BİYOYAPAY PANKREAS: PANKREAS HÜCRELERİNİN ENKAPSÜLASYONU İLE HÜCRE TEDAVİLERİ

BIOARTIFICIAL PANCREAS: CELL THERAPIES WITH THE ENCAPSULATION OF PANCREAS CELLS

MAHMUT ÖZER

PROF. DR. EMİR BAKİ DENKBAŞ
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

MAHMUT ÖZER'in hazırladığı "**Biyoyapay Pankreas: Pankreas Hücrelerinin Enkapsülasyonu ile Hücre Tedavileri**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İbrahim VARGEL
Başkan .....

Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ
Danışman .....

Prof. Dr. Ahmet ÇABUK
Üye .....

Doç. Dr. Lokman UZUN
Üye .....

Yrd. Doç. Dr. Sedat ODABAŞ
Üye .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

☐ **Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**
(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

✓ **Tezimin/~~Raporumun~~ 24/02/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**
(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım taktirde, tezimin/~~raporumun~~ tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

☐ **Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

☐ **Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

24 / 02 / 2017

Mahmut ÖZER

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

14/01/2017

MAHMUT ÖZER

ÖZET

BİYOYAPAY PANKREAS: PANKREAS HÜCRELERİNİN ENKAPSÜLASYONU İLE HÜCRE TEDAVİLERİ

MAHMUT ÖZER

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

Şubat 2017, 74 Sayfa

Diyabet hastalığı çeşitlerinden Tip 1 diyabet (T1D) hastalığı otoimmün veya otoimmündışı sebeplerle pankreatik beta hücrelerinin hasarlanması sonucu oluşmaktadır ve tedavi için konvansiyonel olarak ekzojen insülin uygulanmaktadır. Bu tedavi sırasındaki kan glukoz dalgalanmalarının kötü kontrolü retinopati, nöropati, nefropati ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok sekonder komplikasyonlara yol açmaktadır. Ömür boyu insülin kullanımı yerine pankreas transplantasyonu diyabet hastalığının tedavisinde kullanılan diğer bir seçenek olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak, donör bulmadaki güçlükler, büyük cerrahi operasyon ve zahmetli immün baskılama süreçlerinden dolayı pankreas transplantasyonu öncelikli tedavi seçeneği olarak değerlendirilmemektedir. Pankreas yerine adacık hücrelerinin aktarılması nispeten küçük operasyonlar ile gerçekleştirilebiliyor olmasına karşın, immün baskılama süreci halen gerekmektedir. Geliştirilen nanoteknolojik yöntemler ile adacık hücrelerinin enkapsülasyonu, hücrelerin bağışıklık sisteminden saklanabilmelerini, canlılık ve işlevselliklerini uzun süre koruyabilmelerini sağlamaktadır.

Adacık hücresi kaplama teknikleri, zar kalınlıklarına göre mikro ve nanoenkapsülasyon olarak sınıflandırılabilmektedir. Adacık hücrelerinin

kaplanması sonrasındaki karşılaşılan en önemli sorun, yeterli miktardaki besin ve oksijenin hücrelere ulaşmamasıdır. Mikroenkapsülasyon yöntemiyle elde edilen adacık hücreleri, kaplama yüzeyi ile hücreler arasındaki mesafenin artması nedeniyle canlılıklarını uzun süre koruyamamaktadır. Nano kalınlıktaki enkapsülasyonlar bu mesafeyi azaltmanın yanında kaplanmış olan hücrelerin uygulama alanlarının artmasına da olanak sağlamıştır.

Tez çalışması kapsamında kendiliğinden jelleşen peptitler olan florenil-9-metoksikarbonil-difenilalanin/arjinin-glisin-aspartik asit (Fmoc-FF/Fmoc-RGD) kombinasyonu ile çok katmanlı aljinat-G**RGD**SP/kitosan konformal kaplama yöntemleri uygulanarak biyoyapay pankreas modeli oluşturulması hedeflenmiştir. TEM görüntüleri ile çok katmanlı aljinat-G**RGD**SP/kitosan nanofilm kaplama (100 nm'den daha ince) doğrulandıktan sonra, nanoenkapsüle adacık hücreleri insülin salım modaliteleri ve canlılıkları açısından incelenmiştir. Enkapsüle hücrelerin fizyolojik olarak benzer özellikler göstermesiyle birlikte, sıçanlarda in vivo nakil ön çalışması gerçekleştirilmiştir. İn vivo deneyler sonucunda enkapsüle adacık hücreleri ile kontrol grubu arasında normogliseminin sağlandığı süre bakımından fark elde edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: Tip 1 diyabet hastalığı, adacık hücresi, transplantasyon, mikroenkapsülasyon, nanoenkapsülasyon, Fmoc-FF, Fmoc-RGD, aljinat-G**RGD**SP, kitosan, biyoyapay pankreas.

ABSTRACT

BIOARTIFICIAL PANCREAS: CELL THERAPIES WITH THE ENCAPSULATION OF PANCREAS CELLS

MAHMUT ÖZER

Doctor of Philosophy, Division of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Emir Baki DENKBAŞ

February 2017, 74 pages

Type 1 Diabetic (T1D) Disease, a type of the diabetic diseases, caused by the destruction of the pancreatic beta cells caused by autoimmune and non-immune mechanisms is an autoimmune illness and conventionally exogenous insulin is applied for treatment. Inefficient blood glucose level fluctuation control leads to secondary complications during this treatment such as; retinopaty, neuropaty, nefropaty and cardiovascular diseases. Instead of lifelong insulin usage, pancreas implantation emerges as another option for diabetes treatment. However, pancreas transplantation is not utilized as primary treatment choice, because of difficulties in finding donors, heavy surgical operations and troublesome immune suppression procedure. In spite of the fact that transplantation of islet cells instead of whole pancreas can be achieved by relatively smaller surgical operations, immune suppression procedure is still required. Encapsulation of islet cells with the help of improved nanotechnological methods provides them with immunoisolation, long duration of viability and functionality.

Islet cell encapsulation techniques can be classified as micro or nanoencapsulation regarding the thickness of the membrane. Primary drawback after encapsulation is that encapsulated cells are not supplied with the sufficient amount of oxygen and nutrient. Macroencapsulated islet cells cannot survive for a long time because of increased distance between cells and encapsulation surface. Nano thickness encapsulation minimizes this distance and increases the possible implantation sites of the encapsulated cells as well.

Within the scope of this thesis study, bioartificial pancreas model formation was targeted by applying combination of self-assembled peptides, such as fluorenyl-9-methoxycarbonyl-diphenylalanine/arginine-glycine-aspartate (Fmoc-FF/Fmoc-RGD), and multilayered alginate-G**RGD**SP/chitosan encapsulation method. After nanofilm multilayered islet cell encapsulation with alginate-G**RGD**SP/chitosan was verified by TEM images (less than 100 nm), nanoencapsulated cells were analyzed in terms of their insulin secreting modality and survival in vitro. As they were found to demonstrate physiologically similar properties, in vivo rat islet transplantation pre-study was conducted thereafter. In consequence of in vivo studies, no difference were found between nanoencapsulated islet cells implanted rats and control group regarding normoglycemia maintaining time.

Keywords: Type 1 Diabetic Disease, islet cells, transplantation, microencapsulation, nanoencapsulation, Fmoc-FF, Fmoc-RGD, alginate-G**RGD**SP, chitosan, bioartificial pancreas.

TEŞEKKÜR

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar, T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından, 0564.STZ.2013-2 numaralı ve *Biyoyapay Pankreas: Pankreas Hücrelerinin Enkapsülasyonu ile Hücre Tedavileri* başlıklı San-Tez projesi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i

ABSTRACT iii

TEŞEKKÜR v

İÇİNDEKİLER vi

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

ÇİZELGELER xiii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Tip 1 Diyabet Tedavi Yöntemleri 3

2.2. Biyoyapay Pankreas (BYP) Uygulamaları 7

2.2.1. Makroenkapsülasyon 11

2.2.2. Mikroenkapsülasyon 12

2.2.3. Hücresel Kaplamalar 13

2.2.4. Nanoenkapsülasyon 14

2.3. Kaplama Materyalleri 16

2.3.1. Aljinat 18

2.3.2. Kitosan 19

2.4. Membran Modifikasyonu 20

2.5. Biyomateryallere ve Nakil Dokusuna Karşı Vücut Tarafından Geliştirilen İmmün Yanıt 21

2.6. Nakil Bölgeleri 23

2.7. İn-vivo Deneysel Diyabet Modeli 26

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 27
3.1. Sıçan Pankreası Adacık Hücre İzolasyonu 27
3.2. Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Değerlendirilmesi..... 28
3.3. Adacıkların Statik Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Salınımlarının Belirlenmesi 28
3.4. Adacıkların Dinamik Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Salınımlarının Belirlenmesi 29
3.5. Adacıkların DNA Miktarları Ölçülerek İnsülin/DNA Oranının Belirlenmesi 30
3.6. Çok Tabakalı Konformal Kaplama..... 30
3.6.1. Aljinat-Kitosan 30
3.6.2. Aljinat-GRGDSP / Kitosan ile Konformal Kaplama 31
3.7. Kendiliğinden Jelleşen Peptitler ile Kaplama..... 32
3.7.1. Fmoc-FF ile Kaplama 32
3.7.2. Fmoc-FF ve Fmoc-RGD Kaplama Deneyleri..... 32
3.8. Enkapsülasyon Membranların Karakterizasyonu 33
3.8.1. SEM Görüntüsü..... 33
3.8.2. TEM ile Konformal Kaplamanın Görüntülenmesi..... 33
3.8.3. FITC İşaretli Kitosan ile Kaplamanın Doğrulanması 34
3.9. Enkapsüle Hücrelerin Fizyolojik İncelemeleri 34
3.10. İn-vivo Uygulamalar 34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 36
4.1. İzole Edilen Adacık Görüntüleri..... 36
4.2. Adacıkların Statik Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Salınımının Sonuçları 36
4.3. Adacıkların dinamik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımının sonuçları 37

4.4. Adacıkların DNA miktarlarının ölçüm sonuçları ile insülin/DNA oranı sonuçları 38
4.5. Enkapsüle Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Değerlendirilmesi 39
4.5.1. Aljinat/Kitosan Çok Katmanlı Konformal Kaplama Sonuçları 39
4.5.2. Aljinat-GRGDSP/Kitosan ile Konformal Kaplama 44
4.5.3. Kendiliğinden Jelleşen Peptitler ile Enkapsülasyon 46
4.5.4. Fmoc-FF/Fmoc-RGD Hidrojeli İçerisindeki Adacık Canlılık Oranları ……54
4.6. Enkapsülasyon Membranlarının Karakterizasyonu 62
4.6.1. İzole Edilen Adacık Görüntüleri 62
4.6.2. SEM ile Konformal Kaplamanın Görüntülenmesi 64
4.6.3. TEM ile Konformal Kaplamanın Görüntülenmesi..... 65
4.6.4. FITC İşaretli Kitosan ile Kaplamanın Doğrulanması 66
4.7. Enkapsüle Hücrelerin Fizyolojik İncelemeleri 67
4.8. İn Vivo Ön Çalışmalar 68
5. SONUÇLAR 73
KAYNAKLAR 75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2-1 Tip 1 Diyabet tedavi yöntemleri [10]..... 4

Şekil 2-2 Adacık hücre nakli [29]..... 6

Şekil 2-3 Yarı geçirgen zarın taşıması gerektiği özellikler..... 7

Şekil 2-4 İmmünoizolasyonda moleküler ağırlık (kilodalton) spektrumu: İmmünoizolasyon bariyerinden geçmesi gereken moleküller italik olarak gösterilmiştir [40]. 8

Şekil 2-5 Enkapsüle adacık hücre karşılaştırmaları a) tek katmanlı kapsül b-e) çekirdek-kabuk kapsüller c-e) çekirdek-kabuk kaplamanın konfokal mikroskop görüntüleri. Adacıklar mavi, kabuk bölgesi yeşil ile işaretlenmiştir [57]. 13

Şekil 2-6 A) FITC işaretli poly T20 uygulanan a-1) polyA20-PEG-lipid modifiye Hamster adacık hücreleri ve a-2) kaplama yapılmamış adacık hücreleri B) polyA20-PEG-lipid modifiye Hamster adacık hücreleri üzerine bağlanan polyT20-PEG-lipid modifiye, yeşil floresan protein-HEK hücreleri görüntüleri (b-1, konfokal mikroskop; b-2 faz kontrast mikroskop görüntüleri) C) 1, 3 ve 5 günlük kültüre edilen enkapsüle hücreler [61]..... 14

Şekil 2-7 Hücre yüzeyinin sentetik polimerler ile modifikasyonu: kovalent bağ, hidrofobik etkileşim, elektrostatik etkileşim, ve katman-katman poliiyon kompleksi [70] 15

Şekil 2-8 Adacık hücrelerinin aljinat, fosforilkolin (PC)-kitosan ve PC-modifiye kondroitin-4 sülfat ile 8 katman halinde kaplama görüntüleri [66]..... 16

Şekil 2-9 Fmoc-difenilalanin..... 17

Şekil 2-10 A) Fmoc-FF, Fmoc-RGD moleküler yapısı B) Fmoc-FF/Fmoc-RGD hidrojel görüntüsü C) Hidrojel AFM görüntüsü D) Hidrojel TEM görüntüsü E) 3 nm kalınlığındaki fibril görüntüleri, RGD sekansı kırmızı ile işaretlenmiştir [92]..... 18

Şekil 2-11 Aljinat..... 19

Şekil 2-12 Kitosan, poli β(1 → 4)-2-amino-2-deoksi-β-d-glukan 20

Şekil 2-13 Adacık hücre nakli sonrası oluşan immün yanıt mekanizması [120]... 22

Şekil 2-14 Yaygın deneysel ve klinik çalışma transplantasyon bölgeleri [130]..... 24

Şekil 3-1 Adacıkların dinamik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımlarının belirlenmesi çalışmaları 30

Şekil 4-1 İzole adacık hücresi canlılık testi, yeşil floresan ışıma canlı hücreleri ve kırmızı ışıma ölü olanları göstermektedir..... 36

Şekil 4-2 Adacıkların dinamik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımının sonuçları 38

Şekil 4-3 Çok katmanlı konformal kaplama ışık mikroskobu görüntüleri (t=0 saat) 40

Şekil 4-4 Çok katmanlı konformal kaplama yapılan adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat) 41

Şekil 4-5 Kaplama yapılmamış kontrol grubu adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat) 41

Şekil 4-6 Çok katmanlı konformal kaplama yapılan adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 42

Şekil 4-7 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 42

Şekil 4-8 Çok katmanlı konformal kaplama yapılan adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat) 43

Şekil 4-9 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat) 43

Şekil 4-10 Enkapsüle adacık hücreleri ile kontrol grubunun, t=2, 24 ve 48. saatlerdeki canlılık grafiği 44

Şekil 4-11 3 farklı solüsyon ile (Kitosan/Aljinat, Aljinat-RGD/Kitosan (1 mg/mL), Aljinat-RGD/Kitosan (0,1 mg/mL)) konformal kaplama sonucunda 24 ve 48 saatteki canlılık oranları..... 45

Şekil 4-12 0.1 mg/mL aljinat-RGD/kitosan kaplaması gerçekleştirilen adacık hücresi ve kontrol grubu canlılık oranı grafiği 46

Şekil 4-13 İzole edilen kontrol grubu adacık görüntüleri (t=0) 47

Şekil 4-14 15 mM Fmoc-FF hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat) 48

Şekil 4-15 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat) 49

Şekil 4-16 15 mM Fmoc-FF hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 50

Şekil 4-17 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 51

Şekil 4-18 15 mM Fmoc-FF hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat) 52

Şekil 4-19 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat) 53

Şekil 4-20 Kontrol grubu ve Fmoc-FF hidrojeli uygulanan adacık hücresi canlılık oranları grafiği 54

Şekil 4-21 %10 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 55

Şekil 4-22 %20 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 56

Şekil 4-23 %30 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 57

Şekil 4-24 Kaplama yapılmamış kontrol grubu adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 58

Şekil 4-25 %10 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 59

Şekil 4-26 %20 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 60

Şekil 4-27 %30 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 60

Şekil 4-28 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki kontrol grubu adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat) 61

Şekil 4-29 Hücre yüzeyindeki a5b1 integrinleri bloke edilerek yapılan RGD-integrin bağlantı deneyleri, 20 saat inkübasyon sonucunda, bloke edilmemiş hücrelerin nanofiberler üzerinde yayıldığı (A1); bloke edilen hücrelerin ise yuvarlak şekilde kaldığı (A2) gözlemlenmiştir [92]. 62

Şekil 4-30 İzole edilen adacık hücresi canlılık testi görüntüleri, yeşil floresan ışıma canlı hücreleri ve kırmızı ışıma ölü olanları göstermektedir..... 63

Şekil 4-31 Aljinat-GRGDSP/Kitosan çok katmanlı konformal kaplama (n=7) gerçekleştirilmiş adacık hücre görüntüleri 64

Şekil 4-32 Kontrol adacık hücresi SEM görüntüsü..... 65

Şekil 4-33 Aljinat-GRGDSP/ Kitosan çok katmanlı (n=7) konformal kaplama SEM görüntüsü 65

Şekil 4-34 A ve B. 80.000X büyütmede elde edilen kaplanmış hücre görüntüleri 66

Şekil 4-35 Artan sayıdaki FITC işaretli kitosan ile kaplama sonucunda elde edilen ışık yoğunluğu (ortalama gri seviye değeri) grafiği 66

Şekil 4-36 Kaplama yapılmamış adacık hücresi nakli sonrası diyabetik sıçan kan glukoz seviyesi 69

Şekil 4-37 Aljinat-G**RGD**SP/kitosan ile çok katmanlı (n=7) kaplanan adacık hücresi nakli sonrası diyabetik sıçan kan glukoz seviyesi..... 69

Şekil 4-38 Sham grubu kan glukoz seviyesi ve ağırlık takibi..... 70

Şekil 4-39 Diyabet grubu kan glukoz seviyesi ve ağırlık takibi..... 71

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2-1 Gerçekleştirilen ve devam etmekte olan klinik BYP çalışmaları (29/08/2016 tarihli clinicaltrials.gov verilerine göre) 9

Çizelge 3-1 Fmoc-RGD oranlarına göre solüsyonların gruplanması..... 32

Çizelge 4-1 0. ve 24. saat insülin salım sonuçları 37

Çizelge 4-2 0. ve 24. saat stimülasyon indeksi sonuçları..... 37

Çizelge 4-3 İzole adacık hücresi 0. ve 24. saat DNA miktarları 38

Çizelge 4-4 İzole adacık hücresi 0. ve 24. saat insülin/DNA miktarları 38

Çizelge 4-5 Aljinat-G**RGD**SP/kitosan (n=7) çok katmanlı kaplama sonrası insülin salım testleri ve stimülasyon indeksi değerleri..... 68

SİMGELER VE KISALTMALAR

T1D	Tip 1 Diyabet
Fmoc	Florenil-9-metoksikarbonil
FF	Difenilalanin
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik asit
GRGDSP	Glisin-Arjinin-Glisin-Aspartik asit-Serin-Prolin
BYP	Biyoyapay Pankreas
PP	Pankreatik Polipeptid
CIT	Klinik Adacık Transplantasyonu (*Clinical Islet Transplantation*)
IBMIR	Anlık kan kaynaklı enflamasyon reaksiyonu (*Instant blood-mediated inflammatory reaction*)
PEG	Polietilen Glikol
PEI	Polietilen İmin
PAH	Poli(allilamin) Hidroklorür
PVA	Polivinil Alkol
NHS	*N*-hidroksisuksinimid
GLP-1	Glukagon Benzeri Peptitler (*Glucagon Like Peptide-1*)
PC	Fosforilkolin
PTFE	Politetrafloroetilen
ECM	Hücredışı Matriks
YIGSR	Tirozin-İzolösin-Glisin-Serin-Arjinin
MHC	Temel Doku-Uygunluğu Bileşeni (*Major Histocompatibility Complex*)
DAMPs	Tehlikeyle-İlişkili Moleküler Kalıplar (*Danger-Associated Molecular Patterns*)
PRRs	Kalıp Tanıma Reseptörleri (*Pattern Recognition Receptors*)

STZ	Streptozosin
GLUT-2	Glukoz Taşıyıcı Reseptörler
FDA	Floresan Diasetat
PI	Propidyum İyodür
GdL	Glukano Delta Lakton
FITC	Floresan İzotiyosiyanat

1. GİRİŞ

Diyabet hastalığı, genellikle kalıtımsal ve çevresel etkenlerin birleşimi ile oluşan ve kan şekeri seviyesinin aşırı derecede yükselmesi ile sonuçlanan bir metabolik bozukluk hastalığıdır. Bu hastalık, sanayileşmiş ülkelerde en sık görülen bir endokrin hastalıktır ve önemli bir sağlık problemi teşkil etmektedir. Uluslararası Diyabet Federasyonunun (International Diabetes Federation) verilerine göre dünya genelinde yaklaşık 415 milyon bireyin diyabetten etkilendiği ve bu sayının 2040 yılında 642 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Türkiye'de ise 2015 yılında 6.339.000 şeker hastası bulunduğu bildirilmiş ve bu sayının 2030 yılında 10.629.000 olacağı düşünülmektedir [1]. Yine 2015 yılı verilerine göre hastalığın Türkiye'ye maliyetinin 9 milyar civarında olduğu belirtilmiştir. Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması (TURDEP) kapsamında 1998 ve 2010 yıllarında yaklaşık 25.000 bireyden elde edilen verilere göre diyabet sıklığının ülkemizde % 90 artarak, % 7,7'den % 13,7'ye çıktığı gösterilmiştir [2].

Adacık beta hücreleri insülin salımı gerçekleştirerek kan şeker seviyesinin düzenlenmesinden sorumludur. Pankreatik beta hücrelerinin otoimmün veya otoimmün dışı nedenler ile hasarlanması sonucu Tip 1 diyabet hastalığı ortaya çıkmakta, insülin eksikliği ve hiperglisemi ile birlikte kan glukoz dengesi bozulmaktadır [3]. Diyabetin semptomlarının tanımlanması 16. yüzyıla kadar uzansa da önce transplantasyon sonrasında da ekzojen insülin tedavisinin uygulanması 19. yüzyıla rastlar [4].

Ekzojen insülin tedavisinde fizyolojik insülin metabolizması elde edilememekte ve uzun süreli uygulanması sonucunda nefropati, retinopati gibi yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu komplikasyonları engellemek amacıyla pankreas transplantasyonu çalışmaları uzun yıllardır uygulanmaktadır. Pankreas nakli insülin metabolizmasına daha uygun olmakla birlikte büyük cerrahi operasyon içermesi ve sonrasında ömür boyu immün baskılayıcı ilaçların kullanılmasının gerekliliği bu tedavi yönteminin yaygın olarak kullanılmasının önündeki engellerdendir. Daha küçük cerrahi girişim uygulayarak insülin salgılayan hücrelerin naklinin gerçekleştirilebilmesi için izole edilmiş adacık hücrelerinin kullanımı gerçekleştirilmiştir. Tüm pankreas organı yerine adacık hücrelerinin nakli uygulama alanı olarak da esneklik sağlamış ve karaciğer, böbrek kapsülü,

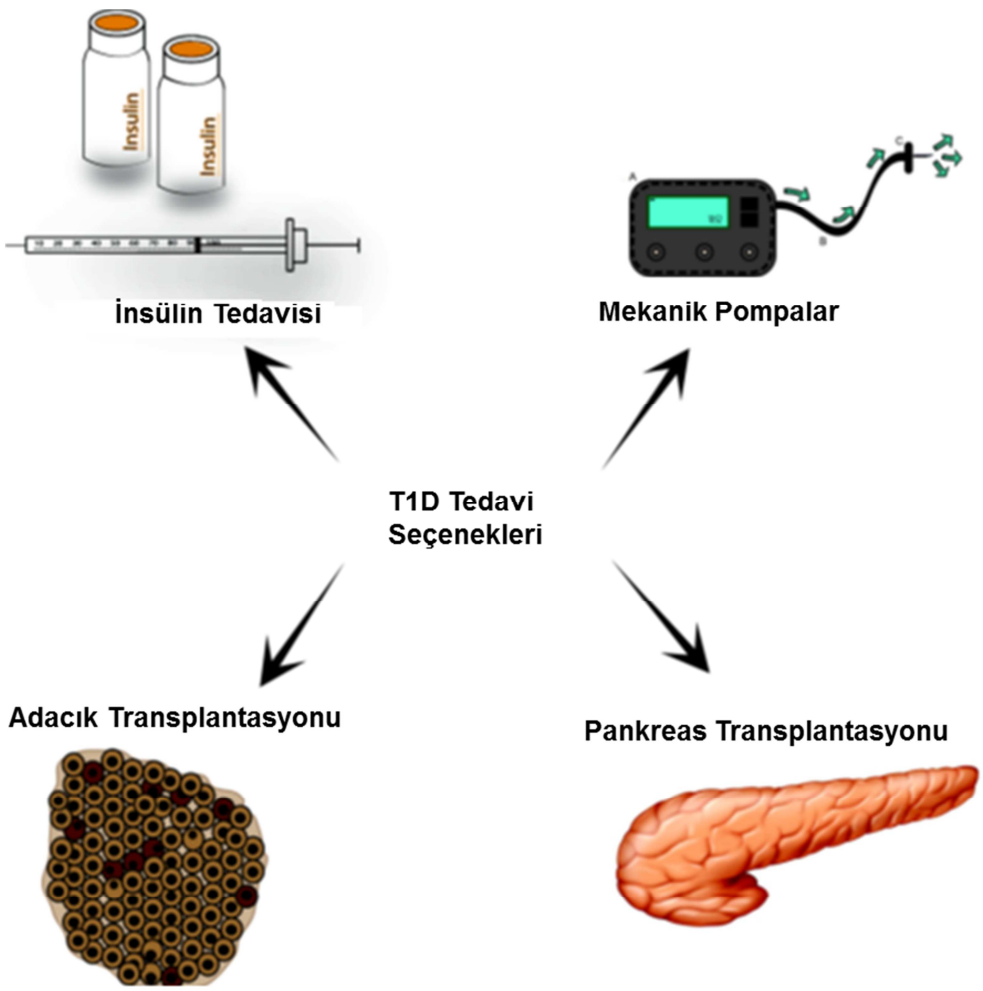
omentum gibi bölgelere de transplantasyon seçenekleri gündeme gelmiştir. Bununla birlikte adacık naklinde de halen immün baskılayıcı ajanların kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı özellikteki biyomalzemelerin kullanılması ile immün baskılayıcı ilaçların kullanılmasına gerek kalmadan transplantasyonun gerçekleşmesine imkan verecek kaplama teknikleri geliştirilmeye başlanmıştır. Makroenkapsülasyon tekniği ile başlayan bu süreç teknolojik ve bilimsel ilerlemeler ile birlikte mikro ve nanoboyuta kadar düşmüştür. Özellikle nanoteknolojik uygulamalar sayesinde nakledilecek doku büyüklüğü en aza indirilerek uygulama alanı genişletilebilmiştir. Ayrıca adacık hücrelerinin teker teker kaplanabilmesine imkan sağlayan nanoenkapsülasyon tekniği sayesinde adacık hücrelerinin işlev ve canlılıkları en üst seviyeye çıkarılabilmektedir. Biyomalzemeler ile kaplamanın yanında kullanılan diğer bir yöntem ise hücresel kaplamalardır. Adacık hücrelerinin farklı tekniklerle kaplanarak nakledilmesi sonucunda oluşturulan yapılar biyoyapay pankreas (BYP) olarak adlandırılmaktadır.

Tez çalışması kapsamında BYP kaplama materyali olarak peptitlerden, florenil-9-metoksikarbonil-difenilalanin/arjinin-lisin-aspartik asit (Fmoc-FF/Fmoc-RGD) çifti ile polimerlerden, modifiye edilmiş olan aljinat-G**RGD**SP/kitosan çifti kullanılmıştır. İn vitro deney aşamasında enkapsüle adacık hücrelerinin canlılık ve işlevsellikleri araştırılıp, kaplama materyali karakterizasyonu gerçekleştirildikten sonra hedeflenen sonuçların elde edildiği kaplama materyali ile in vivo enkapsüle adacık hücresi nakil deneyleri gerçekleştirilmiştir. Nakil işlemi gerçekleştirilen sıçanların kan şekeri seviyeleri 1 ay boyunca izlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tip 1 Diyabet Tedavi Yöntemleri

T1D için ekzojen insülin tedavisi insülin iğneleri ile çok sayıdaki enjeksiyon yoluyla veya deri altı insülin pompaları ile uygulanmaktadır. Bu uygulama sırasında ne kadar insülin alınacağı hasta tarafından, kan şekeri ölçüm cihazından elde ettiği değere ve daha öncesinde almış olduğu doktor tavsiyesine göre anlık belirlenmektedir. Ekzojen tedavisi sırasında insülin seviyesinin aralıklarla belirleniyor olması ve insülinin bir anda vücuda verilmesi fizyolojik insülin metabolizmasını sağlayamamaktadır. Ayrıca, ekzojen insülinin endojen insülini tam olarak taklit edememesi normogliseminin oluşmasına engel teşkil etmektedir [5]. Bu durum hasta uyuncunu olumsuz yönde etkileyerek, insülin direnci oluşmasına ve hiper/hipo-glisemi gibi ikincil komplikasyonların oluşmasına sebep olmaktadır [6]. Günlük insülin ihtiyacındaki farklılıklar, insülin emilim profilindeki dalgalanmalar, günde çok sayıdaki insülin enjeksiyonu zorluğu ve diyet ayarlamaları insülin terapisinde karmaşıklık oluşturmaktadır [7]. Hastaların kan glukoz seviyelerini hedeflenen aralıkta tutabilmeleri için hayat boyu eğitiminin devam etmesi gerekmektedir [8]. İnsülin tedevisinin sakıncalarından kurtulmak için insülin pompalarının kullanılması, yeni nesil kan şeker seviyesi ölçüm cihazlarının geliştirilmesi ve yeni insülin analoğu kombinasyonlarına geçilmesi, seçenekler arasında yer almaktadır (Şekil 2-1) [5, 7, 9].



Şekil 2-1 Tip 1 Diyabet tedavi yöntemleri [10]

Fizyolojik insülin salımının taklit edilebilmesi için geliştirilen mekanik insülin pompaları deri altına yerleştirilerek vücuda ekzojen insülin verilebilmektedir [11]. İnsülin pompaları sayesinde uygulama süresinden tasarruf, kullanım kolaylığı, ayarlanabilir insülin salım modeli, gece boyu glisemik kontrol sağlanması ve bazal şeker metabolizmasının ayarlanabilmesi gibi üstün yönleri bulunmaktadır [12]. Bununla birlikte hipoglisemi, girişim bölgesinde enfeksiyon ve diyabetik ketoasidoz insülin pompası kullanımında karşılaşılan sorunlardır [13]. Ayrıca, her ne kadar vücut dışında taşınan pompalara alternatif olarak implante edilebilir pompalar geliştirilmiş olsa da kateter bölgesindeki pıhtılaşma başarıyı olumsuz yönde etkilemektedir [14].

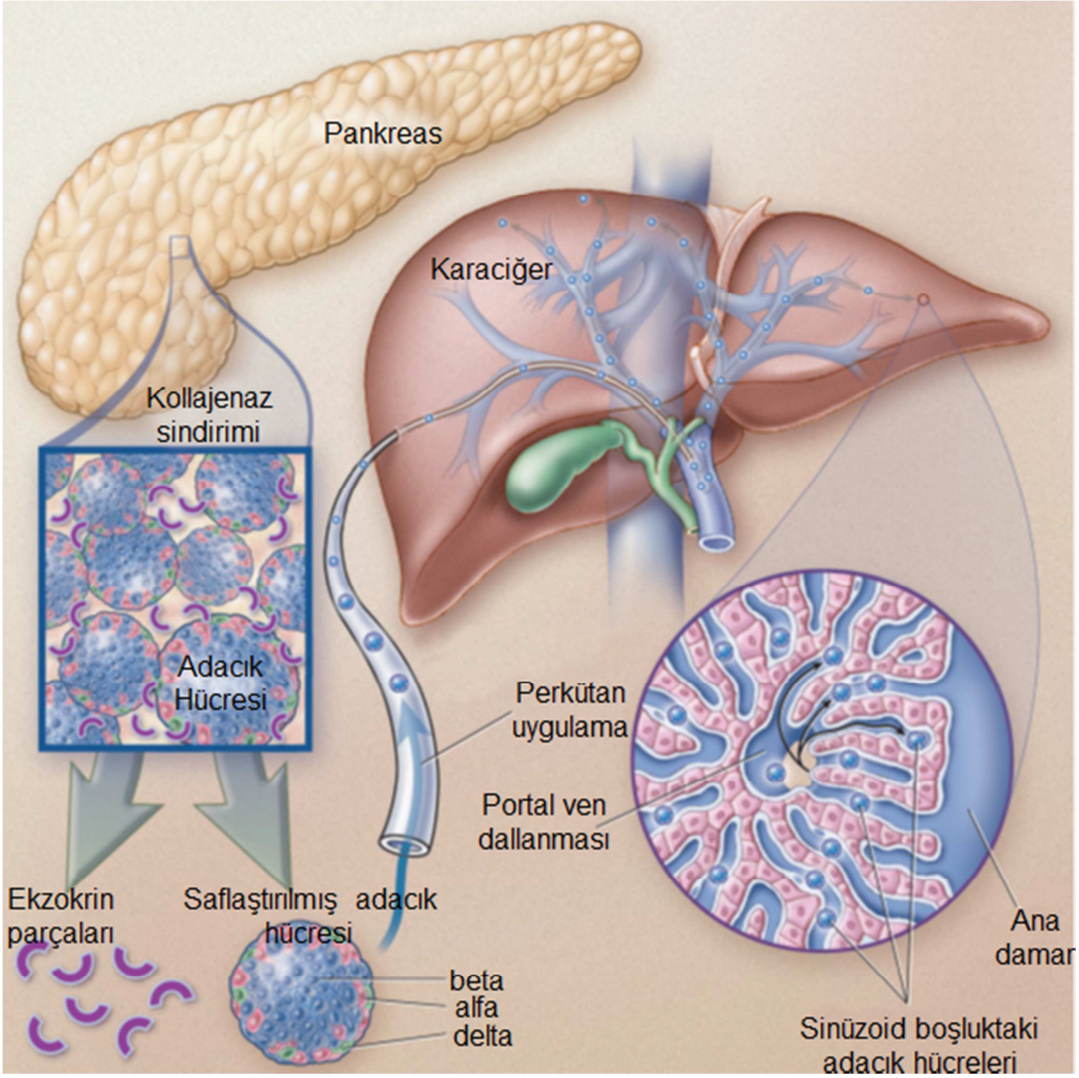
Normogliseminin fizyolojik olarak sağlanabildiği pankreas transplantasyonunun klinik uygulaması ilk olarak Kelly ve ark. [15] tarafından 1966 yılında Minnesota Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir ve bu yıldan itibaren 40.000'den fazla pankreas transplantasyonu yapılmıştır [16]. Pankreas naklinin temel amacı, nakil edilen

hastanın kan şekerini normal seviyede tutmak ve ekzojen insülin tedavisinden uzak tutmaktır [17]. Transplantasyon bilimsel kayıt verilerine göre, 2010-14 yılları arasında ABD'de gerçekleştirilen pankreas ve böbrek birlikte nakil edildiğinde 1 yıllık graft canlılığı başarısı %91,3, böbrek naklinden sonra pankreas nakli başarısı %86 ve yalnızca pankreas nakledildiğinde başarı %85,7'dir [18]. Pankreas transplantasyonu immün baskılama protokolü uygulanarak Tip 1 diyabet hastalığının tedavisinde diğer bir yöntem olarak halen kullanılmakla birlikte kadavra sayısına bağımlı kalınması uygulama alanını kısıtlamaktadır. Adacık transplantasyon işbirliği kayıtlarına göre 3 yıllık insülin bağımsız yaşama oranı 1999-2002 yılları arasında %27 iken, bu oran 2007-2010 yılları arasında %44'e çıkmıştır. Başarılı pankreas nakillerinde normal glukoz homeostazisi sağlanmasına rağmen, yaşam boyu immün baskılama ilaç kullanımı ve nakil işleminin büyük cerrahi operasyon gerektirmesi diyabet hastalarının çoğunluğu için bu yöntemin yaygınlaşmasını engellemektedir [19]. Ayrıca, pankreas nakli ile ilişkilendirilen ameliyat komplikasyonu oranı %20'nin üzerinde seyretmektedir ve 5 yıl sonrasında T1D'nin tekrarlama oranı %17 olarak bulunmuştur [20].

İnsan pankreasının endokrin işlevini yaklaşık 1.000.000 civarındaki adacık hücreleri gerçekleştirmektedir. Pankreasın endokrin içeriği, adacık hücrelerinin Langerhans adacıkları olarak adlandırılmasına sebep olan Paul Langerhans tarafından 1869 yılında tanımlanmıştır [21]. Adacık hücreleri endokrin hücre çeşitlerinin alfa, beta, delta, PP ve epsilon hücrelerini içeren 5 tipinden oluşur. Alfa hücresinden glukagon, beta hücresinden insülin, delta hücresinden somatostatin, PP hücresinden pankreatik polipeptit ve epsilon hücresinden ghrelin salgılanmaktadır. Pankreas adacık hücresinde en fazla beta hücresi (%50-80 oranında), %20-50 arasında alfa hücreleri ve geri kalan oranda diğer hücreler bulunmaktadır. Şekil 2-2'de görüleceği üzere beta hücreleri, adacık hücresinin merkezinde alfa ve diğer hücreler adacık hücresinin kenar kısımlarında bulunmaktadır [22, 23].

