



**KİMYASAL ŞAPERONLARIN *IN VITRO* ORTAMDA SIÇAN PANKREAS
ADACIK HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ**

Mürsel ÇALIŞKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2016

Mürsel ÇALIŞKAN tarafından hazırlanan “KİMYASAL ŞAPERONLARIN *IN VITRO* ORTAMDA SIÇAN PANKREAS ADACIK HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ahmet YAŞAR
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan : Prof. Dr. Emel EMREGÜL
Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Doç. Dr. Fatma ARSLAN
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 14/01/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Metin GÜRÜ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mürsel ÇALIŞKAN

14/01/2016

KİMYASAL ŞAPERONLARIN *IN VITRO* ORTAMDA SIÇAN PANKREAS ADACIK
HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Mürsel ÇALIŞKAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2016

ÖZET

Hüresel şaperonlar, protein sentezi sonrası hücre içinde sentezlenen bu proteinlerin görevlerini yerine getirebilmesi için kritik bir öneme sahip üç boyutlu şekillerini almalarını sağlayan biyolojik moleküllerdir. Bu çalışmanın amacı, kimyasal şaperonlardan Tauroursodeoksikolik Asit (TUDCA) ve 4-Fenilbütirat (4-PBA) biyolojik şaperonların çalışma mekanizmasına benzer bir şekilde sıçan pankreas adacık hücre canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Sıçanlardan izole edilen adacık hücreleri 250-1500 μ M aralığındaki belli derişimde TUDCA ve 4-PBA kimyasal maddeleri ile kültüre edildi. Sonra, adacık hücrelerinin canlılığı floresein diasetat (FDA) ve propidyum iyodür (PI) boyaları kullanılarak floresan mikroskopu ile değerlendirildi. 24. Saat ve 48. saatlerde 1mM'lık derişimdeki TUDCA kimyasal maddesi eklenen hücreler ile 0,5mM'lık derişimdeki 4-PBA kimyasal maddesi eklenen hücreler, kontrol grubundaki hücreler ile kıyas edildiğinde canlılık yüzdeleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulundu ($P<0,05$). Canlılık oranındaki bu artışın, hücre kültürüne eklenen yukarıda belirtilen derişimdeki kimyasal şaperonların, hücrelerdeki endoplazmik retikulum (ER) stresini azaltarak hücre ölüm oranında düşüşe neden olmasından kaynaklandığı gözlenmiştir. Dünyada, tip1 diyabetli hastalara alternatif bir tedavi seçeneği olarak uygulanan adacık hücre naklinde, hüresel düzeyde bu kimyasallar ile yapılacak bir tedavi edici uygulamanın, nakil öncesi dönemde nakledilecek adacık hücrelerinin canlılığında ve uzun vadeli fonksiyonelliğinde iyileştirme sağlayabileceği öngörülmektedir.

Bilim Kodu : 201.1.020
Anahtar Kelimeler : Pankreas adacık hücresi, kimyasal şaperonlar, endoplazmik retikulum stresi
Sayfa Adedi : 54
Danışman : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

THE EFFECT OF CHEMICAL CHAPERONES ON THE VIABILITY OF RAT
PANCREATIC ISLET CELLS *IN VITRO* MEDIUM

(M.Sc. Thesis)

Mürsel ÇALIŞKAN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2016

ABSTRACT

Chaperones are biological molecules, which give the proteins their three-dimensional structures in order to perform their duties with in the cell after the synthesis of those proteins. The purpose of this study was to investigate the effects of Tauroursodeoxycholicacid (TUDCA) and 4- Phenylbutyrate (4-PBA) chemical chaperones on the rat pancreatic islet cell viability. Islet cells isolated from rats were cultured with in a certain concentration of range from 250 to 1500 μ M TUDCA and 4-PBA chemicals. Then, the viability of islet cells was determined by the fluorescence microscopy using fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodure (PI) dyes. 1 mM concentration of TUDCA and 0,5 mM concentration of 4-PBA chemicals were added to isolated islets, and after 24th and 48th hours of cultivation, the viability of those cells was evaluated. When we compared the chaperone added group with the control group, chaperone added cells were significantly higher percentage of cell viability than the control group in statistical terms ($P < 0.05$). The viability of islet cells was increased due to reduced endoplasmic reticulum (ER) stress by adding mentioned chemical chaperones at defined concentrations. In islet cell transplantation, as an alternative treatment for type 1 diabetes, at cell level a therapeutic application with those chemical chaperones for isolated islet cells before transplantation might have positive effect on the viability and the functionality of those islet cells in the post-transplantation period.

Science Code : 201.1.020

Key Words : Pancreatic islet cells, chemical chaperones, endoplasmic reticulum stress

Page Number : 54

Supervisor : Prof. Dr. Ahmet YAŞAR

TEŐEKKÖR

Tez alıŐmamn tÖm aşamalarında bana yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Ahmet YAŞAR'a, bana inanan ve çalışma fırsatı veren sayın hocalarım Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI, Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU, Doç. Dr. Fatma ARSLAN ve Doç. Dr. Servet ÇETE'ye yardımlarından dolayı teŐekkÖr ederim. Ayrıca tez çalıŐmam sırasında benimle beraber çalıŐıp emek veren Adacell Araştırma Merkezindeki arkadaşlarımdan Sercan MERCAN, GÖlbahar BÖYÖK, Sedat FEYAT, Meral TİRYAKİ, Taner TEKER, Buket YURTERİ, Hakan GÖLLÖ, HÖlya ÖZCAN, Safiye BÖYÖK, Meral SATILMIŐ, İbrahim ULUSOY ve Murat SATILMIŐ'a teŐekkÖrü bir borç bilirim. Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve dostlarıma teŐekkÖrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KİMYASAL ŞAPERONLAR VE PANKREAS LANGERHANS ADACIK HÜCRELERİ	5
2.1. Pankreasın Morfolojik Özellikleri.....	5
2.2. Pankreas ve Adacık Hücre Fizyolojisi	6
2.3. Pankreasın Ekzokrin İşlevleri	6
2.4. Pankreasın Endokrin İşlevleri	7
2.5. Langerhans Adacıklarında Endoplazmik Retikulum ve Stres Mekanizması.....	8
2.6. Şaperonlar	10
2.6.1. Moleküler şaperonlar	10
2.6.2. Kimyasal şaperonlar.....	10
2.7. Kaynak Araştırması.....	12
2.7.1. Adacık hücre çalışmalarına ait kaynak araştırmaları	12
2.7.2. Kimyasal şaperon çalışmalarına ait kaynak araştırmaları.....	13

	Sayfa
3. DENEYSEL KISIM	17
3.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	17
3.2. DeneYlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	14
3.3. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar	18
3.3.1. Ameliyat masası	18
3.3.2. Ameliyat mikroskobu	18
3.3.3. Biyolojik güvenlik kabini	18
3.3.4. Santrifüj cihazı	19
3.3.5. Hücre inkübatörü	19
3.3.6. Hücre mikroskobu	19
3.3.7. pH metre	19
3.3.8. Mikro pipet	19
3.3.9. Hassas terazi	19
3.4. Sıçanlardan Pankreas Adacık Hücre Saflaştırılması	20
3.4.1. Çalışılacak deney hayvanlarının özelliklerinin belirlenmesi	20
3.4.2. Sıçan pankreasının elde edilmesi	21
3.4.3. Sıçan pankreasından adacık hücre elde etmesi	22
3.4.4. Adacık hücrelerinin sayımı	25
3.5. Sıçanlardan Pankreas Adacık Hücrelerinin Kimyasal Şaparonlar ile Muamelesi	26
3.5.1. Adacık hücre kültür çözeltisi için kimyasal şaparonların hazırlanması	26
3.5.2. Adacık hücrelerinin kimyasal şaparonlar ile muamelesi	27
3.6. Adacık Hücre Canlılıklarının Floresan Mikroskop ile Değerlendirilmesi ve Analizi	27
3.7. İstatiksel Analiz	29

	Sayfa
4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA	31
4.1. Kontrol Grubu Canlılık Deney Sonuçları ve Tartışma	31
4.2. TUDCA Grubu Canlılık Deney Sonuçları ve Tartışma.....	32
4.2.1. 900 μ M ve 1100 μ M TUDCA canlılık deney sonuçları ve tartışma.....	36
4.3. 4-PBA Grubu Canlılık Deney Sonuçları ve Tartışma.....	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	45
EKLER.....	51
EK-1. Hayvan deneyleri yerel etik kurulu kararı.....	52
EK-2. Deney hayvanları kullanım sertifikası.....	53
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Adacık hücre nakli	2
Şekil 2.1. Pankreasın şekli	5
Şekil 2.2. Adacık hücre şeması	6
Şekil 2.3. İnsülin hormonunun yapısı	8
Şekil 2.4. Sodyum fenilbütiratın yapısı.....	11
Şekil 2.5. TUDCA'nın yapısı.....	12
Şekil 4.1. Kontrol grubu 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	31
Şekil 4.2. 250µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	33
Şekil 4.3. 500µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	33
Şekil 4.4. 750µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	34
Şekil 4.5. 1000µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	34
Şekil 4.6. 1250µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	35
Şekil 4.7. 1500µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	35
Şekil 4.8. İlave çalışma, Kontrol grubu 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı	37
Şekil 4.9. İlave çalışma, 900µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	37
Şekil 4.10. İlave çalışma, 1100µM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	38
Şekil 4.11. 250µM derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	39

Şekil	Sayfa
Şekil 4.12. 500µM derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	39
Şekil 4.13. 750µM derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	40
Şekil 4.14. 1000µM derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	40
Şekil 4.15. 1250µM derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	41
Şekil 4.16. 1500µM derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.....	41
Şekil 5.1. Uygulanan tüm derişimdeki TUDCA ve 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranının kontrol grubu ile karşılaştırması	44

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Deney hayvanları laboratuvarındaki sıçanların konumlanması.....	20
Resim 3.2. Abdominal bölgenin kesilmesi.....	21
Resim 3.3. Pankreasın kollajenaz tipV enzimi ile şişirilmesi	22
Resim 3.4. Pankreas adacık hücrelerinin süzülmesi.....	24
Resim 3.5. Yoğunluk farkı oluşum sonrası adacık hücrelerinin konumlanma durumu	24
Resim 3.6. İzole edilen adacık hücresi.....	25
Resim 3.7. Adacık hücrelerinin DTZ ile boyama görüntüsü.....	26
Resim 3.8. Floresan mikroskop ile hücre canlılığının bakılması.....	28
Resim 3.9. Matlab programı ile hücre canlılığının hesaplanması.....	28
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılıklarının floresan mikroskobu görüntüsü.....	32
Resim 4.2. 1000 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılıklarının floresan mikroskop görüntüsü.....	36
Resim 4.3. 500 μ M derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılıklarının floresan mikroskop görüntüsü.....	42

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sodyum 4-fenil butirat'ın kimyasal özellikleri.....	11
Çizelge 2.2. Tauroursodeoksikolik asit'in kimyasal özellikleri.....	12
Çizelge 3.1. Deneysel kısımda kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edildikleri üretici firmalar	17
Çizelge 3.2. Kontrol ve deney grupları	27
Çizelge 4.1. 900 µM ve 1100 µM TUDCA, Kontrol ve deney grupları	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Celsius derecesi
Rpm	Dakikadaki devir
δ	Gama
g	Gram
G	İğne çapı
kg	Kilogram
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
cm	Santimetre
%	Yüzde
Kısaltmalar	Açıklamalar
4-PBA	4-Fenilbütirat
eIF2α	α ökaryotik başlama faktörü 2
IEQ	Adacık eşdeğeri hesabı
CHOP	Apoptozisten sorumlu C/EBP – homolog protein
CRE	cAMP cevap elementi
C/EBP	CCAAT/geliştirici-bağlanma proteini
dsRNA	Çift zincirli RNA
DTZ	Dithizone
ER	Endoplazmik Retikulum

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ERAD	ER- ilişkili protein degradasyonu
FDA	Floresein diasetat
GRP78	Glukoz düzenleyici protein
HBSS	Hank'sBalanced Salt Solution
HSP	Isı şoku proteinleri
IRE1α	İnozitol gerektiren enzim-1 α
M.Ö.	Milattan Önce
M.S.	Milattan Sonra
PP	PankreatikPolipeptit
PERK	Protein kinazdsRNA benzeri ER kinaz
RNA	Ribonükleik asit
RPMI	Roswell Park MemorialInstitute
cAMP	Siklik adenozinmonofosfat
S1P	Site 1 proteaz
S2P	Site 2 proteaz
TUDCA	Tauroursodeoksikolik Asit
ATF4	Transkripsiyon faktör-4
ATF6	Transkripsiyon faktör-6
XBP1	X-Box Binding Protein 1
XBP1s	X-Box Binding Protein 1 – splicing
HEPA	Yüksek verimli partikül filtresi

1. GİRİŞ

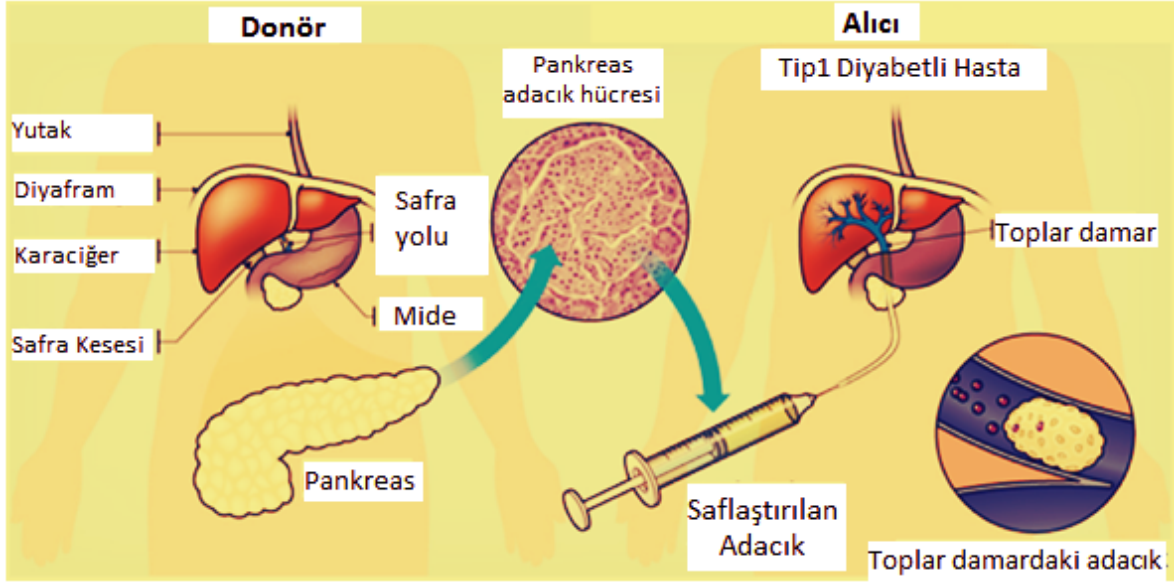
Şeker hastalığı tüm dünyada en sık rastlanan hastalıkların başında gelmekte olup, insülinin gerçek ya da işlevsel eksikliği sonucu ortaya çıkan bozukluk ile karakterize bir hastalıktır. Şeker hastalığı, gelişimine bağlı olarak Tip1 ve Tip2 olarak iki türü bulunmaktadır. Tip1 şeker hastalığı, genetik ve çevresel faktörlerin karşılıklı etkileşimi ile gelişen otoimmün bir hastalık olup, pankreasın adacık hücrelerinde bulunan beta hücrelerindeki harabiyet sonucunda insülin yetersizliği ile karakterizedir. Tip2 şeker hastalığı, insüline hücre zar reseptörlerinin direnç göstermesi ya da insülin duyarlılığının azalması ile insülin sentezi ve salgılanmasının azalması ile meydana gelen bir hastalıktır [1, 2].

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, 2000 yılında tüm dünyada en az 171 milyon şeker hastası (toplam dünya nüfusunun %2,8'i) mevcut olup, tahminlere göre 100 milyon civarındaki şeker hasta sayısının önümüzdeki 10 yılın sonunda 200 milyona ve 21. Yüzyılın ilk çeyreğinde ise 300 milyona ulaşması beklenmektedir [3]. Türkiye'de ise bu oran 2002 yılında 2.217.000 iken 2025'te 4.500.000'i aşması beklenmektedir [4].

Tip2 şeker hastalığının tedavisi için ağız yoluyla alınan antidiyabetik ilaç kullanımı mevcuttur. Bu tedavide kullanılan ilaçlar, karaciğerden salınan glukoz miktarını düzenleyip, kısmi olarak insülin direncini azaltabilirler ya da insülin direncini iyileştirebilirler.

