

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANA BİLİM DALI

**LİMBAL KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO
KOŞULLARDA ÜRETİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

**OKÜLER YÜZEY KÖK HÜCRE TANIMLANMASINDA YENİ BİR BOYA:
“MİTOTRACKER DEEP RED”**

DR. ÖZLEM BARUT SELVER

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

LİMBAL KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO KOŞULLARDA ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

**OKÜLER YÜZEY KÖK HÜCRE TANIMLANMASINDA YENİ BİR BOYA:
“MİTOTRACKER DEEP RED”**

DR. ÖZLEM BARUT SELVER

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İSMET DURAK

- Bu araştırma, DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 2005.KB.SAG.64 sayı ile desteklenmiştir.
- Araştırmacı, TÜBİTAK 2214 bursu ile desteklenmiştir

ÖNSÖZ

Oküler yüzey kök hücrelerinin tanımlanmasını amaçlayan, güncel ve önemi yadsınamaz böyle bir konuda, bana araştırma yapma fırsatı tanıyan; bu araştırmanın planlanması, sürdürülmesi ve sonuçlandırılması aşamalarında bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli hocam, Prof. Dr. İsmet Durak’a çok teşekkür ederim.

Bu önemli konuda, laboratuvar çalışmalarına katılmama imkan tanıyan, bilgi ve deneyimini benimle paylaşan Prof. Dr. Jose Mario Wolosin’e sonsuz teşekkürler.

Göz Hastalıkları uzmanlık eğitimim süresince bilimsel, klinik ve cerrahi eğitimimde, bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım; Prof. Dr. Güray Cıngıl, Prof. Dr. Mehmet Ergin, Prof. Dr. Süleyman Kaynak, Prof. Dr. A. Osman Saatci, Prof. Dr. Üzeyir Günenç, Prof. Dr. F. Meltem Söylev Bajin, Prof. Dr. A. Tülin Berk, Prof. Dr. F. Hakan Öner, Doç. Dr. Zeynep Özbek Söylemezoğlu, Doç. Dr. Nilüfer Koçak, Doç. Dr. Aylin Yaman, Uzm. Dr. Gül Arıkan’ a teşekkür ederim.

Bu dönemde uyum içinde çalıştığım tüm asistan doktor arkadaşlarıma, klinik hemşire ve personeline teşekkürlerimi sunarım.

Projemiz kapsamında birlikte çalıştığımız, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim dalından Doç. Dr Esra Erdal ve ekibineki araştırma görevlisi arkadaşlarımdan İmge Kunter ve Emine Çelik’e teşekkür ederim.

Bugünlere ulaşmamda büyük emek ve desteği olan biricik annem, babam ve kardeşime sevgi, saygı ve minnet duygularımı sunarım.

Uzmanlık eğitim sürecim boyunca iyi ve kötü günlerimde hep yanımda olan, bana desteğini esirgemeyen eşim Alper’e sonsuz teşekkürler.

Dr. Özlem Barut Selver

İzmir, 2010

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	III
TABLO LİSTESİ	IV
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	3
GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
GENEL BİLGİLER	9
Kornea, Limbus ve Konjunktivanın yapısı ve hücreleri	9
Kök hücre tanımı.....	11
Korneal kök hücre varlığına dair kanıtlar	11
Limbal kök hücre aktivasyonu.....	12
Limbal kök hücre yetmezliği	14
Limbal kök hücrenin işaretleyicileri ve izolasyonu	18
Limbal kök hücrenin yerleşimi ve limbal mikro çevre	21
Oküler yüzeyde yan popülasyon tanımı	22
GEREÇ VE YÖNTEM	28
İSTATİSTİK.....	33
BULGULAR	34
TARTIŞMA	43
SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR.....	50

KISALTMALAR

ABCG2	:“ATP-binding cassette sub-family G member 2” (ATP bağlanan taşıyıcı protein G2)
BCRP-1	:“Breast cancer resistance protein-1” (Meme kanseri direnç proteini-1)
BrdU	: Bromodeoksoüridin
DMEM	:“Dulbecco's Modified Eagle Medium” (Dulbecco’nun modifiye Eagle Solüsyonu)
ETDA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	:“Epidermal growth factor” (Epidermal büyüme faktörü)
F12	: Ham’s F12 Solüsyonu
FBS	:“Fetal bovine serum” (Fetal sığır serumu)
FL-1	: Flöresan kanalı-1
FL-4	: Flöresan kanalı-4
FSC	:“Forward scatter” (İleri saçılım)
GÇH	: Geçici çoğlan hücre
HBSS	: “Hank's Buffered Salt Solution” (Hank’ın dengeli tuz solüsyonu)
LEK	: Limbal epitelyal kripta
LKH	: Limbal kök hücre
MTDR	:“Mitotracker deep red”
NGF	:“Nerve growth factor” (Sinir büyüme faktörü)
PBS	:“Phosphate buffered saline” (Fosfatla tamponlanmış salin)
Pgp	: P glikoprotein
PI	: Propidium iodid
PS	: Penisilin-Streptomisin
SHEM	:“Supplemental Hormonal Epithelial Medium” (Zenginleştirilmiş İnsan Epidermal Ortamı)
SSC	:“Side scatter” (Yana saçılım)
Trk A	: Tirozin kinaz reseptör A
YP	: Yan popülasyon

SEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 1 :	13
Şekil 2 :	14
Şekil 3 :	15
Şekil 4 :	22
Şekil 5:	23
Şekil 6:	24
Şekil 7:	25
Şekil 8:	26
Şekil 9:	27
Şekil 10:	33
Şekil 11:	35
Şekil 12:	36
Şekil 13:	37
Şekil 14:	38
Şekil 15:	39
Şekil 16:	40
Şekil 17:	41
Şekil 18:	42

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1:	16
Tablo 2:	21
Tablo 3:	34

LİMBAL KÖK HÜCRELERİN İN VİTRO KOŞULLARDA ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Oküler Yüzey Kök Hücre Tanımlanmasında Yeni Bir Boya: “Mitotracker Deep Red”

ÖZET

Günümüzde, limbal ve konjunktival epitelyal kök hücrelerin izole edilmesinde flow sitometrik yöntemlerin kullanılması giderek yaygınlaşmaktadır. Bu flow sitometrik yöntemlerin önde gelenlerinden bir tanesi, DNA’ya bağlanan bir boya olan Hoechst 33342 boyası kullanılarak, kök hücrelerin ayrıştırılmasıdır. Oküler yüzey kök hücreleri, sahip oldukları Adenozin trifosfat kaset bağlayıcı taşıyıcısının G2 alt tipi (ABCG2) sayesinde, bu boyayı hücre dışına atabilmektedirler. Bu hücre dışına atım kapasiteleri kullanılarak, diğer hücrelerden ayrıştırılabilen kök hücreler, literatürde yan popülasyon olarak adlandırılmaktadır. Kök hücrelerdeki ABCG2 taşıyıcısı tarafından, Hoechst 33342 boyasının hücre dışına atılımı sayesinde, bu boyanın hücre içinde birikmesi ve DNA’nın içine girmesi önlenmektedir. Hoechst 33342 boyası ultraviyole lazer (UV) ile uyarılmaktadır. Kök hücrelerin ayrıştırılmasında kullanılan bu yöntemde, Hoechst 33342 ile uzamış inkübasyon ve UV kullanılması gerekmektedir. Bu iki özellik de yöntemin en önemli dezavantajlarından olup, hücrelerde DNA hasarına yol açabilmektedir.

Bu çalışmada, oküler yüzey epiteli kök hücre seçilmesinde, bir ABC taşıyıcısı ile taşınan ve 633 nm’de uyarılan “Mitotracker deep red” (MTDR) boyasını, Hoechst 33342 boyasına alternatif yeni bir boya olarak tanımladık. Bu boya, DNA yerine mitokondride birikmekte, uygulaması çok kısa bir inkübasyon süresine ihtiyaç duymakta ve genişletilmiş bir YP seçilmesine olanak sağlamaktadır. Bu boyanın kullanımında, gerek UV lazer ihtiyacının olmaması, gerekse boyanın DNA’da birikmemesi nedeniyle hücrelerde meydana gelebilecek DNA hasarı riski azalmaktadır. Bu özellikleri sayesinde, öncül hücreler ile ileride yapılacak klinik uygulamalarda, genetik materyal hasarına bağlı oluşabilecek istenmeyen etkilerden korunmada önem taşıyacaktır.

Kök hücre fenotipi ile uyumlu olarak, MTDR bakımından düşük boyanma gösteren (MTDR^{düşük}) hücreler, yüksek oranda, sessiz fazdaki hücreleri kapsamaktadır. 3T3 hücreleri üzerinde yapılan klonal çalışmalar, bu hücrelerin koloni oluşturma yeteneklerinin, hücre döngüsünde sessiz konumda bulunmalarından, negatif olarak etkilendiklerini göstermektedir. Oküler yüzey kök hücrelerinin, hücre içi ve hücre dışı kontrol mekanizmalarının anlaşılması, bu hücrelerin, oküler yüzey rekonstrüksiyonu amacıyla kullanılmasında gelişmelere imkan sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: Limbal kök hücre, “Mitotracker deep red”, Yan popülasyon.

CHARACTERIZATION AND IN VITRO PROLIFERATION OF LIMBAL STEM CELLS

A New Dye for Identification of Ocular Surface Stem Cells: Mitotracker Deep Red

ABSTRACT

In recent years, flow cytometric techniques are used more widely for isolating limbal and conjunctival epithelial stem cells. Hoechst 33342 is one of the dye for this purpose. Limbal and conjunctival epithelial stem cells transport out (efflux) the DNA binding dye Hoechst 33342 by using their G2 subtype Adenosine triphosphate Binding Cassette transporter (ABCG2) and are isolated by flow cytometry as side population (SP) cells. Transport prevents the dye from accumulating in the cell and intercalating with DNA. Unfortunately, SP sorting requires prolonged incubation with Hoechst 33342 and excitation with a UV laser, features that may lead to DNA damage.

We have now identified a new ABCG2 substratum, Mitotracker deep red (MTDR) that can be used for SP cell isolation, instead of Hoechst 33342. MTDR is excited at 633 nm, accumulates in the mitochondria, not DNA, it's application requires very short incubation and allows the collection of an expanded SP. These properties will prevent genetic material damage in clinical uses of stem cells in the future.

Consistent with the stem cell phenotype, these low Mitotracker deep red dye staining (MTDR^{low}) cells incorporate a high proportion of cells in the quiescent, G0 state. Clonal studies on feeder 3T3 cells demonstrate that the clonal efficiency of these cells, essential to initiate to growth limbal stem cells for ocular reconstruction is affected by their cell cycle status. Understanding intracellular and extracellular control mechanisms of ocular surface stem cells will potentially improves the usage of these cells for ocular reconstruction.

Key words: Limbal stem cell, Mitotracker deep red, Side population.

GİRİŞ VE AMAC

Oküler yüzey, gözün dış ortamla ilk temas eden bölümü olup, üstte ve altta kapak kenarı cildi ile sınırlanan tüm mukozal epiteli kapsamakta ve kornea epiteli, konjunktiva epiteli ve aradaki geçiş zonu olan limbus bölgesinden oluşmaktadır (1)

Limbal bölgenin ciddi hasarlanması ile kornea epitelinin konjunktiva epiteline dönüşümünün, kalıcı korneal epitel defektleri, korneal opaklaşma ve görme kaybı ile sonuçlandığı bilinmektedir (2). Limbal kök hücre yetmezliği yapan nedenler, primer ve sekonder nedenler olarak ikiye ayrılmaktadır. Klinikte, sekonder nedenler, genetik faktörlerin etiolojide rol oynadığı primer nedenlerden daha sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Primer limbal kök hücre yetmezliği nedenleri arasında, aniridi ve konjenital eritrokeratodermi yer alırken; sekonder limbal kök hücre yetmezliği nedenleri arasında, termal, kimyasal yanıklar, ultraviyole (UV), iyonizan radyasyon, kontakt lens kullanımı, prezervan madde toksisitesi ve skatrisyel oküler yüzey hastalıkları sayılabilir (3).

Limbal kök hücre yetmezliği tedavisinde, çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlar arasında, otolog ve allograft limbal greft transplantasyonlarının yanı sıra, günümüzde giderek önem kazanan kültüre edilmiş limbal kök hücre transplantasyonu yer almaktadır (4). Günümüzde, limbal transplantasyon ve/veya amniyotik membran transplantasyonu, oküler yüzey rekonstrüksiyonunda sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntemlerin, yeterli kornea donörü elde edilememesi, allograft rejeksiyonu ve greft başarısızlığı gibi ciddi sorunları bulunmaktadır. Her ne kadar birçok farklı cerrahi yöntem bulunsun da, ciddi limbal kök hücre yetmezliği olan hastalarda, özellikle de bilateral vakalarda, halen etkili bir tedavi yöntemi mevcut değildir (5).

Tüm bu bilgilerin ışığında, limbal kök hücrelerin in vitro kültürü gibi yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, kaçınılmaz hale gelmiştir (6–7). Bu yeni tedavi yaklaşımları, klinik uygulamalarda yer almaya başlamışsa da, biyolojik arka planları, halen net olarak bilinmemektedir. Özellikle limbal kök hücre karakteri ve limbal mikro çevre, günümüz limbal

kök hücre çalışmalarının en önemli araştırma konularındandır (5). Limbal kök ya da diğer adıyla öncül hücrelerin, kültür ortamında çoğaltılması, direkt transplantasyonda kullanılmasının yanı sıra, ileride bu hücrelere yapılacak gen transferlerinde, dolayısıyla kornea hastalıklarında gen tedavilerinin uygulanmasında da önemli rol oynayacaktır.

Kök hücreler, çoğunlukla asimetric hücre bölünmesine girerek, kendi kendini yenileyebilme yeteneğini koruyabilen, özellikli hücrelerdir. Kök hücrelerin bir alt grubu olan embriyonik kök hücreler, blastosistin iç hücre kütesinden gelişen ve vücuttaki çoğu hücreye kaynak oluşturan hücrelerdir. Bir diğer kök hücre alt tipi olan erişkin kök hücreler ise, sadece tek tip hücreye dönüşebilen hücreler olup, kendini yenileyebilme yeteneğine sahip erişkin dokularında bulunmaktadır (8). Kök hücrelerin karakteristik özellikleri arasında; zayıf diferansiye olmaları, sitoplazmalarının ilkel yapıda olması, kendini yenileme kapasitelerinin yüksek olması, bulundukları organizmanın yaşama süresiyle eşit ömürlü olmaları, yavaş döngülü olmaları ve özel hücre bölünmesi geçirmeleri sayılabilir (9). Limbal kök hücreler, boyutlarının küçüklüğü, diferansiyasyon işaretleyicilerini eksprese etmeme ve yüksek çekirdek/sitoplazma oranına sahip olma gibi özellikleri ile vücuttaki diğer erişkin kök hücrelerine benzerlik göstermektedir (10–12).

Kök hücrelerin izole edilebilmesinin sağlanmasında en önemli konulardan biri, uygun hücre membran antijenlerinin tanımlanması ile birlikte flöresanla bağlı antikorlarla immün boyamaların yapılabilmesi ve flöresan ile aktive edilmiş hücre ayırma yönteminin kullanılabilmesidir (13).

Günümüzde, hematopoetik kök hücrelerin tanımlanması ve izolasyonunda çeşitli yöntemler kullanılıyor olmasına rağmen, epitelyal sistemlerde kök hücre için tanımlayıcı işaretleyiciler halen tartışmalıdır.

Kök hücrelerin ayrıştırılmasında, bir DNA boyası olan Hoechst 33342 boyasının kullanılması, alternatif bir yöntemdir. Bu boya, hücrede DNA'ya bağlanarak, hücrenin DNA içeriği hakkında bilgi vermektedir. Serbest konumda boya, 465 nm'de flöresan yayma özelliği göstermektedir. DNA'ya bağlı konumda ise, hücrelerde sıkıca paketlenmiş Hoechst 33342 molekülleri arasındaki elektronik etkileşimler, 675'nm de ikincil bir yayılıma öncülük

etmektedir. 1996 yılında Godell (14), fare hematopoetik kök hücreleri ile yaptığı bir çalışmada, bu hücrelerin, Hoechst 33342 boyasını, hücre membranından dışa atım kapasitelerinin bulunduğunu tespit etmiştir. Bu hücreler, kırmızı ve mavinin iki boyutlu grafik görüntüsünde, solda yerleşen ve DNA içeriği bakımından G0/G1 hücre fazında yer alan, canlı somatik hücrelerin kuyruğunda yer almaktadır. Bu yerleşimleri nedeniyle yan popülasyon (YP) ismi ile tanımlanmışlardır. Bu YP hücreleri, birçok erişkin dokusunda, kök hücre karakteristiği gösteren hücrelerdir. YP hücrelerinin, yani kök hücrelerin, bu azalmış boya tutulumu, sahip oldukları Adenozin trifosfat Kaset Bağlayıcı taşıyıcı süper ailesine mensup olan, çoklu ilaç direnç geni ve meme kanseri direnç proteini (Bcrp1/ABCG2) sayesinde gerçekleşmektedir (13–15).

