T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

DENEYSEL DİYABETTE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI TEDAVİ

BAŞAK IŞILDAR

DANIŞMAN
PROF. DR. MERAL KOYUTÜRK

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

"Başak Işıldar" (İmza)

İTHAF

Babaannem Ümmüş Işıldar'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Akademik yaşamımın başından bu yana yol göstericim olan, bilgi ve deneyimlerini her daim benimle paylaşan ve manevi desteğini hep hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Meral Koyutürk'e çok teşekkür ederim.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Elif Güzel Meydanlı'ya, Prof. Dr. İsmail Seçkin'e, Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na, Doç. Dr. Gözde Erkanlı Şentürk'e ve Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi'ye doktora eğitimime verdikleri katkı ve destek için; Prof. Dr. Selda Oktayoğlu'na doktora tez sürecimdeki yardımları için ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar Sunay'a bu süreçteki sonsuz desteği için teşekkürlerimi sunarım.

İhtiyaç duyduğum her anda yardımıma koşan ve her zaman koşacaklarını bildiğim değerli çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Zehra Sezer'e, Araş. Gör. Halil İbrahim Saygı'ya, Dr. Duygu Neccar'a, Dr. Nurdan Olcar'a, Dr. Kübra Çakıllı'ya, Dr. Özgür Uzun'a ve Dr. Belisa Kaleci'ye her şeyden önce manevi destekleri için; Araş. Gör. Merve Erçin'e, Fatma Beyza Sağ'a, Aynur Abdulova'ya ve Hakan Şahin'e tez sürecimdeki yardımları için çok teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi bu zorlu süreçte de sonsuz sevgileriyle destekçilerim olan annem Emine Işıldar, babam Birol Işıldar ve kardeşim Ekin Işıldar'a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte başladığımız akademik yolculuğumuzdaki yoldaşlığı için, sevgili arkadaşım Araş. Gör. Dr. Aslı Erdoğan'a -manevi desteği olmasa çok zorlanacağımı bilerek- teşekkür ederim.

Son olarak; akademik olarak bu yola çıkma kararımızdan bugüne, karşılaştığımız türlü zorlukta ve sevinçte yan yana olduğumuzu bildiğim ve çalışma arkadaşım olmasından mutluluk duyduğum Araş. Gör. Serbay Özkan'a bu süreçteki yol arkadaşlığı için teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Kurum Koordinatörlüğü ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 219S387).

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Tip I Diyabet 3
2.2. Tip I Diyabet Patogenezi ve Sitokinlerin Rolü 3
2.3. Pankreas Organogenezi 4
2.4. Mezenkimal Kök Hücreler ve T1D ile ilişkisi 6
2.5. Şartlandırılmış Medyum Tanımı ve Özellikleri 9
2.6. 3 Boyutlu Hücre Kültürü 9
3. GEREÇ VE YÖNTEM 12
3.1. Gereçler 12
3.1.1. Kimyasallar 12
3.1.2. Alet ve Teçhizat 14
3.1.3. Cihazlar 15
3.2. Yöntemler 17
3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu 17
3.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu 18
3.2.2.1. İmmünofenotipik Karakterizasyon 18
3.2.2.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaştırma 19
3.2.3. Şartlandırılmış Medyumların Hazırlanması 19

3.2.4. Şartlandırılmış Medyumların Protein Miktarlarının ve Sitokin İçeriklerinin Belirlenmesi 21
3.2.5. Deney Gruplarının ve Diyabet Modelinin Oluşturulması 22
3.2.6. Tedavi Süreci ve Hayvan Deneylerinin Sonlandırılması 23
3.2.7. Treg Popülasyon Analizi 24
3.2.8. İn vivo C-peptit, İnsülin ve Sitokin Analizleri 25
3.2.9. Histolojik Analizler 26
3.2.10. İmmünohistokimyasal Analizler 26
3.2.11. İstatistiksel Analizler 27
4. BULGULAR 28
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyon Analizi 28
4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Analizleri 28
4.2.1. İmmünofenotipik Karakterizasyon Analizleri 28
4.2.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Analizleri 29
4.3. Şartlandırılmış Medyumların İçeriklerinin Belirlenmesi 30
4.4. Deney Hayvanlarına Ait Ağırlık, Kan Glikozu, Serum C-Peptit ve Serum İnsülin Verileri 31
4.5. Treg Popülasyon Analizi 34
4.6. Sitokin Analizi 35
4.7. Histolojik Analizler 37
4.8. İmmünohistokimyasal Analizler 37
4.8.1. Nkx6.1 37
4.8.2. Pdx1 39
4.8.3. İnsülin 41
5. TARTIŞMA 43
KAYNAKLAR 52
HAM VERİLER 60
FORMLAR 61
ETİK KURUL KARARI 62
PATENT HAKKI İZNİ 63
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 64
ÖZGEÇMİŞ ....**ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Deney Grupları 22

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Pankreas Gelişiminde Ana Morfogenetik Süreçlerin Transkripsiyonel Düzenlenmesi 6
Şekil 2: MKH'lerin Tip 1 Diyabetle İlişkisi 8
Şekil 3: Deney Akışı 17
Şekil 4: Şartlandırılmış Medyumun Hazırlanma Basamakları 21
Şekil 5: Hastalık Modeli Oluşturma ve Tedavi Sürecine İlişkin Zaman Akışı 23
Şekil 6: Doku Eksplantı Yoluyla İzole Edilen MKH'lerin Kültür Ortamındaki Görüntüleri 28
Şekil 7: MKH'lerin CD34, CD44, CD45 ve CD90 Belirteçlerine Ait İmmünofenotipik Karakterizasyon Grafikleri 29
Şekil 8: Farklılaştırma Bulgularına Ait Mikrograflar 30
Şekil 9: ŞM'lerin İçindeki Total Protein Miktarı ve Sitokin Düzeyleri 30
Şekil 10: Deney Hayvanlarına Ait Başlangıç (1. Hafta) ve Bitiş (7. Hafta) Haftaları Arasındaki Ağırlık Değişimi Grafiği (g) 31
Şekil 11: Deney Hayvanlarının Deney Süreci Boyunca Kaydedilen Ortalama Kan Glikoz Düzeyleri (n=8) 32
Şekil 12: 7. Haftadaki Serum C-peptit ve İnsülin Düzeyleri 33
Şekil 13: Treg Popülasyon Analizine Ait Flow Sitometrik Kapılama Stratejisi ve Gruplara Ait Treg Popülasyon Yüzde Grafiği 34
Şekil 14: Sitokin Analizlerine Ait Absorbans/konsantrasyon Grafikleri ve Gruplara Ait Ortalama Sitokin Düzeyleri 36
Şekil 15: Adacık Morfolojisi 37
Şekil 16: Nkx6.1 Belirtecine Ait İmmünohistokimyasal Analizler 39
Şekil 17: Adacık Dışında Kalan Ekzokrin Pankreas Alanlarında Görülen Nkx6.1 ve İnsülin Pozitif Hücrelere Ait Mikrograflar 39
Şekil 18: Pdx1 Belirtecine Ait İmmünohistokimyasal Analizler 41
Şekil 19: İnsülin Belirtecine Ait İmmünohistokimyasal Analizler 42

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

APC	:	Allofikosiyanin
BCA	:	Bişinkoninik Asit
CD	:	Başkalaşım Kümesi
CO_2	:	Karbondioksit
D	:	Diyabet Grubu
DMEM	:	Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumu
D+2B	:	Diyabet + 2 Boyutlu Şartlandırılmış Medyum Grubu
D+3B	:	Diyabet + 3 Boyutlu Şartlandırılmış Medyum Grubu
EDTA	:	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELISA	:	Enzim Bağlı İmmünosorbent Analiz
FACS	:	Floresan Aktive Hücre Ayırma
FBS	:	Fetal Bovin Serum
FITC	:	Floresan İzotiyosiyanat
FoxP3	:	Forkhead Box P3
HGF	:	Hepatik Büyüme Faktörü
HLA-G	:	İnsan Lökosit Antijeni G
Hnf6	:	Hepatosit nükleer faktör 6
H_2O_2	:	Hidrojen Peroksit
H&E	:	Hematoksilen ve Eozin
IFN-γ	:	İnterferon γ
IL	:	İnterlökin
ISCT	:	Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği
K	:	Kontrol Grubu
K+2B	:	Kontrol + 2 Boyutlu Şartlandırılmış Medyum Grubu
K+3B	:	Kontrol + 3 Boyutlu Şartlandırılmış Medyum Grubu
MHC	:	Temel doku uyumluluğu kompleksi
MKH	:	Mezenkimal Kök Hücre
NK	:	Doğal Öldürücü

Nkx6.1	:	NK6 Homeobox 1
Nkx2.2	:	NK2 Homeobox 2
NOD	:	Obez Olmayan Diyabetik
Pax6	:	Paired box protein 6
PBS	:	Fosfat Tampon Salin
Pdx1	:	Pankreatik ve Duodenal Homeobox 1
PE	:	Fitoeritrin
PGE2	:	Prostoglandin E2
PTF1A	:	Pankreas Spesifik Transkripsiyon Faktörü 1A
P1	:	Birinci Pasaj
P3	:	Üçüncü Pasaj
RBC	:	Kırmızı Kan Hücresi
RPM	:	Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute
TBS	:	Tris Tamponlu Salin
TC	:	Sitotoksik T hücresi
TH	:	Yardımcı T hücresi
TGF-β	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü β
TNF-α	:	Tümör Nekrosiz Faktör Alfa
Treg	:	Düzenleyici T Hücreleri
T1D	:	Tip 1 Diyabet
Sox9	:	SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 9
STZ	:	Streptozotosin
ŞM	:	Şartlandırılmış Medyum
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	:	World Health Organization
2B	:	İki Boyutlu
2B-ŞM	:	İki Boyutlu Ortamda Şartlandırılmış Medyum
3B	:	Üç Boyutlu
3B-ŞM	:	Üç Boyutlu Ortamda Şartlandırılmış Medyum

ÖZET

Işıldar, B. (2022). Deneysel Diyabette Mezenkimal Kök Hücre Kaynaklı Tedavi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada; insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) 2 boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) ortamlarda kültüre edilmesiyle oluşturulan iki farklı şartlandırılmış medyumun (ŞM) *in vivo* terapötik etkileri immünomodülasyon ve β hücre rejenerasyonu bağlamında değerlendirilmiştir. Bu amaçla önce, insan göbek kordonundan primer kültür yöntemiyle MKH izolasyonu yapılmış ve hücreler karakterize edilmiştir. Ardından, MKH'lerin 2B ve 3B ortamlarda kültüre edilmesiyle iki farklı ŞM oluşturulmuş ve içerikleri analiz edilerek karşılaştırılmıştır. 3B-ŞM'nin içerisinde 2B-ŞM'ye kıyasla daha yüksek düzeyde total protein ve IL-4 tespit edilmiştir. *İn vivo* incelemeler, otoimmün T1D modeli oluşturulan Sprague Dawley türü sıçanlarda gerçekleştirilmiş ve belli bir tedavi modeli çerçevesinde dört hafta süreyle on iki doz ŞM intraperitoneal olarak uygulanmıştır. İmmünmodülasyonun değerlendirilebilmesi için; sakrifikasyonun ardından dalaktan izole edilen lenfositlerde, regülatör T hücre (Treg) popülasyonu belirlenmiş ve serumda IL-4, IL-10, IL-17 ve IFN-λ sitokinleri analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ŞM'lerin Treg popülasyonunu indükleyip sitokin salınımını düzenleyerek immünomodülatör etki gösterdiğini düşündürmektedir. β hücre rejenerasyonu ise, β hücrelerinin oluşumu için kritik öneme sahip Pdx1 ve Nkx6.1 ile insülin belirteçleri işaretlenerek immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Buna göre ŞM'lerin β hücre homeostazına ve rejenerasyonuna katkıda bulunduğu görülmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada; MKH'lerle şartlandırılmış medyumun, T1D modelinde immünomodülasyon ve β hücrelerinin rejenerasyonu üzerindeki ikili terapötik etkisi gösterilmiştir. Bununla birlikte; 3B-ŞM grubuna ait Treg popülasyon ve immünohistokimyasal verilerinin, 2B-ŞM grubuna göre daha olumlu olması, şartlandırılmış medyumların hazırlanması sırasında 3B iskele üzerinde yetiştirilen MKH'lerin kullanılmasının, ŞM'lerin terapötik etkinliğini arttırılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal Kök Hücre, İnsan Göbek Kordonu, 3 Boyutlu Hücre Kültürü, Şartlandırılmış Medyum, Tip 1 Diyabet.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje No: 219S387) ve İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Kurum Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Işıldar, B. (2022). Mesenchymal Stem Cell Based Therapy in Experimental Diabetes. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Histology and Embryology, Cerrahpaşa Medical Faculty. Doktora Tezi. İstanbul.

In this study, the in vivo therapeutic effects of two different conditioned media (CM) prepared by culturing human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (MSCs) in 2-dimensional (2D) and 3-dimensional (3D) environments were evaluated in the context of immunomodulation and β-cell regeneration. For this purpose, MSCs were isolated from the human umbilical cord, and the cells were characterized. Then, two different CMs were prepared by culturing MSCs in 2D and 3D environments, and their contents were analyzed and compared. Total protein and IL-4 were detected higher in 3D-CM compared to 2D-CM. In vivo studies were performed in Sprague Dawley-type rats with an autoimmune T1D model, and twelve doses of CM were administered intraperitoneally for four weeks within the framework of a particular treatment model. In order to evaluate immunomodulation, the regulatory T cell (Treg) population was determined in lymphocytes isolated from the spleen after sacrification, and IL-4, IL-10, IL-17, and IFN-λ cytokines were analyzed in serum. The results suggest that CMs exert an immunomodulatory effect by inducing the Treg population and regulating cytokine release. β cell regeneration was evaluated immunohistochemically by labeling Pdx1, Nkx6.1, and insulin markers, which are critical for the formation of β cells. Accordingly, CMs appear to contribute to β-cell homeostasis and regeneration. In conclusion, the dual therapeutic effect of MSC-CM on immunomodulation and regeneration of β cells in the T1D model has been demonstrated. In addition, the fact that the Treg population and immunohistochemical data of the 3D-CM group are better than the 2D-CM group shows that the use of MSCs grown on the 3D scaffold during the preparation of the conditioned media could increase the therapeutic efficacy of CMs.

Key Words: Mesenchymal Stem Cell, Human Umbilical Cord, 3D Cell Culture, Conditioned Medium, Type 1 Diabetes

The present work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) (Project No. 219S387) and Teaching Staff Training Program, Istanbul University-Cerrahpasa.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 1 diyabet (T1D); pankreas adacıklarında bulunan ve insülin üreten β hücrelerinin geri dönüşümsüz yıkımı ile karakterize, T hücre aracılı otoimmün bir hastalıktır[1]. Yardımcı T hücreleri ve sitotoksik T hücreleri, otoimmün T1D'le sonuçlanan β hücre yıkımında sinerjetik görev alırlar[2]. Bu süreçte bozulan sitokin üretimi de T1D patogenezinde etkin rol oynar ve yıkılan β hücreleri sebebiyle vücutta insülin eksikliğine bağlı olarak hiperglisemi gelişir. T1D için en geçerli tedavi yöntemi olan ekzojen insülin alınımı, hiperglisemi sebebiyle oluşan komplikasyonları azaltma konusunda yetersiz kalmaktadır[3]. T1D'nin tedavisinde amaç; otoimmüniteyi baskılarken vücutta endojen insülin salınımını başlatabilen, uygulanabilirliği yüksek bir tedavi seçeneği geliştirmektir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH); pluripotent özellikte, yüksek doku onarım potansiyelleri olan, immünosupresif hücrelerdir. MKH'lerden salınan parakrin faktörler, anjiyogenezi ve proliferasyonu arttırıp apoptozu baskılayarak immünomodülasyonda rol oynarlar[4]. Ayrıca MKH'lerin düzenleyici T hücrelerini (Treg) arttırdığı, bu hücrelerin de bozulan T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini düzenlediği bilinmektedir. Bu bağlamda MKH'ler T1D tedavisinde önemli bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır[5]. Son yıllarda, MKH'lerin terapötik etkilerini salgıladıkları parakrin faktörler üzerinden gösteriyor olabileceklerine dikkat çekilmektedir. Bu sebeple MKH'lerin direkt uygulanması yerine şartlandırılmış medyum (ŞM) içerisine salgıladıkları hücresel ürünlerin kullanılmasına yönelik artan bir eğilim vardır. Böylece organizmaya hücre verilmeyip hücrelerin salgıladıkları parakrin faktörler verildiği için; hücrelerin istenmeyen yerlere gidip yerleşmesi, istenmeyen hücrelere farklılaşması ve tümör oluşturabilme ihtimali gibi riskler alınmamış olunur[6].

MKH'lerin çeşitli dış uyaranlarla etkinliklerinin artırılarak birim alana daha yüksek düzeyde salgı yapmalarının sağlanmasıyla, ŞM'lerin terapötik etkinliğinin artırılabileceği bildirilmiştir[7]. Bu amaçla çeşitli kimyasallar kullanılabileceği gibi hücrelerin belirli bir topografiyi izleyerek 3 boyutlu (3B) olarak yetişmesine olanak sağlayan hücre iskeleleri de kullanılabilmektedir. Hücre iskeleleri; gözenekli ve fibröz yapıları, geçirgenlik ve mekanik stabilite gibi özellikleri ile doğal hücre dışı matriksi taklit ederler. Böylece hücrelerin biyofiziksel ve biyokimyasal etkileşimlerini artırarak;

çoğalma, farklılaşma, hücre dışı matriks sentezleme gibi fonksiyonları için aktif bir biyolojik ortam yaratırlar[8].

Bu bilgiler ışığında planlan projemizde; insan göbek kordonundan izole edilen ve ardından karakterizasyon analizleri yapılan mezenkimal kök hücreler, iki boyutlu ve üç boyutlu ortamlarda kültüre edilmiş ve %70 yoğunluğa ulaşıldıktan sonra medyumları, serumsuz medyumlarla değiştirilerek 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda, hücrelerin parakrin salgılarını içeren şartlandırılmış medyumlar, hücre içermeyecek şekilde toplanmış ve içerdikleri protein miktarları ile IL-4, IL-10, IL-17 ve IFN-γ düzeyleri ölçülmüştür. Bu medyumların *in vivo* terapötik etkinliklerinin değerlendirilmesi adına, Sprague Dawley tipi sıçanlarda düşük doz, çoklu streptozotosin uygulaması ile otoimmün tip 1 diyabet modeli oluşturulmuş ve diyabetik sıçanlar üç gruba ayrılmıştır. İlk gruba herhangi bir uygulama yapılmazken, ikinci gruba 4 hafta boyunca haftada üç doz olacak şekilde iki boyutlu ortamda kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerden elde edilen şartlandırılmış medyum, üçüncü gruba ise üç boyutlu ortamda kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerden elde edilen şartlandırılmış medyum verilmiştir. Bu üç deney grubunun karşılığı olacak şekilde üç kontrol grubu oluşturulmuştur. Yedi haftalık total deney süresi boyunca, haftalık olarak hayvanların ağırlıkları ve kan glikoz düzeyleri ölçülerek kaydedilmiştir. Deney sürecinin sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için pankreas, Treg analizi için dalak, hormon ve sitokin analizleri için kan toplanmıştır. Toplanan kanlarda ELISA ile C-peptit, insülin, IL-4, IL-10, IL-17 ve IFN-γ düzeyleri belirlenirken, pankreasta β hücre belirteçleri olan NK6 Homeobox 1 (Nkx6.1), pankreatik ve duodenal homeobox 1 (Pdx1) ve insülin immünohistokimyasal olarak analiz edilmiştir. Böylece bu çalışmada, literatürde ilk defa, iki boyutlu ve üç boyutlu ortamlarda kültüre edilen MKH'lerden oluşturulan şartlandırılmış medyumların T1D modeli üzerine terapötik etkileri, otoimmünite ve β hücre rejenerasyonu bağlamında değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tip I Diyabet

Diyabet, Amerikan Diyabet Derneği kriterlerine göre 4 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; otoimmün β hücre yıkımıyla karakterize Tip 1 Diyabet (T1D), β hücrelerinden ilerleyici biçimde insülin salınımının azalması ve insülin direnci geliştirmesiyle karakterize Tip 2 Diyabet, genetik faktörler, ekzokrin pankreas hastalıkları vb. sebeplerle gelişen diyabetler ve gestasyonel diyabettir[3]. T1D; pankreasta insülin üreten β hücrelerinin immün sistem tarafından yıkılması ile karakterize edilen, ilerleyici olarak insülin eksikliğine ve bunun sonucunda hiperglisemiye yol açan otoimmün bir hastalıktır[1]. Hiperglisemi; bireylerde kardiyovasküler hastalıklar, körlük ve böbrek yetmezliği gibi komplikasyonları beraberinde getirmektedir ve bu komplikasyonların önlenebilmesi için hipergliseminin kontrol altında tutulması gerekmektedir[9]. Günümüzde T1D için en geçerli tedavi yöntemi, vücudun üretemediği insülinin replasmanı prensibine dayanan insülin enjeksiyonudur. Ekzojen olarak alınan insülin; hiperglisemiyi kontrol altında tutabilmektedir ancak endojen insülin kadar etkili ve dinamik olmadığı için retinopati, nefropati ve nöropati gibi komplikasyonları azaltma konusunda yetersiz kalmaktadır[9]. Ayrıca otoimmüniteyi önlemede ve yıkılan β hücrelerini yenilemede etkisizdir[10]. T1D için uygulanabilen bir diğer tedavi seçeneği ise adacık transplantasyonudur ancak verici azlığı, transplantasyon sonrası yetersiz hücre oluşumu, immün reaksiyon riski gibi sebepler nedeniyle uygulanabilirliği düşüktür[11]. Dünya üzerinde geniş bir popülasyonu etkileyen T1D'nin tedavisinde amaç; bir yandan otoimmüniteyi baskılarken, bir yandan da vücutta endojen insülin salınımını başlatabilen, uygulanabilirliği yüksek bir tedavi seçeneği geliştirmektir.

2.2. Tip I Diyabet Patogenezi ve Sitokinlerin Rolü

T1D patogenezinde adacık hücrelerine karşı T hücrelerinin aktivasyonu, β hücre yıkımına giden sürecin ilk basamağıdır. Genetik yatkınlık ile çevresel faktörlerin birleşmesi sonucu, düzenleyici T hücrelerinin (Treg) azalması ve oto-reaktif CD8+ sitotoksik T (TC) hücrelerinin artması otoimmün süreci başlatır. β hücrelerinin maruz kaldığı endoplazmik stres benzeri durumlara yanıt olarak protein sentezinde modifikasyonlar geliştiği, post-translasyonel modifikasyonlar sonrası gelişen proteinlerin T hücreleri tarafından oto-antijen olarak kabul edildiği ileri sürülmüştür.