Pankreas transplantasyonundan farklı olarak adacık hücre nakli büyük cerrahi operasyon gerektirmemektedir. Adacık hücre nakli düşüncesi ilk olarak 1972 yılında kobaydan adacık izolasyonuyla birlikte ortaya çıkmıştır [24]. 1989 yılında insanda adacık transplantasyonu Warnock ve Scharp tarafından başarıyla uygulanmış olsa da T1D hastaları için bu yöntemin standart hale gelmesi yaklaşık

20 yıllık bir süre almıştır [25-27]. Allojenik insan adacıkları Edmonton immünosupresif (steroitsiz) protokolü kullanılarak başarı ile transplante edilebilmiştir [28].



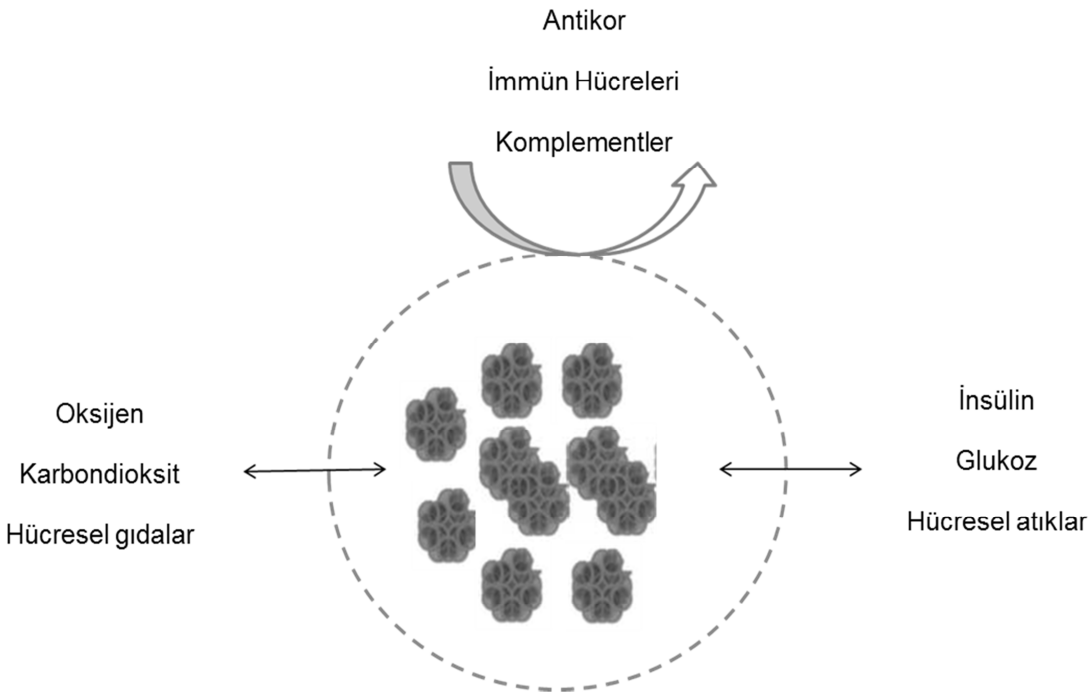
Şekil 2-2 Adacık hücre nakli [29]

Günümüzdeki adacık transplantasyonu çalışmaları genel olarak Klinik Adacık Transplantasyonu (Clinical Islet Transplantation-CIT) konsorsiyumu tarafından gerçekleştirilmektedir ve 2010 yılı içerisinde 75 civarında naklin gerçekleştirildiği rapor edilmiştir [30]. Son 15 yıllık süreçte uygulanan adacık hücresi transplantasyonu ile insülin kullanımına gerek kalmadan, hipoglisemi ve ikincil diyabetik komplikasyonlar engellenebilmiştir. Bu başarının elde dilebilmesi adacık hücre izolasyonu, tutulumu ve korunması ile doğru orantılı olmuştur. Bununla birlikte adacık naklinin geniş bir klinik kabul görmesinin önündeki engeller, adacık hücre izolasyonundaki verimin düşüklüğü, adacık hücrelerinin kana verilmesiyle

birlikte %60'nın kaybına neden olan anlık kan kaynaklı enflamasyon reaksiyonu (instant blood-mediated inflammatory reaction- IBMIR) ve zaman içerisinde adacık hücrelerinin canlılığını yitirmesidir [25, 31]. Ayrıca transplantasyonun başarı ile sonuçlanabilmesi için gerekli olan adacık hücre sayısı 1 milyon olarak belirlenmiştir ve bu sayıya yaklaşık 6 donör pankreasının pürifiye edilmesi sayesinde ulaşılabilmektedir ki bu durum sınırlı donör miktarına bağımlılığı daha da artırmaktadır [32]. Hayat boyu immün baskılayıcı ilaç kullanılması, pankreas naklinde olduğu gibi bu tedavi seçeneğinde de gerekmektedir. Adacık hücre izolasyonu teknolojilerinin geliştirilmesi, IBMIR fenomeninden kurtulabilmek için uygun nakil bölgelerinin bulunması ve adacık hücre canlılığının son aşamaya kadar korunması bu yöntemin sofistike hale gelmesi için gerekli olan adımlar olarak karşımıza çıkmaktadır.

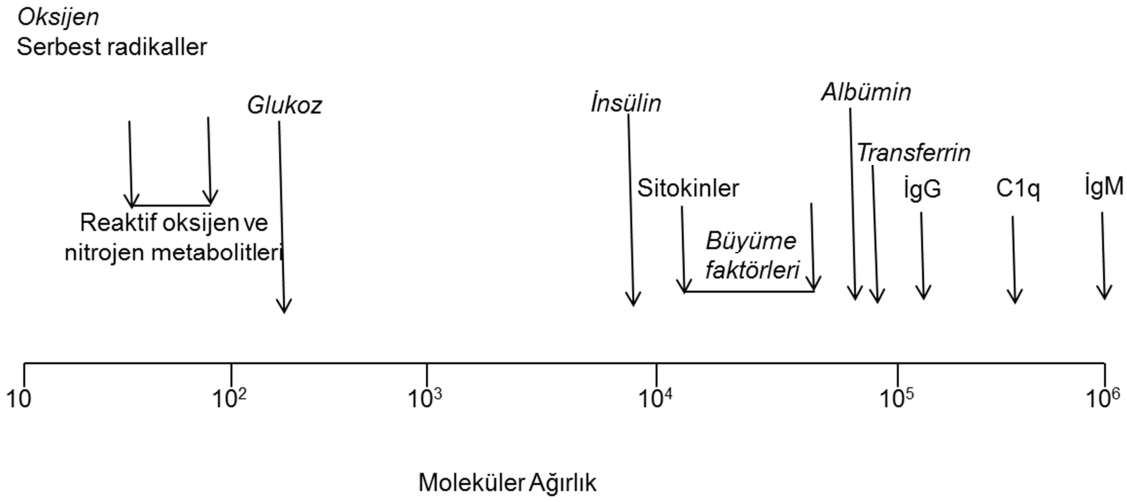
2.2. Biyoyapay Pankreas (BYP) Uygulamaları

Biyoyapay pankreas (BYP), glukoza cevap verebilen ve insülin salımı gerçekleştirebilen adacık hücrelerinin enkapsüle halde bulunduğu yapılardır. Yarı geçirgen enkapsülasyon membranı sayesinde glukoz, oksijen ve besinler hücrelere ulaşabilirken, immünoizolasyon sağlanabilmekte ve yine membran üzerindeki gözeneklerden ortamda bulunan glukoza cevap olarak sentezlenen insülin salıverilebilmektedir (Şekil 2-3).



Şekil 2-3 Yarı geçirgen zarın taşıması gerektiği özellikler

Bu amaçla gözenek çapının hücresel gıdaların, Şekil 2-4'te büyüklükleri verilen, insülin (1.35-2.75 nm) [33], glukoz (0.4 nm) [34] ve hücresel atıkların geçişi için yeterli olması gerekirken, immün sistem hücrelerinin (çap ~ 10 µm) ve medyatörlerinin (örneğin: immünoglobulin G çapı = 5.9 nm) geçişini engelleyecek boyutta olması istenmektedir [35-37]. Yapılan çalışmalarda nakil dokusunun canlılığının korunması için sitokin ve kemokin gibi diğer immün sistem ajanlarının da geçişlerinin engellenmesinin faydalı olacağı gösterilmiştir [38, 39].



Şekil 2-4 İmmünoizolasyonda moleküler ağırlık (kilodalton) spektrumu: İmmünoizolasyon bariyerinden geçmesi gereken moleküller italik olarak gösterilmiştir [40].

Böylelikle pankreas ve adacık hücresi nakillerindeki ana sorunlardan olan ömür boyu immün baskılayıcı ilaç kullanımına gerek kalmadan T1D hastalığına tedavi seçeneği oluşturulması hedeflenmektedir [41]. Ayrıca ksenojenik transplantasyon ve modifiye allojenik hücre hatlarının nakli de yine enkapsülasyon sayesinde klinik uygulamaya girebilecek alternatiflerdir. Bu amaçla gerçekleştirilen ve devam eden klinik çalışmalar Çizelge 2-1'de verilmektedir.

Çizelge 2-1 Gerçekleştirilen ve devam etmekte olan klinik BYP çalışmaları (29/08/2016 tarihli clinicaltrials.gov verilerine göre)

Resmi Adı	No	Sponsor / Ortak	Durum	Tedavi	Faz	Ülke
Safety and Efficacy of PEG-Encapsulated Islet Allografts Implanted in Type I Diabetic Recipients	NCT 00260234	Novocell; Diabetes & Glandular Disease Research Associates, P.A., San Antonio, TX; CHRISTUS Health	Durduruldu	Polietilen glikol ile enkapsüle edilen allojenik insan adacık hücrelerinin subkutan uygulaması	I/II	ABD
Functional Survival of Beta Cell Allografts After Transplantation in the Peritoneal Cavity of Non-uremic Type 1 Diabetic Patients	NCT 01379729	AZ-VUB (Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit)	Yürürlükte	İmmün baskılama altında aljinata gömülü adacık hücrelerinin intraperitonel yoldan verilmesi	II	Belçika
Long-term Function of Beta Cell Allografts in Non-uremic Type 1 Diabetic Patients	NCT 00798785	AZ-VUB (Academisch Ziekenhuis van de Vrije Universiteit)	Bilinmiyor	Enkapsüle adacık hücrelerinin intramusküler, intraperitonel ve omental bölge uygulamasının karşılaştırılması	I/II	Belçika
An Open Label, Pilot Investigation, to Assess the Safety and Efficacy of Transplantation of Macro-encapsulated Human Islets Within the Bioartificial Pancreas Beta-Air in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus	NCT 02064309	Uppsala Üniversite Hastanesi (Ortak: Beta-O_2Technologies Ltd)	Yürürlükte	T1D hastalarında aljinat içeren Beta-Air cihazı implantasyonu	I/II	İsveç

A Monocentre Phase 1 Trial to Assess a Monolayer Cellular Device in the Treatment of Type 1 Diabetes	NCT 00790257	Cliniques universitaires Saint-Luc-Université Catholique de Louvain	Tamamlandı	"Monolayer Cellular Device" içerisinde enkapsüle edilen adacık hücrelerinin subkutan implantasyonu	I	Belçika
A Phase IIb Open-label Investigation of the Safety and Efficacy of DIABECELL [Immunoprotected (Alginate-Encapsulated) Porcine Islets for Xenotransplantation] in Patients With Type 1 Diabetes Mellitus	NCT 01736228	Living Cell Technologies	Tamamlandı	Aljinat içerisine enkapsüle edilen domuz adacık hücrelerinin immün baskılama olmaksızın intraperitonel yoldan uygulanması	II	Arjantin

Etkin bir kaplama sisteminin pankreas adacık hücrelerinin canlılığını ve fonksiyonelliğini koruyabilmeleri için taşıması gerektiği özellikler; i) immünoizolasyon sağlanarak adacık hücrelerinin immün hücre, antikor, komplement vb. yapılarla karşılaşmasını engellemek; ii) adacık hücrelerinin kan şeker seviyesine karşı duyarlı olması ve insülin salımının istenen hızda gerçekleştirilmesi; iii) kaplama materyalinin ince ve biyouyumlu olması; enflamatuvar yanıta ve fibrozise neden olmaması, hücre canlılığı boyunca biyobozunur olmaması; iv) en az düzeyde girişimin yapıldığı cerrahi yöntemlerin kullanılması; v) uzun adacık hücre canlılığı; ve vi) başarısızlık veya beklenmeyen komplikasyonlarla karşılaşılması ihtimaline karşı yeniden uygulanabilmesi [42]; vii) immün yanıtın oluşmasını engelleyici kaplama materyalinin yüzeyinin negatif zeta yüklü ve hidrofilik özellikte olmasıdır [43].

BYP uygulamaları boyutlarına göre makroenkapsülasyon (cm), mikroenkapsülasyon (250-1000 µm), nanoenkapsülasyon (<100 µm) olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca, biyomateryal kullanımı yerine hücresel kaplamalar da alternatif stratejiler olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.2.1. Makroenkapsülasyon

İmplante edilebilir cihazın içerisine hapsedilmiş adacık hücre gruplarının yer aldığı santimetre boyutundaki ve damariçi veya damardışı olarak yerleştirilebilen yapılara makrokapsül denilmektedir. Damariçi yapılar infüzyon bölmeleri ile doğrudan damarlara bağlanırken, damardışı makrokapsüller ise periton boşluğuna veya deri altına tüp veya daire geometrisinde tasarlanarak implante edilmektedir [44, 45]. Damardışı makrokapsüller geniş uygulama ve modifikasyon alanına sahip olmaları nedeniyle, kullanılan biyomateryaller pankreas organ fizyolojisini taklit edecek şekilde düzenlenebilmektedir. Biyomateryallerden bir tabakası hücrelerin tutunması için hücredışı matriks (ECM) olarak düzenlenirken [46], diğer bir tabaka immünoizolasyonu sağlayacak şekilde oluşturulabilmekte, neovaskülarizasyonu sağlayacak moleküller ile yüzeyi kaplanabilmekte [47] ve hücreler öbekler halinde bir arada tutularak hücrelerarası iletişim sağlanabilmektedir [48]. Damardışı makroenkapsülasyon uygulaması periton boşluğuna veya deri altına yapılması nedeniyle uygulamanın tekrarlanması ya da kapsülün çıkarılması küçük cerrahi operasyonlar ile mümkün olabilmektedir [49].

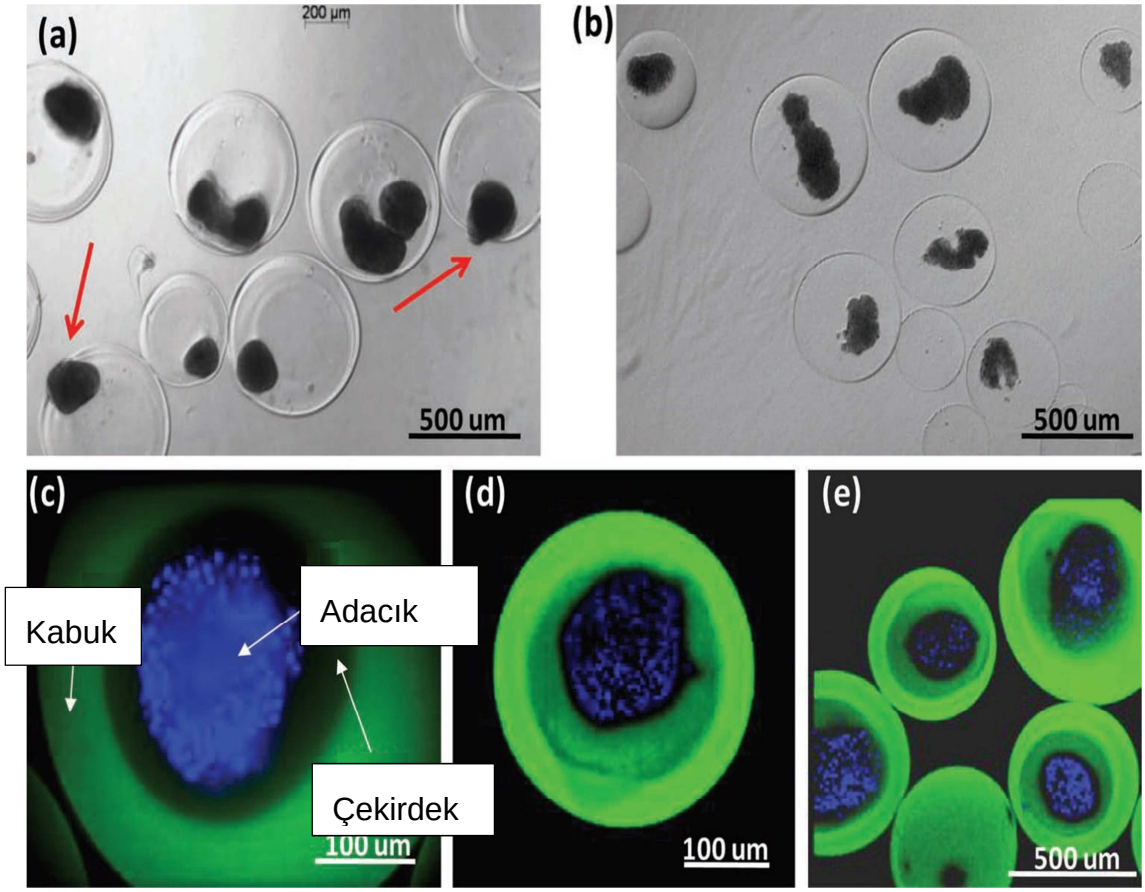
Damardışı makroenkapsülasyon tekniğindeki ana sorun, doğrudan adacık hücre-damar bağlantısının sağlanamaması nedeniyle oksijen ve glukozun difüzyon zamanının uzaması; insülin cevabının gecikmesi ve bunların sonucunda adacık hücrelerinin nekroza uğramasıdır.

Damariçi makrokapsüller doğrudan kan ile bağlantı içerisinde olması sayesinde oksijen ve glukoz difüzyonunda zaman kaybı en aza indirilmekte, insülin yanıtını hızlandırmakta ve adacık hücrelerinin etkinliğini artırmaktadır [50]. Damariçi uygulamalarda karşılaşılan engellerin başında pıhtılaşma ve sonrasında tromboz oluşumu gibi komplikasyonlardır. Sistemik olarak antikoagulan ajanların kullanılması gibi çözümler üretilse de kullanılacak biyomateryallerin modifikasyonu ile bu sorunun aşılması daha uygulanabilir görünmektedir [51].

2.2.2. Mikroenkapsülasyon

Mikroenkapsülasyon tekniği ile makrokapsüllere göre daha az sayıdaki adacık hücrelerinin kaplanması ve daha büyük yüzey/hacim oranı elde edilmesi sağlanmaktadır. Bu sayede oksijen, glukoz, insülin ve hücresel atıkların difüzyonu hızlandırılabilmektedir. Mikrokapsüllerin nakil bölgeleri periton boşluğu, böbrek kapsülü, derialtı veya damarlanmanın daha yoğun olarak görüldüğü omentum olabilmektedir [52]. Küre şeklinde oluşturulan kapsüller, adacık hücrelerinin membrana olan uzaklığının her bir adacık hücresi için benzer olmasını ve enjeksiyon ile nakil imkanı sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar etkin difüzyonun sağlanabilmesi için adacık hücrelerinin kaplama yüzeyi ile arasındaki uzaklığın en fazla 150-200 µm civarında olması gerektiğini de ortaya koymuştur [40].

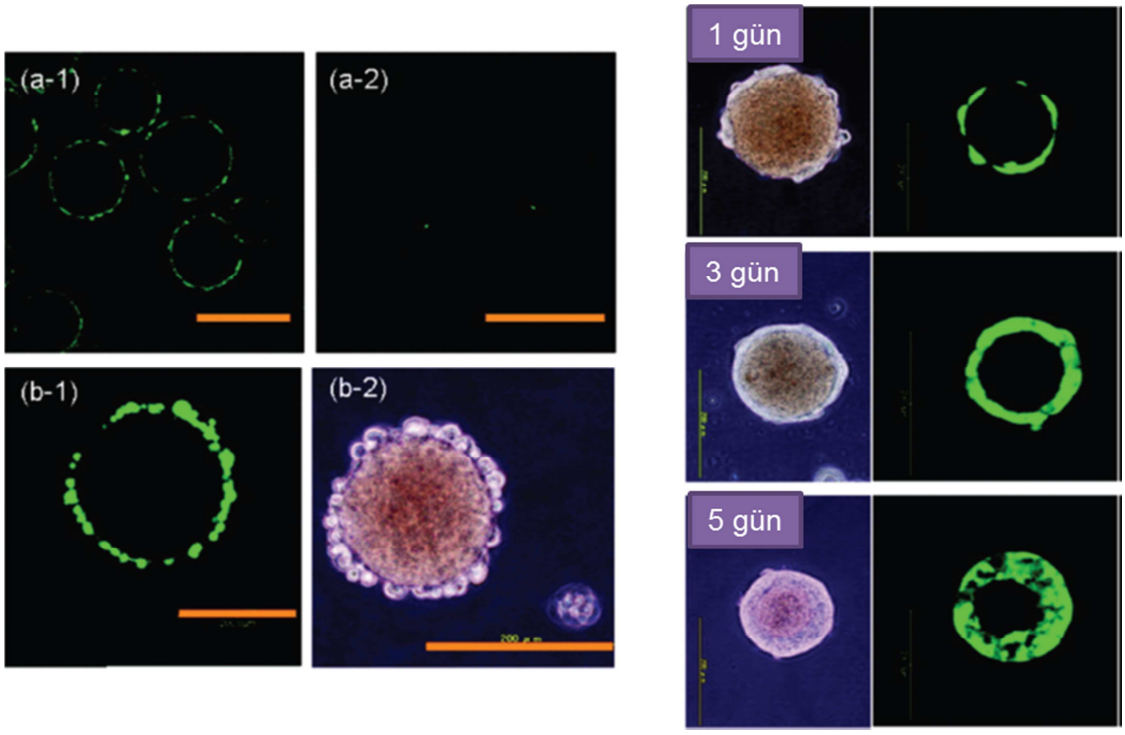
En sık kaplama materyallerinden olan aljinatın hidrojel formu, iyonik çapraz bağlama ile oluşturularak adacık hücreleri hidrojelin içerisine hapsedilmekte ve T1D hastalığının tedavisindeki etkinliği araştırılmaktadır. Literatürde aljinat mikrokapsül uygulamalarının klinik aşama örnekleri yer almaktadır [53-56]. Şekil 2.5’te görülen ve enkapsülatör kullanımı ile elde edilen mikrokapsüller, çekirdek ve kabuk olarak farklı biyomateryaller ile katmanlar halinde modifiye edilebilmekte ve daha etkin immünoizolasyon sağlanabilmektedir.



Şekil 2-5 Enkapsüle adacık hücre karşılaştırmaları a) tek katmanlı kapsül b-e) çekirdek-kabuk kapsüller c-e) çekirdek-kabuk kaplamanın konfokal mikroskop görüntüleri. Adacıklar mavi, kabuk bölgesi yeşil ile işaretlenmiştir [57].

2.2.3. Hücresel Kaplamalar

Canlı hücreler ile kaplama yöntemi son zamanlarda uygulanan enkapsülasyon tekniklerindendir. Bu sayede kan kaynaklı enflamatuvar reaksiyonlar azaltılarak, nakledilen doku reddi engellenebilmekte, histolojik uyum ve kan uyumu sağlanabilmektedir. İlk hücresel kaplama domuz kondrosit zarı ile sıçan adacık hücrelerinin enkapsüle edilmesi şeklinde yapılmıştır [58]. Kim ve diğ. tarafından yapılan çalışmada kondrositler üzerinde hücresel katman mühendisliği metodu uygulanmıştır [59]. Kullanılan diğer bir hücresel kaynak ise Şekil 2-6'da görüntüleri verilen HEK293 hücreleridir ve kaplama sonrası insülin salımı kinetiği istenen seviyede elde edilebilmiştir [60, 61].



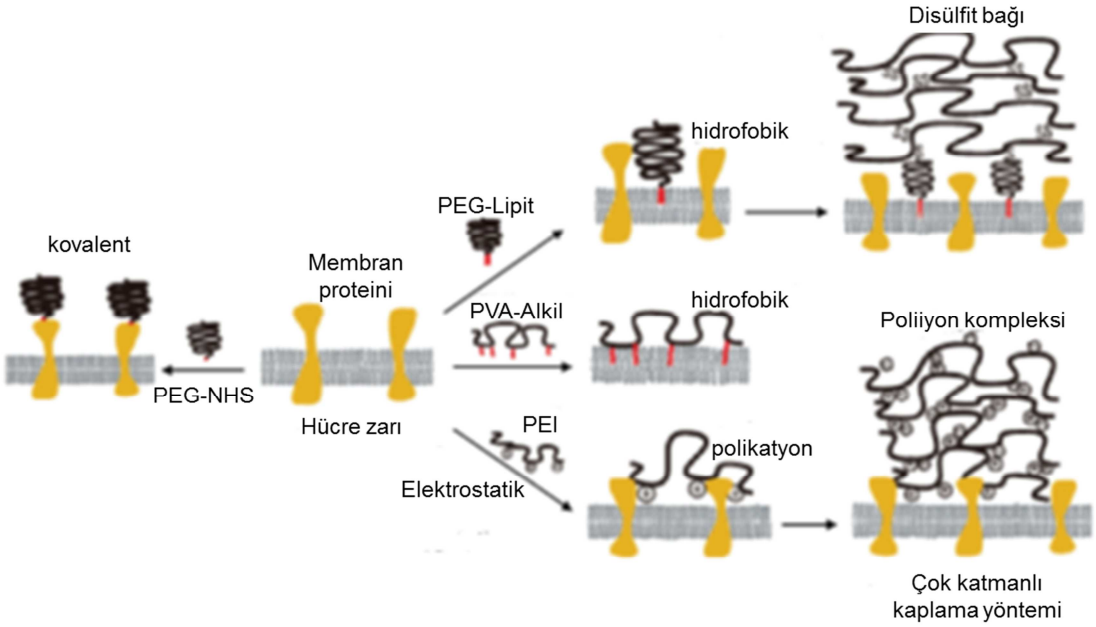
Şekil 2-6 A) FITC işaretli poly T20 uygulanan a-1) polyA20-PEG-lipid modifiye Hamster adacık hücreleri ve a-2) kaplama yapılmamış adacık hücreleri B) polyA20-PEG-lipid modifiye Hamster adacık hücreleri üzerine bağlanan polyT20-PEG-lipid modifiye, yeşil floresan protein-HEK hücreleri görüntüleri (b-1, konfokal mikroskop; b-2 faz kontrast mikroskop görüntüleri) C) 1, 3 ve 5 günlük kültüre edilen enkapsüle hücreler [61]

2.2.4. Nanoenkapsülasyon

Enkapsüle adacık boyutunun difüzyon oranını ve glukoz hassasiyetini etkilemesi nedeniyle nanoenkapsülasyon tekniklerinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. 150 µm'den daha büyük boyuta sahip adacık hücre öbeklerinde yeterli düzeyde difüzyon gerçekleşmemesi nedeniyle nekrozun başladığı gösterilmiştir [62]. Bununla birlikte mikroenkapsülasyon yöntemi ile her ne kadar nakil edilecek adacık hücre hacmi azaltılmış olsa da nanokaplama sonrası daha küçük implantasyon bölgeleri hedeflenebilmektedir [63]. Nanoenkapsülasyon tekniği olarak moleküler kamuflaj veya konformal kaplama ile tabaka tabaka biriktirme kullanılan yöntemlerdir [64].

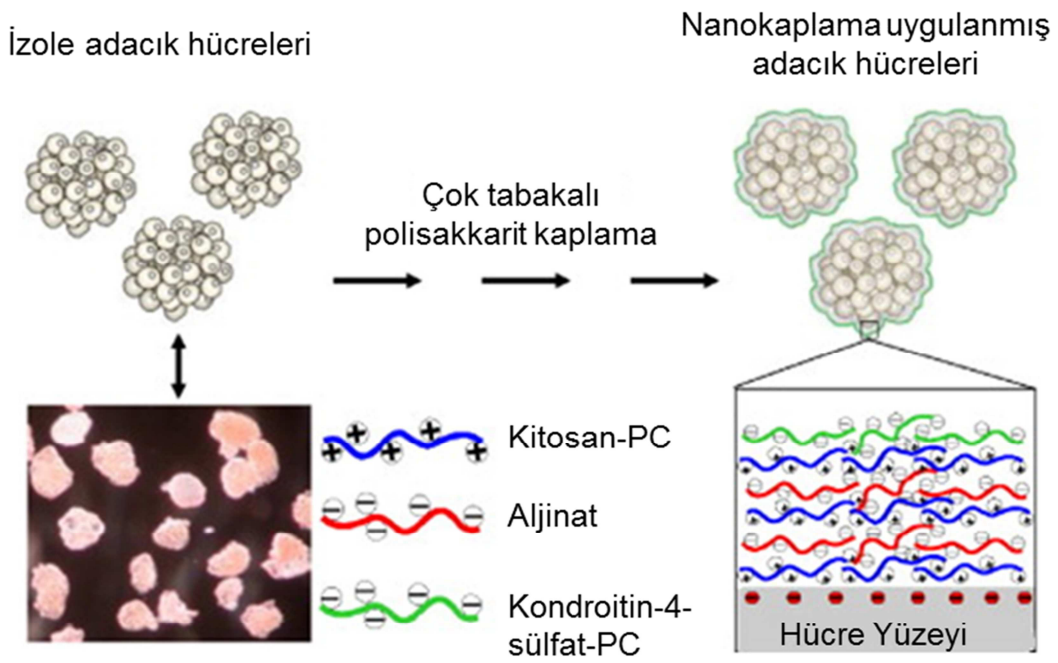
Moleküler kamuflaj sonucunda enkapsüle edilen adacık hücreleri, bağışıklık sistemi ajanları tarafından korunmaktadır. Konformal kaplamada kullanılan polimer gibi malzemeler adacık yüzey proteinlerine bağlanabilmektedir. Polietilen glikol (PEG) polimeri bu amaçla sıkça kullanılmaktadır [65].

Tabaka tabaka kaplama diğer bir nanoenkapsülasyon tekniği olarak karşımıza çıkmaktadır. Adacık hücrelerinin tek tek kaplanabilmesinin önemli bir üstünlük sağladığı bu yöntemde kaplama materyallerinin polianyonik ve polikatyonik özelliklerinden faydalanılarak çok katmanlı immün sistem koruması gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2-7) [21, 66, 67]. 100 nm'den daha küçük boyutlu kaplama sayesinde difüzyon oranının önemli oranda fizyolojik koşullara uyumlu halde kalması hedeflenmektedir. Polielektrolitik özellik gösteren polietilen imin (PEI), poli(allilamin) hidroklorür (PAH), polivinil alkol (PVA), kitosan ve aljinat gibi polimerler bu amaçla birçok çalışmada kullanılmıştır [64, 66, 68, 69].



Şekil 2-7 Hücre yüzeyinin sentetik polimerler ile modifikasyonu: kovalent bağ, hidrofobik etkileşim, elektrostatik etkileşim, ve katman-katman poliiyon kompleksi [70]

Tabaka tabaka kaplama çalışmalarında kaplama materyalinin farklı katmanlarında fonksiyonelleştirme yapılabilmektedir. Kızılel ve diğ. tarafından yapılan çalışmada *N*-hidroksisuksinimid (NHS) bağlı biyotin tabakasına, streptavidin ile bağlı 3. katmanda, biyotinin GLP-1 (glucagon like peptide-1) ile bağlanarak insülin salımının arttığı gösterilmiştir [71]. Bununla birlikte immün korumanın daha aktif hale getirilebilmesi amacıyla katman sayısı çalışma düzenine göre artırılabilmektedir. Adacık hücrelerinin aljinat, fosforilkolin (PC)-kitosan ve PC-modifiye kondroitin-4 sülfat ile 8 katman halinde kaplaması gerçekleştirilmiş ve hayvan modeli üzerinde hipergliseminin 28-37 gün süresince geriye döndürüldüğü gösterilmiştir (Şekil 2-8) [66].



Şekil 2-8 Adacık hücrelerinin aljinat, fosforilkolin (PC)-kitosan ve PC-modifiye kondroitin-4 sülfat ile 8 katman halinde kaplama görüntüleri [66]

2.3. Kaplama Materyalleri

Adacık hücrelerinin kaplanması için istenilen özellikleri taşıyan farklı materyallerin kullanıldığı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Organik materyallerden polimerler doğal ve sentetik formları ile en fazla kullanılan kaplama materyali olarak karşılaşılmaktadır. Polimerlere ek olarak inorganik materyaller ve peptit yapılı hidrojeller de yine hücre enkapsülasyonu çalışmalarında kullanılmakta olup adacık hücre kaplamasındaki potansiyeli araştırılmaktadır.

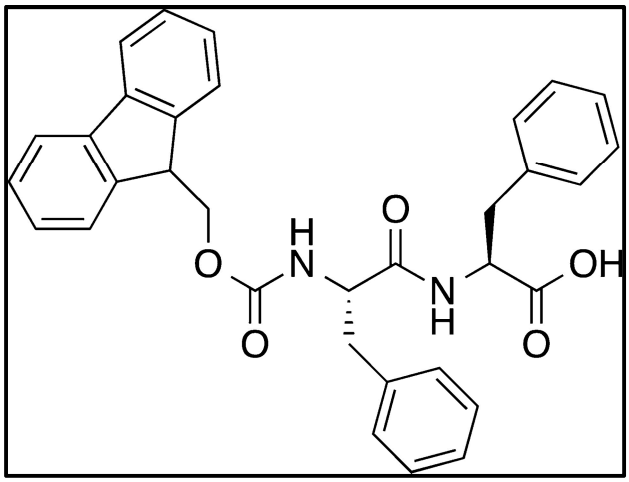
Doğal polimer olarak literatürde en sık karşılaşılan ve başarılı sonuçların elde edildiği aljinat yer almaktadır. Bununla birlikte hücre canlılığına ve fonksiyonelliğine etkisinin sınırlı olması ve fabrikasyonunun kolay olması nedeniyle polisakkaritler kullanılabilmektedir [72]. Ayrıca, agaroz [73, 74], sellüloz sülfat [75, 76], kollajen [77] ve kitosan [78] gibi polimerler de adacık hücre enkapsülasyonunda kullanılan polimerlerdendir.

Sentetik polimerler sentezlenme aşamasında yüksek saflıkta elde edilebiliyor olmaları ve standardize üretim koşullarının sağlanabilmesi sayesinde immün korumada etkin sonuçlar elde edilebilmektedir. Bununla birlikte modifikasyona açık olması nedeniyle membran üzerindeki açıklıkların büyüklüğünün kontrol edilebilir olması, yüzeyin fonksiyonelleştirilebilmesi ve biyouyumluluğunun geliştirilebilmesi

gibi üstünlüklere sahiptir [79, 80]. Bununla birlikte sentetik polimerler sentez aşamasında toksik çözücülerin kullanılması nedeniyle hücre canlılığı üzerinde olumsuz etki gösterebilmektedir. Bunun engellenebilmesi için doğal polimerler ile birlikte kullanılan çalışmalar gerçekleştirilmiştir. En sık kullanılan sentetik polimerler PEG, poliüretan [81, 82], politetrafloroetilen (PTFE) [83] ve polivinil alkol (PVA) [84-86] olarak gözükmektedir.

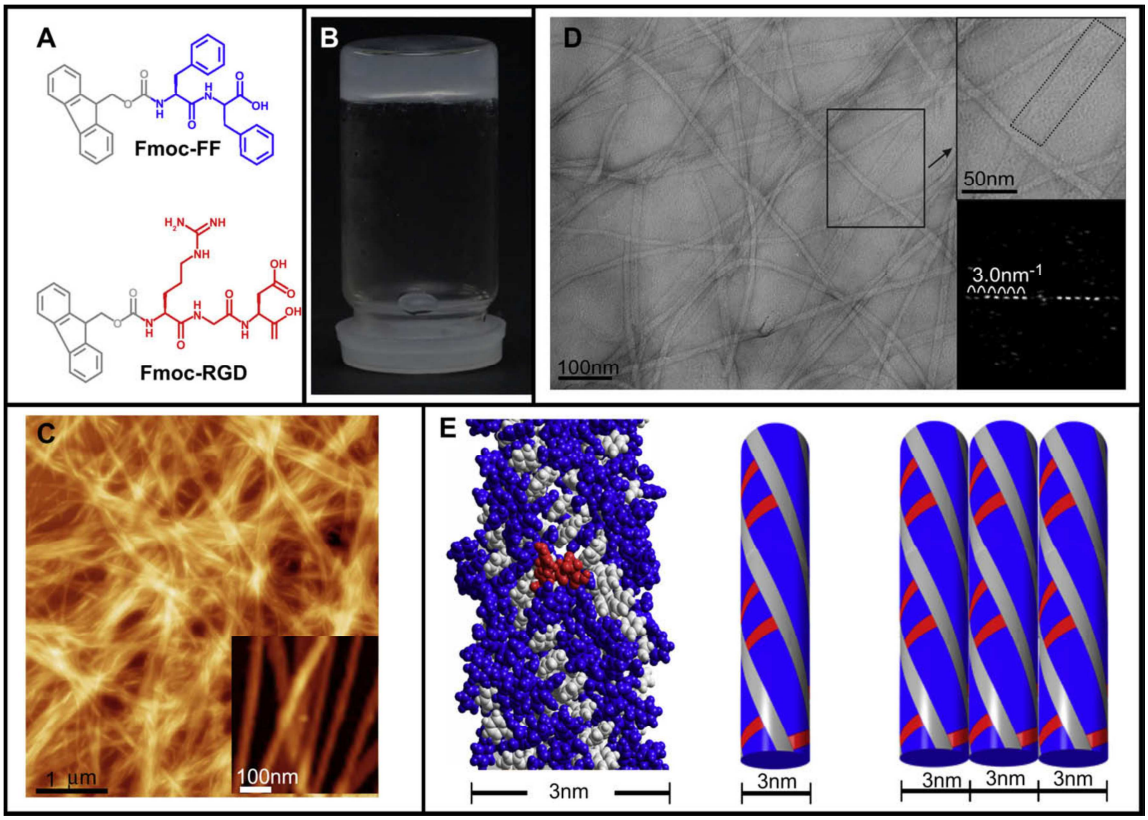
Polimerlere ek olarak silikon, titanyum ve alimünyum oksitler gibi inorganik materyallerin kullanıldığı enkapsülasyon çalışmaları da yine literatürde yer almaktadır [87, 88]. Polimer enkapsülasyonundan farklı olarak inorganik yapıda olması nedeniyle biyouyumluluğu daha düşük olan bu kaplama materyaller ilave kaplamaya veya fonksiyonelleştirilmeye ihtiyaç duymaktadırlar [89, 90].

