ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİYABETES MELLİTUS'TA BOZULMUŞ OVER FONKSİYONLARININ TEDAVİSİNDE FARKLI KÖK HÜCRE KAYNAKLARININ ETKİSİ

Eda TUNÇ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2020

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİYABETES MELLİTUS'TA BOZULMUŞ OVER FONKSİYONLARININ TEDAVİSİNDE FARKLI KÖK HÜCRE KAYNAKLARININ ETKİSİ

Eda TUNÇ

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Eş-danışman: Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI

Diyabetes mellitus (DM), pankreastaki insülin üretiminde, insülin salgılanmasında veya her ikisinde de meydana gelen bozukluklar nedeniyle ortaya çıkan metabolik bir rahatsızlıktır. İlerleyen zamanlarda akut ve kronik komplikasyonlara yol açabilen bu hastalığın komlikasyonlarından biri de bozulmuş over fonksiyonlarıdır.

Bu çalışmada, kolay izole edilmeleri ve epitel hücrelere farklılaşabilmeleri sebebiyle mezenkimal kök hücreler (MKH) kullanılarak diyabetli sıçanların over fonksiyonlarının iyileştirilmesi amaçlandı. Bu amaçla 50 adet Sprague-Dawley dişi sıçan kullanılarak her grupta 8 sıçan olacak şekilde toplam 5 grup oluşturuldu. Gruplar; Kontrol grubu, streptozotosin (STZ) verilerek diyabet edilen grup, STZ + ovaryum kökenli MKH verilen grup, STZ + endometrium kökenli MKH verilen grup, STZ + kemik iliği kökenli MKH verilen gruplar olarak belirlendi. 32 adet sıçana 45 mg/kg STZ intraperitoneal yolla verilerek 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde kan glukoz değerleri 200-250 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi. 6 hafta boyunca takip edilen diyabetli sıçanların 72. Saat, 3.hafta ve 6. haftada sabah ve akşam kan şekerleri ve ağırlıkları ölçülerek kaydedildi. Kök hücre eldesi için; sağlıklı sıçanlardan ovaryum, endometrium ve kemik iliği dokuları alınarak kök hücre izolasyonu yapıldı. Kültüre edilen hücreler yeterli sayıya ulaşınca, monoklonal antikorlarla işaretlendi ve flow sitometri cihazında karakterizasyon işlemi yapıldı. Tanımlanan mezenkimal kök hücreler BrdU ile boyanarak diyabet yapılmış sıçanlara 3. haftanın sonunda endometrium kanalından overe 2.10^6/ ml PBS hücre olacak şekilde 1ml'lik hücre enjekte edildi.

6. haftanın sonunda sıçanların batınları açılarak, over dokuları çıkarılıp %4 'lük formaldehit ile fikse edildi. Takip işlemlerinden sonra dokulardan kesitler alınarak histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelemeler yapıldı. Sonuç olarak diyabetin ovaryum dokusunda hasara yol açtığı, folikül yapılarında defektlere neden olduğu gözlemlendi. Çeşitli kök hücre kaynaklarının over hasarını onarmada etkin olabileceği, çalışmamızda yer alan kemik iliği ve over kaynaklı mezenkimal kök hücrenin de bu hücresel tedavi ürünlerinden olabileceği görüldü.

Şubat 2020, 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: Diyabetes mellitus, ovaryum, mezenkimal kök hücre, flow sitometri, sıçan

ABSTRACT

Master Thesis

THE EFFECT OF DIFFERENT STEM CELL SOURCES ON THE TREATMENT OF IMPAIRED OVARIAN FUNCTIONS IN DIABETES MELLITUS

Eda TUNÇ

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Co-supervisor: Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder caused by defects in insulin production in the pancreas, insulin secretion, or both. One of the complications of this disease, which can lead to acute and chronic complications in the future, is impaired ovarian functions.

In this study, it was aimed to improve the ovarian functions of diabetic rats by using mesenchymal stem cells (MSCs) because of their easy isolation and differentiation into epithelial cells. For this purpose, a total of 5 groups with 8 rats in each group were formed using 50 Sprague-Dawley female rats. Groups; The control group was determined as the diabetic group with streptozotocin (STZ), the STZ + ovarian-derived MSCs, the STZ + endometrial-derived MSCs, and the STZ + bone marrow-derived MSCs. After intraperitoneal administration of 45 mg / kg STZ to 32 rats, rats with blood glucose values of 200-250 mg / dl and above in blood samples taken from the tail vein after 72 hours were accepted as diabetes. Diabetic rats were followed for 6 weeks, and their blood sugars and weights were measured and recorded at 72 hours, 3 weeks and 6 weeks. To obtain stem cells; Stem cell isolation was performed by taking ovarian, endometrium and bone marrow tissues from healthy rats. When the cultured cells reached a sufficient number, they were marked with monoclonal antibodies and characterization was performed on a flow cytometry device. The identified mesenchymal stem cells were stained with BrdU and diabetic rats were injected with 1ml of cells from the endometrial canal to the ovary at the end of the 3rd week, as 2.106 / ml PBS cells.

At the end of the 6th week, the abdomen of the rats were opened, ovarian tissues were removed and fixed with 4% formaldehyde. After follow-up, sections were taken from the tissues and histopathological and immunohistochemical examinations were performed. As a result, it was observed that diabetes caused damage to the ovarian tissue and caused defects in the follicle structures. It was observed that various stem cell sources may be effective in repairing ovarian damage, and bone marrow and ovarian mesenchymal stem cells in our study may also be among these cellular treatment products

February 2020, 62 pages

Key Words: Diabetes mellitus, ovarian, mesenchymal stem cell, flow cytometry, rat

.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında değerli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan ve ayrıca deneyimlerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Özlem YILDIRIM ve Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof.Dr. Candan ÖZOĞUL'a, Arş. Gör. Dr. Gülistan Sanem SARIBAŞ'a ve Uzm. Bio. Meral TİRYAKİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, maddi manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme de sonsuz teşekkürler ederim.

Eda TUNÇ
Ankara, Şubat 2020

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI
ETİK i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR iv
SİMGELER DİZİNİ vii
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 3
2.1 Diyabetes Mellitus 3
2.2 Diyabet Mellitus'un Epidemiyolojisi 3
2.3 Diyabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri 4
2.4 Diyabetes Mellitus' un Sınıflandırılması 6
2.4.1 Tip 1 diyabetes mellitus 6
2.4.2 Tip 2 diyabetes mellitus 6
2.4.3 Gestasyonel diyabetes mellitus 7
2.4.4 Diğer spesifik diyabet türleri 8
2.5 Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları 9
2.6 Diyabetes Mellitus'un Üreme Sistemine Etkileri 10
2.6.1 Diyabetes mellitus'un over fonksiyonları üzerine etkileri 11
2.7 Diyabetes Mellitus'un Tedavisi 13
2.7.1 Diyabetes mellitus'un tedavisinde kök hücreler 14
2.8 Kök Hücre 15
2.8.1 Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler 15
2.8.1.1 Totipotent hücre 15
2.8.1.2 Pluripotent hücre 15
2.8.1.3 Multipotent hücre 15
2.8.2 Elde edildikleri yere göre 16
2.8.2.1 Embriyonik kök hücre 16
2.8.2.2 Erişkin Kök Hücreler 16
2.9 Kök Hücrelerin Etki Mekanizması 16
2.10 İnfertilite 17
2.10.1 İnfertilite tedavisinde kök hücreler 18
3. MATERYAL ve YÖNTEM 19
3.1 Materyal 21
3.1.1 Ovaryum dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu 21
3.1.2 Endometriyum okusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu 21
3.1.3 Kemik iliği dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu 22
3.2 Yöntem 23
3.2.1 Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu 23
3.2.1.1 Akım Sitometri Cihazı ile Tanımlamada Kullanılan Yöntem 24
3.2.1.2 Mezenkimal Kök Hücrenin Farklılaşma Çalışmaları 24
3.2.2 Mezenkimal kök hücre Brdu boyama metodu 25
3.2.3 Işık mikroskobik yöntem 25

3.2.4 İmmunohistokimyasal analizler **26**
3.2.5 İstatistiksel analizler **27**
3.2.6 Folikül sayım ve immünpozitiflik belirleme yöntemi **27**
4. ARAŞTIRMANIN BULGULARI **28**
4.1 Deney Hayvanlarına Ait Bulgular **28**
4.2 AKIM Sitometri Yöntemi ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması **33**
4.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Üç Farklı Hücre Tipine Dönüşümü **34**
4.4 BRDU Boyama Sonuçları **34**
4.5 Hematoksilen-Eosin Boyanma Sonuçları **37**
4.5.1 Kontrol grubu **37**
4.5.2 Diyabet grubu **39**
4.5.3 Diyabet+Ovaryum grubu **40**
4.5.4 Diyabet+Endometriyum Grubu **42**
4.5.5 Diyabet+Kemik İliği Grubu **44**
4.6 İmmünohistokimyasal Boyanma Sonuçları **46**
4.7 Folikül Sayım Sonuçları **49**
5.TARTIŞMA ve SONUÇ **51**
KAYNAKLAR **56**
EKLER **61**
ÖZGEÇMİŞ **62**

SİMGELER DİZİNİ

BrdU	Bromodeoksiüridin
dl	desilitre
kg	kilogram
mg	miligram
ml	mililitre
Pen-Strep-Amp B	Penisilin, Streptomisin, Amfoterisin B

Kısaltmalar

ADA	Amerikan Diyabet Birliği
AF	Antral Folikül
DAB	Diaminobenzedin
DM	Diyabetes Mellitus
DMEM	Dulbecco's Modifed Eagle's Medium (Hücre Kültürü Besiyeri)
DMSO	Dimetil sulfoksit
ED	Erektil Disfonksiyon
END+MKH	Endometrium Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
FBS	Fetal Sığır Serumu
GDM	Gestasyonel Diyabetes Mellitus
GeF	Gerileyen Graff Folikül
GF	Graff Folikül
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
H&E	Hematoksilen-Eozin Boyama
HbA1C	Glikozillenmiş Hemoglobin
HBSS	Hanks dengeli tuz çözeltisi
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropini
IFG	Bozulmuş Açlık Glukozu
IGT	Bozulmuş Glukoz Toleransı
Kİ+MKH	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
MF	Matur Folikül
MKH	Mezankimal Kök Hücre
OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
OV+MKH	Over Kökenli Mezenkimal Kök Hücre
PBS	Fosfat tamponlu salin
PKOS	Polikistik Over Sendromu
STZ	Streptozotosin
TURDEP	Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Tip 1 Diyabet'in Over Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi..... 12

Şekil 2.2 Kemik iliği Kaynaklı Hücreler ve Mezenkimal hücrelerin doku hasarında görev almasI..... 17

Şekil 4.1 Sıçan over, endometrium ve kemik iliği hücrelerinin Mezenkimal Kök Hücrelere farklılaşmasının Akım Sitometri cihazında Histogram Grafiği ile gösterilmesi [CD45 (-) , CD11b/c (-), CD44(+), CD90(+)]..... 33

Şekil 4.2 Sıçan over, endometrial ve kemik iliği kökenli MKH'nin A) Oil-red boyası ile Adiposit dönüşümünün gösterilmesi (Leica D1000, 60X10), B) Alcian Blue boyası ile Kondrosit dönüşümünün gösterilmesi (Leica D1000, 20X10), C) Von Kossa boyası ile Osteosit dönüşümünün gösterilmesi (Leica D1000, 4X10)..... 34

Şekil 4.3 BrdU boyama kontrol grubu..... 35

Şekil 4.4 BrdU boyama DM grubu..... 35

Şekil 4.5 BrdU boyama DM+Ov grubu..... 35

Şekil 4.6 BrdU boyama DM+End grubu..... 36

Şekil 4.7 BrdU boyama DM+Ki grubu..... 36

Şekil 4.8 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve primordial foliküller..... 37

Şekil 4.9 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve unilaminer primer foliküller..... 37

Şekil 4.10 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve antral foliküller..... 38

Şekil 4.11 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve graff folikülleri..... 38

Şekil 4.12 Diyabet grubunda küçük ve büyük büyültmelerde dejeneratif foliküller..... 39

Şekil 4.13 Diyabet grubunda küçük ve büyük büyültmelerde çok sayıda dejeneratif dilate vasküler yapılar..... 39

Şekil 4.14 Diyabet grubunda irregular dejenere graff folikülleri..... 40

Şekil 4.15 Diyabet grubunda büyük büyültmede çok sayıda dejeneratif erken foliküller..... 40

Şekil 4.16 DM+OV grubunda matur (MF) ve gerileyen (GeF) graff folikülleri 41

Şekil 4.17 DM+OV grubunda primordial foliküller 41

Şekil 4.18 DM+OV grubunda antral folikül 42

Şekil 4.19 DM+END grubunda küçük büyültmede over dokusu 43

Şekil 4.20 DM+END grubunda primordial folikül 43

Şekil 4.21 DM+END grubunda büyük büyültmede dilate alanlar 44

Şekil 4.22 DM+Kİ grubunda küçük büyültmede ovaryum dokusu 45

Şekil 4.23 DM+Kİ grubunda büyük büyültmede antral ve primer foliküller 45

Şekil 4.24 DM+Kİ grubunda büyük büyültmede graff folikülü (GF) ve primer foliküller..... 46

Şekil 4.25 Kontrol grubunda VEGF immün tutulumu..... 46

Şekil 4.26 Diyabet grubunda VEGF immün tutulumu..... 47

Şekil 4.27 Diyabet+ovaryum stromal kök hücre grubunda VEGF immün tutulumu 47

Şekil 4.28 Diyabet+endometriyum kök hücre grubunda VEGF immün tutulumu 48

Şekil 4.29 Diyabet+kemik iliği grubunda VEGF immün tutulumu..... 48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Diyabetes mellitus ve glikoz metabolizmasının diğer bozuklukları 5

Çizelge 2.2 ADA ve WHO'ya göre GDM tanı kriterleri 7

Çizelge 2.3 Diyabetes Mellitus sınıflandırılması 8

Çizelge 3.1 Gereç ve yöntemin şeması 20

Çizelge 4.1 STZ öncesi ağırlık ölçümleri 28

Çizelge 4.2 STZ uygulandıktan 72 saat sonra tespit edilen ağırlık ölçümleri 28

Çizelge 4.3 STZ uygulandıktan 3 hafta sonra tespit edilen ağırlık ölçümleri..... 29

Çizelge 4.4 STZ uygulandıktan 6 hafta sonra tespit edilen ağırlık ölçümleri..... 29

Çizelge 4.5 Sıçanların ağırlık ölçümleri..... 30

Çizelge 4.6 STZ uygulandıktan 72 saat sonra tespit edilen şeker ölçümleri 31

Çizelge 4.7 STZ uygulandıktan 3 hafta sonra tespit edilen şeker ölçümleri..... 31

Çizelge 4.8 STZ uygulandıktan 6 hafta sonra tespit edilen şeker ölçümleri..... 32

Çizelge 4.9 Sıçanların kan şekeri ölçümleri..... 33

Çizelge 4.10 ROC Eğrisi Analizi Sonuçları..... 53

1. GİRİŞ

Diyabetes Mellitus (DM), insülin eksikliği veya etkisizliği sonucu ortaya çıkan hiperglisemi,ile karakterize; karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında aksaklık ve arterioskleroz gibi ciddi komplikasyonlara neden olan kronik metabolik bir hastalıktır (Garber 1994). İlerleyen zamanlarda akut ve kronik komplikasyonlara yol açabilmektedir. Aynı zamanda tip 1 diyabete sahip kadınlarda polikistik over sendromunun arttığı, tip 1 diyabetik kadınların diyabetik olmayan kadınlara göre daha önce menopoza girdiği ve menstrüel bozuklukların bu kişilerde daha çok görüldüğü bilinmektedir (Zarzycki ve Magdalena 2005). Bu durum bazen infertilite ile sonuçlanmaktadır.

Bir yılın sonunda düzenli cinsel hayata sahip üreme dönemindeki bir çiftte doğum kontrol yollarını kullanmadan gebeliğin gerçekleşmemesi durumuna infertilite denir (Kırca ve Pasinlioğlu 2013). Üreme işlevinin sorunsuz olarak gerçekleşmesi için kadınlarda ve erkeklerde anatomik, fizyolojik ve hormonal tüm sistemlerin bir bütünlük içinde çalışması gerekmektedir. Aşılama ve tüp bebek yöntemi, en çok bilinen fertilite tedavilerindendir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla kök hücrelerin de infertilite tedavisinde kullanılabileceği görülmüştür.

Kök hücreler, kendini yenileyebilme yeteneği olan ve uzun süre bölünebilen, vücudumuzda var olan farklı ve farklı görevlere sahip dokuları oluşturabilen hücrelerdir (Cheung ve Rando 2013). Kök hücrelerin yüzeyinde bulunan belirteçler sayesinde kök hücre türleri belirlenmektedir (Weissman 2000). Vücuttaki kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılır. Embriyonik kök hücreler blastomer evresindeki iç hücre hattından elde edilirler. Embiyonik kök hücreler tüm hücre tiplerine farklılaşabilme gibi kendilerine özgü özellikleri bünyelerinde bulundurdukları için *in vitro*'da elverişli koşullarda farklılaşması istenilen yönde indüklenebilirler (National Institutes of Health 2004). Plasenta, göbek kordon kanı ve kemik iliği gibi yetişkin bireylerin daha pek çok dokularından da elde edilebilen kök hücreler ise; yetişkin kök hücreler olarak adlandırılırlar (Can 2014). Bu yetişkin kök hücre türlerinden hematopoetik ve mezenkimal kök hücre (MKH)'ler ise en çok tercih

edilen multipotent özellikteki erişkin kök hücre sınıfına girer (Tekeli vd. 2016). Rejeneratif ve reperatif tedavide mezenkimal kök hücre kullanımı günümüzde araştırmalarda geniş bir spektruma yayılmış durumdadır (Trounson vd. 2015, Kılıç vd. 2017).

Çalışmamızda; diyabetli sıçanlar üzerinde kök hücre terapisi uygulanarak bu sıçanların over fonksiyonlarının iyileştirilmesi, over rezervlerinin arttırılması ve tıpkı diyabet gibi tüm toplumlarda yaygın görülen ve diyabete bağlı olarak da artan infertilitenin toplumda görülme sıklığının azaltılabilmesi için yeni olanaklar sağlanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Diyabetes Mellitus

Diyabet, insülin salgılanması veya insülin etkisinden oluşmuş olan bozukluklardan dolayı ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir rahatsızlıktır (Uncu ve Ersun 2006). İlerleyici bir hastalık olması ile birlikte kontrol sağlanamadığında akut ve kronik komplikasyonlara neden olabilmektedir. Kanda glikozun olması gereken değerlerin üzerinde seyretmesi toksik etkilidir ve vücudun tüm hücrelerinde az veya çok çeşitli tahribatlara sebep olmaktadır. Bu tahribat yavaş olmakla beraber oldukça tehlikelidir (İmamoğlu 2009). Hipergliseminin doku ve organlar üzerinde zaman içinde oluşturacağı tahribat pek çok hastalığın kısa sürede oluşturduğu yıkıcı etkiden çok daha ileri düzeylerde olabilmektedir (Hatemi 1998). Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında defektler, hızlanmış arteriosklerozis ve kapiller membran değişiklikleri ile ilerleyen bir hastalıktır (Biberoğlu ve İlçin 2003). Diyabetes mellitus'un en çok görülen klinik semptomları polidipsi, polifaji ve poliüridir. Bazı hastalarda tam olarak anlaşılamayan nedenler yüzünden kilo kaybı, kimisinde kronik komplikasyonlardan kaynaklı problemler ortaya çıkabilir (Watkins vd. 1996). İnsüline bağımlı olan diyabet sık rastlanılan belirtiler ile tanınmaktadır. Ancak insüline bağımlı olmayan diyabet türünde bu belirtiler görülmeyebilir, bu durumlarda doğru tanı koymak için kan ve idrar testine bakmak gerekir.

2.2 Diyabet Mellitus'un Epidemiyolojisi

DM, tüm dünyada çok yaygın görülen kronik metabolik bir rahatsızlıktır. Dünyanın bazı kesimlerinde rastlanma oranı daha azdır. DM prevelansı Grönland ve Alaska yerlilerinde oldukça azdır. Amerika'da bulunan Pime Kızılderililerinde bu prevelans değeri %55 üzerinde olmakla beraber dünyadaki en yüksek prevelans bu kesimdedir (Tanyeri 1996). Bu değişkenlik genetik, davranışsal ve çevresel etmenlere bağlı olarak değişmektedir (Tanyeri 1996).

Toplumda diyabetli hasta sıklığının artması ile beraber yan etkilerde artmaktadır. Türkiye'de 1999 yılında, Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesinde (TURDEP) yaklaşık %7,2 diyabet prevelansı tespit edilmiştir. Diyabetli bireylerin çoğu Tip 2 diyabetlidir. Ülkemizdeki Tip 2 diyabet görülme oranı yaklaşık %2,5-6'civarındadır.

TURDEP sonuçları gösteriyor ki kentlerdeki diyabet oranı kırsal bölgelere göre daha fazladır (Satman vd. 2002). İnsülin salınımındaki defektler veya buna bağlı olarak direnç ortaya çıkması sonucunda bozulmuş açlık glukozu (IFG), bozulmuş glukoz toleransı (IGT) ve tip 2 Diabetes Mellitus (DM) meydana gelmektedir (Baytekin 2009). Bu iki kavram hastaların diyabet olmadan önce tanımlanmasında önemlidir. Çünkü sonra gelişebilecek diyabet ve diyabet kaynaklı rahatsızlıklar için tehlike olarak belirtilmişlerdir (Baytekin 2009). İkisinin birden bulunması daha büyük ihtimal risk faktörüdür (The DECODE Study Group 2001). Sanayileşmekte olan yerlerde Tip iki diyabet görülme sıklığı giderek artmaktadır (Satman vd. 2002).

