

**T.C.
KOCAELI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL PENETRAN KORNEA YARALANMASI OLUŞTURULAN
RATLARDA YAĞ DOKU VE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI KÖK HÜCRE
TRANSPLANTASYONUNUN STROMAL YARA İYİLEŞMESİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Bengi YÜCEL DEMİRAYAK

Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi

2014

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DENEYSEL PENETRAN KORNEA YARALANMASI OLUŞTURULAN
RATLARDA YAĞ DOKU VE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI KÖK HÜCRE
TRANSPLANTASYONUNUN STROMAL YARA İYİLEŞMESİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Dr. Bengi YÜCEL DEMİRAYAK
Göz Hastalıkları Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr.Nurşen YÜKSEL**

**Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Nurşen YÜKSEL**

Etik Kurul Onayı 28.02.2010 tarihli KOÜ/HADYEK 2010-08

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca eşsiz tecrübeleriyle her zaman yol gösterici olan, hekimlik bilgi ve becerisi kadar ahlakını da kendisinden kazandığım ve öğrencisi olmaktan onur duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Yusuf ÇAĞLAR'a

Tez çalışmam sırasında deneyimleriyle her zaman ışık tutan, gün geçtikçe daha fazla metalaşan sağlık sistemi içerisinde bize bu mesleği değerleriyle icra etme konusunda her zaman örnek olan tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Nursen YÜKSEL'e

Bilgi, beceri ve tecrübelerinin eşsizliği ile olduğu kadar onları paylaşmakta gösterdiği cömertlikle de örnek bir akademisyen olan, bu meslekte fark yaratmamızı sağlayan sevgili hocam Doç. Dr. Levent KARABAŞ'a

Her zaman, her konuda yardıma hazır olan, sınırların zorlandığı durumlarda dahi koruduğu nezaketi ve hastaya yaklaşım tarzıyla örnek edindiğim sevgili hocam Prof. Dr. Özgül ALTINTAŞ'a

Bitmez tükenmez sabriyle, bildiği her konuyu öğretmek için gösterdiği çabayla, cerrahinin ilk adımlarındayken sonsuz özverisiyle hakkını ödeyemeyeceğim sevgili hocam Berna ÖZKAN'a

Asistanlığım ilk yıllarında kıdemlim olarak birlikte çalıştığımız ve son aylarında yeniden birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ablam Yrd. Doç. Dr. Dilara PİRHAN'a

Zor zamanlarda varlıklarıyla hayatı kolaylaştıran aileme ve

Sevgili eşim Gökhan'a

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	v
GRAFİK LİSTESİ	vi
RESİM LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMALAR	ix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER	
2.1.KORNEA.....	2
2.1.1.KORNEANIN TABAKALARI.....	3
2.1.2.KORNEA İNNERVASYONU.....	5
2.1.3.KORNEA METABOLİZMASI.....	5
2.1.4.KORNEANIN İŞLEVLERİ.....	5
2.1.5.KORNEAL YARA İYİLEŞMESİ.....	7
2.2.KÖK HÜCRE	
2.2.1.GİRİŞ VE TANIMLAMALAR.....	8
2.2.2.MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO FARKLANMA ÖLÇÜTLERİ.....	11
2.2.3.MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KLİNİK KULLANIMLARI.....	13
BÖLÜM 3	
MATERYAL-METOD	
3.1.DENEYSEL KORNEAL HASAR MODELİ OLUŞTURULMASI.....	14
3.2.MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HAZIRLANMASI	
3.2.1.YD-MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE HAZIRLANMASI.....	15
3.2.2.Kİ-MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE HAZIRLANMASI.....	15
3.2.3.YD- VE Kİ-MKH'LERİN KARAKTERİZASYONU.....	16
3.2.4.HÜCRELERİN GFP İLE İŞARETLENMESİ.....	17
3.3.KLİNİK DEĞERLENDİRME.....	18

3.4.İN VİVO KONFOKAL GÖRÜNTÜLEME.....	18
3.5.SAKRİFİKASYON VE DOKU TEMİNİ.....	18
3.6.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	19
3.7.İMMUNOHİSTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR.....	19
3.8.KERATOCAN, ALDH ve CD34 EKSPRESYONU.....	19
3.9.GEN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI (REAL TIME PCR).....	19
3.10.İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	20
BÖLÜM 4	
SONUÇLAR	
4.1.YD- ve Kİ-MKH'LERİN KARAKTERİZASYON.....	21
4.1.1.AKİM SİTOMETRİK ANALİZ.....	21
4.2.KLİNİK DEĞERLENDİRME.....	22
4.3.İN VİVO KONFOKAL GÖRÜNTÜLEME.....	24
4.4.HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	27
4.5.GFP,KERATOCAN,ALDH ve CD34 EKSPRESYONU.....	29
4.6.GEN EKSPRESYON ÇALIŞMALARI.....	32
BÖLÜM 5	
TARTIŞMA.....	35
ÖZET.....	40
ABSTRACT.....	42
KAYNAKLAR.....	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Histopatolojik kesitlerde inflamatuvar aktivite ve fibroblastik aktivite skor ortalamaları.....	28
---	----



GRAFİK LİSTESİ

Grafik 1. Korneal opasite skorlaması.....	23
Grafik 2. Anterior ve posterior stroma keratosit dansite değerleri.....	25
Grafik 3. Aldehid dehidrogenaz, Keratocan ve CD34 ekspresyon düzeyleri.....	29
Grafik 4. Tümör nekrozis faktör ekspresyon düzeyi.....	33
Grafik 5. Interlökin 6 reseptör ekspresyon düzeyi.....	33
Grafik 6. Interlökin 12 b ekspresyon düzeyi.....	34
Grafik 7. Transforming growth faktör beta ekspresyon düzeyi.....	34



RESİM LİSTESİ

Resim 1. Deneklerin ön segment fotoğrafları.....	24
Resim 2. Konfokal mikroskopi ile alınmış anterior stroma görüntüleri.....	26
Resim 3. Konfokal mikroskopi ile alınmış posterior stroma görüntüleri.....	26
Resim 4. Konfokal mikroskopi ile alınmış endotel görüntüleri.....	27
Resim 5. Histopatolojik kesit görüntüleri.....	28



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kök hücreler dört ana kaynaktan köken alırlar.....	9
Şekil 2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması (Baksh Modeli).....	12
Şekil 3. Mezenkimal kök hücrelerin immün fenotipik özellikleri.....	21
Şekil 4. Parafin kesitlerde keratocan antikoruna ile boyanma.....	30
Şekil 5. Parafin kesitlerde Aldehid dehidrogenaz antikoruna ile boyanma.....	31
Şekil 6. Parafin kesitlerde CD34 antikoruna ile boyanma.....	32



KISALTMALAR

ALDH: Aldehid dehidrogenaz

MKH: Mezenkimal kök hücre

D: Dioptri

mm: milimetre

nm: nanometre

Na: Sodyum

K: Potasyum

A: Angstrom

ECM: ekstrasellüler matriks

TGF: Transforming growth faktör

EGF: epitelyal growth faktör

BMP: bone morfojenetik protein

FGF: fibroblast growth faktör

NGF: nerve growth faktör

HGF: hepatosit growth faktör

HLA: human lökosit antijen

Kİ-MKH: kemik iliği kaynaklı kök hücre

YD-MKH: yağ doku kaynaklı kök hücre

µl: mikrolitre

cm: santimetre

Ca: kalsiyum

Mg: magnezyum

HBSS: Hank's balanced salt solusyonu

FBS: fetal bovine serum

α MEM: minimum esansiyel medium eagle alfa modifikasyon

L-DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose

RT-PCR: reverse transkriptaz polimerized chain reaction

GFP: green floresan protein

PBS: fosfat salin tampon

AKD: anterior keratosit dansitesi

PKD: posterior keratosit dansitesi

IL: interlökin

TNF: tümör nekrozis faktör

1.GİRİŞ

Epitel, stroma ve endotel tabakalarından oluşan kornea fonksiyonelliğini devam ettirebilmek için saydam kalmak zorundadır. Korneal saydamlığın kaybı durumunda standart prosedür korneal greft konulmasıdır. Greft sağlanmasındaki yetersizlik ve greft reddi gibi komplikasyonlar yeni arayışları beraberinde getirmektedir.

Hücre temelli tedaviler bu konuda umut vadeden ve keratoplastiye alternatif sağlayabileceği düşünülen tedavi yaklaşımları arasındadır. İnsan kornea epitelyal kök hücreleri ve endotel hücreleri, hücre kültürü ortamında başarıyla çoğaltılıp hayvan ve insan konaklara transplante edilmiştir.⁽¹⁻⁸⁾ Son zamanlarda kornea epitel rekonstrüksiyonunda oral mukoza epiteli başta olmak üzere non-oküler hücreler de kullanılmıştır.⁽⁹⁻¹¹⁾

Korneal kalınlığın %90' ını oluşturan stroma; korneanın immün, enfeksiyöz, ektazik, travmatik birçok hastalığından primer ya da sekonder olarak etkilenmektedir. Rejenerasyon yeteneğinden yoksun bu hücrelerin etkilenmesi korneal skar gelişimi ve görme kaybıyla sonuçlanmaktadır.

Korneal stromanın temel hücreleri olan keratositler mezenkimal kökenli hücrelerdir. Erişkin dokuda keratositler, mitoz göstermeyen, dendritik morfolojiye sahip, Aldehid dehidrogenaz (ALDH) ve CD-34 bakımından pozitif olan hücrelerdir.⁽¹²⁾ Keratositlerce sentezlenen proteoglikan kompozisyonu korneal şeffaflık için vazgeçilmezdir.⁽¹³⁾ Keratocan, keratositlerce sentezlenen bir keratan sülfat proteoglikandır ve keratosit spesifik marker olarak kabul edilmektedir.⁽¹⁴⁾ Korneal yara iyileşmesi sırasında keratositler aktive olurlar, dendritik morfolojilerini kaybedip fibroblast ya da myofibroblastlara dönüşürler.^(15,16) Sonuç olarak ALDH ve keratan sülfat sentezi azalır korneal şeffaflık kaybedilir.^(17,18)

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) adipojenik, osteojenik, miyojenik ve kondrojenik hücrelere diferansiye olma yeteneklerinin olduğu gösterilmiştir.⁽¹⁹⁾ Bu dokular da kornea stroması gibi mezenkimden köken alan dokulardır. MKH kemik iliği dışında yağ dokuda, kas, periost ve sinoviyumda da bulunmaktadır.⁽²⁰⁾ Bu çalışmada skarla iyileşmesi beklenen korneal penetran yaralanma sonrasında kemik iliği ya da yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerin korneal yara iyileşmesine katkı sağlayıp sağlamadığını ve bu açıdan bir farklılık gösterip göstermediklerini ortaya koymayı amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KORNEA

Kornea embriyolojik olarak incelendiğinde nöroektoderm ve mezenkim olmak üzere iki dokudan köken almıştır . İlk olarak intrauterin hayatın 8.haftasında yüzeyel ektodermden kornea epiteli ve desme zarı gelişmektedir . Hemen devamında nöroektodermden endotel oluşmaktadır. Beşinci ayda mezenkim dokunun göçüyle kornea stroması ve yüzey tabakada bu hücrelerin yoğunlaşmasıyla da Bowman katı gelişmektedir.^(21,22)

Kornea, makroskopik olarak baktığımızda skleranın devamı olan 1/3 ön kısımda yer alan saydam ve optik özelliği olan bölümdür .^(23,24) Kornea skleraya adeta saat camı gibi yerleşmiş ve 40–45 Dioptri (D) kırma gücü olan konveks bir yüzeye sahiptir . Optik görevinden başka dış ortama karşı koruyuculuk görevini de üstlenmiştir . Normal kalınlığı merkezde 520 µm, periferde 650 µm'dir. Erişkinde horizontal çapı 12,6 mm, vertikal çapı 11,7 mm, ön eğrilik yarıçapı 7,8 mm ve arka eğrilik yarıçapı 6,5 mm' dir.^(24,25)

2.1.1 Kornea klasik olarak 5 anatomik tabakadan oluşur.

- . 1- Epitel tabakası
- . 2- Bowman tabakası
- . 3- Stroma
- . 4- Desme membranı
- . 5- Endotel tabakası

Epitel tabakası: Kornea epiteli 40–50 mikron kalınlığındadır ve korneanın 1/10'unu yapar. 5-7 tabaka hücreden ibarettir.

Yüzeyel hücreler, poligonal kanatsız hücreler ve kolumnar bazal hücreler olmak üzere 3 tip hücre içerir:

Yüzeyel hücreler elektron mikroskopik incelemede çok sayıda mikrovillus ve plika içerir. Ayrıca mikrokaliks ile yüzeyi örtülmüştür . Bu yapıları ile epitelin gözyaşı filmine yapışmasını sağlar . Hücrelerarası sıkı bağlantılar ile hücreler arasında ana tomik bariyer

oluşturulur.⁽²⁵⁾

Kolumnar hücreler, tek sıra halinde bazal membran üzerinde dizilir. Bu hücrelerin mitotik aktivitesi vardır. Çoğalıp öne doğru ilerleyerek kanatsız hücreleri oluştururlar . Kolumnar hücrelerde aktin filamanlar ve tonofilamanlar bulunur . Tonofilamanlar ile hücrenin iskeleti korunur . Aktin filamanlar ise yara iyileşmesi sırasında da hücre göçünde rol alır.⁽²⁵⁾Hemidesmozomlar, epitel hücrelerini birbirlerine ve bazal laminaya bağlarlar . “Gap junction” denilen sıkı bağlantı noktaları ise sadece hücreler arasındaki küçük moleküllerin alışverişine izin verir.

Epitel hücreleri, korneada çevreden merkeze doğru ilerler . Bazal ve kanatsız hücreler , arkadan öne doğru ilerler ve dökülürler . Bu, X-Y-Z hipotezi olarak bilinmektedir.⁽²⁶⁻²⁷⁾ Kök hücreler limbusta yüzeysel olarak bulunurlar ve epitel yenilenmesinde yardımcı olurlar . Kornea epiteli gözyaşı , aköz hümör ve limbal kapillerden beslenir. Yenilenme kabiliyeti çok yüksektir. Oksijen ihtiyacı, atmosfer, konjonktiva, kapak damarları ve aközden temin edilir. Glukoz ihtiyacı yine aközden temin edilir. Laktik asit birikimi epitel hücre membranını harap ederek bazal hücreyi bazal membrana yapıştırır ve kornea ödemeine sebep olur ve kistik değişiklikler, erozyon ve neovaskülarizasyon oluşur . Ödem görmeyi bozar , ışık yansımaları ve düzensiz astigmatizmaya yol açar. Epitel tabakası olmadığında stromal iyileşme çok gecikir.

Bowman tabakası: 8 –14 µm kalınlıktadır.Kısa kollajen fibrillerden oluşur . Travmaya karşı dirençlidir. Mikroorganizma ve tümör hücrelerinin korneaya invazyonuna karşı bariyer oluşturur. Yenilenme yeteneği yoktur . Travma sonucu ince tabaka olarak iyileşir ama eski haline geri dönmez.⁽²⁸⁾

Stroma: Fibroblastlara benzeyen keratositler, kollajen fibriller ve ekstraselüler matriks tarafından oluşturulur ve kornea kalınlığının % 90'ını meydana getirir. Yaklaşık 500 µm kalınlığındadır. Stroma %78 oranında sıvı içerir. Keratositler yassı ve uzun olup korneada yaygın olarak bulunurlar. Kollajen ve mukoprotein sentezinden sorumludurlar. Yaralanmalarda fibrositlere dönüşürler. Sitoplazmalarında bulunan glikojen granülleri korneanın enerji deposunu oluşturur. Stromayı oluşturan kollajen lifler çoğunluğu tip 1 kollajen olmak üzere tip 3,5,6 yapıdadır ve 1 µm çapındadırlar. Tip 1 kollajen 25-35 nm çaplı, 67 nm büyüklüğünde fibrillerden oluşmuştur. Bu fibriller düzgün bir şekilde birleşip lamellaları oluştururlar. Bu lamellalar korneal yüzeye paralel şekilde yerleşmişlerdir ve çeşitli büyüklükte olabilirler. Stroma ön yüzeyinde küçük boyutlarda (0,5-30 µm eninde 0,2-1,2 µm

kalınlıkta) ve arka yüzeye yaklaştıkça daha büyük boyutlarda (100-200 µm eninde 1-2,5 µm kalınlıkta) bulunmaktadır. Birbirlerine paralel, eşit uzaklıkta, düzenli bir yerleşim gösterirler. Aralarındaki uzaklık 55-60 nm'dir. Ekstrasellüler matrikse gömülü kafes şeklindeki dizilimi ile korneanın saydamlığını sağlarlar. Stromada sıvı birikimi bu dizilimi bozarak korneanın saydamlığını bozar. Kornea saydamlığının devamı için çevre sıvılarının osmotik basınçlarının en az interstisyel sıvı basıncı kadar olması gerekir. Kornea stromasında bulunan keratan sülfat, kondroitin sülfat gibi glikoz amino glikanların etkisi ile su tutabilir. Epitel tabakasının sağlam yapısı ve endotel pompa fonksiyonu korneal hidrasyonun kontrolünden sorumludur. Korneanın yapıtaşlarından biri de proteoglikan molekülleridir. Proteoglikanlar hidrofilik mukopolisakkarid yapıdadırlar ve kovalent bağlı glikozaminoglikanlarla birleşirler. Kollajen fibriller korneanın bu temel yapıtaşları içine gömülü olarak bulunurlar. Proteoglikanlar ihtiva ettikleri glikozaminoglikan grubuna göre çok çeşitli olabilirler. Korneal stromadaki temel glikozaminoglikanlar keratan sülfat, dermatan sülfat, kondrotin sülfat ve atipik olarak kovalent bağlı olmayan hyalüronik asittir. Dermatan sülfat ve keratan sülfat korneada en çok bulunan glikozaminoglikanlardır. Bunlar kollajen fibrillerle bağlantılı ve genelde fibrille dik olarak yerleşmişlerdir. Kondrotin sülfat ve hyalüronik asit ise daha az sayıdadır, interfibriller boşluklarda bulunur ve fibrillerle bağlantılı değildirler. Korneada glikozaminoglikanların temel görevi interfibriller boşlukların korunmasıdır. ⁽²⁹⁾

