

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
İNSAN AMNİON MEMBRANI İLE KORNEA YANIK
TEDAVİSİNDE KULLANIMI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI

Samsun
Mart-2009

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN
İNSAN AMNİON MEMBRANI İLE KORNEA YANIK
TEDAVİSİNDE KULLANIMI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI

Danışman: Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN

Samsun
Mart-2009


**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Abdullah Ekmekçi, Gazi Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Gülsen Ökten, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Hasan Bağcı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Tunç Fışgın, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Nurten Kara, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Tezin Adı: Sıçan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin İnsan Amnion Membranı İle Kornea Yanık Tedavisinde Kullanımı

Tezi Teslim Eden: Dr. Ferda Alpaslan Pınarlı

Tez Savunma Sınav Tarihi: 27.04.2009

Danışman: Prof. Dr. Gülsen Ökten

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurul'unca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

**Prof. Dr. Süleyman Çelik
Enstitü Müdürü**

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince her aşamada bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşarak iyi bir bilim adamı olarak yetişmem için büyük katkı sağlayan, başta tez danışmanım Prof.Dr. Gülşen Ökten olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma,

Tez çalışması kapsamında yürüttüğümüz projede bizimle birlikte çalışarak araştırmamıza yardımcı olan başta Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'dan hocam Doç.Dr. Nurten Kara olmak üzere Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematoloji Bilim Dalı'ndan Doç.Dr.Tunç Fışgın ve Prof.Dr. Feride Duru'ya, Göz Hastalıklar Anabilim Dalı'ndan Doç.Dr. Ümit Beden'e, Patoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd.Doç.Dr.Mehmet Kefeli'ye,

Doktora eğitim sırasında omuz omuza çalıştığımız, bilgi ve deneyimlerimizi paylaştığımız asistan arkadaşlarıma,

Laboratuar çalışmalarım sırasında benimle tüm deneyimlerini paylaşarak eğitimime katkıda bulunan başta Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Sitogenetik Laboratuvarı teknisyeni Mustafa Düz, Moleküler Genetik Laboratuvarı teknisyeni Öznur Mırık, Çocuk Hematoloji Laboratuvarı teknisyeni Bülent Karakaş olmak üzere adı geçen laboratuvarların tüm teknisyenleri ve çalışanları ile Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezi personeline,

Var olmamı sağlayan canım annem ve aileme,

Her zaman yanımda olan sevgili eşim ve oğluma

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

ÖZET

SIÇAN KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN İNSAN AMNİON MEMBRANI İLE KORNEA YANIK TEDAVİSİNDE KULLANIMI

Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun, Mart-2009

Çeşitli kök hücre kaynaklarından yapılan çalışmalarda, erişkin kök hücrelerin hasarlanmış dokuda tedaviye yönelik olarak kullanımlarında bir takım avantajlar sağladığı görülmüştür. Farklı nedenler sonucu ortaya çıkan ağır kornea hasarında hasta gözde hem limbus hem de merkez epitel kaybı ile birlikte inflamasyon, neovaskülarizasyon ve konjonktivalizasyon meydana gelir. Limbal kök hücrelerin geri dönüşsüz olarak hasarlandığı durumlarda, limbal kök hücre transplantasyonu ya da başka bir kaynaktan elde edilen kök hücrelerin limbal kök hücrelere dönüşmesi kornea hasarını tamire olanak sağlayabilir. Bu arayışta, mezenkimal kök hücreler (MKH) kolay izole edilmeleri ve epitel hücrelerine farklılaşabilme özellikleri nedeniyle gündeme gelmiştir. Bu çalışmada kornea hasarı gerçekleştirilen dört grup sıçan kullanılmış; üç grup dişi sıçana amnion membranı (AM) üzerinde erkek sıçan kemik iliğinden elde edilen MKH'ler ve değişik kombinasyonlarda keratinosit büyüme faktörü-2 (KGF-2) ve otolog serum (OS) uygulanmıştır. Son grup sıçana yalnızca amnion membranı nakledilmiştir. Bu uygulamayı seçmekteki amacımız tam kornea hasarı oluşturulduktan sonra MKH'lerin limbal kök hücrelere dönüşüm sürecini araştırmak, KGF-2 ve OS'nin bu sürece etkisini belirlemektir. Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, grup II (AM+MKH+KGF-2) ve grup III (AM+MKH+KGF-2+OS) sıçanlarda kontrol grubu olarak kullanılan grup IV (AM) sıçanlara göre iyileşmenin anlamlı derecede fazla olduğu bulundu. Grup I (AM +MKH) sıçanlarda grup IV'e göre kornea berraklığı ve neovaskülarizasyon açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı. MKH'lerin limbal kök hücrelerin tam hasarlanması durumunda kornea epitel tamirinde uygun bir hücre/doku tipi olabileceği ve KGF-2'nin otokrin ve/veya parakrin etki ile bu onarım sürecini, hücre çoğalmasını etkileyerek ya da MKH'nin limbal kök hücrelere dönüşüm aşamasında yönlenebilir yardımcı olarak etkilediği söylenebilir. KGF-2'nin MKH ve kornea epiteline etkilerinin buna yönelik farklı çalışmalarla araştırılması gerekmektedir. Bu sonuçlar ileride yapılacak olan insan çalışmalarına da model oluşturabilmesi bağlamında önemlidir.

ABSTRACT

THE USE OF RAT BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS WITH HUMAN AMNION MEMBRANE IN THE TREATMENT OF CORNEAL BURN INJURY

Dr. Ferda ALPASLAN PINARLI, Ph.D. Thesis

University of Ondokuz Mayıs Samsun, March-2009

Various stem cell studies revealed that adult stem cells have numerous advantages when used to repair the tissue injuries. In severe corneal damage there is central epithelial loss with inflammation, neovascularisation and conjunctivalisation. Corneal damage with irreversible loss of limbal stem cells can be cured with transplantation of limbal stem cells or stem cells from other sources. Mesenchymal stem cells (MSCs) are potential sources because they can easily be isolated and have the potential to differentiate to epithelial cells. In this study, mesenchymal stem cells were transplanted with amnion membrane (AM) to four groups of rats with corneal damage. Keratinocyte growth factor-2 (KGF-2) and autologous serum (OS) were added in various combinations in groups 1-3 and the last group were used as controls. The aim of this study is to investigate the differentiation of MSCs to limbal stem cells along with the effect of the KGF-2 and OS to this process. The results of the study revealed that the corneal healing in the group II (AM+MSCs+KGF-2) and in the group III (AM+MSCs+KGF-2+OS) rats was significantly better than that in group IV (AM) rats. No statistically significant difference was present between the corneal healing of the group I and group IV rats. Mesenchymal stem cells can be an appropriate source of tissue type for corneal repair in the case of complete damage of the limbal stem cells. The effect of KGF-2 in corneal healing may be via autocrine and paracrine means or it may aid the mesenchymal stem cells to differentiate into the limbal stem cells. This effect of KGF-2 must be clarified by appropriate studies. These results may also be helpful in creating a model for future human studies.

SİMGELER VE KISALTMALAR

AM:	Amnion membranı
BMP-4:	Kemik morfojenik proteini-4
CFU-F:	Koloni oluşturan birim - fibroblast
DAB:	3,3'-diamino benzidin
DMEM-LG:	“Dulbecco’s modified Eagle’s medium - low glucose”
DMSO:	Dimetil sulfoksit
EB:	Embryoid cisimcik
EGF:	Epidermal büyüme faktörü
EGFR:	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMKH:	Embriyonik kök hücre
ERKH:	Erişkin kök hücre
FBS:	Fetal bovin serum
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
FISH:	Fluoresan in situ hibridizasyon
FITC:	Fluoresein izotiosiyonat
G-CSF:	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GFP:	Yeşil fluoresan protein
GM-CSF:	Granülosit monosit koloni uyarıcı faktör
GSK-3:	Glikojen sentetaz kinaz-3
GVHH:	Greft versus host hastalığı
H&E:	Hematoksilen eozin
HCAM-1:	Homing assosiye hücre adezyon molekülü
HGF:	Hepatosit büyüme faktörü
HKH:	Hematopoetik kök hücre
hTERT:	Ters transkriptaz telomeraz proteini
hTR:	Telomeraz RNA
ICAM:	İntersellüler hücre adezyon molekülü
ICM:	İç hücre kütlesi
IVF:	İn vitro fertilizasyon
JAK:	Janus kinaz

K14:	Sitokeratin 14
K19:	Sitokeratin 19
KGF:	Keratinosit büyüme faktörü
KGF-2:	Keratinosit büyüme faktörü-2 (Fibroblast büyüme faktörü-10)
LİF:	Lösemi inhibitör faktör
LRP:	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili proteinler
MAPC:	Multipotent erişkin progenitor hücreler
M-CSF:	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MEF:	Fare embriyonik fibroblastı
MKH:	Mezenkimal kök hücre
NGF:	Sinir büyüme faktörü
NV:	Neovaskularizasyon
OS:	Otolog serum
PBS:	Fosfat tamponlu salin
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDFGR:	Platelet türevli büyüme faktörü reseptörü
PE:	Fikoeritrin
PPARA:	“Peroxisome proliferation activated receptor antigen”
RunX2:	“Runt homology domain transcription factor”
STAT3:	Sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivatörü
TBE:	Tris-borik asit EDTA
TCFs:	T hücre özgün faktör
TGF-β:	Transforme edici büyüme faktörü-β
UV:	Ultraviyole
VCAM-1:	Vasküler hücre adezyon molekülü
VLA:	“Very late activation”

İÇİNDEKİLER

Özet	iv
Abstract	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
İçindekiler	viii
I. Giriş	1
II. Genel Bilgiler	2
II.A. Kök Hücre Nedir?	2
II. B. Kök Hücre Tipleri ve Kaynakları	10
II. B.1. Embriyonik Kök Hücre (Emkh)	11
II.B.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	18
II.B.2.1. Erişkin Kök Hücreler	18
II.B.2.2. Hematopoetik Kök Hücreler	20
II.B.2.3. Bağırsak Kök Hücreleri	20
II.B.2.4. Karaciğer Kök Hücreleri	20
II.B.2.5. Kemik ve Kıkırdak Kök Hücreleri	21
II.B.2.6. Epidermal Kök Hücreler	22
II.B.2.7. Nöronal Kök Hücreler	22
II.B.2.8. Mezenkimal Kök Hücreler	22
II.B.2.9. Göz Kök Hücreleri	32
II.B.2.9.1. Retina Kök Hücreleri	32
II.B.2.9.2. Oküler Yüzey Kök Hücreleri	33
II.B.2.9.2.A. Konjonktiva Kök Hücreleri	33
II.B.2.9.2.B. Limbal Kök Hücreler	34
II.B.2.9.2.C. Kök Hücre Eksikliğinin Neden Olduğu Oküler Yüzey Hastalıkları	38
III. Gereç ve Yöntem	43
III.A. Deneyde Kullanılan Cihazlar , Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları	43

III.A.1. Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve alışma Solüsyonları	43
III.A.1.1. Cihazlar	43
III.A.1.2. Kimyasal Maddeler	44
III.A.2. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve alışma Solüsyonları	44
III.A.2.1. Cihazlar	44
III.A.2.2. Kimyasal Maddeler	44
III.A.2.3. Çalışma Solüsyonları	45
III.A.3. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve alışma Solüsyonları	45
III.A.3.1. Cihazlar	45
III.A.3.2. Kimyasallar	46
III.A.3.3. Çalışma Solüsyonları	46
III.A.3.3.A. Akım Sitometri Cihazı İle Tanımlamada Kullanılan Yöntem	46
III.A.4. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	47
III.A.4.1. Cihazlar	47
III.A.4.2. Kimyasal Maddeler	47
III.A.4.3.A. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	48
III.A.4.3.B DNA İzolasyonu	49
III.B. Gereç ve Yöntemin Şeması	51
III.C. İnsan Amnion Membranının Hazırlanması	52
III.D. Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	52
III.E. Sıçan Kornealarında Hasar Oluşturulması	57
III.F. Amnion Membranı ve Mezenkimal Kök Hücrelerin Transplantasyonu	57
III.G. Araştırma Gruplarının Özellikleri	61
III.H. İncelenen Parametreler	61
III.H.1. Beyaz ve Mavi Işıktaki İnceleme	61
III.H.2. Histolojik Boyama	61
III.H.3. İmmünohistokimyasal Boyama	62
III.H.4. DNA İzolasyonu ve SRY Geninin Saptanması	62
III.H.5. İstatistik Yöntemi	63

IV. Bulgular	64
IV.A. Grupların Değerlendirilmesi	68
IV. B. Grupların Karşılaştırılması	78
V. Tartışma	80
VI. Sonuç ve Öneriler	86
VII. Kaynaklar	87
VIII. Ekler	106
VIII.A. Bilgilendirilmiş Onam Formu	106
VIII.B. Hayvan Etik Kurul Raporu	107
VIII.C. İnsan Etik Kurul Raporu	108
IX. Özgeçmiş	109

I. GİRİŞ

Bugün için tedavisi olanaksız hastalıkların birçoğunda mortalite ve morbiditeyi etkileyen en önemli neden bazı hücre, doku ve organların geri dönüşsüz şekilde hasarlanmasıdır. Bu tip hastalıkların kesin tedavisini sağlamak ancak hasar gören hücre, doku ya da organların biyolojik işlevlerini yerine koymak ya da onarmak ile mümkün olabilir. Bir hedef doku ya da organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek kadar sayı ve kalitede özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesi ile bu amaca ulaşılabilir (Gage, 1998; Bayık, 2004).

Son yıllarda vücudun kendi dokularını yenileyebilme yeteneği ile ilgili temel araştırmalar, kök hücrelerin varlığına ve bu hücrelerin diğer hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyellerine ışık tutmuştur. Kök hücreler bu amaca hizmet edebilecek ve hücre tabanlı tedavide kullanılacak başlıca kaynak olarak görülmektedir. Bu temelde kimi araştırmalarda hayvan ya da insan kaynaklı farklı dokular kök hücreler ile ilgili araştırmalarda kullanılmıştır (Gage, 1998; Karaöz ve Ovalı, 2004; Müller ve ark., 2006; Caplan, 2008). Çeşitli kök hücre kaynaklarından yapılan çalışmalarda, erişkin kök hücrelerin hasarlanmış dokuda tedaviye yönelik olarak kullanımlarında bir takım avantajlar sağladığı görülmüştür. Bir erişkinden alınan kök hücreleri kullanmanın avantajı hastanın kendi hücrelerinin kültürde çoğaltılabilmesi ve daha sonra immun red olayı ile karşılaşılmadan tekrar kendisine verilebilmesidir (Omay ve Şahin, 2004; Uçkan, 2007).

Değişik nedenlerle oluşan kornea epitel hasarında ya da limbal kök hücrelerin tamamen ve geri dönüşsüz zarar görmesi sonucu meydana gelen oküler yüzey lezyonlarında limbal kök hücre transplantasyonu ya da başka bir kaynaktan elde edilen kök hücrelerin limbal kök hücrelere dönüşmesi kornea hasarının onarımına olanak sağlayabilir (Charukannoetkanok, 2006). Farklı hücre kaynağı arayışında, erişkin kök hücre tiplerinden biri olan mezenkimal kök hücre (MKH)'ler kolay izole edilmeleri ve epitel hücrelerine farklılaşabilme özellikleri nedeniyle gündeme gelmiştir (Ma ve ark., 2006; Pittenger ve ark., 1999; Barry ve Murphy, 2004; Ye ve ark., 2006; Castanheira ve ark., 2008). Biz de çalışmamızda tam kornea epitel hasarı oluşturduktan sonra amnion membran (AM)'ı üzerinde MKH'leri naklederken keratinosit büyüme faktörü-2 (KGF-2) ve otolog serum (OS)'u kullanarak MKH'nin limbal kök hücrelere farklılaşma sürecini ve KGF-2 ile OS'nin bu sürece etkisini belirlemeyi amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

II.A. KÖK HÜCRE NEDİR?

Organizmada fonksiyonların düzenli sürdürülebilmesi, çok iyi düzenlenmiş ve kontrol edilmiş çoğalma, göç etme, farklılaşma ve olgunlaşma etkinliklerinin korunmasına ve birlikteliğine bağlıdır. Bunun sağlanması ancak organ ve dokulardaki hücrelerin üretilmesi ve bu üretimin devamlı olması ile mümkündür. Organizmadaki bu sistemin başında kök hücreler bulunur (Minguell ve ark., 2001).

Bir canlının vücudunda farklılaşmadan çok uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen, gerektiğinde farklılaşarak başka hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip olan hücrelere kök hücre denir. Embriyolojik gelişimini tamamlamış hücreler (karaciğer, cilt, kas vb. hücreler) bölündükleri zaman yine kendileri gibi bir hücre oluştururlar. Kök hücrelerin ise belirlenmiş bir işlevi yoktur ve aldıkları sinyallere göre çeşitli hücre tiplerine dönüşebilirler (Şahin ve ark., 2005).

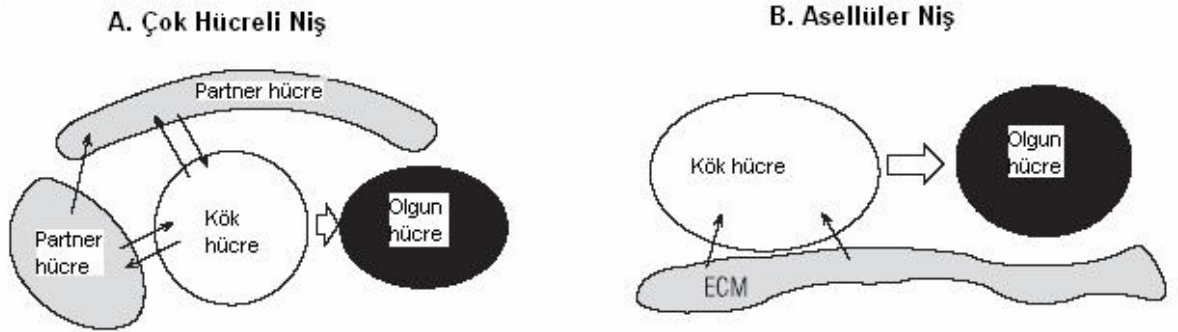
Kök hücre çalışmalarının başlangıcını kemik iliği nakilleri oluşturur. İlk kez 1963’de başlayan kemik iliği nakillerinden sonra 1981 yılında iki farklı araştırma grubunun fare embriyosundan embriyonik kök hücre (EMKH) elde etmesi ve bunu takip eden çalışmalarda 1998 yılında ilk insan embriyo kök hücre serilerine ulaşılması kök hücre çalışmalarının kilometre taşlarıdır (Evans ve ark.,1981; Thompson ve ark.,1998; Çetiner, 2006).

Kök hücre tanımı belirli ölçütlere dayanılarak yapılmaktadır. Leipzig’de 2001 yılında toplanan “Doku Kök Hücreleri Çalışma Grubu” kök hücre tanımlamasını yeniden gözden geçirmiş ve aşağıdaki kriterler üzerinde anlaşmaya varmıştır (Loeffler ve Roedeer, 2002; Verfaillie ve ark., 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004). Buna göre kök hücreler:

1. İşlevsel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen bir topluluktur.
2. Uygun bir büyüme ortamına yerleşebilir (nich-mikroçevre).
3. Çoğalabilme yeteneğine sahiptir.
4. Farklılaşmış (diferansiyasyon) yeni hücreler oluşturabilir.
5. Kendini yenileme ve varlığını sürdürme yeteneğine sahiptir.
6. Hasar sonrasında işlevsel doku oluşturabilir.
7. Bu özellikleri esnek ve geri dönüşümlü olarak kullanır.

Kök hücreler özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapıya sahip değildir. Örneğin kalp kasında bulunan kök hücreler miyositler gibi kasılarak kanı pompalama işlevini yapamaz, ancak bu özelleşmiş hücelere kaynak olabilir (Karaöz ve Ovalı, 2004). Heterojenite özelliği ise farklı alt grupları barındırma yeteneğidir. Örneğin hematopoetik kök hücrelerin heterojenitesi farklı belirteçler (CD34, CD38, c-kit, Sca 1 v.b.) taşımaları ile gösterilmiştir (Uchida ve ark., 1993).

Kök hücrelerini destekleyen sınırlı fizyolojik mikroçevre olarak “niş kavramı” ilk kez Schofield tarafından ortaya atılmıştır (Can, 2007). Güncel anlayış çerçevesinde niş yalnızca kök hücrenin yerleştiği bölge değil, aynı zamanda bu bölgede yer alan hücreleri ve karşılıklı iletim sinyallerini de kapsayan karmaşık bir yapı olarak tanımlanır. Kök hücrelerin yakınında kaynak hücrelerin varlığına bağlı olarak 2 tip niş olduğu belirtilmiştir (Can, 2007) (Şekil 1). Hasarlı dokunun değişen mikroçevresinden gelen uyarılarla kök hücrelerin hasarlı dokuya göçü ve hareketliliği gerçekleşir. Mikroçevreden salınan suda çözünebilir faktörlerden olan Stromal kökenli faktör-1 (stromal derived factor, SDF-1) ve C3’ün bu mekanizmada etkin olduğu bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Wynn ve ark., 2004; Uçkan, 2007).

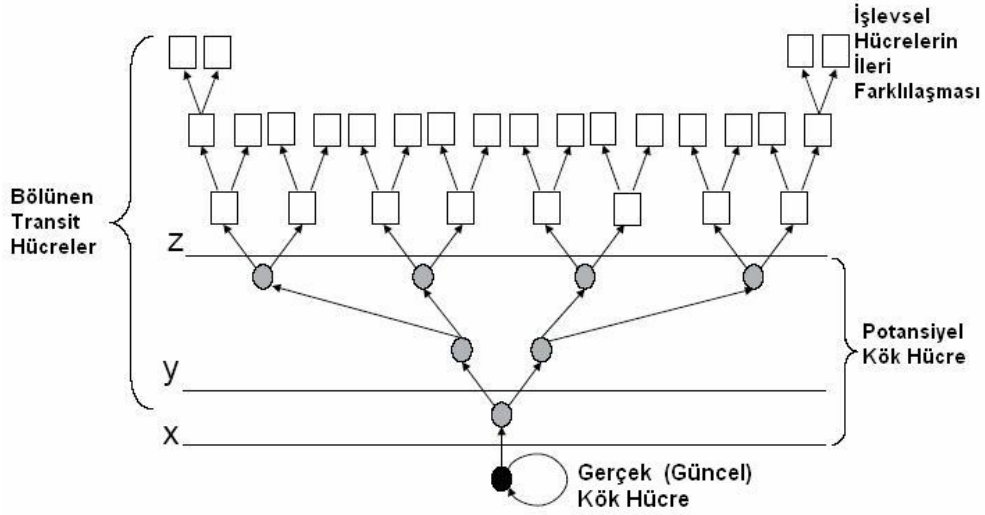


Şekil 1. Kök hücrelerin yakınında kaynak (partner) hücrelerin varlığına bağlı olarak tanımlanan niş tipleri. A. Çok Hücreli Niş: Tipik olarak birbirleri ve kök hücreler ile ilişkili iki ya da daha fazla tipte kaynak hücrelerinden oluşur. B. Asellüler (ekstrasellüler matriks) Niş: Karakteristik özelliği kök hücre yüzeyinde özgül ekstrasellüler matriks proteinleri ile etkileşen hücre adezyon moleküllerinin ifadenesidir (Can'dan, 2007).

Kök hücrelerin ana işlevlerinden biri de kendini yedekleme ve çoğalmadır. Çoğalma, yedekleme işlemi gerçekleştikten sonra meydana gelir. Kök hücreler çoğalma özelliklerini durdurup sessiz hale gelebilirler (potansiyel kök hücre, sessiz kök hücre) ve yeniden döngüye girip çoğalabilirler (gerçek kök hücre) (Şekil 2). Kök hücreler de sonsuz çoğalma yeteneğine sahip değildir. Hücrelerin bölünme yeteneğini ve dolayısı

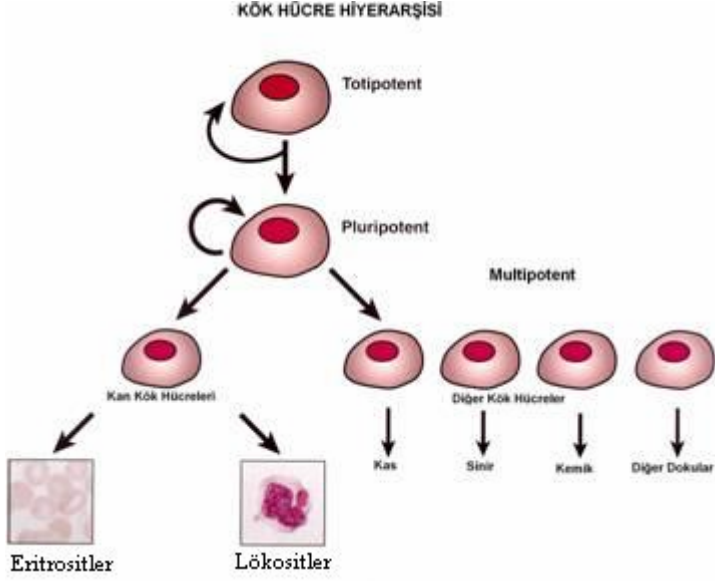
ile ömrünü belirleyen etkenlerden en önemlisi doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve “telomer” adı verilen kısa DNA tekrar dizileri (insanda TTTAGG) ile beraberindeki protein yapılarıdır. Telomerin ana işlevi kromozom uçlarının parçalanmasını, dağılmasını ya da diğer kromozom uçları ile birleşmesini engelleyerek kromozomu genetik değişikliklere karşı korumaktır. Telomerin bir diğer görevi de mayozda ve çekirdek içerisinde kromozomların organize olmalarında rol almaktır. Çevresel faktörler, hücre döngüsü ve oksidatif DNA hasarı gibi nedenlerden dolayı telomerik DNA her döngüde yaklaşık 35 baz çifti kadar kısalır. Bu nedenle telomer kısalması hücre bölünmesini sayan bir saat gibidir. Bu kısalmayı engellemek için telomer bölgesinde ters transkriptaz telomeraz proteini (hTERT) ve telomeraz RNA (hTR) bölgelerini içeren bir ribonükleoprotein olan telomeraz enzimi bulunur. Her replikasyon sonrası telomer kısalmasını engelleyebilmek için telomeraz enzimi telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3’ ucuna takarak kromozom kısalmasını engellemeye çalışır. Somatik hücrelerin çoğunda (yoğun rejenerasyon yeteneği gösteren hücreler hariç) telomeraz etkin değildir. Bu nedenle birçok bölünmeden sonra telomerik bölgede ciddi kayıplar olur ve hücre bölünme kapasitesini kaybeder (Nussbaum ve ark., 2007). Telomer kısalmasının uzun yaşayan memelilerde erişkin kök hücrelerinin ve lenfositlerin sürekli çoğalmalarını denetleyen bir kontrol noktası mekanizması olduğu düşünülmektedir. Uzun yaşayan türlerde telomer kontrol noktaları tümör baskılayıcı bir mekanizma olarak da çalışmaktadır. Somatik hücrelerde durum böyle iken, insan germ, tümör ve kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği çok yüksektir. Bu nedenle telomeraz etkinliği kök hücrelerin bir belirteçidir ve telomeraz aktivitesinin yüksekliği çoğalabilme ve kendini yenileyebilme yeteneğini sağlar (Verfaillie ve ark., 2002; Bayık, 2004; Karaöz ve Ovalı, 2004; Nussbaum ve ark., 2007; Alberts ve ark., 2008).

Kök hücre belirteçlerinden bir diğeri ise C-kit (CD117)’dir. Kök hücre faktör reseptörü olan C-kit dokuya özgü birçok kök hücre çeşidinde ifadelenen (eksprese edilen) bir reseptör tirozin kinazdır. Fertilizasyon, hematopoez, melanogenez gibi birçok gelişimsel dönemde gereklidir. C-kit’e bağlanan kök hücre faktörü ise Trombosit Türevli Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Faktör-PDGF) ailesinin bir üyesidir ve fibroblast, lökosit, epitel hücresi gibi birçok dokudan salgılanmaktadır (Karaöz ve Ovalı, 2004).



Şekil 2. Tipik kök hücre türevli hücre serisi. Gerçek kök hücre hem kendini yeniler, hem de bölünerek transit hücre topluluğunu oluşturur (Potten ve Wilson'dan, 2006).

Bir kök hücrenin özelliklerinden olan farklılaşma (diferansiyasyon), özelleşmemiş hücrelerin özelleşmiş hücelere kaynaklık etmesidir. Bu kavramın içerisinde totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücre kavramları yer alır (Şekil 3). **Totipotent** bir hücre tam bir bireyi oluşturabilecek kök hücre kavramıdır. Vücuttaki tüm hücelere dönüşebilme potansiyeline sahip, sınırsız farklılaşabilen bu hücreler erken embriyonik dönemin ilk 8 hücresidir (blastomerler). Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde blastomerler blastokist denilen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşürler. Blastokist, trofoblast denilen dış tabaka, blastosöl denilen iç boşluk ve embriyoblast adı verilen iç hücre kütesinden [inner cell mass-(ICM)] oluşur. ICM'den oluşan hücreler vücudun her üç embriyonik germ tabakasından (endoderm, ektoderm ve mezoderm) köken alan pek çok hücre çeşidine (yaklaşık 270 farklı tür hücre) kaynaklık edebilir. Bu hücreler **pluripotent** hücreler olarak adlandırılır. Pluripotent hücreler gebeliği destekleyen plasenta ve benzeri hücelere de kaynaklık ederler ancak kendilerinden yeni bir birey meydana gelmez. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde biraz daha özel görevlere sahip kök hücre tipleri oluşur. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücelere **multipotent** kök hücre adı verilir. Bu hücreler tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Bunlara örnek olarak hematopoetik kök hücre ve mezenkimal kök hücre verilebilir (Bongso ve Lee, 2005; Cavaleri ve Schöller, 2006).

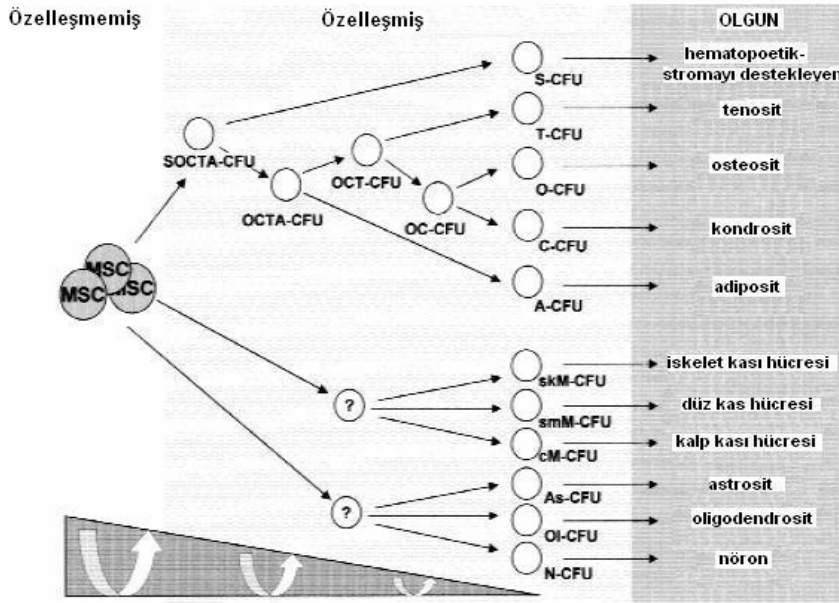


Şekil 3. Kök Hücre Hiyerarşisi (SoRelle'den, 2008).

Farklılaşma kavramının içerisinde **plastisite** (dönüşüm yeteneği) olgusu da yer alır. Plastisite, bir hücrenin köken aldığı dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliği olarak tanımlanır. Herhangi bir dokudaki kök hücrelerin farklı doku veya organlardaki özelleşmiş hücrelere dönüşebilmeleri ya bu hücrelerin ihtiyaç durumunda değişik işlevler görebilecek in-vivo programlanma yetisine sahip hücreler olmaları ya da aynı özelliklere sahip farklı bölgelerdeki multipotent hücreler olmaları ve gerektiğinde kullanılacak rezerv olmaları ile açıklanabilir (Slayton ve Spangrude, 2004) (Şekil 4).

Kök hücre plastisitesinin olası oluşum mekanizmaları şöyle sınıflandırılabilir:

a) Tüm dokularda farklı özelliklere sahip kök hücreler birlikte bulunmaktadır: Bu görüşü destekleyen en önemli bulgu hematopoetik kök hücrelerin kanla tüm dokulara ulaşabilmeleri ve yerleştikleri dokularda ihtiyaç duyulana kadar sessiz hücreler olarak beklemeleridir (Bayık, 2004).



Şekil 4. Mezenkimal Kök Hücrenin Farklılaşma Potansiyeli (Minguell ve ark.'dan, 2001)

b) Pluripotent ve multipotent hücreler doğumdan sonra da dokularda hiç farklılaşmadan kalmakta gerekli olduğunda ilgili dokuya dönüşebilmektedir (plastisite): Bu hipoteze örnek olarak çok farklı hücrelere dönüşebilen Multipotent Erişkin Öncül (Progenitör) Hücreler (MAPC) gösterilebilir. Bu hücreler kültür ortamında farklılaşmadan ve yaşlanmadan çoğalıp fenotipik, morfolojik ve fonksiyonel olarak endoderm, mezoderm ve ektodermdaki hücrelere farklılaşabilirler (Cavaleri ve Schöller, 2006).

c) Dediferansiyasyon-rediferansiyasyon, transdiferansiyasyon, transdeterminasyon kavramlarının varlığı: Farklılaşmış bir hücre diğer bir farklılaşmış hücrenin fenotipini alırsa buna **transdiferansiyasyon** denir. Bir yönde programlanarak belli bir grup hücre oluşturan kök hücrelerin farklı yönde programlanmış kök hücrelere dönüşerek onun oluşturduğu hücreleri yapabilmesine ise **transdeterminasyon** adı verilir. **Dediferansiyasyon-rediferansiyasyon** kavramı ise bu iki kavramı da içine alır. Buna dizin (lineage) kayması da denir. Dediferansiyasyon olan hücre farklılaşmış bir hücre veya bir hücre grubunu oluşturmak üzere planlanmış bir hücre olabilir. Böyle bir hücrenin tamamen farklı bir germ tabakasından hücreler oluşturmasına (farklı bir dizine kaymasına) dediferansiyasyon adı verilir (Loeffler ve Roeder, 2002; Cavaleri ve Schöller, 2006).

d) Hücre füzyonu: Bu hipoteze göre plastisite, verici hücrelerin alıcı dokudaki diğer hücrelerle füzyonu sonucu oluşmaktadır. **Hücre füzyonu** hibrid tetraploidlerin (4n) oluşması sonucunda her iki hücrenin de çeşitli belirteçlerinin aynı hücrede görülmesini sağlar. Bir hücre bir başka hücre ile füzyona uğradığında diğer hücrenin sitoplazmasındaki faktörler tarafından yeniden programlanır ve bu hücrenin özelliklerini alır. Füzyon hipotezi tüm vücut hücreleri için geçerli olmayıp sadece tetraploidiyi tolere eden dokular için uygun olabilir. Bu dokulara örnek olarak kas, hepatosit, purkinje hücreleri verilebilir (Wurmser ve Gage, 2002).

Bir hücre topluluğunda plastisiteden bahsedebilmek için üç temel koşul vardır (Wurmser ve Gage, 2002; Verfaillie ve ark., 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bayık, 2004; Şahin ve ark.,2005; Avcu, 2006; Verfaillie, 2006; Kansu, 2007):

1. Hücre belirteçlerinin değişen hücrenin kökeni hakkında bilgi vermesi gereklidir.
2. Farklılaşan hücre ilgili dokunun morfolojik özelliklerini göstermelidir.
3. Fonksiyonel olarak o dokunun tüm işlevlerini yerine getirmelidir.

Şimdiye kadar birçok çalışma ile kök hücre plastisitesi kavramı ispat edilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmaların tümü kök hücre plastisitesini gösteren önemli verilerdir. Plastisiteyi göstermeye yarayan yaklaşımlar/metodlar kısaca şöyle sınıflandırılabilir (Koton ve ark., 2001; Jiang ve ark., 2002; Rendon-Martin ve Watt, 2003; Karaöz, 2004):

- Direk bölgesel nakillerde alıcı kökenli dokuda vericiye ait genotipin (Y+) izlenmesi [polymerase chain reaction (PCR), fluoresan in situ hibridizasyon (FISH), immunohistokimya].
- Kemik iliği, periferik kan, kordon kanı kökenli kök hücre nakillerinden sonra yine verici kökenli hücrelerin (Y+) çeşitli dokularda kimerik olarak gözlenmesi.
- Bir hücre işaretleyicisi olan Yeşil Flörosan Protein pozitif (GFP+) olarak işaretlenen kök hücrelerin direk organa ya da komşu alana nakilleri sonrasında o dokuyla ilgili farklılaşmanın gösterilmesi.
- YFP ve Lac Z genini taşıyan transgenik hayvanlardan elde edilen kök hücrelerin sağlıklı veya hasar oluşturulmuş dokulara nakli ve bu dokularda takibi.
- Kemik iliği örneğinde olduğu gibi erişkin kök hücrelerin mobilizasyonu sağlanarak farklı organ ya da dokulardaki plastisitesinin kimerizm ile gözlenmesi.

