

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE
KAYNAKLI KORNEA ORGANOİD
MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

NEVİN ERSOY

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2020

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970171

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNDÜKLENMİŞ PLURİPOTENT KÖK HÜCRE
KAYNAKLI KORNEA ORGANOİD
MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
DOKTORA TEZİ

NEVİN ERSOY

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

Bu çalışma “TÜBİTAK 1001-Araştırma Projelerini Destekleme” programı kapsamında 217S654
proje numarası ile desteklenmiştir.

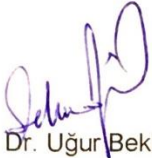
TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970171

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim
Dalı **Histoloji ve Embriyoloji Doktora** programı öğrencisi Nevin ERSOY ‘İndüklenmiş
Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi’ konulu
Doktora tezini **20.01.2020** tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. Alper BAĞRIYANIK

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Uğur Bekir ERGÜR

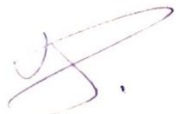
ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Şerife Esra ERDAL BAĞRIYANIK

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL

ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Meltem KURUŞ

ÜYE

İzmir Kâtip Çelebi Üniv. Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Güven ERBİL

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Hüseyin AKTUĞ

YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
TABLO DİZİNİ.....	vi
ŞEKİL DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	xi
TEŞEKKÜR.....	xii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1 Kornea	7
2.1.1 Kornea Anatomisi	7
2.1.2 Kornea Embriyolojisi.....	8
2.1.2.1 Kornea Epitel Tabakasının Gelişimi	11
2.1.2.2 Kornea Endotel Tabakasının Gelişimi.....	13
2.1.2.3 Kornea Stroma Tabakasının Gelişimi	14
2.1.3 Kornea Histolojisi.....	15
2.1.3.1 Epitel Tabakası.....	15
2.1.3.2. Bowman Tabakası	17
2.1.3.3 Stroma Tabakası	18
2.1.3.3.1 Stromal Kolajen.....	19
2.1.3.3.2 Fibril oluşturan kolajenin sentezi	19
2.1.3.3.3 Kolajenlerin Karakteristik Özellikleri	21
2.1.3.4 Dua Tabakası	23
2.1.3.5 Descemet Membranı	23
2.1.3.6 Endotel Tabakası	23
2.2 Kornea Hasarında Onarım	24
2.3 Korneaya Duyulan İhtiyaç	27

2.4 Kornea Hastalıklarında Hücresel Tedaviler.....	27
2.5 Kök Hücreler	29
2.5.1 Totipotent Kök Hücreler.....	30
2.5.2 Pluripotent Kök Hücre (PKH).....	32
2.5.3 Multipotent Kök Hücre (MKH).....	32
2.5.4 Oligopotent Kök Hücreler	33
2.5.5 Unipotent Kök Hücreler	33
2.5.6 İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (İPKH).....	33
2.6 Organoid Teknolojisi	34
2.7 Doku Mühendisliği.....	35
GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1 Araştırmanın Tipi	36
3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı	36
3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	36
3.4 Çalışma Materyali	36
3.5 Araştırmanın Değişkenleri.....	36
3.6 Veri Toplama Araçları	37
3.6.1 Başlangıç Materyali	37
3.6.2 İPKH'lerin Kültüre Edilmesi ve İdamesi	37
3.6.3 İPKH'lerden Kornea Organoidlerinin Eldesi.....	38
3.6.4 Kornea Organoid Kültür Oluşturulması ve İdamesi	38
3.6.5 Hücrelerin Farklılaştırılması.....	39
3.6.6 Karakterizasyon Analizleri	40
3.6.6.1 Whole Mount Boyama	40
3.6.6.2 İmmüno Floresan Boyama.....	40
3.6.6.3 İmmunohistokimyasal Boyama	41
3.6.6.4 Hematoksilen & Eosin Boyama.....	42

3.6.6.5 PAS Boyaması	42
3.6.6.6 Masson Trichrome Boyama.....	43
3.6.6.7 SEM (Scanning Electron Microscopy).....	43
3.6.6.8 TEM (Transmission Electron Microscopy)	43
3.6.6.9 Frozen (Cryo) Kesit için Hazırlık	44
3.6.6.10 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	44
3.6.6.11 Gerçek Zamanlı Gen Ekspresyon Analizi	44
3.6.6.12 İnsan ve Koyun Korneasının Desellülerizasyonu	45
3.6.6.13 İnsan ve Koyun Korneasının Resellülerizasyonu	45
3.6.6.14 DNA İzolasyonu.....	46
3.6.7 İstatistik	46
3.7 Araştırma Planı	46
3.8 Verilerin Değerlendirilmesi	48
3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları	48
3.10 Etik Kurul Onayı	48
BULGULAR	49
4.1 İPKH Üretim Yöntemlerinin Geliştirilmesi.....	49
4.2 Sağlıklı İnsan Fibroblast'larından İPKH'lerin Üretilmesi	49
4.2.1 Sağlıklı Gönüllü Bireylerden Cilt Biyopsisi Alınması ve Fibroblast Kültürü Yapılması	49
4.2.2 Sağlıklı Gönüllü Bireylerin Fibroblastlarından İPKH Üretilmesi.....	49
4.3 İPKH Hücrelerinin Korneaya Farklılaştırma Protokollerinin Test Edilmesi.....	49
4.4 Korneaya Farklılaştırma Basamaklarının Kalite Kontrol Analizleri	55
4.4.1 Transkript Düzeyinde Gen Ekspresyon Analizleri.....	56
4.4.2 Protein Düzeyinde Gen Ekspresyon Analizleri	57
4.4.3 Kornea Organoidlerinin Histolojik Kalite Kontrolü	61
4.4.4 Kornea Organoidlerinin İnce Yapı Analizleri	63
4.5 Kornea İskelesi Hazırlaması Protokollerinin Optimizasyonu	65

4.5.1 Korneanın Desellülerize Edilmesi ve Desellülerize İskelenin Histolojik Kalite Kontrolü.....	66
4.5.2 Desellülerize Kornea İskelesinin İnce Yapı Analizleri	75
4.6 Desellülerize Kornea İskelesinin Kontrol Hücre Hattı ve Organoid ile Resellülerizasyonu.....	76
4.6.1 Kontrol Hücre Hattı ile Resellülerizasyonu	76
4.6.1.1 Resellülerize Kornea İskelesinin Histolojik Kalite Kontrolü	78
4.6.1.2 Resellülerize Kornea İskelesinin İmmunofloresan Analizleri	79
4.6.1.3 Resellülerize Kornea İskelesinin İnce Yapı Analizleri	80
4.6.2 Organoid ile Resellülerizasyonu	81
4.6.2.1 Resellülerize Kornea İskelesinin İmmunofloresan Analizleri	86
4.6.2.2 Resellülerize Kornea İskelesinin İnce Yapı Analizleri	90
5. TARTIŞMA.....	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	101
7. KAYNAKLAR.....	102
8. EKLER	111
8.1 Etik Kurul	111
8.2 Özgeçmiş.....	115
8.3 Makale	118

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Primer antikor listesi.....	40
Tablo 2. Sekonder antikor listesi.....	41
Tablo 3. İş zaman çizelgesi.....	47
Tablo 4. İş zaman tablosu.....	47
Tablo 5. İki protokolün verimlilik açısından birbiriyle kıyaslaması	55
Tablo 6. İPKH'den kornea benzeri yapılara farklılaşma basamaklarına özgü gen ekspresyonları	56
Tablo 7. qPCR için kullanılan primerlerin detay bilgileri	57
Tablo 8. Desellülerize edilen koyun kornealarında nanodrop ile DNA ölçümü sonuçları.....	73
Tablo 9. Desellülerize edilen insan kornealarında nanodrop ile DNA ölçümü sonuçları.....	74

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Gözün embriyonik gelişimi	8
Şekil 2. Korneanın üç hücre katmanının kökeni	9
Şekil 3. Göz gelişimi sırasında nöral krest hücrelerinin davranışı ve oküler dokuda farklılaşma (civciv, fare ve insan)	11
Şekil 4. Kornea gelişimi.....	12
Şekil 5. Kornea tabakalarının şematik görüntüsü.....	15
Şekil 6. Kornea epitel tabakası üzerinde yer alan tabakaların şematik gösterimi.....	17
Şekil 7. Kolajen biyosentezi yolunda yer alan hücre içi ve hücre dışı adımların şematik gösterimi	20
Şekil 8. Kornea stromasının lamelinde yatan düzgün küçük çaplı paralel kolajen fibrillerini gösteren transmisyon elektron mikrofisi	21
Şekil 9. Kornea hasarında limbus bölgesinden göç eden limbal kök hücreler [107]..	26
Şekil 10. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri	30
Şekil 11. Kök hücrelerin farklılaşma kapasitesine göre sınıflandırılması	31
Şekil 12. İPKH'lerden kornea organoidlerinin oluşturulması (Susaimanickam protokolü ve Foster protokolü).....	38
Şekil 13. Başlangıç materyali olarak kullanılan İPKH'lerin MEF üzerinde farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (D: gün, D0 için ölçek çubuğu 1mm, D1-D5 için ölçek çubuğu 200µm).....	51
Şekil 14. Susaimanickam protokolüne göre korneal farklılaştırma süreci (NDM: Nöral farklılaştırma, RDM: Retinal farklılaştırma, CDM: Korneal farklılaştırma) (D0, D1, D8, D17, D30 ve D70 için ölçek çubuğu 200µm, D2, D55 ve D170 için ölçek çubuğu 1mm).....	53
Şekil 15. Foster protokolüne göre korneal farklılaştırma süreci (NDM: Nöral farklılaştırma, RDM: Retinal farklılaştırma, CDM: Korneal farklılaştırma) (D0-D15 için ölçek çubuğu 200 µm, D25 için ölçek çubuğu 100µm, D37-D80 için ölçek çubuğu 200 µm)	54
Şekil 16. Sentezlenen kolajenlerin elektron mikroskopik görüntüsü (A: Foster Protokol, B: Susaimanickam Protokol)	55
Şekil 17. Farklılaşmanın farklı basamaklarındaki spesifik gen ekspresyonlarının qPCR ile değerlendirilmesi	57
Şekil 18. Farklılaşma basamaklarında her basamağa özgü spesifik gen ekspresyonlarının immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	58

Şekil 19. Farklılaşma basamaklarında her basamağa özgü spesifik gen ekspresyonlarının immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	59
Şekil 20. Maturasyon sırasında oluşması beklenen endotele spesifik CD200 protein ekspresyonunun immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	60
Şekil 21. Maturasyon sırasında oluşması beklenen endotele spesifik CD200 protein ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak görüntülenmesi.....	61
Şekil 22. H&E boyaması ile kornea organoidlerinin ışık mikroskopik görüntüleri	62
Şekil 23. PAS boyaması ile kornea organoidlerinde glikojen depolayan hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçek çubuğu Şekil A, B, C: 500µm, Şekil D ve E: 100µm, Şekil F: 200µm	63
Şekil 24. Kornea organoid yapılarından elde edilen (D50) ve Toluidin Mavis ile boyanmış yarı ince kesitlerin ile ışık mikroskopik görüntülenmesi.....	64
Şekil 25. Kornea organoidlerinden (D50) elde edilen ultra ince kesitlerin elektron mikroskopik görüntülenmesi	64
Şekil 26. Kornea organoidlerinin (D300) TEM görüntüsü	65
Şekil 27. Desellülerize edilmiş korneanın histolojik görüntülenmesi. (H&E) (Ölçek çubuğu 500µm)	66
Şekil 28. Korneaların desellülerizasyonunda kullanılan protokoller	67
Şekil 29. C1, C2, C3 ve C4 hastalarına ait desellülerize edilmiş korneaların Hematoksilen ve Eozin (H&E) ve Masson Trichrome boyamaları	68
Şekil 30. Kornea desellülerizasyonu için kullanılan protokollerin şeması	69
Şekil 31. C5, C6, C7 ve C8 gruplarına ait desellülerize edilmiş korneaların Hematoksilen ve Eozin (H&E) ve taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy = SEM) görüntüleri	71
Şekil 32. Protokol-7 ve Protokol-9'e ait desellülerize edilmiş korneaların H&E ışık mikroskopik görüntüleri.....	72
Şekil 33. Desellülerize edilen kornealarda H&E boyamasının ışık mikroskobu görüntüleri	72
Şekil 34. Desellülerize edilen kornealarda immunofloresan olarak Col I ve çekirdek boyası olan DAPI ile gösterilmesi. Ölçek çubuğu 20X objektif	73
Şekil 35. Desellülerize edilen koyun kornealarından izole edilen DNA'ların jelde görüntülenmesi.....	74

Şekil 36. Desellülerize edilen insan kornealarından izole edilen DNA'ların jelde görüntülenmesi.....	75
Şekil 37. Desellülerize edilen korneaların SEM görüntülemesi	75
Şekil 38. Keratosit hücrelerinin ışık mikroskopik görüntüleri (Ölçek barı 200µm).....	77
Şekil 39. Resellülerize edilen kornea iskeletinin 0. ve 1. günlerde floresan mikroskopta görüntülenmesi. Beyaz asteriks kornea yüzeyi, kırmızı çarpı (X) hücre kültür tabağının tabanı) 4X ve 10X objektif kullanılmıştır.....	78
Şekil 40. Resellülerize edilen kornea iskeleti 3. günde stereofloresan mikroskopta görüntülenmesi (Ölçek barı Şekil. A 2mm, Şekil. B 1mm, Şekil. C 500µm).....	78
Şekil 41. Resellülerize edilen kornea iskeletinin H&E boyaması görüntüleri (Ölçek barı; Şekil A, B 500 µm, Şekil C, D 200 µm).....	79
Şekil 42. Resellülerize edilen kornea iskeletinin farklı alanlarından alınan Col I ve DAPI ile boyamaları floresan mikroskobu görüntüleri. Ölçek barı 20X objektif (Yeşil: Col I (+) kolajen fiberler ve Mavi: DAPI ile boyanan hücre çekirdekleridir)	80
Şekil 43. Resellülerize edilen korneaların SEM görüntülemesi (kırmızı işaretler hücreleri göstermektedir)......	81
Şekil 44. GFP(+) İPKH'lerin kornea iskelesi üzerindeki floresan mikroskobu görüntüleri	82
Şekil 45. Susaimanickam protokolü (Protokol-1) uygulanan İPKH hücrelerinin farklı günlerdeki görüntüleri (A; 2x, B, C, D ve E; 4x ve F; 10x büyütme).....	83
Şekil 46. Foster protokolü (Protokol-2) uygulanan İPKH hücrelerinin farklı günlerdeki görüntüleri. (A ve D; 2x, B, C ve E; 4x ve F; 10x büyütme)	83
Şekil 47. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi.....	84
Şekil 48. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi	84
Şekil 49. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 5. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi	85
Şekil 50. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi	86
Şekil 51. Protokol-1'e göre GFP (+) işaretli hücrelerin D30'da farklılaşmanın belirli basamakları için spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	87

Şekil 52. Protokol-2'ye göre GFP (+) işaretli hücrelerin D30'da farklılaşmanın belirli basamakları için spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	87
Şekil 53. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	88
Şekil 54. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	89
Şekil 55. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 5. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	89
Şekil 56. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.....	90
Şekil 57. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin D40'ta yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi.....	91
Şekil 58. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi.....	91
Şekil 59. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 5. gününde ekilen hücrelerin D40'ta yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi.....	92
Şekil 60. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin D40'ta ince kesitlerinin elektron mikroskopunda görüntülenmesi (kırmızı asteriks(*): prokolajen paketleri, sarı yıldız(): kolajenleri işaret etmektedir.)	92
Şekil 61. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta ince kesitlerinin elektron mikroskopunda görüntülenmesi (kırmızı asteriks (*): prokolajen paketleri, sarı yıldız (): kolajenleri, mavi ok(): mikrovillusları işaret etmektedir.)	93

KISALTMALAR

EKH: Embriyonik Kök Hücre

İPKH: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

ECM: Extra Cellular Matrix (Ekstrasellüler Matriks)

3B: Üç boyutlu

2B: İki boyutlu

EGF: Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)

FGF: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)

TGF- β : Transforming Growth Factor-Beta (Transforme Edici Büyüme Faktör-Beta)

GFP: Green Fluorescent Protein

IF: Immunofluorescence (İmmünofloresan)

IHC: Immunohistochemistry (İmmünohistokimya)

NDM: Neural Differentiation Media

RDM: Retinal Differentiation Medium

CDM: Corneal Differentiation Medium

SEM: Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)

TEM: Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)

SOX10: Sex Determining Region Y-Box 10

cDNA: Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

OCT3/4: Octamer-binding Transcription Factor 3/4

BMP: Bone Morphogenetic Protein (Kemik Morfogenetik Proteini)

H&E: Hematoxylen & Eosine (Hematoksilen & Eozin)

Col I: Kolajen tip I

KR 3: Keratin 3

KR 12: Keratin 12

ZO-1: Zonula okludens 1

SCD: Stem Cell Deficiency (Kök Hücre Eksikliği)

LEKH: Limbal Epitelial Kök Hücre

LKHE: Limbal Kök Hücre Eksikliği

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate (Sodyum Dodesil Sülfat)

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi, deneyim ve tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen başta değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK olmak üzere; Prof. Dr. Esra ERDAL'a, Prof. Dr. Bekir ERGÜR'e, Prof. Dr. Meltem KURUŞ'a ve Prof. Dr. Yiğit UYANIKGİL'e teşekkürü borç bilirim. Doktora eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve tecrübelerini paylaşarak değerli zamanlarını bana ayıran sayın hocalarım; DEÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Güven ERBİL'e, Prof. Dr. Ülker CANKURT'a, Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN'e, Prof. Dr. Işıl TEKMEK'e, Prof. Dr. Başak BAYKARA'ya ve Prof. Dr. Kazım TUĞYAN'a teşekkürü borç bilirim. Ayrıca tezimin hazırlık sürecinde her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Serap CİLAKER MICİLİ'ye ve Doç. Dr. Seda ÖZBAL'a teşekkürü borç bilirim.

Tezimin hazırlık aşamasında desteğini esirgemeyen DEÜ Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Canan Aslı UTİNE'ye, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Doç. Dr. Sinan GÜVEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki arkadaşlarıma, Uz. Dr. Betül ATIŞ SARI'ya, doktora öğrencisi Selma AYDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım. Tezimin hazırlık süreci dahil olmak üzere tüm aşamalarındaki desteklerinden dolayı Soheil AKBARI'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin deneysel süreçlerinde alt yapı olanaklarını kullanmamı sağlayan İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi (İBG) 'ne ve ayrıca katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olup sevgi ve desteklerini esirgemeyen sevgili anneme ve ablam Dr. Öğr. Üyesi Pervin ERSOY'a teşekkürlerimi sunarım.

İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi

Nevin ERSOY, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı-İzmir, Türkiye, nevinersoy@gmail.com

ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre dünyada yaklaşık sekiz milyon insan kornea kaynaklı körlük yaşamakta ve genelde tedavi yöntemi olarak kornea nakli işlemi uygulanmaktadır. Kornea nakli için uygun donör sayısında oldukça sıkıntı yaşanmaktadır. Kornea nakline yapay kornealar gibi yeni yaklaşımlar getirilmiş olsa da istenilen sonuçlara ulaşılamamıştır. Bunun nedeni ameliyat sonrası yaşanan uyumsuzluklar ve komplikasyonlardır. Günümüzde artık kişinin kendi deri fibroblast hücresinden indüklenmiş pluripotent kök hücre (İPKH) elde edilebilmekte ve in vitro ortamlarda uygun protokollerle farklı tipteki hücrelere dönüştürülebilmektedir. Dolayısıyla hücresel tedaviler alanında çığır açan bir buluş ile kişiye özel tedavi amaçlı kornea üretmek mümkün hale gelmiştir.

İPKH'lerden in vitro koşullarda 3 boyutlu kornea organoidi oluşturmak için embriyogenez sürecini taklit ederek sırasıyla nöral farklılaşma, retinal ve korneal farklılaşma gerçekleştirilmiştir. Oluşan organoid yapıları ultrastrüktürel olarak elektron mikroskopunda ve farklılaşma verimliliği her basamağa özgün Pax6, p63 (nöroektodermal), Sox10, alpha-crystallin (retinal), Keratin 3/12, Kolajen tip I, Kolajen tip IV (korneal), CD200 gibi belirteçler ile analiz edilmiş ve fonksiyonel olarak oluşan kornea organoidlerinin in vivo'daki yapıyı taklit ettiği gözlenmiştir.

Doku mühendisliği, kornea hasarlanmasında kadavradan elde edilen kornea transplantasyonun yerine geçebilecek matriks yapıları geliştirmeye başlamıştır. Fakat oluşturulan bu yapıların biyoyumluluk, şeffaflık, esneklik gibi sorunlar ve yüksek maliyetler nedeniyle tedavide kullanılır olma yolunda sınırlılıklar içermektedir. Ayrıca elde edilen yapılarda kornea için oldukça önemli olan kolajen fibril dizilimine bağlı şeffaflık problemine bir türlü çözüm bulunamamıştır. Biz de bu bağlamda korneaya en

uygun koşulu sağlayacak kendi doğal ortamını sunacak desellülerize edilmiş kornea iskelelerini kullandık.

İPKH kaynaklı kornea organoidleri in vitro ortamda geliştirilmiş olup geliştirilen yapıların kornea hasarı ve/veya kornea hastalıklarında kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Elde ettiğimiz bu verilerle kişiselleştirilmiş İPKH-türevli organoid kültürleri, hastalık modelleme, ilaç taraması, rejeneratif tıpta kullanılma potansiyeline sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Kornea, İPKH, Organoid, İskele



Development of Induced Pluripotent Stem Cell Induced Corneal Organoid Models

Nevin Ersoy of Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Inciraltı-Izmir, Turkey, nevinersoy@gmail.com

ABSTRACT

Approximately eight million people in the world suffer from corneal blindness and corneal transplantation is generally used as a treatment method according to World Health Organization (WHO) data. It is quite difficult to reach adequate number of donors for corneal transplantation.

Although new approaches such as artificial corneas have been introduced to corneal transplantation, desired success could not have been achieved. The reason of these situations are non-compliance and complications that occurs in the post-operative process. Nowadays, induced pluripotent stem cells (IPSC) can be obtained from one's own skin fibroblast cell and can be transformed into different types of cells in vitro by appropriate protocols. Thus, with a breakthrough invention in the field of cellular treatments, it has become possible to produce corneas for personal treatment purposes.

Neural, retinal and corneal differentiation were performed by mimicking the embryogenesis process to form 3-dimensional corneal organoid from IPSCs in vitro, respectively. The generated organoid structures were analyzed by electron microscopy and differentiation efficiency of each step with markers such as Pax6, p63 (neuroectodermal), Sox10, alpha-crystalline (retinal), Keratin 3/12, Collagen type I, Collagen type IV (corneal), CD200 and functionally formed corneal organoid mimics the structure of the in vivo.

Tissue engineering has begun to develop matrix structures that can replace corneal transplantation from cadavers in corneal injury. Due to the problems such as biocompatibility, transparency, flexibility and high costs of these produced structures have limitations in their usage in treatment. Furthermore, no solution was found for the transparency problem due to collagen fibril sequencing which is very important for the

cornea in the structures obtained. In this context, we used desellularized corneal scaffolds to present their own natural environment that would provide the most suitable condition for the cornea.

IPSC-derived corneal organoids have been developed *in vitro* and are thought to contribute to the development of personalized treatments for corneal damage and / or corneal diseases. With data obtained, personalized IPSC-derived organoid cultures have the potential to be used in disease modeling, drug screening and regenerative medicine.

Keywords: Cornea, IPSC, Organoid, Scaffold



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü 2009 yılı verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık sekiz milyon insan kornea kaynaklı kördür. Bunların yaklaşık bir buçuk milyonu çocuk hastalardır ve acilen kornealarının değiştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu amaçla en sık kullanılan yöntem kadavradan alınan donör korneasının hastalara allogenik naklidir. Ancak nakil için uygun kornea bulmak zordur ve nakil sonrasında erken veya geç dönemde gelişen immünolojik red reaksiyonu ile greft kaybı mümkündür. Diğer bir alternatif olan yapay kornealar (keratoprotezler) ise ameliyat sonrası komplikasyon profilleri nedeniyle günümüzde allojenik kornea naklinin yerini alamamıştır.

Günümüz teknolojilerinde, kişinin kendi deri hücresinden embriyonik kök hücre benzeri indüklenmiş pluripotent kök hücre (İPKH)'sini elde etmek ve bu hücrelerden in vitro koşullarda çeşitli farklılaştırma protokolleri kullanarak vücudumuzdaki birçok hücre tipini üretmek mümkün hale gelmiştir. Dolayısıyla hücresel tedaviler alanında çığır açan bir buluş ile kişiye özel tedavi amaçlı kornea üretmek mümkün hale gelmiştir. Literatürde İPKH kaynaklı kornea oluşturulması ile ilgili çok sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda temel sorun, transplante edilebilir şeffaf 3 boyutlu (3B) bir yapının oluşturulamıyor olmasıdır.

Bu tez çalışmasında indüklenmiş pluripotent kök hücrelerden farklılaştırılmış 3B kornea organoidlerinin, insan kaynaklı desellülerize edilmiş kornea matriksi üzerinde üretilmesi ile ilgili yöntemlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Desellülerize edilmiş kornea yapılarında tip I kolajen liflerin yapısı korunmakta ve bu da gelişen kornea yapısında kolajen fibrillerin diziliminin doğru oryantasyonda yönetmektedir. Bu da korneanın doğal şeffaf yapısının oluşmasında oldukça önemlidir. Biyomühendislik ve doku mühendisliği yaklaşımları kullanılarak bugüne kadar gerçekleştirilen çalışmaların birçoğu kornea ekstraselüler matrisini taklit etmeye yönelik malzeme geliştirme ve bu malzemelerde epitel hücre tabakalarının oluşturulmasına yöneliktir. Bu çalışmada korneaya yönelik yeni bir biyomalzeme geliştirilmeden, desellülerize gerçek kornea dokusunu sadece bir temel olarak alıp geliştirilecek sistemde fizyolojik dokuya uygun fiziksel ortamda kültür edilmesi hedeflenmektedir. Bu şekilde, korneanın en doğal ortamını sunan yapı üzerinde geliştirilen organoidlerin histomorfolojik ve/veya histokimyasal ve ultrastrüktürel olarak kornea yapısını ve/veya spesifik gen

ekspresyonu (P63, KR3, KR12) oluşturmaları analiz edilecektir. Çalışma sonucunda geliştirilecek korneanın, kornea hasarı ve/veya kornea hastalıklarında kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı dūřün÷lmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kornea

Kornea, ışığın göze girdiği oküler yüzeydeki şeffaf ve avasküler bir dokudur. Gözün içyapıları ile dış dünya arasında fiziksel bir bariyer görevi görerek gözü dış çevreden korur [1].