Günümüzde limbal ve konjunktival epitelyal kök hücreler de, hücre membranlarında yerleşen ABCG2 taşıyıcı proteini sayesinde, Hoechst 33342 boyasını hücre dışına atım kapasiteleri kullanılarak, flow sitometri ile yan popülasyon olarak izole edilebilmektedir (14–17).

Araştırmalarda açıklığa kavuşturulmaya çalışılan bir diğer önemli konu da, izolasyonu yapılan YP, yani kök hücrelerin, kültür ortamındaki davranışlarının incelenmesidir. İzole durumdaki kök hücreler, diğer hücrelerden farklı olarak, genellikle gerekli hormonal sinyaller sağlandığında çoğalmaya başlayabilmektedir (18). Hücrenin, kök hücre fenotipine yakınlığı; çoğalarak koloni yapmaya başladığında, uzamış üreme yeteneğini belirlemektedir. Belirli bir popülasyonun, kök hücre açısından durumunu değerlendirmede, koloni oluşturma özelliklerinin incelenmesi, başlangıç dönem koloni yapma yeteneğine göre daha güvenilirdir. Bu koloni oluşturma özellikleri, hücrenin büyük ve sıkı bir koloni yapmak için çoğalmaya devam edebilirliğini ve tekrar hücrelere ayrıştırılıp kültür ortamına ekildikten sonra bile, yeni koloniler yapabilecek yeteneğe sahip olmasını kapsamaktadır.

Oküler yüzey kök hücrelerinin tanımlanması, bu hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması, direkt transplantasyonda kullanılması ve ileride muhtemel gen tedavilerinde uygulanması konularında, anahtar rol oynamaktadır.

Kök hücrelerin karakterizasyonu amacıyla, metabolik olarak durumlarının tanımlanması da, yine günümüzde önemli araştırma konularındandır. Bu amaçla, bir çok

değişik mitokondriyel boya kullanılmaktadır. Bu mitokondriyal boyaların başında, Rhodamin 123 boyası gelmektedir. Flöresan özellikteki Rhodamin 123 boyası, 505 nm’de uyarılmakta, 534 nm’de yayılım yapmaktadır. Bu boya, canlı hücrelerde mitokondrilerin belirlenmesinde kullanılan bir boya olup, mitokondride birikir ve hücre aktifleştikçe yoğunluğu giderek artar (19). Rhodamin 123 boyası ile hematopoetik hücre popülasyonlarında yapılan çalışmalarda, ilginç olarak bu boyanın da Hoechst 33342 boyası ile benzer şekilde kök hücre belirlenmesinde kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir. Bu özellik, hematopoetik hücrelerin sahip olduğu çoklu ilaç direnç genlerinden P-glikoprotein (Pgp) ile ilişkili olup, kodladığı taşıyıcı protein, hücre membranında yer almaktadır ve Rhodamin 123’ün hücre dışına atılımını sağlamaktadır (20). Ancak bu taşıyıcının, insan oküler yüzey epitel hücrelerinde yer almadığı gösterilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> erişim numarası GSE5543). Bu boyanın mitokondriye bağlanması, mitokondriyal membran potansiyeline bağımlıdır ve mitokondriyal membran potansiyelinin ortadan kalkması ile beraber boya, mitokondri iç membranına bağlanamaz hale gelmektedir (21).

Rhodamin 123 boyasından farklı olarak, mitokondriyal membran potansiyeline bağlı olma ve potansiyelin kaybı ile kolayca yıkanma gibi dezavantajlara sahip olmayan bir başka mitokondriyel boya ise “Mitotracker deep red” (MTDR) boyasıdır. Membran potansiyelinden bağımsız olarak çalışan bu boya, özellikle spermatozoaların motilitelerini değerlendirmede ve mitokondriyal aktivitelerinin gözlenmesinde kullanılan bir boyadır. Bu boya, 633 nm’de uyarılır ve 665 nm’de yayılım yapar, hücre membranını difüzyonla geçer ve mitokondride birikir. İçerdiği klorometil grubu sayesinde, fiksasyon yapılan örneklerde bile ölçüm ve değerlendirme yapma imkanı sağlar (22).

Bu çalışma ile amacımız, oküler yüzey epiteli kök hücrelerinin karakterizasyonunun ve izolasyonun yapılması ile birlikte, ileride kök hücrelerin klinik kullanımlarına yönelik çalışmalara öncülük etmektir. Bu amaçla Hoechst 33342 boyası ve flow sitometrik yöntemler kullanılmıştır. Ayrıca, kök hücrelerin metabolik olarak sessiz ya da yarı sessiz fazda oldukları bilgisi ışığında, mitokondriyal boyaların kullanımı, böylece oküler yüzey kök hücrelerinin metabolik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Rhodamin 123 boyasının kullanımı planlanmış olup, bu boyanın mitokondriye bağlanmasının, mitokondriyal membran potansiyeline bağımlı olması ve bu membran potansiyelini ortadan kaldıran durumlarda

kolayca yıkanması nedeniyle, bu dezavantajlara sahip olmayan bir başka mitokondrial boya olan “Mitotracker deep red” kullanımı, çalışma planına dahil edilmiştir.

GENEL BİLGİLER

Oküler yüzey, gözün dış ortamla ilk temas eden bölümü olup, üstte ve altta kapak kenarı cildi ile sınırlanan tüm mukazal epiteli kapsamakta, kornea epiteli, konjunktiva epiteli ve aradaki geçiş zonu olan limbus bölgesinden oluşmaktadır (1).

Kornea epitel tabakası, total kornea kalınlığının % 10'luk bölümünü oluşturan ve korneanın dış ortamdan oksijen ve besin almasını sağlayan en yüzeyel tabakasıdır. Konjunktiva epiteli, 1–2 hücre tabakasından oluşmakta, goblet ve epitel hücrelerini içermektedir (1,23). Limbus, kornea ile konjunktiva arasında yer alan, yaklaşık 11–12 hücre tabakasından oluşan, geçiş zonudur. Limbus epiteli, yaşam boyu korneal epitelyal rejenerasyondan sorumlu olan limbal epitelyal kök hücre olarak bilinen erişkin kök hücrelerini içermesi bakımından, oldukça büyük öneme sahiptir (4,8,24).

1. KORNEA, LİMBUS VE KONJUNKTİVANIN YAPISI VE HÜCRELERİ

Korneanın yapısı ve hücreleri

Kornea, beş tabakadan oluşan gözün saydam bölümüdür (25). Korneanın en dış tabakası olan epitel tabakası, total kornea kalınlığının % 10'luk bölümünü oluşturmaktadır. Dış ortamdan oksijen ve besinin korneaya geçişinden sorumludur. Kornea epitelinde yer alan hücreler; bazal, kanat ve skuamöz hücrelerdir. Epitel tabakasından sonra gelen tabaka, Bowman membranı olup, bazal membranın hemen altında yer alan yapıdır ve ön stromanın aselüler zonudur. Stroma tabakası tüm korneal kalınlığın % 90'ını oluşturan ve Bowman membranının altında yer alan kornea tabakasıdır. Avasküler bir yapıdır ve başlıca su ve kollajen liflerden oluşmaktadır. Stromanın altında yer alan Descement membranı, endotelin bazal membranıdır. Endotel tabakası, korneanın en iç tabakası olup, endotel hücrelerinden oluşmaktadır ve stromadan suyu dışarı pompalayarak, korneanın saydam kalmasını sağlayan yapıdır (4).

Korneanın üç hücre tabakası, mitotik ve kendini yenileme özellikleri açısından incelendiğinde, belirgin farklılık göstermektedir. Kornea epitelinde, mitotik özelliği olmayan

suprabazal hücreleri yenileyen, mitotik özellikteki bazal hücreler yer almaktadır. Stromal keratositler ise yetişkinde çok az mitotik aktivite göstermektedir. İnflamasyon ve yara iyileşmesi sırasında, stromal keratositler aktive olarak, fenotipleri fibroblast ve miyofibroblastlara dönüşerek mitotik aktivite gösterebilmekte ve bağ dokusu materyali salgılayarak opak skarlar oluşmasına yol açmaktadırlar. Endotel hücrelerinin ise kendini yenileme aktiviteleri, kerotositlerden bile daha azdır. Çocukluk çağından sonra bölünme göstermemektedirler. Endotelial hasar sonrası oluşan boşluğu, kalan hücreler şekil değiştirerek kapatmaktadırlar (8).

Limbusun yapısı ve hücreleri

19. yüzyılın başlarında, limbusun biyomikroskopik incelenmesi sonucunda, burada gözlenen nadir yapısal özellik, önceleri radyal şeritler olarak adlandırılmış, sonrasında da Vogt palizatları olarak isimlendirilmiştir (26).

Limbus epiteli, 11–12 hücre tabakasından oluşmaktadır (4). Limbal bölgede, Descement membranı kaybolmakta, endotel hücreleri ise santral korneadan farklı olarak daha büyük ve düz görünüme sahip olmaktadır (27). Kendini yenileme kapasitesine sahip olan tüm dokularda, erişkin kök hücreleri bulunduğu varsayımı doğrultusunda, bu özelliğe sahip dokuların arasında yer alan kornea epitelinin de muhtemel kök hücrelerinin, limbus bölgesinde yerleştiği öngörülmektedir (28).

Konjunktivanın yapısı ve hücreleri

Konjunktiva epiteli, vaskülarize bir stroma üzerinde uzanır ve korneadan farklı olarak organize olmayan, üst üste gelmiş epitel katlarından oluşmaktadır. Konjunktiva epiteli, farklı sitokeratinler ve müsinler eksprese etmesi ve glikokaliks içermesi ile kornea epitelinden ayrılmaktadır (29).

Konjunktiva epiteli; bulber, forniks ve gözkapağı olmak üzere üç ayrı alana ayrılmıştır (30).

Konjunktival kök hücrelerin, tüm konjunktivada bazal hat boyunca yayıldığı ancak özellikle forniks bölgesinde yoğunlaştığı düşünülmektedir (31). Bu kök hücrelerin bipotent özelliği olduğu, yani hem goblet hem de goblet olmayan keratinositlere dönüşebildiği gösterilmiştir (32).

2-KÖK HÜCRE TANIMI

Kök hücreler, çoğunlukla asimetrik hücre bölünmesine girerek, kendi kendini yenileyebilme yeteneğini koruyabilen, özellikli hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler blastosistin iç hücre kütesinden gelişen ve pluripotent özellikleri sayesinde, vücuttaki çoğu hücreye kaynak oluşturan hücrelerdir. Erişkin kök hücrelerin ise, unipotent özellikli, bu nedenle de sadece tek tip hücreye dönüşebilen ve kendini yenileyebilme yeteneği olan erişkin dokularında bulunan hücreler olduğu düşünülmektedir (8).

Kök hücrelerin karakteristik özellikleri arasında; zayıf diferansiye olmaları, sitoplazmalarının primitif yapıda olması, kendini yenileme kapasitelerinin yüksek olması, bulundukları organizmanın yaşama süresine muhtemelen eşit uzunlukta yaşam sürelerinin olması, yavaş döngülü olmaları ve özel hücre bölünmesi geçirmeleri sayılabilir (9). Limbal kök hücreler de vücuttaki diğer erişkin kök hücreleri ile boyutlarının küçüklüğü, diferansiasyon işaretleyicilerini eksprese etmemeleri ve yüksek nükleus/sitoplazma oranına sahip olmaları gibi ortak özellikler göstermektedir (11,12,33).

3-KORNEAL KÖK HÜCRE VARLIĞINA DAİR KANITLAR

Korneanın rejeneratif kapasitesi göz önünde bulundurulduğunda, kök hücrelerin varlığı ve yerleşim yerlerini tanımlama konularında, günümüze kadar birçok çalışma yapılmış olup, halen bu çalışmalar büyük bir hızla devam etmektedir.

1944 yılında Mann (34), tavşan korneasında, yaralanma sonrası oluşan epitel defektine doğru limbal bölgeden pigment hareketi olduğunu rapor etmiştir. Davanger ve Evensen (25), limbustan korneaya olan pigment göçünü tespit etmiş ve kök hücrelerin limbal yerleşimli olabileceğini öne sürmüşlerdir. Costarelis ve arkadaşları (35), ilk kez limbus bölgesinde yavaş

döngülü hücrelerin bulunduğunu rapor etmişlerdir. Schermer ve arkadaşları (36) ise, korneal epitelyal kök hücrelerin, limbal bazal epitelde yer aldığını, keratin içeriği bakımından, korneal epitel hücreleri ile karşılaştırarak göstermişlerdir.

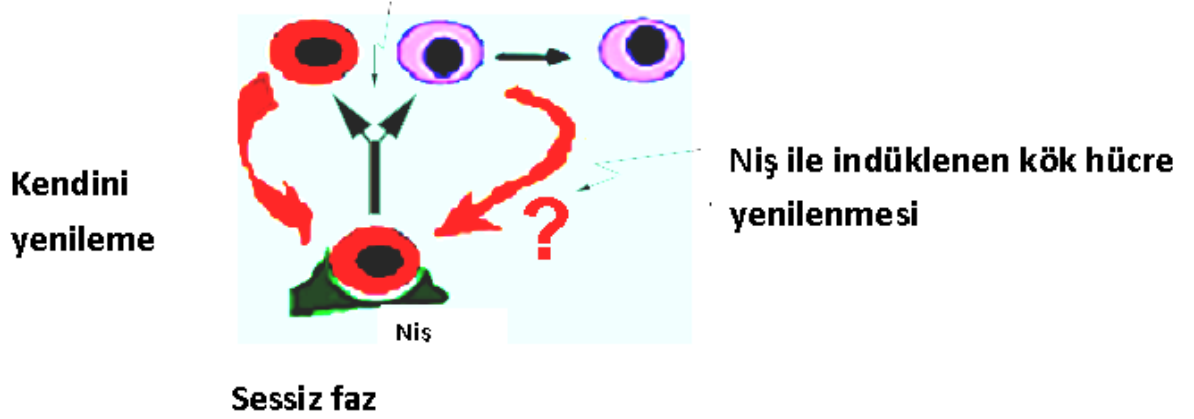
Huang ve arkadaşları (37), kök hücrelerin limbal bazal epitelde yerleşiminden yola çıkarak, limbal bölgenin sağlam olduğu ve yerinden kaldırıldığı durumlardaki korneal yara iyileşmesini incelemek amacıyla, deneysel bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, limbal epiteli kaldırılan tavşanların, korneal yara iyileşmelerinde gecikme, tekrarlayan epitel defektleri, konjunktivalizasyon ve korneada vaskülarizasyon geliştiğini rapor etmişlerdir.

Kinoshita ve arkadaşları (38) ise, farklı cinsiyetlerdeki tavşanlar arasında yaptıkları lameller keratoplasti cerrahisi sonrasında, postoperatif olarak transplante olan epiteldeki cinsiyet kromatinini incelemişler ve donör korneal epitel hücrelerinin zamanla azaldığını, yerini alıcı korneal epitel hücrelerinin aldığını, bunun da sentripedal yolla gerçekleştiğini göstermişlerdir.