- Farklı hücre işaretleyicilerini in vitro ortamda kullanarak işaretlenmiş kök hücrelerin alıcı doku veya organda takibi.

Yukarıda sayılan kök hücre ölçütlerinin tümüne herhangi bir zaman diliminde sahip olan hücrelere **gerçek kök hücreler**, tüm özellikleri taşıdığı halde belirli durumlarda bu özellikleri göstermeyen hücrelere ise **potansiyel kök hücreler** denir (Loeffler ve Roeder, 2002; Bayık, 2004). Kök hücreler bu özellikleri sayesinde canlı organizmadaki sayılarını sabitleyip gerekli durumlarda farklılaşarak ihtiyaç duyulan hücrelerin çoğalmasını, gelişmesini ve olgunlaşmasını sağlarlar. Sadece tanımlanan belli bir veya iki hücre tipine dönüşebilen ve kendini yenileyemeyen hücrelere ise **bağlı-öncül (committed/progenitör/prekürsör) hücre** denir. Kök hücrelerde bölünme olduğunda en az bir hücre kaynak hücre ile aynı özellikleri taşır. Öncül hücrelerde ise bir kez bölünme olduğunda kaynak hücrenin özelliklerinin ancak bir kısmı diğer hücrelerde gözlenir (Verfaillie, 2006).

Kök hücrenin kendini yenileme (self-renewal), çoğalma (proliferasyon) ve farklılaşma (diferansiyasyon) mekanizmalarını belirleyen süreçlerin anlaşılması temelde kök hücre biyolojisinin omurgasını oluşturur. Herhangi bir kök hücrenin izleyeceği yolun belirlenmesini sağlayan olaylar zinciri kısaca şöyle şematize edilebilir (Quesenberry ve ark., 2002; Güneş, 2005; Bongso ve Lee, 2005; Verfaillie, 2006):

1. **İlk Sinyal (Başlangıç Sinyali):** Dışarıdan bir uyarı ile (kemokin, sitokin ya da adezyon reseptörleri) yazılım (transkripsiyon) faktörlerinin farklılaşmayı başlatması.
2. **Kromatinin Yeniden Yapılanması:** Yazılım faktörlerinin etkisiyle çekirdekte yeniden düzenlenmenin olması.
3. **Yazılımın Uyarılması:** DNA'ya daha çok yazılım faktörünün bağlanması.
4. **Yeni Gen İfadelemesi:** Çekirdek DNA'sının işlevsel yapısının tamamen değişmesi sonucunda farklı genlerin ifadelebilen hale gelmesi ve bunun sonucunda kök hücreden farklılaşan yeni hücre tipinin oluşması.

Kök hücrenin farklılaşma-dönüşüm yolu olarak bahsedilen olayların tümü hücre döngüsü boyunca olmaktadır. Kök hücre farklılaşması hücre döngüsünün değişik dönemlerinde ve bu döneme özgü sitokinler, adezyon reseptörleri gibi faktörlere bağlı olarak gelişmektedir.

II. B. KÖK HÜCRE TİPLERİ VE KAYNAKLARI

Kök hücreler temelde iki kaynaktan elde edilirler (Cibelli ve ark., 2002; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bongso ve Lee, 2005):

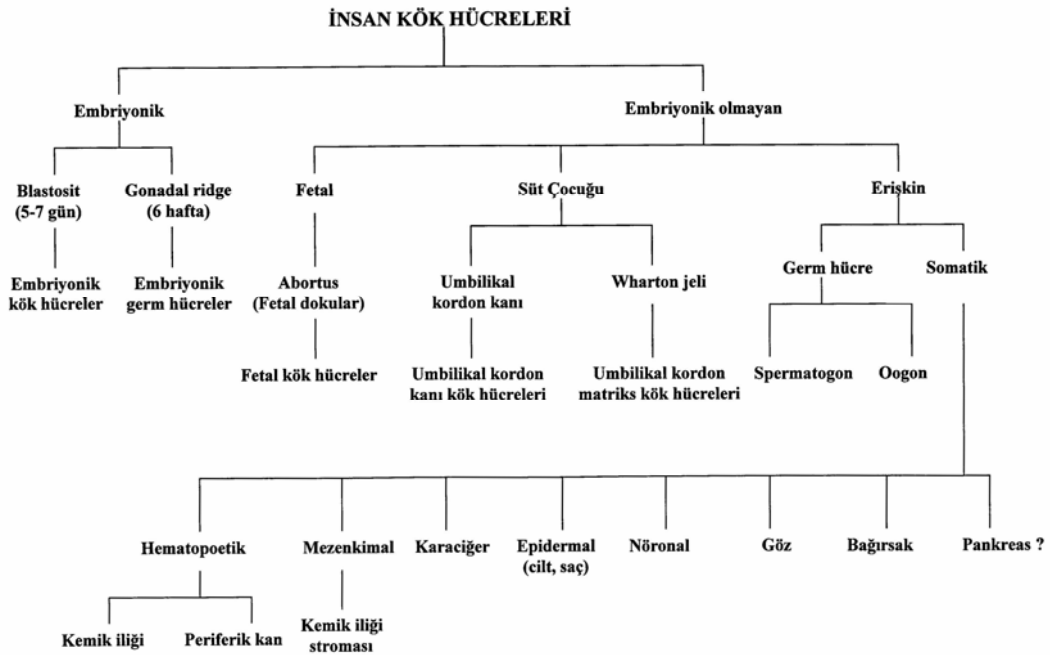
A. Embriyonik kök hücre kaynakları:

- Düşükle sonuçlanmış fetal doku
- İn-Vitro Fertilizasyon (IVF) çalışmaları sırasında elde edilmiş embriyolar
- Sadece kök hücre elde etmek için oluşturulan embriyolar

B. Embriyonik olmayan kök hücre kaynakları:

- Dokulardan elde edilen kök hücre –erişkin kök hücre (dokuya özgü kök hücre: Tabloya ek olarak; Kalp, yağ dokusu, diş kök hücreleri)
- Göbek kordonu ve plasental kök hücre
- Kadavra kökenli kök hücre
- Partenot hücreleri (partenogenez-aseksüel üreme: Döllenenmemiş yumurtaların in vitro olarak blastosist aşamasına kadar getirilerek pluripotent kök hücre serilerinin oluşturulması
- Fetus Kök Hücreleri

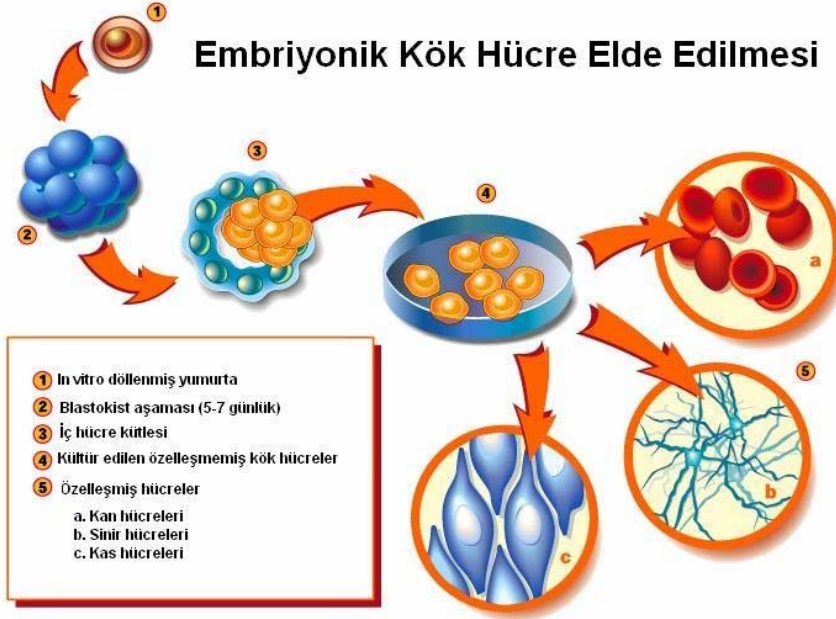
İnsan kök hücre kaynakları Şekil 5’de görülmektedir.



Şekil 5. İnsan Kök Hücre Kaynakları (Bongso ve Lee'den, 2005)

II. B.1. Embriyonik Kök Hücre (EMKH)

Embriyonik kök hücre embriyonun blastokist aşamasında ICM'den ayrıştırılan ve in vitro şartlarda pluripotent özelliğini yitirmeden sınırsız sayıda bölünebilen hücredir. Embriyonik kök hücreler ilk kez birbirinden bağımsız çalışan iki araştırma grubunun (Evans ve Kaufman, 1981; Martin, 1981) 1981 yılında fare blastokistlerinin ICM'den farklılaşmadan sürekli çoğalan hücreleri elde etmesi ile tanımlanmıştır. 1998 yılında Thomson ve arkadaşları (Thomson ve ark., 1998) IVF yöntemiyle elde edilen embriyolardan ilk insan embriyonik kök hücre serilerini elde etmişlerdir. Kullandıkları yöntem kısaca şöyledir: İmmüno cerrahi (kompleman aracılı) yoluyla 6 günlük blastokist evresindeki embriyonun dış trofoektoderminin uzaklaştırılması ve hasarsız bir ICM'nin bırakılması ile işlem başlamış, bunu takiben ICM gama ışınlarına maruz bırakılıp ormitomicin-C ile muamele edildikten sonra fare embriyonik fibroblastlarına (MEF) ekilmiştir. Ekilen hücreler yüksek serum konsantrasyonlu besi yerlerinde kültüre edilerek günler sonra EMKH kolonileri oluşturulmuştur (Şekil 6).

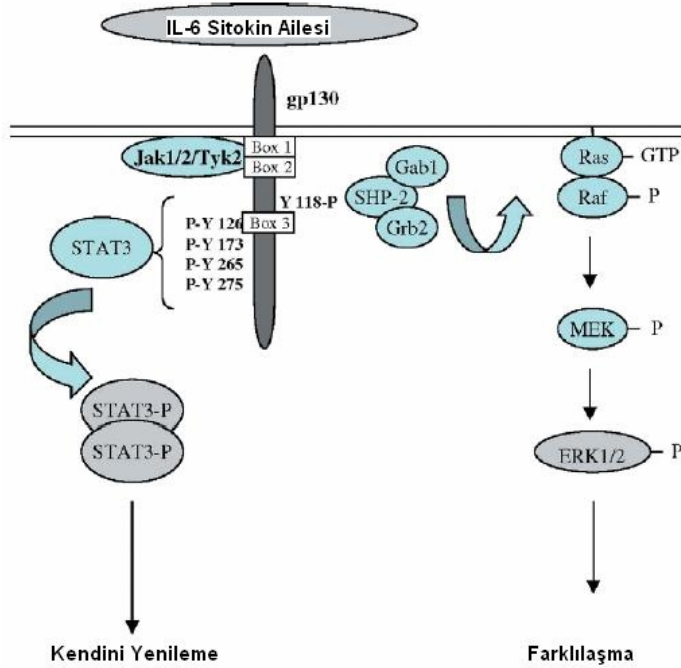


Şekil 6. Embriyonik Kök Hücre Elde Edilmesi ve Farklılaşması (Palmer'dan, 2008).

Thomson ve arkadaşlarına göre EMKH'lerin üç önemli özelliği vardır:

1. Bu hücreler preimplantasyon evresindeki embriyodan elde edilmelidirler.
2. Farklılaşmadan çoğalabilme özelliklerini uzunca bir dönem sürdürebilmelidirler.
3. Çok uzun süreler kültüre edilmelerine rağmen üç germ tabakasının türevlerini de oluşturabilme potansiyellerini devam ettirebilmelidirler.

İnsanlarda ve farelerde birbirine yakın yöntemler kullanılarak blastokistin ICM'sinden elde edilen EMKH'ler arasında bazı önemli farklar vardır. Fare iç hücre kütlesi insandan farklı olarak embriyon dışı endoderm, amniyon ve mezoderme de kaynaklık eder. (Gardner, 2006; Karaöz, 2006) Fare EMKH'nin bir diğer özelliği de besleyici tabaka (feeder layer) olmaksızın ortama İnterlökin-6 (IL-6) ailesinden bir glikoprotein olan Lösemi İnhibitör Faktör (LİF) isimli sitokinin eklenmesiyle farklılaşmadan çoğalabilmesidir. LİF fare EMKH'lerinin yüzeyinde bir reseptör kompleksine (LİF reseptör, gp 130) bağlanır. Bu komplekse LİF'in bağlanması sonucunda Janus Kinaz (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) yolağı aktive olur (Şekil 7). Bu yolağın aktivasyonu ile fare EMKH'ler kendini yeniler. LİF'in ortamdan uzaklaştırıldığı durumlarda 4 gün sonra farklılaşma başlar LİF fare embriyonunda fizyolojik olarak embriyolojik gelişimin yavaşlaması sırasında ICM'yi yaşayabilir kılmak için gerekli olan bir sitokindir. Bu fizyolojik olay sırasında LİF'in ortamda olmaması ICM'nin (pluripotent hücreler) ölümüne yol açmaktadır. Primatlarda bu tür bir fizyolojik olay olmadığı için LİF'in pluripotent hücrelerin düzenlenmesi ile ilişkisi tam olarak bilinmemektedir (Smith, 2001; Cheung ve ark., 2003).

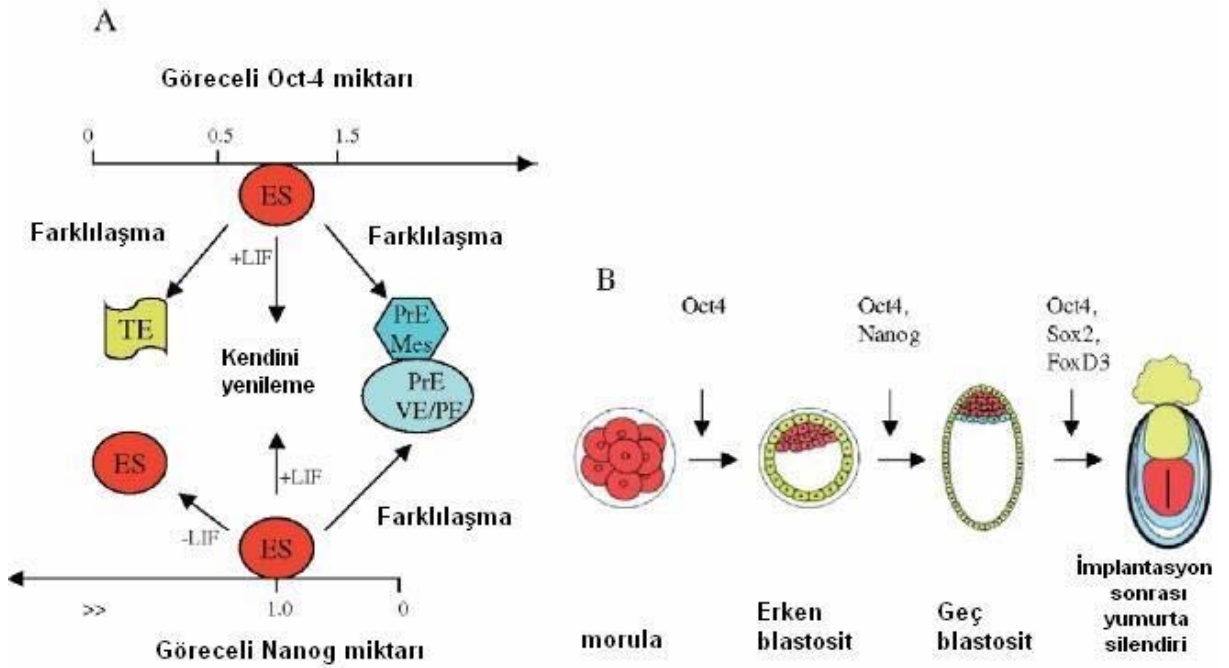


Şekil 7. Embriyonal Kök Hücrenin Kendini Yenileme ve Farklılaşmasında Sinyal İleti Yolları (Cavaleri ve Schoeller'den, 2006).

EMKH'in tüm hücre tiplerine (pluripotensi) dönüşebildiği ve işlevsel olduğu yalnızca farelerde kesin olarak gösterilmiştir. İnsan EMKH çalışmalarında birçok hücre tipinin oluştuğu gözlenmiş ancak bunların işlevselliği gösterilemediği gibi halen oluşturulamayan hücre tipleri de mevcuttur. Morfolojik olarak somatik hücrelere göre bazı farklılıklar görülen insan EMKH'de çekirdek/sitoplazma oranı yüksek ve birden fazla çekirdekçik bulunur (Smith, 2001).

Hücrenin gelişimi sırasında özgün gen ifadesinin programı yazılım faktörleri ile belirlenir. Oct-4 (Oct-4/Oct-3/POU5F1) yazılım faktörünün varlığı farklılaşmamış bir pluripotent hücrenin önemli belirteçlerinden biridir. Oct-4 yazılım faktörünün göreceli miktarı hücre farklılaşması ve embriyolojik gelişim sürecinde önemli olan 7 farklı hedef genin (*PDGF α* , *OPN*, *$\alpha\beta$ HCG*, *τ INF*, *Rex1*, *Foxa1.a2*, *Sox2*) etkinliğinde düzenleyici rol oynar (Cavaleri ve Schöller, 2006) (Şekil 8). Pluripotent hücrelerin diğer belirteçleri arasında yazılım faktörlerinden Nanog (yazılım faktörü içeren bir homeobox), Sox2 (SRY bağlantılı HMG box'a sahip bir yazılım faktörü), Rex-1 (çinko parmak-zinc finger yazılım faktörü, FoxD3, büyüme faktörlerinden GDF-3), FGF-4, teratokarsinom türevli büyüme faktörü-1 (teratocarcinoma derived growth factor-1/TDGF-1), hücre

yüzey polilaktozamin glikokonjugatları ve alkalin fosfataz türevleri sayılabilir (Hyslop ve ark., 2005; Stewart ve ark., 2006).



Şekil 8. A) Değişik Konsantrasyonlardaki Oct-4, Nanog ve LIF'in EMKH'nin Özelleşmesine Etkisi. B) Oct-4, Nanog, Sox2 ve FoxD3'ün fare gelişiminin erken evrelerine –totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücelere etkisi (Cavaleri ve Schöller'den, 2006).

EMKH'in farklılaşmadan çoğalabilmelerinde rol alan farklı hücresel yollar tanımlanmıştır. Bunlardan en iyi bilineni Wnt/ β -katenin yolağıdır. Frizzled ailesinden Lrp5/6 olarak bilinen Wnt reseptörüne Wnt'nin bağlanması sonucu aktive olması ile Glikojen sentetaz kinaz-3 (GSK-3) inhibe olur ve β -Katenin çekirdekte birikir. β -Katenin çekirdekte T-hücre özgün faktörlerle (TCFs) birlikte Wnt hedef genlerinin okunmasına, *Notch1* ve *HoxB4* gibi genlerinin de işlevini kazanmalarına yardımcı olarak kök hücrelerin farklılaşmadan kendini yenilemelerini sağlar. Yine bu dönemde *Nanog*, *Oct3/4* ve *Rex1*'in ifadeleri de devam eder (Baharvand, 2004; Reya ve Clevers, 2005).

EMKH'ler ile ilgili bilgilerimizin birçoğu fare embriyo kültürlerinin çalışılması ile edilmiştir. İnsan embriyo kültürü çalışmaları durdurulmadan önce elde edilen 19 adet normal hücre serisi ile 18 adet preimplantasyon genetik incelemede mutant olduğu belirlenmiş embriyolardan elde edilen genetik bozukluğa sahip (Fankoni anemisi, Frajil-

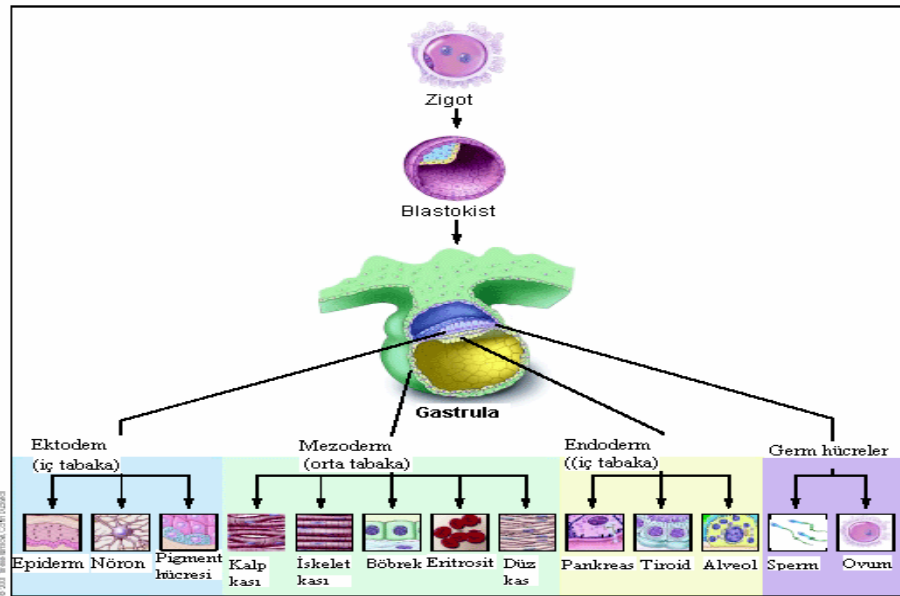
X vb.) insan EMKH serilerinin (line) çalışılması ile insan kaynaklı veriler de elde edilmiştir (Türkşen, 2005; Verlinsky ve ark., 2005).

Bu bilgilere göre EMKH'lerin ortak özellikleri şunlardır (Baharvand, 2004, Karaöz, 2006):

1. ICM'nin epiblastlarından köken alır.
2. Farklılaşma ya da ölümsüzleşme (immortalizasyon) olmaksızın çoğalır.
3. Çok yüksek telomeraz etkinliği vardır.
4. Çok yönde farklılaşma özelliği taşır: İn vitro olarak fetal ve erişkin hücre tiplerine dönüşebilir, farklılaştırmadan organizmaya verildiğinde teratom oluşturur.
5. Farklılaşma gp130 sitokin ya da diğer uyarılar (LIF) tarafından dışarıdan baskılanır.
6. Kendini yenileme kapasitesi çok yüksektir.
7. Klonalite (tek bir germ hücreden çoğalma) özelliği vardır.
8. Oct 3/4 yazılım faktörünün aracılığı ile pluripotent belirteçlerin (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog, Sox-2, Rex-1, FGF-4) ifadenmesi sağlanır.
9. Alt kültürler süresince (pasajlama) karyotip sabit kalır.
10. Embriyonik gelişime katılır ve kimerada (vücut dokuları farklı kromozomlar gösteren iki ayrı hücreden gelişen canlı-XX/XY) her 3 germ tabakasına katkı sağlar.
11. Yaşamının büyük bir kısmında S fazında kalır. G1 hücre siklüs kontrol noktası yoktur.
12. X inaktivasyonu yoktur (Hoffman 2005): İnaktivasyon gelişimsel olarak düzenlenmiştir. Hücresel farklılaşmanın başında fertilizasyondan sonraki 12. günde trofoblastlarda, 16.günden itibaren ise embriyoda, embriyo yaklaşık olarak 5000 hücre iken gerçekleşir (Başaran, 2003).

Uygun kültür ortamında in-vitro EMKH'ler farklılaşmadan çoğalabilirler. Farklılaşmanın sağlanması için bir dizi işlem gerekir. Bunlardan en önemlisi embriyoid cisimcikler (EB) oluşturulmasıdır. Bunun için kültür ortamını besleyici tabakadan (feeder) uzaklaştırmak ya da içinde LIF olmayan kültür ortamı hazırlamak sık kullanılır. Hücrelerin EB'ler oluşturarak bir araya gelmeleri ani farklılaşmaya yol açar. Farelerde

EB oluşturulması farklılaşmanın uyarılmasında en çok kullanılan yöntemdir. Tek tabakalı kültürde çoğaltılan EB'lerden hiçbir ek uyarın olmadan, kendiliğinden kardiak miyositler, eritrositler, kondrositler, nöral hücreler, melanositler gibi hücre tiplerinin farklılaştığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Amit ve ark., 2000; Reubinoff ve ark., 2001; Wang ve ark., 2005; Karaöz, 2006). EMKH'in bulunduğu kültür ortamı Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor-EGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor-FGF), Retinoik Asit (RA), Kemik Morfojenik Proteini-4 (Bone Morphogenic Protein-4-BMP-4) ve Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β -TGF- β) ile uyarılırsa hem ektodermal hem de mezodermal belirteçlerin ifadelendiği görülür. Yalnızca aktivin-A ile uyarılma ise mezodermal belirteçlerin ifadesini sağlar (Schuldiner ve ark., 2000; Türkşen, 2005) (Şekil 9).



Şekil 9. İnsan Dokularının Farklılaşması
(<http://www.epigenetics.co.kr/epigenetics.htm>'den, 2008)

İnsan EMKH'in etik kaygılar nedeniyle in vivo olarak insan embriyosunda çeşitli dokulara farklılaşmasını gözlemlemek mümkün değildir. Bu nedenle insan EMKH'nin bağışıklık yetmezliği olan bir hayvana verilerek farklılaşma örgülerinin gözlemlendiği bir çalışma yapılmış ve iyi huylu teratomların oluştuğu gözlenmiştir (Thomson ve ark., 1998). Teratomlar üç germ tabakasından da hücreler içeren ancak

organize olmamış, eksen ve vücut planı oluşturamamış, içerisinde embriyonik karsinom özelliklerini barındırmayan hücreler topluluğudur. Bu çalışmadan sonra farklı araştırma modelleri de denenmiş insan EMKH'nin belli bir yere kadar farklılaştırılarak hayvanlara uygulandığı durumlarda organizmada teratomların oluşmadan işlevsel hücreleri oluşturabildikleri gösterilmiştir (Reubinoff ve ark. 2001).

Tablo I. Fare Embriyonik Kök Hücrelerinden İn Vitro Ortamda Farklılaştırılan Hücre Tipleri ve İlgili Kaynak Çalışmalar (Karaöz ve Ovalı'dan, 2004)

Hücre Tipi	İlgili Kaynak Çalışma
Primitif Hematopoetik	Doetschman ve ark., 1985; Nakano ve ark., 1996
Definitif Hematopoetik	Nakano ve ark., 1996; Nishikawa ve ark., 1998
Lenfoid Öncüller	Potocnik ve ark., 1994
Mast Hücresi	Tsai M. ve ark., 2000; Garrington ve ark., 2000
Dendritik Hücre	Fairchild ve ark., 2000
Endotel Hücresi	Risau ve ark., 1988; Mc Closkey ve ark., 2003
Kardiyomiyosit	Doetschman ve ark., 1985; Maltsev ve ark., 1993
Çizgili Kas	Rohwedel ve ark., 1994
Düz Kas	Yamashita ve ark., 2000
Adiposit	Dani ve ark., 1998
Osteoblast	Buttery ve ark., 2001; Nieden ve ark., 2003
Kondrosit	Kramer ve ark., 2000
Keratinosit	Yamashita ve ark., 2000; Bagutti ve ark., 1996
Nöron	Bain ve ark., 1995; Fraichart ve ark., 1995
Oligodendrosit	Brustle ve ark., 1999; McDonald ve ark., 2002
İnsülin Salgılayan Hücreler	Lee ve ark., 2000
Glial Öncül Hücreler	Brustle ve ark., 1999
Hepatosit	Hamazaki ve ark., 2001
Melanosit	Yamane ve ark., 1999
Retina Pigment Epitelyum Hücresi	Haruta ve ark., 2004
Sperm Hücresi	Toyooka ve ark., 2003
Oogonium, Follikül benzeri yapılar	Hübner ve ark., 2003

İnsan EMKH'lerle yapılan farklılaşma ile ilgili çalışmaların potansiyel sonuçları şöyle sıralanabilir (Baharvand, 2004; Karaöz ve Ovalı, 2004; Bongso ve Lee, 2005):

1. Kanser hücrelerine olan benzerlikleri nedeniyle kanser oluşum mekanizmalarındaki boşlukların doldurulması ve gelecekte hedefe yönelik tedavide kullanılabilir bilgilerin elde edilmesi.
2. Gen mühendisliği ve gen tedavilerinde kullanılmaları (aktarılmak istenen genin sürekli kendini yenileyen ve çoğalan bir hücre topluluğu ile verilmesinin avantajları).
3. İnfertilite ve doğumsal defektlerin oluşum mekanizmalarına ışık tutması.
4. İnsan gelişimi ve biyolojisi hakkında daha ayrıntılı bilgi edinilmesi.
5. Yeni ilaçların gelişiminde, hedef genlerin tanımlanmasında ve test edilmesinde kullanılması.
6. Hücre temelli tedavilerde sınırsız kaynak oluşturabilmesi.

Bunun yanı sıra EMKH'lerle ilgili potansiyel beklentilerin gerçekleşmesinde aşılması gereken bazı problemler de vardır (Türkşen, 2005):

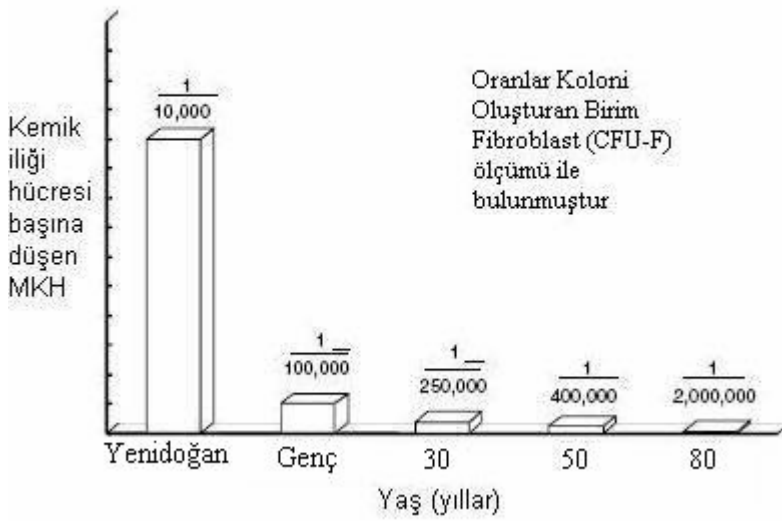
1. Belirlenen hücre serilerine ulaşabilmek için standart kültür koşullarının tam olarak oluşturulamamış olması.
2. Etkinliği çok yüksek olan farklılaştırılmamış EMKH'lerin teratom yapıcı etkisinin henüz çözümlenmemiş olması.
3. İmmün tolerans sorununun halen devam ediyor olması.

II.B.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

II.B.2.1. Erişkin Kök Hücreler

Bir doku ya da organda bulunan farklılaşmamış, kendisini yenileyebilen, içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşan hücrelere erişkin kök hücreler (ERKH) adı verilir. Bu hücrelerin gerçekte görevleri dokunun devamlılığını sağlamak ve hasarlanma durumunda dokuyu tamir etmektir. Somatik kök hücre terimi de ERKH yerine kullanılabilir. Organizmada kök ve öncül hücrelerin sayısı yaş ile ters orantılıdır (Caplan, 2008). Bu nedenle vücudun yenilenme yeteneği yaş ilerledikçe erişkin kök hücrelerin sayısı ile orantılı olarak azalır (Şekil 10). Vücutta dokuların yerine konulması ve yenilenmesinde iki temel mekanizma vardır. Birincisi farklılaşmış hücrenin çoğalma kapasitesinin artmasıdır. Buna örnek olarak

karaciğer, iskelet kası, damar endotel hücreleri verilebilir. Diğer mekanizma ise farklılaşmamış hücrelerin bir sistem dâhilinde farklılaşarak yenilenmeyi sağlamasıdır. Bunun da en iyi örneklerinden biri hematopoetik kök hücrelerdir. ERKH'ler farklılaşmadan önce bağlı-öncül hücreler (committed progenitor cell) olarak kaldıkları dönemde sınırlı çoğalma ve sınırlı fenotipik özelliklerinin imkân verdiği ölçüde bir işleme safhasından geçerler. Olgun dokulardaki hücrelerin bir kısmı çevrelerine uyum sağlamış, bölünmeden sessiz bekleyen, çeşitli fenotipik ifade özellikleri gösteren bağlı öncül hücrelerdir (Gage, 1998).



Şekil 10. İnsan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Yaş ile Ters Orantılı Olarak Azalması (Caplan'dan, 2008).

Erişkin Kök Hücre Kaynakları ve Tipleri (Bongso ve Lee, 2005)

1. Germ Hücre Kökenli
 - a. Spermatogonial kök hücre
 - b. Oogonial kök hücre
2. Somatik Hücre Kökenli
 - a. Hematopoetik kök hücre
 - i. Kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücre
 - ii. Periferik kan kaynaklı hematopoetik kök hücre
 - iii. Kordon kanı kaynaklı hematopoetik kök hücre
 - b. Mezenkimal kök hücre
 - i. Kemik iliği stroma kaynaklı mezenkimal kök hücre
 - ii. Diğer tüm organ ve dokulardaki stroma kaynaklı mezenkimal kök hücre
 - c. Karaciğer kök hücreleri
 - d. Nöronal kök hücreler
 - e. Epidermal kök hücreler

- f. Göz kök hücreleri
 - i. Retinal kök hücre
 - ii. Limbal kök hücre
 - iii. Konjonktival kök hücre
- g. Pankreas kök hücreleri
- h. Bağırsak kök hücreleri
- i. Çeşitli doku kök hücreleri: Yağ dokusu, kalp, diş kök hücreleri gibi

II.B.2.2. Hematopoetik Kök Hücreler

Kemik iliği hematopoetik ve mezenkimal kökenli kök hücreleri içerir. Hematopoez kan kök hücrelerinin üretimi, çoğalması ve periferik kan hücrelerine farklılaşmasıdır. Hematopoetik kök hücre (HKH) erken embriyogenez sırasında mezodermden türer ve embriyoda kemik iliği, karaciğer ve yolk sak gibi çok özgül hematopoetik bölgelerde bulunur. Erişkinde kemik iliğinden, periferik kandan, kordan kanından izole edilebilir ve monoklonal antikolar kullanılarak saflaştırılabilir. Son zamanlarda ortak lenfoid öncül ve myeloid-eritroid öncül hücreler de izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Kemik iliği kök hücreleri beklenenden daha esnek (plastisite) ve çok yönlü olabilirler çünkü multipotentdirler ve in vitro/in vivo birçok hücre tiplerine farklılaşabilirler (Daley, 2006; Kansu, 2007; Zovein ve ark, 2008). İnsan kemik iliği parankim ve stroma bileşenlerine ayrılmıştır. Parankim ve stromayı oluşturan bu hücreler yapısal ve işlevsel olarak birbirine bağlıdır. Bu bileşenlerin arasındaki, temel olarak endosteal (kemik trabekülüne bitişik) ve vasküler (kapillerlere bitişik) niş kompartmanları olarak değerlendirilen mikroçevre ortamına HKH nişi adı verilir. HKH'nin tüm hematopoetik hücrelere oranı 1:2000 iken, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) stromal hücrelere oranı 1:10.000 ile 1:100.000 arasındadır (Can, 2007; Caplan, 2008).

II.B.2.3. Bağırsak Kök Hücreleri

Gastrointestinal epitel hücreleri yaşam boyunca sürekli ve hızlı olarak yenilenir. Epitel yenilenmesi nişler tarafından yönetilen, belirli anatomik bölgelerde bulunan multipotent kök hücre toplulukları tarafından sürdürülür (Wright, 2000).

II.B.2.4. Karaciğer Kök Hücreleri

Memelilerde karaciğer dokusunun 2/3'ü cerrahi olarak çıkarıldığında bile rejenerasyon sayesinde yaşam devam edebilir. Orijinal doku 2-3 hafta içinde yerine

gelir, bu özellik böbrek ya da pankreas gibi diğer organlarda bulunmaz. Organ yenilenmesinde, karaciğer hasarının tipine bağlı olarak, farklı kök hücre tipleri ve mekanizmalar görev yapar (Alison ve ark, 2004).

II.B.2.5. Kemik ve Kıkırdak Kök Hücreleri

Kemik iliğinde bulunan MKH'ler uygun koşulların varlığında kemik ve kıkırdağa farklılaşabilir. Kemik ya da kıkırdak hasar gördüğünde bu dokularda bulunan kök hücrelerin onarım sürecine katılıp katılmadıkları açık değildir. Kemiğin kendisinde hem bağlı olmayan (uncommitted) hem de bağlı (committed) osteoprogenitor hücreler vardır (Nuttal ve ark., 1998). Kemik kırıklarında açığa çıkan kemik iliği, kanama ve ilik boşluğunda hematoma oluşumu onarım için iyi bir ortam sağlar. In vivo, hasar durumunda eklem kıkırdağı çok düşük tamir kapasitesine sahiptir. Kıkırdağın içinde bağlı- progenitor hücre olup olmadığı bilinmemektedir. Kıkırdak hasarı durumunda kök hücreler onarım sürecine katılırlar ancak sayıları azdır ve düzenleyici etkenler sınırlıdır (Metsaranta ve ark., 1996). Bu hücrelerin, çevredeki kas, kemik ya da diğer kıkırdak dışı hücrelerden türediği de öne sürülmüştür (Shapiro ve ark., 1993).

Tablo II. İnsan Kemik İliği Parankim ve Stroma Hücreleri (Can'dan, 2007).