Tip1 şeker hastalığı, sitokinlerin adacık hücrelerinde yer alan beta hücrelerine saldırı düzenleyip öldürmeye çalışması sonucu oluşan metabolik bir hastalıktır [5, 6]. Tip1 diyabette en yaygın tedavi, insülinin vücuda enjekte edilmesidir. Başta Amerika ve bazı Avrupa ülkelerinde başlayan diğer bir tedavi yönteminde, beyin ölümü gerçekleşmiş donörden alınan pankreasın adacık saflaştırılması sonrası Tip1 diyabetli hastaların karaciğer toplar damarına enjekte edilmesi sonucu bu hücrelerin insülin salgılayarak kan şekerini normoglisemik düzeye ulaştırmasıdır [7-10]; (Şekil1.1). Adacık hücre nakli öncesi ve sonrasında hücre ölümlerinin durdurulması için çalışmalar yapılmaktadır. Nakil sonrasındaki adacık hücre ölümlerini durdurmak için yapılan çalışmalarda immün sistemi baskılayıcı ilaç ve adacık hücre kapsülleme çalışmaları yapılmaktadır [11, 12]. Nakil öncesi adacık hücre ölümlerini durdurmak için yapılan çalışmalarda ise ilk önce in vitro deneylerin şart olduğu bilinmektedir. Laboratuvar

ortamındaki bu hücrelerin sağ kalımını artırmaya yönelik önemli çalışma basamaklarından biri de, Endoplazmik Retikulumda (ER) stres kaynaklı aktifleşen mekanizmalardır [13].



Şekil 1.1. Adacık hücre nakli

ER, kalsiyum dengesi, protein sentez ve modifikasyonu ve lipit sentezi dahil, hücresel süreçleri geniş bir yelpazede düzenleyen çok fonksiyonlu hücre elemanıdır [14]. ER stresi, ER protein katlanmasını, çeşitli koşullarda engellenmesini tetikleyici bir hücresel süreç oluşturmaktadır. Ökaryotik hücrelerindeki ER, katlanmamış proteinleri temizlemek ve ER dengesini tamir etmeyi amaçlamaktadır. ER stresinin geri dönmediği durumlarda, hücresel işlevler bozulabilir ve bu durumda genellikle hücre ölümü görülür [15].

Proteinin biyosentezi sonrası kalite kontrol mekanizmasında ilk görev, hücredeki moleküler şaperondur. Bu moleküller, proteinin katlanmasını veya katlanamayan proteinin parçalanmasını sağlar. Moleküler şaperon ailesinin üyeleri olarak bilinen ısı-şok proteinleri (HSP), yüksek sıcaklık ve oksidatif stres gibi koşullarda katlanmamış proteinlerin katlanmasını düzenler [16].

Düşük molekül kütleli olan kimyasal şaperonlar, hücre içi katlanamamış veya yanlış katlanmış proteinlerin onarımını sağlar [17]. Safra asitleri ve bunların türevlerinden olan TUDCA

ile kimyasal veya medikal şaperonlardan 4-PBA, ER stresini düzenlemektedir [18]. ER stresi ile aktifleşen hücre içi ölüm yolları sisteminde, bu kimyasal şaperonlar ile hücre ölümü engellenebilir [19]. Her iki kimyasal maddenin obez ve diyabetik farelerde damar yoluyla ve ağız yoluyla verilen kimyasal şaperon tedavisi sonucunda antidiyabetik bir madde olarak hareket ederek hiperglisemi ve periferik insülin hassasiyetinin yeniden normalizasyonu ile sonuçlanmasını sağlamaktadır [20].

Bu bilgiler ışığında, adacık hücre saflaştırılması sonrasında ER stresinden kaynaklı adacık hücre ölümünü kimyasal şaperonlar ile azaltmayı amaçlayan bir çalışma henüz yayınlanmamıştır. Bu nedenle, biz de bu çalışmamızda kimyasal şaperonlardan TUDCA ve 4-PBA'nın sıçanlardan elde edilen adacık hücrelerine in vitro ortamda belirli oranlarda (250 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM, 1250 µM ve 1500 µM) eklenmesiyle 0., 24. ve 48. saatlerdeki canlılıklarını kontrol grubuyla birlikte takip ettik.

Bu çalışmadaki amacımız, sıçan adacık hücrelerinin saflaştırılması sonrasındaki in vitro ortamda ER stresinden kaynaklı canlılıklarının azalmasından dolayı, TUDCA ve 4-PBA kimyasal şaperonlarının adacık hücre kültürüne eklenmesiyle hücre canlılığını artıracak en iyi kimyasal dozu bulmaktır.

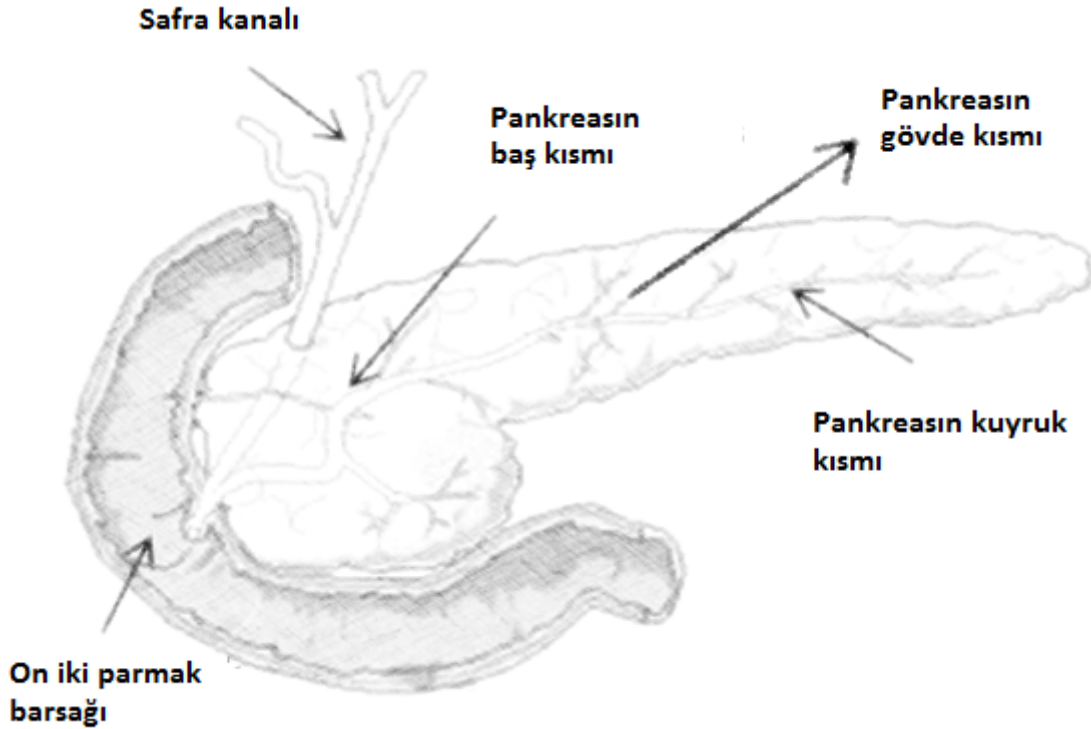
Bu amaç doğrultusunda, tip1 şeker hastalığında tedavi amacıyla insana nakledilen adacık hücrelerinin canlılığının, hücre kültürüne eklenen belirlediğimiz derişimdeki kimyasal şaperonlar ile hücrelerdeki ER stresini azaltarak hücre ölüm oranında düşüşe neden olmasına yardımcı olacağını öngördük.

2. KİMYASAL ŞAPERONLAR VE PANKREAS LANGERHANS ADACIK HÜCRELERİ

2.1. Pankreasın Morfolojik Özellikleri

Pankreas, karın boşluğunda, mide ve kalın barsak arkasında, omurganın bel bölümü önünde bulunan bir organdır. MS.100. yıllarda Ephesuslu Rufus tarafından yunanca pan (tüm, bütün) ve kreas (et) kelimelerinin birleştirilmesiyle adlandırılmıştır.

Pankreas, karbonhidrat, protein, yağ metabolizmasında, sindirimde, enerjili substratların kullanımında ve depolanmasında önemli rol oynayan ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahip bir organdır. Erişkin insan pankreası 15 cm uzunluğunda, 70-140 gram kütleye sahip olup karın boşluğunun üst kısmında midenin arkasında yer alan, on iki parmak barsağından dalağa kadar uzanır. Pankreas anatomik olarak baş, gövde ve kuyruk olarak 3 bölüme ayrılır (Şekil 2.1).

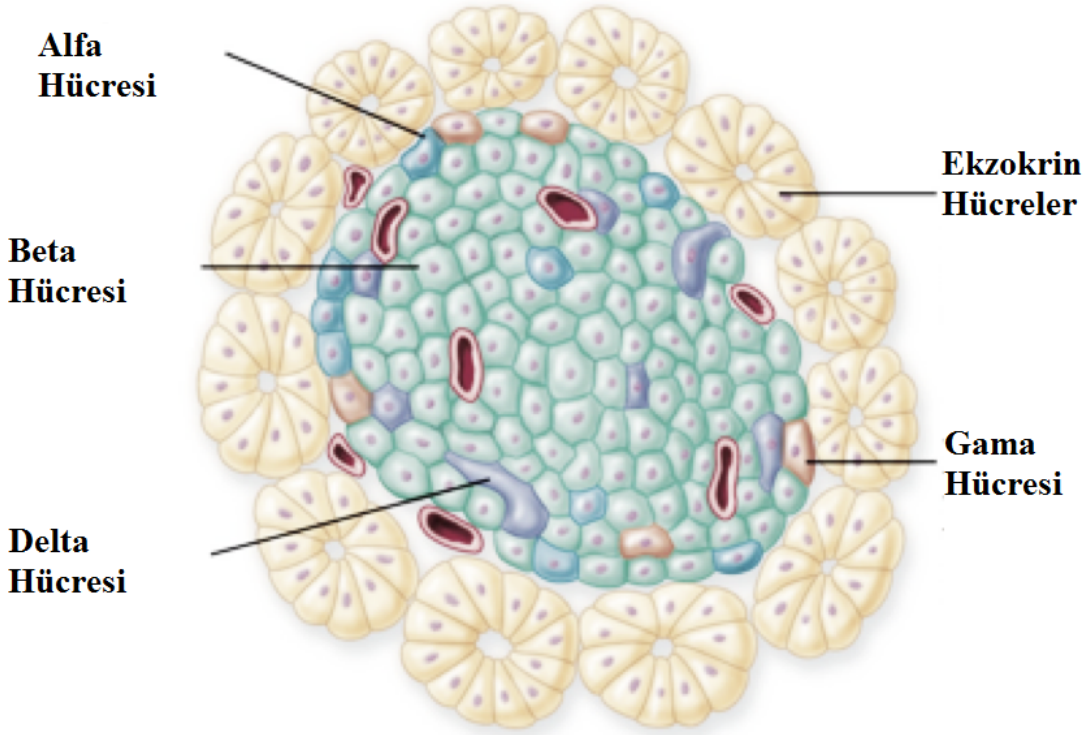


Şekil 2.1. Pankreasın şekli

2.2. Pankreas ve Adacık Hücre Fizyolojisi

Pankreas hem dış, hem de iç salgı yapan bir bezdir. Endokrin salgılar yaşamın devam etmesi için gerekli olan Langerhans adacıklarından salgılanır ve bu adacık hücrelerinin pankreas organında bulunma oranı kütlece %1-3 aralığında olup sağlıklı ve yaklaşık 70 kg kütlesindeki bir insan pankreası yaklaşık 1 milyon adacık hücresi içermektedir.

Adacık hücrelerinde 4 hücre çeşidi bulunmaktadır. Bu hücreler, alfa (α), beta (β), delta (δ) ve gama (γ) hücreleridir. Glukagon salgısında görevli alfa hücrelerinin adacık hücresindeki kütleli oranı %15-20, insülin salgısında görevli beta hücrelerinin oranı %60-80, somatostatin salgısında görevli delta hücrelerinin oranı %2-10, pankreatik polipeptit (pp) salgısında görevli gama hücrelerinin oranı %0,1-1 arasındadır (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Adacık hücre şeması

2.3. Pankreasın Ekzokrin İşlevleri

Pankreas vücudun temel sindirim bezi olup ekzokrin olarak asiner hücreler tarafından üretilir. Ekzokrin hücreler nöral ve humoral sistemlerin kontrolü altında fonksiyon görmektedir.

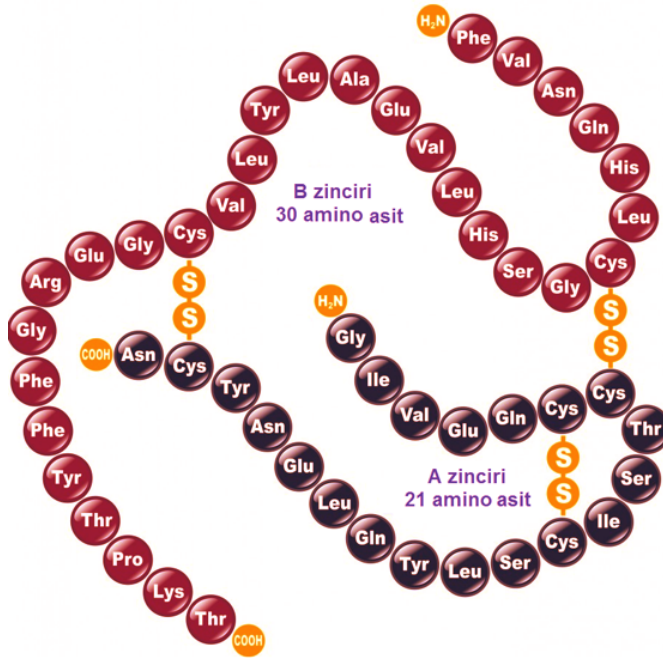
Sindirim enzimleri ve bikarbonatı pankreatik kanala salgılayarak buradan ince barsağa açılır. Ekzokrin pankreas, sindirim enzimleri ve proenzimleri içeren bikarbonatca zengin bir sıvı salgılamaktadır. Ekzokrin hücrelerin salgıladığı sindirim enzimleri mide-barsak kanalındaki besinleri parçalayarak emilime hazır hale getirir. Pankreas salgısı yemek yenilmesiyle uyarılarak hormon ve sinir sistemin bu mekanizmaya katılmasıyla gerçekleşir.

2.4. Pankreasın Endokrin İşlevleri

Endokrin bölüm, ekzokrin bezler arasına dağılmış bulunan Langerhans adacıkları'ndan oluşur. Endokrin pankreasın en önemli görevi kan dolaşımına verdiği hormonlar aracılığıyla glukoz metabolizmasını ayarlamaktır. Bu hormonlar, insulin, glukagon, pankreatik polipeptit ve somatostatindir. α Hücreleri glukagon, β hücreleri insülin, δ hücreleri somatostatın ve gama hücreleri de pankreatik polipeptit salgılar [21]. Endokrin hücreler bu hormonları doğrudan toplar damara vererek görevini yapmaya başlarlar.

Adacıktaki beta hücrelerinden salgılanan insulin, kan glukozunu düzenleyen en temel hormondur. İnsülin, vücuda alınan glukoz ve aminoasitlere yanıt olarak salınan bir hormondur. Bu hormon başlıca karaciğer, iskelet kası ve yağ hücrelerine glukoz alımından sorumludur. İnsülin tokluk glukozuna yanıt olarak salınır ve ilk olarak insüline duyarlı dokulardaki glukozun alımı, karaciğerde fazla miktardaki glukozun glikojene dönüşerek depolanması, pankreas alfa hücrelerine etki ederek glukagon salınımının baskılanması ve hepatik glukoz üretiminin inhibisyonunu sağlar.

İnsülin, ilk aşaması olan preproinsülin'den oluşup 23 aminoasidi bıraktıktan sonra 81 aminoasitten oluşan proinsülin meydana gelir. Beta hücrelerindeki golgi kompleksinde c-peptit kısmının ayrılmasıyla 51 amino asit ve 3 adet disülfür bağı içeren insülin hormonu meydana gelir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. İnsülin hormonunun yapısı

2.5. Langerhans Adacıklarında Endoplazmik Retikulum ve Stres Mekanizması

Langerhans adacıkları 1869 yılında Paul Langerhans tarafından tanımlanmıştır. Langerhans adacıkları tüm bezin %2'lik bir kısmını kapsar. Pankreas, 600 bin ile 1 milyon arası adacık hücresi içermektedir. Adacıklar kendi içinde 3– 4 bin arası hücre içeren, 50 ile 500 µm boyutlarına sahip hücrelerdir.

ER salgı proteinlerinin sentezi ve olgunlaşmasında görevli organeldir [22]. Etkili bir protein oluşumunun kalite kontrolünü bu organel üstlenmiş olduğundan son derece önemli bir göreve sahiptir. ER, granüllü ve granülsüz olarak ikiye ayrılır. Granüllü ER, ribozomlara sahip olup protein sentezi gerçekleştirirler. Yoğun olarak pankreas, karaciğer ve plazma hücrelerinde bulunurlar. Granülsüz ER, ince yassı şekilde olup ribozom granülü taşımazlar. Kolesterol sentezi, steroid hormon sentezi ve barsak epitelinde lipidlerin iletimi gibi görevleri vardır. ER, asidik ve bazik tepkimelerin yürütülmesini sağlamanın yanında en büyük görevi, hücrelerdeki üretilen zar proteinlerinin düzgün katlanmasını ve çalışacakları bölgelere gönderilmelerini sağlamaktadır.

