

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DIYABETİK RATLARDA ADACIK HÜCRE TRANSPLANTASYONUNDA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE AMNİYON MEMBRAN BİRLİKTELİĞİ

Meral TİRYAKİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Nurgül ATMACA

2015-KIRIKKALE

**DIYABETİK RATLARDA ADACIK HÜCRE TRANSPLANTASYONUNDA
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE AMNİYON MEMBRAN BİRLİKTELİĞİ**

Meral TİRYAKİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Nurgül ATMACA

Bu tez Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından 2014/123 numaralı projeyle ve Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Araştırma Laboratuvarı tarafından desteklenmiştir.

2015-KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29 / 05/ 2015

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Doç.Dr. Ebru ÇETİN
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Yrd.Doç.Dr Nurgül ATMACA
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	
İçindekiler	I
Önsöz	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	V
Şekiller	VII
Çizelgeler	VIII
ÖZET	IX
SUMMARY	XI
1.GİRİŞ	1
1.1. Pankreas	2
1.1.1. Anatomisi ve Embriyonik Gelişimi	2
1.1.2. Pankreasın Endokrin Özellikleri	2
1.1.3. Pankreas Beta Hücreleri	3
1.1.4. İnsülinin Salgılanması	4
1.1.5. İnsülin Reseptörü	5
1.1.6. Tip 1 Diyabet	5
1.1.7. Adacık Hücre Transplantasyon Bölgeleri	6
1.2. Mezenkimal Kök Hücre	7
1.2.1. Mezenkimal Kök Hücrenin Özellikleri	7
1.2.2. Mezenkimal Kök Hücrenin Karakterizasyonu	9
1.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonunda Flow Sitometri Kullanımı	9
1.2.3. Mezenkimal Kök Hücrenin Farklılaşma Potansiyeli	9
1.2.3.1. Mezenkimal Kök Hücre Adiposit Farklılaşması	10
1.2.3.2. Mezenkimal Kök Hücre Kondrosit Farklılaşması	10
1.2.3.3 Mezenkimal Kök Hücre Osteosit Farklılaşması	11
1.2.4. Mezenkimal Kök Hücre İmmünolojik Özellikleri	12

1.2.5. Mezenkimal Kök Hücre Kaynağına Göre Özellikleri	13
1.2.5.1. Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler (ASCs)	13
1.2.5.2. Kemik İliği Kökenli Kök Hücreler (BM-MSC)	13
1.2.5.3. Peridontal Ligament Kökenli Kök Hücreler (PDL-SCs)	13
1.2.5.4. Trabeküler Kemik Kökenli Kök Hücreler (TB-MSCs)	13
1.2.5.5. Sinoviyal Membran Kökenli Kök Hücreler (SM-MSCs)	14
1.2.5.6. Periosteum Kökenli Kök Hücreler (P-MSCs)	14
1.2.5.7. Kas Kökenli Kök Hücreler (M-MSCs)	14
1.2.5.8. Deri Kökenli Kök Hücreler (SSCs)	14
1.2.5.9. Warton Jeli Kökenli Kök Hücreler (WJ-MSCs)	14
1.2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin İn-Vitro Üretilmesi	15
1.2.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzlenmesi	15
1.2.8. Pankreas Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	17
1.3. Amnion Membran	18
1.3.1. Anatomisi ve Fizyolojisi	19
1.3.2. Amnion Membran Özellikleri	20
2.GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1.Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları	22
2.2 Yıkama, Floresan Boya, Stimülasyon ve Kültür Solüsyonlarının Hazırlanması ve İşlemleri	23
2.3. Amniyon Membran	24
2.4. Adacık Hücre İzolasyonu	24
2.5. Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Belirlenmesi	25
2.6. Adacık Hücrelerinin Kültüre Alınması	26
2.7. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	26
2.8. Gruplara Göre Ön Hazırlık İşlemleri	30
2.9. Sıçanların Diyabet Yapılması	32
2.10. Transplantasyon	33
2.11. Kan Şekeri Ölçümü	35

2.12. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi	35
2.13. İmmünohistokimyal Değerlendirme	36
2.14. Elisa	36
2.15. İstatistiksel Analiz	36
3.BULGULAR	37
3.1. Adacık Hücre Canlılıkları	37
3.2. Grupların Kan Şeker Bulguları	38
3.3. C-Peptit Testi	40
3.4. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi (IPGTT)	42
3.4. İmmunohistokimyasal Değerlendirme	43
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR	52
EKLER	62
ÖZGEÇMİŞ	63

ÖNSÖZ

Tezim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Nurgül ATMACA'ya ve Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU'na,

Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren Prof.Dr. Tuncay DELİBAŞI'na, Dr. Ferda PINARLI'ya, Doç. Dr. Aynur ALBAYRAK'a,

Tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkân sağlayan Adacell Laboratuvar ekibi arkadaşlarıma, Deney Hayvanları Ünitesi Laboratuvarı'na,

Her zaman yanımda olan canım arkadaşım Uz. Dr. Hülya AKDENİZ'e, tezim dönemimde manevi desteğini ve sabrını esirgemeyen eşim Feyzullah, çocuklarım Dilara, Mert ve Halit Efe'ye,

Bu dünyada var olma kaynağım canım anneme, babama ve canım abime,

Teşekkür Ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AM: Amniyon Membran

ASCs: Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler

BM_MSCs: Kemik İliği Kökenli Kök Hücreler

BrdU: 5-bromo-2'-deoksiüridin

DM: Diyabetes Mellitus

DMEM: Dulbecco's Modifed Eagle's Medium

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

FBS: Fetal Bowine Serum

FDA: Fluorescein Diacetate

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution

H-E: Hematoksilen-Eozin Boyama

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü

HKH: Hematopoetik Kök Hücreler

HPDMKH: Pankreastan Farklılaşan Mezenkimal Kök Hücreler

IBMX: İzobutilmetilksantin

IPGTT: İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi

KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü

KGFR: Keratinosit Büyüme Faktörü Reseptörü

M_ MSCs: Kas Kökenli Kök Hücreler

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

Pen-Strep-Amp. B: Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin B

PDL_SCs: Periodontal Ligament Kökenli Kök Hücreler

P_ MSCs: Periosteum Kökenli Kök Hücreler

PDGF: Plateletten Farklılaşan Büyüme Faktörü

PI: Propidium Iodide

PBS: Fosfat Buffer Saline

SM_ MSCs: Sinoviyal Membran Kökenli Kök Hücreler

SSEA4: Spesifik Embriyonik Antijen 4

SSSCs: Deri Kökenli Kök Hücreler

STZ: Streptozosin

TB_MSCs: Trabeküler Kemik Kökenli Kök Hücreler

TGF: Dönüştürücü Büyüme Faktörü

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

W.J_ MSCs: Warthon Jeli Kökenli Kök Hücreler

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Langerhans Adacıklarının Yapısı	3
Şekil 1.2. Pankreas Beta Hücrelerinden İnsülin Salgılanması	4
Şekil 1.3. Adacık Hücre Transplantasyonundaki Alternatif Bölgeler	6
Şekil 1.4. MKH'lerin Terapotik Etkileri ile İlişkili Biyolojik Özellikleri	8
Şekil 1.5. MKH Adiposit Farklılaşması Oil Red Boyaması	10
Şekil 1.6. MKH Kondrosit Farklılaşması	11
Şekil 1.7. MKH Osteosit Farklılaşması	12
Şekil 1.8. Pankreas Gelişim Yolağı ve Transkripsiyon Faktörleri	18
Şekil 1.9. Amniyon Membran Yapısının Şematik Şekli	20
Şekil 1.10. AM Özellikleri	21
Şekil 2.1. Pankreasa Kollajenaz Verilmesi	24
Şekil 2.2. Adacık Hücreden MKH Elde Edilmesinde 3.gün ve 1.pasaj	26
Şekil 2.3. Oil Red Boyama	27
Şekil 2.4. Von Kossa Boyama	28
Şekil 2.5. Alcian Blue Boyama	28
Şekil 2.6. Transplantasyon Öncesi 6'lı wellde AM ve AM+MKH Görüntüsü	31
Şekil 2.7. Omentuma Transplantasyon Görüntüsü	33
Şekil 3.1. AM+Adacık grubunda FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab'da hazırlanan program ile yapılan analizleri sonrası elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları canlılık sonuçları	37

Şekil 3.2. AM+Adacık+MKH grubunda FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab’da hazırlanan program ile yapılan analizleri sonrası elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları canlılık sonuçları	38
--	----

Şekil 3.3. AM+Adacık grubunda HE Boyama	44
---	----

Şekil 3.4. AM+Adacık grubunda İnsülin Boyaması	44
--	----

Şekil 3.5. AM+Adacık+MKH grubunda HE Boyama	45
---	----

Şekil 3.6. AM+Adacık+MKH) grubunda İnsülin Boyaması	45
---	----

Şekil 3.7. AM+Adacık grubunda İmmünohistokimyasal BrDU Boyama	46
---	----

Şekil 3.8. AM+Adacık+MKH grubunda İmmünohistokimyasal BrDU Boyama	46
---	----

GRAFİK:

Grafik 2.1. MKH’lerin Flow-sitometri Tanımlama Histogramları	30
--	----

Grafik 3.1. Grupların Kan Şekeri Ortalaması	40
---	----

Grafik3.2. Grupların c-Peptit Grafiği	41
---------------------------------------	----

Grafik 3.3. Grupların IPGTT Ortalamalarının Grafiği	43
---	----

TABLO:

Tablo 3.1. Çalışma Gruplarının Kan Şekeri Ortalamaları	39
--	----

Tablo 3.2. Çalışma Gruplarında Transplantasyon Öncesi ve Transplantasyon Sonrası C-Peptit Ortalamaları	41
--	----

Tablo 3.3. Çalışma Gruplarının IPGTT Kan Şekeri Ortalamaları	42
--	----

Diyabetik Ratlarda Adacık Hücre Transplantasyonunda Mezenkimal Kök Hücre ve Amniyon Membran Birlikteliği

ÖZET

Bu çalışmada adacık hücre transplantasyonlarında adacık hücrelerinin canlılığının uzun süre korunamaması, beslenememesi ve immün reaksiyonların gözlenmesi nedeniyle amniyon membranını doğal bir kılıf, mezenkimal kök hücreleri bu membrana destek veren bir katman yaparak adacık hücrelerinin daha korunaklı bir ortama transplantasyonunun yapılması amaçlandı.

Transplantasyonda 40 tane 3,5-4 aylık Wistar Albino erkek rat kullanıldı. Her bir grupta 8 rat olacak şekilde toplam 5 grup oluşturuldu. Bunlar; amniyon membran grubu (AM), amniyon membran+mezenkimal kök hücre grubu (AM+MKH), amniyon membran+adacık grubu (AM+Adacık), amniyon membran+adacık hücre +mezenkimal kök hücre grubu (AM+Adacık+MKH) ve kontrol grubu olarak düzenlendi. Ratlarda streptozotosin ile diyabet oluşturuldu. Transplantasyondan sonraki ilk üç gün, sonraki haftalarda ise haftada iki kez olmak üzere kan şekeri ölçümü yapıldı. Daha sonra 26. günde intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT) yapıldı. Transplantasyon öncesi ve sonrası c-peptid seviyelerine bakıldı. Çalışma 28. günde sonlandırıldı.

Yapılan çalışmada kan şekeri ortalamasında, AM+Adacık ve AM+Adacık +MKH grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH grubuna ait kan şekeri ortalamalarının kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi ($p<0,05$). AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarında transplantasyon öncesi ve sonrası c-peptid seviyeleri arasında istatistiksel fark bulundu ($p<0,05$). AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarındaki immünohistokimyasal boyamada insülin (+) hücrelerin varlığı gösterildi. Ayrıca AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH BrDU boyaması yapılarak BrDU (+) hücreler belirlendi.

Bu çalışmanın sonucunda; adacık ve adacık+MKH'nin AM içinde paketlenerek omentuma nakledilmesinin ratlarda adacık hücre canlılığı, işlevselliği ve fonksiyonelliğini koruduğu, kan şekerini düşürdüğü, c-peptid seviyesi üzerine etkili olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Amniyon membran, adacık hücre, c-peptit, mezenkimal kök hücre, rat.

Mesenchymal Stem Cell and Amnion Membrane Coupling at Islet Cell Transplantation to Diabetic Rats

SUMMARY

In this study, due to failing to keep vital the islet cells for long time, insufficient nutrition and the immune reaction against those cells in standard islet cell transplantation methods; it is aimed to transplant islet cells to more protective environment by using amnion membrane as a natural sheath and mesenchymal stem cells as a supportive layer to this sheath.

Forty adult (3.5-4 months) male Wistar albino rats were used in transplantation. Five groups are formed that each group contains eight rats. Groups were formed as; amnion membrane group (AM), amnion membrane+mesenchymal stem cell group (AM+MKH), amnion membrane+islet cell group (AM+ISLET), amnion membrane+ islet cell+mesenchymal stem cell group (AM+ISLET+MSC) and control group. Diabetes was induced by streptozotocin in rats. Blood glucose levels were measured every day during first three days and then twice in following weeks. On 26th day, intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed. C-peptide levels were checked before and after transplantation. The study was ended on 28th day.

According to results in this study, blood sugar levels of AM + Islet and AM+ Islet + MSC groups were not significantly different but when comparing control, there was a significant difference ($p<0.05$). When comparing c-peptide levels before and after transplantation, there was a significant difference between AM + Islet and AM + Islet + MSC groups. Insulin (+) cells were showed in both AM + Islet and AM + Islet + MSC groups immunohistochemically. Additionally BrDU (+) cells were showed in AM + Islet and AM + Islet + MSC groups with BrDU staining.

As a result of this study we showed that, transplanting of islet cells only and islet + MSCs to omentum region as pocketed with amnion membrane kept islet cell

vitality and function in a normal degree, provided decrease in blood glucose levels and affected c-peptide levels of the rats.

Keywords: Amnion membrane, islet cell, c-peptide, mesenchymal stem cell, rat.

1. GİRİŞ

Tip 1 diyabet pankreastaki insülin salgılayan beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ile oluşan bir hastalıktır. Hastaların eksojen insülin tedavisi ile kan şekerleri normal seviyede tutulmaya çalışılmaktadır (DCCT, 1993; Domínguez-Bendala ve ark., 2012). Klinik çalışmalarda allojenik adacık hücre transplantasyonları alternatif bir tedavi olarak uygulanmaya başlanmıştır (Hou ve ark., 2008). Adacık hücre naklinde adacık greftinin beslenememesi, immünsüpresif tedavinin devam etmesi, beta hücre fonksiyonlarının zarar görmesi, yeterli donörün olmaması gibi sorunlar karşımıza çıkmaktadır. Adacık hücreler mezenkimal kök hücre ile birlikte transplante edildiğinde beta hücre kitlesinin korunması ve fonksiyonun sürdürülmesinde önemli rol oynarlar (Davis ve ark., 2012).

Mezenkimal kök hücreler anti-inflamatuvar, anti-proliferatif, anjiojenik ve immün modülatör olarak fonksiyon görebilmekte ve organ transplantasyonlarında immün cevabı inhibe etmektedirler (Li ve ark., 2012). Mezenkimal kök hücrenin adacık hücre ile birlikteliğindeki transplantasyonda mezenkimal kök hücrelerin çeşitli büyüme hormonları salgıladığı, immünmodülatör olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücre ve adacık hücre birlikteliğinin beta hücre apoptozisini ve proinflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığı, beta hücre proliferasyonunu artırdığı, antijen sunan hücrelerin ve T hücrelerin aktivasyonunu inhibe ettiği ve CD25+, Foxp3+ ve regülatör T hücre sayısını artırdığı gösterilmiştir (Mundra ve ark., 2013).

Amniyon membranının (AM) saydam olması, inflamasyonda koruyucu olması, skar oluşumunu engellemesi, düşük immünolojik özellikler göstermesi ve yara iyileşmesinde rol oynaması gibi özellikleri rejeneratif tıpta kullanılmasına izin vermektedir (Rennie ve ark., 2012). Adacık hücre ve insan amniyon membranı ile yapılan bir çalışmada rejeksiyon açısından değerlendirildiğinde amniyon membranının lenfositik bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Maldonato ve ark., 1985).

Bu çalışmada adacık hücre transplantasyonunun başarısını artırabilmek ve beta hücre canlılığını daha uzun süre devam ettirebilmek için amniyon membran ve mezenkimal kök hücrelerin olumlu özelliklerinden faydalanılması amaçlandı.

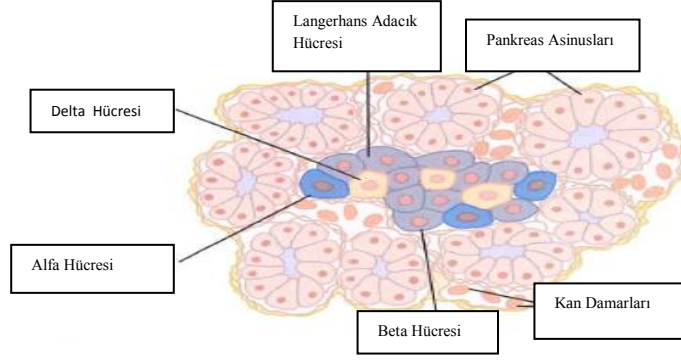
1.1. PANKREAS

1.1.1. Anatomisi ve Embriyolojik Gelişimi

Pankreas, lomber 2-3 hizasında yer alan 15 cm uzunluğunda, 60-140 gram ağırlığında bir organdır. Baş, uncinata process, boyun, gövde ve kuyruk olmak üzere beş bölümden oluşur. Embriyolojik olarak duodenumun dorsal ve ventral tarafından gelişen iki endodermal tomurcuktan oluşur. Bu iki tomurcuk büyür, kaynaşır, endokrin ve ekzokrin hücrelerden oluşan pankreası oluşturur (Edlund, 2002; Zaret, 2008). Pankreas iki bölüme ayrılır. Asini bölümü, sindirim enzimlerinin yapımından ve salımından sorumlu olup diğer bölümü ise Langerhans adacıkları denilen endokrin hücrelerinin oluşturduğu bölümdür. Langerhans adacık hücreleri glukoz metabolizmasında önemli rol oynayan insülin ve glukagon hormonlarını salgılar (Noyan, 2004).

1.1.2 Pankreasın Endokrin Özellikleri:

Pankreasın endokrin kısmını pankreas kütlesinin % 1-2'sini endokrin salgı yapan adacık hücreleri oluşturmaktadır. Adacık hücreleri çeşitli tipte hücreler içermektedir. Alfa (%15-20) hücreleri glukagon, beta (%65-80) hücreleri insülin, delta (%3-10) hücreleri somatostatin, F (%3-5) pankreatik polipeptid ve epsilon (%<1) hücreleri de ghrelin salgılamaktadır. Pankreasın ekzokrin kısmı ise sindirim enzimlerinin in-aktif formlarının sentezlendiği, depolandığı ve salgılandığı asiner hücrelerden oluşan kısımdır. Salgılarını epitelyal kanallarla duodenuma verir. Pankreatik stellat hücreleri de bulunmaktadır. Bu hücreler de peri-asiner ve periduktal bölgelerde bulunmaktadır. Stoplazmalarında lipid damlacıkları bulunmakta ve vitamin A içermektedir (Charrier ve ark., 2013).



Şekil 1.1: Langerhans Adacıklarının Yapısı (Guyton ve Hall, 2013).

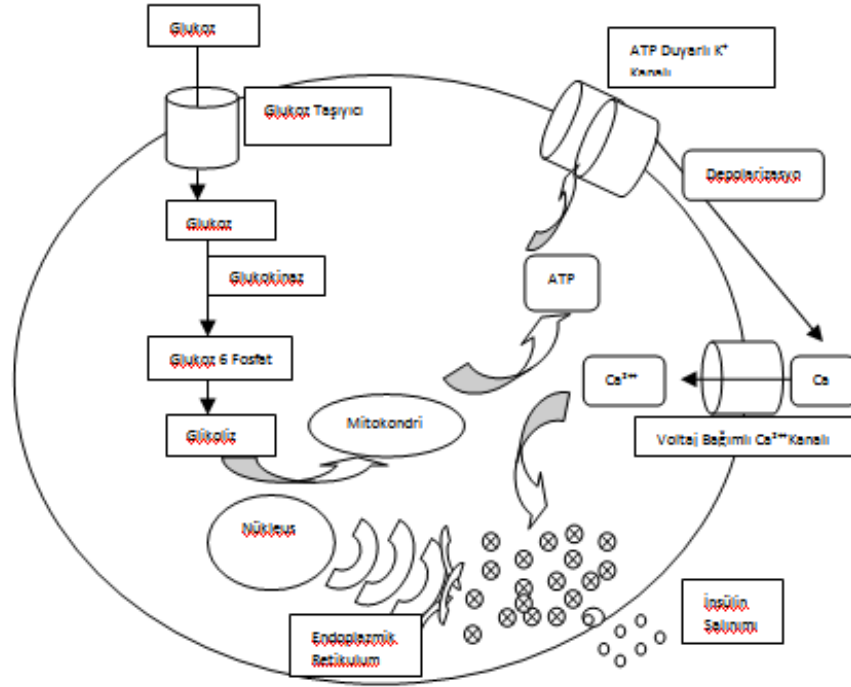
1.1.3. Pankreas Beta Hücreleri

Beta hücrelerinden insülin hormonu salgılanır. İnsülin molekülü bir polipeptiddir. 21 aminoasit içeren A zinciri, 30 aminoasit içeren B zinciri disülfid bağı ile birbirine bağlanır. İnsülin monomerleri iki çinko atomuyla bir kristalinli heksamerik ünite oluşturur (Berne ve ark., 2008).

