

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO LANGERHANS ADACIK HÜCRE CANLILIĞINA FARKLI HÜCRE VE
HORMON UYGULAMALARININ ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELTEM ATEŞ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

ANKARA

Aralık 2012

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İN VİTRO LANGERHANS ADACIK HÜCRE CANLILIĞINA FARKLI HÜCRE VE
HORMON UYGULAMALARININ ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MELTEM ATEŞ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 01/ 2011- 30
proje no' su ile desteklenmiştir.

ANKARA

Aralık 2012

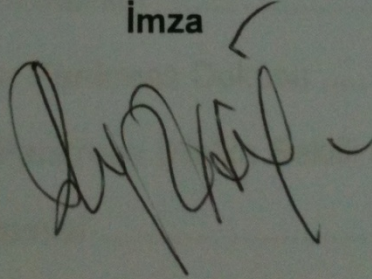
Kabul Onay

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

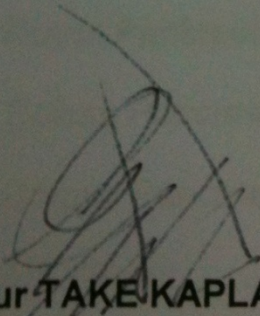
**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 28/12/2012

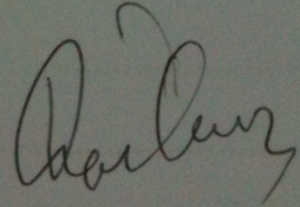
**Jüri Başkanı
Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN
İmza**



**Doç. Dr. Gülnur TAKEKAPLANOĞLU
İmza**



**Doç. Dr. Özgür ÇINAR
İmza**



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
İÇİNDEKİLER	ii
RESİMLER VE GRAFİKLER	viii
TABLolar	x
SEMBOLLER ve KISALTMALAR	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Pankreas Gelişimi	4
2.1.1. Pankreas Anomalileri	6
2.1.1.1. Aksesuar Pankreas Dokusu	6
2.1.1.2. Annular Pankreas (Halka Şekli Pankreas)	6
2.2.Pankreas Anatomisi	7
2.2.1. Caput Pancreatis	8
2.2.2. Collum Pancreatis	9
2.2.3. Corpus Pancreatis	9
2.2.3.1. Yüzler;	10
2.2.3.1.1. Facies anterior(ön yüz)	10
2.2.3.1.2. Facies posterior(arka yüz)	10
2.2.3.1.3. Facies inferior(alt yüz):	10
2.2.3.2. Kenarlar	10
2.2.3.2.1. Margo superior	10
2.2.3.2.2. Margo anterior	11
2.2.3.2.3. Margo inferior	11
2.2.4. Cauda Pancreatis	11

2.2.5.Ductus Pancreaticus(Wirsung Kanalı)	12
2.2.6.Oddi Sfinkteri	13
2.2.7.Damarlar	14
2.2.7.1.Arterler	14
2.2.7.2.Venler	15
2.2.8.Lenf Damarları	15
2.2.9.Sinirler.....	15
2.3.Pankreas Histolojisi.....	17
2.3.1.Endokrin Pankreas.....	18
2.3.1.1. B (beta) Hücreleri.....	21
2.3.1.2.A (alfa) Hücreleri.....	22
2.3.1.3. D (delta) Hücreleri.....	22
2.3.1.4. γ (gamma) Hücreleri	23
2.3.1.5. PP (pankreatik polipeptid) Hücreleri	23
2.4.Pankreas Fizyolojisi	24
2.4.1.Endokrin Pankreas.....	24
2.4.1.1. Pankreastan Salgılanan Hormonlar	26
2.4.1.1.1. İnsülin	26
2.4.1.1.2. Glukagon	26
2.4.1.1.3. Somatostatin	27
2.4.1.1.4. Pankreatik Polipeptit.....	27
2.5. Karaciğer Gelişimi.....	28
2.6. Karaciğer Anatomisi.....	31
2.6.1.Yüzleri, Kenarları ve Karaciğer Yatağı	31
2.6.1.2. Diafragmatik yüz (facies diaphragmatica)	32

2.6.1.2.1. Pars Superior	32
2.6.1.2.2. Pars Anterior	33
2.6.1.2.3. Pars Dextra	33
2.6.1.2.4. Pars Posterior.....	34
2.6.1.3. Facies Visceralis (alt yüz)	34
2.6.1.3.1. Sağ lob (Lobus hepaticus dexter)	36
2.6.1.3.2. Sol lob (Lobus hepaticus sinister).....	37
2.6.1.3.3. Lobus Quadratus	37
2.6.1.3.4. Lobus Caudatus	38
2.6.1.4. Kenarlar	38
2.6.1.4.1. Ön Kenar (margo inferior).....	38
2.6.1.4.2. Arka Kenar	39
2.6.2. Periton Durumu	40
2.6.3. Bağları	40
2.6.3.1. Ligamentum Falciforme Hepatis	41
2.6.3.2. Ligamentum Coronarium Hepatis	41
2.6.3.3. Ligamentum Triangulare Sinistrum	42
2.6.3.4. Ligamentum Triangulare Dextrum	42
2.6.3.5. Ligamentum Teres Hepatis.....	42
2.6.3.6. Omentum Minus	43
2.6.3.7. Ligamentum Hepatorenale	43
2.6.4. Karaciğer Segmentasyonu.....	44
2.6.5. Karaciğer Damarları	45
2.6.5.1. A. Hepatica Propria.....	45
2.6.5.2. V. Portae.....	46

2.6.5.3. Karaciğerin Lenf Damarları	46
2.6.6. Karaciğerin Sinirleri	47
2.7. Karaciğer Histolojisi	48
2.7.1. Karaciğer Stroması	48
2.7.1.1. Klasik Lobulus.....	49
2.7.1.2. Portal Lobulus.....	50
2.7.1.3. Karaciğer Asinusu.....	50
2.7.1.4. Karaciğer Sinüzoidleri	51
2.7.1.4.1. Endotel Hücreleri	52
2.7.1.4.2. Kupffer Hücreleri (Macrophagocytus stellatus)	54
2.7.1.4.3. Yağ Depolayan Hücreler (Lipocytu Perisinusoideus) İto Hücreleri	55
2.7.2. Disse Aralığı (Perisinüzoidal Aralık).....	57
2.7.3. Hepatositler (Karaciğer Parankim Hücreleri).....	58
2.7.3.1. Hepatositlerin İşlevleri.....	60
2.8. Karaciğer Fizyolojisi	63
2.8.1. Karaciğer Dolaşımı:	63
2.8.2. Karaciğerin Metabolik İşlevleri	65
2.8.3. Karbohidrat Metabolizması	65
2.8.3.1. Yağ Metabolizması	66
2.8.3.2. Protein Metabolizması	67
2.8.3.3. Vitaminlerin Depo Edilmesi	68
2.8.3.4. Kan Pıhtılaşması İle Karaciğer İlişkisi	68
2.8.3.5. Demir Depolanması	68
2.8.3.6. Karaciğerin Toksik Maddeleri Metabolize Ve Detoksifiye Etme İşlevi	69

2.9. Progesteron Hormonu.....	70
2.9.1. Progesteron Hormonunun İşlevleri.....	71
2.10. Hücre Kültürü	72
2.11. Akım Sitometri.....	74
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	76
3.1. Deney Grupları	76
3.2. Karaciğer Hücresi (Hepatosit) İzolasyonu	76
3.2.1. Hepatosit İzolasyon Yöntemi.....	77
3.2.3. Hepatosit Hücrelerinin PAS Boyaması.....	83
3. 3. Adacık İzolasyon Aşamaları.....	85
3.3.1. Solüsyonların Hazırlanışı	85
3.3.1.1. RPMI 1640 (+) (FBS'li) Solüsyonunun Hazırlanışı	85
3.3.1.2. RPMI 1640 (-) (FBS'siz) Solüsyonunun Hazırlanışı	85
3.3.1.3. HBSS (+) (FBS'li) Solüsyonunun Hazırlanışı	86
3.3.1.4. Kollajenaz Enzim Solüsyonunun Hazırlanışı	86
3.3.2. Adacık İzolasyonu	86
3.3.3. Floresan Boyaların Hazırlanması.....	88
3.3.3.1. Stok Propidium Iodide solüsyonu (750 µM) :	89
3.3.3.2. Stok Fluorescein diacetate solüsyonu (24 µM):	89
3.3.4. Adacık Hücrelerinin Floresan Boya İle Boyanması	89
3.4. Glukoz Uyarım Testi	90
3.4.1. Glukoz Uyarım Testi Solüsyonları.....	90
3.4.1.1.Yüksek Glukoz Solüsyonu (16,7 mM):.....	91
3.4.1.2. Düşük Glukoz Solüsyonu (3,3 mM):	91
3.4.2. Glukoz Uyarım Testi	91

3.5. Adacıkların Proliferasyonunun Ölçülmesi.....	92
4. BULGULAR	93
4.1. Canlılık Değerlendirilmesi.....	94
4.2. Hücre Çoğalması	97
4.3. Glukoz Uyarım Testi.....	100
4.4. İstatistik Analiz Sonuçları	101
5.TARTIŞMA	105
6.SONUÇ	113
7.ÖZET	115
8. SUMMARY	117
9.KAYNAKLAR.....	119
10.EKLER.....	136
11.TEŞEKKÜR	137
12. ÖZGEÇMİŞ	139

RESİMLER VE GRAFİKLER

Resim 1: Karın kısmından açılmış uygulamaya hazır sıçan görüntüsü

Resim 2: Portal vene enjektör ile girilip sabitleniyor ve perfüzyon solüsyonu uygulanıyor

Resim 3: Perfüzyon solüsyonu uygulandıktan sonra sinüzoitlerin belirgin hale geldikleri görülüyor

Resim 4: Karaciğerin renk değiştirmeye başladığı izleniyor

Resim 5: Cauntes cihazında sayılmı yapılan hepatositler (Tripan mavisiX100)

Resim 6: İzole edilen hepatositlerin PAS reaksiyon (➔) görüntüleri (PAS X 400)

Resim 7: İzole edilen hepatositlerin PAS reaksiyon (⬇) görüntüleri (PASX400)

Resim 8 : Gruplara göre kültüre edilmiş adacık ve hepatosit hücreleri. A)adacık kültürü (*) adacık hücresi B) Adacık+Progesteron kültürü grubu (*) adacık hücresi C) Adacık+ Hepatosit Ko- Kültürü (*) adacık hücresi (⬆) hepatosit hücresi D) Adacık+ Hepatosit+ Progesteron Ko-Kültürü (*) adacık hücresi (⬆) hepatosit hücresi

Resim 9: 0. saat taze adacık floresan mikroskop görüntüsü. A) % 78 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri, B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

Resim 10: 48. saat adacık grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) % 82 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri, B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

Resim 11: 48. saat adacık + progesteron grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) % 90 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri, B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400)

Resim 12: 48. saat adacık+ hepatosit grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) %90 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri, B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

Resim 13: 48. saat adacık+ hepatosit+ progesteron grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) % 92 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri, B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

Grafik 1: Akım Sitometri Historgamları. A) Adacık grubu, B) Adacık-Hepatosit grubu, C) Adacık-Progesteron grubu, D) Adacık-Hepatosit-Progesteron grubu. Yeşil alanlar: eski hücreler, kırmızı alanlar: çoğalan hücreler

Grafik 2: Canlılık değerlendirilmesi

Grafik 3: Poliferasyon değerlendirilmesi

Grafik 4: Düşük glukoz yoğunluğunda ELİZA yüzde değerleri

Grafik 5: Yüksek glukoz yoğunluğunda ELİZA yüzde değerleri

TABLÖLAR

Tablo 1: Gruplara göre adacık canlılık yüzdeleri

Tablo2: Akım sitometri ile yapılan sayım sonuçlar

Toblo 3: Glukoz uyarım testi sonuçları

Tablo 4: Canlılık sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

Tablo 5: BrdU boyamasında proliferasyon ölçüm sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

Tablo 6: 0.Saat ELİZA sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

Tablo 7: 48.Saat ELİZA sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrad Derece
μ	: Mikron
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
aa	: Aminoasit
a	:Arter
a.v	:Arteriol
A	: Alfa hücresi
ATPaz	: Adenozin Trifosfataz
B	: Beta hücresi
BM	: Kemik iliği
BSA	: Bovin Serum Albumin
BrdU	: 5-bromo-2'-deoksiüridin
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
CaCl₂.2H₂O	: Kalsiyum klorid dehidrat
CAMs	: Hücre Adezyon Molekülü
CCl₄	:Karbon Tetraklorit
Cm	: Santimetre

CO₂	: Karbondioksit
D	: Delta hücresi
DEC	: Pankreas kanal epitel hücresi
DEX	: Deksamethazonun
Dk	: Dakika
DMEM	: Dulbecco's Modifiye Eagle Mediyum
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Ekstraselluler Matriks
EM	: Elektron Mikroskop
ELİSA	: Enzim linked immunosorbent assay
FBS	: Fötal Bovin Serum
FDA	: FluoresceinDiacetate
gr	: Gram
γ	: Gamma Hücresi
G	: Santrifüj kuvveti
GER	: Granüllü Endoplazmik Retikulum
GLP-1	: Glukagon benzeri peptit -1
H₂O₂	: Hidrojenperoksit
HBSS	: Hank's balanced salt solüsyon
HEPES	: 4- (2-hidroksietil)1- piperazinetansülfonik asid

HCl	: Hidro Klorik Asit
HGF	: Hepatosit Büyüme Faktörü
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
kg	: Kilogram
KCl	: Potasyum klorür
KRB	: Krebs-Ringer bikarbonat
Lig	: Ligament
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
mmHg	: Milimetre Civa
ml	: Mililitre
mM	: Mili molar
MCP-1	: MakrofajKemo-Atraktan Protein
n	: Sinir
nm	: Nanometre
NaCl	: Sodyum klorür
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
PI	: Propidium Iodide
PP	: Pankreatik Polipeptid hücresi
PRG	: Progesteron
PRL	: Prolaktin

RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Dakika Başına Dönme Sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
Sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Th	: Toraks
TGF-β1	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta 1
TF	: Doku Faktörü
v	: Ven
v.v	: Venül
VDLD	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 1 Diabetes Mellitus pankreatik Langerhans adacıklarının beta hücrelerinin bazı genetik HLA alelleriyle ilişkili olarak otoimmün harabiyeti ve yitimiyle seyreden süreğen bir hastalıktır¹ . Ekzojen insülin tedavisi, Tip 1 diyabetli hastalarda yaşam kalitesini arttırmak ve diyabetin süreğen komplikasyonlarını önlemek ya da geciktirmek için tek seçenektir. Ancak yoğun insulin tedavisinin süreğen komplikasyonları önlemede yeterli başarıya ulaşamadığı gözlenmektedir. Ayrıca çoklu uygulama gerektirmesi ve uyumu kolay olmayan bir tedavi yöntemi olmasının yanı sıra zamanla ciddi hipoglisemik ataklara duyarsızlaşmaya neden olabilmektedir². Yoğun insülin tedavisinin kısıtlayıcı yönleri, Tip 1 diyabetli hastalarda daha fizyolojik glisemik denetim sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesini sağlamıştır. Aynı zamanda pankreas ve böbrek nakli yapılan hastaların %80'inin ilk bir yıl içerisinde insülininden bağımsız hale geldiği gözlenmiştir³. Ancak büyük cerrahiye bağlı yan etkiler ve uzun süreli immün-baskılayıcı tedavi gerektirmesi bu tedavinin kısıtlayıcı yanlarıdır. Pankreasın %2' sinden daha az bir kısmını oluşturan adacık hücrelerinin izole edilerek, daha az-invazif yoldan (portal vene infüzyonla) karaciğere nakledilmesine yönelik çalışmalar 1990' larda hız kazanmıştır. İlk başarılı sonuçlar 90' ılı yılların sonunda gelmeye başlamıştır. Shapiro ve arkadaşları, 7 tip 1 diyabetli hastanın adacık hücre naklinden sonra insulinden bağımsız hale geldiklerini açıklamışlardır⁴. Pankreas adacık hücre nakli, tip 1 diyabetli hastalar için yeni ve umut verici bir yöntem olmasına karşın halen seçilmiş hastalarda uygulanan deneysel bir uygulamadır. Adacık naklinde önemli bir sorun kan aracılı inflamatuvar tepkime sonucu adacık yüzeyinde hızla trombosit birikimi olmaktadır⁵.

Adacıkların transplantasyonu genelde karaciğer portal ven' inden yapılır. Adacıklar verildikten sonra karaciğerin sol lobuna yayılmaya başlar ve sinusoidlere yerleşirler. İmplant edilen adacıklardan salınan insulin karaciğerde yapısal ve işlevsel bazı değişikliklere uğramaktadır. Adacık hücre nakliyle uzun süreli, insulin bağımsız daha fizyolojik bir metabolik denetim sağlamak ve hipoglisemiye duyarlılığı arttırmak hedeflenmektedir. Alıcıyı immün- baskılayıcı tedavinin potansiyel yan etkilerine etkin bırakmadan, graftın ömrünü uzatmaya ve işlevselliğini korumaya yönelik araştırmalar halen sürmektedir⁶⁻⁷.

İzolasyon sürecinde oluşan hipoksi ve oksidatif stres, hücrelerde sitokin aracılı apoptoz ve nekrozu uyarmakta ve hücre yitimine neden olabilmektedir. Nakil öncesi adacık hücrelerinin kültür edilmesinin, preparatlardaki hücre yoğunluğunu artırıp hücre canlılığını uzattığına yönelik veriler bulunmaktadır⁸. Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, gebelik süresince insulin düzeyi ve pankreas adacık hücrelerinde artış olduğu gözlenmiş ve gebelik sırasında yüksek olan progesteron hormonunun bu artışta rol oynadığı ileri sürülmüştür⁹. Diğer yandan adacık hücrelerince sentezlenen doku faktörü (TF) ve makrofaj kemo-atraktan protein (MCP-1) gibi moleküller; portal infüzyon sonrası trombotik ve immünolojik tepkimelere yol açabilmektedir¹⁰.

Bir çok merkezde adacık hücreleri transplantasyon öncesi kültüre edilmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir¹¹⁻¹². Hücrelerin kültüre edilmesi ayrıca nakil öncesi hazırlıklar için zaman kazandırmakta, çeşitli mikrobiyolojik-pirojenik testler ve işlev testlerinin uygulanmasına olanak

sağlamaktadır. Yine de nakil öncesi kültür aşamasında da %20-30 oranında hücre yitimi olmaktadır¹¹. Uygun inkübasyon koşullarının sağlanması, besi yerlerinin geliştirilmesi ve ortama eklenerek hücre canlılığını uzatacak maddelerin bulunup geliştirilmesine yönelik güncel çalışmalar sürmektedir.

Bizde çalışmamızda kültüre adacık hücrelerinin karaciğer portal ven' inden verildikten sonra canlılığının nasıl etkilendiğini gösterebilmek ve progesteron hormonunun etkisini belirleyebilmek ereğiyle in-vitro koşullarda adacık+ hepatosit ko-kültürüne progesteron hormonu ekleyerek adacıklarda floresan boyama ile canlılık ölçümü, BrdU ile boyayıp akım sitometride sayarak proliferasyonuna olan etkilerini ve glukoz tolerans testi ile fonksiyon ölçümü yapmayı ve gruplar arasındaki farklılıkları belirlemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Pankreas Gelişimi

Pankreas, duodenumun proksimal kısmına doğru gelişim gösteren ve ön barsağın kaudal parçasından köken alan endodermal hücrelerinden gelişen bir organdır. Gelişimin erken evrelerinde dorsal ve ventral tomurcuklardan oluşur. Dorsal pankreas tomurcuk' u daha büyüktür ve kranialde dorsal mezenter içerisinde yer alır. Ventral tomurcuk ise ventral mezenter yaprakları arasında safra kanalına yakın olarak yerleşmiştir¹³⁻¹⁴.

Duodenum sağa doğru dönüp 'C' şeklini alırken, ventral tomurcukta arkaya göç edip dorsal pankreas tomurcuğunun arkasında yerini alır. Bunu izleyerek ventral ve dorsal pankreas tomurcuklarının parankimve kanal sistemleri birleşirler.

Ventral pankreas tomurcuğu ; unsinat uzantıyı (unicate process) ve pankreas başının inferior parçasını yapar. Bezin geri kalan kısmı ise dorsal pankreas tomurcuğundan gelişir¹⁵.

Ana pankreas kanalı (Virsung kanalı) dorsal pankreas kanalının distal kısmı ile ventral pankreas kanalının tümünün birleşmesi ile oluşur. Dorsal pankreas kanalının proksimal kısmı ya tümüyle kapanır ya da ana kanalın yaklaşık 2 cm kadar yukarısında aksesuar kanal (Santorini Kanalı) olarak kalır. Ana pankreas kanalı safra kanalı ile birleşerek major duodenal papilla'dan duodenuma açılır. Aksesuar kanal ise minör duodenal papilla' dan duodenuma açılır ve salgısını buradan boşaltır¹⁴.

Endokrin salgı yapan Langerhans adacıkları intrauterin 3. ayda pankreas parankiminden gelişerek organın tümüne dağılır. İnsulin salgısı 5. ayda başlar. Glukagon ve somatostatin salgılayan hücrelerde parankimal hücrelerden gelişir¹³⁻¹⁵.

Bağ dokusu kapsülü ve loblar arası septalar çevre splanknik mezodermden köken alarak gelişir¹⁴⁻¹⁵.

2.1.1. Pankreas Anamolileri

2.1.1.1. Aksesuar Pankreas Dokusu

Pankreasın normal olması gereken yerin dışında başka bir yerde bulunması olgusudur. Özafagus alt ucundan, primer barsağın alt ucuna kadar herhangi bir bölgede görülebilir. Sıklıkla mide ya da duodenum duvarında yada ileal divertikülde yerleşiktir. Pankreas'a özgü tüm histolojik özellikleri gösterir.

2.1.1.2. Annular Pankreas (Halka Şekilli Pankreas)

Genelde ikili pankreas tomurcuğunun duodenum çevresinde büyümesi ile oluşur. Ventral tomurcuğun sağdaki parçası normal yönündeki göçünü sürdürürken, sol parçası aksi yönde hareket eder. Sonra dorsal tomurcuk ile bir pankreas halkası oluşturacak şekilde birleşir. Bu doğumdan önce ya da ergin dönemde duodenumun tıkanmasına neden olabilir. Daha çok erkeklerde görülen bir anamolidir¹⁴⁻¹⁵.

2.2. Pankreas Anatomisi

Pankreas; epigastrium ve sol hypochondrium bölgesinde, bursa omentalis'in arkasında, Planum transpyloricum' u çaprazlayan uzunlamasına bir organdır. Karın arka duvarını transvers geçerek duodenumdan dalağa kadar ulaşmaktadır¹⁶⁻¹⁷⁻¹⁸.

Çok yumuşaktır ve fiziki muayenesi yapılamamaktadır. Gri-pembe renkli ve dış yüzü hafif lobüllenme göstermektedir¹⁶⁻¹⁹.

Pankreas anatomik olarak dört bölümden oluşur.

- Caput Pankreatis
- Collum Pankreatis
- Corpus Pankreatis
- Cauda Pankreatis¹⁹

2.2.1. Caput Pankreatis

Pankreasın en geniş bölümüdür. Disk şeklindedir. Orta çizginin sağında , duodenumun ilk üç bölümünün oluşturduğu 'C' şeklindeki kavsin içinde,1., 2., 3. lumbar vertebra düzeyinde bulunmaktadır¹⁶⁻¹⁹.

Caput pancreatis' in bir bölümü arteria ve vena mesenterica superior' un arkasında sola doğru ilerler ve bu kısım 'processus uncinatus' olarak isimlendirilir¹⁷⁻¹⁸. Processus uncinatus bazen pankreastan tümüyle ayrılmış küçük bir lob şeklinde de olabilir. Bu gibi loblara 'pancreatis accessorium' (Winslow) denilmektedir. Processus uncinatus ile caput arasında incisura pancreatis denilen bir çentik bulunur. Bu çentikten arteria ve vena mesenterica superiorlar pankreas ön yüzüne çıkarlar¹⁶⁻¹⁹.

Caput pancreatis periton ve bağ dokusu ile duodenuma yapışıktır. Bu yapışma bölgesinde duodenum kavsi ile pankreas başı arasında C şeklinde bir oluk vardır. Bu olukta a. Pancreaticoduodenalis superior ve inferior birleşirler ve pankreasın ön yüzüne dağılan dallarını verirler¹⁸⁻¹⁹.

Caput pancreatisin ön yüzünün sağ ve yukarı kısmı peritonsuzdur. Mesocolon transversumun başlangıç kısmına gevşek bağ dokusu ile tutunur. Ön yüz bu alanın altında ince barsaklar ile, üstünde ise bursa omentalis ile komşudur¹⁶⁻¹⁹.

2.2.2. Collum Pancreatis

Cauda pancreatis' den sonra öne ve yukarı doğru uzayan parça 2-2.5 cm uzunluğundadır. Corpus pancreatis ile birleşir. Arka yüzü v. mesenterica superior ve bunun devamı olan v. porta hepatis ile komşuluk yapar. Bu damarları arkadan proc. uncinatus, önden collum pancreatis kuşatır. Arka yüzünde v. linealis ile v. portae hepatis birleşir. Tuber omentale denilen collum pancreatisin sol tarafında hafif bir çıkıntı bulunur¹⁹.

2.2.3. Corpus Pancreatis

1.ve 2. lumbar vertebra düzeyinde sağdan sola ve biraz da yukarıya doğru uzanır. Üç yüz ve üç kenara sahiptir.

2.2.3.1. Yüzler;

2.2.3.1.1.Facies anterior(ön yüz): Pankreasın periton ile örtülü yüzüdür. Mideden bursa omentalis ile ayrılmıştır.

2.2.3.1.2.Facies posterior(arka yüz): Periton ile örtülüdür. Sağdan sola doğru; aorta, a. mesenterica superior, v. renalis, sol v. splenica, gl. suprarenalis sinistra ve sol böbrek ile komşuluk yapar.

2.2.3.1.3.Facies inferior(alt yüz): Periton ile örtülüdür. Flexura duodenojejunalis ve jejunum kıvrımlarının üzerinde yer alır.

2.2.3.2. Kenarlar

2.2.3.2.1. Margo superior: Sağdan sola ve biraz da yukarıya doğru uzar. Kuyruk kısmına yakın sola daralır ve sivrileşir. Bu kenarın sağ ucunda tuber omentale bulunur.Üst kenar, truncus coeliacus, a. renalis' in başlangıcı ve gang. coeliacum ile komşuluk yapar.

2.2.3.2.2. Margo anterior: Ön ve alt yüzler arasında bulunmaktadır. Bu kenara mesocolon transversum yapışır.

2.2.3.2.3. Margo inferior: Arka ve alt yüzler arasında bulunur. Sağından ve altından a. v. mesenterica superior çıkar¹⁶⁻²⁰.