Türkiye'de kayıtlı 1,6 milyon prediabetli insan, 2,6 milyon diyabetli insan vardır (Satman vd. 2002). Diyabetik insan popülasyonu; yaşlanma, fiziksel aktivite, kentleşme, nüfus artışı ve obesite prevelansının yükselmesinden dolayı artmaktadır (Wild vd. 2004).

2.3 Diyabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri

Son Amerikan Diyabet Birliği (ADA), Diabetes mellitus tanısı koymak için belirtilen kriterlerden birinin uymasının yeterli olduğunu bildirmiştir (ADA 2012). Bu kriterler:

1. Rastlantısal plazma glukozunun (PG) ≥200 mg/dl olması sonucunda aşağıdaki hastalık belirtileri görülebilir.

Polidipsi
Poliüri
Polifaji

2. Değişik zamanlarda ölçülen IFG değerinin ≥126 mg/dl olması,

3. Diyabet semptomları taşıyan kişilere verilen 75 gr'lık glukoz yüklemesinden (Oral Glukoz Tolerans Testi, OGTT) 2 saat sonra ölçülen PG ≥200 mg/dl çıkması,

4. Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1C) ≥ 0,065 olmasıdır.

Diyabet açısından yüksek riskli gruplar (WHO 1994**)** aşağıda belirtilmiştir;

- Birinci dereceden akrabalar (Özellikler Tip 2 Diyabetli kişilerde)
- Kalıtsal yükümlülük (aile içerisinde yoğun Tip 2 diyabetli varlığı)
- Hareketsiz bir yaşama sahip kişiler
- Daha önceden gebelik diyabeti saptanmış olan veya büyük çocuk doğurmuş olan kişiler
- Metabolik sendromlu kişiler
- Glikozürisi olan kişiler
- Diabetojenik ilaç kullanan kişiler.

Çizelge 2.1 Diyabetes mellitus ve glikoz metabolizmasının diğer bozuklukları (ADA 2003)

Diabetes mellitus (DM)	
Rastgele glikoz (+ diyabet semptomları)	≥200 mg/dl
AKG (en az 8 saatlik açlığı takiben)	≥126 mg/dl
OGTT 2. saat kan glikozu	≥200 mg/dl
Bozulmuş glikoz Toleransı (IGT)	
OGTT'de 2. saat kan glikozu	≥140 ve <200 mg/dl
Bozulmuş Açlık Glikozu (IFG)	
AKG (en 8 az saatlik açlığı takiben)	≥100 ve <126 mg/dl*

* 2006 WHO/IDF raporunda IGF 110-125 mg/dl olarak benimsenmiştir.

2.4 Diyabetes Mellitus' un Sınıflandırılması

Diyabet'in dört tip çeşidi vardır. Bunlar;

En çok rastlanan diyabet formları olan Tip 1, Tip 2, Gestasyonel diyabet ve diğer spesifik diyabet formları olarak bilinmektedir.

2.4.1 Tip 1 diyabetes mellitus

Pankreas beta adacık hücrelerinde otoimmün yıkım sonucunda insülin eksikliğinden dolayı oluşan diyabet tipi insüline bağımlı diyabet olarak adlandırılmıştır (Paronen vd. 2000, Couper 2001). Pankreatik beta hücrelerine karşı gelişen antikorlardan dolayı beta hücreleri tahribata uğrar ve dolaşımdaki insülin seviyesi azalır. Erken yaşlarda görülmeye başlar. Çocukluk çağının sık görülen kronik hastalıklardan biridir (Cotellessa 2003). Semptomlar birdenbire ortaya çıkar. Eğer insülin alınmazsa diyabetik ketoasidoza kadar ilerleyebilir. İnsüline bağımlı diyabetin nedenleri;

- Otoimmün Bileşenler
- Adacık hücre antijenlerine karşı gelişen antikorlar saptanır.
- Çevresel Faktörler
- İnsülin üreten pankreas beta hücrelerinin tahribatı

2.4.2 Tip 2 diyabetes mellitus

Bu diyabet türü, insülin direnciyle karakterize, insülin cevabındaki ve beta hücrelerindeki yetersizlik sonucu insülin salgılanması kusuruna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. İnsülin direnci; kas, karaciğer ve yağ dokusu gibi organ ve dokularda insüline duyarsızlık olarak tanımlanır (Işıldak vd. 2004). İnsülin direncinin görüldüğü kişiler obez, diyabetik olmayan bireyler ve tip 2 diyabete sahip insanlardır (Flier vd. 1992). Bu tip diyabette genetik olarak yatkınlık söz konusudur ve hastalık kendini geç belli eder. Tip 2 diyabetli hastaların çoğu (%85-95'i) bu gruba dahil olmaktadır. Genellikle 30 yaş sonrasında ortaya çıkmaktadır. Bu hastalığın sonucunda hiperglisemi

pek çok organda ciddi hasara hatta organ yetmezliğene neden olmaktadır (Lasaridis ve Sarafidis 2003). İnsüline bağımlı olmayan diyabetin nedenleri;

- Genetik Faktörler
- Obezite

2.4.3 Gestasyonel diyabetes mellitus

İlk kez gebelik döneminde tespit edilen ve gebelik sonlandığında kaybolan diyabet gestasyonel diyabet olarak tanımlanmıştır (ADA 2004). Gestasyonel diyabet tanısı için toplumda genellikle iki kademeli test yapılır. Birincisi yapılan 50 g glikozlu tarama testidir. Eğer sonuç pozitif çıkarsa daha sonra 100 g glikoz ile, 3 saat boyunca yapılan OGTT yapılmaktadır (Fajans vd. 2001). Hamileliğin 24-28. Haftalarında insülin salgısı artıp, bebek büyümesi hızlandığı için bu süre aralığında yapılan bu testlerde sınır değerlerinin üzerinde çıkan sonuçlar için gestasyonel diyabet tanısı konur. Bireylerin çoğunda doğumdan itibaren diyabet düzelmektedir. Ama sonraki yıllarda tekrar diyabetin ortaya çıkma ihtimali kuvvetlidir.

Çizelge 2.2 ADA ve WHO'ya göre GDM tanı kriterleri (ADA 2003)

	Açlık	1. saat	2.saat	3.saat
ADA kriterleri				
100 g glikoz ile OGTT	≥95	≥180	≥155	≥140
75 g glikoz ile OGTT	≥95	≥180	≥155	-
WHO kriterleri				
75 g glikoz ile OGTT	≥126	-	≥200	-

2.4.4 Diğer spesifik diyabet türleri

a. Beta hücrelerinin işlevlerinin genetik bozuklukları
b. İnsülinden etkilenen genetik dejenerasyonlar
c. Pankreas rahatsızlıkları
d. İç salgı bezlerindeki defektler
e. İlaç veya kimyevi öğelere bağlı
f. İnfeksiyonlar
g. İmmün aracılıklı diyabetin nadir formları

Çizelge 2.3 Diyabetes Mellitus sınıflandırılması (Atmaca 2012)

I. Tip 1 DM (Mutlak insülin eksikliğine yol açan beta hücre hasarı)
- A. Otoimmün
- B. İdyopatik

II. Tip 2 DM (İnsülin direncinin ön planda olduğu rölatif insülin eksikliği veya salınım defektinin ön planda olduğu insülin direnci)

III. Diğer özel tipler

- A. **Beta hücre fonksiyonunun genetik defektleri**
  1. MODY 3
  2. MODY 2
  3. MODY 1
  4. MODY 4
  5. MODY 5
  6. MODY 6
  7. Mitokondrial DNA
  8. Diğerleri
- B. **İnsülin etkisinde genetik defektler**
  1. Tip A insülin direnci
  2. Leprekonizm
  3. Rabson-Mendenhall sendromu
  4. Lipoatrofik diyabet
  5. Diğerleri
- C. **Egzokrin pankreas hastalıkları**
  1. Pankreatit
  2. Travma, pankreatektomi
  3. Neoplazi
  4. Kistik fibroz
  5. Hemokromatozis
  6. Fibrokalküloz pankreatopati
  7. Diğerleri
- D. **Endokrinopatiler**
  1. Akromegali
  2. Cushing sendromu
  3. Glukagonoma
  4. Feokromasitoma
  5. Hipertiroidizm
  6. Somatostatinoma
  7. Aldosteronoma
  8. Diğerleri
- E. **İlaç veya kimyasal madde ile indüklenen**
  1. Vakor
  2. Pentamidin
  3. Nikotinik asit
  4. Glukokortikoidler
  5. Tiroid hormonu
  6. Diazoksit
  7. Beta adrenerjik agonistler
  8. Tiazidler
  9. Fenitoin
  10. Alfa interferon
  11. Diğerleri
- F. **Enfeksiyonlar**
  1. Konjenital rubella
  2. Sitomegalovirüs
  3. Diğerleri
- G. **İmmün diyabetin nadir formları**
  1. Stiff-man sendromu
  2. Anti-insülin reseptör antikorları
  3. Diğerleri
- H. **Diyabetle ilişkili diğer genetik sendromlar**
  1. Down sendromu
  2. Klinefelter sendromu
  3. Turner sendromu
  4. Wolfram sendromu
  5. Friedreich ataksisi
  6. Huntington koresi
  7. Laurence-Moon-Biedl sendromu
  8. Miyotonik distrofi
  9. Porfiri
  10. Prader-Willi sendromu
  11. Diğerleri

IV. Gestasyonel DM

DM = diabetes mellitus
MODY = maturity onset diabetes of the young

İnsülin ve Etkileri

1922 yılında Banting ve Best tarafından izole edilen insülin pankreas beta hürelerinden sentezlenen, iki aminoasit zincirinden oluşan bir proteindir (Guyton vd. 2007). Karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmaları üzerinde önemli etkileri vardır. Hormonun az olması, yokluğu ya da yapısındaki bozukluktan dolayı diyabet hastalıkları ortaya çıkmaktadır.

İnsülin'in vücuttaki en büyük etkisi karbonhidratlar üzerinedir. Çünkü karbonhidrat içerikli besin alınımından sonra kana geçen glukoz, pankreastan hızlı bir şekilde insülin salınmasına sebep olur. İnsülin, glukozun karaciğer, kas ve yağ dokusu tarafından yakalanıp depolanmasını ve kullanılmasını sağlar. Kandaki glukoz seviyesi azalmaya başladığında, insülin salgılanması düşer. Karaciğer glikojeninin parçalanması sonucu serbest kalan glukoz, kan-glukoz yoğunluğunun düşmesini engellemek için kana geri bırakılır. İnsülin dolaşımda serbest halde bulunmaktadır ve plazmadaki ortalama yarı ömrü 5 dakika olduğundan 10-15 dakika içinde endositoz işlemleriyle dolaşımdan temizlenir. İnsülinin hedef hücredeki etkilerinin başlayabilmesi için önce zar reseptörüne bağlanması gerekir ve bundan sonraki süreci aktive olmuş bu reseptör oluşturur (Guyton vd. 2007). Diyabetli hastalarda protein sentez mekanizmasındaki bozukluktan kaynaklı görülen azalma, dokuların tükenmesine ve hücresel işlev aksaklıklarına sebep olmaktadır. Dolayısıyla insülin karbonhidrat metabolizması başta olmak üzere yağ ve protein metabolizmasını da etkilemektedir (Guyton vd. 2007).

2.5 Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Akut komplikasyonları genellikle hastanın koma durumuna girmesine neden olmaktadır.

Kronik komplikasyonları çoğunlukla şunlardır; retinopati, nefropati, ayak ülserleri, nöropati, gastrointestinal, seksüel disfonksion ve kardiyovasküler sendromlar görülmektedir

2.6 Diyabetes Mellitus'un Üreme Sistemine Etkileri

1980'lerin başında diyabet tanısı konulan kadınlarda cinsel disfonksiyonlar tanımlanmıştır. Bunlar; cinsel istek duyarsızlaşması, acı, vajinal lubrikasyon kaybı olarak sınıflanabilir (Tyrer vd. 1983). Cinsel disfonksiyonun sebepleri arasında hiperglisemi, infeksiyonlar, vasküler/nörolojik hasarlar ve hormonal bozukluklar gösterilebilir. Hiperglisemi vajinal mukozal bezlerinin salgılarını bozar ve disparoniye neden olmaktadır (Meeking vd. 2013). Globülin hormonlarındaki dengesizlik nedeni ile androjen, östrojen ve cinsiyet hormonlarındaki bozukluklar epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (Feldhaus 2009). Ayrıca tiroid ilişkili semptomlar ve polikistik over sendromu gibi diyabetle ilişkili hastalıklar cinsel disfonksiyona katkı sağlamaktadırlar (Bhasin vd. 2007). Cinsel sağlık sorunlarına ek olarak vajinal kuruluk, cinsel isteksizlik ve enfeksiyonlar gösterilebilir.

Tip 1 diyabetli kadınlarda, normal kadınlara göre; polistik over sendromu görülme sıklığının arttığı, daha erken menepoza girdiği ve menstrüel bozukluklara sahip oldukları açıklanmıştır (Zarzycki ve Zieniewicz 2005). Tip 1 diyabetin düşük ve konjential anomalilerin riskini arttırması gibi sebeplerden dolayı gebeliğe olumsuz bir etki gösterdiği bulunmuştur (Külekçi 2010). Daha önce yapılmış çalışmalardan elde ettiğimiz sonuçlardan diyabetin zigot evresinden ilkin oluştuğu ve embriyoyu negatif yönde etkilediği gösterilmiştir (Alvin 2000) stz ile indüklenmiş diyabetik farelerden oluşan zigotlarda, hCG enjeksiyonundan iki gün sonra normal kontrollerle karşılaştırıldığında iki hücreli evrenin in vivo gelişiminin geri kaldığını gözlemlemiştir. Bunlara ek olarak gestasyonel diyabetin, tip 1 diyabet yapılan farelerde implantasyondan önce zigot gelişimine kötü yönde katkı sağladığı açıklanmıştır (MacKay 2005).

Diyabetli bir kadının gebeliği, anne ve bebek için risk taşımaktadır. Diyabet kontrol edilemediğinde, büyük oranda fetal anomaliler görülmektedir.

Diyabetli kızlarda, normal yaşıtlarına kıyasla puberte daha erken yaşta başlamaktadır. DM yaşam boyunca menstrual döngüyü negatif şekilde etkilemektedir. Postmenarşiyal

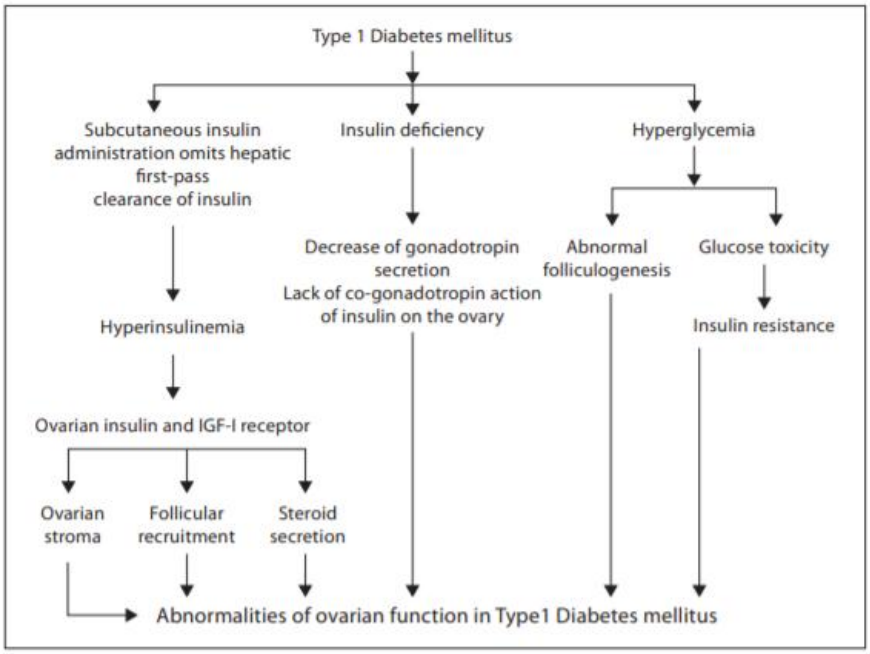
dönemdeki diyabetli kadınlar çoğunlukla periferal androjenin östrojene farklılaşması ve östrojen-progesteron değerlerinin değişmesi neticesinde rahim kanaması nedeni ile sorunlar yaşamaktadır. Endometrial dokunun östrojenden kaynaklı kronik proliferasyonu nedeniyle endometrial büyüme ve düzensiz aralıklarla kanama görülmektedir.

Diyabet, erektil disfonksiyon, seminal emisyonda yetersizlik ve retrograd ejekülasyon gibi erkek üreme potansiyeline etki etmektedir. Diyabetli erkeklerde ED otonomik nöropati ve vasküler bozukluklardan kaynaklanır. Birçok epidemiyolojik çalışma diyabet hastalarında artmış ED riskini işaret etmektedir (Braun 2000, Isidro 2012). Diyabetin cinsel sağlık üzerine meydana getirdiği bu etkiler erkeklerde daha çok cinsel güçsüzlüğe neden olmaktadır. Kan içinde bulunan yüksek glikoz, testislerde üretilen spermi etkileyerek döllenmeyi engelleyerek kısırlıkta önemli bir etken olabilir

Diyabetin üreme fonksiyonlarını etkilemesi özellikle de doğurganlık özelliklerini etkilemesi ile önem kazanmaktadır. Çünkü bu etkiler gelecek kuşaklara aktarılmaktadır.

2.6.1 Diyabetes mellitus'un over fonksiyonları üzerine etkileri

İnsülin'in karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkileri bilinmektedir ancak bu hormon over fonksiyonunun düzenlenmesinde de önemli rol oynar. Tip 1 diyabetli kişilerde insülin eksikliği veya fazlalığı ile ilişkili çok çeşitli üreme anormallikleri görülebilir (Şekil 1). İnsülin gonadotropik etkisi ile yumurtlama öncesi foliküllerin büyümesini arttırır **(**Poretsky vd. 1999**),** over foliküllerinin apoptoz ve atrezisini azaltır **(**Hsueh vd. 1994**)** ve primordialden primer foliküllere geçişi uyarır **(**Kezele vd. 2002**).** İnsülin eksikliği, azalmış GnRH sekresyonu nedeniyle daha düşük gonadotropin seviyelerine yol açabilir. Hiperglisemi yumurtalığı hem doğrudan hem de glikoz toksisitesinin neden olduğu insülin direncinin indüklenmesi yoluyla etkileyebilir. Daha yüksek insülin serum seviyeleri, yumurtalıktaki insülin ve IGF-1 reseptörlerinin aşırı uyarılmasına yol açabilir, steroid sekresyonunu artırabilir ve PKOS gelişimini teşvik edebilir **(**Codner ve Cassorla 2009),



Şekil 2.1 Tip 1 Diyabet'in Over Fonksiyonları Üzerindeki Etkisi **(**Codner ve Cassorla 2009**)**

Diyabet damar ve sinir fonksiyonlarını etkilediği için kadın genital organlarında yapısal ve fonksiyonel değişiklikler oluşturarak cinsel yanıtı etkiler. Farklı hayvan çalışmalarında diyabetin cinsel istek ve orgazm duyusunu azalttığı (Giraldi 2001), vajina kas tabakası ve epitel kalınlığının azalttığı ve kan akımını azaltarak vajinal fibrozise neden olduğu saptanmıştır (Park vd. 2002). Diyabetli kadınlarda over fonksiyonları bozulduğu için hem ovulasyon hem de fertilite oranlarını azaltmaktadır. Buna bağlı olarak over rezervlerinin düştüğü bildirilmiştir (Park vd. 2002).

Yapılan çalışmalarda diyabetik sıçanların ovaryum dokularında, normal sıçanlarla kıyaslandığında; foliküler, stromal dejenerasyon ve stromal fibrozis'in arttığı tespit edildi. Aynı zamanda diyabetli sıçanlarda overin normal yapısının bozulduğu ve stromal inflamasyon olduğu gözlenmiştir (Pala vd. 2013).

2.7 Diyabetes Mellitus'un Tedavisi

Kumamoto çalışması Tip 2 diyabetli hastalarla yapılan bir çalışmadır. Kumamoto çalışmasına göre tespit edilen komplikasyonlardan korunmak ve geciktirmek için açlık şeker seviyesi <110 mg/dl ve 2. saatte postprandiyal şeker seviyesi <180 mg/dl değerlerine dikkat etmek gerekmektedir (Beaser vd. 2005).

Genel Prensipler şunlardır;

- Yüksek kan şekerini düzeltmek
- Tüm semptomlardan ve komplikasyonlardan korumak
- Hareketli bir hayat kalitesi

Tip 1 diyabetli hastalara insülini nasıl uygulamaları gerektiği konusunda, kan şeker ölçümü, egzersiz yapıldığı sırada insülin miktarının ve besin alımının düzenlenmesi ve kan şekeri tedavisi konularında eğitim verilmelidir. Tip 2 diyabetli hastalarda bunları yapmakla birlikte beslenme ve kilo kontrolüne önem vermelidir. Hastalara kullanmaları için verilen oral antidiabetiklerin tesirleri açık ve doğru şekilde anlatılmalıdır ve zaman içerisinde bu antidiabetiklerin uygun bir kontrol için yeterli olmayacağı ve insülin tedavisine başlanabileceği belirtilmelidir (Calmers vd. 2005).

