hücreler (nöronal, hematopoitik sistem, epidermoid, hepatik, mezenkimal ve gastrointestinal sistem gibi) bir çok matür dokudan elde edilebilir (8, 25). Doku kök hücrelerinin sınırlı diferansiasyon potansiyeli vardır. İzole edilen kök hücrelerden, invivo veya invitro koşullarda özelleşmiş hücre tiplerine diferansiasyon indüklenebilir (26). Kök hücrenin iki özelliği tariflenmiştir. Bunlar; basit hücre düzeyinde kendine yenilenme ve spesifik hücre nesline diferansiasyondur (şekil 3). Kök hücrenin bu özellikleri embriyojenik gelişim sürecinde, homeostazda ve özelleşmiş dokuların rejenerasyonunda ve onarımında da gözlenmektedir.

Pankreas dokusunda β -hücre neogenezisi post-natal dönemde de devam etmektedir (27). Deneysel olarak pankreas hasarı oluşturulan modellerde β hücre neogenezisi gösterilmiştir (14, 28, 29). Bu çalışmalar sonucunda yetişkin pankreas dokusunun kök hücre veya progenitör hücre karakterinde hücreler içerdiği bildirilmiştir (8, 30). Adacık rejenerasyonunun, embriyonik gelişim sırasında salınan transkripsiyon faktörlerinin uyarısıyla duktal epitelden, endokrin hücre diferansiasyonu ve proliferasyonu yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir (31). Bir çok çalışmada proliferasyon stimülasyonu için düşük glukoz içeren kültür progenitör olarak kullanılırken, diferansiasyon için yüksek glukoz içeren kültür progenitör olarak kullanılmaktadır (32, 33).

Deneysel çalışmalarda, parsiyel pankreatektomi yapılan ratların fokal rejenerasyon alanlarında dediferansiye hücreler gözlenmiştir. Bu dediferansiye hücrelerin, embriyonal dönemdeki pankreas hücrelerinin özelliklerini gösterdiği ve bazı eksternal uyaranlarla fenotipik hücrelere diferansiye olabildikleri ileri sürülmüştür (14, 34).

Pankreatik kök hücrenin bulunmasındaki zorluğun nedeni güvenilir kök hücre belirteçlerinin henüz saptanamamasıdır (8, 35). Genel kök hücre belirteçlerinin bulunması bir süre sonra bu belirteçlerin pankreatik kök hücreleri de gösterebileceğini düşündürmüştür. Bu belirteçlerle yürütülen çalışmalarda pankreatik duktus sisteminin kök hücre açısından önemli olduğunu göstermiştir. Çeşitli deneysel çalışmalarda kök hücre belirteci olarak şu ajanlar kullanılmıştır; cytokeratin, β -galactoside, PDX-1, tyrosine hydroxylase (TH) ve glucose transporter (GUT-2) (36, 37, 38, 39, 40, 41, 42).

Genel olarak kabul edilen görüş; pankreatik kanal ve duktusların kök hücre içerdiğidir (13, 43). Bazı çalışmalarda ana duktal yapının ve geniş duktuslarında kök hücre içerdiği gösterilmiştir. Pour ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, sentroasiner yapıların da kök hücre içerdiğini göstermişlerdir (44). Ayrıca postnatal dönemde adacık hücre oluşumunun ekzokrin

lobül içerisindeki küçük lobüllerde de gerçekleştiği gösterilmiştir. Bouwens ve Klöppel'e göre postnatal dönemde, pankreas rejenerasyonu sırasında duktal yapılarda görülen kök hücreler, fetal pankreastaki duktal oluşum sırasında gelmektedir (45). Özetleyecek olursak, pankreatik kök hücre embriyonik hücreye benzer ve protodiferansiasyona sahiptir. Henüz fonksiyonel asiner, duktal ve adacık hücrelere diferansiye olmamıştır (46).

Kök Hücre Belirteçleri

Pankreatik kök hücrenin fenotipi henüz tanımlanmamıştır. Ancak çeşitli deneysel çalışmalar sonucunda birçok protein bulunmuş ve kök hücre belirteci oldukları ileri sürülmüştür. Bu proteinler; 'tyrosine hydroxylase (TH)' (41), 'glucose transporter (GLUT-2)' (42), 'cytokeratin 20 (CK-20)' (37), 'high-affinity nerve growth faktör (Trk A)' (47) ve 'PDX-1'dir (48).

Tyrosine hydroxylase (TH) bir nöronal belirteçtir ve rat pankreasının gelişimi sırasındaki hücrel farklılaşmayı gösterir (41). TH embriyonel hayatın 16. günü pankreatik duktüler hücrelerde gözlenirken, endokrin hücrelerde bulunmaz. Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda geç fetal ve erken postnatal dönemde TH'nın adacık hücrelerinde ve bazı duktüler hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir. Yetişkin rat pankreasında TH ekspresyonu β -hücreleriyle sınırlıdır. TH'nın ekspresyon özelliği endokrin prekürsör hücreler için tipiktir.

Glucose transporter 2 (GLUT-2), rat embriyosunun gelişimi sırasında, dorsal ve ventral pankreatik tomurcuklanmadaki hücrelerde bulunmuştur (42). GLUT-2 ekspresyonu dorsal ve ventral pankreas tomurcuklanması ve büyümesi süresince devam eder. Daha sonraki günlerde (embriyonel 17. günde) GLUT-2 ekspresyonu insülin salınımıyla birlikte gözlenir ki, bu β -hücrelerinin bir araya geldiğini gösterir. Asiner hücreler GLUT-2 eksprese etmezler.

Cyokeratin 20 (CK-20)'nin rat pankreatik duktuslarında ve endokrin hücrelerinde bulunması ekspresyonundaki farklılığı gösterir. Erişkin hayvanlarda CK-20 sadece duktuslarda gözlenir. Bununla birlikte CK-20 ekspresyonu fetal dönemde, neonatal dönemde ve pankreatik duktus ligasyonu ile β -hücre neogenesisinin indüklendiği durumlarda endokrin hücrelerde de gözlenir. Bu ekspresyon paterni, duktal hücrelerden endokrin hücrelere olan geçiş formunu gösterir. Bu geçiş formu protodiferansiye hücre kompartmanından sağlanır ve bunlardan terminal diferansiasyonla endokrin hücreler oluşur (42,45).

Nestin proteini bir nöronal kök hücre belirteçidir. Adacık hücrelerinde ve nadiren duktus hücrelerinde eksprese edilir. İn vitro pankreatik endokrin, ekzokrin ve hepatik fenotiplerdeki differansiye hücrelerde nestin pozitif olarak tespit edilir (49, 50).

Endokrin Hücre Diferansiasyonunda Transkripsiyon Faktörleri

PDX-1 geninin ürünü olan protein, memelide insülin ve somatostatin salınımının regülasyonunu sağlayan en önemli transkriptör faktörüdür. Ayrıca insulin promoter factor-1 (IPF-1), somatostatin transactivating factor 1 (STF-1) (51) ve islet duodenal homeodomain protein (IDX-1) bilinen diğer faktörlerdir (52). Farede PDX-1 ekspresyonu, insülin ve glukagon ekspresyonundan önce dorsal gut endoderminden 8,5. günde başlar. Bir gün sonra PDX-1 tüm

dorsal ve ventral pankreatik tomurcukta ve buna komşu duodenum duvarında gözlenir (40, 53, 54). Başlıca PDX-1 üretimi β -hücrelerinden olmaktadır.

Somatostatin transactivating factor 1 (ISL-1), yetişkin adacık hücrelerinin tümü tarafından eksprese edilir (55). ISL-1 adacık hücre diferansiasyonu ve dorsal pankreatik mesenşimin gelişimi için gereklidir.

Embriyonel Endokrin Hücre Diferansiasyonunda Rol Oynayan Büyüme Faktörleri

Soluble faktörlerin hücre büyümesi ve diferansiasyonu üzerine olan etkisi gösterilmiştir. Bunlar arasında en çok bilinen büyüme faktörleridir. Büyüme faktörleri iki yönde etki ederler. Birincil etki hücre mitogenezisi, hücre büyümesi, hücre diferansiasyonu ve hücre bölünmesi üzerinedir. İkincil etki hücrenin fonksiyonu üzerine olan etkidir. Endokrin pankreas üzerine etkili büyüme faktörleri ; insuline-like growth factor-1 ve -2 (IGF-1 ve -2), transforming growth factor α ve β (TGF α ve β), hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/c-met), nerve growth factor (NGF), β -cellulin (BTC), vascular endothelial growth factor (VEGF) ve gastrindir.

İnsuline-like growth factor-1 ve -2 (IGF-1 ve -2) embriyonel hücre üzerine etkisi mitojenik aktivasyon, insulin-like growth faktör aktivasyonu, kemotaksis stimülasyonu ve hücre diferansiasyonunun indüklenmesidir. IGF-1 ve IGF-2 embriyonel rat pankreasında 20. günde eksprese edilir. Fetal hayatta ve fetal gelişimde predominanttır.

TGF α erişkin memelide hücre gelişiminin regülasyonunda ve diferansiasyonunda etkilidir. Pankreatik duktus ligasyonu sonrasında oluşan tubuler komplekslerde duktus hücrelerinde TGF α ekspresyonunda artış gözlenir. Bu artışın nedeni pankreastaki remodelingdir. TGF α düzeyindeki artış, yeni β -hücre formasyonu ve gastrin düzeyindeki artışla beraberdir.

TGF β duktusların ve duktüler hücrelerin büyümesini inhibe eder. TGF β pankreas gelişiminde asiner kompartmanın gerilemesini indükler ve endokrin dokunun diferansiasyonunu artırır.