2.2.4. Cauda Pancreatis

Pankreas gövdesinin sol tarafa doğru devamıdır. Kuyruk bölümünü oluşturur. Yuvarlak- kalın ya da yassı-ince şekilli olabilir. Sol tarafta hilum splenicum, aşağıda flexura coli sinistra ve arkada sol hilum renale ile komşuluk yapar. Cauda pancreatis bazen dalağa kadar gitmez ve 3-4 cm kala sonlanır. Böyle durumlarda cauda pancreatis, periton yapraklarından oluşan lig. pancreaticolienale aracılığı ile dalağa bağlanır. Cauda pancreatisin arkasında ilerleyen dalak damarları bu bağın yaprakları arasında bulunur ve dalak hilusuna girer¹⁹⁻²⁰.

2.2.5. Ductus Pancreaticus(Wirsung Kanalı)

Pankreası soldan sağa çaprazlayan kanaldır. Arka yüze daha yakın yerleşim gösterir. Cauda pancreatiste, lobuluslara ait küçük kanalların birleşmesi ile oluşmaya başlar. Caput pancreatis' e gelince aşağı ve arkaya doğru bükülerek devam eder ve burada bazen bezin içinde bazende arka yüzünde ductus coledochus'la yan yana gelir. İki kanal birlikte eğik bir şekilde 15 mm ilerledikten sonra pars descendens duodeni' nin duvarını delerler. Burada ampulla hepatopancreatica denen bir genişleme yaparlar. Papilla duodeni major' un tepesine açılır. Ductus coledochus ve Ductus pancreaticus ayrı ayrı duodenuma açıldığı durumlarda ampulla ince bir mukoza plikası ile ikiye ayrılmış olur. Üçüncü bir olasılık da ampulla hiç oluşmaz iki kanalda ayrı ayrı doğrudan papilla duodeni major'e açılır¹⁶⁻¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰.

Sıklıkla ek bir kanal daha bulunmaktadır. Bu kanal caput pancreatis' in alt ucundan gelen küçük kanalları alır ve ductus pancreaticus accessorius olarak adlandırılır. Esas ductus pancreaticusun' un önünde yukarıya doğru ilerler. Ve ara bir kanal ile ductus pancreaticus' a bağlanır. Ductus pancreaticus accessorius duodenuma papilla duodeni minor' den açılır. Esas kanalın tıkalı olduğu durumlarda aksesuar kanal tek başına boşaltıcı işlevi yapar¹⁹⁻²⁰.

2.2.6. Oddi Sfinkteri

Oddi sfinkteri ampullanın çevresindeki kas düzenidir. Birçok varyasyonu vardır. Çoğunlukla;

1.Sphincter choledochus: Duodenum duvarına girdiği noktadan ampullaya kadar ductus choledohus' u sarar. Safra akımı ve safra kesesinin dolmasını denetler.

2. Sphincter pancreaticus: Ductus pancreatis' in intraduodenal kısmını sarar. Bazen bu kas yapısı hiç bulunmayabilir.

3. Sphincter ampullae: Ductusların birleştiği noktadan papilla'nın tepesine kadar ampullayı sarar.

4.Longitudinal lifler: Kanalların duodenuma girdiği noktadan, papilla' nın tepesine kadar uzanarak kanalları birbirlerine veya duodenum duvarına bağlar.

5.Destek lifleri: Duodenum duvarının longitudinal kas lifleri sphincterin longitudinal liflerine bağlanırlar. Ampullanın genişlemesini önlerler¹⁶.

2.2.7. Damarlar

2.2.7.1. Arterler

A.splenica, pankreasın gövde ve kuyruk kısımlarını, a .pancreaticoduodenalis superior ve inferior ise pankreasın baş kısmını besler. Bu damarlar septalar boyunca büyük dallara ayrılarak interlobüler kanallar ve asinüsler çevresinde kapiller ağlar oluştururlar. Küçük arterler Langerhans adacıklarının kapsüllerini delerek pencerele kapillerlere dallanırlar ve kan akımı adacığın merkezinden periferine doğru olur.

2.2.7.2. Venler

Arterlerin izlediği yolları izleyerek organı terk eden venül ve venler v. porta, v. splenica ve v. mesenterica superior' a dökülürler²⁰.

2.2.8. Lenf Damarları

Lenf damarları asinuslar çevresinden başlarlar. Çoğunodi lymphatici pancreatica splenci' ye açılırlar. Bir kısmı ise nodi lymphatici pylorici' ye boşalır. Bu lenf düğümlelerinde de nodi lymphatici coeliaci ve nodi lymphatici mesenterici superiores' e açılırlar²⁰.

2.2.9. Sinirler

Sempatik sinirler torakal 5. ve 9. segmentlerden n. splanchnicus major yolu ile gelirler. Bazen torakal 10. ve 11. segmentlerdende lifler ganglia coeliaca ve ganglion mesentericum superius' da sinaps yaparak gelirler

Parasempatik sinirler n. vagus' dan gelirler. Her iki lif de plexus coeliacus' da birbirleri ile karışır¹⁶.

Parasempatik sinir uçları hücrelerde sonlanır ve salgıyı artırır. Sempatik lifler ise damar daraltıcıdır (vazokonstriktör) ve salgıyı azaltır¹⁶⁻¹⁹.

2.3. Pankreas Histolojisi

Pankreas yaklaşık 25 cm uzunluğunda, 5 cm genişliğinde, 1-2 cm kalınlığında ve 150 gr ağırlığında vücut arka duvarına yerleşik karışık bir bezdir. Taze dokunun rengi açık pembe, sarı yada beyazdır²¹⁻²².

Pankreas endokrin ve ekzokrin bölümlerden oluşmuştur²²⁻²³⁻²⁴⁻²⁵. Dıştan az gelişmiş, ince sıkı bağ dokusundan bir kapsül ile çevrelenmiştir²¹⁻²⁴⁻²⁶. Kapsülden organın içine doğru giren bağ doku bölmeleri onu lobcuklara ayırır. Bu bağ doku bölmelerinde damar ve sinirlerle birlikte büyük boşaltım kanalları yer alır²¹.

Lobuluslar içinde pankreasın ekzokrin kısmı olan ve enzim salgılamasıyla yükümlü seröz son kısımlar ve bunların intralobüler kanalları ile endokrin kısmı oluşturan Langerhans adacıkları bulunmaktadır²²⁻²⁷.

2.3.1. Endokrin Pankreas

Pankreasın endokrin kısmı ekzokrin doku içerisinde yer alan Langerhans adacıkları olarak adlandırılan hücre topluluklarından oluşmuştur. 1869 yılında Paul Langerhans, mikroskopla pankreasın yapısını incelerken, ekzokrin dokunun içinde yayılmış hücre kümelerine rastlamıştır. Bir süre sonra Eduard Laguesse, daha sonraları “Langerhans adacıkları” diye anılacak olan ve o dönemde işlevleri bilinmeyen bu hücreler için, sindirimde rolü olan bir salgı üretiliyor olabilecekları fikrini ortaya atmıştır. 1889’ da Oscar Minkowski, Joseph von Mering ile birlikte yaptıkları bir çalışmada, pankreasın sindirim üzerindeki olası rolünü gösterebilmek için sağlıklı bir köpeğin pankreasını çıkarmıştır. Bundan birkaç gün sonra, köpeğin idrarının üzerinde sineklerin uçuştugu farketmişler ve köpeğin idrarı test edildiğinde ise içinde şeker olduğu ortaya çıkmıştır. Bu, pankreas ve şeker hastalığı arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk bulgu olmuştur.

1901 yılında ise, Eugene Opie’ nin Langerhans adacıkları ile şeker hastalığı arasındaki bağlantıyı açıkça ortaya koymasıyla, bir başka önemli adım atılmıştır²⁸.

1916 yılında Schafer, pankreatik adacıklardan antidiabetik bir hormonun salgılandığını öne sürmüş ve Latince’ de “*ada*” anlamına gelen “*insula*” olarak isimlendirmiştir²⁹.

1920’ lerin başlarında Frederick Banting ve John Macleod pankreastan diabetik hayvanların kan şekerini düşürebilen bir madde elde etmeyi başarmışlardır. Diabetik hastalarda insülinin kullanılabilmesi ise 1922 yılında gerçekleşmiştir³⁰.

1923 yılı Nobel ödülleri komitesi insülinin başarılı bir şekilde elde edilebilmesi ve diyabetin insülin ile tedavi edilebilir hale gelmesi üzerine Banting ve Macleod’ a Nobel fizyoloji ödülünü layık görmüşlerdir²⁸.

1926’ da Abel kristalize insülini³¹, ardından Jensen ve Evans B-zincirinin N-terminal fenilalanini hidrolize etmiş ve insülinin protein yapıda olduğunu göstermiştir³².

Adacıklar ortalama 100-200 µm çapındadır. Bir adacık 1000 kadar hücre içerir. Bunların % 80’ i beta hücreleridir ve bu hücreler,

adacığın merkezinde, diğer hücreler tarafından çevrenmiş olarak bulunur. İnsan pankreasında bir milyon kadar adacık bulunur ve adacıklar, pankreasın toplam kitlesinin sadece % 1' ini oluştururlar³³. Langerhans adacıkları pankreasın kuyruk bölümünde daha yoğun bulunurlar²².

Adacıklar hemotoksilen–eozin ile koyu renk boyanan ekzokrin pankreas içerisinde daha açık boyanmış olarak görülürler²².

Adacıklar poligonal hücrelerin düzensiz bir şekilde bir araya gelmeleri ve aralarında pencereleri kapillerler içermeleri ile özelleşmişlerdir.²⁷ Bu hücreler endokrin hücrelerin yüzeyinde bulunan hücre adezyon molekülleri (CAMs) ile bağlıdırlar³⁴⁻³⁵. Adacığı retiküler liflerden yapıli ince bir kapsül çevreleyerek ekzokrin dokudan ayırır²⁷. Bu lifler adacık içindeki kapillerleride sarar³⁶.

Langerhans adacıkları 5 tip hücreden oluşmaktadır. Bunlar;

1. Alfa Hücreleri
2. Beta Hücreleri
3. Delta Hücreleri
4. PP(Pankreatik polipeptid) Hücreleri
5. Gamma Hücreleri' dir²¹.

Bu hücre tiplerini alışlagelmiş histolojik tespit ve boyamalarla birbirinden ayırmak olanaksızdır. Tespit ve boyamaları özel yöntemler uygulayarak yapılabilir. Örneğin; Zenkel-formol tespitinden sonra Mallory-Azan boyası uygulandığında A, B, D hücre tanımlanabilir. Bu yöntemde A hücreleri kırmızı, B hücreleri açık kahve- turuncu ve D hücreleri ise mavi renkte gözlenir²².

2.3.1.1. B (beta) Hücreleri

Beta hücreleri bir Langerhans adacığının % 70' ini oluştururlar. Adacığın merkezinde yerleşmişlerdir. Görevleri; yüksek kan şekerini düşürmekten sorumlu hormon olan insülin salgılamaktır. EM. incelemelerinde sitoplazmada 300 nm çapında granüller gözlenir. Granüller. elektron yoğun bir öz ve çevresinde geniş , az yoğun bir halka ile çevrelenmiş olarak görülürler. Elektron yoğun öz bölgesinde çinko içeren düzensiz insülin kristalleri bulunmaktadır. Hücrelerde Golgi kompleksi iyi gelişmiştir. GER sisternaları azdır, mitokondriyonlar Alfa hücrelerine karşın daha gelişkindir.

2.3.1.2.A (alfa) Hücreleri

Alfa hücreleri Langerhans adacığının % 20' sini oluşturur. Adacığın kenarlarında yerleşim gösterirler. Görevleri; düşük kan şekerini düzenlemek olan glukagon hormonunu salgılamaktır. EM incelemelerinde sitoplazmalarında 250 nm çapında düzenli granüller içerdikleri görülür. Granüller elektron yoğun bir öz ile çevresinde , az yoğun bir bölgeden oluşmuştur. Çekirdeğe komşu Golgi kompleksi iyi gelişmiştir. Az miktarda GER tubulusları ve değişik büyüklükte mitokondriyonlar içerirler.

2.3.1.3. D (delta) Hücreleri

Delta hücreleri Langerhans adacığının % 5' ini oluştururlar. Genellikle A hücreleri ile birlikte adacığın kenarına yerleşiktirler. Görevi; parakrin etki ile diğer hücrelerin hormon salgılamasını baskılayan, endokrin etkisiyle de safra kesesi kaslarının kasılmasını sağlayan somatostatin hormonu salgılamaktır. EM incelemelerinde sitoplazmalarında 350 nm çapında az yoğun ve homojen granüller içerdikleri izlenir.

2.3.1.4. γ (gamma) Hücreleri

Gamma hücreleri Langerhans adacığının % 1' ini oluştururlar. Tüm adacık içerisinde homojen yayılım gösterirler. Görevi; mide paryetal hücrelerinden HCl üretimini uyaran gastrin hormonu salgılamaktır.

2.3.1.5. PP (pankreatik polipeptid) Hücreleri

PP hücreleri Langerhans adacığının % 1' ini oluştururlar. Adacık içerisinde dağınık halde bulunurlar. Görevi; pankreasın ekzokrin salgısını baskılayan pankreatik polipeptid salgılamaktır²¹⁻²²⁻²⁴⁻²⁷⁻³⁶.

2.4. Pankreas Fizyolojisi

Pankreas iç yapısıyla tükürük bezine benzerlik gösteren bileşik bir bezdir. Ekzokrin ve endokrin salgı yapar. Ekzokrin kısmı bezin büyük bir bölümünü kapsar. Pankreasın endokrin kısmını ise Langerhans adacıkları oluşturur³⁷⁻³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰.

2.4.1. Endokrin Pankreas:

Langerhans adacıkları ekzokrin kısmın içinde bulunmaktadır. Hormon sentezleyip salgılamakla yükümlüdür⁴⁰.

Langerhans adacıkları pankreasın baş ve gövde kısmına karşın kuyruk bölümünde daha fazladır. 76 x 175 µm boyutlarında, oval şekilli hücre topluluklarında oluşmaktadır³⁸⁻⁴¹. Adacıkların sentezledikleri hormonları portal ven içine boşaltır. Bu özellik mide bağırsak sistemi dışında diğer endokrin bezlerin hiçbirinde izlenmez⁴¹.

Langerhans adacıklarında 5 farklı hücre tipi bulunmaktadır. Bunların herbirinden farklı hormonlar salgılanır²¹⁻³⁸⁻⁴¹.

İnsan pankreasının kuyruk, gövde ve başının ön ve üst kısmındaki adacıkların kenar kısmında çok sayıda Alfa hücresi ile birkaç adet PP hücresi bulunurken, sıçanlarda ve olasılıkla insan pankreasının başının arka tarafındaki adacıklarda çok sayıda PP hücresi az sayıda Alfa hücresi bulunmaktadır. Alfa hücrelerinden zengin adacıklar embriyonel olarak dorsal pankreas tomurcuğundan, PP hücresinden zengin adacıklar ise embriyonal ventral pankreas tomurcuğundan gelişmişlerdir³⁸.

Adacığı oluşturan hücreler arasında iletişim olduğu ortaya konulmuştur. Alfa ve Beta hücreleri arasında desmozomlar, sıkı bağlantı birimleri ve neksuslar aracılığı ile bağlantı sağlanmaktadır. Hücreler arasında bağlantı birimlerinin belli bir düzene göre olması bunların işlevsel birim olarak çalıştıklarını akla getirmektedir⁴¹. İşlevsel birliktelik hücrelerin bir kısmının diğerlerinin salgılarını denetlenmesini sağlar. Somatostatin, insülin ve glukagon salgısını baskımlarken, insülin, glukagon salgısını baskılamaktadır³⁸.

2.4.1.1. Pankreastan Salgılanan Hormonlar

2.4.1.1.1. İnsülin

Langerhans adacıklarındaki Beta hücrelerinden salgılanır. Protein yapısında bir hormondur. Disülfid bağı ile bağlanmış iki polipeptid zincirinden oluşur. İnsülin karbohidrat metabolizmasını düzenleyen en önemli hormondur. Yağ ve protein metabolizması üzerine etkileri de bulunmaktadır.

2.4.1.1.2. Glukagon

Langerhans adacıklarındaki Alfa hücrelerinden salgılanır. 29 aminoasitten oluşmuş protein yapıda bir hormondur. Kan glukoz düzeyini yükseltir. Glukagonun etkisi karaciğer üzerinedir.

2.4.1.1.3. Somatostatin

Langerhans adacıklarındaki Delta hücrelerinden salgılanır.14 aminoasitten oluşan bir peptid hormondur. İnsülin,glukogon,ve pankreatik polipeptit salgılanmasını baskılar etkisini parakrin olarak gösterir.

2.4.1.1.4. Pankreatik Polipeptit

Langerhans adacıklarındaki PP hücrelerinden salgılanır. Yiyeceklerin emilmesini yavaşlatır. Gerçek fizyolojik işlevi tam olarak bilinmemektedir³⁸⁻³⁹⁻⁴¹.

2.5. Karaciğer Gelişimi

Karaciğer tomurcuğu gelişimin 3. haftası ortasında ön barsağın distal ucunda endodermal bir epitel çıkıntısı olarak belirir. Burası tam gelişmiş duodenumun ikinci bölümünün ortalarına rastlar. Karaciğer tomurcuğunu oluşturan endodermal epitel hücreleri hızla çoğalarak septum transversum denilen splanknik mezodermin içine doğru ilerlerler. Karaciğer tomurcuğu sağ ve sol dallara ayrılır. Bu dallanmalar ve endodermal hücrelerin yaptığı kordonlar, damarlı mezoderm içine doğru büyürken, hücre kordonları bir yandan da birbirleri ile anastomozlar yaparlar. Ana karaciğer tomurcuğu ile onun sağ ve sol lobları kanalize olarak ana hepatik kanal, sağ ve sol hepatik kanalları oluştururlar. Daha sonra karaciğer hücre kordonları içinde daha ileri bir kanalizasyon olur ve kanal sistemi safra kapilleri ile birleşir. Bu arada karaciğer tomurcuğunun ventralindeki küçük çıkıntı safra kesesi ve duktus sistikus'u oluşturur. Karaciğer hücre kordonları septum transversum içinde ilerleyen v. omfalomesenterica' ları etkileyerek bir ağ yapmaya zorlar. Böylece ilk karaciğer sinüzoidleri oluşur. Aynı zamanda karaciğerin dışında bulunan v. umbilicalis' ler de karaciğer ile bağlantı kurarlar. Karaciğerin tipik yapısı oluşurken, septum transversum' a ait olan mezoderm, organın bağ dokusu bölmelerini yaparak karaciğeri lop ve lopcuklara ayırır. Hematopoietik hücreler, Kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri de septum transversum mezoderminden köken alır¹³⁻¹⁴⁻⁴²⁻⁴³.

Karaciğer hızla büyüyerek karın boşluğunun büyük bölümünü doldurur. Başlangıçta sağ ve sol loplar hemen hemen aynı büyüklüğe

sahiptirler. Ancak kısa bir süre sonra sağ lob daha fazla büyür. Kaudat ve quatrat loblar sağ lobun alt bölümleri olarak gelişir.

Karaciğer hızlı büyümesi sonucu septum transversum sınırları içine sığamaz hale gelir ve karın boşluğuna doğru taşar. Karın ön duvarı ile karaciğer arasında yer alan septum mezodermi gerilir, incelir ve ligamentum falciforme olarak adlandırılır. Başlangıçta septum transversum mezodermi içinde yer alan v. umbilicalis artık, ligamentum falciforme' nin kaudal kenarı boyunca uzanır. Bu duruma benzerlik gösteren diğer bir yapıda, karaciğer ve ön barsak arasındaki septum mezoderminin gerileyip zarsı bir yapı halini almasıdır. Bu yapı küçük omentum (gastrohepatik ve duodenohepatik ligamantler) olarak adlandırılır. Küçük omentum' un serbest kenarı boyunca safra kanalları, v. porta ve a. hepatica uzanır. Küçük omentum ile ligamentum falciforme birlikte ön barsakla karın ön duvarı arasındaki peritoneal bağlantıyı oluşturmaları nedeniyle ventral mezogastrium adını alır. Karaciğer yüzeyindeki mezoderm farklanarak, üst yüzeydeki küçük bir alan dışında visseral periton haline gelir. Bu alanda karaciğer orijinal septum transversum ile ilişkisini hala sürdürür. Septum yoğun bir mezenşimal doku halindedir ve ileride diyafragmanın tendinöz parçasını oluşturacaktır. Bu bölgeye değen karaciğer yüzeyi periton ile hiçbir zaman örtülmez ve karaciğerin çıplak bölgesi olarak bilinir¹³⁻¹⁴.

Fötal yaşamın 6. haftasında karaciğer hemopoiezisi başlar ve bu karaciğere parlak, kırmızı bir görünüm kazandırır. 7. ve 10.

haftalarda karaciğer oldukça büyümüştür ve gelişimin 10. haftasında , ağırlığı ortalama embriyonun ağırlığının % 10' u kadardır. Bu durum içerdiği çok sayıdaki sinüzoidler ile fetal yaşamdaki hemopoietik işlevi nedeni ile dir.

Karaciğer hücreleri ile sinüzoidler arasında hemopoietik seri hücre toplulukları görülür. Burada üretilen eritrosit ve lökositler sinüzoid duvarını aşarak kan dolaşımına katılırlar. Fötüsün 5. ayına doğru karaciğerdeki kan yapımı en yüksek düzeye ulaşır. Bu durum doğuma kadar gittikçe azalarak sürer. Doğumda karaciğerde ancak kan adacıklarına rastlanılır. Doğumda karaciğerin ağırlığı tüm vücut ağırlığının % 5' i kadardır¹³⁻¹⁴⁻⁴³⁻⁴⁴⁻⁴⁵.

Karaciğerin bir diğer görevi de gelişimin 12. haftasından başlayarak karaciğer hücrelerinin safra üretmeye başlamasıdır. Safra üretimine koşut olarak bu evrede safra kesesi ve duktus sistikus da gelişmiştir. Duktus sistikus, duktus hepatikus communis ile birleşerek duktus koledokus' u oluşturur. Böylece üretilen safra barsağa akabilir¹³⁻¹⁴.

2.6. Karaciğer Anatomisi

Vücudun en büyük iç organı ve bezidir, karın boşluğunun sağ üst bölümünde yer alır. Regio hypochondriaca dextra' nın tamamını, regio epigastriaca' nın büyük bölümünü , çok az olarak da regio hypochondriaca sinistra'nın üst sağ yarımını doldurur. Erkeklerde 1400- 1800 g kadında 1200-1400 g ağırlığında kırmızı-kahverengi renktedir. Esnek ve dokununca bükülebilen kolayca yırtılabilen bir yapısı vardır. Damarların çokluğu karaciğer yaralarında önemli kanamalara neden olur²⁰⁻⁴⁷⁻⁴⁸.

Karın kaslarının tonusu ve genel karın içi basınç organın yerinde durmasını sağlayan önemli etkenlerdendir. Ayrıca V. hepatica' nın V. cava inf. ile devam etmesi organ için önemli bir destektir¹⁷⁻²⁰.

2.6.1. Yüzleri, Kenarları ve Karaciğer Yatağı

Karaciğerin diafragmatik (üst yüz) ve visseral (alt yüz) olarak iki yüzü , alt ve arka iki kenarı vardır.

2.6.1.2. Diafragmatik yüz (facies diaphragmatica)

Pars superior, pars anterior, pars dextra ve pars posterior olarak dört ayrı parçaya ayrılır. Pars anterior ile visseral yüzün kesiştiği keskin kenara margo inferior, pars posterior ile visseral yüzün kesiştiği künt kenara margo posterior denir. Karaciğerin pars anterior'unu sınırlayan periton, diafragma'nın alt yüzüne atlar. Buna lig. triangulare denir. Lig. coronarium'un serbest sağ köşesine lig. triangulare dextrum, serbest sol köşesine lig. triangulare sinistrum adı verilir. Karaciğerin sol ucu appendix fibrosa hepatis denilen bir fibröz uzantı ile diafragma'nın alt yüzüne uzanır. Lig. triangularis sinistrum'un arka yaprağı omentum minor ile devam eder. Lig. coronarium'un orta kısmından iki yapraklı bir periton katlantısı , ön- arka konumda diafragmaya atlar. Buna lig. falciforme hepatis denir. Bu ligamentin ön ucu karın ön duvarından göbeğe kadar iner. İçinde kapanmış v. umbilicalis sinistra'nın bulunduğu bu uzantı lig. teres hepatis adını alır. Lig. falciforme içinde v. paraumbilicalis' ler bulunur¹⁶.

2.6.1.2.1. Pars Superior

Sağ ve sol parçaları dış bükeydir. Ancak aorta parçasında kalbin durumuna uygun, impressio cardiaca denilen çukurluk görülür. Pleura, sağ akciğer tabanı, perikardiyum, kalp karıncıkları ve bir miktar da sol akciğer tabanı ile komşuluk yapar.

2.6.1.2.2. Pars Anterior

Üçgen şeklindedir. Lig. falciforme hepatis' in yapışma çizgisi dışında peritonla örtülüdür. Bu yüzün büyük bir bölümü diafragma ile komşuluk yapar. Bu komşuluk karaciğeri sağda pleura ve 6- 7. kostalar ile onların kıkırdak parçalarından, solda 7- 8. kıkırdak kostalardan ayrılır. Pars anterior' un orta bölümü karın ön duvarı ve proc. xiphoideus arkasından uzanır.

2.6.1.2.3. Pars Dextra

Peritonla örtülüdür. Diafragma' nın sağ parçası aracılığı ile sağ akciğer ve 7- 11. kostalarla komşudur. Üst yüzün üçte bir bölümü diafragma aracılığı ile sağ akciğer ve pleura ile komşudur. Orta üçte biri rec. costa diafragmaticus ile komşuluktadır. Alt üçte biri diafragma aracılığı ile kostalarla değinir.

2.6.1.2.4. Pars Posterior

Sağda geniş, solda dardır. Bu iç bükeylik columna vertebralis' in öne doğru olan dış bükeyliğine uyar. Bu yüzün geniş bir bölümü peritonsuz olup diafragmaya gevşek bir bağ dokusuyla bağlanır. Peritonsuz alana area nuda, pars affixa, bare area gibi isimler verilmiştir¹³. Area nuda (çıplak alan) üçgen şeklindedir. Lig. coronarium' un üst ve alt yaprakları ile sınırlanmıştır. Area nuda tabanında sulcus venae cavae denilen derin bir oluk vardır. Bu oluk peritonsuzdur. V. cava inferior' un üst bölümü bu oluk içindedir. Hepatik venler (venae hepatica) karaciğer tabanından çıkan oluğun alt ucunun sağ tarafında, çıplak alan gl. suprarenalis' in üst kısmıyla komşudur (impressio suprarenalis). Sulcus venae cavae'nin solunda kalan bölüm lobus caudatus' tur. Sol loptan fissura ligamenti venosi ile ayrılmıştır. Ductus venosus'un fibröz artığı olan ligamentum venosum v. portae hepatis' in sol dalına yapışır. Ligamentin diğer ucu, yukarı v. cava inferior yakınında v. hepatica sinistra ile birleşir. Bazen v. cava inferiora açılabilir¹⁸⁻²⁰.