Diyabet tanısı konan bireyler egzersiz yaparak kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığında ve kan basıncında eksilme, mutlak vücut kas durumunun korunması, vücut yağ oranında düşme ve buna bağlı olarak zayıflama sağlanır. Tip 1 diyabetli hastalarda insülin salınımı olmadığı için amaç, olabildiği kadar fizyolojik salınımın gerçekleşmesini sağlamaktır. İnsülin direk alınımı ile vücut fonksiyonları regüle olmaktadır.

Tip 2 diyabetli hastalarda öncelikle diyet, egzersiz, kilo verme gibi tedavi seçenekleri ile tedaviye başlamak genelde yeterli olmaktadır. Eğer glisemik durum normale döndürülemezse insülin tedavisine başlanmaktadır.

2.7.1 Diyabetes mellitus'un tedavisinde kök hücreler

Tip 1 yani insüline bağımlı diyabet türünde; Pankreas beta hücrelerinde otoimmün yıkım neticesinde insülin yokluğu görülmektedir. Tip 2 yani insüline bağımlı olmayan diyabet türünde; insülin cevabındaki ve beta hücrelerindeki yetersizlik sebebi ile insülin salgılanmasında aksaklıklar görülmektedir. İki tip diyabette de sonuçta beta hücreleri tahribata uğradığı için insülin yetmezliği ya da yokluğu gözlenir. Pankreastaki adacıklarda alfa, beta, delta ve F denilen hücreler bulunmaktadır. Alfa hücreleri glukagon, beta hücreleri ise insülin salgılamaktadır. Vücuttaki dokuların fonksiyonlarının düzgün ilerleyebilmesi için yeterli insülin salınımı gereklidir. Beta hücreleri parakrin/otokrin etkileşimler aracılığıyla komşu hücrelerin fonksiyonlarını da düzenler **(**Ishihara vd. 2003**).** Granülleri ise sitoplazmadaki insülin paketleri şeklindedir. Glukoz insülin salınımının başlıca düzenleyicisidir. Fakat insülin salınımı ile ilgili kesin mekanizmalar ve faktörler net olarak anlaşılamamıştır **(**Rutter 2001**).**

Diyabet tedavisinde birçok tedavi yöntemleri vardır. Son yıllarda hücre tedavileri yeni umutlar doğurmuştur. Kök hücreler insülin üretebilen hücrelere farklılaşabildikleri için diyabet'in tedavisi için önemli bir kaynaktır (Wong 2011, Ricordi vd. 2012, Akinci vd. 2012). Erişkin kök hücreler kaynaklandığı dokunun hücrelerine farklılaşmaya daha meyillidir. Bu sebeple herhangi bir hastalığın tedavisi için, hasar olan doku veya organdan izole edilen kök hücrelerin kullanılması daha çok tercih edilen bir yöntemdir. MKH'lerin salgıladığı sitokin ve büyüme faktörlerinin nakil bölgesindeki beta hücrelerinde hasar oluşumunu engellediği, grefti koruduğu ve hücrelerin apoptozunu engellediğini göstermek için mezenkimal kök hücrelerden salgılandığı ve koruyucu etkileri bilinen sitokin ve büyüme faktörlerinden seçtiğimiz TGFβ ve IL-6 antikorları ile işaretlendiğinde greft bölgesindeki hücrelerde daha yoğun pozitif olduğu görülmüştür. (Poll vd. 2008).

2.8 Kök Hücre

Bir hücreyi kök hücre olarak belirtmek için üç önemli özelliği sıralayabiliriz:

- Kök hücreler, uzun süreler boyunca bölünebilir ve kendi kendilerini yenileyebilirler.
- Kök hücreler kendi içlerinde sınıflandırılmamışlardır, ancak farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleri vardır. Bu hücrelerden elde edilen yavru hücreler, özelleşmiş hücrelere kaynak olabilmektedirler.
- Kök hücreler, nakil bekleyen bir alıcıya transfer işlemi sonrasında kaynak dokunun işlevsel olarak tekrardan çoğalmasını sağlayabilir.

2.8.1 Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler

2.8.1.1 Totipotent hücre

Döllenme meydana gelmesiyle oluşan hücre (zigot) tek başına bir organizmayı gerçekleştirebilecek genetik özelliklere sahiptir. Totipotent hücreler, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilirler. Bu hücrelere her şeyi yapabilen anlamına gelen totipotent hücre denir (Ateş 2016).

2.8.1.2 Pluripotent hücre

Döllenmeden 4-5 gün sonra oluşmuş olan hücreler blastosist (küresel) bir form alır. Bu kürede bulunan hücreler vücuttaki tüm hücrelere farklılaşabilecek özelliklere sahip olmalarına rağmen, tek başlarına tüm organizmayı oluşturamazlar. Bu tür hücreler pluripotent hücre olarak adlandırılmaktadır (Ateş 2016).

2.8.1.3 Multipotent hücre

Sonraki gelişim kısımlarında hücreler daha özel görevlere sahip olup sınırlı sayıda hücrelere dönüşürler, bunlara multipotent hücre denir (Ateş 2016).

2.8.2 Elde edildikleri yere göre

2.8.2.1 Embriyonik kök hücre

Embriyonik gelişimin blastosist evresindeki embriyonun iç hücre grubundan ortaya çıkan pluripotent hücrelerdir (Ateş 2016). Bu hücrelerin vücuttaki farklılaşmış bir hücreyi var etme olasılığı vardır. Bunlar plasenta dışında ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken almış çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilir (Wobus 2001).

2.8.2.2 Erişkin Kök Hücreler

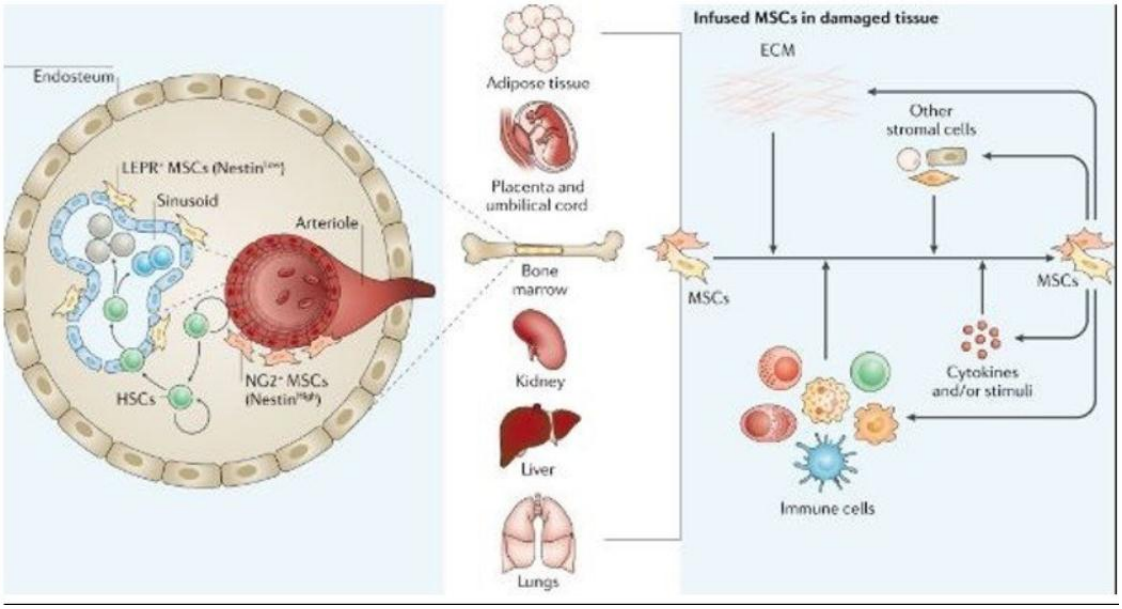
Embriyonik olmayan kök hücreler; bir doku veya organdaki değişim göstermemiş hücreler olup, kendilerini yenileyebilme ve başka dokulara veya organlara farklılaşabilme özelliğindelerdir (Ateş 2016). Bu hücrelerin en temel görevleri olarak, içinde yer aldıkları dokuyu onarmak ve dokunun bütünlüğünü sağlamaktır. Özel bir işlevi ve morfolojiye sahip spesifik bir hücre haline dönüşebilirler. Ama tüm hücre tiplerine dönüşemedikleri için yetişkin kök hücrelerin kullanımlarının sınırlıdır.

2.9 Kök Hücrelerin Etki Mekanizması

Fridenshtein, mezenkimal kök hücreleri ilk defa fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin yayılması sonrasında, fibroblastlara benzeyen, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşmaları ile tanımlanmıştır (Koton vd. 2001).

Kök hücrelerin tedavide en çok kullanılma am acı, hasar gören veya işlevi bozulmuş bir hücre/doku ya da organın fonksiyonlarını onarmak veya yenilemektir. Bu nedenle hasarlı dokuya, o dokunun işlevini tekrar yerine getirmesini sağlayabilecek yeterli sayı ve kalitede, saflaştırılmış olan hücrelerin transferi gerekmektedir.

MKH'ler, uygun mikroçevre ortamında T lenfosit proliferasyonunu ve inflamatuvar sitokin üretimini baskılar (Şekil 2). Aynı zamanda doğal bağışıklık sistemi üzerine baskılayıcı etki yaparlar ve immünsupresif özellik gösteren regülatör T hücrelerin uyarılmasını sağlarlar (Çetinkaya 2013). Başta otoimmün hastalıklar olmak üzere çeşitli doku veya organ hasar durumunda potansiyel bir immünoterapötik yöntem olarak düşünülürler. MKH sekretuar ve migratuar özellikleri sayesinde hasar yerine doğru göç ederler; orada büyüme faktörleri, sitokin, kemokin ve diğer moleküllerin salınımı yoluyla hasarlı dokuda trofik etki oluştururlar. (Çetinkaya 2013). Fakat hücrelerin veriliş zamanı, hücre dozu, aralıkları, veriliş yeri gibi etkenlere bağlı olarak değişik sonuçlar alınabilmektedir. En önemli belirleyici faktör, MKH uygulandığı sırada mikro çevrenin durumudur.



Şekil 2.2 Kemik iliği Kaynaklı Hücreler ve Mezenkimal hücrelerin doku hasarında görev alması (Shi vd. 2018)

2.10 İnfertilite

Düzenli bir cinsel yaşamı olan üreme çağındaki bir çiftte doğum kontrol yöntemlerini kullanmaksızın bir yılın sonunda gebeliğin gerçekleşmemesi durumuna infertil denilmektedir. İnfertilite sebepleri olarak; ovulasyon problemleri, tubal tıkanıklık, uterin

problemler, tubal ligasyon, vazektomi, yaşa bağlı faktörler, açıklanamayan infertilite ve tüberküloz gibi çokça etken verilebilir (Vicdan ve Işık 1999).

İnfertilite nedenlerinin cinsiyet üzerinde erkek veya kadın olarak dağılımı için bir neden belirtilmemiştir. Dünya sağlık örgütünün gerçekleştirdiği çok merkezli bir çalışmada, infertil çiftlerde nedenlerin dağılımı; %20'sinde erkek faktörü, %38'inde kadın faktörü, %27'sinde erkek ve kadın faktörü birlikte, %15'inde ise açıklanamayan şeklinde bulunmuştur (Comhaire 1987). Fakat bu istatistiksel rakamlar toplumun demografik ve çevresel etkenlere bağlı olarak değişebilmektedir (Acosta 1992). Bazı çiftlerde, erkek (azospermi vb.) veya kadının (tubal tıkanıklık, ovaryan başarısızlık ya da uterusun olmayışı) kısırlığından kaynaklı doğal gebelik olasılığını zorlaştırmaktadır.

2.10.1 İnfertilite tedavisinde kök hücreler

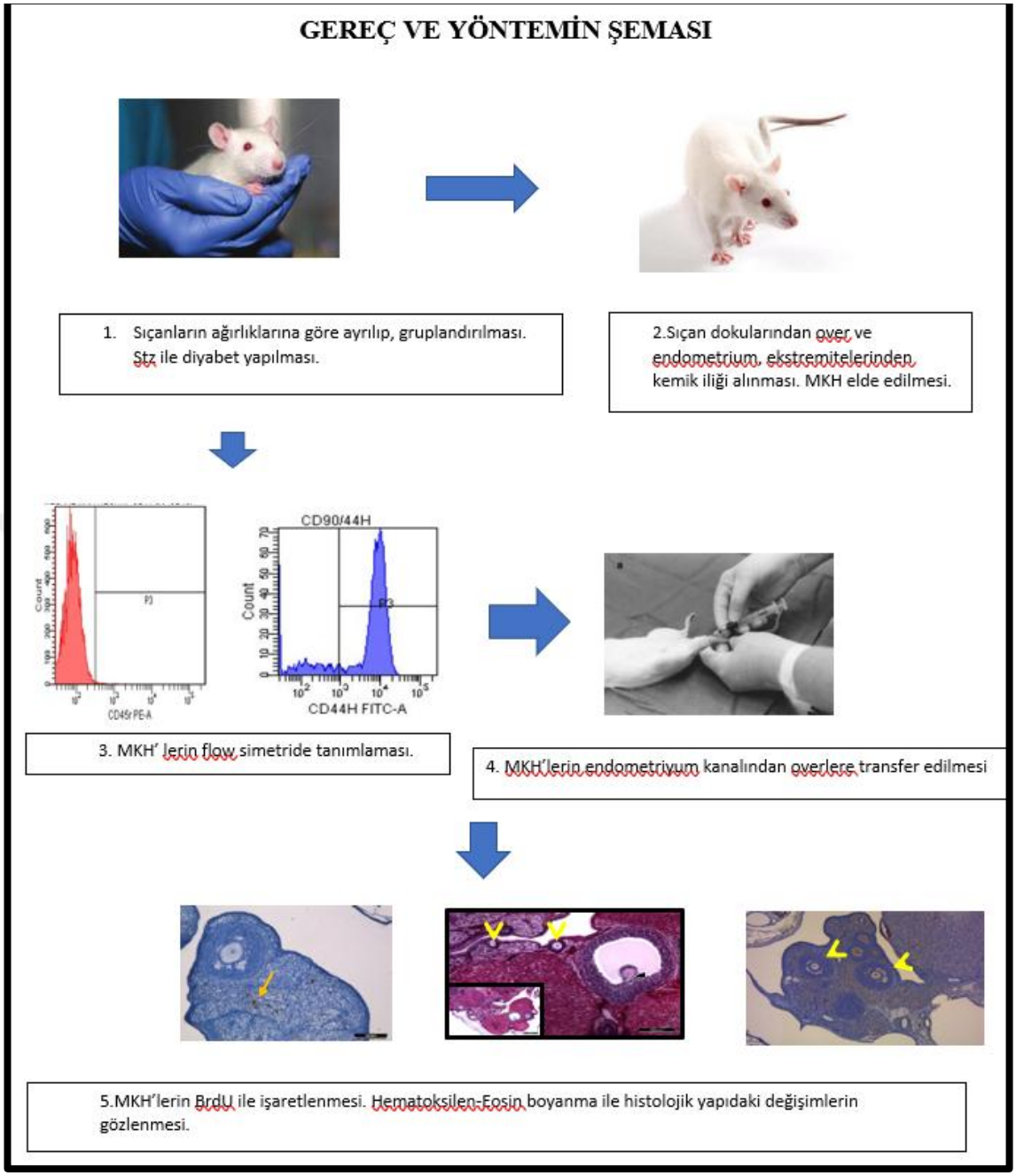
Kök hücre tedavileri, menopozu geciktirebileceği gibi, kısır kadınlarda yumurta üretme potasiyelini de canlandırabilir. Kyoto Üniversitesi'ndeki Prof. Michinori Saito ve ekibi yeni doğmuş farelerin yumurtalıklarındaki kök hücrelerin, kısır dişi farelere nakledilmesi ile kısır farelerin yumurtalıklarında yumurta hücresi gelişip gelişmeyeceğini araştırmak üzere tasarlanan bir çalışmada, kök hücre nakli sonrasında, kısır farelerin yumurta üretebildikleri ve yavrulayabildiklerini tespit etmişlerdir (Hayashi vd. 2011). Kyoto Üniversitesi'ndeki yapay sperm denemelerinde ilk kez tam başarı sağlandı (Sato vd. 2011). Japon araştırmacılar fare embriyosundan alınan kök hücreleri sperm üreten hücrelere dönüştürdü. Ardından bu hücreler farelerin testislerine nakledildi. Farelerin ürettiği spermler yumurtalara enjekte edilerek dişi farelerin rahmine yerleştirildi. Yapay spermlerden hamile kalan dişi fareler sağlıklı yavrular dünyaya getirdi (Hayashi vd. 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

50 adet Sprague cinsi dişi sıçan kullanılarak 5 farklı çalışma grubu oluşturuldu. Bunlardan 10 tanesi mezenkimal kök hücre izolasyonunda kullanıldı.

1. Grup: Kontrol Grubu (n=8)
2. Grup: STZ (45 mg/kg) ile diyabet edilen grup (n=8)
3. Grup: STZ + ovaryum kökenli mezenkimal kök hücre(n=8)
4. Grup: STZ + endometrium kökenli mezenkimal kök hücre(n=8)
5. Grup: STZ + kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre (n=8)

- 32 adet yetişkin dişi sıçana 45 mg/kg STZ intraperitoneal yolla verildi. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde kan glukoz değerleri 200-250 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi. 6 hafta boyunca takip edilen diyabetli sıçanların 72. Saat, 3.hafta ve 6. Haftada sabah ve akşam kan şekerleri ve ağırlıkları ölçülerek kaydedildi.
- Sıçanlar stz ile diyabet yapılmadan önce kök hücre kaynağı olarak kullanılacak sağlıklı sıçanlardan ovaryum, endometrium ve kemik iliği dokuları alınarak kök hücre izolasyonu yapıldı. Kültüre edilen hücreler yeterli sayıya ulaşınca, monoklonal antikorlarla işaretlendi ve flow sitometri cihazında karakterizasyon işlemi yapıldı. Mezenkimal kök hücre tanımlama işlemlerinden bir diğeri olan üçlü dönüşüm (adiposit, kondrosit, osteosit) için hücreler üç farklı kültür ortamına alınarak, 21 gün sonra ilğili boyalarla boyanarak tanımlandı.
- Tanımlanan mezenkimal kök hücreler BrdU ile boyanarak stz ile diyabet yapılmış sıçanlara 3. Haftanın sonunda endometrium kanalından overe 2.10^6/ ml PBS hücre olacak şekilde 1ml'lik hücre enjekte edildi. Bu işlem 4. Haftada tekrar edildi.
- 6. Haftanın sonunda sıçanların batınları açılarak, ovaryum dokuları çıkarılıp %4'lük formaldehit ile fikse edildi. Takip işlemlerinden sonra dokulardan kesitler alınarak hematoksilen eozin ile histokimyasal ve VEGF+BrdU ile immunohistokimyasal olarak boyandı.
- Boyama işlemlerinin ardından dokular analiz edildi.



Çizelge 3.1 Gereç ve yöntemin şeması

Yapılan tüm çalışmaların genel şeması gösterilmektedir.

3.1 Materyal

Deneysel Diyabet Modeli Oluşturma: 32 adet Sprague-Dawley dişi sıçana diyabet oluşturmak için, 45 mg/kg dozunda STZ (Sigma-Aldrich), 0.1 mmol sodyum-sitrat tampon içinde (pH 4.5) çözülerek intraperitoneal yolla uygulandı. Hemelatha ve arkadaşları 2004 yılına 0.1M buffer sitrat içinde STZ'nin çözünmesiyle sıçanların ağırlıklarına göre tek doz (50 mg/kg) enjeksiyonla intraperitoneal yolla deneysel diyabet modeli oluşturmuşlardır (Hemalatha vd. 2004). Diyabet gelişimini kontrol etmek için 72 saat sonra rutin olarak kuyruk veninden alınan kan örneklerinde kan glukoz değerleri 200-250 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi.

3.1.1 Ovaryum dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu

1. Derin ketamine/ksilazin anestezisi altında sıçanlar uyutuldu.
2. Batikonla batın bölgesi temizlenerek yenidoğan ovaryum materyali taşıma besiyeri içine alındı.
3. Materyal laboratuvara getirildi.
4. Cam petri içine materyal alındı.
5. Bistüri ile ufak parçalara ayrıldı.
6. T25 flaskın taban kısmına yerleştirildi.
7. İnkübatörde 15-30 dakika bekletildi.
8. Dokunun yapıştığından emin olununca üzerine nazikçe mezenkimal kök hücre besiyeri eklendi.
9. Her 3 günde bir besiyeri değiştirildi.
10. Hücrelerin gelişimi göz önünde bulundurularak pasajlama işlemleri yapıldı.

3.1.2 Endometriyum okusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu

1. Derin ketamine/ksilazin anestezisi altında sıçanlar uyutuldu.
2. Batikonla batın bölgesi temizlenerek yenidoğan endometriyum materyali taşıma besiyeri içine alındı.

3. Materyal laboratuvara getirildi.
4. Cam petri içine materyal alındı.
5. Makas veya bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı.
6. T25 flaskın taban kısmına yerleştirildi.
7. İnkübatörde 15-30 dakika bekletildi.
8. Dokunun yapıştığından emin olununca üzerine nazikçe mezenkimal kök hücre besiyeri eklendi.
9. 3 günde bir besiyeri değişimi yapıldı.
10. Hücrelerin gelişimi göz önünde bulundurularak pasajlama işlemleri yapıldı.

