



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**İNSAN ORBİTAL ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERDE (İOA-MKH) LOSARTAN'IN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SEVINJ EYUBOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. ERAY ATALAY

Eskişehir, 2025



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

**İNSAN ORBİTAL ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERDE (İOA-MKH) LOSARTAN'IN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SEVINJ EYUBOVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ.DR. ERAY ATALAY

Eskişehir, 2025

Proje No: ESOGÜ BAP TYL-2023-2874, TÜSEB A2 32085

ÖZET

Başlık: İnsan Orbital Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerde (iOA-MKH) Losartan'ın Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Losartan'ın kornea yaralanmalarından sonra gerçekleşen stromal miyofibroblast oluşumunu engellediği ve antifibrotik özellikte olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada blefaroplasti ameliyatı sonrasında atık doku olan insan orbital adipoz dokudan izole edilen mezenkimal kök hücreler (iOA-MKH'ler) ile *in vitro* oksidatif stres modeli oluşturularak, Losartan'ın hücre canlılık ve proliferasyon, ROS üretimi ve üç farklı yolak üzerinden fibrozis ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: İlk olarak *in vitro* oksidatif stres modelinde kullanılacak H₂O₂ konsantrasyonu ve Losartan'ın sitotoksik olmayan konsantrasyonu belirlendi. Oluşturulan oksidatif stres modelinde belirlenen Losartan'ın konsantrasyonları analiz edildiğinde oksidatif strese karşı tedavi edici etki gösteren 2, 10, 20 ve 50nM konsantrasyonları belirlendi. Son aşamada oksidatif stres modelinde Losartan'ın iOA-MKH'lerdeki canlılık ve proliferasyon üzerindeki etkisi MTT ile, ROS üretimi flow sitometri ile ve fibrozis ile ilişkili genlerin ekspresyonuna (TGFβR, cGMP, SIRT1, AT2, LOX, VEGF, TGFβ1 ve TGFβ3) olan etkisi ise Real-Time PCR ile analiz edildi.

Bulgular: Losartan'ın iOA-MKH'lerle oluşturulan *in vitro* oksidatif stres modelinde 72. saatte 2nM, 10nM ve 50nM Losartan konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu arttırdığı ve ROS seviyesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. *In vitro* oksidatif stres modelinde 20nM ve 50nM Losartan konsantrasyonlarında VEGF ekspresyonu artarken LOX ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. SIRT1 ve AT2R ekspresyon seviyesi artarken TGFβR'nin Losartan'ın tüm konsantrasyonlarında overeksprese olduğu gözlemlenmiştir. 20nM Losartan konsantrasyonunda cGMP upregüle olmuştur.

Sonuç: Çalışmamızın bulguları Losartan'ın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. Yapılan tez çalışmasında *in vitro* olarak iOA-MK hücrelerinde Losartan'ın antifibrotik etkisini LOX, cGMP, AT2R ve SIRT1 genleri üzerinden gerçekleştirebileceği kanıtlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: mezenkimal kök hücre, losartan, oksidatif stres, kornea, fibrozis.

ABSTRACT

Title: Investigation of Losartan Effects on Human Orbital Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (hOA-MSCs)

Purpose: Losartan is known to inhibit stromal myofibroblast formation after corneal injuries and has antifibrotic properties. In this study, we aimed to investigate the effect of Losartan on cell viability and proliferation, ROS production and expression of fibrosis-related genes through three different pathways by establishing an in vitro oxidative stress model with mesenchymal stem cells (iOA-MSCs) isolated from orbital adipose tissue, a waste tissue after blepharoplasty surgery.

Methods: First, the concentration of H₂O₂ to be used in the in vitro oxidative stress model and the non-cytotoxic concentration of Losartan were determined. When the concentrations of Losartan determined in the oxidative stress model were analyzed, 2nM, 10nM, 20nM and 50nM concentrations showing therapeutic effect against oxidative stress were determined. In the final stage, the effect of Losartan on the viability and proliferation of iOA-MSCs in the oxidative stress model was analyzed by MTT, ROS production was analyzed by flow cytometry and the effect on the expression of fibrosis-related genes (TGFR, cGMP, SIRT1, AT2, LOX and VEGF) was analyzed by Real-Time PCR.

Results: Losartan increased cell proliferation and decreased ROS levels at 2nM, 10nM and 50nM Losartan concentrations at 72 hours in the in vitro oxidative stress model induced by iOA-MSCs. In the in vitro oxidative stress model, VEGF expression increased and LOX expression decreased at 20nM and 50nM Losartan concentrations. SIRT1 and AT2R expression levels increased while TGFβR was overexpressed at all concentrations of Losartan. At 20nM Losartan concentration, cGMP was upregulated.

Conclusion: The findings of our study showed that Losatan showed concentration and time-dependent changes. In the thesis study, it was proved that the antifibrotic effect of Losatan in OA-MK cells in vitro can be realised via LOX, cGMP, AT2R and SIRT1.

Keywords: mesenchymal stem cell, losartan, oxidative stress, cornea, fibrosis

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	
ETİK BEYAN.....	
TEŞEKKÜR	
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kornea.....	5
2.1.1.Kornea epiteli.....	6
2.1.2. Bowman zarı	6
2.1.3.Kornea stroması	6
2.1.4. Descemet zarı.....	6
2.1.5. Kornea endoteli.....	8
2.2. Kornea Yaralanmaları	8
2.3. Kornea Yara İyileşmesi.....	11
2.4. Kök Hücreler	14
2.5. Losartan	17
2.6. Fibrozis ve Oksidatif Stres.....	20
3. YÖNTEMLER	23
3.1. Deney Protokolü	23
3.1.1. Deney grupları	23
3.1.2. Hücrelerin izolasyonu, kültür edilmesi, çoğaltılması ve karakterizasyonu.....	23
3.1.2.1. İnsan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iOA-MKH'ler) izolasyonu ve kültüre edilmesi	23
3.1.2.2. iOA-MKH'lerin immunofenotipik karakterizasyonu.....	24
3.1.2.3. iOA-MKH'lerin farklılaştırma analizi	24
3.1.2.4. iOA-MKH'lerin immunofloresan işaretleme ile immunohistokimyasal karakterizasyonu.....	26
3.1.3. İn vitro oksidatif stres modeli'nin oluşturulması	27
3.1.3.1. iOA-MKH'lere Losartan'ın konsantrasyonunun belirlenmesi.....	27

3.1.3.2. iOA-MKH'lere oksidatif stres modelini oluşturmak için hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)'nin konsantrasyonunun belirlenmesi.....	27
3.1.3.3. İn vitro oksidatif stres modeli'nde Losartanın etkisinin belirlenmesi.....	28
3.1.3.4. Oksidatif stres tayini için reaktif oksijen türleri (ROS) testi.....	28
3.1.3.5. iOA-MKH'de TGFβ1 protein analizi.....	29
3.1.3.6. qRT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizi	29
3.2. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (iOA-MKH'lerin) İzolasyonu ve Kültürü.....	32
4.2. iOA-MKH'lerin İmmunofenotipik Olarak Karakterize Edilmesi.....	32
4.2.1. iOA-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu	32
4.2.2. iOA-MKH'lerin karakterizasyonu için farklılaşma analizleri	32
4.3. iOA-MKH'lere Losartan'ın Konsantrasyonunun Belirlenmesi	35
4.4. iOA-MKH'lere Oksidatif Stres Modelini Oluşturmak İçin Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)'in Konsantrasyonunun Belirlenmesi	35
4.5. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) ile Oksidatif Stres Modeli Oluşturulan iOA-MKH'lere Losartan Uygulanması	36
4.6. Oksidatif Stres Tayini İçin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Testi	37
4.7. qRT-PCR Yöntemi ile mRNA Düzeyinde Gen Ekspresyon Analizi	38
4.8. iOA-MKH'de TGFβ1 protein analizi	42
5. TARTIşMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
7. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	52
8. EKLER DİZİNİ	69
EK-1. Etik Kurul Kararı	
EK-2. Turnitin Raporu	
9. ÖZGEÇMİř.....	77
10. YAYINLAMAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan korneası ve histolojisinin şeması.	6
Şekil 2.2. Korneal yara iyileşme süreci ve skar oluşumunun genel şematik görüntüsü.	13
Şekil 2.3. Losartanın iki boyutlu (2B) kimyasal yapısı.	17
Şekil 4.1. İzolasyon sonrasında ve kültürdeki iOA-MKH hücrelerinin faz-kontrast invert mikroskop görüntüleri.....	31
Şekil 4.2. iOA-MKH'lerin 3.pasaj'da flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu.....	32
Şekil 4.3. iOA-MKH'lerin immunohistokimyasal boyamalar ile karakterizasyon deneyleri.....	34
Şekil 4.4. iOA-MKH'lere LST'nin 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat uygulama sonrası MTT testi ile sitotoksik etkisinin belirlenmesi.....	35
Şekil 4.5. iOA-MKH'lerde oksidatif stres modelini oluşturmak için H ₂ O ₂ 'nin 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µM konsantrasyonlarının MTT ile hücre canlılık analizi.....	36
Şekil 4.6. iOA-MKH'lerde oksidatif stres modelini oluşturduktan sonra LST'nin tedavi edici etkisini belirlemek için 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat maruz bırakıldıktan sonra MTT testi ile hücre canlılık analizi.	37
Şekil 4.7. iOA-MKH'lerde oksidatif stres modelini oluşturduktan sonra LST'nin tedavi edici etkisini belirlemek için 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat LST'a maruz bırakıldıktan sonra ROS analizi ile reaktif oksijen türlerinin seviyesinin belirlenmesi.	38

Şekil 4.8. iOA-MKH’lerde oksidatif stres modelini oluşturduktan sonra LST’nin etkisini belirlemek için 2 nM, 10 nM, 20 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda 72 saat maruz bırakıldıktan sonra TGFBR1, cGMP, SIRT, AT2, LOX, VEGF TGFβ1 ve TGFβ3 genlerinin ekspresyon analizi.....	42
Şekil 5.1. LST’nin antifibrotik etkisinin grafiksel özeti..	50



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AT1	:Anjiotensin II tip 1
ARA	:Anjiotensin reseptör antagonistleri
ARB	:Anjiyotensin II reseptör blokeridir
AT2	:Anjiotensin II tip 2
cGMP	:Siklik guanozin monofosfat
ECM	:Ekstraselüler matriks
FGF	:Fibroblast Büyüme Faktörü
H₂O₂	:Hidrojen peroksit
IL-1	:İnterlökin 1
İOA-MKH	:İnsan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler
LOX	:Lizil oksidaz
LST	:Losartan
MMP	:Matriks metalloproteinaz
NUTRİ	:NutriStem XF Medium
PBS	:Fosfat salin tampon
PDGF	:Platelet kaynaklı büyüme faktörü
RAS	:Renin anjiyotensin sistemin
ROS	:Reaktif oksijen türü
RT-PCR	:Real time polimeraz zincir reaksiyonu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam ediyor)

SIRT1	:Sirtuin
TGFR	:Dönüştürücü büyüme faktörü reseptörü
TGFβ1	:Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
α-SMA	:α-düz kas aktin
μl	:Mikrolitre
μM	:Mikromolar

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kornea beş farklı katmandan oluşan ışık geçirgen bir doku olup optik fonksiyonunu sağlayabilmesi için saydam olması gereklidir. Korneanın yaklaşık %90'ını oluşturan stroma tabakası, birbirine paralel uzanım gösteren kollajen fibrillerinin bir araya gelmesiyle ortaya çıkan lamellalardan meydana gelir. Bu özel dizilim korneaya mekanik güç ve optik netlik sağlar (Ruberti vd., 2008). Kollajen lamelleri arasında bulunan keratositler, kollajenleri ve keratan sülfat proteoglikanları (lumikan, keratikan ve mimekan) sentezleyerek ve biriktirerek stromanın saydamlığı için önemli olan kollajen fibril hizalamasını ve interfibriller aralığı düzenler (Pomin vd., 2015). Korneada epitel bütünlüğünü bozan yaralanmalar sonrası çeşitli pro-inflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinaz gibi proteinler salgılanarak stromaya geçer ve keratosit aktivasyonuna neden olurlar. Bu etkiyle birlikte G0 fazında senesensde olan keratositler kornea hasarı sonucu aktive olarak yara iyileşmesi sırasında ekstraselüler matriks bileşenleri üreten proliferatif özellikli stromal fibroblastlara dönüşebilmektedir (West-Mays vd., 2006). Stromal fibroblastlar ise miyofibroblastlara dönüşerek düzensiz kollajen sentezine ve akabinde skar oluşumuna neden olabilmektedir. Bunun sonucu ışığın optik iletimi engellenir veya ışıktaki kırılmalar ortaya çıkarak kişide görme bozuklukları ortaya çıkarabilmektedir. Kornea enfeksiyonu, travma veya refraktif cerrahi sonrasında keratosit ölümü gerçekleşerek yara iyileşmesi süreci tetiklenip hayatta kalan keratositlerin fibroblastlara dönüşmesiyle skarlaşma meydana gelebilmektedir (Vemuganti vd., 2004).

Son yıllarda kornea yaralanmalarında mezenkimal kök hücre (MKH) tedavileri giderek artmaktadır. MKH'ler adipoz doku, kemik iliği, Wharton jeli, periferik kan gibi çok farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir. Farklı hücrelere farklılaşma yetenekleri ve spesifik immünolojik özellikleri ile doku yenilenmesi için umut vaat eden hücre tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır (Musial vd., 2019). Korneal epitel hücreler yaralanma sonrası çeşitli pro-inflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri, matrix metalloproteinaz gibi proteinler salgırlar ve stromaya geçerek keratosit aktivasyonuna neden olurlar. Keratositler yaralanmaya cevap olarak stromada miyofibroblast dönüşümüne ve sonrasında skar dokusu oluşumuna neden olmaktadır (McKay vd., 2020).

İnsan vücudu, anatomik bölgeye göre çeşitli yağ dokusu depolarına sahiptir. Bu depolar adipoz doku miktarına göre değişir ve farklı biyolojik özelliklere sahip adipoz doku kaynaklı kök hücreler üretebilir. Spesifik koşullar altında kornea epitel soyu, düz kas soyu ve nöronal soy olarak farklılaşabilen ve korneal hastalıkların tedavisinde büyük terapötik potansiyel gösteren insan orbital adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin (iOA-KH) varlığı da doğrulanmıştır. Orbital adipoz dokusundan türetilen hücreler, hücre yüzeyi işaretleyici ekspresyonu, gen ekspresyonu ve çok soylu farklılaşma yetenekleri bakımından kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile benzer özellikler göstermektedir (Chen vd., 2017).

İki tip anjiyotensin II reseptörü vardır. Anjiyotensin II tip 2(AT2) reseptörleri hücre proliferasyonunu engeller ve diferensiasyon, apoptozis, vazodilatasyonu uyarırlar. Anjiyotensin II tip 1 (AT1) reseptörleri vazokonstriksiyon, kalp kontraktilitesi ve böbrek tubuler sodyum geri emiliminde artış, kalp ve damarlardaki hipertrofiye sorumlu dururlar. Anjiyotensin reseptör antagonistleri (ARA) anti-hipertansif ilaç grubudur. ARA grubu ilaçlar arasında losartan (LST), valsartan, irbesartan, telmisartan, candesartan, eprosartan ve olmesartan medoxomil sıralanabilir. Bu ilaçların hepsi AT1 reseptörlerini spesifik olarak engellerler. Bu ilaçlardan biri olan losartan, hipertansiyon, diyabetik nefropati, kalp yetmezliği ve sol ventrikül genişlemesini tedavi etmek için kullanılan oral bir ilaçtır (Simpson vd., 2000).

LST'nin bu etkilerinin yanında, Wilson ve arkadaşları (2022) yaptıkları bir çalışmada LST'nin kornea yaralanmalarından sonra gerçekleşen stromal myofibroblast oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir. Tavşanlarda yapılan çalışmalar alkali yanık yaralanmasından sonra LST ile tedavinin kornea opaklığını ve stromal myofibroblast oluşumunu en etkili şekilde azalttığını göstermiştir. İnsanlarda kimyasal yanıklar için etkili tedavi sağlamak üzere yaralanma sonrası doz ve tedavi zamanlamasını optimize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Sampaio vd., 2022).

LST bir anjiyotensin II reseptörü antagonistidir. Renal fibrozisin engellenmesinde kullanılan ve AT1 reseptör antagonisti olan LST, AT1 reseptörünü bloke ederek AT1 aracılı sentezlenen Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) reseptörünün sentezini ve hücre zarına yerleşimini bloke ederek ortamda artan ve fibroze neden olan TGF β 1'in TGF reseptörüne bağlanmasını engellemektedir. Aynı zamanda Anjiyotensin II proteini AT2 reseptörüne bağlanarak cGMP (siklik guanozin

monofosfat) yolağı üzerinden artan ECM miktarını düşürerek fibrozis oluşumunu engellemektedir (Michel vd., 2013). Fibrozise neden olan diğer bir etken, hücre koruyucu ve reaktif oksijen türü (ROS) dengesini sağlayan proteinlerden olan sirtuin'in (SIRT1) sitoplazmadaki miktarının azalması ile TGF β 1 yolağının aktifleşmesi ve bunun sonucunda fibrozisin gerçekleşmesidir (Li vd., 2010). LOX'un ekspresyon seviyesinin azalması ile LST'nin oksidatif stres ile tetiklenen fibrozisin azalması ile antifibrotik etkisi olabilmektedir.

Bu çalışmada insan gözünden izole edilen orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iOA-MKH'ler) ile *in vitro* oksidatif stres modeli oluşturularak, LST'nin hücre canlılık ve proliferasyon, ROS üretimi ve üç farklı yolak üzerinden fibrozis ile ilişkili genlerin (TGFR, cGMP, SIRT1, AT2, LOX, VEGF) ekspresyonu üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Losartan'ın, kornea yaralanmalarından sonra gerçekleşen stromal miyofibroblast oluşumunu engellediği için antifibrotik özellikte olduğu yapılan çalışmalarla literatürde gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında mezenkimal kök hücre kaynağı olarak insan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Çoğu yağ dokusu mezodermal kökenlidir, ancak göz kapağından elde edilen yağ dokuları, yüz kası ve kıkırdak gibi nöral krest kaynaklı hücreler olarak ektodermal kökene sahiptir ve ayrıca mezodermal soy olarak farklılaşabilir. Göz kapağından elde edilen adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin nöral krest ile benzer özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Wang vd., 2017). Bu hücrelerin kullanılma amacı orbital yağ dokusunun gözdeki rim dokusundaki limbal mezenkimal kök hücreler gibi (Gage vd., 2005) hem mezodermal hem de nöroektodermal kökene sahip olması bakımından zengin olmasıdır (Wang vd., 2017). Aynı zamanda bu doku blefaroplasti ameliyatında atık doku olarak elde edildiğinden hücrelerin elde edilmesi de kolaydır.

Bu tez çalışmasında Losartan'ın antifibrotik etkisini hangi moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

- 1) İnsan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iOA-MKH) izole edilip karakterize edildi.
- 2) iOA-MKH ile *in vitro* oksidatif stres modeli oluşturuldu.
- 3) Oluşturulan *in vitro* modelde Losartan uygulaması yapıldı.
- 4) Losartan'nın hücre proliferasyonuna ve fibrozis ile ilişkili genlere (TGFR, cGMP, SIRT1, AT2R, LOX, VEGF) etkisi araştırıldı.

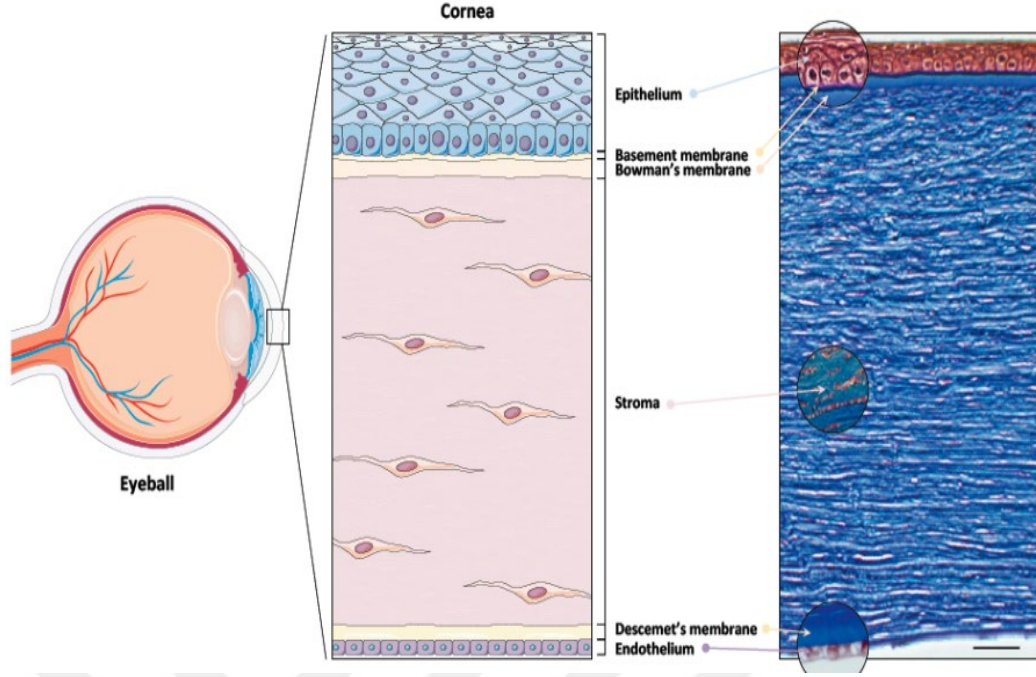


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kornea

İnsan korneası gözün ön kısmında yer alan saydam avasküler bir dokudur. Göz içi içeriğini korumak, ışığın göze girip retinaya ulaşmasını ve optik sistemin kırma gücünün üçte ikisini sağlamak korneanın üç ana amacı olarak bilinmektedir (Sridhar vd., 2018). Kornea saydamlığına lakrimal film bütünlüğü ile bağlantılı olarak epitel yüzeyinin ve kalınlığının düzenliliği, stromadaki kollajen fibrillerinin düzenli olması, çözünür kristallin proteinlerinin üretimi ve stromal keratositler tarafından üretilen proteoglikanların varlığı, hidrasyon seviyesinin endotel tarafından düzenlenmesi ve vaskülarizasyonun olmaması gibi birçok faktör katkıda bulunur (Jester vd., 2008). Kornea çapı yaklaşık 12 mm'dir ve ortalama ön kornea eğriliği yarıçapı yaklaşık 8 mm'dir (Guerin vd., 2021). Kornea kalınlığı merkezde 540 µm, periferde 700 µm civarındadır. Kornea avasküler bir doku olduğundan besin kaynağı (çoğunlukla oksijen ve glukoz) korneoskleral bileşkedeki küçük kan damarlarının yanı sıra aköz hümör ve lakrimal film yoluyla palpebral arterlerden gelir (DelMonte vd., 2011). Ayrıca korneanın derinin 300-600 katı ve dış pulpasının 20-40 katı bir innervasyon yoğunluğuna sahip olduğu ve onu insan vücudundaki en innerve dokulardan biri haline getirdiği tahmin edilmektedir (Beuerman vd., 1996).

