

**SIÇAN MODELİNDE POLİKROMATİK IŞIK VE ADİPOZ
DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
UYGULAMASININ KORNEA YARA İYİLEŞMESİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

**EFFECT OF POLYCHROMATIC LIGHT AND ADIPOSE
TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS
APPLICATION ON CORNEAL WOUND HEALING IN A
RAT MODEL**

BETÜL SEHER UYSAL

PROF. DR MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

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

2024

ÖZET

SIÇAN MODELİNDE POLİKROMATİK IŞIK VE ADİPOZ DOKU KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE UYGULAMASININ KORNEA YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

Betül Seher UYSAL

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Ocak 2024, 118 sayfa

Sunulan tez çalışması, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TCD-2021-6929 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Sunulan tez çalışmasının amacı kornea yara iyileşmesinde sıçan kornea opasite modeli kullanılarak subkonjonktival enjeksiyon yoluyla adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre (AdMKH) uygulaması ve 600-1200 nm dalga boyu aralığındaki polikromatik ışık kaynağı ile fotobiyomodülasyon (FBM) tedavilerinin tek başına ve birlikte uygulamasının kornea saydamlığı, enflamasyonu ve hücre dışı matriks organizasyonu üzerindeki terapötik etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmektir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında sıçan AdMKH'lerin izolasyonu, kültürü ve karakterizasyonu yapılmış ve uygulanacak FBM tedavisinin süresi ve enerji dozu için optimizasyon çalışmaları yapılarak tedavi parametreleri oluşturulmuştur. İkinci aşamada, sıçan kornealarına elmas uçlu tur ile mekanik debridman yapılarak kornea opasite modeli oluşturulmuştur. Kornea skarı oluşturulan sıçanlar 4 tedavi grubuna ayrılmıştır: negatif kontrol (NK), AdMKH tedavisi, FBM tedavisi ve AdMKH + FBM tedavisi (n=12). Son aşamada, yaralanmayı takip eden 10. ve 30. günde kornea opasite skoru (KOS) ve neovaskülarizasyon derecesi (NVD) yarıklı lamba muayenesi ile değerlendirilmiş ve merkezi kornea kalınlığı (MKK) ön segment optik koherens tomografi ile ölçülmüştür. Yaralanma sonrası 30. günde kornealar eksiz

edilerek geçirimli elektron mikroskopi (TEM), hematoksilen ve eozin (H&E), immünohistokimyasal (İHK) boyama ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile analiz edilmiştir.

Yaralanmayı takip eden 30. günde, tüm tedavi gruplarında KOS ve MKK değeri NK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Neovaskülarizasyon derecesi AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında anlamlı azalırken, FBM grubundaki değişim NK grubuna benzer bulunmuştur. Geçirimli elektron mikroskopi ve H&E boyamada, FBM ve AdMKH tedavilerinin tek başına uygulanmasına kıyasla FBM + AdMKH grubu en iyi yara iyileşme yanıtını göstermiştir. Hasar sonrası artan kolajen tip 1 (COL1) ve kollajen tip 3 (COL3) sentezi FBM + AdMKH grubunda NK grubuna göre anlamlı azalmıştır. Negatif kontrol grubuna göre dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1) değerinde anlamlı azalma sadece FBM + AdMKH grubunda izlenmiştir. İnterlökin 1-beta (IL-1 β) düzeyi NK, FBM ve AdMKH gruplarına kıyasla FBM + AdMKH grubunda anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak enflamasyonu baskılamada en iyi sonuç FBM + AdMKH tedavi grubunda elde edilmiştir. Tüm tedavi gruplarında α -düz kas aktini (α -SMA) düzeyi, NK grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Keratokan düzeyi AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında pozitif kontrol grubu ile benzer bulunmuştur. Gerçek zamanlı PCR analizinde COL1, COL3, IL-1 β ve α -SMA tüm tedavi gruplarında NK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Polikromatik ışık, TEM görüntüleme ve H&E boyamaya göre sıçan lensi, retinası ve endotelinde hasara neden olmamıştır.

Bu tez çalışması, *in vivo* görüntüleme ve *in vitro* doku analizleri sonucunda subkonjonktival AdMKH enjeksiyonunun ve polikromatik ışıkla FBM tedavisinin (her seansta toplam enerji yoğunluğu 4,6 J/cm² olmak üzere 3 seans) kornea dokusu rejenerasyonunda etkili ve güvenli olduğunu ve FBM'nin kornea yara iyileşmesi için potansiyel bir tedavi olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Ayrıca FBM tedavisi, AdMKH'lerle birlikte uygulandığında kök hücrelerin terapötik etkinliği artmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fotobiyomodülasyon, Polikromatik ışık, Adipoz kökenli mezenkimal kök hücre, Sıçan kornea opasite modeli, Mekanik hasar, Kornea yara iyileşmesi.



ABSTRACT

EFFECT OF POLYCHROMATIC LIGHT AND ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS APPLICATIONS ON CORNEAL WOUND HEALING IN A RAT MODEL

Betül Seher UYSAL

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

January 2024, 118 pages

The thesis study was financially supported by Gazi University Scientific Research Projects Unit with the project number TCD-2021-6929.

The aim of the presented thesis was to evaluate the therapeutic efficacy and safety of subconjunctival adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (AdMSC) injection and photobiomodulation (PBM) treatment via polychromatic light source in the wavelength range of 600-1200 nm alone and in combination, on corneal opacity, inflammation, and extracellular matrix organization in corneal wound healing using a rat corneal opacity model.

In the first part of the study, the isolation, culture, and characterization of rat AdMSCs were performed and optimization studies were carried out to establish the parameters of the duration and energy dose of the FBM treatment to be applied. In the second part, a corneal opacity model was created by mechanical debridement of rat corneas with a diamond burr. Rats with corneal scar were divided into 4 treatment groups: negative control (NC), AdMSC treatment, PBM treatment and combined (AdMSC + PBM) treatment (n=12 eyes in each group). Finally, on the 10th and 30th days following the injury, corneal opacity score (COS) and degree of neovascularization (NVD) were evaluated by slit lamp examination, and central corneal thickness (CCT) was measured by anterior segment optical coherence tomography. On the 30th day, corneas were harvested and analyzed by transmission electron microscopy

(TEM), hematoxylin and eosin (H&E), immunohistochemical (IHC) staining, and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR).

On day 30, COS and CCT values decreased significantly in all treatment groups compared to the NC group. While the NVD decreased significantly in the AdMSC and combined treatment groups, the change in the PBM group was similar to the NC group. In TEM and H&E staining, the best results in corneal wound healing were observed in the combined treatment compared to the application of PBM and AdMSCs alone. The increased synthesis of collagen type 1 (COL1) and 3 (COL3) after injury was significantly reduced in the combined treatment group compared to the NC group. Compared to the NC group, a significant decrease in transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) value was observed only in the PBM + AdMSC group. With combined treatment, interleukin 1 beta (IL-1 β) level was found to be significantly lower compared to the NC, PBM and AdMSC groups. As a result, the best results in suppressing inflammation were obtained in the combined treatment group. In all treatment groups, α -smooth muscle actin (α -SMA) level was found to be significantly lower compared to the corneas in the NC group. Keratocan levels in the combined treatment and AdMSC groups were found to be similar to those in healthy corneas. In the RT-PCR analysis, COL1, COL3, IL-1 β and α -SMA were significantly decreased in all treatment groups compared to the NC group. Polychromatic light did not cause any damage to the rat lens, retina and endothelium according to TEM and H&E staining analyses.

In this study, *in vivo* imaging and *in vitro* tissue analysis demonstrated that subconjunctival AdMSC injection and PBM treatment with polychromatic light (3 sessions with total energy density of 4.6 J/cm² in each session) were effective and safe in corneal tissue regeneration and PBM could be considered as a potential treatment for corneal wound healing. Moreover, PBM therapy can enhance the therapeutic efficacy of stem cells when combined with AdMSCs.

Keywords: photobiomodulation, polychromatic light, adipose-derived mesenchymal stem cells, rat corneal opacity model, mechanical injury, corneal wound healing.

TEŞEKKÜR

Beni araştırma grubuna içtenlikle kabul eden, her zaman hoşgörölü ve anlayışlı olan, doktora tez çalışmam boyunca çok değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Hem hayata dair hem de hekimlikteki tecrübeleriyle bana yol gösteren, tez izleme komitemde yer alarak değerli görüşleriyle destek olan sayın hocalarım Prof. Dr. Fikret Akata ve sayın Prof. Dr. Kamil Bilgihan'a,

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini esirgemeyen ve her zaman yol gösteren canım arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Burcu Sarıkaya'ya,

Çalışmanın histolojik analizi için sayın Prof. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu'na ve tanımaktan büyük mutluluk duyduğum sevgili arkadaşım Doç. Dr. Saadet Özen Dizakar Akarca'ya,

Tez çalışmama mali destek sağlayan Gazi Üniversitesi BAP Birimi'ne,

Hayvan deneylerinin yapılmasında uygun ortamı sağlayan ve büyük bir özveri ile çalışan GÜDAM ailesine,

Çalışmanın TEM örneklerini büyük bir özveri ile hazırlayan Başkent Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ekibine,

Çalışmanın istatistiksel analizini yapan Melih Uzunoğlu'na,

Tez çalışmam sırasında tanıştığım sevgili arkadaşım Dr. Ekin Özge Akdere başta olmak üzere Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu'ndaki sevgili arkadaşlarıma,

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili Şenay Çay, Şengöl Orak, Zafer Yıldırım ve Cengiz Aksel başta olmak üzere tüm Gazi Göz Ailesi'ne,

Beni bugünlere getiren, her zaman cesaretlendirip destekleyen canım anneme ve babama,

Bu zorlu süreçte sabrını ve desteğini her zaman hissettiren sevgili eşime ve varlıklarıyla beni her zaman mutlu eden canım çocuklarıma,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kornea Dokusu ve Özellikleri	4
2.1.1. Korneanın Yapısı.....	4
2.1.2. Kornea Stromasının Yapısı.....	5
2.2. Kornea Hasarı ve Tedavi Yaklaşımları	7
2.2.1. Kornea Hasarına Neden olan Hastalıklar.....	7
2.2.2. Kornea Yara İyileşme Yanıtı	8
2.2.3. Kornea Hasarında Skar Dokusunu Azaltmaya Yönelik Klinik Yaklaşım.....	9
2.3. Kornea Rejenerasyonundaki Tedavi Seçenekleri.....	10
2.3.1. İnsan Donör Stroma Lentikülü	11
2.3.2. Aselüler Domuz Korneası Stroması	12
2.3.3. Balık Pulundan Türetilmiş Kornea	12
2.3.4. Yapay Aselüler Kornea Stroması	13
2.3.5. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Ürünleri	14
2.3. Kök Hücre Tedavisi.....	15
2.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler	16
2.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kornea Stroması Rejenerasyonunda Kullanımı	18
2.4. Fotobiyomodülasyon Tedavisi.....	21
2.4.1. Fotobiyomodülasyon	21
2.4.2. Fotobiyomodülasyonda Kullanılan Işık Kaynakları.....	21
2.4.3. Fotobiyomodülasyonun Etki Mekanizması	22

2.4.4. Fotobiyomodülasyonun Göz Hastalıklarında Kullanım Alanları	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	27
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar, Biyolojik ve Kimyasal Malzemeler	27
3.2. Çalışma Tasarımı.....	29
3.3. Sıçan AdMKH'lerin İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu	30
3.4. Sıçanlarda Kornea Mekanik Yara Modeli Oluşturma.....	31
3.5. <i>In vivo</i> Tedavi Protokolleri	34
3.5.1. Sıçan AdMKH Uygulaması	34
3.5.2. Polikromatik Işık ile Fotobiyomodülasyon Uygulaması	35
3.5.2.1. Uygulanan Işık Dozunun Optimizasyonu	35
3.6. Deney Gruplarında Yapılan Analizler.....	39
3.6.1. Ön Segment Görüntüleme	40
3.6.2. Ön Segment Optik Koherens Tomografisi.....	40
3.6.3. Histolojik Değerlendirme	40
3.6.3.1. Hematoksilen&Eosin Boyama Protokolü	41
3.6.3.2. İmmünohistokimyasal Analizler.....	41
3.6.3.3. Bromodeoksiüridin İmmün Boyama Yöntemi	42
3.6.4. Geçirimli Elektron Mikroskopi	43
3.6.5. Gerçek Zamanlı PCR ile Kantitatif Gen Ekspresyonu Analizi.....	43
3.7. İstatistiksel Analiz.....	45
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	46
4.1. Wistar Albino Sıçanlardan Allojenik AdMKH İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu	46
4.2. Sıçanlarda Mekanik Abrasyon ile Kornea Yara Modelinin Oluşturulması ve Tedavi Protokollerinin Uygulanması.....	48
4.3. Tedavi Protokollerinin Etkinliğinin Klinik Görüntüleme ve Doku Analizleri ile Değerlendirilmesi	53
4.3.1. Klinik Değerlendirme ve Merkezi Kornea Kalınlığı Ölçümleri.....	53
4.3.2. Geçirimli Elektron Mikroskopi Analizi.....	63
4.3.3. Hematoksilen ve Eozin Boyama.....	69

4.3.4. İmmünohistokimyasal Boyama	72
4.3.5. Kornea Dokularında Gen Ekspresyonu	80
4.3.6. Polikromatik Işığın Kornea Endoteli, Lens ve Retina Üzerindeki Etkisi	82
5. GENEL SONUÇLAR	84
6. KAYNAKLAR	88
EKLER.....	104
EK 1 – Etik Kurul İzin Belgesi	104
EK 2 – Tezden Türetilmiş Bildiriler	106
EK 3 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	107
ÖZGEÇMİŞ	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılan primerler ve baz dizileri.	45
Çizelge 4.1. Kornea abrazyonunu takiben 10 ve 30. günlerde tüm gruplardaki KOS ve NVD sonuçları.	53



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Göz küresinin yapısı ([32]'den değiştirilerek).....	4
Şekil 2.2. Korneanın katmanları.	5
Şekil 2.3. Kornea stromasının katmanlarının şematik gösterimi ([35]'den değiştirilerek).....	6
Şekil 2.4. Kornea onarımı sırasında hücresel etkileşimler ([52]'den değiştirilerek).....	9
Şekil 2.5. Mezenkimal kök hücrelerin kornea hastalıklarında terapötik etkilerinin mekanizmaları ([103]'den değiştirilerek).....	20
Şekil 2.6. Fototerapinin hücre içi redoks seviyeleri üzerindeki etkisinin şematik gösterimi ([128]'den değiştirilerek).	24
Şekil 3.1. A) Kornea yara modelinin oluşturulması B) Tedavi grupları C) <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> analizler.	29
Şekil 3.2. Kornea yara modelinin oluşturulması A) Elmas uçlu tur B) Turun başlığının yakından görünümü C) Korneanın tur ile abrazyonu D) Ultrasonik pakimetri ile kornea kalınlığının ölçümü E) Pakimetrik ölçümün ekran görüntüsü.	33
Şekil 3.3. Çalışma grupları.	33
Şekil 3.4. Subkonjonktival AdMKH enjeksiyonun basamakları A) Pasaj 4 ve 5 AdMKH'lerin 2×10^5 hücre/hayvan yoğunlukta subkonjonktival enjeksiyonu B) Enjeksiyon sırasında konjonktivanın şişmesi C) Enjeksiyon sonrası rezervuar alanı.	34
Şekil 3.5. Tez çalışmasında kullanılan polikromatik ışık kaynağı (Collagentex) ve sıçanlara polikromatik ışık uygulaması	35
Şekil 3.6. Grup 1'de kornea abrazyonundan hemen sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 3'er dk FBM uygulaması.	36
Şekil 3.7. Grup 2'de epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 3'er dk FBM uygulaması.....	37
Şekil 3.8. Grup 3'te epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 2'şer dk FBM uygulaması.....	37

Şekil 3.9. Grup 4'te epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 1'er dk FBM uygulaması.....	38
Şekil 3.10. Grup 5'te epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile sırasıyla 1 dk, 2 dk ve 3 dk FBM uygulaması	38
Şekil 3.7. Deney gruplarına yapılan analizler.....	39
Şekil 4.1. Sıçanlardan izole edilen AdMKH hücrelerinin karakterizasyonu A) Pasaj 3'teki optik mikroskop görüntüleri (10X büyütme) B) Negatif ve pozitif yüzey antijenleri için akış sitometri analiz sonuçları.	47
Şekil 4.2. Kornea opasite skorunun (KOS) 10. ve 30. gündeki değerlerinin ve ortalama değişim değerlerinin grafiksel gösterimi. Değerler ortalama $\pm$ SD (10-12 hayvan/grup) olarak sunulmuştur. Grup içi analizde $\Delta p < 0,05$; 30. günde tedavi gruplarının NK grubuyla karşılaştırılmasında $\blacksquare p < 0,05$; tedavi gruplarının ortalama değişimlerinin NK grubunun değeri ile karşılaştırılmasında $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ ve $****p < 0,0001$	54
Şekil 4.3. Kornea neovaskülarizasyon derecesi (NVD) 10. ve 30. gündeki değerlerinin ve ortalama değişim değerlerinin grafiksel gösterimi. Değerler ortalama $\pm$ SD (10-12 hayvan/grup) olarak sunulmuştur. Grup içi analizde $\Delta p < 0,05$; 30. günde tedavi gruplarının NK grubuyla karşılaştırılmasında $\blacksquare p < 0,05$; tedavi gruplarının ortalama değişimlerinin NK grubunun değeri ile karşılaştırılmasında $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ ve $****p < 0,0001$	55
Şekil 4.4. Merkezi kornea kalınlığının (MKK) 10. ve 30. günlerdeki değerlerinin grafiksel gösterimi. Değerler ortalama $\pm$ SD (10-12 hayvan/grup) olarak sunulmuştur. Tedavi gruplarının NK grubu ile karşılaştırılmasında $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ ve $****p < 0,0001$	56
Şekil 4.5. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde NK grubunun temsili yarıklı lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.....	57
Şekil 4.6. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde FBM grubunun temsili yarıklı lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.....	58

- Şekil 4.7. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde AdMKH grubunun temsili yarık lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.....59
- Şekil 4.8. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde AdMKH + FBM grubunun temsili yarık lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.....60
- Şekil 4.9. Sağlıklı bir sıçanın (PK grubu) kornea kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), desmozom (↔), nükleus (N), Bowman tabakası (↔), stroma (S), keratosit (K), Descemet membranı (D), endotel (▲), (3000X büyütme).....64
- Şekil 4.10. Yaralanmayı takiben 30. günde, NK grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), vakuol (v), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücresinde vakuol (↔), neovaskülarizasyon (↔), enflamatuar hücre (◀), epitel hücreleri ve stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (↔), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (■), Descemet membranı (D), endotel (▲), (3000X büyütme). 65
- Şekil 4.11. Yaralanmayı takiben 30. günde, FBM grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücresinde vakuol (↔), neovaskülarizasyon (↔), enflamatuar hücre (◀), epitel hücreleri ve stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (↔), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (■), Descemet membranı (D), endotel (▲), (3000X büyütme). 66
- Şekil 4.12. Yaralanmayı takiben 30. günde, AdMKH grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücreleri veya stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (↔), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (■), Descemet membranı (D), endotel (▲), (3000X büyütme).....67
- Şekil 4.13. Yaralanmayı takiben 30. günde, FBM + AdMKH grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücreleri ve stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (↔), vakuol

- (v), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (►), Descemet membranı (D), endotel (▲), (3000X büyütme).....68
- Şekil 4.14. Tüm deney gruplarının 30. günde H&E ile boyanmış histolojik kesitleri. (A) Pozitif kontrol grubu (B, C) negatif kontrol grubu (D) FBM grubu (E) AdMKH grubu (F) FBM + AdMKH grubu. Epitel (e), Bowman tabakası (◄), stroma (s), keratosit (→), Descemet membranı (◄), endotel (▲), Epitel ve stroma arasında ayrılma ve bütünlük kaybı (*), ödem (↔), vakuolize sitoplazmalı epitel hücreleri (◄), vaskularize oluşumlar (neovaskülarizasyon) (↔), mononükleer hücre infiltrasyonu (◄), kolajen lamellerde ayrılma ve düzensizleşme (↔) ve fibrotik alanlar (►), (400X büyütme). 70
- Şekil 4.15. Yaralanma sonrası 30. günde tüm deney gruplarının kornea kesitlerinin İHK boyama görüntüleri (DAB-Hematoksilen, 400X büyütme). 72
- Şekil 4.16. Tüm gruplarda 30. günde kornea dokularının İHK boyamalarına ait immünoreaktivite yoğunluklarının analizi. Grafikler ortalama $\pm$ SD (4-5 hayvan/grup) olarak temsil edilmektedir. Negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $*p<0,05$; pozitif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $\blacksquare p<0,05$ ve gruplar arası analizde $\blacktriangle p<0,05$ 74
- Şekil 4.17. Deney gruplarına ait kornea kesitlerinde BrdU İHK boyaması (A) Pozitif kontrol grubu (B) Negatif kontrol grubu (C) FBM grubu (D) AdMKH grubu (E) FBM + AdMKH grubu (F) Kit içerisinde mevcut olan BrdU pozitif kontrol bağırsak kesiti. BrdU pozitif hücreler (▲), (DAB-Hematoksilen, 400X büyütme). 80
- Şekil 4.18. Yaralanma sonrası 30. günde kornea dokularında COL1, COL3, α -SMA, TGF- β 1, KERA ve IL-1 β için RT-PCR ile kantitatif gen ekspresyon analizleri. Sonuçlar, β -aktin'e göre kat değişimi olarak hesaplanmıştır ve grafikler, ortalama $\pm$ SD (4-5 hayvan/grup) olarak temsil edilmektedir. Negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$ 81

Şekil 4.19. H&E ile boyanmış FBM grubuna ait lens (A) ve retina (B) görüntüleri (400X büyütme). FBM grubuna ait endotelin (C) TEM görüntüsü (3000X büyütme). SLT; sinir lifi tabakası, GHT; gangliyon hücre tabakası, İPT; iç pleksiform tabaka, İNT; iç nükleer tabaka, DPT; dış pleksiform tabaka, DNT; dış nükleer tabaka, FRT; fotoreseptör tabaka. 82



SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
cm	Santimetre
CO_2	Karbondioksit
dk	Dakika
J	Joule
K^+	Potasyum
mm	Milimetre
Na^+	Sodyum
Nm	Nanometre
O_2	Oksijen
sa	Saat
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Kütle/hacim oranı
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

α -MEM	Minimum Essential Eagle ortamı α modifikasyonu
α -SMA	α -düz kas aktini
AD	Anabilim dalı
AdMKH	Adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre
ATP	Adenozin trifosfat
BrdU	Bromodeoksiüridin
BSA	Sığır serum albümin
CD	Farklılaşma kümesi
cDNA	Tamamlayıcı DNA
COL	Kolajen
DAB	Diaminobenzedin

DNA	Deoksiribonükleik asit
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBM	Fotobiyomodülasyon
FBS	Fötal sıgır serumu
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
GMP	İyi üretim uygulamaları
GÜDAM	Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi
H&E	Hematoksilen ve eozin
IL	İnterlökin
İHK	İmmünohistokimyasal
KERA	Keratokan
KOS	Kornea opasite skoru
LED	Işık yayan diyetler
LLL	Düşük seviyeli lazer
LLLT	Düşük seviyeli lazer terapisi
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi
MKH	Mezenkimal kök hücre
MKK	Merkezi kornea kalınlığı
MMP	Matriks metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı RNA
NIR	Yakın kızılötesi
NK	Negatif kontrol
NVD	Neovaskülarizasyon derecesi
ÖS-OKT	Ön segment optik koherens tomografi
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PK	Pozitif kontrol
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SD	Standart deviasyon
SMILE	Küçük insizyonlu lentikül ekstraksiyonu
TEM	Geçirimli elektron mikroskopi
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü

VEGF

Vasküler endotelyal büyüme faktörü



1. GİRİŞ

Kornea, görme sisteminin en önemli refraktif bileşenlerinden biridir ve ışığı retinaya odaklayarak görmede çok önemli bir rol oynamaktadır. Kornea, dıştan içe doğru sırasıyla kornea epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotel tabakalarından oluşmaktadır. Kornea stroması, kornea kalınlığının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır ve sahip olduğu benzersiz kolajen fibril dizilimi ve üniform interfibriller arası mesafe sayesinde optik berraklığı korumaktadır [1]. Enfeksiyon, immün hastalıklar, kronik enflamasyon ve mekanik veya kimyasal travma dahil kornea hastalıklarının çoğu stromayı etkilemekte ve korneada yara iyileşme yanıtına neden olmaktadır. Şiddetli yara iyileşme yanıtında, bu oküler bozukluklar şiddetli enflamasyona, neovaskülarizasyona ve stromal organizasyonda bozulmaya neden olma eğilimindedir, böylece kornea opasitesine ve sonunda kalıcı görme kaybına yol açabilmektedir [2].

Kornea opasiteleri görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir [3]. Lubrikasyon, antibiyotikler, steroidler veya amniyotik membran dahil olmak üzere mevcut tedaviler, kornea hasarının ve bulanıklığının iyileşme sürecinde kornea opasitesi ve vaskülarizasyonunun yönetiminde yetersiz kalmaktadır [4]. Kornea saydamlığını yeniden sağlamak için uygulanan en yaygın yöntem kornea naklidir. Ancak kornea naklinin, donör dokusunun sınırlı olması ve ameliyat sonrası gelişebilen immün reaksiyon, doku reddi, katarakt ve glokom gibi önemli komplikasyonları bulunmaktadır [5].

Bu nedenle ciddi kornea bozukluğu olan hastalarda yara iyileşmesini hızlandırmada etkili olan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Kornea nakli ihtiyacını azaltmak veya ortadan kaldırmak için üzerinde en çok çalışılan tedavi yaklaşımlarından biri, kök hücre kullanımı temelli rejeneratif tedavilerdir. Kornea stroması rejenerasyonunda kornea limbusundan elde edilen kornea stroması kök hücrelerinin başarısını gösteren çalışmalar bulunmaktadır, ancak kornea stroma hücrelerinin terapötik amaçlarla kullanılmasında çeşitli zorluklar ortaya çıkabilmektedir [6]. Bu nedenle kornea dışı kaynaklı kök hücreler üzerinde daha çok durulmaya başlanmıştır. Özellikle

ağız dokusundan, kordon kanından, kalp dokusundan, kemik iliğinden ve yağ dokusundan kolaylıkla izole edilebilen mezenkimal kök hücrelerin (MKH) doku iyileşmesindeki önemi, tıbbın hemen her dalında iyi bilinmektedir [7-9]. Son yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalar MKH'lerin, farklılaşma potansiyelleri, anti-enflamatuar etkileri ve en önemlisi immün yanıtı modüle edici özellikleri sayesinde [10-13] oküler yüzey hastalıklarında stroma fonksiyonlarını ve kornea şeffaflığını tedavi etmedeki başarısını göstermektedir [14-16].

Son yıllarda düşük seviyeli lazer (LLL, *low level laser*) kullanılarak yapılan fotobiyomodülasyon (FBM) tedavisi, hücresel canlılığı, proliferasyonu ve migrasyonu, kolajen sentezi ve büyüme faktörleri seviyelerini düzenleyerek doku onarımını uyardığı için rejeneratif tıpta da uygulanmaktadır [17-20]. Ayrıca bu yöntem, MKH'lerin proliferasyonunu ve immünomodülatör fonksiyonlarını artırarak doku onarım kapasitesine olumlu katkıda bulunmaktadır [21-23]. Fotobiyomodülasyonda görünür (390-700 nm) ve yakın kızılötesi (NIR, *near-infrared*) (780-1200 nm) spektrumdaki fotonlar mitokondride sitokrom oksidaz sistemi tarafından absorbe edilerek adenosin trifosfat (ATP) üretimi ve nitrik oksit miktarı artmakta ve böylece dokuda hücresel fonksiyonlar iyileşmektedir [24]. Ancak bu çalışmalarda FBM uygulaması için optimum dalga boyuna ilişkin fikir birliği bulunmamaktadır. Son zamanlarda, NIR dalga boyları da dahil olmak üzere daha geniş spektrumda polikromatik ışığın uygulanması, optimum fayda için önerilmektedir [25]. Altı yüz nm'den 1200 nm'ye kadar geniş bir spektrumda ışık enerjisi uygulayabilen polikromatik ışık kaynağı kullanılarak doku onarımı için yeni bir yaklaşım uygulanmıştır. Polikromatik ışık ile yapılan FBM'nin kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında ve kas-doku flep canlılığının artırılmasında olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir [25, 26].

Fototerapinin mitokondriyal disfonksiyon temelli göz ve beyindeki dejeneratif bozukluklarda tedavi edici uygulamaları bulunmaktadır. Örneğin, FBM'nin retinitis pigmentosa ve yaşa bağlı maküler dejenerasyonu olan hastalarda olumlu etkileri rapor edilmiştir [27, 28], ancak oküler yüzey hastalıkları ve kornea hasarında FBM tedavisinin etkinliğini araştıran sınırlı sayıda çalışma

bulunmaktadır [29-31]. Oküler yüzey rejenerasyonunda etkinliği çalışılan FBM tedavilerinin, epitel hücrelerinin göçü kapasitesini kısa sürede artırabildiği [29], kuru göz bulgularında iyileşme sağladığı [30] ve tavşan modelinde alkali kornea yanığının iyileşme sürecinde keratosit hücrelerinin proliferasyonunu artırarak kornea iyileşmesinde önemli bir rol oynayabileceği ne sürülmüştür [31]. Ancak günümüze kadar özetlenen bu çalışmalarda tek dalga boyundaki ışık kaynakları ile FBM uygulaması yapılmıştır.

Sunulan tez çalışmasında sıçan korneasında mekanik yaralanma ile oluşturulan kornea opasite modelinde, adipoz doku kökenli MKH (AdMKH) ve polikromatik ışık kaynağıyla FBM tedavilerinin tek başına ve birlikte kullanımlarının kornea opasitesi, neovaskülarizasyonu, dokudaki enflamatuar yanıt ve doku mimarisi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, polikromatik ışık ile FBM tedavisinin kornea yara iyileşmesinde etkisi ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca FBM tedavisinin AdMKH enjeksiyonu ile birlikte uygulanarak terapötik etkinin arttırılması hedeflenmiştir. Bu alışma, ışık ve hücre terapisinin (AdMKH + FBM) kornea yara iyileşmesinde, tek başına AdMKH veya tek başına FBM tedavisi uygulamasına göre daha fazla terapötik etkisi olabileceği hipotezi üzerine kurulmuştur.

Tez alışması 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada sıçan yağ dokusundan MKH izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. İkinci aşamada korneada mekanik yara modeli oluşturulması ve FBM tedavisinde uygulanacak ışık dozunun optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. nc aşamada ise hayvan deney gruplarına polikromatik ışık ile FBM ve AdMKH tedavileri tek başına ve birlikte uygulanarak doku iyileşme yanıtı hem *in vivo* görüntüleme hem de *in vitro* doku analizleri ile değerlendirilmiştir. Son olarak, elde edilen sonuçlar istatistiksel analiz ile değerlendirilip literatür desteği ile yorumlanmıştır.

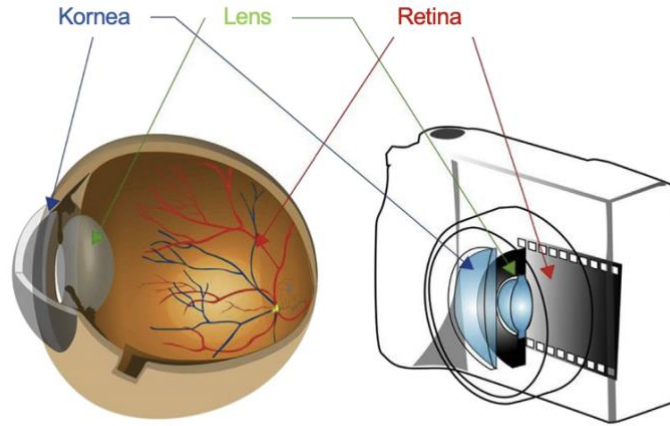
2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmasında bahsedilen konular hakkında güncel literatür ışığında detaylı bilgi verilmiştir. İlk kısımda kornea dokusu ve özellikleri anlatılmış, ikinci kısımda ise kornea hasarı ve mevcut tedavi yaklaşımlarına yer verilmiştir. Üçüncü kısımda kornea rejenerasyonundaki tedavi seçenekleri ve özellikle kök hücre temelli tedavi yaklaşımları üzerinde durulmuştur. Dördüncü kısımda ise çalışmanın temelini oluşturan FBM tedavisi hakkında detaylı bilgi verilmiştir.

2.1. Kornea Dokusu ve Özellikleri

2.1.1. Korneanın Yapısı

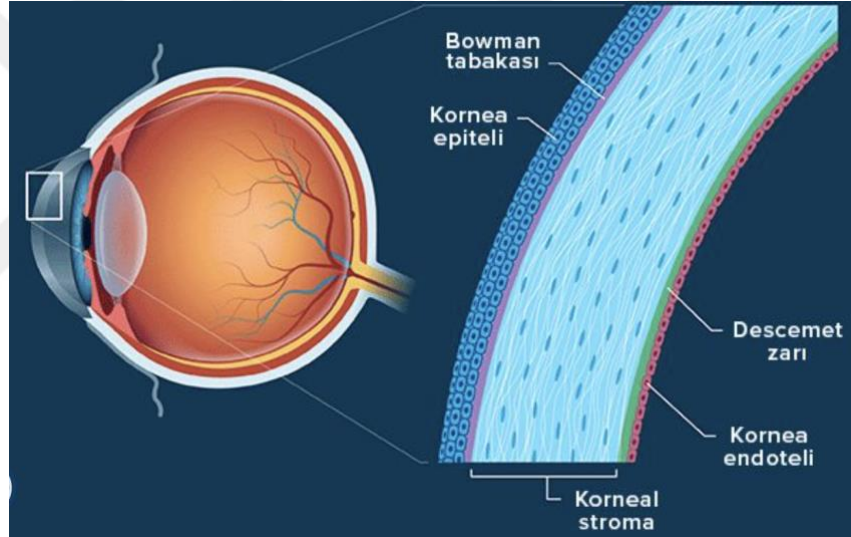
Kornea, göz küresinin avasküler, şeffaf ve kubbe şeklindeki en dış tabakasıdır. Korneanın lensle birlikte ana optik işlevi, ışığı retinaya odaklayacak şekilde kırmasıdır. Gözün kırma gücünün 2/3'ü kornea, 1/3'ü lens kaynaklıdır. Gözdeki kornea ve lens, kameradaki merceğe benzer şekilde, retina ise kameradaki filme benzer şekilde çalışmaktadır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Göz küresinin yapısı ([32]'den değiştirilerek).

Kornea dokusu beş ayrı katmandan oluşur: epitel, Bowman tabakası, stroma, Descemet membranı ve endotel (Şekil 2.2.). Tüm tabakalar kornea homeostazının korunmasında önemli rol oynamaktadır. Sağlıklı bir epitel, oldukça farklılaşmış ve kendini yenileyebilen hücre tipine sahip 3 katmandan

oluşmaktadır; germinatum tabakası, yavru/kanat hücreleri tabakası ve skuamöz hücre tabakası [33]. Kornea epiteli bakteri, mantar ve toz gibi yabancı maddelerin göze geçişini engellemekte ve gözyaşı filmindeki oksijenin korneaya geçişini sağlayan pürüzsüz bir yüzey sağlamaktadır. Kornea stroması kornea kalınlığının %90'ını oluşturan bağ dokusudur ve keratositler olarak bilinen az miktardaki stroma hücreleri ve üç ana protein grubundan oluşmaktadır: kolajenler, proteoglikanlar ve glikoproteinler. Stromadaki kolajen liflerinin düzenli hizalanması ve belli bir çapta olması korneanın saydamlığı ve biyomekanik gücünün korunması için önem taşımaktadır [33]. Kornea endoteli, kornea ile ön kamara arasında sınır oluşturan tek hücreli bir tabakadır. Kornea endotelinin işlevi, stromanın hidrasyonunu düzenleyen Na^+/K^+ ATPaz pompa fonksiyonunu kullanarak kornea saydamlığını korumaktır [34].



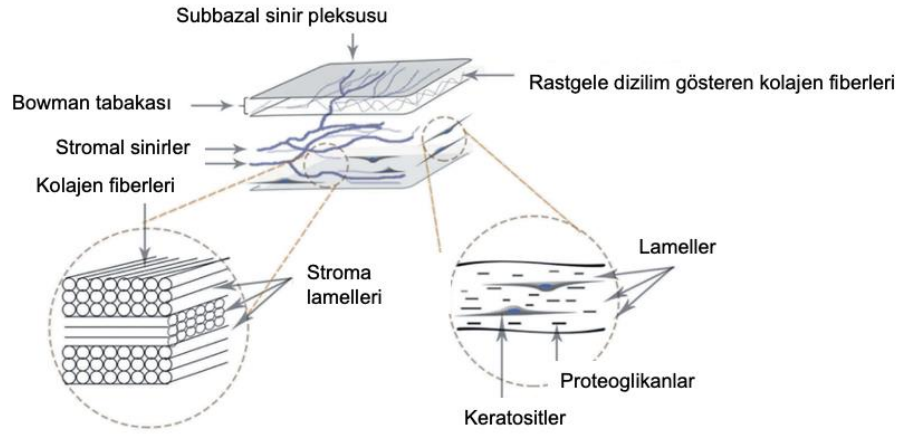
Şekil 2.2. Korneanın katmanları.

2.1.2. Kornea Stromasının Yapısı

Rastgele ve sıkı dizilim gösteren kolajen fibrillerinden oluşan 10 μm kalınlığındaki Bowman tabakasının arkasında, daha az kompakt fakat lameller yapıda organize olmuş kolajen fibrillerinden oluşan kornea stroması bulunmaktadır (Şekil 2.3.) [35]. Kornea stroması kolajenlerden, proteoglikanlardan, glikoproteinlerden ve bunları üreten kornea stroma hücrelerinden (keratositler) oluşmaktadır. Korneanın kuru ağırlığının %71'i kolajendir [36]. Kolajen ve proteoglikanlar, keratositler arasındaki hücre dışı matriksin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Keratositler ise stromanın yalnızca

%2-3'ünü oluşturmaktadır [36]. Kornea sinirleri stromadan geçerek ön stromada yoğun bir subbazal sinir pleksusu oluşturmaktadır.

Kornea kolajenleri çoğunlukla tip I'den, daha az miktarda ise tip III, V ve VI'dan oluşmaktadır [36]. Kolajen fibrilleri yaklaşık 25-35 nm çapındadır ve 200-250 nm kalınlığında katmanlar (lameller) halinde birbirine paralel ve ortogonal olarak yakın şekilde düzenlenmiştir [37]. Merkezi korneada limbustan limbusa uzanan yaklaşık 200-400 lamel bulunmaktadır. Lamel organizasyonu ve dağılımı kornea şeklini ve eğriliğini kontrol etmektedir (Şekil 2.3.) [37].



Şekil 2.3. Kornea stromasının katmanlarının şematik gösterimi ([35]'den değiştirilerek).