Desme membranı: Stromanın arka sınırı desme tabakasıdır . Kalınlığı yaşla artar ve elastik özelliğe sahiptir. 10 µm kalınlığındadır. İç kısımdaki endotelin ise bazal membranıdır . Bu yüzden korneanın endoteliyal hastalıkları onun yapısında karakteristik değişikliklere yol açar. Açıya 2 mm uzaklıkta son bularak Schwalbe çizgisini yapar. ⁽³⁰⁾

Endotel tabakası: Endotel hücreleri yaklaşık k doğumda 3500 – 4000 hücre/mm², erişkinlerde 2500–3000 hücre/mm² düzeyindedir. Yaklaşık 350 – 400 bin hücre bulunmaktadır. ⁽²⁴⁾ Aközle direkt temastadır . Korneanın beslenmesini üstlenmiştir . Endotelde aktif pompa mekanizması vardır. Bu pompa ısıyla değişir. ⁽³⁰⁾

Endotelyal hücre bölünmesi çocuklarda mevcut iken yetişkinlerde nadirdir . Yaşla, hücre sayısında azalma ve büyüklüğünde artma olur . Hücre sayısı 300–400/ mm² nin altında düşerse ödem gelişir . Aşırı stres ve travma sonucu endotel hücreleri fibroblast benzeri hücrelere değişebilmektedir . Kornea endotel kaybı olduğunda çoğalamayan endotel hü creleri kendilerini genişleterek kayıp olan yerleri doldururlar. ^(31,32)

2.1.2. Kornea İnnervasyonu

Kornea sinir yönünden çok zengindir. Bunların hepsi duyu sinirleridir. N. Trigemius'un oftalmik dalından (V1) gelen uzun arka siliyer sinirler, ön ve arka dala ayrılarak korneaya girmektedirler . Lifler korneaya ulaştıkları noktadan itibaren miyelin kılıflarını kaybederler .Ön kısma giden sinirler epitel bazal membranı ve bazal hücreler seviyesinde sonlanır. Buna karşılık endotel seviyesinde sinir lifi yoktur. (24)

2.1.3. Kornea Metabolizması

Korneanın saydamlığı ve dehidratasyonunun devamlılığı için enerji gereksinimi vardır. Kornea glukozu aköz hümörden almaktadır. Gözyaşı ve limbal kapillerler yolu ile glukoz kazancı daha düşük düzeydedir . Korneada glukoz ‘‘Krebs siklusu’’ ile enerjiye çevrilmektedir. Krebs siklusu da oksijene gereksinim gösterir . Kornea endoteli gerekli oksijeni aköz hümörden , epitel ve stroma ise limbal damarlardan ve gözyaşında çözünmüş oksijenden karşılar. Epitel düzeyinde glukoz, glikojen olarak depolanır . Epitel stromaya göre çok daha yüksek oranlarda ATP , glikojen ve oksidatif enzimler içerir . Kornea endotelinin Krebs siklusu yanında , pentoz fosfat şantı ile çalışabilecek özellikleri bulunmaktadır . Bu yol ile kornea epiteli lipit sentezi yapabilir . Elektrolit düzeyleri karşılaştırıldığında ; kornea stroması Na+, epitel ise K+ iyonu bakımından zengindir. İodoasetat gibi metabolik zehirler le korneanın Krebs siklusu (glukoz) bloke edilirse korneada su tutulumu ve ödem tablosu gelişecektir. Epitel ve endotel metabolizması ATP yokluğundan bozulacak ve Na +-K+ ATP az pompası çalışmadığından korneada elektrolit ve su tutulumu görülecektir. (33)

2.1.4. Korneanın İşlevleri

Kornea üzerinde çok önemli özellikleri barındırmaktadır. İlk sırada gelenler ise kırıcılığı, saydamlığı, dehidratasyonu ve ilaç geçirgenliğidir . Kornea saydamlığının ilk şartı kollajen demetlerinin birbirlerine paralel ve düzgün dizilimidir . Fibrillerin birbirleri ile olan uzaklıkları aynıdır . Eğer aralarındaki mesafe farklılaşırsa bu ışık dağılmasına ve korneada bulanıklığa sebep olur . Ancak şüphesiz kornea saydamlığı sadece kollajen liflerin düzgün ve simetrik dizilimine bağlı değildir . Kollajen demetlerin uzaklığı ışık dalga boyundan k ısa olduğu sürece saydamlık devam eder . Korneada kan damarının olmaması ,korneadaki hücrelerarası vasatın aynı kırıcılığa sahip olması ve korneanın su içeriği de saydam bir kornea için vazgeçilmez unsurlardır . Ani göz içi basıncı artışı kornea saydamlığı nı azaltır . Bunun muhtemel sebebi; ani basınç artışının glikozaminoglikan yapı içinde düzgün dizilmiş kollajen

demetlerinin dağılımını değiştirmesi ve bu duruma bağlı olarak bölgesel kırıcılık indeksinin 2000 A çapının değişikliğe uğramasıdır.

Kornea liyofilik kolloidal bir sistemdir . İçerdiği su miktarını ayarlayan başlıca faktör kollajen ve glikozaminoglikanlardan oluşan su emici bağ dokusu yapısıdır . Ayrıca korneanın saydam kalabilmesi için, onu çevreleyen sıvıların ozmotik basınçlarının en az interstisyel sıvı basıncı kadar olması gerekir.

Korneal dehidratasyon : Korneanın toplam ağırlığının %75 – 80'i sudur . İzotonik ortamda bekletildiği halde su tutabilir ve daha önce belirtildiği gibi buradaki en önemli faktör stromal glikozaminoglikan yapının ozmotik gucüdür. Korneanın su içeriği 5 faktöre bağlıdır:

1- Endotel ve epitel tabakalarının anatomik butnlğ gerek mekanik gerekse kimyasal faktörlerle bozulduğunda korneada su tutulumu kaçınılmazdır . Epitel hücreleri gözyaşına karşı, endotel hücreleri aköz hmre karşı bariyer görevi görürken , aynı zamanda endotel hücreleri aktif bir pompa gibi çalışarak dehidratasyona yardımcı olur .

2- Kornea stroması glikozaminoglikan yapı nedeniyle hidrofilik özelliktedir . Bu yüzden stromaya doğru su akımı vardır . Endotel hücreleri stromada tutulan su ve elektrolitleri aköz hmre pompalamaktadır. Gözyaşı ve aköz hmrn ozmotik yükü kornea dehidratasyonuna doğrudan etki eder.

3- Kornea metabolizmasının bozulması aktif pompa fonksiyonunu bozacak ve korneada su tutulumuna yol açacaktır.

4- Gz yüzeyinden buharlaşma gözyaşının osmolaritesini artırarak korneal dehidratasyona yardımcı olur. Hipertonik gözyaşı korneadan su çekecektir.

5- Gz içi basıncının çok yükselmesi kornea ödemine yol açar . Buradaki mekanizma hem endotel fonksiyonlarının bozulmuş olma sı hem de stromaya karşı aköz hidrostatik basıncının artmasıdır.

Kornea geçirgenliği , işlevleri arasındaki en önemlilerinden birisidir . Hem oksijen ve glukoz geçişi hem de ilaç geçirgenliği korneanın katlarına bağlıdır . Kornea epiteli lipid yapıda olup özellikle ilaç için önemli bir bariyer oluşturur . Epitelin kaldırıldığı durumlarda suda eriyen maddelerin penetrasyonu logaritmik olarak artacaktır. Hidrofilik yapıdaki stromadan penetrasyon, suda eriyen maddeler için daha kolay, lipofilik maddeler için daha güçtür .

Endotel düzeyinde lipofilik yapı belirginleşir ve stromadan aköz hümöre diffüzyon , hidrofilik maddeler için daha güçleşir.

Kornea geçirgenliğinde etkili mekanizmalar;

- 1- Maddenin kimyasal yapısı (hidrofilik – lipofilik ve diğer)
- 2- Maddenin molekül ağırlığı ve konsantrasyonu
- 3- PH düzeyi ve osmolaritesi
- 4- Yüzey gerilimi ve ıslanma açısı

Kornea, üzerine tüm bu özellikleri almış ve bu özelliklerden dolayı da çok önemli görevler üstlenmiş benzersiz bir dokudur . İlaç tedavisi ile düzelemeyen sorunlar sonunda dokunun ameliyatla daha sağlıklı başka bir doku ile değiştirilmesine kadar gidebilir.

2.1.5. Korneal yara iyileşmesi

Korneal yaralanma prostaglandin, platelet aktive edici faktör, büyüme faktörleri ve sitokin salınımı ve takiben yara komşuluğundaki keratositlerin apopitozisi ile sonuçlanır.⁽³⁴⁾ Aktive olmuş keratositler iğ şekilli fibroblastlara dönüşerek proliferer olur ve yara bölgesine göç eder ve apopitozise uğramış keratositlerin yerini alır.^(35,36) Fibroblastik hücreler yara yerine ulaştığında geniş, büyük myofibroblastlara dönüşür. Myofibroblastlar sadece stromal yaralanmada tespit edilebilen hücrelerdir ve yara yerindeki çevresel faktörlerin myofibroblast dönüşümünün belirleyicisi olduğu düşünülmektedir. ⁽³⁷⁻³⁸⁾

Myofibroblastlar sonrasında yara yeri invazyonuna devam eder ve tamamen yara yerini doldurur. Birbiri içerisine geçen hücreler şeklinde düzenlenerek ekstrasellüler matrix depo ederler ve bu sayede yara yerini geçebilecek kontraktıl güç kazanırlar.⁽³⁹⁻⁴⁰⁾ Mekanik güç, ekstrasellüler matriks kollajen ve fibronektine $\alpha 2\alpha 1$ ve $\alpha 5\alpha 1$ integrin reseptörleriyle bağlanan intrasellüler α SMA içeren aktin filamentlerince üretilir. Miyofibroblastlar, ayrıca fagositoz, ECM yi çapraz bağlayan transglutaminaz ve matriks metalloproteinaz ekspresyonu ile yara yerinin yeniden şekillenmesinde görev alır.⁽⁴¹⁾ İnsizyonel yaralanmalarda, yara iyileşme süreci ilerledikçe ekstrasellüler matriks yara yerini tekrar bir araya getirmek üzere kontrakte olur ve bunu miyofibroblastların apopitozisle ortadan kaybolması takip eder. ⁽⁴²⁾

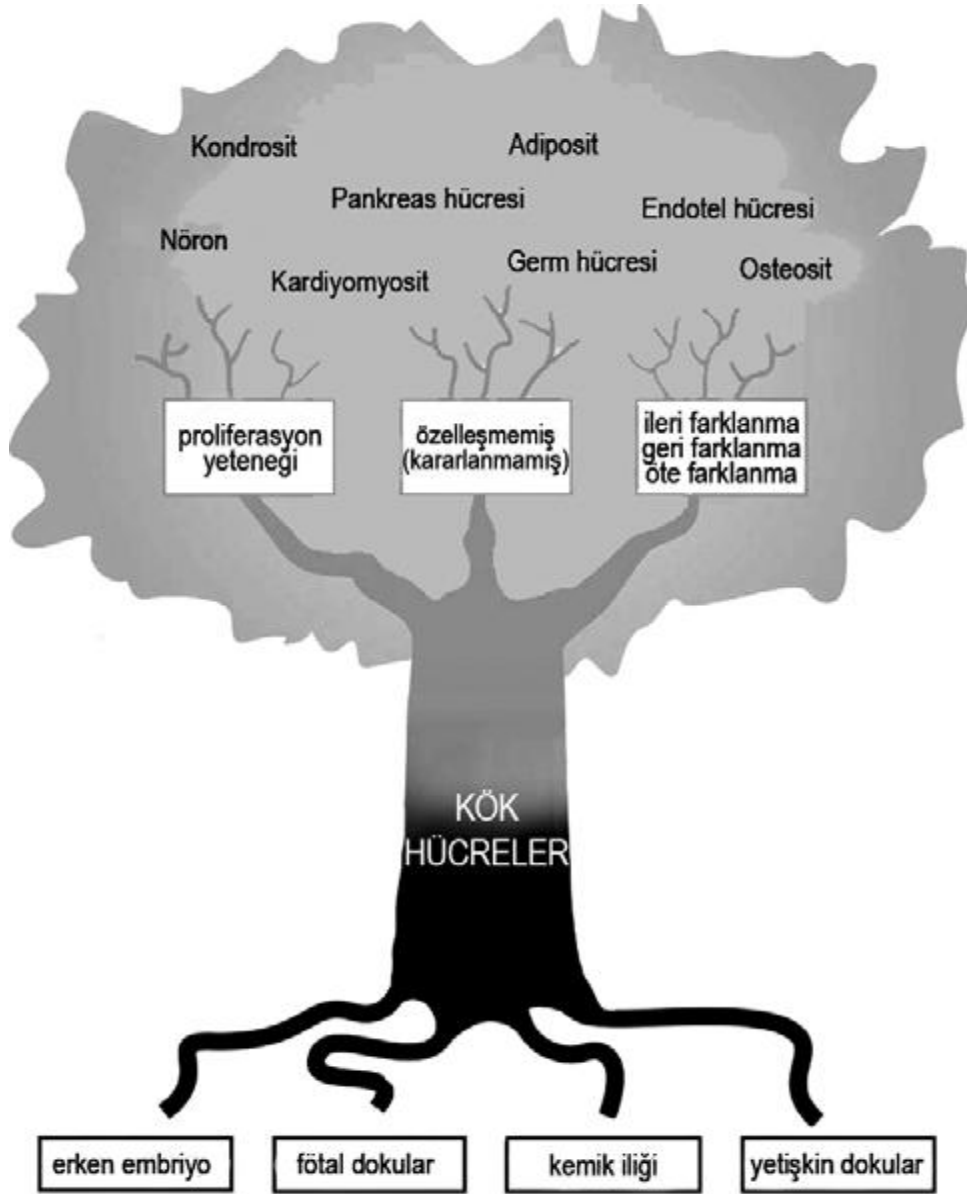
Stromal keratositlerin fibroblast ya da miyofibroblastlara yer değiştirmesi korneal Őeffaflıęın kaybı ve bulanıklık gelişmesi ile sonuçlanır.⁽⁴³⁾ Stromal insizyonun, yaranın ya da ülserin skar halini alması moleküler yapının kalıcı değişikliği ve stromal ECM organizasyonunun kaybedilmesinin sonucudur. Korneal opasite ayrıca, yüzeyel stromadaki aktive olmuş keratositlerden korneal kristalin ekspresyonunun azalması ile de ilişkilidir.⁽⁴⁴⁾

2.2 KÖK HÜCRE

Kök hücreler ile ilgili ęalıřmalar yaklaşık 60 yıl önce başlamıştır. 1945’de Hiroşima ve Nagasaki’ye atom bombası atılması sonrasında daha düşük dozda ve uzun sürede radyasyon maruz kalarak ölen kişilerin hematopoetik sistemlerinin zayıfladığı ve yeterli kan hücre üretilemedikleri görülmüştür. Deneysel ęalıřmalarda; tüm vücut irradiasyonu yapılan farelerin iki hafta içinde hematopoetik yetersizlik nedeniyle öldükleri, kemik iliğinden hazırlanan hücre süspansiyonlarının verilmesi ile de hematopoetik yetmezliklerinin düzeldeği gösterilmiştir.⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾

2.2.1. Giriş ve Tanımlamalar

Kök hücreleri, uzun süreyle bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip, kendilerinden başka hücrelere farklılaşabilen ve hasarlı dokuya transplante edildiklerinde dokuda işlevsellik kazanabilen hücreler olarak tanımlanmışlardır (Şekil 1). Farklı sınıflamalar olmakla birlikte kök hücreleri, embriyon kök hücreleri ve embriyon dışı kök hücreleri olmak üzere iki genel grupta irdelenir.⁽⁴⁷⁾



Şekil 1. Kök hücreler dört ana kaynaktan köken alırlar; (i) erken embriyon döneminde blastosist, (ii) embriyonel yapraklar ve fötal dokular, (iii) kemik iliği, (iv) diğer yetişkin dokular. Buradan köken alan kök hücreler buldukları zaman ve mekan koşulları içinde oldukları, günler, aylar veya yıllar içinde çoğalmaya ve daha sonra bir başka hücreye farklılaşmak üzere değişim sinyallerine yanıt verirler. Sonuçta çeşitli düzenleyici mekanizmaların etkisi altında doku homeostazına yardımcı olurlar.