2.1.1 Kornea Anatomisi

Kornea, göz küresinin primer bariyeri olarak işlev gören, saydam ve avasküler bir bağ dokusudur. Korneal hücrelerin anatomik ve fizyolojik özellikleri saydamlığın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle kornea stromasındaki kolajen liflerin düzenli yerleşimi korneal saydamlık için kritik öneme sahiptir [2, 3].

Kornea, göz küresinin ön kısmında yer alan, periferde daha da kalınlaşarak sklera ile devamlılık gösteren gözün kırıcılık gücü en yüksek yapısıdır. Eğrilik yarıçapı skleradan küçük olduğu için saat camı gibi konveks bir yapıya sahiptir. Erişkin insanlarda korneanın horizontal çapı 12,6 milimetre (mm), vertikal çapı 11,7 mm, anterior kurvatür yarıçapı 7,8 mm ve posterior kurvatür yarıçapı 6,8 mm'dir. Merkezde yaklaşık 500 µm kalınlığındadır ve perifere gidildikçe bu kalınlık artarak ortalama 700 µm'a ulaşır [4]. Santral korneanın eğrilik çapı ortalama 7,8 mm'dir. Santral kornea kalınlığı (SKK) 520 mikrometre (µm), periferde 650 µm'dir [5].

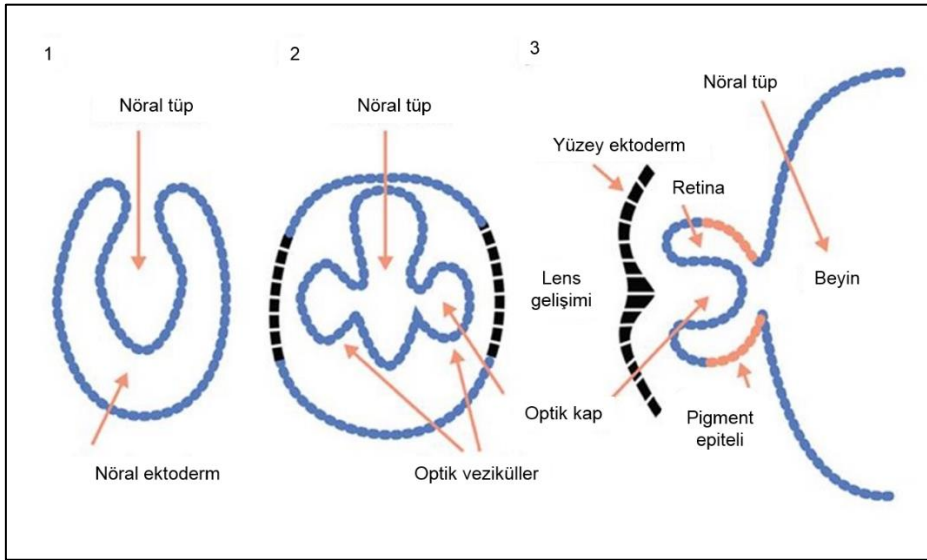
Kornea, gözün toplam kırma gücünün %70'ini oluşturmaktadır. Korneanın kırıcılık gücü, korneanın eğrilik yarıçapı ile hava arasındaki kırıcılık indeksi farkına bağlıdır. Kornea anterior yüzeyin kırma gücü 48 diyoptri (D), posterior yüzeyin kırma gücü -5.8 D, net kırma gücü ise 43 D'dir. Korneanın anterior yüzü asferik yapıda olup, merkezi 3-4 mm'lik alan sferiktir. Kırıcılık merkezden limbusa doğru gittikçe düşer.

Eğrilik yarıçapının kısalığı (dik kornea) kırıcılığın artması nedeniyle miyopiye yol açarken, uzun olması (düz kornea) ise kırıcılığı azaltarak hipermetropiye neden olmaktadır. Dikey ekseninde eğrilik yarıçapı, yatay eksene göre daha kısa olduğundan

dikey ekseninde kırıcılık daha fazladır. Ancak bu durum fizyolojiktir ve çoğu zamanda kristalin lens tarafından düzeltildiği için refraktif kusur oluşturmaz [5, 6].

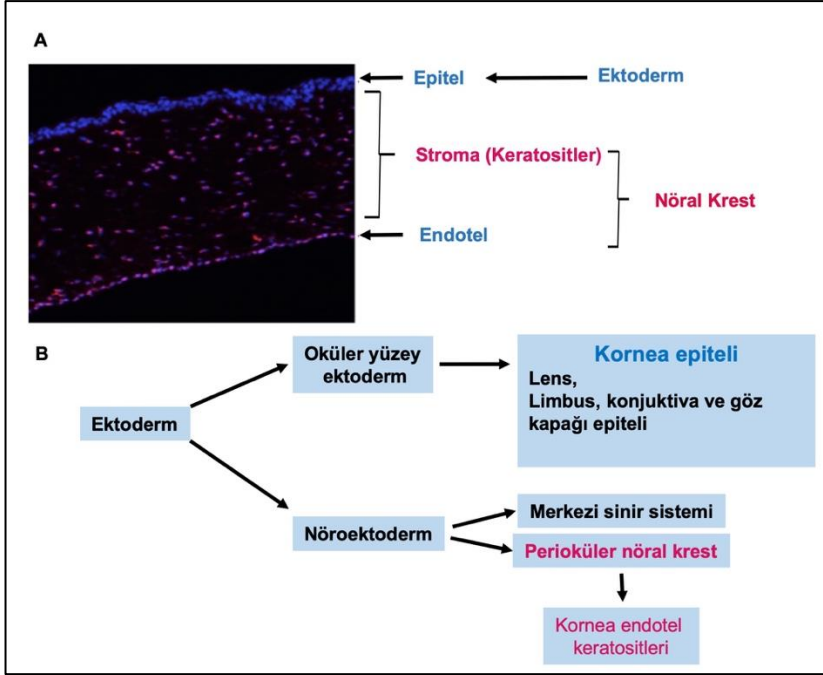
2.1.2 Kornea Embriyolojisi

Gestasyonun 5. haftasında, yüzey ektoderminden epitel, nöroektoderminden endotel hücreleri, 13. haftasında da yassılaştırmış endotel hücrelerinden Descemet membranı gelişir. Mezenşimden gelişen stroma, intrauterin 6. haftanın sonunda oluşmaya başlar ve dördüncü ayda epitel altında yoğunlaşarak, Bowman tabakasını oluşturur [5] (**Şekil 1**).



Şekil 1. Gözün embriyonik gelişimi

Kornea, kraniyal (yüzey) ektoderminden köken alan üç hücresel katmanından oluşur (**Şekil 2**). Çok tabakalı bir epitel (doğrudan ektoderminden köken alan) korneanın en dış yüzeyini kaplar. Orta tabaka (kornea stroması) ve en içteki tabakanın (kornea endoteli) her ikisi de nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. Tüm bu hücresel tabakalar başlangıçta anterior göz bölgesinde birleşerek farklılaşma durumlarında varsayımsal korneayı oluşturur. Daha sonra iyi düzenlenmiş hücresel etkileşimler ve moleküler sinyalleşme olayları, farklılaşmalarını ve beraberinde şeffaf korneanın oluşumunu sağlar.



Şekil 2. Korneanın üç hücresel katmanının kökeni

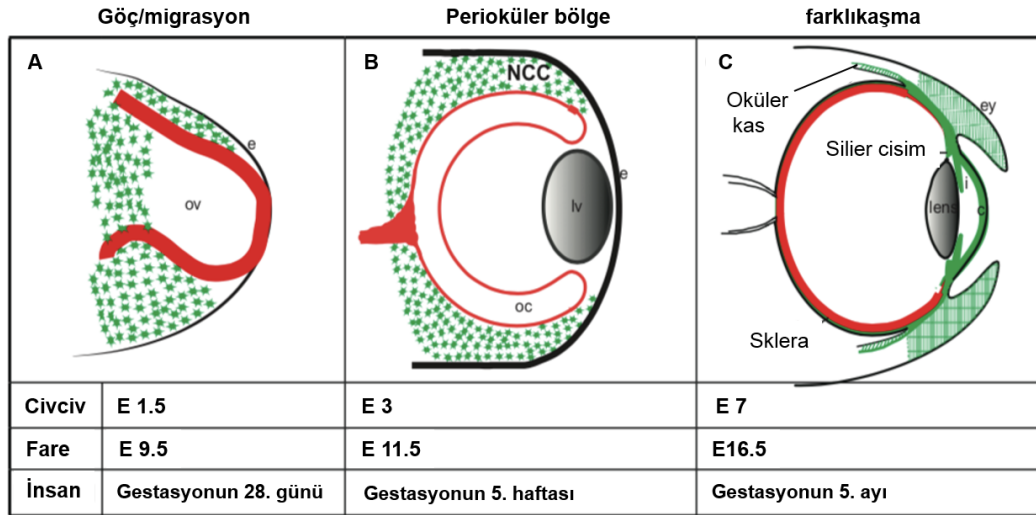
(A) E8 civciv korneasının ektoderm kaynaklı korneal epitel ve nöral krest hücre kaynaklı stromal keratositleri ve korneal endoteli gösteren enine kesit. (B) Kornea epitelinin yüzey ektoderminden korneal endotel ve keratositlerin nöral krest hücre progenitorlerinden kaynaklandığını gösteren şematik diyagram [7].

Erken gelişim sırasında, ön kraniyal ektodermın iki taraflı bölgelerinde, daha sonra koku alma ve lens epitelini ortaya çıkaran plaklar (ektodermde kalınlaşmalar) oluşur. Varsayımsal korneal epitel ilk olarak lens plakasına bitişik bölgeyi işgal eden ektoderm olarak tanımlanır. Sonrasında sürekli bir epitel tabakası haline gelir. Optik vezikülü oluşturmak için ayrılır. Plakların ve optik vezikül ile mercek oluşumuna yol açan ektoderm arasındaki endüktif sinyallerin spesifikasyonu iyi çalışılmış olmasına rağmen, kornea epitelinin ilk kökeni hakkında çok az şey bilinmektedir. Yakın zamana kadar, kornea epitelinin lens vezikülünden sinyalleri alana kadar belirtilmediği genel olarak kabul edildi [8]. Bununla birlikte, son araştırmalar, varsayımsal kornea ve lens epitelinin, eşleştirilmiş kutu proteini Pax6'yı ifade eden ektoderm'de belirtildiğini göstermektedir [9]. Bununla birlikte, optik veziküllerden gelen BMP sinyali, lens

plakasının oluşumunu indüklerken, Pax6 eksprese eden ektoderm, varsayımsal korneal epitelini oluşturur. Optik veziküllerin sinyal aldığı sırada lens plakasının mikrocerrahi ablasyonu, lens vezikülünün rejenere olan bitişik varsayımsal epitelden indüklenmesine neden olur. Bu, Pax6'yı eksprese eden kraniyal ektodermi ifade etmenin hem lens hem de kornea epiteline ve dolayısıyla hem lens hem de kornea epitelinin ortak progenitörüne neden olma yeteneğine sahip olduğunu gösterir.

Nöral krest hücreleri, embriyonun çeşitli bölgelerine göç eden multipotent türevli kök hücre benzeri hücre popülasyonudur [10]. Korneal endotel ve stromal keratosit hücreleri, embriyonun orta hat bölgesinde bulunan nöral tüpten kaynaklanan (varsayımsal merkezi sinir sistemi) nöral krest hücrelerinden köken almaktadır. Nöral krest hücre progenitörleri nöral tüpten kaynaklanır. Orta hat bölgesindeki yüzey ektodermi Bmp inhibisyonu ve Wnt sinyallerinin uyarılmasının ardından sinirsel bir kimliğe bürünür [11-13]. Nöral krest hücresi indüksiyonu için nöral tüp ve komşu ektoderm sinyalleri gerekir [14, 15]. Diensefalon ve mesensefalon arasındaki nöral tüp bölgesinden kaynaklanan nöral krest hücrelerin göçüyle kornea endoteli ve stromal keratositler meydana gelir [16, 17]. Göçeden nöral krest hücrelerinin optik akışı ayrıca, kraniyal duysal ve siliyer ganglionlar, düz kas, yüzün bağ dokusu, kemik ve kıkırdak dahil diğer kraniyal yapıların oluşmasına neden olur [10, 18-20].

Nöral krest hücreleri kornea bölgesine (ektoderm ve mercek vezikülü arasında) göç etmeden önce perioküler mezenşimde bulunur. Nöral krest hücrelerinde 3 hücre dalgası şeklinde göç gerçekleşmektedir. İlk hücre göçü dalgasında korneanın endotel tabakası oluşmaktadır. İkinci hücre dalgasında endotel tabakasının bazal tabakası olan descement membranı oluşur. Üçüncü hücre dalgasında ise hücreler kornea epitelini ve endoteli arasına göç ederek stromadaki keratosit hücrelerini oluşturmaktadır (**Şekil 3**).



Şekil 3. Göz gelişimi sırasında nöral krest hücrelerinin davranışı ve oküler dokuda farklılaşma (civciv, fare ve insan)

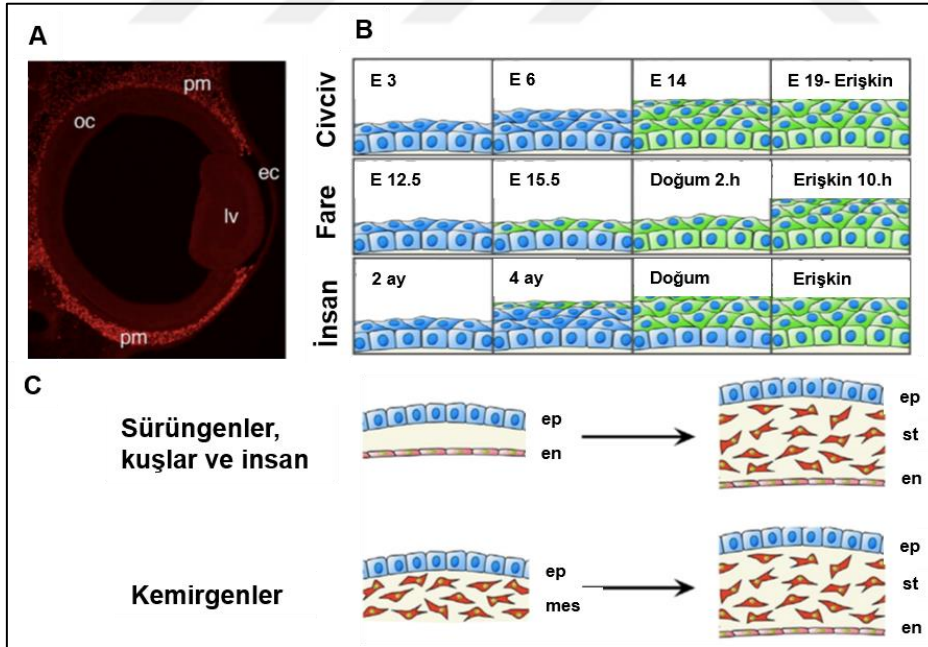
Göz gelişimi (A, B) sırasında kraniyal nöral krest hücrelerin davranışı ve oküler dokulara (C) farklılaşması (civciv, fare ve insan arasında korunur). Nöral krest hücrelerin (yeşil) varsayımsal oküler bölgeye göç ettiği, rudimenter gözün mezenşimine katkıda bulunduğu ve çeşitli oküler dokulara farklılaştığı gelişme sırasındaki göreceli zamanlar belirtilmiştir. (ov, optik vezikül; e, ektoderm; oc, optik kap; lv, lens vezikülü; NCC, periyodik bölgedeki nöral krest hücreleri; ey, göz kapakları; c, kornea; i, Iris.) [21].

2.1.2.1 Kornea Epitel Tabakasının Gelişimi

Lens vezikül oluşumundan kısa bir süre sonra, üstte uzanan ektoderm birleşir ve varsayımsal kornea epiteli olur. Civciv embriyo modellerinin kullanıldığı daha önceki çalışmalar ektoderm ve lens vezikülü arasındaki etkileşimlerin, iki doku tarafından sandviçlenen aselüler bir hücre dışı matriks (ECM) olan birincil stroma senteziyle sonuçlandığını göstermiştir [22-24]. Korneal fibrilogenenezin başlangıcını gösteren primer stroma, varsayımsal korneal epitel tarafından sentezlenir ve ortogonal olarak sıralı tip I, II, IX kolajen ve kondroitin sülfat proteoglikan tabakalarından oluşur [25-27].

Civcivlerde kornea epiteli E3 – E5 arasında kalın iki hücreli tabakadır. Bazal hücreler, yüzeysel hücrelerden farklı, küboidal bir görünüme sahiptir. Dorsal mezenkimin uyarması sonucu Pax6 ekspresyonuna bağlı olarak kornea epitelinin

E5'te özelliştiği gözlenmektedir [9, 28]. E6'da, epitel üç sıra tabaka kalınlığında iken E19'da 4-5 sıralı hücre tabakasına kadar yükselir [29]. Kornea epiteli E14'te Keratin 3/ Keratin 12 (K3/K12) çiftini eksprese etmeye başlar. Bu aşamada epitel tabakası tamamen gelişmiş olup 6-8 tabakalı hücre katmanlarından oluşur (**Şekil 4B**). İç bazal hücreler sütun şeklindedir ve altta uzanan bazalmembran üzerine yapışır. Bu hücreler çoğalır ve suprabasal hücre katmanlarını oluşturarak yüzeyel skuamöz hücrelerin 1-3 sıralı katmanını meydana getirir. Yetişkin memeli kornea epitelindeki hücresel düzenleme, civcivinkine benzese de, benzer gelişim modellerini takip etmemektedirler. Farede varsayımsal kornea epiteli, E15.5'te K12'yi eksprese eder, fakat embriyonik gelişim boyunca ve doğum esnasında 1-2 sıra hücre tabakası kalınlığındadır [30]. Doğum sonrası 12. günde göz kapakları açıldığında epitel tabakası çok hızlı bir şekilde çoğalmaya başlar ve doğumdan sonra 10. haftada olgun kornea epitel tabaka sayısına ulaşarak 6-8 sıralı hücre tabakası haline gelir [31] (**Şekil 4B**). Gelişmekte olan insan kornea epitelinin tabakalaşması benzer şekilde civcivlerde de gözlenmiştir. Kornea epiteli, gebeliğin 2. ayında iki sıra hücre tabakası halindedir. 4. ayda 3-4 tabakalı hale gelir ve doğumda tam tabakalı görünür [32] (**Şekil 4B**).



Şekil 4. Kornea gelişimi

(A) Optik kap (oc) ve lens vezikülünün (lv) nöral krest türevli perioküler mezenşimi (pm) ve varsayımsal kornea epitel (ec) ile çevrili olduğunu gösteren rudimenter aşamada civciv gözünden çapraz kesit E3. (B) Civciv, fare ve insanda korneal epitel ve keratin ekspresyonunun katmanlaşma aşamalarını gösteren şematik şekil. (C) Kornea endotel (en) ve stroma (st) tabakası oluşumu sırasında korneal epitel (ep) ve lens arasındaki farklı nöral krest hücre göçünü gösteren şemalar. mes., nöral krest mezenşimi.

2.1.2.2 Kornea Endotel Tabakasının Gelişimi

Kornea endotelinin oluşumu, perioküler nöral krest hücrelerinin, kornea epitel ve lens vezikülü arasında göç etmesiyle başlar. Nöral krest hücreleri, bir mezenkim-epitel geçişine uğrar ve korneanın arka yüzeyini kaplayan tek bir tabaka oluşturur. Sürüngenlerde, kuşlarda ve insan gözlerinde, kornea endoteli, ilk nöral krest hücre göç dalgasının bir sonucu olarak oluşur [24, 32] (**Şekil 4C**). Bu işlem kemirgenlerde farklılık gösterir. Kediler, tavşanlar ve büyük baş hayvanlarda nöral krest hücrelerinin tek bir mezenkim dalgası içinde göç ettiği ve sadece lens vezikülüne en yakın olan hücrelerde mezenkimden epitele geçiş olduğu ve endotel tabakasını oluşturduğu bilinmektedir.

Kornea endotelinin morfogenezisi civcivlerde iyi çalışılmıştır [16, 33]. İlk perioküler nöral krest hücre göç dalgası E4.5'te başlar ve sonuç olarak E5'teki lens ile epitel arasında bir hücre tabakası oluşmasına neden olur. Kornea endotelinin en erken belirteci olan hücre adezyon molekülü N-kadherin, E3'te periyodik mezenkimde eksprese edilir ve nöral krest hücrelerinin mezenkimal-epitelyal geçişinde ve tek tabaka oluşumunda rol oynar [33]. Araştırmalar ayrıca N-kadherinin aşağı regülasyonunun nöral tüpten nöral krest hücre göçü için gerekli olduğunu ancak morfogenez sırasında sıkı bağlantıların oluşması için yukarı regülasyonunun gerekli olduğunu göstermiştir [34-38]. İnsanda, varsayımsal korneal endoteli, gebeliğin yaklaşık 8. haftasında düzleşmiş ve inceltirilmiş tek bir katman olarak gevşek şekilde düzenlenmiş bir çift kübital hücre tabakası olarak gelişmeye başlar [39]. 17. haftada zonula okludens sıkı bağlantıları çok iyi gelişmiş olmasına rağmen pompa fonksiyonu henüz tam olarak gelişmemiştir [40]. Fare kornea endoteli E15.5'te lens epiteline bitişik olan kornea mezenşiminin dönüşmesiyle oluşur. Sıkı bağlantılar (ZO) oluşur ve gelişmekte olan kornea endoteli N-kadherin eksprese eder [41, 42]. Yetişkin kornea

endoteli sıkı bağlantı işaretleyicisi ZO-1 ve fonksiyonel pompa işaretleyicisi Na^+/K^+ -ATPase'i eksprese eder; ancak bu fonksiyonel işaretleyicilerin fare kornea gelişimi sırasındaki ifadesi net değildir. Kornea endoteli oluşmasından kısa bir süre sonra, Descemet'in membranı sentezlenir. Bu membran hücre içermeyen, kolajenden zengin ekstra selüler matriksten oluşur [43, 44]. Yetişkin korneasında Descemet membranının endotelin bütünlüğünü ve fonksiyonunu korumada önemli bir rolü vardır.

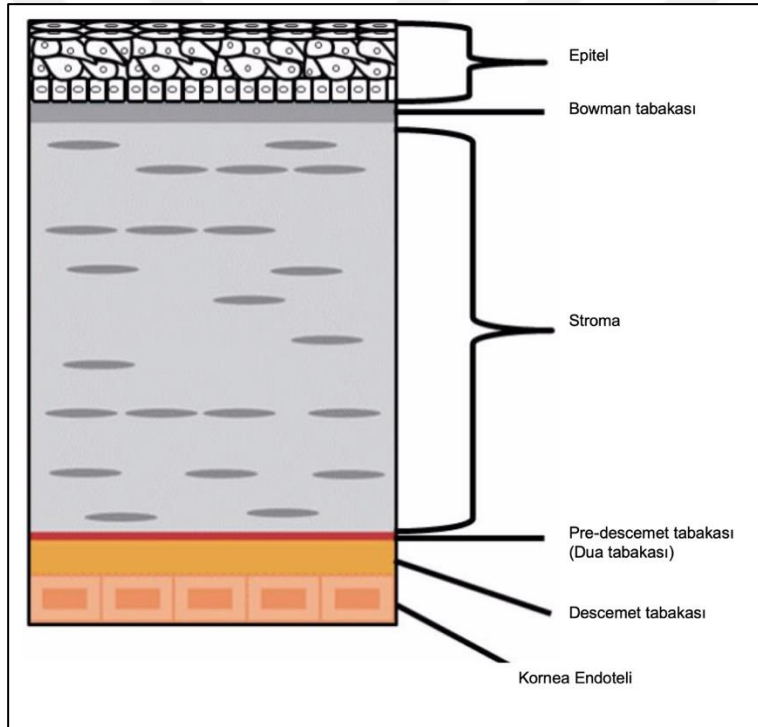
2.1.2.3 Kornea Stroma Tabakasının Gelişimi

Stroma, kornea gelişimi sırasında oluşan son hücre tabakasıdır. Cıvcivlerde, kornea stromasının oluşumu, varsayımsal korneal endotel ve epitel arasında ikinci bir nöral krest göç dalgası tarafından başlatılır [17, 22, 33]. Bu göç, E6'da gelişmekte olan korneanın çevresinde devam eder. Hücreler oldukça proliferatiftir ve mezenkimal hücre morfolojisine sahiptir. Öncü stromal hücreler çoğalmaya devam eder ve keratosit hücrelerine dönüşerek içine gömüldüğü ekstra selüler matriksi sentezlemeye başlar [45]. Kolajen ve korneal proteoglikanlarının (keratan ve kondroitin / dermatan sülfat) en erken ifadesi E6 ve E7 arasında gözlenir ki bu evrede nöral krest hücrelerin keratosit hücrelerine farklandığı aşamaya denk gelmektedir [46-49]. Gelişim sırasında korneanın önemli bir bileşeni olan kolajenin sentezi ve dağılımı, Quantock ve Young tarafından detaylı olarak incelenmiştir [50]. Tip I ve tip V kolajenleri stromal hücreler tarafından sentezlenirken, tip II kolajen kornea epitelinden türetilir. Tip VI, IX, XII ve XIV dahil olmak üzere diğer kolajenler, gelişmekte olan korneada yapısal bütünlüğü ile ilişkili oldukları yerde bulunur [51-54]. Kornea proteoglikanları ve kolajenleri arasındaki etkileşimler, kornea ECM'nin fibrillojenezi, idamesi ve yapının şeffaflığının sağlanması için oldukça önemlidir [55-57]. Korneadaki keratokanın knock-out (susturulması) edilmesi, kolajen fibrillerinin çapının artmasına korneanın incelmeye neden olur, ancak kornea şeffaflığı etkilenmez [58]. Mimekan ve lumikan eksikliği olan farelerde korneada daha kalın kolajen fibriller bulunur, ancak sadece lumikan knock-out fareler kornea opasitesi gösterir [56, 59]. Proteoglikanlar ve kolajenler arasındaki bu etkileşimler ECM içerisindeki keratosit hücrelerini hapseder ve kornea daha kompakt ve şeffaf hale gelir. Keratositler cıvcivlerde yaklaşık E14'te, farelerde ise göz kapaklarının açılmasından kısa bir süre sonra çoğalmaya son verir. Keratositler pasif

hale geçer ve normal korneal homeostazının travma veya enfeksiyon tarafından tetiklenmesine kadar bu durumda kalır [7].