Kolajen fibril çaplarının görünür ışığın dalga boyundan daha küçük olması ve kırılma indeksinin korneadaki hücre dışı matriksine yakın olması nedeni ile kolajen fibrilleri göze gelen ışıklarda neredeyse hiç saçılmaya neden olmamaktadır [38]. Korneaya özgü bu kolajen dizilimi sayesinde göze gelen ışıklardaki saçılma korneada girişim ile engellenerek ışığın korneadan düzgün şekilde geçmesini sağlamaktadır [39]. Korneaya özgü bu eşsiz mikro mimari kornea saydamlığının korunması için önem taşımaktadır. Sonuç olarak, stroma tabakasının nano ölçekli organizasyonu korneanın gücünden, saydamlığından ve ışığı kırma yeteneğinden sorumludur. Doku mühendisliğiyle üretilen korneaların şu ana kadar kliniğe ulaşamamasının

temel nedeni bu eşsiz nano ölçekteki yapının tam olarak taklit edilememesidir [40].

Kornea stromasındaki ikinci ana protein grubu proteoglikanlardır. Proteoglikanlar bir veya daha fazla glikozaminoglikan yan zincirini içeren bir çekirdek proteinden oluşmaktadırlar. Kornea glikozaminoglikanlarının yaklaşık %65'i keratin sülfattır, geri kalanlar ise kondroitin sülfat ve dermatan sülfattır. Kornea stromasının çekirdek proteinleri arasında ise lumikan, keratokan ve mimekan, dekorin ve biglikan bulunmaktadır. Glikozaminoglikanlar yüksek miktarda suyu absorbe edip tutabilmekte ve böylece stromanın şişme basıncını oluşturmaktadır. Liflerin çapının ve diziliminin mükemmel kontrolünün yanı sıra interfibriler boşlukların düzenlenmesi kısmen glikozaminoglikanlar ve kolajenler arasındaki etkileşimler sayesinde [41].

Keratosit adı verilen stroma hücreleri, stroma boyunca bitişik lamellerin arasına düzenli olarak yerleşmiştir ve hücre dışı matriks bileşenlerinin salgılanmasından sorumludur [42]. Keratositler yaklaşık olarak her 2-3 yılda bir yenilenmektedir. Normal şartlar altında keratositler sessizdir, ancak stroma hasarlandığında yanıt olarak α -düz kas aktini (α -SMA, *α -smooth muscle actin*) açısından pozitif olan miyofibroblastlara dönüşebilmektedir [43]. Yara iyileşme yanıtında bu miyofibroblastlar düzensiz yapılanma gösteren kolajen fibrilleri ve proteoglikanlardan oluşan hücre dışı matriks üretimine neden olabilmekte ve sonuç olarak korneanın eşsiz mikro mimarisinde bozulma ve kornea opasitesi (bulanıklığı) gerçekleşebilmektedir [43].

2.2. Kornea Hasarı ve Tedavi Yaklaşımları

2.2.1. Kornea Hasarına Neden olan Hastalıklar

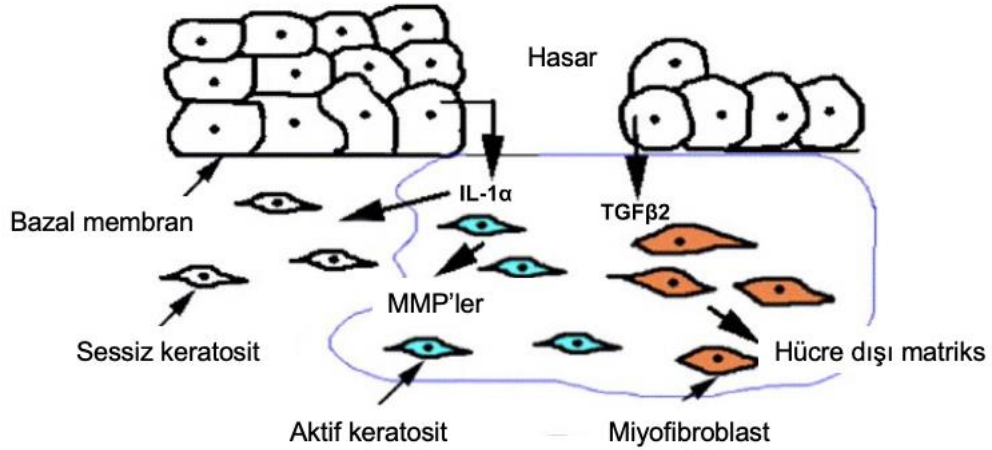
Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kornea opasitesi, dünya genelinde katarakt, glokom ve yaşa bağlı maküla dejenerasyonundan sonra en sık dördüncü körlük nedenidir [3]. Kornea opasiteleri dünya çapında 10 milyondan fazla insanı etkileyen küresel körlüğün önemli bir nedenidir ve trahom, oküler travma ve kornea ülserasyonu kornea opasitesinin başlıca nedenleridir [44]. Hindistan'da yapılan epidemiyolojik çalışmada 12.899 katılımcının %3,7'sinde kornea opasitesi saptanmış ve ilk üç nedenin pterjium (göz eti) (%34,5),

travma (%22,3) ve enfeksiyöz keratit (%14,5) olduğu tespit edilmiştir [45]. Çin'de 10.384 katılımcı üzerinde yapılan bir çalışmada, nüfusun %0,3'ünde kornea körlüğü olduğu bulunmuştur; bunun başlıca nedenleri ise çocukluk çağındaki keratit (kornea enfeksiyonu) (%40), göz travması (%33,3) ve yetişkinlikte görülen keratit (%20) olarak bildirilmiştir [46]. Kornea opasitesinin en sık nedenleri olan travma ve kornea enfeksiyonunun yanında kornea dejenerasyonu ve immünolojik bozukluklar, kalıtsal hastalıklar ve kornea refraktif cerrahi ameliyatları da keratosit ölümüne yol açabilmekte ve hayatta kalan keratositler stromal fibroblastlara ve miyofibroblastlara dönüşerek bulanıklık gelişimine ve hatta opaklaşmaya neden olabilmektedir [47, 48].

2.2.2. Kornea Yara İyileşme Yanıtı

Hafif kornea yaralanmalarında kornea stroması, saydamlığını ve avasküler yapısını koruyarak oldukça hassas bir şekilde yeniden şekillenebilmektedir [49]. Kornea epitelinin kaybı ya da çeşitli fiziksel veya kimyasal faktörlerle stromanın ağır hasar görmesi nedeniyle keratosit kaybı olabilmektedir [50]. Bu tür bir hasar, epitel hücrelerinden ve/veya gözyaşından başta interlökin 1 (IL-1) (α ve β) olmak üzere enflamatuar sitokinlerin salınmasını tetiklemekte ve Fas/Fas ligand sistemi yoluyla hızlı apoptoza ve daha sonra ön stroma keratositlerinin nekrozuna neden olmaktadır [51]. Yara onarımının erken aşamasında, yara kenarlarındaki hareketsiz keratositler özelliklerini değiştirerek fibroblastlara dönüşmekte ve bu hücreler yarayı yeniden doldurmak ve kapatmak için gerekli göç özelliklerini kazanmaktadır (Şekil 2.4.) [33]. Keratositlerin fibroblastlara dönüşmesinde fibroblast büyüme faktörü, platelet kökenli büyüme faktörü ve dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1, *transforming growth faktör- β 1*) gibi büyüme faktörleri aracılık etmektedir [33]. Bu hücreler, stres lifleri elde etmek ve morfolojilerini iğsi şekline dönüştürmek için aktin hücre iskeletini yeniden şekillendirmektedir. Bunun yanında kornea kristalinleri (transketolaz ve aldehit dehidrojenaz 1A1) ve keratan sülfat gibi farklılaşmış keratosit proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak yara yerindeki hücre dışı matriksi yeniden şekillendirmek için gerekli olan matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi proteinazları üretmeye başlamaktadır (Şekil 2.4.) [33]. Yara yatağına ulaşan fibroblastlar α -SMA ve desmini eksprese

etmeye başlamakta ve mevcut vimentin ekspresyonunu arttırmaktadır. Fibroblastlar yara yerindeki hücre dışı matriksi yeniden şekillendirmek için gerekli olan oldukça hareketli ve kasılabilir miyofibroblastlar haline gelmekte ve kasılarak yara alanını daraltmaktadır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Kornea onarımı sırasında hücresel etkileşimler ([52]'den değiştirilerek).

Ayrıca miyofibroblastlar fibronektin ve tenaskin-C ve kolajen tip III dahil bazı proteinler açısından zengin geçici hücre dışı matriksi de üretmektedirler [53]. Yeniden şekillenen hücre dışı matriksteki proteoglikanlar ve kolajen yapısı, sağlıklı korneanın eşsiz mimarisinde bozulmaya neden olmakta ve böylece ışığın korneadan geçerken düzensiz saçılmasına neden olan skar dokusu oluşmaktadır. Oluşan skar dokusu göze gelen ışığın korneadan geçişini engelleyerek görme keskinliğinin azalmasına ve sonunda görme kaybına neden olabilmektedir [54].

2.2.3. Kornea Hasarında Skar Dokusunu Azaltmaya Yönelik Klinik Yaklaşım

Mevcut klinik uygulama, yaralanma sonrası kornea skarını en aza indirmek veya azaltmak için büyük ölçüde %1 prednizolon asetat gibi steroid içeren oftalmik süspansiyon ve %0,02 mitomisin C dahil olmak üzere topikal ilaçların uygulanmasına dayanmaktadır [55]. Bununla birlikte, bu ilaçlar katarakt oluşumu, glokom ve korneoskleral erime gibi görsel açıdan önemli uzun vadeli komplikasyonlara neden olabilmektedir [55].

Kornea skarı fonksiyonel görmeyi olumsuz etkilediğinde güncel ana tedavi seçeneği, skarlı korneanın saydam olan insan donör dokusu ile değiştirildiği kornea nakli tedavisidir. Çoğu durumda, cerrahi müdahale görme yeteneğini geri kazandırabilmektedir. Stromadaki skar için 2 kornea nakli yöntemi vardır: tam kat kornea nakli ve derin ön lameller kornea nakli (alıcıda kornea endoteli korunarak sadece epitel ve stroma tabakası değiştirilmektedir.) [56]. Ancak bugün uygulandığı şekliyle kornea naklinin önemli kısıtlılıkları bulunmaktadır. Donör korneanın alıcının gözüne implantasyonunda, donör-alıcı doku ara yüzlerinde skar oluşumuna neden olma, yetersiz kornea sinir rejenerasyonu ile sonuçlanabilir, greftte yetersiz keratosit çoğalması, implante edilen greftin optimal olmayan eğriliği nedeniyle görmeyi azaltan düzensiz astigmat oluşumu ve donör dokusu içinde bulunan yabancı hücre kaynaklı immünolojik doku reddi gibi istenmeyen sonuçlar gelişebilmektedir [57-59]. İnsan donör stroma dokusunun kullanımının bu potansiyel dezavantajları önemli olabilse de kornea naklinin esas dezavantajları, bağışlanan korneaların küresel düzeyde kısıtlılığı ve donör kornealarının sınırlı bir zaman penceresi içinde tanımlanması, toplanması, taşınması, depolanması ve dağıtılması için altyapıyı sağlayan göz bankacılığı ihtiyacıdır [60]. Donör kornea dokusu ve göz bankacılığı ihtiyacı, milyonlarca önlenebilir kornea körlüğü vakasını çözümsüz bırakan önemli küresel sorunlardır.

2.3. Kornea Rejenerasyonundaki Tedavi Seçenekleri

Kornea ve endoteli hasarında kornea nakline alternatif olan ve doku rejenerasyonuna yönelik klinik kullanımda olan tedaviler tanımlanmıştır. Kornea epitelinin limbal kökenli kök hücreler kullanılarak terapötik rejenerasyonu sağlanmış ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA, *European Medicines Agency*) onaylı ilk kök hücre ürünü Holoclar® yaygın klinik kullanım kazanmıştır [61]. Benzer şekilde, endotelin rejenerasyon tedavisinde, donör endotel hücre süspansiyonu büllöz keratopati tedavisinde ilk klinik denemelere girmiştir [62].

Epitel ve endotel rejenerasyonuna benzer şekilde, stroma rejenerasyonu için de implantlar, doku iskeleleri ve kök hücre tedavileri yardımıyla dokunun yeniden onarımı kornea nakli problemleri göz önüne alındığında ideal bir tedavi yaklaşımı olmaktadır. Her ne kadar kornea stromasına yönelik klinik

kullanım için onaylanmış bir rejeneratif tedavi henüz ortaya çıkmamış olsa da çeşitli alternatif yöntemler önerilmiştir ve bazıları klinik deneme aşamasına gelmiştir [63-65]. Güncel araştırma konusu olan terapötik rejeneratif yöntemlerden aşağıda kısaca bahsedilmiştir.

2.3.1. İnsan Donör Stroma Lentikülü

Küçük insizyonlu lentikül ekstraksiyonu (SMILE, *small incision lenticule extraction*) refraktif cerrahi prosedürü, yüksek frekanslı femtosaniye lazerlerin mevcudiyeti ve ameliyat sonrası mükemmel kırma sonuçları nedeniyle son on yılda popülerlik kazanmıştır [66]. Prosedür, küçük bir diskin (lentikül) çıkarılmasını içermektedir. Korneayı düzleştirmek ve miyopiyi düzeltmek için merkezi stromadan yaklaşık 10-50 µm kalınlığında ve 6-8 mm çapında stroma dokusu çıkarılmaktadır. Bugüne kadar 26 milyonun üzerinde SMILE prosedürü gerçekleştirilmiş olup, potansiyel olarak stroma patolojilerinin tedavisi için geniş bir ince stroma lentikülü havuzu oluşturulmuştur. Bu yaklaşımı kolaylaştırmak için Ganesh ve ark. çıkarılan lentiküllerin uzun süreli saklanmasını mümkün kılan bir doku işleme ve dondurarak saklama (kriyoprezervasyon) tekniği geliştirmiş ve böylece çıkarılan lentiküller sıvı azot ortamında (<196°C) uzun süreli saklanabilmektedir [67]. SMILE sonrasında miyop hastalardan çıkarılıp dondurularak saklanan lentiküller daha sonra hipermetrop kornealara implante edilmiş ve allojenik ret bildirilmemiştir. Başka bir çalışmada, benzer şekilde elde edilmiş stroma lentikülleri kornea perforasyonu, kornea defekti ve travmatik kornea yırtığı olan vakaları tedavi etmek için fibrin yapıştırıcı yardımıyla implante edilmiş ve kornea saydamlığı ve bütünlüğünün korunduğu bildirilmiştir [68].

İnsandan insana doku implantasyonunun doğal biyouyumluluğu ve allogreft dokusunun immünojenitesinin kriyoprezervasyon yoluyla potansiyel olarak azaltılması bu yöntemin önemli avantajlarını oluşturmaktadır. Uzun dönemde stroma hücre infiltrasyonu ve implante edilen kolajenin dönüşümü ile rejeneratif bir etki elde edilebileceği öngörülse de bu etki henüz kanıtlanmamıştır ve bu nedenle lentiküllerin uzun vadeli başarısı bilinmemektedir.

2.3.2. Aselüler Domuz Korneası Stroması

Donör kornealarının teminini desteklemek için uygulanan hücresizleştirme yöntemleri, son yıllarda özellikle insan kornea nakli için insan dışı kornea dokusunun kullanılmasıyla popülerlik kazanmıştır. Domuz korneaları boyut, kalınlık ve biyomekanik özellikleri açısından insan korneasına benzer özelliklere sahip olması ve gıda işleme endüstrisinden kolayca elde edilebilmesi nedeniyle insan dışı korneaların kullanımında alternatif bir yöntem olmaktadır. Yabancı domuz kaynaklarını, zenojenik immünreaktivite olasılığını ve domuzdan insana hastalık bulaşma olasılığını azaltmak için hücresizleştirmek elzemdir. Ancak bu prosedürde endotel tabakası yok olduğu için sadece stroma replasmanı ve ön lameller kornea nakli ile sınırlı kalınmaktadır [69].

Hücresizleştirilmiş domuz korneaları mantar keratiti geçirmiş 47 hastaya ön lameller kornea nakli ile uygulanmış ve çoğu vakada enfeksiyon nüksetmemiş, ancak dört vakada neovaskülarizasyon ve greftin degradasyonu rapor edilmiştir [70]. Başka bir araştırmada, herpes simpleks keratitli 13 hastayı tedavi etmek için lameller kornea naklinde aselüler domuz kornea stroması kullanılmış ve ortalama 15 aylık postoperatif takip sonrasında 11 vakada neovaskülarizasyon ve 3 vakada greft degradasyonu meydana geldiği bildirilmiştir [71]. Bildirilen sonuçlara göre, gelecekte epitelizeasyon, şeffaflık ve greftin neovaskülarizasyonunun önlenmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Bununla birlikte, domuz kornea stromasının stromal rejenerasyona stabil bir şekilde izin verip veremeyeceği henüz tam olarak bilinmemektedir.

2.3.3. Balık Pulundan Türetilmiş Kornea

Stroma rejenerasyonu için kolajen bazlı iskelelerin bir diğer yenilikçi biyolojik kaynağı da *Tilapia* cinsi tatlı su balığının pullarıdır. Atık ürün olarak kabul edilen balık pulları, kornea hücresiyle uyumlu bir doku iskelesi üretmek için hücresizleştirilmiş ve kalsiyumdan arındırılmıştır [72]. Uygun kalınlıkta balık pulundan elde edilen şeffaf stroma doku iskelesi, tavşan kornealarına intrastromal implantasyon sonrasında değerlendirilmiş ve bu iskelenin, bir

bağışıklık tepkisi oluşturmada şeffaflığını koruyarak bir yıl boyunca kaldığı tespit edilmiştir [73]. Ancak bu yöntemin klinikte uygulanabilirliği henüz çalışılmamıştır.

2.3.4. Yapay Aselüler Kornea Stroması

İnsanlardan veya hayvanlardan toplanan dokuların kullanımını içermeyen stromal rejenerasyona yönelik bir başka yaklaşım, doku mühendisliği ile kornea stromasına benzer doku iskelelerinin üretilmesidir. Bu yaklaşımın istenilen fiziksel ve fizyolojik özelliklere sahip doku iskelelerinin kolaylıkla üretimi ve hayvan ya da insan dokusu kaynaklı immünolojik yapıya sahip olmaması gibi önemli avantajları bulunmaktadır. Böylece, doku implantının biyouyumluluğu büyük ölçüde artırılabilir. İmplant edilen stroma hücrelerinden, stromal rejenerasyon konakçı hücre infiltrasyonunu ve doku iskelesine göç eden yeni hücrelerin oluşturacağı yeni kolajen üretimini gerektirmektedir.

Üzerinde çalışılan implantlardan biri biyosentetik kornea stroması olarak adlandırılan, aselüler rekombinant olarak üretilmiş insan kolajeni temelli doku iskelesidir [74]. Biyosentetik iskele, mayada rekombinant şekilde üretilen insan kolajeninden oluşmuş ve toksik olmayan bir yöntemle çapraz bağlanarak güçlendirilmiştir. Bu biyosentetik iskele, ileri keratokonus ve kornea skarı olan 10 hastaya ön lameller kornea nakli ile implante edilmiş ve başlangıçta hafif kornea erimesi ve bulanıklık olduğu görülmüştür [75]. Uzun dönem takipte implante edilen iskelenin stabil kaldığı ve immün reaksiyonun olmadığı gösterilmiştir [76]. Hücresel düzeyde *in vivo* konfokal mikroskopi ile 3. yılda implant ve konakçı stromanın arayüz bölgelerinde konakçı stroma hücrelerinin mevcut olduğu görülmüş, ancak konakçı stroma hücrelerinin biyosentetik iskeleye net bir göçü tespit edilememiştir. Ancak iskelenin ön kısmında sinir rejenerasyonu ile subbazal sinir pleksusunun oluştuğu gösterilmiştir [76].

Konakçı hücrelerin doku iskelesine migrasyonuna alternatif bir yaklaşım olarak doku iskelelerine uygun hücrelerin implante edilmesine çalışılmaktadır. İspanyol bir ekip tarafından geliştirilen biyomühendislik ürünü insan allojenik nanoyapılı yapay kornea, insan kan plazması ve korneanın nano ölçekli

özelliklerine sahip bir fibrin-agaroz doku iskelesinden oluşmaktadır [77]. Donör insan kornea fibroblastları ve donör kornea limbal epitel hücreleri iskeleye implante edilmiş ve *in vitro* olarak iyi üretim uygulamaları (GMP, *good manufacturing practices*) koşulları altında bir ön lamel greft oluşturulmuştur. Bu implant ile dirençli nörotrofik ülseri olan 20 hastanın ön lameller kornea nakli ile tedavi edilmesine yönelik bir Faz I/IIA randomize çok merkezli klinik çalışma yürütülmüştür [64, 78]. Fibrin-agaroz iskelesi implante edilen ilk beş hastada, iki yıllık takipte enfeksiyon veya allojenik ret belirtisi olmaksızın ülserin tamamen iyileştiği gözlenmiş ve hastalar oküler semptomlarının düzeldiğini bildirmiştir [63].

Bu umut verici yaklaşım nihai değerlendirmeyi beklemektedir. Oluşturulan bu doku iskeleleri kalınlık, hiyerarşi ve mekanik dayanım açısından stroma mimarisinin yeniden oluşturulmasını, stroma hücrelerinin yeniden proliferasyonunu ve sinir innervasyonunu yeniden sağlayacak özelliklere sahip olmalıdır. Kornea nakli için küresel donör stroma dokusu eksikliğini gidermek için biyomühendislik ürünü olan bu implantların, daha biyoyumlu olması ve yeterli raf ömrüne sahip olması için çalışmalar devam etmektedir.

2.3.5. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Ürünleri

Stroma dokusu implantlarında kullanılan ham maddelerden yapılan biyomühendislik ürünü korneaların aksine üç boyutlu biyoyazıcı, üretilen stromanın yapısal organizasyonunu kontrol etmek için esneklik sunabilmektedir. Bir biyoyazıcı ayrıca farklı biyomateryalleri, hücreleri ve diğer faktörleri yüksek uzaysal çözünürlüğe sahip özelleştirilmiş bir matriskte birleştirme olanağı sağlamaktadır. Bu yönde ilk olarak, Connon ve ark. tarafından metakrilatlı tip I kolajen ve biyomürekkep olarak sodyum aljinat kullanılmış ve ardından kalsiyum klorür kullanılarak çapraz bağlanan 3 boyutlu biyobaskılı kornea stroma implantı yapılmıştır [65]. İnsan kornea keratositleri kolajen-aljinat biyomürekkep içerisinde 7 gün boyunca canlı kalabilmişlerdir.

Skottman ve ark. tarafından bildirilen alternatif bir yaklaşımda, tip I insan kolajeni, insan adipoz mezenkimal kök hücreleri ve insan plazmasını içeren içeren biyomürekkep kullanılarak 3 boyutlu biyobasım ile stroma implantı

oluşturulmuştur [79]. Keratosit veya fibroblast gibi allojenik farklılaşmış stroma hücreleri ile karşılaştırıldığında, kök hücrelerin yüksek onarım ve proliferasyon kapasitelerinin olması ve immün reaksiyona neden olmamaları gibi avantajları bulunmaktadır.

Yukarıda bahsedilen biyobasım yaklaşımları stroma rejenerasyonunu sağlamak için umut verici görünse de bu implantların uygun hayvan modellerinde *in vivo* değerlendirilmesi, implantasyon sonrası hücre canlılığının belirlenmesi, skar bırakmadan iyileşme ve yeni kolajen üretimi gibi stromal rejeneratif yeteneğinin gösterilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, bu ve benzeri 3 boyutlu iskeleler, seri üretime uygun, oldukça kontrol edilebilir bir üretim sürecine sahip olduklarından ve alternatif olarak hastanın korneasının durumu ve topografisine göre hastaya özel yapıların basımına olanak tanıdığından büyük önem taşımaktadır.

2.3. Kök Hücre Tedavisi

Fonksiyonel kornea eşdeğeri biyomalzemeler için doku mühendisliği alanında çalışmalar devam etmektedir. Keratositler çoğalmalarını destekleyebilen bu doku iskelelerine implante edilebilmektedir [80, 81]. Ancak iskele temelli tasarımların kullanımının bazı dezavantajları bulunmaktadır. Biyobozunmaları sırasında güçlü enflamatuar yanıt indüklenebilmekte ve neredeyse tüm polimer malzemeler spesifik olmayan bir enflamatuar yanıtı neden olmaktadır [82]. Ayrıca, iskelelerdeki periferik hücrelerin genel olarak sağlıklı olduğu ve doğal dokulara çok benzediği, ancak merkezi hücrelerin nekrotik bir çekirdek oluşturduğu ve bunun da çoğu zaman tatmin edici olmayan doku yenilenmesine yol açtığı sıklıkla gözlenmektedir. Bu nedenle hücre temelli terapiler daha iyi bir seçenek olarak kabul edilmektedir [6].

Kök hücreler, kendi kendini yenileme ve klonal çoğalma yoluyla sınırsız veya uzun süreli çoğalma gibi benzersiz yeteneklere sahiptirler. Kök hücreler, teorik olarak tüm fonksiyonel hücre türlerine farklılaşabilen embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler gibi pluripotent olabilir veya sınırlı fonksiyonel hücre tiplerine farklılaşabilen mezenkimal yetişkin kök hücreler gibi multipotent olabilirler [83, 84]. Plastisite ve çoğalma yetenekleri nedeniyle kök

hücreler, göz de dahil olmak üzere birçok doku ve organda doku rejenerasyonu için araştırılmaktadır [85]. Geçtiğimiz yıllarda, translasyonel araştırmalarda ve klinik çalışmalarda kornea körlüğünün tedavisinde kök hücrelerin kullanılması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

Kornea stroması rejenerasyonunda kornea limbusundan elde edilen kornea stroması kök hücrelerinin başarısını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [86, 87], ancak kornea stroma hücrelerinin terapötik amaçlarla kullanılmasının korneada alıcı yatağa zarar verebilme ve sınırlı sayıda hücre izolasyonu gibi dezavantajları bulunmaktadır [6]. Bu nedenle, kornea stroması kök hücreleri yanı sıra, göz dışı dokulardan elde edilebilen embriyonik kök hücre, adipoz doku kaynaklı kök hücre gibi MKH'ler de kornea skarını tedavi etme potansiyelleri açısından araştırılmaktadır. Etik tartışmalar ve yasal düzenlemeler embriyonik kök hücre kullanımını kısıtlamaktadır [83]. Bu nedenle yeni tedavi yaklaşımlarında farklı yetişkin dokularından elde edilen multipotent farklılaşma kapasitesi olan MKH'ler üzerinde daha fazla durulmaktadır.

2.3.1. Mezenkimal Kök Hücreler

Mevcut rejeneratif tıp stratejileri, farklı yaklaşımlar kullanılarak kornea stromasının yenilenmesine odaklanmıştır [87]. Bunlar, kornea stroma kök hücrelerinin ve diğer kök hücre türlerinin, sekretomlar formunda kök hücrelerden elde edilen büyüme faktörlerinin ve biyomühendislik ürünü yapay korneaların kullanımını içermektedir. Genellikle, yapay bir doku iskelesine kök hücre uygulamasına alternatif olarak mevcut kornea stromasına kök hücre uygulaması ile kornea stromasını onarmak ve yenilemek için kök hücrelerin doğrudan ve/veya parakrin fonksiyonlarının kullanılması amaçlanmaktadır.

Kök hücre terapisi, kornea stroması rejenerasyonunda ilk olarak kornea nakli gerektiren kornea skarının tedavisi için denenmiştir. Basu ve ark. insan kornea stroması kök hücrelerini allojenik limbal stromadan izole edip bu hücrelerin MKH benzeri özelliklere sahip olduğunu göstermiştir [86]. Bu kök hücreler hücre kültüründen izole edildikten sonra, stroma debridmanı yapılan fare korneasının ön stromasına implante edildiklerinde stromada skar bırakmadan

yara iyileşmesinin olduğu gözlenmiştir. Yakın zamanda yapılan bir araştırmada, sıvı azot ile fare korneasında geliştirilen skar modelinde kornea saydamlığının restorasyonunda kornea stroması kök hücre enjeksiyonundan sonra, tedavi edilen kornealarda opaklığın azaldığı, kornea hiperreflektivitesinin zayıfladığı, enflamasyonun azaldığı, kolajenin organizasyonunun arttığı, stromanın mikro mimarisinin iyileştiği, kornea sertliğinin azaldığı ve görmenin iyileştiği gösterilmiştir [88]. Hayvan deneylerinde elde edilen olumlu sonuçlar üzerine insanda herhangi bir patoloji veya cerrahiye bağlı gelişen kornea opasitelerinin tedavisinde kök hücre uygulamasının klinik çalışmaları devam etmektedir [87].

Mezenkimal kök hücreler, birden fazla hücre tipine farklılaşabilme potansiyeli yüksek fibroblastik hücreler olarak kabul edilmektedirler. Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ dokusu, diş pulpası, göbek kordonu, kas ve potansiyel olarak kornea stroması dahil olmak üzere birçok doku nişinde bulunmaktadır [89]. Mezenkimal kök hücrelerin çeşitli kökenleri olduğu göz önüne alındığında, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (*International Society for Cellular Therapy*), MKH tanımı için 3 ana kriter tanımlamıştır: (1) Plastik yüzeye tutunabilme, (2) Belirli yüzey belirteçlerinin ekspresyonu [farklılaşma kümesi 29 (CD, *cluster of differentiation*), CD44, CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonu; CD11b, CD14 (monosit/makrofaj belirteçleri), CD19 (B hücre belirteci), CD45 (lökosit belirteci) ve HLA-DR (T hücre belirteci) ekspresyonunun olmaması] ve (3) Üç ana hücre tipine (osteosit, kondrositler ve adipositler) *in vitro* farklılaşabilme [90].

Yaralanmaya yanıt olarak MKH'ler, Caplan tarafından tanımlandığı gibi dokuların iyileşme sürecini modüle etmede "ilk müdahaleciler" olarak hareket etmektedirler [91]. Bu yetenek, hasara tepki olarak salınan adezyon molekülleri, büyüme faktörleri, hücre dışı matriks proteinleri ve sitokinler arasındaki bir dizi karmaşık etkileşimlerle elde edilmektedir. Mezenkimal kök hücreler normal yara iyileşmesini yönlendirmek için yeterli dozda uygun parakrin faktörleri ortama salgılamaktadır [92]. Bu faktörlerin salımı, hücrelerin etkileşimi ve fonksiyonu tarafından belirlenmekte ve MKH aktivasyonu, migrasyonu ve yara iyileşmesinin modülasyonu ile sonuçlanmaktadır [93].

Mezenkimal kök hücreler, majör doku uygunluk kompleksi II'nin (MHC, *major histocompatibility complex*) ekspresyonunun olmaması, MHC I'in azalmış ekspresyonu ve hücre yüzeyi immünfenotipik belirteçlerinin bulunmaması sayesinde konakçıdaki bağışıklık tepkisinden kaçabilmektedirler [94]. Bu sayede MKH'ler hücre temelli tedavilerde ve rejeneratif tıpta önemli bir rol oynamaktadır [95]. Mezenkimal kök hücrelerin büyüme faktörü üretimi, anti-enflamatuar aktivitesi, immünomodülatör kapasitesi ve çoklu hücre soylarına farklılaşma konusundaki benzersiz yetenekleri nedeniyle son yıllarda oküler yüzey hasarı tedavisinde MKH temelli hücresel terapi üzerine giderek artan sayıda prelinik ve klinik araştırmalar yapılmaktadır ve bazı ülkelerde klinik tedavi olarak halihazırda kullanılmaktadır [96, 97].

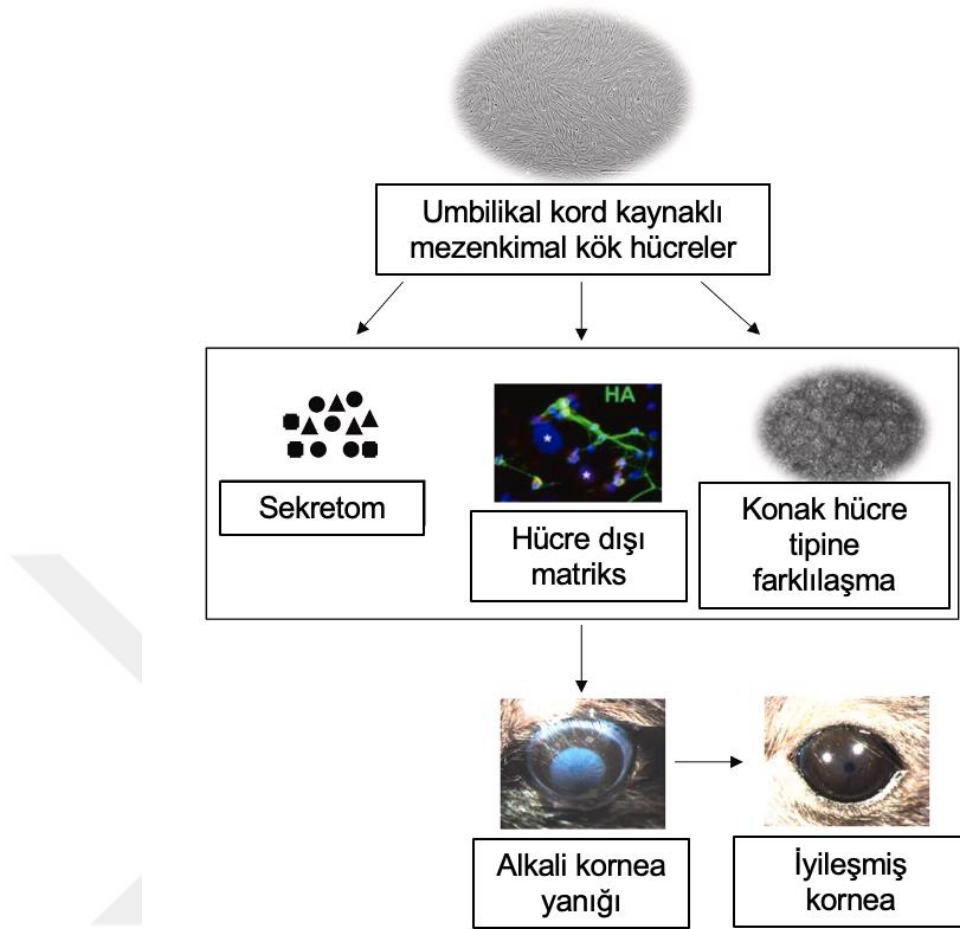
2.3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Kornea Stroması Rejenerasyonunda Kullanımı

Yapılan çalışmalar daha çok keratokonus, limbal kök hücre yetmezliği ve kornea opasitesinin tedavisine yöneliktir [35]. Özellikle MKH'lerin kornea hasarındaki tedavi etkisi üzerine birçok çalışma yapılmıştır [87]. Korneada hasar meydana geldiğinde, bağışıklık hücresi infiltrasyonunu teşvik eden pro-enflamatuar faktörler salınmakta ve bunun sonucunda korneada pro-enflamatuar bir ortam oluşmaktadır. Enflamasyon seviyesi kontrol edilemediğinde, yeniden epitelizasyon engellenip vaskülarizasyon başlar, düzensiz hücre dışı matriksi üreten stroma fibroblastlarının kontrolsüz aktivasyonu meydana gelir ve böylece kornea opaklaşır [52]. Mezenkimal kök hücreler immünomodülatör faktörler üreterek bu durumu kontrol edebilmekte ve başarılı yara iyileşmesinin tamamlanmasına izin verebilmektedir [95].

Kimyasal kornea yaralanmaları, kornea yüzeyinin yalnızca dış katmanını etkileyen küçük hasarlardan, kornea katmanlarının derinliklerine nüfuz ederek enflamasyon, skar ve görme kaybına neden olabilen daha ciddi alkali yanıklara kadar değişen şiddetlerde en yaygın göz yaralanmasıdır [98]. Korneanın kimyasal yaralanmasında, MKH'lerin kornea enflamasyonunu ve neovaskülarizasyonu önemli ölçüde baskılayan antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir [99]. Tavşan korneasında oluşturulan alkali yanık modelinde, nanofiber bir iskele üzerinde çoğaltılan tavşan kemik iliği

MKH'lerinin ve limbal kök hücrelerin korneanın yeniden epitelizasyonunu hızlandırdığı, antioksidan dengeyi yeniden sağladığı, enflamasyonu inhibe ettiği ve neovaskülarizasyonu azalttığı bulunmuştur [100]. Ayrıca MMP, TGF- β 1, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) ve α -SMA düzeylerinde de azalma izlenmiş ve bu da korneada neovaskülarizasyon ve skar oluşumunda azalmayı sağlamıştır. Birçok hayvan modelinde MKH'lerin anti-enflamatuar etkilerinin kornea rejenerasyonunda anahtar faktör olduğu bulunmuştur. Ke ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada subkonjonktival olarak enjekte edilen sıçan MKH'lerinin bir orkide türünden izole edip ürettikleri polisakkarit hidrojel ile birlikte uygulandığında kornea opasitesi, ödemi ve neovaskülarizasyonun azaldığı gösterilmiştir [101]. Başka bir *in vivo* çalışmada, korneanın mekanik yaralanmasında subkonjonktival olarak enjekte edilen limbal MKH'lerin, yaraya göç ederek ve anti-enflamatuar sitokinler üreterek kornea opasifikasyonunu ve neovaskülarizasyonu azaltabildiği gösterilmiştir [102]. Dolayısıyla şu ana kadar elde edilen kanıtlar, korneanın kimyasal yanıklarına yönelik bir tedavide MKH'lerin varlığının iyileşmeyi destekleyebileceğini ve geliştirebileceğini göstermektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin kornea hastalıklarında terapötik etkinliklerine nasıl ulaştıklarına ilişkin moleküler ve hücresel mekanizmalarla ilgili çeşitli bakış açıları vardır ve bunlar genellikle iki kategoriye ayrılmaktadır [103]; (1) Mezenkimal kök hücrelerin konakçı hedef dokulardaki hücre fenotiplerine farklılaşması. (2) Salgıladıkları sekretomlar (sitokin ve kemokinler) ve hücre dışı matriks bileşenleri ile konakta anti-enflamatuar ve immün modülatör etki göstermeleri (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Mezenkimal kök hücrelerin kornea hastalıklarında terapötik etki mekanizmaları ([103]'den değiştirilerek).

Mekanik debridman ile kornea yaralanmasında da MKH tedavisi hem stroma hem de epitel iyileşmesinde etkili bulunmuştur [104-107]. Çalışmaların önemli bir kısmında kök hücre tedavisi sonrası opasitede azalma, vaskülarizasyon düzeylerinde azalma ve epitelizasyonda iyileşme olduğu gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, MKH'lerin terapötik yeteneğinin hücrenin yara yerine göçü olmadan da ortaya çıkabileceği bulunmuştur [108]. İyileşmeyi teşvik etmek için MKH'ler mevcut keratosit ve epitel hücrelerinin farklılaşmasını, göç etmesini ve parakrin faktörleri üretmesini indükleyebilmekte veya MKH'lerin kendileri parakrin mekanizmaları veya farklılaşma yoluyla iyileşmeyi teşvik edebilmektedir. Şu ana kadar hangi mekanizmanın daha üstün olduğuna ya da hangisinin daha iyi etkiye sahip olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda MKH'lerin rejenerasyon kapasitesinin altında yatan en yaygın

mekanizma, MKH'lerin anti-enflamatuar ve immünomodülatör parakrin etkisi olarak bulunmuştur [109].

Sonuç olarak, MKH'ler, yeniden epitelizasyonu teşvik ederken, opaklığı ve vaskülarizasyonu azaltarak kornea yara iyileşmesi üzerinde güçlü bir etki gösterebilmektedir. Mekanizmaları çok faktörlü olmasına rağmen, hasara yanıt olarak ürettikleri anti-enflamatuar ve immünomodülatör faktörlerin, hücrel ortamı kontrol etmede ve yara iyileştirmede anahtar rol oynadığı açıktır.

