



**T.C.**  
**SAĞLIK BAKANLIĞI**  
**TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU**  
**Ankara İli 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği**  
**Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi**  
**GÖZ KLİNİĞİ**

**OKÜLER YÜZEY REKONSTRÜKSİYONUNDA KULLANILMAK  
ÜZERE İNSAN KAYNAKLI FİBRİN KAPLAMA VARLIĞINDA  
LİMBAL EKSPANT KÜLTÜR**

Uzmanlık Tezi  
Dr. Gamze DERELİ CAN

Ankara, 2017

**T.C. SAĞLIK BAKANLIĞI  
ATATÜRK EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ  
GÖZ KLİNİĞİ**

**OKÜLER YÜZEY REKONSTRÜKSİYONUNDA KULLANILMAK  
ÜZERE İNSAN KAYNAKLI FİBRİN KAPLAMA VARLIĞINDA  
LİMBAL EKSPANT KÜLTÜR**

Uzmanlık Tezi  
Dr. Gamze DERELİ CAN

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Nurullah ÇAĞIL

Ankara, 2017

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimiyle bana göz cerrahisinin inceliklerini öğreten, umutsuzluğa kapıldığım anlarda beni cesaretlendiren, çalışma disiplini ve insani yönlerini hayatım boyunca örnek alacağım değerli hocam **Doç. Dr. Nurullah Çağıl'a** saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimimin son döneminde tanışma fırsatı bulduğum, beni araştırma grubuna içtenlikle ve sevgiyle kabul eden, tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesinde gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, başarılı bir bilim insanı olmanın yanında ANNELİĞİ ile her zaman örnek alacağım çok değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na** sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Mesleğe adım attığım ilk dönemde bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, iyi bir hekim ve iyi bir insan olmam için destek olan değerli hocalarım **Prof. Dr. Canan Gürdal'a** ve **Doç. Dr. Tamer Takmaz'a** saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne** teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, bilimsel desteğinin yanında sevgi ve anlayışı ile varlığını her zaman hissettiren, hayat boyu kaybetmek istemediğim canım arkadaşım **Özge Ekin Akdere'ye**,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum kliniğimizin çok değerli **uzman ve asistan hekimlerine, hemşirelerine ve personeline**, Hacettepe Üniversitesi **Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubundaki değerli arkadaşlarıma**,

Bugüne kadar desteğini ve emeğini hiç esirgemeyen, hayatımın ve başarılarımın gerçek kahramanları canım **annem'e, babam'a ve kardeşime**,

Sonsuz sevgisi ve anlayışı ile her zaman elimi tutan, tanıdığım günden bu yana beni bir kere bile üzmeyen, bana mutluluğu sunan, her şeyim canım eşim **Mehmet Erol Can'a**, Hayattaki en büyük hediyem, canımın ve varlığımın en önemli sebebi, değerlim canım yavrum **Aymiram'a**,

Ablasının ardından beni ikinci kez anne yapan, şuan içimdeki kıpırtısıyla beni heyecanlandıran ve hayata gelmek için sabırsızlanan bebeğim **.....'a**,

**En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.**

Gamze DERELİ CAN

Ankara, 2017

## ÖZET

Sunulan tez çalışması kapsamında tamamen insan kaynaklı hücre kültürü biyomalzemeleri kullanılarak korneal limbal eksplant kültür ile limbal epitel kök hücreler (LEKH) in elde edilmesi amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının ilk aşamasında limbal eksplantların yerleştirileceği ve hücre migrasyonunu destekleyecek kültür yüzeyleri oluşturulmuştur. Bu amaçla literatürde sıklıkla kullanılmakta olan insan kaynaklı amniyotik membran (AM) (donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş) ve çalışmanın özgün noktası olarak insan kaynaklı trombositten zengin fibrin (TZF) (1,000 rpm 5 dk) kullanılmıştır. Hazırlanan yüzeyler faz kontrast mikroskobu (FKM) ve tarayıcı elektron mikroskobu ile incelendiğinde, AM yüzeyin TZF yüzeye göre daha sıkı konumlanmış fiberlerden oluştuğu gözlemlenmiştir. Daha sonra insan kaynaklı AM (taze) ve standart protokol (2,700 rpm 12 dk) ile hazırlanan TZF'nin 14 günlük inkübasyonu ile hazırlanan modifiye besi ortamları *in vitro* hücre kültürü çalışmaları süresince kullanılmıştır. Besi ortamı ve kültür yüzeyi hazırlamakta kullanılan tüm biyomateryallerin salım kinetikleri *in vitro* salım çalışmaları ile değerlendirildiğinde epidermal büyüme faktörü (EGF) ve transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) için en yüksek konsantrasyona sahip biyomateryalin 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF; vasküler endotel büyüme faktörü-A (VEGF-A) için en yüksek konsantrasyona sahip biyomateryalin ise taze AM olduğu görülmüştür.

Karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra 4 farklı grup oluşturularak hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Grup 1'de AM yüzey kaplama ve standart besi ortamı, Grup 2'de AM yüzey kaplama ve AM ile modifiye edilmiş besi ortamı, Grup 3'te TZF yüzey kaplama ve standart besi ortamı, Grup 4'te TZF yüzey kaplama ve TZF ile modifiye edilmiş besi ortamı kullanılmıştır. Demografik açıdan istatistiksel bir fark arz etmeyen 32 adet donör kornea-skleral rim gruplara rastgele dağıtılarak 14 günlük hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. Kültür süresince migrasyona uğrayan hücrelerin morfolojisi FKM ve canlı hücre görüntüleme sistemleri ile takip edilmiştir. On dördüncü gün sonunda hücre iskeleti/çekirdek boyamaları ile hücrelerin morfolojisi, canlı/ölü boyamaları ile hücrelerin canlılıkları, immünohistokimyasal boyamalar ile belirlenen belirteçler bakımından hücrelerin köklülüğü değerlendirilmiş ve gruplar arasında karşılaştırmalar yapılmıştır. Ayrıca akış sitometre analizi ile belirteçlerin ifade yüzdeleri hesaplanarak gruplar arasında kantitatif karşılaştırmalar yapılmıştır. Son olarak, gen ifade seviyelerini belirlemek amacıyla gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi gerçekleştirilmiştir. Semi-kantitatif olarak yorumlanan boyama sonuçları ve kantitatif olarak değerlendirilen akış sitometre ve RT-PCR sonuçları, TZF ile kaplanan yüzeylerde TZF ile modifiye edilmiş besi ortamı ile beslenen hücrelerin morfolojik ve kök hücre belirteçleri açısından daha çok LEKH lehine çıktığını göstermiştir.

Elde edilen veriler, bu tez çalışmasında özgün olarak kurgulanmış insan kaynaklı fibrin kaplamanın limbal eksplant kültürde LEKH migrasyonunu köklülüğü koruyacak şekilde uyardığını göstermiştir. Bu sonuçlar, LEKH kültüründe literatürde sıklıkla kullanılan ancak sahip olduğu dezavantajları sebebiyle alternatifleri aranan standart yöntemlere üstünlüğü olan ve tamamen insan kaynaklı ürünlerden oluşan yeni bir hücre kültür sisteminin önemini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Limbal epitel kök hücre, Limbal eksplant kültür, Amniyotik membran, Trombositten zengin fibrin.

## ABSTRACT

Within the scope of the presented thesis study, it was aimed to obtain limbal epithelial stem cell (LESC) by conducting corneal limbal explant culture using completely human-derived cell culture biomaterials.

At the first stage of the thesis study, culture surfaces were created to place limbal explants and support cell migration. For this purpose, human-derived amniotic membrane (AM) (frozen-thawed-de-epithelialized) which is frequently used in the literature and human-derived platelet-rich fibrin (PRF) (1000 rpm 5 min), which was chosen as the original point of this study, were used. When the prepared surfaces were examined with phase contrast microscopy (PCM) and scanning electron microscopy, it was observed that the surface of the AM consisted of more tightly positioned fibers than the surface of the PRF. Then, the modified culture media prepared with a 14-day incubation of PRF prepared with standard protocol (2700 rpm 12 min) and human-derived AM (fresh) were used during *in vitro* cell culture studies. The release kinetics of all biomaterials used to prepare the culture medium and culture surface are evaluated by *in vitro* release studies: The biomaterial with the highest concentration for epidermal growth factor (EGF) and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) was PRF prepared with a 2700 rpm 12 min protocol; and the biomaterial with the highest concentration for vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) was fresh AM.

After the characterization studies were completed, 4 different groups were formed and cell culture studies were carried out. Group 1 consisted of AM surface coating and standard media, Group 2 consisted of AM surface coating and AM modified media, Group 3 consisted of PRF surface coating and standard media, Group 4 consisted of PRF surface coating and PRF modified media. Thirty-two donor cornea-scleral rim without statistical difference in terms of demographics were randomly distributed into groups, and a 14-day cell culture study was performed. Morphology of the migrating cells during culture was followed by PCM and live cell imaging systems. At the end of the fourteenth day, cell morphology with cell skeletal/nuclear staining, viability of cells with live/dead staining, stemness of cells with immunocytochemical staining were evaluated and the groups were compared. In addition, quantitative comparisons between groups were made by calculating the percentages of expression of the markers by flow cytometer analysis. Finally, real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis was performed to determine gene expression levels. Semi-quantitatively evaluated staining results and quantitatively evaluated flow cytometer and RT-PCR results showed that the cells fed with media modified with PRF on the surfaces coated with PRF favored LESCs more in terms of morphological and stem cell markers.

The obtained data in this thesis study show that, the originally constructed human fibrin coating stimulates LESCs migration in the limbal explant culture, preserving the stemness. These results emphasize the importance of a new cell culture system which is based entirely on human-derived products and which has advantages over standard methods used in the LESCs culture, alternatives of which is being searched for because of their disadvantages.

**Keywords:** Limbal epithelial stem cell, Limbal explant culture, Amniotic membrane, Platelet-rich fibrin.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvii
1. GENEL BİLGİLER .....	1
1.1. Kornea ve Limbus.....	1
1.1.1. Korneal Embriyoloji ve Anatomi .....	1
1.1.2. Kornea Epiteli.....	1
1.1.3. Limbal Epitel Kök Hücre .....	2
1.1.4. Limbal Epitel Kök Hücre Belirteçleri .....	4
1.1.5. Limbal Epitel Kök Hücre Yetmezliği (LEKHY) Tanı ve Güncel Tedavi Yöntemleri .....	7
1.2. Amniyotik Membran ve Kullanım Alanları .....	15
1.3. Trombositten Zengin Fibrin (TZF) ve Kullanım Alanları .....	16
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	19
2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Biyolojik Ürünler .....	19
2.2. Modifiye Besleyici Ortam Hazırlanması ve Kültür Yüzeylerinin Kaplanmasında Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması .....	21
2.2.1. Modifiye Besleyici Ortam Oluşturulmasında Kullanılan İnsan Amniyotik Membran'ın Hazırlanması .....	21
2.2.2. Kültür Yüzeylerinin Kaplanmasıda Kullanılan İnsan Amniyotik Membran'ın Hazırlanması .....	22
2.2.3. Modifiye Besleyici Ortam Oluşturulmasında Kullanılan İnsan Kaynaklı Trombositten Zengin Fibrin'in Hazırlanması .....	22
2.2.4. Kültür Yüzeylerinin Kaplanmasıda Kullanılan İnsan Kaynaklı Trombositten Zengin Fibrin'in Hazırlanması .....	23
2.2.5. Besi Ortamlarında Kullanılan İnsan Serumunun Hazırlanması .....	23

2.3. Kültür Yüzeylerinin Kaplanması ve Kullanılan Malzemelerin Karakterizasyonu .....	24
2.3.1. Faz Kontrast Mikroskop Analizi .....	24
2.3.2. Tarayıcı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi .....	24
2.4. Modifiye Besleyici Ortam Hazırlanması ve Kültür Yüzeylerinin Kaplanması ve Kullanılan Malzemelerin Büyüme Faktörü Salım Profillerinin <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları ile Belirlenmesi .....	24
2.5. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları .....	25
2.5.1. Limbal Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Yüzeyine Nakledilmesi .....	25
2.5.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi .....	26
2.5.3. Donörlerin Genel Demografik Bilgilerinin Kaydedilmesi .....	27
2.5.4. Limbal Eksplantlardan Hücre Migrasyonunun Gözlenmesi .....	27
2.5.5. Hücre Morfolojisi ve Köklülüğünün Belirlenmesi .....	28
2.6. Deneysel Çalışmalarda kullanılan İnsan Kaynaklı Materyallerin Elde Edilmesinde İnsan Etik Kurulu'nun Onayı .....	34
2.7. İstatistiksel Analiz .....	34
3. BULGULAR .....	35
3.1. Modifiye Besleyici Ortam Hazırlanması ve Kültür Yüzeylerinin Kaplanması ve Kullanılan Malzemelerin Karakterizasyonu .....	35
3.1.1. Faz Kontrast Mikroskop Analizi .....	35
3.1.2. Tarayıcı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi .....	36
3.1.3. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmaları .....	37
3.2. Kadavra ve Gönüllülere Ait Demografik Veriler .....	44
3.2.1. Kadavralara Ait Demografik Veriler .....	44
3.2.2. Gönüllülere Ait Demografik Veriler .....	47
3.3. Limbal Eksplantlardan Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi .....	47
3.4. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Morfolojinin Değerlendirilmesi .....	53
3.5. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Canlılığın Değerlendirilmesi .....	54
3.6. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Köklülüğünün Kalitatif Değerlendirilmesi .....	55
3.6.1. p63 Boyama .....	55

3.6.2. ABCG2 Boyama.....	56
3.6.3. K12 Boyama.....	57
3.7. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Köklülüğün Kantitatif Değerlendirilmesi .....	59
3.8. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Gen İfadesinin Değerlendirilmesi .....	70
4. TARTIŞMA .....	73
5. SONUÇLAR.....	85
6. ÖNERİLER.....	90
7. KAYNAKLAR .....	91
8. EKLER.....	97
EK-1. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmalarında Kullanılan Egf Kalibrasyon Grafiği.....	98
EK-2. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmalarında Kullanılan Vegf-A Kalibrasyon Grafiği .....	99
EK-3. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışmalarında Kullanılan Tgf-B Kalibrasyon Grafiği.....	100
EK-4. Deneysel Çalışmaların Gerçekleştirilebilmesi İçin Alınan İnsan Etik Kurul Onay Belgesi.....	101
ÖZGEÇMİŞ .....	102



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyum Klorür
Co	Kobalt
CO <sub>2</sub>	Karbondiyoksit
Gy	Gray
Mg <sup>+2</sup>	Magnezyum
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
w/v	Ağırlık/Hacim Oranı
v/v	Hacim/Hacim Oranı

### KISALTMALAR

ABCG2	ATP Bağlanıcı Kaset Protein G2
AIDS	Kazanılmış İmmün Yetmezlik Sendromu
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AM	Amniyotik Membran
AMT	Amniyotik Membran Transplantasyonu
ATP	Adenozin Trifosfat
B	Boyut
CD71	Diferansiyasyon Kümesi 71
cDNA	Tamamlayıcı Deoksi Ribonükleik Asit
CST	Hücre Tabaka Teknolojisi
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Fenilindol
dk	Dakika
DMEM-HAM's F12	Dulbecco'nun Modifiye Ettiği Eagle Medium
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
D-PBS	Dulbecco Fosfat Tampon Çözeltisi

EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGF-R	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzim Bağlantılı İmmün Analiz
E-PRP	Göz-Trombositten Zengin Plazma
F-Aktin	Filementöz Aktin
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FKM	Faz Kontrast Mikroskobu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
GAP-2	Büyüme İlişkili Protein 2
HbsAg	Hepatit B Virüs Yüzey Antijeni
HCV	Hepatit C Virüs
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
Ig G	İmmünglobulin G
IL-1	İnterlökin 1
IL-6	İnterlökin 6
İTL	İnsan Kaynaklı Trombosit Lizat
K3	Sitokeratin 3
K5	Sitokeratin 5
K12	Sitokeratin 12
K14	Sitokeratin 14
LCST	Düşük Kritik Çözelti Sıcaklığı
LEKH	Limbal Epitel Kök Hücre
LEKHY	Limbal Epitel Kök Hücre Yetmezliği
LEKHT	Limbal Epitel Kök Hücre Transplantasyonu
MAP-2	Membran İlişkili Protein 2
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
NGF-R Trk-A	Sinir Büyüme Faktör Reseptörü Tirozin Kinaz A
NSE	Sinir Hücrelerine Özel Enolaz
p53	Tümör Protein 53

p63	Tümör Protein 63
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
PBS-A	Sığır Serum Albumini ile Hazırlanmış Fosfat Tampon Çözeltisi
PBS-GG	Glisin ve Goat Serum ile Hazırlanmış Fosfat Tampon Çözeltisi
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PF-4	Trombosit Faktör 4
PIPAAm	Poli-N-İzopropilakrilamid
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Tepkimesi
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Devir
RPR	Hızlı Plazma Antikoru
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi
sa	Saat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SLET	Basit Limbal Epitel Transplantasyonu
SOR	Serbest Oksijen Radikali
SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi
SS	Standart Sapma
SYN-1	Sinapsin 1
TCPS	Polistiren Hücre Kültür Kapları
TGF- $\beta$	Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta
TGF- $\beta$ -RI	Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta Reseptör 1
TGF- $\beta$ -RII	Transforme Edici Büyüme Faktörü-beta Reseptör 2
Transferrin-R	Transferrin Reseptörü
TZF	Trombositten Zengin Fibrin
TZFM	Trombositten Zengin Fibrin Membran
TZP	Trombositten Zengin Plazma
UV	Ultraviyole
VEGF	Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Kornea anatomisi, (2)'den değiştirilerek. ....	1
Şekil 1.2. Kornea epitel anatomisi, (4)'ten değiştirilerek. ....	2
Şekil 1.3. Anatomik limbus ve kök hücre nişi, (6)'dan değiştirilerek. ....	3
Şekil 1.4. İnsan kaynaklı fetal zarlar ve amniyotik membranın histolojik görünümü, (22)'den değiştirilerek. ....	15
Şekil 1.5. Trombositten zengin fibrin. (a) Santrifüj sonrası tüpün orta kısmında yoğunlaşan trombositten zengin fibrin, (b) tüpten çıkarılan trombositten zengin fibrinin altta kalan kırmızı kan hücrelerinden ayrılmış görüntüsü. ....	18
Şekil 2.1. Modifiye besleyici ortam oluşturulmasında kullanılan taze amniyotik membranın hazırlanması: (a) steril şartlarda laboratuvar ortamına nakledilen amniyotik membranın koryondan künt diseksiyonla ayrıldıktan sonraki yarı saydam görüntüsü, (b) 1x2 cm boyutlarında kesilen amniyotik membranların 3 ml DMEM-HAM's F12 besi ortamına aktarılması. ....	21
Şekil 2.2. Kültür yüzeyinin kaplanmasında kullanılan amniyotik membranın hazırlanması: (a) kültür kabının yüzeyine amniyotik membranları stabilize etmek için hazırlanan 2 cm çapında parafilm halkalar, (b) epitel tabakası kaldırılmış 3x4 cm boyutlarında amniyotik membran, (c) parafilm halkaların 12 gözlü kültür kabına yerleştirilmesi. ....	22
Şekil 2.3. Donörlerden elde edilen kornea-skleral rimin kültür yüzeylerine aktarılmak üzere hazırlanması: (a) donörden elde edilmiş kornea - skleral rim, (b) rim etrafındaki fazla konjonktiva, sklera ve iris dokusunun uzaklaştırılması, (c) posterior skleranın diseksiyonu ve eksizyonu (d) sonuçta elde edilen yaklaşık 200 µm derinlikte limbal epiteli içeren yarım limbal halka (e) yarım limbal epitel halkasının 3 eşit parçaya bölünmüş görüntüsü. ....	26
Şekil 2.4. Deneysel çalışma grupları ve özellikleri. ....	27

Şekil 3.1.	İnsan kaynaklı amniyotik membran ve trombosit zengin fibrin'in farklı büyütmelelerdeki faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) amniyotik membran 4X (bar 500 µm), (b) amniyotik membran 10X (bar 200 µm), (c) amniyotik membran 20X (bar 100 µm), (d) trombosit zengin fibrin 4X (bar 500 µm), (e) trombosit zengin fibrin 10X (bar 200 µm), (f) trombosit zengin fibrin 20X (bar 100 µm). .....	36
Şekil 3.2.	İnsan kaynaklı amniyotik membran ve trombosit zengin fibrin'in aynı büyütmede (1000 X) SEM görüntüleri: (a) amniyotik membran, (b) trombosit zengin fibrin.....	37
Şekil 3.3.	Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen EGF kümülatif salım profili.....	38
Şekil 3.4.	Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen VEGF-A kümülatif salım profili. ....	39
Şekil 3.5.	Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen TGF-β kümülatif salım profili. ....	41
Şekil 3.6.	Tüm örneklerde 14. güne ait toplam salınan ortalama EGF miktarı. (Serum için salım çalışması yapılmamış, tek seferde bakılan örneklerden konsantrasyon hesabı yapılmıştır). ....	43
Şekil 3.7.	Tüm örneklerde 14. güne ait toplam salınan ortalama VEGF- A miktarı. (Serum için salım çalışması yapılmamış, tek seferde bakılan örneklerden konsantrasyon hesabı yapılmıştır). ....	43
Şekil 3.8.	Örneklerde 14. güne ait toplam salınan ortalama TGF-β miktarı.....	44
Şekil 3.9.	Çalışma gruplarında kadavraların yaş ortalamalarının karşılaştırılması.....	46
Şekil 3.10.	Çalışma gruplarında kadavra-kültür arası geçen zaman ortalamalarının karşılaştırılması. ....	46
Şekil 3.11.	Kültürün 14. gününde çalışma gruplarında aynı büyütmede (4X - bar 500 µm) faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4.....	48

Şekil 3.12.	Kültürün 14. gününde çalışma gruplarında aynı büyütmeye (10X - bar 200 µm) faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. ....	48
Şekil 3.13.	Grup 3'te kültürün ilk günlerinde hücre migrasyonunu ve fibrin yıkımını gösteren faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) 0. gün, (4X - bar 500 µm), (b) 3. gün, (4X - bar 500 µm), (c) 3. gün, (4X - bar 500 µm), (d) 3. gün, (10X - bar 200 µm). ....	50
Şekil 3.14.	Çalışma gruplarında ortalama hücre migrasyonu başlangıç zamanlarının karşılaştırılması. ....	50
Şekil 3.15.	Çalışma gruplarında 7. günde ortalama kültür yüzeyi hücre doluluk oranlarının karşılaştırılması. ....	52
Şekil 3.16.	Çalışma gruplarında 14. günde ortalama kültür yüzeyi hücre doluluk oranlarının karşılaştırılması. ....	52
Şekil 3.17.	Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmeye (10X - bar 200 µm) hücre iskeleti/çekirdek boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (Hücre iskeleti yeşil, çekirdek mavi renkte görülmektedir). ....	53
Şekil 3.18.	Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmeye (10X - bar 200 µm) canlı-ölü hücre boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı renkte görülmektedir, beyaz oklar kırmızı ile boyanan ölü hücrelere işaret etmektedir). ....	54
Şekil 3.19.	Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmeye (20X - bar 100 µm) p63 ve DAPI immün boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (p63 proteini yeşil, hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir, iki boyanmanın çakıştığı hücrelerde ise turkuaza yakın bir renk görülmektedir). ....	56
Şekil 3.20.	Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmeye (20X - bar 100 µm) ABCG2 ve DAPI immün boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (ABCG2 proteini kırmızı, hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir, iki boyanmanın çakıştığı bölgelerde ise mor renge yakın bir renk görülmektedir). ....	57

- Şekil 3.21. Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmede (20X - bar 100 µm) K12 ve DAPI immün boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (K12 proteini yeşil, hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir). ..... 59
- Şekil 3.22. Grup 1'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelili histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelili histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği. .... 62
- Şekil 3.23. Grup 1'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tek parametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği. .... 63
- Şekil 3.24. Grup 2'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelili histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelili histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği. .... 64
- Şekil 3.25. Grup 2'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tekparametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği. .... 65
- Şekil 3.26. Grup 3'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelili histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelili histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği. .... 66
- Şekil 3.27. Grup 3'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tek parametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği. .... 67
- Şekil 3.28. Grup 4'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelili histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelili histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği. .... 68
- Şekil 3.29. Grup 4'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tek parametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği. .... 69

Şekil 3.30.	Çalışma gruplarında 14. günde p63 proteinine ait bağıl gen ifadesini gösteren grafik. ....	70
Şekil 3.31.	Çalışma gruplarında 14. günde K3 proteinine ait bağıl gen ifadesini gösteren grafik. ....	71
Şekil 3.32.	Çalışma gruplarında 14. günde Konneksin 43 proteinine ait bağıl gen ifadesini gösteren grafik. ....	72





## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

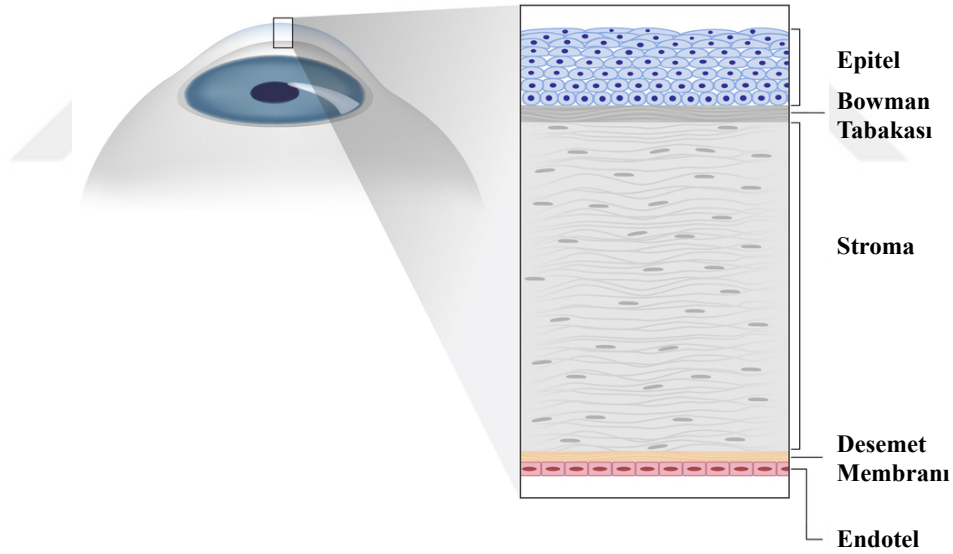
Çizelge 1.1.	Santral kornea epitel ve limbal epitel sitoplazmik / nükleer / yüzey belirteçleri, (10)' dan değiştirilerek.....	6
Çizelge 1.2.	Limbal epitel kök hücre yetmezliği etyolojisi, (11)'den değiştirilerek.....	9
Çizelge 1.3.	Limbal epitel kök hücre yetmezliği tedavi yöntemleri ve etki mekanizmaları, (11)'den değiştirilerek.....	13
Çizelge 1.4.	Limbal epitel kök hücre yetmezliği tedavi yöntemleri ve dezavantajları.....	14
Çizelge 2.1.	Hücre kültür çalışmalarında kullanılan malzemeler ve kaynakları.....	20
Çizelge 2.2.	İmmünohistokimyasal boyama akış şeması.....	30
Çizelge 2.3.	Akış sitometre analizi için hücrelerin işaretlenmesini gösteren akış şeması.....	32
Çizelge 2.4.	Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri.....	33
Çizelge 3.1.	Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen EGF kümülatif salım değerleri.....	38
Çizelge 3.2.	Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen VEGF-A kümülatif salım değerleri.....	40
Çizelge 3.3.	Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen TGF- $\beta$ kümülatif salım değerleri.....	41
Çizelge 3.4.	Çalışmada kullanılan kadavraların ortalama yaş ve kültüre alınma süreleri.....	45
Çizelge 3.5.	Çalışma gruplarında 7. ve 14. günde kültür yüzeylerinin ortalama hücre doluluk oranları.....	51

## 1. GENEL BİLGİLER

### 1.1. Kornea ve Limbus

#### 1.1.1. Korneal Embriyoloji ve Anatomi

Kornea temel olarak kranial ektodermden köken alan 3 ana tabakadan oluşur. Kranial ektoderm gelişim sırasında yüzey ektodermi ve nöroektoderm tabakalarına ayrılarak kornea gelişimini destekler. Yüzey ektodermi korneanın en dış katmanında yer alan “epitel” tabakasını oluştururken; nöroektoderm tabakası nöral tüpten göç eden nöral krest hücreleri aracılığıyla korneanın en kalın ve orta tabakası olan “stroma” ile en içte yer alan “endotel” tabakasını oluşturur. Embriyolojik gelişim sürecinde zamanla ön stromal hücreler tarafından kornea epitelinin bazal membranı ile stroma arasında “Bowman tabakası” sentezlenir. Korneal stroma ve korneal endotel tabakaları arasında ise “Desemet membranı” sentezlenir (Şekil 1.1) (1, 2).

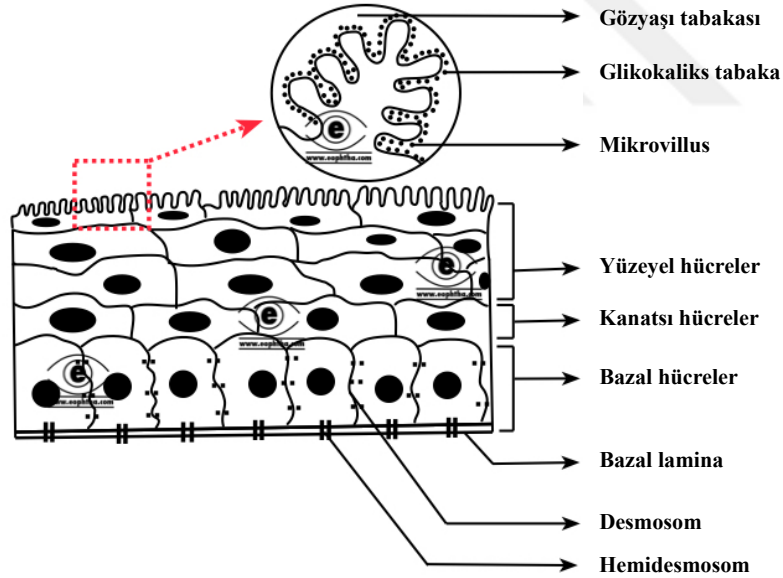


Şekil 1.1. Kornea anatomisi, (2)'den değiştirilerek.

#### 1.1.2. Kornea Epiteli

Kornea epiteli 40-50 mikrometre ( $\mu\text{m}$ ) kalınlığında 5-7 hücre tabakasından oluşan çok katmanlı, skuamöz ve nonkeratinize yapıdadır. Bu hücre tabakalarından en alt kısımda kolumnar morfolojide “bazal hücreler”, orta tabakada poligonal morfolojide “kanatsız hücreler” ve en dış kısımda göz yaşı film tabakasına komşu yassı “yüzeyel hücreler” yer almaktadır (Şekil 1.2). Bazal hücreler altlarında yer alan bazal laminaya

hemidesmosomlar aracılığıyla sıkıca tutunmaktadır. Ayrıca, desmosomlar aracılığıyla komşu hücreler birbirleri ile sıkı bağlantı kurarlar. Bazal hücreler anatomik limbus bölgesinde yer alan. limbal epitel kök hücre (LEKH) olarak bilinen bazal epitel hücrelerinden köken alan ve mitotik aktivite gösteren hücrelerdir. Anatomik limbus bölgesinden korneanın santraline doğru (sentripedal) yayılım gösteren bu hücreler kornea epitelinin devamlılığı için oldukça büyük bir önem arz etmektedir. Bazal hücre tabakasının üzerinde hücreler morfolojik açıdan yassılaşılarak sırasıyla kanatsız hücreler ve yüzeyel yassı hücreleri oluştururlar. Yüzeyel yassı hücrelerin göz yaşı tabakasına bakan apikal yüzeylerinde doğal koruyucu olarak görev yapan ve glikokaliks tabakayı üzerinde barındıran mikrovilluslar yer almaktadır. Glikokaliks tabaka ile birlikte bu mikrovillus yapısı gözün ve korneanın doğal immün yanıtında oldukça önemli bir anatomik bariyer görevi üstlenir. Kornea epiteli, gözyaşı tabakasına komşu apikal yüzeyi ile Bowman tabakasına komşu bazal yüzeyi arasındaki iyon ve elektron farkından ötürü polarite gösteren bir hücre tabakasıdır (3, 4).

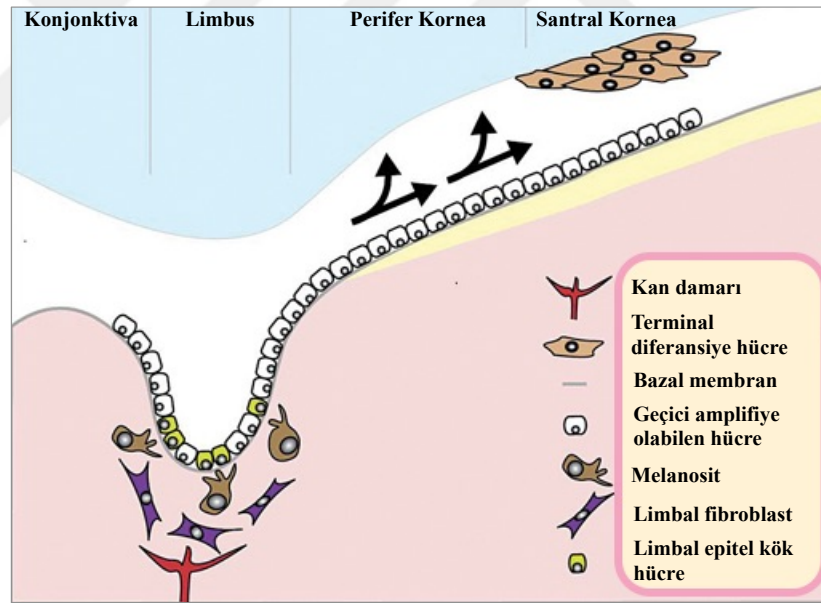


Şekil 1.2. Kornea epitel anatomisi, (4)'ten değiştirilerek.

### 1.1.3. Limbal Epitel Kök Hücre

Limbal epitel kök hücreleri, gözün sklera ve kornea tabakalarının birleşim bölgesinde bulunan, 0.5-1 mm çapa sahip anatomik limbus bölgesinde yer alan, dokuya

özgü pluripotent kök hücrelerdir (5). Anatomik limbus bölgesinde epitel tabakası yüzeyden bazal kısma doğru bir içe kıvrılma (invajinasyon) gösterir. “Vogt Palisadları” olarak bilinen bu içe kıvrılma alanlarında kornea epitelinin devamlılığını sağlayan kök hücre nişi (mikroçevre) yer almaktadır (Şekil 1.3). Bu bölgenin anatomik yapısı nedeniyle kök hücreler, göz kapağının devamlı hareketinden kaynaklanan kayma geriliminden ve güneşin etkisiyle oluşan ultraviyole (UV) ve serbest oksijen radikalleri (SOR) nin olumsuz etkisinden korunmuş olur. Bazal epitel katmanında yer alan kök hücre nişi, etrafındaki melanositler, fibroblastlar ve kan damarları sayesinde yoğun olarak desteklenmektedir. Melanositler, UV absorpsiyonu yaparak kök hücrelerin hasar görmesini engellerken, fibroblastlar sisteinden zengin asidik proteinleri yoğun olarak sentezler ve adezyonu kolaylaştırırlar. Ayrıca bu bölgenin yoğun kan akımı sayesinde plazma ve serum kaynaklı büyüme faktörleriyle zengin olarak beslendiği bilinmektedir (6).



Şekil 1.3. Anatomik limbus ve kök hücre nişi, (6)'dan değiştirilerek.

Kök hücre nişini destekleyen bazal membran bileşimi santral kornea epitelinin bazal membran bileşiminden farklılık gösterir. Santral kornea epitelinin bazal membranında tip 4 kollajenin  $\alpha3-\alpha5$  zincirleri gözlenirken, LEKH nişinin bazal membranında tip 4 kollajenin  $\alpha1-\alpha2-\alpha5$  zincirleri gözlenmektedir. Epitel bazal membran yapısının diğer önemli bileşeni olan laminin de santral kornea ve limbal bölge arasında farklılıklar

gösterir. Limbal bölgede laminin 1-5,  $\alpha$ 2- $\beta$ 2- $\gamma$ 3 zincirlerinden oluşurken, santral kornea bazal membranında bu zincirler bulunmaz. Ayrıca, limbal bölgede bazal membran yapısı santral kornea epitelinin bazal membranından farklı olarak fenestrelili bir yapı gösterir. Bu fenestrasyonlar nedeniyle normalde avasküler olan limbal epitel bölgesi bazal membranın altında yer alan ve yoğun olarak kan damarları ile beslenen limbal stroma ile madde alışverişini sağlayabilmektedir. Özellikle yara iyileşmesi döneminde metabolik aktivitelerini arttıran ve çoğalmaya başlayan kök hücrelerin atık maddeleri bu fenestrasyonlardan stromal kan akımına aktarılırken, dolaşımdan kaynaklanan büyüme faktörleri, sitokinler ve adezyon proteinleri kimyasal destek amacıyla limbal epitel bölgesine aktarılır. Limbal bölgedeki bazal membranın kendine özgü bileşimi ve fenestrelili yapısı nedeniyle günümüzde çalışmalar hem *in vivo* hem de *in vitro* koşullarda bu yapıyı taklit etmeye odaklanmıştır (7).

Santral korneada meydana gelen yüzeysel bir yaralanma durumunda LEKH nişine nöral ve kimyasal uyarılar aracılığıyla çoğalma isteği gönderilir. Normal şartlarda kornea epitelinin homeostazını sağlamak üzere yavaş çoğalma siklusunda olan LEKH'ler aktifleşir ve mitotik aktivitelerini hızlandırırlar (8). Vücudun diğer bölgelerindeki pluripotent kök hücrelerde olduğu gibi bu hücreler de kök hücre nişinde farklılaşmadan kök hücre havuzunu devam ettirebilecek yüksek kendini yenileyebilme kapasitesiyle beklemektedirler (9). Yara iyileşmesi durumunda aktive olan bu kök hücre topluluğu mitotik aktivitelerini artırır ve çoğalma (proliferasyon) ya başlarlar. Çoğalmaya başlayan LEKH'ler kök hücre nişini terk eder ve bazal membran seyri boyunca santrale doğru (sentripedal) göç ederler. Bu seyir sırasında bazal membranın anatomik yapısında ve mikroçevrenin kimyasal yapısında meydana gelen değişimler nedeniyle farklılaşma (diferansiyasyon) başlar. Sırasıyla önce geçici amplifiye olabilen hücre, sonra terminal diferansiye hücre olarak santral kornea epiteline dönüşürler (Şekil 1.3) (6-8).

#### **1.1.4. Limbal Epitel Kök Hücre Belirteçleri**

Anatomik limbus bölgesinde yer alan diferansiye olmamış LEKH ile diferansiye santral kornea epitel hücresi arasında bazı nükleer, sitoplazmik ve hücre membranı yüzey belirteçleri açısından farklılıklar mevcuttur. Limbal epitel kök hücreler için henüz kesin olarak ispatlanmış belirteçler olmamakla birlikte uzun yıllardır yapılan çalışmalar günümüzde bu belirteçlerin izolasyon için kullanılabilecek nitelikte olduklarını

göstermektedir (10). Sitoplazmik keratin (K) belirteçlerinden K3 ve K12 santral kornea epitelinde bulunurken, K5 ve K14 LEKH'de bulunmaktadır. Tümör baskılayıcı gen ailesinden tümör protein 63 (p63) nükleer belirteci ise özellikle LEKH izolasyonunda en sıklıkla kullanılmakta olan pozitif belirteçtir. Hücre membranı yüzey belirteçleri oldukça farklılıklar göstermektedir. Santral kornea epiteli yüzey belirteci olarak hücreler arası 'gap junction' proteini olarak bilinen Konneksin 43 kullanılırken, LEKH pozitif belirteci olarak bir ATP-bağlanıcı kaset proteini olan ve transporttan sorumlu ABCG2 kullanılmaktadır. Santral kornea epiteli ve LEKH için belirleyici işaretler Çizelge 1.1'de ayrıntılı olarak gösterilmektedir. Tüm bu belirteçler *in vitro* çalışmalarda LEKH izolasyonu ve başarılı kültürasyonu için akış sitometre, immünohistokimyasal boyamalar ve genetik ifade analizlerinde kullanılmaktadır.