Trk-A, nerve growth factor (NGF)'e yüksek afinite gösteren reseptördür. Trk-A ekspresyonu β hücrelerinde, normal rat adacık hücrelerinde, fetal rat in-vivo kültüründe ve ayrıca yetişkin pankreas primer kültüründe gözlenir (55). Trk-A ekspresyonu embriyonel hayatın 16. gününde pankreatik duktüler hücrelerde varken endokrin hücrelerde yoktur. Geç fetal ve erken postnatal dönemde adacık hücrelerinden ve komşu duktüler hücrelerden eksprese edilir. Bu ekspresyon paterni, endokrin prekürsör hücreler için belirteç olarak kullanılır.

Betacellulin (BTC) fibroblastların ve vasküler düz kas hücrelerinin büyümesini stimüle ederken, pankreatik hücrelerin endokrin hücrelere dönüşümünü indükler (56). BTC ekspresyonu insan pankreatik adacıklarından ve differansiye β -hücrelerinden olmaktadır (57).

VEGF bir anjiojenik faktör olup, rat pankreasında normal adacık hücrelerinde bulunur. Gastrin ekspresyonu insan ve özellikle rat pankreasında mRNA ve protein düzeyinde artışa neden olur. Bu bulgular, gastrinin trofik etkiyle endokrin pankreasın büyümesi ve gelişmesi üzerine etkisi olduğunu gösterir (58, 59).

Bu çalışmanın amacı, ratlarda %90 pankreatektomi sonrası 4 ve 7. günlerde, pankreasın gastrik ve splenik loblarının, ana kanallarda oklüzyon yaratmaksızın bağlanması (pankreatik duktus ligasyonu) sonra, 4, 7 ve 11. günlerde gözlenen rejenerasyon odaklarındaki asinoduktüler metaplazi gösteren hücrelerde, nöronal kök hücre belirteci olduğu bilinen nestin ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntem kullanılarak araştırılmasıdır. Nestin ekspresyonu yanı sıra, iyi bilinen bir nöroendokrin belirteç olan kromogranin A'nın ekspresyonu da çalışılmıştır.

2. MATERYAL METOD

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Etik Kurul'u tarafından 81-10635 proje numarasıyla onaylanmış ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel/Tıbbi Cerrahi Araştırma Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Tıbbi/ Cerrahi Araştırma Ünitesi'nden temin edilen toplam 8 adet ortalama ağırlığı 125-128 g ağırlığında 3-5 haftalık sağlıklı erkek Wistar ratlar kullanıldı. Ratlar +25 °C'de, 12 saat gündüz ve 12 saat gece periyotlarıyla istedikleri kadar standart rat yemi ve normal içme suyuyla beslendiler. Bu ratlar rasgele, her birinde 4'er adet rat olacak şekilde iki gruba ayrılarak farklı kafeslerde tutulmuşlardır. Anestezi için 50 mg/kg dozunda intramusküler ketamin hidroklorid (Ketalar-Parke Davis) uygulanmış ve cerrahi girişimler tamamen steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Her birinde 4 rat olacak şekilde ratlar 2 gruba ayrılmış ve yapılan cerrahi işleme göre %90 pankreatektomi (PDx) grubu ve pankreatik dukt ligasyon (PDL) grubu olarak kodlanmıştır. PDx grubundaki ratlar 4. veya 7. günde sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı.

CERRAHİ GİRİŞİMLER

Parsiyel Pankreatektomi (PDx)

Ratlar tartıldıktan sonra intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorid ile anestezi uygulandı ve karın tüyleri traşlandıktan sonra cilt %10'luk povidon-iodin solüsyonu ile temizlenerek tamamen steril koşullar altında orta hat kesisi ile karına girildi. Pankreas eksplorasyonu, ratın mide ve dalağı karın dışına alındıktan sonra künt uçlu forceps ile mide nazıkçe ekarte edilerek sağlandı. Parsiyel pankreatektomi daha önce Bonner-Weir'in tariflediği teknikle yapıldı (43). Pankreasın kuyruk ve gövde kesiminin tümü pamuk aplikatör (steril edilmiş pamuklu kulak çöpü) kullanılarak çok nazik sürtme hareketleriyle dalak segmentinden başlanarak rezeke edildi (Resim.1). Rezeksiyon materyali rat pankreasının dalak, mide ve duodenal segmentinden oluşuyordu (bu yaklaşık pankreas dokusunun %90'nını oluşturur). Redundan pankreas dokusu ise ana safra yolları ile duodenumun 1. kıtası arasındaki 1-2 mm'lik dokuyu içeriyordu. Operasyonlarda ciddi kanama olmadı ve diğer organlara ait anatomik yapılar ile ana vasküler yapılar korundu. Karın, intraperitoneal 1 cc %0,9'luk NaCl (Eczacıbaşı) enjeksiyonunu takiben 3/0 prolene (Ethicon) iğne ile kapatıldı. Postoperatif dönemde ratlar istedikleri kadar standart rat yemi ve normal içme suyuyla beslendi. Parsiyel pankreatektomiyi takiben 4. ve 7. günlerde

sakrifikasyon ve doku örnekleme planlandı. Dördüncü gün parsiyel pankreatektomi yapılan 2 rata intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorid ile anestezi uygulandı, kan şekerleri ölçüldü ve karın tüyleri traşlandıktan sonra cilt %10'luk povidon-iodin solüsyonu ile temizlenerek tamamen steril koşullar altında eski orta hat kesisinden karına girildi. Pankreas lojunun eksplorasyonunu takiben kalan pankreas dokusu duodenumuda içine alacak şekilde eksize edildi. Spesmenin alınmasının ardından ratlar intrakardiyak kan alma yöntemiyle sakrifiye edildi. Alınan spesmenler %10'luk formaldehid içinde 4°C'de 6 saat fikse edildikten sonra parafinize edilerek bloklandı. Bu bloklardan 3 µm'lik seriler şeklinde kesitler alındı. Aynı işlemler 7. gün sakrifikasyon yapılan 2 rat için de uygulandı.

Pankreatik dukt ligasyonu (PDL)

Ratlar tartıldıktan sonra intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorid ile anestezi uygulandı ve karın tüyleri traşlandıktan sonra cilt %10'luk povidon-iodin solüsyonu ile temizlenerek tamamen steril koşullar altında orta hat kesisi ile karına girildi. Pankreas eksplorasyonu ratın mide ve dalağı karın dışına alındıktan sonra künt uçlu forceps ile mide nazıkçe ekarte edilerek sağlandı. Pankreatik band ligasyonu daha önce Rosenberg tarafından tanımlan ve Benedic'in belirttiği teknikle yapıldı (60). PDL grubunu oluşturan 4 ratın pankreasının gastrik lobu, gastrik pankreatik kanalı ligate edecek şekilde nonabsorbabl bir materyal olan steril edilmiş seloteyp kullanılarak ligate edildi (Resim-2). Operasyonlarda ciddi kanama olmadı ve diğer organlara ait anatomik yapılar ile ana vasküler yapılar korundu. Karın intraperitoneal 1 cc %0,9'luk NaCl (Eczacıbaşı) enjeksiyonunu takiben 3/0 prolene (Ethicon) sütür ile kapatıldı. Postoperatif dönemde ratlar istedikleri kadar standart rat yemi ve normal içme suyuyla beslendi. Dördüncü gün gastrik pankreatik dukt ligasyonu yapılan 2 rata intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorid ile anestezi uygulandı, karın tüyleri traşlandıktan sonra cilt %10'luk povidon-iodin solüsyonu ile temizlenerek tamamen steril koşullar altında eski orta hat kesisinden karına girildi. Pankreas lojuna ulaşıldıktan sonra gastrik lob eksize edildi. Ardından pankreasın dalak segmentinin kanalını ligate edecek şekilde seloteyp kullanılarak ligate edildi ve karın intraperitoneal 1 cc %0,9'luk NaCl (Eczacıbaşı) enjeksiyonunu takiben 3/0 prolene (Ethicon) sütür ile kapatıldı. Postoperatif dönemde ratlar istedikleri kadar standart rat yemi ve normal içme suyuyla beslendi. Bu grubun sakrifikasyonu 7. günde gerçekleştirildi. Alınan spesmenler %10'luk formaldehid içinde 4°C'de 6 saat fikse edildikten sonra parafinize edildi. Bu bloklardan 3 µm'lik seriler şeklinde kesitler alındı.

Yedinci gün gastrik pankreatik dukt ligasyonu yapılan 2 rata intramusküler 50 mg/kg ketamin hidroklorid ile anestezi uygulandı, karın tüyleri traşlandıktan sonra cilt %10'luk povidon-iodin solüsyonu ile temizlenerek tamamen steril koşullar altında eski orta hat kesisinden karna girildi. Pankreas lojuna ulaşıldıktan sonra gastrik lob eksize edildi. Ardından pankreasın dalak segmentinin kanalını oklüde etmeyecek şekilde seloteyp kullanılarak ligasyon yapıldı ve karın intraperitoneal 1 cc %0,9'luk NaCl (Eczacıbaşı) enjeksiyonunu takiben 3/0 prolene (Ethicon) sütür ile kapatıldı. Postoperatif dönemde ratlar istedikleri kadar standart rat yemi ve normal içme suyuyla beslendi. Bu grubun sakrifikasyonu 4 gün sonra yapıldı. Alınan spesmenler aynı şekilde hazırlanarak 3 µm'lik seri kesitler alındı.