Oto-antijenlerin β hücrelerinden salınıp antijen sunucu hücrelerle CD4+ yardımcı T hücrelerine (TH) sunulduğu düşünülmektedir[12]. TH hücreleri makrofajlardan ve dendritik hücrelerden salınan interlökin (IL)-12 ile aktive edilir. TH hücrelerinin bir türü olan TH1 hücreleri, TC hücrelerini ve sitotoksisiteyi tetikleyen IL-2 ve interferon γ (IFN-γ) salgılayarak, TH2 hücrelerini ve bu hücrelerin koruyucu etkilerini azaltır. β hücre oto-antijenlerine yanıt olarak IL-17 salgılayan TH17 hücreleri, bu sürecin ilerlemesine katkıda bulunur. Ek olarak β hücreleri, TC hücreleri tarafından salgılanan perforin ve granzimler aracılığıyla da hasarlanabilir. Böylece aktifleşmiş makrofajlar, TH hücreleri ve TC hücreleri, otoimmün T1D'yle sonuçlanan β hücre yıkımında sinerjetik görev almış olurlar[13]. T1D patogenezinin bu kısa özetinde de görüldüğü gibi bozulan sitokin üretimi, bu süreçte etkin rol oynar. Ancak bununla birlikte yapılan çalışmalar bazı sitokinlerin T1D üzerinde tedavi edici etkilerinin olduğunu göstermektedir. IL-1β, tümör nekroz faktör α (TNF- α), TNF-β, IFN-γ, IL-2, IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinler β hücrelerinin apoptozunu indükleyerek hastalığın ilerlemesine neden olurken; IL-4, IL-10, TGF- β gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin hastalığı inhibe edici özellikte olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur[2].

2.3. Pankreas Organogenezi

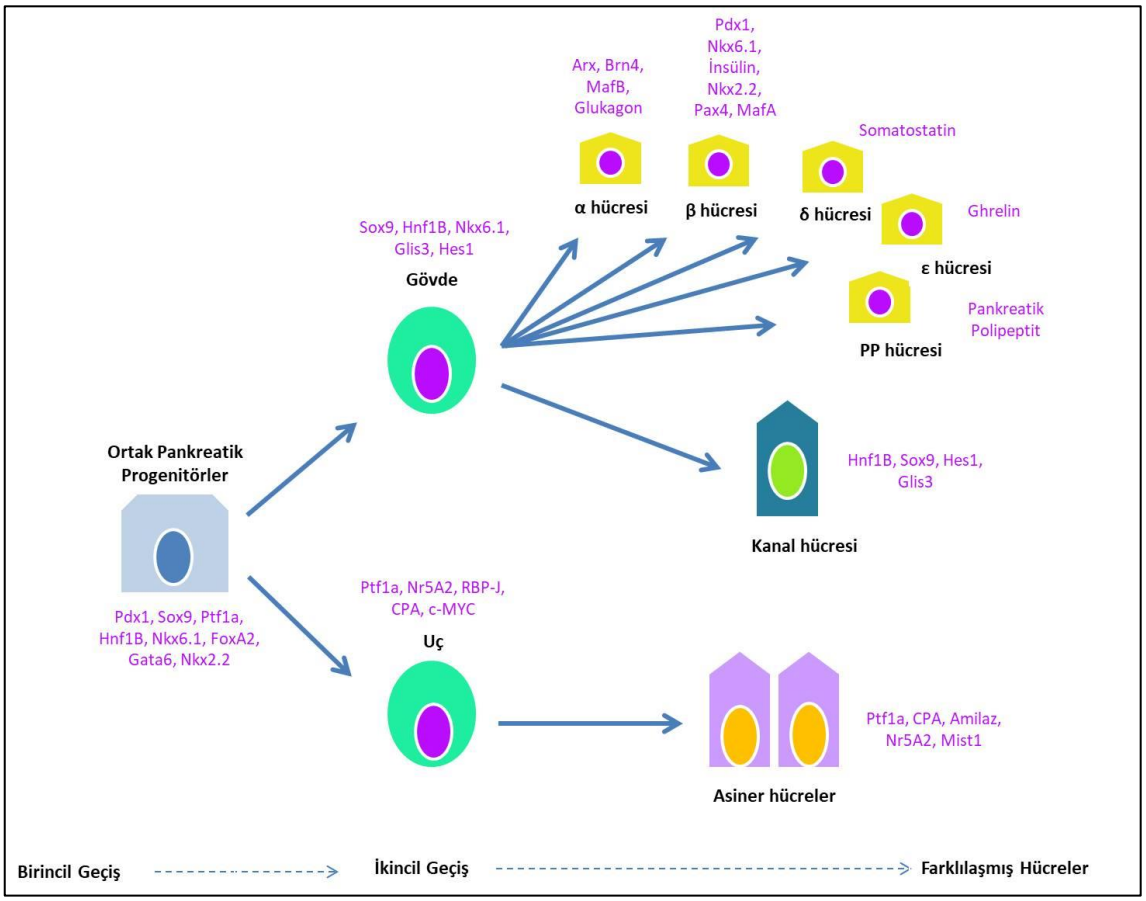
Pankreas besin metabolizması için gerekli, ekzokrin ve endokrin fonksiyonları olan, retroperitoneal yerleşimli bir organdır[14] ve iki ana bileşenden oluşur. Bu bileşenler; sindirim enzimleri için rezerv görevi gören ve asiner hücrelerden oluşan ekzokrin pankreas bölümü ile kan glikozunu düzenleme görevinde, vital bir metabolik hormon olan insülinin ana kaynağı olan ve Langerhans adacıkları olarak adlandırılan endokrin pankreas bölümleridir[15]. Endokrin işlevi olan Langerhans adacıklarının hücresel içeriği başlıca; glukagon üreten α hücrelerinden, insülin üreten β hücrelerinden, somatostatin üreten δ hücrelerinden, pankratik polipeptit üreten PP hücrelerinden ve ghrelin üreten ε hücrelerinden oluşmaktadır[16].

Pankreas gelişimi, progenitör hücrelerin spesifikasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden ve çoklu sinyal yolları ile transkripsiyon faktörleri tarafından yönlendirilen karmaşık bir süreçtir[17]. Pankreas; gestasyonun 4. haftasında önbarsak endoderminden köken alan dorsal ve ventral pankreas tomurcuklarından gelişir[18]. Gelişim sürecinde, pankreası oluşturacak dorsal ve ventral tomurcuklar, çevre mezenkimin içine doğru büyür, genişler ve dallara ayrılarak çok katmanlı, çok katlı bir epitel oluşturur[19]. Bu

tomurcuklar ortak pankreatik progenitörlerden oluşur ve üstlendikleri farklı görevlere karşın; endokrin, ekzokrin ve duktal pankreas hücreleri önbarsak endodermine ait olan bu ortak prekürsörlerden farklılaşır[16]. Gelişim devam ederken; duodenal halkayı oluşturan önbarsak tüpünün rotasyonu sırasında; ventral tomurcuk, dorsal mezenter yoluyla periton duvarına sabitlenen dorsal tomurcuğa doğru taşınır. Bu süreç, iki pankreas tomurcuğunun bir araya gelerek tek bir bez yapısı oluşturmalarıyla sonuçlanır. Eşzamanlı olarak hücre proliferasyonu, pankreatik tomurcukların hızlı bir şekilde büyümesine yol açar, tomurcuklarda şekil değişikliği meydana gelir ve dallanma morfogenezi olarak bilinen bir süreçle dallı tübüler yapılar oluşmaya başlar. Birincil geçiş olarak adlandırılan pankreas gelişiminin bu erken evresi sırasında pankreas epiteli halen farklılaşmamış durumdadır ve mezenkimal hücrelerle sıkıca çevrilidir[14]. Bu dallanma süreci; pankreas epitelini, asiner hücrelere farklılaşacak olan bir "uç" alanına ve endokrin öncülleri ile kanal epitelini oluşturacak bir "gövde" alanına ayırır. Bu olay ikincil geçiş olarak adlandırılır. Endokrin hücreler farklılaştıkça, "gövdeden" uzaklaşır ve Langerhans adacıklarını oluşturmak üzere toplanırlar[16,19].

Pankreas gelişiminde ana morfogenetik süreçlerin transkripsiyonel düzenlenmesi pek çok transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir. Ortak pankreatik prekürsörlerin; Pdx1, SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 9 (Sox9), pankreas spesifik transkripsiyon faktörü 1A (Ptf1A), Nkx6.1 ve hepatosit nükleer faktör 6 (Hnf6)'nın da dahil olduğu birtakım transkripsiyon faktörlerini eksprese ettiği bilinmektedir ve bu transkripsiyon faktörleri memeli pankreasının gelişimi için esansiyel öneme sahiptir[18]. Pdx1, paired box protein (Pax6), NK2 Homeobox 2 (Nkx2.2), Nkx6.1 ve Neurogenin-3 (Ngn3) Langerhans adacıklarını oluşturan farklı endokrin hücre tiplerinin kronolojik gelişimini kontrol eden ana transkripsiyon faktörleri arasındadır[14,18]. Farklılaşmış β hücrelerinde eksprese edilen transkripsiyon faktörlerine örnek olarak ise; Pdx1, Nkx6.1, MafA verilebilir[16]. Bu süreç Şekil 1'de özetlenmiştir[20]. Ortak pankreatik progenitörlerin de eksprese ettiği iki transkripsiyon faktörü olan Pdx1 ve Nkx6.1, fonksiyonel pankreas β hücrelerinin oluşumunu belirler ve bu hücrelerde eksprese edilir. Ancak yetişkin pankreasta Pdx1 ekspresyonu, β hücreleri ile sınırlı değildir ve ekzokrin pankreas bölümlerinde de ekspresyon görülebilir. Nkx6.1 ise, pankreas gelişiminin erken aşamalarında ve yetişkin β hücrelerinde eksprese edilir. Pankreas gelişimi sırasında, üç farklı Nkx6.1 pozitif hücre popülasyonu bulunur: Bunlar; ortak pankreatik progenitörler (Pdx1+/Nkx6.1+),

endokrin progenitörler (Ngn3+/Nkx6.1+) ve β hücreleridir (insülin+/Pdx1+/Nkx6. 1+)[18].



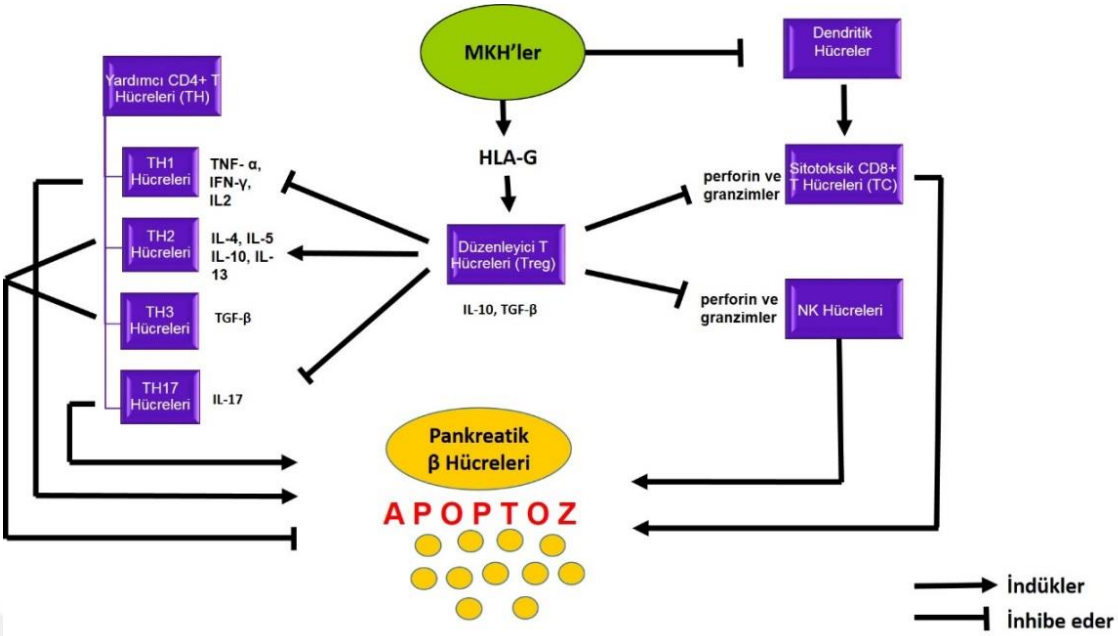
Şekil 1: Pankreas Gelişiminde Ana Morfogenetik Süreçlerin Transkripsiyonel Düzenlenmesi

2.4. Mezenkimal Kök Hücreler ve T1D ile ilişkisi

Mezenkimal kök hücreler (MKH); vücut içerisinde kemik iliği, göbek kordonu, yağ dokusu, amniyotik membran gibi pek çok dokudan izole edilip in vitro olarak geniş ölçekte çoğaltılabilen, proliferasyon kapasiteleri yüksek, multipotent öncül hücrelerdir. Fibroblastik morfolojileri, plastik adherent özellikte oluşları ve CD44, CD73, CD90 gibi hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmeleri ile karakterize edilirler[4]. MKH'ler ilk olarak kemik iliğinden izole edilmiştir ve seneler içerisinde kemik iliği en çok çalışılan kaynak olmuştur. Bu sebeple kemik iliği kaynaklı MKH'ler altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak toplanması sırasında invaziv işlem gerektirmesi, alındığı hastanın yaşına bağlı olarak izole edilen hücrelerin proliferasyon yeteneklerinin düşmesi vb.

nedenler, araştırıcıları yeni kök hücre kaynaklarına yöneltmiştir. Bu bağlamda göbek kordonu; primitif bir doku olması nedeniyle izole edilen hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin yüksek, immünomodülasyon ve immünosupresyon yeteneklerinin güçlü oluşu, invaziv işlem gerektirmeden toplanabilmesi ve atık bir materyal olması gibi sebeplerle avantajlı bir kaynak haline gelmiştir[21]. Ayrıca göbek kordonu MKH'leri temel doku uyumluluğu kompleksi (MHC) sınıf II moleküllerini eksprese etmedikleri için allojenik olarak kullanılabilme özelliğine sahiptirler[22]. Belirtilen avantajlı özelliklerinden dolayı bu çalışmada MKH kaynağı olarak göbek kordonu seçilmiştir.

Çeşitli hücre ve dokulara farklılaşabilme yeteneklerinin yanı sıra; doku onarım potansiyelleri, immünosupresyon ve immünomodülasyon özellikleri, allojenik olarak kullanılabilmeleri ve göç yetenekleri MKH'lerin çeşitli hastalıkların tedavisinde ön plana çıkmalarını sağlamıştır[5]. Ayrıca MKH'lerden salınan çok çeşitli parakrin faktörler (kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri, ekzosomlar vb.) anjiyogenezi ve proliferasyonu arttırıp apoptozu baskılayarak immünomodülasyonda hayati rol oynarlar[23]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; MKH'lerin terapötik etkilerini farklılaşma yetilerinden ziyade, salgıladıkları sekretomlar aracılığıyla parakrin olarak gösteriyor olabileceklerine dikkat çekilmektedir[6,24,25]. Bu sekretomlar çözünebilir ve çözünemeyen faktörler içermektedir[26]. Yapılan araştırmalarda çözünebilir faktörlerin; IL-4, IL-6, IL-10 vb. sitokinler, transforme edici büyüme faktörü β1 (TGF-β1), hepatik büyüme faktörü (HGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri, temel doku uyumluluğu kompleksi-G (HLA-G), prostoglandin E2 (PGE2) gibi immünomodülatör moleküller ve kemokinler olduğu ortaya konmuştur. Çözünemeyen faktörler ise hücre-hücre etkileşiminde rol oyanayacak mikroRNA ve proteinlerin taşınmasını sağlayan, çeşitli boyutlarda ve içeriklerde membranlı partiküller olan ekstrasellüler veziküllerdir[26,27]. Tüm bu bilgiler ışığında, Şekil 2'de genel hatlarıyla MKH'ler ve T1D patogenezi arasındaki ilişki gösterilmiştir.



Şekil 2: MKH'lerin Tip 1 Diyabetle İlişkisi

MKH'lerin diyabet üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar diyabet kaynaklı çeşitli sorunlara odaklanmış durumdadır. Bunların bir kısmı MKH'lerin immünomodülasyon ve immünosupresyon özelliklerinden yararlanmayı amaçlamıştır. Bir diğer kısmı da bu hücrelerin farklılaşabilme kapasitelerinden dolayı β hücre farklılaşmasına yoğunlaşmıştır. Ancak transplante edilen hücrelerin dokuya yerleşmeleri sırasında oluşan kayıplar, bir süre sonra apoptoza uğrayan hücreler, transplante edilen hücrelerin tümünde farklılaşma gerçekleşmemesi vb. sebeplerden dolayı farklılaşma genellikle çok düşük seviyede kalmakta ve üretilen insülin değeri anlamlı olmamaktadır[28]. T1D'de β hücre rejenerasyonu diyabet çalışma gruplarının bir diğer önemli konusudur. Yapılan bir çalışmada T1D'de β hücre rejenerasyonu ve immünomodülasyonun sitokinler aracılığıyla uyarılabileceği gösterilmiştir. Bahsi geçen çalışmada mikobakteriyal adjuvantlar kullanılarak Treg hücreleri tetiklenmiş ve bu hücrelerin ürettikleri sitokinler doğal ve edinsel immüniteyi düzenlemekle kalmayıp aynı zamanda insülin üreten hücreler olan β hücrelerini koruyup, rejenere olmalarını sağlamıştır[2]. Bu bağlamda sitokin ve diğer pek çok faktörü salgılayan ve Treg hücrelerini tetikleme yetenekleri olan MKH'ler; T1D tedavisinde önemli bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.5. Şartlandırılmış Medyum Tanımı ve Özellikleri

Tüm olumlu ve iyileştirici etkilerinin yanı sıra terapötik uygulamalarda kök hücrelerin kendilerinin kullanımı; verilen hücrelerin istenmeyen yerlere gidip yerleşmesi, istenmeyen hücre tiplerine farklılaşması ve tümör oluşturabilme olasılığı gibi istenmeyen bazı etkilere de yol açabilmektedir. Bu sebeple hücresel terapi yerine; şartlandırılmış medyum, ekstraselüler veziküller gibi hücre kaynaklı ürünlerin kullanılmasına yönelik artan bir eğilim bulunmaktadır[6,24,25]. Böylece organizmaya hücre verilmeyip sadece hücrenin salgıladığı parakrin faktörler verildiği için; hücrelerin istenmeyen yerlere gidip yerleşmesi, istenmeyen hücre tiplerine farklılaşması ve tümör oluşturabilme ihtimali gibi riskler alınmamış olunur. Ayrıca organizmada, hedef hastalığa bağlı olarak oluşan proinflamatuvar sitokinler, nakledilen MKH'lerin biyolojik özelliklerini de olumsuz yönde etkileyebileceği için hücrelerin doğrudan kullanımı yerine hücre ürünlerinin kullanımı daha avantajlı görülmektedir[22]. MKH'ler, in vitro ortamda, içinde bulundukları medyum içerisine çok çeşitli faktörler (kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri, ekzosomlar vb.) salgılarlar. Hücrelerin içinde yetiştikleri bu medyum, hücre içermeyecek bir şekilde toplandığında şartlandırılmış medyum olarak adlandırılır ve bu biyolojik materyal patofizyolojik süreçlerde otokrin/parakrin mekanizmalar üzerinden etki göstermektedir[29]. Ayrıca şartlandırılmış medyum hücrelere göre daha kolay dondurulabilir, saklanabilir ve taşınabilir olma özelliklerine sahiptir. Bu özellikleriyle ticari bir terapötik ürün olarak geliştirilme potansiyeli daha yüksektir[6].

MKH'ler ile şartlandırılmış medyum terapötik olarak değerlidir. Ancak MKH'lerin çeşitli dış uyaranlarla etkinliklerinin artırılarak birim alana daha yüksek düzeyde salgı yapmasının sağlanması, oluşturulacak şartlandırılmış medyumların terapötik etkinliğini arttırmaktadır. Bu yöntemler; hipoksik koşullandırma, kimyasal ajan kullanımı, 3 boyutlu kültür ortamı (3B) oluşturulması ve inflamatuvar sitokinlerin kullanılması olarak sınıflandırılabilir[30]. MKH'lerin in vitro ortamda 3B olarak kültürlenmesi, bu hücrelerin parakrin salgı kapasitelerini arttırmaktadır[7].

2.6. 3 Boyutlu Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmalarının başlangıcından itibaren, hücreler genellikle bir plastik kültür kabına yapışacak şekilde 2 boyutlu (2B) olarak kültürlenmiştir. Ancak fizyolojik ortamdaki hücreler 2B hücre kültürünün aksine; migrasyon, apoptoz,

transkripsiyonel regülasyon ve reseptör ekspresyonu gibi karmaşık biyolojik fonksiyonları düzenleyen hücre dışı matriksle sürekli etkileşim halindedir ve etraflarında bulunan farklı tipteki hücreler parakrin sinyaller aracılığıyla iletişim kurarlar[31]. Dolayısıyla hücreler ve hücre dışı matriks arasındaki karmaşık ilişkilerin, 2B kültür koşullarında taklit edilebilmesi mümkün değildir. Bu sebeple de 2B hücre kültürü ortamında yapılmış çalışmaların kliniğe translasyonu zordur. 3B kültür ortamları bu zorluğu giderebilecek ve in vivo fizyolojik koşulları yakından temsil edebilecek daha iyi bir model olarak hizmet etmektedir[31]. Yapılan çalışmalarla 3B kültürlenen hücrelerin gen ve protein ekspresyon profillerinde ve salgıladıkları parakrin faktörlerin miktarlarında değişiklikler olduğu gösterilmiştir[32,33].

