



**T.C.
S.B. ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI KLİNİĞİ
Klinik Şefi Doç.Dr. Tuncay DELİBAŞI**

**TİP 1 DM RATLARDA ADACIK HÜCRE NAKLİ İLE EŞ
ZAMANLI OLARAK PANKREAS KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE NAKLİNİN TEDAVİ EDİCİ
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. İlknur ÖZTÜRK ÜNSAL

UZMANLIK TEZİ

ANKARA-2012



**T.C.
S.B. ANKARA DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI KLİNİĞİ
Klinik Şefi Doç.Dr. Tuncay DELİBAŞI**

**TİP I DM RATLARDA ADACIK HÜCRE NAKLİ İLE EŞ
ZAMANLI OLARAK PANKREAS KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE NAKLİNİN TEDAVİ EDİCİ
ÖZELLİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. İlknur ÖZTÜRK ÜNSAL

UZMANLIK TEZİ

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Tuncay Delibaşı**

ANKARA

2012

TEŞEKKÜR

Bilgi, tecrübe ve desteğini benden esirgemeyen değerli hocam Endokrinoloji ve Metabolizma Kliniği Şefi Doç. Dr. Tuncay DELİBAŞI'na, ihtisas süresi boyunca her an yardım ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Erman Çakal, Doç. Dr. Mustafa Şahin, Doç. Dr. Mustafa Özbek, Uzm. Dr. Oya Topaloğlu, Dr. Ferda Pınarlı, Dr. Zeynep Giniş, Dr. Aynur Albayrak, Pankreas Adacık Hücre Araştırmaları Merkezi'nde çalışan tüm arkadaşlar, klinik yan dal asistan arkadaşlarım, klinik ve poliklinik hemşire, sekreter ve personellerine ve her an yanımda olan ve beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	v
I.GİRİŞ	1
II.GENEL BİLGİLER	3

1.Pankreas

1.1 Anatomisi ve Embriyolojik gelişimi

1.2 Pankreas gelişiminde rol oynayan transkripsiyon faktörleri

1.3 Ekzokrin Pankreas

1.4 Endokrin Pankreas

1.5 İnsülin Biyosentezi ve Sekresyonu

2. Diyabetes Mellitus

2.1 Tarihçesi

2.2 Tanım

2.3 Diyabetes Mellitus Tanısı

2.4 Tip 1 Diyabetes Mellitus

2.4.1 Epidemiyoloji

2.4.2 Patogenez

2.5 Tedavi

2.5.1 İnsülin Tedavisi

3. Alternatif Tedavi Yöntemleri

3.1 Pankreas Transplantasyonu

3.2 Adacık Transplantasyonu

3.2.1 Adacık Kaybı

4. Mezenkimal Kök Hücre

4.1 Pankreas kökenli mezenkimal kök hücre

III.GEREÇ ve YÖNTEM 23

IV.BULGULAR 29

V. TARTIŞMA 43

VI. ÖZET

VII. ABSTRACT

VIII. KAYNAKLAR



SİMGELER ve KISALTMALAR

DM	Diyabetes Mellitus
MKH	Mezenkimal kök hücre
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni stimulan faktör
G-CSF	Granülosit koloni stimulan faktör
M-CSF	Makrofaj koloni stimulan faktör
IL	İnterlökin
APG	Açlık plazma glukozu
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ϵ	Epsilon
PP	Pankreatik polipeptid
HLA	İnsan lökosit antijen
MHC	Major histocompatibility complex
TNF-α	Tümör nekrozis factor- alfa
IFN-γ	İnterfekon- gama
ADA	Amerikan Diyabet Birliği
EASD	Avrupa Diyabet Araştırma Birliği
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
NGSP	Ulusal Glikohemoglobin Standartizasyon Programı
DCCT	Diabet Kontrol ve Komplikasyon Çalışması
ADVANCE	Action in Diabetes and Vascular Disease
ACCORD	The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study
UKPDS	The United Kingdom Prospective Diabetes Study
VADT	Veterans Affairs Diabetes Trial

ŞEKİLLER

Şekil 1. Pankreasın embriyolojik gelişimi

Şekil 2. Farelerde pankreatik linage

Şekil 3. Langerhans adacıklarının yapısı

Şekil 4. İnsülinin biyosentezi

Şekil 5. İnsülin Sekresyonu

Şekil 6. Tip 1 diabetes mellitus geçimi

Şekil 7. MHC gen aracılı beta hücre hasarı

Şekil 8. Adacık transplantasyon işlemi

Şekil 9. Adacık implantasyonu için alternatif yerler

Şekil 10. Pankreas Kök Hücre

Şekil 11. Grup 3 ve Grup 4 Adacık canlılık oranları

Şekil 12. Grup 3 (Adacık transplantasyonu) FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab'da hazırlanan program ile yapılan analizleri sonrası elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları (%86,0±2,2)

Şekil 13. Grup 4 (Adacık+MKH transplantasyonu) FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab'da hazırlanan program ile yapılan analizleri sonrası elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları (%84,1±1,7)

Şekil 14. Grupların kan şekeri ortalamaları

Şekil 15. IPGTT kan şekeri ortalamaları

Şekil 16. C-peptid sonuçları

Şekil 17. Pankreas ortalama adacık sayısı

Şekil 18. Grup 3 (adacık taransplantasyonu) Karaciğer histolojisi

Şekil 19. Grup 3 (Adacık transplantasyonu) Pankreas histolojisi

Şekil 20. Grup 4 (Adacık+MKH transplantasyonu) Karaciğer histolojisi

Şekil 21. Grup 4 (Adacık+MKH transplantasyonu) Pankreas histolojisi

Şekil 22. Grup 1 (kontrol) karaciğer (A) ve pankreas (B) histolojisi

Şekil 23. Karaciğerde parankimal değişiklikler

TABLÖLAR

Tablo 1. Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflaması

Tablo 2. Diyabetes Mellitus Tanı Kriterleri

Tablo 3. En Sık Kullanılan İnsülin Çeşitleri ve Özellikleri

Tablo4. Adacık Kaybına Etki Eden Faktörler

Tablo 5. Grupların kan şekeri ortalamaları

Tablo 6. Kan şekeri ortalamalarında günlere göre değişim

Tablo 7. Gruplar arasında kan şekeri ortalamasındaki değişim

Tablo 8. İntraperitoneal glukoz tolerans testi kan şekeri sonuçları

Tablo 9. C-peptid sonuçları

Tablo 10. Rat karaciğerlerinin histolojik değerlendirme sonuçları

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 1 Diabetes Mellitus (Tip 1 DM); pankreatik Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin bazı genetik HLA alleleriyle ilişkili olarak otoimmün harabiyeti ve kaybıyla seyreden kronik bir hastalıktır (1). Eksojen insülin tedavisi, Tip 1 diyabetli hastalarda yaşam kalitesini arttırmak ve diyabetin kronik komplikasyonlarını önlemek ya da geciktirmek için tek seçenektir. Ancak yoğun insülin tedavisinin kronik komplikasyonları önlemede yeterli başarıya ulaşmadığı gözlenmektedir (2). Pankreas ve pankreasdan elde edilen adacık nakli kesin tedavi edici yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Pankreas naklinin kısıtlayıcı yönleri nedeniyle (büyük cerrahi girişim, cerrahi komplikasyonlar, yoğun immunsupresif kullanma zorunluluğu v.b.) adacık nakli son zamanlarda ön plana çıkmıştır (3). Pankreasın %2'sinden daha az bir kısmını oluşturan adacık hücrelerinin izole edilerek, daha az invazif yoldan (portal vene infüzyonla) karaciğere nakledilmesine yönelik çalışmalar 1990'larda hız kazanmıştır. İlk başarılı sonuçlar 1990'ların sonunda gelmeye başlamıştır; Shapiro ve arkadaşları, 7 tip 1 diyabetli hastanın adacık hücre naklinden sonra insülininden bağımsız hale geldiklerini açıklamışlardır (4).

Pankreas adacık hücre nakli, tip 1 diyabetli hastalar için yeni ve umut verici bir yöntem olmasına rağmen halen seçilmiş hastalarda uygulanan deneysel bir prosedürdür. İzolasyon sürecinde meydana gelen hipoksi ve oksidatif stres, hücrelerde sitokin aracılı apoptoz ve nekrozu uyarmakta ve hücre kaybına neden olabilmektedir (8).

Adacık hücre naklinin başarısı, donörün özellikleri ve transplante edilen hücre kitlesiyle ilişkili bulunmuştur. Uygun donör-alıcı seçimi, enkapsülasyon, yeni immünmodülatör rejimler, daha fazla miktarda ve saf hücre elde etmeye yönelik stratejilerin yanı sıra adacık hücreleriyle birlikte adacık hücrelerinin yaşam sürelerini uzatmaya yardımcı olacak ikinci bir hücre tipinin belirlenmesi bu çalışmalardan bazılarını oluşturur (6,7). İkinci hücre tipi olarak üzerinde en çok çalışılan hücre grubu Mezenkimal kök hücre (MKH)'dir.

MKH, kemik iliği ve diğer stromal dokulardan köken alan, çeşitli uyaranlarla osteoblastik, adipositik ve kondrositik seriyeye dönüşebilen fibroblastoid hücrelerdir. Kemik iliği stroması ve diğer tüm organ ve dokulardaki stroma olmak üzere başlıca iki kaynaktan bulunur. MKH multipotenttir, kıkırdak, kemik, kas, tendon, ligament, adipoz doku, sinir hücreleri, pankreas beta hücreleri ve endotele farklılaşabilir. MKH birçok büyüme faktörünü (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) ve reseptörlerini, çeşitli IL (IL-6,7,8 vb) ve reseptörlerini, hücre dışı matriks proteinleri (kollajen, fibronektin, laminin) ve adezyon moleküllerini sentezleme yeteneğine sahiptir. HLA-DR ve ko-stimülatör molekül ifadenmesi olmadığı için immünojeniteleri

düşüktür. Hem immünsupresif etkileri hem de multipotent farklılaşma potansiyelleri nedeniyle hücresel tedavilerde diğer kök hücre türlerine göre daha çok tercih edilirler.

Tüm bu bilgiler ışığında tip 1 diyabetik sıçanlarda adacık hücre nakli ile eş zamanlı olarak pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücre naklinin adacık canlılığı ve dolayısıyla diyabetin tedavisine etkilerini araştırmayı amaçladık.



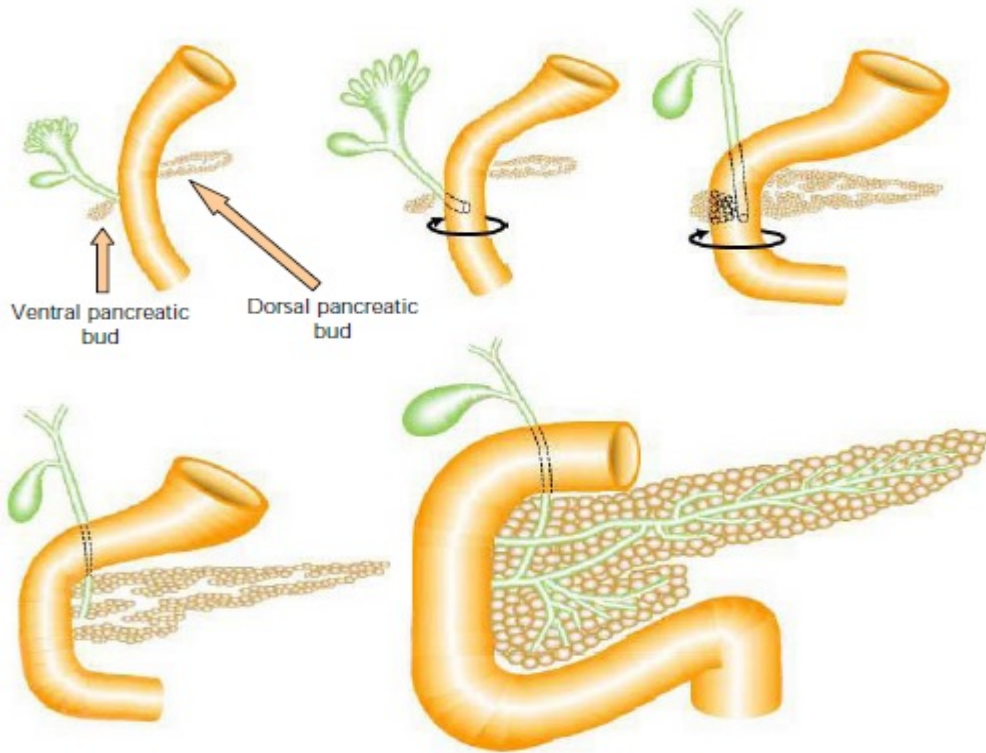
II. GENEL BİLGİLER

1.Pankreas

1.1Anatomisi ve Embriyolojik gelişimi

Pankreas, ikinci ve üçüncü lomber vertebralar hizasında yer alan, 15 cm uzunluğunda, 60-140 gram ağırlığında sekretuvar bir organdır. Anatomik olarak baş, uncinate process, boyun, gövde ve kuyruk olarak 5 bölüme ayrılır. Embriyolojik olarak, duodenum dorsal ve ventral tarafında gelişen iki endodermal tomurcuktan köken alır (8-10). Bu iki pankreatik tomurcuk endokrin ve ekzokrin hücrelerden oluşan pankreası oluşturmak için büyür ve kaynaşır (Şekil1).

Gelişim sırasında adacıkları oluşturmak üzere diferansiye olan hücreler kanallardan pankreas taslağına göç eder (11). Ekzokrin pankreas, duodenum içine sindirim enzimlerinin salgılanmasını ve taşınmasını sağlayan duktal ve asiner hücrelerden oluşan lobüle bir dokudur. Endokrin hücreler, Langerhans adacıkları içerisinde gruplanmış α , β , δ , ϵ , ve PP olmak üzere beş ana hücre tipinden oluşur (12). Sonuçta pankreasın, ekzokrin ve endokrin pankreas olmak üzere iki farklı fonksiyonu vardır.

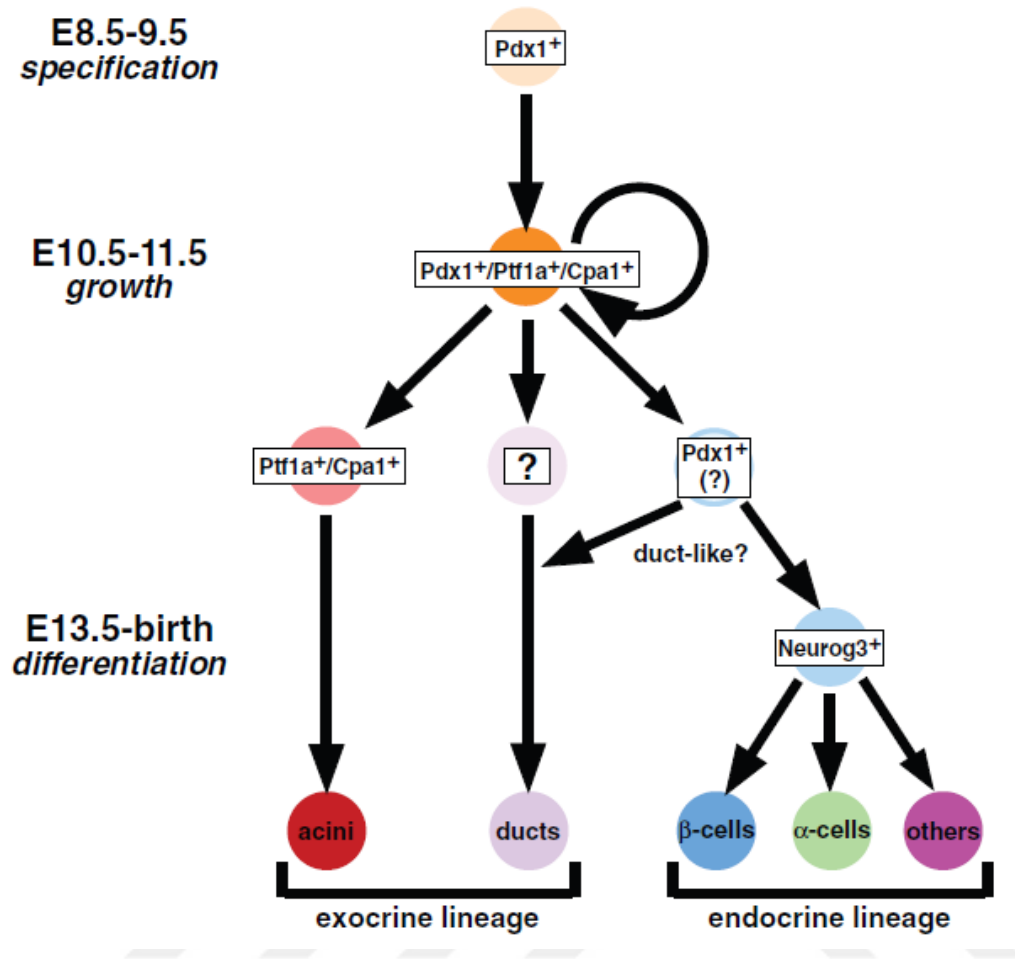


Şekil 1.Pankreasın embriyolojik gelişimi

1.2 Pankreas gelişiminde rol oynayan transkripsiyon faktörleri

Hem endokrin hem de ekzokrin lineage diferansiyasyon ve spesifikasyon çeşitli transkripsiyon faktörleri ile ilişkilidir. Pankreatik endoderm önce pankreas ve duodenum homeobox geni 1 (Pdx1) ve sonrasında pankreas-transkripsiyon faktörü 1a (Ptf1a) ekspresyonu ile işaretlenir (13,14). Tüm transkripsiyon faktörleri pankreas gelişimi için kritik öneme sahiptir. Pdx1 duodenum içinde olduğu gibi dorsal ve ventral pankreas tomurcuklarında erken aşamada ifade edilir (15). Daha sonraki aşamalarda β hücrelerinde yüksek derecede eksprese olurken asiner hücrelerde düşük seviyede bulunur (16). Pdx1 seviyesi pankreas içindeki diferansiyasyonu sağlayan endokrin ve ekzokrin (asiner ve duktal) progenitörler arasındaki dengeye ve kontrole yardımcı olur (17). Pdx1 eksik farelerde pankreas gelişmez (18,19) ve insanlardaki homolog mutasyonu pankreas agenezi ile ilişkilidir(20). Ptf1a erken pankreatik progenitörlerden (dorsal ve ventral tomurcuklar) eksprese edilen temel bir helix-loop-helix (bHLH) gendir (21). Yetişkinlerde, sadece asiner hücrelerinde eksprese edilir (22). Farelerde yapılmış fonksiyon kaybı çalışmaları göstermiştir ki; Ptf1a asiner hücre gelişimi için gereklidir ve endokrin hücre gelişiminde de önemli rol oynar (21,23). İnsanlarda ise PTF1A gen mutasyonu, pankreas ve serebellar agenezi ile ilişkilidir (24).

Notch sinyali de muhtemelen farklılaşmamış pankreas progenitör popülasyonun genişlemesine izin vererek ekzokrin ve endokrin hücrelerin dengesini düzenlemeye yardımcı olur (25-27). Notch sinyal kaybı, bHLH transkripsiyon faktörü ve neurogenin 3 (Ngn3) tarafından işaretlendiğinde endokrin lineage gelişimine izin verir (13,25,28). Ngn3 eksik farelerde ise endokrin hücreler gelişmez ve düzensiz asiner polarite gösterir. Ngn3 direkt olarak nörojenik diferansiyasyonunu (NeuroD, aynı zamanda BETA2 olarak da bilinir) ve diğer adacık spesifik gen bHLH gen ekspresyonunu etkiler (29) (Şekil 2).



Şekil 2. Farelerde pankreatik lineage (12)

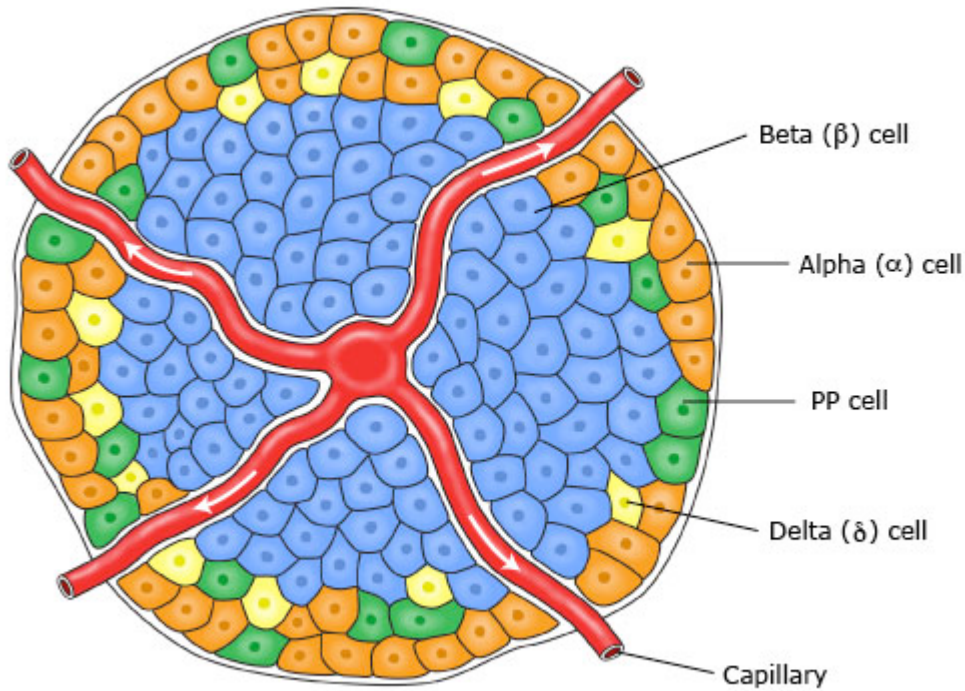
1.3 Ekzokrin Pankreas

Sentroasiner hücrelerden ve bunları drene eden duktuslardan oluşmaktadır. Gastrik asit ve gastrointestinal lümendeki yağ asitleri tarafından uyarılan sekretin duktal hücrelerden su ve bikarbonat sekresyonu sağlamaktadır. Duodenum lümenindeki yağ asitleri, peptid ve aminoasitler tarafından uyarılarak asiner hücrelerden sekrete edilen kolesistokininin ise sindirim enzimlerinin (tripsin, kimotripsin, aminopeptidazlar, elastaz, amilaz, lipaz, fosfolipaz ve nükleaz) salgılanmasını sağlar (30).