Parankim

Lenfoid progenitörler ve türev hücreler

Myeloid progenitörler ve türev hücreler

Hematopoetik kök hücreler

Stroma

Kan damarları (arterioller, sinüzoidal kapillerler, venüller)

Endotelyal hücreler

Arterioller miyositler

Perisitler

Adipositler (sayıya bağlı olarak kırmızı ve sarı ilik)

Stromal hücreler (retikulum hücreleri ve mezenkimal kök hücreler)

Osteoblast ve osteoklastlar

Hücreler arası lifler

Retikulum lifleri

Tip I kollajen lifler

Tip II kollajen lifler

Ekstrasellüler matriks proteinleri

Fibronektin

Laminin

Proteoglikanlar

Hemonektin

II.B.2.6. Epidermal Kök Hücreler

İnsan derisi dışta epidermis ve içte dermis tabakalarından oluşur. Kıl ve sebace glandlar da epidermiste bulunur. Epidermiste en önemli hücre tipi bazal tabakada bulunan ve bölünen bir epitel hücresi olan keratinositlerdir. Epidermiste kıl folliküllerinin temelinde kök hücreler bulunur ve bunların kendini yenileme özellikleri deri hücreleri ve kılların yeniden büyümesine olanak sağlar. Erişkin yaşam süresince dökülen deri tabakası ve kılların yerine yenilerinin gelmesi için sürekli yeni keratinositler üretilir. Kök hücreler “geçici büyüyen hücre” adı verilen bir ara forma farklılaşır ve bu da keratinositler ve sebositler gibi daha farklılaşmış hücre tiplerini oluşturur (Blanpain ve ark., 2004; Christiano, 2004).

II.B.2.7. Nöronal Kök Hücreler

Merkezi sinir sisteminin (MSS) bazı sınırlı bölgelerinde sürekli bir nörojenik dönüşüm olduğu varsayılmaktadır. Nöral kök hücrelerin bu bölgelerde bulunduğu ve devamlı yeni nöronlar ürettiği düşünülmektedir (Gage, 2000). Nöral kök hücreler daha önceki bilgilerin aksine kendini yenileme kapasitesi bulunan multipotent progenitor hücrelerdir (Bongso ve Lee, 2005).

II.B.2.8. Mezenkimal Kök Hücreler

Kemik iliği ve diğer stromal dokulardan köken alan, çeşitli uyarılarla osteoblastik, adipositik ve kondrositik seriye dönüşebilen fibroblastoid hücrelere MKH denir (Pittenger ve ark., 1999). Kemik iliği organizmanın en önemli kök hücre kaynaklarından biridir ve mezodermden köken alan hematopoietik, endotel ve MKH’leri içerir. Kemik iliği mikroçevresinin bileşenlerinden olan MKH’ler hematopoezin gerçekleştirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Stromal kökenli MKH’lerin HKH’lerin stromaya tutunması, salgıladıkları çeşitli sekretuar faktörler ile hematopoietik progenitör hücrenin olgun hücreye farklılaşması, yine bu salınan faktörlerin inhibisyonu ile kök hücrenin G₀ fazında kalarak kendi rezervini oluşturması, kendini yenilemesi, diğer dokulara mobilizasyonu ve migrasyonu gibi farklı biyolojik işlevleri vardır (Avecilla, 2004; Wilson ve Trumpp, 2006; Uçkan, 2007). Mezenkimal kök hücreler başlıca iki kaynaktan bulunur:

- 1- Kemik iliği stroması
- 2- Diğer tüm organ ve dokulardaki stroma

Kemik iliği stroması, retiküler hücreler, adipositler, osteojenik hücreler, düz kas hücreleri, endotelyal hücreler ve makrofajları da içeren heterojen bir hücre topluluğundan oluşmuştur. Kararlı durumda ya da doku hasarına yanıt olarak, stromal dokunun “yıkım-yapım”ı ya da onarımı stromal dokuda bulunan kök hücre topluluklarının katılımı ile gerçekleşir (Bongso ve Lee, 2005). Kemik iliği stroması dışında, MKH’ler birçok organ ve dokuda bulunur. Bu hücreler konnektif doku hücrelerine dönüşerek stromayı oluşturmakta, organ işlevlerinin yürütülmesinde önemli roller üstlenmektedirler. Diş pulpası, kas, kemik, kordon kanı, lipoaspirasyon materyalleri, kordon stoması, deri, amnion sıvısı, periferik kan, siynoviyal sıvı gibi çok çeşitli alanlardan izole edilebilirler. Bu dokulardan elde edilen MKH’lerin kökenleri ne olursa olsun biyolojik ve fonksiyonel özellikleri çok benzerdir (Minguell ve ark., 2001; Uçkan, 2007). MKH’ler multipotentdir, kıkırdak, kemik, kas, tendon, ligament, adipoz doku, sinir hücreleri, pankreas B hücreleri ve endotele farklılaşabilir. MKH’nin in-vitro ve in-vivo çalışmalarda yalnızca mezodermal değil, endodermal dokulara da kaynaklık edebilen nadir pluripotent hücreler (MAPC) olduğunu gösteren kanıtlar vardır (Jiang ve ark., 2002; Uçkan, 2007).

Mezenkimal kök hücreler ile ilgili çalışmaların çoğunda, elde edilmesinin kolaylığı, hematopoetik kök hücreler ile yakın ilişkisi, hematopoezde önemli fonksiyonları olması ve hematopoetik kök hücrelerin biyolojisi ve klinik sonuçları iyi bilinen hücreler olması nedeniyle kemik iliği kaynaklı MKH’ler kullanılır. Kemik iliği kökenli MKH iki farklı kök hücre tipinde bulunurlar. Bunlar bağı olmayan- MKH, bağı MKH’dir. Bağı olmayan- MKH’ler koloni oluşturma kapasitesi düşük, granülsüz hücrelerle bir arada bulunan, geri dönüşüm yapabilen ve bir hücre döngüsü antijeni olan Ki-67’ye karşı yanıtız olan hücrelerdir. Bağı MKH’ler ise hızla çoğalan, koloni oluşturma kapasitesi yüksek olan hücrelerdir (Colter ve ark., 2000).

Mezenkimal kök hücreler dokularda az sayıda buldukları için araştırma amaçlı bile olsa in-vitro ortamda çoğaltılmaları gerekir (Minguell ve ark., 2001; Adassi ve Verfaillie, 2006; Uçkan, 2007). Kemik iliği aspirasyonunda MKH/mononükleer hücre oranı 2-5 /10⁶ kadardır (Koç ve Lazarus, 2001). Kemik iliğinin toplanmasında kullanılan yöntem, vericinin yaşı, içinde bulunduğu şartlar ve alınan numunedeki öncül

hücrelerin sayısı MKH'lerin alt kültürleme (pasajlama) sonrasında farklı çoğalma kapasiteleri göstermelerine neden olur. İn-vitro ortamda çoğalan MKH'ler koloni oluşturan birim fibroblast (colony forming unit fibroblast-CFU-F) adlı homojen fibroblast benzeri hücre toplulukları içerirler (Minguell ve ark.,2001; Şahin, 2006). MKH'ler ile yapılan hücre döngüsü çalışmalarında hücrelerin büyük çoğunluğunun G0/G1 fazında beklediğini, %10'luk bir kısmının da S+G2+M fazında olduğunu göstermiştir. G0/G1 fazında bekleyen hücrelerin çoğunlukta olması bu hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin yüksek olması ile ilişkilendirilmiştir (Minguell ve ark., 2001). Jiang ve arkadaşlarının (Jiang ve ark., 2002) yaptığı bir çalışmada MKH kavramı içerisinde MAPC tanımlanmıştır. Bu hücreler 80 defadan fazla bölünebilen ve mezenkimal öncüllerin dışında endotel, endoderm ve ektoderme de dönüşebilen (üç germ tabakası) multipotent hücrelerdir. Araştırmacılar MAPC'yi bir blastokistin içine enjekte ettiklerinde tüm somatik dokulara işlevsel olarak katkıda bulduklarını, hasar görmemiş dokuda kuvvetli ve erken bir yerleşme gösterdiklerini ve in-vitro şartlarda üç germ tabakasına da farklılaştıklarını göstermişlerdir. Bu özellikleri ile EMKH gibi görünen bu hücrelerin bir kısım EMKH belirteçlerini de taşıdıkları ancak EMKH'den farklı olarak damar içi verildiklerinde tümör oluşturmadıkları gösterilmiştir. Tüm bu verilere dayanarak MAPC'leri mezengenezis (mezengenik işlem hipotezi) şemasında en üste koymak doğru olacaktır (Caplan, 1994).

İN-vitro olarak çoğaltılan MKH'in özgün yüzey belirteçleri yoktur. CD34, CD45, CD11b/c vb HKH belirteçleri negatif, CD105 (SH2-Endoglin), CD73 (SH3/SH4), CD44 (HCAM-1),CD90 (Thy-1), STRO-1 (fibroblast yüzey belirteçi), CD106 (VCAM-1) gibi belirteçler de pozitifdir (Tablo III).

Mezenkimal kök hücreler birçok büyüme faktörünü (GM-CSF, G-CSF, M-CSF gibi), reseptörlerini, çeşitli interlökinleri (IL-6, IL-7, IL-8, v.b.), reseptörlerini, hücre dışı matriks proteinleri (kollegen, fibronektin, laminin gibi) ve adezyon moleküllerini sentezleme yeteneğine sahiptirler (Minguell ve ark., 2001) (Tablo IV).

Tüm bu üretim profili birlikte değerlendirildiğinde kemik iliği kökenli MKH'nin kendi çoğalmaları ve farklılaşmalarının dışında kendi mikroçevresindeki diğer hücreler için de düzenleyici bir rol oynadığı görülmektedir (Avecilla, 2004; Wilson ve Trumpp 2006; Caplan, 2008) (Tablo V).

Tablo III. Kùltürde çoğaltılan mezenkimal kùk hùcrelerin immunofenotipik òzellikleri (Minguell ve ark.'dan, 2001).

Antijen	CD numarası	Ekspresyon
VLA-2	CD49b	Pozitif
VLA-4	CD49d	Negatif
VLA-5	CD49e	Pozitif
LFA-1	CD11a	Negatif
E-selektin	CD62E	Negatif
P-selektin	CD62P	Negatif
L-selektin	CD62L	Negatif veya pozitif
PECAM	CD31	Negatif
LFA-3	CD58	Negatif veya pozitif
ICAM-1	CD54	Pozitif
ICAM-2	CD102	Pozitif veya negatif
ICAM-3	CD50	Pozitif veya negatif
VCAM-1	CD106	Pozitif veya negatif
HCAM-1	CD44	Pozitif
	CD34	Negatif
	CD45	Negatif
	CD14	Negatif
	CD13	Pozitif
Transferrin reseptör	CD71	Pozitif veya negatif
Thy-1	CD90	Pozitif
Endoglin, SH2	CD105	Pozitif
SH3	CD73	Pozitif
SH4	CD73	Pozitif
HLA ABC		Negatif veya pozitif
HLA DR		Negatif

Tablo IV. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin ana özellikleri; özgün antijenlerin, sitokin reseptörlerinin, adezyon moleküllerinin ifadenmesi ve sitokinlerin - matriks proteinlerinin üretimi (Minguell ve ark.'dan, 2001).

Belirteç tipi	Belirteci	Kaynak
Spesifik antijenler	SH2, SH3, SH4, STRO-1, düz kas α -aktin MAB1740	Conget ve Minguell, 1999; Galmiche ve ark., 1993; Simmons ve Torok-Storb, 1991; Haynesworth ve ark., 1992
Sitokinler ve büyüme faktörleri	İnterlökinler: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 ve 15 LIF, SCF, Flt-3 ligand GM-CSF, G-CSF, M-CSF	Majumdar ve ark., 1998; Haynesworth ve ark., 1996
Sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-SCFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF β IR, TGF β IIR, BFGFR, PDGFR, EGFR	Conget ve Minguell, 1999; Pittenger ve ark., 1999; Gronthos ve Simmons., 1995; Satomura ve ark., 1998
Adezyon molekülleri	İntegrinler: α v β 3, α v β 5, İntegrin zincirleri: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 1, β 3, β 4, ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selektin Endoglin, CD44	Koton ve ark., 2001; Conget ve Minguell, 1999; Bruder ve ark., 1998 Bruder ve ark., 1997
Hücre dışı matriks proteinleri	Tip I, III, IV, V ve VI kollagen, fibronektin, laminin, hyalüronan, proteoglikanlar	Conget ve Minguell, 1999; Prockop, 1997;

Tablo V. Kemik iliği kökenli mezenkimal öncüllerin in vitro farklılaşma potansiyeli: Uyarı, moleküler ve hücresel belirteçler (Minguell ve ark.'dan, 2001).

FARKLILAŞMA	UYARI	TERMİNAL FENOTİP TANIMLAMA	
		BELİRTEÇLERİ MOLEKÜLER	HÜCRESEL
Adipositler	Deksametazon +isobütilmetilksantin (Nuttall ve ark., 1998) Deksametazon +isobütilmetilksantin +indometasin+insülin (Pittenger ve ark., 1999) Deksametazon+insülin (Muraglia ve ark., 2000) Deksametazon+indometasin (Hung ve ark., 2002) Deksametazon+indometasin +eikosate+raynoik asit	PPAR γ 2 C/EBP β aP2 Adiposin Leptin Lipoprotein Lipaz (Pittenger ve ark., 1999; Gori ve ark., 1999; Tontonoz ve Spiegelman, 1994)	Sitoplazmik lipid damlacığı (Hung ve ark., 2002)
Kondrositler	TGF β 3+askorbik asit (Pittenger ve ark., 1999) TGF β 1+askorbik asit (Satomura ve ark., 1998) TGF β 1 ITS+Premix+ TGF β 1 (Hung ve ark., 2002)	Cbfa-1 Tip II ve IX kollagen Agrekan (Ducy ve ark., 1997)	Proteoglikanlar e Tip II ve Tip IV kollagen yönünden zenginleştirilmiş matriks (Hung ve ark., 2002; Pittenger ve ark., 1999; Muraglia ve ark., 2000)
Osteoblastlar	Deksametazon+ β - gliserofosfat+askorbik asit (Hung ve ark., 2002; Bruder ve ark., 1997) BMP-2 (Balk ve ark., 1997)	Cbfa-1 Kemik / karaciğer / böbrek alkalen fosfataz Kemik siyaloproteini Osteopontin, Osteokalsin Tip I kollagen (Hung ve ark., 2002; Pittenger ve ark., 1999; Gori ve ark., 1999; Ducy ve ark., 1997; Balk ve ark., 1997)	Mineralize matriks formasyonu (Hung ve ark., 2002; Balk ve ark., 1997)
Tenositler	BMP-12 (Lou ve ark., 1999)	Tip II kollagen, Proteoglikanlar (Young ve ark., 1998)	İmplant edilen tendonun gelişen biyomekanik özellikleri (Young ve ark., 1998)
Hematopoetik destekleyici stroma	Hidrokortizon+at serumu (Majumdar ve ark., 1998) Hematopoetik kök hücre (Mbalaviele ve ark., 1999)	-	CD34+ hücrelerin hematopoetik farklılaşmasını destekler ve devam ettirir (Majumdar ve ark., 1998) Osteoklastogenezisi destekler (Mbalaviele ve ark., 1999)
İskelet kas hücreleri	5-azaktidin (Wakitani ve ark., 1995; Adassi ve Verfaillie, 2006)	MyoD, Myt 5 ve 6, MEF- 2, Miyogenin, MRF4, Miyozin (Adassi ve Verfaillie, 2006; Dominov ve ark., 1998)	Çok çekirdekli kasılabilir hücreler (Williams ve ark., 1999)

Tablo V (devamı). Kemik iliği kökenli mezenkimal öncüllerin in vitro farklılaşma potansiyeli: Uyarı, moleküler ve hücresel belirteçler (Minguell ve ark.'dan, 2001).

Düz kas hücreleri	PDGF-BB (Adassi ve Verfaillie, 2006)	ASMA, Metavinkülin, Kalponin, h-Kaldesmon, Düz kas aktin (Adassi ve Verfaillie, 2006; Dominov ve ark., 1998)	-
Kalp kası hücreleri	bFGF (Adassi ve Verfaillie, 2006)	Desmin, β -miyozin ağır zinciri, Fosfolamban GATA 4 ve 6 Kardiyak troponin 1 ve C Sarkomerik-aktin Yavaş kasılan miyozin ANP (Ducy ve ark., 1997)	-
Astrositler	DMSO+Deksametazon, FN+bFGF (Jiang ve ark., 2002)	Glial fibriler asidik protein Ara filaman (Ducy ve ark., 1997)	Neonatal beyinde entegrasyon (Jiang ve ark., 2002)
Oligodendrositler	PDGF+ EGF+ linoleik asit (Ducy ve ark., 1997)	Galaktoserebrosit (Jiang ve ark., 2002)	-
Nöronlar	FN+bFGF (Jiang ve ark., 2002) B-mercaptoetanol + retinoik asit (Hung ve ark., 2002)	Nörofilaman, Tübülün B III, Sinaptofizin (Jiang ve ark., 2002; Ducy ve ark., 1997) Netsin, NeUN, Tuj-1 (Hung ve ark., 2002)	-
Sinir hücreleri	Retinoik asit (Cheung ve ark., 2003)	-	-
Sinir benzeri hücreler	Retinoik asit (Cheung ve ark., 2003)	-	-
Glia hücreleri	Retinoik asit (Cheung ve ark., 2003)	-	-
Beta hücreleri	Retinoik asit (Cheung ve ark., 2003)	İnsülin	-
Endotel hücreleri	VEGF+Fibronektin (Jiang ve ark., 2002)	CD31, FIK-1, vWf (Jiang ve ark., 2002)	Endotelial fenotip (Jiang ve ark., 2002)
Epiteloid hücreler (+adiposit)	FGF4+HGF (Jiang ve ark., 2002)	Sitokeratin 18 HNF-1 Albumin (Jiang ve ark., 2002)	Epiteloid morfoloji (Jiang ve ark., 2002)

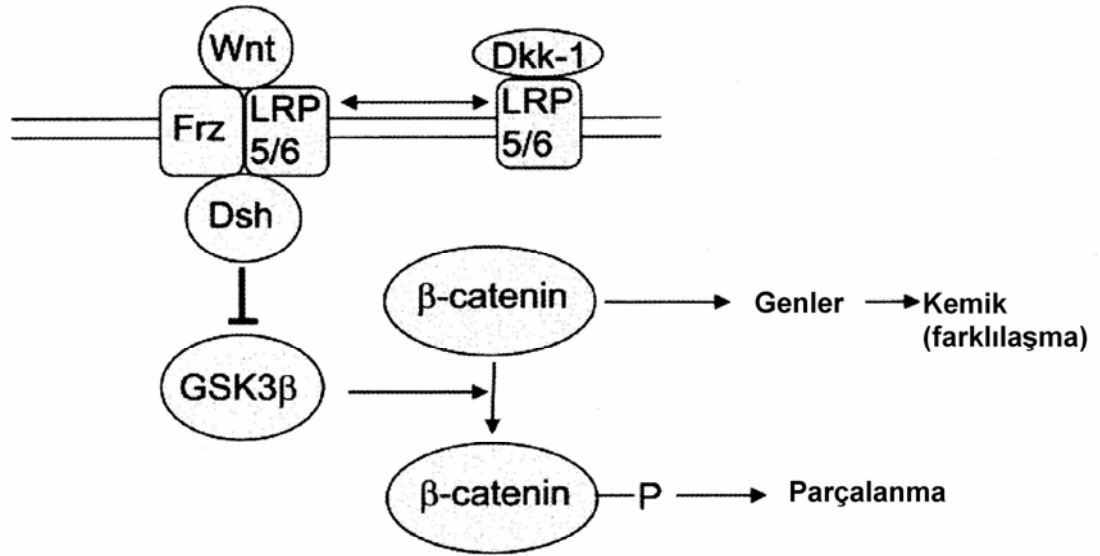
Mezenkimal kök hücrelerin in vivo olarak değişik uyaranlarla çeşitli hücre tiplerine farklılaştığı ve bu hücrelerin işlev gördüğü birçok çalışma ile gösterilmiştir (Galmiche ve ark., 1993; Bruder ve ark., 1998; Pittinger ve ark., 1999; Minguell ve ark., 2001; Loeffler ve Roeder, 2002; in't Anker ve ark., 2003; Caplan, 2008; Zovein ve ark. 2008) (Tablo VI).

Tablo VI. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin in vivo farklılaşma potansiyeli (Karaöz ve Ovalı'dan, 2004)

FARKLILAŞMA	TERMİNAL FENOTİP BELİRTEÇLERİ	
	MOLEKÜLER	HÜCRESEL
Tip I alveoler epitel hücresi	T1 α (Koton ve ark., 2001) Pan-CK ⁺ -CD45 ⁻ (Jiang ve ark., 2002)	Lac-Z eksprese eden hücreler Tip I pnömosit morfolojisi (Koton ve ark., 2001)
Astrositler	Glial fibriler asidik protein Ara filaman (Koton ve ark., 2001)	Neonatal beyinde entegrasyon (Koton ve ark., 2001)
İskelet kası hücreleri	Distorfin, Distorfin+TO-PRO-3 (Jiang ve ark., 2002)	Lokalizasyon + Morfoloji -
Kalp kası hücreleri	Kardiyak troponin-I-Cy3 + TO-PRO-3 (Jiang ve ark., 2002)	-
Hepatosit	CK18 ⁺ , CD45 ⁻ , albumin ⁺ (Jiang ve ark., 2002)	-
İnce bağırsak epitel hücreleri	Pan-CK ⁺ -CD45 ⁻ (Jiang ve ark., 2002)	-
Osteoblast	BMP-2 (Balk ve ark., 1997)	Artmış alkalin fosfataz aktivitesi ve osteokalsin üretimi (Balk ve ark., 1997)

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma çalışmaları arasında en çok osteojenik ve adiposit hücrelere farklılaşma çalışılmış bu çalışmalarda BMP ve TGF ailesi, sinyal ileti yolları analiz edilmiştir. Low Density Lipoprotein Receptor Related Proteinler (LRP)'in

Wnt-Katenin yolağını inhibe edici etkisi gösterilerek in-vitro MKH elde edilmesini kolaylaştırdığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda, Runx2 (Runt Homology Domain transcription Factor)'nin etkinleştiği, PPARA (Peroxisome Proliferation-Activated Receptor Antigen)'nin azaldığı durumlarda MKH'lerin osteojenik yönde farklılaştığı, tersi ortamda ise adipojenik farklılaşmanın olduğu gösterilmiştir. Osteojenik yönde farklılaşmayı artıran birbaşka etken de Wnt/ β -katenin yolağında Wnt ligandının reseptörüne bağlanarak β -katenin'nin yıkılmasını engelleyen yolağı çalıştırması ve ilgili genlerin ifadesini sağlamasıdır. MKH'de osteojenik yönde farklılaşmayı engelleyerek çoğalmayı arttıran Dickkopf-1 (Dkk-1), adezyon, migrasyon, çoğalma ve yaşamın sürdürülmesinde etkin olan ise Sisteinden Zengin Protein (Cysteine Rich Protein-CCN)'dir (Tontonoz ve ark., 1994; Balk ve ark., 1997; Lou ve ark., 1999; Reya ve Clevers, 2005; Saydam, 2006; Park ve ark., 2008; Gnecci ve ark., 2008) (Şekil 11).



Şekil 11. Wnt/Dkk-1 sisteminin kök hücreler üzerindeki etkisi (Reya ve Clevers'dan, 2005).

Mezenkimal kök hücrede immünojeniteyi sağlayan HLA-DR ve ko-stimülör molekül ifadesi olmadığı için immünojenite düşüktür. İmmünsüpresif etkiyi yapan ise T lenfosit aktivasyonu, alloreaktif reaksiyonların önlenmesi, B lenfositlerin inhibisyonu, düzenleyici T hücrelerinin uyarılması ve çözünebilen faktörlerin varlığıdır (Uçkan, 2007; Caplan, 2008; Müller ve ark. 2006).

Mezenkimal kök hücreler farklılaşma potansiyelleri (multipotent olmaları) ve immunsupresif etkileri nedeniyle hücrel tedavilerde diğer kök hücre türlerine göre daha çok tercih edilirler. Klinikte, hücrel tedavilerde MKH tercih edilmesinin diğer nedenleri şunlardır:

1. Yüksek farklılaşma potansiyelleri: Mezodermal dokuların dışında diğer germ tabakalarına da farklılaşma.
2. Stromal kaynaklı oldukları için tüm doku hücrelerine destek hücre olarak, fonksiyon ve gelişimlerinde katkıda bulunma.
3. Hasarlı dokuya ulaşmada migrasyon yeteneklerini kullanma.
4. Gen tedavisine uygun olma (transfer kolaylığı, hızlı çoğalma ve dayanıklılık).
5. Füzyon yeteneğinin olması.
6. Enzim defekti olan hastalıklarda enzim üreten hücre olma özelliği.
7. İmmunsupresif ve immunojenitesinin düşük olması nedeniyle doku uygunluğunun aranmaması.
8. Kemokinler, büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımı ile hücre ve /veya dokuda destek hücre olarak onarım yapabilme (Koç ve ark., 2002; Barry ve Murphy, 2004; Wynn ve ark., 2004; Kasem ve ark, 2004; Müller ve ark, 2006; Ringden ve ark, 2006; Uçkan, 2007; Caplan, 2008; Ball ve ark. 2008).

Mezenkimal kök hücreler klinik kullanımda bu avantajları nedeniyle diğer kök hücre çeşitlerine göre avantajlı görünse de bazı teknik nedenler yüzünden dezavantajlı tarafları da vardır:

1. Az sayıda oldukları için in-vitro ortamda çoğaltılmaları gerekir.
2. İn-vitro kültür ortamında kullanılan malzemeler ve uzun süreli kültür yapmanın dezavantajları vardır (mikroorganizma kontaminasyonu, sitogenetik instabilite).
3. Tekrarlayan transplantların gerekmesi, direk hasarlı dokuya vermenin avantajlı olduğu durumlarda özel yöntem gerektirmesi (Uçkan, 2007; Caplan, 2008).

Mezenkimal kök hücreler klinikte başlıca şu amaçlar için kullanılır:

1. Organ ve doku tamiri: MKH'in hayvan çalışmalarında kullanıldığı çok çeşitli organ hasarı ve hastalık modeli vardır (Orlic ve ark, 2001; Tomita ve ark., 2002; Chen ve ark., 2003; Castenheira ve ark., 2008).
2. Organ ve doku nakli: İmmunsupresif etkisi ve özellikle HKH nakillerinde stromal destek sağlaması nedeniyle organ ve doku nakillerinde sıkça

kullanılmaya başlanmış, en çok da allojenik transplantasyonlarda Graft Versus Host Hastalığı (GVHH)'ında iyi sonuçlar alınmıştır (Rybka ve ark., 1995; Le Blanc ve ark., 2004; Le Blanc ve Ringdén, 2005; Uçkan, 2007).

3. Otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanım: İmmünesupresif etkisi nedeniyle kullanılabilirliği düşünülmektedir (İshida ve ark., 1994; Marinova- Mutafchieva ve ark., 2002).
4. Organ-doku nakilleri ve tamirinde birlikte kullanımı: Çeşitli metabolik hastalıklarda kemik iliği nakli ile birlikte MKH nakilleri denenmiştir (Koç ve ark., 2002; Uçkan, 2007).
5. Çeşitli tümörlerin, kalıtsal hastalıkların tedavisinde (özellikle enzim bozukluklarında) ve yine bir tedavi yöntemi olarak gen tedavisinde hedef hücre olarak kullanımı: Deneysel Lökodistrofi tedavisinde başarı sağlanmıştır (Koç ve ark., 2002; Uçkan, 2007; Kim ve ark., 2008; Biffi ve ark., 2008).

II.B.2.9. Göz Kök Hücreleri

Gözde şu ana kadar üç farklı kök hücre tanımlanmıştır. Bunlar; retinal kök hücre, limbal kök hücre ve konjonktival kök hücredir.

Kusursuz görme için hem optik odaklama sisteminin hem de retinadan başlayarak optik yol ile devam eden ve görme korteksinde sonlanan nöral sistemin sağlam olması gereklidir. Göz kök hücreleri araştırmaları oküler sisteminin iki bileşeni olan oküler yüzey (kornea, limbus ve konjonktiva) ve retina üzerinde yoğunlaşmıştır (Ang ve Tan, 2005).

II.B.2.9.1. Retina Kök Hücreleri

Retina gözün en içteki nöral tabakasıdır ve bir iç nörosensöriyel katman ve bir dış pigment katmanından –retinal pigment epiteli- oluşur. Erişkin memeli gözlerinde silier cisim ve retinanın periferik sınırlarında kök hücre özellikleri olan ve retinal nöronlara dönüşen nöral öncüller bulunduğu düşünülmektedir. Erişkin retinal kök hücreler santral ya da periferal retinal pigmente epitelde değil, pigmenter silier sınırda bulunur (Tropepe ve ark., 2000). Bu hücreler multipotentdir ve kendini yenileme özelliğine sahiptir. Nöral hücrelerin özelleşmiş ve farklılaşmış olduğunun bilinmesine karşın, bu insan nöral kök hücrelerinin, uygun uyarı verildiğinde, retina hücrelerine

farklılaşma potansiyeline sahip olduğu da gösterilmiştir (Reh ve Levine, 1998; Ahmad ve ark., 1999).

II.B.2.9.2. Oküler Yüzey Kök Hücreleri

Oküler kök hücre biyolojisi ve tedavisinde en önemli gelişmeler oküler yüzey kök hücreleri alanında olmuştur. Oküler yüzey epiteli, kornea, limbus ve konjonktiva epitelinin içerir. Kornea görme için özelleşmiş berrak bir optik yüzeydir; kornea epiteli katmanlaşmış skuamöz, keratinize olmayan 5 tabaka kalınlığında epitelden oluşur. Limbus ise kornea ve bulbar konjonktiva arasında bulunan, 1.5-2mm genişliğinde ve 8-10 tabaka kalınlığında epitelden oluşan bir alandır. Konjonktiva korneal limbustan göz kapağı sınırında mukokütanöz bileşkeye dek uzanır ve anatomik olarak üçe ayrılır: 1) Bulbar konjonktiva-limbusa kadar uzanır 2) forniseal konjonktiva- göz küresi ve göz kapakları arasındaki bileşkede bulunur 3) Palpebral konjonktiva-gözkapaklarının iç kısmını döşer ve göz kapağı sınırının mukokütanöz bileşkesinde sona erer. Bu bölgeler 2-5 tabakalı keratinize olmayan katmanlaşmış kolumnar epitel ile döşelidir (Charukamnoetkanok, 2006).

Erişkin kornea ve konjonktiva kök hücreleri homeostaz ve oküler yüzey rejenerasyonundan sorumlu en erken progenitor hücrelerdir. Birçok intrinsik ve ekstrinsik faktörler kök hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyon hızını etkileyerek oküler yüzey hücrelerin kararlı bir durumda kalmasını sağlar (Secker ve Daniels, 2008).

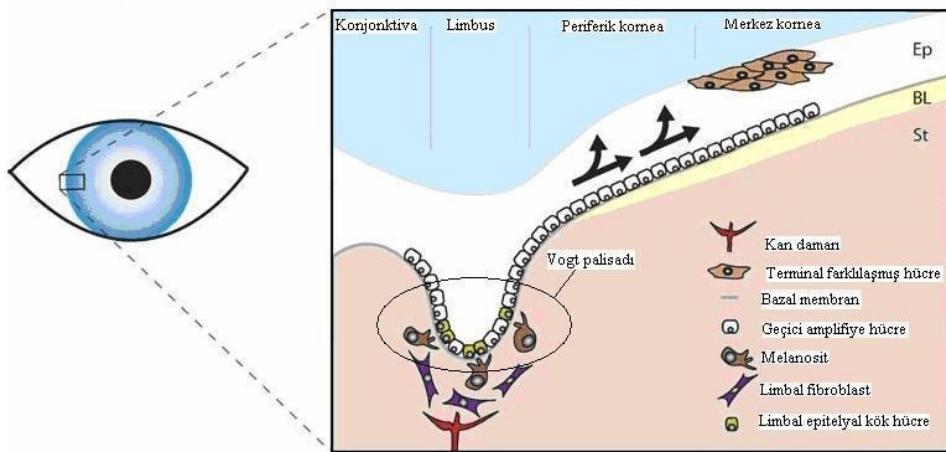
II.B.2.9.2.a. Konjonktiva Kök Hücreleri

Konjonktiva ve kornea epitel hücreleri iki ayrı hücre serisine aittir ve farklı kök hücre topluluklarından oluştuklarına inanılmaktadır (Wei ve ark., 1996). Konjonktiva epiteli keratinositler ve goblet hücrelerinden oluşur. Konjonktiva epitelinin oluşturan goblet dışı epitel hücrelerinin ve goblet hücre topluluklarının ortak bir bipotent progenitor hücreden meydana geldiği gösterilmiştir (Wei ve ark., 1997). Oküler yüzeyin homeostazını sürdürmekte konjonktivanın öneminin büyük olmasına karşın, konjonktiva kök hücrelerinin doğası ve yerleşimi hakkında fazla bilgi yoktur. Forniks konjonktivasının kök hücrelerden zengin olduğu tavşan ve fare modellerinde gösterilmiştir. Forniksde bulunan kök hücrelerin varlığı, iyi bilinen özellikleri olan yavaş siklusları gösterilerek doğrulanmıştır (Wei ve ark., 1995). Tümör uyarısı ve

yaralanma ile forniks bazal hücreleri, diğer bölgelerdeki hücelere oranla, daha fazla ve daha uzun süreli proliferatif yanıt verirler. Konjonktiva forniksi en fazla miktarda kök hücre içeren yer olmakla birlikte, olasılıkla tüm konjonktiva epiteli boyunca konjonktival kök hücre toplulukları bulunmaktadır.

II.B.2.9.2.b. Limbal Kök Hücreler

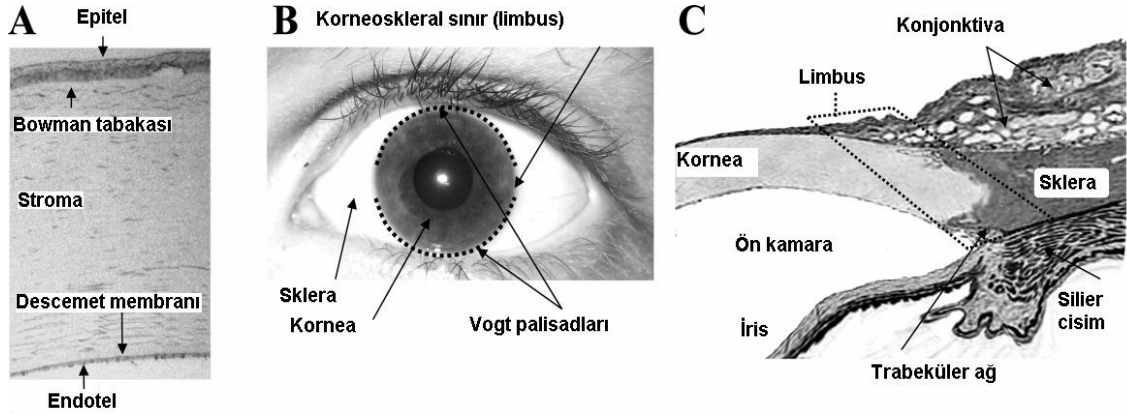
Kornea epitelinde yüzeyde yerleşmiş terminal farklılaşmış (diferansiye) hücrelerin kaybı ve bazal epitel hücrelerin onların yerini almasıyla oluşan sürekli bir döngü vardır. Lavker ve Sun (Lavker ve Sun, 1998) kornea epiteli arasında dereceli gradiyent diferansiyasyonunu açıklamak amacıyla kök hücrelerin farklılaşma akışını; kök hücre, geçici amplifiye hücre, terminal farklılaşmış hücre olarak önerdiler. Korneal epitel hücrelerinin limbusun bazal tabakasında yerleşen ve kornea epitelinin yenilenmesi ve rejenerasyonundan sorumlu olan özgül progenitor hücrelerden meydana geldiği bilinmektedir. (Takacs ve ark., 2009) (Şekil 12). Limbal kök hücreler bölünerek geçici amplifiye hücreleri oluşturur, bunlar da göç ederek yüzeyde limbusun suprabazal yerleşimini işgal eder ve merkezde kornea epitelinin bazal tabakasını oluştururlar. Bu geçici genişleyen hücreler “post-mitotik” hücelere, onlar da terminal farklılaşmış hücelere diferansiye olur. Bu hücreler yüzeysel olarak göç eder ve dokunun son fenotipik özelliklerini alırlar. Post-mitotik hücreler ve terminal farklılaşmış hücreler bölünme yeteneğine sahip değildir (Dua 1995; Dua ve Blanco, 2000; Charukamnoetkanok, 2006; Secker ve Daniels, 2008).