Kornea dıştan içe doğru kornea epiteli, Bowman zarı, kornea stroması, Descemet zarı ve kornea endoteli olarak beş tabakaya ayrılmıştır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. İnsan korneası ve histolojisinin şeması (Guerin vd., 2021).

2.1.1. Kornea epiteli

Kornea epiteli, korneanın en dış tabakasıdır ve bu nedenle sürekli olarak çevresel etkilere ve lakrimal filme maruz kalır. Epitel yaklaşık 40-50 μm kalınlığındadır ve gözün en önemli ışığı kırma elemanıdır. Bu tabaka hem bazal epitel hücreleri hem de stromadan keratositler tarafından üretilen bir bazal membran üzerinde olan 5-7 tabakalı ve keratinize olmayan skuamöz epitel hücrelerinden oluşur (DelMonte vd., 2011). Bazal membran 40-60 nm kalınlığındadır ve tip IV kollajen, laminin, perlacan ve nidojenden oluşur (Eghrari vd., 2015). Epitel ayrıca yüzeysel hücreler, kanat hücreleri ve bazal hücreler olarak üç hücre katmanına ayrılabilir. Yüzeysel epitel hücreleri 2-3 düz tabaka oluşturur ve toksinlerin, mikroorganizmaların ve gözyaşlarının epitele girmesini önleyen bir bariyer görevi görür. Bazal hücreler yüzeye doğru göç ederken bölünerek kanat ve yüzeysel epitel hücrelerine farklılaşır (Dua vd., 2000). Epitel hücrelerinin ömrü 7-10 gündür. Epitel, korneoskleral kavşakta bulunan ve kornea epitel kök hücrelerinin bulunduğu limbustan başlayarak merkezci göç yoluyla her hafta kendini tamamen yeniler (Osei-Bempong vd., 2013). Kök hücreler, merkezi korneanın bazal hücre tabakasını oluşturmak üzere göç eden geçici çoğalan hücrelere asimetric olarak bölünür (Guerin vd., 2021).

2.1.2. Bowman zarı

Bowman zarı, epitel hücrelerinin bazal membranı ile kornea stroması arasındaki aselüler bir tabakadır. Esas olarak kollajen tip I, III, V, VI ve xıı'den oluşur, aynı zamanda bazal membrandan gelen kollajen tip IV ve vıı'yı de içerir (Marshall vd., 1991). Bowman zarının kalınlığının yaşla birlikte azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, bu zar travma veya cerrahi olarak çıkarıldıktan sonra skar dokusu oluşturarak iyileşir. (Lagali vd., 2009). Yokluğu görme kaybına veya korneada önemli yapısal değişikliklere neden olmadığı için bu yapının işlevi hala belirsizdir (Jacobsen vd., 1984).

2.1.3. Kornea stroması

Korneanın kalınlığının %90'ını oluşturan stroma, yapısal destek ve gerilme mukavemeti, stabilite ve şeffaflık gibi özellikler sağladığı için önemli bir rol oynar (Eghrari vd., 2015). Esas olarak katmanlı tabakalar halinde düzenlenmiş kollajen tip I ve V fibrillerinden oluşur, ancak kollajen tip III, VI, XII ve XIV de bulunabilir (Meek vd., 2001). Ayrıca bu tabakalar, kondroitin sülfat veya keratan sülfat ile glikozaminoglikanlarla ilişkili proteoglikanlarla çevrilidir ve bu da, korneanın hidrasyonunu ve şeffaflığını sağlar (Ruberti vd., 2011). Stroma, heterojen olarak organize edilmiş 250-300 kollajen lamel içerir. Ön stromada kollajen lifleri iç içe geçerken, orta ila arka stromada birbirine paraleldir (Morishige vd., 2011). Stromanın yenilenmesinden sorumlu olan keratositler, lameller arasında bulunur ve stromanın yaklaşık %20'sini kaplar. Keratositler, kollajen ve proteoglikanlar üretmektedir, böylece hücre dışı matrisin düzenlenmesine ve yara iyileşme sürecine katkıda bulunur (Chen vd., 2015). Korneanın şeffaflığı ve biyokimyasal özellikleri stromanın karmaşık yapısının sonucudur.

2.1.4. Descemet zarı

Descemet zarı, kornea endotel hücreleri tarafından sürekli olarak salgılanan ve endotelin yapısını koruyan bir bazal tabakadır. Kalınlığı doğumda yaklaşık 3 μm 'dir, ancak Bowman zarının aksine yaşla birlikte yaklaşık 10 μm ' ye kadar genişler. Doğumdan önce (in utero) üretilen Descemet zarının ön kısmı (stroma ile ilişkili) liflidir. Bunun aksine, arka kısım (endotel ile ilişkili) doğumdan sonra üretilir ve daha homojendir (Beuerman vd., 1996). Yapısal olarak Descemet zarı esas olarak tip IV ve

VIII kollajen fibrillerini içerir, ancak fibronektin ve lamininlerin yanı sıra kollajen tip III, V ve VII de bulunabilir (Marshall vd., 1991).

2.1.5. Kornea endoteli

İnsan kornea endoteli 5 µm kalınlığında, aköz hümörle ilişkili tek katmanlı bir yapıdır. Endotel hücreleri 20 µm çapındadır ve hücrel membranlarının bazolateral kısmında yer alan iyonik pompalar aracılığıyla kornea stromasının dehidrasyon durumunun korunmasından sorumludurlar (Beuerman vd., 1996). Endotel hücreleri lateral boşluklara ve sıkı bağlantılara sahiptir ve Descemet zarına hemidesmozomlarla bağlanır. Bu da, suyun aköz hümörden stromaya geçişine izin veren bir bariyerin oluşmasıyla sonuçlanır (Stiemke vd., 1991). Kornea epitel hücrelerinin aksine, endotel hücreleri mitoz yeteneğine sahip değildir ve bu nedenle *in vivo* olarak yenilenemezler. Hasarlı hücrelerin yenilenmesi, periferik endotel hücrelerinin merkezci göçüyle sağlanır (Joyce vd., 2005). Başlangıçta 4000 hücre mm² civarında olan hücre yoğunluğu, yaşla birlikte merkezi endotelde yılda yaklaşık %0,6 oranında azalarak yetişkinlerde 2500 hücre mm² yoğunluğuna ulaşır (Abib vd., 2001). Endotelin ana işlevi, kornea saydamlığının kaybına ve dolayısıyla görme kaybına yol açan kornea ödemi oluşumunu önlemek için stromal dehidrasyonu kontrol etmektir. Bu da, bazolateral membranda bulunan Na⁺, K⁺-adenozin trifosfataz (ATPaz) pompalarının sonucudur. Bu pompalar pasif olarak iyonları ve suyu hipotonik olan stromadan hipertonic olan aköz hümöre hareket ettirir (Geroski vd. 1985). Sonuç olarak, iyon ve su değişimleri besinlerin transferine izin verdiği için bu mekanizma kornea saydamlığını korumak ve korneayı beslemek için çok önemlidir.

2.2. Kornea Yaralanmaları

Kör ve/veya görme engelli olan 253 milyon kişinin 6,17 milyonu veya %2,4'ü korneal nedenlere bağlıdır (Porth vd., 2019). Travmatik yaralanma, mikrobiyal enfeksiyonlar, ve bazı kornea ameliyatlarından sonra miyofibroblastların gelişiminin aracılık ettiği korneal skarlar, tüm dünyada görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir. Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre körlüğün başlıca nedenlerinden biri olarak kornea hastalıkları katarakttan sonra ikinci sıradadır ve çok çeşitli enfeksiyöz ve enflamatuvar göz hastalıklarını kapsamaktadır (Whitcher vd., 2001). Korneal travma ve hastalıkların korneal fibroze katkıda bulunduğu ve bunun da önemli görme bozukluklarına yol açabileceği düşünülmektedir (Whitcher vd., 2001).

Korneanın hasar gördüğü durumlarda skar dokusu oluşturmada iyileşmesi önem arz etmektedir. Aksi takdirde görmeyi etkileyebilecek opasitelerin ortaya çıkması söz konusudur (Fini vd., 2005). Korneada epitel bütünlüğünü bozan yaralanmalar sonrası çeşitli pro-inflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinaz (MMP) gibi proteinler salgılanarak stromaya geçer ve keratosit aktivasyonuna neden olurlar. Keratositler kornea hasarı sonucu aktive olarak yara iyileşmesi sırasında ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri üreten proliferatif özellikli stromal fibroblastlara dönüşebilmektedir (West-Mays vd., 2006). Kornea enfeksiyonu, travma veya refraktif cerrahi sonrasında keratosit ölümü gerçekleşerek yara iyileşmesi süreci tetiklenip hayatta kalan keratositlerin fibroblastlara dönüşmesiyle skarlaşma meydana gelebilmektedir (Vemuganti vd., 2004). Kornea yaralanmalarında stromada bulunan keratositler yara iyileşmesi cevabı olarak myofibroblastlara dönüşebilmekte ve sentez etmiş oldukları düzensiz kollajen korneanın ışık geçirgenliğini azaltarak görme kayıplarına sebep olabilmektedir (de Oliveira vd., 2021). Kornea yaralanması gerçekleştiğinde korneanın epitelinde bulunan TGFβ1 stromaya geçerek stromadaki keratositlerin aktif hale gelmesiyle myofibroblasta farklılaşıp fibrozis oluşumuna ve bunun sonucunda kornea opaklaşmasına neden olmaktadır (de Oliveira vd., 2020).

Kornea çeşitli yaralanmalardan etkilenebilir. Kornea yaralanmaları kimyasal, termal, radyasyon ve laserasyon/perforasyon gibi çeşitli yanıklardan oluşur (Saccu vd., 2021). Son çalışmalar, gözde oküler yanık insidansının tüm oküler travmaların %7,7-18'i olduğunu ortaya koymaktadır. (Singh vd., 2013).

Korneadaki kimyasal yanıklar, oküler bir acil durumdur ve tedavi edilse bile yüksek körlük riski taşır (Zhang vd., 2017). Kimyasal yanıklar esas olarak asidik veya alkali ajanlardan kaynaklanır. Alkali yanıklar, alkali ajanların korneaya daha derin nüfuz etmesini sağlayan lipofilik doğası nedeniyle genellikle asitin neden olduğu yanıklardan daha şiddetlidir (Dua vd., 2001). Asit yanıkları korneaya alkali yanıklarından daha az zarar verme eğilimindedir çünkü birçok kornea proteini aside bağlanır ve kimyasal bir tampon görevi görür. Alkali yanıklarına karışan en yaygın maddeler arasında amonyum hidroksit, sodyum hidroksit ve kalsiyum hidroksit yer alır (Ramponi vd., 2017). En yaygın asit yanıklarına ise sülfürik asit ve hidroklorik asit neden olmaktadır (Singh vd., 2013).

Termal yanıklar sık görülmez ve yangınla ilgili yaralanmalarla meydana gelebilir. Ultraviyole (UV) kaynaklarından oluşan radyasyon yanıkları ise ultraviyole keratit ile sonuçlanabilir (Willmann vd., 2017).

Kornea laserasyonları ve perforasyonları benzer yaralanmalardan kaynaklanır ve yaralanmanın derinliğine göre ayırt edilebilir. Kornea laserasyonları stromayı içerirken, kornea perforasyonlarında yaralanma endotele nüfuz eder (Vinuthinee vd., 2015). Meydana gelen kornea laserasyonları zamanı epitel tabakası zarar görür, kornea kolajen lameli parçalanabilir ve bu da yaranın kapatılmasını zorlaştırır (Soeken vd., 2018).

Kornea perforasyonlarına yabancı cisimler, mikrobik keratit ve immun yetmezlik neden olabilir (Choudhary vd., 2018). Kornea perforasyonu gözde, şekilsiz iris ve görme keskinliğinde azalma gibi komplikasyonlara yol açabilir (Willmann vd., 2017). Yaranın kapatılması ve onarılması, enfeksiyon riskini azaltmak ve optimum görme keskinliği için gerekli olan kornea yüzeyini korumak ve skarlaşmayı önlemek için kritik öneme sahiptir. Yaranın uygun şekilde kapatılmaması endoftalmi, epitel büyümesi ve doku ölümü gibi komplikasyonlara neden olabilir (Ratzlaff vd., 2017). Kornea laserasyonları ve perforasyonları, diğer kornea yaralanmaları gibi, korneanın anatomik bütünlüğünü korumak için zamanında tedavi gerektirir (Choudhary vd., 2018).

Yanık hasarı durumunda, epitelyal ve stromal düzeyde enflamatuar yanıtı ortaya çıkarmak için birkaç biyolojik aracı salınır. Tümör Nekroz Faktörü (TNF)- α , epitel dokunun nekrozunu takiben üretilen ilk kemokinlerden biridir ve İnterlökin (IL)-1, IL-6, IL-10, Dönüştürücü Büyüme Faktörü (TGF)- β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (bFGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) salınımını indükler (Bukowiecki vd., 2017). Bu faktörler, yeni damarların oluşumu ve stromal matrisin yeniden şekillenmesi olarak yara iyileşme sürecini başlatmak için monositler, makrofajlar ve nötrofiller gibi enflamatuar hücreleri yaralanma bölgesine yönlendirir (Gao vd., 2019).

Nötrofiller, yaralanma bölgesine sızan en belirgin inflammatuar hücreleri temsil eder ve kemotaksise yardımcı kemokin reseptörleri (CCR1, CCR2 ve CCR3) tarafından yönlendirilir. Nötrofiller, korneanın alkali yanık hasarını takiben IL-1 β , IFN- γ , IL-17 ve MMP-9 içeren pro-enflamatuar sitokinler ve diğer enflamatuar moleküller salgılar (Shimizu vd., 2019). IL-1 β monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından da üretilen esas pro-enflamatuar moleküldür (Yawata vd., 2019). Özellikle, yaralanma süreci sırasında, kornea saydamlığı ile ilgili birkaç genin (kristallinler gibi) ekspresyonu aşağı doğru düzenlenirken, akut faz yanıt genleri (Saa3 gibi) ve pro-inflamatuar genler (Ccl2, Ccl7 ve Ccl9 gibi) indüklenmiştir. Onarım sürecinde, enflamatuar sitokin genleri (IL6st, Ccl7 gibi) ve hücre dışı matris (ECM) yeniden şekillendirme genleri (MMP3, MMP12 gibi) ekspresyonu baskılanırken, pro-fibrojenik genler (Col1a1, Col3a1 gibi) ve interstisyel hücre dışı matris (ECM) sentez genleri (kolajen tip I, III, V ve fibronektin gibi) ekspresyonu yukarı doğru düzenlenmiştir (Chakravarti vd., 2004). Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesi korneal yara iyileşmesi için çok önemlidir (Chan vd., 2013). MMP-2, MMP-12 ve MT1-MMP gibi çeşitli MMP'lerin ekspresyonu, yara iyileşmesini düzenlemek için sitokinler tarafından indüklenir (Ellenberg vd., 2010).

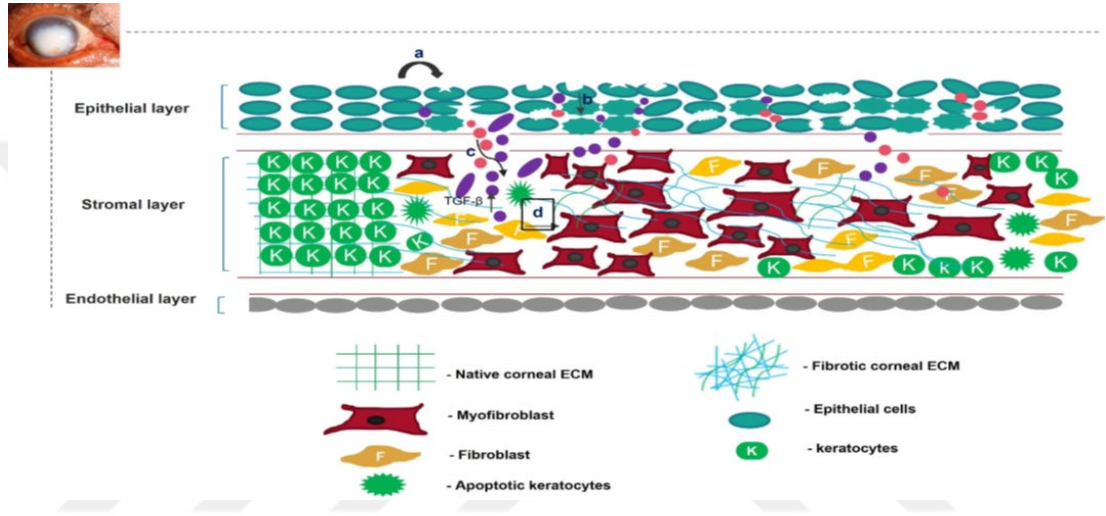
2.3. Kornea Yara İyileşmesi

Korneal yara iyileşmesi hücre ölümü, göçü, çoğalması, farklılaşması ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesini içeren karmaşık bir süreçtir. Kornea beş farklı katmandan oluşan ışık geçirgen bir doku olup gözün optik fonksiyonunu sağlar (Ljubimov vd., 2015). Kornea kalınlığının yaklaşık %90'ını oluşturan stroma tabakası, kolajen fibriller ve proteoglikanlardan oluşan bir matriks içine gömülmüş keratositlerden oluşur (Meek vd., 2015). Stromadaki kolajen fibrilleri lamel adı verilen paralel düzenlenmiş katmanlar halinde döşenmiştir. Lamel düzeni kornea şeklinden sorumludur ve stromal şeffaflıkta sınırlı bir role sahiptir. Stromal şeffaflık görme için gereklidir ve farklı ölçeklerde belirlenir (DelMonte vd., 2011). Stromada yara iyileşmesine ilk yanıt, yaralanma bölgesi içindeki kornea epitelinin altındaki keratositlerin apoptozisidir (Mohan vd., 2013). Korneada epitel bütünlüğünü bozan yaralanmalar sonrası çeşitli pro-inflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinaz gibi proteinler salgılanarak stromaya geçer ve keratosit aktivasyonuna neden olurlar. Bu etkiyle birlikte G0 fazında senesensde olan keratositler kornea hasarı sonucu aktive olarak yara iyileşmesi sırasında ekstraselüler

matriks bileşenleri üreten proliferatif özellikli stromal fibroblastlara dönüşebilmektedir (West-Mays vd., 2006). Stromal fibroblastlar ise miyofibroblastlara dönüşerek düzensiz kollajen sentezine ve akabinde skar oluşumuna neden olabilmektedir. Bunun sonucu ışığın optik iletimi engellenir veya ışıktaki kırılmalar ortaya çıkarak kişide görme bozuklukları ortaya çıkarabilmektedir. Kornea enfeksiyonu, travma veya refraktif cerrahi sonrasında keratosit ölümü gerçekleşerek yara iyileşmesi süreci tetiklenip hayatta kalan keratositlerin fibroblastlara dönüşmesiyle skarlaşma meydana gelebilmektedir (Zieske vd., 2001). Normal kornealarda, keratositler esas olarak G0 fazındadırlar veya çok yavaşlırlar. ECM modellemesi için kollajenleri, KSPG'leri (Lum, Kera ve mimecan) ve enzimleri (kollajenazlar gibi) biyosentezler ve biriktirirler. Bu aktiviteler, kollajen fibrillerinin nispi konumunu ve hizalamasını korur ve kornea dayanıklılığı, şeffaflığı için önemli olan fibril büyümesini ve interfibriller aralığını düzenler. Keratosit enjeksiyonu ile apoptozun azaldığı bildirilmiştir (Yam vd., 2018).

TGF β , fibroblastlar, endotel, epitel, düz kas hücreleri gibi birçok hücre tipi tarafından eksprese edilir. Ayrıca, immün hücreler tarafından salınır ve özellikle inflamasyon ve doku onarımı sırasında yara sıvısında tespit edilmiştir. Her üç TGF β izoformu da yara iyileşmesine katılmasına rağmen, TGF β 1 yara onarım sürecinde baskın bir rol oynarken, TGF β 2 ve TGF β 3'ün embriyonik gelişim ve izsiz yara iyileşmesinde anahtar rol oynadığı gösterilmiştir (Karamichos vd., 2010). TGF β 1 miyofibroblastik farklılaşmadan, korneal fibrotik hastalıkta görülen keratositlerin fibroblastlara ve miyofibroblastlara transdiferansiyasyonundan sorumludur. Miyofibroblast dönüşümü yara kontraksiyonuna ve ardından anormal doku fonksiyonuna yol açar. Miyofibroblastlar, enfeksiyonlara, yaralanmalara karşı korneal stromal yanıtta kritik bir role sahip olan ve aşırı geliştiklerinde korneal skarlaşma fibrozisi üreten alfa-düz kas aktin (SMA) + hücrelerdir. Bu kontraktıl ve opak hücreler büyük miktarlarda düzensiz ekstraselüler matriks (ECM) üretir ve keratosit kaynaklı korneal fibroblastlardan veya kemik iliği kaynaklı fibrositlerden ve diğer hücre tiplerinden epitel, gözyaşı, endotel ve diğer stromal hücrelerden gelen TGF β 1, TGF β 2 ve PDGF'ye yanıt olarak gelişir (Wilson vd., 2020). Mezenkimal hücrelerden veya epitelyal-mezenkimal geçiş yoluyla epitelyal hücrelerden köken alan miyofibroblastlar, α -düz kas aktin (α -SMA) ekspresyonu ile ayırt edilebilir ve kornea yara iyileşmesinde ECM üretimini değiştirebilir. Biyokimyasal ve morfolojik olarak

düz kas hücreleri ile fibroblastlar arasında bir ara madde olan miyofibroblastlar, yaranın kapanması için gerekli olan güçlü bir kasılma kuvveti oluşturur (Tandon vd., 2010). TGF β 1 tarafından oluşturulan miyofibroblastik farklılaşmaya genellikle önemli yara iyileştirici proteinlerin gen ekspresyon artışları eşlik eder. Bu proteinler arasında hücre iskeleti proteinleri (α -SMA), ECM proteinleri (fibronektin, proteoglikanlar ve kolajen) ve ECM bozulmasını engelleyen inhibitör proteinler yer alır. Ayrıca, miyofibroblastik dönüşüm hücre kültüründe fibroblastlar arasında hücre-hücre bağlantısının kaybolmasına yol açar (Tandon vd., 2010).