2.1.3 Kornea Histolojisi

İnsan korneası beş ayrı katmandan oluşur. Önden arkaya (dıştan içe) doğru sıraladığımızda; 1) Epitel, 2) Bowman tabakası, 3) Stroma, 4) Descemet membranı ve 5) Endotel tabakası. Altıncı bir katman da yakın zamanda tarif edildi [60] ve stroma ile Descemet'in zarı arasında karakterize edildi [61]. Sadece 15 μm kalınlığa sahip olan bu aselüler katman, pre-descemet membranı veya "Dua'nın katmanı" olarak adlandırılır (bu terim henüz genel olarak kabul edilmese de) (**Şekil 5**).



Şekil 5. Kornea tabakalarının şematik görüntüsü

2.1.3.1 Epitel Tabakası

Kornea epitel tabakası, keratinize olmamış çok katlı yassı epitel tabakası yapısındadır. Bu tabakanın ortalama kalınlığı 50 μm olup kornea kalınlığının yaklaşık %10'luk kısmını oluşturmaktadır. Epitel tabakası tüm kornea yüzeyi boyunca sabit kalınlıktadır [62]. Epitel tabakası; yüzeyel hücreler, kanat hücreleri ve bazal

hücrelerden oluşur. Ayrıca bu tabakaların altında Bowman tabakası ile bitişik olan bazal membran bulunmaktadır. Farklılaşma döngüsü yaklaşık 7- 14 gün olup bu süre sonunda yüzey hücreleri gözyaşı içine dökülerek döngü tamamlanır [63].

- **Yüzeyel Hücreler;** Kornea epitelinin en yüzeydeki ve son farklılaşmış tabakasıdır. Yüzeyleri mikrovilluslarla kaplıdır [64]. Yüzey hücreleri desmozomlar ve sıkı bağlantılarla birbirine bağlanmıştır [65].

- **Kanat Hücreler;** Yüzeyel hücrelerin altında 2- 3 sıra olarak bulunmaktadır. Keratinden zengindir [3].

- **Bazal Hücreler;** Kolumnar bazal hücreler bazal membran üzerinde tek sıra olarak yer alır. Yüzey ve kanat hücrelerin aksine çoğalma kapasitesi vardır. Bozukluğunda rekürren korneal epitel erozyonları ve iyileşmeyen epitel defektleri oluşur [66].

- **Bazal Membran;** Epitelyal bazal membran ortalama 0,05 µm kalınlığında tip IV kolajen ve laminin içeren bir yapıdadır. Zarar gördüğünde yeni oluşan bağların eski saydamlığa ulaşması zaman alacağından epitelyal iyileşme süresi uzar [3].

Korneanın epitel tabakası gözyaşı filmi ile endotel tabakası ise aköz hümör ile temas halindedir. Gözyaşı film tabakası 7 µm kalınlıktadır (**Şekil 6**).

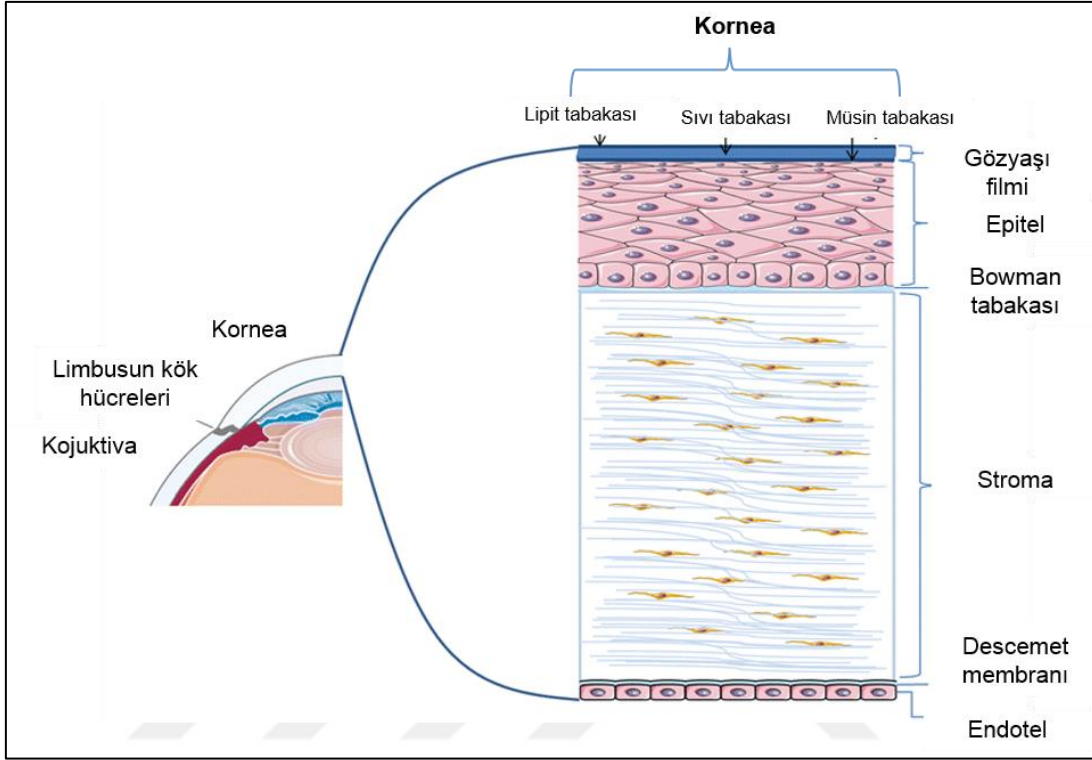
Gözyaşı filmi 3 tabakadan oluşur. Bu tabakalar:

1. Lipit tabaka: En dışıdır. 0.5 µm kalınlığındadır. Göz kapağında yerleşmiş olan Meibomian, Zeis ve Moll bezlerinden salgılanır. Gözyaşının buharlaşmasını engeller.

2. Aköz tabaka: 6 µm kalınlığındadır. NaCl, glukoz, üre, immünglobulinler, kompleman ve albumin gibi proteinleri içerir. Lakrimal bez ile konjonktivada yerleşmiş olan Krause ve Wolfring bezlerinden salgılanır.

3. Müsin tabaka: 0,2–0,5 µm kalınlığındadır. Konjonktivada yerleşmiş olan Goblet hücrelerinden salgılanır. Hidrofilikliği arttırarak gözyaşının göz yüzeyine dağılımını sağlar.

Her göz kırpma ile gözyaşı film tabakası yenilenerek göz yüzeyi ıslatılır. Atmosferdeki oksijen gözyaşında çözünür ve avasküler bir yapı olan korneanın oksijenizasyonuna katkı sağlar [67].



Şekil 6. Kornea epitel tabakası üzerinde yer alan tabakaların şematik gösterimi

2.1.3.2. Bowman Tabakası

Yaklaşık 10 μm kalınlığında olan bu tabaka kolajen fibrillerin ve proteoglikanların oluşturduğu bir tabakadır. Daha çok kolajen tip 1 ve tip 3 bulunur. Hasarında yenilenemez, skar bırakır. Korneanın şeklinin korunmasında yardımcıdır [68, 69]. Bowman katmanının tam işlevsel rolü henüz netleştirilmemiştir ancak korneanın yapısal bütünlüğünü korumak ve viral penetrasyona karşı engel olduğu düşünülmektedir [68, 70-72]. Ayrıca bu tabakanın hızlı stromal yara iyileşmesini ve epitel travmasını takiben ilişkili anterior korneal saydamlığı kolaylaştırmada olası bir rolü olduğuna dair kanıtlar vardır.

2.1.3.3 Stroma Tabakası

Korneal stroma, kornea kalınlığının %90'ını oluşturan tabakadır. Korneanın fiziksel gücü, şeklinin stabilitesi ve saydamlığı büyük ölçüde stromanın anatomik ve biyokimyasal özellikleri ile sağlanır. Yapısındaki kolajen fibriller ve ekstraselüler matriks elemanlarının düzenlenişi sayesinde saydamlık sağlanır [73]. Paralel olarak yerleşim gösteren bu kolajen fiberler fibril olarak adlandırılır. Periferik stroma merkez stromaya göre daha kalındır ve limbusa yaklaştıkça fibrillerin dairesel yerleşimi izlenir [74]. Yüzeyel stromanın daha rijid olması ödematöz durumlarda derin stromada asimetrik şişmeye ve dezme kırışıklıklarına yol açar [75].

Stromanın yaklaşık %78'i sudur. Kolajenler kornea yüzeyine paralel olarak sıralanmıştır. Stromadaki kolajenlerin %70'ini tip I kolajen oluşturmakla beraber tip III, V, VI, VII, XI ve XIV kolajenler de bulunmaktadır [69]. Tip III kolajen yara iyileşmesinde görev alırken, tip VII kolajen epitelin bağlayıcı fibrillerini oluşturur. Proteoglikan ve glikoproteinlerden oluşan bir matriks içinde bulunan kolajen fibriller yaklaşık 200 adet kolajen lamel oluştururlar. Korneanın tüm çapı boyunca uzanan lameller, stromanın 1/3'lük ön kısmında oblik, arka 2/3'lük kısmında paralel, limbus etrafında da çevresel bir şekilde yerleşir. Kolajen lameller ön stromada 0,5 µm eninde, 0,2–1,2 µm kalınlığında, arka stromada 100–200 µm eninde, 1–2,5 µm kalınlığındadır. Stromadaki kolajen fibrillerin arasındaki boşluklar homojendir ve yaklaşık 55–60 nm genişliğindedir [76, 77]. Bu özellik korneanın şeffaf olmasında çok önemlidir. Skleranın opak olmasının sebebi ise kolajen fibrillerindeki dizilimin uniform olmamasındandır.

Stromal ekstraselüler matrikste yer alan ana glikozaminoglikanlar keratan sülfat, dermatan sülfat ve kondroitin sülfattır. Glikozaminoglikanlar stromaya hidrofilik özellik kazandırır. Stromada ortalama 2-4 milyon keratosit vardır. Keratositler kolajen lameller arasında uzanarak kolajen ve proteoglikan sentezlerler. Keratositlerin yoğunluğu ön stromada yaklaşık 1058 hücre/mm², arka stromada ise 771 hücre/mm² dir. Keratositler aktif hücreler oldukları için yüksek miktarda mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği içerirler. Keratositlerin içeriğindeki kristalin yapı ışığın keratositlerden geri saçılımını engelleyerek kornea saydamlığında rol alır. Keratositler hasar durumunda miyofibroblastlara dönüşebilirler. Miyofibroblastlar

ekstraselüler matriks, matriks metalloproteinaz, sitokin salınımı ile stromal yara iyileşmesini sağlar [78].

2.1.3.3.1 Stromal Kolajen

Kornea kolajeni, korneanın içindeki ana yapısal bileşendir ve sadece dokunun saydamlığını korumak için değil, aynı zamanda sürekli şekil ve dayanıklılık sağlayan gerekli biyomekanik özellikleri sağlamak için gerekli bazı özelliklere sahiptir.

Bugüne kadar yirmi dokuz farklı tipte kolajen tanımlanmış ve memeli korneası, kolajen I, III, IV, V, VI, VII, VIII, XII, XIII ve XVII tipleri dahil olmak üzere bunların en az 10'unu eksprese etmektedir. Korneanın toplam kuru kütlesinin yaklaşık onda biri, esasen fibriller formunda kolajendir.

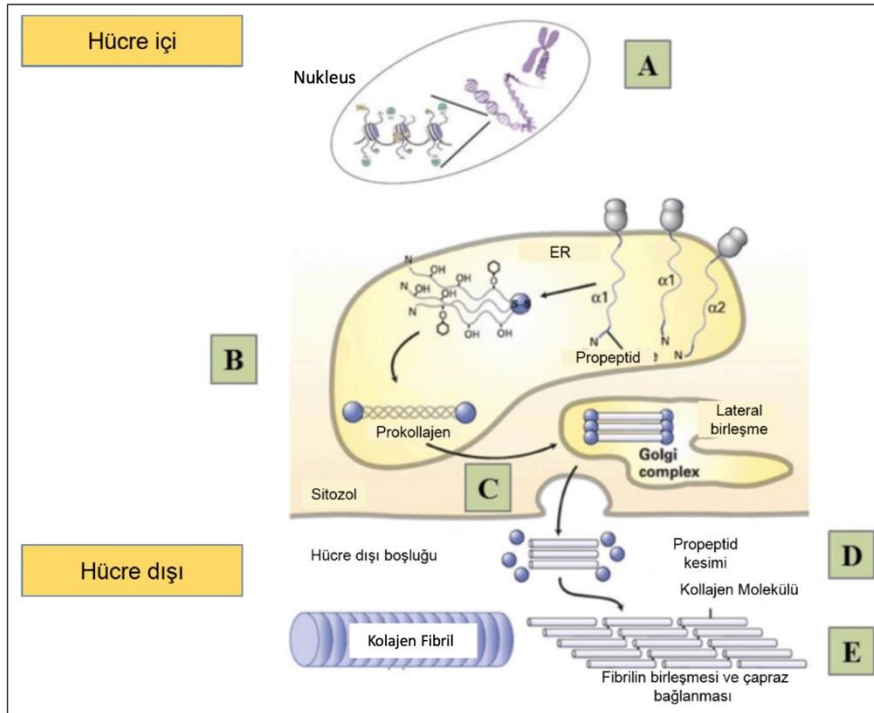
Değişken özelliklerine rağmen, kolajenler arasında ortak tutulan bazı yapısal özellikler vardır. Hepsinde, yaygın olarak α -zinciri olarak bilinen üç polipeptit zincirinden oluşan bir veya daha fazla üçlü sarmal alan bulunur. Bunlar sırasıyla G-X-Y tekrarlarından oluşur, burada G glisindir, X herhangi bir amino asittir ve Y genellikle prolin veya hidroksiprolindir. Üçlü sarmal etki alanında, her α -zinciri, diğer zincirlere göre bir tortu ile eksenel olarak ilerler ve üç α -zinciri, ortak bir eksen etrafında sağ el rotasyonu şeklinde sarılır.

2.1.3.3.2 Fibril oluşturan kolajenin sentezi

Kolajen sentezi, kolajen gen transkripsiyonunun ve mRNA işleminin gerçekleştiği hücre çekirdeğinde başlar [79-82] (**Şekil 7A**). Olgun mRNA sitoplazmaya taşınır ve kolajen translasyon ürünleri öncü pro- α zincirlerinin sentezlendiği kaba endoplazmik retikuluma (RER) transfer edilir (**Şekil 7B**). Öncü pro- α zincirinin yapısı, 20-amino asitlik bir sinyal dizisini, N-terminal propeptidi, N-terminal peptidlerinin proteolitik bölünme bölgelerini, ana üçlü sarmal alanını taşıyan bir üçlü sarmal olmayan alan oluşturur.

Peptit uzadıkça, prokolajen peptidin translasyon sonrası çeşitli modifikasyonları meydana gelir. Bunlar, sinyal peptidinin bölünmesini, prolin 3- ve / veya 4-

hidroksiprolinin hidroksilasyonunu ve lisinin hidroksilasyonunu içerir. Bunu daha sonra üçlü sarmal formasyonu izler. Üçlü sarmal formlarında önce kolajen molekülleri, N-bağlı oligosakaritlerin işlenebildiği Golgi aparatına taşınır (**Şekil 7C**). Prokolajen molekülleri daha sonra salgılayıcı vakuollere paketlenir ve hücre dışı boşluğa salgılanır. Ekzositoz gerçekleştiğinde, prokolajen molekülleri, N ve C propeptitlerini (Kielty ve Grant, 2003) parçalayan spesifik proteinazlar (prokolajen N-proteinaz ve prokolajen C-proteinaz) tarafından daha fazla modifikasyona tabi tutulur (**Şekil 7D**). Bu propeptitlerin bölünmesi normal fibril morfolojisi için gereklidir ve bu aşama tamamlandıktan sonra, artık tropokolajen olarak adlandırılan kolajen molekülleri, karakteristik bir dizileme dizisinde (**Şekil 7E**) hizalanarak fibril oluşumuna maruz kalır. Dizi daha sonra kovalent çapraz bağların oluşmasıyla dengelenir.



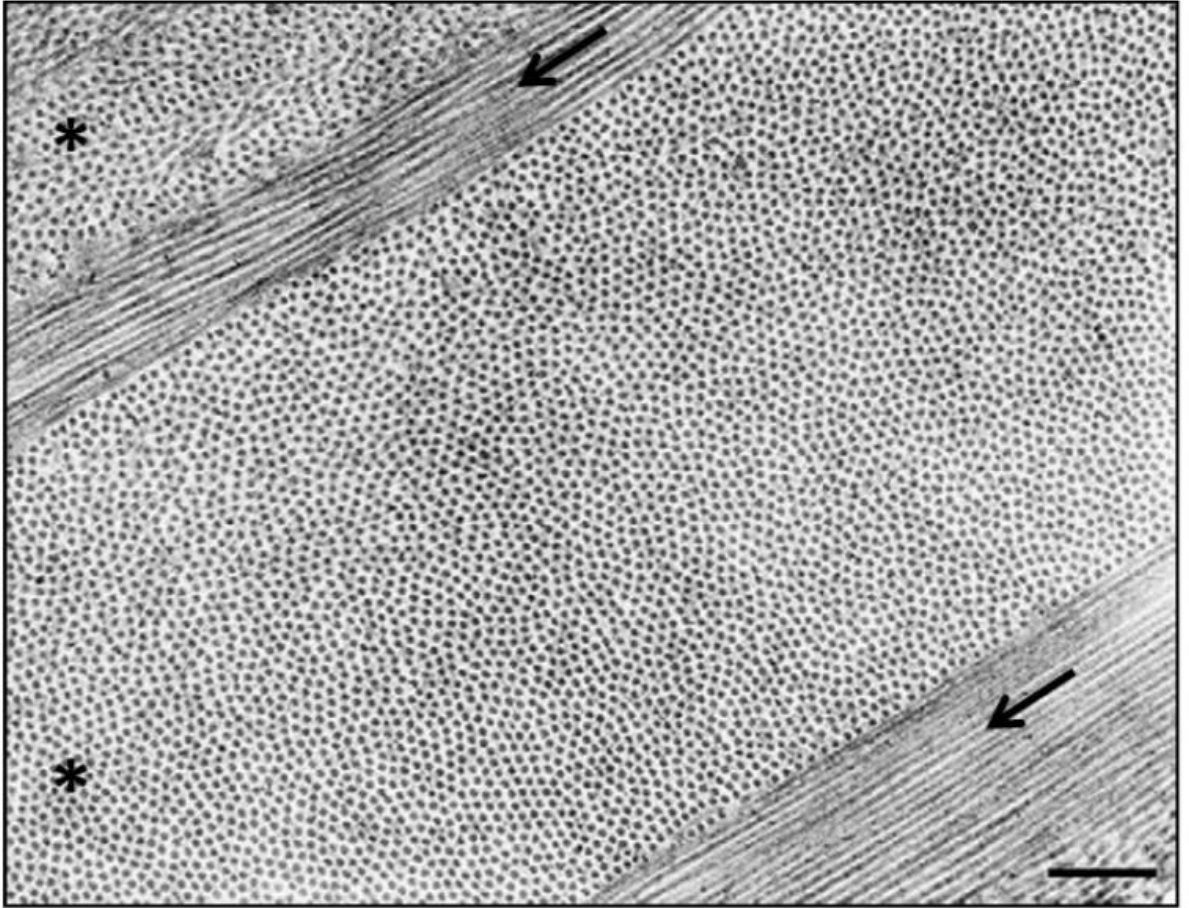
Şekil 7. Kolajen biyosentezi yolunda yer alan hücre içi ve hücre dışı adımların şematik gösterimi

(A) Sentez hücrenin çekirdeğinde başlar. (B) RNA ürünleri RER'e taşınır ve prokolajen yapılır. Prokolajen molekülünün translaasyon sonrası modifikasyonları yapılır. Üçlü sarmal oluşturulduktan ve N-Oligosakaritler işlendikten sonra, Golgi aparatında (C) daha ileri işlemler meydana gelir ve daha sonra prokolajen molekülleri salgılayıcı

veziküllerde paketlenir. Ekzositoz üzerine, N- ve C- propeptidler çıkarılır (D) ve kolajen molekülleri, kolajen fibrilleri (E) içerisinde toplanır.

2.1.3.3.3 Kolajenlerin Karakteristik Özellikleri

Korneadaki kolajen fibrilleri nispeten homojen çaplarda dar ve ayrıca fibril demetleri içerisinde yüksek derecede yanal sırayla dizilmiş gibi görünmektedirler (**Şekil 8**). Bu özellikler genel olarak diğer bağ dokularında bulunmaz ve bu nedenle kornea da bulunan kolajen, korneanın biyomekanik ve optik özelliklerini açıklamaya çalışırken özellikle ilgi çekici olmuştur [74, 83].



Şekil 8. Kornea stromasının lamelinde yatan düzgün küçük çaplı paralel kolajen fibrillerini gösteren transmisyon elektron mikrofrafisi

Bu görüntüde, iki enine (yıldız) ve iki boyuna (oklar) bölüm olmak üzere dört lamel gösterilmiştir. Ölçek çubuğu: 300 nm. Meek ve Boote'den (2009) uyarlanan görüntü. Robert D. Young'ın orijinal görüntüsü.

Ortalama fibril çapı çoğu türlerde merkezi korneadan çevre birime artar, nispeten sabit kalır ve sonra limbusta keskin bir şekilde yükselir [73, 84]. Ayrıca merkezden merkeze kolajen fibrillerinin merkez aralığı, merkezden çevre birime, merkez korneada yaklaşık 57 nm'den limbus kenarında yaklaşık 62 nm'ye kadar artmaktadır [73]. Hem insan hem de tavşan kornealarında farklı derinliklerde merkezden merkeze aralık ölçülürken çok daha küçük bir değişiklik gözlemlenmiştir [85].

Hem kolajen fibril çapları hem de merkezden merkeze interfibriler boşluklar, türler arasında önemli farklılıklar gösterir [86], ancak daha önce de belirtildiği gibi, merkezden periferik kornea çaplarında artış meydana gelmektedir. Bağ dokusu olarak korneanın kilit biyomekanik özelliklerinden biri mekanik gücüdür. Bu mekanik gücün, fibril hacim fraksiyonu olarak adlandırılan, hidratlanmış kolajen fibrillerinin kapladığı doku oranından etkilendiğine inanılmaktadır [73, 87, 88]. Her ne kadar fibril çapları ve merkezden merkeze aralıklar türler arasında değişse de, daha dar lifler yaklaşık %28 oranında sabit bir fibril hacim fraksiyonu ile sonuçlanan bir araya toplanır [87]. Çoğu türdeki merkezden çevreye artan çaplar söz konusu olduğunda, fibril hacim fraksiyonu değişir [73]. Eğer fibril hacmi fraksiyonu mekanik kuvveti etkiliyorsa, bu farklılıklar muhtemelen korneanın farklı özellikleriyle ilgilidir. Bir dokunun esnekliği, çatlak yayılmasına karşı koyma kabiliyeti ve sünme-engelleme yoluyla gerilmelerin etkisi altında kalıcı deformasyonları önleme kabiliyeti, daha dar çaplı fibrillerin yüzdesine bağlıyken, gerilme mukavemeti daha büyük fibrillerin yüzdesine bağlıdır [89]. Bu nedenle daha küçük çaplı fibrillerin daha yüksek paketleme yoğunluğunun kornea mukavemeti için gerekli olduğu düşünülebilir [83]. Bu, merkezi insan korneasının neden periferikten daha ince olabileceğini açıklayabilir, ancak korneanın kuvveti koruyabildiği ve örneğin göz fırçalama sırasında deformasyona dayanabileceği açıklanabilir [83].

2.1.3.4 Dua Tabakası

Yeni tanımlanan bu tabaka, derin stroma ve Descemet membranı arasında yer alır. Derin stromadaki sıkı kolajen fibrillerinden oluşur.

2.1.3.5 Descemet Membranı

Descemet membranı kornea endotelinin bazal membranı olarak görev yapar. Doğumda 3 µm kalınlığında iken yetişkinde 8-10 µm kalınlığa ulaşır. Descemet membranı kolajen tip IV, VIII, laminin ve fibronektinin birleşimi ile oluşur. Stromal kolajen fibriller Bowman membranı ile devamlılık gösterirken Descemet membranı ile devamlılık göstermezler. Descemet membranının periferik uzantısı Schwalbe hattını oluşturur [44, 90].

2.1.3.6 Endotel Tabakası

Korneal endotelyal hücreler Descemet membranının arka yüzeyini tek sıra olarak kaplayan, mozaik paternde, nöral krest kökenli hücrelerdir. 5 µm kalınlığında 20 µm genişliğinde poligonal şekilde hücrelerdir. Genç erişkinlerde endotel hücre yoğunluğu 3500 hücre/mm²'dir. Merkezi endotelyal hücre yoğunluğu yıllık %0,6'lık azalma gösterir. 500 hücre/mm²'nin altındaki değerler korneal ödem gelişimi için oldukça risklidir.

Endotel hücreleri metabolik olarak oldukça aktif hücreler olmakla beraber bazolateral kısımlarında Na-K bağımlı ATPaz ve Na/H değişimi sağlayan iyon pompası bulunur. Bu mekanizma ile korneal stromada fazla su bulunması engellenir ve korneal saydamlığına katkı sağlar. Endotel hücrelerinde mitoz nadirdir ve hücre sayısı yaşla azalır. Endotel hasarında iyileşme, hücre göçü, yeniden düzenlenme ve geriye kalan hücrelerin genişlemesi şeklinde olur. Cerrahi hasar, inflamasyon veya kazanılmış bazı hastalıklar nedeniyle oluşabilecek endotel hücre disfonksiyonu ve kaybı, endotelyal yetmezliğe, stromal ödeme ve görme kaybına yol açar [91].