Şekil 12. İnsan kornea limbusunun kesitsel şeması (Secker ve Daniels'den, 2008). Ep: Epitel tabaka; BL: Bowman tabakası; St: Stroma

Kornea epitel hücrelerinin rejenerasyonunda limbus bazal epitel hücrelerinin rolü olduğu kavramı kornea epitel defektlerinin iyileşme sürecinde epitel hücre serilerinin limbal bölgeden merkez korneaya göç ettiğini gösteren Davanger ve Evensen tarafından 1971 yılında ortaya atılmıştır (Davanger ve Evensen, 1971). Limbal bazal epitel hücreleri kornea epitelinin en az farklılaşmış hücrelerini oluşturur. Farklılaşmış kornea epitelinde ve limbusun suprabazal tabakasında gösterilen K3 keratinin, limbal bazal hücrelerinde olmaması limbal bazal hücrelerin daha öncül ve farklılaşmamış olduğunu düşündürür (Schermer ve ark, 1986). Kornea kök hücrelerine özgül bir moleküler belirteç tanımlanamamış, ancak kök hücrelerin yavaş döngü özelliği dolayısıyla dolaylı bir işaretleme yöntemi geliştirilmiştir (Bickenbach ve Mackenzie, 1984). Devamlı timidin infüzyonunun yavaş bölünen kök hücrelerde uzun süre tutulmasına dayanan bu yöntem limbusun, kornea kök hücrelerinin yeri olduğunu göstermiştir. Dinlenme halinde düşük döngü hızına sahip limbal bazal epitel hücre topluluklarının, yaralanma ve tümör uyarılma durumlarında, periferik ve santral kornea hücrelerine göre daha yüksek rezerv kapasitesi ve proliferatif yanıt özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir (Costarelis ve ark., 1989).

Kornea kök hücrelerinin barınması ve korunması için limbus özellikli bir yerdir. Vücuttaki kök hücreler genellikle derin doku tabakalarında bulunur. Korneal epitel çoğunlukla 5 tabakadan oluşurken, limbal epitel 8–10 tabaka kalınlığındadır ve limbal kök hücreler de diğer kök hücreler gibi alt tabakalarda yer alır. Limbusun bir diğer özelliği de pigmentasyonun fazla olmasıdır, bu da bazal hücreleri UV ve radyasyon gibi karsinojenik etkilerden korur (Costarelis ve ark, 1989). Vogt palisadları (Şekil 13) limbusa lokalize papilla benzeri kolonlardan oluşan karmaşık bir yapıdır, dalgalı bir epitel-stroma bileşkesine sahiptir ve bu nedenle daha fazla adezyon özelliği sağlayarak epiteli yırtılmalara karşı dirençli kılar. Aynı zamanda bu katlantılar bazal hücrelerin yüzey alanını da artırır. Limbusun bu komponenti sinir açısından da zengindir ve geniş bir vasküler yatağa sahiptir. Tüm bu özellikler limbal kök hücrelerin çeşitli sitokin ve nöral aracılı yollar ile çoğalmasına olanak sağlar. Vogt palisadları limbal kök hücreler için benzersiz koruyuculukta bir ortamdır. Bu ortam, kök hücre aktivitesinin düzenlenmesinde çok önemli olan stromal mikroçevreyi – kök hücre nişi – oluşturur (Ang ve Tan, 2005, Charukamnoetkanok, 2006).



Şekil 13. Kornea ve Limbus Anatomisi (Takacs ve ark.'dan, 2009)

Kök hücre nişinin düzenlenmesinde ve idamesinde hem intrinsik (hücrenin doğasında var olan) hem de ekstrinsik (hücresinin etrafındaki çevreye ait) faktörler etkilidir (Zieske, 1994). Limbal bazal hücrelerin epidermal büyüme faktörü reseptör (epidermal growth factor receptor-EGFR) düzeyinin merkez korneanın bazal hücrelerine oranla daha fazla olduğu bilinmektedir. Daha olgun ve farklılaşmış hücreler daha düşük düzeyde reseptöre sahiptir. Yüksek düzeyde EGFR ifadesinin, gelişme ve yara iyileşmesi sırasında hücrelerin büyüme faktörleri tarafından kolaylıkla uyarılmasına yol açarak büyümeye yönlendireceği ileri sürülmüştür (auf dem Keller ve ark.,2004). Limbal bazal hücrelerin intermediate filamanlar, sitokeratin 19 (K19), vimentin, $\alpha 6\beta 4$ -integrin, metallothionein, AE1 ve transferrin reseptörü de ifade ettiği gösterilmiştir (Zieske ve Wasson, 1993; Kasper, 1992; Charukamnoetkanok, 2006).

Bu hücrelerin benzersiz fenotipleri onları çevrelerindeki bazal hücrelerden ayırır. Limbal epitelin bazal hücrelerinde, merkez kornea epitelinden daha yüksek oranda var olan birçok protein bulunmuştur (Dua ve Azuara-Blanco, 2000). Limbus bazal membranı da merkez kornea membranından farklılık gösterir. Merkez kornea epiteli bazal membranı AE27 monoklonal antikoru tarafından tanımlanan ve limbal bölgede düşük düzeyde bulunan bir protein içerir (Kolega ve ark., 1989). Bunun aksine, kollagen tip IV limbus bazal membranında bol miktarda bulunurken, merkez korneada yoktur. Kornea ve konjonktiva epitel bazal membranı bu özellikleri ile üç bölüme ayrılabilir: Konjontival bazal membranda tip IV kollagen (+), AE27 zayıf (+) ; limbal bazal membranda tip IV kollagen (+), AE27 kuvvetli (+) ; ve kornea bazal membranda tip IV kollagen (-), AE27 kuvvetli (+)'dir. Bazal membran heterojenitesi keratin ifadesinin düzenlenmesinde ve kornea epitelinin farklılaşmasının diğer yönlerinde rol

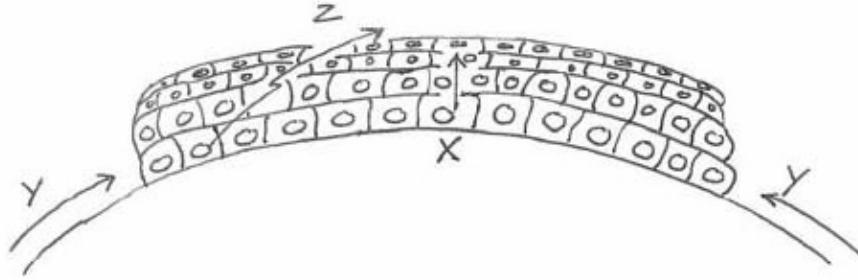
oynar. Bu özellikler ve beraberindeki limbusun “anchor” fibrilleri, bazal hücrelerin altındaki stromaya adezyonunu artırır (Ang ve Tan, 2005).

Oküler yüzey epitel hücrelerinin çok sayıda sitokin ifade ettiği gösterilmiştir (Wilson ve ark., 1994; Li ve Tseng, 1996; Wilson ve ark., 1999/b). Stroma-epitel etkileşimleri normal kornea işlevini desteklemekte son derece önemlidir. Özellikle erken gelişim, homeostaz ve yara iyileşmesi sırasında korneada stromal ve epitelyal hücreler arasındaki iletişim koordinasyonunun iyi olması gereklidir. TGF- α platelet kaynaklı büyüme faktörü- β (PDGF- β) ve IL-1 β gibi birçok büyüme faktörünün epitel hücreleri tarafından sentez edildiği ve reseptörlerinin de stroma fibroblastları arasında bulunduğu gösterilmiştir (Li ve Tseng, 1996; Charukamnoetkanok, 2006).

Korneada en iyi tanımlanan stroma-epitel etkileşimi, hepatosit büyüme faktörü (hepatocyte growth factor-HGF) ve keratinosit büyüme faktörü (keratinocyte growth factor-KGF) aracılığı ile gerçekleşen parakrin etkileşimdir (Li ve Tseng, 1997). Limbal fibroblastların çoğunlukla KGF transkript ve proteinlerini, kornea fibroblastlarının ise HBF transkript ve proteinlerini ifade ettiği gösterilmiştir (Wilson ve ark., 1994; Wilson ve ark., 1999/a). Yara iyileşmesinde KGF'nin önemli rol oynadığı bilindiği için, KGF'nin yüksek oranda ifadelenmesinin kök hücrelerin proliferasyon, motilite ve farklılaşmasının düzenlenmesinde de görev yaptığı düşünülmektedir. Keratinosit büyüme faktörü-2 (KGF-2) epitel dokusunun oluşmasında ve epitel dokusunun hasarlanması durumunda rejenerasyonda görev alan büyüme faktörlerinden biridir. Kornea epitelinin hasarlanması durumunda ilgili genin ifadesinde artış olduğu çeşitli yayınlarla da gösterilmiştir (Liu ve ark., 2008). Bu bulgular mikroçevrenin limbal kök hücreleri düzenlediğini, sitokinler ile büyüme faktörlerinin epitelyal-stromal etkileşiminin kök hücre homeostazı ve düzenlenmesinde görev aldığı düşüncesini desteklemektedir (Ang ve Tan, 2005).

Kornea epitelinin idamesinde X,Y,Z hipotezini ilk kez Thoft ve Friend ileri sürmüşlerdir (Thoft ve Friend, 1983). Buna göre, kornea epitelinin varlığı üç ayrı ve bağımsız mekanizma ile sürdürülür. Bazal epitel hücrelerinin proliferasyonu “X”, perifer hücrelerinin proliferasyonu ve sentripedal göçü “Y”, yüzeydeki epitel hücrelerinin kaybı ise “Z” ile simgelenir. Kornea epitel idamesi bu süreçlerin bir dengesi olarak $X+Y=Z$ denklemi ile tanımlanır (Thoft ve Friend, 1983) (Şekil 14). Kornea epitelinin her 7–10 günde bir yenilendiği düşünülmektedir. Kornea hasarı ve

sonucunda oluşan epitel hücre kaybı ile kornea epitel rejenerasyon mekanizmaları harekete geçer ve hücrelerin periferden merkeze doğru sentripedal hareketi başlar (Buck, 1985). Kornea epitel defektleri, hasarın niteliğinden bağımsız olarak, oldukça tutarlı bir yeniden epitelizasyon sürecine yol açar. Defektin çevresinde göç eden 3–6 konveks öncü tabaka gelişir ve merkeze doğru ilerler. Daha sonra bu doku tabakaları tüm yüzeyi kaplayacak şekilde birleşirler (Dua ve Forrester, 1987; Charukamnoetkanok, 2006).



Şekil 14. Kornea epitel idamesi için öne sürülen X,Y,Z hipotezi. X=bazal hücre proliferasyonu; Y=hücrelerin sentripedal hareketi; Z=yüzeyden hücre kaybı (Ang ve Tan'dan, 2005)

II.B.2.9.2.c. Kök Hücre Eksikliğinin Neden Olduğu Oküler Yüzey Hastalıkları

Çeşitli kalıtsal ve edinsel hastalıklar limbal kök hücre eksikliğine yol açar. Limbal kök hücrelerin konjenital yokluğu ya da işlevsizliği bulunan kalıtsal hastalıklar ve edinsel nedenler Tablo VII'de verilmiştir (Ang ve Tan, 2005).

Tablo VII. Limbal Kök Hücre Eksikliği Nedenleri (Ang ve Tan'dan, 2005)

Edinsel Durumlar
Stevens-Johnson sendromu
Kimyasal yaralanma
Oküler sikatrisyel pemfigoid
Kontak lense bağlı keratopati
Limbal bölgeye çok sayıda cerrahi ya da kriyoterapi
Nörotrofik keratopati
Periferik ülseratif keratit
Kalıtsal Hastalıklar
Aniridi keratiti
Çoklu endokrin eksiklikler ile birlikte keratopati

Limbal kök hücre eksikliği korneanın anormal epitelizasyonu ve hatalı iyileşmesine neden olur. Karakteristik özellikleri olan geçmeyen ve tekrarlayan epitel defektleri, ülserasyon, kornea vaskülarizasyonu, stroma inflamasyonu ve skarlaşma ile konjonktivalizasyon (konjonktiva epitelinin merkeze ilerlemesi) sonucunda limbal bölgede kornea ve konjonktiva epiteli arasındaki demarkasyon hattı kaybolur. Kornea epitelinin süregelen instabilitesi ve kronik ülserasyon korneanın giderek erimesine ve perforasyona yol açar. Limbal kök hücre eksikliğinin patognomonik özelliği kornea yüzeyinde konjonktiva epitelinin merkeze ilerlemesidir. Korneanın biomikroskopik incelemesinde korneanın donuk olduğu, kornea refleksinin bozulduğu, vaskülarizasyon ve saydamlık kaybı gözlenir (Dua, 2000; Tseng ve ark., 1998; Sridhar ve ark., 2001).

Normalde kornea avaskülerdir fakat birçok neden limbal vasküler pleksusdan kapiller invazyon oluşumuna yol açabilir. Bu yeni kan damarı oluşumu korneal neovaskülarizasyon (NV) olarak adlandırılır. Korneal NV'nin 3 majör kategorisi yüzeysel vaskülarizasyon, fibrovasküler pannus ve derin stromal vaskülarizasyondur. Yüzeysel vaskülarizasyon nadiren görmede azalmaya yol açar. Ancak diğer iki tip korneal NV görme aksını tuttuklarında belirgin görme kaybına yol açabilirler (Charukamnoetkanok, 2006). 1998 yılı verilerine göre tüm dünyada 7 milyondan fazla insan korneal opasite ve vaskülarizasyon nedeniyle görme kaybına uğramıştır (Lee ve ark., 1998).

Kornea NV'sinin kesin nedenleri halen araştırma konusudur. Bu nedenlerden bir tanesi de hasarlı ya da defektif limbal kök hücrelerdir. Kornea epitel kök hücre eksikliği hastaya rahatsızlık verici semptomlar ile seyreden ve körlüğe neden olarak morbiditeye yol açan bir hastalıktır. Bu hastalıklarda, epitel hücrelerinin kornea üzerinde yeniden düzgün bir yüzey oluşturamaması bir kısır döngüyü tetikleyerek skarlaşma ve vasküler invazyona neden olur.

Limbal kök hücre eksikliği lokalize ya da diffüz olabilir (Dua ve Forrester, 1987; Dua, 1995). Lokalize limbal kök hücre eksikliğinde, limbus ve kornea epitelinin bazı bölgeleri normaldir ve konjonktivalizasyon sağlıklı epitelin olmadığı bölgeler ile sınırlıdır. Limbal kök hücre eksikliğinin çok küçük olduğu durumlarda hastalık klinik bulgu vermeyebilir ve komşu sağlıklı limbal dokunun proliferatif kapasitesi kornea yüzeyini onarmak için yeterli olur. Diffüz eksiklik olgularında ise onarım mümkün

değildir, bu nedenle mutlaka tedavi yoluna gidilmelidir (Ang ve Tan, 2005; Charukamnoetkanok, 2006).

Oküler yüzeysel hastalıklarında limbal eksikliğin varlığını saptamak çok önemlidir çünkü bu hastalarda tedavi yöntemlerinden biri olan basit kornea transplantasyonunun başarı şansı çok azdır. Konvansiyonel keratoplasti korneal kök hücreleri yerine koyamaz, bu nedenle kornea grefti yapılan hastalarda komplikasyon gelişme ve greft rejeksiyon riski yüksektir. Ek olarak, bu gözlerde vaskülarizasyon ve kronik stromal inflamasyon, beraberinde göz kapağı sınırında düzensizlik ve keratinizasyon görülebilir (Ang ve Tan, 2005).

Limbusun korneal kök hücrelerin yerleşim yeri olduğu kabul edildikten sonra, limbal transplantasyon kornea kök hücrelerinin eksikliği ile ilgili hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Limbal transplantasyon, kornea epitel yüzeyini onarmada, konjonktiva greftlerinden çok daha etkili bulunmuştur (Kenyon ve Tseng, 1989; Coster ve ark., 1995; Tsai ve ark., 1990; Tsubota, 1997; Tsubota ve ark., 1999). Limbal otogreft transplantasyon genellikle yeterli rezidüel sağlıklı limbal doku bulunan tek taraflı olgular ve bilateral lokalize limbal eksiklik olguları ile sınırlı kalmıştır (Tsubota ve ark., 1999). Tek taraflı limbal kök hücre hastalığında, sağlıklı karşı gözden iki limbal segment (genellikle superior ve inferior) çıkarılır ve hastalıklı gözün yüzey epitelini ortadan kaldırmak için uygulanan yüzeysel keratektomi ve konjonktival peritomi sonrası bu segmentler transplante edilir. Bilateral yaygın hastalığı olanlar için limbal allogreftler akraba canlı vericilerden ya da kadavralardan elde edilir (Dua ve Azuara-Blanco, 1999). Canlı akraba verici olarak sıklıkla HLA uygun birinci derece akraba seçilir ve limbal korneanın iki segmenti alınır. Kadavra vericilerinde tüm 360° limbus, tek halka şeklinde ya da birçok bitişik segment halinde, transplante edilebilir. Limbal eksiklik olan gözler vaskülarize ve inflamedir, göz kapağı düzensizlikleri ve tabaka yırtıkları olabilir. Tüm bu durumlar ve kronik stromal inflamasyon transplantasyon başarısını olumsuz etkiler (Ang ve Tan, 2005). Öte yandan, allojenik transplantasyon yapılan hastalarda greft rejeksiyonunu önlemek için siklosporin, FK506 ya da mikofenolat mofetil ile uzun süreli sistemik immun baskılayıcı tedavi gereklidir (Swift ve ark., 1996).

Oküler yüzeysel hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir diğer yöntem de insan amniotik membranı kullanımudur. Amniotik membran fetal membranların en içte

yerleşmiş olanıdır. Amniotik mezenkim blastokistin ekstraembriyonik mezoderminden köken alır. Işık mikroskopu ile yapılan çalışmalarda amnion membranın kollajenden zengin ortamda fibroblast kümelerinden oluşan zemin üzerinde tek sıra halinde dizilmiş küboidal epidermis benzeri hücrelerden oluştuğu gözlenir (Kubo ve ark., 2001; Li ve ark., 2006). Kolay, ucuz ve bol bulunması, uzun süre saklanabilmesi, insan lökosit antijenleri içermediği için immunolojik reaksiyon oluşturmaması ve bakteriyel kontaminasyonu önleyici etkisiyle göz yüzey cerrahilerinde tercih edilen bir materyaldir. Amnion membranın kalın bir bazal membran ve avasküler stromal matriksten oluşması başarılı bir transplantasyon olanağı sunar. Amniotik membran yara iyileşmesini kolaylaştıracak birçok özelliğe sahiptir ve yara iyileşmesinde etkin olabilecek birçok büyüme faktörü üretir. Bazal membran epitel hücrelerinin göçünü ve adezyonunu kolaylaştırarak yaranın kapanmasını sağlar (Tseng ve ark., 1998; Meller ve ark., 2000). Epitel iyileşmesinin dışında, amniotik membranın antiinflamatuvar özelliği inflamasyonun süresini ve şiddetini azaltır (Ang ve Tan, 2005). Limbal kök hücrenin kısmi eksikliğinde ve oküler yüzeyin rekonstrüksiyonunda amnion membranı bu özellikleri nedeniyle kullanılmıştır (Solomon ve ark., 2002; Ilari ve Daya, 2002).

Kornea yüzey defektlerinin tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri de topikal otolog serum uygulamasıdır. Bu uygulamadaki amaç, biyokimyasal özellikleri gözyaşına yakın olan (pH 7.4, osmolarite 296 mosm/l, EGF 0.5 ng/ml, TGF- β 6–33 ng/ml, Vitamin A 46 mg/ml, lizozim 6 mg/ml, Yüzey IgA 2 mg/ml, Fibronectin 205 μ g/ml) otolog serumun insan kornea fibroblastlarının göçünü ve farklılaşmasını arttırmasıdır. Ayrıca, içerdiği büyüme faktörü ve vitaminlerin epiteliyotrofik etkisi olduğu öne sürülmektedir (Geerling ve ark., 2004; Watson ve ark. 2008).

Limbal epitel kök hücrelerin in vitro ekspansiyonu ve transplantasyonu limbal kök hücre eksikliği tedavisinde yeni bir seçenek oluşturmuştur. Bu işlem için sağlıklı diğer gözden yalnızca küçük bir limbal biopsi alınarak amniotik membran ya da fibrin bazlı substratlar gibi çeşitli maddelerin üzerine ekilerek kompozit greft dokusu elde edilir ve hastalıklı göze transplante edilir (Pellegrini ve ark., 1997; Tsai ve ark., 2000; Koizumi ve ark., 2001; Meller ve ark., 2000; Charukamnoetkanok, 2006). Oküler yüzey kök hücrelerini in-vitro ortamda çoğaltmak için kullanılan en yaygın yöntem serum içeren besi yeri kullanmaktır. Hayvan serumu, fetal bovin serum (FBS) ve kültür ortamında “feeder”-besleyici zemin (hayvan fibroblast hücreleri) kullanmak zoonotik

enfeksiyon ve kseneogreft rejeksiyon riskini de beraberinde getirir (Ang ve Tan, 2005). Bu durumda feeder olarak amnion membranı, besleyici serum olarak da otolog serum kullanmak bu tedavi seçeneğini en güvenli hale getirecek yöntemlerden biri olabilir. Bu yöntemin olumsuzluklarından biri olan verici dokunun “kör” bir biçimde toplanması cerrahi riskleri iki açıdan arttırır. Eğer verici limbal grefti yeteri kadar kök hücre içermezse, cerrahi işlem ya hemen başarısız olacak ya da uzun ömürlü olmayacaktır. Öte yandan, eğer çok fazla kök hücre toplanmışsa, verici gözde limbal kök hücre eksikliğine bağlı sorunlar gelişecektir. Daha fazla araştırma yapmanın zorlayıcı bir kanıtı da bilateral hastalıklarda tek kök hücre kaynağının allojenik verici dokusu (yaşayan akraba ya da kadavra) olmasıdır. Beraberinde güçlü immunsupresif ilaçlar kullanılmasına karşın, allojenik kök hücre naklinin uzun dönem başarı oranı halen düş kırıklığına yol açmaktadır (Charukamnoetkanok, 2006).

Bilateral limbal kök hücre eksikliklerinde allojenik nakillerin uzun dönem sonuçlarının çok iyi olmaması araştırmaları otolog kök hücre kaynaklarını kök hücrelerin farklılaşma, dönüşme özelliklerinden yararlanarak tedavide kullanmaya yönlendirmiştir (Du ve ark, 2003; Ye ve ark, 2006; Ma ve ark, 2006).

Oküler yüzey hastalıklarında, üzerinde uzun yıllardır çalışılan alternatif bir tedavi seçeneği de yapay kornea (keratoprotez, K-pro)’dır. Biyomühendislik ile üretilecek olan ideal yapay korneanın üç temel özelliği olmalıdır: 1) Doğal korneanın optik ve biyomekanik özelliklerini taklit etmeli (kornea toksin ve infeksiyonlara bariyer görevi yapmalı, postoperatif olarak intraoküler basınç ölçümü de dahil olmak üzere göz sağlığı izlemindeki ölçümlerin yapılabileceği özellikleri içermeli) 2) Konuksever olmayan çevrelerde de büyümelidir (immunolojik olarak inert). 3) Yapay kornea alıcı gözü ile dikişsiz olarak bioentegre olmalıdır. K-pro hakkında birçok belirlenemeyen faktörün olması ve bu konuda henüz tatmin edici sonuçlara ulaşılamaması bu tedavi seçeneğinin çıkmazlarındanıdır.

Limbal kök hücre biyolojisi-tedavisi ve otolog kök hücrelerin tedavide kullanımı ile elde edilecek bilgilerin bu sürece de olumlu etkileri olacağı düşünülmektedir (Charukamnoetkanok, 2006). Biz de bu nedenlerle MKH’yi kornea epitelinin onarımında KGF-2 ve OS ile kullanarak MKH’nin limbal kök hücrelere dönüşüm sürecini inceledik

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi ve Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Hücre kültürü aşaması Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Sitogenetik Laboratuvarı, moleküler genetik analiz aşaması Moleküler Genetik Laboratuvarı, hayvan çalışmaları ise Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nde yapıldı. Akım sitometri çalışmaları Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarında, patolojik incelemeler Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Deneyde kullanılan amnion membranı (AM), Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde Kadın Hastalıkları ve Doğum ekibi tarafından onamı alınmış (EK 1) dişi fetus taşıyan gönüllü gebeden sezaryen doğum sırasında alındı. Çalışma araştırma planında olan dört grup için onar adet dişi, kemik iliği donörü olarak kullanılacak yirmi adet erkek, ön çalışmada kullanılan iki adet dişi ve ayrıca dört adet yedek dişi sıçandan oluşmak üzere toplam 66 adet 180–200 g. erişkin “Sprague Dawley” cinsi sıçan ile gerçekleştirildi. İki hayvan deneyin başlangıcında ön çalışma için kullanılırken dört adet dişi sıçan ise araştırma gruplarında transplantasyondan önce ölen sıçanların yerine kullanıldı.

Tez çalışmalarına başlamadan önce Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan ve Hayvan Etik Kurul Başkanlığı'ndan yazılı olarak izin alındı (Ek 2A - 2B).

III.A. DENEYDE KULLANILAN CİHAZLAR , KİMYASAL MADDELER VE ÇALIŞMA SOLÜSYONLARI

III.A.1. Tıbbi ve Cerrahi Araştırmalar Merkezinde Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları

III.A.1.1. Cihazlar

- Mikrocerrahide kullanılan cerrahi araçları
- Biomikroskop (mikrocerrahide kullanılan cerrahi mikroskop) (Zeiss, Almanya)

III.A.1.2. Kimyasal Maddeler

- NaOH (Merck, Almanya)
- Floresein damla (Sigma-Aldrich, St. Louis, [http://www. Sigma-aldrich.com](http://www.Sigma-aldrich.com))
- Eter (Merck, Almanya)
- Ksilazin Flakon (Merck, Almanya)
- Alkain Damla (Sanofi, Türkiye)

III.A.2. Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları

III.A.2.1. Cihazlar

- Santrifüj (Heraeus, Almanya)
- CO₂ İnkübatörü (Hera-cell, Almanya)
- Hücre Kültür Kabini (Nuair, Almanya)
- İnvart Mikroskop (Zeiss-Axiovert 100, Almanya)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

III.A.2.2. Kimyasal Maddeler

- “Dulbecco’s modified Eagle’s medium “ LG /DMEM-LG (Biological İndustry, İsrail)
- %50 Gliserol (Merck, Almanya)
- Tripsin-ETDA C (Sigma-Aldrich, St. Louis, [http://www. Sigma-aldrich.com](http://www.Sigma-aldrich.com))
- Penisilin-Streptomisin (Sigma-Aldrich, St. Louis, [http://www. Sigma-aldrich.com](http://www.Sigma-aldrich.com))
- Fosfat buffer salin /PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, [http://www. Sigma-aldrich.com](http://www.Sigma-aldrich.com))
- Fetal bovin serum /FBS (Hyclone, Logan, UT, <http://www.hyclone.com>)
- L-Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, [http://www. Sigma-aldrich.com](http://www.Sigma-aldrich.com))
- Ficoll solüsyonu /1.077 g/mL (Merck, Almanya)
- Dimetil Sülfoksit/DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, [http://www. Sigma-aldrich.com](http://www.Sigma-aldrich.com))
- KGF-2 (Biocience, Almanya)

III.A.2.3. Çalışma Solüsyonları

MKH Besi Yeri: 100 ml besi yeri için,

- 20 ml FBS
- 2 ml L-Glutamin
- 1 ml Pen-Sterp
- 77 ml DMEM-LG

MKH Saklama (Kriyo Tüp) Besi Yeri: 10 ml saklama besi yeri için,

- 7 ml DMEM-LG
- 2 ml FBS
- 1 ml DMSO

Amnio Membranı Saklama Besi Yeri: 100 ml besi yeri için,

- 50 ml %50 gliserol
- 50 ml DMEM- LG

III.A.3. Çocuk Hematoloji Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar, Kimyasal Maddeler ve Çalışma Solüsyonları

III.A.3.1. Cihazlar

- FACSCalibur TM (Becton Dickinson and Company)
- Cell Quest Software (Becton Dickinson and Company, immunsitometri sistemi, Mac OS X10.3.6/7R28)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

III.A.3.2. Kimyasallar (Biyomoleküller)

- CD11b/c [İntegrin $\alpha_M\text{-}\alpha_X$ chains/OX-42, R-Phycoerythrin (R-PE)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD45 [Leukocyte Common Antigen/Ly-5, (PE)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD90 [Thy-1, Flurescein Isothiocyanate (FITC)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD106 [Vascular Cell Adhesion Molecule-1/VCAM-1,(R-PE)] (BD Pharmingen, San Diego)
- CD44 [Hyaluronate Receptor Cell Adhesion Molecule/H-CAM, (FITC)] (BD Pharmingen, San Diego)

III.A.3.3. Çalışma Solüsyonları

Yıkama Solüsyonu: 100 ml için,

- 0.1 ml Na azid
- 99.9 ml PBS

III.A.3.3.a. Akım Sitometri Cihazı ile Tanımlamada Kullanılan Yöntem

Her hücre dizini için 6 tüp kullanıldı. Tüplerin üzerine sırayla yüzey belirteçleri ve kontrol (otofloresan kontrol/hücrelere hiçbir yüzey belirteci eklenmeden hazırlanan tüp) yazılarak etiketlendi. Daha sonra tüplere hücre konsantrasyonu 1×10^6 olacak şekilde 100'er μl hücre süspansiyonu konulup 10'ar μl yüzey belirteçleri eklenerek vortekslendi. 15 dakika 4°C 'de karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyondan sonra üzerine 1 ml yıkama solüsyonu eklenerek 1400 dakika/devir'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücre çökeltisine tekrar 0.5 ml yıkama solüsyonu eklenerek akım sitometri cihazında tanımlandı.

III.A.4. Moleküler Genetik Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

III.A.4.1. Cihazlar

- Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)
- Yatay elektroforez sistemi (Scie-Plas, İngiltere)
- Elektroforez güç kaynağı (Wealtec, Tayvan)
- UV transilluminator (Uvitec-BTX-26-M, İngiltere)
- UV görüntü analiz sistemi (Biolab-UVIPhoto MW, İngiltere)
- Mikrosanrifüj (Hettich, Almanya)
- Su banyosu (Nüve, Türkiye)
- Hassas terazi (Mettler AJ 100, Almanya)
- pH metre (Hanna, Almanya)
- Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya; Capp, Danimarka)
- Vorteks (Nüve, Türkiye)

III.A.4.2. Kimyasal Maddeler

- Tris (Merck)
- Borik asit (Sigma)
- EDTA, sodyum tuzu (Merck)
- Nü mikropor (Prona)
- Magnezyum klorür (Gen Tag)
- Etidyum bromür (Sigma)
- Taq DNA polimeraz enzimi (Gen Tag)
- 10 X PCR buffer (Gen Tag)
- Deoksiribonükleosid trifosfatlar (dNTPs, Fermentas)
- PCR Primerleri (Alpha DNA)
- DNA belirteçi pUC19/MSPI (baz aralığı: 501-489, 404, 331, 242, 190
147, 111-110, 67, 34)

III.A.4.3.a. Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

0.5M EDTA, pH 8.0:

- 18.61 g disodyum EDTA.
- 80 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- Solüsyona 2 g NaOH tableti atılarak eritilir.
- pH 8'e ulaştığında bidistile H₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Otoklavda steril edilir.
- Oda ısısında saklanır.

1M Tris pH 7.5:

- 12.11 g Tris-bazı.
- 80 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- pH HCl ile 7.5'a ayarlanır.
- Bidistile H₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.
- Otoklavda steril edilir.
- Oda ısısında saklanır.

10X TBE (Stok solüsyon):

- 108 g Tris-bazı (0.9M).
- 55 g Borik asit (0.9M).
- 40 ml 0.5M EDTA, pH 8.0 (20 mM).
- Tris-base ve borik asit 700 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- EDTA eklenir.
- Bidistile H₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.
- Oda ısısında saklanır.

1X TBE (Çalışma solüsyonu):

- 100 ml 10X TBE stoktan.
- 900 ml bidistile H₂O eklenir.

Etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml):

- 10 ml bidistile H₂O içinde çözülür.
- Isık almayan bir sise içinde +4 °C 'de saklanır.
- Stok solüsyondan, çalışma solüsyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde hazırlanır.

%2 Nü Mikropor Jel Hazırlanışı:

- 2 gr nü mikropor
- 100 ml 1X TBE içinde çözdürülüp kaynatıldıktan sonra
- 75 °C'de 100µl (10mg/ml) etidyum bromür eklenir ve karıştırılıp sete dökülür.
- Jel soğuyunca gerektiğinde kullanılmak üzere +4 °C 'te saklanır.

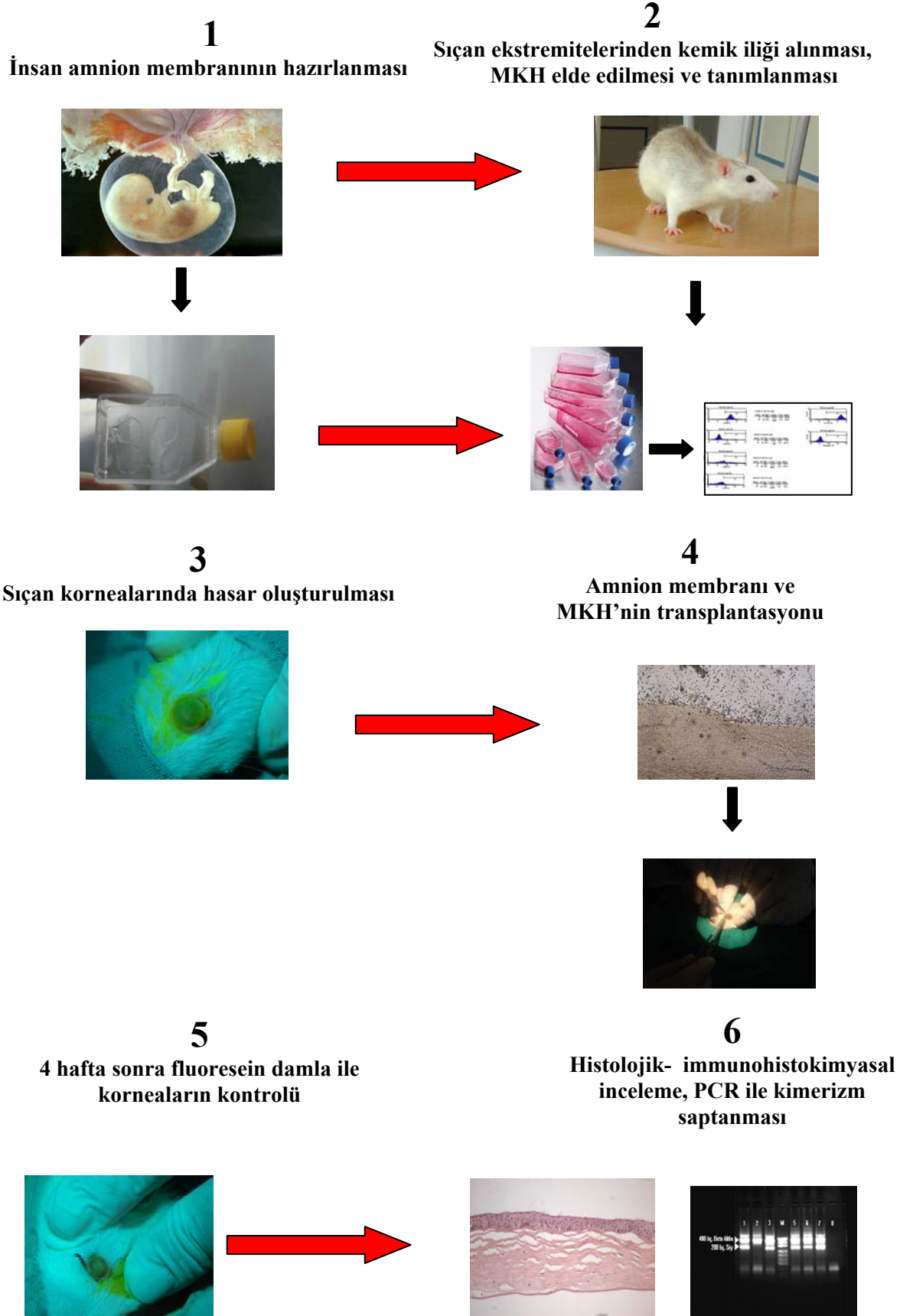
III.A.4.3.b DNA izolasyonu

Dokudan DNA izolasyonu FavorPrep (Favorgen) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kit kullanılmadan önce Proteinaz K (lyofilize 10mg) tüpünün içerisine 1 ml steril bidistile H₂O eklenerek 10 mg/ml'lik stok solüsyonu elde edildi. Daha sonra dört ayrı eppendorf tüpüne 250'şer µl olacak şekilde dağıtılarak, gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'te saklandı. Ayrıca yıkama tamponuna (Wash Buffer) 25 ml (her iki tampona toplam 50 ml) etanol (%96 - %100) eklenerek oda ısısında muhafaza edildi. Kitin standart yöntemi (25 mg taze doku parçası için) uygulanırken kornealardan DNA izolasyonu için alınan her doku parçası hassas terazide tartılarak solüsyonların oranları yeniden hesaplandı. DNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.

1. 25 mg'lık taze doku parçası mikrosantrifüj tüpüne alındı.
2. Parçalama çubuğu yardımıyla küçük parçalara ayrılıp ezildi.
3. 200 µl FATG1 (hücre lizis tamponu) tamponu konulup parçalama çubuğu ile ezilerek homojen hale getirildi.
4. 20 µl proteinaz K (10mg/ml) eklenip vortekslendi.
5. 60 °C'de bir saat su banyosunda her 15 dakikada bir vortekslenerek dokunun tamamen parçalanması sağlandı. Ardından çöktürme (2000 devir/dakika (rpm)'ya gelene kadar birkaç saniyelik santrifüj işlemi) yapıldı.
6. 200 µl FATG2 (hücre lizis tamponu) tamponu eklenip vortekslenerek 70 °C'de on dakika su banyosunda tutulup ardından yeniden çöktürme yapıldı.