Polimerik hidrojeller kovalent çapraz bağlar ile birbirlerine bağlanırken, kovalent olmayan etkileşimler sonrasında moleküler jeller meydana gelmektedir. Kovalent olmayan etkileşimlere örnek olarak hidrojen bağları, *π-π* istiflenmesi, van der Waals, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler verilebilmektedir. Moleküler jellerin yapıtaşında bu bağlar ile birbirine bağlanmış tekil moleküller yer almaktadır. Bu sayede oluşan ipliksi ağ, moleküler jellerin yapısına esneklik sağlamakta ve sıcaklık, pH değişikliği gibi moleküler yapıda gerilim oluşturan durumların ortadan kalkması sonrasında bir önceki haline geri dönebilmektedir. Şekil 2-9'da moleküler yapısı gösterilen, peptit yapılı hidrojellerden olan florenil-9-metoksikarbonil-difenilalanin (Fmoc-FF), Fmoc grupları arasındaki *π-π* istiflenmesi sonucunda kendiliğinden antiparalel β-yaprak şeklindeki tübüler yapılar oluşturmaktadır [91, 92].



Şekil 2-9 Fmoc-difenilalanin

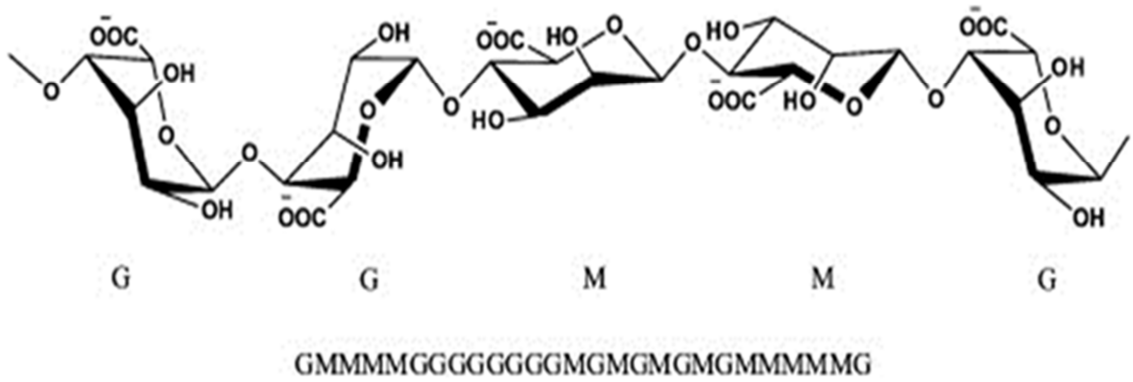
Fmoc-FF biyouyum göstermesi ve jelleşme sonrasında stabil 3 boyutlu yapıya sahip olması nedeniyle hücreler için matris ortam olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca Fmoc-FF jelinin yapısına, hücrelerin tutunabileceği fonksiyonel grupları içeren biyoaktif Fmoc peptitlerin eklenebiliyor olması doku mühendisliği çalışmalarında yer bulmasını sağlamıştır. Bu amaçla hücre yüzeyindeki integrinlere bağlanabilen Fmoc-arjinin-glisin-aspartik asit (Fmoc-RGD)/Fmoc-FF hidrojel çalışmaları literatürde yer almaktadır [92-94].



Şekil 2-10 A) Fmoc-FF, Fmoc-RGD moleküler yapısı B) Fmoc-FF/Fmoc-RGD hidrojel görüntüsü C) Hidrojel AFM görüntüsü D) Hidrojel TEM görüntüsü E) 3 nm kalınlığındaki fibril görüntüleri, RGD sekansı kırmızı ile işaretlenmiştir [92].

2.3.1. Aljinat

Aljinat D-mannuronik asit (M) ve L-gluronik asit (G) birimlerinden oluşan anyonik yapıda lineer bir polimerdir. Aljinat *Azotobacter vinelandii*, birçok Pseudomonas türleri ve alglerden izole edilebilmekte ve izolasyon kaynağına göre farklı oranlarda G, M veya MG bloğu içerebilmektedir (Şekil 2-11) [62]. Yüksek oranda guluronik asit içeriğine sahip aljinat sert bir yapı oluştururken, mannuronik asidin üstünlüğünde esnek yapılar meydana gelmektedir.



Şekil 2-11 Aljinat

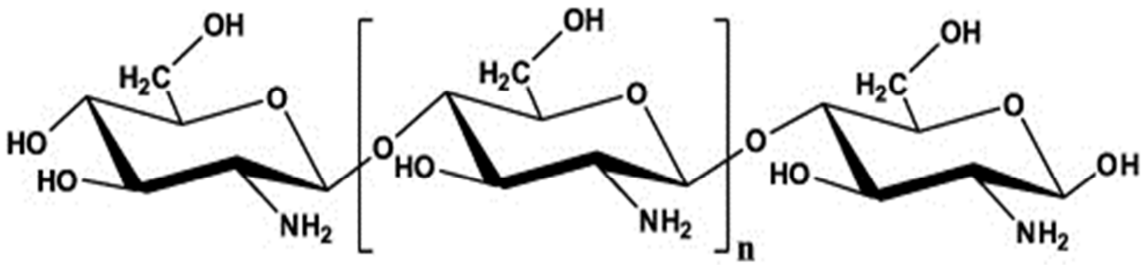
Biyouyumluluğu, yüksek oranda saflaştırılabiliyor olması ve toksik çözücüler kullanmadan kolayca işlenebilmesi aljinatı pankreas hücre kaplamalarında en fazla araştırılan polimerlerden biri haline getirmiştir [42].

Aljinat kapsüllerinin oluşturulması sırasında sıklıkla sol-jel yöntemi kullanılmaktadır. Sol-jel yönteminde, 2 değerlikli katyon (Ca^{+2}, Sr^{+2}, Ba^{+2} gibi) bulunduran çapraz bağlayıcı solüsyon içerisinde terapötik hücre içeren aljinat çözeltisinin ekstrüzyonu gerçekleştirilmektedir. Aljinat jeller poröz yapılarından dolayı immün ajanlardan etkin bir koruma sağlayamamaktadır [95]. Baryum aljinat jellerin allojenik nakilde koruma sağlarken ksenojenik transplantasyonda başarılı sonuç vermediği rapor edilmiştir [96]. İmmün korumayı etkinleştirmek için aljinat kapsüllerin, kitosan [66, 97, 98], glutaraldehit [98], polietilenglikol (PEG), poli-L-lizin [99] ve poli-L-ornitin [100] gibi diğer katyonik polimerlerle enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir.

T1D hastalığına sahip 10 kişi üzerinde gerçekleştirilen klinik çalışmada, aljinat kaplı adacık hücresi nakli gerçekleştirilmiştir. İmmünbaskılayıcı ajanın verilmediği bu araştırmada, 400-600 bin arasındaki adacık hücreleri periton boşluğuna nakledilmiş ve 2 hastanın glukoz seviyelerinde düşüş meydana geldiği görülmüştür [55].

2.3.2. Kitosan

Ticari olarak kitinden üretilen kitosan, kitinin deasetile halidir [101]. Kitin mantarlarda, kabuklularda, böceklerde ve yumuşakçalarda bulunan bir biyopolimerdir. Kitosanın reaktif amino ve hidroksil grupları taşıması nedeniyle sahip olduğu polikatyonik yapısı polianyonlara karşı yüksek afinite göstermesine sebep olmaktadır (Şekil 2-12).



Şekil 2-12 Kitosan, poli β(1 → 4)-2-amino-2-deoksi-β-d-glukan

Asidik solüsyonlar içerisinde çözünebilen kitosanın fizyolojik şartlarda çözünemiyor olması hücre enkapsülasyonunda dezavantaj oluşturmaktadır. Ayrıca polikatyonik yapısı nedeniyle kitosan mukoadezif özellik göstermekte ve sitotoksisite oluşturmaktadır [102]. Bu nedenlerle tek başına hücre kaplamalarında etkin bir immün koruma gerçekleştiremeyen kitosanın farklı polimerler ile birlikte kullanılması araştırılmıştır. Polianyonik özelliğe sahip aljinat bu amaçla adacık hücre enkapsülasyonu uygulamalarında kitosanla birlikte en sık kullanılan biyopolimerdir [66, 78, 103].

2.4. Membran Modifikasyonu

Kaplama materyallerinin adacık hücrelerini enkapsüle etmesi ve immün sistem ajanlarına karşı sadece bariyer görevi taşıması BYP hedefine ulaşılması için yeterli görünmemektedir. Bu sebeple ECM özelliği taşıyan ve nakil sonrasındaki etkinliği ve canlılığı artırmaya yönelik membran modifikasyonları araştırılmaktadır. Ayrıca, hücrelerin tutulu halde bulunduğu kapsüllerin mekanik stabilitesinin güçlendiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [104, 105]. Doğal olarak elde edilen ve ECM proteinlerinden olan fibrin, kollajen ve jelatinin tek olarak veya aljinat ile birlikte kullanıldığı araştırmalar bulunmaktadır [106, 107]. Diğer taraftan hücre yüzeyine tutunmayı sağlayacak fonksiyonel epitopların protein mühendisliği yaklaşımı ile kaplama materyaline bağlanması da kullanılan diğer bir yöntemdir. Bu amaçla en sık kullanılan epitoplar fibronektinden elde edilen arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) ve lamininden geliştirilen tirozin-izolösin-glisin-serin-arjinin (YIGSR) gibi polipeptitlerdir. Zhou ve diğ. dermal fibroblastlar üzerine yapmış oldukları çalışmada Fmoc ile bağlı RGD sekansının hücrelerin integrinleri ile bağlandığını ve hücrelerin sayısının artış gösterdiğini bulmuştur [92]. Ayrıca aljinat ile konjuge G**RGD**SP polipeptiti ile adacık hücre enkapsülasyonu da gerçekleştirilen çalışmalar arasındadır [108].

Apoptozu başlatan anti-Fas monoklonal antikorlarının, PEG modifiye hidrojellere bağlanması sonucunda, otoreaktif T hücrelerinin nakledilen adacık hücrelerine zarar vermesi engellenebilmiştir [109].

Nakil sonrası IBMIR etkisinin ortadan kaldırılması sistemik uygulanan antikoagulan ajanlar kanamaya sebep olarak çeşitli yan etkiler göstermektedir. Bunun önüne geçilmesi için adacık hücrelerinin heparin ile enkapsülasyonu uygulanan yöntemlerdendir. Biyotin/avidin konjugasyonu ile heparin adacık yüzeyine tutturulabilmiştir [110]. IBMIR etkisinden korunmak için diğer bir çalışmada ise ürokinaz, PEG polimeri ile konjuge edilerek adacık hücrelerinin üzerinde immobilize edilmiştir [111-114]. Fare modelinde yapılan çalışmada nakledilen hücrelerin IBMIR etkisinden kurtulduğu gösterilmiştir.

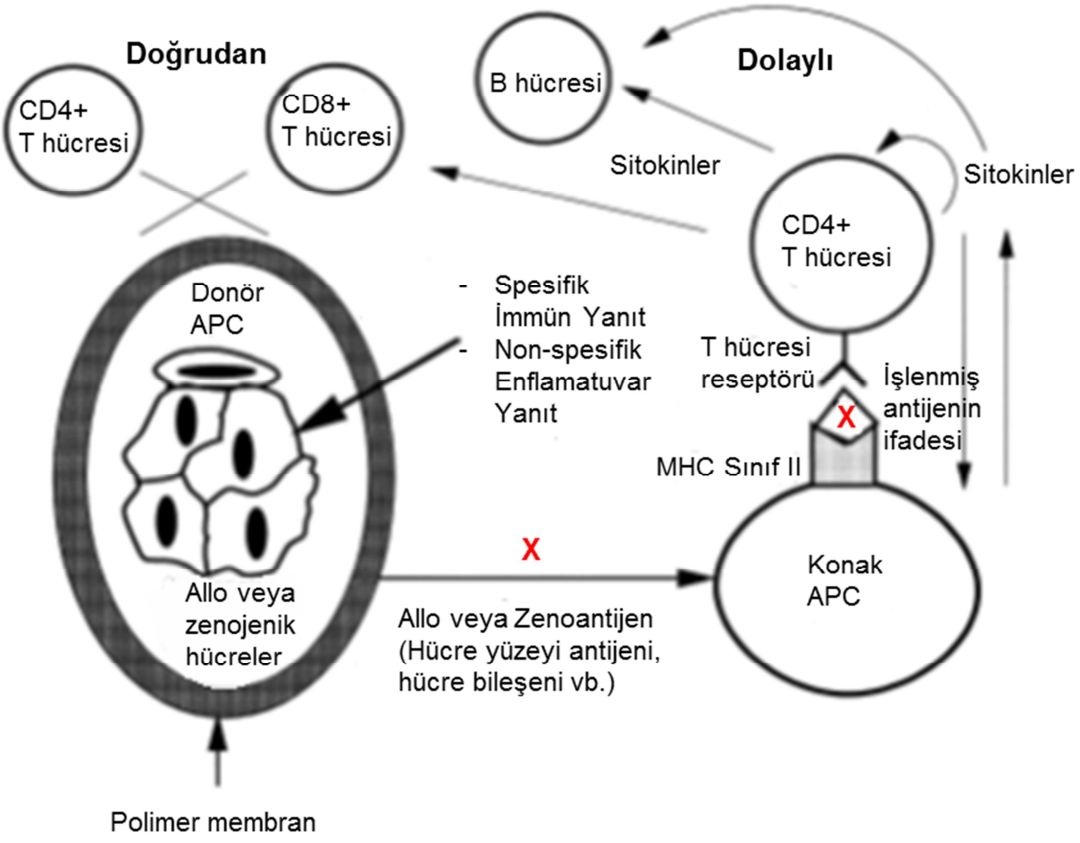
Adacık hücrelerinin apoptoza gitmesini engelleyen ve insülinotropik etkiye sahip olan GLP-1'in PEG hidrojeli ile bağlanarak kaplama materyali olarak kullanılması uygulanan diğer bir yaklaşımdır [115]. Böylelikle adacık hücrelerinin hem canlılığının artırılması sağlanmış hem de insülin salım miktarında artış elde edilmiştir.

2.5. Biyomateryallere ve Nakil Dokusuna Karşı Vücut Tarafından Geliştirilen İmmün Yanıt

Doku mühendisliği uygulamalarındaki biyouyumluluk kavramı transplantasyon sonrası biyomateryale, nakil dokusuna ve bunların ikisinin birlikte bulunması halinde her ikisine karşı geliştirilen cevabı içermektedir. Biyomateryaller tek başına uygulanmaları halinde akut enflamatuvar yanıt, sonrasında kronik enflamatuvar yanıt ve/veya granülasyon doku oluşumuna kadar gidebilmektedir [116]. Nakli gerçekleştirilen hücreler kaynağına göre aynı canlıdan olması durumunda, oto; aynı türden ve farklı bir canlıdan ise, allo; ve farklı bir türden nakil gerçekleştiriliyor ise ksenogreft olarak adlandırılmaktadırlar. İmmün sistem yanıtı bu nakil dokularına karşı farklı şekilde gelişmektedir. T1D hastalığında otoimmünite bozukluğu bulunması nedeniyle diğer nakillerden farklı olarak ototransplantasyonda dahi immün yanıt oluşmaktadır. Ksenogreftlerin nakli sonucunda immün yanıt doğal antikorlar ve sonrasında kompleman sistem ile gerçekleşmektedir [117, 118]. Allogreftlere cevapta ise T hücreleri temel doku-uygunluğu bileşeni (major histocompatibility complex, MHC) I veya II hücrelerine bağlanarak nakil hücrelerinin erken reddine sebep olabilmektedir. Ayrıca

nakledilen hücreler tarafından hücreye-özgü-salınan antijenlerin, konak hücreleri tarafından içeri alınarak MHC II üzerinden ifade edilmesi sonucunda yardımcı T hücreleri aktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen bu hücreler salgıladıkları sitokinler ve sinyaller ile öldürücü T hücrelerin aktifleşerek nakil dokusunun zarar görmesine sebep olabilmektedir ve bu durum dolaylı yolak olarak ifade edilmektedir [119].

Enkapsüle adacık hücrelerinin nakli sonrasında kaplama materyali enflamasyonu tetikleyerek dendritik, makrofaj hücreleri gibi elemanların yoğunlaşmasına sebep olabilmekte ve transplante edilen hücreler tarafından salınan antijenlere karşı oluşturulan immün yanıta adjuvan etki oluşturabilmektedir. Kaplama sonucunda nakledilen adacık hücrelerinin immün sistem ajanlarına doğrudan maruziyeti engellenmiş olmakla birlikte hücrelerden salınan antijenlerin kaplama kapsülünden dışarı çıkması sonucunda, dolaylı yolak üzerinden bağışıklık sistemi aktif hale gelebilmektedir (Şekil 2-13) [120].



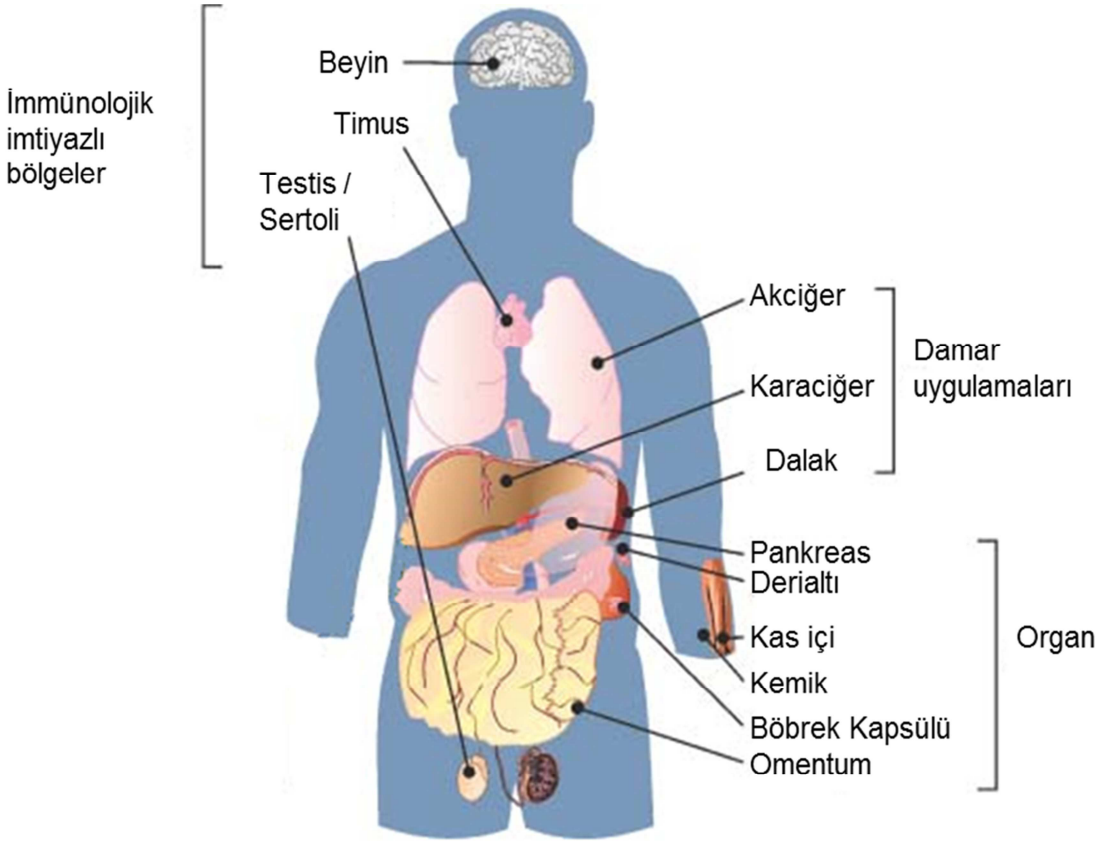
Şekil 2-13 Adacık hücre nakli sonrası oluşan immün yanıt mekanizması [120]

Kapsül dışına salınan ve antijen özelliği gösteren yapılar hücre yüzey molekülleri, ısı şok proteinleri ve diğer hücre bileşenleri (fosfolipid, DNA, RNA gibi) olabilmektedir. Örneğin büyük boyutlu olması ve hipoksiye uğraması sonucunda

nekroza giden enkapsüle hücreler tarafından salınan tehlikeyle-ilişkili moleküler kalıplar (danger-associated molecular patterns-DAMPs) kapsül dışına çıkabilmektedir [121-124]. Bağışıklık sisteminde bulunan kalıp tanıma reseptörleri (pattern recognition receptors-PRRs) DAMPs'a karşı özelleşmiş olan Toll-like reseptörleri, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon domaini (NOD) reseptörleri, c-tip lektinleri ve inflamazomları kapsamaktadır [123]. PRRs tarafından tanınan DAMPs enflamasyon yanıtını oluşturmakta ve kaplama gözeneklerinden geçebilecek boyutta salınan sitokinler nakil hücrelere zarar verebilmektedir [62]. Salınan sitokinler antikor üreten B hücrelerinin, öldürücü T hücrelerinin ve makrofajların aktif hale gelmesine sebep olmakta ve özelleşmiş immün cevabın oluşmasına sebep olmaktadır [125]. Özelleşmiş immün cevabın etkisinden korunabilmek için, immünoglobülinlerin boyutları nedeniyle kaplama gözeneklerinin çapının 100 nm'den küçük olması gerekmektedir [126]. Bununla birlikte aktif hale gelen lökositler tarafından üretilen NO ve reaktif oksijen (O_2^-, H_2O_2 gibi) molekülleri, boyutlarından dolayı kapsül içerisine girebilmekte ve adacık hücrelerine zarar verebilmektedirler [127, 128].

2.6. Nakil Bölgeleri

Nakil bölgesi olarak karaciğer ilk uygulamalardan itibaren kullanılmakla birlikte transplantasyon başarısının artırılabilmesi için farklı bölgeler de araştırılmıştır. Karaciğer kaynaklı nakil sorunlarının başında yeterli miktarda damarlanmanın sağlanmaması, düşük oksijen basıncı ve IBMIR gelmektedir [129]. Bu sorunların etkisini en aza indirmek için adacık hücrelerinin periton, pankreas, böbrek kapsülü, kas içi, kemik iliği, immünojenik olarak imtiyazlı bölgeler (testis, timüs ve gözün arka odası gibi) ve omentum bölgesine nakli literatürdeki çalışmalarda görülmektedir (Şekil 2-14) [130].



Şekil 2-14 Yaygın deneysel ve klinik çalışma transplantasyon bölgeleri [130]

Pankreas insülin salımının fizyolojik olarak ilgili bölgeye sağlanabilmesi ve yeterli düzeyde oksijen basıncı sağlaması nedeniyle nakil bölgesi olarak düşünülmüştür [131]. Bununla birlikte pankreas içerisine gerçekleştirilen nakil büyük cerrahi operasyon gerektirmesi nedeniyle otoimmünitenin tetiklenmesi ve pankreatitis riski bulunmaktadır [132].

Kas içerisine gerçekleştirilen transplantasyon, cerrahisinin kolay olması, damarlanmanın yoğun olması ve kolay erişilebilir bir yer olması nedeniyle seçenekler arasında yer almaktadır [130]. Kronik pankreatitis sonrası kas içi ototransplantasyonun yapıldığı klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir [133, 134]. Kas içi adacık nakli yeterli oksijen basıncı sağlarken, merkezdeki hücrelerin nekroza gitmesi ve yaygın fibroz oluşumu transplantasyon verimini düşürmektedir [135].

Omentum bölgesi tekrarlanabilen transplantasyona uygun olmaması, bağırsak yapışması ve tıkanıklıklarına sebebiyet verebilmesi gibi nedenlerle dezavantaj oluşturmaktadır [136]. Bununla birlikte geniş damar ağına sahip olması, portal drenajın sağlanması, kolay ulaşılabilirlik ve yeterli miktarda kan akışının bulunması omentumun nakil bölgesi olarak düşündürtmüştür [137, 138]. Hayvan modellerinde

yapılan çalışmalarda omentuma yapılan adacık transplantasyonu sonrasında hipergliseminin geri döndürüldüğü gösterilmiştir, ancak nispeten fazla miktardaki adacık hücre kaybı nedeniyle daha fazla adacık hücre nakli yapılması gerekmiştir [139]. Bu durum klinik uygulamalarda donör bulmadaki kısıtlılıklar nedeniyle omentum bölgesinin öncelikli nakil alanı olarak değerlendirilmesini güçleştirmektedir.

İyi damarlanmaya sahip olan ve kolay ulaşılabilen kemik iliğine adacık nakli hayvan modelinde çalışılarak olumlu sonuçlar elde edilmiştir [140]. T1D hastalığı olan 4 kişi üzerinde yapılan pilot çalışmada ise otolog adacık transplantasyonu gerçekleştirilerek yaklaşık 3 yıl boyunca adacık hücrelerinin fonksiyonelliklerini korudukları gösterilmiştir [141].

Farelerin lenf nodüllerine gerçekleştirilen adacık hücresi transplantasyon çalışmasında etkin sonuçlar elde edilmiştir [142]. Yoğun damarlanma sayesinde nodüllerde oksijen ve hücresel gıdalara doğrudan ulaşım sağlanabilmektedir. Bununla birlikte lenf nodüllerinin bağışıklık sisteminin merkezi olması ve bol miktarda immün ajan içermesi klinik uygulama önündeki engellerdendir.

Diğer bir transplantasyon bölgesi olarak farklı hayvan modellerinde dalak çalışılmış ve diyabetin geri döndürüldüğü gözlenmiştir [143, 144]. Bol miktarda lenfosit içermesi dalağın nakil bölgesi olarak kullanılmasının önündeki engel olarak gözükmektedir.

Nakledilen adacık hücrelerinin immün sistem tarafından parçalanmasını engellemek amacıyla immünolojik olarak imtiyazlı bölgelere nakledilmesi geliştirilen stratejilerdendir. Bu amaçla her ne kadar testis, timüs ve gözün arka odası gibi bölgelere transplantasyon gerçekleştirilebiliyor olsa da nakil alanının küçüklüğü klinik uygulama önündeki engel olarak karşılaşılmaktadır [132].

Böbrek kapsülü altına gerçekleştirilen adacık transplantasyonu çok sayıda hayvan çalışmasında denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [145, 146]. 4 farklı adacık nakil bölgesinin operasyon süresi, ölüm oranı, glukoz kontrolü, normoglisemiye ulaşma süresi gibi parametreler açısından değerlendirildiği çalışmada en iyi sonucu böbrek kapsülü altına gerçekleştirilen nakil sağlamıştır [136]. Böbrek kapsülüne transplantasyonun gerçekleştirildiği klinik çalışma sonucunda adacık hücrelerine kolay ulaşılabilir olmasının avantajı vurgulanmış;

ancak neovaskülarizasyonun uzun sürmesi nedeniyle normogliseminin sağlanmasının geciktiğinden bahsedilmiştir [147].

2.7. İn-vivo Deneysel Diyabet Modeli

Deney hayvanlarında oluşturulan diyabet yöntemleri insanlarda meydana gelen diyabeti tam olarak yansıtmamaktadır. Fakat diyabet hastalığı ile ilgili konularda aydınlatıcı olabilecek modellerdir. Günümüzde kimyasal toksinler ve virüsler deneysel diyabet modellerini oluşturmak için kullanılmaktadır. Bununla birlikte transgenik hayvanlarda model uygulamalarda kullanılmaktadır. Kimyasal toksinlerden alloksan, çinko şelatörleri ve streptozosin (STZ) kullanılmaktadır [148]. STZ antioksidan enzim sisteminin bulunmadığı pankreas β hücrelerini oksidan etkisi ile tahrip ederek insülin salınımını azaltır. Glukozamin-nitrozüre içeren, STZ, Langerhans adacıkları β hücrelerinde insülin üretiminin yüksek seviyelerinde meydana gelen GLUT-2 glukoz taşıyıcı reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınır. STZ'nin sitotoksik etkisi, NAD seviyelerinin azaltılması ve intrasellüler serbest radikallerin oluşturulması aracılığıyladır. Pankreas β hücrelerinin NAD seviyeleri düşüktür ve STZ saldırısıyla kolayca hasarlanabilirler. GLUT-2 glukoz taşıyıcı reseptörlerinin kan beyin bariyerinde olmaması nedeniyle, sistemik uygulamayı takiben beyinde STZ'nin direkt etkileri oluşmaz. Ayrıca bunların dışında, STZ'nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirerek diyabete sebep olduğu fikri de ortaya atılan görüşler arasındadır. STZ-diyabetik hayvanlar hipoinsülinemiktirler; ancak, sağ kalım için insülin tedavisine ihtiyaç duymazlar. Normal kan glukoz seviyesi 5 mmol/L iken STZ uygulanan hayvanlarda bu değer 20-25 mmol/L'dir. Diyabetli insanlarda olduğu gibi, STZ-diyabetik hayvanlarda da gözler, böbrekler, kan damarları ve sinir sisteminde hasarlar gelişir. STZ-diyabetik hayvan modelinin avantajı, her yaşta verilebilmesi nedeni ile diyabet ile yaşlanmanın etkileşim çalışmalarına uygun oluşudur. Böylece STZ-diyabetik hayvan modeli, kronik hiperglisemi etkilerinin çalışmasında da kullanışlıdır. Bu modelin endokrinolojik özellikleri ne sadece tip 1'i ne de tip 2'yi yansıtmaktadır; ancak, tip 1'e daha yakın bir diyabet benzeri tablo gelişir [149].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez çalışması kapsamındaki hayvan deneyleri 03.10.2013 tarihli ve 2013/55 protokol numaralı etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Sıçan Pankreası Adacık Hücre İzolasyonu

Ketamin/Ksilazin anestezik maddesi ile uyutulan 4 adet 3 aylık Sprague Dawley erkek sıçanların abdominal bölgesindeki tüyler temizlenip batikon ile silinmiştir. Abdominal bölge kesildikten sonra karaciğere bastırılarak duktus belirginleştirilerek ampulla vateri klemplenmiştir. Mavi renk katater kullanılarak pankreasa 7 mL 1 mg/mL derişimindeki soğuk kollajenaz tip 5 enzimi perfüze edilmiştir. Sıçanın kalbi kesilerek öldürülmüş ve pankreas bağlantılı olduğu dokulardan ayrılarak 50 mL'lik falcon tüpün içerisine koyularak buza gömülmüştür. Hazır olan 37 ^{o}C'deki su banyosunda pankreaslar 18 dakika inkübe edilip, inkübasyon sonrası pankreas çalkalanarak homojenize edilmiştir. 25 mL soğuk HBSS (%10 fetal bovine serumu (FBS), % 1 L-Glutamin, % 1 Penisilin-streptomisin) [HBSS (+)] solüsyonu eklenmiş ve kuvvetlice çalkalanmıştır. 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 ^{o}C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan atılıp pellet çalkalanarak kırılmıştır. 25 mL soğuk HBSS (+) solüsyonu eklenerek kuvvetlice çalkalanmıştır. 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 ^{o}C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan atılarak pellet tekrar çalkalanarak kırılmıştır. 50 mL soğuk HBSS (+) solüsyonu eklenmişi ve kuvvetlice çalkalanmıştır. 425 µm'lik çelik elekten pankreas dokusu 50 mL'lik falkon tüp içerisine süzüldükten sonra 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 ^{o}C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatan atılıp pellet çalkalanarak kırılmıştır. Pellet üzerine 5 mL Biocoll 1100 ilave edilip çalkalanarak homojenlik sağlanmıştır. Üzerine yavaşça 10 mL Histopaque 1077 solüsyonu ilave edilmiştir. En son olarak 10 mL RPMI 1640 solüsyonu ilave edilmiştir. 2400 rpm'de 20 dakika 1 hız 0 frende 4 ^{o}C'de santrifüj edilmiştir. 1077 yoğunluğu ve RPMI solüsyonu tabakalarının arasındaki adacık hücreleri RPMI 1640 (%10 fetal bovine serumu (FBS), % 1 L-Glutamin, % 1 Penisilin-streptomisin, 25 mM HEPES) [RPMI 1640 (+)] solüsyonu içerisine toplanmıştır. 2 kez 1300 rpm'de 3 dakika 3 hız 1 frende 4 ^{o}C'de santrifüj edilerek yıkama yapılmış ve adacık hücreleri elde edilmiştir. Adacık hücrelerine "handpicking" işlemi uygulanmış ve RPMI 1640 (+) besiyeri içerisinde 37 ^{o}C % 5 CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir.

3.2. Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Değerlendirilmesi

İzolasyondan sonra ve daha sonraki inkübasyon işlemlerinde adacık hücrelerinden 90 µL örnek alınarak 35 mm'lik petri kabının içerisine koyulmuştur. Daha sonra üzerine 910 µL PBS (pH 7,4) solüsyonu koyulmuştur. 20 µL floresan diasetat (FDA) stok solüsyonundan (24 µM; 1 mg FDA, 100 mL asetonda çözülür), 20 µL de propidyum iyodür (PI) stok solüsyonundan (750 µM; 5 mg PI, 10 mL PBS (pH 7,4) solüsyonu içerisinde çözülerek hazırlanır) ilave edilerek karanlık ortamda 5 dakika saklanmış ve floresan mikroskobunda 20X ve 40X büyütmede, her iki ışıma altında da hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir ve çekilen fotoğraflar MAT-LAB programı kullanılarak birbiriyle çakıştırılarak hücrelerin % canlılığı hesaplanmıştır.

3.3. Adacıkların Statik Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Salınımlarının Belirlenmesi

Deneye başlamadan önce stimülasyonda kullanılacak olan solüsyonlar hazırlanmıştır. 100 mL'lik D-Glukoz içermeyen RPMI'dan 14,5 mL alınmıştır. 2,5 mL HEPES, 10 mL FBS, 1 mL Penisilin-Streptomisin, 1 mL L-Glutamine ilave edilmiştir. 59,4 mg D-Glukoz tartılırak 100 mL hazırlanan çözeltiye eklenmiştir. 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek 3,3 mM derişiminde glukoz içeren RPMI 1640 besiyeri hazırlanmıştır.

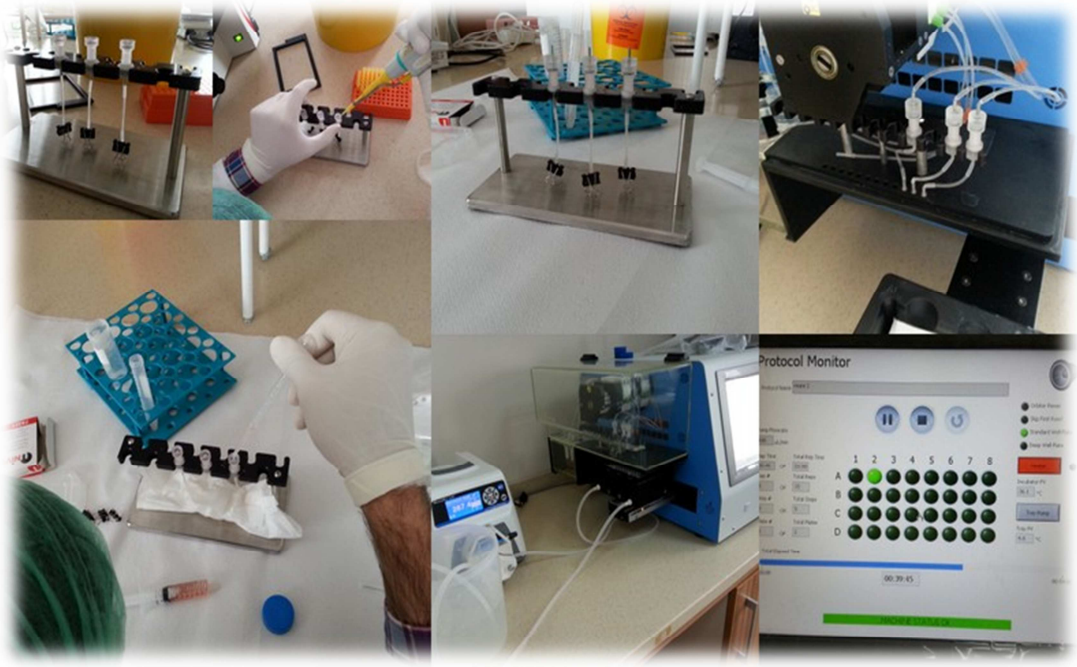
16,7 mM derişiminde glukoz içeren RPMI 1640 besiyeri hazırlamak için, 100 mL'lik D-Glukoz RPMI'dan 14,5 mL alınmıştır. 2,5 mL HEPES, 10 mL FBS, 1 mL Penisilin-Streptomisin, 1 mL L-Glutamine ilave edilmiştir. 300 mg D-Glukoz tartılmış ve 100 mL hazırlanan çözeltiye eklenmiştir. 24 kuyucuklu plakaların 1 ve 2 numaralı kuyularına 1'er mL 3,3 mM RPMI 1640 solüsyonu, 3 numaralı kuyusuna 1 mL 16,7 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu koyulmuştur. 1 numaralı kuyuya 8 µm gözenek çapına sahip insert koyulmuştur ve insert içerisine 25 adet yaklaşık 150 µm çapında adacık koyulmuştur. 30 dakika 37 ^{o}C CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Daha sonra insert 2 numaralı kuyucuğa alınmıştır. 1 saat 37 ^{o}C CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. 2 numaralı kuyucuktan 500 µL insülin örneği alınmıştır. Daha sonra insert 3 numaralı kuyucuğa alınmış ve 1 saat 37 ^{o}C CO_2 inkübatöründe inkübe edilerek, 3 numaralı kuyucuktan 500 µL insülin örneği alınmıştır. Alınan insülin örnekleri Rat insülin eliza kiti kullanılarak insülin miktarları ölçülmüştür. 16,7 mM glukoz derişiminde elde edilen insülin miktarı 3,3 mM glukoz derişiminde elde edilen insülin miktarına oranlanarak stimülasyon indeksi hesaplanmıştır. Bu işlem bütün gruplarda 0. ve 24.saatlerde 3 kez

tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.