PDL grubunun splenik segment ligasyonu yapılan ratların ilk grubu 7. günde ve ikinci grubu 4. günde sakrifiye edildi. Böylece PDL sonrası 4. 7. ve 11. günlere ait pankreas dokusu elde edilmiş oldu.

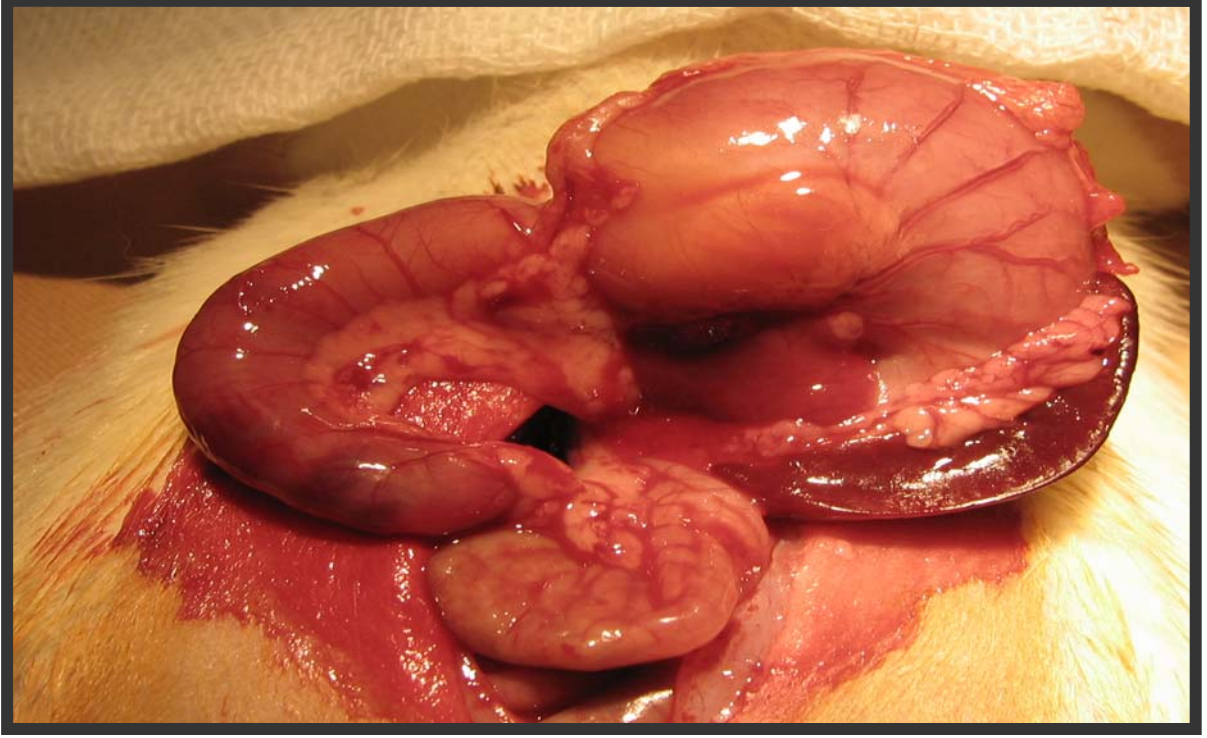
Her iki cerrahi yöntemle elde edilen dokulardan hazırlanan kesitler önce standart hemotoksilen-eozin ile boyandı. Rejenerasyon odakları bulunan kesitlere komşu kesitler, immünohistokimyasal boyamalar için seçildi.

İmmünohistokimyasal Yöntem

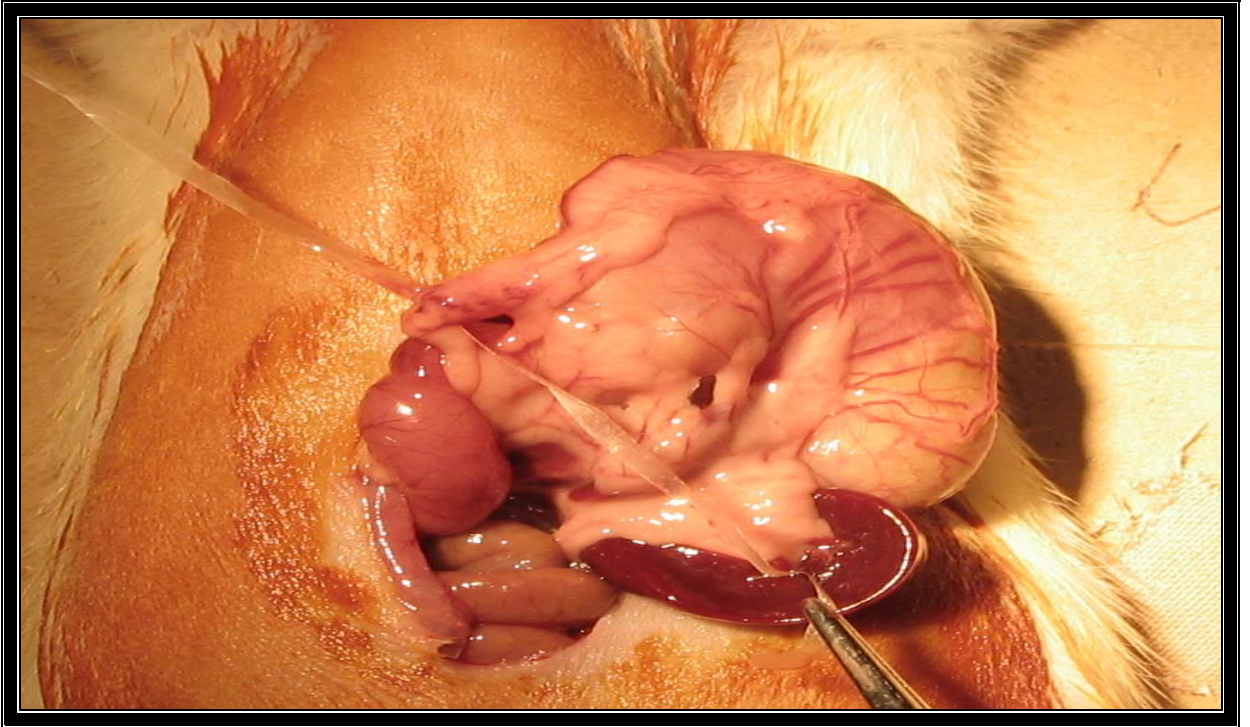
Nestin immünohistokimyasal boyaması için çalışmada monoklonal rat anti-nestin (Chemicon, ABD) antikoru 1/50 dilüsyonla kullanıldı. Preparatlar 5 dakika süreyle %3 H₂O₂ içerikli metanol ile deparafinize ve rehidrate edildi. Ardından fosfat tamponlu fizyolojik salin çözeltisi (fosfat buffered saline= PBS) ile yıkandı. Spesifik olmayan antijenler normal tavşan serumu ile 20 dakika süreyle yıkanmak suretiyle bloke edildi. Primer antikor preparatlara 1 saat süreyle oda sıcaklığında tatbik edildi. Preparatların PBS ile yıkanmasından sonra, 30 dakika süreyle biotin işaretli anti-mouse IgG uygulandı. Ardından 30 dakika sürele peroksidaz işaretli streptoavidin uygulandı. Peroksidaz, %0,003 H₂O₂ içeren diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ile gösterildi. Nukleuslar Mayer'in hemotoksileni ile boyandı. Nestin immünohistokimyasal boyaması standartize edilmiş ticari kitle yapıldı.

Aynı yöntem uygulanarak anti-human kromogranin-A (Zymed, ABD) antikoru ile dokular boyanarak endokrin diferansiasyon varlığı araştırıldı.

Parsiyel pankreatektomi planlanan ratlarda preoperatif kan ölçümünü takiben %90 pankreatektomi yapıldı. Doku örnekleme yapılacak parsiyel pankreatektomili ratlarda, parsiyel pankreatektominin başarısını belirlemek için kan şekeri ölçümü yapıldı.



Resim-1: Parsiyel pankreatektomi.



Resim-2: Selofan pakreatik dukt ligasyonu.

3. BULGULAR

Parsiyel pankreatektomi yapılan grupta ortalama kan şekeri 210 ± 5 mg/dl olarak tespit edildi. Ratlar %90 pankreatektomi sonrasında diyabetik olmuşlardı.