Embriyon kök hücreleri, erken dönemdeki (insanda 5-6 günlük implantasyon öncesinde blastosist dönemi) memeli embriyonu blastosistindeki iç hücre kitlesinden elde edilen kök hücreleridir. Bu hücrelerin pluripotent özelliği farede tam olarak gösterilmiştir.⁽⁴⁸⁾ Embriyon kök hücreleri Oct-4, SSEA-1, TRA1-60, TRA1-81, telomeraz gibi kök hücrelerini tanıtmak için kullanılan bazı proteinleri ekspres ederler. Çeşitli büyüme

faktörlerinin etkisi bu hücreler üzerinde denenmiş, büyüme faktörleriyle indüksiyon yapıldığında üç embriyonik germtabakasından (ektoderm, mezoderm ve endoderm) köken alan 11 farklı doku elde edilmiş ve 24 tür hücrede özgün belirteçlerin varlığı izlenmiştir.⁽⁴⁹⁾Büyüme faktörleri, etkilerine göre mezodermal hücrelere farklılaşmayı indükleyen faktörler (aktivin-A, TGF α 1); ektodermal ve mezodermal indüksiyon yapan faktörler (retinoik asit, EGF, BMP-4, bFGF) ve tüm germtabakalarına (NGF, HGF) indüksiyon sağlayan faktörler olmak üzere üç gruba ayrılmıştır.⁽⁵⁰⁾Embriyon kök hücreleri, avantajlarına karşın kullanımları etik çekinceler nedeniyle sınırlıdır. Hatta bazı ülkelerdeki çalışmaların sınırları bizim ülkemizde de olduğu gibi yasalarla belirlenmiştir.

Embriyonun iç hücre kitlesi dışındaki kaynaklardan elde edilen kök hücreleri, embriyonik olmayan kök hücreleri adını alır. Embriyon dışı kök hücreleri genel olarak erişkin kök hücreleri veya dokuya özgü kök hücreleri olarak adlandırılır. Bunlar yetişkinin farklı dokularında bulunan farklılaşmamış kök hücreleridir ve organizmanın yaşamı boyunca kendilerini kopyalayabilme özelliklerini saklı tutarlar. Embriyon kök hücrelerin aksine, erişkin kök hücreler enjekte edildiklerinde tümöral oluşumlara neden olmazlar, hazır kök hücre kaynağı olarak kabul edilirler, bireylerden doğrudan elde edilirler, daha az etik probleme yol açarlar. Buna karşın ayrıştırılmaları, saflaştırılmaları ve tanımlanmaları da zordur, sınırlı büyüme kapasitesi nedeniyle büyük miktarlarda elde edilmeleri zordur, zamanla özelliklerini kaybedebilirler, sadece belli hücre tipine dönüşebilme yetenekleri vardır ve alıcıda daha yüksek rejeksiyon tepkimesine yol açarlar.

Erişkin kök hücrelerinden en yaygın çalışılanları hematopoetik kök hücreleri ve nonhematopoetik kök hücreleridir. Hematopoetik erişkin kök hücreleri, kemik iliği, kordon kanı veya periferik kandan elde edilmiştir. Non hematopoetik kök hücreleri olarak kategorize edilebilecek hücreler arasında en çok çalışılanı MKH'dir. Bunlar kemik iliğinin stroması içinde yer alan uzantılı fibroblast-benzeri hücrelerdir. Hematopoetik kök hücreler, hematopoetik belirteçler olan CD34, CD14, CD45 ve CD133'ü ekspres ederler. Literatürde bu hücrelerin karaciğer, pankreas, çizgili iskelet kası, kalp kası, böbrek, akciğer, merkez sinir sistemi hücrelerine farklılaştırıldığı bildirilmiştir.⁽⁵²⁾Farklanmanın sağlanması *in vitro* kültür ortamlarının kimyasal kompozisyonlarının değiştirilmesiyle başarılmış, *in vivo* hücrelerin kullanımıysa özellikle hematopoetik kanserlerin tedavilerinde mümkün olmuştur. Sinir hücresi, kalp kası ve karaciğer hücrelerinin *in vivo* işlevlerinin gösterilmesiyle ilgili bilgiler ise çelişkilidir. Yapılan çalışmalarda kordon kanında, kemik iliğine göre daha yüksek oranda CD34+/CD38- hücrelerin olduğu gösterilmiş ve kordon kanı hücrelerinin kemik iliğindeki hücrelere göre daha az farklılaşmış olabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır.

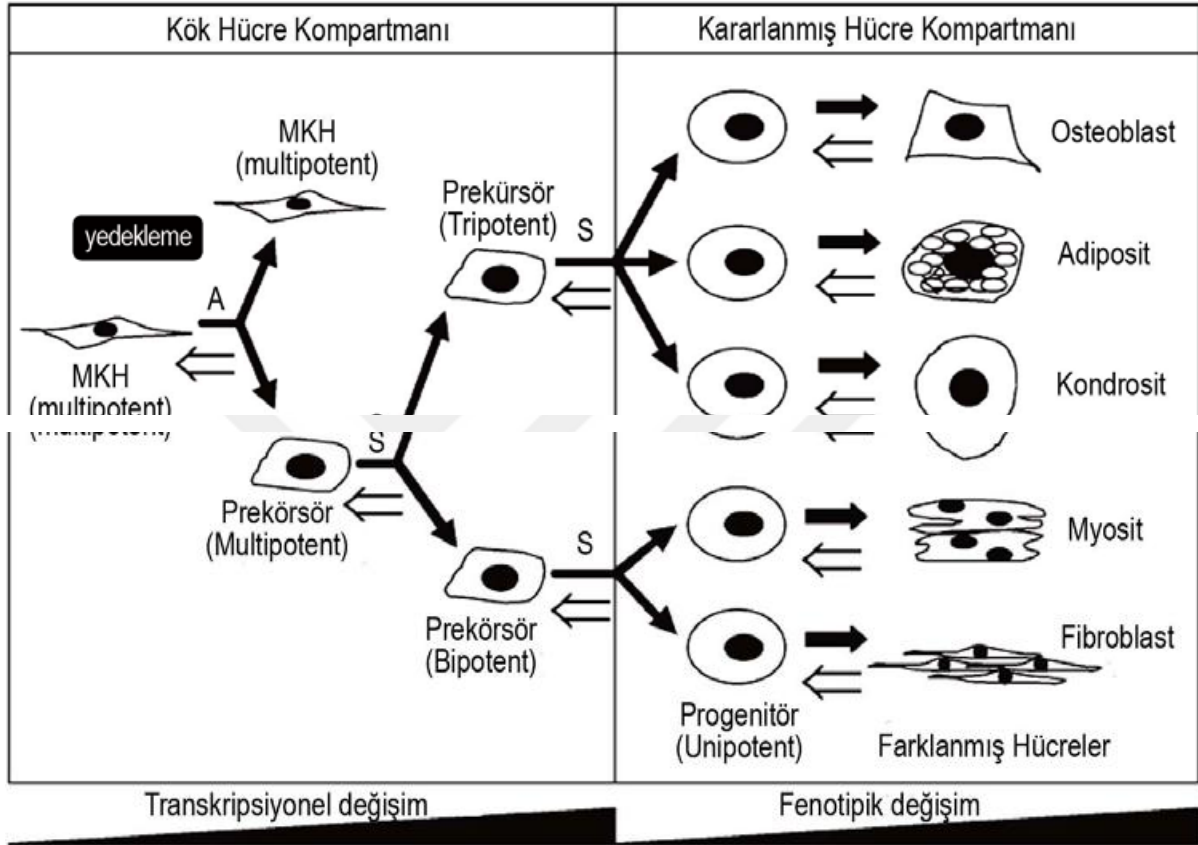
Kordon kanındaki CD34+ hücrelerin dendritik hücrelere endotel progenitör hücrelere ve diğer hematopoetik hücrelere farklılaştığı gösterilmiştir.⁽⁵¹⁾

Mezankimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesinin olduğu gösterilmesi büyük ilgiyle karşılanmıştır. Kemik iliği yerleşimli MKH ilk olarak 1980'lerde farelerde çalışılmıştır. Bu hücrelerin kendileri gibi mezoderm kökenli olan adiposit, osteoblast ve kondrosit farklılaştığı görülmüştür.⁽⁵²⁾ Ancak son yıllardaki yayınlarda bu hücrelerin nöroektoderm ve endoderm kökenli hücrelere de farklılaşmasının rapor edilmiş olması bu hücreleri multipotent kök hücresi sınıfına sokmaktadır.⁽⁵³⁾ Bu hücrelerin embriyon kök hücrelerine göre en büyük avantajları daha kolay elde edilebilir olmaları ve teratom benzeri tümör gelişimi göstermemeleridir. Ancak hematopoetik hücrelerin farklılaşması sırasında ortaya çıkan hücresel belirteçler, MKH de bu denli iyi ifade edilememiştir. Buna rağmen, CD73 (SH3, SH4), CD54, CD105 (SH2), CD39, CD49e gibi belirteçlerin MKH'nde ekspresyon edildiği bildirilmiştir. Bu belirteçlerden bazıları hücre-hücre adezyonunda görev alan proteinlerdir (CD54= ICAM-1, CD 49e= $\alpha 5$ -integrin vb.).

2.2.2. Mezankimal Kök Hücrelerin (MKH) In vitro Farklılaşma Ölçütleri

1970'lerde Friedenstein'in öncülüğündeki çalışmalarla MKH'nin *ex vivo* olarak büyütülebildiği ve *in vivo* implantasyondan sonra farklılaşma özelliklerini korudukları gösterilmiştir. İrradiasyonda tutulan farelere yapılan MKH implantasyonundan sonra, hücrelerin kemik, kıkırdak ve akciğerlerdeki varlığı gösterilerek bu hücrelerin fibroblastlar veya fibroblast-benzeri hücreleri ürettiği gösterilmiştir. Farklılaşan bu fibroblastlar daha sonra akciğer, kıkırdak, uzun kemikler, kuyruk ve deriden tekrar izole edilmişlerdir. İnsan kaynaklı MKH'nin koyun uterusuna transplante edilerek yerleştiği bölgeye göre kondrosit, adiposit, miyosit, kardiyomiyosit ve kemik iliği stroma hücrelerinin oluşumuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir.⁽⁵⁴⁾ İnsan hücrelerinin koyundaki immünolojik tepkiye karşı birçok dokuda 13 ay gibi bir süre boyunca varlığını sürdürdüğü görülmüştür. Böylece ilk kez insan kaynaklı MKH'nin farklı hücrelere dönüşebilme yeteneklerinin yanında özgün immünolojik özelliklerinin olabileceği savı ortaya atılmıştır. Her geçen gün daha fazla sayıda ve farklı dokunun onarımında MKH'nin kullanıldığına ilişkin raporlar yayımlanmaktadır. Multipotent MKH'nin kültür ortamlarında kolayca çoğaltılabilmeleri ve çok sayıda dokuya farklılaşabilmeleri, bu hücrelerin özellikle doku onarımı veya gen tedavileri gibi klinik başlatabilecek ve sürdürebilecek moleküler mekanizmaları uyarabilmeleri kontrollü olarak sınanmalıdır. *In vitro* ortamlardaki farklılaşmanın moleküler

mekanizmaları bile henüz yeni anlaşılır hale gelmiştir.⁽⁵⁵⁾ MKH'nin niş adı verilen yerleşkelerinden çıkarak farklılaşma uyarısı almaları karşısındaki davranışlarına ilişkin kabul gören modellerden birisi de Baksh ve arkadaşlarının önerdiği modeldir (Şekil 2).⁽⁵⁶⁾



Şekil 2. Baksh ve ark'nın önerdiği modele göre mezankimal kök hücrelerin (MKH) farklılaşması kök hücre kompartmanında başlar. Burası niş bölgesi olarak bilinen embriyonel veya erişkin dokularını oluşturur. Belli uyarılar altında multipotent MKH'ler ilk asimetrik (A) bölünmesiyle (siyah oklar) önce kendisini yedekler; bunu yaparken kendisine benzemeyen prekürsörleri üretir ki, bu hücreler simetrik (S) sitokinezle tripotent/bipotent prekürsörlere dönüşür. Bu aşamadan sonraki olaylar kararlanmış hücre kompartmanı olarak adlandırılan doku bölgesinde gerçekleşir. Mezenkimal seri hücreler örnek alındığında bundan sonraki bölünmeler tipik farklılaşma sürecini oluşturur, yani ileri doğru farklılaşan hücreler bu sürecin sonunda olgun birer adiposit veya kondrosit haline gelirler. Yapılan çalışmalar tüm bu sürecin geriye doğru da gidebildiğini göstermiştir (dediferansiyasyon) (açık oklar).

Gen transkripsiyon kök hücrenin çoğalma süreçlerinde giderek artar. Bunun yanı sıra fenotipik değişimi hemen hemen sabit kalır. Ancak farklılaşmanın son aşamasında fenotip değişimi çok dramatiktir ve gen aktivasyonu çoktan aktive olmuş hücrelerde büyük değişimler gözlenir.

2.2.3. Mezankimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanımları

MKH ve MKH-benzeri hücrelerin multipotent olmaları ve kültür koşullarında kolayca çoğaltılabilmelerinden dolayı özellikle doku onarımlarındaki ve gen tedavilerindeki potansiyelleri göz önüne alınarak önemleri artmıştır. O nedenle, şu aralar, birçok klinik tarafından bir dizi hastalıkta denenmektedirler. Özellikle, osteogenezis imperfecta, metakromatik lökodikrofi ve Hurler Sendromlu hastalardaki klinik uygulamada ümit veren sonuçlar ortaya çıkmıştır. ⁽⁵⁷⁾ Son yıllarda, allojenik MKH infüzyonları ve alıcı uyumluluğu çok tartışılır olmuştur. MKH'nin en belirgin özelliklerinden birisi, alıcıda inflamasyonu ve immünolojik yanıtları baskılamasıdır. *İn vitro* testlerde MKH'nin karışık lenfosit tepkime testlerinde allojenik yanıt göstermediği ve sitotoksik T-hücreleri ve doğal öldürücü hücreler tarafından ortadan kaldırılmadığı saptanmıştır. MKH'nin bu bağışıklık düzenleyici özellikleri bu hücrelerin HLA tip-II reseptörleri olmamasıyla ve sitokin salgılamamasıyla açıklanabilir. ⁽⁵⁸⁾ Buna karşın, allojenik transplante edilen MKH'nin farklılandıktan sonra *in vivo* koşullarda varlıklarını sürdürebilmeleri konusundaki bilgiler henüz yeterli değildir. Bugün en çok çalışılan alanlardan birisi de budur. Öyle gözükmektedir ki, yetişkin kök hücreler, özellikle insan kaynaklı MKH, onarımsal tıpta ve gen tedavilerinde giderek daha önemli hale gelecektir. İlginç olan birçok hücresel ve moleküler mekanizma ortaya kondukça MKH'nin klinik kullanımları daha yaygın ve daha güvenli hale gelecektir.

3.MATERYAL- METOD

Korneal hasar modelinin oluşturulması, kök hücretransplantasyonu, sakrifikasyon ve enükleasyon işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıbbi Araştırma Birimi'nde yapılmıştır. İmmunohistokimyasal ve immunfloresan görüntüleme işlemleri Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, histopatolojik preparat oluşturma ve inceleme işlemleri Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Çalışma Helsinki Bildirgesinde (2008) deneysel araştırmalarda belirtilmiş olan esaslara uygun olarak yürütülmüştür. Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. (HAEK-2010-08)

3.1. Deneysel korneal hasar modeli oluşturulması:

Çalışmada toplam 40 adet erişkin dişi Wistar albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlara ketamin hidroklorid (25 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) intraperitoneal yolla verildi ve %0,4 proparakain hidroklorid ile topikal anestezi uygulandı. Korneal hasar oluşturmak üzere daha önce tanımlanmış deneysel model uygulandı.⁽⁵⁹⁾ Tüm hayvanlara mikroskop altında (Topcon OMS 75) kornea üst parasantralinde korneal tünel bıçağı (Beaver-Visitec International) kullanılarak 2 mm. lik tam kat insizyon yapıldı ve 1 adet 10.0 naylon (US IOL Inc.) ile suture edildi. Her hayvanın bir gözüne işlem yapıldı, diğer gözlerine herhangi bir işlem uygulanmadı. Deneysel hasar modeli aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi. Oluşturulan insizyon hattından ön kamaralarına 30 Gauge Hamilton enjektör ile 10 µl enjeksiyon yapıldı. Grup 1 (n=15) ön kamaralarına 2×10^5 /10 µl Yeşil Flouresans Protein (YFP) geni transfekte edilmiş kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre transplante edilen hayvanlar tarafından oluşturuldu. (Kİ-MKH). İkinci grup (n=15) ön kamaralarına 2×10^5 /10 µl YFP geni transfekte edilmiş yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (YD-MKH) transplante edilen hayvanlarca oluşturuldu. Üçüncü grubun (n=10) ön kamaralarına 10 µl dengeli tuz solüsyonu enjekte edildi (kontrol). Postoperatif dönemde 1 hafta siprofloksasin damla günde 3 kez kullanıldı.