İnsülinin etkileri;

1. İnsülin hücrelere glukoz girişini artırır,
2. Karaciğerde glikojen sentezini artırır,
3. Aminoasitlerden glukoz yapımını azaltır,
4. Serbest yağ asitlerini kandan alarak trigliserid halinde depo edilmesini artırır (Noyan, 2004).

1.1.4. İnsülin Salgılanması



Şekil 1.2: Pankreas Beta Hücrelerinden İnsülin Salgılanması (Leon ve ark., 2007).

Spesifik bir taşıyıcı olan Glut-2 beta hücrelerine glukozun geçişini kolaylaştırmaktadır. Hücre içine giren glukoz, glukokinaz ile glukoz 6 fosfata dönüşür. Adacıklardaki glukoz kullanımının ilk ve hız kısıtlayıcı basamağıdır. Glikolizis sonucunda piruvat oluşmaktadır. Glukozun oksidasyonu, intrasellüler ATP konsantrasyonu, ATP/ADP oranı, NADH-NADPH ve H^+ konsantrasyonunun artmasına neden olur. ATP duyarlı K^+ kanalı kapandığında beta hücresinden K^+ sızıntısı baskılanır ve hücre depolarize olur. Bu durumda voltaj ayarlı Ca^{++} kanalı açılır ve intra-sellüler Ca^{++} konsantrasyonu artar. Artan Ca^{++} konsantrasyonu mikrotübüller boyunca salgı granülünün hareketini sağlar. Salgı vezikülüne bağlı olan G protein (GTPaz) bazal plazma membran proteinleri ile etkileşir. Bu etkileşim sayesinde granülün membran kaynaşması oluşur. Ekzositozla insülin heksomerik olarak salgılanır. Portal vende insülin dimerlerine ve biyolojik aktif monomerlerine ayrışır (Berne ve ark., 2008).

1.1.5 İnsülin Reseptörü

İnsülin hücre membranında bulunan özgül reseptörüne bağlanarak etki gösterir. İki alfa, 2 beta zincirinden yapılmıştır. Her iki ünite de gliko-proteinden yapılmıştır. Alfa zinciri insülini bağlayan bölge, beta alt zinciri ise trozinkinaz aktivitesine sahiptir (Noyan, 2004). Alfa bölgesine insülin bağlanmadığında trozinkinaz inaktif haldedir. Tek bir molekül insülin alfa ünitesine bağlandığında trozinkinaz aktif hale geçer ve fosforillenme oluşur. Aktif olan insülin reseptör substrat (IRS) fosforile olur. İnsülin reseptör substratlar fosforile olduklarında plazma membranı glukoz transport proteinlerin taşınması, glukoz ve yağ asit metabolizmasındaki enzimlerin aktivasyonu veya deaktivasyonuna, hedef hücre nükleusunda genlerin baskılanması veya transkribe edilmesine neden olur (Berne ve ark., 2008).

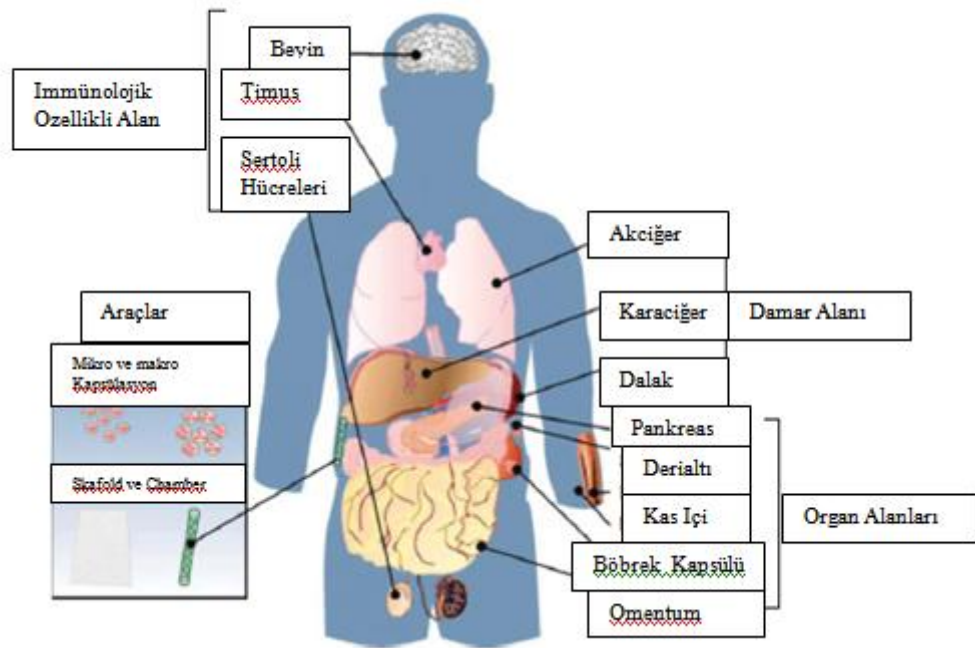
1.1.6. Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabet otoimmün bir hastalık olup her yıl giderek artmaktadır. Dünyada 347 milyonun üzerinde diyabetes mellitus (DM)'lu hasta bulunmaktadır. Yüksek yağlı diyet uygulaması, yüksek şekerli yiyeceklerin kullanılması ve hareketsiz yaşam şeklinin artması ile DM hastalığının görülme sıklığının artacağı bildirilmektedir. Diyabet ve komplikasyonları dünya ekonomisinde yıllık 100.000.000 dolarlık bir bütçeye neden olmaktadır (Paek ve ark., 2014).

Tip1 DM pankreas adacık hücrelerindeki insülin salgılayan beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ile oluşan bir hastalıktır. Beta hücrelerinin kaybı insülin seviyesinde yetersizliğe ve glisemik kontrolün kötüleşmesine neden olmaktadır. Mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla ilişkili olarak mortalite ve morbititeye neden olmaktadır (Pileggi ve ark., 2001; Hematti ve ark., 2013). Kronik hiperglisemi çeşitli organlarda hasar, fonksiyonlarında değişiklik oluşturmaktadır. Örneğin; nefropati, retinopati, kardiyo vasküler semptomlar, seksüel bozukluklar

(Pileggi ve ark., 2001; Couri ve ark., 2006; Katuchova ve ark., 2012; Paek ve ark., 2014). Beta hücrelerinin otoimmün yıkımı genetik yatkınlık ve çevresel faktörler ile ilişkilidir. Klinik belirtiler otoimmün diyabette % 60-80 beta hücre kaybından sonra teşhis edilebilmektedir. İleriki evrelerde plazmada C-peptit seviyesi belirlenememekte ve insülin salgılanması ya çok az ya da hiç gerçekleşmemektedir. Beta hücrelerinden insülin salgılanırken C-peptit de salgılanır. C-peptit insülinin endojen olarak üretildiğinin bir belirtisi olması nedeniyle beta hücre kitlesi hakkında bilgi verir (Couri ve ark., 2006).

1.1.7. Adacık Hücre Transplantasyon Bölgeleri



Şekil 1.3: Adacık Hücre Transplantasyonundaki Alternatif Bölgeler (McCall ve Shapiro ark., 2012).

Lancy (1973) tarafından diyabetik rat modelinde ilk kez karaciğere adacık hücre transplantasyonu yapılmıştır. 1980'deki klinik çalışmada insan adacık hücre ototransplantasyonu karaciğere uygulanmıştır. Klinik uygulamalarda 1990'dan itibaren ise karaciğerde portal vene transplantasyon yapılmaya başlanmıştır.

Karaciğer, pankreas, kas, omentum, kemik iliği, gastrik submukoza, gastro intestinal bölge, böbrek kapsülü, göz, testis ve timus transplantasyonun yapılabildiği bölgelerdir (Cantarelli ve ark., 2011). Böbrek kapsülü, karaciğer, omentum ve kasa adacık hücre nakli yapılabilmekte ve operasyonun uygulanabilirliği, implantasyonun etkinliği ve glukoz üzerindeki düzenleyici etkisine göre bu bölgeler avantaj sağlamaktadır (Kim ve ark., 2010).

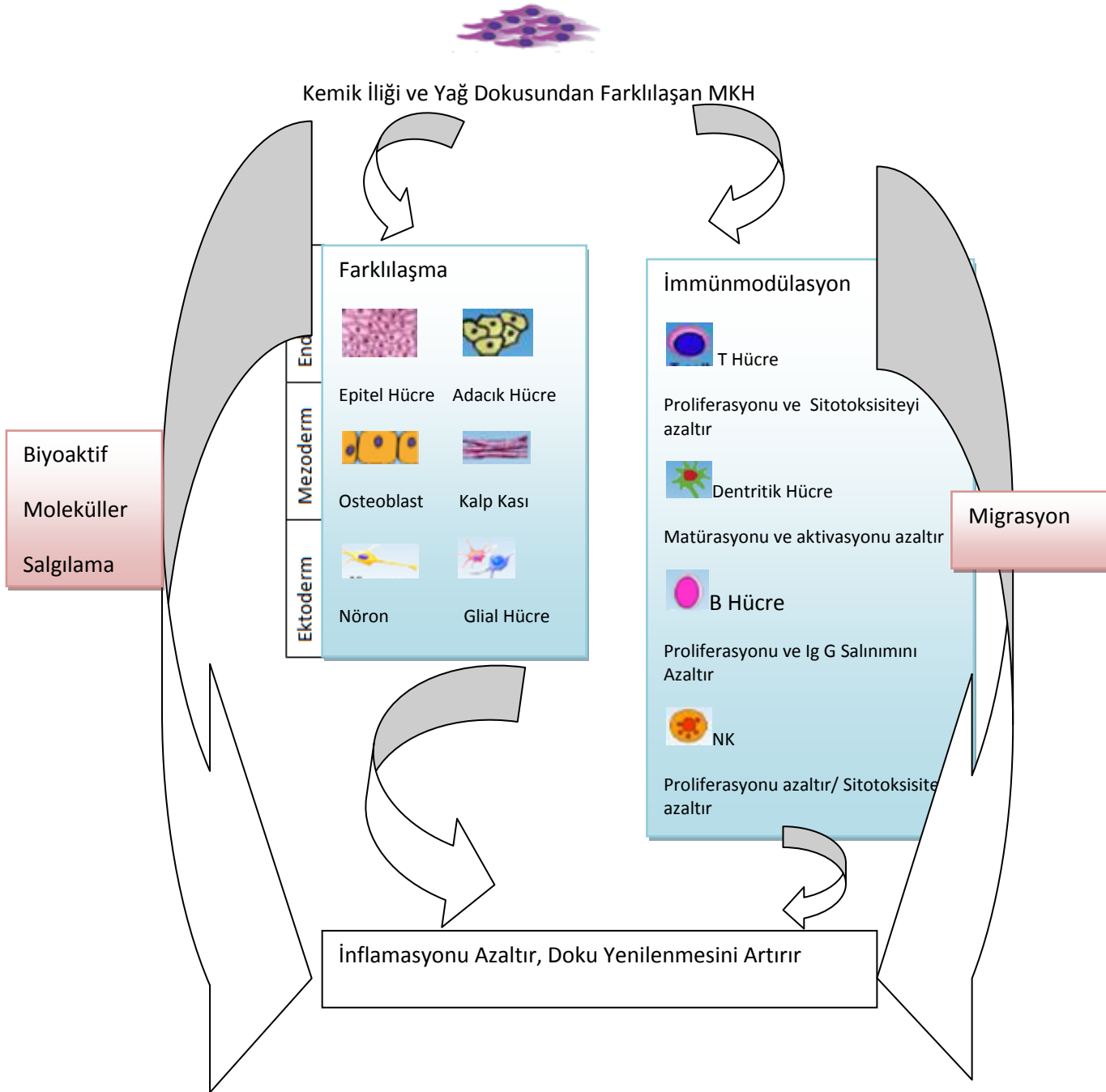
1.2. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE

1.2.1. Mezenkimal Kök Hücre Özellikleri

Mezenkimal kök hücreler (MKH) bağ dokunun ana hücreleri olup yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi farklı hücrelere dönüşebilmektedirler. Plastik yüzeye yapışması, stromal karakterindeki yüzey antijenlerini taşıması ve multipotent farklılaşma kapasitesine sahip olması nedeniyle mezenkimal kök hücre denilmektedir (Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011; Kim ve ark., 2012; Baer ve Geiger, 2012). Mezenkimal kök hücreler adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma göstermektedirler (Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012; Li ve ark., 2012). En çok kemik iliğinde bulunurlar. Bunun yanında yağ dokusunda, kas dokusunda, kordon kanında, amnion sıvısında, deride, diş pulpasında, retinada, korneada, sinir sisteminde ve böbreklerde de bulunmaktadır (Bassi ve ark., 2011; Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011). Son yapılan bir çalışmada ise adenoid dokusundan da MKH elde edilmiştir (Lee ve ark., 2013). Mezenkimal kök hücrelerin plastik kültür kaplarına yapışıp orada çoğalması, fibroblast benzeri şekle sahip olması, yüzey antijenleri içermesi kökenine göre farklı olmazken farklılaşma potansiyeli ve işlevlerine göre farklı olabilmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin hasarlı doku tarafından salgılanan sitokinlere doğru hareket etme ve immünmodülatör, antiapoptotik, antiinflamatuvar ve angiogenik rol oynamaları gibi önemli özellikleri vardır (Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011; Li ve ark., 2012; Li ve ark., 2014). Aynı zamanda MKH'ler doku hasarının tamirinde ve dokunun yenilenmesinde de önemli roller üstlenmiştir (Ra ve ark., 2011).

MKH'ler hasarlanmış dokuya doğru göç edebilir, farklı hücre tiplerine dönüşebilir, salgıladığı biyoaktif moleküller ile inflamasyonu engelleyebilir, hasarlı dokunun iyileşmesini destekler ve immünmodülatör olarak rol oynayabilir (Wang ve ark., 2012).



Şekil 1.4: MKH'lerin Terapötik Etkileri ile İlişkili Biyolojik Özellikleri (Wang ve ark., 2012).

1.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücreler çeşitli kaynaklardan elde edilmektedir. Kemik iliği, kord kanı, diş pulpası, yağ dokusu, akciğerler, plasenta, tendon, sinoviyal sıvı ve fetal karaciğer belli başlı kaynaklardır. Mezenkimal kök hücrelerin yüzey markerları CD105, CD73, CD90 pozitif iken, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α ve CD19 negatiftir (Mafi ve ark., 2011; Davis ve ark., 2012; Li ve ark., 2012).

1.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonunda Flow-Sitometri Kullanımı

Flow-sitometri; süspansiyon haline getirilmiş olan hücrelerin yüzey veya hücre içi yerleşimli antijenik yapılarının işaretlenerek sayımının yapılması, biyofiziksel ve biyokimyasal özellikleri ile değerlendirilmesini sağlar. Flow-sitometri immün fenotiplendirmede, DNA analizinde, apoptoziste, hücre içi sitokinlerin ve diğer moleküllerin tanımlanmasında, RNA ve protein içeriğinin analizinde kullanılmaktadır.

Flow sitometri süspansiyon halindeki hücrelerin MKH olup olmadığını belirlemede rol oynar. Flow sitometri ile monoklonal antikorlar kullanılarak kök hücrelerin karakterizasyonu belirlenir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

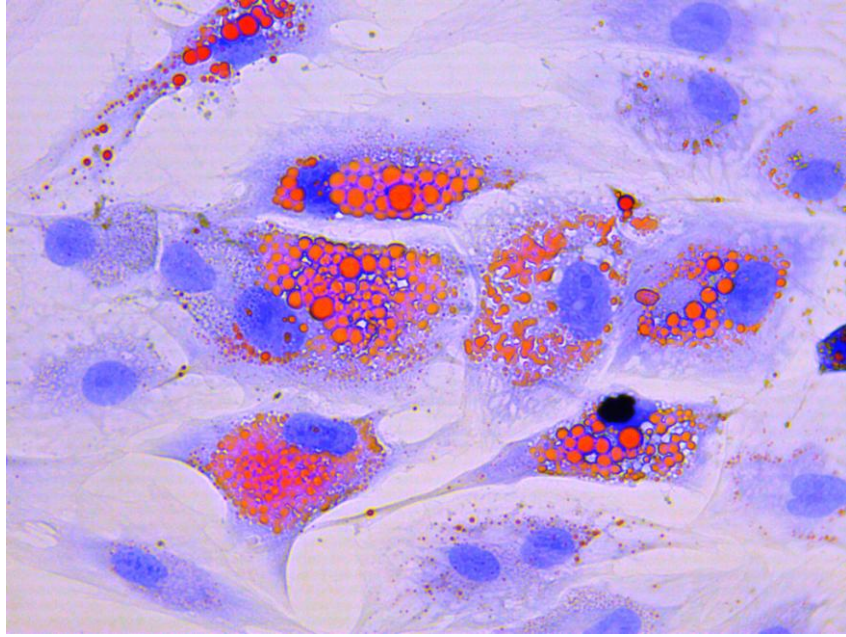
1.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyeli

Plastisite bir hücrenin köken aldığı dokudan başka bir dokuya farklılaşabilme özelliğidir (Şahin ve ark., 2005). Mezenkimal kök hücrelerin in-vivo ve in-vitro olarak farklı dokulara dönüşebildiği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin rejenerasyon, anti-apoptotik, anjiojenik, anti-inflamatuvar, natriüretik gibi özellikleri vardır. Böylelikle zarar görmüş dokulardaki hücrelerin fonksiyonlarını tekrar kazanmasına neden olabilir, o bölgenin kanlanmasını artırabilir, anti-

inflamatuvar sitokinler salgılayarak immüniteyi ve serebral ödemi azaltabilirler (Karaöz ve Ovalı, 2004; Davis ve ark., 2012).

1.2.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Adiposit Farklılaşması

MKH'ler adiposit hücrelerine farklılaşabilme potansiyeline sahiptir. %10 fetal koyun serumu, %1 antibiyotik, 0.5 mM isobutilmetilksantin (IBMX), 1 mM dexamethasone ve 0.2 mM indometasin ve Minimum Essential Medyumu ile farklılaşma medyumu hazırlanır. Kültürdeki hücrelere iki günde bir besiyeri değişikliği yapılarak farklılaşma medyumu kullanılır. Sekiz gün sonra adiposit hücreler görülmeye başlar ve oil red boyası ile boyama yapılarak adiposit hücreler belirlenir (Higuchi ve ark., 2013).

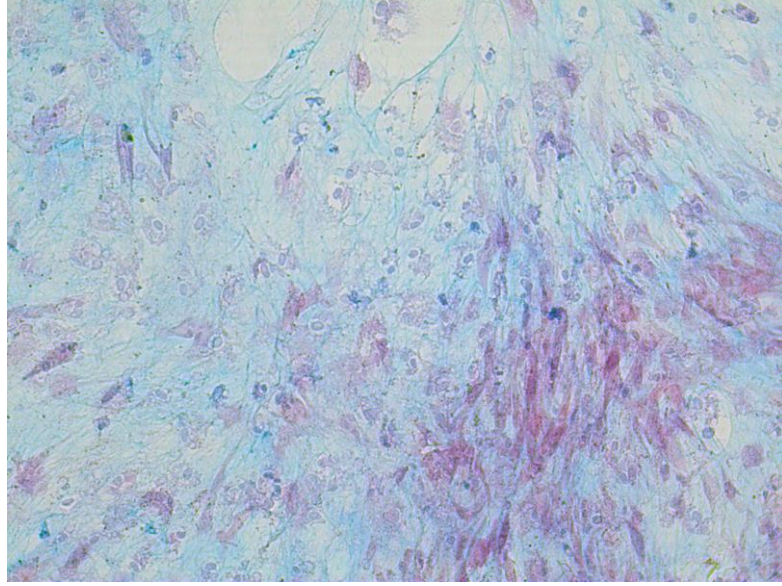


Şekil 1.5: Mezenkimal Kök Hücrenin Adiposit Farklılaşması (Welter ve ark., 2012).

1.2.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kondrosit Farklılaşması

Kondrosit farklılaşma medyumu 10 nM desametazon, 10 ng/ml TGF- β 3, 50mg/ml askorbik asit, 50 mg/ml ITS + Premix ve Dulbecco's Modifed Eagle's Mediumdan yüksek glikozdan oluşan besiyeri ile 2-3 günde bir besiyeri değişimi

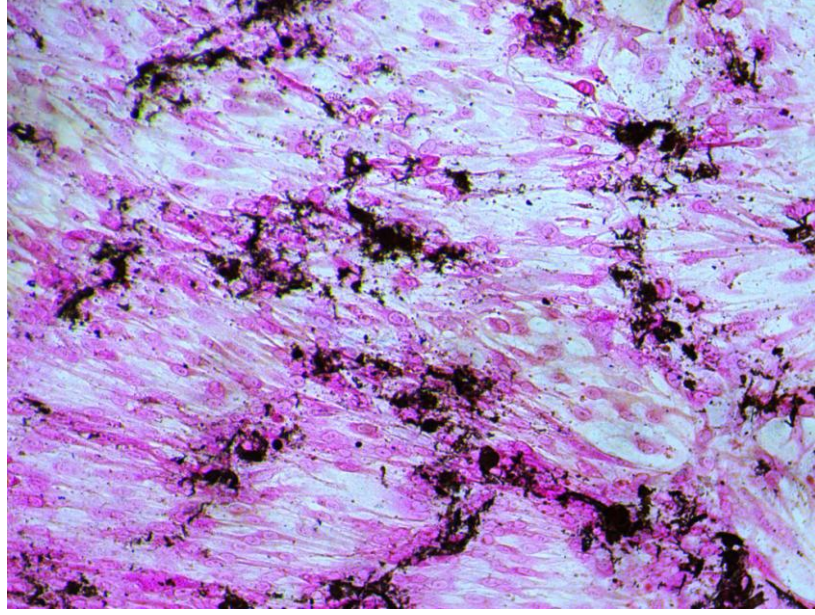
yapılır. Kondrosit boyaması alcian blue ile yapılır (Kılıç ve ark., 2007). Ekstrasellüler matrikste glikozaminoglikanların biyosentezi gerçekleşir. Kondroadherin, Tip 11 kollajen, kartilaj oligomerik matriks proteini, decorin ve agreganlar ekstrasellüler matrikste görülür (Barry ve Murphy, 2004).