2.2 Kornea Hasarında Onarım

Kornea epitelı bazal hücre tabakası mitoz bölünme ile 7-10 günde bir düzenli olarak yenilenmektedir. Yüzeydeki epitel hücreleri prekorneal gözyaşı filmine dökülür. Bazal tabakadaki hücreler ise sürekli olarak çoğalarak bu hücrelerin yerini alırlar.

Kornea yaralanmalarının iyileşmesi, vücudun diğer bölümlerinde gerçekleşecek olan aynı evrelerle gerçekleşir, ancak bazı değişkenliklerle birlikte gerçekleşir. Korneanın önemli bir özelliği vasküler sistemin olmamasıdır. Kan damarlarının eksikliği, yara iyileşmesi ve granülasyonunun enflamatuar aşamasının normalde minimal veya var olmadığı anlamına gelir. Bir yaralanma meydana geldiğinde, kornea epitel hücreleri ve aktive olmuş stromal fibroblastlar, parakrin ve otokrin fonksiyonları olan büyüme faktörlerini ve sitokinleri salgılar [92]. Korneal yara iyileşmesi, epitel hücreleri, stromal fibroblastlar, enflamatuar hücreler ve lakrimal bez hücreleri tarafından üretilen çoklu büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve proteazların entegre etkilerini içeren ve yara şiddetinin derecesine bağlı olarak birkaç hafta sürebilen kalıcı bir işlemdir.

Kornea epitel yaralanması küçük ise yaralanmayı takiben hücrelerin bu alana göçmesiyle en kısa zamanda hasar kapatılmaya çalışılır. Epitel göçü dakikalar içinde başlar fakat daha büyük hasarlarda 4-5 saate varan gecikmeler olabilmektedir. Bu gecikme süreci hızlı hücre bölünmesi öncesinde anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal hazırlık için gereklidir. Özellikle bazal tabakada hücreler filopodia, lamellopodia ve tırtıklı kenarlar gibi uzantılarla hareket kazanarak bazal lamina üzerinden defektif alana göç ederler. Bazal hücreler arasındaki sıkı hemidesmozom bağları kaybolur ve defekt tamamen kapanıncaya kadar hareket devam eder. Erken mitotik olmayan yara kapanma fazı oldukça hızlıdır. Hücre göçü, intrastoplazmik aktin-miyozin kompleksinin kontraksiyonu ile gerçekleşir. Hücre zarının sitoplazmik tarafında fokal yapışma plaklarında bulunan vinkülin proteini aracılığı ile aktin lifleri hücre zarı proteinine bağlanır. Talin proteini ise bir yapışma proteini olan integrin ile bağlanır. Bu yapışma protein kompleksleri (vinkülin-talin-integrin) göçeden hücrelerin ilerleyen kenarında yoğundur ve hemidesmozom yokluğunda bazal membrana yapışmayı sağlarlar. Yaralanma durumlarında Vinkülin-talin-integrin kompleksi ile üretimi artan hücreler

arası mesafede bulunan fibronektinin hücre göçünde önemli rolü olduğu düşünülmektedir.

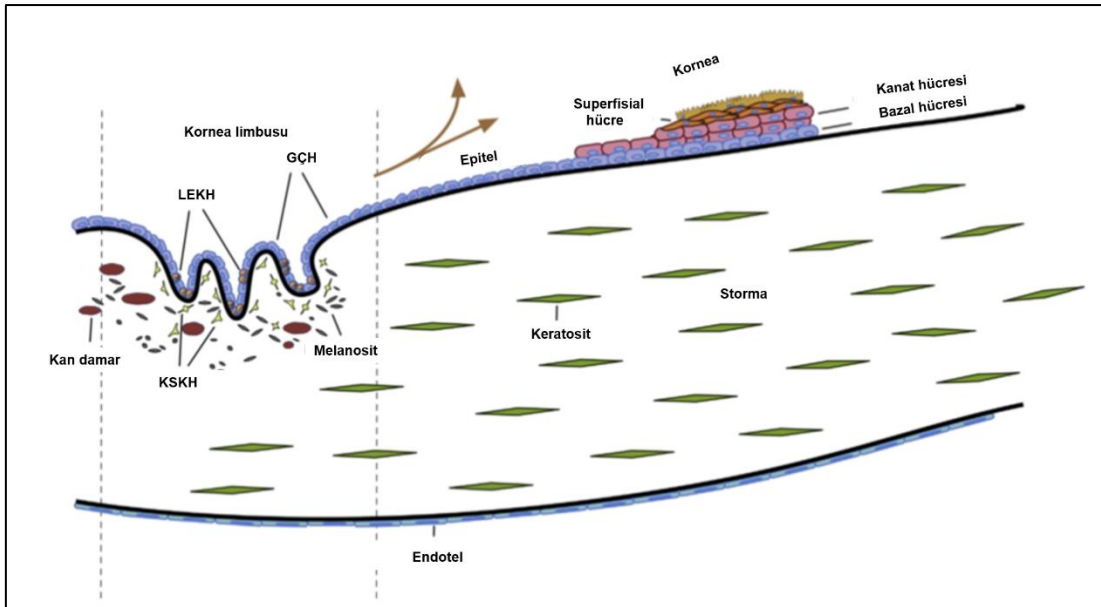
1971'de Davanger ve Evensen ilk önce limbustaki pigmentli hücrelerin merkez korneaya merkezciil şekilde geçtiğini, bu nedenle kök hücrelerin limbusun bazal hücre tabakasında lokalize olduklarını doğruladı [93]. Shermer ve ark. ilk olarak kornea epitelyal kök hücrelerin limbusta yer aldığını ve kornea bazal hücrelerinin kök hücrelerin şemasındaki "geçici güçlendirici hücrelere" karşılık geldiğini açıkladı [94]. Zietske [95], limbal bazal hücrelerin, kök hücrelerden beklendiği gibi, hücre bölünmesi geçirerek merkezi kornea yaralarına cevap verdiğini ileri sürmüştür. Schofield, kök hücrelerin farklı bir durumda tutulmasını destekleyen optimal bir "niş" içinde bulunduğunu gösteren bir model önermiştir [96]. Limbal niş, limbal epitelyal kök hücre (LEKH) fonksiyonunun birincil belirleyicisidir. Kök hücre eksikliği (SCD) birincil ve ikincil olabilir. Bu koşulların klinik yönetimi ve tedavisi, kornea nakli ve limbal kök hücrelerin (LKH'ler) düşük bulunuşluğu ile sınırlıdır. Bu nedenle, LEKH tedavisi şimdi olası bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedir [97, 98].

Kornea epiteli, korneanın dış katmanını oluşturur ve dış etkenlerden zarar görmesini engeller. Kornea epitelinin hücre kütlesi, korneosleral limbusun bazal epitelinde bulunan unipotent kök hücrelerin farklı bir popülasyonuyla sağlanır; bu nedenle, limbal kök hücrelerde herhangi bir hasar veya düzensizlik, kornea ve oküler yüzey bozukluklarına neden olur [99]. 2005 yılında Majo ve ark. (i) oligopotent kök hücrelerin memeli oküler yüzeyine göç ettiğini ve (ii) farenin kornea epitelinin seri olarak transplante edilebileceğini ve goblet hücrelerini yenileyebileceğini gösterdi [100].

Kornea epitelyal kök / progenitör hücrelerinin (aynı zamanda limbal kök / progenitör hücreler, LKH'ler olarak da bilinir) limbusta bulunduğu düşünülmektedir (**Şekil 4**). Bu progenitör hücreler, santral korneaya merkezciil şekilde göç eden transamplifikasyon hücrelerine farklılaşır. Bu alanda hücre dışı matriks, limbal vaskülatür ve niş içindeki çeşitli destek hücreleri bulunur. Ayrıca çeşitli çözünebilir faktörlerin ve hücre-hücre / matris etkileşimlerinin LKH'lere spesifik homeostatik sinyaller sağladığı görülmüştür. Limbal bölgede birkaç hücre tipi mevcuttur ve LKH niş

hücreleri (limbal mezenkimal hücreler, melanositler, vasküler endotel hücreleri ve düz kas hücreleri) olarak işlev görebilir. Bütün bu niş bileşenlerin, LSC'lerin büyümesinde ve düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir [101].

Korneayı çevreleyen limbus, korneanın farklı bölümlerini yenileyen limbal kök hücreleri barındırmaktadır [94, 102] (**Şekil 9**). Korneada bir hasar meydana geldiğinde limbus bölgesindeki kök hücreler hasar bölgesine göç ederek buradaki hücrelerin yenilenmesini sağlarlar. Bazı durumlarda hasar limbus bölgesini de etkileyerek bu hasar onarımını engellemektedir. Kimyasal veya termal yaralanmalar, limbal bölgeyi içine alan geçirilmiş çok sayıda cerrahi, Stevens-Johnson Sendromu, allerjik konjonktivitler, skatrisyel pemfigoid gibi kronik inflamatuvar hastalıklarda limbus epitelinin hasarlanmasına bağlı olarak LKH yetmezliği gelişebilir. Bunun sonucunda korneada iyileşmeyen epitel defektleri, konjonktivalizasyon, kronik enflamasyon, neovaskülarizasyon, skarlaşma, kalsifikasyon, ülserasyon, incelme ve perforasyon ortaya çıkabilir [103]. Limbal kök hücre eksikliği (LKHE) olan bu hastalarda otolog ya da allojenik erişkin limbal greftleri kullanılarak standart bir hücre tedavi yöntemi geliştirilmiştir [104-106].



Şekil 9. Kornea hasarında limbus bölgesinden göç eden limbal kök hücreler [107].

2.3 Korneaya Duyulan İhtiyaç

Korneanın keratokonus gibi şekilsel anomalileri, kalıcı kornea ödemi, keratitler veya kazalar, kimyasal yanıklar ve yaralanmalar sonucu gelişen lekeler (opasiteler), kalıtsal kornea lekeleri, uzun süreli kontakt lens kullanımına bağlı kornea hasarları gibi çok sayıda patolojik durumda korneada geri dönüşümsüz hasar oluşabilmektedir. Bu hastalarda sıklıkla tek tedavi seçeneği cerrahi, yani kornea nakli (keratoplasti) ile olmaktadır. Kornea nakli, hastalıklı korneanın kadavradan alınan kornea dokusu ile değiştirilmesidir. Ancak nakil dokusunun immunolojik reddinin ameliyat sonrası erken veya geç dönemlerde gerçekleşme riski vardır. İmmunolojik reddin baskılanması için kullanılan damla şeklinde veya sistemik verilen kortizon tedavilerinin ise, ciddi yan etkileri olabilmektedir. Bunun yanı sıra nakledilmek üzere kadavradan kornea temininde büyük zorluklar yaşanmakta ve pek çok hasta yıllarca kornea transplantasyonu için beklemektedir.

Dünya Sağlık Örgütü, 2009 yılı verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık 8 milyon insan kornea kaynaklı kördür. Bunların yaklaşık 1,5 milyonu çocuk hastalardır ve acilen kornealarının değiştirilmesine ihtiyaç vardır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılı tahminlerine göre tüm dünyada, korneadan kaynaklanan sebeplerle her iki gözü kör olan 4,9 milyon, sadece tek gözü kör olan 10 milyon insan bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008'den 2012'ye kornea nakli sayısında %31 artış (52,487'den 68,681'e) görülmekle birlikte; 2023 yılına kadar verici toplumda %16'lık bir artış, kornea ihtiyacında ise %133'lük bir artış olacağı ve kornea havuzunun nakil bekleyen hastaların ihtiyacını karşılamada yetersiz kalacağı tahmin edilmektedir. Kornea bankacılığının daha az geliştiği ülkelerde ise durum çok daha vahim görülmektedir [108].

2.4 Kornea Hastalıklarında Hücresel Tedaviler

Hücresel tedaviler son yıllarda spinal yaralanmalar, böbrek hastalıkları, Parkinson hastalığı, Makuler dejenerasyon, kalp rahatsızlıkları ve kanser gibi kesin tedavisi bulunmayan pek çok genetik ve metabolik hastalıklar için önemli bir tedavi potansiyeline sahiptirler [109]. Bu tip tedavilerde kullanılacak hücrelerin hasarlı

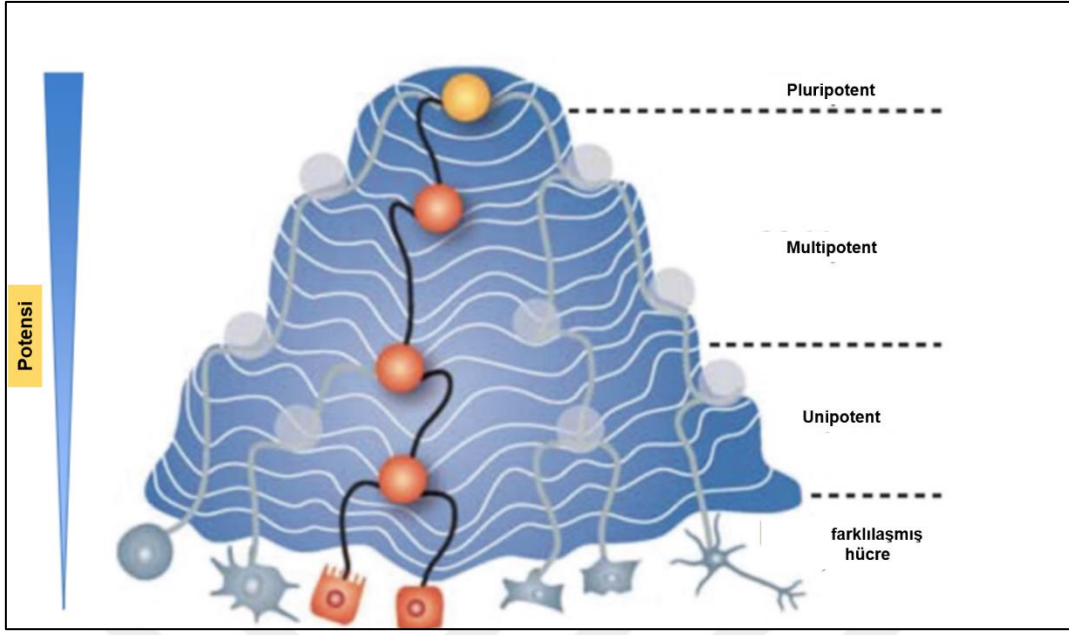
dokulara yerleşerek dokunun normal işlevini yerine getirmesi beklenmektedir. Ayrıca kişinin kendi hücreleri kullanıldığı için immun yanıt oluşturmayacak olması önemli avantajlarından biridir. Limbal kök hücre eksikliği (LKHE) olan hastalarda otolog ya da allojenik erişkin limbal greftleri kullanılarak standart bir hücre tedavi yöntemi geliştirilmiştir [105, 106, 110]. Bununla birlikte bilateral epitel defektlerinde stromal ve endotelial hücre tabakalarını etkileyen koşullarda, embriyonik kök hücreler (EKH) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler çeşitli kornea hücre tiplerini oluşturmak için alternatif kök hücre kaynağı olarak kullanılabilmektedir [111-113]. Son yıllarda hücre tedavisi anlamında oldukça önemli gelişmeler gözlenmektedir. Bunlardan biri, somatik yani farklılaşmasını tamamlamış bir vücut hücresinin geri programlama tekniğiyle kök hücreye/ indüklenmiş pluripotent kök hücreye (iPKH) dönüştürülmesi diğeri ise hücrelerin 3B ortamlarda üretilerek, kaynak aldığı organa benzeyen organimsi yapıları oluşturan organoid teknolojisidir [114]. Kişiyi özgü olarak üretilen, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) kişisel tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde, kişiyi özel ilaç taramalarında ve rejeneratif tıpta uygulanabilirlik potansiyellerine sahiptirler. Ancak uygulanabilirliğin önünde birtakım engeller bulunmaktadır. Hücrelerin *in vitro* koşullarda iki boyutlu (2B) büyütülürken çok düşük verimlilikte, miktarda ve kalitede elde edilmeleridir. iPKH' den lens epitel, retina hücreleri, pigmente nöral krest hücreleri ve kornea epitel koordineli bir şekilde 2B kültür sisteminde oluşturulmuştur [115]. Bununla birlikte dokuya spesifik hücrelerin düzgün tabakalar oluşturmada, 2B kültürler oldukça sınırlandırıcı olduğundan, 3B kültür sistemine ihtiyaç duyulmuştur. Son yıllarda geliştirilen organoid modellerinde, hücrelerin, 3B ortamlarda üretilerek, kaynak aldığı organa benzeyen epitel organ parçacıklarını oluşturmada başarılı olmuştur. Bu yöntem, *in vitro* olarak kompleks yapıları üretmek için progenitor hücrelerin farklılaşma ve kendi kendini organize etme kapasitesinden yararlanmaktadır [116-118]. Hastadan alınan hücrelerden laboratuvar koşullarında elde edilen bu organoidlerin, çok miktarda tekrar tekrar elde edilebilmeleri ve köken aldıkları hücreler ile genetik olarak aynı olmalarından dolayı, tedavide kullanımları mümkün olabilir. Beyin, kolon, karaciğer gibi dokuların organoidleri hastalıkların modellenmesi ve tedaviye yönelik stratejilerin geliştirilmesinde model olarak kullanılmaya başlanmıştır [119-122].

2.5 Kök Hücreler

Kök hücreler, kendini yenileme özelliğine sahip olup *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda, uygun sinyaller aldıklarında, birçok özelleşmiş hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Başka bir tanıma göre kök hücreler kendi kendini yenileyebilen (self-renewal), sayılarını devamlı sabit tutan, kan, karaciğer ve kas gibi özelleşmiş görev yapan organları oluşturan ve farklılaşma yeteneğinde olan hücredir [123].

Kök hücre çalışmaları, 1960'larda hematopoetik kök hücre keşfi ile başlamıştır. James Till ve Ernest McCulloch'un tarafından yapılan çalışmada ışınlanmış farelere kemik iliği hücrelerinin enjekte edilmesi, dalakta birden fazla soya sahip hematopoietik koloninin görülmesine yol açtı. Bunu stromal kök hücrelerin (mezenkimal hücreler) bulunması takip etmiştir. 1990'lı yıllarda bilim adamları memeli beyinde, sinir kök hücrelerini tespit etmişlerdir. Daha sonraki yıllarda ise epidermis, karaciğer ve diğer birçok organlarda kök hücrelerin varlığı kanıtlanmıştır. Yetişkin kök hücreleri, kordon kanından elde edilen kök hücreler ve embriyonik kök hücreler, günümüzde bilinen üç temel kök hücre kaynaklarıdır. Kök hücreler, henüz farklılaşmamış hücreler olup, kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptirler. Bu hücreler, kaynaklandıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle uyarıldıklarında, çok farklı özelleşmiş doku hücrelerine de dönüşebilme potansiyeline sahiptirler.

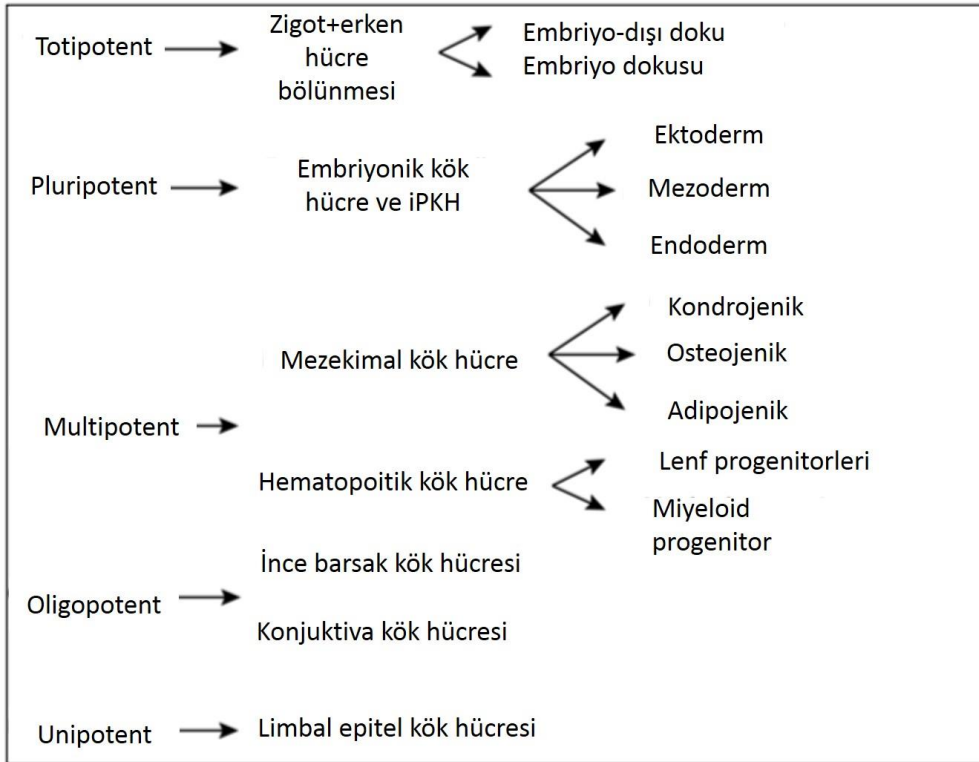
Kök hücrelerin potansiyeli, Waddington'un epigenetik manzarası ile gösterilebilir [124]. Bu modelde, montajın üstündeki top en yüksek potansiyele sahip kök hücreyi temsil eder. Bu manzara bir yöne sahiptir: top inişe geçtikten sonra geriye kaymaz. Bu yön kök hücre farklılaşmasını gösterir. Top, pluripotent ya da multipotent kök hücrelerin çok sayıda soyun farklılaşması yeteneğini yansıtan çok sayıda yola düşme yeteneğine sahiptir. Topun potansiyel olarak durabildiği her bir havza potansiyel bir duruma karşılık gelir. Top aşağıya doğru indikçe, daha fazla kök hücre potansiyeli nihayet montajın dibinde terminal olarak farklılaşmış bir hücre olana kadar sınırlandırılır (**Şekil 10**).



Şekil 10. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri

2.5.1 Totipotent Kök Hücreler

Kök hücreler farklılaşabilme kabiliyetine sahip oldukları soy aralığına karşılık gelen potansiyellerine göre sınıflandırılabilir (**Şekil 11**). Omnipotent kök hücreler olarak da adlandırılan totipotent kök hücreler, gelişimin ilk aşamasında bulunan en farklılaşmamış hücrelerdir. İnsan gelişiminde döllenmiş oosit veya zigot ve ilk iki hücre bölünmesinden kaynaklanan hücreler totipotenttir. Bu totipotent hücreler ayrıca tüm ekstra-embriyonik ve embriyonik dokularda farklılaşabilme kapasitesindeki kök hücrelerdir.



Şekil 11. Kök hücrelerin farklılaşma kapasitesine göre sınıflandırılması

Totipotent kök hücreler en yüksek farklılaşma potansiyeline sahip kök hücreleridir ve hem embriyonik hem de ekstra embriyonik dokuların kökenidir. Pluripotent kök hücreler ya blastosistin embriyonik hücreleridir ya da yapay olarak uyarılmıştır. Bu hücreler 3 germ tabakasının hücrelerini üretme potansiyeline sahiptir. Multipotent kök hücreler, bir organ içinde çoklu hücre soyları üretme potansiyeline sahiptir. Oligopotent kök hücreler hem goblet hem de konjonktival epitel hücreleri için progenitör olan oküler yüzeyin konjonktival kök hücreleri gibi belirli bir doku içinde farklı soyları üretme konusunda sınırlı bir yeteneğe sahiptir. Tek kutuplu kök hücreler hala kendi kendini yenileme potansiyeline sahiptir, ancak yalnızca tek bir tip hücre olarak ayırt edebilirler. Son zamanlarda, kemirgen oküler yüzeyinin LEKH'sinin ayrıca uygun ortama bulunduğu konjonktival kadeh hücreleri üretme kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir. LEKH'nin oligopotensi domuzlarda gösterilmiştir, ancak insanda bu kavramı destekleyen veriler henüz sunulmamıştır [100].

2.5.2 Pluripotent Kök Hücre (PKH)

Blastosist, insan gelişiminde (döllenmeden 5-6 gün sonra) ortaya çıkan bir yapı gibidir. Blastosist, plasentayı oluşturacak trofoblast ve üç primer germ tabakasını (ektoderm, mesoderm, endoderm) oluşturacak olan iç hücre kütesinden oluşur. İç hücre kütesini oluşturan hücreler pluripotenttir ve genellikle embriyonik kök hücreler (ESC'ler) olarak adlandırılır. Bu hücreler farklılaşmamış bir durumda tutulur ve NANOG, Sox2, Oct4 ve Rex-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ile tanımlanır [125]. Farklılaşmamış EKH'ler, fareyle ışınlanmış embriyonik fibroblastların bir besleyici katmanını içeren spesifik kültür koşullarında veya lösemi inhibe edici faktör sitokin LIF'yi içeren bir kültür ortamında *in vitro* olarak genişletilebilir [126, 127].

2.5.3 Multipotent Kök Hücre (MKH)

Çok kutuplu kök hücreler, yetişkin dokularında bulunur ve verilen bir organ içindeki çoklu soylara farklılaşma kabiliyetine sahiptir. Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) tipik bir örnektir. Bu hücreler başlangıçta kemik iliği stromasında tanımlandı, ancak kalp kası, adipoz doku veya kornea stroması gibi birçok yetişkin organında da mevcut [128-131]. (MKH'ler kültür plakalarına yapışır ve CD73, CD90 ve CD105 gibi spesifik belirteçleri eksprese ederler [132]. Ek olarak, bu hücreler kültürde koloniler üretme kabiliyetini gösterir ve spesifik kültür koşullarına bağlı olarak osteojenik, kondrojenik ve adipogenik soylara farklılaşma potansiyeline sahiptir[133]. Son zamanlarda, limbal stromanın mezenkimal kök hücrelerinin, E-Cadherin ve CK3, CK12 ve CK15 gibi sitokeratinleri eksprese eden kornea epitel hücrelerine transferderasyon yapma kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir [134]. Kemik iliğinde bulunan bu hücreler hematopoetik hiyerarşinin tepesindedir ve hem lenfoid hem de miyeloid soylara yol açar.