3.2.Mezenkimal kök hücre hazırlanışı:

3.2.1. Yağ Doku kökenli Mezenkimal kök hücrelerin (YD-MKH'lerin) izolasyonu ve kültüre hazırlanması:

Wistar albino cinsi 8 haftalık erkek sıçanlar genel anestezi altında iken, göbek altı insizyonu ile omentektomi ve perigenital ve mesane önünden yaklaşık 2.5 gr civarında adipoz doku elde edildi. Elde edilen adipoz dokular, içerisinde %5 oranında Penicilline-Streptomycine ilave edilen kalsiyum magnezyum içermeyen Hank's balanced salt solusyonu (HBSS; Gibco-BRL) bulunan steril kaplara kondu. Sıçan adipoz dokusundan MKH'lerin izolasyonu için; laboratuara gelen adipoz doku %1 oranında penisilin-streptomisin içeren HBSS ile birkaç kez yıkama işleminden geçirilerek makasla 1cm³'lük küçük parçalara ayrıldı. Yıkama işleminden sonra dokular makas yardımıyla mins edildi ve üzerine Ca ve Mg içermeyen HBSS ile hazırlanmış %0.075'lik tip 1 kollajenaz solüsyonundan 5 ml koyularak doku örnekleri 37°C çalkalamalı su banyosunda 60 dk bekletildi ve takip eden santrifüj sonrasında süpernatant atılıp pelet 5 ml HBSS ile sulandırılarak hücre süzgeci ile süzüldü ve tekrar santrifüj edildi. Pelet üzerine 5 ml lysing solüsyon eklenip oda ısında 5 dk bekletildi. Süre sonunda 5 ml HBSS eklenerek 1800 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlanıp süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra oluşan pelet üzerine %15 oranında FBS ve %1 oranında penisilin-streptomisin içeren α -MEM kültür besiyerinden 1 ml eklenip pipetaj yapılarak 25 cm²'lik kültür kabına ekim yapıldı. Gerekli miktarda kültür besiyeri konduktan sonra 37°C, %5 CO₂ ve nemli ortamda kültüre edildi. 48 saat sonra besiyeri değiştirilerek yüzen tüm hücreler uzaklaştırıldı. Haftada iki kez besiyeri değişimi tekrarlandı. Flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edildiler ve bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirildi. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlandı ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlandı.

3.2.2. Kemik İliği Kökenli Mezenkimal kök hücrelerin (Kİ-MKH) izolasyonu ve kültüre hazırlanması:

Sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu için sıçanlar servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldü, sıçanların femurları uygun steril şartlarda çıkartıldı.

Femurun etrafındaki yumuşak dokular çıkartıldıktan sonra hava akımlı steril kabinde uygun kesiler yapılarak kemik iliği içerikleri L-DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium-low glucose) medyum içeren petri tabaklarında toplandı. Toplanan kemik iliği içerikleri santrifüj edildikten sonra iki kez daha yıkama işleminden geçirildi ve sonra %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren L-DMEM'de T75 flasklarında kültüre edildi (yaklaşık 1.2×10^8 hücre). Yetmiş iki saat sonra yüzen tüm hücreler atıldı ve yeni medyum ilavesi yapıldı. Haftada iki kez olmak üzere bu işlem tekrarlandı ve flaskın tabanı yaklaşık %80 oranında hücreler ile kaplanınca (konfluent) tripsinizasyon işlemiyle yapışan hücreler kaldırılıp yeniden kültüre edildi (yaklaşık olarak 14-25. günler arasında). Bu ilk pasaj (sub-kültür) olarak değerlendirildi. Bu işlemler üçüncü pasaja kadar tekrarlandı ve 3. pasajın sonunda elde edilen hücrelerin karakterizasyon çalışmasına başlandı.

3.2.3. YD- ve Kİ-MKH'lerin Karakterizasyonu:

Sıçan yağ dokusundan elde edilen MKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edildi ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelendi. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometrik analiz ve immünsitokimyasal işaretleme (İmmunhistokimyasal İşaretleme (İHK) ve İmmunfloresan İşaretleme (İF)) çalışmaları gerçekleştirildi. Gen ekspresyonları RT-PCR ile belirlendi. YD-MKH'ler in vitro diferansiyasyon kapasitelerinin belirlenmesi için; adipojenik, osteojenik, kondrojenik nörojenik ve hepatojenik farklılaşmaya alındı.

İmmunfenotipleme:

Akım sitometrik Analiz:

Analizler, her alt-kültür işlemi sonrasında (P1'den P3'e kadar) ve *FACS Calibur* akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 8×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-konjuge monoklonal antikorlar (CD29, CD45, CD54, CD90, CD106) ve uygun izotip kontrollerinden 10µl eklenerek inkübe edildi (oda ısısında-karanlıkta-45 dk.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren

PBS) eklenerek santrifüj edilerek (5dk. 1780rpm) 400µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspanasyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutuldu ve analizi *BD Cell Quest TM* software programı ile gerçekleştirildi.

3.2.4.Hücrelerin GFP (yeşil floresan protein) ile işaretlenmesi:

Hücrelerin GFP (yeşil floresan protein) ile işaretlenmesi Neon Transfection Sistemi (Kat. No. MPK5000, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ve 10 µl Neon Kiti (Kat. No. MPK1096) kullanılarak gerçekleştirildi. EndoFree Plazmid Maxi Kiti (Kat. No. 12362, Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak saflaştırılmış GFP genini ve hücre içi ekspresyonu için gerekli tüm yapısal öğeleri taşıyan, yüksek kalitede, endotoksin içermeyen plazmid DNA 'sı 5 µg/µl konsantrasyonunda deiyonize su içerisinde hazırlandı. Transfeksiyon başına 10⁶ düşecek kadar hücreler çoğaltıldı. Tripsin (0,25 %) yardımıyla hücreler kültür kabından kaldırıldı, Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen fosfat salin tamponunda (PBS)iki kez yıkandı ve "Resuspension Buffer R" tampon çözeltisi ile son hücre yoğunluğu 1 ml başına 10⁷ hücre olacak şekilde süspanse edildi. Transfeksiyon parametreleri daha önceden optimize edildiği değerlere ayarlandı. (yağ doku için 1200 V, 40 ms; kemik iliği için 990 V, 40 ms).Steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine transfeksiyon başına 2- 4 µg plazmid DNA 'sı ve transfeksiyon başına 10 µl hücre karıştırıldı.Neon Transfer Pipeti ile yavaşça tip içerisine 10 µl DNA-hücre süspanasyonunun çekildi ve pipet istasyonu içerisine yerleştirildi. Belirtilen ayarlarda sistem elektrik akımını uygular. Gen aktarılmış hücreler hemen önceden ısıtılmış serum içeren besi ortamına aktarıldı. Kültür kabı hücrelerin eşit dağılması için dairesel hareketlerle karıştırıldı. Hücreler standart koşullarda çoğaltıldı. Transformasyon sonrasında 3'üncü gününde ortam değiştirilerek besi ortamı tazelendi. Ancak bu noktadan itibaren seçici antibiyotik (pGFP için G418, Kat. No. 11811-098) eklendi.Kalıcı olarak gen ekspresyonu isteniyorsa 2-3 ay (5-10 pasaj) boyunca hücreler antibiyotik direncine göre seçilir.

3.3. Klinik değerlendirme:

Tüm gruplara postoperatif 1.hafta, 4.hafta ve 8.haftada mikroskop altında ön segment muayenesi yapıldı ve fotoğraflandı. Korneal haze 0-4 arasında derecelendirildi.

Derece 0: şeffaf kornea, derece 1: hafif bulanıklık, derece 2: orta derecede bulanıklık-iris ayrıntıları seçilebiliyor, derece 3: ağır derecede bulanık-iris ayrıntıları seçilmiyor, derece 4: total opasite olacak şekilde skora yapıldı.

Kİ-MKH grubunda 4 nolu denekte katarakt ve ön segment inflamasyonu gelişmesi, YD-MKH grubunda 3 nolu denekte fitizis gelişmesi üzerine deney kapsamı dışına alınıp sakrifiye edildiler.

3.4. İn vivo Konfokal Görüntüleme:

Postoperatif 8. haftada sakrifikasyon öncesi genel anestezi altında in vivo konfokal kornea görüntülemesi yapıldı. Bu işlem için Heidelberg Retinal Tomograph- HRT-3 Rostock Kornea Modül (HRT3- Heidelberg Engineering Inc., Germany) kullanıldı. Objektif başlığı üzerine immersiyon amaçlı Viscotears jel (Novartis Sağlık, Gıda, Tarım ürünleri A.Ş) damlatıldı. Topikal anestezi sonrası deneklerin korneal konfokal görüntülemesi yapıldı. Epitelden başlanarak endotele kadar görüntü serileri alındı. Anterior ve posterior keratosit dansitesi (hücre/mm²) ve stromal kalınlık (μ) ölçüldü. Stromal kalınlık ölçümü, bazal epitel tabakasından endotele kadar olan mesafenin 3 farklı alandan yapılan ölçümünün ortalaması alınarak yapıldı. Anterior keratosit dansitesi (AKD) ölçümü için bazal epitelden sonra keratositlerin en net seçildiği kesit alınarak keratositler manual olarak sayıldı ve cihazın donanımında bulunan program sayesinde otomatik olarak mm² başına düşecek hücre şeklinde hesaplandı. Posterior keratosit dansitesi (PKD), endotelden önce keratositlerin en net seçildiği kesit alınarak AKD de anlatıldığı gibi ölçüldü.

3.5. Sakrifikasyon ve doku temini:

Sekiz haftalık deney süresi sonunda denekler eter inhalasyonu ile sakrifiye edildi. Globlar enükle edildi ve korneaları diseke edildi. Kİ-MKH grubundan rastlantısal seçilen 4 kornea, YD-MKH grubundan rastgele seçilen 4 kornea ve kontrol grubundan rastgele seçilen 4 kornea, RNA analizi için PBS içerisine alındı. Kalan kornealar % 4'lük paraformaldehit içinde tespit edildi. Vertikal kesitler alınarak formalin, alkol ve ksilenden geçirilerek parafine gömüldü ve 5 mikron kalınlığında kesitler alındı.

3.6. Histopatolojik değerlendirme:

Hematoksilen-Eozin ile boyanarak mikroskop altında inceleme gerçekleştirildi. Her bir preparat inflamasyon şiddeti ve fibroblastik aktivite yönünden değerlendirildi. İnflamasyon şiddeti 0-3 arasında derecelendirildi. 0: inflamasyon yok, 1: zayıf ve fokal inflamatuvar aktivite, 2: kuvvetli ancak fokal inflamatuvar yanıt 3: yaygın ve kuvvetli inflamasyon olarak skorlandı. Fibroblastik aktivite 0-3 arasında derecelendirildi. 0: normal, 1: hafif fibroblast artışı ve polarite kaybı yok, 2: orta derecede fibroblast artışı ve polaritede hafif kayıp, 3: belirgin ve yaygın fibroblast artışı ve belirgin polarite kaybı olarak skorlandı.

3.7. İmmunohistokimyasal çalışmalar:

İmmunofloresan çalışmalarda, parafin kesitler deparafinizasyon işleminden sonra düdüklü tencerede antijen retrieval işlemi için 30-45 dk citrate buffer içerisinde kaynatıldı. Parafin kesitlerde antijen retrievaldan sonra blok serumlarla 30 dk inkübe edildi, daha sonra uygun dilüsyonlarda hazırlanan primer antikorlarla +4 de bir gece bekletilen parafin kesitler yine uygun dilüsyonlarda hazırlanan FITC ve TR işaretli sekonder antikorlarla 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra parafin kesitler UltraCruz™ Mounting Medium (sc-249414), 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile kapatılıp Leica DMI 4000 Microsystems floresan mikroskopunda analiz edilip görüntüledi (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır).

3.8. Parafin kesitlerde Keratocan- ALDH ve CD 34 ekspresyonu:

İmmunofloresan çalışmaları Keratocan (sc-33244), ALDH (sc-166302) ve CD34 (sc-7045) primer antikorlarıyla ve bu antikorlara uygun floresan işaretli sekonder antikorlar ile deney ve kontrol grupları boyanarak Keratocan, ALDH ve CD34 pozitif hücre tesbiti yapıldı. GFP pozitif hücrelerin gözlemlenebilmesi için GFP antikor (sc-9996) ile de ikili boyamalar yapılarak hem Keratocan, ALDH, CD34 hem de GFP pozitif hücreler tespit edildi.

3.9. Gen ekspresyon çalışmaları (Real Time PCR):

Doku düzeyinde inflamasyon değişimlerinin gen düzeyindeki analizi için gerçek zamanlı-PCR yöntemi kullanıldı. TGFB1, IL12B, IL-6R ve TNF genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişimler incelendi. Bu amaçla, kemik iliği ve adipoz doku kaynaklı kök hücre verilen gruplar ile kontrol gruplarından alınan kornea dokularından total RNA izolasyonları RNA İzolasyon Kiti (High Pure RNA Isolation Kit; Roche,

Mannheim,Germany) ile gerçekleştirildi. İzolasyondan sonra RNA konsantrasyonu picodrop spektrofotometre ile ölçülerek ve 0,5 µg total RNA olacak şekilde cDNA'ya (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit; Roche, Mannheim, Germany) çevrim gerçekleştirildi. Hedef genlerin amplifikasyonunu UPL (Universal Probe Library) taqman hidroliz problemlerin kullanımıyla LightCycler 480-II (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) gerçek-zamanlı kantitatif PCR cihazında eşit miktarda cDNA kullanılarak gerçekleştirildi. Hedef gen ve ona uygun seçilmiş olan referans genler aynı kuyucuklarda çoğaltıldı. Primer ve problemler üretici firmanın önerdiği şekilde daha önceden standardize edildiği gibi kullanıldı. PCR koşulları; 95°C'de 10 dakika inkübasyon, takibinde 45 siklus 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 saniye şeklinde uygulanmıştır. Sonuçlar Light Cycler yazılımıyla (version 4) seri dilüsyonla, bilinen konsantrasyonlarda hazırlanmış standartlara ve (PCR etkinliği 1.85 - 2.0 arasındaki değerler kullanılarak) ACTB ile GAPD referans genlerine göre normalize edildi. Grafiklerde relatif mRNA ekspresyonları referans genlere göre hazırlanmış ve değerlendirmeler kontrol gruba göre yapılmıştır.

3.10. İstatistiksel analiz:

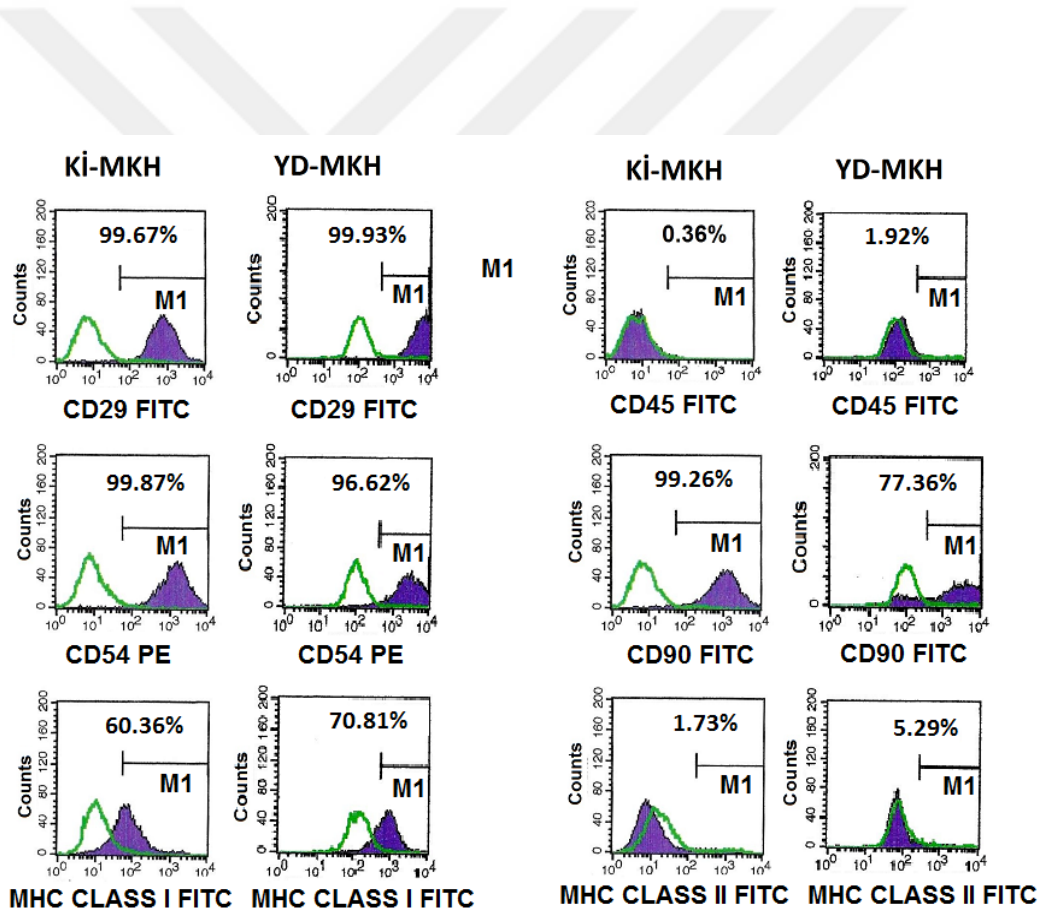
Klinik ve patolojik verilerin istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı ile yapılmıştır. Analizler Kruskal-Wallis yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. İn vivo konfokal mikroskopik veriler bağımsız T testi ile değerlendirilmiştir. İmmünohistokimyasal veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman-Keuls metodu ile test edilmişlerdir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p < 0,05$ olduğunda anlamlı ve $p < 0,01$ olduğunda oldukça anlamlı olarak ifade edilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1.YD- ve Kİ-MKH'lerin Karakterizasyonu

4.1.1. Akım sitometrik Analiz

Akım sitometri aygıtında pasaj 3'deki Kİ- ve YD-MKHlerinin karakterizasyon çalışmalarında hücrelerin MKH'lere özgün CD29, CD54, CD90 ve MHC class 1 belirteçlerini eksprese ederken hematopoetik hücelere ait CD45 ve MHC class 2 belirteçlerini eksprese etmedikleri saptanmıştır (Şekil 3).