2.4. Fotobiyomodülasyon Tedavisi

2.4.1. Fotobiyomodülasyon

Düşük seviyeli lazer terapisi (LLLT, *low level laser therapy*) ilk kez Dr. Mester tarafından tanımlanmıştır ve günümüzde de özellikle yara iyileşme ve doku rejenerasyonuna yönelik tedavi yaklaşımlarında uygulama alanı giderek artmaktadır [110]. Fotobiyomodülasyon veya fototerapi olarak da adlandırılan bu tedavide görünür ışık ve yakın kızılötesi (NIR, *near-infrared*) spektrumundaki (600-1100 nm) ışık kullanılmaktadır. Fotobiyomodülasyonun sitoprotektif faktörleri düzenleyerek ve hasara karşı koruma sağlayarak hasarlı mitokondri fonksiyonlarını eski haline getirdiği gösterilmiştir [111]. Bu bulgular, fototerapinin enflamasyonu engelleyebileceğini ve çeşitli dokularda bağışıklık cevabını ve yara iyileşmesini destekleyebileceğini düşündürmektedir [112]. Fotobiyomodülasyon tedavisinde görünür veya NIR spektrumundaki ışık, lazerler ve ışık yayan diyotlar (LED, *light-emitting diodes*) gibi iyonlaştırıcı olmayan ışık kaynakları ile uygulanmaktadır.

2.4.2. Fotobiyomodülasyonda Kullanılan Işık Kaynakları

Lazer, teorik olarak elektromanyetik radyasyon emisyonunun uyarılmasına bağlı olarak, optik amplifikasyon yoluyla ışık yayan bir cihaz olarak tanımlanmaktadır. “Lazer” kelimesi, Emisyon Radyasyonunun Stimülasyonu Yoluyla Işık Amplifikasyonunun (Light Amplification by Stimulation of Emission Radiation) kısaltmasıdır. İlk lazer, 1960 yılında Hughes Araştırma Laboratuvarları’nda Theodore H. Maiman tarafından icat edilmiştir. Doğada bulunmayan lazer ışını tek dalga boyunda, monokromatik ve birbirine paralel

olarak aynı fazda hareket eden (koherent) foton parçacıklarından oluşan ve saçılım göstermeyen bir ışın demetidir [112]. Çıkış gücü 100 W'a kadar olabilen yüksek seviyeli lazer uygulamasında, aşırı ısınma, ablasyon yoluyla doku tahribatı, pıhtılaşma, diseksiyon ve buharlaşma gibi yıkıcı etkiler görülmektedir. Miliwatt düzeyinde çıkış gücü olan düşük seviyeli lazer uygulamaları ise doku onarımı ve rejenerasyonunda kullanılmaktadır [112].

Fototerapide uygulanan diğer bir ışık kaynağı olan LED'ler, lazere benzer şekilde monokromatik ışık yayar, ancak koherent olmayan yani aynı fazda hareket etmeyen ışık kaynağıdır [112, 113]. Işık yayan diyotlar yalnızca ihmal edilebilir düzeyde ısı üretmekte ve bu da termal yaralanmayı engellemektedir [114]. Sınırlı bir alanda etki gösteren lazerin aksine LED'ler enerjinin geniş bir alana iletilmesine olanak tanımaktadır. Işık yayan diyotların klinik çalışmalarda insanda etkinliği ve güvenirliliği değerlendirilmiş ve LED'ler Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi (FDA, *US Food and Drug Administration*) tarafından onaylanmıştır [115].

Monokromatik ışık kaynağı olan lazer ve LED'lerden farklı olarak geniş bir dalga boyunda (morötesi, görünür ve NIR) polikromatik ışık yayabilen plazma ark ışık kaynakları da fototerapide kullanılmaktadır [116]. Plazma ark ışık kaynaklarında, inert gaz dolu basınçlı bir haznede iki farklı tungsten elektrot bulunmaktadır. Bu elektrotlar arasındaki boşlukta yüksek elektrik potansiyeli bulunmaktadır. Elektrotlar arasında yüksek voltajlı elektrik oluştuğunda çevrede bulunan ksenon gazı iyonize olarak plazma meydana gelmektedir. 'Plazma' kelimesi, yüksek sıcaklıkta, pozitif elektrotlardan ve iyonlardan oluşmuş iyonize gazı ifade etmektedir [116]. Tez kapsamında fototerapi için kullanılan Collagentex cihazı (Tanses Tech., Kanada) da polikromatik ışık yayabilen plazma ark ışık kaynağıdır.

2.4.3. Fotobiyomodülasyonun Etki Mekanizması

Fototerapi uygulamasında, hücrelerin biyolojik fonksiyonlarını değiştirmek için ışık enerjisi metabolik enerjiye dönüşmektir. Lazerin yüksek enerjili fotonlarının canlı doku ve hücrelerde sıcaklığı artırıp tahrip etmesiyle sonuçlanan etkileriyle karşılaştırıldığında, daha düşük enerji seviyesine sahip lazer ve LED

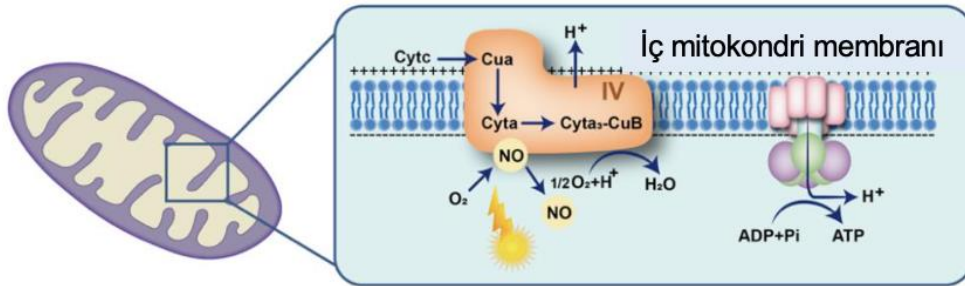
ışığı dokularda yan etkiye neden olmamaktadır. Ayrıca dokulara genellikle düşük dozda ışıma hedeflenmekte bu da yan etki riskini azaltmaktadır. Fotodinamik terapi, yan etkilere neden olmadan cilt hastalıklarında [117] ve sinir sistemi ile ilgili hastalıklarda elektriksel fotonöromodülasyon için kullanılabilir [118].

Klinik olarak, kırmızıdan NIR'ye kadar dalga boylarına karşılık gelen terapötik optik pencere (600-1100 nm), duyarlı hücre içi moleküllerin *in vivo* uyarılmasını destekleyen ışık enerjisiyle eşleşmektedir [119]. Bu nedenle NIR ışığı ile fototerapi kavramı, canlı hücreler ve dokulardaki bazı moleküllerin fotonları absorbe ederek ışık tarafından tetiklenen sinyal yollarını başlatabileceği teorisine dayanmaktadır [120]. Hemoglobin, melanin, oksihemoglobin daha kısa dalga boyundaki ışığı absorbe ederken su ve dokular 1100 nm üzerindeki dalga boylarındaki ışığı absorbe etmektedir. Bu kromoforlar tarafından absorpsiyon eğrisi 600-1100 nm dalga boyu aralığında minimum düzeydedir ve ışığın FBM için belirli fotoreseptörleri aktive etmesi için bu dalga boyu aralığı bir optik pencere sağlamaktadır [119]. Hücreler, kırmızıdan NIR'ye kadar olan ışığa duyarlıdır ve böylece hücre metabolizması, çoğalması ve göçü gibi hücresel aktiviteler değişmektedir [121]. Terapötik optik penceredeki ışıkla aktive edilebilen sitokrom c oksidaz, hücresel değişikliklere neden olan ana fotoreseptördür [114]. Ayrıca katalaz, süperoksit dismutaz, sitokrom b, guanilat siklaz ve nitrik oksit sentaz gibi diğer moleküllerde de fotoreseptörler bulunmaktadır [114, 115, 121].

Görünür ve NIR ışık, fotoreseptör sitokrom c oksidazı aktive eder, bu da enerji metabolizmasının artmasına, yara iyileşmesinin artmasına ve toksisitenin engellenmesine yol açmaktadır [114, 121]. Sitokrom oksidaz, elektromanyetik spektrumda kırmızı ve NIR bölgesindeki ışığın birincil fotoreseptörü olarak tanımlanmaktadır [122]. Sitokrom oksidaz, mitokondride elektron transferinde anahtar enzimdir ve sitokrom c'den oksijene elektron transferini katalize etmektedir. Sitokrom oksidaz aynı zamanda transmembran elektrokimyasal gradyanın oluşumunu desteklemek için redoks-bağlı proton pompası olarak da görev yapmakta ve enerji depolayan adenosin trifosfatı (ATP) sentezlemek için de hız sınırlayıcı işlevi bulunmaktadır [123]. 1990'larda Passarella ve ark. NIR

ışığın, sıçan karaciğerinin izole mitokondrisinden ATP sentezini önemli ölçüde arttırdığını ve oksijen tüketim düzeyini yükselttiğini keşfetmiştir [124]. Bir fotonun enerjisi sitokrom c oksidaza transfer edildikten sonra redoks durumunu değiştirebilmekte ve elektron transfer hızını artırarak ATP üretimini teşvik edebilmektedir. Böylece fototerapi, hücrel göçü, çoğalmayı ve canlılığı, kolajen üretimini, nitrik oksit ve büyüme faktörleri düzeylerini arttırarak ve gen regülasyonu yaparak doku onarımını teşvik etmektedir [125].

Ayrıca NIR ışığı, tekli oksijen ve elektronun oto-oksidasyonuyla oluşan süperoksit iyonu yoluyla serbest radikaller üretebilmektedir. 1990'larda Moncada ve ark. ilk olarak nitrik oksidin sitokrom c oksidaza bağlanabildiğini ve memeli hücrelerinin mitokondriyal solunum zincirini inhibe edebildiğini göstermiştir [126]. Ancak birçok çalışma, kırmızı ışıkla ışınlamanın hücre içi nitrik oksit düzeyini önemli ölçüde artırabileceğini göstermiştir [127]. Foton enerjisinin transferi, nitrik oksidin sitokrom c oksidazın demir ve bakırın bağlanma bölgesinden ayrılmasını kolaylaştırıp oksijen bağlanmasını teşvik eder ve böylece mitokondriyal solunumu, reaktif oksijen türlerini ve ATP oluşumunu arttırmak için uyarır (Şekil 2.6.) [127].



Şekil 2.6. Fototerapinin hücre içi redoks seviyeleri üzerindeki etkisinin şematik gösterimi ([128]'den değiştirilerek).

Ayrıca artan reaktif oksijen türleri, gen ekspresyonunu etkileyen çeşitli sinyal yollarını düzenleyen ikinci bir haberci olarak işlev görebilmektedir [129]. Artan reaktif oksijen türleri deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein sentezini uyararak hücre proliferasyonunu ROS/Akt yolu üzerinden indüklemektedir [130]. Fototerapi sadece mitokondride ATP üretim hızını

arttırmakla kalmamakta, aynı zamanda hücrel enflamatuvar faktörlerin salımını modüle ederek enflamasyonu baskılayabilmektedir [131].

Çalışmalar, FBM'nin MKH'lerin proliferasyonunu, farklılaşmasını, göçünü ve immünolojik fonksiyonlarını arttırarak doku onarımını hızlandırdığını göstermiştir [22]. Park ve ark., FBM'nin AdMKH'lerin apoptozunu engelleyerek canlılığını arttırdığını ve kök hücrelerden büyüme faktörlerinin salımını teşvik ettiğini göstermiştir [132]. Ayrıca son çalışmalarda, 5 J/cm² enerji yoğunluğunda FBM'ye maruz kalan AdMKH'lerin çoğalmasında artış olduğu ve ortama daha fazla büyüme faktörleri salgıladıkları izlenmiştir [133].

Düşük seviyeli ışık kullanılan fotobiyomodülasyon tedavisinde birden fazla memeli hücre tipinin bu tedaviye yanıt verebildiğine dair kanıtlar vardır [134]. Bu tedavide, görünür ve NIR dalga boyundaki ışık mitokondrideki kromoforlar tarafından emilerek hücrel fonksiyonu iyileştirerek hasarlı hücreleri onarmaktadır [135]. Ancak bu çalışmalarda FBM uygulaması için optimum dalga boyuna ilişkin fikir birliği bulunmamaktadır. Son zamanlarda, NIR dalga boyları da dahil olmak üzere daha geniş spektrumda polikromatik ışığın uygulanması, optimum fayda için önerilmektedir [25]. Altı yüz nm'den 1200 nm'ye kadar son derece geniş bir spektrumda ışık enerjisi uygulayabilen polikromatik ışık kaynağı ile yapılan FBM'nin kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasında ve kas-doku flep canlılığının arttırılmasında olumlu sonuçlar verdiği gösterilmiştir [25, 26].

2.4.4. Fotobiyomodülasyonun Göz Hastalıklarında Kullanım Alanları

Fotobiyomodülasyonun mitokondriyal disfonksiyonun esas rol aldığı bilinen göz ve beyindeki dejeneratif bozukluklarda tedavi edici uygulamaları vardır [111]. Örneğin, FBM'nin retinitis pigmentosa ve yaşa bağlı maküler dejenerasyonu olan hastalarda faydalı etkileri rapor edilmiştir [27, 28]. Bunun, ışık kaynaklı stresi, enflamasyonu ve hücre ölümünü azaltarak retinal dejenerasyona karşı koruma sağladığı [136], maküler dejenerasyonda kontrast duyarlılığını ve görme keskinliğini arttırdığı [137], fagositozu arttırdığı ve reaktif oksijen türlerinin üretimini azalttığı [138] ve diyabetik retinopatide yapısal ve fonksiyonel hasarları azalttığı gösterilmiştir [139].

Ayrıca, oküler yüzey için yapılan FBM tedavilerinin epitel hücre göç kapasitesini kısa sürede artırabildiği [29], kuru göz bulgularında iyileşme sağladığı [30] ve tavşanda alkali kornea yanığının iyileşme sürecinde keratositin yeniden popülasyonunu teşvik ederek kornea iyileşmesinde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür [31].



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez çalışması kapsamında yapılan deneyler hakkında detaylı bilgi verilmiştir. Sunulan tez çalışması, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay almıştır (Evrak tarih ve sayısı: 20.10.2020-E.112198) ve hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tez çalışmasının finansal desteği, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından Çok Disiplinli Araştırma Projesi kapsamında sağlanmıştır (Proje kodu: TCD-2021-6929).

Sunulan tez çalışması kapsamında ilk aşamada Wistar albino sıçanlardan AdMKH izolasyonu yapılmıştır. İkinci aşamada Wistar albino sıçan kornealarında mekanik yaralanma ile kornea opasite modeli oluşturulması hedeflenmiştir. Tezin üçüncü aşamasında polikromatik ışık kaynağı ile kornea yara iyileşmesinde FBM tedavisi için optimum parametreler belirlenmiş ve uygulanmıştır. Son aşamada ise tedavi uygulamalarının klinik görüntüleme ve doku analizi ile kornea yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonundaki etkileri araştırılmış ve tedavi sonuçları gruplar arasında istatistiksel analiz yapılarak değerlendirilmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar, Biyolojik ve Kimyasal Malzemeler

Hayvan çalışmalarında kullanılan 51 adet Wistar albino sıçan GÜDAM'dan temin edilmiştir. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan, Minimum Essential Medium Alpha Modifikasyonu (α -MEM), fetal sığır serumu (FBS, *fetal bovine serum*), fosfat tampon çözeltisi (PBS, *phosphate buffered saline*) ve sığır serum albumin (BSA, *bovine serum albumin*) Capricorn Scientific (Almanya) firmasından; tripsin-etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), penisilin/streptomisin, gentamisin, amfoterisin B ve kolajenaz Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. *In vivo* çalışmalardan önce AdMKH'leri işaretleme için kullanılan bromodeoksiüridin (BrdU, *bromodeoxyuridine*), Invitrogen Life Technologies (ABD) firmasından tedarik edilmiştir.

In vivo kornea yara modeli oluşturulmasında kullanılan elmas uçlu tur (Algerbrush II, Allomed, ABD) Gazi Üniversitesi Göz Hastalıkları AD'den; yaranın oluşturulması ve takibinde kullanılan cerrahi mikroskop (Leica, Topcon Corp., Japonya) ise GÜDAM'dan temin edilmiştir. Fotostimülasyon uygulamaları, Collagentex RX-1 (Tanses Tech., Kanada) polikromatik ışık kaynağı ile yapılmıştır. Sıçan gözlerine subkonjonktival AdMKH enjeksiyonu 33G hipodermik iğne (TSK Lab., Japonya) ile yapılmıştır.

Klinik görüntülemeye Gazi Üniversitesi Göz Hastalıkları AD'de bulunan yarık lamba mikroskobu (Haag-Streit, ABD) ve mikroskoba takılı dijital kamera (EyeSuite, Haag-Streit IM 900, ABD) kullanılmıştır. Korneanın *in vivo* kesitsel görüntülenmesi ise ön segment optik koherens tomografi (ÖS-OKT) (MS-39, CSO, İtalya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Ötenazi sonrası elde edilen kornea dokularına uygulanan histolojik incelemelerde; hematoksilen ve eozin (H&E) Sigma-Aldrich (Almanya); sitrat tamponu, %3 hidrojen peroksit ve Ultra Vision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) kiti Thermo (İngiltere) firmasından temin edilmiştir. İmmünohistokimyasal (İHK) analizde kullanılan antikorlardan kolajen tip I (COL1), kolajen tip III (COL3), TGF- β 1, IL-1 β ve keratokan Bioss (ABD) firmasından ve α -SMA ise Santa Cruz (ABD) firmasından satın alınmıştır. Histolojik kesitler Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD'deki mikrotom (Leica RM, Almanya) ile alınmıştır ve kesitlerin görüntülenmesi ZEISS Axiolab 5 (Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskobu ile yapılmıştır.

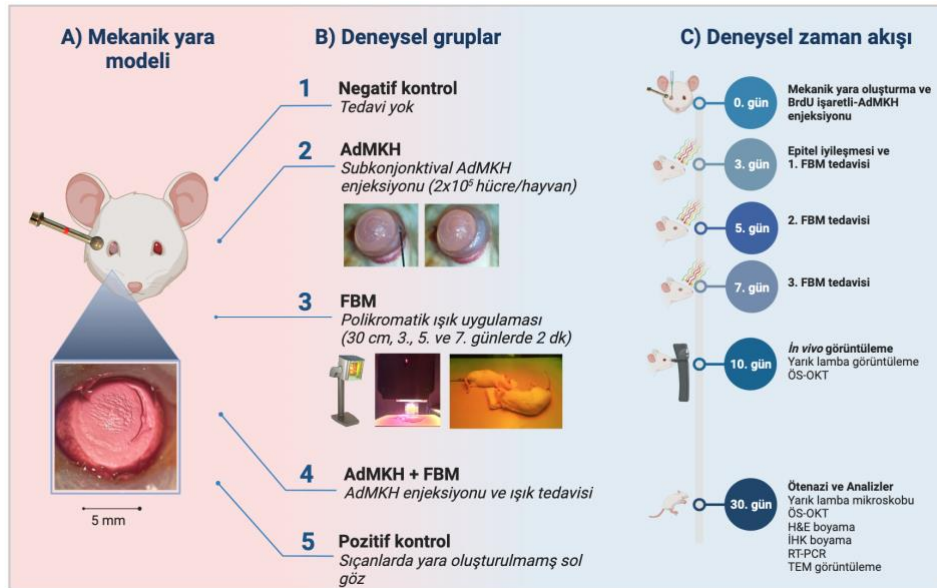
COL1, COL3, TGF- β 1, IL-1 β , keratokan ve α -SMA gen ifadelerinin belirlenmesi için yapılan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizinde kullanılan trizol ve RNeasy Mini Column Kiti Qiagen (ABD); cDNA Kiti Applied Biosystems (ABD); Hot FirePol Eva Green qPCR Mix Plus ise Solis BioDyne (Estonya) firmalarından satın alınmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizi Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik AD'de bulunan LightCycler Nano (Roche, İsviçre) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Geçirimli elektron mikroskopi (TEM, *transmission electron microscopy*) analizinde kullanılan %2 glutaraldehit, %1 osmiyum tetroksit, propilen oksit ve

kurşun sitrat Sigma-Aldrich (Almanya); süksinik anhidrit, benzil dimetilamin ve dibütil fitalid içeren araldit CY 212 karışımı Ciba-Geigy (İsviçre); uranil asetat ise ProSciTech (Avustralya) firmasından temin edilmiştir. İnce kesitler Başkent Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD'de hazırlanmış ve fotomikroskopla (DM 500 Leica, Almanya) incelenmiştir. TEM örneklerinin görüntülenmesi ise ODTÜ Merkez Laboratuvarı'nda Tecnai G2 Spirit (FEI Company, ABD) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. Çalışma Tasarımı

Tez çalışmasının amacı, sıçan kornea yara modelinde AdMKH ve FBM tedavilerinin tek başına veya birlikte uygulamasının kornea saydamlığı ve hücre dışı matris organizasyonu üzerindeki terapötik etkinliğini test etmektir. İlk olarak, elmas uçlu tur aracılığıyla epitel ve anterior stromanın mekanik debridmanı ile kornea opasite modeli oluşturulmuştur. Tedavi gruplarına göre allojenik sıçan AdMKH'lerinin subkonjonktival enjeksiyonu ve FBM tedavisi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Yaralanmayı takip eden 10. ve 30. günde korneada opasite ve neovaskülarizasyon oluşumu yarıklı lamba muayenesi ile değerlendirilmiş ve kornea kalınlığı ÖS-OKT ile ölçülmüştür. Yaralanmayı takiben 30. günde ötenazi sonrası eksize edilen kornealar histolojik değerlendirme, İHK boyama, RT-PCR ve TEM ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.1. A) Kornea yara modelinin oluşturulması B) Tedavi grupları C) *In vivo* ve *in vitro* analizler.

3.3. Sıçan AdMKH'lerin İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu

Allojenik AdMKH izolasyonu için 3 adet Wistar albino sıçan kullanılmıştır. Sıçanlara anestezi uygulandıktan sonra cerrahi alana %10 povidon iyot solüsyonu (Battikon, Türkiye) ile antisepsi uygulanmıştır. Abdominal cilt kesisini takiben abdominal boşluğa ulaşılarak gonodal ve perirenal yağ dokusu künt diseksiyonla çıkarılmıştır. Elde edilen yağ dokusundan sıçan AdMKH'lerinin izolasyonu, hazırlanması ve kültüründe tez danışmanına bağlı grubun uyguladığı protokol kullanılmıştır ve aşağıda özetlenmiştir [140]:

- Eksize edilen yağ dokuları %4 (v/v) penisilin/streptomisin içeren PBS ortamında izolasyona kadar soğuk koşullarda saklanmıştır. Üç saat dolmadan hücre izolasyonuna başlanmıştır.
- Laminer akışlı kabin içerisinde dokular 4 kez %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren PBS içerisinde yıkanmış ve Petri kaplarına alınarak steril bisturi yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Damar yapıları olabildiğince uzaklaştırılmıştır.
- Doku parçaları steril santrifüj tüplerine aktarılıp dokunun parçalanması amacıyla her bir sıçan için 4 mL kolajenaz enzimi (%0,075 kolajenaz IA (w/v), PBS içerisinde) eklenmiştir. Doku parçalarını içeren santrifüj tüplerine 15 dk arayla vorteks uygulanmış ve toplamda 60 dk 37°C'de inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda kolajenaz etkisini durdurmak için tüplere kolajenaz miktarının iki katı kadar kültür ortamı eklenerek homojenizasyon yapılmış ve 1800 rpm'de 5 dk santrifügasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Santrifügasyon sonunda süpernatant tüplerden uzaklaştırılıp dokular 3 kez kültür ortamıyla yıkanmış ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj uygulanmıştır.
- Santrifügasyon sonrası elde edilen hücreler gözenek çapı 70 µm olan steril filtreden geçirildikten sonra hücreler %15 (v/v) FBS, %1 (v/v) L-glutamin, %0,2 (v/v) gentamisin, %0,4 (v/v) penisilin-streptomisin ve %0,2 (v/v)

amfoterisin B içeren α -MEM ortamı ile süspanse edilerek 25 cm² yüzeyli polistiren kültür kaplarına aktarılmıştır.

İzolasyonu tamamlanan AdMKH'ler %5 CO₂ içeren ortamda 37°C'de inkübe edilmiştir (Heraus Instruments, Almanya). Hücreler kültür kabının %75'ini kaplandıktan sonra (confluency) pasajlama işlemi yapılmıştır. Pasajlama için öncelikle üreme ortamı uzaklaştırılıp Dulbecco's PBS ile kap yüzeyi yıkanmıştır. Yıkamadan sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması için %0,25 (v/v) EDTA içeren tripsin ile 37°C'de 5 dk boyunca enzim muamelesi yapılmıştır. Tripsinize edilen hücreler kültür ortamı ile yıkandıktan sonra 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve kültür ortamı ile süspanse edilerek 1:3 oranında pasajlanmıştır. Dondurma ortamı olarak, %10 (v/v) dimetil sülfoksit içeren FBS kullanılmıştır.

Pasaj 3 AdMKH'ler kök hücre karakterizasyonu için yüzey belirteçleri açısından Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi'nde akış sitometri (Navios, Beckman Coulter, ABD) ile analiz edilmiştir. Bu amaçla, kök hücrelerde eksprese edildiği bilinen 3 pozitif (CD44, CD29 ve CD90) ve hematopoetik kök hücre belirteci CD45 ile lökosit belirteci CD11b olmak üzere 2 negatif yüzey belirteci incelenmiştir. Ayrıca optik mikroskopik görüntülemeye de hücre morfolojisi incelenmiştir.

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu yapıldıktan sonra Pasaj 4 ve 5'ten elde edilen AdMKH'ler subkonjonktival enjeksiyon için deneylerde kullanılmıştır. Hücreler enjeksiyondan önce BrdU reaktifi (Invitrogen Life Technologies, ABD) ile işaretlenmiştir. Kültüre edilmiş AdMKH'ler, 1:100 (v/v) BrdU içeren besi ortamı ile 37°C'de 2 sa inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra 2 kez PBS ile yıkanmış ve yukarıda belirtilen tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmıştır. Sayımı yapılan hücreler, her bir sıçana 10 μ L'de enjeksiyon yapılacak şekilde 2×10^5 hücre/sıçan dozunda ayarlanmış ve PBS içerisinde yeniden süspanse edilmiştir.

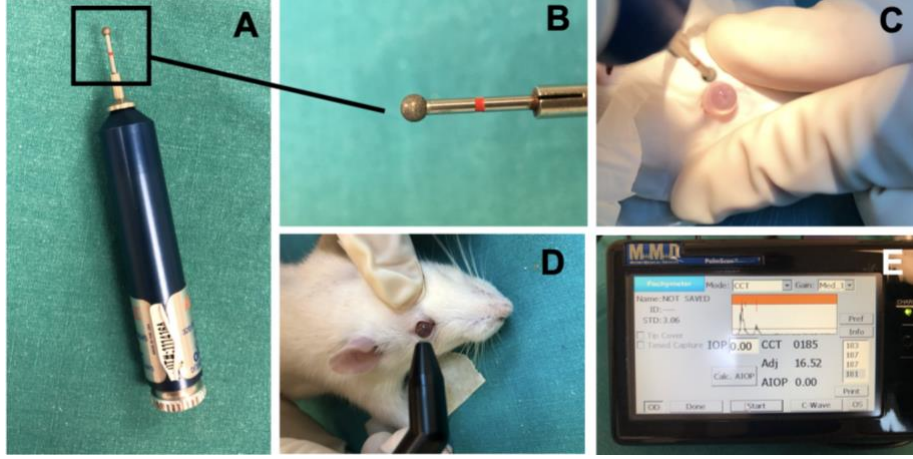
3.4. Sıçanlarda Kornea Mekanik Yara Modeli Oluşturma

Hayvanların bakımı ve deney tasarımı, hayvanların oftalmoloji ve görsel bilim çalışmalarında kullanımına ilişkin ARVO beyanına uygun olarak yapılmıştır.

Çalışma protokolü Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay numarası: E.112198).

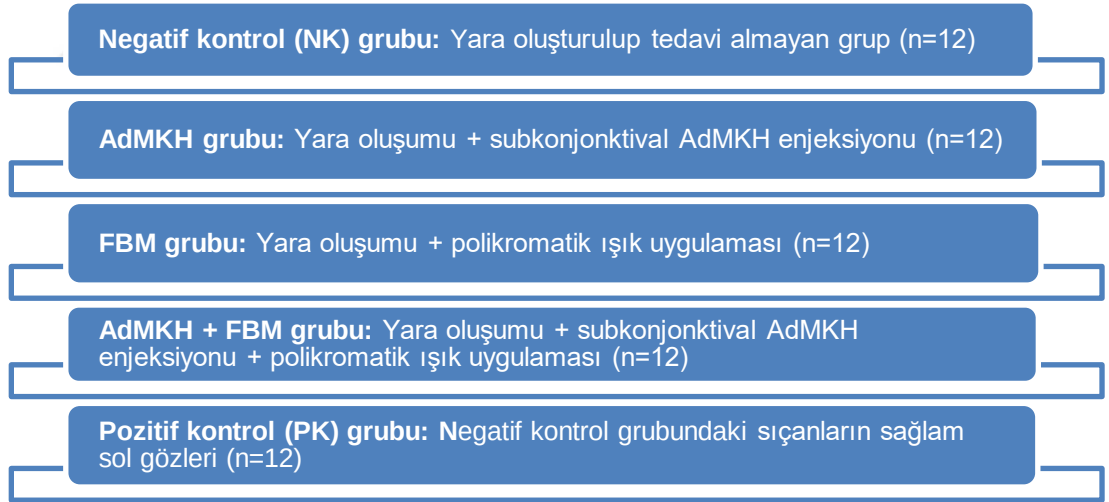
Deneylerde 51 adet Wistar albino sıçanı (9-12 haftalık, 200-300 g ağırlığında) kullanılmıştır. Yara modeli indüksiyonu ve tedavilerden önce sıçanlara ksilazin (10 mg/kg) (Rompun, Bayer, Türkiye) ve ketamin hidroklorür (80 mg/kg) (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) intraperitoneal enjeksiyonu ile genel anestezi ve %0,5 proparakain hidroklorür (Alcaine, Alcon, ABD) topikal göz damlası ile lokal anestezi uygulanmıştır. İşlem öncesi tüm gözler biyomikroskop altında enfeksiyon, skar, kornea neovaskülarizasyonu varlığı açısından muayene edilmiştir ve sadece sağlam olan gözler çalışmaya dahil edilmiştir.

Kornea yara modeli oluşturmak için Sahu ve ark. tarafından önceden tanımlanan deneysel korneal mekanik abrazyon gerçekleştirilmiştir [141]. Sistemik ve topikal anestezi sonrasında hayvanların (n=48) sağ gözlerine %5 povidon iyot solüsyon uygulandıktan sonra cerrahi mikroskop altında (Leica, Topcon Corp., Japonya) elmas uçlu tur (Algerbrush II, Allomed, ABD) ile her sıçanın sağ korneasının üst parasantral alanında epitel ve ön stromayı (toplam kornea kalınlığının yaklaşık 1/3'ü kadar) içeren 5 mm çapında dairesel bir abrazyon oluşturulmuştur (Şekil 3.2. A-C). Abrazyon öncesi kornea kalınlığı ultrasonik pakimetri cihazı (Palmscan, MMD, ABD) ile ölçülmüştür ve abrazyon sırasında da aralıklı pakimetri ölçümleri ile korneanın 1/3 kalınlığına kadar abrazyon yapıldığı kontrol edilmiştir (Şekil 3.2. D ve E).



Şekil 3.2. Kornea yara modelinin oluşturulması A) Elmas uçlu tur B) Turun başlığının yakından görünümü C) Korneanın tur ile abrazyonu D) Ultrasonik pakimetri ile kornea kalınlığının ölçümü E) Pakimetrik ölçümün ekran görüntüsü.

Tüm hayvanlar, mekanik yaralanmanın ardından her bir grupta 12 sıçan olacak şekilde rastgele dört gruba ayrılmıştır. Negatif kontrol grubunun yaralanmamış sol gözleri pozitif kontrol (sağlam göz) olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Çalışma grupları.

Kornea enfeksiyonunu önlemek için kornea abrazyonunu takiben tüm gruptaki sıçanların gözlerine %0,5 moksifloksasin içeren topikal göz damlası (Moxai, Abdi İbrahim, Türkiye) 4 gün boyunca günde 3 kez tüm sıçanlara uygulanmıştır.

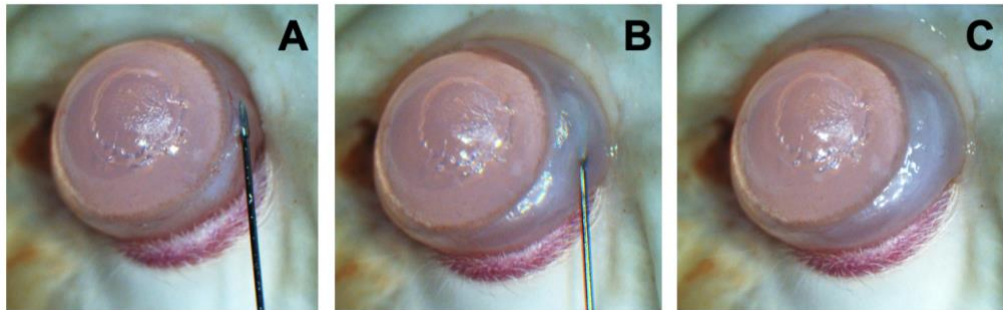
Tüm işlemler Gazi Üniversitesi GÜDAM'da yarı patojenden arındırılmış bölgede her hayvanın sadece sağ gözüne uygulanmış, sol gözleri sağlam bırakılmıştır. Deneyin sonunda intrakardiyak yüksek dozda ketamin enjeksiyonu ile ötenazi uygulanmış ve ileri analiz için tüm kornealar eksize edilmiştir.

3.5. *In vivo* Tedavi Protokolleri

3.5.1. Sıçan AdMKH Uygulaması

Korneaya AdMKH uygulaması için öncelikli olarak intrastromal (kornea stroması içerisine) enjeksiyon denenmiştir. Bunun için piyasada bulunan en ince uçlu olan hayalet iğne (0,2 mm x 9 mm) kullanılmıştır. Ancak sıçan korneası toplam kalınlığının 150-200 µm arasında olması ve kullanılan iğnenin çapının daha kalın olması nedeniyle kornea için yapılan enjeksiyon denemelerinin yaklaşık 1/3'ünde kornea perforasyonu oluşmuş ve bu yöntemden vazgeçilmiştir.

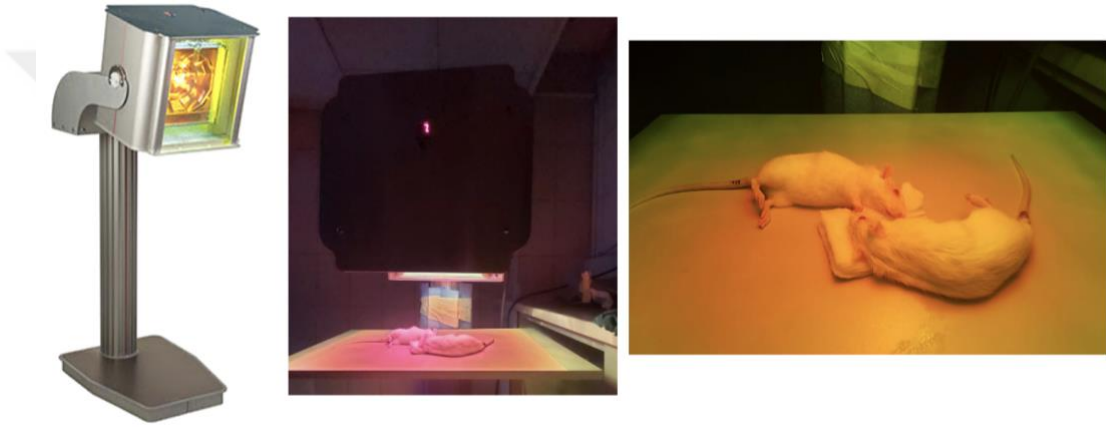
Bu nedenle tez çalışmasında sıçanlarda kornea yara iyileşmesinde olumlu sonuçlar gösteren subkonjonktival MKH uygulaması yapılmıştır [10]. Abrazyonun ardından, AdMKH grubundaki sıçan gözlerine, 2×10^5 BrdU işaretli AdMKH içeren 10 µL PBS süspansiyonu kornea yara bölgesine yakın subkonjonktival alana 33G bir iğne (TSK Lab., Japonya) ile enjekte edilmiştir (Şekil 3.4. A). Yapılan enjeksiyon sonrası subkonjonktival alanda şişme olduğu ve bir rezervuar alanı olduğu görülmüştür (Şekil 3.4. B ve C).



Şekil 3. 4. Subkonjonktival AdMKH enjeksiyonun basamakları A) Pasaj 4 ve 5 AdMKH'lerin 2×10^5 hücre/hayvan yoğunlukta subkonjonktival enjeksiyonu B) Enjeksiyon sırasında konjonktivanın şişmesi C) Enjeksiyon sonrası rezervuar alanı.

3.5.2. Polikromatik Işık ile Fotobiyomodülasyon Uygulaması

Fotobiyomodülasyon tedavisini gerçekleştirmek için 633, 666, 712, 812, 1018 ve 1128 nm (görünür ve NIR ışık) dalga boylarında ışık enerjisi yayan polikromatik ışık kaynağı (Collagentex RX-1, Tanses Tech., Kanada) kullanılmıştır (Şekil 3.5.). Altı yüz nm ile 1200 nm arasındaki herhangi bir emisyon, cihazın kendisi tarafından bloke edilebilmektedir. Özel filtre ve kuvars plazma ark lambasına sahip cihazın çıkış gücü 685 W'dır. Polikromatik ışık 0,3 m² alanda etki göstermektedir. Dış akrilik bariyerden 30 cm mesafedeki enerji yoğunluğu 2,3 J/cm².dk olarak ölçülmüştür.



Şekil 3.5. Tez çalışmasında kullanılan polikromatik ışık kaynağı (Collagentex) ve sıçanlara polikromatik ışık uygulaması.