2.5.4 Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücreler hala kendi kendini yenileme özellikleri gösterir, ancak belirli bir doku içindeki sınırlı soyları (genellikle 2) izleyebilir. Pellegrini ve diğ. 1999, insan oküler yüzeyinde hem konjonktival keratinositler hem de goblet hücreleri için ortak bir oligopotent progenitörünün varlığını göstermiştir [135]. Daha sonra Majo ve ark. 2008 hem kornea hem de konjonktival koloniler oluşturabilen domuz oküler yüzeyinin tamamına yayılmış oligopotent keratinositlerin varlığını göstermiştir [100].

2.5.5 Unipotent Kök Hücreler

Tek kutuplu kök hücreler hala kendi kendini yenileme özelliklerine sahiptir, ancak yalnızca belirli bir hücre tipine farklılaşabilir ve tek bir soy oluşturabilir. İnsan korneasının LEKH'leri belirsizlik örneğidir.

2.5.6 İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH) hücreleri, embriyonik bir duruma yeniden programlanmış somatik hücrelerdir. iPKH hücreleri teknik olarak pluripotent olarak kabul edilir ve üç primer germ tabakasının soyunu üretebilir. Bu fenomen, tanımlanmış bir embriyonik transkripsiyon faktörü kümesi erişkin hücrelerinde tekrar aktif hale geldiğinde oluşur. Yamanaka ve ark.'ları 2006, fare fibroblastlarını kullanan işlemi tanımlayan ilk kişidir. Retroviral aracılı transkripsiyon faktörlerinin tanıtımı, Oct3/4, Sox2, Myc ve Klf4, terminal olarak farklılaşmış yetişkin hücrelerin pluripotitesini restore etti [136]. İnsan iPKH hücreleri doğrudan bir hastanın kendi hücrelerinden türetilbildiğinden, iPKH hücreleri dokuya özel hücre tedavileri, ilaç taraması veya insan hastalığı modelleri geliştirmek için hücreler üretmek için potansiyel olarak kullanılabilir. Yeniden programlama prosedürü daha da optimize edildi ve diğer murinlere (karaciğer ve mide) ve insan yetişkin hücrelerine uygulandı [137-139]. Yeniden programlama faktörlerini ortaya çıkarmak için retroviral vektörlerin kullanımı, onkojen Myc kullanımı ve yeniden programlanmış hücreleri tanımlamak için bir seçim belirteci kullanma ihtiyacı, hücresel tedaviler için iPKH hücrelerinin kullanılmasından önce aşılması gereken temel teknik zorluklardır. Bununla birlikte, iPKH tabanlı hücre

terapisinin, farelerdeki orak hücre anemisinin tedavisi için, gelecekte insan iPKH bazlı hücre terapileri için büyük potansiyel olduğunu gösteren farelerdeki başarısı rapor edilmiştir [140].

2.6 Organoid Teknolojisi

Kök hücre teknolojileri, gelişimi modellemek, hastalık mekanizmalarını analiz etmek ve potansiyel tedaviler geliştirmek için umut vaad etmektedirler. Yakın zamana kadar, kök hücre yöntemlerinin çoğu, bir organın tüm hücre türlerinden ziyade, belirli kök hücre türlerinin saf popülasyonlarına odaklandı. Ancak, bu organoid denilen gelişmekte olan dokuların üç boyutlu (3B) kültürlerinin gelişimi ile değişmeye başlamıştır [141]. Organoid, basitçe 3 boyutlu koşullarda primer dokudan (yetişkin kök hücre) ya da pluripotent hücrelerden (EKH ve iPKH) elde edilen kendini yenileyebilen, kendi kendine organize olabilen ve organın yapısını (mimarisini) ve fonksiyonlarını taklit edebilen yapılar olarak tanımlanmaktadır [142, 143]. Bununla birlikte temel tanım, organların özellikleri olan birkaç önemli özelliği ifade eder. İlk olarak, modellediği organın birden fazla hücre tipi içermesi gerekir; ikincisi, o organa özgü bir işlev göstermelidir ve üçüncüsü, hücreler organın kendisine benzer şekilde organize edilmelidir. Bu aynı zamanda, gelişme sürecinde organın karakteristik organizasyonunu kurma biçimine benzerlik göstermektedir.

İnsan İPKH'lerinden türetilen organoidler, şimdiye kadar, diğerleri arasında bağırsak, böbrek, beyin ve retina için kurulmuştur. İncelenen organların çoğunun, embriyonik dokulardan yeniden düzenleme deneylerinde kendi kendini organize ettiği kanıtlanmıştır, bu organojenlerin prensip olarak İPKH'lerden türetilmesi durumunda organoidlerin üretilebileceğini göstermektedir.

Kornea organoidlerinin oluşturulması ile ilgili protokoller ise son 1-2 yılda literatürde bulunabilir olmuştur. Bu çalışmalarda histolojik olarak korneanın tüm tabakalarını içeren heterojen yapılar elde edilse de fibriller yapının düzgün olmaması kornea stromasının şeffaflığını belirgin derecede azaltabilmektedir. Foster, J.W. ve ark. 2016 da yaptıkları çalışmada, oluşturdukları kornea organoid yapılarında, kornea stromasında kolajen fibrillerin elektron mikroskopik incelemesinde fibriller yapının oluştuğunu fakat bu dizilimin ve açısız düzenlenimin korneanın doğal yapısına uygun olmadığını gözlemlemişlerdir. Kolajenlerin bu dizilimi korneanın şeffaf yapısının

oluşmasında oldukça önemlidir. Böylelikle organoidlerin sağlıklı transplantasyonu için bir yüzey üzerinde ve/veya içerisinde üretilip, yama şeklinde nakledilmesi ile ilgili yöntemlerin geliştirilmesine büyük ihtiyaç vardır.

2.7 Doku Mühendisliği

Son yıllarda doku mühendisliği, kornea hasarlanmasında kadavradan elde edilen kornea transplantasyonun yerine geçebilecek matriks yapıları geliştirmeye başlamıştır. Doku mühendisliği insan vücudunda kornea dahil olmak üzere hasarlı dokuların yerini [144], fibrin-agaroz [145], kolajen [146] ve ipek [147] olmak üzere farklı biyomalzemelerden kornea matriksi oluşturulmuştur. Fakat oluşturulan bu yapıların biyouyumluluk, şeffaflık, esneklik ve yeterli dikiş kolaylığı gibi sorunlar ve yüksek maliyetler nedeniyle tedavide kullanılır olma yolunda sınırlılıklar içermektedir. Ayrıca farklı biyomalzemelerden elde edilen yapay kornealarda histolojik olarak korneanın tüm tabakalarını içeren heterojen yapılar elde edilsede, fibriller yapının düzgün olmaması kornea stromasının şeffaflığını belirgin derecede azaltabilmektedir. Anlatılan tüm bu sorunlara çözüm aramak için literatürde hücresele tedavi ve doku mühendisliği deneyimleri ile alternatif tedavi yöntemi üretilmeye çalışılmaktadır.

Doku mühendisliğinde, organ yetmezliği gibi durumlarda fonksiyonel organ replasmanı için gelecek vaad eden bir yaklaşım ortaya çıkmıştır. Kalp, [148] akciğer [149], akciğer [150] gibi allojenik ya da zenojenik donör organların desellülerize (aselülerize) edilmesi ile dokunun kendi doğal 3 boyutlu (3B) biyolojik yapısının korunması sağlayan ve bu 3B yapı iskelesine işlevsel parenkimal hücreler veya seçilmiş progenitör hücre popülasyonu ekilerek işlevsel bir doku/organ bütünlüğünün oluşmasını sağlayan teknikler geliştirilmeye başlanmıştır [151]. Bu üç boyutlu iskele yapılarına ekilen hücrelerin kendi kendine etkileşimleriyle doku matriksini oluşturduğu gözlenmiştir [149, 152]. Böylece hasarlı ya da işlevini tamamen kaybetmiş dokuların yerine yine doku ya da organın kendi doğal 3B iskelesi kullanılarak ona doğal ortamını sunan matriksler kullanılabilir hale gelmiştir. Bu bağlamda desellülerize edilmiş aselüler kornea yapıları insanlara kornea nakillerinde alternatif bir çözüm oluşturabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Kesitsel ve deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma literatür taraması ile Haziran 2016'da başlamış olup; 20 Ocak 2020'de tez savunmasıyla sonlanmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurulu tarafından 22/06/2017 tarihinde 3438-GOA protokol numaralı 2017/17-44 karar no ile etik açıdan uygun bulmuştur. Bu proje daha sonra TÜBİTAK tarafından 1001 projeler kapsamında 217S654 no ile destek kazanmıştır. Bu projenin çalışmaları Haziran 2018 ile Aralık 2019 zaman diliminde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İzmir Biyotıp ve Genom Merkez'inde ve Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmamız, gönüllü sağlıklı insanlardan elde edilen İPKH ve 3T3 (GFP+) hücre hatları ile gerçekleştirilmiştir.

3.4 Çalışma Materyali

Koç Üniversitesi ile ortak yürütülen 213S182 no'lu TÜBİTAK 1003 projemizde elde ettiğimiz indüklenabilir pluripotent kök hücreleri (İPKH) kornea organoid modeli oluşturmak üzere başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

İPKH'lerden elde edilen kornea progenitör hücreler ve kültüründen farklılaştırılmış matür korneal hücreler (epitel, stromal hücreler, endotel hücreleri) bağımsız

değişkenlerdir. Farklılaşma boyunca hücrelerin ortamına eklenen büyüme faktörleri ile değişen hücre fenotipleri bağımlı değişkenlerdir.

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Başlangıç Materyali

Koç Üniversitesi ve Dokuz Eylül Üniversitelerinin ortak olarak yürüttüğü 213S182 no'lu TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında, sağlıklı gönüllü insanlardan alınmış olan fibroblastlar kullanılarak halihazırda üretilmiş indüklenabilir pluripotent kök hücreleri (İPKH) ve primer fibroblast hücreleri, organoid modeli oluşturmak üzere başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

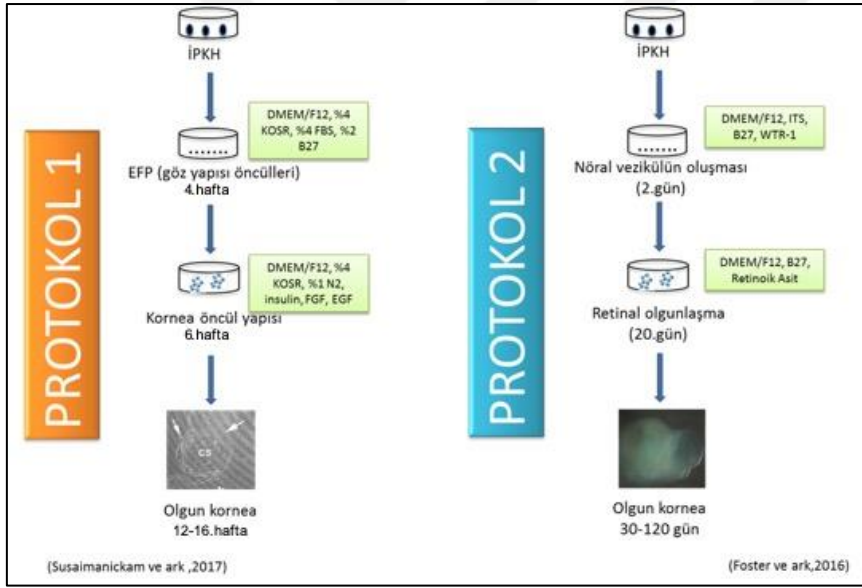
3.6.2 İPKH'lerin Kültüre Edilmesi ve İdamesi

Sıvı azotta dondurulmuş İPKH'ler, 37°C'de çözüldükten sonra, destekleyici yüzey olarak (feeder layer) fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri üzerinde kültüre edilmiştir. Destekleyici yüzey hazırlamak için; kültür kapları %0,1'lik jelatin ile kaplanıp en az 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra jelatin uzaklaştırıp PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. MEF hücreleri %10 FBS, %1 glutamax, %1 NEAA ve %1 sodyum piruvat içeren yüksek glukoz besiyeri içerisinde jelatin kaplı kaplarda kültür edilmiştir. Gece boyu inkübasyondan sonra MEF hücrelerin çoğalmasını baskılamak için 3 saat boyunca 10ug/ml olacak şekilde mitomycin c (Biovision, cat no 2713-5) ile inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemde sonra mitomycin c uzaklaştırılıp MEF hücreleri pasajlanmıştır. MEF hücreleri gece boyu inkübe edildikten sonra İPKH hücrelerini bu hücrelerin üzerinde kültür etmek için hazır hale gelmiştir. Bu doğrultuda İPKH hücreleri %10 Knock out serum (Gibco), %1 glutamax, %1 NEAA ve %55 mm beta mercapto etanol içeren DMEM/F12 içerisinde kültür edilmiştir. İlk gün ortam içerisine Rock inhibitör (Tocris) ve tüm kültür boyunca bFGF ortam içerisine ilave edilmiştir. Yaklaşık bir haftada İPKH'lerin sınırları düzgün görünen koloniler hale gelmiştir. Bu basamaktan sonra İPKH'ler pasajlanarak Matrijel (Corning, 354277) kaplı kültür kaplarına aktarılmıştır. Ekim yapılmadan önce kültür kapları Matrijel ile 1 saat 37°C'de

kaplanmıştır. İPKH'ler farklılaşma başlatılana kadar mTESR1 (STEM CELL Technologies) besiyeri içerisinde çoğaltılıp besiyeri her gün yenilenmiştir (Fidan K ve ark, 2015). Farklılaşma başlatılmadan önce İPKH kolonileri dispaz ile disosiye edilerek single cell (tek hücreli) haline getirilmiştir. Trypan Blue boyaması ile hücre sayımı yapıldıktan sonra 1×10^6 olacak şekilde İPKH hücresi matrijel kaplı kültür kaplarına ekilmiştir. Her iki protokol için kullanılan İPKH kolonileri aynı hattan olup aynı yoğunluk kullanılarak tüm deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.6.3 İPKH'lerden Kornea Organoidlerinin Eldesi

İPKH'lerin kornea organoidlerine farklılaştırılmasında iki farklı protokol kullanılmıştır (Foster ve Susaimanickham) (**Şekil 12**).



Şekil 12. İPKH'lerden kornea organoidlerinin oluşturulması (Susaimanickam protokolü ve Foster protokolü)

3.6.4 Kornea Organoid Kültür Oluşturulması ve İdamesi

İPKH hücreleri %70 yoğunluğa geldiğinde her iki protokole uygun olarak hücre sayısı 1×10^6 olacak şekilde ekilmiştir. Bir gün sonra hücrelerin farklılaştırma basamaklarına geçilmiştir. Susaimanickam ve ark. tarafından elde edilen protokol

protokol-1 olarak, Foster ve ark. tarafından elde edilen protokol ise protokol-2 olarak adlandırılmıştır.

Protokol 1: iPKH'ler Matrigel kaplı kültür kabında mTESR 1 besiyeri ile kültüre edilmiştir (Fidan K ve ark,2015). Koloni yoğunluğu %70'e ulaştıktan sonra besiyeri DMEM/F12, %4 KOSR, %4 FBS, 1X NEAA, 1X Glutamax, 1X Pen-Strep içeren besiyeri ile 2 gün süreyle tutularak ektoderm kökenli hücrelere farklılaşması sağlanmıştır. Daha sonra ortam besiyeri nöroektodermal (nöral retina, retina pigment epiteli) yapıları oluşturmak üzere noggin içermeyen, DMEM/F12, %4 KOSR, % 4 FBS, 1X NEAA, 1X Glutamax, 1X Pen-Strep ve %2 B27 içeren besiyerine geçilmiştir. Son farklılaşma basamağında yüzey ektodermal yapıları (kornea) oluşturmak üzere DMEM/F12, %4 KOSR, %4 FBS, 1X NEAA, 1X Glutamax, 1X Pen-Strep + %1 N2 + 5 µg/mL İnsulin + 5 ng/mL FGF + 10 ng/mL EGF içeren besiyeri ile kültüre edilmiştir (Susaimanickam, P.J. ve ark., 2017). Besi ortamı her 2 günde bir değiştirilmiştir.

Protokol 2: iPKH'ler Matrigel kaplı kültür kabında mTESR 1 besiyeri ile kültüre edilmiştir. Hücre yoğunluğu %70'e ulaştıktan sonra iPKH besiyeri Nöral indüksiyon besiyeri (DMEM/F12, %1 B27 (vitamin A içermeyen), ITS, 28 µg/l sodyum selenyum, 128 mg/L l-askorbik asit) ile 18 gün boyunca muamele edilmiştir. 20. günde besiyeri ortamı DMEM /F12, %1 B27, %10 FBS, 1 X Glutamax, 1XNAEE, 500nM retinoik asit ile muamele edilmiştir (Foster, J.W. ve ark., 2016). Kullanılan besi ortamı her 2 günde bir değiştirilerek idamesi sağlanmıştır.

3.6.5 Hücrelerin Farklılaştırılması

Kornea organoidleri, 120 günden daha uzun süre boyunca hücre kültüründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin nöral farklılaştırma basamakları göre 2-8 gün sürmektedir. Bu sürede hücrelerde B27 ile ektodermal farklılaştırma uyarılmıştır. Retinal farklanma süreci yaklaşık 30 gün sürmektedir. Bu aşamada vitamin A desteği ile hem korneal yapılara hem de retinal yapılara farklanma gerçekleşmektedir. Son olarak korneal farklılaştırma ve olgunlaştırma basamağında EGF, FGF, insülin, retinoik asit (RA), taurin yardımıyla oluşan organoidlerde korneal yapıların gelişmesi ve maturasyonu sağlanmaktadır.

3.6.6 Karakterizasyon Analizleri

3.6.6.1 Whole Mount Boyama

Organoidler, %0,1 BSA içeren soğuk 1x PBS (PBS-B) ile kuyucuklardan toplanıp falkonlara aktarılmış ve 10 ml soğuk PBS ile buz üzerinde 10 dk. süre ile inkübe edilmiştir. Sonrasında tüpün alt kısmında bulunan organoidlerin çekilmemesine dikkat edilerek tüpteki tamponun 8 ml'si çekilip atılmış yerine taze, soğuk PBS eklenerek tüp altüst edilmiş ve tekrar 10 dk. buz üzerinde inkübe edilmiştir. Yukarıda anlatılan prosedür toplamda 3 kere tekrarlandıktan sonra, organoidleri çekmemeye dikkat edilerek tampon solüsyonun hepsi çekilmiş ve organoidlerin üzerine %4 PFA eklenerek buz üzerinde 30 dk. fikse edilmiştir. Yıkama işlemi yukarıda anlatıldığı gibi, PBS ile 10 dk. buz üzerinde inkübasyon ve tamponun değiştirilmesi şeklinde 3 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında ilgili boyama protokolüne göre işlemlere devam edilmiştir.

3.6.6.2 İmmü floresan Boyama

Hücreler ve organoidler 1 kere 1x PBS ile yıkadıktan sonra %4 PFA ile 20 dk. oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Bu basamaktan sonra %0,5 TritonX100 ile permabilize edilip ardından %1BSA/ %10serum/ 0.3M glycin içeren PBS ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra bloklama buffer'ında primer antikorlar seyreltilip +4°C'de gece boyu inkübasyon yapılmıştır. Antikorların listesi ve çalışma koşulları **Tablo 1**'de verilmiştir. Daha sonra her antikor için uygun sekonder antikorlar (**Tablo 2**) kullanılarak floresan mikroskop (Olympus BX61) altında görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Primer antikor listesi

Primer Antibody	Kaynağı	Marka/Katalog Numarası	İnkübasyon Konsantrasyonu
Anti Pax6	RbM	Abcam / ab195045	1:350
Anti Alfa Crystallin	RbM	Abcam / ab181866	1:500

Anti Cytokeratin 10	RbM	Abcam / ab76318	1:150
Anti Cytokeratin 3/12	MS	Abcam / ab68260	1:150
Anti Cytokeratin 15	RbM	Abcam / ab52816	1:150
Anti Cytokeratin 17	RbM	Abcam / ab183330	1:100
Anti Collagen I	Rb	Abcam / ab34710	1:500
Anti Collagen IV	Rb	Abcam / ab6586	1:250
Anti SOX10	RbM	Abcam / ab155279	1:500
CD200	Rb	Abcam / ab195045	IF 1:200 IHC 1:100

Tablo 2. Sekonder antikor listesi

Sekonder Antibody	Kaynağı	Marka/Katalog Numarası	İnkübasyon Konsantrasyonu
Anti-Rabbit Ig H&L, 488	Donkey	Abcam / ab150073	1:1000
Anti-Mouse Ig H&L, 594	Donkey	Abcam / ab150108	1:1000

3.6.6.3 İmmunohistokimyasal Boyama

%4 PFA ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra organoidler parafine gömülmüştür. Parafin bloklarından Mikrotom (Leica, RM2255) cihazı ile 5 µm kalınlıkta alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 60°C'lik etüvde bir gece bekletilip, daha sonra 30'ar dk. üç değişim ksilole tabi tutulmuştur. Kesitler azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandıktan sonra, suyu uzaklaştırılan kesitlerin etrafı PapPen ile çizilmiştir. Ardından tripsin ile 15 dk. 37°C'lik etüvde bekletilip ve 3 kez TBST ile yıkanan kesitler 10 dk. H₂O₂ ile oda ısısında muamele edilmiştir. TBST ile yıkama yapıldıktan sonra, 1 saat Bloklama Solüsyonunda (Regeant A, Invitrogen) bekletilmiştir. Yıkama yapmadan kesitler üzerine Primer antikorlar koyularak +4°C'de gece boyu bekletilmiştir (Tablo 5). Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra biotin-streptavidin

hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (Regeant B ve C, Invitrogen-Plus Broad Spectrum) ile sırasıyla 30 ve 20 dk. bekletilmiştir. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Invitrogen) ile muamele edilmiştir. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer's Hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkanmıştır. Artan alkol serilerinden ve ksilolden geçirildikten sonra entellan ile kapatılıp, ışık mikroskobunda değerlendirmesi yapılmıştır. Bu deneyde primer ve sekonder antikor dilüsyonları, inkübasyon süreleri ve fiksasyon yöntemleri optimizasyon işlemleri yapıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

3.6.6.4 Hematoksilen & Eosin Boyama

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. Sonrasında dehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dk. hematoksilen ile boyanmıştır. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dk. musluk suyu ile yıkanan kesitler, 2 dk. eozin boyası ile boyanmıştır. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dk. üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatılıp ve değerlendirmesi yapılmıştır.

3.6.6.5 PAS Boyaması

Glikojen depoları Periyodik Asit-Schiff (PAS) ile boyanarak analiz edilmiştir. Deparafinizasyonu gerçekleştirilen (bkz İHC yöntem) parafin kesitleri 1x PBS ile yıkandıktan sonra, glikojenin parçalanması için bir saat Diastase enzimine (1mg/ml) maruz bırakılmıştır. Enzim inkübasyonundan sonra PAS eklenip 10 dk. inkübasyon bırakılmıştır. Daha sonra Schiff eklenip 20 dk. karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Boyama işlemi bittikten sonra ışık mikroskop altında görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6.6.6 Masson Trichrome Boyama

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutulur. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirilir. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama kiti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 4 damla weigert hematoksilen boyası (A) ile 4 damla ferrik klorür (B) çözeltisi damlatılır ve 10 dk. bekletilir. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi (C) 4 dk. sonra uzaklaştırılır. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi (D) dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulanır 4 dk. bekletilen kesitler distile su ile yıkanır. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası (E) ile 10 dk. muamele edildikten sonra uzaklaştırılır ve 8 damla açık yeşil boya ile (F) 5 dk. boyanır. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilir. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatılır.

3.6.6.7 SEM (Scanning Electron Microscopy)

Organoidler, desellülerize edilen kornea iskelesi ve resellülerize edilen kornealar SEM ile analizlenmiştir. Örnekler 0.1mol/l sodyum kakodilat tamponu (pH 7.4) içinde hazırlanmış %3,2 gluteraldehit ile fikse edilip daha sonra %1 OsO₄ ile postfiksasyon işlemi yapıp ardından 3 kez 1X PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Etilalkol serilerinden geçirilerek dehidratasyonu sağlanıp dehidre olan örnekler metalik stamlar üzerine konularak 5nm kalınlığında altınla kaplanıp (Quorum Q150R S) Zeiss Sigma 500 elektron mikroskobunda görüntülenmiştir.

3.6.6.8 TEM (Transmission Electron Microscopy)

Kornea organoidlerinin, desellülerize ve resellülerize edilen kornea iskelelerin ultrasütrüktürel yapısının incelenmesi için örnekler %2,5 gluteraldehit içeren karnovsky solüsyonu ile fikse edilmiştir. %1 osmiyum tetraoksit ile post-fiksasyonu sağlandıktan sonra epon:propilen oksit karışımlarında 30 dk. bekletildikten sonra saf eponda 2 gün boyunca 63°C etüvde polimerleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra epon bloklardan ultramikrotom (Ultratom, Leica EM UC7) cihazıyla yarı ince kesitler alınmıştır.

Belirlenen alanlardan ince kesitler (100-150 nm kalınlıkta) gridler üzerine alınmıştır. Alınan ince kesitler elektron mikroskopunda (Carl Zeiss Sigma 500 STEM detektörü ile) görüntülenmiştir.

3.6.6.9 Frozen (Cryo) Kesit için Hazırlık

Farklılaşmanın belli basamaklarında izole edilen kornea organoidleri bir gece %4 PFA ile +4°C'de bir gece fikse edilir. Ertesi gün 1XPBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra %30 sükröz içerisinde konularak 1 gece +4°C'de bekletilir. Ertesi gün bulunduğu kabın dibine çöken organoidler OCT (Tissue Tek) gömme materyali ile kuru buz üzerinde plastik gömme kaplarına gömülür ve cryosection cihazıyla (Leica, CM1950) 7µm'lik kesitler alınır.

3.6.6.10 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonu için RNeasy Mini Kiti (Qiagen 74104) kullanılmıştır. Hücrelerin ve organoidlerin RNA'sı kitin önerdiği şekilde izole edilmiştir. İzole edilen total RNA miktarı ve saflığı belirlendikten sonra, 1 µg total RNA'dan, cDNA sentezi yapılmıştır. Bu işlemde ticari olarak elde edilen cDNA sentez kiti (Thermo, K1622) kullanılmıştır.