Ökaryot hücrelerde gerçekleşen protein katlanmalarında oluşan bir problem yaşandığı anda ER lümeninde katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikmesiyle ER stresi oluşarak katlanmamış protein cevabı (UPR) yolağı aktif hale gelir. Bu yolağın aktif hale gelmesiyle ER'ye gelecek proteinlerin miktarını azaltıp ER deki protein katlanma kapasitesini artırır ve katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin yıkılımını ve sitoplazmaya gönderilmesini sağlar.

Şaperonlar, moleküler, farmakolojik ve kimyasal olarak 3 farklı gruba ayrılırlar. Moleküler şaperonlardan en aktif olanı glukoz düzenleyici proteindir (GRP78). Glukoz kaybı, kalsiyum deposundaki azalma ve katlanmamış protein birikmesiyle GRP78, protein katlanmasına yardımcı olmaya başlar. GRP78'in salınımıyla üç UPR dönüştürücü aktif hale gelir. Bunlar; Transkripsiyon faktör-6 (ATF6), inozitol gerektiren enzim-1 α (IRE1 α) ve protein kinaz çift zincirli RNA benzeri ER kinazdır (PERK).

UPR'ın aktif hale gelmesiyle proteini parçalamak için IRE1 α ve PERK fosforilasyonu gerçekleşir veya ATF6 yolağının aktifleşmesiyle golgiye transfer gerçekleşir ve kısım 1-2 (S1P-S2P) proteazlarıyla bölünerek aktif duruma geçer. Bu arada protein sentezinin durdurulması için PERK, α ökaryotik başlama faktörü 2 (eIF2 α)'yi fosforilleyerek ribozomal RNA'nın transkripsiyonunu yavaşlatır ve transkripsiyon faktör-4 ATF4'ün translasyonunu artırmasıyla, cAMP cevap elemanına (CRE) bağlanır ve hücre ölümünden sorumlu C/EBP - homolog protein (CHOP) aktif hale gelir.

Bir endoribonükleaz olan IRE1 α , XBP1'in (X-Box Binding Protein 1) birleşme formunu (XBP1s) aktifleştirerek moleküler şaperonların transkripsiyonunu başlatarak katlanmamış proteinlerin tekrar sitozole geçip ER ilişkili protein bozulmasını (ERAD) aktif hale getirir

Hücrede çalışan bu sıralı mekanizma ile hücre kendini yaşamda tutmayı, üretkenliğini düzenli sürdürmeyi ve bulunduğu canlı içerisindeki sorumluluğunu devam ettirmek için çalışır.

2.6. Şaperonlar

2.6.1. Moleküler şaperonlar

Hücrelerde, sentezlenen proteinlerin yanlış katlanma ve birikmesini önleyip doğru katlanmasını kolaylaştırmak için, moleküler şaperon olan ısı-şoku proteinleri ve GRP78 proteinlerinden oluşan kompleks bir kalite kontrol sistemi gelişmiştir. Şaperonlar, her hücre oluşumu ve hücre bölünmesinde mevcut olup, protein denge ve stres durumlarında önemli bir göreve sahiptir [23].

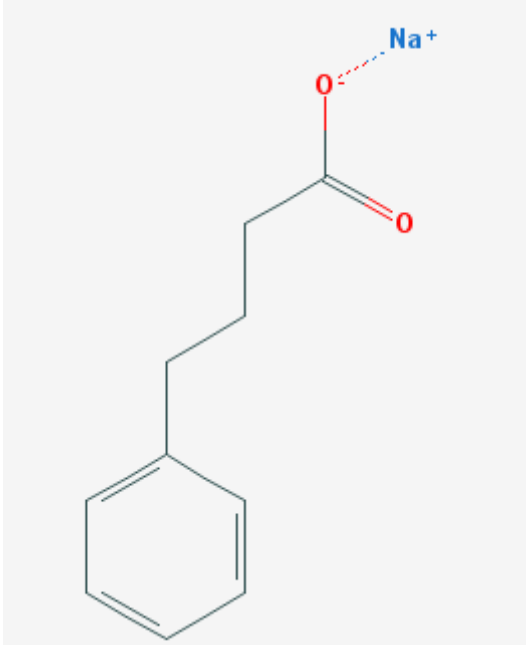
Moleküler şaperonlar ve ısı şok proteinleri alt tabaka etkileşimleri ile anlaşılabilir ve sınıflandırılabilirler. Bunlar birbirinden bağımsız olarak proteinlerin hatalı katlanmasını engeller ve yığılmasına karşı koruyabilir. Isı-şoku proteinlerinden majör olanlar: Hsp104, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40 ve küçük Hsp'ler (Hsp27)'dir [24]. Stresle yanlış katlanan proteinlerin çökmesi sonra tekrar açılarak yeniden katlanmasında kullanılan bu ATP bağımlı şaperonlar için kararlılıklarında çeşitli rolleri vardır.

GRP78, ER stres sensörlerinden IRE1, PERK ve ATF6'nın aktiflik mekanizmasını kontrol ederek hücre ölümüne karşı koyabilme özelliğine sahip bir majör moleküler şaperondur [25, 26]. Pek çok doku tiplerinde GRP78'in hücre yüzeylerinde eksprese edildiği bilinmektedir. GRP78'in bozukluğunda aterosklerotik, trombotik ve oto-immün hastalıkların ortaya çıktığı gözlenmiştir [27].

2.6.2. Kimyasal şaperonlar

Kimyasal şaperonların, in vitro ve in vivo ortamda protein katlanmasını artırdığı ve in vivo ortamda da proteinin agregasyonu bastırdığını gösterilmiştir [28]. Kimyasal şaperonlar, farmakolojik şaperonların aksine daha yüksek konsantrasyonlarda etki göstermektedir. Bu yüzden insanlarda tedavi edici ajanlar olarak kullanmaya fazla yanaşılmamıştır [29]. Yapılan çalışmalarda, 4-PBA₃Na (C₁₀H₁₁NaO₂, 4-Fenilbütirat) ve TUDCA (C₂₆H₄₅NO₆S, Tauroursodeoksikolik Asit)'nin hücrelerde ER stresini hafiflettiği gözlenmiştir. Bu bileşiklerin obez ve diyabetli farelerde uygulanmasıyla, hipergliseminin normalleşmesi, insülin duyarlılığının

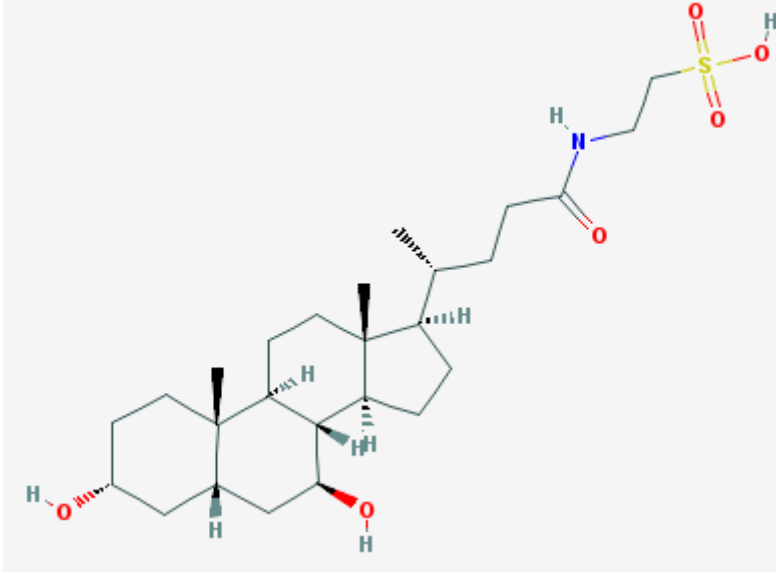
düzelmesi, yağlı karaciğer hastalığının çözümlenmesi ve karaciğer, kas ve yağ dokuda insülin etkisinin artması ile sonuçlanmıştır [30]. Proteinlerin katlanıp şekillenmesinde kimyasal yapıları ve özelliklerinin önemi büyüktür (Şekil 2.4; Şekil 2,5; Çizelge 2.1; Çizelge 2.2).



Şekil 2.4. Sodyum fenilbütiratın yapısı

Çizelge 2.1. Sodyum 4-fenilbutirat'ın kimyasal özellikleri (PubChem)

Molekül Formülü	$C_{10}H_{11}NaO_2$
Molekül İsmi	Sodyum fenilbütirat
Molekül Kütlesi	186,18 g/mol
Erime sıcaklığı	214-216 °C
Yoğunluğu	1,09 g/cm ³
Çözünürlüğü	25 mg/mL, suda



Şekil 2.5. TUDCA'nın yapısı

Çizelge 2.2. Tauroursodeoksikolik asit'in kimyasal özellikleri (PubChem)

Molekül Formülü	$C_{26}H_{45}NO_6S$
Molekül İsmi	Tauroursodeoksikolik asit
Molekül Kütlesi	499,70 g/mol
Erime sıcaklığı	173-175 ° C
Yoğunluğu	1,21 g/cm ³
Çözünürlüğü	10 mg/mL, suda

2.7. Kaynak Araştırması

2.7.1. Adacık hücre çalışmalarına ait kaynak araştırmaları

Camillo Ricordi ve arkadaşları, Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan "Diabetes Research Institute" de yapılan adacık hücre çalışmaları referans alınarak adacık hücre saflaştırma yöntemleri geliştirmeye çalışmışlardır. Çalışmalarında, sıçandan adacık hücresi saflaştırma yönteminde kollajenaz tipV enzimi kullanımı ile adacıklar dokudan ayrıştırılıp farklı yoğunluk-taki kimyasal maddelerinin kullanımıyla da asiner hücrelerden uzaklaşmasıyla gerçekleşen saflaştırma yöntemini kullanmışlardır [31].

Saskia Erbel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, insandan yaptıkları adak hücre saflaştırması sonrası hücrelerin en fazla üç hafta hayatta kalabildiklerini göstermişler. Üçüncü haftadan sonra izlenen adacık hücre fonksiyonunun bozulmasıyla artan ER stresi sonrası hücre ölümlerinde artış gözlemişlerdir [32].

Ghorbani Rostam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farelerden izole ettikleri adacık ve beta hücrelerini daha fazla yaşatmayı amaçlamışlardır. 4°C ve 23°C’da RPMI’da tuttıkları hücrelerin canlılık analizleri sonucunda adacık hücrelerinin performans ve canlılığını korumada en verimli sıcaklığın 4°C olduğunu belirtmişlerdir [33].

Hua Yang ve arkadaşları, adacık hücrelerinin nakil öncesi dönemde, uzun dönemli fonksiyon ve canlılığını korumak için çalışma yapmışlardır. Sonucunda, kollajen ve agaroz ile kaplanmış, sıçandan elde ettikleri adacık hücrelerinin 40 haftaya kadar verimli olabildiklerini göstermişlerdir [34].

Gopalakrishnan Loganathan ve arkadaşları, insana nakletmek için domuzdan elde edilen adacık hücrelerinin verimini artırmayı amaçlamışlardır. Soya fasulyesi yağı ile zenginleştirilmiş besinle beslenen genç domuzlardan elde edilen adacık hücre veriminin diğer gruplara göre daha iyi sonuç verdiğini göstermişlerdir [35].

Nacher M. ve arkadaşlarının yaptığı, adacık hücrelerinin yaşamını artırma çalışmasında, insan adacık hücrelerini insan serumu ile kültüre etmişlerdir. Sonucunda, adacık hücrelerinin canlılığında, yaşam süresinde ve fonksiyonunda olumlu sonuçlar almışlardır [36].

Montane J. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, oksidatif stres ve ER stresinin tip 2 diyabetli hastalarda adacık hücresindeki beta hücrelerini öldürdüğü hipotezini kurmuşlardır [37].

2.7.2. Kimyasal şaperon çalışmalarına ait kaynak araştırmaları

Umut Özcan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kimyasal şaperonlardan TUDCA ve 4-PBA’nın tip 2 diyabetli obez farelerde kan glukozunu ve ER stresini düşürdüğünü göstermeye çalışmışlardır. Bir hücrede gerçekleşen protein katlanmasında yaşanan problem sonrası

oluşan yüksek ER stresinin, hücre sağ kalımının devamı için düşürülmesi gerektiğini ve bu ER stresinin azalmasında, hücre içindeki moleküler şaperonlar ile birlikte kimyasal şaperonların da takviyesinin hücre yaşam süresini artırdığını bulmuşlardır [38].

Zhu Q. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sıçan adacık hücrelerinden elde edilen beta hücrelerinde ER stresini düşürmeyi hedeflemiştir. Hücre kültüründe kullanılan TUDCA kimyasalı ile beta hücrelerindeki ER stresinde düzelmenin görüldüğünü ve ATF4/CHOP hücre ölüm yolağının aktifliğini durdurduğunu açıklamışlardır [39].

Choi SE. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, serbest yağ asitlerinin insülin salınımını bozduğunu ve bunun ER stresini durdurmaya çalışan 4-PBA kimyasalı ile tedavi edilebildiğini gösterilmiştir [40].

Cadavez L. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, beta hücre fonksiyonu bozulan tip 2 diyabetli hastalarda, kimyasal şaperonlardan TUDCA ve 4-PBA'nın ER stresini azalttığı ve insülin salınımını artırdığı açıklanmıştır [41].

da-Silva WS. ve arkadaşları, kimyasal şaperonlardan TUDCA ve 4-PBA'nın metabolizmadaki tiroit hormon aktivasyonunu ve enerji tüketimini hızlandırdığını göstermişlerdir [42].

Humere C. ve arkadaşları, sıçanlardaki kalp fibroblastında hücresel bozukluğa neden olan ER stresinin taspigarginle indükleyerek, 4-PBA kimyasal şaperonu ile tedavi edilebildiğini açıklamışlardır [43].

Zhu M. ve arkadaşları, DTZ ile diyabet edilmiş sıçanlardaki beta hücrelerinin, ağız yoluyla verilen 4-PBA kimyasalı aracılığıyla canlılığını koruduğunu göstermişlerdir [44].

Kemter E. ve arkadaşları, böbrek hastalıkları ile ilgili yaptıkları in vitro fare çalışmasında, 4-PBA kimyasalının kullanımının böbrek fonksiyonlarının iyileşmesinde olumlu sonuç verdiğini raporlamışlardır [45].

Koyama M. ve arkadaşlarının akciğer atardamarında gerçekleşen yüksek tansiyonu iyileştirmek amaçlı yaptıkları fare çalışmasında, 4-PBA kimyasalının uygulanmasıyla bu hastalığın tedavi edilebildiğini göstermişlerdir [46].

Zhang H. ve arkadaşları, böbrek epitel hücrelerinden NRK-52E hücre hattına verilen ER stres tetikleyicileri sonrasında, 4-PBA kimyasalını hücre kültürüne ekleyerek IRE1 ve ATF6 yollarının aktifliğini kayb ettiklerini göstermişlerdir [47].

Hua Y. ve arkadaşları, insan makrofaj hücre kültürüne ekledikleri ER stres tetikleyicisi tunicamisin kimyasalı ile lipit tutulum oranında artış görmüşlerdir. Bu hücre kültürüne eklenen TUDCA kimyasalı ile artış gösteren lipit tutulumunun inhibe edildiği gösterilmiştir [48].

Yan F. ve arkadaşları, subaraknoid kanamasının tedavisi için sıçanlarda çalışma yapmışlardır. SAH.84 kodlu bu kanama hastalığına sahip özel sıçanlara damar yolu ile TUDCA kimyasalı vermişler ve sonucunda beyindeki bu kanamanın azaldığını gözlemleyerek kanamanın ER stresi ile ilişkili olduğu yorumunu yapmışlardır [49].

Rodrigues CM. ve arkadaşlarının, kanamalı felci tedavi etme amaçlı yaptıkları çalışmada, bu hastalığı oluşturdukları sıçana damar yolu ile TUDCA kimyasalının verilmesi sonrasında nöronal koruma sayesinde iyileşmeye olumlu etki yaptığını gösterilmişlerdir [50].

Ramalho RM. ve arkadaşlarının alzaymır hastalığının tedavisi üzerine farelerin nöroblastoma hücreleri ile yaptıkları çalışmada, hücre ölümüne neden olan p53 proteinin aşırı üretilmesine karşılık TUDCA kimyasalı uygulamasıyla hücre ölümünde azalma gözlemlemişler [51].

3. DENEYSEL KISIM

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tezin deneysel kısmında kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edildikleri üretici firmalar Çizelge 3.1’de verilmiştir. Kullandığımız tüm kimyasal maddeler analitik safliktadır.