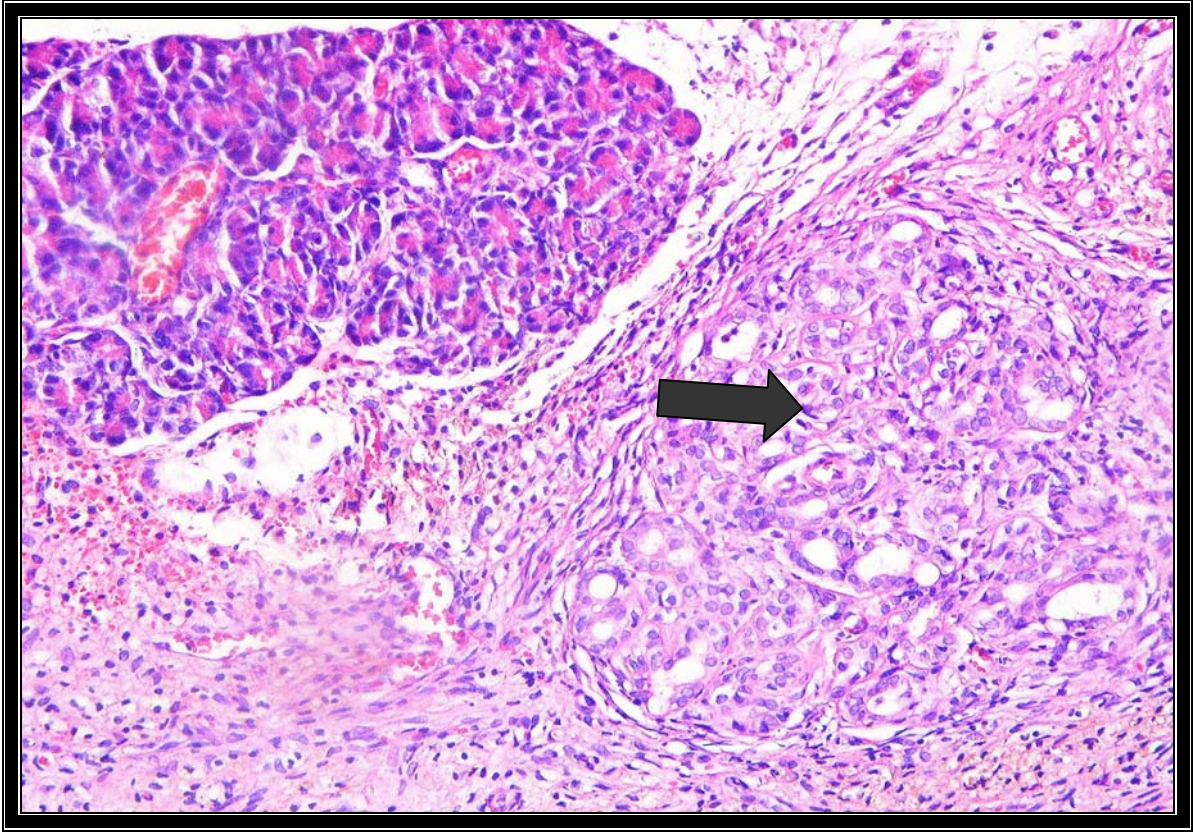
Işık mikroskopisi

PDx ve PDL gruplarından alınan örnekler hemotoksilen-eozin ile boyanarak incelendi. Kesitlerde pankreas lobuler ve interlobuler alanlarında ödem gözlemlendi. Asiner interstisyel alanlarda ileri düzeyde nötrofil infiltrasyonu saptandı. Asinus yapısında ileri derecede dilatasyon ve asiner hücrelerde granül kaybı gözlemlendi. Fokal rejenerasyon alanları fibrotik bölümlere ayrılmıştı ve dilate lumenli asiner hücreler ile birlikte duktus benzeri hücreler (tübüler kompleksler) içermekteydi. Arada kan damarlarının bulunduğu normal asiner hücrelerden oluşan pankreas dokusu komşuluğunda asino-ductüler proliferasyon alanları gözlenmekteydi. Duktusu oluşturan hücreler eozinofilik stoplazmalı kuboidal hücrelerdi (Resim.3). Yoğun fibrotik dokuyla ayrılmış odalar halinde asinoduktüler metaplazi alanları izlendi (Resim.4).

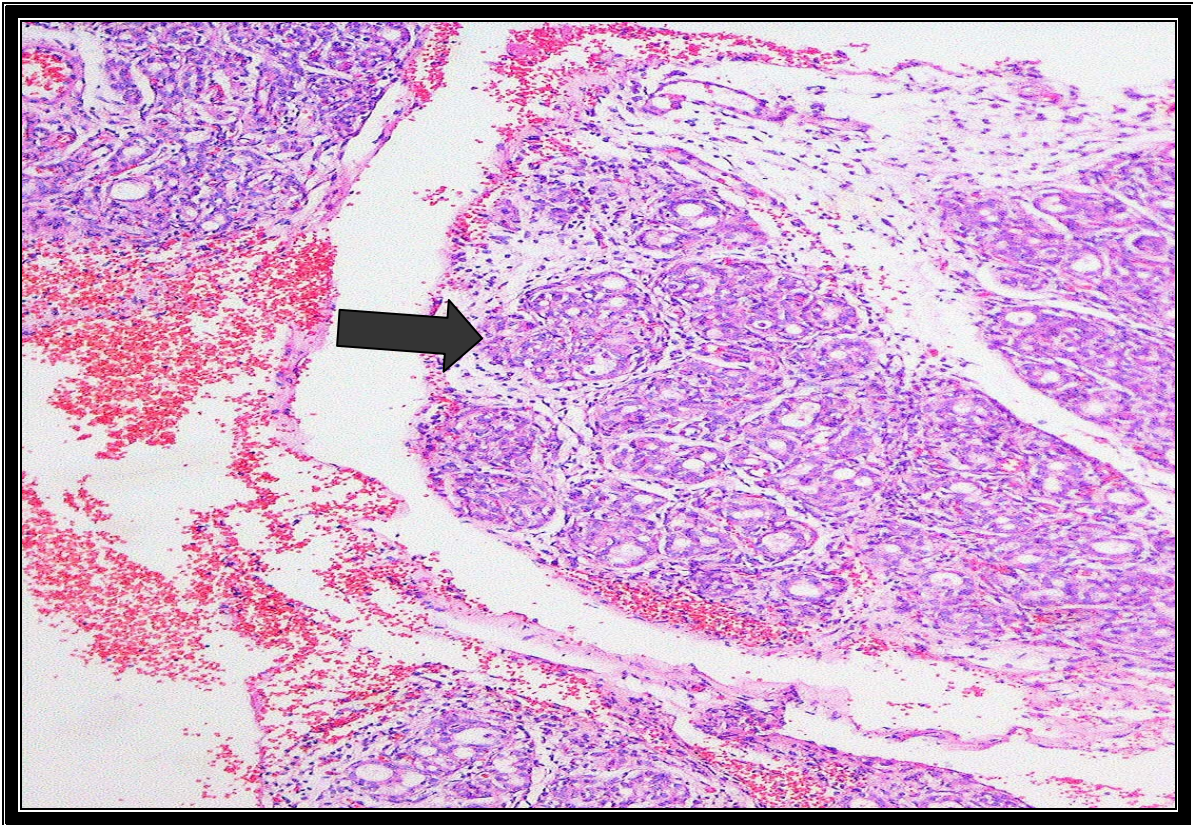
İmmünohistokimyal boyama

Nestin normal pankreas alanlarında adacık hücreleri ile bağ dokusundaki mezenşimal hücrelerde eksprese olduğu görüldü. Normal pankreatik asiner hücrelerde ve her çaptaki duktus hücrelerinde nestin ekspresyonu saptanmadı. Rejenerasyon odaklarında gözlenen asinoduktüler metaplazi gösteren hücrelerde (tübüler kompleks hücrelerinde) nestin belirgin şekilde eksprese olmaktaydı. Bu en tipik şekilde PDL-7 preparatlarında gözlemlendi (Resim-5) Ayrıca bazı duktuslar nestin ile hafif düzeyde stoplazmik boyanma göstermiştir (Resim-6). Benzer şekilde nestinin PDx-4 olarak kodlanan %90 pankreatektomi sonrası 4. günde gelişmiş rejenerasyon odaklarında da eksprese olduğu görüldü. (Resim-7).

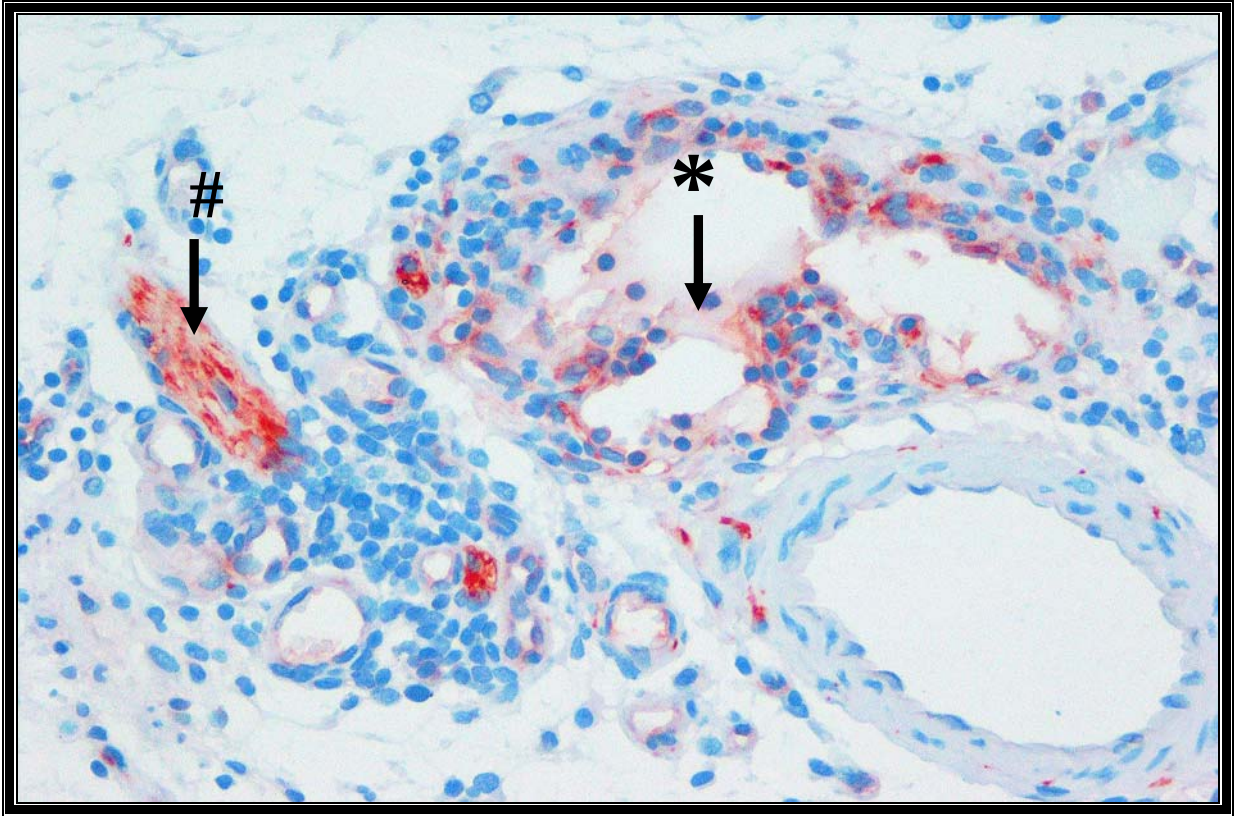
Rejenerasyon odaklarında, belirgin şekilde nestin pozitif olan bölgelerin devam eden diğer kesitlerinde, CGA ile periferde daha belirgin olmak üzere diffüz kuvvetli sitoplazmik pozitiflik saptanmıştır (Resim-8).