Şekil 2.2. Korneal yara iyileşme süreci ve skar oluşumunun genel şematik görüntüsü.

Oküler bir yaralanmadan sonra, (a) epitel hücreleri apoptoza uğrar, (b) ve korneal epitel yaralanma nedeniyle epitel hücre belirteçleri kaybolur. Yaralanma Bowman membranını bozarak nötrofillerin (pembe) ve makrofajların (mor) stromal tabakaya invazyonuna ve TGF- β salınımına izin verir. Bu da stromal tabakadaki TGF- β konsantrasyonunu artırır, (c) bu nedenle keratositler apoptoza uğrar, miyofibroblastlara farklılaşır ve kornea ECM'sinin düzenini bozar (Ghosh vd., 2022).

Korneal epitel hücreleri yaralanma sonrası çeşitli pro-inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri, MMP gibi proteinler salgırlar ve stromaya geçerek keratosit aktivasyonuna neden olurlar. Keratositler yaralanmaya cevap olarak stromada miyofibroblast dönüşümüne ve sonrasında skar dokusu oluşumuna neden olmaktadır (McKay vd., 2020). Korneada mezenkimal kökenli yetişkin kök hücrelerin varlığı yapılan çalışmalar ile bilinmektedir. Son dönemlerde mezenkimal kök hücreler (MKH), limbal nişin rehabilitasyonunda ve kornea stromasında skarsız iyileşme

sürecini desteklemede potansiyel kullanımları nedeniyle dikkat çekmiştir (Basu vd., 2014). MKH'ler, hasarlı hücrelerin değiştirilmesinde ve ayrıca immünomodülasyon sağlayan anti-inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasında yerel kök hücreleri destekler (Shukla vd., 2019).

Son yıllarda kornea yaralanmalarında MKH tedavileri giderek artmaktadır. MKH'ler adipoz doku, kemik iliği, Wharton jeli, periferik kan gibi çok farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir. Farklı hücrelere farklılaşma yetenekleri ve spesifik immünolojik özellikleri ile doku yenilenmesi için umut vaat eden hücre tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır (Musial-Wysocka vd., 2019).

2.4. Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileme yeteneğine sahiptir ve çeşitli doku ve organlarda görev yapabilen çeşitli işlevsel olarak aktif hücrelere çoğalabilir ve farklılaşabilir. Kök hücreler kökenlerine göre iki gruba ayrılır: embriyonik kök hücreler (EKH'ler) ve yetişkin kök hücreler (Sun vd., 2014). EKH'ler hemen hemen tüm matür hücre türlerine farklılaşabilir. MKH'ler osteosit, adiposit ve kondrosit dahil olmak üzere mezenkimal hücre türlerine farklılaşabilen hematopoetik olmayan yetişkin kök hücrelerin bir alt kümesidir (Kwon vd., 2016). MKH'ler kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordon kanı, amniyon, koryon, plasenta ve endometriyum gibi çeşitli yetişkin dokulardan izole edilebilir (Alcayaga-Miranda vd., 2015). EKH'ler MKH'lerden daha yüksek potansiyele sahip olsalar da, malignite, immünojenite ve etik sorunlar oluşturma potansiyelleri nedeniyle terapötik uygulamaları sınırlıdır (Rong vd., 2014). EKH'lerdeki bu sorunlarından dolayı MKH'lerin rejeneratif tedavilerde kullanımı daha uygun gözükmemektedir. Ancak, MKH'lerin izolasyonun yapılacağı dokunun eldesi için invazif bir yaklaşım gerekmektedir (Bongso vd., 2013). İnsan pluripotent kök hücreleri (iPKH'ler) temel olarak embriyonik kök hücreleri (iEKH'ler) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreleri ((iPKH'ler) içerir. Embriyonik kök hücreler embriyonun iç hücre kütesinden türetilir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreler somatik hücrelerin yeniden programlanmasından türetilir. Pluripotent kök hücreler, her üç germ katmanından (endoderm, mezoderm ve ektoderm) türetilen hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir. Yetişkin kök hücreleri multipotent veya unipotent olabilir ve dokuya özgü terminal olarak farklılaşmış hücreler üretebilir. Kök hücreler, hasarlı dokuları veya organları değiştirmek ve yenilemek için hücre tedavisinde kullanılabilir (Tian vd., 2023).

MKH'ler başta kemik iliği olmak üzere yağ, dental pulpa, umliikal kord gibi pek çok dokudan izole edilebilir. Fakat bu kaynaklardan hücre temininde bazı dezavantajlar söz konusudur. Örneğin doku dönörünün yaşı, kemik iliği alımını sırasında oluşabilecek komplikasyonlar ve işlemin invazifliği oldukça önemli dezavantajlardır. Ayrıca bu doku kaynaklarından elde elen MKH'ler bulundukları dokulara spesifik birtakım özellikler içerdiğinden kornea rejenerasyonunda kullanımı çok sınırlıdır. Bu nedenle kornea rahatsızlıkları, yanıkları ve kimyasal yaralanmaları olan hastalar için limbal bölgede bulunan hücreler tercih edilen kök hücre kaynağıdır.ve kapasitesinin yenilenmesi nedeniyle en yüksek başarı oranına sahiptir. Limbustan alınan küçük bir biyopsi ile yapılacak *in vitro* kültürler sonucu kornea stroması ve epitelinin yenilenmesi için yeterli miktarda kaynak elde edilebilmektedir (Mitragotri vd., 2019).

Yüzey CD işaretleyicisi genellikle MKH'yi CD34, CD45, CD14 ve HLA-DR eksikliği nedeniyle hematopoetik hücrelerden ayırt etmek için kullanılır. MKH'lerin hematopoetik yüzey belirteçleri, farklılaşma kümesi (CD34, CD45 ve HLADR) ve endotelial belirteç (CD31) ekspresyonlarının negatif olduğu, ancak CD73, CD90 ve CD105 ekspresyonlarının yüksek olduğu bilinmektedir (Mafi vd., 2011). Bu hücreler *in vitro* ortamda yağ, kıkırdak ve kemik hücrelerinin özelliklerine sahip hücreler oluşturmak üzere farklılaşabilir (Gronthos vd., 2003). MKH'ler ayrıca miyofibroblastlar (α -düz kas aktin, düz kas miyozin ağır zinciri), nöronlar (nestin, Tuj-1) ve endotel hücreleri (CD146, CD105) dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) reseptörü ve çeşitli integrin formları gibi bazı belirteçleri de ifade eder (Majumdar vd., 2003).

MKH'ler belirli *in vitro* koşullar altında kemik, yağ, kondrosit, kas, nöron, adacık hücreleri ve karaciğer hücreleri gibi mezodermal, ektodermal ve endodermin çeşitli soylarına farklılaşabilir (Oishi vd., 2009). Farklılaşma ayrıca transkripsiyon faktörlerini içeren genetik olaylar tarafından da düzenlenir. Belirli bir fenotip yoluna farklılaşma, progenitör hücrelerin belirli bir soya farklılaşmasını indükleyebilen bazı düzenleyici genler tarafından kontrol edilebilir (Dennis vd., 2002). Büyüme faktörleri ve indüksiyon kimyasallarının yanı sıra, biyomateryal iskelelerle oluşturulan bir mikro çevre de MKH'lere uygun çoğalma ve farklılaşma koşulları sağlayabilir (Vayssade vd., 2009).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), bazı patolojik hastalıklar veya travma nedeniyle oluşan doku hasarının tedavisi için rejeneratif tıpta yaygın olarak uygulanmaktadır ve kemik iliği, yağ dokuları, deri, kas ve tendon gibi farklı dokulardan elde edilmektedir (Orbay vd., 2012). Kemik iliği en iyi kök hücre kaynağıdır, ancak adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH'ler) klinik alanda alternatif kaynak olabilir, çünkü her ikisi de morfoloji, proliferasyon, multipotensi ve bazı spesifik belirteçler açısından benzer özellikler gösterir. Yağ dokusu blefaroplasti, levator kas rezeksiyonu ve laparotomi gibi çeşitli yöntemlerle karın, meme, kalça, orbita ve uyluk gibi birçok bölgeden bol miktarda kolayca izole edilebilir (Peroni vd., 2008). Bu nedenle AD-MKH'ler, bolluğu ve kolay erişilebilirliği nedeniyle rejeneratif tıp uygulamaları için daha uygun bir kaynaktır (Naderi vd., 2017). Farklı doku bölgelerinden elde edilen AD-MKH'lerin özellikleri farklılıklar gösterir; örneğin, deri altı yağ dokusundan ve karından izole edilen hücrelerin özellikleri birbirine benzemez (Hanson vd., 2013). Özellikle, deri altı yağ dokusundan alınan stromal hücreler karından alınanlara göre daha hızlı çoğalır; ancak hücrelerin farklılaşmasında bölgesel bir fark bulunmamıştır (Van Harmelen vd., 2004). AD-MKH sıklığı ise karında uyluk veya kalça bölgesine göre daha yüksek bulunmuştur (Jurgens vd., 2008).

AD-MKH'ler mezodermal kökenlidir ve adipojenik, osteojenik, kondrojenik, miyojenik, kardiyojenik ve nörojenik farklılaşmanın çeşitli soylarından geçerler (Xu vd., 2003). Çoğu yağ dokusu mezodermal kökenlidir ancak göz kapağından elde edilen yağ dokuları, yüz kası ve kıkırdak gibi nöral krest kaynaklı hücreler olarak ektodermal kökenlidir (Wang vd., 2017) ve mezodermal soy olarak da farklılaşabilir (Crane vd., 2006). Göz kapağından türetilen AD-MKH'lerin nöral krest ile benzer özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Kang vd., 2009).

Orbital yağ dokusu, optik siniri ve ekstraoküler kasları çevreleyen orbita içinde yer alır. Orbital yağ dokusu, hem mezodermal hem de nöroektodermal kökene sahip olması bakımından benzersizdir. Spesifik olarak, üst ve alt kapakların intrakonal yağ ve nazal adyopoz pedleri nöroektodermden türetilirken, üst ve alt göz kapağı merkezi yağ pedleri ve alt göz kapağı lateral yağ pedi mezodermden türetilir (Rohrich vd., 2009). Son yapılan çalışmalar orbital yağ dokusunun yüksek kapasitede kök hücre rezervuarına sahip olduğunu göstermektedir (Chen vd., 2017).

LST sinyal iletim molekülü ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinazın (ERK) aktivasyonunu inhibe ederek dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) beta sinyalini engelleyen bir anjiyotensin II reseptör Tip 1 blokeridir (ARB) (Wilson vd., 2023). Günümüzde, anjiyotensin II reseptör blokerinin fibrozisi azalttığı ve karaciğer, kaslar, akciğerler ve böbrekler dahil olmak üzere yaralı organların işlevini iyileştirdiği ortaya konmuştur. Bu nedenle, bir anjiyotensin II tip 1 reseptör blokeri olan LST umut verici bir antifibrotik ajan olarak ortaya çıkmıştır (Cohn vd., 2007). LST'nin TGF- β 'yı inhibe ettiği spesifik mekanizmalar sinyali tam olarak karakterize edilmemiştir. Bir çalışmada LST'nin SMAD sinyal yollarına müdahale ettiği bulunmuştur (Wu vd., 2016). Başka bir çalışmada LST'nin SMAD2 ekspresyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Yao vd., 2004). Yine başka bir çalışmada LST'nin ERK aktivasyonunun dolaylı inhibisyonu yoluyla TGF- β sinyalini inhibe ettiği bulunmuştur (Wylie-Sears vd., 2014). Bu nedenle, LST'nin TGF- β sinyali üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu SMAD ile ilişkili birkaç mekanizma olabilir. Bununla birlikte, çoğu çalışma, LST'nin diğer dokulardaki yaralanma modellerinde bilinen TGF- β aracılı süreçlerin son etkisini engellediğini göstermiş ve spesifik mekanizmaları araştırmamıştır (Sampaio vd., 2022). Losartan (LST), hemodiyalize giren son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) hastalarında kan basıncını kontrol etmede ve yüksek oksidatif stres belirteci olan OSI'yi azaltmada ve bir antioksidan olan SH gruplarının plazma seviyelerini artırmada da etkili olmuştur (Kayabasi vd., 2013).

Losartan, endometriyal kanser hücrelerinde Ang II aracılı hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azaltır. Losartan ve anti-miR-155 kombinasyonu, tek başına her bir ilaca kıyasla önemli ölçüde daha büyük bir antiproliferatif etkiye sahiptir (Choi vd., 2012).

Siklik guanozin monofosfat (cGMP) ve Nitrik oksit (NO) üretimini artıran ajanlar renal fibrozisin ilerlemesini iyileştirmektedir. Ancak bu sürecin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. cGMP ve cGMP'ye bağlı kinaz I'in (cGKI) antifibrotik etkilerine, hem ERK hem de Smad'a bağlı yol üzerinden TGF β sinyal yolunun düzenlenmesinin aracılık ettiği varsayılmıştır (Schinner vd., 2017).

Fibrotik böbrekte, fibroblastlarda eksprese edilmeyen α -düz kas aktin (SMA) ekspresyonu ile miyofibroblast sayısı artar. Bu nedenle SMA, fibroblastların miyofibroblastlara geçişi için bir belirteç görevi görür ve mezenkimal bir fenotipi gösterir (Eddy vd., 1996). Dönüştürücü büyüme faktörü β 1 (TGF β 1) ve trombosit

kaynaklı büyüme faktörü B'nin her ikisi de fibroblastları miyofibroblastlara farklılaştırabilir. TGF β , kolajenler veya fibronektin dahil olmak üzere ECM proteinlerinin sentezini uyarır ve epitelden mezenkimal geçişi indükler. Sonuç olarak, TGF β fibrotik hastalıkların patogenezinde önemli bir role sahiptir (Cutroneo vd., 2007). Sinyal molekülleri Nitrik oksit (NO) ve Natriüretik peptit (NP) antifibrotik bir potansiyel göstererek perivasküler veya kardiyak interstisyel alanlarda ECM birikiminin azalmasına neden olur. Son yapılan çalışmalar, böbrek fibrozisinin önlenmesinde cGMP yükselmesinin (çözünebilir guanilil siklaz sGC'lerin uyarılmasıyla) veya NP reseptör-A aktivasyonunun rolünü öne sürmüştür (Schinner vd., 2013).

Renin anjiyotensin sistemin (RAS) ana efektör peptidi olan anjiyotensin II (Ang II), hücre büyümesi, fibrozis ve enflamatuar yanıtın düzenlenmesinde rol oynayan pleiotropik bir sitokindir. Ang II iki ana reseptöre bağlanır: AT1 ve AT2 (Mezzano vd., 2001). AT1 reseptörü kalsiyum mobilizasyonu, protein kinazların aktivasyonu ve reaktif oksidan türlerin üretimi dahil olmak üzere çeşitli sinyal iletim yollarının aktivasyonu yoluyla büyümeyi teşvik edici etkilerde, fibrotik, trombotik ve enflamatuar süreçlerde rol oynar (Touyz vd., 2000). AT2'nin biyolojik işlevleri ve sinyal yolu tam olarak bilinmemektedir. AT2 apoptoz ve hücre büyüme inhibisyonunu, vazodilatasyonu indükler ve renal nitrik oksit (NO) üretimini düzenler (Ruiz-Ortega vd., 2001). AT2 sinyali fosfatazları ve kinin/NO/cGMP üretimini aktive eder. AT2 reseptörü insan fetal mezenkimal dokularında her yerde eksprese edilir, ancak doğumdan sonra ekspresyonu azalır. AT2 yara iyileşmesi gibi doku yeniden şekillenmesi veya enflamasyonu içeren patolojik durumlarda yeniden eksprese edilir. Bununla birlikte, renal AT2 hakkında hala bazı tartışmalı veriler bulunmaktadır (Ruiz-Ortega vd., 2003). Anjiyotensin II, AT1 ve AT2 olarak adlandırılan iki farklı hücre yüzeyi reseptörü aracılığıyla sinyal vererek hücre işlevini değiştirir. AT1 reseptörü yetişkin böbreğinde anjiyotensin II etkileri için baskın reseptör tipi olmasına rağmen, AT2 reseptörü basınç natriürezini kontrol ederek ve cGMP üretimini azaltarak böbrek fonksiyonunu etkiler. Ayrıca, fetal organlarda organogenezi düzenlemenin yanı sıra, AT2 reseptörünün deneysel doku hasarı modellerinde veya kültürdeki hücrelerde hücre proliferasyonunu düzenlediği görülmektedir (Morrissey vd., 1999).

Renal fibrozisin engellenmesinde kullanılan ve AT1 reseptör antagonisti olan LST, AT1 reseptörünü bloke ederek AT1 aracılı sentezlenen dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) reseptörünün sentezini ve hücre zarına yerleşimini bloke ederek ortamda artan ve fibroze neden olan TGF β 1'in TGF reseptörüne bağlanmasını engellemektedir. Aynı zamanda Anjiyotensin II proteini AT2 reseptörüne bağlanarak cGMP (siklik guanozin monofosfat) yolağı üzerinden artan ECM miktarını düşürerek fibrozis oluşumunu engellemektedir (Abramicheva vd., 2022).

Sirtuinler, çok çeşitli sinyal molekülleri, transkripsiyon faktörleri, histonlar ve enzimlerle etkileşime girerek çok sayıda hücresel işlev gören NAD + (nikotinamid adenin dinükleotid) bağımlı protein deasetilaz ailesidir (Haigis vd., 2010). Memelilerde SIRT1-7 olarak adlandırılan yedi farklı sirtuin bulunmaktadır. SIRT1'in deasetilasyon veya çeşitli hedef proteinlerle etkileşim yoluyla interstisyel fibroz, inflamasyon ve apoptozu inhibe ederek renoprotektif bir etki gösterdiği bilinmektedir (Hong vd., 2020). Bir anjiyotensin II reseptör blokörü olan LST, kronik böbrek hastalıklarında ilk tedavi seçeneği olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır (Kim vd., 2017). LST'nin renal tübüler hücrelerde SIRT1 ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde indükleyebildiği bulunmuştur. Hayvan çalışmaları da LST ile tedavinin SIRT1'in tübüler ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (Shiota vd., 2012). SIRT1'in hücre döngüsü ve endoplazmik retikulum stresi (ERS) de dahil olmak üzere streslere karşı hücresel yanıtla ilgili çok çeşitli hücresel süreçlerde yer aldığı gösterilmiştir (Pantazi vd., 2015). Buna ek olarak, LST'nin ER stresi üzerindeki inhibitör etkisinin SIRT1'in yukarı regülasyonu yoluyla gerçekleştirdiği de bulunmuştur (Kim vd., 2017).

Tez çalışmasında LST'nin kornea yaralanmalarından sonra gerçekleşen stromal miyofibroblast oluşumunu engellediği için antifibrotik özellikte olup olmadığı göstermek için iOA-MKH'lerinde, LST'nin oksidatif strese durumundaki etkisinin hücre proliferasyonu (MTT), reaktif oksijen türleri (ROS) ve fibrozis ilişkili genlerin ekspresyonu (Real-time PCR) seviyesi incelenmiştir.

2.6. Fibrozis ve Oksidatif Stres

Fibrozis, yavaş gelişen ancak sonunda doku dejenerasyonuna yol açan, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek ve cilt hastalıkları için yıkıcı sonuçları olan bir durumdur (Conte vd., 2022). Yaralanmış dokuların hücre dışı matriks (ECM) alanında aşırı fibröz bağ dokusu birikimi olduğunda ortaya çıkar. Fibrotik yara dokusunun temel

bileşenleri ve fibrotik hücrelerin bir karışımı, özellikle tip I ve III olmak üzere kolajenlerdir. Aşırı fibrotik dokular kalıcı iyileşme sorunları yaşayacak ve bu da organ veya doku işlev bozukluğuna yol açacaktır (Davidson vd., 2020). Pro-fibrotik hücreler ve pro-fibrotik faktörler ve sitokinler (büyüme faktörleri/sitokinler), ECM, doku vasküler hasarı, mekanik gerilim ve oksidatif stres gibi diğer değişkenlerle birlikte çeşitli dokularda fibrozun aracıları arasındadır (Al-Hattab vd., 2022). Doku travması ve fibrojenik bozukluklarda, miyofibroblastlar veya miyofibroblast benzeri hücreleri, ECM'nin kolajen sentezine ve döngüsüne katkıda bulunan birincil hücre tipidir (Schuster vd., 2021). Tüm düz kas hücrelerinin paylaştığı belirteçlerden biri, miyofibroblastlar tarafından ifade edilen alfa-düz kas aktinidir (α -SMA). Mezenkimal hücreler vücutta yaygın olarak bulunur ve hasar sonucu epitelden mezenkimale değişim geçiren kemik iliği hücrelerini ve fibroblastları içerir. Kan dolaşımı yoluyla, tipik olarak monositler olarak yaralanma bölgelerine çekilirler ve daha sonra enflamatuar ve profibrotik sitokinler tarafından makrofajlara dönüşmeye teşvik edilirler (Lafuse vd., 2020). Miyofibroblast bir Şekil 1'de gösterildiği gibi fibrotik hastalıkların ortaya çıkmasında kilit rol oynar. Miyofibroblast, organ fibrozisi, embriyolojik gelişim ve epitelyal malignitelere karşı stromal yanıt gibi çeşitli süreçlerde rol oynar (Meng vd., 2018). Son keşifler miyofibroblastların normal veya patolojik duruma bağlı olarak çeşitli hücre kökenlerinden türemesi bu hipotezi desteklemektedir.

İlerleyici fibrotik hastalık çeşitli farklı faktörler tarafından ortaya çıkarılabilir. Nakillerde minör insan lökosit antijen anormallikleri, yüksek serum kolesterolü, miyokard enfarktüsü, kötü kontrol edilen diyabet, obezite ve hipertansiyon kronik enflamasyona neden olabilecek durumlara birkaç örnektir (Distler vd., 2019). İmmünolojik yanıt ve enflamasyon dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin fibroblastların nasıl farklılaştığını ve aktive olduğunu etkilediği artık anlaşılmıştır (Antar vd., 2023).

ROS üretimi, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve antioksidan savunma arasındaki dengesizlik oksidatif strese yol açarak hücre işlev bozukluğu ve doku hasarına neden olur (Kapoor vd., 2019). Yüksek oranda reaktif oksijen metabolitleri hidrojen peroksit (H_2O_2) içerir, süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($HO\cdot$), Nitrik oksit (NO) ve oksijen (O_2), nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit gibi türevlerini oluşturmak üzere reaksiyona girer. Aşırı ROS üretimi ve/veya tükenmiş antioksidan savunmanın

neden olduğu tüm moleküler, hücresel ve doku sorunları toplu olarak “oksidatif stres” olarak adlandırılır (Casas vd., 2020).