4-LİMBAL KÖK HÜCRENİN AKTİVASYONU

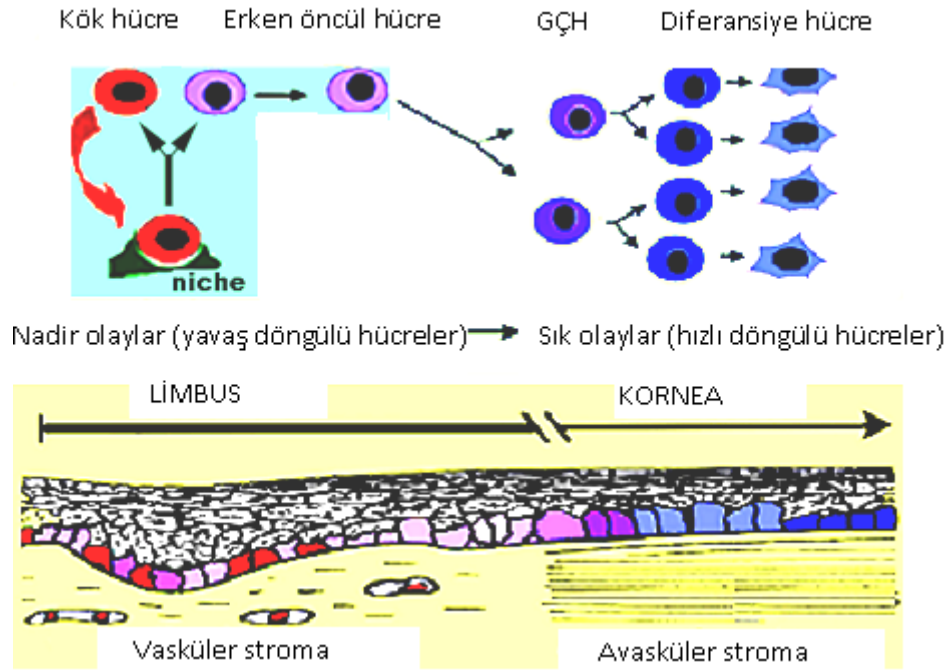
Kök hücrelerin aktivasyonu ile ilgili birçok hipotez yer alsa da en çok kabul gören görüşlerden bir tanesi, limbal nişte (mikro çevre) yer alan kök hücrelerin, asimetric hücre bölünmesidir. (Şekil-1)

Asimetrik hücre bölünmesi



Sekil-1: Limbal nişte (mikro çevre) yerleşim gösteren kök hücreler, aktivasyon sonrası asimetrik hücre bölünmesine gitmektedir. Yavru hücrelerden küçük olanı, lokal ortamda diferansiye olmamış olarak kalırken, diğeri diferansiye olmakta ve migrasyona uğramaktadır. Yavru hücrenin tekrar mikro çevreye dönerek kök hücre fonksiyonunu üstlenmesinde, mikro çevre ile indüklenen hücre yenilenmesi gibi açıklayıcı görüşler bulunmakla beraber halen etkili faktörler net olarak aydınlatılamamıştır. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

Bu asimetrik bölünme sonucu, aktivasyon sonrası diferansiye olmamış yavru hücre, limbal bölgede kalarak, gelecekte gerekli durumlarda yeniden kök hücre rezervini oluşturma görevini üstlenirken, diğeri yavru hücre, geçici çoğalan hücreye (GÇH) dönüşerek, korneaya ve suprabazal bölgeye doğru yer değiştirmektedir (4,39). (Şekil-2)



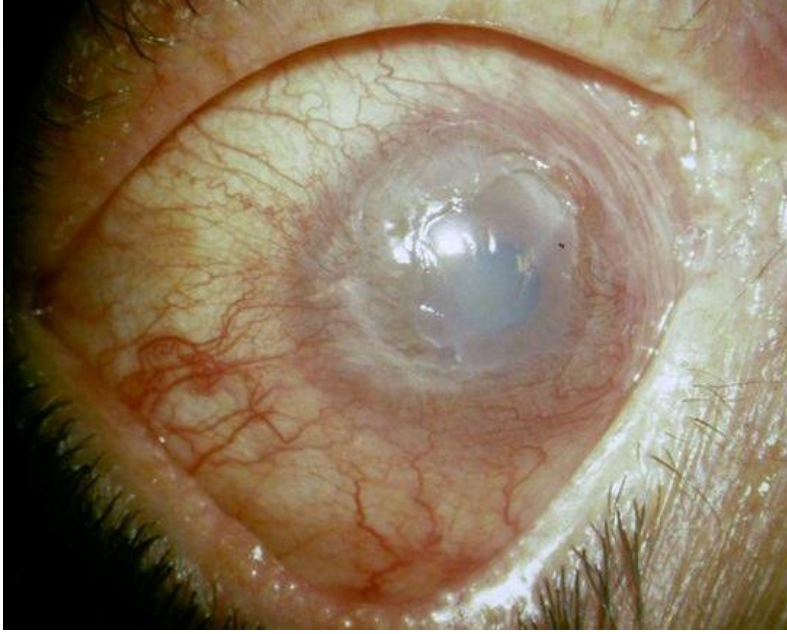
Sekil-2: Limbal mikro çevrede yerleşim gösteren kök hücreler, nadir olarak aktive olmakta ve asimetric hücre bölünmesine gitmektedir. Yavru hücrelerden küçük olanı, lokal ortamda diferansiye olmamış olarak kalırken, diğeri diferansiye olmakta, önce geçici çoğalan hüceye sonrasında da terminal diferansiye kornea epitel hücrelerine dönüşmekte, bu süreç içerisinde de aynı zamanda kornea santraline doğru yer değiştirmektedir. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

Kök hücreler sahip oldukları özel iç karakteristikleri sayesinde, hemostaz ve doku onarımı sırasında, hücre değişimini kontrol edebilmektedirler. Bu özellikleri, kök hücreleri, daha diferansiye formları olan geçici çoğalan hücrelerden ayırmaktadır. Bu önemli karakteristikleri nedeniyle, kök hücreler genellikle korunaklı vücut bölgelerinde yer almaktadırlar. Limbusta da bu korunaklı yer, bazal epiteldir (4).

5-LİMBAL KÖK HÜCRE YETMEZLİĞİ

Limbal kök hücre yetmezliği, etiolojisinde birçok faktörün yer aldığı, korneanın gereksinim duyduğu rejenerasyon yeteneğini kısmen veya tamamen kaybederek buna bağlı

konjunktivalizasyon, tekrarlayan epitel bozulmaları gibi sonuçlarla karşımıza çıkan karmaşık bir patolojidir (40). (Sekil-3)



Sekil-3: Steven-Johnson Sendromuna bağlı olarak gelişen limbal kök hücre yetmezlikli bir olguya ait fotoğraf. Ağır konjunktivalizasyon, korneanın opaklaşması ve belirgin vaskülarizasyon izlenmekte. (Prof. Dr. İsmet Durak'ın arşivinden)

Limbal kök hücre yetmezliğinde etiyoloji

Limbal kök hücre yetmezliğine neden olan durumlar, primer ve sekonder nedenler olarak ikiye ayrılmaktadır. Klinikte, sekonder nedenler, genetik faktörlerin etiyolojide rol oynadığı primer nedenlerden daha sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Primer limbal kök hücre yetmezliği nedenleri arasında, aniridi ve konjenital eritrokeratodermi yer alırken; sekonder limbal kök hücre yetmezliği nedenleri arasında, termal ve kimyasal yanıklar, UV, iyonizan radyasyon, kontakt lens kullanımı, prezervan madde toksisitesi, Steven -Johnson sendromu ve oküler skatrisyel pemfigoid gibi oküler yüzeyin skatrisyel hastalıkları, limbal bölgeye uygulanan cerrahiler ve yaşlanma sayılabilir (3). (Tablo-1)

Primer kök hücre yetmezliği sebepleri	Sekonder kök hücre yetmezliği sebepleri
Aniridi Konjenital eritrokeratodermi	Termal yanıklar Kimyasal yanıklar Ultraviyole İyonizan radyasyon Kontakt lens kullanımı Prezervan madde toksisitesi Oküler yüzeyin skatrisyel hastalıkları Limbal bölgeye uygulanan cerrahiler Yaşlanma

Tablo-1: Limbal kök hücre yetmezliği nedenlerinin sınıflandırılması

Limbal yetmezlik durumundaki semptomlar arasında; azalmış görme keskinliği, fotofobi, sulanma, blefarospazm, kronik inflamasyona bağlı kızarıklık ve epitel bozulmasına bağlı tekrarlayan ağrı atakları sayılabilir (3, 41).

Biyomikroskopik muayenede, kornea epitelinin donuk ve düzensiz refleksi görülür. Limbal kök hücrelerin ciddi düzeydeki fonksiyon kaybı, kalın fibrovasküler pannus oluşumu, kronik keratit, skarlaşma ve kalsifikasyona yol açabilir. Korneanın konjunktivalizasyonu sonucundaki geçirgenlik artışına bağlı olarak, korneal flöreseın tutulumu da sıklıkla anormal olur (3).

Limbal kök hücre yetmezliğinde tanı

Limbal kök hücre yetmezliğinde, kesin tanı konulması büyük önem taşımaktadır. Bunun en önemli nedenlerinden bir tanesi, bu hastalarda korneal transplantasyonda prognozın oldukça kötü olmasıdır (4).

Limbal kök hücre yetmezliğinin tüm bulgularına rağmen, yalnızca konjunktivalizasyon ve korneal yüzey üzerine goblet hücre göçü, tanıda özellik taşımaktadır.

Konjunktivalizasyonun klinik bulguları arasında, Vogt limbal palizatlarında bozulma veya korneada gecikmiş flöresein boyanması sayılabilmektedir. Konjunktivalizasyonun asıl tanısı, impresyon sitolojisi ile korneada goblet hücrelerinin varlığının gösterilmesi yoluyla konulabilmektedir (40).

Limbal kök hücre yetmezliğinde tedavi yaklaşımları

Limbal kök hücre yetmezliği tedavisinde, çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlar arasında otolog ve allogreft limbal greft transplantasyonlarının yanı sıra, günümüzde giderek önem kazanan kültüre edilmiş limbal kök hücre transplantasyonu yer almaktadır (4).

Tek taraflı limbal kök hücre yetmezliğinde, otolog limbal greftler kullanılabilmektedir (42). Ancak bilateral limbal kök hücre yetmezliklerinde, allogreft kullanımı söz konusu olmakta fakat bu yöntemin de immün reaksiyon nedeni ile başarı şansı kısıtlı kalmaktadır (4,41). Ayrıca, limbal transplantasyon ya da amniyotik membran transplantasyonu gibi yöntemlerin, yeterli kornea donörü elde edilememesi, allograft rejeksiyonu ve greft başarısızlığı gibi sorunları bulunmaktadır. Her ne kadar birçok cerrahi yöntem bulunsun da, ciddi limbal kök hücre yetmezliği olan hastalarda, özellikle de bilateral vakalarda, halen güvenilir bir tedavi yöntemi mevcut değildir (5). Tüm bu nedenlerle, limbal hücre kültürü gibi yeni tedavi stratejilerinin gelişmesi kaçınılmaz hale gelmiştir. (6.7.43–46)

Klinik uygulamalarda, yavaş yavaş yer almaya başlayan yeni tedavi yaklaşımlarının, biyolojik arka planları net olarak bilinmemektedir. Özellikle limbal kök hücrelerin karakteri ve mikro çevreleri, günümüz limbal kök hücre kültürü çalışmalarının en önemli araştırma konuları arasındadır (5). Son yıllarda, kültür ortamında üretilen limbal kök ya da öncül hücrelerin transplantasyonuna dayalı teknikler geliştirilmiş ve bu yöntemin, ciddi oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde kullanılabildiği gösterilmiştir (7,45).

İlk kez 1997 yılında Pellegrini ve arkadaşlarının (6), Lancet dergisinde yayınlanan çalışmalarında, limbal kök hücrelerin “feeder layer” (besleme tabakası) üzerinde üretildiği ve 80 kadar bölünme geçirdikleri bildirilmiştir. Daha sonraki yıllarda araştırmacılar, amniyotik membran üzerinde üretilen korneal limbal epitel hücrelerini, kornea rekonstrüksiyonunda

kullanmışlardır (46). Fakat bu yaklaşımlar, tamamıyla stratifiye olmuş ve iyi differansiye epitel tabakalarının oluşmasını sağlayamamıştır. Ayrıca limbal kök hücreye özgü işaretleyicilerin tam olarak bilinmemesi, fiziksel izolasyonunun yapılamamasına neden olmaktadır. Dolayısıyla çalışmalar çoğunlukla, kornea farklılaşmasını sağlayan genleri kontrol eden, kök hücre ortamını oluşturacak mikro çevrenin karakterizasyonu ve limbal bazal epitelde bulunan geçici çoğalan hücrelerin farklılaşması için gerekli sinyallerin bulunması yolunda olmuştur (47–49).

6-LİMBAL KÖK HÜCRENİN İŞARETLEYİCİLERİ VE İZOLASYONU

Kök hücreler için en iyi işaretleyicilerden bir tanesi, DNA'nın 3H timidin veya bromodeoksoüridin (BrdU) ile uzun dönem etiketlenmesidir. Bu işlem yavaş döngülü hücreleri, daha hızlı döngülü yavru GÇH' dan ayırmada belirleyicidir. Cotarelis ve arkadaşları (35), 1989 yılında yaptıkları çalışmalarında, 3H timidin veya BrdU ile limbal epitelyal hücreleri işaretlemişler, 4–8 haftalık takip periyodunda yavaş döngülü kök hücrelerde seviyenin değişmediğini göstermişlerdir. Fare kornealarının limbal bölgesinde, bu yöntemle bazal hücrelerin % 10'unun kök hücre olduğunu bildirmişlerdir.

Kök hücrelerin varlığına dair, güçlü kanıtlar bulunmasına rağmen, halen bu hücrelerin kültür ve izolasyonunu sağlayacak metotlar kesin olarak tanımlanamamıştır (8).

Moleküler çalışmalara ve limbal epitelyal hücrelerle yapılan immünofenotipik karakterizasyonlara dayanarak limbusun, epitelyal kök hücrelerin kaynağı olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (50, 51).

P63

P53, tümör süpresör özelliği olan genlerdendir. P63, p53 gen ailesinin üyelerinden olmasına rağmen, tümör süpresör gen olmayıp, proliferatif keratinositlerin nükleuslarından normal olarak eksprese edilen bir gendir (8, 52). P63, Pelligrini (52) tarafından, keratinosit kök hücre işaretleyicisi olarak ileri sürülmüştür. Bu çalışmada, klonal analiz ve “Western blotting” yöntemleri kullanarak, p63'ün epidermal ve limbal kök hücrelerde güçlü, genç GÇH' da zayıf, GÇH' da ise belirlenemeyecek seviyede olduğu rapor edilmiştir. Takip eden

Çalışmalarda, P63'ün yalnız limbal bölgede değil, kornea santralindeki bazal epitelde de pozitif olduğu tespit edilmiştir (53). Di Iorio ve arkadaşları (54), yaptıkları bir çalışmada, p63'ün alfa, beta ve gama olmak üzere üç alt izomerinin de oküler yüzey epitel hücrelerinde farklı görevlerle bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Kawasaki ve arkadaşları (55) ise, yaptıkları çalışmada, p63'un, Delta Np63 alfa izoformunun, insan oküler yüzey epitelinde en baskın izoform olduğunu göstermişlerdir.

Konneksin 43 ve 50

Konneksinler, iletişimi sağlayan hücreler arası bağlantı birimlerini ("gap junctionlar") oluşturan proteinlerdir. Kornea epitelinde varlığı saptanan iki konneksin, konneksin 43 ve 50'dir. Bu iki konneksinle ilgili yapılan çalışmalarda, konneksin 43 ve 50'nin diferansiasyon işaretleyicileri olduğu ve kök hücrelerde bulunmadığı belirtilmektedir. (54, 56, 57)

Keratin 3/12

Schermer ve arkadaşları (36), 1980'li yıllarda yaptıkları çalışmaları ile temel keratinlerden olan Keratin 3'ün tüm korneal ve suprabazal limbal hücrelerde bulunduğunu, bazal limbal epitel hücrelerinde ise mevcut olmadığını göstermişlerdir.

Yine bir diğer keratin olan Keratin 12 de, Keratin 3 ile benzer şekilde diferensiasyon işaretleyicisidir ve limbal bazal epitel hücrelerinde bulunmamaktadır (11).

Sinir büyüme faktörü reseptörleri (NGF) Trk-A ve p75^{NTR}

Sinir büyüme faktörü (NGF), nörotrofin ailesinin bir üyesi olup, insan kornea hücrelerinin proliferasyonu ve diferensiasyonunda önemli rol oynamaktadır (58, 59).

Nörotrofinlerin, p75^{NTR} adı verilen ve düşük affinite gösteren bir ortak reseptörleri bulunmakla birlikte, farklı alt tipleri, tirozin kinaz (Trk) reseptörlerinin farklı üyelerini reseptör olarak kullanırlar (60).

Trk-A, tirozin kinaz reseptörlerinden birisi olup, NGF'e yüksek afinite göstermektedir. Bu reseptörün, limbal bazal hücrelerde yer aldığı gösterilmiştir (61)

NGF'nin bir başka reseptörü olan p75^{NTR}, hem limbal hem de korneal bazal ve suprabazal hücrelerde yer alan, limbal bazal hücrelerde fazla ekspresyonu olduğu rapor edilen bir reseptördür (62).

Qi ve arkadaşları (63), yaptıkları bir çalışmada, limbal bazal epitel tabakasında, NGF ve Trk A'nın, ABCG2 ve p 63 ile birlikte eksprese olurken, keratin 3 ile koeksprese olmadıklarını göstermişlerdir. Primer limbal epitel kültüründe, NGF eksprese eden hücre sayısı, p 63 eksprese eden hücre sayısından az bulunurken, Trk A eksprese eden hücre sayısı ile p63 eksprese eden hücre sayısı eşit bulunmuştur.

ABCG2

ABCG2, diğer adıyla BCRP-1, kök hücrelerin genel işaretleyicisi olarak öne sürülen, limbal kök hücre tanımlamasında en güncel ve en iyi işaretleyicilerden bir tanesidir (8,15).

Chen ve arkadaşları (64), 2004 de yayınladıkları çalışmalarında, ABCG2'nin primer olarak limbal bazal epitel hücrelerinde yer aldığını göstermişlerdir.

Kök hücre belirlemede kullanılan diğer işaretleyiciler arasında, nestin, involucrinler, metabolik enzimler ve daha birçok molekül yer almakta ve bunlarla ilgili çalışmalar halen devam etmektedir (5, 64-70).

Oküler yüzeye ait işaretleyiciler eksprese oldukları bölgelere göre aşağıdaki tabloda özetlenmiştir. (Tablo-2)

İşaretleyici	Korneal epitel		Limbal epitel	
	suprabazal	bazal	suprabazal	Bazal
P63	-	±	±	+++
ABCG2	-	-	±	+++
Keratin 3/12	+++	+++	+++	-
Konneksin 43	+++	+	+++	-
Konneksin 50	+++	-	+++	-
Trk-A	++	+++	++	+++

Tablo-2: Kornea ve limbal epitelde bazal ve suprabazal yerleşim bölgelerinde çeşitli işaretleyicilerin ekspresyon düzeyleri.