1.4 Endokrin Pankreas

Ekzokrin pankreas içerisinde düzenli bir dağılım göstermeden bulunur ve birkaç yüz- birkaç bin endokrin hücre içeren çeşitli büyüklükteki Langerhans adacıklarından oluşur. Sağlıklı bireylerde yaklaşık bir milyon adacık bulunur. Adacıklar 1-2 gram ağırlığında olup pankreas kitlesinin %1-2'ni oluşturur (31). Fakat vasküler kaynağın yaklaşık 2/3'ni alır.

Adacıkların boyutu 50-300 mikrometre arasında değişir ve birkaç hücre tipinden oluşur. Bu hücreler alfa (α), beta (β), delta (δ), epsilon (ϵ), ve PP hücreleri olup, sırasıyla glukagon, insülin, somatostatin, ghrelin ve pankreatik polipeptid hormonlarını salgılar. Beta hücreleri adacığın ortasında lokalizedir ve hücrelerin en az %70'ni oluşturur. Beta hücreleri diğer hücreler tarafından çevrilir (Şekil 3). Tüm hücreler ekstrasellüler boşluk ve gap junction aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarlar. Bu düzenlenme bir hücre tipinden salgılanan hücresel ürünün, diğer hücrelerin fonksiyonunu etkilemesine izin verir. Örneğin beta hücrelerinden salgılanan insülin, alfa hücrelerinden glukagon salgısını suprese eder.



Şekil 3. Langerhans adacıklarının yapısı

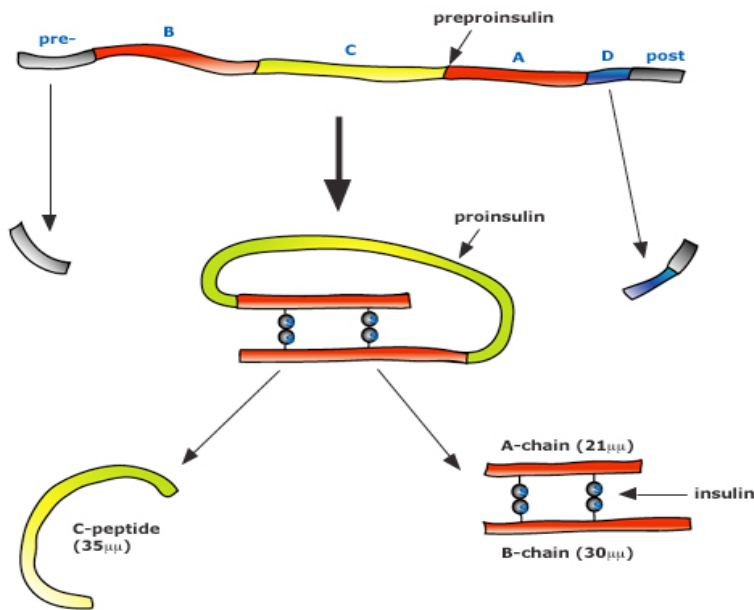
Endokrin pankreas, ekzokrin pankreasa göre 5–10 kat daha fazla kanlanmaktadır. Adacık içerisindeki kan akımı santralden perifer doğru olmaktadır. Adacık hücreleri ince yapılarına ve immünohistokimyasal özelliklerine göre ayırt edilebilir. Beta hücreleri çok yüzlü piramid benzeri şeklinde, 10x10x8 μm boyutlarındadır. Genellikle bol granüllüdür ve 10.000 kadar salgı granülü vardır. 250–300 nm çaplarında iki tür insülin granülü içerirler. Olgun olan granüllerde, bazen kristal yapılı olarak da görülen, bir elektron yoğun çekirdeği ve gevşek sınırlayıcı membranı vardır. Olgunlaşmamış granüllerde ise, gevşek sınırlayıcı membranı yoktur ve orta derece de elektron yoğun bir içerik görülür. Proinsülinin büyük kısmının

olgunlaşmamış granüller içinde olduğu gösterilmiştir (32). Her granülde insülinin yanı sıra adacık amiloid polipeptidi de dahil 100 kadar peptid de bulunur (33). Endokrin hücreler hormonları direkt olarak portal kanala verirler.

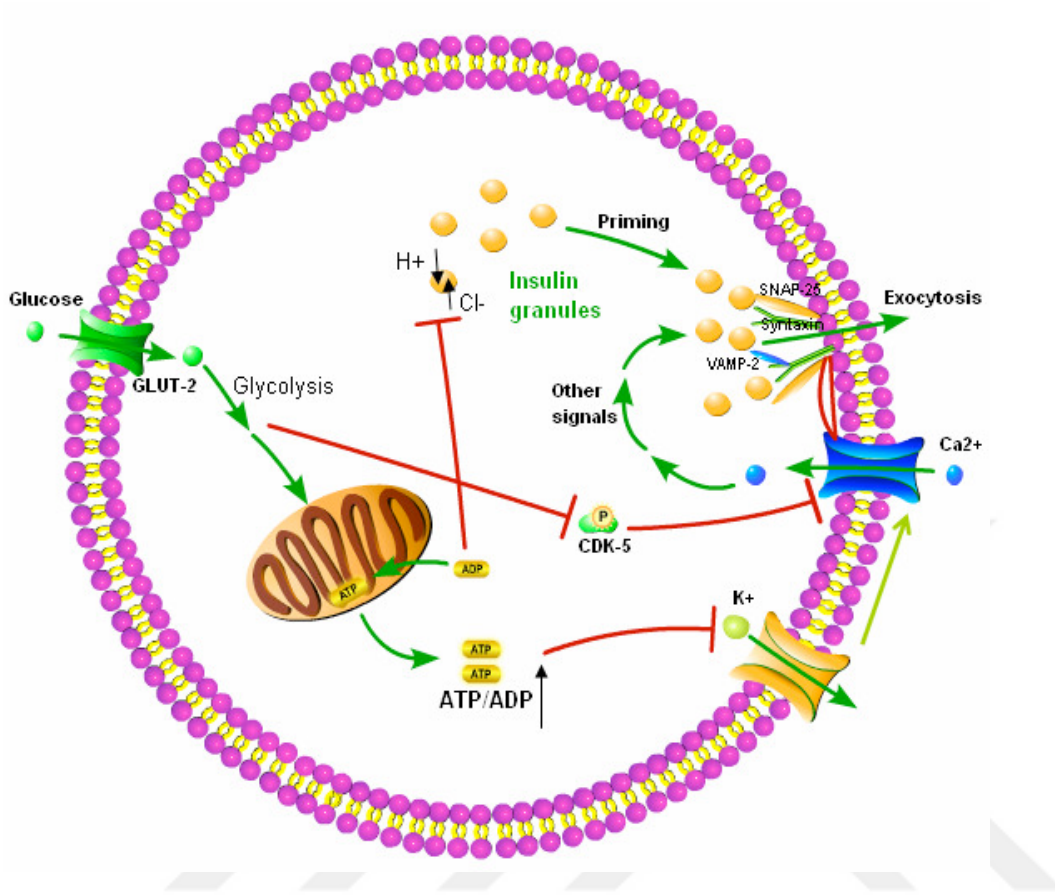
1.5 İnsülin Biyosentezi ve Sekresyonu

İnsülin pankreasın Langerhans adacıklarındaki β hücrelerince sentezlenen, depolanan ve salgılanan, 51 aminoasitten oluşan peptid yapıda glukoregülatör bir hormondur. İnsülin endoplazmik retikulum ribozomlarında preproinsulin olarak sentezlenir. Preproinsülin proinsülin oluştuktan sonra golgi aygıtında salgı granülleri içinde paketlenir (Şekil 4). Proinsülin eşit molar miktarlarda insülin ve C-peptid içerir. İnsülin salgılanması işlemi salgı granüllerinin hücre zarı ile füzyonu ve insülin, C-peptid ve proinsülin ekzositozunu içerir (Şekil 5).

İnsülin salgılanmasının başlıca düzenleyicisi glukozdur. Glikoz taşıyıcıları (GLUT2) aracılığıyla beta hücreleri tarafından alınır. Bu taşıyıcıların yüksek glukoz konsantrasyonlarına kronik maruziyet ile ekspresyonları artar (34). Bazal (uyarılmamış) insülin salgılanması 9-14 dakika aralıklarla pulsatildir (35). Pulsatil insülin sekresyonunun kaybı tip 1 diyabet için aday hastalarda beta-hücre disfonksiyonunun en erken belirtilerinden biridir (36).



Şekil 4. İnsülinin biyosentezi



Şekil 5. İnsülin Sekresyonu

İnsülin hepatik glukojenolizi, hepatik ve renal glukoneojenezi baskılar, kas ve yağ dokusunun glukoz alımını uyarır.

2. Diyabetes Mellitus

2.1 Tarihçesi

DM hakkındaki bilgiler M.Ö. 1500 yıllarına kadar uzanmaktadır. Bu dönemdeki Mısır papirüslerinde aşırı idrar yapmakla ilgili hastalıktan bahsedilmektedir. Hastalığa ilk kez diyabet (“diabetes=sifon, süzme, süzülme) adını M.S 130-200 yıllarında yaşayan Kapadokya’lı hekim Aretheaus vermiştir. Willis 1670 yılında, diyabetiklerin idrarın tatlı bir tadı olması nedeniyle hastalığa “Diyabetes mellitus (mellitus=bal) adını vermiştir (37).

1869 yılında Langerhans, pankreastaki adacıkları tanımlamış, 1893 yılında Paul Laguesse, Langerhans tarafından tanımlanan adacıkların endokrin fonksiyonu olabileceğini düşünmüş

ve bu adacıkları Langerhans adacıkları olarak adlandırmıştır. Bantig ve Best 1921 yılında pankreas ekstresinin köpeklerdeki yüksek glukoz düzeyini düşürdüğünü göstermiş, 1922 yılında ilk kez bir çocuğa pankreas ekstresinin enjekte edilmesinin yüksek kan glukoz düzeyini düşürdüğü, glukozüri ve ketonemiye engellediği gösterilmiştir (38). İnsülinin moleküler yapısı 1950’li yıllarda aydınlatılmış (39-44), 1980 yılında Bell tarafından insülin geni tespit edilmiştir (45).

2.2 Tanım

DM, çeşitli etiyolojik nedenlerle insülinin yetersiz salınması ve/veya yetersiz etkisi sonucu ortaya çıkan, kronik hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozukluğudur.

DM, etiyopatogenez açısından oldukça heterojendir, tek bir hastalık tablosu olmayıp etiyoloji, patogenez ve genetik yönden farklılıklar gösteren hastalıklar grubudur.

TABLO 1: Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflaması (46)

I. Tip 1 diyabetes mellitus

- A. İmmün aracıklı (Tip 1A)
- B. İdiyopatik (Tip 1B)

II. Tip 2 diyabetes mellitus

III. Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)

IV. Diğer spesifik diyabet tipleri

A. β -hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları)

- 20. Kromozom , HNF-4a (MODY1)
- 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2)
- 12. Kromozom, HNF-1a (MODY3)
- 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4)
- 17. Kromozom, HNF-1b (MODY5)
- 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6)
- 2. Kromozom, KLF11 (MODY7)
- 9. Kromozom, CEL (MODY8)
- 7. Kromozom, PAX4 (MODY9)
- 11. Kromozom, INS (MODY10)
- Mitokondriyal DNA
- 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu)
- Diğerleri

B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler

- Leprechaunism
- Lipoatrofik diyabet
- Rabson-Mendenhall sendromu
- Tip A insülin direnci
- Diğerleri

C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları

- Fibrokalkülöz pankreatopati
- Hemokromatoz
- Kistik fibroz
- Neoplazi
- Pankreatit
- Travma/pankreatektomi
- Diğerleri

D. Endokrinopatiler

- Akromegali

- Aldosteronoma
- Cushing sendr.
- Feokromositoma
- Glukagonoma
- Hipertiroidi
- Somatostatinoma
- Diğerleri

E. İlaç veya kimyasal ajanlar

- Atipik anti-psikotikler
- Anti-viral ilaçlar (HIV tedavisi)
- β -adrenerjik agonistler
- Diazoksit
- Fenitoin
- Glukokortikoidler
- α -İnterferon
- Nikotinik asit
- Pentamidin
- Proteaz inhibitörleri
- Tiyazid grubu diüretikler
- Tiroid hormonu
- Vacor
- Diğerleri (post transplant diyabet)

F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları

- Anti-insülin reseptör antikorları
- Stiff-man sendromu
- Diğerleri

G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar (Monogenik diyabet formları)

- Alström sendr.
 - Down sendr.
 - Friedreich tipi ataksi
 - Huntington korea
 - Klinefelter sendr.
 - Laurence-Moon-Biedl sendr.
 - Miyotonik distrofi
 - Porfiria
 - Prader-Willi sendr.
 - Turner sendr.
 - Wolfram (DIDMOAD) sendromu
 - Diğerleri
-

2.3 Diyabetes Mellitus Tanısı

Açlık plazma glukozu (APG) 100-125 mg/dl arasında ise bozulmuş açlık glukozu, oral glukoz tolerans testi sonrası 2. saat plazma glukozu 140-200 mg/dl arasında ise glukoz intoleransı olarak tanımlanır. Poliuri, polidipsi, ketonüri ve ağırlık kaybı ile birlikte, APG 126 mg/dl'nin üzerinde veya oral glukoz tolerans testinin 2. saat veya rastgele alınan kanda plazma glukoz değeri 200 mg/dl'nin üzerinde ise DM tanısı konur (47) (Tablo 2).

2010 yılına kadar DM tanısı, plazma glukoz kriterini (APG yada 75 gr. oral glukoz tolerans testi sonrası 2. saat plazma glukozu) baz alarak yapılmakta idi. 2009 yılında, Amerikan Diyabet Birliği (ADA), Avrupa Diyabet Araştırma Birliği (EASD), Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) dahil olduğu Uluslararası Uzman Komitesi, diyabet tanısı için HbA1c eşik

değerini $\geq 6,5$ olarak kullanılmasını tavsiye etmiş ve ADA 2010 klavuzunda bu eşik değer tanı kriteri olarak kabul edilmiştir (48). Tanı testi, Ulusal Glikohemoglobin Standartizasyon Programı (NGSP) tarafından onaylanmış ve Diabet Kontrol ve Komplikasyon Çalışması (DCCT) referans ölçümleri ile standardize edilmiş metotlar kullanılarak yapılmalıdır.

Tablo 2. Diyabetes Mellitus Tanı Kriterleri

Tanımlama	Plazma glukoz değeri (mg/dl)
Rastgele değer (DM semptomları ile birlikte)	
Diyabet	≥ 200
Açlık plazma glukozu	
Normal	< 100
Bozulmuş açlık glukozu	110-125
Diyabet	≥ 126
Oral glukoz tolerans testi (2.Saat)	
Normal	< 140
Bozulmuş glukoz toleransı	140-199
Diyabet	≥ 200

2.4 Tip 1 Diyabetes Mellitus

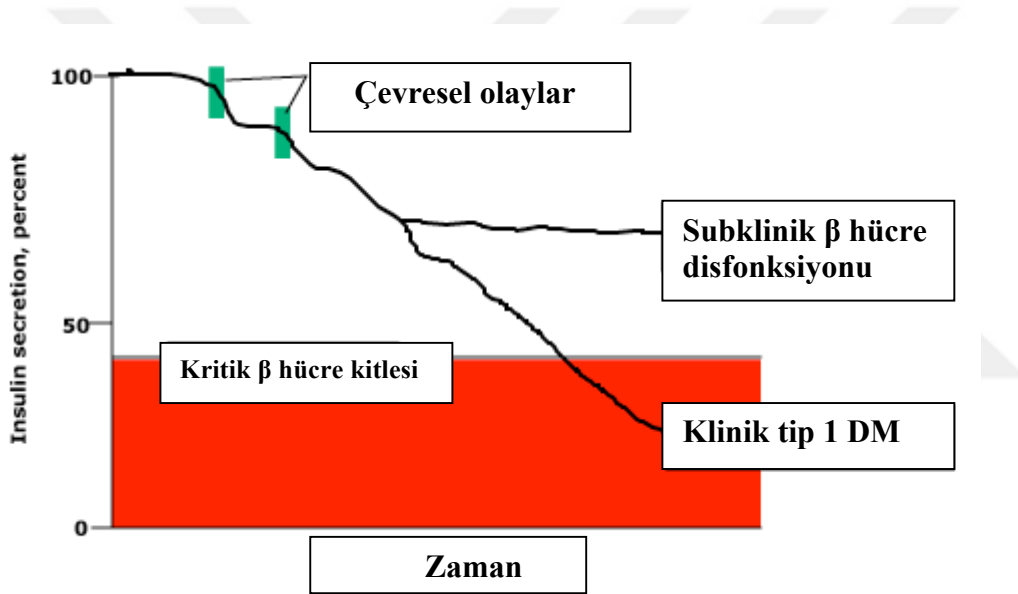
Tip 1 DM ciddi insülin eksikliği ile karakterize olup, yaşamı sürdürmek ve ketozisten korunmak için dışarıdan insülin desteğine ihtiyaç duyar. Bu nedenle diyabetin bu formu için insüline bağımlı diyabet tabiri kullanılmıştır. Hastalık genellikle çocukluk yaş grubunda başladığından “Juvenil diyabet” olarak da tarif edilmiştir. Fakat tip 1 diyabet herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir. Hastalar otoimmün kaynaklı tip 1 DM ve idiopatik tip 1 DM olmak üzere iki ayrı grupta incelenir (47,48).

2.4.1 Epidemiyoloji

Tip 1 diyabetes mellitus, çocukluk çağının en sık görülen kronik hastalıklardan biridir. Nedeni insülin üreten pankreatik beta hücrelerinin hasarı sonucu gelişen insülin eksikliğidir. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 'na göre 2011'de tüm dünyada tip 1 ve tip 2 diyabetik hasta sayısı 336 milyon olup bu rakamın 2030 yılında 552 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (49). Tip 1 diabetes mellitus, A.B.D'de 1 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Bu tüm diyabet vakalarının %10'unu oluşturmaktadır (50). Genç popülasyonda astımdan sonra en sık görülen ikinci kronik hastalık olup her yıl en az 13 bin infant, çocuk ve genç erişkine tip 1 diabetes mellitus tanısı konmaktadır (51). Türkiye'de ise, Türkiye İstatistik kurumu Adrese Dayalı Nüfus Kayıt Sistemi (TÜİK ADNKS) 2009 verilerine göre diyabetik hasta sayısı 6.503.027 kişidir (52).

2.4.2 Patogenezi

Tip 1A Diabetes Mellitus, Langerhans adacıklarındaki insülin üreten β hücrelerinin kronik otoimmün hasarı sonucu gelişir (53). İnsülinin mutlak eksikliği, özellikle bozulmuş glukoz homeostazisi ve metabolik disfonksiyon ile sonuçlanır (54). Bu süreç, genetik olarak yatkın kişilerde genellikle asemptomatik ve öglisemik oldukları sırada ilerler ve muhtemelen bir yada daha fazla çevresel ajan tarafından tetiklenir. Hiperglisemi gelişmeden önceki bu uzun latent dönem beta hücre fonksiyonlarında büyük oranda kayıp olur (55). Beta hücrelerinin yaklaşık %80'ni tahrip olmadan diyabet ortaya çıkmaz. Bu noktada rezidüel fonksiyonel β hücresi halen mevcuttur, ancak glukoz toleransını sağlayacak miktarda değildir (Şekil 6). Tip 1B diabetes mellitus ise otoimmün olmayan adacık hasarını ifade eder.

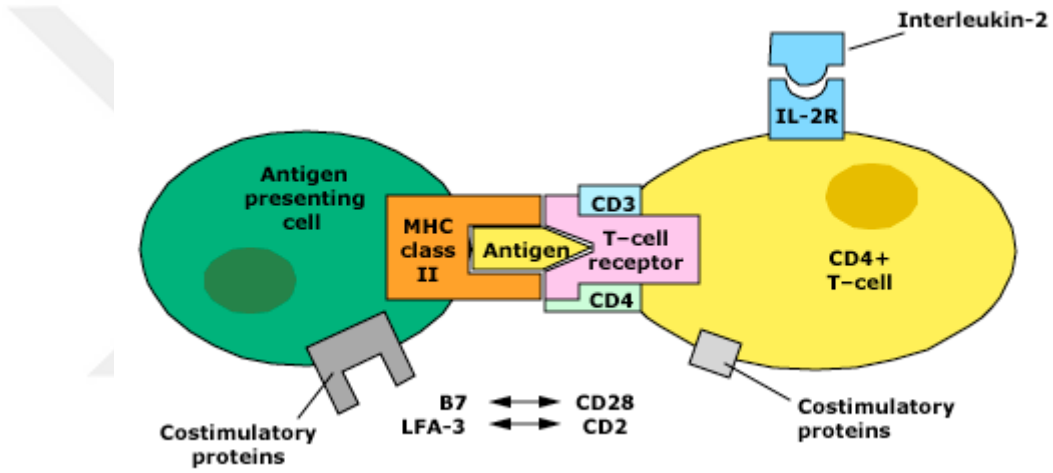


Şekil 6. Tip 1 diabetes mellitus gelişimi

Genetik Yatkınlık: HLA-DQalpha, HLA-DQbeta, HLA-DR, preproinsulin, PTPN22 gen, CTLA-4, interferon-induced helicase, IL2 receptor (CD25), lectin-like gen (KIA0035), ERBB3e ve 12q'da tanımlanmamış gen dahil çok sayıda gendeki polimorfizmin tip 1A DM riskini etkilediği raporlanmıştır (56-62). Genom ilişkili çalışmalardan elde edilen verilerin meta analizinde, artmış tip 1 DM riski ile ilişkili dört riskli lokus (BACH2, PRKCQ, CTSH, C1QTNF6) belirlenmiştir (63).