3B kültür ortamları çeşitli şekillerde karşımıza çıkar. Bunlardan biri olan sferoid kültür, hücrelerin basitçe plastik yüzeyle bağlantılarının kesilerek birbirlerine bağlanmalarının indüklendiği bir kültür yöntemidir. Bu yöntem ucuz ve kolay uygulanabilir olmakla birlikte oluşturulan 3B yapıda, hücreler birbirleriyle rastgele bağlantı kurarlar ve belirli bir topografiyi taklit etmezler. Bu sebeple sferoid kültürlerde, 2B kültürler ile karşılaştırıldığında ancak kısıtlı düzeyde bir sekretom artışından söz edilmektedir[33]. 3B kültür oluşturmak için bir diğer yöntem ise hücre iskelelerinin kullanılmasıdır. Hücre iskeleleri; kollajen, elastin, jelatin gibi doğal ya da polistiren gibi sentetik materyallerle hazırlanmaktadır. Bu iskeleler gözenekli ve fibröz yapıları, geçirgenlik ve mekanik stabilite gibi özellikleri ile doğal hücre dışı matriksi taklit ederler. Oluşturulan bu mikroyapılar; üzerinde büyüyen hücrelerin biyofiziksel ve biyokimyasal etkileşimlerini arttırır, ayrıca hücrelerin çoğalması, farklılaşması, spesifik hücre dışı matriks sentezlenmesi vb. için uygun bir mikroçevre yaratır[8]. Böylelikle hücreler, fizyolojik koşullarına daha uygun bir ortamda yetişirler ve biyolojik özelliklerini bu doğrultuda düzenlerler[34]. Dolayısıyla 2B ortamda ve hücre iskeleleri kullanarak 3B ortamda kültürlenmiş MKH'lerin sekretom profillerinde farklılık beklenmektedir. Bu durum şartlandırılmış medyum oluşturulurken, medyumun içerisindeki faktörlerin arttırılması amacıyla kullanılabilir. Son yıllarda, hücre iskeleleri üzerinde kültürlenmiş MKH'lerin sekretom profillerini inceleyen çalışmalar az olmakla birlikte dikkat çekmeye başlamıştır. Yapılan bir çalışmada 3B kültürlenmiş yağ dokusu kökenli MKH'lerin in vitroda karaciğer kanser hücrelerine etkileri incelenmiş ve 2B kültürlenmiş hücrelere göre 3B kültürlenmiş hücrelerin etkilerinin daha güçlü olduğu görülmüştür[33]. Yapılan bir diğer çalışmada MKH'lerin sitokin salgılama profillerinin

mikroçevre topografisine bağlı olarak değiştiği ortaya konmuş ve bu profilin çeşitli tekniklerle manipüle edilerek ayarlanabileceği söylenmiştir. Aynı çalışmada 3B hücre dışı matriks yapısının, hücrelerde sitokin salınımını ayarlayarak hücre fonksiyonlarını iyileştirdiği belirtilmiştir[31].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan çalışma; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından verilen 14.03.2019 tarihli ve 83045809-604.01.02 sayılı etik kurul ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 28.02.2019 tarihli ve 2019/38 sayılı etik kurul onayları doğrultusunda, etik konulara dikkat edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

- Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumu (DMEM/F12) (ThermoFisher: 11320074)
- Leibovitz-15 medyum (Pan-Biotech: P04-27500)
- Fetal bovine serum (FBS: Hyclone: HY30160.03)
- L-Glutamin 200 mM (Hyclone: SH30034.01)
- Amfoterisin B solüsyonu (Sigma: A5955)
- Penisilin+Streptomisin (Hyclone: SV30010)
- Tripsin/EDTA solüsyonu (Hyclone: SH30042.01)
- Fosfatla tamponlanmış tuz solüsyonu (PBS: Amresco E404)
- RPMI 1640 Medyum (ThermoFisher: 21875034)
- CD34-FITC antikor (BD Biosciences: 555801)
- CD44-PE- antikor (BD Biosciences:550989)
- CD45-APC-Cy antikor (BD Biosciences: 557833)
- CD90-APC-antikor (BD Biosciences: 559869)
- APC Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol (Biolegend: 400120)
- APC/Cyanine7 Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol (Biolegend: 400128)
- PE Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol (Biolegend: 400112)

- FITC Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol (Biolegend: 400108)
- PE anti-mouse/rat/human FOXP3 (Biolegend: 320008)
- PE Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (ICFC) (Biolegend: 400140)
- FITC anti-rat CD25 (Biolegend: 202103)
- APC anti-rat CD4 (Biolegend: 201509)
- RBC Lysis Buffer (10X) (Biolegend: 420301)
- True-NuclearTM Transcription Factor Buffer Set (Biolegend: 424401)
- Osteojenik Farklılaştırma Medyumu (Sigma-Aldrich: 811D-250)
- Adipojenik Farklılaştırma Medyumu (Sigma-Aldrich: 417D-250)
- Oil Red O (Sigma-Aldrich: O0625-25G)
- Alizarin Red S (Sigma-Aldrich: A5533-25G)
- Streptozocin (Sigma-Aldrich: S0130-1G)
- Protein Kantifikasyon Kiti (BCA Assay) (Abbkine: KTD3001)
- Sıçan C-Peptid ELISA Kit (Cloudclone: CEA447Ra)
- Sıçan İnsülin ELISA Kit (Cloudclone: CEA448Ra)
- Sıçan IL-4 PicoKine ELISA Kit (Cloudclone: SEA077Ra)
- Sıçan IL-10 PicoKine ELISA Kit (Cloudclone: SEA056Ra)
- Sıçan IL-17 ELISA Kit (Cloudclone: SEA063Ra)
- Sıçan IFN Gamma PicoKine ELISA Kit (Cloudclone: SEA049Ra)
- İnsan IL-4 PicoKine ELISA Kit (Boster: EK0404)
- İnsan IL-10 PicoKine ELISA Kit (Boster: EK0416)
- İnsan IFN Gamma PicoKine ELISA Kit (Boster: EK0373)
- İnsan IL-17 PicoKine ELISA Kit (Boster: EK0430)
- Anti-Pdx1 antikor (Abcam: ab47267)
- Anti-Nkx6.1 antikor (Abcam: ab221544)

- Anti-İnsulin antikor (Abcam: ab181547)
- Metanol (Sigma-Aldrich: 24229)
- Hematoksilen (Invitrogen 00-8011)
- Eozin (Merck: 1.15935)
- Entellan Alkol bazlı kapatma solüsyonu (Merck 1.07961)
- Etil Alkol %96 (Alkomed: CAS 64-17-5)
- Sodyum sitrat (Merc: 1.06448.1000)
- Sitrik asit monohidrat (Merc: 100244)
- Lityum karbonat (Merck: 105671)
- Paraformaldehit (Merck: 1.04005.1000)
- Triton X-100 (Fisher BioReagents BP151)
- HRP Anti-Polyvalent (ScyTek SHP125)
- AEC kromojen kit (ScyTek)
- Tween-20 (P2287 Sigma)
- Ketamin HCl (Doğa İlaç)
- Ksilazin HCl (Bayer)
- Trizma-Base (T1503 Sigma)
- Su bazlı kapatma medyumu (TA-125-UG Thermo Scientific)
- Hidrojen peroksit (1.08600 Merck Millipore)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (161-0729 BioRAD)

3.1.2. Alet ve Teçhizat

- 11 numaralı ince uçlu pens
- 24 numaralı ince uçlu pens
- Forseps
- Cerrahi dikiş seti

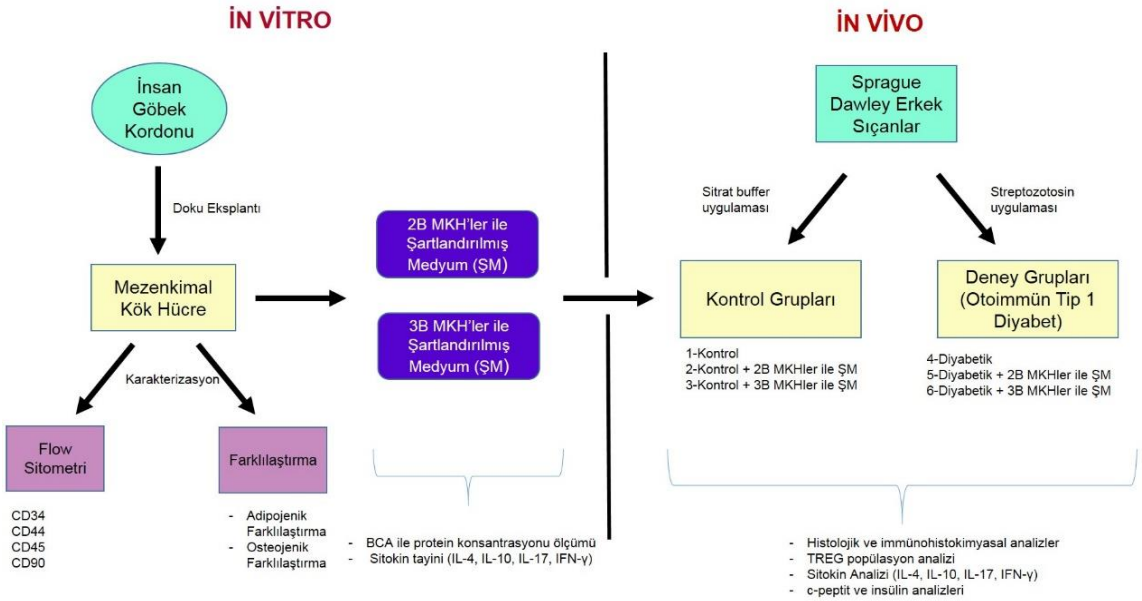
- Otomatik pipetör (Ratiolab: Accupetta)
- Steril serolojik pipet 10 ml (Jet Biofil: GSP-010-010)
- 1-10 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 10-100 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 10-200 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 100-1000 µl'lik mikropipet (Eppendorf)
- 10 µl, 100 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik mikropipet uçları
- 15 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü (Corning Star: 430790)
- 50 ml'lik steril dibi konik santrifüj tüpü (Corning Star: 430829)
- Ependorf tüpü (Labosel 98/79/CE)
- Kültür petri kabı [(kapakları ile birlikte) BD Falcon)
- 25 cm^2'lik hücre kültür kabı (Jet Biofil: TCF-012-050)
- 75 cm^2'lik hücre kültür kabı (Jet Biofil: TCF-012-250)
- Alvetex Scaffold 12 kuyucuklu doku kültür kabı (Amsbio AVP002-10)
- 12 kuyucuklu doku kültür tabağı (Biofil: TCP 011024)
- 24 kuyucuklu doku kültür tabağı (Biofil: TCP 011024)
- 0,70 µm'lik hücre filtresi (SPL Life Sciences)
- Tek kullanımlık filtre 0,22 µm (Sartorius Biotech: 1653400449103)
- Hemositometre (Marienfeld: 0640010)
- Lam (Marienfeld)
- Yuvarlak lamel (Marienfeld)
- Countour Plus Test çubukları (Bayer AG)
- 1 ml'lik enjektör (AYSET)

3.1.3. Cihazlar

- Sterile edilmiş sınıf II laminar havalandırmalı tezgâh (Esco: Class II)

- İnkübatör (Thermo Scientific, Heracell 150i)
- Santrifüj (Eppendorf: 5810 R)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Sıvı Azot Tankı (Thermo Scientific)
- 20 L Azot Tankı (Thermo Scientific)
- Vorteks (Biocote: Stuart SA8)
- Dijital çalkalamalı sıcak su banyosu (Fisher Scientific)
- Manyetik karıştırıcı (IKA Rct Basic)
- Mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00)
- Elektrikli pipet pompası (Ratiolab: Accupetta)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Flow sitometer (BD FACSCanto II)
- Etüv (Heraeus)
- Mikrotom (Thermo Scientific Microm hm430)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Ters (İnvert) mikroskop (Olympus IX71)
- Işık mikroskobu (Olympus BX61)
- Kamera (Olympus DP72)
- Distile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF)
- Masaüstü otoklav (Thermo Scientific Varioklav: 25T)
- Lionheart FX otomatikleştirilmiş mikroskop (BioTek)
- Distile su cihazı (Sartorius Stedim Biotech: arium pro VF)
- Countour Plus glukometre (Bayer)

3.2. Yöntemler



Şekil 3: Deney Akışı

3.2.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Bu çalışmada MKH kaynağı olarak; Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Polikliniğine başvurmuş vericiden, gerekli bilgilendirme yapılıp onam alındıktan sonra alınan 20 cm'lik göbek kordonu kullanılmıştır. Bu hususta gerekli etik kurul izni; İÜ-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Etik Kurul No:83045809-604.01.02). Kontaminasyon riskini düşük tutmak amacıyla sezaryen doğum yapan hasta tercih edilmiştir.

Doku eksplantı metoduyla hücre izole etmek amacıyla, alınan göbek kordonu düşük sıcaklıkta, Leibovitz's L-15 Medyum (%1 penisilin/streptomisin/amphoterisin B) içerisine konularak, hızla laboratuvara getirildi. Kordon parçaları, steril kabin içinde kan pıhtılarından arınana dek fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkandı. Kordon içerisinde bulunan 2 adet arter ve 1 adet ven dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve geri kalan kordon dokusu 1-2 mm^3'lük parçalar halinde kesildi. Doku eksplantı metodu ile hücre izolasyonu, aşağıdaki işlemler takip edilerek gerçekleştirildi[21]:

1- 1-2 mm^3'lük parçalara bölünen kordon dokusu, Petri kaplarına 0,5 cm aralıklarla yerleştirildi. Doku parçaları, parça başına 20 µl olacak şekilde

eklenen kültür medyumu içerisinde [DMEM/F12(1/1), %10 FBS, 1% penisilin/streptomisin, 2,5 ug/mL amphoterisin B], 37^{o}C sıcaklıkta ve %5 CO_2 içeren inkübatörde 3 saatlik inkübasyona bırakıldı.

2- 3 saatlik inkübasyonun sonunda, doku parçalarının üzerine 6 ml medyum eklendi.

3- Petrilerdeki medyumlar haftada üç kez değiştirilerek yenilendi. Medyum değiştirme işlemleri sırasında doku parçalarının yerinden oynatılmamasına dikkat edildi.

4- Doku parçalarının etrafındaki bölgeler, invert mikroskop ile gün gün incelenerek izolasyon takip edildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra doku parçaları Petri kabından uzaklaştıldı.

5- Petri kaplarına yapışan hücrelerin medyumları haftada üç defa değiştirildi ve hücrelerin çoğalmasına izin verildi. Hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığı zaman pasaj yapıldı ve 1. pasaj (P1) hücreleri T75 kültür flasklarına aktarıldı.

3.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

İzole edilen hücrelerin MKH olduğunun gösterilmesi amacıyla aşağıdaki karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.2.1. İmmünofenotipik Karakterizasyon

İzole edilen hücreler, kültür ortamında 3. pasaja geldiklerinde (P3) hücre yüzey antijen ekspresyonları açısından flow sitometrik analizler ile değerlendirildi. Bu amaçla pozitif belirteçler olarak mezenkimal kök hücrelere özgü belirteçler olan CD44 ve CD90, negatif belirteçler olarak ise endotelyal CD34 ve hematopoetik CD45 belirteçleri ile analiz yapıldı[35]. Her antikor için belirlenen izotip antikorlar, negatif kontrol olarak kullanıldı [Allofikosiyanin (APC) Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol, APC/Cyanine7 Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol, fitoeritrin (PE) Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol, Floresan İzotiyosiyanat (FITC) Mouse IgG1, κ Isotype Kontrol]. Flow sitometrik analizler için öncelikle hücreler tripsinlenerek toplandı ve 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek pellet haline getirildi. Hücreler tripan mavisi ile boyanıp sayılarak, canlı hücre sayısı belirlendi. İstenen miktarda hücre pipetajlanarak 70 μm'lik filtreden geçirildi ve flow sitometri analizi için hücrelerin birbirlerinden iyice ayrılmaları

sağlandı. Boyama tamponunda (PBS içerisinde %2 FBS) 2 defa yıkama işlemini takiben, karışımlara primer ve izotip antikorlar eklendi ve 30 dk, karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, boyama tamponu ile 2 defa daha yıkanan hücreler, flow sitometre cihazı (BD FACSCalibur) ile analiz edildi[21,35].

3.2.2.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaştırma

Adipojenik ve osteojenik farklılaştırmalar, ticari olarak satın alınan adipojenik ve osteojenik farklılaştırma medyumlarının talimatları takip edilerek gerçekleştirildi. Bu amaçla; izole edilen hücreler kültür ortamında 3. pasaja geldiklerinde hücreler tripsinlenerek toplandı. Ardından adipojenik farklılaştırma için 12'li kültür kaplarına $1{,}6x10^6$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 48 saat normal kültür medyumunda kültüre edildikten sonra, kültür medyumu adipojenik farklılaştırma medyumu (Sigma: 417D-250) ile değiştirildi. Farklılaşma süresi boyunca farklılaştırma medyumu 3 günde bir tazelendi. Farklılaşmaya götürülen hücreler, 21. günün sonunda PBS ile yıkandıktan sonra 20 dk boyunca %4 paraformaldehitle fikse edildi. Fiksasyonun ardından PBS ile yıkama aşaması tekrarlandı ve hücreler lipit içeriklerinin gösterilebilmesi amacıyla 20 dk Oil Red O ile inkübe edildi. Boyamadan sonra hücreler, zemin şeffaflaşana dek PBS ile yıkandı ve fotoğraflandı.

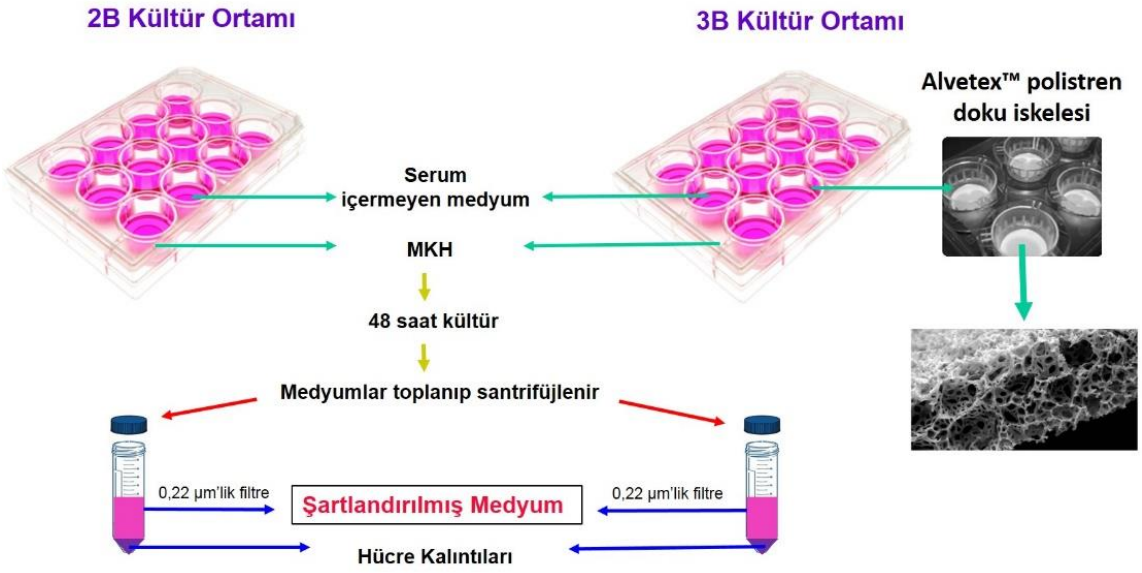
Osteojenik farklılaştırma için ise; 3. pasajlarındaki hücreler 12'li kültür kaplarına $8x10^5$ olacak şekilde ekildi. 24 saat normal kültür medyumunda kültüre edildikten sonra, kültür medyumu osteojenik farklılaştırma medyumu (Sigma: 811D-250) ile değiştirildi. Farklılaşma süresi boyunca osteojenik farklılaştırma medyumu 3 günde bir tazelendi. 21. günün sonunda farklılaşma sonucu ortamda biriken kalsiyumun gösterilebilmesi için Alizarin Red boyaması yapıldı. Bu amaçla hücreler PBS ile yıkanıp, %4 paraformaldehit ile 20 dk boyunda fikse edildi. Yıkama aşamasının tekrarlanmasının ardından hücreler, karanlık ortamda ve oda sıcaklığında Alizarin Red ile 45 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra zemin şeffaflaşana dek distile suyla yıkanan hücreler BioTek LionHeart FX mikroskop ile incelenerek fotoğraflandı.

3.2.3. Şartlandırılmış Medyumların Hazırlanması

T1D tedavisinde kullanılan şartlandırılmış medyumlar, iki farklı kültür ortamı kullanılarak hazırlandı. Bunlardan ilki 2 boyutlu (2B) geleneksel kültür ortamıyken, diğeri 3 boyutlu (3B) kültür ortamı idi. 2B kültür ortamında hücreler; tek tabaka halinde, polistren materyalden yapılmış ve rutin olarak kullanılan hücre kültür

tabaklarında kültüre edilirken, 3B kültür ortamı için ticari olarak satın alınan Alvetex® doku iskeleleri kullanıldı. Alvetex® 3B doku iskeleleri yüksek derecede poröz, çarpaz bağlı, kullanım sırasında degrade olmayan polistren materyalden yapılmıştır. Hücrelerin büyüme, göç etme, farklılaşabilme vb. işlevlerini gerçekleştirmeleri için uygun bir 3B ortam sağlar [24]. Alvetex® doku iskeleleri; degrade olmadan mekanik yapılarını koruyabilmeleri, 2B kültürlenen hücrelerin temas ettiği materyal olan polistrenden yapılmış olmaları ve kullanım kolaylığı[36] gibi sebeplerle bu çalışma için ön plana çıkmıştır.

Şartlandırılmış medyumlar hazırlanırken şu basamaklar takip edildi: Öncelikle Alvetex® kültür kaplarının kuyucukları %70 etanol ve ardından 2 defa kültür medyumuyla yıkandı. 2B kültür için kullanılacak kültür kapları herhangi bir yıkama işleminden geçirilmedi. Hücreler 3. pasajdayken, 12 kuyucuklu kültür kaplarına, 3 ml medyum içerisinde $2X10^5$ hücre olacak biçimde ekildi. Her iki koşulda da hücreler öncelikle normal kültür medyumu içerisinde [fetal bovin serum (FBS), %1 penisilin-streptomisin/Amphoterisin B içeren DMEM F12], 37 C^o'de, %5 CO2 içeren inkübatörde kültüre edildi. 2 boyutlu kültür ortamındaki hücreler takip edilerek %80 yoğunluğa ulaşmaları beklendi ve daha sonra eş zamanlı olarak hem 2B hem 3B ortamların medyumları; FBS içermeyen serumsuz medyumlarla değiştirildi. Bu yeni ortamda hücreler 48 saat kültüre edildikten sonra, oluşan medyumlar hücre içermeyecek şekilde toplandı. Medyumlar uzaklaştırıldıktan sonra kalan hücreler, tripsin ile kaldırıldı ve tripan mavisi ile boyanarak canlılık değerlendirildi. Canlılığın %70'in üzerinde korunduğu kuyucuklardan elde edilen medyumlar şartlandırılmış medyum olarak adlandırıldı ve santrifüjlenip kalıntılardan arındırıldıktan sonra, 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek kullanılacağı zamana dek -80^{o}C'de saklandı[33,37]. Şekil 4'te şartlandırılmış medyumların hazırlanma süreçleri şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 4: Şartlandırılmış Medyumun Hazırlanma Basamakları

3.2.4. Şartlandırılmış Medyumların Protein Miktarlarının ve Sitokin İçeriklerinin Belirlenmesi

MKH'lerin 2B ve 3B ortamda kültüre edilmesi sonucu elde edilen şartlandırılmış medyumların içerdikleri protein miktarı, kolorimetrik bir yöntem olan bişinkoninik asit (BCA) yöntemi ile ölçüldü. Ticari olarak satın alınan protein kantifikasyon kitindeki (Abbkine: KTD3001) yönlendirmelerle gerçekleştirilen işlemler sonucunda, her iki şartlandırılmış medyuma ait absorbanslar mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00) ile ölçüldü ve protein miktarı µg/ml olarak hesaplandı. Şartlandırılmış medyumların içerisindeki sitokin seviyeleri ise, ticari olarak satın alınan "enzim bağlı immünosorbent analiz" (ELISA) kitlerinin yardımı ile analiz edilerek karşılaştırıldı. Proinflamatuvar olarak, **TH1 ilişkili IFN-γ, TH17 ilişkili IL-17**; anti-inflamatuvar olarak ise **TH2 ilişkili IL-4 ve Treg ilişkili IL-10** sitokinlerinin seviyeleri değerlendirildi. Analizler sırasında, satın alınan kitlerin yönlendirmeleri takip edildi ve ölçümler mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00) ile yapıldı. Örneklere ait ölçülen absorbans değerleri, standart absorbans-konsantrasyon değerleri üzerinden çizilen grafik yardımıyla pg/ml olarak hesaplandı ve gruplar arasındaki değerler karşılaştırıldı.

3.2.5. Deney Gruplarının ve Diyabet Modelinin Oluşturulması

İn vitro deneyler tamamlandıktan sonra, elde edilen ŞM'lerin T1D modeli üzerine in vivo etkileri incelendi. Bu amaçla vücut ağırlıkları 350-450 gram arasında değişen, 10-12 haftalık Sprague Dawley tipi erkek sıçanlar kullanıldı ve deney grupları Tablo 1'de verilen şekilde oluşturuldu. Hayvan sayıları güç analizi yapılarak belirlendi. Güç analizi için referans alınan çalışmada[38] gruplar arasındaki insülin salınımının farkı; 47.6 pmol/l × dk iken, grup I standart sapması 14.9, grup II'nin standart sapması 18.8 olarak görüldü. Bu veriler ile yapılan analiz sonucunda, uygun örnek sayısının 8 olduğu bulundu.