2.6.1.3. Facies Visceralis (alt yüz)

İç organlarla komşu olan bu yüz aşağıya, sola ve arkaya bakar. Bu yüz oluklarla birkaç parçaya ayrılmıştır. Oluklar üç tanedir. Bunlardan, biri sağda, diğeri solda olmak üzere karaciğerin ön ve arka kenarları arasında uzanırlar. Üçüncü oluk ortada enine durumda olup iki

yan oluğu birbiriyle birleştirir ve bu şekilde üç oluk H harfine benzeyen bir şekil oluştururlar. Enine durumda olan orta oluğa karaciğer kapısı (porta hepatis) denir. Buradan, karaciğere giren çıkan damarlar, safra yolları, sinirler ve lenf damarları geçer.

Yan olukların sağda olanına, sulcus sagittalis dexter denir. Bu oluğu, önde ve arkada iki çukur oluşturur. Öndeki çukura, burada safra kesesi bulunduğundan, fossa vesicae biliaris adı verilir. Arkadaki çukurdan v. cava inferior geçer. Bu nedenle bu çukura sulcus venae cavae denir. Bu iki çukur birbirinden kuyruklu lobun processus caudatus denilen uzantısı ile ayrılmıştır. Soldaki oluğa, daha fazla yarığa benzetildiği için fissura sagittalis sinistra adı verilir. Bu oluk da iki yarığın birleşmesinden oluşmuştur. Öndeki yarığa sulcus venae umbilicalis ya da fissura ligamenti teretis denir. Bu yarıқта, főtüste v. umbilicalis bulunur. Doğum olaylandıktan sonra bu ven kapanır ve bir bağ şeklini alır. Bu bağa lig.teres hepatis adı verilir. Sol oluğun arka parçasını yapan yarık fissura ligamenti venosi' dir. Üçüncü oluk (porta hepatis) enine durumda olup iki yan oluğu birbiriyle birleştirir. Uzunluğu yaklaşık olarak 5 cm kadardır. Oldukça derin ve geniş olan bu oluk önde lobus quadratus, arkada lobus caudatus ve bu lobu sağ lobla birleştiren proc. caudatus, sağda sulcus sagittalis dexter ve solda fissura sagittalis sinistra ile sınırlanmıştır.

Lig. hepatoduodenale omentum minus' un bir parçası olup duodenum ile porta hepatis arasında uzanır. Porta hepatis' e ulaşınca iki yaprak halinde karaciğerin alt yüzüne yayılır. Omentum minus' un iki yaprağı arasında gelen damar ve sinirler burada karaciğerin içine girerler.

Sağ ve sol loblardan gelen ductus hepaticus dexter ve ductus hepaticus sinister, porta hepatis' in sağ parçasında birbirleriyle birleşerek ductus hepaticus communis' i oluştururlar. A. hepatica, ductus hepaticus communis' in solunda porta hepatis' e gelir ve burada iki kola ayrılır. Porta hepatis' te plexus hepaticus adı verilen, sempatik ve parasempatik liflerden yapılmış bir sinir ağı bulunur. Bu pleksustan sinir dalları damarlarla birlikte karaciğerin içine girerler. Buradan her tarafa, karaciğer lobüllerine ve hücrelerine kadar dağılırlar. Porta hepatis' te birkaç lenf düğümü bulunur.

Porta hepatis karaciğerin alt yüzünü dört loba ayırır. Sağ oluğun sağında kalan kısma sağ lob, sol oluğun solunda kalan kısma sol lob; porta hepatis' in önünde bulunan parçaya lobus quadratus, arkasında kalan parçaya lobus caudatus denir⁴⁹.

2.6.1.3.1. Sağ lob (Lobus hepaticus dexter)

Geniş ve üzerinde izler bulunan çukur bir lobdur. Bu izler önden arkaya doğru; sağ kolon dirseği (impressio colica), sağ böbreğin ön yüzü (impressio renalis), sağ böbreküstü bezi (impressio suprarenalis) ve safra kesesi çukurunun hemen yanında duodenum' un ikinci parçasının izi (impressio duodenalis) dir.

2.6.1.3.2. Sol lob (Lobus hepaticus sinister)

Midenin fundus kısmı ile sol lobun alt yüzü komşuluk yapar. Burada impressio gastrica görülür. Bu yüzün arka kısmında özafagusun geçtiği bir çentik bulunmaktadır. Karaciğerin arka yüzünde de devam eder. Sol lob karaciğerin soluna doğru gittikçe incelik ve fibröz bir uzantı ile sonlanır (apendix fibrosa hepatis). Burada yalnızca fibröz doku arasında safra yollarının artıkları Vasa aberrantia hepatis bulunur. Karaciğer dokusu bu alanda yoktur. Sol lob Lobus quadratus ve caudatus olarak ikiye ayrılır.

2.6.1.3.3. Lobus Quadratus

Arkada porta hepatis, sağda fossa vesicae felleae, solda sulcus venae umbilicalis (pars chordae venae umbilicalis) ile sınırlandırılmıştır. Bu lob midenin boş olduğu zaman colon transversum ve pars duodeni ile komşuluk yapar.

2.6.1.3.4. Lobus Caudatus

Arka yüzde bulunur. Sağ tarafta sulcus venae cavae ile, solda fissura ligamenti venosi ile sınırlandırılmıştır. Aşağıda ve sağda lobus caudatus, dil şeklinde dar bir karaciğer bölümü olan proc. caudatus ile sağ loba bağlanır. Lobus caudatus' un aşağıda solda processus papillaris denilen küçük yuvarlak bir uzantısı vardır¹⁸⁻²⁰⁻⁴⁹⁻⁵⁰.

2.6.1.4. Kenarlar

Karaciğerin ön (alt) ve arka olarak iki kenarı vardır.

2.6.1.4.1. Ön Kenar (margo inferior)

Solda beşinci intercostal aralıkta, linea medioclavicularis' ten başlayarak sağa ve aşağıya doğru uzanıp 7- 8. kıkırdak costaların birleştiği yerde sol arcus costalis' i çaprazlar. Buradan aynı yönde devam eder. Epigastrium bölgesine geçerek 10. ve 9. kıkırdak costaların birleştiği yerde sağ arcus costalis' e ulaşır. Buradan başlayarak margo inf.

costaların altından toraks' ın alt kenarını izler ve linea axillaris' in arkasında, 11. costanın altında karaciğerin arka kenarı (margo dorsalis) ile uzanır. Ön kenarın epigastrium bölgesinden geçen kısmı, orta çizgiyi processus xiphoideus' un tabanı ile göbek arasındaki aralığın ortasında çaprazlar. Ön kenar iki çentiğe sahiptir. Bunlardan biri önde orta çizginin biraz sağ tarafında bulunur. Karaciğerin visseral yüzünde bulunan fissura sagittalis sinistra'nın başlangıcında bulunan ve ligament teres' in geçtiği incisura ligamenti teretis' tir. İkinci çentik ise biraz daha sağda musculus rectis abdominis' in dış kenarının sağ costa kavisini çaprazladığı yerde bulunur. Bu alanda safra kesesinin fundusu bulunduğundan bu çentiğe incisura vesicalis adı verilmiştir.

2.6.1.4.2. Arka Kenar

Arkada diaphragmatik yüz ile visseral yüzün yapışık parçası arasında bulunmaktadır. Karaciğerin arka kenarı sağda künt ve kalındır. Omurganın solunda karaciğerin sol ucuna doğru gittikçe incilir ve keskinleşir.

2.6.2. Periton Durumu

Karaciğerin tamamına yakını periton ile örtülüdür. Peritonsuz kısımları ise ;

1. Pars affixa ya da posterior faciei diafragmaticae, karaciğerin arka tarafında, lig. coronarium'un üst ve alt yaprakları arasında kalan ve doğrudan diafragmaya yapışmış olan parçasıdır

2. Safra kesesinin gevşek bağ dokusu ile karaciğere bağlı olduğu fossa vesicae felleae

3. Sulcus venae cavae ve fissura lig. venosi

4. Porta hepatis⁴⁹.

2.6.3. Bağları

Karaciğer duodenum, diafragma, mide ve karın duvarına peritonun birçok kıvrım yapmasıyla bağlanmıştır.

2.6.3.1. Ligamentum Falciforme Hepatis

Karaciğeri diafragma ve karın ön duvarına bağlayan orak şeklinde bir bağıdır. Dışbükey kenarı diafragma' nın alt yüzüne ve karın ön duvarının arka yüzüne yapışır. Lig. falciforme hepatis karaciğerin üst ve ön yüzeyleri ile margo inf.' da fissura ligamenti teretis' e yapışır. Umblicus'tan fissura ligamenti teretis' e uzanan serbest kenarı lig. teres hepatis' i ve küçük vv. paraumbilicales' i içerir. Ligamentin üst ucunda iki yaprağı birbirinden ayrılır. İki yaprak arasında küçük üçgen bir alanda periton örtüsü bulunmaz. Sol yaprak lig. triangulare sinistrum'un ön yaprağı ile sağ yaprağı lig. coronarium' un üst yaprağı ile devam eder.

2.6.3.2. Ligamentum Coronarium Hepatis

Karaciğerin üst ve alt yüzlerini örten periton yapraklarının diafragmaya atlamasıyla oluşmuştur. Arka tarafta bulunur. İki yaprak arasında diafragmatik yüzün yapışık kısmı yer alır. Lig. coronarium önde lig. falciforme ile birleşir. Sağda ve solda lig. coronarium' un iki yaprağı birleşerek lig. triangulare dextrum ve sinistrum ile uzanır.

2.6.3.3. Ligamentum Triangulare Sinistrum

Birbirine sıkıca yapışmış iki periton yaprağından oluşmuştur. Sol lobun alt yüzünden yukarıya ve geriye doğru diafragma' nın alt yüzüne geçer.

2.6.3.4. Ligamentum Triangulare Dextrum

Sağ lobun arka yüzünün dış parçasını diafragma' ya bağlayan V şeklinde kısa bir kıvrımdır. V' nin uç bölümü bağın serbest sağ kenarını oluşturur. Gerçek lig. coronarium' un sağ sınırını yapar.

2.6.3.5. Ligamentum Teres Hepatis

Bu bağ embriyonal evrede var olan v. umbilicalis sinistra' nın sonradan tıkanması ve fibröz bağ dokusu haline gelmesinden oluşan bir bağdır. Göbekten başlayarak , lig. falciforme' nin serbest kenarının içinde yukarı ve biraz sağa doğru uzanır. Karaciğerin ön kenarına geldiğinde visseral yüze geçer. Burada fissura sagittalis sinistra' nın ön parçasının

içinde arkaya doğru devam eder. Sonlanması ise venae portae' nin sol koluna yapışması ile olur.

2.6.3.6. Omentum Minus

Embriyonda görülen mezogastrium ventrale' nin karaciğerin arkasında kalan ve mide ile duodenuma uzanan parçasından oluşmuştur. Omentum minus iki parçadan oluşur. Lig. hepatogastrium küçük kurvaturdan başlar. Karaciğerin visseral yüzünü örten periton ile uzanır. Omentum minus' un ikinci parçası lig. hepatoduodenale, pilor ve duodenum' un birinci parçasını karaciğere bağlar.

2.6.3.7. Ligamentum Hepatorenale

Bu bağ karaciğeri sağ böbreğe ve sağ böbrek üstü bezine bağlar. Ancak her zaman görülen bir bağ değildir.

Tüm bu bağlar ince ve zayıf bir periton yapısıdır. Bu bağlar karaciğeri yerinde tutmak için yeterli değildir. Bunlar karaciğerin sağ sola

kaymaması ve dönmemesini sağlayabilir. Karaciğerin yerinde kalmasını sağlayan önemli nedenler ise;

1. Karaciğer arka tarafında sağlam bir bağ dokusuyla (area nuda) doğrudan doğruya diafragmaya tutunmuştur.

2. Diafragmanın altında periton boşluğunda basıncın negatif olması. Bu durumda diafragma karaciğeri kendisine doğru çeker. Diafragma ile karaciğer arasındaki sıkı ilişki periton kapalı kaldıkça bozulmaz⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵².

2.6.4. Karaciğer Segmentasyonu

Karaciğer segmentlerini oluşturmak üzere a. hepatica propria, ductus hepaticus communis, v. portae sağ ve sol olmak üzere ikiye dallara ayrıldıktan sonra daha alt dallara bölünür. Buna göre karaciğer segmentlerinin saptanmasında esas ilke bu oluşumların intrahepatik dallarının karaciğer parankimasında dağılmasıdır, böylece lobus hepatis dexter, segmentum posterius' a, lobus hepatis sinister, segmentum mediale ve segmentum laterale' ye ayrılır. Segmentum laterale lobus quadratus' u ve lobus caudatus' un bir bölümünü kapsar. Facies visseralis' te lobus quadratus' u içeren bölüme pars quadrata denir. Bir segment içinde a. hepaticae ile v. portae'nin dalları ve kanallar çaprazlaşmazlar²⁰.

2.6.5. Karaciğer Damarları

Karaciğer damarlarca oldukça zengin bir organdır. Besleyici ve işlevsel olarak iki tip damar içerir. Bunlar;

1. Parankimayı besleyen a.hepatica propria ile
2. İşlevsel damar v. portae' dır.

2.6.5.1. A. Hepatica Propria

Truncus coeliacus' dan çıkan a. hepaticus communis' in uç dallarından biridir. A. hepatica propria omentum minus' un iki yaprağı arasında porta hepatis' e giriş yapar. Burada ramus dexter ve sinister olarak ikiye ayrılır. A. hepatica propria' dan karaciğere giden dallar, Kiernan aralıklarına kadar ilerler ve burada, aa. interlobularis'l eri oluştururlar. Bundan sonra karaciğer epitel hücre kordonları arasında uzanan sinüzoidlere açılırlar. A. hepatica propria dalları arasında anastomoz yoktur.

2.6.5.2. V. Portae

V. splenica ve v. mesenterica' nın birleşmesiyle oluşan bir damardır. A. hepatica propria ile birlikte omentum minus' un iki yaprağı arasında porta hepatis' e gelir ve karaciğer içinde dallara ayrılır. Kiernan aralıklarında vv. interlobularis' leri oluştururlar. Bundan sonra karaciğer epitelyum hücre kordonları arasında uzanan sinüzoidlere açılırlar. Bu sinüzoidlere a. hepatica propria' nın dalları da açılır. Böylece her iki damar sistemi ile gelen arteryal ve venöz kan vv. centrales'lere geçer. Bu venlere v. hepaticae denir. Venae hepaticae' ler de karaciğerin arka yüzünden geçen v. cava inferior' a açılırlar²⁰⁻⁵¹.

2.6.5.3. Karaciğerin Lenf Damarları

Karaciğerin derin damarları v. cava inferior çevresi lenf düğümleri ve nodi lymphatici hepatici' de, yüzeysel damarları ise v. cava inferior çevresi lenf düğümleri, nodi lymphatici coeliaci, nodi lymphatici hepatici' de sonlanır.

2.6.6. Karaciğerin Sinirleri

Karaciğer parasempatik ve sempatik sinirlerini plexus coeliacus' tan almaktadır. Plexus coeliacus; parasempatik liflerini sağ ve sol n. vagus' dan ve plexus cervicalis' in dalı olan phrenicus' dan, sempatik liflerini n. splanchnia' dan alır. Plexus coeliacus' dan ayrılan sinir lifleri plexus hepaticus' u oluştururlar. Bu plexustan çıkan sinir lifleri de karaciğere giden damarların çevresinde karaciğere girerek karaciğer hücrelerine kadar ilerler. Sensitif lifler sempatik sinirler ile birlikte Th 8- 11 spinal segmentlere giderler. Bu nedenle karaciğer ağrıları 10. intercostal sinirin dağılma alanında ve karnın yukarı bölümlerinde duyulur¹⁷⁻²⁰⁻⁵¹.

2.7. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer deriden sonra vücudumuzdaki en büyük organdır. Yaklaşık 1500 g ağırlığındadır. Sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği, depolandığı bir organdır. Çok zengin bir kan damar ağına sahiptir. Bu nedenle canlıda kırmızı ya da kırmızı-kahverengi renkte görülür. Karaciğer endokrin ve ekzokrin salgı yapan bir bezdir. Karın boşluğunda diyafragmanın altında yer alan karaciğerin kan dolaşımındaki yeri ve dolaşımla olan ilişkisi oldukça önemlidir. Kanın % 70- 80' i v. porta' dan , az bir kısmı ise a. hepatica propria ile gelir. Karaciğerin dolaşımdaki yeri metabolitlerin biriktirilip taşınması, toksik maddelerin nötralize edilmesi ve uzaklaştırılması için oldukça uygundur²⁴⁻⁵³⁻⁵⁴⁻⁵⁵.

2.7.1. Karaciğer Stroması

Karaciğer Glisson kapsülü denen hilusda kalınlaşan ince bir bağ dokusu ile örtülüdür. Kapsül kollagen ve elastik lifler ile az sayıda bağ dokusu hücrelerinden oluşmaktadır. Karaciğer lobuslarının oluşumunda kapsülden ayrılan ince bağ dokusu septaların, organın içine doğru ilerlemesi rol oynar. V. porta ve a. hepatica organa hilusdan giriş yaparken, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenf damarları buradan organı terk ederler. Bu damarlar ve kanallar klasik karaciğer lobülleri arasında yer alan portal alanlarda bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu alandan başlayarak

retiküler bir lif ağı ile hepatositlere ve karaciğer lobüllerinin sinüzoidal endotel hücrelerine desteklik sağlar.

Karaciğer lopları histolojik kesitlerde hekzagonal (altıgen) şekildedir. Lobuluslar karaciğer için işlev birimidir. Karaciğerin lobüler yapısının oluşumunda stromanın büyük payı vardır. Bazı bölgelerde lobüller, safra kanalları, lenf ve kan damarları, sinirler içeren bağ dokusuyla sınırlandırılmıştır. Portal alan Glisson üçgeni ya da Kiernan aralığı olarak adlandırılan bu bölgeler lobüllerin köşelerinde bulunur. Her bir Glisson üçgeninde V. porta' nın dalı, a. hepatica propria' nın dalı, safra kanalı ve lenf damarı bulunur. Bu yapıların içinde en büyük olan venüllerdir. Damarlarla stromaya bağlı olan bu lobulus yapısına ' klasik lobulus' denir.

2.7.1.1. Klasik Lobulus

Klasik lobusta v. interlobularis ile a. interlobularis altıgenin köşesinden geçerken, venulae perilobulares ile arteriolae perilobulares altıgenin kenarlarından geçer. Kan klasik lobülde çevreden merkeze doğru akar. Bunun sonucunda oksijen, metabolitler, ince barsaktan emilen toksik ve toksik olmayan maddeler lobülün önce periferik hücrelerine sonrada merkezdeki hücrelere ulaşır. Buda perilobüler hücrelerin sentrolobüler hücrelerden farklı davranmasının nedenidir.

2.7.1.2. Portal Lobulus

Portal alan merkez alınarak, komşu lobulusların v. centralis'lerini birleştiren köşeli ve genellikle üçgen şekilli prizmalardan oluşur. Kan akımı burada merkezden çevreye doğrudur.

2.7.1.3. Karaciğer Asinusu

İki v.centralis ve iki komşu lobulus sınırındaki v. perilobulares eksen alınarak belirlenen karaciğer parankiması karaciğerin en küçük işlevsel birimidir. Böylece iki komşu lobulus segmentlerini kapsayan karaciğer parankimasının oluşturduğu birimde kan v. a. perilobulares'lerden iki taraftanda v. centralise doğru akar. Bu eksen etrafında asinusta bir bölgenin 'zona' lar oluşur. Eksene en yakın bölge 1. zona bunu izleyen 2. zona daha sonra 3. zona bölgesi v. centralise komşu olan bölgedir. 1. zona en çok kanlanan ve beslenen bölgedir⁵³⁻⁵⁵.

2.7.1.4. Karaciğer Sinüzoidleri

Karaciğere kan sağlanması karaciğer hücre kordonları arasındaki sinüzoidler aracılığı ile olur. Sinüzoidler kapillerlerden daha geniş (9- 12 μ) ve düzensiz şekillidir. Venülae perilobülares' lerden, v. centralis yönüne akan kan, sinüzoid aracılığı ile karaciğer metabolizmasına katılmaktadır. Sinüzoidleri sınırlayan hücreler tipik endotel hücrelerinden farklıdır.²⁴

Bir sıra hücrelerden oluşan, sinüzoid duvarı iki yönden tipik kapiller endotel hücrelerinden farklılık gösterirler:

1. Sinüzoid duvarında bulunan hücrelerin bazıları aktif fagositoz yaparlar.
2. Hücre sınırları gümüş nitrat boyama ile belirlenemez.

Sinüzoid duvarında iki tip hücre izlenir. Bunlardan biri endotel hücresi, diğeri ise makrofaj özelliği olan Kupffer hücresidir. Kupffer ve endotel hücreleri arasında ara tiplerde bulunmaktadır. Endotel hücreleri gereksinim olduğunda fagositik hücrelere dönüşebilmektedir. Perfüzyon ile tespit edilmiş karaciğerin elektron mikroskop resimlerinde sinüzoidlerde üç farklı hücre tipi belirlenmiştir;

1.Endotel hücreleri

2.Kupffer hücreleri

3.Perisinüzoidal yağ depolayan hücreler (İto Hücreleri)⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶⁻

57.

2.7.1.4.1. Endotel Hücreleri

Endotel hücreleri sinüzoid duvarındaki hücrelerin büyük bölümünü oluşturur. Küçük yassı şekilli koyu boyanan bir çekirdekleri ve son derece yassılaştırmış sitoplazmaları vardır. Bu hücreler EM' de hücre zarı altında pinositik veziküller izlenir²⁴.

Endotel hücreleri 0.1 µm büyüklüğünde diyaframsız pencereler içerirler. Birçok türde karaciğer sinüzoidlerinin endotel hücreleri altındaki bazal laminası kesintilidir. Bazal laminası kesintili olan ve pencereli endotele sahip olan türlerde makromoleküller ya da 0.5 µm çapındaki partiküller için filtrasyon bariyeri yoktur. Şilomikron ve VDLD bu pencerelerden serbestçe geçebilir⁵⁴.

Pencerelerin büyüklüğü in-vivo faktörlerin etkisi altında değişebilmektedir. Pencerelerin çapının alkol, basınç, CCl₄, hipoksi, irradilyasyon ve endotoksin verilmesinde sonra büyüdüğü, serotonin ve noradrenalin uygulamasından sonrada küçüldüğü belirtilmiştir⁵⁸. Sinüzoid duvar yapısı kan ile karaciğer parankimi arasında alış-verişe uygun olarak özelleşmiştir. Bu özelleşmeler arasında; endotel hücrelerinin pencereci olması, endotel altında sürekli bir bazal laminanın olmayışı, Disse aralığında yer alan ve sinüzoid hücrelerine destek olan bağ dokusu retiküler liflerinin gevşek yapıda olması sayılabilir⁵³. Endotel hücrelerinin Disse aralığına ve hepatositler arasına veya komşu sinüzoidlere kadar uzanan intersinüzoidal köprüler denen sitoplazmik uzantıları vardır. Bu uzantılarla endotel hücrelerin hepatik parankime tutunmaları sağlanır⁵⁹.

İzole edilmiş endotel hücrelerinde aktin ve miyozin filamentleri bulunmuştur. Bu da pencere ve sinüzoid boyutlarının değişmesini kasılabilir proteinlerin etkileyebileceğini göstermektedir⁵⁸. Bunun yanında endotel ve Kupffer hücrelerinin çok düşük düzeyde retinoid içerdiği de öne sürülmektedir⁵⁶.

2.7.1.4.2. Kupffer Hücreleri (Macrophagocytus stellatus)

Kupffer hücreleri (Macrophagocytus stellatus)⁶⁰ 1876' da Kupffer, Karl Wilhelm Von tarafından altın klorid impregnasyon tekniği uygulanmış karaciğerde tanımlanmıştır. Değişik uzunluktaki sitoplazmik uzantıları ile sinüzoid boyunca endotel üzerine otururlar. Kupffer hücreleri oldukça kuvvetli fagositoz yeteneğine sahiptirler. Kupffer hücreleri venöz kan ile gelen zararlı maddeleri yakaladıkları gibi, yaşlanan eritrositleride yakalayarak hemoglobini sindirir ve immünolojik olaylarla ilgili olan proteinleri salgırlar. Kupffer hücrelerinin fagositik özellikleri tripan mavisi, lityum karmin, çini mürekkebi gibi vital boyalar ile gösterilebilir. Berlin mavisi tepkimesi ile eritrositlerin yıkılması sonucu ortaya çıkan demir içerikli pigmentin Kupffer hücrelerinde depolandığı izlenebilir. Kupffer hücreleri karbon veya thoriumdioksit' in elektron opak partiküllerini de alırlar. Bu özellikleriyle Kupffer hücreleri yaygın mononükleer fagositik sisteme dahil edilir. Kupffer hücreleri büyük oranda şekil değiştirme yeteneğine sahiptirler. Düzensiz hücre yüzeyleri ile sinüzoid lümenindeki kan ile temas halindedirler. Mikrovillus ya da yalancı ayak benzeri sitoplazmik uzantılarını sinüzoid lümenine gönderirler ve buradan geçen kan akışını düzenleyen sfinkter etkisi yaparlar. Ayak benzeri uzantıları organel içermezken çok sayıda mikrofilamanlara sahiptirler⁵⁴⁻⁶¹⁻⁶². Hücre yüzey katlanmalarının ve ince villöz uzantıların yanı sıra sitoplazma çevresindeki hücre zarının özel sinüs invaginasyonları vardır. Bu yapılar ince kesitlerde solucan şeklinde göründükleri için bunlara 'Vermiform cisimler' (solucan benzeri cisimler) denmektedir . Bu özelleşmiş hücre zarı yapıları şilomikronları ve karbohidrat partiküllerini fagosit etmektedir⁵⁴⁻⁶³⁻

Kupffer hücrelerinin sitoplazmik organelleri endotel hücrelerinkinden daha zengindir. Sitoplazmalarında sekonderlizozom ve çeşitli büyüklükte vakuoller bulunmaktadır. Çekirdekleri büyük ve soluk renkte, çekirdek zarı ise son derece düzgündür, çekirdekleri makrofaj hücrelerinin çekirdeklerine benzerlik gösterir. Golgi kompleksi ve sentrozom çekirdeğe yakın yerleşim gösterir. Ribozom ve granüllü endoplazmik retikulum sisternaları tüm sitoplazmaya dağılmıştır. Granüllü endoplazmik retikulum sisternalarının uzantıları annulat lamellere bağlanır. Kupffer hücrelerinin granüllü endoplazmik retikulamları ve annulat lamelleri peroksidaz aktivitesine pozitif tepkime verirken sinüzoidal endotel hücreleri peroksidaz aktivitesi göstermezler. Kupffer hücrelerin sayısı monositlerinde kuppfer hücrelerine dönüşmesiyle birlikte artış gösterir. Kupffer hücreleride diğer mononükleer fagositik sistem hücreleri gibi kemik iliği kökenlidir²⁴⁻⁵⁴⁻⁶³.