MHC genleri: Tip 1 DM için majör yatkınlık genleri kromozom 6p üzerindeki HLA bölgesindedir. HLA bölgesindeki polimorfizm genetik olarak tip 1A DM gelişme

riskinin %40-50'sinden sorumludur (64). Bu bölgedeki genler makrofaj gibi antijen sunan hücrelerin hücre yüzeyinde bulunan MHC sınıf II moleküllerini kodlar. Sınıf II MHC moleküllerinin antijen sunma yeteneği, antijen bağlama bölgelerindeki aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Aminoasit substitüsyonu sınıf II MHC molekülleri için farklı antijenlerin bağlanma afinitesini değiştirerek immün yanıtın spesifitesini etkileyebilir ve bu MHC moleküllerine bağlanan antijenler T hücre reseptörüne bağlanarak pankreatik β hücre hasarını başlatır (Şekil 7). Tip 1A DM olan bireylerin çoğunda HLA DR3 ve/veya DR4 haplotipi vardır. Tip 1A DM ile en kuvvetli ilişkiye DQA1*0301, DQB 1*0302, DQA1*501, DQB1*201 haplotiplerinin sahip olduğu gösterilmiştir (65).



Şekil 7. MHC gen aracılı beta hücre hasarı

Non-MHC genleri: MHC yatkınlık genlerinin çoğu poligenik kalıtım gösteren tip 1 diyabet oluşturmak için yeterli değildir (64). Tip 1 DM'e yatkınlıkta önemli bir komponenti olmayan, yalnızca uygun MHC alellerinin varlığında bir etkisi olan bazı MHC genleri bulunur. Özellikle lenfosit-spesifik tirozin fosfatazdaki (termed lyp, PTPN22) aminoasit değişikliği ve insülin geninin promotor bölgesindeki polimorfizm tip 1 riski ile ilişkili bulunmuştur (66-69). Sitotoksik T-lenfosit ilişkili antijen-4 genindeki bir polimorfizmin 5000 üzerinde hasta içeren 33 çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde tip 1 diyabet riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (70). NOD farelerde (non-obese diabetic mice) insanlardaki tip 1 DM benzer diyabet spontan gelişir ve Langerhans adacıklarındaki otoimmün infiltrasyon (insülitis) fareler 50 günlükken başlar. Pozitif T hücreler (Th1) NOD farelerde insülitisin önemli bir mediatörü olarak

görülmektedir ve anti-interferon gama antikorları ile adacıklardaki destrüksiyon yavaşlatılabilir (71). Interferon gamma-inducing factor (IGIF ya da interlökin-18) ve interlökin-12 interferon gammanın güçlü indükleyicileridir. İnsulitisin progresyonu bu iki sitokinin artmış salınımı ile paralel başlar (72).

Otoimmün faktörler: Diğer adacık hücre tipleri (α , δ , ϵ , ve PP hücreleri) fonksiyonel ve embriyolojik olarak beta hücreleri ile benzer olmalarına ve birçok benzer proteini eksprese etmelerine rağmen otoimmün süreçten korunur. Patolojik olarak adacıklar lenfositler ile infiltredir (insülitis). Bütün beta hücreleri tahrip olduktan sonra inflamatuvar süreç durur, adacıklarda atrofi gelişir ve immünolojik göstergeler kaybolur. İnsanlarda ve tip 1A diyabetik hayvan modelleri (NOD fare ve BB rat) ile yapılan çalışmalarda hücreSEL ve humoral immün sistemde bazı anormallikler saptanmıştır. Bunlar;

- (1) Adacık hücre antikorları
- (2) Adacıklarda, peripankreatik lenf nodlarında ve sistemik dolaşımında aktive lenfositler
- (3) Adacık proteinleri ile stimüle olduğunda proliferen olan T lenfositler
- (4) Sitokin salınımı

Beta hücreleri tümör nekrozis faktör α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ) ve interlökin 1 (IL-1) gibi bazı sitokinlerin toksik etkisine duyarlıdır. Beta hücre ölümünün tam mekanizması bilinmemektedir, ancak nitrik oksit metabolitleri, apoptoz ve doğrudan CD8+ T hücre sitotoksitesisi sorumlu faktörler olarak düşünülmektedir. Otoantikorlar hayvanlara verildiğinde diyabet oluşturmadığından adacık otoantikorlarının yıkım süreci ile ilişkili olmadığı düşünülmektedir (73).

Yapılan çalışmalarda pankreas beta hücrelerinde, otoimmün adacık hasarının başlaması ve ilerlemesinde önemli rol oynayan çeşitli otoantijenler belirlenmiştir (74,75). Bunlar insülin, glutamik asit dekarboksilaz (GAD), insülinoma-associated protein-2 (IA-2), zinc transporter (ZnT8)'dır. NOD fare modeli üzerinde yapılan çalışmalar proinsülin/insülinin otoantikorlar için primer hedef olduğunu göstermektedir (76-78). Yani insülin haricindeki diğer otoantijenler beta hücrelerine spesifik değildir. Teorilere göre beta hücre hasarındaki otoimmün süreç, doğrudan beta hücrelerinde başlamakta ve

hasar ilerledikçe diğer adacık moleküllerine yayılmakta ve bu da bir dizi sekonder otoantijeni ortaya çıkarmaktadır (73).

Çevresel faktörler: Çevresel etkiler tip 1 diyabet gelişiminde önemli bir faktördür. Virüsler doğrudan bulaş ile beta hücrelerini yok ederek ya da bu hücrelere karşı otoimmün bir saldırı tetikleyerek hayvan modellerinde diyabete neden olabilir (79). Tip 1 diyabetik 75 hastada yapılan otopsi çalışmasında hastaların pankreas dokusunda Cocksackie, Epstein-Barr virüsü, kabakulak veya sitomegalovirüsün neden olduğu akut veya inatçı enfeksiyona dair hiçbir kanıt bulunamamıştır. Bununla birlikte diyabetin bazı alışılmadık biçimleri Cocksackie virüsü varlığı ile ilişkili bulunmuştur (80). Çocukluk çağı aşılarının tip 1 diyabet gelişimi ile ilişkili olabileceği endişesi olmuştur. Ancak, aşılama ile tip 1 diyabet gelişme riski arasında bir ilişkili bulunamamıştır. İnek sütü, Omega-3 yağ asitleri ve içme sularındaki nitrat konsantrasyonu da tip 1 diyabet gelişiminde etkisi olduğu düşünülen diyet ile ilişkili faktörlerdir

2.5 Tedavi

2.5.1 İnsülin Tedavisi

İnsülinin normalde vücutta enerji dengesinin sağlanmasında ve devamında önemli görevleri vardır. İnsülin reseptörlerini aktive ederek intravasküler mesafedeki glukozun intraselüler hücrelere girişini sağlamaktadır. Hücre içine giren glukoz enerji kaynağı olarak kullanıldığı gibi özellikle karaciğer, kas dokusu ve böbrekte glikojen olarak depo edilmekte veya lipogenezi aktive ederek lipid sentezini artırmaktadır. İnsülin aynı zamanda karaciğerden glukozun salınımını inhibe ederek hepatik glikojen birikimine katkı sağlamaktadır. İnsülinin protein metabolizması üzerine de direkt ve indirekt etkileri mevcuttur. Hücrelerin büyümesinde ve proliferasyonunda da önemli görevleri vardır (81).

1920’li yıllarda keşfedilen insülin tip 1 diyabet tedavisinde çığır açmıştır. Özellikle son 20 yıl içindeki gelişmelerle sığır ve domuz insülinlerinin yerini rekombinan DNA teknolojisiyle üretilen insan insülini almıştır. Günümüz teknolojisi ile insülin analoglarındaki yapısal değişiklikler sayesinde etki süreleri değiştirilip insan fizyolojisi taklit edilmeye çalışılmaktadır. Genel kullanım şekli olan subkutan yol dışında oral, inhaler ve ultrasonik transdermal insülin tedavileri konusunda çalışmalar devam etmektedir (82). Tip 1 diyabetik hastalarda tercih edilen yoğun insülin tedavisi hepatik glikoz çıkışını baskılayacak bazal

insülin ile postprandiyal hiperglisemiye karşılayacak öğün öncesi bolus insülinlerin verilmesi şeklinde uygulanmaktadır (30).

Tablo 3. En Sık Kullanılan İnsülin Çeşitleri ve Özellikleri (81)

İnsülin tipi süresi	Etki başlama süresi	Zirve etki zamanı	Toplam etki
Kristalize insülin	30 dakika	2,5-5 saat	5-8 saat
NPH insülin	1-2 saat	4-14 saat	10 ila >24 saat
Hızlı etkili analoglar			
Lispro	<30 dakika	0,5-1,5 saat	< 6 saat
Aspart	<15 dakika	40-50 dakika	3-5 saat
Glulisin	<15 dakika	55 dakika	< 6 saat
Uzun etkili analoglar			
Glarjin	1-2 saat	Gerçek bir zirve etkisi yoktur	24 saat
Detemir	1-2 saat	Gerçek bir zirve etkisi yoktur	24 saat

3. Alternatif Tedavi Yöntemleri

Tip 1 DM 1922 yılında Banting tarafından insülinin keşfinden önce ölümcül bir hastalıktı. Bununla beraber, insülinin parenteral bir tedavi olması, sıkı kan şekeri kontrolü için yakından monitorize edilmesi ve iyi bir diyet yönetimi gerekliliği esastır. DCCT (The Diabetes Control and Complication Trials) çalışması ile yoğun insülin tedavisinin tip 1 diyabetin uzun dönem komplikasyonlarını engellediği hatta sıkı glikemik kontrol ile albüminüri ve retinopati progresyonunda azalma olduğu gösterildi (2). Ancak, mevcut çoğu insülin formülasyonu ile endokrin pankreasın insülin üreten beta hücrelerinin doğal düzenleyici yetenekleri taklit edilemez (83). Tedaviye rağmen tip 1 diyabetik hastaların çoğunda normal kan şekeri düzeylerine ulaşılamamakta ve yüksek kan şekeri seviyeleri, körlük, son dönem böbrek yetmezliği ve amputasyonlara neden olan organ hasarı ile sonuçlanabilmektedir. Özellikle insülin tedavisine sekonder gelişen hipoglisemik ataklar bu hastalardaki yaşam kalitesini düşürmektedir (84,85). Birçok tip 1 diyabetik hastada sıkı glikemik kontrol, hipoglisemi duyarsızlığı, düşük kan şekerini anlamada yetersizlik nedeniyle ölümcül olabilir ve bu hastalarda hipoglisemi sonucu mortalite %10'dur (86,87). Bu nedenle günümüzde alternatif veya ek tedavilere ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla, tüm pankreas transplantasyonu veya allojenik adacık hücre nakli ile elde edilen beta hücre replasmanı ile fizyolojik glukoz homeostazisi sağlanmaya çalışılmaktadır.

3.1 Pankreas Transplantasyonu

Pankreas transplantasyonu ilk defa 1893 yılında Dr. Watson –Williams ve Mr. Hansant tarafından koyun pankreasının ketoasidozlu genç bir erkeğin subkutan dokusuna transplante edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (88). Ancak hasta çocuk 3 gün sonra ölmüştür. İlk başarılı pankreas transplantasyonu 1966 yılında son dönem diyabetik nefropatisi olan 2 hastaya böbrek nakli ile eş zamanlı yapılmıştır (89). Hastalardan birinde transplantasyon sonrası yaklaşık 2 ay boyunca normale yakın glisemi elde edilmiştir (90). Başarılı bir böbrek nakli geçirmiş tip 1 diyabetik hastalar böbrek nakli sonrası pankreas nakli için adaydırlar. Ayrıca, normal böbrek fonksiyonuna sahip, ciddi hipoglisemi duyarsızlığı ve glisemik labilitesi olan tip 1 diyabetik hastalar yalnızca pankreas nakli ile tedavi edilmiştir (54). Hem eş zamanlı pankreas ve böbrek nakli hem de yalnız pankreas nakli, yaşam kalitesini artırır, hiperglisemi ile ilişkili komplikasyonları azaltır ve diyabetik nöropatiyi geri çevirir veya azaltır (90). Ancak bu faydalarla birlikte kronik immunsupresyon, cerrahi komplikasyonlar ve greft rejeksiyonu riski de beraberinde gelir (91). İnsülin bağımsızlık eşzamanlı pankreas ve böbrek alıcılarının % 85'inde ve soliter pankreas nakli alıcılarında ise yaklaşık % 80'inde korunurken, nakilden bir yıl sonra alıcıların hayatta kalma oranı, alıcı kategorileri arasında % 95'i aşmaktadır. Pankreas transplantasyonu tip 1 diyabetik hastalarda insülin bağımsızlığını sağlar, ancak büyük bir ameliyat ve yaşam boyu immünosupresyon gerektirir (92).

3.2 Adacık Transplantasyonu

Adacık naklinin avantajı, pankreas naklinde olduğu gibi majör bir cerrahi gerekmemesidir. Ancak izole adacıklar da pankreas naklindeki gibi immunsupresyona rağmen immunolojik rejeksiyona duyarlıdır. Adacık Nakli İşbirliği Kayıt (Collaborative Islet Transplant Registry: CITR) raporuna göre, adacık transplantasyonunun periprosedürel komplikasyonlarının pankreas naklinden yaklaşık 20 kat daha az morbidite riski vardır (54). Adacık naklinin diğer bir avantajı, tüm pankreas transplantasyonu için kullanılamaz donör pankreaslarından gelen sağlıklı adacıklar izole edilebilir (93)

1972 yılında izole adacık naklinin, kemirgenlerde diyabeti başarılı bir şekilde geri çevirdiği gösterilmiştir (94,95). 20 yıl sonra 1990 yılında Scharp ve arkadaşları bir vakada yaklaşık 1 ay süreyle klinik olarak insülin bağımsızlığı sağlamışlardır (88). Bu başarı 1989 yılında Dr. Camillo Ricordi tarafından Ricordi çemberinin geliştirilmesi ile mümkün olmuştur. O zamandan beri izole adacıkların inokülasyon için bir yer olarak portal ven ve karaciğer seçimi

(96), insan pankreas adacık izolasyonu için otomatik bir yöntem kullanılması (97) ve adacık izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılan kollajenaz enzim karışımındaki iyileştirmeler elde edilmiş bir takım aşamalardır. 2000 yılında Edmonton grubu tarafından yapılan adacık nakli çalışmaları dönüm noktası oldu ve 7 tip diyabetik hastanın diyabetinin başarılı bir şekilde düzeldiği gösterildi (98). 1 yıllık izlemin sonunda, yedi hastanın tümü insülin bağımsızdı, serum glukoz düzeyleri daha az dalgalanma göstermiş ve hiçbiri ciddi hipoglisemi atağı yaşamamıştı. Ancak uzun dönem izlemde ilerleyici beta hücre kaybı ve tekrar diyabet ortaya çıktı. 2004 yılında Edmonton grubu tarafından yürütülen 65 hastadan oluşan bir çalışmada, kısmi greft fonksiyonu hastaların yüzde 80'inde kalıcı olmasına rağmen, 5 yılda hastaların sadece yüzde 10'u insülin bağımsız kalmıştır (99).

2001 yılında kurulan Ortak Adacık Nakli Rejistrisi, Tüm Amerika ve Kanada'da ve Avrupa ile Avustralya'da bulunan bazı transplant merkezlerindeki verileri toplayarak analiz etmiştir. 2009 raporu 412 allograft alıcının verilerini içermekte idi. Adacık alıcılarının çoğunda, bazıları dört adacık infüzyonu üzerinde olmakla beraber ek adacık infüzyonuna ihtiyaç duyulmuştur. Total infüzyon sayısı göz önüne alınmaksızın, 3 yıllık takipte, alıcıların yaklaşık %27'si insülin bağımsız, %30'u ölçülebilir c-peptid değerleri ile insülin bağımlı, %27'sinde ise ölçülebilir c-peptid tespit edilememiştir (Ortak Adacık Nakli Rejistrine verileri girilen hastalardan elde edilen sonuçlara göre). 2005 yılından sonra adacık nakli yapılan alıcıların, 1994-2004 yılları arasında nakil yapılanlara göre insülin bağımsızlığın çok daha uzun olduğu görülmüş, bu sonuç da gelişmiş adacık izolasyon yöntemlerine ve transplantasyon sonrası artmış adacık canlılığı oranlarına bağlanmıştır. Tüm adacık transplantasyon alıcılarında insülin bağımsızlık oranı transplantasyon sonrası 6. Ayda %55'den 4. Yılda %16'ya düşmektedir. Tersine, adacık fonksiyon kaybı oranı ise 6. Ayda %12'den 4. Yılda %42'ye çıkmaktadır. Genel olarak 5 yıllık insülin bağımsızlık oranı ise yaklaşık olarak %10'dur (100,101).

3.2.1 Adacık Kaybı

Adacık kaybını nakil öncesi ve sonrası dönemde etkileyen çok sayıda faktör vardır (tablo 4). Greft fonksiyon kaybı immunsupresif ilaçların toksisitesi, immün rejeksiyon ve adacık prekürsörlerinin yetersizliği gibi çeşitli faktörlere bağlı olabilir.

Tablo 4. Adacık Kaybına Etki Eden Faktörler

Adacık verim ve kalitesini etkileyen faktörler
Verici özellikleri
Organ alımı
Koruma ve ulaşım
İzolasyon teknikleri
Kültür koşulları

Transplantasyon sırası ve sonrasında, transplante hücre kitlesi kaybına etki eden faktörler
Hızlı kan aracılı inflamatuvar reaksiyon
Otoimmünite nüksü
İmmüsupresif ilaçların toksisitesi
Allorejeksiyon
Glukotoksosite
Hepatik yağlanma

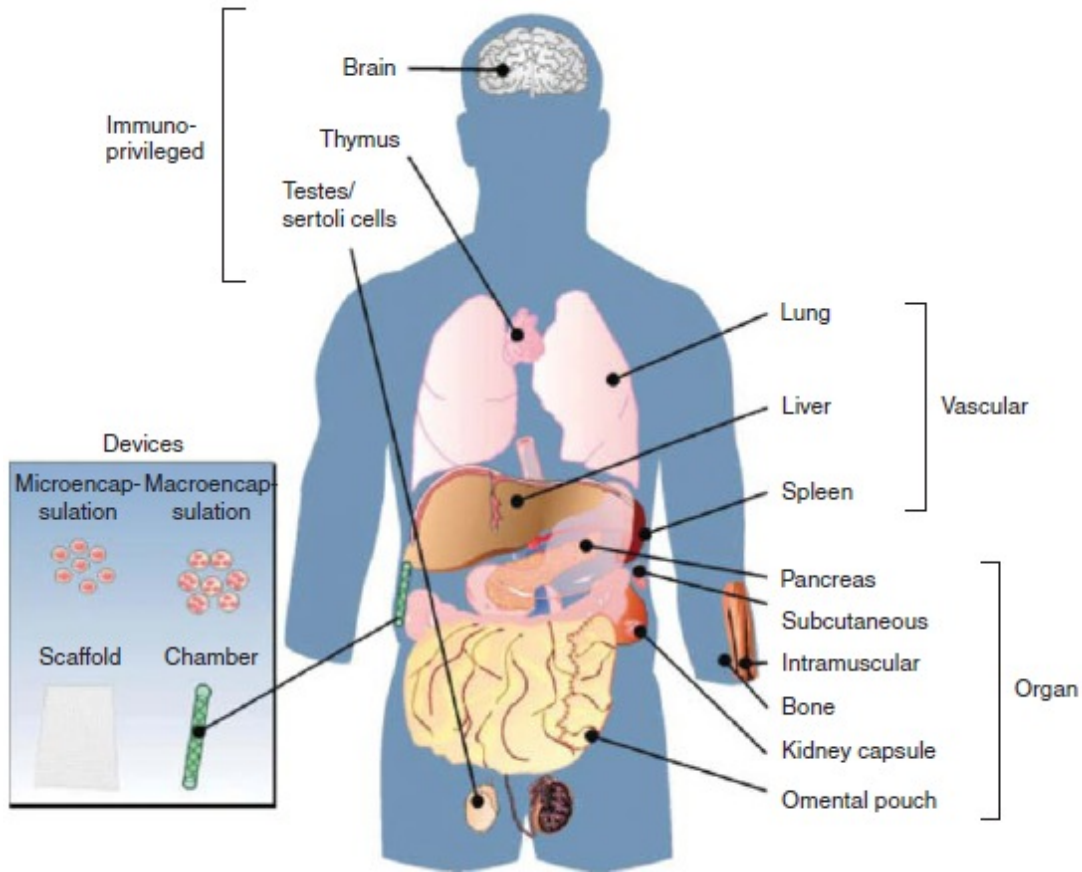
▪ **Transplantasyon öncesi ve transplantasyon sırasında etkili faktörler**

Donör özellikleri, donör pankreasın elde edilmesi, taşıma sırasında pankreasın korunması, kullanılan adacık izolasyon prosedürü ve kültür koşulları adacıkların sayı ve kalitesinde önemli etkiye sahip faktörlerdir (99). Adacık kitlesinin %60'dan fazlası nakilden sonraki ilk birkaç günde kaybolur. Birden fazla adacık nakli yerine büyük bir adacık kitlesinin kullanımı kalan beta hücre kitlesinin daha büyük olmasına ve dolayısıyla daha büyük olasılıkla insülin bağımsızlığına yol açar (88). Ayrıca, adacık, karaciğer portal sisteminin kan bileşenleri ile doğrudan temas ettiğinde pıhtılaşma ve kompleman sisteminin hızlı aktivasyonu ile karakterize anlık kan aracılı iltihabi reaksiyon tetiklenmektedir (102). Bu nedenle adacık transplantasyon sonuçlarını geliştirmek için en iyi yolun, adacık transplantasyonu sırasında ve hemen sonrasında gelişen inflamatuvar reaksiyonun önlenmesi ile mümkün olabileceğini düşünülmektedir.