Tablo 1: Deney Grupları

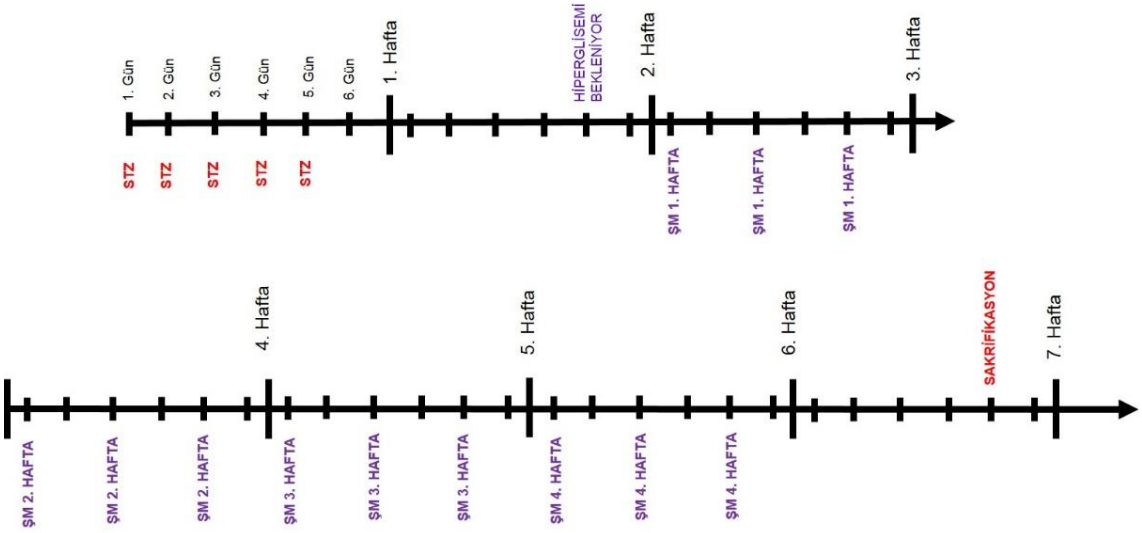
Kontrol: Sitrat tamponu uygulanan sıçan grubu	**8**	**Diyabetik: Sitrat tampon içerisinde STZ uygulanan sıçan grubu**	**8**
Kontrol + 2B MKHler ile şartlandırılmış medyum	**8**	**Diyabetik + 2B MKHler ile şartlandırılmış medyum**	**8**
Kontrol + 3B MKHler ile şartlandırılmış medyum	**8**	**Diyabetik + 3B MKHler ile şartlandırılmış medyum**	**8**

Otoimmün tip 1 diyabet modelinin oluşturulması amacıyla; deney grubu sıçanlara, birbirini takip eden 5 gün boyunca günde bir doz olmak üzere, 20 mg/kg streptozotosin (STZ), sitrat tampon (pH 4,5) içerisinde çözülerek intraperitoneal yolla uygulandı[39]. Kontrol grubu sıçanlara ise aynı süre boyunca sadece sitrat tampon uygulaması yapıldı. Bu süreçte sıçanların kuyruk veninden alınan kanda, glukometre ile kan glikoz takibi yapıldı ve 250 mg/dl den yüksek olan sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi[40]. Son STZ uygulamasını takiben hayvanlarda hiperglisemi gelişmeye başladı, 7. günün sonunda STZ uygulanan tüm hayvanlarda hiperglisemi görülmekteydi. Deney sonlandırılana dek, haftalık olarak sıçanların kan glikoz değerleri ve ağırlıkları takip edildi.

Hayvan deneyleri için gerekli etik kurul onayı; Bezmialem Vakıf Üniversitesi Yerel Etik Kurulundan alınmış (Etik Kurul No: 2019/38) ve hayvan deneyleri, alınan izinler doğrultusunda Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinde yapılmıştır.

3.2.6. Tedavi Süreci ve Hayvan Deneylerinin Sonlandırılması

Deney gruplarında belirtildiği üzere; STZ ile otoimmün T1D diyabet modeli indüklenen sıçanlar, üç gruba bölündü ve tedavi süresi boyunca birinci gruba herhangi bir müdahalede bulunulmadı. İkinci gruba 2B ortamda kültüre edilen MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış medyum, üçüncü gruba ise 3B ortamda kültüre edilen MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış medyum; hiperglisemi oluştuktan sonra, haftada üç kez, 1'er ml olacak şekilde, dört hafta boyunca intraperitoneal olarak uygulandı. Kontrol grupları, STZ çözücüsü olarak kullanılan sitrat tampon uygulanarak oluşturuldu ve 3 gruba bölündü. İlk gruba tedavi süresi boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. İkinci gruba 2B ortamda kültüre edilen MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış medyum, üçüncü gruba ise 3B ortamda kültüre edilen MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış medyum; deney gruplarıyla eş zamanlı olacak şekilde, intraperitoneal olarak uygulandı. Son şartlandırılmış medyum uygulamasından bir hafta sonra sıçanlar ketamin/ksilazin altında sakrifiye edildi. Deney sonlandırılmadan hemen önce, ELISA analizleri için hayvanlardan kan örnekleri toplandı. Kan örnekleri 2000 g'de 10 dk santirfüjlendikten sonra serum toplandı ve serumlar kullanılıncaya dek -80ºC'de saklandı. Sakrifikasyon sonrasında; yapılacak histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için pankreas dokuları %10'luk tamponlanmış formaldehit solüsyonu içerisine, dalak dokuları ise Treg popülasyon analizi için RPMI 1640 medyum içerisine alındı. Hastalık modelinin oluşturulması ve tedavi sürecine ilişkin zaman akışı Şekil 5'te verilmiştir.



Şekil 5: Hastalık Modeli Oluşturma ve Tedavi Sürecine İlişkin Zaman Akışı

3.2.7. Treg Popülasyon Analizi

Treg hücrelerin analizi, dalaktan izole edilen mononükleer hücreler üzerinden yapıldı. Bu amaçla hayvanların sakrifikasyonu sırasında çıkartılan dalak, RPMI 1640 medyum içerisine alındı ve aynı gün içerisinde hücre izolasyonu gerçekleştirildi. Hücre izolasyonu için aşağıdaki protokol takip edildi[41]:

1. RPMI medyum içerisinde Petri kabına aktarılan dalak dokusu, kaba parçalara bölündü. İzolasyon için dalağın üçte biri kullanıldı.
2. Dalaktan hücreleri izole edebilmek için, dalak dokusu iki lam arasına sıkıştırılarak ezildi. Lam üzerindeki hücreler HBSS ile yıkandı ve Petri kabında bir hücre solüsyonu oluşturuldu.
3. Hücre solüsyonu bir Falcon tüpte toplandı ve üzerine 25 ml'ye tamamlanana dek HBSS eklendi. Ardından +4ºC'de, 2000 RPM'de 10 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı ve hücre pelleti hızlıca çözüldü.
4. Sonraki aşamada, hücre solüsyonundan eritrositlerin giderilmesi için pellet 5 ml 1X eritrosit lizis tamponu ile çözüldü ve oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi. İnkübasyonun ardından solüsyonun üzerine soğuk PBS eklenerek 40 ml'ye tamamlandı. 2000 RPM'de 10 dakika santrifüjlendi.
5. Son aşamada süpernatant atıldı ve hücre pelleti 30 ml medyumda çözüldü. Solüsyon 70 µm'lik hücre filtresinden geçirilerek tripan mavisi ile canlılık kontrol edildi. %80'in üzerinde görülen canlılığın ardından, hücrelerde flow sitometrik analize geçildi.

İzole edilen hücre popülasyonun içerisinde Treg oranının belirlenebilmesi için CD4, CD25, FoxP3 antikorları ve bu antikorlara uygun izotip antikorlar ile flow sitometrik analiz yapıldı. Bu analiz için aşağıdaki protokol takip edildi[41]:

1. Analiz için yaklaşık $2x10^6$ hücre 2 ml PBS ile yıkandı. 3000 RPM'de 5 dakika santrifüjlendi.
2. Süpernatant atıldı, pellet 100 µl boyama solüsyonuyla (PBS içinde %2 FBS solüsyonu) çözüldü. Solüsyonun içerisine 0,5 µl CD4 ve 0,2 µl CD25 antikorları eklendi ve +4ºC'de, karanlıkta 45 dk inkübasyona bırakıldı.

3. İnkübasyonun ardından tüplere 500 µl boyama solüsyonu eklenerek santrifüjlendi. Süpernatant atılarak pellet çözüldü. Ardından bu aşama tekrarlandı.
4. Santrifüjü takiben süpernatant atıldı. Pellet 500 µl permeabilizasyon ve fiksasyon solüsyonu ile çözüldü. +4^{o}C'de 16 saatlik inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyonun ardından tüpler, +4^{o}C'de ve 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
6. Hücre pelleti permeabilizasyon yıkama tamponuyla çözüldü. 15 dakikalık inkübasyonun ardından santrifüjlenerek süpernatant atıldı.
7. Son olarak hücreler FoxP3 antikoru ile işaretlendi. +4^{o}C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyonun ardından tüplere permeabilizasyon yıkama tamponu eklendi ve tüpler +4^{o}C'de, 3000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
9. Son oluşan hücre pelleti 500 µl boyama solüsyonunda çözüldü ve Flow sitometre (BD FACSCanto II) cihazı ile analiz gerçekleştirildi.

3.2.8. İn vivo C-peptit, İnsülin ve Sitokin Analizleri

C-peptid ve insülin analizleri, 2. hafta ve 7. haftada sıçanlardan toplanan kanlardan elde edilen serumlarda, ticari olarak satın alınan kitlerin yönlendirmeleri takip edilerek "enzim bağlı immünosorbent analiz" (ELISA) analizleriyle belirlendi ve mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00) ile absorbans ölçümü yapıldı. Örneklere ait absorbans değerleri, standart absorbans-konsantrasyon değerleri üzerinden çizilen grafik yardımıyla pg/ml olarak hesaplandı. Sonuçlar insülin için µIU/ml, c-peptid için pmol/ml cinsinden verilerek gruplar arasındaki değerler karşılaştırıldı. Sitokin analizleri için 7. haftada hayvanlardan alınan kardiyak kanlar kullanıldı. Proinflamatuvar olarak, Th1 ilişkili IFN-γ, Th17 ilişkili IL-17; anti-inflamatuvar olarak ise Th2 ilişkili IL-4 ve Treg ilişkili IL-10 sitokinlerinin serum içerisindeki seviyeleri ELISA analizleriyle değerlendirildi. Analizler sırasında, satın alınan kitlerin yönlendirmeleri takip edildi ve ölçümler mikroplate okuyucu (Allsheng AMR-100 Microplate Reader AS-16050-00) ile yapıldı. Örneklere ait ölçülen absorbans değerleri, standart absorbans-konsantrasyon değerleri üzerinden çizilen grafik yardımıyla pg/ml olarak hesaplandı ve gruplar arasındaki değerler karşılaştırıldı.

3.2.9. Histolojik Analizler

Alınan pankreas dokuları ışık mikroskobik analizler için %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonu ile fikse edildi. Dokular, fiksasyonun ardından yükselen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve toluenle şeffaflaştırma aşamasından sonra parafin bloklar halinde gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler alındı ve histolojik incelemeler için hematoksilen eozin (H&E) ile boyandı. Boyama işlemi sırasında, öncelikle kesitlere 20 dk hematoksilen, ardından 15 dakika çeşme suyunda morartma uygulandı. Asit alkol ile fazla boyanma giderildikten sonra ikinci morartma aşaması gerçekleştirildi. Lityum karbonat içerisinde nukleusların mavileşmesi için bir dakika tutulan kesitler ardından eozin ile boyandı ve yükselen alkol serisi ile toluenden geçirilerek kapatıldı. Bu boyamanın sonucunda nukleuslar mor, sitoplazma pembe boyandı. H&E boyanan kesitler Olympus BX61 ışık mikroskobunda incelendi ve ayrıca adacık morfolojisi değerlendirildi[42].

3.2.10. İmmünohistokimyasal Analizler

Pankreas kesitlerinde immünohistokimyasal olarak; insülin üretebilen β hücrelerinin oluşumu için kritik öneme sahip Pdx1 ve Nkx6.1 belirteçleri için işaretleme yapılarak β hücre rejenerasyonu değerlendirildi[43]. β hücrelerinin insülin ekspresyonunu incelemek için ise kesitler, anti-insülin antikoru ile işaretlendi[44]. Tüm kesitler Olympus BX61 ışık mikroskobunda incelenip fotoğraflandı. Değerlendirme amacıyla Nkx6.1 antikoru için hayvan başına 7-10 adacık, Pdx1 antikoru için ise hayvan başına 5 adacık incelenerek hücre sayıldı ve bir adacık içerisinde bulunan pozitif hücre sayısı hesaplandı. İnsülin antikorunun değerlendirilmesi amacıyla, her hayvan için ortalama 7 adacık incelendi ve bir adacık içerisinde insülin pozitifliği gösteren alanın, total adacık alanı içindeki yüzdesi Image J programıyla hesaplanarak gruplara ait ortalama değerlere ulaşıldı. İmmünohistokimya uygulamaları aşağıdaki metot takip edilerek gerçekleştirildi[45]:

1- Parafine gömülü pankreas bloklarından adeziv lamlar üzerine 5 µm'lik kesitler alındı ve 56°C'lik etüvde bekletildikten sonra toluen içerisinde parafini giderildi. Kesitler azalan alkol serilerinden [%100 (x2), %96 (x1), %90 (x1), %70 (x1)] geçirilerek distile suya alındı.

2- Antijen iyileştirme; Pdx1 için pH:6.0 olacak şekilde sitrat tampon içinde, Nkx6.1 ve insülin antikorları için pH:9.0 olacak şekilde Tris/EDTA

içerisinde yapıldı ve kesitlere mikrodalgada 2x10 dk olacak şekilde uygulandı. Bu aşamayı takiben oda sıcaklığına getirilen kesitler tris tampon salinde (TBS) yıkandı, ardından %3'lük H_2O_2, 10 dk uygulanarak endojen peroksidaz aktivitesi durduruldu.

3- 3x5 dk TBS yıkaması sonrası kesitler, spesifik olmayan antikor bağlanmalarının engellenmesi amacıyla Nkx6.1 ve insülin antikorları için 10 dk, Pdx1 antikoru için 1 saat süreyle süreyle bloklama solüsyonunda tutuldu. Bloklama solüsyonu sonrası kesitler yıkama yapılmadan; anti-Pdx1 (1/500), anti-Nkx6.1 (1/200) ve anti-insülin (1/500) antikorları ile belirtilen dilüsyonlarda ve +4^{o}C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyonun ardından TBS ile 3x5 dk yıkanan kesitler, 10 dk boyunca biyotinlenmiş sekonder antikor solüsyonunda bekletildi.

4- TBS ile 3x5 dk yıkamanın ardından kesitler streptavidin peroksidaz solüsyonunda 10 dk süreyle bekletildi.

5- TBS ile 3x5 dk yıkama sonrasında kesitlere aminoetil karbazol (AEC) kromojeni uygulandı. Reaksiyon gelişimi sona erdikten sonra kesitler distile suya alındı ve kapatma işlemi uygulandı. Spesifik reaksiyonu kapatmayacak şekilde, morfolojinin kolay incelenebilmesi için hematoksilen zıt boyaması yapıldı.

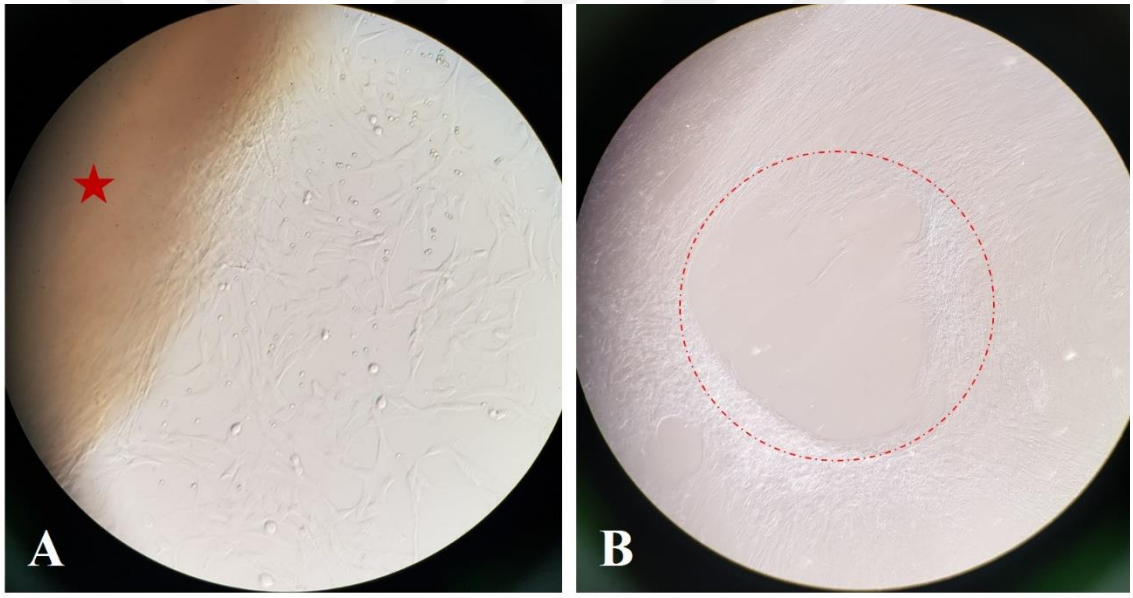
3.2.11. İstatistiksel Analizler

İstatiksel analizler için SPSS sürüm 21.0 istatistik programı kullanıldı ve veriler ortalama ± standart sapma değerleri ile ifade edildi. Gruplara ait verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığı, Saphiro-Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma sahip, ikiden fazla grup ortalamasının karşılaştırılması; parametrik Tek Yönlü Varyans (Tek Yönlü ANOVA) analizi ile yapıldı. Anlamlı fark durumunda, gruplar arasındaki anlamlılık post-hoc Tukey HSD testi kullanılarak analiz edildi. Verilerin normal dağılmadığı durumlarda ise gruplar arasındaki anlamlılık, parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanılarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyon Analizi

Göbek kordonu dokusundan, doku eksplantı metoduyla hücre izolasyonu gerçekleştirildi. Petri kaplarına ekilen doku parçalarının etrafı, invert mikroskop ile incelenerek hücrelerin izolasyonu takip edildi. 10. günde, ekim yapılan Petri kaplarının tümünde hücrelerin belirdiği gözlendi. 17. günde Petri kaplarındaki hücre yoğunluğu %70-80'e ulaştığında tüm Petri kapları pasajlanarak P1 hücreleri elde edildi. İzole edilen adherent hücreler incelendiğinde, MKH'ler ile uyumlu, iğ şeklinde morfoloji gösterdikleri gözlendi. Şekil 6'da MKH'lerin izolasyonları sırasında invert mikroskop ile çekilmiş görüntüleri verilmiştir.



Şekil 6: Doku Eksplantı Yoluyla İzole Edilen MKH'lerin Kültür Ortamındaki Görüntüleri

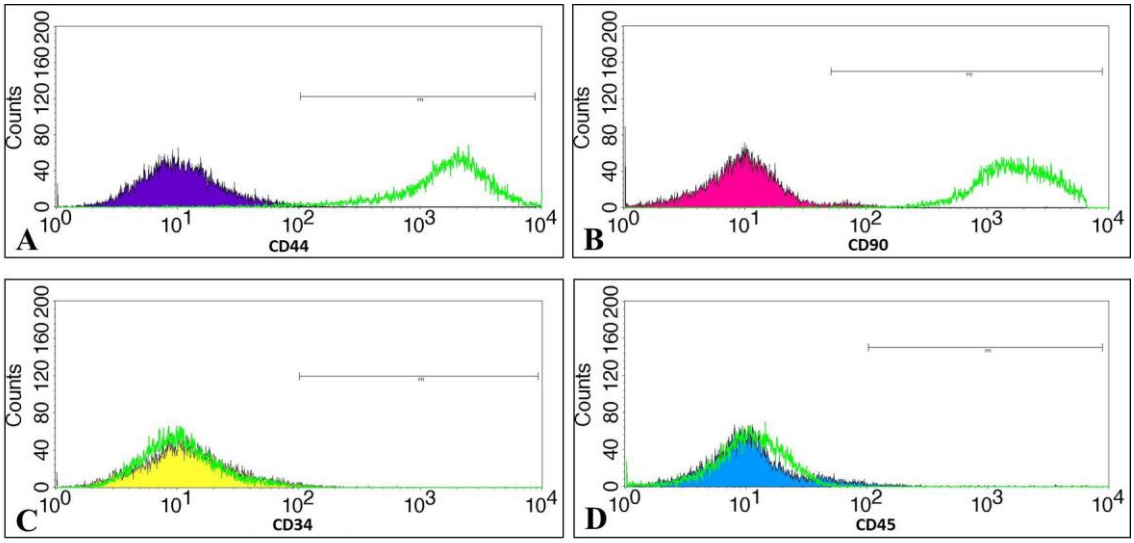
A- 10. güne ait mikrograf. Yıldız: Kordon dokusu parçası, X10 **B-** 17. güne ait mikrograf. Çember: Doku parçası kaldırıldıktan sonra kültür ortamında görünen hücresiz alan, X10.

4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Analizleri

4.2.1. İmmünofenotipik Karakterizasyon Analizleri

İzole edilen hücrelerin karakterize edilebilmesi amacıyla CD34, CD44, CD45 ve CD90 olmak üzere dört adet hücre yüzey belirteci, flow sitometri ile analiz edildi. Analiz sonucunda; hücre popülasyonunun, MKH belirteçleri olan CD44 ve CD90 için sırasıyla %98,15 ve %99,68 ekspresyon gösterdikleri belirlendi. Hücre popülasyonu

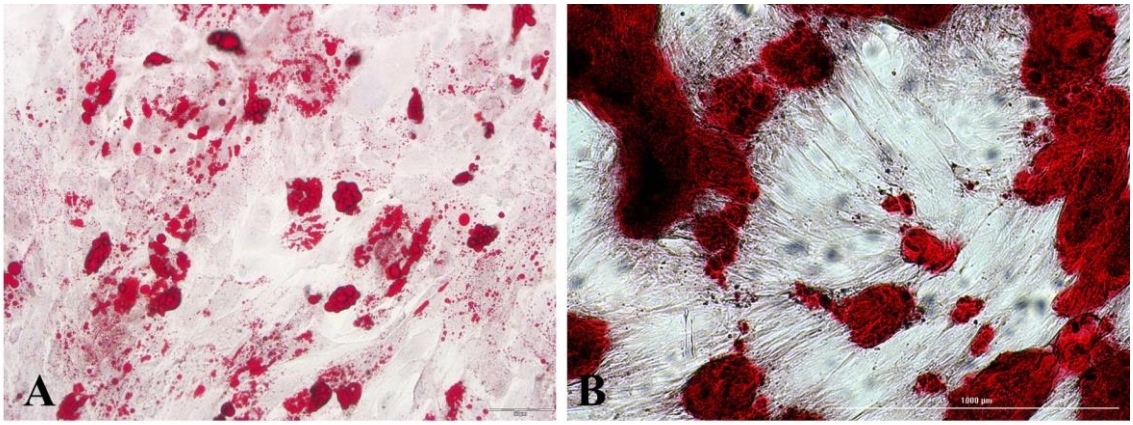
negatif belirteçler ile kontrol edildiğinde ise; endotelyal bir belirteç olan CD34 için %0,34 ekspresyon gözlenirken, hematopoetik CD45 belirteci için %4,26 ekspresyon gözlendi. Böylece, izole edilen hücre popülasyonunun immünofenotipik açıdan MKH'lerle uyumlu olduğu ortaya konmuş oldu. MKH'lerin CD34, CD44, CD45 ve CD90 belirteçlerine ait immünofenotipik karakterizasyon grafikleri Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7: MKH'lerin CD34, CD44, CD45 ve CD90 Belirteçlerine Ait İmmünofenotipik Karakterizasyon Grafikleri

4.2.2. Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşma Analizleri

İnsan göbek kordonundan izole edilen hücrelerin, farklı hücre serilerine farklılaşabilme kapasitesine sahip hücreler olduğunun gösterilebilmesi için, adipojenik ve osteojenik farklılaşma prosedürleri uygulandı. Bu prosedürlerin sonunda, adipojenik farklılaşma Oil Red O boyaması ile, osteojenik farklılaşma Alizarin Red boyaması ile değerlendirildi. Şekil 8.A'da, 3 haftalık adipojenik farklılaşma süreci sonunda adipositlere farklılaşan MKH'lerin içerisinde biriken ve Oil Red O ile kırmızı boyanan lipit damlacıkları görülmektedir. Şekil 8.B'de ise, osteojenik farklılaşma gösteren MKH'lerin salgıladıkları ekstraselüler kalsiyum depositleri Alizarin Red ile kırmızıya boyanarak gösterilmiştir. Bu bulgular; izole edilen hücrelerin MKH karakteristikleriyle uyumlu olarak iki farklı hücre serisine farklılaşabildiğini ortaya koymaktadır.