3.1.3 Kemik iliği dokusundan mezenkimal kök hücre izolasyonu

1. Derin ketamine/ksilazin anestezisi altında sıçanlar uyutuldu.
2. Batikonla batın bölgesi temizlenerek yenidoğan kemik iliği materyali taşıma besiyeri içine alındı.
3. Materyal laboratuvara getirildi.
4. Kemiklerin uçları kırıldı ve medium çekilen enjektörlerle delinelerek ilikler falkonlara toplandı.
5. Yeni falkonlara fikol koyuldu. Kemik ilikleri fikol üzerine yavaş yavaş ilave edildi. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
6. Oluşan bafikot tüplere toplandı. Tüplerin üstü 10 cc'ye kadar medium ile tamamlandı ve 1200 rpm'de 5 dk 2 kere santrifüj işlemi yapıldı. Süpernatant atıldı ve hücrelerin üzerine mezenkimal kök hücre besiyeri eklendi.
7. Hücreler T25 flasklara dağıtıldı.
8. 3 gün boyunca besiyeri değişimi yapıldı.
9. Hücrelerin gelişimi göz önünde bulundurularak pasajlama işlemleri yapıldı.

Pasajlama İşlemi:

1. Flaskımız %80-90 doluluğa ulaştığında pasajlama işlemi yapıldı.
2. Flaskın içindeki besiyeri boşaltıldı.
3. İçine 2-3 mlt fosfat buffer saline (PBS, Ca ve Mg içermeyen) solüsyonu eklendi.

4. 1-2 dakika bekletildi.
5. İçindeki PBS boşaltıldı.
6. 2 mlt tripsin EDTA-C solüsyonu eklendi.
7. 5 dakika bekletildi.
8. Hücrelerin flask tabanından ve birbirlerinden ayrıldığı kontrol edilerek üzerine DMEM eklendi.
9. 10 mlt'lik tüplere alınarak 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Süpernatant kısım atılarak pelet kırıldı.
11. Üzerine DMEM solüsyonu ilave edildi.
12. 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj işlemi yapıldı.
13. Süpernatant kısım atılarak pelet kırıldı.

T25 flasklara hücre yoğunluğuna göre ekim işlemi yapıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu

Primer hücre kültürü yapılarak Mezenkimal Kök Hücre besi yeri ortamında çoğaltılarak dönüştürülen hücrelerin dönüşümünün sağlanıp sağlanamadığı karakterizasyon testleri yapılarak test edilir. Bu testler:

1. Akım sitometri ile yüzey belirteçlerine göre tanımlama
2. Üç farklı germ yaprağı kökenli hücreye dönüşümü gösteren farklılaşma testleri.

Bu amaçla ikinci pasaj sonunda hücreler Countess® Automated Cell Counter (İnvitrogen, USA) cihazında hem sayısına hem de canlılığına bakıldıktan sonra Mezenkimal Kök Hücre karakterizasyonu için süspansiyon haline getirilerek çeşitli yüzey markerlarına göre Akım Sitometri cihazında (*FACSAria* III,USA) tanımlandı. Bu hücreler çeşitli farklılaşma besi yerlerine alınarak adiposit, osteosit, kondrosit hücrelerine farklılaştırıldı.

3.2.1.1 Akım Sitometri Cihazı ile Tanımlamada Kullanılan Yöntem

İkinci pasajdan sonra süspansiyon haline getirilen hücreler konsantrasyonu 1X106 olacak şekilde 100'er µl hücre süspansiyonu haline getirilip 10'ar µl yüzey markerları (CD45, CD11b/c, CD44, CD90/ Tüm belirteçler BD_ USA) eklenerek vortekslendi ve karanlık ortamda 15 dakika 4 C'de inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon işleminin devamında üzerlerine 2ml yıkama solüsyonu eklendi ve 1200 dakika/devir'de 10 dakika santrifüj edildip süpernatant atıldı. Hücre çökeltisine tekrar 1 ml yıkama solüsyonu ilave edilerek akım sitometri cihazında tanımlandı (Şekil 1).

3.2.1.2 Mezenkimal Kök Hücrenin Farklılaşma Çalışmaları

1. Mezenkimal Kök Hücre Adiposit Farklılaşma Metodu:

Adiposit farklılaşma amacıyla Adiposit Diferansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA) kullanılarak çalışmalar yapıldı. İkinci pasaja gelen hücreler besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişikliği yapılıp üçüncü hafta sonra dönüştürülen hücrelerde yağ damlacıklarını belirlemek için Oil Red (Diagnostıc BioSystem, USA) ile boyandı ve yağ hücreleri içindeki lipid damlacıkları kırmızı renge boyanmış olarak görüntülendi (Şekil 2/A).

2. Mezenkimal Kök Hücre Kondrosit Farklılaşma Metodu:

İkinci pasaja gelen hücreler Kondrosit farklılaşma için Kondrosit Differansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA) kullanılarak hazırlanan besiyeri ile üç günde bir besiyeri değişimi yapılarak kültüre edildi. Kondrosit hücreleri, üç hafta sonra Alcian Blue (Diagnostıc BioSystem, USA) kullanılarak sitoplazmasındaki hyaluronik asitin maviye boyanması sonucu belirlendi (Şekil 2/B).

3. Mezenkimal Kök Hücre Osteosit Farklılaşma Metodu:

Osteosit farklılaşma için Osteosit Differansiyasyon Basal Mediumu ve suplementi (Gibco, USA) kullanıldı. İkinci pasaj sonunda hücreler osteosit besiyeri ile üç günde bir

besiyeri değişikliği yapıldıktan sonra üç hafta sonunda Von Kossa (Diagnostıc BioSystem, USA) ile boyandı. Osteosit hücreleri sitoplazmasındaki kalsiyum depositlerinin siyaha boyanması ile tespit edildi (Şekil 2/C).

3.2.2 Mezenkimal kök hücre Brdu boyama metodu

Diyabetik sıçanlara verilen kök hücrelerin deneyin sonunda histopatolojik olarak yerleşim yerlerini görebilmek ve iyileşmeye katkısını yorumlayabilmek için mezenkimal kök hücreler BrdU (Bromodeoksiüridin) ile boyandı.

1. Bir cc'de10µM BrDU solüsyonu hazırlandı.
2. Bir cc'de 2.10^6 hücre olacak şekilde her bir cc'ye 10µL BrDU solüsyonu ilave edildi.
3. İki saat inkübasyona (37°, %5 CO_2) bırakıldı.
4. Her bir sıçan için intraperitoneal olarak 2.10^6 hücre uygulandı. (ŞEKİL 3,4,5,6,7)

3.2.3 Işık mikroskobik yöntem

Histolojik ve immunhistokimyasal çalışmalar için, tüm sıçanlara ketamin ve ksilazin anestezisi intraperitoneal olarak verildi. Sıçanların batınları açılarak over dokuları çıkarılıp %4 formaldehit ile fikse edildi. Takip işlemlerinden sonra 4 µm'lik kesitler alınarak ve sonrasında hematoksilen & eosin (H&E) için immunohistokimyasal boyama yapıldı.

Hematoksilen&Eosin (H&E) Boyama Protokolü

Rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon aşaması için 37°C'lik etüvde gece boyunca bırakılmasının ardından ısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat etüvde bekletildi. Bu işlemi eksiksiz bitirmek için kesitler 3 defa 20'şer dakika ksilolde tutularak, rehidratasyon aşaması için azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80, %70 ve %50) 10'ar dakika

bekletildi. Kesitler havada kurutma işleminden sonra, 10 dakika musluk suyu ile yıkanıp etil alkolden ayrıldı. Bu işlemden sonra 10 dakika Harris hematoksilen boya solüsyonunda bekletilen kesitler sonra akan musluk suyu altında 10 dakika, glasiyel asetik asit ile alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında tekrar 10 dakika yıkandı. Sonra 10 dakika Eosin boya solüsyonunda tutuldu, tekrar 10 dakika akan musluk suyu yıkandıktan sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla % 50, %70, %80, %90 ve %100'lük artan alkol serilerinden hızlı bir şekilde geçirildi. 45 dakika ksilolde bekletilip lamlar entellan ile kapatıldı. Hazırlanmış olan kesitlerden Leica DM 4000B (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskobunda elde edilen görüntüler, Leica LAS V4.9 programında değerlendirildi.

3.2.4 İmmunohistokimyasal analizler

İmmunohistokimyasal yöntem Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) ve Ultra Vision Detection System DAB Substrat System immunohistokimya kitleri kullanılarak gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal boyama için parafin bloklardan polilizinli lamlara 4 μm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon aşamasının ardından azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %80 ve %70) geçirildi. Dehidrate edilen dokular ethanolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi, sonra, dokulara sitrat tamponu (pH 6.0) ile retrival işlemi yapıldı. Dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Dokuların çevresi PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olmasına dikkat edilen immünohistokimya barına sıralandı. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH:7.4) ile yıkandı. Bu işlemin ardından 15 dakika %3'lük hidrojen ile etkin bırakılacaktır. İşlem sonrasında PBS ile lamlar yıkandı, yıkanan lamlara 5 dakika UltraV block (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) uygulanarak, spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor işlemine geçildi. Kesitler uygun dilüsyonda (1:200) gece boyunca VEGF primer antikoruna (bs-1665R, Bioss, USA) etkin bırakılarak inkübe edildi. Ayrıca kök hücreleri işaretlemek için kesitler oda sıcaklığında 60 dakika boyunca 1:10 dilusyonda bromo-deoksiüridin (BrdU) primer antikoruna (550803; BD Pharmingen) etkin bırakılarak inkübe edildi. Primer antikordan sonra lamlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra 10

dakika biotinli sekonder antikor (TP-125-BN, Lab Vision, Fremont, CA) uygulandı. Tekrar PBS ile yıkanan dokular 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (TS-125-HR, Lab Vision, Fremont, CA) bırakıldı. İşlem sonrasında dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra, diaminobenzedin (DAB) kromojeni (TA-125-HD, Lab Vision, Fremont, CA) eklenerek bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması amaçlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilen'i kullanıldı. DAB ile boyanan lamlar eksilen alkol serilerinden geçirildi. 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entallan ile kapatılan kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q LAS programında görüntülendi.

3.2.5 İstatistiksel analizler

Veriler SPSS 21.0 istatistik paket programına girilerek, çoklu ROC Eğrisi analizi uygulandı. Testler sonucunda $p<0.05$ olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.6 Folikül sayım ve immünpozitiflik belirleme yöntemi

Folikül sayımı ve immünohistokimyasal değerlendirme için over dokusu seri olarak 4 um kalınlıkta kesitlere ayrıldı. Her beşinci bölüm folikül sayımında, altıncı bölüm ise immünohistokimyasal değerlendirme için kullanıldı. H&E boyamaları yapılan tüm deneklere ait over kesitlerinde Primordial, primer ve antral folikül olarak folikül sayımları yapıldı.

İmmünohistokimyasal değerlendirmede her kesit için VEGF immuntutulum oranı Image J programı kullanılarak yüzde (%) olarak hesaplandı.

4. ARAŞTIRMANIN BULGULARI

4.1 Deney Hayvanlarına Ait Bulgular

Araştırmada 50 adet erişkin Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kulanıldı. 10 tanesi mezenkimal kök hücre izolasyonunda kullanıldı.

Sıçanların Ağırlık ve Kan Şekeri Değerleri

Deneye dahil edilen tüm sıçanların başlangıç ağırlık değerleri ortalama 204 gr. olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.1 STZ öncesi ağırlık ölçümleri

STZ ÖNCESİ	AĞIRLIK ÖLÇÜMLERİ (gr)				
	KONTROL	DİYABETİK	DM+OVER	DM+ENDOMETRİUM	DM+Kİ
1.SIÇAN	204	210	204	212	205
2.SIÇAN	208	198	198	194	210
3.SIÇAN	205	204	209	208	212
4.SIÇAN	201	214	196	196	209
5.SIÇAN	202	212	205	214	199
6.SIÇAN	206	192	212	192	195
7.SIÇAN	209	208	206	201	196
8.SIÇAN	196	200	208	204	208

Çizelge 4.2 STZ uygulandıktan 72 saat sonra tespit edilen ağırlık ölçümleri

72 saat sonra	Ağırlık Ölçümleri (gr)			
	DM	DM+OVER	DM+ENDOMETRİUM	DM+Kİ
1.SIÇAN	204	203	203	206
2.SIÇAN	207	204	202	204
3.SIÇAN	193	202	198	199
4.SIÇAN	203	198	201	201
5.SIÇAN	198	196	199	203
6.SIÇAN	204	201	203	198
7.SIÇAN	208	208	204	201
8.SIÇAN	201	203	206	202
ORTALAMA DEĞER	203,5	202	203	201,75

Stz uygulandıktan 72 saat sonra yapılan ağırlık ölçümlerinde deney başlangıcındaki ağırlık ölçümlerinden farklı bir değere ulaşılmamıştır. Stz öncesi ağırlık ölçümü ortalama 204 iken stz sonrası 72. Saatteki ölçüm 202,5 gr olarak tespit edilmiştir. Ağırlık ölçümlerinde ilk 72 saat içinde anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$).

Çizelge 4.3 STZ uygulandıktan 3 hafta sonra tespit edilen ağırlık ölçümleri

3 hafta sonra	Ağırlık Ölçümleri (gr)			
	DM	DM+OVER	DM+ENDOMETRİUM	DM+Kİ
1.SIÇAN	183	201	182	184
2.SIÇAN	185	183	186	198
3.SIÇAN	175	187	175	188
4.SIÇAN	182	189	186	176
5.SIÇAN	181	176	179	181
6.SIÇAN	186	181	185	176
7.SIÇAN	185	183	183	175
8.SIÇAN	179	179	182	187
ORTALAMA DEĞER	182	184,8	182	183

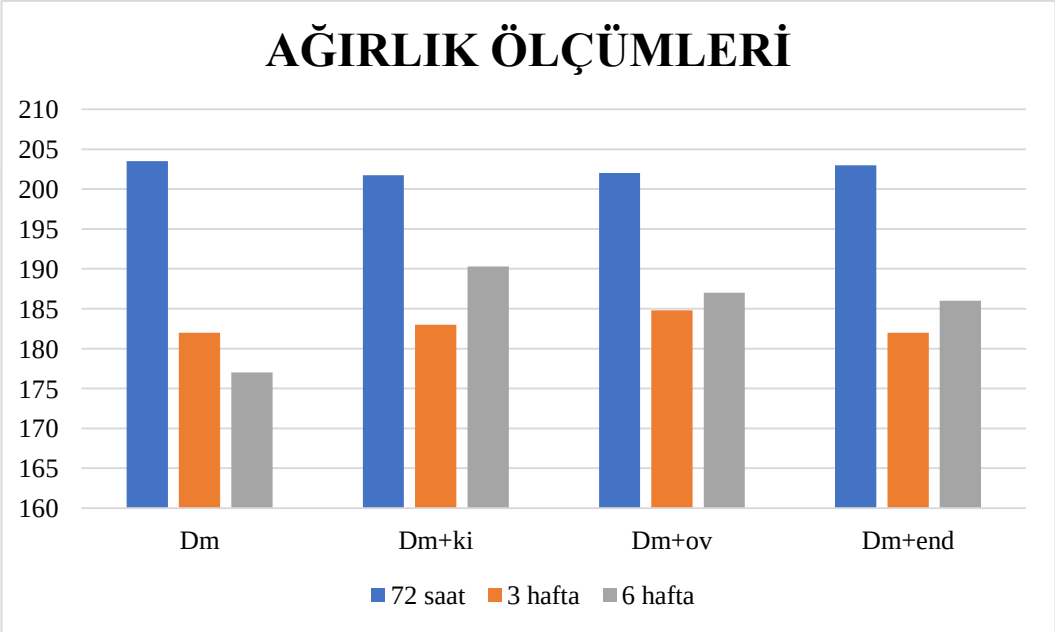
Stz uygulandıktan 3 hafta sonra yapılan ağırlık ölçümlerinde ise deney başlangıcındaki ağırlık ölçümlerinden farklı olarak tüm gruplarda ortalama ağırlığın 204'ten 182 ye düştüğü gözlenmiştir. Ortalama olarak ağırlık ölçümlerinde 3. Haftanın sonunda gruplar arasında anlamlı bir fark olmamakla birlikte deneyin başlangıcın göre stz ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda beklendiği gibi ağırlık kaybı oluştuğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.4 STZ uygulandıktan 6 hafta sonra tespit edilen ağırlık ölçümleri

6 hafta sonra	Ağırlık Ölçümleri (gr)			
	DM	DM+Kİ	DM+OVER	DM+ENDOMETRİUM
1.SIÇAN	179	190	204	184
2.SIÇAN	180	195	185	188
3.SIÇAN	172	193	192	179
4.SIÇAN	178	185	191	200
5.SIÇAN	177	186	180	181
6.SIÇAN	184	181	183	189
7.SIÇAN	180	201	184	186
8.SIÇAN	169	192	181	185
ORTALAMA DEĞER	177	190,3	187	186

Stz uygulandıktan sonra 3. Haftanın sonunda yapılan kök hücre uygulamalarını takiben 6. Haftanın sonunda yapılan ağırlık ölçümlerinde ortalama ağırlığın 185 gr. olduğu görülmüştür. Kök hücre uygulanmalarından önceki ortalama ağırlığın 182 gr olduğu göz önüne alındığında, kök hücre uygulamasının sistemik uygulanmamış olması nedeniyle ağırlık artışında farklılık olmaması normal olarak yorumlanmıştır.

Çizelge 4.5 Sıçanların ağırlık ölçümleri



Şeker ölçümleri

Deneye dahil edilen tüm sıçanların başlangıç kan şekeri değerleri ortalama 105mg/dl olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.6 STZ uygulandıktan 72 saat sonra tespit edilen şeker ölçümleri

72 saat sonra	Şeker Ölçümleri (mg/dl)			
	DM	DM+Kİ	DM+OVER	DM+ENDOMETRİUM
1.SIÇAN	252	375	412	365
2.SIÇAN	486	415	371	272
3.SIÇAN	265	286	264	413
4.SIÇAN	275	369	295	269
5.SIÇAN	405	486	374	415
6.SIÇAN	346	368	459	468
7.SIÇAN	469	264	256	314
8.SIÇAN	350	252	364	356
ORTALAMA DEĞER	356	352	350	359

Stz uygulandıktan sonra 72 saatte yapılan kan şekeri ölçümlerinde tüm gruplarda ortalama değerin 354 mg/dl olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.7 STZ uygulandıktan 3 hafta sonra tespit edilen şeker ölçümleri

3 hafta sonra	Şeker Ölçümleri (mg/dl)			
	DM	DM+Kİ	DM+OVER	DM+ENDOMETRİUM
1.SIÇAN	254	378	417	372
2.SIÇAN	488	420	376	276
3.SIÇAN	266	274	272	416
4.SIÇAN	276	374	300	272
5.SIÇAN	406	491	380	418
6.SIÇAN	348	372	462	470
7.SIÇAN	470	270	258	319
8.SIÇAN	352	258	370	361
ORTALAMA DEĞER	357	354	354	363

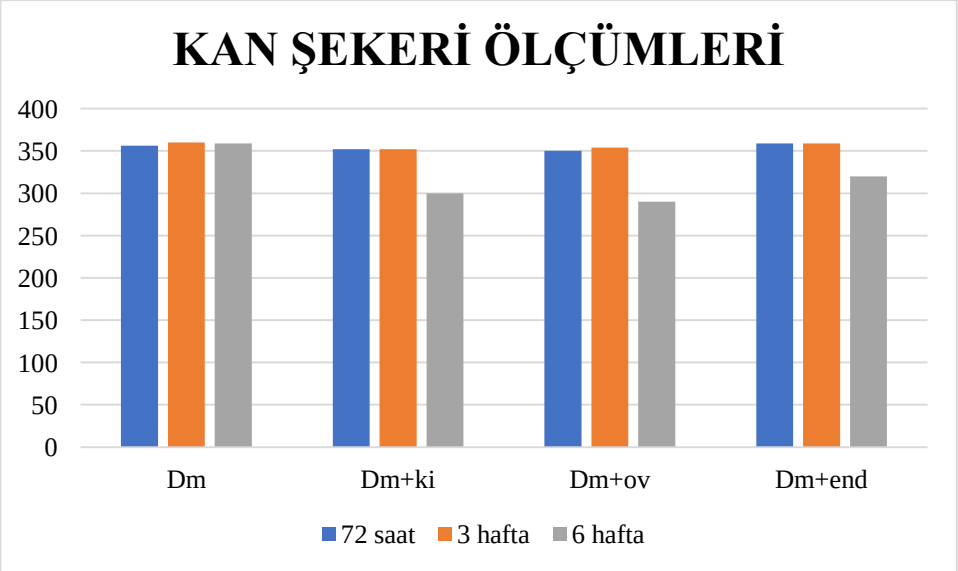
Stz uygulandıktan 3 hafta sonra yapılan kan şekeri ölçümlerinde tüm gruplarda ortalama değer 357 mg/dl olarak bulunmuştur. Bu değerin 72'nci saatte yapılan ölçümlerle hemen hemen aynı oldugu gözlenmiştir.