Fibrozisin indüklenmesi için oksidatif stres ve TGF- β 'nın etkileşime girmesi çok önemlidir. TGF- β oksidatif strese neden olan ROS oluşumunu artırdığında ve oksidatif stres latent TGF- β 'yı aktive ettiğinde pozitif bir geri besleme döngüsü oluşur. Ek olarak, Süperoksit ve NO birleştğinde peroksinitrit ve diğer RNS'ler oluşabilir. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) çoğunlukla akciğerde, özellikle de enflamasyon sırasında NO üretir (Antar vd., 2022). İnsan akciğer hücreleri, NO üretimini artırmaya yardımcı olan NOS'un yapısal formlarını yaygın olarak sergiler. Hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve fibroblast sağkalımında rol oynayan çok sayıda gen bu oksidanlar tarafından aktive edilebilir. Kritik hedef hücrelerin mitokondrileri tarafından üretilen ROS'un fibroze aracılık etmede çok önemli bir rol oynadığı görülmektedir. ROS (H_2O_2 ve O_2 gibi) mitokondriyal arızanın bir sonucu olarak üretilir çünkü elektron taşıma zinciri proton pompalamadan ayrılır ve ROS'u sitozole salar (Richter vd., 2016)

Tipik olarak aktive olmuş enflamatuar hücreler tarafından üretildiğinde ve NOX oksidoredüktaz ailesi, enflamatuar olmayanların yanı sıra, hücresel iletişime, istilacı mikroorganizmaların öldürülmesine ve çevredeki konak dokulara zarar verilmesine yardımcı olan O_2 ve H_2O_2 oluşturmak için bir veya iki elektron indirgemesi katalize eder. NOX'un, özellikle de NOX1, NOX2 ve NOX4 izoformlarının pulmoner fibrozis etiyolojisindeki kilit işlevi son araştırmalarla ortaya konmuştur (Kato vd., 2020). TGF- β 1 NOX4'ü indükler ve bu da fibrotik akciğer hastalığında önemli gelişmeleri teşvik eder. Çalışmalar, farelerde bleomisin kaynaklı fibrozisin NOX4'ün genetik olarak bozulmasıyla veya farmakolojik olarak inhibe edilmesiyle önlenebileceğini göstermiştir (Hecker vd., 2014). Fibrozisin ROS ve oksidatif stres ile bağlantısı, hastalığa özgü tedavilere ve TGF- β sinyalizasyonunun engellenmesine ek olarak antioksidan içeren besinlerle veya diyetlerle takviyenin faydalı olacağı anlamına gelir. Üzüm ve bazı meyvelerde doğal olarak bulunan bir antioksidan olan resveratrol, akciğer fibrozu, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve astım gibi solunum rahatsızlıkları için bir tedavi olarak savunulmaktadır (Firuzi vd., 2011).

3. YÖNTEMLER

3.1. Deney Protokolü

Bu tez çalışması sadece hücre kültürü ortamında (insan ya da hayvan vücudu dışında) ve Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ), Tıp fakültesi, Klinik araştırmalar Etik Kurul Başkanlığın (30:13.05.2020) izni ile insan kaynaklı orbital adipoz dokudan izole edilerek gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Deney grupları

Tez çalışmamızda oksidatif stres durumunda Losartan'ın (LST) hücre proliferasyonuna ve fibrosize etkisini değerlendirmek için 4 deney grubu oluşturulmuştur. Bunlar:

1. Grup (Kontrol Grubu): Yalnızca insan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri.

2. Grup (Pozitif kontrol Grubu): H₂O₂ eklenerek oksidatif stres modellenmiş insan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri.

3. Grup (Deney Grubu): Sadece LST eklenmiş insan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri.

4. Grup (Deney Grubu): Hem H₂O₂ ile oksidatif stres modeli oluşturulduktan sonra LST eklenmiş insan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri.

3.1.2. Hücrelerin izolasyonu, kültür edilmesi, çoğaltılması ve karakterizasyonu

3.1.2.1. *İnsan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iOA-MKH'ler) izolasyonu ve kültüre edilmesi*

Bu tez çalışmasında eksplant yöntemi ile izolasyonu yapılabi kültüre alınan ve 3. pasajda karakterizasyonu gerçekleştirilen insan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iOA-MKH'ler) kullanılmıştır. iOA-MKH'lerin izolasyonu için uygulanan eksplant kültür yönteminde öncelikle doku %10 Penisilin/Streptomisin (Pen/St) içeren Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) solüsyonu ile yıkandı ve dokudan küçük kesitler alınarak 6 kuyucuklu kültür plakasının tabanına konularak 15 dakika tabana tutunması için beklendi. 15 dakika sonra üzerine %10 fetal sığır serumu (FBS, Capricorn Scientific), %1 primosin (İnvivogen, California, ABD) ve %1 stabil glutamin (Capricorn

Scientific) içeren NutriStem XF Media eklentisi (Sartorius, Goettingen, Almanya) besiyerinde, %5 CO₂, %5 O₂ ve %95 bağıl nemde ve 37°C inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) çoğaltıldı.

İzolasyonu yapılan iOA-MKH'lerin günlük olarak yapılan faz-kontrast invert mikroskopik (Carl Zeiss, Ax10 Observer D1, Oberkochen, Almanya) morfolojik görüntülerinde eksplant kültür yönteminde dokudan hücre kültür plakasının tabanına doğru hücre hareketleri gözlemlendi, morfolojik analizler yapıldı ve fotoğrafları çekildi. Hücrelerin durumu her gün faz-kontrast invert mikroskobu ile takip edildi ve hücreler %80 konfluensiye ulaştığında pasajlandı. Bunun için eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca⁺² ve Mg⁺² içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, Gibco, Massachusetts, ABD) ile 3 kez yıkama yapıldı. Ardından %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) eklendikten sonra üç dakika inkübatörde bekletildi. Mikroskopta hücrelerin kalktığı belirlendiğinde tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için 1:1 oranından serum içeren besiyeri eklendi. Hücre solüsyonu kapaklı konik tabanlı santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak mikropipet ile homojenize edildikten sonra 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Daha sonra hücre sayımı için pellet 1 ml besiyeri ile resüspanse edildi. Resüspanse edilen hücre örneğinden 20 µl alınarak 1:1 oranında tripan mavisi eklenerek Thoma lamında ışık mikroskobu (Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya) ile hücre sayımı yapıldı. Yapılan sayım ile elde edilen sonuç hücre sayım formülü ile hesaplanarak hücre sayısı elde edildi.

Sayım sonrasında iOA-MKH hücreleri 5x10⁵ hücre/flask olacak şekilde ekim yapılarak kültüre devam edildi. Kalan hücre pelleti ilerideki çalışmalarda kullanılmak için donduruldu. Bunun için; hücreler 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Hücre pelletine daha önce hazırlanıp 2-8°C'de bekletilmiş olan kriyoprezervasyon solüsyonu (%60 DMEM, %35 FBS ve %5 DMSO) eklenerek mikropipet yardımıyla hızla homojenize hale getirildi. Hızlı bir şekilde her kriyovialde 3x10⁶ hücre olacak şekilde viallere paylaştırıldı ve her bir kriyoviale %5 dimetil sülfoksit (DMSO) pipetaj yapılmadan eklendi. Hücrelerin homojenize olması için kriyoviallerin dış kısmından el ile tabanına nazikçe vuruldu. Daha sonra hızla, dondurma işleminden önce kriyoprezervasyon kayıt defterinde belirlenmiş olan yerine

ulaştırılarak -150°C’de derin dondurucuya (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) yerleştirildi.

3.1.2.2. iOA-MKH’lerin immunofenotipik karakterizasyonu

3.1.2.2.1. iOA-MKH’lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

İzole edilmiş iOA-MKH’lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu için üçüncü pasaja kadar çoğaltılan iOA-MKH’lerin pasajlanması gerçekleştirildi. İzole edilmiş iOA-MKH’lerin karakterizasyonu için CD44, CD69, CD73, CD90, CD105, CD19, CD25, CD29, CD34, CD45, CD14, HLA A-B-C ve HLA-DR (Biolegend, Californiya, ABD) antikorları kullanıldı. Pasajlanma işleminin sonuncu aşamasında santrifüj sonrasında süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti soğuk PBS ile yıkandı. Hücre pelleti üzerine 100 µL bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve 2 µL ilgili antikor eklenerek, 30 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak amacıyla santrifüj edildi. Daha sonrasında 300 µL PBS eklenerek flow sitometri cihazında (Agilent Novacyte, 3500) okutuldu. NovoExpress 6.0 software (Agilent, CA, ABD) programında analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.1.2.3. iOA-MKH’lerin farklılaştırma analizi

iOA-MKH’lerin farklılaşma karakterizasyon analizi olarak kemik (osteojenik farklılaşma) ve adipoz (adipojenik farklılaşma) hücre hatlarına farklılaştırıldı.

Adipojenik farklılaşma: Adipojenik farklılaşma için iOA-MKH’lerden 6 kuyucuklu kültür plakasının her kuyucuğuna 15×10^4 sayıda hücre ekildi. Ekilen hücreler kültür kabının %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman içinde %10 FBS, 0.5 mM isobutyl-methylxanthine, 5×10^{-7} M dexamethasone, 10 µg/ml insulin, 200 µM indomethacin 1% penisilin-streptomisin bulunan ve %1 glutamax bulunan DMEM F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) kültür medyumunda 2 hafta kültüre edildi ve kültür sonrası hücre içi biriken lipidler, Oil-Red-O histolojik boyaması yapılarak pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterildi.

Osteojenik farklılaşma: Aynı şekilde osteojenik farklılaşma için de iOA-MKH'lerden 6 kuyucuklu kültür plakasının her kuyucuğuna 15×10^4 sayıda hücre ekildi. Kültüre alınan hücrelerin kültür kabının %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman hücreler içinde %10 FBS, 100 nM dexamethasone, 0.05 μ M ascorbate-2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, %1 penisilin- streptomisin ve %1 glutamax içeren DMEM F12 (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) kültür medyumunda 4 hafta boyunca kültüre edildi. Osteojenik farklılaşma Alizarin Red-S boyası ile boyandı ve bu histolojik boyamanın pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterildi.

3.1.2.4. iOA-MKH'lerin immunofloresan işaretleme ile immunohistokimyasal karakterizasyonu

iOA-MKH'lerde adipojenik farklılaşma sonrasında adiponektin ve osteojenik farklılaşma sonrasında osteonektin proteinlerinin ekspresyon durumunu belirlemek için immunofloresan (İF) işaretleme ile karakterizasyon işlemleri yapıldı.

Farklılaşması yapılmış iOA-MKH'ler %4 paraformaldehit ile 30 dakika boyunca fikse edildi ve PBS ile 5 dakika boyunca yıkandı, bu işlem 3 kez tekrar edildi. Fikse edilen hücrelere % 0.1 Triton-X-100 eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler PBS ile 5 dakika boyunca yıkandı ve bu işlem üç kez tekrar edildi. Bloklama için %10 Goat serum içeren PBS hazırlandı ve fikse edilen hücreler 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun bitiminde hücreler üzerine adiponektin ve osteonektin primer antikorumları ile gece boyu $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilerek antikorumların antijene bağlanması sağlandı. Ertesi gün hücreler oda sıcaklığında PBS ile üç kez yıkanarak bağlanmayan primer antikorumlar uzaklaştırıldı. Primer antikorumlara uygun olarak seçilen Alexa Flour-488 (yeşil) (Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD) ve Alexa Flour-594 (kırmızı) (Cell Signaling Technology) sekonder antikorumlar ile iki saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler üç kez PBS ile yıkanarak sekonder antikorum uzaklaştırıldı. Hücreler en son nükleus belirteci olan DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta (Carl Zeiss Axio Observer D1, Almanya) görüntülendi.

3.1.3. *İn vitro* oksidatif stres modeli'nin oluşturulması

Yaralanmadan sonra dokudaki hasar sonucu oluşan stresi modellemek için oksidatif stres modeli oluşturuldu. Daha sonra LST'nin (MedChemExpress, New Jersey, ABD) ve H₂O₂'nin uygun konsantrasyonları belirlendikten sonra, H₂O₂ ile hücrelere ön uygulama yapıldıktan sonra, LST'nin belirlenen konsantrasyonları uygulandı ve oksidatif stres modeli oluşturularak LST'nin etkileri araştırıldı.

3.1.3.1. *iOA-MKH'lere Losartan'ın konsantrasyonunun belirlenmesi*

LST'nin (MedChemExpress) sitotoksik olmayan konsantrasyonunu belirlemek için hücre canlılık ve proliferasyon testi olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür) analizi yapıldı. Hücre canlılığı, özellikle yeni ilaçların geliştirilmesinde hücre büyümesini ve hücre sitotoksitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılan MTT kolorimetrik test kullanılarak değerlendirildi (Akhir vd., 2011). MTT testi canlı hücrelerin bir tetrazolyum tuzunu mitokondride formazan kristallerine metabolize etme yeteneğine dayanır. Formazan birikimi canlı hücre sayısı ile orantılıdır ve sitotoksite derecesi ile ters orantılıdır (Berridge vd., 2005). MTT toz halindedir ve 5 mg/mL olacak şekilde PBS içerisinde solüsyon haline getirildikten sonra 0.22 µm filtreden süzülerek steril edildi. *iOA-MKH*'ler 100 µL DMEM F12 (Capricorn Scientific) besiyeri içerisinde kuyucuk başına 5x10³ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve inkübatörde bir gün boyunca inkübe edilerek hücrelerin tutunmasına izin verildi. 24 saat sonra besiyeri uzaklaştırılarak kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde taze besiyeri içerisinde 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarında LST eklendi. LST eklendikten 24, 48, 72 saat sonra 10 µL/kuyucuk hazırlanan MTT solüsyonundan eklendi. Hücreler 3 saat boyunca inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuk başına 100 µl DMSO eklendi ve formazan kristallerin oluşması için oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda monokromatör sistemli mikropilaka okuyucuda (BIOTEK ELx808IU, Vermont, ABD) belirlendi.

3.1.3.2. *iOA-MKH'lere oksidatif stres modelini oluşturmak için hidrojen peroksit (H₂O₂)'nin konsantrasyonunun belirlenmesi*

iOA-MKH'ler ile *in vitro* oksidatif stres modeli oluşturmak amacıyla, H₂O₂ konsantrasyonunun sitotoksik olmayan konsantrasyonunu belirlemek için hücre canlılık ve proliferasyon testi olan MTT analizi yapıldı. *iOA-MKH*'ler 100 µL DMEM

F12 besiyeri içerisinde kuyucuk başına 3×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve bir gün boyunca inkübe edildi. Hücreler kültür kabına tutunduktan sonra besiyeri uzaklaştırılarak kuyucuk başına 100 μ L olacak şekilde taze besiyeri içerisinde 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μ M konsantrasyonlarında hidrojen peroksit (H_2O_2) eklendi. H_2O_2 eklendikten 24 saat sonra H_2O_2 konsantrasyonunun sitotoksik olmayan konsantrasyonunu belirlemek için MTT analizi yapıldı.

3.1.3.3. *İn vitro* oksidatif stres modeli'nde Losartanın etkisinin belirlenmesi

İn vitro oksidatif stres modeli'nde LST'nin etkisinin belirlenmesi için iOA-MKH'ler 100 μ L DMEM/F12 (Capricorn Scientific) besiyerinde kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi ve bir gün boyunca inkübe edildi. Daha sonra besiyeri çekilerek H_2O_2 'nin belirlenmiş 25 μ M konsantrasyonu kontrol grubu hariç pozitif kontrol ve diğer grup kuyulara eklendikten sonra 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri çekilip atılarak 96 kuyucuklu kültür plakasının kuyucuk başına kontrol ve pozitif kontrol kuyuları hariç kalan kuyulara 100 μ L olacak şekilde taze besiyeri içerisinde 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarında LST (MedChemExpress) eklendi. LST eklendikten 24, 48, 72 saat sonra LST'nin etkisinin belirlenmesi için MTT analizi gerçekleştirildi.

3.1.3.4. Oksidatif stres tayini için reaktif oksijen türleri (ROS) testi

Oksidatif stres durumunda LST'nin oksidatif strese etkisini belirlemek için ROS analizi yapıldı. Bunun için hücrelerdeki serbest radikal üretimini ölçmek amacıyla kullanılan yöntemlerden biri olan DCFH-DA kullanılmıştır. Reaktif oksijen türleri (ROS) test kiti, hücre içindeki hidroksil, peroksil ve diğer ROS aktivitesini ölçen florojenik bir boya olan hücre geçirgen reaktif 2',7' -dikloroflorescein diasetat (DCFDA) kullanır. Hücreye difüzyondan sonra, DCFDA hücreler tarafından floresan olmayan bir bileşiğe deasetile edilir ve daha sonra ROS tarafından 2', 7' -diklorofloresceine (DCF) oksitlenir. 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA), bir hücrenin redoks durumunu doğrudan ölçmek için en yaygın kullanılan tekniklerden biridir (Eruslanov vd., 2010).

ROS analizi için iOA-MKH hücreleri 6 kuyucuklu kültür plakasının her bir kuyucuğuna 1×10^5 hücre olacak şekilde ekildi ve bir gün boyunca inkübe edilerek hücrelerin tutunmasına izin verildi. Ertesi gün eski besiyeri uzaklaştırılarak kuyu

başına 1 mL olacak şekilde taze besiyeri içerisinde 20 µM konsantrasyonunda DCFH-DA (Cayman Chemical) eklendi ve 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 mL Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen DPBS, (Capricorn Scientific) ile yıkama yapılarak besiyeri uzaklaştırıldı. Daha sonra kontrol grubu hariç kuyu başına 1 mL olacak şekilde taze besiyeri içerisinde 25 µM konsantrasyonunda H_2O_2 eklendi ve 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyeri çekilerek 1 mL Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen DPBS ile yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Sonra ise taze besiyeri içerisinde LST’nin belirlenen 2 nM, 10nM, 20nM ve 50nM konsantrasyonları eklendi ve 24, 48, 72 saat boyunca inkübe edildi. Daha sonra hücreler tripsin-EDTA aracılığı ile kaldırılarak flow sitometri cihazında (Agilent Novacyte, 3500) okutuldu.

3.1.3.5. ELISA tekniği ile iOA-MKH’de TGFβ1 protein analizi

iOA-MKH’lerin H_2O_2 ve LST’nin 2 nM, 10nM, 20nM ve 50nM konsantrasyonları uygulandıktan sonra 24, 48 ve 72 saatlerde toplanan süpernatantlarından elde edilen örneklerde TGFβ1 protein seviyesini ölçmek amacıyla Human TGFβ1 ELISA kit (SunRed Biotechnology Company, Şanghay, Çin) kullanıldı. Bunun için öncelikle reagentler, örnekler ve standartlar hazırlandı. Blank kuyucuğuna sadece 50 µl kromojen A, B solüsyonları ve 50 µl stop solüsyonu eklendi. Standartların olacağı kuyucuklara 50 µl standart, 50 µl Streptavidin-HRP eklendi. Örnek kuyucuklara ise her bir örnekten 40 µl eklendi, 10 µl biotinle işaretli TGFβ1 antikoru, 50 µl Streptavidin-HRP eklendi ve 60 dakika 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra 5 kez yıkama yapıldı, her bir kuyucuğa 50 µl kromojen A, B solüsyonları eklendi ve 10 dakika 37 °C’de inkübe edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyon eklenerek (mavi rengin sarı renge dönüşmesi) 15 dakika içinde 450 nm optik yoğunluğun (OD) ölçülmesi gerçekleştirildi.

3.1.3.6. qRT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde gen ekspresyon analizi

Oluşturulan *in vitro* modelde fibrozis ile ilişkili TGFR, SIRT1, cGMP, AT2, LOX ve VEGF ve TGFβ1, TGFβ3 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişim Real Time PCR (RotorGene, Qiagen, Almanya) ile analiz edildi. Bunun için LST’nin belirlenen 2 nM, 10nM, 20nM ve 50nM konsantrasyonları eklendi ve 72 saat boyunca maruz bırakıldı. LST uygulanan hücrelerden total RNA MiRNeasy Micro Kiti (QIAGEN, Germantown, ABD) kullanılarak izole edildi. Hücre pelletinin üzerine 700

μ L Trizol eklenerek 1 dakika boyunca vortekslendi. 5 dakika oda ısısında bekletildi daha sonra üzerine 140 μ L kloroform eklenerek hücrelerde faz ayırımı gerçekleştirildi. Faz ayırımı için 2 dakika bekletildikten sonra 12.000g'de 15 dakika santrifüj edildi. Faz ayırımından sonra üstteki açık renkli sıvı kısmı toplandı. Toplam hacminin 1.5 katı kadar %100 etanol eklendi. Daha sonra kolonlara eklenmiştir ve 10.000g'de 20 saniye santrifüj edilmiştir. Kolonların altına toplanan sıvı atılmıştır. Sonrasında kolona 700 μ L RW1 buffer eklenmiştir ve 10.000g'de 20 saniye santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında 500 μ L RPE buffer eklenerek 10.000g'de 20 saniye santrifüj edilmiştir. Sonra 500 μ L %80 etanol eklenerek 10.000g'de 20 saniye santrifüj edilmiştir. Ayırıştırma kolonu yeni tüpe yerleştirdikten sonra 1-2 dakika ağzı açık bırakılarak alkolün uçması sağlanmıştır. Son olarak 14 μ L RNase free water eklenerek 2 dakika bekletildikten sonra 22.000g'de 1 dakika santrifüj edilerek RNA'nın ayırıştırma kolonun filtresinden tüpe aktarılması sağlanmıştır. Daha sonra nanodrop spektrofotometre cihazı (Thermo Fisher Scientific Nanodrop-one, Massachusetts, ABD) ile RNA konsantrasyonu ölçülmüştür. Elde edilen mRNA'lar cDNA sentez kiti (QuantiTect Reverse Transcription kit, Almanya) kullanılarak komplementer DNA elde edilmiştir. cDNA elde edilmesiyle birlikte, hedef genlere uygun primerler ve SYBR Green PCR kiti (QuantiNova, Almanya) kullanılarak Real Time PCR (Rotor Gene, Almanya) cihazında analiz gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR (qPCR) analizi sonrasında GAPDH referans geni kullanılarak Ct (threshold cycle) değerleri elde edildi. Ardından, $\Delta\Delta$ CT yöntemi kullanılarak ham veri normalizasyonu yapıldı. Bu yöntem sayesinde, hedef genin ekspresyonundaki farklılıklar, kontrol grubunun ekspresyonu ile karşılaştırılarak belirlendi. Böylece gerçek zamanlı PCR verilerinin analizi gerçekleştirildi.