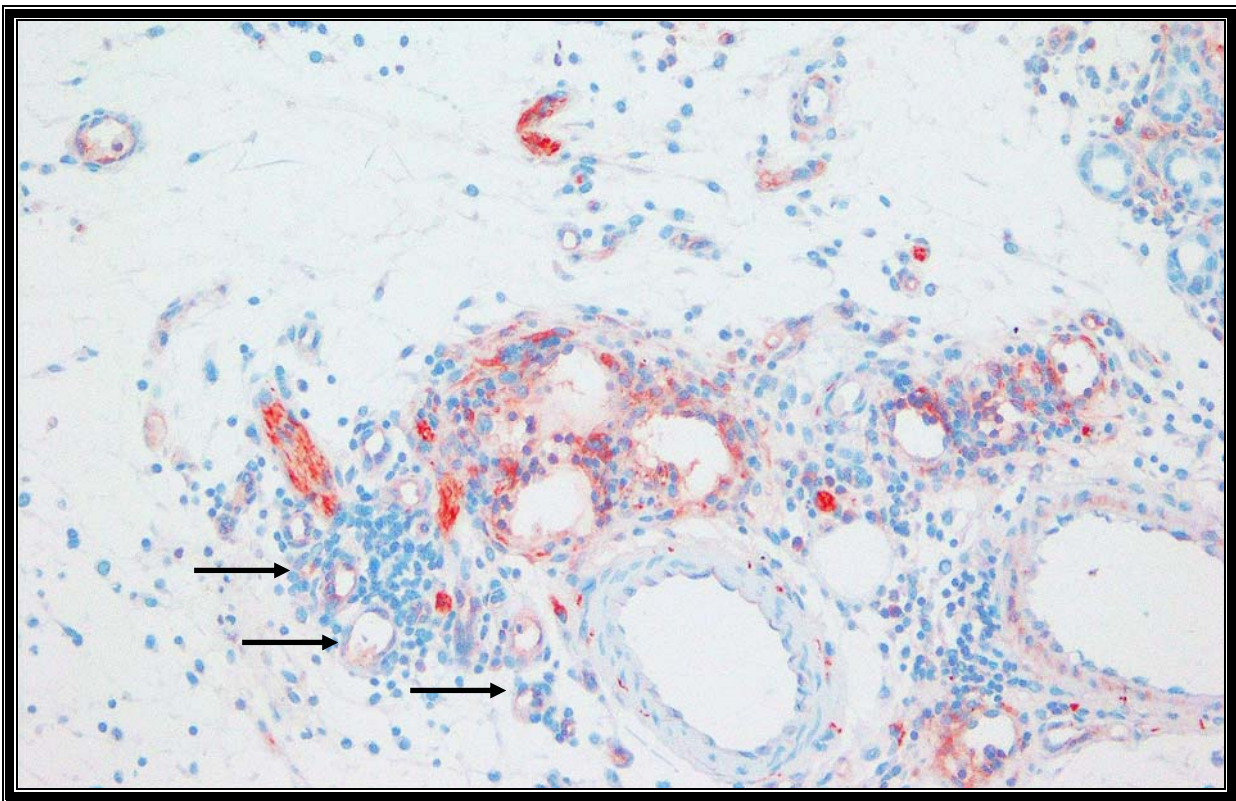
Resim 3: Fokal rejenerasyon alanları ve dilate lumenli asiner hücreler.



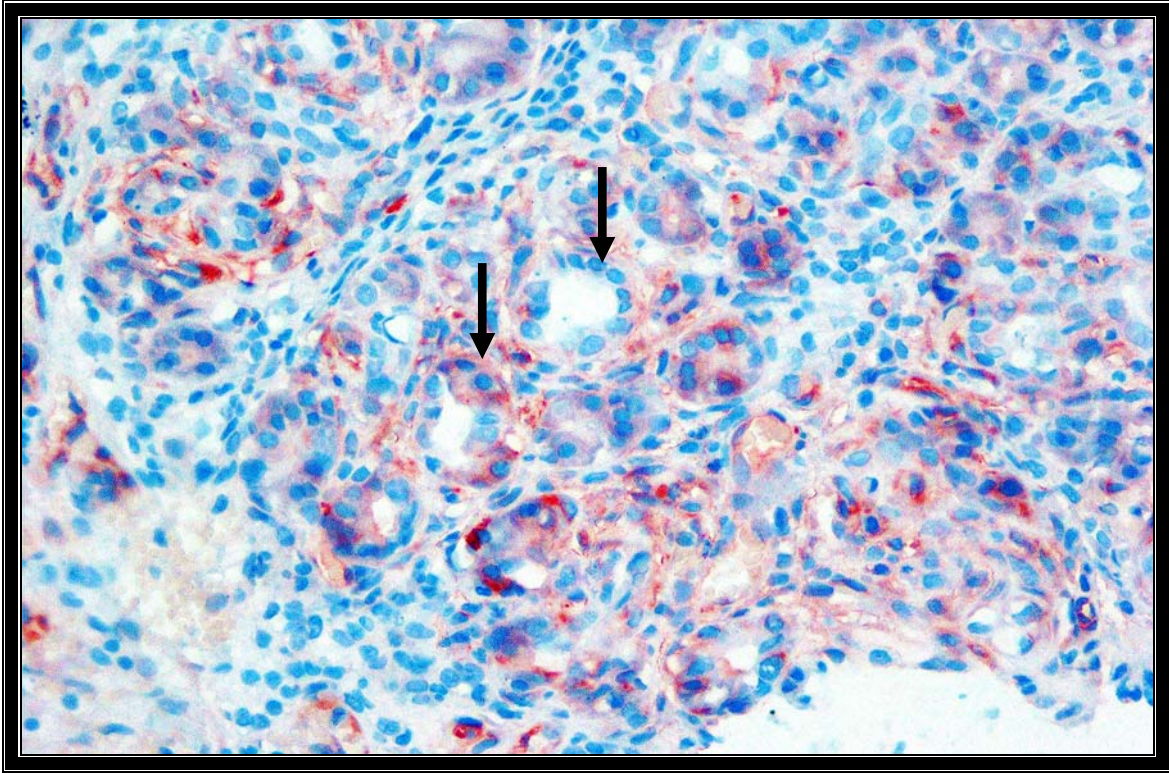
Resim 4: Asinoduktüler metaplazi alanları.



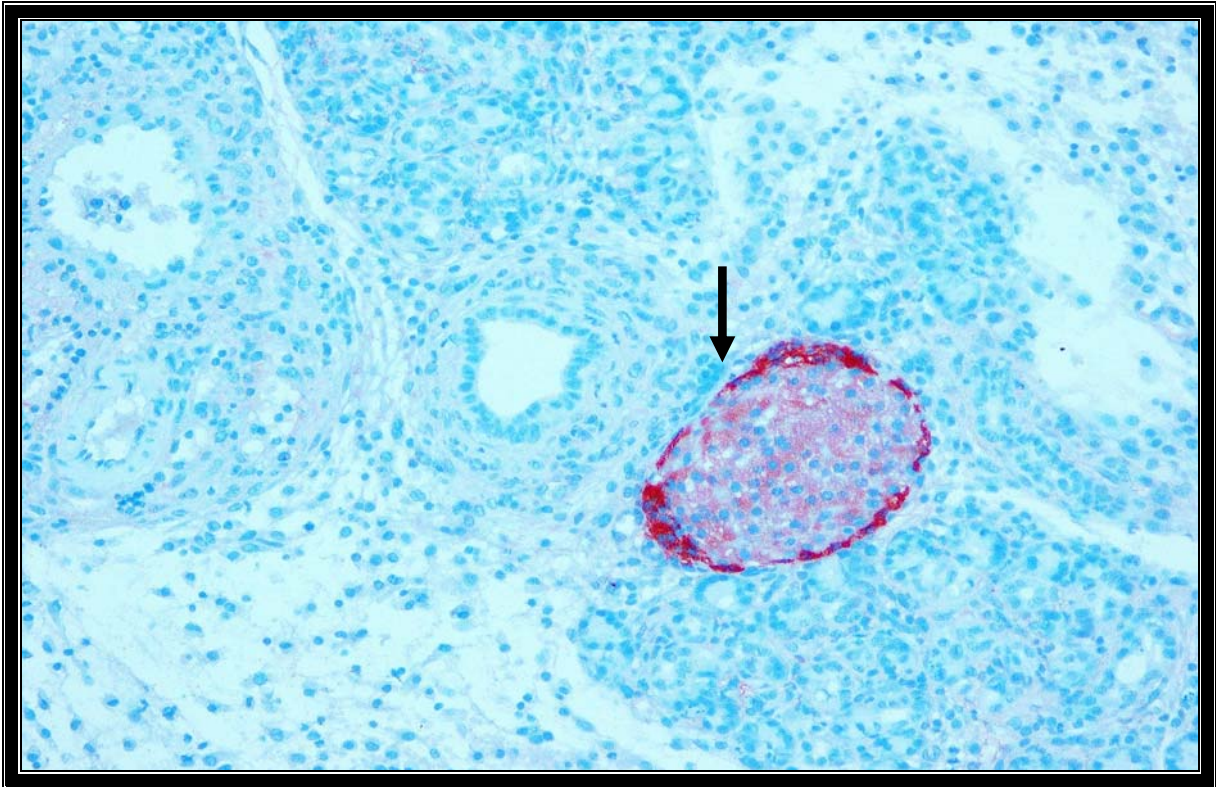
Resim 5: Nestinin asinoduktüler metaplazi alanındaki duktus epitelinde (*) ve komşuluğundaki sinir dokusunda (#) kuvvetli stoplazmik pozitiflik saptanmıştır.