Çizelge 4.8 STZ uygulandıktan 6 hafta sonra tespit edilen şeker ölçümleri

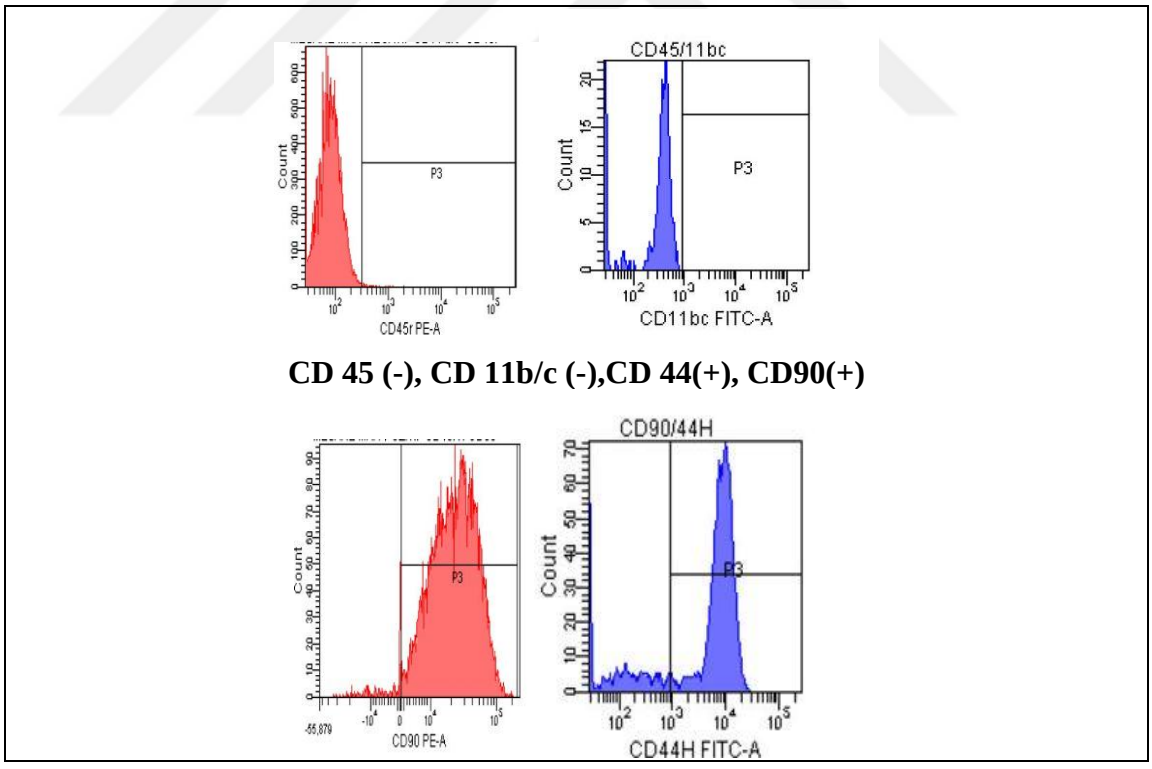
6 hafta sonra	Şeker Ölçümleri (mg/dl)			
	DM	DM+Kİ	DM+OVER	DM+ENDOMETRİUM
1.SIÇAN	256	316	326	328
2.SIÇAN	490	358	318	248
3.SIÇAN	266	222	208	374
4.SIÇAN	278	318	216	242
5.SIÇAN	408	424	308	364
6.SIÇAN	350	332	425	414
7.SIÇAN	470	216	206	272
8.SIÇAN	352	218	310	318
ORTALAMA DEĞER	359	300	290	320

Stz uygulandıktan 6 hafta sonra yapılan kan şekeri ölçümlerinde kök hücre uygulanmayan dm grubunda 359mg/dl, dm+ki 300, dm+ov 290, dm+end 320 ortalama değerleri tespit edilmiştir. Kök hücre uygulanmayan dm grubun özellikle dm+ov ve dm+ki gruplarına göre ortalama kan şekeri değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür. Kök hücre uygulanan gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde ortalama kan şekeri değerlerinde kaydadeğer bir fark bulunmamıştır. Kök hücre uygulanmayan dm grubu ile özellikle over hasarının daha iyi tedavi edildiği dm+ki ve dm+ov gruplarında ortalama kan şekeri değerleri ölçümü açısından anlamlı bir düşüşün olması her ne kadar sistemik uygulanmasada kök hücrenin, parakrin ve endokrin etki ile diyabetin düzeltilmesine katkı sunduğunu yönünde yorumlanmıştır.

Çizelge 4.9 Sıçanların kan şekeri ölçümleri



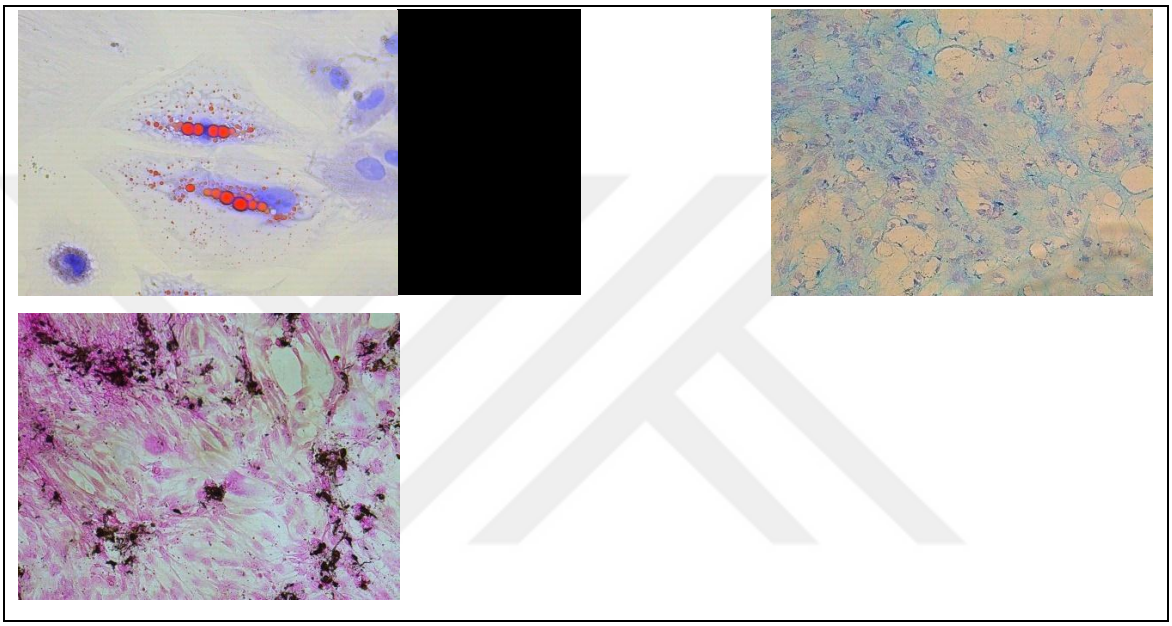
4.2 AKIM Sitometri Yöntemi ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Tanımlanması



Şekil 4.1 Sıçan over, endometrium ve kemik iliği hücrelerinin Mezenkimal Kök Hücrelere farklılaşmasının Akım Sitometri cihazında Histogram Grafiği ile gösterilmesi [CD45 (-) , CD11b/c (-), CD44(+), CD90(+)]

İmmünofenotiplemede kullanılan antikorlardan CD 45 (-) ve CD 11b/c (-) negatif CD44, CD90 monoklonal antikorları ise pozitif belirteç olarak düşünülmüştür. Sonuçlar doğrultusunda mezenkimal kök hücre elde ettiğimizi gördük. Bu çalışma sonucunda ikinci bir mezenkimal kök hücre deneyi olan farklılaşma çalışmalarına geçildi.

4.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Üç Farklı Hücre Tipine Dönüşümü



A **B** **C**

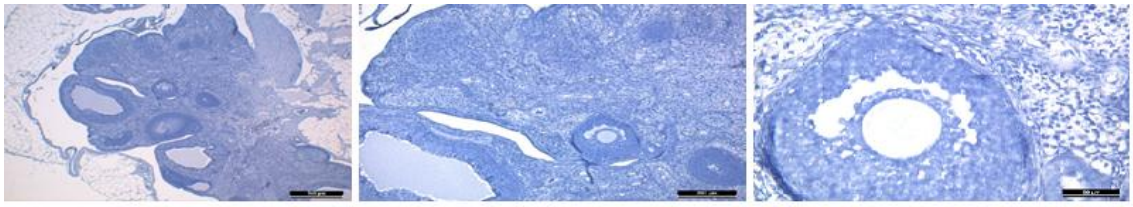
Şekil 4.2 Sıçan over, endometrial ve kemik iliği kökenli MKH'nin A) Oil-red boyası ile Adiposit dönüşümünün gösterilmesi (Leica D1000, 60X10), B) Alcian Blue boyası ile Kondrosit dönüşümünün gösterilmesi (Leica D1000, 20X10), C) Von Kossa boyası ile Osteosit dönüşümünün gösterilmesi (Leica D1000, 4X10)

Bu deneyimizin sonucunda Adipojenik değişim lipid damlacıklarının kırmızı ile boyanması, Osteojenik değişim kalsiyum depositlerinin siyah boyanması ve Kondrojenik değişim hyaluronik asitin mavi boyanması ile gösterildi.

4.4 BRDU Boyama Sonuçları

Kontrol ve DM gruplarında BrdU pozitif hücreye rastlanmadı. Mezenkimal kök hücre uygulaması yapılan DM+Ov, DM+End ve DM+Ki ve gruplarında BrdU

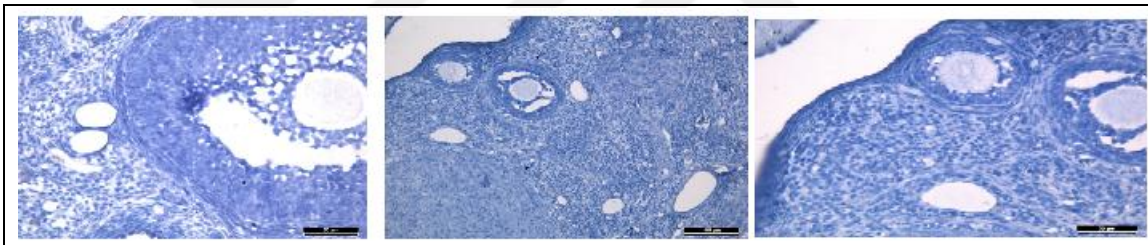
immunpozitifliği değerlendirildiğinde, mezenkimal kök hücre uygulaması yapılan tüm gruplarda özellikle over stromasında ve folikül çevresinde BrdU pozitif hücrelerin yaygın olduğu gözlendi.



Kontrol 2-1 **Kontrol 2-2** **Kontrol2-5**

Şekil 4.3 BrdU boyama kontrol grubu

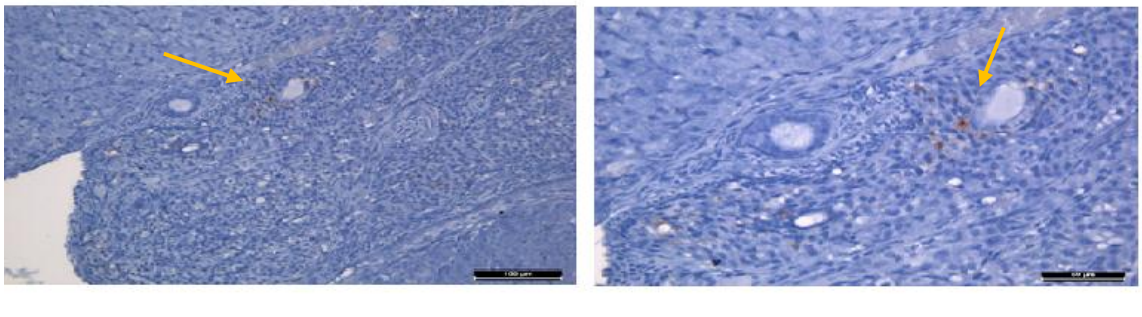
Kontrol grubunda BrdU pozitif hücreye rastlanmadı.



DM-003 **DM-004** **DM-005**

Şekil 4.4 BrdU boyama DM grubu

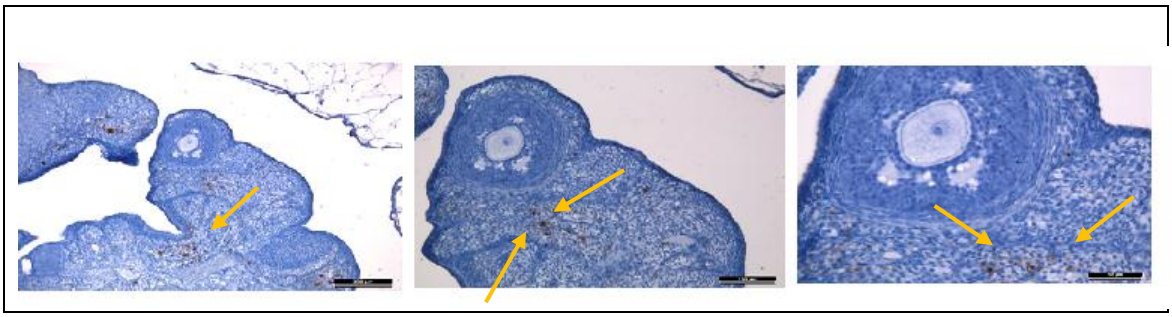
DM grubunda BrdU pozitif hücreye rastlanmadı.



DM+OV 5-1 **DM+OV 5-0002**

Şekil 4.5 BrdU boyama DM+Ov grubu

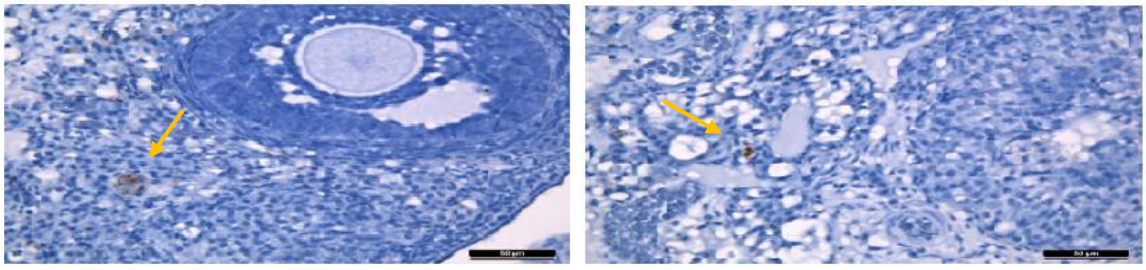
Mezenkimal kök hücre uygulaması yapılan DM+Ov grubunda BrdU immunpozitifliği değerlendirildiğinde, genellikle over stromasında ve folikül çevresinde BrdU pozitif hücrelerin yaygın olduğu gözlendi.



DM+END 1-1 **DM+END 1-002** **DM+END 1-003**

Şekil 4.6 BrdU boyama DM+End grubu

Mezenkimal kök hücre uygulaması yapılan DM+End grubunda over stromasında ve folikül çevresinde BrdU pozitif hücrelerin yaygın olduğu gözlendi.



DM+Kİ 2-1 **DM+K1 2-1**

Şekil 4.7 BrdU boyama DM+Ki grubu

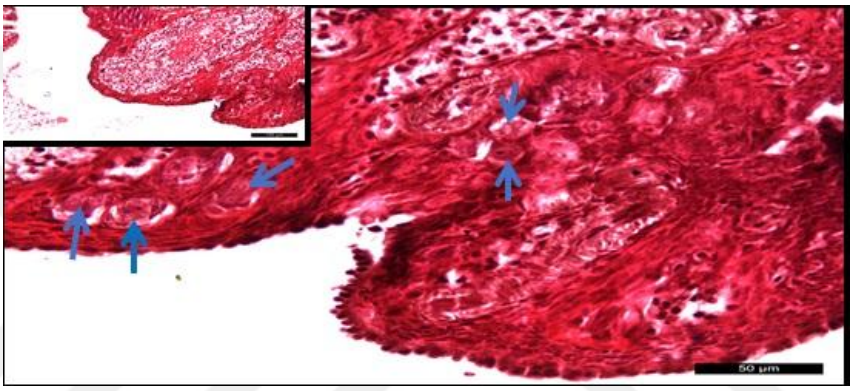
Mezenkimal kök hücre uygulaması yapılan DM+Ki grubunda BrdU immunpozitifliğine bakıldığında, mezenkimal kök hücre uygulaması yapılan diğer gruplarda olduğu gibi BrdU pozitif hücrelerin özellikle over stromasında ve folikül çevresinde sıkça bulundukları görülmüştür.

4.5 Hematoksilen-Eosin Boyanma Sonuçları

4.5.1 Kontrol grubu

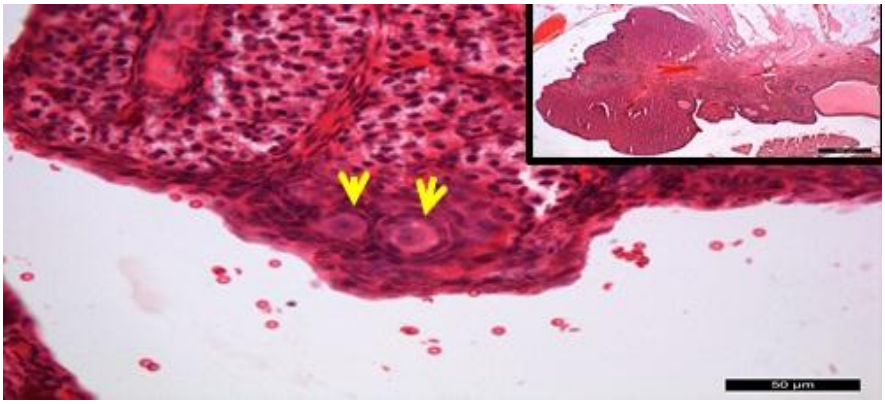
Çalışmanın H&E boyama ile yapılan histomorfolojik değerlendirilmesinde;

Kontrol grubu ovaryum dokusu incelendiğinde çok sayıda primordial, primer, antral ve graff folikülleri ile, stromal yapılarıyla normal histolojik özellikleri içeriyordu.



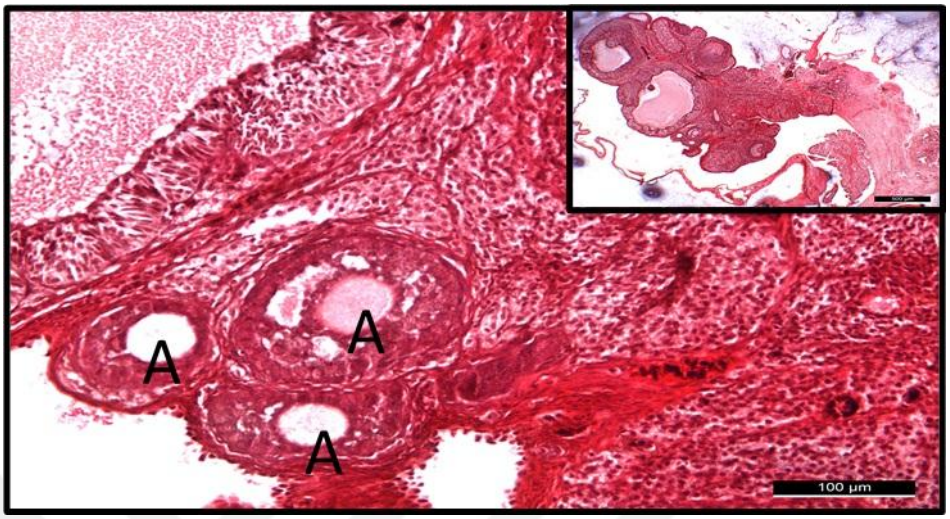
Şekil 4.8 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve primordial foliküller

Kontrol grubunda primordial foliküller normal histolojik görünümde ve çok sayıda görüldü (mavi oklar).



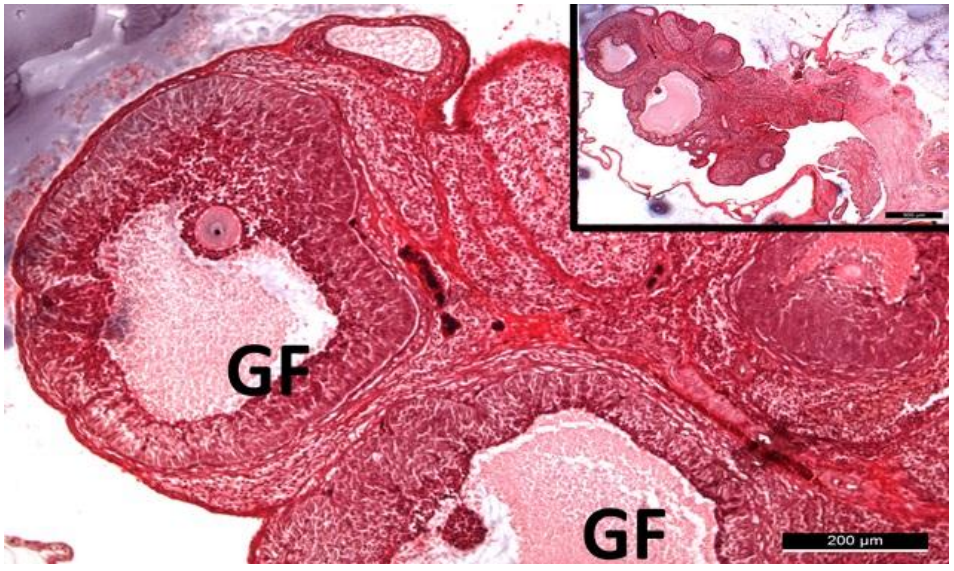
Şekil 4.9 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve unilaminer primer foliküller

Kontrol grubunda unilaminer primer foliküllerin normal histolojik görünümde oldukları tespit edildi (sarı oklar).



Şekil 4.10 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve antral foliküller

Kontrol grubunda antral foliküllerin normal histolojik yapıda oldukları görüldü.

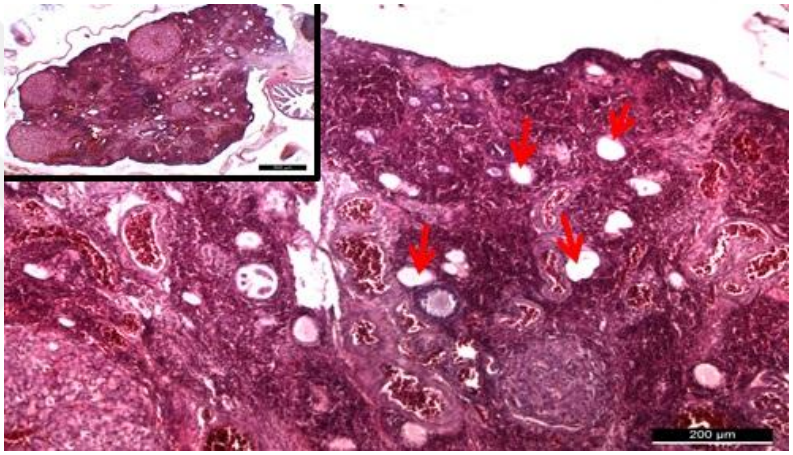


Şekil 4.11 Kontrol grubu, küçük büyültmede ovaryum dokusunun genel görünümü ve graff foliküller

Kontrol grubu graff foliküllerin de normal histolojik görünümde oldukları tespit edildi.