Şekil 1.6: Mezenkimal Kök Hücre Kondrosit Farklılaşması (Pittenger ve ark., 2013).

1.2.3.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteosit Farklılaşması

Osteosit farklılaşması için %10 fetal koyun serumu, %10 at serumu, %1 antibiyotik, 100 nM dexametazon, 0,45mM isobutylmetilksantin, 3 µg/mL insülin, 1 µM Roziglitazon ve Dulbecco's Modifed Eagle's Mediumdan oluşan besiyeri ile üç günde bir değişiklik yapılır. Alkalen Fosfataz ile boyama yapılarak osteosit hücreler boyanır (Al-Nbaheen ve ark., 2013). Osteosit farklılaşmasında ekstrasellüler matrikste kalsiyumdan zengin mineralizasyon ve artmış alkalen fosfataz aktivitesi görülür (Barry ve Murphy, 2004). Ayrıca osteokalsin, osteopontin, kollajen-1alfa-1 aktivitesi de görülür (Corn ve ark., 2013).



Şekil 1.7: Mezenkimal Kök Hücre Osteosit Farklılaşması (Capitelli ve ark., 2014).

1.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünolojik Özellikleri

Mezenkimal kök hücreler sitokin ve kimyasal çekiciler yardımıyla inflamatuvar bölgesine doğru hareket edip orada anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik olarak rol oynar (Karaöz ve Ovalı, 2004). Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin yanı sıra parakrin etkilerinin olması, büyüme faktörü ve sitokin salgılaması, antifibrotik ve damarlanmada rol oynaması önemlidir (Ghannam ve ark., 2010).

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımında immünolojik etkileri önemlidir. Mezenkimal kök hücrelerler HLA-DR ve ko-stimülatör moleküllerini bulundurmaz. Bu nedenle klinik kullanımda alıcının immün sisteminde sorun ortaya çıkarmazlar. Mezenkimal kök hücrelerin en önemli özelliklerinden biri de immünsüpresif olmaları, bağışıklık sistemini engelleyici etki göstermeleridir. Mezenkimal kök hücreler dentritik hücre ve makrofajlar yoluyla anti-inflamatuvar özellik de göstermektedirler. Bu özelliğinde MKH'lerden salınan TGF- β , hepatosit büyüme faktörü (HGF), indolamin 2,3 dioksijenaz ve prostaglandin E'nin rol oynadığı bilinmektedir (Yalvaç, 2011). Mezenkimal kök hücrelerin B hücre

proliferasyonunu, farklılaşmasını ve antikor salgılamasını hem in-vitro hem de in-vivo olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2012).

1.2.5. Mezenkimal Kök Hücrenin Kaynağına Göre Özellikleri

1.2.5.1. Yağ Doku Kökenli Kök Hücreler (ASCs)

Bir gram adipoz dokusunda yaklaşık 5 bin kök hücre bulunmaktadır. Adiposit kökenli kök hücreler CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2, SH3 ve STRO-1 yüzey belirteçlerini eksprese ederken, CD14, CD16, CD31, CD34, CD45, CD56, CD61,CD62E, CD104 ve CD106 yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.2. Kemik İliği Kökenli Kök Hücreler (BM_MSCs)

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin CD14, CD34, CD45 yüzey belirteçlerini eksprese etmezlerken, CD44, CD105, CD166, CD28, CD33, CD13, STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD146, Octamer-4 (Oct4) ve evre spesifik embriyonik antijen-4 (SSEA4) eksprese ederler (Akiyama ve ark., 2012; Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.3 Periodontal Ligament Kökenli Kök Hücreler (PDL-SCs)

Periodontal ligament kökenli mezenkimal kök hücreler CD13,CD29, CD44, CD59, CD90 ve CD105 eksprese ederler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.4. Trabeküler Kemik Kökenli Kök Hücreler (TB-MSCs)

Trabeküler kemik kökenli mezenkimal kök hücreler CD73, STRO-1, CD105 yüzey belirteçlerini eksprese ederken CD34, CD45, CD144 yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.5. Sinovial Membran Kökenli Kök Hücreler (SM-MSCs)

Sinovial membran kökenli mezenkimal kök hücreler CD34, CD45, CD31, CD14 yüzey belirteçlerini eksprese etmezlerken CD44, CD73, CD90, CD105 yüzey belirteçlerini eksprese ederler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.6. Periosteum Kökenli Kök Hücreler (P-MSCs)

Periosteum kökenli mezenkimal kök hücreler CD11 ve CD45'i eksprese etmezlerken CD90'ı eksprese ederler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.7. Kas Kökenli Kök Hücreler (M-MSCs)

Kas kökenli mezenkimal kök hücreler CD34, Sca1 yüzey belirteçlerini eksprese ederken CD45 ve c-Kit yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.8. Deri Kök Hücreleri (SSSCs)

Deri kökenli mezenkimal kök hücreler CD105, CD90, CD73, CD29, CD13 ve CD44 yüzey belirteçlerini eksprese ederken CD45, CD34, CD31, CD14 ve HLA-DR yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.5.9. Warton Jeli Kökenli Kök Hücreler (WJ-MSCs)

CD105, CD73 ve CD90 yüzey belirteçlerini eksprese ederken CD45, CD34, CD14, CD19 ve HLA-DR yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (Orbay ve ark., 2012).

1.2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerinin İn-Vitro Üretilmesi

MKH'ler izole edildikten sonra plastik kültür kabının tabanına yapışırlar. Çoğalan hücreler % 0.25 tripsin-EDTA ile kaldırılarak yeni plastik kaplara alınır. Üç günde bir besiyeri değiştirilir. İstenilen sayıya ulaşınca kadar çoğaltma işlemi devam eder. Her bir pasajda hücrelerde sitogenetik bozukluklar, telomer kısalması gibi durumlarla karşılaşılabilirdiği için pasaj sayısı genelde üç olarak belirlenir (Matur ve Solmaz, 2011). Kemik iliğinden mezenkimal kök hücre izolasyonunda, heparinize olarak elde edilmiş kemik iliği fikol ile gradient yöntemi ile santrifüj edilir. Elde edilen hücreler 2×10^3 hücre/cm² olacak şekilde ekilir. Buna pasaj 0 (P0) denir. Hücreler 37 °C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyona alınır. Kırksekiz saat sonra yapışmayan hücreler uzaklaştırılıp Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), %10 fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 250 µg/ml fungizon içeren besiyeri eklenir. Bunu takiben 3-4 günde bir besiyeri değiştirilir. Hücreler kültür kabında 70-80% doluluğa ulaşınca pasaj işlemi tekrarlanır (Foudah ve ark., 2013).

1.2.7. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzlenmesi

Mezenkimal kök hücreler immünsüpresif ve farklılaşma potansiyeli nedeniyle hücresel tedavilerde daha çok tercih edilmektedir. Klinikte MKH kullanılmasının tercih nedenleri şunlardır:

- Yüksek farklılaşma potansiyelleri: endodermal, mezodermal ve ektodermal germ tabakalarına, yani üç germ tabakasına da farklılaşabilme potansiyelinin bulunması,
- Stromal kökenli olmaları nedeniyle tüm doku hücrelerine destek hücre olabilme yeteneği, fonksiyon ve gelişimsel olarak katkıda bulunması,
- İmmünsüpresif ve immünojenitesinin düşük olması nedeniyle doku uyumunun aranmaması,
- Migrasyon özelliği ile hasarlı dokuya hareket etmesi,
- Gen tedavi uygulamaları için uygun olması (transfer kolaylığı, hızlı çoğalma potansiyeli ve dayanıklılığı),

- Füzyon özelliğinin bulunması,
- Kemokinler, büyüme faktörleri ve sitokin salınımı ile hücre veya dokuda destek hücre olarak oranın yapabilme yeteneği (Koç ve ark., 2002; Barry ve Murphy, 2004; Kassem ve ark., 2004; Wynn ve ark., 2004; Müller ve ark., 2006; Ringden ve ark., 2006; Uçkan, 2007; Ball ve ark., 2008; Caplan, 2008).

Mezenkimal kök hücreler klinik kullanımda avantajlı görünseler de bazı teknik nedenlerden dolayı dezavantajları da vardır.

- Sayılarının az olması nedeniyle in-vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir.
- İn-vitro kültür ortamlarında kullanılan malzemeler ve uzun süreli kültür çalışmalarının yarattığı dezavantajlar
- Tekrarlayan transplantasyonlarda direkt dokuya hücreleri vermenin gerektiği durumlarda özel yöntemlerin kullanılmasına ihtiyaç duyulması (Uçkan, 2007; Caplan, 2008).

Klinikte MKH'lerin kullanım alanları şunlardır:

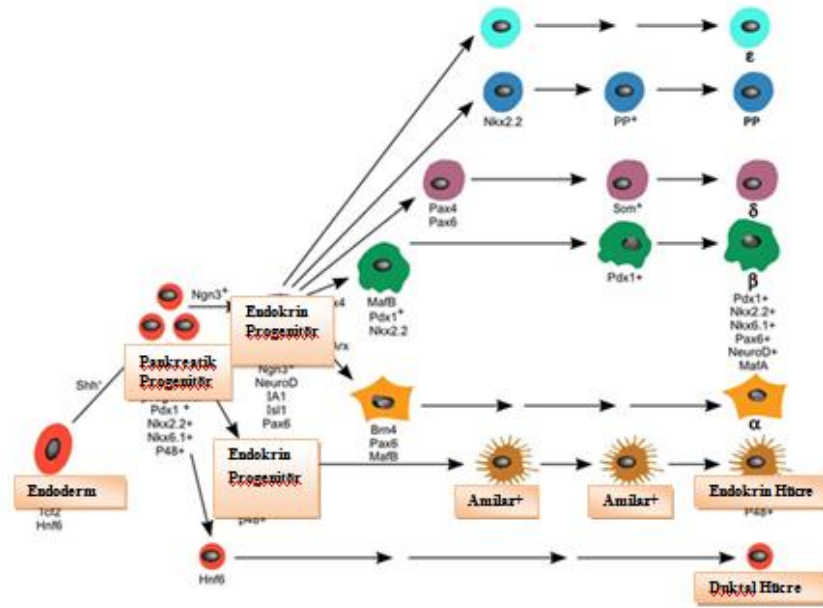
- Organ ve doku tamiri: Mezenkimal kök hücrelerin hayvan çalışmalarında kullanıldığı çok çeşitli organ hasarı ve hastalık modeli vardır (Orlic ve ark., 2001; Tomita ve ark., 2002; Chen ve ark., 2003; Castenheira ve ark., 2008).
- Organ ve doku nakli: İmmüsupresif etkisi ve stromal destek sağlaması nedeniyle organ ve doku nakillerinde sıkça kullanılmaya başlanmış, allojenik transplantasyonlarda Graft Versus Host Hastalığı'nda iyi sonuçlar alınmıştır (Rybkave ark., 1995; LeBlanc ve ark., 2004; Le Blanc ve Ringdén, 2005; Uçkan, 2007).
- Organ-doku nakilleri ve tamirinde birlikte kullanımı: Çeşitli metabolik hastalıklarda kemik iliği nakli ile birlikte mezenkimal kök hücre nakilleri denenmiştir (Koç ve ark. 2002, Uçkan 2007).
- Otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanım: İmmüsupresif etkisi nedeniyle kullanılabileceği düşünülmektedir (İshida ve ark., 1994; Marinova- Mutaftchieva ve ark., 2002).
- Çeşitli tümörlerin, kalıtsal hastalıkların tedavisinde ve bir tedavi yöntemi olarak gen tedavisinde hedef hücre olarak kullanılmaktadır (Biffi ve ark., 2008; Kim ve ark., 2008; Koç ve ark., 2002; Uçkan, 2007).

Son yıllarda mezenkimal kök hücreler birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Sistemik lupus eritromatozis, romatoid artrit, otoimmün tip 1 diyabet, hematopoetik sistem defektlerinde, graft-versusu host hastalığında, myokardial enfarktüste, parkinson hastalığında, spinal kord yaralanmasında, karaciğer fibrozisinde, akciğer yaralanmasında, kemik kırıklarında, cilt yanıklarında, korneal abrasyonda farklı kökenden elde edilen mezenkimal kök hücreler farklı özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır (Ren ve ark., 2012).

Mezenkimal kök hücrenin insanlar üzerindeki denemesinin az olması, nakledilen kök hücrelerin dokuda kanser oluşturma riskinin tam bilinmemesi, kök hücrelerin alıcı tarafından reddedilmesi gibi durumlara bağlıdır (Daştan ve ark., 2009).

1.2.8. Pankreas Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Doğum sonrası pankreatik kanal embriyonik gelişim boyunca spesifik göçe sebep olduğundan adacık prekürsör/kök hücrelerini barındırır. İn-vitro olarak yapılan çalışmalarda yetişkin pankreatik duktal dokularından insülin üreten hücrelerin oluştuğu gösterilmiştir. Farklılaşmamış hPDMKH (pankreastan farklılaşan insan MKH)'in gen ekspresyon profilinde insulin, glukagon, somatostatin, Ngn3, and Isl1' in mRNA ekspresyonları gözlenmektedir (Gioviale ve ark., 2013). Birçok çalışmada beta hücre progenitör hücrelerinin duktus kanalına yakın olduğu bilinmektedir. Kısmen pankrektomi yapılan kemirgenlerde ve Tip1 DM hastalarında, adacık hücreleri duktus kanallarına yakın bir yerleşimde bulunmaktadır. Duktal ve asiner hücreleri de içeren adacık hücrelerinin epidermal büyüme faktörü ve gastrin kombinasyonu ile muamele ederek duktal hücrelerden adacık beta hücre neogenesisinin indüklenmesiyle fonksiyonel beta hücre kitlesinde artış gözlenmiştir (Stanekzai ve ark., 2012).



Şekil 1.8: Pankreas Gelişim Yolu ve Transkripsiyon Faktörleri (Jiang ve Morahan 2011).

1.3. Amniyon Membran

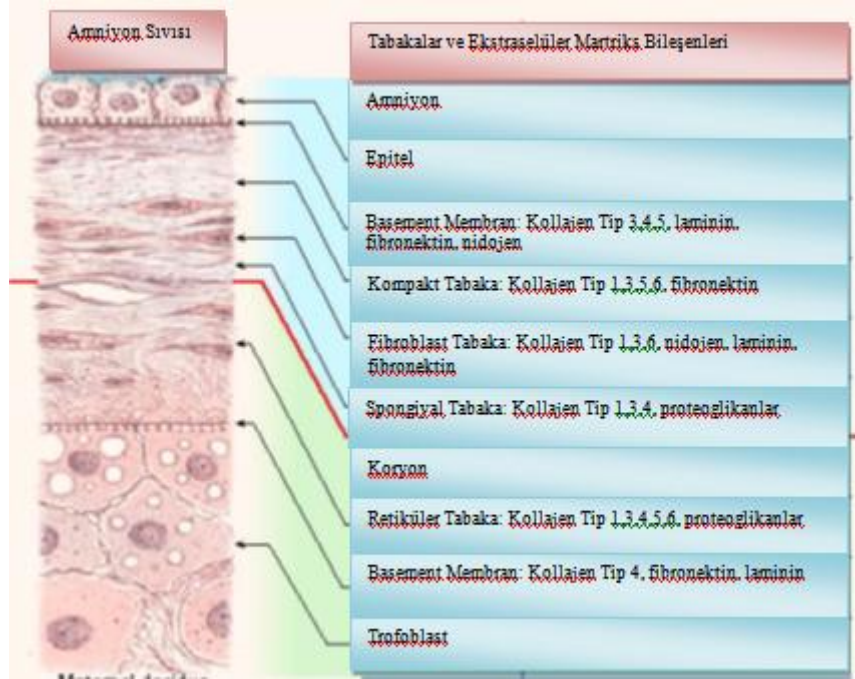
İnsan amniyon membranı yaklaşık 100 yıldır cerrahi rekonstrüksiyonda biyo-malzeme olarak kullanılmaktadır. Amniyon membran (AM) 1910 yılında ilk kez cilt transplantasyonunda kullanılmıştır. Yanık tedavisinde, oral kavite, mesane ve vajinanın cerrahi rekonstrüksiyonunda kullanılmaktadır. De Rotth tarafından 1940'da oftalmolojide ilk kez kullanılmış olup, 1990 yılında Kim and Tseng amniyon mebranı korneal hasarın iyileşmesinde kullanmışlardır. Günümüzde inflamasyonu ve skar oluşumunu azaltması, yara iyileşmesini ve epitelizasyonu artırması, anti-mikrobiyal ve anti-viral özelliklerinin bulunması amnion membranını önemli kılmıştır. Ayrıca transplantasyon sonrasında doku rejeksiyonuna neden olmaması, düşük immünojenik özellik göstermesi de amniyon membran kullanımı için önemlidir (Riau ve ark., 2009; Mamede ve ark., 2014).

1.3.1. Anatomisi ve Fizyolojisi

Amniyon membrann döllenmeden yaklaşık 7 gün sonra oluşmaya başlamaktadır. Amniyon 0,02 ve 0,05 mm kalınlığındadır (Riau ve ark., 2009) olup 5 tabakadan oluşmaktadır:

1. Epitel tabaka
2. Basement membran
3. Kompakt tabaka
4. Fibroblast tabaka
5. Süngersi tabaka (Fairbairn, 2014; Galera ve ark., 2014)

En içte epitel tabaka bulunur. Amniyon sıvısı ile direkt temas halindedir. Bu hücrelerin apikal yüzeyinde bulunan mikrovilluslar amniyotik sıvının hemostazisinde önemli rol oynar. Basement membran ince retiküler liflerden oluşmuştur. Kompakt, fibroblast ve süngersi tabaka blastokistin extra-embriyonik mezoderminden köken alır ve amniyonun mezenkimali olarak adlandırılır. Mezenkimal kollajen Tip 1 ve kollajen Tip 7 içerirken elastin, laminin, fibronektin, vitronektin gibi proteinleri de içermektedir. Epitel tabaka prostaglandin E2 salımına neden olur ve uterus kasılmasının başlatılmasında ve sürdürülmesinde önemli rol oynar. Epitel ayrıca insan koryonik gonodotropin reseptörleri içerdiğinden prostoglandin üretiminden sorumludur ve aktivitesinin düzenlenmesinde de görevlidir. Epitel hücreler ayrıca birçok vazoaktif peptidlerin, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve extra-sellüler matriks proteinlerinin üretiminde de görevlidir (Fairbairn, 2014).



Şekil 1.9: Amniyon Membran Yapısının Şematik Şekli (Niknejad ve ark., 2008).

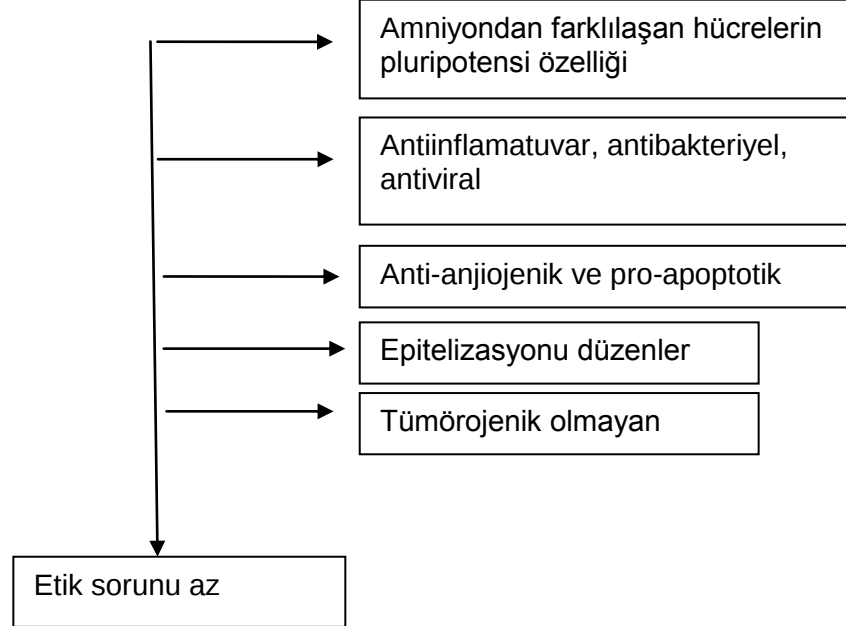
1.3.2. Amniyon Membranın Özellikleri:

Amniyon membran inflamasyonu azaltma, epitelizasyonu artırma, skar önleme ve yeni damar oluşturma gibi özelliklere sahiptir (Niknejad ve ark., 2008; Dobrev ve ark., 2010; Lo ve ark., 2013). AM'nın basement tabakası epitelyumun büyümesini ve farklılaşmasını sağlamakta, bazal epitelyum hücrelerin adezyonunu sağlamakta ve epitelin apoptosisini azaltmaktadır (Lo ve ark., 2013). Çok az immunolojik özellik gösteren amniyon zarı epitel hücre yüzeyinde insan lökosit antijenlerinden olan HLA-A,B,C ve DR ve $\beta 2$ mikroglobulin bulundurmamaktadır. Amniyon zarı transplantasyonu yapılan hastalarda akut red reaksiyonu görülmemiş ve HLA antijenlerine karşı antikor üretimi gözlenmemiştir. İn vitro amniyon epitel hücre kültüründe yapılan bir çalışmada amniyon epitel hücrelerinin nötrofil ile makrofajların kemotaktik aktivitelerini inhibe ettiği, B ve T lenfositlerinin proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Cindarik, 2010). Araştırmalarda amniyon membranın epidermal büyüme faktörü (EGF), transforming büyüme faktörü (TGF)-a, -b1, -b2 ve -b3, keratinosit büyüme faktörü (KGF), KGF receptor (KGFR), hepatosit büyüme faktörü (HGF), HGF receptor (HGFR), basic fibroblast büyüme

faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve platelet-derived büyüme faktörü (PDGF) gibi birçok büyüme faktörünü salgıladığı belirlenmiştir (Niknejad ve ark., 2008; Riau ve ark., 2009).