Çizelge 1.1. Santral kornea epiteli ve limbal epitel sitoplazmik / nükleer / yüzey belirteçleri, (10)' dan değiştirilerek.

Belirteçler	Santral Kornea Epiteli		Limbal Epitel	
	Bazal	Suprabazal	Bazal	Suprabazal
<b>Sitoplazmik / Nükleer Belirteçler</b>				
Keratin K3/K12	++	++	-	++
Keratin K5/14	-(+)	-	+	(+)
Vimentin	-	-	++	(+)
$\alpha$ - enolaz	(+)	-	++	(+)
p63	(+)	-	++	(+)
Nestin	++	++	-	-
<b>Yüzey Belirteçleri</b>				
Konneksin 43	++	+	-	+
E-kaderin	++	++	(+)	++
$\beta$ - katenin	++	++	++	++
İntegrin $\alpha 2$	++	+	-	+
İntegrin $\alpha 3$	++	+	-	+
İntegrin $\alpha 6$	++	+	-	+
İntegrin $\beta 1$	++	+	++	+
İntegrin $\beta 2$	+	+	+	+
İntegrin $\beta 4$	++	+	-	+
İntegrin $\beta 5$	+	-	+	(+)
İntegrin $\alpha 3\beta 1$	++	+	-	+
EGF-R	++	+	++	+
NGF-R TrkA	+	(+)	+	-
Transferrin-R CD71	-	+	-	+
TGF- $\beta$ -RI	++	+	++	+
TGF- $\beta$ -RII	++	+	++	+
ABCG2	-	-	++	-

-: tespit edilememiş, (+): zayıf pozitif, +: orta pozitif, ++: güçlü pozitif.

p63: tümör protein 63, EGF-R: epidermal büyüme faktör reseptörü, NGF-R TrkA: sinir büyüme faktör reseptörü tirozin kinaz A, TGF- $\beta$ -RI: transforme edici büyüme faktör beta reseptör I, TGF- $\beta$ -RII: transforme edici büyüme faktör beta reseptör II, ABCG2: ATP-bağlanıcı kaset protein G2.

### **1.1.5. Limbal Epitel Kök Hücre Yetmezliği (LEKHY) Tanı ve Güncel Tedavi Yöntemleri**

Limbal epitel kök hücre yetmezliği, anatomik limbus bölgesinde epitel kök hücrelerinin ve/veya limbal stromanın primer veya sekonder bazı sebeplere bağlı olarak hasarlanması sonucunda oluşan klinik tablodur. Etyolojide birçok hastalık ve travma suçlanmakla birlikte oküler yüzey kimyasal yaralanmaları başı çekmektedir. Çizelge 1.2'de etyolojiden sorumlu primer ve sekonder sebepler özetlenmiştir. Limbus bölgesinde sklera-konjonktiva kompleksi ile saydam kornea arasında bariyer görevi gören epitel kök hücrelerinin hasarlanması sonucunda bariyer görevi ortadan kalkar ve sklera-konjonktiva kompleksinden kaynaklı fibroblast, goblet ve vasküler endotel hücrelerinde periferden kornea merkezine doğru bir hareket başlar. Avasküler ve saydam kornea yapısı için istenmeyen bu hücre göçü sonuçta korneada vaskülarizasyon, fibrozis ve pannus oluşumuna sebep olur. Normal şartlarda 5-7 sıra kornea epiteli ile kaplı olması gereken kornea yüzeyinin farklı hücre popülasyonu tarafından işgal edilmesi sonucunda subepitelyal sinir pleksusu açığa çıkar ve kişide yoğun batma, yanma ve ağrı gözlemlenir. Devam eden inflamasyon ve kapanmayan epitel defektleri zamanla korneal skar gelişimine ve korneal saydamlığın ileri derecede azalmasına sebep olur. Ayrıca, yoğun batma, yanma, ağrı hissedilen ve görme düzeyi ileri derecede azalan bu hasta grubunda hayat kalitesi önemli oranda azalır (11).

Limbal epitel kök hücre yetmezliğinde tanı genellikle hikaye ve klinik bulgulara dayanır. Hastaların muayenesi sonucu, görme azlığı, limbal anatomisinin kaybolması ve/veya limbal iskemi, korneal konjonktivalizasyon, persistan epitel defektleri ve korneal skar oluşumu gözlemlenir. Etyolojik ajanın göz yüzeyini etkileme genişliğine göre kornea harici göz yüzeyi yapılarında da etkilenimler gözlenebilir. Örneğin, Stevens-Johnson Sendromu, Toksik Epidermal Nekroliz veya Oküler Skatrisyel Pemfigoid gibi hastalıklarda ciddi mukoza tutulumuna bağlı olarak konjonktival skarlaşma, yapışıklıklar ve semblefaron da tabloya eşlik eder. Tüm kornea ve oküler yüzey etkilenebileceği gibi, limbusta sadece birkaç saat kadranını etkileyen lokalize hasarlar da oluşabilir. Bu durumda oküler yüzeyin rejenerasyonu total hasara oranla daha kolay olacaktır (11, 12).

Anamnez ve genel oftalmolojik muayene haricinde tanıda sıklıkla kullanılan ileri inceleme yöntemi "impresyon sitolojisi" dir. Bu yöntemde, hasarlı bölgenin bir miktar



kurummasına izin verildikten sonra özel olarak kesilmiş sellülöz asetat kağıtları eksternal olarak uygulanır ve yüzeyel epitelin kağıt üzerine yapışması sağlanır. Noninvazif olması, uygulamanın kolay olması ve hastaya hasar vermemesi dolayısıyla tüm dünyada yaygınlık kazanmış önemli bir tanı yöntemi haline dönüşen impresyon sitolojisi, LEKHY tanısı haricinde, kuru göz, oküler skatrisyel pemfigoid ve vitamin A eksikliğine bağlı oküler yüzey hastalıklarının tanısında da kullanılmaktadır. Sellülöz asetat kağıt üzerinde laboratuvar ortamına aktarılan biyopsi örneğinden elde edilen hücreler immünsitokimyasal boyamalar ile morfolojik açıdan veya çeşitli belirteçler ile işaretlenerek akış sitometrisinde incelenebilir. Morfolojik incelemeler sonucunda skuamöz metaplazi ve goblet hücrelerinin varlığı muayene sonucu gözlemlenen kornea konjonktivalizasyonunu destekleyen bulgulardır (12).

Çizelge 1.2. Limbal epitel kök hücre yetmezliği etyolojisi, (11)'den değiştirilerek.

---

**PRİMER**

---

Aniridia

Multiple Endokrin Yetmezlik

Epidermal Displazi

Konjenital Eritrokeratodermi

Diskeratozis Konjenita

---

**SEKONDER**

---

Termal ve Kimyasal Yanıklar\*

Uzamış ve Uygun Olmayan Kontakt Lens Kullanımı

İnflamatuvar Göz Hastalıkları

Stevens-Johnson Sendromu

Toksik Epidermal Nekroliz

Oküler Skatrisyel Pemfigoid

Kronik Limbitis

Otoimmün Hastalıklar

Atopik Konjonktivit

Mikrobiyolojik Enfeksiyon

Nörotrofik Keratit

Limbal Cerrahi, Radyasyon, Kriyoterapi

Kronik Büllöz Keratopati

Topikal Antimetabolit Tedavisi

5-Fluorourasil

Mitomisin-C

Sistemik Kemoterapi

Hidroksiüre

---

\* En sık

Günümüzde LEKHY, hasarın ciddiyetine bağlı olarak konservatif veya invazif bir takım yöntemler kullanılarak tedavi edilmektedir. Konservatif tedaviler arasında destekleyici topikal damlalar, kornea yüzey epitel debridmanı ve insan amniyotik membran transplantasyonu (AMT) yer almaktadır. Konservatif tedaviler ile halen az miktarda da olsa mevcut olan LEKH'lerin uygun mikroçevre sağlanarak aktivasyonu ve

korneal yüzeyi rejenere etmek için harekete geçmesi uyarılmaya çalışılır. Ancak LEKH miktarı korneal yüzeyi rejenere edemeyecek oranda azalmış ise LEKH transplantasyonu gündeme gelir. Limbal epitel kök hücre kaynağı olarak kişinin sağlıklı diğer gözünden veya hasarlı aynı gözün sağlıklı bölgesinden elde edilen limbal epitel grefti (konjonktiva-limbal otogreft), kadavra kaynaklı konjonktiva-limbal allogreft veya kerato-limbal allogreft kullanılabilir. Ancak otogreft yöntemlerde nispeten büyük doku parçası gerekliliği ve kişinin limbal rezervine verilen hasar, allogreft yöntemlerde ise immun yanıtın akut veya kronik dönemde oluşturacağı red cevabı veya kronik limbitisin limbal stroma ve kök hücre nişinde meydana getireceği olumsuz cevaplar nakledilen limbal dokunun uzun vadede başarısını düşürür. Ayrıca, allogreft tekniklerde inflamasyon ve red cevabını baskılamak için uzun süre kullanılan topikal ve/veya sistemik steroid ve immun baskılayıcılar, oküler (katarakt, göz içi basıncı yüksekliği) ve sistemik (böbrek ve karaciğer hasarı, gastrointestinal sistem ve cilt problemleri) yan etkilere sebep olarak cerrahinin başarısını olumsuz yönde etkiler (11, 13).

Limbal epitel kök hücreleri transplante etmenin bir başka yöntemi ise özellikle son yıllarda yaygınlık kazanan *in vitro* ortamda kültüre edilmiş LEKH transplantasyonudur (LEKHT). Bu yöntemle gerek kadavra gerekse otojenik kaynaklı az miktarda limbal doku parçasından laboratuvar ortamında çeşitli izolasyon yöntemleri kullanılarak LEKH'ler izole edilir ve çoğaltılarak hasarlı göz yüzeyine nakledilir. İlk başarılı kültüre edilmiş LEKHT 1997 yılında Pellegrini ve ark. (14) tarafından 2 hasta üzerinde uygulanmıştır. Günümüzde gelinen noktada ise LEKH'lerin izolasyonunun ardından *in vitro* kültürasyon protokollerinde “eksplant kültür” ve “enzimatik kültür” olarak 2 farklı yaklaşım sahip olduğu avantaj ve dezavantajlarıyla karşılaştırılmaktadır. “Eksplant kültür” sisteminde LEKH'lerin kendilerine mikroçevre ve destek sağlayan limbal stromal hücrelerin mevcudiyeti sebebiyle daha kolay çoğalabildikleri savunulurken, çoğalan hücrelerin kök hücre karakterinin korunmadığı ve geçici amplifiye olabilen hücre karakterinde olmaları dezavantajlarını oluşturmaktadır (15, 16). “Enzimatik kültür” sisteminde ise çoğalan hücrelerin kök hücre karakterini koruduğu gösterilmesine rağmen çoğalabilmeleri için mekanik ve kimyasal bir besleyici tabakaya gereksinim gösterdikleri bilinmektedir (17). Günümüzde hücrelere kimyasal ve mekanik destek sağlayan besleyici tabaka olarak Amerika Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) onayını almış

olan ve fare embriyolarından elde edilen, üremesi baskılanmış ancak büyüme faktör salımını devam ettiren 3T3 fibroblast hücre hatları kullanılmaktadır (18). İmmortal özelliğe kavuşmuş bu hücre hatlarının çoğalma kapasitesi yüksek enerjili ışımaya (X ışınları veya  $\gamma$  radyasyonu yayan  $^{60}\text{Co}$  ile 60 Gy enerjiye maruz bırakılır) veya bir antineoplastik, antibiyotik ajan olan Mitomisin-C uygulaması ile durdurulur (19). Ancak hayvansal kaynaklı olan bu besleyici tabakalarda mikrokimerizm, prion ajanları ve tespit edilemeyen viral bulaşların olabilmesi araştırmacıları insan kaynaklı besleyici tabaka arayışına yönlendirmiştir (18). Ayrıca hücrelerin kültürasyonu sırasında kullanılan besleyici ortamlar (medium) özellikle üremesi yavaş olan LEKH için birçok modifikasyon göstermektedir. Rekombinant DNA teknolojisi ile bakteriler tarafından üretilen büyüme faktörlerinin ortama eklenme zorunluluğu, hem maliyeti arttırmakta hem de post-translasyonel modifikasyona uğramadan üretildiklerinden dolayı son hücre ürününün insan vücuduna nakli sonrasında kanser yapıcı etkiler yaratabilmektedir (20). *In vitro* kültür sistemlerinin ve hayvansal kaynaklı besleyici tabakaların sahip olduğu bu dezavantajlar sebebiyle günümüzde halen optimum hücre kültür protokolünün belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmaya devam etmektedir (17).

Basit limbal epitel transplantasyonu (Simple Limbal Epithelial Transplantation-SLET), insan AMT ve kerato-limbal otogreft tekniğinin birleşimi olarak bilinen yeni bir klinik yaklaşımdır. Sangwan ve ark. (21) tarafından literatüre tanıtılmış olan bu yöntem ilk kez 2012 yılında oküler yüzey kimyasal yaralanması sonucu LEKHY gelişen 6 hasta üzerinde uygulanmış ve yaklaşık 9 aylık takip sonunda görme düzeyi ve biyomikroskopik bulgular açısından olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Kültüre edilmiş limbal epitel transplantasyonunda olduğu gibi bu yöntemde de küçük bir limbal doku parçası yeterli olmaktadır. Elde edilen küçük doku parçası 8-10 eşit parçaya ayrılarak hasarlı ve AMT ile kaplanmış olan kornea yüzeyine fibrin yapıştırıcı ile sabitlenir. Her bir limbal eksplanttan gerçekleşen LEKH migrasyonu yaklaşık 10-14 gün içinde kornea yüzeyinin tamamen epitel ile kaplanmasına sebep olur. Ancak, ampirik olarak kabul edilen bu yöntemde migrasyona uğrayan hücrelerin karakterinin bilinmiyor olması, yakın konumlanan her bir limbal eksplanttan migrasyona uğrayan hücrelerin karşılaşma alanlarında düzensizliğe ve ışık kırılımında sapmalara sebep olarak fotopsi veya görme bulanıklığına sebep olabilmesi, fibrin yapıştırıcının kullanım gerekliliği ve allogreft bir

yaklaşım olan insan AMT ile kombine uygulanıyor olması yöntemin dezavantajları arasında sayılabilir.

Çizelge 1.3'te günümüzde LEKHY tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan tedavi yöntemlerinin etki mekanizmaları, Çizelge 1.4'te bu tedavi yöntemlerinin dezavantajları karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.



Çizelge 1.3. Limbal epitel kök hücre yetmezliği tedavi yöntemleri ve etki mekanizmaları, (11)'den değiştirilerek.

YÖNTEM	ETKİ MEKANİZMASI
<b><i>Konservatif-Cerrahi Olmayan Yöntemler</i></b>	
Otolog Serum Damlası	Oküler yüzey lubrikasyonu Sağlıklı epitel hücrelerinin migrasyon ve proliferasyonu Epitel hücrelerinin tarsal konjonktivaya adezyonunun engellenmesi Kayma gerilimini azaltılması
Terapotik Yumuşak Kontakt Lens	Persistan epitel defektlerinin kapanması Yeni epitel defekti oluşumunun engellenmesi
Terapotik Skleral Lens	Persistan epitel defektlerinin kapanması Yeni epitel defekti oluşumunun engellenmesi Yüzey düzleştirici etki ile görmenin artırılması Ağrı ve fotofobinin azaltılması
Lubrikasyon	Epitel hücrelerinin tarsal konjonktivaya adezyonunun engellenmesi Kayma gerilimini azaltılması
<b><i>Konservatif-Cerrahi Yöntemler</i></b>	
Korneal Debridman	Konjonktivanın uzaklaştırılması Halen aktivite gösterebilecek limbal epitel için ortam hazırlanması
İnsan Amniyotik Membran Transplantasyonu	Limbal epitel hücrelerin migrasyon ve proliferasyonu için bazal membran etkisi Anti-inflamatuar Anti-anjiojenik Anti-fibrotik Anti-mikrobiale Anti-apoptotik
<b><i>Limbal Epitel Kök Hücre Transplantasyonu</i></b>	
Konjonktiva-Limbal Otograft	Superior ve inferior kadrandan ikişer saat kadranı konjonktiva ve limbal epitelin alınması Konjonktivanın migrasyona uğrayacak limbal epitel hücreleri için bazal membran görevi görmesi
Konjonktiva-Limbal Allograft	Yaşayan kişi veya kadavradan superior ve inferior kadrandan elde edilen ikişer saat kadranı konjonktiva ve limbal epitelin alınması Konjonktivanın migrasyona uğrayacak limbal epitel hücreleri için bazal membran görevi görmesi
Kerato-Limbal Allograft	Kadavradan altı saat kadranı büyüklüğünde kornea-limbal greft elde edilmesi Korneanın migrasyona uğrayacak limbal epitel hücreleri için bazal membran görevi görmesi
<i>In Vitro</i> Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Kök Hücre	Hastanın kendinden veya kadavradan elde edilen az miktarda limbal doku parçasından kök hücre izolasyonu İzole edilen kök hücrelerin genellikle besleyici tabakalar (3T3, amniyotik membran, sıcaklık duyarlı yüzeyler) üzerinde çoğaltılması
Basit Limbal Epitel Transplantasyonu	Tek basamakta az miktarda doku eldesi ile limbal kök hücrelerin amniyotik membran üzerinde <i>in vivo</i> kültürasyonu

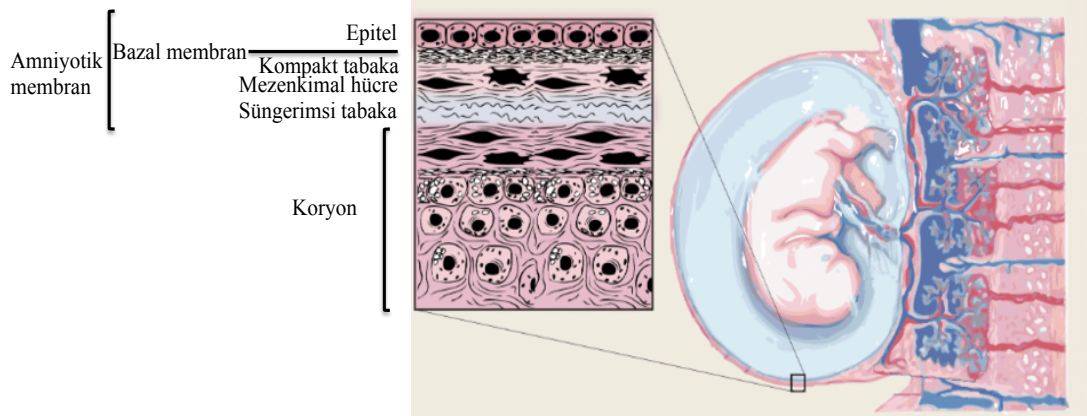
Çizelge 1.4. Limbal epitel kök hücre yetmezliği tedavi yöntemleri ve dezavantajları.

YÖNTEM	DEZAVANTAJLAR
<b><i>Konservatif-Cerrahi Olmayan Yöntemler</i></b>	
Otolog Serum Damlası	Bileşim standart değil
Terapotik Yumuşak Kontakt Lens	Mikrobiyolojik ajan varlığında riskli Hastanın kullanım zorluğu
Terapotik Skleral Lens	Mikrobiyolojik ajan varlığında riskli Hastanın kullanım zorluğu
Lubrikasyon	-
<b><i>Konservatif-Cerrahi Yöntemler</i></b>	
Korneal Debridman	Sık tekrar
İnsan Amniyotik Membran Transplantasyonu	Allojenik Saklama koşulları her merkezde mevcut değil Donör içi ve donörler arası yüksek varyasyon
<b><i>Limbal Epitel Kök Hücre Transplantasyonu</i></b>	
Konjonktiva-Limbal Otogreft	Sağlıklı olan göze ve hastanın limbal rezervine hasar Geniş doku parçası gereksinimi
Konjonktiva-Limbal Allogreft	Yaşayan kişi için sağlıklı olan göze ve hastanın limbal rezervine hasar Geniş doku parçası gereksinimi Enfeksiyon bulaşı Uzun süreli topikal ve veya sistemik immünbaskılayıcı kullanımı ve buna bağlı yan etkiler
Kerato-Limbal Allogreft	Enfeksiyon bulaşı Uzun süreli topikal ve veya sistemik immünbaskılayıcı kullanımı ve buna bağlı yan etkiler
İn Vitro Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Kök Hücre	Hayvansal kaynaklı ürün kullanımına bağlı yan etkiler (patojen bulaşı, mikrokimerizm, kullanılan faktörlerde post-translasyonel modifikasyon olmaması) Kök hücre laboratuvarı gereksinimi Maliyetin yüksek olması
Basit Limbal Epitel Transplantasyonu	Hızla çoğalan konjonktiva epitel hücrelerinin baskın gelebilmesi Ampirik yöntem Oküler yüzeyde düzensizlik

## 1.2. Amniyotik Membran ve Kullanım Alanları

İnsan kaynaklı AM, fetal ektoderm tabakasından köken alan, gebeliğin ilk haftasında oluşmaya başlayıp fetusu gelişimi süresince saran zarların en iç tabakasıdır. İçte amniyotik sıvı ile, dışta koryon tabakası ile temas halindedir. Düz kas hücresi, sinir, lenfatik veya kan damarı içermeyen AM temel olarak 5 histolojik tabakadan oluşur (22):

- Epitel hücre tabakası: Fetal ektodermden köken alan en iç katmandır ve tek sıralı küboid epitel hücrelerinden oluşur. Epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde yerleşmiş olan mikrovilluslar sayesinde amniyotik sıvı ile yoğun bir etkileşim halindedir. Bu etkileşim hem fetüs için gerekli olan faktörlerin geçişine izin verir, hem de amniyotik sıvıda oluşan metabolik artıkların uzaklaştırılmasına olanak sağlar.
- Bazal membran tabakası: Epitel hücre tabakasının hemidesmozomlar aracılığı ile sıkıca yapışık halde bulunduğu tabakadır.
- Kompakt tabaka: Temel olarak tip 1, 3, 5 kollajenden oluşan, asellüler, membrana esneklik ve dayanıklılık özelliklerini sağlayan temel tabakadır.
- Mezenkimal hücre tabakası: Kompakt tabakaya ait kollajenin sentezinden sorumlu tek sıra fibroblast benzeri mezenkimal hücrelerden oluşan ve embriyonik mezoderm tabakasından köken alan tabakadır. Mezenkimal hücrelerin sentezlediği interlökin (IL)-1, IL-6 ve monosit kemoatraktanları sayesinde enfeksiyonlara karşı direnç oluşturduğu düşünülmektedir.
- Süngerimsi tabaka: Amniyotik membranın koryon ile komşulukta olan en dış tabakasıdır.



Şekil 1.4. İnsan kaynaklı fetal zarlar ve amniyotik membranın histolojik görünümü, (22)'den değiştirilerek.



Amniyotik membran, özellikle göz yüzeyi rekonstrüksiyonunda sıklıkla tercih edilen allojenik bir biyomateryaldir. Sahip olduğu epitel tabakasından salgılanan birçok büyüme faktörü ile komşulukta olduğu ve rejenerere edilecek cerrahi sahadaki hücrelerin proliferasyonunu ve migrasyonunu kolaylaştırır. Epitel hücre tabakası epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- $\beta$ ), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) gibi birçok büyüme faktörünü salgılandığından *in vivo* rekonstrüktif cerrahilerde vazgeçilemez bir fizyolojik yara örtü materyali haline gelmiştir (23). Ayrıca, *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında da sahip olduğu bazal membran yapısı dolayısıyla üzerinde kültüre olmakta olan hücelere mekanik destek sağladığından sıklıkla kullanılmaktadır (24). Ancak, allojenik kaynaklı olması, elde edilmesinin ve saklanması için bazı sıkı koşullar gerektirmesi dezavantajları arasındadır.

### **1.3. Trombositten Zengin Fibrin (TZF) ve Kullanım Alanları**

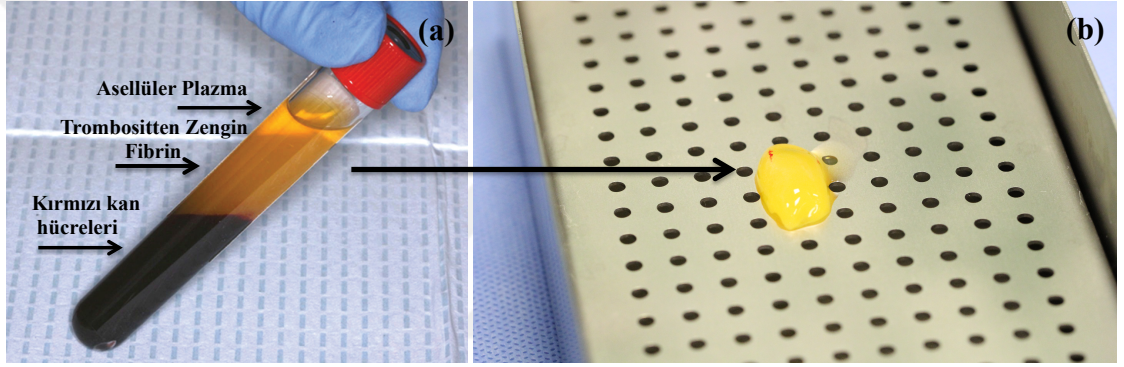
Trombosit ekstraktlarının hücre büyümesindeki yararlı etkileri 1970'li yıllarda gösterilmiş olmasına rağmen, uzun yıllar trombositten zengin preparatlar daha çok hemostatik ve yapıştırıcı amaçlar (otojenik veya allojenik fibrin yapıştırıcılar) ile kullanılmışlardır (25). Oysa trombositlerin alfa granüller içinde içermiş oldukları platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), TGF- $\beta$ , VEGF, IGF-1, hepatosit büyüme faktörü (HGF), angiopoetin, trombosit faktör 4 (PF-4) ve trombospondin gibi büyüme faktörleri doku hasarının tamirinde hücelere mitojenik ve kemotaktik yararlar sağlamasından dolayı önemlidir. Trombositlerin bu etkileri, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği alanlarında hem *in vitro* çalışmalarda hem de *in vivo* uygulamalarda tercih edilirliliğini arttırmıştır (26). Bu amaçla ilk olarak trombositten zengin plazma (TZP) çözeltilerinin (birinci jenerasyon trombosit ürünü) içerdikleri büyüme faktörleri ve sitokinler ile hücre proliferasyonu, kemotaksis, hücre farklılaşması ve matriks sentezi gibi anahtar hücresele olayları düzenledikleri ve doku rejenerasyonunda etkili oldukları gösterilmiştir (26, 27). Yapılan çalışmalarda da otolog olarak elde edilen TZP'nin içerdiği büyüme faktörleri ve proteinler nedeniyle doku yenilenmesi, yara iyileşmesi ve anjiogenezis için önemli katkı sağladığı gösterilmiştir (27). Trombositten zengin plazma, bu olumlu özellikleri sebebiyle ortopedi ve çene cerrahisi, spor hekimliği, doku mühendisliği, plastik ve rekonstrüktif cerrahi ve dental implant cerrahisi dahil birçok alanda kullanım bulmuştur (26-31). Göz hastalıklarında TZP kullanımını ise "Eye-Platelet

Rich Plasma (E-PRP)” tanımlaması ile kuru göz, iyileşmeyen kornea epitel defektleri, korneal ülserler ve korneal perforasyonlar sonrası göz yüzey rekonstrüksiyonunda tedavi amaçlı denenmiştir (32). Alio ve ark. (33) otolog fibrin membran (çeşitli kimyasallar, laminar akış sağlayan cihazlar ve 1.5-3 saat hazırlama süresi gerektiren kompleks bir prosedüre sahip) ve E-PRP kombinasyonu ile tedavi ettikleri korneal perforasyonlarda başarılı sonuçlar bildirmişlerdir. Ancak, TZP hazırlanmasında trombositlerin aktive olması için hayvansal kaynaklı trombin, kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) gibi kimyasalların eklenmesi, pahalı ekipman gereksinimi, fibrin molekülleri arasında oluşan bağların yaptığı üç boyutlu (3B) yapının sitokinler ve diğer proteinleri desteklemekte yeterli olmaması ve solüsyon formundan dolayı doku rejenerasyonunda 3B doku iskelesi fonksiyonu göstermemeleri nedeniyle rekonstrüktif yaklaşımlarda kullanımları sınırlanmıştır. Bu sebeple, Fransız araştırmacı Joseph Choukron ve ark. (34) tarafından trombositten zengin fibrin (TZF) (ikinci jenerasyon trombosit ürünü) tanımlanmıştır. Trombositten zengin fibrinin sahip olduğu 3B fibrin yapı, yara iyileşmesi sürecinde hücreler için sağlam bir mekanik destek oluşturmakta ve bu yapının içinde hapsolmuş trombositlerden yapının degradasyonu süresince degranülasyonla salınan büyüme faktörleri ve sitokinler uzun süre etkin tutulabilmektedir (34).

Trombositten zengin fibrin membran/matriks (TZFM) ise TZF’den türetilen ikinci jenerasyon bir trombosit ürünü olup, mikro ve makro mimari yapısı TZP’den farklılık gösterir. Trombositten zengin fibrinin baskılama işleminden geçirildikten sonra membran formu alması sonucu oluşan TZFM hem doku bütünlüğünün sağlanmasına olanak vermesi (doku iskelesi olarak görev alarak) hem de içerisinde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinler aracılığıyla hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve migrasyonunu desteklemesi sebebiyle diş hekimliği, ortopedi, plastik cerrahi, üroloji ve dermatoloji bilim dallarında yara iyileşmesinin kontrolü, defektlerin kapatılması, tendon-kas-dişeti-menisküs tamiri gibi rekonstrüktif prosedürlerde tercih edilmiştir (35-39).

Trombositten zengin fibrin ayrıca, ortopedi, plastik cerrahi ve diş hekimliği alanlarında yapılan farklı kök hücre tipleri ve primer hücre kültür çalışmalarında besleyici tabaka olarak kullanılmış ve doku rejenerasyonunu destekleyecek ölçüde hücre proliferasyonu ve differansiyasyonuna katkı sağladığı gösterilmiştir (40-44).

Trombositten zengin fibrin, kişinin kendisinden alınan kan örneklerinden basit ve ucuz bir yöntem kullanılarak eritrosit ve lökositlerin uzaklaştırılması ile trombositlerin daha konsantre ve saf bir şekilde 3B bir fibrin iskelenin içine hapsolmesiyle elde edilebilmektedir. Hazırlama prosedüründe öncelikle antikoagülan içermeyen biyokimya tüpüne alınan kan örneği hemen 2,700 devirde (revolutions per minute, rpm) 12 dk santrifüj edilir. Antikoagülan olmadığından tüp duvarları ile temas halinde olan kanda trombositlerin birkaç dakika içinde aktivasyonu sonucu pıhtılaşma meydana gelecektir. Trombin tüpün üst kesiminde henüz yoğunlaşmamış fibrinojeni fibrine dönüştürür. Üstte asellüler plazma ve altta kırmızı cisimciklerin arasında tüp ortasında fibrin bir pıhtı (TZF) elde edilir (Şekil 1.4).



Şekil 1.5. Trombositten zengin fibrin. (a) Santrifüj sonrası tüpün orta kısmında yoğunlaşan trombositten zengin fibrin, (b) tüpten çıkarılan trombositten zengin fibrinin altta kalan kırmızı kan hücrelerinden ayrılmış görüntüsü.

## 2. GEREÇ ve YÖNTEM

Sunulan tezin bu bölümünde, çalışma kapsamında kullanılan malzemeler ve yapılan deneyler detaylandırılmıştır. Çalışmanın ilk kısmında, hücre kültür çalışmalarında kullanılacak olan insan amniyotik membran (AM) ve trombosit zengin fibrin (TZF) in literatürden farklı özgün protokoller kullanılarak besleyici ortam ve yüzey destek malzemesi olarak kullanımı planlanmış, faz kontrast mikroskop ve tarayıcı elektron mikroskop (SEM) ile karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra farklı protokoller ile hazırlanmış bu hücre kültürü ürünlerinin içeriğindeki büyüme faktörü konsantrasyonları “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA) ile analiz edilmiştir. İkinci kısımda kadavralardan elde edilen limbal dokular ile hücre kültürü çalışmalarına başlanmıştır. Bu kısımda daha önce karakterizasyonu yapılan farklı AM ve TZF materyalleri ile çeşitli kombinasyonlar oluşturularak çalışma grupları belirlenmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm kadavraların demografik özellikleri kaydedilmiş ve kültür başlangıcından itibaren limbal dokuların ve hücrelerin seyri çeşitli yöntemler kullanılarak görüntülenmiştir. Hücrelerin migrasyona başlangıç zamanı, kültür yüzeyinin tam doluluğa ulaşma süresi ve yüzdesi, hücre morfolojisi, köklülüğü ve koloni formasyonu alt başlıklarda detaylandırılan analizlerle incelenmiştir.

### 2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Biyolojik Ürünler

Hücre kültür çalışmaları süresince kullanılan tüm malzemelerin elde edildiği kaynaklar Çizelge 2.1’de özetlenmiştir. Kullanılan tüm alet ve teçhizatın marka ve model numarası ise metin içinde belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan malzemeler ve kaynakları.

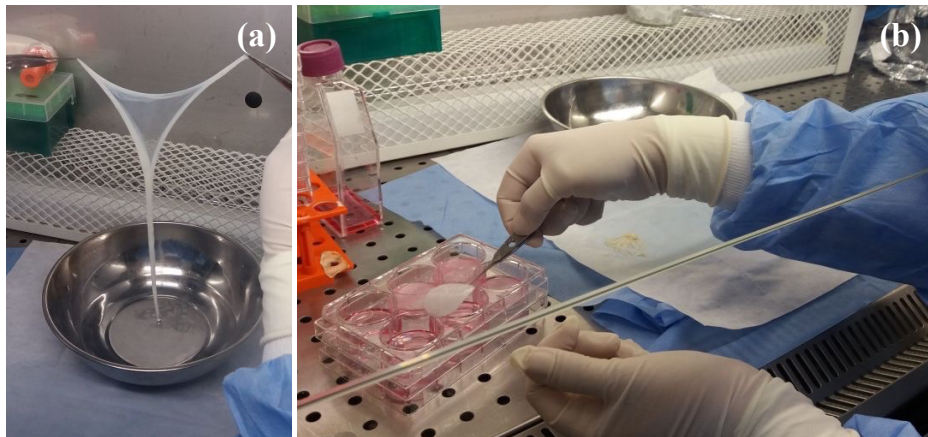
Malzeme	Kod	Firma	Ülke
5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR mix Plus (No ROX)	08-25-00001	Solis BioDyne	Estonya
ATP bağlanıcı kaset protein 2 (ABCG2) birincil antikor	BXP-21	Abcam	ABD
Accutase	ACC-1B	Capricorn Scientific	Almanya
Alexa Fluor 488 konjuge anti Rabbit IgG ikincil antikor	A11008	Thermo Fisher Scientific	ABD
Alexa Fluor 488 Phalloidin	A12379	Thermo Fisher Scientific	ABD
Alexa Fluor 568 konjuge anti Mouse IgG ikincil antikor	A11004	Thermo Fisher Scientific	ABD
Amfoterisin B	SV30078.01	Hyclone	İngiltere
Calcein Am	C-3099	Thermo Fisher Scientific	ABD
DAPI (4,6-diamidine-2'-phenylindole)	D-1306	Invitrogen	ABD
Dulbecco'nun steril fosfat tampon çözeltisi (wo Ca/Mg <sup>2+</sup> )	BE17-516F	Lonza	İsviçre
Dulbecco'nun steril fosfat tampon çözeltisi (w Ca/Mg <sup>2+</sup> )	BE17-513F	Lonza	İsviçre
Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 (wo L-Glutamin)	D6421	Sigma-Aldrich	Almanya
EDTA (Ethylendiamintetraasetik asit)	E9884	Sigma-Aldrich	Almanya
Etanol	32221	Sigma-Aldrich	Almanya
Etidyum Homodimer-1	46043	Sigma-Aldrich	Almanya
Gentamisin	L-0012-010	Biowest	ABD
Gliserol	15524	Sigma-Aldrich	Almanya
Glisin	G-7126	Sigma-Aldrich	Almanya
Gluteraldehid (%25)	G-6257	Sigma-Aldrich	Almanya
Goat Serum	G-9023	Sigma-Aldrich	Almanya
Hekzametildisilazan	8.04324	Merck	Almanya
İntegrin $\alpha\beta 1$ birincil antikor	Y9A2	Abcam	ABD
Konneksin 43 birincil antikor	4E6.2	Abcam	ABD
L-Glutamin	G7513	Sigma-Aldrich	Almanya
Metanol	34885-2.5l-R	Sigma-Aldrich	Almanya
Paraformaldehid	1.04002	Merck	Almanya
Penisilin – Streptomisin	P4333	Sigma-Aldrich	Almanya
QIAzol Lysis Reagent	79306	Qiagen	Almanya
Sığır Serum Albümini	A2153	Sigma-Aldrich	Almanya
Sitokeratin 3 (K3) birincil antikor	AE5	Abcam	ABD
Sitokeratin 12 (K12) birincil antikor	EPR17882	Abcam	ABD
Tripsin	T9935	Sigma-Aldrich	Almanya
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich	Almanya
Tümör protein 63 (p63) birincil antikor	EPR5701	Abcam	ABD
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich	Almanya

Biyolojik ürün listesi alfabetik sıraya göre verilmiştir. w: with, wo: without.

## 2.2. Modifiye Besleyici Ortam Hazırlanması ve Kültür Yüzeylerinin Kaplanması Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

### 2.2.1. Modifiye Besleyici Ortam Oluşturulmasında Kullanılan İnsan Amniyotik Membran'ın Hazırlanması

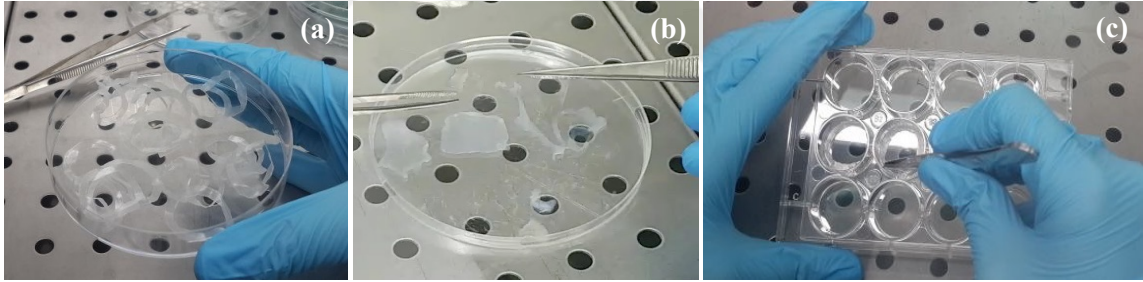
Modifiye besleyici ortam oluşturulmasında taze AM kullanılmıştır. Tıbbi özgeçmiş bulunan, seroloji testlerinde AIDS (HIV), sifiliz (RPR) ve sarılık (HbsAg, anti-HCV) tespit edilmeyen, herhangi bir sistemik hastalığı bulunmayan donörlerden steril şartlar altında sezeryan doğumda elde edilen 10 farklı insan AM'si Dulbecco'nun steril fosfat tampon çözeltisi (D-PBS – pH:7.4) içerisinde laboratuvar ortamına aktarılmıştır. Steril hava çevrimli laminar akışlı tip II kabin (Bioair, İtalya) içerisinde kan artıklarından temizlenen tüm AM'ler 50 µg/ml penisilin, 50 µg/ml streptomisin, 100 µg/ml gentamisin ve 2.5 µg/ml amfoterisin B içeren D-PBS içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Yapışık olduğu koryon tabakasından küt diseksiyon ile ayrılan tüm AM'ler 1x2 cm boyutlarında olacak şekilde eşit parçalara ayrılmış ve her bir parça, %1 Penisilin-Streptomisin içeren 3 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12 (DMEM-HAM's F12) içerisinde 37°C karbondioksit (CO<sub>2</sub>) inkübatörüne (Heraus Instruments, Almanya) aktarılmıştır (Şekil 2.1). On dört günlük inkübasyon süresi sonunda toplanan tüm besi ortamı 3,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra 1:1 oranında DMEM-HAM's F12 ile karıştırılarak sonuç modifiye besleyici ortam hazırlanmıştır.