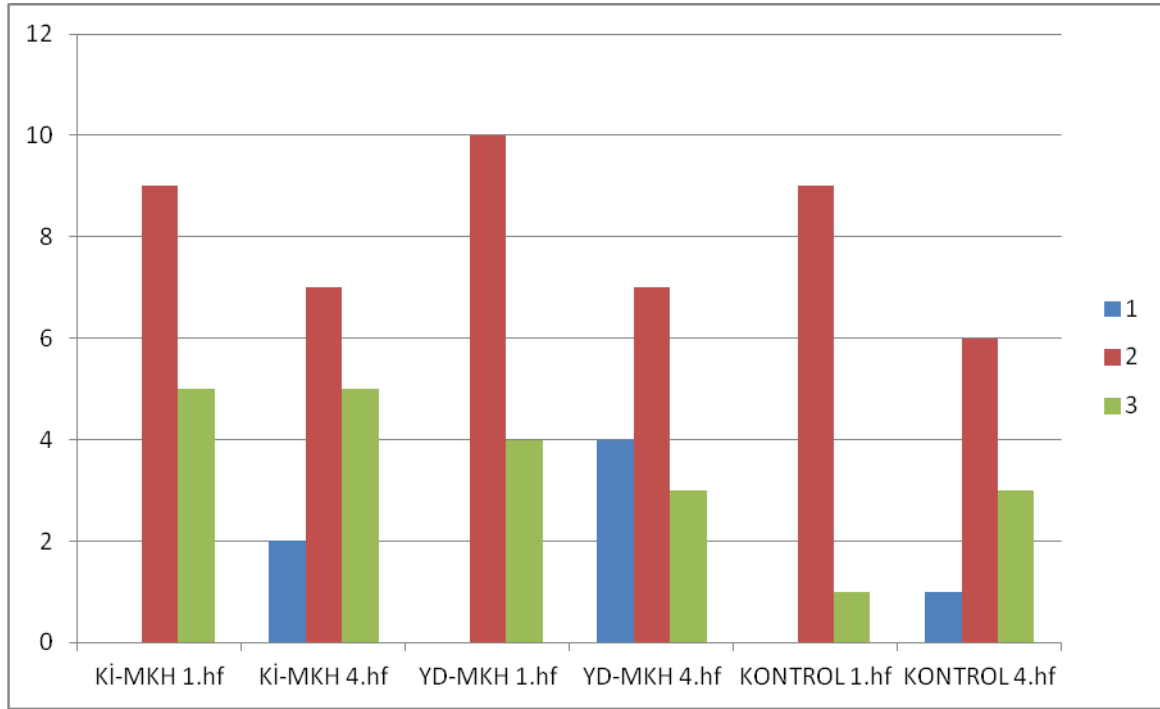
Şekil 3: Sıçan yağ ve kemik iliği dokularından elde edilen MKH'lerin immunofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için akım sitometrik analiz çalışmaları gerçekleştirildi. MKH'lere özgü belirteçlerin (CD29, CD54, CD90 ve MHC sınıf I) yüksek oranda eksprese olduğu belirlendi. Hematopoetik hücelere özgü belirteçlerin ise yok denecek kadar az ekspresyonu olduğu gözlemlendi (CD45, MHC sınıf II).

4.2. Klinik değerlendirme:

Kİ-MKH grubunda 4 nolu gözde katarakt ve ön segment inflamasyonu geliştiği için çalışma kapsamı dışında bırakıldı, 14 denek çalışmayı tamamladı. Postoperatif 1. haftada yapılan ön segment muayenesinde dokuz gözde kornea opasite derecesi 2, beş gözde ise 3 olarak değerlendirildi. Postoperatif 4.haftada deneklerden ikisinde ilk muayeneye göre korneal opasitenin azaldığı, birinde ise artış olduğu görüldü. Yapılan skorlamada iki gözde opasite derecesi 1, yedi gözde 2, beş gözde ise 3 olduğu görüldü. Postoperatif 8.haftada sakrifikasyon öncesi yapılan korneal opasite skorlamasının 4.hafta muayenesiyle aynı olduğu görüldü.

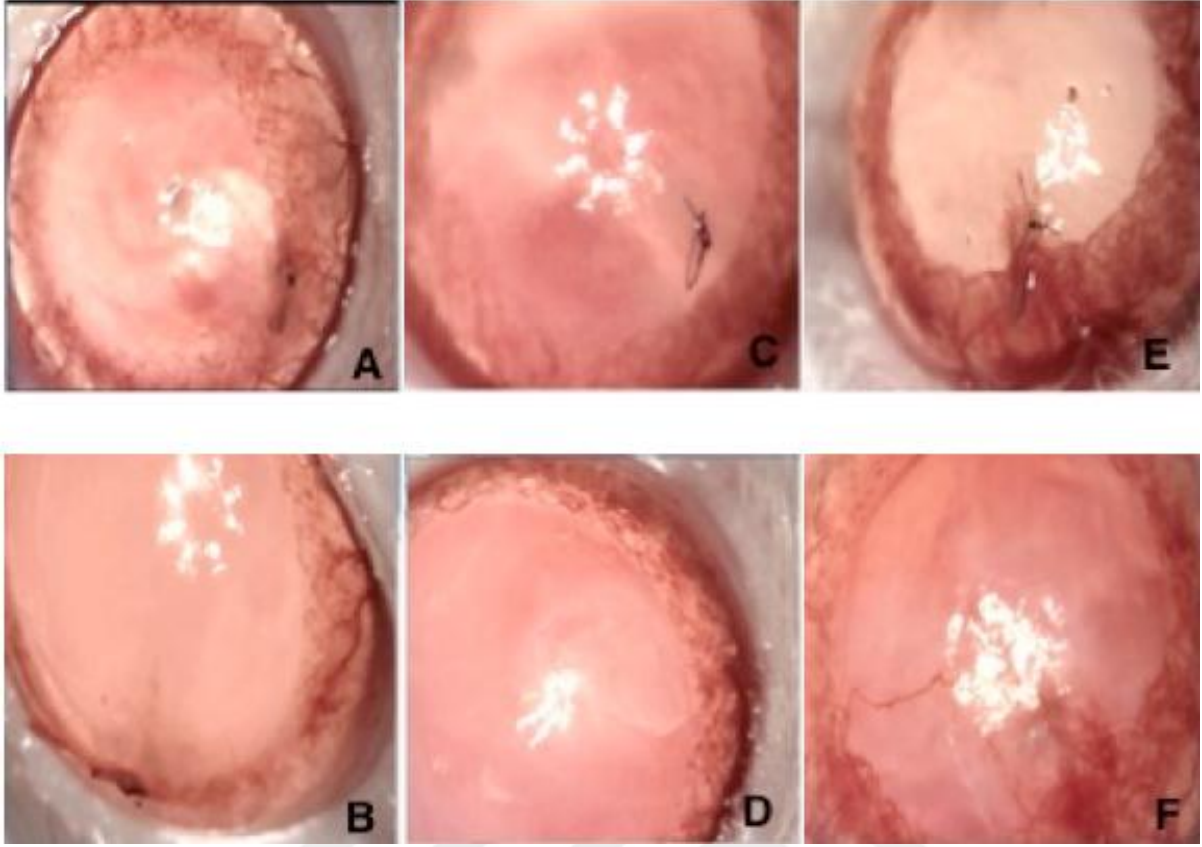
YD-MKH grubunda 3 nolu gözde fitizis gelişmesi üzerine deney kapsamı dışında bırakıldıve 14 denek çalışmayı tamamladı. Postoperatif 1. hafta yapılan muayenede on gözde korneal opasite derecesi 2, dört gözde ise 3 olarak derecelendirildi. Dördüncü haftada yapılan muayenede, 4 denekte korneal opasitede azalma olduğu görüldü. Dört gözde 1 derece opasite, yedi gözde 2 derece opasite, üç gözde ise 3 derece opasite saptandı. Sekizinci haftada yapılan muayenede, korneal opasitede, dördüncü haftaya göre herhangi bir değişiklik izlenmedi (Grafik 1).

Kontrol grubunda 10 denek çalışmayı tamamladı. Postoperatif 1. haftada yapılan korneal opasite derecelemesi dokuz denekte derece 2, bir denekte derece 3 olarak değerlendirildi ve takip süresince 2 denekte opasite skoru artarken, 1 denekte azalma olduğu saptandı (Grafik 1).



Grafik 1. Korneal opasite skorlaması (y eksenini denek sayısını göstermektedir.)

Korneal opasite bakımından gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.49$). Ancak, birinci, dördüncü ve sekizinci haftada yapılan muayenelerde korneal opasite skorlamasında kontrol grubunda 1 gözde azalma olurken, KI-MKH grubunda 2 gözde, YD-MKH grubunda ise 4 gözde 4. haftada yapılan muayenede 1. haftaya göre korneal opasite derecesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde 1.hafta ve 4. haftadaki korneal opasite derecesindeki değişiklik tüm gruplarda anlamlı olarak bulunmuştur. ($p=0.00$) (Resim 1)



Resim 1. Deneklerin cerrahi işlemden 1 ve 8 hafta sonraki dijital fotoğraf makinesi ile alınmış ön segment fotoğrafları izlenmektedir. YD-MKH (A), Kİ-MKH (C) ve kontrol (E) gruplarından alınmış postoperatif 1.hafta görüntüleri izlenmektedir. YD-MKH (B), Kİ-MKH (D) ve kontrol (F) grubundan alınmış postoperatif 8. hafta fotoğrafları gözlenmektedir.

4.3. İn vivo Konfokal Görüntüleme:

Kİ-MKH grubunda tespit edilen ortalama stromal kalınlık 130.1μ ölçülmüştür. Ön stromada daha fazla, posterior stromada daha seyrek olmak üzere inflamatuvar hücrelerin yerleşim gösterdiği saptanmıştır. AKD $135,5 \pm 8$ hücre/ mm^2 , PKD 117 ± 14 hücre/ mm^2 ölçüldü. (Grafik 2) Hem AKD hem PKD ölçümü kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak oldukça anlamlı derecede yükseklik gösterdiği görüldü. ($p=0.000$ ve $p=0.002$)

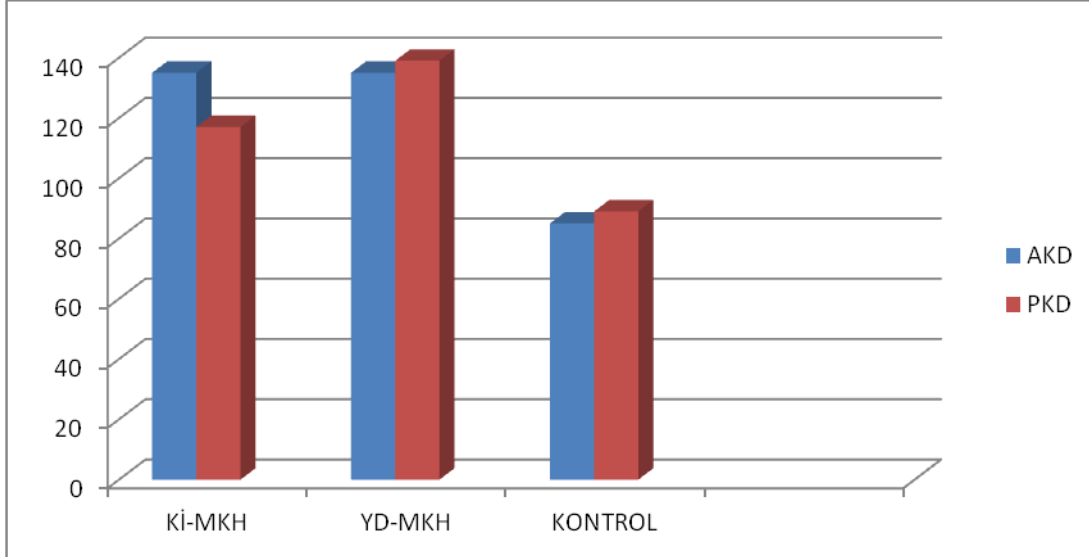
YD-MKH grubunda ortalama stromal kalınlık 139.3μ ölçülmüştür. İnflamatuvar hücre yoğunluğu ve stromal hücre paterninin Kİ-MKH ile benzer özellikte olduğu, endotel tabakasının normal olduğu görülmüştür. AKD 135 ± 15 hücre/ mm^2 , PKD 139 ± 11 hücre/

mm² ölçüldü. (Grafik 2) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında keratosit dansitesinin hem anterior stroma hem posterior stromada istatistiksel olarak oldukça anlamlı düzeyde yüksek olduğu ölçüldü. (p=0.000 ve p=0.000)

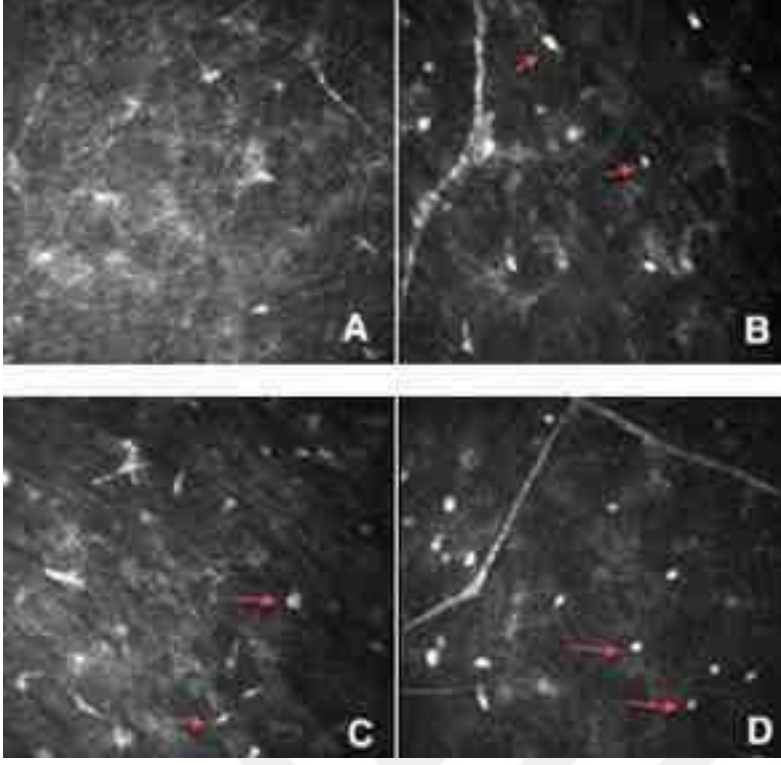
Kontrol grubunda ortalama stromal kalınlık 128.1 μ saptanmıştır. Ön stromada yerleşim gösteren inflamatuvar hücrelerin kontrol grubunda daha yoğun bulunduğu gözlenmiştir (Resim 2,3,4). AKD 85,7 \pm 23 hücre/ mm² , PKD 89,6 \pm 14 hücre/ mm² ölçüldü. (Grafik 2)

YD-MKH grubu ve Kİ-MKH grubu AKD açısından birbiriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p= 0,936). PKD ölçümünde ise YD-MKH grubunun Kİ- MKH ye göre anlamlı derecede yükseklik gösterdiği görülmüştür (p=0,003) (Grafik 2).

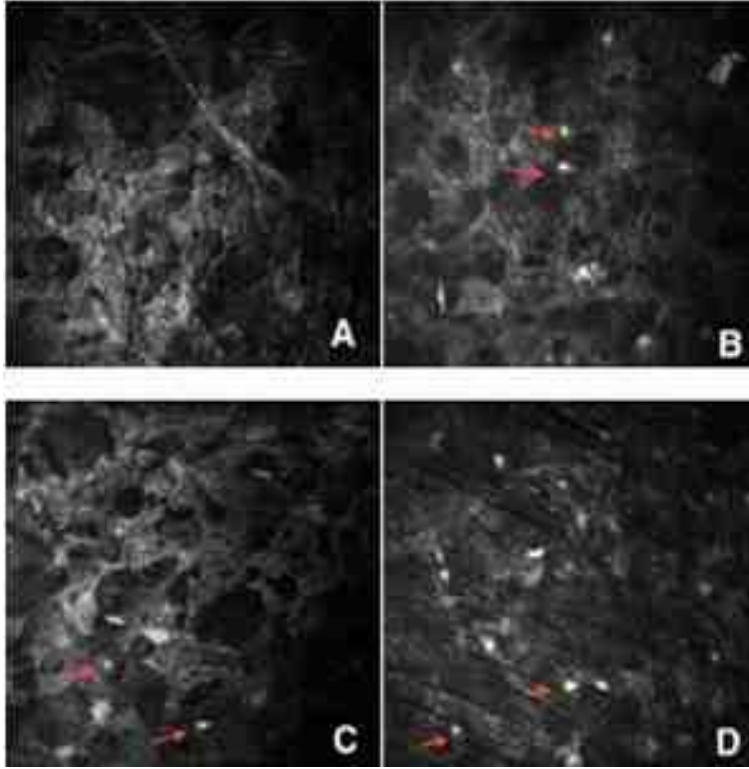
Ortalama stromal kalınlık bakımından tüm gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmamıştır (p=0.8).