Resim 6: Nestin ile hafif düzeyde stoplazmik boyanma gösteren duktuslar.



Resim 7: Nestinin PDx-4 grubunda 4. günde duktus yapılarında pozitif olarak bulundu.



Resim 8: Nestin pozitif bölgelerin devam eden diğer kesitlerinde CGA ile periferalde daha belirgin olmak üzere diffüz kuvvetli sitoplazmik pozitiflik saptanmıştır.

4. TARTIŞMA

Transdiferansiasyon, doku rejenerasyonunda rol oynayan iyi tanımlanmış bir mekanizmadır. Transdiferansiasyon hücre düzeyindeki değişimi tanımlamak için uygun bir terimdir. Bir başka terim olan transformasyon, yaygın olarak normal fenotipteki hücrelerin malign hücrelere değişimini tariflemeye kullanılır. Metaplazide ise hücreler konvensiyonel histolojik yapıya diferansiye olmazlar ve metaplazi matür hücrelerin (terminal differansiye hücreler) hücre tipindeki değişimi içerir (61). Bu fenotipik değişim sırasında hücreler dediferansiasyon, proliferasyon ve rediferansiasyon gibi çeşitli süreçlere giderler (62). Dediferansiasyonun orta evresindeki hücreler ne orijinal hücrenin fenotipine, ne de differansiye hücrenin tipine benzerler. Bu tip hücreler çeşitli dokularda da gösterilmiştir. Diğer bir süreç olan direkt transdiferansiasyonda ise hücreler proliferasyona uğramadan transdiferansiasyona giderler ve bu hücreler orta evrede karışık fenotiptedirler (63).

Pankreas dokusunda β -hücre neogenezi, post-natal dönemde de devam etmektedir. DeneySEL olarak pankreas hasarı oluşturulan modellerde β hücre neogenezi gösterilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda yetişkin pankreas dokusunun kök hücre veya progenitör hücre karakterinde hücreler içerdiği bildirilmiştir. Adacık rejenerasyonunun embriyonik gelişim sırasında salınan transkripsiyon faktörlerinin uyarısıyla duktal epitelden, endokrin hücre diferansiasyonu ve proliferasyonu yoluyla olduğu gösterilmiştir. Bir çok çalışmada, proliferasyon stimülasyonu için düşük glükoz kültürü progenitör olarak kullanılırken diferansiasyon için yüksek glükoz kültürü progenitör olarak kullanılmaktadır. DeneySEL çalışmalarda, parsiyel pankreatektomi yapılan ratların fokal rejenerasyon alanlarında dedifferansiye hücreler gözlenmiştir (13, 64, 65). Bu dedifferansiye hücreler pankreatik kök hücrelerdir ve bu hücreler eksternal uyarıyla veya morfogenezle fenotipik hücrelere diferansiye olabilirler (14, 66). Pankreatik kök hücreyi tanımlamadaki zorluğun nedeni, hücre verifikasyonları ve karakteristiği nedeniyle güvenilir kök hücre belirteçlerinin olmamasıdır. Genel kök hücre belirteçlerinin bulunması bir süre sonra bu belirteçlerin pankreatik kök hücreleri de gösterebileceğini düşündürmüştür. Bu belirteçlerle yürütülen çalışmalarda pankreatik duktus sisteminin kök hücre açısından önemli olduğunu göstermiştir.

Pour 1978'de karsinojen bir madde olan N-nitrosobis(2-oksopropyl) amini kullanarak yaptığı çalışmada, duktular hücrelerin hiperplazi ve hipertrofisi ile ilişkili yeni adacık hücrelerinin gelişimini gösterdi (67). Bu çalışmada, yeni oluşan β -hücrelerinin sentroasiner hücrelerin yoğun olarak bulunduğu kısımlardan periferik doğru herniasyon gösterdiğini ve histolojik olarak yeni gelişen adacık hücrelerine benzediğini saptamıştır. İlerleyen evrelerde asinus yapısı, ya hiperplastik duktüler hücrelerle ya da yeni oluşmuş adacık hücreleriyle replase edilmiştir. Bu yeni

bulgular, pankreasta rejenerasyonun erişkin çağlarda da olabileceğini göstermesinin yanı sıra, adacık hücrelerinin kökeni konusunda önemli ipuçları vermesi açısından da önemlidir.

Soria, nestinin insülin salgılayan hücrelerin diferansiasyonu sırasında kök hücrelerin gösterilmesinde önemli bir belirteç olduğunu bildirmiştir (68). Nestin neuroepitelyal kök hücrenin bilinen bir belirteçidir. İntermediate bir filaman proteini olan nestin geçici olarak çeşitli organların doku rejenerasyonunun erken dönemlerinde eksprese olur. Lumelsky ve arkadaşları, maymundan nestin pozitif embriyonik kök hücreyi izole ettiler ve bu hücrelerin yapısal ve fonksiyonel olarak pankreas adacık hücrelerine benzeyen insülin salgılayan adacık hücrelerini oluşturduğunu bildirdiler (69, 70). Zulewski ve arkadaşları, 2001 yılında yetişkin pankreasından nestin pozitif kök hücreyi izole etti ve bunun insülin salgılayan hücreler için varsayılan kök hücre olduğunu rapor etti (50, 71). Bu çalışmalar, nestinin embriyonik dokuların dışında tam differansiye pankreas dokusunda da insülin salgılayan hücrelerin differansiye olduğu pankreatik kök hücrenin belirlenmesinde bir kök hücre belirteci olarak kullanılabileceğini göstermektedir (69, 72, 73, 74). Ancak halihazırda, nestin pozitif duktus hücrelerinin varlığı tartışmalı bir konudur, çünkü bazı yayınlar nestin ekspresyonunun pankreatik epitel hücrelerinden değil de mezenşimal doku hücrelerinden olduğunu rapor etmektedir (75, 76, 77). Buna karşın nestini neogenetik duktus hücrelerinde güçlü şekilde pozitif olarak bulan güvenilir çalışmalar da vardır (78, 79).

Bizim çalışmamızda parsiyel pankreatektomi ve pankreatik dukt ligasyonu ile neogenetik stimülasyon uyarılarak rejenerasyon odakları oluşturuldu. Bu rejenerasyon odaklarında tubuler kompleks ünitelerinde nestin pozitif hücreler tespit edildi. Nestin pozitif hücrelerin bulunduğu bölümün bir sonraki kesitlerindeki hücrelerin tipik duktuler özellikler gösterdiği görüldü. Bu hücrelerin asinus ya da duktus sisteminden gelişmiş pankreatik kök hücreler olabilecekleri varsayıldı. Çalışmamızda yetişkin ratlara uygulanan PDx ve PDL işlemlerinin ardından alınan örneklerde yapılan immunohistokimyasal çalışmada, nestin pozitif hücrelerin bulunduğu bölümün devam eden kesitlerinde bu hücrelerin Chromagranin A ile de boyandığı gözlemlendi.

Çalışmamız göstermiştir ki, erişkin ratlarda PDx ve PDL gibi pankreatik neogenesi artıran işlemler sonucunda tubüler kompleksler içeren rejenerasyon odakları oluşmaktadır. Bu rejenerasyon odakları pankreatik kök hücre gibi davranan asinoduktüler metaplazi gösteren hücreler içermektedir. Bu hücreler, kök hücre belirteci olduğu ileri sürülen nestin eksprese etmelerinin yanı sıra yer yer endokrin diferansiasyon göstererek, CGA da eksprese etmekteydiler.

Pankreas kanalının parsiyel obstrüksiyonu modeli üzerinde çalışan Rosenberg ve ekibi küçük intralobuler duktus epitelinden göçeden bir takım hücrelerin yeni adacık benzeri yapılar oluşturduklarını gözlemlediler. Bonner-Weir, %90 pankreatektomi uyguladığı erişkin ratlarda

duktal hücrelerin duktal fenotiplerini kaybederek proliferere olduklarını ve multipotent hücrelere dönüşerek uygun stimuluslar altında adacık hücrelerine farklılaşma potansiyeli kazandıklarını göstermiştir.

Normal şartlarda, organizmada bu hücreler transforming growth factor- β (TGF- β) gibi lokal stromal faktörlerce baskılanmaktadır (80). Stromalarından izole edildiklerinde, duktal hücreler primer kültürde aşırı proliferasyon göstererek glukoza cevap veren adacık hücrelerine differansiye olmaktadır.