Şekil 2.1. Modifiye besleyici ortam oluşturulmasında kullanılan taze amniyotik membranın hazırlanması: (a) steril şartlarda laboratuvar ortamına nakledilen amniyotik membranın koryondan küt diseksiyonla ayrıldıktan sonraki yarı saydam görüntüsü, (b) 1x2 cm boyutlarında kesilen amniyotik membranların 3 ml DMEM-HAM's F12 besi ortamına aktarılması.

### 2.2.2. Kültür Yüzeylerinin Kaplanması ve Kullanılan İnsan Amniyotik Membran'ın Hazırlanması

Kültür yüzeylerinin kaplanmasında donmuş-çözdürülmüş ve epiteli kaldırılmış AM kullanılmıştır. Yukarıdaki şartları sağlayan donörlerden aynı şartlar altında laboratuvara nakledilen ve antibiyotikli D-PBS ile mekanik olarak temizlenip koryondan ayrılan tüm AM'ler 3x4 cm boyutlarında olacak şekilde eşit parçalara ayrılmış ve her bir parça nitrosellüöz kağıt (Sesim Medikal, Türkiye) üzerinde 1:1 oranında DMEM-HAM's F12:Gliserol içeren karışım içerisinde -80°C dondurucuya aktarılmıştır. Daha sonra çözdürülen AM'ler %0,25 Tripsin/EDTA solüsyonu içerisinde 37°C inkübatörde 30 dk bekletilmiş ve yüzeyden gevşeyen epitel tabakası hücre fırçası yardımıyla kaldırılmıştır. Epitel tabakası kaldırılmış olarak elde edilen tüm AM'ler hücre kültür çalışmalarının gerçekleştirileceği 12 gözlü kültür kaplarının (Polistiren Hücre Kültür Kapları-TCPS, Orange Scientific, Belçika) yüzeyine daha önceden yaklaşık 2 cm çapında kesilerek sterilize edilmiş parafilm halkaları ile stabilize edilmiştir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kültür yüzeyinin kaplanmasında kullanılan amniyotik membranın hazırlanması: (a) kültür kabının yüzeyine amniyotik membranları stabilize etmek için hazırlanan 2 cm çapında parafilm halkalar, (b) epitel tabakası kaldırılmış 3x4 cm boyutlarında amniyotik membran, (c) parafilm halkaların 12 gözlü kültür kabına yerleştirilmesi.

### 2.2.3. Modifiye Besleyici Ortam Oluşturulmasında Kullanılan İnsan Kaynaklı Trombositten Zengin Fibrin'in Hazırlanması

Modifiye besleyici ortam oluşturulmasında Dr. Joseph Choukroun'un (34) tanımladığı standart TZF kullanılmıştır. Gönüllülerin antekübital veninden steril şartlar altında alınan 8 ml kan örneği silika kaplı ve antikoagülan içermeyen plastik kan tüpü (BD Vacutainer, Tıp Kim San, Türkiye) içerisinde toplanmış ve hızlıca santrifüj cihazına (Hettich Eba 20, Almanya) aktarılmıştır. Parametreleri 2,700 rpm ve 12 dk'ya ayarlanan cihazda santrifüjlenen kan örneği santrifüj sonunda hızlıca steril kabin

içerisine aktararak genel bilgiler kısmında da belirtildiği gibi alt kısmında bulunan kırmızı kan hücrelerinden cerrahi makas ve steril gazlı bez yardımıyla ayrılmıştır. Steril D-PBS ile yıkanan ve yaklaşık 1x2 cm boyutlarında olan her bir TZF, %1 Penisilin-Streptomisin içeren 3 ml DMEM-HAM's F12 içerisinde 37°C inkübatöre aktarılmıştır. On dört günlük inkübasyon süresi sonunda toplanan tüm besi ortamı 3,000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra 1:1 oranında DMEM-HAM's F12 ile karıştırılarak sonuç modifiye besleyici ortam hazırlanmıştır.

#### **2.2.4. Kültür Yüzeylerinin Kaplanması Kullanılan İnsan Kaynaklı Trombositten Zengin Fibrin'in Hazırlanması**

Kültür yüzeylerinin kaplanmasında standart protokolden farklı ve özgün olarak santrifüj parametreleri değiştirilerek sıvı halde TZF elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla gönüllülerden toplanan kan örnekleri aynı santrifüj cihazı ile 1,000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda tüpün üst kısmında halen sıvı halde bulunmakta olan TZF materyali hızlıca steril kabin içerisine aktararak mikropipet yardımıyla 12 gözlü kültür kaplarının her bir gözünü kaplamak üzere yüzeylere 300 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Yüzeyleri kaplayacak şekilde yayılması için kültür kabı hafifçe oynatılmış ve tüm yüzeylerin homojen olarak sıvı TZF ile kaplandığından emin olunmuştur. Daha sonra kültür kapları steril kabin içerisinde yaklaşık 1 dakika hareketsiz olarak bekletildiğinde yüzeylere aktarılan sıvı formdaki TZF'nin jelleşerek katı forma dönüştüğü gözlemlenmiştir.

#### **2.2.5. Besi Ortamlarında Kullanılan İnsan Serumunun Hazırlanması**

Donörlerin antekubital veninden elde edilen 8 ml kan örneği silika kaplı jelli kan tüpü (Tıp Kim San, Türkiye) içerisinde toplanmıştır. Toplanan kan örnekleri tüpün içerisinde yavaşça alt-üst olacak şekilde sallanarak silika partikülleri ile iyice temas etmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Yaklaşık 1 saat +4°C'de kendiliğinden pıhtılaşması beklenen kan örnekleri 2,000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek jelin kırmızı kan hücreleri ile kan serumu arasına girmesi sağlanmıştır. Bu şekilde santrifüj işlemi sonunda tüpün üst kısmında kan serumu, kırmızı kan hücrelerinden tamamen ayrılmış olarak elde edilebilmiştir. Her bir donörden toplanan kan serumu 50 ml steril tüplere aktarılmış ve laboratuvar ortamına aktarılmıştır. Aktarılan tüm insan serumu örnekleri 0.22 µm



gözenek çapına sahip sellülöz asetat filtrelerden (Sartorius, Almanya) geçirildikten sonra hücre kültür çalışmalarında kullanılmak üzere -20°C'ye aktarılmıştır.

### **2.3. Kültür Yüzeylerinin Kaplanması Kullanılan Malzemelerin Karakterizasyonu**

#### **2.3.1. Faz Kontrast Mikroskop Analizi**

Kültür yüzeylerinin kaplanmasında kullanılan donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ve 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryalleri kültür yüzeyine aktarıldıktan sonra faz kontrast mikroskobu (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir. Her bir örnekten 3 paralel ile görüntülemeler ve analizler gerçekleştirilmiştir.

#### **2.3.2. Tarayıcı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi**

Kültür yüzeylerinin kaplanmasında kullanılan donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ve 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryallerinin yatay ve dikey kesitlerde 3B olarak incelenmesi SEM (Quanta 400F, ABD) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler D-PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra oda sıcaklığında %2,5 (v/v) Gluteraldehid/PBS çözeltisinde 30 dk bekletilerek fikse edilmiştir. Daha sonra 3 defa D-PBS ile yıkanan örnekler, artan derişimlerde etanol çözeltilerinde (%30, %50, %70, %90, %100, v/v) ikişer dk bekletilerek susuzlaştırılmıştır. Akabinde, %100 heksametildisilazan ile 5 dk muamele edilerek kurutulan örnekler inceleme öncesinde altın-palladyum ile kaplanmıştır. Her bir örnekten 3 paralel ile görüntülemeler ve analizler gerçekleştirilmiştir.

### **2.4. Modifiye Besleyici Ortam Hazırlanması ve Kültür Yüzeylerinin Kaplanmasında Kullanılan Malzemelerin Büyüme Faktörü Salım Profillerinin *In Vitro* Salım Çalışmaları ile Belirlenmesi**

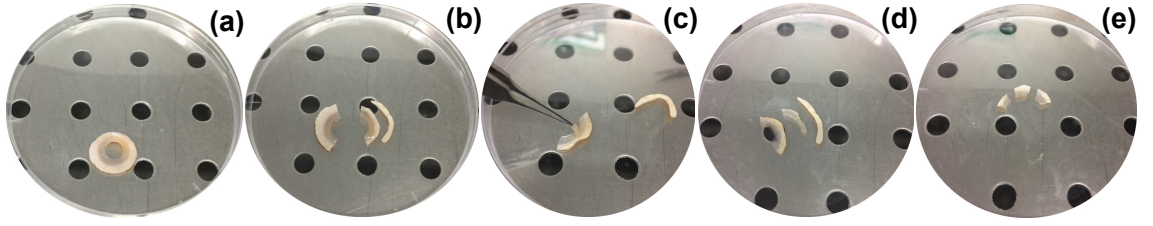
Kültür yüzeylerinin kaplanmasında kullanılan donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ve 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryalleri ile modifiye besleyici ortam oluşturulmasında kullanılan taze AM ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryallerinin çeşitli büyüme faktörleri için salım profilleri *in vitro* salım çalışmaları ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, EGF, VEGF-A ve TGF-β'ya ait ELISA (Thermo Fisher Scientific, ABD) kitleri kullanılmıştır. Analiz edilecek her bir grup için 4 farklı gönüllüden 3'er paralel ile örnekler hazırlanmış ve

tüm örnekler %1 Penisilin-Streptomisin içeren 3 ml DMEM-HAM's F12 içerisinde 37°C inkübatöre aktarılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (1. sa, 3. sa, 1., 3., 7., 14., 21., 28. günler) 500 µl örnek ependorf tüplerine alınarak 5,000 rpm'de 10 dk santrifüj (Hettich Mikro 22R, Almanya) edilmiştir. Daha sonra her bir örnek başka ependorf tüplerine aktararak -20°C dondurucuya kaldırılmış ve analiz gününe kadar muhafaza edilmiştir. Ayrıca 4 farklı gönüllüden 3'er paralel olacak şekilde elde edilen insan serum örnekleri de -20°C dondurucuya kaldırılmış ve analiz gününe kadar muhafaza edilmiştir. Analizde çalışmada kullanılan tüm kitlerin önerdiği protokole göre işlem basamakları uygulanmıştır. Son basamakta kalorimetrik spektrofotometre (ASYS, Hitech UVM 340 plate reader, Avusturya) ile 450 nm dalga boyunda elde edilen optik absorbans değerleri her bir örnek grubu için grafik haline dönüştürülmüştür. Bilinen konsantrasyonlarda EGF, VEGF-A ve TGF-β içeren çözeltilerden spektrofotometrik olarak elde edilen optik absorbans değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafikleri sırasıyla Ek-1, Ek-2 ve Ek-3'te sunulmuştur.

## **2.5. *In Vitro* Hücre Kültür Çalışmaları**

### **2.5.1. Limbal Eksplantların Hazırlanması ve Kültür Yüzeyine Nakledilmesi**

Sunulan tez çalışması kapsamında, Helsinki Deklarasyonu Prensiplerine uygun olarak 75 yaş altı, 5 günden daha az ölüm süresine sahip, ölüm sebebi bilinen, sistemik ve/veya lokal göz malignensisi bulunmayan, bulaşıcı bir hastalığı olmayan donörlerden elde edilen 32 adet kornea-skleral rim kullanılmıştır. Kornea nakillerinde santral 8 mm'lik kısmı kullanılan dokunun periferinde kalan bu rim parçaları Optisol (Chiron Ophthalmics, ABD) kornea saklama solüsyonu içerisinde laboratuvar ortamına aktarılmıştır. Aktarılan tüm kornea-skleral rimler rastgele ve eşit olarak 4 gruba ayrılmış (her grup için n=8) ve %1 antibiyotik içeren D-PBS'de 10 dk bekletilmiştir. Kornea-skleral rimlerden fazla konjonktiva, sklera ve koroid dokusu eksize edildikten sonra limbal epitel kısmını ve anterior stromanın da bir kısmını içerecek şekilde yüzeyel diseksiyon yapılmıştır. Her bir rim önce 2 eşit yarım halkaya ayrıldıktan sonra her bir yarım halka 3 eşit parçaya ayrılmıştır (Şekil 2.3). Sonuçta elde edilen 6 eşit, 1x2 mm çapa sahip kornea-skleral limbal eksplant, belirlenen gruplarda rastgele olarak kültür yüzeylerine aktarılmıştır.



Şekil 2.3. Donörlerden elde edilen kornea-skleral rimin kültür yüzeylerine aktarılmak üzere hazırlanması: (a) donörden elde edilmiş kornea-skleral rim, (b) rim etrafındaki fazla konjonktiva, sklera ve iris dokusunun uzaklaştırılması, (c) posterior skleranın diseksiyonu ve eksizyonu (d) sonuçta elde edilen yaklaşık 200 µm derinlikte limbal epiteli içeren yarım limbal halka (e) yarım limbal epitel halkasının 3 eşit parçaya bölünmüş görüntüsü.

### 2.5.2. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi

Sunulan tez çalışmasının temel amacı farklı protokoller ile hazırlanmış AM ve TZF'lerin modifiye besleyici ortam hazırlanmasında ve kültür yüzeylerinin kaplanmasında kullanılması ve bu bileşenlerin farklı kombinasyonlarda kullanıldığında limbal eksplant kültür üzerine etkisinin karşılaştırılmasıdır. Bu amaçla daha önce hazırlama protokolleri bahsedilen;

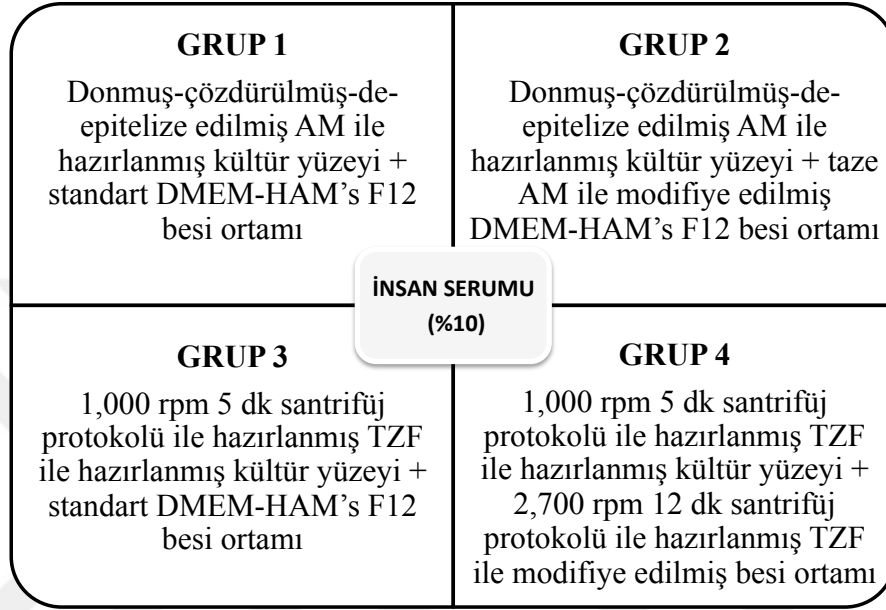
- Taze AM ile modifiye edilmiş besi ortamı
- Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ile hazırlanmış kültür yüzeyi
- 2,700 rpm 12 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış TZF ile modifiye edilmiş besi ortamı
- 1,000 rpm 5 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış TZF ile hazırlanmış kültür yüzeyi

belirlenen gruplarda farklı kombinasyonlarla kullanılmıştır. Bu amaçla oluşturulan 4 grup şu şekilde sıralanabilir:

- **Grup 1:** Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ile hazırlanmış kültür yüzeyi + standart DMEM-HAM's F12 besi ortamı + %10 insan serumu
- **Grup 2:** Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ile hazırlanmış kültür yüzeyi + taze AM ile modifiye edilmiş DMEM-HAM's F12 besi ortamı + %10 insan serumu
- **Grup 3:** 1,000 rpm 5 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış TZF ile hazırlanmış kültür yüzeyi + standart DMEM-HAM's F12 besi ortamı + %10 insan serumu

- **Grup 4:** 1,000 rpm 5 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış TZF ile hazırlanmış kültür yüzeyi + 2,700 rpm 12 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış TZF ile modifiye edilmiş besi ortamı + %10 insan serumu

Grupların içerdiği modifiye besi ortamı, destekleyici serum ve kültür yüzeyleri Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Deneysel çalışma grupları ve özellikleri.

### 2.5.3. Donörlerin Genel Demografik Bilgilerinin Kaydedilmesi

Çalışmalar süresince donörlerin yaş-cinsiyet bilgileri ve kadavra ile kültür başlangıcı arasında geçen süre kaydedilerek gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma yapılmıştır.

### 2.5.4. Limbal Eksplantlardan Hücre Migrasyonunun Gözlenmesi

Hazırlanan tüm limbal eksplantlar belirlenen gruplara eşit ve rastgele olacak şekilde dağıtıldıktan sonra her bir eksplantın kültürü süresince;

- Hücrelerin migrasyona başlangıç zamanı
- Hücrelerin kültür yüzeyinde doluluğa ulaşma zamanı
- Kültür yüzeyinin doluluk yüzdesi
- Kültür yüzeyinin TZF ile kaplı olduğu gruplarda (Grup 3 ve Grup 4) yüzeydeki fibrin jelin yıkımının başlama zamanı
- Migrasyona uğrayan hücrelerin eş zamanlı video görüntüleme sistemi (JuLI™ - Live cell imaging system, NanoEnTek, Kore) ile görüntülenmesi

gerçekleştirilmiş ve sayısal veriler gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

## **2.5.5. Hücre Morfolojisi ve Köklülüğün Belirlenmesi**

### **2.5.5.1. Faz Kontrast Mikroskop Analizi**

Hücre kültür çalışmaları süresince tüm eksplant kültürlerdeki hücre morfolojisi 3. 7. ve 14. günlerde faz kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir.

### **2.5.5.2. Hücre İskeleti ve Çekirdeğin Boyanması**

Tüm gruplarda hücre morfolojisinin belirlenmesi amacıyla kültürün 14. gününde immün boyama yapılarak flöresan mikroskop (Olympus, ABD) ile görüntüler çekilmiştir. Öncelikle hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez D-PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin fiksasyonu amacıyla her bir göze 300 µl %4 (v/v) soğuk paraformaldehid çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 3 kez D-PBS ile yıkanan hücrelerin membran geçirgenliğini arttırmak amacıyla 300 µl %0,1 (v/v) TritonX-100 çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. Kültür yüzeyleri 3 kez daha %10 Sığır Serum Albümini (BSA) (w/v) içeren PBS (PBS-A) ile yıkandıktan sonra hücre iskeletini boyamak için her bir göze 300 µl Alexa Fluor 488 Phalloidin (1:200) çözeltisi eklenerek 30 dk oda sıcaklığında karanlık şartlarda inkübe edilmiştir. Kültür yüzeyleri 3 kez daha PBS-A ile yıkanmış ve hücre çekirdeğini boyamak için her bir göze 300 µl 4,6-diamidine-2'-phenylindole (DAPI) (1:1000) çözeltisi eklenerek 10 dk oda sıcaklığında karanlık şartlarda bekletilmiştir. Son olarak kültür yüzeylerine 3 kez daha PBS-A ile yıkama yapılarak flöresan mikroskop görüntüleri alınmıştır.

### **2.5.5.3. Canlı-Ölü Hücre Boyama**

Tüm gruplarda hücrelerin 14. gün canlılıklarının belirlenmesi amacıyla Calcein Am ve Etidyum Homodimer-1 boyaları kullanılarak canlı-ölü analizi yapılmıştır. Örneklerin üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  içeren D-PBS (D-PBS+) ile 2 defa hızlıca yıkanmıştır. Canlı hücreleri görüntülemek için ökaryotik hücrelerde sitoplazmik esterazlar tarafından asetoksimetil hidrolizine uğrayarak flöresan yeşil boyaya dönüşen ve bütünlüğü bozulmamış canlı hücrelerin membranını geçebilen Calcein Am (1:2000) çözeltisi kullanılmıştır. Ölü hücreleri boyamak için ise ancak bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerin içine girebilen ve nükleik asitlerini boyayan Etidyum Homodimer-1 çözeltisi (1:1000) kullanılmıştır. Her bir örnek gözü için 400 µl Calcein Am (1:2000) ve Etidyum Homodimer-1 (1:1000) içeren çözelti eklendikten

sonra 30 dk oda sıcaklığında karanlık şartlarda inkübe edilmiştir. Daha sonra hızlıca örneklerin üzerindeki boya çözeltisi uzaklaştırılmış ve D-PBS+ ile 2 defa yıkama yapılarak flöresan mikroskopi görüntüleri alınmıştır.

#### **2.5.5.4. İmmünsitokimyasal Boyama**

Tüm gruplarda hücre köklülüğünün kalitatif olarak belirlenmesi amacıyla kültürün 14. gününde LEKH için pozitif belirteçler olarak tümör protein 63 (p63) ve ATP bağlanıcı kaset protein G2 (ABCG2); LEKH için negatif ancak diferansiye olmuş santral kornea epiteli için pozitif belirteç olarak sitokeratin 12 (K12) ile immünboyamalar gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez D-PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerin fiksasyonu amacıyla p63 ve K12 boyaması yapılacak olan hücelere 300 µl %100 (v/v) soğuk metanol çözeltisi, ABCG2 boyaması yapılacak olan hücelere %4 (v/v) soğuk paraformaldehid çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 2 kez D-PBS ile yıkanan hücrelerin membran geçirgenliğini arttırmak amacıyla 300 µl %0,2 (v/v) Tween 20 çözeltisi oda sıcaklığında 4 defa 5'er dk uygulandıktan sonra 300 µl %0,1 (v/v) Triton X-100 çözeltisi eklenerek 5 dk daha inkübe edilmiştir. Daha sonra 2 kez D-PBS ile yıkanan hücrelerde spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla 300 µl %10 (w/v) PBS-A ile oda sıcaklığında 1 sa bloklama yapılmıştır. Bloklama ardından hücreler, %10 (v/v) Goat Serum çözeltisi ile hazırlanmış p63 (1:100) birincil antikor çözeltisi, ABCG2 (1:50) birincil antikor çözeltisi ve K12 (1:50) birincil antikor çözeltisi ile oda sıcaklığında 2 sa inkübe edilmiştir. Kültür yüzeyleri 3 kez daha PBS-A ile yıkandıktan sonra p63 birincil antikor boyaması yapılmış kültür yüzeyine %10 (v/v) Goat Serum çözeltisi ile hazırlanmış 300 µl Alexa Fluor 488 konjuge anti Rabbit IgG (1:500) ikincil antikor çözeltisi; ABCG2 birincil antikor boyaması yapılmış kültür yüzeyine %10 (v/v) Goat Serum çözeltisi ile hazırlanmış 300 µl Alexa Fluor 568 konjuge anti Mouse IgG (1:50) ikincil antikor çözeltisi; K12 birincil antikor boyaması yapılmış kültür yüzeyine %10 (v/v) Goat Serum çözeltisi ile hazırlanmış 300 µl Alexa Fluor 488 konjuge anti Rabbit IgG (1:500) ikincil antikor çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında karanlık şartlarda 45 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra kültür yüzeyleri 3 kez daha PBS-A ile yıkanarak hücre çekirdeklerinin boyanması amacıyla her bir göze 300 µl DAPI (1:1000) çözeltisi eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında karanlık şartlarda bekletilmiştir. Son olarak kültür yüzeylerine 3 kez daha PBS-A ile yıkama yapılarak gliserol çözeltisi (1:1) eklenmiş ve

flöresan mikroskopi görüntüleri alınmıştır. İmmünsitokimyasal boyama için akış şeması Çizelge 2.2’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. İmmünsitokimyasal boyama akış şeması.

<b>p63</b>	<b>ABCG2</b>	<b>K12</b>
D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama
%100 metanol ile 10 dk fiksasyon	%4 paraformaldehid ile 10 dk fiksasyon	%100 metanol ile 10 dk fiksasyon
D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama
%0,2 PBS-Tween 20 ile 4 defa 5’er dk yıkama	%0,2 PBS-Tween 20 ile 4 defa 5’er dk yıkama	%0,2 PBS-Tween 20 ile 4 defa 5’er dk yıkama
%0,1 Triton X-100 ile 5 dk inkübasyon	%0,1 Triton X-100 ile 5 dk inkübasyon	%0,1 Triton X-100 ile 5 dk inkübasyon
D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama
%10 PBS-A ile 1 sa bloklama	%10 PBS-A ile 1 sa bloklama	%10 PBS-A ile 1 sa bloklama
%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:100</b> dilüsyonda p63 birincil antikor çözeltisi ile 2 sa inkübasyon	%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:50</b> dilüsyonda ABCG2 birincil antikor çözeltisi ile 2 sa inkübasyon	%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:50</b> dilüsyonda K12 birincil antikor çözeltisi ile 2 sa inkübasyon
PBS-A ile yıkama	PBS-A ile yıkama	PBS-A ile yıkama
%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:500</b> dilüsyonda <b>AF 488</b> konjuge anti <b>Rabbit</b> IgG ikincil antikor çözeltisi ile 45 dk inkübasyon	%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:50</b> dilüsyonda <b>AF 568</b> konjuge anti <b>Mouse</b> IgG ikincil antikor çözeltisi ile 45 dk inkübasyon	%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:500</b> dilüsyonda <b>AF 488</b> konjuge anti <b>Rabbit</b> IgG ikincil antikor çözeltisi ile 45 dk inkübasyon
PBS-A ile yıkama	PBS-A ile yıkama	PBS-A ile yıkama
%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:1000</b> dilüsyonda DAPI çözeltisi ile 5dk inkübasyon	%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:1000</b> dilüsyonda DAPI çözeltisi ile 5dk inkübasyon	%10 PBS - Goat Serum ile hazırlanmış <b>1:1000</b> dilüsyonda DAPI çözeltisi ile 5dk inkübasyon
PBS-A ile yıkama	PBS-A ile yıkama	PBS-A ile yıkama
Gliserol (1:1) çözeltisi eklenerek flöresan mikroskopi görüntülerin alınması	Gliserol (1:1) çözeltisi eklenerek flöresan mikroskopi görüntülerin alınması	Gliserol (1:1) çözeltisi eklenerek flöresan mikroskopi görüntülerin alınması

Tüm basamaklar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. p63: tümör protein 63, ABCG2: ATP bağlanıcı kaset protein 2, K12: sitokeratin 12, D-PBS: Dulbecco’nun steril fosfat tampon çözeltisi, PBS-A: Sığır Serum Albümini (BSA) (w/v) içeren PBS, DAPI: 4,6-diamidino-2’-phenylindole, AF: Alexa Fluor, 488 ve 568 kodları flöresan boyanın eksite olduğu elektromanyetik dalga boylarına işaret etmektedir.

### 2.5.5.5. Akış Sitometre Analizi

Tüm gruplarda hücre köklülüğünün kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla kültürün 14. gününde LEKH için pozitif belirteçler olarak p63 ve İntegrin  $\alpha 9\beta 1$ , LEKH için negatif ancak diferansiye olmuş santral kornea epitelini için pozitif belirteçler olarak sitokeratin 3 (K3) ve Konneksin 43 kullanılarak akış sitometre analizi gerçekleştirilmiştir ve tüm gruplarda belirlenen belirteçler bakımından yüzde oranlar hesaplanmıştır. Hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılıp 2 kez D-PBS ile yıkanmıştır. Ardından 300  $\mu$ l Accutase/0,5mM EDTA ile 37°C'de 10 dk inkübe edilerek kültür yüzeylerinden toplanan hücreler +4 °C 1,500 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonunda hücrelerin fiksasyonu amacıyla her bir göze 250  $\mu$ l %80 (v/v) soğuk metanol çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 2 kez D-PBS ile yıkanan hücreler +4 °C 1,500 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Hücrelerin membran geçirgenliğini arttırmak amacıyla 250  $\mu$ l %0,1 (v/v) Tween 20 çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 2 kez D-PBS ile yıkanan hücreler +4 °C 1,000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Hücrelerde spesifik olmayan bağlanmaların önlenmesi amacıyla 250  $\mu$ l 0,3 molar Glisin içeren % 10 (v/v) Goat Serum çözeltisi (PBS-GG) ile oda sıcaklığında 30 dk bloklama yapılmıştır. Bloklama ardından hücreler yıkama yapılmadan +4°C 1,000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında p63 işaretlenecek olan hücrelere PBS-GG ile hazırlanmış 250  $\mu$ l p63 (1:1000) birincil antikor çözeltisi; İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  işaretlenecek hücrelere PBS-GG ile hazırlanmış integrin  $\alpha 9\beta 1$  (10  $\mu$ l/10<sup>6</sup> h) birincil antikor çözeltisi; K3 işaretlenecek hücrelere PBS-GG ile hazırlanmış K3 (2  $\mu$ g/10<sup>6</sup> h) birincil antikor çözeltisi; Konneksin 43 işaretlenecek hücrelere PBS-GG ile hazırlanmış Konneksin 43 (1  $\mu$ g/10<sup>6</sup> h) birincil antikor çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Ardından, 2 kez D-PBS ile yıkanan hücreler +4 °C 1,500 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında p63 işaretlenmiş olan hücrelere PBS-GG ile hazırlanmış 250  $\mu$ l Alexa Fluor 488 konjuge anti Rabbit IgG (1:500) ikincil antikor çözeltisi; İntegrin  $\alpha 9\beta 1$ , K3, Konneksin 43 işaretlenmiş olan hücrelere PBS-GG ile hazırlanmış 250  $\mu$ l Alexa Fluor 568 konjuge anti Mouse IgG (1:50) ikincil antikor çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında karanlık şartlarda 30 dk inkübe edilmiştir. Son olarak 2 kez daha D-PBS ile yıkanan hücreler +4°C 1,500 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiş ve üzerlerine 250  $\mu$ l D-PBS eklenerek BD Accuri C6 Plus akış sitometre cihazı (BD Biosciences, ABD) ile analiz



edilmiştir. Akış sitometre analizi için hücrelerin işaretlenmesini gösteren akış şeması Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Akış sitometre analizi için hücrelerin işaretlenmesini gösteren akış şeması.

<b>p63</b>	<b>İntegrin <math>\alpha\beta 1</math></b>	<b>K3</b>	<b>Konneksin 43</b>
D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama	D-PBS ile yıkama
Accutase ile hücre kaldırma	Accutase ile hücre kaldırma	Accutase ile hücre kaldırma	Accutase ile hücre kaldırma
Santrifüj	Santrifüj	Santrifüj	Santrifüj
%80 metanol ile 10 dk fiksasyon	%80 metanol ile 10 dk fiksasyon	%80 metanol ile 10 dk fiksasyon	%80 metanol ile 10 dk fiksasyon
D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj
%0,1 PBS-Tween 20 ile 20 dk inkübasyon	%0,1 PBS-Tween 20 ile 20 dk inkübasyon	%0,1 PBS-Tween 20 ile 20 dk inkübasyon	%0,1 PBS-Tween 20 ile 20 dk inkübasyon
D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj
PBS-GG ile 30 dk bloklama	PBS-GG ile 30 dk bloklama	PBS-GG ile 30 dk bloklama	PBS-GG ile 30 dk bloklama
Santrifüj	Santrifüj	Santrifüj	Santrifüj
PBS-GG ile <b>1:1000</b> (v/v) dilüsyonda hazırlanmış p63 birincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon	PBS-GG ile <b>10 <math>\mu\text{l}/10^6 \text{ h}</math></b> konsantrasyonda hazırlanmış İntegrin $\alpha\beta 1$ birincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon	PBS-GG ile <b>2 <math>\mu\text{g}/10^6 \text{ h}</math></b> konsantrasyonda hazırlanmış K3 birincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon	PBS-GG ile <b>1 <math>\mu\text{g}/10^6 \text{ h}</math></b> konsantrasyonda hazırlanmış Konneksin 43 birincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon
D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj
PBS-GG ile <b>1:500</b> (v/v) dilüsyonda hazırlanmış <b>AF 488</b> konjuge anti <b>Rabbit</b> IgG ikincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon	PBS-GG ile <b>1:50</b> (v/v) dilüsyonda hazırlanmış <b>AF 568</b> konjuge anti <b>Mouse</b> IgG ikincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon	PBS-GG ile <b>1:50</b> (v/v) dilüsyonda hazırlanmış <b>AF 568</b> konjuge anti <b>Mouse</b> IgG ikincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon	PBS-GG ile <b>1:50</b> (v/v) dilüsyonda hazırlanmış <b>AF 568</b> konjuge anti <b>Mouse</b> IgG ikincil antikor çözeltisi ile 30 dk inkübasyon
D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj	D-PBS ile yıkama ve santrifüj
D-PBS eklenerek analiz	D-PBS eklenerek analiz	D-PBS eklenerek analiz	D-PBS eklenerek analiz

Tüm basamaklar oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. p63: tümör protein 63, K3: sitokeratin 3, D-PBS: Dulbecco'nun steril fosfat tampon çözeltisi, PBS-GG: 0,3 molar Glisin içeren %10 (v/v) Goat Serum çözeltisi, AF: Alexa Fluor, 488 ve 568 kodları floresan boyanın eksite olduğu elektromanyetik dalga boylarına işaret etmektedir.

### 2.5.5.6. Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

Tüm gruplarda hücre kültürününün 14. gününde toplanan hücrelerin aranan belirteçler açısından genetik ifadesinin belirlenmesi amacıyla Light Cycler Nano RT-PCR analiz sistemi (Roche, İsviçre) kullanılmıştır. Bu analizde kullanılan, LEKH'lerin ifade etmesini beklediğimiz p63 ve ifade etmesini beklemediğimiz K3 ve Konneksin 43 (Oligomer Biyoteknoloji, Türkiye) belirteçlerine ait gen primer dizileri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Kültür yüzeylerinden Accutase/0.5mM EDTA ile toplanan hücreler üzerine Qiazol (trizol çözültisi) eklenerek hücrelerin parçalanması sağlanmış ve kloroform ile faz ayrımı gerçekleştirilerek santrifüj sonrası RNA süpernatanda toplanmıştır. Bu aşamadan sonra RNA izolasyonuna RNeasy Mini Kit (Qiagen, Japonya) ile devam edilmiştir. Kit içerisinde belirtilen protokol kapsamında RNA izolasyonu sonrası Yüksek Kapasite tamamlayıcı DNA (cDNA) Ters Transkripsiyon Kit (Applied Biosystem) yardımı ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Analiz için 5x HOT FIREPol ve EvaGreen (Solis Biodyne) qPCR Supermix çözültisi kullanılmıştır. Her bir gen için ifade değerinin referans gen olarak seçilen insan  $\beta$ -aktin geninin ifade değerine oranı  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodu (45) kullanılarak hesaplanmıştır. Her bir grup için örnekler 3 paralel ile çalışılmıştır.

Çizelge 2.4. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primer dizileri.

Belirteç	Erişim	
	Numarası	Primerler (5'-3')
p63	NM_003722.4	<i>Sense</i> GAAACCAGAGATGGGCAAGT
		<i>Antisense</i> ATGCTATCTTCATCCGCCTTC
K3	NM_057088.2	<i>Sense</i> GGGATGACCTAAGAAATACCAAGA
		<i>Antisense</i> GTTGGCATTCTGCTTCTTGAC
Konneksin 43	NM_000165.4	<i>Sense</i> GGTCTGAGTGCCTGAACTT
		<i>Antisense</i> CCTGGGCACCACTCTTT

p63: tümör protein 63, K3: sitokeratin 3, sense: ileri yönde primer baz dizilimi, antisense: geri yönde primer baz dizilimi.

## **2.6. Deneysel Çalışmalarda kullanılan İnsan Kaynaklı Materyallerin Elde Edilmesinde İnsan Etik Kurulu'nun Onayı**

Deneysel çalışmalarda kullanılan insan kan serumu, insan kaynaklı TZF hazırlanmasında gerekli olan kan örneği, insan kaynaklı AM hazırlanmasında gerekli olan AM örneği ve kadavralardan elde edilen limbal doku parçalarının deneysel amaçlı kullanılabilmesi için T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu, Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 2 Nolu Genel Sekreterliği, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği Klinik Araştırma Etik Kurulu'ndan 2012-KAEK-15/1266 sayılı ve 28.12.2016 tarihli onay belgesi temin edilmiştir. Sözü edilen etik kurul onay belgesi Ek-4'te sunulmuştur.

## **2.7. İstatistiksel Analiz**

Çalışma sonuçları Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versiyon 23.0 (IBM Inc., ABD) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sayısal veriler için gruplar arası fark tek yönlü ANOVA testi ile değerlendirilmiş ve  $p$  değerinin 0,05'ten düşük olduğu durumlar istatistiksel açıdan anlamlı kabul edilmiştir.

### 3. BULGULAR

Sunulan tez çalışmasının bu bölümünde deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen veriler sunulmuş ve olası sebepleri hakkında kısa yorumlar yapılmıştır. Öncelikle, çalışmaya özgünlük veren farklı hücre kültür yüzeyi hazırlama protokolleri ve modifiye besleyici ortam hazırlama protokolleri sonucunda elde edilen özgün ürünlerin karakterizasyon çalışmalarına ait sonuçlar ayrıntılı olarak sunulmuştur. Daha sonra, deneysel çalışmalar için donör olarak kullanılan tüm kadavra ve gönüllülere ait demografik veriler grafiklerle desteklenerek açıklanmıştır. Bu veriler ışığında gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar saptanmış ve deneysel sonuçların demografik veriler ile bağlantısı ortaya konulmuştur. Bir sonraki bölümde, hücre kültür çalışmalarına ait tüm sonuçlar ayrıntılı olarak verilerle kalitatif sonuçlar görsel açıdan, kantitatif veriler istatistiksel açıdan karşılaştırılmıştır.

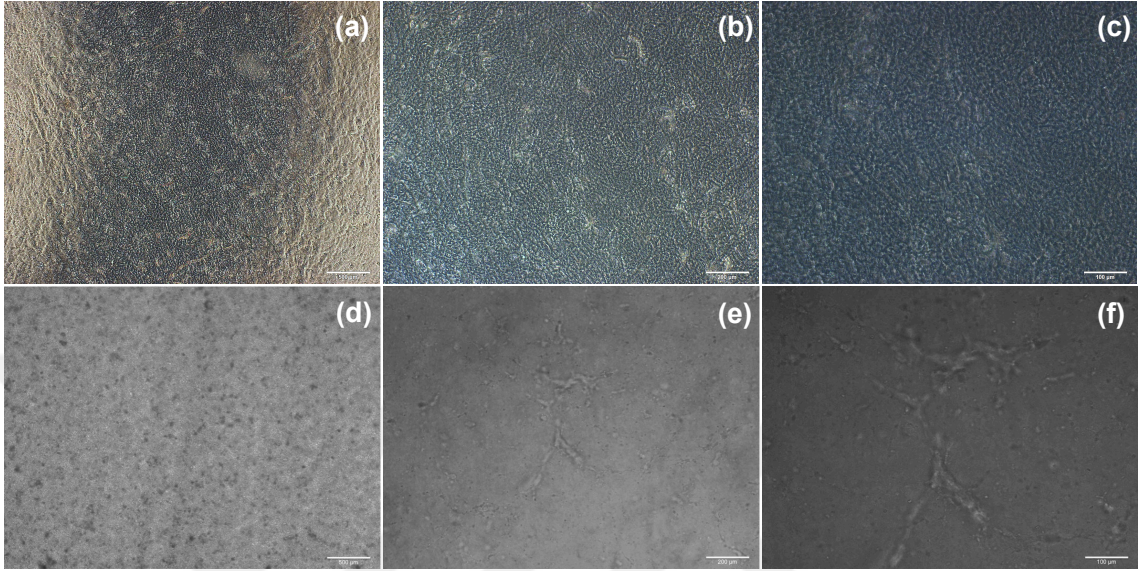
#### **3.1. Modifiye Besleyici Ortam Hazırlanması ve Kültür Yüzeylerinin Kaplanması Kullanılan Malzemelerin Karakterizasyonu**

Tez çalışmasında limbal eksplantlardan *in vitro* şartlarda kök hücre migrasyonunu destekleyecek farklı kültür yüzeylerinin ve besleyici ortamların oluşturulması amacıyla literatürde sıklıkla kullanılmakta olan insan kaynaklı AM ve bu tez çalışmasına özgünlük veren insan kaynaklı TZF kullanılmıştır. Hücrelerin ilk ve temel davranışı olarak bilinen hücre tutunmasını sağlayacağı kültür yüzeylerinin 2B incelenmesi faz kontrast mikroskobu ile gerçekleştirilmiştir. Kültür yüzeylerinin daha ileri 3B incelemeleri ise SEM ile yapılmıştır. Tüm kültür yüzey modifikasyonlarının ve karakterizasyon çalışmalarının temel amacı, hücrelerin en öncelikli gerçekleştirdikleri yüzeye tutunma davranışını desteklemek ve en olumlu etkiyi gösteren kültür yüzey modifikasyonunu tespit etmektir.