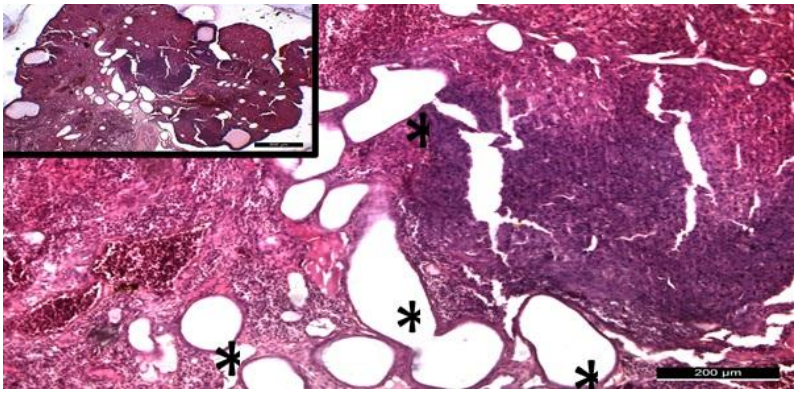
4.5.2 Diyabet grubu

Diyabet grubunda ise küçük büyültmelerde bile belirgin olarak gözlenebilen çok sayıda dejeneratif gelişen foliküller ve medullar bölgede çok sayıda dilate vasküler yapılar, yer yer hematom alanları gözlendi. Bu grupta kesit düzlemlerinde primordial foliküller gözlenmezken gelişen foliküllerin duvarları folikül hücre katmanının az olması nedeniyle ince duvarlı olarak gözlendi. Bu tür foliküllerin gerileyen folikül yapısından daha çok immatür foliküller olduğu düşünüldü. Diyabet grubundaki graff folikülleri de ince duvarlı ve düzensiz yapılar olarak immatür görünümdeydi.



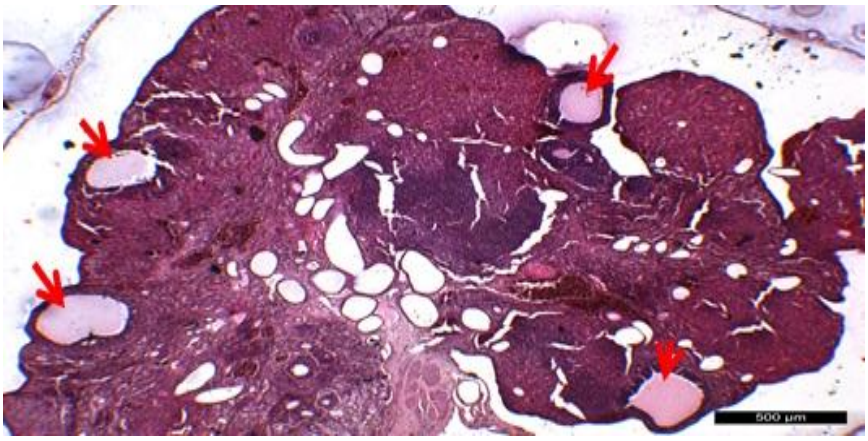
Şekil 4.12 Diyabet grubunda küçük ve büyük büyültmelerde dejeneratif foliküller

Diyabetli grupta foliküllerin dejenerasyona uğradığı görüldü (kırmızı oklar).



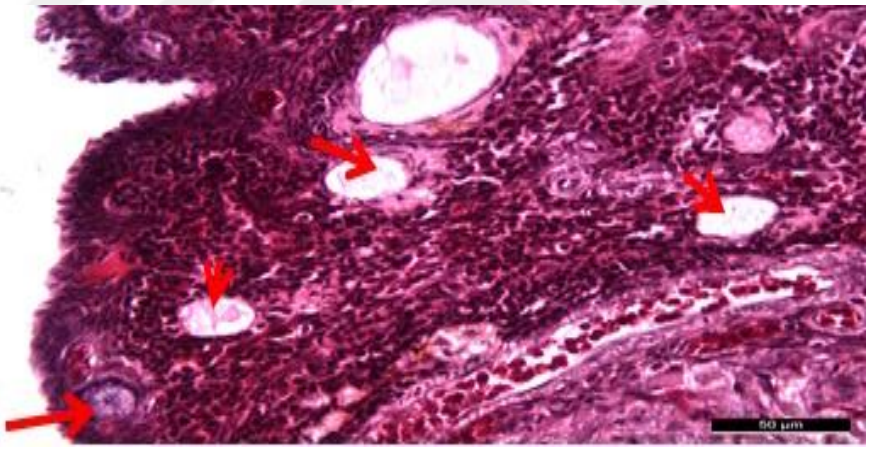
Şekil 4.13 Diyabet grubunda küçük ve büyük büyültmelerde çok sayıda dejeneratif dilate vasküler yapılar

Diyabetli grupta vasküler yapıların dejenerasyona uğradığı tespit edildi.



Şekil 4.14 Diyabet grubunda irregular dejenere graff folikülleri

Diyabet grubunda irregular dejenere graff foliküller saptandı (kırmızı oklar).



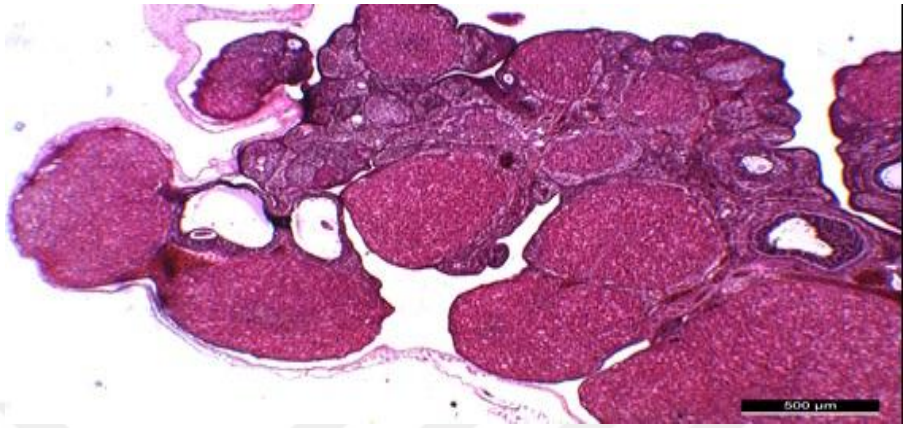
Şekil 4.15 Diyabet grubunda büyük büyültmede çok sayıda dejeneratif erken foliküller

Diyabet edilen grupta dejeneratif erken foliküller saptandı.

4.5.3 Diyabet+Ovaryum grubu

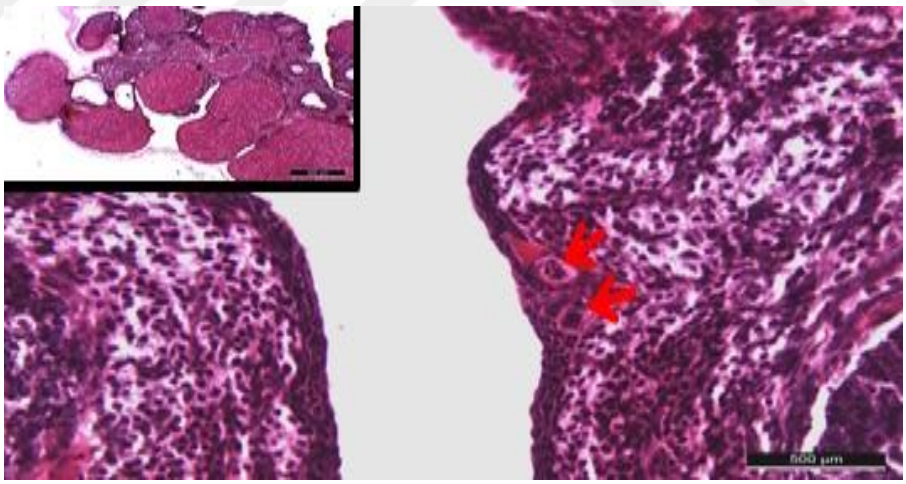
Diyabet+Ovaryum (DM+OV) stromal kök hücre grubunda ise primordial foliküller kontrol grubuna göre daha az sayıda olmakla birlikte mevcuttu ve normal histolojik

yapıda izlendi. Bu grupta gelişen foliküller ve antral foliküller de sayıca daha az olmakla birlikte normal histolojik yapıdaydı.



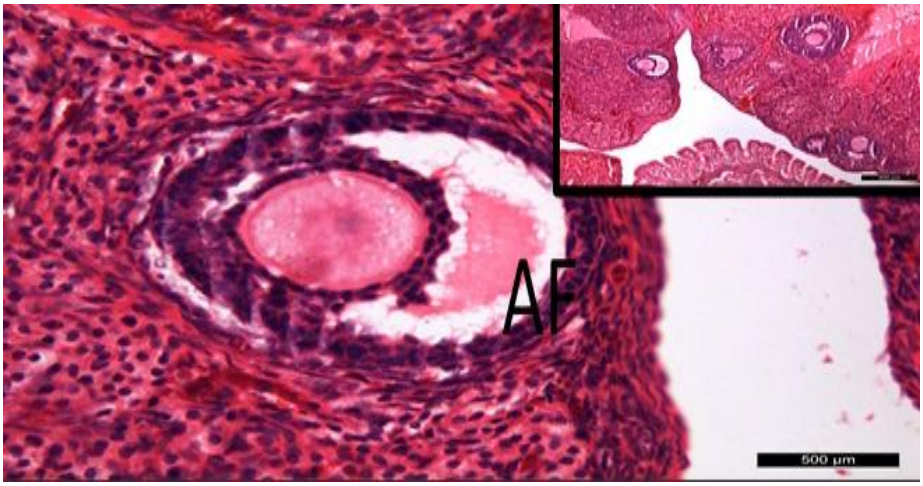
Şekil 4.16 DM+OV grubunda matur (MF) ve gerileyen (GeF) graff folikülleri

OV+MKH verilen grupta ovaryumda matur (MF) ve gerileyen (GeF) graff folikülleri görüldü.



Şekil 4.17 DM+OV grubunda primordial foliküller

OV+MKH grupta primordial foliküllerin normal histolojik yapıda oldukları tespit edildi (kırmızı oklar).

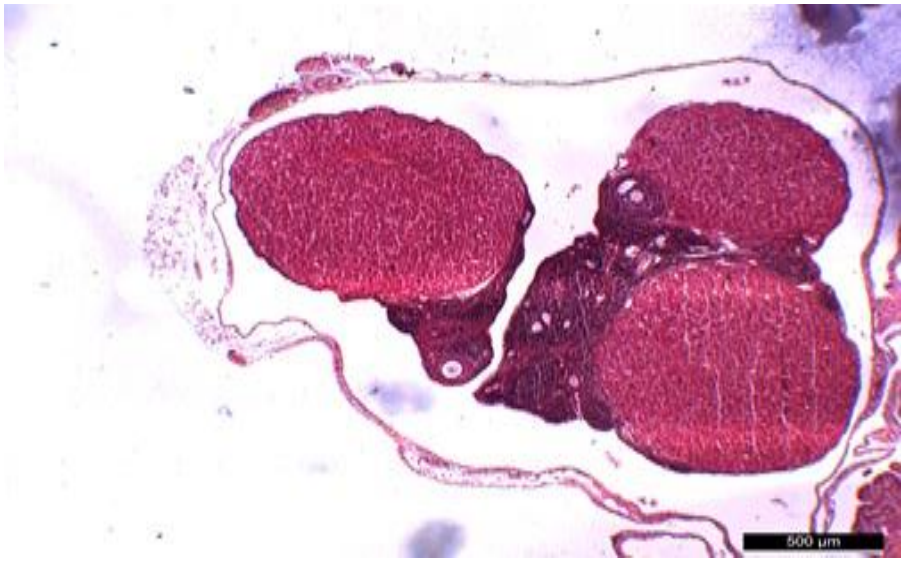


Şekil 4.18 DM+OV grubunda antral folikül

OV+MKH verilen grupta antral foliküller normal histolojik yapıda görüldü (kırmızı oklar).

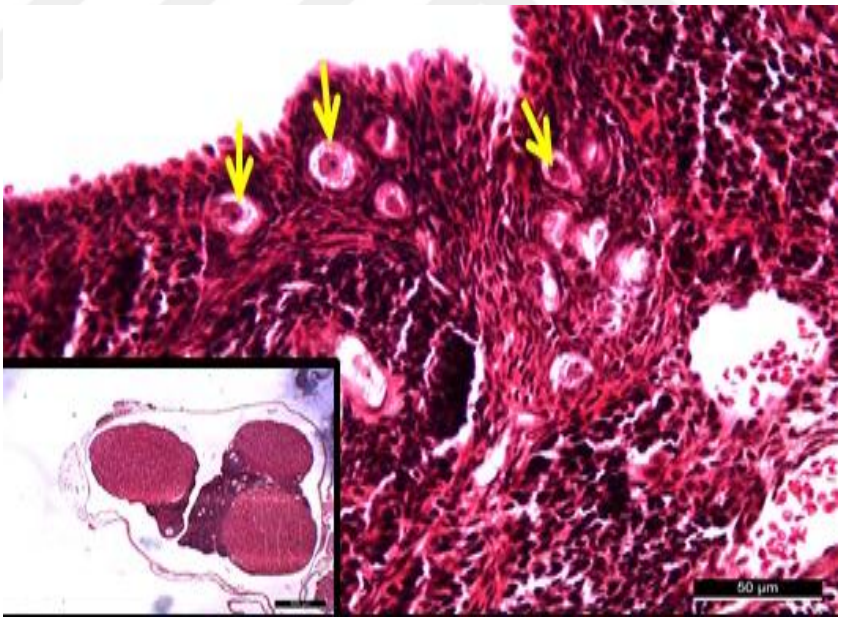
4.5.4 Diyabet+Endometriyum Grubu

Diyabet+endometriyum kök hücre grubunda foliküllerle ilgili bulgular genel olarak diyabet+ovaryum kök hücre grubundakine benzer olmakla birlikte özellikle primordial foliküllerde oosit sitoplazmasında yaygın vakuolizasyonlar dikkati çekti. Ayrıca endometriyum kök hücre grubu çok daha az olmakla stromada dilate alanların varlığı ile diyabet grubundaki dejenerasyon bulguları içeriyordu.



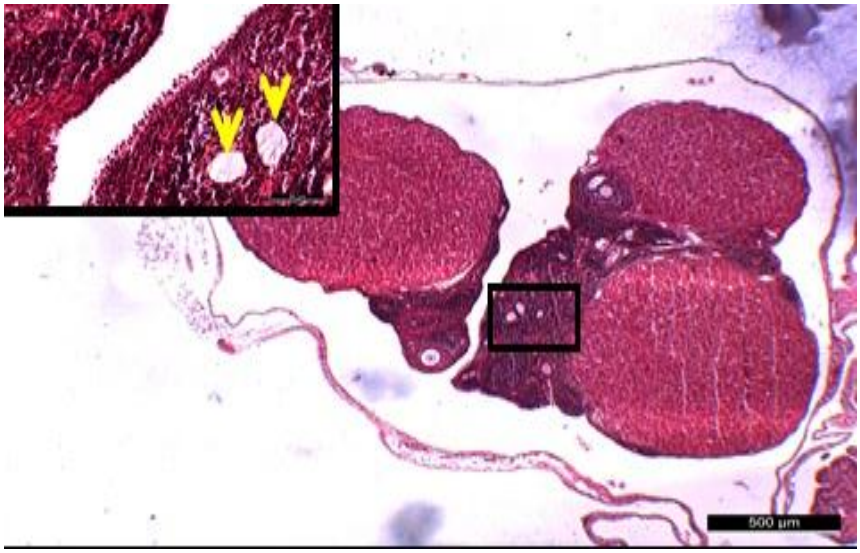
Şekil 4.19 DM+END grubunda küçük büyültmede over dokusu

END+MKH verilen grupta over dokusu normal histolojik yapıda görüldü.



Şekil 4.20 DM+END grubunda primordial folikül

END+MKH verilen bu grupta çok sayıda primordial folikül'ün dejenere olduğu ve büyük sitoplazmik vakuollere sahip olduğu görüldü (sarı oklar).

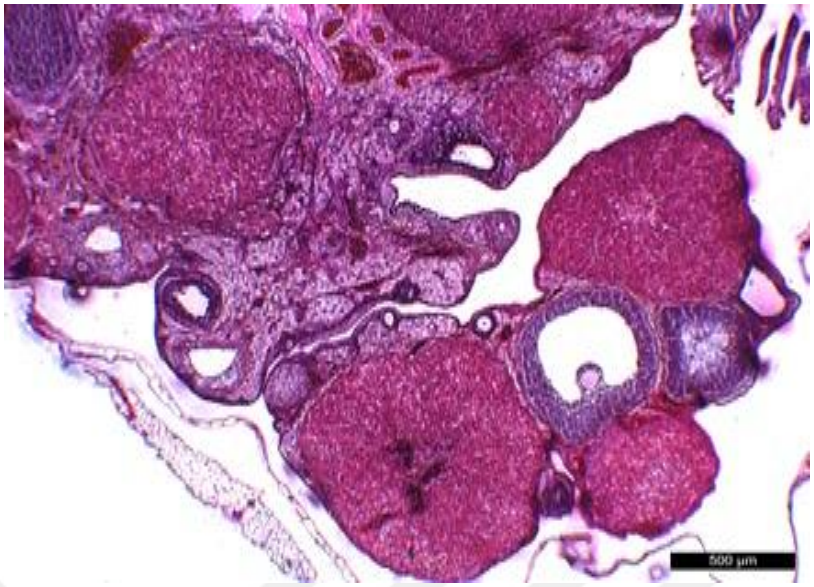


Şekil 4.21 DM+END grubunda büyük büyültmede dilate alanlar

END+MKH verilen grupta stromada azda olsa dejenere dilate alanlar görüldü (sarı oklar)

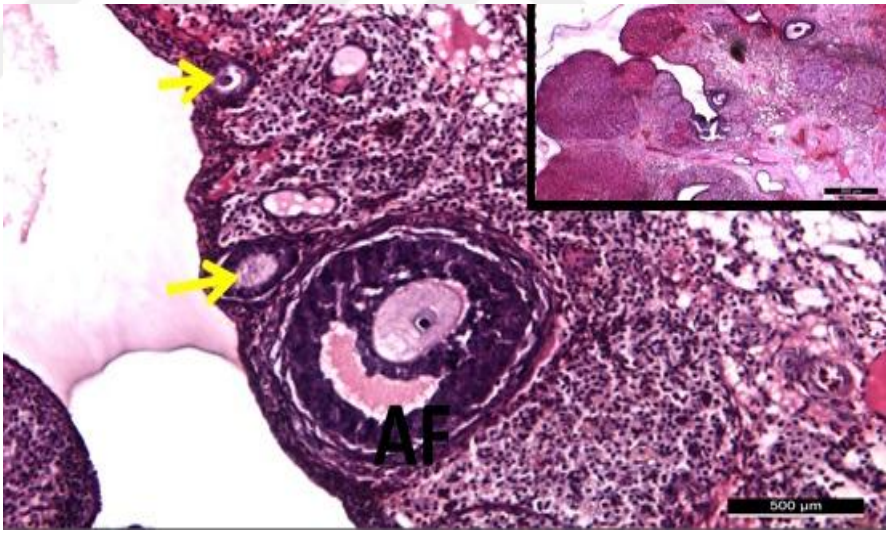
4.5.5 Diyabet+Kemik İliği Grubu

Diyabet+Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre grubunda küçük ve büyük büyültmede yapılan ışık mikroskobik incelemede bulguların diyabet+ovaryum stromal kök hücre grubundaki bulgularla özdeş olduğu gözlendi. Primordial foliküller, gelişen foliküller ve graff folikülleri sayıca kontrol grubuna göre daha az olmakla birlikte normal histolojik yapıdaydı.



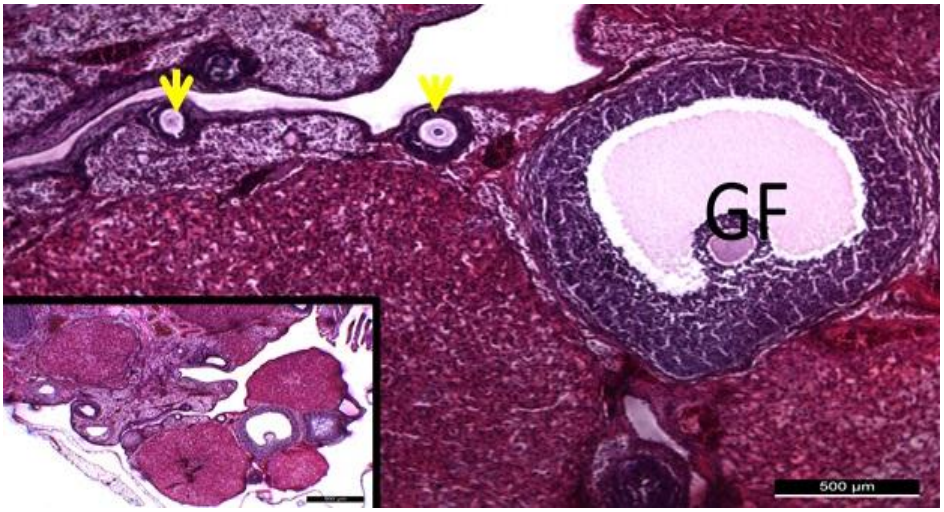
Şekil 4.22 DM+Kİ grubunda küçük büyültmede ovaryum dokusu

Kİ+MKH grubunda ovaryum dokusu normal histolojik yapıda görüldü.