7-LİMBAL KÖK HÜCRELERİN YERLEŞİMİ VE MİKRO ÇEVRELERİ

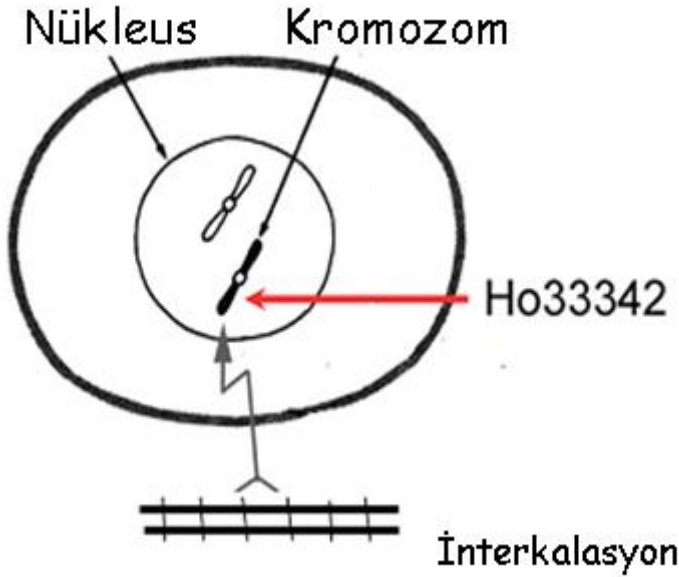
Son yıllarda, erişkin kök hücrelerinin, özel bölgelerde veya mikro çevrelerde yer aldığı anlaşılmıştır (71). 2005 yılında Dua ve arkadaşları (72), limbusun bazı bölgelerinde, epitel hücrelerine ait solid kordların, alttaki stromaya doğru uzandığını göstermişlerdir. Bu bölgeler limbal epitelyal kriptalar (LEK) olarak adlandırılmıştır. Shanmuganattahan ve arkadaşlarının (73), 2006 yılında limbal epitelyal kriptaların morfolojik karakteristiklerini tanımlamak üzere yaptıkları çalışmalarında, 8 insan kornea-skleral riminde total olarak 74 limbal epitelyal kripta saptanmıştır. Bunların 46 tanesi minör (<40 mikron), 28 tanesi major (>40 mikron) kripta olarak tespit edilmiştir. Kriptaların en çok yerleşim gösterdiği alan ise, nazal bölge olarak saptanmıştır. Yeung ve arkadaşlarının (74), 2008 de LEK'i inceledikleri çalışmalarında, bazal membranda yer alan ve limbal kök hücrelerin yavaş döngülü olmalarında rol oynadığı düşünülen, ekstrasellüler bağ doku proteinlerinden Tenascin C'nin boyanmasına göre limbal bölge; zon 1'i LEK içeren limbus; zon2'yi LEK ile ilişkili limbus ve zon3'ü ise LEK'ten uzak limbus olmak üzere üç zona ayrılmıştır.

8-OKÜLER YÜZEYDE YAN POPÜLASYON TANIMI

1996'da Godell (14), fare hematopetik hücrelerinde, uzun dönemli ve birçok hücreye dönüşme kapasitesi olan hücrelerin, Hoechst 33342 boyasını dışa atım yeteneğine göre, yan popülasyon adı altında izole edilebileceklerini göstermiştir.

Epitelyal sistemlerde, kök hücre için tanımlayıcı işaretleyiciler halen tartışmalıdır. Kök hücrelerin ayrıştırılmasında, bir DNA boyası olan Hoechst 33342 boyasının kullanılması alternatif bir yöntemdir (17).

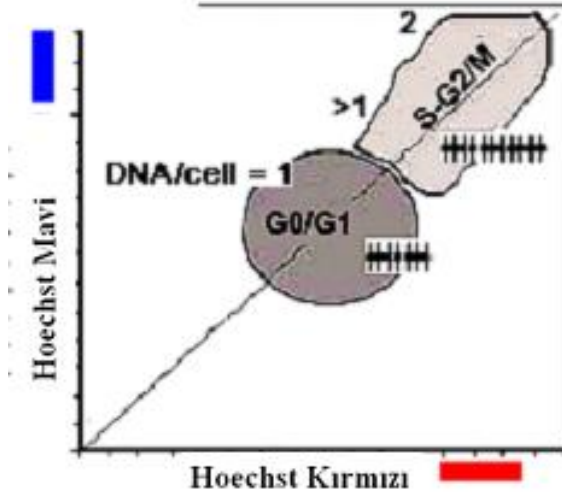
Serbest konumda bu boya, 465'nm de bir flöresan yayma özelliği göstermektedir. Boya DNA ile interkalasyon yapmaktadır. (Şekil-4)



Şekil-4: Hoechst 33342 molekülü, hücre içine girdikten sonra, nükleusta DNA ile interkalasyon yapmaktadır. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

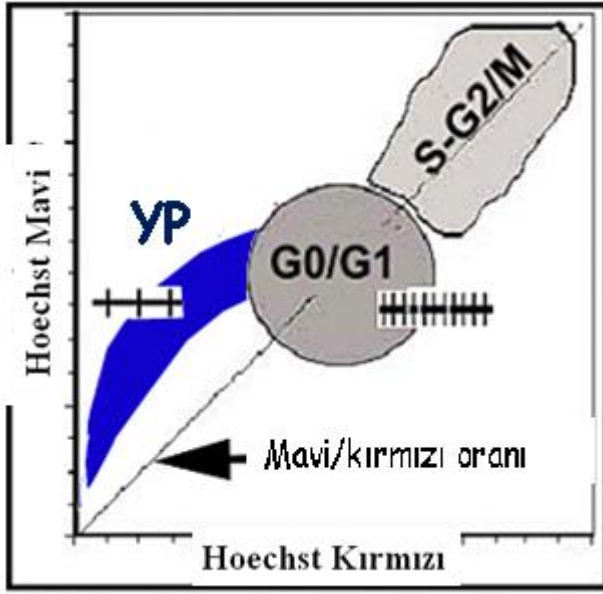
Canlı hücrelerde, sıkıca paketlenmiş Hoechst 33342 molekülleri arasındaki elektronik etkileşimler, 675'nm de sekonder bir yayılıma öncülük eden, renk koyulaştırıcı bir kaymaya

neden olmaktadır. Bir popülasyondaki hücreler, DNA içerik miktarlarına göre Hoechst 33342 boyanması açısından değerlendirilebilmektedirler. (Şekil-5)



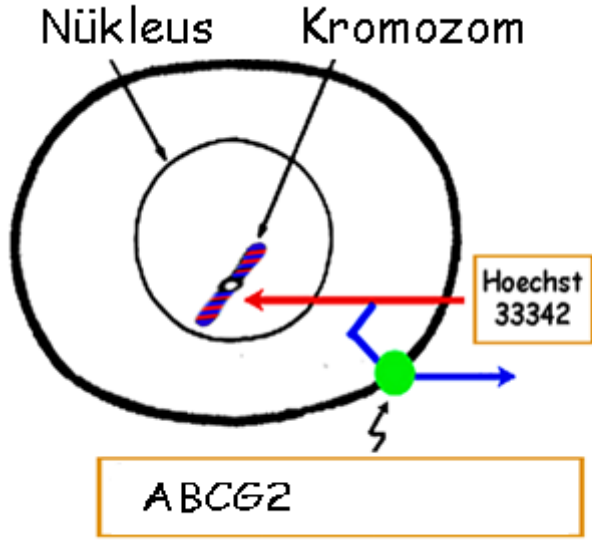
Şekil-5: Bir popülasyondaki hücreler, DNA miktarlarına göre Hoechst 33342 boyanması açısından değerlendirilebilirler. DNA miktarının arttığı S, G2 ve M fazlarında Hoechst 33342 boyanması yüksek saptanmakta, DNA miktarının hücre sayısına eşit olduğu G0 ve G1 fazlarında ise Hoechst 33342 boyanması düşük olmaktadır. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

Yan popülasyon hücreleri, birçok erişkin dokusunda, kök hücre karakteristiği gösteren hücrelerdir. Yan popülasyon olarak tanımlanan bu hücreler, kırmızı ve mavinin iki boyutlu görüntüsünde azalmış Hoechst 33342 boyanması olan hücreler olup, solda yerleşen hücre döngüsünde, G0/G1 fazında yer alan canlı somatik hücrelerin kuyruğunda bulunmaktadır. (Şekil-6)



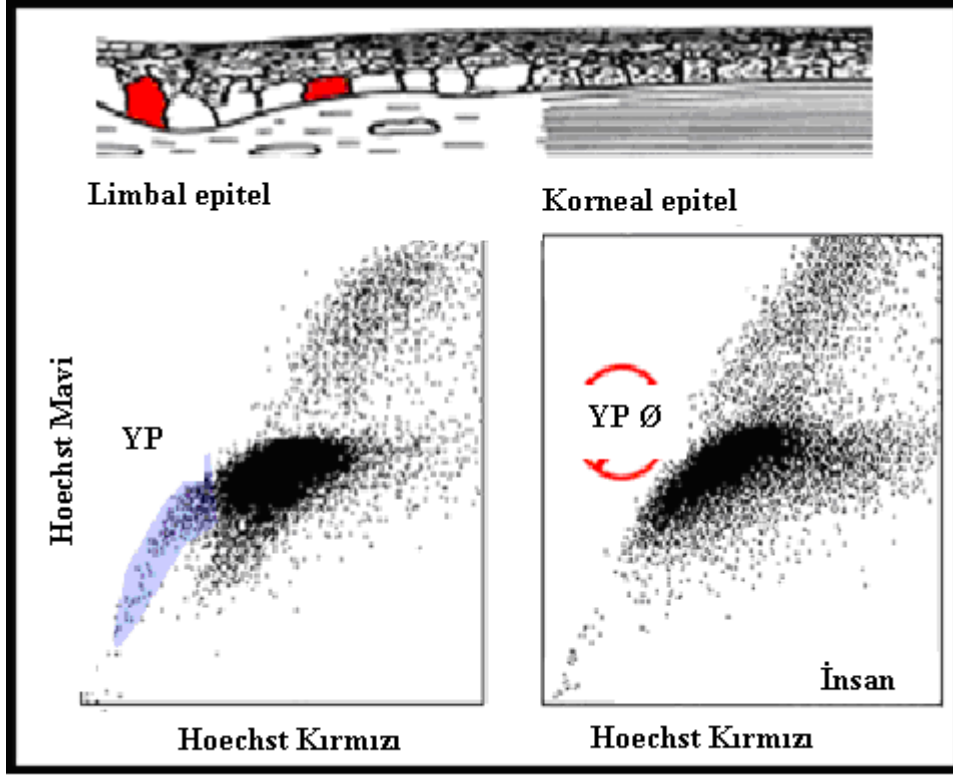
Şekil-6: Hoechst 33342 boyası hücrelerin DNA içeriğini belirlemede kullanılan bir boyadır. Yan popülasyon hücreleri, Hoechst 33342 grafiğinde DNA içeriklerine göre tek kopya DNA içeren G0/G1 fazındaki, canlı somatik hücrelerin kuyruğunda yer almaktadır. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

Yan popülasyon hücrelerinin bu azalmış boya tutulumu, hücre membranında yerleşmiş ABCG2 ilaç direnç taşıyıcı proteini sayesinde, Hoechst 33342 boyasının hücre dışına atılması dolayısıyla gerçekleşmektedir. ABCG2 ilaç direnç taşıyıcı proteini, Hoechst 33342 taşıma pompası olarak tanımlanmıştır (8,15, 17). (Şekil-7)



Şekil-7: Yan popülasyon hücrelerindeki azalmış boya tutulumu, hücre membranında yerleşmiş ABCG2 ilaç direnç taşıyıcı proteininin, Hoechst 33342 boyasını hücre dışına atması sonucu ortaya çıkmaktadır. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

Watanabe ve arkadaşları (16) da yine insan limbal epitelinde, Hoechst 33342 boyasının dışa atılımına dayanarak, yan popülasyon hücrelerinin varlığını göstermişler; kornea epitelinde ise bu hücrelerin yer almadığını bildirmişlerdir. Bir başka deyişle, limbal bölgeden yapılan flow sitometrik analizde, yan popülasyon hücreleri saptanırken, korneal bölgede saptanmamaktadır. (Şekil-8)

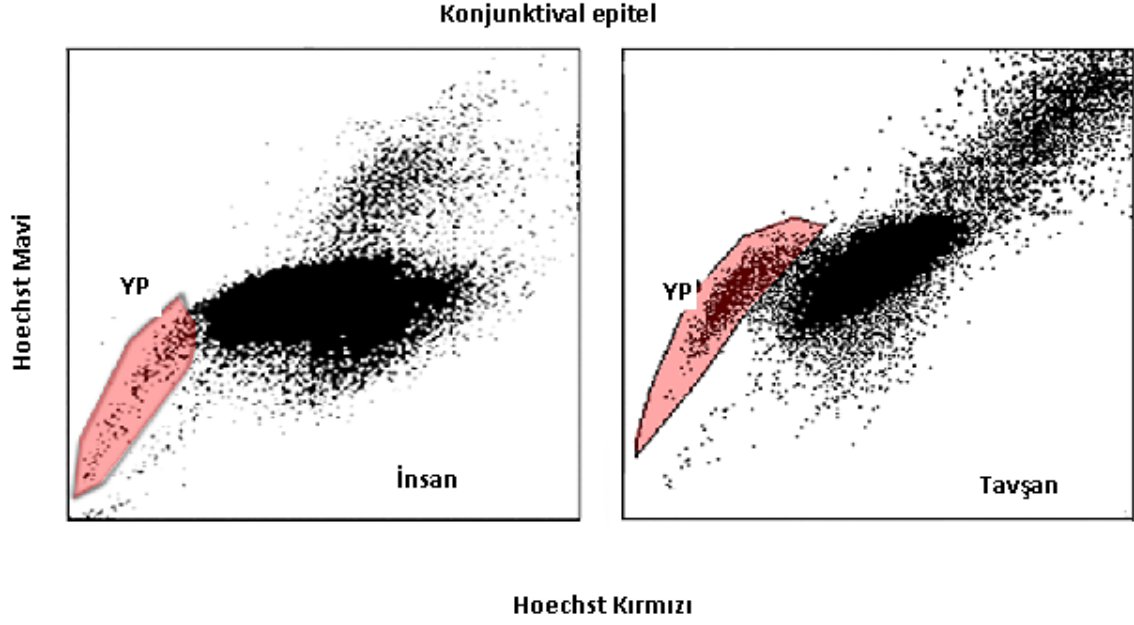


Şekil-8: Flow sitometrik analizde, insan limbal epitelinde Hoechst 33342 boyasının dışa atım kapasitesine bağlı, yan popülasyon hücreleri saptanırken, korneal bölgede saptanmamaktadır. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

Gerçek zamanlı PCR çalışmalarında da, YP hücrelerindeki ABCG2/mRNA oranının, yan popülasyon olmayan hücelere göre istatistiksel anlamlı yüksek olduğu rapor edilmiştir. İmmünlöresan çalışmalarında da, limbal bazal hücrelerde ABCG2 varlığı gösterilmiştir (17).

Budak ve arkadaşları (17), oküler yüzey epitelindeki ABCG2 bağımlı yan popülasyonun, kök hücre ile ilişkili özellik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, insan ve tavşan oküler yüzey epitel hücrelerini, Hoechst 33342 boyası ile inkübe ettikten sonra flow sitometre ile analiz etmişler ve hücreleri biriktirmişlerdir. ABCG2 inhibitörü Fumitromorgin C'ye duyarlı olan yan popülasyonu, limbal ve konjunktival epitelde % 1 oranında pozitif bulurken, korneal epitelde negatif olarak bildirmişlerdir. Yan popülasyon hücrelerinin, flow sitometrik olarak küçük yan dağılma paterni bulunduğunu, kültür sonrası proliferasyonda başlangıç bir gecikme gösterdiklerini, klonojenik kapasite sergilediklerini ve forbol indüklü

diferensiasyona dirençli olduklarını rapor etmişlerdir. Tüm bu özellikleri ile oküler yüzey yan popülasyon hücrelerinin, kök hücre fenotipi ile uyumlu olduklarını rapor etmişlerdir. Oküler yüzeyde, limbal bölge ile benzer şekilde konjunktivada da yan popülasyon hücrelerinin varlığı gösterilmiştir. (Şekil–9)



Şekil–9: Oküler yüzeyde, hem limbal hem de konjunktival epitelde yan popülasyon hücreleri mevcuttur. (Prof. Dr. J. M. Wolosin’in izniyle)

GEREÇ VE YÖNTEM

Doku temini ve işlem süreci:

İnsan limbal ve korneal epitel elde edilmesi:

Korneal transplantasyon için uygun olmayan insan korneaları, mikroskop altında önce PBS (Phosphate buffered saline) (Invitrogen/GIBCO, Grand Island, NY) ile yıkandı ve bu solüsyon içerisinde konjunktiva ve skleradan olabildiğince diseke edildi. Elde edilen kornea ve limbal doku birbirinden ayrıldı.

Ayrıştırılan dokular, DMEM (Dullbeccos modified Eagles medium) / Ham-F12 1:1 (Invitrogen/GIBCO, Grand Island, NY) %1 PS (Penisilin-Streptomisin) (Invitrogen/GIBCO, Grand Island, NY) ile 5mg/1ml olarak hazırlanan Dispaz II 0.82U/mg (Roche, Indianapolis, IN) solüsyonundan 2 ml içerisinde, 16 saat +4 derecede yavaş salınlı (20–30 siklus/dakika) yan yana eğimli harekete bırakıldı.