##### **3.1.1. Faz Kontrast Mikroskop Analizi**

Limbal eksplantlardan hücre migrasyonunun gerçekleşeceği kültür yüzeylerine insan kaynaklı donmuş-çözdürülmüş ve de-epitelize edilmiş AM ve 1,000 rpm 5dk protokolü ile hazırlanmış TZF ile kaplama yapıldıktan sonra faz kontrast mikroskobu ile 2B görüntüleri alınmıştır. İnsan kaynaklı AM kaplanmış kültür yüzeylerinin gözenek çapı son derece düşük, fiber aralıkları dar olarak sıkı konumlanmış bir yapıdan oluştuğu gözlemlenmiştir. İnsan kaynaklı TZF ile kaplanmış kültür yüzeylerinin ise AM

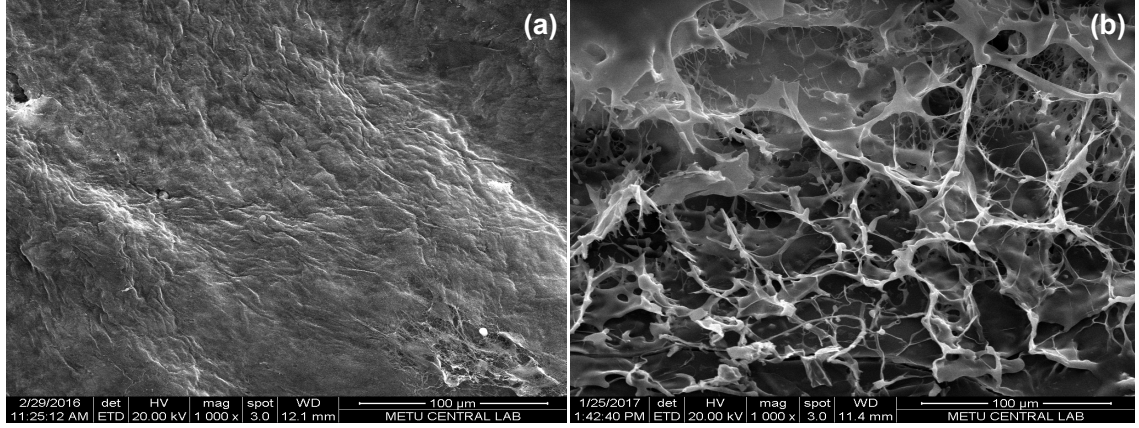
kaplanmış yüzeylere göre gözenek çapı daha geniş olup, fiber aralıkları geniş ve gevşek konumlanmış bir yapıdan oluştuğu gözlemlenmiştir. Şekil 3.1’de insan kaynaklı AM ve TZF’lere ait farklı büyütmelelerdeki faz kontrast mikroskop görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 3.1. İnsan kaynaklı amniyotik membran ve trombositten zengin fibrin’in farklı büyütmelelerdeki faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) amniyotik membran 4X (bar 500 µm), (b) amniyotik membran 10X (bar 200 µm), (c) amniyotik membran 20X (bar 100 µm), (d) trombositten zengin fibrin 4X (bar 500 µm), (e) trombositten zengin fibrin 10X (bar 200 µm), (f) trombositten zengin fibrin 20X (bar 100 µm).

### 3.1.2. Tarayıcı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

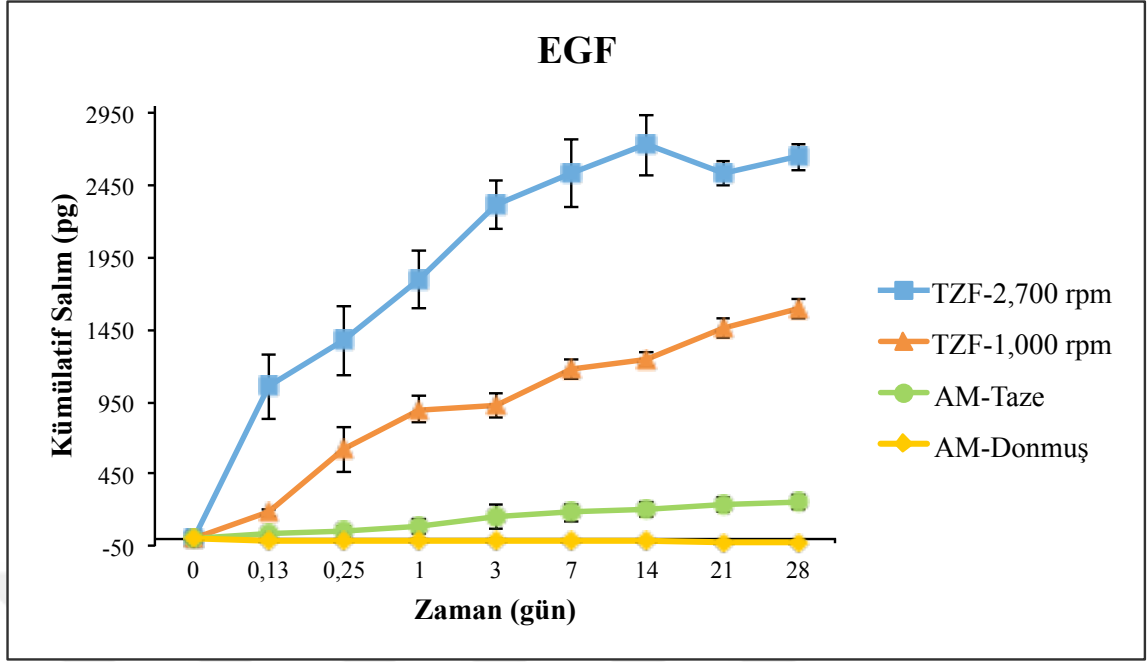
Limbal eksplantlardan hücre migrasyonunun gerçekleşeceği kültür yüzeylerine insan kaynaklı donmuş-çözdürülmüş ve de-epitelize edilmiş AM ve 1,000 rpm 5dk protokolü ile hazırlanmış TZF ile kaplama yapıldıktan sonra 3B morfolojik analizleri SEM ile gerçekleştirilmiştir. Faz kontrast mikroskop görüntüsü ile uyumlu olarak, insan kaynaklı AM kaplanmış kültür yüzeylerinin gözenek çapı son derece düşük, fiber aralıkları dar ve sıkı konumlanmış bir yapıdan oluştuğu gözlemlenmiştir. İnsan kaynaklı TZF ile kaplanmış kültür yüzeylerinin ise AM kaplanmış yüzeylere göre gözenek çapı daha geniş, fiber aralıkları geniş ve gevşek konumlanmış bir yapıdan oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.2). Her iki biyomalzemenin tamamı incelendiğinde homojen olmayan dağılımın olduğu dikkat çekmiştir.



Şekil 3.2. İnsan kaynaklı amniyotik membran ve trombositten zengin fibrin'in aynı büyütmede (1000 X) SEM görüntüleri: (a) amniyotik membran, (b) trombositten zengin fibrin.

### 3.1.3. *In Vitro* Salım Çalışmaları

Kültür yüzeylerinin kaplanmasında kullanılan donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ve 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryalleri ile modifiye besleyici ortam oluşturulmasında kullanılan taze AM ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryallerinin EGF, VEGF-A ve TGF- $\beta$  için salım profilleri *in vitro* salım çalışmaları ile analiz edilmiştir. Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen EGF salım profili Şekil 3.3'te görülmektedir. Taze AM'den salınan EGF miktarı kitin tespit edebileceği değer aralığının altında kaldığından grafikte negatif değerler olarak gösterilmiştir. Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM, 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryalleri karşılaştırıldığında ise gün bazında ve kümülatif sonuçlarda en yüksek EGF konsantrasyonuna sahip materyalin 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF olduğu görülmektedir. Her bir biyomateryalden ortama salınan günlük ortalama kümülatif EGF konsantrasyonu ve standart sapma değerleri ise Çizelge 3.1'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.



Şekil 3.3. Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen EGF kümülatif salım profili.

Çizelge 3.1. Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen EGF kümülatif salım değerleri.

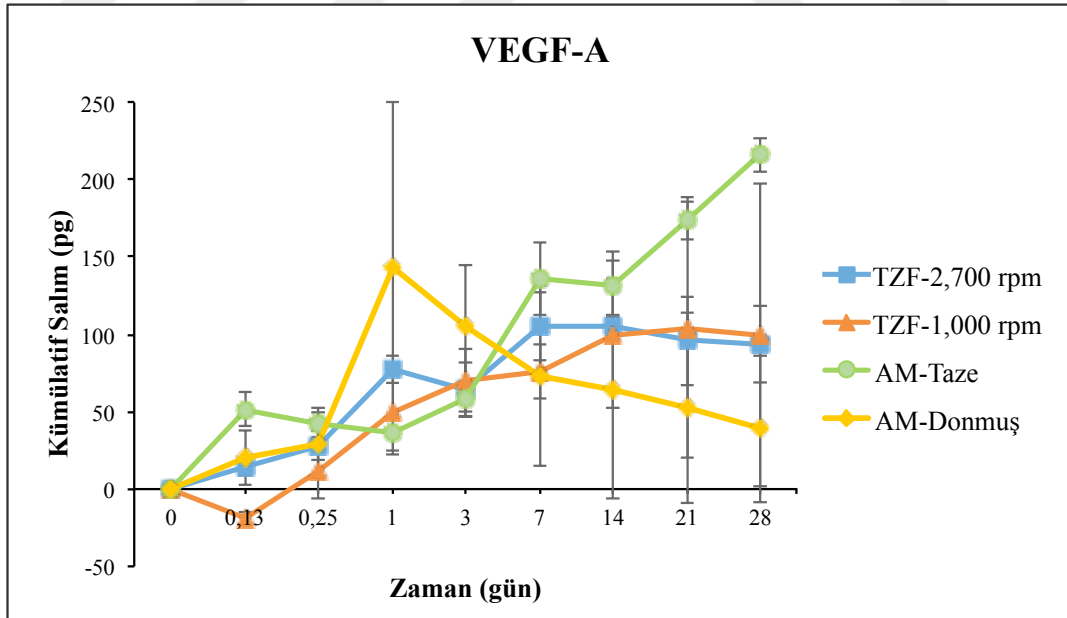
GÜN	BİYOMATERYAL							
	TZF-2,700 rpm		TZF-1,000 rpm		AM-Taze		AM-Donmuş	
	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama*	SS
	pg/ml							
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,13	1056,9	224,6	180,8	30,7	40,5	11,3	-10,2	3,5
0,25	1376,9	242,2	616,7	151,7	52,3	41,3	-10,1	4,1
1	1802,3	203,2	897,1	87,9	83,2	52	-5,2	7,8
3	2316,3	171,5	921,1	83,9	149,7	85,2	-9,3	7,3
7	2535,4	235,2	1177,2	75	182,4	64,2	-15	6,1
14	2728,1	208,6	1243	44,5	203,6	49,1	-14,5	6,4
21	2533	84,1	1461,3	65,9	234,8	48,4	-20,5	4,8
28	2647,3	92,2	1593	70	257,8	51,2	-22,5	4,9

TZF-2,700 rpm: 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin, TZF-1,000 rpm: 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin, AM-Taze: taze amniyotik membran, AM-Donmuş: donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş amniyotik membran, SS: standart sapma, pg: pikogram.

\*Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş amniyotik membran için konsantrasyon değerleri tespit edilebilir sınıra altında olduğundan negatif olarak gösterilmiştir.

Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen VEGF-A kümülatif salım profili değerlendirildiğinde 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış

TZF için 3. sa konsantrasyon değeri kitin tespit edebileceği aralığın altında kaldığından negatif değer olarak sunulmuştur. Bunun haricinde analiz edilen tüm biyomateryaller için 28 günlük takipte negatif değer tespit edilmemiştir. İlk 6 saatlik sürede ve 7. günden itibaren taze AM'nin en yüksek ortalama konsantrasyon değerlerine sahip olduğu gözlenmiştir. Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM'nin ise 0-1 gün arasında ortalama kümülatif salım konsantrasyonları en yüksek değerlere ulaşmış, akabinde 28. güne kadar değerlerde düşme saptanmıştır. Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM'nin EGF salım profilinde kitin tespit edebileceği aralığın altında ve sabit bir konsantrasyon sergilemesine rağmen VEGF-A için ani patlama etkisine benzer şekilde önce hızlı bir salım göstermesi ve akabinde konsantrasyon değerlerinde hızlı bir düşme olması VEGF-A'nın özellikleri ve ortamdaki kararlılığının düşük olmasına bağlanabilir. Trombositten zengin fibrin biyomateryalleri açısından 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF arasında 6. saatten itibaren benzer bir kümülatif salım profili gözlenmiştir. Çizelge 3.2'de her bir biyomateryalden ortama salınan ortalama kümülatif VEGF-A konsantrasyonu ve standart sapma değerleri ayrıntılı olarak verilmiş, karşılaştırmanın daha net anlaşılabilceği Şekil 3.4'te ise grafik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.4. Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen VEGF-A kümülatif salım profili.



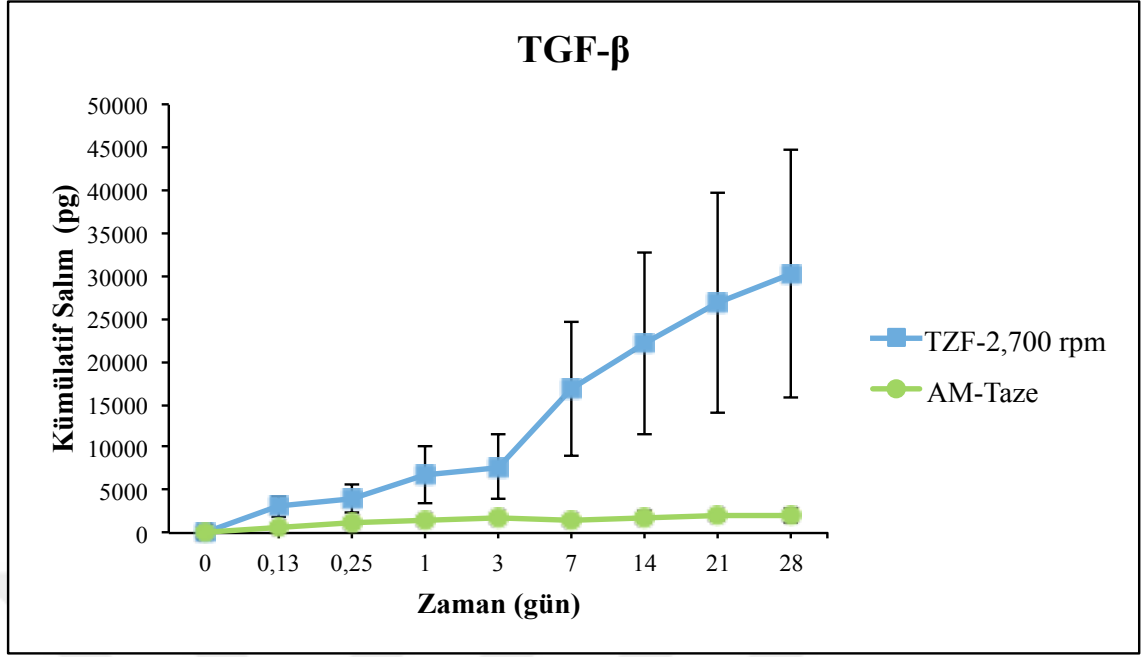
Çizelge 3.2. Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen VEGF-A kümülatif salım değerleri.

GÜN	BİYOMATERYAL							
	TZF-2,700 rpm		TZF-1,000 rpm		AM-Taze		AM-Donmuş	
	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS
pg/ml								
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,13	14,3	5,3	-18,7*	4,0	51,5	11,1	19,9	17,5
0,25	27,9	9,6	11,1	17,6	42,7	9,1	28,7	21,5
1	77,2	9,1	50,1	27,7	36,6	11,7	143,5	106,6
3	64,4	17,2	70,2	20,1	57,8	11,2	105,8	38,4
7	105,4	22,3	76,1	17,5	135,7	23,5	73,3	58,3
14	104,9	7,9	99,6	47,8	132,2	21,6	64,5	70,9
21	95,8	28,7	104,1	84,4	173,6	12,2	52,1	61,2
28	93,5	24,5	99,6	97,8	216,2	11,0	39,1	47,5

TZF-2,700 rpm: 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin, TZF-1,000 rpm: 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin, AM-Taze: taze amniyotik membran, AM-Donmuş: donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş amniyotik membran, SS: standart sapma, pg: pikogram.

\*1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin için 3. saat konsantrasyon değerleri tespit edilebilir sınırın altında olduğundan negatif olarak gösterilmiştir.

Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  açısından çalışılan 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF'nin ortalama kümülatif salım konsantrasyonunun 3. günden sonra artış gösterdiği görülmüştür. Taze AM için ise 28 günlük süreç boyunca salım kinetiğinin sabit ilerlediği görülmektedir. Taze AM ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF'nin ortalama kümülatif salım konsantrasyonları ve standart sapma değerleri Çizelge 3.3'te ayrıntılı olarak sunulmuştur. Her iki biyomateryale ait salım profili ayrıca Şekil 3.4'te grafik olarak verilmiştir.



Şekil 3.5. Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen TGF- $\beta$  kümülatif salım profili.

Çizelge 3.3. Yirmisekiz günlük takip süresi boyunca alınan örneklerden elde edilen TGF- $\beta$  kümülatif salım değerleri.

GÜN	BİYOMATERYAL			
	TZF-2,700 rpm		AM-Taze	
	Ortalama	SS	Ortalama	SS
	pg/ml			
0	0	0	0	0
0,13	3098,2	1213	750,1	66,3
0,25	4053,3	1652,5	1129,7	126,7
1	6843,9	3360,3	1468,8	248,7
3	7756,3	3784,9	1743,9	210,9
7	16744,7	7777,1	1541,5	321,0
14	22051,2	10582,4	1900,1	641,3
21	26862,6	12936,7	1925,7	497,0
28	30336,9	14508,9	2043,2	854,7

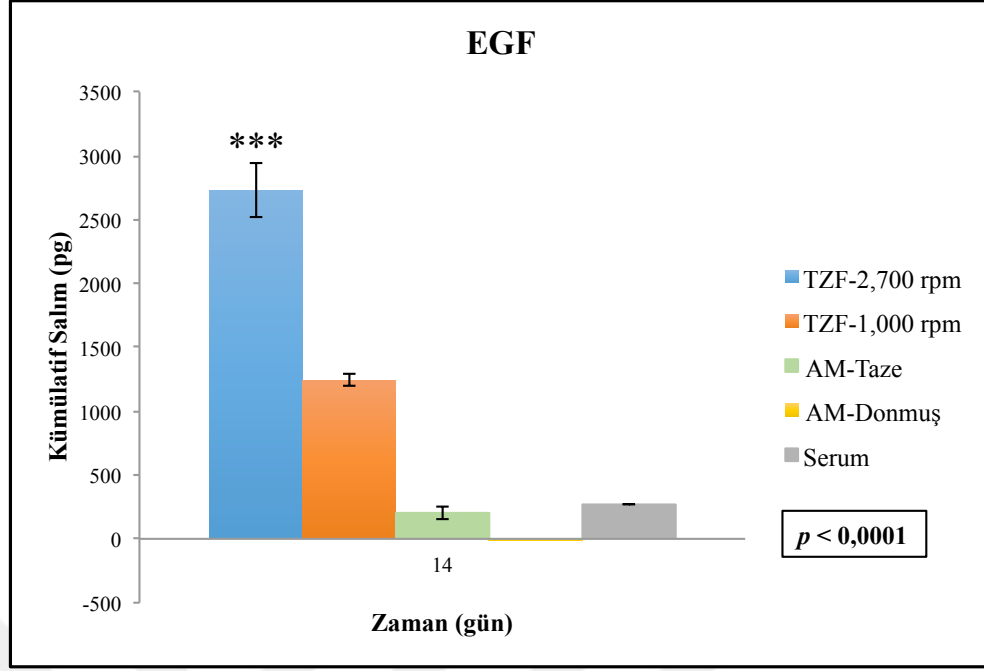
TZF-2,700 rpm: 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış trombositten zengin fibrin, AM-Taze: taze amniyotik membran, SS: standart sapma, pg: pikogram.

Sunulan tez çalışmasında modifiye besleyici ortam hazırlanmasında kullanılan taze AM ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF'lerden 14. gün sonunda besi ortamı toplanarak hücreler üzerinde kullanıldığından ve her bir çalışma grubunda toplam 14 günlük kültür süresi uygulandığından *in vitro* kümülatif salım profilleri karşılaştırılan her bir biyomateryal için ayrıca 14. gün toplam salım miktarları arasında karşılaştırma yapılmıştır. Son olarak 4 farklı gönüllüden 3'er paralel olacak şekilde muhafaza edilen insan kan serumu örneklerinden tek seferde bakılan büyüme faktörü konsantrasyonları hesaplanmıştır.

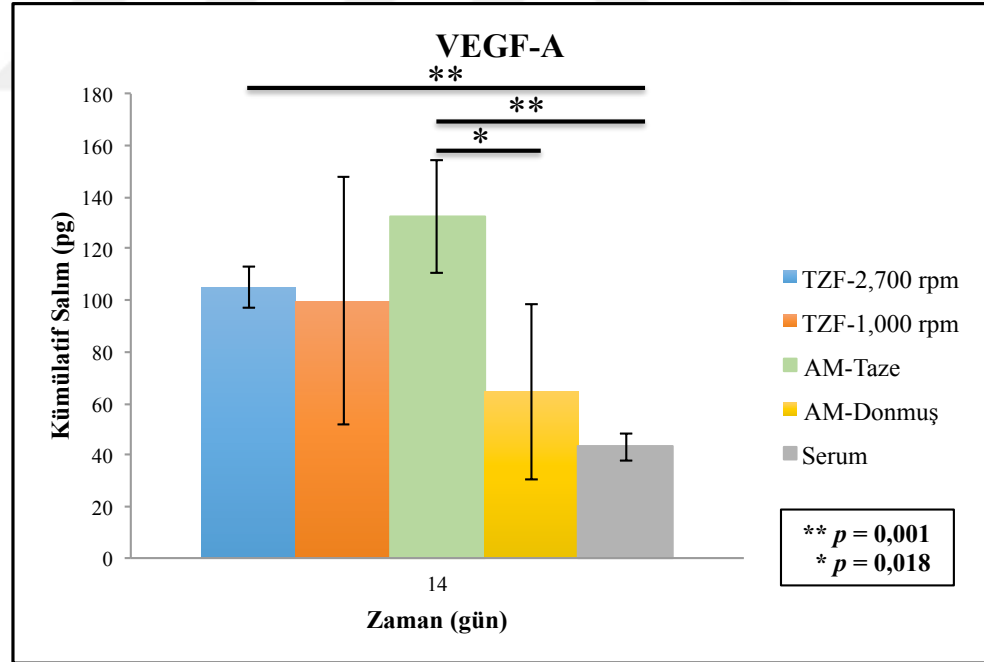
On dördüncü gün sonunda çalışmada karşılaştırılan her bir biyomateryalin kümülatif salım miktarları ile insan kan serumunun tek seferde bakılan büyüme faktör konsantrasyonu karşılaştırıldığında;

- Epidermal büyüme faktörü için en yüksek konsantrasyon  $2728,1 \pm 208,6$  pg/ml olarak 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF'ye aittir (Şekil 3.6).
- Vasküler endotel büyüme faktörü-A için en yüksek konsantrasyon  $132,2 \pm 21,6$  pg/ml olarak taze AM'ye aittir (Şekil 3.7).
- Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  için en yüksek konsantrasyon  $22051,2 \pm 10582,4$  pg/ml olarak 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF'ye aittir (Şekil 3.8).

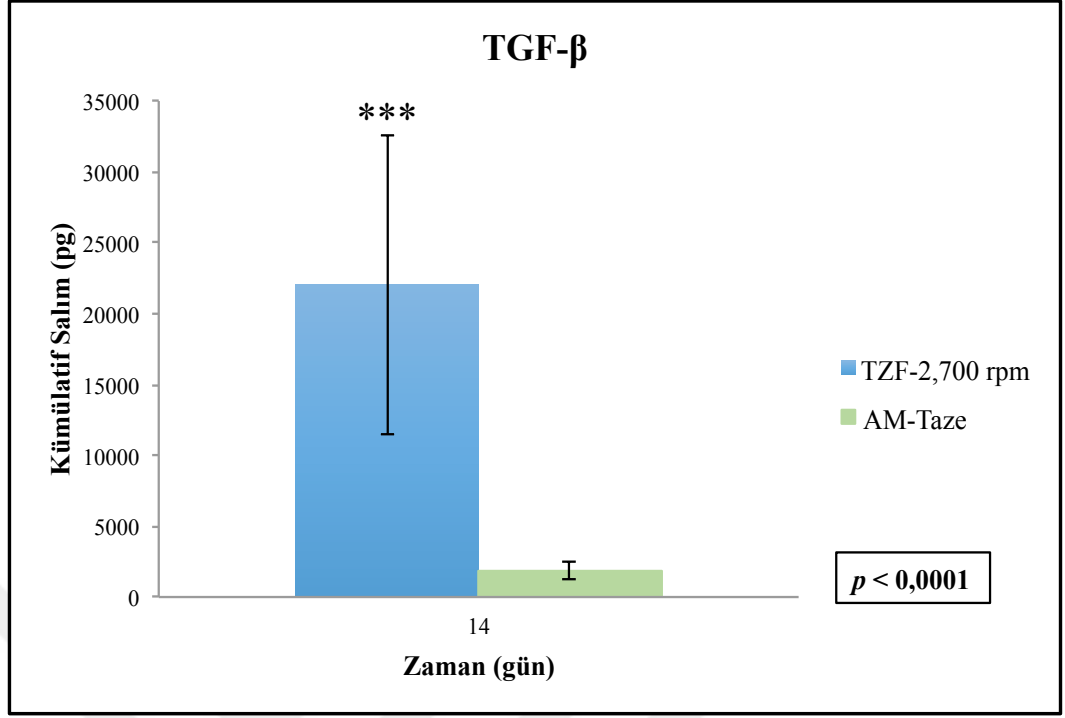
On dördüncü gün sonunda çalışmada karşılaştırılan her bir biyomateryalin büyüme faktörleri açısından kümülatif salım miktarları ile insan kan serumunun tek seferde bakılan büyüme faktör konsantrasyonunu karşılaştırılan grafikler Şekil 3.6, Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de sunulmuştur.



Şekil 3.6. Tüm örneklerde 14. güne ait toplam salınan ortalama EGF miktarı. (Serum için salım çalışması yapılmamış, tek seferde bakılan örneklerden konsantrasyon hesabı yapılmıştır).



Şekil 3.7. Tüm örneklerde 14. güne ait toplam salınan ortalama VEGF-A miktarı. (Serum için salım çalışması yapılmamış, tek seferde bakılan örneklerden konsantrasyon hesabı yapılmıştır).



Şekil 3.8. Örneklerde 14. güne ait toplam salınan ortalama TGF- $\beta$  miktarı.

### 3.2. Kadavra ve Gönüllülere Ait Demografik Veriler

#### 3.2.1. Kadavralara Ait Demografik Veriler

Sunulan tez çalışmasında toplam 32 adet donör olma şartlarını karşılayan kadavradan elde edilen limbal halkalar kullanılmıştır. Donör olmaya uygunluk kriterleri;

- 18-75 yaş aralığında olan
- Ölüm sebebi biliniyor olan
- Seroloji taramasında HIV, HbsAg, sifiliz ve HCV negatif olan
- Bulaşıcı bir sistemik ve/veya göz hastalığına sahip olmayan
- Bilinen kanser öyküsü olmayan

kişiler olarak belirlenmiştir. Bu şartları karşılayan toplam 32 adet kadavradan kornea nakillerinde kullanılmak üzere elde edilen kornea-skleral rimlerden santral 8 mm'lik saydam korneanın çıkarılması sonucu geriye kalan limbal halkalar deneysel çalışmalarda LEKH'lerin elde edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Laboratuvar ortamına nakledilen tüm limbal halkalar rastgele olarak çalışma gruplarına ayrıştırılmış ve gereç-yöntem bölümünde de bahsedildiği üzere 6 eşit parçaya ayrılmıştır. Bu şekilde her gruba ayrılan limbal halka sayısı 8 olmakla birlikte, limbal halkaların 6 eşit parçaya ayrılması ile her grup için çalışılan kültür yüzeyi sayısı 48'e çıkmıştır.

Gereç-yöntem kısmında belirtildiği şekilde deneysel çalışmalarda toplam 4 grup bulunmaktadır. Gruplara rastgele dağıtılan limbal dokuların ait olduğu kadavrular yaş ve cinsiyet açısından karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir. Grup 1 için ortalama yaş  $62,7 \pm 4,7$  yıl; Grup 2 için ortalama yaş  $61,6 \pm 3,5$  yıl; Grup 3 için ortalama yaş  $59,6 \pm 7,5$  yıl; Grup 4 için ortalama yaş  $61,6 \pm 2,6$  yıl olarak tespit edilmiştir ( $p > 0,05$ ). Grup 1’de bulunan 8 kadavrada kadın/erkek oranı eşitken, Grup 2’de 3 kadın, 5 erkek, Grup 3 ve Grup 4’te 5 kadın, 3 erkek bulunmaktadır ( $p > 0,05$ ).

Kadavruların ölüm zamanından limbal dokuların *in vitro* şartlarda kültüre alınmasına kadar geçen süre tüm gruplarda tüm kadavrular için kaydedilmiştir. Grup 1 için bu süre ortalama  $2,5 \pm 0,5$  gün, Grup 2 için ortalama  $2,6 \pm 0,5$  gün, Grup 3 için ortalama  $3,1 \pm 1,1$  gün ve Grup 4 için ortalama  $2,4 \pm 0,5$  gün olarak bulunmuştur. Kadavruların ölüm zamanı ile kültür arası geçen zaman dilimi gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemiştir ( $p > 0,05$ ).

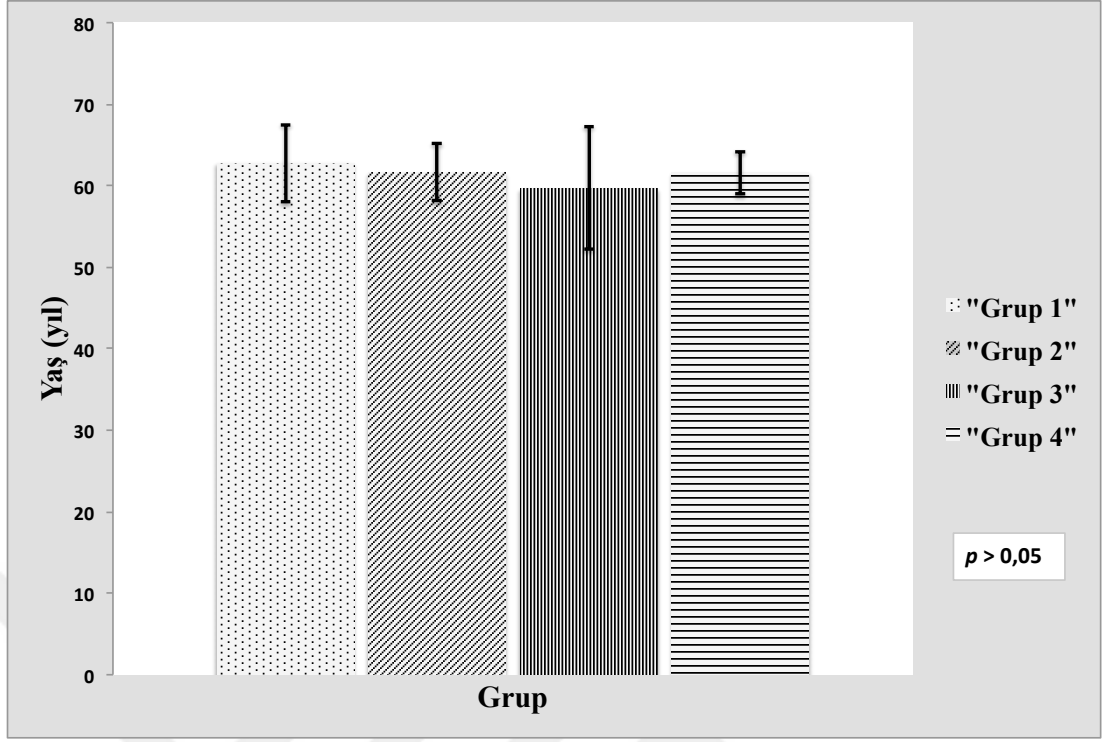
Kadavralara ait yaş ve cinsiyet verileri ile kadavruların ölüm zamanından limbal dokuların kültüre alınmasına kadar geçen sürenin gruplar arasında anlamlı bir fark sergilememesi çalışmaya kabul edilen ve gruplara rastgele dağıtılan limbal dokulardan LEKH elde etmek açısından potansiyellerinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Bu şekilde ilerleyen aşamada sunulan deneysel sonuçların kadavruların başlangıçta sergiledikleri temel farklılıklardan etkilenmeyeceği sonucuna ulaşılabilir.

Kadavralara ait demografik bilgiler ve kadavra-kültür arası geçen süre Çizelge 3.4’te özetlenmiş olup, istatistiksel karşılaştırmaların yapıldığı grafikler Şekil 3.9 ve Şekil 3.10’da gösterilmiştir.

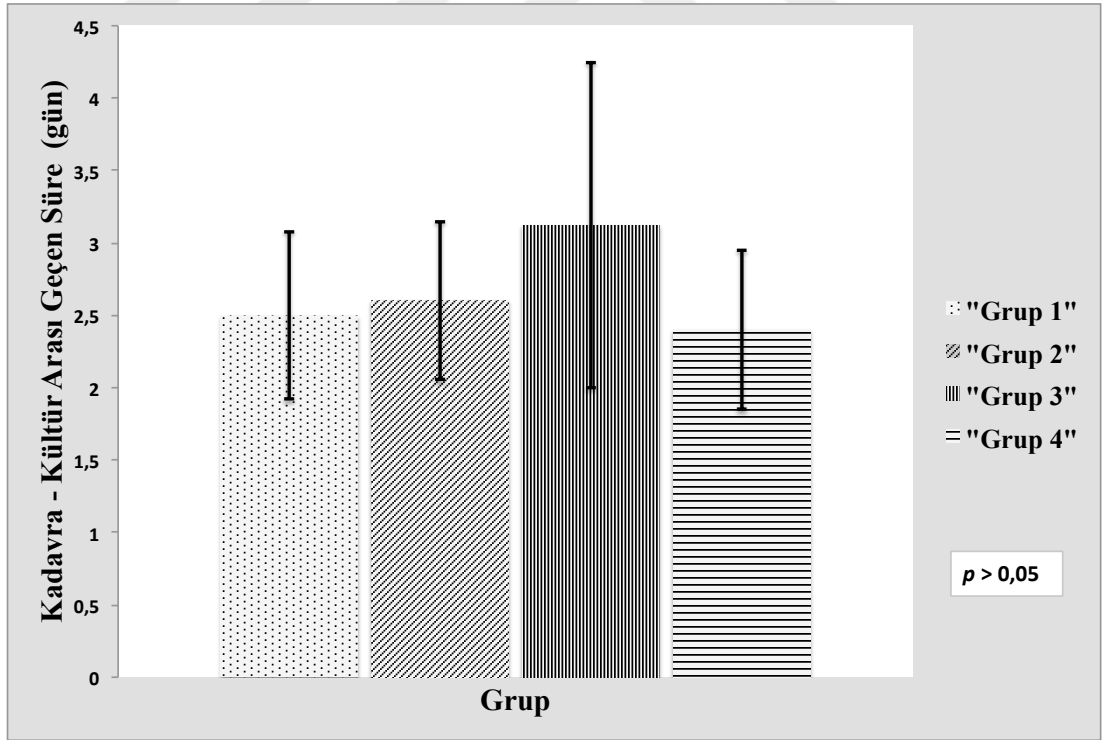
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan kadavruların ortalama yaş ve kültüre alınma süreleri.

Özellik		Grup 1 (n=8)		Grup 2 (n=8)		Grup 3 (n=8)		Grup 4 (n=8)	
		Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS
Yaş	yıl	62,7	4,7	61,6	3,5	59,6	7,5	61,6	2,6
Kadavra- Kültür arası geçen süre	gün	2,5	0,5	2,6	0,5	3,1	1,1	2,4	0,5

SS: standart sapma



Şekil 3.9. Çalışma gruplarında kadvraların yaş ortalamalarının karşılaştırılması.



Şekil 3.10. Çalışma gruplarında kadavra-kültür arası geçen zaman ortalamalarının karşılaştırılması.

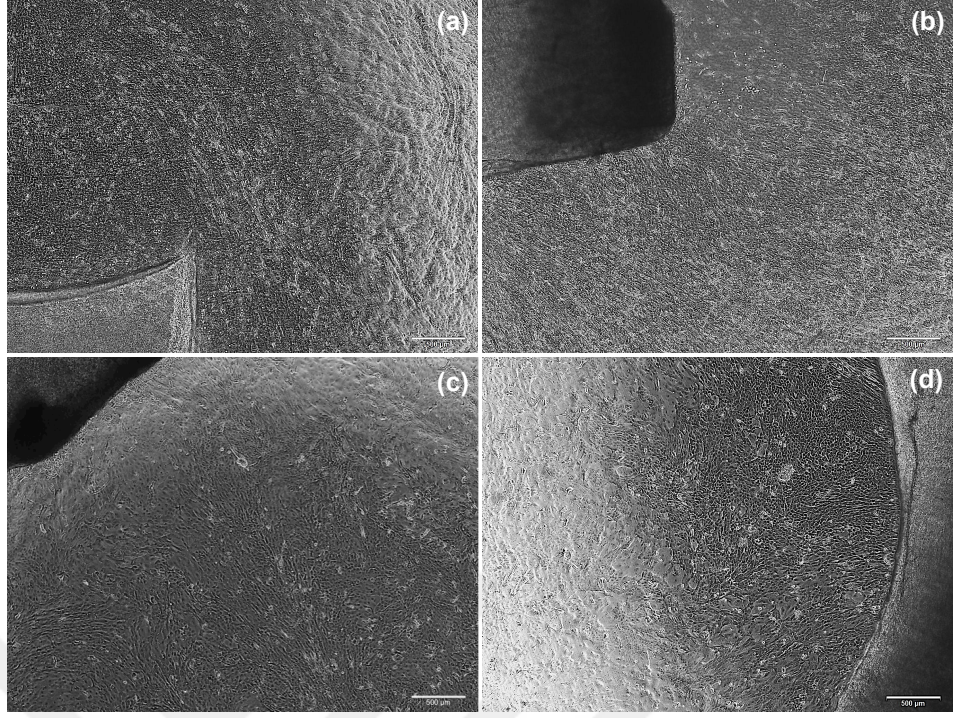
### 3.2.2. Gönüllülere Ait Demografik Veriler

Kültür yüzeylerinin kaplanması için kullanılan donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM ve 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryalleri, modifiye besleyici ortam oluşturulmasında kullanılan taze AM ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF biyomateryallerinin ve insan kan serumunun hazırlanmasında toplam 8 adet gönüllü kullanılmıştır. Donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş ve taze olarak kullanılan AM'lerin hazırlanmasında 4 tane kadın gönüllü kullanılmıştır. Bu 4 bayan gönüllünün yaş ortalaması  $24,2 \pm 2,2$  yıl olarak hesaplanmıştır. Bu gönüllülerden elde edilen AM'ler gereç ve yöntem kısmında belirtildiği üzere parçalara ayrıldıktan sonra *in vitro* salım çalışmasında ve hücre kültür deneylerinde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir. İnsan kan serumu, 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF ve 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış TZF'lerin hazırlanmasında ise 2 kadın ve 2 erkek toplam 4 gönüllü daha kullanılmıştır. Bayan hastaların yaş ortalaması  $27,5 \pm 4,9$  yıl olarak hesaplanmıştır. Erkek hastaların yaş ortalaması ise  $28 \pm 7$  yıl olarak hesaplanmıştır. Hazırlanan tüm materyaller için kadın/erkek dağılımı ve yaş açısından istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ( $p > 0,05$ ).