7. 200 µl etanol eklenerek vortekslenip bir kez daha çöktürme yapıldı.
8. Solüsyon FATG kolonuna alınarak bir dakika 13.000 devir/dakika santrifüj edildikten sonra kolon temiz tüpe aktarıldı.
9. Kolona 500 µl yıkama tamponu eklenip bir dakika 13.000 devir/dakika santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrar edildi.
10. Son santrifüjden sonra kolonun altındaki sıvı dökülerek tekrar üç dakika 13.000 devir/dakika santrifüj edildi.
11. FATG kolonu süzme (elution) tüpüne alınarak 200 µl süzme tamponu eklenerek iki dakika oda ısısında beklendi.
12. Bir dakika 13.000 devir/dakika son kez santrifüj edildikten sonra kolon atıldı ve içinde izole edilmiş DNA bulunan tüp gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C 'de saklandı.

III.B. GEREÇ ve YÖNTEMİN ŞEMASI



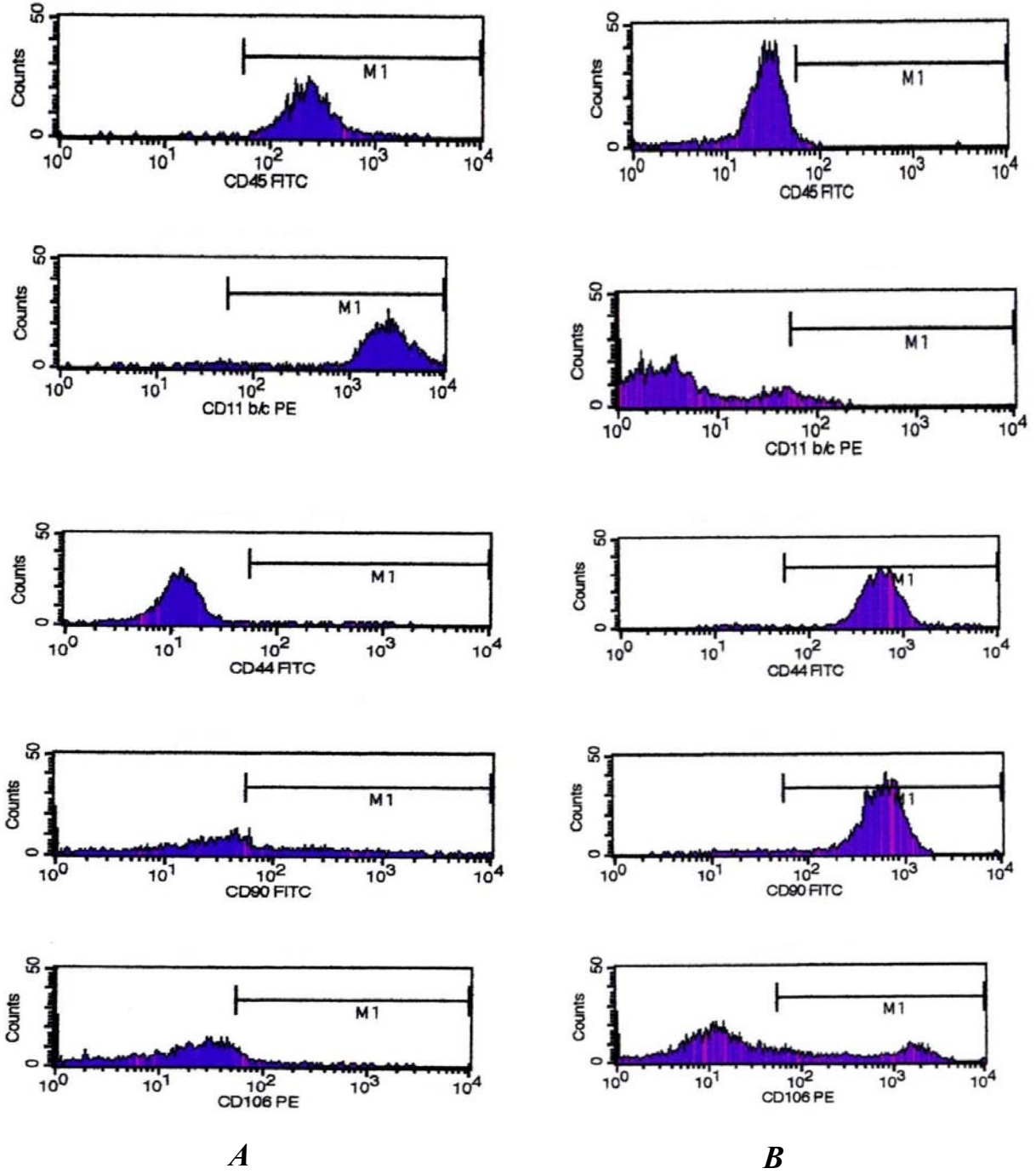
III.C. İNSAN AMNİON MEMBRANININ HAZIRLANMASI

Onamı alınmış dişi fetus taşıyan gönüllü gebeden sezaryen doğum sırasında amnion membranı (AM) alınarak içinde 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin bulunan fosfat buffer salin (PBS) ile yıkandı. Epitel ve bazal membranın diğer dokulardan ayrılmasından sonra 4 ayrı parçaya ayrılan AM %50 gliserol içeren düşük glikozlu (1g/L) DMEM- LG içinde (-80 °C)'de saklandı. Kullanımdan önce, amnion epitelini çıkarmak için AM %0.25 tripsin içinde %0.02 EDTA (Tripsin-ETDA C) bulunan küçük küvetlerde 25–30 dakika süre ile işleme tabi tutuldu. Bu uygulamadan sonra saflaştırılmış AM kullanıma hazır hale geldi (Kubo ve ark., 2001; Du ve ark., 2003; Ma ve ark., 2006).

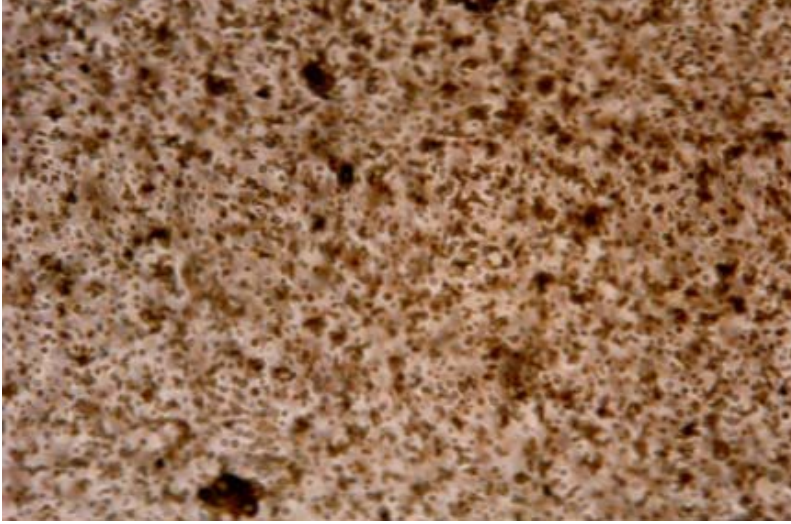
III.D. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE ELDE EDİLMESİ

Erkek donör deney hayvanlarından eter inhalasyonu ile anestezi altında eksternal intrakardiyak yol ile her birinden 10 ml kan alınarak 4000 devir/dakika (rpm)'da 10 dakika santrifüj edilerek otolog serum elde edildi. Eter inhalasyonuna devam edilerek deney hayvanları öldürülüp, femur ve tibialarından yıkama yöntemi ile kemik iliği alınabilmesi için kemiklerin medüller kaviteleri insülin enjektörü kullanılarak DMEM-LG besiyeri ile her hayvan için toplam 10ml olacak şekilde yıkandı. DMEM-LG içeren hücreler eşit hacimdeki Ficoll solüsyonu üzerine tüp içerisinde yayıldı. Elde edilen solüsyondan mononükleer hücreleri ayırmak amacıyla dansite gradiyent yöntemi kullanılarak (Şahin, 2006) 900 devir/dakika'da 30 dakika süre ile santrifüj edildi. İnterfazdan toplanan mononükleer hücrelerden 3ml'si akım sitometri cihazında hematopoetik ve mezenkimal kök hücre belirteçleri; CD11b/c, CD45, CD90, CD106, CD44 kullanılarak CD11b/c [%97 (+)], CD45 [%99 (+)], CD90 [%34 (+)], CD106 [%11 (-)], CD44 [%1 (-)] olduğu gösterilip tanımlandı (şekil 15). Geri kalan 7 ml hacmindeki kısım 200 mL/L FBS, 100 U/mL penisilin ve 100 Ug/mL streptomisin ve 20 mL/L L-Glutamin eklenmiş 3ml'lik DMEM-LG besiyeri içinde 25 cm²'lik (T25) hücre kültür kaplarına 10⁶/mL konsantrasyonunda ekildi. Hücreler 37⁰C ve 50 mL/L CO₂ içeren %95 nem oranına sahip ortamda inkübe edildi. Besi yeri, ilk 3 gün her gün, sonrasında besi yeri 5ml'ye çıkarılarak 3–4 günde bir değiştirildi. 14.günde invert mikroskopda CFU-F'ler gözlendikten sonra (Şekil 16) kültür kaplarına 1.5ml'lik Tripsin-EDTA-C konularak öncesinde ve sonrasında 2'şer dakikalık elle vurma yöntemi

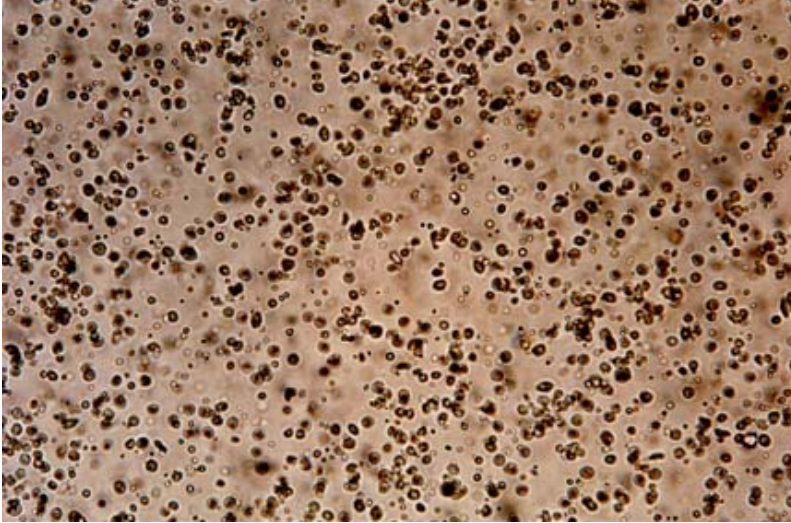
uygulanıp 5 dakika 37 C'lik inkubatörde tutulduktan sonra 5 kez pasajlandı (Şekil 16). Çoğaltılan 8 kültür kabından Tripsin-ETDA-C ile kaldırılan hücreler süspansiyon haline getirilip 1 saat içinde akım sitometri cihazında kemik iliği kökenli hematopoetik ve mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri tekrar kullanılarak [CD11b/c [%5 (-)], CD45 [%1(-)], CD90 [%97 (+)], CD106 [%30 (+)], CD44 [%97 (+)] yeniden tanımlandı (Şekil 15). Tanımlamada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Hematoloji laboratuvarında bulunan FACSCalibur TM cihazı kullanıldı. Pasajlanarak çoğaltılan diğer hücre kültürleri deneyde daha sonra kullanılmak üzere yine her kültür kabına 1.5ml'lik Tripsin-ETDA-C konularak kaldırılıp süspansiyon haline getirildikten sonra %10 DMSO ve %20 FBS içeren DMEM -LG'den 1.5ml eklenerek 2ml'lik kriyotüpte (-80 °C)'de saklandı.



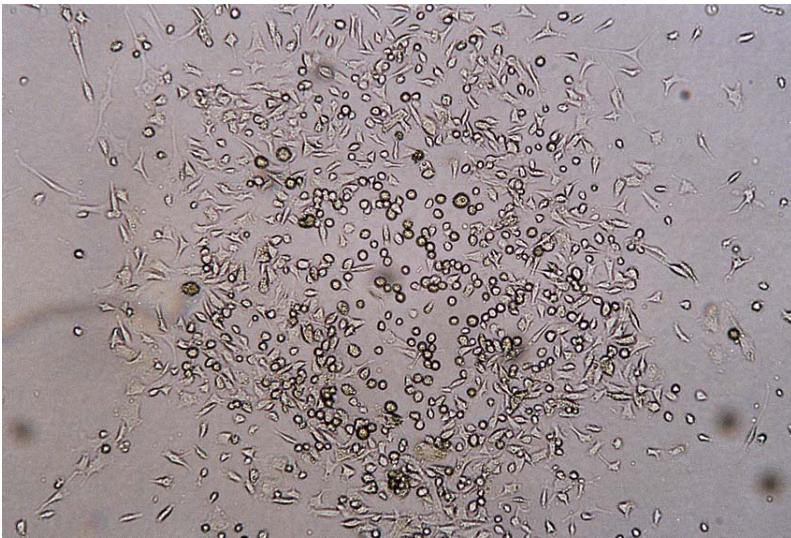
Şekil 15. Akım sitometri cihazında, kemik iliği hücrelerinin (*A*); [CD45 (+) ve CD11b/c (+)] mezenkimal kök hücrelere farklılaşmasının (*B*); [CD44(+), CD90(+), ve CD106 (+)] Histogram Grafiği ile gösterilmesi.



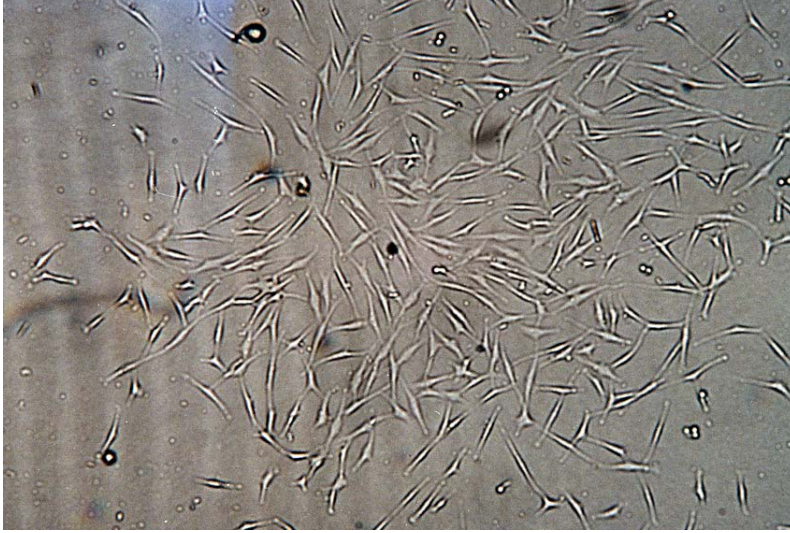
Şekil 16a. Kemik iliğinden mononükleer hücreler ayrıştırılıp ekildikten sonra 1. gün invert mikroskop görüntüsü (Zeiss –Axiovert 100/ X10)



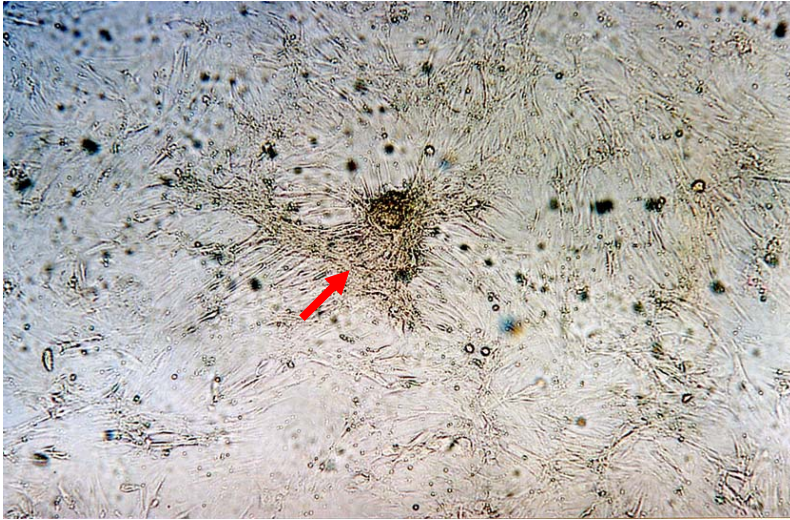
Şekil 16b. Kemik iliğinden mononükleer hücreler ayrıştırılıp ekildikten sonra 3.gün invert mikroskop görüntüsü (Zeiss –Axiovert 100/ X10)



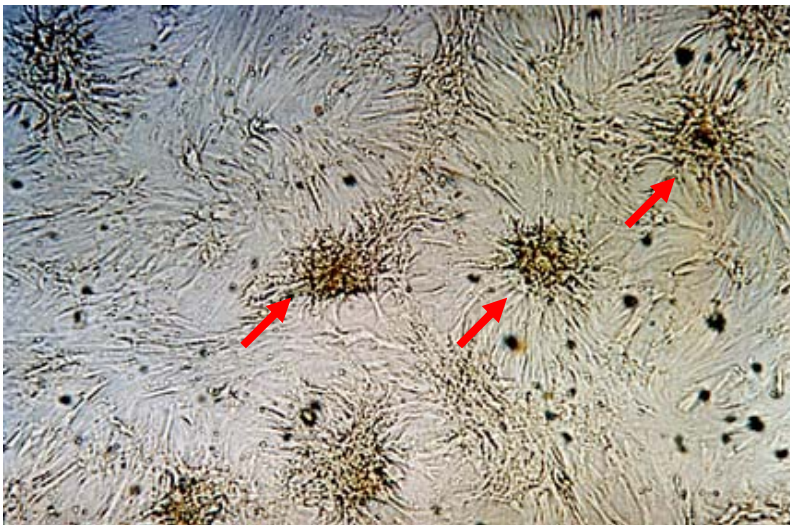
Şekil 16c. Kemik iliğinden mononükleer hücreler ayrıştırılıp ekildikten sonra 7.gün, (fibroblastların oluşması) invert mikroskop görüntüsü (Zeiss – Axiovert 100/ X10)



Şekil 16d. Kemik iliğinden mononükleer hücreler ayrıştırılıp ekildikten sonra 9.gün (fibroblast kolonilerinin oluşmaya başlaması) invert mikroskop görüntüsü (Zeiss –Axiovert 100/ X10)



Şekil 16e. Kemik iliğinden mononükleer hücreler ayrıştırılıp ekildikten sonra 12.gün [CFU-F’ler (kırmızı ok)] invert mikroskop görüntüsü (Zeiss –Axiovert 100/ X5)



Şekil 16f. Kemik iliğinden mononükleer hücreler ayrıştırılıp ekildikten sonra 15.gün [CFU-F odakları (kırmızı oklar)] invert mikroskop görüntüsü (Zeiss –Axiovert 100/ X5)

III.E. SIÇAN KORNEALARINDA HASAR OLUŞTURULMASI

Dişi deney hayvanlarının sağ gözlerine 1 N (mol L⁻¹) NaOH emdirilmiş iç çapı 4 mm ve dış çapı 8 mm olan halka şeklinde filtre kağıdı 30 saniye süre ile eter anestezisi altında temas ettirilerek kornea hasarı oluşturulup sonrasında hızla serum fizyolojik ile 20 saniye süre ile yıkandı (Ormerod ve ark., 1989). Geriye kalan limbus ve santral epitel bölgesi de cerrahi olarak çıkarıldı. Opere edilen göze inflamasyon ve infeksiyonu önlemek amacı ile günde iki kez deksametazon ve gentamisin damlatıldı. Yanık oluşturulan gözde infeksiyon, hifema, korneal fistül, fitizis ya da hipopyon gelişen 4 sıçan çalışma dışı bırakıldı (Ma ve ark., 2006).

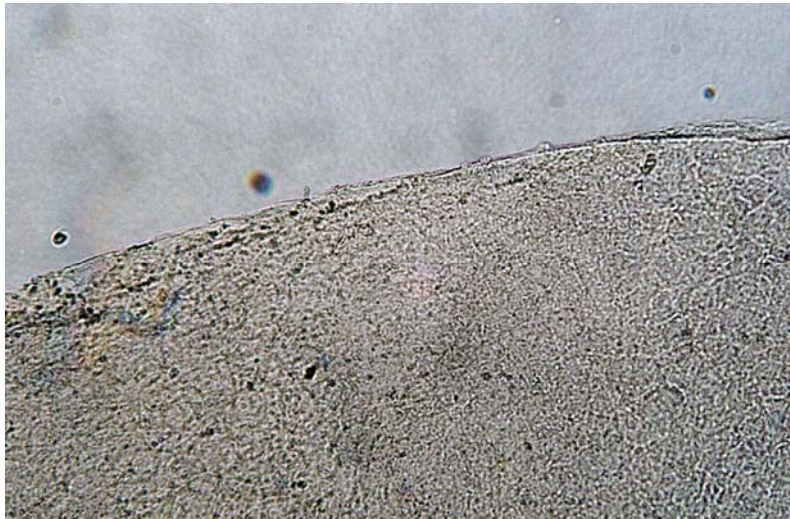
III.F. AMNİON MEMBRANI VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN TRANSPLANTASYONU

Daha önce alınıp epitel ve bazal membranın diğer dokulardan ayrılmasından sonra %50 gliserol içeren DMEM-LG içinde (-80 °C)'de 4 ayrı parça halinde saklanan AM'ler sıra ile çözündürülerek amnion epitelini çıkarmak %0.25 tripsin içinde %0.02 EDTA ile 25–30 dakika süre ile işleme tabi tutulup çapları 1.2 cm'lik yuvarlaklar olacak şekilde kesildi (Şekil 17).

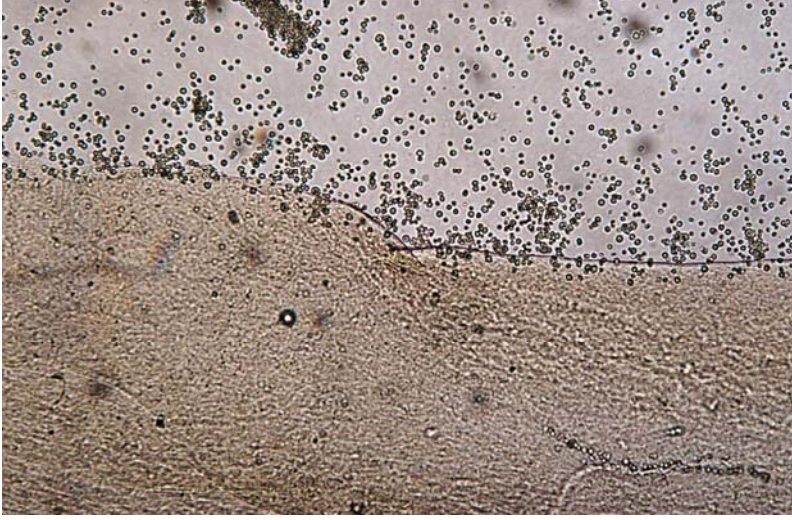


Şekil 17. 1.2 cm'lik diskler haline getirilerek kültür kabına yerleştirilen AM'ler

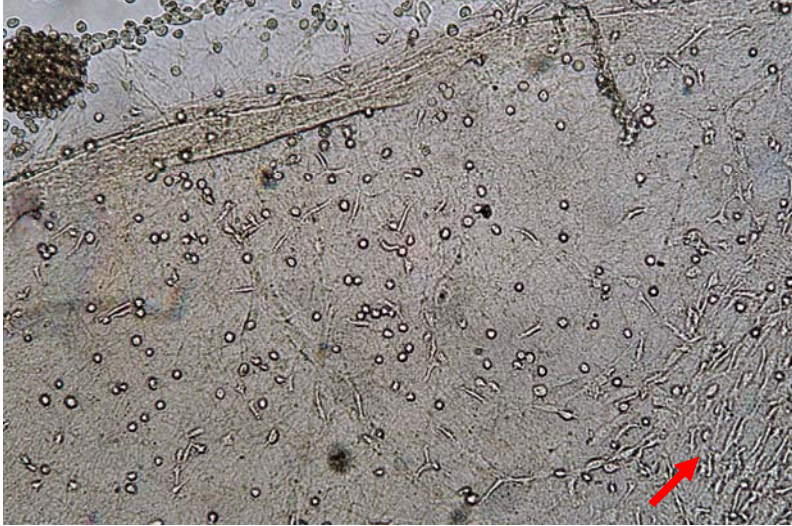
Diskler halinde getirilen AM'ler korneaları zedelenmiş ve floresein damla ile bir hafta boyunca iyileşmedikleri gösterilen on dişi sıçanın kornea bölgelerine nakledildi. Nakilden sonra deney hayvanlarının göz kapakları sütüre edilip işlemden on gün sonra sütürler alındı. Deneyde Grup 4 olarak adlandırılan bu sıçanların gözlerine nakilden sonra günde 4 defa olmak üzere Gentamisin ve Deksametazon damla damlatıldı. Nakilden 4 hafta sonra nakledilen amnion membranları kaldırılarak %0,9'luk NaCl ile bolca yıkanıp 24 saat beklenildi. Bu sürenin ardından floresein damla ile iyileşme olmadığı gösterilip sıçanlar sakrifiye edildi. Bu işlemden sonra kornea tabakası çıkarılıp yarısı patolojik inceleme, diğer yarısı da DNA elde etmek üzere kullanıldı. Bir diğer AM parçası kullanımdan önce, amnion epitelini çıkarmak için %0.25 tripsin içinde %0.02 EDTA ile 25–30 dakika süre ile işleme tabi tutuldu. Bu uygulamadan sonra saflaştırılmış AM T75'lik ve T25'lik kültür kaplarına çapları 1.2 cm'lik yuvarlaklar olacak şekilde kesilerek yerleştirildi ve üzerlerini kaplayacak kadar, içerisine 200 mL/L FBS, 100 U/mL penisilin ve 100 Ug/mL streptomisin ve 20 mL/L L-Glutamin ilave edilmiş DMEM-LG eklenip bir gün %5'lik CO2 inkübatöründe bekletildi. Amnion membranlarının yüzeye yapıştığı gözlenince daha önceden elde edilip akım sitometri ile tanımlanan mezenkimal kök hücreler her amnion diskinin üzerine yaklaşık olarak 1×10^5 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. Bir haftalık inkübasyondan sonra bu membranlar Grup 1 olarak adlandırılan, üzerinde yalnızca mezenkimal kök hücre olan amnion membranlarının nakledileceği sıçanlara uygulandı. Çalışmada kullanılan diğer amnion membranları da yine aynı işlemlerden geçirilerek Grup 2 için her kültür kabına içerisinde 200 mL/L FBS, 100 U/mL penisilin, 100 Ug/mL streptomisin, 20 mL/L L-Glutamin ve 1 microg/ml keratinosit büyüme faktörü-2 (KGF-2), Grup 3 için ayrıca 20ml/L'lik otolog serum eklenmiş DMEM-LG konularak 1 hafta inkübe edildi (Ma ve ark., 2006) (Şekil 18).



Şekil 18a. Boş amnion membranı
(Zeiss –Axiovert 100/ X10)



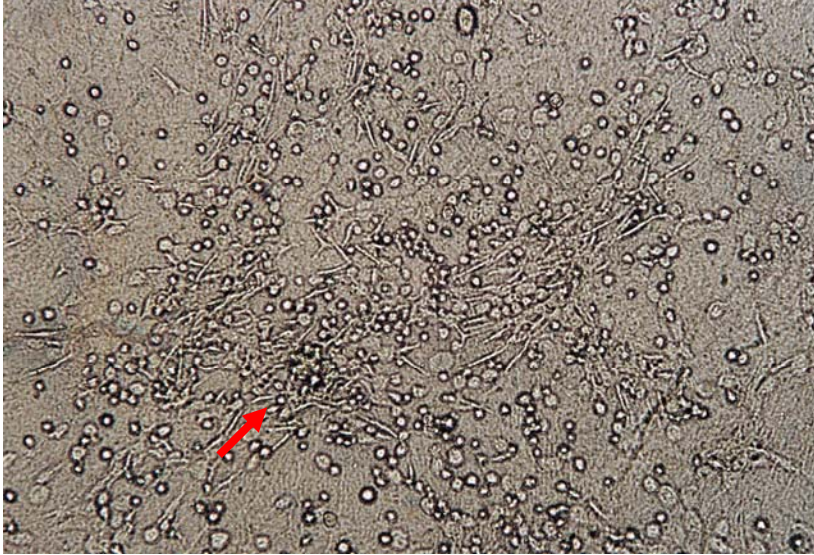
**Şekil 18b. Amnion
membranı üzerine MKH
göçünün başlaması
(Zeiss -Axiovert 100/ X10)**



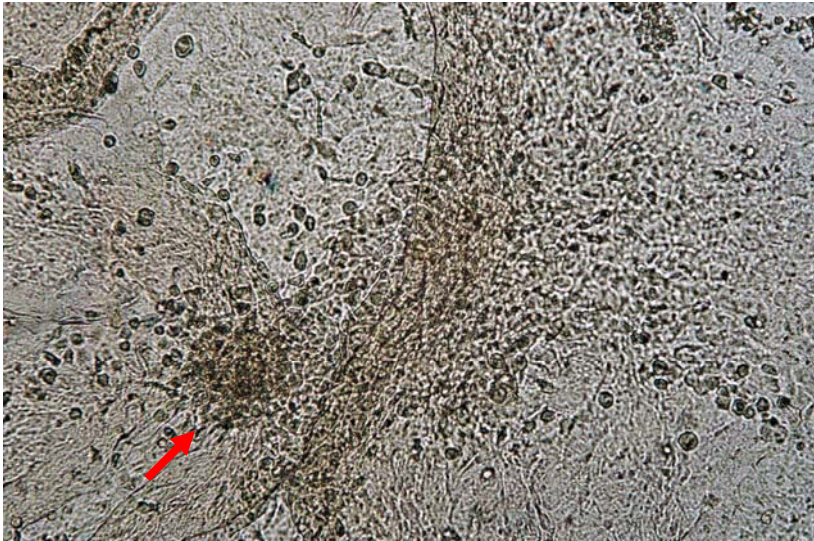
**Şekil 18c. Amnion
membranı üzerine
MKH'lerin yerleşmesi
(kırmızı ok)
(Zeiss -Axiovert 100/ X10)**



**Şekil 18d. Amnion
membranı üzerinde
MKH'lerin çoğalması ve
koloni oluşumunun
başlaması (kırmızı ok)
(Zeiss -Axiovert 100/ X10)**



**Şekil 18e. Amnion
membranı üzerinde
MKH'lerin koloni
oluşturması (kırmızı ok)
(Zeiss –Axiovert 100/ X10)**



**Şekil 18f. Amnion
membranı üzerinde CFU-
F'ler (kırmızı ok)
(Zeiss –Axiovert 100/ X10)**

Bu sürenin sonunda membranlar, korneaları zedelenmiş ve floresein damla ile bir hafta boyunca iyileşmedikleri gösterilmiş, çalışmada Grup 2 ve Grup 3 olarak adlandırılan sıçanlara nakledildi. Nakilden sonra deney hayvanlarının göz kapakları sütüre edilip işlemden on gün sonra sütürler alındı. Nakilden sonra günde 4 defa olmak üzere Gentamisin ve Deksametazon damla damlatıldı. 4 hafta sonra nakledilen amnion membranları kaldırılarak %0,9'luk NaCl ile bolca yıkanıp 24 saat beklenildi. Bu sürenin ardından floresein damla ile iyileşme olup olmadığı gösterilip sıçanlar sakrifiye edildi. Bu işlemden sonra kornea tabakası çıkarılıp yarısı patolojik inceleme, diğer yarısı da DNA elde etmek üzere kullanıldı.

III.G. ARAŞTIRMA GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ

Sıçanlar dört gruba ayrıldı:

I. Grup'da deney hayvanlarının kornea defekti oluşturulmuş gözlerine sıçan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler ekilmiş olan amnion membranı transplante edildi.

II. Grup'da deney hayvanlarının kornea defekti oluşturulmuş gözlerine KGF-2 (1 µg/ml) eklenerek bir hafta besi yerinde inkübe edilen mezenkimal kök hücreler ekilmiş amnion membranı transplante edildi.

III. Grup'da deney hayvanlarının kornea defekti oluşturulmuş gözlerine KGF-2 (1 µg /ml) ve otolog serum (20ml/L) eklenerek bir hafta besiyerinde inkübe edilen mezenkimal kök hücreler ekilmiş amnion membranı transplante edildi.

IV. Grup'da deney hayvanlarının kornea defekti oluşturulmuş gözlerine yalnızca amnion membranı transplante edildi.

III.H. İNCELENEN PARAMETRELER

III.H.1. Beyaz ve Mavi Işıktaki İnceleme

Sıçan korneaları nakilden sonra berraklık ve neovaskülarizasyon açılarından da dıştan muayene ile kontrol edildi. Deney sonlandırıldıktan sonra sıçan korneaları doğrudan tutulan beyaz ışık altında kornea saydamlığı ve neovaskülarizasyon açılarından incelendi. Kornea berraklığı değerlendirmesi sonucunda kornealar 3 alt gruba ayrıldı: 1) Tam saydam kornea 2) Berrak olmayan iris 3) Pupilin görülememesi. Neovaskülarizasyon değerlendirmesi sonucunda da kornealar 3 alt gruba ayrıldı: 1) Neovaskülarizasyon izlenmedi 2) Limbustan başlayan ve ≤2mm uzaklığa ulaşan neovaskülarizasyon 3) Limbustan başlayarak >2mm uzaklığa ulaşan neovaskülarizasyon (Ma ve ark., 2006). Deney süresince nakilden önceki hafta 2 defa ve deneyin bitiminde 1 defa olmak üzere toplam 3 defa sıçan kornealarına fluoresein solüsyonu damlatılarak mavi ışık altında korneal epitel hücrelerin bütünlüğü kontrol edildi. Fluoresein damlatıldıktan sonra 1 dakika beklenerek kornea epitelinin hasarında fluoresein damlatılan alanın yeşil görünmesi prensibine dayanarak, hasar oranı üç kategoride değerlendirildi: 1) Korneanın 1/4'ünden az (0 - <1/4) 2) Korneanın 1/4'ü ile 1/2'si arası 3) Korneanın 1/2'sinden fazla (> 1/2).

III.H.2. Histolojik Boyama

Deneyin sonunda çıkarılan kornealar fikse edilmeden önce dokudan DNA izolasyonu yapılmak üzere materyel alınıp ve kalan doku histoloji ve immunhistokimya boyaları için %4

formaldehid ile fikse edilip parafin bloklar halinde hazırlandı. Hazırlanan preparatlar hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyandı. Fikse edilen kornea dokularından yapılan histopatolojik ve immunhistokimyasal çalışmalar ile kornea epitelinin yeniden oluşup oluşmadığına bakıldı (Ma ve ark., 2006). Sonuçlar Leica HMLB45 (Leica, Germany, 2000) ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Her grupta korneal epitel hasarı değerlendirilerek:

1) epitelizasyon tam (hasar yok), 2) epitelin %50'inden azı hasarlı 3) epitelin %50'sinden fazlası hasarlı olarak 3 grupta derecelendirildi.

III.H.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Dokuların tümü, %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonunda 24 saat fikse edilerek parafinde bloklandı. Her blokdan 4 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak pansitokeratin (Klon AE1/AE3, LabVision) ve sitokeratin 19 (Klon Ks19.1, LabVision) primer antikorlarıyla, streptavidin biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal çalışma yapıldı. Deparafinize edilen kesitlerin endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilerek giderildi. Bundan sonra kesitler sitrat tamponu içerisinde 30 dakika kaynatılıp oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. Kesitlere 5'er dakika blok antikor, sonrada 1'er saat primer antikorlar uygulandı. Biotinli anti-immünglobulin ve streptavidin-peroksidaz konjugat ile 10'ar dakika inkübe edildi. Renklendirici ajan olarak 3,3'-diamino benzidin (DAB) içeren kit (DAKO, Carpinteria, USA) kullanıldı. Son olarak kesitler Mayer hematoksilen ile 60 saniye boyandı. Kesitler DAB uygulamasına kadar tüm aşamalarda pH 7,6 fosfat tamponu ile, DAB uygulamasından sonra ise distile su ile yıkandı. İşlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Sonuçlar Leica HMLB45 (Leica, Germany, 2000) ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Projede yer alan diğer sitokeratin, K14 (Klon Ks19.1, LabVision) kullanım kılavuzuna (data sheet) uygun şekilde, değişik antijen geri kazanım metodları ve primer antikor için farklı dilüsyon oranları denenmesine rağmen çalıştırılmadı.

III.H.4. DNA İzolasyonu ve SRY Geninin Saptanması

Kornea dokularından genomik DNA DNeasy doku kiti- FavorPrep (Favorgen) kullanılarak elde edildi. Alıcı dişi sıçanların korneasında Y kromozom üzerindeki cinsiyet belirleyici *SRY* geninin varlığı ya da yokluğu PCR ile çalışıldı. Tüm dokularda DNA'nın varlığı internal kontrol olarak bir "house-keeping" gen olan *β -aktin*'in çalışılması ile değerlendirildi. *SRY* ve *β -aktin* genin PCR ürünlerinin primer dizileri daha önce yayınlanmış çalışmalardan yararlanılarak belirlendi (Ise ve ark., 2004).