Diseksiyon mikroskobu altında, iki penset yardımıyla, limbus ve kornea epiteli nazikçe altındaki dokudan ayrıştırıldı. Elde edilen epitel, önce 50 ml konikal tüpe aktarıldı, sonrasında 0.05% 1X Trypsin/EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid)(Invitrogen/GIBCO, Grand Island, NY) ile 37 C derecede, orbital çalkalamada (40 siklus/dakika) 20 dakika inkübe edildi. İlave edilen tripsin miktarı ile aynı miktarda DMEM/F12 (1:1) (Invitrogen/GIBCO, Grand Island, NY) %20 FBS (Gemini Bioproducts, Calabasas, CA) kullanılarak, tripsin nötralize edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu sırasıyla, 100 ve 40 mikrometrelik filtrelerden süzüldü. Saf tekli hücreleri içeren süspansiyondan alınan örnekten, hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. 200 g de santrifüje edilerek hücre peleti elde edildi. SHEM (DMEM / Ham-F12 1:1, %5 FBS (Fetal Bovine Serum), 10ng/ml kolera toksini (Sigma, St. Louis, MO), 10 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor) (Sigma, St. Louis, MO), 5ng/ml selenyum sodyum selenat (Sigma, St. Louis, MO), %0.5 dimetil sulfoksit (Sigma, St. Louis, MO), 5 mikrogram/ml insulin (Sigma St. Louis, MO), 0.5 mikrogram/ml hidrokortizon (Sigma, St.

Louis, MO), 5 mikrogram/ml transferrin (Sigma, St. Louis, MO), 1:1000 fosfoetanolamin (Sigma, St. Louis, MO), 1;1000 etanolamin (Sigma, St. Louis, MO), 50 mikrogram/ml gentamisin (Sigma, St. Louis, MO) ile tekrar süspansiyon haline getirilerek, 37 C derecede %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

İnsan konjunktiva epiteli elde edilmesi:

Klinik kullanıma uygun olmayan insan konjunktivaları elde edildikten sonraki 48 saat içinde işleme tabi tutuldu. İnsan konjunktivası mikroskop altında önce PBS yıkandı ve bu solüsyon içerisinde altındaki stromal dokudan olabildiğince diseke edildi.

Ayrıştırılan dokular, DMEM/Ham-F12 1:1 %1 PS ile 5mg/1ml olarak hazırlanan Dispaz II 0.82U/mg'dan 2 ml içerisinde, 16 saat +4 derecede yavaş salınımlı (20-30 siklus/dakika) yan yana eğimli harekete bırakıldı.

Diseksiyon mikroskobu altında, konjunktiva epiteli, nazıkçe altındaki dokudan ayrıştırıldı. Elde edilen epitel, önce 50 ml konikal tüpe aktarıldı, sonrasında 0.05% 1X tripsin/EDTA ile 37 C derecede, orbital çalkalamada (40 siklus/dakika) 20 dakika inkübe edildi. İlave edilen tripsin miktarı ile aynı miktarda DMEM/F12 (1:1) % 20 FBS kullanılarak tripsin nötralize edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu sırasıyla, 100 ve 40 mikrometrelik filtrelerden süzüldü. Saf tekli hücreleri içeren süspansiyondan alınan örnekten, hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. 200 g de santrifüje edilerek hücre peleti elde edildi. SHEM ile tekrar süspansiyon haline getirilerek, 37 C derecede %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

Tavşan kornea ve limbal epitel elde edilmesi:

Tavşan korneaları, mikroskop altında önce PBS ile yıkandı ve bu solüsyon içerisinde konjunktiva ve skleradan diseke edildi. Elde edilen kornea ve limbal doku birbirinden ayrıldı.

Ayrıştırılan dokular, DMEM/Ham-F12 1:1 %1 PS ile 5mg/1ml olarak hazırlanan Dispaz II 0.82U/mg'dan 2 ml içerisinde, 16 saat +4 derecede yavaş salınımlı (20-30 siklus/dakika) yan yana eğimli harekete bırakıldı.

Diseksiyon mikroskobu altında, limbus ve kornea epiteli, nazıkçe altındaki dokudan ayrıştırıldı. Elde edilen epitel, önce 50 ml konikal tüpe aktarıldı, sonrasında 0.05% 1X tripsin/EDTA ile 37 C derecede, orbital çalkalamada (40 siklus/dakika) 20 dakika inkübe edildi. İlave edilen tripsin miktarı ile aynı miktarda DMEM/F12 (1:1) %20 FBS kullanılarak tripsin nötralize edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu sırasıyla, 100 ve 40 mikrometrelik filtrelerden süzüldü. Saf tekli hücreleri içeren süspansiyondan alınan örnekten, hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. 200 g de santrifüje edilerek hücre peleti elde edildi. DMEM/F12 (1:1) %20 FBS ile tekrar süspansiyon haline getirilerek, 37 C derecede %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

Tavşan konjunktiva elde edilmesi:

Tavşan konjunktiva dokusu, kapak ve bulber konjunktivaları içerecek şekilde diseke edildi. Mikroskop altında önce PBS ile yıkandı ve bu solüsyon içerisinde, altındaki stromal dokudan olabildiğince diseke edildi.

Ayrıştırılan dokular, DMEM/Ham-F12 1:1 %1 PS ile 5mg/1ml olarak hazırlanan Dispaz II 0.82U/mg'dan 2 ml içerisinde, 16 saat +4 derecede yavaş salınımlı (20–30 siklus/dakika) yan yana eğimli harekete bırakıldı.

Diseksiyon mikroskobu altında, konjunktiva epiteli, nazıkçe altındaki dokudan ayrıştırıldı. Elde edilen epitel, önce 50 ml konikal tüpe aktarıldı, sonrasında 0.05% 1X tripsin/EDTA ile 37 C derecede, orbital çalkalamada (40 siklus/dakika) 20 dakika inkübe edilir. İlave edilen tripsin miktarı ile aynı miktarda DMEM/F12 (1:1) %20 FBS kullanılarak tripsin nötralize edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu sırasıyla, 100 ve 40 mikrometrelik filtrelerden süzüldü. Saf tekli hücreleri içeren süspansiyondan alınan örnekten, hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. 200 g de santrifüje edilerek hücre peleti elde edildi. DMEM/F12 (1:1) %20 FBS ile tekrar süspansiyon haline getirilerek, 37 C derecede %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi.

Flöresan boyaların kullanımı ve Flow Sitometre

Elde edilen oküler yüzey epitel hücreleri, %5 CO₂ inkübatöründe 6 saatlik inkübasyon sonrası, 4 ug/ml Hoechst 33342 (Sigma, St. Louis, MO) ile 1-1.5 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun son 30 dakikasında, “Mitotracker deep red”in (Invitrogen, Carlsbad, CA) 25ug/ml stok solüsyonundan 0.5 ul/ml ve Rhodamin 123’ün (Sigma, St. Louis, MO) 50ug/ml stok solüsyonundan 4 ug/ml olacak şekilde kültür ortamına ilave edildi. Toplam 1.5 saatlik inkübasyon sonrasında kültür ortamları, insan hücre kültürleri için SHERM, tavşan hücre kültürleri için ise DMEM/F12 %5 FBS solüsyonu olacak şekilde yenilenerek, Rhodamin 123 boyasının temizlenmesi için 30 dakika daha 37 C derecede %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Daha sonra hücre kültür solüsyonu, PBS ile değiştirildi. PBS ile yıkanan kültür kapları, tripsin ile 37 C derecede 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, eşit miktarda DMEM/F12 %20 FBS kullanılarak tripsin nötralize edildi. Elde edilen hücre süspansiyonundan alınan örnekten, hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Hücreler santrifüje edildi. Elde edilen hücre peleti, %4 FBS ve 2ul/ml Propidium Iodide (PI, Roche, Indiana, IN) içeren HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) solüsyonu ile 10⁶ hücre/ml olacak şekilde tekrar süspansiyon haline getirilerek flow sitometrik incelemeler için hazırlandı. BD Influx hücre ayırıcısı ile ileri saçılım (FSC), yana saçılım (SSC) ve flöresan yayılımları açısından değerlendirildi ve özelliklerine göre biriktirildi.

İnhibitör etkisini gözlemek için yapılan deneylerde, elde edilen oküler yüzey epiteline, 6 saatlik %5 CO₂ inkübatöründe inkübasyon sonrası, 20uM Rezerpin (Sigma, St. Louis, MO) ilave edildi. Rezerpin ile 15 dakika inkübe edilen oküler yüzey epiteline, sonrasında yukarıda tarif edildiği şekilde boyalarla inkübasyon işlemi uygulandı.

Hücre kültürü:

Çeşitli boyalar kullanılarak izole edilen hücreler, koloni yapma yetenekleri ve kültür ortamında davranışları açısından incelenmek üzere, 3T3 hücreleri üzerine ekildi. Ekim yapılan hücre alt gruplarını; yan populasyon hücreleri, yan populasyon olmayan hücreler,

“Mitotracker deep red” bakımından düşük ve yüksek boyanan hücreler ve yine Rhodamin 123 bakımından düşük ve yüksek boyanma gösteren hücreler oluşturmaktaydı.

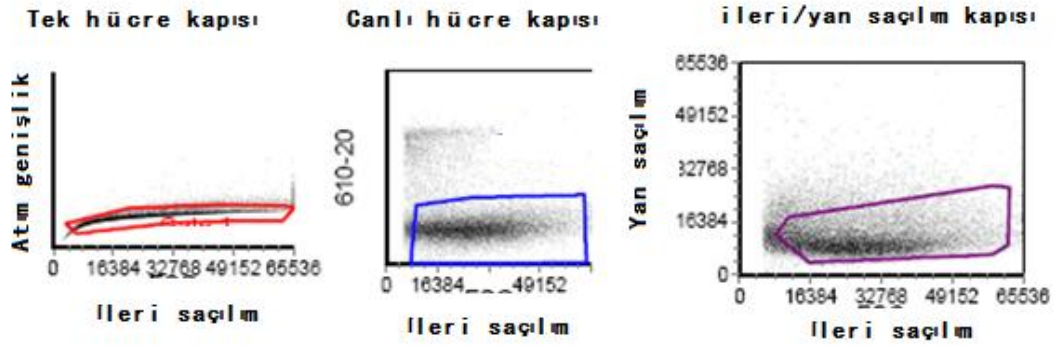
Bu amaçla, gama radyasyona maruz tutulmuş 3T3 hücreleri, 24 saat öncesinde, 1×10^4 hücre/cm² yoğunluğunda, 6 odacıklı kültür kaplarına ve 25cm² kültür kaplarına (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) ekildi. Bir gün sonrasında izole edilen hücreler, bu 3T3 hücrelerini içeren kültür kaplarına ayrı ayrı, 80–160–400 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. İnsan hücre kültürleri için, besi yeri olarak SHEM, tavşan hücre kültürleri için ise DMEM/F12 %20 FBS solüsyonu kullanıldı. Ekim işlemi tamamlanan kültür kapları, 37 C derecede %5 CO₂ inkübatöründe 2 ile 3 hafta arasında inkübe edildi. İnkübasyon süresince kültür ortamları gün aşırı olarak yenilendi.

İnkübasyonun sonunda hücre kültürleri, koloni oluşturma yetenekleri bakımından metanol ile fikse edildikten sonra, “Coomesia brilliant blue” boyası ile boyanarak değerlendirildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Canlı hücreler, FCS Express (DeNovo Software, Toronto, Canada) programı kullanılarak analiz edildi. Enstrümanın voltajı, DNA'nın tek kopyasını içeren ana hücre kohortunu görüntülemek için ayarlandı.

Atım genişlik ve ileri saçılım grafiğinde tek hücreler kapılandı. Kapılanan tek hücreler, PI ileri saçılım grafiğinde canlı oldukları tespit edilenler açısından tekrar kapılandı. Canlı ve tek hücreler, yana ve ileri saçılım grafiğinde, muhtemel lenfositler ve apoptotik hücreler gibi çok küçük hücrelerden ayıklanarak tekrar kapılandı. (Şekil-10)



Şekil-10: Atım genişlik ve ileri saçılım grafiğinde tek hücreler kapılandı. Kapılanan tek hücreler, PI ileri saçılım grafiğinde canlı oldukları tespit edilenler açısından tekrar kapılandı. Canlı ve tek hücreler, yana ve ileri saçılım grafiğinde muhtemel lenfositler ve apoptotik hücreler gibi çok küçük hücrelerden ayıklanarak tekrar kapılandı. (Prof. Dr. J. M. Wolosin'in izniyle)

Bu üç kapı yardımıyla elde edilen hücreler, flöresan içeriklerine göre analiz edildi. Flöresan analizinde, Hoechst 33342 boyasının yanı sıra mitokondriyal aktiviteyi belirlemek üzere, Rhodamin 123 ve "Mitotracker deep red" boyaları kullanıldı.

BULGULAR

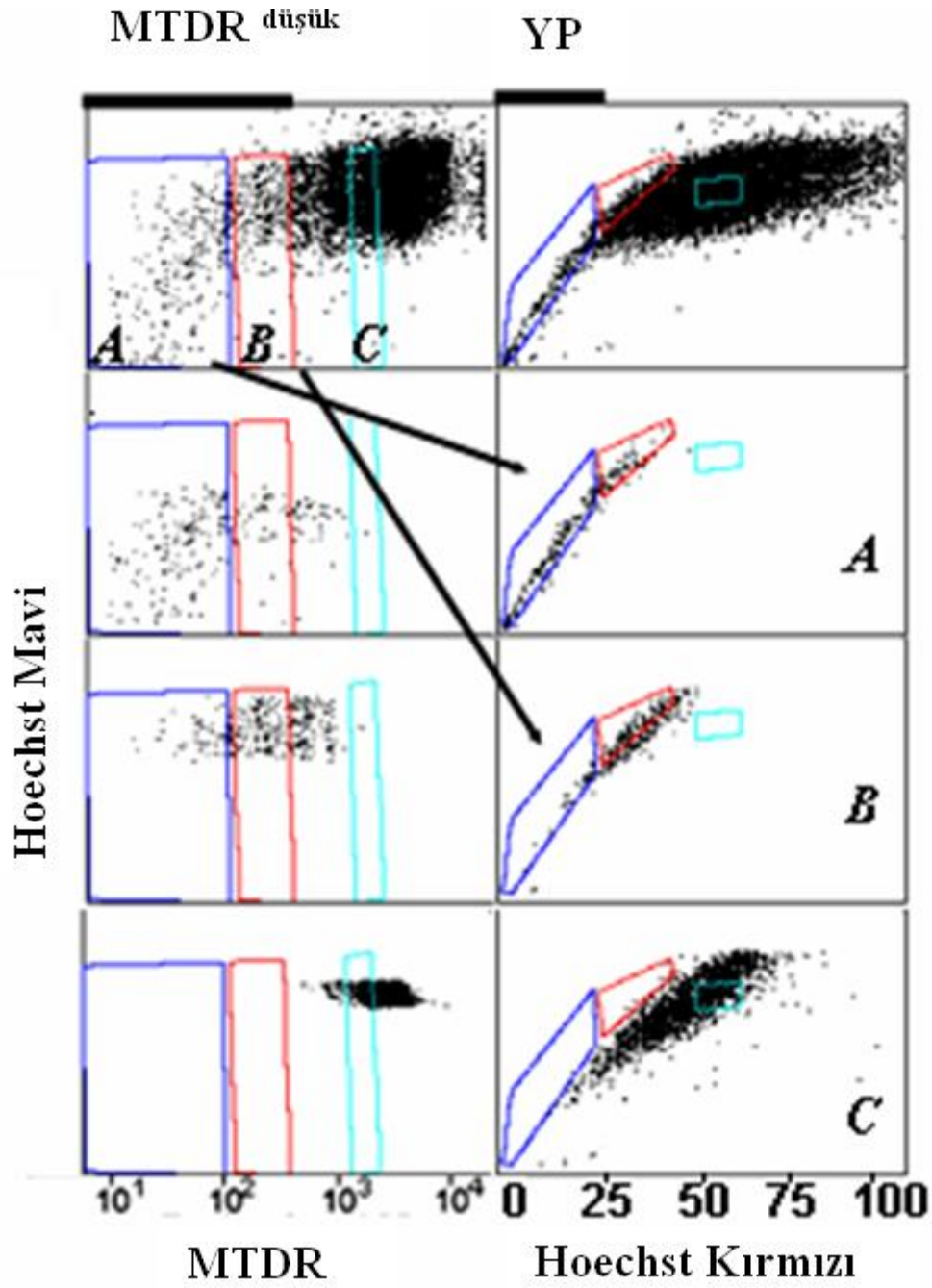
Çalışmamızda, Hoechst 33342 boyası kullanılarak yapılan deneylerde, ortalama YP oranı insan konjunktivasında % 1.15, tavşan konjunktivasında %0.95 ve insan limbusunda ise % 1.79 olarak saptandı. (Tablo-3)

Doku	Deney tekrarı	Yan Popülasyon (%)	MTDR ^{düşük} (%)
İnsan limbusu	2	1.79	5.64
İnsan konjunktivası	1	1.15	3.24
Tavşan konjunktivası	12	0.95	4.19

Tablo-3: Oküler yüzey epitel hücrelerinde türe ve epitel tipine göre deney tekrarı ve YP ve MTDR ^{düşük} fenotipteki hücrelerin ortalama yüzdeleri.