İnsan amniyon membran ve insan amniyon membran epitelinin anti-inflamatuvar etkisi vardır. Çeşitli anti-anjiojenik ve anti-inflamatuvar proteinleri (IL-1 reseptör antagonisti, metaloproteinaz (TIMPs)-1, -2, -3, -4 doku inhibitörleri ve IL-10) eksprese ettiklerini bilinmektedir (Toda ve ark., 2007). Amniyon membranın anti-inflamatuvar özellikleri tam olarak belirlenememiş olmasına rağmen AM fiziksel bir bariyer görevi yaparak inflamatuvar hücrelerin bulundukları bölgede kalmasını sağladığı ve inflamatuvar mediatörlerin de düzeyini azalttığı bilinmektedir (Mamede ve ark., 2012).

Amniyon membranın doğum sonrası atılması, anne ve bebeğe zarar verilmeden elde edilmesi nedeniyle etik sorun oluşturmamaktadır. Ancak yine de AM materyali alınmadan önce etik kurulun onayı gerekmekte ve anneden izin formu alınmaktadır. AM elde edilirken etik sorun yaşanmaması nedeniyle hücre transplantasyonları için yeni bir kaynak olmasına neden olmuştur (Toda ve ark., 2007).



Şekil 1.10: AM'nin Özellikleri (Mamede ve ark., 2012).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Etik kurul onayı alındıktan sonra 3,5-4 aylık toplam 80 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Bunlardan 40 tanesi adacık hücre ve mezenkimal kök hücre izolasyonunda, 40 tanesi de çalışma gruplarının oluşturulmasında kullanıldı.

2.1 Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları

- RPMI 1640 without L-Glutamine (Lonza, Belçika)
- FBS (Lonza, Belçika)
- L-Glutamine (Lonza, Belçika)
- Pen-Strep-Amp.B (Lonza, Belçika)
- HBSS (Lonza, Belçika)
- Kollejenaz Tip 5 (Sigma, USA)
- PBS (pH 7,4) (Lonza, Belçika)
- DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium - low glucose) (Lonza, Belçika)
- Trypsin-ETDA C (%0.05 trypsin %0.02 EDTA) (Lonza, Belçika)
- Biochrom 1100 (Biochrom, Almanya)
- Biochrom 1077 (Biochrom, Almanya)
- Adiposit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA)
- Kondrosit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA)
- Osteosit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA)
- Oil Red (Diagnostic BioSystem, USA)
- Von Kossa (Diagnostic BioSystem, USA)
- Alcian Blue (Diagnostic BioSystem, USA)
- CD 45R (BD, USA)
- CD 90 (BD, USA)
- CD11b/c (BD, USA)
- CD 44(BD, USA)
- BrDU (Sigma, USA)
- BrDU Belirleme Kiti (Sigma, USA)
- İnsülin Antikoru (Abcam, USA)

- ELISA c-Peptid Kiti (Millipore, USA)
- 3,3'-diamino benzidin (DAB) içeren kit (Thermo, Finlandia)
- %10 Formol

2.2. Yıkama, Floresan Boya, Stimülasyon ve Kültür Solüsyonlarının Hazırlanması ve İşlemleri

Bütün hazırlama işlemlerinde filtre kullanıldı.

- **RPMI 1640 (+) Solüsyonunun Hazırlanması**

RPMI 1640 (500 mL'lik) solüsyonunun içerisinden 60 mL alındı. Geriye kalan 440 mL solüsyonun üzerine FBS (50 mL), L-Glutamine (5 mL), Pen-Strep-Amp. B (5 mL) ilave edilerek +4 °C'de saklandı. 1 hafta içerisinde kullanıldı.

- **RPMI 1640 (-) Solüsyonunun Hazırlanması**

RPMI 1640 (500 mL'lik) solüsyonunun içerisinden 10 mL alındı. Geriye kalan 490 mL solüsyonun üzerine L-Glutamine (5 mL) ve Pen-Strep-Amp.B (5 mL) ilave edilerek +4 °C'de saklandı. 1 hafta içerisinde kullanıldı.

- **HBSS (+) Solüsyonunun Hazırlanması**

HBSS (500 mL'lik) solüsyonunun içerisinden 60 mL alındı. Geriye kalan 440 mL solüsyonun üzerine FBS (50 mL), L-Glutamine(5 mL), Pen-Strep-Amp.B (5 mL) ilave edilerek +4 °C'de saklandı. 1 hafta içerisinde kullanıldı.

- **Kollejenaz Enzim Solüsyonunun Hazırlanması**

100 mg kollejenaz Tip 5 , HBSS (-) (100 ml) solüsyonu içinde çözdürüldü, hazırlanan solüsyon filtrelerden (0,22 µm'lik) geçirilerek -20 °C'de saklandı. Bir hafta içerisinde kullanıldı.

- **Floresan Boyaların Hazırlanması**

a) Stok Propidium Iodide Solüsyonu (750 µM) :

PI (5 mg), PBS (10 mL) solüsyonu içerisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan solüsyon alüminyum folyo sarılı kaptan +4 °C'de 3 ay süre ile saklanabilir.

b) Stok Fluorescein Diacetate Solüsyonu (24 µM):

FDA (1 mg), asetonda (100 mL) çözündürüldü. Hazırlanan solüsyon alüminyum folyo sarılı kapta -20 °C’de 3 ay süre ile saklanabilir.

2.3. Amniyon Membran

Çalışmada Sağlık Bakanlığı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Araştırma Laboratuvarı Doku Bankası’ndan gönüllü gebelerden alınmış %50 Gliserol ve %50 DMEM içinde -80 derecede muhafaza edilmiş AM kullanıldı.

2.4. Adacık Hücre İzolasyonu



Şekil 2.1: Pankreasa Kollajenaz Verilmesi

Ksilazin (10mg/kg) ve ketamin hidroklorid (60 mg/kg) anestezik maddesi ile uyutulan sıçanların abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silindi. Abdominal bölge kesildikten sonra karaciğere bastırılarak duktus belirginleştirildi. Sarı (24 G) ya da mavi (22 G) renk katater kullanılarak pankreasa kollajenaz enzimi (7 mL) perfüze edildi. Sıçanın kalbi kesilerek öldürüldü. Pankreas bağlantılı olduğu dokulardan ayrılarak falcon tüpün içerisine (50 mL’lik) konularak buza gömüldü Bu işlem adacık hücre elde edilmek için uyutulan bütün sıçanlara uygulandı. Bu işlemler Deney Hayvanları Ünitesi’nde gerçekleştirildi. Alınan dokular, Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Araştırma Laboratuvarı Adacık Hücre Laboratuvarı’na getirildi.

- Pankreaslar hazır olan su banyosunda (37 °C) 18 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası pankreas çalkalanarak homojenize edildi.
- Üzerine soğuk HBSS(+) (25 mL) solüsyonu eklendi ve kuvvetlice çalkalandı.
- 1300 rpm’de 3 dakika süreyle santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- Pellet çalkalanarak karıştırıldı.
- Üzerine soğuk HBSS (+) (25 mL) solüsyonu eklenip ve kuvvetlice çalkalandı.
- Tekrar 1300 rpm’de 3 dakika süreyle 4 °C’de santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- Pellet çalkalanarak karıştırıldı.
- Üzerine soğuk HBSS (+) (50 mL) solüsyonu eklenerek kuvvetlice çalkalandı.
- Pankreas dokusu elekten (425 µm) süzüldü.
- 1300 rpm’de 3 dakika süreyle 4 °C’de santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı.
- Pellet çalkalanarak karıştırıldı.
- Pellet üzerine Biochrom 1100 (5 mL) ilave edildi. Çalkalanarak homojenlik sağlandı. Üzerine yavaşça Biochrom 1077 (10 mL) solüsyonu ilave edildi. En son olarak RPMI 1640(-) (10 mL) ilave edildi.
- 2400 rpm’de 20 dakika 1 hız 0 frende 4 °C’de santrifüj edildi.
- 1077-RPMI tabakalarının arasındaki adacık hücreleri RPMI 1640 (+) solüsyonu içerisine toplandı.
- 2 kez 1300 rpm’de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 °C’de santrifüj edilerek yıkama yapılarak adacık hücreleri elde edildi.
- Elde edilen adacıklar hand-picking yöntemi ile sayıldı.

2.5. Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Belirlenmesi

Küçük bir petri kabının içerisine adacık örneği (90 µL) alınarak üzerine PBS (910 µL) solüsyonu eklendi. FDA stok solüsyonu (20 µL) ve PI (20 µL) stok solüsyonu eklenerek karanlık ortamda 5 dakika saklandı ve floresan mikroskopunda 40 X büyütmede MATLAB programı aracılığı ile canlılık testi yapıldı.. Kullanılan floresan boyaların yeni derişimleri 0.46 µM FDA ve 14.34 µM PI olur. FDA canlı

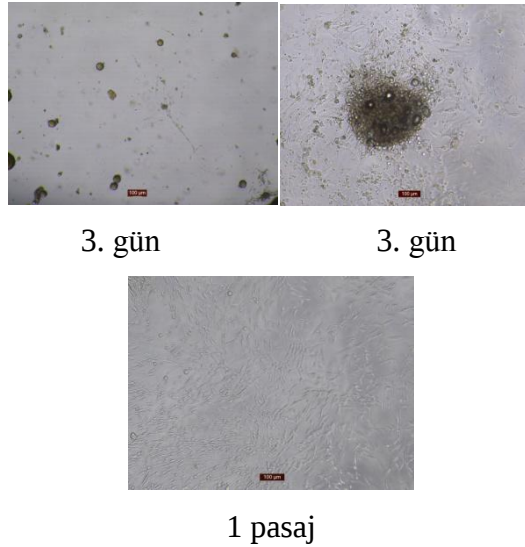
hücrelerin sitoplazmalarını boyar ve 490 nm dalga boyunda mavi ışık eksitasyonu altında yeşil floresans verir. PI ise ölü hücrelerin geçirgen hücre membranlarından DNA'ya girerek 536 nm dalga boyunda kırmızı floresans veren bir boyadır.

2.6. Adacık Hücrelerinin Kültüre Alınması

Hand-picking yöntemi ile sayılan adacıklar her bir flaskta 2000 adacık hücre olacak şekilde T75 kültür flaskın içinde RPMI (+) (15 mL'lik) besiyeri ile inkübatöre konuldu (37 °C, %5 CO₂).

2.7. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Hand-picking işlemi ile sayılan 400 tane adacık, her bir flaskta 200 tane olacak şekilde, T25 flasklara MKH besiyeri içine alındı. 2-3 günde bir besiyeri değişimi yapılarak hücrelerin gelişimi Leica İnvert Mikroskobu ile takip edildi. Yaklaşık 10 gün sonrasında pasaj işlemi yapılarak hücrelerin çoğaltılması sağlandı. İkinci pasaj sonunda elde edilen MKH farklılaşma işlemlerine tabi tutuldu. Akım-sitometri cihazında mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerine göre tanımlama işlemleri yapıldı. Diğer hücreler dondurma solüsyonu içinde -80'e kaldırıldı.

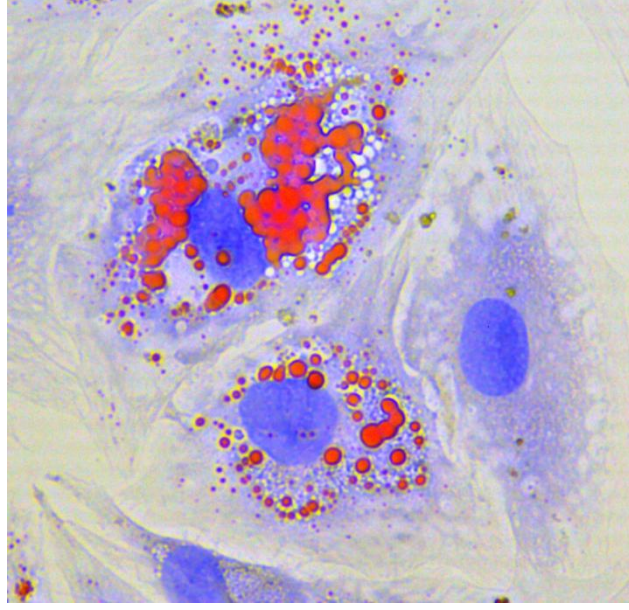


Şekil 2.2: Adacık Hücreden MKH Elde Edilmesinde 3.Gün ve 1.Pasaj Görüntüsü

MKH lerin farklılaşma işlemleri;

Mezenkimal Kök Hücre Adiposit Farklılaşma Metodu

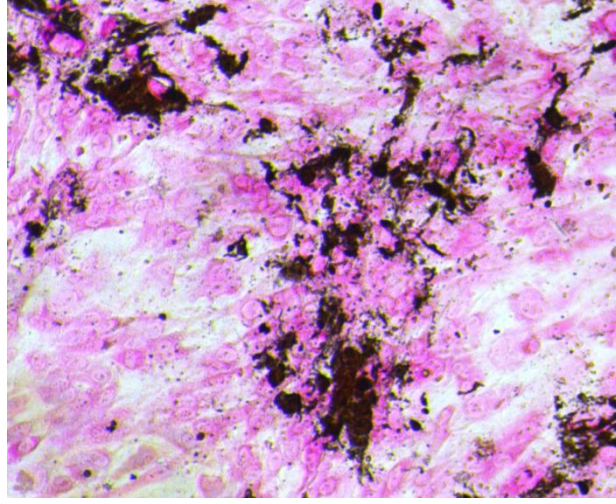
Adiposit farklılaşma için Adiposit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücreler adiposit besiyeri ile üç günde bir, besiyeri değişikliği yapılarak üçüncü hafta sonunda Oil Red ile boyama işlemi gerçekleştirildi. Yağ hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülendi ve yağ hücreleri belirlendi.



Şekil 2.3: Oil Red Boyama (10X40)

Mezenkimal Kök Hücre Osteosit Farklılaşma Metodu

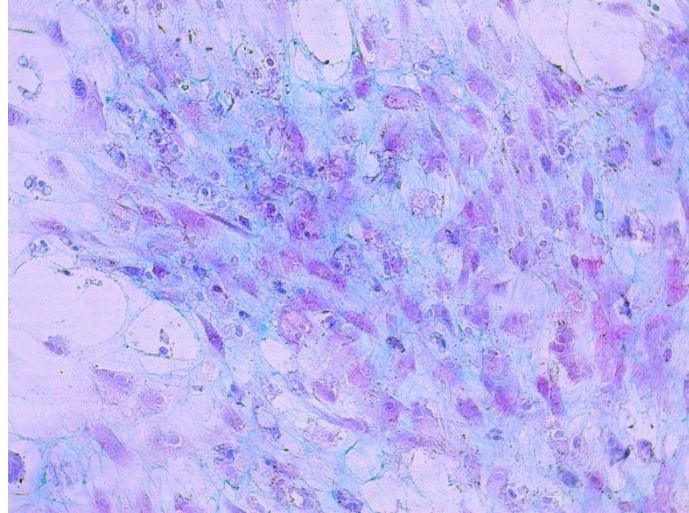
Osteosit farklılaşma için Osteosit Differansiyasyon Basal Mediumu ve supplement mediumu kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücrelerde osteosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapıldı. Üçüncü hafta sonunda Von Kossa ile boyama işlemi gerçekleştirilerek Osteosit hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülendi ve osteosit hücreleri belirlendi.



Şekil 2.4: Von Kossa Boyama (10X10)

Mezenkimal Kök Hücre Kondrosit Farklılaşma Metodu

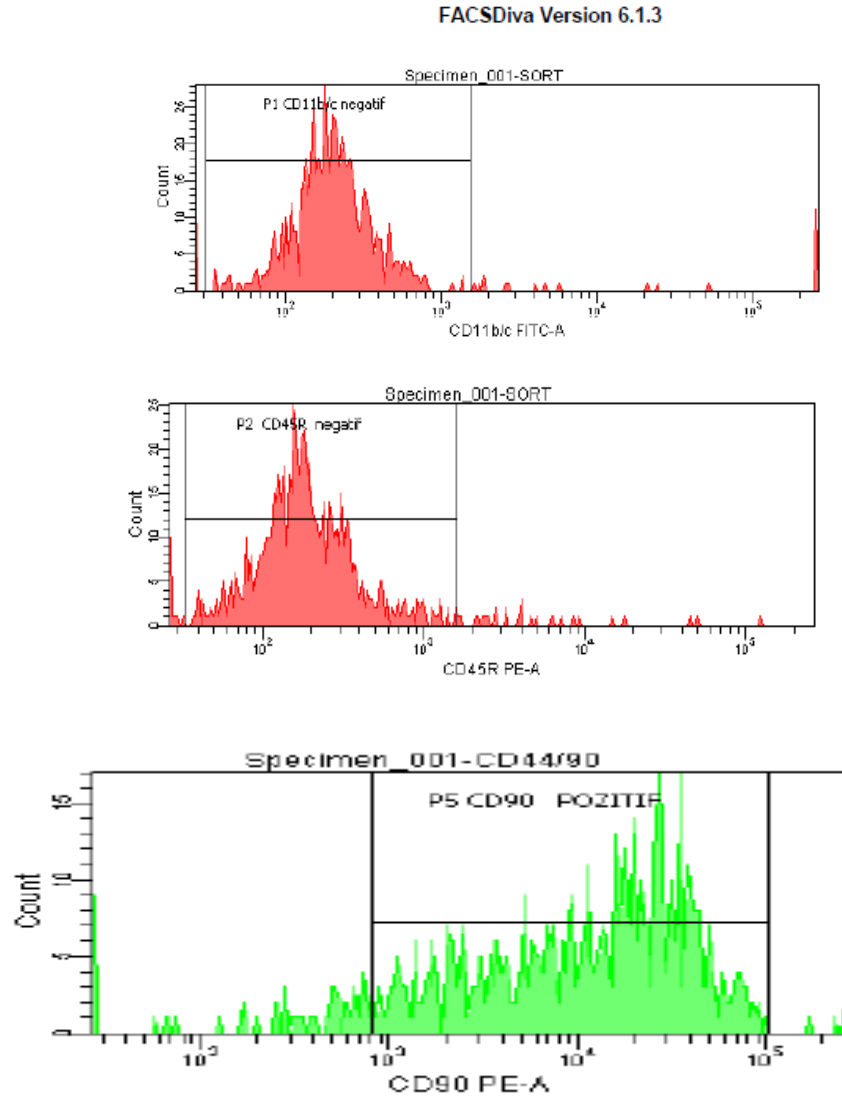
Kondrosit farklılaşma için Kondrosit Differansiyasyon Basal Mediumu ve supplement mediumu kullanıldı. İkinci pasaja gelen hücrelerde kondrosit besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapıldı. İkinci hafta sonunda Alcian Blue ile boyama işlemi gerçekleştirilerek Kondrosit hücreleri Leica invert mikroskobu ile görüntülendi ve kondrosit hücreleri belirlendi.

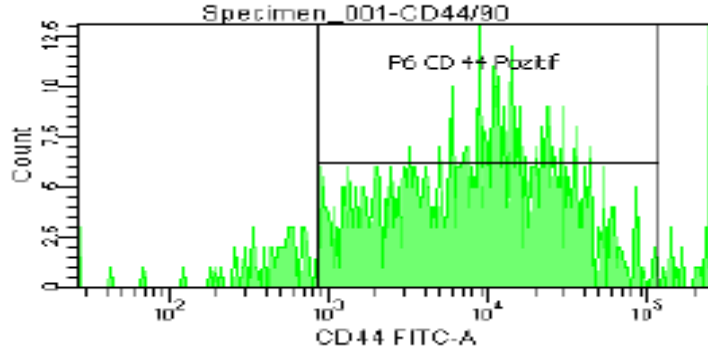


Şekil 2.5: Alcian Blue Boyama (10X10)

Flow sitometride cihazında mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerine göre tanımlama işlemi;

İkinci pasajın sonunda hücreler süspansiyon haline getirilerek 3 ayrı tüp içinde her bir tüpte 150000 hücre olacak şekilde flow sitometri cihazının tüpüne konuldu. Hücre süspansiyonu PBS 5 dakika süreyle içinde santrifüj edildi (1200 rpm). CD45R, CD11b/c, CD90 ve CD44 antikorları ilave edilerek 45 dakika karanlıkta inbübe edildi. FACS-ARIAIII cihazında okuma işlemi yapıldı. Okuma işlemi sonunda CD45R (%5.7(-)), CD11b/c (%4.5(-)), CD90 (%90.8(+)) ve CD44 (%85(+)) olarak bulundu yani yüzey belirteçlerinden CD45R, CD11b/cnegatif olarak belirlenirken CD90 ve CD44 pozitif olarak belirlendi.