2.7.1.4.3. Yağ Depolayan Hücreler (Lipocytu Perisinusoideus) İto Hücreleri

Yağ depolayan hücreler parankimal hücrelerin arasında sinüzoidlerin dış tarafında yer alır ve bol miktarda lipid damlacığı içerir⁵⁴. Filamentöz materyal ve mikrotübül içeren uzantılarını endotele doğru uzatırlar⁶⁴. Yağ depolayan hücreler değişik isimlerle adlandırılmıştır; İntersitisiyel hücreler, lipositler, stellat hücreler, to hücreleri, perisitler ve ekstrasvasküler retiküler hücreler bunlardan bazılarıdır. Bu hücreler altın klorid ile boyanırlar⁶⁵. ve fibroblastların sitolojik özelliklerini yansıtır. Yetişkin karaciğerinde kollajen ve retiküler liflere yakın bulunurlar ve bu

liflerin şekillenmesiyle yükümlüdür. İto hücrelerinde lizozom bulunmadığı için ve plazma zarlarında yüksek ATPaz erkide göstermediklerinden fagositoz yetenekleri yoktur²⁴⁻⁵⁴⁻⁶⁶.

Sitoplazmalarında bol miktardaki lipid damlacıklarının yanı sıra granüllü endoplazmik retikulum tübülusları ve bir kaçta mitkondriyon bulunmaktadır. Sitoplazmalarında bol miktarda lipid damlacıkları ile karakterize olmakla beraber % 25' inden fazlası yağ damlacığı içermez. Bu tip ito hücrelerine boş ito hücresi denilir. Çekirdekleri yuvarlak ya da oval şekildedir ve küçük bir çekirdekçik içerirler. Çekirdeği hepatosit çekirdeğinden daha koyu boyanmaktadır⁶⁷.

Yapılan araştırmalarda normal karaciğerde 60- 100 hepatosit alanında 3- 4 ito hücresi bulunduğu saptanmıştır⁶⁸. İto hücreleri kollajen tip III üretimine katılarak karaciğer fibrozisinde önemli rol oynarlar⁶⁹. Mezenşimal kökenlidirler²⁴⁻⁵⁴.

A vitamini, retinil esterleri formunda karaciğer ito hücrelerinde depolanır. Bu hücreler, hücre dışı matriks yapım ve yıkımı, TGF- β 1 ve HGF 'nin üretilmesi ve karaciğerdeki mikrovasküler düzenlemeden sorumlu hücre fonksiyonlarını yerine getirmektedirler⁷⁰⁻⁷¹.

2.7.2. Disse Aralığı (Perisinüzoidal Aralık)

Joseph Disse tarafından insan ölüm sonrası materyalinin histolojik kesitlerinde fark edilmiş ve Disse aralığı olarak adlandırılmıştır. Disse aralığı sinüzoid endoteli ile karaciğer parankim hücreleri arasında bulunmaktadır. Disse aralığı uzun yıllar histologlar tarafından ölüm sonrası değişiklik olarak kabul edilmiş ancak iyi tesbit edilmiş karaciğer dokusunun elektron mikroskop incelemelerinde, içinde mikrovillus bulunduran gerçek bir aralık olduğu saptanmıştır.

Disse aralığında plazma serbestçe hareket etmektedir. Disse aralığının büyük kısmını plazma oluşturur. Disse aralığı lenf damarı endoteli ile çevrilmediği için lenfotik bir aralık değildir. Yinede karaciğer lenfinin şekillenmesinde önemli bir işlevci olduğu düşünülmektedir.

Disse aralığı hepatosit yüzeyine plazmanın doğrudan geçişi, kan ve karaciğer arasında metabolitlerin aktif olarak değişiminde önemli bir yer tutar. Bu değişimin etkisi bu aralıkta bulunan mikrovillusların yüzeyi genişletmesi ile daha da artar⁵⁴.

2.7.3. Hepatositler (Karaciğer Parankim Hücreleri)

Hepatositler 20- 30 µm çapında altı ya da daha fazla yüzlü poligonal hücrelerdir. Hepatositlerin her bir yüzeyi, Disse aralığı yolu, sinüzoidlerin duvarı ve diğer hepatositlerin yüzeyleri ile değini halindedir. Komşu iki hepatosit arasında safra kanalcığı bulunur. Disse aralığına bakan yüzünde aralığa doğru çok sayıda mikrovilluslar vardır.

Hepatositlerin % 25' i iki çekirdek içerirken % 75' i tek çekirdekli. Çekirdek büyük ve yuvarlak şekillidir ve merkezde yerleşmiştir. Çekirdek yüzeyi düzgündür bir ya da daha fazla çekirdekçik içerir. Sitoplazma organel ve inklüzyondan zengindir²⁴⁻⁵³⁻⁵⁵⁻⁶³. Hepatositlerde bol miktarda granüllü ve granülsüz endoplazmik retikulum bulunur. Granüllü endoplazmik retikulum tübülusları yüzeyinde çok sayıda ribozom vardır. Sitoplazma çok sayıda serbest ribozom kapsar. Granüllü endoplazmik retikulum plazma lipoproteinlerinin protein kısımlarını sentezler. Çeşitli maddelerin vücuttan atılmadan önce detoksifikasyon için gerekli oksidasyon, metilasyon ve konjugasyon olaylarından sorumludur. Granülsüz endoplazmik retikulum sisternalarında yaklaşık 30- 40 nm çapında küçük cisimler görülür. Bu cisimlerin VDLD olduğu belirtilmiştir. Granülsüz endoplazmik retikulum kolesterol ve trigliserid oluşturur. Karaciğer hücrelerinin sitoplazmaları hücrenin işlevine göre değişiklik gösterir. Değişkenliğin esas kökeni içeriğinde depoladığı glikojen ve yağdır. Uygun tespit yöntemleri ile glikojen ve yağ korunabilinir ve boyanabilinir. Glikojen yeterince korunduğunda karaciğer hücrelerinin EM görüntülerinde 20- 30 nm çapındaki glikojen toplulukları rozetler şeklinde

görülür ve β partikülleri olarak adlandırılır. Glikojen hepatosit sitoplazmasında granülsüz endoplazmik retikuluma yakın olarak bulunmaktadır. Karaciğer glikojeni kan glikozu için depodur. Kandaki glikoz düzeyi normalin altına düşerse glikojen metabolize olur. Hepatositler çok sayıda mitokondriyon içerir bu sayı hepatosit başına 2000 kadardır. Mitokondriyonların şekil ve büyüklüğü hepatositin bulunduğu lobüle ve farklı fizyolojik koşullara göre değişiklik gösterir. Mitokondriyonlar tübüler kristalidirlar. Golgi kompleksi çekirdeğe yakın olarak ya da safra kanalığına yakın yerleşim gösterir. Golgi kompleksi 3- 5 düz, birbirine koştut dizi kese ya da sisternadan oluşmuştur. Sisternaların uçları genişlemiştir ve çok sayıda 30- 60 nm çapında orta derecede yoğun granül içerir. Bunlar granülsüz endoplazmik retikulumda gözlenen VDLD partikülleri ile aynıdır. Hepatosit lizozomları hücre içi organellerin degradasyonu ve dönüşümü için önemlidir. Lizozomların endositozda da önemli rolü vardır. Makromoleküller önce endozomlarla taşınır sonra lizozomlarla birleşirler. Makromoleküllerin katabolizması bu sekonder lizozomlarda gerçekleşir. Hepatositlerde peroksizomlar tüm sitoplazmaya dağılmış halde bulunurlar. Bunlar 0.2- 0.8 μ m çapında ve zarla çevrili yuvarlak cisimciklerdir. Peroksizomlar mitokondriyonlar gibi oksijen kullanan organellerdir. Oksijen kullanımı oksidazla aracılığıyla serbest radikal oluşumuna yol açtığından bu zararlı son ürünlerinde ortadan kaldırılması gerekmektedir. Oksijen son derece toksik bir ürün olan hidrojen peroksit'e yıkılır. Peroksizomlarda hidrojen peroksiti su ve oksijene yıkan katalaz enzimi vardır. İnsanlarda ayrıca D- aminoasit oksidaz ve alkoldehidrogenaz enzimleri de bulunur. Peroksizomlar yağ asitlerinin β oksidasyonu, glukoneogenez ve purin metabolizmasında da görev alırlar²⁴⁻

53-54-55-61-63-72-73

2.7.3.1. Hepatositlerin İşlevleri

Hepatositlerin endokrin ve ekzokrin işlevleri vardır. Bazı maddelerin sentezini yapar ve biriktirirler, bir kısmını detoksifiye ederler, bazı maddelerin de taşınması sağlarlar.

Karaciğerin en önemli görevlerinden birisi kan glikoz yoğunluğunu sabit oranda tutmaktır. Hepatositler kandaki glikozu glikojene dönüştürerek depolarlar. Glikozun yanı sıra laktik asit, gliserol ve pirüvik asit gibi bazı bileşikler karaciğerde glikoza daha sonrada glikojene dönüştürölüp depolanır. Gerektiğinde ise glikojen, glikojen fosforilaz enzimi ile katalizlenen bir işlemle yeniden glikoza dönüştürölür. Bu enzim genellikle inaktif halde bulunur, epinefrin ve glukagon hormonu ile aktif hale getirilir. EM görüntülerinde glikojen daha çok granölsüz endoplazmik retikulumun çok olduğu sitoplazma alanlarına yerleşmiştir.

Karaciğerde lipitler trigliserit, karbohidratlar glikojen olarak depolanırlar. Metabolitlerin depolanma erki vücudun öğünler arasındaki enerji gereksinimini karşıladığı için önemlidir. Hepatosit granölsüz endoplazmik retikulumu kolesterolün sentezlenmesinde önemli rol oynar.

Hepatositler kendileri için gerekli olan proteinlerin yanında albumin, protrombin, fibrinojen, ve lipoproteinler gibi çeşitli plazma proteinlerini de sentezlerler. Bu proteinlerin sentezi granüllü endoplazmik retikuluma bağlı polizomlarca gerçekleştirilir. Diğer bez hücrelerinde görülenin aksine hepatositler proteinleri ikincil granüller halinde depolamazlar. Sürekli olarak kan dolaşımına verirler. Böylece endokrin bir bez olarak işlev görürler. Karaciğer tarafından kana verilen proteinlerin % 5' i Kupffer hücrelerinde % 95' i ise hepatositlerde sentezlenir.

Safranin üretilmesi, hepatositlerin kan bileşiklerini alıp çeşitli işlemlerden geçirip safra kanalı içine salgılaması ile olaylanan ekzokrin bir işlevdir.

Büyük bir kısmı hemoglobinin parçalanması sonucu oluşan bilirubin mononükleer fagositik sistemde oluşur ve hepatositlere taşınır. Hepatositlerin granülsüz endoplazmik retikulumunda hidrofobik bilirubin glukronik asit ile birleşip suda çözünebilir bilirubin glukuronit oluşur. Daha sonraki aşama bilirubin glukuronit bileşiğinin safra kanalikülleri içine salgılanmasıdır.

Hepatositler bazı boyaları aktif olarak taşıyabilme özelliğine sahiptirler. Bu özelliği kullanılarak bu boyalar karaciğer fonksiyon testi olarak kullanılır.

Hepatositler ürenin oluşması ile sonlanan amino asit deaminasyonun asıl yeridir.

Çeşitli ilaçlar ve maddeler oksidasyon, metilasyon ve konjugasyonla inaktive edilebilirler. Bu olayların gerçekleşmesinden sorumlu enzimler granülsüz endoplazmik retikulumunda bulunur⁵⁴⁻⁵⁵.

2.8. Karaciğer Fizyolojisi

Karaciğer vücutta oldukça önemli görevleri olan bir organdır. Bu fonksiyonlar kısaca;

1. Vücuttaki metabolik sistemin büyük bir bölümü ile ilgilenir.
2. Kanın depolanması ve filtrasyonunda görev alır.
3. Salgı ve vücuttan uzaklaştırma görevi, safranin oluşumu ve sindirim kanalına boşaltılmasıdır³⁹⁻⁷⁴⁻⁷⁵.

2.8.1. Karaciğer Dolaşımı:

Karaciğere a. hepatica propria ve v. porta olmak üzere iki kaynaktan kan gelir.

V. porta; v. mesenterica sup. ile barsaklardan, v. splenica ile de dalak mide pankreas safra kesesinden kan alır.V. porta, a. hepatica propria ve safra kanalı ile birlikte Glisson kapsülü içinde yol alır. Ven ve arterden ayrılan kollar karaciğer lobüllerine karaciğer epitel hücre kordonları arasından girerler. V. porta' dan gelen kollar burada sinüzoidleri oluştururlar. Lobüllerin merkezinde bulunan v. centralis' leri v. hepatica' ya

bunlarda v. cava' ya açılırlar. A. hepatica' nın lobüle giren kolları, v. porta kolları ve sinüzoidler ile anastomoz yaparlar.

V. porta' dan bir dakikada karaciğer sinüzoidlerine 1100 ml kan akar. Buna a. hepatica'dan gelen 350 ml kan da eklenirse karaciğere ortalama dakikada 1450 ml kan gelmektedir.

Karaciğerdeki venöz akışta basıncın artması kanın karaciğer sinüzoidlerinde birikimine ve karaciğerin şişmesine neden olur. Karaciğer, venöz basınçtaki 4- 6 mmHg' lık bir yükselme ile 200- 400 ml kanı depolamaktadır. Bu nedenle karaciğer vücuttaki başlıca kan depolarından biridir. Aksine, bir kişide, hemoraji sonucu dolaşımdan büyük miktarda kan kaybolursa, karaciğer sinüzoidlerindeki normal kanın büyük bir bölümü dolaşıma verilerek kan yitimi önlenmeye çalışılır.

Yemekten sonra bağırsakların oksijen kullanımı artar ve v. porta' da oksijen doymuşluğu azalır. Bu sırada a. hepatica propria' da kan akımı 3- 4 katına çıkarak oksijen gereksinimini karşılar. Karaciğer kan damarları vazokonstriktör sinir alırlarken vazodilatatör sinir almazlar. Karaciğerde lenf üretimi yüksek düzeydedir. V. porta' nın yapmış olduğu sinüzoid duvarları oldukça geçirgendir. Kan proteinleri diğer yerlerdeki kılcal damarlara karşın, kolayca sinüzoid duvarından dışarıya sızabilir. Bu

nedenle karaciğer lenflerinin protein düzeyi kan plazmasınıninkine yakındır³⁹⁻⁴⁰⁻⁴⁶⁻⁷⁶.

2.8.2. Karaciğerin Metabolik İşlevleri

Karaciğer hücreleri oldukça yüksek metabolizma hızına sahiptirler. Karaciğerin metabolik işlevleri şunlardır:

2.8.3. Karbohidrat Metabolizması

Karaciğerin karbohidrat metabolizmasındaki görevi;

1. Glikojen depolamak
2. Glikoneogenezis
3. Galaktoz ve fruktozu glikoza çevirmek
4. Karbohidrat metabolizmasının ara ürünlerinden önemli kimyasal maddelerin oluşturulması.

Karaciğer özellikle kanda normal glikoz yoğunluğunun sürekliliği için önemli bir organdır. Kandaki glikozun fazlasını alıp glikojen olarak depo eder. Buna karaciğerin glikoz tamponlama işlevi denilir. Büyük miktarda karbohidrat içeren bir yemekten sonra karaciğer işlevleri bozuk olan birinin kanındaki kan şekeri miktarı karaciğeri normal çalışan birine göre 3 kat daha yüksektir.

Glikoneogenez; glikoz yoğunluğu normalin altına düştüğünde görülür. Kandaki glikozun normal düzeyde kalmasına yardımcı olur. Büyük miktarda amino asidin glikoza çevrilmesi kandaki glikoz yoğunluğunun normale döndürülmesine katkı sağlar.

2.8.3.1. Yağ Metabolizması

Karaciğerin yağ metabolizmasındaki özgün görevleri;

1. Yağ asitlerinin büyük bir hızla beta oksidasyonu ve asetoasetik asit oluşumu
2. Lipoproteinlerin çoğunun yapımı
3. Kolesterol ve fosfolipid sentezi
4. Büyük miktarda karbohidrat ve proteinin yağa çevrilmesi olarak sıralanır.

Karaciğerde sentezi yapılan yağ, lipoproteinler içinde yağ dokusuna taşınarak depo edilir.

2.8.3.2. Protein Metabolizması

Karaciğerin protein metabolizmasındaki görevleri;

1. aa deaminasyonu
2. Amonyanın üreye dönüştürülerek vücut sıvılarından uzaklaştırılması
3. Plazma proteinlerinin oluşumu
4. Önemli aa. ve diğer maddelerin vücuttaki metabolik olaylar için birbirlerine dönüşümünü gerçekleştirmektir.

Aminoasitler karbohidrat ya da yağlara dönüştürülmeden ve enerji için kullanılmadan önce deaminasyona uğramaları gerekmektedir. Gama globulinlerinin bir bölümü dışında, hemen hemen bütün plazma proteinleri karaciğer hücrelerinde yapılırlar (yaklaşık % 90' ı). Geri kalan gama globulinler antikorlardır ve başlıca lenfatik dokularda yapılırlar. Plazma proteinlerinin azalması karaciğer hücrelerinde mitoz bölünmeyi hızlandırır bunun sonucunda karaciğer büyümesi gözlenir³⁹.

2.8.3.3. Vitaminlerin Depo Edilmesi

Karaciğerde depo edilen vitaminler A, B₁₂ ve D vitaminleridir. Karaciğer, B₁₂ eksikliğini en az 1 yıl, A vitamini eksikliğini 10 ay, D vitamini eksikliğini ise 3- 4 ay önlemeye yetecek kadar depo eder.

2.8.3.4. Kan Pıhtılaşması İle Karaciğer İlişkisi

Kanın pıhtılaşması için gerekli maddelerin çoğu karaciğerde üretilir. Bu maddeler; fibrinojen, akseleratör globulin, faktör VII ve birçok önemli pıhtılaşma faktörleridir³⁹⁻⁷⁴.

2.8.3.5. Demir Depolanması

Vücutta demirin büyük bir kısmı karaciğerde ferritin olarak depolanır. Karaciğer hücrelerinde bol miktarda apoferritin denen demirle az ya da çok miktarda birleşebilen bir protein bulunmaktadır. Vücut sıvılarında demir miktarı arttığında, apoferritinle birleşerek ferritin' i oluşturur ve gerektiğinde başka bir yerde kullanılmak üzere depo edilir. Dolaşımda demir düzeyi düştüğünde ise ferritin demiri serbest hale geçirilir. Böylece apoferritin- ferritin hem demir deposu hem de kan demirinin tamponu işlevi görür³⁹.

2.8.3.6. Karaciğerin Toksik Maddeleri Metabolize Ve Detoksifiye Etme İşlevi

Vücuda giren ilaç ve kimyasal toksik maddeler metabolize edilir ve böbrek, barsak ve akciğer de biyolojik değişikliklere uğratılırlar. Ancak detoksifiye edilmelerinden karaciğer sorumludur. Barsaktan emilen maddeleri içeren kan v. porta aracılığı ile karaciğere getirilir. Burada toksik maddeler detoksifiye edilirler. Zararlı maddeler safra içine verilir ve barsak yoluyla vücudu terk eder. Detoksifiye işleminde birkaç enzim çalışmaktadır. Bu enzimler karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulum zarında bulunmaktadır.

İlaçlar ve diğer yabancı maddeler karaciğerde oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjugasyon tepkimeleri ile metabolize edilirler. Bu kimyasal tepkimelerin esas hedefi yağda eriyen maddeleri suda eriyebilen hale dönüştürmektir. Yabancı maddelerin detoksifiye edilmesinde çoğunlukla oksidasyon tepkimesi kullanılır. Konjugasyon ise kimyasal maddelerin vücudun doğal maddeleri ile birleştirilmesi ile olur. Konjuge edilmiş yabancı maddelerin biyolojik aktiviteleri ortadan kalkar. Karaciğerdeki mikrozomal enzimler, steroid hormonları, kolesterolü, yağ asitlerini okside ederler. Okside olmuş bileşikler konjuge edilirler ve böbreklerce vücuttan uzaklaştırılırlar⁴⁰.

2.9. Progesteron Hormonu

Progesteron hormonu progestinlerin en önemlisidir. Progestinler uterusun gebeliğe, meme bezlerinin de laktasyona hazırlanmasını sağlar.

Progesteron hormonu gebe olmayan bir kadında ovaryum döngüsünün ikinci yarısında korpus luteumdan salgılanır.

Gebeliğin 4. ayından başlayarak plasentadan da progesteron salgılanır.

Progesteron steroid yapıda bir hormondur. Kandan alınan kolesterolde az miktarda da asetil koenzim- A' dan sentezlenir.

Progesteron kanda plazma albumini ve özel progesteron bağlayıcı globulinler ile taşınır.

Progesteron salgılandıktan birkaç dakika sonra tümüyle, progesteron etkisi olmayan diğer steroidlere yıkılır. Karaciğerin metabolik yıkımda önemli bir rolü vardır.

Progesteronun en önemli son yıkım ürünü pregnandiyoldür. özgün progesteronun yaklaşık % 10' u idrarla bu şekilde dışarı atılır.

2.9.1. Progesteron Hormonunun İşlevleri

Uterus üzerine etkisi; döngünün ikinci yarısında uterus endometriyumunda sekresyon evresiyle ilgili değişimleri başlatarak uterusu döllenmiş ovumun implantasyonuna hazırlamaktır.

Ayrıca uterus kasılmalarının şiddetini ve frekansını azaltıcı etkiye sahiptir. Böylece implante olmuş ovumun atılması önlenmiş olur.

Tuba uterina üzerine etkisi; tuba uterinayı döşeyen mukozada sekresyonla ilgili değişimleri başlatır.

Meme bezlerine etkisi; Progesteron alveol hücrelerinin proliferasyonu ile memelerdeki lobül ve alveollerin gelişimini hızlandırır. Böylece memeler büyüyerek sütle dolar. Progesteron hormonu etkisiyle kısmen lobül ve alveollerin sekretuar gelişimi kısmende deri altı dokusundaki sıvının artmasına bağlı olarak göğüslerde büyüme olur³⁹⁻⁷⁷.

Gebelik süresince insülin ve pankreas adacık hücrelerinde artış olmaktadır. Gebelik sırasında yüksek olan progesteron düzeyinin bu artışta rol oynadığı ileri sürülmektedir⁷⁸.

2.10. Hücre Kültürü

Hücrelerin, dokulardan mekanik ve enzimatik yollarla tek hücre ya da küçük kümeler halinde ayrıştırılıp uygun besiyeri ile cam yada polipropilen kültür ortamı içerisinde in-vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü denilmektedir⁷⁹. Hücre ve doku kültürlerinin kullanılması ile son yıllarda moleküler biyoloji ve tıp alanında büyük aşamalar sağlanmış, hastalıkların epidemiyolojisi, patogenezi, tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir⁸⁰.

Hücre ve doku kültüründe kullanılan kültür ortamlarında hücrelerin kendilerinin üretemediği dışarıdan almak zorunda kaldıkları maddeler bulunmaktadır. Hücrelerin in-vitro olarak çoğaltılabilmeleri için en uygun ortam, *in-vivo* ortamlarına en yakın olan ortamı sağlamaktır⁷⁹⁻⁸⁰.

Basit bir kültür ortamında enerji kaynağı olarak glikoz, plazma ve serum, esansiyel aminoasitler, vitamin, mineralituz ve antibiyotikler yer almaktadır⁷⁹⁻⁸⁰.

Vücutta bulunan birçok hücre yüzey bağımlıdır ve büyüme, bölünme, gelişme ve farklılaşma sırasında bir protein iskelete tutunurlar. Ekstrasellüler matriks (ECM) olarak adlandırılan bu yapı, hücrelerin düzenlenmesinde üç boyutlu yapı sağlayan protein ve glikozaminoglikanlardan oluşur. Hücre kültüründe de serum içindeki proteinler petri ve flaskların yüzeyine absorbe olurlar ve ECM işlevi görürler. Hücrelerin matrikse tutunmaları için bir hücre yüzey reseptörü olan integrinin fibronektine bağlanması gerekmektedir. Serum içerisinde

fibronektin de bulunmaktadır. Fibronektinin polimerik malzemeye absorbe olması ile hücreler hücre-matriks etkileşiminde olduğu gibi petri yüzeyine yapışırlar⁸¹.

Hücre-Doku kültürü 3' e ayrılmaktadır

1. Birincil Kültür (öncül kültür): Organ, doku ve hücreler uygun bir kültür ortamına konulduklarında, burada yüzeye bağlanmakta ve bölünerek çoğalmaktadır. Bu hücreler canlı doku parçalarından gelen ve yüzeye yapışan ilk hücrelerdir⁸².

2. İkincil Kültür: Öncül kültür sonucu elde edilen hücrelerin enzimatik yollarla tutundukları yüzeyden kaldırılıp başka bir ortama aktarılması ile elde edilen hücrelerin oluşturduğu kültürdür⁸³.

3. Sürekli Kültür Hücresi: *İn-vitro* koşullarda sürekli büyüyen kültür hücre tipidir⁸⁴.

2.11. Akım Sitometri

Akım sitometri, süspanse hücrelerin bir akış kanalı boyunca geçerken tek tek ayrışımını sağlayan bir alettir. Moldaven' in 1934 yılında akım boyunca kan hücrelerinin sayımı yöntemini geliştirmesi ile başlayan süreç hızlı adımlarla gelişmiş ve günümüze kadar hücrelerin tek tek araştırılması aşamasına ulaşmıştır.

Işık mikroskopunda bir kerede 10^2 - 10^3 hücre yaklaşık 5 dakikada incelenebilirken, akım sitometride 10^3 - 10^6 hücre 1 dakika gibi kısa bir sürede incelenebilmektedir. Akım sitometride yarı otomatik bir işlem sonrası çok parametrelili bilgiye ulaşmak olasıdır.

Bu veriler ışığında akım sitometrinin kullanım alanları arasında immün fenotipleme, DNA analizi, hücre çoğalmasının ve ölümünün incelenmesi, RNA ve protein içerik analizi, membran geçirgenlik ve potansiyellerinin değerlendirilmesi sayılabilmektedir⁸⁵.

Akım sitometri bir çok sistemin birleşmesinden oluşmuştur. Bunlar; örnek toplayıcı ve taşıyıcı sistem, akış sistemi (sheath fluid), ışık kaynağı (lazer kaynağı), sferik ve çapraz silindirik filtreler, odaklama aynaları, sinyal dedektörleri, bilgisayar ve ayırma düzeneğidir⁸⁶.

Süspansiyon halindeki işaretli hücreler ve partiküller hava basıncı ile akış sistemi içinden geçirilir. Akış sistemi içindeki sıvının akışı çok hızlı olduğundan yüksek bir basınç oluşturur ve bu basınç ile hücreler

cam ya da quartzdan yapılmış akış kabinine gelirler. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı, hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler. Hücrelerin işaretlenmesinde kullanılan florokrom denilen madde lazer ışığı ile aktiflenir ve bu enerjiyle ışın yayar. Bu yayılan ışığın yoğunluğuna göre hücre boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgisayara veriler aktarılır⁸⁷.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deneyde 2-5 aylık, 200- 250 gr ağırlığında, erkek, 60 adet Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Deneyler, Ankara Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Protokol No: 2011-3) izin alınmasından sonra, Ankara Yıldırım Beyazıt Dışkapı Eğitim Araştırma Hastanesi Etlik Polikliniği Hücre Araştırmaları Merkezi Laboratuvarı'nda yapıldı. Sıçanlar standart 12 saat karanlık 12 saat aydınlık, havalandırılmalı, sabit oda sıcaklığında olacak şekilde kafeslere yerleştirildi. Denekler standart pellet yemi ve musluk suyu kullanılarak ad libitum olarak beslendi. Deneyler süresince yerel etik kurulca istenilen şartlara uyuldu.