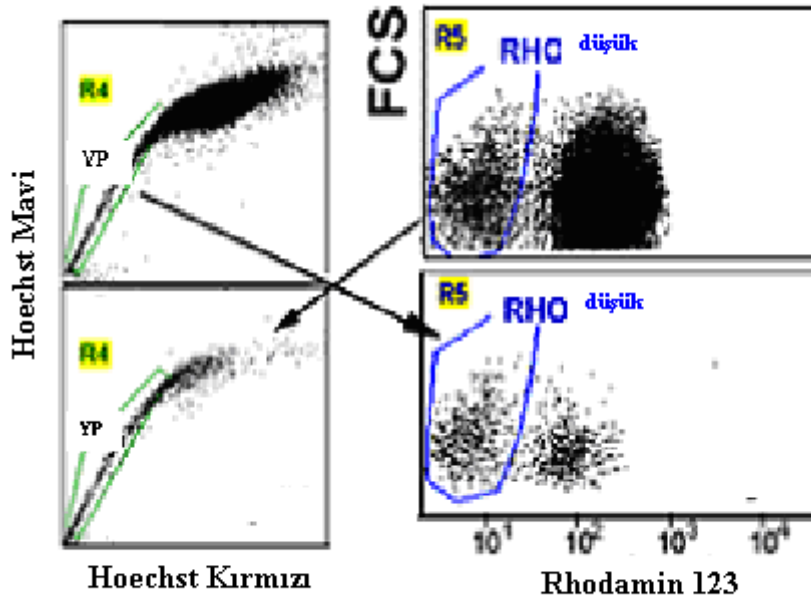
Yan popülasyon başlığı altında izole edilen hücrelerin, 3T3 hücreleri üzerinde koloni oluşturma yetenekleri, yan popülasyon olmayan hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri ile karşılaştırıldı. Yan popülasyon hücrelerinin, koloni oluşturma yeteneklerinin geç başlama özelliği gösterdiği, oluşturdıkları kolonilerin sayısının daha düşük olduğu ancak bu kolonilerin daha sıkı bir koloni yapmak için çoğalmaya devam edebilir olduğu gözlemlendi. Ayrıca tek hücre haline getirilip, kültür ortamına tekrar ekildikten sonra bile yeni koloniler yapabilecek özelliğe sahip oldukları tespit edildi. Tüm bu özellikleri ile YP hücrelerin, kök hücrelerin koloni yapma yetenekleri ile uyumlu oldukları gözlemlendi.

YP, yani kök hücrelerin, yarı sessiz veya sessiz fazda yer aldıkları bilgisi ışığında, bu hücrelerin mitokondriyal konumlarını tanımlanması amaçlandı. Bu amaçla kullanılan mitokondriyal boyalardan olan Rhodamin 123 ve MTDR boyaları ile yapılan deneyler sırasında, her iki boya bakımından da düşük boyanma özelliği gösteren hücreler gözlemlendi. Bu iki hücre popülasyonunu birbiri ile karşılaştırıldıklarında, örtüşmedikleri, bununla beraber MTDR boyası ile düşük boyanma gösteren hücrelerin YP hücrelerini kapsadığı izlendi. (Şekil-11)



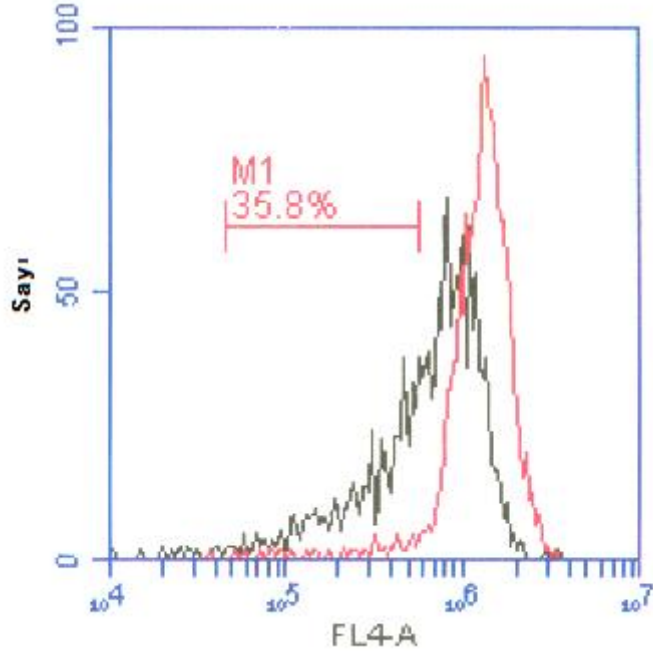
Şekil-11: YP ve MTDR bakımından düşük boyanan hücreler, mavi ve yeşil kapılar ile kapılandığında, YP'unun tamamını içerdikleri ve kuyruğun ana popülasyonla birleşim yerine doğru yayılım gösterdikleri izlenmektedir.

Yapılan deneylerde, YP ile kapılanan Rhodamin 123 grafiğinde YP hücrelerinin Rhodamin 123 bakımından değişken boyanma gösterdiği gözlemlendi. (Şekil-12)



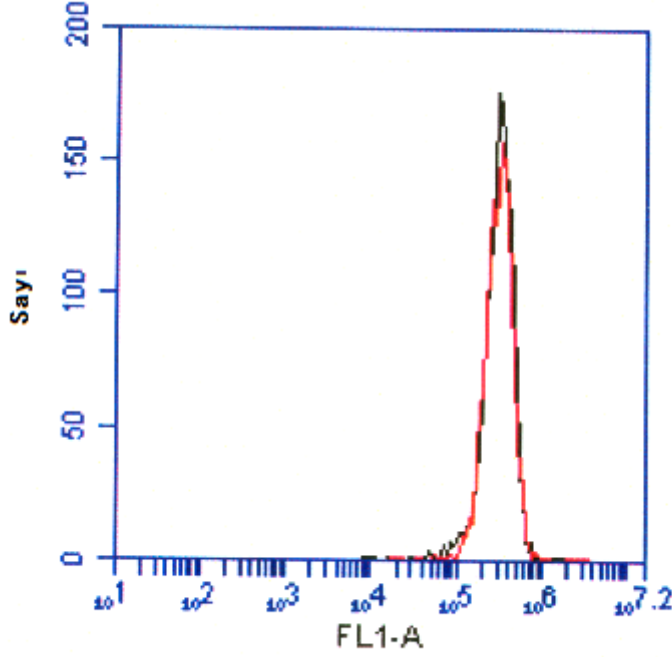
Şekil-12: Tekrarlanan deneylerde, YP ile kapılanan Rhodamin 123 grafiğinde, YP hücreleri, Rhodamin 123 bakımından değişken boyanma göstermekte.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, MTDR boyasının, Hoechst 33342 boyasına benzer bir mekanizma ile bir taşıyıcı yardımıyla uzaklaştırılabileceği varsayımı düşünüldü. Bu varsayımı kanıtlamak adına, deneyler, ABC taşıyıcılarının evrensel bir inhibitörü olan Rezerpin ile tekrarlandı. Rezerpin, etkili bir ABC taşıyıcısı inhibitörü olup, bir çok ABC taşıyıcısını inhibe edebilmektedir. Daha önce hem hematopetik hem de oküler yüzey YP hücreleri ile yapılan çalışmalarda Rezerpin ilavesi ile bu hücrelerin kaybolduğu gösterilmiştir (15,17). Çalışmamızda, Rezerpin ilavesi ile MTDR bakımından düşük boyanma gösteren hücrelerin kaybolduğu tespit edildi. Böylece MTDR boyasının, Rezerpin duyarlı bir ABC taşıyıcısı ile dışa atılımının bulunduğu gösterildi. (Şekil-13)



Şekil-13: Tavşan konjunktivası ile yapılan Rezerpin deneyinde, FL-4 kanalında flöresan veren MTDR boyasının, hücre sayısı-flöresan grafiği. Siyah çizgi herhangi bir inhibitör madde kullanılmaksızın elde edilen durumu göstermekte. Kırmızı çizgi, Rezerpin ile tekrarlanan deneyde flöresan yayılımı bakımından düşük fenotipteki hücre sayısının azaldığına işaret etmekte.

Oysa ki Rhodamin 123 boyanması Rezerpin ilavesinden etkilenmemektedir. (Şekil-14)

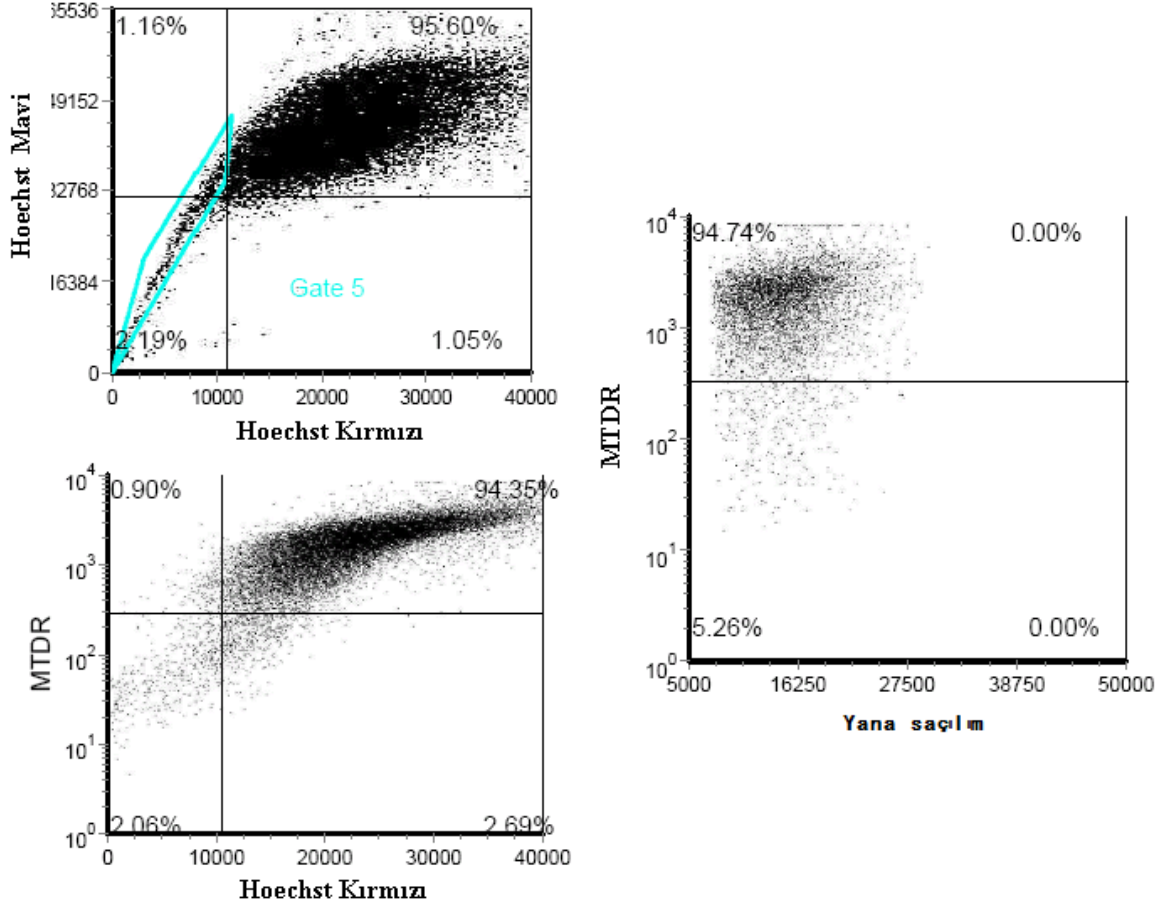


Şekil-14: Tavşan konjunktivası ile yapılan Rezerpin deneyinde, FL-1 kanalında flöresan veren Rhodamin 123 boyasının hücre sayısı flöresan grafiği. Siyah çizgi herhangi bir inhibitör madde kullanılmaksızın elde edilen durumu göstermekte. Kırmızı çizgi, Rezerpin ile tekrarlanan deneyde flöresan yayılımını göstermekte. İki çizgi arasında belirgin bir fark bulunmamakta.

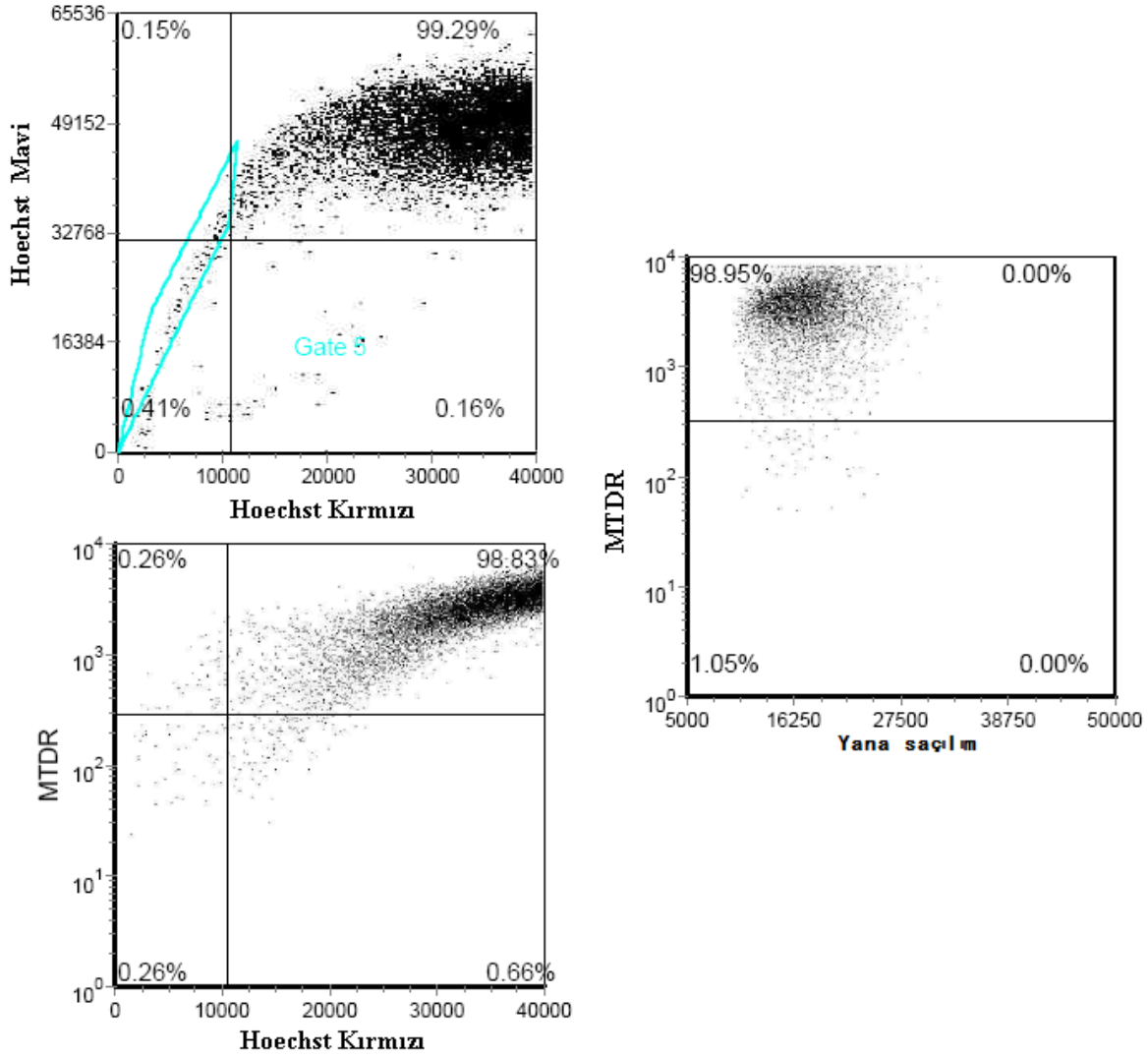
Rezerpin ile, MTDR boyası yüksek boyanma gösteren hücrelerin (MTDR ^{yüksek}), ortalama flöresan değerinin yaklaşık 1/3'ü ve daha az flöresan değerine sahip hücrelerin kaybolduğu gözlemlendi. Bu orandan yararlanarak, orta düzeyde boyanan hücreleri de dışlamak adına, MTDR bakımından düşük boyanma gösteren hücreler (MTDR ^{düşük}), MTDR ^{yüksek} hücrelerin ortalama boya konsantrasyon değerinin 1/5'i ve altında yer alan hücreler olarak tanımlandı. MTDR ^{düşük} hücrelerin oranı, insan konjunktivası ile yapılan deneylerde ortalama % 3.24, tavşan konjunktivaları ile yapılan deneylerde ortalama % 4.19 ve insan limbusları ile yapılan deneylerde ortalama % 5.64 olarak saptandı. (Tablo-1)

Sonuçlarımız, bu dışa atım fenomeninin yan hücre popülasyonunda ortaya çıktığını ve bu kapasiteye sahip hücrelerin kök hücre fenotipi ile uyumlu olduğunu göstermekteydi.