İnsülin miktarlarını standardize edebilmek için, insertlerin içerisindeki hücreler DNA miktarları çalışılmak üzere –80 ^{o}C'ye eppendorf tüp içerisinde kaldırılmıştır.

3.4. Adacıkların Dinamik Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Salınımlarının Belirlenmesi

Bu deneyde statik glukoz stimülasyonunda hazırlanan 3,3 mM ve 16,7 mM glukoz içeren RPMI 1640 [150] solüsyonları kullanılmıştır. Deneyin gerçekleştirilmesi için Biorep Otomatik perfüzyon cihazı kullanılmıştır (Şekil 3-1). Cihaz deney öncesi çalıştırılarak 37 ^{o}C'ye ayarlanmıştır. 24 saat CO_2 inkübatöründe inkübe edilen adacık hücrelerinden 100 tanesi perifüzyon kolonu içerisine poliakrilamit jellerin arasına yerleştirilmiştir. Cihazın bağlantıları kurulduktan sonra kolondan 10 dakika boyunca 3,3 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu geçirilmiştir. Bu aşamadaki örnekler toplanmamıştır. Daha sonra 10 dakika daha 3,3 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu geçirilmiş ve soğuk tabla üzerinde bulunan 96'lık kuyucuklara her dakikada 100 µL örnek otomatik olarak toplanmıştır. 10 dakika sonunda 2 dakika glukoz içermeyen RPMI 1640 solüsyonu geçirilmiş ve bu aşamadan sonra 15 dakika 16,7 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu geçirilmiştir. 2 dakika daha glukoz içermeyen RPMI 1640 solüsyonu geçirildikten sonra 10 dakika 3,3 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu geçirilmiştir. 5, 7, 14 16, 18, 22, 31, 33, 35 ve 39. dakikada toplanan örneklerin insülin derişimleri ölçülmüş ve dinamik glukoz stimülasyonu grafiği çizilmiştir. Böylelikle, adacık hücrelerinin fonksiyonelliği belirlenmiştir.



Şekil 3-1 Adacıkların dinamik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımlarının belirlenmesi çalışmaları

3.5. Adacıkların DNA Miktarları Ölçülerek İnsülin/DNA Oranının Belirlenmesi

Adacık hücreleri –80 ^{o}C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Üzerlerine 100 µL deiyonize su koyulmuştur. 37 ^{o}C'de 1 saat inkübe edilmiş, 1 gece –80 ^{o}C'de bekletilmiş ve sonrasında –80 ^{o}C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. DNA miktarları Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (invitrogen) ile ölçülmüştür. Statik glukoz stimülasyonundan elde edilen insülin miktarları ölçülen DNA miktarına oranlanarak insülin/DNA oranı belirlenmiştir.

3.6. Çok Tabakalı Konformal Kaplama

3.6.1. Aljinat-Kitosan

Kitosan ve aljinat çözeltileri RPMI 1640 besiyeri içinde 1mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. Kitosan çözelisi için çözelti pH'ı asetik asit kullanılarak 4.5'e getirilmiştir. Bütün solüsyonlar 0.2 µm membran filtreden geçirilmiştir. 1.5 mL eppendorf içerisine 250 şer adet adacık hücreleri eklenmiş ve HBSS ile yıkanmıştır. İlk olarak 400 µl (katyonik) kitosan eklenmiştir. 5 dk birikme süresinden sonra hücrelerden fazla kitosanı uzaklaştırmak için HBSS buffer ile 2 defa yıkanmış ve her seferinde 1-2 dk. beklenmiştir. 400 µl (anyonik) aljinat ile aynı uygulama tekrarlanmıştır. Bu iki katmanlı kaplama işlemi n(=4) defa tekrarlanarak toplamda 8 tekli katman elde edilmiştir.

Konformal kaplama yapılmış adacık hücrelerin % canlılığı FDA ve PI solüsyonları

kullanılarak t=2, 24 ve 48. saatlerde hesaplanmıştır.

3.6.2. Aljinat-GRGDSP / Kitosan ile Konformal Kaplama

Daha önce gerçekleştirilen aljinat/kitosan konformal kaplama deneyleri, bu sefer fonksiyonel grup olarak GRGDSP eklenmiş aljinat (NOVATACH™, Norveç) kullanılarak yapılmıştır. Kullanılan protokol ve deney grupları aşağıda sunulmuştur:

- Kitosan/Aljinat Konformal Kaplama (Grup A1, Grup A2)

- Kitosan ve aljinat çözeltileri RPMI 1640 besiyeri içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır.
- Kitosan çözeltisi için çözelti pH'ı asetik asit ile 4.5 olarak ayarlanmıştır.
- Falkon tüpleri içerisinde 300'er adet adacık hücreleri eklenmiş ve HBSS ile yıkanmıştır.
- 400 µL (katyonik) kitosan eklenmiştir.
- 5 dk birikme süresi için beklenmiştir.
- Fazla kitosan HBSS ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır.
- 400 µL (anyonik) aljinat eklenmiştir.
- (n=4) tekrar ile 8 tabaka kaplama yapılmıştır.

- Aljinat-RGD/ Kitosan Konformal Kaplama (Grup B1, Grup B2)

- 1 mg/mL konsantrasyondaki aljinat-GRGDSP ile kitosan solüsyonları kullanılarak ve 1. tabaka aljinat-GRGDSP ve diğer tekli tabakalar aljinat olacak şekilde oluşturulan deney grubudur.

- Son tabakada anyonik aljinat polimerinin yer alması için 7 katmanlı kaplama gerçekleştirilmiştir.

- Aljinat-RGD/ Kitosan Konformal Kaplama (Grup B1, Grup B2)

- 0.1 mg/mL konsantrasyondaki aljinat-GRGDSP ve kitosan solüsyonları kullanılarak ve 1. tabaka aljinat-GRGDSP olacak şekilde oluşturulan deney grubudur.

- Son tabakada anyonik aljinat polimerinin yer alması için 7 katmanlı kaplama gerçekleştirilmiştir.

- Kontrol (K1, K2)

- Herhangi bir polimer içermeyen ve deney grubu çözeltilerine eşit miktarda maruz kalan adacık hücreleri kullanılmıştır.

Kaplama protokolü gerçekleştirilen adacık hücrelerinin canlılıkları 24. saatte kontrol edilmiştir.

3.7. Kendiliğinden Jelleşen Peptitler ile Kaplama

3.7.1. Fmoc-FF ile Kaplama

15 mM Fmoc-FF (Bachem, Almanya) solüsyonu hazırlamak için 30 mg Fmoc-FF, 3 mL DMEM ve 0,1 M konsantrasyondaki 1 mL NaOH içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan solüsyon 1 gece bekletilmiştir. 250 adet adacık hücresi, 500 µL Fmoc-FF solüsyonu ile birlikte 2 mg glukano delta lakton (GdL) içeren kuyucuklara eklenmiştir. Uygulama öncesi hücreler Fmoc-FF DMEM ile hazırlanmış olması nedeniyle 2 defa DMEM ile yıkanmıştır. Jelleşmeye bırakılan Fmoc-FF solüsyonu içerisindeki adacık hücrelerinin % canlılıkları t=2, 24 ve 48. saatlerde FDA ve PI solüsyonları kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7.2. Fmoc-FF ve Fmoc-RGD Kaplama Deneyleri

Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda uygulanması kararlaştırılan 20 mM konsantrasyondaki solüsyonların hazırlanması için 5,2 mg Fmoc-FF ve 5,5 mg Fmoc-RGD (BACHEM, Almanya), 500 µL dH_2O içerisinde çözünmüştür. Fmoc-FF, 0,5 M NaOH ve Fmoc-RGD, 0,5 M HCl ile pH'ları sırasıyla 10 ve 3 olacak şekilde ayarlanmıştır. Peptitlerin tamamen çözünebilmesi için ultrasonikasyon yapılmış ve vorteks kullanılmıştır.

İzole edilen hücreler RPMI ile yıkandıktan sonra 4 mL hücre solüsyonu hazırlanmıştır. 8 kuyucuklu plakalara 500 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Her tabakada 300 hücre içeren solüsyonların üzerine öncelikle Fmoc-RGD sonrasında Fmoc-FF solüsyonları tabloda verilen %10, 20 ve 30'luk konsantrasyonlarda verilmiştir (Çizelge 3-1) ve hafifçe sallanarak jelleşmeye bırakılmıştır.

Çizelge 3-1 Fmoc-RGD oranlarına göre solüsyonların gruplanması

	A	B	C
Fmoc-RGD	50 µL	100 µL	150 µL
Fmoc-FF	450 µL	400 µL	350 µL
	%10	%20	%30

Jelleşmenin oluşmasıyla birlikte 2 mL RPMI eklenmiştir. Jel oluşumu kontrol edilerek kurumayı önlemek amacıyla 500 µL daha besiyeri eklenmiştir. 24. saatteki

canlılıklar test edilerek elde edilen bulgular sunulmuştur.

3.8. Enkapsülasyon Membranların Karakterizasyonu

Sıçan pankreası adacık hücre izolasyonu ve hücrelerin canlılıkları değerlendirildikten sonra aljinat-GRGDSP/kitosan çok katmanlı konformal kaplama uygulanan adacık hücre membranının karakterizasyonu için SEM, TEM görüntüleri ile birlikte katman sayısının doğrulanabilmesi için imageJ programı kullanılmıştır.

3.8.1. SEM Görüntüsü

Konformal kaplama yapılan hücrelerin sahip olduğu kaplama ile ilgili olarak yapılan morfolojik değerlendirmelerin ardından kaplama kalınlıkları ile ilgili olarak yapılması planlanan çalışmalarda öncelikle hücreler uygun fiksasyon teknikleri ile (özellikle alkol dehidratasyonu ve aldehit fiksasyonu gibi) muamele edilerek parafine gömülmüştür. Ardından parafin bloklardan kesitler alınarak optik mikroskopta hücrelerin bulunduğu kesitler belirlenmiş ve görüntüleri alınarak ön değerlendirmeler yapılmıştır. Bu bölümde yapılan ön değerlendirmeler kaplamanın kalınlığı ya da varlığından ziyade hücre kesitlerinin bulunduğu numunelerin belirlenmesi olmuştur. Ancak kaplama olmayan ve farklı kalınlıklarda kaplamaların oluşmasının beklendiği numunelerde optik mikroskop bulguları da destekleyici yorumlarda kullanılmıştır. SEM görüntülerinden kontrol grubu ile konformal kaplama yapılan örnek karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

3.8.2. TEM ile Konformal Kaplamanın Görüntülenmesi

Adacık hücrelerinin konformal kaplama kalınlığı ve morfolojisi TEM altında incelenmiştir. Adacık kümelerinin 7 katman kaplanmasından sonra 0.1M PBS içerisinde %2.5 glutaraldehit ilave edilmiş ve hücreler 1 gece boyunca +4°C'de birinci fiksasyona bırakılmıştır, sonrasında PBS ile 2 kez yıkanan hücreler, %1'lik ozmiyum tetroksit (2ml) ile muamele edilmiş ve +4°C'de 1 saat boyunca ikincil fiksasyon gerçekleştirilmiştir ve tekrar PBS ile yıkanmıştır. %5'lik eriyik agar pastör pipet yardımıyla falkon tüp içerisindeki hücrelere eklenmiş ve homojen bir hücre agar karışımı elde edilmiştir. Kuruyan agar parçaları bistüri ile parçalandıktan sonra TEM analizinde kontrast yaratması açısından uranil asetat eklenerek 15 dakika +4°C'de inkübe edilmiştir. Kontrast boyama işlemi sonrasında alkol serisinden geçirilen örnekler saf propilen oksitte +4°C'de 10 dakika bekletilmiş ve 1:1 oranında propilen oksit/epon karışımı ilave edilerek ve +4°C'de 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Sonrasında saf epon içinde 48 saat +4°C'de tutulan

hücreler araldite gömülerek analiz işlemine geçilmiştir.

TEM analizi biyolojik numuneler için gerekli olan 80 kV hızlandırma gerilimi altında incelenerek yapılmıştır. 80.000X büyütmede kümelenme sınırları odaklanarak görüntüler elde edilmiştir.

3.8.3. FITC İşaretli Kitosan ile Kaplamanın Doğrulanması

Çok katmanlı kaplamanın doğrulanması için FITC işaretli kitosan kullanılmıştır. Tez çalışmasının bu aşamasında işaretli kitosan polimerinin 1, 3, 5 ve 7. katmanda kullanılması ile birlikte floresan mikroskop altındaki ışıma yoğunluğunda ne tür bir değişiklik olacağı araştırılmıştır. Elde edilen floresan görüntüleri imageJ programında karşılaştırılmıştır.

3.9. Enkapsüle Hücrelerin Fizyolojik İncelemeleri

0,1 mg/mL aljinat-RGD/kitosan ile enkapsüle edilen adacık hücrelerinin düşük ve yüksek konsantrasyondaki glukoz ile stimüle edilmesi sonrasında salınan insülin miktarı kit yardımıyla tespit edilmiştir.

3.10. İn-vivo Uygulamalar

Ağırlıkları tartıldıktan sonra bir gece aç bırakılan Sprague Dawley cinsi sıçanlara intraperitonal olarak 45 mg/kg dozunda streptozosin pH 4.5 sitrat tamponunda çözülerek enjekte edilmiştir. 3 gün sonra kan glukoz değeri glukometre ile kuyruk veninden alınan kan örneği ile ölçülmüştür. 300 mg/dL ve üzeri kan glukoz değerine sahip sıçanlar diyabetli olarak kabul edilmiştir [151]. Kan glukoz değerleri ve ağırlıkları takip edilmiştir.

Adacık nakli grubu (Enkapsüle edilmemiş adacık hücrelerinin transplante edildiği diyabetli sıçan grubu & 0.1 mg/mL aljinat-RGD/kitosan ile kaplanmış adacık hücrelerinin transplante edildiği diyabetli sıçan grubu)

Sprague dawley cinsi sıçanlardan izole edilen adacıklar 24 saat RPMI 1640 (+) besiyerinde % 5 CO_2 inkübatöründe kültüre edildikten sonra HBSS solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. Daha sonra 1 mL'lik insülin enjektörüne 2000 adacık/enjektör dozunda 5 mL HBSS solüsyonu ile çekilmiştir. Ketamin / Ksilazin anestezi maddesi ile uyutulan 7 günlük diyabetli Sprague dawley cinsi sıçanların portal veninden sarı kanül ile girilerek 2000 adacık karaciğere nakil edilmiş ve kan glukoz değerleri ile ağırlıkları takip edilmiştir.

Sham grubu

Ketamin / Ksilazin anestezi maddesi ile uyutulan 9 günlük diyabetli Sprague dawley cinsi sıçanların portal veninden sarı kanül ile girilerek 5 mL HBSS karaciğere infüze edilmiştir. Kan glukoz değerleri ve ağırlıkları takip edilmiştir.

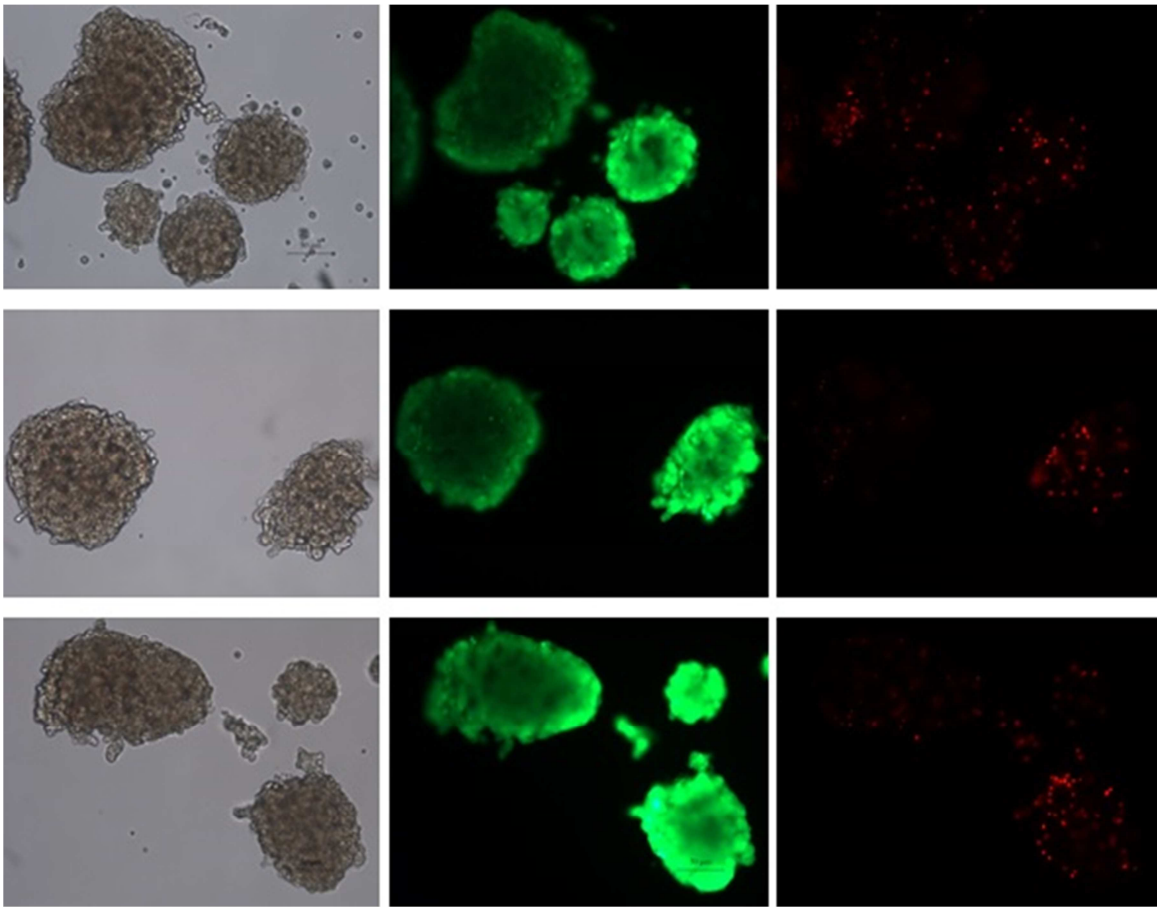
Diyabetli grup

Bu gruptaki ratların STZ enjeksiyonundan itibaren kan glukoz değerleri ve ağırlıkları takip edilmiştir. Herhangi bir cerrahi operasyon uygulanmamıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İzole Edilen Adacık Görüntüleri

Sıçanlardan izole edilen adacık hücrelerinin floresan mikroskop altında görüntüleri alınmıştır. Adacık canlılık seviyesinin belirlenebilmesi amacıyla FDA ve PI ile uygulamaya tabi tutulmuş ve istenilen oranda canlılık elde edilmiştir (Şekil 4-1).



Şekil 4-1 İzole adacık hücresi canlılık testi, yeşil floresan ışıma canlı hücreleri ve kırmızı ışıma ölü olanları göstermektedir.

4.2. Adacıkların Statik Glukoz Stimülasyonu ile İnsülin Salınımının Sonuçları

İzole edilen adacık hücrelerinin fizyolojik özelliklerini koruyup korumadığının test edilebilmesi amacıyla düşük (3,3 mM) ve yüksek (16,7 mM) derişimdeki glukoz çözeltisi stimülasyonu gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4-1,2). 0 ve 24. saatlerde elde edilen insülin miktarları belirlenmiş ve stimülasyon indeksi yine her iki saat dilimi için sırasıyla 2,10 ve 1,85 olarak bulunmuştur. Çalışmanın bu aşamasında elde edilen veriler daha önceki çalışmalar ile uyumlu olarak bulunmuştur.

Çizelge 4-1 0. ve 24. saat insülin salım sonuçları

	İnsülin ng/mL
0.saat 3,3 mM glukoz	0,78
0.saat 16,7 mM glukoz	1,66
24.saat 3,3 mM glukoz	0,15
24.saat 16,7 mM glukoz	0,26

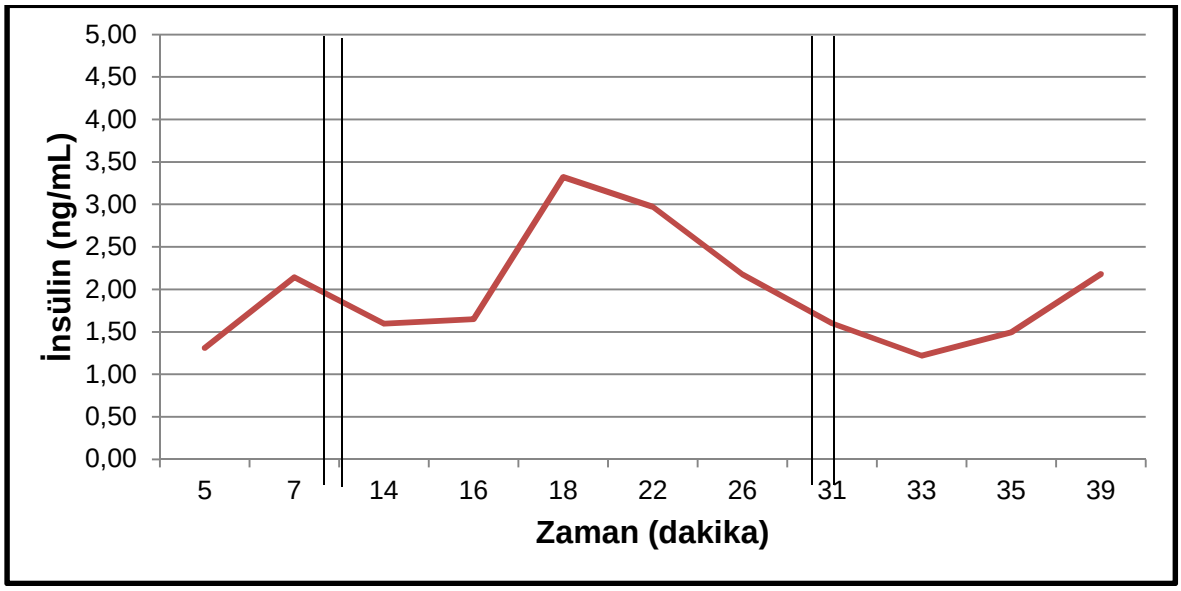
Çizelge 4-2 0. ve 24. saat stimülasyon indeksi sonuçları

	Stimülasyon İndeksi 16,7 mM glukoz/3,3 mM glukoz
0.saat	2,10
24. saat	1,85

4.3. Adacıkların dinamik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımının sonuçları

İzole edilen adacık hücrelerinin fonksiyonelliğinin araştırılması amacıyla düşük ve yüksek orandaki glukoz stimulasyonu testlerine ardışık cevabı irdelenmiştir. Düşük konsantrasyondaki glukoz uygulaması sonrası salınan insülin miktarının, yüksek konsantrasyon uygulaması sonrası yine benzer şekilde elde edilmesi adacık hücrelerinin foksiyonelliğini ve fizyolojik şartlardaki uyumunu kanıtlamaktadır. Bu amaçla uygulanan yöntem aşağıda belirtilmiş olup, elde edilen grafik Şekil 4-2'de sunulmuştur.

- İlk 10 dakika 3,3 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu kullanılmıştır.
- 10-12. dakikalar arası glukozsuz RPMI solüsyonu kullanılmıştır.
- 12-27. dakikalar arasında 16,7 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu kullanılmıştır.
- 27-29. dakikalar arasında glukozsuz RPMI solüsyonu kullanılmıştır.
- 29-39. dakikalar arasında 3,3 mM glukoz içeren RPMI 1640 solüsyonu kullanılmıştır.



Şekil 4-2 Adacıkların dinamik glukoz stimülasyonu ile insülin salınımının sonuçları

4.4. Adacıkların DNA miktarlarının ölçüm sonuçları ile insülin/DNA oranı sonuçları

İzole edilen adacık hücrelerinin ortalama insülin salım performansının belirlenmesi amacıyla 2 farklı zamanda (0 ve 24. saat) düşük ve yüksek glukoz stimülasyonu sonrası insülin/DNA oranı tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda da yüksek glukoz stimülasyonu sonucunda hem 0. hem de 24. saatte daha yüksek oran elde edilmiş olup, bu durum birim hücre başına insülin salımının, farklı glukoz konsantrasyonlarına uyumlu olduğunu göstermiştir (Çizelge 4-3,4). Hesaplamalara canlılığını kaybeden hücrelerin DNA'ları da dahil olmaktadır; ancak bu miktar ihmal edilebilecek düzeydedir.

Çizelge 4-3 İzole adacık hücresi 0. ve 24. saat DNA miktarları

	DNA ng/mL
0. saat	830,00
24. saat	430,00

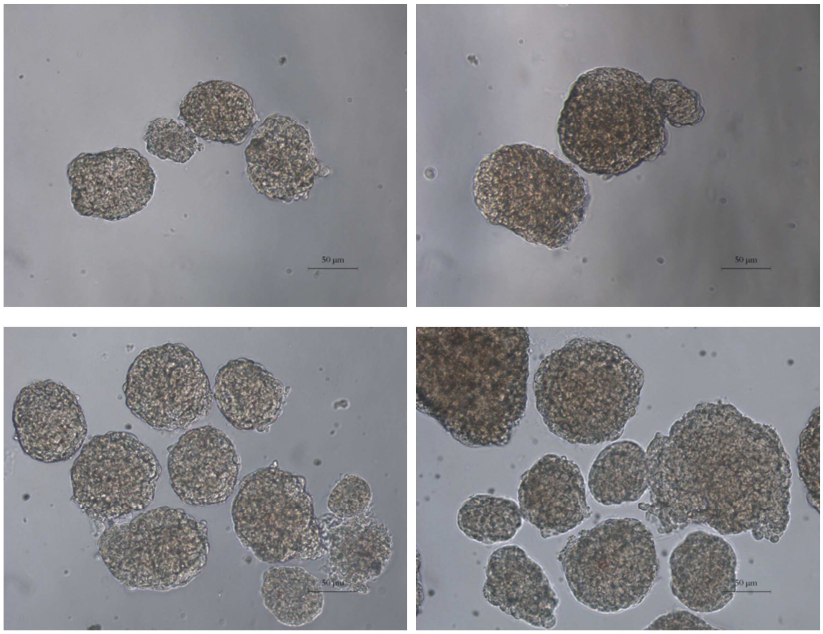
Çizelge 4-4 İzole adacık hücresi 0. ve 24. saat insülin/DNA miktarları

	İnsülin/DNA
0.saat 3,3 mM glukoz	0,00094
0.saat 16,7 mM glukoz	0,00200
24.saat 3,3 mM glukoz	0,00030
24.saat 16,7 mM glukoz	0,00055

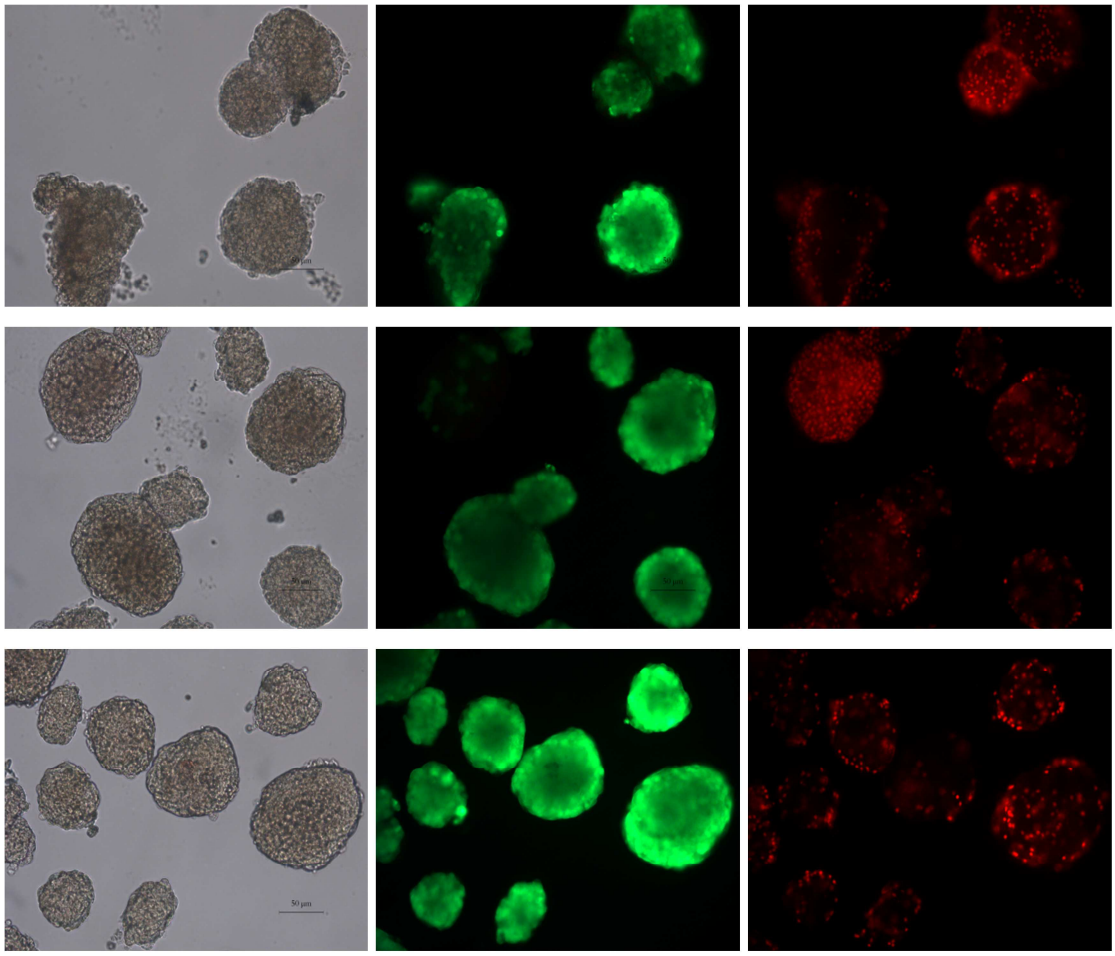
4.5. Enkapsüle Adacık Hücrelerinin Canlılıklarının Değerlendirilmesi

4.5.1. Aljinat/Kitosan Çok Katmanlı Konformal Kaplama Sonuçları

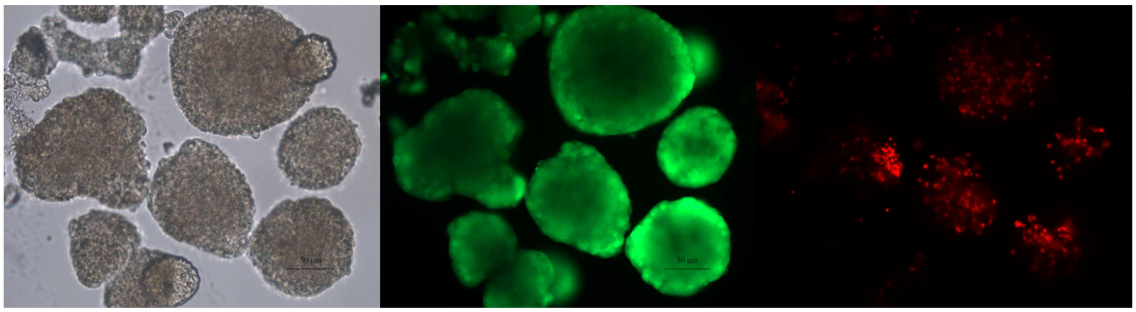
1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan polianyonik yapıdaki aljinat ve polikatyonik yapıdaki kitosan ile 8 katman kaplanan adacık hücrelerinin canlılık oranlarının belirlenmesi amacıyla 2, 24 ve 48. saatlerde mikroskop görüntüleri alınmıştır (Şekil 4-3/9). FDA ve PI ile boyama sonrasında enkapsüle adacık hücrelerinin ve kontrol grubunun canlılık oranları hesaplanmıştır. Elde edilen görüntülerdeki yeşil floresan ışıma canlı hücreleri ve kırmızı ışıma ölü olanları göstermektedir.