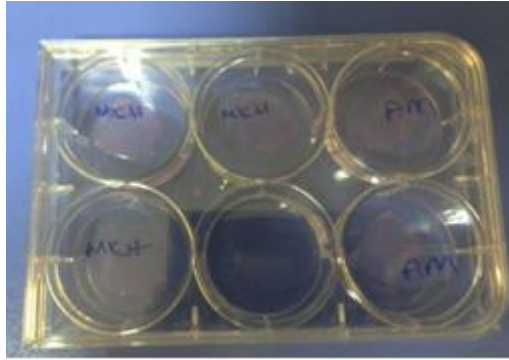
Grafik 2.1: MKH Flow-sitometride Tanımlanma Histogramları.

2.8. Gruplara Göre Ön Hazırlık İşlemleri

Grup 1: AM: Kullanılmak için -80°C 'den çıkarılan AM materyali 37°C 'lik su banyosunda, 1-2 dakika bekletilerek solüsyonun katı halden sıvı hale dönüşmesi sağlandı. Kısa bir süre içinde üzerine, DMEM eklendi ve iki kez yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra AM üzerindeki epitelden arındırılma işlemi yapıldı. Arındırma işleminde AM Tripsin-ETDA C içinde 25-30 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda ardışık olarak DMEM ile muamele edilerek ortamdaki Tripsin-EDTA-C'nin uzaklaştırılması sağlandı. AM yaklaşık 1 cm çap olacak şekilde kesilerek küçük parçalara ayrıldı. Petri kabına alınarak MKH besiyeri ilavesinin ardından inkübatörde 24 saat inkübe edildi (37°C , %5 CO_2).

Grup 2: AM+MKH: Kullanılmak için -80°C 'den çıkarılan AM materyali 37°C 'lik su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek solüsyonun katı halden sıvı hale dönüşmesi sağlandı. Kısa bir süre içinde üzerine DMEM eklendi ve iki kez yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra amniyon membran üzerindeki epitelden arındırılma işlemi yapıldı. Arındırma işleminde AM Tripsin-ETDA C 25-30 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda ardışık olarak DMEM ile muamele edilerek ortamdaki Tripsin-EDTA-C'nin uzaklaştırılması sağlandı. AM yaklaşık 1 cm çap olacak şekilde kesilerek küçük parçalara ayrıldı. Dondurma solüsyonu ile -80°C 'ye kaldırılan adacık kökenli MKH hızlı bir şekilde 37°C 'lik su banyosunda çözündürülerek hemen üzerine DMEM eklendi. Daha sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.

Süpernatant atıldı pelet karıştırıldı. Üzerine tekrar DMEM eklendi. Tekrar 10 dakika süreyle 1200 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı. Pelet karıştırıldı. Countess (İnvitrogen, Avusturalya) cihazında hücre sayımı ve canlılığına bakıldı Bir cc’de 10µM BrDU solüsyonu hazırlandı. Bir cc’de 2×10^6 hücreyi geçmeyecek şekilde her bir cc’ye 10µL BrDU solüsyonu eklendi. Hücre süspansiyonu iki saat inkübatörde inkübasyona bırakıldı (37°C, %5 CO₂). Herbir AM üzerine 5×10^4 hücre gelecek şekilde adacık kökenli mezenkimal kök hücre eklendi. MKH besiyeri 5-10 dakika aralıklarla petri kabına eklendi. Hazırlanan hücreler 24 saat süreyle inkübe edildi (37°C, %5 CO₂).



Şekil 2.6: Tranplantasyon Öncesi AM ve AM+MKH’ın 6’lı Well Görüntüsü

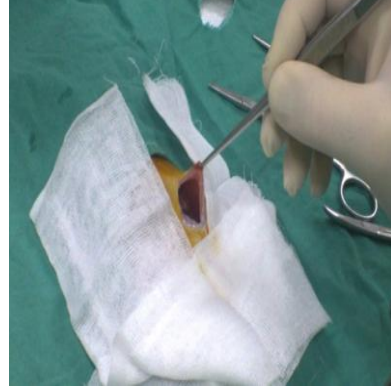
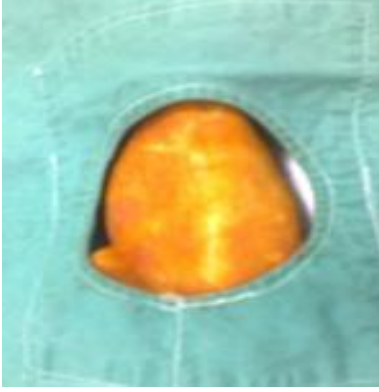
Grup 3: AM+ADACIK: Kullanılmak için -80°C’den çıkarılan AM materyali 37°C’lik su banyosunda 2 dakika bekletilerek solüsyonun katı halden sıvı hale dönüşmesi sağlandı. Kısa bir süre içinde üzerine DMEM eklendi ve iki kez yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra amnion membran üzerindeki epitelden arındırıldı. Arındırma işleminde AM Tripsin-ETDA C solüsyonu içinde 25-30 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. Bekleme süresinin sonunda amniyon membran ardışık olarak DMEM ile muamele edilerek ortamdaki Tripsin-EDTA-C’nin uzaklaştırılması sağlandı. AM yaklaşık 1cm çap olacak şekilde kesilerek küçük parçalara ayrıldı. Adacık hücre izolasyonu sonunda hand-picking yöntemi ile sayılan adacıklar her bir flaskın içinde 2000 adacık hücre olacak şekilde T75 kültür flaskına RPMI (+)(15 mL’lik) besiyeri ile inkübe edildi (37°C, %5CO₂) .

Grup 4: AM+ADACIK+MKH: Kullanılmak için -80°C'den çıkarılan AM materyali 37°C'lik su banyosunda, 2 dakika bekletilerek solüsyonun katı halden sıvı hale dönüşmesi sağlandı. Üzerine DMEM eklendi ve iki kez yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra amnion membran üzerindeki epitelden arındırıldı. Arındırma işleminde AM tripsin-ETDA C içinde 25-30 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda amniyon membran ardışık olarak DMEM ile yıkanarak ortamdaki Tripsin-EDTA-C'nin uzaklaştırılması sağlandı. AM yaklaşık 1 cm çap olacak şekilde kesilerek küçük parçalara ayrıldı. Dondurma solüsyonu ile -80°C'ye kaldırılan adacık kökenli MKH hızlı bir şekilde 37°C'lik su banyosunda çözündürülerek hemen üzerine DMEM eklendi. Ardından 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı pelet karıştırıldı. Üzerine tekrar DMEM eklendi. Tekrar 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı. Pelet kırıldı. Countess(İnvitrogen, Avusturalya) cihazında hücre sayımı ve canlılığına bakıldı. Bir cc'de 10µM BrDU solüsyonu hazırlandı. Bir cc'de 2×10^6 hücreyi geçmeyecek şekilde her bir cc'ye 10µL BrDU solüsyonu eklendi. İki saat inkübasyona bırakıldı. Herbir AM üzerine 5×10^4 hücre gelecek şekilde adacık kökenli mezenkimal kök hücre eklendi. MKH besiyeri 5-10 dakika aralıklarla petri kabına eklendi. 24 saat inkübe edildi (37°C, %5 CO₂). Adacık hücre izolasyonu sonunda hand-picking yöntemi ile sayılan adacıklar her bir flaskın içinde 2000 adacık hücre olacak şekilde T75 kültür flaskına RPMI (+)(15 mL) besiyeri ile inkübe edildi (37°C, %5CO₂)

2.9. Sıçanların Diyabet Yapılması:

12 saatlik açlık sonrasında, Wistar Albino erkek sıçanlara streptozosin (45 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulamadan 3 gün sonra kan şekeri 200 mgr/dL ve üzeri olan hayvanlar diyabet olarak kabul edildi. STZ verilmesini takiben 15 gün boyunca, haftada 2 kez kan şekeri takibi yapıldı.

2.10. Transplantasyon



Şekil 2.7: Omentuma Transplantasyon

Grup 1: AM

AM 24 saat inkübasyon sonunda hayvan laboratuvarına götürüldü. Ksilazin (10mg/kg) ve ketamin hidroklorid (60 mg/kg) anestezi maddesi ile uyutulan diyabetik sıçanların abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silindi. Abdominal bölgesi açıldı. Omentum bölgesi belirlendi. Omentum zarı dikkatli bir şekilde steril, ıslak bir gazlı bez üzerine serildi. Hazırlanan AM materyali omentum zarının üzerine yerleştirildi. Omentum bir kese şeklinde, içinde AM olacak şekilde dikildi. Cilt altı ve cilt dikişleri atıldı. Dikiş yerlerine batikonla pansuman yapıldı. Sıçanların uyanması beklenildi.

Grup 2: AM+MKH

AM+MKH 24 saat inkübasyondan sonra aliminyum folyaya sarılarak hayvan laboratuvarına götürüldü. Ksilazin (10mg/kg) ve ketamin hidroklorid (60 mg/kg) anesteziik maddesi ile uyutulan diyabetik sıçanların abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silindi. Abdominal bölgesi açıldı. Omentum bölgesi belirlendi. Omentum zarı dikkatli bir şekilde steril, ıslak bir gazlı bez üzerine serildi. Hazırlanan AM+MKH materyali hücreler üst kısma gelecek şekilde omentum zarının üzerine yerleştirildi. Omentum bir kese şeklinde içinde AM+MKH hücreleri olacak şekilde dikildi. Cilt altı ve cilt dikişleri atıldı. Dikiş yerlerine batikonla pansuman yapıldı. Sıçanların uyanması beklenildi.

Grup 3:AM+ADACIK

Kültüre alınan adacık hücreleri, T75 flask içinden dikkatli bir şekilde toplandı. 1300 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım atıldı. Üzerine PBS eklendi. 1300 rpm’de 5 dakika ikinci kez santrifüj yapıldı. Tüpün dibinde 1 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant kısım atıldı. Amniyon membran 24 saat inkübe edildiikten sonra hayvan laboratuvarına götürüldü. Ksilazin (10mg/kg) ve ketamin hidroklorid (60 mg/kg) anesteziik maddesi ile uyutulan diyabetik sıçanların abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silindi. Abdominal bölgesi açıldı. Omentum bölgesi belirlendi Omentum zarı dikkatli bir şekilde steril, ıslak bir gazlı bez üzerine serildi. Hazırlanan AM materyali omentum zarının üzerine yerleştirildi. AM üzerine bir pastör pipeti yardımıyla damlalar şeklinde adacık hücreleri eklendi. Omentum, bir kese şeklinde, AM+ADACIK hücreleri içinde olacak şekilde dikildi. Cilt altı ve cilt dikişleri atıldı. Dikiş yerlerine batikonla pansuman yapıldı. Sıçanların uyanması beklenildi.

Grup 4: AM+ADACIK+MKH

Kültüre alınan adacık hücreleri T75 flask içinden inkübasyonun sonunda dikkatli bir şekilde toplandı. 5 dakika santrifüj edildi (1300 rpm). Süpernatant kısım atıldı. Üzerine PBS eklendi. İkinci kez tekrar santrifüj yapıldı. Tüpün dibinde 1 ml sıvı kalacak şekilde üstteki süpernatant kısım atıldı. 24 saat inkübasyonun sonunda

AM+MKH aliminyum folyaya sarılarak hayvan laboratuvarına götürüldü. Ketamin/Ksilazin anestezi madde ile uyutulan diyabetik sıçanların abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silindi. Abdominal bölgesi açıldı. Omentum bölgesi belirlendi. Omentum zarı dikkatli bir şekilde steril, ıslak bir gazlı bez üzerine serildi. Hazırlanan AM+MKH materyali hücreler üst kısma gelecek şekilde omentum zarının üzerine yerleştirildi. AM+MKH üzerine pastör pipeti yardımıyla tüpün içinde bulunan adacık hücreleri damla şeklinde bekletilerek eklendi Omentum içinde MKH hücreleri olacak şekilde bir kese biçiminde dikildi. Cilt altı ve cilt dikişleri atıldı. Dikiş yerlerine batikonla pansuman yapıldı. Sıçanların uyanması beklenildi

Grup 5: Kontrol

Ksilazin (10mg/kg) ve ketamin hidroklorid (60 mg/kg) anestezi madde ile uyutulan diyabetik sıçanların abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silindi. Abdominal bölgesinin açılmasının ardından açıldı, omentum bölgesi belirlendi. Omentum bir kese şeklinde dikildi. Cilt altı ve cilt dikişleri atıldı. Dikiş yerlerine batikonla pansuman yapıldı. Sıçanların uyanması beklenildi.

2.11. Kan Şekeri Ölçümü

Transplantasyondan sonra ilk üç gün, diğer günlerde ise haftada 2 kez olmak üzere, günün belli saatlerinde (09:00-10:00) kan şekeri ölçümü (glukometre ile) yapıldı. Transplantasyondan 4 hafta sonra deney sonlandırıldı.

2.12. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi (IPGTT)

Transplantasyondan sonra 26. günde IPGT testi yapıldı. Testten bir gün öncesinde sıçanların ağırlıkları ölçüldü ve ardından 12 saat aç bırakıldı. Sıçanların açlık kan şekeri ölçüldü. Sonrasında sıçanlara IP yolla glukoz (2gr/kg) enjeksiyon

yapıldı. Glikoz verildikten sonra 5dk, 10dk, 15dk, 30dk, 60dk, 90dk, 120dk sonra glukometri ile kan şekeri ölçümleri yapıldı.

2.13. İmmünohistokimyal Değerlendirme

Dokuların tümü, %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonunda, 24 saat fiske edilerek parafinde bloklandı. Her blokdan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak BrDU, insülin antikorları ile immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Deparafinize edilen kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi, %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda, 10 dakika inkübe edilerek giderildi. Kesitler sitrat tamponu içerisinde, 30 dakika kaynatılıp oda ısısında, 20 dakika soğumaya bırakıldı. Kesitler üzerine 5'er dakika blok antikor, sonrada 1'er saat primer antikorlar uygulandı. Kesitler ardından biotinli anti-immünglobulin ve streptavidin-peroksidaz konjugat ile 10'ar dakika inkübe edildi. Renklendirici ajan olarak bileşiminde 3,3'-diamino benzidin (DAB) içeren ticari kit kullanıldı. Kesitler Mayer hematoksilen ile 60 saniye boyandı. Kesitler DAB uygulamasına kadar tüm aşamalarda pH 7.6 fosfat tamponu ile DAB uygulamasından sonra ise distile su ile yıkandı. İşlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Sonuçlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

2.14. Elisa

Her bir gruba başlamadan önce 1 mL kan örneği alınarak C peptid düzeyi için serumları ayrıldı. ELİSA testi aynı gün içinde ELISA kitleri Millipore USA kullanılarak sandviç ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü.

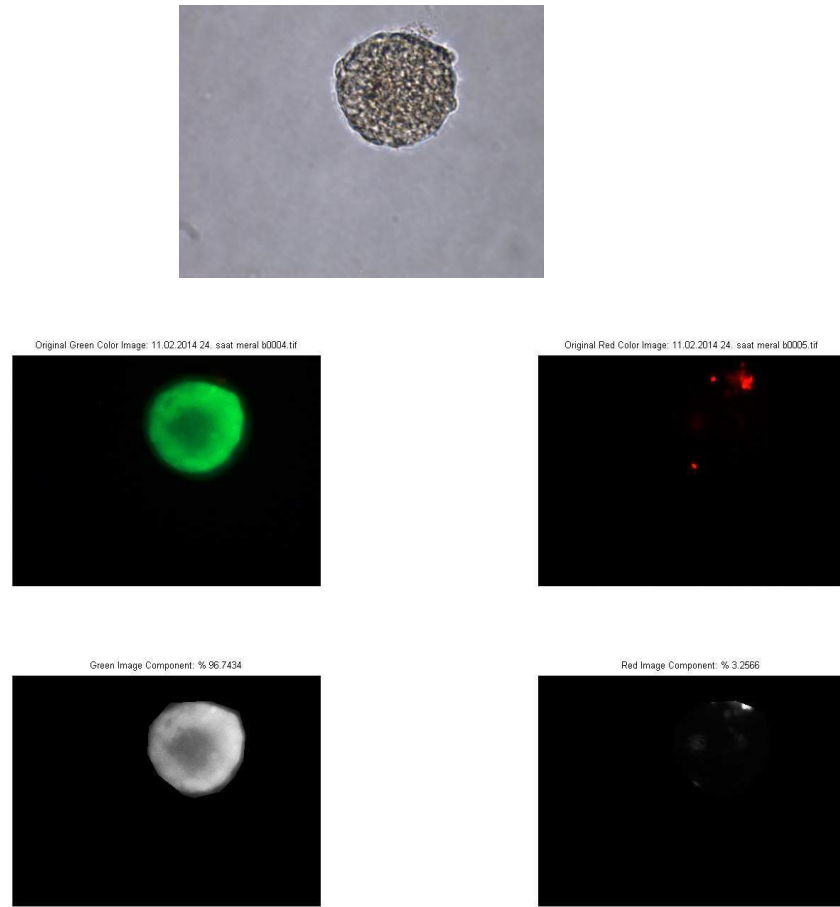
2.15. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SAS (SAS version 8.02, SAS Institute, Cary, NC, USA) istatistik programı kullanıldı. Tekrarlı ölçümler general linear model (GLM) kullanılarak değerlendirildi. Gruplararası ve grup içi farkın belirlenmesinde

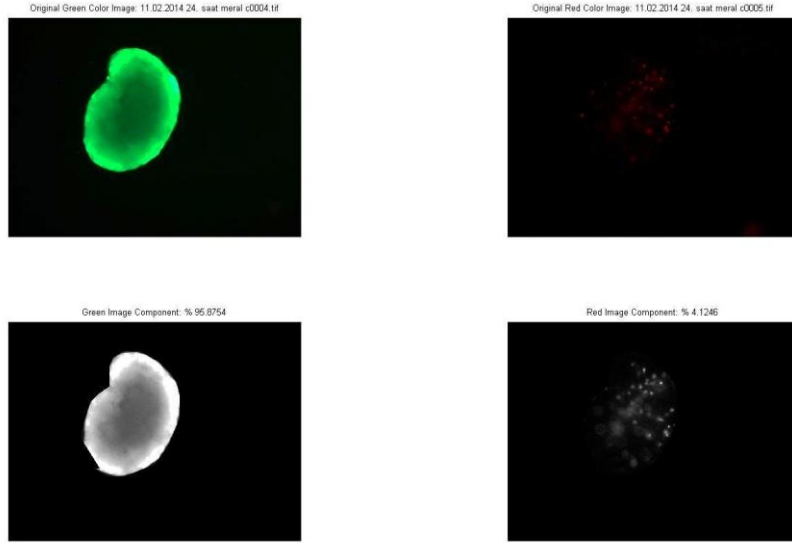
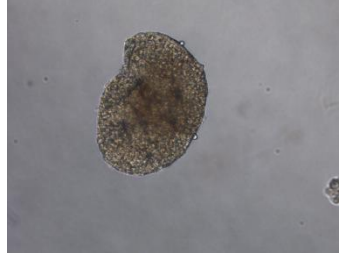
Tukey testi kullanıldı, $p < 0.05$ önemli kabul edildi. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ ortalama değerin standart hatası ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) olarak verildi.

3. BULGULAR

3.1. Adacık Hücre Canlılıkları



Şekil 3. 1: AM+Adacık grubunda FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab’da hazırlanan program ile yapılan analizleri sırasında elde edilen canlılık yüzdesi ortalaması canlılık sonuçları (%96.74) a) FDA ile boyanan canlı hücreler b) PI ile boyanan ölü hücreler c) Canlı hücre yüzdesi d) Ölü hücre yüzdesi



Şekil 3.2: AM+Adacık+MKH grubunda FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab'da hazırlanan program ile yapılan analizleri sırasında elde edilen canlılık yüzdesi ortalaması canlılık sonuçları (%95.87) a) FDA ile boyanan canlı hücreler b) PI ile boyanan ölü hücreler c) Canlı hücre yüzdesi d) Ölü hücre yüzdesi

Matlab programına göre yapılan canlılık analizine göre AM+Adacık grubuna verilen adacık hücrelerinin ortalama canlılığı %96.74 iken AM+Adacık+MKH grubunun adacık canlılık ortalamaları %95.87'dir.