Ayrıca limbal ve kornea hücreleri ile karşılaştırmalı deneylerde, kök hücrelerin, limbusta yer aldığı bilgisi ile uyumlu olarak hem YP hem de MTDR ^{düşük} hücrelerin oranı, korneada belirgin olarak düşük bulundu. (Şekil-15 ve 16)

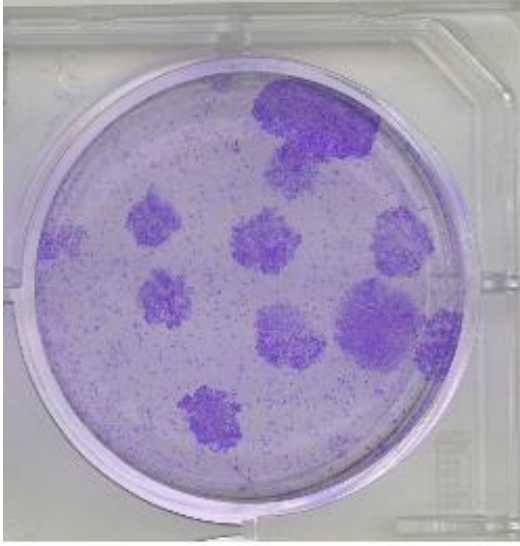


Şekil-15: İnsan limbusunda, hem YP hem de MTDR ^{düşük} hücrelerin varlığı izlenmektedir.

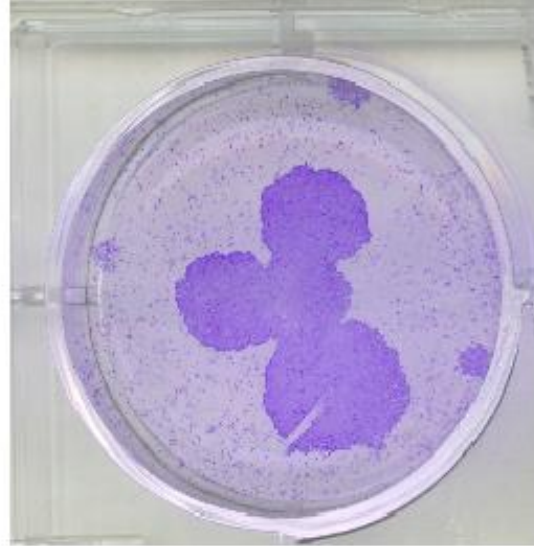


Şekil-16: İnsan korneasında, hem YP hem de MTDR ^{düşük} hücrelerin limbusa göre belirgin oranda düşük olduğu izlenmektedir.

3T3 hücreleri üzerinde, koloni oluşturma yeteneklerini gözlemlemek amacıyla yaptığımız çalışmalarda, tavşan konjunktivasında, MTDR ^{düşük} fenotipteki hücrelerin, koloni yapma yeteneklerinin, MTDR ^{yüksek} fenotipteki hücrelerden daha düşük olduğu gözlemlendi. Bununla beraber gelişmekte olan yeni kolonilerin, MTDR ^{düşük} fenotipteki hücrelerde proliferasyon olmaya daha uzun süre devam ettikleri, daha geniş koloniler yaptıkları ve ikincil koloni yapma yeteneklerinin de daha yüksek olduğu tespit edildi. (Şekil-17a ve 17b)

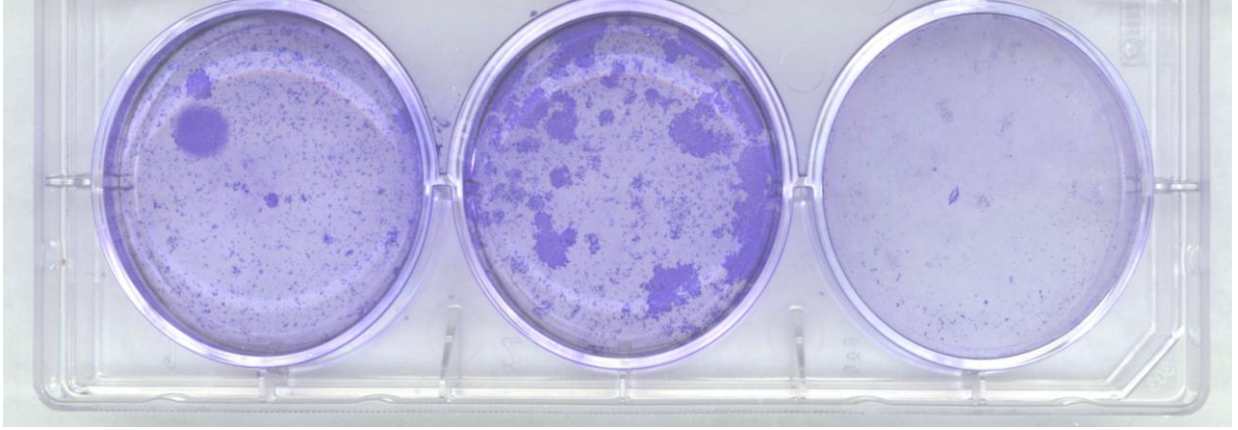


Şekil-17a: MTDR ^{yüksek} fenotipteki hücrelerin oluşturdukları koloniler sayıca fazla ancak küçük ve kenarları düzensiz görünümde.



Şekil-17b: MTDR ^{düşük} fenotipteki hücrelerin oluşturdukları koloniler sayıca az ancak geniş ve kenarları düzenli görünümde.

MTDR ^{düşük} fenotipteki hücrelerin koloni yapma yeteneklerini, Rhodamin 123 statülerine göre incelemek için yaptığımız kültürlerde ise Rhodamin 123 içeriği düşük olan alt grubun 13. günde fikse edilen kültüründe, koloni yapma kapasitesinin, Rhodamin 123 içeriği yüksek alt gruba göre daha düşük oranda olduğu gözlemlendi. (Şekil-18)



Şekil-18: MTDR ^{düşük} fenotipteki hücrelerin koloni yapma yeteneklerini, Rhodamin 123 statülerine göre incelemek için yaptığımız kültürlerin görüntüsü. Sırası ile ilk kültür Rhodamin 123 içeriği düşük olan alt grup, ikinci kültür Rhodamin 123 içeriği yüksek alt grup, üçüncü kültür yalnızca 3T3 hücrelerini içeren kontrol grubu göstermekte. Rhodamin 123 içeriği düşük olan alt grubun 13. günde fikse edilen kültüründe belirlenen koloni yapma kapasitesi, Rhodamin 123 içeriği yüksek alt gruba göre daha düşük.

TARTIŞMA

Limbal kök hücre yetmezliği, limbal bölgenin hasarlanması ile ortaya çıkan karmaşık bir patoloji olup, etiyojisinde kalıtsal ve edinsel bir çok faktör yer alabilmektedir. Hastalığın başlıca klinik bulgularını; korneanın, gereksinim duyduğu rejenerasyon yeteneğini kısmen veya tamamen kaybetmesine bağlı olarak, korneal bulanıklaşma, konjunktivalizasyon ve tekrarlayan epitel hasarları oluşturmaktadır (2,40).

Limbal kök hücre yetmezliği tedavisinde, halen etkin bir tedavi seçeneği mevcut değildir. Korneal nakil başarısı düşük olan bu patoloji için uygulanan çeşitli yaklaşımlar arasında, otolog ve allogreft limbal greft transplantasyonlarının yanı sıra günümüzde giderek önem kazanan kültüre edilmiş limbal kök hücre transplantasyonu yer almaktadır (4).

Limbal kök hücrelerin klinik kullanımları için, bu hücrelerin karakteristik özelliklerinin tanımlanması kaçınılmazdır. Tanımlanan karakteristik özellikler ve çeşitli işaretleyiciler ile beraber kök hücrenin izolasyonu ve beraberinde rekonstrüksiyon amaçlı kullanımı mümkün olabilecektir.

Günümüzde kök hücre tedavileri, tıbbın her alanında giderek önem kazanan konuların başında gelmektedir. Canlı somatik kök hücrelerin izole edilebilmesi, bu hücrelerin karakterize edilmelerinde ve ileride gen tedavilerinde kullanılmalarında çok önemli katkılar sağlayacaktır (75).

Kök hücrelerin izole edilebilmesinin sağlanmasında en önemli konulardan biri, uygun hücre membran antijenlerinin tanımlanması ile birlikte, flöresanla bağlı antikorlarla immün boyamaların yapılabilmesi ve flöresan ile aktive edilmiş hücre ayırma yönteminin kullanılabilmesidir (13).

Hematopoetik kök hücrelere ait belli sayıda işaretleyicilerinin tanımlanması, bu hücrelerin rutin olarak hazırlanmasını kolaylaştırmıştır (76).

Epitelyal kök hücrelerin tanımlanmasında ise işaretleyiciler, halen tartışmalı konumdadır. Hoechst 33342 boyası kullanılarak oküler yüzey epitelyal kök hücrelerin izolasyonu, alternatif bir yöntemdir. Bu yöntemde, temel mekanizmayı, limbal epitelyal kök hücrelerin sahip oldukları ABCG2 taşıyıcısının, DNA'ya bağlanan Hoechst 33342 boyasını hücre dışına atması oluşturmaktadır (17).

Çalışmamızda, Hoechst 33342 boyası ile yapılan oküler yüzey hücre analizlerinde elde edilen YP oranı, literatür ile uyumlu bulundu. Budak ve arkadaşları (17), 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında, oküler yüzey epitelinin ABCG2 bağımlı YP içerdiğini ve bu hücrelerin de kök hücrelerle ilişkili özellikler gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmalarında, boyalarla inkübasyonda insan, tavşan, limbal ve konjunktival dokularından elde edilen taze hücreler süspansiyon halinde kullanılmıştır. Hoechst 33342 boyasının optimum konsantrasyonunu, konjunktiva için 3–3.5 mikromolar, limbus için 2–2.5 mikromolar, optimum inkübasyon süresi ise konjunktiva için 90 dakika, limbus için 60 dakika olarak belirtmişlerdir. Çalışmalarında ortalama YP oranını, % 0.64 ile 1.43 arasında bulmuşlardır. Hoechst 33342 boyası ile saptanan YP' unun, ABCG2 spesifik fumitremorgin C ile %80–90, tüm ABC taşıyıcılarının inhibitörü olan rezepin ile ise %100 oranında inhibe olduğunu göstermişlerdir. Umemoto ve arkadaşları da (77), 2006 yılında yaptıkları çalışmalarında, tavşan kornea ve limbal epitel hücrelerini, YP açısından incelemişlerdir. Çalışmalarında, taze hücreler süspansiyon halinde kullanılmıştır. Hoechst 33342 boyasının kullanım konsantrasyonunu, 3 mikromolar, inkübasyon süresi ise 90 dakika olarak belirtilmiştir. YP oranı, limbal epitelde 0.40 ± 0.19 olarak saptanmıştır. De Paiva ve arkadaşları ise (78), 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında, insan limbal epitel hücrelerini YP açısından incelemişlerdir. Çalışmalarında, hem taze hücreler süspansiyon halinde hem de primer kültürden elde edilen hücreler kullanılmıştır. Hoechst 33342 boyasının kullanım konsantrasyonu, 5 mikromolar, inkübasyon süresi ise 120 dakika olarak belirtilmiştir. YP oranı, taze insan limbal epitelinde 2.90 ± 1.14 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda, oküler yüzey epitelyal kök hücreleri belirlemede, Hoechst 33342 boyası kullanıldı. Deney çalışmalarımızda, doku kaynağını, insan konjunktiva, kornea ve limbal dokuları yanında tavşan konjunktival dokuları oluşturdu. Burada kısıtlı insan hücre teminine ek olarak, yapılan çalışmalarla fenotipik özelliklerinin, insan dokusuna yüksek oranda benzerlik göstermesi

nedeniyle tavşan konjunktival dokuları, destek doku olarak kullanıldı (17). Boyanın kullanım konsantrasyonu, 4 mikromolar düzeyinde, inkübasyonunu ise 1,5 saat olarak uygulandı. Taze elde edilen epitelyal hücreler, 6 saat kadar inkübe edildikten sonra yıkandı ve yapışma gösteren hücreler, tripsinize edilmeden, kendi hücre kültür kaplarında, çeşitli boyalar ile inkübe edildi. Tüm inkübasyonların bitiminden sonra, tripsin ile muamele ile elde edilen hücre süspansiyonu, flow sitometrik olarak incelendi. Bu şekilde elde edilen örneklerde tespit ettiğimiz YP oranı, özellikle insan dokularında Budak ve arkadaşlarının (17) çalışmalarında belirttikleri değerden yüksek miktarda idi. Bu sonuç doğrultusunda, flow sitometrik değerlendirme öncesinde, 6 saatlik inkübasyonun bazal hücrelerin yapışmalarına olanak sağlayarak, bazal epitelde yer aldığı bilinen kök hücrelerin daha yüksek oranda izole edilmesine katkıda bulunabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda, Hoechst 33342 boyası kullanımının yanı sıra, oküler yüzey kök hücrelerinin metabolik aktivitelerini belirlemek amacıyla, Rhodamin 123 ve MTDR boyaları kullanıldı. Yapılan deneyler sırasında, her iki boya bakımından da düşük boyanma özelliği gösteren hücreler gözlemlendi. Bu iki hücre popülasyonu, birbiri ile karşılaştırıldığında, örtüşmedikleri, bununla beraber MTDR boyası ile düşük boyanma gösteren hücrelerin, YP hücrelerini kapsadığı izlendi. MTDR bakımından düşük boyanma gösteren hücreler, YP hücreleri ile çeşitli deneylerde karşılaştırıldığında, YP hücrelerinin çoğunluğunun MTDR^{düşük} hücreler olduğu, MTDR^{düşük} hücrelerin tamamının YP hücrelerini kapsayacak şekilde yerleştiği gözlemlendi.

Elde edilen bu sonuçlardan yola çıkarak, MTDR boyasının da Hoechst 33342 ile benzer bir mekanizma ile hücre dışına atılımının bulunup bulunmadığını belirlemeyi planladık. Bu amaçla ABC taşıyıcılarının evrensel bir inhibitörü olan Rezerpini kullandık. Rezerpin, antihipertansif ve nöroleptik özelliklere sahip, Rauwolfia bitkilerinden elde edilen bir alkaloid olup, bakteriyel dışa atım proteinlerinin ilk tanımlananları arasında yer almaktadır (79). Rezerpin, çoğu çoklu ilaç direnç dışa atım proteinlerinin fonksiyonlarını inhibe etmektedir ancak bu etkinin tam mekanizması halen açıklığa kavuşmamıştır (80). Çalışmamızda, Rezerpin ilavesi sonrası, MTDR^{düşük} hücrelerin belirgin oranda azaldığı izlendi. Bu sonuç, MTDR boyasının, ABC taşıyıcılarından biri ile taşındığını göstermekte idi. MTDR boyası, YP hücrelerini kapsayan MTDR^{düşük} fenotipteki hücrelerin izolasyonuna

olanak tanımaktadır ve bir ABC taşıyıcısı ile taşınmaktadır. Bu taşıyıcının, hücre membranında yerleşmesi muhtemel olduğu gibi, mitokondriyal membranda da yerleşmesi mümkün olabilir. Nitekim Graf ve arkadaşları (81), memeli mitokondriyal membranında yerleşmiş ABC taşıyıcılarından bir tanesinin varlığını göstermişlerdir. MTDR boyasının taşıyıcısı, hücre membranında yerleşim göstermekteyse, ABCG2 veya başka bir alt tiple taşınıp taşınmadığının ayrıca belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla ABCG2 boyasına özgünlüğü yüksek inhibitörlerle deneylerin yapılması gerekmektedir. Bu deneylerde, inhibitörlerin Hoechst 33342 ve MTDR boyalarına etkileri de karşılaştırılmalı olarak değerlendirmelidir.

Çalışmamızda, YP hücrelerini kapsayan ve Rezerpin ile ortadan kayboldukları gözlenen, MTDR ^{düşük} hücrelerin oranı, Hoechst 33342 boyası ile saptanan YP hücrelerinin oranının, 2.81 ile 4.41 katı arasında saptandı. Hoechst 33342 boyası ile yapılan flow sitometrik çalışmalarda saptanan kök hücre oranının, %1 civarında olduğu bilinmektedir (17). Cotarelis 1989 yılında yaptığı çalışmasında, limbal epitelyal hücreleri 3H-Timidin veya bromdeoksoüridin ile işaretleyerek, yavaş döngülü hücreleri incelemiş ve fare kornealarında limbal bazal hücrelerin % 10'unun kök hücre özelliği gösterdiğini bildirmiştir (35). Bizim çalışmamızda MTDR ^{düşük} hücrelerin YP hücrelerine göre yüksek oranda saptanması sonucundan yola çıkılarak, bu yöntemin limbal kök hücre izolasyonunda kullanımı ile, genişletilmiş yan popülasyon izolasyonun mümkün olabileceği düşüncesindeyiz. Genişletilmiş yan popülasyon izolasyonu da gelecekte, minimum doku ile yüksek miktarda kök hücreye ulaşılmasını sağlayarak, kök hücrelerin oküler yüzey rekonstrüksiyonunda kullanımlarında, klinik olarak önemli avantajlar sağlayabilecektir.