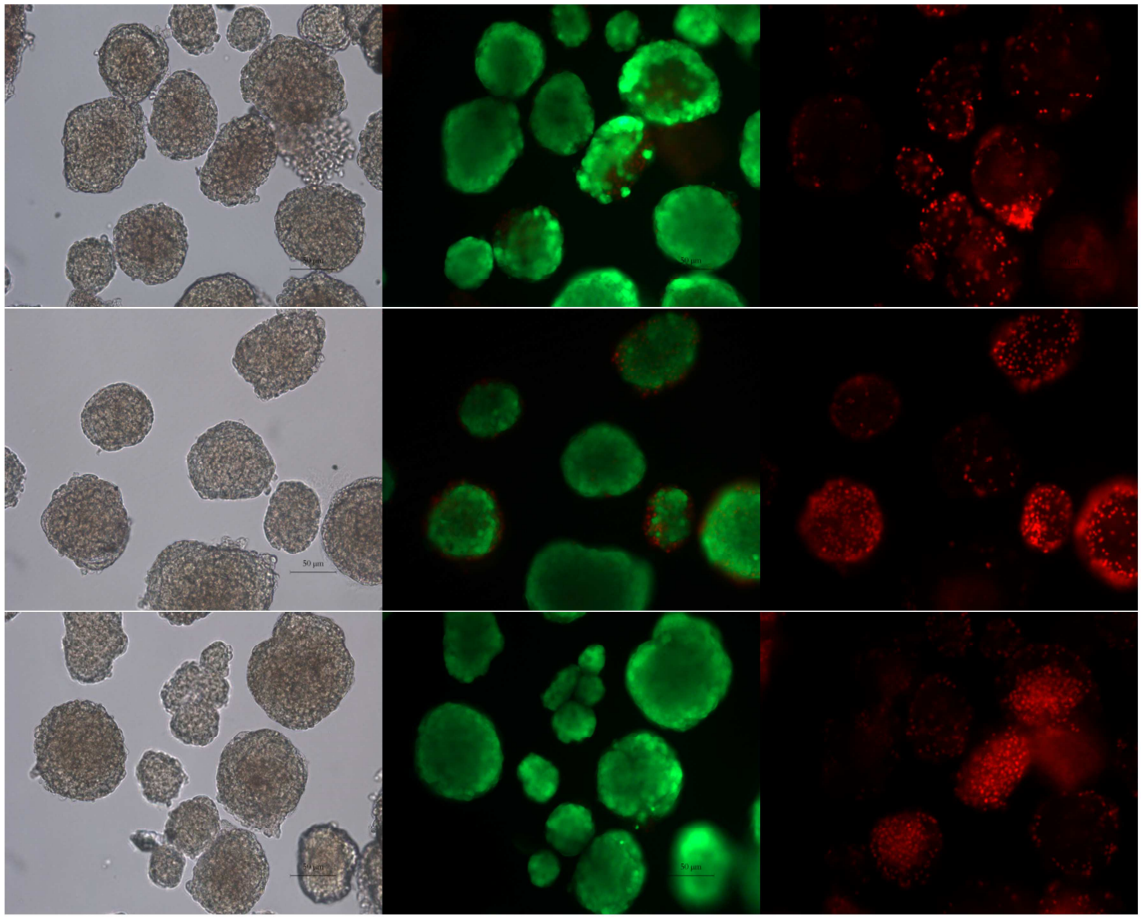
Şekil 4-3 Çok katmanlı konformal kaplama ışık mikroskobu görüntüleri (t=0 saat)



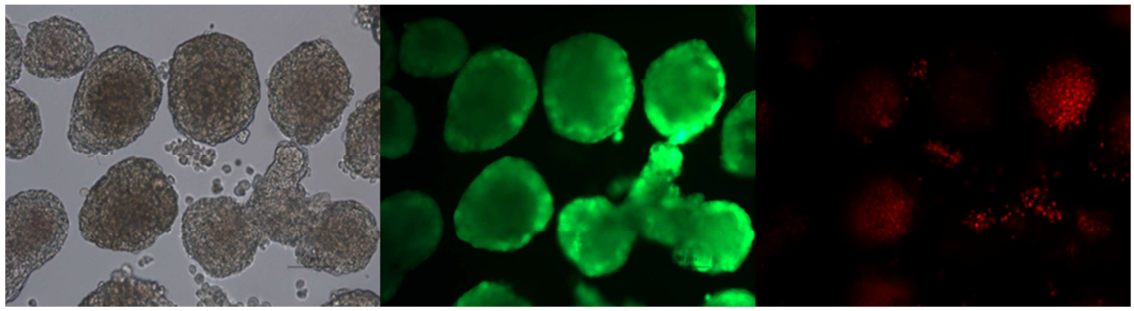
Şekil 4-4 Çok katmanlı konformal kaplama yapılan adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat)



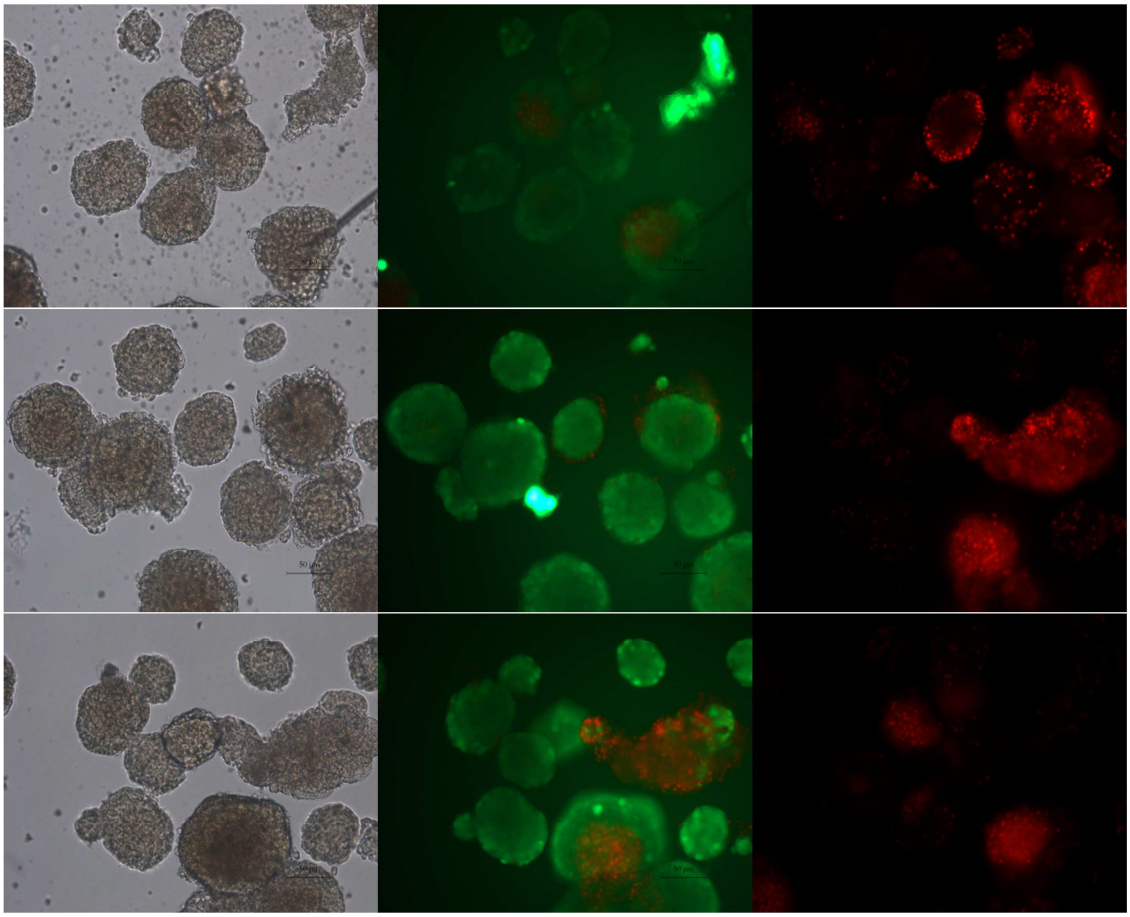
Şekil 4-5 Kaplama yapılmamış kontrol grubu adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat)



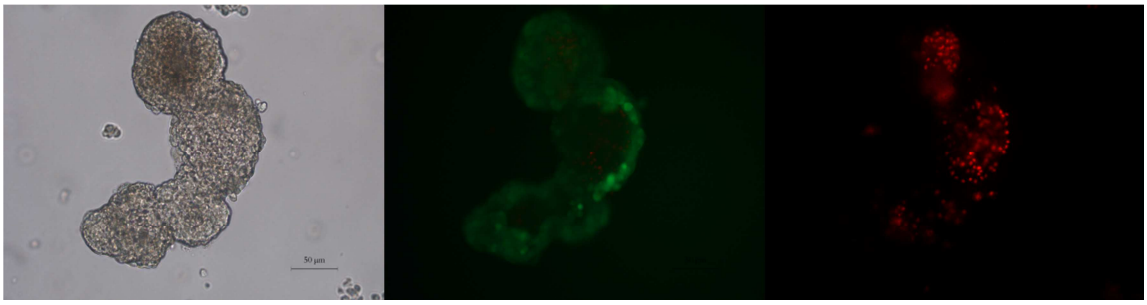
Şekil 4-6 Çok katmanlı konformal kaplama yapılan adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)



Şekil 4-7 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)

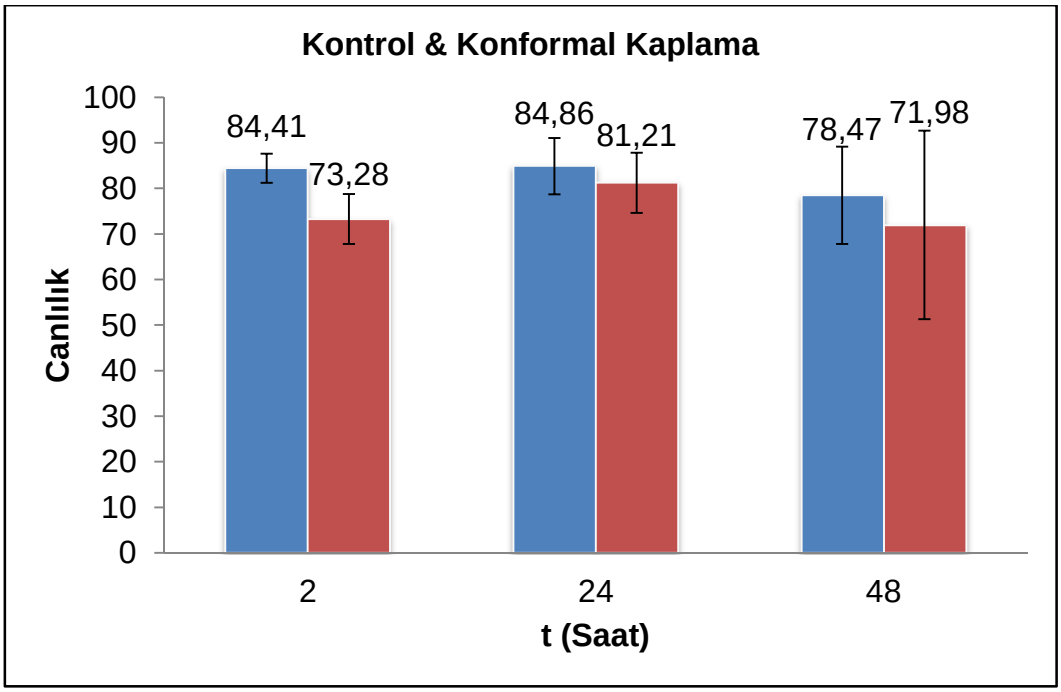


Şekil 4-8 Çok katmanlı konformal kaplama yapılan adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat)



Şekil 4-9 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat)

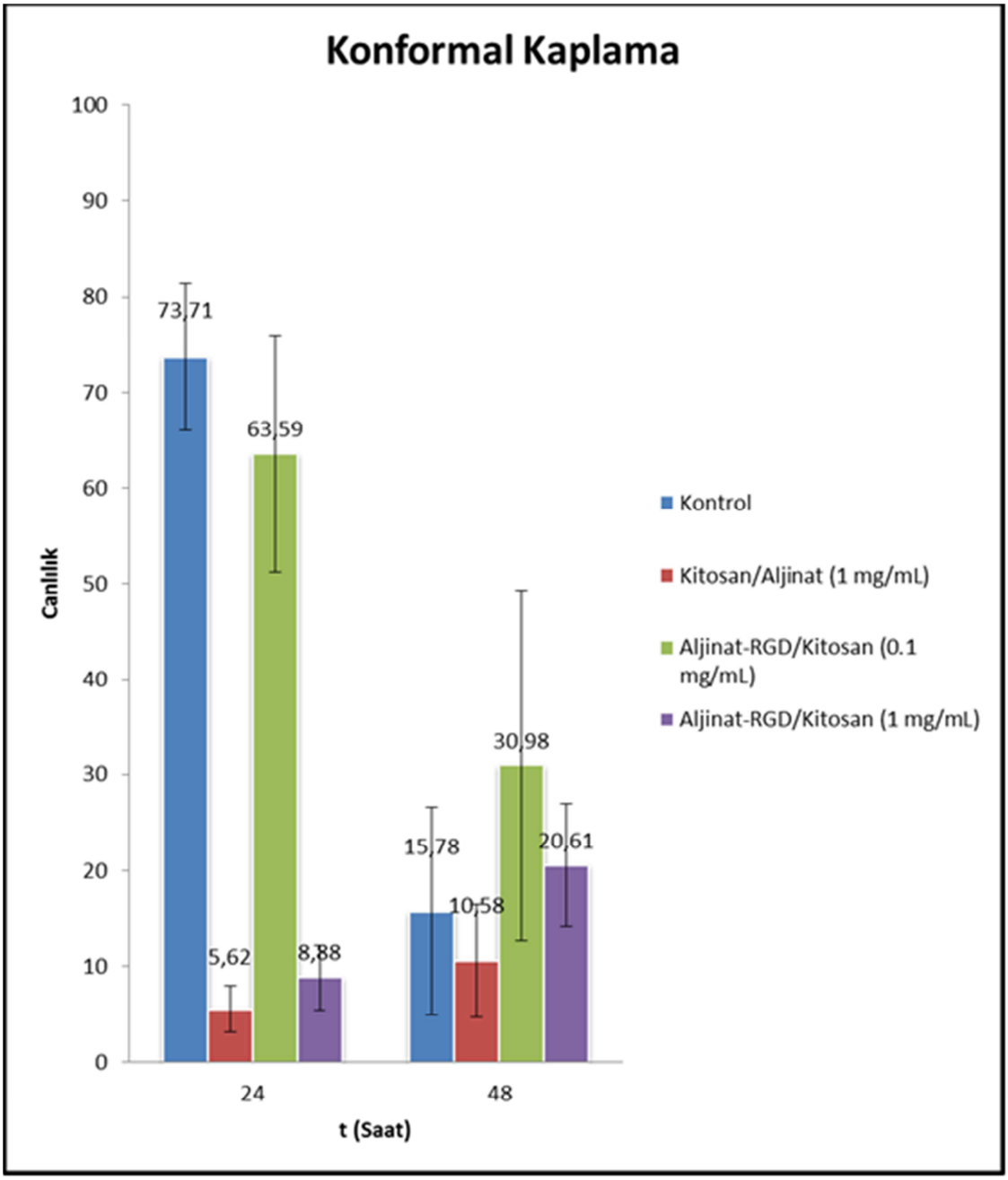
Polikatyonik yapıdaki kitosan ile kaplamaya başlanan adacık hücrelerinin, polianyonik aljinatla kaplanması ve bu işlemin 8 katmana kadar tekrarlandığı çalışma sonrasında enkapsüle adacık hücreleri ile kontrol grubunun, t=2, 24 ve 48. saatlerdeki canlılıkları karşılaştırıldığı zaman birbirine yakın değerlerin elde edildiği görülmüştür (Şekil 4-10).



Şekil 4-10 Enkapsüle adacık hücreleri ile kontrol grubunun, t=2, 24 ve 48. saatlerdeki canlılık grafiği

4.5.2. Aljinat-G**RGD**SP/Kitosan ile Konformal Kaplama

Aljinat ve kitosan biyopolimerleri ile gerçekleştirilen çok katmanlı konformal kaplama neticesinde elde edilen başarılı sonuçlar ile birlikte, güncel literatür çalışmalarında daha fazla karşılaşılmaya başlanan fonksiyonelleştirilmiş membran kullanımı çalışmasına geçilmiştir. Bu amaçla adacık hücresi yüzeyinde yer alan integrinler ile bağlanabilecek kısa peptit dizilerinden RGD sekansının kullanılması amaçlanmıştır. G**RGD**SP peptitiyle fonksiyonelleştirilmiş aljinat polimeri (NOVATACH™, Norveç), kitosan ile birlikte çok katmanlı kaplama çalışmasında kullanılmıştır. Bu aşamada integrinlere bağlanan RGD sekansının bulunması uygulanacak olan polimerlerin konsantrasyonunda değişikliğe sebep olmuştur. Şekil 4-11'den de görüleceği üzere 0,1 mg/mL konsantrasyondaki fonksiyonelleştirilmiş aljinat polimeri ile daha yüksek canlılık oranı elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen diğer bir modifikasyon ise, daha önceki çalışmalarda polikatyonik özelliği nedeniyle ilk katman olarak kullanılan kitosan yerine, integrinlere bağlanması nedeniyle aljinat-G**RGD**SP ilk katmanda kullanılmıştır. 1. katman dışındaki diğer katmanlarda G**RGD**SP içermeyen aljinat biyopolimeri kullanılmıştır ve son tabakada polikatyonik bir yapı oluşturmaması nedeniyle yine aljinat biyopolimeri olacak şekilde 7 katmanlı enkapsülasyon tekniği geliştirilmiştir.

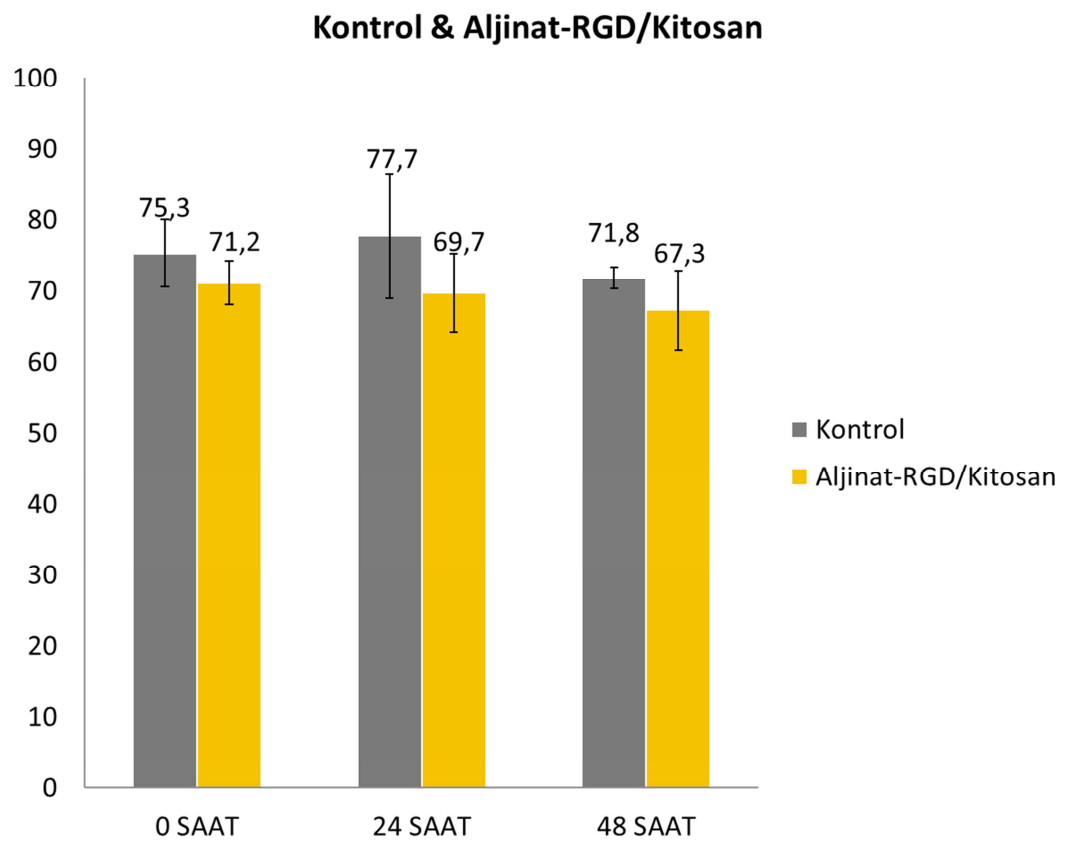


Şekil 4-11 3 farklı solüsyon ile (Kitosan/Aljinat, Aljinat-RGD/Kitosan (1 mg/mL), Aljinat-RGD/Kitosan (0,1 mg/mL)) konformal kaplama sonucunda 24 ve 48 saatteki canlılık oranları

Çalışılan 3 farklı solüsyon sonrasında elde edilen sonuçlardan 0.1 mg/mL aljinat-RGD/kitosan ile enkapsüle edilen adacık hücrelerinin canlılık oranlarının en yüksek seviyede olduğu bulunmuştur. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonunda Şekil 4-12'de görüldüğü üzere 0.1 mg/mL aljinat-RGD/kitosan kaplaması gerçekleştirilen canlılık oranı kontrol hücrelerle yakınlık göstermiştir.

Tez çalışması kapsamında ilk defa uygulanan aljinat-G**RGD**SP/kitosan konformal kaplama çalışmalarının in vitro kısmı başarıyla gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon

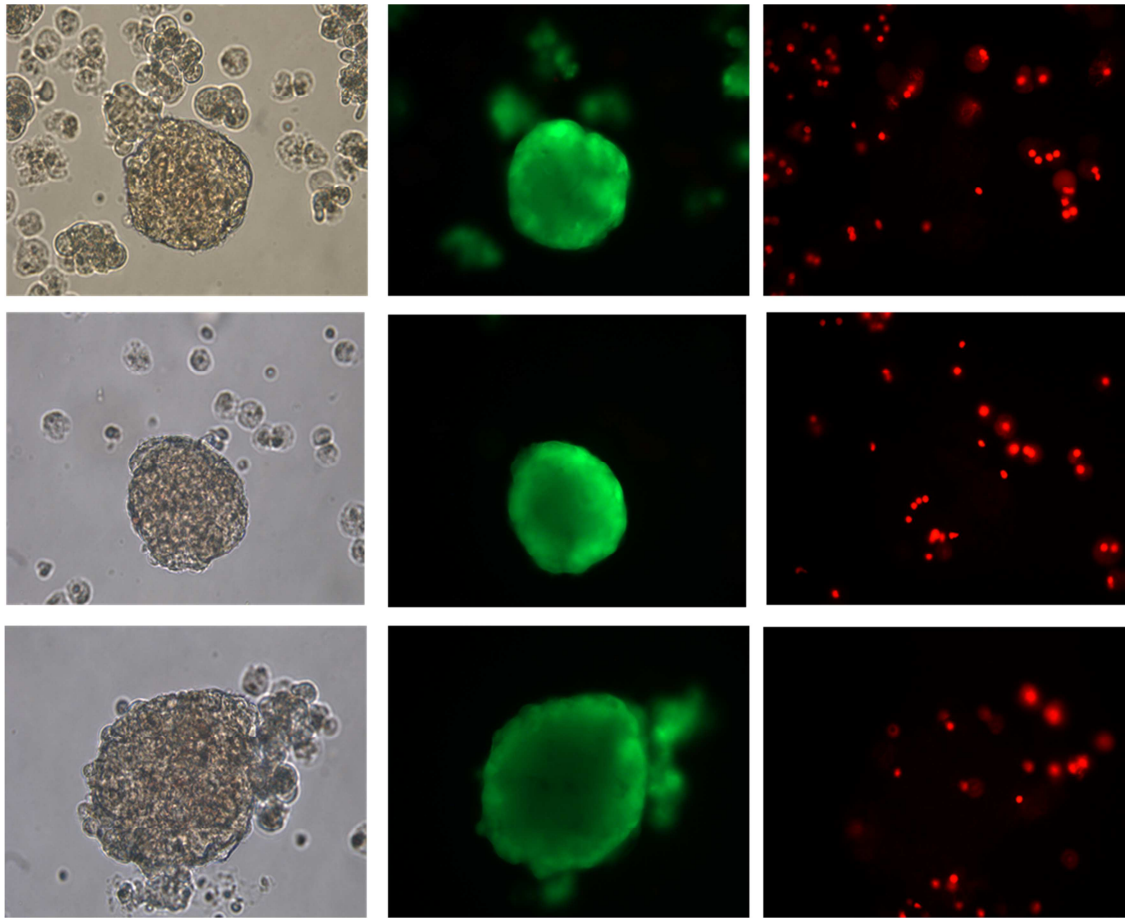
çalışmalarının ve in vivo deneylerin belirlenen bu protokol ile gerçekleştirilmesi kararlaştırılmıştır.



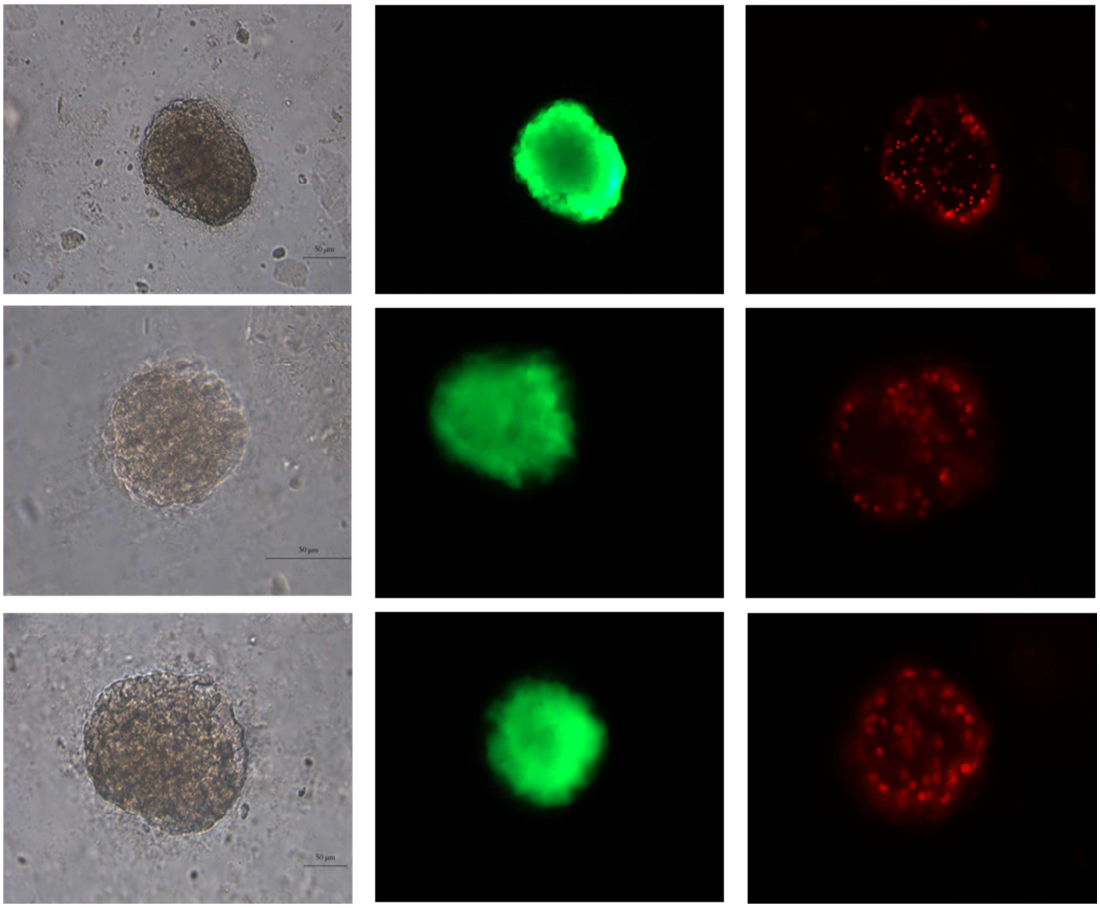
Şekil 4-12 0.1 mg/mL aljinat-RGD/kitosan kaplaması gerçekleştirilen adacık hücresi ve kontrol grubu canlılık oranı grafiği

4.5.3. Kendiliğinden Jelleşen Peptitler ile Enkapsülasyon

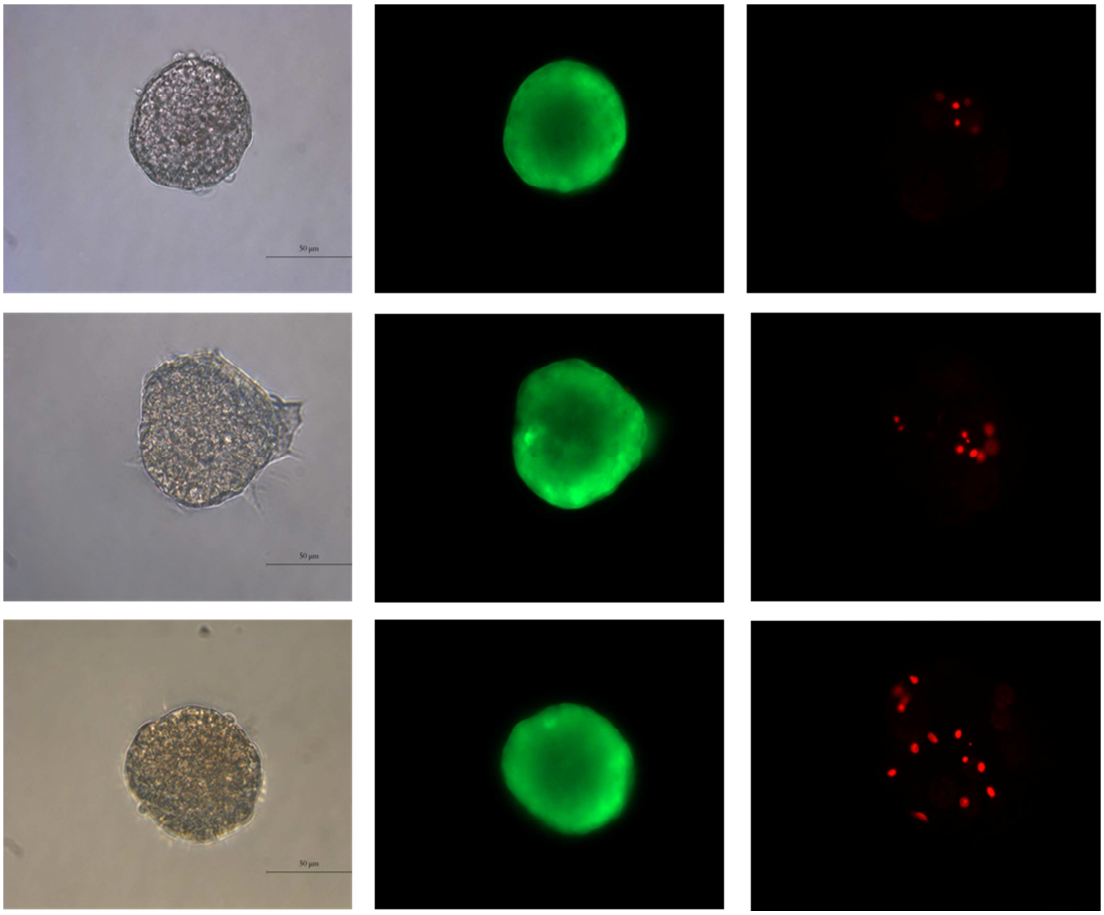
Jelleşmeye bırakılan Fmoc-FF solüsyonu içerisindeki adacık hücrelerinin % canlılıkları t=2, 24 ve 48. saatlerde FDA ve PI solüsyonları kullanılarak floresan görüntüleri alınmıştır (Şekil 4-13/19). Görüntülerdeki yeşil floresan ışıma canlı hücreleri ve kırmızı ışıma ölü olanları göstermektedir.



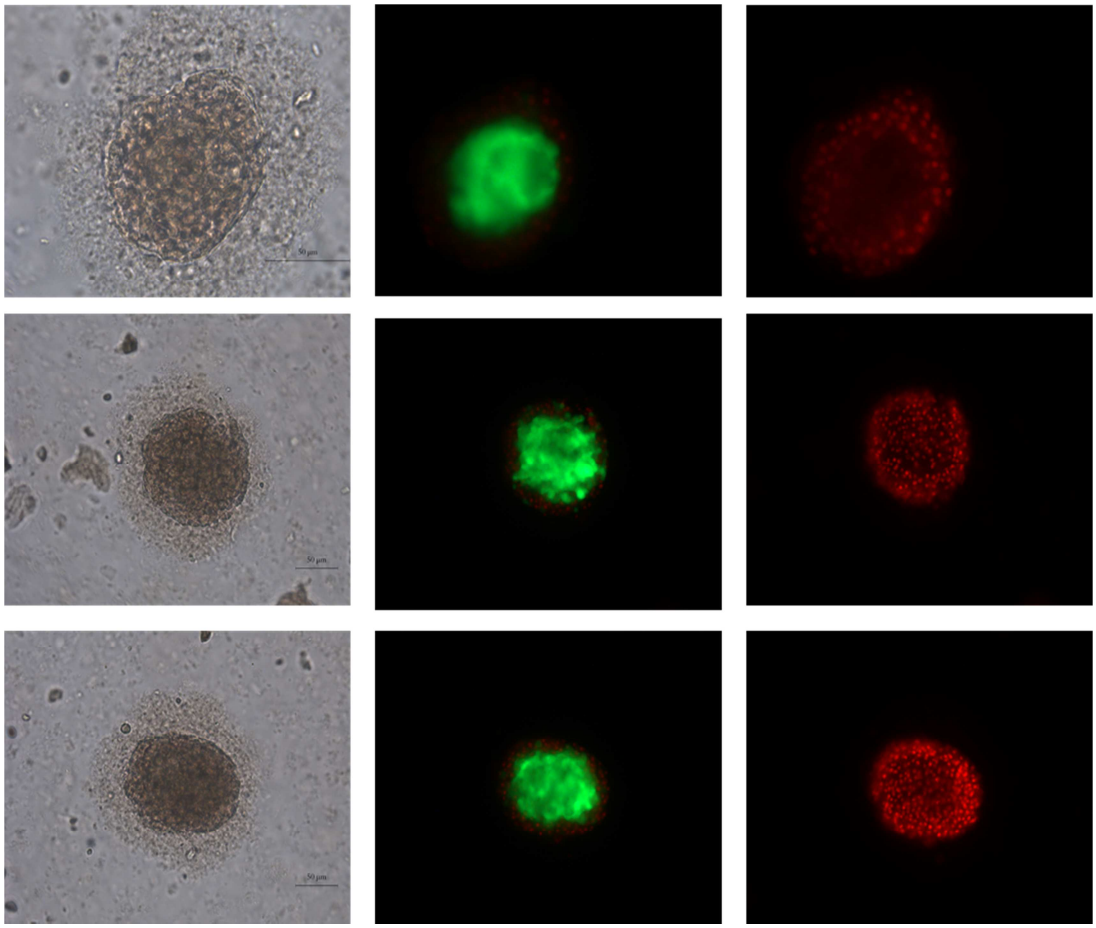
Şekil 4-13 İzole edilen kontrol grubu adacık görüntüleri (t=0)



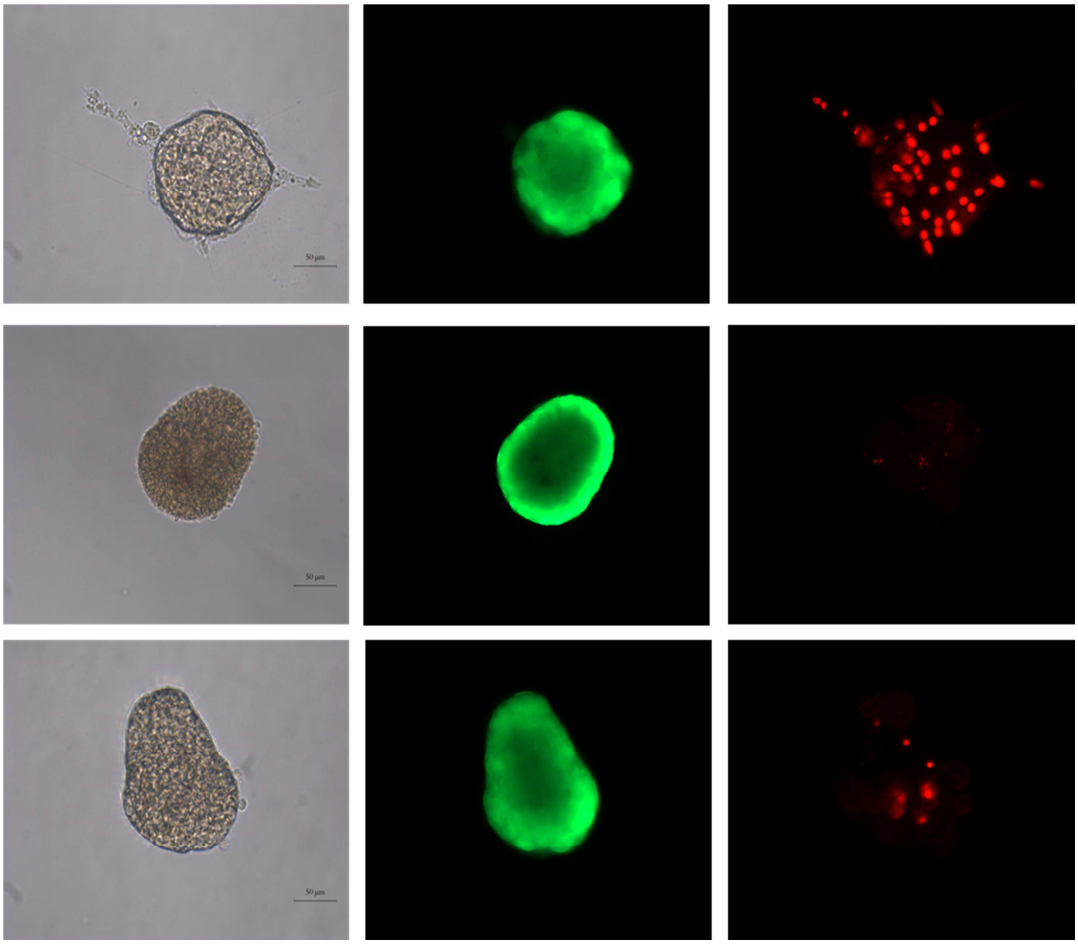
Şekil 4-14 15 mM Fmoc-FF hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat)



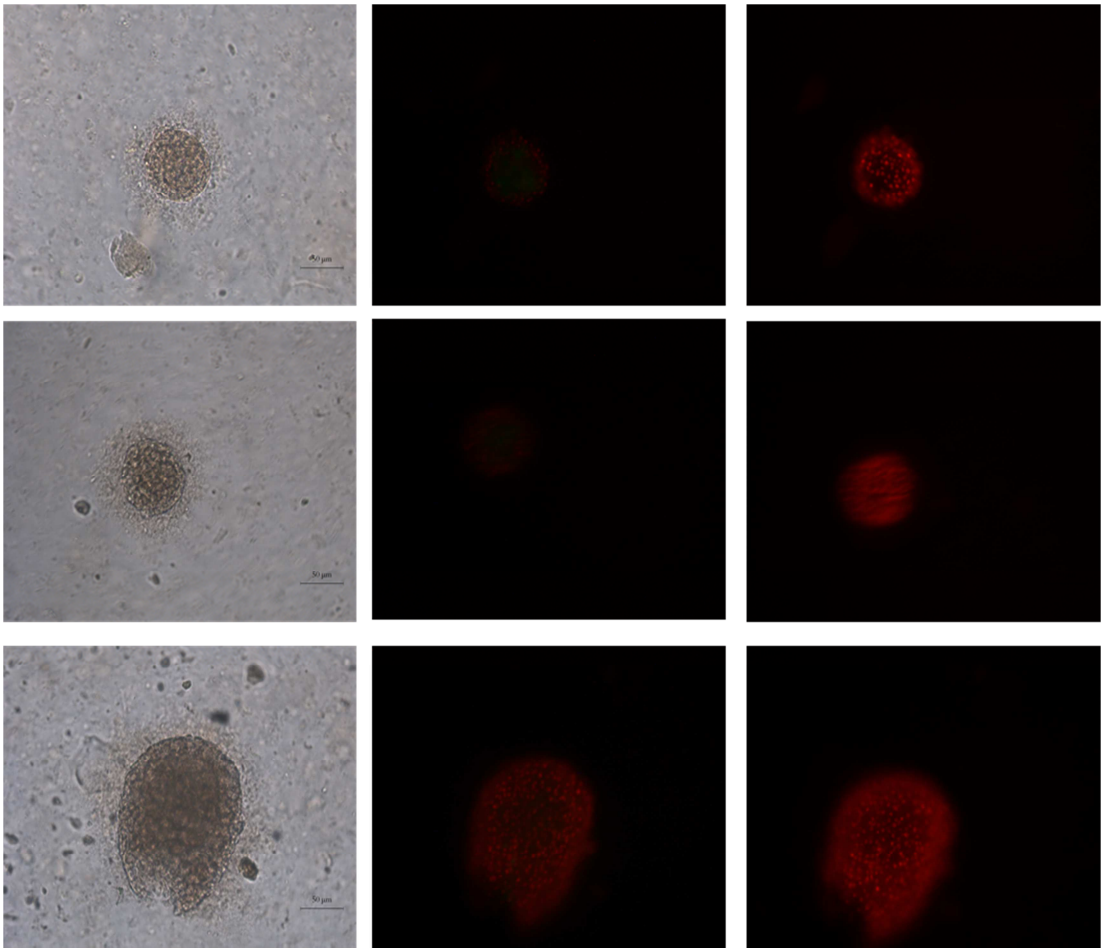
Şekil 4-15 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=2 saat)