3.6.6.11 Gerçek Zamanlı Gen Ekspresyon Analizi

Tüm PCR reaksiyonları AB Step-One-Plus (Applied Biosystems system kat no: 4376592) cihazı ve amplifikasyonlar SYBR Green PCR Master Mix (Power SYBR Green Applied Biosystems cat no: 4367695) kullanılarak yapılmıştır. Primerler her bir gen için özgün olarak tasarlanmıştır. Deney seti gen ekspresyonları analizlenmeden önce, primer çiftleri ile, cDNA miktarı, primer miktarı, annealing ısıları gibi parametrelerin optimizasyon deneyleri yapılmıştır. Amplifikasyon optimizasyon sonrası elde edilen en uygun koşullarda yapılıp ve her örnek için dört tekrarlı setlerle çalışılmıştır. Amplifikasyon bittikten sonra her primer için Ct değerleri tespit edilmiştir. Gen ekspresyonları Relative Kantifikasyon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplanıp endojen

kontrole göre normalize edilmiştir. Bu deneylerde RPL41 (ribozomun 60 s. biriminin bir parçası kodlayan gen) endojen kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6.6.12 İnsan ve Koyun Korneasının Desellülerizasyonu

Kornealar, stereomikroskop altında disekte edilerek dikiş, skar doku gibi istenmeyen yapılar uzaklaştırıldıktan sonra, desellülerizasyon işlemi için Sasaki S. ve ark'larının kullandığı protokol uygulanmıştır. Kornealar %10 antibiyotik içeren PBS ile yıkandıktan sonra %1 SDS içeren solüsyon içerisinde 48 saat süresinde, her 12 saatte bir solüsyon yenilenerek bekletilmiştir. Süre sonunda 3 kez PBS ile yıkanan kornealar 48 saat %75 etanol ile muamele edilmiştir. Tüm bu işlemler 37°C orbital shaker içerisinde 200rpm'de gerçekleştirilmiştir. Son basamakta PBS ile yıkanarak ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk tamponlu formalin içerisine alınmıştır.

Ayrıca immunfloresan yöntemiyle desellülerize edilen korneaların stromal tabaka bütünlüğünün korunup korunmadığını gözlemlemek için kolajen tip I boyaması ve çekirdek boyası olan DAPI ile iskele üzerinde kalan hücre olup olmadığı kontrol edilmiştir.

3.6.6.13 İnsan ve Koyun Korneasının Resellülerizasyonu

Resellülerizasyon işlemi için kontrol hücre hattı olarak ATCC'den ticari olarak insan keratosit primer hücre hattı (CRL11515) satın alınmıştır. Bu hücreler hücre kültürü ortamında sağlıklı olarak büyümediğinden dolayı kontrol hücre hattı olarak GFP işaretli fibroblast hücresi olan 3T3 hücreleri kullanılmıştır.

3T3 hücreleri uygun şartlarda açılmış olup, uygun koşullarda ve uygun besiyeride kültüre edilmiştir. Hücreler 2-3 gün inkübatörde kültüre edildikten sonra %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanmıştır. Ekim yapılacak hücreler tripsin kullanılarak hücre kültür kaplarından kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler trypan blue boyamasıyla hem canlılıkları kontrol edilmiş hem de hücre sayımı yapılmıştır. Desellülerize kornea iskeleti üzerine ekim yapılacak konsantrasyonda yani 2×10^5 hücre ayarlanıp ayrı ependorflar içerisine koyularak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstteki süpernatant atılmış ve her bir ependorfa 10 µl hücre ortamı (%10 FBS içeren RPMI)

konulmuştur. Tüm bu işlemler devam ederken desellülerize edilen kornealar steril hale getirilerek hücre ekim işlemine hazırlanmıştır.

Hücreler homojen olacak şekilde hafif bir pipetaj sonrasında desellülerize edilen kornealar üzerine ekilmiştir ve inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin tutunabilmeleri için, ekim yapıldıktan sonra 4 saat boyunca hücre ortamı eklenmemiştir. Bu sürenin sonunda kültür kaplarına hücre besiyeri konularak inkübatöre kaldırılmıştır. Farklı günlerde hücrelerin desellülerize kornea üzerindeki tutunma alanları izlenmiş olup floresan ve stereo-floresan mikroskop altında gözlenmiştir.

İmmunofloresan yöntemiyle resellülerize edilen korneaların stromal tabaka bütünlüğünün korunup korunmadığını gözlemlemek için kolajen tip I boyaması ve çekirdek boyası olan DAPI ile iskele üzerinde hücre olup olmadığı kontrol edilmiştir

3.6.6.14 DNA İzolasyonu

Desellülerize edilen kornealar DNA izolasyon kiti ile (PureLink™ Genomic DNAMini Kit, K182001) izole edilmiştir. Elde edilen DNA içerikleri nanodrop cihazı ölçülerek yoğunlukları listelenmiştir. Aynı zamanda elde edilen DNA'lar agaroz jel üzerinde yürütülmüştür.

3.6.7 İstatistik

İstatistik analizleri GraphPad Prism 6 programı kullanılarak yapılmıştır. Deneyler 3 tekrar olarak yapılmış, istatistik analizler 2 grubun karşılaştırıldığı durumlarda student t-test ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki anlamlı farklar p değeri (*P < 0,05, **P < 0.001, and ***P < 0.0001) şeklinde kabul edilmiştir.

3.7 Araştırma Planı

İş-zaman çizelgesi Tablo 3'te, iş zaman tablosu ise Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 3. İş zaman çizelgesi

İP Adı/Tanımı	AYLAR																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Literatür çalışması, Etik kurul ve TÜBİTAK başvurusu	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X																		
iPKH hücrelerinin korneaya farklılaştırma protokollerinin test edilmesi													X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X			
Korneaya farklılaştırma basamaklarının kalite kontrol analizleri																X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
Korneanın desellüerize edilmesi ve desellüerize scaffoldun histolojik kalite kontrolü																	X	X	X	X	X	X	X							
Kontrol hücre hattı ve organoid ile resellüerizasyonu ve histolojik kalite kontrolü																				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Verilerin Toplanması																X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Tez yazımı																												X	X	

Tablo 4. İş zaman tablosu

Tez Konusunun Belirlenmesi ve Literatür Taraması
(Haziran 2016 - Haziran 2017)
Etik Kurul ve Yönetim Kurulu Onayı
(Haziran 2017)
TÜBİTAK Proje Başvurusu ve Kabulü
(Haziran 2017 - Haziran 2018)
Laboratuvar Çalışmaları ve Veri Toplama
(Temmuz 2018 - Kasım 2019)
Tez Yazımı
(Kasım 2019 - Aralık 2019)

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Bütün istatistiksel çözümler GraphPad Prism 6 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ANOVA (Analysis of variance) yöntemi çoklu grupların kıyaslanması ve analizlenmesinde kullanılmıştır. İkili grupların karşılaştırmalı değerlendirilmelerinde Mann-Whitney U ve t testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Grafikler üzerindeki “*” işareti $p < 0.05$, “**” $p < 0.001$, “***” $p < 0.0001$ değerini ifade etmektedir.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmada desellülerizasyon ve resellülerizasyonda kullanılan insan kornealarının temininde donör kornea sayısı sıkıntısından dolayı protokol deneme süreçleri oldukça zaman almıştır. Ayrıca resellülerizasyonda kullanılmak üzere ticari olarak satın alınan insan kornea keratosit primer hücre hattı in vitro ortamda sağlıklı olarak büyüyememiştir.

3.10 Etik Kurul Onayı

Etik Kurul'un 22.06.2017 tarihinde 2017/17-44 karar numarası ile görüşülen çalışmamız etik açıdan değerlendirilip uygun görülmüştür (EK1).

BULGULAR

4.1 İPKH Üretim Yöntemlerinin Geliştirilmesi

4.2 Sağlıklı İnsan Fibroblast'larından İPKH'lerin Üretilmesi

4.2.1 Sağlıklı Gönüllü Bireylerden Cilt Biyopsisi Alınması ve Fibroblast Kültürü Yapılması

Sağlıklı bireylerden fibroblast eldesi proje ortağımız olan Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Tamer Önder laboratuvarında gerçekleştirildi.

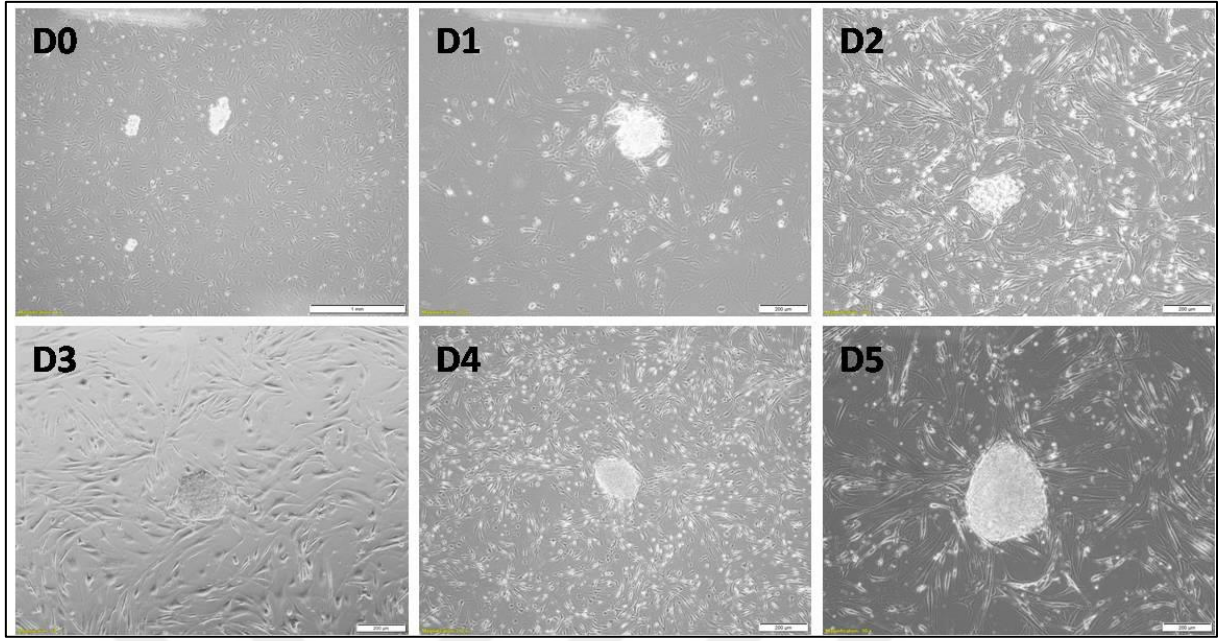
4.2.2 Sağlıklı Gönüllü Bireylerin Fibroblastlarından İPKH Üretilmesi

Deri fibroblast hücreleri, Doç. Dr. Tamer Önder laboratuvarında, transgenik olmayan bir yöntem olan epizomal yol ile OSKM transkripsiyon faktörleri kullanarak yeniden programlandı. Yaklaşık 14 gün sonra üretilen İPKH'lerden DNA izolasyonu yapıp ve PCR ile çoğaltılan DNA'larda dizileme yapıldı. Analiz sonuçlarında hastalardan elde edilen İPKH'ler türev aldıkları fibroblastlar ile aynı mutasyonu taşıdıkları gözlemlendi. Daha sonra elde edilen İPKH'lerin özgün gen ifadeleri, teratom yapma yetenekleri ve karyotipleme gibi çeşitli analizlerle karakterize edildi.

4.3 İPKH Hücrelerinin Korneaya Farklılaştırma Protokollerinin Test Edilmesi

Koç Üniversitesi ve Dokuz Eylül Üniversitelerinin ortak olarak yürüttüğü bir TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında, Doç. Dr. Tamer Önder öncülüğünde, sağlıklı gönüllülerden alınmış fibroblastların epizomal yeniden programlama ile elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücreleri (İPKH) kornea organoid modeli oluşturmak üzere başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Sıvı azotta depolanmış olan bu İPKH'ler, uygun şekilde çözülerek çoğaltılmış ve kornea organoidlerinin oluşturulmasında halihazırda literatürde bulunan iki farklı protokol ile farklılaştırılmıştır (Susaimanickam, P.J. ve ark., 2017 ve Foster, J.W. ve ark., 2016).

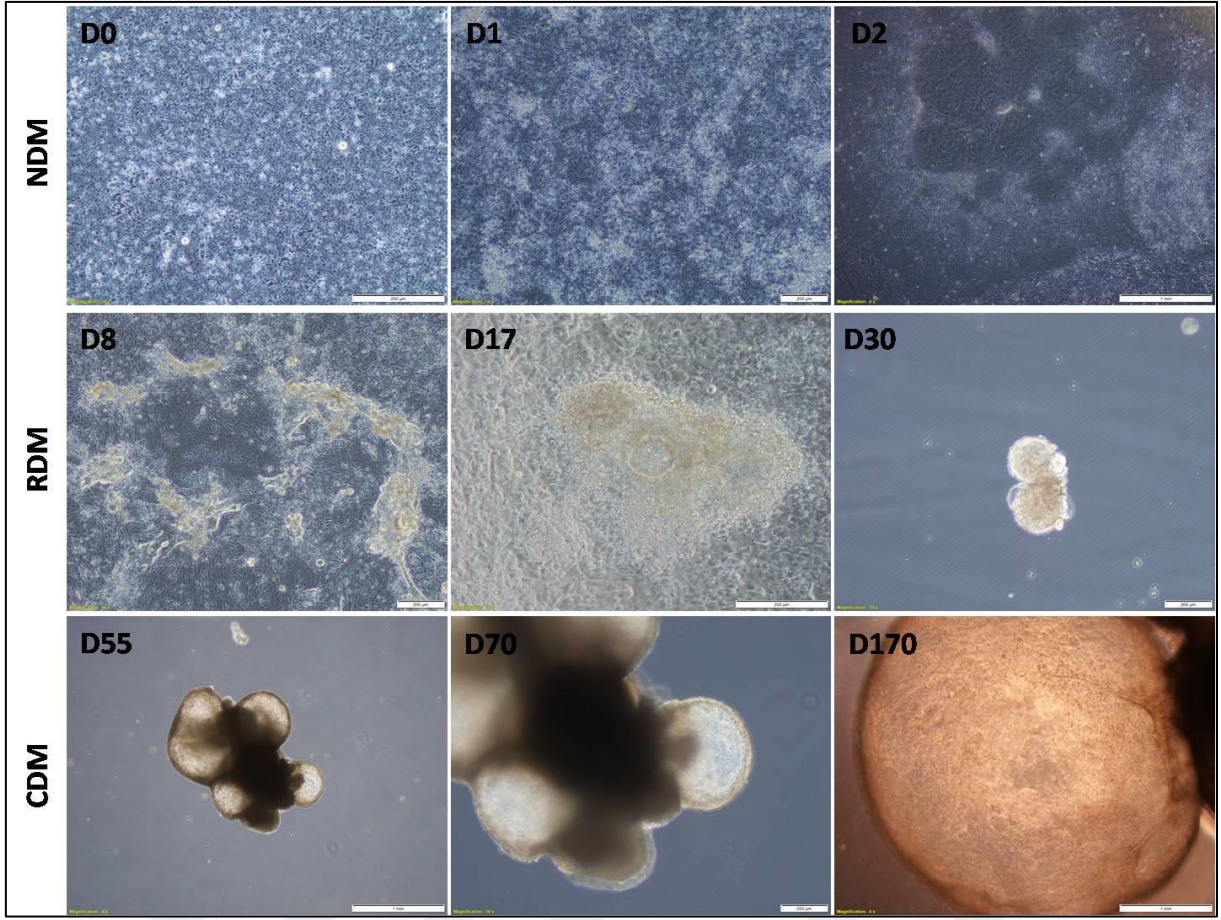
Sıvı azotta dondurulmuş İPKH'ler, 37°C'de çözüldükten sonra, destekleyici yüzey olarak (feeder layer) fare embriyonik fibroblast (MEF) hücreleri üzerinde kültüre edilmektedir (**Şekil 13**). Destekleyici yüzey hazırlamak için; kültür kapları %0,1'lik jelatin ile kaplanıp en az 1 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra jelatin uzaklaştırıp PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. MEF hücreleri %10 FBS, %1 glutamax, %1 NEAA ve %1 sodyum piruvat içeren yüksek glukoz besiyeri içerisinde jelatin kaplı kaplarda kültür edilmiştir. Gece boyu inkübasyondan sonra MEF hücrelerin çoğalmasını baskılamak için 3 saat boyunca 10ug/ml olacak şekilde mitomycin c (Biovision, cat no 2713-5) ile inkübasyon yapılmıştır. Bu işlemten sonra mitomycin c uzaklaştırılıp MEF hücreleri pasajlanmıştır. MEF hücreleri gece boyu inkübe edildikten sonra İPKH hücrelerini bu hücrelerin üzerinde kültür etmek için hazır hale gelmiştir. Bu doğrultuda İPKH hücreleri %10 Knock out serum (Gibco), %1 glutamax, %1 NEAA ve %55 mm beta mercapto etanol içeren DMEM/F12 içerisinde kültür edilmiştir. İlk gün ortam içerisine Rock inhibitör (Tocris) ve tüm kültür boyunca bFGF ortam içerisine ilave edilmiştir. Yaklaşık bir haftada İPKH'lerin sınırları düzgün görünen koloniler hale gelmiştir. Bu basamaktan sonra İPKH'ler pasajlanarak Matrijel (Corning, 354277) kaplı kültür kaplarına aktarılmıştır. Ekim yapılmadan önce kültür kapları Matrijel ile 1 saat 37°C'de kaplanmıştır. İPKH'ler farklılaşma başlatılana kadar mTESR1 (STEMCELL Technologies) besiyeri içerisinde çoğaltılıp besiyeri her gün yenilenmiştir (Fidan K ve ark, 2015). Farklılaşma başlatılmadan önce İPKH kolonileri dispaz ile disosiye edilerek single cell (tek hücreli) haline getirilmiştir. Trypan Blue boyaması ile hücre sayımı yapıldıktan sonra 1×10^6 olacak şekilde İPKH hücresi matrijel kaplı kültür kaplarına ekilmiştir. Her iki protokol için kullanılan İPKH kolonileri aynı hattan olup aynı yoğunluk kullanılarak tüm deneyler gerçekleştirilmiştir.



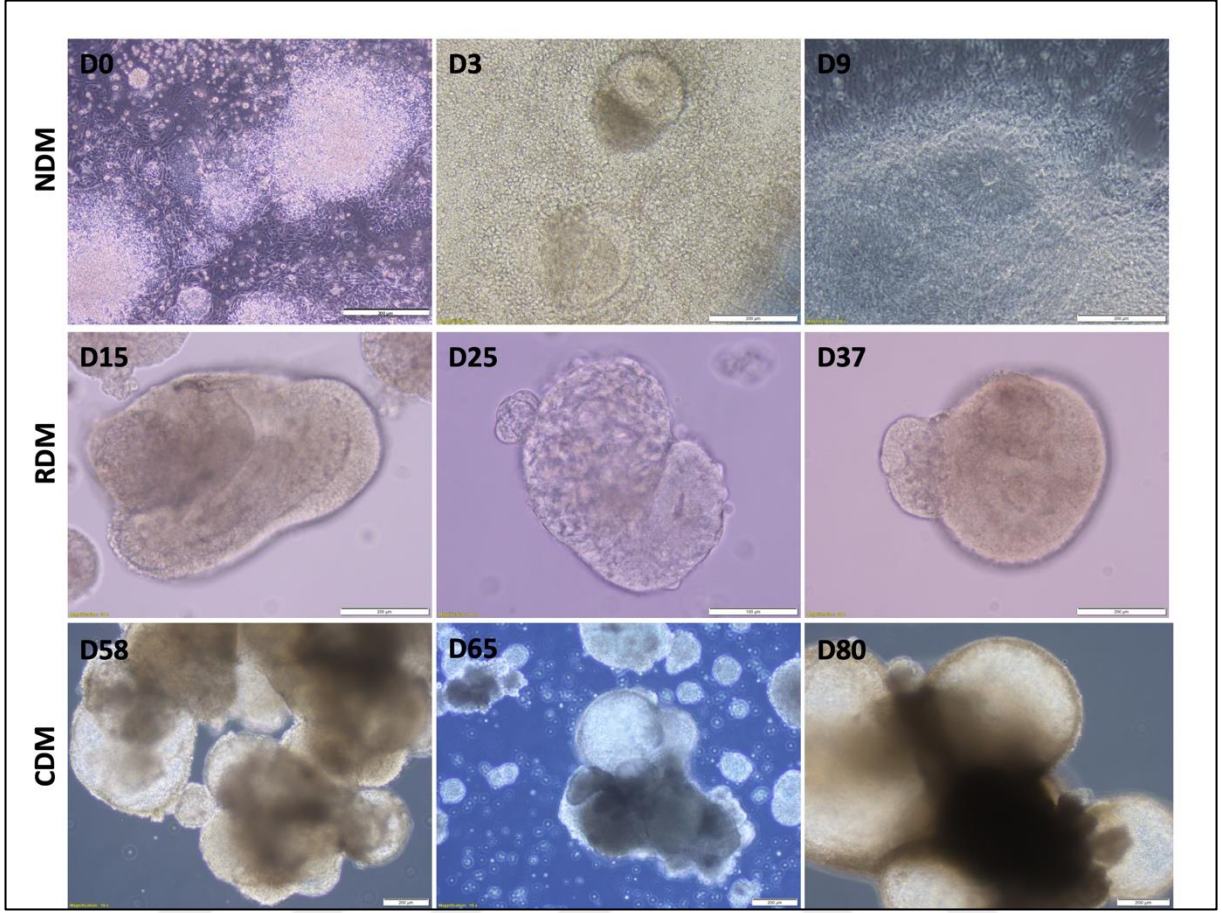
Şekil 13. Başlangıç materyali olarak kullanılan İPKH'lerin MEF üzerinde farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntüleri (D: gün, D0 için ölçek çubuğu 1mm, D1-D5 için ölçek çubuğu 200µm)

Protokol 1: İPKH'ler Matrigel kaplı kültür kabında mTESR 1 besiyeri ile kültüre edilmiştir (Fidan K ve ark, 2015). Koloni yoğunluğu %70'e ulaştıktan sonra besiyeri DMEM/F12, %4 KOSR, %4 FBS, 1X NEAA, 1X Glutamax, 1X Pen-Strep içeren besiyeri ile 2 gün süreyle tutularak ektoderm kökenli hücrelere farklılaşması sağlanmıştır. Daha sonra ortam besiyeri nöroektodermal (nöral retina, retina pigment epiteli) yapıları oluşturmak üzere noggin içermeyen, DMEM/F12, %4 KOSR, %4 FBS, 1X NEAA, 1X Glutamax, 1X Pen-Strep ve %2 B27 içeren besiyerine geçilmiştir. Son farklılaşma basamağında yüzey ektodermal yapıları (kornea) oluşturmak üzere DMEM/F12, 4% KOSR, 4% FBS, 1X NEAA, 1X Glutamax, 1X Pen-Strep + %1 N2 + 5 µg/mL Insulin + 5 ng/mL FGF + 10 ng/mL EGF içeren besiyeri ile kültüre edilmiştir (Susaimanickam, P.J. ve ark., 2017). Besi ortamı her 2 günde bir değiştirilmiştir. Farklılaşma basamakları ilerledikçe oluşan yapılar morfolojik olarak değişiklikler göstermiştir. Kornea organoidlerinin boyutları farklılaşma süresi ilerledikçe (özellikle 50.günden itibaren) artış göstermiştir. Aynı zamanda oluşan kornea organoidinin içinde sıvı birikimi ve oluşan yapılarda farklı katmanların oluştuğu yapılan mikroskopik incelemelerde gözlenmiştir (**Şekil 14**).

Protokol 2: iPKH'ler Matrijel kaplı kültür kabında mTESR 1 besiyeri ile kültüre edilmiştir. Hücre yoğunluğu %70'e ulaştıktan sonra iPKH besiyeri Nöral indüksiyon besiyeri (DMEM/F12, %1 B27 (vitamin A içermeyen), ITS, 28 µg/l sodyum selenyum, 128 mg/L l-askorbik asit) ile 18 gün boyunca muamele edilmiştir. 20. günde besiyeri ortamı DMEM /F12, %1 B27, %10 FBS, 1 X Glutamax, 1XNAEE, 500nM retinoik asit ile muamele edilmiştir (Foster, J.W. ve ark., 2016). Kullanılan besi ortamı her 2 günde bir değiştirilerek idamesi sağlanmıştır. Farklılaşma süresinde 12. günden sonra retinal tabakalanmanın olduğu gözlenmiştir. 25. günden itibaren korneal yapıların gözle görünür şekilde olduğu, farklılaşmanın ilerleyen günlerinde oluşan kornea organoidlerinin boyutlarının arttığı ve içinde sıvı birikimi olduğu gözlenmiştir. Farklılaşma ilerledikçe kornea organoidlerinin maturasyonunun ilerlediği ve yapıların daha dayanıklı olduğunu gözlemlenmiştir. Bu da bize kolajen sentezinin olduğunu ve yapıya dayanıklılık kazandırdığını düşündürmüştür (**Şekil 15**).