3.5.2.1. Uygulanan Işık Dozunun Optimizasyonu

Polikromatik ışık uygulaması, ilk aşamada yara oluşturulduktan hemen sonra 20 cm mesafeden 10 dk olacak şekilde 1 gün ara ile 3 kere yapılmıştır, ancak postoperatif 10. gün kontrolünde korneada yara oluşturulan alanda artmış kornea ödemi ve neovaskülarizasyonu izlenmiştir. Korneada yara bölgesine komşu sağlam epitel altındaki stromada ise bu bulgular izlenmemiştir. Artmış kornea ödemi ve neovaskülarizasyonun termal yanığa bağlı olduğu düşünülmüştür ve yara oluşumu sonrası epitel kapandıktan sonra uygulanacak ışık dozunun optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Optimizasyon çalışması için her grupta 2 sıçan gözü olacak şekilde 5 grup oluşturulmuştur. Kornea abrazyonundan hemen sonra düşük doz ışık

uygulamasının etkisini görmek için 30 cm mesafeden, 1 gün ara ile toplamda 3 kere 3'er dk olacak şekilde FBM uygulaması yapılmıştır. Diğer sekiz sıçanda ise epitel defekti kapandıktan sonra optimizasyon çalışması yapılmıştır. Tüm sıçanlarda 3. günde epitelin kapandığı izlenmiştir. Epitel kapandıktan sonra tüm kornealara 30 cm mesafeden, 1 gün ara ile toplamda 3 kere aşağıda belirtilen sürelerde polikromatik ışık uygulanmıştır ve gün aşırı yara iyileşme yanıtı ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

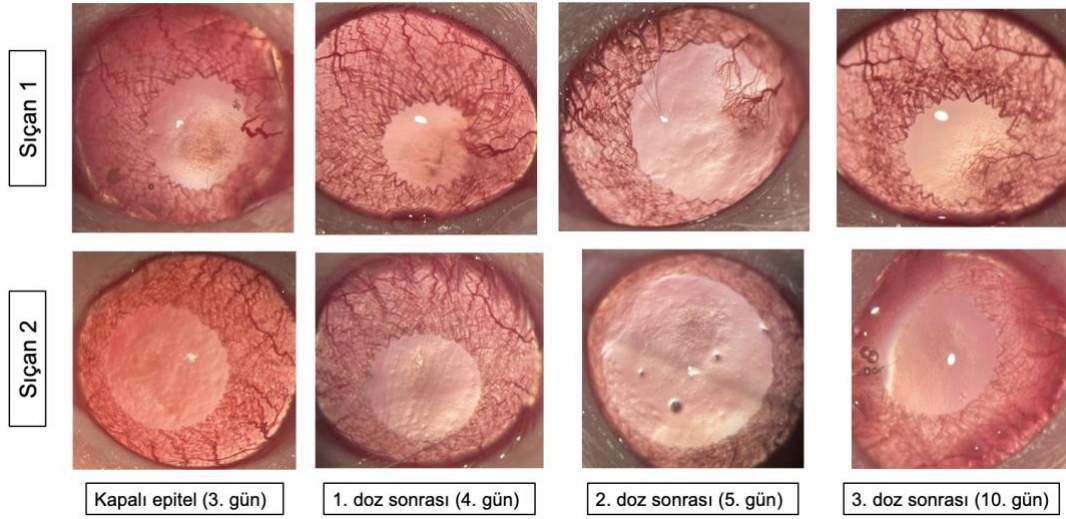
- Grup 1 (kornea abrazyonu yapıldıktan hemen sonra FBM): 3-3-3 dk
- Grup 2 (epitel kapandıktan sonra FBM): 3-3-3 dk
- Grup 3 (epitel kapandıktan sonra FBM): 2-2-2 dk
- Grup 4 (epitel kapandıktan sonra FBM): 1-1-1 dk
- Grup 5 (epitel kapandıktan sonra FBM): 1-2-3 dk

Grup 1'de önceki kornea abrazyonu yapıldıktan hemen sonra yüksek doz polikromatik ışık uygulanan sıçanlardakine benzer şekilde korneada artmış skar ve neovaskülarizasyon izlenmiştir (Şekil 3.6.).



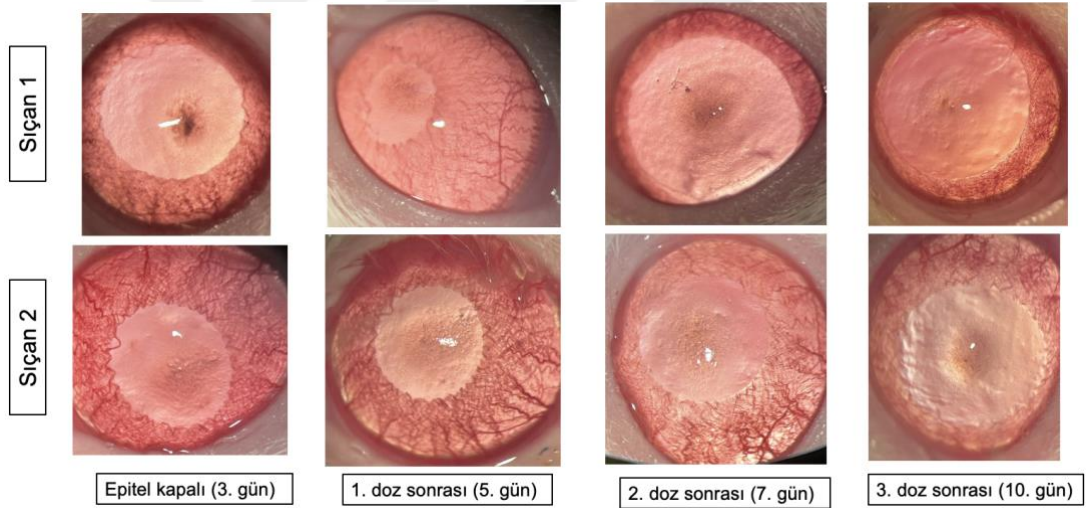
Şekil 3.6. Grup 1'de kornea abrazyonundan hemen sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 3'er dk FBM uygulaması.

Grup 2'de bir sıçanda iyileşme yanıtı iyi iken diğer sıçanda 3. doz polikromatik ışık uygulamasından sonra vaskülarizasyonda artış olduğu görülmüştür (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Grup 2’de epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 3’er dk FBM uygulaması.

Grup 3’te her iki sıçanda da iyileşmenin belirgin olduğu izlenmiştir (Şekil 3.8.).



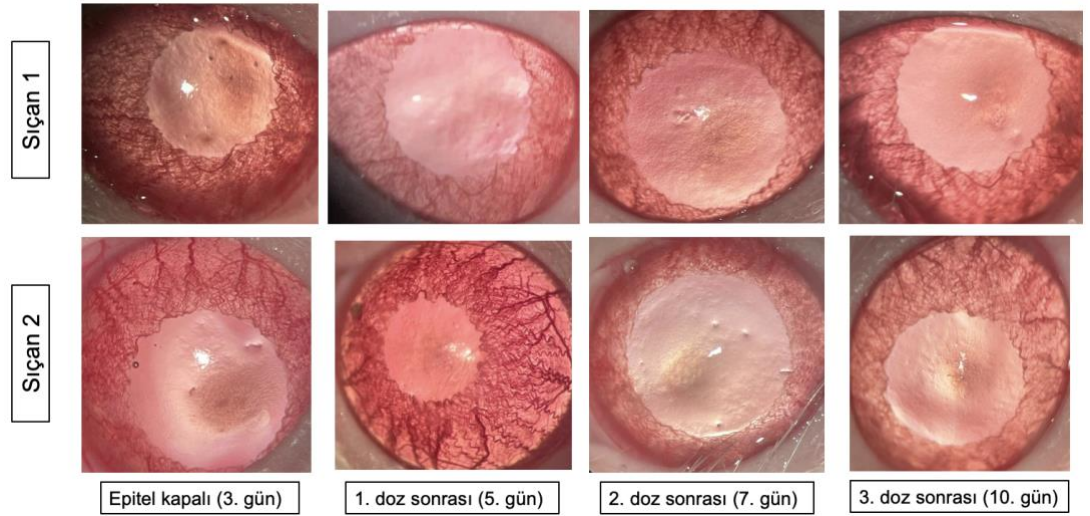
Şekil 3.8. Grup 3’te epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 2’şer dk FBM uygulaması.

Grup 4’de ise bir sıçanda iyileşme cevabı iyi iken diğer sıçanda kornea skarında belirgin artış olduğu izlenmiştir (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9. Grup 4'te epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile toplamda 3 kere 1'er dk FBM uygulaması.

Grup 5'te ise 2 sıçanda polikromatik ışık uygulaması sonrası kornea yara iyileşme cevabının iyi olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.10.). Bu ışık uygulama protokolünün etkinliği Grup 3'e benzer idi.



Şekil 3.10. Grup 5'te epitel kapandıktan sonra 1 gün ara ile sırasıyla 1 dk, 2 dk ve 3 dk FBM uygulaması.

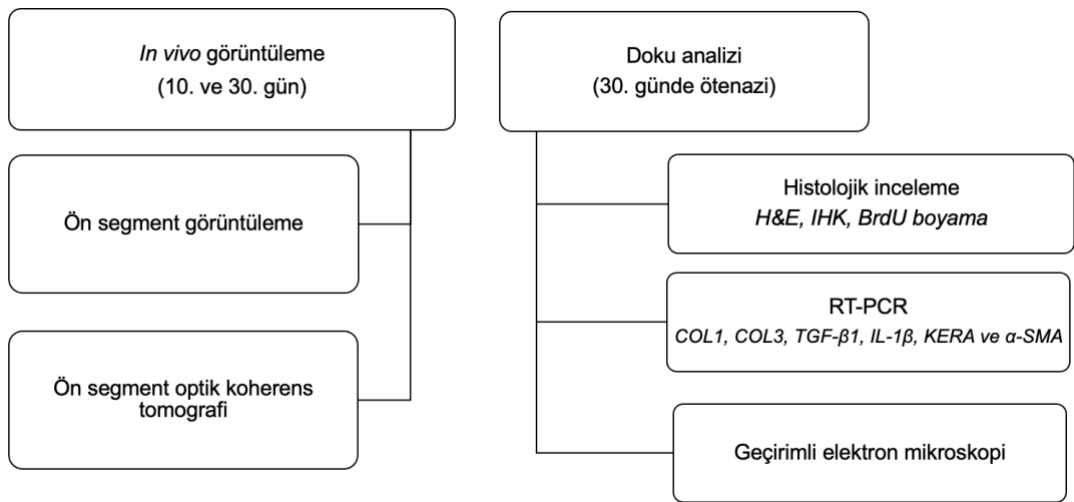
Tez çalışmasında kullandığımız polikromatik ışık kaynağının dış akrilik bariyerden 30 cm mesafedeki enerji yoğunluğu dakikada 2.3 J/cm^2 ve Grup 3'te olduğu gibi her seansta 2 dk polikromatik uygulaması ile $4,6 \text{ J/cm}^2$ enerji yoğunluğu uygulanmaktadır. Mvula ve ark., AdMKH'lere 5 J/cm^2 enerji yoğunluğunda fototerapi uygulandığında kök hücre proliferasyonun arttığını ve

ortama daha fazla büyüme faktörlerinin salgılandığını göstermişlerdir [133]. Grup 3'teki tedavi protokolü (2-2-2 dk) uygulanarak FBM'nin AdMKH'lerin rejenerasyon potansiyelini artırması hedeflenmiştir.

Bu sonuca göre, standart tedavi protokolü korneaya 30 cm mesafeden ve 2 dk boyunca polikromatik ışık uygulanması şeklinde güncellenmiş ve böylece her tedavi setinde toplam 4.6 J/cm² doz enerji uygulanmıştır. Polikromatik ışık uygulaması, sıçan korneasının tamamını kaplamaktadır. Hem FBM hem de FBM + AdMKH grubundaki sıçanlara sistemik anestezi altında her seansta 2 dakika süreyle polikromatik ışık uygulaması yapılmıştır. Ardışık 3 FBM seansı 1 gün arayla (abrazyon sonrası epitel iyileşmesini göz önüne alarak 3., 5. ve 7. günlerde) gerçekleştirilmiştir.

3.6. Deney Gruplarında Yapılan Analizler

Yapılan tedavilerin kornea yara iyileşmesindeki etkisini araştırmak için yapılan analizler 2 ana kısma ayrılmıştır. İlk kısımda tüm hayvanların kornea abrazyonu sonrası 10. ve 30. gündeki klinik değerlendirmesi *in vivo* görüntüleme ile yapılmıştır. İkinci kısımda ise 30. günde *in vivo* görüntüleme yapıldıktan sonra yüksek doz anestezi ile ötenazi gerçekleştirilip elde edilen kornea dokuları histolojik, genetik ve mikroskobik olarak incelenmiştir. Şekil 3.7.'de yapılan analizler özetlenmiştir.



Şekil 3.7. Deney gruplarına yapılan analizler.

3.6.1. Ön Segment Görüntüleme

Abrazyon sonrası 10. günde kornea opasitesi, neovaskülarizasyonu, enflamasyonu veya diğer komplikasyonların (enfeksiyon, perforasyon vb.) varlığını araştırmak için her sıçan korneası kamera ataşmanlı yarık lamba mikroskobu ile incelenmiştir. Bulguları belgelemek için biyomikroskoba bağlı dijital kamera kullanılmıştır. Korneadaki opasite ve neovaskülarizasyon 0'dan 4'e kadar derecelendirilmiştir [142]:

(0), vaskülarizasyon olmadan tamamen şeffaf bir kornea

(1), görünür iris detayları ile belirgin opasite ve 2 mm dahilinde limbal neovaskülarizasyon

(2), iris detaylarının minimal düzeyde seçilememesi ve korneanın yarısından daha az kadranda neovaskülarizasyon

(3), iris detaylarının orta derecede seçilememesi ve korneanın yarısından fazlasında neovaskülarizasyon

(4) total kornea opasitesi ve neovaskülarizasyonu

Abrazyon sonrası 10. ve 30. günlerde tüm sıçan kornealarının yarık lamba mikroskobu ile görüntüleri alınarak korneadaki opasite ve neovaskülarizasyon varlığı skorlanmıştır.

3.6.2. Ön Segment Optik Koherens Tomografisi

Kornea kesitlerini görüntülemek ve merkezi kornea kalınlığını (MKK) ölçmek için 3,6 µm'lik yüksek aksiyal çözünürlüğe sahip ÖS-OKT cihazı (MS-39, CSO, İtalya) kullanılmıştır. Abrazyon sonrası 10. ve 30. günlerde anestezi altında, tüm sıçan korneaları görüntülenmiştir.

3.6.3. Histolojik Değerlendirme

Abrazyondan 30 gün sonra *in vivo* görüntülemeyi takiben tüm hayvanlara ötenazi uygulanmış ve korneaları eksize edilmiştir. Her gruptan 4-5 tane

kornea rastgele seçilerek H&E boyama ve İHK analizler için %10'luk formaldehit solüsyonuna alınmış ve dokular sabitlenmiştir.

Işık mikroskobu ile inceleme öncesi %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edilen kornea doku örnekleri akar suda yıkanmıştır. Rutin histolojik takip işlemlerinin ardından, parafine gömülerek parafin bloklama işlemi tamamlanmıştır. Işık mikroskobu incelemeleri için parafin bloklardan mikrotom ile (Leica RM, Almanya) 4 µm kalınlığında rodajlı ve polilizinli lamlara kornea kesitleri alınmıştır. Deparafinizasyon işleminin ardından preparatlar histokimyasal ve İHK boyamalar için hazır hale getirilmiştir.

3.6.3.1. Hematoksilen&Eosin Boyama Protokolü

Rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığındaki kesitler, deparafinizasyon işlemi sonrasında rehidratasyon işlemi için azalan etil alkol serilerinde 10'ar dk bekletilmiştir. Kesitler havada kurutma işleminin ardından, 10 dk akan musluk suyu ile yıkanıp alkolden uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrası 10 dk Harris hematoksilen boya solüsyonu ile boyanan kesitler daha sonra akan musluk suyu altında yıkanarak glasiyel asetik asit ve alkol karışımı olan solüsyona batırılıp çıkarılarak akan musluk suyu altında tekrar yıkanmıştır. Yıkama sonrası 10 dk eosin boya solüsyonunda bekletilmiş ve tekrar 10 dk akan musluk suyu ile yıkanmıştır. Dehidratasyon işlemi için sonrasında ksilolde bekletilip lamalar kapama ortamı ile kapatılmıştır. Hazırlanan kornea kesitlerinden, ZEISS Axiolab 5 (Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüler, Zen Blue 3.4 programında değerlendirilmiştir. Yara bölgesinden alınan tüm kesitler bir histoloji uzmanı tarafından kör olarak incelenmiş ve tüm örnekler iyileşme yanıtı, enflamasyon varlığı ve neovaskülarizasyon açısından değerlendirilmiştir.

3.6.3.2. İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal analizler için kornea dokusuna ait parafin bloklardan polilizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler, deparafinizasyon işlemi sonrasında alkol serilerinden geçirilmiştir. Dehidrate edilen kornea dokuları distile sudan geçirilerek, sitrat tamponu (Thermo,

İngiltere) (pH 6.0) ile yüksek sıcaklıkta antijen retrieval işlemi uygulanmıştır. Dokular, 2 kez 5'er dk distile sudan geçirilmiştir. Ardından dokuların çevresi Pap pen (Patolab, Türkiye) ile sınırlandırılmıştır. Dokular 3 kez 3'er dk PBS (Thermo, İngiltere) (pH:7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra, 10 dk %3'lük hidrojen peroksit (Thermo, İngiltere) maruz bırakılmıştır.

İşlem sonrasında PBS ile lamlar yıkanmış ve İHK yöntemi Ultra Vision Detection System Large Volume Anti- Polyvalent, HRP (RTU) (Thermo, İngiltere) kiti kullanılarak devam edilmiştir. Yıkanan lamlara 5 dk UltraV block uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlanmıştır. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan doğrudan primer antikor aşamasına geçilmiştir. Kesitler uygun seyreltmede (1:100) birincil antikorlarla gece boyunca +4°C'de inkübe edilmiştir. Tez çalışmasında birincil antikor olarak; COL1 (Bioss, ABD), COL3 (Bioss, ABD), TGF- β 1 (Bioss, ABD), IL-1 β (Bioss, ABD), keratokan (Bioss, ABD) ve α -SMA (Santa Cruz, ABD) kullanılmıştır.

Birincil antikor uygulamasından sonra lamlar PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından 10 dk biotinli sekonder antikor uygulanarak tekrar PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Dokular 10 dk streptavidin peroksidaz enzim kompleksine maruz bırakılmış ve işlem sonrasında tekrar PBS ile yıkanmıştır. Diaminobenzedin (DAB) substratı içeren kromojen DAB (Thermo, İngiltere) ile gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlanmıştır. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksileni kullanılmıştır. DAB ile boyanan lamlar azalan alkol serilerinden geçirilmiştir. Kesitler 20 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatılmıştır. İmmunohistokimyasal analizlerin görüntülenmesi, ZEISS Axiolab 5 (Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskobu ve Zen Blue 3.4 (Almanya) programı ile yapılmıştır. Image J programı (National Institutes of Health (NIH), Bethesda MD, ABD) ile kornea kesitlerinde primer antikorlara ait immunoreaktivite yoğunluk yüzdeleri hesaplanmıştır [143].

3.6.3.3. Bromodeoksiüridin İmmün Boyama Yöntemi

Deney gruplarına ait kornea stroma tabakasında BrdU pozitif hücre varlığını göstermek için BrdU In-Situ Detection Kiti (BD Pharmingen, Invitrogen Life Technologies, ABD) kullanılmıştır. Deparafinizasyon sonrasında BD™

Retrievagen A solüsyonu ile antijen retrieval işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesitler 5 dk 3'er kez PBS'de yıkanıp anti-BrdU antikoru ile 1 saat inkübe edilmiştir. Üç kez 2'şer dk PBS'de yıkanan kesitler, streptavidin-HRP ile 40 dk inkübe edilmiştir. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra DAB ile muamele edilen dokular su ile yıkamaya alınmıştır. Hematoksilen ile boyandıktan sonra tekrar yıkanıp dehidrasyonun ardından ksilolde bekletilmiştir. Kapama ortamı ile kapatılarak ZEISS Axiolab 5 Digital (Almanya) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda ve Zen Blue 3.4 (Almanya) programında görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6.4. Geçirimli Elektron Mikroskopi

Kornea stromasındaki kolajenin yapısı, dizilimi ve kornea stromasının mikroçevresinin kalitatif olarak analiz edilmesi için TEM analizi yapılmıştır. Analiz için her gruptan 2 sıçan korneası incelenmiştir. Tüm kornealar, TEM örnekleri hazırlanana kadar %2 (v/v) glutaraldehit (Sigma-Aldrich, Almanya) solüsyonunda saklanmıştır.

Dokular %2 glutaraldehit (v/v) ve %1 (v/v) osmiyum tetroksit (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren bir PBS çözeltisi içinde sabitlenmiştir ve daha sonra artan konsantrasyonlarda etanol çözeltileri ile dehidrate edilmiştir. Numuneler propilen oksit (Sigma-Aldrich Corp.) ile işlendikten sonra süksinik anhidrit, benzil dimetilamin ve dibütil fitalid içeren araldit CY 212 karışımına (Ciba-Geigy) gömülmüştür. Kalınlığı 1500 nm olan yarı ince kesitler toluidin mavisi ile boyanıp fotomikroskopla (DM 500 Leica, Almanya) incelenmiştir. Uygun örneklerden 75 nm kalınlığında ince kesitler alınmış ve kurşun sitrat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve uranil asetat (ProSciTech, Avustralya) ile boyanmıştır. Numuneler ODTÜ Merkez Laboratuvarları'ndaki TEM cihazı (Tecnai G2 Spirit, FEI Company, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.6.5. Gerçek Zamanlı PCR ile Kantitatif Gen Ekspresyonu Analizi

COL1, COL3, TGF- β 1, IL-1 β , keratokan ve α -SMA genlerinin ifadeleri RT-PCR analizi ile incelenmiştir. Analize her gruptan 4-5 sıçan dahil edilmiştir. Abrazyon sonrası 30. günde ötenazi sonrası eksize edilen kornealar RT-PCR analizine kadar -80°C'de saklanmıştır.

İlk aşamada mesajcı RNA (mRNA) elde edilmesi hedeflenmiştir. Mikromakas yardımıyla küçük parçalara ayrılan dokulara 500 µL trizol reaktifi eklenmiş ve vorteks işlemi 20 s uygulanarak trizol ile 20 dk inkübe edilmiştir. Tüplere 125 µL kloroform eklenip çalkalama işlemi yapılmış ve 5 dk inkübasyonu takiben 4°C'de 15 dk 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında izole olan RNA içeriği alınmış ve alınan miktar kadar her bir tüpe %70 (v/v) mutlak etanol çözeltisi eklenmiştir. Mesajcı RNA'nın saflaştırılması için (taşıyıcı RNA ve ribozomal RNA'nın uzaklaştırılma işlemi), üreticinin protokolüne göre RNeasy Mini Column Kit (Qiagen, ABD) kullanılmıştır. Elde edilen mRNA konsantrasyonları, 260 nm optik yoğunlukta Nanodrop (Thermo Scientific, ABD) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

İkinci aşamada, elde edilen mRNA içeriğinin tamamlayıcı DNA'a (cDNA, *complementary DNA*) çevrilmesi hedeflenmiştir. Tamamlayıcı DNA sentezine eşit miktarda mRNA ile başlayabilmek için en düşük konsantrasyona sahip gruba göre hesaplama yapıp kullanılan kitin protokolüne göre soğuk koşullarda hazırlanan reaksiyon karışımı ve mRNA içeriği PCR tüplerine aktarılmıştır. Yüksek kapasiteli bir cDNA kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak mRNA örnekleri, cDNA'ya kopyalanıp bir termal döngüleyici ile çoğaltılmıştır. High Capacity cDNA Reverse Transkripsiyon Kiti ile (Thermo Fischer, ABD) 25°C'de 10 dk, 40°C'de 120 dk ve 85°C'de 5 dk reaksiyon programıyla Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, ABD) cihazında cDNA sentezlenmiştir. Sentezlenen cDNA -20°C'de RT-PCR çalışmaları için saklanmıştır.

Son aşamada ise RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. 5X HotFire Pol[®] Eva Green[®] qPCRMix Plus (SolisBioDyne, Estonya) kiti kullanılarak reaksiyon içeriği hazırlanmış ve primer dizileri eklenerek analiz LightCycler[®] Nano Instrument (Roche, İsviçre) cihazında, denatürasyon basamağı 95°C'de 900 s, uzama basamağı 95°C'de 15 s, primerin yapışma sıcaklığında 20 s ve 72°C'de 20 s olacak şekilde 45 döngü ve son olarak ayrılma basamağı 60°C'de 20 s ve 95°C'de 20 s olacak şekilde uygulanmıştır. Her genin ekspresyon seviyesi, housekeeping gen β -aktin'e göre normalize edilmiştir. Negatif kontrol grubunun C_t değerleri kontrol olarak kullanılıp kat değişimi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi

kullanılarak belirlenmiştir. Gerçek zamanlı PCR ile analiz edilen tüm hedef genler ve bunların primer dizileri Çizelge 3.1.'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1. Gerçek zamanlı PCR analizi için kullanılan primerler ve baz dizileri.

Primer		Primer baz dizisi (5' - 3')
Kolajen tip 1	<i>COL1</i>	<i>Forward</i> GGACACTACCCTCAAGAGCC <i>Reverse</i> TCGATCCAGTACTCTCCGCT
Kolajen tip 3	<i>COL3</i>	<i>Forward</i> GCCTACATGGATCAGGCCAA <i>Reverse</i> CACCAGTGTGTTTAGTGCAGC
Dönüştürücü büyüme faktörü $\beta 1$	<i>TGF-$\beta 1$</i>	<i>Forward</i> CTGCTGACCCCCACTGATAC <i>Reverse</i> AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
İnterlökin-1 β	<i>IL-1β</i>	<i>Forward</i> TGGCAACTGTCCCTGAACTC <i>Reverse</i> AAGGGCTTGGAAGCAATCCTTA
α -düz kas aktini	<i>α-SMA</i>	<i>Forward</i> ACCGGGAGAAAATGACCCAG <i>Reverse</i> GTCCAGCACAATACCAGTTGT
Keratokan	<i>KERA</i>	<i>Forward</i> TGACCAGTCACCATACGTTTCA <i>Reverse</i> CCATTGCAGTGCCTTGCTTT
β -actin	<i>β-actin</i>	<i>Forward</i> AGCAAGCAGGAGTACGATGAG <i>Reverse</i> AAAGGGTGTAACACGCAGCTC

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package for Social Science (SPSS, Chicago, ABD) 27,0 versiyonu kullanılarak yapılmıştır. Bulguların yorumlanmasında frekans tabloları ve tanımlayıcı istatistikler kullanılmıştır. Veri dağılımının normal olup olmadığını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanılmıştır. Tüm veriler ortalama $\pm$ standart deviasyon (SD) olarak belirtilmiştir. Klinik veriler Wilcoxon signed rank testi ve Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edilmiştir ve p değeri 0,05'ten küçük olan sonuçlar ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

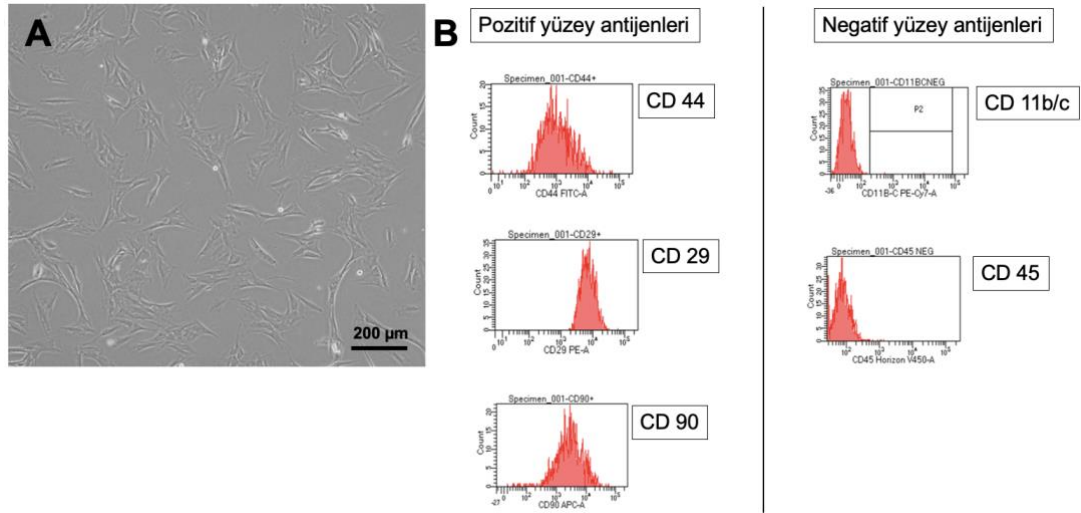
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasının sonuçları üç temel başlıkta özetlemiştir, bu kapsamda;

- (1) Wistar albino sıçanlardan allojenik AdMKH izolasyonu, kültürü ve karakterizasyonu
- (2) Sıçanlarda mekanik abrazyon ile kornea yara modelinin oluşturulması ve tedavi protokollerinin uygulanması
- (3) Tedavi uygulamalarının klinik görüntüleme ve doku analizi ile kornea yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonundaki etkileri ve farklı tedavi uygulamalarının gruplar arasında kıyaslanmasına ait sonuçlar incelenmiş ve güncel literatür çalışmalarıyla kıyaslanarak tartışılmıştır.

4.1. Wistar Albino Sıçanlardan Allojenik AdMKH İzolasyonu, Kültürü ve Karakterizasyonu

Allojenik AdMKH izolasyonu için 3 adet Wistar albino sıçan kullanılmıştır. İzolasyon sonrası, pasaj 0'dan pasaj 3'e kadar hücre stoğu oluşturulmuştur. Her pasajda kültür, kontaminasyon ve hücre morfolojisi açısından değerlendirilmiştir. Kültür çalışmaları boyunca kontaminasyon izlenmemiştir. Her pasajda hücrelerin morfolojisinin homojen olup içsi görünümü ve fibroblast benzeri morfolojisini koruduğu görülmüştür (Şekil 4.1 A).



Şekil 4.1. Sıçanlardan izole edilen AdMKH hücrelerinin karakterizasyonu A) Pasaj 3'teki optik mikroskop görüntüleri (10X büyütme) B) Negatif ve pozitif yüzey antijenleri için akış sitometri analiz sonuçları.

Ayrıca MKH karakterizasyonu için Pasaj 5'teki hücelere akış sitometri analizi yapılmıştır. Literatürde belirtildiği gibi MKH için fenotip pozitif antijenler (CD105, CD29, CD73, CD90, CD44) ve fenotip negatif antijenlerin (CD45, CD34, CD14, CD11b) varlığı incelenmiştir [144, 145]. Pozitif antijenlerden CD29 ve CD90, adipoz doku kaynaklı kök hücreler için spesifiktir [145]. Yapılan akış sitometri analizinde, yüzey belirteçlerinden CD44, CD29 ve CD90'nın oranları sırasıyla %88,9, %87,9 ve %86,8 ve lökosit hücre belirteçleri olan CD11b ve CD45'in oranları da sırasıyla %0,2 ve %0,3 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak izole edilen hücrelerin AdMKH'ler olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.1 B). Bu tez çalışmasında kullanılan AdMKH izolasyon yöntemi çalışmanın yapıldığı laboratuvar tarafından rutin olarak uygulanan bir yöntem olup kemik, kıkırdak ve yağ gibi dokulara farklılaşma potansiyelleri, özgül üreme hızı ve ikilenme süresi açısından incelenmiştir [146].

Adipoz kaynaklı MKH'lerin fizyolojik rolleri çeşitlidir ve doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesinde umut vericidir. Lipoaspirattan elde edilen AdMKH'lerin, fonksiyonel insan MKH'lerini tanımlamak için kullanılan, Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi (*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*) tarafından önerilen minimum 3 kriter setini karşıladığı gösterilmiştir

[90]. Yüksek proliferasyon kapasitesine ve çoklu hücre tipine farklılaşmasına ek olarak AdMKH'ler, pro-enflamatuar faktörlerin azaltılması ve çeşitli trofik faktörlerin üretimi yoluyla etkileşime girebilir ve bağışıklık sisteminin yaralanmaya cevabını olumlu etkileyebilmektedir [147]. Çeşitli raporlar MKH'nin immün düzenleyici özelliklerini göstermiştir; bunlar arasında T hücrelerinin inhibisyonu, dentritik hücrelerden tümör nekroz faktöründe artış, düzenleyici T hücrelerinde artış, immünosüpresif sitokin olan IL-10 ve TNF- β 'da artış, IL-2'de azalma ve çok sayıda büyüme faktörünün salgılanması bulunmaktadır [148].

Mezenkimal kök hücre tedavisi oftalmolojide yaygın olarak kullanılmaktadır ve benzersiz anti-enflamatuar ve immünomodülatör etkileri sayesinde kuru göz, kornea epitel hasarı, kornea nakli ve diğer hastalıkların tedavisinde ideal bir terapötik araç haline gelmiştir [101, 149, 150]. Kemik iliği ve yağ dokusu MKH'lerin elde edilmesinde en sık kullanılan kaynaklardır ve kornea doku mühendisliğinde benzer başarıya sahiptirler [151]. Birçok çalışma MKH'lerin intravenöz, intrastromal ve subkonjonktival uygulamasının doğrudan veya parakrin etki yoluyla kornea rejenerasyonuna olumlu katkısı olduğunu göstermiştir [100-102, 151, 152]. Kemik iliğinden MKH izolasyonu yağ dokusundan kök hücre izolasyonuna göre daha ağırlı ve invazivdir. Ayrıca kemik iliği aspiratından elde edilen kök hücre yoğunluğu yağ dokusuna göre daha azdır. Bu tez çalışmasında yağ dokusu, diğer mevcut MKH kaynaklarıyla karşılaştırıldığında farklılaşma kapasitesinin yüksek olması, daha az morbidite ile kolayca erişilebilmesi ve çok sayıda kök hücrenin kolayca izole edilebilmesi nedeniyle tercih edilmiştir [153].

4.2. Sıçanlarda Mekanik Abrasyon ile Kornea Yara Modelinin Oluşturulması ve Tedavi Protokollerinin Uygulanması

Dünya genelinde kornea kaynaklı görme kaybının globalde en önemli nedenlerinden biri kimyasal veya mekanik travmadır [44-46]. Bu nedenle bu tez çalışmasında kornea yara iyileşmesini değerlendirmek için mekanik abrazyon modelini tercih edilmiştir [141]. Tüm sıçanlarda kornea yara modeli başarıyla tamamlanmıştır. Mekanik abrazyonu takiben 10. günde tüm sıçanlarda, yarıklı lamba muayenesinde korneada skar oluşumu ve ÖS-OKT

ile kornea stromasının ön kısmında artmış hiperreflektivite (skar ile uyumlu bulgu) izlenmiştir. Çalışmaya 48 adet sıçanla başlanmış ancak 10. günde yapılan yarıklı lamba değerlendirmesinde negatif kontrol grubunda 2 sıçan, FBM + AdMKH tedavi grubunda ise 1 adet sıçan keratit oluşumu nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır. Böylece negatif kontrol (NK) grubunda 10 adet sıçan, FBM grubunda 12 adet sıçan, AdMKH grubunda 12 adet sıçan ve FBM + AdMKH grubunda 11 adet sıçan olmak üzere toplamda 45 adet sıçan değerlendirmeye alınmıştır. Tüm sıçanlarda mekanik abrazyon ile yara modeli sadece sağ göze uygulanmıştır. Negatif kontrol grubundaki sıçanların (n=10) sağlam olan sol gözleri ise pozitif kontrol (PK) grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Hayvanlarda yapılan prelinik çalışmalarda kornea yara iyileşmesi için MKH uygulaması ilk olarak intrastromal (kornea stroması içine) enjeksiyon veya excimer lazerle oluşturulan stromal flep altına hücre implantasyonu ile uygulanmıştır [6, 147, 154, 155]. Nakledilen hücrelerin güvenli olduğu, kornea şeffaflığını koruduğu ve herhangi bir bağışıklık reaksiyonuna neden olmadığı görülmüştür. Ayrıca implante edilen kök hücrelerin keratositlere benzer özellikler kazandığı gösterilmiştir [156]. Bu nedenle, tez çalışmasında ilk olarak sıçan gözüne intrastromal (kornea stroması içine) AdMKH enjeksiyonu planlanmıştır, ancak piyasada bulunan en ince iğne (33G) ile yapılan ön denemelerde 1/3 oranında kornea perforasyonu olduğu için bu yöntemden vazgeçilmiştir.

Literatürde MKH uygulaması için farklı yöntemler de bildirilmiştir. Topikal damla [157-159], intravenöz [12, 160, 161], intraperitoneal [161], subkonjonktival [11] ve ön kamaraya enjeksiyon [151] ile MKH uygulaması yapan çalışmalarda da doku onarımında ve kornea şeffaflığının yeniden sağlanmasında olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Alkali kornea yanığı olan insanlarda standart medikal tedaviye ek olarak yaralanmanın ilk 2 haftası içinde subkonjonktival kemik iliği MKH enjeksiyonu yapılmıştır. Hastaların %87'sinde epitelizeasyon sağlanarak kornea perforasyonu engellenmiştir [162]. İnsanda MKH'leri akut oküler yanıkların tedavisinde uygulayan ilk klinik çalışmada kök hücrelerin subkonjonktival enjeksiyonunun geçerli ve güvenli

olduğu ve bu hastalarda potansiyel bir tedavi olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir. Bir çalışmada fare modelinde kornea hasarı onarımı için farklı MKH uygulama yollarının (topikal damla, subkonjonktival, intraperitoneal ve intravenöz enjeksiyon) etkinliği kıyaslanmıştır. Kornea opaklığı ve fibrozisi azaltmada, enflamatuar yanıtı sınırlamada ve yeniden epitelizasyonu teşvik etmede en iyi sonuçlar intravenöz ve subkonjonktival uygulama ile elde edilmiştir [10]. İlginç olarak en düşük etkinlik topikal uygulamada izlenmiştir. Topikal göz damlaları göz hastalıklarında en uygun uygulama yöntemidir. Ancak göz damlası formunda uygulanan MKH'ler yeterli sürede oküler yüzeyde kalamamakta ve istenilen etkiyi gösterememektedir. Bazı araştırmacılar MKH'lerin yüzeyde kalmasını arttırmak için kök hücreleri fibrin jel içine implante etmiş ve göz yüzeyine uygulamıştır [86, 104]. Ancak, fibrin jel kök hücrelerin fenotipini ve fonksiyonel özelliklerini değiştirerek etkinliğini azaltmıştır [163].

Kök hücrelerin bulundukları mikroçevre onların immünojenitesini, hayatta kalmalarını ve farklılaşmalarını etkileyerek MKH'lerin terapötik etkinliğini değiştirebilmektedir [164]. Her ne kadar sistemik olarak infüze edilen MKH'lerin %1'inden azı hedef dokuya ulaşsa da [165], topikal damla olarak uygulamanın aksine, intravenöz uygulama ile verilen hücrelerin besin ve oksijen açısından zengin bir ortamda olması etkinliğini arttırmaktadır [166]. Benzer şekilde, konjonktivanın altındaki mezenkimal bir doku olan tenon dokusu, MKH'lerin hayatta kalması için uygun bir mikroçevre sunabilmektedir [164]. Subkonjonktival MKH uygulaması klinik kullanımda ümit verici görünmektedir. Bu nedenle tez çalışmasında AdMKH uygulaması hem kanıtlanmış etkinliği hem de uygulama yolunun kolay olması nedeniyle subkonjonktival enjeksiyon ile gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda, düşük seviyeli ışık kullanan FBM tedavisi, hücre metabolizmasını artırma veya çeşitli sinyal yollarını düzenleme potansiyeli nedeniyle çeşitli klinik yaklaşımlarda uygulanmaktadır. Birçok memeli hücre tipinin bu tedaviye yanıt verebildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır [134]. Bu tedavide, görünür (390–700 nm) ve yakın kızılötesi (780–1100 nm) dalga boyundaki ışık mitokondrideki birçok kromofor tarafından emilerek hücresel fonksiyonu

iyileştirmekte ve böylelikle hasarlı hücreleri onarabilmektedir [135]. Fototerapinin bu olumlu etkisinin tam olarak hangi mekanizma üzerinden olduğuna dair çalışmalar devam etmektedir. Terapötik optik penceredeki ışıkla aktive edilebilen sitokrom c oksidaz hücresel değişikliklere neden olan ana fotoreseptördür [114]. Ayrıca katalaz, süperoksit dismutaz, sitokrom b, guanilat siklaz ve nitrik oksit sentaz gibi diğer moleküllerde de fotoreseptörler bulunmakta ve hepsinin optimum etki gösterdiği ışığın dalga boyu farklı olmaktadır [114, 115, 121]. Bu nedenle henüz FBM uygulaması için maksimum etkinin elde edilebildiği optimum dalga boyuna ilişkin fikir birliği bulunmamaktadır. Fototerapi ve parametrelerine ilişkin bilinenler henüz temel düzeyde olup, doğru parametrelerin tanımlanması için daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır [167]. Son zamanlarda, NIR dalga boyları da dahil olmak üzere daha geniş spektrumda polikromatik ışık uygulaması, optimum fayda için önerilmektedir [25, 26]. Çalış ve ark. metakrilatlı jelatin hidrojelleri içinde kapsüllenmiş AdMKH'lerin *in vivo* kemik rejenerasyonunu ve osteojenik farklılaşma potansiyelini arttırmak için polikromatik ışık kaynağı ile FBM uygulanmasının etkisini değerlendirmiştir. Kök hücre içeren metakrilatlanmış jelatin hidrojellerinin ve periyodik polikromatik ışık uygulamasının kemik yenilenmesi üzerinde faydalı etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve bu iki yöntem birlikte uygulandığında osteojenik farklılaşmanın en yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir [26]. Sert ve ark. yağ dokusu greftinin canlılığını arttırmak için polikromatik ışık ile yağ dokusu transferinden önce ve sonra alıcı bölgeye FBM uygulamıştır ve neovaskülarizasyon ile adiposit canlılığının arttığını, nekroz, fibrozis ve inflamasyonun azalması yoluyla yağ greftinin canlılığını devam ettirdiklerini rapor etmiştir [168]. Bu deneysel çalışmalarla polikromatik ışık uygulamasının yara iyileşmesinde etkinliği ve güvenirliliği gösterilmiştir.