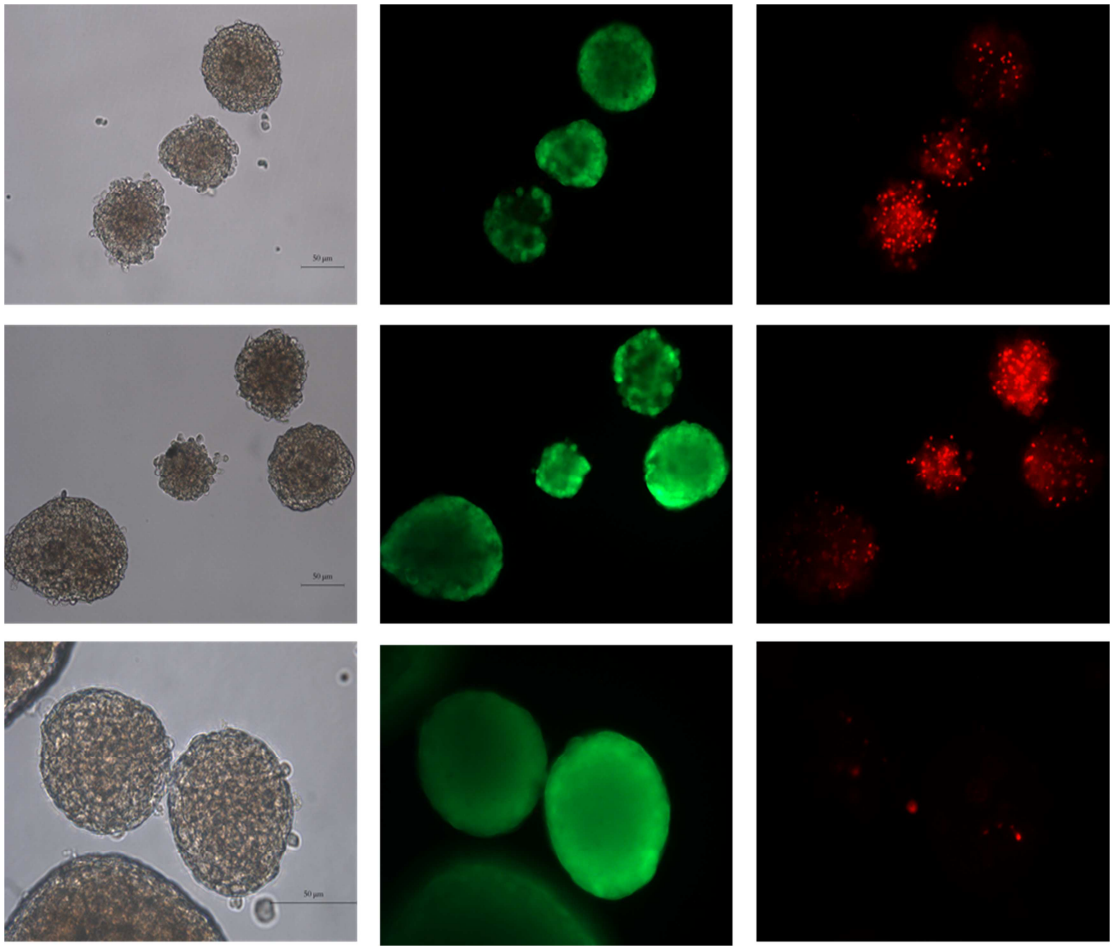
Şekil 4-16 15 mM Fmoc-FF hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)



Şekil 4-17 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)

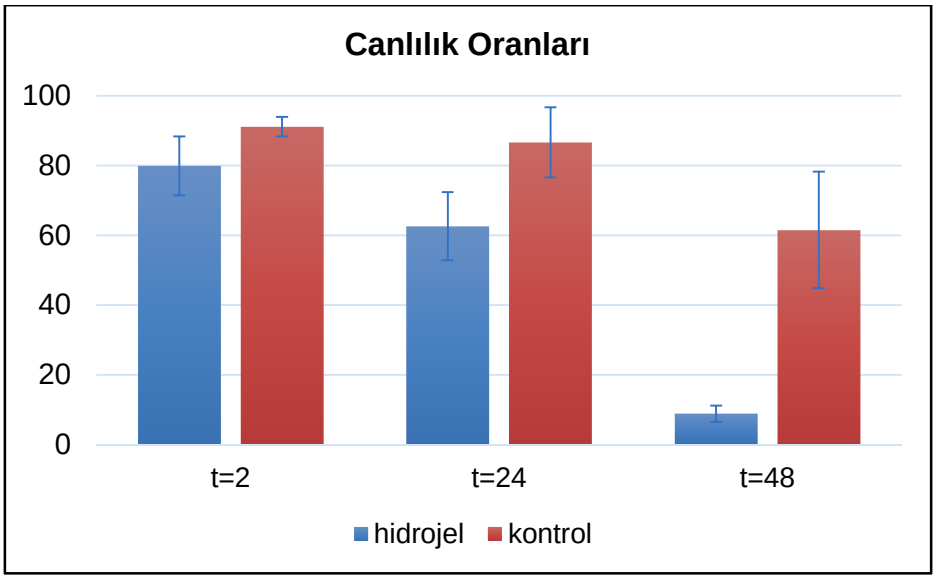


Şekil 4-18 15 mM Fmoc-FF hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat)



Şekil 4-19 Kaplama yapılmamış kontrol adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=48 saat)

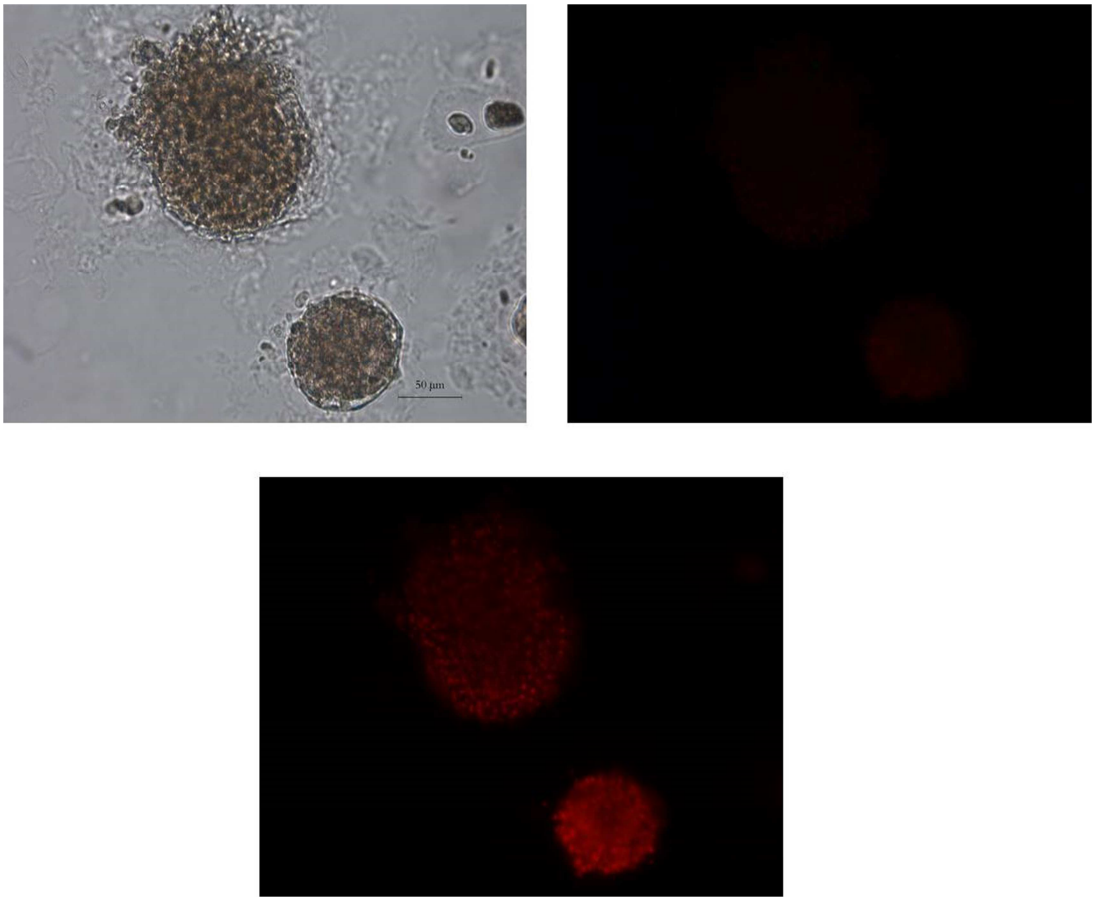
Elde edilen görüntüler üzerinden gerçekleştirilen hesaplama sonrasında kontrol grubunda 24. saatte %5, 48. saatte %32'lik düşüş; hidrojel grubunda ise 24. saatte %21, 48. saatte ise %89 düşüş olmuştur (Şekil 4-20). 48. saatteki düşüşün hidrojellerin kurumasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür ve ileri dönemdeki deneylerde jelleşme sonrası günlük taze besi yeri eklenmesiyle deneylere devam edilmesi sonucuna varılmıştır.



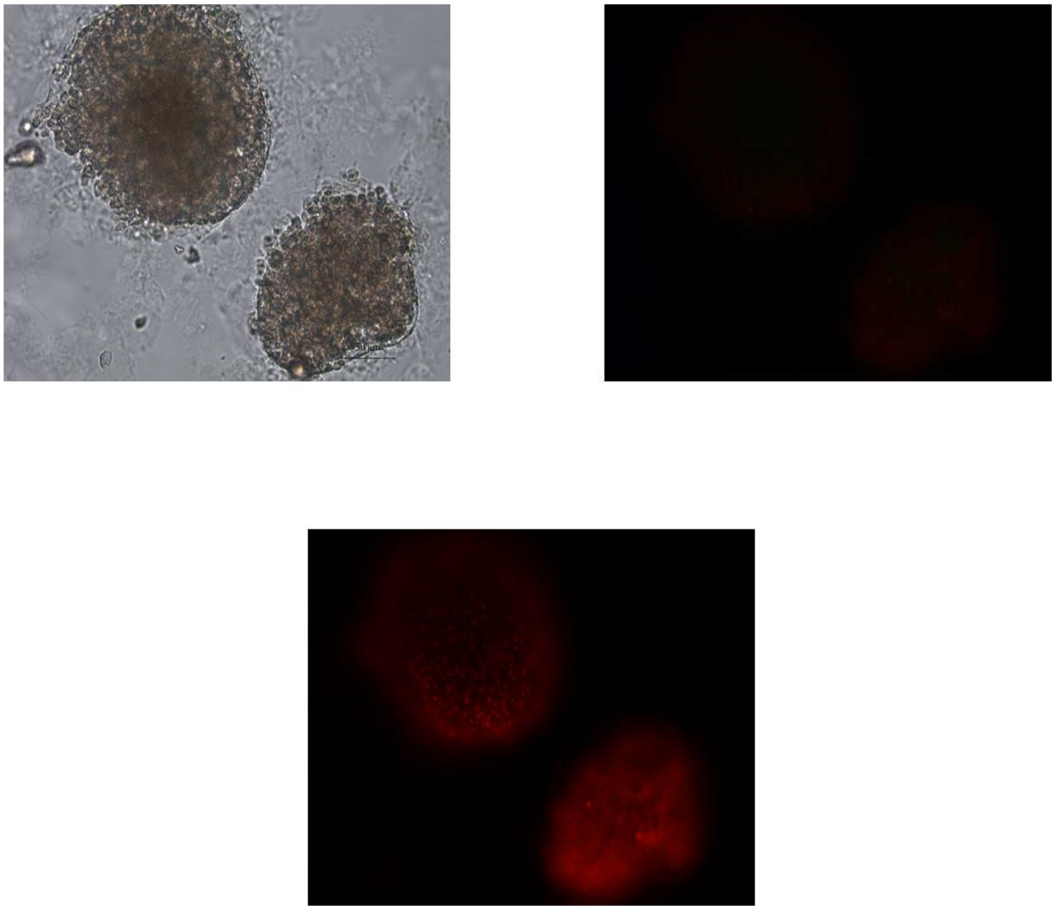
Şekil 4-20 Kontrol grubu ve Fmoc-FF hidrojeli uygulanan adacık hücresi canlılık oranları grafiği

4.5.4. Fmoc-FF/Fmoc-RGD Hidrojeli İçerisindeki Adacık Canlılık Oranları

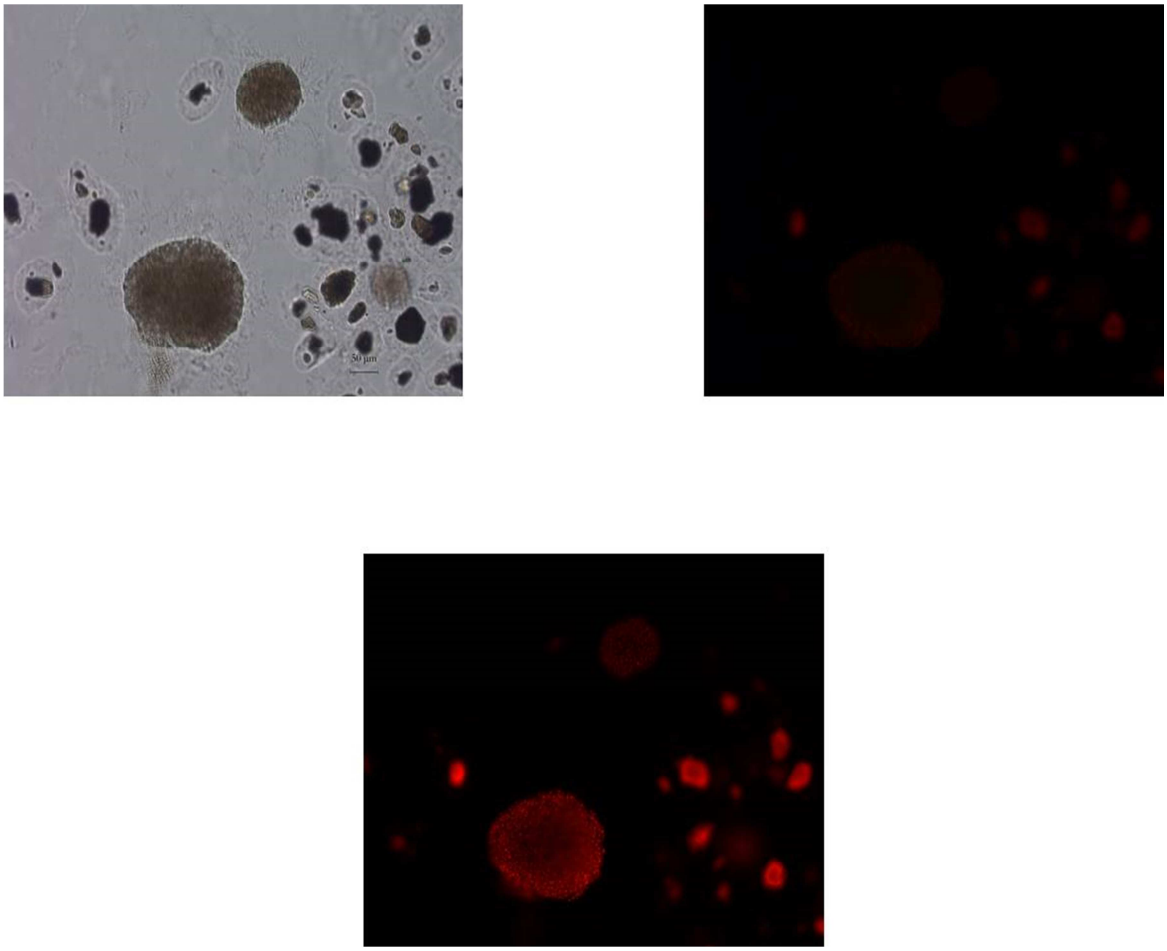
İzole edilen adacık hücreleri üzerine %10, 20 ve 30 Fmoc-RGD içerecek şekilde hazırlanan Fmoc-FF/Fmoc-RGD solüsyonlarının jel formları uygulanmıştır. Protokolde belirtildiği üzere Fmoc-RGD solüsyonu pH değeri 10 olarak ayarlanarak adacık hücrelerine uygulanmış ve sonrasında Fmoc-FF solüsyonu (pH=3) eklenerek nötrleşme ve jel oluşumu gerçekleştirilmiştir. Önceki çalışmalarda elde edilen jelde kuruma gözlenmesi nedeniyle, 2. saatte 500 µL daha besiyeri eklenmiş ve 24. saatteki adacık canlılık görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4-21/24). Görüntülerdeki yeşil floresan ışıma canlı hücreleri ve kırmızı ışıma ölü olanları göstermektedir.



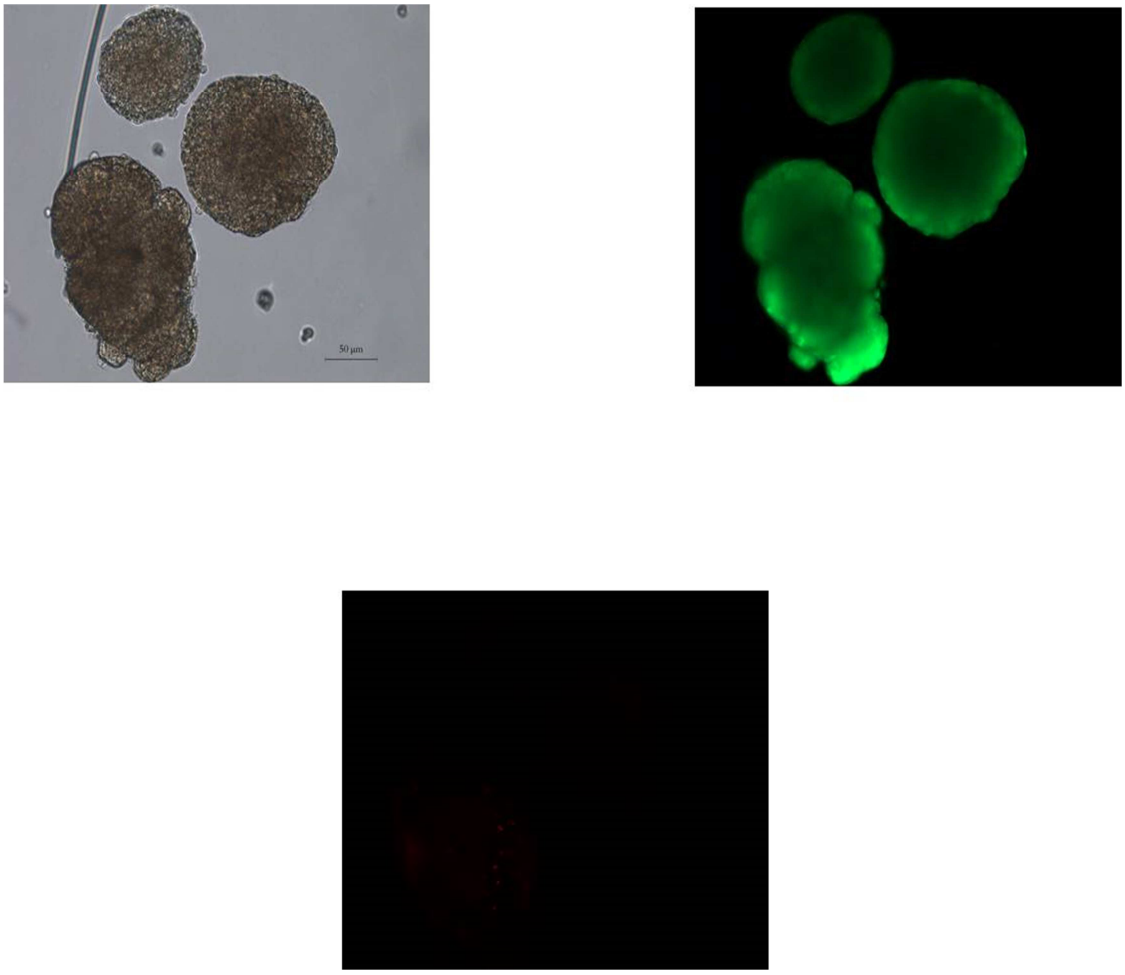
Şekil 4-21 %10 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)



Şekil 4-22 %20 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)



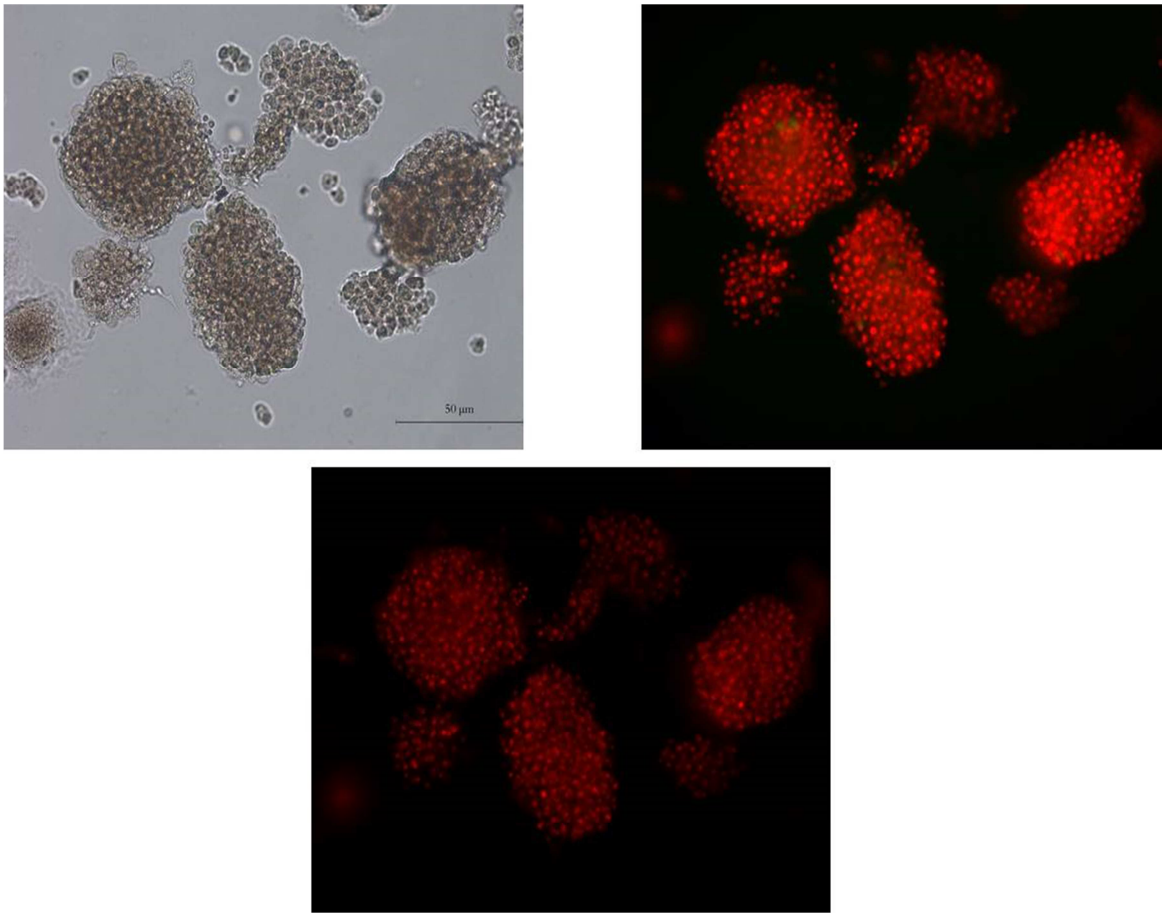
Şekil 4-23 %30 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)



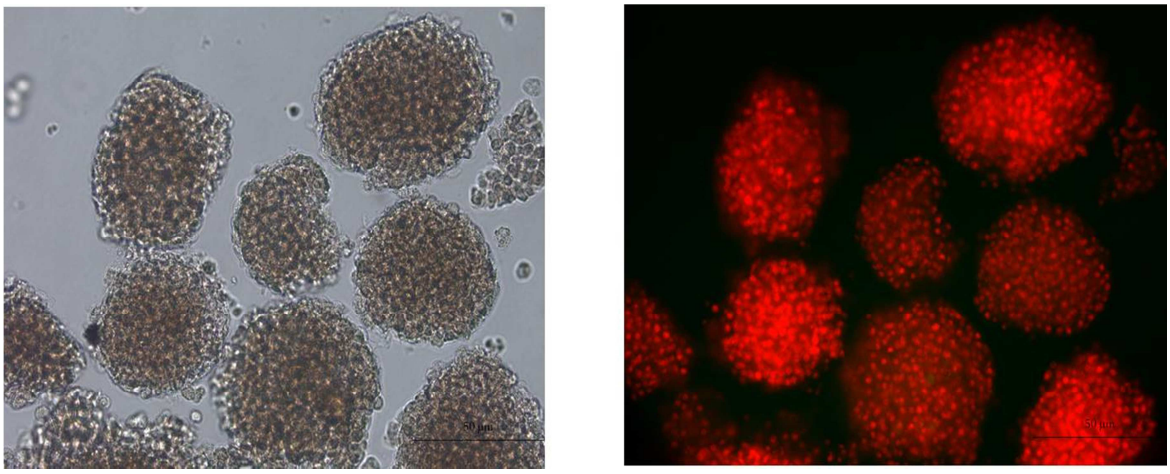
Şekil 4-24 Kaplama yapılmamış kontrol grubu adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)

Yukarıda verilen sonuçlar doğrultusunda istenen canlılık oranı elde edilemeyen peptit kaplı hücrelerin deneylerinin tekrarlanmasına karar verilmiştir.

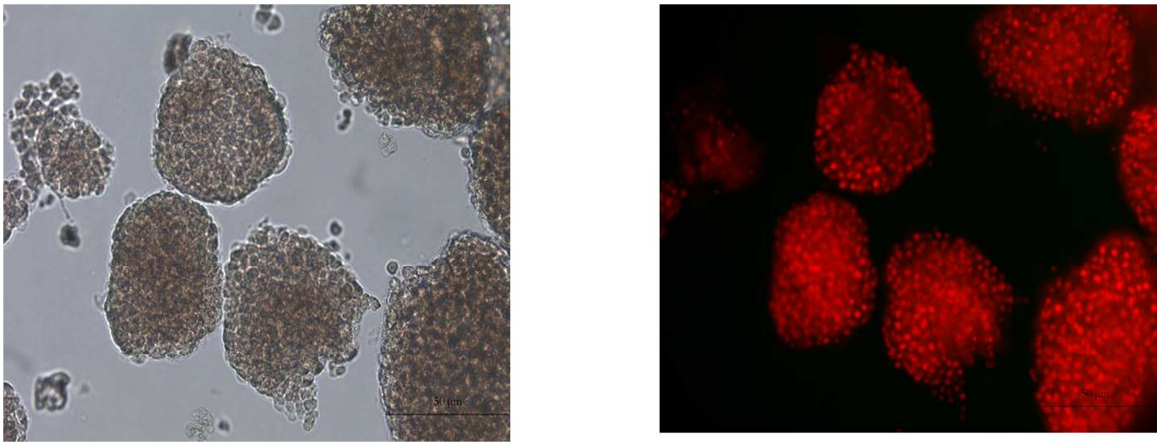
Adacık hücrelerinin naifliği nedeniyle bazik pH'da kaybedildiği düşünülen adacık hücrelerinin canlılık oranını artırmak için tekrarlanan çalışmada öncelikle jel oluşumu sağlanıp, jelin RPMI solüsyonu ile 2 defa yıkandıktan sonra adacık hücrelerinin eklenmesi kararlaştırılmıştır. %10, 20 ve 30 oranında Fmoc-RGD içerecek şekilde hazırlanan solüsyonlar kuyucuklara aktarılıp 30 dk. bekleme sonrası jelleşme görüldükten sonra RPMI solüsyonu ile 2'şer defa jeller yıkanmış ve sonrasında 500 µL adacık hücresi eklenmiştir. Sonrasında 2 mL RPMI besiyeri eklendikten sonra 24. saatteki canlılık değerlerine bakılmıştır.



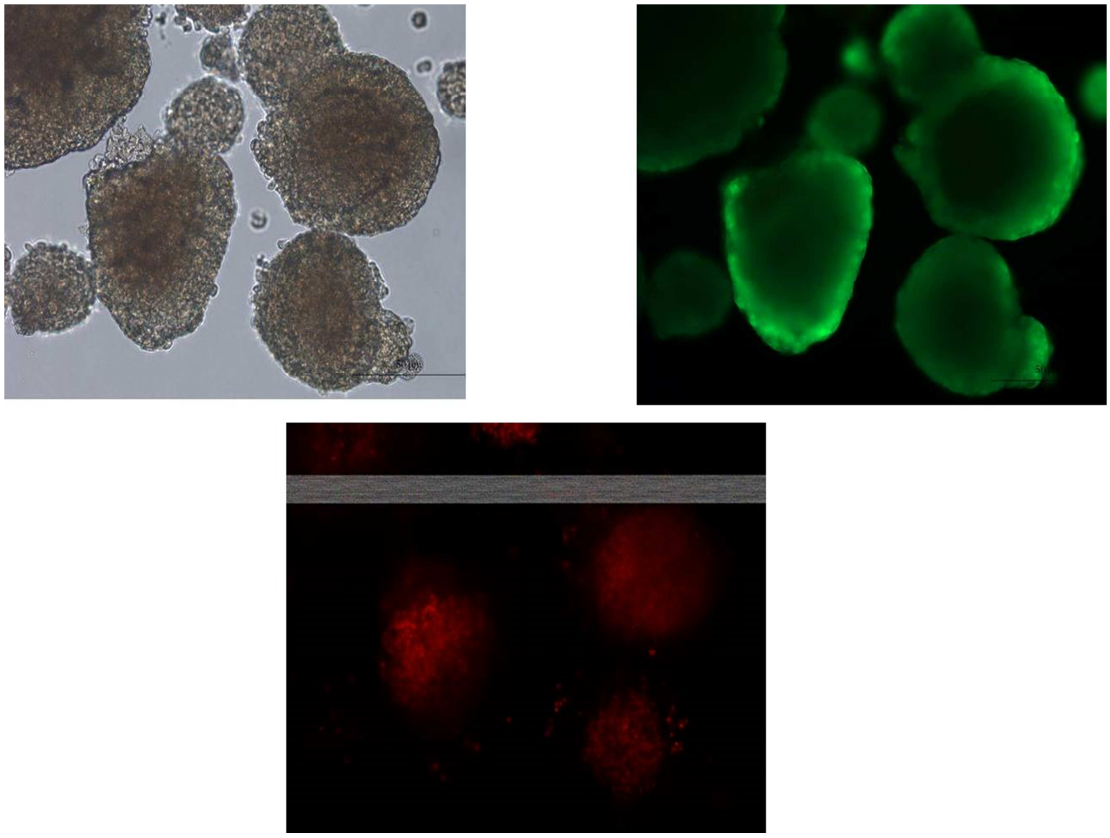
Şekil 4-25 %10 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)



Şekil 4-26 %20 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)

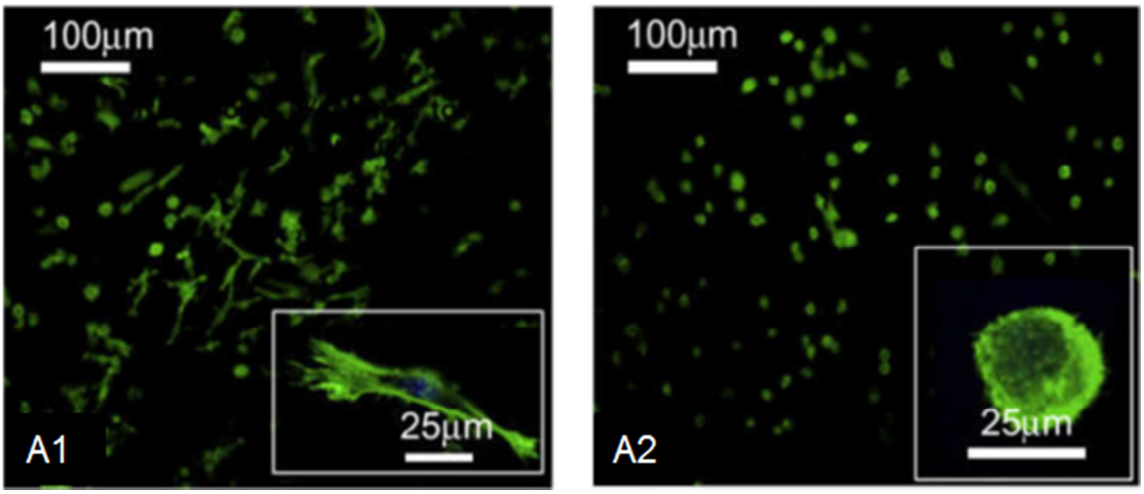


Şekil 4-27 %30 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)



Şekil 4-28 Fmoc-FF/RGD hidrojeli içerisindeki kontrol grubu adacık hücresi canlılık testi görüntüleri (t=24 saat)

Fmoc-RGD/Fmoc-FF peptitlerinin kendiliğinden jelleşmeleri sonucunda gerçekleştirilen enkapsülasyon çalışmaları sonrasında canlılık oranları düşük bulunmuştur. RGD tripeptiti ile fonksiyonel hale getirilen Fmoc molekülünün hücre yüzeyi üzerindeki integrinler ile bağ oluşturduğu Zhou ve diğ. tarafından dermal fibroblastlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada gösterilmiştir (Şekil 4-29) [92]. A1 olarak verilen görüntüde RGD tripeptitine bağlanan dermal fibroblastların jelleşme ile birlikte morfolojilerine uygun olan şekle sahip oldukları, A2'de ise integrinler ile bağlantı sağlanamaması nedeniyle yuvarlak bir görünüme sahip oldukları görünmektedir. Bu durum jelleşme esnasında RGD sekansı ile bağlanan adacık hücre zarının strese maruz kalmış olabileceğini göstermektedir. Düşük canlılık oranının da naif yapıdaki adacık hücrelerinin yuvarlağa yakın doğal morfolojilerinin bozulması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4-29 Hücre yüzeyindeki a5b1 integrinleri bloke edilerek yapılan RGD-integrin bağlantı deneyleri, 20 saat inkübasyon sonucunda, bloke edilmemiş hücrelerin nanofiberler üzerinde yayıldığı (A1); bloke edilen hücrelerin ise yuvarlak şekilde kaldığı (A2) gözlemlenmiştir [92].

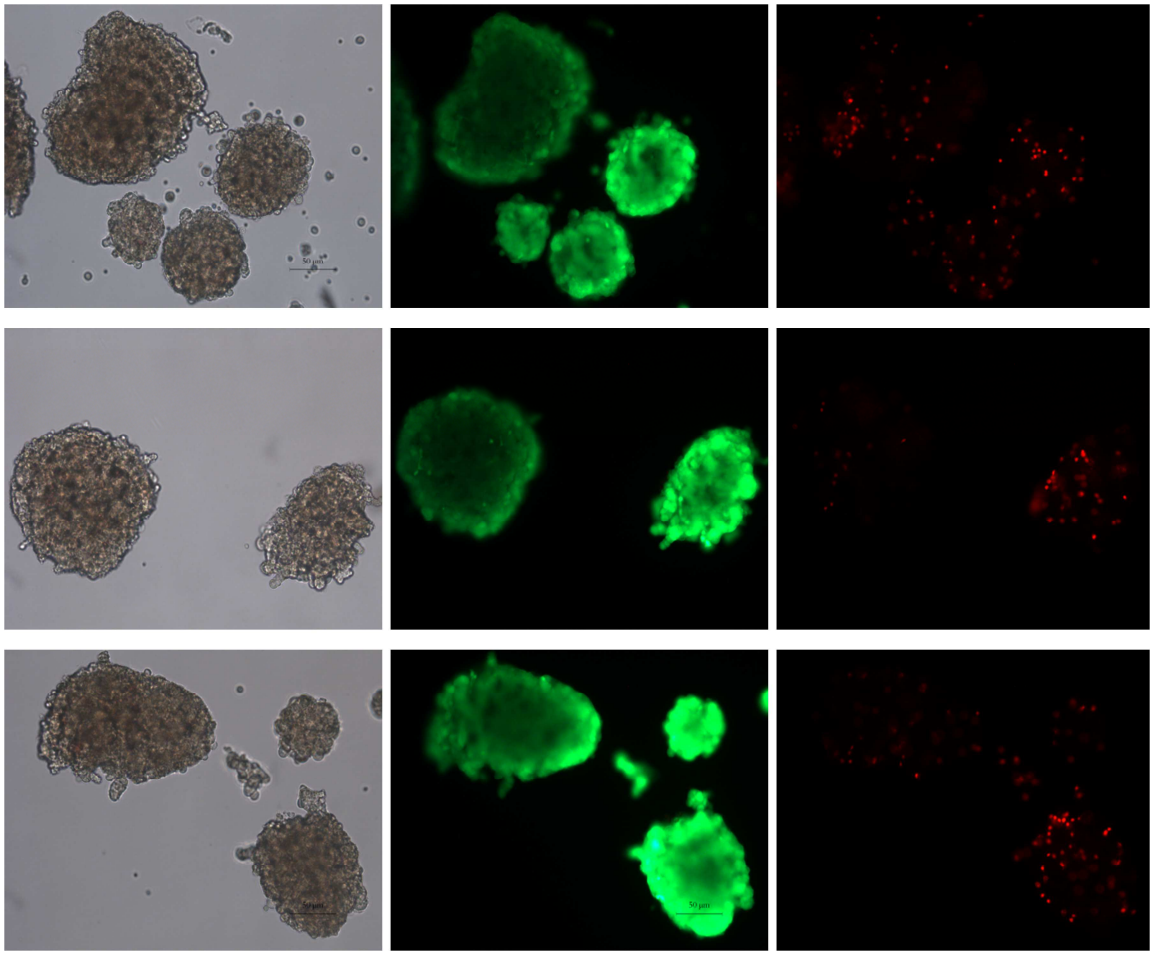
Kendiliğinden jelleşen peptitlerden olan Fmoc-FF/Fmoc-RGD ile adacık hücre uygulamasından in vitro aşamada beklenen canlılık oranı elde edilememiş olması nedeniyle ilerleyen aşamalara geçilememiştir.