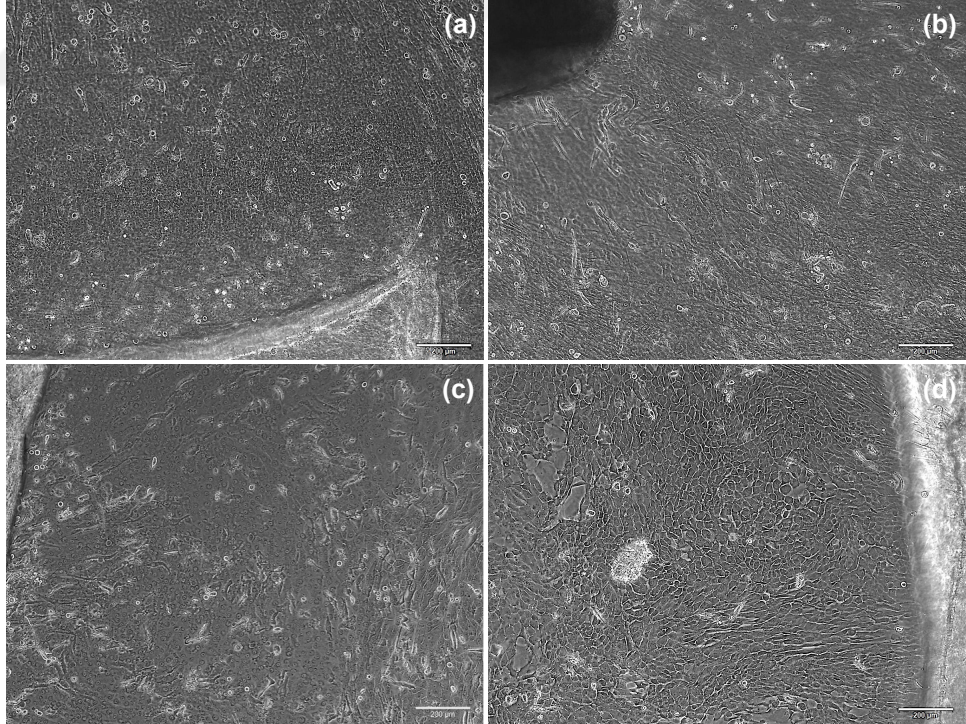
### 3.3. Limbal Eksplantlardan Hücre Migrasyonunun Değerlendirilmesi

Her grupta limbal dokular kültür yüzeyine yerleştirildikten sonra hücrelerin migrasyonunu gözlemek amacıyla 0., 3., 7. ve 14. günlerde faz kontrast mikroskobu ile görüntüleri alınmıştır. Ayrıca Juli<sup>TM</sup> canlı hücre görüntüleme sistemi ile kültürün ilk gününden itibaren hücre migrasyonu gözlenmiştir. Migrasyona uğrayan hücrelerin morfolojisi herhangi bir boyama yapılmadan faz kontrast mikroskobu ile değerlendirildiğinde tüm gruplarda öncelikle küçük, yuvarlak nükleuslu, nükleus/sitoplazma oranı yüksek hücrelerin varlığı dikkat çekmiştir. Kültürün ilerleyen günlerinde ise migrasyona uğrayan hücre kolonilerinin uç noktalarında hücrelerin büyüdüğü, nükleus/sitoplazma oranının azaldığı ve hücrelerin kaldırım taşı morfolojisi kazandığı gözlenmiştir. Şekil 3.11'de ve Şekil 3.12'de her grubun farklı büyütmelerde limbal eksplanta yakın bölgelerden 14. günde alınmış görüntüleri sunulmuştur.





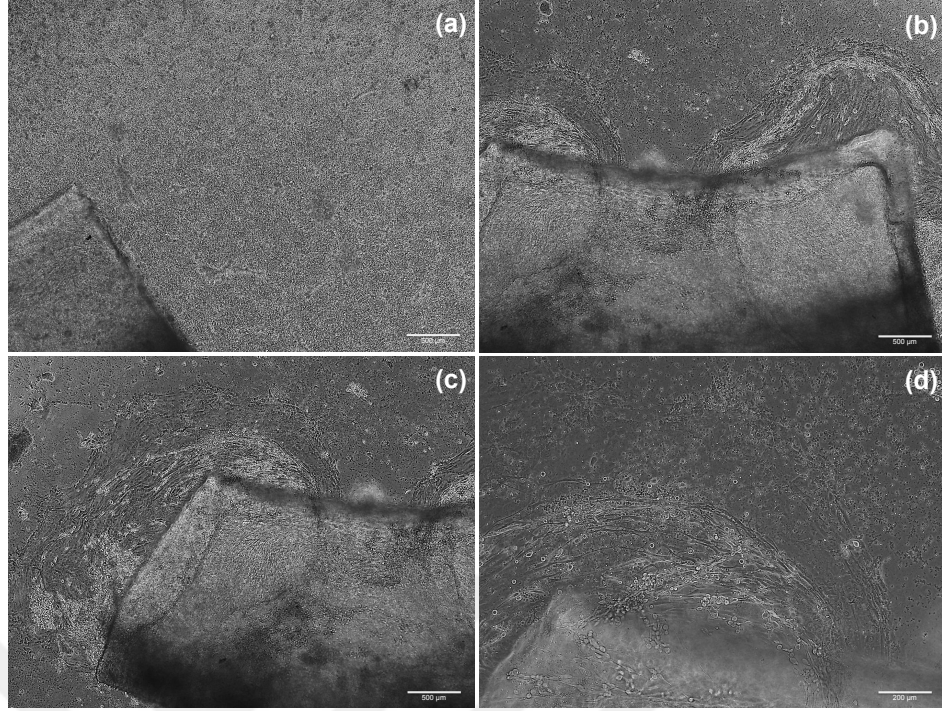
Şekil 3.11. Kültürün 14. gününde çalışma gruplarında aynı büyütmeye (4X - bar 500 µm) faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4.



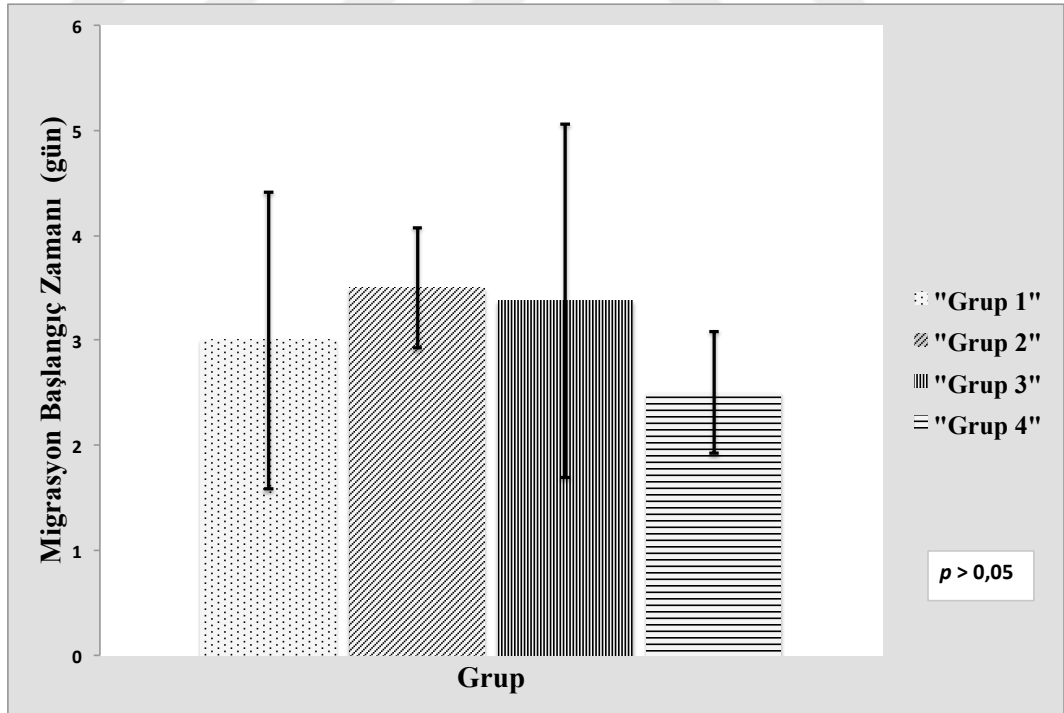
Şekil 3.12. Kültürün 14. gününde çalışma gruplarında aynı büyütmeye (10X - bar 200 µm) faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4.

Kültür yüzeylerinin 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF ile kaplandığı gruplarda (Grup 3 ve Grup 4) hücre migrasyonu ile eş zamanlı seyreden fibrin yıkımı dikkat çekmiştir. Juli™ canlı hücre görüntüleme sistemi ile video görüntüleri alınan fibrin yıkımının ayrıca faz kontrast mikroskop ile 0. ve 3. günlerde farklı büyütmelelerde görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.13'te, Grup 3'te kültürün ilk günlerinde alınan ve limbal eksplantlardan hücre migrasyonu ile birlikte yüzeydeki fibrin kaplamasının yıkıldığını gösteren görüntüler yer almaktadır. Hücre migrasyonunun başlangıcı ile birlikte yıkılmaya başlayan yüzeydeki fibrin kaplamadan açığa çıkan trombositler limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerden farklı olarak daha küçük, yuvarlak ve yüzeye tutunmayan karakterleri ile dikkat çekmiştir. Yıkım ile birlikte açığa çıkan bu trombositlerin kültürün farklı günlerinde yer yer toplanmalar göstererek *in vivo* şartlarda sergilemekte olduğu doğal agregasyon özelliğini devam ettirmeye çalıştığı gözlenmiştir. Ancak bu durum *in vitro* kültür şartlarında uzun süre varlığını sürdüremeyen trombositlerin bir süre sonra yıkılmaya başlaması ve ortamdan tamamen temizlenmesiyle son bulmaktadır. Bu sayede trombositler içerdiği büyüme faktörlerinin bir çoğunu degranülasyonla salarak ortamdan uzaklaşıp migrasyona uğrayan hücrelerin önünde bir engel oluşturmaktan kaçınmış olurlar.

Hücre migrasyonunun ortalama kaçınıcı günde başladığı değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Grup 1'de bu süre ortalama  $3\pm 1,4$  gün, Grup 2'de ortalama  $3,5\pm 0,5$  gün, Grup 3'de ortalama  $3,3\pm 1,6$  gün ve Grup 4'te ortalama  $2,5\pm 0,5$  gün olarak bulunmuştur. Grup 3 ve Grup 4 için fibrin yıkımının başlangıcı hücre migrasyonunun başlangıcı ile eş zamanlı seyrettiğinden ortalama fibrin yıkım zamanları da hücre migrasyonu için verilen ortalama değerler ile aynıdır. Şekil 3.14'te gruplar arasında hücre migrasyonunun karşılaştırılması grafik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.13. Grup 3'te kültürün ilk günlerinde hücre migrasyonunu ve fibrin yıkımını gösteren faz kontrast mikroskop görüntüleri: (a) 0. gün, (4X - bar 500 µm), (b) 3. gün, (4X - bar 500 µm), (c) 3. gün, (4X - bar 500 µm), (d) 3. gün, (10X - bar 200 µm).



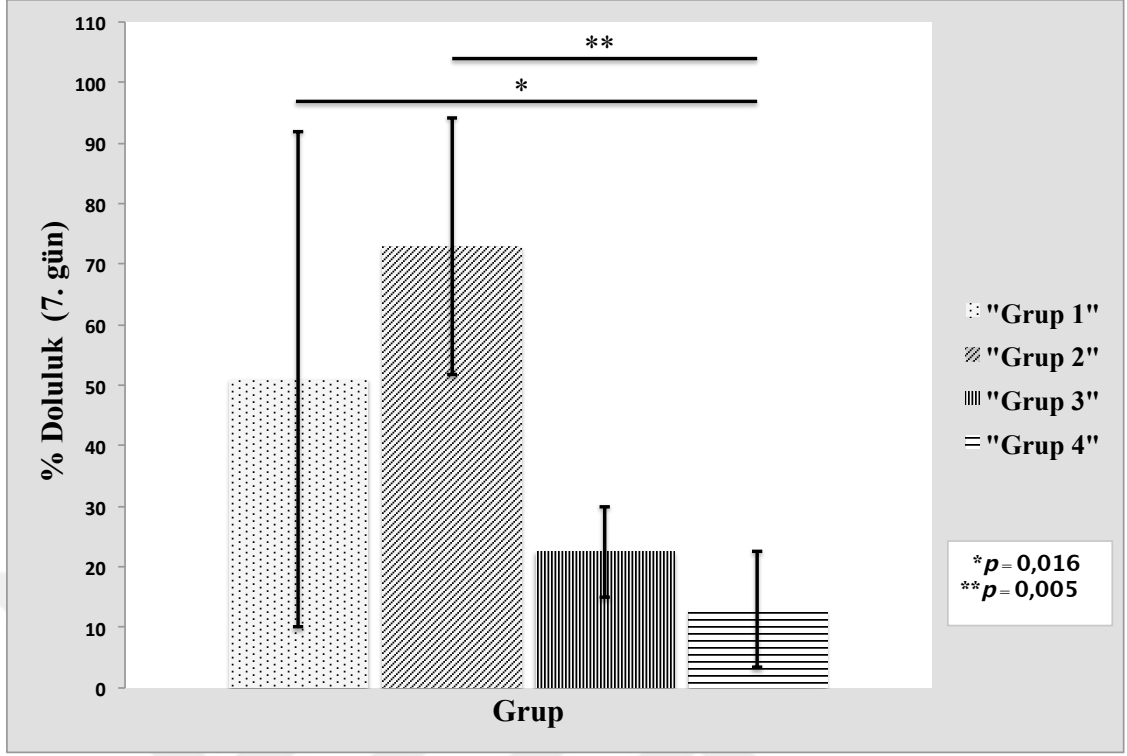
Şekil 3.14. Çalışma gruplarında ortalama hücre migrasyonu başlangıç zamanlarının karşılaştırılması.

Migrasyona başlayan hücrelerin tüm gruplarda 7. ve 14. günlerde kültür yüzeyinde oluşturdukları doluluk oranı faz kontrast mikroskobu ile bu günlerde alınan görüntülerden semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Kültür yüzeyinde migrasyona uğrayan hücre yoğunluğu yüzde olarak kaydedilmiş ve her bir limbal eksplantın sonuç ortalama yüzde doluluk oranı hesaplanmıştır. Kültürün 7. gününde Grup1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 için ortalama doluluk oranları sırasıyla %51±41, %73±21,2, %22,5±7,5 ve %13±9,5 olarak hesaplanmıştır. Grup 1 ve Grup 2’de 7. gün doluluk oranları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde Grup 3 ve Grup 4’e göre yüksektir (Grup 1 ve Grup 2 için *p* değerleri sırasıyla 0,016 ve 0,005). Kültürün 14. gününde ise Grup1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 için ortalama doluluk oranları sırasıyla %59,2±31,5, %73±21,2, %75,6±13,2 ve %60±21,3 olarak hesaplanmış ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (*p* > 0,05). Bu sonuçlar kültürün ilk haftasında yüzeyin AM ile kaplı olduğu gruplarda hücre migrasyonunun daha hızlı olduğunu, ikinci haftada ise fibrin kaplı yüzeylerde hücre migrasyonunun AM kaplı yüzeylerdeki migrasyon hızını yakalayıp bir miktar geçtiğini desteklemektedir. Gruplarda 7. ve 14. günlere ait kültür yüzeylerinin doluluk oranları Çizelge 3.5’te ayrıntılı olarak sunulmuş ve karşılaştırmalı grafikleri Şekil 3.15 ve Şekil 3.16’da verilmiştir.

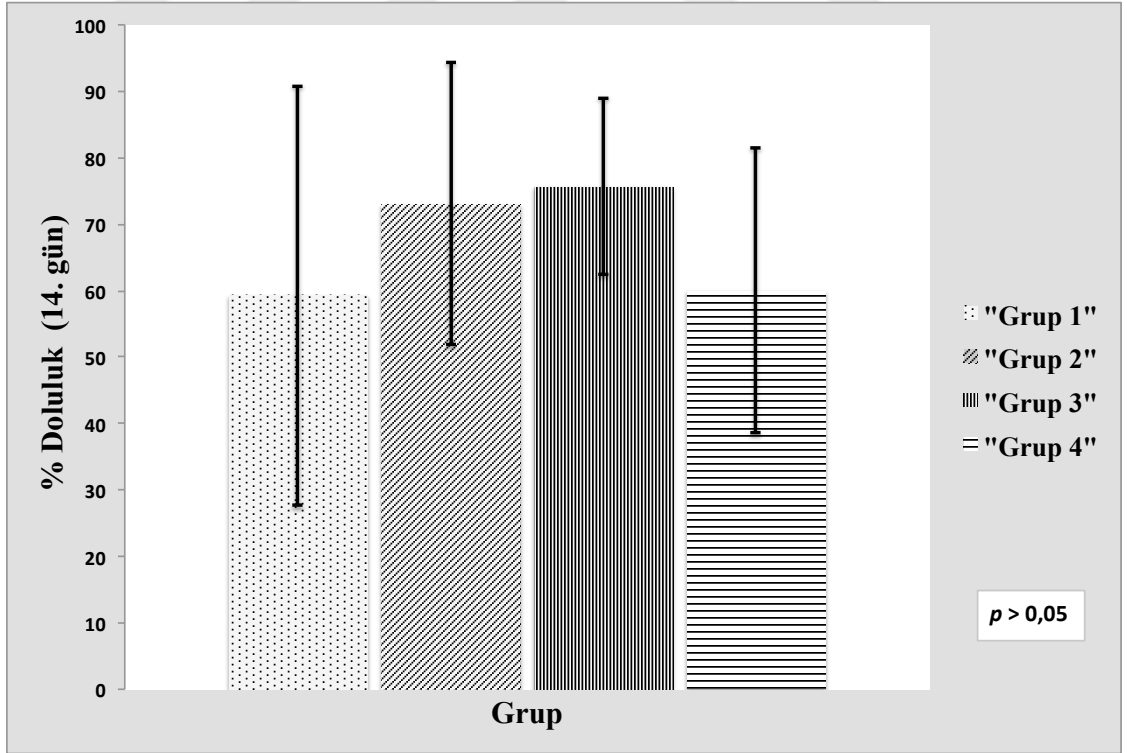
Çizelge 3.5. Çalışma gruplarında 7. ve 14. günde kültür yüzeylerinin ortalama hücre doluluk oranları.

Özellik		Grup 1 (n=8)		Grup 2 (n=8)		Grup 3 (n=8)		Grup 4 (n=8)	
		Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS
7. gün doluluk	%	51	41	73	21,2	22,5	7,5	13	9,5
14. gün doluluk	%	59,2	31,5	73	21,2	75,6	13,2	60	21,3

SS: standart sapma



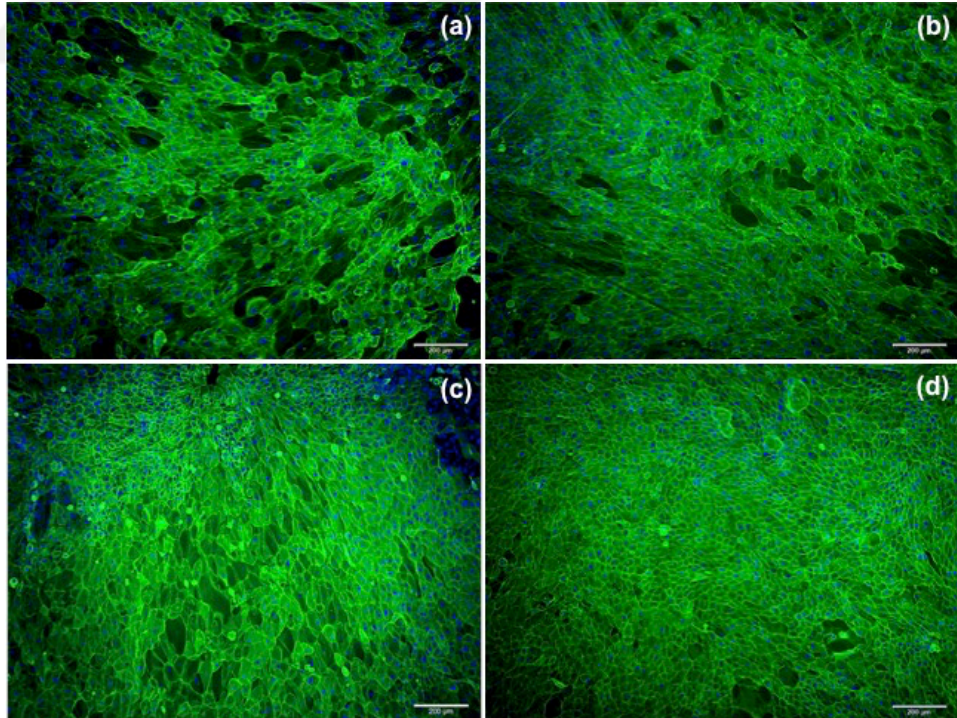
Şekil 3.15. Çalışma gruplarında 7. günde ortalama kültür yüzeyi hücre doluluk oranlarının karşılaştırılması.



Şekil 3.16. Çalışma gruplarında 14. günde ortalama kültür yüzeyi hücre doluluk oranlarının karşılaştırılması.

### 3.4. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Morfolojinin Değerlendirilmesi

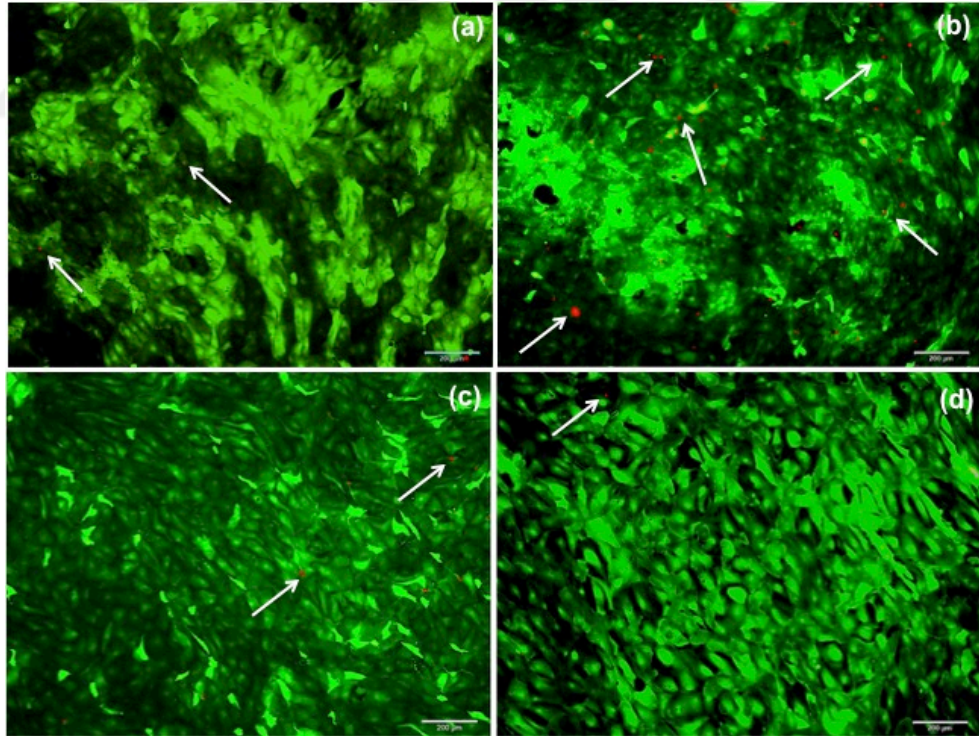
Tüm gruplarda kültürün 14. gününde doluluğa ulaşan kültür yüzeylerinde hücre morfolojisinin daha net anlaşılabilmesi için hücre iskeleti ve çekirdek boyanarak flöresan mikroskop ile görüntüleri alınmıştır. Faz kontrast mikroskop görüntüleri ile uyumlu olarak limbal eksplantlara yakın bölgelerde küçük, yuvarlak nükleuslu, nükleus/sitoplazma oranı yüksek hücrelerin varlığı dikkat çekmiştir. Şekil 3.17’de gruplarda 14. güne ait hücre iskeleti/çekirdek boyama görüntüleri yer almaktadır. Hücre iskeletinin yeşil, çekirdeğin ise mavi olarak boyandığı görüntülerde Grup 1’de yoğunluğu düşük epitel morfolojisinde hücrelerden oluşan tabakalı bir yapı gözlenmiştir. Grup 2’de doluluk oranının Grup 1’e göre biraz daha yüksek olduğu gözlenmiş ve Grup 1’e benzer şekilde üstüste gelen epitel morfolojisinde hücre tabakalarının varlığı dikkat çekmiştir. Grup 2’de yer yer morfolojisi epitelden daha farklı ince ve uzun fibroblastik hücrelerin varlığı gözlenmiştir. Şekil 13.17(b)’de sol üst köşede bu farklı morfolojideki hücrelerin varlığı gözlemlenmektedir. Grup 3 ve Grup 4’te ise Grup 1 ve Grup 2’ye oranla daha homojen ve küçük, daha az katmanlı (tek sıra) epitel morfolojisinde hücre tabakasının varlığı gözlenmiştir.



Şekil 3.17. Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmede (10X - bar 200 µm) hücre iskeleti/çekirdek boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (Hücre iskeleti yeşil, çekirdek mavi renkte görülmektedir).

### 3.5. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Canlılığın Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda kültürün 14. gününde doluluğa ulaşan kültür yüzeylerinde hücre canlılığının değerlendirilebilmesi için canlı ve ölü hücreler boyanarak flöresan mikroskop ile görüntüleri alınmıştır. Şekil 3.18’de gruplarda 14. güne ait canlı-ölü boyama görüntüleri yer almaktadır. Canlı hücrelerin yeşil, ölü hücrelerin ise kırmızı olarak boyandığı görüntülerde Grup 2’de diğer gruplara oranla ölü hücre oranının fazla olduğu dikkat çekmektedir. Hücre morfolojisinin değerlendirildiği hücre iskeleti/çekirdek boyama görüntüleri ile uyumlu olarak Grup 3 ve Grup 4’te Grup 1 ve Grup 2’ye kıyasla daha homojen ve tek sıra hücre dağılımının olduğu gözlenmiştir. Grup 1 ve Grup 2’de ise hücreler çok katmanlı olarak dizilmiş ve yer yer hücre kolonileri arasında boşlukların olduğu görülmüştür. Özellikle Grup 2’de diğer gruplara oranla fazla miktarda görülen ölü hücrelerin daha canlı hücrelerden oluşan yüzeyel katmanların derininde yerleşim gösterdiği de dikkat çeken diğer önemli noktadır. Bu sonuçlar ile *in vitro* şartlarda ve 2B kültür sistemleri ile kültüre edilen LEKH’lerin derinlik boyunca besin maddelerinin iletilmemesine bağlı ölüme gittiği düşünülebilir.



Şekil 3.18. Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmede (10X - bar 200 µm) canlı-ölü hücre boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (Canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı renkte görülmektedir, beyaz oklar kırmızı ile boyanan ölü hücrelere işaret etmektedir).

### **3.6. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Köklülüğün Kalitatif Değerlendirilmesi**

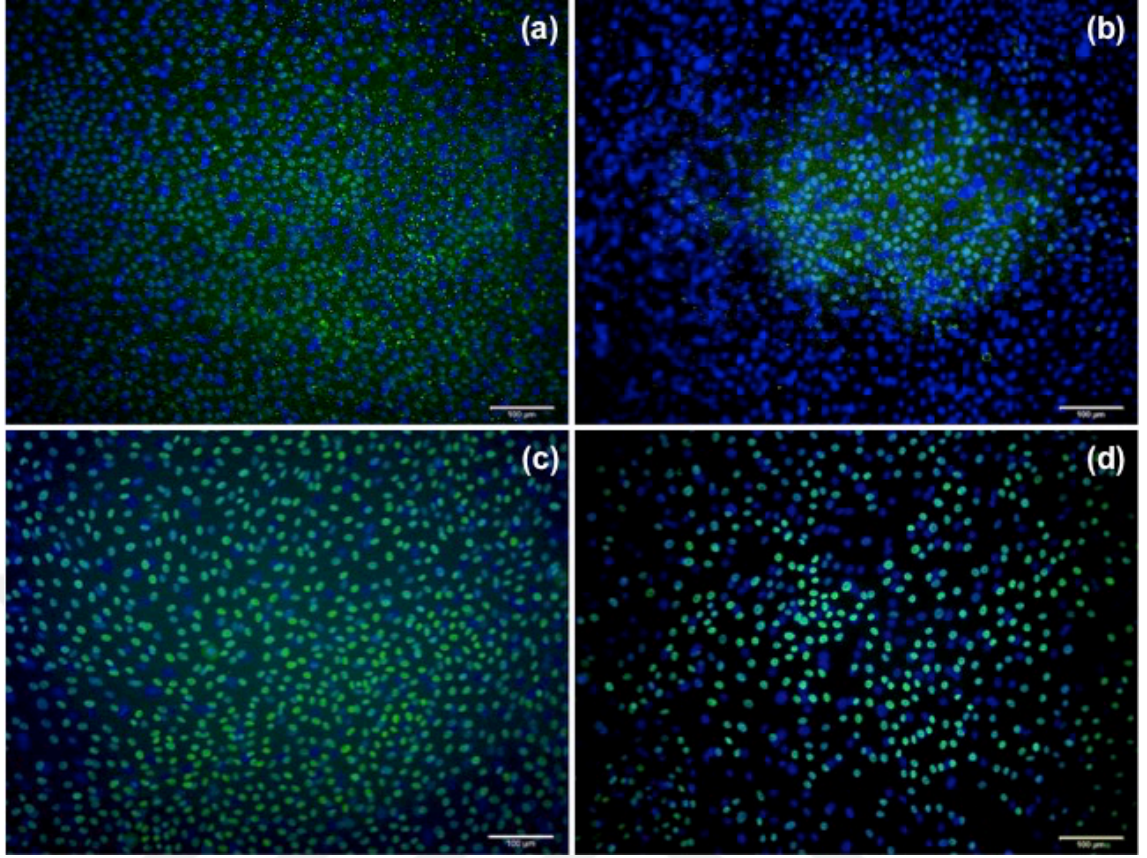
Tüm gruplarda kültürün 14. gününde doluluğa ulaşan kültür yüzeylerinde hücre köklülüğünün değerlendirilebilmesi amacıyla belirlenen pozitif ve negatif belirteçler ile immün boyamalar yapılarak flöresan mikroskop ile görüntüleri alınmıştır.

#### **3.6.1. p63 Boyama**

Limbale epitel kök hücreleri için pozitif bir belirteç olarak bilinen p63 nükleer proteininin limbale eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerde ifade oranını semikantitatif olarak gözlemlemek için p63 birincil antikoru ile boyamalar yapılmıştır. Tüm boyamalarda p63 ile eş zamanlı olarak DAPI ile hücre çekirdekleri de boyanmıştır. Bu şekilde aranan belirteçin ifade oranının haricinde hücre içindeki ifade bölgesi de belirlenmiş olmaktadır. Bu sonuçların literatürde bugüne kadar bilinen ifade bölgesi ile uyumluluğu da değerlendirilerek spesifik olmayan boyanmaların sebep olacağı yanlış değerlendirmelerin önüne geçilmiş olmaktadır. Şekil 3.19'da kültürün 14. gününde tüm gruplarda p63 boyamalarına ait görüntüler yer almaktadır. Hücre çekirdeğinin DAPI ile boyandığı bu görüntülerde p63 proteininin tüm gruplarda çekirdekte boyanmaya sebep olduğu ve DAPI'nin mavi rengi ile p63 boyamasının yeşil renginin buluşması sonucunda turkuaza yakın bir rengin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda gruplarda yapılan p63 immün boyamalarında spesifik olmayan boyanmaların gerçekleşmediği ve gruplar arası semikantitatif değerlendirmelerin optimum seviyede yapılabileceği sonucuna ulaşılabilir.

Grup 1 ve Grup 2'de altta halen var olan AM'nin immün boyamalarda flöresan özellik veren ikincil antikorun rengini bir miktar absorbe etmesi, görüntüyü bozmayacak oranda ard plan boyanmasına sebep olmuştur. Ard plan boyanmasının haricinde hücre çekirdeği ile boyut ve şekil bakımından uyumlu olacak şekilde p63 boyanan bölgeler değerlendirildiğinde Grup 1 ve Grup 2'de, Grup 3 ve Grup 4'e kıyasla daha düşük oranda boyanmanın var olduğu gözlenmiştir. Özellikle Grup 3'te hücrelerin büyük bir oranında p63 ile pozitif boyanma gerçekleşmiştir. Ayrıca, bu görüntülerde de hücre çekirdeğinin küçük ve yuvarlak olduğu görülmektedir.



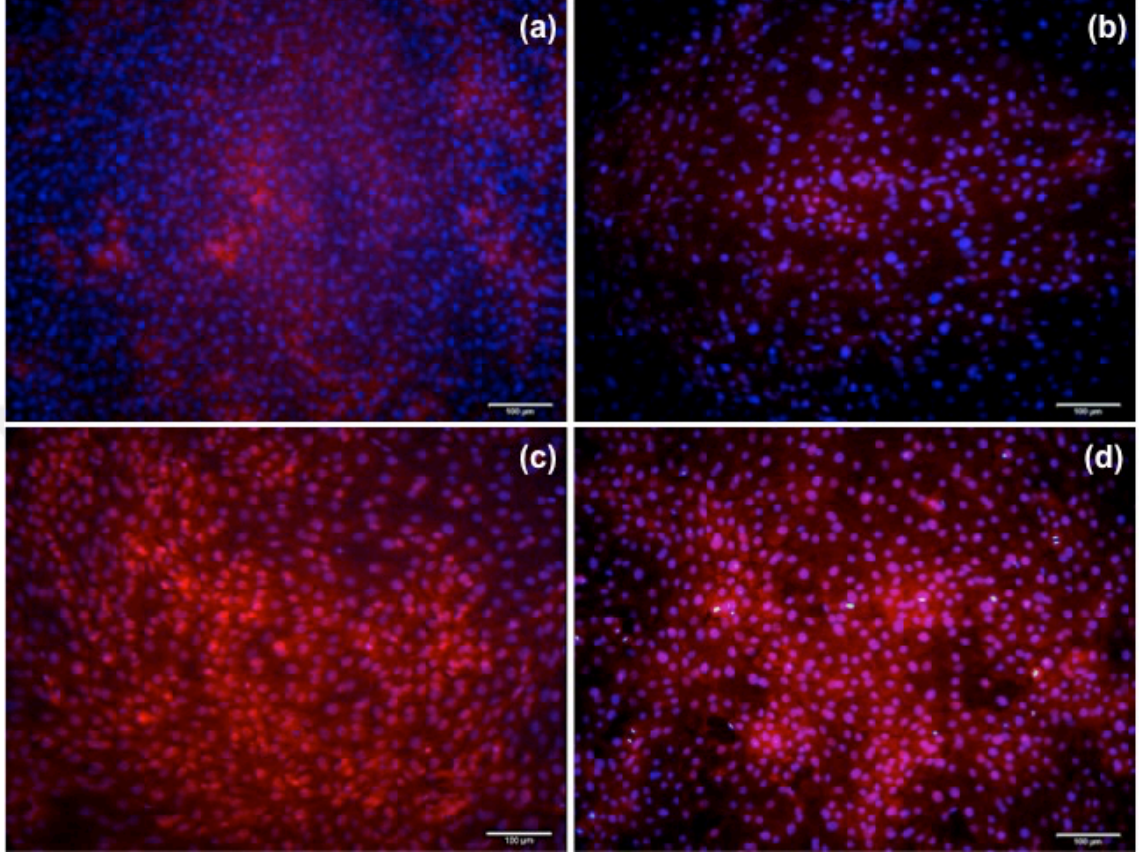


Şekil 3.19. Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmeye (20X - bar 100 µm) p63 ve DAPI immün boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (p63 proteini yeşil, hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir, iki boyanın çakıştığı hücrelerde ise turkuaza yakın bir renk görülmektedir).

### 3.6.2. ABCG2 Boyama

Limbal epitel kök hücreleri için pozitif bir belirteç olarak bilinen ABCG2 membran bağlantılı sitoplazmik proteininin limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerde ifade oranını semi-kantitatif olarak gözlemlemek için ABCG2 birincil antikoru ile boyamalar yapılmıştır. Tüm boyamalarda ABCG2 ile eş zamanlı olarak DAPI ile hücre çekirdekleri de boyanmıştır. Bu şekilde aranan belirtecin ifade oranının haricinde hücre içindeki ifade bölgesi de belirlenmiş olmaktadır. Bu sonuçların literatürde bugüne kadar bilinen ifade bölgesi ile uyumluluğu da değerlendirilerek spesifik olmayan boyamaların sebep olacağı yanlış değerlendirmelerin önüne geçilmiş olmaktadır. Şekil 3.20’de kültürün 14. gününde tüm gruplarda ABCG2 boyamalarına ait görüntüler yer almaktadır. Hücre çekirdeğinin DAPI ile boyandığı bu görüntülerde ABCG2 proteininin tüm gruplarda sitoplazmada boyanmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda gruplarda yapılan ABCG2 immün boyamalarında spesifik olmayan

boyanmaların gerçekleşmediği ve gruplar arası semi-kantitatif değerlendirmelerin optimum seviyede yapılabileceği sonucuna ulaşılabilir.



Şekil 3.20. Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmeye (20X - bar 100 µm) ABCG2 ve DAPI immün boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (ABCG2 proteini kırmızı, hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir, iki boyanmanın çakıştığı bölgelerde ise mor rengine yakın bir renk görülmektedir).