Fotobiyomodülasyon terapisinin özellikle mitokondriyal disfonksiyonun esas rol aldığı bilinen göz ve beyindeki dejeneratif bozukluklarda tedavi edici uygulamaları üzerinde çalışılmaktadır ve FBM'nin retinitis pigmentosa ve yaşa bağlı maküler dejenerasyonu olan hastalarda faydalı etkileri rapor edilmiştir [27, 28, 111]. Bu terapinin yakın gelecekte pek çok hastalığın tedavisini sağlayacak "mucize tedavi" olma potansiyeli bulunmaktadır ve yeni NIR ışık ekipmanlarının geliştirilmesi ve standart tedavi protokollerinin oluşturulması

için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Oftalmoloji alanında fototerapi, retina ve optik sinir hastalıkları ile sınırlı kalmıştır. Oküler yüzey için yapılan FBM çalışmaları henüz az sayıdadır [29-31]. Rhee ve ark.'nın yaptığı bir *in vitro* çalışmada, FBM'nin kornea epitelindeki yara iyileşmesi üzerinde kısa vadeli etkisi araştırılmıştır [29]. Kornea epitelinin göçü, proliferasyonu, yüzeye tutunması ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, kornea epitelinin yara iyileşme sürecinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, FBM'nin kornea epitel hücrelerinin yara iyileşmesi üzerindeki kısa vadeli etkisini incelemek ve kornea epitelindeki yara iyileşmesinde hangi dalga boyunun en etkili olduğunu belirlemek için 470, 530, 660, 740 ve 850 nm dalga boylarına sahip farklı LED kaynakları kullanılmıştır. Tüm ışık kaynaklarında FBM'nin hücre çoğalması üzerinde hiçbir etkisi yok iken; 660 nm'den büyük dalga boylarında FBM uygulaması epitel hücrelerinin göç kapasitesini arttırmıştır. Kanavi ve ark. ise düşük frekanslı atımlı elektromanyetik alan ve LLLT'nin kombinasyonunun tavşan kornealarındaki alkali yanık modelinde yara iyileşmesi üzerine etkisini araştırmıştır [31]. Çalışmada LLLT tedavisi için dalga boyu 810 nm, maksimum çıkış gücü 100 mW, enerji yoğunluğu 0,5 J/cm² olan NIR LED kullanılmıştır. Fototerapi ile kornea stromasında enflamasyonun daha düşük olduğu ve daha düşük keratosit kaybının olduğu gösterilmiş ve bu tedavinin, alkali yanık olan korneaların iyileşmesi için bir tedavi seçeneği olabileceği sonucuna varılmıştır. Oküler yüzeyde epitel ve stromanın rejenerasyonunda fototerapinin olumlu sonuçlarını bildiren bu çalışmalar tez çalışması için yol gösterici olmuştur.

Tez çalışması kapsamında, 600 nm'den 1200 nm'ye kadar son derece geniş bir spektrumda ışık enerjisi uygulayabilen polikromatik ışık kaynağının kornea epitel ve stromasında mekanik abrazyonla oluşturulan yaranın iyileşmesindeki etkinliği ve güvenilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Henüz polikromatik ışık uygulamasının oküler yüzeydeki yara iyileşmesi ve rejenerasyonu hakkında çalışma bulunmamaktadır. Bu yönüyle tez çalışması özgün bir çalışmadır. Ayrıca kornea yara iyileşmesinde etkinliği deneysel çalışmalarla gösterilen ve insanda klinik çalışmaları yapılan AdMKH uygulaması da tez kapsamında çalışılmıştır ve FBM ile birlikte uygulaması yapılmıştır. Çalışmalar, FBM'nin mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonunu, farklılaşmasını ve göçünü, immünolojik fonksiyonlarını arttırarak doku onarımını hızlandırdığını

göstermiştir [21-23]. Bu nedenle, tez çalışmamız, polikromatik ışık ve hücre terapisinin kornea yara iyileşmesinde, tek başına AdMKH veya tek başına FBM tedavisi uygulamasına göre daha fazla terapötik etkisi olabileceği hipotezi üzerine kurulmuştur. Ayrıca 5 J/cm² enerji yoğunluğunda FBM'ye maruz kalan AdMKH'lerde hücre çoğalmasının arttığı ve ortama daha fazla büyüme faktörlerinin salgılandığı gösterilmiştir [133]. Bu nedenle bu tez çalışmasında her seansta 4,6 J/cm² enerji yoğunluğunda uygulanan FBM'nin, AdMKH'lerin korneadaki yarayı iyileştirme potansiyelini artırabileceği düşünülmüştür.

4.3. Tedavi Protokollerinin Etkinliğinin Klinik Görüntüleme ve Doku Analizleri ile Değerlendirilmesi

4.3.1. Klinik Değerlendirme ve Merkezi Kornea Kalınlığı Ölçümleri

Kornea abrazyonunu takiben kornea opasitesini azaltmaya yönelik tedavi yaklaşımlarının etkinliğini incelemek için, kornea opasite skoru (KOS) ve neovaskülarizasyon derecesi (NVD), abrazyon sonrası 10. ve 30. günlerde tüm gruplarda analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.1.). Ortalama KOS ve NVD değerleri tüm gruplarda 10. günde benzer bulunmuştur ($p=0,393$).

Çizelge 4.1. Kornea abrazyonunu takiben 10 ve 30. günlerde tüm gruplardaki KOS ve NVD sonuçları.

Gruplar		p^b				Çoklu karşılaştırma
		Negatif kontrol (NK) ⁽¹⁾	FBM ⁽²⁾	AdMKH ⁽³⁾	FBM+AdMKH ⁽⁴⁾	
Kornea opasite skoru (KOS)	10. gün	2,00±0,00	1,82±0,75	1,64±0,81	1,70±0,82	0,393
	30. gün	1,92±0,51	1,18±0,60	0,91±0,54	1,00±0,00	<0,001
	p^a	0,564	0,020	0,011	0,038	(1,2) (1,3) (1,4)
	Ortalama değişim	-0,08±0,51	-0,64±0,67	-0,73±0,65	-0,70±0,82	0,012
Kornea neovas. derecesi (NVD)	10. gün	1,08±0,29	1,82±1,17	1,36±0,67	1,50±0,85	0,198
	30. gün	1,17±0,39	1,10±0,87	0,36±0,67	0,70±0,82	0,022
	p^a	0,317	0,034	<0,001	0,011	(1,3) (1,4) (2,3)
	Ortalama değişim	0,08±0,29	-0,72±0,92	-1,00±0,00	-0,80±0,63	0,001

Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir.

Ortalama değişim her parametre için 30. gün – 10. gün olarak hesaplanmıştır.

^a Wilcoxon signed rank test.

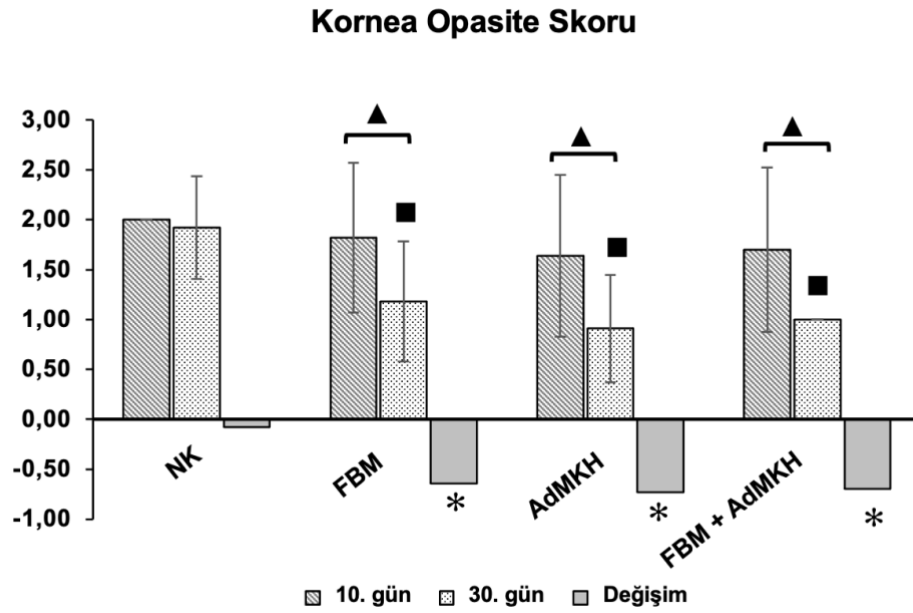
^b Kruskal-Wallis H test.

Bonferroni yöntemiyle çoklu karşılaştırmalar yapılmıştır.

Çoklu karşılaştırmalar için yalnızca $p<0,05$ olanlar gösterilmiştir.

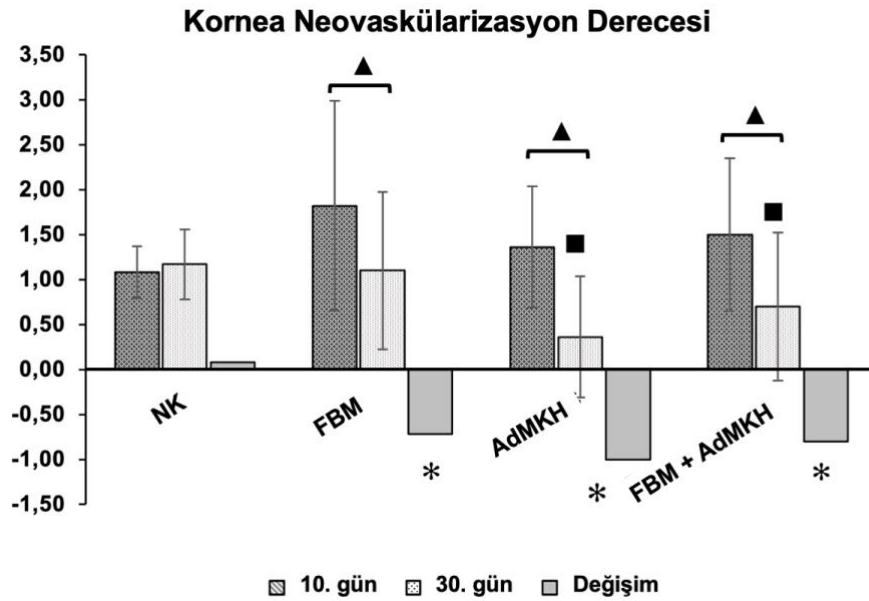
Kalın yazı tipi, anlamlı değerler, $p<0,05$.

Gruplar arası karşılaştırmada, tüm tedavi gruplarının (FBM, AdMKH ve FBM + AdMKH grupları) 30. günde ortalama KOS değerleri, tedavi edilmemiş skarlı kornealarla (negatif kontrol grubu, NK) karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,001$) (Şekil 4.2.). Ortalama NVD değeri ise AdMKH ve FBM + AdMKH tedavi gruplarında, NK grubuna göre anlamlı derecede düşük iken ($p=0,022$); FBM grubundaki ortalama NVD değeri 30. günde NK grubuyla benzer bulunmuştur ($p>0,05$) (Şekil 4.3.). AdMKH grubuyla karşılaştırıldığında ise FBM grubundaki NVD değerinin anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,013$).



Şekil 4.2. Kornea opasite skorunun (KOS) 10. ve 30. gündeki değerlerinin ve ortalama değişim değerlerinin grafiksel gösterimi. Değerler ortalama $\pm$ SD (10-12 hayvan/grup) olarak sunulmuştur. Grup içi analizde $\blacktriangle p<0,05$; 30. günde tedavi gruplarının NK grubuyla karşılaştırılmasında $\blacksquare p<0,05$; tedavi gruplarının ortalama değişimlerinin NK grubunun değeri ile karşılaştırılmasında $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$.

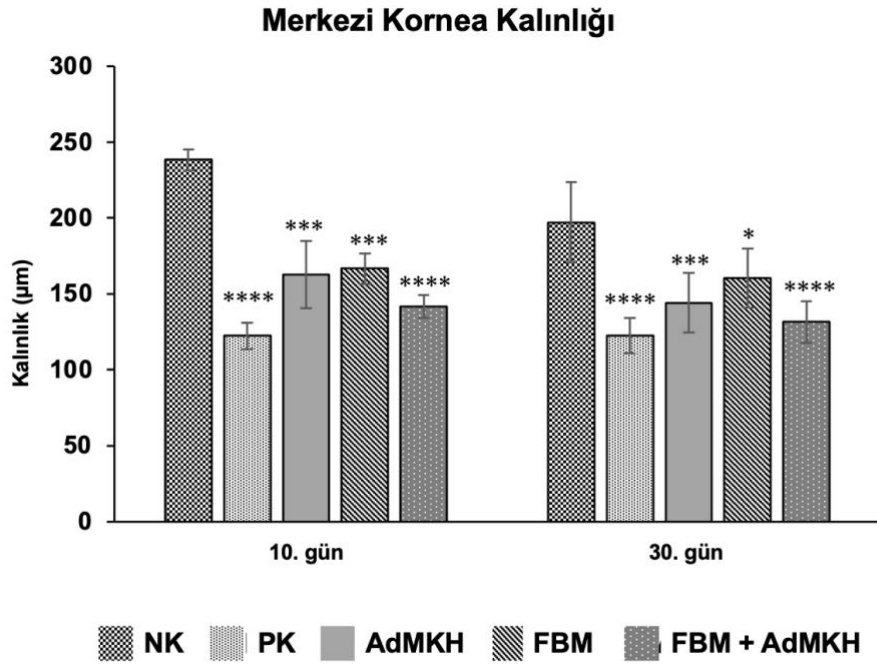
Grup içi karşılaştırmada, FBM, AdMKH ve FBM+AdMKH gruplarında yaralanmanın 30. gününde 10. güne kıyasla KOS ve NVD değerlerinde anlamlı iyileşme izlenmiştir (tüm ikili karşılaştırmalar için $p<0,05$) (Şekil 4.2.). Negatif kontrol grubunda ise KOS değerinde 30. günde anlamlı olmayan bir azalma izlenmiştir ($p<0,05$). Tedavilerin 30. günde etkinliğini değerlendirmek için KOS ve NVD değerlerinin 10. gündeki değerlerine göre değişimi gruplar arasında kıyaslanmıştır. Ortalama değişim her iki parametre için 30. gündeki değer ile 10. gündeki değerin farkı olarak hesaplanmıştır. Tüm tedavi gruplarında KOS ve NVD değerlerinin ortalama değişimleri benzer bulunmuştur (tüm ikili karşılaştırmalar için $p>0,05$) ve NK grubuyla karşılaştırıldığında bu değişimlerin anlamlı olarak daha iyi olduğu görülmüştür ($p=0,001$) (Şekil 4.2.). Sonuç olarak her tedavi grubunda KOS ve NVD değerinde 30. günde 10. güne göre anlamlı iyileşme görülmüştür ama NK grubunda iyileşme görülmemiştir. Bu bulgular her tedavi grubunun kornea yara iyileşmesinde klinik olarak anlamlı düzelme sağladığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Kornea neovaskülarizasyon derecesi (NVD) 10. ve 30. gündeki değerlerinin ve ortalama değişim değerlerinin grafiksel gösterimi. Değerler ortalama $\pm$ SD (10-12 hayvan/grup) olarak sunulmuştur. Grup içi analizde ▲ $p<0,05$; 30. günde tedavi gruplarının NK grubuyla karşılaştırılmasında ■ $p<0,05$; tedavi gruplarının ortalama

değişimlerinin NK grubunun değeri ile karşılaştırılmasında $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$.

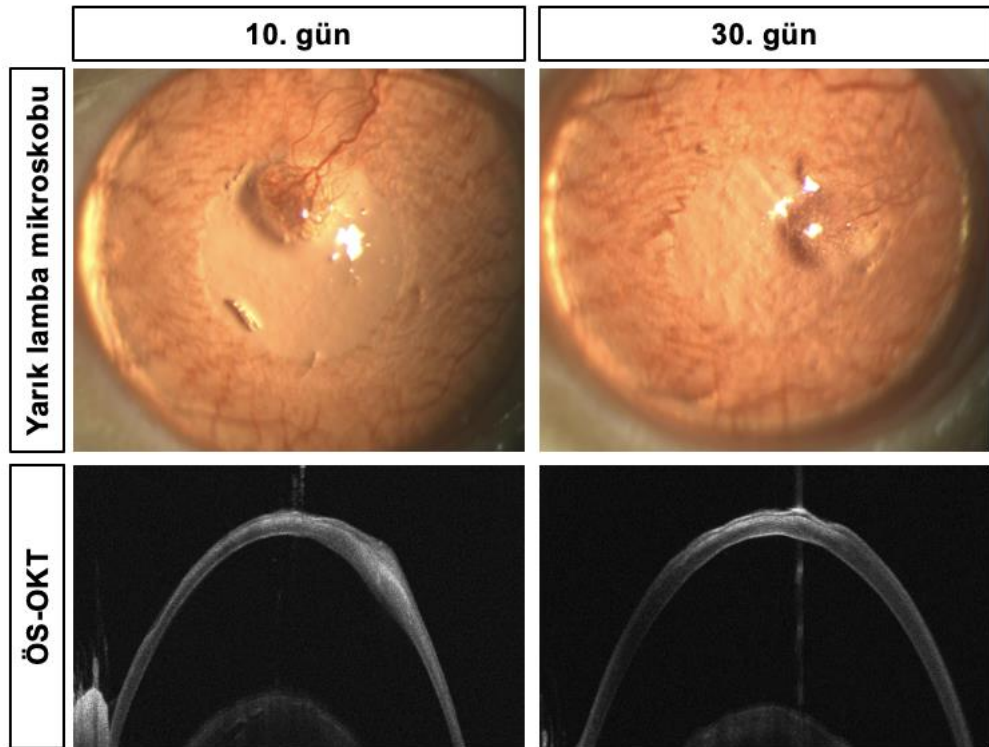
Şekil 4.4.'teki grafik tüm gruplarda yaralanmanın 10. ve 30. günlerini takiben ÖS-OKT ile ölçülen merkezi kornea kalınlığı (MKK) değerlerini temsil etmektedir. Ön segment OKT ile kornea kalınlığı ölçümleri klinik önem taşımaktadır, çünkü doku eksizyonu ve örnek hazırlamaya gerek kalmadan doku görüntülerini yerinde ve gerçek zamanlı olarak göstermekte ve analiz etmektedir [169]. Onuncu ve 30. günlerde tedavi edilmemiş yaralı kornealardaki (NK grubu) ortalama MKK değeri, pozitif kontrol (PK) ve tüm tedavi gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Yaralanmadan 30 gün sonra ortalama MKK değeri PK grubunda $122,5 \pm 11,6$ μm ; NK grubunda $197,1 \pm 26,6$ μm ; FBM grubunda $160,5 \pm 19,2$ μm ; AdMKH grubunda $144,1 \pm 19,7$ μm ; FBM + AdMKH grubunda ise $131,5 \pm 13,6$ μm olarak bulunmuştur. Tedavi grupları arasında 30. günde PK grubuna en yakın olan ve en düşük ortalama MKK değerine sahip FBM + AdMKH uygulanan gözler olmasına rağmen diğer tedavi yöntemleri ile arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.4. Merkezi kornea kalınlığının (MKK) 10. ve 30. günlerdeki değerlerinin grafiksel gösterimi. Değerler ortalama $\pm$ SD (10-12 hayvan/grup)

olarak sunulmuştur. Tedavi gruplarının NK grubu ile karşılaştırılmasında $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ ve $****p<0,0001$.

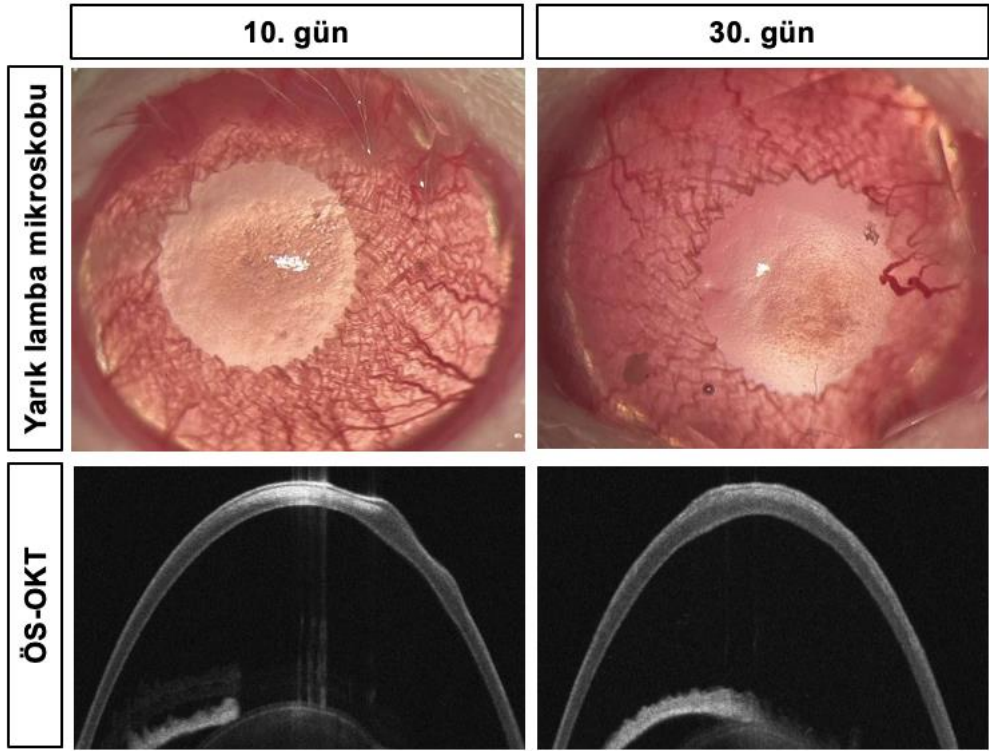
Şekil 4.5.'te NK grubunun 10. ve 30. günlerdeki yarık lamba biyomikroskop görüntülerinin ve ÖS-OKT ölçümlerinin temsili görüntüleri gösterilmiştir. Kornea abrazyonunu takiben 10. günde yara alanında elevasyon (yükseklik) gösteren vaskülarize skar alanı izlenmektedir. Yara iyileşmesindeki yeniden yapılanma (remodeling) ile 30. günde skar dokusunun azaldığı ve vaskülarizasyonun nispeten azaldığı görülmektedir. Ön segment OKT kesitlerinde de 10. günde eleve skar alanı ve o bölgedeki artmış hiperreflektivite dikkat çekmektedir. Hiperreflektivite yani yansımanın artması kornea saydamlığının azaldığını göstermektedir. Otuzuncu günde ise hem skar alanındaki elevasyon hem de hiperreflektivitenin azaldığı görülmektedir. Bu bulguların ön segment görüntüleme ile uyumlu olduğu izlenmiştir.



Şekil 4.5. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde NK grubunun temsili yarık lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.

Şekil 4.6.'da FBM grubunun 10. ve 30. günlerdeki yarık lamba biyomikroskop görüntülerinin ve ÖS-OKT ölçümlerinin temsili görüntüleri gösterilmiştir.

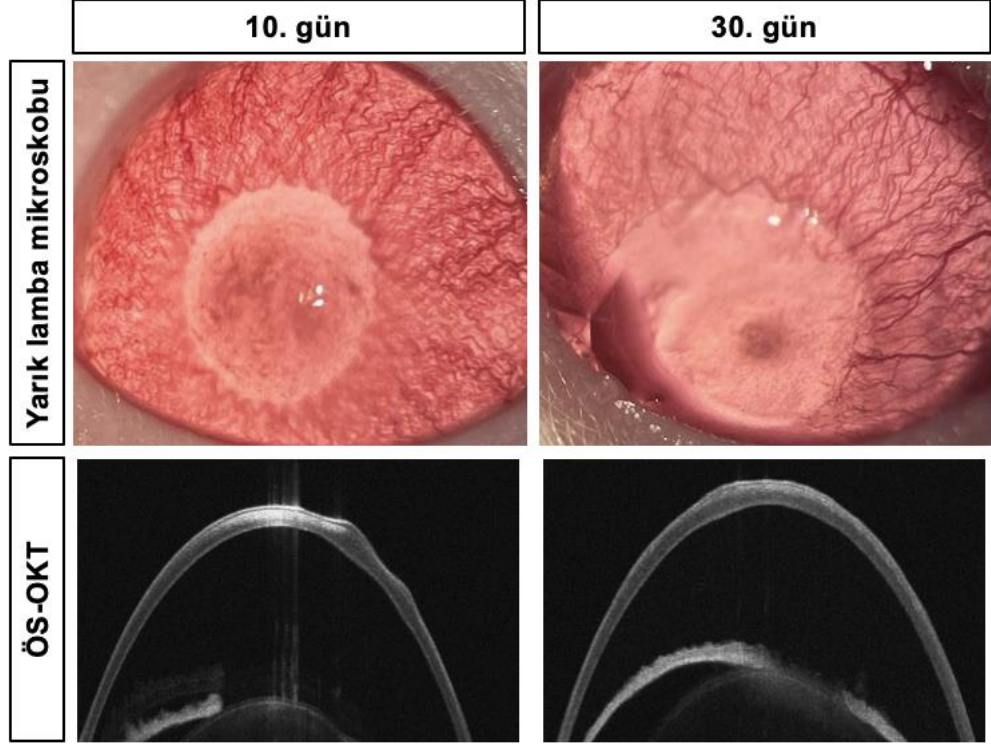
Kornea abrazyonunu takiben 10. günde kornea santralinde belirgin kornea skarına eşlik eden hafif vaskülarizasyon izlenmektedir. Ön segment OKT kesitinde de kornea skar alanı ile uyumlu bölgede korneanın derin tabaklarına kadar inen hiperreflektivite ve düzensiz kornea ön yüzeyi seçilmektedir. Tedavi sonrası 30. günde skar alanının azaldığı, ancak neovaskülarizasyon yoğunluğunda azalma olmadığı görülmektedir. Ön segment OKT kesitinde ise hiperreflektif alanın derinliğinin ve yoğunluğunun azalmış olduğu ve kornea yüzeyinin daha regüler hale geldiği görülmektedir.



Şekil 4.6. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde FBM grubunun temsili yarık lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.

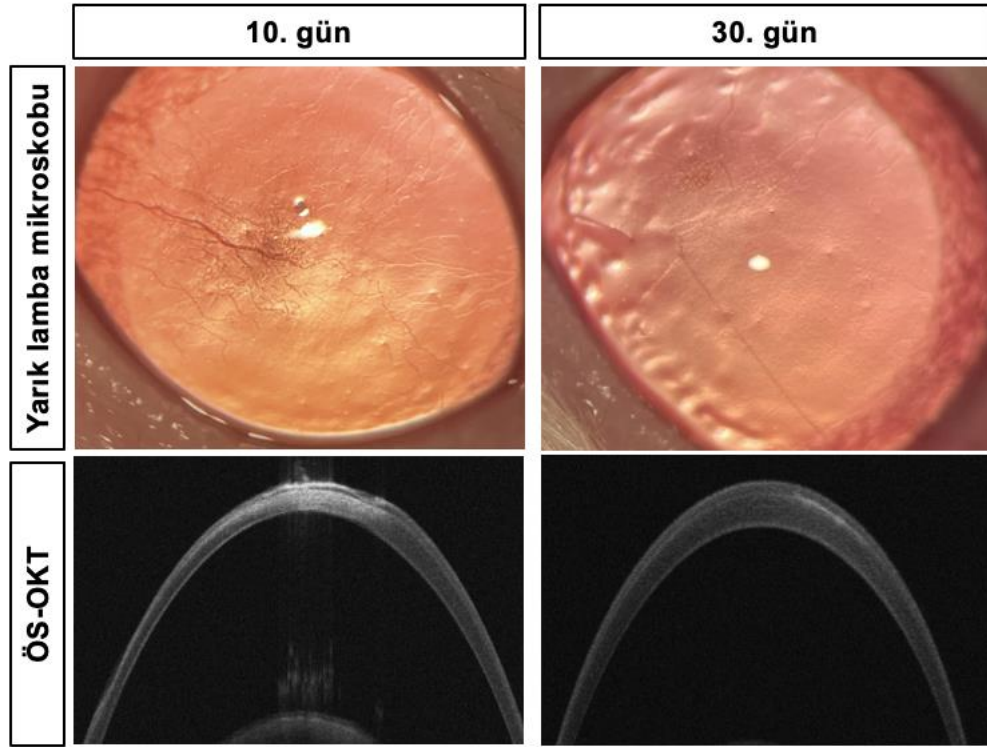
Şekil 4.7.'de AdMKH grubunun 10 ve 30. günlerdeki yarık lamba biyomikroskop görüntülerinin ve ÖS-OKT ölçümlerinin temsili görüntüleri gösterilmiştir. Yaralanma sonrası 10. günde kornea santralinde belirgin geniş kornea skarı izlenmektedir. Ön segment OKT kesitinde de kornea skar alanı ile uyumlu bölgede korneanın derin tabaklarına kadar inen hiperreflektivite ve düzensiz kornea ön yüzeyi seçilmektedir. Tedavi sonrası 30. günde skar alanında belirgin azalma olduğu, ancak hala neovaskülarizasyonun eşlik ettiği görülmektedir. Ön segment OKT kesitinde ise hiperreflektif alanın derinliğinde

ve yoğunluğunda belirgin azalma olduğu ve kornea yüzeyinin daha düzenli hale geldiği izlenmektedir.



Şekil 4.7. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde AdMKH grubunun temsili yarık lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.

Şekil 4.8.'de FBM + AdMKH grubunun 10 ve 30. günlerdeki yarık lamba biyomikroskop görüntülerine ve ÖS-OKT ölçümlerinin temsili görüntülerine yer verilmiştir. Yaralanma sonrası 10. günde kornea santralinde orta derecede kornea skarı ve skar alanına kadar ulaşan neovaskülarizasyon görülmektedir. Ön segment OKT kesitinde kornea skarı alanı ile uyumlu bölgede hiperreflektivite seçilmektedir. Tedavi sonrası 30. günde skar alanında belirgin azalma olduğu ve yeni oluşan damarlarda da belirgin azalma olduğu izlenmiştir. Ön segment OKT kesitinde ise hiperreflektivitenin belirgin olarak azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.8. Yaralanmanın 10. ve 30. gününde AdMKH + FBM grubunun temsili yarık lamba biyomikroskop görüntüleri ve ÖS-OKT kesitleri.

Literatürde korneada çeşitli yöntemlerle oluşturulan yara modelinde farklı kök hücreler farklı yöntemlerle uygulanmıştır ve çoğunluğunda sunulan tez çalışmasında da olduğu gibi kök hücre uygulaması yapılan gruplarda kornea opasitesinde ve neovaskülarizasyonunda ve kornea kalınlığında anlamlı azalma bildirilmiştir. Demirayak ve ark. sıçanlardaki kornea yara modelinde kemik iliği MKH ve AdMKH'lerin terapötik etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada korneaya yapılan tam kat kesi sonrası ön kamaraya 2×10^5 kök hücre enjeksiyonu yapmışlar ve kornea opasitesi ve kornea kalınlığını 4. ve 8. haftada değerlendirmişlerdir. Adipoz kaynaklı MKH grubunda kornea opasite skoru ve kornea kalınlığı, NK ve kemik iliği MKH uygulanan gruplara göre azalmış, ancak bu değişiklikler anlamlı düzeye ulaşamamıştır [151]. Başka bir hayvan çalışmasında farelerde alkali yanık modelinde yara iyileşmesini arttırmak için kornea stroma kök hücreleri (1×10^4 hücre/hayvan) intrastromal enjeksiyon ile uygulanmıştır. Kök hücre uygulamasından 3 ay sonra kornea opasite skorları karşılaştırıldığında NK grubuna kıyasla stroma kök hücre enjeksiyonu yapılan grupta anlamlı bir azalma görülmüştür. Ancak kornea kalınlığında tedavi ile anlamlı değişim izlenmemiştir. Bu iyileşme kök hücrelerin

anti-enflamatuar etkisi ve COL3 üretiminin azalması ile açıklanmıştır [88]. Rohaina ve ark. kemik iliği MKH'lerini limbal kültür ortamında öncelikle kornea kök hücresi olarak değiştirmiş ve amniyon membran üzerine ekerek sıçanlarda kornea alkali yanık modelinde kornea yüzeyinin yeniden yapılandırılması için kullanmıştır [170]. Kornea yüzeyine kök hücre ekilmiş amniyon membranı uygulamasının 8. hafta yarık lamba değerlendirmesinde, kornea berraklığı ve azalmış vaskülarizasyon açısından dikkate değer bir iyileşme olduğu gözlenmiş, ÖS-OKT analizleri ile kornea kalınlığının normal korneaya benzediği gösterilmiştir. Sunulan tez çalışmasındaki protokole benzer bir hayvan çalışmasında kornea abrazyonunu takiben kornea opasifikasyonunun sınırlandırılmasında farklı MKH uygulama yollarının etkinliğini incelemek için, MKH'ler (5×10^5 hücre) topikal yolla, subkonjonktival, intraperitoneal veya intravenöz enjeksiyonla uygulanmıştır. Yaralanan kornealar yarık lamba mikroskobu ile değerlendirilmiş ve yaralanma sonrası 0., 2. ve 4. günlerde kornea opaklaşma alanı Image J yazılımı kullanılarak toplam opasite alanının yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Tedavi edilmemiş gruptaki kornea opasitesine kıyasla ($52,0 \pm 10,1$) AdMKH'lerin hem subkonjonktival ($14,0 \pm 3,4$) hem de intravenöz ($17,2 \pm 8,8$) uygulanmasının yaralanmaya bağlı kornea bulanıklaşmasını önemli ölçüde baskıladığı gösterilmiştir [10].

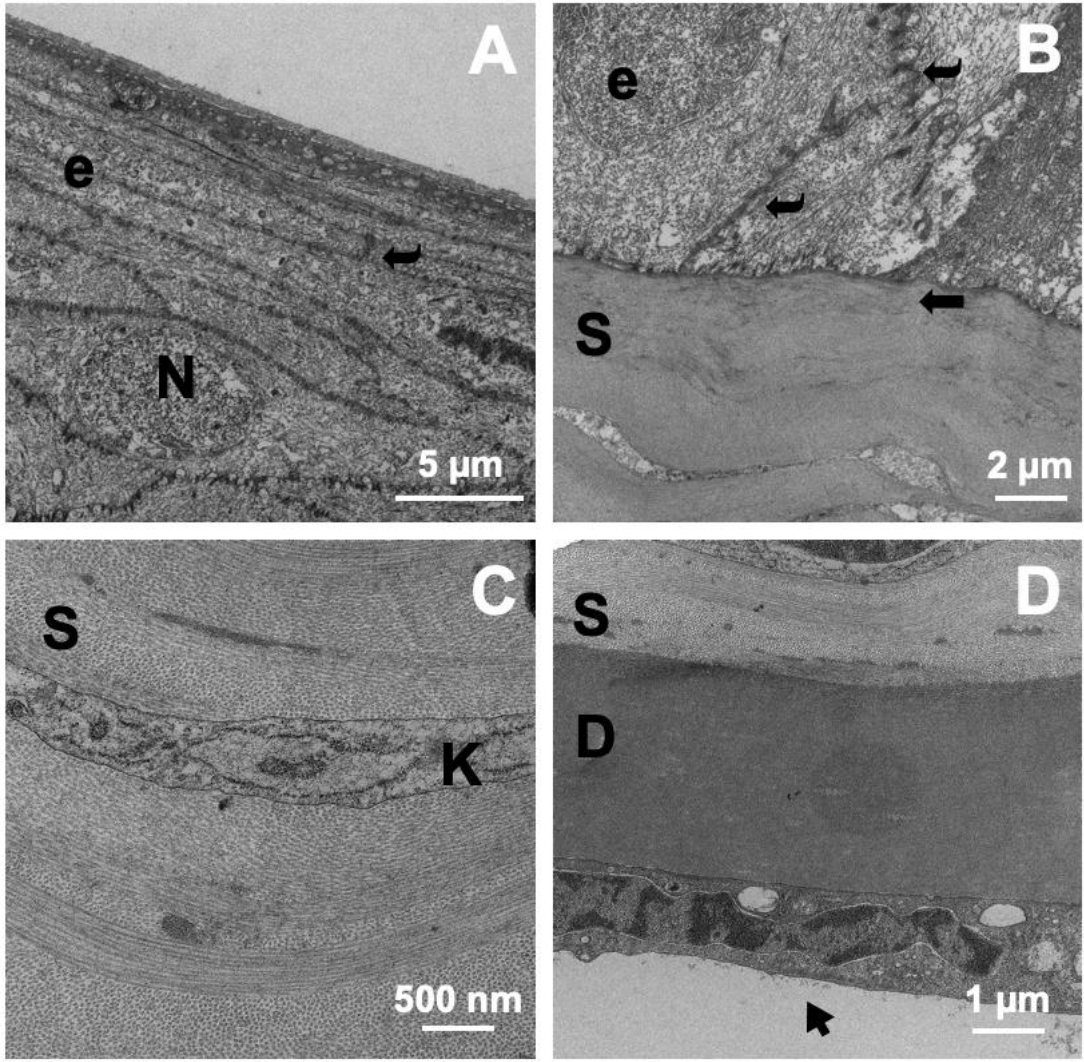
Korneada herhangi bir kan damarı yoktur, korneanın beslenmesi gözyaşıdan ve ön kamaradan sağlanmaktadır. Bununla birlikte, kornea hasarı meydana geldiğinde, onarım ve yenilenme aşamasının önemli bir parçası olarak besin maddelerini ve bağışıklık hücrelerini taşımak için damarlar oluşmaktadır. Onarım sonrası yeni oluşan damarlar geriler veya korneayı bulanıklaştıran kalıcı kan damarlarının oluşmasıyla sonuçlanır. Korneanın saydamlığını bozduğu için korneada neovaskülarizasyon önemli bir yara iyileşme komplikasyonudur. Bu nedenle kornea neovaskülarizasyonunun azaltılması oftalmolojide her zaman önem taşımaktadır ve yönetimi zor olan bir durumdur [171]. Onarım sürecinde en önemli basamak, genellikle fibrozisin eşlik ettiği granülasyon oluşumudur. Kolajen lif onarımı ve skar oluşumu olarak da bilinen kornea fibrozisi, miyofibroblast farklılaşması ve çoğalması, kornea stroması kalınlaşması ve büyük miktarda hücre dışı matriks üretimi ile karakterizedir. Hücre dışı matriks sadece çeşitli dokulardaki ana yapısal bileşenlerden biri

değildir, aynı zamanda fizyolojik ve patolojik koşullar sırasında neovaskülarizasyonda da hayati bir rol oynamaktadır [172]. Hücre dışı matriks, çözünür anjiyogenik faktörlerin biyoyararlanımını artırarak anjiyogenik sinyalleşme için bir ortam sağlamaktadır [173]. Sonuç olarak, hücre dışı matriks bileşenlerini aşırı eksprese eden fibroblastların kornea neovaskülarizasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir [174].