Şekil 4.23 DM+Kİ grubunda büyük büyültmede antral ve primer foliküller

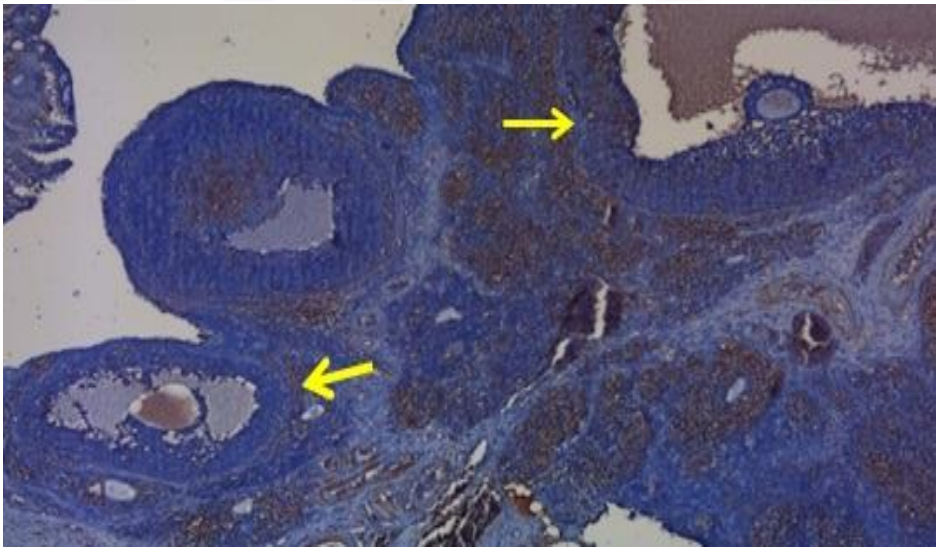
Kİ+MKH grubunda antral ve primer foliküller normal histolojik yapıda görüldü (sarı oklar).



Şekil 4.24 DM+Kİ grubunda büyük büyültmede graff folikülü (GF) ve primer foliküller

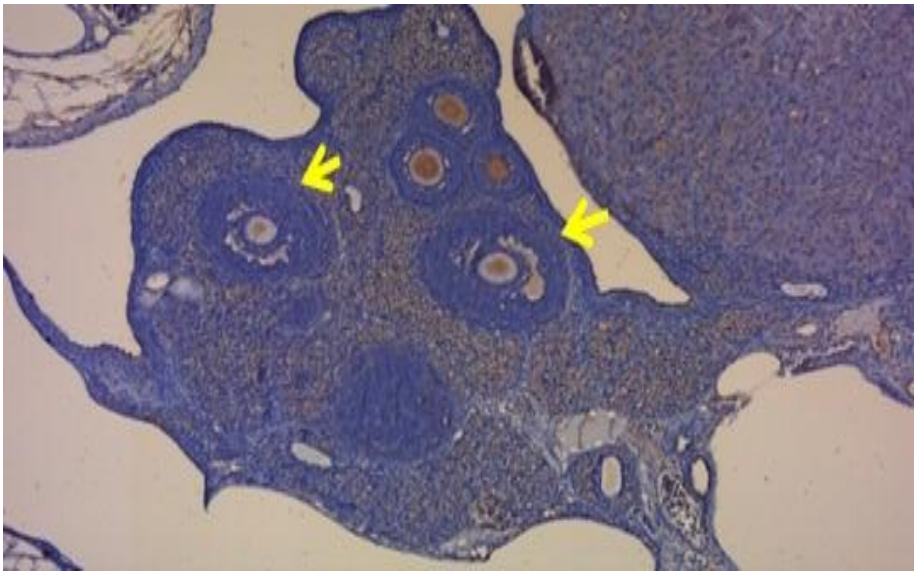
Kİ+MKH grubunda graff ve primer foliküllerin normal histolojik yapıda oldukları tespit edildi (sarı oklar).

4.6 İmmünohistokimyasal Boyanma Sonuçları



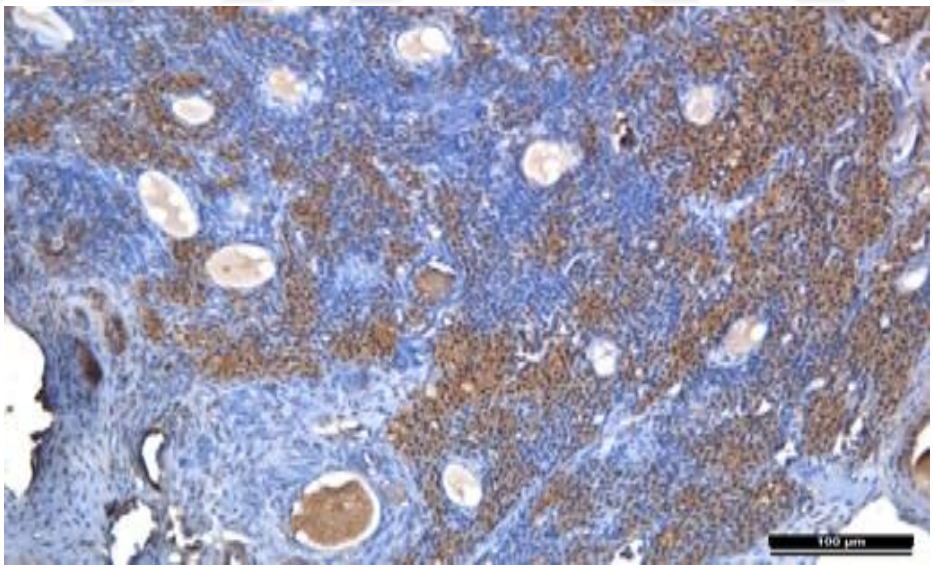
Şekil 4.25 Kontrol grubunda VEGF immün tutulumu

Kontrol grubunda VEGF immün tutulumu yaygın olarak stromal hücrelerde ve antral foliküllerin teka katmanında (sarı oklar) gözlendi.



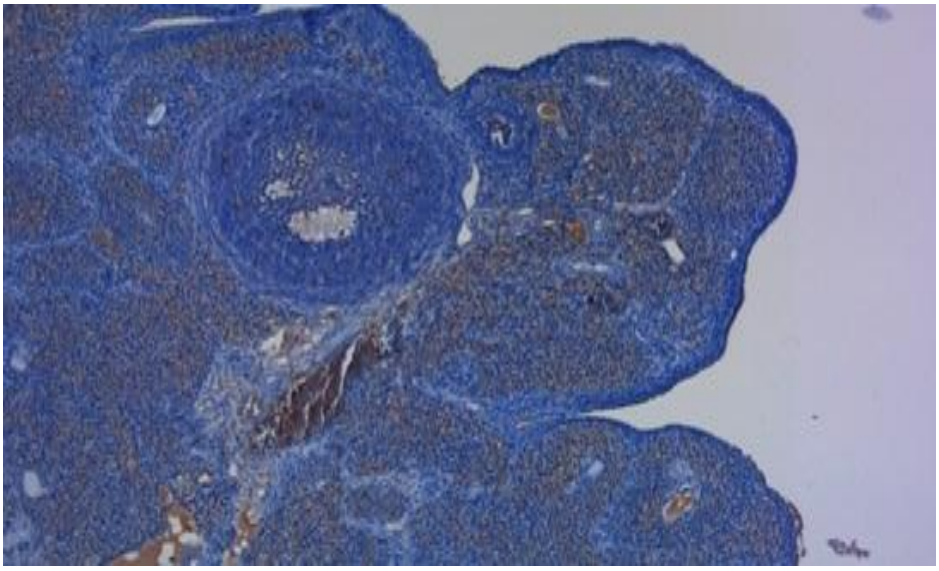
Şekil 4.26 Diyabet grubunda VEGF immün tutulumu

Diyabet grubunda kontrol grubuna göre stromal hücrelerde daha zayıf VEGF immün tutulumu gözlendi, ancak antral folikülleri çevreleyen teka katmanındaki hücrelerde tutulum negatifti (sarı oklar).



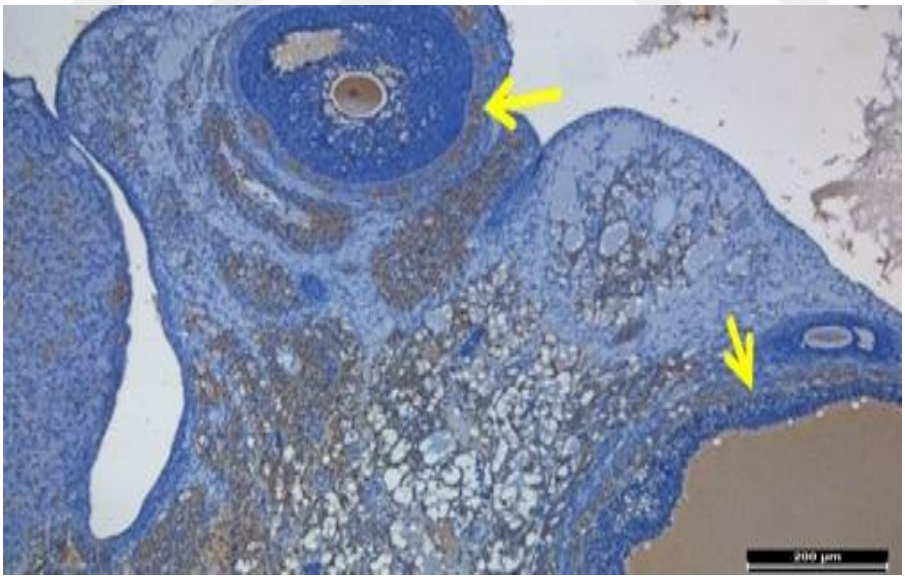
Şekil 4.27 Diyabet+ovaryum stromal kök hücre grubunda VEGF immün tutulumu

Diyabet+ ovaryum stromal kök hücre grubunda VEGF kuvvetli olarak stromal hücrelerde gözlendi.



Şekil 4.28 Diyabet+endometriyum kök hücre grubunda VEGF immün tutulumu

Diyabet+endometriyum kök hücre grubunda VEGF tutulumu diyabet grubundakine benzer şekilde sadece stromal hücrelerde zayıf reaksiyon olarak gözlendi. Teka katmanında immün reaksiyon yoktu.



Şekil 4.29 Diyabet+kemik iliği grubunda VEGF immün tutulumu

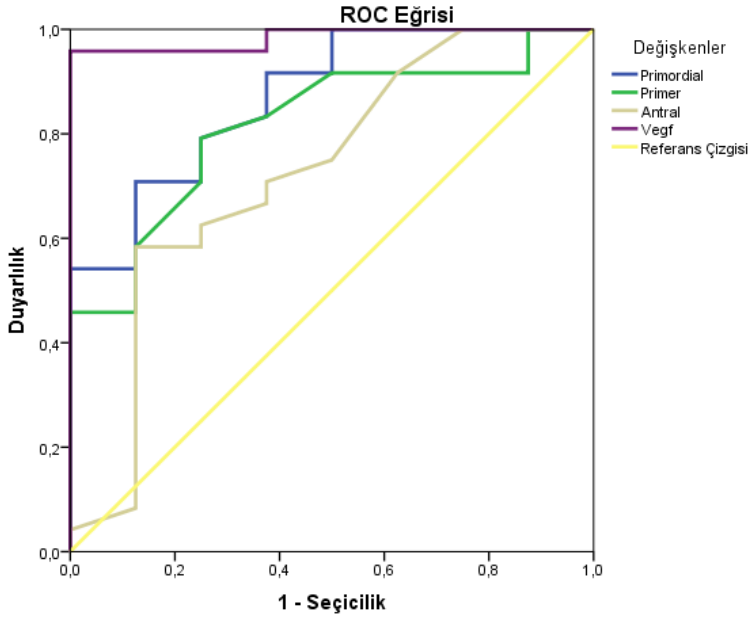
Diyabet+kemik iliği grubunda bulgular kontrol grubu bulgularına benzerdi. Kontrol grubuna göre daha zayıf olmakla birlikte stromal hücreler ve antral foliküller

çevreleyen teka katmanındaki hücreler (sarı oklar) VEGF immünreaksiyonu göstermekteydi.

İmmun sonuçlara bakıldığında VEGF tutulumu kontrole yakın olarak en iyi DM+ Ov ve DM+ Kİ gruplarında saptandı.

4.7 Folikül Sayım Sonuçları

Çizelge 4.10 ROC Eğrisi Analizi Sonuçları



ROC Eğrisi Analizi Sonuçları

Değişken	AUC	Standart Hata (AUC)	p değeri	AUC için %95'lik Güven Aralığı	
				Alt Limit	Üst Limit
Primordial	0,872	0,069	0,002	0,738	1
Primer	0,818	0,080	0,008	0,66	0,975
Antral	0,727	0,114	0,058	0,503	0,95
Vegf	0,984	0,018	<0,001	0,949	1

Elde edilen çoklu ROC Eğrisi analizi sonuçlarına göre, primordial, primer, antral ve vegf değerlerinin dm ile dm+ov, dm+ki ve dm+end gruplarını birbirinden ayrımsama gücü sırasıyla 0,872 (p=0,002), 0,818 (p=0,008), 0,727 (p=0,058) ve 0,984 (p<0,001) olarak bulunmuştur.

Tüm gruplara ait örneklerdeki primordial folikül sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre diğer tüm grupların değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir. Diyabet grubu primordial folükül sayısı değerlendirildiğinde ise, dm grubuna göre tüm tedavi gruplarının primordial folikül sayıları artış göstermiştir. Dm grubu ile dm+end grubu hariç diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Dm+ov grubu ile dm+end grubu ve dm+end ile dm+ki grupları arasındaki fark istatistik olarak anlamlı iken; dm+ov ile dm+ki arasında anlamlı fark görülmedi. Tedavi grupları arasında en fazla sayıda primordial folikül içeren grup dm+ki grubu olarak saptandı.

Tüm gruplara ait sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarının primer folikül sayıları azalma göstermiştir. Kontrol grubu ile dm+ov grubu hariç diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında bu azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Diyabet grubu primer folükül sayısı değerlendirildiğinde ise, dm grubuna göre tüm tedavi gruplarının antral folikül sayıları artış göstermiştir. Dm grubu ile dm+end grubu hariç diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Dm+ov grubu ile dm+end grubu ve dm+end ile dm+ki grupları arasındaki fark istatistik olarak anlamlı iken; dm+ov ile dm+ki arasında anlamlı fark görülmedi. Tedavi grupları arasında en fazla sayıda primer folikül içeren grup dm+ov grubu olarak tespit edildi.

Tüm gruplara ait örneklerdeki antral folikül sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubuna göre tüm tedavi gruplarının antral folikül sayıları azalma göstermiştir. Kontrol grubu ile dm+ki grubu hariç diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında bu azalma istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir. Diyabet grubu antral folükül sayısı değerlendirildiğinde ise, dm grubuna göre tüm tedavi gruplarının antral folikül sayıları artış göstermiştir. Dm grubu ile diğer tüm tedavi grupları karşılaştırıldığında bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermemiştir. Dm+ov grubu ile dm+end grubu; Dm+ov grubu ile dm+ki grubu ve dm+end ile dm+ki grupları arasında anlamlı fark görülmedi. Tedavi grupları arasında en fazla sayıda antral folikül içeren grup dm+ki grubu olarak tespit edildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tezde STZ ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda, farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin diyabetin ovaryumlara vermiş olduğu hasarın tedavi edici etkileri araştırıldı. Diyabet oluşturulan sıçanlarda, ağırlık ölçümleri, kan şekeri ölçümleri ve immunohistopatolojik incelemelerin sonuçları mevcut literatürdeki bulguların değerleriyle karşılaştırıldı.

Bizim çalışmamızda kontrol grubu (hiçbir işlem yapılmamış, normal grup) dışındaki yetişkin dişi sıçanlara 45 mg/kg STZ intraperitoneal yolla verildi. 72. Saatte kuyruk veninden alınan kan örneklerinde kan glukoz değerleri 200-250 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diyabet olarak kabul edildi. 3. Haftanın sonunda farklı kaynaklardan elde edilen kök hücreler deney hayvanlarına verilerek 6. Haftanın sonunda sıçanlar sakrifiye edilip over dokuları çıkarılmıştır.

Deney sonunda yapılan histopatolojik incelemelerde kök hücre uygulanmayan diyabetik grupta sıçanların over dokusunda, normal sıçanlarla karşılaştırıldığında (kontrol grubu) foliküler dejenerasyon, stromal dejenerasyon ve stromal fibrozis'in arttığı, overin morfolojik yapısının bozulduğu ve stromal inflamasyonun olduğu tespit edilmiştir (Şekil 14, 15,16 17). Kontrol grubunda ise ovaryum dokusu incelendiğinde çok sayıda primordial, primer, antral ve graff folikülleri ile stromal yapıların normal histolojik özellikleri içerdiği gözlenmiştir (Şekil 10, 11, 12, 13). Bu bulguların Pala ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışma ile uyumlu olduğu görülmüştür (Pala vd. 2013).

Diyabet grubunda ise belirgin olarak gözlenebilen çok sayıda dejeneratif gelişen foliküller ve medullar bölgede çok sayıda dilate vasküler yapılar, yer yer hematom alanları gözlenmiştir (Şekil 14, 15, 17). Bu grupta kesit düzlemlerinde primordial foliküller gözlenmezken gelişen foliküllerin duvarları folikül hücre katmanının az olması nedeniyle ince duvarlı olarak tespit edilmiştir (Şekil 15). Bu tür foliküllerin gerileyen folikül yapısından daha çok immatür foliküller olduğu düşünülmüştür.

Yapılan incelemede graff folikülleri ise ince duvarlı ve düzensiz yapılar olarak immatür şekilde gözlenmiştir (Şekil 16).

Yapılan deney hayvanları çalışmalarında değişik şekillerde işaretlenen mezenkimal kök hücrelerin ovaryumlardaki foliküllerin teka tabakalarına kadar ulaştığı gösterilmiştir (Wang vd. 2013). Bizim çalışmamızda da BrdU ile işaretli kök hücrelerin her üç hücre grubunda da over dokusu içinde ve foliküllerin çevresinde yerleştiği gösterilmiştir (Şekil 29,30,31).

Çalışmanın histopatolojik sonuçları değerlendirildiğinde, Diyabet grubunda belirgin olarak gözlenebilen çok sayıda dejeneratif gelişen foliküller ve medullar bölgede çok sayıda dilate vasküler yapılar, yer yer hematom alanları gözlenmiştir (Şekil 14, 15,16). Bu grupta kesit düzlemlerinde primordial foliküller gözlenmezken gelişen foliküllerin duvarları folikül hücre katmanının az olması nedeniyle ince duvarlı olarak tespit edilmiştir (Şekil 17). Bu tür foliküllerin gerileyen folikül yapısından daha çok immatür foliküller olduğu ve diyabetin hasarına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Kök hücre tedavisi uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna göre gelişen foliküller ve antral foliküller de sayıca daha az olmakla birlikte normal histolojik yapıda gözlenmiştir. Primordial folikül değerleri sırasıyla kontrol grubunda ortalama %79,38, diyabet grubunda %20,88, dm+ov grubunda %47,13, dm+end grubunda %24,13, dm+ki grubunda 53,38 olarak tespit edilmiştir. Diyabet+Ovaryum stromal kök hücre grubunda primordial foliküller kontrol grubuna göre daha az sayıda olmakla birlikte over dokusu içinde ve normal histolojik yapıda izlenmiştir Bu değerler sırasıyla kontrol grubunda %79,38, dm+ov %47,13 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 14). Bu grupta gelişen foliküller ve antral foliküller de sayıca daha az olmakla birlikte normal histolojik yapıda görülmüştür. Bu değerler sırasıyla kontrol grubunda 24,50, dm+ov 14,75 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 14). Diyabet+endometriyum kök hücre grubunda foliküllerle ilgili bulgular genel olarak diyabet+ovaryum kök hücre grubundakine benzer olmakla birlikte özellikle primordial foliküllerde oosit sitoplazmasında yaygın vakuolizasyonlar dikkati çekmiştir. Ayrıca bu grupta primordial folikül sayısı %24,13 olarak ve kök hücre uygulanmayan diyabet grubunda olduğu gibi stromada dilate alanların varlığı ve

dejenerasyon bulguları gözlenmiştir (Şekil 15). Bu grupta gelişen foliküller ve antral foliküller de kontrol grubuna göre sayıca daha azdır. Bu değerler sırasıyla kontrol grubunda 24,50, dm+ov 12,00 olarak tespit edilmiştir. Diyabet+Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre grubunda küçük ve büyük büyültmede yapılan ışık mikroskobik incelemede bulguların diyabet+ovaryum stromal kök hücre grubundaki bulgularla özdeş olduğu tespit edilmiş ve primordial foliküller, gelişen foliküller ve graff folikülleri sayıca kontrol grubuna göre daha az olmakla birlikte normal histolojik yapıya benzer şekillerde saptanmıştır (Şekil 25, 26). Bu değerler sırası ile kontrol grubunda %79,38, dm+ki grubunda %53,38 olarak saptanmıştır. Bu grupta gelişen foliküller ve antral foliküller de kontrol grubuna göre sayıca daha azdır. Bu değerler sırasıyla kontrol grubunda 24,50, dm+ov 17,50 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 14).