Çizelge 3.1. Deneysel kısımda kullanılan kimyasal maddelerin isimleri ve temin edildikleri üretici firmalar

Kimyasal Madde	Temin Edilen Üretici Firma
TUDCA	Calbiochem
4-PBA	Ucyclyd Pharma
Ketamin	Pfizer
Ksilazin	Ege-Vet
Kollejanaz TipV	Sigma
HBSS	Biowest
RPMI 1640	Sigma
Biocoll 1100	Biochrom
Biocoll 1077	Biochrom
Dithizone	Sigma
Floresein diasetat	Thermo Fisher Scientific
Propidyum iyodür	Sigma
Polivinil pirolidon iyot	Dermosept
Saf su	ELGA LabWater

3.2. Deneylerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

TUDCA çözeltisi: Tauroursodeoksikolik asit uygun miktarlarda tartılarak RPMI’da çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH’sı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile 7.4’e ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

4-PBA çözeltisi: 4-Fenilbütirat uygun miktarlarda tartılarak RPMI'da çözüldü, hazırlanan çözeltinin pH'sı 0,1 M NaOH ve 0,1 M HCl ile 7.4'e ayarlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

Kollajenaz TipV Enzimi: Hayvan başına 8 mg enzim tartılarak +4 °C soğukluktaki HBSS çözeltisi ile çözümlenerek +4 °C' de buzdolabında en fazla 1 saat süre sınırıyla saklandı.

DTZ: 100 mg Dithizone tartılarak 20 mL Dimetil sülfoksit (DMSO, (CH₃)₂SO) ile çözüldü. Hazırlanan çözeltiye 30 mL HBSS çözeltisi ilave edilerek seyreltildi ve 0,4 µm çapındaki filtre ile süzülerek oda sıcaklığında saklandı.

3.3. Deneyleerde Kullanılan Cihazlar

3.3.1. Ameliyat masası

Sıçanlara uygulanan genel anestezi ardından, pankreasın sıçandan çıkarılana kadar geçen süreç de 37 °C lik sıcaklığı korumak için ayarlanmış metal masa ile Adacell Araştırma Merkezi'nde çalışılmıştır.

3.3.2. Ameliyat mikroskobu

Leica marka, M620 model ameliyat mikroskobu kullanılarak cerrahi işlemler Adacell Araştırma Merkezi'nde uygulanmıştır.

3.3.3. Biyolojik güvenlik kabini

Adacık hücre saflaştırma ve kültüre hazırlama aşamalarında kullanılan, partikül ve mikro organizma sayısının, sıcaklığın, nem oranının, taze hava miktarının, ortam hava basıncının, hava hareketlerinin ve buna benzer parametrelerin kontrol altında tutulmasını sağlayan, Metisafe marka, class 2 model cihaz ile çalışılma basamağı Adacell Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Santrifüj cihazı

Adacık hücre saflaştırma ve kültüre hazırlama aşamalarında kullanılan, hızlanma, frenleme ve sıcaklık ayarı yapılabilme özelliği bulunan Hettich Rotanta marka, 460R model santrifüj cihazı ile Adacell Araştırma Merkezi'nde çalışılmıştır.

3.3.5. Hücre inkübatörü

Adacık hücrelerinin besi ortamı sağlandıktan sonra 37 °C lik sıcaklık ve %5 lik CO₂ hava salınımı ile hücre yaşamasını sağlayan Panasonic marka, MCO-230AIC-PE model hücre inkübatörü ile Adacell Araştırma Merkezi'nde çalışılmıştır.

3.3.6. Hücre mikroskobu

Adacık hücre canlılığının incelenmesi için kullanılan, floresan boyalı hücrelerin ışımalarını algılayan Leica marka, AM6000 model hücre mikroskobu ile Adacell Araştırma Merkezi'nde çalışılmıştır.

3.3.7. pH metre

pH ölçümleri METTLER TOLEDO marka, S 220 model pH-iyonmetre ile Adacell Araştırma Merkezi'nde çalışılmıştır.

3.3.8. Mikro pipet

Hücre sayımları ve toplamaları 0,2 µL-1,0 mL aralıklarındaki Axygen marka ±0,005 µL hassasiyeti olan mikropipetler ile Adacell Araştırma Merkezi'nde çalışılmıştır.

3.3.9. Hassas terazi

Kimyasal maddelerin kütle ölçümleri Mettler Toledo marka, ML104T model cihaz ile Adacell Araştırma Merkezi'nde çalışılmıştır.

3.4. Sıçanlardan Pankreas Adacık Hücre Safılaştırılması

3.4.1. Çalışılacak deney hayvanlarının özelliklerinin belirlenmesi

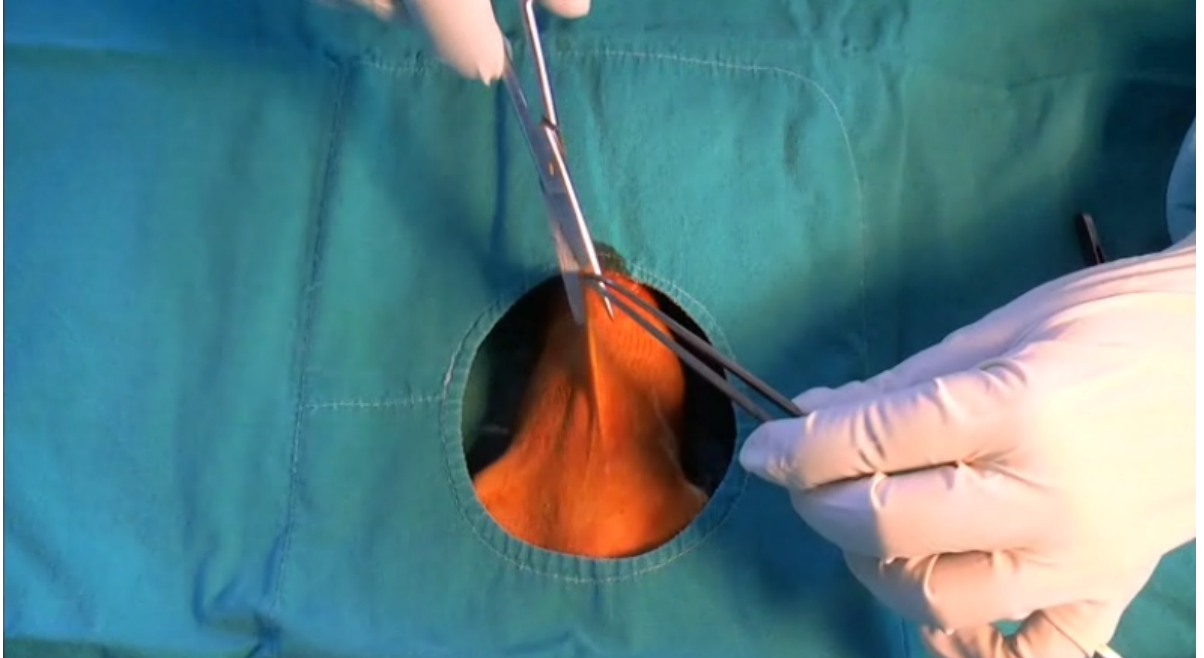
Yaş ortalaması 3 aylık olan, 190-260 g kütleyle sahip olan, erkek cinsiyetinde ve Wistar *albino* türünden olan 20 adet sıçan ile çalışma planlanmıştır. Deneyler, Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan (Ek-1, Protokol No: 2015-15) izin alınmasından sonra, Adacell, Pankreas Adacık Hücre Araştırma Merkezi Laboratuvarında Ek-2 de mevcut olan belge ile çalışma yapıldı. Sıçanlar, elektronik olarak otomatize edilmiş sistem yardımıyla 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık sağlayan, HEPA (yüksek verimli partikül filtresi) filtreli havalandırma sistemine sahip, 23 ± 2 °C sıcaklığında, 45 ± 10 bağıl nem değerinde olan laboratuvar ortamında hayvanların barınması sağlanmıştır (Resim 3.1). Hayvanlar standart pellet yemi ve steril su kullanılarak beslenmesi sağlanmıştır. Deneyler süresince yerel etik kurulca istenilen şartlara uygun olarak deneyler gerçekleştirilmiştir.



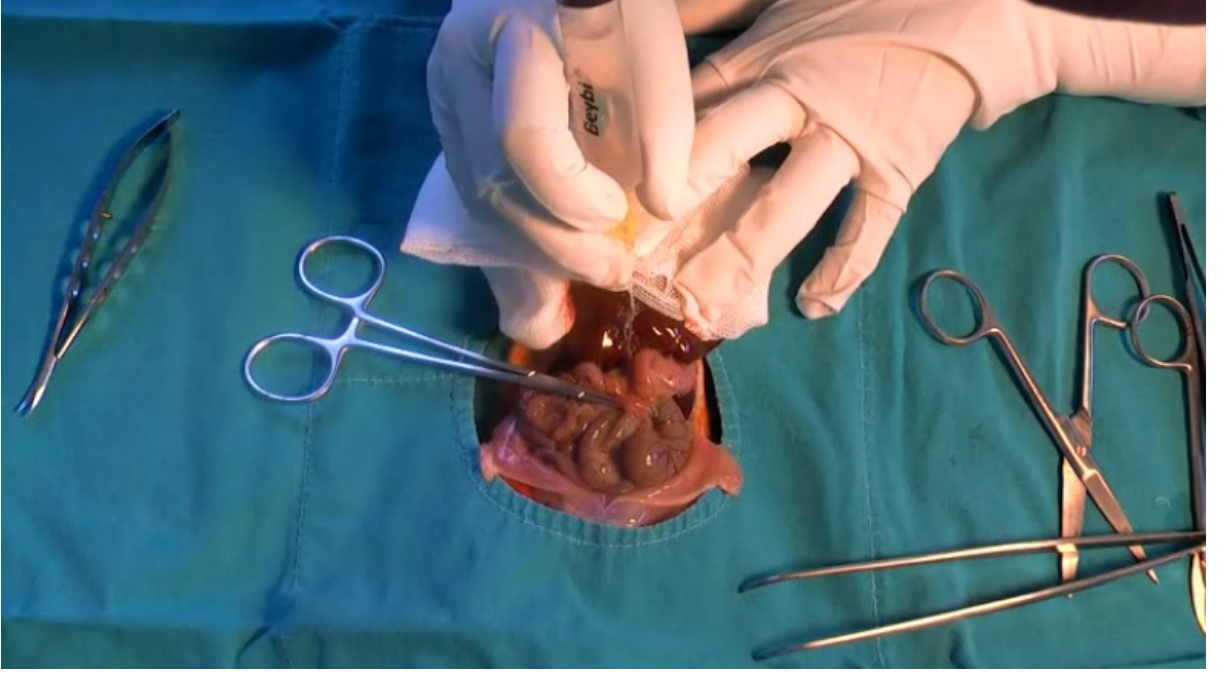
Resim 3.1. Deney hayvanları laboratuvarındaki sıçanların konumlanması

3.4.2. Sıçan pankreasının elde edilmesi

Ketamin/Ksilazin anestezi maddesinin (hacimce 1/9 oranında karışımı yapılarak) kas arasına enjektör ile verilmesiyle uyutulan sıçanların karın boşluğu bölgesindeki tüyler tıraş makinesi ile temizlenip antiseptik olan batikon (polivinil pirolidon-iyot) ile alan silinir. Karın bölgesinin derisi pens yardımıyla kaldırılıp cerrahi makas ile kesilir ve deri altı dokusu makas ile aralanır (Resim 3.2). Göğüs kafesine el ile baskı uygulanarak karaciğerin dışarı çıkarılması gerçekleştirilir. Karaciğerde bir kanama gerçekleşmemesi için karaciğer gazlı beze sarılır ve pankreas ve on iki parmak barsağı bağlantısında olan duktus kanalı, cerrahi mikroskop yardımıyla belirginleştirilerek kısıkaç ile sıkıştırılır. Duktus kanalının kalınlığına göre 26G ya da 22G damar yol açma seti (intraket) ile duktusa girilerek, her bir pankreas başına 7 mL (1 mg/mL derişiminde) soğuk (+4°C) kollajenaz tipV enzimi verilir (Resim 3.3). Tamamı verildikten sonra, sıçanın aort damarı kesilerek sıçan öldürülür. Bu işlem yapıldığında pankreasın kanlanması önlenmiş olur. Pankreas bağlantılı olduğu doku ve organlardan makas yardımıyla kesilerek 50 mL'lik deney tüpünün içerisine alınır ve buza gömülür. Bu paketlenme sonrasında doku, hayvan laboratuvarından hücre saflaştırma laboratuvarına taşınır.



Resim 3.2. Abdominal bölgenin kesilmesi



Resim 3.3. Pankreasın kollajenaz tipV enzimi ile şişirilmesi

3.4.3. Sıçan pankreasından adacık hücre elde etmesi

Pankreasa gönderilen kollajenaz tipV enziminin aktif hale gelmesi için yaklaşık bir saat önceden hazır hale getirilen 37°C da ki su banyosunda pankreaslar 18 dakika bekletilerek organ içindeki enzimin aktifleşmesi sağlanır. Bu inkübasyon sonrasında tüp içindeki pankreas 30 saniye kadar elde çalkalanarak homojen hale getirilir.

Hücredeki enzimatik sindirimi durdurması için ve hücrenin ozmotik basıncını ile pH'sını ayarlayan özel üretim HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Lonza) çözeltisinden 25 mL çalışma tüpüne eklenir ve kuvvetlice çalkalanır.

Santrifüj, 1300 rpm de 3 dakika ve 4°C'a ayarlanarak ürün yüklemesi yapılır ve çalıştırılır. Santrifüj sonrasında oluşan sıvı kısım pipetleme yöntemi ile tüp içerisinden alınarak atılır. Pellet elde hafifce çalkalanarak, karışması gerçekleştirilir. Tüp içine 25 mL soğuk HBSS çözeltisinden ekleme, santrifüjleme ve sıvının atılma işlem tekrarı 2 kez daha gerçekleştirilir ve böylece pankreasın parçalanmasını sağlayan enzimin sistemden uzaklaşması sağlanır. Karışım üzerine 50 mL soğuk HBSS çözeltisi eklenir ve kuvvetlice çalkalanır.

425 µm çapında delikleri bulunan çelikten üretilmiş elek sistemi yardımıyla bu parçalanmış pankreas dokusu 50 mL'lik falkon tüp içerisine süzülür (Resim 3.4.). Süzme işlemi sonrası dokuya ait yağ artıkları elek üzerinde kalarak bu atıklardan kurulmuş olunur. Süzüntü, 1300 rpm'de 3 dakika ve 3/9 hız, 1/9 fren sistemi ile 4°C'de santrifüj edilir. Yukarıda kalan sıvı kısım pipetleme yardımı ile uzaklaştırılarak atılır. Tüpün dibinde biriken pellet çalkalanarak karışması sağlanır. Pankreasın içindeki kollajen doku ve hücreler arası bağların koparılması sonrasında elde edilen ekzokrin hücrelerin ve adacık hücrelerinin birbirinden ayrılması için bir deney tüpü içinde iki farklı yoğunluk katmanı oluşturularak adacıkların diğer hücreden ayrılması sağlanır (Resim 3.5.).

Elde edilen pellet içine ilk yoğunluk katmanı olan 5 mL Biocoll 1100 g/mL ilave edilip çalkalanarak homojenlik sağlanır. Üzerine yavaşça 10 mL Biocoll 1077 g/mL solüsyonu ilave edilir. Son olarak 10 mL RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Lonza) solüsyonu ilave edilir. Santrifüj cihazı ile 2400 rpm'de 20 dakika ve 4°C'da santrifüj edilir. Yoğunlukların arasındaki RPMI 1640 çözeltisinden oluşan tabaka içinde adacık hücreleri yerlerini alır. Plastik pipet yardımı ile bu tabaka üzerindeki adacık hücreleri toplanarak HBSS çözeltisi bulunan yeni tüplere transfer işlemi gerçekleştirilir.

Hücre için toksik etki oluşturacak bu yoğunluk farkını meydana getiren kimyasallardan kurtulmak için hücreler HBSS çözeltisi ile yıkanıp 1300 rpm'de 3 dakika ve 3/9 hız, 1/9 fren sistemi ile 4°C'de santrifüj edilir. Tüp içerisindeki çökeltide elde etmek istediğimiz adacık hücreleri mevcut olmaktadır. Çökelti üzerindeki sıvı çekilip atıldıktan sonra dipteki hücreler kullanıma hazır adacık hücreleri olup mikroskopta incelmeye alınır (Resim 3.6.).