▪ **Transplantasyon sonrasında etkili faktörler**

Portal ven içerisine infüze edildikten sonra adacıklar, karaciğere ulaşmaktadır. Burada yeni çevrelerine uyum sağlamaları gerekir ve olumsuz koşullarla karşı karşıya gelirler. Adacıklar, infüzyon sonrasında hemen, ilaçlara ve glukoz gibi portal sistemde periferik dolaşımdan daha yüksek konsantrasyonda bulunan besinlere maruz kalırlar ve bu da adacık fonksiyonunu olumsuz etkileyebilir. En potansiyel sorunlardan biri immüsupresif ilaçların verilmesini

gerektiren akut rejeksiyondur. Ne yazık ki, kalsinörin inhibitörü ve steroid gibi bazı immünsupresif ilaçlar, β hücre fonksiyonunu olumsuz etkileyebilir (103). Glukoz metabolizması üzerinde daha az etkiye sahip immünsupresif ilaçlar kullanmak ve glukotoksisiteden kaçınmak için sıkı glisemik kontrol yapmak gibi önlemler, adacıkların iyi bir başlangıç yapmasına yardımcı olabilir (104). Ek olarak, karaciğerdeki toksik ilaç seviyeleri ve ani kan aracılı inflamatuvar reaksiyondan kaçınacak, transplante dokunun vaskülaritesini iyileştirecek ve portal sitesinin sakıncaları, yani erken dönem adacık kaybı ve güvenilir greft izlenmesinde güçlük nedeniyle alternatif implantasyon yerleri araştırılmaktadır. Akciğer, dalak, böbrek kapsülü, omental poş, subkutan doku, kemik, pankreas, intramusküler, beyin, testis ve timus alternatif yerlerdir (99) (Şekil 8).



Şekil 6. Adacık implantasyonu için alternatif yerler (88)

Adacık revaskülarizasyonu birkaç hafta içinde ortaya çıkar, ama karaciğer içine transplante edilen adacıklarda, adacık içi damar ağı daha az gelişir (105). Bu nedenle, erken red olmasa bile adacık greftleri, transplantasyon sonrası bir aydan üç aya kadar maksimal etkinliğe ulaşamayabilirler. Üç aya kadar adacık etkinliği belirgin hale gelir, ancak hastaların ortalama

olarak sadece yarısı 15 ay insülin bağımsız olarak kalır (106). Kronik allogreft rejeksiyon, uzun dönem greft yetmezliğinin potansiyel bir nedenidir (105). Otoimmünite de tekrarlayabilir, çünkü otoantijenlere pozitif T hücre yanıtları ile adacık alıcılarının, tüm greft işlevini kaybetmesi daha olasıdır (107). Dahası, β hücreleri üzerinde immunosupresif ilaçların uzun dönem toksik etkileri de büyük bir öneme sahiptir.

Dolayısıyla adacıkların hayatta kalımında artış ya da transplante adacıkların revaskularizasyonunda artış adacık nakil sonuçlarında düzelme sağlayacaktır. Adacık greftlerinde inflamasyonun kontrolü mezenkimal kök hücreler (MKH) ile beraber adacık transplantasyonu ile elde edilebilir. Çünkü bu hücrelerin immunmodülatör ve rejeneratif özellikleri vardır. Ayrıca anti-inflamatuar proteinler salgılar ve T ve B lenfositlerin aktivitesini baskırlar.

4. Mezenkimal Kök Hücre

Kemik iliği ve diğer stromal dokulardan köken alan, çeşitli uyaranlarla osteoblastik, adipositik ve kondrositik seri hücrelerine dönüşebilen fibroblastoid hücrelere mezenkimal kök hücre (MKH) denir (108). Başlıca iki kaynaktan bulunur;

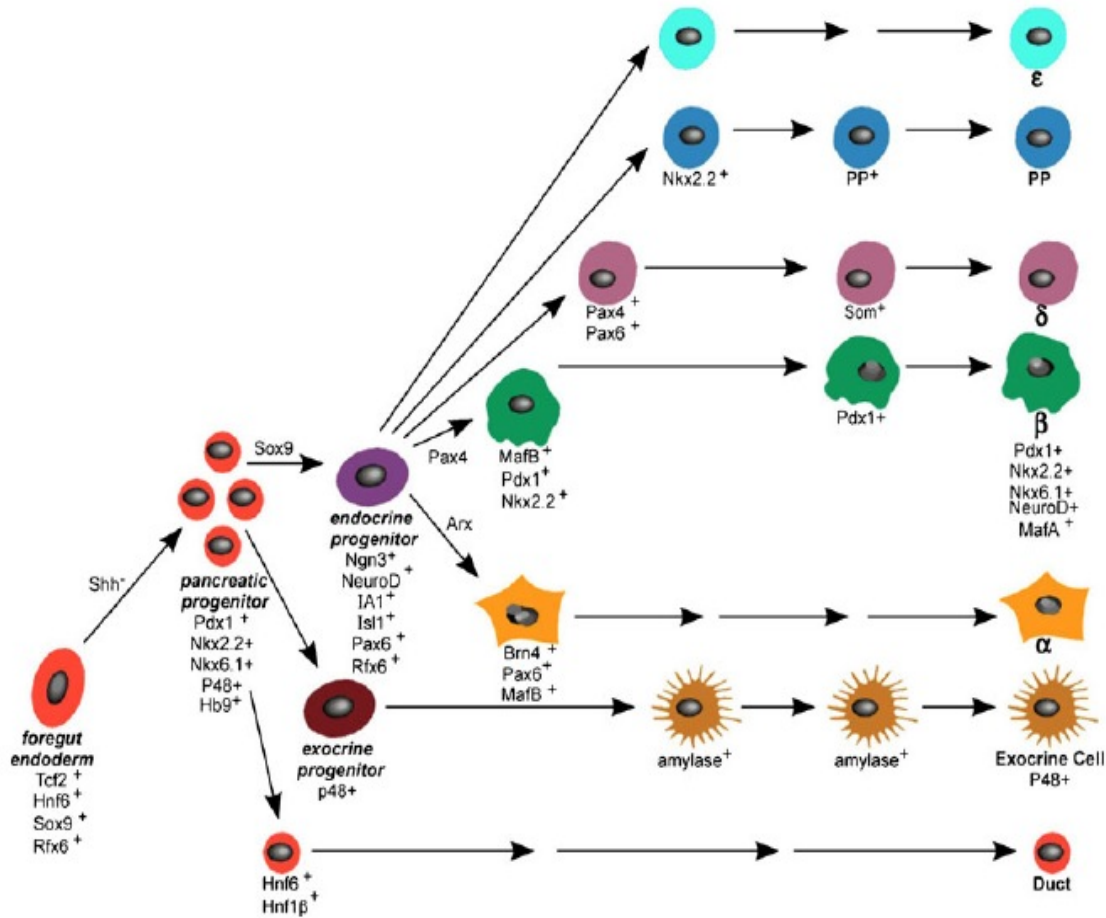
- 1- Kemik iliği stroması
- 2- Diğer tüm organ ve dokulardaki stroma

MKH'ler multipotent olup kıkırdak, kemik, kas, tendon, ligament, adipöz doku, nöron, pankreas beta hücreleri ve endotele farklılaşabilirler. Elde edilen MKH'lerin kökenleri ne olursa olsun biyolojik ve fonksiyonel özellikler çok benzerdir (109,110). MKH'lerde immünojeniteyi sağlayan HLA DR ve ko-stimülatör molekül ekspresyonu olmadığı için immünojenitesi düşüktür. MKH'ler birçok büyüme faktörünü (GM-CSF, G-CSF, M-CSF) ve reseptörlerini, çeşitli interlekinleri (IL-6, IL-7, IL-8 vb.) ve reseptörlerini, hücre dışı matriks proteinleri (kollojen, laminin) ve adezyon moleküllerini sentezleme yeteneğine sahiptir (109). Hemen nakil sonrasında inflamasyon adacık fonksiyonu kaybında önemli bir rol oynar. Bu inflamatuvar yanıt IFN- γ , TNF- α ve IL-1 β artışı ile karakterizedir. Bu pro-inflamatuar sitokinlere maruz kalan rodent ve insan adacık hücreleri glukozu cevap verme yeteneğini kaybeder ve apoptoz markerları artar. Sitokinler β hücre toksisitesi yanında makrofaj gibi immun hücreleri aktive ederek inflamatuvar yanıtı artırabilir. Sitokin ekspresyonunun azalması, makrofaj ve sitokin aktivitesinin inhibisyonu ile transplante edilen adacıkların fonksiyonunu

iyileştirir. Böylece, engraftman sırasında nakil yerinde inflamasyonun minimize edilmesi adacık greft fonksiyonunu uzatmak ve uzun vadeli insülin bağımsızlığını korumak için yardımcı olabilir (111).

4.1 Pankreas kökenli mezenkimal kök hücre

Pankreas kök hücreleri (PSC) veya pankreasın diğer hücre tiplerinin transdiferansiyasyonu β hücrelerine alternatif bir kaynak sağlayabilir (Şekil 9). Yapılan çalışmalar nakledilen adacıkların uzun dönem sağkalım gözlemlerine ek olarak invitro pluripotent pankreatik kök hücrelerde (PSC) üç ana pankreas bölümünün de (duktal epitel, adacıklar ve asiner doku mevcut) olabileceğini göstermiştir. Bu kanıt insan ve kemirgen pankreasları ile yapılan çalışmalardan gelmektedir. Bu hücreler in vitro bireysel hücrelerden multiple pankreatik lineage hücrelere farklılaşırlar ve in vivo transplantasyonu takiben pankreatik endokrin ve asiner hücrelerin ortaya çıkmasına neden olabilirler (112).



Şekil 9. Pankreatik Kök Hücre

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Etik kurul onayı alındıktan sonra deney için 3-3,5 aylık 100 adet Wistar albino cinsi rat kullanıldı.

1. Pankreasın çıkarılması ve Saflaştırılması

1.1 Kullanılan Kimyasal malzemeler

- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS or Hanks BSS) – LONZA- veya Biological
- RPMI Without L- glutamin LONZA- BE12-167F
- Fetal Bovine Serum (FBS) (heat inactivated) –PAA D17602E
- 1M HEPES Buffer—LONZA 17737F
- Penicillin/Streptomycin (pen/strep) –LONZA 17602L
- Ficoll solution – Biochrom L6113
- Kollegenaz tip V SIGMA-C9263
- Dithizone (DTZ) –SIGMA-D5130
- Dimethylsulfoxide (DMSO) – SIGMA- SID8418
- Utraglutamine LONZA BE17-605E/U1

1.2 Kullanılan Solüsyonlar

- **RPMI 1640 (+) solüsyonunun hazırlanması:**

500 mL lik RPMI 1640 without L-Glutamine solüsyonunun içerisinde 60 mL alınır. Geriye kalan 440 mL solüsyonun üzerine 50 mL FBS, 5 mL L-Glutamine, 5 mL Pen-Strep-Amp ilave edilerek +4 °C de saklanır. 1 hafta içerisinde tüketilir.

- **RPMI 1640 (-) solüsyonunun hazırlanması:**

500 mL lik RPMI 1640 without L-Glutamine solüsyonunun içerisinde 10 mL alınır. Geriye kalan 490 mL solüsyonun üzerine 5 mL L-Glutamine ve 5 mL Pen-Strep-Amp ilave edilerek +4 °C de saklanacaktır. 1 hafta içerisinde tüketilir.

- **HBSS (+) solüsyonunun hazırlanması:**

500 mL lik HBSS solüsyonunun içerisinde 60 mL alınır. Geriye kalan 440 mL solüsyonun üzerine 50 mL FBS, 5 mL L-Glutamine, 5 mL Pen-Strep-Amp ilave edilerek +4 °C de saklanır. 1 hafta içerisinde tüketilir.

- **Kollejenaz enzim solüsyonunun hazırlanması:**

100 mg kollejenaz, 50 mL ye HBSS (-) solüsyonu ile tamamlanır, 0,22 µm lik filtrelerden geçirilerek -20 °C de saklanır. 1 hafta içerisinde tüketilir.

1.3 Floresan Boyaların Hazırlanması

a) Stok Propidium Iodide solüsyonu (750 µM) :

5 mg PI, 10 mL PBS (pH 7,4) solüsyonu içerisinde çözülerek hazırlanır. +4 °C de alüminyum folyo sarılı kapta 3 ay süre ile saklanabilir.

b) Stok Fluorescein diacetate solüsyonu (24 µM):

1 mg FDA, 100 mL asetonda çözünür. -20 °C de alüminyum folyo sarılı kapta 3 ay süre ile saklanabilir.

1.4 Pankreasın Çıkarılması:

Ketamin (90 mg/kg) ve xylazine (10 mg/kg) karışımı her sıçana kilograma 0,1mg gelecek şekilde verilerek uyutuldu. Ratın abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip %70 alkol ile silindi ve Linea alba hizasından kesildi. Karaciğer kraniyele çekildi ve üzerine bir gazlı bez yerleştirildi. Ortak safra kanalının duodenuma birleştiği uca hemostat klemp yerleştirildi. Kanalin karaciğer ucuna bir kesik atıldı ve bu kesikten PE50 katateri ile ortak safra kanalına girildi. PE50 tüpünün diğer ucuna kollajenaz enzim solüsyonu çekilmiş enjektör yerleştirildi ve PE50 aracılığıyla 7cc soğuk enzim solüsyonu enjekte edilerek pankreasın tamamı şişirildi. Kalbe giden damarlara kesik atılarak kansızlaştırma işlemi uygulandı. Pensetler yardımıyla hızlı bir şekilde pankreas çevre doku organlardan ayrıldı ve 50 mL'lik falkon tüpüne alındı.

1.5 Adacıkların Saflaştırılması

Pankreaslar çıkartıldıktan hemen sonra, 37°C su banyosunda 18 dakika enzimatik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, tüp içindeki pankreasların üzerine HBSS (+) ile 35 ml'ye tamamlandı ve 20 saniye kuvvetlice çalkandı. 1300 rpm 3dakika 4°C santrifüj edildi ve süpernatanı atıldı. Süpernatanı üzeri 35 mL'ye HBSS (+) solüsyonu ile tamamlandı, 1300 rpm de yavaş frende 3 dakika santrifüj edildi ve oluşan süspansiyon 450 µm çapında porları olan çelik filtreden geçirilerek 50 mL'lik falcon tüpe süzülerek alındı. 1300 rpm de 3 dakika santrifüj işlemi tekrarlandı. Süpernatanı atılarak tüm peletler bir falcon tüpte birleştirildi. Pelet 50 mL ye kadar RPMI/FBS ile tamamlandı ve 1300 rpm de 3 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatanı atıldı ve üzerine 50 mL serumsuz medium eklenerek 1300 rpm'de 3 dakika

santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı, 15 ml serumuz RPMI eklendi. 3 adet 15'lik falkon tüpe 5'er mL olarak konularak 15 ml. ye serumuz RPMI ile tamamlandı. 1300 rpm de 3 dakika santrifüj yapıldı, süpernatant atıldı ve tüpler ters çevrilerek peletler iyice kurutuldu. Üzerine 10 mL'ye kadar ficoll eklendi ve 2400 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Dansite yoğunluğu nedeniyle orta kısımda kalan adacık hücreleri pastör pipeti ile alınıp başka bir 50 mL'lik tüpe RPMI (+) ile tamamlanarak koyuldu. 1300 rpm de 3 dakika santrifüj yapılarak süpernatant alındı. 25 ml ye kadar serumuz mediumu eklenip 1300 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı ve aynı işlem bir kez daha tekrarlandı. Daha sonra 15 mL'lik falkon tüplerine handpicking ile inverted bir mikroskop yardımıyla 500 adet hücre alındı ve 1200 rpm de santrifüj edildi ve 2 kere daha hücreler RPMI 1640 (+) ile yıkandı. Laminar akım altında T25 kültür flasklarına alınan adacık hücreleri üzerine 5 mL RPMI (+) 0,22 'lik filtreden geçirilerek eklendi. 48 saat sonra adacık hücrelerine PI/FDA ile canlılık boyaması yapıldı

1.6 Adacık Hücre Saflığının Belirlenmesi

Adacık hücre saflığı ditiazon (DTZ) boyaması ile ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

1.7 Adacık Hücrelerin Canlılığının Belirlenmesi:

Adacık hücrelerin canlılığı (floresan diasetat [FDA]) ve (propidium iyodür [PI]) floresan bileşiklerinin kullanımı ile değerlendirildi. PI pozitif hücrelerin, FDA pozitif hücrelere göre relatif yüzdeleri adacık hücre canlılığının yarı kantitatif analizinin yapılmasına imkan sağlayacaktır. Küçük petri kabının içerisine 918 µL PBS (pH 7,4) solüsyonu koyuldu. Üzerine 90 µL adacık örneği koyuldu. 20 µL FDA stok solüsyonundan, 20 µL de PI stok solüsyonundan ilave edilerek karanlık ortamda 5 dakika saklandı ve floresan mikroskobunda 40 X büyütmede değerlendirildi. Kullanılan floresan boyaların yeni derişimleri 0,46 µM FDA ve 14,34 µM PI oldu.

2.Pankreastan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonunun ve Tanımlanması

Sıçanların anestezi altında yapılan abdominal kesiden sonra duktusları belirlenip, ampulla vateri klemlenip daha önceden hazırlanan kollejenaz Tip V'den 10ml verilerek pankreasları şişirildi. Taze adacıklar (yaklaşık 20 adacık / cm²) 25 cm² doku kültürü kaplarında standart koşullar altında medium 2 (RPMI 1640 + 200 mg / dlt glukoz + % 10 fetal bovin serum + 100 IU / mlt penisilin-100 mcg / mlt streptomisin + 2 mmol /L L- glutamine) ile kültüre edildi. Kültürün 13-15. gününden sonra hücreler tek tabakalı hale (% 70 influency) ulaştı (pasaj 0) ve sonraki pasajlar buna göre adlandırıldı. Pasaj için tripsin-EDTA C solüsyonu kullanılıp

hücreler 1×10^6 cell / cm^2 olacak şekilde T75'lik flasklara ekildikten sonra 3 günde bir besi yeri değişikliği yapıldı. 3-15 gün sonra koloni oluşturan hücreler akım sitometri cihazında CD29 (integrin β 1 chain; Ha2/5; fl uorescein isothiocyanate, FITC), CD45 and CD90 (Thy-1/Thy-1.1-FITC) ve onların izotip kontrollerine (IgG2a K; FITC) karşı antikor ile tanımlandı.

3. Ratların Diyabet Yapılması

Ratlara 45 mg/kg dozunda streptozotosin Ph=4,5 olacak şekilde hazırlanan taze sitrat tamponu ile çözündürülerek verildi. 72 saat sonra hayvanların kan şekerlerine bakıldı ve kan şekeri 350 mg/dl' yi geçen sıçanlar diyabetik kabul edilip deneye dahil edildi. Sıçanların 10 günlük diyabetik takipleri yapıldıktan sonra adacık hücre transplantasyonu yapıldı.

4. Adacık Hücre Transplantasyonu

4.1 Deney Gruplarının Oluşturulması

- **Grup 1 (Kontrol grubu):** Bu gruba sadece Portal ven içerisinde PBS gönderildi.
- **Grup 2 (MKH grubu):** Bu gruba 600.000 adacık kökenli MKH portal venden verildi.
- **Grup 3 (Adacık grubu):** Bu gruba 1500 adacık portal venden verildi.
- **Grup 4 (Adacık+MKH grubu):** Bu gruba 1500 adacık ve 600.000 adacık kökenli MKH portal venden verildi.

Her bir gruba başlamadan önce 1 mL kan örneği alınarak (100 μL aprotinin eklenerek) C peptid düzeyi için serumları ayrıldı. Analiz yapılınca kadar -80°C 'de saklandı. Millipore USA ELISA kitleri kullanılarak sandviç ELISA yöntemi ile çalışıldı. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü.

4.2 Hayvanların Hazırlanması

Adacık hücreleri kültürden çıkarıldıktan sonra 1 kere RPMI (+) ile yıkandı ve 1 mL'lik enjektörlere (40-60 IU) çekildi. MKH grupları için hücreler direkt (40-60 IU) 1 mL' lik enjektöre çekildi. Adacık + MKH grubu için hücreler birlikte (40-60 IU) 1 mL' lik enjektöre çekildi. Hayvanın ketamin ksilasın ile düşük dozda anesteziye alındı, karın bölgesi traş edildi. Küçük bir kesik atılarak pankreas ve portal ven bulundu ve Portal vene 23 G' lik mavi uçlu katater ile girildi. Daha önceden 1 mL enjektör içinde hazırlanan hücreler kataterin ucuna

takılarak portal venden içeri verildi. Hücre enjekte edildikten hemen sonra daha önceden ayarlanan spone gel bastırılarak kanama durduruldu. 5 dakika bekledikten sonra spone gel çekildi ve hayvanın iç ve dış derisi ayrı ayrı dikilerek cerrahi işlem tamamlandı.

4.3. Hayvanların Kan Şekeri Takibi

Transplantasyondan hemen sonra ve 7 gün boyunca günlük saat 09:00-10:00 arası kan şekeri ölçümü (glukometre ile) yapıldı. 7. günden sonra, 3 gün aralıklarla kan şekeri ölçümü yapılmaya devam edildi. 8. 15. 21 ve 28. günlerde açlık kan şekeri ölçüldü. Diğer günlerde tokluk kan şekeri takibi yapıldı. 30. gün deney sonlandırıldı.

4.4 Deneyin Sonlandırılması

Transplantasyondan 30 gün sonra hayvanlara ketamin ksilasin ile letal dozda anestezi yapıldı ve kan örnekleri alındı. Kan alındıktan sonra karaciğer ve pankreasları %10'luk formol içerisine alınarak deney sonlandırıldı.

5. IPGTT (İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi)

27. transplantasyon gününde hayvanlar aç bırakıldı (su içebilirler). 12-18 saatlik açlıktan sonra hayvanların açlık kan şekeri ölçüldü. %30'luk glukoz hazırlanır. Her hayvan için kilogram başına 2 gr glukoz intraperitoneal olarak verildi. 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda glukometre ile kan şekerlerine bakıldı.