3.2. İstatistiksel Analiz

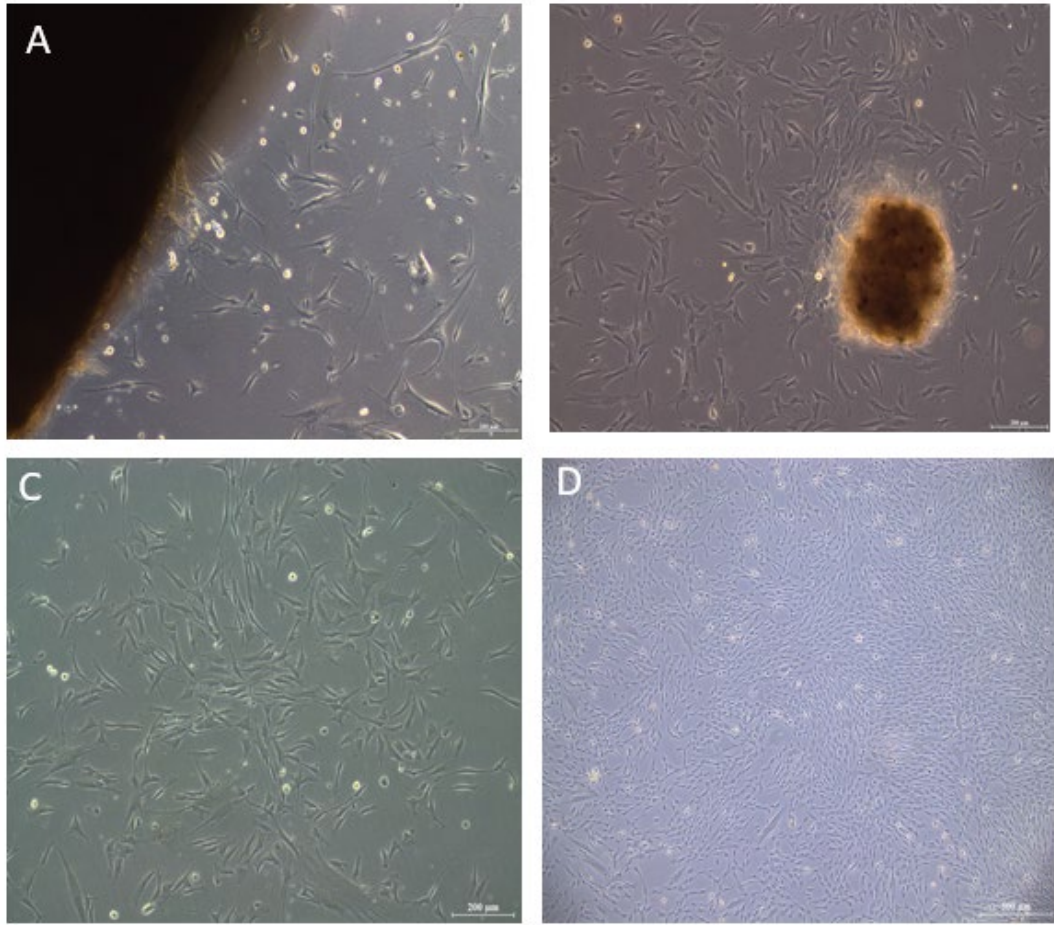
Her deney en az üç kez tekrarlanmıştır. Tüm istatistiksel analizler, SPSS 20.0 (ya da güncel sürümü) ile gerçekleştirilmiştir. One-way ANOVA ile yapılan istatistik analizlerinde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı sayılmıştır.

Real-time PCR analizinin istatistiksel değerlendirilmesinde, elde edilen Ct değerlerinden $\Delta\Delta$ Ct değerleri hesaplandı. Referans gen ile hedef gen arasındaki kat değişimi (fold change) gösterildi. Elde edilen verilerin Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk ile normal dağılımları değerlendirildi daha sonra ise ANOVA Tukey Post hoc testi ile istatistiksel anlamlılıkları değerlendirildi

4. BULGULAR

4.1. İnsan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin (iOA-MKH'lerin) İzolasyonu ve Kültürü

İzole edilen iOA-MKH'ler üçüncü pasaja ulaşana kadar çoğaltılmıştır ve kültüre edilmiştir. Kültürlenene hücreler kültür kaplarına seyrek olarak tutunmuş ve hücreler iğsi ve yıldız şekilli fibroblast benzeri bir morfoloji sergiledi. iOA-MKH'ler çoğalarak koloni oluşturdu. İzole edilip kültüre alınan hücreler, ilk hücre tutunmaları görüldükten 7 gün sonra konfluensiye (%70-80) ulaştı (Şekil 4.1).

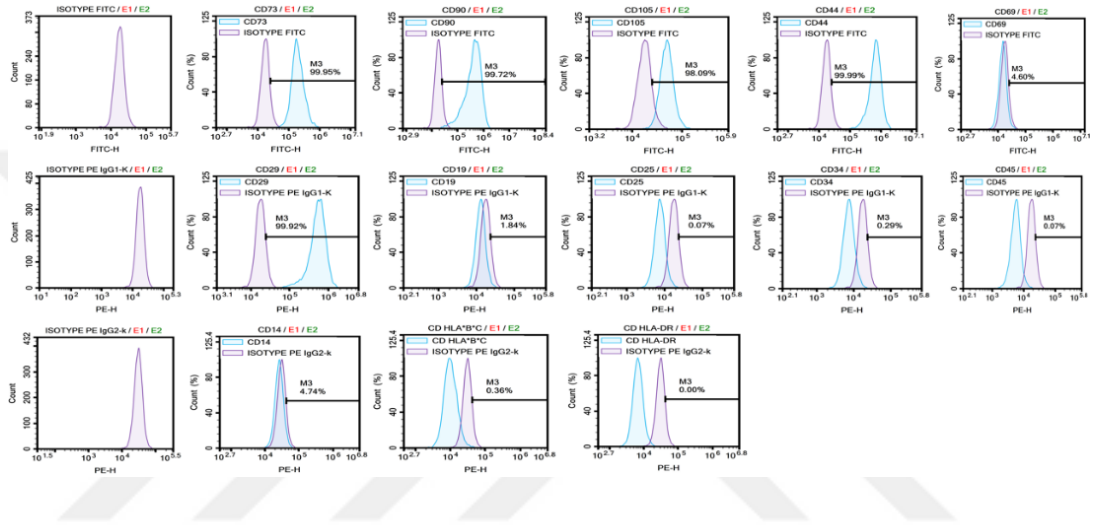


Şekil 0.1. İzolasyon sonrasında ve kültürdeki iOA-MKH hücrelerinin faz-kontrast invert mikroskop görüntüleri. **A:** İzolasyonun 7. günü eksplant dokunun çevresinde olan hücreler. **B-C:** Eksplant yöntemiyle izole edilmiş iOA-MKH'lerin izolasyonunun (P1) iğ şeklindeki yıldız şekilli fibroblast-benzeri hücreleri. **D:** İzolasyon sonrasında pasajlanan hücrelerin kültürde 3. günü (P3). (Ölçek çubuğu: A-C 200 μ m, D 500 μ m).

4.2. iOA-MKH'lerin İmmunofenotipik Olarak Karakterize Edilmesi

4.2.1. iOA-MKH'lerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu

İzole edilen ve üçüncü pasaja getirilen iOA-MKH'ler flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu yapıldı. CD73 (%99.95), CD90 (%99.72), CD105 (%98.09), CD44 (%99.99) ve CD29 (%99.97) için pozitif, CD69 (%4.60), CD19 (%1.84), CD25 (%0.07), CD34 (%0.29), CD45 (%0.07), CD14 (%4.74), HLA-B-C (%0.36), ve HLA-DR (%0.00) için negatif olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 0.2. iOA-MKH'lerin 3.pasaj'da flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu. CD73 (%99.95), CD90 (%99.72), CD105 (%98.09), CD44 (%99.99) ve CD29 (%99.97) pozitif, CD69 (%4.60), CD19 (%1.84), CD25 (%0.07), CD34 (%0.29), CD45 (%0.07), CD14 (%4.74), HLA-B-C (%0.36), ve HLA-DR (%0.00) negatiftir. Histogramda, hedef antikorlar mavi renkte ve izotip antikorlar (negatif kontrol) mor renkte gösterilmiştir.

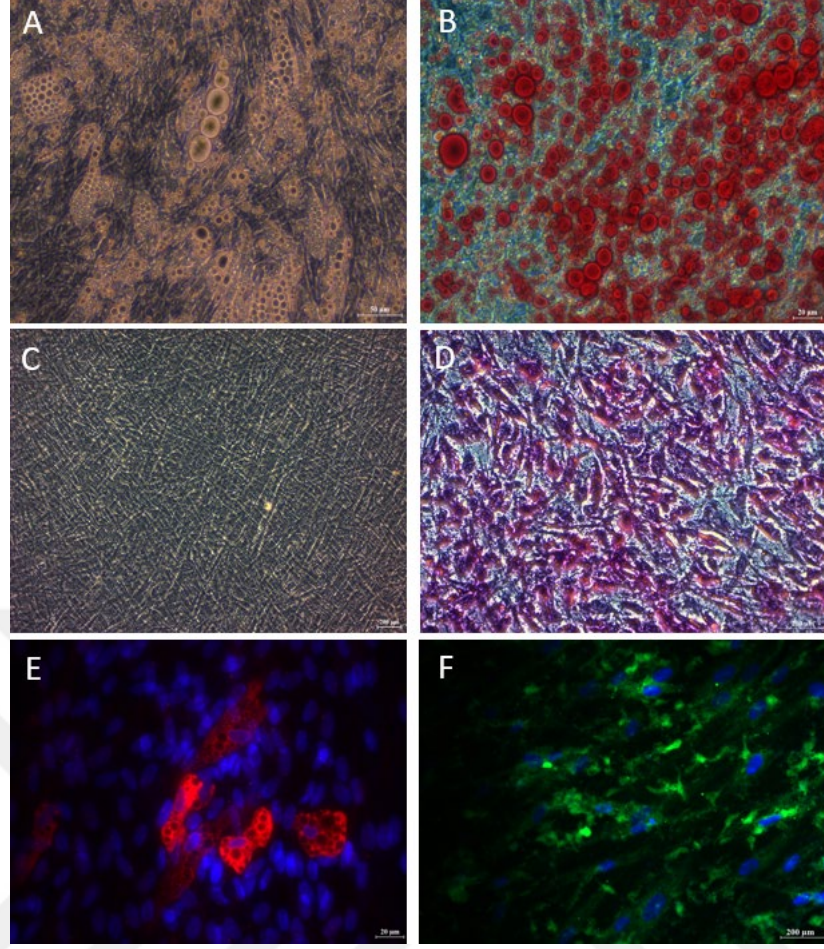
4.2.2. iOA-MKH'lerin karakterizasyonu için farklılaşma analizleri

İzole edilen ve üçüncü pasaja getirilen iOA-MKH'ler farklılaşma analizine alınmıştır. ISSCR (International Society for Stem Cell Research) klavuzuna uygun olarak adipojenik ve osteojenik farklılaşması yapılmıştır (Dominici vd., 2006). Farklılaşma sonrası hücreler immunohistokimyasal ve immuofloresans olarak boyanmıştır.

Adipojenik farklılaşmanın üçüncü haftasından sonra, faz-kontrast invert mikroskobu altında farklılaşmış hücrelerde yağ damlacıkları gözlenmiştir (Şekil 4.3a).

Adipojenik farklılaşmış hücrelerdeki yağ damlacıkları Oil Red O boyası ile immünohistokimyasal olarak boyanmış ve pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3b). Hücreler aynı zamanda adiponektin ile boyanarak pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3e). Osteojenik farklılaşma kültürünün 28 gün boyunca sürdürülmesinin ardından, kümelenmiş kalsiyum birikintileri faz kontrast mikroskobu altında gözlemlenen nodüler agregatlarla karakterize edilmiştir (Şekil 4.3c). Osteojenik farklılaşmış hücrelerdeki kalsiyum mineral nodülleri immünohistokimyasal olarak Alizarin Red S boyası ile işaretlenerek pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3d). Ayrıca hücreler osteokalsin ile immüofloresans olarak işaretlenerek pozitif olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3f).

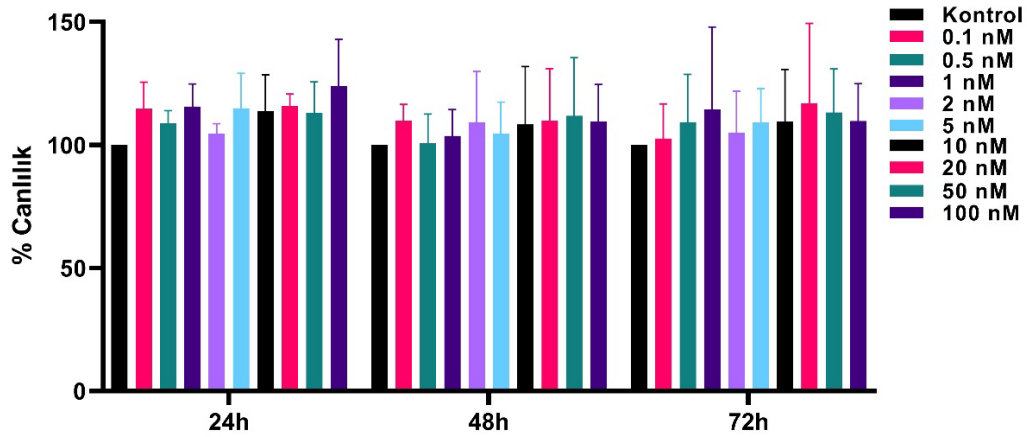




Şekil 0.3. iOA-MKH'lerin immunohistokimyasal boyamalar ile karakterizasyon deneyleri. **A.** Adipojenik indüksiyondan 8 gün sonra yağ hücrelerine dönüşmüş iOA-MKH'lerin faz-kontrast invert mikroskopik görünümü (Ölçek çubuğu = 50µm). **B.** Adipojenik farklılaşmış hücrelerde nötral yağ damlacıklarının Oil Red O boyası (kırmızı) ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 20 µm). **C.** Osteojenik indüksiyondan 28 gün sonra oluşan mineral nodüllerin faz-kontrast invert mikroskopik görünümü (Ölçek çubuğu = 200 µm). **D.** Osteojenik farklılaşmış hücrelerde mineral nodüllerin Alizarin Red S boyası (kırmızı) ile gösterilmesi (Ölçek çubuğu = 200 µm). **E.** Adipojenik farklılaşma sırasında hücrelerde biriken nötral yağ damlacıklarının adiponektin (kırmızı) ile immünofloresan (IF) işaretlenmesi. Hücre çekirdeği DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir (Ölçek çubuğu = 20 µm). **F.** Osteojenik farklılaşmış hücrelerin osteokalsin (yeşil) ile immünofloresan (IF) işaretlenmesi. Hücre çekirdeği DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir (Ölçek çubuğu = 200 µm).

4.3. iOA-MKH'lere Losartan'ın Konsantrasyonunun Belirlenmesi

LST'nin sitotoksik olmayan konsantrasyonunu belirlemek için iOA-MKH'ler üzerine 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarında LST'ye maruz bırakılmıştır. LST ile muamele edilen hücreler 24, 48, 72 saat sonra hücre canlılık ve proliferasyon testi olan MTT analizi yapılmıştır. Yapılan analizlerde LST için kullanılan 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonların toksik etki yaratmadığı konsantrasyon ve saatten bağımsız olarak sitotoksik etkisi olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.4).

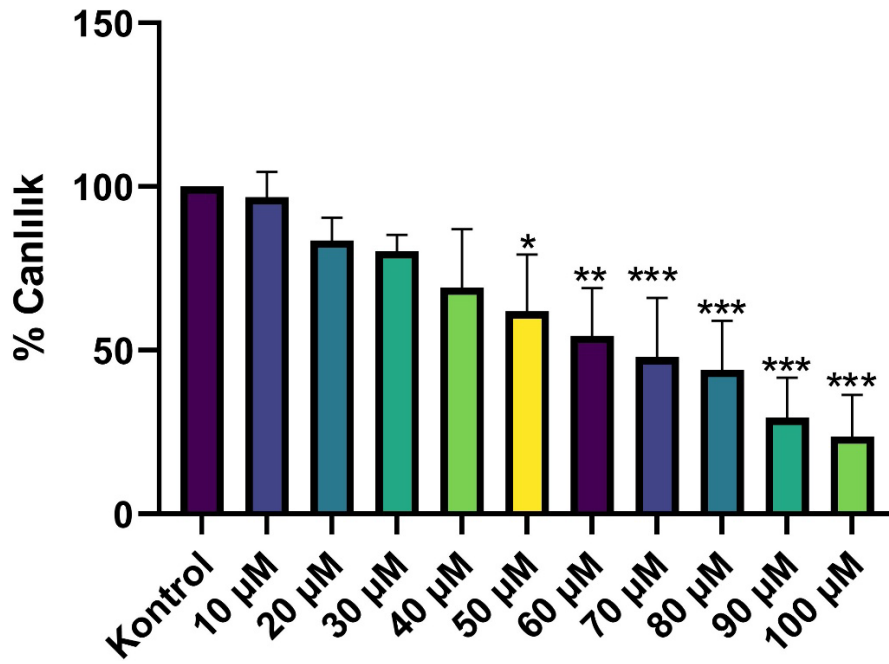


Şekil 0.4. iOA-MKH'lere LST'nin 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat uygulama sonrası MTT testi ile sitotoksik etkisinin belirlenmesi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4.4. iOA-MKH'lere Oksidatif Stres Modelini Oluşturmak İçin

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)'in Konsantrasyonunun Belirlenmesi

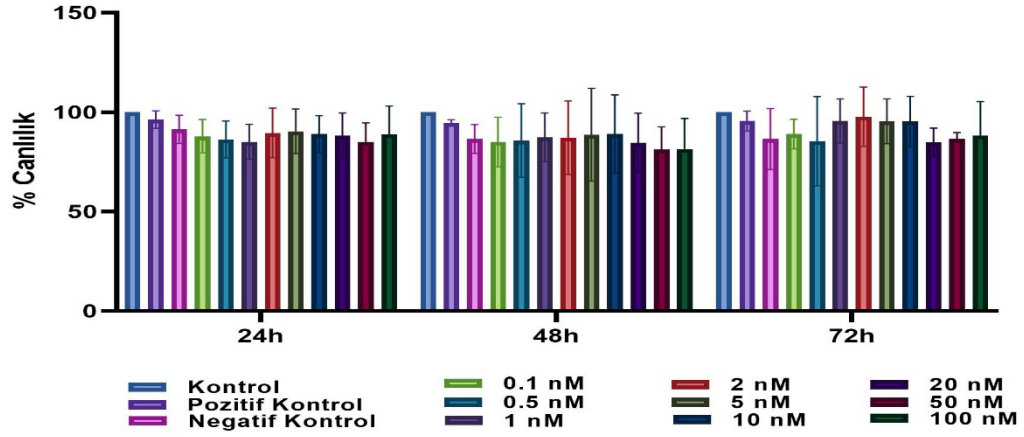
Oksidatif stres modeli oluşturmak için kullanılan H_2O_2 'nin iOA-MKH'ler üzerinde sitotoksik olmayan konsantrasyonunu belirlemek için hücre canlılık ve proliferasyon testi olan MTT analizi yapılmıştır. H_2O_2 'nin 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 μM konsantrasyonları ile analiz yapılmıştır. H_2O_2 'nin analiz edilen konsantrasyonları içerisinde 24 saatte yaklaşık %80 canlılık gösteren konsantrasyonu lineer regresyon analizi sonucu 25 μM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.5). Yapılan deneylerde, oksidatif stres modeli oluşturmak için 25 μM H_2O_2 konsantrasyonu kullanılmıştır.



Şekil 0.5. iOA-MKH’lerde oksidatif stres modelini oluşturmak için H₂O₂’nin 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µM konsantrasyonlarının MTT ile hücre canlılık analizi. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

4.5. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) ile Oksidatif Stres Modeli Oluşturulan iOA-MKH’lere Losartan Uygulanması

H₂O₂ ile oksidatif stres modeli oluşturulan iOA-MKH’lere LST’nin proliferatif konsantrasyonunun belirlenmesi için canlılık ve proliferasyon analizi yapılmıştır. Hücreler önce 24 saat boyunca 25 µM H₂O₂ uygulandıktan sonra LST’ye maruz bırakıldıktan sonra MTT testi ile analizi yapılmıştır. Bu konsantrasyonlardan elde edilen sonuçlara göre oksidatif stres modeli oluşturulmasına rağmen LST konsantrasyonunun 72 saatte 2nM, 10nM ve 50nM konsantrasyonlarında kontrole göre yaklaşık %120 hücre canlılığını artıran etkisi olduğu görülmüştür. LST oksidatif strese karşı tedavi edici konsantrasyonu 72 saatte 2nM, 10nM ve 50nM konsantrasyonları olarak saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 0.6. iOA-MKH’lerde oksidatif stres modelini oluşturduktan sonra LST’nin tedavi edici etkisini belirlemek için 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat maruz bırakıldıktan sonra MTT testi ile hücre canlılık analizi. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

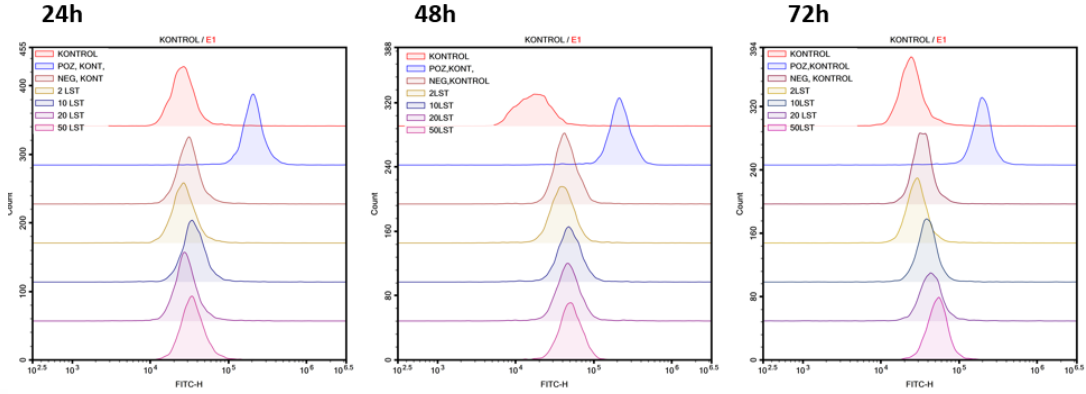
4.6. Oksidatif Stres Tayini İçin Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Testi

iOA-MKH’lere uygulanan H_2O_2 ile oksidatif stres modeli oluşturulduktan sonra LST’nin 2 nM, 10 nM ve 50 nM konsantrasyonları uygulanmıştır. Reaktif oksijen türleri (ROS)’un aktivitesinin belirlenmesi flow sitometri cihazıyla yapılmıştır (Şekil 4.7).