3.2. Grupların Kan Şekeri Ortalaması:

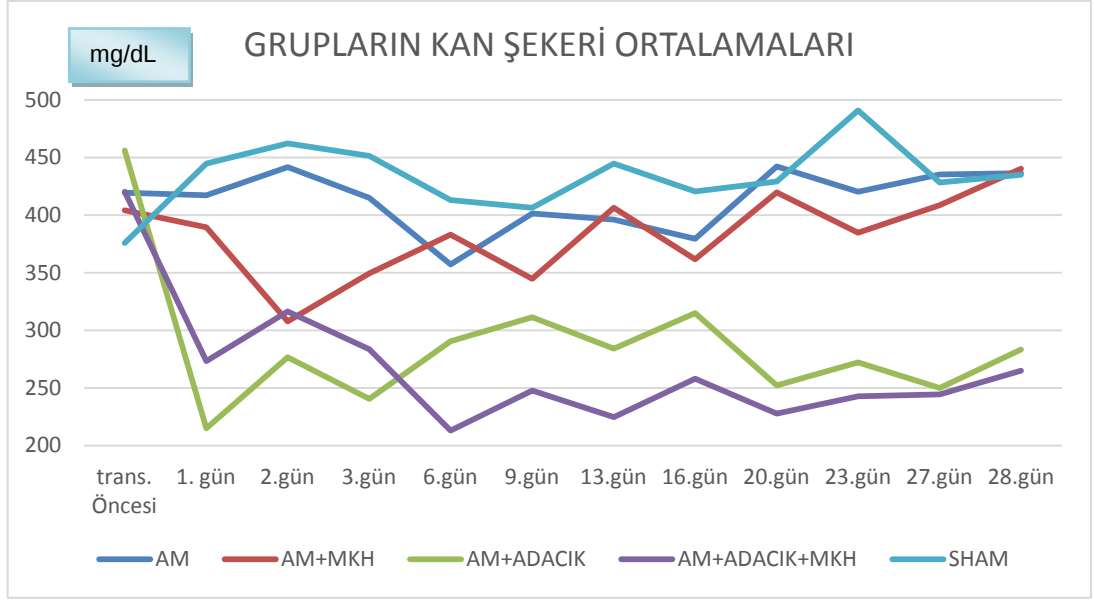
Transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası günlerde gruplara ait kan şekeri ortalamaları Tablo 3.1.'de verilmiştir. Transplantasyon öncesi kan şekeri ortalamalarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Kontrol ile karşılaştırıldığında, AM grubuna ait kan şekeri ortalamalarında

istatistiksel farklılık olmadığı görüldü. Amniyon membran+MKH grubuna ait kan şekeri ortalamalarının ise yalnızca 2. günde kontrol grubundan anlamlı farklılık gösterdiği diğer günlerde anlamlı bir fark göstermediği bulundu. Diğer taraftan transplantasyon sonrası yapılan tüm ölçümlerde AM+Adacık+MKH grubuna ait kan şekeri ortalamalarının kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu, AM+Adacık grubunun ise 9 ve 16. günler dışında kontrol grubundan istatistiksel olarak farklılıklar gösterdiği belirlendi.

Tablo 3.1. Çalışma Gruplarının Kan Şekeri Ortalamaları

	AM	AM+MKH	AM+Adacık	AM+Adacık+ MKH	KONTROL
KAN ŞEKERİ (mg/dL)	Ort	Ort	Ort	Ort	Ort
TRANS. ÖNCESİ	419,37±85,35 ^a	404,25±95,44 ^a	456,12±155,60 ^a	420,37±109,32 ^a	375,75±78,34 ^a
GUN1	417,37±48,12 ^a	389,50±43,83 ^a	215,12±139,55 ^b	273,37±164,33 ^b	444,8767,36 ^a
GUN2	441,75±117,39 ^a	307,75±37,52 ^b	276,75±174,89 ^b	316,50±217,95 ^b	462,12±38,21 ^a
GUN3	415,12±72,26 ^a	349,50±29,69 ^{ab}	240,62±166,64 ^b	283,62±167,58 ^b	451,50±57,00 ^a
GUN6	357,12±119,93 ^{ab}	383,00±48,05 ^{ab}	290,62±175,01 ^{ac}	213,00±83,59 ^c	413,00±55,07 ^b
GUN9	401,37±84,54 ^a	344,87±71,97 ^{ab}	311,50±216,26 ^{ab}	247,75±148,16 ^b	406,50±41,87 ^a
GUN13	396,12±136,61 ^{ac}	406,50±145,08 ^a	284,12±195,72 ^{cb}	224,75±95,66 ^b	444,75±90,30 ^a
GUN16	379,37±67,40 ^a	361,62±69,79 ^{ab}	315,00±185,14 ^{ab}	258,00±124,11 ^b	420,50±59,42 ^a
GUN20	442,25±110,11 ^a	419,75±73,83 ^a	252,12±121,80 ^b	227,87±121,28 ^b	429,25±69,71 ^a
GUN23	420,25±98,84 ^a	384,75±69,07 ^{ab}	272,12±156,41 ^{bc}	242,75±113,91 ^c	490,75±56,00 ^a
GUN27	435,37±53,70 ^a	408,75±57,17 ^a	250,12±115,48 ^b	244,50±124,69 ^b	428,37±121,62 ^a
GUN28	436,50±142,65 ^a	440,25±141,68 ^a	283,25±154,60 ^b	265,00±142,71 ^b	435,00±104,68 ^a

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).



Grafik 3.1. Grupların Kan Şekeri Ortalamaları Grafiği

3.3. C-Peptit Testi

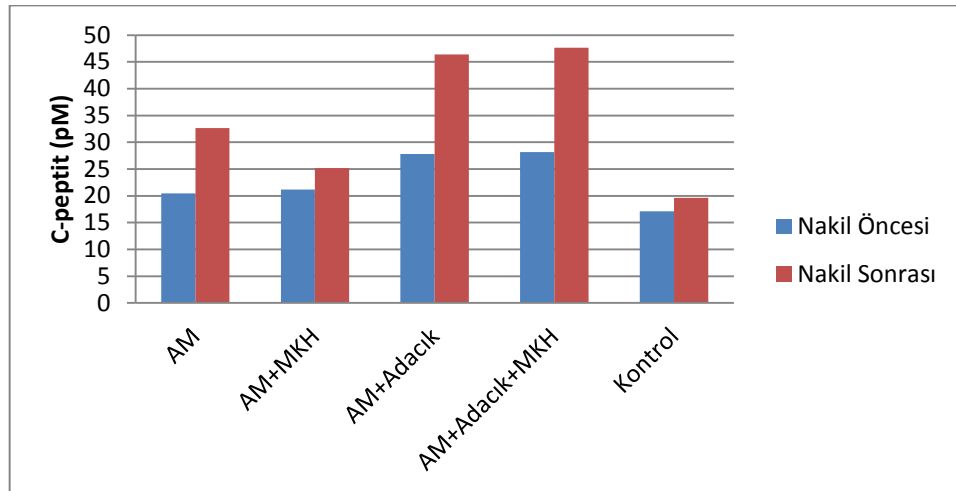
Gruplara ait transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası c-peptid ortalamaları Tablo 3.2.'de verildi. Transplantasyon öncesi gruplar arasındaki fark önemli bulunmadı ($p>0,05$). Kontrol ile karşılaştırıldığında, transplantasyon sonrası c-peptit düzeyleri; AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarında istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ($p<0,05$). Transplantasyon öncesi ve transplantasyon sonrası c-peptit düzeylerinin AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH grupları arasındaki fark önemli bulundu ($p<0,05$).

Tablo 3.2. Çalışma Gruplarında Transplantasyon Öncesi ve Transplantasyon Sonrası C-Peptit Ortalamaları

	Transplantasyon Öncesi (pM)	Transplantasyon Sonrası (pM)
AM	20,47±8,37 ^a	32,64±17,58 ^{a*†}
AM+MKH	21,19±10,51 ^a	27,81±12,66 ^{a†}
AM+Adacık	25,18±11,95 ^b	46,38±43,99 ^{a*}
AM+Adacık+MKH	28,17±25,21 ^b	47,63±38,15 ^{a*}
KONTROL	17,10±5,55 ^a	19,62±6,26 ^{a†}

^{a,b}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (p<0,05).

^{*,†}: Aynı sütunda farklı simgeleri taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir (p<0,05).



Grafik3.2. Grupların c-Peptit Grafiği

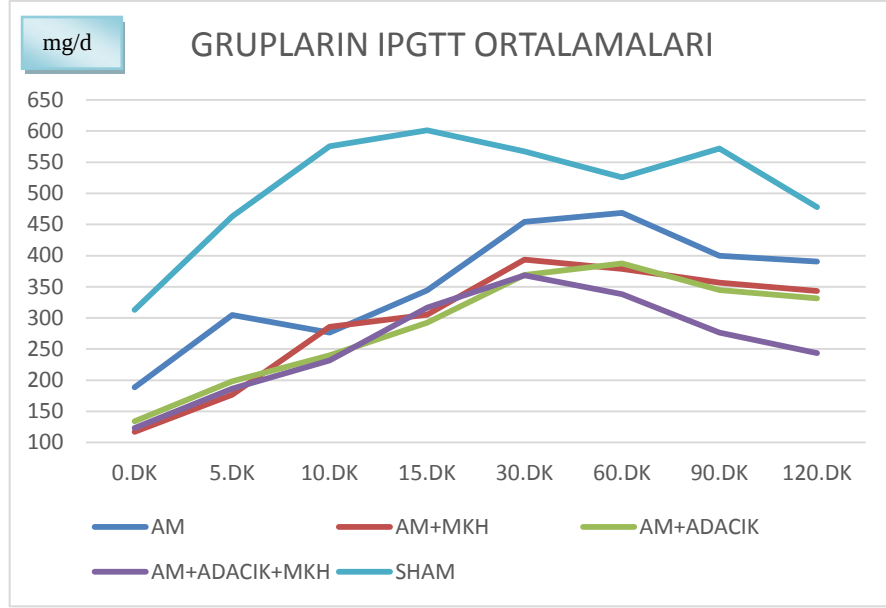
3.4. IPGTT

Çalışma gruplarına ait IPGTT kan şekeri ortalamaları Tablo 3.3.'de verilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AM+MKH, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarına ait IPGTT kan şekeri ortalamalarının 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalardakinden farklı olduğu görüldü ($p<0,05$). Buna ilaveten AM grubunda IPGTT kan şekeri ortalamalarının yalnızca 5, 10 ve 15. dakikalarda kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi.

Tablo 3.3. Çalışma Gruplarının IPGTT Kan Şekeri Ortalamaları

	AM	AM+MKH	AM+Adacık	AM+Adacık+MKH	KONTROL
IPGTT	Ort mg/dL	Ort mg/dL	Ort mg/dL	Ort mg/dL	Ort mg/dL
DK0	188,62±117,56 ^{ac}	116,87±46,46 ^c	133,87±40,88 ^c	123,50±43,74 ^c	313,12±83,71 ^a
DK5	304,87±160,49 ^a	176,50±6039 ^b	198,12±81,65 ^{ab}	186,25±53,91 ^{ab}	463,12±106,57 ^c
DK10	276,62±95,73 ^a	285,75±137,76 ^a	239,87±95,02 ^a	231,87±51,29 ^a	575,37±175,61 ^b
DK15	344,50±93,04 ^a	305,12±155,80 ^a	292,12±113,83 ^a	316,37±98,92 ^a	601,25±140,00 ^b
DK30	454,25±116,15 ^{ab}	393,75±216,08 ^b	369,12±172,68 ^b	368,62±144,48 ^b	567,16±119,66 ^a
DK60	468,37±139,98 ^{ab}	378,75±104,91 ^{bc}	387,62±160,23 ^{bc}	338,00±157,25 ^c	525,75±130,40 ^a
DK90	399,75±118,46 ^a	356,37±130,65 ^a	344,62±166,08 ^a	276,25±151,76 ^a	572,12±144,29 ^b
DK120	390,62±137,99 ^{ac}	343,37±139,03 ^{ab}	331,62±186,60 ^{ab}	243,50±143,71 ^b	478,00±70,05 ^c

^{a,b,c}: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

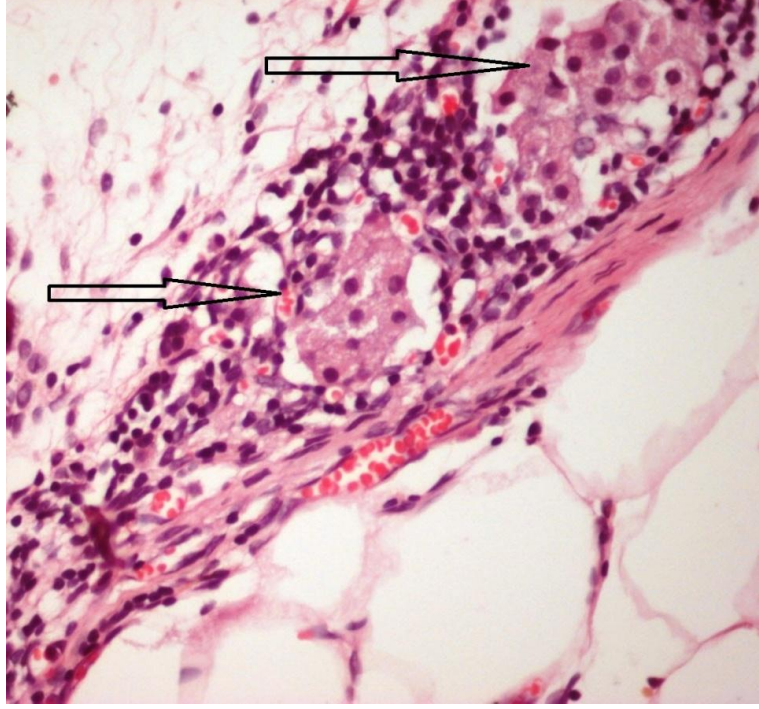


Grafik 3.3. Grupların IPGTT Grafiği

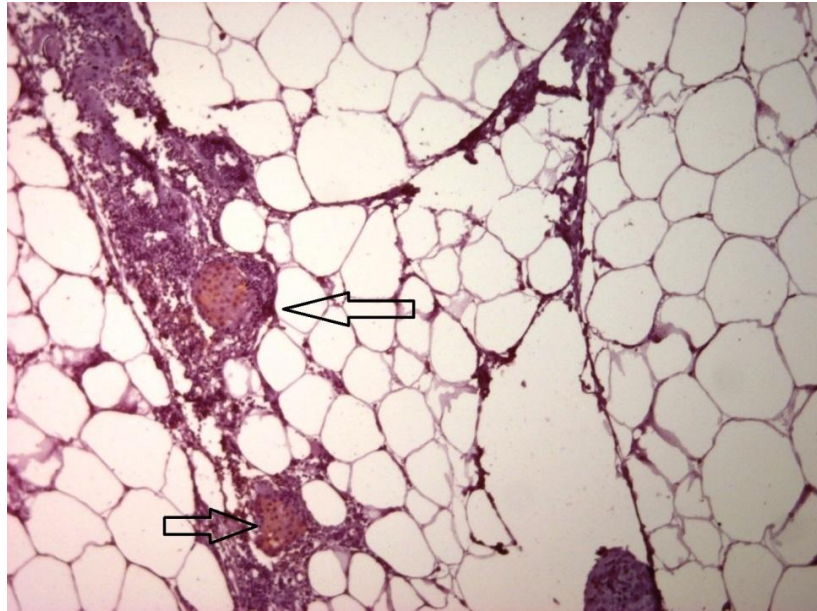
3.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Yapılan çalışmada tüm grupların omentumları HE boyaması ile boyandı. AM grubunda omentum dokusu ve AM gözlemlendi. AM+MKH grubunda omentum ve AM gözlemlenirken, BrDU boyamada MKH'ler belirlendi. AM+Adacık grubunda HE boyamada adacık hücreleri, omentum ve AM belirlenirken anti-insülini antikoru ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada insülin ile reaksiyon veren hücreler saptandı. AM+MKH+Adacık grubunda ise HE boyamada adacık hücreleri, omentum ve AM gözlemlenirken immünohistokimyasal açıdan, BrDU boyamasında MKH'i, insülin antikoru ile yapılan çalışmada ise adacık hücreleri tespit edildi. MKH'lerin adacık hücrelerinin etrafında toplandığı hatta adacık hücreleri ile bir bütün oluşturduğu BrDU

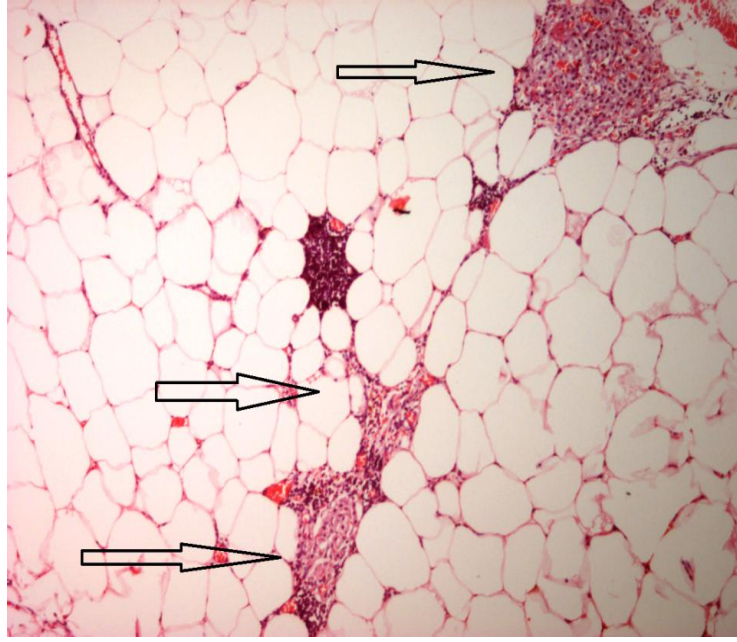
boyaması ile belirlendi. Kontrol grubunda ise HE boyamasında ile omentum materyali görüldü.



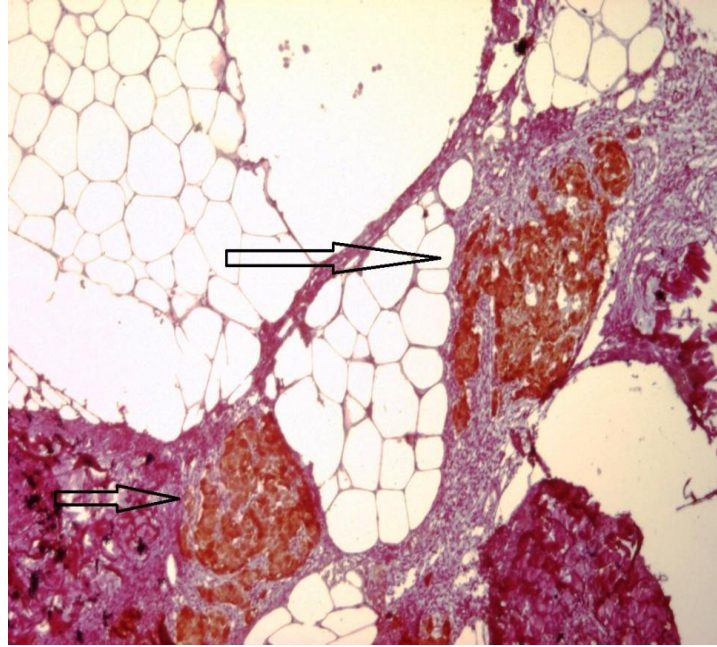
Şekil 3.3. AM+Adacık HE Boyama. Adacık hücreleri ok ile gösterilmektedir (10X40).



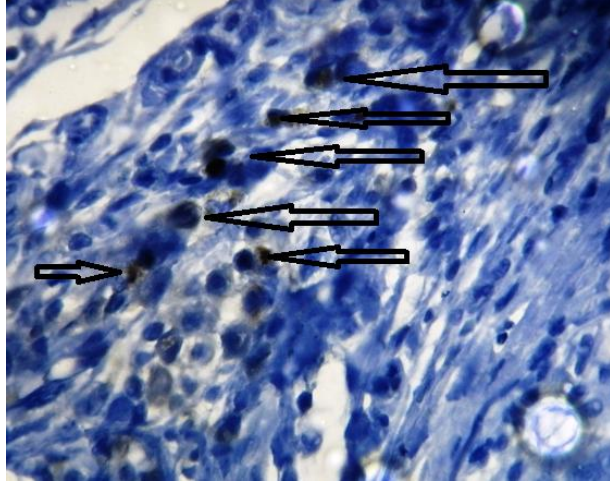
Şekil 3.4. AM+Adacık İnsülin Boyaması. Salgılanan insülin ok ile gösterilmektedir (10X10).



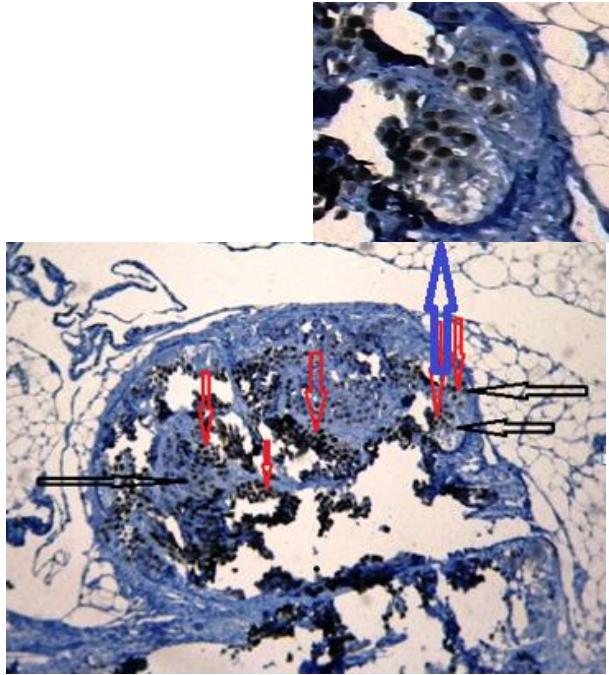
Şekil 3.5. AM+Adacık+MKH HE Boyama. Adacık hücreler ok ile gösterilmektedir (10X20).



Şekil 3.6. AM+Adacık+MKH İnsülin Boyaması. Salgılanan insülin ok ile gösterilmektedir (10X20).



Şekil 3.7. AM+MKH İmmünohistokimyasal BrDU Boyaması. Ok ile gösterilen BrDU(+) boyananan MKH (10X10).