6. Histolojik Analiz

Karaciğer örnekleri Hematoksilen-Eozin ile boyanma sonrasında konvansiyonel mikroskopta (OLYMPUS CX41, JAPAN, TOKYO) pankreas adacık morfolojisi için değerlendirmeye alındı. Mevcut 30 rat karaciğerinden her birinden 3' er kesit alınarak incelenmeye dahil edildi. Karaciğer örnekleri adacık hücre varlığı, adacıkların her birinin yaklaşık kaç hücreden oluştuğu, adacık hücrelerinde degenerasyon (sitoplazmik vakuolizasyon) varlığı, adacık çevresi karaciğer histoloji anomalisi, (steatozis, hepatositlerde şişme, kalsifikasyon varlığı /varsa lokalizasyonu, amiloid birikimi) inflamasyon varlığı ve varsa yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldı.

Pankreas örneklerinin tamamı incelemeye alındı. H&E boyama sonrasında ışık mikroskopunda (OLYMPUS CX41, JAPAN, TOKYO) pankreas adacık morfolojisi sayısal açıdan ve morfolojik açıdan değerlendirmeye alındı. Pankreas örneklemelerindeki tüm gruplarda adacıklar sayıldı.

7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, ortanca, standart sapma, minimum ve maksimum şeklinde verildi. Bağımsız sayısal değişkenlerin çoklu grup karşılaştırmalarında normal dağılım koşulu sağlanmadığı durumda Kruskal Wallis, ikili grup karşılaştırmalarında normal dağılım koşulu sağlanmayan durumda Mann Whitney U test istatistiği kullanıldı. Alt grup analizlerinde bonferroni düzeltmesi ile Mann Whitney U testi kullanıldı. Tekrarlı ölçüm analizlerinde Wilcoxon-Signed Rank Test ve Repeated Measures Testi kullandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p değerinin 0,05 ten küçük olması ($p<0.05$) durumu olarak kabul edildi.



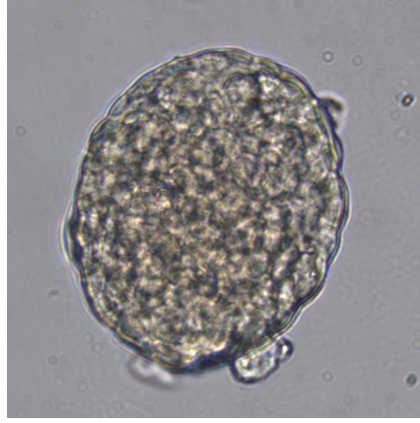
V. BULGULAR

5.1. Florasan Boyama ile Canlılık Değerlendirmeleri

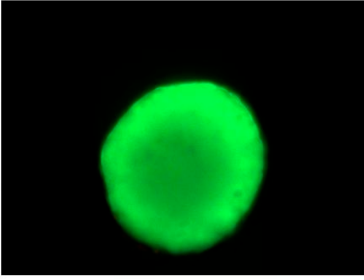
Çalışmada elde edilen adacıkların canlılıkları, transplantasyon öncesi FDA/PI ile boyanarak değerlendirildi. Canlılık oranları ortalamaları, adacık transplantasyonu yapılan grup 3 (Adacık)'de $86,0 \pm 2,2$ ve grup 4 (Adacık+Mezenkimal kök hücre)'de $84,1 \pm 1,7$ ($p=0,393$) olup gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (Şekil 1).



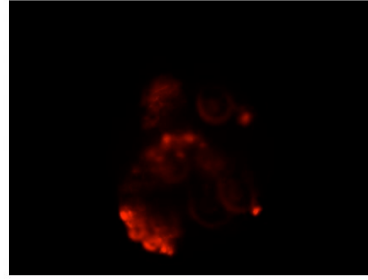
Şekil 11. Grup 3 ve Grup 4 Adacık canlılık oranları



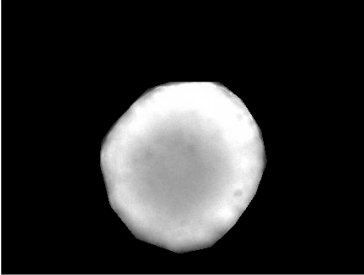
Original Green Color Image: 31.05.12 ilknur trans 48 saat flo c0002.jpg



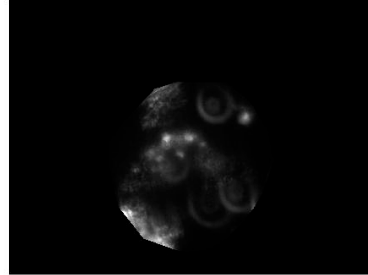
Original Red Color Image: 31.05.12 ilknur trans 48 saat flo c0004.jpg



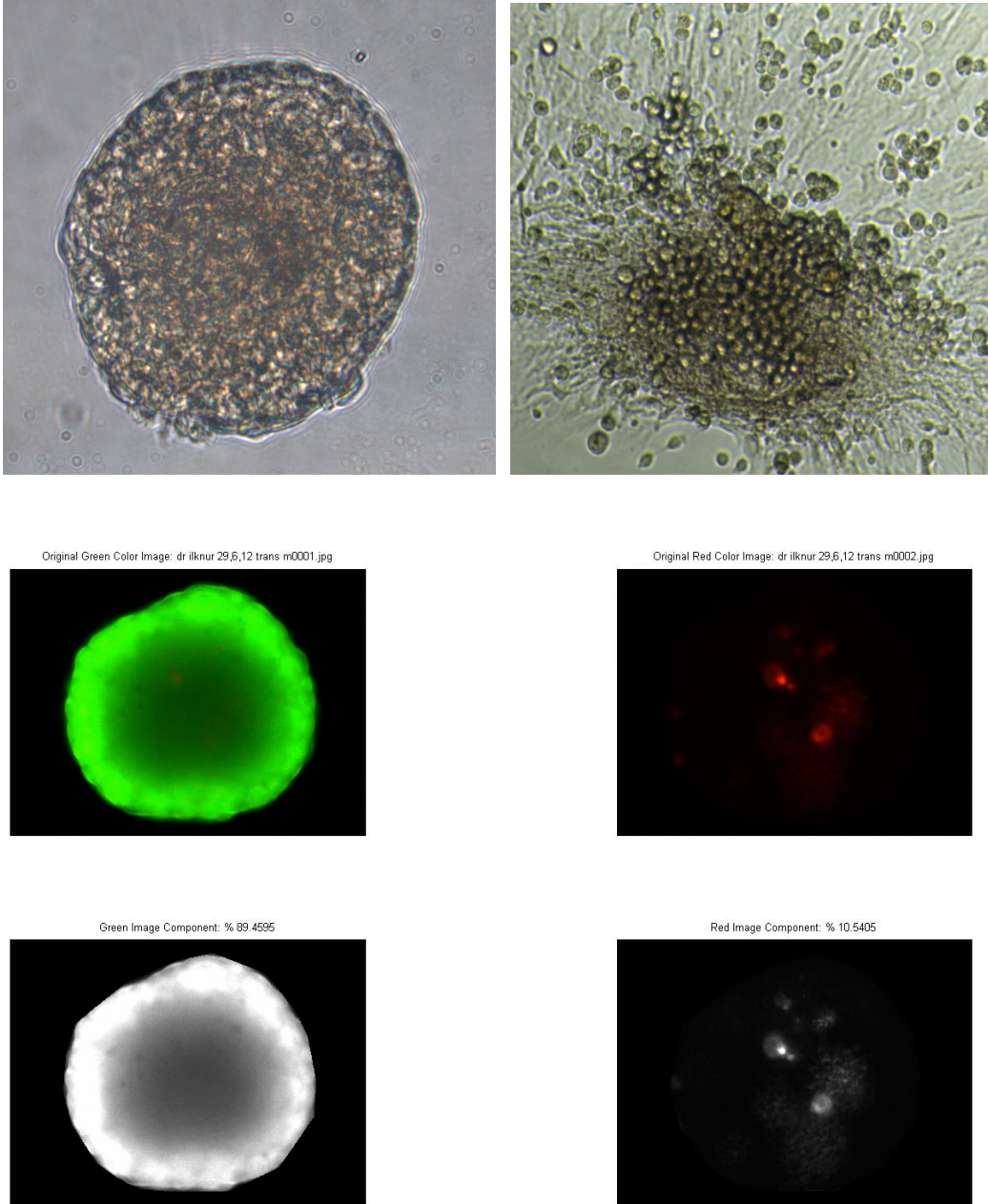
Green Image Component: % 86.9126



Red Image Component: % 13.0874



Şekil 12. Grup 3 (Adacık transplantasyonu) FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab’da hazırlanan program ile yapılan analizleri sonrası elde edilen canlılık yüzdelerinin ortalamaları canlılık sonuçları ($86,0 \pm 2,2$)



Şekil 13. Grup 4 (Adacık+MKH transplantasyonu) FDA/PI ile boyanan adacıkların Matlab’da hazırlanan program ile yapılan analizleri sonrası elde edilen canlılık yüzdelерinin ortalamaları ($\%84,1 \pm 1,7$)

5.2. Grupların kan şekeri ortalamaları

Çalışma başlangıcında (0.gün) gruplar arasında kan şekeri düzeyi ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,076$). Takip eden ölçümlerde kan şekeri ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark saptandı (sırası ile $p<0,001$, $p<0,001$, $p=0,001$, $p=0,005$, $p<0,001$, $p<0,001$). Bu fark 3, 5, 21 ve 30. günlerde grup 1 (kontrol) ve grup 2 (mezenkimal kök hücre)'de, grup 3 (adacık) ve grup 4 (adacık+mezenkimal kök hücre)'e göre istatistiksel anlamlı yüksekti. 7. Gün kan şekeri ortalamaları kontrol grubunda adacık+mezenkimal kök hücre grubuna, mezenkimal kök hücre grubunda da adacık ve adacık+mezenkimal kök hücre gruplarına göre istatistiksel anlamlı yüksekti. 15. günde mezenkimal kök hücre grubunda, adacık+mezenkimal kök hücre grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksekti. Kan şekeri düzeyi ortalamalarının zamanla değişimi istatistiksel anlamlıydı ($p=0,001$). Gruplar arasında kan şekeri düzeyi ortalamasının zamanla değişiminde de istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p=0,027$) (Tablo 5).

Tablo 5. Grupların kan şekeri ortalamaları

(Ort.±SD)	Kontrol	Mezenkimal kök hücre	Adacık	Adacık + Mezenkimal kök hücre	p*
Kan şekeri (0. gün)	573,1±162,2	557,5±167,1	614,6±155,5	436,6±31,8	0,076
Kan şekeri (3. gün)	555,9±166,9 ^{cd}	615,9±165,4 ^{cd}	209,0±123,3 ^{ab}	158,1±38,5 ^{ab}	<0,001
Kan şekeri (5. gün)	523,5±179,4 ^{cd}	627,1±166,0 ^{cd}	213,4±144,5 ^{ab}	157,9±52,3 ^{ab}	<0,001
Kan şekeri (7. gün)	550,0±169,4 ^d	618,5±193,1 ^{cd}	255,6±205,0 ^b	195,6±103,2 ^{ab}	0,001
Kan şekeri (15. gün)	534,0±182,7	646,3±133,2 ^d	353,1±224,4	289,3±140,7 ^b	0,005
Kan şekeri (21. gün)	614,4±136,8 ^{cd}	738,0±0,0 ^{cd}	296,5±210,0 ^{ab}	265,6±123,5 ^{ab}	<0,001
Kan şekeri (30. gün)	607,3±136,4 ^{cd}	738,0±0,0 ^{cd}	327,3±196,4 ^{ab}	243,3±138,5 ^{ab}	<0,001
p**			0,027		

* Kruskal Wallis

** Repeated Measures

^a Kontrol grubundan farklı

^b Mezenkimal kök hücre grubundan farklı

^c Adacık ı grubundan farklı

^d Adacık + Mezenkimal kök hücre grubundan farklı

Gruplar arasında kan şekeri ortalamalarındaki değişim, 0. gün ile 3. gün ve 15. gün ile 21. gün arasında farklıydı (sırası ile $p<0,001$, $p=0,023$) (Tablo 6).

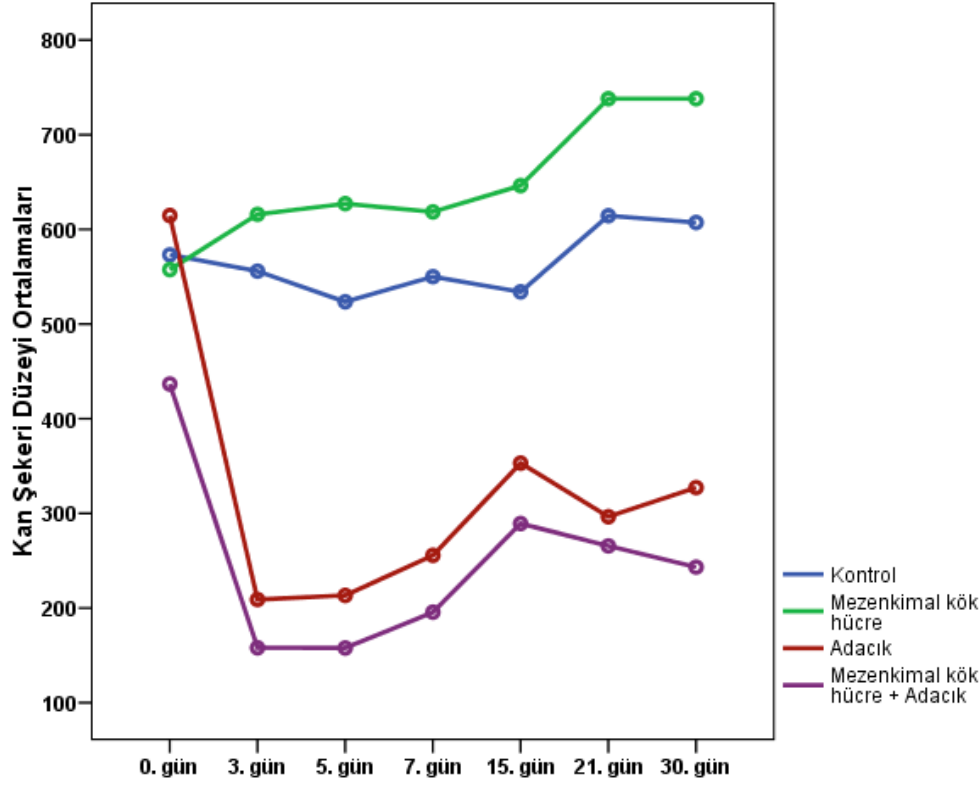
Tablo 6. Kan şekeri ortalamalarında günlere göre değişim

	p
Kan şekeri (0. gün) vs Kan şekeri (3. gün)	<0,001
Kan şekeri (3. gün) vs Kan şekeri (5. gün)	0,527
Kan şekeri (5. gün) vs Kan şekeri (7. gün)	0,642
Kan şekeri (7. gün) vs Kan şekeri (15. gün)	0,119
Kan şekeri (15. gün) vs Kan şekeri (21. gün)	0,023
Kan şekeri (21. gün) vs Kan şekeri (30. gün)	0,282

Adacık ve adacık+mezenkimal kök hücre grubunda kontrol ve mezenkimal kök hücre grubuna göre kan şekeri ortalamasındaki değişim istatistiksel anlamlıydı (sırası ile $p=0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$). Kontrol ile mezenkimal kök hücre grubundaki değişimler ve adacık ile adacık+mezenkimal kök hücre grubundaki değişimler ise birbirinden istatistiksel anlamlı farklı değildi ($p=0,485$, $p=0,575$) (Tablo 7)

Tablo 7. Gruplar arasında kan şekeri ortalamasındaki değişim

	<i>Kontrol</i>	<i>Mezenkimal kök hücre</i>	<i>Adacık</i>
Mezenkimal kök hücre	0,485		
Adacık	0,001	<0,001	
Adacık+ Mezenkimal kök hücre	<0,001	<0,001	0,575



Şekil 14. Grupların kan şekeri ortalamaları

5.3. İntraperitoneal glukoz tolerans testi sonuçlarının değerlendirilmesi

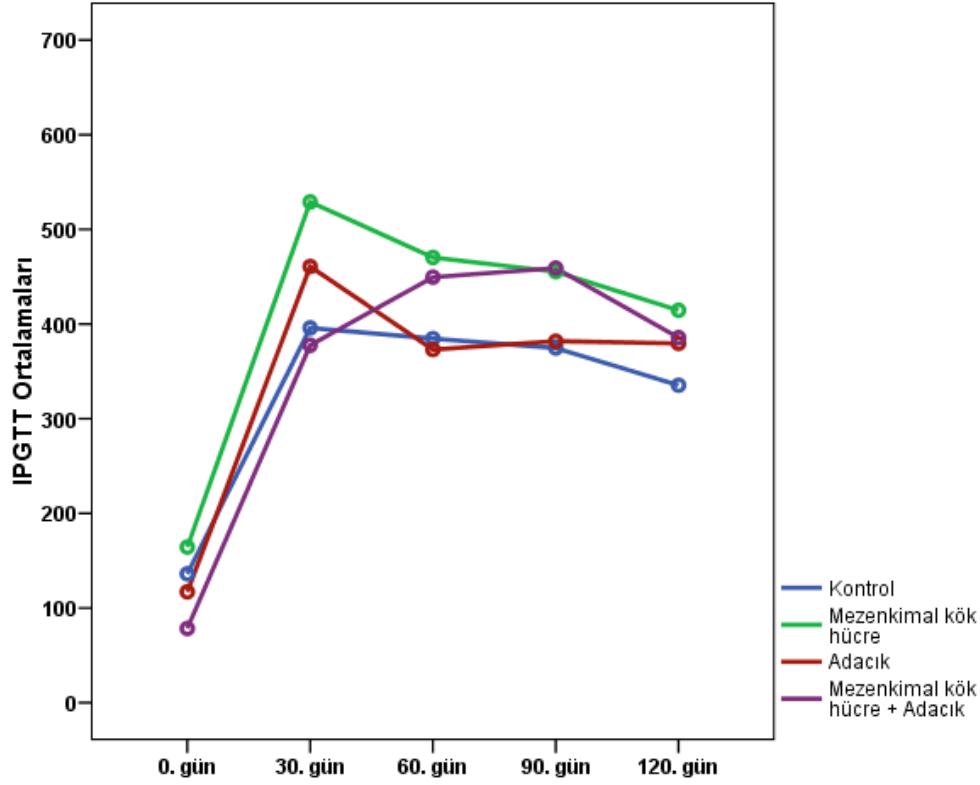
Gruplar arasında intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT) kan şekeri ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı, ancak beklendiği gibi kan şekerinin zamanla değişimindeki fark istatistiksel anlamlıydı ($p < 0,001$). Bu fark 0.dakika ile 30. dakika ve 90. dakika ve 120. dakika arasındaydı. Gruplar arasında ise IPGTT kan şekeri ortalamalarının zamanla değişiminde istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Tablo 8).

Tablo 8. İntraperitoneal glukoz tolerans testi kan şekeri sonuçları

(Ort.±SD)	Kontrol	Mezenkimal kök hücre	Adacık	Adacık+ Mezenkimal kök hücre	p*
IPGTT (0. dk)	136,1±65,6	164,4±123,2	117,1±51,1	78,5±9,5	0,107
IPGTT (30. dk)	395,9±161,6	529,0±202,7	460,8±173,4	377,6±69,1	0,358
IPGTT (60. dk)	384,6±152,8	470,3±130,7	373±114,9	449,5±93,9	0,455
IPGTT (90. dk)	374,6±152,3	455,3±141,6	381,9±82,2	459,1±72,6	0,316
IPGTT (120.dk)	335,4±141,5	414,5±167,2	379,5±87,0	385,6±37,4	0,883
p**	0,108				

* Kruskal Wallis

** Repeated Measures



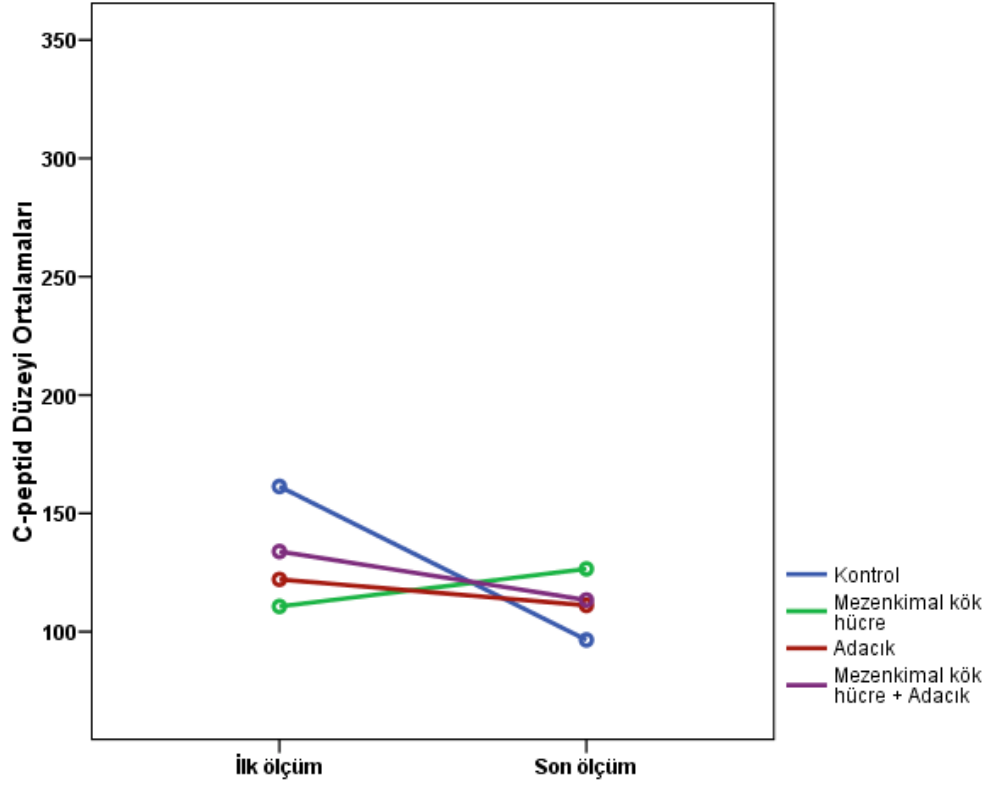
Şekil 15. IPGTT kan şekeri ortalamaları

5.4 Transplantasyon öncesi ve sonrası c-peptid düzeylerinin değerlendirilmesi

Gruplar arasında transplantasyon öncesi ve transplantasyondan 30 gün sonra c-peptid düzeyi ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Kontrol grubunda c-peptid düzeyi ortalamasının, transplantasyon öncesi düzeyine göre transplantasyondan 30 gün sonra ölçülen düzeyindeki düşüş istatistiksel anlamlıydı ($p=0,036$). Diğer gruptaki ölçümlerin değişiminde istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırası ile $p=0,293$, $p=0,398$, $p=0,093$) (Tablo 9).