Şekil 14. Susaimanickam protokolüne göre korneal farklılaştırma süreci (NDM: Nöral farklılaştırma, RDM: Retinal farklılaştırma, CDM: Korneal farklılaştırma) (D0, D1, D8, D17, D30 ve D70 için ölçek barı 200µm, D2, D55 ve D170 için ölçek barı 1mm)



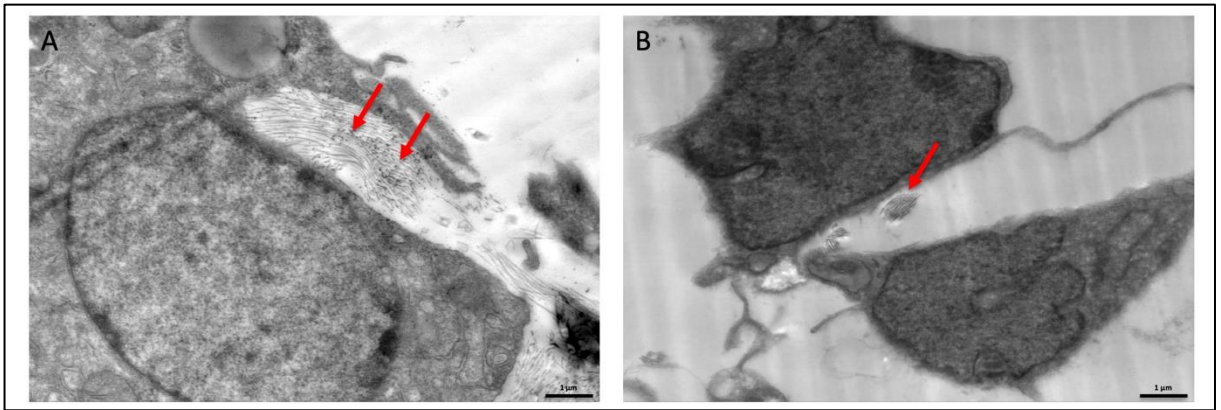
Şekil 15. Foster protokolüne göre korneal farklılaştırma süreci (NDM: Nöral farklılaştırma, RDM: Retinal farklılaştırma, CDM: Korneal farklılaştırma) (D0-D15 için ölçek barı 200 μm , D25 için ölçek barı 100 μm , D37-D80 için ölçek barı 200 μm)

Protokoller başlangıç sayısına oranla oluşan organoid sayısına bakılarak karşılaştırıldığında Foster protokolünün kısmen daha başarılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yapılan elektron mikroskobu analizleri sonucunda Foster protokolünde elde edilen organoidlerde kolajen sentezinin daha yoğun olduğu gözlenmiştir (**Şekil 16**). Ek olarak Foster protokolünün süresinin daha kısa olması ile birlikte bu protokolün tercih etme sebebimiz olmuştur (**Tablo 5**).

Bu verilerden sonra çalışmalarımıza artık bu protokolü uygulayarak devam edilmiştir.

Tablo 5. İki protokolün verimlilik açısından birbiriyle kıyaslaması

	Foster Protokol	Susaimanickam Protokol
Organoid Sayısı	++	+
Kolajen sentezi	+++	++
Kültür süresi	>120	>98



Şekil 16. Sentezlenen kolajenlerin elektron mikroskopik görüntüsü (A: Foster Protokol, B: Susaimanickam Protokol)

4.4 Korneaya Farklılaştırma Basamaklarının Kalite Kontrol Analizleri

Bu iş paketinde, iPKH'lerden kornea benzeri yapılar elde edilmesi sürecinin farklı aşamalarında gerçekleşen spesifik gen ekspresyon değişiklikleri (**Tablo 6**) analiz edilerek, farklılaşmanın doğasına en yakın ve beklenen şekilde olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Tablo 6. İPKH'den kornea benzeri yapılara farklılaşma basamaklarına özgü gen ekspresyonları

	İPKH	NDM	RDM	CDM
Pax6	-	+	++	+++
Nestin	-	+++	-	-
TUBB3	-	+++	-	-
P63 α	-	+	++	+++
Δ P63	-	+	++	+++
Sox10	-	-	+++	-
α -Crystallin	-	-	+++	-
Col I	-	-	+	+++
Col IV	-	-	+	+++
CR3/12	-	-	+	+++
CR10	-	-	+	-
CR15	-	-	+	++
CR17	-	-	+	++

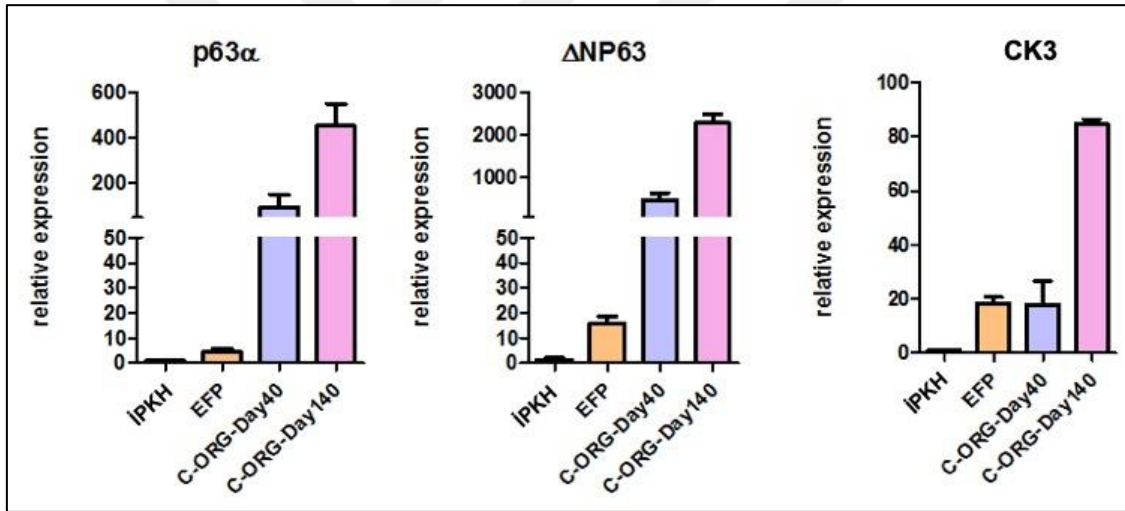
4.4.1 Transkript Düzeyinde Gen Ekspresyon Analizleri

İPKH' den korneaya farklılaştırma protokolünün son aşamalarında (olgun kornea organoidleri) elde edilen hücre pelletlerinden, RNeasy kiti kullanarak, total RNA izole edilmiştir. Ekstraksiyon sonrası RNA konsantrasyonu nanodrop cihazında tespit edilmiştir. RNA saflığı OD260/OD280 değeri ile belirlenmiş olup, bunun en az 2 olmasına dikkat edilmiştir. cDNA sentezi, Thermo Maxima kit kullanılarak önerilen protokol ile gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen genler için tasarlanmış özgün primerler (**Tablo 7**) kullanılarak yapılan gerçek zamanlı qPCR ile, cDNA'ların kalıp olarak kullanıldığı özgün gen amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon değişimleri $\Delta\Delta C_t$ yöntemine göre analiz edilmiştir. Normalizasyon için RPL41 geni kullanılmıştır. P63 α , Δ NP63 ve KR3 ekspresyonlarının İPKH, EFP (göz öncül yapıları), kornea organoid maturasyonun 40. ve 140. günlerindeki ekspresyonları incelenmiştir.

P63 α , Δ NP63 ve CK3 kornea maturasyonu süresince pozitif olduğu, İPKH hücrelerinde ekspresyonunun olmadığı gözlenmiştir. Bu da bize, korneaya spesifik olan genlerin organoidlerde eksprese olduğunu ve farklılaşmanın gerçekleştiğini göstermiştir (**Şekil 17**).

Tablo 7. qPCR için kullanılan primerlerin detay bilgileri

Primer	Forward	Reverse	Amplikon Büyükliği (bp)
Δ NP63	GAAACAATGCCCACTCAATTT	TCTGCGCGTGGTCTGTGTTAT	127
P63 α	ATGTCGAAATTGCTCAGGGATTTTCAGA	TGACCACCATCTATCAGATTGAGCATTACT	77
CK3	AGGAGCGGGAACAGAATCAAGA	GGAACCGCACCTGTCAATG	66

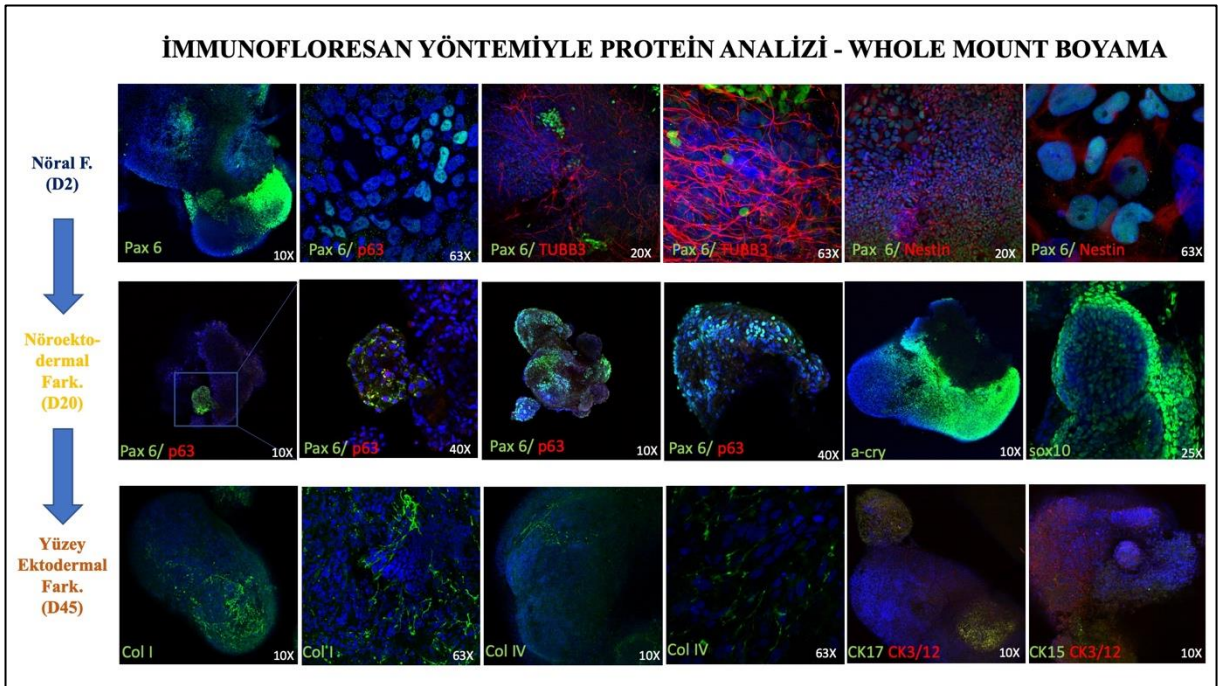


Şekil 17. Farklılaşmanın farklı basamaklarındaki spesifik gen ekspresyonlarının qPCR ile değerlendirilmesi

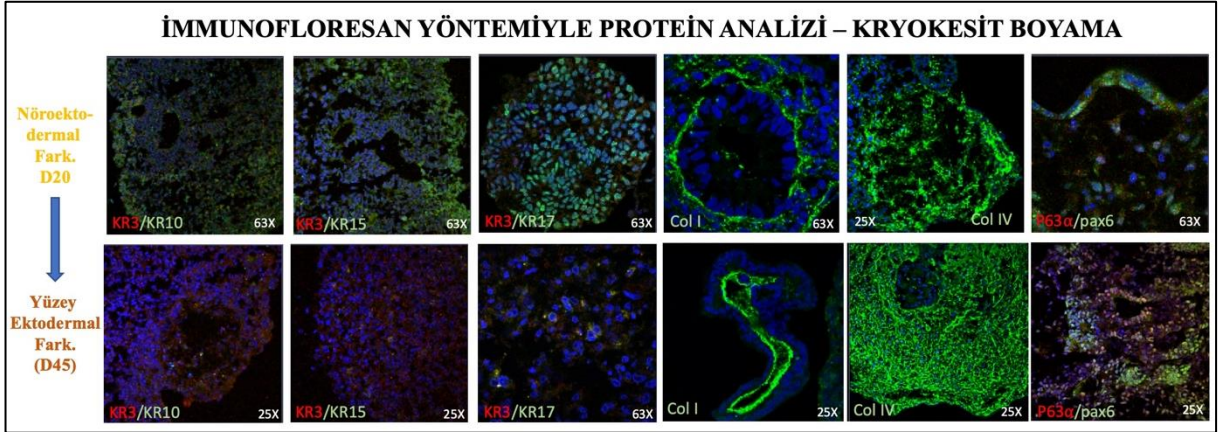
4.4.2 Protein Düzeyinde Gen Ekspresyon Analizleri

İPKH'lerden farklılaştırılan kornea organoidleri her basamağa özgün antikorlar kullanılarak yapılan immunoboyama aracılığı ile incelendi. Antikorların listesi ve çalışma koşulları **Tablo 1**'de verilmiştir. Whole mount boyamalar ve cryokesitler için aynı protokol uygulanmıştır. 1 kere 1x PBS ile yıkadıktan sonra %4 PFA ile 20 dk. oda sıcaklığında tespit edilmiştir. Bu basamaktan sonra %0,5 Triton X-100 ile permabilize

edilip ardından %1BSA /%10serum/0.3M glycin içeren PBS ile 1saat oda sıcaklığında bloklama yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra bloklama tamponunda antikorlar seyreltilip +4°C gece boyu inkübasyon yapıldı. Daha sonra her antikor için uygun sekonder antikor kullanılarak floresan mikroskop altında görüntüleme işlemi gerçekleştirildi (**Şekil 18** ve **Şekil 19**). Bu deneyde primer ve sekonder antikor dilüsyonları, inkübasyon süreleri ve fiksasyon yöntemleri optimizasyon işlemleri yapıldıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

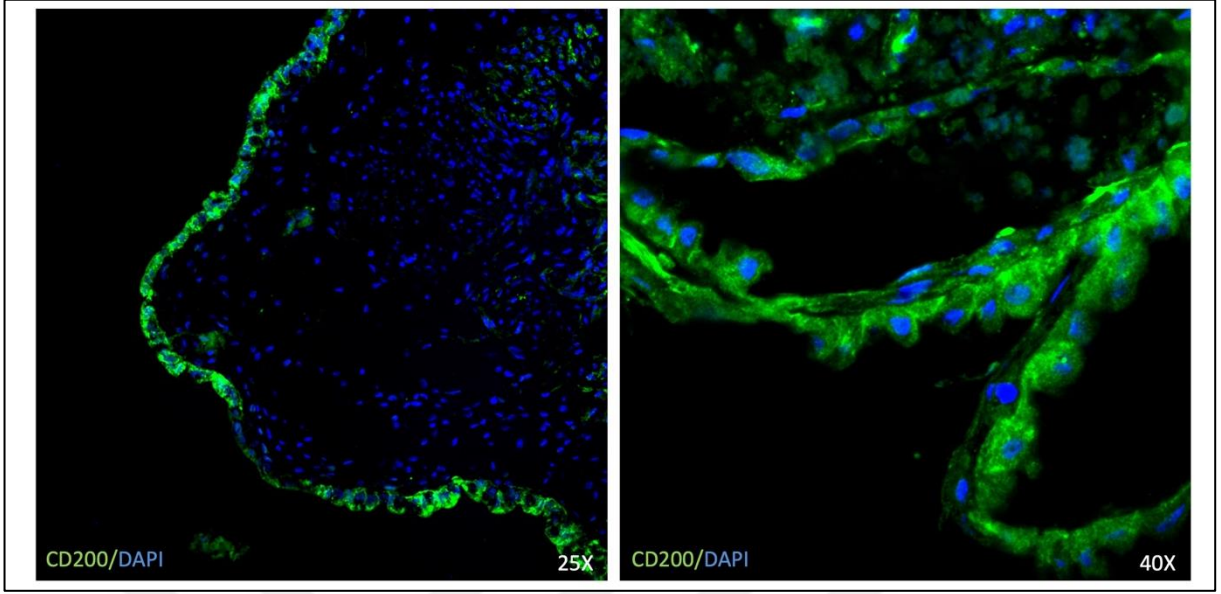


Şekil 18. Farklılaşma basamaklarında her basamağa özgü spesifik gen ekspresyonlarının immunofloresan olarak görüntülenmesi

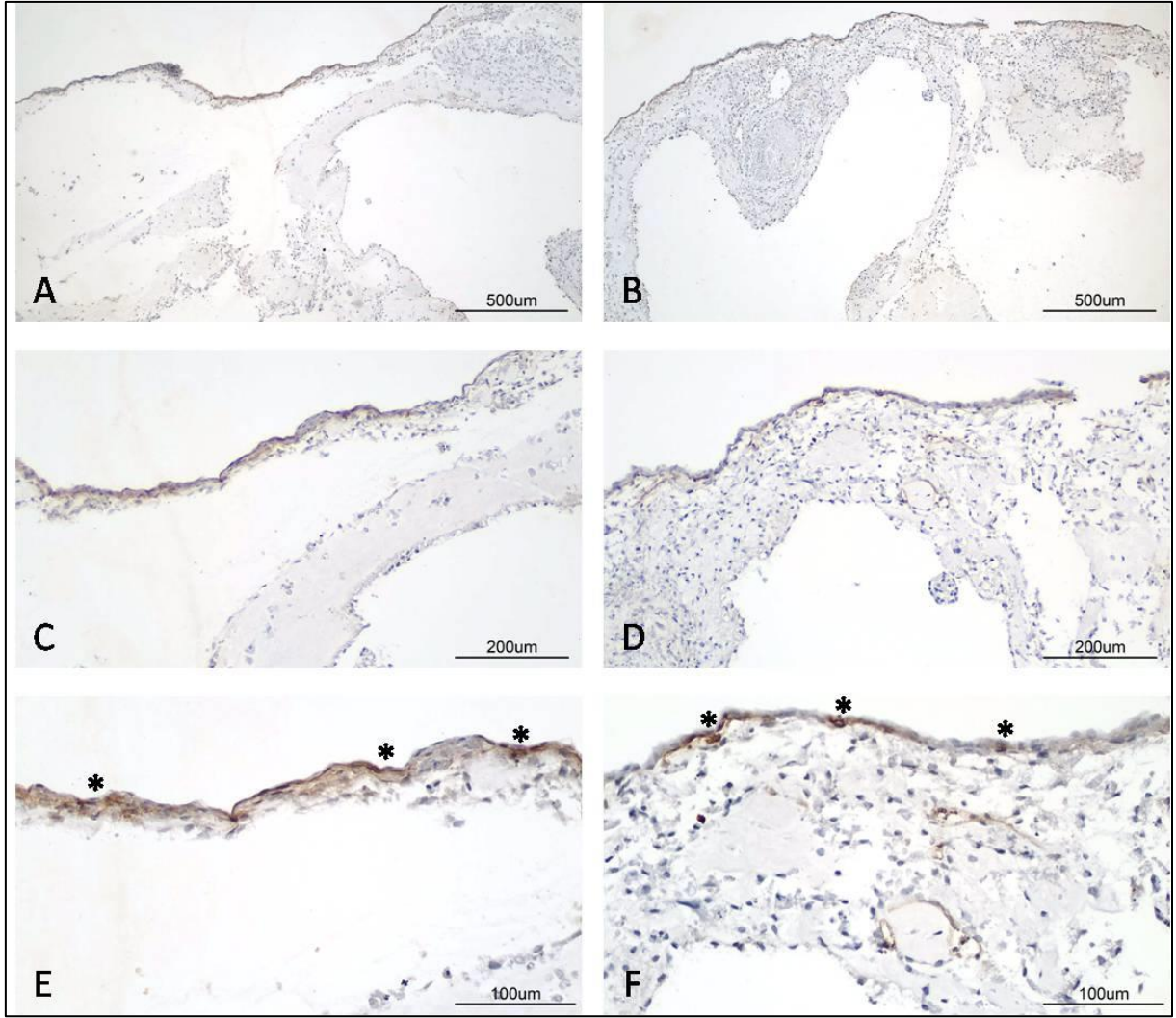


Şekil 19. Farklılaşma basamaklarında her basamağa özgü spesifik gen ekspresyonlarının immunofloresan olarak görüntülenmesi

İPKH'lerden başlayarak kornea organoidlerine gelene kadar farklılaşmanın her basamağında Tablo 2'de listelenen proteinlerin ekspresyonları immunofloresan boyamalarla incelenmiştir. Bu sonuçlara ilave olarak, maturasyon sırasında veya sonrasında oluşması beklenen stroma ve endotele spesifik olan CD200 protein ekspresyonları da incelenmiştir (**Şekil 20** ve **Şekil 21**).



Şekil 20. Maturasyon sırasında oluşması beklenen endotele spesifik CD200 protein ekspresyonunun immunofloresan olarak görüntülenmesi



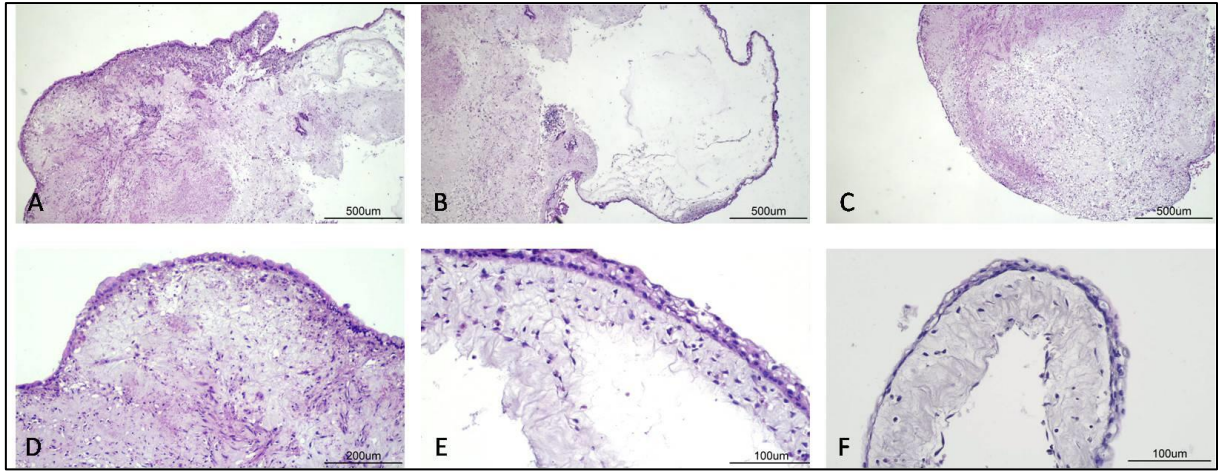
Şekil 21. Maturasyon sırasında oluşması beklenen endotele spesifik CD200 protein ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak görüntülenmesi

4.4.3 Kornea Organoidlerinin Histolojik Kalite Kontrolü

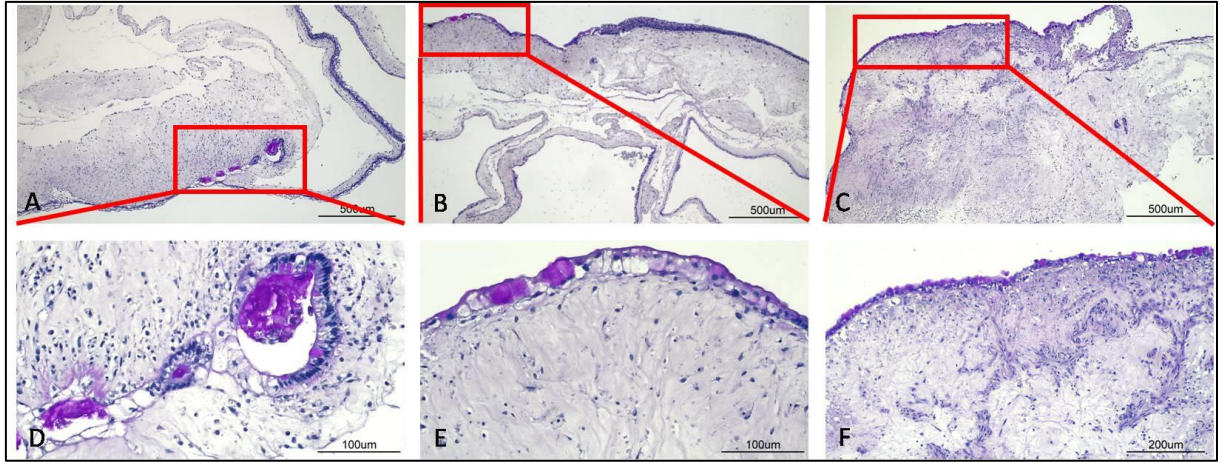
Kornea organoidlerinin morfolojik yapısını inceleyebilmek amacıyla histokimyasal olarak boyamalar yapılmıştır. Genel yapı hakkında bilgi sahibi olabilmek amacıyla Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyamaları yapılmıştır. Aynı zamanda hücrelerin farklı fonksiyonlarının olup olmadığını gözlemleyebilmek amacıyla Periodik Asit Schiff (PAS) boyamaları yapılmıştır. Bunun için kornea organoidleri %10'luk tamponlu formalinde fikse edildikten sonra, rutin doku takibi işlemi sonrası parafin bloklara gömülmüştür. Mikrotom ile 5 µm'lik kesitler alındıktan sonra deparafinizasyon işlemi sonrası H&E ve

PAS boyamaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda oluşan yapılarda, kornea alanını temsil eden bölgelerde epitelin çok sıralı tabakalanma gösterdiği ve kolajen benzeri yapıların olduğu gözlenmiştir. Yine bu tabakalanmanın alt kısmında endotel benzeri hücreler gözlenmiştir (**Şekil 22**).

PAS boyaması sonucunda elde edilen görüntüler incelendiğinde, oluşan kornea organoid yapılarının farklı bölgelerinde hücrelerin PAS pozitif reaksiyon verdiği gözlemlenmiştir (**Şekil 23**). PAS pozitif olan hücreler pembe-mor renkte boyanmış olup yapısında glikojen biriktirdiği görülmüştür. Bu bölge insan gözünde kornea bölgesinin devamı olan konjunktiva bölgesinde gözlenmektedir.



Şekil 22. H&E boyaması ile kornea organoidlerinin ışık mikroskopik görüntüleri
Şekil A, B ve C yapıların genel oluşumunu göstermektedir. Şekil D, E ve F’de epitel hücre tabakasının birden fazla sıralı olduğu ve bu tabakanın altında fibriller yapı şeklinde kolajen fibrilleri görülmektedir. Ölçek barı Şekil A, B, C: 500µm, Şekil D: 200µm, Şekil E ve F: 100µm



Şekil 23. PAS boyaması ile kornea organoidlerinde glikojen depolayan hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri. Ölçek barı Şekil A, B, C: 500µm, Şekil D ve E: 100µm, Şekil F: 200µm

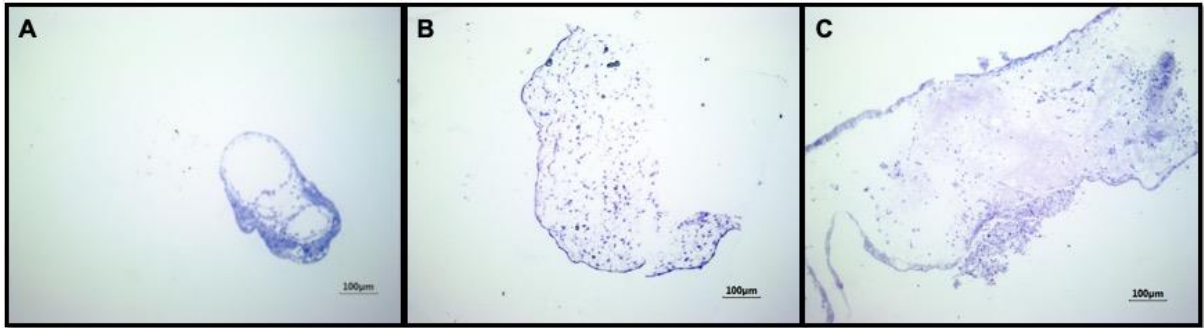
4.4.4 Kornea Organoidlerinin İnce Yapı Analizleri

Oluşan kornea yapılarının ileride rejenerasyon amaçlı kullanımlarının olabilmesi için en önemli sınırlılık, gözde ışık geçirgenliğini sağlayan doğru mimaride dizimlenmiş kolajenlerin doğru mimaride oluşmasıdır. Hâlihazırda elde ettiğimiz kornea benzeri yapılarda kolajen oluşum ve dizimlerini incelemek amacıyla, geçirimli elektron mikroskopik (Transmission Electron Microscopy = TEM) analizler yapılmıştır.