Şekil 3.8. AM+Adacık+MKH İmmünohistokimyasal Brdu Boyaması. Siyah ok İle gösterilen adacık hücreleri, kırmızı ok ile gösterilen Brdu(+) boyananan MKH (10X4).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Beta hücre harabiyetiyle karakterize Tip 1 DM tedavisinde günümüzde en yaygın klinik tedavi uygulaması ekzojen kaynaklı insülin replasmanıdır (Bellin ve ark., 2012; Atkinson ve ark., 2014). Bununla birlikte uzun süreli insülin kullanımının meydana getirdiği komplikasyonların oluşması bu uygulamanın yerine alternatif tedavi şekillerinin araştırılmasına bir temel oluşturmaktadır. Bu uygulamalar içinde üzerinde en çok çalışılan kadavratik donörden elde edilen pankreatik adacık hücrelerinin naklidir (Shapiro ve ark., 2000). Ancak nakli yapılan beta hücrelerinin nakil sonrası erken dönemde yetersiz oksijenlenmesi, besin kaynağının azalması, zayıf damarlanma profili, immün cevap gibi olumsuz şartların oluşturduğu hücresel stres nedeniyle kaybedilmesi (Miao ve ark., 2006), nakil modellerinin geliştirilmesine yönelik bir araştırma alanının doğmasına neden olmuştur (Fenn, 2008).

Bugüne kadar yapılan diyabetik hayvan modeli çalışmalarında MKH (Wu ve ark., 2014), 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 özellikle 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 yapılmış ve (Pagliucave ark., 2014; Rezania ve ark., 2014) literatürde yerlerini almışlardır.

Bu çalışmada nakil sonrası dönemde adacık hücre kaybına neden olan apoptotik etmenlere karşı bugüne kadar yapılan immünomodüler, antimikrobiyal, biyo-uyumluluk özellikleriyle ön plana çıkan doğal bir biyomateryal olan amniyon membran, adacık hücreleri için destekleyici temel nakil ögesi olarak kullanılmıştır (Miki ve Strom, 2006; Niknejad ve ark., 2008). Bu modelde, ratlardan izole edilen fonksiyonel adacık hücreleri, insan AM'ı içerisine lokalize edilerek hazırlanan hücre paketi ile diyabet oluşturulmuş ratların omentum bölgesine nakil yapılmıştır. Naklin diyabet modeli üzerindeki etkisi ve bu etkinin nakledilen hücre modelinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesinde benzer çalışmalarda olduğu gibi; düzenli kan şekeri takibi, c-peptit seviyesi tayini, IPGTT gibi analizler kullanılmıştır.

Ayrıca immünohistokimyasal olarak da bu hücrelerin ve nakil modelinin temel etkinliği gösterilmiştir (Phelps ve ark., 2013; Yoshimatsu ve ark., 2015). Liu ve ark.(2013)'nın klinik bir uygulama olarak yaptıkları çalışmalarında, 26 yaşındaki Tip 1 DM hasta erkeğe, oğlunun doğum sırası AM'ından elde edilen hücrelerin yapılan analizlerle kök hücre karakterinde olduğunu belirledikten sonra, pankreatik dorsal arter üzerinden nakletmiştir. Nakilden 3 gün sonra hastanın kan şekerinde düşme başlamış, 3 ay sonra hasta insüline bağımsız hale gelerek bu durumunu 6.2 ay boyunca korumuştur. Sunulan çalışmada ise nakil için kullanılan AM'lar hücresel yapılarından arındırılarak kullanılmıştır. Dolayısıyla deney gruplarında AM'ın terapötik etkiye sağladığı düşünülen desteğin, bu kök hücre karakterindeki hücrelerden bağımsız olarak gerçekleştirdiği öngörülmektedir. Sunulan çalışmada adacık hücre transplantasyonu için omentum bölgesinin seçilmesinde; omentuma yapılan adacık hücre transplantasyonlarında damarlanmanın artmış olması ve lokal olarak salgılanan büyüme faktörlerinin varlığının bildirilmiş olması etkili olmuştur (Hefty ve ark., 2008; Solari ve ark., 2009; McQuilling ve ark., 2011; Bartholomeus ve ark., 2013; Pareta ve ark., 2013). Bartholomeus ve ark. (2013) adacık hücre transplantasyonunda omentum ile böbrek kapsülünü karşılaştırdıklarında omentuma transplantasyonda, damarlanmanın arttığı ve çeşitli büyüme faktörlerinin bu süreçte rol oynadığı ve omentumun böbrek kapsülüne göre daha iyi bir transplantasyon bölgesi olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle mevcut çalışmada transplantasyon bölgesi olarak omentum seçilmiştir. Nakil sonrası dönemde yapılan kan şekeri ve c-peptit seviyesi ölçümlerinde, omentuma nakledilen adacık hücrelerinin fonksiyonel olduğu ve yine deney sonrasında alınan patoloji örneklerinde yapılan immünohistokimyasal analizler sonucunda adacık hücre kitlesinin fonksiyonel, üç boyutlu yapısını koruduğu ve insülin salınımını gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler ile adacık hücrelerinin birlikte yapıldığı transplantasyon çalışmalarında, MKH'lerin çeşitli büyüme faktörlerini salgıladığı, salgılanan bu faktörlerin kanlanmayı artırdığı (Mahgoub ve ark., 2004; Figliuzzi ve ark., 2009), MKH'lerin beta hücre proliferasyonunu uyardığı, greftin apoptosisini azalttığı, immün hücrelerin greftin infiltrasyonuna aktivasyonunu ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını engellediği bilinmektedir (Mundra ve ark., 2013). Katuchova ve ark.(2012) diyabet modelinde MKH'leri farklı pankreatik mikroçevrelere

naklederek yaptıkları çalışmada, nakil sonrası dönemde MKH'lerin tüm diyabetik gruplarda kan şekerini düşürücü yönde terapotik etkisinin olduğunu göstermiştir. Maldonato ve ark.(1985) AM'dan difüzyon bir çember oluşturarak insülin salınımındaki rolünü değerlendirmiş ve AM'nın insülinin difüzyon yoluyla salgılanmasına izin verdiğini göstermiştir. Bunun yanı sıra yaptıkları çalışmada, nakledilen adacık hücrelerine karşı bir rejeksiyonun gelişmediği yani immün ataktan da korunduğunu bildirmişlerdir. Bu bilgiler ışığında sunulan çalışmada, AM'nı bir temel taşı olarak kullanıp, immün atağı engelleyerek, adacık hücre sağ kalımının artırmayı ve fonksiyoneliyesini sürdürülmesi amaçlandı. Mezenkimal kök hücrelerin diyabetik modellerde tedavi amaçlı kullanılması (Lee ve ark., 2013; Davey ve ark., 2014; Borg ve ark., 2014), salgıladıkları sitokinler yoluyla parakrin etki oluşturması (Castillo-Melendez ve ark., 2013; Chen ve ark., 2015) ve bu etkinin iyileştirmeye yönelik olması, sunulan çalışmada AM+Adacık hücre transplantasyonunda MKH'lerin bu özelliklerinden faydalanarak transplantasyonun daha başarılı olabileceğini düşündürdü. Bu çalışmada AM temel materyal olarak kullanılırken AM, AM+Adacık, AM+MKH, AM+Adacık+MKH ve kontrol grupları oluşturuldu. Kontrol ile karşılaştırıldığında AM grubuna ait kan şekeri ortalamalarının istatistiksel olarak farklı olmadığı görüldü. Amniyon membran+MKH grubuna ait kan şekeri ortalamalarının yalnızca 2. günde kontrol grubundan istatistiksel farklılık gösterdiği, diğer günlerde anlamlı bir fark göstermediği bulundu. Diğer taraftan transplantasyon sonrası yapılan tüm ölçümlerde AM+Adacık+MKH grubuna ait kan şekeri ortalamalarının kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu, AM+Adacık grubunun ise 9 ve 16. günler dışında kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu belirlendi. Kan şekeri ortalamasına ilişkin bu sonuçlar AM ve AM+MKH grubunda pankreasdaki adacık hücrelerinin insülin salgılayamadığını, hasarlanmanın sürdüğünü, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarında ise nakledilen adacıkların canlılığını sürdürdüğü, fonksiyoneliyesini devam ettirdiğini göstermektedir. AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH grubunda immünohistokimyasal olarak yapılan boyamalarda adacık hücrelerinden salgılanan insülinin varlığının, canlılığını koruyan ve fonksiyoneliyesini devam ettiren adacık hücreleri ile ilgili olduğunu düşündürdü.

İntraperitoneal glukoz tolerans testi ile adacık hücreleri fonksiyoneliyeti bakımından değerlendirildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AM+MKH, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarına ait IPGTT kan şekeri ortalamalarının 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 ve 120. Dakikalardaki ölçümlerde farklı olduğu görüldü. Buna ilaveten AM grubunda IPGTT kan şekeri ortalamalarının yalnızca 5, 10 ve 15. Dakikalarda yapılan ölçümlerde kontrol grubuna kıyasla farklı olduğu belirlendi. İntraperitoneal glukoz tolerans testi kan şekeri ortalamalarında kontrol grubu ile AM grubu arasında 120. dakikada fark bulunmazken, kontrol grubu ile AM+MKH, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH grupları arasında farklılıklar bulundu. Bu bulgu; AM+MKH, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarındaki adacık hücrelerinin glukozu duyarlı olduğunu ve glukoz ile uyarıldığında adacık hücrelerinden insülin salgılayarak kan şekerini düzenlemeye çalıştığını göstermektedir.

Endojen insülinin pulsatil bir salınım göstermesi ve kısa bir yarılanma ömrüne sahip olması sebebiyle, endojen insülin düzeyine bakılarak beta hücre fonksiyonu değerlendirilememektedir. Beta hücre fonksiyonunun değerlendirilmesinde endojen insülin üretiminin bir göstergesi olan ve daha uzun yarılanma ömrüne sahip olan c-peptit düzeylerine bakılmaktadır (Yalçın, 2004). Kontrol, AM, AM+MKH gruplarında transplantasyon öncesi ve sonrası c-peptit değerlerinde gruplararası ve grup içi anlamlı fark bulunmazken, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarının transplantasyon sonrası değerlerinin kontrol'den daha yüksek olduğu görüldü ($p<0,05$). Ayrıca AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarında transplantasyon sonrası c-peptit seviyelerinin transplantasyon öncesine göre artış gösterdiği belirlendi. AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarında c-peptit düzeyinde saptanan bu artışın, canlılığını ve fonksiyonlarını sürdüren adacık hücreleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak; tip 1 DM'in klinik tedavisinde güncel bir tedavi şekli olan adacık nakli uygulamalarında, kadavratik donörlerden sayısal olarak yeterli fonksiyonel adacık hücresi elde edilmesinin teknik olarak zorluğu, nakil bölgesi olarak genel itibarıyla tercih edilen portal ven bölgesinin adacık hücrelerinin fonksiyonel üç boyutlu bütünsel yapısının korunmasında ve yeterli sayıda hücrenin nakli için gerekli alanı sağlanmasında yetersiz kalması, nakledilen bu adacık hücrelerinin fizyolojik olarak

kırılgan yapısı ve immün atağa karşı yaşanan hücre kaybı oranının yüksek olması gibi sorunlar bu tedavinin klinik başarısının önündeki en büyük engeller olarak ön plana çıkmaktadır.

Sunulan çalışmada, yukarıda sayılan problemlere ortak bir alternatif çözüm önerisi olarak; nakil bölgesi için diyabetik ratlarda omentum bölgesi tercih edildi. Çünkü omentum yeterli sayıda hücre nakledilebilmesi için sağladığı geniş alanın yanında, nakledilen adacık hücrelerinin fonksiyonel üç boyutlu yapısını korumalarına ve nakil sonrası dönemde fonksiyonellik ve hücre sağ kalımı için kritik bir öneme sahip yeterli seviyede kanlanmanın gerçekleşmesine imkan sağlayan doğal bir biyolojik yapıya sahiptir. Ayrıca nakil sonrası dönemde, immün atağa karşı adacık hücrelerinin korunabilmesi için daha önce yapılan birçok referans çalışmada da farklı patolojik durumlarda, immün modülatör özellikleri gösterilen MKH'ler, pankreatik kökenli MKH'lerin benzer mekanizmalar üzerinden adacık hücre sağ kalımında ve fonksiyonelliğinde pozitif yönde etki edeceği yönündeki hipotezden yola çıkılarak farklı nakil grupları üzerinden çalışma gerçekleştirildi. Mevcut çalışmada yapılan kan şekeri ölçümleri, c-peptit seviye analizleri, IPGTT ve immünohistokimyasal olarak boyanan insülin (+) adacık hücrelerin varlığı, bulunan değerler kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında, AM+Adacık ve AM+Adacık+MKH gruplarında ki değerlerin anlamlı olması, oluşturduğumuz modelin adacık hücre nakli için iyi bir alternatif nakil modeli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, AM'nın biyolojik yapısının bu terapötik etkiyi hangi hücresel mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği sorusu bu alanda yeni bir araştırma konusu olarak çalışılmaya ihtiyaç göstermektedir.

KAYNAKLAR

- AL-NBAHEEN M, VISHNUBALAJI R, ALI D, BOUSLIMI A, AL-JASSIR F, MEGGES M, PRIGIONE A, ADJAYE J, KASSEM M, ALDAHMAH A (2013) Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev and Rep*, 9:32–43.
- AKIYAMA K, YOU Y, YAMAZA T, CHEN C, TANG L, CHEN YJX, GRONTHOS S, SHI S (2012) Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension. *Stem Cell Research & Therapy*, 3:40.
- ATKINSON MA, EISENBARTH GS, MICHELS AW (2014) Type 1 diabetes. *Lancet* 383, 69–82.
- BAER PC, GEIGER H(2012), Adipose-derived mesenchymal stromal/stemcells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International Article ID 812693, 11 pages doi:10.1155/2012/812693.
- BALL LM, BERNARDO ME, LOCATELLI F, EGELER RM (2008) Potential role of mesenchymal stromal cells in pediatric hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, 42 Suppl 2, S60–66.
- BARRY PF, MURPHY MJ (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 568–584.
- BARTHOLOMEUS K, JACOBS-TULLENEERS -THEVISSEN D, SHOUYUE S, SUENENS K, IN'T VELD PA, PIPELEERS-MARÍCHAL M, PIPELEERS DG, HELLEMANS K (2013) Omentum is better site than kidney capsule for growth, differentiation, and vascularization of immature porcine a-cell implants in immunodeficient rats. *Transplantation & Volume* 96, Number 12.
- BASSI EJ, AITA CAM, CAMARA NOS (2011) Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*, 3:1-8.
- BELLIN MD, BARTON FB, HEITMAN A, HARMON JV, KANDASWAMY R, BALAMURUGAN AN, SUTHERLAND DE, ALEJANDRO R, HERING BJ (2012). Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. *Am J Transplant*, 12: 1576–1583.
- BERNE RM (2008) Fizyoloji, 5.baskı, s: 766-793.
- BIFFI A, LUCCHINI G, ROVELLI A, SESSA M (2008) Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments. *Bone Marrow Transplantation*, 42: 2-6.

- BORG DJ, WEIGELT M, WILHELM C, GERLACH M, BICKLE M, SPEIER S, BONIFACIO E, HOMMEL A (2014) Mesenchymal stromal cells improve transplanted islet survival and islet function in a syngeneic mouse model. *Diabetologia*, 57:522–531.
- CAI J, WEISS LM, RAO SM (2004) In search of “stemness”. *Exp Hematol*, 32: 585–598.
- CANTARELLI E, PIEMONTE L (2011) Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts. *Curr Diab Rep*, 11:364–374.
- CAPITELLI CS, LOPES CS, ALVES AC, BARBIERO J, OLIVEIRA LF, SILVA VJD, VITAL MA (2014) Opposite effects of bone marrow-derived cells transplantation in mptp-rat model of parkinson’s disease: a comparison study of mononuclear and mesenchymal stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, 11(10): 1049-1064.
- CAPLAN A (2008) Why are mscs therapeutic? new data: new insight. *Journal of Pathology*, 217:318–324.
- CASTANHEIRA P, TORQUETTI L, NEHEMY MB, GOES AM (2008) Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros De Oftalmologia*, 71:644–650.
- CASTILLO-MELENDEZ M, YAWNO T, JENKING, MILLER SL (2013) Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Front Neurosci*, doi: 10.3389/fnins.2013.00194.
- CHARRIER A, BRIGSTOCK DR (2013) Regulation of pancreatic function by connective tissue growth factor (CTGF, CCN2). *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24:59–68.
- CHEN H, MIN X, WANG Q, LEUNG FW, SHI L, ZHOU Y, YU T, WANG C, AN G, SHA W, CHEN Q(2015) Pre-activation of mesenchymal stem cells with TNF- α , IL-1 β and nitric oxide enhances its paracrine effects on radiation-induced intestinal injury. *Scientific Reports*, doi: 10.1038/srep08718.
- CHEN J, ZHANG ZG, LI Y, WANG L, XU YX, GAUTAM SC, LU M, ZHU Z, CHOPP M (2003), Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circulation Research*, 92 (6), 692–699.
- CİNDARİK D (2010) Oküler yüzey hastalıklarında amnion zar transplantasyonu sonuçlarımız, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- CORONEL MM, STABLER CL (2013) Engineering a local microenvironment for pancreatic islet replacement. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 900–908.
- CORN DJ, KIM Y, KREBS MD, MOUNTS T, MOLTER J, GERSON S, ALSBERG E, DENNIS JE, LEE Z (2013) Imaging early state osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Orthopaedic Research Society*, doi: 10.1002/jor.22328.

- COURICEB, FOSS MC, 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.
- DAVEY GC, PATİL SB, O'LOUGHLIN A, O'BRIEN T(2014) Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of Diabetes mellitus. *Front Endocrinol*, doi: 10.3389/fendo.2014.00086.
- DAVIS EN, HAMILTON D, FONTAİNE JM (2012) Harnessing the immunomodulatory and tissue repair properties of mesenchymal stem cells to restore β cell. *Curr Diab Rep*, 12:612–622.
- DCCT (1993) The Diabetes Control and Complications Trial Research Group The Effect of Intensive. Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*, 329: 977–986.
- DOBREVA MP, PEREIRA PNG, DEPREST J, ZWIJSEN A (2010) On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *The International Journal of Developmental Biology*, 54: 761-777.
- DOMÍNGUEZ-BENDALA J, LANZONI G, INVERARDI L, RICORDIA C (2012) Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Translational Medicine*, 1, 59–63.
- EDLUND H (2002) Pancreatic organogenesis–developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet*, 3:524-532.
- FAIRBAIRN NG, RANDOLPH MA, REDMOND RW (2014) The clinical applications of human amnion in plastic surgery. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 67:662-675.
- FENN J, RASKINO M. (2008) Mastering the hype cycle: how to choose the right innovation at the right time. Boston, Mass, Harvard Business Press.
- FIGLIUZZI M, CORNOLTI R, PERICO N, ROTA C, MORIGI M, REMUZZI G, REMUZZI A, BENIGNI A (2009) Bone marrow–derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplantation Proceedings*, 41, 1797–1800.
- FOUDAH D, REDONDO J, CALDARA C, CARINI F, TREDICI G, MILOSO M (2013) Human mesenchymal stem cells express neuronal markers after osteogenic and adipogenic differentiation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, doi: 10.2478/S11658-013-0083-2.
- GALERA PD, RIBEIRO CR, SAPP HL, COLEMAN J, FONTES W, BROOKS DE (2014) Proteomic analysis of equine amniotic membrane: characterization of proteins. *Veterinary Ophthalmology*, 18:198–209.

- GHANNAM S, BOUFFI C, DJOUAD F, JORGENSEN C, NOEL D (2010) Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Research&Therapy*, doi:10.1186/scrt2.
- GIOVIALE MC, BELLAVIA M, DAMIANO G, LO MONTE AI (2013) Beyond islet transplantation in diabetes cell therapy: from embryonic stem cells to transdifferentiation of adult cells. *Transplantation Proceedings*, 45:2019–2024.
- GUYTON AC, HALL JE(2013) Textbook of Medical Physiology. Tibbi Fizyoloji. Çeviren: KURDAK SS, ISBN:978-975-420-956-3.
- GRAPENSPARR L, VASYLOVSKA S, LI Z, OLERUD J, JANSSON L, KOZLOVA E, CARLSSON POJ (2015) Co-transplantation of human pancreatic islets with post-migratory neural crest stem cells increases β -cell proliferation and vascular and neural regrowth. *Clin Endocrinol Metab*, 100(4):E583-E590.
- HEFTY TR, KUHR CS, CHONG KT, GUINEE DG, WANG W, REEMS JA, GREENBAUM CJ (2008) omental roll-up: atechnique for islet engraftment in a large animal model. *Journal of Surgical Research*, 161:134–138.
- HEMATTI P, KIM J, STEIN AP, KAUFMAN D (2013) Potential role of mesenchymal stromal cells in pancreatic islet transplantation. *Transplantation Reviews*, 27:21–29.
- HIGUCHI M, DUSTING JG, PESHAVARIYA H, JIANG F, HSIAO ST, CHAN EC, LIU G (2013) Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and forkhead box o1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells and Development*, 22: 878–888.
- HOU Y, HUANG Q, LIU T, GUO L (2008) Human amnion epithelial cells can be induced to differentiate into functional insulin-producing cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40: 830-839.
- ISHIDA T, INABA M, HISHA H, SUGIURA K, ADACHI Y, NAGATA N, OGAWA R, GOOD RA, IKEHARA S (1994) Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation, Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-Ipr/Ipr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor, *Journal of Immunology*, 152:3119–3127.
- JIANG F, MORAHAN G(2011) pancreatic stem cells: unresolved business. *Stem Cells in Clinic and Research*, ISBN 978-953-307-797-0.
- KARAÖZ E, OVALI E (2004) Kök Hücreler. ISBN:975-8053-53-1.
- KATUCHOVA J,TOTHOVA T, IANNACCONE S.F, TOPORCER T, HARVANOVA D, HILDEBRAND T, KILIK R, BACENKOVA D, FROHLICHOVA L, ROSOCHA J, BOBROV N, RADONAK J(2012) Impact of different pancreatic microenvironments on improvement in hyperglycemia and insulin deficiency in diabetic rats after transplantation of allogeneic mesenchymal stromal cells. *Journal of Surgical Research*,178, 188-195.