Tablo 9. C-peptid sonuçları

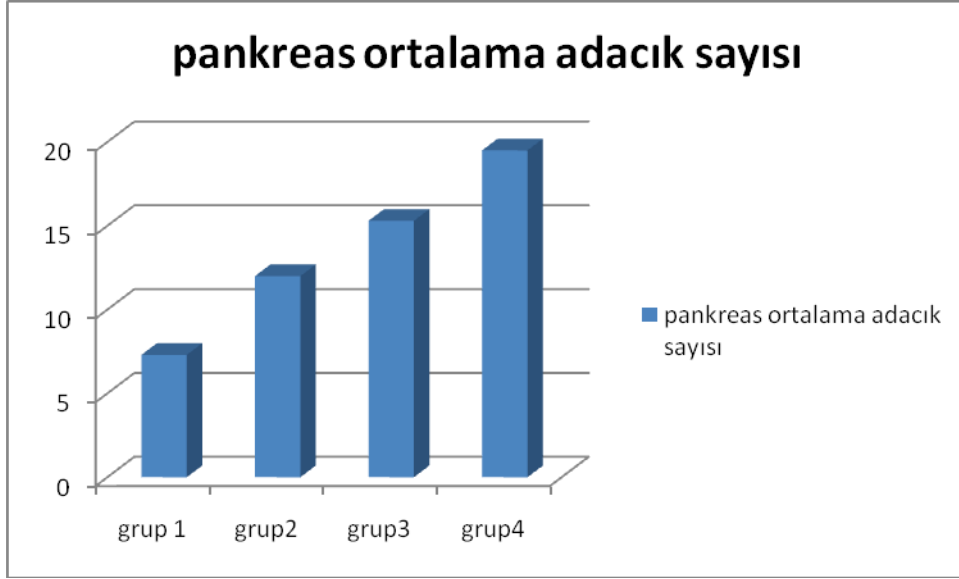
(Ort.±SD)					
	Kontrol	Mezenkimal kök hücre	Adacık	Adacık+ Mezenkimal kök hücre	p
C-peptid ilk ölçüm	161,4±88,0	110,7±35,4	122,1±17,5	133,9±34,5	0,510
C-peptid son ölçüm	96,6±17,8	126,5±55,9	111,1±29,7	113,4±33,1	0,574
p*	0,036	0,293	0,398	0,093	



Şekil 16. C-peptid sonuçları

5.5. Histolojik değerlendirme

Deney sonlandırıldıktan sonra yapılan histolojik incelemeye göre ratların pankreasındaki ortalama adacık sayısı, kontrol grubunda $7,3 \pm 2,6$, mezenkimal kök hücre grubunda $12,0 \pm 4,0$, adacık grubunda $15,3 \pm 5,8$ ve adacık + mezenkimal kök hücre grubunda $19,5 \pm 4,6$ olarak saptandı (Şekil 17). Gruplar arasında pankreas adacık sayısı ortalamalarında bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$). Pankreas adacık sayısı ortalaması kontrol grubunda, adacık ve adacık + mezenkimal kök hücre grubuna göre, mezenkimal kök hücre grubu ortalaması ise adacık+ mezenkimal kök hücre grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüktü (sırası ile $p=0,004$, $p=0,001$, $p=0,006$).

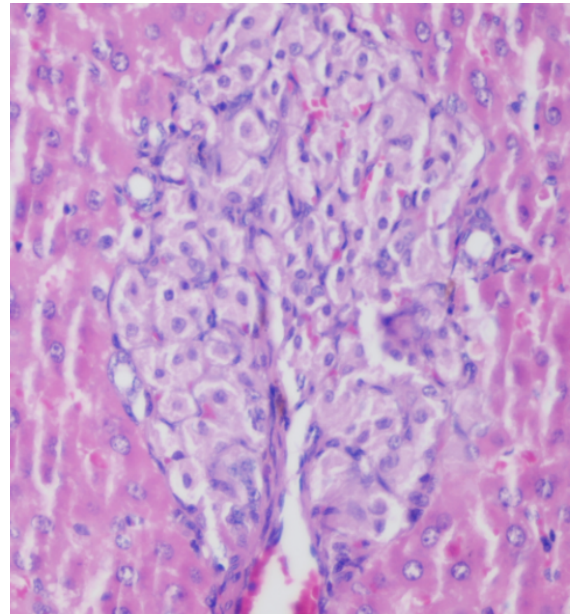
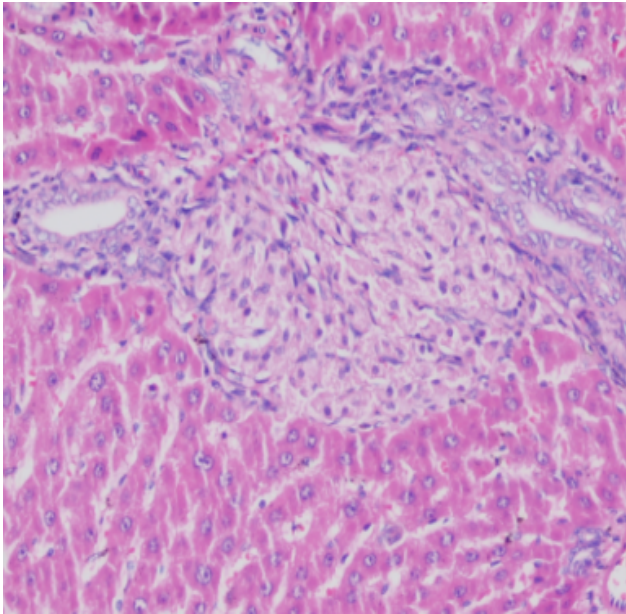
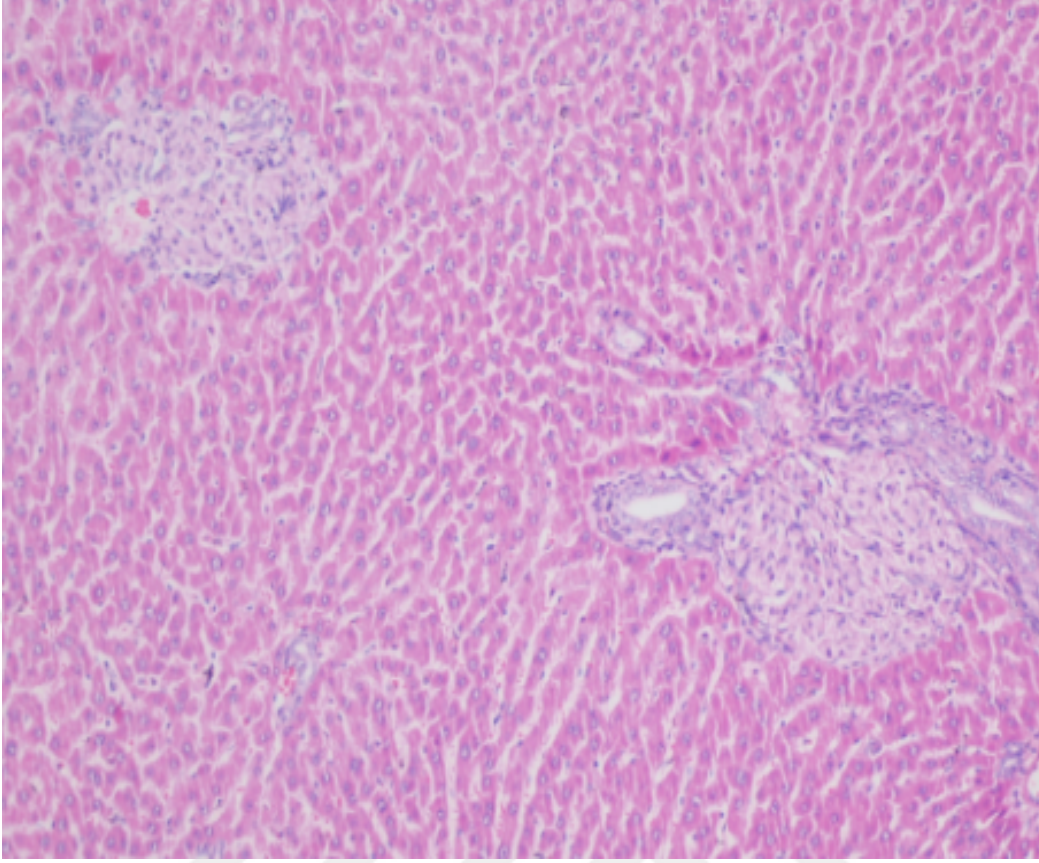


Şekil 17. Pankreas ortalama adacık sayısı

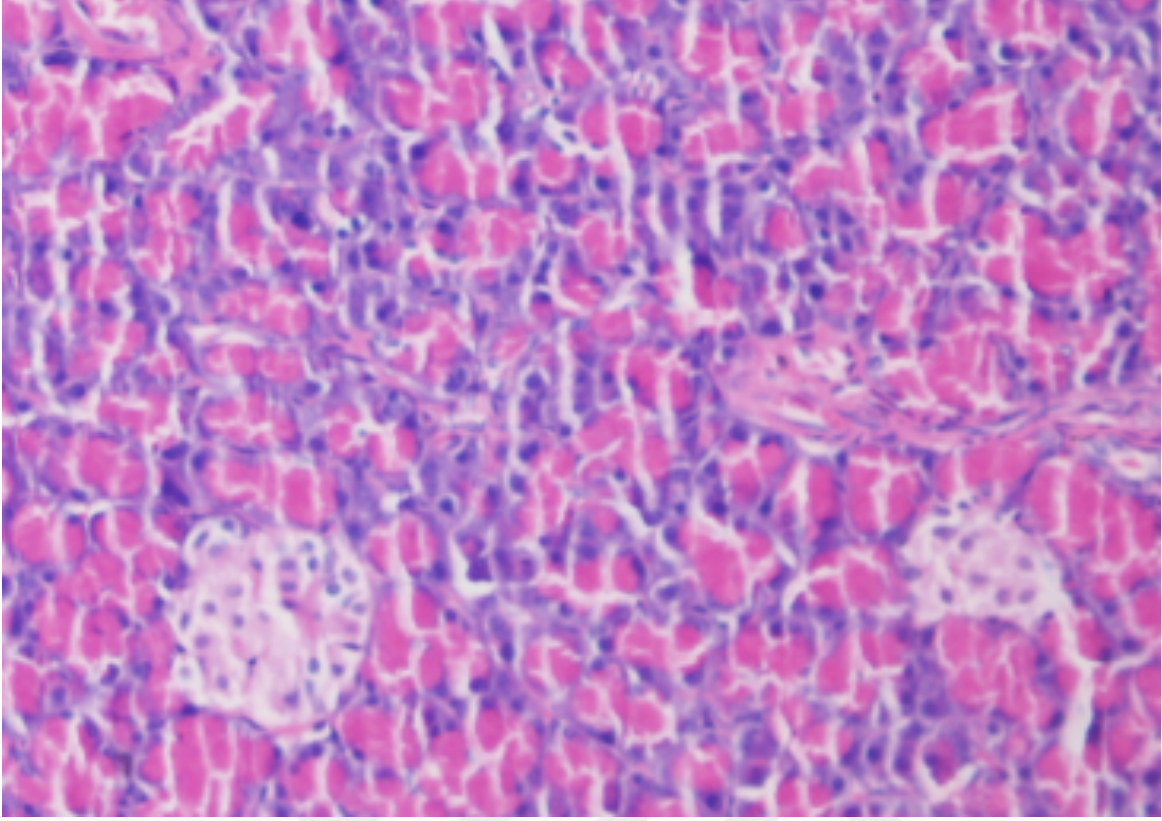
Adacık transplantasyonu yapılan gruplarda (grup3 ve grup 4) adacık odak sayısı ve adacıklarda hücre sayısı ortalamalarında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Bu gruplarda (grup3 ve grup 4) yapılan karaciğerdeki histolojik değerlendirmeye göre; periislet hepatositlerde şişme adacık grubunda minimal, adacık + mezenkimal kök hücre grubunda ise orta derece saptandı (Şekil 18, 19,20,21). Adacık hücrelerinde vakualizasyon ve inflamasyon ise iki grupta da minimaldi (Tablo 10). İki grupta da steatoz görülmedi. Grup 1 (kontrol) ve grup 2 (mezenkimal kök hücre)'deki ratların karaciğerlerinin histolojik incelemesinde ise dejeneratif değişiklikler izlendi (Şekil 22,23).

Tablo 10. Rat karaciğerlerinin histolojik değerlendirme sonuçları

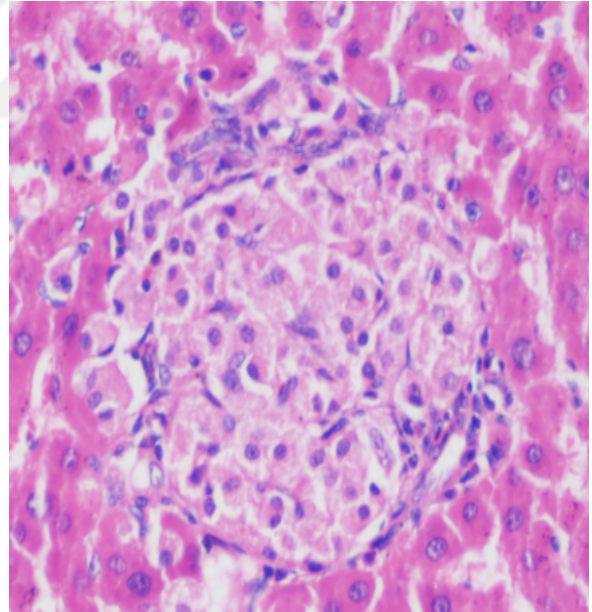
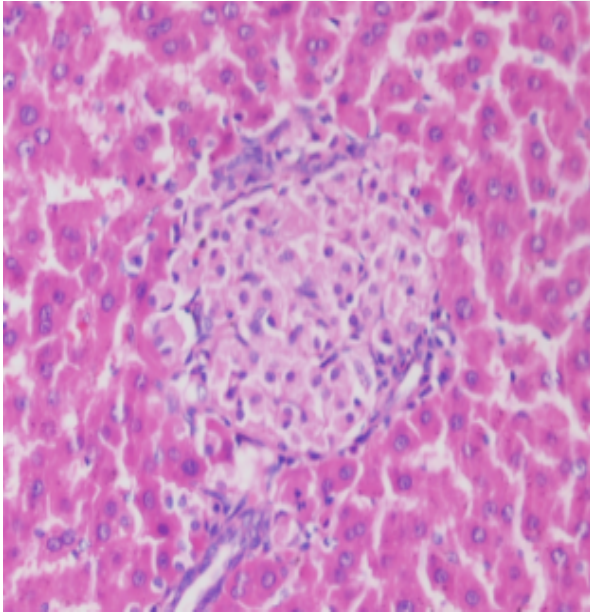
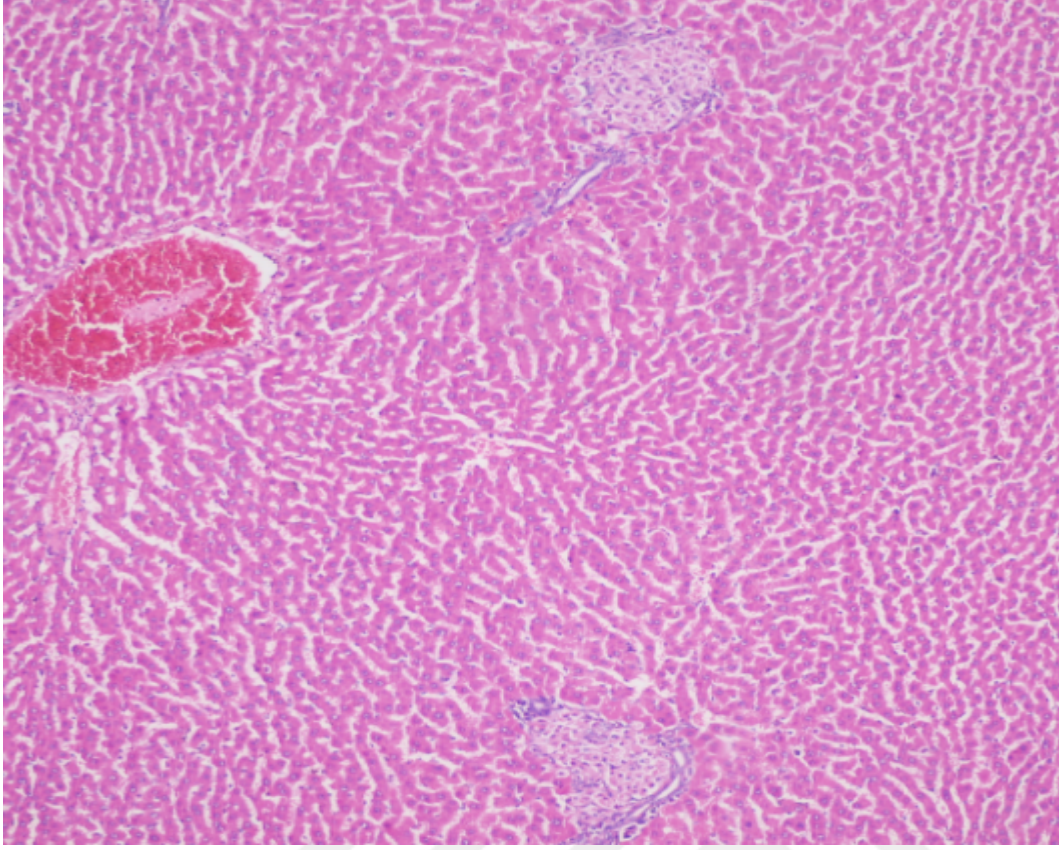
	Adacık	Adacık + Mezenkimal kök hücre	p
Adacık odak sayısı (Ort.±SD)	5,9±1,6	4,8±0,9	0,085
Adacıklarda hücre sayısı (Ort.±SD)	37,6±9,4	34,5±4	0,791
Periislethepatositlerde şişme (n)	8 (Minimal)	8 (Orta)	-
Adacık vakualizasyonu (n)	8 (Minimal)	8 (Minimal)	-
İnflamasyon (n)	8 (Minimal)	8 (Minimal)	-