MTDR boyasının, kök hücre izolasyonunda genişletilmiş YP seçilmesine olanak sağlaması dışında ayrıca çok önemli özellikleri bulunmaktadır. YP seçilmesinde kullanılan Hoechst 33342 boyası, DNA'ya bağlanan bir boyadır ve inkübasyon süresi 60 ile 90 dakika arasında bulunmaktadır. Ayrıca hücrelerin flow sitometri ile incelenmesi işleminde, boyanın UV ile uyarılması nedeniyle UV lazer kullanımı gerekmektedir. DNA ya bağlanma ve flow sitometrik incelemelerde UV lazer kullanımı, bu boyanın önemli dezavantajlarından olup, bu özellikler hücrelerde DNA hasarına yol açabilmektedir. YP seçilmesinde kullanılacak, ABC taşıyıcılarından biri ile taşınan ve 633 nm'de uyarılan “Mitotracker Deep Red” (MTDR)

boyası ise DNA yerine mitokondride birikmekte, uygulaması yaklaşık 30 dakika gibi kısa bir inkübasyon süresine ihtiyaç duymakta ve UV lazer kullanımına gerek duymamaktadır. Ayrıca gerek UV lazer kullanılmaması, gerekse DNA'da birikim olmaması nedeniyle hücrelerde meydana gelebilecek DNA hasarı riski azalmaktadır. Bu sayede, bu hücrelerin ileride klinik kullanımlarında, genetik materyal hasarına bağlı istenmeyen etkilerden korunmak mümkün olabilecektir.

Ayrıca dünya çapında, flow sitometrilere UV lazer eksitasyonunun erişilebilirliği, yaygın değildir. Bu açıdan değerlendirildiğinde de UV lazere ihtiyaç duymaksızın kullanılabilecek bir kök hücre izolasyon boyası, bu amaçla yapılabilecek çalışma sayısına da katkıda bulunabilecektir.

Tüm bu özellikleri ile MTDR boyası, oküler yüzey kök hücre izolasyonunda, Hoechst 33342 boyasına alternatif yeni bir işaretleyici boyadır.

Çalışmamızda ayrıca kök hücre fenotipik özelliklerini taşıyan YP hücrelerini kapsayan MTDR^{düşük} hücrelerin, fiziksel ve proliferatif özelliklerinin kök hücre fenotipi ile uygunluğu araştırıldı. Oküler yüzey kök hücre fenotipinin özelliği de, diğer kök hücrelere benzer şekilde, boyutlarının küçük olması ve yüksek çekirdek/sitoplazma oranına sahip olmasıdır (10). Flow sitometrik sonuçlarda, MTDR^{düşük} hücrelerin çoğunlukla, düşük ileri saçılım yani küçük hücrelerden oluştuğu, yine düşük yana saçılım yani düşük hücre içi yapıya sahip olduğu gözlemlendi. İzole durumdaki kök hücreler, diğer hücrelerden farklı olarak genellikle, gerekli hormonal sinyaller sağlandığında çoğalmaya başlayabilirler (18). Bir popülasyonun kök hücre açısından durumunun değerlendirilmesinde, başlangıç dönem klonojenik kapasitenin kriter olarak alınması iyi bir seçenek olmayıp, çoğalmaya uzun süre devam edebilme ve geniş koloni yapma gibi koloni oluşturma özelliklerinin gözlenmesi daha güvenilirdir. Koloni oluşturma yeteneklerini gözlemlediğimiz deneylerimizde, MTDR^{düşük} fenotipteki hücrelerin koloni yapma yeteneklerinin, MTDR^{yüksek} fenotipteki hücrelerden daha düşük olduğu izlendi. Gelişmekte olan yeni koloniler MTDR^{düşük} fenotipteki hücrelerin kültürlerinde çoğalmaya daha uzun süre devam ettiler, daha geniş koloniler yaptılar ve ikincil koloni yapma yetenekleri daha yüksek oldu. MTDR^{düşük} hücrelerin, bu özellikleri de yine çalışmamızda beraber değerlendirdiğimiz YP hücreleri ile uyum göstermekteydi.

Oküler yüzey öncül popülasyonda klonojenik aktiviteyi değerlendirmek amacıyla Umemoto ve arkadaşları (77), tavşan limbal dokularında YP olan ve olmayan hücreleri klonojenik aktiviteleri açısından karşılaştırmışlardır. İn vitro olarak, 10 günde sonlandırdıkları çalışmalarında, YP hücrelerin klonojenik aktivitelerinin olmadığını göstermişlerdir. De Paiva ve arkadaşları (78) ise, ABCG2 taşıyıcısı ile taşınan Hoechst 33342 boyasını kullanarak izole ettikleri insan limbal epitel YP hücrelerini, 3T3 fibroblastları üzerinde kültüre ederek klonojenik kapasitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, Umemoto ve arkadaşlarının sonuçlarına zıt sonuçlar bulmuşlardır. Çalışmalarında, YP hücrelerinin, YP olmayan hücelere göre, klonojenik kapasitelerinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda, MTDR boyanması bakımından alt gruplara ayrılan ve 80–160–400 hücre/cm² olacak şekilde kültür kaplarına ekim yapılan hücrelerin, kültür işlemine kültür süresinin 17. günde son verildi. Bir kısmı fikse edilip koloni oluşumu açısından değerlendirildi, bir kısmı ise sekonder koloni oluşturma açısından tekrar kültüre edilerek gözlemlendi. Primer kültür süresinde, gelişmekte olan yeni koloniler, MTDR^{dusuk} fenotipteki hücrelerde prolifer olmaya daha uzun süre devam ettiler, daha geniş koloniler yaptılar, ikincil koloni yapma yetenekleri daha yüksek oldu. Tüm bu özellikleri ile MTDR^{düşük} fenotipindeki hücreler, kök hücelere ait klonojenik yeteneklere büyük oranda uyum göstermekteydi.

Primer kültür süremizin uzun olmasının, Umemoto ve arkadaşlarının (77) çalışmasında gözlenemeyen öncül hücrelerin geç dönemde başlayan proliferasyon yeteneğini göstermede önemli olduğu kanısındayız. De Paiva ve arkadaşlarının (78), yaptıkları çalışmada, öncül hücrelerin klonojenik aktivitesinin yüksek bulunmasının nedenleri arasında, sonuçların yanıltıcı olarak yorumlanabilmesine yol açan faktörler bulunmaktadır. Bu faktörlerin başında, izolasyon öncesi hücrelerin uzun dönemli kültüre edilmesi (10-14 gün), ve ekilen hücre sayısının yüksek olması (1000/cm²) sayılabilir.

Tüm bulunan sonuçlarımıza dayanarak, MTDR^{düşük} fenotipindeki hücreler, kök hücre bakımından koloni oluşturma yeteneklerine yüksek oranda uyum göstermekteydi.

SONUC

Oküler yüzey kök hücrelerinin tanımlanması, bu hücrelerin kültür ortamında çoğaltılması, direkt transplantasyon ile oküler yüzey rekonstrüksiyonunda kullanılması ve ileride muhtemel gen tedavilerinde uygulanması konularında anahtar rol oynamaktadır.

MTDR boyası ile oküler yüzey kök kök hücreleri tanımlanabilmekte ve izole edilebilmektedir.

MTDR boyası ile, Hoechst 33342 boyasına oranla oküler yüzey kök hücrelerinin tanımlanabilme ve izole edilebilme oranı daha yüksektir.

MTDR boyasının, Hoechst 33342 boyasına oranla hücrelere zarar verme potansiyeli daha düşüktür.

MTDR boyası ile oküler yüzey kök hücreleri analiz ve izolasyonu, Hoechst 33342 boyasına göre, daha ekonomik ve yaygın kullanımı olan aletlerle mümkün olabilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency : Concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. Indian J Ophthalmol. 2000;48:83-92.
2. Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981;21:135-42.
3. Dua HS. Stem cells of the ocular surface: scientific principles and clinical applications. Br J Ophthalmol. 1995;79:968-9.
4. Daniels JT, Dart JKG, Tuft SJ, Khaw PT. Corneal stem cells in review. Wound Repair Regen. 2001;9:483–494.
5. Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, et al. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. Exp Eye Res. 2007;85:845-60.
6. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet 1997; 349:990-993.
7. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, et al. Cultivated corneal epithelial transplantation for ocular surface reconstruction in acute phase Stevens-Johnson syndrome. Arch Ophthalmol. 2001;119:298-300.
8. Du Y. and Funderburgh JL. Culture of Human Corneal Stem cells. Freshney RI., Stacey GN. Auerbach JM. Culture of Human Stem cells. Hoboken, New Jersey; John Wiley & Sons, 2007, 251-276.
9. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. Surv Ophthalmol 2000;44:415-25.
10. Romano AC, Espana EM, Yoo SH, Budak MT, Wolosin JM, Tseng SC. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44:5125-9.
11. Kurpakus MA, Stock EL, Jones JC. Expression of the 55-kD/64-kD corneal keratins in ocular surface epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1990;31:448-56.
12. Lehrer MS, Sun TT, Lavker RM. Strategies of epithelial repair: Modulation o stem cell and transit amplifying cell proliferation. J Cell Sci. 1998;111: 2867–2875.

13. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, et al. Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4028–4033.
14. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996;183:1797-806.
15. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001;7:1028-34.
16. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, et al. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS Lett*. 2004;565:6-10.
17. Budak MT, Alpdogan OS, Zhou M, et al. Ocular surface epithelia contain ABCG2-dependent side population cells exhibiting features associated with stem cells. *J Cell Sci*. 2005;118:1715-24.
18. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:2302-6.
19. Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77:990-4.
20. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*. 1991;66:85-94.
21. Chen LB. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol*. 1988;4:155-81.
22. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by “Mitotracker deep red” 633. *Theriogenology*. 2005;63:2311-22.
23. Rosellini A, Papini S, Giannarini C, Nardi M, Revoltella RP. Human conjunctival epithelial precursor cells and their progeny in 3D organotypic culture. *Int J Dev Biol*. 2007;51:739-43.
24. Daniels JT, Harris AR, Mason C. Corneal epithelial stem cells in health and disease. *Stem Cell Rev*. 2006;2:247-54.

25. Davanger M, Evensen A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature*. 1971;229:560-1.
26. Goldberg MF, Bron AJ. Limbal palisades of Vogt. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1982; 80:155–171.
27. Takács L, Tóth E, Berta A, Vereb G. Stem cells of the adult cornea: from cytometric markers to therapeutic applications. *Cytometry A*. 2009;75:54-66.
28. Secker GA, Daniels JT. Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation. *Stem Cell Rev*. 2008;4:159-68.
29. Meller D, Dabul V, Tseng SC. Expansion of conjunctival epithelial progenitor cells on amniotic membrane. *Exp Eye Res*. 2002; 74:537-45.
30. Revoltella RP, Papini S, Rosellini A, Michelini M. Epithelial stem cells of the eye surface. *Cell Prolif*. 2007; 40:445-61.
31. Lavker RM, Wei ZG, Sun TT. Phorbol ester preferentially stimulates mouse fornical conjunctival and limbal epithelial cells to proliferate in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998; 39:301-7.
32. Wei ZG, Lin T, Sun TT, Lavker RM. Clonal analysis of the in vivo differentiation potential of keratinocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:753-61.
33. Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110:1001–1020
34. Mann I. A Study of epithelial regeneration in the living eye. *Br J Ophthalmol*. 1944;28:26-40.
35. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989;57:201-9.
36. Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*. 1986;103:49-62.
37. Huang AJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32:96-105.
38. Kinoshita S, Friend J, Thoft RA. Sex chromatin of donor corneal epithelium in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1981;21:434-41.

39. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. 1997;88:287-98.
40. Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. *Eye*. 2008 Dec 19. [Epub ahead of print]
41. Espana EM, Grueterich M, Romano AC, Touhami A, Tseng SC. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2002;109:2004-10.
42. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989;96:709-23.
43. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, et al. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2506-2513.
44. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol* 2003;48:631-46.
45. Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, et al. Successful regrafting of cultivated corneal epithelial transplantation using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea* 2003;22:70-71.
46. Tsai RJF, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*. 2000;343:86-93.
47. Wolosin JM, Schütte M, Zieske JD, Budak MT. Changes in connexin43 in early ocular surface development. *Curr Eye Res*. 2002;24:430-8.
48. Li DQ, Chen Z, Song XJ, de Paiva CS, Kim HS, Pfludger sc. Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp Eye Res*. 2005;80:581-90.
49. Papini S, Rosalini A, Revoltella RP, Nardi M, Giannari C. Selective growth and expansion of human corneal epithelial basal stem cells in a three-dimensional-organ culture. *Differentiation*. 2005;73:61-8.
50. Vascotto SG, Griffith M. Localization of candidate stem and progenitor cell markers within the human cornea, limbus, and bulbar conjunctiva in vivo and in cell culture. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288:921-31.
51. Dua HS, Miri A, Alomar T, Yeung AM, Said DG. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: testing the dogma. *Ophthalmology*. 2009;116:856-63.

52. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:3156-61.
53. Dua HS, Joseph A, Shanmuganathan VA, Jones RE. Stem cell differentiation and the effects of deficiency. *Eye (Lond)*. 2003;17:877-85.
54. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9523-8.
55. Kawasaki S, Tanioka H, Yamasaki K, Connon CJ, Kinoshita S. Expression and tissue distribution of p63 isoforms in human ocular surface epithelia. *Exp Eye Res*. 2006;82:293-9.
56. Matic M, Petrov IN, Rosenfeld T, Wolosin JM. Alterations in connexin expression and cell communication in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:600-9.
57. Wolosin JM, Xiong X, Schutte M, Stegman Z, Tieng A. Stem cells and differentiation stages in the limbo-corneal epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2000;19:223-55.
58. Maness LM, Kastin AJ, Weber JT, Banks WA, et al. The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev*. 1994;18:143–159
59. You L, Kruse FE, Völcker HE. Neurotrophic factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:692-702.
60. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:609–642.
61. Touhami A, Grueterich M, Tseng SC. The role of NGF signaling in human limbal epithelium expanded by amniotic membrane culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:987-94.
62. Lambiase A, Bonini S, Micera A, Rama P, Bonini S, Aloe L. Expression of nerve growth factor receptors on the ocular surface in healthy subjects and during manifestation of inflammatory diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1272-5.
63. Qi H, Li DQ, Shine HD, Chen Z, Yoon KC, Jones DB, Pflugfelder SC. Nerve growth factor and its receptor TrkA serve as potential markers for human corneal epithelial progenitor cells. *Exp Eye Res*. 2008;86:34-40.

64. Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells*. 2004;22:355-66.
65. Utheim TP, Raeder S, Olstad OK Utheim OA, et al. Comparison of the histology, gene expression profile, and phenotype of cultured human limbal epithelial cells from different limbal regions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5165-72.
66. Vossmerbaeumer U, Kuehl S, Bieback K, Klüter H, Jonas JB. Cultivation and differentiation characteristics of human limbal progenitor cells. *Tissue Cell*. 2008;40:83-8.
67. Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. *Exp Eye Res*. 2004;79:41-9.
68. Chen Z, Evans WH, Pflugfelder SC, Li DQ. Gap junction protein connexin 43 serves as a negative marker for a stem cell-containing population of human limbal epithelial cells. *Stem Cells*. 2006;24:1265-73.
69. Liu S, Li J, Wang C, Tan D, Beuerman R. Human limbal progenitor cell characteristics are maintained in tissue culture. *Ann Acad Med Singapore*. 2006;35:80-6.
70. Figueira EC, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007;48:144-56.
71. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004;116:769-78.
72. Dua HS, Shanmuganathan VA, Powell-Richards AO, et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche. *Br J Ophthalmol*. 2005;89:529-32.
73. Shanmuganathan VA, Foster T, Kulkarni BB, Hopkinson A, et al. Morphological characteristics of the limbal epithelial crypt. *Br J Ophthalmol*. 2007 Apr;91(4):514-9.
74. Yeung AM, Schlötzer-Schrehardt U, Kulkarni B, Tint NL, Hopkinson A, Dua HS. Limbal epithelial crypt: a model for corneal epithelial maintenance and novel limbal regional variations. *Arch Ophthalmol*. 2008;126:725-6.
75. Goodell MA. Multipotential stem cells and 'side population' cells. *Cytherapy*. 2002;4:507-8.

76. Silvestri F, Banavali S, Baccarani M, Preisler HD. The CD34 hemopoietic progenitor cell associated antigen: biology and clinical applications. *Haematologica*. 1992;77:265-73.
77. Umemoto T, Yamato M, Nishida K, Yang J, Tano Y, Okano T. Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state. *Stem Cells*. 2006;24:86-94.
78. De Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, Pflugfelder SC, Li DQ. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells*. 2005;23:63-73.
79. Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:3202-9.
80. Frempong-Manso E, Raygada JL, DeMarco CE, Seo SM, Kaatz GW. Inability of a reserpine-based screen to identify strains overexpressing efflux pump genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33:360-3.
81. Graf SA, Haigh SE, Corson ED, Shirihai OS. Targeting, import, and dimerization of a mammalian mitochondrial ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB10 (ABC-me). *J Biol Chem*. 2004;279:42954-63.