- KASSEM M, KRISTIANSEN M, ABDALLAH BM (2004) Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 95:209–214.
- KILIÇ E, CEYHAN T, ÇETİNKAYA UD (2007) Evaluation of differentiation potential of human bone marrowderived mesenchymal stromal cells to cartilage and bone cells. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 41:295-301.
- KIM H, YU JE, PARK C, KIM S(2010) Comparison of four pancreatic islet implantation sites. *J Korean Med Sci*, 25: 203-10.
- KIM MJ, KIM CW, CHOI Y.S. , KIM MH, PARK CJ, SUH Y (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.
- KIM SM, LIM JY, PARK SI, JEONG CH, OH JH, JEONG M, OH W, PARK SH, SUNG YC, JEUN SS (2008) Gene therapy using trail-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Research*, 68:9614–9623.
- KOÇ ON, DAY J, NIEDER M, GERSON SL, LAZARUS HM, KRIVIT W (2002) Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy and Hurler syndrome. *Bone marrow transplantation*, 30:215–22.
- LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B, GÖTHERSTRÖM C, HASSAN M, UZUNEL M, RINGDÉN O(2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, 363:1439–1441.
- LE BLANC K, RINGDÉN O(2005) Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 11 (5):321–334.
- LEE S, YOUN H, CHUNG T, HWANG DO W, OH SW, KANG KW, CHUNG JK, LEE DS(2014) In vivo bioluminescence imaging of transplanted mesenchymal stem cells as a potential source for pancreatic regeneration. *Mol Imaging*, doi: 10.2310/7290.2014.00023.
- LEE SY, LEE J, PARK H, LIM Y, LEE J, WANG S, LEE B(2013) Isolation of mesenchymal stromal cells (mscs) from human adenoid tissue. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31:513-524.
- LEÓN D, STANLEY CA(2007) Mechanisms of disease: advances in diagnosis and treatment of hyperinsulinism in neonates. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 3:57-68.
- LI F, ZHAO SZ (2014) Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World J Stem Cells*, 6: 296-304.

- LI J, EZZELARAB MB, COOPER DKC (2012) Do mesenchymal stem cells function across species barriers? *Xenotransplantation*, 19: 273–285.
- LIU Y, CAO D, GUO L, GUO S, XU J, ZHUANG H (2013) Amniotic stem cell transplantation therapy for type 1 diabetes: A case report. *Journal of International Medical Research*, 41: 1370–1377.
- LIU Y, WANG S, SHI S (2012) The role of recipient T cells in mesenchymal stem cell-based tissue regeneration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44: 2044–2050.
- LO K, KOHANIM S, TRIEF D, CHODOSH J (2013) Role of Amniotic Membrane Transplantation in Acute Chemical Injury. *International Ophthalmology Clinics*, 53: 33–41.
- MAFI P, HINDOCHA S, MAFI R, GRIFFIN M, KHAN WS (2011) Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization – a systematic review of the literature. *The Open Orthopaedics Journal*, 5:253-260.
- MALDONATO A, LUCISANO A, MANICCIA E, LUCIANI G, AGNES R, MAGALINI S, CAMA A, MARANI F, BARBETTI F, FATTIBENE M (1985) Amniotic membrane diffusion chambers: a new possibility for pancreatic islet transplantation. *Life Support Syst*, 3: 640-4.
- MARINOVA-MUTAFCHIEVA L, WILLIAMS RO, FUNA K, MAINI RN, ZVAIFLER NJ (2002) Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 46:507–513.
- MATUR İ, SOLMAZ S (2011) Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı.
- MAHGOUB MA, AMMAR A, FAYEZ M, EDRİS A, HAZEM A, AKL M, HAMMAM O(2004) Neovascularization of the amniotic membrane as a biological immune barrier. *Transplant Proc*, 36:1194-1198.
- MAMEDE AC, CARVALHO MJ, ABRANTES AM, LARANJO M, MAIA CJ, BOTELHO MF(2012) Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications, *Cell Tissue Res*, 349:447–458.
- MAMEDE AC, LARANJO M, CARVALHO M J, ABRANTES AM, PİRES AS, BRİTO A F, MOURA P, MAİA CJ, BOTELHO MF (2014) Effect of amniotic membrane proteins in human cancer cell lines: an exploratory study. *J Membrane Biol*, 247:357–360.
- McCALL M, SHAPIRO JAM (2012) Update on islet transplantation. *Cold Spring Harb Perspect*, doi: 10.1101/cshperspect.a007823.
- MCQUİLLİNG JP, ARENAS-HERRERA J, CHİLDERS C, PARETA RA, KHANNA O, JİANG B, BREY EM, FARNEY AC, OPARA EC(2011) New alginate microcapsule

system for angiogenic protein delivery and immunoisolation of islets for transplantation in the rat omentum pouch. *Transplant Proc*, 43: 3262–3264.

MIKI T, STROM SC (2006) Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Reviews*, ISSN 1550–8943/06/2:133–142.

MULLER I, KUSTERMAN-KUHN B, HOLZWARTH C, ISENSEE G, VAEGLER M, HARZER K, KRÄGELOH-MANN I, HANDGRETINGER R, BRUCHELT G (2006) In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Experimental Hematology*, 34 (10), 1413–1419.

MIAO G, OSTROWSKI RP, MACE J, HOUGH J, HOPPER A, PEVERINI R, CHINNOCK R, ZHANG J, HATHOUT E (2006) Dynamic production of hypoxia-inducible factor-1alpha in early transplanted islets. *Am J Transplant*, 6: 2636-2643.

MUNDRA V, GERLING CI, MAHATO IR (2013) Mesenchymal stem cell-based therapy. *Molecular pharmaceutics*, 10, 77–89.

NAGANO K, YOSHIDA Y, ISOBE T (2008) Cell surface biomarkers of embryonic stem cells. *Proteomics*, 8, 4025–4035.

NIKNEJAD H, PEIROVI H, JORJANI M, AHMADIANI A, GHANAVI J, SEIFALIANA M (2008) Properties of the amniotic membrane for potential use in Tissue Engineering. *European Cells and Materials*, 15:88- 99.

NOYAN A (2004) Fizioloji. 15.baskı, s: 1048-1055.

ORBAY H, TOBITA M, MIZUNO H (2012) Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem Cells International*, doi:10.1155/2012/461718.

ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P (2001) Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 938, 221–229.

PAEK HJ, KIM C, WILLIAMS SK (2014) Adipose stem cell-based regenerative medicine for reversal of diabetic hyperglycemia. *World J Diabetes*, 5: 235-243.

PAGLIUCA FW, MILLMAN JR, GUTTLER M, SEGEL M, DERVORT AV, RYU JH, PETERSON QP, GREINER D, MELTON DA (2014) Generation of functional human pancreatic b cells in vitro. *Cell*, 159:428-39.

PARETA R, MCQUILLING JP, SITTADJODY S, JENKINS R, BOWDEN S, ORLANDO , FARNEY AC, BREY EM, OPARA EC (2014) Long-term function of islets encapsulated in a redesigned alginate microcapsule construct in omentum pouches of immune-competent diabetic rats. *Pancreas*, 43(4):605-13.

- PHELPS EA, HEADEN DM, TAYLOR WR, THULÉ PM, GARCÍA AJ (2013) Vasculogenic bio-synthetic hydrogel for enhancement of pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Biomaterials*, 34:4602-11.
- PILEGGI A, RICORDI C, ALESSIANI M, INVERARDI L (2001) Factors influencing islet of langerhans graft function and monitoring. *Clinica Chimica Acta*, 310:3-16.
- PITTENGER MF, MACKAY MA, BECK CS, JAISWAL KR, DOUGLAS R, MOSCA DJ, MOORMAN AM, SIMONETTI WD, CRAIG S (2013) Human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999;284:143–147.
- RA JC, KANG SK, SHIN IS, PARK GH, JOO SA, KIM JG, KANG BC, LEE YS, NAKAMA K, PIAO M, SOHL B, KURTZ A (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.
- REN G, CHEN X, LI W, REN X., ZHANG Y, SHI Y (2012) Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: Emerging Issues. *Stem Cells Translational Medicine*, 1:51-58.
- RENNIE K, GRUSLIN A, HENGSTSCHLAGER M, PEI D, CAI J, NIKAIDO T, BANI-YAGHOUB M (2012) Applications of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. *Stem Cells International*, doi:10.1155/2012/721538.
- REZANIA A, BRUIN JE, ARORA P, RUBIN A, BATUSHANSKY I, ASADI A, O'DWYER S, QUIKAMP N, MOJIBIAN M, ALBRECHT T, YANG YHC, JOHNSON JD, KIEFFER TJ (2014) Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.3033.
- RIAU AK, BEUERMAN RW, LIM LS, MEHTA JS (2009) Preservation, sterilization and de-epithelialization of human amniotic membrane for use in ocular surface reconstruction. *Biomaterials*, 31:216–225.
- RINGDÉN O, UZUNEL M, RASMUSSEN I, REMBERGER M, SUNDBERG B, LONNIES H, MARSCHALL HU, DLUGOSZ A, SZAKOS A, HASSAN Z, OMAZIĆ B, ASCHAN J, BARKHOLT L, LE BLANC K (2006) Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, 81:1390–1397.
- RYBKA WB, FONTES PA, RAO AS, WINKELSTEIN A, RICORDI C, BALL ED, STARZL TE (1995) Hematopoietic progenitor cell content of vertebral body marrow used for combined solid organ and bone marrow transplantation. *Transplantation*, 59: 871–874.
- SHAPIRO AMJ, LAKEY JRT, RYAN EA (2000) Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *The New England Journal of Medicine*, 343:230–238.
- STANEKZAI J, ISENOVIC ER, MOUSA SA (2012) Treatment options for diabetes: Potential role of stem cells. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 98:361–368.

- SOLARI MG, SRINIVASAN S, BOUMAZA I, UNADKAT J, HARB G, GARCIA-OCANA A, FEILI-HARIRI M (2009) Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet allograft survival and sustained normoglycemia. *J Autoimmun*, 32:116-24.
- ŞAHİN F, SAYDAM G, OMA Y SB (2005) Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi*, 15:48-56.
- TODA A, OKABE M, YOSHIDA T, NIKAI DO T (2007) The potential of amniotic membrane/amnion-derived cells for regeneration of various tissues. *J Pharmacol Sci*, 105, 215 – 228.
- TOMITA M, ADACHI Y, YAMADA H, TAKAHASHI K, KIUCHI K, OYAIZU H, IKEBUKURO K, KANEDA H, MATSUMURA M, IKEHARA S (2002) Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*, 20 :279–283.
- UÇKAN ÇETİNKAYA D(2007) Mezenkimal kök hücreler: nerede? ne zaman? kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. 4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi, Bursa, Konuşma Metinleri, 8–14.
- WANG S, QU X, ZHAO RC (2012) Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, doi:10.1186/1756-8722-5-19.
- WELTER FJ, PENICK JK, SOLCHAGA AL (2013) Assessing adipogenic potential of mesenchymal stem cells: a rapid three-dimensional culture screening technique. *Stem Cells International*, Article ID 806525, 8 pages.
- WU H, MAHATO RI(2014) Mesenchymal stem cell-based therapy for type 1 diabetes. *Discov Med*, 17:139-43.
- WYNN RF, HART CA, CORRADI-PERİNİ C, O'NEILL L, EVANS CA, WRAITH JE, FAIRBAIRN LJ, BELLANTUONO I (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104:2643–2645.
- YALÇIN GS (2004) Yeni tespit tip 2 diabetes mellituslu hastalarda pankreas beta hücre rezervinin değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- YALVAÇ ME (2011) İnsan üçüncü molar diş jerm kök hücrelerinin yara iyileştirici, anjiojenik, ve nöroprotektif etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- YOSHIMATSU G, SAKATA N, TSUCHIYA H, MINOWA T, TAKEMURA T, MORITA H, HATA T, FUKASE M, AOKI T, ISHIDA M, MOTOI F, NAITOH T, KATAYOSE Y, EGAWA S, UNNO M (2015) The co-transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells

reduced inflammation in intramuscular islet transplantation. *Plos One*, doi:10.1371/journal.pone.0117561.

ZARET KS (2008) Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet*, 9:329-340.

ZHANG ZY, ZHOU ZQ, SONG KB, KIM SC, ZHOU GW (2014) Hepatic stellate cells induce immunotolerance of islet allografts. *Transplant Proc*, 46:1594-600.



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 08.06.2015
Protokol No. : 2015/28
Proje yürütücüsünün adı soyadı: Yard. Doç. Dr. Nurgül ATMACA

Projenin başlığı : **Diyabetik Ratlarda Adacık Hücre Transplantasyonunda Mezenkimal Kök Hücre ve Amniyon Membran Birlikteliği (Düzeltilme)**

Proje ekibi : Prof. Dr. Ersin Fadılhoğlu, Dr. Ferda Pınarlı,
Prof. Dr. Tuncay Delibaşı, Uzm. Dr. Aynur Albayrak,
Bio. Meral Tiryaki, Bio. Gülbahar Böyük, Kim.
Sercan Mercan

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Wistar Hannover

Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 10-12 haftalık, 280- 320 grAdı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik KuruluYönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi biretiksakinca bulunmadığına karar verildi.

(KATILMADI) Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI (Kurul Başkanı)		
(İmza) Uzm. Vet. Hek. M. Ziya KARAKULLUKÇU (Üye)	(İmza) Doç. Dr. Osman YÜKSEL (Başkan Vekili)	(İmza) Doç. Dr. Ekrem YETER (Üye)
Ecz. İlhan ÇAYIR (Üye) (İmza)	Ecz. Mine BARUT (Üye) (İmza)	

ÖZGEÇMİŞ

MERAL TİRYAKİ

Telefon: +90 532 684 35 87

E-mail: meralsabantiryaki@hotmail.com

Adres: 19 Mayıs Mah. Çamlık Sok.

15/13 Keçiören/ANKARA -TURKEY

EĞİTİM ve ÖĞRENİM BİLGİLERİ

1. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Yüksekokulu /Anestezi Teknikerliği
1995-1997
2. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi/ Biyoloji- 2000-2004
3. Kırıkkale Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek
Lisans 2012-Halen

ARAŞTIRMA DENEYİMLERİ

- Rodentlerden Kemik İliği Hücre İzolasyonu
- Rodentlerden Kemik İliğinden Mesenkimal Kök Hücre Eldesi
- Rodentlerden Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi
- İnsan Yağ Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Eldesi
- İnsan Kord Kanından Mezenkimal Kök Hücre Eldesi
- Hücre Kültürü Teknikleri
- ELİSA ile Çalışma Teknikleri
- DNA İzolasyon Teknikleri
- RNA İzolasyon Teknikleri
- Spektrofotometri Protein Tayin Teknikleri
- İmmün-Histokimya Boyama Teknikleri
- PCR Teknikleri
- Jel Elektrophorez Çalışma Teknikleri

- İdrar Mikroskopisi
- Biyokimya Otoanalizör Cihaz Kullanım ve Kalibrasyonu
- Patoloji Blok-Kesit-Boyama Teknikleri
- Bilimsel Araştırma ve Literatür Taraması Yapma
- Kan Gazı Çalışma Teknikleri
- Ratlardan Adacık Hücre İzolasyonu ve Sayımı
- Deney Hayvanlarında Girişimsel İşlemler

İLGİLENDİĞİ ARAŞTIRMA KONULARI

- Kök Hücre Tedavileri ve Diyabet
- Mezenkimal Kök Hücre İzolasyon ve Hücre Kültür Metodları

GÖREV YERLERİ

1. Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi
1998-2005 Anestezi ve Reanimasyon Bölümü
2005-2009 Biyokimya Laboratuvarı
2009-2010 Patoloji Laboratuvarı
2. **2011-Halen.** Pankreas Adacık Hücre Transplantasyonu Merkezi-Kök Hücre ve Genetik Tanı Merkezi

KURSLAR ve SERTİFİKALAR

1. III. Pankreas Adacık Hücre Araştırmaları Sempozyumu: Pankreas Adacık Hücre Enkapsülasyonu Kursu, 23-29 Mayıs 2011, Ankara
2. Kanser Kök Hücre Sempozyumu: Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Derneği-

Pamukkale Üniversitesi (17-19 Şubat 2012)

3. IV. Pankreas Adacık Hücre Araştırmaları Sempozyumu: Pankreatik adacık ve kök hücre korelasyonu kursu (23-29 Nisan 2012)
4. Kocaeli Üniversitesi '18. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu'(5-9 Kasım 2012)
5. xCELLigence RTCA DP Sistem Eğitim Sertifikası(14 Aralık 2012)
6. Kocaeli Üniversitesi Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi (6 Kasım 2012)
7. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası(11-25 Ocak 2014)

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Emrullah Beyazyıldız, Uğur Acar, Özlem Beyazyıldız, Ferda Alparslan Pınarlı, Aynur Albayrak, Nagihan Uğurlu, Meral Tiryaki, Tuncay Delibas
“Comparison of Prednisolone Acetate and Loteprednol Etabonate for the Treatment of Benzalkonium Chloride-Induced Dry Eye Syndrome in Rats”, Journal Of Ocular Pharmacology And Therapeutics, DOI: 10.1089/jop.2013.0129, 2014
2. İrem GÜL SANCAK, Asuman ÖZEN, Ferda Alpaslan PINARLI, Meral TİRYAKİ, Ahmet CEYLAN, Uğur ACAR, Tuncay DELİBAŞI **“Limbic Stem Cells in Dogs and Cats Their Identification Culture and Differentiation into Keratinocytes”, Kafkas Univ Vet Fak Derg x (x): xxx-xxx, 2014 DOI: 10.9775/kvfd.2014.11355**

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:

1. Umut Taşdelen, Ferda Alpaslan Pınarlı, Demet İzgü, Gülbahar Böyük, Sercan Mercan, Meral Tiryaki, Tuncay Delibaşı **“Effects of human amnion membrane on cell viability and functionality of rat Langerhans islet cells” Avrupa Biyoteknoloji Kongresi 2013 Bratislava/SLOVAKYA**

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

1. Meltem Ateş, Ferda Alpaslan Pınarlı, Gülnur Take Kaplanoğlu, Meral Tiryaki, Sercan Mercan, Davut Erdoğan, Gülbahar Büyük, Zehra Fırat, Nilnur Eyerci, Oya Topaloğlu, Ahmet Yeşilyurt **A Modified Method for Isolation of Rat Hepatocyte: Saving Time Increases Viability.** Niche 2012; 1: 8-11, DOI: 10.5152/niche.2012.02
2. Hülya Akdeniz, Zeynep Giniş, Selçuk Çomoğlu, Bilge Koçer, Ferda Pınarlı, Meral Tiryaki, Namık Delibaş **Comparison of Neuronal and Axonal Degeneration Markers Cystatin-C, Beta-Amyloid (1-42), Total and Phosphorylated Tau Protein Levels in Cerebrospinal Fluids of Patients with Multiple Sclerosis and Alzheimer's Disease** , Niche 2012; 1: 24-30 DOI: 10.5152/niche.2012.06

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. Mehmet Koray Sevinç , Güngör Sobacı , Ferda Pınarlı , Aynur Albayrak , Tuncay Delibaşı, Meral Tiryaki **“Limbik Mezenkimal Kök Hücrelerin Tapetoretinal Dejenerasyon Modelinde Retina Dış Katlarının Replasmanı Tedavisinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması”** , Türk Oftalmoloji Derneği 47. Ulusal Kongresi, 6-10 Kasım 2013
2. Delibasi,T., Alpaslan Pinarli, F.,Albayrak, A.,Ginis,Z., Ozturk, G.,Erden,G., Tiryaki, M., Guler, O G., Boyuk, G., Yesilyurt, A. **“Ratlarda Streptozosin İle Oluşturulmuş Deney Modelinde Kordon Kanı Serum ve Kemik İliği Mononükleer Hücre Kullanımı Diyabeti Tedavi Edebilir Mi?”**, 34.Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi, 11 - 15 Nisan2012, Antalya

3. Ateş,M., Alpaslan Pinarlı, F., Take Kaplanoğlu,G., **Tiryaki, M.**, Mercan, S., Erdoğan, D., Boyuk, G., Topaloğlu, O.,Yesilyurt, A. **“Rat Karaciğerinden Hepatosit İzolasyonunda Modifiye Bir Yöntem: Zamandan Kazanmak”**. 34.Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi, 11 - 15 Nisan2012, Antalya
4. Gürdal C.,Acar M., Doğan A.S., Pınarlı F.A., **Tiryaki M.**, Delibaşı T. **“Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonunda Kök Hücre Yüklenmiş Kontakt Lens İle Limbal Kök Hücre Yetmezliği Tedavisi: Alkali Yanık Modeli”**. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi 5-9 Kasım 2014,Antalya
5. Acar M., Gürdal C., Pınarlı F.A., **Tiryaki M.**, Han Ü., Delibaşı T. **“Lakrimal Bez Patolojisine İkincil Sekretuar Kuru Göz Modelinde Lakrimal Bez Kök Hücre Tedavisi”**. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi 5-9 Kasım 2014,Antalya

Ödüller:

1. **En İyi Araştırma 3.lük Ödülü**; Gürdal C.,Acar M., Doğan A.S., Pınarlı F.A., **Tiryaki M.**, Delibaşı T. **“Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonunda Kök Hücre Yüklenmiş Kontakt Lens İle Limbal Kök Hücre Yetmezliği Tedavisi: Alkali Yanık Modeli”**. Türk Oftalmoloji Derneği 48. Ulusal Kongresi 5-9 Kasım 2014,Antalya