SRY primeri olarak (sense 5'-CAGAGATCAGCAAGCATCTGG-3'; antisense 5'-TCTGGTTCTTGGAGGACTGG-3') *β -actin* primeri olarak ise (sense 5'-AGAGAAGCTGTGCTATGTTG3'; anti-sense 5'-GTACTCCTGCTTGCTGATCC-3') kullanılarak *SRY* geninin 288 baz çiftlik PCR ürünü, *β -aktin* geninin 488 baz çiftlik PCR ürünü çoğaltıldı.

Amplifikasyon reaksiyonu 25 μ l toplam hacim içinde, 1x reaksiyon tamponu [10mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, %0.001'lik jelatin], 3.0 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP karışımı, *SRY* primeri 0.2 μ M, *β -aktin* primeri 0.15 μ M, 200 ng genomik DNA ve 1.5 ünite *Taq polimeraz* eklenerek gerçekleştirildi. 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben; 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 57°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 60 saniye uzatma olmak üzere termal döngüleme cihazında toplam 37 döngü PCR uygulandı. PCR ürünleri %2 nü-mikropor jel elektroforezde etidium bromid ile boyanarak görüntülendi. DNA belirteci olarak pUC19/MspII kullanıldı. Erkek sıçandan elde edilen MKH verildiği halde *SRY* genine ait PCR ürünleri gözlenmeyen örnekler üçer kez çalışıldı. Her analize pozitif (sağlıklı erkek sıçan korneasından elde edilen DNA) ve negatif kontroller eklendi (Bryja ve Konecny, 2003; Ise ve ark., 2004).

III.H.5. İstatistik Yöntemi

Sonuçlar SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 13.0 programı ile değerlendirildi. Tüm veriler sayı ve yüzde değerleri ile gösterildi. Analizde Pearson Ki-Kare, Süreklilik Düzeltmeli Ki- Kare, Fisher Exact testleri kullanıldı. İstatistik için anlamlılık P< 0.05 olarak kabul edildi. Grafik ve tabloların yapımında yine SPSS 13.0'den yararlanıldı.

IV. BULGULAR

Deney hayvanları dört gruba ayrılarak değerlendirildi: Grup I'de transplantasyonda AM ve MKH (AM+MKH); grup II'de transplantasyonda AM, MKH ve KGF-2 (AM+MKH+KGF-2); Grup III'de transplantasyonda AM, MKH, KGF-2 ve otolog serum (AM+MKH+KGF-2+OS); Grup IV'de ise transplantasyonda yalnızca AM uygulanan (AM) sıçanlar yer almaktaydı. Deneyin sonunda önce sıçan korneaları doğrudan ışık altında ve fluoresein damlatılıp mavi ışıkta, sonra da patolojik, immunhistokimyasal ve genetik olarak incelendiğinde aşağıdaki sonuçlara varıldı. Her dört gruptaki sıçanların her birinin inceleme sonuçları Tablolar VIII, IX, X ve XI'de verildi. Tüm grupların değerlendirilmesi Tablo XII'de verildi.

Tablo VIII. Grup I sıçanlarda incelenen parametreler ve sonuçları

Grup	Sıçan no	Kornea Berraklığı	Neovaskülarizasyon	Fluoresin Boyanma	H&E Boyama	Kornea İH (K19)	Limbus İH	Konjonktiva İH (K19)	SRY
I	1	Tamamen şeffaf	Limbustan ≤2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
I	2	Tamamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
I	3	Pupil tam görülemiyor	Limbustan >2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(+)	(+)	(+)	(+)
I	4	Pupil tam görülemiyor	Limbustan >2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(+)	(+)	(+)	(+)
I	5	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
I	6	Pupil tam görülemiyor	Limbustan >2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(+)	(+)	(+)	(+)
I	7	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
I	8	Pupil tam görülemiyor	Limbustan >2mm alanda	>1/2 kornea	Epitel kaybı>%50	(-)	(-)	(+)	(-)
I	9	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
I	10	İris berrak değil	Limbustan ≤2mm alanda	1/4-1/2 kornea	Epitel kaybı<%50	(-)	(+)	(+)	(+)

Tablo IX. Grup II sıçanlarda incelenen parametreler ve sonuçları

Grup	Sıçan no	Kornea Berraklığı	Neovaskülarizasyon	Fluoresin Boyanma	H&E Boyama	Kornea İH(K19)	Limbus İH(K19)	Konjonktiva İH (K19)	SRY
II	11	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
II	12	İris berrak değil	Limbustan ≤2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel kaybı<%50	(-)	(+)	(+)	(+)
II	13	İris berrak değil	Limbustan ≤2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(+)	(+)	(+)	(+)
II	14	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
II	15	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
II	16	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
II	17	Pupil tam görülemiyor	Limbustan >2mm alanda	>1/2 kornea	Epitel kaybı>%50	(-)	(-)	(+)	(-)
II	18	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
II	19	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
II	20	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)

Tablo X. Grup III sıçanlarda incelenen parametreler ve sonuçları

Grup	Sıçan no	Kornea Berraklığı	Neovaskülarizasyon	Fluoresin Boyanma	H&E Boyama	Kornea İH(K19)	Limbus İH(K19)	Konjonktiva İH (K19)	SRY
III	21	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	22	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	23	Tamamen şeffaf	Limbustan ≤2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	24	İris berrak değil	Limbustan ≤2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(+)	(+)	(+)	(+)
III	25	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	26	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	27	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	28	Tamamen şeffaf	Limbustan ≤2mm alanda	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	29	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)
III	30	Tamamen şeffaf	Yok	0-<1/4 kornea	Epitel hasarı yok	(-)	(+)	(+)	(+)

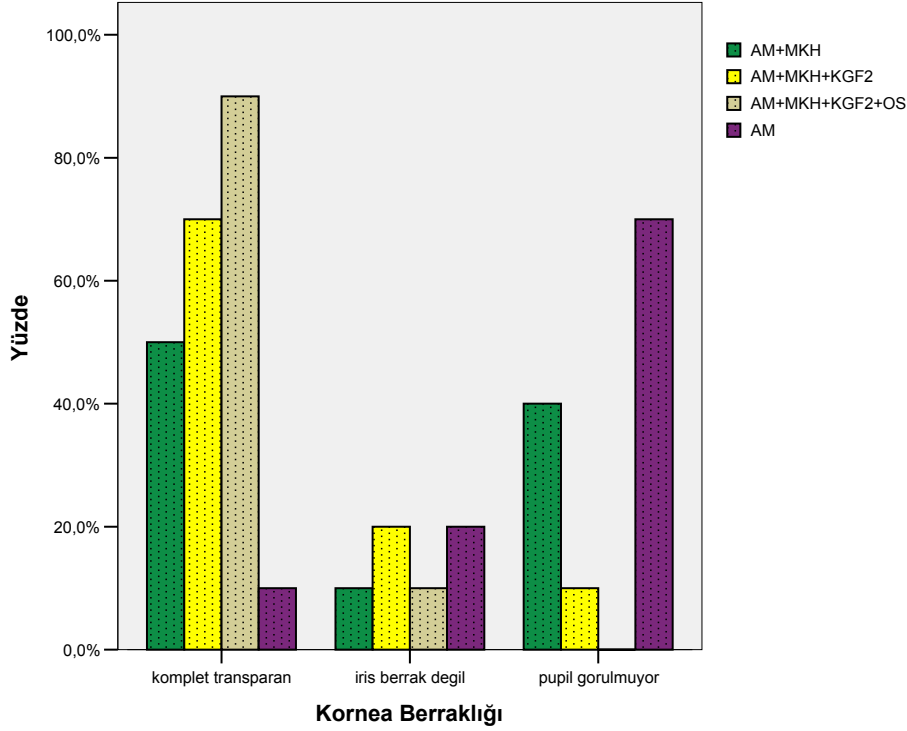
Tablo XII. Grup I-IV sıçanlarda incelenen parametreler ve sonuçlar

	Grup I <i>AM+MKH</i> (n=10) (%)	Grup II <i>AM+MKH</i> <i>+KGF-2</i> (n=10) (%)	Grup III <i>AM+MKH</i> <i>+KGF-2+OS</i> (n=10) (%)	Grup IV <i>AM</i> (n=10) (%)
Kornea Berraklığı				
Tamamen saydam	5 (%50)	7 (%70)	9 (%90)	1 (%10)
İris berrak değil	1 (%10)	2 (%20)	1 (%10)	2 (%20)
Pupil görülemiyor	4 (%40)	1 (%10)	0 (%0)	5 (%50)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)
Neovaskülarizasyon				
Yok	4 (%40)	7 (%70)	7 (%70)	1 (%10)
Limbustan ≤2mm alanda	2 (%20)	1 (%10)	3 (%30)	2 (%20)
Limbustan >2mm alanda	4 (%40)	2 (%20)	0 (%0)	5 (%50)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)
Fluoresein Boyama ile Epitel Hasarı				
<1/4 kornea	8 (%80)	8 (%80)	10 (%100)	1 (%10)
1/4-1/2 kornea	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)	2 (%20)
>1/2 kornea	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)	5 (%50)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)
H&E Boyama ile Epitel Hasarı				
Epitel Hasarı Yok	8(%80)	8 (%80)	10 (%100)	1 (%10)
Epitel Kaybı <%50	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)	2 (%20)
Epitel Kaybı>%50	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)	5 (%50)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)
Kornea İmmunhistokimya K 19				
Negatif	7 (%70)	9 (%90)	9 (%90)	8 (%80)
Pozitif	3 (%30)	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)
Limbus İmmunhistokimya K 19				
Negatif	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)	7 (%70)
Pozitif	9 (%90)	9 (%90)	10 (%100)	1 (%10)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)
Konjonktiva K 19 Pozitifliği				
Negatif	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Pozitif	10 (%100)	10 (%100)	10 (%100)	8 (%80)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)
SRY Gen Pozitifliği				
Negatif	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)	8 (%80)
Pozitif	9 (%90)	9 (%90)	10 (%100)	0 (%0)
Ftızis nedeniyle değerlendirilemedi	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)

AM: Amnion Membranı; MKH: Mezenkimal Kök Hücre; KGF-2: Keratinosit Büyüme Faktörü-2; OS: Otolog Serum; H&E: Hematoksilen-Eozin

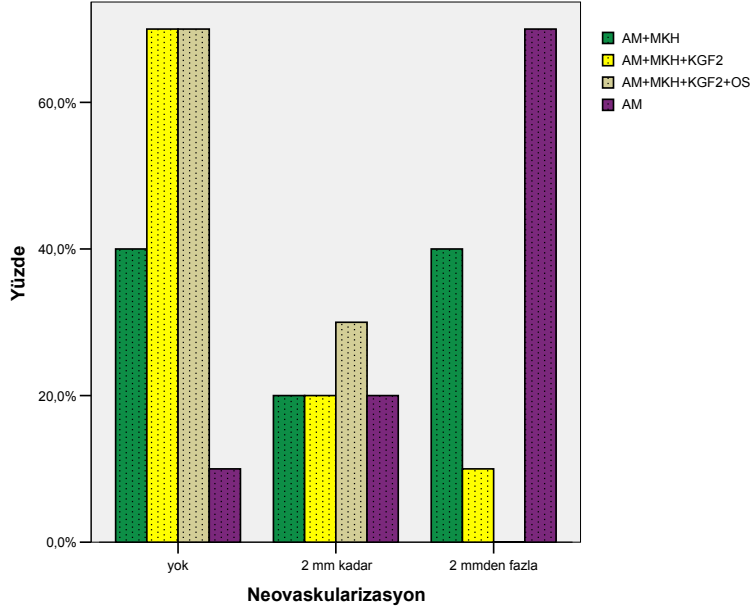
IV.A. GRUPLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

1. Kornea berraklığı değerlendirmesi sonucunda; grup I'de %50, grup II'de %70, grup III'de %90 ve grup IV'de %10 oranında tamamen saydam kornea görüldü. Grup III'de irisin berraklığını yitirmesi %10 oranında görüldü. Yalnızca Grup IV'de %20 oranında ftizis (göz küresinin kaybı) gelişti ve bunlarda değerlendirme yapılamadı (Şekil 19).



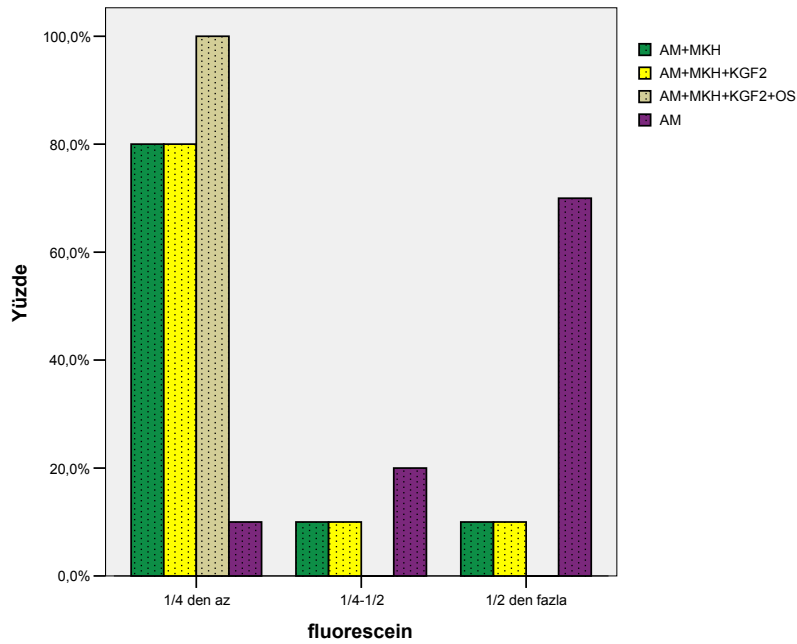
Şekil 19. Grup I-IV sıçanlarda kornea berraklığı

2. Neovaskülarizasyon değerlendirmesi sonucunda; grup I'de %40, grup II'de %70, grup III'de %70 ve grup IV'de %10 oranında neovaskülarizasyon bulgusuna rastlanmadı. Grup III'de limbustan başlayan ve ≤ 2 mm uzaklığa ulaşan neovaskülarizasyon %30 oranında izlenirken, limbustan başlayarak > 2 mm uzaklığa ulaşan neovaskülarizasyon gözlenmedi. Grup IV'de toplam neovaskülarizasyon oranı %70 iken, sıçanların %20'sinde ftizis geliştiği için değerlendirme yapılamadı (Şekil 20).



Şekil 20. Grup I-IV sıçanlarda kornea neovaskularizasyonu

3. Fluoresein damlatılarak yapılan incelemede grup I'de %80; grup II'de %80; grup III'de %100 ve grup IV'de %10 oranında sıçanın kornea yüzeyinin 1/4'ünden azının hasar gördüğü saptandı. Grup IV'de kornea yüzeyinin 1/2'sinden fazlasının hasar görme oranı %50 iken, %20'sinde ftizis geliştiği için değerlendirme yapılamadı (Şekil 21-22).



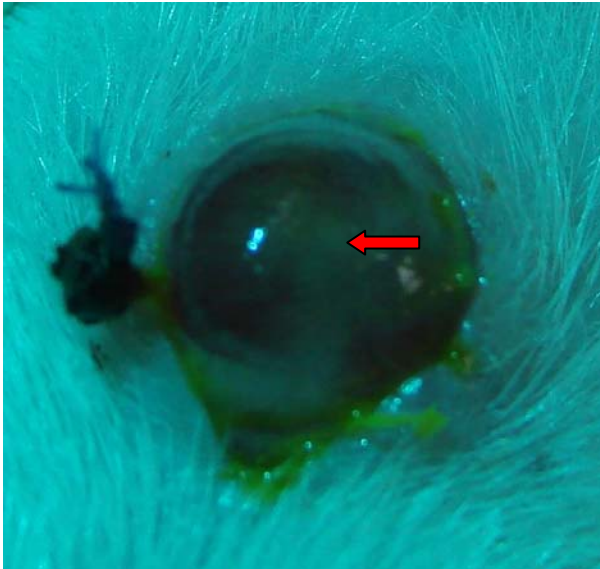
Şekil 21. Grup I-IV sıçanlarda korneanın fluoresein ile değerlendirilmesi



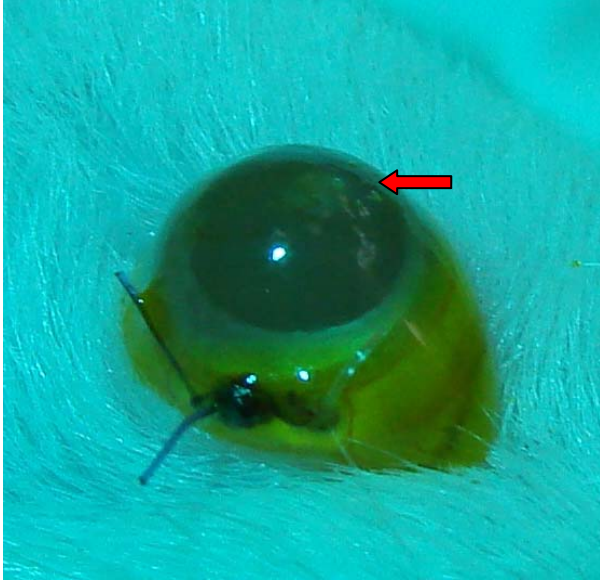
Şekil 22a. Amnion membranının nakilden dört hafta sonraki görünümü (kırmızı ok)



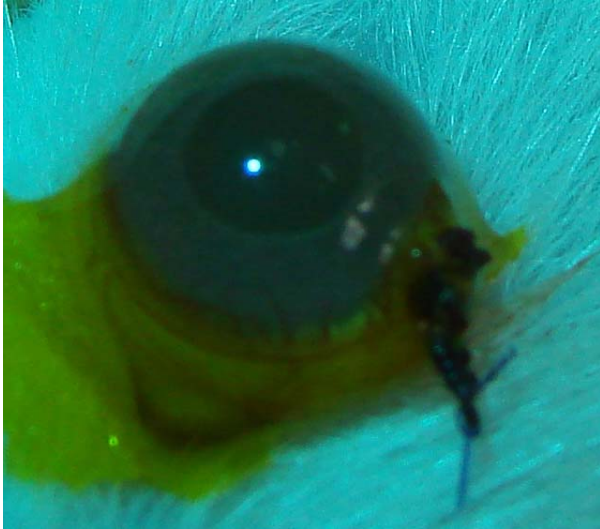
Şekil 22 b. MKH nakli yapılmayan (grup IV), fluorescein damlatıldığında mavi ışıkta büyük oranda yeşil boyanan (kırmızı ok) yoğun neovaskülarizasyon görülen, kornea berraklığının olmadığı olgu



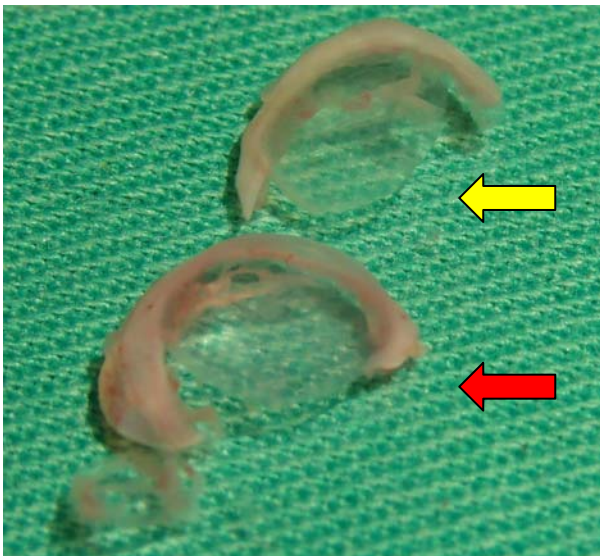
Şekil 22 c. MKH nakli yapılan (grup I) iyileşmenin gözlendiği, fluorescein ile kısmen yeşile boyanan (kırmızı ok), daha az neovaskülarizasyon görülen, kornea berraklığının iyi olduğu olgu



Şekil 22 d. MKH +KGF-2 (grup II) nakli yapılan; fluorescein ile yeşile boyanmanın çok az olduğu (kırmızı ok) neovaskülarizasyon görülmeyen, kornea berraklığı iyi olan olgu

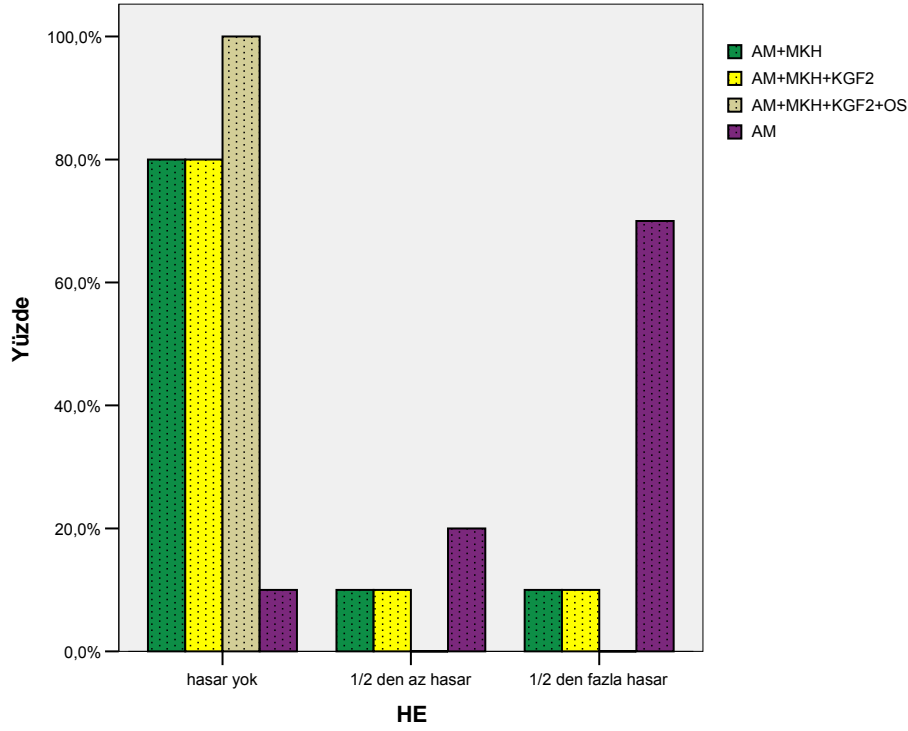


Şekil 22 e. MKH+KGF-2+OS (grup III) nakli yapılan kornea epitel onarımının tam olduğu olgu

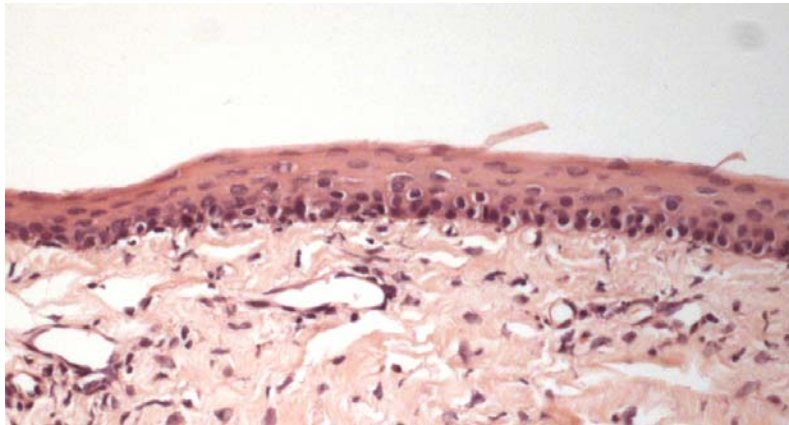


Şekil 22 f. Hasarlanmamış sıçana ait korneanın makroskopik görünümü (sarı ok) ve MKH+KGF-2+OS (grup III) nakledilen tam iyileşme görülen sıçanlardan bir olguya ait korneanın makroskopik görünümü (kırmızı ok)

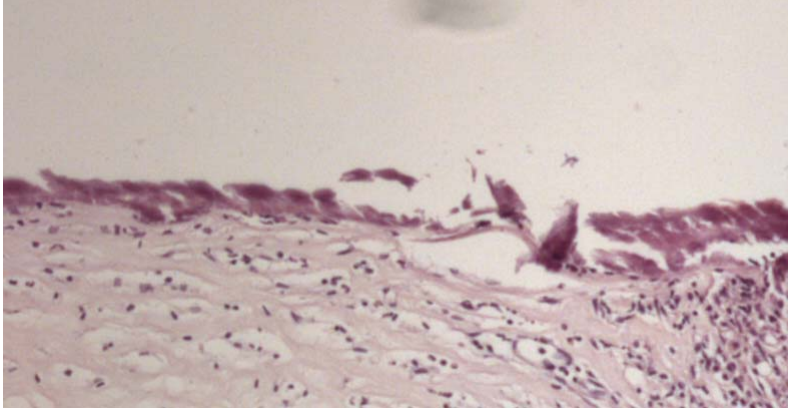
4. H&E boyama ile kornea epitelinin yeniden oluşup oluşmadığına bakıldığında, grup I'de %80, grup II'de %80, grup III'de %100 ve grup IV'de %10 oranında kornea epitelinin tamamen sağlam olduğu görüldü. Grup IV'de kornea epitelinin yarısından azının kaybı %20, yarısından fazlasının kaybı da %50 oranında saptanırken, sıçanların %20'sinde fizis geliştiği için değerlendirme yapılamadı (Şekil 23-24).



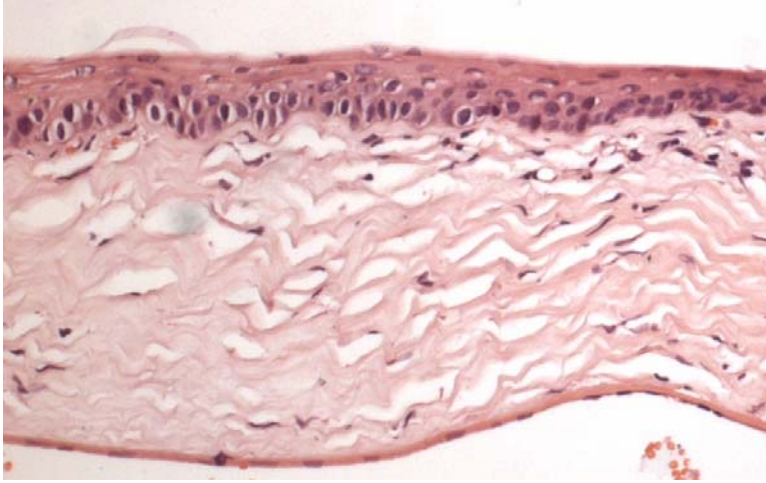
Şekil 23. Grup I-IV sıçanlarda HE boyamanın değerlendirilmesi



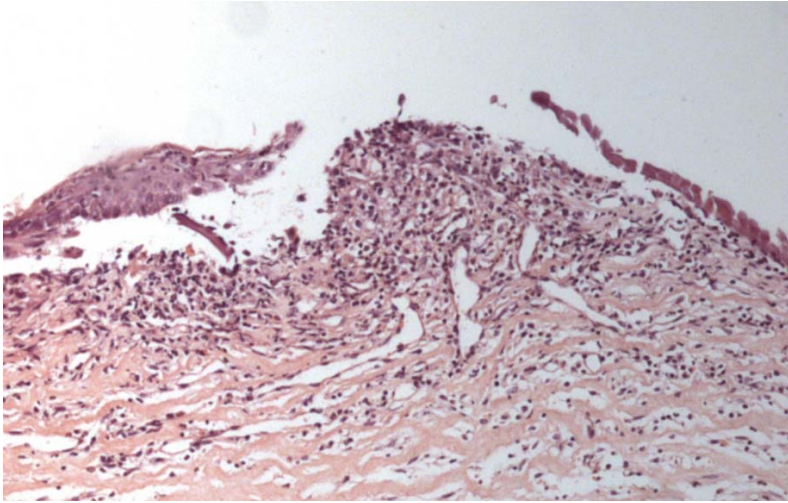
Şekil 24 a.
Hasarlanmamış
korneada epitel tabakası
(Leica HMLB45/X200)



Şekil 24 b. Hasarlanmış korneada epitel tabakası (Leica HMLB45/X100)



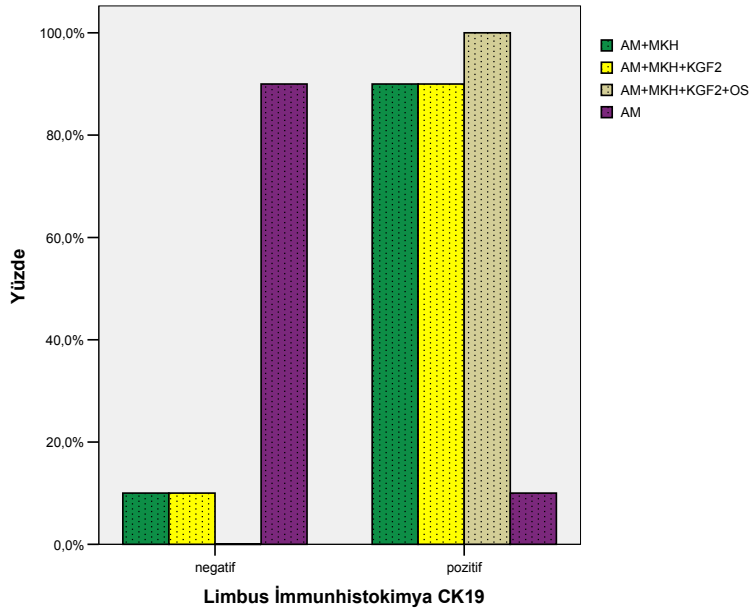
Şekil 24 c. Hasarın ardından yapılan MKH+KGF-2 nakli ile tamir edilmiş kornea epiteli (Leica HMLB45/X200)



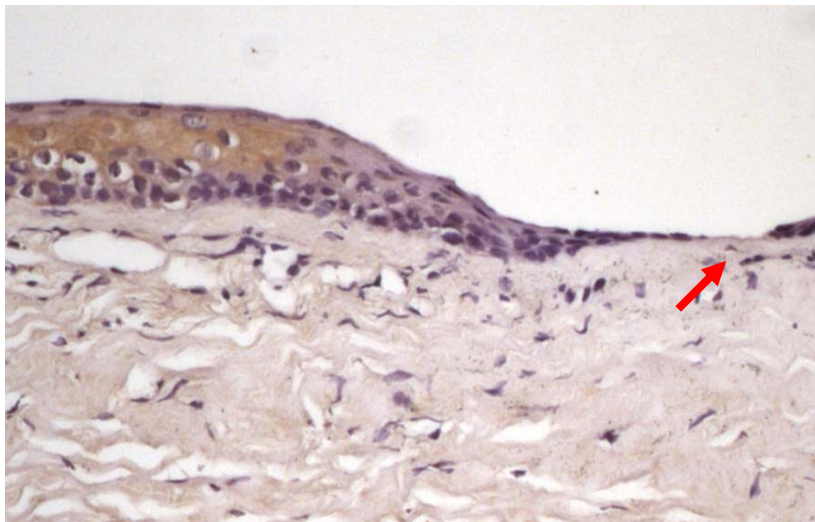
Şekil 24 d. Hasarın ardından yalnızca amnion membranı nakledilen ve tamir olmayan kornea epiteli (Leica HMLB45/X100)

5. Sitokeratin 19 (K19) primer antikoruyla yapılan immünohistokimyasal çalışmada korneada grup I'de %70, grup II'de %90, grup III'de 90 ve grup IV'de %80 oranında negatif sonuç bulundu.

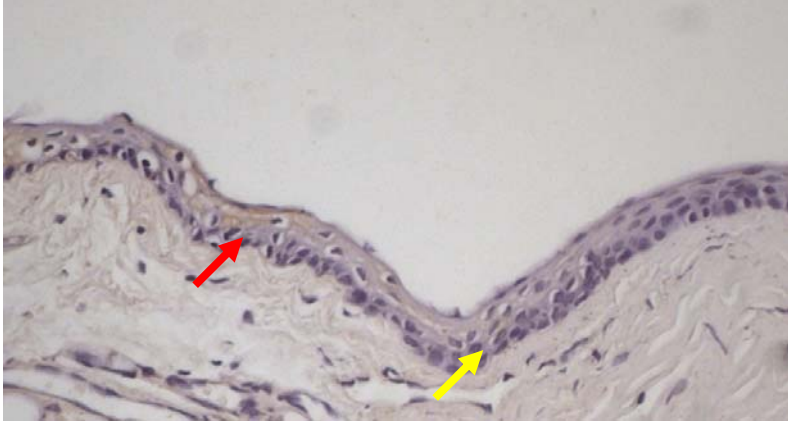
6. Limbus K19 çalışmasında grup I'de %90, grup II'de %90, grup III'de %100 ve grup IV'de %10 oranında pozitif sonuç bulundu (Şekil 25-26). Konjonktiva K19 çalışmasında grup I'de %100, grup II'de %100, grup III'de %100 ve grup IV'de %80 oranında pozitif sonuç gözlemlendi. Pansitokeratin ile yapılan immünohistokimyasal çalışmada iyileşen dokularda izlenen epitel diffüz olarak pozitifliği (Şekil 27). Grup IV'de sıçanların %20'sinde ftizis geliştiği için değerlendirme yapılamadı.



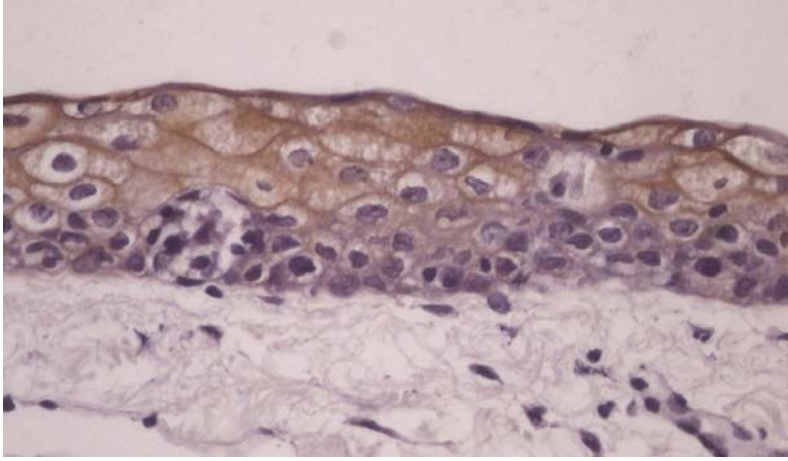
Şekil 25. Grup I-IV sıçanlarda limbus K19 boyama sonuçlarının değerlendirilmesi



Şekil 26 a. Hasarlanmış, limbusu çıkarılmış ardından yalnızca amnion membran uygulanmış (grup IV) olguda limbal bölgede K19 negatifliği (kırmızı ok) (Leica HMLB45/X200)

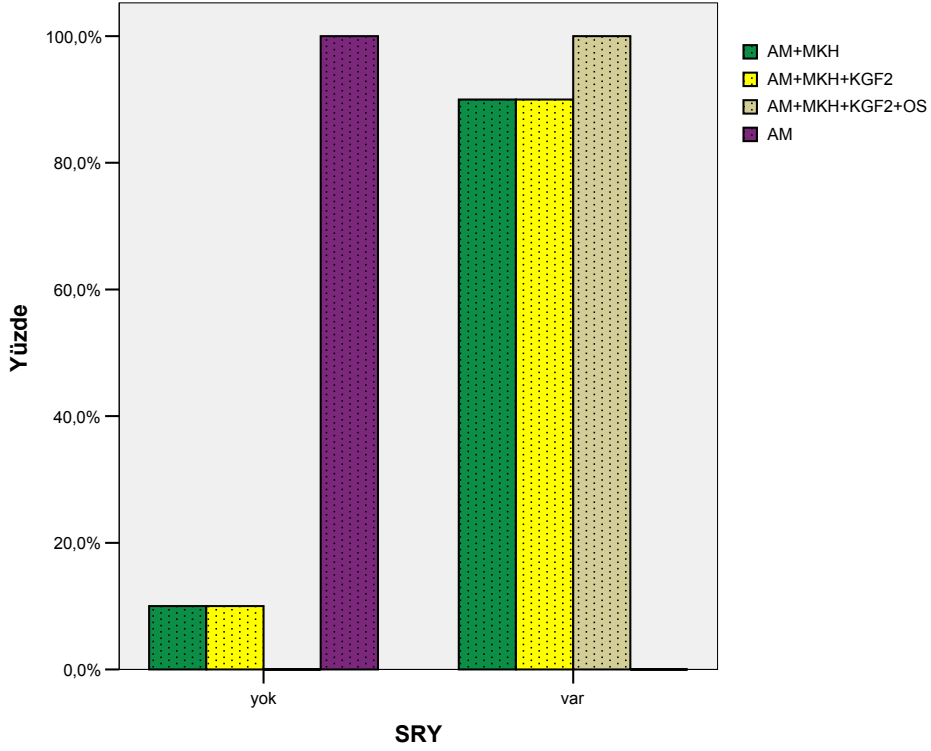


Şekil 26 b. Hasarlanmış, limbusu çıkarılmış ardından MKH+KGF-2 nakli gerçekleştirilmiş olguda (grup II) konjonktival (kırmızı ok) ve limbal (sarı ok) bölgenin K19 pozitifliği (Leica HMLB45/X200)

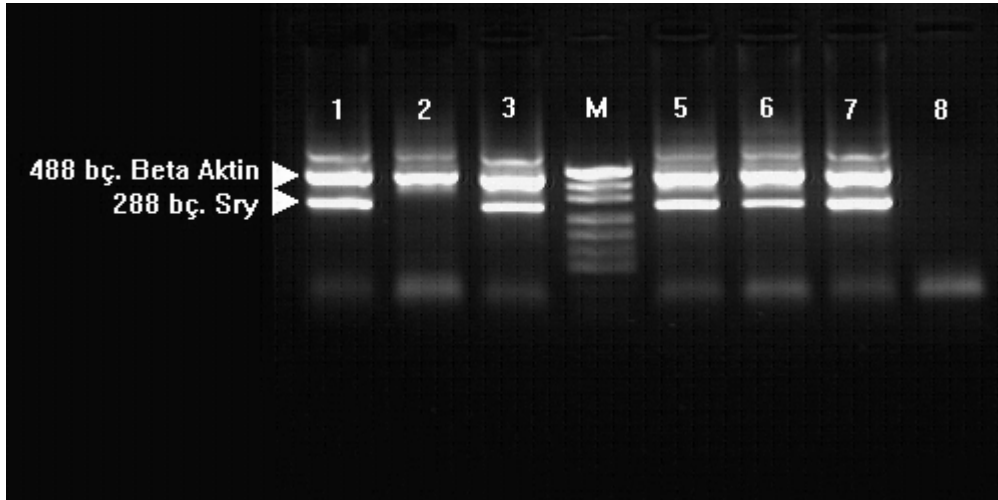


Şekil 27. Epitel onarımının gerçekleştiği olgularda epitel tabakasının pansitokeratin ile diffüz boyanması (Leica HMLB45/X400)

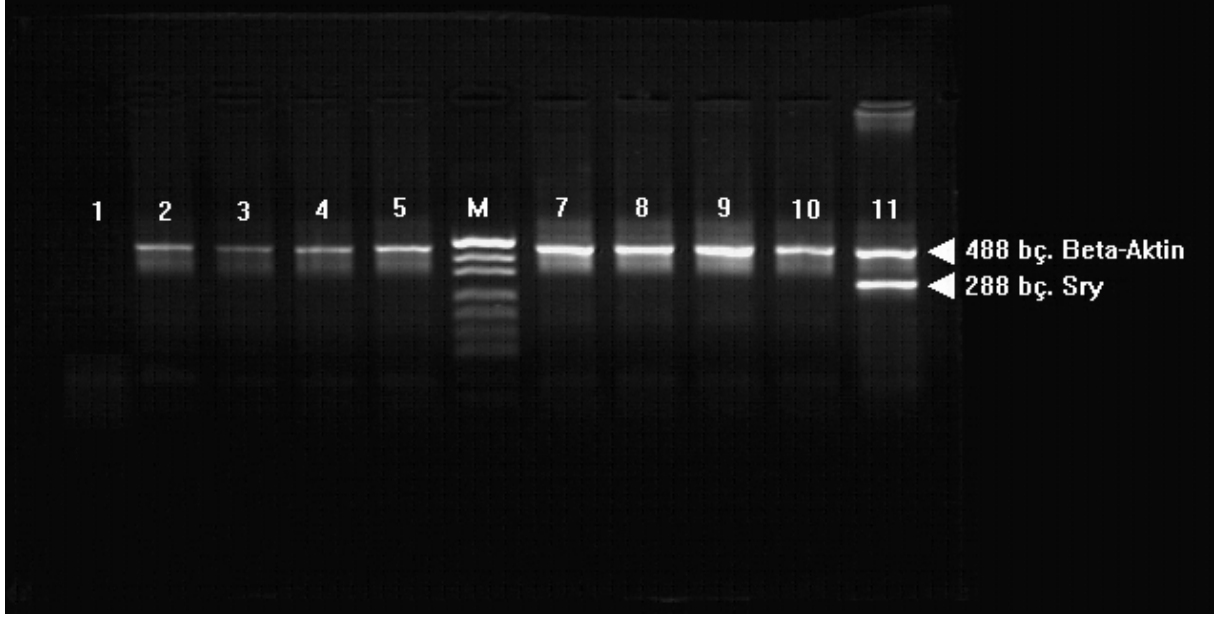
7. Alıcı dişi sıçanların korneasında Y kromozom üzerindeki cinsiyet belirleyici bölgenin (*SRY* gen) varlığı ya da yokluğu PCR ile çalışıldığında; grup I'de %90, grup II'de %90, grup III'de %100 ve grup IV'de %0 oranında *SRY* pozitifliği saptandı (Şekil 28-29). Grup IV'de sıçanların %20'sinde ftizis geliştiği için değerlendirme yapılamadı.