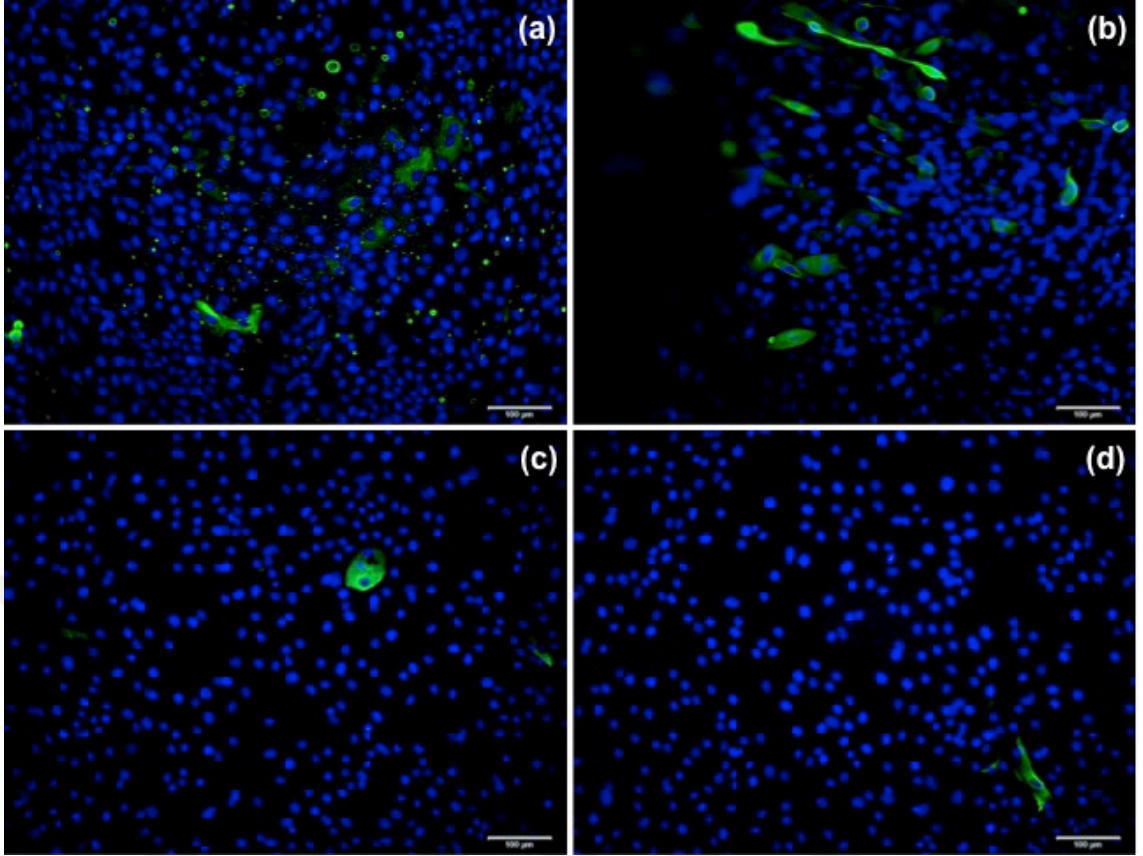
Alınan görüntülerden yapılan semi-kantitatif değerlendirmeler sonucu Grup 3 ve Grup 4'te Grup 1 ve Grup 2'ye oranla boyanmanın daha yoğun olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. Mavi ile boyanmış hücre çekirdekleri ve kırmızı ile boyanmış hücre sitoplazması göz önüne alındığında özellikle Grup 2'de hücre yoğunluğunun diğer gruplara oranla daha düşük olduğu anlaşılabilir.

### 3.6.3. K12 Boyama

Limbal epitel kök hücreleri için negatif, ancak diferansiye olmuş santral kornea epiteli için pozitif bir belirteç olarak bilinen K12 sitoplazmik proteininin limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerde ifade oranını semi-kantitatif olarak

gözlemlemek için K12 birincil antikoru ile boyamalar yapılmıştır. Tüm boyamalarda K12 ile eş zamanlı olarak DAPI ile hücre çekirdekleri de boyanmıştır. Bu şekilde aranan belirtecin ifade oranının haricinde hücre içindeki ifade bölgesi de belirlenmiş olmaktadır. Bu sonuçların literatürde bugüne kadar bilinen ifade bölgesi ile uyumluluğu da değerlendirilerek spesifik olmayan boyanmaların sebep olacağı yanlış değerlendirmelerin önüne geçilmiş olacaktır. Şekil 3.21’de kültürün 14. gününde tüm gruplarda K12 boyamalarına ait görüntüler yer almaktadır. Hücre çekirdeğinin DAPI ile boyandığı bu görüntülerde K12 proteininin tüm gruplarda boyanma gerçekleşen hücrelerin sitoplazmasında ifade olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda gruplarda yapılan K12 immün boyamalarında spesifik olmayan boyanmaların gerçekleşmediği ve gruplar arası semi-kantitatif değerlendirmelerin optimum seviyede yapılabileceği sonucuna ulaşılabilir.

On dördüncü günde alınan görüntülerden yapılan semi-kantitatif değerlendirmeler sonucu Grup 1’de ve özellikle Grup 2’de, Grup 3 ve Grup 4’e oranla daha fazla sayıda hücrede boyanma izlenmiştir. Mavi ile boyanmış hücre çekirdekleri göz önüne alındığında yine Grup 2’de tabakalı bir yapı oluşturmuş ve yoğunluğu az olan hücre topluluğunun olduğu dikkat çekmiştir. Ayrıca, Grup 1 ve Grup 3’te yeşil renkte K12 immün boyanmasının gerçekleştiği hücrelerin genellikle yuvarlak morfolojide olduğu, Grup 2 ve Grup 4’te ise yeşil renkte K12 immün boyanmasının gerçekleştiği hücrelerin yuvarlak veya ince uzun fibroblastik morfolojide karışık hücre grubundan oluştuğu gözlenmiştir. Grup 1 ve Grup 2’de altta halen var olan AM’nin immün boyamalarda flöresan özellik veren ikincil antikorun rengini bir miktar absorbe etmesinden dolayı görüntüyü bozmayacak oranda ard plan boyanmasına sebep olmuştur. Ancak bu boyanma hücrenin tüm iskeletinin boyanmasına sebep olan ve dolayısıyla morfolojisini yansıtan boyanmadan farklı olarak küçük noktasal boyanma alanları olduğundan değerlendirmede yanılgılara sebep olmayacak seviyededir.



Şekil 3.21. Çalışma gruplarında 14. güne ait aynı büyütmeye (20X - bar 100 µm) K12 ve DAPI immün boyamaları: (a) Grup 1, (b) Grup 2, (c) Grup 3, (d) Grup 4. (K12 proteini yeşil, hücre çekirdeği mavi renkte görülmektedir).

### 3.7. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Köklülüğün Kantitatif Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda kültürün 14. gününde doluluğa ulaşan kültür yüzeylerinde hücrelerin enzim aktivitesi ile yüzeyden toplandıktan sonra köklülüğüne işaret eden pozitif ve negatif belirteçler açısından akış sitometre analizi yapılarak kantitatif değerlendirmeler yapılmıştır. Her grupta belirlenen birincil ve ikincil antikorlar ile analiz edilecek örnekler işaretlenmiştir. Ayrıca, birincil ve ikincil antikor işaretlemesinin yapılmadığı negatif kontrol grubu ve sadece ikincil antikor işaretlemesi yapılarak ikincil antikorun spesifik olmayan bağlanmalarının dışlanmasına yardım eden pozitif kontrol grupları her numunenin analizinde kullanılmıştır. Analiz sonuçlarında benzer hücre alan işaretlemeleri ve kapı tanımlamaları yapıldıktan sonra pozitif ve negatif belirteçler açısından analiz edilen hücre grubunun ifade seviyesi yüzde olarak hesaplanmıştır. Her numune için hem nokta alan grafikleri ile hem de tek parametrelili histogramlar ile sonuçlar raporlanmıştır. Pozitif belirteçler için %85 altındaki ifade seviyesi ve negatif

belirteçler açısından %15 üzerindeki ifade seviyesi diferansiyasyona işaret eden bir parametre olarak kabul edilmiştir.

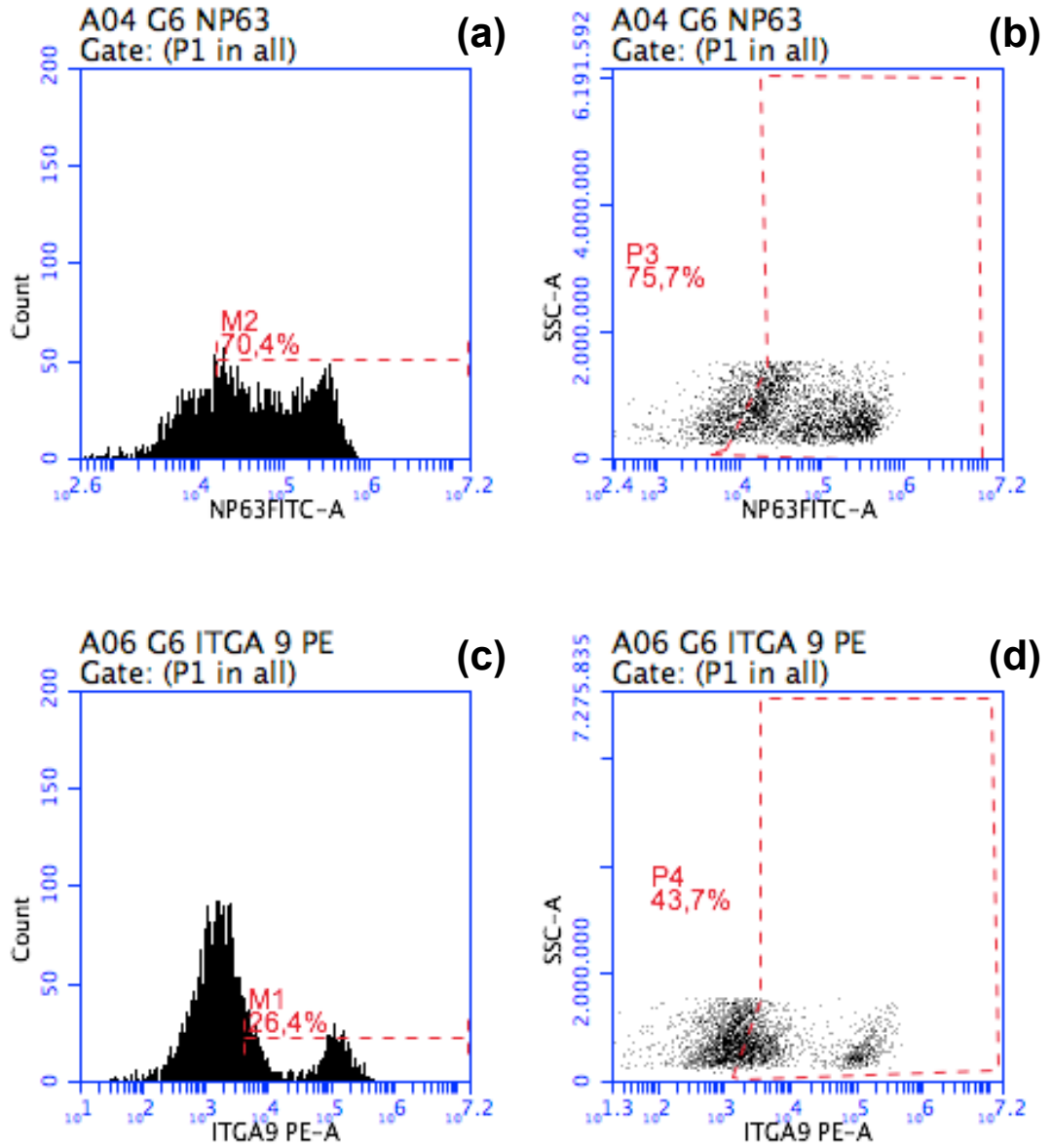
Şekil 3.22'de Grup 1'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Grup 1'de pozitif belirteçler olan p63 ve İntegrin  $\alpha\beta1$  için ifade seviyeleri nokta alan grafiklerine göre sırasıyla %75,7 ve %43,7 olarak bulunmuştur. Şekil 3.23'te ise Grup 1'e ait negatif belirteçler olan K3 ve Konneksin 43'ün ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Nokta alan grafiklerine göre K3 için ifade seviyesi %29,6, Konneksin 43 için ifade seviyesi %21,3 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, Grup 1'de tespit edilen düşük pozitif belirteç seviyeleri ve yüksek negatif belirteç seviyelerinden diferansiye olmuş epitel hücre oranının yüksek olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Şekil 3.24'de Grup 2'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Grup 2'de pozitif belirteçler olan p63 ve İntegrin  $\alpha\beta1$  için ifade seviyeleri nokta alan grafiklerine göre sırasıyla %69,9 ve %41,9 olarak bulunmuştur. Şekil 3.25'te ise Grup 2'e ait negatif belirteçler olan K3 ve Konneksin 43'ün ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Nokta alan grafiklerine göre K3 için ifade seviyesi %24,3, Konneksin 43 için ifade seviyesi %15 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, Grup 2'de tespit edilen düşük pozitif belirteç seviyeleri ve yüksek negatif belirteç seviyelerinden diferansiye olmuş epitel hücre oranının yüksek olduğu sonucuna ulaşılabilir.

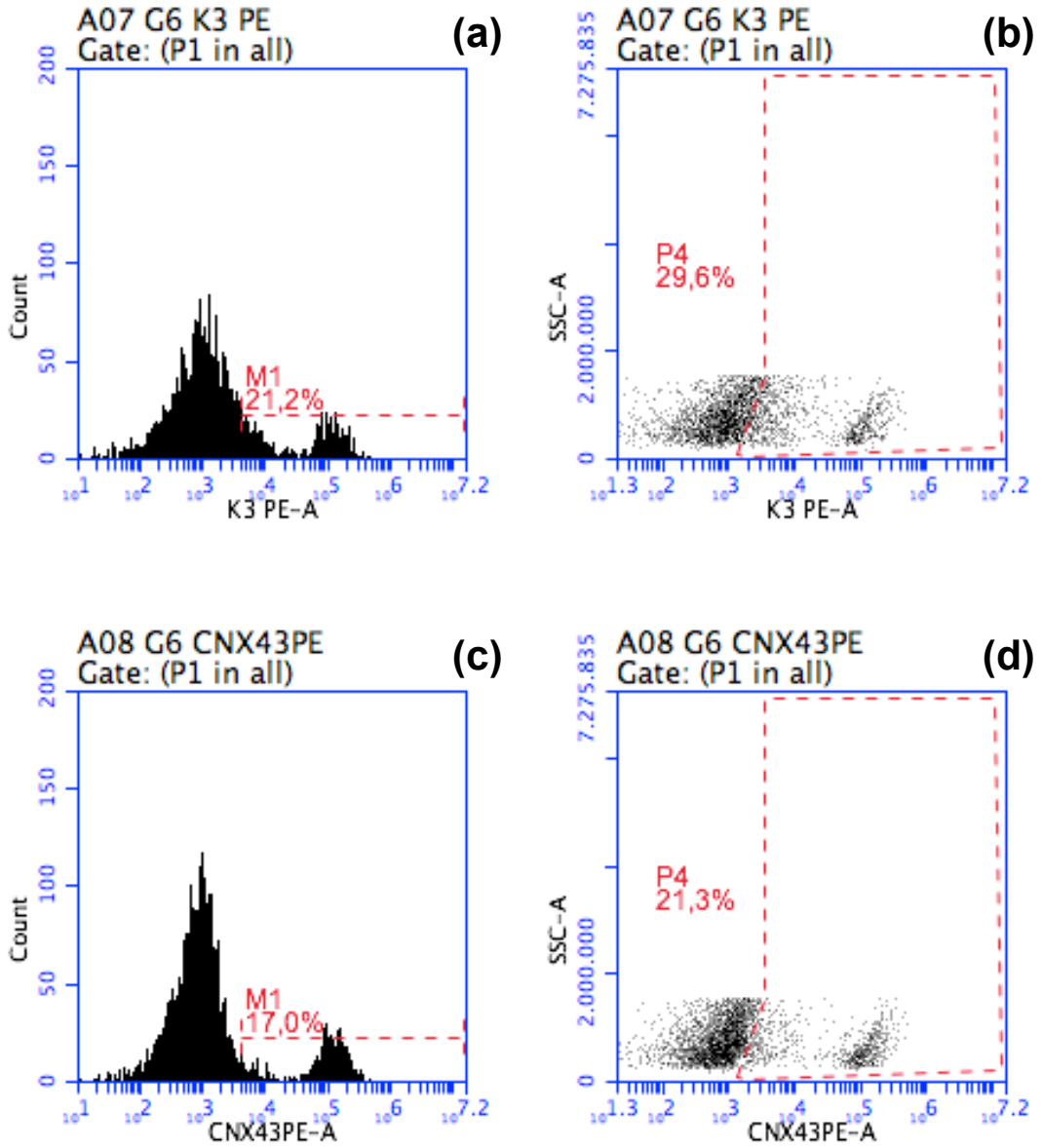
Şekil 3.26'da Grup 3'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Grup 3'te pozitif belirteçler olan p63 ve İntegrin  $\alpha\beta1$  için ifade seviyeleri nokta alan grafiklerine göre sırasıyla %84,4 ve %90,9 olarak bulunmuştur. Şekil 3.27'de ise Grup 3'e ait negatif belirteçler olan K3 ve Konneksin 43'ün ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Nokta alan grafiklerine göre K3 ve Konneksin 43 için ifade seviyeleri %3,1 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, Grup 3'te tespit edilen yüksek pozitif belirteç seviyeleri ve düşük negatif belirteç seviyelerinden LEKH oranının yüksek olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Şekil 3.28’de Grup 4’e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Grup 4’te pozitif belirteçler olan p63 ve İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  için ifade seviyeleri nokta alan grafiklerine göre sırasıyla %88 ve %93,6 olarak bulunmuştur. Şekil 3.29’da ise Grup 4’e ait negatif belirteçler olan K3 ve Konneksin 43’ün ifade seviyeleri nokta alan grafikleri ve tek parametrelili histogramlar ile sunulmuştur. Nokta alan grafiklerine göre K3 için ifade seviyesi %7,1, Konneksin 43 için ifade seviyesi %2,6 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, Grup 4’te tespit edilen yüksek pozitif belirteç seviyeleri ve düşük negatif belirteç seviyelerinden LEKH oranının yüksek olduğu sonucuna ulaşılabilir.



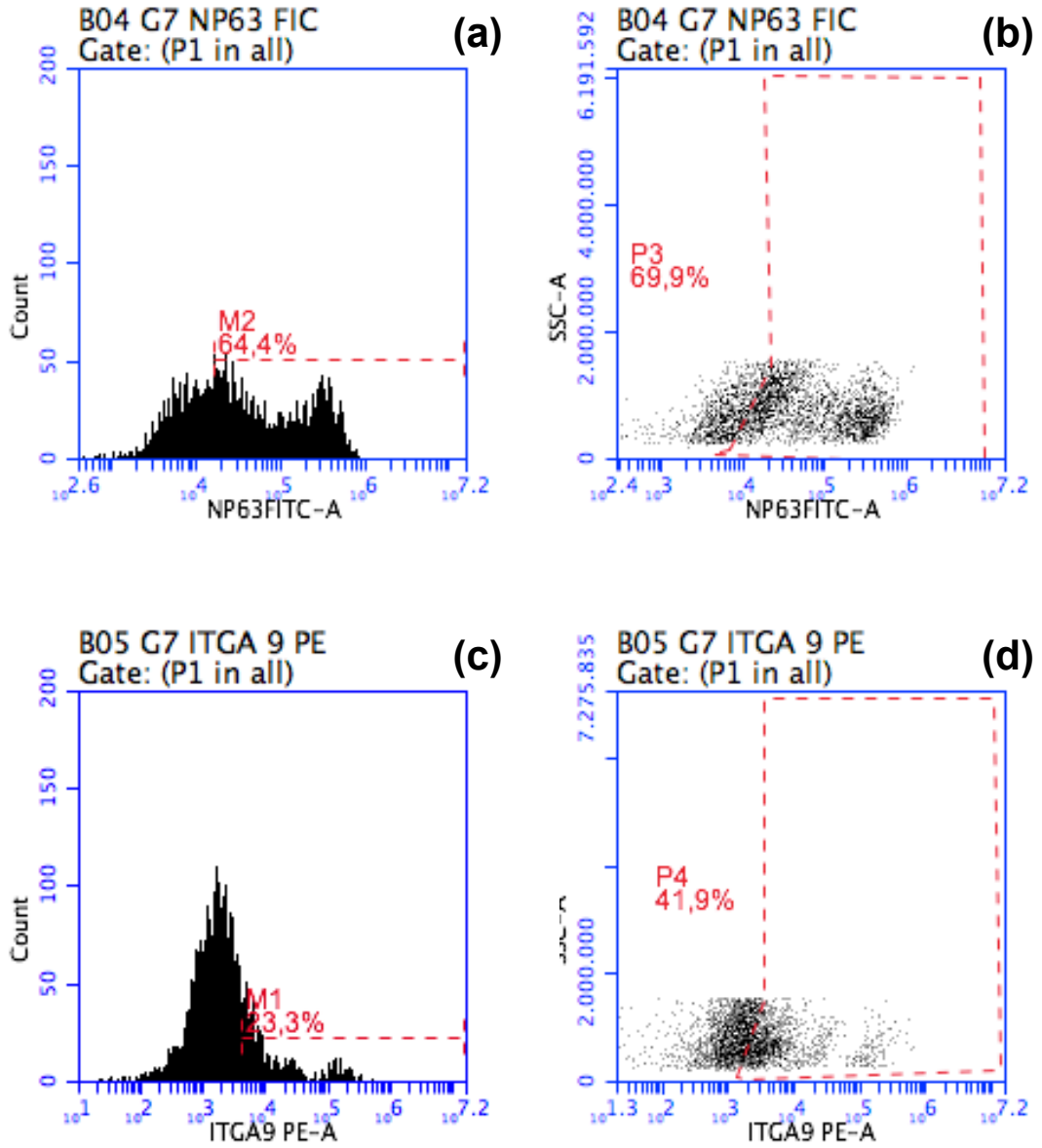


Şekil 3.22. Grup 1'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelili histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelili histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği.

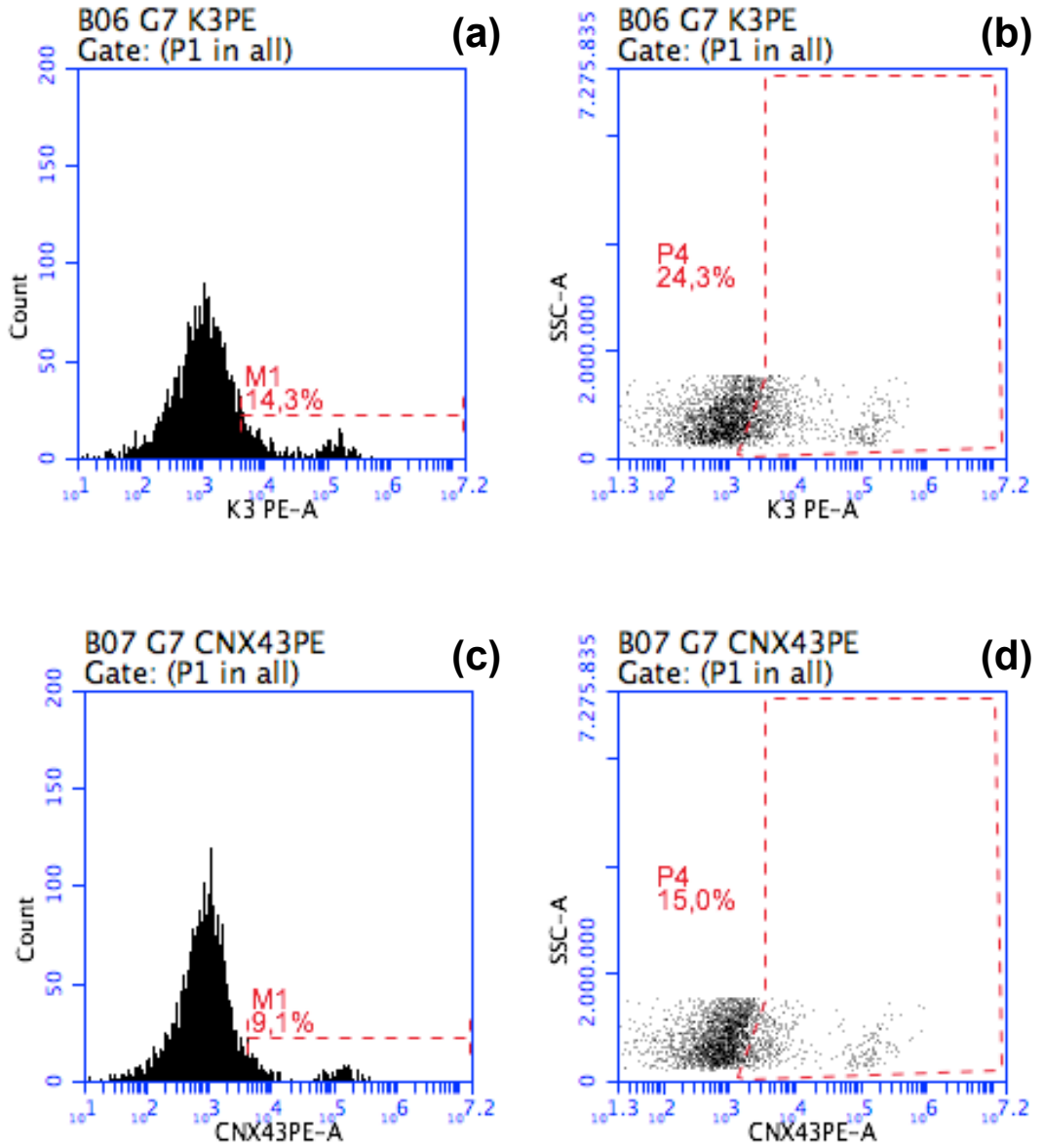


Şekil 3.23. Grup 1'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tek parametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği.

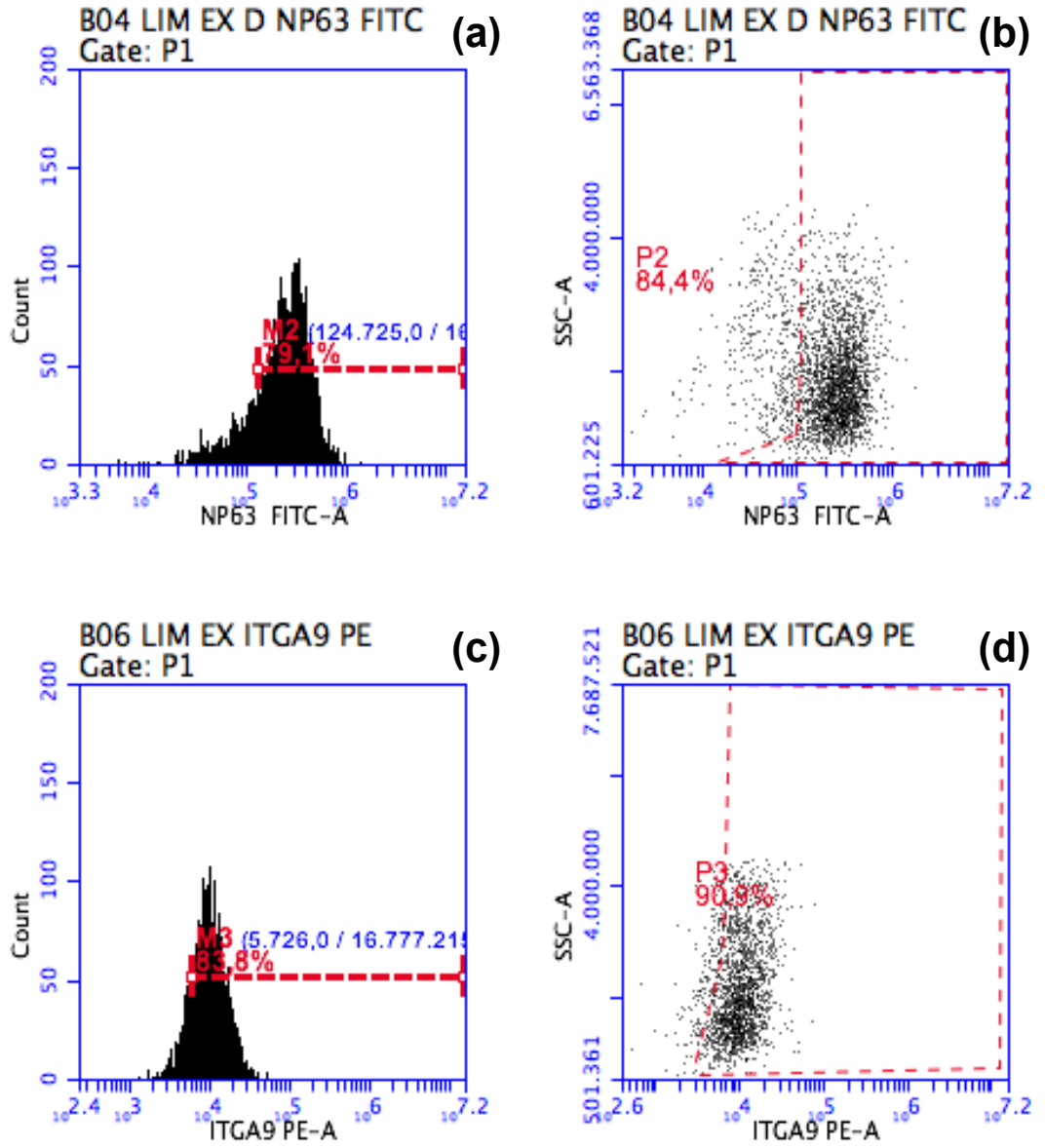




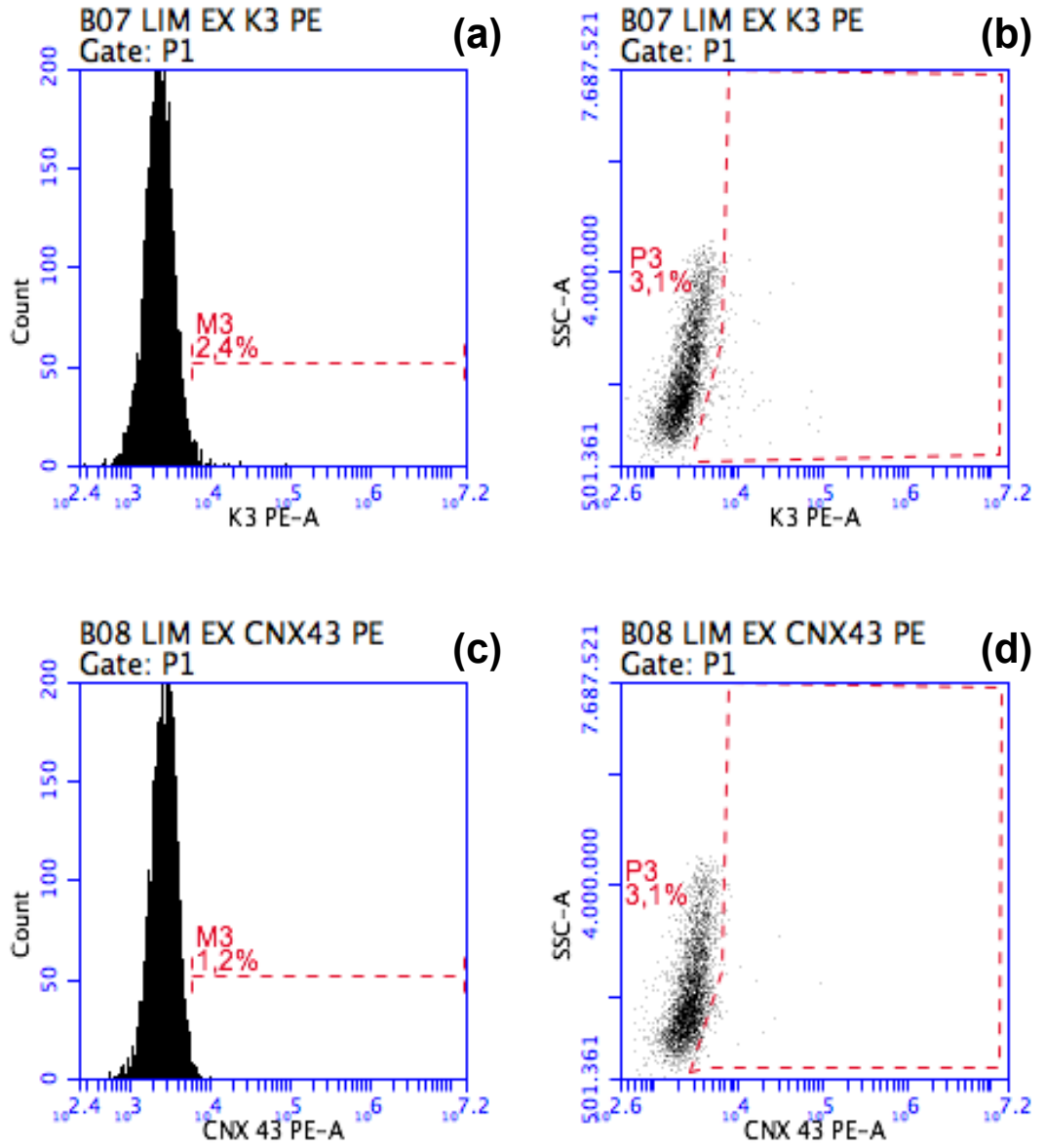
Şekil 3.24. Grup 2'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelili histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelili histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği.



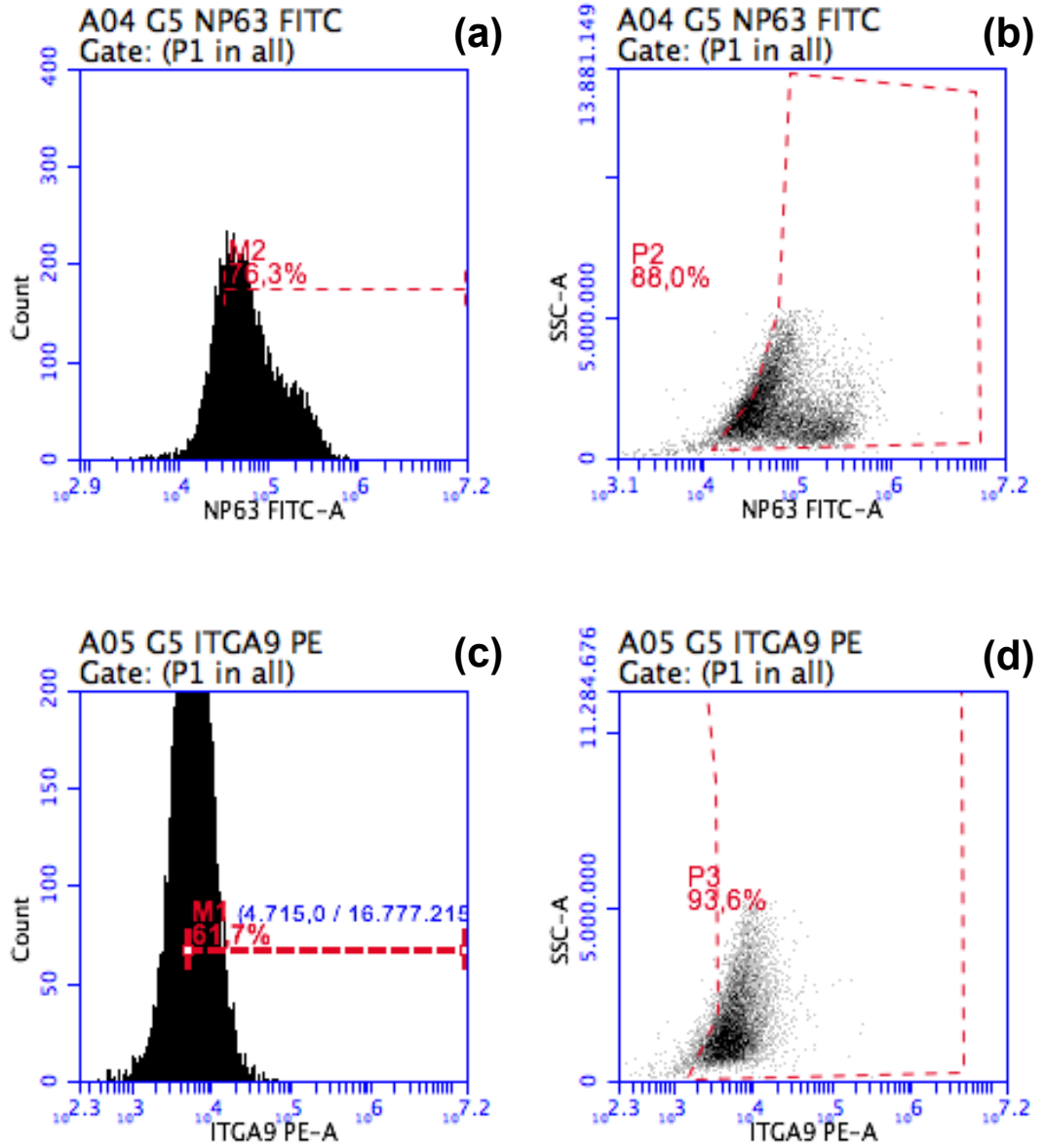
Şekil 3.25. Grup 2'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tek parametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği.



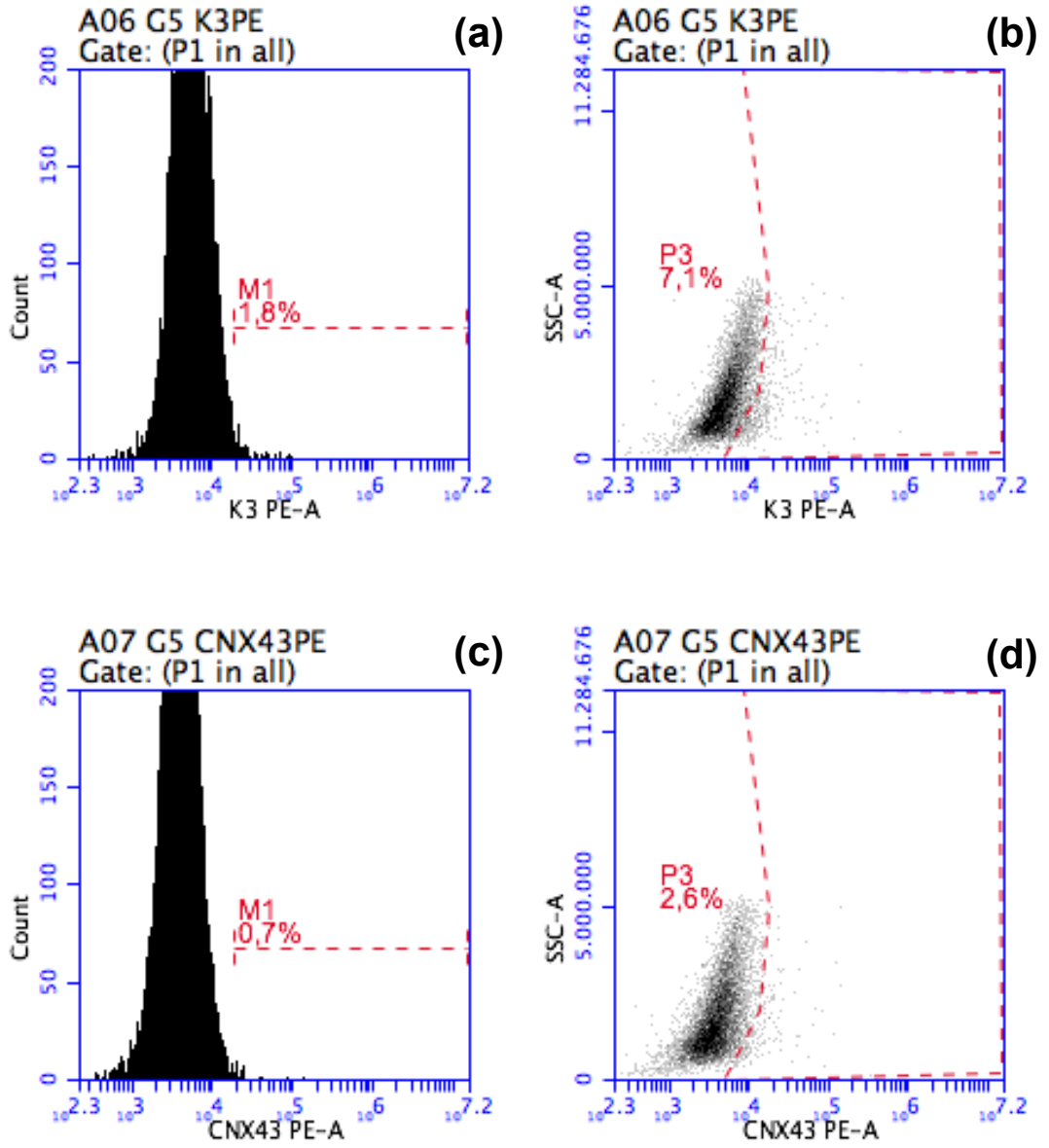
Şekil 3.26. Grup 3'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelî histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelî histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği.