Kontrol olarak LST ile muamele edilmeyen ve H_2O_2 ile oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak H_2O_2 ile oksidatif stres modeli oluşturulan ve 24 saat sonra H_2O_2 çekilerek taze besiyeri eklenmiş fakat LST uygulanmayan hücreler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak H_2O_2 ile oksidatif stres modeli oluşturulan ve tüm deney süresince H_2O_2 ile strese maruz bırakılan fakat LST uygulanmayan hücreler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Oksidatif stres modeli oluşturulduktan sonra LST uygulamasının ardından hücre için reaktif oksijen türleri (ROS) seviyesi değerlendirilmiştir. Model oluşturulduktan sonra LST uygulamasının ardından, LST’nin tedavi edici etkisinin konsantrasyon ve zamana bağlı olduğu gözlemlenmiştir. 24, 48 ve 72 saat sonunda LST konsantrasyonlarının etkisi değerlendirildiğinde pozitif kontrole göre daha az seviyede ROS üretimi olduğu buna karşın kontrol grubuyla benzer seviyede ROS olduğu gözlemlenmiştir. 24 ve 72 saat uygulanan 2nM LST konsantrasyonunda kontrol grubu

ile aynı seviyede ROS olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar yaralanma sonrasında oluşan oksidatif stresin iOA-MKH'lerde 2 nM LST konsantrasyonunun ROS seviyesini düşürerek anti-fibrotik etkisi olabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 0.7. iOA-MKH'lerde oksidatif stres modelini oluşturduktan sonra LST'nin tedavi edici etkisini belirlemek için 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat LST'a maruz bırakıldıktan sonra ROS analizi ile reaktif oksijen türlerinin seviyesinin belirlenmesi.

4.7. qRT-PCR Yöntemi ile mRNA Düzeyinde Gen Ekspresyon Analizi

H₂O₂ ile oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 2nM, 10nM, 20nM ve 50nM konsantrasyonlarında LST uyguladıktan sonra RT-PCR yöntemi ile TGFR, cGMP, SIRT, AT2, LOX, VEGF, TGFβ1 ve TGFβ3 genlerinin ekspresyon analizi yapıldı (Şekil 4.8).

TGFβR1 gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 0,8 kat, negatif kontrol 0,9 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,93 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 2,15 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,94 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 2,12 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,41 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,84 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında

1,25 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 2,76 kat artmıştır.

cGMP gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 0,16 kat, negatif kontrol 0,3 kat, oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,5 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,3 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,08 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,14 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,40 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,96 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,06 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,13 kat azalmıştır.

LOX gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 1,4 kat, negatif kontrol 1,4 kat, oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,3 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,9 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,82 kat artmıştır, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,59 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,83 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,92 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,62 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,35 kat azalmıştır.

VEGF gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 0,83 kat, negatif kontrol 0,61 kat, oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,76 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,97 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,15 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,41 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücelere 20

nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,65 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,57 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,66 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,98 kat azalmıştır.

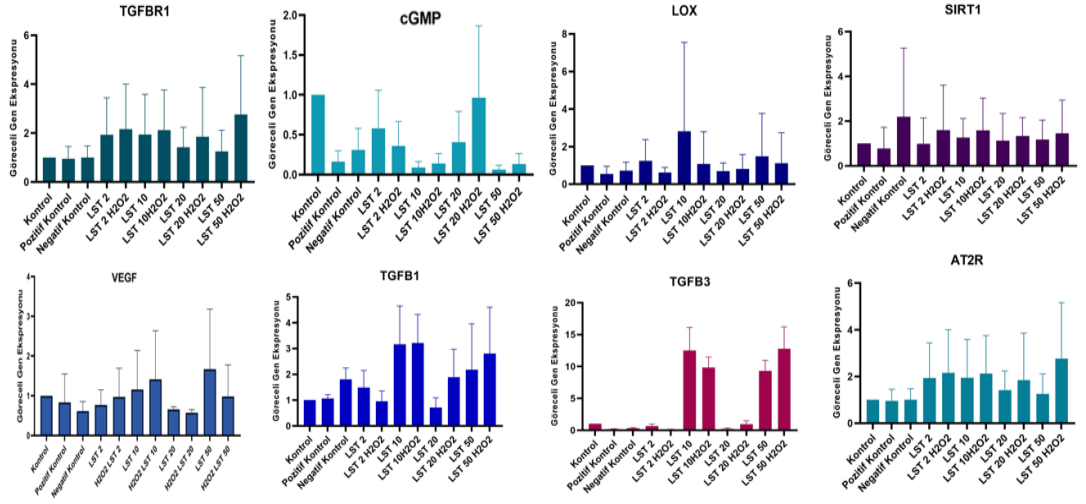
AT2R gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 0,54 kat, negatif kontrol 0,71 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,24 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,61 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 10 nM konsantrasyonda Losartan uygulandığında 2,81 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 2,81 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,07 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,87 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,48 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,12 kat artmıştır.

SIRT1 gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 1,07 kat, negatif kontrol 2,19 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,0 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,59 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,26 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 10 nM konsantrasyonda Losartan uygulandığında 1,58 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,12 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,33 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,17 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,45 kat artmıştır.

TGFβ1 gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 1,05 kat, negatif kontrol 1,8 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,48 kat artmış, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,95 kat azalmıştır.

Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 3,16 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 10 nM konsantrasyonda Losartan uygulandığında 3,21 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,71 kat azalmış, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 1,88 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 2,18 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 2,8 kat artmıştır.

TGFβ3 gen ekspresyon analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 0,18 kat, negatif kontrol 0,32 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,66 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,12 kat azalmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 12,5 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 10 nM konsantrasyonda Losartan uygulandığında 9,84 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,22 kat azalmış, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 0,95 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 9,28 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 12,78 kat artmıştır.

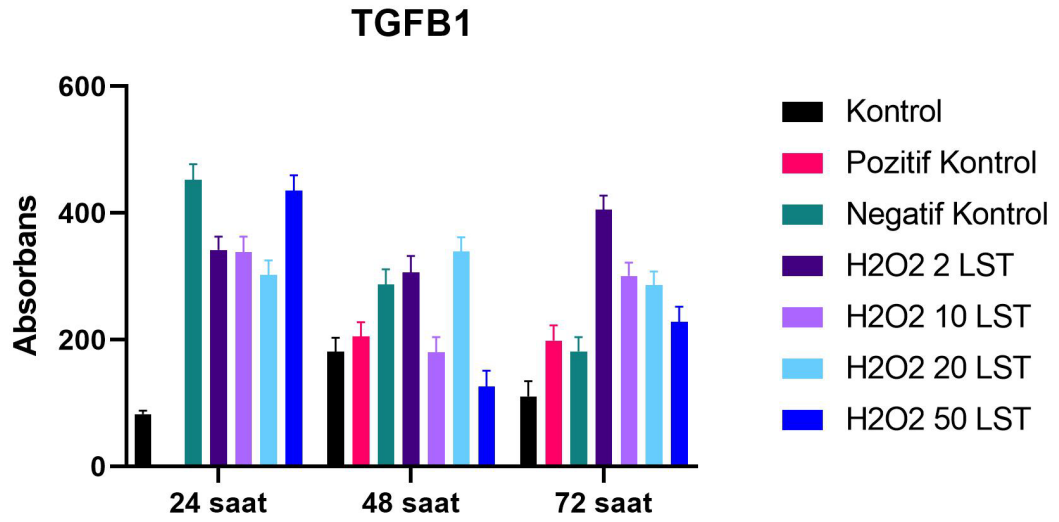


Şekil 0.8. iOA-MKH’lerde oksidatif stres modelini oluşturduktan sonra LST’nin etkisini belirlemek için 2 nM, 10 nM, 20 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda 72 saat maruz bırakıldıktan sonra TGFB1, cGMP, SIRT, AT2, LOX, VEGF TGFB1 ve TGFB3 genlerinin ekspresyon analizi.

4.8. ELISA tekniği ile iOA-MKH’de TGFβ1 protein analizi

TGFβ1 protein analizi ELISA ile tespit edilmiş olup, her örnek kendi saat aralığındaki kontrol örnekleri ile kıyaslanmıştır. Protein analizi sonucunda kontrole göre pozitif kontrol 48 ve 72 saat analizinde sırasıyla 1,13 kat ve 1,8 kat arttığı görülmektedir. Negatif kontrol için yapılan analizde 24 saatte kontrole göre 5,49 kat, 48 saatte kontrole göre 1,58 kat, 72 saatte kontrole göre 1,64 kat artış görülmüştür. Oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 2 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 24 saatte kontrole göre 4,14 kat, 48 saatte kontrole göre 1,69 kat, 72 saatte kontrole göre 3,66 kat artış görülmüştür. Oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 24 saatte kontrole göre 4,10 kat artış, 48 saatte kontrole göre yaklaşık aynı 0,99 kat, 72 saatte kontrole göre 2,72 kat artış görülmüştür. Oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 20 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 24 saatte kontrole göre 3,66 kat, 48 saatte kontrole göre 1,87 kat, 72 saatte kontrole göre 2,59 kat artış görülmüştür. Oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 24

saatte kontrole göre 5,28 kat artış, 48 saatte kontrole göre 0,70 kat azalma, 72 saatte kontrole göre 2,07 kat artış görülmüştür (Şekil 4.9.).



Şekil 0.9. iOA-MKH'lerin H₂O₂ ve LST'nin 2 nM, 10nM, 20nM ve 50nM konsantrasyonları uygulandıktan sonra 24, 48 ve 72 saatlerde toplanan süpernatantlardan elde edilen örneklerde TGFβ1 protein analizi.

5. TARTIŞMA

Kornea, gözün ön kısmında yer alan ve gözü koruyucu özellikleri ile birlikte görme fonksiyonu için önem arz eden optik fonksiyonları bulunan bir dokudur. Mikrobiyal enfeksiyonlar, travmatik yaralanmalar, skarlı hastalıklar ve kornea ameliyatları sonrası gelişen miyofibroblastların oluşumundan dolayı fibrozis nedeniyle oluşan kornea skarlari tüm dünyada görme kaybının en önemli nedenlerinden biridir (Wylie-Sears vd., 2014). Korneada epitel bütünlüğünü bozan yaralanmalar sonrası çeşitli pro-inflamatuar sitokinler, büyüme faktörleri, matriks metalloproteinaz (MMP) gibi proteinler salgılanarak stromaya geçer ve keratosit aktivasyonuna neden olurlar. Keratositler kornea hasarı sonucu aktive olarak yara iyileşmesi sırasında ekstraselüler matriks (ECM) bileşenleri üreten proliferatif özellikli stromal fibroblastlara dönüşebilmektedir (Fini vd., 2005). Kornea enfeksiyonu, travma veya refraktif cerrahi sonrasında keratosit ölümü gerçekleşerek yara iyileşmesi süreci tetiklenip hayatta kalan keratositlerin fibroblastlara dönüşmesiyle skarlaşma meydana gelebilmektedir (Vemuganti vd., 2004).

Mezenkimal kök hücreler (MKH), bazı patolojik hastalıklar veya travma nedeniyle oluşan doku hasarının tedavisi için rejeneratif tıpta yaygın olarak uygulanmaktadır (Orbay vd., 2012). Yağ dokusu blefaroplasti, levator kas rezeksiyonu ve laparotomi gibi çeşitli yöntemlerle karın, meme, kalça, orbita ve uyluk gibi birçok bölgeden bol miktarda kolayca izole edilebilir (Mailey vd., 2014). Bu bağlamda doku spesifik bir kök hücre olması ve geniş farklılaşma potansiyeli sebebiyle iOA-MKH'ler LST'nin farklı konsantrasyonlardaki etkilerinin araştırılması için uygun bir kök hücre tipidir.

Orbital yağ dokusu üst veya alt blefaroplasti operasyonu sırasında elde edilmiştir. Orbital adipoz doku kaynaklı MKH'lerin izolasyonunda kollejenaz Tip 1 enzimi kullanılarak hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Follin vd., 2013). İzole edilmiş hücrelerin karakterizasyonu için flow sitometri analizi sonucunda CD44, CD90, CD105 belirteçleri için pozitif ve CD34, CD45 (hematopoietik hücrelerde bulunur ve hücre büyümesini, farklılaşmasını, mitotik döngüyü düzenler), HLA-DR belirteçleri için negatif olduğu gözlemlenmiştir (Hass vd., 2011).

Bu tez çalışmasında insan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iOA-MKH) eksplant izolasyon yöntemi kullanarak izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada iOA-MKH'lerinden izole edilen ve izolasyonun 7. günü mezenkimal kök hücrelerin kültür kabına tutunduğu, iğ şeklindeki yıldız şekilli fibroblast-benzeri morfolojide olduğu, 3. pasajda bulunan MKH'lerin seçilmiş MKH belirteçlerini (CD44, CD90, CD105, CD29 belirteçleri için pozitif ve CD69, CD25, CD19, CD34, CD45, CD14, HLA-B-C ve HLA-DR belirteçleri için negatif) eksprese ettiği ve iOA-MKH'lerin uygun besiyeri eklentileri ile indüklendiklerinde adipojenik ve osteojenikyönde farklılaştığı gözlemlenmiştir (Nepali vd., 2018). Bu çalışma için insan orbital adipoz dokudan izolasyonu gerçekleştirilen hücreler, mezenkimal kök hücre karakterinde olup Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT), Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Kurulu kılavuzunda yer alan gereksinimleri karşılamaktadır (Dominici vd., 2006).

Losartan (LST), hipertansiyon, diyabetik nefropati, kalp yetmezliği ve sol ventrikül genişlemesini tedavi etmek için kullanılan oral bir ilaçtır (Simpson vd., 2000). LST bir anjiyotensin II reseptör Tip 1 antagonistidir (Michel vd., 2013), ancak aynı zamanda TGF beta ile uyarılan süreçlerin bir inhibitörü olduğu da gösterilmiştir.

İnsan orbital adipoz doku kaynaklı mezenkimal hücrelerinde (iOA-MKH) LST 0.1-0.5-1-2-5-10-20-50-100 nM konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saat olarak denenmiştir. Tez çalışmasında 72 saatte 2 nM, 10 nM ve 50 nM LST konsantrasyonlarının hücre proliferasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Literatürde LST'nin pulmoner epitel hücrelerinde ve endometriyal kanser hücrelerinde 20 nM'da sitotoksik olmasına rağmen (Choi vd., 2012; Ashry vd., 2014) iOA-MK hücrelerinde sitotoksik olduğu görülmemiştir. ABC transporter mekanizması aktif olduğundan mezenkimal kök hücrelerin doksorobusın dirençli olduğu bilinmektedir (Chen vd., 2014). iOA-MKH'leri de mezenkimal kök hücreler olduğu için ve ABC transport mekanizmalarının aktif olabileceğinden sitotoksik etki göstermemesinin bu mekanizma kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Begicevic vd., 2017).

Süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (HO) dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) çeşitli biyolojik moleküllerin aktivitelerini inhibe ettiği bilinmektedir (Day vd., 2005). Reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikiminin neden olduğu oksidatif stres, hücre hasarına ve işlev bozukluğuna yol açarak MKH'lerin canlılığını ve immünomodülatör aktivitesini azaltır (Denu vd., 2016). Hücresel reaktif oksijen türleri (ROS) içeriğini belirlemek için DCFHDA

olarak adlandırılan ROS'a duyarlı bir floresan indikatörü kullanılmaktadır (Raei vd., 2024).

iOA-MKH'lere uygulanan H₂O₂ ile oksidatif stres modeli oluşturulduktan sonra LST'nin 2 nM, 10 nM ve 50 nM konsantrasyonları denenmiştir. Literatürde de LST'nin kanser hücrelerinde ROS üretimini azalttığı görülmektedir (Raei vd., 2024). Yapılan tez çalışmasında 24 ve 72 saat sonunda strete bırakılan pozitif kontrolde ROS seviyesi artarken, 2 nM LST konsantrasyonunun stres uygulanmayan kontrolle aynı seviyede olduğu gözlemlenmiştir. LST'nin literatürde olduğu gibi iOA-MKH'lerinde stres yaratılığında LST'nin ROS seviyesini düşürdüğü, ROS seviyesinin düşürülmesi ile de artan ROS seviyesi fibrozisi artırdığından anti-fibrotik etkisi olabileceği düşünülmektedir (Anan vd., 2016).

Bakır-bağımlı lizil oksidaz (LOX), gelişim, doku onarımı sırasında hücre kaderi, farklılaşma ve iletişim için gerekli olan dinamik bir yapısal ve düzenleyici çerçeve olan hücre dışı matrisin (ECM) birleştirilmesinde katalitik aktivite ile ilişkili, önemli rol oynar. LOX, ayrıca, normal dokularda önemli işlevleri yerine getiren ve vasküler, kardiyak, pulmoner, dermal, plasenta, diyafram, böbrek, pelvik bozukluklarına katkıda bulunan hem aktiviteye bağlı hem de bağımsız ekstraselüler, intraselüler ve nükleer roller oynamaktadır. LOX'un epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler epidermal büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) ile etkileşimi ve bu etkileşimin mekanotransdüksiyon, inflamatuvar ve steroid sinyal yolları ile düzenleyici ve çapraz düzenleyici fonksiyonel önemi vardır (Laczko vd., 2020). Yapılan tez çalışmasında LOX ekspresyon seviyesinin strete olan pozitif kontrolde, kontrole göre 1,5 kat arttığı gözlemlenirken stres sonrası uygulanan 50 nM LST konsantrasyonunda LOX ekspresyon seviyesi kontrole göre 0,4 kat azalmıştır. LOX ekspresyon seviyesinin artışının fibroze sebep olduğu bilinmektedir. Strete olan pozitif kontrolün LOX'un artması fibrozisin oluşabileceğini buna karşın LST uygulandıktan sonra LOX'un downregüle olması ile LST'nin oksidatif stresle tetiklenen fibrozisin azalmasıyla antifibrotik etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

PDGF sinyalizasyonunun sadece aktif LOX tarafından modüle edilmediği, aynı zamanda LOX'u da kontrol ettiği bildirilmiştir. İnsan periodontal, ligament kaynaklı, mezenkimal kök hücrelerinde PDGF tedavisi hücre proliferasyonunu uyarmış ve LOX aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuştur (Mihaylova vd. 2018). PDGF'nin LOX

aktivitesini kontrol etmedeki rolünün ayrıntıları ve bu etkileşimin daha genel mi yoksa bu kök hücrelerle mi sınırlı olduğu belirsizliğini korumaktadır. Bu tez çalışmasında PDGFA ekspresyon seviyesine de bakılmıştır fakat kontrol grubu dahil ekspresyon tespit edilememiştir. Çalışma sonunda mezenkimal kök hücrelerde PDGF olmadan da LOX ekspresyon seviyesinin konsantrasyona bağlı değişiminin olabileceği ve regüle edilebileceği gözlemlenmiştir.

LOX AKT'ı aktive ederek hücre canlılığını desteklediği ve bunu da PDGFR üzerinden artan VEGF ile gerçekleştirdiği bilinmektedir (Baker vd. 2013; Barratt vd 2018). Yapılan tez çalışmasında ilginç bir şekilde stres uygulamasından sonra uygulanan LST konsantrasyonlarında özellikle 20 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda VEGF ekspresyonu artarken LOX ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir. Bilinenin aksine VEGF ve LOX ekspresyon seviyelerinin ters orantılı olacak şekilde ekspresyon vermesi LST'nin miRNA gen regülatörleri üzerinden etkileşimde olabileceğini düşündürmektedir.

AT1R ve AT2R'nin her ikisi de Angiotensin II'ye benzer bir afinite gösteren yeditransmembran reseptörleridir, ancak bu iki reseptör amino asit dizilimi, dokuya özgü ekspresyon ve fonksiyonel etkileri bakımından farklılık gösterir. AT2R'nin ana rolü, vazodilatör etkiye ve kan basıncında düşüşe ek olarak hücre farklılaşmasını teşvik ederken hücre büyümesini ve çoğalmasını azaltarak AT1R'nin aracılık ettiği eylemleri engellemektir (Nouet vd 2020). AT2R'nin cGMP üzerinden renal fibrozisi engellediği bilinmektedir (Abramicheva ve Plotnikov 2022; Yamamoto vd. 2016). Çalışmalarda gösterildiği üzere, AT2R ekspresyonu zamansal olarak düzenlenmektedir. Çalışmalar AT2R'nin fetal yaşam sırasında yaygın olarak eksprese edildiğini, ancak yetişkinlerde tercihen eksprese edilen AT1R'nin aksine, yetişkinlerde tüm organlarda ekspresyonunun düşük seviyelerde korunduğunu göstermektedir (Grady vd. 1991; Lenkei vd 1997; Danigo vd 2021). Ayrıca Xu ve arkadaşlarının (2024) yapmış olduğu çalışmada Anjiyotensin II tip-2 reseptör sinyalinin Hippo yolunun inaktivasyonu ile karaciğer hasarı onarımını ve rejenerasyonunu desteklediği rapor edilmiştir. Streste olmayan hücrelere 10 nM LST uygulandığında AT2R ekspresyonunun kontrole göre 4,1 kat artış gösterdiği buna karşında streste olan hücrelere LST 10nM konsantrasyonda uygulandığında 1,59 kat artış gözlemlenmiştir. Streste kalan pozitif kontrolün kontrole göre, 0,77 kat, negatif kontrolün ise 0,95 kat azaldığı gözlemlenmiştir. AT2R'nin azalması ile fibrozisin arttığı bilinmektedir. Yapılan

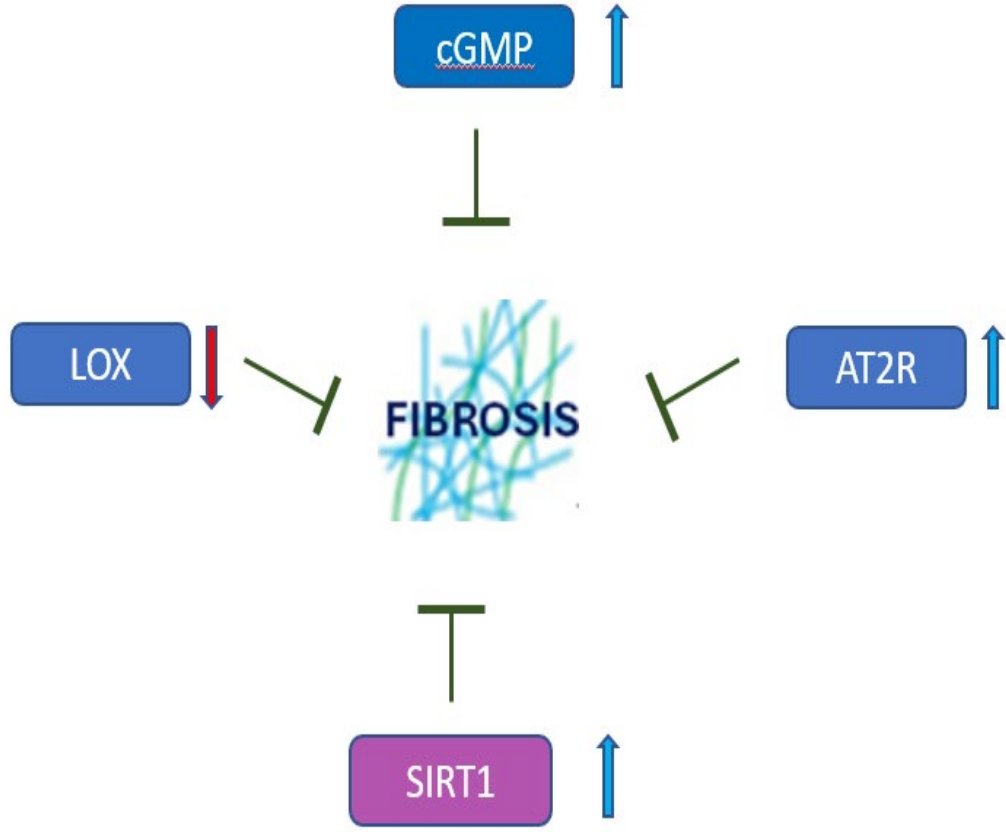
çalışmada LST'nin AT2R üzerinden etki ederek anti fibrotik etkisinin bu yolak ile etki edebileceği düşünülmektedir.