Mezenkimal kök hücreler kornea neovaskülarizasyonu için tedavi edici bir ajan olarak araştırılmaktadır [136, 157, 175]. Adipoz kaynaklı MKH'ler kornea fibrozisini inhibe ederek neovaskülarizasyonu azaltabilmektedir [175]. Ayrıca neovaskülarizasyon, proanjiyogenik MMP-2'nin baskılanması ve bir VEGF inhibitörü olan antianjiyogenik faktör trombospondin-1'in (TSP-1) gen ekspresyonunun indüksiyonu yoluyla inhibe edilebilmektedir [157, 176, 177]. Shang ve ark. farelerde etanol ile oluşturdukları kornea hasarı sonrası AdMKH tedavisinin gözlerde α -SMA ekspresyonunu ve kolajen, fibronektin ve tenaskin-C gibi hücre dışı matriks bileşenlerini de azaltarak kornea neovaskülarizasyonunu azalttığını göstermiştir [175]. Bizim çalışmamızda NK grubuna kıyasla kornea neovaskülarizasyonunun azaldığı gruplar AdMKH ve FBM + AdMKH grupları olmuştur. Sadece FBM uygulanan grupta 30. gündeki NVD değeri 10. güne göre azalmış olsa da 30. günde NVD değeri hala NK grubu ile benzer bulunmuştur. Fotobiyomodülasyon VEGF ve hipoksinin neden olduğu faktör-1 α ekspresyonundaki artış yoluyla yeni kan damarı oluşumunu artırarak dolaşımı artırır ve böylece doku onarımını iyileştirmede etkili olmaktadır [178]. Fotobiyostimülasyon sonrası muhtemel anjiyogenik faktörlerin artması ile çalışmamızdaki FBM grubunda yeni damar oluşumunda istenen azalma gözlenememiştir. Benzer sonuç bildiren bir çalışmada, Kanavi ve ark. LLLT'nin tavşan kornealarındaki alkali yanık modelinde yara iyileşmesi üzerine etkisini araştırmış ve fototerapi ile kornea stromasında enflamasyonunun daha düşük olduğunu ve daha düşük keratosit kaybının olduğunu göstermiştir [31]. Bu çalışmadaki sonuca benzer şekilde, anlamlı kornea neovaskülarizasyonu olan tavşan oranı LLLT grubunda daha az olmasına rağmen sadece medikal tedavi verilen NK grubu ile kıyaslandığında kornea neovaskülarizasyonu açısından anlamlı bir fark gösterilememiştir.

4.3.2. Geçirirli Elektron Mikroskopu Analizi

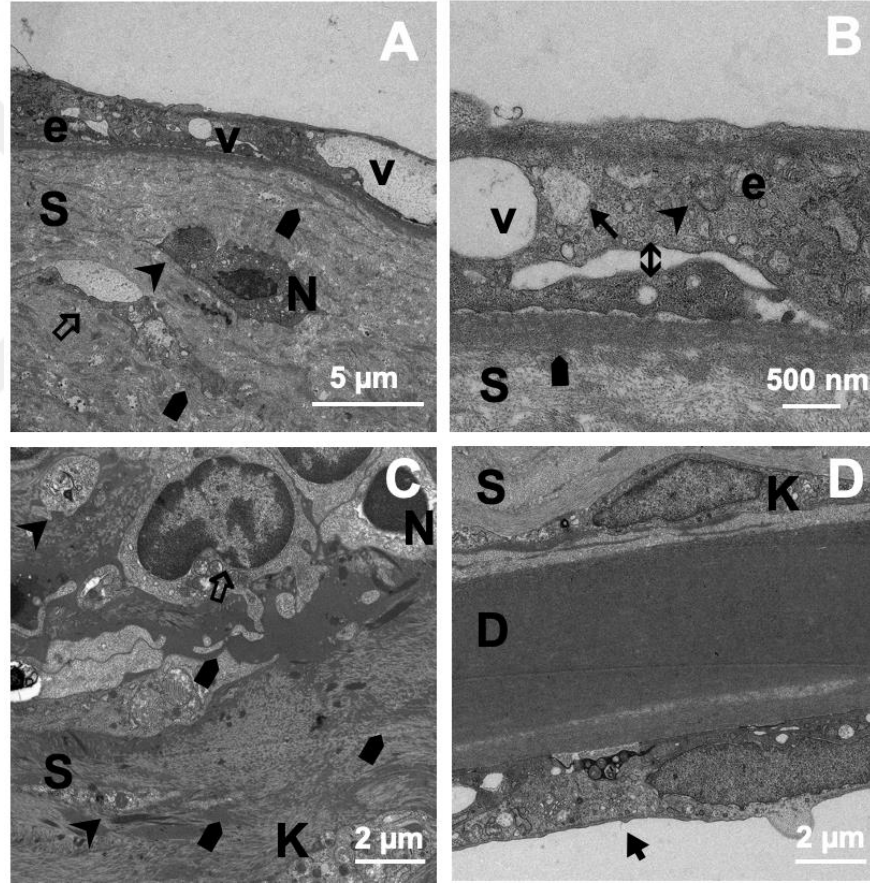
Pozitif kontrol grubunun sağlam korneasının TEM görüntülemesinde, epitelin yüzeyel katmanları yassı ökromatik çekirdeklere sahip skuamöz hücrelerden oluşmakta ve epitel hücreleri arasındaki desmozom bağlantıları izlenmektedir (Şekil 4.9 A). Ara katmanlar, yuvarlak ökromatik çekirdeklere ve sitoplazmalarında çok sayıda mitokondriye sahip poligonal hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 4.9 A). Bazal katmanlar, sitoplazmada düzenli ökromatik çekirdeklere ve mitokondriye sahip kolumnar hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 4.9 B). Hücreler düzenli bir bazal membran üzerinde bulunmaktadır (Şekil 4.9. B). Stroma, düzenli ortogonal dizilim gösteren kolajen fibrillerinden oluşmaktadır (Şekil 4.9. C). Kolajen fibriller arasında ökromatik çekirdeklere ve sitoplazmik organellere sahip iç şeklindeki keratositler görülmektedir. Descemet membranı stroma ve endotel arasında homojen olarak seçilmektedir (Şekil 4.9. D). Endotel, ökromatik yassı çekirdek ve değişken büyüklükte pinositotik veziküller içeren sitoplazmadan oluşmaktadır (Şekil 4.9. D).



Şekil 4.9. Sağlıklı bir sıçanın (PK grubu) kornea kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), desmozom (↔), nükleus (N), Bowman tabakası (↔), stroma (S), keratosit (K), Descemet membranı (D), endotel (↗), (3000X büyütme).

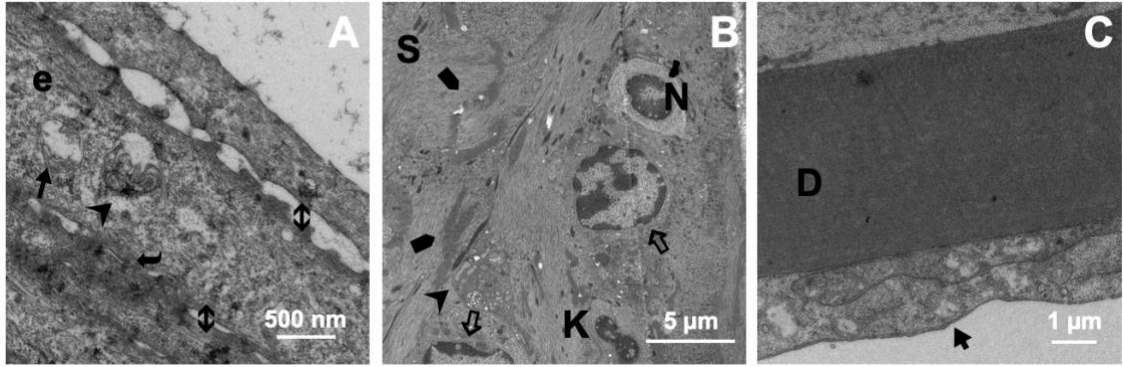
Yaralanmayı takip eden 30. günde, NK grubundaki sıçanların kornealarında, sağlıklı korneaya kıyasla, kornea epitelinin hücre morfolojisi ve diziliminin, kornea stromasındaki kolajen fibril diziliminin ve keratosit morfolojisinin bozulduğu, enflamatuar hücre infiltrasyonunun ve skar oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir (Şekil 4.10. A). Yüzeyel tabakanın skuamöz hücreleri küçülmüş çekirdeklere sahiptir ve enflamatuar hücrelerin infiltrasyonu ile hücre içi geniş boşluklar (vakuoller) seçilmektedir (Şekil 4.10. B). Ara ve bazal katmanlardaki düzensiz şekilli hücreler arasında da ayrılma (ödem) ve epitel hücre çekirdekleri ve sitoplazmalarında çeşitli dejeneratif değişiklikler

görülmektedir. Bazal membran devamlılığı bozulmuş ve komşuluğunda yoğun skar dokusu oluşmuştur (Şekil 4.10. B). Stromada kolajen fibrillerin düzensizliği (skar oluşumu) ve aralarında çok sayıda enflamatuvar hücrenin, birçok dilate kan damarının (neovaskülarizasyon) bulunduğu geniş aralıklar (ödem) görülmektedir. Keratositler düzensiz heterokromatik çekirdeklere ve vakuollü sitoplazmaya sahiptir (Şekil 4.10. C). Stromadaki üniform kolajen fibrillerinin dizilimi ve ortogonal yapı tamamen bozulmuştur ve yoğun skar alanları dikkat çekmektedir. Yara modelinde korneanın 1/3'ü yani epitel ve ön stroması etkilenmiştir. Korneanın kalan kısmı olan arka stroma, Descemet membranı ve endotelde herhangi bir patoloji izlenmemiştir (Şekil 4.10 E).



Şekil 4.10. Yaralanmayı takiben 30. günde, NK grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), vakuol (v), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücresinde vakuol (↔), neovaskülarizasyon (⇌), enflamatuvar hücre (◀), epitel hücreleri ve stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (⇔), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (►), Descemet membranı (D), endotel (↑), (3000X büyütme).

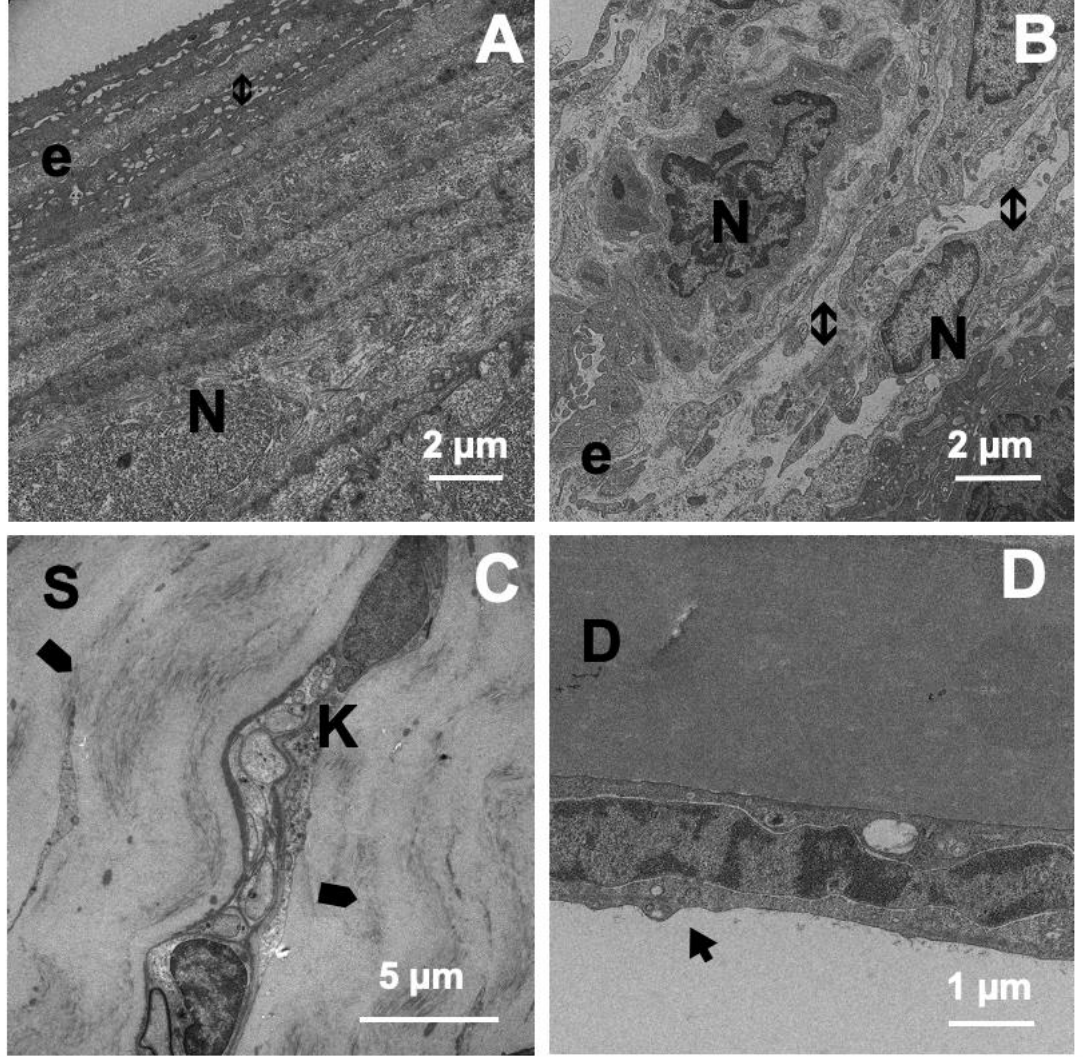
Yaralanmayı takip eden 30. günde, polikromatik ışıkla tedavi edilen kornealarda epitel hücrelerinin hala düzensiz oluşu ve hücreler arası boşluklar tespit edilmiş, ancak epitel hücre morfolojisinin daha iyi organize olduğu ve desmozom bağlantılarının NK grubuna göre daha iyi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11. A). Negatif kontrol grubundaki kornealarla karşılaştırıldığında stromanın hücre dışı matriks organizasyonu daha iyidir, ancak düzensiz kolajen fibrilleri (skar dokusu), neovaskülarizasyon ve enflamasyon hücrelerinin 30. günde de olduğu görülmektedir. Bazı keratositlerde düzensiz ökromatik çekirdek ilerleyen zamanda da izlenmektedir (Şekil 4.11. B). Endotel hücresinin çekirdek ve sitoplazmasının sağlıklı ve Descemet membranının homojen ve devamlılığının olduğu görülmüştür (Şekil 4.11. C).



Şekil 4.11. Yaralanmayı takiben 30. günde, FBM grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücrelerinde vakuol (↖), neovaskülarizasyon (↔), enflamatuar hücre (◀), epitel hücreleri ve stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (⇔), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (▶), Descemet membranı (D), endotel (↗), (3000X büyütme).

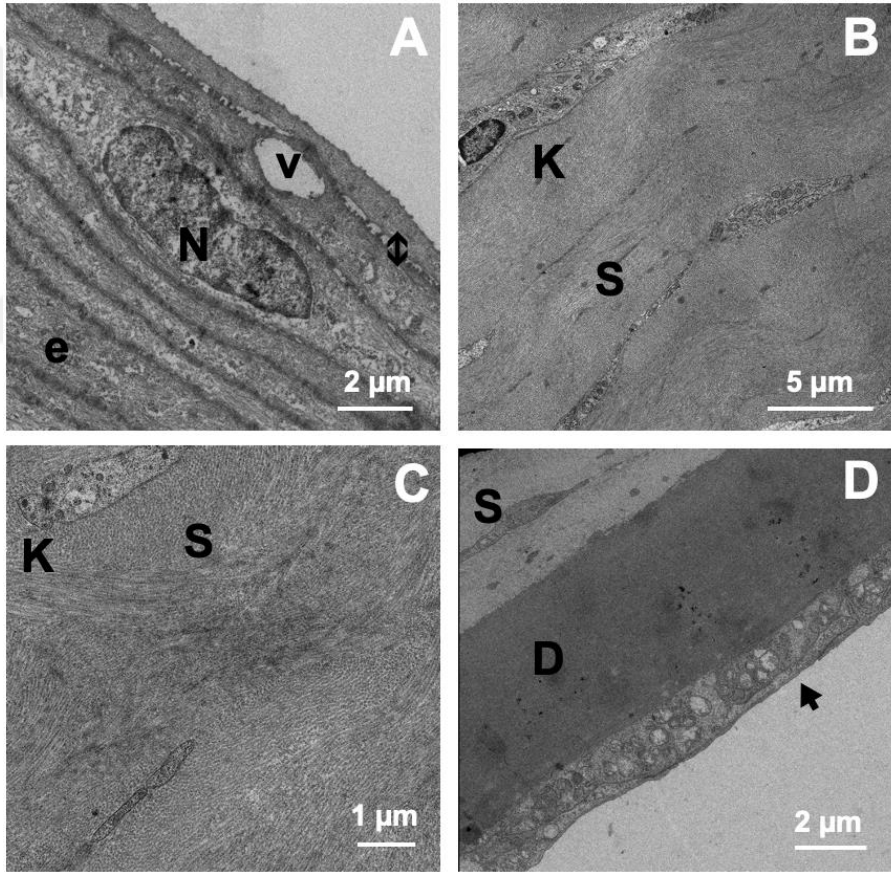
Yaralanmayı takip eden 30. günde, subkonjonktival AdMKH enjeksiyonu yapılan sıçan kornealarında epitel hücrelerinin bir kısmının, minimal hücreler arası boşluklarla PK grubundakilerle karşılaştırılabilir hücre morfolojisine ve desmozom bağlantılarına sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.12. A). Yer yer epitel hücrelerinde hala düzensizlik, heterokromatik çekirdek ve hücreler arası belirgin boşluk (ödem) olduğu izlenmiştir (Şekil 4.12. B). Kornea stromasında

ise, FBM ile tedavi edilen kornealarla karşılaştırıldığında daha az skar, neovaskülarizasyon ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttur ve keratositler tekrar iğsi morfoloji göstermeye başlamıştır (Şekil 4.12. C). Sonuç olarak AdMKH grubundaki korneaların FBM grubuna göre daha iyi stromal organizasyona sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.12. Yaralanmayı takiben 30. günde, AdMKH grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücreleri veya stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (⇔), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (►), Descemet membranı (D), endotel (↑), (3000X büyütme).

Yaralanmayı takip eden 30. günde, polikromatik ışık ve AdMKH ile tedavi edilen korneaların epitel tabakası normal korneaya benzer görünümündedir. Kornea epitelinde minimal hücreler arası boşluk ve vakuoller, belirgin desmozom bağlantılarına sahip normal nükleer ve sitoplazmik konfigürasyonu olan hücreler izlenmektedir (Şekil 4.13. A). Stromada, PK grubundaki kornealara benzer ortogonal dizilime sahip iyi organize olmuş kolajen fibrilleri ve ökromatik çekirdeğe sahip iğ şeklindeki keratositler görülmektedir (Şekil 4.13. B). Yer yer dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) seçilebilmektedir (Şekil 4.13. C). Descemet membranı homojen izlenmekte ve endotel hücreleri ökromatik çekirdek ve değişken büyüklükte pinositotik veziküller içeren sitoplazmadan oluşmaktadır (Şekil 4.13. D).



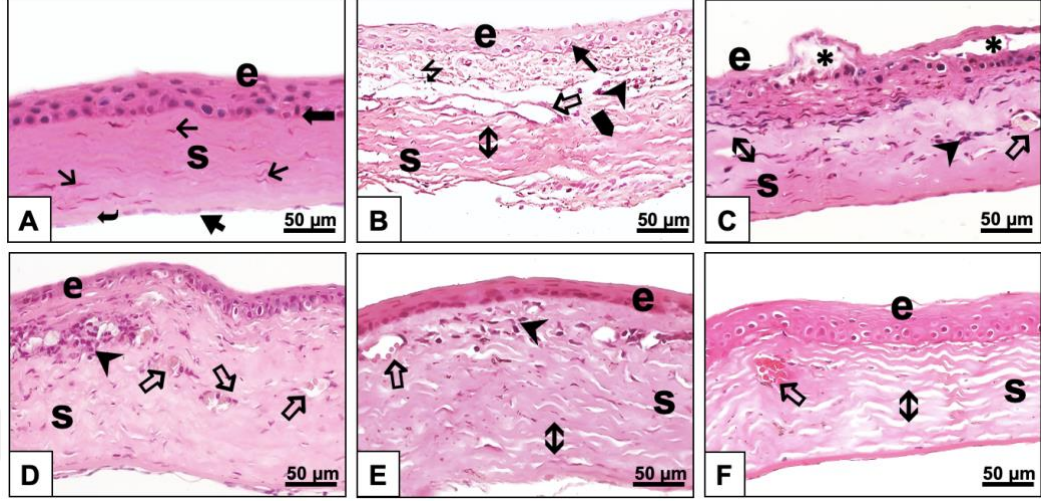
Şekil 4.13. Yaralanmayı takiben 30. günde, FBM + AdMKH grubundaki sıçan korneası kesitlerinin TEM görüntüleri. Epitel (e), nükleus (N), stroma (S), keratosit (K), epitel hücreleri ve stromadaki kolajen lifleri arasında geniş boşluklar (↔), vakuol (v), dizorganize kolajen fibrilleri (skar dokusu) (►), Descemet membranı (D), endotel (↑), (3000X büyütme).

Farelerde alkali yanık modelinde yara iyileşmesini arttırmak için intrastromal kornea stroma kök hücre enjeksiyonu uygulanmış ve 3. ayda TEM analizinde kolajen fibrillerinin üniform ve sıkı bir şekilde paketlenmiş farklı katmanlar halinde düzenlendiği ve tedavi edilmemiş hasarlı kornealarda bu organizasyonun kaybolduğu izlenmiştir [88]. Sağlıklı kornea ile karşılaştırıldığında alkali yaralanmasından sonra kolajen fibril çaplarında anlamlı bir artış olduğu ve kök hücre tedavisi ile fibril çaplarında anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür. Ön segment görüntülemeye de bu bulguları destekleyen kornea opasitesinde azalma izlenmiştir [88]. Başka bir hayvan çalışmasında kornea opasite modeli için genetiği değiştirilerek lumikan üretimi yapamayan lumikan negatif (Lum-/-) fare kullanılmıştır. Lumikan, kornea saydamlığı için gerekli olan proteoglikanların çekirdek proteinidir ve yokluğunda korneada bulanıklık meydana gelmektedir [41]. Lum-/- farelerin TEM görüntülemesinde kornealarında stroma mimarisinin bozulduğu ve arka stromada büyük, anormal, kaynaşmış kolajen fibriller izlenmiştir. İnsan stroma kök hücreleri, 14 haftalık Lum-/- farelere enjekte edilmiş ve 12 hafta sonra kornea stromasındaki lumikan ekspresyonu immün boyama ile gösterilmiş ve TEM analizinde hem ön hem de arka stromada, normal korneaya benzer dizilim gösteren ve benzer boyutta olan kolajen fibrilleri izlenmiştir. Bu çalışmalara benzer olarak bu tez çalışmasında da kök hücre uygulamasının korneadaki kolajen mimariyi iyileştirdiği gösterilmiştir. Kök hücre uygulanan kornealardaki kadar olmasa da FBM uygulanan grupta da kornea rejenerasyon bulguları izlenmiştir.

4.3.3. Hematoksilen ve Eozin Boyama

Pozitif kontrol grubuna ait kornea dokuları karakteristik özellikte normal histolojik yapıya sahip olup kornea epitel keratinizasyon göstermeyen çok katlı yassı epitel özelliği sergilemektedir (Şekil 4.14. A). Bazal katmanda küboidal hücreler, üstteki katmanda daha az küboidal hücre ve ardından 1-2 sıra yassı çekirdeklere sahip hücreler görülmektedir. Epitel, aselüler Bowman membranı ile desteklenmektedir. Avasküler stroma tabakası, paralel düzenlenmiş kolajen lifleri ve stroma lamelleri arasında homojen dağılmış keratositleri içermektedir. Kornea stroması ve tek katlı yassı epitel olan endotel arasında Descemet

membran yer almaktadır. Pozitif kontrol grubunun kornea kesitlerinde fibrozis, neovaskülarizasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu gibi histopatolojik değişimler izlenmemektedir (Şekil 4.14. A).



Şekil 4.14. Tüm deney gruplarının 30. günde H&E ile boyanmış histolojik kesitleri. (A) Pozitif kontrol grubu (B, C) negatif kontrol grubu (D) FBM grubu (E) AdMKH grubu (F) FBM + AdMKH grubu. Epitel (e), Bowman tabakası (←), stroma (s), keratosit (→), Descemet membranı (⇐), endotel (▲), Epitel ve stroma arasında ayrılma ve bütünlük kaybı (*), ödem (⇄), vakuolize sitoplazmalı epitel hücreleri (↔), vaskularize oluşumlar (neovaskülarizasyon) (⇨), mononükleer hücre infiltrasyonu (◀), kolajen lamellerde ayrılma ve düzensizleşme (⇄) ve fibrotik alanlar (■), (400X büyütme).

Yaralanmayı takip eden 30. günde NK grubuna ait kornea kesitlerinde epitel bütünlüğünün bozulduğu ve bazı kornea epitel hücrelerinde sitoplazmik vakuolizasyon dikkati çekmektedir (Şekil 4.14. B ve C). Epitel ve stroma sınırının net olarak ayırt edilemediği izlenirken, tabakalar arası ayrılma ve ödem olduğu görülmektedir. Stroma tabakasında fibrotik değişimlerin yanı sıra kolajen lamellerinde düzensizleşme ve ayrılmaların olduğu, keratositlerin dağılmış olarak yer aldığı izlenmektedir. Stromada mononükleer hücre infiltrasyonu ve kan damarlarının invazyonu görülmektedir. Ödem ve neovaskülarizasyon ile birlikte stroma hücre kaybı izlenen bulgular arasındadır (Şekil 4.14. B ve C).

Polikromatik ışık uygulanan FBM grubuna ait kornea kesitlerinde neovaskülarizasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize histopatolojik değişimlerin yer yer devam ettiği izlenmektedir (Şekil 4.14. D). Bazı epitel hücrelerinde pinositotik çekirdeklerin yanı sıra sitoplazmada vakuolizasyon varlığı dikkati çekmektedir. Negatif kontrol grubuna göre stroma alanında kolajen lif dağılımının düzenli hale geldiği, ancak fibrotik değişimlerin bazı alanlarda devam ettiği görülmektedir (Şekil 4.14. D).

Subkonjonktival AdMKH enjeksiyonu yapılan gruba ait kornea kesitlerinde ise NK ve FBM gruplarına göre epitel bütünlüğünün korunduğu, stromal fibrotik değişimlerin, vaskülarize oluşumların ve mononükleer hücre infiltrasyonunun azaldığı ve kolajen liflerinin dağılımının daha düzenli hale geldiği dikkati çekmektedir (Şekil 4.14. E). Adipoz doku kaynaklı MKH grubundaki histolojik veriler, TEM'de olduğu gibi FBM grubuyla karşılaştırıldığında epitel ve stromada enflamasyon, neovaskülarizasyon ve skar oluşumu açısından daha iyi yara iyileşme sürecinin işaretlerini göstermektedir. Başka bir çalışmada AdMKH'lerin kornea alkali yaralanmalarındaki kornea iyileşmesine etkilerini değerlendirmek için AdMKH'ler tavşanlara intrastromal ve subkonjonktival enjeksiyon ile uygulanmıştır. Bu çalışmaya benzer şekilde tedavi edilmeyen kornealara göre kolajen liflerinin diziliminin daha iyi olduğu ve damarlanmanın ve enflamatuar hücre infiltrasyonunun daha az olduğu gösterilmiştir [179].

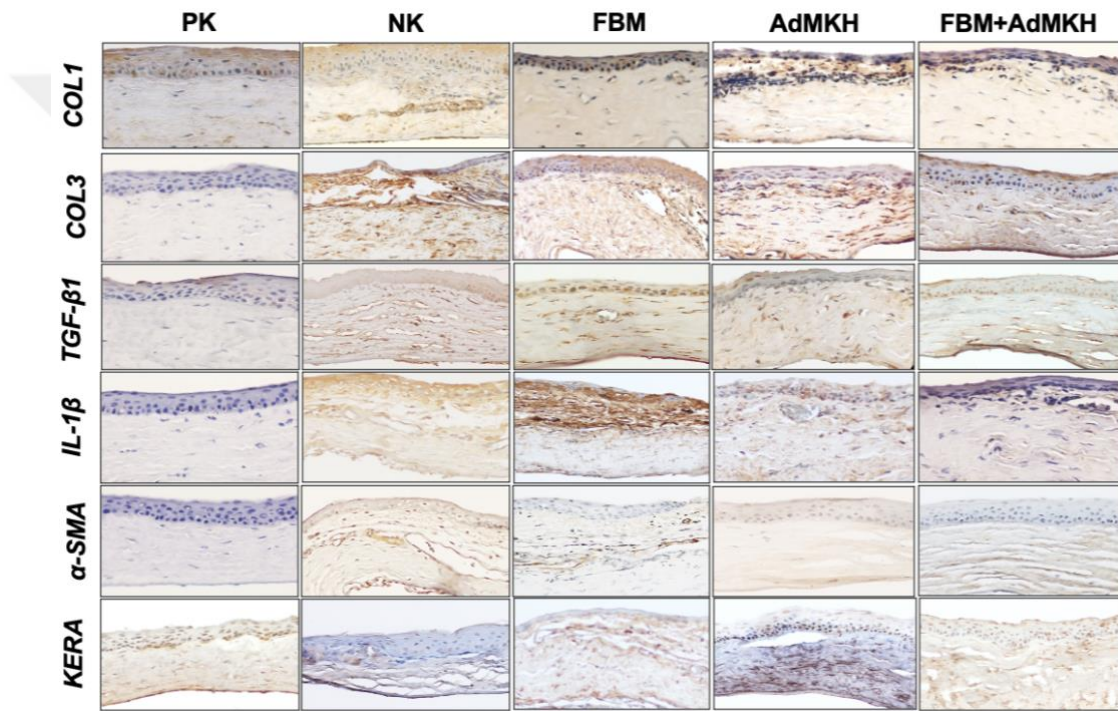
Fotobiyomodülasyon ve AdMKH'nin birlikte uygulandığı grupta ise NK, FBM ve AdMKH gruplarına göre epitel bütünlüğünün, stroma alanında kolajen liflerinin ve keratosit diziliminin belirgin şekilde korunduğu izlenmektedir (Şekil 4.14. F). Bu grupta epitel bütünlüğünün, kolajen liflerinin diziliminin ve keratosit morfolojisinin normal kornea kesitleriyle karşılaştırılabilir düzeyde olduğu izlenmiştir. Mononükleer hücre infiltrasyonu stromada yer yer azalırken, ödem ve fibrotik alanlardaki azalma dikkati çekmektedir (Şekil 4.14. F). Bu bulguların TEM görüntüleri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, TEM görüntüleme ve H&E boyamayla birlikte yapılan histolojik analizde, FBM ve AdMKH tedavilerinin tek başına uygulanmasına kıyasla polikromatik ışık ile birlikte uygulanan kök hücre tedavisinde kornea

opasitesinde ve neovaskülarizasyonunda belirgin azalma ve en iyi yara iyileşme cevabı olduğu görülmüştür.

4.3.4. İmmünohistokimyasal Boyama

Yaralanmayı takiben 30. gündeki deney gruplarına ait kornealardaki COL1, COL3, TGF- β 1, IL-1 β , α -SMA ve keratokan antikorlarına ait İHK boyamalarının kesitleri Şekil 4.15'te sunulmuştur. İmmunopozitif yoğunlukları kantitatif olarak analiz edilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak kıyaslanmıştır (Şekil 4.15.)



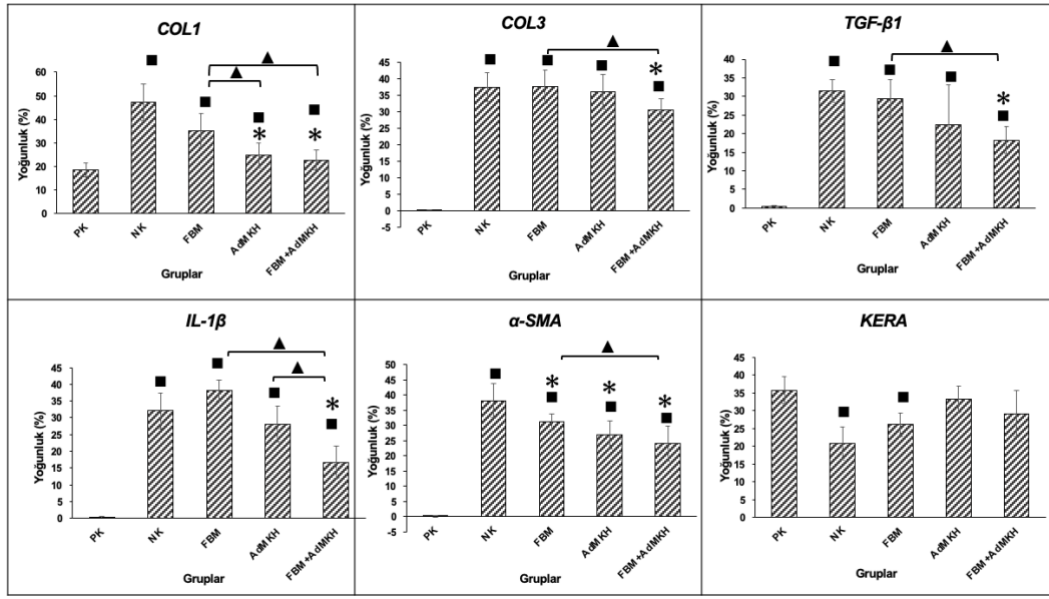
Şekil 4.15. Yaralanma sonrası 30. günde tüm deney gruplarının kornea kesitlerinin İHK boyama görüntüleri (DAB-Hematoksilen, 400X büyütme).

Kornea yara iyileşmesi sırasında aktive hale gelen keratositler hücre dışı matriks üretimini arttırmaktadır. Kornea yara iyileşme cevabında, COL1'in ve esas olarak COL3'ün aşırı üretimi, stromadaki benzersiz hücre dışı matriks organizasyonunu bozarak kornea berraklığının azalmasına ve korneada skar oluşumuna yol açmaktadır [180]. Kolajen üretimini karakterize etmek için COL1 ve COL3 için İHK boyama yapılmıştır. Negatif kontrol grubunda COL1 immünoreaktivite yoğunluğu, PK, AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarına göre

istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0,001$). Adipoz kaynaklı MKH grubu ve FBM + AdMKH grubunda COL1 yoğunluğunun benzer düzeyde ($p>0,05$) ve FBM grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Bu iki gruptaki COL1 değeri PK grubuna yaklaştıysa da PK grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,01$).

Sağlıklı kornea stromasında COL3 bulunmaz ve yara iyileşme cevabında hücre dışı matriks bileşeni olarak üretilmektedir [52]. Negatif kontrol, FBM, AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında sağlıklı kornealarla karşılaştırıldığında COL3 yoğunluğu düzeyinde anlamlı bir artış izlenmiştir ($p<0,01$). Adipoz doku kaynaklı MKH ile FBM birlikte uygulandığında COL3 yoğunluğu hem NK hem de FBM grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0,01$). Negatif kontrol grubuna göre COL3 değerinde anlamlı azalma sadece FBM + AdMKH grubunda izlenmiştir.

Bu sonuçlar, kornea stromasındaki keratosit hücre ölümü ve ardından kalan keratositlerin aktivasyonu ve miyofibroblastların ürettiği hücre dışı matriks ile karakterize olan onarım sürecini gösteren önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur [88, 181, 182]. İlk olarak deri yaralanmalarında tanımlanan miyofibroblastların, kornea onarımı sırasında yara kontraksiyonunun yanı sıra hücre dışı matriks birikimi ve organizasyonundan da sorumlu olduğu düşünülmektedir [183]. Torricelli ve ark., miyofibroblastların ve bu hücreler tarafından üretilen düzensiz hücre dışı matriksin, kornea hasarından sonra stroma opaklığının seviyesi ve kalıcılığının kritik belirleyicisi olduğunu tanımlamıştır [54]. Bu tez çalışmasında mekanik abrazyon sonrası COL1 miktarındaki artış ve COL3 varlığı bu hücrelerin gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Normalde kornea stromasında bulunmayan COL3 birikmesi, kolajen lamellerinin organizasyonunu değiştirerek stroma opaklığının artmasına neden olmaktadır. Benzer sonuç Shojaati ve ark. tarafından fare kornea opasite modelinin geliştirilmesinde de elde edilmiştir. Çalışmalarında, fare korneasının merkezi 2 mm üzerine elmas tur uygulanarak kornea epiteli ve bazal membranın debridmanı yapılmış ve COL3 sentezi, fibrotik skar dokusunun gelişimi ve kornea şeffaflığının kaybı izlenmiştir [182].



Şekil 4.16. Tüm gruplarda 30. günde kornea dokularının İHK boyamalarına ait immünoreaktivite yoğunluklarının analizi. Grafikler ortalama $\pm$ SD (4-5 hayvan/grup) olarak temsil edilmektedir. Negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p < 0,05$; pozitif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ■ $p < 0,05$ ve gruplar arası analizde ▲ $p < 0,05$.

Kornea hasarından sonra aşırı kornea skarı oluşumunu önlemek için inflamasyonun baskılanması önemlidir [180]. Korneada hasar, epitel hücrelerinden ve/veya gözyaşından başta IL-1 α ve β olmak üzere enflamatuar sitokinlerin salınmasını tetiklemekte [51] ve IL-1 de fibroblastlara dönüşüme neden olan fibroblast büyüme faktörü, platelet kökenli büyüme faktörü ve TGF- β 1 gibi büyüme faktörlerinin salınımı uyarmaktadır [33]. Önceki çalışmalar, epitelyal-mezenkimal geçişin ve miyofibroblast farklılaşmasının anormal skar oluşumunda önemli bir rol oynadığını göstermiştir ve bu çoklu sinyal yollarında en kritik düzenleyici faktör TGF- β 1'dir [11, 50]. Bu çalışmada AdMKH'lerin ve FBM tedavisinin anti-enflamatuar etkisini araştırmak için yaralanma sonrası 30. günde eksize edilen kornealarda TGF- β 1 ve IL-1 β varlığı incelenmiştir. Negatif kontrol, FBM, AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında sağlıklı kornealarla karşılaştırıldığında TGF- β 1 yoğunluğu düzeyinde anlamlı bir artış izlenmiştir ($p < 0,01$). Adipoz doku kaynaklı MKH ile FBM birlikte uygulandığında TGF- β 1 yoğunluğu hem NK hem de FBM grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0,01$), ancak yine de sağlıklı kornealardan daha yüksek düzeyde olmuştur ($p < 0,01$).