3.1. Deney Grupları

1. Grup: Adacık Kültürü
 2. Grup: Adacık+ Progesteron Kültürü
 3. Grup: Adacık+ Hepatosit Ko-Kültürü
 4. Grup: Adacık+ Hepatosit+ Progesteron Ko- Kültürü
- uygulananlar şeklinde düzenlendi.

3.2. Karaciğer Hücresi (Hepatosit) İzolasyonu

Hepatosit izolasyonu Seglenin modifiye edilmiş iki basamaklı kollagenaz yöntemi ile yapıldı.

3.2.1. Hepatosit İzolasyon Yöntemi

Yıkama solüsyonunun hazırlanması (500ml için);

-3,5 g NaCl (SK.R.13423 Sigma GERMANY)

-0,02 g KCl (SK.R.12636 Sigma GERMANY)

-0,48 g CaCl₂ . 2H₂O (SK.R.12022 Sigma GERMANY)

- 5 mL 1M HEPES

-1 g BSA (A2153 Sigma GERMANY)

500 mL DMEM (D6046 Sigma GERMANY) ile tamamlandı.

Tuzlar eriyene dek karıştırıldı.

Perfüzyon solüsyonunun hazırlanması (130 ml için);

-1,17 g NaCl (SK.R.13423 Sigma GERMANY)

-0,05 g KCl (SK.R.12636 Sigma GERMANY)

-0,1 g Glukoz (158968 Sigma GERMANY)

-0,27 g NaHCO₃ (S5761 Sigma GERMANY)

2,6 mL 1M HEPES

130 mL DMEM (D6046 Sigma GERMANY) ile tamamlandı.

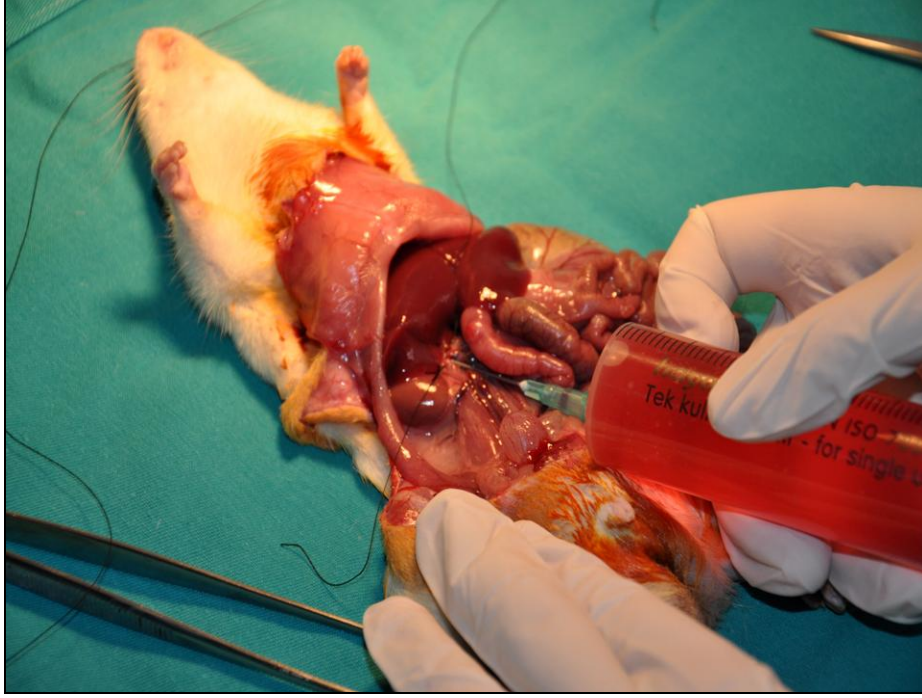
Tuzlar eriyene değin karıştırıldı.37 °C' ye ayarlanmış su banyosuna konuldu. Solüsyonun ısı 37 °C' ye gelene kadar bekletildi. Perfüzyon solüsyonunun 100 ml' si 50 ml' lik 2 enjektöre çekilir cerrahi işlem için ayrıldı. Geriye kalan 30 ml solüsyon sindirim solüsyonu için 37 °C' de tutulmaya devam edildi.

Solüsyon hazırlama işlemi bittikten sonra letal dozda anestezi verilmiş karın tüyleri tıraşlanmış ve batikon ile iyice sterilizasyonu sağlanmış erkek sıçanlarkarın kısımdan açıldı (Resim1). Karaciğer ve

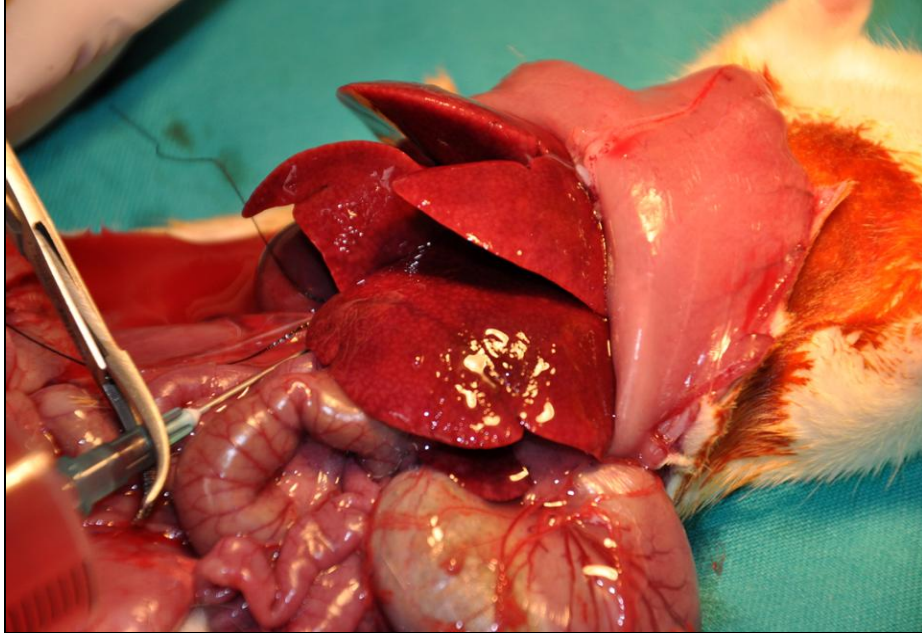
portal ven tespit edildi. Rahat işlem yapılabilicek konum verildi. Portal vene kanül ile girildi (Resim 2). Önceden enjektörlere çekip hazırladığımız perfüzyon solüsyonu kanülden karaciğere yavaş yavaş uygulanmaya başlandı. Solüsyon karaciğere gittikçe karaciğer sinüzoidleri belirgin bir şekilde görünmeye ve sarımsı bir renk almaya başladı (Resim 3-4). Karaciğerdeki kan dışarı çıkmış olurken aynı zamanda perfüzyon solüsyonunda Ca^{++} bulunmadığından hepatositleri birbirine bağlayan Ca^{++} bağımlı E- cadherin bağları basit difüzyon kuralına göre Ca^{++} suz kaldıkları için kopar⁸⁸. Bu işlem iki aşamalı kollajenaz yönteminin ilk basamağını oluşturur. Perfüzyon solüsyonunun tamamı karaciğere verildikten sonra dikkatli bir şekilde karaciğer çıkartıldı. Bu işlemlerden sonra sıçanın kalbi kesilmek sureti ile öldürüldü.



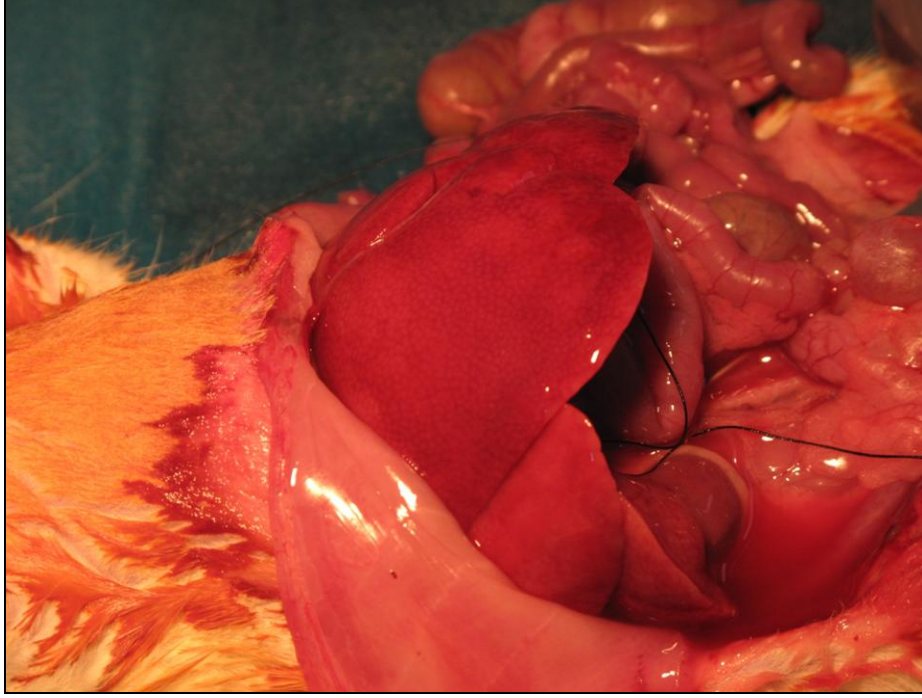
Resim 1: Karın kısmından açılmış uygulamaya hazır sıçan görüntüsü



Resim 2: Portal vene enjektör ile girilip sabitleniyor ve perfüzyon solüsyonu uygulanıyor.



Resim 3: Perfüzyon solüsyonu uygulandıktan sonra sinüzoidlerin belirgin hale geldikleri görülüyor.



Resim4:Karaciğerin renk değiştirmeye başladığı izleniyor

İkinci basamak olan kollagenaz ile sindirim aşamasında 37 °C' de tuttuğumuz perfüzyon solüsyonuna 0,005 gr tip IV kollagenaz eklendi. Enjektör ile 30 ml sindirim solüsyonu karaciğere verildi. Karaciğer bistüri yardımı ile 5- 6 parçaya kesildi ve sindirim solüsyonu ile birlikte 37 C° de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürecinde karaciğerdeki retiküler fibrillerin parçalanması sağlandı.

İnkübasyondan sonra karaciğer doku örnekleri olabildiğince küçük parçalara kesildi. Yıkama solüsyonu eklenerek sırası ile 210 μ , 70 μ ve 40 μ ' luk eleklerden geçirildi. 50 ml' lik falkon tüplere konularak 4°C'de 5 dk 23 G (150 rpm) yıkama solüsyonu ile santrifüj edildi. Bu işlem her defasında süpernatantı atılıp pellet üzerine yıkama solüsyonu konularak 3 kez yinelenildi. Sonunda safa yakın hepatositler elde edildi. Canlı ve ölü hücreleri ayırmak için gradient işlemi yapıldı. Bu işlem için pellet üzerine 10.8 ml percoll konulur pellet kırıldı. Üzerine yavaş yavaş 12 ml DMEM

eklendi. Percoll ve DMEM birbirine karıştırılmadan 4 °C' de 20 dk.2000 rpm de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında tüpün orta kısmında toplanan kısım pastör pipeti ile diğer bir tüpe alındı 50 ml' ye kadar yıkama solüsyonu ile tamamlandı 4 °C' de 5 dk 23 G (150 rpm) santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet kırıldı, yıkama işlemi yinelenildi. Böylece hepatositler saf ve canlı şekilde izole edildiler⁸⁹.

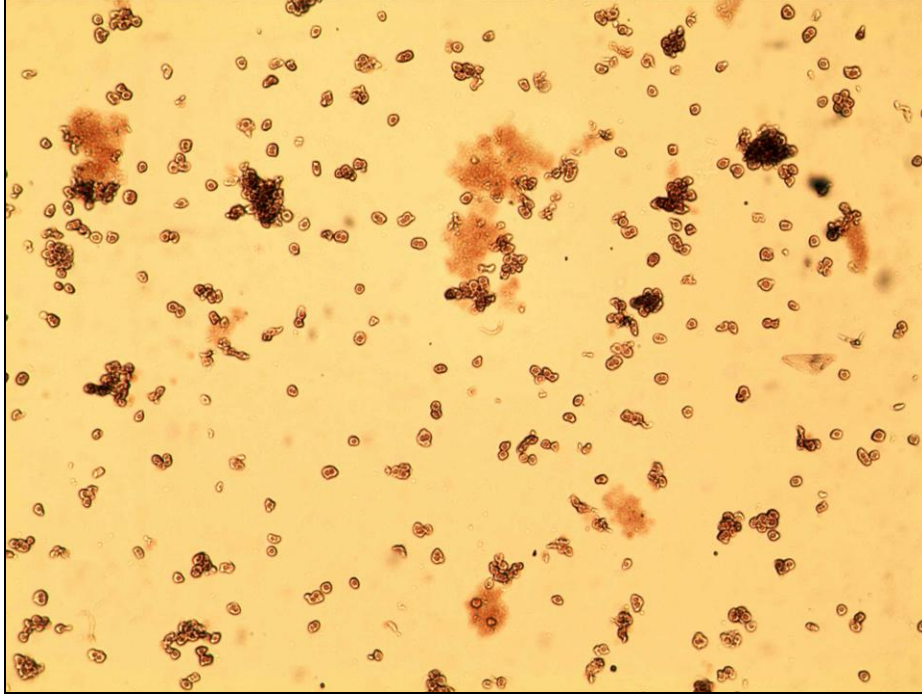
Hepatositlerin sayısını ve canlılığını ölçmek için Caountes cihazı kullanıldı. İzole edilen hücreler yıkama solüsyonu ile 20 ml' ye tamamlandı ve homojenize edildi. Elde edilen materyalden 10 µl alınarak üzerine 10 µl tripan mavisi eklendi. Hazırlanan süspansiyondan cihazın özel lamına 10 µl konularak sayım ve canlılık ölçümü yapıldı (Resim 5).

Total : 6.1×10^6 hücre/ ml

Canlı : 5.9×10^6 hücre / ml

Ölü : 2.0×10^5 hücre / ml

Sonuç olarak % 97 oranında canlı hücre elde edildiği belirlendi.



Resim 5: Cauntes cihazında sayımlı yapılan hepatositler (Tripan mavisix100)

3.2.2. Hepatosit Hücre Kültürü

Hepatosit kültüründe besi yeri için William' s medium E kullanıldı. Toz halindeki besiyerinin hazırlanışı;

%90 hacminde, sıcaklığı 15-20 °C olan steril saf su üzerine sürekli karıştırarak yavaş yavaş toz medium eklendi. Toz tümüyle eridikten sonra 2,2 gr sodyum bikarbonat eklenerek karıştırıldı. Bu işlem laminar flow içerisinde steril koşullar sağlanarak yapıldı.

% 10 FBS+ 10 µg insülin+ 0.0004 gr dexamethason+ 100 U/ ml penicilin+ 100 mg/ ml streptomycin eklenerek William's medium E ile 100 ml ye tamamlandı.

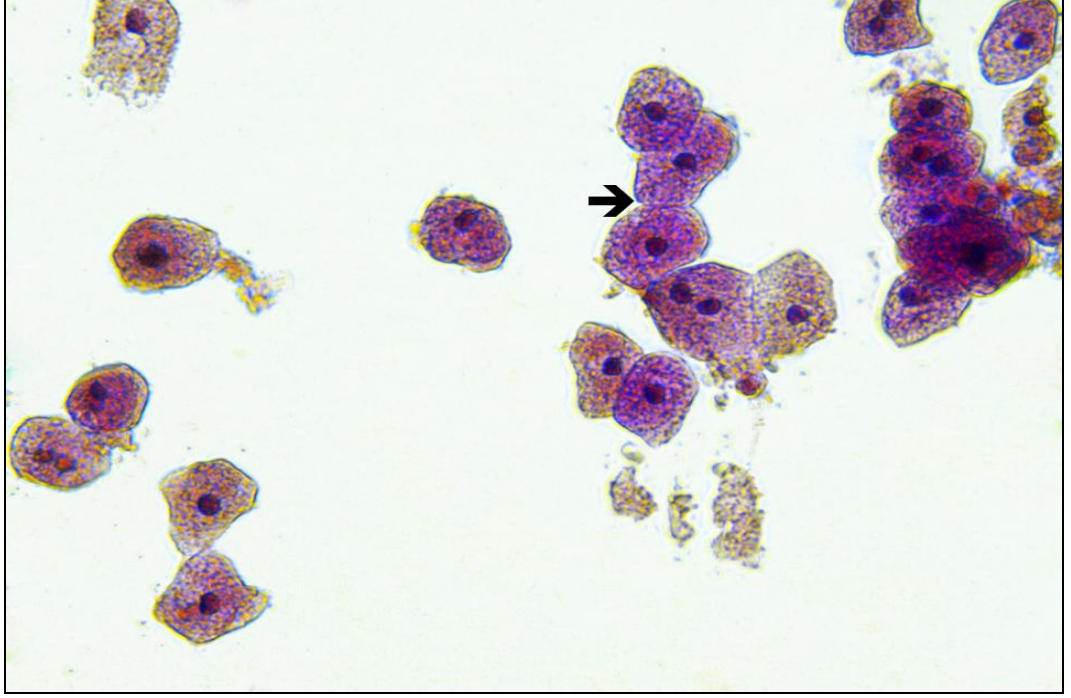
24 saat önceden insan serumu ile kaplayıp +4 °C de bekletilen 6' lı kuyucuklara, her kuyucuğa yaklaşık 50 bin hepatosit hücresi gelecek biçimde ekim yapıldı. Üzerine 4 ml hepatosit besiyeri konuldu.1 damla pen-strep damlatıldı. 37 °C'de % 5 CO₂ inkübatörde kültüre edildi⁸⁸.

3.2.3. Hepatosit Hücrelerinin PAS Boyaması

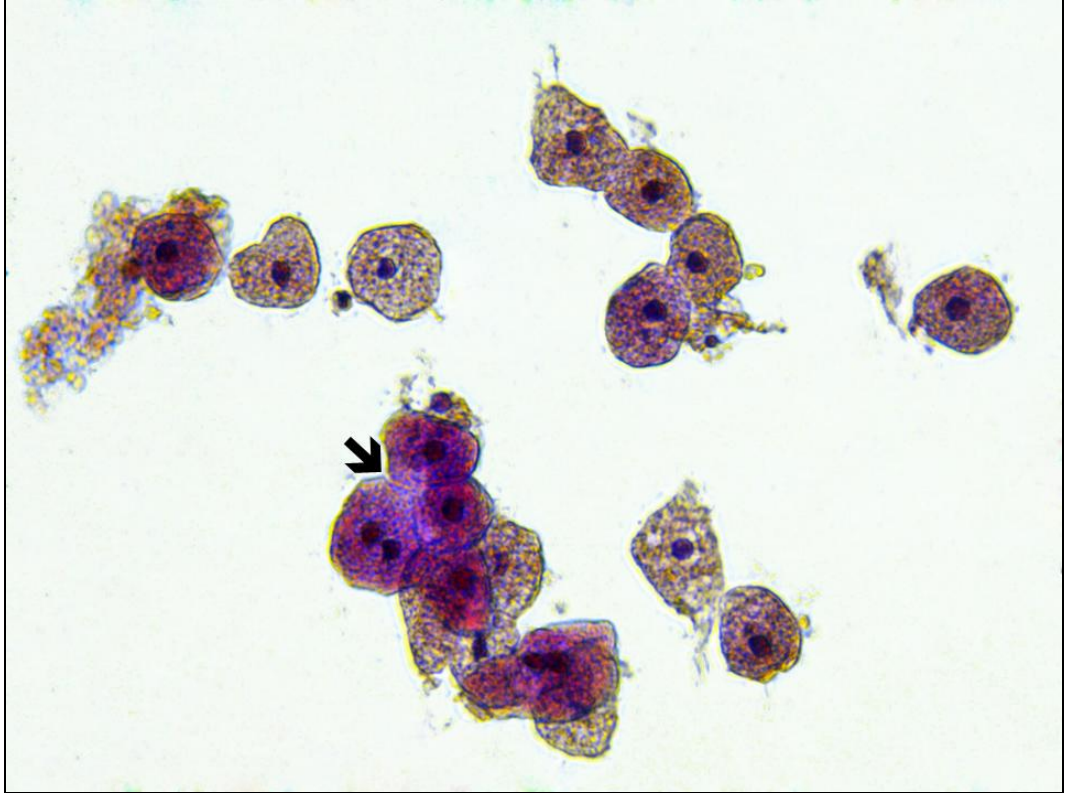
Kültüre edilen hepatositlerin bir kısmı PAS reaksiyonunda kullanılmak üzere ayrıldı ve PAS için aşağıda belirtilen yöntem uygulandı;

- 1) Methanol içerisinde 5-15 dak. bekletildi.
- 2) Distile su ile yıkandı.
- 3) 30 dak. havada kuruması sağlandı.
- 4) Periodik asit solüsyonunda 5-10 dak. bekletildi.
- 5) Distile su ile yıkandı.
- 6) Schiff Reagent'da 15-30 dak. oda sıcaklığında bekletildi.
- 7) Distile su ile yıkandı.
- 8) Haemalum Mayer' de 10 dak. bekletildi.
- 9) Distile su ile yıkandı.

Elde edilen hücreler invert mikroskopta (Leica, Germany) resimlendirildi (Resim 6-7).



Resim 6: İzole edilen hepatositlerin PAS reaksiyon (→) görüntüleri (PAS X 400)



Resim 7: İzole edilen hepatositlerin PAS reaksiyon (↘) görüntüleri (PASX400)

3. 3. Adacık İzolasyon Aşamaları

3.3.1. Solüsyonların Hazırlanışı

3.3.1.1. RPMI 1640 (+) (FBS'li) Solüsyonunun Hazırlanışı

500 ml lik RPMI 1640 (-) L-Glutamine solüsyonunun içerisinde 60 mL alındı. Geriye kalan 440 ml solüsyonun üzerine 50 ml FBS, 5 ml L- Glutamine, 5 ml Pen- Strep- Amp eklenerek +4 °C' de saklandı. Solüsyon 1 hafta içerisinde tüketilmelidir.

3.3.1.2. RPMI 1640 (-) (FBS'siz) Solüsyonunun Hazırlanışı

500 ml lik RPMI 1640 (-) L-Glutamine solüsyonunun içerisinde 10 mL alındı. Geriye kalan 490 mL solüsyonun üzerine 5 ml L- Glutamine ve 5 ml Pen-Strep-Amp eklenerek +4 °C 'de saklandı. Solüsyon 1 hafta içerisinde tüketilmelidir.

3.3.1.3. HBSS (+) (FBS'li) Solüsyonunun Hazırlanışı:

500 ml lik HBSS solüsyonunun içerisinde 60 ml alındı. Geriye kalan 440 ml solüsyonun üzerine 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamine, 5 ml Pen- Strep- Amp eklenerek +4 °C' de saklandı. Solüsyon 1 hafta içerisinde tüketilmelidir.

3.3.1.4. Kollajenaz Enzim Solüsyonunun Hazırlanışı:

100 mg kollajenaz, 50 ml ye HBSS (-) solüsyonu ile tamamlandı, 0,22 µm lik filtrelerden geçirilerek -20 °C' de saklandı. Solüsyon 1 hafta içerisinde tüketilmelidir.

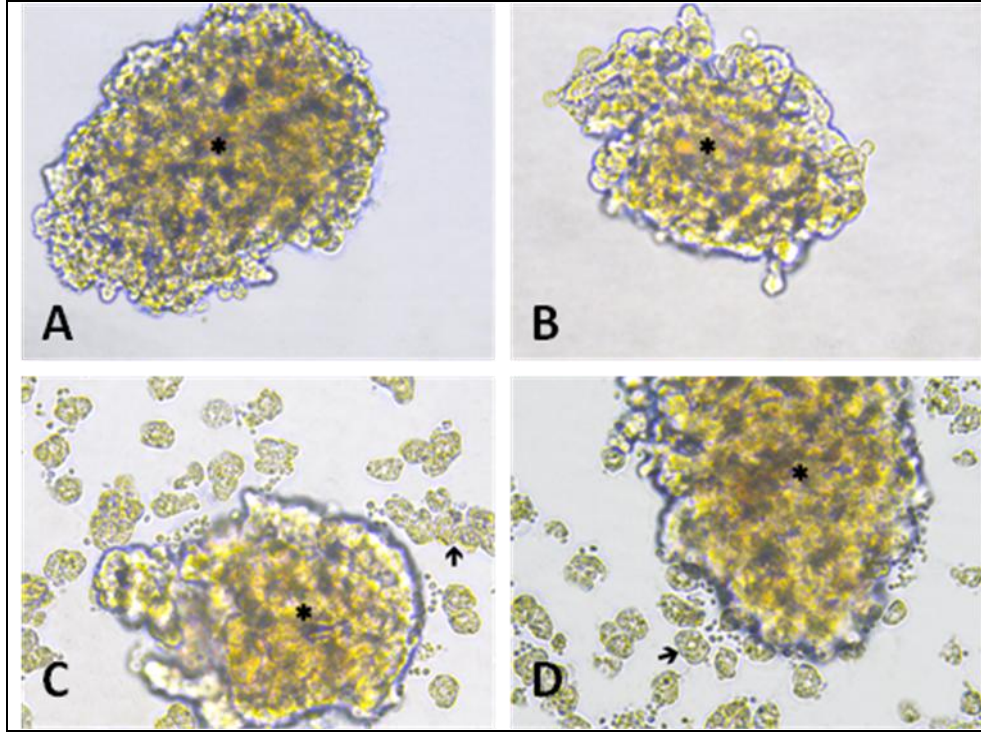
3.3.2. Adacık İzolasyonu

Ketamin-ksilazin anestezisi altındaki sıçanların karın bölgeleri açılarak duktusları belirlenip ampulla vateri kleplendi. Önceden hazırlanan kollajenaz Tip V' den 10ml uygulanarak pankreasları şişirildi. Şişirme işleminden sonra pankreas hızlıca çıkarılarak 50 ml' lik tüplere

alındı ve 37 °C' de su banyosunda 18 - 20 dakika inkübe edilip inkübasyon sonunda falcon tüp 35 ml' ye kadar RPMI/ FBS veya HBSS/ FBS ile tamamlandı. Bunun ardından 15 Sn hızlı bir şekilde tüp alt üst edilip 1300 rpm de yavaş frende 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelletler pipetajla kırılıp aynı işlem yinelenindikten sonra pellet 400- 450 µm' lik çelik elekten süzülerek huniden 50 ml' lik falcon tüpe alındı. Eski falcon, çelik elek ve huni RPMI/ FBS ile yıkanarak 50 ml ye tamamlandı. Süspansiyon 1300 rpm de yavaş frende 3 dakika santrifüj yapıp süpernatanı atıldıktan sonra bu işlem bir kez daha yinelenip elde edilen pellet üzerine 50 ml serumsuz RPMI eklenip tekrar 1300 rpm, 3 dak. santrifüj edildi. Santrifüjün ardından 15 ml' ye kadar süpernatant atılıp kalan kısım 3 adet 15' lik falcon tüpe 5' er ml olarak konulduktan sonra 1400 rpm de yavaş frende 5 dakika santrifüj yapıp süpernatant atıldı. Elde edilen pelletin üzerine 5 ml'ye kadar ficoll 1077 eklenip vorteks yapıp 5 ' er ml serumsuz RPMI eklendi. 2400 rpm de 20 dakika frensiz santrifüjde santrifüj edildikten sonra dansite yoğunluğu nedeniyle orta kısımda kalan adacık hücreleri pastör pipeti ile alınıp hücreler başka bir 50 ml' lik tüpe konuldu. 1400 rpm de yavaş frende 4 dakika santrifüj yapıp süpernatanı alınıp pipetaj yapıldı. 25 ml ye kadar serumsuz ortam eklenip 1400 rpm de yavaş frende 4 dakika yeniden santrifüj edildi ve aynı işlem bir kez daha yinelenildi.