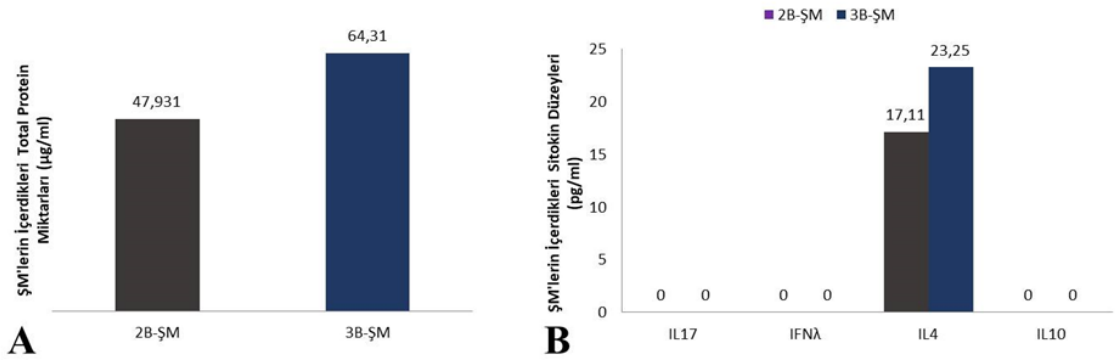


Şekil 8: Farklılaştırma Bulgularına Ait Mikrograflar

A- Adipojenik farklılaşmaya indüklenen hücrelerin 3. hafta sonundaki görüntüsü, Oil Red O. **B-** Osteojenik farklılaşmaya indüklenen hücrelerin 3. hafta sonundaki görüntüsü, Alizarin Red.

4.3. Şartlandırılmış Medyumların İçeriklerinin Belirlenmesi

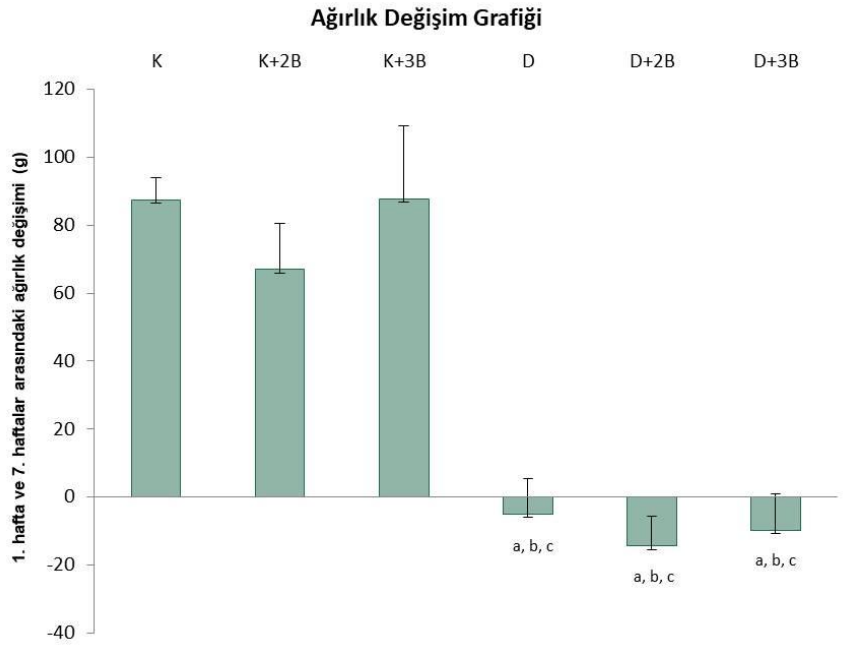
MKH'lerin 2B ve 3B ortamda kültüre edilmesi sonucu elde edilen şartlandırılmış medyumların içerdikleri protein miktarı, kolorimetrik bir yöntem olan bişinkoninik asit (BCA) yöntemi ile ölçüldü. Yapılan analiz sonucunda; 2B-ŞM içerisindeki protein konsantrasyonu 47,931 µg/ml, 3B-ŞM içerisindeki protein konsantrasyonu ise 64,310 µg/ml olarak belirlendi (Şekil 9.A). ŞM içerikleri sitokin düzeyleri açısından ELISA analizleriyle değerlendirildiğinde; anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-4 düzeyinin 2B-ŞM içerisinde 17,11 pg/ml, 3B-ŞM içerisinde 23,25 pg/ml olduğu görüldü. Anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 ve pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-17 ve IFN-γ için ise ŞM'ler içerisinde ölçülebilir düzeyde protein tespit edilemedi (Şekil 9.B). Tüm analizler kullanılan kitlerdeki talimatlar takip edilerek gerçekleştirildi ve absorbans değerleri, Allsheng AMR-100 Mikroplaka Okuyucu ile ölçüldü.



Şekil 9: ŞM'lerin İçindeki Total Protein Miktarı ve Sitokin Düzeyleri

4.4. Deney Hayvanlarına Ait Ağırlık, Kan Glikozu, Serum C-Peptit ve Serum İnsülin Verileri

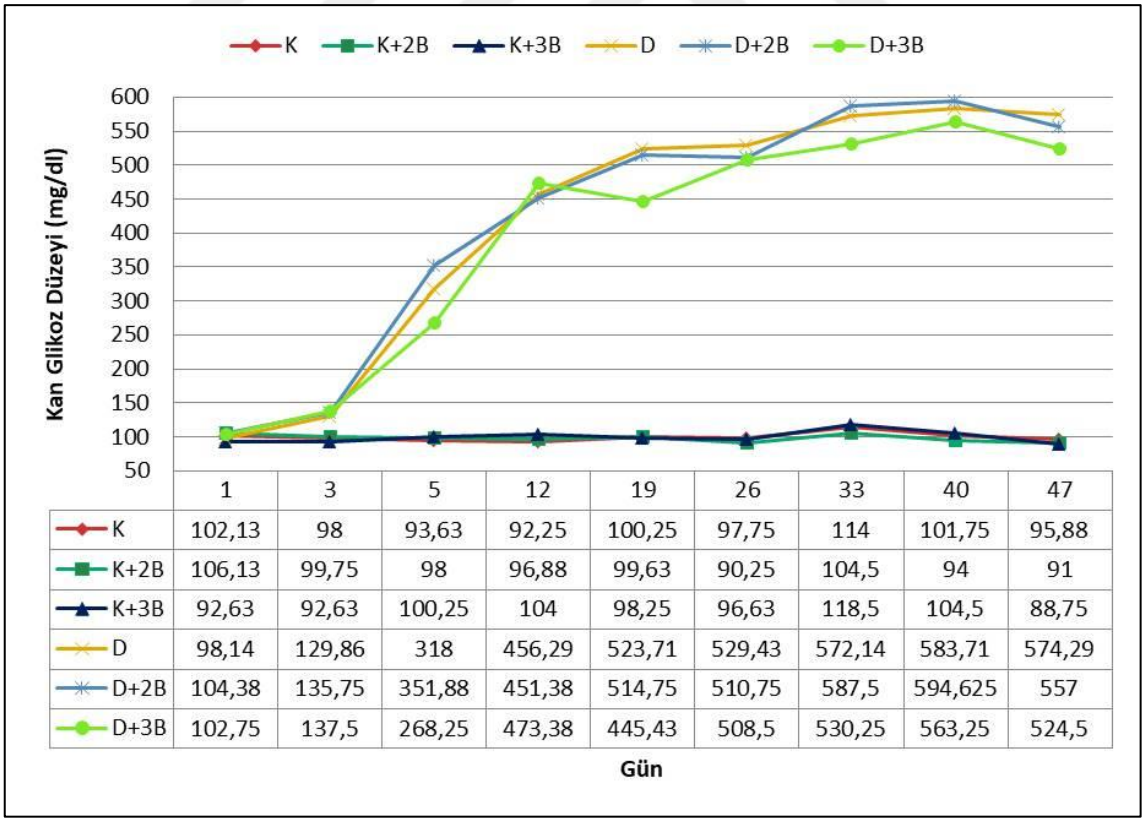
MKH'lerin 2B ve 3B ortamlarda kültüre edilmesiyle üretilen şartlandırılmış medyumlar, belirlenen deney modeli çerçevesinde Sprague-Dawley türü sıçanlara uygulandı ve deneysel süreç 7. haftanın bitiminde sonlandırıldı. Deneyin 1. günü ve devamında haftada bir kez olmak üzere; hayvanların ağırlıkları ve kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Ayrıca 7. haftada alınan kanlardan elde edilen serumlarda, C-peptit ve insülin analizleri yapıldı. Deney hayvanlarının 7 hafta boyunca izlenen ağırlık verileri incelendiğinde; STZ uygulamasına bağlı ani kilo kayıplarının olmadığı gözlendi. Bununla birlikte, deney sürecinin başlangıcında ve bitişinde ölçülen değerler üzerinden hesaplanan ağırlık değişimleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ($p<0,001$). Anlamlı farklılığı yaratan grupların; K ve D ($p<0,001$), K ve D+2B ($p<0,01$), K ve D+3B ($p<0,001$), K+2B ve D ($p<0,01$), K+2B ve D+2B ($p<0,01$), K+2B ve D+3B ($p<0,01$), K+3B ve D ($p<0,001$), K+3B ve D+2B ($p<0,001$) ile K+3B ve D+3B ($p<0,001$) olduğu belirlendi. Ağırlık değişimleri diyabet grupları arasında değerlendirildiğinde ise, anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü (Şekil 10).



Şekil 10: Deney Hayvanlarına Ait Başlangıç (1. Hafta) ve Bitiş (7. Hafta) Haftaları Arasındaki Ağırlık Değişimi Grafiği (g)

[a]$p < 0,001$ K grubuna göre, [b]$p < 0,01$ K+2B grubuna göre, [c]$p < 0,001$ K+3B grubuna göre. Veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n=8).

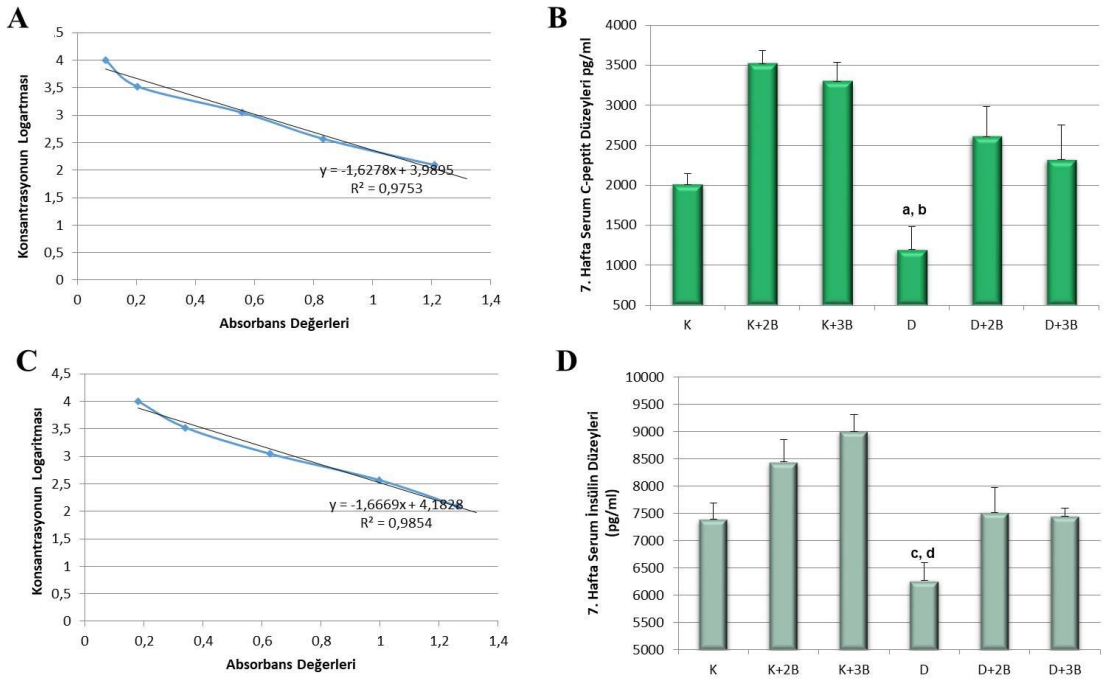
Diyabet modeli oluşturmak için, 5 gün boyunca deney hayvanlarına 20 mg/kg STZ uygulandı ve kan glikoz düzeyleri ölçüldü. Uygulama süresince hayvanların kan glikoz düzeylerinin kademeli olarak arttığı gözlendi ve 12. günde STZ uygulanan tüm hayvanların kan glikozu 250 mg/dl değerinin üzerinde ölçülerek diyabet modeli oluştulmuş oldu. STZ uygulanan tüm hayvanlar, deney sonuna dek diyabetik durumlarını korudu. Deney sürecinin başında (1. gün) tüm gruplarda ölçülen kan glikoz düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Deney sürecinin sonundaki (47. gün) veriler incelendiğinde ise gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu gözlendi ($p<0,001$). Anlamlı farklılığı yaratan grupların; K ve D ($p<0,01$), K ve D+3B ($P<0,05$), K+2B ve D ($p<0,01$), K+2B ve D+2B ($p<0,05$), K ve D+3B ($p<0,05$), K+3B ve D ($p<0,001$), K+3B ve D+2B ($p<0,01$) ile K+3B ve D+3B ($p<0,01$) olduğu belirlendi. Kan glikoz düzeylerinin, D+2B ve D+3B tedavi gruplarında düşme eğilimi gösterdiği ancak bu düşüşün anlamlı fark yaratacak düzeyde olmadığı görüldü. Haftalık kan glikoz düzeylerine ilişkin gruplara ait ortalama veriler ve verilere ait grafik Şekil 11'de verilmiştir.



	1	3	5	12	19	26	33	40	47
K	102,13	98	93,63	92,25	100,25	97,75	114	101,75	95,88
K+2B	106,13	99,75	98	96,88	99,63	90,25	104,5	94	91
K+3B	92,63	92,63	100,25	104	98,25	96,63	118,5	104,5	88,75
D	98,14	129,86	318	456,29	523,71	529,43	572,14	583,71	574,29
D+2B	104,38	135,75	351,88	451,38	514,75	510,75	587,5	594,625	557
D+3B	102,75	137,5	268,25	473,38	445,43	508,5	530,25	563,25	524,5

Şekil 11: Deney Hayvanlarının Deney Süreci Boyunca Kaydedilen Ortalama Kan Glikoz Düzeyleri (n=8)

Oluşturulan diyabet modelinin klasifikasyonu için; 7. haftada, açlık durumunda olmayan hayvanlardan alınan kanlarda c-peptit analizi yapıldı. Bu analiz için, Cloudclone (CEA447Ra) C-peptit ELISA kiti kullanıldı. Standartların absorbans değerlerinden faydalanarak çizilen grafikte R^2 değeri 0,9753 olarak bulundu ve bu denklem üzerinden örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Sonuçlar incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu ($p<0,01$); bu farklılığı yaratan grupların K+2B ve D grubu ($p<0,05$) ile K+3B ve D grupları ($p<0,01$) olduğu belirlendi (Şekil 12A, 12B). İnsülin düzeylerinin analizi için, Cloudclone (CEA448Ra) ELISA kiti kullanıldı ve 7. haftada açlık durumunda olmayan hayvanlardan toplanan kanlar ile çalışıldı. Elde edilen verilere göre, standartların absorbans değerlerinden faydalanılarak çizilen grafikte R^2 değeri 0,985 bulundu. Bu denklem kullanılarak, örneklerin absorbans değerleri üzerinden, serum örneklerinde bulunan insülin konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu ($p<0,01$), bu farklılığı yaratan grupların K+2B ve D grubu ile K+3B ve D grupları olduğu belirlendi (Şekil 12C, 12D).

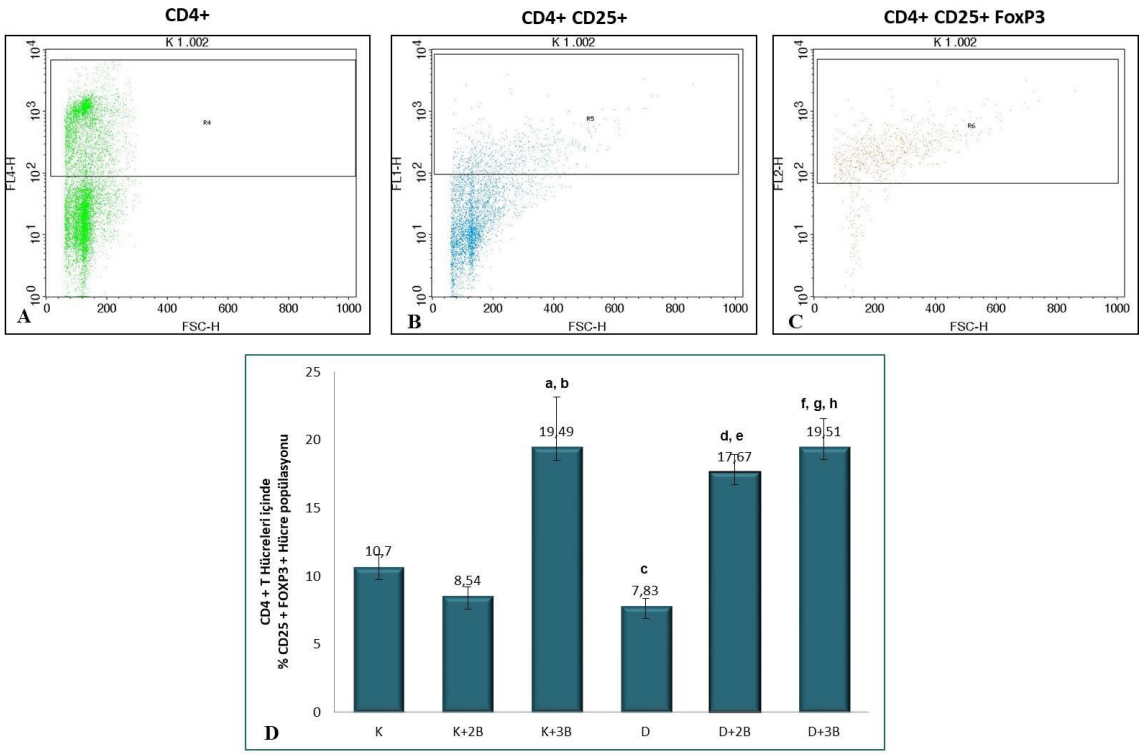


Şekil 12: 7. Haftadaki Serum C-peptit ve İnsülin Düzeyleri

A- C-peptit ELISA kitine ait çizilen absorbans/konsantrasyon grafiği. **B-** Gruplara ait ortalama serum c-peptit düzeyleri, [a]$p<0,01$ K+2B grubuna göre, [b]$p<0,05$ K+3B grubuna göre. **C-** İnsülin ELISA kitine ait çizilen absorbans/konsantrasyon grafiği. **D-** Gruplara ait ortalama serum insülin düzeyleri, [c]$p<0,05$ K+2B grubuna göre, [d]$p<0,01$ K+3B grubuna göre, (n=5). Veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n=5).

4.5. Treg Popülasyon Analizi

2B ve 3B şartlandırılmış medyumların immünomodülatör özelliklerinin değerlendirilebilmesi için, T hücre proliferasyonu ve sitokin üretimini düzenleyerek otoimmün reaksiyonun önlenmesinde önemli rol oynadığı bilinen regülatör T hücrelerinin (Treg) yüzdesi, dalaktan izole edilen mononükleer hücrelerde flow sitometrik analizlerle belirlendi. Bu analiz; CD4 pozitif T hücreleri içinde, Treg belirteçleri olan CD25 ve Foxp3 pozitif hücreler seçilerek gerçekleştirildi. Buna göre; D grubundaki Treg yüzdesinin K gruplarına göre göreceli olarak düştüğü gözlendi. 2B ve 3B şartlandırılmış medyum uygulamasının yapıldığı D+2B ve D+3B gruplarında Treg yüzdesi, D grubuna kıyasla anlamlı bir yükseliş göstermekteydi. Ayrıca 3B şartlandırılmış medyum uygulaması yapılan sağlıklı sıçanların bulunduğu K+3B grubundaki Treg yükselişinin, K ve K+2B grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlılık göstermesi dikkat çekiciydi. Flow sitometrik kapılama stratejisi ve bu verilere ilişkin ortalamalar üzerinden oluşturulan grafik Şekil 13'de verilmiştir.