Negatif kontrol grubuna göre TGF- β 1 değerinde anlamlı azalma sadece FBM + AdMKH grubunda izlenmiştir. Sağlıklı kornealarla karşılaştırıldığında IL-1 β düzeyinde NK, FBM, AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında anlamlı bir artış izlenmiştir ($p<0,001$). Fotobiyomodülasyon ve AdMKH'nin birlikte uygulanması ile IL-1 β düzeyi NK, FBM ve AdMKH gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0,001$). Sonuç olarak enflamasyonu baskılamada en iyi sonuç FBM + AdMKH grubunda elde edilmiştir.

Mezenkimal kök hücreler izole edildikleri dokuya göre farklı özellikler gösterirler. Enflamasyonun farklı düzeylerine ve zamanına bağlı olarak immünomodülatör sitokinlerin salgı düzeyi değişiklik gösterebilmektedir. Bu, aynı koşullar altında MKH'lerin farklı tepkilerini belirleyebilir ve MKH'lerin etkileri büyük oranda parakrin nitelikte olmaktadır [184]. Sıçanlarda penetran kesi ile kornea yaralanması sonrası AdMKH ve kemik iliği MKH'ler  n kamaraya enjekte edilmiş ve kök hücre nakledilen her iki grupta da pro-enflamatuar olarak bilinen TNF- α , IL-6r ve IL-12b ekspresyonları tedavi almayan kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Her iki kök hücre uygulanan grupta NK grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüş ve kemik iliği MKH grubuyla karşılaştırıldığında AdMKH grubunda IL-12b'nin ekspresyonu anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar, MKH'lerin delici yaralanma geçiren korneaya nakledildiğinde anti-enflamatuar özelliklere sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca AdMKH'ler anti-enflamatuar özellikler açısından kemik iliği MKH'lerine göre daha üstün bulunmuştur [151]. Bu hücreler, sadece keratositlere farklılaşmak yerine, Basu ve ark.'nın açıkladığı gibi parakrin etki ve anti-enflamatuar özellikleri ile yaralı bölgenin rejenerasyonuna katkı sağlamaktadır [86].

Tez çalışmasında uygulanan subkonjonktival AdMKH enjeksiyonunun anti-enflamatuar etkisini destekleyen bir çalışmada, AdMKH'lerin sıçanlarda mekanik yaralanmaya bağlı enflamasyonu farklı uygulama yolları ile ne ölçüde azalttığını değerlendirmek için, enflamatuar sitokinlerden IL-1 β ve TNF- α 'nın mRNA ekspresyonu, yaralanmadan sonraki 4. günde toplanan kornealarda RT-PCR ile ölçülmüştür. Adipoz kaynaklı MKH'lerin subkonjonktival ve

intravenöz yolla uygulandığı gruplarda en iyi anti-enflamatuar yanıt elde edilmiştir [10].

Bu çalışmada hem TGF- β 1 hem de IL-1 β düzeylerinde NK grubuna göre anlamlı azalma kök hücre ve fototerapi birlikte uygulandığında elde edilmiştir. Bu sonuç FBM uygulamasının AdMKH'lerin anti-enflamatuar etkisini arttırdığını ispatlamaktadır. Henüz kornea yara iyileşmesinde bu iki tedavi modalitesini birlikte uygulayan bir çalışma bulunmamaktadır. Deneysel *in vitro* yapılan bir çalışmada derideki yara iyileşmesinde aşırı skar (keloid veya hipertrofik skar) oluşumu üzerine FBM ve AdMKH tedavilerinin tek başına ve birlikte uygulamalarının anti-fibrotik etkisi incelenmiştir. Adipoz kaynaklı MHK uygulamasının keloid fibroblastların (KF) ve hipertrofik skar fibroblastlarının (HSF) çoğalması ve göçü üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu ve AdMKH'lerin aynı zamanda COL1 ve COL3 sentezini, fibronektin ve α -SMA'nın mRNA ekspresyonunu da azalttığı bulunmuştur. Kök hücre tedavisine ek olarak 635 nm ve 655 nm dalga boyunda LLLT 152 s boyunca her seansta 4 J/cm² olacak şekilde toplamda 4 kere uygulanmış ve fibroziste anahtar rol oynayan TGF- β 1 ve Notch1 üretiminin azalması ile fibroblastların proliferasyon ve migrasyonunun inhibe olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak fototerapinin AdMKH'lerin keloid fibroblastları ve hipertrofik skar fibroblastlarının üzerindeki anti-fibrotik kapasitesini arttırdığı sonucuna varılmıştır [185]. Tez çalışmasında bu çalışmaya benzer FBM parametreleri uygulanmış ve ışık ile kök hücreleri birlikte uygulamasının COL1, COL3, TGF- β 1 ve IL-1 β 'i azaltmada en başarılı tedavi modalitesi olduğu gösterilmiştir. Başka bir deneysel çalışmada FBM ve AdMKH tedavilerinin terapötik etkileri, tip 1 diyabetli sıçanlarda gecikmiş yara iyileşme modelinde yara onarımının matürasyon aşamasında ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmiştir. Mikrobiyolojik analiz, FBM + AdMKH'nin tek başına FBM ve AdMKH'den anlamlı olarak daha iyi olduğunu göstermiştir. Ayrıca yara kapanma hızı ve anjiyogenez açısından FBM + AdMKH grubu daha iyi bulunmuştur. Sonuç olarak FBM + AdMKH kombinasyon terapisi, tip 1 diyabetli sıçanların metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ile enfekte olmuş yara modelinde cilt hasarı onarımını uyarmada ve enflamatuar yanıtı modüle etmede FBM veya AdMKH'den daha etkili bulunmuştur [186].

Kornea hasarını takiben TGF- β 1'in artmış ekspresyonu, sessiz stroma keratositlerinin miyofibroblastlara dönüşümünü teşvik eder ve miyofibroblastların aşırı birikimi ve aktivitesi, düzensiz hücre dışı matrikse yol açarak kornea skarı oluşumuna neden olmaktadır [187]. Bu çalışmada skar oluşumunu değerlendirmek için miyofibroblastlara geçişi gösteren α -SMA varlığı İHK boyama ile incelenmiştir [187]. Negatif kontrol, FBM, AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarındaki α -SMA yoğunluğu normal kornealarla karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Tüm tedavi gruplarında (FBM, AdMKH ve FBM + AdMKH grupları) α -SMA'nın düzeyinin, NK grubundaki kornealara kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Skar oluşumu için önemli bir belirteç olan α -SMA'daki bu değişim, klinik değerlendirmedeki KOS değişimi ile tutarlı bulunmuştur (Şekil 4.2.). Fotobiyomodülasyon ve AdMKH'nin birlikte uygulandığı grup, tek başına FBM grubuna göre anlamlı olarak daha düşük α -SMA yoğunluğu göstermiştir ($p<0,001$).

Sonuç olarak, çalışmamızda bir miyofibroblast belirteci olan α -SMA düzeyi hem FBM grubunda hem de AdMKH grubunda tedavi edilmemiş kornealara göre önemli ölçüde azalmıştır. Fototerapi tedavisine kök hücrelerin eklenmesiyle α -SMA seviyesinde anlamlı derecede daha yüksek bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonuçlar tedavi gruplarındaki anti-enflamatuvar yanıtla paralellik göstermektedir. Adipoz kaynaklı MKH'lerin topikal damla formunda uygulamasının etkinliğini araştıran bir çalışmada excimer lazer ile kornea yara modeli oluşturulan farelere topikal AdMKH damla 5 gün boyunca günde 3 kere uygulanmıştır. Tedavi almayan kontrol grubuna göre AdMKH damla uygulanan kornealarda epitel iyileşme hızı daha fazla bulunmuş ve epitele komşu stromada α -SMA varlığının ciddi olarak azaldığı ve muhtemelen α -SMA azalmasıyla ilişkili olarak kornea bulanıklığının da daha az olduğu belirtilmiştir [188]. Bu tez çalışmasında α -SMA sonuçlarına benzer şekilde KOS değerleri her tedavi grubunda NK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Başka bir çalışmada farklı AdMKH uygulama yollarının (topikal yol, subkonjonktival, intraperitoneal veya intravenöz enjeksiyon) kornea mekanik yaralanmasının neden olduğu kornea fibrozisi üzerindeki etkisini belirlemek için, kornea kesitlerinde İHK analizi ile α -SMA ekspresyonu ve ayrıca RT-PCR kullanarak

mRNA seviyesinde α -SMA ve TGF- β 1'in ekspresyonu incelenmiştir. Uygulama yollarından subkonjonktival enjeksiyon, tedavi edilmemiş yaralı kontrollere göre α -SMA (~%90 azalma) ve TGF- β 1'in (~%70 azalma) ekspresyonunu en fazla azaltan uygulama yöntemi olmuştur [10]. Bu çalışmada da AdMKH uygulamasında etkinliği kanıtlanmış subkonjonktival enjeksiyon yöntemi tercih edilmiştir.

Kornea stromasına özgü proteoglikan olan keratokan, sağlıklı keratositler tarafından üretilmekte ve kornea şeffaflığının korunmasında önem taşımaktadır [52]. Yara iyileşme cevabında keratositler fibroblastlara farklılaşırlar ve bu hücreler kornea kristalinleri (transketolaz ve aldehit dehidrojenaz 1A1) ve keratan sülfat gibi farklılaşmış kerosit proteinlerinin ekspresyonunu azaltarak yara yerindeki hücre dışı matriksi yeniden şekillendirmek için gerekli olan MMP gibi proteinazları ve fibronektin ve tenaskin-C ve COL3 dahil diğer proteinler açısından zengin geçici hücre dışı matriksi üretmeye başlamaktadır [53]. Bu süreçte yeni üretilen hücre dışı matriks ve keratokanın azalması kolajen fibrillerinin muntazam dizilimini bozmakta ve kornea skarına neden olmaktadır. Bu nedenle çalışmada saydam kornea için önemli bir biyobelirteç olan keratokanın varlığı incelenmiştir. Pozitif kontrol kornealarıyla karşılaştırıldığında keratokan immunoreaktivite yoğunluğu hem NK hem de FBM grubunda önemli ölçüde azalmıştır ($p<0,001$). Polikromatik ışık uygulamasıyla NK grubuna göre keratokan yoğunluğu artmış olsa da hala sağlıklı korneadaki yoğunluğa ulaşamamıştır. Bunun yanında, AdMKH'ler ile tedavi edilen kornealarda ve AdMKH ve FBM kombinasyonu ile tedavi edilen kornealarda keratokan düzeyi sağlıklı kornealarınkine benzer bulunmuştur ($p>0,05$). Başka bir çalışmada sıçanlarda penetran yaralanma sonrası ön kamaraya AdMKH ve kemik iliği MKH enjekte edilmiş ve 8 hafta sonra kök hücrelerin kornea epiteli ve stromasında olduğu gösterilmiştir. Ayrıca immünofloresan analizinde kornea stromasına özgü proteoglikan olan keratokanın ekspresyonunun, kontrol grubundaki ekspresyonla karşılaştırıldığında hem kemik iliği MKH hem de AdMKH uygulanan gözlerde anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir [151]. Keratokan ekspresyonundaki artış kornea stromasına göç eden kök hücrelerinin keratosite farklılaşmasını göstermektedir. Bu çalışmada kök hücre uygulanan grupta keratokan

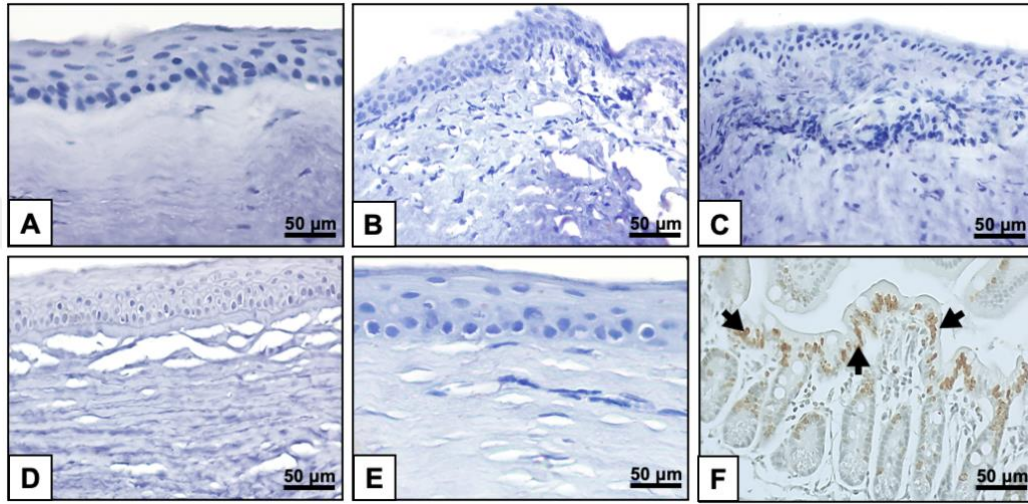
yoğunluğunda belirgin artış olmamasının muhtemel nedeni subkonjonktival enjekte edilen kök hücrelerin korneaya göç edip keratositlere farklılaşamamasıdır.

Sonuç olarak, İHK analizler FBM ve AdMKH tedavilerinin tek başına enflamatuvar cevabı ve skar oluşumunu azalttığını göstermiştir. Ancak polikromatik ışık ile kök hücre uygulaması beraber yapıldığında, muhtemelen fototerapi AdMKh'lerin olumlu etkilerini daha da arttırmış, kornea yara iyileşmesinde enflamasyonu ve skar oluşumunu azaltmada en iyi sonuç elde edilmiştir.

Çalışmamızda birçok çalışmada kanıtlandığı üzere kök hücre terapisinin yara iyileşmede olumlu katkısı olduğu gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücreler kornea hastalıklarında terapötik etkinliklerini 2 mekanizma üzerinden gerçekleştirmektedir; (1) Mezenkimal kök hücrelerin korneada keratositlere farklılaşması, (2) Korneada parakrin etki (sekretomlar (sitokin ve kemokinler) ve hücre dışı matriks bileşenleri salgılayarak) ile anti-enflamatuvar etki ve immün modülasyonu sağlaması [103].

Bazı çalışmalarda direk stromaya enjekte edilmeyip sadece subkonjonktival enjeksiyon yolu ile uygulanan kök hücrelerin korneadaki yara bölgesine göç edip keratositlere farklılaşarak yara iyileşmeye katkı sağladığı da gösterilmiştir [10]. Mezenkimal kök hücreler tercihen yaralanan bölgeye yanaşıp oraya göç etmektedirler [189]. Yaralı bölgeye bu yönelme, MKH'lerin sistemik uygulamasında trofik faktörlerin ve hücre dışı matriksin yara bölgesine salınmasını kolaylaştırmaktadır [190]. Araştırmalar MKH'lerin hasarlı üç kornea hücre katmanına (epitel, stroma ve endotel) da göç ettiğini göstermiştir [106, 191, 192]. Demirayak ve ark. penetran kornea yaralanmasında iyileşmeyi arttırmak için ön kamaraya yeşil floresan proteini işaretli kemik iliği MKH ve AdMKH'leri enjekte ettikten 8 hafta sonra kornea epiteli, stroması ve endotelinde işaretli kök hücrelerin olduğunu göstermiştir [151]. Shukla ve ark. MKH'lerin oküler yüzey dokularına migrasyonunu araştırmak için MKH'leri kuantum noktaları (QDs) ile *in vitro* olarak işaretlemiş ve kornea hasarı sırasında topikal olarak, subkonjonktival, intraperitoneal veya intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulamıştır [10]. İmmünohistokimyasal analizde, işaretli

MKH'lerin subkonjonktival veya intravenöz enjeksiyonunu takiben 4. günde hem korneada hem de konjonktivada olduğu izlenmiştir. Bu tez çalışmasında da 30. günde eksize edilen kornealarda BrdU işaretli AdMKH'lerin varlığı incelenmiştir. İmmünohistokimyasal analizde, BrdU pozitif kontrol bağırsak kesitinde BrdU pozitif hücreler izlenirken, kök hücre uygulanan AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarının kornealarında BrdU pozitif hücrelerin bulunmadığı izlenmiştir (Şekil 4.17.).



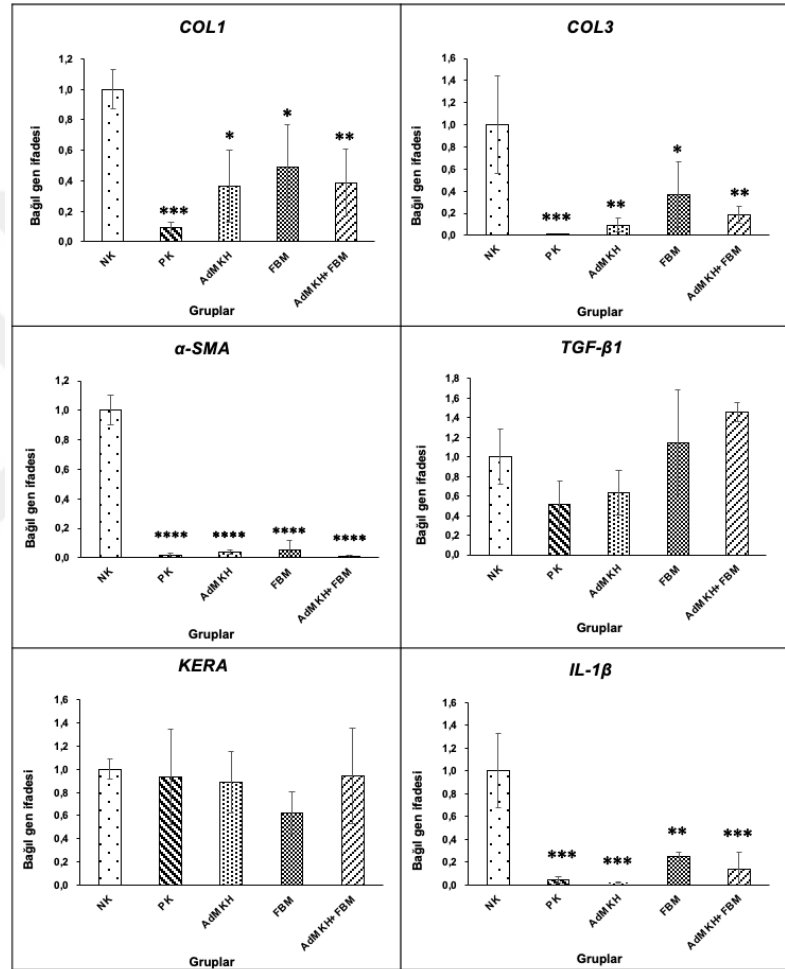
Şekil 4.17. Deney gruplarına ait kornea kesitlerinde BrdU İHK boyaması (A) Pozitif kontrol grubu (B) Negatif kontrol grubu (C) FBM grubu (D) AdMKH grubu (E) FBM + AdMKH grubu (F) Kit içerisinde mevcut olan BrdU pozitif kontrol bağırsak kesiti. BrdU pozitif hücreler (↗), (DAB-Hematoksilen, 400X büyütme).

Bu sonuç, subkonjonktival enjeksiyonla uygulanan AdMKH'lerin terapötik etkisinin, AdMKH'lerin korneaya göçü olmadan parakrin faktörlerinin (sitokinler ve büyüme faktörleri) salınması yoluyla olduğunu göstermektedir.

4.3.5. Kornea Dokularında Gen Ekspresyonu

İmmünohistokimyasal sonuçları doğrulamak için RT-PCR analizi yapılmıştır. Negatif kontrol grubundaki COL1 ve COL3'ün göreceli ekspresyon seviyeleri sağlıklı kornealardan anlamlı derecede yüksektir ($p < 0,001$) ve AdMKH, FBM ve AdMKH + FBM gruplarında COL1 ve COL3 düzeyleri NK grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir (sırasıyla; $p < 0,01$, $p < 0,01$, $p < 0,001$) (Şekil 4.18.). α -SMA'nın göreceli mRNA ekspresyonu, NK grubunda en yüksek ve

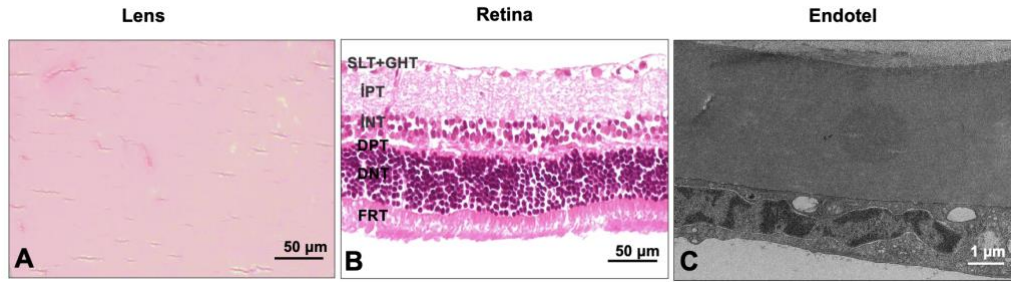
FBM, AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında NK grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha az bulunmuştur ($p<0,0001$) (Şekil 4.18.). Benzer şekilde, NK grubuyla karşılaştırıldığında tüm tedavi gruplarında IL-1 β 'nin mRNA ekspresyonunda anlamlı bir azalma izlenmiştir ($p<0,001$) (Şekil 4.18.). Bununla birlikte, İHK boyama değerlendirmesinin aksine, kornea dokularında keratokan ve TGF- β 1'in mRNA ekspresyonunda dikkate değer bir değişiklik izlenmemiştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Yaralanma sonrası 30. günde kornea dokularında COL1, COL3, α-SMA, TGF- β 1, KERA ve IL-1 β için RT-PCR ile kantitatif gen ekspresyon analizleri. Sonuçlar, β -aktin'e göre kat değişimi olarak hesaplanmıştır ve grafikler, ortalama $\pm$ SD (4-5 hayvan/grup) olarak temsil edilmektedir. Negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ ve **** $p<0,0001$.

4.3.6. Polikromatik Işığın Kornea Endoteli, Lens ve Retina Üzerindeki Etkisi

Polikromatik ışık ile tedavi edilen sıçanların lens ve retina örneklerinin histolojik analizi, polikromatik ışığın sıçan gözlerinin lensi ve retinası üzerinde olumsuz bir etkisi olup olmadığını araştırmak için yapılmıştır. Lens lifleri normal görünümde birbirine paralel uzanmaktadır ve katarakt benzeri değişiklikler görülmemiştir (Şekil 4.19. A). Retina dokusundaki hücre çekirdekleri ve hücreler arası bağlantılar sağlamdır ve retinanın çok katmanlı yapısı düzgün olarak izlenmiştir (Şekil 4.19. B). Yalnızca polikromatik ışığın uygulandığı sıçan kornealarının TEM görüntülemesinde, Descemet membran-endotel kompleksinde herhangi bir olumsuz etki görülmemiştir. Stroma ve endotel arasında Descemet membranı homojen ve devamlı olarak izlenmiştir. Endotel hücresinin yassı ökromatik çekirdeği ve sitoplazmasında çeşitli boyutlarda pinositotik veziküller görülmüştür (Şekil 4.19. C).



Şekil 4.19. H&E ile boyanmış FBM grubuna ait lens (A) ve retina (B) görüntüleri (400X büyütme). FBM grubuna ait endotelin (C) TEM görüntüsü (3000X büyütme). SLT; sinir lifi tabakası, GHT; gangliyon hücre tabakası, IPT; iç pleksiform tabaka, INT; iç nükleer tabaka, DPT; dış pleksiform tabaka, DNT; dış nükleer tabaka, FRT; fotoreseptör tabaka.

Tez çalışmasında, polikromatik ışık tedavisinde her seansta $4,6 \text{ J/cm}^2$ enerji yoğunluğu uygulanmıştır. Mevcut uluslararası standartlara göre, gözü bu enerji yoğunluğuna sahip düşük seviyeli bir lazere maruz bırakmak optik bir tehlike oluşturmamaktadır [193]. Gopalakrishnan ve ark. P23H transgenik sıçan olan retinitis pigmentosa modelinde NIR (830 nm) FBM tedavisinin mitokondriyal metabolik durumu koruyacağı ve fotoreseptör kaybını azaltacağı hipotezini test

etmiştir [194]. P23H sıçan yavruları, doğum sonrası 10. günden 25. güne kadar bir LED kaynağı kullanılarak 830 nm ışık ile 180 s boyunca toplamda $4,5 \text{ J/cm}^2$ enerji yoğunluğu ile tedavi edilmiştir. Tedaviden 1 ay sonra tedavi almayan gruba kıyasla FBM ile tedavi edilen hayvanlarda retinanın metabolik durumu, fonksiyonu ve morfolojisi korunmuştur. Sonuç olarak, FBM tedavi almayan hayvanlarda görülen mitokondriyal solunum zincirinin oksidasyon durumunun bozulmasına karşı koruma sağlamıştır. Ayrıca tüm sıçanlarda, klinik muayene ve histolojik analizlere göre oküler ortamın (kornea, lens, vitreus) saydamlığı korunmuştur. Daha da önemlisi, 830 nm FBM'den sonra normal, etkilenmemiş retinada hasar olduğuna dair bir kanıt bulunamamıştır [194]. Tez çalışmasında da 4.6 J/cm^2 enerji yoğunluğu kullanılmıştır ve sıçan kornealarına uygulanan polikromatik ışığın TEM ve histopatolojik analizlere göre sıçan lensi, retinası ve endotelinde hasara neden olmadığı ve güvenilir bir uygulama olduğu gösterilmiştir.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında kornea yara iyileşmesinde sıçan kornea yara modeli kullanılarak subkonjonktival AdMKH enjeksiyonu ve polikromatik ışık kaynağı ile FBM tedavilerinin tek başına ve birlikte uygulamasının kornea saydamlığı ve hücre dışı matriks organizasyonu üzerindeki terapötik etkinliği ve güvenilirliği değerlendirilmiştir. Tez çalışması, polikromatik ışık ve hücre terapisinin kornea yara iyileşmesinde, tek başına AdMKH veya tek başına FBM tedavisi uygulamasına göre daha fazla terapötik etkisi olabileceği hipotezi üzerine kurulmuştur. İlk olarak başarılı bir şekilde sıçanlardan allojenik AdMKH izolasyonu ve karakterizasyonu yapılmıştır. İkinci aşamada, elmas uçlu tur aracılığıyla epitel ve anterior stromanın mekanik debridmanı ile başarılı bir şekilde kornea opasite modeli oluşturulmuştur. Üçüncü aşamada uygulanan FBM tedavisinin süresi ve enerji dozu için optimizasyon çalışmaları yapılarak tedavi parametreleri oluşturulmuştur. Dördüncü aşamada kornea skarı oluşturulan sıçanlar 4 tedavi grubuna ayrılmıştır ve tedavi gruplarına göre allojenik sıçan AdMKH'lerinin subkonjonktival enjeksiyonu ve polikromatik ışık kaynağı ile FBM tedavisi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada, yaralanmanın 10. ve 30. gününde korneada opasite ve neovaskülarizasyon oluşumu yarıklı lamba muayenesi ile değerlendirilmiş ve kornea kalınlığı ÖS-OKT ile ölçülmüştür. Tüm sıçanlara 30. günde ötenazi uygulandıktan sonra kornealar eksize edilip histolojik değerlendirme, İHK boyama, RT-PCR ve TEM ile analiz edilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Kök hücre karakterizasyonu için yapılan akış sitometri analizinde, yüzey belirteçlerinden CD44, CD29 ve CD90'nın oranları sırasıyla %88,9, %87,9 ve %86,8 ve lökosit hücre belirteçleri olan CD11b ve CD45'in oranları da sırasıyla %0,2 ve %0,3 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak izole edilen hücrelerin AdMKH'ler olduğu gösterilmiştir.
- Polikromatik ışık uygulamasının optimizasyon çalışmasına göre standart tedavi protokolü korneaya 30 cm mesafeden ve 2 dk boyunca polikromatik ışık uygulanması şeklinde güncellenmiş ve böylece her tedavi seansında toplam 4,6 J/cm² doz enerji uygulanmıştır. Ardışık 3 FBM seansı 1 gün

arayla (abrazyon sonrası epitel iyileşmesini göz önüne alarak 3., 5. ve 7. günlerde) gerçekleştirilmiştir.

- Yarıklı lamba mikroskobu ile değerlendirmede KOS değeri tüm tedavi gruplarında (FBM, AdMKH, FBM + AdMKH) NK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Kornea neovaskülarizasyonu AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında NK grubuna göre anlamlı azalmıştır, ancak FBM grubundaki değişim NK grubuna benzer bulunmuştur.
- Ön segment OKT ile ölçülen MKK değeri tüm tedavi gruplarında NK grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. Pozitif kontrol grubuna en yakın olan ve en düşük ortalama MKK değerine sahip FBM + AdMKH uygulanan gözler olmasına rağmen diğer tedavi yöntemleri ile arasında anlamlı fark görülmemiştir.
- Tüm tedavi gruplarında yapılan TEM görüntüleme ve H&E boyama değerlendirmesinde NK grubuna göre epitel ve stroma mimarisinin daha iyi olduğu, enflamatuar hücre, yeni damar oluşumu ve skar varlığının azalmış olduğu izlenmiştir. Tedavi grupları kendi içinde kıyaslandığında; FBM ve AdMKH tedavilerinin tek başına uygulanmasına kıyasla polikromatik ışık ile birlikte uygulanan kök hücre tedavisinin kornea opasitesinde ve neovaskülarizasyonunda belirgin azalmaya neden olduğu ve yara iyileşmesinde en iyi sonucu sağladığı görülmüştür.
- Hasar sonrası artmış COL1 sentezi AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarında NK grubuna göre anlamlı azalmıştır. Yaralanma sonrası artmış COL3 sentezi ise sadece FBM + AdMKH grubunda anlamlı olarak azalmıştır.
- Tedavilerin anti-enflamatuar etkisini araştırmak için TGF- β 1 ve IL-1 β varlığı incelenmiştir. Adipoz doku kaynaklı MKH ile FBM birlikte uygulandığında TGF- β 1 yoğunluğu hem NK hem de FBM grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Negatif kontrol grubuna göre TGF- β 1 değerinde anlamlı azalma sadece FBM + AdMKH grubunda izlenmiştir. Adipoz doku kaynaklı MKH ile FBM birlikte uygulandığında IL-1 β düzeyi NK, FBM ve AdMKH gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak enflamasyonu baskılamada en iyi sonuç FBM + AdMKH grubunda elde edilmiştir.

- Skar oluşumunu değerlendirmek için miyofibroblastlara geçişi gösteren α -SMA incelenmiştir ve tüm tedavi gruplarında α -SMA düzeyinin, NK grubundaki kornealara kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. Fotobiyomodülasyon ile AdMKH birlikte uygulandığında, α -SMA yoğunluğu tek başına FBM tedavisine göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.
- Saydam kornea için önemli bir biyobelirteç olan keratokanın yoğunluğu polikromatik ışık uygulamasıyla NK grubuna göre artmış olsa da hala sağlıklı korneadaki yoğunluğa ulaşamamıştır. Adipoz kaynaklı MKH ve AdMKH ve FBM kombinasyonu ile tedavi edilen kornealarda keratokan düzeyi sağlıklı kornealarinkine benzer bulunmuştur.
- Eksize edilen kornealara kök hücre göçünün varlığını araştırmak için eksize edilen kornealarda BrdU işaretli AdMKH'lerin varlığını incelenmiştir ve AdMKH ve FBM + AdMKH gruplarının kornealarında BrdU pozitif hücrelere rastlanmamıştır. Bu sonuç, subkonjonktival enjeksiyonla uygulanan AdMKH'lerin terapötik etkisinin, parakrin faktörlerinin salınması yoluyla olduğunu göstermektedir.
- Gerçek zamanlı PCR ile yapılan analizde COL1, COL3, IL-1 β ve α -SMA'da tüm tedavi gruplarında NK grubuna göre anlamlı azalma olmuştur ve İHK analizine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak İHK boyama değerlendirmesinin aksine, kornea dokularında keratokan ve TGF- β 1'in mRNA ekspresyonunda dikkate değer bir değişiklik izlenmemiştir.
- Uygulanan polikromatik ışığın güvenilirliğini değerlendirmek için H&E boyama ile sıçan lensi ve retinası, TEM ile sıçan endoteli incelenmiştir. Sıçan kornealarına uyguladığımız 4,6 J/cm² enerji yoğunluğundaki polikromatik ışığın TEM ve histopatolojik analizlere göre sıçan lensi, retinası ve endotelinde hasara neden olmadığı ve güvenilir bir uygulama olduğu gösterilmiştir.

Sunulan tez çalışması kornea hasarını takiben AdMKH'lerin subkonjonktival enjeksiyonunun kornea opasitesi, kalınlığı, fibrozisi ve enflamasyonunu önemli ölçüde azaltarak kornea rejenerasyonunda etkili olduğunu göstermiştir. Tedavinin etkinliğini arttırmak için AdMKH uygulama sıklığı ve/veya uygulanan kök hücre sayısının ileri çalışmalarla optimize edilerek kullanılması önerilmektedir.

Literatür araştırmalarına göre bu tez çalışması, mekanik kornea yara modelinde FBM'nin AdMKH uygulamasına karşı etkinliğini karşılaştıran ve aynı zamanda bu tedavilerin birlikte kullanımının etkisini araştıran ilk çalışmadır. Klinik gözlem ve doku analizi ile elde edilen verilere göre AdMKH tedavisine benzer sonuçlar elde edilen FBM tedavisinin, kornea doku rejenerasyonunda kök hücre tedavisine güvenli bir alternatif tedavi olanağı sunabileceği değerlendirilmiştir. Çalışmada uygulanan FBM tedavi protokolü ile faydalı sonuçlar elde edilmiş olsa da terapötik etkinliği arttırmak için optimizasyon çalışmalarının yapılması nihai tedavi protokolünün belirlenmesi açısından uygun olacaktır. Bununla birlikte gelecekteki FBM çalışmaları için bu çalışmanın iyi bir referans protokolü oluşturacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması *in vivo* görüntüleme ve *in vitro* doku analizleri ile, polikromatik ışık ile uygulanan FBM tedavisinin kornea doku rejenerasyonunda etkili ve güvenli olduğunu ve kornea hastalıklarında potansiyel bir tedavi olarak değerlendirilebileceğini göstermiştir. Ayrıca kornea yara iyileşmesinde FBM tedavisinin, AdMKH ile birlikte kullanımında hücre temelli rejeneratif tedavilerin etkinliğini de arttırabileceği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] J.V. Jester, Y.G. Lee, J. Huang, J. Houston, B. Adams, H.D. Cavanagh, W.M. Petroll, Postnatal corneal transparency, keratocyte cell cycle exit and expression of ALDH1A1, *Investigative ophthalmology & visual science*, 48 (2007) 4061-4069.
- [2] M. P De Miguel, J. L Alio, F. Arnalich-Montiel, S. Fuentes-Julian, L. de Benito-Llopis, F. Amparo, L. Bataille, Cornea and ocular surface treatment, *Current stem cell research & therapy*, 5 (2010) 195-204.
- [3] D. Pascolini, S.P. Mariotti, Global estimates of visual impairment: 2010, *British Journal of Ophthalmology*, 96 (2012) 614-618.
- [4] A. Baradaran-Rafii, M. Eslani, Z. Haq, E. Shirzadeh, M.J. Huvard, A.R. Djalilian, Current and upcoming therapies for ocular surface chemical injuries, *The ocular surface*, 15 (2017) 48-64.
- [5] K.A. Williams, A.J. Esterman, C. Bartlett, H. Holland, N.B. Hornsby, D.J. Coster, How effective is penetrating corneal transplantation? Factors influencing long-term outcome in multivariate analysis, *Transplantation*, 81 (2006) 896-901.
- [6] F. Arnalich-Montiel, S. Pastor, A. Blazquez-Martinez, J. Fernandez-Delgado, M. Nistal, J.L. Alio, M.P. De Miguel, Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma, *Stem Cells*, 26 (2008) 570-579.
- [7] J.M. Gimble, F. Guilak, B.A. Bunnell, Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells, *Stem cell research & therapy*, 1 (2010) 1-8.
- [8] B. Philippe, S. Luc, P.-B. Valerie, R. Jerome, B.-R. Alessandra, C. Louis, Culture and use of mesenchymal stromal cells in phase I and II clinical trials, *Stem cells international*, 2010 (2010).
- [9] A.P. Beltrami, D. Cesselli, N. Bergamin, P. Marcon, S. Rigo, E. Puppato, F. D'Aurizio, R. Verardo, S. Piazza, A. Pignatelli, Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow), *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 110 (2007) 3438-3446.
- [10] S. Shukla, S.K. Mittal, W. Foulsham, E. Elbasiony, D. Singhanian, S.K. Sahu, S.K. Chauhan, Therapeutic efficacy of different routes of mesenchymal stem cell administration in corneal injury, *The ocular surface*, 17 (2019) 729-736.
- [11] L. Yao, Z.-r. Li, W.-r. Su, Y.-p. Li, M.-l. Lin, W.-x. Zhang, Y. Liu, Q. Wan, D. Liang, Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn, *PLoS one*, 7 (2012) e30842.
- [12] S.K. Mittal, A. Mashaghi, A. Amouzegar, M. Li, W. Foulsham, S.K. Sahu, S.K. Chauhan, Mesenchymal stromal cells inhibit neutrophil effector functions in a murine model of ocular inflammation, *Investigative ophthalmology & visual science*, 59 (2018) 1191-1198.

- [13] L. Liang, X. Luo, J. Zhang, W. Su, W. Zhu, Y. Xie, N. Zhang, Y. Peng, X. Chen, A.P. Xiang, Safety and feasibility of subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for acute severe ocular burns: A single-arm study, *The Ocular Surface*, 22 (2021) 103-109.
- [14] A. Uccelli, L. Moretta, V. Pistoia, Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells, *European journal of immunology*, 36 (2006) 2566-2573.
- [15] M. Eslani, I. Putra, X. Shen, J. Hamouie, N. Afsharkhamseh, S. Besharat, M.I. Rosenblatt, R. Dana, P. Hematti, A.R. Djalilian, Corneal mesenchymal stromal cells are directly antiangiogenic via PEDF and sFLT-1, *Investigative ophthalmology & visual science*, 58 (2017) 5507-5517.
- [16] C. Nombela-Arrieta, J. Ritz, L.E. Silberstein, The elusive nature and function of mesenchymal stem cells, *Nature reviews Molecular cell biology*, 12 (2011) 126-131.
- [17] R.T. Masha, N.N. Houreld, H. Abrahamse, Low-intensity laser irradiation at 660 nm stimulates transcription of genes involved in the electron transport chain, *Photomedicine and laser surgery*, 31 (2013) 47-53.
- [18] M. Esmaeelinejad, M. Bayat, H. Darbandi, M. Bayat, N. Mosaffa, The effects of low-level laser irradiation on cellular viability and proliferation of human skin fibroblasts cultured in high glucose mediums, *Lasers in medical science*, 29 (2014) 121-129.
- [19] P.R. Sekhejane, N.N. Houreld, H. Abrahamse, Irradiation at 636 nm positively affects diabetic wounded and hypoxic cells in vitro, *Photomedicine and laser surgery*, 29 (2011) 521-530.
- [20] S.S. Hakki, S.B. Bozkurt, Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts, *Lasers in medical science*, 27 (2012) 325-331.
- [21] B. Mvula, T. Moore, H. Abrahamse, Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells, *Lasers in Medical Science*, 25 (2010) 33-39.
- [22] K.H. Min, J.H. Byun, C.Y. Heo, E.H. Kim, H.Y. Choi, C.S. Pak, Effect of low-level laser therapy on human adipose-derived stem cells: in vitro and in vivo studies, *Aesthetic plastic surgery*, 39 (2015) 778-782.
- [23] A. Constantin, M. Dumitrescu, M.C. Mihai, D. Jianu, M. Simionescu, CO₂ laser increases the regenerative capacity of human adipose-derived stem cells by a mechanism involving the redox state and enhanced secretion of pro-angiogenic molecules, *Lasers in medical science*, 32 (2017) 117-127.
- [24] Y.-Y. Huang, A.C.-H. Chen, J.D. Carroll, M.R. Hamblin, Biphasic dose response in low level light therapy, *Dose-response*, 7 (2009) dose-response. 09-027. Hamblin.
- [25] M. Calis, T.T. Demirtas, G. Sert, G. Irmak, M. Gumusderelioglu, A. Turkkani, A.N. Çakar, F. Ozgur, Photobiomodulation with polychromatic

light increases zone 4 survival of transverse rectus abdominis musculocutaneous flap, *Lasers in surgery and medicine*, 51 (2019) 538-549.