Elde edilen pellet üzerine 10ml RPMI ekleyerek petriye alındı. İnvert mikroskopta pipet yardımıyla her kültür kabı için 50 adet adacık toplandı. 15' lik falconlara konuldu. Üzerleri RPMI besiyeri ile tamamlandı. 1200 rpm' de 10 dak santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı atıldı. Pelletler gruplara göre 6' ılı kuyucuklara ekildi⁹⁰.

Adacık+progesteron ve adacık + hepatosit +progesteron ko-kültür gruplarına 2 µg/ ml progesteron eklendi⁹¹ (Resim 8).



Resim 8 : 48.saat gruplara göre kültüre edilmiş adacık ve hepatosit hücreleri. A)adacık kültürü (*) adacık hücresi (X 400) B) Adacık+Progesteron kültürü grubu (*) adacık hücresi (X 400) C) Adacık+ Hepatosit Ko- Kültürü (*) adacık hücresi (↑) hepatosit hücresi (X 400) D) Adacık+ Hepatosit+ Progesteron Ko-Kültürü (*) adacık hücresi (↑) hepatosit hücresi (X 400)

3.3.3. Floresan Boyaların Hazırlanması

3.3.3.1. Stok Propidium Iodide solüsyonu (750 μ M) :

5 mg PI, 10 mL PBS (pH 7,4) solüsyonu içerisinde çözülerek hazırlandı. Bu solüsyon +4 $^{\circ}$ C ' de alüminyum folyo sarılı kapta 3 ay süre ile saklanabilir.

3.3.3.2. Stok Fluorescein diacetate solüsyonu (24 μ M):

1 mg FDA, 100 mL asetonda çözündü. Bu solüsyon -20 $^{\circ}$ C de alüminyum folyo sarılı kapta 3 ay süre ile saklanabilir.

3.3.4. Adacık Hücrelerinin Floresan Boya İle Boyanması

Küçük petri kabının içerisine 918 μ l PBS (pH 7,4) solüsyonu konuldu. Üzerine 90 μ l adacık örneği eklendi. 20 μ l FDA stok solüsyonundan, 20 μ l de PI stok solüsyonundan eklenerek karanlık ortamda 5 dakika saklandı ve floresan mikroskopunda 40 X büyütmede canlılıkları değerlendirildi. Kullanılan floresan boyaların yeni derişimleri 0,46 μ M FDA ve 14,34 μ M PI olur.

Kullanılan reaktif boyalardan floresein diasetat (FDA), canlı hücrelerin sitoplazmalarını boyar. 490 nm dalga boyunda, mavi ışık eksitasyonu altında yeşil floresans verir⁹².

Diğer reaktif Propidium Iyot (PI), uyarılma dalga boyu 536 nm' dir. Ölü hücrelerin geçirgen hücre membranlarından DNA arasına girerek kırmızı floresansveren bir boyadır. Çalışmamızda her bir adacığın kırmızı ve yeşil renkli floresan görüntüleri resimlendirilmiştir. Bunlardan, yeşil ve kırmızı floresans yoğunluğu hesaplanıp birbirine oranlanarak, MATLAB programında renk analizi kodu kullanılarak canlılık yüzdesi hesaplanmıştır⁹³.

3.4. Glukoz Uyarım Testi

3.4.1. Glukoz Uyarım Testi Solüsyonları

Adacıklar glikoz ile uyarıldıklarında insülin salgılama özelliğine sahiptirler.

Elde edilen kültürlerde adacık hücrelerinin fonksiyonlarının değerlendirilmesi için glikoz varlığında insülin salgılamaları ELİZA testi ile değerlendirilebilir. Bunun için gerekli solüsyonlar;

3.4.1.1.Yüksek Glukoz Solüsyonu (16,7 mM):

100 ml lik D- Glucose RPMI (-) dan 9,5 ml atılır. 2,5 ml HEPES, 5 ml FBS, 1 ml Pen-Strep, 1 ml L-Glutamine eklendi. 300 mg glukoz tartıldı ve 100 ml ye hazırlanan çözeltiyle tamamlandı. 0,22 µm lik filtreden geçirildi.

3.4.1.2. Düşük Glukoz Solüsyonu (3,3 mM):

100 mL lik RPMI (-) D-Glucose dan 9,5 mL atıldı. 2,5 ml HEPES, 5 ml FBS, 1 ml Pen- Strep, 1 ml L- Glutamine eklendi. 59,4 mg glukoz tartıldı ve 100 ml ye hazırlanan çözelti ile tamamlandı. 0,22 µm lik filtreden geçirilerek hazırlandı.

3.4.2. Glukoz Uyarım Testi

Adacıklar kültürde ise çıkarıldıktan sonra 1 kere 50 ml lik falkon tüpte RPMI (+) ile yıkandı. 300 g de 3 dakika santrifüj edildi. 2 kere 50 ml glukozsuz RPMI (-) ile yıkandı. 2.yıkamadan sonra 60 mm lik petriye 5 ml örnek alındı. 6' lık kuyucuklara 4 adet 150 µm boyutunda adacık eklendi. 37 °C de CO₂ inkübatöründe ağzı kapalı olarak 1 saat inkübe edildi. 1 saat inkübasyondan sonra adacık hücrelerinin bulunduğu kuyucuklardan hücreler besiyerleri ile birlikte, numaralandırılmış ependorf tüp içerisine alındı. 1800 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Tüplerden 900 µl süpernatant dikkatlice atıldı. Üzerine 900 µl 3,3 mM lık glukozsuz RPMI dan eklenerek ependorf tüpten 6'lık kuyucuklardaki aynı kuyucuklara koyulurdu. 1 saat 37 °C de CO₂ inkübatöründe ağzı kapalı olarak inkübe edildi. 1 saat inkübasyondan sonra adacık hücrelerinin bulunduğu kuyucuklardan hücreler besiyerleri ile birlikte, numaralandırılmış ependorf tüp içerisine alındı. 1800 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Düşük glukoz olarak işaretlenmiş ependorf tüp içerisine 900 µl örnek alındı ve hemen -20 °C ye kaldırıldı. Ependorf tüpteki hücreler üzerine 16,7 mM derişiminde glukoz içeren besiyerinden 900 µl eklenerek hücreler ependorf tüpten 6 'lık kuyucuklardaki aynı kuyucuklara koyuldular. 37 °C 'de CO₂ inkübatörüne ağzı kapalı olarak yerleştirildi, her 15 dakikada bir kuyucuklar çalkalandı ve 1 saat inkübe edildiler. 1 saat inkübasyondan sonra adacık hücrelerinin bulunduğu kuyucuklardan hücreler besiyerleri ile birlikte, numaralandırılmış ependorf tüp içerisine alındılar. 1800 rpm de 1 dakika santrifüj edildiler. Yüksek glukoz olarak işaretlenmiş ependorf tüp içerisine 900 µl örnek alındı ve hemen -20 °C ye ELIZA testi çalışılmak üzere kaldırıldı⁹⁴.

3.5. Adacıkların Proliferasyonunun Ölçülmesi

Toz halindeki 5-Bromo-2'-deoksiüridin (16880 Sigma-GERMANY) 50 mg' ı 1M amonyun hidroksit içerisinde çözölerek hazırlandı. Kültürden alınan adacıklar tripsinle etkin bırakılarak hücrelerine ayrıştırılırdı. 480 µl ortam içine 20 µl BrdU konularak 40 dk karanlıkta boyanmaya bırakıldı.500 µl örneğın üzerine 20 µl anti-BrdU eklenerek akımsitometride sayım işlemi yapıldı⁹⁵.

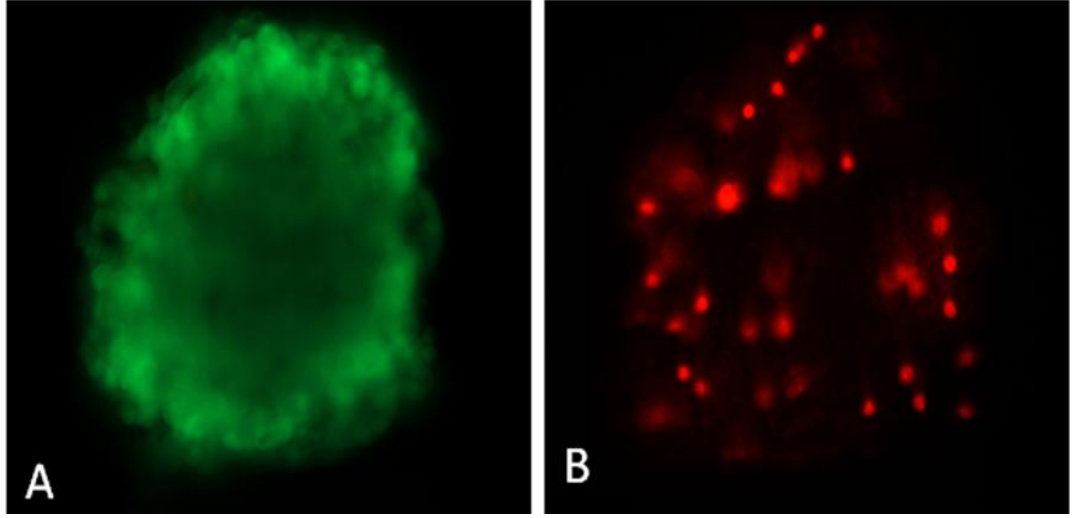
4. BULGULAR

4.1. Canlılık Değerlendirilmesi

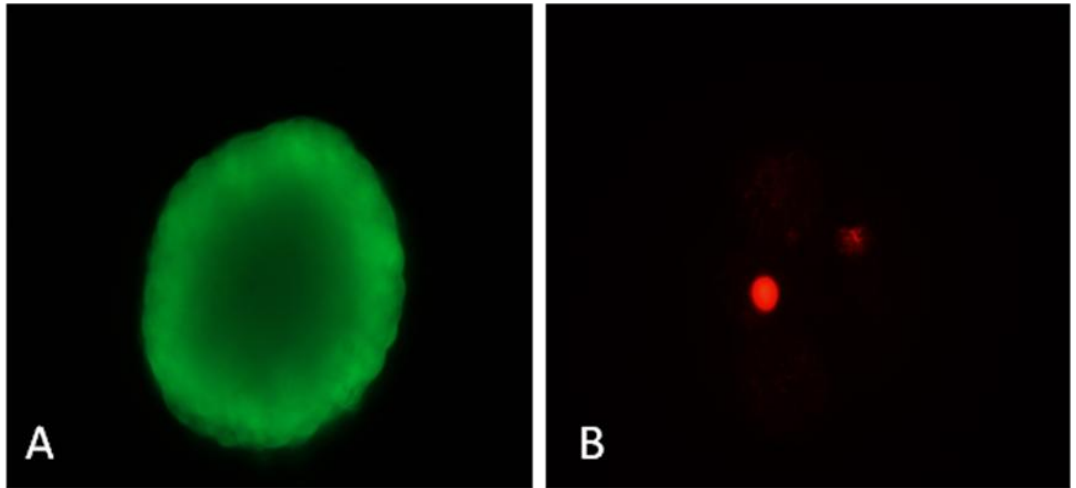
Adacık, adacık+ hepatosit, adacık+ progesteron ve adacık+ hepatosit+ progesteron gruplarının canlılıkları PI/ FDA floresan boyalar ile boyandıktan sonra floresan mikroskopunda (Leica ,GERMANY) çekilen resimler (Resim 9, 10, 11, 12, 13). MATLAB programı aracılığı ile ölçülmüştür. Artan süreye koşut canlılık oranının Adacık+ hepatosit+ progesteron grubunda en yüksek düzeye ulaştığı görülürken, adacık+ hepatosit ve adacık+ progesteron gruplarında aynı düzeyde artış olduğu belirlenmiştir (Tablo 1) .

Tablo 1: Gruplara göre adacık canlılık yüzdeleri

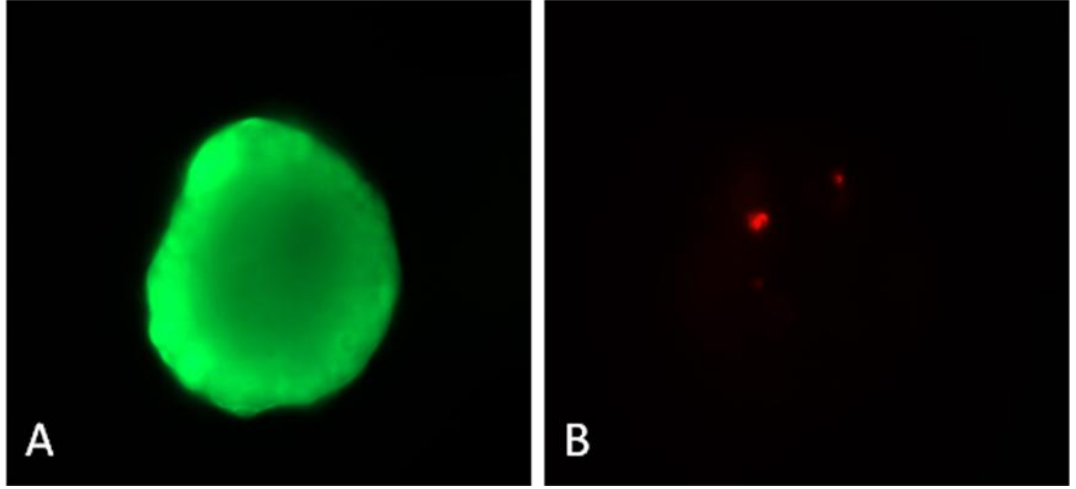
CANLILIK	ADACIK	ADACIK+PRO	ADA+HEPA	ADA+HEPA+PRO
0.SAAT	%78	%78	%78	%78
0.SAAT	%76	%81	%81	%80
0.SAAT	%82	%83	%77	%86
0.SAAT	%80	%75	%75	%76
0.SAAT	%74	%73	%79	%70
48.SAAT	%82	%90	%90	%92
48.SAAT	%79	%93	%89	%96
48.SAAT	%84	%91	%93	%91
48.SAAT	%80	%87	%91	%88
48.SAAT	%85	%89	%87	%93



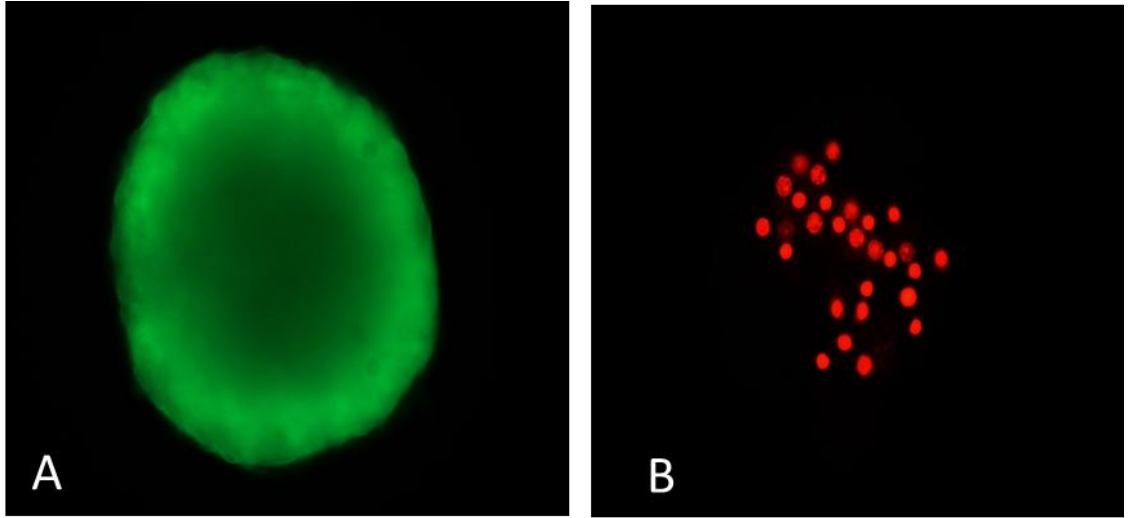
Resim 9: 0. saat taze adacık floresan mikroskop görüntüsü. A) % 78 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).



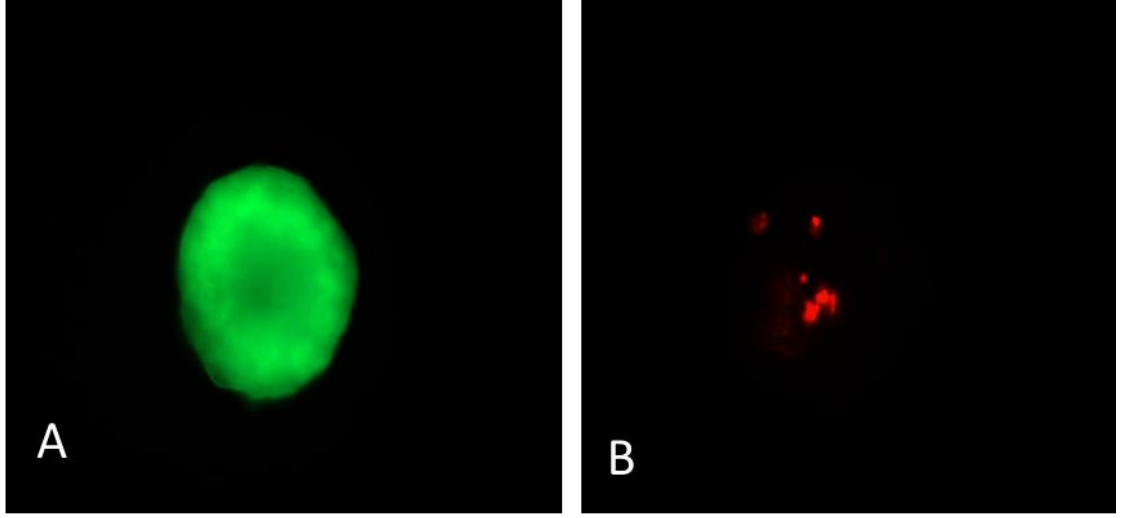
Resim 10: 48. saat adacık grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) % 82 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).



Resim 11: 48. saat adacık+ progesteron grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) % 90 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400)



Resim 12: 48. saat adacık+ hepatosit grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) %90 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri, B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).



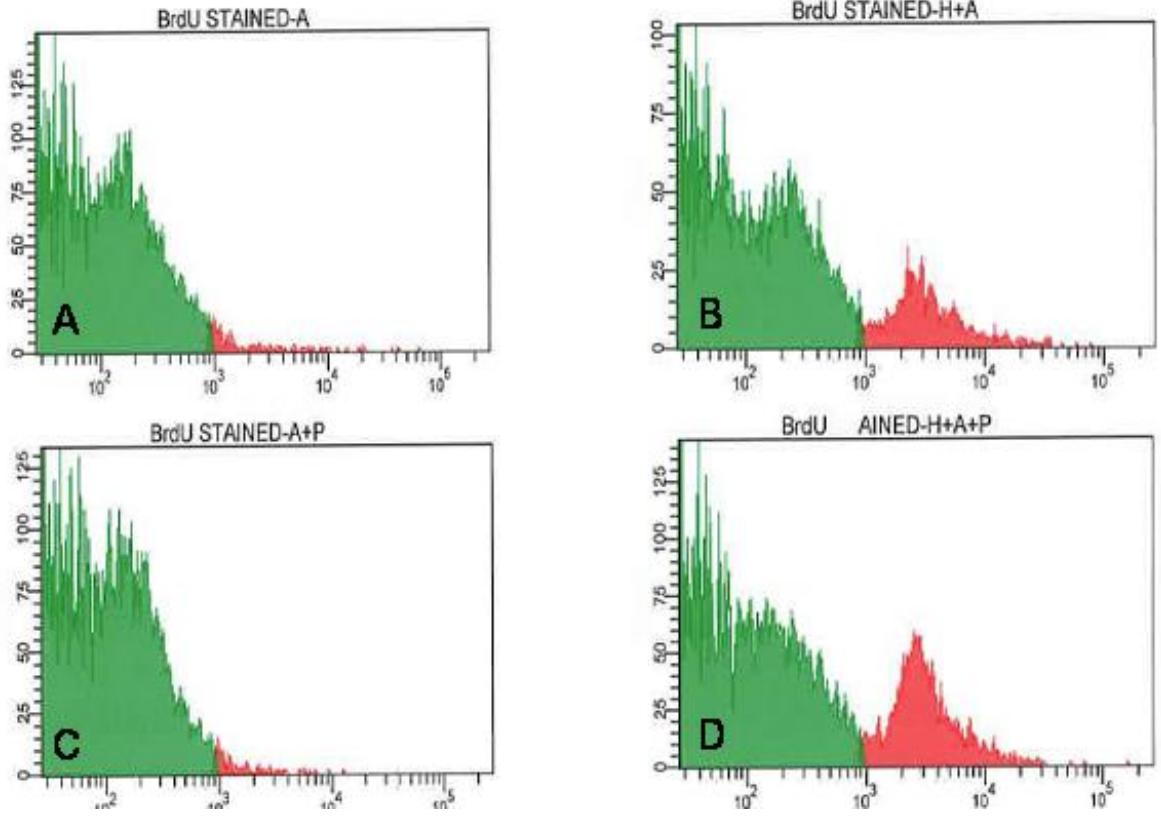
Resim 13: 48. saat adacık+ hepatosit+ progesteron grubu floresan mikroskop görüntüsü. A) % 92 oranında canlılık gösteren adacık hücreleri B) Ölü adacık hücreleri (PI/ FDA X 400).

4.2. Hücre Çoğalması

Akım sitometride yapılan sayım sonrasında 0. saatte tüm gruplarda adacık hücre çoğalma yüzdeleri birbirine eşit olarak % 0.5 düzeyinde belirlenmiştir. 48. saatte yapılan sayım sonrasında ise gruplar arasında hücre çoğalması açısından belirgin farklılıklar olduğu gözlenmiştir; çoğalmanın en çok adacık+ hepatosit+ progesteron grubunda olduğu bunu sırasıyla adacık+ hepatosit ve hiçbir uygulama yapılmayan adacık grubunun izlediği saptanmıştır. Proliferasyonun en az adacık+ progesteron grubunda olduğu görülmüştür. Elde edilen bulgular Tablo 2' de ve Grafik 1'de özetlenmiştir.

Tablo2:Akım sitometri ile yapılan sayım sonuçlar

BRDU boyama	ADACIK	ADACIK+PROGESTERON	ADA+HEPA	ADA+HEPA+PRO
0.SAAT	%0,5	%0,4	%0,6	%0,5
0.SAAT	%0,7	%0,3	%0,6	%0,3
0.SAAT	%0,6	%0,5	%0,8	%0,6
0.SAAT	%0,3	%0,4	%0,6	%0,7
0.SAAT	%0,4	%0,4	%0,4	%0,4
48.SAAT	%1,1	%0,4	%3,1	%10,4
48.SAAT	%1,4	%0,8	%3,3	%12,8
48.SAAT	%1,0	%0,1	%3,2	%9,2
48.SAAT	%1,2	%0,5	%3,0	%8
48.SAAT	%0,8	%0,6	%2,9	%11,6



Grafik 1: Akım Sitometri Historgamları. A) Adacık grubu, B) Adacık-Hepatosit grubu, C) Adacık-Progesteron grubu, D) Adacık-Hepatosit-Progesteron grubu. Yeşil alanlar: eski hücreler, kırmızı alanlar: çoğalan hücreler.

4.3. Glukoz Uyarım Testi

0. ve 48. saatlerde glikoz uyarımı için yapılan ELİZA testi değerlendirildiğinde adacık ve adacık-progesteron gruplarında düşük glukoz yoğunluğunda 48. saatte insülin salınımında az da olsa artış gözlenirken, adacık+ hepatosit ve adacık+ hepatosit+ progesteron gruplarında düşüş belirlendi. Yüksek glukoz yoğunluğunda ise tüm grupların insülin salınımında 0.saate göre düşüş olduğu görüldü (Tablo 3).

Tablo 3.Glukoz uyarım testi sonuçları

	ELİZA	ADACIK	ADACIK+PRO	ADA+HEPA	ADA+HEPA+PRO
0.SAAT	LOW	14,5	12,5	12,5	12,5
	LOW	12,5	9,5	12,0	11,5
	LOW	10,5	15,5	13,0	13,5
	HIGH	60,5	62	66	69,5
	HIGH	66	70	65	66
	HIGH	71,5	66	67	62,5
48.SAAT	LOW	16,6	14,65	11,5	8,2
	LOW	15,1	16,99	8,4	8,1
	LOW	18,1	12,31	14,6	8,3
	HIGH	44,38	46,6	39,5	31,24
	HIGH	45,3	40,3	40,6	30,2
	HIGH	43,46	52,9	38,4	32,28

4.4. İstatistik Analiz Sonuçları

Elde edilen veriler anova testi ile değerlendirildi. Temel ve standart sapmaları hesaplandı.

0.saatten 48. saate kadar geçen sürede canlılık değerlendirmesinde tüm gruplarda artan süreye koşut canlılığın arttığı, ancak en belirgin artışın adacık+hepatosit+progesteron grubunda olduğu istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0.05$) (Tablo 4) (Grafik 2).

Gruplar arasında yapılan istatistik analizinde BrdU boyaması sonucunda adacık+hepatosit+progesteron grubunda 48.saatte proliferasyondaki artış istatistiki olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). (Tablo 5) (Grafik 3).

İnsülin salınımının değerlendirilmesi için yapılan düşük ve yüksek yoğunluktaki glukoz uyarım testinde 0. saatte düşük ve yüksek glukoz varlığındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı çıkmazken 48.saatte elde edilen değerler anlamlı bulunmuştur. Buna göre düşük glukoz varlığında en yoğun insülin salınımının adacık ve adacık+progesteron gruplarında olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 6-7) (Grafik 4-5).