Şekil 3.27. Grup 3'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tek parametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği.



Şekil 3.28. Grup 4'e ait pozitif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) p63 tek parametrelili histogram, (b) p63 nokta alan grafiği, (c) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  tek parametrelili histogram, (d) İntegrin  $\alpha 9\beta 1$  nokta alan grafiği.

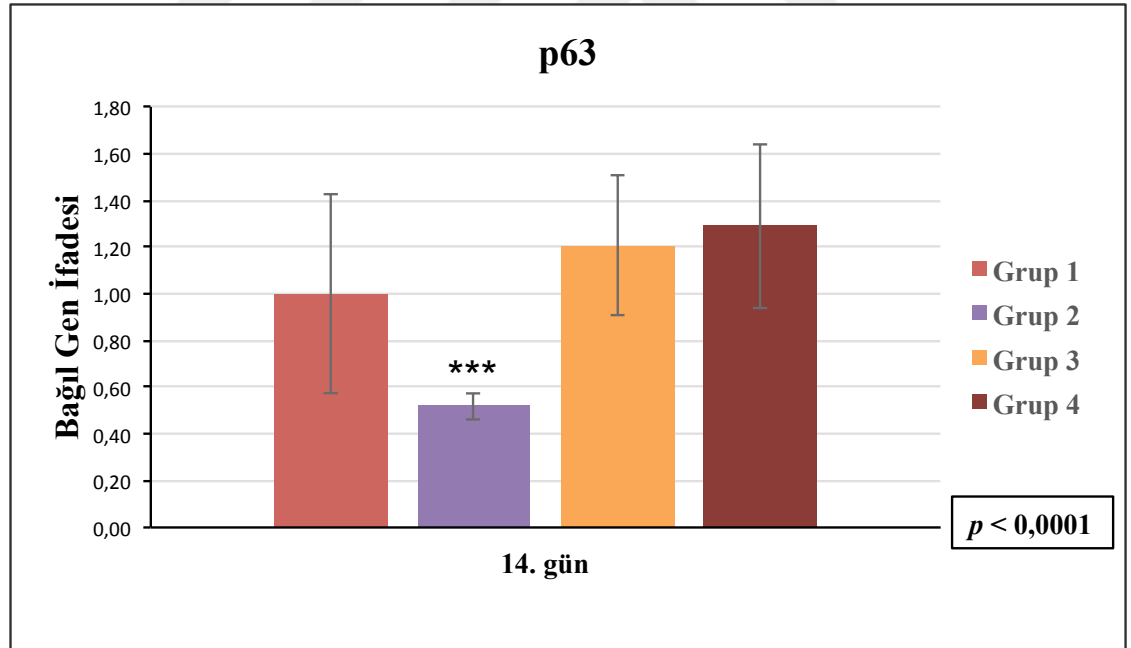


Şekil 3.29. Grup 4'e ait negatif belirteçlerin ifade seviyeleri: (a) K3 tek parametrelili histogram, (b) K3 nokta alan grafiği, (c) Konneksin 43 tek parametrelili histogram, (d) Konneksin 43 nokta alan grafiği.

### 3.8. Migrasyona Uğrayan Hücrelerde Gen İfadesinin Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda kültürün 14. gününde doluluğa ulaşan kültür yüzeylerinde hücrelerin köklülüğüne işaret eden pozitif ve negatif belirteçler açısından gen ifade seviyeleri gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla LEKH'ler için pozitif bir belirteç olarak bilinen p63 ve LEKH'ler için negatif ancak diferansiye olmuş santral kornea epitelini için pozitif belirteçler olarak bilinen K3 ve Konneksin 43 proteinleri kullanılmıştır. Gereç ve yöntem kısmında işlem basamakları anlatılan RT-PCR analizi sonucunda elde edilen gen ifade seviyeleri Şekil 3.30, Şekil 3.31 ve Şekil 3.32'de gösterilmiştir.

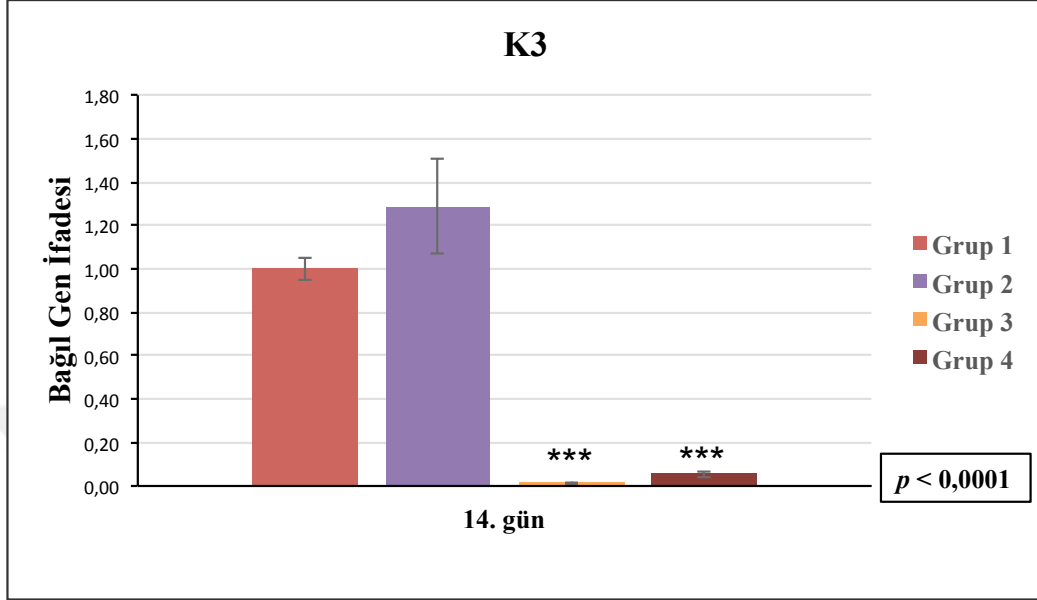
Tümör protein 63 için tüm gruplarda 14. günde gen ifade analizi değerlendirildiğinde, Grup 2'de bağıl gen ifadesinin diğer gruplara oranla istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca Grup 3 ve Grup 4'te, Grup 1'e kıyasla istatistiksel açıdan anlamlılık yaratmayan bir gen ifade yüksekliği görülmüştür.



Şekil 3.30. Çalışma gruplarında 14. günde p63 proteinine ait bağıl gen ifadesini gösteren grafik.

Sitokeratin 3 için tüm gruplarda 14. günde gen ifade analizi değerlendirildiğinde, Grup 3 ve Grup 4'ün, Grup 1 ve Grup 2'ye oranla istatistiksel açıdan anlamlı düşük

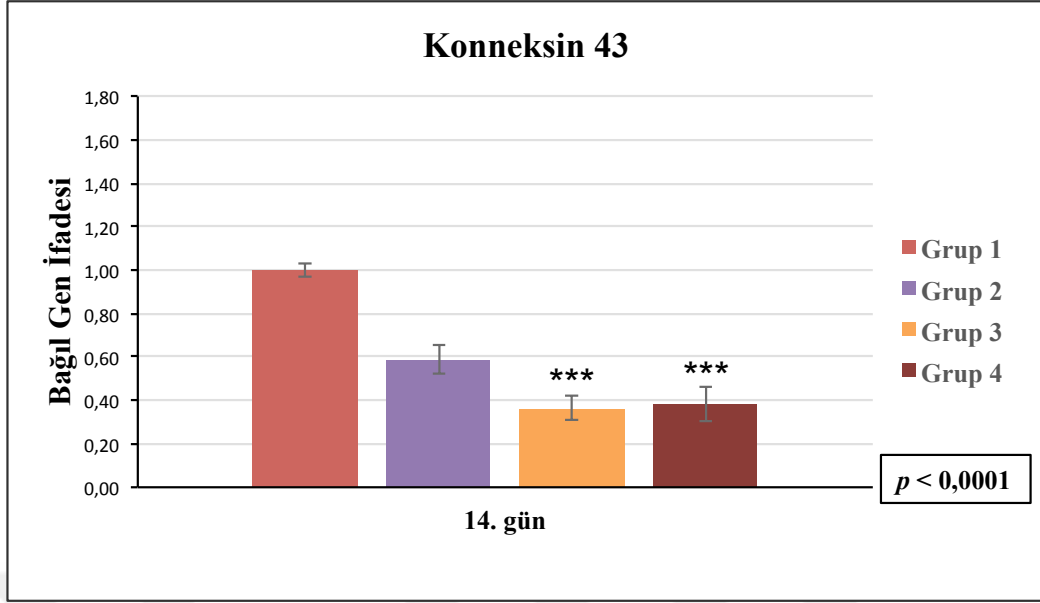
olduğu görülmüştür ( $p < 0,0001$ ). Limbal epitel kök hücreler için negatif bir belirteç olan K3 için en yüksek gen ifadesini Grup 2 göstermektedir.



şekil 3.31. Çalışma gruplarında 14. günde K3 proteinine ait bağıl gen ifadesini gösteren grafik.

Konneksin 43 için tüm gruplarda 14. günde gen ifade analizi değerlendirildiğinde, Grup 3 ve Grup 4n, Grup 1 ve Grup 2ye oranla istatistiksel açıdan anlamlı düşük olduğu görülmüştür ( $p < 0,0001$ ). Limbal epitel kök hücreler için negatif bir belirteç olan Konneksin 43 için en yüksek gen ifadesini Grup 2 göstermektedir.





Şekil 3.32. Çalışma gruplarında 14. günde Konneksin 43 proteinine ait bağıl gen ifadesini gösteren grafik.

#### 4. TARTIŞMA

*In vitro* hücre kültürü çalışmalarında kültür koşullarının temel hücre davranışları üzerine önemli oranda etkisinin olduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir (46). Çoğalma (proliferasyon), göç etme (migrasyon) ve farklılaşma (diferansiyasyon) olarak bilinen temel hücre davranışları hücrelerin organizma içinde doğal ortamlarındaki yaşam şartlarına (*in vivo* yaşam şartları) bağımlı olarak her hücre tipi için farklı özellikler arz etmektedir. Bu sebeple, araştırmacılar *in vitro* ortamda kültüre etmek istedikleri her hücre tipi için uygun yaşam şartlarını sağlayabilmenin arayışı içine girmişlerdir. Hücrelerin *in vitro* yaşam şartları denildiği zaman ilk akla gelmesi gerekenler;

- Yüzey bağımlı hücreler için (kan hücreleri ve mikroorganizmalar hariç tüm hücreler) doğal mikroçevreye benzer bir tutunma ve hareket etme yüzeyi,
- Doğal mikroçevresine tutunmuş ve hareket edebilen hücrelerin temel metabolik faaliyetlerini sürdürebileceği beslenme şartları,

olmalıdır (47). Bu iki özellik bir hücrenin *in vitro* şartlarda yaşantısının devamlılığını sağlayan en önemli belirleyicilerdir.

Doğal mikroçevreye benzer tutunma ve hareket etme yüzeyi ile tanımlanmak istenen asıl konu *in vitro* şartlarda kullanılan kültür yüzeyleridir. *In vivo* şartlardan *in vitro* şartlara çeşitli yöntemler kullanılarak aktarılan hücreler uzaysal konumlarının değişmesini olumsuz olarak algırlarlar. Bu sebeple *in vivo*'daki konumlarına en yakın yüzeylerin hazırlanması hücreler için farkı hissettirmeyecek ve temel davranışlarını etkilemeyecek birinci basamaktır. Doğal olarak, araştırmacıların uzun yıllardır gerçekleştirdikleri yüzey modifikasyonlarının temel gerekçesi hücrelerin yabancı bir ortama aktarılmasının hücreler üzerinde olumsuz etkilere yol açmasını önlemektir (47, 48).

Yüzeye tutunup hareket edebilen hücrelerin temel hayati ve metabolik fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için ikinci önemli basamak hücreleri *in vivo* yaşantılarına en yakın şekilde besleyebilmektir. Beslenme şartları ile tanımlanmak istenen asıl konu ise *in vitro* şartlarda kullanılan besi ortamlarıdır (49). *In vivo* şartlarda kan damarları ve lenfatikler aracılığıyla ihtiyacı olan besin maddelerine ulaşabilen ve metabolik artıklarını yine aynı yolla uzaklaştırabilen hücreler *in vitro* şartlarda da aynı fonksiyonları yerine getirebilmek isterler. Bu sebeple, içeriği zengin olan besi ortamları çeşitli kaynaklardan elde edilmiş kan serumu ve büyüme faktörlerinin desteği ile

hücrelerin kullanımına sunulur. Ancak, *in vitro* şartlarda bugüne kadar sıklıkla tercih edilen, eldesi kolay fakat ekonomik açıdan yüksek maliyetli hücre kültürü ürünleri (modifiye edilmiş besi ortamları, destekleyici hayvansal kaynaklı serumlar, rekombinant DNA teknolojisi ile üretilmiş büyüme faktörleri) nin hem *in vitro* şartlarda kültüre olan hücrelerde oluşturabileceği olumsuz etkiler hem de *in vivo* şartlara aktarıldığında organizma üzerinde yaratabileceği yan etkiler dolayısıyla kullanımı tartışmalı hale gelmiştir (50). Modifiye edilmiş besi ortamları üretici firma tarafından ticari ürün olarak elde edilebileceği gibi, araştırmacıların çeşitli büyüme faktörlerini kültüre etmek istedikleri hücre tipine göre besi ortamına eklemesiyle de elde edilebilir. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen ve besi ortamlarının modifikasyonunda kullanılan büyüme faktörlerinin ve antikörlerin bakteri kaynaklı olmasından ötürü post-translasyonel modifikasyona uğramadıkları ve organizmaya naklinden sonra memeli hücrelerini tanıyamadıklarından ötürü immünojenik yanıtı sebep olmadıkları bilinmektedir (20, 51). Ancak, metilasyon, asetilasyon, glikozilasyon veya fosforilasyon gibi epigenetik mekanizmaları içine alan post-translasyonel modifikasyonun sağlıklı hücrelerin yaşam döngüsünde de çok önemli bir yerinin olduğu bilinmektedir. Epigenetik modifikasyonlar gerçekleşmeden üretilen proteinlerin hücre çekirdeğinde çeşitli transkripsiyon faktörlerinin üretimini ve etkinliğini baskılayarak p53 tümör baskılayıcı genin baskılanması üzerinden kontrolsüz hücre çoğalması, immortalizasyon ve transformasyon gibi durumlara neden olup kanser gelişimine yol açtığı düşünülmektedir (20). İçeriğindeki adezyon proteinleri aracılığıyla hücrelerin *in vitro* kültür ortamına aktarıldıklarında yüzeye tutunmasını ve yayılmasını kolaylaştıran, büyüme faktörleriyle hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonunu uyaran kan serumlarının hayvansal kaynaklı olması da modifiye besi ortamlarının bir diğer dezavantajıdır. Yapılan çalışmalarda, fetal sıgır serumu desteği ile kültüre edilmiş hücrelerin *in vivo* transplantasyonu sonucu, viral ve prion kaynaklı bulaşların haricinde, kültüre edilen hücrelerin membranına yapışan hayvansal proteinlerin immünojenik yanıtı uyararak arthus benzeri reaksiyon, malign ventriküler aritmiler ve ani kardiyak ölüme sebep olduğu bildirilmiştir (50).

*In vitro* kültür şartlarının insan kaynaklı olması hayvansal kaynaklı ürünlerin kullanımına karşı bir avantaj oluşturarak hücre kültürü ürününün klinik uygulamalara aktarılmasında güvenli bir seçenek sunmaktadır (52). Bu sebeple birçok hücre tipinde

kullanılmak üzere insan kaynaklı kan serumu (53), AM (54) ve fibrinin (55) kullanılması denenmektedir. Özellikle mezenkimal kök hücreler üzerinde yaygın olarak yapılan çalışmalarda insan kaynaklı kan serumu ve insan kaynaklı trombositlerden elde edilen büyüme faktörleri ile desteklenen hücre kültür ortamları oluşturulmaya çalışılmaktadır (40-42). Ayrıca, epitel morfolojisinde olan hücrelerin (deri keratinositleri ve kornea epiteli) *in vitro* kültüründe insan kaynaklı AM sıklıkla kullanılmaktadır (54, 56).

Sunulan tez çalışmasında limbal epitel kök hücrelerin elde edilmesinde, limbal eksplant kültür tekniği kullanılmıştır. Eksplant kültür sisteminde LEKH'lerin kendilerine mekanik ve kimyasal destek sağlayan limbal stromal hücrelerin varlığı ile proliferasyon ve köklülüğünü korumasına rağmen, migrasyona uğrayan hücrelerin eksplant bölgesini terk ettikten sonra bu mekanik ve kimyasal destekten uzaklaştıkları için diferansiyasyona uğradıkları savunulmaktadır (15, 16). Bu sebeple limbal eksplant bölgesinden migrasyona uğrayan hücrelerin desteğini devam ettirmek için çeşitli kültür yüzeyi ve besi ortamı modifikasyonları denenmektedir. Bu amaçla en sıklıkla kullanılan kültür yüzeyi modifikasyonu insan kaynaklı AM ile kültür yüzeyinin kaplanmasıdır (57).

İnsan kaynaklı AM, *in vitro* kültür için yüzey destek malzemesi olarak 2 şekilde kullanılmaktadır. Öncelikle epitel tabakası kaldırılmadan doğal hali ile kültür şartlarında kullanılan AM'nin limbal eksplantlardan hücre migrasyonunu çok desteklemediği görüldükten sonra, epitel tabakası kaldırılarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla literatürde, tripsin, EDTA, dispaz, sodyum dodesil sülfat ve termolizin tabanlı teknolojiler kullanılmaktadır (58-60). Ancak, elde edilmesinin bazı sıkı şartlar gerektirmesi, saklama koşulları ve homojen olmayan yapısının deney tekrarlanabilirliğini olumsuz etkilemesi sebebiyle alternatifleri aranmaktadır. Bu sebeple, LEKH kültüründe 3T3 fibroblast hücre hattı ile ko-kültür veya sıcaklık duyarlı yüzeyler gibi yöntemler denenmektedir.

Dr. Teruo Okano ve grubunun 2000'li yılların başında geliştirdikleri "Hücre Tabaka Teknolojisi-Cell Sheet Technology (CST)" ile hücre yoğunluğu fazla olan doku ve organ rejenerasyonunda doku iskelesi kullanılmaksızın elde edilen tek katmanlı (2 boyutlu) veya çok katmanlı (3 boyutlu) hücre tabakalarının transplantasyonu literatüre yeni bir bakış açısı kazandırmıştır (61). Bu teknolojiye, sıcaklık duyarlı poli-N-

izopropilakrilamid (PIPAAm) polimeri hücre kültür kaplarının yüzeyine elektron ışın demeti ile uyarılmış polimerizasyon, atom transfer radikal polimerizasyonu ve tersinir ekleme ve parçalama transfer zincir polimerizasyonu gibi farklı polimerizasyon teknikleri ile kovalent olarak bağlanarak sıcaklık duyarlı yüzeyler hazırlanabilmektedir (61, 62). Bu polimerin sıcaklık değişimi ile gerçekleşen hidrofobik-hidrofilik özellik değişimi hücre adezyonu-çoğalması-tabaka olarak yüzeyden kaldırılmasının temelini oluşturur. Bu polimerinin düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) olan 32°C üstündeki sıcaklıklarda (37°C) hidrofobik özellik göstermesi hücrelerin bu yüzeyler üzerinde çoğalmasına ve tam bir tabaka oluşturmaya olanak sağlar. Hidrofobik yüzeye 37°C'de hücre adezyonunun ardından adenozin trifosfat (ATP) kaynaklı metabolik süreç hücre morfolojisinde değişikliğe sebep olarak hücre yayılmasını kolaylaştırır. Proliferasyona başlayan hücreler, hücre yüzey bağlanma reseptörlerini sentezleyerek normal morfolojiye uygun olarak çoğalır ve doluluğa ulaşırlar. Genellikle sıcaklığın ortalama 30 dk boyunca 20°C altına çekilmesiyle PIPAAm yüzeyinin hidrofilik özellik kazanması ve polimer zincirlerinin uzamasına bağlı olarak hücre tabakaları kendiliğinden yüzeyden ayrılırlar (63). Nishida ve ark.'nın (63) yaptıkları çalışmada tavşanlardan elde edilen LEKH'ler *in vitro* 3T3 fibroblast hücre hattı ve sıcaklık duyarlı yüzeyler üzerinde kültüre edilmiştir. Hiçbir enzimatik müdahaleye gerek kalmadan hücre tabakasının elde edilebileceğini ve tabakanın halen taşımakta olduğu ekstrasellüler matris yapısı dolayısıyla herhangi bir sabitleyiciye gerek kalmadan cerrahi sahaya nakledilebileceğini savunmuşlardır. Ancak bir besleyici tabaka olarak bilinen 3T3 fibroblast hücre hatlarının hayvansal kaynaklı olması, CST'de kullanılan sıcaklık duyarlı yüzeyin ise maliyeti yüksek bir malzeme olması dolayısıyla LEKH kültüründe dezavantaj oluşturmaktadır.

Sunulan çalışmada tasarlanan limbal eksplant hücre kültür sistemi ise tamamen insan kaynaklı ürünlerden oluşmaktadır. Öncelikle limbal eksplantların ve hücrelerin adezyonu, akabinde hücre migrasyonunu destekleyecek insan kaynaklı bir yüzey modifikasyonu oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, literatürde sıklıkla kullanılmakta olan donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş AM'ye alternatif olabilecek yine insan kaynaklı bir fibrin kaplama metodu oluşturulmuştur. Choukroun ve ark.'nın (34) tanımladığı standart TZF'den farklı santrifüj protokolüne sahip bu yeni TZF üretim şekli ile sıvı halde elde edilen trombosit zengin fibrinojen çözeltisi hızlıca kültür

yüzeyine aktarıldığında kısa bir süre içinde yüzeyde jelleşmenin gerçekleştiği görülmüştür. Bu durum, standart protokolda yüksek devirde (2,700 rpm) daha uzun süre (12 dk) santrifüjlenen kan örneğinden oluşan katı yapıda TZF'nin, düşük devirde (1,000 rpm) daha kısa süre (5 dk) santrifüjlenmesi ile başarılabilmiştir. Silika kaplı ve antikoagülan içermeyen kan tüpünün duvarlarındaki silika ile temas halinde olan kan, santrifüj sırasında trombinin fibrinojeni fibrine parçalaması sonucunda pıhtılaşmaya ve katı TZF'yi oluşturmaya başlar. Ancak düşük devirde santrifüjlenen kan örneğinde bu işlem daha uzun sürede gerçekleşebilecektir. Çalışmada kurgulanan protokole göre düşük devirde tam jelleşmenin gerçekleşmesini beklemeden santrifüjleme işlemine son verildiğinde trombin işlevini henüz tamamlayamadan kan örneği santrifüjden alınır. Bu sırada tüpün üst kısmında kırmızı kan cisimciklerinden tamamen ayrılmış ancak polimerizasyonunu tamamlayamamış sıvı haldeki fibrinojen çözeltisi bulunmaktadır. Sıvı haldeki bu fibrinojen çözeltisinin tüp içinden pipet yardımıyla kültür yüzeyine aktarıldığı sırada devam etmekte olan trombin aktivitesi sebebiyle fibrinojen yıkımı ve katı fibrin oluşumu süreci devam etmektedir. Kültür yüzeyini kaplayacak şekilde aktarılan sıvı fibrinojen çözeltisi çok kısa bir süre içinde trombinin aktivitesini tamamlaması sonucu jelleşerek kültür yüzeyinde bir tabaka oluşturur. Artık bu tabaka limbal eksplantların kolayca yerleştirilebileceği ve hücrelerin migrasyonuna izin veren, AM'ye alternatif bir yüzey haline dönüşmüştür. Sunulan tez çalışmasında kullanılan alternatif yüzey kaplama materyali olan 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış TZF, hücrelere ve eksplantlara mekanik destek sağlamasının haricinde kimyasal destek de sağlamaktadır. Yapının içine hapsolmuş bol miktardaki trombositlerin alfa granülleri içindeki çeşitli büyüme faktörleri sayesinde doğal yoldan hücrelerin beslendiği ortam da zenginleşmektedir. Yani önerilen yüzey kaplayıcı TZF materyali literatürde sıklıkla kullanılmakta olan 3T3 fibroblast hücre hatları, sıcaklık duyarlı kültür yüzeyleri ve AM'ye alternatif doğal insan kaynaklı bir besleyici tabaka olarak düşünülebilir. Ayrıca ilerleyen dönemde yapılacak *in vivo* çalışmalarda hastanın kendi kan örneğinden elde edilen TZF ile kendi hücreleri kültüre edilerek kişiye özel bir kültür sistemi de kurulabilir. Bu tez çalışması ile limbal eksplant kültürde ilk kez insan kaynaklı ve ucuz bir protokol ile fibrin kaplama gerçekleştirilmiştir.

Sunulan tez çalışmasının bir diğer özgün noktası, standart protokol ile hazırlanan TZF ile modifiye edilmiş bir kültür besi ortamının hazırlanması ve limbal eksplant

kültürde kullanılmasıdır. Gereç ve yöntem kısmında da belirtildiği üzere hem taze AM hem de standart protokol ile hazırlanmış TZF, DMEM-HAM's F12 içinde 14 günlük inkübasyon sonucunda zenginleştirilmiş besiyeri oluşumuna sebep olmuşlardır. Taze AM ve standart TZF ile zenginleştirilmiş besi ortamları ile kültüre edilen limbal eksplantlar hücre migrasyonu, hücre doluluğu ve hücre köklülüğü açısından değerlendirildiklerinde, TZF ile beslenen limbal eksplantlarda 14. gün analizlerinin daha çok hücre migrasyonunun hücre köklülüğünü koruyacak şekilde gerçekleştiğini göstermiştir. Bu sonuçlar TZF'nin içeriğindeki büyüme faktör oranı ve konsantrasyonunun limbal eksplantlardan göç etmekte olan LEKH'leri kendi doğal mikroçevresine yakın bir durumda hissettirmesinden kaynaklandığını göstermektedir. Limbal epitel kök hücrelerin *in vivo*'da yaşamakta oldukları Vogt Palisadlarının anatomik ve histolojik yapısı hatırlanacak olursa, limbal stromadaki yoğun kanlanmanın LEKH'lere bazal membran desteği sağlayan fenestreli tabakadan süzülerek kimyasal destek sağladığı görülecektir. Bu da aslında *in vitro* şartlarda kurgulanan deney protokolünde alınan kan örneğinin santrifüjlenmesi sonucu elde edilen süpernatanın besi ortamı desteği olarak kullanılmasını anımsatmaktadır. Bu tez çalışmasının deneysel sonuçları, *in vitro* şartlarda LEKH kültürü sırasında kullanılan besi ortamlarının içeriğinin, bu hücrelerin doğal yaşantısındaki beslenme şartlarına benzemesinin en iyi sonucu oluşturduğunu göstermiştir.

Sunulan tez çalışması, literatürde LEKH kültüründe (enzimatik veya eksplant) TZF materyalinin kültür yüzeyi ve/veya besi ortamı hazırlamada kullanıldığı ilk çalışmadır. Heydenrych ve ark.'nın (64) yaptıkları bir çalışmada 4000 rpm santrifüj sonunda çapraz bağlayıcı olarak yapıya  $CaCl_2$  eklenmesi sonucunda elde edilen TZP jellerin üzerinde travmalı gözlerin evisserasyonu sonucunda elde edilen kornealardan hazırlanan limbal eksplantları kültüre etmişlerdir. Hazırlanan TZP jel birinci grupta hem yüzey kaplayıcı mekanik destek malzemesi hem de üzerinde kültüre olan hücrelere büyüme faktörü desteği sağlayan bir kimyasal destek olarak kullanılmıştır. İkinci grupta ise yüzey kaplama yapılmadan standart DMEM solüsyonuna kan serumu ve/veya rekombinant büyüme faktörleri ile hiç bir modifikasyon uygulanmadan kullanılmıştır. Altı haftalık süre sonunda, TZP jel üzerinde kültüre edilen hücrelerin migrasyon hızının kontrol grubuna göre daha çok olduğunu ve migrasyona uğrayan bu hücrelerin K3 ve K12 boyamaları sonucunda epitel karakterinde olduklarını göstermişlerdir. Ancak bu

çalışmanın kurgulanmasında ve sonuçların gösterilmesinde çok ciddi eksiklikler bulunmaktadır. Öncelikle, çalışmada karşılaştırılan 2 grup arasında birden fazla parametre için farklılık uygulanmış ve sonuçlar bunun üzerinden karşılaştırılmıştır. Birinci grupta hem yüzey hem de beslenme ortamı için bir farklılık söz konusu iken, kontrol grubunda literatürde çok farklı amaçlar için uygulanmakta olan yüzey modifikasyonsuz ve serumsuz kültür şartları oluşturulmuştur. Bu durumda TZP jel kaplama yapılan yüzeye ait olumlu sonuçların kontrol grubunda bulunmayan yüzey modifikasyonundan veya kimyasal besi ortamı eksiliğinden kaynaklandığı net olarak yorumlanamaz. İkinci olarak, TZP hazırlanmasında literatürde bilinmekte olan protokolden farklı olarak tek basamaklı bir santrifüj protokolünden bahsedilmiştir. Kan örneği antikoagülan kaplamalı bir kan tüpüne alınmış ve 4,000 rpm'de süre bilgisi verilmeden santrifüjlenmiştir. Hızlı ve yavaş santrifüj basamaklarından oluşan 2 aşamalı bir hazırlama protokolüne sahip olan TZP jelin tek basamakta nasıl hazırlandığı da net olarak anlatılmamıştır. Son olarak, çalışmanın sonucunda TZP'nin hücre migrasyon hızı haricinde LEKH kültürüne avantaj sunduğu hiçbir analiz gerçekleştirilmemiştir. Enzimatik veya eksplant tekniği ile gerçekleştirilen LEKH kültürlerinde en önemli amaç köklülüğün korunmasıdır. Oysa ki bu çalışmada, sadece diferansiye olmuş santral kornea epitelinin sitoplazmik belirteçleri olarak bilinen K3 ve K12 ile immün boyama yapılmış ve 6 haftalık süre sonunda bu incelemeler gerçekleştirilmiştir. Limal epitel kök hücrelerin doğal yaşantısında limbustan yola çıktıklarında 10-14 gün içinde diferansiyasyona uğrayarak santral kornea yüzey epitelini oluşturdukları bilinmektedir (2, 3). Bu sebeple, 6 haftalık bir süre çalışmanın başlığında belirtilen limbal epitel hücrelerin kültürü için uzun bir süredir ve immün boyamada kullanılan belirteçler de santral kornea epitelinin belirteçleridir. Ayrıca çalışmada kullanılan 2 donörün HIV pozitif olması iyi laboratuvar uygulamaları için uygun olmayan bir durumdur. Bu sonuçlar ile Heydenrych ve ark.'nın (64) limbal epitel hücrelerinin kültüründe TZP'nin etkinliğini tarafsız ve optimum olarak ortaya koyamadıkları düşünülebilir.

Trombositten zengin plazma, LEKH hariç birçok hücrenin kültüründe halen denenmektedir. Lee ve ark. (65), TZP'nin biyolojik etkilerinin insan periodontal ligamentinden elde edilmiş dental kök hücrelerin *in vitro* proliferasyon ve diferansiyasyonu üzerine etkisini incelemiştir. Dental kök hücrelerin %0,5 ve %1



konsantrasyonda proliferasyon ve mineralizasyon diferansiyasyonu açısından olumlu etkiler oluşturduğunu, ancak proliferasyon ve koloni oluşumunun %5 konsantrasyonda düştüğünü göstermişlerdir. Wu ve ark. (66), kondrojenik hücre hattı ile gerçekleştirdikleri *in vitro* hücre kültüründe pro-inflamatuar sitokinler ile indüklenmiş artrit modeli oluşturmuşlar ve TZP'nin etkinliğini incelemişlerdir. Kollajen matriks üzerinde pro-inflamatuar sitokinler aracılığı ile dejenere olmaya başlayan kondrositlerin re-proliferasyonu ve rejenerasyonunda, 1 ng/ml TGF- $\beta$  içeren TZP'nin en etkin doz olduğunu göstermişlerdir. Li ve ark. (67), yağ doku kaynaklı kök hücrelerin nöral diferansiyasyonunda TZP'nin etkinliğini incelemişlerdir. Yağ doku alımı ameliyatı sırasında elde edilen dokulardan kök hücreler izole edilmiş ve yine aynı hastadan alınan kan örneği ile otojenik TZP hazırlanmıştır. Kontrol grubunda literatürde sıklıkla kullanılmakta olan nöral diferansiyasyon besi ortamı kullanılırken, çalışma grubunda %10 TZP içeren modifiye diferansiyasyon ortamı kullanılmıştır. Hücre proliferasyon ve diferansiyasyon analizleri sonucunda %10 TZP içeren modifiye diferansiyasyon ortamının nöron spesifik enolaz (NSE), membran ilişkili protein-2 (MAP-2), büyüme ilişkili protein-43 (GAP-2), nöral hücre adezyon molekülü (NCAM) ve sinapsin-1 (SYN-1) gibi sinir doku farklılaşma belirteçlerini anlamlı olarak yüksek ifade ettiği gözlemlenmiştir. Papait ve ark. (68) ise allojenik TZP'nin monositleri düzenleyici anti-inflamatuar popülasyona diferansiye olmaya teşvik ettiğini ve bunun yara iyileşmesi için önemli bir basamak olduğunu vurgulamışlardır.

Literatürdeki çalışmalardan da anlaşılacağı üzere, TZP'nin *in vitro* kültüre edilmekte olan hücreler üzerinde farklı açılardan olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak, dikkat edilmesi gereken önemli bir konu TZP'nin hücreler üzerine uygulanırken belirli bir konsantrasyonun temel alınması gerektiğidir. Trombositlerin ihtiva ettiği büyüme faktörleri ve matriks proteinlerinin *in vitro* şartlarda büyümeye ve çoğalmaya çalışan hücreler için çok önemli katkılar sağladığı çok iyi bilinmekle birlikte, içeriğin hangi konsantrasyonda ne yönde etki yaratacağı halen tartışılmaktadır. Tabii ki bu durum kültüre edilen hücre tipine göre de değişkenlik göstermektedir. Bu sebeple modifiye hücre kültürü şartları oluşturmak istediğimizde kullanacağımız yenilikçi biyomateryalin morfolojik yöntemlerle yapısını ve kimyasal yöntemlerle içeriğini belirlemek en önemli basamaktır. Literatürdeki birçok çalışma incelendiğinde öncelikle morfolojik, mekanik ve kimyasal özelliklerin karakterize edildiği görülmektedir (66, 69, 70). Passaretti ve

ark. (70), TZP ve TZF'nin büyüme faktörü ve sitokin içeriğini karşılaştırmışlar, insan fibroblast hücreleri ve insan umbilikal ven kaynaklı endotel hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Ancak, 1 günlük inkübasyon sonucunda TZF'den elde ettikleri TGF- $\beta$  ve VEGF-A konsantrasyonlarını sunulan tez çalışmasında bulunan konsantrasyon değerlerine oranla sırasıyla 37 ve 30 kat yüksek bulmuşlardır. Dohan ve ark. (71), 4 gönüllüden aldıkları kan örnekleri ile hazırladıkları TZF'yi DMEM içerisinde 7 gün inkübe etmişler ve belirli aralıklarla örnek alarak ELISA yöntemi ile incelemişlerdir. Yedinci günün sonunda ortama salınan toplam büyüme faktör konsantrasyonunu TGF- $\beta$  için  $273,4 \pm 15,3$  ng/ml, VEGF-A için  $6,071 \pm 773$  pg/ml olarak bulmuşlardır. Bu değerler bizim sonuçlarımız ile karşılaştırıldığında TGF- $\beta$  için 17 kat, VEGF-A için 57 kat yüksek görünmektedir. Su ve ark. (72), hazırladıkları TZF'nin erken dönem salım analizini yaptıklarında 5. saatte toplam salınan TGF- $\beta$  konsantrasyonunu  $72,21 \pm 49,73$  ng/ml, VEGF-A konsantrasyonunu  $1,04 \pm 0,33$  ng/ml, EGF konsantrasyonunu ise  $3,23 \pm 2,77$  ng/ml olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlar sunulan tez çalışmasında tespit edilen konsantrasyon değerlerine göre sırasıyla 18, 37 ve 2 kat yüksektir. Dohan ve ark.'nın (73) yaptıkları bir başka çalışmada ise TZF'ye ait 7. gün TGF- $\beta$  konsantrasyonu yaklaşık olarak 292 ng iken, VEGF-A konsantrasyonu 362 pg olarak bulunmuştur. Bu değerler sunulan tez çalışmasındaki 7. gün konsantrasyon değerleri ile karşılaştırıldığında TGF- $\beta$  için 17 kat yüksek, VEGF-A için ise benzerdir. Ayrıca, literatürde daha birçok çalışmada farklı trombosit ürünlerine ait büyüme faktör içeriği çeşitli analiz yöntemleri ile incelenmiş ve karşılaştırılmıştır (74-77). Sonuçlardan da anlaşılacağı üzere, literatürde farklı kişilerin donör olarak kullanıldığı ve trombosit ürünlerinin hazırlandığı çalışmalarda çeşitli büyüme faktörü konsantrasyonları değerlendirilmiş ve sonuçlar birbirinden oldukça farklı çıkmıştır. Bu durum, çalışmalarda maliyeti çok arttıran analiz yöntemlerinin kısıtlı sayıda gönüllü kullanılmasına olanak tanınması, kişilerin cinsiyeti ve yaşına bağımlı olarak barındırdıkları faktör içeriğinin farklı olmasına bağlanabilir. Sonuçta, AM uygulamalarında olduğu gibi TZF ve TZP uygulamalarında da kişiler arasında büyük farklılıklar gözlenebilir ve çalışmaların sonucunda farklı veriler elde edilebilir. Ancak, TZF'nin AM ile kıyaslandığında otojenik kaynaklı bir biyomateryal olması, bu materyali kişiye özel *in vitro* hücre kültürü uygulamalarına uygun hale getirmektedir. Yani bir kişinin kendi büyüme faktör konsantrasyonu ne seviyede olursa olsun, kendi

hücrelerinin kültürasyonu sırasında kendi TZF'si ile hazırlanmış kültür şartlarının kullanılacak olması, kişinin kendi potansiyeli ile hücrelerini besleyecek olmasına ve her deneyde benzer sonuçların oluşmasına olanak tanıyacaktır.