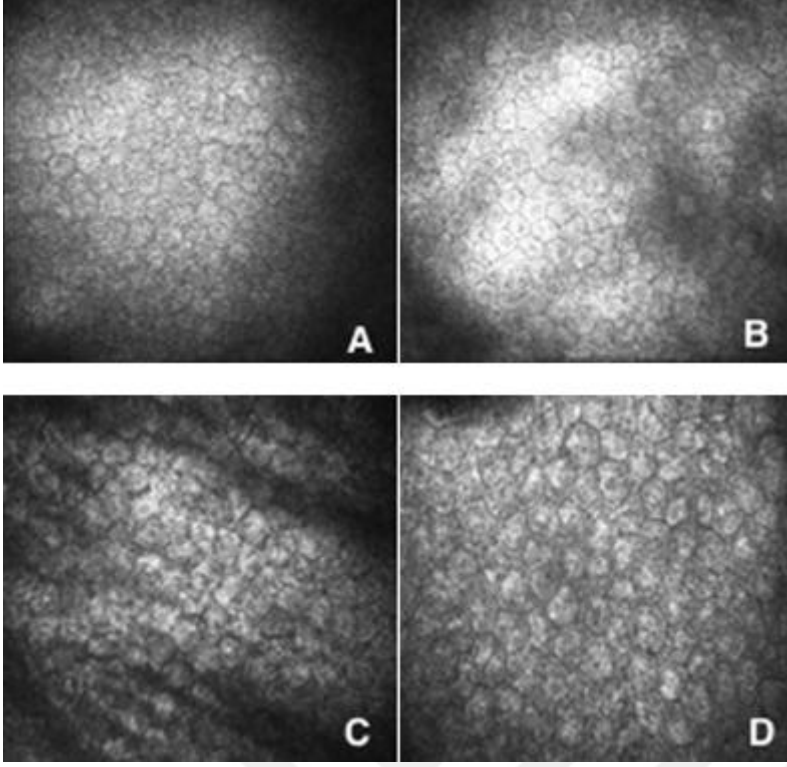
Grafik 2. Anterior ve posterior stroma keratosit dansite değerleri



Resim 2. Anterior stromanın konfokal mikroskopi ile alınmış görüntüleri, kırmızı oklar inflamatuvar hücre infiltrasyonunu göstermektedir. (A) normal rat, (B) YD-MKH grubu, (C) Kİ-MKH grubu, (D) kontrol grubuna ait görüntüler izlenmektedir.



Resim 3. Posterior stromanın konfokal mikroskopi ile alınmış görüntüleri, kırmızı oklar inflamatuvar hücre infiltrasyonunu göstermektedir.(A) normal rat, (B) YD-MKH grubu, (C) Kİ-MKH grubu, (D) kontrol grubuna ait görüntüler izlenmektedir.



Resim 4. Konfokal mikroskopi ile alınmış endotel görüntüleri.(A) normal rat, (B) YD-MKH grubu, (C) Kİ-MKH grubu, (D) kontrol grubuna ait görüntüler izlenmektedir.

4.4. Histopatolojik değerlendirme:

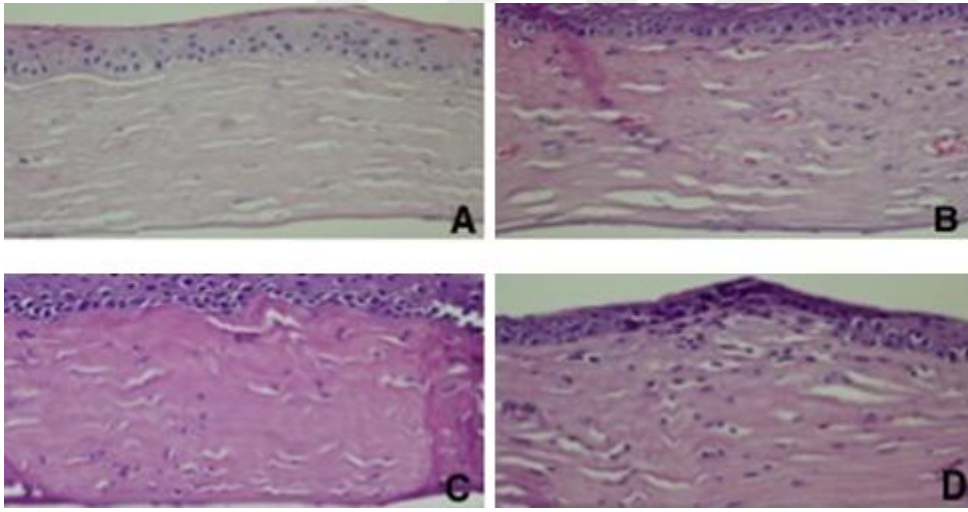
Kİ-MKH grubunda dört denekte derece 0, dört denekte derece 1, iki denekte derece 2 inflamatuvar aktivite görüldü. Ortalama inflamasyon skoru 0.8 idi. Dört denekte derece 1, altı denekte derece 2 fibroblastik aktivite saptandı. Ortalama fibroblastik aktivite skoru 1.6 idi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında inflamasyon şiddeti ve fibroblastik aktivite yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p=0,93$ ve $p=0,80$)(Resim 5)(Tablo 1).

YD- MKH grubunda inflamatuvar aktivite iki denekte derece 0, altı denekte derece 1 ve iki denekte derece 2 ve ortalama 1 olarak saptandı. Fibroblastik aktivite dört denekte derece 0, beş denekte derece 1, bir denekte derece 2 ve ortalama olarak 0.7 saptandı.Kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,33$ ve $p=0,62$)(Resim 5)(Tablo 1).

Kontrol grubunda ise iki denekte inflamasyon derecesi 0, dört denekte derece 1 ve ortalama 0.6 idi.Fibroblastik aktivite ise üç denekte derece 0, üç denekte derece 1 ve ortalama 0.5 bulundu (Resim 5)(Tablo 1).

Tablo 1. Histopatolojik kesitlerde inflamatuvar aktivite ve fibroblastik aktivite skor ortalamaları

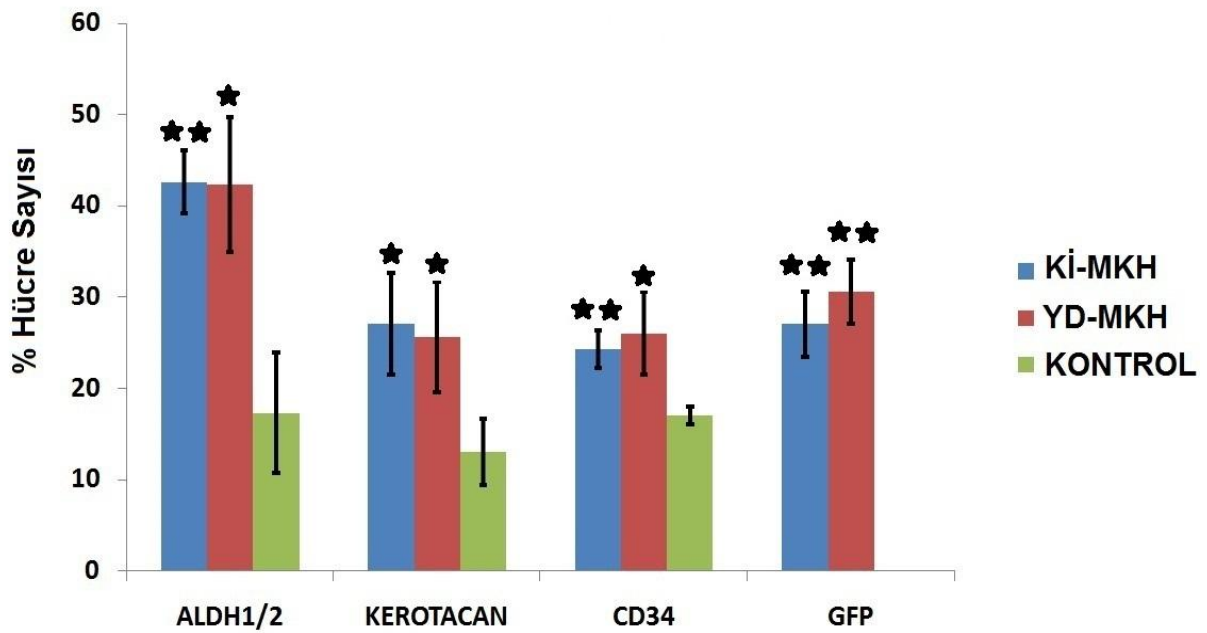
	Kİ-MKH	YD-MKH	KONTROL
İNF. AKTİVİTE	0.8 (P:0.93)	1.0 (P:0.33)	0.6
FİBRO. AKTİVİTE	1.6 (P: 0.80)	0.7 (P:0.62)	0.5



Resim 5. Histopatolojik kesit görüntüleri. Normal rat korneal kesiti, epitelyal yüz üsttedir (A), YD-MKH grubundan inflamasyon ve fibroblastik aktivite skoru 1 olan deneğe ait kesit (B), Kİ-MKH grubundan inflamasyon skoru 1, fibroblastik aktivite skoru 2 olan deneğe ait kesit (C), kontrol grubundan inflamasyon ve fibroblast aktivitesi 1 olarak skorlanan deneğe ait kesit (D) izlenmektedir.

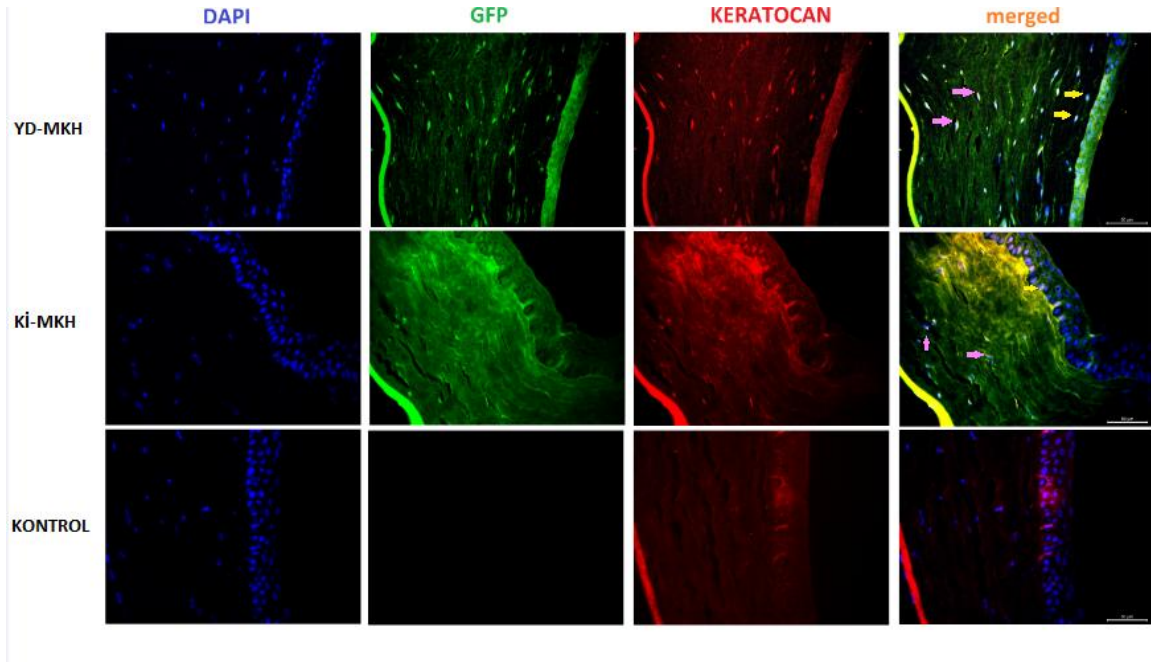
4.5. Parafin kesitlerde GFP, Keratocan- ALDH ve CD 34 ekspresyonu:

Yeşil floresan ile işaretlenmiş kemik iliği ve yağ doku kaynaklı kök hücrelerin transplante edildiği Kİ-MKH ve YD-MKH gruplarının her ikisinde de mikroskopik incelemede işaretli hücrelerin stromada ayrıca epitel ve damar endotelinde de yerleştiği görüldü. Kİ-MKH ve YD-MKH grupları yerleşen hücre sayıları bakımından karşılaştırıldığında YD-MKH grubunda hücre sayısının daha fazla olduğu ancak farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=0.276$) (Grafik 3).



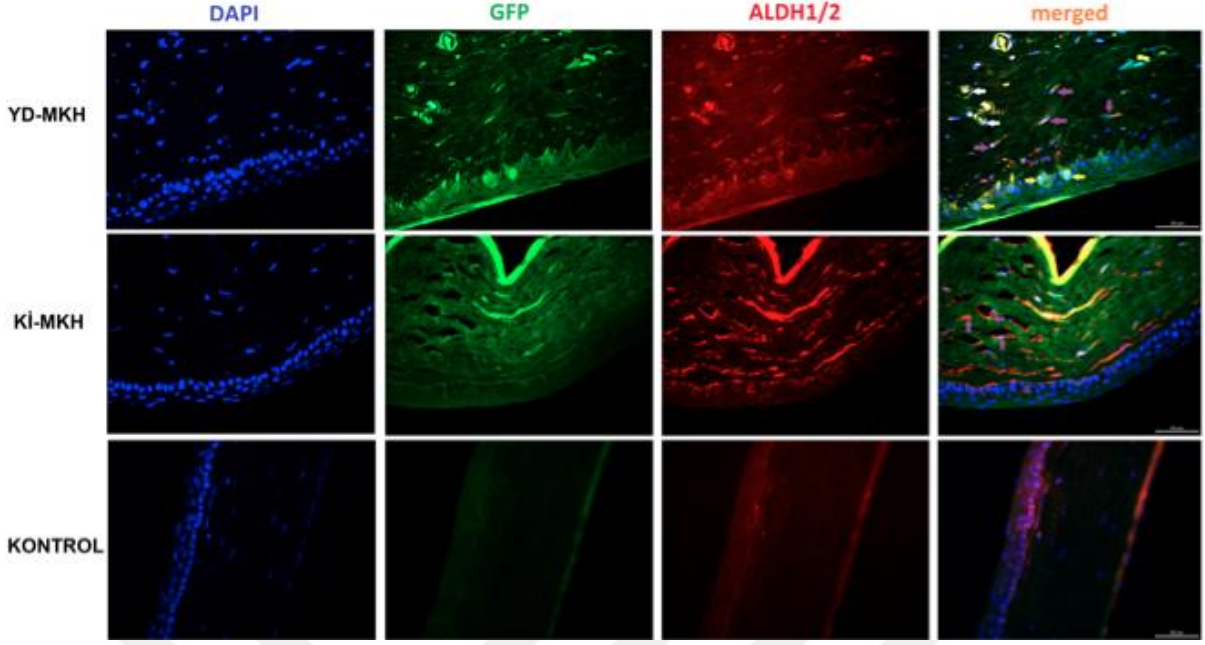
Grafik 3 : ALDH, Keratocan, CD34 ve GFP eksprese eden hücre oranlarını gösteren grafik. Kİ-MKH ve YD-MKH gruplarında bu belirteçleri eksprese eden hücre oranları kontrol grubuna oranla belirgin şekilde artmıştır (* $p<0.05$ veya ** $p<0.01$).

İmmunohistokimyasal çalışmalarla değerlendirilen keratocan ekspresyonunun Kİ-MKH ve YD-MKH grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yükseklik gösterdiği ($p=0.02$ ve $p=0.035$), ancak iki grup arasında anlamlı düzeyde farklılık olmadığı görüldü ($p=0.7$) (şekil 4).



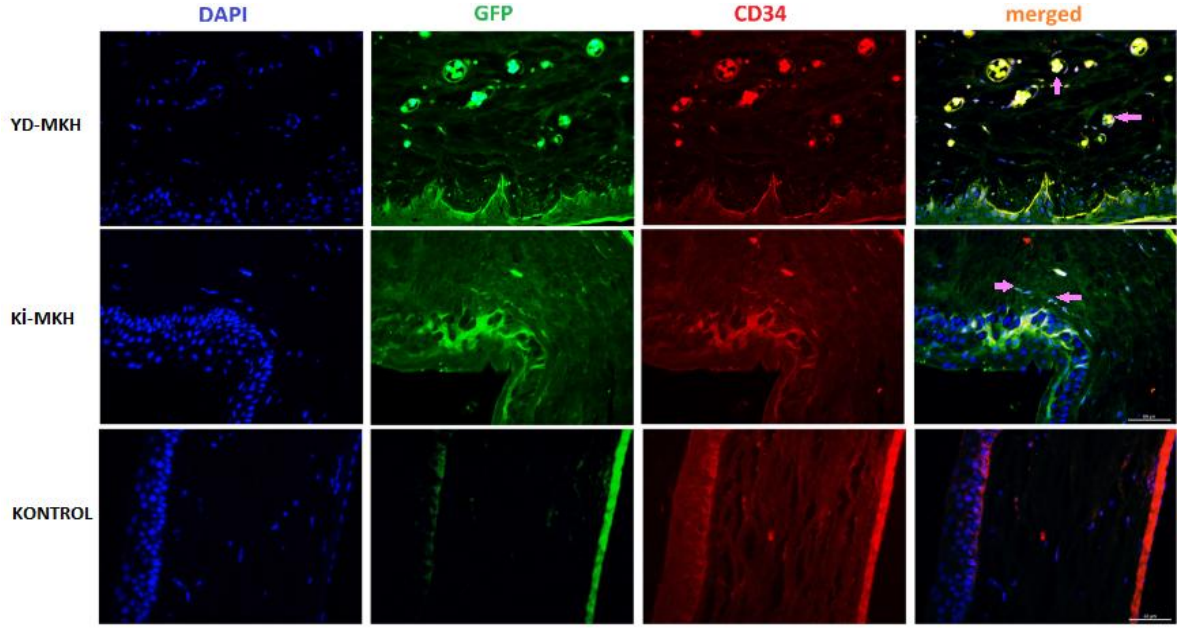
Şekil 4: Deney gruplarına ait parafin kesitlerde keratocan ekspresyonu izlenmektedir. YD-MKH ve Kİ-MKH gruplarında ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna oranla belirgin şekilde artmış olduğu gözlenmektedir ($p < 0,05$). (mor oklar, stromadaki yerleşimi; sarı oklar epiteldeki yerleşimi göstermektedir.)