Tablo 4: Canlılık sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

CANLILIK	ADACIK	ADA+PRO	ADA+HEPA	ADA+HEPA+PRO
0. SAAT	78-3,1± 1 [#]	78-4,1 ± 1 [#]	78-2,2± 1 [#]	78-5,8±1 [#]
48. SAAT	82-2,5±0*	90-2,2± 0*	90-2,2±0*	92-2,9±0*

* P< 0,05, # p >0,05

Tablo 5: BrdU boyamasında proliferasyon ölçüm sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

BRDU	ADACIK	ADA+PRO	ADA+HEPA	ADA+HEPA+PRO
0. SAAT	0,5-0,1 ± 0,1 [#]	0,4-7,07x 10 ⁻² ±0,1 [#]	0,6-0,1 ± 0,1 [#]	0,5-0,1± 0,1 [#]
48. SAAT	1,1-0,2 ± 0*	0,4-0,2 ± 0*	3,1-0,1 ± 0*	10,4-1,8± 0*

* P< 0,05 , # p >0,05

Tablo 6: 0.Saat ELİZA sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

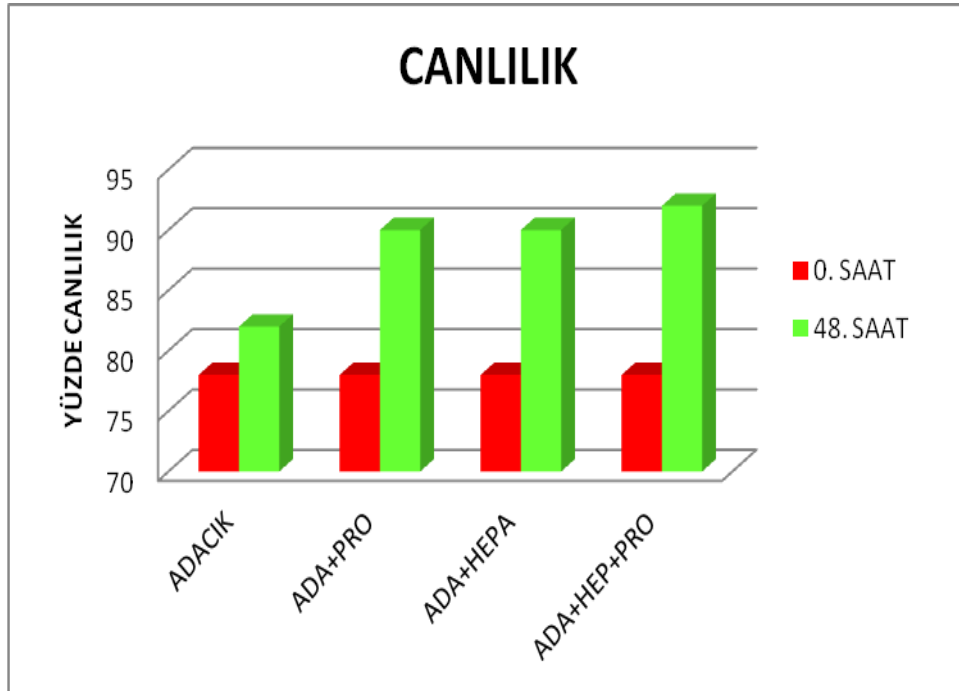
ELİZA 0.SAAT	ADACIK	ADA+PRO	ADA+HEPA	ADA+HEPA+PRO
DÜŞÜK	12,5-2±1 [#]	12,5-3±1 [#]	12,5-05±1 [#]	12,5-1±1 [#]
YÜKSEK	66-5,5±1 [#]	66-4± 1 [#]	66-1±1 [#]	66-3,5±1 [#]

* P< 0,05 # p >0,05

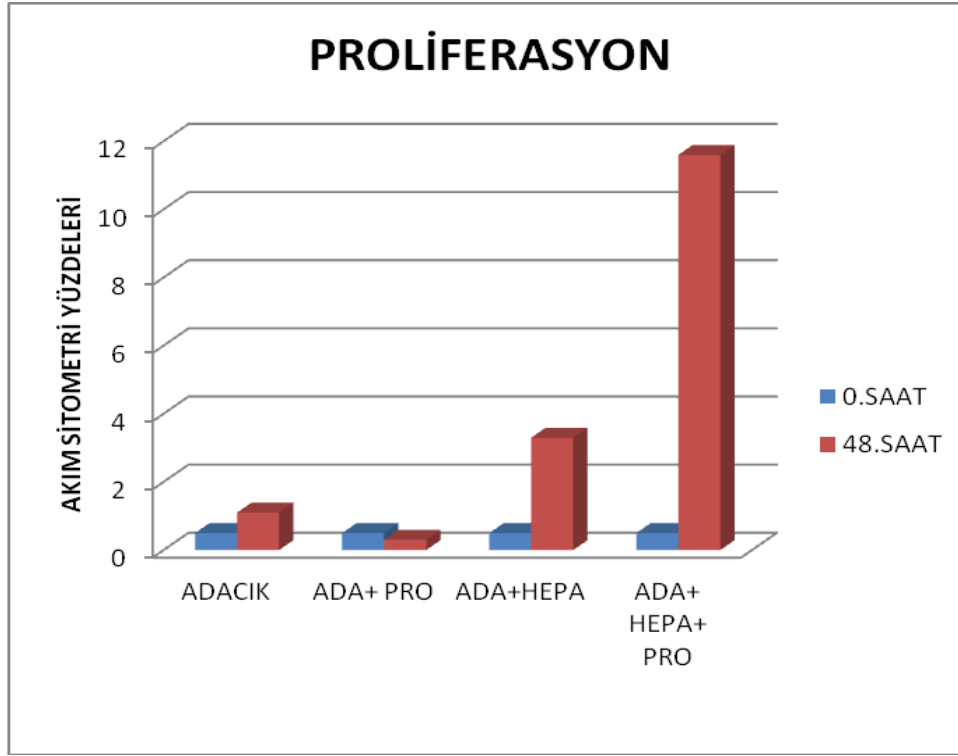
Tablo 7: 48.Saat ELİZA sonuçlarının anova testi ile değerlendirilmesi

ELİZA 48.SAAT	ADACIK	ADA+PRO	ADA+HEPA	ADA+HEPA+PRO
DÜŞÜK	16,6-1,5±0,005*	14,6-2,3±0,005*	11,5-3,1±0,005*	8,2-0,1±0,005*
YÜKSEK	44,3-0,9±0,02*	46,6-6,3±0,02*	39,5-1,1±0,02*	31,2-1,0±0,02*

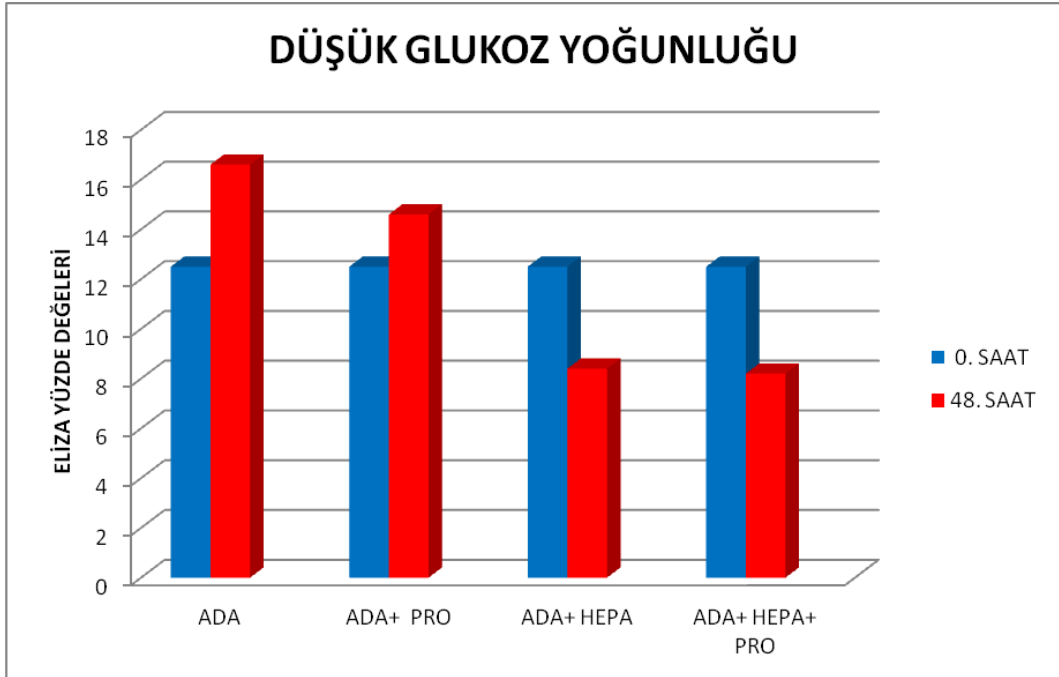
* P< 0,05, # p >0,05



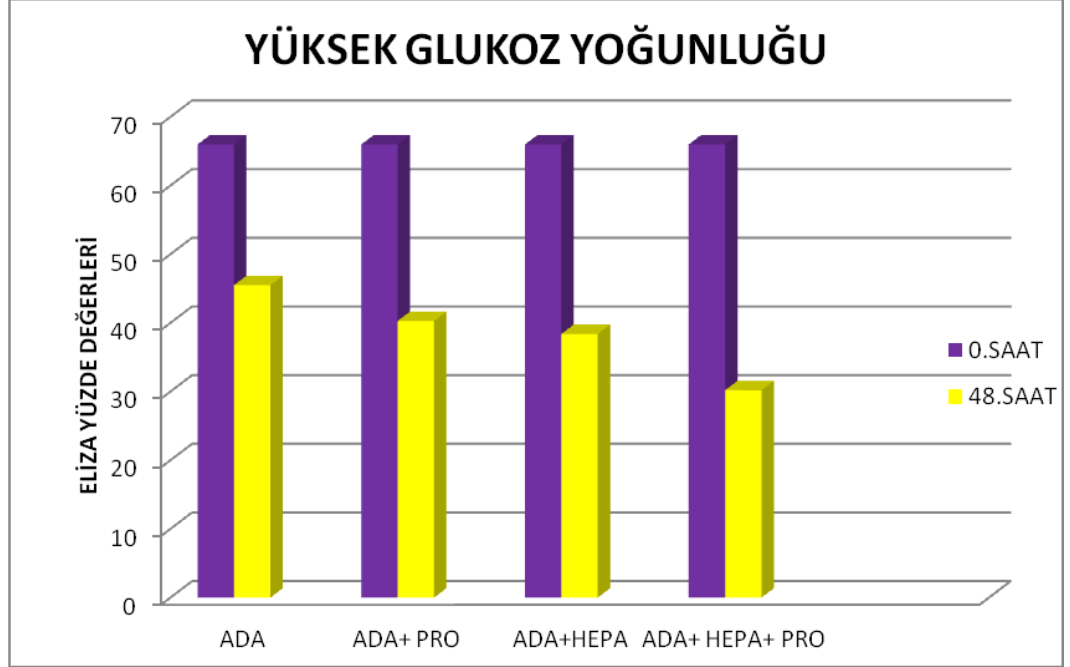
Grafik 2: Canlılık değerlendirilmesi



Grafik 3: Poliferasyon değeriendirilmesi



Grafik 4: Düşük glukoz yoğunluğunda ELİZA yüzde değeri



Grafik 5: Yüksek glukoz yoğunluğunda ELİZA yüzde değerleri

5. TARTIŞMA

Diabetin tedavisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunların başında diyet, oral antidiyabetik ilaçları ve dışardan insulın alımı gelmektedir.

Diabetin tedavisinde son yıllarda kullanılan deneysel tedavi yöntemlerden birisi pankreas adacık naklidir. Adacık nakli ilk olarak 1970 yılında yapılmıştır. Ancak dışardan insulın kullanmadan yaşayan ilk hasta 1989 da uygulanan nakilde olmuştur. 2000 yılında uygulanan adacık nakli ile tedavi edilen kişinin bir yıl dışardan insulın almadan yaşadığı bildirilmiştir.

Adacık nakli yapılan hastalar transplantasyondan 200 gün sonra % 66, 400 gün sonra % 44, 600 gün sonra % 34, 1000 gün sonra ise %12 oranında insulın bağımsız yaşamışlardır⁹⁴.

Langerhans adacık naklinde, yeterli sayıda adacık transplantasyonun yapılması ve nakledilen adacıkların uzun süre canlılıklarının korunması çok önemlidir. Enzimatik sindirimde yapılan değişimler⁹⁵ saflaştırma sırasında “ficoll” yerine daha az toksik maddelerin kullanılması⁹⁶ kültür ortamına adacık canlılığını koruyucu maddelerin eklenmesi ve genetik işlemler⁹⁷ gibi adacık canlılığını artırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır.

İzolasyon koşullarını optimize etme çabalarına karşın adacıkların çıkarılması, saflaştırılması ve kültürü sırasında ortaya çıkan

stres sonucu oluşan hasarlar, nakil öncesi adacıkların yitimine ve işlev bozukluğuna neden olmaktadır⁹⁸⁻⁹⁹⁻¹⁰⁰.

Organın çıkarılması sırasındaki mekanik etkenler, soğukta korunma süresi, izolasyon ve saflaştırma aşamasında kullanılan bazı kimyasallar gibi birçok girişimsel etken bulunmaktadır. İzole edilmiş adacıklar artık damarsızdır ve yeniden damarlanana dek iskemik hasara etkin kalırlar¹⁰¹.

Pankreatik adacık hücreleri tedavi edilemeyen diabet hastalarında karaciğer portal veninden verilerek alternatif tedavi saęlanır¹⁰². Adacıklar portal venden verildikten sonra karaciğerin sol lobuna yayılmaya baslar ve hepatik sinuzoidlere yerleşirler. Adacık naklinde önemli bir sorun kan aracılı inflamatuvar tepkime sonucu adacık yüzeyinde hızla trombosit birikimidir.

İmplant edilen adacıklardan salınan insulin karaciğerde yapısal ve işlevsel bazı değişiklikler yapar⁵.

Biz alışmamızda adacık hücrelerinin karaciğer hepatositleri ile olan etkileşimlerinin hangi boyutta olduklarını incelemek ereği ile in-vitro koşullarda aynı ortamı oluşturarak adacık-hepatosit etkileşimini izlenmeyi amaçladık. Hepatositlerin adacık canlılığı üzerine olumlu bir etkisi olduğunu, aynı zamanda canlılığı arttığı gibi insülin salgılama erkinde de bir artış olacağını ortaya koymaya çalıştık.

Progesteron hormonu hipofiz bezinin ön lobundan salgılanan LH uyarısına yanıt olarak ovulasyondan sonra geride kalan folliküler hücre katmanının büzüşmesiyle oluşan korpus luteumdan salgılanır.

Pankreas adacıklarında progesteron reseptörü olduğu bilinmektedir. Progesteron hormonunun sıçanlarda adacık hücrelerinin proliferasyonuna etki ettiği gösterilmiştir¹⁰³.

Bu etkiyi gözlemleyebilmek ereğiyle deney gruplarımıza progesteron hormonu ekleyerek hem progesteronun adacık canlılığı, çoğalması ve işlevine etkilerini, hem de hepatosit ile birlikte uygulandığında nasıl bir etki gösterdiğini belirlemeyi amaçladık.

Literatür incelemelerinde konu ile ilgili çok sayıda in vivo ve in vitro çalışmaya rastlanmıştır. Çalışmaların bir grubunda çeşitli ajanların adacık hücrelerine etkisi incelenirken, bir grubunda farklı hücre gruplarının etkisi, diğer bir grubunda ise hormonların etkileri araştırılmıştır.

Çeşitli ajanların adacık hücrelerine etkilerinin incelendiği çalışmaların birinde araştırmacılar sıçanlara oral olarak uygulanan vildagliptinin adacık hücrelerine etkileri incelenmiştir. Sıçanlara 4 gün süreyle vildagliptin 20, 60 ve 100 mg/kg/gün oral olarak uygulandıktan sonra adacık hücreleri izole edilmiş ve adacıklar +4 °C' de 15 dakika 0 ve 300 µM H₂O₂ içeren ortama etkin bırakılmışlardır. Adacık hücrelerinin canlılıkları floresein diasetat (FDA) ve propidyum iyot (PI) ile boyanarak

fluoresan mikroskop ile değerlendirilmiştir. Geri kalan adacıklar ise glikoz uyarımı, lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve süperoksit dismutaz (SOD) erki için saklanmıştır. Vildagliptin'in 100 mg/kg/gün oranındaki dozunun hücre canlılığını arttırdığı saptanırken bu dozun H₂O₂'in yol açtığı lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyonuna karşı hücreleri koruduğu vurgulanmıştır. Ancak araştırmacılar Vildagliptin uygulanan sıçanlardan izole edilen adacık hücrelerinde glikoz salınımının değişkenlik gösterdiğini belirtmişler; H₂O₂ ile etkin bırakma sonrasında insülin salınımı açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır¹⁰⁴.

In vitro primer insan adacık kültürlerinde yapılan bir diğer çalışmada, kısa süreli GLP-1 (glukagon like peptide – 1) etkinliği izlenmiş, sonuç olarak kültüre hücrelerde glukoz bağımlı insülin salgılanmasının düzeldiği ve hücre canlılığının arttığı gösterilmiştir¹⁰⁵.

Dağlı Gül ve arkadaşları, sıçanlara 9 gün süresince oral karvakrol uygulayarak adacık canlılığına, oksidatif DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve protein oksidasyonuna etkisini incelemişler ve 20 mg/kg/gün dozunun oksidatif hasarı azaltarak adacık canlılığını koruduğunu saptamışlardır¹⁰⁶.

Adacık hücrelerine çeşitli hücrelerin eklenerek araştırıldığı çalışmalardan olan Gatto ve arkadaşlarının araştırmalarında ise pankreas kanal hücrelerinin (DEC) adacıkların büyüme ve işlevini destekleyen kök hücreler olduğu bildirilmiş; bu nedenle taze ve dondurulmuş pankreas adacık hücre canlılığı üzerine DEC ko-kültürünün etkileri araştırılmıştır.

Sonuç olarak ko-kültür sürecinin adacık sağ kalım ve işlevsel erkini geliştirmek için önemli bir yöntem olduğu gösterilmiştir¹⁰⁷.

Miki ve arkadaşları adacık hücrelerinden farkedandırılan fibroblast hücre serisi olan MNNK-1 hücreleri ile fare, sıçan, domuz Langerhans adacıklarının ko-kültüre etmişler ve sonuçta bu hücre serisinin adacıkların glukoza olan tepkisi, canlılığı ve insülin salgılanması üzerine olumlu etkisinin olduğunu belirlemişlerdir¹⁰⁸.

Luo ve arkadaşları insan Langerhans adacıkları ile allojenik BM (kemik iliği) mononükleer hücrelerini birlikte kültüre etmişler ve BM hücrelerinin adacıklar üzerindeki onarıcı etkilerini incelemişlerdir. BM ile ko-kültürde aktif adacık hücrelerinin sağ kalım süreleri ve insülin salınımının arttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar BM' nin adacık hücrelerinde hasar oluşumunu geciktirdiğini bildirmişlerdir¹⁰⁹.

Bizim çalışmamızda da saf adacık kültürü ile adacık+hepatosit ko-kültürü karşılaştırılmış ve hepatositlerin adacık hücrelerine etkileri incelenmiştir. Sonuçta kültüre hepatosit eklenmesinin diğer çalışmalarda (107,108,109) belirtilen hücrelerde olduğu gibi adacık hücre canlılıklarında artışa neden olduğu saptanmıştır. Ancak adacık kültürüne DEC (107) ve MNNK-1 (108) eklendiğinde gözlenen işlev ve proliferasyona olan olumlu etki bizim çalışmamızda kullandığımız hepatosit hücrelerinin eklenmesinde gözlenmemiştir. Bu bulgular hepatositlerin adacık hücrelerine eklenmesinin kültürde belirgin bir etki yaratmadığını göstermiştir.

Adacık hücre kültürüne hormonların eklendiği çalışmalardan birinde Yamamoto T. ve arkadaşları rekombinat insan prolaktinini (PRL) adacık hücre kültürüne uygulamışlar ve β hücre sağ kalımında anlamlı bir düzelme olduğunu ve aynı zamanda bu hücrelerin *in-vitro* ortamın zararından korunduğunu göstermişlerdir. Sonuçta kültür ortamında PRL eklenmesi başarılı bir adacık nakli artışına, nakil öncesi kültür sırasında β hücre yitiminin en az düzeye indirilmesinde yararlı bir süreç olabileceğini düşünmüşlerdir. Alfa ve gama hücrelerinin aksine beta hücrelerinin yüzdesinde kontrol grubuna karşın daha anlamlı olarak artış belirlemişlerdir¹¹⁰.

Bizim çalışmamızda Yamamoto' nun araştırmasından farklı olarak tüm adacık hücreleri bir bütün olarak değerlendirilmiştir. Yine çalışmamızda farklı olarak adacık kültürüne progesteron hormonu eklenmesinin etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak adacık kültürüne progesteron hormonu eklenen grupta canlılığın saf adacık grubuna karşın arttığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmada diğer çalışmalardan ayrıcalık olarak hepatositlerle birlikte kültüre edilen adacık hücrelerine progesteron hormonunun etkisi de incelenmiş ve gerek adacık canlılığı gerekse proliferasyonunun en yüksek bu grupta olduğu saptanmıştır.

Shao ve arkadaşları, progesteron (PRG), prolaktin (PRL) ve deksamethazonun (DEX) , MIN-6 β -hücreleri üzerine insülin salınımı etkisini göstermek için bu üç hormonu aynı yoğunluklarda aynı koşullarda ayrı ayrı kültür solüsyonu içine ekleyerek etkilerini incelemişlerdir. İnsülin salgılanması üzerine hormonların etkilerini belirlemek ereğiyle hücreler ilk olarak modifiye Krebs-Ringer bikarbonat (KRB) ile iki kez yıkanmış ve 37 °C de 1 saat KRB tamponunda inkübasyona bırakılmıştır. Ardından KRB solüsyonuna 3, 10 ve 16 mM glukoz eklenerek MIN6 β -hücrelerinin glukoz

ile uyarılmaları sağlanmış ve daha sonra örneklerin ELİZA ile ölçümleri yapılmıştır. Sonuçta PRL ve PRG uygulanmış kültürdeki hücrelerde insülin salgılanması arttığı buna karşın DEX eklenmiş kültürdeki hücrelerde insülin salgılanmasının baskılandığı bildirilmiştir. PRL ve PRG ile artan bir insülin salınımı olsa da PRG' a etkin bırakılan hücrelerin PRL' e karşın çok daha az etkilendiği vurgulanmıştır. DEX' in düşük glukoz yoğunluğunda insülin salınımına belirgin bir etkisi bulunmazken yüksek glukoz yoğunluğunun insülin salınımını baskıladığı gözlenmiştir¹¹¹.

Bizim çalışmamızda Shao' nun çalışmasından ayrıcalı olarak tüm adacık hücreleri bir bütün olarak değerlendirilmiş, Ayrıca progesteron hormonunun glukoz varlığında insülin salınımına etkisi incelenirken, ek olarak adacık+ hepatosit ve adacık+ hepatosit+ progesteron gruplarında da aynı inceleme yapılmıştır. Deney 0. ve 48. saatlerde uygulanmıştır. Düşük glukoz varlığında 48.saatte en belirgin insülin artışının saf adacık ve adacık+ progesteron grubunda olduğu belirlenirken, yüksek glukoz varlığında ise 0. saat ile karşılaştırıldığında 48. saatte tüm gruplarda insülin salınımında düşüş saptanmıştır. Bu bulgu Shao' nun çalışması ile uyumlu olarak progesteron hormonunun insülin salınımını arttırmada yeterli etkinlikte olmadığını göstermiştir.

6.SONUÇ

Çalışmamızda pankreas Langerhans adacık hücre canlılığına hepatosit ve progesteron hormonunun etkilerini incelemek ereğiyle, 4 farklı grupta canlılık, proliferasyon ve glukoz uyarım testi çalışmaları yapıldı.

Canlılık ölçümünde 0. ve 48. saatlerde PI/ FDA floresan boyası kullanıldı ve MATLAB programında sayısal veriler elde edildi. Elde edilen veriler sonucunda canlılık oranı en fazla adacık+ hepatosit+ progesteron hormon grubunda olduğu belirlendi. Adacık+ hepatosit ve adacık+ progesteron hormon gruplarında canlılık oranı birbirine eşit bulundu. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Sonuç olarak adacık canlılığı üzerine hepatosit hücrelerinin ve progesteron hormonunun birlikte uygulanmasının tek tek uygulanmalarına göre daha etkin olduğu saptandı.

Adacık hücrelerinin proliferasyon değerlendirilmesi BrdU ile işaretlenip akım sitometride ölçülerek yapıldı. Elde edilen sayısal verilerde adacık+ hepatosit+ progesteron hormon grubunda adacık proliferasyonunun diğer gruplara karşın daha fazla olduğu gözlemlendi. Tek başına hepatosit hücresi ya da progesteron hormonu uygulamasının adacık proliferasyonu üzerine herhangi bir etkisi olmadığı belirlendi. Bulgular istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0,05$).

Adacıkların düşük ve yüksek glukoz varlığında insülin salınımları ELİZA testi ile değerlendirildi. 0. ve 48. saatlerde glikoz uyarımı

için yapılan ELİZA sonuçlarında, adacık ve adacık-progesteron gruplarında düşük glukoz yoğunluğunda 48. saatte insülin salınımında az da olsa artış gözlenirken, adacık+hepatosit ve adacık+ hepatosit+ progesteron gruplarında düşüş belirlendi. Yüksek glukoz yoğunluğunda ise tüm grupların insülin salınımında 0. saate göre düşüş olduğu görüldü. Bulgularımızda yaptığımız istatistiksel değerlendirmede sonuçlar anlamlıydı ($p < 0,05$).

Sonuç olarak elde ettiğimiz tüm veriler değerlendirildiğinde adacık hücrelerinin canlılığı, proliferasyonu ve işlevi üzerinde hepatosit hücrelerinin ve progesteron hormonunun tek tek uygulanmalarının olumlu bir etkisinin olmadığı, ancak birlikte uygulandıklarında bu etkinin olumlu olduğu kanısına varıldı. Bu bilgiler ışığı altında adacık canlılığı, proliferasyonu ve işlevini artırmaya yönelik çalışmaların sürdürülmesi gerektiği düşünüldü.

7.ÖZET

Tip 1 Diabetes Mellitus pankreatik Langerhans adacıklarının beta hücrelerinin bazı genetik HLA alelleriyle ilişkili olarak otoimmün harabiyeti ve yitimiyle seyreden süregelen bir hastalıktır. Ekzojen insülin tedavisi, Tip 1 diyabetli hastalarda yaşam kalitesini arttırmak ve diyabetin süregelen komplikasyonlarını önlemek ya da geciktirmek için tek seçenektir. Yoğun insülin tedavisinin süregelen komplikasyonları önlemede yeterli başarıya ulaşamadığı gözlenmektedir. Tip I diyabet tedavisinde pankreas adacık hücrelerinin izole edilerek, daha az-invazif yoldan (portal vene infüzyonla) karaciğere nakledilmesine yönelik çalışmalar 1990' larda hız kazanmıştır. İzolasyon sürecinde oluşan hipoksi ve oksidatif stres, hücrelerde sitokin aracılı apoptoz ve nekrozu uyarmakta ve hücre yitimine neden olabilmektedir. Nakil öncesi adacık hücrelerinin kültür edilmesinin, preparatlardaki hücre yoğunluğunu arttırıp hücre canlılığını uzattığına yönelik veriler bulunmaktadır.

Biz de çalışmamızda kültüre adacık hücrelerinin karaciğer portal ven' inden verildikten sonra canlılığının nasıl etkilendiğini gösterebilmek ve progesteron hormonunun etkisini belirleyebilmek ereğiyle in-vitro koşullarda adacık+ hepatosit ko-kültürüne progesteron hormonu ekleyerek adacıklarda floresan boyama ile canlılık ölçümü, BrdU ile boyayıp akım sitometride sayarak proliferasyonuna olan etkilerini ve glukoz tolerans testi ile fonksiyon ölçümü yapmayı ve gruplar arasındaki farklılıkları belirlemeyi amaçladık.