Resim 3.4. Pankreas adacık hücrelerinin süzülmesi

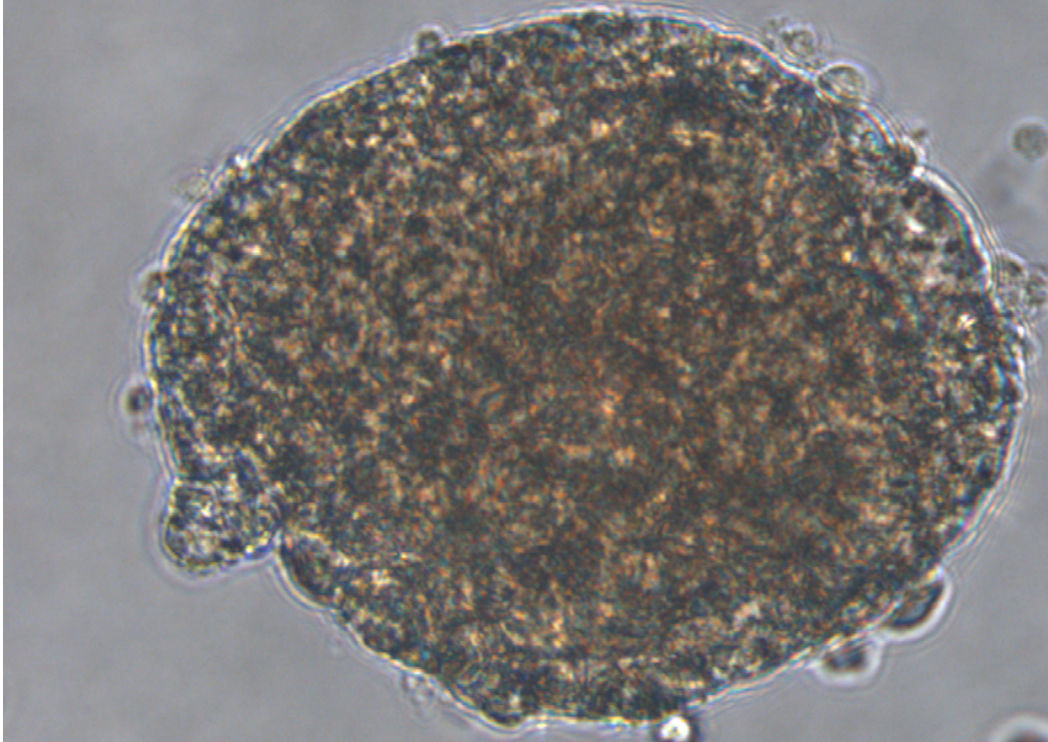


Resim 3.5. Yoğunluk farkı oluşum sonrası adacık hücrelerinin konumlanma durumu

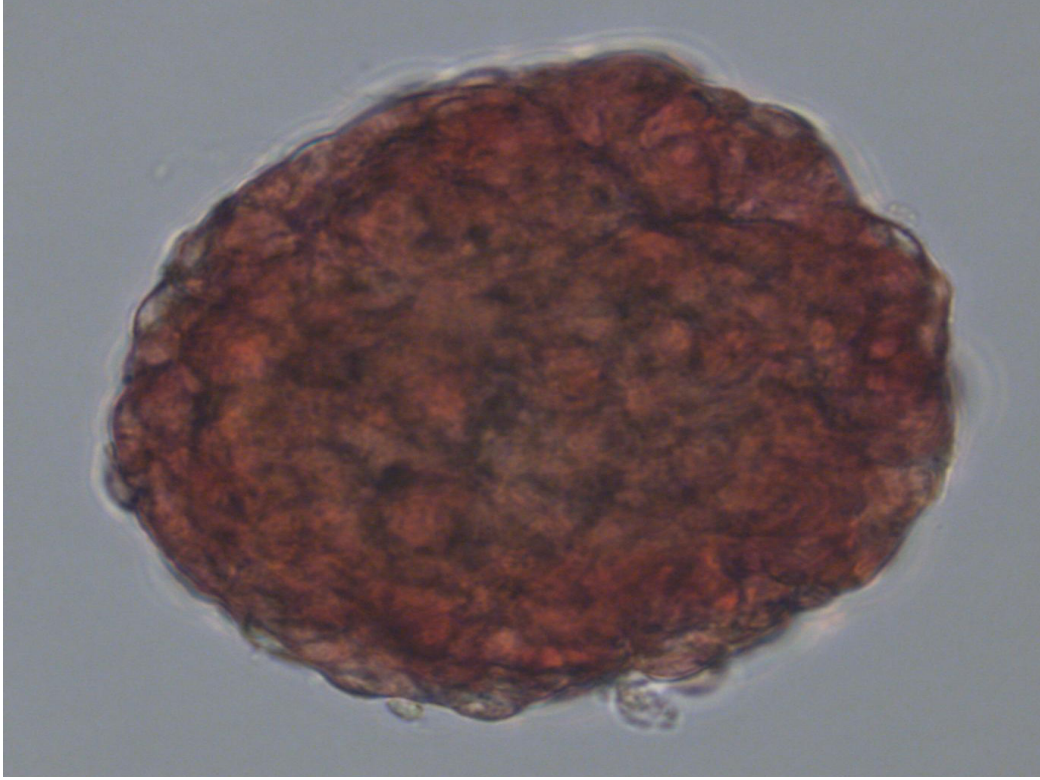
3.4.4. Adacık hücrelerinin sayımı

Elde edilen adacık hücrelerinin kesinliğini ve sayısını belirlemek için, adacık hücre içinde bulunan beta hücrelerinden salgılanan insülin hormonundaki çinko şelatına bağlanan Dit-hizone (DTZ) boyası kullanılır. Bağlanma sonrası mikroskop ile bakılarak kırmızı renk alan adacık hücreleri kontrol edilir (Resim 3.7.). Steril pipet ile hücreler alınıp 10x35 mm boyun-daki ölçekli hücre sayma kaplarına alınır.

Adacık hücreleri, DTZ kimyasal maddesi ile boyandıktan sonra, ters tip mikroskop ile bo-yutlarına göre 10 X'lik büyütmede tüm adacık hücreleri sayılarak deney defterine hangi bo-yutta kaç adacık olduğu not edilir. Farklı boyutlardaki adacık hücrelerinin sayısını belirleme için adacık eşdeğeri hesabı (IEQ) ile sayım yapılır. Bu hesaplamada, çapı 150 μm olan stan-dart bir adacık hücresi standart olarak alınıp tüm adacıkların sayım hesabı bu boyuta göre yapılır. 50 μm 'den daha küçük hücre parçalarının toplam hacme katkı yapmadığı düşünül-düğünden hesaba katılmaz. 50 μm 'den büyük adacıklar sayılır ve IEQ hesabı için oluşturul-muş bir çizelge yardımıyla adacık sayısı standart faktörlerle çarpılarak hesaplanır.



Resim 3.6. İzole edilen adacık hücresi



Resim 3.7. Adacık hücresinin DTZ ile boyama görüntüsü

3.5. Sıçanlardan Pankreas Adacık Hücrelerinin Kimyasal Şaperonlar ile Muamelesi

3.5.1. Adacık hücre kültür çözeltileri için kimyasal şaperonların hazırlanması

TUDCA kimyasalı Calbiochem'dan ve 4-PBA kimyasalı Ucylyd Pharma firmasından temin edilmiş olup her ikisi de oda sıcaklığında, nemden uzak ortamda depolanmıştır.

250 μ M, 500 μ M, 750 μ M, 1000 μ M, 1250 μ M ve 1500 μ M'lık TUDCA ve 4-PBA kimyasalları ayrı ayrı RPMI hücre kültür çözeltilerinde çözülerek steril ortamda hazır hale getirilmiştir. Seri dilüsyon yapılarak hazırlanan bu çözeltilerden her bir gruptan üç tekrar (n=3) olacak şekilde kontrol grubuna karşı hücre besisi kaplarına konularak hazır hale getirilir.

3.5.2. Adacık hücrelerinin kimyasal şaperonlar ile muamelesi

0. Saat, 24. saat ve 48. saat deney grupları Çizelge 3.2.'deki gibi, her bir gruba paralel 3 grup (n=3) oluşturularak toplamda 81 çalışmalık grup oluşturuldu. RPMI hücre kültüründe bulunan pankreas adacık hücreleri her bir kültür kabına yaklaşık 50 adacık gelecek şekilde toplam 81 hücre kültür kabına uygulama gerçekleştirildi. Tüm hücre kültür kapları 37 °C'deki hücre inkübatör cihazına yerleştirildi.

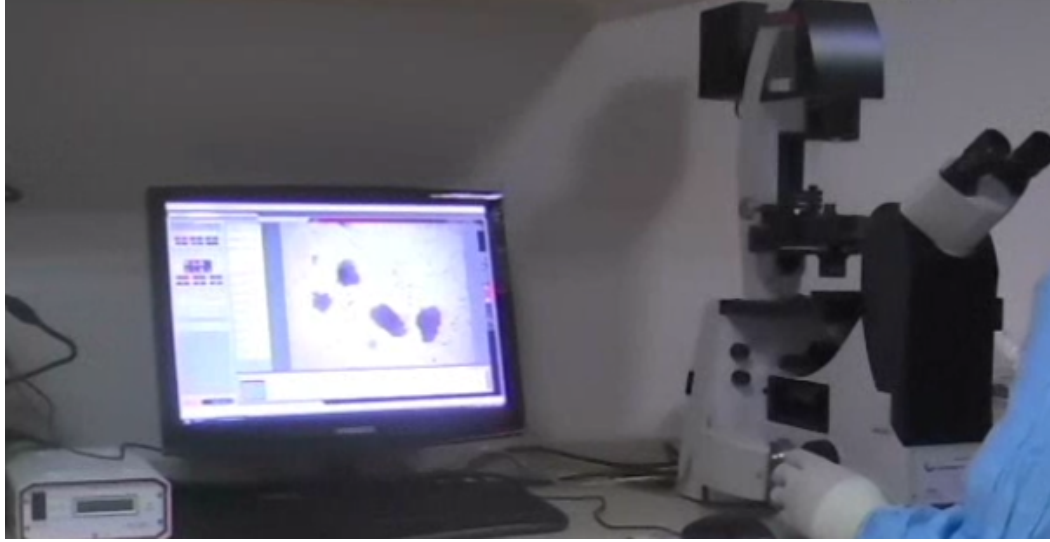
Çizelge 3.2. Kontrol ve deney grupları

Kontrol Grubu	Deney Grupları	
0. Saat Kontrol	0. Saat TUDCA 250 µm , 500 µM , 750 µM 1000 µM , 1250 µM, 1500 µM	0. Saat 4-PBA 250 µm , 500 µM , 750 µM 1000 µM , 1250 µM, 1500 µM
24.Saat Kontrol	24.Saat TUDCA	24.Saat 4-PBA
48.Saat Kontrol	48.Saat TUDCA	48.Saat 4-PBA

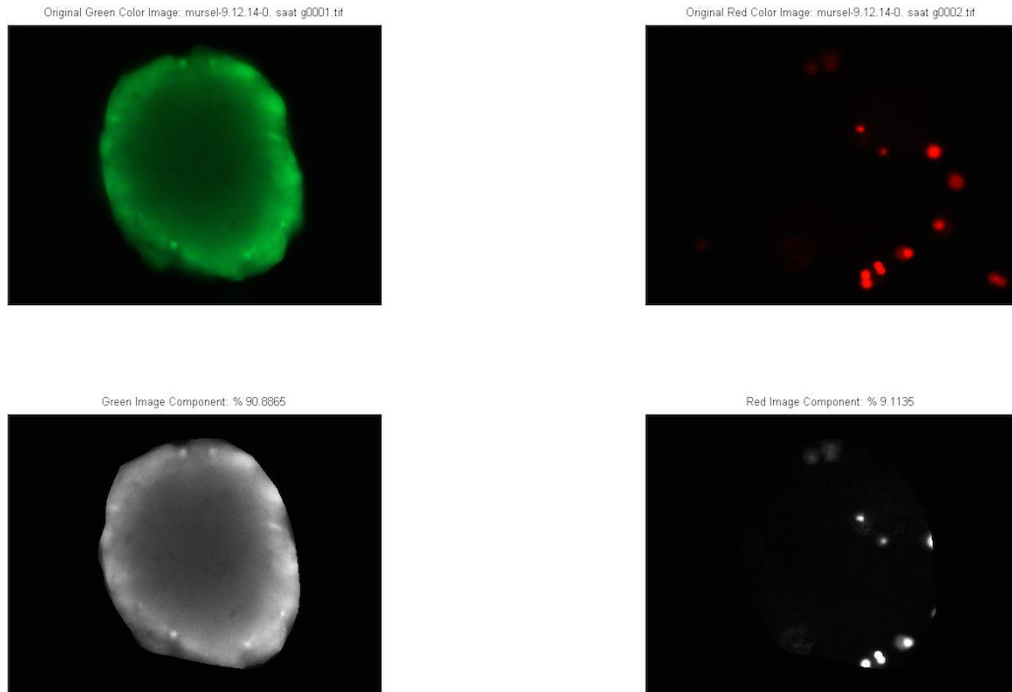
3.6. Adacık Hücre Canlılıklarının Floresan Mikroskop ile Değerlendirilmesi ve Analizi

Adacık hücre canlılıklarının değerlendirilmesinde kullanılan boyalardan floresein diasetat (FDA) ve propidyum iyodür (PI) seçildi. Karanlık ortamda, 1,5 mL'lik bir plastik deney tüpünde 25 µL PI, 25 µL FDA çözeltileri ve 950 µL aseton ile karıştırılarak boya karışımı hazırlandı. Hücre canlılığına bakmak için ilk kültür kabı alındı ve taze olarak hazırlanan PI/FDA karışımı hücre kültürünün içine eklendi. FDA hücre membranını boyayarak 490nm dalga boyunda, PI ise ölü hücre membranından içeri girip nükleik asitleri boyayarak 536nm dalga boyunda ışımaya yaparlar (Resim 3.8.). Yeşil renkli ışımaya, hücre canlılığını gösterirken kırmızı renkli ışımaya hücre ölümünü göstermektedir. Bakılan tüm hücrelerin fotoğrafları çe-

kildi ve hücre canlılık analizleri Matlab programı kullanılarak değerlendirildi. Her bir hücrenin yeşil ve kırmızı floresan ışımları üst üste getirilerek program aracılığıyla renk yüzdelelerini hesapladı (Resim 3.9.).



Resim 3.8. Floresan mikroskop ile hücre canlılığının görüntülenmesi



Resim 3.9. Matlab programı ile hücre canlılığının hesaplanması.

3.7. İstatiksel Analiz

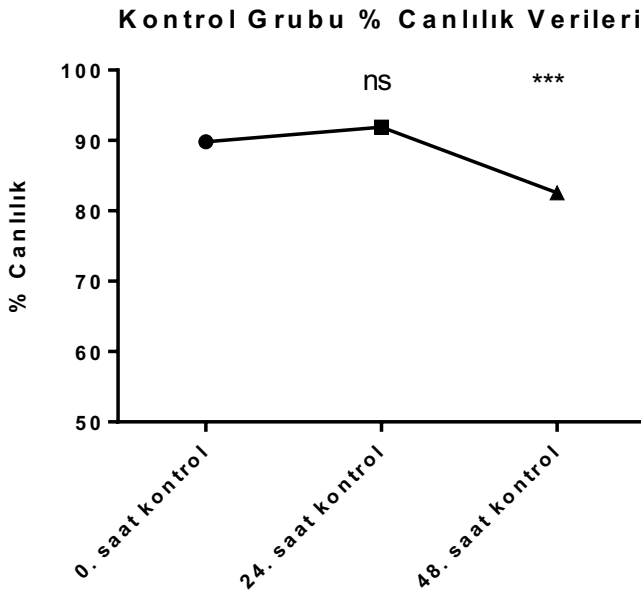
Sonuçlar, ANOVA programı yardımıyla, istatistiksel yöntem olarak tek yönlü varyans analizi (OneWay ANOVA) ile değerlendirildi ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

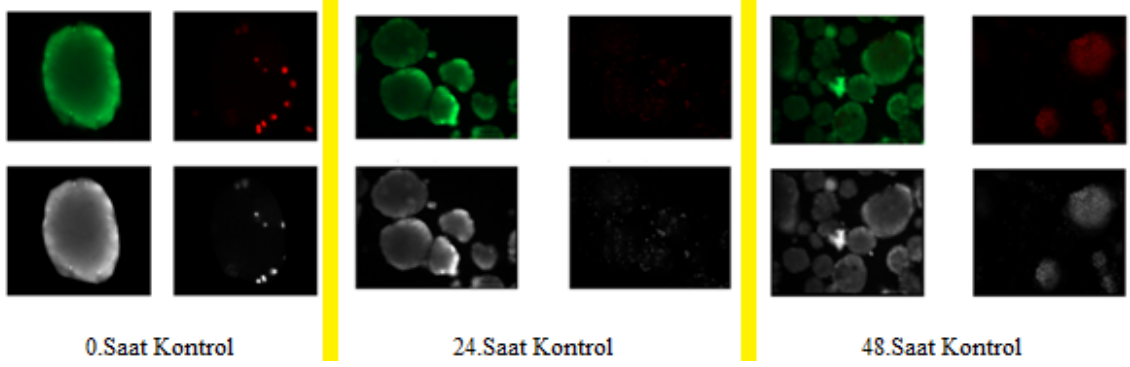
4.1. Kontrol Grubu Canlılık Deney Sonuçları ve Tartışma

Kontrol grubunda, Çizelge 3.3.'de planlandığı üzere 0., 24. ve 48. saatlerdeki canlılık sonuçlarında değişimler incelendi ve Resim 4.1 ile Şekil 4.1'de sonuçlandığı gibi 48. saatte hücre canlılığı %82,5'e düştü. Canlılık oranındaki bu düşüş adacık hücre verimliliğinin azalmasına da sebebiyet vermektedir.