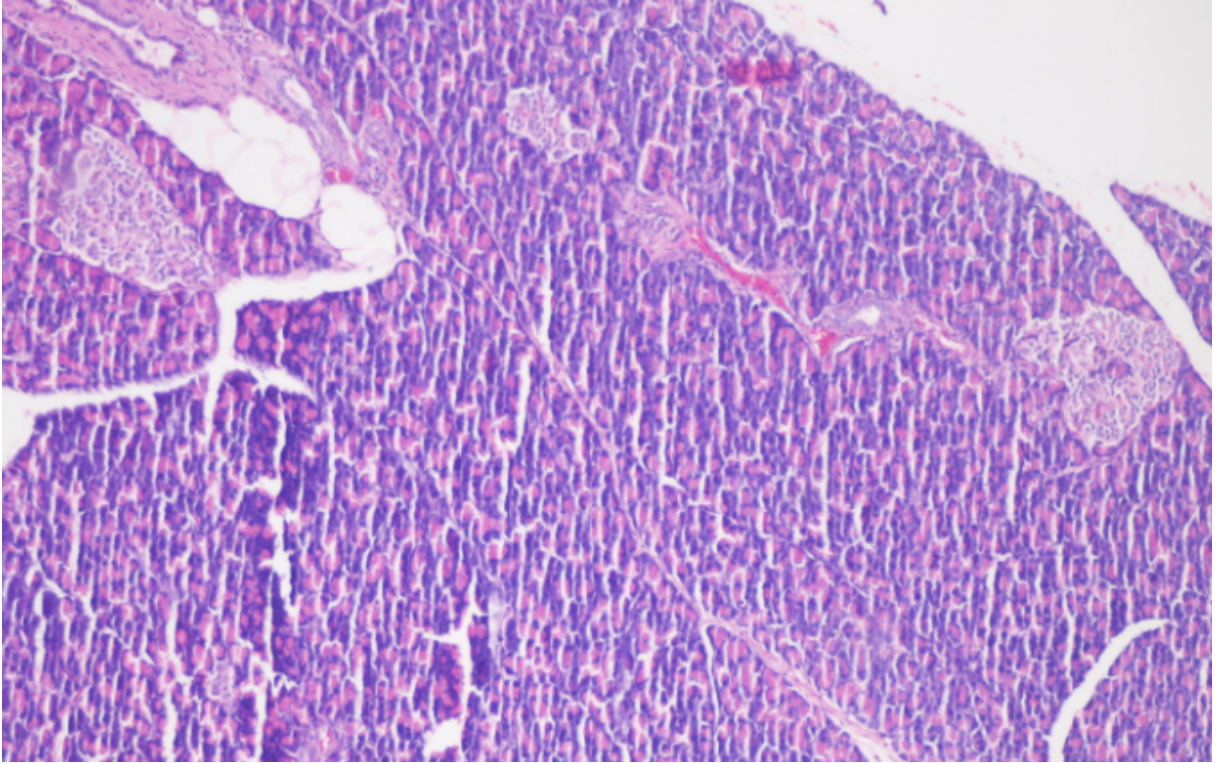
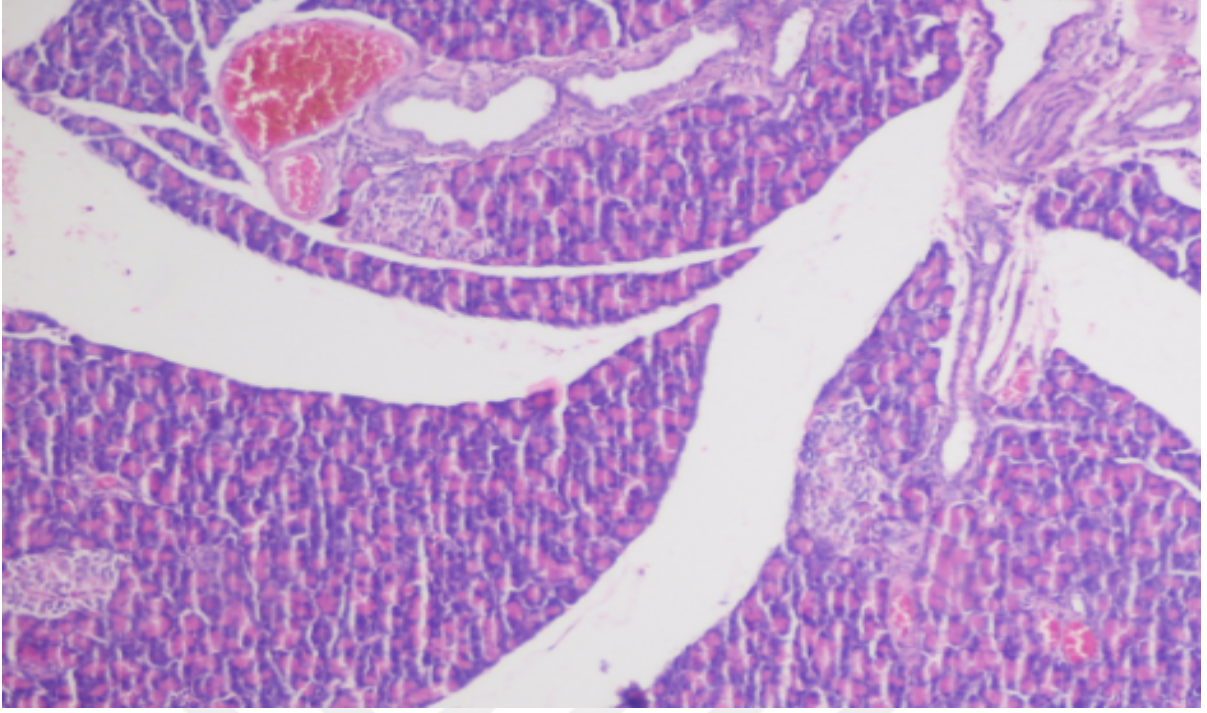
Şekil 18. Grup 3 (adacık taransplantasyonu) Karaciğer histolojisi



Şekil 19. Grup 3 (Adacık transplantasyonu) Pankreas histolojisi

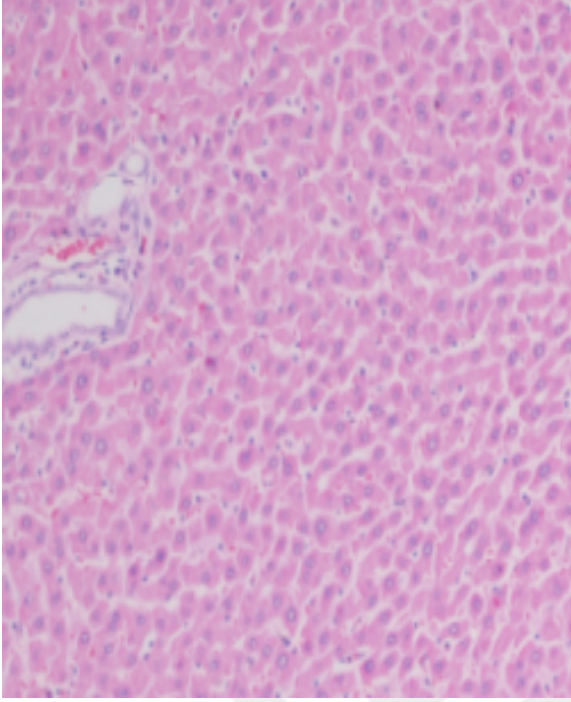


Şekil 20. Grup 4 (Adacık+MKH transplantasyonu) Karaciğer histolojisi

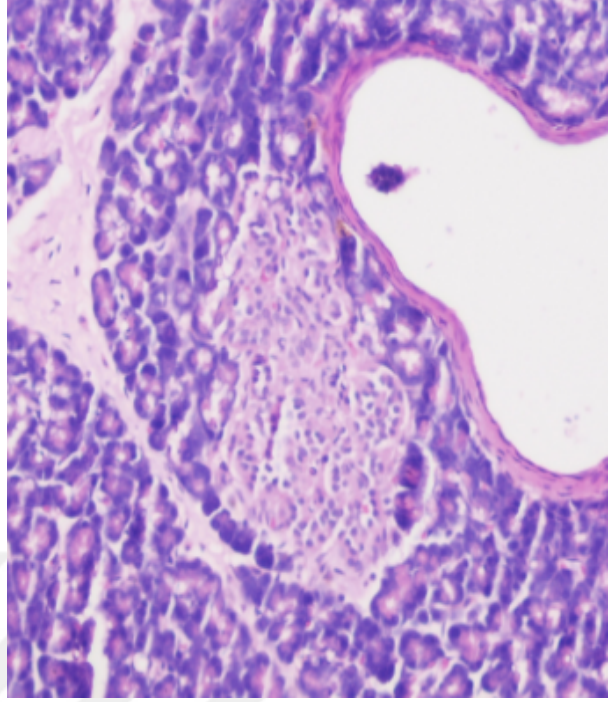


Şekil 21. Grup 4 (Adacık+MKH transplantasyonu) Pankreas histolojisi

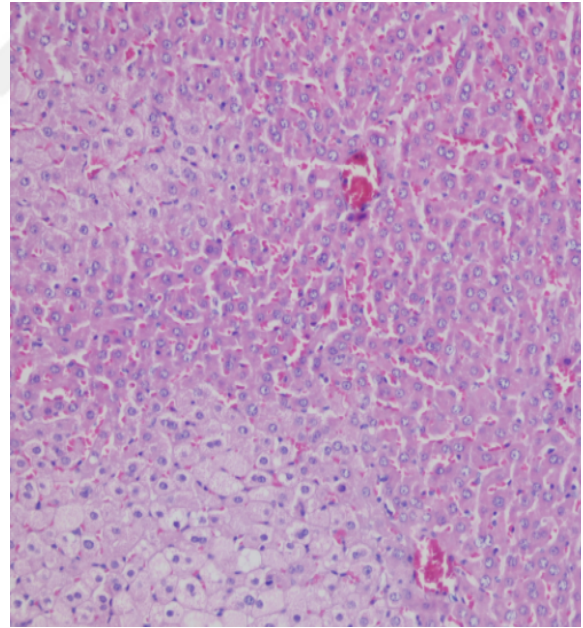
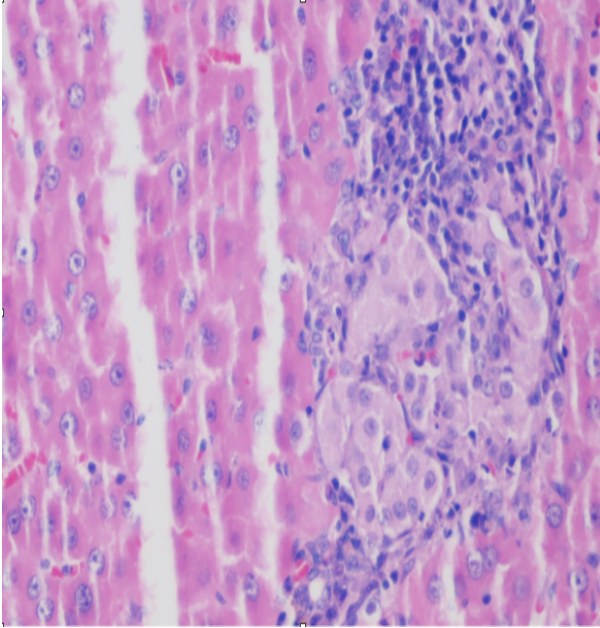
A



B



Şekil 22. Grup 1 (kontrol) karaciğer (A) ve pankreas (B) histolojisi



Şekil 23. Karaciğerde parankimal değişiklikler

V. TARTIŞMA

Diyabet mellitus (DM), Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) 'na göre 2011'de tüm dünyada 336 milyon insanın etkilendiği epidemiyolojik bir problemdir. Bu durum, beta hücre rejenerasyonundaki yetmezlik nedeniyle beta hücre popülasyonundaki major kaybın klinik sonucudur (113). DM, yaşam kalitesini ve süresini azaltan, kronik hiperglisemiye bağlı mikrovasküler (nefropati, retinopati ve nöropati) ve aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar gibi hayati organları tehdit eden makrovasküler komplikasyonlarla seyreden, önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. İyi glisemik kontrolün hem mortalite hem de diyabet komplikasyonları üzerine etkisinin değerlendirildiği 1 tanesi (DCCT) tip 1 DM, 4 tanesi (UKPPS, ADVANCE, ACCORD, VADT) tip 2 DM hastalarda yapılmış toplam 5 büyük çalışma vardır. Bu çalışmalar sonucunda görüldü ki; günümüzde yoğun insülin tedavisi ile sıkı glisemik kontrol sağlanmaya çalışılsa da diyabetin komplikasyonları tam olarak önlenememektedir. Çünkü mevcut çoğu insülin formülasyonu ile endokrin pankreasın insülin üreten beta hücrelerinin doğal düzenleyici yetenekleri taklit edilemez (83). İlerleyici beta hücre hasarı nedeniyle sıkı glisemik kontrol elde etmek de giderek daha zor hale gelir. Bu durum günümüzde alternatif veya ek tedavilere ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur. Bu amaçla, tüm pankreas tranplantasyonu veya allojenik adacık hücre nakli ile elde edilen beta hücre replasmanı ile fizyolojik glukoz homeostazisi sağlanmaya çalışılmaktadır. Bu amaçla uygulanan hem eş zamanlı pankreas ve böbrek nakli hem de yalnız pankreas nakli, yaşam kalitesini artırır, hiperglisemi ile ilişkili komplikasyonları azaltır ve diyabetik nöropatiyi geri çevirir veya azaltır (88). Ancak bu faydalarla birlikte kronik immunsupresyon, cerrahi komplikasyonlar ve greft rejeksiyonu riski de beraberinde gelir (91). Pankreas adacık naklinde ise, pankreas naklinde olduğu gibi majör bir cerrahi gerekmemektedir. Ancak, adacık naklinde klinik uygulamalarda donör yetersizliği, transplante dokunun etkin olmayan engraftmanı ve uzun dönemde adacık fonksiyon kaybı gibi önemli problemlerle karşılaşilmektedir. Bu durum adacık kaybını önlemeye yönelik birtakım yöntemler denenmesine neden olmuştur. Adacıkları immün sistemden korumayı başarabilmek amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda, adacık nakil bölgesi olarak immün sistemden korunmuş olduğu bilinen bölgeler seçilmiştir. Yapılan çalışmalarda, gerçekte bu bölgelerin, grefti immün sistemden uzak tutarak değil, yüksek oranda FasL sentezleyerek grefte karşı koruma sağlandığı belirlenmiştir (114).

Adacık sağkalımı uzatmak amacıyla denenen başka bir yaklaşım da adacıkların nakilden önce kapsülle kaplanmasıdır. Bu amaçla geliştirilen mikro ve makro enkapsülasyon yöntemi, adacıklar için potansiyel immün izolasyon ile güvenli ve de oksijen ve besin açısından zengin bir ortam sağlayabilir. Adacık kapsülleme umut verici olmasına rağmen, biyouyumluluk, etkisiz immün koruma, hipoksi ve nakil sonrası enflamasyon gibi zorluklar nedeniyle kullanımı kısıtlanmıştır. (88).

Donör dokusundaki yetersizlik adacıkların sağkalımı üzerine etkili diğer bir faktördür. Adacık kitlesinin %60'dan fazlası nakilden sonraki ilk birkaç günde kaybolur. Birden fazla adacık nakli yerine büyük bir adacık kitlesinin kullanımı kalan beta hücre kitlesinin daha büyük olmasına ve dolayısıyla daha büyük olasılıkla insülin bağımsızlığına yol açar (88). İmmünojenik çevre, adacıkların inflamasyona yanıtı ve vaskularizasyon yetersizliğine bağlı iskemi adacık kaybına katkıda bulunan başlıca sebeplerdir (115). Embriyonik gelişim sırasında adacık hücreleri kan damarlarından sinyal alır ve bundan etkilenir. Vasküler sinyaller primitif pankreatik dokuların hem proliferasyon hem de diferansiyasyonuna katkıda bulunur. Adacıklar toplam pankreas dokusunun %1-2'ni oluşturur fakat vasküler kaynağın yaklaşık 2/3'ni alır. Kan damarlarından besin ve oksijen temin edilmesinin yanısıra vasküler sinyal ve adacık hücre kitlesi arasında da güçlü bir korelasyon vardır. Rivas Carrillo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada beta hücre hasarından sonra endotel hücrelerinin adacık rejenerasyonu ve kök hücre proliferasyonunu desteklediğini gözlenmiştir (113). Bu nedenle, transplante adacıkların revaskularizasyonunda artış adacık nakil sonuçlarında düzelme sağlayacaktır.

Hemen nakil sonrasında inflamasyon adacık fonksiyonu kaybında önemli bir rol oynar. Bu inflamatuvar yanıt IFN- γ , TNF- α ve IL-1 β artışı ile karakterizedir. Bu pro-inflamatuvar sitokinlere maruz kalan rodent ve insan adacık hücreleri glukozu cevap verme yeteneğini kaybeder ve apoptoz markerları artar. Sitokinler β hücre toksisitesi yanında makrofaj gibi immün hücreleri aktive ederek inflamatuvar yanıtı artırabilir. Sitokin ekspresyonunun azalması, makrofaj ve sitokin aktivitesinin inhibisyonu ile transplante edilen adacıkların fonksiyonunu iyileştirir. Böylece, engraftman sırasında nakil yerinde inflamasyonun minimize edilmesi adacık greft fonksiyonunu uzatmak ve uzun vadeli insülin bağımsızlığını korumak için yardımcı olabilir. (111).

MKH'ler, adult progenitör hücrelerdir, in vitro koşullarda çoğalırlar ve mezenkimal hücre tiplerine diferansiye olurlar. Bu hücrelerin immunmodulator ve rejeneratif özellikleri vardır. Ayrıca anti-inflamatuar proteinler salgılar ve T ve B lenfositlerin aktivitesini baskılar, doku sağkalımı, anjiogenezin stimülasyonu ve doku engraftmanını kolaylaştıran growth faktörler salgılar. MKH, salgıladıkları bu solubl trofik faktörler ile komşu hücreleri etkileyerek ve lokalize immun supresif etkileri yoluyla doku tamirinde major rol oynarlar. MKH'ler bu özellikleri ile tranplante adacıkların hayatta kalımının düzeltilmesinde mükemmel adaylardır. Bu nedenle, adacık greftlerinde inflamasyonun kontrolü MKH'ler ile adacıkların eş zamanlı transplantasyonu ile elde edilebilir (111, 115).

Çalışmamızda elde edilen pankreas Langerhans adacık hücrelerinin transplantasyon öncesi canlılıkları, floresan mikroskopisi ile ölçümler yapılarak test edildi ve Matlab programı ile FDA/PI boyalarının tutulumları yüzde olarak hesaplandı. Elde edilen adacık hücrelerinin fonksiyonel olarak incelenmesi de intraperitoneal glikoz stimülasyon testi ile yapıldı.

Fetal gelişim sırasında, pankreas adacık progenitör hücreler endokrin pankreasın tüm hücrelerinin kaynağıdır. Ancak bu pankreas adacık progenitör hücrelerinin yaralanma sonrası pankreas hücrelerinin kaynağı olup olmadığı belirsizdir. İn vitro progenitör hücrelerin β -benzeri hücrelere indüklenmiş farklılaşmasına alternatif kaynaklar vardır. Bu amaç için kullanılan potansiyel hücre popülasyonu mezenkimal kök hücrelerdir (MKH) (116). Birkaç çalışmada adacık greftleri içeren farklı transplantasyon modellerinde MKH'lerin faydalı etkilerine dikkat çekilmiş. Çalışmamızda STZ ile diyabetik yapılmış ratlarda adacık hücre nakli ile eş zamanlı olarak pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücre naklinin adacık canlılığı ve dolayısıyla diyabetin tedavisine etkileri incelendi. Çalışmamızın sonuçlarına göre; STZ ile hiperglisemik yapılan ratlarda tek başına MKH transplantasyonu, c-peptid düzeyleri ve pankreastaki ortalama adacık sayısına bakıldığında ne pankreatik beta hücre rejenerasyonunu artırarak ne de diğer parakrin etkiler yoluyla hiperglisemiye geri çevirmede yeterli değildi. Kontrol grubunun çalışma başlangıcı ve 30 gün sonra bakılan c-peptid düzeylerindeki anlamlı düşüş ilerleyici beta hücre hasarını göstermektedir. Adacık+MKH transplantasyonu hiperglisemi indüklendikten 1 ay sonra c-peptid düzeylerine göre beta hücre kitlesi üzerine anlamlı etkisi yoktu. Daha önce yapılan çalışmalarda, salgılanan sitokinler veya metalloproteinazlar aracılığıyla transplantasyondan sonra adacık sağkalımında artışın MKH'lerin immunsupresif özelliklerinden olduğu gösterilmiş. Bu mekanizma allojenik greftler için geçerli olabilir, fakat sinjeneik transplantation modelinde MKH faydalı etkilerini

açıklamada immunmodülasyon tek başına olası değildir. Eş zamanlı adacık+ MKH transplantasyon modelinde adacık hücre canlılığını ve fonksiyonu üzerine pozitif etkileri olan farklı trofik faktörler MKH tarafından salgılanır. İn vitro deneylerinde MKH ko-kültürünün adacık ATP içeriğini modüle etmek yoluyla insülin salgı fonksiyonlarını düzelttiği ve anti-apoptotik genleri upregüle ederek adacık viabilitesini artırdığı gösterilmiştir (117,118). Bu etkiler, transplantasyon sonrasında glisemik kontrolü sağlarken revaskülarizasyonun artırılması ve fonksiyonların korunması yoluyla adacık engraftmanının etkin şekilde desteklenmesinde önemlidir (119,120). Çalışmamıza göre bu faktörler tek başına MKH'lerin faydalı etkilerini açıklamada yetersizdir. Transplantasyondan 30 gün sonra her ne kadar greft dokusunda insülin içeriği çalışılmamasına rağmen kan şekerlerinin istatistiksel anlamlı olmasa da adacık+MKH grubunda daha iyi olması greft fonksiyonları üzerine MKH'lerin artmış etkilerine bağlı olabilir.

IPGTT sonuçlarına bakıldığında bozulmuş glukoz toleransının derecesinin tüm gruplarda benzer olduğu görülmektedir. Bu transplante edilen adacık greftindeki kitlenin minimal olması ve dolayısıyla düşük insülin içeriğinin bir sonucu olabilir. Bu nedenle glukoz tolerans testi hiperglisemik farelerde yapılmamalıdır. MKH'ler hipergliseminin düzeltilmesinde etkilidir fakat hiperglisemi geliştikten sonra adacık transplantasyonu ile karşılaştırıldığında işlevselliği artırmaz.

Adacıklar hazır oksijen ve glukozla ulaşabilecekleri ve ürettikleri insülini hedef dokulara gönderebilecekleri sağlam vasküler bir kaynağa ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle adacık nakillerinin büyük çoğunluğu portal ven sistemi içine perkütan olarak yapılır. Hepatositler lobül içinde periferden merkeze doğru yönelen kordonlar oluştururlar. Hücre kordonları arasında karaciğer sinüzoidleri yer alır. Sinüzoidler endotel ve makrofaj tipinde tek sıra hücre ile döşeli geniş kapiller yapılardan ibarettir. Normalde hepatik sinüzoidal perfüzyon basıncı düşüktür. Bu prekapiller-postkapiller rezistansın çok yüksek olmasına bağlıdır. Bu sayede sinüzoidler portal perfüzyon artışından ve presinüzoidal rezistans artışından kaynaklanan basınç dalgalanmalarından korunmuş olur. Hepatositlerdeki hücre hasarı hücresel şişme, balonlaşma ya da hücre ölümü şeklinde olabilir. Çalışmamızda rat karaciğerlerinin histolojik incelemesinde adacık transplantasyon grubuna göre adacık+MKH transplantasyon grubunda adacık etrafındaki hepatositlerde şişmenin orta derecede olması verilen hücre miktarının daha fazla olması nedeniyle sinüzoidal basıncı artırarak yaptığı hepatosit hasarına bağlı olabilir. Beta hücreleri üzerine MKH'lerin koruyucu etkilerinin altta yatan mekanizmalarının hücre

ölümü yolaklarının zayıflatılması ve doğal adacık morfolojisinin korunması ile ilişkili olduğunu düşünülmektedir (111). Son çalışmalarda MKH pankreas mikroçevresini geliştiren ve endojen pankreas kök hücrelerinin genişlemesini teşvik eden çeşitli trofik sitokinler üretebildiğini göstermiştir (121,122). Çalışmamızda da rat pankreaslarının histolojik incelemesinde pankreastaki ortalama adacık sayısının adacık+MKH grubunda daha yüksek saptanmasında bu mekanizmalar etkili olabilir.