Deneyde 2-5 aylık, 200-250 gr ağırlığında, erkek, 60 adet Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Adacık kültürü, Adacık+ Hepatosit ko-

kültürü, Adacık+ Progesteron kültürü, Adacık+ Hepatosit+ Progesteron ko-kültürü, grupları olmak üzere 4 grupta, 0. ve 48. saatlerde incelemeler yapıldı. Hepatosit izolasyonunda Seglen' in iki basamaklı izolasyon yöntemi temel alındı. Canlılık ve sayım işlemleri Cauntess (İnvitrogen-ABD) cihazında yapıldı. Adacık hücrelerinin canlılık ölçümü için PI/ FDA ile florasan boyaması yapıldı. BrdU boyası ile işaretlenip akım sitometride hücre çoğalması hesaplandı. Glukoz uyarım testi için ise ELİZA yöntemi uygulandı.

Adacık hücrelerinin canlılık değerlendirmesinde 0. saat ile 48. saat arasında en fazla artış Adacık+ Hepatosit+ Progesteron grubunda gözlemlendi.. Adacık hücrelerinin çoğalmasının ölçümünde canlılıkla orantılı olarak en fazla artış Adacık+ Hepatosit+ Progesteron grubunda gözlemlendi. Glukoz uyarım testi verilerinde insülin salınımı düşük glukoz varlığında adacık ve adacık+ progesteron grubunda 0. saate göre 48. saatte artış olduğu gözlemlenirken, yüksek glukoz varlığında ise bütün gruplarda bir düşüş olduğu belirlendi. Elde edilen veriler anova testi ile değerlendirildi ve sonuçlar bulgularla uyumlu bulundu.

8. SUMMARY

Type1 Diabetes Mellitus is a chronic disease accompanied by the autoimmune destruction and loss of the beta cells of the pancreas related to some HLA alleles. Exogenous insulin therapy is the only treatment option to increase the quality of life and to prevent or to delay the chronic complications in patients with Type 1 diabetes. Intensive insulin therapy does not appear to achieve adequate success in preventing the chronic complications. In the treatment of Type 1 diabetes, the studies directed to isolate the pancreatic islet cells and to perform the islet cell transplantation in to the liver via a lessinvasive way (to the portal vein, by infusion) accelerated in 1990s. Hypoxia and the oxidative stress that developed during the isolation process may induce the cytokine-mediated apoptosis and necrosis and may lead to cell loss. There are data indicating that performing the culture of the islet cells before the transplantation may increase the volume of the cells in the preparations and prolongs the cell's life.

In our study, we aimed to demonstrate how the liveness of the cultured islet cells were affected after the introduction into the portal vein, to determine the effect of progesterone by adding progesterone to the islet hepatocyte co-culture under the in-vitro conditions and measuring the liveness of the islets by fluorescent staining and determining its effects on proliferation by counting the BrdU- stained islets in flow cytometry, to perform the measurement of the function by glucose tolerance test and to determine the inter group differences.

60 male Wistar albino rats weighing 200-250 g, aged from 2 to 5 months were used in the experiment. The examinations were performed at 0th and 48th hour in the 4 groups which were the islet culture group, the islet+ hepatocyte co-culture group, the Islet+ Progesterone culture group, Islet+ Hepatocyte+ Progesterone co-culture group. The hepatocyte isolation was based on the two-step isolation method of Seglen. The procedures for liveness and counting, were performed in Cautes (Invitrogen-ABD). The fluorescent staining was performed with PI/FDA in order to measure the liveness of the islet cells. The cell proliferation was calculated in flow cytometry after the cells being marked by BrdU staining. ELIZA method was used for the glucose stimulation test.

In the assessment of the liveness of the Islet cells, the highest increase between the 0th hour and 48th hour, was observed in the Islet+ Hepatocyte + Progesterone group. In the measurement of the islet cell proliferation, correspondingly to the liveness, the highest increase was observed in the Islet+Hepatocyte+ Progesterone group. While the results of glucose stimulation test revealed an increase in the insulin secretion at 48th hour in comparison with 0th hour, in the islet+ progesterone group in the presence of low glucose level, a decrease was observed in all groups in the presence of high glucose level. The data obtained were assessed by anova test and the results were found to be consistent with the findings.

9.KAYNAKLAR

1.Larsen CE, Alper CA. The genetics of HLA-associated disease. Curr Opin Immunol. 2004;16(5):660

2. DCCT. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group The Effect of Intensive. Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. N Engl J Med 1993; 329: 977–986

3. Sutherland DE, Gruessner RW, Gruessner AC. Pancreas transplantation for treatment of diabetes mellitus. World J Surg. 2001;25(4):487.

4. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. N Engl J Med. 2000; 343 (4): 230

5. Seok L.Ong,Cristina Pollard,Yvonne Reeas,Giuseppe Garcea,M'Balu Weeb,Severine Illouz, David P.Berry,Ashley R. Dennison: Ultrasound Changes Within The Liver Afetr Total Pankreatectomy And

Intrahepatic Islet Cell Autotransplantation Transplantation 2008;85:1773-1777

6. P. Fiorina, A. M. J. Shapiro, C. Ricordi and A. Secchi, The Clinical Impact of Islet Transplantation. American Journal of Transplantation 2008; 8: 1990–1997

7. Hirohito Ichii Camillo Ricordi. Current status of islet cell transplantation. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2009 16:101–112

8. Bottino R, Balamurugan AN, Tse H, et al. Response of human islets to isolation stress and the effect of antioxidant treatment. Diabetes. 2004; 53 (10): 2559

9. A.G. Nieuwenhuizen, G.A. Schuiling, L. G. Hibrands, E. M. Bisschop, T.R. Koiter Proliferation of Pancreatic Islet-Cells In Cyclic and Pregnant Rats After Treatment With Progesterone Horm Metab Res 1998; 30: 649-655

10. Moberg L, Olsson A, Berne C, et al. Nicotinamide inhibits tissue factor expression in isolated human pancreatic islets: implications for clinical islet transplantation. Transplantation 2003;76(9):1285

11. Froud T, Ricordi C, Baidal DA, et al. Islet transplantation in type 1 diabetes mellitus using cultured islets and steroid-free immunosuppression: Miami experience. Am J Transplant. 2005; 5(8):2037

12. Ryan EA, Paty BW, Senior PA, et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation Diabetes 2005;54(7):2060

13. MOORE,K.L.,PERSAUD,T.V.N.:The Developing Human,6.Baskı,,W.B.Saunders Company, Philadelphia 1998: 235-236,280-282

14. SADLER,T.W.:Langman's Medical Embriyology(Türkçe Çeviri)7.Baskı,,Palme Yayıncılık,Ankara,1994245-246

15. SEFTALİOĞLU,A.:İnsan Embriyolojisi,3.Baskı,Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd.Şti. Ankara 1998:239-240,302-306,

16. DERE,F.:Anatomi Atlası ve Ders Kitabı,5.Baskı,Nobel Kitabevi Ltd.Şti.,Adana,1999 :718-723,948- 953

17. SNELL,R.S.Klinik Anatomi(Türkçe Çeviri),5.BaskıNobel Tıp Kitabevi Ltd.Şti.,İstanbul 1997: 221-223,669-684

18.WILLIAMS,P.L.,WARWICK,R.,DAYSON,M.,BANNISTER, L.H.:Gray's Anatomy, 28.Baskı Churchill Livingstone Longman Group UKLtd.,1995: 1691- 1699, 1790- 1795

19. ARINCI,K., ELHAN, A. Anatomi Cilt I, 2. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, 2001: 233- 235, 261- 265

20. ÇİMEN, A. : Anatomi, 6. Baskı, Uludağ Üniversitesi Yayınları, Bursa, 1996: 376- 379, 413- 416

21. GARTNER,P.L.,HIATT,J.L.:Text Book oh Histology,W.B. Saunders Company, Baltimore, 1997:338- 345

22. ROOS,M., H., ROMRELL, L. J., KAYE, G.I.: Hitology A Text and Atlas, 3. Baskı , Williams and Wilkins Company, Philedelphia,1995:415-424,509-518

23. BERGMAN, R. A.,AFIFI, A. K.,HEIDGERJR, P., M.: Histology, 1. Baskı,W.B.Saunders Company,Philadelphia, 203-207, 276-278

24. LEESON, T. S., LEESON. C. R. : Text/Atlas of Histoloji, 1. Baskı, W. Saunders Company, Philadelphia 1988 : 413- 415, 463- 475

25. YOUNG, B. ,HEATH, J. W. Functional Histology, 4. Baskı, Churchill Livingstone, New York, 2000: 246- 248, 283- 285

26. STEVENS,A.,LOWE,J.:Human Histology,2.Baskı,Mosby Company, Philadelphia 1996: 188-190,207,267-269

27. JUNGUERIRA,L.C.,CARNIER,O.J.,KELLY,R.O.:Temel Histoloji (Türkçe Çeviri) 8. Baskı, Barış Kitabevi,İstanbul 1998: 302-307, 394- 395

28. Von Mering J, Minkowski O., Diabetes mellitus nach pankreas extirpation. Arch Exp Path Pharmacol Leipzig 1890 : 26:371

29. Schafer E.A. An introduction to the study of internal secretion. In: The Endocrine Organs. London: Longmans, Green 1916

30. Banting F. G, Best C.H. The internal secretion of the pancreas. J Lab Clin Med. Bliss M. The Discover of Insulin. University of Chicago Press, Chicago 1982:7:247-253

31. Murnaghan J. H, Talalay P. John Jacob Abel and the crystallization of insulin. Perspect Biol Med 1967:10:334

32. Jensen H, Evans E.A . Studies on crystalline insulin. XVIII The nature of free amino groups in insulin and the isolation of phenylalanine and proline from crystalline insulin. J Biol Chem 1935 108:1

33. Jay S. Skyler: Atlas of Diabetes 2007: 1-3

34. Rouiller D.G, Cirulli V, Halban P: Difference in aggregation properties and levels of neural cell adhesion molecule (NCAM) between islet cell types. Exp Cell Res 1990 391: 305-312

35. Rouiller D.G, Cirulli V, Halban P.A: Uvomorulin mediates calcium dependent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types. Dev Biol 1991: 148- 233- 242

36. BLOOM, W., FAWCET, D. W.: A Text Book of Histology, 11. Baskı, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996: 587- 593, 716- 729

37. COROLA, R., HARLEY, P. J., NOBACK, C. K.: Human Anatomy and Physiology, 2. Baskı, McGraw Hill Inc., New York, 1992: 534- 536, 784- 787

38. GANONG, W. F.: Tıbbi Fizyoloji (Türkçe Çeviri), 17. Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 1997: 352- 375, 494- 505, 526- 527

39. Guyton A.C., Hall J.E: Tıbbi Fizyoloji (Türkçe Çeviri) 1. Baskı Yüce Yayınları A.Ş. & Nobel Tıp Kitapevi Ltd.Şti 2001: 933- 936

40. NOYAN, A.: Fizyoloji Ders Kitabı, 6. Baskı, Meteksan Matbaacılık ve Teknik Ticaret A.Ş., Ankara 1989: 860- 862, 879- 882, 1048- 1066

41. TÜMER,A.:Endokrinolojiye Giriş,1.Baskı,Meteksan Matbaacılık ve Teknik ticaret A.Ş.,Ankara,1989:99-124

42. BALINSKY,B.I.:An introduction to embriology,fifth edition,Saunders Collage Publishing,Philadelphia,1981:544-545

43. PETORAK, İ. Medikal embriyoloji.1.Baskı,(Türkçe Çeviri),Osman Aykaç Matbaası,İstanbul,1984 : 200-202

44. KAYALI,H.: İnsan embriyolojisi,3.Baskı,Renk Ofset Matbaacılık,Ankara,1987: 203-204

45. KAYALI ,H.,ŞATIROĞLU,G.,TAŞYÜREKLİ,M.:İnsan embriyolojisi,6.Baskı,Evrin Basım-Yayım-Dağıtım,İstanbul,1990:181-182

46. ÖZER,F.:Sindirim Fizyolojisi,4.Baskı,Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını,Ankara, 1981:68-72

47. HATİBOĞLU. M. T.: Anatomi ve Fizyoloji, 8. Baskı, Hatiboğlu Yayınları, Ankara, 1990: 173- 175

48. NOYAN F.,ERALP,İ.:Kısa insan anatomisi,Fatih Yayınevi Matbaası,İstanbul,1981: 79-80

49. ODAR İ.V.:Anatomi Ders Kitabı,1.Cilt 12.Baskı,Elif Matbaacılık,1980:115-138

50. ZEREN Z.:Sistemik insan anatomisi,Ekim Yayınları,İstanbul,1982:368-378

51. KURAN O.:Sistemik anatomi, Filiz Kitabevi, İstanbul, 1983: 429-440

52. ŞİMŞEK E.:Anatomi-Fizyoloji,Hacattepe Taş Kitapçılık,Ankara, 1992: 95- 96

53. ERBENGİ T. Histoloji 2, 1.Baskı, Beta Basımevi, İstanbul, 1985: 98-111

54. FAWCETT D.W.:Atextbook of histology,Eleventh edition,Igaku-shoin/Saunders International edition1986: 679- 708

55. JUNQUEİRA,L.C.,CARNEIRO J.KELLEYR.O : (Çeviri editörü: AYTEKİNY.) Temel Histoloji, 7.Baskı,Barış Kitabevi ,İstanbul, 1993: 380- 394

56. BLOMHORFFR.:Hepaticretinol metabolism:Role of the various cell types, Nutr.rev.,1987; 45 (9): 257- 63

57. DAVIDH.,REİNKEP.:The conceot of the perisinuzodial functional unit of the liver importance to pathological processes,Exp.Pathol.,1987: 32,193 – 224

58.WISSEE., ZANGERR. B., CHARELS K., SMISSEN.P.V., McCUSKEY, R. S.: The liver sieve:Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae,the sinusoidal wall and the space of Disse, Hepatology, 1985: 5 (4), 683- 692

59. WAKE. J., MOTOMATSU K., DANDANC., KANEDAK.: Three-dimensional structure endothelial cells in hepatic sinuzoids of the rat as revealed by the Golgi method,Cell Tissue Res. 1988: 253, 563- 571

60. INTERNATIONAL ANATOMICAL NOMENCLATURA COMMITTEE: Nomina histologica, thirdedition, H22, Churchill Livingstone, 1989

61. KAYALIH.: Özel histoloji,İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları,İstanbul,1984: 140-148

62. MOTTAP.:Ascanning electron microscopie study of the rat liver sinuzoid,Cell Tissue Res.,1975: 164,371-385

63. CORMACKD.H. :Ham's histology, Ninth edition, J. B. Lippincott company, Philadelphia 1987:520- 537

64. WISSEE.: An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids,Ulrastructure Research,1970: 31,125-150

65.WAKEK.,MOTOMATSUK.,SENOOH.,MASUDAA.andADA CHI E.:Improved Kupffer'sgold chloride method for demonstrating the stellate cells storing retinol in the liver and extrahepatic organs of vertebras,Stain Technology,1986: 61, 193- 200

66. WAKEK.: Sternzellen' in the liver:perisinuzoidal cells with special reference to storage of vitamin A,Amer.J.Anat.,1971: 132,429-637

67. BRONFENMAJERS., SCHAFFNER F.and POPPER, H.:Fat storing cells (Lipocytes) in human , Arch.Path. 1966: 82,447-453

68.WAKE K.:Development of vitamin A rich lipid droplets in multivesicular bodies of rat liver stellate cells, J.Cell Bio.1974: 63, 683-691

69. KUDOS.:the morphology of release of vitamin Acontaining lipid droplets by hepatocyte in rat liver,Anat. Rec.,1989: 225, 11- 20

70. Imai K, Sato Kojima N, Mivra M, Sato T, Sugiyama T. et al. Storage of lipid droplets in and production of extracellular matrix by hepatic stellate cells (vitamin A-storing cells) in Long-Evans Cinnamon-like colored (LEC) rats. *Anat Rec* 2000;258:338-348

71. Kiiyasov A. P, Gumerova A. A. The Ito cells in ontogenesis and liver regeneration. *Tsitologiya* 2002; 44 (4) :342- 349

72. BEVELANDER G., RAMALEY J. A.: *Essential of histology*, Eight edition, The C.V. Mosby company, S.T. LOUIS, Toronto-London, 1979, 249-258

73. KRAUSE W. J., CUTTS J. H. : *Concise text of histology*, Williams and Wilkins, Baltimore/ London, 1981: 284- 286

74. BELL G. H., SMITH D. E., PATERSON C. R.: *Textbook of physiology*, 10. edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, 1980: 95-103

75. CAROLAR., HARLEY J. P., NOBACK C. R.: *Human anatomy and physiology*, 2. edition, McGraw Hill, inc., 1992: 787-792

76. AKGÜN N.: *Boşaltım, dolaşım, fizyolojisi* 7. Baskı, Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova-İzmir, 1981: 266-267

- 77.** Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji 17. Baskı Meteksan Ankara 2008:1123-1125
- 78.** Freshney R. I. Animal Cell Culture: A Practical Approach. IRL Press Limited, Oxford, 1986
- 79.** Davis J. M. Basic Cell Culture. A Practical Approach Oxford University Press INC. New York ,1996
- 80.** Çetinkaya G. Fare embriyonik kök hücrelerinin NWPF disklerde üretilmesi ve kültürasyonu. Yüksek Lisans Tez Çalışması Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü 2004
- 81.** Jacoby B.W., Paston H.I., Cell Culture, Academic Press Limited, San Diego, California, 1979: 642
- 82.** Ozban N., Hücre 2. baskı, İstanbul Üniv. Yayınları, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul. 1988:283
- 83.** Berns W.N., Cell, 2nd Ed., Saunders College Pub, New York, 1983:256
- 84.** Shapiro M. Flow cytometric approaches to clinical microbiology. Labmedica, 1990 4: 20,.
- 85.** Riley R. S., Mahin E. J. Flow Cytometry Clinical Applications ASCP National Meeting Fall, Washington D.C., 1989:3-15
- 86.** Fuller T. A. The physics of surgical lasers. Laser Surg Med, 1980:1-15

87. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes Wan-Chun Li, Kate L. Ralphs, and David Tosh, Mouse Cell Culture, Methods in Molecular Biology 633, DOI Springer Science+ Business Media, LLC 2010 10.1007/978-1-59745-019-5-13

88. Koebe H. G., Mühling B., Deigmann, C. J. F. W. Cryopreserved porcine hepatocyte cultures Schildberg Department of surgery, Klinikum Grosshadern, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Marchioninistrasse Munich, Germany 1999:15, D-81377

89. Morgan N. G., Diakogiannaki E., Russell, M.A., “The incubation and monitoring of cell viability in primary rat islets of Langerhans and pancreatic beta-cell lines”, Methods of Molecular Biology, 2009: 560, 53-64

90. Kim M. K., Fibrianto Y.H., Oh J.H., Jang G., Kim H.J., Lee K.S., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. Effects of Estradiol-17 β and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes Elsevier Inc 2004. 07. 019

91. Carter J.D., Dula S.B., Corbin K. L. Wu R. A., “Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment”, Biological Procedures Online, 2009:11, 3-31

92. London J. M., Contractor H., Lake S.P. “A fluorometric viability assay for single human and rat islets” Horm Metab Res Suppl 1990:25: 82-87

93. Bothino R., Trucco M., “Multifaceted therapeutic approaches for a multigenic disease”, *Diabetes*, 2005;54:S79-86

94. Vijayaganapathy Vaithilingam, Gayathri Sundaram, Bernard E. Tunch: Islet cell transplantation current opinion in organ transplantation 2008: 13:633-638

95. Givan, A.L., *Flow Cytometry: First Principles*, 1992 116-118.

96. Hyder, A. Effect of the pancreatic digestion with liberase versus collagenase on the yield, function and viability of neonatal rat pancreatic islets. *Cell Biology International* 2005, 29 (9), 831-834

97. Dellê H., Saito, M.H., Yoshimoto, P.M., Noronha, I.L.). The use of iodixanol for the purification of rat pancreatic islets. *Transplantation Proceedings*, 2007: 39 (2), 467- 469

98. Chen, X.B., Li, Y.X., Jiao, Y., Dong, W.P., Li, G., Chen, J., Tan, J.M. Influence of heme oxygenase-1 gene transfer on the viability and function of rat islets in in vitro culture. *World Journal of Gastroenterology*, 2007;13(7), 1053-1059

99. Lakey, J. R., Burridge P.W., Shapiro, A.M. (. Technical aspects of islet preparation and transplantation. *Transplant International*, 2003: 16(9), 613-632

100. Paraskevas S., Maysinger D., Wang R., Duguid T.P., Rosenberg, L. Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. *Pancreas*, 2000;20(3), 270-276

101. Kin T., Senior P., O’Gorman, D. Risk factors for islet loss during culture prior to transplantation. *Transplant International*, 2008;21(11),1029-1035

102. Pileggi A., Molano R.D., Berney T., Cattan P., Vizzardelli C., Oliver R. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes*, 2001;50(9), 1983-1991

103. Frank Dombrowski, Dietrich Klingmüller, Ulrich Pferfer Insulinomas Derived From Hyperplastic Intra-Hepatic Islet Transplants *American Journal of Pathology* vol.1998: 152

104. Nieuwenhuizen A. G., Schuiling, G. A. Liem, S. M. S Moes H., Koiter T. R. Uilenbroek Th.J. J.: Progesterone Stimulates Pankreatic Cell Proliferation in -Vivo: *European Journal Of Endocrinology* 1999: 140 256- 263

105. Büyük G. Vildagliptin uygulamasının pankreas adacık hücreleri üzerine etkisi Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi 2011 Ankara

106. Farilla L., Bulotta A., Hirsbirg B., et al. “GLP-1 inhibits cell apoptosis and improves glucose responsiveness of freshly isolated human islets”, *Endocrinology* 2003: 144 (12):5145-5148

107.Dağlı Gül AŞ., Fadıllıoğlu E., Karabulut İ., Yeşilyurt A., Delibaşı T., “Oral karvakrol uygulamasının izole sıçan pankreas adacık hücrelerinde H₂O₂ ile oluşturulan hasara karşı etkileri”, Türk Fizyolojik Bilimler Derneği 36. UlusalFizyoloji Kongresi, Edirne, (14-17 Eylül 2010).

108.Gatto C, Callegari M, Folin M, Conconi M, Paolin A, Di Falco G et al. Effects ofcryopreservation and coculture with pancreatic ductal epithelial cells on insulin secretion from human pancreatic islets. Int J Mol Med 2003; 12: 851–854

109. Miki A, Narushima M, Okitsu T, Takeno Y, Soto-Gutierrez A, Rivas-Carrillo JD et al.Maintenance of mouse, rat, and pig pancreatic islet functions by coculture with human isletderived fibroblasts. Cell Transplant 2006; 15: 325–334

110.Luo L, Badiavas E, Luo J, Z, Maizel A. Allogeneic bone marrow supports human islet beta cell survival and function over six months. Biochem Biophys Res Commun 2007; 361:859–864

111. Prolactin Supplementation to Culture Medium Improves β -Cell Survival Yamamoto T,Mita A.Ricordi C.,Messinger S.,Miki A,Sakuma Y.,Timoneri F.,Barker S.,Fornoni A.,Molano R.D.Inverardi L.,Pileggi A.,Iciji H.,Transplantation 2010; 89:1328-1335

112. Jianhua Shao, Liping Qiao, and Jacob E. Friedman Am J Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 β -cells Physiol Endocrinol Metab 2004; 286: E 304– E 310

10.EKLER



ANKARA NUMUNE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 17.01.2011
Protokol no.su : 2011/3

Proje yürütücüsünün adı soyadı : Doç.Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU
Projenin başlığı : Karaciğer Hepatosit Hücreleri ile Birleşik Kültür Yapılan Pankreas
Adacık Hücrelerinin Canlılığına Progesteron Hormonunun Etkisi
Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Wistar Albino Sıçan
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 2-5 aylık / 200-250 gr

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

Doç.Dr.Mahmut Keç (Kurul Başkanı)

Doç.Dr. Serdar Güler (Üye)

Doç.Dr. Erdal Göçmen (Üye)

KATILMADI

Gülşay Arslan (Üye)

Doç.Dr.Tuncay Delibaşı (Başkan vekili)

KATILMADI

Doç.Dr. Ali Rıza Odabaşı (Üye)

Vet. Murat Duruk (Üye)

İbrahim Çiçek (Üye)

11.TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN başta olmak üzere, yüksek lisans öğrenimim süresince anlayışlı yaklaşımları ile beni yönlendiren, desteğini ve ilgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU' na;

Yüksek lisans eğitimimde katkıları olan hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Tahir HATİPOĞLU' na, Prof. Dr. Celal ILGAZ' a, Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL' a, Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU' na ve Doç. Dr. Çiğdem ELMAS' a; Tezimin yazım döneminde zamanlarını ve desteklerini esirgemeyen başta Arş. Gör. Güleser GÖKTAŞ, Arş. Gör. Gülce Naz YAZICI SARAÇ, Arş. Gör. C. Merve SEYMEN, Arş. Gör. Özen AKARCA olmak üzere tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı asistanlarına, öğrencilerine ve personeline; yüksek lisans öğrenimimi birlikte tamamladığım her konuda desteklerini yanımda hissettiğim sevgili dönem arkadaşlarım Perihan YALÇINKAYA Sena KOCAARSLAN, , İlkay BAŞER ve Canan ERDEMLİ' ye

Yüksek lisans eğitimimin başından sonuna kadar bana her konuda yardımcı olan en kötü günlerimde bile bana destek olup beni motive eden, deneylerimin yapım aşamasında bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen Uzm. Dr. Ferda ALPARSLAN PINARLI' ya; Deneylerimin yapılma aşamasında bana teknik destek ve imkan sağlayan Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi Hücre Araştırmaları

Merkezi' nde görev yapan Bio. Meral SABAN TİRYAKİ' ye Yüksek Bio. Gülbahar BÖYÜK' e Yüksek Kimyager Sercan MERCAN' a Yüksek Bio. Davut ERDOĞAN' a tüm hoca ve çalışanlarına;

Tezimin İstatistik analizlerini yapan Doç. Dr. A. Tulga ULUS' a; resimlerin düzeltilmesini yapan Barış TURAN' a

Beni bugünlere getiren canım annem Satı ATEŞ' e sevgili babam Yunus ATEŞ' e, maddi ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen daima yol gösterici olan sevgili ablalarım Yasemin ATEŞ TÜTÜNCÜ ve Fatma ATEŞ' e ve sevgili abim Akın ATEŞ' e ve canım arkadaşım Ayşe SAİ-ERES' e

TEŞEKKÜR EDERİM.

12. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Ankara Nallıhan' da doğdum. 1989 yılında İlkokula Yalova Atatürk ilkokulunda başladım Gümüşhane/ Torul Namık Kemal İlkokulunda 1994 yılında bitirdim. 1997 yılında ortaokulu Ankara Kürşat Bey ilköğretim okulunda, liseyi 2000 yılında Batıkent Mobil lisesinde tamamladım.

2002 yılında Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde eğitime başladım 2006 yılında mezun oldum. 2008 yılında Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsünde Pedagojik Formasyon eğitimi aldım. 2010 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.