Parsiyal pankreatektomi ve pankreatik dukt ligasyon modellerinde pankreas rejenerasyonu; 1) önceden replike olmuş differansiye endokrin ve ekzokrin hücreler ve 2) duktal epitelyumdan diferansiye ve proliferere olmuş yeni pankreatik lobüller tarafından gerçekleştirilir. Diğer hayvan deneylerinde tespit edilen, duktuler proliferasyonların olduğu rejenerasyon odaklarına benzer rejenerasyon odakları bizim çalışmamızda da gözlemlendi. Bu bulgular pankreas rejenerasyonunda tariflenen ikincil yolu, yani proliferasyonun ve diferansiasyonun asinoduktüler hücrelerden olduğunu desteklemektedir. Ayrıca kronik pankreatit, pankreatik adenokarsinom ve kistik fibroziste duktus benzeri tubuler kompleksler tanımlanmıştır (81, 82). Tubuler komplekslerin orijini konusunda görüş ayrılıkları vardır. Kimi araştırmacılar, bu yapının intralobüler duktuslardan differansiasyonla geliştiğini düşünürken, bazıları da bu yapının asiner doku içerisindeki duktus benzeri yapının öncülüğünde dediferansiasyonla oluştuğunu düşünmektedir (83, 84).

Tüm bu çalışmalar pankreasta rejenerasyon sürecinin erişkin dokularda da devam ettiğini ve bu mekanizmada asiner/duktal transdiferansiasyonun ve/veya dediferansiasyonun önemli bir yeri olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmanın anlaşılması sadece kanser ve kronik pankreatit gibi morbidite ve mortalitesi yüksek hastalıkların patogenezinin aydınlatılması ve tanı/tedavilerinin gerçekleştirilmesi açısından olduğu kadar, aynı zamanda diabetes mellitusun tedavisinde yeni bir dönemi açabilecek otolog β hücre naklinin gerçekleşmesi açısından da önemlidir.

Bizim çalışmamızda %90 pankreatektomi ve pankreatik duktus ligasyonu yapılan genç erkek ratlarda, endokrin ve ekzokrin hücrelerde proliferasyon ve diferansiasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu proliferasyon ve diferansiasyonun duktal epitelyumdaki prekürsör hücrelerden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (33, 85).

Nestin proteini bir nöronal kök hücre belirteçidir. Adacık hücrelerinden ve nadiren de duktus hücrelerinde eksprese edilir. İn vitro pankreatik endokrin, ekzokrin ve hepatik fenotiplerdeki diferansiye hücrelerde nestin saptanmaktadır. Nestin ile yapılan pankreatik kök hücre araştırmalarında farklı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Kimi araştırmacılar nestinin nöronal

hücrelerde, fibroblastlarda ve mezenşimal kökenli diğ r hücrelerde pozitif olduğunu bildirdiler. Bazı araştırmacılar da nestinin pankreatik kök hücre olduğunu düşündükleri duktus hücrelerinde de pozitif olduğunu göstermişlerdir. Bizim  alışmamızda da nestin, neogenezin uyarıldığı pankreas dokusunda özellikle de asinoduktüler epitelde pozitif olarak tespit edildi. Bu sonuçlar nestinin pankreatik kök hücrelerinin belirlenmesinde önemli olabileceğini ve daha ileri teknikler kullanılarak nestin eksprese eden asinoduktüler metaplazi odaklarının pankreas rejenerasyonundaki rolünün araştırılması gereğini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ

1. Ratlarda parsiyal pankreatektomi ve pankreatik dukt ligasyon modeliyle duktuler proliferasyonların olduğu rejenerasyon odakları elde edilmiştir.
2. Parsiyel pankreatektomi ve pankreatik duktus ligasyonu yapılan genç erkek ratlarda, endokrin ve ekzokrin hücrelerde proliferasyon ve diferansiasyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu proliferasyon ve diferansiasyonun duktal epitelyumdaki prekursor hücrelerden kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir.
3. Nestin, neogenezin uyarıldığı pankreas dokusunda özellikle de asinoduktüler epitelde pozitif olarak tespit edildi ve bu sonuçlar nestinin pankreatik kök hücrelerinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olduğunu göstermiştir.

6. ÖZET

Bu çalışmada rat pankreatik rejenerasyon modellerinde asinoduktüler metaplazi gösteren rejenerasyon odaklarında nestin ekspresyonu incelenmiştir.

Bu amaçla; her birinde 4 rat olacak şekilde ratlar 2 gruba ayrılmış ve yapılan cerrahi işleme göre %90 pankreatektomi (PDx) grubu ve pankreatik dukt ligasyon (PDL) grubu olarak kodlanmıştır. PDx grubundaki ratlar 4. veya 7. günde sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı. PDL grubunda doku örnekleri 4., 7. ve 11. günlerde alındı. Her iki cerrahi yöntemle elde edilen dokulardan hazırlanan kesitler önce standart hemotoksilen-eozin ile boyandı. Rejenerasyon odakları bulunan kesitlere komşu kesitler immünohistokimyal boyama için seçildi.

Alınan örneklerde normal pankreatik asiner hücrelerde ve her çaptaki duktus hücrelerinde nestin ekspresyonu saptanmadı. Rejenerasyon odaklarında gözlenen asinoduktüler metaplazi gösteren hücrelerde (tübüler kompleks hücrelerinde) nestin belirgin şekilde eksprese olmaktaydı. Bu en tipik şekilde PDL-7 preparatlarında gözlemlendi.

Bizim çalışmamızda nestin, neogenezin uyarıldığı pankreas dokusunda özellikle de asinoduktüler epitelde pozitif olarak tespit edildi. Bu sonuçlar nestinin, pankreatik kök hücrelerinin belirlenmesinde önemli olabileceğini göstermiştir. Ayrıca daha ileri teknikler kullanılarak yapılacak çalışmalarda, nestin eksprese eden asinoduktüler metaplazi odaklarının pankreas rejenerasyonundaki rolünün araştırılması gerektiği fikrini ortaya koymaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. T.W. Sadler, Langman's medical embryology; Williams&Wilkins, 6th ed, 1990: 232-235.
2. Dawson W, Langman J: An anatomical-radiological study on the pancreatic duct pattern in man. Anat Rec 1961: 139: 59.
3. Falin LT: The development and cytodifferentiation of islets of langerhans in human embryos and foetuses. Acta Anat 1967: 68: 147.
4. Martinez NS, Morlach CG, Dockerty B, Waugh JM, Weber H: Heterotopic pancreatic tissue involving stomach. Ann Surg 1958: 147:1.
5. Edlund H, Pancreas: how to get there from the gut? Curr Opin Cell Biol.1999; 11:663 -8.
6. Rosenberg L. In vivo cell transformation: neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. Cell Transplant 1995: 4: 371-383.
7. Rosenberg L. Induction islet cell neogenesis in the adult pancreas: the partial duct obstruction model. Microsc Resc Tech 1998: 43:337-346.
8. Andrew MH, Jorge GL, Leonard CH. Progenitor cells in the adult pancreas. 2004: 20: 13-27.
9. Davidson PM, Cambell IL, Oxbrow L, Hutson JM. Pancreatic β cell proliferation in rabbits demonstrated by bromodeoxyuridine labeling. Pancreas 1989: 4: 594-560.
10. Waguri M, Yamamoto K, Miyagawa JI. Demonstration of two different processes of β cell regeneration a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of aloxan. Diabetes 1997: 46: 1281:1290.
11. Like AA, Rossini AA. Streptozotocine-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. Science 1976: 193: 315-417.

12. Elsasser HP, Adler G, Kern HF. Time course and cellular source of pancreatic regeneration following acute pancreatitis in the rat. *Pancreas* 1986; 1: 421-429.
13. Bonner-Weir S, Baxter LA, Schupp GT, Smith FT. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 1993; 42: 1715-1720.
14. Sharma A, Zangen DH, Reitz P, et al. The homeodomain protein IDX-1 increases after an early burst of proliferation during pancreatic regeneration. *Diabetes* 1999; 42: 1715-1720.
15. Lin HT, Chiou SH, Kao CL, Shyr YM, Hsu CJ, Tarn YW, Ho LL, Kwok F, Ku HH. Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 4529-35.
16. Vinik A, Rafaeloff R, Pittenger G, Rosenberg L, Duguid W: Induction of pancreatic islet neogenesis. *Horm Metab Res* 1997; 29:278 –293.
17. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154–156.
18. Gu D, Lee MS, Krah T, Sarvetnick N. Transitional cells in the regenerating pancreas. *Development* 1994; 120: 1873-1881
19. Iovanna JL. Redifferentiation and apoptosis pancreatic cells during acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1996; 20: 77-84 -
20. Bocman DE, Merlino G. Cytological changes in the pancreas of transgenic mice overexpressing transforming growth factor alpha. *Gastroenterology* 1992; 103: 1883-1992.
- 21 Yashpal NK, Li J, Wang R. Characterization of c-Kit and nestin expression during islet cell development in the prenatal and postnatal rat pancreas. *Dev Dyn* 2004; 229:813–825.