Beşikçioglu ve Arkadaşlarının 2019 yılında sıçanlarda yaptıkları deneylerde ilk gün siklofosfamid uygulayıp bunu takip eden gün kök hücre uygulamasını yapmışlardır. Bu işlemi 2 kez tekrar eden araştırmacılar ilk hasarı takip eden 10. Gün deneyi sonlandırarak dokuları incelemişlerdir. Histopatolojik incelemelerde overyen stromal kökenli mezenkimal kök hücrelerin kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelere göre over dokusu üzerine protektif etkisinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Beşikçioglu vd. 2019). Biz ise çalışmamızda kronik bir hastalık olarak diyabetin over dokusunda yaptığı hasarı iyileştirmek için üç farklı kaynaktan elde edilmiş mezenkimal kök hücreyi kullandık. Bunlardan over dokusu kökenli mezenkimal kök hücre ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin endometriyum kökenli mezenkimal kök hücrelere göre daha etkin bir hasar onarımı yaptığını gösterdi. Sun ve arkadaşlarının 2013 yılında siklofosfamid kullanarak yaptıkları fare çalışmasında siklofosfamid uygulamadan 15 gün sonra 1x10/0,3 ml olacak şekilde hem over dokusuna hem de intravenöz olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanmıştır. Uygulamadan sonra farelerin yarısı 1 hafta yarısı 1 ayda sakrifiye edilerek over dokuları çıkarılmıştır (Sun vd. 2013). Bizim çalışmamızda ise Sun ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak üç farklı kökenli kök hücre kullanıldı. Tedavi edilmeye çalışılan kronik diyabet sonucu oluşan over hasarında kemik iliği ve over dokusu kökenli mezenkimal kök hücrelerin etkinliği gösterildi. Terraciano ve arkadaşlarının 2014 yılında farelerde yaptığı çalışmada sisplatin kullanılarak over hasarı oluşturulmuştur. Oluşturulan hasardan bir hafta sonra

$1x10^4$/5 µl PBS içinde adipoz kaynaklı kök hücre, dişi germline kaynaklı kök hücre ve over süspansiyondan elde edilen hücreler verilmiştir. Hücre uygulamasından sonra farelerin yarısı 7, yarısı 14. Gün'de sonlandırılarak over dokuları incelenmiştir. Sonuç olarak adipoz kaynaklı kök hücre ve dişi germline kaynaklı kök hücrelerin sisplatin uygulaması sonucu oluşan over hasarını ortadan kaldırdığı ancak over dokusundan enzimatik yolla süspansiyon haline getirilen hücre uygulamasının ise etkin olmadığı gösterilmiştir (Terraciano vd. 2014). Bizim çalışmamızda ise Terraciona ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak kronik sistemik bir hastalık olarak diyabetin oluşturduğu over hasarını iyileştirmede eksplant yöntemi ile elde edilen kemik iliği kaynaklı ve over kaynaklı mezenkimal kök hücrenin etkin olduğu görülmüştür. Wang ve arkadaşlarının 2013 yılında farelerde siklofosfamid ile oluşturmuş oldukları over hasarını umblikal kord kaynaklı kök hücre kullanarak 10^7/ml/100 µl PBS içinde overlere enjekte edilmiştir. Kök hücre uygulamasından 48 saat sonra bizim deney modelimizden farklı olarak intraperitoneal yolla 5 µl hCG enjekte edilmiştir. Hücre uygulamasından bir hafta sonra over dokuları çıkarılarak histopatolojik inceleme yapılmıştır. Göbek kordonu kökenli kök hücrelerin siklofosfamid sonucu oluşan over hasarını iyileştirdiği görülmüştür (Wang vd. 2013). Tüm bu çalışmaların yanı sıra klinik olarak rapor edilen bazı vakalarda, siklofosfamid veya benzeri bir kemoterapötik hasar sonucu oluşan prematur overyen yetmezliklerin hastaya farklı nedenle uygulanan kemik iliği kökenli hematopoetik kök hücrelerinin naklinden sonra düzeldiği ve spontan gebeliklerin geliştiği gösterilmiştir (Salooja N vd. 1994, Sanders vd. 1996, Salooja N vd. 2001, Hershlag vd. 2002, Veitia vd. 2007, Herraiaz vd. 2018).

Üreme tıbbında kök hücreler; fertilitenin korunması ve kök hücrelerden fonksiyonel gamet hücresi üretimi amacıyla kullanılmaktadırlar. Biz bu çalışmada kök hücrelerin terapötik etkilerini inceledik. Kök hücreler salgılamış oldukları sitokinlerle mikro-çevre oluşturarak endokrin ve parakrin etki ile doku onarımını sağlarlar. Ayrıca başka hücrelere farklılaşabilme yetenekleri sayesinde dokunun yenilenmesine yardımcı olurlar. Sonuç olarak bizim çalışmamızda, toplumda sık görülen kronik bir hastalık olan diyabet nedenli over hasarı sıçan modelinde, kemik iliği, over ve endometriyum kaynaklı mezenkimal kök hücre kullanarak diyabetin over dokusu üzerine oluşturduğu hasarı onarmaya çalıştık. Çalışmanın sonucu değerlendirildiğinde ve ilgili literatürler ile

birlikte tartışıldığında çeşitli kök hücre kaynaklarının over hasarını onarmada etkin olabileceği, bizim çalışmamızda yer alan kemik iliği ve over kaynaklı mezenkimal kök hücrenin de bu hücresel tedavi ürünlerinden olabileceği görülmüştür. Bu çalışmalar, olası doku restorasyon ve rejenerasyon mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için daha geniş gruplarda ve çeşitli gen ekspresyon ve yolak çalışmaları ile desteklenmelidir.

KAYNAKLAR

Acosta, AA. 1992. Recent advances in medically assisted conception- ıntroduction. Who Technical Report Series, (820): 1-1.

Akinci, E., Banga, A., Greder, LV., Dutton, JR. ve Slack, JM. 2012. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. Biochem J., 442(3):539-50.

Alvin, C. 2000. Diabetes Mellitus. Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Lango D, Harrison.15thed., 2114-2125, New York: Mcgraw-Hill Company.

American Diabetes Association. 2004. Diagnosis And Clasification Of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 27:5-14.

American Diabetes Association. 2012. Standards Of Medical Care İn Diabetes-2012. Diabetes Care, 35:11-63.

Anonim. 2001. The Decode Study Group On Behalf Of The European Diabetes Epidemiyology Group: Glucose Tolerance And Cardiovascular Mortality, Comparison Of Fasting And 2-Hour Diagnostic Criteria; Arch Intern Med., 161:397-404.

Ateş, U. 2016. Kök Hücreyi Tanıyalım. Fng & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 1(1):19-28.

Atmaca, A. 2012. Diabetes mellitusun tanı ve izlem kriterler. J. Exp. Clin. Med., 29:S2-S6

Baytekin, Ö. 2009. Güvenen Bozulmuş Açlık Glukozu, Bozulmuş Glukoz Toleransı Ve Tip 2 Diabetes Mellitus Olgularında Chemerin, Vaspin ve Hscrp Düzeyleri. Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Ve Klinik Biyokimya Bölümü

Beaser, R.C., Weinger, K. ve Bolduc-Bissell, L.M. 2005. Education in the treatment of diabetes. İn: Kahn Cr, Weir Gc, King Gl, Jacobson Am, Moses Ac, Smith Rj, Editors. Joslin's Diabetes Mellitus. 14th Ed. 597- 610, Boston: Lippincott Williams&Wilkins.

Beşikçioglu, H.E., Sarıbas, G.S., Ozogul, C., Tıryakı, M., Kılıc, S., Pınarlı, F.A. ve Gülbahar, Ö. 2019. Determination of the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and ovarian stromal stem cells on follicular maturation in cyclophosphamide induced ovarian failure in rat. Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology, 58, 53-59.

Bhasin, S., Enzlin, P., Coviello, A. ve Basson, R. 2007. Sexual Dysfunction İn Men And Women With Endocrine Disorders. Lancet, 369:597-611.

Biberoğlu, K. ve İlçin, G. 2003. İç Hastalıkları-Diabetes Mellitus'ta Tanı ve Sınıflama. 2279.

Braun, M., Wassmer, G., Klotz, T., Reifensrath, B., Mathers, M. ve Engelmann, U. 2000. Epidemiology Of Erectile Dysfunction: Results Of The `Cologne Male Survey.' Int J Impot Res., 12(6): 305-311.

Calmers, K.H. 2005. Medical Nutrition Theraphy. in: Kahn Cr, Weir Gc, King Gl, Boston: Lippincott Williams&Wilkins, 611- 32.

Can, A. 2014. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Ankara: Akademisyen Kitapevi.

Cheung, Th. ve Rando, T.A. 2013. Molecular Regulation Of Stem Cell Quiescence. Nat Rev Mol Cell Biol.,14:329-340.

Codner, E. ve Cassorla, F. 2009. Puberty and Ovarian Function in Girls with Type 1 Diabetes Mellitus. Horm Res, 71:12–21.

Comhaire, F.H. 1987. Towards More Objectivity in Diagnosis And Management Of Maleınfertility. International Journal Of Andrology, 3-53.

Cotellessa, M., Barbieri, P., Mazzella, M., Bonassi, S., Minicucci, L. ve Lorini, R. 2003. High İncidence Of Childhood Type 1 Diabetes İn Liguria, Italy, From 1989 To 1998. Diabetes Care, 26: 1786–9.

Couper, J.J. 2001. Environmental Triggers Of Type 1 Diabetes. J Paediatr Child Health, 37: 218–20.

Çetinkaya, D 2013. Mezenkimal Kök Hücrelerin Rejeneratif Tıpta Önemi, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji/Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi ve Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Merkezi, Ankara.

Fajans, S.S., Bell, G.I. ve Polonsky K.S. 2001. Moleculer Mechanisms And Clinical Pathophysiology Of Maturity-Onset Diabetes of The Young. N Engl J Med, 345:971-977.

Feldhaus-Dahir, M. 2009. The Causes And Prevalence Of Hypoactive Sexual Desire Disorder: Part I. Urol Nurs, 29:259-263.

Flier, J.S. 1992. Lilly Lecture: Syndromes Of İnsulin Resistance. From Patient To Gene And Back Again. Diabetes, 41:1207-19

Garber, A.J. 1994. Diabetes Mellitus "İnternel Medicine, Editor: Stein Jlt, Mosby – Year Book, St. Louis, Missouri, 1391- 92.

Giraldi, A., Persson, K., Werkström, V., Alm, P., Wagner, G. ve Andersson, K.E. 2001. Effects Of Diabetes On Neurotransmission in Rat Vaginal Smooth Muscle. Int J Impot Res, 13:58-66.

Guyton, A.C., Hall, J. E., Çavuşoğlu, H., Yeğen, B.Ç., Aydın, Z. ve Alican, İ. 2007. Tıbbi fizyoloji. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.

Hatemi, H. 1988. Diabet komplikasyonları ve risk faktörleri. 313-343, Cerrahpasa Tıp Fakültesi Yayınları.

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S. ve Saitou, M. 2011. Reconstitution Of The Mouse Germ Cell Specification Pathway İn Culture By Pluripotent Stem Cells Cell, Aug 19;146(4):519-32.

Herraiz, S., Romeu, M., Buigues, A., Martínez, S., García, C.D., Seguí, I.G., Martínez, J., Pellicer, N. ve Pellicer, A. 2018. Fertil Steril, 110:496–505.

Hershlag, A. ve Schuster, M.W. 2002. Return of fertility after autologousstem cell transplantation. Fertil Steril, 77:419–21.

Hsueh, A.J., Billig, H., Tsafriri, A. 1994 Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev, 15: 707– 724.

Ishihara, H., Maechler, P., Gjinovci, A., Herrera, P.L., Wollheim, C.B. 2003. Islet beta-cell secretion determines glucagon release from neighbouring alpha-cells. Nature Cell Biology, 5:330–335.

Isidro, M.l. 2012. Sexual Dysfunction in Men With Type 2 Diabetes. Postgrad Med J. 88(1037):152-9

Işıldak, M., Güven, S.G. ve Gürlek, A. 2004. Hacettepe Tıp Dergisi, 35:96-99

İmamoğlu, Ş. 2009. Diabetes Mellitus Multidisipliner Yaklaşımla Tanı, Tedavi ve izlenim. 3. Baskı İstanbul Deomed Medikal Yayıncılık.

Kezele, P.R., Nilsson, E.E. ve Skinner, M.K. 2002. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol, 192: 37–43.

Kırca, N. ve Pasinlioğlu, T. 2013. İnfertilite Tedavisinde Karşılaşılan Psikososyal Sorunlar. Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches İn Psychiatry, 5(2):162-178.

Koton, D.N., Ma, B.Y., Cardosa, W.V. Sanderson, E.A., Summer, R.S., Williams, M.C. ve Fine, A. 2001. Bone marrowderived cells as progenitor of lung epithelium. Development, 128:5181-5188

Kubilay, V. ve Işık, A.Z. 1999. İn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuar. 1. Baskı: Çağdaş Medikal Kitabevi.

Külekçi, G.D. 2010. Diyabetik Farelerin Ovaryan Folikül Morfolojisinde ve Zona Pellusida Proteinleri Dağılımında Görülen Değişikliklerin İmmünohistokimyasal ve İnce Yapı Düzeyinde İncelenmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.

Lasaridis, A.N. ve Sarafidis, P.A. 2003. Diabetic Nephropaty And Antihypertensive Treatmen: What Are The Lessons From Clinical Trials. Am J Hypertens, 16:689-697.

Mackay, L., Glasier, A. ve Mcknight, J.A. 2005. Contraception For Women With Diabetes Mellitus. Pract Diab Int, 22(2):49-52.

Meeking, D.R., Fosbury, J.A ve Cummings, M.H. 2013. Sexual Dysfunction And Sexual Health Concerns İn Women With Diabetes. Practical Diabetes, 30:327-331.

National Institutes of Health. 2004. Stem Cells: Scientific Progress And Future Research Directions. University Press Of The Pacific, 8

Pala, H.G., Erbaş, O., Oltulu, F., Pala, E.E., Aktuğ, H. ve Yavaşoğlu, A. 2013. Diyabetik Rat Overlerindeki Glikoz Hasarı ve Nf-Kappa B Yolunun Etkisi. Ege Tıp Dergisi / Ege Journal Of Medicine, 52(1):32-36.

Park, K., Ahn, K., Chang, J.S., Lee, S.E., Ryu, S.B ve Park, Y.I. 2002. Diabetes İnduced Alteration of Clitoral Hemodynamics And Structure İn The Rabbit. J Urol, 168:1269-1272.

Paronen, J., Knip, M., Savilahti, E. et al. 2000. Effect Of Cow's Milk Exposure And Maternal Type 1 Diabetes On Cellular And Humoral İmmunization To Dietary İnsulin İn İnfants At Genetic Risk For Type 1 Diabetes. Finnish Trial To Reduce Iddm İn The Genetically At Risk Study Group. Diabetes, 49: 1657–65.

Poll, D.V., Parekkadan, B., Cho, C.H., Berthiaume, F.C., Arno, Y.N., Tilles, W. ve Yarmush. M.L. 2008. Mesenchymal Stem Cell–Derived Molecules Directly Modulate Hepatocellular Death and Regeneration In Vitro and In Vivo. Hepatology, 47:1634-1643.

Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z. ve Giudice, L.C. 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr Rev, 20:535–582.

Ricordi, C., Inverardi, L. ve Domínguez-Bendala, J. 2012. From cellular therapies to tissue reprogramming and regenerative strategies in the treatment of diabetes. Regen Med., 7(6 Suppl):41-8.

Rutter, G.A. 2001. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: Recent advances. Molecular Aspects of Medicine, 22: 247–284

Salooja, N., Chatterjee, R., McMillan, A.K., Kelsey, S.M., Newland, A.C., Milligan, D.W. et al. 1994. Successful pregnancies in women following single auto-transplant for acute myeloid leukemia with a chemotherapy ablation protocol. Bone Marrow Transplant, 13:431–5

Salooja, N., Szydlo, R.M., Socie, G., Rio, B., Chatterjee, R., Ljungman, P. et al. 2001. Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. Lancet, 358:271–6.

Sanders, J.E., Hawley, J., Levy, W., Gooley, T., Buckner, C.D., Deeg, H.J. et al. 1996. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. Blood, 87:3045–52.

Satman, I., Yılmaz, M.T. and Turdep Group. 2002. Population-Based Study Of Diabetes And Risk Characteristics in Turkey: Results Of The Turkish Diabetes Epidemiology Study (Turdep). Diabetes Care,25:1551-1556

Sato, T., Katagiri, K., Yokonishi, T., Kubota, Y., Inoue, K., Ogonuki, N., Matoba, S., Ogura, A. ve Ogawa, T. 2011. In Vitro Production of Fertile Sperm From Murine Spermatogonial Stem Cell Lines Takuya. Nature Communıcatıons.

Shi, Y., Wang, Y., Li, Q., Liu, K., Hou1, J., Shao, C. ve Wang, Y. 2018. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. Nature Reviews Nephrology, volüme 14, 93-507.

Sun, M., Wang, S., Li, Y.,Yu, L., Gu, F., Wang, C. ve Yao, Y. 2013. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failureSun et al. Stem Cell Research & Therapy.

Tanyeri, F. 1996. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması Ve Prevelansı. Aktüel Tıp Dergisi, 7: 500 – 503.

Tekeli, S., Arısu Naghavi, E., Gökçe, B., Sır, G., Yiğittürk, G., Çavuşoğlu, T. vd. 2016. Kök Hücreler; Mezenkimal Kök Hücreler ve Güncel Klinik Uygulamaları. Fng & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 1:72-83

Terraciano, P., Garcez, T., Ayres, L., Durli, I., Baggio, M., Kuhl, C.P., Laurino, C., Passos, E., Paz, A.H. ve Lima, E.C. 2014. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice Hindawi Publishing Corporation.

Trounson, A. ve Mcdonald, C. 2015. Stem Cell Therapies İn Clinical Trials: Progress And Challenges. Cell Stem Cell,17:11-22.

Tyrer, G., Steel, J.M., Ewing, D.J, Bancroft, J., Warner, P. ve Clarke, B.F. 1983. Sexual Responsiveness İn Diabetic Women. Diabetologia, 24:166-171.

Veitia, R.A., Gluckman, E., Fellous, M. ve Soulier, J. 2007. Recovery of female fertility after chemotherapy, irradiation, and bone marrow allograft: further evidence against massive oocyte regeneration by bone marrow-derived germline stem cells. Stem Cells, 25:1334 5

Wang, S., Yu, L., Sun, M., Mu, S., Wang, C., Wang, D. ve Yao, Y. 2013. The Therapeutic Potential of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Mice Premature Ovarian Failure Hindawi Publishing Corporation.

Wang, Z., Wang, Y., Ting Yang, T., Li, J. ve Yang, X. 2017. Study of The Reparative Effects Of Menstrual-Derived Stem Cells On Premature Ovarian Failure İn Mice. Stem Cell Research & Therapy, 8:11-58.

Watkins P.J., Drury, P.l., Howell, S.l. 1996. Diabetes And İts A Managenant 5th Ed. Blackwell Cop, 3.

Weissman, I. 2000. Translating Stem And Progenitor Cell Biology To The Clinic: Barriers And Opportunities. Science 287:1442-1446.

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R. ve King, H. 2004. Global Prevelance of Diabetes: Estimates For The Year 2000 And Projection For 2030. Diabetes Care, 27: 1047- 1053.

Wobus, A.M. 2001. Potential Of Embryonic Stem Cells. Mol Aspects Med, 22:149-64.

Wong, R.S.Y. 2011. Extrinsic Factors Involved in the Differentiation of StemCells into Insulin-Producing Cells: An Overview. Hindawi Publishing Corporation Experimental Diabetes Research, 406182.

Zarzycki, W. ve Zieniewicz, M. 2005. Reproductive Disturbances İn Type 1 Diabetic Women. Neuroendocrinol Lett., 26(6):733–73.

EK 1 Etik Kurul Kararı

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

T.C. Sağlık Bakanlığı

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : **02.05.2016**
Protokol No : **2016 / 20**

Proje yürütücüsünün Adı-Soyadı : **Prof.Dr.Özlem YILDIRIM**
Projenin başlığı : **Kronik Sistemik Bir Hastalık Olarak Diyabetin Over Fonksiyonları Üzerine Etkisi.**
Proje ekibi : Bio.Eda TUNÇ, Uzm.Bio.Meral TİRYAKİ, Bio.Emrullah ÇALIŞIR, Prof.Dr.Candan ÖZOĞUL, Uzm.Dr.Seda Nur AKYOL, Dr.Ferda ALPASLAN PINARLI

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Sprague Dawley, Rat
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 3-6 Aylık, 200-350 gr.

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

Doç. Dr. Ahmet YEŞİLYURT
(Kurul Başkanı)

Prof. Dr. Hakan KORKMAZ
(Başkan Vekili)

Uzm.Vet.Hekim Ziya KARAKULLUKÇU
(Üye)

Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI
(Üye)
(KATILMADI)

Dr. M. Yunus ALP
(Üye)

Bio. Hatice KANTAR
(Üye)

Fatma KILIÇ
(Üye)

İrfan Baştuğ Caddesi No:12 Dışkapı-Altındağ/ANKARA • Telefon: 0 312 596 20 00 • Faks: 0 312 318 66 90 • www.diskapiesh.gov.tr

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eda TUNÇ

Doğum Yeri : Yenimahalle/ANKARA

Doğum Tarihi : 21.04.1992

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise	Nefise Andiçen Lisesi (2006-2010)
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2010-2014)
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (Ağustos 2020)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Mikrogen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi (3/2017- Halen)

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Ve Araştırma Hastanesi (3/2016 – 10/2016)