- [26] M. Calis, G. Irmak, T.T. Demirtaş, M. Kara, G.G. Üstün, M. Gümüşderelioğlu, A. Türkkani, A.N. Çakar, F. Özgür, Photobiomodulation combined with adipose-derived stem cells encapsulated in methacrylated gelatin hydrogels enhances in vivo bone regeneration, *Lasers in Medical Science*, (2022) 1-12.
- [27] B.T. Ivandic, T. Ivandic, Low-level laser therapy improves vision in patients with age-related macular degeneration, *Photomedicine and laser surgery*, 26 (2008) 241-245.
- [28] B.T. Ivandic, T. Ivandic, Low-level laser therapy improves vision in a patient with retinitis pigmentosa, *Photomedicine and laser surgery*, 32 (2014) 181-184.
- [29] Y.-H. Rhee, K.J. Cho, J.-C. Ahn, P.-S. Chung, Effect of photobiomodulation on wound healing of the corneal epithelium through Rho-GTPase, *Medical Lasers*, 6 (2017) 67-76.
- [30] H. Goo, H. Kim, J.-C. Ahn, K.J. Cho, Effects of low-level light therapy at 740 nm on dry eye disease in vivo, *Medical Lasers; Engineering, Basic Research, and Clinical Application*, 8 (2019) 50-58.
- [31] M.R. Kanavi, F. Tabeie, F. Sahebjam, N. Poursani, N. Jahanbakhsh, P. Paymanpour, S. AfsarAski, Short-term effects of extremely low-frequency pulsed electromagnetic field and pulsed low-level laser therapy on rabbit model of corneal alkali burn, *Experimental eye research*, 145 (2016) 216-223.
- [32] Y. Oie, K. Nishida, Corneal regenerative medicine, *Regenerative therapy*, 5 (2016) 40-45.
- [33] J.A. West-Mays, D.J. Dwivedi, The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38 (2006) 1625-1631.
- [34] D. Maurice, The location of the fluid pump in the cornea, *The Journal of physiology*, 221 (1972) 43-54.
- [35] N. Lagali, Corneal stromal regeneration: current status and future therapeutic potential, *Current Eye Research*, 45 (2020) 278-290.
- [36] E.J. Miller, S. Gay, [1] Collagen: An overview, *Methods in enzymology*, 82 (1982) 3-32.
- [37] A. Bron, The architecture of the corneal stroma, *BMJ Publishing Group Ltd*, 2001, pp. 379-381.
- [38] Y.M. Michelacci, Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36 (2003) 1037-1046.
- [39] K.M. Meek, C. Boote, The use of X-ray scattering techniques to quantify the orientation and distribution of collagen in the corneal stroma, *Progress in retinal and eye research*, 28 (2009) 369-392.

- [40] J.W. Ruberti, J.D. Zieske, Prelude to corneal tissue engineering—gaining control of collagen organization, *Progress in retinal and eye research*, 27 (2008) 549-577.
- [41] L. Robert, J. Legeais, A. Robert, G. Renard, Corneal collagens, *Pathologie Biologie*, 49 (2001) 353-363.
- [42] M. Lim, H. Ye, N. Panoskaltsis, E.M. Drakakis, X. Yue, A.E. Cass, A. Radomska, A. Mantalaris, Intelligent bioprocessing for haemotopoietic cell cultures using monitoring and design of experiments, *Biotechnology advances*, 25 (2007) 353-368.
- [43] J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, R.A. Brown, Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling, *Nature reviews Molecular cell biology*, 3 (2002) 349-363.
- [44] W. Jp, Corneal blindness: a grobal perspective, *Bull World Health Organ.*, 79 (2001) 214-221.
- [45] N. Gupta, P. Vashist, R. Tandon, S.K. Gupta, S. Dwivedi, K. Mani, Prevalence of corneal diseases in the rural Indian population: the Corneal Opacity Rural Epidemiological (CORE) study, *British Journal of Ophthalmology*, 99 (2015) 147-152.
- [46] H. Wang, Y. Zhang, Z. Li, T. Wang, P. Liu, Prevalence and causes of corneal blindness, *Clinical & experimental ophthalmology*, 42 (2014) 249-253.
- [47] G.K. Vemuganti, K. Reddy, G. Iftekhar, P. Garg, S. Sharma, Keratocyte loss in corneal infection through apoptosis: a histologic study of 59 cases, *BMC ophthalmology*, 4 (2004) 1-8.
- [48] J.C. Erie, S.V. Patel, J.W. McLaren, D.O. Hodge, W.M. Bourne, Corneal keratocyte deficits after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis, *American journal of ophthalmology*, 141 (2006) 799-809. e791.
- [49] M.E. Fini, B.M. Stramer, How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes, *Cornea*, 24 (2005) S2-S11.
- [50] S.E. Wilson, S.S. Chaurasia, F.W. Medeiros, Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response, *Experimental eye research*, 85 (2007) 305-311.
- [51] N.J. Maycock, J. Marshall, Genomics of corneal wound healing: a review of the literature, *Acta Ophthalmologica*, 92 (2014) e170-e184.
- [52] A.V. Ljubimov, M. Saghizadeh, Progress in corneal wound healing, *Progress in retinal and eye research*, 49 (2015) 17-45.
- [53] M.E. Fini, Keratocyte and fibroblast phenotypes in the repairing cornea, *Progress in retinal and eye research*, 18 (1999) 529-551.
- [54] A.A. Torricelli, S.E. Wilson, Cellular and extracellular matrix modulation of corneal stromal opacity, *Experimental eye research*, 129 (2014) 151-160.
- [55] S.S. Kwok, K.C. Shih, Y. Bu, A.C.-Y. Lo, T.C.-Y. Chan, J.S.-M. Lai, V. Jhanji, L. Tong, Systematic review on therapeutic strategies to minimize

- corneal stromal scarring after injury, *Eye & Contact Lens*, 45 (2019) 347-355.
- [56] D.T. Tan, J.K. Dart, E.J. Holland, S. Kinoshita, Corneal transplantation, *The Lancet*, 379 (2012) 1749-1761.
 - [57] R.L. Niederer, D. Perumal, T. Sherwin, C.N. McGhee, Corneal innervation and cellular changes after corneal transplantation: an in vivo confocal microscopy study, *Investigative ophthalmology & visual science*, 48 (2007) 621-626.
 - [58] A.A. Khodadoust, A.M. Silverstein, Transplantation and rejection of individual cell layers of the cornea, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 8 (1969) 180-195.
 - [59] M. Nubile, P. Carpineto, M. Lanzini, R. Calienno, L. Agnifili, M. Ciancaglini, L. Mastropasqua, Femtosecond laser arcuate keratotomy for the correction of high astigmatism after keratoplasty, *Ophthalmology*, 116 (2009) 1083-1092.
 - [60] P. Gain, R. Jullienne, Z. He, M. Aldossary, S. Acquart, F. Cognasse, G. Thuret, Global survey of corneal transplantation and eye banking, *JAMA ophthalmology*, 134 (2016) 167-173.
 - [61] G. Pellegrini, D. Ardigo, G. Milazzo, G. Iotti, P. Guatelli, D. Pelosi, M. De Luca, Navigating market authorization: the path holoclar took to become the first stem cell product approved in the European Union, *Stem Cells Translational Medicine*, 7 (2018) 146-154.
 - [62] S. Kinoshita, N. Koizumi, M. Ueno, N. Okumura, K. Imai, H. Tanaka, Y. Yamamoto, T. Nakamura, T. Inatomi, J. Bush, Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy, *New England Journal of Medicine*, 378 (2018) 995-1003.
 - [63] M.G. Andrades, C.G. Gallardo, B. Mataix, S. Medialdea, J. Martinez-Atienza, A. Ruiz-Garcia, S. Arias, A. Campos, R. Mata, N. Cuende, Results of a Phase I-IIA Multicentre Clinical Trial Evaluating an Allogeneic Nanostructured Artificial Anterior Human Cornea, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60 (2019) 2231-2231.
 - [64] N. Poliseti, G.K. Vemuganti, M. Griffith, Biomaterials-enabled regenerative medicine in corneal applications, *Regenerative Medicine-from Protocol to Patient: 3. Tissue Engineering, Biomaterials and Nanotechnology*, (2016) 97-122.
 - [65] A. Isaacson, S. Swioklo, C.J. Connon, 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent, *Experimental eye research*, 173 (2018) 188-193.
 - [66] A. Ivarsen, S. Asp, J. Hjortdal, Safety and complications of more than 1500 small-incision lenticule extraction procedures, *Ophthalmology*, 121 (2014) 822-828.
 - [67] S. Ganesh, S. Brar, P.A. Rao, Cryopreservation of extracted corneal lenticules after small incision lenticule extraction for potential use in human subjects, *Cornea*, 33 (2014) 1355.

- [68] V. Bhandari, S. Ganesh, S. Brar, R. Pandey, Application of the SMILE-derived glued lenticule patch graft in microperforations and partial-thickness corneal defects, *Cornea*, 35 (2016) 408-412.
- [69] L. Du, X. Wu, Development and characterization of a full-thickness acellular porcine cornea matrix for tissue engineering, *Artificial organs*, 35 (2011) 691-705.
- [70] M.-C. Zhang, X. Liu, Y. Jin, D.-L. Jiang, X.-S. Wei, H.-T. Xie, Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma, *American Journal of Transplantation*, 15 (2015) 1068-1075.
- [71] J. Zheng, X. Huang, Y. Zhang, Y. Wang, Q. Qin, L. Lin, X. Jin, C. Lam, J. Zhang, Short-term results of acellular porcine corneal stroma keratoplasty for herpes simplex keratitis, *Xenotransplantation*, 26 (2019) e12509.
- [72] T.H. van Essen, C.C. Lin, A.K. Hussain, S. Maas, H.J. Lai, H. Linnartz, T.J. van den Berg, D.C. Salvatori, G.P. Luyten, M.J. Jager, A fish scale-derived collagen matrix as artificial cornea in rats: properties and potential, *Investigative ophthalmology & visual science*, 54 (2013) 3224-3233.
- [73] T. Van Essen, L. Van Zijl, T. Possemiers, A. Mulder, S. Zwart, C.-H. Chou, C. Lin, H. Lai, G. Luyten, M. Tassignon, Biocompatibility of a fish scale-derived artificial cornea: cytotoxicity, cellular adhesion and phenotype, and in vivo immunogenicity, *Biomaterials*, 81 (2016) 36-45.
- [74] Y. Liu, L. Gan, D.J. Carlsson, P. Fagerholm, N. Lagali, M.A. Watsky, R. Munger, W.G. Hodge, D. Priest, M. Griffith, A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation, *Investigative ophthalmology & visual science*, 47 (2006) 1869-1875.
- [75] P. Fagerholm, N.S. Lagali, K. Merrett, W.B. Jackson, R. Munger, Y. Liu, J.W. Polarek, M. Söderqvist, M. Griffith, A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study, *Science translational medicine*, 2 (2010) 46ra61-46ra61.
- [76] P. Fagerholm, N.S. Lagali, J.A. Ong, K. Merrett, W.B. Jackson, J.W. Polarek, E.J. Suuronen, Y. Liu, I. Brunette, M. Griffith, Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold, *Biomaterials*, 35 (2014) 2420-2427.
- [77] M. González-Andrades, R. Mata, M. del Carmen González-Gallardo, S. Medialdea, S. Arias-Santiago, J. Martínez-Atienza, A. Ruiz-García, L. Pérez-Fajardo, A. Lizana-Moreno, I. Garzón, A study protocol for a multicentre randomised clinical trial evaluating the safety and feasibility of a bioengineered human allogeneic nanostructured anterior cornea in patients with advanced corneal trophic ulcers refractory to conventional treatment, *BMJ open*, 7 (2017) e016487.
- [78] M.G. Andrades, J. Martinez-Atienza, A. Campos, S. Arias-Santiago, C.G. Gallardo, B. Mataix, S. Medialdea, A. Ruiz-Garcia, R. Mata, N. Cuende, Preliminary results of a multicenter randomized clinical trial

evaluating the safety and feasibility of an allogeneic nanostructured artificial anterior human cornea, *Cytotherapy*, 19 (2017) S26.

- [79] A. Sorkio, L. Koch, L. Koivusalo, A. Deiwick, S. Miettinen, B. Chichkov, H. Skottman, Human stem cell based corneal tissue mimicking structures using laser-assisted 3D bioprinting and functional bioinks, *Biomaterials*, 171 (2018) 57-71.
- [80] X. Duan, H. Sheardown, Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interactions, *Biomaterials*, 27 (2006) 4608-4617.
- [81] M. Alaminos, M. Del Carmen Sánchez-Quevedo, J.I. Muñoz-Avila, D. Serrano, S. Medialdea, I. Carreras, A. Campos, Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47 (2006) 3311-3317.
- [82] T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction, *Biomaterials*, 24 (2003) 2309-2316.
- [83] J. Kramer, C. Hegert, K. Guan, A.M. Wobus, P.K. Müller, J. Rohwedel, Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4, *Mechanisms of development*, 92 (2000) 193-205.
- [84] H. Young, M. Mancini, R. Wright, J. Smith, A. Black Jr, C. Reagan, P. Lucas, Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs, *Developmental dynamics*, 202 (1995) 137-144.
- [85] J.H. Stern, Y. Tian, J. Funderburgh, G. Pellegrini, K. Zhang, J.L. Goldberg, R.R. Ali, M. Young, Y. Xie, S. Temple, Regenerating eye tissues to preserve and restore vision, *Cell stem cell*, 22 (2018) 834-849.
- [86] S. Basu, A.J. Hertszenberg, M.L. Funderburgh, M.K. Burrow, M.M. Mann, Y. Du, K.L. Lathrop, F.N. Syed-Picard, S.M. Adams, D.E. Birk, Human limbal biopsy-derived stromal stem cells prevent corneal scarring, *Science translational medicine*, 6 (2014) 266ra172-266ra172.
- [87] A. Kumar, H. Yun, M.L. Funderburgh, Y. Du, Regenerative therapy for the Cornea, *Progress in Retinal and eye Research*, 87 (2022) 101011.
- [88] D. Ghoubay, M. Borderie, K. Grieve, R. Martos, R. Bocheux, T.-M. Nguyen, P. Callard, A. Chédotal, V.M. Borderie, Corneal stromal stem cells restore transparency after N2 injury in mice, *Stem Cells Translational Medicine*, 9 (2020) 917-935.
- [89] I. Pountos, D. Coruscadden, P. Emery, P.V. Giannoudis, Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application, *Injury*, 38 (2007) S23-S33.
- [90] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8 (2006) 315-317.

- [91] A.I. Caplan, MSCs: the sentinel and safe-guards of injury, *Journal of cellular physiology*, 231 (2016) 1413-1416.
- [92] J. Wang, L. Liao, J. Tan, Mesenchymal-stem-cell-based experimental and clinical trials: current status and open questions, *Expert opinion on biological therapy*, 11 (2011) 893-909.
- [93] M. Kassem, B.M. Abdallah, Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases, *Cell and Tissue Research*, 331 (2008) 157-163.
- [94] J.M. Ryan, F.P. Barry, J.M. Murphy, B.P. Mahon, Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection, *Journal of inflammation*, 2 (2005) 1-11.
- [95] P. Galvez-Martin, R. Sabata, J. Verges, J.L. Zugaza, A. Ruiz, B. Clares, Mesenchymal stem cells as therapeutics agents: quality and environmental regulatory aspects, *Stem Cells International*, 2016 (2016).
- [96] M.D. Li, H. Atkins, T. Bubela, The global landscape of stem cell clinical trials, *Regenerative medicine*, 9 (2014) 27-39.
- [97] A. Rosemann, G. Bortz, F. Vasen, M. Sleeboom-Faulkner, Global regulatory developments for clinical stem cell research: diversification and challenges to collaborations, *Regenerative medicine*, 11 (2016) 647-657.
- [98] M.D. Wagoner, Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy, *Survey of ophthalmology*, 41 (1997) 275-313.
- [99] C. Cejka, J. Cejkova, Oxidative stress to the cornea, changes in corneal optical properties, and advances in treatment of corneal oxidative injuries, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015 (2015).
- [100] C. Cejka, V. Holan, P. Trosan, A. Zajicova, E. Javorkova, J. Cejkova, The favorable effect of mesenchymal stem cell treatment on the antioxidant protective mechanism in the corneal epithelium and renewal of corneal optical properties changed after alkali burns, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016 (2016).
- [101] Y. Ke, Y. Wu, X. Cui, X. Liu, M. Yu, C. Yang, X. Li, Polysaccharide hydrogel combined with mesenchymal stem cells promotes the healing of corneal alkali burn in rats, *PloS one*, 10 (2015) e0119725.
- [102] U. Acar, F.A. Pinarli, D.E. Acar, E. Beyazyildiz, G. Sobaci, B.B. Ozgermen, A.A. Sonmez, T. Delibasi, Effect of allogeneic limbal mesenchymal stem cell therapy in corneal healing: role of administration route, *Ophthalmic research*, 53 (2015) 82-89.
- [103] J. Venkatakrishnan, Y. Saeed, W.W. Kao, Trends in using mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) in treating corneal diseases, *The Ocular Surface*, 26 (2022) 255-267.
- [104] A.J. Hertsenbergh, G. Shojaati, M.L. Funderburgh, M.M. Mann, Y. Du, J.L. Funderburgh, Corneal stromal stem cells reduce corneal scarring

by mediating neutrophil infiltration after wounding, *PloS one*, 12 (2017) e0171712.

- [105] Y.I. Yun, S.Y. Park, H.J. Lee, J.H. Ko, M.K. Kim, W.R. Wee, R.L. Reger, C.A. Gregory, H. Choi, S.F. Fulcher, Comparison of the anti-inflammatory effects of induced pluripotent stem cell–derived and bone marrow–derived mesenchymal stromal cells in a murine model of corneal injury, *Cytherapy*, 19 (2017) 28-35.
- [106] S.K. Mittal, M. Omoto, A. Amouzegar, A. Sahu, A. Rezazadeh, K.R. Katikireddy, D.I. Shah, S.K. Sahu, S.K. Chauhan, Restoration of corneal transparency by mesenchymal stem cells, *Stem cell reports*, 7 (2016) 583-590.
- [107] A. Zajicova, K. Pokorna, A. Lencova, M. Krulova, E. Svobodova, S. Kubinova, E. Sykova, M. Pradny, J. Michalek, J. Svobodova, Treatment of ocular surface injuries by limbal and mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds, *Cell transplantation*, 19 (2010) 1281-1290.
- [108] J. Ye, K. Yao, J. Kim, Mesenchymal stem cell transplantation in a rabbit corneal alkali burn model: engraftment and involvement in wound healing, *Eye*, 20 (2006) 482-490.
- [109] O. Al-Jaibaji, S. Swioklo, C.J. Connon, Mesenchymal stromal cells for ocular surface repair, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19 (2019) 643-653.
- [110] L. Gáspár, Professor Endre Mester, the father of photobiomodulation, *J Laser Dent*, 17 (2009) 146-148.
- [111] J.C. Rojas, J. Lee, J.M. John, F. Gonzalez-Lima, Neuroprotective effects of near-infrared light in an in vivo model of mitochondrial optic neuropathy, *Journal of Neuroscience*, 28 (2008) 13511-13521.
- [112] A.P. Sommer, A.L. Pinheiro, A.R. Mester, R.-P. Franke, H.T. Whelan, Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system, *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 19 (2001) 29-33.
- [113] T.I. Karu, Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation, *Photochemistry and photobiology*, 84 (2008) 1091-1099.
- [114] J.T. Eells, M.T. Wong-Riley, J. VerHoeve, M. Henry, E.V. Buchman, M.P. Kane, L.J. Gould, R. Das, M. Jett, B.D. Hodgson, Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy, *Mitochondrion*, 4 (2004) 559-567.
- [115] M.T. Wong-Riley, H.L. Liang, J.T. Eells, B. Chance, M.M. Henry, E. Buchmann, M. Kane, H.T. Whelan, Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (2005) 4761-4771.
- [116] F. Rueggeberg, Contemporary issues in photocuring, *Compendium of continuing education in dentistry*.(Jamesburg, NJ: 1995). Supplement, (1999) S4-15; quiz S73.

- [117] C. Morton, K. McKenna, L. Rhodes, B.A.o.D.T. Guidelines, A. Subcommittee, t.B.P. Group, Guidelines for topical photodynamic therapy: update, *British Journal of Dermatology*, 159 (2008) 1245-1266.
- [118] R.L. Fork, Laser stimulation of nerve cells in *Aplysia*, *Science*, 171 (1971) 907-908.
- [119] L.F. de Freitas, M.R. Hamblin, Proposed mechanisms of photobiomodulation or low-level light therapy, *IEEE Journal of selected topics in quantum electronics*, 22 (2016) 348-364.
- [120] J. Tafur, P.J. Mills, Low-intensity light therapy: exploring the role of redox mechanisms, *Photomedicine and laser surgery*, 26 (2008) 323-328.
- [121] T. Karu, Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells, *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology*, 49 (1999) 1-17.
- [122] M.G. Pastore, S. Passarella, D. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase, *International journal of radiation biology*, 76 (2000) 863-870.
- [123] Y. Hatefi, The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system, *Annual review of biochemistry*, 54 (1985) 1015-1069.
- [124] S. Passarella, A. Ostuni, A. Atlante, E. Quagliariello, Increase in the ADP/ATP exchange in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser, *Biochemical and biophysical research communications*, 156 (1988) 978-986.
- [125] M.R. Hamblin, Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation, *AIMS biophysics*, 4 (2017) 337.
- [126] S. Moncada, J.D. Erusalimsky, Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis?, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3 (2002) 214-220.
- [127] N.J. Pope, S.M. Powell, J.C. Wigle, M.L. Denton, Wavelength-and irradiance-dependent changes in intracellular nitric oxide level, *Journal of Biomedical Optics*, 25 (2020) 085001-085001.
- [128] C.X. Zhang, Y. Lou, J. Chi, X.L. Bao, B. Fan, G.Y. Li, Considerations for the Use of Photobiomodulation in the Treatment of Retinal Diseases, *Biomolecules*, 12 (2022).
- [129] S. Farivar, T. Malekshahabi, R. Shiari, Biological effects of low level laser therapy, *J Lasers Med Sci*, 5 (2014) 58-62.
- [130] K.M. AlGhamdi, A. Kumar, N.A. Moussa, Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells, *Lasers Med Sci*, 27 (2012) 237-249.
- [131] I. Kokkinopoulos, A. Colman, C. Hogg, J. Heckenlively, G. Jeffery, Age-related retinal inflammation is reduced by 670 nm light via increased mitochondrial membrane potential, *Neurobiol Aging*, 34 (2013) 602-609.

- [132] I.S. Park, A. Mondal, P.S. Chung, J.C. Ahn, Prevention of skin flap necrosis by use of adipose-derived stromal cells with light-emitting diode phototherapy, *Cytotherapy*, 17 (2015) 283-292.
- [133] B. Mvula, H. Abrahamse, Differentiation Potential of Adipose-Derived Stem Cells When Cocultured with Smooth Muscle Cells, and the Role of Low-Intensity Laser Irradiation, *Photomed Laser Surg*, 34 (2016) 509-515.
- [134] P. Moore, T.D. Ridgway, R.G. Higbee, E.W. Howard, M.D. Lucroy, Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro, *Lasers Surg Med*, 36 (2005) 8-12.
- [135] W.S. Kim, R.G. Calderhead, Is light-emitting diode phototherapy (LED-LLLT) really effective?, *Laser Ther*, 20 (2011) 205-215.
- [136] R. Albarracin, J. Eells, K. Valter, Photobiomodulation protects the retina from light-induced photoreceptor degeneration, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52 (2011) 3582-3592.
- [137] G.F. Merry, M.R. Munk, R.S. Dotson, M.G. Walker, R.G. Devenyi, Photobiomodulation reduces drusen volume and improves visual acuity and contrast sensitivity in dry age-related macular degeneration, *Acta Ophthalmol*, 95 (2017) e270-e277.
- [138] S. Fuma, H. Murase, Y. Kuse, K. Tsuruma, M. Shimazawa, H. Hara, Photobiomodulation with 670 nm light increased phagocytosis in human retinal pigment epithelial cells, *Mol Vis*, 21 (2015) 883-892.
- [139] Y. Cheng, Y. Du, H. Liu, J. Tang, A. Veenstra, T.S. Kern, Photobiomodulation Inhibits Long-term Structural and Functional Lesions of Diabetic Retinopathy, *Diabetes*, 67 (2018) 291-298.
- [140] B. Sarıkaya, M. Gümüşderelioğlu, Aligned silk fibroin/poly-3-hydroxybutyrate nanofibrous scaffolds seeded with adipose-derived stem cells for tendon tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, 193 (2021) 276-286.
- [141] S.K. Sahu, S.K. Mittal, W. Foulsham, M. Li, V.S. Sangwan, S.K. Chauhan, Mast cells initiate the recruitment of neutrophils following ocular surface injury, *Investigative ophthalmology & visual science*, 59 (2018) 1732-1740.
- [142] T.-S. Jiang, L. Cai, W.-Y. Ji, Y.-N. Hui, Y.-S. Wang, D. Hu, J. Zhu, Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats, *Molecular vision*, 16 (2010) 1304.
- [143] W.S. Kang, H. Choi, G. Jang, K.H. Lee, E. Kim, K.J. Kim, G.-Y. Jeong, J.S. Kim, C.-S. Na, S. Kim, Long-term exposure to urban particulate matter on the ocular surface and the incidence of deleterious changes in the cornea, conjunctiva and retina in rats, *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2020) 4976.
- [144] H.J. Charvet, H. Orbay, L. Harrison, K. Devi, D.E. Sahar, In Vitro Effects of Adipose-Derived Stem Cells on Breast Cancer Cells Harvested From the Same Patient, *Annals of Plastic Surgery*, 76 (2016) 241-245.

- [145] A.A. Nery, I.C. Nascimento, T. Glaser, V. Bassaneze, J.E. Krieger, H. Ulrich, Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications, *Cytometry Part A*, 83 (2013) 48-61.
- [146] E. Akdere Ö, İ. Shikhaliyeva, M. Gümüşderelioğlu, Boron mediated 2D and 3D cultures of adipose derived mesenchymal stem cells, *Cytotechnology*, 71 (2019) 611-622.
- [147] Y. Du, E.C. Carlson, M.L. Funderburgh, D.E. Birk, E. Pearlman, N. Guo, W.W. Kao, J.L. Funderburgh, Stem cell therapy restores transparency to defective murine corneas, *Stem Cells*, 27 (2009) 1635-1642.
- [148] S. Aggarwal, M.F. Pittenger, Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses, *Blood*, 105 (2005) 1815-1822.
- [149] M.J. Lee, A.Y. Ko, J.H. Ko, H.J. Lee, M.K. Kim, W.R. Wee, S.I. Khwarg, J.Y. Oh, Mesenchymal stem/stromal cells protect the ocular surface by suppressing inflammation in an experimental dry eye, *Mol Ther*, 23 (2015) 139-146.
- [150] N. Murphy, K. Lynch, P. Lohan, O. Treacy, T. Ritter, Mesenchymal stem cell therapy to promote corneal allograft survival: current status and pathway to clinical translation, *Curr Opin Organ Transplant*, 21 (2016) 559-567.
- [151] B. Demirayak, N. Yüksel, O.S. Çelik, C. Subaşı, G. Duruksu, Z.S. Unal, D.K. Yıldız, E. Karaöz, Effect of bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on the natural course of corneal scarring after penetrating injury, *Exp Eye Res*, 151 (2016) 227-235.
- [152] G.H. Yam, E.P. Teo, M. Setiawan, M.J. Lovatt, N. Yusoff, M. Fuest, B.T. Goh, J.S. Mehta, Postnatal periodontal ligament as a novel adult stem cell source for regenerative corneal cell therapy, *J Cell Mol Med*, 22 (2018) 3119-3132.
- [153] G.I. Im, Y.W. Shin, K.B. Lee, Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?, *Osteoarthritis Cartilage*, 13 (2005) 845-853.
- [154] H. Liu, J. Zhang, C.Y. Liu, I.J. Wang, M. Sieber, J. Chang, J.V. Jester, W.W. Kao, Cell therapy of congenital corneal diseases with umbilical mesenchymal stem cells: lumican null mice, *PLoS One*, 5 (2010) e10707.
- [155] S.A. Patel, L. Sherman, J. Munoz, P. Rameshwar, Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications, *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 56 (2008) 1-8.
- [156] A.C. Boquest, A. Shahdadfar, K. Frønsdal, O. Sigurjonsson, S.H. Tunheim, P. Collas, J.E. Brinchmann, Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture, *Mol Biol Cell*, 16 (2005) 1131-1141.

- [157] J.Y. Oh, M.K. Kim, M.S. Shin, H.J. Lee, J.H. Ko, W.R. Wee, J.H. Lee, The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury, *Stem Cells*, 26 (2008) 1047-1055.
- [158] T.S. Jiang, L. Cai, W.Y. Ji, Y.N. Hui, Y.S. Wang, D. Hu, J. Zhu, Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats, *Mol Vis*, 16 (2010) 1304-1316.
- [159] S. Galindo, J.M. Herreras, M. López-Paniagua, E. Rey, A. de la Mata, M. Plata-Cordero, M. Calonge, T. Nieto-Miguel, Therapeutic Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Corneal Failure Due to Limbal Stem Cell Niche Damage, *Stem Cells*, 35 (2017) 2160-2174.
- [160] A. Amouzegar, S.K. Mittal, A. Sahu, S.K. Sahu, S.K. Chauhan, Mesenchymal Stem Cells Modulate Differentiation of Myeloid Progenitor Cells During Inflammation, *Stem Cells*, 35 (2017) 1532-1541.
- [161] G.W. Roddy, J.Y. Oh, R.H. Lee, T.J. Bartosh, J. Ylostalo, K. Coble, R.H. Rosa, Jr., D.J. Prockop, Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6, *Stem Cells*, 29 (2011) 1572-1579.
- [162] L. Liang, X. Luo, J. Zhang, W. Su, W. Zhu, Y. Xie, N. Zhang, Y. Peng, X. Chen, A.P. Xiang, Y. Liu, D. Liang, Safety and feasibility of subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for acute severe ocular burns: A single-arm study, *Ocul Surf*, 22 (2021) 103-109.
- [163] E. Chung, J.A. Rytlewski, A.G. Merchant, K.S. Dhada, E.W. Lewis, L.J. Suggs, Fibrin-based 3D matrices induce angiogenic behavior of adipose-derived stem cells, *Acta Biomater*, 17 (2015) 78-88.
- [164] K. Nemeth, Mesenchymal stem cell therapy for immune-modulation: the donor, the recipient, and the drugs in-between, *Exp Dermatol*, 23 (2014) 625-628.
- [165] M. Zhang, N. Mal, M. Kiedrowski, M. Chacko, A.T. Askari, Z.B. Popovic, O.N. Koc, M.S. Penn, SDF-1 expression by mesenchymal stem cells results in trophic support of cardiac myocytes after myocardial infarction, *Faseb j*, 21 (2007) 3197-3207.
- [166] D. Sarkar, J.A. Spencer, J.A. Phillips, W. Zhao, S. Schafer, D.P. Spelke, L.J. Mortensen, J.P. Ruiz, P.K. Vemula, R. Sridharan, S. Kumar, R. Karnik, C.P. Lin, J.M. Karp, Engineered cell homing, *Blood*, 118 (2011) e184-191.
- [167] R. Zein, W. Selting, M.R. Hamblin, Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity, *J Biomed Opt*, 23 (2018) 1-17.
- [168] G. Sert, A. Kucukguven, E.B. Zırh, T.T. Demirtaş, A.N. Çakar, M. Gümüşderelioğlu, M. Calis, Photobiomodulation with polychromatic light (600-1200 nm) improves fat graft survival by increasing adipocyte

viability, neovascularization, and reducing inflammation in a rat model, *Lasers Surg Med*, 54 (2022) 268-280.

- [169] J.G. Fujimoto, Optical coherence tomography for ultrahigh resolution in vivo imaging, *Nat Biotechnol*, 21 (2003) 1361-1367.
- [170] C.M. Rohaina, K.Y. Then, A.M. Ng, W.H. Wan Abdul Halim, A.Z. Zahidin, A. Saim, R.B. Idrus, Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane, *Transl Res*, 163 (2014) 200-210.
- [171] J.H. Chang, N.K. Garg, E. Lunde, K.Y. Han, S. Jain, D.T. Azar, Corneal neovascularization: an anti-VEGF therapy review, *Surv Ophthalmol*, 57 (2012) 415-429.
- [172] E. Van Obberghen-Schilling, R.P. Tucker, F. Saupe, I. Gasser, B. Cseh, G. Orend, Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth, *Int J Dev Biol*, 55 (2011) 511-525.
- [173] S. Astrof, R.O. Hynes, Fibronectins in vascular morphogenesis, *Angiogenesis*, 12 (2009) 165-175.
- [174] Q. Zhou, L. Yang, M. Qu, Y. Wang, P. Chen, Y. Wang, W. Shi, Role of senescent fibroblasts on alkali-induced corneal neovascularization, *J Cell Physiol*, 227 (2012) 1148-1156.
- [175] Q. Shang, Y. Chu, Y. Li, Y. Han, D. Yu, R. Liu, Z. Zheng, L. Song, J. Fang, X. Li, L. Cao, Z. Gong, L. Zhang, Y. Chen, Y. Wang, C. Shao, Y. Shi, Adipose-derived mesenchymal stromal cells promote corneal wound healing by accelerating the clearance of neutrophils in cornea, *Cell Death Dis*, 11 (2020) 707.
- [176] T.I. Kim, S.W. Kim, S. Kim, T. Kim, E.K. Kim, Inhibition of experimental corneal neovascularization by using subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin), *Cornea*, 27 (2008) 349-352.
- [177] H.B. Song, S.Y. Park, J.H. Ko, J.W. Park, C.H. Yoon, D.H. Kim, J.H. Kim, M.K. Kim, R.H. Lee, D.J. Prockop, J.Y. Oh, Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Inflammatory Lymphangiogenesis in the Cornea by Suppressing Macrophage in a TSG-6-Dependent Manner, *Mol Ther*, 26 (2018) 162-172.
- [178] V. Cury, A.I. Moretti, L. Assis, P. Bossini, S. Crusca Jde, C.B. Neto, R. Fangel, H.P. de Souza, M.R. Hamblin, N.A. Parizotto, Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1 α and MMP-2, *J Photochem Photobiol B*, 125 (2013) 164-170.
- [179] D. Almaliotis, A. Thomas, A. Komnenou, E. Gounari, S. Almpantidou, T. Siempis, N. Papaioannou, G. Koliakos, E. Papakonstantinou, K. Sotiropoulos, V. Karampatakis, Evaluation of Clinical and Histological Outcomes of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Corneal Alkali Burn Model, *Stem Cells Int*, 2021 (2021) 6610023.

- [180] W.M. Petroll, M. Miron-Mendoza, Mechanical interactions and crosstalk between corneal keratocytes and the extracellular matrix, *Exp Eye Res*, 133 (2015) 49-57.
- [181] J.V. Jester, M.M. Rodrigues, I.M. Herman, Characterization of avascular corneal wound healing fibroblasts. New insights into the myofibroblast, *Am J Pathol*, 127 (1987) 140-148.
- [182] G. Shojaati, I. Khandaker, K. Sylakowski, M.L. Funderburgh, Y. Du, J.L. Funderburgh, Compressed Collagen Enhances Stem Cell Therapy for Corneal Scarring, *Stem Cells Transl Med*, 7 (2018) 487-494.
- [183] J.V. Jester, W.M. Petroll, H.D. Cavanagh, Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts, *Prog Retin Eye Res*, 18 (1999) 311-356.
- [184] W.J. Ennis, A. Sui, A. Bartholomew, Stem Cells and Healing: Impact on Inflammation, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2 (2013) 369-378.
- [185] B. Han, J. Fan, L. Liu, J. Tian, C. Gan, Z. Yang, H. Jiao, T. Zhang, Z. Liu, H. Zhang, Adipose-derived mesenchymal stem cells treatments for fibroblasts of fibrotic scar via downregulating TGF- β 1 and Notch-1 expression enhanced by photobiomodulation therapy, *Lasers Med Sci*, 34 (2019) 1-10.
- [186] R. Ebrahimpour-Malekshah, A. Amini, F. Zare, A. Mostafavinia, S. Davoody, N. Deravi, M. Rahmanian, S.M. Hashemi, M. Habibi, S.K. Ghoreishi, S. Chien, S. Shafikhani, H. Ahmadi, S. Bayat, M. Bayat, Combined therapy of photobiomodulation and adipose-derived stem cells synergistically improve healing in an ischemic, infected and delayed healing wound model in rats with type 1 diabetes mellitus, *BMJ Open Diabetes Res Care*, 8 (2020).
- [187] S.E. Wilson, Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency, *Exp Eye Res*, 99 (2012) 78-88.
- [188] M. Zeppieri, M.L. Salvetat, A. Beltrami, D. Cesselli, R. Russo, I. Alcalde, J. Merayo-Llodes, P. Brusini, P.C. Parodi, Adipose Derived Stem Cells for Corneal Wound Healing after Laser Induced Corneal Lesions in Mice, *J Clin Med*, 6 (2017).
- [189] S. Meirelles Lda, A.M. Fontes, D.T. Covas, A.I. Caplan, Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells, *Cytokine Growth Factor Rev*, 20 (2009) 419-427.
- [190] L. da Silva Meirelles, A.I. Caplan, N.B. Nardi, In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 26 (2008) 2287-2299.
- [191] N.C. Joyce, D.L. Harris, V. Markov, Z. Zhang, B. Saitta, Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium, *Mol Vis*, 18 (2012) 547-564.
- [192] Y. Lan, S. Kodati, H.S. Lee, M. Omoto, Y. Jin, S.K. Chauhan, Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53 (2012) 3638-3644.

- [193] E. Eadie, P. Miller, T. Goodman, H. Moseley, Assessment of the optical radiation hazard from a home-use intense pulsed light (IPL) source, *Lasers Surg Med*, 41 (2009) 534-539.
- [194] S. Gopalakrishnan, S. Mehrvar, S. Maleki, H. Schmitt, P. Summerfelt, A.M. Dubis, B. Abroe, T.B. Connor, Jr., J. Carroll, W. Huddleston, M. Ranji, J.T. Eells, Photobiomodulation preserves mitochondrial redox state and is retinoprotective in a rodent model of retinitis pigmentosa, *Sci Rep*, 10 (2020) 20382.