4.6. Enkapsülasyon Membranlarının Karakterizasyonu

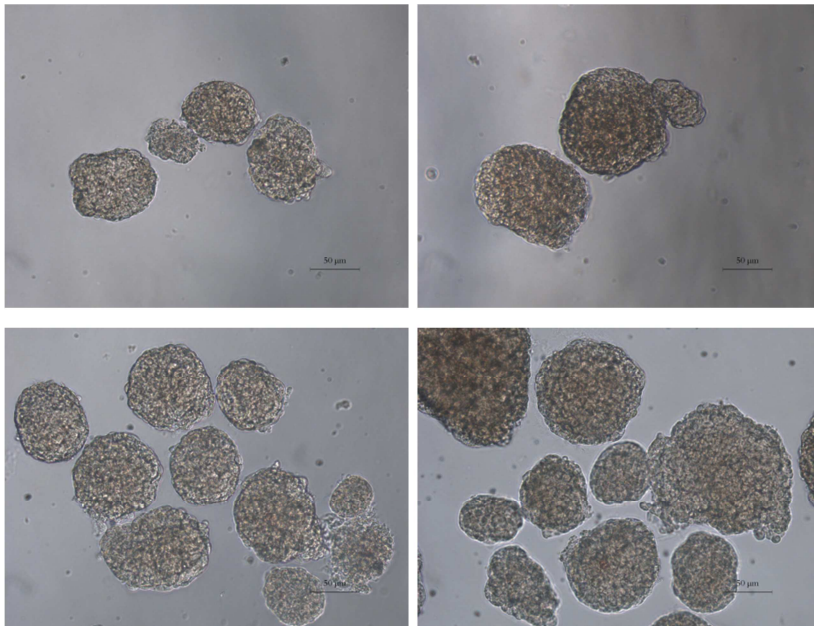
Aljinat-GRGDSP/kitosan kaplaması sonucunda istenen seviyede adacık hücre canlılığı elde edilmesi sonucunda, enkapsülasyon membranının kalınlığının tespit edilmesi ve çok katmanlı yapısının ortaya konması için SEM, TEM görüntüleri alınmış ve floresan mikroskop görüntüsüne imageJ programı ile analiz gerçekleştirilmiştir.

4.6.1. İzole Edilen Adacık Görüntüleri

Sıçanlardan izole edilen adacık hücrelerinin canlılıkları test edildikten sonra (Şekil 4-30), aljinat-G**RGD**SP/kitosan ile çok katmanlı konformal kaplama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon membranı karakterizasyon çalışmaları öncesi, 7 katmanlı kaplama gerçekleştirilen adacık hücrelerinden elde edilen ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4-31'de verilmiştir.



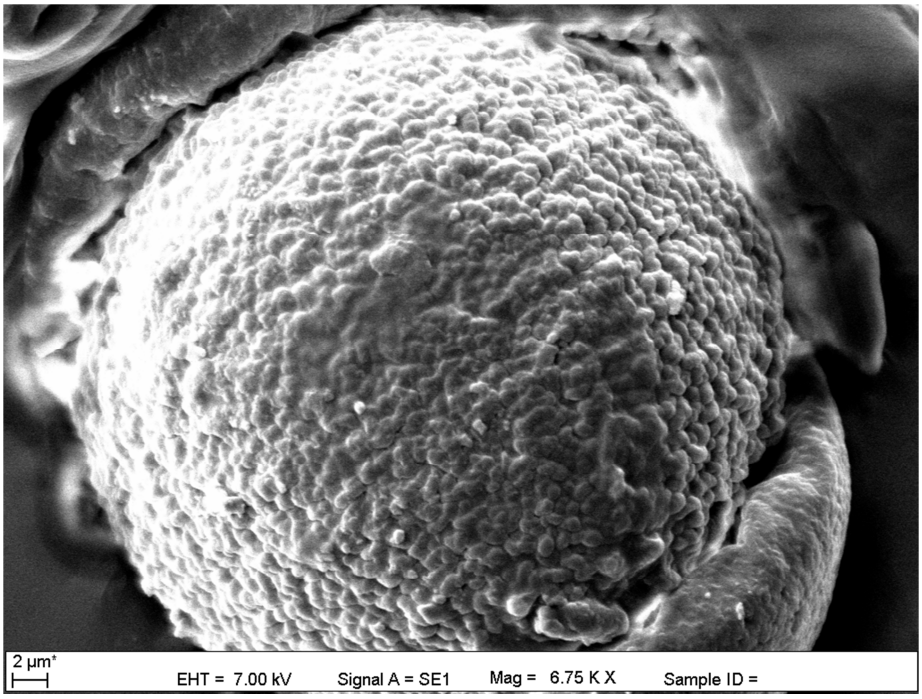
Şekil 4-30 İzole edilen adacık hücresi canlılık testi görüntüleri, yeşil floresan ışıma canlı hücreleri ve kırmızı ışıma ölü olanları göstermektedir.



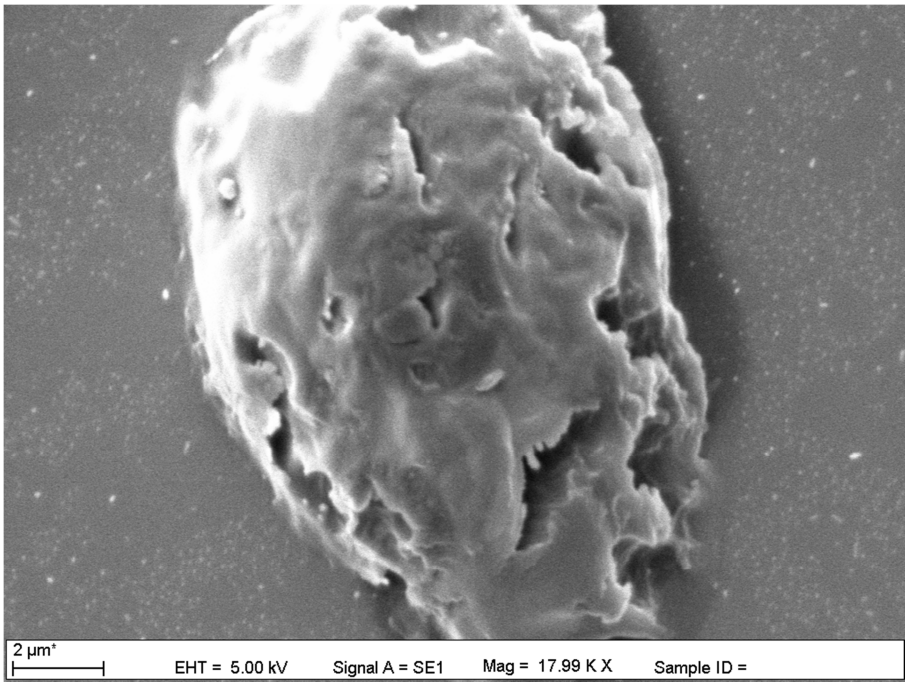
Şekil 4-31 Aljinat-GRGDSP/Kitosan çok katmanlı konformal kaplama (n=7) gerçekleştirilmiş adacık hücre görüntüleri

4.6.2. SEM ile Konformal Kaplamanın Görüntülenmesi

SEM fotoğrafları yakından incelendiğinde yaklaşık 5 µm kalınlığında olan numunelerden kontrol olarak adlandırılan ve adacık hücrelerinin kesitine yer verilen fotoğrafta (Şekil 4-32) hücreler homojen bir görüntü oluştururken diğer konformal kaplamanın gerçekleştirildiği hücre topluluklarında bu görüntü (Şekil 4-33) ortadan kaybolarak doğrudan kaplama malzemesi ile örtüldükleri anlaşılmaktadır. Ancak burada rastgele kesitler alınarak değerlendirme yapıldığından kaplama kalınlığı hakkında yine tam olarak kesin bir ifade kullanılamamasına rağmen SEM görüntülerinde kullanılan büyütme oranları ve fotoğraflarda yer alan skala barları dikkate alındığında kaplama kalınlığının mikron altı bölge olarak adlandırılan büyüklükte olduğu ifade edilebilmektedir.



Şekil 4-32 Kontrol adacık hücresi SEM görüntüsü

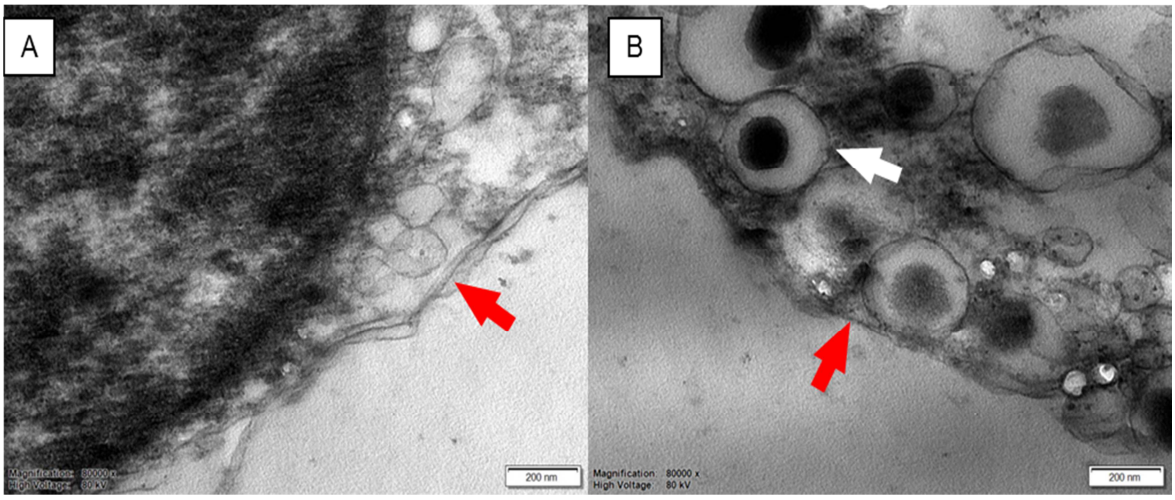


Şekil 4-33 Aljinat-GRGDSP/ Kitosan çok katmanlı (n=7) konformal kaplama SEM görüntüsü

4.6.3. TEM ile Konformal Kaplamanın Görüntülenmesi

Küme sınır hattı boyunca devam eden şeritler kırmızı ok ile gösterilmiştir ve kaplama yapısının sürekli olduğu görülmüştür. Elde edilen morfoloji literatürdeki görüntüler ile benzerlik göstermektedir [66]. TEM görüntüsünden kapsül kalınlığının 100 nm'nin altında olduğu görülmektedir. Beyaz ok ile işaret edilen kısım ise insülin keseciklerini göstermekte olup kaplama işlemi sonucunda

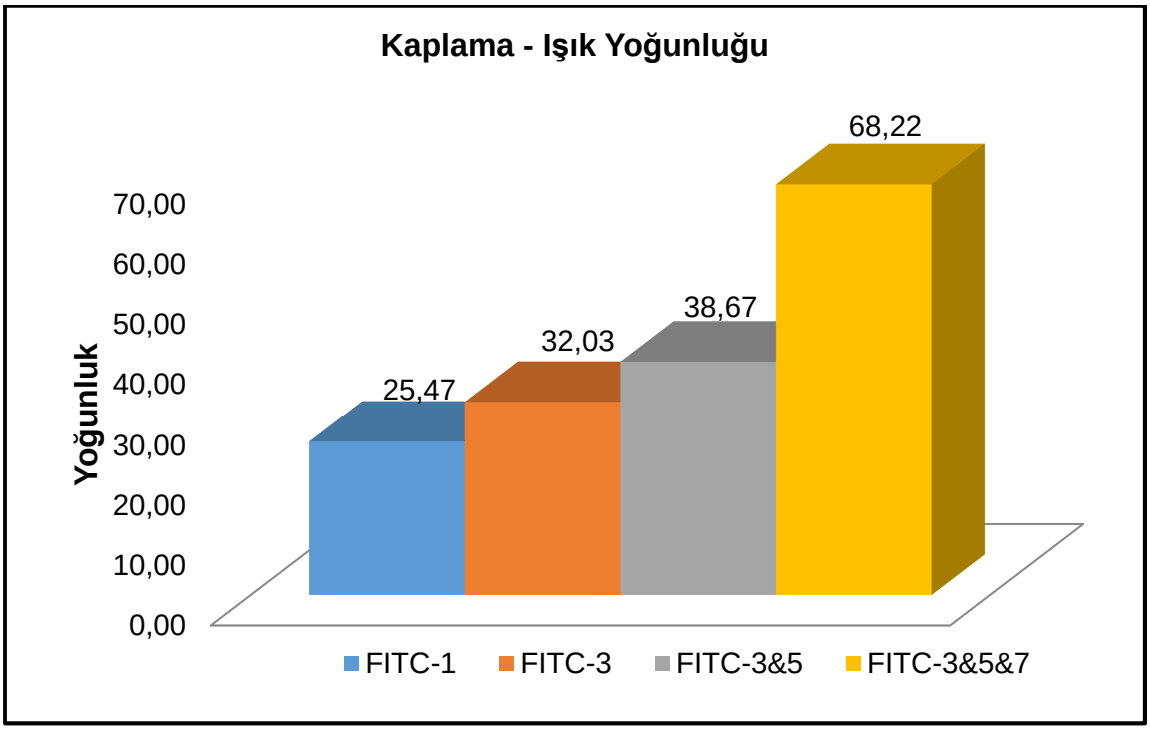
keseciklerin zarar görmediğini ispatlamaktadır (Şekil 4-34).



Şekil 4-34 A ve B. 80.000X büyütmede elde edilen kaplanmış hücre görüntüleri

4.6.4. FITC İşaretli Kitosan ile Kaplamanın Doğrulanması

FITC işaretli kitosanın kullanıldığı kaplamanın 1, 3, 5 ve 7. katmanında ışıma elde edilmiştir. Floresan mikroskop altında elde edilen görüntülerindeki ışık yoğunluğu imageJ programı yardımıyla karşılaştırılmıştır (Şekil 4-35). Yoğunluğun giderek artması katmanlar halinde kaplamanın başarıyla gerçekleştirildiğini göstermiştir.



Şekil 4-35 Artan sayıdaki FITC işaretli kitosan ile kaplama sonucunda elde edilen ışık yoğunluğu (ortalama gri seviye değeri) grafiği

4.7. Enkapsüle Hücrelerin Fizyolojik İncelemeleri

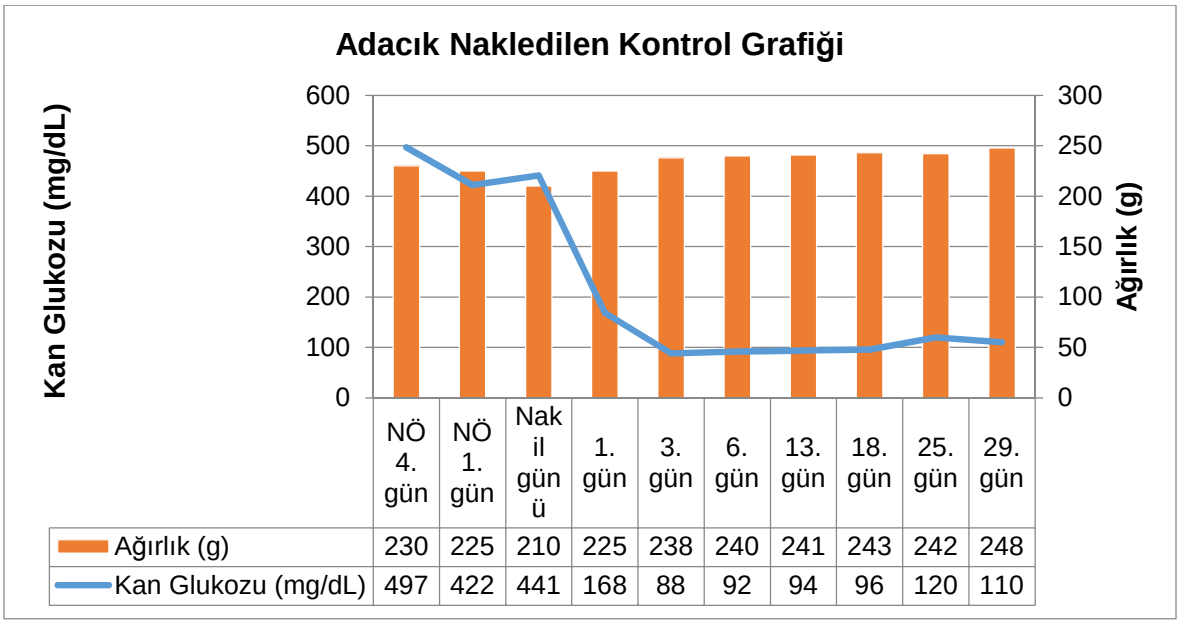
Adacık hücrelerine kaplama öncesinde uygulanan fonksiyonel analizler, aljinat-G**RGD**SP/kitosan (n=7) enkapsülasyonu sonrasında da uygulanarak insülin salım kinetiklerinin başarı ile devam edip etmediği araştırılmıştır. 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen fonksiyonel analiz testinde 24. saat düşük ve yüksek glukoz stimülasyonu uygulanmıştır (Çizelge 4-5). Elde edilen sonuçlar, enkapsülasyondan 1 gün sonra in vitro ortamda adacık hücrelerinin düşük ve yüksek orandaki glukoz stimülasyonuna kabul edilebilir oranda cevap verdiğini göstermektedir.

Çizelge 4-5 Aljinat-G**RGD**SP/kitosan (n=7) çok katmanlı kaplama sonrası insülin salım testleri ve stimülasyon indeksi değerleri

Yüksek Glukoz Stimülasyon Testi				
Kontrol	24.saat 1	161,68	162,03	102,78
		162,37		
	24.saat 2	53,81	56,47	
		59,14		
	24.saat 3	95,96	89,83	
		83,70		
Aljinat - G**RGD**SP / Kitosan	24.saat 1	96,31	97,85	73,13
		99,39		
	24.saat 2	60,79	68,61	
		76,43		
	24.saat 3	51,73	52,94	
		54,14		
Düşük Glukoz Stimülasyon Testi				
Kontrol	24.saat 1	7,90	8,39	16,50
		8,88		
	24.saat 2	12,38	12,62	
		12,86		
	24.saat 3	28,95	28,49	
		28,04		
Aljinat - G**RGD**SP / Kitosan	24.saat 1	9,03	9,31	6,99
		9,59		
	24.saat 2	5,39	5,60	
		5,81		
	24.saat 3	5,58	6,06	
		6,53		
Stimülasyon İndeksi (Yüksek/Düşük)				
24.saat kontrol			6,23	
24.saat aljinat			10,47	

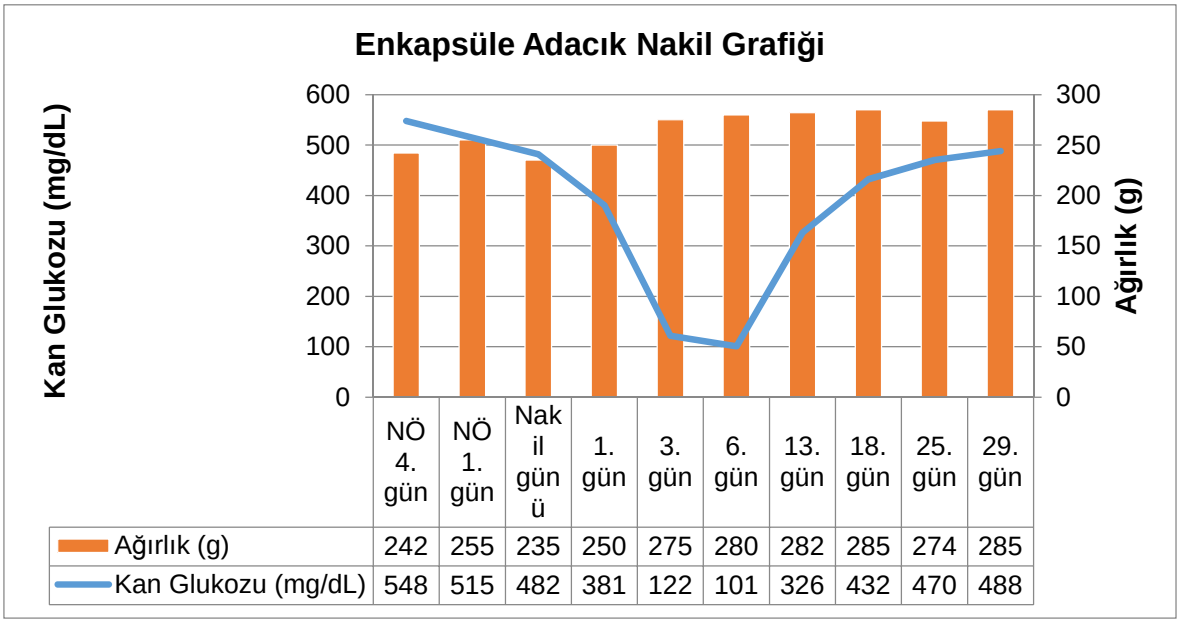
4.8. İn Vivo Ön Çalışmalar

Enkapsüle adacık hücrelerinin nakil sonrası bağışıklık sistemi ajanlarına karşı koruma sağlayıp sağlamadığının araştırılması amacıyla allotransplantasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Sıçandan izole edilen adacık hücresinin STZ ile diyabet oluşturulmuş sıçanlara nakledilmesi sonrası, enkapsülasyon gerçekleştirilmeyen kontrol grubunda 29 gün boyunca hipergliseminin geri çevrildiği görülmüştür (Şekil 4-36).



Şekil 4-36 Kaplama yapılmamış adacık hücresi nakli sonrası diyabetik sıçan kan glukoz seviyesi

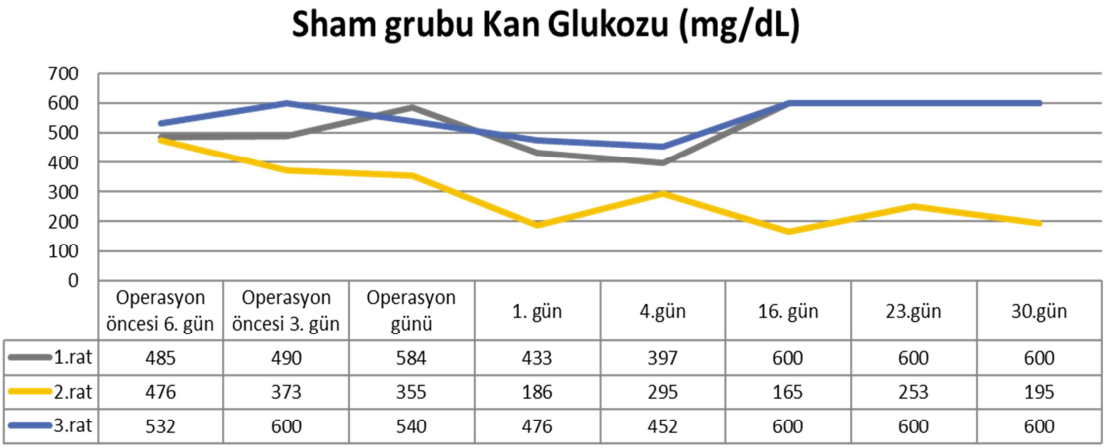
Aljinat-G**RGD**SP/kitosan ile çok katmanlı (n=7) konformal kaplama gerçekleştirilen adacık hücrelerinin nakli sonrasında ise diyabetik sıçan kan glukoz seviyesinin 13 güne kadar normoglisemik değerler içerisinde olduğu görülmüştür (Şekil 4-37).



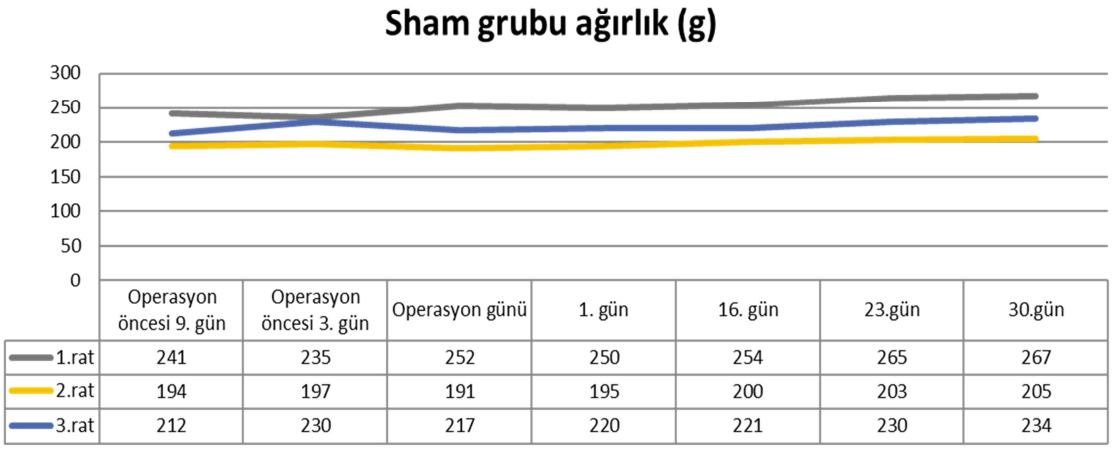
Şekil 4-37 Aljinat-G**RGD**SP/kitosan ile çok katmanlı (n=7) kaplanan adacık hücresi nakli sonrası diyabetik sıçan kan glukoz seviyesi

Diyabet oluşturulan sıçanlara sadece serum fizyolojiğin uygulandığı sham ile herhangi bir uygulamanın gerçekleştirilmediği diyabet gruplarında, 1 sıçan haricinde kan şekeri seviyesinde düşüş gerçekleşmediği görülmüştür (Şekil 4-38,39). Kan şekeri seviyesinde düşüş görülen sıçanda ise operasyon öncesi kan

glukoz seviyesinin düşmekte olması bu değerin göz ardı edilmesine sebep olmuştur.

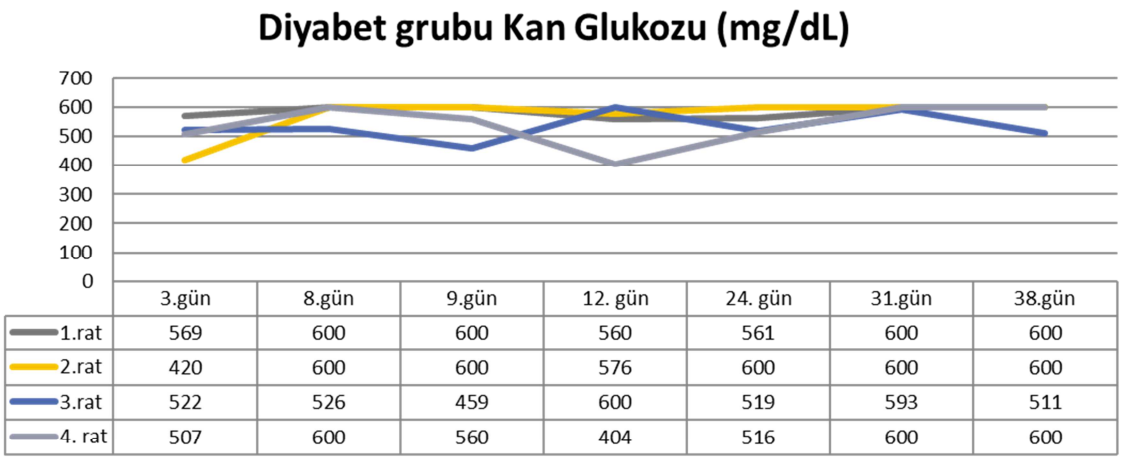


	Operasyon öncesi 6. gün	Operasyon öncesi 3. gün	Operasyon günü	1. gün	4.gün	16. gün	23.gün	30.gün
1.rat	485	490	584	433	397	600	600	600
2.rat	476	373	355	186	295	165	253	195
3.rat	532	600	540	476	452	600	600	600

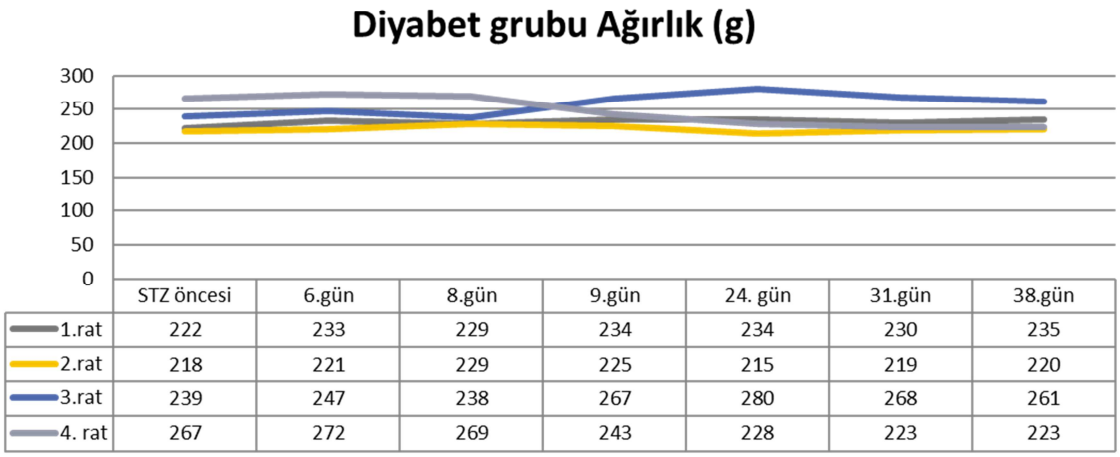


	Operasyon öncesi 9. gün	Operasyon öncesi 3. gün	Operasyon günü	1. gün	16. gün	23.gün	30.gün
1.rat	241	235	252	250	254	265	267
2.rat	194	197	191	195	200	203	205
3.rat	212	230	217	220	221	230	234

Şekil 4-38 Sham grubu kan glukoz seviyesi ve ağırlık takibi



	3.gün	8.gün	9.gün	12. gün	24. gün	31.gün	38.gün
1.rat	569	600	600	560	561	600	600
2.rat	420	600	600	576	600	600	600
3.rat	522	526	459	600	519	593	511
4. rat	507	600	560	404	516	600	600



	STZ öncesi	6.gün	8.gün	9.gün	24. gün	31.gün	38.gün
1.rat	222	233	229	234	234	230	235
2.rat	218	221	229	225	215	219	220
3.rat	239	247	238	267	280	268	261
4. rat	267	272	269	243	228	223	223

Şekil 4-39 Diyabet grubu kan glukoz seviyesi ve ağırlık takibi

Tez çalışmasında transplantasyon sonrası enkapsüle adacık hücrelerinin immün sistem saldırısından ne kadar süre ile korunabildiğinin gösterilmesi ve fonksiyonelliğinin araştırılması planlanmıştır. Daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda enkapsüle edilmemiş adacık hücrelerinin sıçanlar arasındaki allotransplantasyonu sonrasında kısa süreli ömürlerinin olduğu gösterilmiş olmakla birlikte, diğer sinjeneik adacık nakil çalışmalarına benzer şekilde, 30 günün üzerinde canlılık ve fonksiyonellik gösteren nakiller de yer almaktadır [152]. Kaplama gerçekleştirilmeyen adacık hücrelerinin canlılıklarını daha uzun süre korumaları, enkapsüle adacık hücrelerinin koagülasyon sonucu apoptoza gittiklerini düşündürtmüştür. Koagülasyon sonucunda aktif hale gelen plateletler enkapsüle adacık hücrelerine bağlanarak pıhtı oluşumuna sebep olabilmektedirler. Pıhtı oluşumu ile birlikte kaplama materyalinin etrafında biriken protein tabakasında (fibrinojen vb.) C5a gibi kompleman sistem ajanları tutunarak lökositlerin aktivasyonunda görev almaktadırlar. Enflamatuvar yanıt nedeniyle

aktive olan makrofajlardan salınan küçük boyutlu aktif metabolitler (NO, O2-, H2O2 vb.) ve sitokinler, kaplama membranından geçerek adacık hücrelerinin apoptoza gitmesine neden olabilmektedir. Zarar gören adacık hücreleri tarafından kapsül dışına salınan hücre komponentleri ve DAMPs'lar, PRRs tarafından tanınarak sitokin salımını daha da artırabilmektedir. Kaplama materyaline karşı gelişen bu yanıtın engellenebilmesi için en dış yüzeyde polianyonik aljinat polimeri yer alacak şekilde 7 katmanlı enkapsülasyon tekniği oluşturulmuştur. Ancak, enkapsüle adacık nakli yapılan grubun daha kısa süre normoglisemi sağlaması; koagülasyon ajanları ile makrofaj, T-hücresi gibi immün sistem ajanlarıyla protein-protein etkileşiminin yeterli düzeyde engellenemediğini göstermiştir. Ön çalışma olarak tasarlanan in vivo uygulamalar sonucunda antikoagulasyon ajanları ve immün yanıt oluşumunu engelleyebilecek ajanlar ile modifiye edilmiş kaplamaların kullanılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

5. SONUÇLAR

T1DM hastalığının tedavisinde kullanılan güncel yaklaşım enkapsüle adacık hücrelerinin transplantasyonudur. Bu sayede cerrahi operasyon boyutu en aza indirilerek uzun süreli ve yüksek hasta uyumunun sağlandığı bir tedavi ortaya konulması hedeflenmektedir. Nakli gerçekleştirilecek adacık hücrelerinin fizyolojik şartlarını taklit eden ve immün sistem ajanlarından en üst seviyede koruma sağlayabilen kaplama materyallerinin geliştirilmesinde nanoteknolojik uygulamalar ön plana çıkmaya başlamıştır. Tez çalışması kapsamında kendiliğinden jelleşen peptitler olan Fmoc-FF/RGD kombinasyonu ile çok katmanlı aljinat-RGD/kitosan konformal kaplama yöntemleri uygulanmıştır.

Toplam kaplama kalınlığı 100 nm'nin altında 7 katmanlı aljinat-G**RGD**SP/kitosan kaplama çalışmasının in vitro deney sonuçları başarı ile elde edilmiştir. Çok katmanlı kaplamanın elde edildiği mikroskop görüntülerinin imageJ programı ile analizi sonucu kanıtlanmış, elektron mikroskop görüntülerinde ise adacık hücrelerine nano kalınlıktaki kaplamanın gerçekleştirildiği ve insülin granüllerinin bütünlüğünü koruduğu gösterilmiştir. Adacık hücrelerinin kaplama sonrası fizyolojik özelliklerini taşıyıp taşımadıklarına yönelik gerçekleştirilen canlılık ve glukoz stimülasyonu deneylerinde de başarılı sonuçlar alınmıştır.

İn vivo ön çalışmalar aşamasında sıçandan izole edilen adacık hücreleri, tez kapsamında geliştirilen aljinat-G**RGD**SP/kitosan polimer çifti ile kaplanarak, yine sıçan portal veninden karaciğere nakledilmiştir. Enkapsüle yapılmayan adacık nakli gerçekleştirilen kontrolde kan glukoz seviyesinin 29 gün boyunca normoglisemi seviyesinde kaldığı gözlenmiştir. Aljinat-G**RGD**SP/kitosan polimer çifti ile kaplanan adacık hücreleri ile gerçekleştirilen nakil çalışması sonucunda ise kan glukoz seviyesinin 13 gün sonunda yükseldiği görülmüştür.

Tez çalışmasındaki kan şekeri seviyesinin 1 ay boyunca normal seviyede tutulması hedefinin elde edilememiş olmasına, koagülasyon ile başlayan enflamatuvar yanıtın ve gelişen immün yanıtın neden olduğu düşünülmüştür. Aljinat-G**RGD**SP/kitosan çok katmanlı kaplama gerçekleştirilen adacık hücrelerinin nakli sonrasında oluşan enflamasyon nedeniyle aktif hale gelen bağışıklık sistemi elemanları, adacık hücrelerinin canlı ve fonksiyonel kalma süresini kısaltabilmektedir. Tüm bunlarla birlikte tez kapsamında elde edilen

nanoenkapsülasyon materyali, ileri fonksiyonelleştirme aşamalarıyla elde edilebilecek BYP uygulamaları için temel çalışma özelliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

[1] I. D. Federation. (2016). Available: http://www.diabetesatlas.org/across-the-globe.html

[2] "Abstracts of the 47th Annual Meeting of the EASD, Lisbon 2011," *Diabetologia,* vol. 54, pp. 1-542, **2011**.

[3] T. L. Van Belle, K. T. Coppieters, and M. G. Von Herrath, "Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology, and Therapeutic Strategies," *Physiological Reviews,* vol. 91, pp. 79-118, Jan **2011**.

[4] N. S. Papaspyros, *The History of Diabetes*: George Thieme Verlag, Stuttgart, **1964**.

[5] K. Hermansen, P. Fontaine, K. K. Kukolja, V. Peterkova, G. Leth, and M.-A. Gall, "Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with Type 1 diabetes," *Diabetologia,* vol. 47, pp. 622-629, **2004**.

[6] S. J. Cleland, B. M. Fisher, H. M. Colhoun, N. Sattar, and J. R. Petrie, "Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks?," *Diabetologia,* vol. 56, pp. 1462-1470, **2013**.