Sirtuin 1 (SIRT1), sınıf III histon deasetilazlara ait bir nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)-bağımlı deasetilazdır. SIRT1 böbrek hasarı ve fibroziste koruyucu bir rol oynamaktadır (Liv d. 2021). SIRT1 inhibisyonunun miyofibroblastın immün gözetimden kaçarak daha sonra birikim ve akciğer fibrozisi ile sonuçlanabileceği bilinmektedir (Bulvik vd. 2020). Yapılan tez çalışmasında strese olan iOA-MK hücrelerine LST konsantrasyonları uygulandığında konsantrasyon arttıkça SIRT ekspresyon seviyesi azalmıştır. Stres indüklenen pozitif kontrol grubunda, kontrol ile aynı seviyede SIRT1 ekspresyonu gözlemlenirken stres sonrası LST uygulanan konsantrasyonlarda SIRT1 seviyesi kontrol ve pozitif kontrole göre artmıştır. SIRT1 stres sonrasında hücrenin sağ kalımı için eksprese olarak hücrelerin canlılık ve proliferasyonunu desteklemiştir. LST'nin bilinen antifibrotik etkisinin aynı zamanda SIRT1 aktivitesini artırarak yaptığı düşünülmektedir.

SIRT1'in aşırı ekspresyonunun TGFβR1 ve P-Smad2/3 seviyelerini baskıladığı ve P-Smad2/3'ün TGFβ'nın downregüle olması ile SIRT1'in Smad2/3'e bağlanarak TGFβ ile indüklenen fibrozisi inhibe ettiği rapor edilmiştir (Liu vd 2019). TGFβ1, TGFβ reseptörü 1 (TGFR1, ALK5 olarak da bilinir) tarafından Smad2 ve Smad3'ün fosforilasyonunu ve aktivasyonunu içeren çok iyi tanımlanmış bir kanonik sinyal yolu aracılığıyla etki eder (Meng vd. 2016). Yapılan tez çalışmasında, LST'nin TGFβR1 ekspresyonuna etkisi araştırılmıştır. SIRT1 ekspresyonu TGFβR1'e göre stres uygulama sonrası uygulanan LST'nin tüm konsantrasyonlarında overeksprese olduğu gözlemlenmiştir. TGFβR1 tek başına değerlendirildiğinde kontrol ve pozitif kontrole göre uygulanan konsantrasyonlarda upregüle olmuştur. Stres uygulanmayan hücrelere LST uygulaması sonrası TGFβR1'in downregüle olması anti-fibrotik etki ile daha uyumlu iken, çalışma bulguları bunun tam aksini göstermektedir. Bu bulgular ışığında antifibrotik etkilerin TGFβR1 üzerinden değil LST'in SIRT1 ekspresyonunun upregüle etmesi ile ilişki olması daha muhtemel gözükmemektedir.

Siklik guanozine monofosfatın (cGMP), renal fibrozisi inhibe ettiği bilinmektedir (Abramicheva ve Plotnikov, 2022). Yapılan tez çalışmasında stres sonrası uygulanan 20 nM LST konsantrasyonunda cGMP strese olan pozitif kontrole göre upregüle olmuştur. LST, iOA-MKH'lerinde oksidatif stres karşısında cGMP'i artırarak antifibrotik etki yaratabileceği düşünülmektedir (Şekil 4.9.).

Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF β 1) vücutta birçok hücre tarafından salgılanan önemli bir sitokindir. Üç farklı TGF β izoformu bulunmaktadır. TGF β 1 ve TGF β 3 tüm hücre tiplerinde üretilen bir sinyal proteinleridir. Genellikle inaktif formda salgılanır ve sonrasında aktivasyon gerektirir. Yara iyileşmesini koordine eder, bağışıklık hücresi işlevini modüle eder, hücre dışı matrisi korur ve epitel ve endotel hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenler. TGF β izoformları, TGF β tip I ve tip II reseptörleri (sırasıyla T β RI ve T β RII) olarak bilinen iki yüzey reseptörü aracılığıyla sinyal verir. (Huang vd., 2014). Yapılan tez çalışmasında TGF β 1 üzerinde yapılan analizlerde stres uygulamasından sonra uygulanan LST konsantrasyonlarında özellikle 10 nM, 20 nM ve 50 nM konsantrasyonlarda TGF β 1 ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. TGF β 1 ile ilişkili olan TGF β R1 üzerinde yapılan analizlerde de stres uygulamasından sonra uygulanan tüm LST konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir. TGF β 1 protein seviyelerinde ise özellikle 24 ve 72 saatlerde stres uygulamasından sonra uygulanan tüm LST konsantrasyonlarında artış gözlemlenmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak TGF β yolağının hem reseptör düzeyinde hem de protein ekspresyonu düzeyinde belirgin aktivasyonunun fibrozisi teşvik ettiği düşünülmektedir. TGF β yolağındaki artışlar ECM modifikasyonunda artışa neden olduğundan TGF β 1'in profibrotik yönünde etkisi olabileceği düşünülmektedir. TGF β 3 üzerinde yapılan analizlerde ise özellikle oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 10 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 12,5 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 10 nM konsantrasyonda Losartan uygulandığında 9,84 kat artmıştır. Oksidatif stres modeli oluşturulmayan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 9,28 kat, oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelere 50 nM konsantrasyonda LST uygulandığında 12,78 kat artmıştır. Bu bilgiler doğrultusunda 20 nM ve 50 nM LST uygulamasındaki artışlar TGF β 3'ün antifibrotik etkili profil ortaya koyduğunu göstermektedir. TGF β 1'deki artış profibrotik bir etki olarak görüldüğü TGF β 3/TGF β 1 oranının önemli ölçüde artması (yaklaşık 3 kat) bu etkinin antifibrotik yönde olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak yüksek TGF β 3/TGF β 1 oranı, LOX ekspresyonundaki azalma, SIRT1, AT2R ve cGMP ekspresyonlarındaki artış LST'nin antifibrotik etkisini *in vitro* olarak iOA-MKH'lerde ortaya koymaktadır.



Şekil 5.1. LST'nin antifibrotik etkisinin grafiksel özeti. LOX'un ekspresyon seviyesinin azalması ile LST'nin oksidatif stres ile tetiklenen fibrozisin azalması ile antifibrotik etkisi olabilmektedir. LST'nin AT2R üzerinden etki etmesi fibrozis oluşumunu engellemektedir. cGMP'nin ekspresyon seviyesinin LST konsantrasyonunda artması ile antifibrotik etki göstermektedir. SIRT1'nin antifibrotik etkisinin yanı sıra proliferatif etkisi de olduğu bilinmektedir. SIRT1 ekspresyonunun artması ile fibrozis oluşumunun azalacağı ve antifibrotik etkinin bu yolak üzerinden olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde LST'nin renal fibrozisi TGF β /smad üzerinden inhibe ettiği (Zou vd. 2022), klinik çalışmalarla karaciğer fibrozisi (Salama vd. 2016), hacimsel kas yaralanmasında oluşan fibrozisi (Garg vd. 2014) inhibe ettiği ve özellikle korneada topikal uygulama ile antifibrotik etkiye sahip olduğu rapor edilmektedir (Sampaio vd. 2022). Fakat bu etkilerin moleküler mekanizması kornea özelinde yeterince aydınlatılamamıştır.

Yapılan tez çalışmasında LST'nin antifibrotik etkisinin iOA-MKH'leri üzerinde olası kullandığı moleküler yolağın aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla fibrozis ile ilişkili LOX, cGMP, TGF β R1, AT2R, anjiyogenez ve LOX ile ilişkili VEGF ve proliferasyonda ve antifibrotik yolda etkili olan SIRT1 gen ekspresyon seviyesi strese olan hücrelerde LST'nin bu genlerin ekspresyon seviyesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bulgular sonucunda LST'nin iOA-MKH'leri üzerindeki etkisinin konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değişim gösterdiği gözlemlenmiştir. LST, SIRT1, AT2R ve cGMP ekspresyon seviyesini artırıp LOX ekspresyonunu downregüle ettiği, LOX ve VEGF'in literatürün aksine ters orantılı şekilde işlev gösterdiği bulunmuştur. LOX ve VEGF arasında tez çalışmasında çalışılmayan miRNA'ların görev alabileceği ve gen regülasyonunu bu şekilde sağladığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak LST'nin antifibrotik etkisini LOX, cGMP, AT2R ve SIRT1 üzerinden gerçekleştirebileceği *in vitro* olarak iOA-MKH'lerinde gösterilmiştir. Tez çalışması sonunda LST'nin ROS'la ilişkilendirilen fibrozisi engelleyebileceği LOX, cGMP, AT2R ve SIRT1 genleri üzerinden *in vitro* olarak iOA-MKH'lerinde gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abib, F. C., & Barreto Jr, J. (2001). Behavior of corneal endothelial density over a lifetime. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 27(10), 1574-1578.
- Abramicheva, P. A., & Plotnikov, E. Y. (2022). Hormonal regulation of renal fibrosis. *Life*, 12(5), 737.
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Luz-Crawford, P., Aguila-Díaz, C., Fernandez, A., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2015). Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 6, 1-14.
- Al-Hattab, D. S., Chattopadhyaya, S., & Czubryt, M. P. (2022). Canadian contributions in fibroblast biology. *Cells*, 11(15), 2272.
- Ashry, O., Schnecko, A., Clauss, W. G., & Fronius, M. (2014). Evidence for expression and function of angiotensin II receptor type 1 in pulmonary epithelial cells. *Respiratory physiology & neurobiology*, 195, 37-40.
- Akhir, N. A. M. A., Chua, L. S., Majid, F. A. A., & Sarmidi, M. R. (2011). Cytotoxicity of aqueous and ethanolic extracts of *Ficus deltoidea* on human ovarian carcinoma cell line. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 1(4), 397-409.
- Anan, H. H., Zidan, R. A., Shaheen, M. A., & Abd-El Fattah, E. A. (2016). Therapeutic efficacy of bone marrow derived mesenchymal stromal cells versus losartan on adriamycin-induced renal cortical injury in adult albino rats. *Cytotherapy*, 18(8), 970-984.
- Antar, S. A., Ashour, N. A., Marawan, M. E., & Al-Karmalawy, A. A. (2023). Fibrosis: types, effects, markers, mechanisms for disease progression, and its relation with oxidative stress, immunity, and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 4004.
- Antar, S. A., Abdo, W., Taha, R. S., Farage, A. E., El-Moselhy, L. E., Amer, M. E., Monsef, A. S. A., Hamid, A. M. A., Kamel, E. M., & Ahmeda, A. F. (2022). Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by mitigating oxidative stress and inflammation, and upregulating Nrf2/HO-1 signaling in diabetic rats. *Life sciences*, 291, 120260.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Basu, S., Hertsenbergh, A., Funderburgh, M. L., & Funderburgh, J. L. (2014). Limbal Biopsy Derived Stromal Stem Cells Prevent Corneal Scarring. *Investigative ophthalmology & visual science*, 55(13), 5172-5172.
- Basu, S., Hertsenbergh, A. J., Funderburgh, M. L., Burrow, M. K., Mann, M. M., Du, Y., Lathrop, K. L., Syed-Picard, F. N., Adams, S. M., & Birk, D. E. (2014). Human limbal biopsy-derived stromal stem cells prevent corneal scarring. *Science translational medicine*, 6(266), 266ra172-266ra172.
- Baker, A.-M., Bird, D., Welte, J. C., Gourelaouen, M., Lang, G., Murray, G. I., Reynolds, A. R., Cox, T. R., & Erler, J. T. (2013). Lysyl oxidase plays a critical role in endothelial cell stimulation to drive tumor angiogenesis. *Cancer research*, 73(2), 583-594.
- Barratt, S. L., Flower, V. A., Pauling, J. D., & Millar, A. B. (2018). VEGF (vascular endothelial growth factor) and fibrotic lung disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1269.
- Beuerman, R. W., & Pedroza, L. (1996). Ultrastructure of the human cornea. *Microscopy research and technique*, 33(4), 320-335.
- Begicevic, R.-R., & Falasca, M. (2017). ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2362.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 11, 127-152.
- Bongso, A., & Fong, C.-Y. (2013). The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9, 226-240.
- Bongso, A., & Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 18(6), 827-842.
- Bukowiecki, A., Hos, D., Cursiefen, C., & Eming, S. A. (2017). Wound-healing studies in cornea and skin: parallels, differences and opportunities. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 125