Şekil 28. Grup I-IV sıçanlarda *SRY* pozitifliğinin değerlendirilmesi



Şekil 29 a. 1. kuyu GrupI/7, 2. kuyu GrupI/8, 3. kuyu GrupI/9, 4. kuyu M (pUC19), 5. kuyu GrupI/10, 6. kuyu GrupII/1, 7. kuyu Pozitif Kontrol, 8. kuyu Negatif Kontrol. 2. kuyu GrupI/8 (Grup I, 8no'lu sıçan), erkek sıçandan elde edilen MKH verildiği halde *SRY* saptanamayan örnek.



Şekil 29 b. 1. kuyu negatif kontrol, 2. kuyu GrupIV/31, 3.kuyu GrupIV/32, 4. kuyu GrupIV/33, 5. kuyu GrupIV/34, 6. kuyu M(pUC19), 7.kuyu GrupIV/35, 8. kuyu GrupIV/ 36, 9. kuyu GrupIV/37, 10. kuyu GrupIV/38, 11. kuyu Pozitif Kontrol.

IV. B. GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Gruplar birbirleri ile ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edildi (Tablo XIII):

1. Grup I (AM+MKH) ve Grup II (AM+MKH+KGF-2) karşılaştırıldığında; sıçanların kornea berraklığı, neovaskülarizasyon, fluoresein boyama ile epitel hasarı, H&E boyama ile epitel hasarı, limbus K19 ve *SRY* pozitifliği açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).
2. Grup I (AM+MKH) ve Grup III (AM+MKH+KGF-2+OS) karşılaştırıldığında; kornea berraklığı, neovaskülarizasyon, fluoresein boyama ile epitel hasarı, H&E boyama ile epitel hasarı, limbus K19 ve *SRY* pozitifliği açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).
3. Grup I (AM+MKH) ve Grup IV (AM) karşılaştırıldığında; grup I'de fluoresein boyama ile epitel hasarı anlamlı olarak ($p=0.006$) ve H&E boyama ile epitel hasarı anlamlı olarak ($p=0.006$) daha az, limbus K19 pozitifliği anlamlı olarak ($p=0.002$) ve *SRY* pozitifliği de anlamlı olarak ($p=0.0001$) daha fazla bulundu. Kornea berraklığı ve neovaskülarizasyon açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).
4. Grup II (AM+MKH+KGF-2) ve Grup III (AM+MKH+KGF-2+OS) karşılaştırıldığında; sıçanların kornea berraklığı, neovaskülarizasyon, fluoresein boyama ile epitel hasarı, H&E boyama ile epitel hasarı, limbus K19 ve *SRY* pozitifliği açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).
5. Grup II (AM+MKH+KGF-2) ve Grup IV (AM) karşılaştırıldığında; grup II'de kornea berraklığı anlamlı olarak ($p=0.011$), limbus K19 pozitifliği anlamlı olarak ($p=0.002$) ve *SRY* pozitifliği anlamlı olarak ($p=0.0001$) daha fazla, neovaskülarizasyon anlamlı olarak ($p=0.011$), fluoresein boyama ile epitel hasarı anlamlı olarak ($p=0.006$) ve H&E boyama ile epitel hasarı anlamlı olarak ($p=0.006$) daha az bulundu.
6. Grup III (AM+MKH+KGF-2+OS) ve Grup IV (AM) karşılaştırıldığında; grup III'de kornea berraklığı anlamlı olarak ($p=0.001$), limbus K19 pozitifliği anlamlı olarak ($p=0.0001$) ve *SRY* pozitifliği anlamlı olarak ($p=0.0006$) daha fazla, neovaskülarizasyon anlamlı olarak ($p=0.003$), fluoresein boyama ile epitel hasarı anlamlı olarak ($p=0.0003$) ve H&E boyama ile epitel hasarı anlamlı olarak ($p=0.0003$) daha az bulundu.

Tablo XIII. Grup I-IV sıçanların kornea berraklığı, neovaskülarizasyon, fluoresein boyama, H&E boyama, limbus K19 Pozitifliği ve SRY pozitifliği açılarından ki-kare testi ile karşılaştırma sonuçları.

	Kornea berraklığı	Neovaskülarizasyon	Fluoresein Boyama	H&E boyama	Limbus K19 Pozitifliği	SRY Pozitifliği
Grup I-II	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup I-III	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup I-IV	p>0.05	p>0.05	p=0.006	p=0.006	p=0.002	p=0.0001
Grup II-III	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Grup II-IV	p=0.011	p=0.011	p=0.006	p=0.006	p=0.002	p=0.0001
Grup III-IV	p=0.001	p=0.003	p=0.0003	p=0.0003	p=0.0001	p=0.0006

Grup I: AM+MKH

Grup II: AM+MKH+KGF-2

Grup III: AM+MKH+KGF-2+OS

Grup IV: AM

V. TARTIŞMA

Çeşitli nedenler sonucu ortaya çıkan ağır kornea hasarında hasta gözde hem limbus hem de merkez epiteli kaybı ile birlikte inflamasyon, neovaskülarizasyon ve konjonktivalizasyon meydana gelir (Ma ve ark., 2006). Birçok olguda kornea hasarının prognozunu belirleyen limbal epitelyal kök hücre miktarıdır (Dua ve Azuara-Blanco, 2000). İnflamasyon inhibisyonu ve koruma uygulanarak limbal kök hücrelerin hasarlı korneayı onarması sağlanmaya çalışılır. Son yıllarda, antiinflamatuvar ilaç tedavisinin yanı sıra limbal kök hücreleri ve biomühendislik maddelerini kullanarak kornea epitel hasarının iyileştirilmesi için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Amniotik membran, yanık ve cilt ülserleri sağaltımında biyolojik membran olarak kullanılmış ve son zamanlarda kimyasal yanıkların yol açtığı ağır konjonktival hastalıklarda da uygulanmıştır. Bu membran, Tip IV kollajenden zengin olduğu için öküler yüzey hastalıklarında korneal ya da konjonktival epitelin gelişmesi amacıyla bazal membran transplantasyonunda sık kullanılır hale gelmiştir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda kolay elde edilebilir olması ve immün reaksiyona yol açmaması nedeni ile insan amnion membranı kullanılmaktadır (Kubo ve ark., 2001; Li ve ark., 2006). Kornea epitel hasarının iyileştirilmesi amacıyla amniotik membran da kullanılmakla birlikte, tek başına neovaskülarizasyon ve konjonktivalizasyonu baskılamadığı, ancak amniotik membran üzerine kültürlenmiş limbal kök hücrelerin hasarlı kornea yüzeyinin onarımında rol oynadığı gösterilmiştir (Tseng ve ark., 1998; Meller ve ark., 2000; Du ve ark., 2003; Li ve ark., 2006; Ma ve ark., 2006). İnsan AM'sinin limbal kök hücrelerin büyümesini destekleyici etkisi, içinde barındırdığı büyüme faktörleri (NGF, KGF, HGF, bFGF, TGF), ve bazal membran komponentlerine (integrinler) bağlanmış (Grueterich ve ark., 2003), antiinflamatuvar ve antiangiogenik etkileri de gösterilmiştir (Ma ve ark., 2006). Ayrıca MKH ve AM'nin birlikte uygulandığı çalışmalar da mevcuttur (Ma ve ark., 2006). Biz de çalışmamızda MKH'leri epitel dokusu çıkarılmış AM üzerinde çoğaltarak, AM'yi hücreleri transfer etmek için kullanırken, içerisindeki büyüme faktörlerinin koruyucu etkisinden de yararlandık. Kornea hasarının tamirinde topikal olarak kullanılan OS'nin fibroblast göçü ve farklılaşmasına olan etkisi bilinmektedir (Watson ve ark., 2008). Bu etkinin in vitro ortamda yine bir fibroblast kökenli hücre olan MKH üzerine ve bunun kornea hasarının iyileşmesine katkısını görmek için çalışma gruplarından birine (grup III) uyguladık.

Limbal kök hücrelerin geri dönüşsüz olarak hasarlandığı durumlarda, limbal kök hücreler allotransplantasyon ve ototransplantasyon yoluyla elde edilmekte ve hasarlı dokuya nakledilmektedir. Her iki yöntemde de limbal kök hücre sağlanmasında çeşitli zorluklarla

karşılaşılmaktadır (Kenyon ve Tseng, 1989; Dua ve Azuara-Blanco, 1999; Ilari ve Daya, 2002). Allotransplantasyon ve ototransplantasyon olgularında görülen güçlükler kornea hastalıklarının tedavisinde limbal kök hücrelerden başka hücre kaynakları bulmak gerekliliğini ortaya koymuştur. Başka bir kaynaktan elde edilen kök hücrelerin limbal kök hücrelere dönüşmesi kornea hasarını tamire olanak sağlayabilir (Charukamnoetkanok, 2006; Ma ve ark., 2006). Bu arayışta, MKH'ler kolay izole edilmeleri ve epitel hücrelerine farklılaşabilme özellikleri nedeniyle gündeme gelmiştir (Pittenger ve ark., 1999; Barry ve ark., 2004; Ma ve ark., 2006; Ye ve ark., 2006; Castanheira ve ark., 2008). Kemik iliği kökenli MKH, erişkin kök hücre tiplerinden biridir (Bayık, 2004). Mezenkimal kök hücreler başta konnektif doku kökenli hücreler (kemik, kıkırdak, yağ, tendon, stroma) olmak üzere birçok farklı doku hücresine (kalp, sinir sistemi, vb) farklılaşabilmeleri, in-vitro ortamda kök hücre özelliklerini koruyarak kolaylıkla çoğaltılabilmeleri, hematopoezi destekleyerek greft reddini önlemeleri ve immunsupresif özellikleri nedeniyle hücrel tedavi için çok uygun kaynaklardır (Kılıç ve ark., 2004).

Keratinosit büyüme faktörü; epitel dokusunun oluşmasında ve var olan epitel dokusunun hasarlanması durumunda rejenerasyonda görev alan büyüme faktörlerinden biridir. Kornea epitelinin hasarlanması durumunda KGF geninin ekspresyonunda artış olduğu da gösterilmiştir (Wilson ve ark., 1999/a ; Wilson ve ark., 1999/b). KGF normal mezenkimal dokular tarafından üretilir ve parakrin etki ile epitel kökenli hücrelerin proliferasyonunu özgül olarak uyarır (Sotozono ve ark., 1995). Sotozono ve ark.'ı KGF'nin topikal uygulamasının kornea epitel yara iyileşmesini hızlandırdığını in vivo olarak göstermiş ve olası mekanizmanın rejenerasyona uğrayan korneada limbal epitelyal hücrelerin mitotik aktivitesini artırmak olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ang ve Tan (Ang ve Tan, 2005) da yara iyileşmesinde KGF'nin ifadenme artışının epitelyal kök hücre proliferasyon, motilite ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Limbal kök hücrelerin mikroçevrenin düzenlenmesi altında olduğu, sitokinler ve büyüme faktörlerinin epitelyal-stromal etkileşiminin kök hücre homeostazı ve düzenlenmesinde görev aldığı bilinmektedir (Ang ve Tan, 2005). Jiang ve ark. (Jiang ve ark., 2002), in vitro olarak fibroblast büyüme faktörü (FGF)-4 ile MKH'leri uyarmış ve epiteloid morfolojide hücreler elde edip sitokeratinler ile tanımlamışlardır. Sueblinvong ve ark., (Sueblinvong ve ark., 2008) ise in vitro olarak KGF (FGF-7)'yi MKH üzerinde kullanarak bu hücrelerin havayolu epiteli yönünde diferansiyasyonunu göstermişlerdir. Biz de in vitro olarak MKH'ler üzerinde bir FGF ailesinde olan KGF-2 (FGF-10)'yi kullanarak kornea epiteli iyileşmesinde etkinliğini araştırdık.

Bu çalışmada kornea hasarı oluşturulmuş sıçanlarda, sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin uygun ortamda limbal kök hücrelere transdifferansiyasyonu ile kornea defektinin onarım süreci ile KGF-2 ve OS'nin bu sürece etkisi araştırıldı. Her grupta 10 sıçan olmak üzere 4 gruba ayrılan hayvanların kornealarında epitel hasarı oluşturuldu ve limbusları çıkarıldı. Deney sonunda K19 ile yapılan immunhistokimyasal incelemede, MKH nakli yapılmayan grup IV sıçanların birinde (34 no'lu sıçan, Tablo XI) iyileşmenin tam olması, korneada K19'un (-) ve limbusta K19'un (+) bulunması bu hayvanda onarımı sağlayacak oranda rezidü limbal epitel kaldığını ve amnion membranının koruyucu etkisi ile onarımın gerçekleştiğini göstermektedir. Aynı gruptaki iki sıçanda (39 ve 40 no'lu sıçanlar, Tablo XI) ise kornea hasarı sonrasında ftizis gelişmesi, ağır hasarlı kornealarda amnion membranının koruyucu etkisinin yeterli olmadığını (Tseng ve ark., 1998; Ma ve ark., 2006) ve/veya stromal hasarın da gelişmiş olabileceğini (Larouche ve ark., 2008) düşündürmüştür. Grup I ve grup II'de birer sıçanda (sırası ile 8 no'lu ve 17 no'lu sıçanlar, Tablo VIII ve Tablo IX) erkek sıçandan elde edilmiş MKH'ler dişi sıçanlara nakledildiği halde, kornea dokusundan elde edilen DNA'larda *SRY* genine ait PCR ürünü (-) bulundu ve iyileşme gözlenmedi. Bu sonuç, MKH naklinin bu hayvanlarda başarısız olduğunu göstermektedir. Bu sıçanlardaki başarısızlık ortam şartlarının uygun olmaması ve nakil sırasında MKH'lerin canlılığını yitirmesinden kaynaklanabileceği gibi, otolog serum kullanılmamış olması da, hücre proliferasyonunun daha az olmasına neden olarak (Watson ve ark., 2008) amnion membranı üzerinde çoğaltılan hücrelerin yeterli sayıya ulaşmamasına yol açmış olabilir.

Çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, grup II (AM+MKH+KGF-2) ve grup III (AM+MKH+KGF-2+OS) sıçanlarda kontrol grubu olarak kullanılan grup IV (AM) sıçanlara göre iyileşmenin anlamlı derecede fazla olduğu bulundu (Tablo XIII). Bununla birlikte grup I (AM +MKH) sıçanlarda grup IV'e göre kornea berraklığı ve neovaskülarizasyon açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamadı. Grup I ve grup II-III arasındaki bu fark, grup I sıçanlarda kullanılmayan, grup II ve grup III sıçanlarda eklenen KGF-2 kullanımından kaynaklanmış olabilir. Grup I sıçanlarda fluoresein ve H&E boyama ile epitel hasarı az bulunmakla birlikte, korneada K19 pozitifliğinin %30 oranında görülmesi, bu epitelin konjonktivalizasyon ile oluştuğunu ve bu nedenle korneal iyileşmenin tam olmadığını düşündürmektedir. Grup I sıçanlardaki bu istenmeyen iyileşmeye, KGF-2'nin ortamda olmaması nedeniyle MKH'yi epitel yönünde diferansiye edici etkisinden faydalanılamamış olması yol açmış olabilir. Grup I ve Grup III neovaskülarizasyon açısından karşılaştırıldığında, grup III'de neovaskülarizasyon grup I'e göre daha az görülmekle birlikte (Tablo XII), aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Grup III'de H&E ve

fluoresein boyamalar ile hiç epitel hasarı saptanmaz iken, grup I'de %20 oranında epitel hasarının bulunması da (Tablo XII) bu grupta iyileşmenin daha az olduğuna işaret etmektedir. Aralarında istatistiksel anlamda fark olmamasına rağmen ($p>0.05$), Grup III'de kornea berraklığı Grup II'ye göre daha fazladır (Tablo XII). Bu farkın oluşmasında Grup III'e eklenen OS'nin in vitro olarak hücre kültüründe de gözlemlendiği gibi epitel çoğalmasını artırıcı etkisi neden olabilir.

Keratinler (sitokeratinler ve kıl keratinleri) epitel hücre iskeletinin komponenti olan proteinlerdir. Sitokeratinler Tip I (asidik) ve tip II (basık-nötral) olmak üzere iki alt gruba ayrılır ve her tipin bir üyesi her bir epitel hücresinde ifadelenecek birlikte epitel hücrelerinin yapısal bütünlüğünden sorumlu ara filamanları oluştururlar. Yoshida ve ark. (Yoshida ve ark., 2006) insan ve fare konjonktiva, limbus ve kornealarında sitokeratin ifade özelliklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada insanda konjonktiva epitelinde K15 (+), K19 (+), K12 (-); limbus epitelinde K15 (+), K19 (+), K12 (+); merkez kornea epitelinde ise K15 (-), K19 (+), K12 (+) bulunmuştur. Farede ise konjonktiva epitelinde K15 (+), K19 (+), K12 (-); limbus epitelinde K15 (+), K19 (+), K12 (+); merkez kornea epitelinde ise K15 (-), K19 (-), K12 (+) olarak gözlenmiştir. K15 ve K19 merkez kornea epitelinde ifade edilmediği için, her ikisi de farelerde konjonktivalize epiteli göstermekte kullanılabilir (Yoshida ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda K19'un bu özelliğinden yararlanılarak kornea üzerinde oluşan epitelin konjonktivalize olmuş epitel dokusu olup olmadığı tanımlandı. Ayrıca K19, diferansiye olmamış limbal epitelin belirteçlerinden biri olduğu için (Yoshida ve ark. 2006) limbusu çıkarılmış sıçanlarda limbusta diferansiye olmamış epitelin oluşup oluşmadığını araştırmak amacıyla kullanıldı. MKH verilen tüm araştırma gruplarında (grup I, II ve III), iki sıçan dışında, limbal epitelde K19'un (+); buna karşın MKH verilmeyen ve yalnızca AM uygulanan grup IV'de limbal epitelde K19'un (-) bulunması, verilen MKH'nin limbal epitele transdiferansiye olduğunun bir kanıtı olarak görülebilir. Grup I'de 8 no'lu ve grup II'de 17 no'lu sıçanlarda iyileşmenin olmaması (kornea epitel hasarı $>50\%$), limbal epitelde K19'un (-) olması ve aynı zamanda *SRY*'nin (-) bulunması bu sıçanlara yapılan MKH naklinin başarılı olmadığını göstergesi olabilir. Bu başarısızlığın nedenleri AM üzerinde nakledilen uyarılmış MKH'lerin ortam koşullarına bağlı olarak nakilden önce canlılığını yitirmesi ya da nakledilen hücrelerin yüzeye tutunmadan göz sıvısı ile yıkanarak atılması olabilir. Grup IV'de 34 no'lu sıçanda epitel hasarının olmadığı gösterildi ve limbal epitelde K19 pozitif bulundu. Bu durum, deneyin başlangıcında yapılan limbal bölgenin çıkarılması işleminin tamamen başarılı olmamasına ve rezidü limbal kök hücrenin kalmasıyla verilen AM'nin katkısı sonucu epitel hasarının onarılmasına bağlandı. K19 aynı zamanda konjonktivalize epiteli gösterdiği için

kornea epitelinde grup I'de %30, grup II ve grup III'de %10 pozitifliği, verilen MKH'nin bu sıçanlarda limbal epitele dönüşmesine rağmen kornea epitel defektinin iyileşmesinde yeterli etkinliği gösteremediğini ve kornea epitelinin konjonktivalizasyon ile oluştuğunu düşündürebilir.

Kök hücre plastisitesini gösteren verilerin bir kısmı doğrudan bölgesel nakillerde alıcı kökenli (X) dokuda vericiye ait genotipin (Y+), PCR, FISH ya da immunohistokimya yöntemlerini kullanarak saptanması yoluyla elde edilmiştir (Rao ve ark., 2003, Ise ve ark. 2004, Albini ve ark. 2005,). PCR yöntemi ile 1µg dişi DNA'sı içinde 1ng erkek DNA'sı (%0.1) ve erkek ve dişi hücreleri karışımında %0.01 erkek hücresi (1:10.000) saptanabilir (Rao ve ark., 2003). Çalışmamızda AM üzerinde çoğaltıp, uyararak naklettiğimiz erkek sıçana ait MKH'leri dişi sıçan korneası üzerinde saptamak için daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan yöntem esas alınarak (Mills ve ark., 2002; Rao ve ark., 2003; Ise ve ark., 2004; Song ve Joo, 2004; Albini ve ark., 2005; Mi ve ark., 2008) multipleks PCR yöntemi kullanıldı. Mezenkimal kök hücre nakledilen gruplardan grup I'de 8 no'lu ve grup II'de 17 no'lu sıçan dışında tüm dişi sıçan kornealarında *SRY* genine ait 288 baz çiftlik, internal kontrol olan *β-aktin* genine ait 488 baz çiftlik PCR ürünleri birlikte pozitif bulundu. Grup I'de 8 no'lu ve grup II'de 17 no'lu sıçanda yalnızca *β-aktin* genine ait 488 baz çiftlik PCR ürünü saptandı. Bu iki sıçanın direk ışık muayenesi ve histopatolojik incelemelerinde ileri derecede epitel kaybı olduğu gözlemlendi. Bu verilere dayanarak bu iki sıçana yapılan MKH naklinin başarısız olduğu sonucuna varıldı. Grup IV'de ise MKH nakli yapılmadığı için, yalnızca *β-aktin* genine ait 488 baz çiftlik PCR ürünü görüntülendi.

Ağır kornea hasarında mezenkimal kök hücre nakli uygulayan çok az sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Ma ve ark., 2006; Ye ve ark., 2006; Oh ve ark., 2008). Ma ve ark. (Ma ve ark., 2006), sıçan kornealarında alkali yanık oluşturduktan sonra amnion membranı üzerinde ayrı ayrı çoğaltılmış insan kaynaklı limbal kök hücreler, MKH'ler ve fibroblastları farklı grup sıçanların korneaları üzerine transplante etmişlerdir. Bu çalışmada limbal kök hücre ve MKH'lerin kornea epitelinin iyileşmesine anlamlı etkisi gözlenirken, fibroblast transplantasyonu etkisiz bulunmuştur. Ne var ki çalışmalarında iyileşen kornea epitelinde insan keratin 3 ve pansitokeratin gösteremedikleri için, yazarlar MKH'lerin epitele diferansiye olduğunu kanıtlayamamış ve iyileşmenin MKH'lerin inflamasyonu ve inflamasyona bağlı anjiogenezi inhibe edici etkisine mi bağlı olduğunu sorgulamışlardır. MKH'lerin inflamasyonu ve inflamasyona bağlı anjiogenezi inhibe edici etkisi Oh ve ark.'ı tarafından da gösterilmiştir (Oh ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda ise limbusları çıkarılan ve MKH transplantasyonu yapılmayan grup IV sıçanların konjonktivasında bir konjonktiva epitel belirteci olan K19

antikoru (+) iken, limbusunda aynı zamanda andiferansiye epitel hücresine özgül olan K19 antikoru (-) bulundu. Limbusları çıkarılarak MKH transplantasyonu yapılan grup I-II-III sıçanlarda iyileşen dokuların tümünde pansitokeratin (+), konjonktivada K19 antikoru (+) ve diğer gruptan farklı olarak limbusda da K19 antikoru (+) bulundu. Bu gruplarda konjonktivalizasyon ile iyileşen kornea yalnızca 5 sıçanda (%16.6) görüldüğü için, bu bulgu MKH'nin andiferansiye limbal epitele transdiferansiyasyonu olarak yorumlanabilir.

Ye ve ark. (Ye ve ark., 2006), tavşan kornealarında alkali yanık oluşturduktan sonra kulak veninden MKH enjekte ettikleri çalışmalarında, immunitesi sağlam olan grupta sistemik MKH transplantasyonunun korneaya yerleşerek iyileşmeyi sağladığını göstermişlerdir. Bu çalışmada tavşan kornealarında alkali yanık oluşturduktan 24 saat sonra, limbus eksizyonu yapılmaksızın, MKH transplantasyonu sistemik yol ile yapılmıştır. Yazarlar, sistemik verilen multipotansiyel kök hücrelerin özgül dokulara yerleşerek lokal mikroçevreye yanıt olarak farklılaştığını ve lokal iyileşmeyi uyardığını belirtmişlerdir.

Kornea, mikroskopik olarak dıştan içe doğru epitel, bowman membranı, stroma, descemet membranı ve endotel olarak adlandırılan yapılardan oluşur (Takács ve ark., 2009). Korneanın kimyasal yanıkları ve mekanik yaralanmalarında kornea stromasının da etkilenmesi söz konusudur. Kornea stroması özel bir mezenkimatöz dokudur: Diziler halinde kollajen lif tabakalarından meydana gelir ve her stroma tabakası bir öncekine göre 60° açı oluşturur. Bu yapılanma korneanın saydamlığından sorumludur ve hasarlanması halinde stroma içeren bir korneanın oluşturulması görmenin azalmasını önlemek için gereklidir (Larouche ve ark., 2008). Ye ve ark. (Ye ve ark., 2006), mezenkimal kök hücrelerin, kornealarında alkali yanık oluşturulan tavşanlara sistemik olarak verildikten sonra bu hücrelerin stromaya da göç ettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada kornea yüzeyindeki MKH'ler kornea epiteline farklılaşırken, stromaya göç edenlerin epitel dışı hücrelere farklılaştığı belirtilmiştir. Bu bulgu da stromanın etkilendiği derin alkali yanıklarında MKH naklinin, limbal kök hücre nakline göre daha yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızda oluşturulan alkali yanığın stromayı etkileyip etkilemediği çalışmanın prensibi gereği, başlangıçta histopatolojik olarak inceleme yapılamadığı için bilinmemekle birlikte, deneyin sonunda MKH nakledilmeyen grup IV sıçanların ikisinde (%20) ftizis gelişmesi beklendiği gibi stromanın da etkilenme olasılığını gündeme getirmiştir. MKH nakledilen gruplarda hiç ftizis görülmemesi ise, MKH'lerin stroma iyileşmesine katkıda bulunduğunu düşündürülebilir.

VI. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın kornea epitel onarımı ile ilgili diğer çalışmalardan farklılığı yaptığımız literatür taramalarından görebildiğimiz kadarıyla MKH, AM, KGF-2 ve OS'nin birlikte uygulandığı ilk çalışma olmasıdır. Bu uygulamayı seçmekteki amacımız tam kornea hasarı oluşturulduktan sonra MKH'lerin limbal kök hücrelere dönüşüm sürecini araştırmak, KGF-2 ve OS'nin bu sürece etkisini belirlemektir.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde limbal kök hücrelerin tamamen hasar gördüğü durumlarda AM'nin tek başına onarıcı bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Limbal kök hücre kaybında MKH'lerin epiteli onarıcı etkisinin olabildiği ancak ortamda KGF-2, OS gibi hücre çoğalmasını artıran ve mikroçevrenin de yardımıyla hücre farklılaşmasını sağlayan etkenlerin olmasının bu süreci daha olumlu etkilediği sonucu çıkmaktadır. KGF-2'nin MKH'ler üzerindeki etkilerinin in vitro ve in vivo olarak farklı moleküler biyolojik çalışmalarla araştırılması bu süreci aydınlatmada değerli bir adım olacaktır.

Bu süreç ile ilgili yapılan hayvan çalışmaları ileride yapılacak insan çalışmaları için gerekli bilgilerin toplanmasında ve yöntem belirlenmesinde önemli kazanımlar sağlayacaktır.

VII. KAYNAKLAR

1. Adassi A., Verfaillie M. (2006). Multipotent adult progenitor cells. In: Essentials of Stem Cell Biology, **First Edition**, Ed (s), Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., Thomas E.D., West M. Elsevier, Burlington, 201-204.
2. Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, Rogers JA, Afiat S. (1999). In vitro analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Research*, **831**, 1–10.
3. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2008). DNA Replication, Repair, and Recombination. In: The Cell, **Fifth edition**, Ed (s), Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. Garland Science, New York, 263-328.
4. Albin T.A., Wang R.C., Reiser B., Zamir E., Wu G.S., Rao N.A. (2005). Microglial stability and repopulation in the retina. *British Journal of Ophthalmology*, **89**, 901–903.
5. Alison M.R., Vig P., Russo F., Bigger B.W., Amofah E., Themis M., Forbes S. (2004). Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Proliferation*, **37**, 1–21.
6. Amit M., Carpenter M.K., Inokuma M.S. (2000). Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Developmental Biology*, **227**, 271–278.
7. Ang L.P.K. ve Tan T.H.D. (2005). Stem Cells of the Eye. In: Stem Cells. From Bench to Bedside. Eds: Bongso A., Lee E.H., World Scientific Publishing Co.Pte. Ltd., Singapore
8. auf dem Keller U., Krampert M., Kümin A., Braun S., Werner S. (2004). Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action *European Journal of Cell Biology*, **83**, 607- 612
9. Avcu F. (2006). Kök Hücre Biyolojisi. 2. *Ulusal Kök Hücre Kongresi*, Trabzon, Özet Kitabı, S45–47.
10. Avecilla S.T. (2004) Chemokine-Mediated Interaction of Hematopoietic Progenitor With The Bone-Marrow Vascular Niche is Required for Thrombopoiesis. *Nature Medicine*, **10 (1)**, 64–71.
11. Bagutti C., Wobus A.M., Fässler R., Watt F.M. (1996). Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Developmental biology*, **179 (1)**, 184–196.

12. Baharvand H. (2004). Differentiation of Embryonic Stem Cells into Neurons and Insulin-Secreting Cells. *I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi*, İstanbul, Özet kitabı, S64–S74.
13. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. (1995). Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Developmental biology*, **168 (2)**, 342–357.
14. Balk M.L., Bray J., Day C., Epperlym M., Greenberger J., Evans C.H., Niyibizi C. (1997). Effect of rhBMP-2 on The Osteogenic Potential of Bone Marrow Stromal Cells From An Osteogenesis Imperfecta Mouse. *Bone*, **21 (1)**, 7–15.
15. Ball L.M., Bernardo M.E., Locatelli F., Egeler R.M. (2008). Potential role of mesenchymal stromal cells in pediatric hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplantation*, **42 Suppl 2**, S60–66.
16. Barry F.P., Murphy J.M. (2004) Mesenchymal Stem Cells: Clinical Applications and Biological Characaterization. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, **36**, 568–584.
17. Başaran N. (2003). Laboratuar Yöntemleri. *Tıbbi Genetik’de*, **Sekizinci Baskı** Editör, Başaran N. Nobel & Güneş Tıp Kitabevi, 174–195.
18. Bayık M. (2004). Kök Hücre: Yaşamın Kaynağı. *I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi*, İstanbul, Özet kitabı, S13–S23.
19. Bickenbach J.R., Mackenzie I.C. (1984). Identification and localization of label-retaining cells in hamster epithelia. *The Journal Of Investigative Dermatology*, **82 (6)**, 618–622.
20. Biffi A., Lucchini G., Rovelli A., Sessa M. (2008). Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments. *Bone Marrow Transplantation*, **42 Suppl 2**, S2–6.
21. Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A., Polak L., Fuchs E. (2004). Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, **118 (5)**, 635–648.
22. Bongso A. ve Lee E.H. (2005). Stem Cells: Their Definition, Classification and Sources. In: Stem Cells. From Bench to Bedside. Eds: Bongso A., Lee E.H., World Scientific Publishing Co.Pte. Ltd., Singapore, 1-13.
23. Bruder S.P., Horowitz M.C., Mosca J.D., Haynesworth S.E. (1997). Monoclonal Antibodies Reactive With Human Osteogenic Cell Surface Antigens. *Bone*, **21 (3)**, 225–235.

24. Bruder S.P., Ricalton N.S., Boynton R.E., Connolly T.J., Jaiswal N., Zaia J., Barry F.P. (1998) Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *Journal Of Bone And Mineral Research*, **13 (4)**, 655–663.
25. Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. (1999). Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*, **285**, 754–756.
26. Bryja J, Konecny A. (2003). Fast sex identification in wild mammals using PCR amplification of the Sry gene. *Folia Zoologica*, **52**, 269–274.
27. Buck R.C. (1985). Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **26 (9)**, 1296–1299.
28. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM. (2001). Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue engineering*, **7 (1)**, 89–99.
29. Can A. (2007). “Niche” concept and the hematopoietic stem cell niches. *Turkish Journal of Hematology*, **24**, 95–101.
30. Caplan A. (1994). The Mesengenic Process. *Clinics in Plastic Surgery*, **21 (3)**, 429–435.
31. Caplan A. (2008). Why are MSCs Therapeutic? New Data: New Insight. *Journal of Pathology*, **217 (2)**, 318–324.
32. Castanheira P., Torquetti L., Nehemy M.B., Goes A.M. (2008). Retinal incorporation and differentiation of mesenchymal stem cells intravitreally injected in the injured retina of rats. *Arquivos Brasileiros De Oftalmologia*, **71 (5)**, 644–650.
33. Cavaleri F. ve Schöller H. (2006). Molecular Basis of Pluripotency. In: *Essentials of Stem Cell Biology*. Ed (s), Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., Thomas E.D., West M. Elsevier, Burlington, 29-41.
34. Charukamnoetkanok P. (2006). Corneal stem cells: Bridging the knowledge gap. *Seminars in Ophthalmology*, **21**: 1–7.
35. Chen J., Zhang Z.G., Li Y., Wang L., Xu Y.X., Gautam S.C., Lu M., Zhu Z., Chopp M. (2003). Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circulation Research*, **92 (6)**, 692–699.