Kontrol grubundaki adacık hücre canlılığının 48. saatindeki görülen bu hücre canlılığındaki azalmanın nedenlerinden biride yanlış protein katlanmasıyla oluşan ER stres aracılı hücre ölümüdür [58]. Adacık hücrelerinin pankreastan saflaştırılması sonrasında beklenen bu ER stresi kaynaklı hücre ölümü, CHOP ve XBP1s gibi proteinlerin aktif hale gelmesiyle gerçekleşir [59].



Şekil 4.1. Kontrol grubu 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı

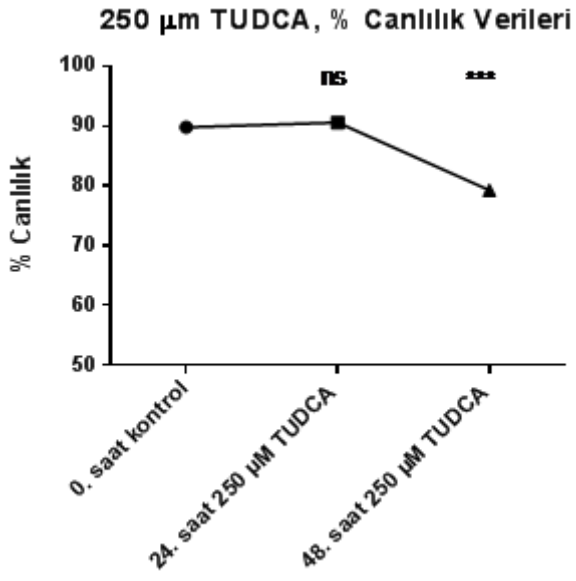


Resim 4.1. Kontrol grubuna ait 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılıklarının floresan mikroskop görüntüsü

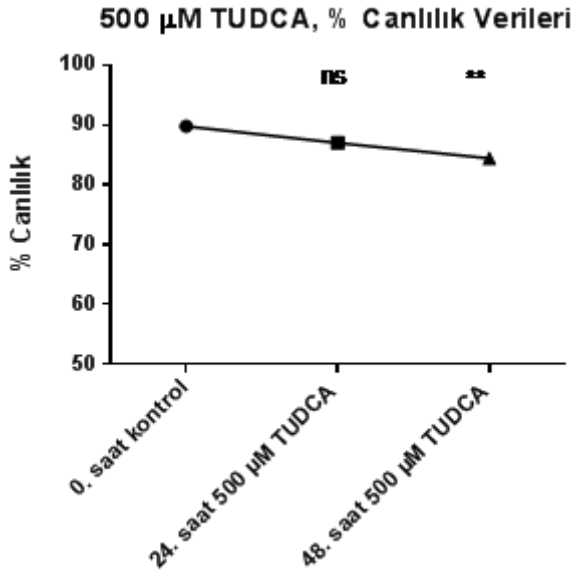
4.2. TUDCA Grubu Canlılık Deney Sonuçları ve Tartışma

Bu çalışma, Çizelge 3.3.'de planlandığı üzere, 10– 45 arasındaki deney gruplarına ait hücrelere verilen farklı derişimler deki TUDCA kimyasalının 0., 24. ve 48. saatlerdeki saatlerdeki canlılık sonuçlarında ki değişimler incelenerek, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 çizildi. Şekillerde de görüldüğü gibi 24. ve 48. saatlerdeki %92 ve %96'lık sonuç ile istatistik olarak en anlamlı ($p<0,05$) hücre canlılığı, 1000 μM derişimdeki TUDCA kimyasalı uygulanan hücrelerde tespit edildi (Resim 4.2; Şekil 4.5).

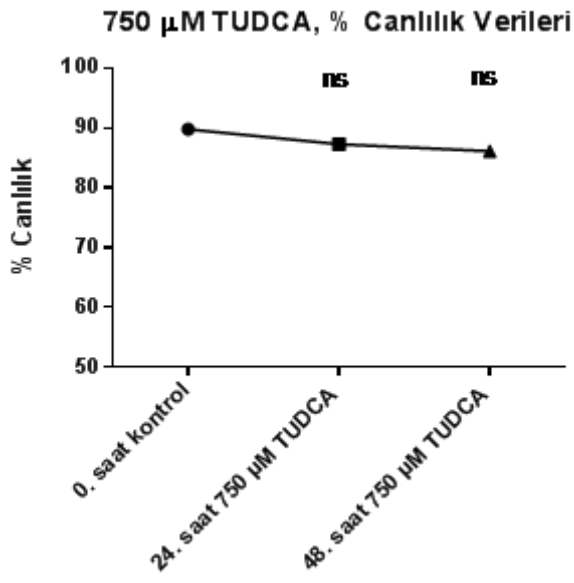
Literatürdeki TUDCA kimyasalı ile yapılan insan ve hayvan deneylerinde de görüldüğü üzere hücre canlılığını korumada rolünün olduğu belirtilmiştir [60-63]. Farklı derişimler deki TUDCA kimyasalı ile yapılan çalışmalarımızda, tüm sonuçlarımızın adacık hücre canlılığını artırmadığı görülmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmamız sonucunda adacık hücre canlılığını artırmak için kullanılacak TUDCA kimyasalının miktarı tayin edilmiş oldu.



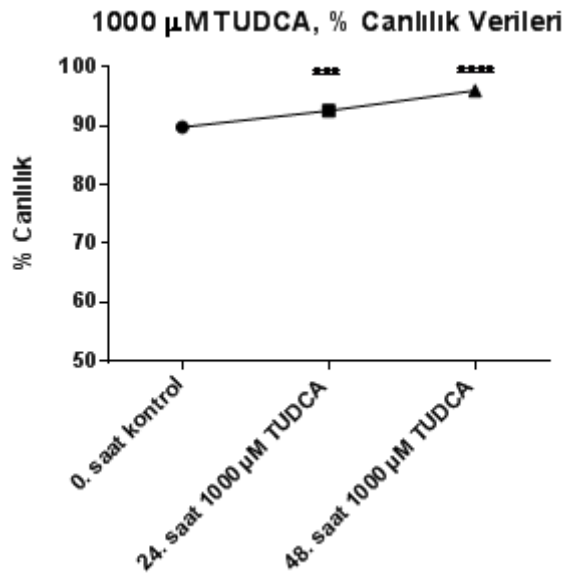
Şekil 4.2. 250 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



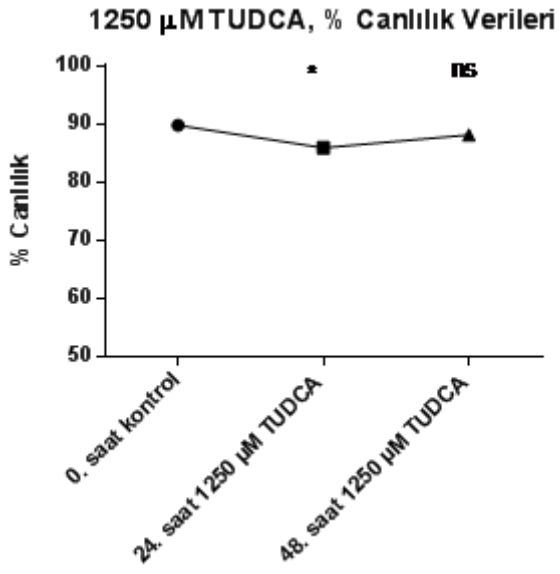
Şekil 4.3. 500 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



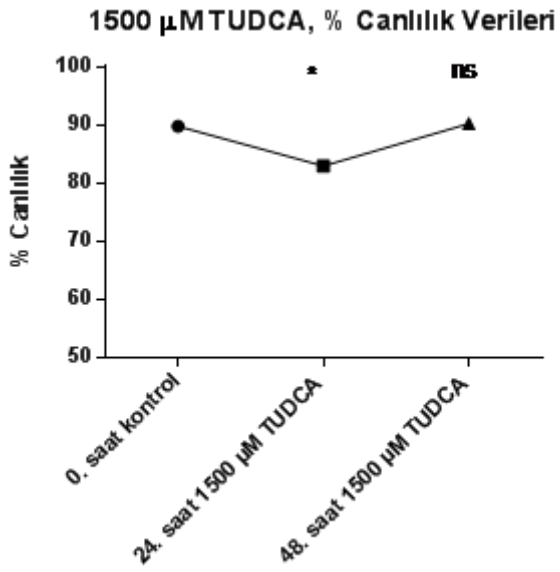
Şekil 4.4. 750 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlilik oranı



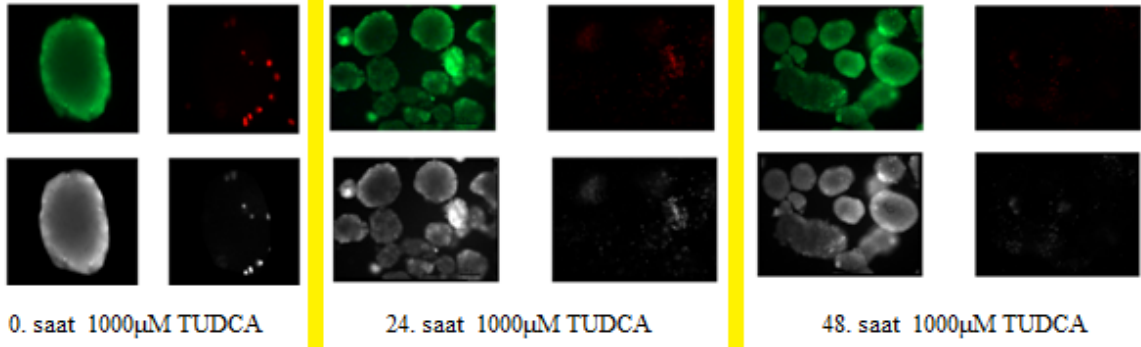
Şekil 4.5. 1000 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlilik oranı



Şekil 4.6. 1250 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



Şekil 4.7. 1500 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



Resim 4.2. 1000 μM derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılıklarının floresan mikroskop görüntüsü

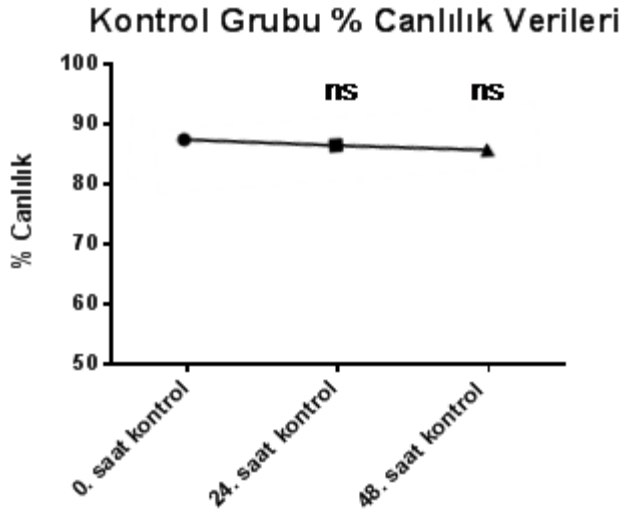
4.2.1. 900 μM ve 1100 μM TUDCA canlılık deney sonuçları ve tartışma

TUDCA gruplarında yapılan çalışma sonucunda pozitif olarak en anlamlı sonuç 1000 μM derişimdeki TUDCA grubunda bulunmuştur. Fakat 1000 μM TUDCA grubunun bir alt çalışması olan 750 μM ve bir üst çalışması olan 1250 μM derişimdeki grupların 48. saatteki canlılıklarının 1000 μM 'a göre fazla fark oluşturması dikkat çekmiştir. Dolayısıyla bu gruptaki çalışmanın yorumlanabilmesi için Çizelge 4.1.'de görüldüğü gibi, 1000 μM 'ın 100 μM düşüğü ve 100 μM fazlası olan 900 μM 'lık ve 1100 μM 'lık, 0. Saat, 24. saat ve 48. saat deney gruplarına paralel 3 grup (n=3) oluşturularak toplamda 21 çalışmalık grup oluşturuldu.

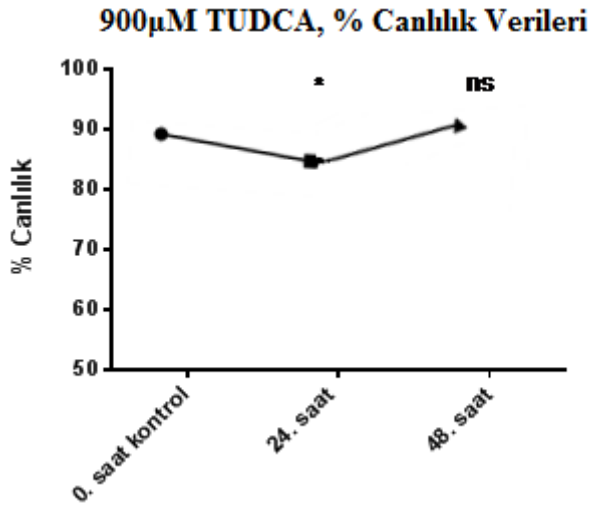
Bu iki grubun çalışma sonuçları kendi aralarında ve kontrole karşı değerlendirildiğinde 1000 μM TUDCA grubu kadar anlamlı pozitif bir canlılık sonucu verememiştir.

Çizelge 4.1. 900 μM ve 1100 μM TUDCA, Kontrol ve deney grupları

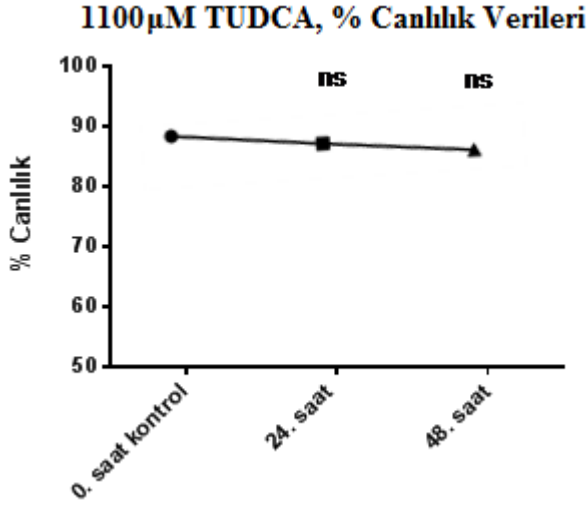
Kontrol Grubu	Deney Grupları
0. Saat Kontrol	0. Saat TUDCA 900 μM ve 1100 μM
24.Saat Kontrol	24.Saat TUDCA
48.Saat Kontrol	48.Saat TUDCA



Şekil 4.8. İlave çalışma, Kontrol grubu 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



Şekil 4.9. İlave çalışma, 900 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı

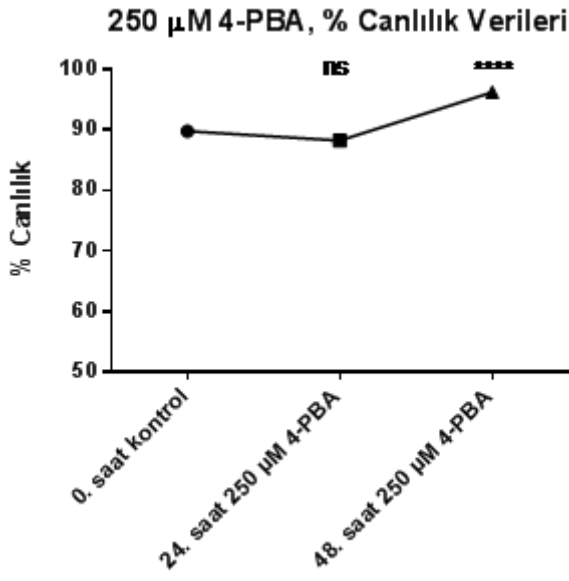


Şekil 4.10. İlave çalışma, 1100 μ M derişimdeki TUDCA grubunun 0., 24. ve 48. Saatler deki hücre canlılık oranı

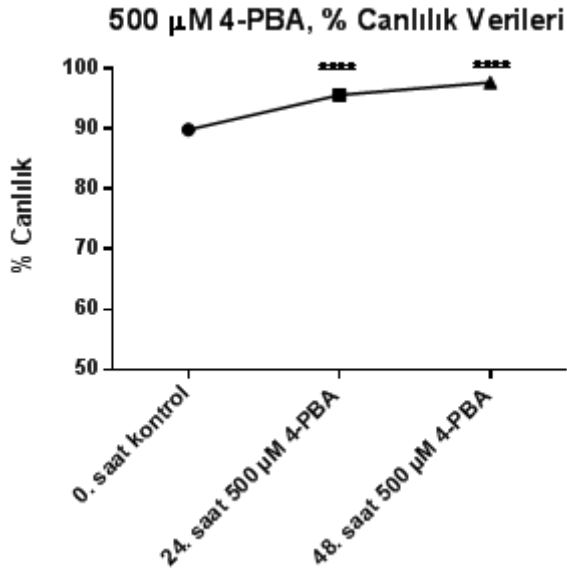
4.3. 4-PBA Grubu Canlılık Deney Sonuçları ve Tartışma

Bu çalışmada, Çizelge 3.3.'de planlandığı üzere, 46– 81 arasındaki deney gruplarına ait hücrelere verilen 4-PBA kimyasalının 0., 24. ve 48. saatlerdeki canlılık sonuçlarında ki değişimler incelenerek, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 çizildi. Şekillerde de görüldüğü gibi 24. ve 48. saatlerdeki %95 ve %97'lik sonuç ile istatistik olarak anlamlı ($p < 0,05$) hücre canlılığı, 500 μ M derişimdeki 4-PBA kimyasalı eklenen hücrelerde tespit edildi (Resim 4.3; Şekil 4.12).