Son dönemlerde kornea yüzey rekonstrüksiyonu ve *in vitro* kornea epitel kültürlerinde “insan trombosit lizat (İTL)” kullanımı gündeme gelmiştir. İlk kez 2010 yılında Geremicca ve ark. (78) tarafından tanımlanan yöntemde insandan alınan kan örneği, kan serumu hazırlanırken kullanılan santrifüj ayarlarından daha düşük ayarda tek basamakta santrifüjlendikten sonra tüpün üst kısmında kalan süpernatant toplanarak dondurucuya aktarılmış ve nörotrofik ülseri olan hastalara 7-14 gün süre ile uygulanmıştır. Bu hazırlama protokolünün TZP hazırlama protokolünden farkı tek basamakta santrifüj uygulanması ve toplanan süpernatantın trombin ve CaCl<sub>2</sub> eklenmesi ile jel haline getirilmeden göz damlası olarak uygulanmasıdır. Bu tedavi ile hastalarda travma, kimyasal yanıklar veya *Herpes viridae* ailesi enfeksiyonlarından sonra görülen nörotrofik ülserlerin kapandığı ve epitelizasyonun gerçekleştiği görülmüştür. Daha sonra Sandri ve ark. (79) yaptıkları çalışmada, İTL göz damlalarına termosensitif ve mukoadesif özellik kazandırmak amacıyla kondroitin sülfat sodyum ve hidroksipropilmetil sellüloz eklemişler ve tavşanlardan elde ettikleri kornea epitel hücrelerin *in vitro* kültürasyonunda hücre adezyonu ve proliferasyonunu uyardığını göstermişlerdir. Suri ve ark. (80) 2016 yılında yayınladıkları çalışmalarında farklı yöntemler ile elde edilen İTL'yi kadavra kaynaklı limbal eksplantların kültüründe modifiye besi ortamı oluşturulmasında kullanmışlardır. Araştırmacılar bir araştırma laboratuvarından hazır olarak elde ettikleri trombosit süspansiyonlarından 50 µl trombosit ayırdıktan sonra içeriğindeki lökositleri parçalamak amacıyla %1 amonyum oksalat solüsyonunda bekletmişler ve 2 defa dondurma-çözdürme protokolünden geçirmişlerdir. Akabinde parçalanmış lökosit ve trombositleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla 5,700 rpm'de 15 dk santrifüjlemişlerdir. Daha sonra filtreden geçirilen İTL, hücrelerin besi ortamına eklenmiştir. Amniyotik membran ile kaplanmış yüzeylerde fetal sığır serumu ve İTL ile modifiye edilmiş besi ortamlarında kültüre edilen limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerde köklülüğü ifade eden p63 ve ABCG2 belirteçlerinin İTL ile modifiye edilmiş besi ortamında daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, insan serumu ile hazırlanan İTL'lerin büyüme faktör içerikleri tek seferde alınan örneklerden karşılaştırılmış ve İTL'nin VEGF-A, TGF-β ve EGF

açısından konsantrasyonu daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, İTL'nin içerdiği büyüme faktörlerinin LEKH kültüründe köklülüğü koruyarak proliferasyonu arttıran bir besleyici olduğu vurgulanmıştır. Ancak Suri ve ark.'nın (80) yaptıkları bu çalışmada migrasyona uğrayan hücrelere mekanik destek sağlayan AM yüzey kaplamanın bulunması ve İTL ve AM'nin otojenik ve allojenik olarak farklı kaynaklardan elde ediliyor olması sonuçların tek başına İTL'ye bağlanmasını güçleştirmektedir. Ayrıca, literatürde çok farklı protokoller ile hazırlanan İTL'nin standardizasyonu henüz gerçekleştirilememiştir. Suri ve ark.'nın (80) yapmış oldukları çalışmada hazırlama protokolünde kullanılan amonyum sülfat solüsyonu toksik bir kimyasal olarak hücrelere olumsuz etkiler yaratabilir ve sonuç hücre kültürü ürününün *in vivo*'ya naklinde dezavantaj oluşturacaktır. Sonuç olarak, optimum hazırlama protokolü henüz belirlenememiş, toksik kimyasalların kullanıldığı, zaman alıcı ve maliyeti yüksek bir protokol ile hazırlanıyor olması İTL'nin dezavantajları arasında sıralanabilir. Ancak, TZF ve TZP'de olduğu gibi otojenik kaynaktan hazırlanabiliyor olması ilerleyen dönemde kişiselleştirilmiş laboratuvar ve tedavi uygulamaları için avantaj sunmaktadır. Matthyssen ve ark.'nın (81) yapmış oldukları bir çalışmada korneal stromadan elde edilen mezenşimal kök hücrelerin *in vitro* kültürasyonunda kültür yüzeyine bağlanma, diferansiyasyon ve mezenşimal kök hücre belirteçleri açısından fetal sığır serumu kullanılan grup ile İTL kullanılan grup arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık olmadığını, ancak İTL'nin *in vitro* hücre kültürlerinde hayvansal kaynaklı ürün kullanımına bir avantaj sunduğunu savunmuşlardır. Sandri ve ark. (82) ise farklı kontakt lens materyalleri ile birleştirdikleri İTL'yi *in vitro* kornea epitel hücre kültüründe kullanmışlardır. Negatif yüklü kondroitin sülfat materyalinin pozitif yüklü birçok büyüme faktörü ile etkileşime girerek yıkımını azalttığını ve stabilizasyonunu sağladığını savunan araştırmacılar, kontakt lens-İTL-kondroitin sülfat kombinasyonu üzerinde kültüre edilen korneal epitel hücrelerin proliferasyonunun arttığını göstermişlerdir. Literatürde daha birçok çalışmada İTL yardımcı biyomateryal olarak kullanılmaktadır (83-86).

Gerçekleştirilen tüm hücre kültürü çalışmaları sonucunda, insan kaynaklı biyomateryallerden oluşan ve özgün olarak kurgulanmış hücre kültür protokolünün limbal eksplant kültür tekniği ile elde edilen hücrelerin köklülüğünü koruduğu ve proliferasyonunu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir. İnsan kaynaklı fibrin kaplama,

serum ve besleyici ortam varlığında kùltùre edilen limbal eksplantlardan arzulanan sonuçların elde edilmiş olması, literatürde altın standart olarak bilinen yaklaşımlara ciddi bir avantaj sunmaktadır. Bu avantajlar sebebiyle, kişiye özel iyi laboratuvar uygulamaları ve güvenli klinik uygulamalarda kullanılacak yeni bir doğal biyomateryal olarak gelecekte yapılacak çalışmalarda kullanılabilir.



## 5. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- ❖ Limbal epitel kök hücrelerin elde edilmesinde limbal eksplant tekniği kullanılmış ve tüm çalışma gruplarında hücre migrasyonu gözlenmiştir.
- ❖ Tüm *in vitro* hücre kültürü deneylerinde sadece insan kaynaklı ürünler steril şartlarda ve kurallara uygun olarak kullanılmış ve toksik kimyasallar, sentetik malzemeler, hayvansal kaynaklı ürünler ve rekombinant teknoloji ile üretilmiş faktörler kültür ortamından elimine edilmiştir. Dolayısıyla, *in vitro* hücre kültürü deneysel çalışmalarının tamamı iyi laboratuvar uygulamaları şartlarını yerine getirmektedir.
- ❖ *In vitro* hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan insan kaynaklı amniyotik membranların ait olduğu gönüllülerin serolojik kontrolleri hem başlangıçta hem de çalışmanın başlangıcından itibaren 6. ayda yapılarak negatif olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, iyi laboratuvar uygulamalarını destekleyen niteliktedir.
- ❖ *In vitro* hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan trombosit zengin fibrin materyallerinin ait olduğu gönüllülerin serolojik kontrolleri hem başlangıçta hem de çalışmanın başlangıcından itibaren 6. ayda yapılarak negatif olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, iyi laboratuvar uygulamalarını destekleyen niteliktedir.
- ❖ *In vitro* hücre kültür deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş insan kaynaklı amniyotik membran ile 1,000 rpm 5 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin materyali morfolojik açıdan karşılaştırıldığında 2 boyutlu ve 3 boyutlu görünümünün birbirinden oldukça farklı olduğu gözlemlenmiştir. Amniyotik membran sıkı konumlanmış ince fiber çapları ve daha geniş gözenek çaplarına sahipken, trombosit zengin fibrin biyomateryali daha gevşek konumlanmış kalın fiber çaplarına ve geniş gözenek çaplarına sahip bulunmuştur.
- ❖ *In vitro* hücre kültür deneylerinde kullanılmak üzere hazırlanan insan kaynaklı donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş ve taze amniyotik membran ile 1,000

rpm 5dk ve 2,700 rpm 12 dk protokolleri ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin materyallerinin büyüme faktörü içerikleri *in vitro* salım çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Epidermal büyüme faktörü için en yüksek konsantrasyon 2728,1±208,6 pg/ml olarak 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin materyaline aittir. Vasküler endotel büyüme faktörü-A için en yüksek konsantrasyon 132,2±21,6 pg/ml olarak taze amniyotik membrana aittir. Transforme edici büyüme faktörü-β için en yüksek konsantrasyon ise 22051,2±10582,4 pg/ml olarak 2,700 rpm 12 dk protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin materyaline aittir.

- ❖ *In vitro* salım çalışmalarında karşılaştırılan biyomateryallerin 14. Gün toplam büyüme faktörü konsantrasyonları ile insan kaynaklı serumdan tek seferde bakılan büyüme faktörü konsantrasyonları karşılaştırıldığında, insan kaynaklı trombosit zengin fibrin biyomateryallerinin epidermal büyüme faktörü, vasküler endotel büyüme faktörü-A ve transforme edici büyüme faktörü-β içeriğinin insan kan serumundan yüksek olduğu görülmüştür.
- ❖ *In vitro* hücre kültür deneylerinde kullanılmak üzere elde edilen tüm limbal dokular çalışmada belirlenen 4 adet çalışma grubuna rastgele dağıtılmıştır. Grup 1, donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş amniyotik membran ile hazırlanmış kültür yüzeyi + standart DMEM-HAM's F12 besi ortamı + %10 insan serumu; Grup 2, donmuş-çözdürülmüş-de-epitelize edilmiş amniyotik membran ile hazırlanmış kültür yüzeyi + taze amniyotik membran ile modifiye edilmiş DMEM-HAM's F12 besi ortamı + %10 insan serumu; Grup 3, 1,000 rpm 5 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin ile hazırlanmış kültür yüzeyi + standart DMEM-HAM's F12 besi ortamı + %10 insan serumu; Grup 4, 1,000 rpm 5 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin ile hazırlanmış kültür yüzeyi + 2,700 rpm 12 dk santrifüj protokolü ile hazırlanmış trombosit zengin fibrin ile modifiye edilmiş besi ortamı + %10 insan serumu'ndan oluşmaktadır.
- ❖ *In vitro* hücre kültür deneylerinde kullanılmak üzere elde edilen tüm limbal dokuların ait olduğu kadavraların demografik özellikleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar gruplara rastgele dağıtılan limbal doku parçalarının limbal epitel

kök hücre içeriği bakımından yakın potansiyelde olduğunu ve deney sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebilecek bir farklılığa sahip olmadığını göstermektedir.

- ❖ *In vitro* hücre kültür deneylerinde hücrelerin migrasyona başlama süreleri ortalama 2,5 gün olarak tespit edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.
- ❖ *In vitro* hücre kültür deneylerinde yüzeylerin insan kaynaklı trombosit zengin fibrin biyomateryali ile kaplı olduğu Grup 3 ve Grup 4'te limbal eksplantlardan hücre migrasyonu ile eş zamanlı yüzeydeki fibrin jelin degradasyonu başlamıştır. Bu sebeple, Grup 3 ve Grup 4'te ortalama hücrelerin migrasyona başlama zamanı ile yüzey fibrin kaplamanın yıkımının başlama zamanı benzer olarak tespit edilmiştir.
- ❖ Kültür yüzeylerinin doluluğa ulaşma oranları 1. haftada insan amniyotik membranı ile modifiye edilmiş kültür yüzeyleri ve besi ortamlarını içeren Grup 1 ve Grup 2'de insan kaynaklı trombosit zengin fibrin biyomateryali ile modifiye edilmiş kültür yüzeyi ve besi ortamı içeren Grup 3 ve Grup 4'e oranla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ancak bu farklılık, ikinci haftada kapanmış ve istatistiksel açıdan anlamlı olmayacak şekilde Grup 3 ve Grup 4 lehine artmıştır.
- ❖ Tüm deneysel gruplarda limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerin hareketleri 14 günlük kültür süresi boyunca canlı hücre görüntüleme sistemi ile kaydedilmiştir. Limbal eksplanta yakın bölgeden yapılan incelemelerde eksplantlardan çıkış yapan hücrelerin boyutlarının küçük, çekirdeklerinin yuvarlak ve çekirdek/sitoplazma oranının yüksek olduğu gözlemlenmiş ve bu durum gruplar arasında farklılık arz etmemiştir.
- ❖ Tüm deneysel gruplarda limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerin morfolojileri 14 günlük kültür süresi boyunca belirli aralıklarla faz kontrast mikroskop ile görüntülenmiştir. Kültürün ilk günlerinde limbal eksplanta yakın bölgelerden alınan görüntülerde küçük, yuvarlak çekirdekli, çekirdek/sitoplazma oranı yüksek hücrelerin varlığı dikkat çekerken, 10. günden sonra özellikle göç eden hücre kolonisinin uç kısımlarında nispeten büyük, çekirdek/sitoplazma oranı azalmış ve kaldırım taşı morfolojisinde hücrelerin varlığı gözlemlenmiştir.



Morfolojik analizlerde Grup 2'ye ait bazı eksplant gözlerinde ince, uzun morfolojiye sahip fibroblastik hücrelerin varlığı dikkat çekmiştir.

- ❖ Tüm deneysel gruplarda limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerin morfolojileri 14. günde çekirdek/hücre iskeleti boyamaları ile incelenmiştir. Grup 1 ve Grup 2'de çok tabakalı, yer yer boşlukların olduğu hücre kolonisi gözlenirken, Grup 3 ve Grup 4'te daha az katmanlı tek sıra homojen, birbirine yakın morfolojide ve devamlılık gösteren hücre kolonileri gözlenmiştir. Grup 2'de faz kontrast mikroskop analizlerinde görüldüğü gibi ince, uzun morfolojiye sahip fibroblastik hücreler gözlemlenmiştir.
- ❖ Tüm deneysel gruplarda limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerin canlılıkları 14. günde canlı-ölü boyamalar ile incelenmiştir. Grup 2'de diğer gruplarla kıyaslandığında daha fazla sayıda ölü hücrenin varlığı dikkat çekmiştir. Grup 2'de tespit edilen ölü hücrelerin özellikle çok katmanlı hücrelerin olduğu bölgelerde canlı hücrelerin alt kısımlarında bulunduğu dikkat çekmiştir.
- ❖ Tüm deneysel gruplarda limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerin köklülüğü immünohistokimyasal boyamalar ile kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Limbal epitel kök hücreler için pozitif belirteçler olarak bilinen tümör protein 63 ve ATP bağlanıcı kaset protein G2'nin Grup 3 ve Grup 4'te, Grup 1 ve Grup 2'ye oranla daha fazla boyanmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir. Limbal epitel kök hücreler için negatif belirteç olarak bilinen Sitokeratin 12'nin ise Grup 1 ve Grup 2'de, Grup 3 ve Grup 4'e kıyasla daha fazla boyanmaya sebep olduğu gözlemlenmiştir.
- ❖ Tüm deneysel gruplarda limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerin köklülüğü akış sitometre analizi ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Limbal epitel kök hücreler için pozitif belirteçler olarak bilinen tümör protein 63 ve integrin  $\alpha 9\beta 1$  için Grup 3 ve Grup 4'te ortalama %89,5 ifade oranları tespit edilmişken, bu oran Grup 1 ve Grup 2 için ortalama %57,5 olarak tespit edilmiştir. Limbal epitel kök hücreler için negatif belirteçler olarak bilinen Sitokeratin 3 ve Konneksin 43'ün ise Grup 3 ve Grup 4'te ifade oranı ortalama olarak %4 tespit edilmişken, Grup 1 ve Grup 2'de ortalama %22,5 olarak tespit edilmiştir.

- ❖ Tüm deneysel gruplarda limbal eksplantlardan migrasyona uğrayan hücrelerin gen ifade analizleri gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirilmiştir. Limbal epitel kök hücreler için pozitif belirteç olarak bilinen tümör protein 63 için Grup 2 istatistiksel açıdan anlamlı olarak en düşük gen ifade analizine sahip olarak tespit edilmiştir. Limbal epitel kök hücreler için negatif belirteçler olarak bilinen Sitokeratin 3 ve Konneksin 43 için Grup 3 ve Grup 4 istatistiksel açıdan anlamlı olarak en düşük gen ifade analizine sahip tespit edilmiştir.
- ❖ Tüm sonuçlar göz önüne alındığında insan kaynaklı trombositten zengin fibrin biyomateryalleri ile modifiye edilmiş kültür şartlarının elde edilen hücrelerin limbal epitel kök hücre belirteçlerini daha yüksek oranda ifade etmesine ve kültür sonunda daha yüksek kültür yüzeyi doluluk oranına ulaşmasına destek olduğu görülmektedir. Önerilen tamamen insan kaynaklı materyallerden oluşan hücre kültür sisteminin ilerleyen dönemde kişiselleştirilmiş laboratuvar ve klinik uygulamalar için önemli avantajlar sunduğu görülmektedir.

## 6. ÖNERİLER

Bu tez çalışması ile literatürde ilk kez insan kaynaklı trombositten zengin fibrin biyomateryali varlığında limbal eksplant kültür gerçekleştirilmiştir. Sunulan tüm sonuçlar literatür ışığında değerlendirildiğinde önerilen kültür sisteminin şu an sıklıkla kullanılmakta olan ve altın standart olarak görülen limbal epitel kök hücre kültür sistemlerine önemli bir avantaj sunduğu görülmektedir. Literatürdeki önemli bir açıklığı kapatan bu çalışma ile dünyada bu konuda araştırma yapmakta olan tüm araştırmacılara farklı bir seçenek sunulmuş olacaktır. Günümüzde *in vitro* çalışmalar ile meydana getirilen doku mühendisliği ve hücre kültürü ürünlerinin klinik uygulamalara geçiş yapabilmesi için aranan ve sıkı şartlar barındıran iyi laboratuvar uygulamalarının temelini tüm *in vitro* deneylerde insana zarar vermeyecek madde ve teçhizatın kullanılması ilkesi oluşturmaktadır. Bu sebeple, sunulan tez çalışması iyi laboratuvar uygulamaları prensiplerini temel noktada birebir karşılamaktadır.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışması ile hipotezini kurduğum ve sonuca ulaştırdığım bu hücre kültür sisteminin ilerleyen dönemde yapılacak *in vivo* çalışmalarda güvenle kullanılabileceğini önermekteyim.

## 7. KAYNAKLAR

1. Lwigale PY. Chapter Four-Corneal Development: Different Cells from a Common Progenitor. *Progress in molecular biology and translational science*. 2015;134:43-59.
2. Epstein AB. Understanding and Treating Corneal Scratches and Abrasions 2015 [Available from: <http://discoveryeye.org/treatment-corneal-scratches-and-abrasions/>].
3. Kaufman HE. *The cornea*: Butterworth-Heinemann; 1988.
4. Majumder PD. *Illustrated Ocular Anatomy* 2008 [Available from: <http://www.eophtha.com/eophtha/anatomy/anatomyofcornea1.html>].
5. Cotsarelis G, Cheng S-Z, Dong G, Sun T-T, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989;57(2):201-9.
6. Secker GA, Daniels JT. Limbal epithelial stem cells of the cornea. 2009.
7. Li W, Hayashida Y, Chen Y-T, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell research*. 2007;17(1):26-36.
8. Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem cells*. 2004;22(3):355-66.
9. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414(6859):98-104.
10. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Experimental eye research*. 2005;81(3):247-64.
11. Haagdoorns M, Van Acker SI, Van Gerwen V, Ni Dhubhghaill S, Koppen C, Tassignon M-J, et al. Limbal stem cell deficiency: current treatment options and emerging therapies. *Stem cells international*. 2015;2016.
12. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea*. 1988;7(1):71-81.
13. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Archives of Ophthalmology*. 1998;116(4):431-41.
14. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *The Lancet*. 1997;349(9057):990-3.
15. Zhang X, Sun H, Tang X, Ji J, Li X, Sun J, et al. Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells. *Experimental eye research*. 2005;80(2):227-33.
16. Kim H-S, Song XJ, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li D-Q. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Experimental eye research*. 2004;79(1):41-9.
17. Mariappan I, Kacham S, Purushotham J, Maddileti S, Siamwala J, Sangwan VS. Spatial distribution of niche and stem cells in ex vivo human limbal cultures. *Stem cells translational medicine*. 2014;3(11):1331-41.
18. Ramachandran C, Basu S, Sangwan VS, Balasubramanian D. Concise review: the coming of age of stem cell treatment for corneal surface damage. *Stem cells translational medicine*. 2014;3(10):1160-8.
19. Rheinwaldt JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation keratinizing colonies from single cell is. *Cell*. 1975;6(3):331-43.

20. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*. 2001;268(10):2764-72.
21. Sangwan VS, Basu S, MacNeil S, Balasubramanian D. Simple limbal epithelial transplantation (SLET): a novel surgical technique for the treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *British Journal of Ophthalmology*. 2012;96(7):931-4.
22. Heckmann N, Auran R, Mirzayan R. Application of Amniotic Tissue in Orthopedic Surgery. *American journal of orthopedics (Belle Mead, NJ)*. 2016;45(7):E421-E5.
23. Dua HS. Amniotic membrane transplantation. *British Journal of Ophthalmology*. 1999;83(6):748-52.
24. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. *Cornea*. 2000;19(1):65-71.
25. Tawes RL, Sydorak GR, DuVall TB. Autologous fibrin glue: the last step in operative hemostasis. *The American journal of surgery*. 1994;168(2):120-2.
26. Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology*. 2015;103(2):126-35.
27. Carlson NE, ROACH RB. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *The Journal of the American Dental Association*. 2002;133(10):1383-6.
28. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K-I, Nagasaka T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue engineering*. 2004;10(5-6):955-64.
29. Ramos-Torrecillas J, De Luna-Bertos E, Garcia-Martinez O, Ruiz C. Clinical utility of growth factors and platelet-rich plasma in tissue regeneration: a review. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*. 2014;26(7):207-13.
30. Mehrotra D, Kumar S, Dhasmana S. Hydroxyapatite/collagen block with platelet rich plasma in temporomandibular joint ankylosis: a pilot study in children and adolescents. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;50(8):774-8.
31. Willemsen JC, van der Lei B, Vermeulen KM, Stevens HP. The effects of platelet-rich plasma on recovery time and aesthetic outcome in facial rejuvenation: preliminary retrospective observations. *Aesthetic plastic surgery*. 2014;38(5):1057-63.
32. Alio JL, Rodriguez AE, WróbelDudzinska D. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. *Current opinion in ophthalmology*. 2015;26(4):325-32.
33. Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM, Rio AL. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: a pilot study. *JAMA ophthalmology*. 2013;131(6):745-51.
34. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e45-e50.
35. Pathak H, Mohanty S, Urs AB, Dabas J. Treatment of oral mucosal lesions by scalpel excision and platelet-rich fibrin membrane grafting: A review of 26 sites. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;73(9):1865-74.
36. Guinot A, Arnaud A, Azzis O, Habonimana E, Jasienski S, Frémond B. Preliminary experience with the use of an autologous platelet-rich fibrin membrane for

- urethroplasty coverage in distal hypospadias surgery. *Journal of pediatric urology*. 2014;10(2):300-5.
37. Soydan SS, Uckan S. Management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with a platelet-rich fibrin membrane: technical report. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;72(2):322-6.
  38. Jankovic S, Aleksic Z, Klokkevold P, Lekovic V, Dimitrijevic B, Barrie Kenney E, et al. Use of platelet-rich fibrin membrane following treatment of gingival recession: a randomized clinical trial. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*. 2012;32(2):165.
  39. Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Açil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clinical oral implants research*. 2010;21(5):543-9.
  40. Ehrenfest DMD, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte M-P, Charrier J-B. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009;108(3):341-52.
  41. Wu CL, Lee SS, Tsai CH, Lu KH, Zhao JH, Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Australian dental journal*. 2012;57(2):207-12.
  42. Ehrenfest DMD, Doglioli P, Giuseppe M, Del Corso M, Charrier J-B. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Archives of oral biology*. 2010;55(3):185-94.
  43. Tsai C-H, Shen S-Y, Zhao J-H, Chang Y-C. Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. *Journal of Dental Sciences*. 2009;4(3):130-5.
  44. Gaßling VL, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009;108(1):48-55.
  45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
  46. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2006;24(2):462-71.
  47. Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2000;22(1):87-96.
  48. Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, et al. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell motility and the cytoskeleton*. 2005;60(1):24-34.
  49. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R, et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein–nanoparticle complexes and influence on the cellular response. *ACS nano*. 2010;4(12):7481-91.
  50. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-

free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem cells*. 2007;25(7):1603-9.

51. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*. 2009;27(3):297-306.

52. Matthyssen S, Ni DS, Van Gerwen V, Zakaria N. Xeno-Free Cultivation of Mesenchymal Stem Cells From the Corneal Stroma. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(5):2659.

53. Pathak M, Cholidis S, Haug K, Shahdadfar A, Moe MC, Nicolaisen B, et al. Clinical transplantation of ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells using a culture medium with human serum as single supplement: a retrospective case series. *Acta ophthalmologica*. 2013;91(8):769-75.

54. Zhao Y, Ma L. Systematic review and meta-analysis on transplantation of ex vivo cultivated limbal epithelial stem cell on amniotic membrane in limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2015;34(5):592-600.

55. Mis B, Rolland E, Ronfard V. Combined use of a collagen-based dermal substitute and a fibrin-based cultured epithelium: a step toward a total skin replacement for acute wounds. *Burns*. 2004;30(7):713-9.

56. Zhao B, Liu J-Q, Zheng Z, Zhang J, Wang S-Y, Han S-C, et al. Human amniotic epithelial stem cells promote wound healing by facilitating migration and proliferation of keratinocytes via ERK, JNK and AKT signaling pathways. *Cell and tissue research*. 2016;365(1):85-99.

57. Sangwan VS, Basu S, Vemuganti GK, Sejpal K, Subramaniam SV, Bandyopadhyay S, et al. Clinical outcomes of xeno-free autologous cultivated limbal epithelial transplantation: a 10-year study. *British Journal of Ophthalmology*. 2011:bjophthalmol-2011-300352.

58. Ljubimov A, Sareen D, Ornelas L, Sahabian A, Hemmati D, Ghiam C, et al. A NEW RAPID METHOD OF DENUING HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE FOR LIMBAL AND STEM CELL CULTURE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54(15):998-.

59. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, et al. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2008;14(4):371-81.

60. Taghiabadi E, Nasri S, Shafieyan S, Firoozinezhad SJ, Aghdami N. Fabrication and characterization of spongy denuded amniotic membrane based scaffold for tissue engineering. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2015;16(4):476.

61. Owaki T, Shimizu T, Yamato M, Okano T. Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies. *Biotechnology journal*. 2014;9(7):904-14.

62. Matsuura K, Utoh R, Nagase K, Okano T. Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*. 2014;190:228-39.

63. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*. 2004;77(3):379-85.

64. Heydenrych LG, du Toit DF, Aldous CM. Eviscerated Corneas as Tissue Source for Ex Vivo Expansion of Limbal Epithelial Cells on Platelet-Rich Plasma Gels. *Current eye research*. 2016:1-5.

65. Lee U-L, Jeon SH, Park J-Y, Choung P-H. Effect of platelet-rich plasma on dental stem cells derived from human impacted third molars. *Regenerative medicine*. 2011;6(1):67-79.
66. Wu C-C, Chen W-H, Zao B, Lai P-L, Lin T-C, Lo H-Y, et al. Regenerative potentials of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis. *Biomaterials*. 2011;32(25):5847-54.
67. Li H, Han Z, Liu D, Zhao P, Liang S, Xu K. Autologous platelet-rich plasma promotes neurogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. *International Journal of Neuroscience*. 2013;123(3):184-90.
68. Papait A, Cancedda R, Mastrogiacomo M, Poggi A. Allogeneic platelet-rich plasma affects monocyte differentiation to dendritic cells causing an anti-inflammatory microenvironment putatively fostering the wound healing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2016.
69. Pifer MA, Maerz T, Baker KC, Anderson K. Matrix metalloproteinase content and activity in low-platelet, low-leukocyte and high-platelet, high-leukocyte platelet rich plasma (PRP) and the biologic response to PRP by human ligament fibroblasts. *The American journal of sports medicine*. 2014;42(5):1211-8.
70. Passaretti F, Tia M, D'esposito V, Pascale MD, Corso MD, Sepulveres R, et al. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. *Platelets*. 2014;25(4):252-6.
71. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. 2009;27(1):63-9.
72. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su C-H, Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009;108(1):56-61.
73. M Dohan Ehrenfest D, Bielecki T, Jimbo R, Barbé G, Del Corso M, Inchingolo F, et al. Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1145-52.
74. Burnouf T, Lee C-Y, Luo C-W, Kuo Y-P, Chou M-L, Wu Y-W, et al. Human blood-derived fibrin releasates: composition and use for the culture of cell lines and human primary cells. *Biologicals*. 2012;40(1):21-30.
75. Sadeghi-Ataabadi M, Mostafavi-pour Z, Vojdani Z, Sani M, Latifi M, Talaei-Khozani T. Fabrication and characterization of platelet-rich plasma scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;71:372-80.
76. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orłowska A, Dias A, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*. 2017:1-13.
77. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2017:1-14.



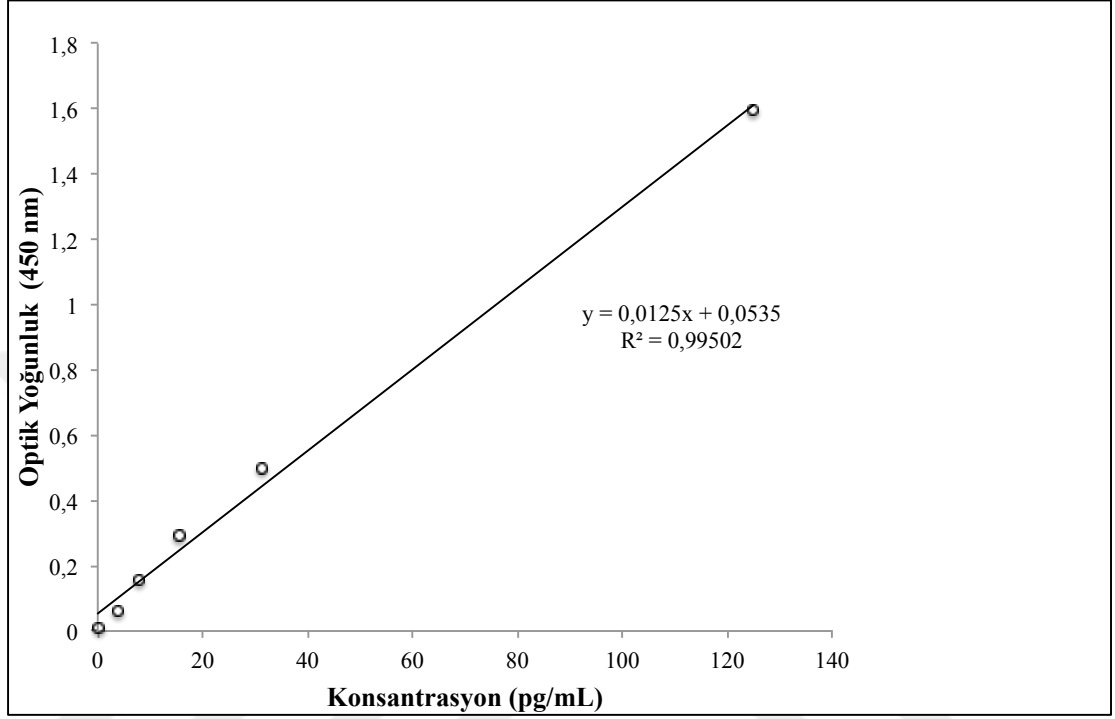
78. Geremicca W, Fonte C, Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood Transfus.* 2010;8(2):107-12.
79. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Del Fante C, et al. Thermosensitive eyedrops containing platelet lysate for the treatment of corneal ulcers. *International journal of pharmaceutics.* 2012;426(1):1-6.
80. Suri K, Gong HK, Yuan C, Kaufman SC. Human Platelet Lysate as a Replacement for Fetal Bovine Serum in Limbal Stem Cell Therapy. *Current eye research.* 2016;41(10):1266-73.
81. Matthyssen S, Dhubhghaill SN, Van Gerwen V, Zakaria N. Xeno-Free Cultivation of Mesenchymal Stem Cells From the Corneal StromaXeno-Free Cultivation of MSCs From the Corneal Stroma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2017;58(5):2659-65.
82. Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Delfino A, Riva F, Cornaglia AI, et al. Platelet lysate and chondroitin sulfate loaded contact lenses to heal corneal lesions. *International journal of pharmaceutics.* 2016;509(1):188-96.
83. Wagner ER, Parry J, Dadsetan M, Bravo D, Riestler SM, van Wijnen AJ, et al. Chondrocyte Attachment, Proliferation, and Differentiation on Three-Dimensional Polycaprolactone Fumarate Scaffolds. *Tissue Engineering Part A.* 2017.
84. Švajger U. Human platelet lysate is a successful alternative serum supplement for propagation of monocyte-derived dendritic cells. *Cytotherapy.* 2017;19(4):486-99.
85. Glovinski PV, Herly M, Mathiasen AB, Svalgaard JD, Borup R, Talman M-LM, et al. Overcoming the bottleneck of platelet lysate supply in large-scale clinical expansion of adipose-derived stem cells: A comparison of fresh versus three types of platelet lysates from outdated buffy coat-derived platelet concentrates. *Cytotherapy.* 2017;19(2):222-34.
86. Tan C, Shichinohe H, Wang Z, Hamauchi S, Abumiya T, Nakayama N, et al. Feasibility and efficiency of human bone marrow stromal cell culture with allogeneic platelet lysate-supplementation for cell therapy against stroke. *Stem Cells International.* 2016;2016.

## 8. EKLER

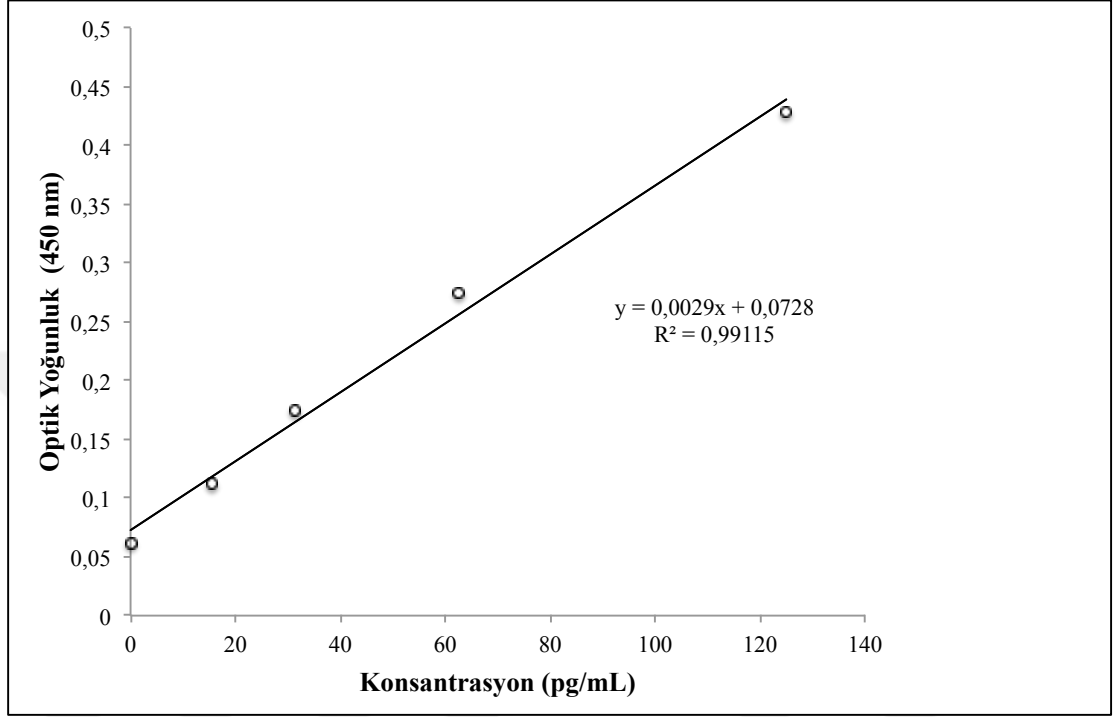
Bilinen konsantrasyonlarda EGF, VEGF-A ve TGF- $\beta$  içeren çözeltilerden spektrofotometrik olarak elde edilen optik absorbans değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafikleri ve deneysel çalışmaların gerçekleştirilebilmesi için alınan insan etik kurul onay belgesi bu bölümde sunulmaktadır.



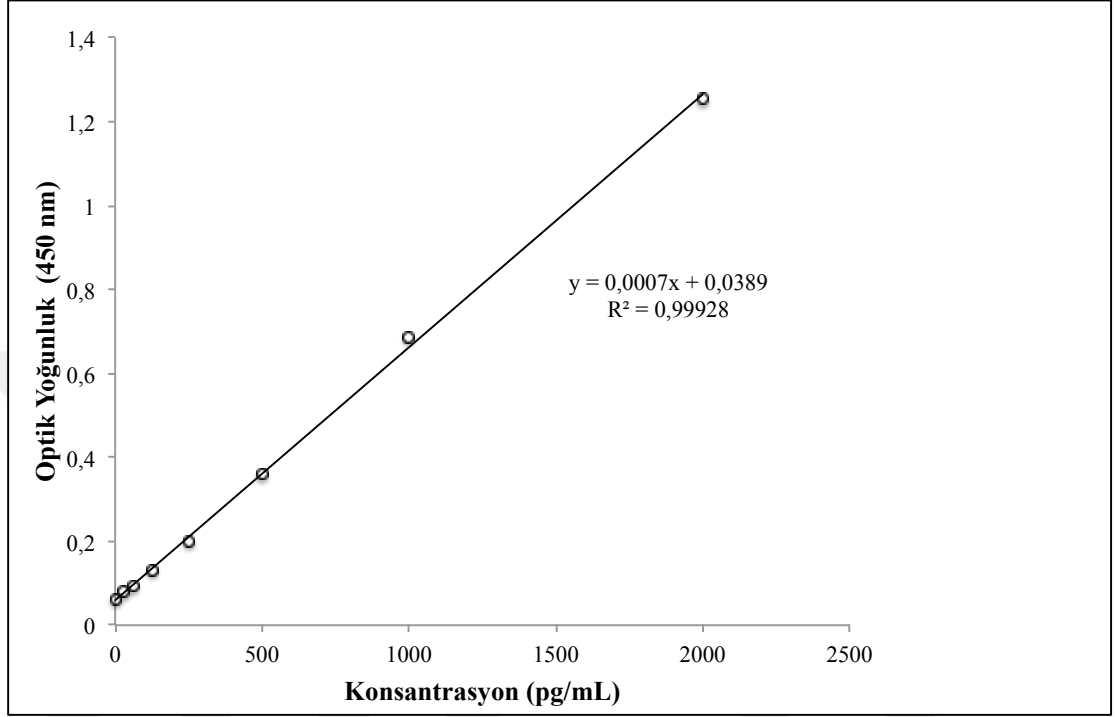
**EK-1. İN VİTRO SALIM ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN EGF  
KALİBRASYON GRAFİĞİ**



**EK-2. İN VİTRO SALIM ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN VEGF-A  
KALİBRASYON GRAFİĞİ**



**EK-3. İN VİTRO SALIM ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN TGF-β  
KALİBRASYON GRAFİĞİ**



**EK-4. DENEYSSEL ÇALIŞMALARIN GERÇEKLEŞTİRİLEBİLMESİ İÇİN  
ALINAN İNSAN ETİK KURUL ONAY BELGESİ**



T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU  
Ankara İli Kamu Hastaneleri Birliği 2 Nolu Genel Sekreterliği  
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği  
Klinik Araştırma Etik Kurulu

Sayı : 2012-KAEK-15/1266  
Konu: Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Etik Kurul Kararı

28.12.2016

**KEÇİÖREN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMA  
ETİK KURULU**

“Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonunda Kullanılmak Üzere İnsan Kaynaklı Fibrin Kaplama Varlığında Limbal Explant Kültür” adlı klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibi tarafından sağlık bakanlığına arzına gerek olmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

Op.Dr. Ömer Faruk TANER  
Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi  
Klinik Araştırmalar Etik Kurul  
Pınarbaşı Mahallesi Sanatoryum Cad.  
Ardahan Sokak No:25 Keçiören / ANKARA  
Web: [www.akeah.gov.tr](http://www.akeah.gov.tr)

## ÖZGEÇMİŞ

Gamze DERELİ CAN 1986 yılında Elazığ'da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2010 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldu. 2011 yılından beri Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göz Kliniğinde asistan hekim olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.