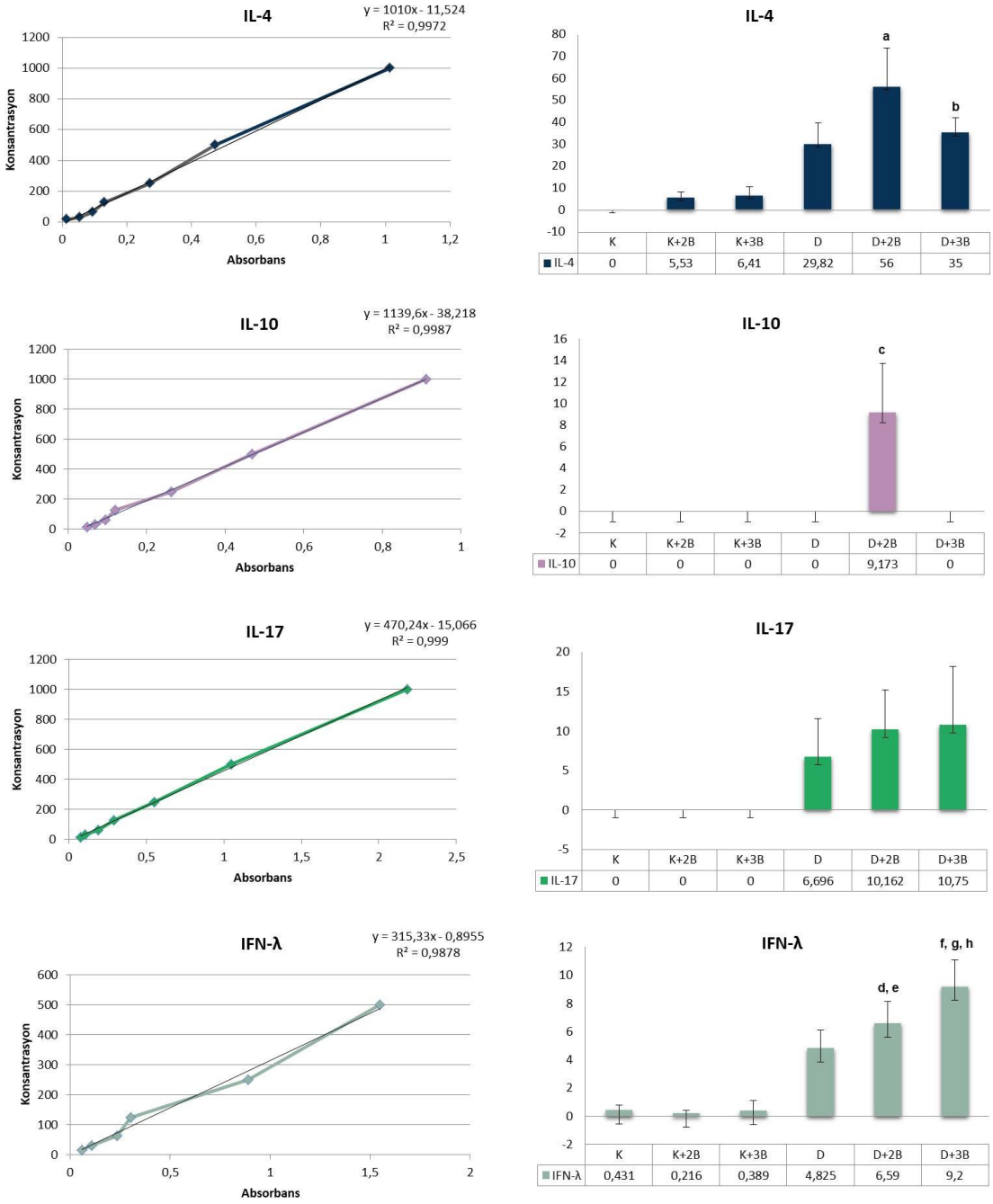
Şekil 13: Treg Popülasyon Analizine Ait Flow Sitometrik Kapılama Stratejisi ve Gruplara Ait Treg Popülasyon Yüzde Grafiği

A- Dalaktan izole edilen lenfositler içindeki CD4+ hücre popülasyonunu gösteren grafik. **B-** CD4+ hücreler içerisinde CD25+ hücre popülasyonunu gösteren grafik. **C-** CD4+CD25+ hücreler içindeki FoxP3 hücre popülasyonunu gösteren grafik. **D-** Dalaktan izole edilen CD4+ lenfositler içerisindeki

CD25+Foxp3 pozitif Treg yüzdesi. [a]p < 0,05 K grubuna göre, [b]p< 0,05 K+2B grubuna göre, [c]p < 0,01 K+3B grubuna göre, [d]p < 0,05 K+2B grubuna gore, [e]p < 0,01 D grubuna göre, [f]p < 0,05 K grubuna göre, [g]p < 0,01 K+2B grubuna göre, [h]p < 0,01 D grubuna göre. Veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n=8).

4.6. Sitokin Analizi

Hayvanların sakrifikasyonundan önce toplanan kanlardan elde edilen serumlarda anti-inflamatuvar sitokinler olan IL-4 ve IL-10 ile pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-17 ve IFN-λ düzeyleri ELISA analiziyle tespit edildi. Elde edilen absorbans değerleri üzerinden çizilen absorbans/konsantrasyon grafiğine göre, serumlardaki sitokin konsantrasyonları hesaplandı ve pg/ml olarak ifade edildi. Belirtilen sitokin düzeylerine ait, standartlar üzerinden çizilen absorbans/konsantrasyon grafikleri ve gruplara ait ortalama sitokin düzeyi grafikleri Şekil 14'te verilmiştir. Buna göre IL-4 sonuçları incelendiğinde; gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunduğu ($p<0,001$) görüldü. Diyabet gruplarında, kontrol gruplarına kıyasla IL-4 düzeylerinde bir artış görülmekteydi ve D+2B ($p<0,01$) ve D+3B ($p< 0,05$) gruplarındaki artış, K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi. Bununla birlikte, IL-10 düzeyinin D+2B grubu dışındaki gruplarda ölçülebilir düzeyde olmadığı görüldü. D+2B grubunda IL-10 düzeyi, ortalama 9,173 pg/ml olarak belirlendi ve bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$). Pro-inflamatuvar sitokinlerden olan IL-17 düzeyleri K gruplarında tespit edilemezken, D gruplarında artış gösterdi ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Son olarak IFN-λ düzeyleri değerlendirildi ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ($p<0,001$). Bulunan anlamlı farklılığın; K+2B ve D+2B ($p<0,05$), K+2B ve D+3B ($p<0,001$), K ve D+2B ($p<0,05$), K ve D+3B ($p<0,01$) ile K+3B ve D+3B ($p<0,05$) gruplarından kaynaklandığı belirlendi.

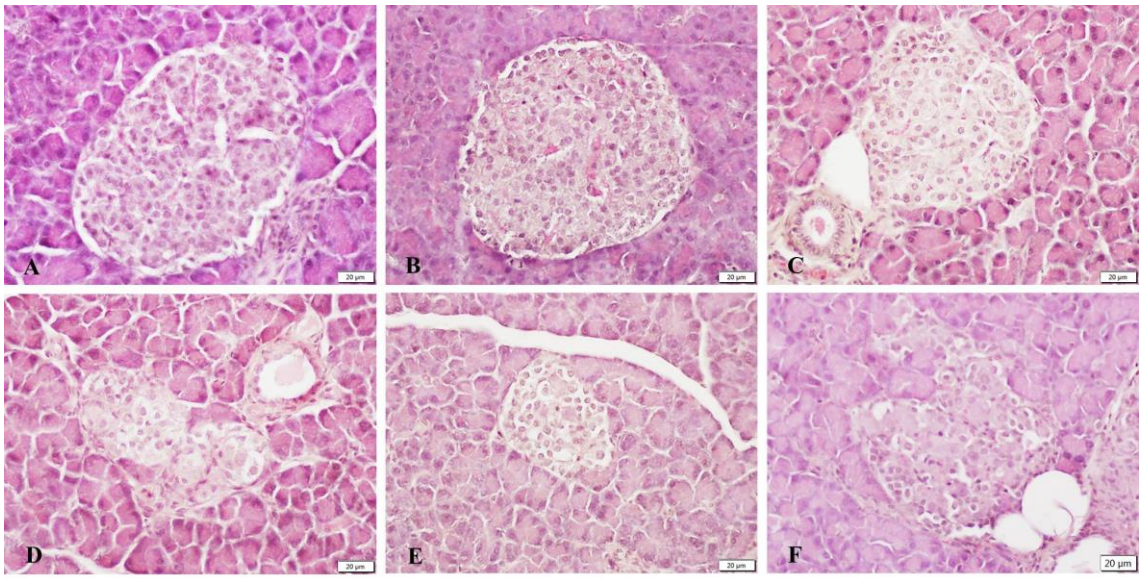


Şekil 14: Sitokin Analizlerine Ait Absorbans/konsantrasyon Grafikleri ve Gruplara Ait Ortalama Sitokin Düzeyleri

[a]p<0,01 K grubuna göre, [b]p<0,05 K grubuna göre, [c]p<0,05 tüm gruplara göre, [d]p<0,05 K grubuna göre, [e]p<0,05 K+2B grubuna göre, [f]p<0,01 K grubuna göre, [g]p<0,001 K+2B grubuna göre, [h]p<0,05 K+3B grubuna göre. Veriler ortalama ± SEM olarak sunulmuştur (n=8).

4.7. Histolojik Analizler

Pankreas dokularından hazırlanan parafin bloklardan alınan kesitler, H&E ile boyanarak adacık morfolojisi değerlendirildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda diyabet oluşturulmuş gruplara ait kesitlerde, düzensiz dış hatlara sahip ve kontrol gruplarına kıyasla boyutları küçülmüş adacıklar izlendi. Ayrıca, adacık içerisinde hücre sayılarının azaldığı izlendi. İleri analizler için immünohistokimyasal işaretlemeler yapıldı. Gruplara ait pankreas adacık mikrografları Şekil 15'te verilmiştir.



Şekil 15: Adacık Morfolojisi

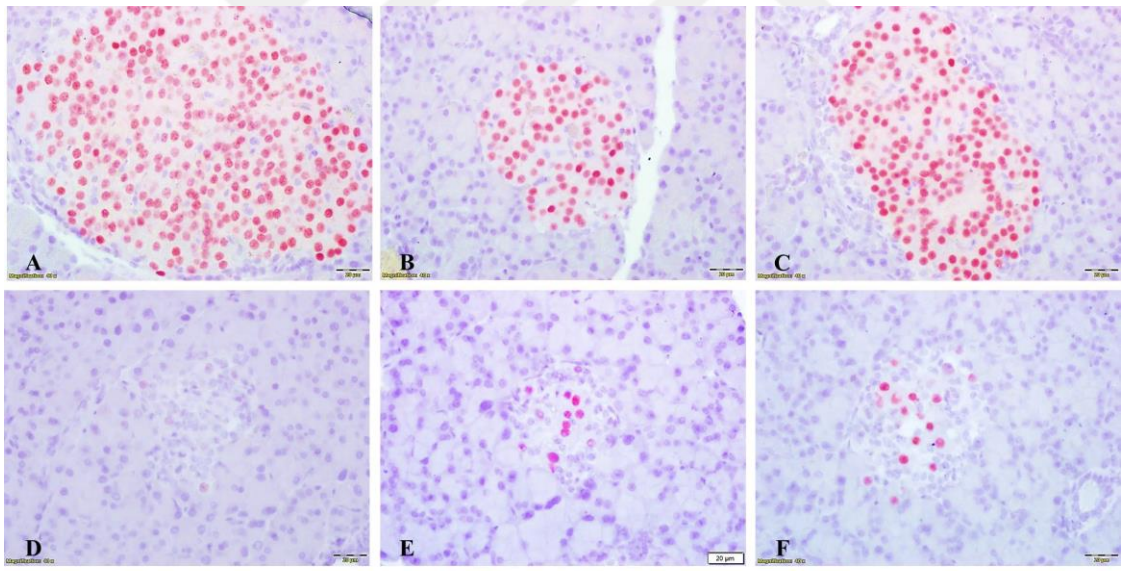
A- K grubuna ait mikrograf. **B-** K+2B grubuna ait mikrograf. **C-** K+3B grubuna ait mikrograf. **D-** D grubuna ait mikrograf. **E-** D+2B grubuna ait mikrograf. **F-** D+3B grubuna ait mikrograf. H&E, X40.

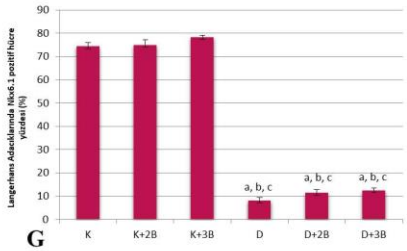
4.8. İmmünohistokimyasal Analizler

4.8.1. Nkx6.1

T1D modeli oluşturulan sıçanlara uygulanan 2B-ŞM ve 3B-ŞM'lerin, β hücre homeostazı ve rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilebilmesi amacıyla, pankreas kesitlerinde β hücre belirteci olan Nkx6.1, immünohistokimyasal olarak işaretlendi. Ardından her hayvan için 7-10 kesit incelenerek kesitlerde nükleer boyanma gösteren Nkx6.1 pozitif hücreler sayıldı ve bu hücrelerin adacıkta bulunan total hücreler içindeki yüzdesi hesaplandı. Buna göre; K grubundaki adacıklarda %74,44, K+2B grubunda %74,95 ve K+3B grubunda %78,33 oranında Nkx6.1 pozitif hücre olduğu görüldü. D grubunda bu pozitiflik, ekspresyon yoğunluğu zayıflamış olarak %8,14 oranında tespit edildi. Tedavi grupları olan D+2B ve D+3B gruplarında Nkx6.1

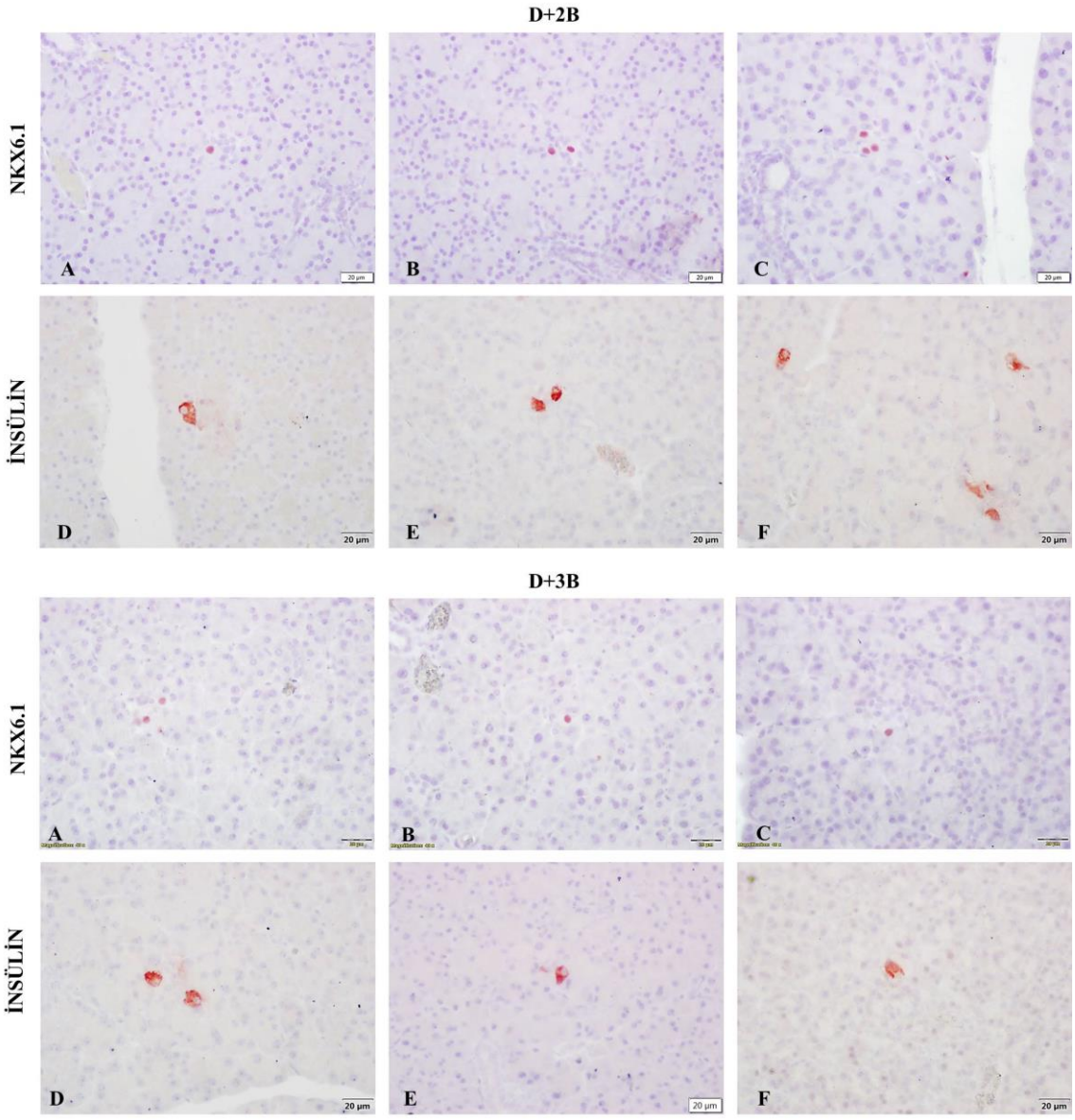
ekspresyon yoğunluğu, kontrol gruplarıyla uyumlu güçlü boyanma gösterdi, pozitif hücre yüzdesi sırasıyla %11,52 ve %12,49 olarak belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,001$). Gruplar arasındaki değerlendirmede anlamlı farklılığı yaratan grupların; D grubuyla K, K+2B ve K+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$), D+2B grubuyla K, K+2B ve K+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$) ve D+3B grubuyla K, K+2B ve K+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$) olduğu gösterildi. D+2B ve D+3B gruplarında, D grubuna kıyasla meydana gelen artışın anlamlı farklılık yaratacak düzeyde olmadığı tespit edildi. Ancak D grubunda görülen boyanma yoğunluğu, D+2B ve D+3B gruplarına kıyasla daha zayıftı. Gruplara ait mikrograflar, incelenen kesitlerin ortalama alanları ve adacık içinde bulunan Nkx6.1 pozitif hücre yüzdesini gösteren grafikler Şekil 16'da verilmiştir. Ayrıca kesitlerde adacık dışında kalan ekzokrin pankreas bölümü incelendiğinde, D+2B ve D+3B gruplarında, asiner hücreler arasında Nkx6.1 pozitifliği gösteren hücreler olduğu görüldü (Şekil 17)





Şekil 16: Nkx6.1 Belirtecine Ait İmmünohistokimyasal Analizler

A- K grubuna ait mikrograf. **B-** K+2B grubuna ait mikrograf. **C-** K+3B grubuna ait mikrograf. **D-** D grubuna ait mikrograf. **E-** D+2B grubuna ait mikrograf. **F-** D+3B grubuna ait mikrograf. **G-** Adacık içerisinde bulunan Nkx6.1 pozitif hücrelerin yüzdesi. [a]p< 0,001 K grubuna göre, [b]p< 0,001 K+2B grubuna göre, [c]p< 0,001 K+3B grubuna göre. X40.

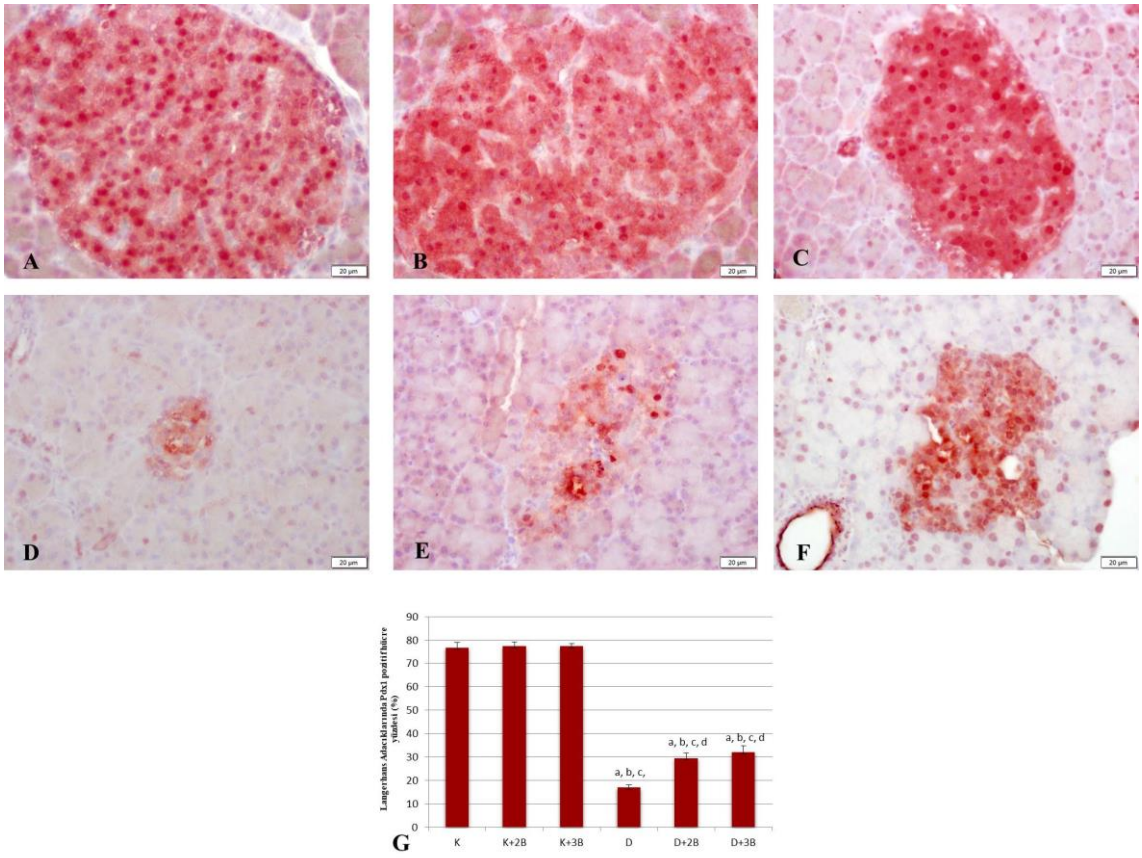


Şekil 17: Adacık Dışında Kalan Ekzokrin Pankreas Alanlarında Görülen Nkx6.1 ve İnsülin Pozitif Hücrelere Ait Mikrograflar

4.8.2. Pdx1

Uygulanan şartlandırılmış medyumların, β hücrelerinin korunması ve rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilebilmesi için; embriyonik pankreas gelişiminde, endokrin hücre farklılaşmasında ve olgun β hücre fonksiyonunun

sürdürülmesinde kritik bir rol oynayan Pdx1 belirteci immünohistokimyasal olarak işaretlendi. Ardından her hayvan için 5 kesit incelenerek bir adacık içerisindeki Pdx1 pozitif hücre yüzdesi hesaplandı ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak değerlendiridi. Buna göre; K grubundaki adacıklarda %76,99, K+2B grubunda %77,54 ve K+3B grubunda %77,54 oranında Pdx1 pozitif hücre olduğu görüldü. D grubunda bu pozitifliğin %17,11'e düştüğü gözlenirken, tedavi grupları olan D+2B ve D+3B gruplarında Pdx1 pozitif hücre yüzdesinin sırasıyla %29,72 ve %32,20 oranlarına yükseldiği belirlendi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu ($p<0,001$) gözlenirken; bu anlamlı farklılığın D grubuyla, K, K+2B, K+3B, D+2B, D+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$), D+2B grubuyla, K, K+2B ve K+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$), D+3B grubuyla, K, K+2B ve K+3B gruplarından ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$) kaynaklandığı gösterildi. Tedavi grupları olan D+2B ve D+3B gruplarındaki Pdx1 pozitif hücre yüzdesinin artışı; istatistiksel olarak D grubuna göre anlamlıyken, bu iki grup kendi aralarında değerledirildiğinde anlamlı farklılık görülmedi. Gruplara ait mikrograflar, incelenen kesitlerin ortalama alanları ve adacıklardaki Pdx1 pozitif hücre yüzdesini gösteren grafikler Şekil 18'de verilmiştir.