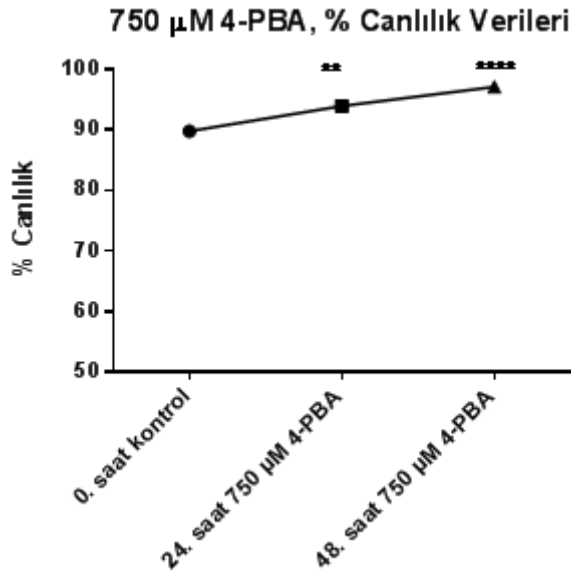
4-PBA'nın farklı derişimde, farklı hücre kültürlerine uygulanmasına ilişkin yapılan çalışmalarda da görüldüğü üzere tüm hücre gruplarındaki canlılığı bizim yaptığımız deneydeki gibi olumlu sonuçlar vermiştir [64, 65]. 4-PBA, aktif olarak üre döngüsü bozukluğu, kistik fibrozis, kalp-damar hastalığı ve sinir hücre ölümlerinin tedavisinde kullanılmakta olup, yaptığımız bu çalışma sonucunda adacık hücre nakil çalışmalarında da kullanılması için yol gösterici olmuştur [66-70].



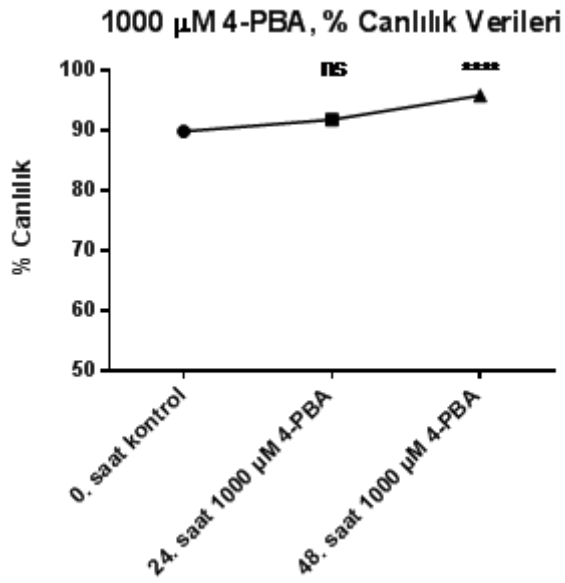
Şekil 4.11. 250 μ M derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



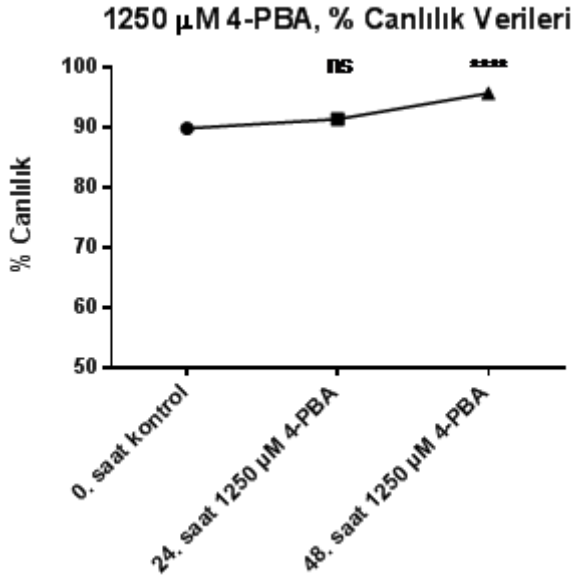
Şekil 4.12. 500 μ M derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



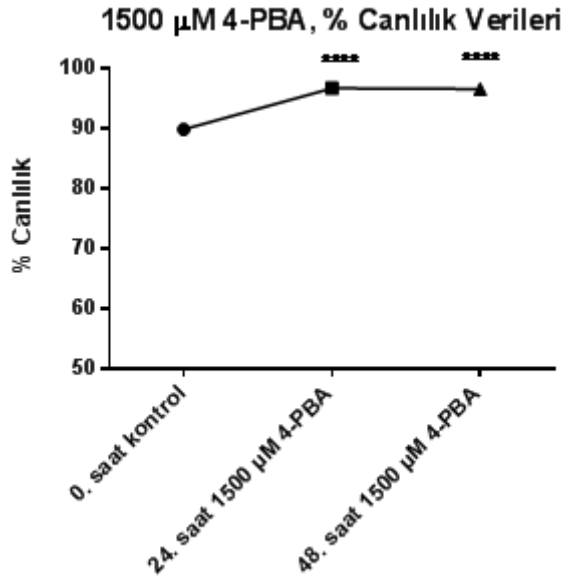
Şekil 4.13. 750 μ M derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı.



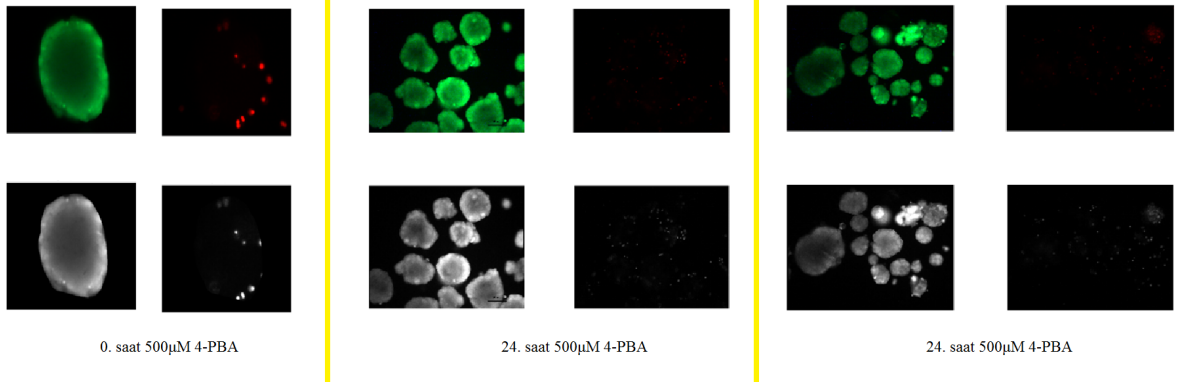
Şekil 4.14. 1000 μ M derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



Şekil 4.15. 1250 μ M derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



Şekil 4.16. 1500 μ M derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık oranı



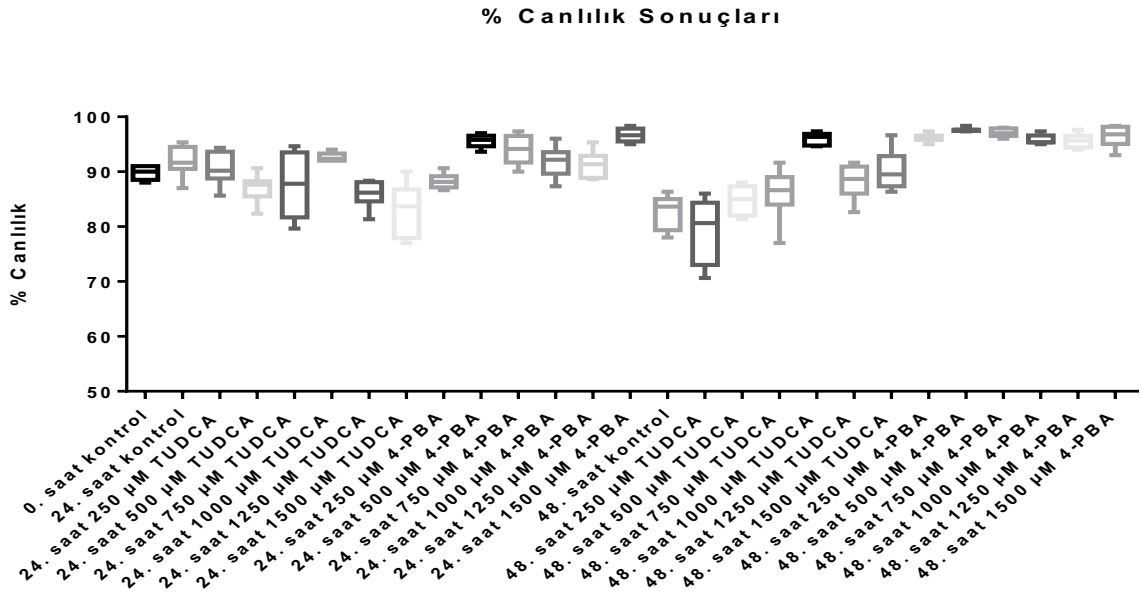
Resim 4.3. 500µM derişimdeki 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılıklarının floresan mikroskop görüntüsü

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada kullandığımız TUDCA ve 4-PBA kimyasal şaperonların belirli dozlarda kullanımı, sıçan pankreas adacık hücre canlılığı üzerine olumlu katkısı olduğunu göstermiştir. Bu dozların, hücre ölümlerini durdurmasındaki en büyük etkenlerin protein katlanmasını iyileştirmesi ve katlanmayan proteinlerin parçalanması için ubikütine göndermesi olarak düşünmekteyiz.

Çalışmamızda sıçan pankreas adacık hücrelerinin canlılıklarını denemek için florasan mikroskobu kullanıldı. FDA/PI boyalarının adacık hücrelerdeki konumlanma ve reaksiyonu ile canlılık yüzdeleri hesaplandı. Bu hesaplamaadan yola çıkılarak, hücrelerin 1 mM derişimdeki TUDCA çözeltisi ile 500 µM derişimdeki 4-PBA çözeltisinin adacık hücre canlılığını iyileştirmek için en ideal doz seçimi olduğu belirlenmiştir.

Kimyasal şaperonlar ile yapılan tüm *in vivo* veya *in vitro* çalışmaların tümünde ER stresinin azaldığı gözlenmiştir [38, 59-62]. Fakat, bizim çalışmamızda Şekil 5.1'de görüldüğü üzere 250 µM TUDCA grubunun adacık hücre kültürüne ilavesi sürecindeki 48. saatte, kontrol grubuna kıyasla canlılığını artırmaması, literatür araştırma sonuçlarına göre farklı bir yaklaşım oluşturmuştur. Bu sonuç ışığında, *in vivo* veya *in vitro* tedavi amaçlı TUDCA çalışmalarında, uygulama öncesi doz belirleme yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. 4-PBA çalışmalarımızın sonuçları göz ününe alındığında, tüm grupların adacık hücre canlılığında kontrol grubuna göre daha olumlu olduğu yorumu yapılabilmektedir. 4-PBA çalışmamızda, TUDCA grubunda karşılaşıldığı gibi adacık hücre canlılığını değiştirmeyecek bir derişim ile karşılaşılmaş olup, uygulanan tüm derişimlerin canlılığı artırmasıyla literatürdeki diğer 4-PBA'çalışmalarına benzer sonuçlar elde edilmiştir [38, 64, 65].



Şekil 5.1. Uygulanan tüm derişimdeki TUDCA ve 4-PBA grubunun 0., 24. ve 48. saatler deki hücre canlılık oranının kontrol grubu ile karşılaştırması

Literatürde, *in vitro* adacık hücre canlılığını koruma ve artırma amaçlı, belli derişimdeki kimyasal şaperonlar ile yapılan detaylı ilk çalışma olarak, elde ettiğimiz sonuçlardaki canlılıkların artışı, hücrelerdeki ER stresini azaltarak programlanmış hücre ölümünde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir.

Dünyada, tip1 diyabetli hastalara alternatif bir tedavi seçeneği olarak uygulanan adacık hücre naklinde, hücrenel düzeyde bu kimyasal maddeler ile yapılacak bir iyileştirmenin, nakledilecek adacık hücre canlılığında ve uzun vadeli işlevlerinde iyileştirme sağlayabileceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Velloso, L.A., Eizirik, D.L., and Cnop, M. (2013). Type 2 diabetes mellitus an autoimmune disease? *Nature Reviews Endocrinology*, 9-750.
2. Spellman CW. (2010). Pathophysiology of Type 2 Diabetes: Targeting Islet Cell Dysfunction. *The Journal of the American Osteopathic Association*, 110-2
3. King, H., Rewers, M., and WHO ad hoc Diabetes reporting group: "Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adult." (1993). *Diabetes Care*, 16:155-177.
4. Satman, I., Yilmaz, T., Sengül, A., Salman, S., Salman, F., Uygur, S., Bastar, I., Tütüncü, Y., Sargin, M., Dinççag, N., Karsidag, K., Kalaça, S., Ozcan, C., and King, H. (2002). Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*, 25-1551.
5. Mandrup-Poulsen, T. (2012). Interleukin-1 antagonists and other cytokine blockade strategies for type 1 diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, 9-338.
6. Ovcinnikovs, V., and Walker, L.S. (2015). Regulatory T Cells in Autoimmune Diabetes: Mechanisms of Action and Translational Potential. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 136-245.
7. McCall, M., and Shapiro, A.M. (2014). Islet cell transplantation. *Seminars in Pediatric Surgery*, 23-83.
8. Hatzivramidis, D.T., Karatzas, T.M., and Chrousos, G.P. (2013). Pancreatic islet cell transplantation: an update. *Annals of Biomedical Engineering*, 41-469.
9. Pileggi, A., and Ricordi, C. (2013). A New Home for Pancreatic Islet Transplants: The Bone Marrow. *Diabetes*, 62-3333.
10. Pileggi, A., Ricordi, C., Kenyon, N.S., Froud, T., Baidal, D.A., Kahn, A., Selvaggi, G., and Alejandro, R. (2004). Twenty years of clinical islet transplantation at the Diabetes Research Institute-University of Miami. *Clinical Transplantation*, 177-204.
11. Krishnan, R., Alexander, M., Robles, L., Foster, C.E., and Lakey, J.R. (2014). Islet and stem cell encapsulation for clinical transplantation. *The Review of Diabetic Studies*, 11-84.
12. Blau, J.E., Abegg, M.R., Flegel, W.A., Zhao, X., Harlan, D.M., and Rother, K. (2015). Long-Term Immunosuppression After Solitary Islet Transplantation Is Associated With Preserved C-Peptide Secretion for More Than a Decade. *American Journal of Transplantation*, 15-2995.
13. Pluquet, O., Pourtier, A., and Abbadie, C., (2015). The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Cell Physiology - American Journal of Physiology*, 308-415.