36. Cheung L.P., Leung H.Y., Bongso A. (2003). Effect of Supplementation of Leukemia Inhibitory Factor and Epidermal Growth Factor on Murine Embryonic Development In Vitro, Implantation and Outcome of Offspring. *Fertility and Sterility*, **80 (Suppl 2)**, 727–735.
37. Christiano A.M. (2004). Epithelial stem cells: stepping out of their niche. *Cell*, **118 (5)**, 530–532.
38. Cibelli J.B., Grant K.A., Chapman K.B., Cunniff K., Wort T., Green H.L., Walker S.J., Gutin P.H., Vilner L., Tabar V., Dominko T., Kane J., Wettstein P.J., Lanza R.P., Studer L., Vrana K.E., West M.D. (2002). Parthenogenetic stem cell in nonhuman primates. *Science*, **295**, 819.
39. Colter D.C., Class R., Di Girolamo C.M., Prockop D.J. (2000). Rapid Expansion of Recycling Stem Cells in Cultures of Plastic-Adherent Cells From Human Bone Marrow. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **97**, 3213–3218.
40. Conget P.A., Minguell J.J. (1999) Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *Journal Of Cellular Physiology*, **181 (1)**, 67–73.
41. Coster D.J., Aggarwal R.K., Williams K.A. (1995). Surgical management of ocular surface disorders using conjunctival and stem cell allografts. *The British Journal Of Ophthalmology*, **79 (11)**, 977–982.
42. Cotsarelis G., Cheng S.Z., Dong G., Sun T.T., Lavker R.M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*, **57 (2)**, 201–209.
43. Çetiner M. (2006). Hücresel Tedaviler Tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, Özet Kitabı, S29–33.
44. Daley G.Q. (2006). Hematopoietic Stem Cells. In: *Essentials of Stem Cell Biology, First Edition*, Ed (s), Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., Thomas E.D., West M. Elsevier, Burlington, 187-190.
45. Dani C, Chambers I, Johnstone S, Robertson M, Ebrahimi B, Saito M, Taga T, Li M, Burdon T, Nichols J, Smith A. (1998). Paracrine induction of stem cell renewal by LIF-deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Developmental biology*, **203 (1)**, 149–162.
46. Davanger M., Evensen A. (1971). Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*, **229**, 560–561.

47. Doetschman T.C., Eistetter H, Katz M., Schmidt W., Kemler R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology*, **87**, 27–45.
48. Dominov J.A., Dunn J.J., Miller J.B. (1998). Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *Journal of Cell Biology*, **142 (2)**, 537–544.
49. Du Y, Chen J, Funderburgh J, et al. (2003). Functional reconstruction of rabbit corneal epithelium by human limbal cells cultured on amniotic membrane. *Molecular Vision*, **9**, 635–643.
50. Dua H.S., Forrester J.V. (1987). Clinical patterns of corneal epithelial wound healing. *American Journal Of Ophthalmology*, **104 (5)**, 481–489.
51. Dua H.S. (1995). Stem cells of the ocular surface: scientific principles and clinical applications. *The British Journal Of Ophthalmology*, **79 (11)**, 968–969.
52. Dua H.S., Azuara-Blanco A. (1999). Allo-limbal transplantation in patients with limbal stem cell deficiency. *The British Journal Of Ophthalmology*, **83 (4)**, 414–419.
53. Dua H.S., Azuara-Blanco A. (2000). Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of Ophthalmology.*, **44 (5)**, 415–425.
54. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, **89 (5)**, 747–754.
55. Evans M.J., Kaufman M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotent tail cells from Mouse Embryos. *Nature*, **292**, 154–156.
56. Fairchild P.J., Brook F.A., Gardner R.L., Graça L., Strong V., Tone Y., Tone M., Nolan K.F., Waldmann H. (2000). Directed differentiation of dendritic cells from mouse embryonic stem cells. *Current Biology*, **10 (23)**, 1515–1518.
57. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *Journal of Cell Science*, **108**, 3181–3188.
58. Gage F.H. (1998). Cell Therapy. *Nature*, **392 Sup**, 18–24.
59. Gage F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, **287**, 1433–1438.
60. Galmiche M.C., Koteliensky V.E., Brière J., Hervé P., Charbord P. (1993). Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood*, **82 (1)**, 66–76.

61. Gardner R.L. (2006). Present Perspective and Future Challenges. In: Essentials of Stem Cell Biology. Ed (s), Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., Thomas E.D., West M. Elsevier, Burlington, 1-9.
62. Garrington TP, Ishizuka T, Papst PJ, Chayama K, Webb S, Yujiri T, Sun W, Sather S, Russell DM, Gibson SB, Keller G, Gelfand EW, Johnson GL. (2000). MEKK2 gene disruption causes loss of cytokine production in response to IgE and c-Kit ligand stimulation of ES cell-derived mast cells. *The EMBO journal*, **19 (20)**, 5387–5395.
63. Geerling G., MacLennan S., Hartwig D. (2004) Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *British Journal of Ophthalmology*, **88**, 1467–1474.
64. Gnecci M., Zhang Z., Ni A., Dzau V.J. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research*, **103 (11)**, 1204–1219.
65. Gori F., Thomas T., Hicok K.C., Spelsberg T.C., Riggs B.L. (1999). Differentiation of human marrow stromal precursor cells: bone morphogenetic protein-2 increases OSF2/CBFA1, enhances osteoblast commitment, and inhibits late adipocyte maturation. *Journal of bone and mineral research*, **14 (9)**, 1522–1535.
66. Gronthos S., Simmons P.J. (1995). The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*, **85(4)**, 929–940.
67. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. (2003). Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: Amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 2003, **48**: 631–646.
68. Güneş A.M. (2005) Kök Hücre Plastisitesi ve Tıptaki Kullanım Alanları. *Güncel Pediatri*, **3**, 36–42.
69. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. (2001). *FEBS Letters*, **497 (1)**, 15–19.
70. Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, Amemiya K, Ooto S, Kitada M, Suemori H, Nakatsuji N, Ide C, Honda Y, Takahashi M. (2004). In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, **45 (3)**, 1020–1025.
71. Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I. (1992). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*, **13 (1)**, 69–80.

72. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *Journal of Cell Physiology*, **166 (3)**, 585–592.
73. Hoffman L.M., Batten J., Carpenter M.K. (2005). Epigenesis in Pluripotent Cells. In: Stem Cells. From Bench to Bedside. Eds: Bongso A., Lee E.H., World Scientific Publishing Co.Pte. Ltd., Singapore, 161-185.
74. Hung SC, Cheng H, Pan CY, Tsai MJ, Kao LS, Ma HL.(2002). In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells*, **20 (6)**, 522–529.
75. Hübner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd, Boiani M, Schöler HR. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*, **300**, 1251–1256.
76. Hyslop L.A., Stojkovic M., Armstrong L., Walter T., Stajkovic P., Przyborski S., Herbert M., Murdoch A., Srachan T., Lako M. (2005). Downregulation of NANOG Induced Differentiation of Human Embryonic Stem Cell to Extraembryonic Lineages. *Stem Cells*, **23 (8)**, 1035–1043.
77. Ilari L, Daya SM. (2002). Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*, **109 (7)**, 1278–1284.
78. Ise H., Nikaido T., Negishi N., Sugihara N., Suzuki F., Akaike T., Ikeda U. (2004). Effective hepatocyte transplantation using rat hepatocytes with low asialoglycoprotein receptor expression. *American Journal of Pathology*, **165**, 501–510.
79. Ishida T, Inaba M, Hisha H, Sugiura K, Adachi Y, Nagata N, Ogawa R, Good RA, Ikehara S. (1994). Requirement of donor-derived stromal cells in the bone marrow for successful allogeneic bone marrow transplantation. Complete prevention of recurrence of autoimmune diseases in MRL/MP-Ipr/Ipr mice by transplantation of bone marrow plus bones (stromal cells) from the same donor. *Journal of immunology*, **152 (6)**, 3119–3127.
80. in `t Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A., Van Der Keur C.K., Kruisseelbrink A.B., Van Bezoioijen R.L., Beekhuizen W., Willemze R., Kanhai H.H., Fibbe W.E. (2003). Mesenchymal Stem Cells in Human Second-Trimester Bone Marrow, Liver, Lung, and Spleen Exhibit A Similar Immunophenotype Bit A Heterogeneous Multilineage Differentiation Potential. *Hematologica*, **88 (8)**, 845–852.

81. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult bone marrow. *Nature*, **418**, 41–49.
82. Kansu E. (2007). Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar. 4. *Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi*, Bursa, Konuşma Metinleri, S1–7.
83. Karaöz E. (2006). Embriyonik Kök Hücre: Temel Prensipler ve Mevcut Deneysel Yaklaşımlar. 2. *Ulusal Kök Hücre Kongresi*, Trabzon, Özet Kitabı, S69–76.
84. Karaöz E.(2004). Kök Hücre Plastisitesi: Sanılanlar ve Gerçekler. I. *Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi*, İstanbul, Konuşma Özetleri, S35.
85. Karaöz E., Ovalı E. (2004). *Kök Hücreler*, **1. Baskı**, Derya Kitabevi, Trabzon.
86. Kasper M. (1992). Patterns of cytokeratins and vimentin in guinea pig and mouse eye tissue: evidence for regional variations in intermediate filament expression in limbal epithelium. *Acta Histochemica*, 93 (1), 319–332.
87. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. (2004). Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, **95 (5)**, 209–214.
88. Kenyon K.R., Tseng S.C. (1989) Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*, **96 (5)**, 709–722.
89. Kılıç E, Tezcaner A, Uçkan D (2006). Kalıtsal hastalıklarda mezenkimal kök hücre. II. Ulusal Kök Hücre Kongresi, Trabzon, s. 171-172
90. Kim S.M., Lim J.Y., Park S.I., Jeong C.H., Oh J.H., Jeong M., Oh W., Park S.H., Sung Y.C., Jeun S.S. (2008). Gene Therapy Using TRAIL-Secreting Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells against Intracranial Glioma. *Cancer Research*, **68 (23)**, 9614–9623.
91. Koç O., Lazarus H.M. (2001). Mesenchymal Stem Cells: Heading into The Clinic. *Bone Marrow Transplantation*, **27**, 235–239.
92. Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. (2002). Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone marrow transplantation*, 30 (4), 215–222.
93. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. (2001). Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology*, **108 (9)**, 1569–1574.

94. Kolega J., Manabe M., Sun T.T. (1989). Basement membrane heterogeneity and variation in corneal epithelial differentiation. *Differentiation*, **42 (1)**, 54–63.
95. Kotton D.N., Ma B.Y., Cardoso W.V., Sanderson E.A., Summer R.S., Williams M.C., Fine A. (2001). *Development*, **128**, 5181–5188.
96. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Müller PK, Rohwedel J. (2000). Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanism of Development*, **92 (2)**, 193–205.
97. Kubo M, Sonoda Y, Muramatsu R, Usui M. (2001). Immunogenicity of human amniotic membran in experimental xenotransplantation. *Investigative ophthalmology & visual science*, **42**, 1539–1546.
98. Larouche D., Lavoie A., Proulx S., Paquet C., Carrier P., Beauparlant A., Auger F.A., Germain L. (2008). Regenerative medicine: Stem cells, cellular and matricial interactions in the reconstruction of skin and cornea by tissue engineering. *Pathologie Biologie*, doi:10.1016/j.patbio.2008.04.015
99. Lavker R.M., Wei Z.G., Sun T.T. (1998). Phorbol ester preferentially stimulates mouse fornical conjunctival and limbal epithelial cells to proliferate in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, **39**, 301–307.
100. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, **363**, 1439–1441.
101. Le Blanc K, Ringdén O. (2005). Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation*, **11 (5)**:321–334.
102. Lee P., Wang C.C., Adamis A.P. (1998). Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Survey of Ophthalmology*, **43 (3)**, 245–269.
103. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, **18 (6)**, 675–679.
104. Li D.Q., Tseng S.C. (1996). Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 beta. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **37 (10)**, 2068–2080.

105. Li D.Q., Tseng S.C. (1997). Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. *Journal Of Cellular Physiology*, **172 (3)**, 361–372.
106. Li W, He H, Kuo CL, Gao Y, Kawakita T, Tseng SC. (2006). Basement membrane dissolution and reassembly by limbal corneal epithelial cells expanded on amniotic membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47: 2381–2389.
107. Liu Y, Wang X, Jin Y. (2008). Can bone marrow cells give rise to cornea epithelial cells? *Medical hypotheses*, **71 (3)**, 411–413.
108. Loeffler M., Roeder I. (2002). Tissue Stem Cells: Definition, Plasticity, Heterogeneity, Self-Organization And Models – A Conceptual Approach. *Cells Tissues Organs*, **171**, 8–26.
109. Lou J., Tu Y., Ludwig F.J., Zhang J., Manske P.R. (1999). Effect of BMP-12 Gene Transfer on Mesenchymal Progenitor Cells. *Clinical Orthopaedics And Related Research*, **369**, 333–339.
110. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L (2006). Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cell. *Stem Cells*, 24, 315–321.
111. Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moorman M., Gerson S.L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal Of Cellular Physiology*, **176 (1)**, 57–66.
112. Maltsev V.A., Rohwedel J., Hescheler J., Wobus A.M. (1993). Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mechanisms of Development*, **44 (1)**, 41–50.
113. Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. (2002). Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism*, **46 (2)**, 507–513.
114. Martin G. (1981). Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**, 7634–7638.
115. Mbalaviele G., Jaiswal N., Meng A., Cheng L., Van Den Bos C., Thiede M. (1999). Human mesenchymal stem cells promote human osteoclast differentiation from CD34+ bone marrow hematopoietic progenitors. *Endocrinology*, **140 (8)**, 3736–3743.

116. McCloskey K.E., Lyons I., Rao R.R., Stice S.L., Nerem R.M. (2003). Purified and proliferating endothelial cells derived and expanded in vitro from embryonic stem cells. *Endothelium*, **10 (6)**, 329–336.
117. McDonald J.W., Howard M.J. (2002). Repairing the damaged spinal cord: a summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination. *Progress in Brain Research*, **137**, 299–309.
118. Meller D, Pires RT, Mack RJ, Figueiredo F, Heiligenhaus A, Park WC, Prabhasawat P, John T, McLeod SD, Steuhl KP, Tseng SC. (2000). Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns. *Ophthalmology*, **107 (5)**, 980–989.
119. Metsaranta M., Kujala U.M., Pelliniemi L., Osterman H., Aho H, Vuorio E. (1996). Evidence for insufficient chondrocytic differentiation during repair of full thickness defects of cartilage. *Matrix Biology*, **15**, 39–47.
120. Mi S., , Yang X., Zhao Q., Qu L., Chen S., Meek K.M., Dou Z. (2008). Reconstruction Of Corneal Epithelium With Cryopreserved Corneal Limbal Stem Cells In A Goat Model. *Molecular Reproduction And Development*, **75**, 1607–1616.
121. Mills R. A. D., Coster D. J., Williams K. A.(2002). Effect of Immunosuppression on Outcome Measures in a Model of Rat Limbal Transplantation. *Investigative ophthalmology & visual science*, **43**, 647–655.
122. Minguell J.J., Erices A., Conget P. (2001). Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology & Medicine*, **226 (6)**, 507–520.
123. Muraglia A., Cancedda R., Quarto R. (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, **113**, 1161–1166.
124. Müller I., Kustermann-Kuhn B., Holzwarth C., Isensee G., Vaegler M., Harzer K., Krägeloh-Mann I., Handgretinger R., Bruchelt G. (2006). In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients. *Experimental hematology*, **34 (10)**, 1413–1419.
125. Nakano T., Kodama H., Honjo T. (1996). In Vitro development of Primitive and Definitive Erythrocytes From Different Precursors. *Science*, **272**, 722–724.
126. Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. (2003). In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation*, **71 (1)**, 18–27.

127. Nishikawa S., Nishikawa S., Hirashima M., Matsuyoshi N., Kodam H., (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VEcadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, **125**, 1747–1757.
128. Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F., Hamosf A. (2007). Cancer Genetics and Genomics. In: Thompson & Thompson Genetics in Medicine., **Seventh edition**, Ed(s), Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F., Hamosf A. Saunders Elsevier, Philadelphia, 461-486.
129. Nuttal M.E., Patton A.J., Olivera D.L., Nadeau D.P., Gowen M. (1998). Human trabecular bone cells are able to Express both osteoblastic and adipocytic phenotype: Implications for osteopenic disorderes. *Journal Of Bone And Mineral Research*, **13**, 371–382.
130. Oh J.Y., Kim M.K., Shin M.S., Lee H.J., Ko J.H., Wee W.R., Lee J.H. (2008). The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*,. **26 (4)**, 1047–1055.
131. Omay S.B., Şahin F. (2004). Klinik Pratikte Yetişkin Kök Hücre Tedavisi. *I. Ulusal Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi*, İstanbul, Özet kitabı, S53–S58.
132. Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. (2001). Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **938**, 221–229.
133. Ormerod LD, Abelson MB, Kenyon KR. (1989). Standard models of corneal injury using alkali-immersed filter discs. I. *Investigative ophthalmology & visual science* **30**, 2148–53.
134. Palmer C. (2008). Cures and Clones: Stem Cells in the News. Stanford University. Illustration by Sue Medaris/UW-Madison University. www.thetech.org/genetics/news.php?id=5.
135. Park J.R., Jung J.W., Lee Y.S., Kang K.S. (2008). The roles of Wnt antagonists Dkk1 and sFRP4 during adipogenesis of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Proliferation*, **41 (6)**, 859–874.
136. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. (1997). Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*, **349**, 990–993.

137. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**,143–147.
138. Potocnik A.J., Nielsen P., Eichmann K. (1994). In vitro generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *The EMBO Journal*, **13**, 5274–5283.
139. Potten C.S., Wilson J.W. (2006). The Development of Epithelial Stem Cell Concepts. In: Essentials of Stem Cell Biology. Ed (s), Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., Thomas E.D., West M. Elsevier, Burlington, 11-21.
140. Prockop D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, **276**, 71–74.
141. Quesenberry P.J., Colvin G.A., Lambert J.F. (2002). The chiaroscuro stem cell: A unified stem cell theory. *Blood*, **100 (13)**, 4266–4271.
142. Rao N.A., Kimoto T., Zamir E., Giri R., Wang R., Ito S. Pararajasegaram G., Read R.W., Wu G.S. (2003). Pathogenic Role of Retinal Microglia in Experimental Uveoretinitis. *Investigative ophthalmology & visual science*. **44**, 22–31.
143. Reh T.A., Levine E.M. (1998). Multipotential Stem Cells and Progenitors in the Vertebrate Retina. *Journal of Neurobiology*, **36**, 206–220.
144. Rendon-Martin E, Watt S.M. (2003). Exploitation of stem cell plasticity. *Transfusion Medicine*, **13**, 325–349.
145. Reubinoff B.E., Itsykson P., Turetsk T., Pera M.F., Reinhartz E., Itzik A., Ben-Hur T., (2001) Neural Progenitors from Human Embryonic Stem Cells. *Nat Biotechnology*, **19 (12)**, 1134–1140.
146. Reya T, Clevers H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, **434**, 843–850.
147. Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. (2006). Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*, **81 (10)**, 1390–1397.
148. Risau W., Sariola H., Zerwes H.G., Sasse J., Ekblom P., Kemler R., Doetschman T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* **102**, 471–478.

149. Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. (1994). Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Developmental Biology*, **164** (1), 87–101.
150. Rybka WB, Fontes PA, Rao AS, Winkelstein A, Ricordi C, Ball ED, Starzl TE (1995). Hematopoietic progenitor cell content of vertebral body marrow used for combined solid organ and bone marrow transplantation. *Transplantation*, **59** (6), 871–874.
151. Satomura K., Derubeis A.R., Fedarko N.S., Ibaraki-O'Connor K., Kuznetsov S.A., Rowe D.W., Young M.F., Gehron Robey P. (1998). Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. *J Cellular Physiol*, **177** (3), 426–438.
152. Saydam G. (2006). Mezenkimal Kök Hücre Diferansiyasyonu ve Sinyal İleti Sistemi. 2. *Ulusal Kök Hücre Kongresi*, Trabzon, Özet Kitabı, S61–68
153. Schermer A., Galvin S., Sun T.T. (1986). Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *The Journal of Cell Biology*, **103** (1), 49–62.
154. Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Eldor J., Melton D.A., Benvenisty N. (2000). Effects of Eighth Growth Factors on the Differentiation of Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 11307–11312.
155. Secker G.A., Daniels J.T., (2008) Corneal Epithelial Stem Cells: Deficiency and Regulation. *Stem Cell Review*, **4**, 159–168.
156. Shapiro F., Koide S., Glimcher M.J. (1993). Cell origin and differentiation in the repair to full thickness defects of articular cartilage. *The Journal Of Bone And Joint Surgery*, **75**, 532–533.
157. Simmons P.J., Torok-Storb B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, **78**(1), 55–62.
158. Slayton W.B., Spangrude G.J. (2004). Adult Stem Cell Plasticity. In: *Adult Stem Cells*, First Edition, Ed: Türkşen K, Humana Pres, New Jersey, 1–18.
159. Smith A.G. (2001). Embryo-Derived Stem Cells: Of Mice and Men. *Annual Review Of Cell And Developmental Biology*, **17**, 435–462.

160. Solomon A, Ellies P, Anderson DF, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, Ti SE, Goto E, Feuer WJ, Tseng SC. (2002). *Ophthalmology*, **109 (6)**, 1159–1166. Long-term outcome of keratolimbic allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency.
161. Song I.K., Joo C.K. (2004). Morphological and Functional Changes in the Rat Cornea with an Ethanol-Mediated Epithelial Flap. *Investigative ophthalmology & visual science*, **45**, 423–428.
162. SoRelle R (2008). What are stem cells? National Institute of Health Image. http://www.bcm.edu/fromthelab/vol03/is10/04dec_n5.htm
163. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura M, Kinoshita S. (1995) Keratinocyte growth factor accelerates corneal epithelial wound healing in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, **36**, 1524–1529.
164. Sridhar M.S., Vemuganti G.K., Bansal A.K., Rao G.N. (2001). Impression cytology-proven corneal stem cell deficiency in patients after surgeries involving the limbus. *Cornea*, **20 (2)**, 145–148.
165. Stewart R., Stojkovic M., Lako M. (2006). Mechanisms of Self-Renewal in Human Embryonic Stem Cells. *European Journal of Cancer*, **42 (9)**, 1257–1272.
166. Sueblinvong V., Loi R., Eisenhauer P.L., Bernstein I.M., Suratt B.T., Spees J.L., Weiss D.J. (2008). Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*, **177 (7)**, 701–711.
167. Swift GJ, Aggarwal RK, Davis GJ, Coster DJ, Williams KA. (1996). Survival of rabbit limbal stem cell allografts. *Transplantation*, **62 (5)**, 568–574.
168. Şahin F, (2006). Mezenkimal Kök Hücre Üretiminde Sorunlar ve Çözümleri. 2. *Ulusal Kök Hücre Kongresi*, Trabzon, Özet Kitabı, S55–59.
169. Şahin F., Saydam G., Omay S.B. (2005). Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. *The Turkish Journal of Hematology and Oncology*, **1 (15)**, 48–56.
170. Takács L., Tóth E., Berta A., Vereb G. (2009). Stem cells of the adult cornea: From cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry. Part A*, **75A (1)**, 54–66.
171. Thoft R.A., Friend J. (1983). The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **24 (10)**, 1442–1443.
172. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Sharipo SS., Waknitz MA., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, **282**, 1145–1147.

173. Tomita M., Adachi Y., Yamada H., Takahashi K., Kiuchi K., Oyaizu H., Ikebukuro K., Kaneda H., Matsumura M., Ikehara S. (2002). Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*, **20** (4), 279–283.
174. Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M. (1994). Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR γ 2, α Lipid-Activated Transcription Factor. *Cell*, **79**, 1147-1156.
175. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100** (20), 11457–11462.
176. Tropepe V., Coles B.L., Chiasson B.J., Horsford D.J., Elia A.J., McInnes R.R., van der Kooy D. (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, **287**, 2032–2036.
177. Tsai M., Wedemeyer J., Ganiatsas S., Tam S.Y., Zon L.I., Gali S.J. (2000). In Vivo Immunological Function Of Mast Cells Derived From Embryonic Stem Cells: An Approach For The Rapid Analysis Of Even Embryonic Lethal Mutations In Adult Mice In Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97** (16), 9186–9190.
178. Tsai R.J., Sun T.T., Tseng S.C. (1990). Comparison of limbal and conjunctival autograft transplantation in corneal surface reconstruction in rabbits. *Ophthalmology*, **97** (4), 446–455.
179. Tsai R.J., Li L.M., Chen J.K. (2000). Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *New England Journal of Medicine*, **343** (2), 86–93.
180. Tseng S.C, Prabhasawat P., Barton K., Gray T., Meller D. (1998). Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Archives of Ophthalmology*, **116** (4), 431–441.
181. Tsubota K. Corneal epithelial stem-cell transplantation. (1997). *Lancet*, **349**, 1556.
182. Tsubota K., Satake Y., Kaido M., Shinozaki N., Shimmura S., Bissen-Miyajima H., Shimazaki J. (1999). Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation. *The New England Journal Of Medicine*, **340** (22), 1697–1703.
183. Türkşen K. (2005) İnsan Embriyonik Kök Hücreleri İzolasyonu, İdame ve Farklılaşma. Türk Hematoloji Derneği 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu Konuşma Metinleri Kitabı: S9–15.

184. Uchida N., Fleming W.H., Alpern E.J., Weissman I.L. (1993). Heterogeneity Of Hematopoietic Stem Cells. *Current Opinion In Immunology*, **5 (2)**, 177–184.
185. Uçkan Çetinkaya, D. (2007). Mezenkimal Kök Hücreler: Nerede? Ne Zaman? Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar. 4. *Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi*, Bursa, Konuşma Metinleri, S8–14.
186. Verfaillie C.M., Pera M.F., Landsdorp P.M. (2002). Stem Cells: Hype and Reality. *Hematology*, **1**, 369–391.
187. Verfaillie C.M. (2006). Adult Stem Cells: Tissue Specific or Not? In: *Essentials of Stem Cell Biology*. Ed (s), Lanza R., Gearhart J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., Thomas E.D., West M. Elsevier, Burlington, 23-28.
188. Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukhareenko V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V, Kuliev A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reproductive Biomedicine Online*, **10**, 105–110.
189. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, **18 (12)**, 1417–1426.
190. Wang L., Li L., Menendez P., Cerdan C., Bhatia M. (2005). Human Embryonic Stem Cells Maintined in the Absence of Mouse Embryonic Fibroblasts orconditioned Media are Capable of Hematopoietic Development. *Blood*, **105**, 4598–4603.
191. Watson S.L., Secker G.A., Daniels J.T. (2008). The effect of therapeutic human serum drops on corneal stromal wound-healing activity. *Current eye research*, **33 (8)**, 641–652.
192. Wei Z.G., Cotsarelis G., Sun T.T., Lavker R.M. (1995). Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium: implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **36 (1)**, 236–246.
193. Wei Z.G., Sun T.T., Lavker R.M. (1996). Rabbit conjunctival and corneal epithelial cells belong to two separate lineages. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **37 (4)**, 523–533.
194. Wei Z.G., Lin T., Sun T.T., Lavker R.M. (1997). Clonal analysis of the in vivo differentiation potential of keratinocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **38 (3)**, 753–761.
195. Williams J.T., Southerland S.S., Souza J., Calcutt A.F., Cartledge R.G. (1999). Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *The American surgeon*, **65 (1)**, 22–26.

196. Wilson A., Trumpp A. (2006). Bone- Marrow Hematopoietic Stem Cell Niches. *Nature Reviews Immunology*, **6**, 93–106.
197. Wilson S.E., He Y.G., Weng J., Zieske J.D., Jester J.V., Schultz G.S. (1994). Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, and keratinocyte growth factor, on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research*, **59** (6), 665–678.
198. Wilson S.E., Chen L., Mohan R., Liang Q., Liu J. (1999/a). Expression Of Hgf, Kgf, Egf And Receptor Messenger Rnas Following Corneal Epithelial Wounding. *Experimental Eye Research*, **68**, 377–397.
199. Wilson S.E., Liu J.J., Mohan R.R. (1999/b). Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Progress in Retinal And Eye Research*, **18** (3), 293–309.
200. Wright N.A. (2000). Epithelial stem cell repertoire in the gut: Clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *International Journal Of Experimental Pathology*, **81**, 117–143.
201. Wurmser A.E., Gage F.H. (2002). Stem cells: Cell fusion causes confusion. *Nature*, **416**, 485–487.
202. Wynn R.F., Hart C.A., Corradi-Perini C., O'Neill L., Evans C.A., Wraith J.E., Fairbairn L.J., Bellantuono I. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, **104** (9), 2643–2645.
203. Yamane T, Hayashi S, Mizoguchi M, Yamazaki H, Kunisada T. (1999). Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture. *Developmental dynamics*, **216**, 450–458.
204. Yamashita J., Itoh H., Hirashima M., Ogawa M., Nishikawa S., Yurugi T., Naito M., Nakao K., Nishikawa S.I. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, **408**, 92–96.
205. Ye J., Yao K., Kim J.C. (2006). Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing. *Eye*, **20**, 482–490.
206. Yoshida S., Shimmura S., Kawakita T., Miyashita H., Den S., Shimazaki J., Tsubota K. (2006). Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. *Investigative ophthalmology & visual science*, **47** (11), 4780–4786

207. Young R.G., Butler D.L., Weber W., Caplan A.I., Gordon S.L., Fink D.J. (1998). Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair *Journal of orthopaedic research*, **16 (4)**, 406–413.
208. Zieske J.D, Wasson M. (1993). Regional variation in distribution of EGF receptor in developing and adult corneal epithelium. *Journal of Cell Science*, **106**, 145–52.
209. Zieske J.D. (1994). Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye*, **8**, 163–169.
210. Zovein A.C., Hofmann J.J., Lynch M., French W.J., Turlo K.A., Yang Y., Becker M.S., Zanetta L., Dejana E., Gasson J.C., Tallquist M.D., Iruela-Arispe M.L. (2008). Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, **3 (6)**, 625–636.

VIII. EKLER

VIII.A. BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU (EK 1)

8. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

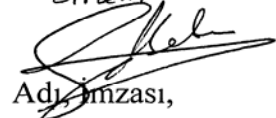
“Sıçan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin İnsan Amnion Membranı ile Kornea Yanık Tedavisinde Kullanımı”

Yukarıda açık ismi yazılı bu projenin amacı, sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin uygun ortamda sıçan gözünde limbal kök hücrelere dönüşerek kornea defektini onardığını göstermekdir. Böylece limbal kök hücrelerin tam hasarlanması durumunda bile kornea yenilenmesinin gerçekleştiği kanıtlanmış olacaktır. Amniotik membran yanık ve cilt ülserleri sağaltımında biyolojik membran olarak kullanılmış ve son zamanlarda kimyasal yanıkların yol açtığı ağır konjonktival hastalıklarda da uygulanmıştır. Bu membran, Tip IV kollajenden zengin olduğu için öküler yüzey hastalıklarında korneal ya da konjonktival epitelin gelişmesi amacıyla bazal membran transplantasyonunda kullanılmıştır. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda kolay elde edilebilir olması ve immun reaksiyona yol açmaması nedeni ile insan amnion membranı kullanılmaktadır. Bu çalışmada dişi fetus taşıyan gönüllü iki gebeden bir kereye mahsus olmak üzere sezaryen doğum sırasında amnion membranı alınarak içinde penisilin ve streptomisin bulunan fosfat buffer serum fizyolojik ile yıkanıp besiyeri içinde (-80 °C)'de saklanacak ve daha sonra hayvan deneyinde kullanılacaktır. Bu uygulama sırasında gönüllünün karşılaşılabileceği herhangi bir rahatsızlık ya da risk yoktur.

Yukarda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu araştırmaya katılmayı red etme hakkım olduğunu ve araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahip olduğumu biliyorum. Araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabileceğimi kabul ediyorum Bu koşullarla sözkonusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün Adı, İmzası, Adresi (Varsa telefon no, faks no.)

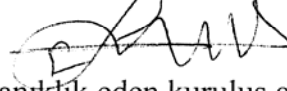
Sinem Beden



Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin Adı, İmzası, Adresi (varsa telefon no, faks no).

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı, İmzası

Dr. Feride Alpaslan Pınarlı



Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı, İmzası, Görevi.:

Dr. Ümit Beden



VIII.B. HAYVAN ETİK KURUL RAPORU (EK 2A)



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN ETİK KURULU
SAMSUN

Sayı : HEK/ 189
Konu : Araştırma projeniz hk.

21/11/2006

Prof. Dr. Gülsen ÖKTEN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

2006/34 numaralı “Sıçan Kemik İliğinden Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Sıçan Kornea Yüzeyinde Oluşturulan Kimyasal Yanıkların Tedavisinde Kullanımı.” konu başlıklı Projeniz; Hayvan Etik Kurulu'nun 21.11.2006 tarihli toplantısında görüşülmüş, **İnsan Etik Kurulundan onay aldıktan sonra başlamasına oy birliği ile karar verildi.**

Prof. Dr. Muhlise ALVUR
Hayvan Etik Kurulu Başkanı

VIII.C. İNSAN ETİK KURUL RAPORU (EK 2B)

ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Say: EK/ 107

06.04.2007

Sayın Doç.Dr. Tunç FIŞGIN

Etik kurulumuza sunmuş olduğunuz "Sıçan kemik iliği, mezenkimal kök hücrelerinin insan amniyon membranı ile kornea yanık tedavisinde kullanımı" başlıklı 2007/133 Karar nolu **hasta materyal** araştırma projeniz ile ilgili değerlendirme çalışmaları sonuçlandırılmıştır.

Projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamalarınızı dikkate alarak değerlendirilmiş olup, OMÜ Tıp Fakültesi Etik Kurul yönergesinin 5. maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere bu araştırmanın uygulanmasında herhangi bir etik sakıncanın olmadığına ve araştırma tamamlandıktan sonra sonucunun etik kurulumuza bildirilmesi gereğine 27.11.2006 tarihli etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmişti. Ancak o tarihte 447 YTL'lik araştırma bütçenizin desteği yoktu. Bütçenize 22.05.2007 tarihinde 15.000.00 YTL'lik fon desteği sağlanmış olduğundan araştırmanıza etik kurulumuzdan onay verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr.Yüksel KESİM
Etik Kurul Başkanı

IX. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ferda Alpaslan Pınarlı

Doğum Tarihi: 04 Ocak 1970

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm	Eğitim Kurumu	Yıl
İlköğretim	İlkokul	Ankara Telsizler ilkokulu	1976-1981
Ortaöğretim	Orta	Ankara Atıf Bey Ortaokulu	1981-1984
Ortaöğretim	Lise	Ankara Atatürk Lisesi	1984-1987
Üniversite	Tıp Fakültesi	Gazi Üniversitesi	1988-1997
Doktora	Tıbbi Biyoloji	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	2004-

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler :

Tıbbi Genetik Derneği

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

1. Kara N, Ökten G, Güneş SO, Sağlam Y, Taşdemir HA, Pınarlı FA. An epileptic case with mosaic ring chromosome 6 and 6q terminal deletion. *Epilepsy Res.* 2008 Aug;80(2-3):219-23. Epub 2008 May 15.
2. Gülsen Ökten, Nurten Kara, Sezgin Güneş, Şengül Bekar Tural, Serbüent Yiğit, Ferda Alpaslan Pınarlı. Retrospective Study Of Cases With Sex Chromosome Anomaly At Samsun And Around. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi (Baskıda)*

B. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

1. Tural ŞB, Kara N, Ökten G, Güneş SÖ, Koçak İ, Sağlam İY, Pınarlı FA. Tekrarlayan Düşükleri Olan Bir Olguda Ailesel T(1;3), İnv(9) Ve Trombofili. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi.*, 2008, 18, 270-273

2. Tural Ş, Kara N, Güneş S, Pınarlı FA, Koçak İ, Ökten G. X Kromozom Anöplidili Habituel Abortus ve İnfertilite Olguları. Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, 2008, 5, ek1,22-25.
3. Kara N, Ökten G, Güneş SÖ, Koçak İ, Yiğit S, Tural Ş, Taşkın E, Pınarlı FA. Samsun ve Çevresinde 2000-2005 Yılları Arasında Amniosentez Sitogenetik Analiz Sonuçları. OMÜ Tıp Dergisi, 2005, 22(3), 119-122.
4. Ökten G, Güneş SÖ, Kara N, Yiğit S, Tural Ş, Pınarlı FA. Tekrarlayan Düşükleri Olan Çiftlerde Kromozom Anomalileri. OMÜ Tıp Dergisi, 2008.
5. Ekmekçi A, Alpaslan F, İmancı H, Üçer B. Difenilhidantoinin civciv Embryoları Üzerinde Teratojenik Etkisi. Gazi Tıp dergisi, 1992, 3, 53-56.

C. Ödüller:

1. Poster Ödülü: Alpaslan FA, Ökten G, Fışgın T, Beden Ü, Kefeli M, Kara N, Duru F, Tomak L. Kornea Epitelinin Onarımında Mezenkimal Kök Hücre Kullanımı. I. Hücrel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi, 5-8 Mart 2009, Kapadokya
2. En İyi Araştırma Ödülü Mansiyon: Ekmekçi A, Alpaslan F, İmancı H, Üçer B. Difenilhidantoinin Civciv Embryoları Üzerinde Teratojenik Etkisi. I.Tıp bilimleri Öğrenci Kongresi, 7-10 Mayıs 1992,