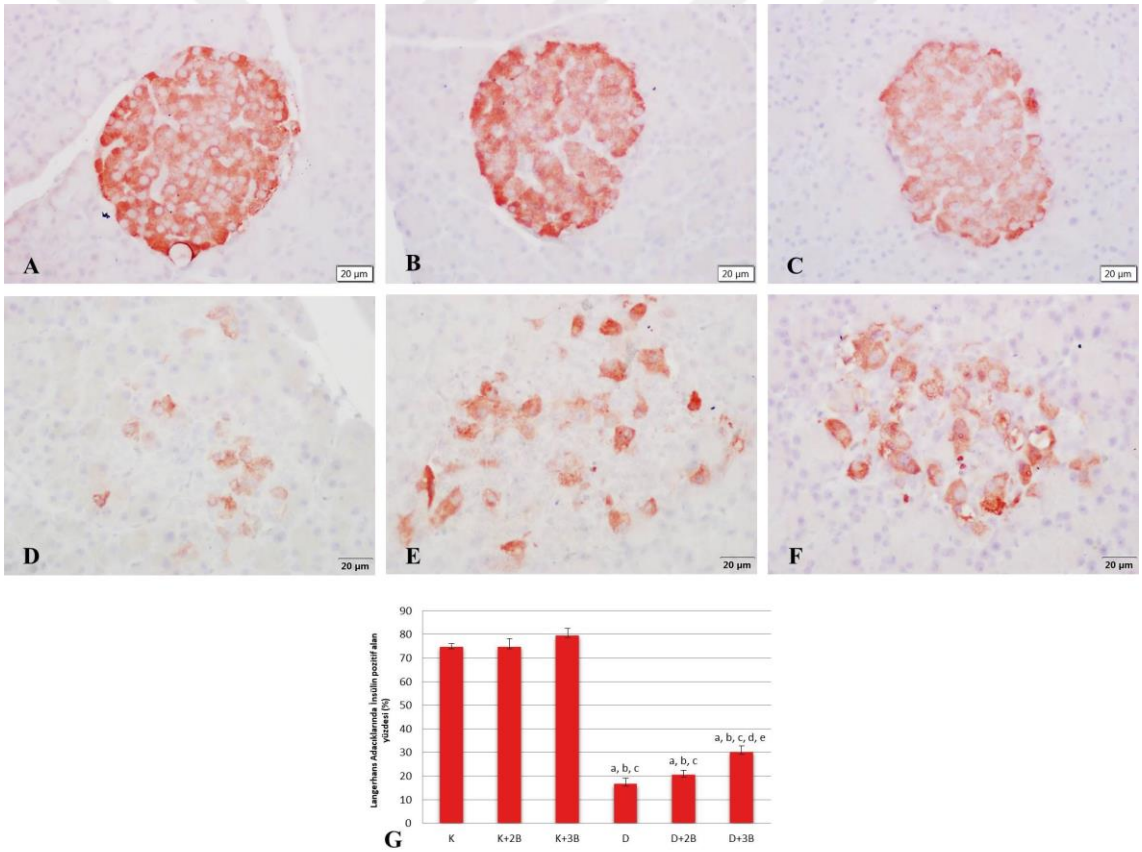
Şekil 18: Pdx1 Belirtecine Ait İmmünohistokimyasal Analizler

A- K grubuna ait mikrograf. **B-** K+2B grubuna ait mikrograf. **C-** K+3B grubuna ait mikrograf. **D-** D grubuna ait mikrograf. **E-** D+2B grubuna ait mikrograf. **F-** D+3B grubuna ait mikrograf. **G-** Adacık içerisinde bulunan Pdx1 pozitif hücrelerin yüzdesi. $^{a}p< 0,001$ K grubuna göre, $^{b}p< 0,001$ K+2B grubuna göre, $^{c}p< 0,001$ K+3B grubuna gore, $^{d}p< 0,001$ D grubuna göre.

4.8.3. İnsülin

2B ve 3B ortamlarda kültüre edilen MKH'lerden elde edilen şartlandırılmış medyumların, T1D modeli üzerindeki etkilerinin insülin salgılayan β hücrelerinin korunması ve rejenerasyonu ile insülin salınımı bağlamında değerlendirilebilmesi için, pankreas kesitlerinde insülin belirteci immünohistokimyasal olarak işaretlendi. Analiz sırasında, her hayvan için ortalama 7 kesit incelendi ve bir adacık içerisinde insülin pozitifliği gösteren alanın, total adacık alanı içindeki yüzdesi, Image J programıyla hesaplanarak elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Buna göre; K grubundaki adacıklarda %74,82, K+2B grubunda %74,90 ve K+3B grubunda %79,60 oranında insülin pozitif alan olduğu görüldü. D grubunda bu pozitifliğin %16,63'e düştüğü gözlenirken, tedavi grupları olan D+2B ve D+3B gruplarında insülin pozitif alan yüzdesinin sırasıyla

%20,54 ve %30,22 oranlarına yükseldiği belirlendi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu görüldü ($p<0,001$) ve görülen anlamlı farklılığın D grubuyla, K, K+2B, K+3B ve D+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $P<0,01$), D+2B grubuyla, K, K+2B ve K+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$), D+3B grubuyla, K, K+2B ve K+3B grupları ($p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$) ve D+2B grubuyla D+3B grubundan ($p<0,05$) kaynaklandığı tespit edildi. Ayrıca kesitlerde, adacık dışında kalan ekzokrin pankreas bölümü incelendiğinde D+2B ve D+3B gruplarında, asiner hücreler arasında insülin pozitifliği gösteren hücreler olması dikkat çekti (Şekil 15). Gruplara ait adacık mikrografları, incelenen kesitlerin ortalama alanları ve adacık içindeki insülin pozitif alan yüzdesini gösteren grafikler Şekil 19'da verilmiştir.



Şekil 19: İnsülin Belirtecine Ait İmmünohistokimyasal Analizler

A- K grubuna ait mikrograf. **B-** K+2B grubuna ait mikrograf. **C-** K+3B grubuna ait mikrograf. **D-** D grubuna ait mikrograf. **E-** D+2B grubuna ait mikrograf. **F-** D+3B grubuna ait mikrograf. **G-** Adacık içerisinde bulunan insülin pozitifliği yüzdesi. [a]$p< 0,001$ K grubuna göre, [b]$p< 0,001$ K+2B grubuna göre, [c]$p< 0,001$ K+3B grubuna gore, [d]$p< 0,01$ D grubuna gore, [e]$p< 0,05$ D+2B grubuna göre.

5. TARTIŞMA

Mezenkimal kök hücreler (MKH); kendilerini yenileyebilen, farklı hücre serilerine farklılaşabilen, sitokin, kemokin, büyüme faktörü, eksozom vb. pek çok faktör salgılayan immünomodülatör ve immünosupresör hücrelerdir[4]. Bu hücrelerden salınan parakrin faktörler (kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri vb.), anjiyogenezi ve proliferasyonu arttırıp apoptozu baskılayarak immünomodülasyonda hayati rol oynarlar[23]. MKH'lerin parakrin etkileri hakkında araştırmalar arttıkça, bu hücrelerin sekretomlarının bulunduğu medyumun terapötik olarak değerli olabileceği düşünülmüş ve MKH'lerin sekretom profillerinin düzenlenerek bu medyumların terapötik etkinliklerinin arttırılabileceği anlaşılmıştır. Bu çalışmada ilk kez, MKH'lerle şartlandırılmış medyumların T1D modeli üzerindeki terapötik etkileri, immünomodülasyon ve β hücre rejenerasyonu bağlamında incelenmiştir. Bu amaçla; insan göbek kordonundan izole edilip karakterize edilen MKH'ler, 2B ve 3B ortamlarda kültüre edilerek iki farklı şartlandırılmış medyum oluşturulmuştur. Hazırlanan şartlandırılmış medyumlar, protein düzeyleri ve belirlenen sitokinler için analiz edildikten sonra, T1D modeli oluşturulan sıçanlara dört hafta boyunca, on iki doz intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Bu süreçte hayvanlarda kan glikoz ve ağırlık değerleri takip edilmiş, sakrifikasyonun ardından dalakta bulunan Treg popülasyonu flow sitometrik olarak değerlendirilmiş ve serumda insülin, c-peptit, IL-4, IL-10, IL-17 ve IFN-λ düzeyleri analiz edilmiştir. Pankreasta Langerhans adacıkları histolojik olarak incelendikten sonra, β hücre belirteçleri olan Pdx1 ve Nkx6.1 ile insülin antikorları immünohistokimyasal olarak işaretlenerek β hücreleri tespit edilmiş ve elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

İnsan göbek kordonu MKH'leri terapötik olarak değerli; doku onarımına ve rejenerasyonuna yardımcı, T hücre mekanizmasını ve sitokin salınımını düzenleyerek immünosupresor ve immünomodülatör özellikler gösteren, bunun yanı sıra farklı hücre serilerine farklılaşabilme kapasitesine sahip hücrelerdir[46]. Bu özellikleri sayesinde pek çok hastalığın tedavisi için umut verici hücrelerdir ancak doğru ve etkili biçimde kullanılabilmeleri için etki mekanizmalarının anlaşılabilmesi gerekmektedir. Son yıllarda MKH'lerin parakrin etkileri üzerine yapılan çalışmalar artmış ve bu hücrelerin sekretomlarının terapötik olarak değerli olduğu ortaya konmuştur. Birçok çalışma,

MKH'ler tarafından salgılanan küçük moleküllerin sinerjik etkisinin hücre hasarını azaltabildiğini ve doku onarım kapasitesini geliştirdiğini doğrulamıştır. Hücrelerden salınan çözünür moleküller hedefe taşınabilir olduğu için uygulama bölgesinin hasarlı bölgeye fiziksel olarak yakın olması gerekmemektedir. Bu sebeplerle MKH kaynaklı ürünler, hücrelerin kendilerinden daha fazla dikkat çeker olmuştur [47,48]. Ayrıca terapötik amaçla hücre kaynaklı ürünlerin kullanımı; hücrelerin istenmeyen yerlere gidip yerleşmesi, istenmeyen hücre tiplerine farklılaşması ve tümör oluşturabilme ihtimali gibi risklerin önüne geçer. Bunun yanı sıra organizmada, hedef hastalığa bağlı olarak oluşan proinflamatuvar sitokinler, nakledilen MKH'lerin biyolojik özelliklerini de olumsuz yönde etkileyebileceği için hücrelerin doğrudan kullanımı yerine hücre ürünlerinin kullanımı daha avantajlı görünmektedir[22]. Bu çalışmada, MKH'lerin sekretomlarının terapötik etkileri araştırılmak istenmiş ve bu amaç doğrultusunda insan göbek kordonu MKH'leri ile şartlandırılmış medyumlar oluşturulmuştur. Bunun için öncelikle, insan göbek kordonundan doku eksplantı ile hücre izolasyonu yapılmış, ardından Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (ISCT) Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından belirlenen kriterler doğrultusunda karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerine sahip olduğu, CD44 ve C90 belirteçlerini %98'in üzerinde, CD34 ve CD45 belirteçlerini ise %5'in altında eksprese ettiği belirlenmiş, böylece izole edilen hücrelerin MKH olduğu gösterilmiştir[49].

Şartlandırılmış medyumlar, MKH'lerin salgıladıkları sitokinleri (TNF-a, IL-4, IL-6 vb.), büyüme faktörlerini (VEGF vb.) ve ekstraselüler veziküller (eksozom vb.) içerirler. ŞM'lerin sekretom profili, MKH'lerin kültüre edilmeleri sırasında çeşitli uyaranlarla indüklenerek düzenlenebilmekte ve bu sayede medyumların terapötik etkinlikleri arttırılabilmektedir. Bu uyaranlar; hipoksik ön koşullandırma, kimyasal ajan kullanımı, 3 boyutlu kültür ortamı (3B) oluşturulması ve inflamatuvar sitokinlerin kullanılması olarak sınıflandırılabilir[30]. Bu çalışmada kullanılan ŞM'ler iki farklı şekilde hazırlanmış; ilk ŞM için MKH'ler geleneksel iki boyutlu kültür ortamında kültüre edilirken, ikinci ŞM hazırlanırken Alvetex® doku iskeleleri kullanılarak, MKH'lerin belli bir topografiyi takip ederek büyümeleri sağlanmıştır. 3B kültür ortamları son yıllarda hücre kültürü çalışmalarında önem kazanan bir konudur çünkü 3B ortam hücrelerin normal fizyolojik koşullarına daha uygun bir ortam sağlar. Hücrelerin fenotip, proliferasyon, migrasyon ve protein ekspresyonu gibi biyolojik davranışları 3B

ortamlarda daha etkin şekilde düzenlenebilmekte[24] ve salgıladıkları parakrin faktörlerin miktarlarında değişiklikler beklenmektedir[32,33]. Bu çalışmada hazırlanan ŞM'ler, öncelikle protein konsantrasyonu açısından analiz edilmiş ve kolorimetrik bir yöntem olan bişinkoninik asit (BCA) yöntemiyle yapılan ölçüm sonucunda; 2B-ŞM içerisindeki protein konsantrasyonu 47,931 µg/ml, 3B-ŞM içerisindeki protein konsantrasyonu ise 64,310 µg/ml olarak belirlenmiştir. Aynı sayıda, aynı birim alana ekilen hücrenin, aynı süre boyunca kültüre edilmesi sonucunda protein konsantrasyonları karşılaştırıldığında, öngörüldüğü üzere 3B ortamda daha fazla protein tespit edilmiştir. Literatürdeki veriler, doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen MKH'lerin daha yüksek oranda sekretom salgıladığını göstermektedir[7,24,50] ve elde edilen bulgu literatür ile uyumludur. Ardından ŞM'ler içerisinde ölçülen total protein içeriklerinin anlaşılabilmesi amacıyla ELISA analizleriyle IL-4, IL-10, IL-17 ve IFN-γ düzeyleri ölçülmüş; bu sitokinler deneysel sürecin devamında hayvanlardan elde edilen serumda T1D patogeneziyle ilişkili sitokin düzeyleri analiz edileceği seçilmiştir. Yapılan değerlendirmede; anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-4 düzeyinin 2B-ŞM içerisinde 17,11 pg/ml, 3B-ŞM içerisinde 23,25 pg/ml olduğu görülmüştür. Anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 ve pro-inflamatuvar sitokinler olan IL-17 ve IFN-γ için ise ŞM'ler içerisinde ölçülebilir düzeyde tespit edilememiştir. Pro-inflamatuvar sitokinlerin ŞM'ler içerisinde tespit edilememesi olumludur. Ancak ŞM içeriğinin analiz edilebilmesi için seçilen anti-inflamatuvar sitokinlerden olan IL-10 düzeyinin tespit edilebilir düzeyde olmaması ve IL-4 düzeyinin total protein miktarının küçük bir bölümünü oluşturuyor olması; ŞM içeriği için ilişkili sitokin gruplarının gelecek araştırmalarda incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

2B-ŞM ve 3B-ŞM hazırlandıktan sonra, bu medyumların terapötik etkilerinin incelenebilmesi adına, Sprague Dawley türü sıçanlara, birbirini takip eden 5 gün boyunca 20 mg/kg olacak şekilde STZ uygulanmış ve deneysel otoimmün T1D modeli indüklenmiştir[39]. Bu çalışmada MKH'lerle şartlandırılmış medyumların T1D modeli üzerindeki terapötik etkilerinin, immünomodülasyon ve β hücre rejenerasyonu bağlamında değerlendirilmesi amaçlandığından otoimmün mekanizmalar sonucu meydana gelen T1D'ye en yakın model oluşturulmaya çalışılmıştır. Literatür bilgileri inflamasyonla seyreden T1D modeli için; çoklu, düşük doz STZ kullanımına işaret etmektedir[51,52]. Bu modelde; çoklu, düşük doz STZ kullanımına bağlı olarak adacık lezyonları T hücre ve makrofaj infiltrasyonu ile başlamakta, sitokin üretimiyle devam etmektedir. Bu model insandaki T1D'ye daha yakın, otoimmün bir model olarak kabul

görmektedir[53]. Deney modelinin oluşturulmasının ardından terapötik olarak kullanılan 2B-ŞM ve 3B-ŞM'nin etkileri öncelikle ağırlık, kan glikozu, c-peptit ve insülin düzeyi bağlamında değerlendirilmiştir. Sıçanlarda gerçekleşen ağırlık değişimlerine bakıldığında, seçilen deney modelinde de beklendiği üzere, STZ uygulamasına bağlı gelişen ani kilo kayıplarının olmadığı gözlenmiştir[39]. Ancak başlangıç ve bitiş haftaları arasındaki farklar incelendiğinde, K gruplarındaki kilo artışına karşın, D gruplarında kilo kaybı olduğu belirlenmiş ve ağırlık değişimlerindeki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kan glikoz düzeyleri incelendiğinde ise; deney sürecinin başında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmezken, deney sürecinin sonundaki verilerde anlamlı farklılık gözlenmiştir. Bu farklılığın D gruplarında meydana gelen kan glikoz düzeylerindeki yükselişten kaynaklandığı belirlenmiştir. Bununla birlikte D+2B ve D+3B tedavi gruplarında kan glikoz düzeyleri anlamlı farklılık yaratacak düzeyde olmasa da düşme eğilimi göstermeye başlamıştır ve bu durum uygulanan ŞM'lerin insülin salınımına etki eden birtakım mekanizmaları tetiklemiş olabileceğine işaret etmektedir. Bu konuda literatürde bulunan çalışma sayısı kısıtlı olmakla birlikte, mevcut veriler MKH sekresyon ürünlerinin tek başlarına kullanımlarının, kan glikozunu fizyolojik düzeylere indirmek için yeterli olmadığını göstermektedir. Örneğin Nojehdehi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; adipoz doku kökenli MKH'lerin ürünü olan eksozomlar kullanılmış ve diyabetik farelere uygulandıktan sonra eksozomların immünomodülasyonda etkili olduğu gösterilmiştir. Ancak kan glikoz düzeyleri incelendiğinde, tedavi grubundaki düşüşün kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı belirtilmiştir[54].

C-peptit, pankreatik beta hücrelerinden insülin ile birlikte salgılanmadan önce parçalanan proinsülinin bir parçasıdır ve endojen insüline eş molar miktarlarda üretilir. Terapötik olarak uygulanan ekzojen insülinin bir ürünü olmadığı ve vücuttaki bozunma hızı insüline göre daha yavaş olduğu için insülin sekresyonunun bir ölçüsü olarak yaygın olarak kullanılmaktadır[55]. Bunun yanında c-peptit, diyabet klasifikasyonu için de önemli bir araçtır. Kan glikoz düzeyleri ile birlikte değerlendirildiğinde; yüksek kan glikoz düzeyiyle seyreden düşük c-peptit seviyesi tip 1 diyabeti işaret ederken, yüksek kan glikozu ile seyreden yüksek c-peptit seviyesi tip 2 diyabeti düşündürmektedir[56]. Bu çalışmada açlık durumunda olmayan sıçanlarda, 7. haftada c-peptit analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir düşüş gösteren diyabet grubu c-peptit düzeyi ve sıçanlardaki yüksek kan glikozu birlikte

değerlendirildiğinde oluşturulan deneysel diyabet modelinin tip 1 diyabet ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca c-peptit düzeylerinin D+2B ve D+3B gruplarında artış eğilimi gösterdiği ancak bu artışın istatistiksel anlamlılık yaratmadığı gözlenmiştir. 7. haftada ölçülen serum insülin düzeylerinde de c-peptit düzeylerine benzer bir sonuçla karşılaşılmış ve D grubunda anlamlı biçimde düşüş gösteren insülin düzeyinin, D+2B ve D+3B gruplarında yükselme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Literatürdeki veriler incelendiğinde; deney hayvanları için standart bir c-peptit ve insülin referans aralığı bulunmadığı, deney hayvanının türüne, laboratuvar ve deney koşulları ile hayvanların açlık/tokluk durumlarına göre bu düzeylerin değişiklik gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte, insan dental pulpa kök hücrelerinin STZ ile indüklenen T1D'li sıçanlara transplante edildiği ve ardından serum c-peptit ve serum insülin düzeylerinin ölçüldüğü çalışma ile karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçların tutarlı olduğu görülmektedir[57].

MKH'lerin anti-inflamatuvar ve immünomodülatör etkileri olduğu bilinmektedir[58]. Otoimmün bir hastalık olan T1D'de, MKH'lerden elde edilen ŞM'lerin göstereceği bu etkilerin değerlendirilebilmesi amacıyla dalaktaki T hücrelerinde Treg popülasyon analizi ve periferik kanda pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokin analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analizlere göre, diyabet indüklenen grupta Treg popülasyonunun azaldığı ve periferik kanda Th1 ilişki IFN-λ ve Th17 ilişkili IL-17 sitokinlerinin arttığı gözlenmiştir. Bu durumun T1D'ye bağlı kronik inflamasyon durumuna bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir[59]. Diyabet oluşturulan gruplara dört hafta boyunca 2B-ŞM ve 3B-ŞM uygulandıktan sonra yapılan değerlendirmelerde ise, Treg popülasyonunda anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 3B-ŞM uygulanan K grubu olan K-3B grubunda da Treg hücrelerinde anlamlı bir yükseliş olduğu görülmüştür. Bu bulgular MKH'lerle şartlandırılmış medyumların içerdikleri moleküller sayesinde Treg hücrelerini indüklediğini göstermektedir. Periferik kanda yapılan sitokin analizi; pro-inflamatuvar sitokinler olan IFN-λ'nın kontrol gruplarında tespit edilebilir düzeyde olmadığını, IL-17'nin ise çok düşük düzeylerde bulunduğunu ortaya koymuştur. Diyabetin indüklenmesiyle her iki sitokinde meydana gelen artışın, Treg azalmasına bağlı olarak Th1 ve Th17 inhibe edilememesi sonucunda meydana gelmiş olabileceği düşünülebilir[60]. Tedavi grupları olan D+2B ve D+3B gruplarında IFN-λ ve IL-17 düzeyleri incelendiğinde her iki sitokinde de artış bulunduğu, IFN-λ'da görülen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Diyabet patogenezinde önemli rol oynadığı bilinen bu proinflamatuvar sitokinlerin, genel paradigmanın aksine,

uygulanan tedavinin ardından artışı dikkat çekici olmuştur[61]. Hayvanlara uygulanan ŞM'lerin içinde IL-17 ve IFN-λ'nın olmadığı tespit edildiği için, meydana gelen sitokin artışlarının uygulanan tedavinin direkt etkilerine bağlı olmadığı, bu artışın T1D için terapötik olarak kullanılan ŞM'lerin immün hücreleri düzenleme yetenekleri sonucu meydana geldiği söylenebilir. Literatürdeki veriler incelendiğinde, diyabetojenik T hücrelerinin paradoksal olarak adacık spesifik Treg hücrelerinin diyabetten sürekli koruma sağlamasına yardımcı olabileceğini göstermektedir[62]. Bunun yanında, yapılan çalışmalarda IFN-λ reseptörü veya IFN-λ üretimindeki kaybın, obez olmayan diyabetik (NOD) farelerde kendiliğinden T1D gelişimini engelleyemediği ortaya konulurken[63], başka bir çalışmada, IFN-λ indüksiyonunun normoglisemiyi restore ettiği gösterilmiştir[64]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, NOD farelere mikobakteriyal adjuvant tedavisi uygulandığında, hastalıktan korunma ile birlikte IFN-λ ve IL-17 düzeylerinin arttığı bildirilmiştir[65]. Literatürdeki farklı veriler ve yaklaşımlar incelendiğinde; aslında bir sitokini, pro-inflamatuvar veya anti-inflamatuvar olarak adlandırmanın zor olduğu, çünkü aslında her iki mekanizmanın farklı aşamalarında etki göstermeyen sitokin olmadığı ifade edilmektedir[34]. Sitokinlerin, etkileşimde oldukları hücrelerin ve ilişkili oldukları hastalık mekanizmalarının anlaşılabilmesi ancak literatüre katılacak yeni çalışmaların kümülatif etkisi sayesinde olacaktır. Anti-inflamatuvar sitokinler olan bilinen IL-4 ve IL-10'un periferik kandaki düzeyleri incelendiğinde; Treg ilişkili IL-10 düzeyinin K gruplarında tespit edilemediği ve D+2B grubunda anlamlı derecede arttığı görülmüştür. D+3B grubunda ise; dalaktaki Treg hücre popülasyonundaki artışa rağmen, periferik kanda IL-10 tespit edilememiştir. Periferik kandaki sitokin düzeyleri çok sayıda faktörle etkileşimde olup buna bağlı pek çok değişiklik göstermektedir[60]. D+2B grubunda IL-10 düzeyi artmış olmasına karşın, D+3B grubunda artmış olmaması 3B ŞM içeriğindeki sitokin ve büyüme faktörlerindeki değişikliklere bağlı gelişmiş olabilir. ŞM'ler içerisindeki sitokin ve büyüme faktörlerinin çeşitliliği düşünüldüğünde gelecek çalışmalarla yapılacak içerik profilinin tam olarak ortaya konması olası etkileşimleri açıklamayı mümkün kılacaktır. Son olarak IL-4 düzeyinin K grubunda tespit edilemezken K+2B, K+3B ve D gruplarında göreceli olarak artış gösterdiği, tedavi grupları olan D+2B ve D+3B gruplarında ise anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Bu durum, artan Treg popülasyonuna bağlı olarak indüklenen Th2 hücrelerinden anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-4 salınımının arttığını ve immünomodülasyona yardımcı olduğunu düşündürmektedir[9]. Tüm bu bulgular birlikte

değerlendirildiğinde, 2B-ŞM'lerin ve 3B-ŞM'lerin Th1, Th2, T17 ve Treg hücreleri arasındaki dengesizliği düzenleyerek otoimmün T1D diyabet modelinde iyileşme başlattığı söylenebilir.