[7] M. Lepore, S. Pampanelli, C. Fanelli, F. Porcellati, L. Bartocci, A. Di Vincenzo*, et al.*, "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous injection of long-acting human insulin analog glargine, NPH insulin, and ultralente human insulin and continuous subcutaneous infusion of insulin lispro," *Diabetes,* vol. 49, pp. 2142-2148, 2000-12-01 00:00:00 **2000**.

[8] B. W. Bode, H. T. Sabbah, T. M. Gross, L. P. Fredrickson, and P. C. Davidson, "Diabetes management in the new millennium using insulin pump therapy," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews,* vol. 18, pp. S14-S20, **2002**.

[9] P. Raskin, L. Klaff, R. Bergenstal, J. P. Hallé, D. Donley, and T. Mecca, "A 16-week comparison of the novel insulin analog insulin glargine (HOE 901) and NPH human insulin used with insulin lispro in patients with type 1 diabetes," *Diabetes Care,* vol. 23, pp. 1666-1671, 2000-11-01 00:00:00 **2000**.

[10] B. Kepsutlu, C. Nazli, T. Bal, and S. Kizilel, "Design of Bioartificial Pancreas with Functional Micro/Nano-Based Encapsulation of Islets," *Current Pharmaceutical Biotechnology,* vol. 15, pp. 590-608, 2014 **2014**.

[11] G. Scheiner, R. J. Sobel, D. E. Smith, A. J. Pick, D. Kruger, J. King*, et al.*, "Insulin Pump Therapy Guidelines for Successful Outcomes," *Diabetes Educator,* vol. 35, pp. 29S-41S, Mar-Apr **2009**.

[12] N. Weintrob, H. Benzaquen, A. Galatzer, S. Shalitin, L. Lazar, G. Fayman*, et al.*, "Comparison of continuous subcutaneous insulin infusion and multiple daily injection regimens in children with type 1 diabetes: A randomized open crossover trial," *Pediatrics,* vol. 112, pp. 559-564, Sep **2003**.

[13] J. Pickup, M. Mattock, and S. Kerry, "Glycaemic control with continuous subcutaneous insulin infusion compared with intensive insulin injections in patients with type 1 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials," *British Medical Journal,* vol. 324, pp. 705-708, Mar **2002**.

[14] E. Renard, "Implantable closed-loop glucose-sensing and insulin delivery: the future for insulin pump therapy," *Current Opinion in Pharmacology,* vol. 2, pp. 708-716, Dec **2002**.

[15] W. Kelly, R. Lillehei, F. Merkel, Y. Idezuki, and F. Goetz, "Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy," *Transplantation,* vol. 6, p. 145, **1968**.

[16] S. Dholakia, S. Mittal, I. Quiroga, J. Gilbert, E. J. Sharples, R. J. Ploeg*, et al.*, "Pancreas Transplantation: Past, Present, Future," *The American Journal of Medicine,* vol. 129, pp. 667-673, 7// **2016**.

[17] D. E. Sutherland, R. W. Gruessner, and A. C. Gruessner, "Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus," *World journal of surgery,* vol. 25, pp. 487-496, **2001**.

[18] A. C. Gruessner and R. W. G. Gruessner, "Pancreas Transplantation of US and Non-US Cases from 2005 to 2014 as Reported to the United Network for Organ Sharing (UNOS) and the International Pancreas Transplant Registry (IPTR)," *The review of diabetic studies : RDS,* p. e2016002, 2016/03// **2016**.

[19] J. M. Venstrom, M. A. McBride, K. I. Rother, B. Hirshberg, T. J. Orchard, and D. M. Harlan, "Survival after pancreas transplantation in patients with diabetes and preserved kidney function," *Jama,* vol. 290, pp. 2817-2823, **2003**.

[20] K. S. Reddy, R. J. Stratta, M. H. Shokouh-Amiri, R. Alloway, M. F. Egidi, and A. O. Gaber, "Surgical complications after pancreas transplantation with portal-enteric drainage1," *Journal of the American College of Surgeons,* vol. 189, pp. 305-313, 9// **1999**.

[21] Z.-L. Zhi, F. Khan, and J. C. Pickup, "Multilayer nanoencapsulation: A nanomedicine technology for diabetes research and management," *Diabetes Research and Clinical Practice,* vol. 100, pp. 162-169, **2013**.

[22] Y. Stefan, L. Orci, F. Malaisse-Lagae, A. Perrelet, Y. Patel, and R. H. Unger, "Quantitation of endocrine cell content in the pancreas of nondiabetic and diabetic humans," *Diabetes,* vol. 31, pp. 694-700, **1982**.

[23] A. Clark, C. Wells, I. Buley, J. Cruickshank, R. Vanhegan, D. Matthews*, et al.*, "Islet amyloid, increased A-cells, reduced B-cells and exocrine fibrosis: quantitative changes in the pancreas in type 2 diabetes," *Diabetes research (Edinburgh, Scotland),* vol. 9, pp. 151-159, **1988**.

[24] W. F. Ballinger and P. E. Lacy, "Transplantation of intact pancreatic islets in rats," *Surgery,* vol. 72, pp. 175-186, **1972**.

[25] A. J. Ahearn, J. R. Parekh, and A. M. Posselt, "Islet transplantation for Type 1 diabetes: where are we now?," *Expert Review of Clinical Immunology,* vol. 11, pp. 59-68, 2015/01/02 **2015**.

[26] D. W. Scharp, P. E. Lacy, J. V. Santiago, C. S. McCullough, L. G. Weide, L. Falqui*, et al.*, "Insulin Independence After Islet Transplantation Into Type I Diabetic Patient," *Diabetes,* vol. 39, pp. 515-518, 1990-04-01 00:00:00 **1990**.

[27] G. L. Warnock, N. M. Kneteman, E. A. Ryan, M. G. Evans, R. E. A. Seelis, P. F. Halloran*, et al.*, "Originally published as Volume 2, Issue 8662CONTINUED FUNCTION OF PANCREATIC ISLETS AFTER TRANSPLANTATION IN TYPE I DIABETES," *The Lancet,* vol. 334, pp. 570-572, 1989/09/02 **1989**.

[28] A. J. Shapiro, J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock*, et al.*, "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen," *New England Journal of Medicine,* vol. 343, pp. 230-238, **2000**.

[29] R. P. Robertson, "Islet transplantation as a treatment for diabetes—a work in progress," *New England Journal of Medicine,* vol. 350, pp. 694-705, **2004**.

[30] F. B. Barton, M. R. Rickels, R. Alejandro, B. J. Hering, S. Wease, B. Naziruddin*, et al.*, "Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010," *Diabetes care,* vol. 35, pp. 1436-1445, **2012**.

[31] W. Bennet, C.-G. Groth, R. Larsson, B. Nilsson, and O. Korsgren, "Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes," *Upsala journal of medical sciences,* vol. 105, pp. 125-133, **2000**.

[32] P. Fiorina, A. M. J. Shapiro, C. Ricordi, and A. Secchi, "The Clinical Impact of Islet Transplantation," *American Journal of Transplantation,* vol. 8, pp. 1990-1997, **2008**.

[33] M. A. Ibrahim, A. Ismail, M. I. Fetouh, and A. Göpferich, "Stability of insulin during the erosion of poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres," *Journal of controlled release,* vol. 106, pp. 241-252, **2005**.

[34] R. Rastogi, S. Anand, and V. Koul, "Evaluation of pharmacological efficacy of ‘insulin–surfoplex’encapsulated polymer vesicles," *International journal of pharmaceutics,* vol. 373, pp. 107-115, **2009**.

[35] S. Jose, J. Fangueiro, J. Smitha, T. Cinu, A. Chacko, K. Premaletha*, et al.*, "Cross-linked chitosan microspheres for oral delivery of insulin: Taguchi design and in vivo testing," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* vol. 92, pp. 175-179, **2012**.

[36] F. Ungaro, R. d. E. di Villa Bianca, C. Giovino, A. Miro, R. Sorrentino, F. Quaglia*, et al.*, "Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: in vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs," *Journal of Controlled Release,* vol. 135, pp. 25-34, **2009**.

[37] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker, "Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano-and microparticles," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* vol. 59, pp. 375-388, **2005**.

[38] R. Shelma and C. P. Sharma, "In vitro cell culture evaluation and in vivo efficacy of amphiphilic chitosan for oral insulin delivery," *Journal of biomedical nanotechnology,* vol. 9, pp. 167-176, **2013**.

[39] X. Zhang, M. Sun, A. Zheng, D. Cao, Y. Bi, and J. Sun, "Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration," *European Journal of Pharmaceutical Sciences,* vol. 45, pp. 632-638, **2012**.

[40] J. Schweicher, C. Nyitray, and T. A. Desai, "Membranes to achieve immunoprotection of transplanted islets," *Frontiers in bioscience (Landmark edition),* vol. 19, p. 49, **2014**.

[41] N. Kobayashi, "Bioartificial pancreas for the treatment of diabetes," *Cell Transplantation,* vol. 17, pp. 11-17, 2008 **2008**.

[42] V. Iacovacci, L. Ricotti, A. Menciassi, and P. Dario, "The bioartificial pancreas (BAP): Biological, chemical and engineering challenges," *Biochem Pharmacol,* vol. 100, pp. 12-27, Jan 15 **2016**.

[43] M. Santander-Ortega, D. Bastos-Gonzalez, J. Ortega-Vinuesa, and M. Alonso, "Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization," *Journal of biomedical nanotechnology,* vol. 5, pp. 45-53, **2009**.

[44] S. Kizilel, M. Garfinkel, and E. Opara, "The bioartificial pancreas: progress and challenges," *Diabetes technology & therapeutics,* vol. 7, pp. 968-85, 2005-Dec **2005**.

[45] H. Uludag, P. De Vos, and P. A. Tresco, "Technology of mammalian cell encapsulation," *Advanced drug delivery reviews,* vol. 42, pp. 29-64, **2000**.

[46] J. Y. Cheng, M. Raghunath, J. Whitelock, and L. Poole-Warren, "Matrix components and scaffolds for sustained islet function," *Tissue Engineering Part B: Reviews,* vol. 17, pp. 235-247, **2011**.

[47] A. Fort, N. Fort, C. Ricordi, and C. L. Stabler, "Biohybrid devices and encapsulation technologies for engineering a bioartificial pancreas," *Cell transplantation,* vol. 17, pp. 997-1003, **2008**.

[48] K. E. La Flamme, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, and T. A. Desai, "The Effects of Cell Density and Device Arrangement on the Behavior of Macroencapsulated □-Cells," *Cell transplantation,* vol. 16, pp. 765-774, **2007**.

[49] A. Pileggi, R. D. Molano, C. Ricordi, E. Zahr, J. Collins, R. Valdes*, et al.*, "Reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation into a subcutaneous, neovascularized device," *Transplantation,* vol. 81, pp. 1318-1324, **2006**.

[50] J. T. Wilson and E. L. Chaikof, "Challenges and emerging technologies in the immunoisolation of cells and tissues," *Advanced drug delivery reviews,* vol. 60, pp. 124-145, **2008**.

[51] A. Prochorov, S. Tretjak, V. Goranov, A. Glinnik, and M. Goltsev, "Treatment of insulin dependent diabetes mellitus with intravascular transplantation of pancreatic

islet cells without immunosuppressive therapy," *Advances in medical sciences,* vol. 53, p. 240, **2008**.

[52] S. Veriter, P. Gianello, and D. Dufrane, "Bioengineered Sites for Islet Cell Transplantation," *Current Diabetes Reports,* vol. 13, pp. 745-755, Oct **2013**.

[53] P. Soon-Shiong, R. Heintz, N. Merideth, Q. Yao, Z. Yao, T. Zheng*, et al.*, "Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation," *The Lancet,* vol. 343, pp. 950-951, **1994**.

[54] R. B. Elliott, L. Escobar, P. L. Tan, M. Muzina, S. Zwain, and C. Buchanan, "Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation," *Xenotransplantation,* vol. 14, pp. 157-161, **2007**.

[55] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, M. P. Montanucci, G. Calabrese*, et al.*, "Microencapsulated Pancreatic Islet Allografts Into Nonimmunosuppressed Patients With Type 1 Diabetes First two cases," *Diabetes Care,* vol. 29, pp. 137-138, **2006**.

[56] B. E. Tuch, G. W. Keogh, L. J. Williams, W. Wu, J. L. Foster, V. Vaithilingam*, et al.*, "Safety and viability of microencapsulated human islets transplanted into diabetic humans," *Diabetes care,* vol. 32, pp. 1887-1889, **2009**.

[57] M. L. Ma, A. Chiu, G. Sahay, J. C. Doloff, N. Dholakia, R. Thakrar*, et al.*, "Core-Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation," *Advanced Healthcare Materials,* vol. 2, pp. 667-672, May **2013**.

[58] J.-M. Pollok, M. Lorenzen, P. Kölln, É. Török, P. M. Kaufmann, D. Kluth*, et al.*, "In vitro function of islets of Langerhans encapsulated with a membrane of porcine chondrocytes for immunoisolation," *Digestive surgery,* vol. 18, pp. 204-210, **2001**.

[59] J. Kim, J.-I. Lee, J. Jeong, Y.-J. Park, S. Kim, Y. Fang*, et al.*, "Functional evaluation of chondrocyte sheeting immunodelusive immunoisolated bioartificial pancreas," in *Transplantation proceedings*, **2010**, pp. 903-906.

[60] Y. Teramura and H. Iwata, "Islet encapsulation with living cells for improvement of biocompatibility," *Biomaterials,* vol. 30, pp. 2270-2275, **2009**.

[61] Y. Teramura, L. N. Minh, T. Kawamoto, and H. Iwata, "Microencapsulation of islets with living cells using polyDNA-PEG-lipid conjugate," *Bioconjugate chemistry,* vol. 21, pp. 792-796, **2010**.

[62] P. de Vos, H. A. Lazarjani, D. Poncelet, and M. M. Faas, "Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective," *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 67-68, pp. 15-34, Apr 10 **2014**.

[63] H. Hashimoto, N. Moritani, M. Terada, P. Kromkhun, W. Fungfuaug, T. Nakada*, et al.*, "Improvement of Hyperglycemia and Sexual Dysfunction in Diabetic Female Rats by an Artificial Endocrine Pancreas Developed from Mouse. BETA. Cells," *Experimental Animals,* vol. 59, pp. 515-519, **2010**.

[64] K. E. L. Flamme, G. Mor, D. Gong, T. L. Tempa, V. A. Fusaro, C. A. Grimes*, et al.*, "Nanoporous alumina capsules for cellular macroencapsulation: transport and biocompatibility," *Diabetes technology & therapeutics,* vol. 7, pp. 684-694, **2005**.

[65] W. Wang, Y. Gu, H. Hori, T. Sakurai, A. Hiura, S. Sumi*, et al.*, "Subcutaneous transplantation of macroencapsulated porcine pancreatic endocrine cells normalizes hyperglycemia in diabetic mice1," *Transplantation,* vol. 76, pp. 290-296, **2003**.

[66] Z. I. Zhi, A. Kerby, A. J. F. King, P. M. Jones, and J. C. Pickup, "Nano-scale encapsulation enhances allograft survival and function of islets transplanted in a mouse model of diabetes," *Diabetologia,* vol. 55, pp. 1081-1090, Apr **2012**.

[67] Z. L. Zhi, B. Liu, P. M. Jones, and J. C. Pickup, "Polysaccharide Multilayer Nanoencapsulation of Insulin-Producing beta-Cells Grown as Pseudoislets for Potential Cellular Delivery of Insulin," *Biomacromolecules,* vol. 11, pp. 610-616, Mar **2010**.

[68] M. Oak and J. Singh, "Controlled delivery of basal level of insulin from chitosan–zinc–insulin-complex-loaded thermosensitive copolymer," *Journal of pharmaceutical sciences,* vol. 101, pp. 1079-1096, **2012**.

[69] W. S. Shim, J.-H. Kim, H. Park, K. Kim, I. C. Kwon, and D. S. Lee, "Biodegradability and biocompatibility of a pH-and thermo-sensitive hydrogel formed from a sulfonamide-modified poly (ε-caprolactone-co-lactide)–poly (ethylene glycol)–poly (ε-caprolactone-co-lactide) block copolymer," *Biomaterials,* vol. 27, pp. 5178-5185, **2006**.

[70] Y. Teramura and H. Iwata, "Bioartificial pancreas Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans," *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 62, pp. 827-840, Jun 15 **2010**.

[71] S. Kizilel, A. Scavone, X. A. Liu, J. M. Nothias, D. Ostrega, P. Witkowski*, et al.*, "Encapsulation of Pancreatic Islets Within Nano-Thin Functional Polyethylene Glycol Coatings for Enhanced Insulin Secretion," *Tissue Engineering Part A,* vol. 16, pp. 2217-2228, Jul **2010**.

[72] L. Gasperini, J. F. Mano, and R. L. Reis, "Natural polymers for the microencapsulation of cells," *Journal of the Royal Society Interface,* vol. 11, p. 20140817, **2014**.

[73] L. S. Gazda, H. V. Vinerean, M. A. Laramore, R. D. Hall, J. W. Carraway, and B. H. Smith, "No evidence of viral transmission following long-term implantation of agarose encapsulated porcine islets in diabetic dogs," *Journal of diabetes research,* vol. 2014, **2014**.

[74] R. W. Holdcraft, L. S. Gazda, H. Adkins, S. G. Harbeck, E. D. Meyer, M. A. Bautista*, et al.*, "Enhancement of in vitro and in vivo function of agarose-encapsulated porcine islets by changes in the islet microenvironment," *Cell transplantation,* vol. 23, pp. 929-944, **2014**.

[75] S. Schaffellner, V. Stadlbauer, P. Stiegler, O. Hauser, G. Halwachs, C. Lackner*, et al.*, "Porcine islet cells microencapsulated in sodium cellulose sulfate," in *Transplantation proceedings*, **2005**, pp. 248-252.

[76] V. Stadlbauer, P. Stiegler, S. Schaffellner, O. Hauser, G. Halwachs, F. Iberer*, et al.*, "Morphological and functional characterization of a pancreatic β-cell line microencapsulated in sodium cellulose sulfate/poly (diallyldimethylammonium chloride)," *Xenotransplantation,* vol. 13, pp. 337-344, **2006**.

[77] B. R. Lee, J. W. Hwang, Y. Y. Choi, S. F. Wong, Y. H. Hwang, D. Y. Lee*, et al.*, "In situ formation and collagen-alginate composite encapsulation of pancreatic islet spheroids," *Biomaterials,* vol. 33, pp. 837-845, **2012**.

[78] H. K. Yang, D.-S. Ham, H.-S. Park, M. Rhee, Y. H. You, M. J. Kim*, et al.*, "Long-term efficacy and biocompatibility of encapsulated islet transplantation with chitosan-coated alginate capsules in mice and canine models of diabetes," *Transplantation,* vol. 100, pp. 334-343, **2016**.

[79] R. M. Olabisi, "Cell microencapsulation with synthetic polymers," *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* vol. 103, pp. 846-859, **2015**.

[80] E. Piskin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,* vol. 6, pp. 775-795, **1995**.

[81] S. S. Kadam, M. Sudhakar, P. D. Nair, and R. R. Bhonde, "Reversal of experimental diabetes in mice by transplantation of neo-islets generated from human amnion-derived mesenchymal stromal cells using immuno-isolatory macrocapsules," *Cytotherapy,* vol. 12, pp. 982-991, **2010**.

[82] S. George, P. D. Nair, M. V. Risbud, and R. R. Bhonde, "Nonporous polyurethane membranes as islet immunoisolation matrices–biocompatibility studies," *Journal of biomaterials applications,* vol. 16, pp. 327-340, **2002**.

[83] K. Suzuki, S. Bonner-Weir, J. Hollister, and G. C. Weir, "A method for estimating number and mass of islets transplanted within a membrane device," *Cell transplantation,* vol. 5, pp. 613-625, **1996**.

[84] S. R. Winn, M. D. Lindner, A. Lee, G. Haggett, J. M. Francis, and D. F. Emerich, "Polymer-encapsulated genetically modified cells continue to secrete human nerve growth factor for over one year in rat ventricles: behavioral and anatomical consequences," *Experimental neurology,* vol. 140, pp. 126-138, **1996**.

[85] M. Qi, Y. Gu, N. Sakata, D. Kim, Y. Shirouzu, C. Yamamoto*, et al.*, "PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas," *Biomaterials,* vol. 25, pp. 5885-5892, **2004**.

[86] Z. Qi, Y. Shen, G. Yanai, K. Yang, Y. Shirouzu, A. Hiura*, et al.*, "The in vivo performance of polyvinyl alcohol macro-encapsulated islets," *Biomaterials,* vol. 31, pp. 4026-4031, **2010**.

[87] T. A. Desai, D. Hansford, and M. Ferrari, "Characterization of micromachined silicon membranes for immunoisolation and bioseparation applications," *Journal of Membrane Science,* vol. 159, pp. 221-231, **1999**.

[88] T. A. Desai, W. H. Chu, G. Rasi, P. Sinibaldi-Vallebona, E. Guarino, and M. Ferrari, "Microfabricated biocapsules provide short-term immunoisolation of insulinoma xenografts," *Biomedical microdevices,* vol. 1, pp. 131-138, **1999**.

[89] K. E. La Flamme, K. C. Popat, L. Leoni, E. Markiewicz, T. J. La Tempa, B. B. Roman*, et al.*, "Biocompatibility of nanoporous alumina membranes for immunoisolation," *Biomaterials,* vol. 28, pp. 2638-2645, **2007**.

[90] S. Sharma, R. W. Johnson, and T. A. Desai, "Ultrathin poly (ethylene glycol) films for silicon-based microdevices," *Applied Surface Science,* vol. 206, pp. 218-229, **2003**.

[91] N. A. Dudukovic and C. F. Zukoski, "Mechanical properties of self-assembled Fmoc-diphenylalanine molecular gels," *Langmuir,* vol. 30, pp. 4493-4500, **2014**.

[92] M. Zhou, A. M. Smith, A. K. Das, N. W. Hodson, R. F. Collins, R. V. Ulijn*, et al.*, "Self-assembled peptide-based hydrogels as scaffolds for anchorage-dependent cells," *Biomaterials,* vol. 30, pp. 2523-30, May **2009**.

[93] V. Jayawarna, S. M. Richardson, A. R. Hirst, N. W. Hodson, A. Saiani, J. E. Gough*, et al.*, "Introducing chemical functionality in Fmoc-peptide gels for cell culture," *Acta biomaterialia,* vol. 5, pp. 934-943, **2009**.

[94] R. Orbach, L. Adler-Abramovich, S. Zigerson, I. Mironi-Harpaz, D. Seliktar, and E. Gazit, "Self-assembled Fmoc-peptides as a platform for the formation of nanostructures and hydrogels," *Biomacromolecules,* vol. 10, pp. 2646-2651, **2009**.

[95] R. P. Lanza, D. Ecker, W. M. Kühtreiber, J. E. Staruk, J. Marsh, and W. L. Chick, "A simple method for transplanting discordant islets into rats using alginate gel spheres," *Transplantation,* vol. 59, pp. 1485-1487, **1995**.

[96] P. d. Vos, A. Andersson, S. Tam, M. Faas, and J. Halle, "Advances and barriers in mammalian cell encapsulation for treatment of diabetes," *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents),* vol. 6, pp. 139-153, **2006**.

[97] M. Sobol, A. Bartkowiak, B. de Haan, and P. de Vos, "Cytotoxicity study of novel water-soluble chitosan derivatives applied as membrane material of alginate microcapsules," *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* vol. 101, pp. 1907-1914, **2013**.

[98] T. Chandy, D. L. Mooradian, and G. H. Rao, "Evaluation of Modified Alginate-Chitosan-Polyethylene Glycol Microcapsules for Cell Encapsulation," *Artificial organs,* vol. 23, pp. 894-903, **1999**.

[99] P. De Vos, B. De Haan, and R. Van Schilfgaarde, "Effect of the alginate composition on the biocompatibility of alginate-polylysine microcapsules," *Biomaterials,* vol. 18, pp. 273-278, **1997**.

[100] G. Basta, P. Sarchielli, G. Luca, L. Racanicchi, C. Nastruzzi, L. Guido*, et al.*, "Optimized parameters for microencapsulation of pancreatic islet cells: an in vitro study clueing on islet graft immunoprotection in type 1 diabetes mellitus," *Transplant immunology,* vol. 13, pp. 289-296, **2004**.

[101] S. M. Hudson and D. W. Jenkins, "Chitin and chitosan," *Encyclopedia of polymer science and technology,* **2001**.

[102] H.-J. Kim, H.-C. Lee, J.-S. Oh, B.-A. Shin, C.-S. Oh, R.-D. Park*, et al.*, "Polyelectrolyte complex composed of chitosan and sodium alginate for wound dressing application," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition,* vol. 10, pp. 543-556, **1999**.

[103] K. Roshanbinfar and S. Salahshour Kordestani, "Encapsulating beta islet cells in alginate, alginate-chitosan and alginate-chitosan-PEG microcapsules and investigation of insulin secretion," *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering,* vol. 3, pp. 185-189, **2013**.

[104] G. Orive, M. De Castro, H.-J. Kong, R. M. Hernández, S. Ponce, D. J. Mooney*, et al.*, "Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery," *Journal of Controlled Release,* vol. 135, pp. 203-210, **2009**.

[105] K. Y. Lee, H. J. Kong, R. G. Larson, and D. J. Mooney, "Hydrogel formation via cell crosslinking," *Advanced Materials,* vol. 15, pp. 1828-1832, **2003**.

[106] T. A. Ahmed, E. V. Dare, and M. Hincke, "Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications," *Tissue Engineering Part B: Reviews,* vol. 14, pp. 199-215, **2008**.

[107] J. Liu, H. Zhou, M. D. Weir, H. H. Xu, Q. Chen, and C. A. Trotman, "Fast-degradable microbeads encapsulating human umbilical cord stem cells in alginate for muscle tissue engineering," *Tissue Engineering Part A,* vol. 18, pp. 2303-2314, **2012**.

[108] S. Vériter, J. Mergen, R.-M. Goebbels, N. Aouassar, C. Grégoire, B. Jordan*, et al.*, "In vivo selection of biocompatible alginates for islet encapsulation and subcutaneous transplantation," *Tissue Engineering Part A,* vol. 16, pp. 1503-1513, **2010**.

[109] P. S. Hume and K. S. Anseth, "Inducing local T cell apoptosis with anti-Fas-functionalized polymeric coatings fabricated via surface-initiated photopolymerizations," *Biomaterials,* vol. 31, pp. 3166-3174, **2010**.

[110] S. Cabric, J. Sanchez, T. Lundgren, A. Foss, M. Felldin, R. Källen*, et al.*, "Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation," *Diabetes,* vol. 56, pp. 2008-2015, **2007**.

[111] Y. Teramura and H. Iwata, "Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses," *Bioconjugate Chemistry,* vol. 19, pp. 1389-1395, Jul **2008**.

[112] T. Totani, Y. Teramura, and H. Iwata, "Immobilization of urokinase on the islet surface by amphiphilic poly (vinyl alcohol) that carries alkyl side chains," *Biomaterials,* vol. 29, pp. 2878-2883, **2008**.

[113] N. Takemoto, Y. Teramura, and H. Iwata, "Islet surface modification with urokinase through DNA hybridization," *Bioconjugate chemistry,* vol. 22, pp. 673-678, **2011**.

[114] Y. Teramura and H. Iwata, "Improvement of graft survival by surface modification with poly (ethylene glycol)-lipid and urokinase in intraportal islet transplantation," *Transplantation,* vol. 91, pp. 271-278, **2011**.

[115] C.-C. Lin and K. S. Anseth, "Glucagon-like peptide-1 functionalized PEG hydrogels promote survival and function of encapsulated pancreatic β-cells," *Biomacromolecules,* vol. 10, pp. 2460-2467, **2009**.

[116] J. M. Anderson, "Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices," *Cardiovascular Pathology,* vol. 2, pp. 33-41, **1993**.

[117] J. L. Platt and F. Bach, "Mechanism of tissue injury in hyperacute xenograft rejection," in *Xenotransplantation*, ed: Springer, **1991**, pp. 69-79.

[118] N. Thai, S. Wang, L. Valdivia, S. Celli, M. Reilly, A. Demetris*, et al.*, "Cytokine messenger RNA profiles in hamster-to-rat liver xenografts," in *Transplantation proceedings*, **1993**, pp. 444-444.

[119] R. S. Lee, M. J. Grusby, L. H. Glimcher, H. J. Winn, and H. Auchincloss, "Indirect recognition by helper cells can induce donor-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo," *The Journal of experimental medicine,* vol. 179, pp. 865-872, **1994**.

[120] M. H. Sayegh, B. Watschinger, and C. B. Carpenter, "Mechanisms of T cell recognition of alloantigen: The role of peptides," *Transplantation,* vol. 57, pp. 1295-1302, **1994**.
[121] S. Hirsiger, H.-P. Simmen, C. M. Werner, G. A. Wanner, and D. Rittirsch, "Danger signals activating the immune response after trauma," *Mediators of inflammation,* vol. 2012, **2012**.
[122] A. Kaczmarek, P. Vandenabeele, and D. V. Krysko, "Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance," *Immunity,* vol. 38, pp. 209-223, **2013**.
[123] K. Pittman and P. Kubes, "Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment," *Journal of innate immunity,* vol. 5, pp. 315-323, **2013**.
[124] D. Tang, R. Kang, C. B. Coyne, H. J. Zeh, and M. T. Lotze, "PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity," *Immunological reviews,* vol. 249, pp. 158-175, **2012**.
[125] J. E. Babensee, J. M. Anderson, L. V. McIntire, and A. G. Mikos, "Host response to tissue engineered devices," *Advanced Drug Delivery Reviews,* vol. 33, pp. 111-139, Aug **1998**.
[126] C. Colton and E. Avgoustiniatos, "Bioengineering in development of the hybrid artificial pancreas," *Journal of biomechanical engineering,* vol. 113, pp. 152-170, **1991**.
[127] K.-D. Kröncke, J. Funda, B. Berschick, H. Kolb, and V. Kolb-Bachofen, "Macrophage cytotoxicity towards isolated rat islet cells: neither lysis nor its protection by nicotinamide are beta-cell specific," *Diabetologia,* vol. 34, pp. 232-238, **1991**.
[128] M. de Groot, T. A. Schuurs, H. G. Leuvenink, and R. van Schilfgaarde, "Macrophage overgrowth affects neighboring nonovergrown encapsulated islets 1," *Journal of Surgical Research,* vol. 115, pp. 235-241, **2003**.
[129] A. M. Smink, M. M. Faas, and P. de Vos, "Toward Engineering a Novel Transplantation Site for Human Pancreatic Islets," *Diabetes,* vol. 62, pp. 1357-1364, 2013-05-01 00:00:00 **2013**.
[130] S. Merani, C. Toso, J. Emamaullee, and A. Shapiro, "Optimal implantation site for pancreatic islet transplantation," *British Journal of Surgery,* vol. 95, pp. 1449-1461, **2008**.
[131] J. I. Stagner, H. L. Rilo, and K. K. White, "The pancreas as an islet transplantation site. Confirmation in a syngeneic rodent and canine autotransplant model," *Jop,* vol. 8, pp. 628-636, **2007**.
[132] E. Cantarelli and L. Piemonti, "Alternative transplantation sites for pancreatic islet grafts," *Current diabetes reports,* vol. 11, pp. 364-374, **2011**.
[133] E. Rafael, A. Tibell, M. Ryden, T. Lundgren, L. Sävendahl, B. Borgström*, et al.*, "Intramuscular Autotransplantation of Pancreatic Islets in a 7-Year-Old Child: A 2-Year Follow-Up," *American Journal of Transplantation,* vol. 8, pp. 458-462, **2008**.
[134] M. D. Stegall, "Monitoring human islet allografts using a forearm biopsy site," *Annals of transplantation: quarterly of the Polish Transplantation Society,* vol. 2, pp. 8-11, **1996**.
[135] J. Svensson, J. Lau, M. Sandberg, and P.-O. Carlsson, "High vascular density and oxygenation of pancreatic islets transplanted in clusters into striated muscle," *Cell transplantation,* vol. 20, pp. 783-788, **2011**.
[136] H. I. Kim, J. E. Yu, C. G. Park, and S. J. Kim, "Comparison of four pancreatic islet implantation sites," *J Korean Med Sci,* vol. 25, pp. 203-10, Feb **2010**.
[137] T. Kin, G. S. Korbutt, and R. V. Rajotte, "Survival and metabolic function of syngeneic rat islet grafts transplanted in the omental pouch," *American Journal of Transplantation,* vol. 3, pp. 281-285, **2003**.
[138] S. M. Gustavson, R. V. Rajotte, D. Hunkeler, J. R. Lakey, D. S. Edgerton, D. W. Neal*, et al.*, "Islet Auto-Transplantation into an Omental or Splenic Site Results in a

Normal Beta Cell but Abnormal Alpha Cell Response to Mild Non-Insulin-Induced Hypoglycemia," *American journal of transplantation,* vol. 5, pp. 2368-2377, **2005**.

[139] Z. Ao, K. Matayoshi, J. R. Lakey, R. V. Rajotte, and G. L. WARNOCK, "Survival and function of purified islets in the omental pouch site of outbred dogs," *Transplantation,* vol. 56, pp. 524-529, **1993**.

[140] E. Cantarelli, R. Melzi, A. Mercalli, V. Sordi, G. Ferrari, C. W. Lederer*, et al.*, "Bone marrow as an alternative site for islet transplantation," *Blood,* vol. 114, pp. 4566-4574, **2009**.

[141] P. Maffi, G. Balzano, M. Ponzoni, R. Nano, V. Sordi, R. Melzi*, et al.*, "Autologous Pancreatic Islet Transplantation in Human Bone Marrow," *Diabetes,* vol. 62, pp. 3523-3531, 2013-10-01 00:00:00 **2013**.

[142] J. Komori, L. Boone, A. DeWard, T. Hoppo, and E. Lagasse, "The mouse lymph node as an ectopic transplantation site for multiple tissues," *Nature biotechnology,* vol. 30, pp. 976-983, **2012**.

[143] Y. Cheng, J.-L. Zhang, Y.-F. Liu, T.-M. Li, and N. Zhao, "Islet transplantation for diabetic rats through the spleen," *Hepatobiliary Pancreat Dis Int,* vol. 4, pp. 203-206, **2005**.

[144] D. Gray, "Islet isolation and transplantation techniques in the primate," *Surgery, gynecology & obstetrics,* vol. 170, pp. 225-232, **1990**.

[145] P.-O. Carlsson, F. Palm, A. Andersson, and P. Liss, "CHRONICALLY DECREASED OXYGEN TENSION IN RAT PANCREATIC ISLETS TRANSPLANTED UNDER THE KIDNEY CAPSULE1," *Transplantation,* vol. 69, pp. 761-766, **2000**.

[146] G. R. Rayat, G. S. Korbutt, J. F. Elliott, and R. V. Rajotte, "Survival and function of syngeneic rat islet grafts placed within the thymus versus under the kidney capsule," *Cell transplantation,* vol. 6, pp. 597-602, **1997**.

[147] R. M. Jindal, R. A. Sidner, H. B. McDaniel, M. S. Johnson, and S. E. Fineberg, "Intraportal Vs Kidney Subcapsular Site for Human Pancreatic Islet Transplantation 1," *Transplantation Proceedings,* vol. 30, pp. 398-399, 3// **1998**.

[148] G. Take, G. Karabay, C. A. Yazici, and D. Erdogan, "Dişi Sıçanlarda Streptozotosin İle Oluşturulmuş Diyabetin Kalp Kası Üzerine Etkisinin Ultrastrüktürel Düzeyde Gösterilmesi," *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* vol. 30, pp. 199-204, **2004**.

[149] H. Öntürk and H. Özbek, "Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi," *Genel Tıp Derg,* vol. 17, pp. 231-36, **2007**.

[150] N. Sakata, S. Egawa, S. Sumi, and M. Unno, "Optimization of glucose level to determine the stimulation index of isolated rat islets," *Pancreas,* vol. 36, pp. 417-423, **2008**.

[151] E. R. B. Shanmugasundaram, K. L. Gopinath, K. R. Shanmugasundaram, and V. M. Rajendran, "Possible regeneration of the islets of langerhans in streptozotocin-diabetic rats given gymnema sylvestre leaf extracts," *Journal of Ethnopharmacology,* vol. 30, pp. 265-279, 1990/10/01 **1990**.

[152] W. J. Tze and J. Tai, "Allotransplantation of dispersed single pancreatic endocrine cells in diabetic rats," *Diabetes,* vol. 37, pp. 383-392, **1988**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı	: Mahmut ÖZER
Doğum Yeri	: Burdur
Medeni Hali	: Bekâr
E-posta	: mahmutozer@yahoo.com
Adresi	: Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Çankaya, Ankara

Eğitim

Lisans	: ODTÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek Lisans	: Yeditepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Doktora	: Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce / İyi

İş Deneyimi

Bilimsel Programlar Uzmanı, Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, TÜBİTAK, (2011 - devam ediyor)

Deneyim Alanları

Nanomalzemeler, Rejeneratif Tıp, Biyomalzemeler, Farmakogenetik

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

0564.STZ.2013-2; Biyoyapay Pankreas: Pankreas Hücrelerinin Enkapsülasyonu ile Hücre Tedavileri; T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, San-Tez Projesi; 01/03/2014-15/12/2015, 343.454,00 TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 23/02/2017

Tez Başlığı / Konusu: Biyoyapay Pankreas: Pankreas Hücrelerinin Enkapsülasyonu ile Hücre Tedavileri

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç ve e)Kaynakça kısımlarından oluşan toplam 78 sayfalık kısmına ilişkin, 23/02/2017 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

1- Kaynakça hariç
2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza
23/02/2017

Adı Soyadı: Mahmut Özer
Öğrenci No: N11242436
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp
Programı: Doktora
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Emir Baki Denkbaş