14. Miyazaki-Anzai, S., Masuda, M., Demos-Davies, K.M., Keenan, A.L., Saunders, S.J., Masuda, R., Jablonski, K., Cavasin, M.A., Kendrick, J., Chonchol, M., McKinsey, T.A., Levi, M., and Miyazaki M., (2014). Endoplasmic reticulum stress effector CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) regulates chronic kidney disease-induced vascular calcification. *Journal of the American Heart Association*, 3-949.
15. Sano, R., and Reed, J.C., (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833-3460.
16. Smith, H.L., Li, W., and Cheetham, M.E., (2015). Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 40-142.
17. Roth, S.D., Schüttrumpf, J., Milanov, P., Abriss, D., Ungerer, C., Quade-Lyssy, P., Simpson, J.C., Pepperkok, R., Seifried, E., and Tonn, T., (2012). Chemical chaperones improve protein secretion and rescue mutant factor VIII in mice with hemophilia A. *PLoS One*, 10-1371.
18. Ben Mosbah, I., Alfany-Fernández, I., Martel, C., Zaouali, M.A., Bintanel-Morcillo, M., Rimola, A., Rodés, J., Brenner, C., Roselló-Catafau, J., and Peralta, C., (2010). Endoplasmic reticulum stress inhibition protects steatotic and non-steatotic livers in partial hepatectomy under ischemia-reperfusion. *Cell Death and Disease*.10-1038.
19. Galán, M., Kassin, M., Kadowitz, P.J., Trebak, M., Belmadani, S., and Matrougui, K., (2014). Mechanism of endoplasmic reticulum stress-induced vascular endothelial dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843-1063.
20. Cadavez, L., Montane, J., Alcarraz-Vizán, G., Visa, M., Vidal-Fàbrega, L., Servitja, J.M., and Novials, A., (2014). Chaperones ameliorate beta cell dysfunction associated with human islet amyloid polypeptide overexpression. *PLoS One*, 10-1371.
21. McHenry, C.R., and Strain, J.W. "Anatomy and embryology of the pancreas", (1997). In: *Clarck O. H., editör. Textbook of endocrine surgery. Philedelphia: Saunders*, 549-555.
22. Kimura, K., Inoue, K., Okubo, J., Ueda, Y., Kawaguchi, K., Sakurai, H., Wada, I., Morita, M., and Imanaka, T., (2015) Endoplasmic reticulum stress response and mutant protein degradation in CHO cells accumulating antithrombin (C95R) in Russell bodies. *Pharmaceutical Biology*, 38-12.
23. Mokry, D.Z., Abrahão, J., and Ramos, C.H. (2015). Disaggregases, molecular chaperones that resolubilize protein aggregates. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87-2.
24. Fan, C., Lee, S. and Cyr, D.M. (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 by Hsp40. *Cell Stress Chaperon*, 8-309.
25. Chang, Y.J., Chen, W.Y., Huang, C.Y., Liu, H.H., and Wei, P.L. (2015). Glucose-regulated pro-tein 78 (GRP78) regulates colon cancer metastasis through EMT biomarkers and the NRF-2/HO-1 pathway. *Tumour Biology*, 36-1859.

26. Lee, A.S. (2005). The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*, 35-373.
27. Quinones, Q.J., de Ridder, G.G. and Pizzo, S.V. (2008). GRP78: a chaperone with diverse roles beyond the endoplasmic reticulum. *Histology and Histopathology*, 23-1409.
28. Rajan, R.S., Tsumoto, K., Tokunaga, M., Tokunaga, H., Kita, Y., and Arakawa, T. (2011). Chemical and pharmacological chaperones: application for recombinant protein production and protein folding diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 18-1.
29. Cortez, L., and Sim, V. (2014). The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion*, 8-197.
30. Tersey, S.A., Nishiki, Y., Templin, A.T., Cabrera, S.M., Stull, N.D., Colvin, S.C., Evans-Molina, C., Rickus, J.L., Maier, B., and Mirmira, R.G. (2012). Islet β -cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *Diabetes*, 61-818.
31. Ichii, H., and Ricordi, C. (2009). Current status of islet cell transplantation. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 16-101.
32. Erbel, S., Reers, C., Nawroth, P.P., and Ritzel, R.A. (2010). Prolonged culture of human islets induces ER stress. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 118-81.
33. Ghorbani, R., Jalili, C., Salahshoor, M.R., and Shiasi, M. (2015). The effect of time and temperature on viability and performance of Langerhans islets separated from Balb/c mouse after death. *Advanced Biomedical Research*, 4-93.
34. Yang, H., and Zhang, X. (1999). Investigation of long-term preservation of pancreatic islets. *Chinese Medical Journal*, 112-103.
35. Loganathan, G., Graham, M.L., Spizzo, T., Tiwari, M., Lockridge, A.D., Soltani, S., Wilhelm, J.J., Balamurugan, A.N., and Hering, B.J. (2014). Pretreatment of donor pigs with a diet rich in soybean oil increases the yield of isolated islets. *Transplantation Proceedings*, 46-1945.
36. Nacher, M., Estil, L.E., Garcia, A., Nadal, B., Pairó, M., Garcia, C., Secanella, L., Novials, A., and Montanya, E. (2015). Human serum versus human serum albumin supplementation in human islet pretransplantation culture. In vitro and in vivo assessment. *Cell Transplantation*, 10-3727.
37. Montane, J., Cadavez, L., and Novials, A. (2014). Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Journal of Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 7-25.
38. Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Görgün, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*, 313-1137.

39. Zhu, Q., Zhong, J.J., Jin, J.F., Yin, X.M., and Miao, H. (2013). Tauroursodeoxycholate, a chemical chaperone, prevents palmitate-induced apoptosis in pancreatic β -cells by reducing ER stress. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 121-43.
40. Choi, S.E., Lee, Y.J., Jang, H.J., Lee, K.W., Kim, Y.S., Jun, H.S., Kang, S.S., Chun, J., and Kang, Y. (2008). A chemical chaperone 4-PBA ameliorates palmitate-induced inhibition of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 475-109.
41. Cadavez, L., Montane, J., Alcarraz-Vizán, G., Visa, M., Vidal-Fàbrega, L., Servitja, J.M., and Novials, A. (2014). Chaperones ameliorate beta cell dysfunction associated with human islet amyloid polypeptide overexpression. *PLoS One*, 10-1371.
42. da-Silva, W.S., Ribich, S., Arrojo e Drigo, R., Castillo, M., Patti, M.E., and Bianco, A.C. (2011). The chemical chaperones tauroursodeoxycholic and 4-phenylbutyric acid accelerate thyroid hormone activation and energy expenditure. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 585-539.
43. Humeres, C., Montenegro, J., Varela, M., Ayala, P., Vivar, R., Letelier, A., Olmedo, I., Catalán, M., Rivas, C., Baeza, P., Muñoz, C., García, L., Lavandero, S., and Díaz-Araya, G. (2014). 4-Phenylbutyric acid prevent cytotoxicity induced by thapsigargin in rat cardiac fibroblast. *Toxicology In Vitro*, 28-1443.
44. Zhu, M., Guo, M., Fei, L., Pan, X.Q., and Liu, Q.Q. (2014). 4-phenylbutyric acid attenuates endoplasmic reticulum stress-mediated pancreatic β -cell apoptosis in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Endocrine*, 47-129.
45. Kemter, E., Sklenak, S., and Rathkolb, B. (2014). No amelioration of uromodulin maturation and trafficking defect by sodium 4-phenylbutyrate in vivo: studies in mouse models of uromodulin-associated kidney disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 289-10715.
46. Koyama, M., Furuhashi, M., and Ishimura, S. (2014). Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory*, 306-1314.
47. Zhang, H., Nakajima, S., Kato, H., and Gu, L. (2013). Selective, potent blockade of the IRE1 and ATF6 pathways by 4-phenylbutyric acid analogues. *British Journal of Pharmacology*, 170-822.
48. Hua, Y., Kandadi, M., Zhu, M., Ren, J., and Sreejayan, N. (2010). Tauroursodeoxycholic acid attenuates lipid accumulation in endoplasmic reticulum-stressed macrophages. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 55-49.
49. Yan, F., Li, J., Chen, J., Hu, Q., Gu, C., Lin, W., and Chen, G. (2014). Endoplasmic reticulum stress is associated with neuroprotection against apoptosis via autophagy activation in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience Letters*, 563- 160.

50. Rodrigues, C.M., Sola, S., Nan, Z., Castro, R.E., Ribeiro, P.S., Low, W.C., and Steer, C.J. (2003). Tauroursodeoxycholic acid reduces apoptosis and protects against neurological injury after acute hemorrhagic stroke in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100-6087.
51. Ramalho, R.M., Borralho, P.M., Castro, R.E., Solá, S., Steer, C.J., and Rodrigues, C.M. (2006). Tauroursodeoxycholic acid modulates p53-mediated apoptosis in Alzheimer's disease mutant neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, 98- 1610.
52. Marathe, C.S., Drogemuller, C.J., Marathe, J.A., Loudavaris, T., Hawthorne, W.J., O'Connell, P.J., Radford, T., Kay, T.W., Horowitz, M., Coates, P.T., and Torpy D.J. (2014). Islet cell transplantation in Australia: screening, remote transplantation, and incretin hormone secretion in insulin independent patients. *Hormone and Metabolic Research*, 47-16.
53. Unsal, I.O., Ginis, Z., Pinarli, F.A., Albayrak, A., Cakal, E., Sahin, M., and Delibasi, T. (2015). Comparison of therapeutic characteristics of islet cell transplantation simultaneous with pancreatic mesenchymal stem cell transplantation in rats with Type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Reviews and Reports*, 526-32.
54. Tersey, S.A., Nishiki, Y., Templin, A.T., Cabrera, S.M., Stull, N.D., Colvin, S.C., Evans-Molina, C., Rickus, J.L., Maier, B., and Mirmira, R.G. (2012). Islet β -cell endoplasmic reticulum stress precedes the onset of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse model. *Diabetes*, 61-818.
55. Cnop, M., Welsh, N., Jonas, J.C., Jörns, A., Lenzen, S., and Eizirik, D.L. (2005). Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes*, 54-97.
56. Vincenz, L., Szegezdi, E., Jäger, R., Holohan, C., O'Brien, T., and Samali, A. (2011). Cytokine induced β -cell stress and death in type 1 diabetes mellitus. *Complications, Pathogenesis, and Alternative Treatments*, 12-214.
57. Potter, K.J., Westwell-Roper, C.Y., Klimek-Abercrombie, A.M., Warnock, G.L., and Vercher, C.B. (2014). *Diabetes*, 63-12.
58. Kim, I., Xu, W., and Reed, J.C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7-1013.
59. Çelik, S., Şen, S., and Hamzan, Ö. (2015). Endoplasmik Retikulum Stresine Cevap Yolakları ve Tip 2 Diyabet Patogenezinde Endoplasmik Retikulum Stres Aracılı Beta Hücre Apoptosisinin Rolü. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16-227.
60. Gupta, S., Li, S., Abedin, M.J., Noppakun, K., Wang, L., Kaur, T., Najafian, B., Rodrigues, C.M., and Steer, C.J. (2012). Prevention of Acute Kidney Injury by Tauroursodeoxycholic Acid in Rat and Cell Culture Models. *PLoS One*, 10-1371.
61. Fimognari, C., Lenzi, M., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. (2009). Apoptosis and modulation of cell cycle control by bile acids in human leukemia T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1171-264.

62. Schulz, F., Just, I., and Genth, H. (2009). Prevention of *Clostridium sordellii* lethal toxin-induced apoptotic cell death by tauroursodeoxycholic acid. *Biochemistry*, 48-9002.
63. Peng, P., Ma, Q., Wang, L., Zhang, O., Han, H., Liu, X., Zhou, Y., and Zhao, Y. (2015). Preconditioning With Tauroursodeoxycholic Acid Protects Against Contrast-Induced HK-2 Cell Apoptosis by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *Angiology*, 66-941.
64. Kim, D.S., Li, B., and Rhew, and K.Y. (2012). The regulatory mechanism of 4-phenylbutyric acid against ER stress-induced autophagy in human gingival fibroblasts. *Archives of Pharmacal Research*, 35-1269.
65. Kubota, K. and Niinuma, Y. (2006). Suppressive effects of 4-phenylbutyrate on the aggregation of Pael receptors and endoplasmic reticulum stress. *Journal of Neurochemistry*, 97-1259.
66. Peng, P., Ma, Q., Wang, L., Zhang, O., Han, H., Liu, X., Zhou, Y., Zhao, Y. (2015). Preconditioning With Tauroursodeoxycholic Acid Protects Against Contrast-Induced HK-2 Cell Apoptosis by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress. *Angiology*, 66-941.
67. Kibleur, Y., Dobbelaere, D., Barth, M., Brassier, A., Guffon, N. (2014). Results from a Nationwide Cohort Temporary Utilization Authorization (ATU) survey of patients in france treated with Pheburane (Sodium Phenylbutyrate) taste-masked granules. *Paediatric Drugs*, 16-407.
68. Sorrenson, B., Suetani, R.J., Williams, M.J., Bickley, V.M., George, P.M., Jones, G.T., and McCormick, S.P. (2013). Functional rescue of mutant ABCA1 proteins by sodium 4-phenylbutyrate. *The Journal of Lipid Research*, 54-55.
69. Mimori, S., Ohtaka, H., Koshikawa, Y., Kawada, K., Kaneko, M., Okuma, Y., Nomura, Y., Murakami, Y., Hamana, H. (2013). 4-Phenylbutyric acid protects against neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23-6015.
70. Rubenstein, R.C., and Zeitlin, P.L. (2000). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70 Implications for intracellular trafficking of $\Delta F508$ -CFTR. *American Physiological Society*, 259-267.

EKLER

EK-1. Hayvan deneyleri yerel etik kurulu kararı



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi



T.C. Sağlık Bakanlığı

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 06.04.2015
Protokol No : 2015 / 15


Proje yürütücüsünün Adı-Soyadı : Prof.Dr. Ahmet YAŞAR
Projenin başlığı : Kimyasal Şaperonların *in vitro* Ortamda Siçan Pankreas Adacık Hücre Canlılığına Etkisi
Proje ekibi : Prof.Dr. Tuncay DELİBAŞI, Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU, Kim.Mürsel ÇALIŞKAN, Kim.Sercan MERCAN.

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Wistar Albino, Rat
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 3-6 Aylık, 180-270 gr


Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına karar verildi.

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

EK-2. Deney hayvanları kullanım sertifikası



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
(HADYEK)



Sertifika No: 2014-1/012

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI


Sayın **MÜRSEL ÇALIŞKAN**

HADYEK'in, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurullarının Çalışma, Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğin 15. Maddesi ve 2007/11 sayılı Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Eğitim Programına Dair Genelgeye uygun olarak **araştırmacılar için** düzenlediği **DENEY HAYVANLARI KULLANIMI EĞİTİM PROGRAMI'nı** başarıyla tamamlamış ve bu belgeyi almaya hak kazanmıştır.


11 - 25 Ocak 2014
ANKARA

Kurs Konuları (Ders şekli ve süresi):

- Deney hayvanlarının anatomisi, fizyolojisi, histolojisi ve biyokimyası (Teorik, 3 saat)
- Mevzuat (Teorik, 2 saat)
- Hayvan deneyleri etiği (Teorik, 2 saat)
- Alternatif yöntemler (Teorik, 4 saat)
- Tutuş teknikleri (Teorik, 3 saat)
- İlaç verme ve enjeksiyon teknikleri (Teorik, 3 saat)
- Kan ve örnek alma teknikleri (Teorik, 3 saat)
- Anestezi-Ötanazi teknikleri (Teorik, 3 saat)
- Laboratuvar işletmesi (Teorik, 1 saat)
- Temel laboratuvar güvenliği ve temizlik (Teorik, 6 saat)
- Hayvan refahı ve davranış özellikleri (Teorik, 3 saat)
- Deney hayvanlarının üretimi (Teorik, 2 saat)
- Deney hayvanlarının beslenmesi (Teorik, 1 saat)
- Hayvan hastalıkları (Teorik, 2 saat)
- İş sağlığı ve güvenliği (Teorik, 2 saat)
- Laboratuvar stajı (Uygulama, 40 saat)



Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI
HADYEK Başkanı



Prof. Dr. Murat ALPER
Başhekim

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÇALIŞKAN, Mürsel
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 07.08.1984, Sivas
 Medeni hali : Bekar
 Telefon : 0 (312) 326 00 10 / 1426
 Faks : 0 (312) 326 00 87
 e-mail : caliskanmursel@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi / F.B.E	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi / Kimya	2007
Lise	Dikmen Lisesi	2001

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2010- hâlen	Adacell, Ankara	Araştırma Proje Görevlisi
2009-2010	University of California, Berkeley	Araştırma Proje Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

-

Hobiler

Yüzme, Araba yarışları.

A

Adacık · 3
 Alfa · 3
 ATF6 · 6
 ANOVA · 24
 Aterosklerotik · 8

B

Beta · 3
 Batikon · 12
 Biocoll · 14

C

Calbiochem · 18
 CHOP · 7
 CRE · 7

Ç

Çölyak arter · 3

D

Dithizone · 16
 Delta · 3

E

Endoplazmik Retikulum · 6
 Ekzokrin · 4
 ERAD · 7
 eIF2a · 7

F

Fenilbütirat · 9
 Floresein diasetat · 22

G

Glukagon · 3
 Gama · 3
 Golgi · 5
 Granül · 6
 GRP78 · 8

H

HSP · 8
 HEPA · 11
 HBSS · 14

İ

insülin · 3
 IRE1 · 6
 İnkübatör · 19

K

Kimyasal şaperonlar · 9
 Kollajenaz tipV · 12

L

Langerhans · 6

M

Matlab · 9, 11, 20

O

Obez · 9

Ö

Ölçek · 16

P

Pankreas · 3
 Pankreatik polipeptit · 3
 PERK · 6
 Propidyum İyodür · 22

R

Ribozom · 6
 RPMI · 14

S

Somatostatin · 3
 Splenikven · 2

Ş

Şaperon · 2

T

Tip1 · 1
 Tip2 · 1
 Tauroursodeoksikolik asit · 9
 Tavernus · 2
 Transmembran · 6

U

UPR · 6



GAZİ GELECEKTİR...