MKH'lerle şartlandırılmış medyumların; endojen mekanizmaları indükleyerek β hücre homeostasını ve rejenerasyonunu tetikleme yeteneklerinin değerlendirilebilmesi amacıyla pankreas kesitlerinde öncelikle; hem multipotent pankreatik progenitör hücrelerde, hem de fonksiyonel β hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen iki ana transkripsiyon faktörü olan Pdx1 ve NKX6.1 immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Buna göre her iki antikorda da kontrol gruplarında %74 ile %78 arasında tespit edilen pozitif hücre oranı, kemirgenlerdeki β hücre oranının %70-80 olduğu bilgisiyle örtüşmektedir [18]. Nkx6.1 belirtecine ait sonuçlar incelendiğinde; T1D modeli indüklenen grupta pozitif hücre yüzdesinin anlamlı bir düşüş göstererek %8,14'e indiği görülmüş, tedavi gruplarında bu oran yükselme eğilimi göstermiş ancak bu yükseliş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Pdx1 belirtecine ait sonuçlarda; D grubunda pozitif hücre yüzdesi K gruplarına göre anlamlı bir düşüş gösterirken, tedavi grupları olan D+2B ve D+3B gruplarında görülen yükselişin D grubuna göre anlamlı olduğu görülmüştür. Bu iki belirteç birlikte değerlendirildiğinde, uygulanan ŞM'lerin β hücre homeostazında ve rejenerasyonunda etkili olduğu söylenebilmektedir. Bu bulguların ardından, pankreaslarda insülin işaretlemesi yapılarak adacıklarda bulunan β hücrelerinin, insülin salgılama kapasiteleri değerlendirilmiştir. Buna göre kontrol gruplarındaki insülin pozitif alan yüzdesinin, Pdx1 ve Nkx6.1 belirteçlerindeki pozitif hücre yüzdesiyle tutarlılık gösterdiği görülmüştür. D grubundaki insülin pozitif alan yüzdesi, K gruplarına kıyasla anlamlı düşüş göstermiş ve tedavi gruplarında bu oran artmıştır. Bu artışın; D+3B grubunda, D ve D+2B grubuna göre anlamlılık gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar üzerinden; MKH'lerin salgıladıkları faktörlerin, immünomodülasyonda görev alarak ve anti-inflamatuvar, anti-apoptotik ve sitoprotektif özellikleri sayesinde, pankreas adacıklarında β hücre homeostazını korumaya yardımcı olduğu ve β hücre rejenerasyonunu indüklediği söylenebilir. Tedavi gruplarında görülen β hücre artışının; β hücre proliferasyonu ve rejenerasyonu, α hücre transdiferansiyasyonu veya öncül hücrelerin neogenezi gibi mekanizmalarla gerçekleşmiş olabileceği bilinmekte[66,67], bunun anlaşılabilmesi ve bu mekanizmaların hangi yolaklar üzerinden tetiklendiğinin ortaya konulabilmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bunlara ek olarak; D+2B ve D+3B gruplarına ait pankreas

kesitlerinde adacık dışındaki ekzokrin pankreas alanlarında görülen Nkx6.1 pozitif ve insülin pozitif hücreler; uygulanan ŞM'lerin lokal kök hücre nişlerini tetiklemiş olabileceğini ya da ekzokrin hücrelerin β hücre benzeri, insülin eksprese eden hücrelere yeniden programlandığını gösteriyor olabilir[67]. Eldeki bulgular, bu konuda yorum yapabilmek için yetersizdir, ancak ileri araştırmalarla incelenmesi gereken önemli bir bulgu olarak dikkati çekmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada; MKH'lerle şartlandırılmış medyumların, T1D modelinde Treg popülasyonunu indükleyip sitokin salınımını düzenlediği, aynı zamanda pankreas adacıklarında Pdx1, Nkx6.1 ve insülin pozitif hücre sayısında artış meydana getirdiği gösterilmiştir. Bu veriler şartlandırılmış medyumların T1D modeli üzerinde immünomodülasyon ile β hücre homeostazı ve rejenerasyonu bağlamında iki yönlü terapötik etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Adacık yapısında meydana gelen değişiklikler ve ŞM uygulanan gruplardaki β hücre belirteçlerine ait ekspresyon düzeyleri ile pozitif hücrelerin pankreatik dokudaki yerleşimleri, β hücre homeostazı ve rejenerasyonuna yeni yaklaşımlar kazandırabilecek bulgular ortaya koymuştur. Ayrıca 3B-ŞM uygulanan grupta, Treg popülasyonu ve adacıklarda görülen Pdx1, Nkx6.1 ve insülin pozitif hücre sayılarındaki artışın 2B-ŞM uygulanan gruba göre yüksek olması, 3B-ŞM'de ölçülen yüksek protein miktarının, in vivoda karşılık bulduğunu göstermiş ve bu bulgular; şartlandırılmış medyumların terapötik etkilerinin, MKH'lerin 3B iskeleler üzerinde belirli bir topografiyi takip ederek yetiştirilmesiyle arttırılabileceğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada MKH'lerin 2B ve 3B ortamlarda kültüre edilmesiyle oluşturulan şartlandırılmış medyumlar in vitro ve in vivo deneylerden elde edilen bulgularla karşılaştırılmıştır. Her iki medyumun da eşit koşullarda hazırlanabilmesi için, birim alana ekilen hücre miktarı aynı tutulmuştur ancak 3B ortam olarak kullanılan doku iskeleleri, ekilen hücre miktarının 10 katı kadar hücrenin kültüre edilebilmesi için uygun bir ortam sağlamaktadır. Dolayısıyla, bu doku iskeleleriyle çok daha güçlü şartlandırılmış medyumların oluşturulabileceği düşünülmektedir. Ayrıca şartlandırılmış medyumların içerik analizleri yapılırken, in vivoda incelenecek ve T1D patogenezinde etkili olduğu bilinen sitokinlerle paralel seçimler yapılmıştır ancak bu sitokinlerden IL-10, IL-17 ve IFN-γ'nın medyumlar içerisinde tespit edilebilir düzeyde bulunmadığı görülmüştür. Bu konuda yapılan araştırmalar oldukça yeni olduğu için, farklı

kaynaklardan izole edilen MKH'lerin salgı profilleri hakkında yorum yapmak güçtür. Elde ettiğimiz veriler, ŞM'lerin terapötik etkinliklerinin ortaya konması için büyüme faktörleri, farklı sitokin ve kemokin molekülleri açısından içeriklerinin belirlenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. Burrack AL, Martinov T, Fife BT. T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Published online 2017. doi:10.3389/fendo.2017.00343

2. Singh B, Nikoopour E, Huszarik K, Elliott JF, Jevnikar AM. Immunomodulation and regeneration of islet beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes. *J Interf Cytokine Res*. 2011;31(10):711–719. doi:10.1089/jir.2011.0025

3. Haak T, Gölz S, Fritsche A, Füchtenbusch M, Siegmund T, Schnellbächer E, Klein HH, Uebel T, Droßel D. Therapy of type 1 diabetes: Abstract of the S3 guideline (AWMF register number: 057-013; 2nd edition), Status: June 30, 2018. *Diabetologe*. 2019;15(2):135–145. doi:10.1007/s11428-019-0458-8

4. Hu L, Hu J, Zhao J, Liu J, Ouyang W, Yang C, Gong N, Du L, Khanal A, Chen L. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Biomed Res Int*. Published online 2013. doi:10.1155/2013/438243

5. Hu J, Wang Y, Wang F, Wang L, Yu X, Sun R, Wang Z, Wang L, Gao H, Fu Z, Zhao W, Yan S. Effect and mechanisms of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on type 1 diabetes in NOD model. *Endocrine*. 2014;48(1):124–134. doi:10.1007/s12020-014-0219-9

6. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2014;2014:7–9. doi:10.1155/2014/965849

7. Su N, Gao PL, Wang K, Wang JY, Zhong Y, Luo Y. Fibrous scaffolds potentiate the paracrine function of mesenchymal stem cells: A new dimension in cell-material interaction. *Biomaterials*. Published online 2017. doi:10.1016/j.biomaterials.2017.06.028

8. Ravi M, Paramesh V, Kaviya SR, Anuradha E, Paul Solomon FD. 3D cell culture systems: Advantages and applications. *J Cell Physiol*. 2015;230(1):16–26. doi:10.1002/jcp.24683

9. Xv J, Ming Q, Wang X, Zhang W, Li Z, Wang S, Li Y, Li L. Mesenchymal stem

cells moderate immune response of type 1 diabetes. *Cell Tissue Res*. 2017;368(2):239–248. doi:10.1007/s00441-016-2499-2

10. Wu H, Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy for type 1 diabetes. *Discov Med*. Published online 2014.

11. Katuchova J, Harvanova D, Spakova T, Kalanin R, Farkas D, Durny P, Rosocha J, Radonak J, Petrovic D, Siniscalco D, Qi M, Novak M, Kruzliak P. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Type 1 Diabetes Mellitus. *Endocr Pathol*. 2015;26(2):95–103. doi:10.1007/s12022-015-9362-y

12. Giwa AM, Ahmed R, Omidian Z, Majety N, Karakus KE, Omer SM, Donner T, Hamad ARA. Current understandings of the pathogenesis of type 1 diabetes: Genetics to environment. *World J Diabetes*. Published online 2020. doi:10.4239/wjd.v11.i1.13

13. Sarang S, Viswanathan C. Umbilical cord derived mesenchymal stem cells useful in insulin production - another opportunity in cell therapy. *Int J Stem Cells*. 2016;9(1):60–69. doi:10.15283/ijsc.2016.9.1.60

14. Shih HP, Wang A, Sander M. Pancreas organogenesis: From lineage determination to morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. Published online 2013. doi:10.1146/annurev-cellbio-101512-122405

15. Zhou Q, Melton DA. Pancreas regeneration. *Nature*. Published online 2018. doi:10.1038/s41586-018-0088-0

16. Sakhneny L, Khalifa-Malka L, Landsman L. Pancreas organogenesis: Approaches to elucidate the role of epithelial-mesenchymal interactions. *Semin Cell Dev Biol*. 2019;92(August):89–96. doi:10.1016/j.semcdb.2018.08.012

17. Márquez-Aguirre AL, Canales-Aguirre AA, Padilla-Camberos E, Esquivel-Solis H, Díaz-Martínez NE. Development of the endocrine pancreas and novel strategies for β-cell mass restoration and diabetes therapy. *Brazilian J Med Biol Res*. Published online 2015. doi:10.1590/1414-431X20154363

18. Aigha II, Abdelalim EM. NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation. *Stem Cell Res Ther*. Published online 2020. doi:10.1186/s13287-020-01977-0

19. Cano DA, Soria B, Martín F, Rojas A. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell Mol Life Sci*. Published online 2014. doi:10.1007/s00018-013-1510-2

20. Larsen HL, Grapin-Botton A. The molecular and morphogenetic basis of pancreas organogenesis. *Semin Cell Dev Biol*. Published online 2017. doi:10.1016/j.semcdb.2017.01.005

21. Isildar B, Ozkan S, Oncul M, Baslar Z, Kaleli S, Tasyurekli M, Koyuturk M. Comparison of different cryopreservation protocols for human umbilical cord tissue as source of mesenchymal stem cells. *Acta Histochem*. 2019;121(3). doi:10.1016/j.acthis.2019.02.008

22. Yang C, Chen Y, Li F, You M, Zhong L, Li W, Zhang B, Chen Q. The biological changes of umbilical cord mesenchymal stem cells in inflammatory environment induced by different cytokines. *Mol Cell Biochem*. Published online 2018. doi:10.1007/s11010-018-3284-1

23. Yaochite JNU, Caliari-Oliveira C, De Souza LEB, Neto LS, Palma PVB, Covas DT, Malmegrim KCR, Donadi EA. Therapeutic efficacy and biodistribution of allogeneic mesenchymal stem cells delivered by intrasplenic and intrapancreatic routes in streptozotocin-induced diabetic mice. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):1–16. doi:10.1186/s13287-015-0017-1

24. Kim MH, Wu WH, Choi JH, Kim JH, Hong SH, Jun JH, Ko Y, Lee JH. Conditioned medium from the three-dimensional culture of human umbilical cord perivascular cells accelerate the migration and proliferation of human keratinocyte and fibroblast. *J Biomater Sci Polym Ed*. Published online 2018. doi:10.1080/09205063.2017.1340045

25. Kay AG, Long G, Tyler G, Stefan A, Broadfoot SJ, Piccinini AM, Middleton J, Kehoe O. Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium Reduces Disease Severity and Immune Responses in Inflammatory Arthritis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–11. doi:10.1038/s41598-017-18144-w

26. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells*. Published online 2020.

doi:10.4252/wjsc.v12.i12.1529

27. Montanucci P, Alunno A, Basta G, Bistoni O, Pescara T, Caterbi S, Pennoni I, Bini V, Gerli R, Calafiore R. Restoration of t cell substes of patients with type 1 diabetes mellitus by microencapsulated human umbilical cord Wharton jelly-derived mesenchymal stem cells: An in vitro study. *Clin Immunol*. 2016;163:34–41. doi:10.1016/j.clim.2015.12.002

28. Päth G, Perakakis N, Mantzoros CS, Seufert J. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus — Focus on mesenchymal stem cells. *Metabolism*. 2019;90:1–15. doi:10.1016/j.metabol.2018.10.005

29. Dai M, Zhang Y, Yu M, Tian W. Therapeutic applications of conditioned medium from adipose tissue. *Cell Prolif*. 2016;49(5):561–567. doi:10.1111/cpr.12281

30. Ferreira JR, Teixeira GQ, Santos SG, Barbosa MA, Almeida-Porada G, Gonçalves RM. Mesenchymal stromal cell secretome: Influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning. *Front Immunol*. Published online 2018. doi:10.3389/fimmu.2018.02837

31. Leuning DG, Beijer NRM, Du Fossé NA, Vermeulen S, Lievers E, Van Kooten C, Rabelink TJ, De Boer J. The cytokine secretion profile of mesenchymal stromal cells is determined by surface structure of the microenvironment. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–9. doi:10.1038/s41598-018-25700-5

32. Redondo-Castro E, Cunningham CJ, Miller J, Brown H, Allan SM, Pinteaux E. Changes in the secretome of tri-dimensional spheroid-cultured human mesenchymal stem cells in vitro by interleukin-1 priming. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):1–11. doi:10.1186/s13287-017-0753-5

33. Xie H, Liao N, Lan F, Cai Z, Liu X, Liu J. 3D-cultured adipose tissue-derived stem cells inhibit liver cancer cell migration and invasion through suppressing epithelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Med*. Published online 2018. doi:10.3892/ijmm.2017.3336

34. Kyurkchiev D. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552. doi:10.4252/wjsc.v6.i5.552

35. Ozkan S, Isildar B, Oncul M, Baslar Z, Kaleli S, Koyuturk M. Ultrastructural analysis of human umbilical cord derived MSCs at undifferentiated stage and during osteogenic and adipogenic differentiation. *Ultrastruct Pathol*. 2018;42(3). doi:10.1080/01913123.2018.1453905

36. Romo-Morales A, Knight E, Przyborski S. Alvetex®, a highly porous polystyrene scaffold for routine three-dimensional cell culture. In: *Technology Platforms for 3D Cell Culture*. ; 2017. doi:10.1002/9781118851647.ch10

37. Sagaradze G, Grigorieva O, Nimiritsky P, Basalova N, Kalinina N, Akopyan Z, Efimenko A. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *Int J Mol Sci*. Published online 2019. doi:10.3390/ijms20071656

38. Medina A, Parween S, Ullsten S, Vishnu N, Siu YT, Quach M, Bennet H, Balhuizen A, Åkesson L, Wierup N, Carlsson PO, Ahlgren U, Lernmark Å, Fex M. Early deficits in insulin secretion, beta cell mass and islet blood perfusion precede onset of autoimmune type 1 diabetes in BioBreeding rats. *Diabetologia*. 2018;61(4):896–905. doi:10.1007/s00125-017-4512-z

39. Kim E, Sohn S, Lee M, Jung J, Kineman RD, Park S. Differential responses of the growth hormone axis in two rat models of streptozotocin-induced insulinopenic diabetes. *J Endocrinol*. 2006;188(2):263–270. doi:10.1677/joe.1.06501

40. Metwally MMM, Ebraheim LLM, Galal AAA. Potential therapeutic role of melatonin on STZ-induced diabetic central neuropathy: A biochemical, histopathological, immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Histochem*. Published online 2018. doi:10.1016/j.acthis.2018.09.008

41. Luo Z, Thorvaldson L, Blixt M, Singh K. Determination of regulatory T cell subsets in murine thymus, pancreatic draining lymph node and spleen using flow cytometry. *J Vis Exp*. Published online 2019. doi:10.3791/58848

42. Li L, Li F, Gao F, Yang Y, Liu Y, Guo P, Li Y. Transplantation of mesenchymal stem cells improves type 1 diabetes mellitus. *Cell Tissue Res*. 2016;364(2):345–355. doi:10.1007/s00441-015-2330-5

43. Ma X, Zhu S. Chemical strategies for pancreatic β cell differentiation,

reprogramming, and regeneration. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. Published online 2017. doi:10.1093/abbs/gmx008

44. Reddy S, Pathipati P, Bai Y, Robinson E, Ross JM. Histopathological changes in insulin, glucagon and somatostatin cells in the islets of NOD mice during cyclophosphamide-accelerated diabetes: A combined immunohistochemical and histochemical study. *J Mol Histol*. Published online 2005. doi:10.1007/s10735-005-7330-4

45. Koyuturk M, Sacan O, Karabulut S, Turk N, Bolkent S, Yanardag R, Bolkent S. The role of ghrelin on apoptosis, cell proliferation and oxidant-antioxidant system in the liver of neonatal diabetic rats. *Cell Biol Int*. Published online 2015. doi:10.1002/cbin.10464

46. Carlsson PO, Schwarcz E, Korsgren O, Le Blanc K. Preserved β-cell function in type 1 diabetes by mesenchymal stromal cells. *Diabetes*. 2015;64(2):587–592. doi:10.2337/db14-0656

47. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. Published online 2006. doi:10.1002/jcb.20886

48. Yeh Yeo RW, Chai R, Hian K, Kiang S. Exosome: A novel and safer therapeutic refinement of mesenchymal stem cell. *Exosomes and Microvesicles*. Published online 2013. doi:10.5772/57460

49. Eleuteri S, Fierabracci A. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. *Int J Mol Sci*. Published online 2019. doi:10.3390/ijms20184597

50. Bhang SH, Lee S, Shin JY, Lee TJ, Jang HK, Kim BS. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Mol Ther*. Published online 2014. doi:10.1038/mt.2013.301

51. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. Published online 2005. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01499.x

52. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. Published online 2012. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x

53. Maksimovic-Ivanic D, Trajkovic V, Miljkovic DJ, Mostarica Stojkovic M,

Stosic-Grujicic S. Down-regulation of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes by mycophenolate mofetil. *Clin Exp Immunol*. Published online 2002. doi:10.1046/j.1365-2249.2002.02001.x

54. Nojehdehi S, Soudi S, Hesampour A, Rasouli S, Soleimani M, Hashemi SM. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cell–derived exosomes on experimental type-1 autoimmune diabetes. *J Cell Biochem*. 2018;119(11):9433–9443. doi:10.1002/jcb.27260

55. Leighton E, Sainsbury CA, Jones GC. A practical review of c-peptide testing in diabetes. *Diabetes Ther*. Published online 2017. doi:10.1007/s13300-017-0265-4

56. Welborn TA, Garcia-Webb P, Bonser AM. Basal C-peptide in the discrimination of type I from type II diabetes. *Diabetes Care*. Published online 1981. doi:10.2337/diacare.4.6.616

57. El-Kersh AOFO, El-Akabawy G, Al-Serwi RH. Transplantation of human dental pulp stem cells in streptozotocin-induced diabetic rats. *Anat Sci Int*. Published online 2020. doi:10.1007/s12565-020-00550-2

58. Chhabra P, Brayman KL. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: From hype to hope. *Stem Cells Transl Med*. Published online 2013. doi:10.5966/sctm.2012-0116

59. Alnek K, Kisand K, Heilman K, Peet A, Varik K, Uibo R. Increased blood levels of growth factors, proinflammatory cytokines, and Th17 cytokines in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *PLoS One*. Published online 2015. doi:10.1371/journal.pone.0142976

60. Hashemi SM, Hassan ZM, Hossein-Khannazer N, Pourfathollah AA, Soudi S. Investigating the route of administration and efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and conditioned medium in type 1 diabetic mice. *Inflammopharmacology*. Published online 2020. doi:10.1007/s10787-019-00661-x

61. Bedoya SK, Lam B, Lau K, Larkin J. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol*. Published online 2013. doi:10.1155/2013/986789

62. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Grégoire S,

Martin GH, Elhage R, Derian N, Carpentier W, Marodon G, Klatzmann D, Piaggio E, Salomon BL. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest*. Published online 2010. doi:10.1172/JCI42945

63. Hultgren B, Huang X, Dybdal N, Stewart TA. Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes*. Published online 1996. doi:10.2337/diabetes.45.6.812

64. Jain R, Tartar DM, Gregg RK, Divekar RD, Bell JJ, Lee HH, Yu P, Ellis JS, Hoeman CM, Franklin CL, Zaghouani H. Innocuous IFNγ induced by adjuvant-free antigen restores normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J Exp Med*. Published online 2008. doi:10.1084/jem.20071878

65. Serreze D V., Chapman HD, Post CM, Johnson EA, Suarez-Pinzon WL, Rabinovitch A. Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: Sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation. *J Immunol*. Published online 2001. doi:10.4049/jimmunol.166.2.1352

66. Wu J, Yang X, Chen B, Xu X. Pancreas β cell regeneration and type 1 diabetes (Review). *Exp Ther Med*. Published online 2015. doi:10.3892/etm.2014.2163

67. Zhong F, Jiang Y. Endogenous pancreatic β cell regeneration: A potential strategy for the recovery of β cell deficiency in diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Published online 2019. doi:10.3389/fendo.2019.00101

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DENEYSEL DİYABETTE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KAYNAKLI TEDAVİ

ORIGINALITY REPORT

8%	6%	3%	4%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Istanbul University Student Paper	1%
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Student Paper	1%
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	1%
4	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	<1%
5	halic.edu.tr Internet Source	<1%
6	Submitted to Inonu University Student Paper	<1%
7	docplayer.biz.tr Internet Source	<1%
8	6e9ed515-8cbf-4760-8640-9a7779db5794.filesusr.com Internet Source	<1%