22. Yuan S, Rosenberg L, Paraskevas S, Agapitos D, Duguid WP. Transdifferentiation of human islets to pancreatic ductal cells in collagen matrix culture. *Differentiation* 1996; 61: 67–75.
23. Bonner-Weir S, Arun S. Pancreatic stem cell. *J Pathology* 2002; 197: 519-526.
24. Sharmann R. Control of early development of pancreas in rodents and humans: implications of signals from the mesenchyme. *Diabetologia* 2000; 43: 1083-1092.
25. Bouwens L, Braet F, Heimberg H: Identification of rat pancreatic duct cells by their expression of cytokeratins 7, 19, and 20 in vivo and after isolation and culture. *J Histochem Cytochem* 1995; 43:245–253.
26. Xin-Hua Ferg, Jeffrey BM, Xion Lin, F Charles Brunicardi, Schwartz's principles of surgery. Cell, Genomics and molecular surgery. McGraw-HILL 8th ed 2005: 14: 415-416.
27. Bonner-Weir S. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 2000; 24: 297-302.
28. Xu X, Kahan B, Forgianni A, Jing P, Jacobson L, Browning V, Treff N, Odorico J. Endoderm and pancreatic islet lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2006; 8: 96-107.
29. Jonsson J, Carisson L, Edlund T, Edlund H: Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371:606–609.
30. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat. Biotechnol* 2004; 22: 1115–1124.
31. Bonner-Weir S. β -cell turnover: its assessment and implications. *Diabetes* 2001; 50:20-24.
32. Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Scharzt DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000; 6:278-282.

33. Borner-Weir S, Taneja M, Weir GC, et al, In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7999-8004.
34. Cornelius JG, Tchernev V, Kao KJ, Peck AB: In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm Metab Res* 1997; 29:271–277.
35. Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 670–674.
36. Bouwens L, De Blay E. Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 947-951.
37. Bouwens L, Wang R-N, De Blay E, Pipeleers DG, Kloppel G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 1994; 43: 1279-1283.
38. Beattie GM, Levine FM, Mally MI, et al. Acid β -galactosidase a developmentally regulated marker of endocrine cell precursors in the human fetal pancreas. *J Clin End Met* 1994; 78: 1232-1240.
39. Jonsson J, Carlsson L, Edlund H. Insulin-promoter factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371: 606-609,
40. Offield MF, Jeton TL, Labosky P, et al. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996; 122: 983-985.
41. Titelman G, Alpert S, Polak JM, Martinez A, Hanahan D. Precursor cells of mouse endocrine pancreas coexpress insulin. *Development* 1993; 118: 1031-1039.

42. Pank K, Mukonoweshuro C, Wong GG. B-cell arise from glucose transporter type 2 (GLUT-2) expressing epithelial cell of the developing rat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9559-9563.
43. Rooman I, Heremans Y, Heimberg H, Bouwens L. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of PDX-1 in vitro. *Diabetologia* 2000; 43:907–914.
44. Pour PM, Pancreatic centroaciner cells. The regulator of both exocrine and endocrine function. *Int J Pancreatol* 1994; 15: 51-64.
45. Bouwens L, Klöppel G. Islet cell neogenesis in the pancreas. *Virchows Arc* 1996; 427: 553-560.
46. Bouwens L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet β -cell in the pancreas. *Diabetes* 2001; 12: 143-148.
47. Hormi K, Lehy T. Developmental expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor proteins in the human pancreas and digestive tract. *Cell Tissue Res* 1994; 278: 439-450.
48. Titelman G, Lee GK, Alpert S. Cell lineage analysis of pancreatic exocrin and endocrine cells. *Cell Tissue Res* 1987; 250: 435-439.
49. Oberg-Welsh C, Welsh M. Effects of certain growth factors on in vitro maturation of rat fetal islet-like structures. *Pancreas* 1996; 12: 334–339.
50. Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive kök hücre isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001; 50:521–533.
51. Ohisson H, Thor S, Edlung T. Novel insulin promoter and enhancer-binding protein that discriminate between pancreatic α and β cells. *Mol endocrinol* 1991; 5:897-904.

52. Miller CP, McGehee RE, Habener JF. IDX-1 a new hemeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islet and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J* 1994; 13: 1145-1156.
53. Jochen P, Anja P, Günter K. Ontogeny, differentiation and growth of the endocrine pancreas. *Virchows Arch* 2000; 436: 527-538.
54. Wang RN, Klöppel G, Bouwens L. Duct to islet cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct ligated adult rats. *Diabetologia* 1995; 40: 887-893.
55. Scharfmann R, Tazi A, Polak M, Kanaka C. Expression of functional nerve growth factor receptors in pancreatic β cell line and fetal rat islets in primary culture. *Diabetes* 1993; 42: 1829-1836.
56. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Müller B, Zulewski H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 341: 1135–1140.
57. Peters J, Jungensen A, Klöppel G. Ontogeny, differentiation and growth of the endocrine pancreas. *Virchows Arch* 2000; 436: 527- 538.
58. Madsen OD, Jensen J, Petersen HV, Pedersen EE, Oster A, Andersen FG, Jorgensen MC, Jensen PB: Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype. *Horm Metab Res* 1997; 29: 265–270.
59. Larsson LI, Rehfeld JF, Hakanson R, Sundler F. Pancreatic gastrin in foetal and neonatal rats. *Nature* 1976; 262: 609-610.
60. Benedic JP, Don FT, Christo JFM, Johannes M, Romeo RL. An immunocytochemical profile of the endocrine pancreas using an occlusive duct ligation model. *J Pancreas* 2000; 1: 191-203.
61. Tezel E. Pankreatik hücre diferansiasyonu: Klinik ve patolojik yönden kısa bir bakış. *Dializ, Transplantasyon ve Yanık* 2003; 14; 141-145.

62. Tokoro T, Tezel E, Nagasaka T, Kaneko T, Nakao A. Differentiation of acinar cells into acinoductular cells in regenerating rat pancreas. *Pancreatology* 2003; 3: 487-496.
63. Tezel E, Nagasaka T, Tezel G, Kaneko T, Takasawa S, Okamoto H, Nakao A. REG I as a marker for human pancreatic acinoductular cells. 2004; 51: 91-96.
64. Rosenberg L, Brown RA, Durguid RA. A new model for the development of duct epithelial hyperplasia and the initiation of nesidioblastosis. *J Surg Res* 1983; 35: 63-72.
65. Bouwens L. Cytokeratins and cell differentiation in the pancreas. *J Pathol.* 1998; 184: 234 – 239.
66. Stoffers DA, Thomas MK, Habener JF: Homeodomain protein IDX-1: a master regulator of pancreas development and insulin gene expression. *Trends Endocrinol Metab* 1997; 8:145–151.
67. Pour P. Islet cells as a component of pancreatic ductal neoplasms. Experimental study: Ductular cells, including islet cell precursors as primary pregenitor cells of tumors. *Am J Pathol* 1978; 90:295-316.
68. Soria B. In-vitro differentiation of pancreatic β cells. *Differentiation* 2001; 68: 205-219.
69. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R. Differentiation of embryonic stem cell to insulin secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292: 1389-1393.
70. Huang H, Tang X Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest* 2003; 83:539–547.
71. Katharina P, Roswitha P, Jinming L, Ganter KI, Rennan W. Expression of stem cell markers and transcription factors during the remodeling of the rat pancreas after duct ligation. *Virchows Arch* 2005; 446:56–63.

72. Matsuoka M, Osada T, Yashida-Matsuoka J, Ikal A. A comparative immunocytochemical study of development and regeneration of chemosensory neurons in the rat vomeronasal system. *Brain Res* 2002; 946: 52-63.
73. Shibuya S, Miyamoto O, Auer R, Itano T, Mori S. Embryonic intermediate filaments, nestin expression following traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuroscience* 2002; 114: 905-910.
74. Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271:116–119.
75. Lordon J, Roman I, Bouwens L. iNestin expression pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochem Cell Bio* 2002; 117:535-540.
76. Bonner-Weir S, Sharma A. Pancreatic stem cell. *J Pathol* 2002; 197: 519-526.
77. Selander L, Edinburg H. Nestin is expressed in mesenchyme and not epithelial cells of the developing mouse pancreas. *Mech Dev* 2002; 113: 189-192.
78. So-Yoon Kim, Seung-Hee Lee, Byeong-Moo Kim, Eun-Hom Kim, Bon-Hong Min, Bendayan M. Activation of nestin positive duct stem (NPDS) cell in pancreas upon neogenic motivation and possible cytodifferentiation into insulin secreting cells from NPDS cells. 2004: *Developmental Dynamics* 2004; 230: 1-11.
79. Zhang YQ, Zhang H, Maeshima A, Kurlhara H, Miyagawa J, Takaue T. Up regulation of the expression of activins in the pancreatic duct by reductions of the β cell mass. *Endocrinology* 2004; 143: 3540-3547.
80. Sanvito F, Herrera PL, Huarte J, Nichols A, Montesano R. TGF- β influences the relative development of the exocrine and endocrine pancreas in vivo. *Development* 1994; 120; 3451-3462.
81. Bocman DE, Black OJ, Mills JR, Webster PD. Origin of tubular complexes developing during induction of pancreatic adenocarcinoma by dimethylbenz[a]anthracene. *Am J Pathol* 1978; 90:645-51.

82. Parsa I, Langnecker DS, Scarpelli DG, Pour PE. Ductal metaplasia of human exocrine and its association with carcinoma. *Cancer Res* 1985;45: 1285-90.
83. Dreilling DA, Bordalo OR, Noronha M, Greenstein R: Update: big duct, little duct or toxic metabolic pathogenesis of pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1979; 71: 424-426.
84. Deliste RC, Grendell JH, Williams JA: Growing pancreatic acinar cells (postpancreatitis and fetal) express a ductal antigen. *Pancreas* 1990; 5: 381-388.
85. Weissman IL: Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000;100:157–168.