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Bulvik, R., Breuer, R., Dvir-Ginzberg, M., Reich, E., Berkman, N., & Wallach-Dayana, S. B. (2020). SIRT1 deficiency, specifically in fibroblasts, decreases apoptosis resistance and is associated with resolution of lung-fibrosis. *Biomolecules*, 10(7), 996.
- Chakravarti, S., Wu, F., Vij, N., Roberts, L., & Joyce, S. (2004). Microarray studies reveal macrophage-like function of stromal keratocytes in the cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(10), 3475-3484.
- Casas, A. I., Nogales, C., Mucke, H. A., Petrain, A., Cuadrado, A., Rojo, A. I., Ghezzi, P., Jaquet, V., Augsburger, F., & Dufrasne, F. (2020). On the clinical pharmacology of reactive oxygen species. *Pharmacological reviews*, 72(4), 801-828.
- Chan, M. F., Li, J., Bertrand, A., Casbon, A.-J., Lin, J. H., Maltseva, I., & Werb, Z. (2013). Protective effects of matrix metalloproteinase-12 following corneal injury. *Journal of cell science*, 126(17), 3948-3960.
- Chen, S., Mienaltowski, M. J., & Birk, D. E. (2015). Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Experimental eye research*, 133, 69-80.
- Chen, X., & Liu, G. (2017). Development of orbital adipose-derived stem cells as a model for studying the formation of baggy lower eyelids. *Medical Hypotheses*, 103, 78-80.
- Choudhary, D. S., & Agrawal, N. (2018). New surgical modality for management of corneal perforation using bowman membrane. *Cornea*, 37(7), 919-922.
- Cohn, R. D., Van Erp, C., Habashi, J. P., Soleimani, A. A., Klein, E. C., Lisi, M. T., Gamradt, M., Ap Rhys, C. M., Holm, T. M., & Loeys, B. L. (2007). Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- β -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nature medicine*, 13(2), 204-210.
- Coster, D. J., & Williams, K. A. (2005). The impact of corneal allograft rejection on the long-term outcome of corneal transplantation. *American journal of ophthalmology*, 140(6), 1112-1122.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Crane, J. F., & Trainor, P. A. (2006). Neural crest stem and progenitor cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22(1), 267-286.
- Cutroneo, K. R. (2007). TGF- β -induced fibrosis and SMAD signaling: oligo decoys as natural therapeutics for inhibition of tissue fibrosis and scarring. *Wound Repair and Regeneration*, 15, S54-S60.
- Choi, C. H., Park, Y.-A., Choi, J.-J., Song, T., Song, S. Y., Lee, Y.-Y., Lee, J.-W., Kim, T.-J., Kim, B.-G., & Bae, D.-S. (2012). Angiotensin II type I receptor and miR-155 in endometrial cancers: synergistic antiproliferative effects of anti-miR-155 and losartan on endometrial cancer cells. *Gynecologic oncology*, 126(1), 124-131
- Chen, D.-R., Lu, D.-Y., Lin, H.-Y., & Yeh, W.-L. (2014). Mesenchymal stem cell-induced doxorubicin resistance in triple negative breast cancer. *BioMed research international*, 2014(1), 532161.
- Conte, E. (2022). Targeting monocytes/macrophages in fibrosis and cancer diseases: Therapeutic approaches. *Pharmacology & Therapeutics*, 234, 108031
- Danigo, A., Rovini, A., Bessaguet, F., Bouchenaki, H., Bernard, A., Sturtz, F., Bourthoumieu, S., Desmoulière, A., Magy, L., & Demiot, C. (2021). The angiotensin II type 2 receptor, a target for protection and regeneration of the peripheral nervous system? *Pharmaceuticals*, 14(3), 175.
- Davidson, M. D., Burdick, J. A., & Wells, R. G. (2020). Engineered biomaterial platforms to study fibrosis. *Advanced healthcare materials*, 9(8), 1901682
- de Oliveira, R. C., Tye, G., Sampaio, L. P., Shiju, T. M., DeDreu, J., Menko, A. S., Santhiago, M. R., & Wilson, S. E. (2021). TGF β 1 and TGF β 2 proteins in corneas with and without stromal fibrosis: delayed regeneration of apical epithelial growth factor barrier and the epithelial basement membrane in corneas with stromal fibrosis. *Experimental eye research*, 202, 108325
- de Oliveira, R. C., & Wilson, S. E. (2020). Fibrocytes, wound healing, and corneal fibrosis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 61(2), 28-28.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- DelMonte, D. W., & Kim, T. (2011). Anatomy and physiology of the cornea. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 37(3), 588-598.
- Dennis, J. E., Carbillet, J.-P., Caplan, A. I., & Charbord, P. (2002). The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*, 170(2-3), 73-82.
- Distler, J. H., Györfi, A.-H., Ramanujam, M., Whitfield, M. L., Königshoff, M., & Lafyatis, R. (2019). Shared and distinct mechanisms of fibrosis. *Nature Reviews Rheumatology*, 15(12), 705-730.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317.
- Du, Y., Funderburgh, M. L., Mann, M. M., SundarRaj, N., & Funderburgh, J. L. (2005). Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells*, 23(9), 1266-1275.
- Dua, H. S., & Azuara-Blanco, A. (2000). Limbal stem cells of the corneal epithelium. *Survey of ophthalmology*, 44(5), 415-425.
- Dua, H. S., King, A. J., & Joseph, A. (2001). A new classification of ocular surface burns. *British Journal of Ophthalmology*, 85(11), 1379-1383.
- Day, R. M., & Suzuki, Y. J. (2005). Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose-response*, 3(3), dose-response. 003.003. 010.
- Denu, R. A., & Hematti, P. (2016). Effects of oxidative stress on mesenchymal stem cell biology. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016(1), 2989076.
- Eddy, A. A. (1996). Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 7(12), 2495-2508.
- Eghrari, A. O., Riazuddin, S. A., & Gottsch, J. D. (2015). Overview of the cornea: structure, function, and development. *Progress in molecular biology and translational science*, 134, 7-23.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Ellenberg, D., Azar, D. T., Hallak, J. A., Tobaigy, F., Han, K. Y., Jain, S., Zhou, Z., & Chang, J.-H. (2010). Novel aspects of corneal angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Progress in retinal and eye research*, 29(3), 208-248.
- Eslani, M., Baradaran-Rafii, A., Movahedan, A., & Djalilian, A. R. (2014). The ocular surface chemical burns. *Journal of ophthalmology*, 2014(1), 196827.
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. In *Advanced protocols in oxidative stress II 2010* (pp. 57-72). In: Humana Press, Totowa, NJ.[View at Publisher][DOI: 10.1007/978-1-60761-411.
- Fini, M. E., & Stramer, B. M. (2005). How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*, 24(8), S2-S11.
- Firuzi, O., Miri, R., Tavakkoli, M., & Saso, L. (2011). Antioxidant therapy: current status and future prospects. *Current medicinal chemistry*, 18(25), 3871-3888.
- Follin, B., Tratwal, J., Haack-Sørensen, M., Elberg, J. J., Kastrup, J., & Ekblond, A. (2013). Identical effects of VEGF and serum-deprivation on phenotype and function of adipose-derived stromal cells from healthy donors and patients with ischemic heart disease. *Journal of Translational Medicine*, 11, 1-14.
- Flores-Junior, L. A. P., Santos, E. G. D., Muri, E. M. F., Lima, C. H. S., & Dias, L. R. S. (2024). Putative Inhibitor of Tc CYP51 from a Library of Approved Drugs: A Virtual Screening Study. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 35(9), e-20240064.
- Gain, P., Jullienne, R., He, Z., Aldossary, M., Acquart, S., Cognasse, F., & Thuret, G. (2016). Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA ophthalmology*, 134(2), 167-173.
- Gao, X., Guo, K., Santosa, S. M., Montana, M., Yamakawa, M., Hallak, J. A., Han, K.-Y., Doh, S. J., Rosenblatt, M. I., & Chang, J.-H. (2019). Application of corneal injury models in dual fluorescent reporter transgenic mice to understand the roles of the cornea and limbus in angiogenic and lymphangiogenic privilege. *Scientific Reports*, 9(1), 12331.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Gage, P. J., Rhoades, W., Prucka, S. K., & Hjalt, T. (2005). Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(11), 4200-4208.
- Garg, K., Corona, B. T., & Walters, T. J. (2014). Losartan administration reduces fibrosis but hinders functional recovery after volumetric muscle loss injury. *Journal of Applied Physiology*, 117(10), 1120-1131.
- Geroski, D. H., Matsuda, M., Yee, R. W., & Edelhauser, H. F. (1985). Pump function of the human corneal endothelium: effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology*, 92(6), 759-763.
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*, 100(9), 1249-1260.
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortessidis, A., & Simmons, P. J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of cell science*, 116(9), 1827-1835.
- Grady, E. F., Sechi, L. A., Griffin, C. A., Schambelan, M., & Kalinyak, J. E. (1991). Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *The Journal of clinical investigation*, 88(3), 921-933.
- Guérin, L.-P., Le-Bel, G., Desjardins, P., Couture, C., Gillard, E., Boisselier, É., Bazin, R., Germain, L., & Guérin, S. L. (2021). The human tissue-engineered cornea (hTEC): Recent Progress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1291.
- Haigis, M. C., & Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5(1), 253-295.
- Hanson, S. E., Kim, J., & Hematti, P. (2013). Comparative analysis of adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from abdominal and breast tissue. *Aesthetic Surgery Journal*, 33(6), 888-898.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9, 1-14.
- Hong, Y. A., Kim, J. E., Jo, M., & Ko, G.-J. (2020). The role of sirtuins in kidney diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6686.
- Huang, T., Schor, S. L., & Hinck, A. P. (2014). Biological activity differences between TGF- β 1 and TGF- β 3 correlate with differences in the rigidity and arrangement of their component monomers. *Biochemistry*, 53(36), 5737-5749.
- Hecker, L., Logsdon, N. J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., Hock, T., Meldrum, E., Sanders, Y. Y., & Thannickal, V. J. (2014). Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance. *Science translational medicine*, 6(231), 231ra247-231ra247.
- JACOBSEN, I. E., Jensen, O., & Prause, J. (1984). Structure and composition of bowman's membrane: study by frozen resin cracking. *Acta ophthalmologica*, 62(1), 39-53.
- Jester, J. V. (2008). Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Seminars in cell & developmental biology*,
- Joyce, N. C. (2005). Cell cycle status in human corneal endothelium. *Experimental eye research*, 81(6), 629-638.
- Jurgens, W. J., Oedayrajsingh-Varma, M. J., Helder, M. N., ZandiehDoulabi, B., Schouten, T. E., Kuik, D. J., Ritt, M. J., & Van Milligen, F. J. (2008). Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell and tissue research*, 332, 415-426.
- Kang, H. M., Kim, J., Park, S., Kim, J., Kim, H., Kim, K. S., Lee, E. J., Seo, S. I., Kang, S. G., & Lee, J.-E. (2009). Insulin-secreting cells from human eyelid-derived stem cells alleviate type I diabetes in immunocompetent mice. *Stem Cells*, 27(8), 1999-2008.
- Karamichos, D., Guo, X. Q., Hutcheon, A. E., & Zieske, J. D. (2010). Human corneal fibrosis: an in vitro model. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(3), 1382-1388.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Kapoor, D., Singh, S., Kumar, V., Romero, R., Prasad, R., & Singh, J. (2019). Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). *Plant gene*, 19, 100182.
- Kayabasi, H., Yilmaz, Z., Sit, D., Kadiroglu, A., & Yilmaz, E. (2013). The effects of Losartan on oxidative stress and inflammation in non-diabetic patients undergoing chronic hemodialysis. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*, 17(2).
- Kato, K., & Hecker, L. (2020). NADPH oxidases: Pathophysiology and therapeutic potential in age-associated pulmonary fibrosis. *Redox Biology*, 33, 101541.
- Kim, H., Baek, C. H., Lee, R. B., Chang, J. W., Yang, W. S., & Lee, S. K. (2017). Anti-fibrotic effect of losartan, an angiotensin II receptor blocker, is mediated through inhibition of ER stress via up-regulation of SIRT1, followed by induction of HO-1 and thioredoxin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), 305.
- Kwon, A., Kim, Y., Kim, M., Kim, J., Choi, H., Jekarl, D. W., Lee, S., Kim, J. M., Shin, J.-C., & Park, I. Y. (2016). Tissue-specific differentiation potency of mesenchymal stromal cells from perinatal tissues. *Scientific Reports*, 6(1), 23544.
- Lagali, N., Germundsson, J., & Fagerholm, P. (2009). The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(9), 4192-4198.
- Lafuse, W. P., Wozniak, D. J., & Rajaram, M. V. (2020). Role of cardiac macrophages on cardiac inflammation, fibrosis and tissue repair. *Cells*, 10(1), 51.
- Laczko, R., & Csiszar, K. (2020). Lysyl oxidase (LOX): functional contributions to signaling pathways. *Biomolecules*, 10(8), 1093.
- Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., & Llorens-Cortes, C. (1997). Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Frontiers in neuroendocrinology*, 18(4), 383-439.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Li, J., Qu, X., Ricardo, S. D., Bertram, J. F., & Nikolic-Paterson, D. J. (2010). Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney: potential role in deacetylation of Smad3. *The American journal of pathology*, 177(3), 1065-1071.
- Li, P., Liu, Y., Qin, X., Chen, K., Wang, R., Yuan, L., Chen, X., Hao, C., & Huang, X. (2021). SIRT1 attenuates renal fibrosis by repressing HIF-2 α . *Cell Death Discovery*, 7(1), 59.
- Liu, Z.-H., Zhang, Y., Wang, X., Fan, X.-F., Zhang, Y., Li, X., Gong, Y.-s., & Han, L.-P. (2019). SIRT1 activation attenuates cardiac fibrosis by endothelial-to-mesenchymal transition. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109227.
- Ljubimov, A. V., & Saghizadeh, M. (2015). Progress in corneal wound healing. *Progress in retinal and eye research*, 49, 17-45.
- Mafi, P., Hindocha, S., Mafi, R., Griffin, M., & Khan, W. (2011). Suppl 2: Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization-A systematic review of the literature. *The open orthopaedics journal*, 5, 253.
- Mailey, B., Hosseini, A., Baker, J., Young, A., Alfonso, Z., Hicok, K., Wallace, A. M., & Cohen, S. R. (2014). Adipose-derived stem cells: methods for isolation and applications for clinical use. *Stem Cells and Tissue Repair: Methods and Protocols*, 161-181.
- Majumdar, M. K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W. B., Moorman, M. A., McIntosh, K. R., & Mosca, J. D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science*, 10(2), 228-241.
- Marshall, G. E., Konstas, A. G., & Lee, W. R. (1991). Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea: I. Types I-IV collagen and laminin. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 229(2), 157-163.
- McKay, T. B., Hutcheon, A. E., Zieske, J. D., & Ciolino, J. B. (2020). Extracellular vesicles secreted by corneal epithelial cells promote myofibroblast differentiation. *Cells*, 9(5), 1080.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Meek, K., & Fullwood, N. (2001). Corneal and scleral collagens—a microscopist's perspective. *Micron*, 32(3), 261-272.
- Meng, X.-m., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2016). TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325-338.
- Meng, Q., Bhandary, B., Bhuiyan, M. S., James, J., Osinska, H., Valiente-Alandi, I., Shay-Winkler, K., Gulick, J., Molkentin, J. D., & Blaxall, B. C. (2018). Myofibroblast-specific TGF β receptor II signaling in the fibrotic response to cardiac myosin binding protein C-induced cardiomyopathy. *Circulation research*, 123(12), 1285-1297.
- Meek, K. M., & Knupp, C. (2015). Corneal structure and transparency. *Progress in retinal and eye research*, 49, 1-16.
- Mezzano, S. A., Ruiz-Ortega, M., & Egido, J. (2001). Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension*, 38(3), 635-638.
- Michel, M. C., Foster, C., Brunner, H. R., & Liu, L. (2013). A systematic comparison of the properties of clinically used angiotensin II type 1 receptor antagonists. *Pharmacological reviews*, 65(2), 809-848.
- Mitragotri, N., Damala, M., Singh, V., & Basu, S. (2019). Limbal stromal stem cells in corneal wound healing: current perspectives and future applications. *Corneal Regeneration: Therapy and Surgery*, 387-402.
- Mohan, R. R., Hutcheon, A. E., Choi, R., Hong, J., Lee, J., Mohan, R. R., Ambrósio Jr, R., Zieske, J. D., & Wilson, S. E. (2003). Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Experimental eye research*, 76(1), 71-87.
- Morishige, N., Takagi, Y., Chikama, T.-i., Takahara, A., & Nishida, T. (2011). Three-dimensional analysis of collagen lamellae in the anterior stroma of the human cornea visualized by second harmonic generation imaging microscopy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(2), 911-915.
- Morrissey, J. J., & Klahr, S. (1999). Effect of AT2 receptor blockade on the pathogenesis of renal fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 276(1), F39-F45.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Musiał-Wysocka, A., Kot, M., & Majka, M. (2019). The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. *Cell transplantation*, 28(7), 801-812.
- Mihaylova, Z., Tsikandelova, R., Sanimirov, P., Gateva, N., Mitev, V., & Ishkitiev, N. (2018). Role of PDGF-BB in proliferation, differentiation and maintaining stem cell properties of PDL cells in vitro. *Archives of oral biology*, 85, 1-9.
- Naderi, N., Combella, E. J., Griffin, M., Sedaghati, T., Javed, M., Findlay, M. W., Wallace, C. G., Mosahebi, A., Butler, P. E., & Seifalian, A. M. (2017). The regenerative role of adipose-derived stem cells (ADSC) in plastic and reconstructive surgery. *International wound journal*, 14(1), 112-124.
- Nepali, S., Park, M., Lew, H., & Kim, O. (2018). Comparative Analysis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Orbital and Abdominal Fat. *Stem cells international*, 2018(1), 3932615.
- Nouet, S., & Nahmias, C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 11(1), 1-6.
- Oishi, K., Noguchi, H., Yukawa, H., & Hayashi, S. (2009). Differential ability of somatic stem cells. *Cell transplantation*, 18(5-6), 581-590.
- Orbay, H., Tobita, M., & Mizuno, H. (2012). Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications. *Stem cells international*, 2012(1), 461718.
- Osei-Bempong, C., Figueiredo, F. C., & Lako, M. (2013). The limbal epithelium of the eye—a review of limbal stem cell biology, disease and treatment. *Bioessays*, 35(3), 211-219.
- Pantazi, E., Bejaoui, M., Zaouali, M. A., Folch-Puy, E., Rolo, A. P., Panisello, A., Palmeira, C. M., & Roselló-Catafau, J. (2015). Losartan activates sirtuin 1 in rat reduced-size orthotopic liver transplantation. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(26), 8021.
- Peroni, D., Scambi, I., Pasini, A., Lisi, V., Bifari, F., Krampera, M., Rigotti, G., Sbarbati, A., & Galiè, M. (2008). Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Experimental Cell Research*, 314(3), 603-615.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Pinnamaneni, N., & Funderburgh, J. L. (2012). Concise review: stem cells in the corneal stroma. *Stem Cells*, 30(6), 1059-1063.
- Polisetti, N., Islam, M. M., & Griffith, M. (2013). The artificial cornea. *Corneal Regenerative Medicine: Methods and Protocols*, 45-52.
- Porth, J. M., Deiotte, E., Dunn, M., & Bashshur, R. (2019). A review of the literature on the global epidemiology of corneal blindness. *Cornea*, 38(12), 1602-1609.
- Ramponi, D. R. (2017). Chemical burns of the eye. *Advanced emergency nursing journal*, 39(3), 193-198.
- Ratzlaff, T., Wei, D., Wang, Y., Xu, M., & Johnson, D. (2017). Collagen cross-linking as an adjunct for repair of corneal lacerations: a cadaveric study. *Canadian Journal of Ophthalmology*, 52(5), 508-512.
- Rohrich, R. J., Ahmad, J., Hamawy, A. H., & Pessa, J. E. (2009). Is intraorbital fat extraorbital? Results of cross-sectional anatomy of the lower eyelid fat pads. *Aesthetic Surgery Journal*, 29(3), 189-193.
- Rong, Z., Wang, M., Hu, Z., Stradner, M., Zhu, S., Kong, H., Yi, H., Goldrath, A., Yang, Y.-G., & Xu, Y. (2014). An effective approach to prevent immune rejection of human ESC-derived allografts. *Cell stem cell*, 14(1), 121-130.
- Ruberti, J. W., Sinha Roy, A., & Roberts, C. J. (2011). Corneal biomechanics and biomaterials. *Annual review of biomedical engineering*, 13(1), 269-295.
- Ruiz-Ortega, M., Esteban, V., Suzuki, Y., Ruperez, M., Mezzano, S., Ardiles, L., Justo, P., Ortiz, A., & Egido, J. (2003). Renal expression of angiotensin type 2 (AT2) receptors during kidney damage. *Kidney international*, 64, S21-S26.
- Ruiz-Ortega, M., Lorenzo, Ó., Rupérez, M., Blanco, J., & Egido, J. (2001). Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor-κB and AP-1 in the kidney: role of AT1 and AT2 receptors. *The American journal of pathology*, 158(5), 1743-1756.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Rüfer, F., Schröder, A., & Erb, C. (2005). White-to-white corneal diameter: normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea*, 24(3), 259-261.
- Richter, K., & Kietzmann, T. (2016). Reactive oxygen species and fibrosis: further evidence of a significant liaison. *Cell and tissue research*, 365, 591-605.
- Raei, M., Ahmadi, M., Abrotan, S., Razavi, A., Hedayatizadeh-Omran, A., Shamshirian, A., Heydari, K., Saeedi, M., & Alizadeh-Navaei, R. (2024). Effect of Losartan on Cell Proliferation and Reactive Oxygen Species Scavenging in Gastric Cancer Cell Lines. *Eurasian Journal of Medicine and Oncology*, 8(2), 135-140.
- Saccu, G., Menchise, V., Giordano, C., Delli Castelli, D., Dastrù, W., Pellicano, R., Tolosano, E., Van Pham, P., Altruda, F., & Fagoonee, S. (2021). Regenerative approaches and future trends for the treatment of corneal burn injuries. *Journal of clinical medicine*, 10(2), 317.
- Sampaio, L. P., Hilgert, G. S., Shiju, T. M., Murillo, S. E., Santhiago, M. R., & Wilson, S. E. (2022). Topical losartan inhibits corneal scarring fibrosis and collagen type IV deposition after Descemet's membrane-endothelial excision in rabbits. *Experimental eye research*, 216, 108940.
- Sampaio, L. P., Hilgert, G. S., Shiju, T. M., Murillo, S. E., Santhiago, M. R., & Wilson, S. E. (2022). Topical losartan inhibits corneal scarring fibrosis and collagen type IV deposition after Descemet's membrane-endothelial excision in rabbits. *Experimental eye research*, 216, 108940.
- Salama, Z. A., Sadek, A., Abdelhady, A. M., Darweesh, S. K., Morsy, S. A., & Esmat, G. (2016). Losartan may inhibit the progression of liver fibrosis in chronic HCV patients. *Hepatobiliary surgery and nutrition*, 5(3), 249.
- Schinner, E., Schramm, A., Kees, F., Hofmann, F., & Schlossmann, J. (2013). The cyclic GMP-dependent protein kinase Ia suppresses kidney fibrosis. *Kidney international*, 84(6), 1198-1206.
- Schinner, E., Wetzl, V., Schramm, A., Kees, F., Sandner, P., Stasch, J. P., Hofmann, F., & Schlossmann, J. (2017). Inhibition of the TGF β signalling pathway by cGMP and cGMP-dependent kinase I in renal fibrosis. *FEBS Open Bio*, 7(4), 550-561.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Schuster, R., Rockel, J. S., Kapoor, M., & Hinz, B. (2021). The inflammatory speech of fibroblasts. *Immunological reviews*, 302(1), 126-146.
- Shimizu, H., Sakimoto, T., & Yamagami, S. (2019). Pro-inflammatory role of NLRP3 inflammasome in experimental sterile corneal inflammation. *Scientific Reports*, 9(1), 9596.
- Shiota, A., Shimabukuro, M., Fukuda, D., Soeki, T., Sato, H., Uematsu, E., Hirata, Y., Kurobe, H., Maeda, N., & Sakaue, H. (2012). Telmisartan ameliorates insulin sensitivity by activating the AMPK/SIRT1 pathway in skeletal muscle of obese db/db mice. *Cardiovascular diabetology*, 11, 1-9.
- Shukla, S., Mittal, S. K., Foulsham, W., Elbasiony, E., Singhanian, D., Sahu, S. K., & Chauhan, S. K. (2019). Therapeutic efficacy of different routes of mesenchymal stem cell administration in corneal injury. *The ocular surface*, 17(4), 729-736.
- Simpson, K. L., & McClellan, K. J. (2000). Losartan: a review of its use, with special focus on elderly patients. *Drugs & aging*, 16, 227-250.
- Singh, P., Tyagi, M., Kumar, Y., Gupta, K., & Sharma, P. (2013). Ocular chemical injuries and their management. *Oman journal of ophthalmology*, 6(2), 83-86.
- Soeken, T. A., Zhu, H., DeMartelaere, S., Davies, B. W., Kim, M., Wang, H.-C., Aden, J., Grimm, R., Alt, C., & Kochevar, I. E. (2018). Sealing of corneal lacerations using photoactivated rose bengal dye and amniotic membrane. *Cornea*, 37(2), 211-217.
- Sridhar, M. S. (2018). Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian journal of ophthalmology*, 66(2), 190-194.
- Stiemke, M. M., Edelhauser, H. F., & Geroski, D. H. (1991). The developing corneal endothelium: correlation of morphology, hydration and Na/K ATPase pump site density. *Current eye research*, 10(2), 145-156.
- Sun, Q., Zhang, Z., & Sun, Z. (2014). The potential and challenges of using stem cells for cardiovascular repair and regeneration. *Genes & diseases*, 1(1), 113-119.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Tandon, A., Tovey, J. C., Sharma, A., Gupta, R., & Mohan, R. R. (2010). Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Current molecular medicine*, 10(6), 565-578.
- Tian, Z., Yu, T., Liu, J., Wang, T., & Higuchi, A. (2023). Introduction to stem cells. *Progress in molecular biology and translational science*, 199, 3-32.
- Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*, 52(4), 639-672.
- Utheim, T. P., Aass Utheim, Ø., Salvanos, P., Jackson, C. J., Schrader, S., Geerling, G., & Sehic, A. (2018). Concise review: altered versus unaltered amniotic membrane as a substrate for limbal epithelial cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 7(5), 415-427.
- Van Harmelen, V., Röhrig, K., & Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*, 53(5), 632-637.
- Vayssade, M., & Nagel, M.-D. (2009). Stromal cells. *Front Biosci*, 14, 210-224.
- Vemuganti, G. K., Reddy, K., Iftekhar, G., Garg, P., & Sharma, S. (2004). Keratocyte loss in corneal infection through apoptosis: a histologic study of 59 cases. *BMC ophthalmology*, 4, 1-8.
- Vinuthinee, N., Azreen-Redzal, A., Juanarita, J., & Zunaina, E. (2015). Corneal laceration caused by river crab. *Clinical Ophthalmology*, 203-206.
- Wang, G., Cao, L., Wang, Y., Hua, Y., Cai, Z., Chen, J., Chen, L., Jin, Y., Niu, L., & Shen, H. (2017). Human eyelid adipose tissue-derived Schwann cells promote regeneration of a transected sciatic nerve. *Scientific Reports*, 7(1), 43248.
- West-Mays, J. A., & Dwivedi, D. J. (2006). The keratocyte: corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(10), 1625-1631.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Whitcher, J. P., Srinivasan, M., & Upadhyay, M. P. (2001). Corneal blindness: a global perspective. *Bulletin of the world health organization*, 79(3), 214-221.
- Willmann, D., Fu, L., & Melanson, S. W. (2017). Corneal injury.
- Wilson, S. E. (2023). Topical losartan: practical guidance for clinical trials in the prevention and treatment of corneal scarring fibrosis and other eye diseases and disorders. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 39(3), 191-206.
- Wilson, S. E. (2020). Corneal myofibroblasts and fibrosis. *Experimental eye research*, 201, 108272
- Wu, M., Peng, Z., Zu, C., Ma, J., Lu, S., Zhong, J., & Zhang, S. (2016). Losartan attenuates myocardial endothelial-to-mesenchymal transition in spontaneous hypertensive rats via inhibiting TGF- β /Smad signaling. *PLoS One*, 11(5), e0155730.
- Wylie-Sears, J., Levine, R. A., & Bischoff, J. (2014). Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor- β -induced phosphorylation of ERK. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(4), 870-875.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., & Tartaglia, L. A. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1821-1830.
- Xu, C. Y., Jiang, J., An, Y., Ye, P. F., Zhang, C. C., Sun, N. N., ... & Wei, W. (2024). Angiotensin II type-2 receptor signaling facilitates liver injury repair and regeneration via inactivation of Hippo pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 45(6), 1201-1213.
- Yam, G. H.-F., Fuest, M., Yusoff, N. Z. B. M., Goh, T.-W., Bandeira, F., Setiawan, M., Seah, X.-Y., Lwin, N.-C., Stanzel, T. P., & Ong, H.-S. (2018). Safety and feasibility of intrastromal injection of cultivated human corneal stromal keratocytes as cell-based therapy for corneal opacities. *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(8), 3340-3354.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

- Yamamoto-Nonaka, K., Koike, M., Asanuma, K., Takagi, M., Trejo, J. A. O., Seki, T., Hidaka, T., Ichimura, K., Sakai, T., & Tada, N. (2016). Cathepsin D in podocytes is important in the pathogenesis of proteinuria and CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(9), 2685-2700.
- Yao, Q., Qian, J., Lin, X., & Lindholm, B. (2004). Inhibition of the effect of high glucose on the expression of Smad in human peritoneal mesothelial cells. *The International journal of artificial organs*, 27(10), 828-834.
- Yawata, N., Awate, S., Liu, Y.-C., Yuan, S., Woon, K., Siak, J., Kawano, Y.-I., Sonoda, K.-H., Mehta, J. S., & Yawata, M. (2019). Kinetics of tear fluid proteins after endothelial keratoplasty and predictive factors for recovery from corneal haze. *Journal of clinical medicine*, 9(1), 63.
- Zou, J., Zhou, X., Ma, Y., & Yu, R. (2022). Losartan ameliorates renal interstitial fibrosis through metabolic pathway and Smurfs-TGF- β /Smad. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112931.
- Zhang, L., Coulson-Thomas, V. J., Ferreira, T. G., & Kao, W. W. (2015). Mesenchymal stem cells for treating ocular surface diseases. *BMC ophthalmology*, 15, 55-65.
- Zhang, X., Jeyalatha M, V., Qu, Y., He, X., Ou, S., Bu, J., Jia, C., Wang, J., Wu, H., & Liu, Z. (2017). Dry eye management: targeting the ocular surface microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), 1398.
- Zieske, J. D. (2001). Extracellular matrix and wound healing. *Current opinion in ophthalmology*, 12(4), 237-241.