Sonuç olarak, mezenkimal kök hücreler tek başına streptozosin ile indüklenen diyabeti geri çevirme kapasitesine sahip değildi. Ancak bu grupta, adacıkların mezenkimal kök hücre ile birlikte verilmesi adacık greftlerinin sağkalımını uzatmada fayda sağladı. Klinik adacık transplantasyonunda adacıkla birlikte mezenkimal kök hücre transplantasyonunun Tip 1 DM’de insülin bağımsız hasta oranını arttırmada faydalı olabileceği düşünüldü.



VI. ÖZET

Pankreas adacık hücre nakli, tip 1 diyabetli hastalar için yeni ve umut verici bir yöntem olmasına rağmen halen seçilmiş hastalarda uygulanan deneysel bir prosedürdür. Adacık hücre naklinin başarısı, donörün özellikleri ve transplante edilen hücre kitlesiyle ilişkili bulunmuştur. Adacık hücreleriyle birlikte adacık hücrelerinin yaşam sürelerini uzatmaya yardımcı olacak ikinci bir hücre tipinin belirlenmesi adacık hücrelerinin sağkalımını artırmaya yönelik çalışmalardan biridir. İkinci hücre tipi olarak üzerinde en çok çalışılan hücre grubu mezenkimal kök hücre (MKH)'dir. Hem immünsupresif etkileri hem de multipotent farklılaşma potansiyelleri nedeniyle hücresel tedavilerde diğer kök hücre türlerine göre daha çok tercih edilirler.

Biz çalışmamızda in vivo tip 1 diyabetik ratlarda adacık hücre nakli ile eş zamanlı olarak pankreas kaynaklı mezenkimal kök hücre naklinin adacık canlılığı ve dolayısıyla diyabetin tedavisine etkilerini araştırmayı amaçladık. Rat pankreas adacıkları izole edilip pankreas kökenli mezenkimal kök hücreler in vitro kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra streptozosin ile diyabetik yapılmış ratlara transplante edildi. Transplantasyon öncesi adacık hücrelerinin canlılığı floresein diasetat (FDA) ve propidyum iyot (PI) kullanılarak floresan mikroskobu ile değerlendirildi. Adacık morfolojisi transplantasyondan 30 gün sonra deney gruplarındaki tüm ratlar kurban edilerek değerlendirildi. Eş zamanlı adacık ve pankreas kökenli mezenkimal kök hücre transplantasyonu ile daha iyi glisemik kontrol sağlandı. Ayrıca pankreastaki ortalama adacık hücre sayısı daha fazla saptandı.

Bu çalışma eş zamanlı adacık ve pankreas kökenli mezenkimal kök hücre transplantasyonunun özellikle pankreasta, MKH'lerin hem pankreas mikroçevresini geliştirip hem de endojen pankreas kök hücrelerinin genişlemesini teşvik ettiğini desteklemektedir.

VII. ABSTRACT

Although pancreatic islet cell transplantation is a new and promising method for type 1 diabetic patients, it is still an experimental procedure performed in selected patient population. Success of islet cell transplantation has been found to be associated with donor characteristics and transplanted cell mass. Determination of a second type of cell in addition to islet cells, which would prolong the survival of islet cells, is one of the studies performed for the enhancement of survival of islet cells. Mesenchymal stem cells (MSC) are the cell group the studies have been mostly performed on. They are more frequently preferred in cellular therapies than the other types of stem cell due both to their immunosuppressive effects and to their multipotent differentiation potential.

The present study aimed to in vivo investigate effects of simultaneous transplantation of pancreatic mesenchymal stem cell and islet cells on vitality of the islet cells thus on the treatment of diabetes in type 1 diabetic rats. Rat pancreatic islets were isolated, pancreatic mesenchymal stem cells were augmented in in vitro culture media, and then they were transplanted into the rats, which have been made diabetic by streptozotocin. Pre-transplantation vitality of islet cells was evaluated by fluorescence microscope using fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodine (PI). Islet morphology was evaluated following sacrifice of all rats in the experiment group 30 days after the transplantation. Better glycemic control was provided with simultaneous transplantation of islet and pancreatic mesenchymal stem cells. Moreover, the mean number of islet cells in the pancreas was found higher.

The present study corroborates that simultaneous transplantation of islet cells and pancreatic mesenchymal cells both improves the microenvironment of MSCs particularly in the pancreas and encourages expansion of endogenous pancreatic stem cells.

VIII. KAYNAKLAR

1. Larsen CE, Alper CA. The genetics of HLA-associated disease. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(5):660.
2. DCCT. 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* 1993; 329: 977–986.
3. Sutherland DE, Gruessner RW, Gruessner AC. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. *World J Surg.* 2001;25(4):487
4. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000; 343(4):230.
5. Figliuzzi M, Cornolti R, Perico N, Rota C, Morigi M, Remuzzi G, Remuzzi A, Benigni A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve islet graft function in diabetic rats. *Transplant Proc.* 2009 Jun;41(5):1797-800.
6. P. Fiorin, A. M. J. Shapiro, C. Ricordi and A. Secchi. The Clinical Impact of Islet Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2008; 8: 1990–1997
7. Hirohito Ichii Æ Camillo Ricordi. Current status of islet cell transplantation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* (2009) 16:101–112
8. Edlund H. Pancreatic organogenesis – developmental mechanisms and implications for therapy. *Nat Rev Genet* 2002. 3:524-532.
9. Zaret KS, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 2008. 322:1490-1494.
10. Zaret KS. Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet* 2008. 9:329-340.
11. Gu G, Brown JR, Melton DA. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during Mouse embryogenesis. *Mech Dev* 2003. 120:35-43
12. Noguchi H. Pancreatic Stem/Progenitor Cells for the Treatment of Diabetes. *The Review of Diabetic Studies* Vol. 7, No. 2, 2010
13. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002. 129:2447-2457
14. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, Mac-Donald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002. 32:128-134

15. Wright CV, Schnegelsberg P, De Robertis EM. XIHbox 8: a novel *Xenopus* homeo protein restricted to a narrow band of endoderm. *Development* 1989. 105:787-794
16. Jonsson J, Ahlgren U, Edlund T, Edlund H. IPF1, a homeodomain protein with a dual function in pancreas development. *Int J Dev Biol* 1995. 39:789-798
17. Fujitani Y, Fujitani S, Boyer DF, Gannon M, Kawaguchi Y, Ray M, Shiota M, Stein RW, Magnuson MA, Wright CV. Targeted deletion of a cis-regulatory region reveals differential gene dosage requirements for Pdx1 in foregut organ differentiation and pancreas formation. *Genes Dev* 2006. 20:253-266
18. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin promoter factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994. 371:606-609.
19. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, Hogan BL, Wright CV. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996. 122:983-995.
20. Stoffers DA, Zinkin NT, Stanojevic V, Clarke WL, Habener JF. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human IPF1 gene coding sequence. *Nat Genet* 1997. 15:106-110.
21. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002. 32:128-134.
22. Krapp A, Knöfler M, Frutiger S, Hughes GJ, Hagenbüchle O, Wellauer PK. The p48 DNA-binding subunit of transcription factor PTF1 is a new exocrine pancreas specific basic helix-loop-helix protein. *EMBO J* 1996. 15:4317-4329.
23. Krapp A, Knöfler M, Ledermann B, Bürki K, Berney C, Zoerkler N, Hagenbüchle O, Wellauer PK. The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes Dev* 1998. 12:3752-3763.
24. Sellick GS, Barker KT, Stolte-Dijkstra I, Fleischmann C, Coleman RJ, Garrett C, Gloyn AL, Edghill EL, Hattersley AT, Wellauer PK, Goodwin G, Houlston RS. Mutations in PTF1A cause pancreatic and cerebellar agenesis. *Nat Genet* 2004. 36:1301-1305
25. Apelqvist A, Li H, Sommer L, Beatus P, Anderson DJ, Honjo T, Hrabe de Angelis M, Lendahl U, Edlund H. Notch signalling controls pancreatic cell differentiation *Nature* 1999. 400:877-8781.
26. Jensen J, Pedersen EE, Galante P, Hald J, Heller RS, Ishibashi M, Kageyama R, Guillemot F, Serup P, Madsen OD. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet* 2000. 24:36-44.

27. Nakhai H, Siveke JT, Klein B, Mendoza-Torres L, Mazur PK, Algül H, Radtke F, Strobl L, Zimmer- Strobl U, Schmid RM. Conditional ablation of Notch signaling in pancreatic development. *Development* 2008. 135:2757-2765.
28. Gradwohl G, Dierich A, LeMeur M, Guillemot F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. 97:1607-1611
29. Huang HP, Liu M, El-Hodiri HM, Chu K, Jamrich M, Tsai MJ. Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. *Mol Cell Biol* 2000. 20:3292-3307
30. İmamoğlu Ş 2006 Tip 1 Diabetes Mellitus'ta İnsülin Tedavisi. Ed. İmamoğlu Ş. *Diabetes Mellitus* s 69-78
31. Skyler, JS 2007“Adacık hücresinin Anatomi, Embriyoloji ve Fizyolojisi”, *Atlas of Diabetes*: 8
32. Orci, L, Ravazzola M., Amherdt M, Madsen O, Vassalli J.D, Perrelet A 1985 Direct identification of prohormone conversion site in insulin secreting cell. *Cell*. 42:671-681
33. Guest P.C, Bailyes E.M, Rutherford N.G, Hutton J.C 1991 İnsülin secretory granule biogenesis. *Biochem J* , 274:73-78
34. Yasuda K, Yamada Y, Inagaki N, et al. Expression of GLUT1 and GLUT2 glucose transporter isoforms in rat islets of Langerhans and their regulation by glucose. *Diabetes* 1992; 41:76.
35. Goodner CJ, Walike BC, Koerker DJ, et al. Insulin, glucagon, and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys. *Science* 1977; 195:177.
36. Bingley PJ, Matthews DR, Williams AJ, et al. Loss of regular oscillatory insulin secretion in islet cell antibody positive non-diabetic subjects. *Diabetologia* 1992; 35:32.
37. David MN, Enrico C, Philip F, Lawrence AF 2001 Diabetes Mellitus. In: *Endocrinology and Metabolism*: McGraw-Hill Companies. p. 827-926.
38. Poggioli R, Faradji R. N, Ponte G, Betancourt A, Messinger S, Baidal D. A, FroudT, Ricordi C, Alejandro R 2006 Quality of life after islet transplantation. *Am. J. Transplant*. 6:371-78
39. Brown H, Sanger F, Kitai R 1955 The structure of pig and sheep insulins. *Biochem.J*. 60:556-65.
40. Ryle AP, Sanger F, Smith LF, Kitai R 1955 The disulphide bonds of insulin. *Biochem.J*. 60:541-56.
41. Sanger F, Smith LF, Kitai R 1954 The disulphide bridges of insulin. *Process Biochem*. 58(330th Meeting):vi-vii.

42. Sanger F, Thompson EO, Kitai R 1955 The amide groups of insulin. *Biochem.J.* 59:509-18.
43. Sanger F, Tuppy H 1951 The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. 2. The investigation of peptides from enzymic hydrolysates. *Biochem.J.* 49:481-90.
44. Sanger F, Tuppy H 1951 The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem.J.* 49:463-81.
45. Bell GI, Pictet RL, Rutter WJ, Cordell B, Tischler E, Goodman HM 1980 Sequence of the human insulin gene. *Nature* 284:26-32.
46. Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı tedavi izlem klavuzu-2011. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Derneği
47. Diagnosis and classification of diabetes mellitus 2010 *Diabetes Care.* 33:62-9
48. American Diabetes Association 2012 Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 35:64–S71
49. Insa S. Schroeder Potential of Pluripotent Stem Cells for Diabetes Therapy. *Curr Diab Rep* DOI 10.1007/s11892-012-0292-5 (www.idf.org, accessed 2012-04-22)
50. Anja Richter, MD, Susan M. Lerner, MD, and Bernd Schröppel, MD. Curing Diabetes With Transplantation? *Mount Sinai Journal of Medicine* 79:267–275, 2012
51. Forlenza GP, Rewers M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011; 18: 248–251
52. İ Satman ve TURDEP Çalışma Grubu. TURDEP-II, 2011
53. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *New Engl J Med.* 1986;314(21):1360-8
54. Ryan M. Jamiolkowski, lucie Y. Guo, Yun Rose li, Sydney M. Shaffer, Ali Naji. Islet Transplantation in Type I Diabetes Mellitus. *Yale Journal of Biology and Medicine* 85 (2012), pp.37-43.
55. McCulloch DK, Palmer JP. The appropriate use of B-cell function testing in the preclinical period of type 1 diabetes. *Diabet Med* 1991; 8:800.
56. Smyth DJ, Cooper JD, Bailey R, et al. A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region. *Nat Genet* 2006; 38:617.
57. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447:661.

58. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39:857.
59. Hakonarson H, Grant SF, Bradfield JP, et al. A genome-wide association study identifies KIAA0350 as a type 1 diabetes gene. *Nature* 2007; 448:591.
60. Lowe CE, Cooper JD, Brusko T, et al. Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet* 2007; 39:1074.
61. Concannon P, Onengut-Gumuscu S, Todd JA, et al. A human type 1 diabetes susceptibility locus maps to chromosome 21q22.3. *Diabetes* 2008; 57:2858.
62. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360:1646
63. Cooper JD, Smyth DJ, Smiles AM, et al. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nat Genet* 2008; 40:1399
64. Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature* 1994; 371:130.
65. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* 1996; 85:291.
66. Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1984; 33:176.
67. Barratt BJ, Payne F, Lowe CE, et al. Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53:1884.
68. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 2004; 36:337.
69. Smyth D, Cooper JD, Collins JE, et al. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 2004; 53:3020.
70. Kavvoura FK, Ioannidis JP. CTLA-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes mellitus: a HuGE Review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2005; 162:3.
71. Kolb H. Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3:751.
72. Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest* 1997; 99:469.
73. Powers Alvin C. Diabetes mellitus. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th edition

74. Boitard C. The differentiation of the immune system towards anti-islet autoimmunity. Clinical prospects. *Diabetologia* 1992; 35:1101.
75. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 331:1428.
76. Nakayama M, Abiru N, Moriyama H, et al. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 2005; 435:220.
77. Boitard C. The differentiation of the immune system towards anti-islet autoimmunity. Clinical prospects. *Diabetologia* 1992; 35:1101.
78. Krishnamurthy B, Dudek NL, McKenzie MD, et al. Responses against islet antigens in NOD mice are prevented by tolerance to proinsulin but not IGRP. *J Clin Invest* 2006; 116:3258.
79. Vehik K, Hamman RF, Lezotte D, et al. Increasing incidence of type 1 diabetes in 0- to 17-year-old Colorado youth. *Diabetes Care* 2007; 30:503.
80. Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 2002; 51:3353.
81. Escobar O, Becker D.J, Drash A.L 2003 Manangment of the Child with Diabetes. In:Lifshitz F, (eds). *Pediatric Endocrinology*. 4 edition. New York (USA): Marcel Dekker. p.653-67
82. Ang LP, Do TP, Thein ZM, Reza HM, Tan XW, Yap C, Tan DT, Beuerman RW 2011 Ex Vivo Expansion of Conjunctival and Limbal Epithelial Cells Using Cord Blood Serum Supplemented Culture Medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 52:6138-47
83. Krinsley JS, Schultz MJ, Spronk PE, Harmsen RE, van Braam Houckgeest F, van der Sluijs JP, et al. Mild hypoglycemia is independently associated with increased mortality in the critically ill. *Crit Care*. 2011;15(4):R173.
84. Atkinson MA, Eisenbarth GS 2001 Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 358:221–985. Daneman D 2006 Type 1 diabetes. *Lancet* 367:847–858
86. Cryer PE. Mechanisms of Hypoglycemia-Associated Autonomic Failure and Its Component Syndromes in Diabetes. *Diabetes*. 2005;54(12):3592-601
87. Cryer PE. The barrier of hypoglycemia in diabetes. *Diabetes*. 2008;57(12):3169-76.
88. Michael McCall and A.M. James Shapiro Update on Islet Transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a007823
89. Kelly WD, Lillehei RC, Merkel FK, Idezuki Y, Goetz FC. Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. *Surgery*. 1967;61(6):827-37.

90. Nathan DM. Isolated Pancreas Transplantation for Type 1 Diabetes. *JAMA*. 2003;290(21):2861-3.
91. Venstrom JM, McBride MA, Rother KI, Hirshberg B, Orchard TJ, Harlan DM. Survival After Pancreas Transplantation in Patients With Diabetes and Preserved Kidney Function. *JAMA*. 2003;290(21):2817-23
92. Ugo Boggi, Fabio Vistoli, Francesca Maria Egidi, Piero Marchetti, Nelide De Lio, Vittorio Perrone, Fabio Caniglia, Stefano Signori, Massimiliano Barsotti, Matteo Bernini, Margherita Occhipinti, Daniele Focosi, Gabriella Amorese. Transplantation of the Pancreas. *Curr Diab Rep*. 2012
93. Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 2004;114(7):877-83
94. Ballinger WF, Lacy PE. Transplantation of intact pancreatic islets in rats. *Surgery*. 1972;72(2):175-86
95. Reckard CR, Barker CF. Transplantation of isolated pancreatic islets across strong and weak histocompatibility barriers. *Transplant Proc*. 1973;5(1):761-3.
96. Kemp CB, Knight MJ, Scharp DW, Lacy PE, Ballinger WF. Transplantation of isolated pancreatic islets into the portal vein of diabetic rats. *Nature*. 1973;244(5416):447.
97. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 1988;37(4):413-20
98. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *New Engl J Med*. 2000;343(4):230-8
99. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, Bigam D, Alfadhli E, Kneteman NM, et al. Five-Year Follow- Up After Clinical Islet Transplantation. *Diabetes*. 2005;54(7):2060-9.
100. Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ et al 2006 International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 355:1318–30
101. Langer R 2010 Islet transplantation: lessons learned since the Edmonton breakthrough. *Transplant Proc*. 42:1421–24
102. Fiorina P, Gremizzi C, Maffi P, Caldara R, Tavano D, Monti L, et al. 2005 Islet transplantation is associated with an improvement of cardiovascular function in type 1 diabetic kidney transplant patients. *Diabetes Care*. 28:1358-65.
103. Harlan DM, Kenyon NS, Korsgren O, Roep BO 2009 Current advances and travails in islet transplantation. *Diabetes*. 58:2175-84.

104. Warnock GL, Thompson DM, Meloche RM, Shapiro RJ, Ao Z, Keown P, et al. 2008 A multi-year analysis of islet transplantation compared with intensive medical therapy on progression of complications in type 1 diabetes. *Transplantation*. 86:1762-.
105. Campbell P, Senior P, Salam A, LaBranche K, Bigam D, Kneteman N, et al. 2007 High risk of sensitization after failed islet transplantation. *Am J Transplant*. 7:2311-7.
106. Robertson RP 2010 Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass. *Diabetes* 59:1285-91.
107. Khan MH, Harlan DM 2009 Counterpoint: clinical islet transplantation: not ready for prime time. *Diabetes Care*. 32:1570-4.
108. Pittenger M.F, Mackay A.M, Beck S.C, Jaiswal R.K, Douglas R, Mosca J.D, Moorman M.A, Simonetti D.W, Craig S, Marshak D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147, 1999
109. Minguell JJ, Erices A, Conget P. *Experimental Biology and Medicine*, 226(6), 507-520, 2001
110. Uçkan Çetinkaya D. 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, S8-14
111. Telford Y. Yeung, Karen L. Seeberger, Tatsuya Kin, Adetola Adesida, Nadr Jomha, A. M. James Shapiro, Gregory S. Korbutt Human Mesenchymal Stem Cells Protect Human Islets from Pro-Inflammatory Cytokines. *PLoS ONE* May 2012 volume 7 Issue 5
112. Fang-Xu Jiang & Grant Morahan. Pancreatic Stem Cells: From Possible to Probable. *Stem Cell Rev and Rep* (2012) 8:647–657
113. S.D. Rivas-Carrillo, J. Kanamune, Y. Iwanaga, S. Uemoto, A. Daneri-Navarro, and J.D. Rivas-Carrillo. Endothelial Cells Promote Pancreatic Stem Cell Activation During Islet Regeneration in Mice. *Transplantation Proceedings*, 43, 3209–3211 (2011)
114. Takeda Y et al 1998 Protection of islet allografts transplanted together with Fas ligand expressing testicular allografts. *Diabetologia*. 41(3): p. 315-21
115. CL. Rackham, PC. Chagastelles, NB. Nardi, C. Hauge-Evans, PM. Jones, AJF King. Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* (2011) 54:1127–1135
116. Ryan T Wagner, Jennifer Lewis, Austin Cooney, Lawrence Chan. Stem cell approaches for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Transl Res*. 2010 September ; 156(3): 169–179.

117. Solari MG, Srinivasan S, Boumaza I et al (2009) Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes long-term islet allograft survival and sustained normoglycemia. *J Autoimmun* 32:116–124
118. Park KS, Kim YS, Kim JH et al (2009) Influence of human allogenic bone marrow and cord blood-derived mesenchymal stem cell secreting trophic factors on ATP (adenosine-5'-triphosphate)/ ADP (adenosine-5'-diphosphate) ratio and insulin secretory function of isolated human islets from cadaveric donor. *Transplant Proc* 41:3813–3818
119. Longoni B, Szilagyi E, Quaranta P et al (2010) Mesenchymal stem cells prevent acute rejection and prolong graft function in pancreatic islet transplantation. *Diabetes Technol Ther* 12:435–446
120. Berman DM, Willman MA, Han D et al (2010) Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates. *Diabetes* 59:2558–2568
121. Ding Y, Xu D, Feng G, Bushell A, Muschel RJ, Wood KJ (2009) Mesenchymal stem cells prevent the rejection of fully allogenic islet grafts by the immunosuppressive activity of matrix metalloproteinase-2 and -9. *Diabetes* 58:1797–1806
122. Si Y, Zhao Y, Hao H, Liu J, Guo Y, Mu Y, Shen J, Cheng Y, Fu X, Han W. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes*. 2012 Jun;61(6):1616-25.