Benzer şekilde aldehid dehidrogenazın da kontrol grubuna göre Kİ-MKH ve YD-MKH gruplarında yüksek düzeyde eksprese edildiği görüldü ($p=0.005$, $p=0.012$) ancak Kİ-MKH ve YD-MKH grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı ($p=0.94$) (şekil 5).



Şekil 5: Deney gruplarına ait parafin kesitlerde ALDH ekspresyonu izlenmektedir. YD-MKH ($p < 0,05$) ve Kİ-MKH ($p < 0,01$) nakledilen gruplarda ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna oranla belirgin şekilde artmış olduğu gözlenmektedir. (mor oklar, stromadaki yerleşimi; sarı oklar epiteldeki yerleşimi, beyaz oklar damar endotelindeki yerleşimi göstermektedir.)

Ayrıca iyi bilinen bir keratosit markerı olan CD 34 antikorı ile immün boyama yapıldı.^(60,61) Transplant gruplarında (Kİ-MKH ve YD-MKH) kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde pozitiflik saptanırken ($p = 0.005$ ve $p = 0.029$) iki grup arasında anlamlı farklılık görülmedi ($p = 0.84$) (Şekil 6).



Şekil 6: Deney gruplarına ait parafin kesitlerde CD34 ekspresyonu izlenmektedir. YD ($p<0,05$) ve Kİ-MKH ($p<0,01$) nakledilen gruplarda ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna oranla belirgin şekilde artmış olduğu gözlenmektedir. (mor oklar, stromadaki yerleşimi göstermektedir.)

4.6. Gen ekspresyon çalışmaları (Real Time PCR):

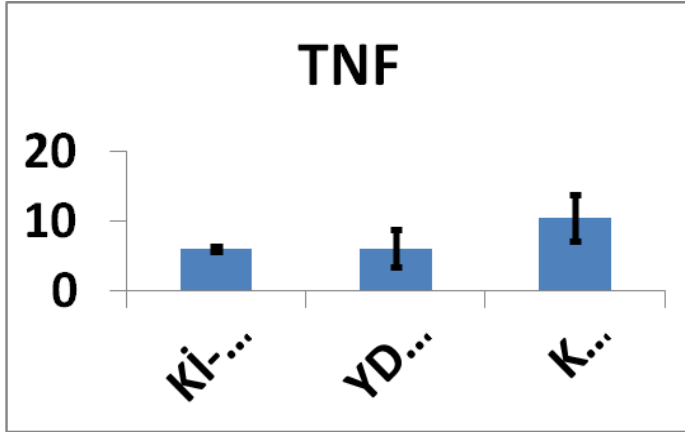
Tümör nekroz faktör (TNF): İnflamatuar etkinliği artırıcı fonksiyonu en belirgin olan sitokindir. YD-MKH ve Kİ-MKH gruplarında TNF geninin ekspresyonunda kontrol gruplarına göre yaklaşık iki kat düşüş gözlenmiştir. (Grafik 4)

İnterlökin 6 reseptörü (IL-6R): IL-6 başlıca T hücre ve makrofajlar tarafından salınan proinflamatuar bir sitokindir. Stromal meltinge sebep olabilen nötrofil infiltrasyonuna liderlik eder. ⁽⁶²⁾ Etkisini membrana bağlanan (IL-6R) ve serbest tip (IL-6 soluble) olmak üzere iki tipte bulunan reseptörleri üzerinden göstermektedir. IL-6 düzeyi arttıkça, IL-6R düzeyi de artmaktadır.

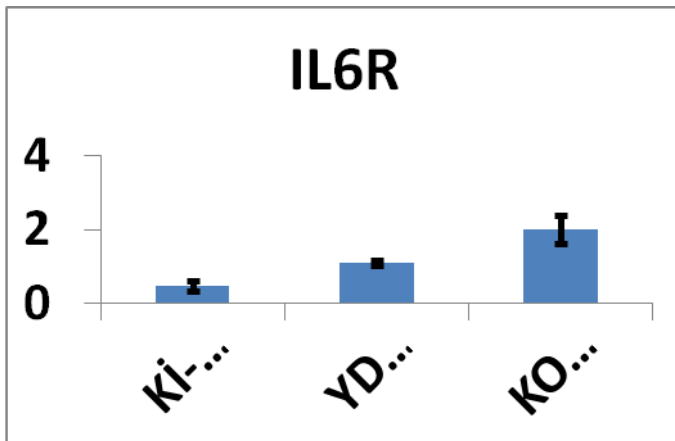
IL-6R gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında Kİ-MKH grubunda yaklaşık 4 kat, YD-MKH grubunda ise yaklaşık 2 kat, kontrol grubuna göre azalma saptanmıştır. (Grafik 5)

İnterlökin 12b (IL-12b): T hücreleri ve natural killer (NK) hücreler üzerinde proinflamatuvar etki göstermektedir. YD-MKH uygulanmış dokuda ekspresyonu 8 kat azalma göstermiştir. Kİ-MKH grubunda da kontrol grubuna göre daha az eksprese edildiği saptanmıştır (Grafik 6).

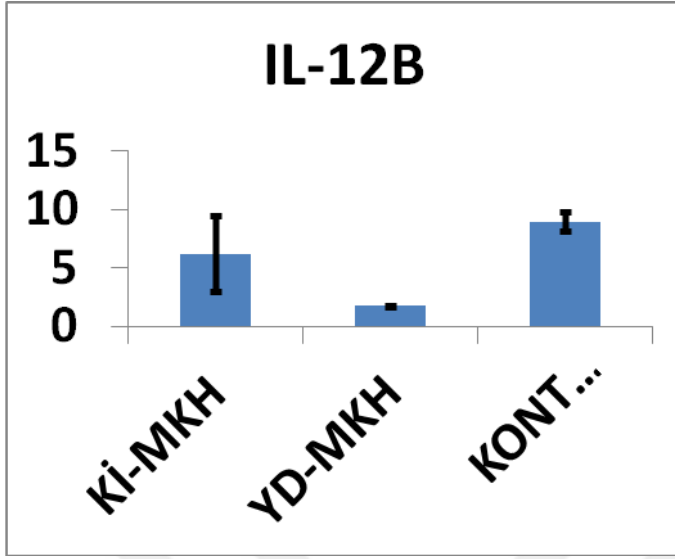
Transforming growth faktör beta (TGF-B1) : İmmunosupresyon etkinliği bilinen bir sitokindir. Stromal yara iyileşmesinde miyofibroblast dönüşümü ve skar gelişimindeki rolü tanımlanmıştır. Kontrol grubuna göre, Kİ-MKH grubunda ekspresyonu fazla iken YD-MKH grubunda ekspresyonu azalmıştır. (Grafik 7).



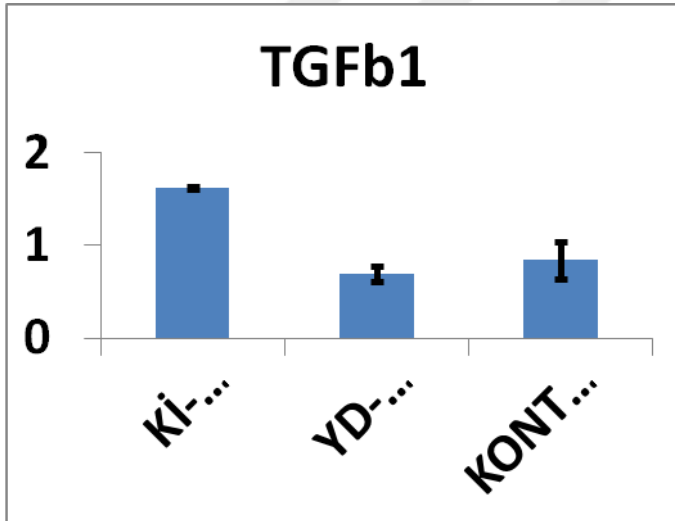
Grafik 4. TNF ekspresyon düzeyi



Grafik 5. IL-6 reseptör ekspresyon düzeyi



Grafik 6. IL-12b ekspresyon düzeyi



Grafik 7. TGF-B1 ekspresyon düzeyi

5. TARTIŞMA:

Korneanın travma sonrası ya da enfeksiyon nedeniyle olan yara iyileşmesi sırasında, mezenkimal kökenli stromal hücreler olan keratositler aktive olurlar, dendritik morfolojilerini kaybederek fibroblast ya da myofibroblastlara dönüşürler.^(15,16) Sonuç olarak ALDH ve keratan sülfat sentezi azalır korneal şeffaflık kaybedilir.^(17,18) Korneal skar gelişen durumlarda görme fonksiyonunun yeniden sağlanabilmesi için gereken işlem kornea naklidir. Hücre temelli tedaviler son yıllarda her alanda yoğun olarak çalışılan ve kornea nakline de alternatif sağlayabileceği düşünülen tedavi yöntemleri arasındadır.

Literatürde korneal hasar modellerinde kök hücrelerin etkisi üzerindeki çalışmaların çoğunluğunu deneysel korneal alkali yanık ve limbal kök hücre yetmezliği modelleri oluşturmaktadır. Sistemik ve ya subkonjonktival yolla verilen ya da amnion zarına ekilerek implante edilen mezenkimal kök hücrelerin epitel hücrelerine diferansiye olduğunu ve klinik olarak epitelizasyonu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur.⁽⁶³⁻⁶⁵⁾ Ayrıca persistan epitel defekti olan bir hastada topikal kullanılan yağ doku kaynaklı MKH lerin epitelizasyonu sağladığı bir olgu rapor edilmiştir.⁽⁶⁶⁾

Kornea stromal hasar modeli olarak lumican gen defekti oluşturularak korneal bulanıklık yaratılan fareler üzerinde kök hücre verilerek yapılmış çalışmalar mevcuttur. Du ve arkadaşları insan kornea stromal kök hücrelerini, Liu ve arkadaşları ise umbilikal kord kaynaklı kök hücreleri intrastromal enjeksiyon yöntemiyle transfer etmişler ve korneal opasitenin azaldığını bildirmişlerdir.⁽⁶⁷⁻⁶⁸⁾ Arnalich-Montiel ve arkadaşları ise excimer laser ablasyon yöntemiyle korneal hasar oluşturdukları tavşan modelinde yağ doku kaynaklı kök hücreleri korneal flep altına transfer etmişler ve 8 haftalık takipte korneal hazede değişiklik saptanmadığını bildirmişlerdir.⁽⁶⁹⁾

Bu çalışma, oluşturulan hasar modeli ve kök hücre transferinde kullanılan ön kamara enjeksiyonu yöntemi açısından, literatürdeki kornea hasar modellerinde gerçekleştirilen kök hücre uygulamalarına ilişkin ilk çalışmadır. Yaptığımız bu çalışmada postoperatif 1.haftada yapılan klinik muayene ile 4.hafta yapılan klinik muayene karşılaştırıldığında YD- MKH grubunda 4 denekte, Kİ- MKH grubunda 2 denekte korneal opasite skorunda azalma tespit ettik. Buna karşın kontrol grubunda 1 denekte korneal opasitede azalma görüldü. Mezenkimal kök hücre enjeksiyonu yapılan her iki grupta da kornea opasitede azalma

saptanan denek sayısı, kontrol grubundan fazla olarak tespit edildi. Kontrol grubunda 1 denekte opasite artışı olmasına rağmen mezenkimal kök hücre enjeksiyonu yapılan gruplarda hiçbir denekte korneal opasite skorunda artış görülmedi. Ancak gruplar arasında korneal opasite skorunda görülen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı saptanmadı.

Yapılan in vivo konfokal mikroskopi sonucunda kök hücre transplante edilen her iki grupta da hem anterior stromada hem posterior stromada keratosit sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu bulundu. Literatürdeki kornea modellerinde gerçekleştirilen kök hücre çalışmalarında in vivo konfokal mikroskopi ile stroma kalınlığının değerlendirildiği çalışmalar mevcuttur. Ancak keratosit sayısının değerlendirildiği çalışma mevcut değildir. Bu çalışma in vivo konfokal mikroskopi ile kök hücre transplante edilen gruplarda keratosit sayısının arttığının gösterildiği literatürdeki ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Yapılan immunflouresan mikroskopik incelemede, flouresan protein ile işaretlenmiş olarak ön kamaraya nakledilen kök hücrelerin hem Kİ- MKH grubunda, hem YD- MKH grubunda stroma içerisinde yerleşmiş olduğu ve 8 hafta sonunda halen yaşadığı gösterilmiştir. Bu sonuç kök hücrelerin ön kamaraya enjekte edilmesi yönteminin korneal yaralanmalarda korneaya kök hücre transferi için uygun bir yöntem olabileceğini göstermiştir. Kök hücrelerin klinik kullanımı yaygınlaştığında ön kamara enjeksiyonu yöntemiyle kök hücre transferinin kolay uygulanabilirliği ve komplikasyonunun çok nadir olması gibi sebeplerle tercih edilebilir olduğunu düşünmekteyiz.

Hücre temelli tedavilerde verilen hücrelerin konak dokusu hücrelerine dönüşümünü değerlendirmek önem arz etmektedir. Keratocan, keratositlerce sentezlenen bir keratan sülfat proteoglikandır ve keratosit spesifik marker olarak kabul edilmektedir.⁽¹⁴⁾ İmmunohistokimyasal incelemede yerleşen kök hücrelerin stromaya spesifik ekstrasellüler matriks protein olan keratocan eksprese ettiği hem Kİ- MKH grubunda, hem YD- MKH grubunda gösterildi. Kontrol grubu ile keratocan eksprese eden hücre sayıları karşılaştırıldığında hem Kİ-MKH hem YD-MKH grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptandı. Kİ- MKH ve YD- MKH gruplarının her ikisinde de keratosit spesifik belirteç olan ALDH ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede pozitif bulundu. Benzer şekilde keratosit belirteci olarak kullanılan CD 34 antikoru ile yapılan immun boyama sonucunda Kİ- MKH ve YD- MKH grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede pozitif boyanma saptandı. İmmunohistokimyasal incelemelerle ortaya konan bu

veriler stromaya yerleşen kök hücrelerin stroma hücrelerine spesifik kabul edilen bazı belirteçleri sentezleyebildiklerini göstererek, verilen bu hücrelerin konak dokusuna ait bazı özellikleri kazandığını bir anlamda fonksiyonel keratositlere dönüştüğünü göstermektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin klinik yararı konusunda konak dokuya dönüşebilme yeteneği dışında, ulaştığı dokudaki parakrin faktörlerin etkisiyle farklı moleküller sentez edebilme özelliği üzerinde durulmaktadır. İn vitro ortamda yağ doku kaynaklı kök hücrelerin keratocan ya da ALDH sentez etmedikleri görülmüştür. Bu proteinlerin ekspresyonu korneal stromal mikroçevrenin etkisi altında olmaktadır. Ayrıca Arnalich-Montiel ve arkadaşlarının çalışmasında bu proteinlerin sağlam korneaya transfer edilen yağ doku kaynaklı MKH ler tarafından sentez edilmediğini, kornea ablasyon modelinde transfer edilen MKH lerin keratocan ve ALDH sentezleyebilme kapasitesi kazandığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, yara iyileşme ve inflamasyon sürecinde ortamdaki çeşitli faktörlerin kök hücrelerin hangi fonksiyonları üstleneceği konusunda belirleyici olduğunu düşündürmektedir.

Kök hücrelerin inflamasyon üzerindeki etkileri değişkenlik göstermektedir. Nakledilen dokuda bu hücrelerin inflamasyonu arttırıcı ya da baskılayıcı yönde hareket etmesini belirleyen de yine mikroçevre ve parakrin etkilerdir. Yara iyileşmesi için inflamasyonun başlaması ne kadar önemliyse mikroçevreden gelen sinyallerle inflamasyonun sonlandırılması da eşit derecede önemlidir. Uzamış inflamasyon ve buna bağlı başlayan fibroblastik proliferasyon her doku için yara iyileşmesinin skarla sonlanmasına neden olmaktadır. MKH lerin inflamasyon üzerindeki etkileri ortamdaki ortama farklılık gösterir. Ortamda interferon-gama (IFG) düşük miktarda bulunuyorsa MKH ler proinflamatuvar sitokin sentezini arttırırken, IFG yüksek miktarda bulunuyorsa anti-inflamatuvar sitokin sentezini arttırırlar.⁽⁷⁰⁾ Keratoplasti yapılan ratlar üzerinde sistemik yolla verilen MKH lerin kornea greft reddine olan etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada postoperatif verilen MKH lerin greft sağkalım süresini arttırdığı tespit edilmiştir. Preoperatif ya da rejeksiyon sonrası verildiğinde ise etkisinin olmadığı gösterilmiştir.⁽⁷¹⁾

Bu çalışmada gerçek zamanlı PCR yöntemiyle değerlendirilen TNF, IL-6R, IL-12b gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun kök hücre nakli yapılan her iki grupta da kontrol grubuna göre azalmış olduğunu tespit ettik. Bu sonuç, penetran kesi yapılan kornea modelinde transplante edilen YD- ve Kİ- MKH lerin anti-inflamatuvar etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir. Yine aynı yöntemle değerlendirilen TGF-beta'nın stromal yara iyileşmesindeki rolü belirgin olarak tanımlanmıştır. Stromal yara cevabı olarak ortaya çıkan

fibroblastların korneal skar gelişiminden sorumlu myofibroblastlara dönüşümü TGF- beta düzeyine bağlıdır. TGF- beta düzeyinin artışı fibroblastların myofibroblastlara dönüşümü ve skar gelişimi ile sonuçlanırken TGF-beta'nın azalması myofibroblastların apoptozisine neden olmaktadır.⁽⁷²⁻⁷³⁾ YD-MKH grubunda TGF- beta ekspresyonunun Kİ-MKH ve kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler, klinik olarak opasite skorunun azaldığı en fazla denek sayısının YD-MKH grubunda olmasının TGF-beta ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ancak bu ilişkinin daha açık olarak ortaya konabilmesi için daha geniş denek grubuna ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma, kornea üzerinde yapılan mezenkimal kök hücre çalışmaları konusunda iki farklı kökenli MKH lerin karşılaştırıldığı literatürdeki ilk çalışmadır. Çalışmamızda yağ doku ve ya kemik iliğinden elde edilen MKH ler arasında gerek klinik iyileşme yönünden, gerek keratosit fonksiyonel belirteçlerini sentezleyebilme ve anti-inflamatuar etkinlik bakımından anlamlı farklılık saptanmamıştır. Etkinlik yönünden farkı görülmeyen bu iki dokudan elde edilme kolaylığı, miktar olarak fazla olması ve proliferasyon yeteneğinin daha iyi olması gibi sebeplerle yağ doku klinik araştırma ve uygulamalarda daha elverişli kök hücre kaynağı olabilir.

Her iki grupta da ön kamaraya nakledilen mezenkimal kök hücrelerin stromaya yerleştiği ve matür keratosit fonksiyonu kazandığı immun histokimyasal olarak gösterilmesine rağmen optik şeffaflık kazanılmasında yeterli katkı sağlamamış olduğunu gördük. Arnalich-Montiel ve arkadaşlarının çalışmasında da bizim çalışmamıza benzer şekilde verilen kök hücrelerin stromada yerleştiği ve fonksiyonel keratosit özelliği kazandığı gösterilmesine rağmen korneal bulanıklık açısından kontrol grubuna göre farklılık saptanmadığı rapor edilmiştir. Biz bu sonuçla ilişkili olarak ekstrasellüler matriksin organizasyonu ve kollajen matürasyonu için geçen sürenin yetersiz olabileceğini ve ya transfer edilen tek doz mezenkimal kök hücrenin stromanın yeniden şekillendirilmesinde yetersiz kalmış olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, korneal şeffaflık için gerekliliği kabul edilen keratocan, aldehid dehidrogenaz gibi markerlar transfer edilen tüm hücreler tarafından sentez edilmiyor olabilir, ya da bunlardan başka fonksiyonel markerlar mevcut olabilir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz veriler ışığında, her ne kadar mükemmel optik şeffaflığa ulaşamamış olsak da, keratosit yerini alabilecek, elde edilmesi ve çoğaltılması kolay hücre kaynağı tespit ettiğimizi düşünüyoruz. Stromal incelmeye seyreden dejeneratif hastalıklarda, stroma kaybına yol açan travmalarda, enfeksiyon ya da immun yanıtı bağlı stromal hasar olan

durumlarda keratosit yerine geçebilecek bu hücre kaynakları çok değerlidir. Özellikle antiinflamatuvar özelliklerinin de katkısıyla enfektif-inflamatuvar hasarla seyreden süreçlerde kullanımı oldukça uygun gözükmektedir. Yağ doku ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin şeffaf korneal yara iyileşmesinde katkı sağlayabileceği ancak farklı doz rejimleri, farklı uygulama süreleri, tekrarlayan enjeksiyonlarla yapılmış, daha uzun takip süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.



ÖZET

DENEYSEL PENETRAN KORNEA YARALANMASI OLUŞTURULAN RATLARDA YAĞ DOKU VE KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI KÖK HÜCRE TRANSPLANTASYONUNUN STROMAL YARA İYİLEŞMESİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

AMAÇ: Korneal stroma hasarının skarla iyileşmesi beklenen doğal süreci üzerinde kök hücre naklinin etkilerini fonksiyonel ve yapısal parametreler kullanarak araştırmak

YÖNTEM: Penetran kornea yaralanması oluşturulan 40 adet Wistar rat 3 gruba ayrılmıştır. Grup 1 (n=15)'deki hayvanların ön kamaralarına Yeşil Flouresans Protein geni transfekte edilmiş kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre ($2 \times 10^5/10 \mu\text{l}$), grup 2 (n=15)'deki deneklere adipoz doku kaynaklı kök hücre ($2 \times 10^5/10 \mu\text{l}$) ve son gruba (n=10) eşit hacimde dengeli tuz solüsyonu enjekte edildi. Post-op 1. haftada biyomikroskopik olarak korneal haze derecelendirildi. Deney sonunda (8 hafta) biyomikroskopik muayene, konfokal mikroskopi ve histopatolojik inceleme yapıldı. İmmunoflouresans boyanmış kesitlerde nakledilen hücrelerin dokuya yerleşimleri değerlendirildi. Keratocan, aldehid dehidrogenaz ve CD 34 ekspresyon düzeyleri için immun boyamalar yapıldı. TNF, IL-6R, IL-12b, TGF beta düzeylerine bakıldı.

SONUÇLAR: İmmunoflouresans boyama ile YFP+ kök hücrelerin kornea stromasında yerleştikleri saptanmıştır. Aldehid dehidrogenaz, keratocan ve CD 34 ekspresyonunun kök hücre enjeksiyonu yapılan her iki grupta da sham enjeksiyon grubuna göre anlamlı derecede artmış olduğu ($p < 0,05$) ancak, grup 1 ve 2 arasında anlamlı farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Klinik değerlendirmede opasite skorunun azaldığı hayvan sayısı transplant gruplarında sham enjeksiyon grubuna göre daha fazla bulunmuştur ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. İn vivo konfokal mikroskopi ile transplant gruplarında anterior ve posterior keratosit dansitesi anlamlı derecede artmıştır. TNF, IL-6R, IL-12b düzeyleri transplant gruplarında sham gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır.

TARTIŞMA: İmmunohistokimyasal olarak allograft enjeksiyon yöntemiyle nakledilen kök hücrelerin kornea stromasına yerleştiği ve fonksiyonel keratosit özelliği kazandığı gösterilmiştir. İn vivo konfokal mikroskopi ile kök hücre nakledilen gruplarda keratosit dansitesinde artış olduğu gösterilmiştir. Korneal opasite skorlarında gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Bu sonuçlar, allojenik kaynaklı kök hücrelerin alıcı kornea stromal

rejenerasyonun sağlanmasında katkı sağlayabileceğini ve fonksiyonel iyileşme için çoklu doz ve daha fazla süreye gereksinim olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: keratocan, kornea, mezenkimal kök hücre, stromal yara iyileşmesi



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON STROMAL WOUND HEALING OF RATS THAT HAD BEEN CREATED EXPERIMENTAL CORNEAL PENETRATING INJURY

PURPOSE:To investigate the efficacy of stem cell transplantation on corneal scarring that heals scarring naturally by using functional and structural parameters.

METHOD:Penetrating injury had been created to right corneas of forty Wistar rats. Subjects were randomized into 3 groups. Green fluorescent protein transfected bone marrow derived mesenchymal stem cells ($2 \times 10^5/10 \mu\text{l}$) were injected into anterior chamber of subjects in group 1 (n=15). Adipose tissue derived mesenchymal stem cells ($2 \times 10^5/10 \mu\text{l}$) were injected in group 2 (n=15) and balanced salt solution in $10 \mu\text{l}$ was injected in group 3 (n=10) as a sham group. Corneal opacity was scored by using biomicroscop after 1 week postoperatively. Biomicroscopic examination, in vivo confocal microscopy and histopathological evaluation were done at the end of the trial on 8th week. Immunofluorescence sections were evaluated to detect transplanted cells in tissue. Immun staining were done to measure level of keratocan, aldehyde dehydrogenase and CD34 expressions. Expressions of TNF, IL-6R, IL-12b, TGF beta were measured in each group by real time PCR analysis.

RESULTS:Establishment of GFP + stem cells on subjects corneas of transplanted groups were detected by immunofloresan staining. Expressions of Keratocan, aldehyde dehydrogenase and CD34 were increased in transplanted groups when compared sham group ($p < 0,05$). The number of subjects that had reduced corneal opacity score in transplanted groups were much than sham group. But that data was not significant istatistically. Anterior and posterior keratocyte density were increased significantly in both transplanted groups according to in vivo confocal microscopic datas. Expressions of TNF, IL-6R, IL-12b were decreased significantly in transplanted groups compared with sham group.

DISCUSSION:Establishment of mesenchymal stem cells that injected into subjects eyes were detected on subjects corneas and functional keratocyte activities that belongs to transplanted cells were shown by immunohistochemistrical tests. Increment in keratocyte densities in transplanted groups were found. There was no significant difference in corneal

opacity scores among three groups. Based on our findings we thought that allogenic stem cells provide benefits for regeneration of corneal stroma but functional healing requires multiple injections and long time.

Key words: cornea, keratocan, mesenchymal stem cells, stromal wound healing



6. KAYNAKLAR

- 1.Engelmann K, Bohnke M, Friedl P. Isolation and long-term cultivation of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988;29: 1656 –1662.
- 2.Tsubota K, Satake Y, Kaido M et al. Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 1999;340:1697–1703.
- 3.Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet* 1997;349:990 –993.
- 4.Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal cells. *N Engl J Med* 2000;343: 86 –93.
- 5.Rama P, Bonini S, Lambiase A et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation* 2001;72:1478 –1485.
- 6.Engelmann K, Drexler D, Bohnke M. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. *Cornea* 1999;18:199–206.
- 7.Mimura T, Amano S, Usui T et al. Transplantation of corneas reconstructed with cultured adult human corneal endothelial cells in nude rats. *Exp Eye Res* 2004;79:231–237.
- 8.Mimura T, Yokoo S, Araie M et al. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3637–3644.
- 9.Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C et al. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1280–1284.
- 10.Hayashida Y, Nishida K, Yamato M et al. Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:1632–1639.
- 11.Nishida K, Yamato M, Hayashida Y et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004;351:1187–1196.
- 12.JesterJV, Moller-PedersenT, HuangJetal. The cellular basis of corneal transparency: Evidence for “corneal crystallins”. *J Cell Sci* 1999;112: 613– 622.
- 13.Carlson EC, Liu CY, Chikama T et al. Keratocan, a cornea-specific keratan sulfate proteoglycan, is regulated by lumican. *J Biol Chem* 2005;280:25541–25547.

14. Hassell JR, Newsome DA, Krachmer JH et al. Macular corneal dystrophy: Failure to synthesize a mature keratan sulfate proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 3705–3709.
15. Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: The role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res* 1999;18:311–356.
16. Mahatta M, Vaisanen T, Vaisanen MR et al. Altered expression of type XIII collagen in keratoconus and scarred human cornea: Increased expression in scarred cornea is associated with myofibroblast transformation. *Cornea* 2006;25:448 – 453.
17. Funderburgh JL, Mann MM, Funderburgh ML. Keratocyte phenotype mediates proteoglycan structure. A role for fibroblasts in corneal fibrosis. *J Biol Chem* 2003;278:45629 – 45637.
18. Funderburgh JL, Chandler JW. Proteoglycans of rabbit corneas with nonpenetrating wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:435–442.
19. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-228.
20. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z et al. Fat tissue: An under appreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150-154
21. Bengisu Ü. Göz hastalıkları,4.baskı: Kornea Anatomisi ve Fizyolojisi. Ankara, Palme yayıncılık, 1998; 69-72.
22. Tipathi RC, Chalam KV, Cibis GW, Kardon PH, Tipathi BJ, Weleber RG, Wand M. Fundamentals and principles of ophthalmology, American Academy of ophthalmology, Taylor Fran, USA,1999; 150-4.
23. Özdemir Ö. Kornea transplantasyonu. *Medikal Network Oftalmoloji Dergisi* 1995; 2(1):69.
24. Arffa RC. Disease of the cornea, fourth edition. Mosby Co. 1997, 6-7.
25. William MH. Adler's Physiology of the eye, Ninth edition, Mosby Co.1992.
26. Brown SI, Dervichian DG. The oils of the meibomian glands: physical and surface characteristics. *Arch Ophthalmol* 1969; 82:537.
27. Waltman RS, Hart WM. The Cornea In : Moses R.A, editor, Physiology of the eye. St. Louis, CV Mosby, 1987; 36-59.
28. Waring GO, Laibson PR, Rodrigues M. Clinical and pathologic alterations of Descemet's membrane. *Surv Ophthalmol* 1974; 18: 325.

29. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1983 Oct;24(10):1442-3.
30. Katryn AH. Fundamentals and principles of Ophthalmology, Src 2; American Academy Of Ophthalmology, s.46-49
31. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, eds. *Cornea* 1997;1:3-27.
32. Klyce SD. Distribution of sympathetic nerves in rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 354.
33. Thorft RA, Friend J. Corneal glucose flux. *Arch Ophthalmol* 1971; 86: 685.
34. Fini ME. Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea. *Progress in Retinal and Eye Research* 1999; 18: 529–551.
35. Moller-Pedersen T, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Confocal microscopic characterization of wound repair after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 487–501.
36. Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Experimental Eye Research* 2001; 72: 33–39.
37. Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36: 809–819.
38. Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Corneal haze development after PRK is regulated by volume of stromal tissue removal. *Cornea* 1998; 17: 627–639.
39. Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Temporal, 3-dimensional, cellular anatomy of corneal wound tissue. *Journal of Anatomy* 1995; 186(Pt 2): 301–311
40. Ebihara N, Yamagami S, Chen L, et al. Expression and function of toll-like receptor-3 and -9 in human corneal myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul;2007 48(7):3069-3076.
41. Jester JV, Petrol WM, Feng W, Essepian J, Cavanagh HD. The wound healing process and measurement of incisional gape in two animal models using in vivo confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Nov;1992 33(12):3255-3270
42. Jester JV, Petrol WM, Garana RM, Lemp MA, Cavanagh HD. Comparison of in vivo and ex vivo cellular structure in rabbit eyes detected by tandem scanning microscopy. *J Microsc.* Jan; 1992 165(Pt 1): 169-181
43. Wilson SE, Mohan RR, Ambrosio R Jr., Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* Sep; 2001 20(5):625-637.

44. Jester JV, Budge A, Fisher S, Huang J. Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro light-scattering. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul;2005 46(7):2369-2378.
45. Jacobsen LO, Marks EK, Gaston EO, Zirkle RE. Effect of spleen protection on mortality following X-irradiation. *J Lab Clin Med.* 1949;Vol 34 :1538-1543.
46. Lorenz E, Uphoff ED, Reid TR, Shelton E. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injection. *Radiology.* 1951;Vol 58:863-877.
47. Can A, Karahüseyinoğlu S. Erişkin Kök Hücrelerin Farklanmasındaki Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar. *Sağlıkta Birikim* 2010;1:57-65
48. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20):11457-11462.
49. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(21): 11307-11312.
50. Poulosom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002; 197(4): 441-456.
51. Ryu KH, Cho SJ, Jung YJ, Seoh JY, Kie JH, Koh SH, et al. In vitro generation of functional dendritic cells from human umbilical cord blood CD34+ cells by a 2-step culture method. *Int J Hematol* 2004; 80(3): 281-286.
52. Aoki M, Yasutake M, Murohara T. Derivation of functional endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood mononuclear cells isolated by a novel cell filtration device. *Stem Cells* 2004; 22(6): 994-1002.
53. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226(6): 507-520.
54. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-147.
55. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Gumus Akay G, Ozel Demiralp D, et al. Biology of the Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In situ and in vitro Surveys. *Stem Cells* 2007; 25(2): 319-331. Epub 2006 Oct 19.
56. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8(3):301-316.
57. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant* 2002; 30(4): 215-222.

58. Angoulvant D, Clerc A, Benchalal S, Galambrun C, Farre A, Bertrand Y, et al. Human mesenchymal stem cells suppress induction of cytotoxic response to alloantigens. *Biorheology* 2004; 41(3-4): 469-476.
59. Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J. Expression of macrophage migration inhibitory factor in corneal wound healing in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:1555-1562
60. Joseph A, Hossain P, Jham S et al. Expression of CD34 and L- selectin on human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4689-4692
61. Espana EM, Kawakita T, Liu CY et al. CD34 expression by cultured human keratocytes is downregulated during myofibroblast differentiation induced by TGF-B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;45:2985-2991
62. Sotozono C, He J, Tei M et al. Effect of Metalloproteinase Inhibitor on Corneal Cytokine Expression after Alkali Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2430-2434
63. Ye J, Yao K, Kim JC. Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye*. 2006;20:482-490
64. Yao L, Li Zhan-rong, Su Wen-ru et al. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *Plos one*. 2012;7:1-7
65. Jiang Ting- Shuai, Cai Li, Ji Wei-Ying et al. Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Molecular Vision* 2010; 16: 1304-1316
66. Agorogiannis G, Alexaki V, Castana O et al. Topical application of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) for persistent sterile corneal epithelial defect. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250:455-457
67. Du Y, Carlson E, Funderburgh M et al. Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas. *Stem Cells* 2009;27:1635-1642
68. Liu H, Zhang J, Liu C et al. Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice. *Plos One* 2010;5(5):e10707
69. Arnalich- Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A et al. Adipose derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells* 2008;26:570-579
70. Aggarwal S and Pittenger MF: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune responses. *Blood* 2005; 105:1815
71. Jia Z, Jiao C, Zhao S et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model. *Exp Eye Res*. 2012;102:44-49
72. Wilson SE. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency. *Exp Eye Res*. 2012;99:78-88
73. Singh V, Santhiago MR, Barbosa FL et al. Effect of TGF-B and PDGF-B blockade on corneal myofibroblast development in mice. *Exp Eye Res*. 2011;93(6):810-7