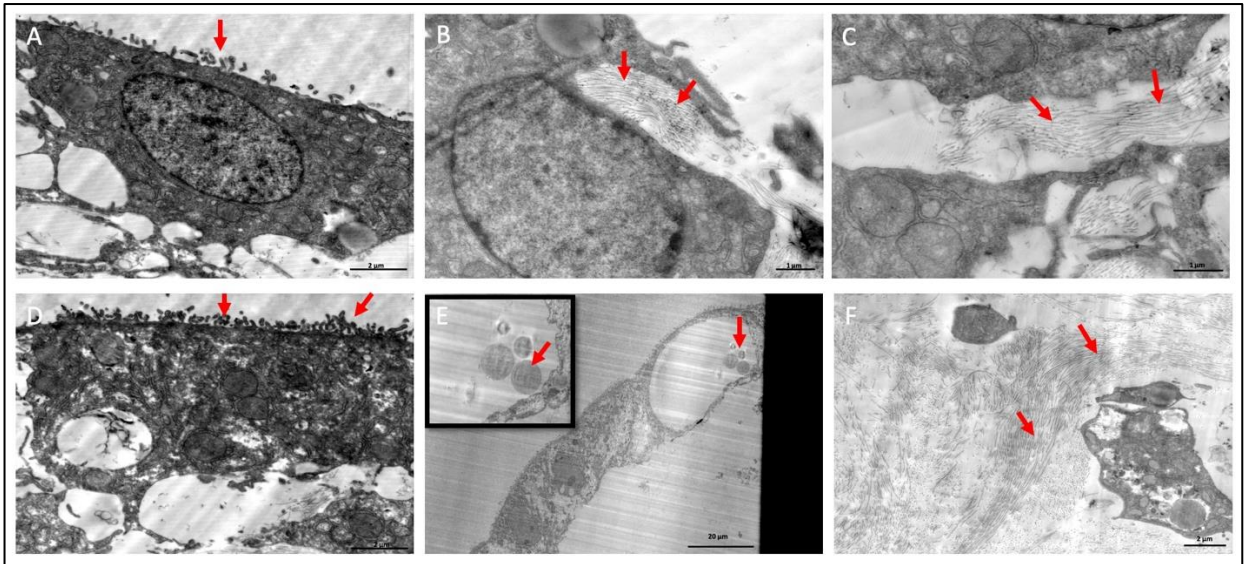
TEM analizi için farklılaşmanın 50. ve 300. günündeki kornea organidleri %2,5 gluteraldehitte fikse edilmiştir. %1 osmiyum tetraoksitle post-fiksasyonu sağlandıktan sonra epon: propilen oksit karışımlarında 30 dk. bekletildikten sonra saf eponda 2 gün boyunca 63°C etüvde polimerleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra kornea organoid yapılarından ultramikrotom (Ultratom, Leica EM UC7) aracılığıyla yarı ince (800nm) kesitler alınmış ve toluidine mavisi boyasıyla boyanmıştır (**Şekil 24**). Aynı alanlardan ince kesitler (50-100nm kalınlıkta) alınarak gridler üzerine alınmıştır. Kesitlerde hücrelerin ince yapısı, hücreler arası bağlantı yapıları ve korneanın stroma tabakasında fibriler yapılar TEM ile incelenmiştir (**Şekil 25**).

Elde edilen elektron mikroskopik bulgulara; hücrelerin apikal farklılaşma gösterdikleri (mikrovillus yapıları) (**Şekil 19A-19D**), hücreler arasında kolajen paketlerinin olduğunu ve kolajen sentezinin gerçekleştiğini gözlemledik (**Şekil 19B**,

19C, 19E, 19F). Ayrıca organoidlerde farklı hücre tiplerinin oluştuğu, farklı epitel sıralanması gösteren bölgelerin olduğu yani bazı bölgelerin 2-3 sıralı, bazı bölgelerin ise 5-7 sıralı epitel hücre tabakasına sahip olduğu gözlenmiştir. Keratosit hücre morfolojisine benzeyen hücreler gözlenmiş olup bu hücrelerin organoid için dolduran sıvıyı kuşatan ve sıvıyı içinde düzensiz yerleşmiş olarak kolajen fibrillerin yakınında konumlandığı gözlenmiştir. Ayrıca prokolajen paketleri yine kornea organoid iç bölgesinde düzensiz olarak yerleşmiş keratinositlerde intrastoplazmik olarak gözlenmiştir (**Şekil 26**).

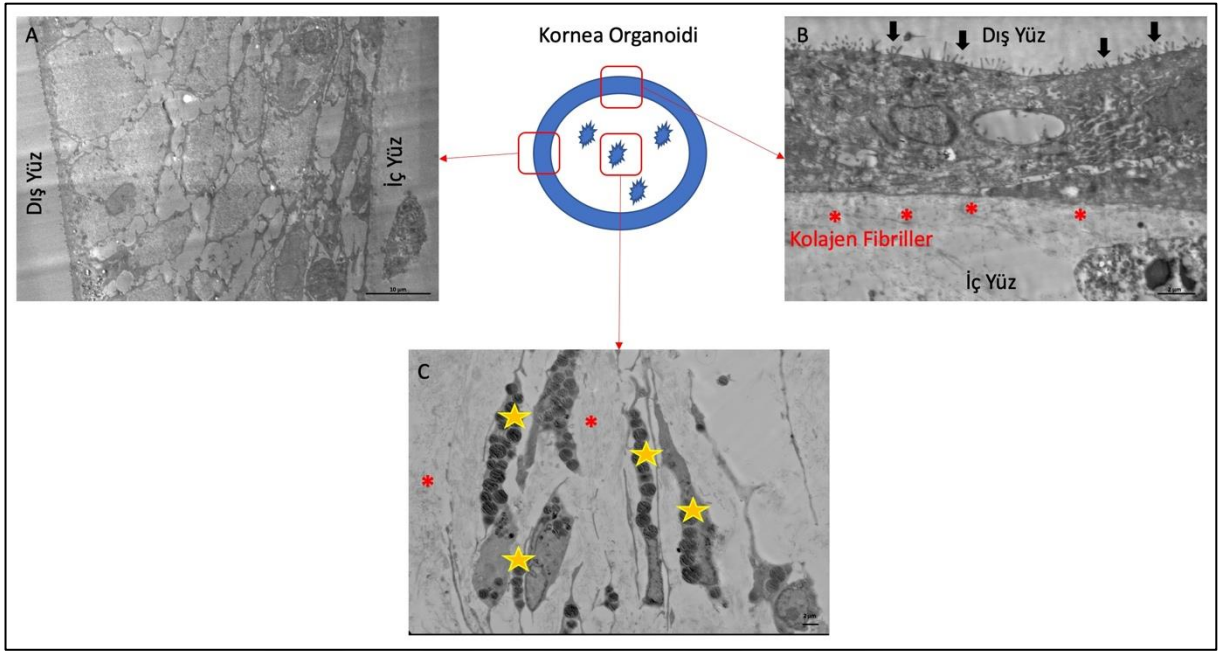


Şekil 24. Kornea organoid yapılarından elde edilen (D50) ve Toluidin Mavisi ile boyanmış yarı ince kesitlerin ile ışık mikroskopik görüntülenmesi



Şekil 25. Kornea organoidlerinden (D50) elde edilen ultra ince kesitlerin elektron mikroskopik görüntülenmesi

A ve D: kırmızı ok mikrovillus yapılarını; B, C ve F: kırmızı ok kolajen yapılarını; E: kırmızı ok kolajen paketlerini göstermektedir.



Şekil 26. Kornea organoidlerinin (D300) TEM görüntüsü
(*kolajen fibriller, ★ prokolajen paketler, ↓ apikal yüzey farklanması)

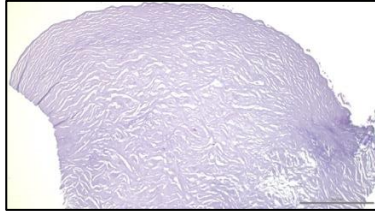
4.5 Kornea İskelesi Hazırlaması Protokollerinin Optimizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında, kornea yapılarının gerçeğe en yakın yapıda oluşmasını tetiklemek üzere, gerçek kornea iskeletinin matriks olarak kullanıldığı koşulların kültür ortamında oluşturulması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, DEÜ Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan kornea nakli için başvuran hastalardan ameliyat sonrası çıkarılan ve kullanılmayacak olan kornealar iskele hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.

Kornea temininde yaşanan kısıtlılıklar nedeniyle desellülerizasyon işlemleri için insan korneasına en yakın özellik gösteren koyun korneaları üzerinde optimizasyon çalışmaları yapılmış olup en iyi sonuç alınan protokol insan kornealarına uygulanmıştır.

4.5.1 Korneanın Desellülerize Edilmesi ve Desellülerize İskelenin Histolojik Kalite Kontrolü

Desellularizasyon işlemi için birçok farklı protokol denenmiştir. Kornealar, stereomikroskop altında disekte edilerek dikiş, skar doku gibi istenmeyen yapılar uzaklaştırılmıştır. Alınan korneaya desellülerizasyon işlemi için Youruek E., ve ark'larının kullandığı protokol uygulanmıştır. Kornea %10 antibiyotik içeren PBS ile yıkandıktan sonra %0,1 SDS içeren solüsyon içerisinde 48 saat muamele edilmiştir. Her 12 saatte bir solüsyon yenilenmiştir. Süre sonunda 3 kez TBS ile yıkanan kornea son basamakta PBS ile yıkanarak ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk tamponlu formalin içerisinde alınmıştır. Doku takibi işlemine tabi tutulan kornealar parafin bloklar haline getirilerek 5µm'lik kesitler alınmıştır. Alınan kesitler histolojik incelemeler için Hematoksilen ve Eozin (H&E) ve Masson Trichrome boyaları ile boyanmıştır (**Şekil 27**).



Şekil 27. Desellülerize edilmiş korneanın histolojik görüntülenmesi. (H&E) (Ölçek çubuğu 500µm)

Histolojik olarak incelendiğinde epitel tabakasında hücre kalıntıları gözlenmiş olup aynı zamanda stroma tabakasında oldukça şişme (kalınlaşma) gözlenmiştir. Bu yüzden yeni protokol arayışına geçilmiştir. Yapılan literatür taramalarında elde edilen farklı protokoller kullanılmıştır (**Şekil 28**).

Dört farklı hastadan elde edilen kornealar C1, C2, C3 ve C4 olarak kodlanmıştır. Bu kornealara sırasıyla Protokol 1, Protokol 2, Protokol 3 ve Protokol 4'te yer alan desellülerizasyon basamakları uygulanmıştır.

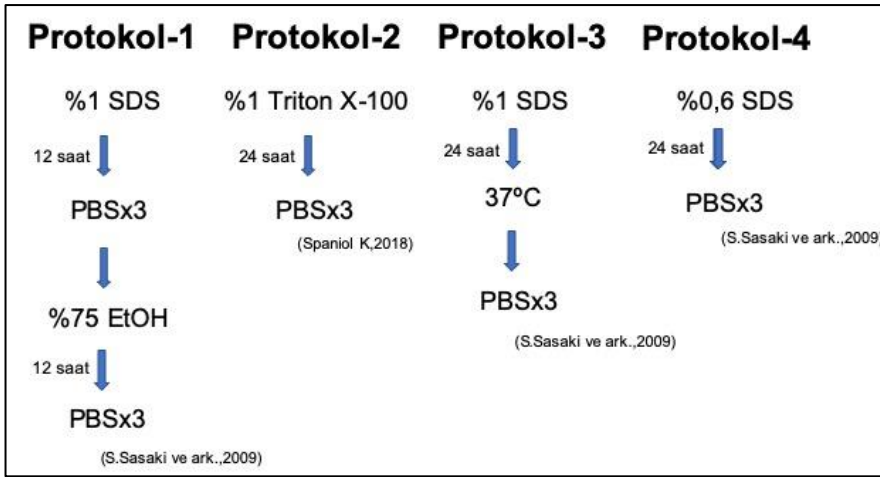
C1: Protokol-1,

C2: Protokol-2,

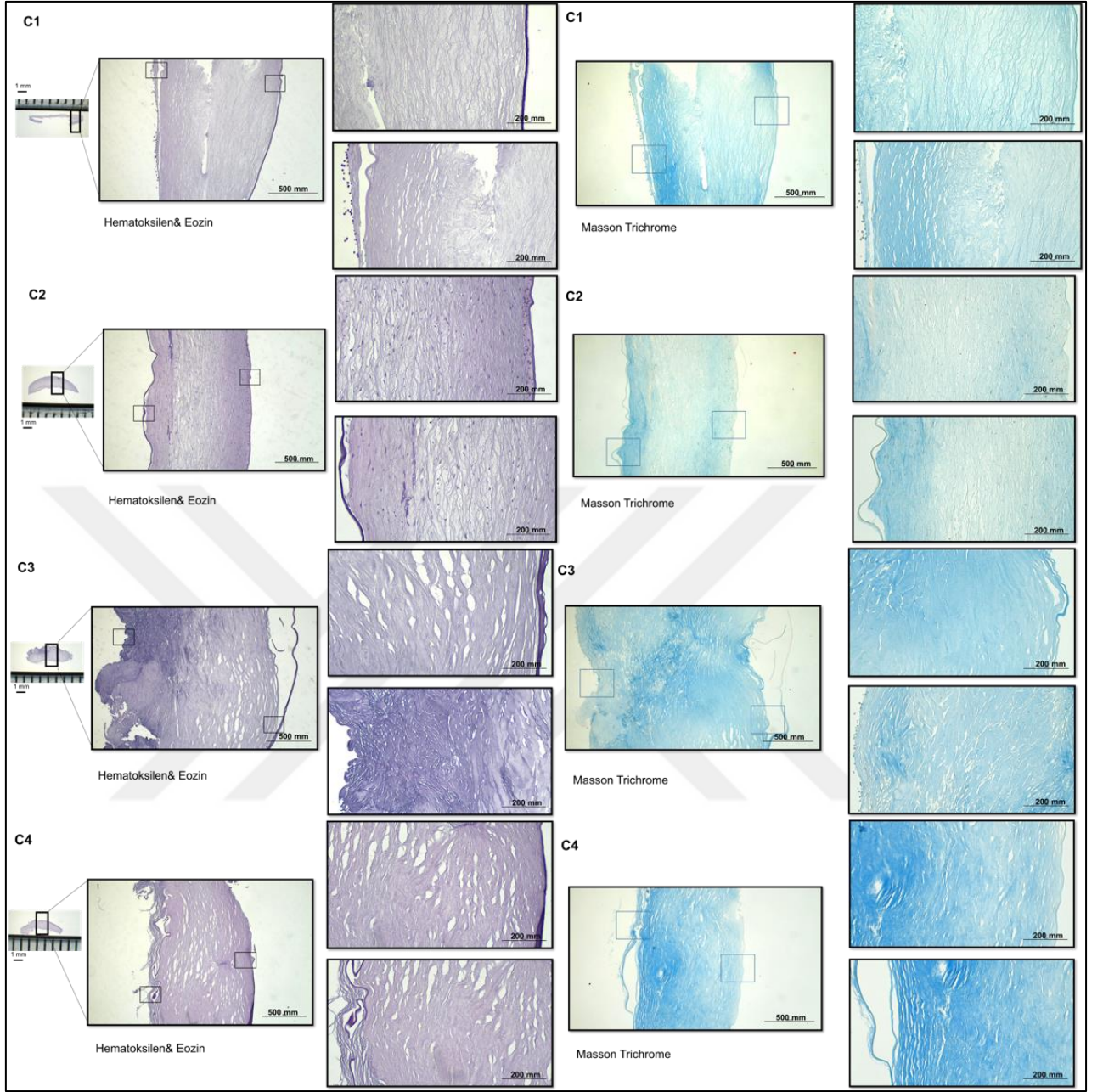
C3: Protokol-3,

C4: Protokol-4.

Desellülerizasyon sonunda kornealar histolojik incelemeler için %10'luk tamponlu formalinde tespit edilmiştir. Fiksasyondan 24-48 saat sonra, kornealar doku takibi yapılarak parafine gömülmüştür. Parafin bloklardan 5µm kalınlığında kesitler alınarak histolojik incelemeler yapılmıştır. Korneanın epitel tabakası, stroma tabakası ve endotel tabakalarında hücre varlığı (H&E) ve kolajen liflerin (Masson Trichrome) varlığı kontrol edilmiştir (**Şekil 29**).



Şekil 28. Korneaların desellülerizasyonunda kullanılan protokoller



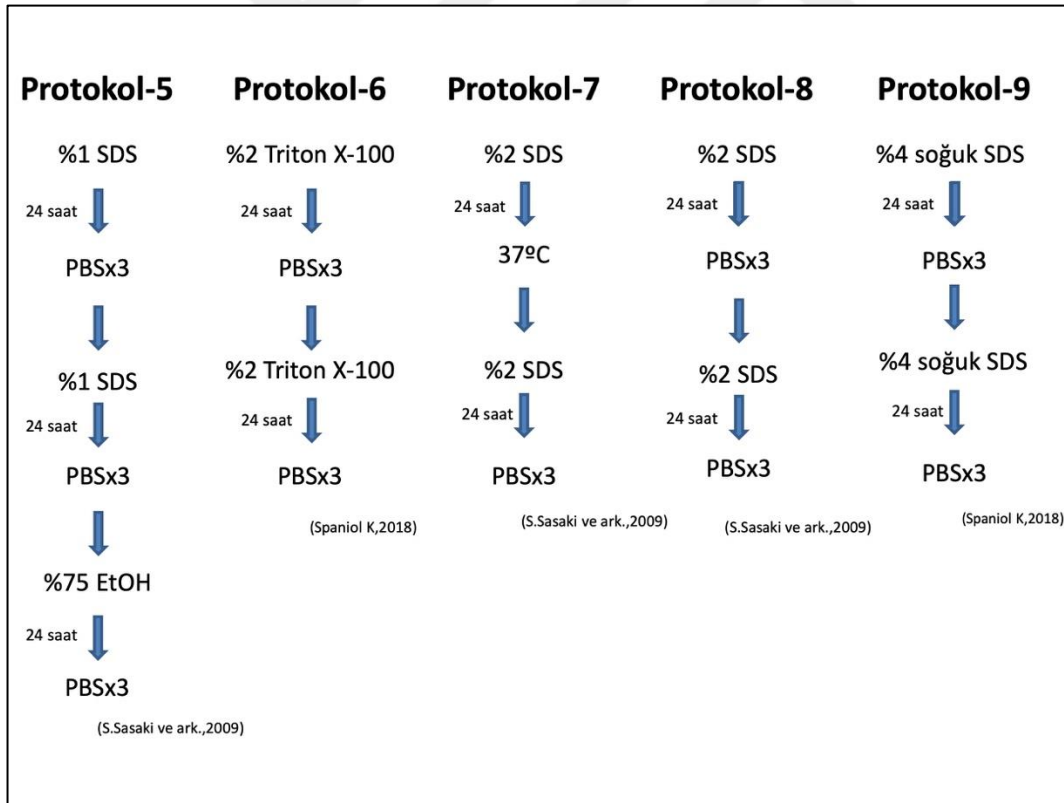
Şekil 29. C1, C2, C3 ve C4 hastalarına ait desellülerize edilmiş korneaların Hematoksilen ve Eozin (H&E) ve Masson Trichrome boyamaları

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, C1 ve C2 numaralı hastalara ait kornealara uygulanan protokollerin başarılı bir desellülerizasyon göstermediği gözlenmiştir. C1 hastasına ait korneada endotel tabakasındaki hücrelerin ve C2 hastasına ait kornea da ise stroma tabakasındaki hücrelerin hala varlığını gösterdiğini gözlemledik. C3 ve C4 hastalarına ait desellülerize edilen korneaların yapısına bakıldığında tabakalarda hücre gözlenmemiş olup stroma tabakasındaki kolajenlerinde yapısının deformasyona

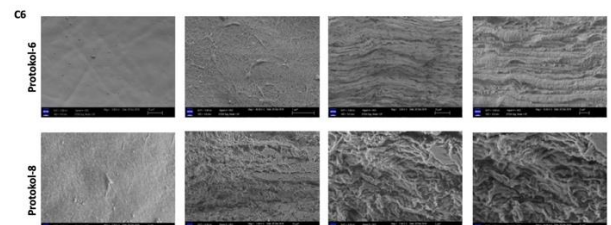
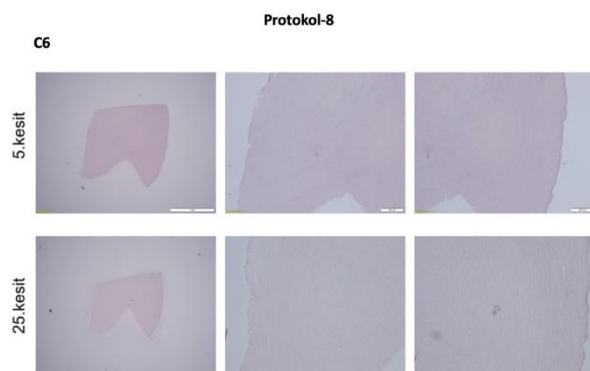
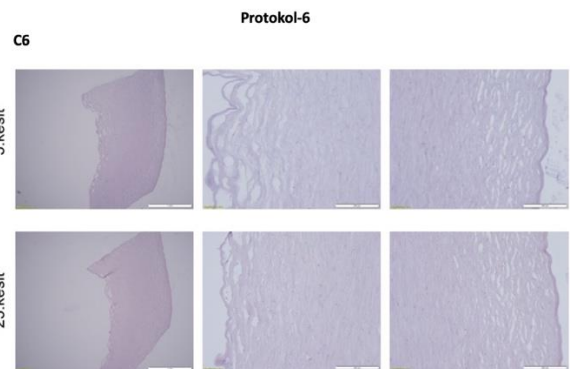
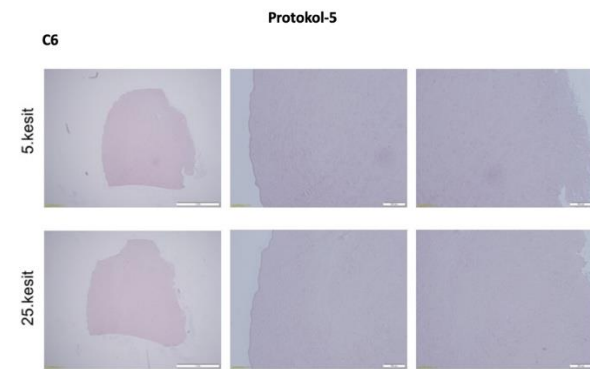
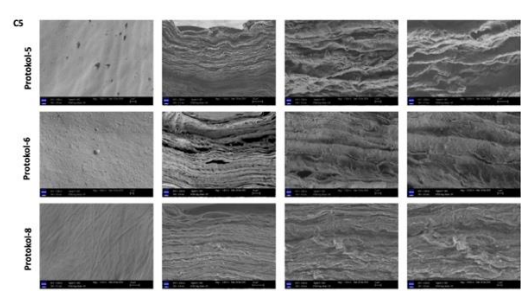
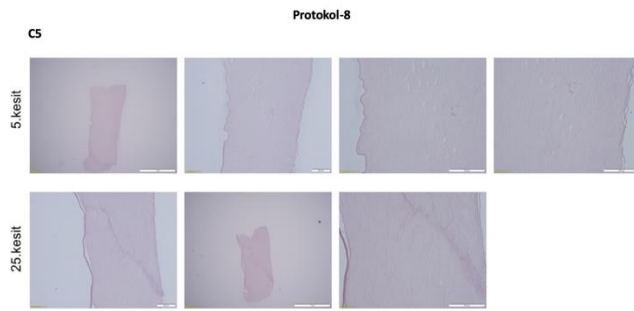
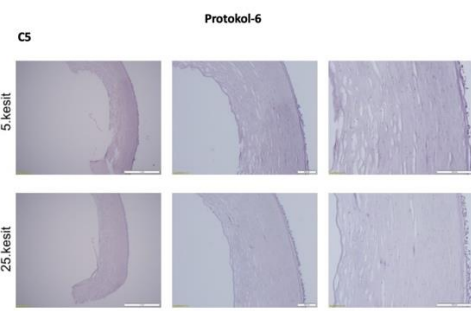
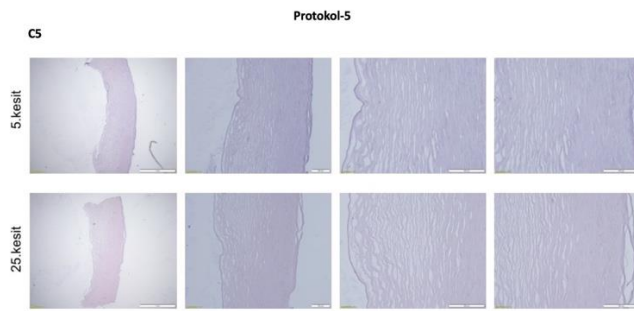
uğramadığı gözlenmiştir. Bu durumda desellülerizasyon işlemlerine daha başarılı olduğu gözlenen protokol-3 ve protokol-4 protokolleri denemeye devam edilirken diğer protokollerin deney süreleri uzatılarak modifiye protokoller oluşturulmuştur.

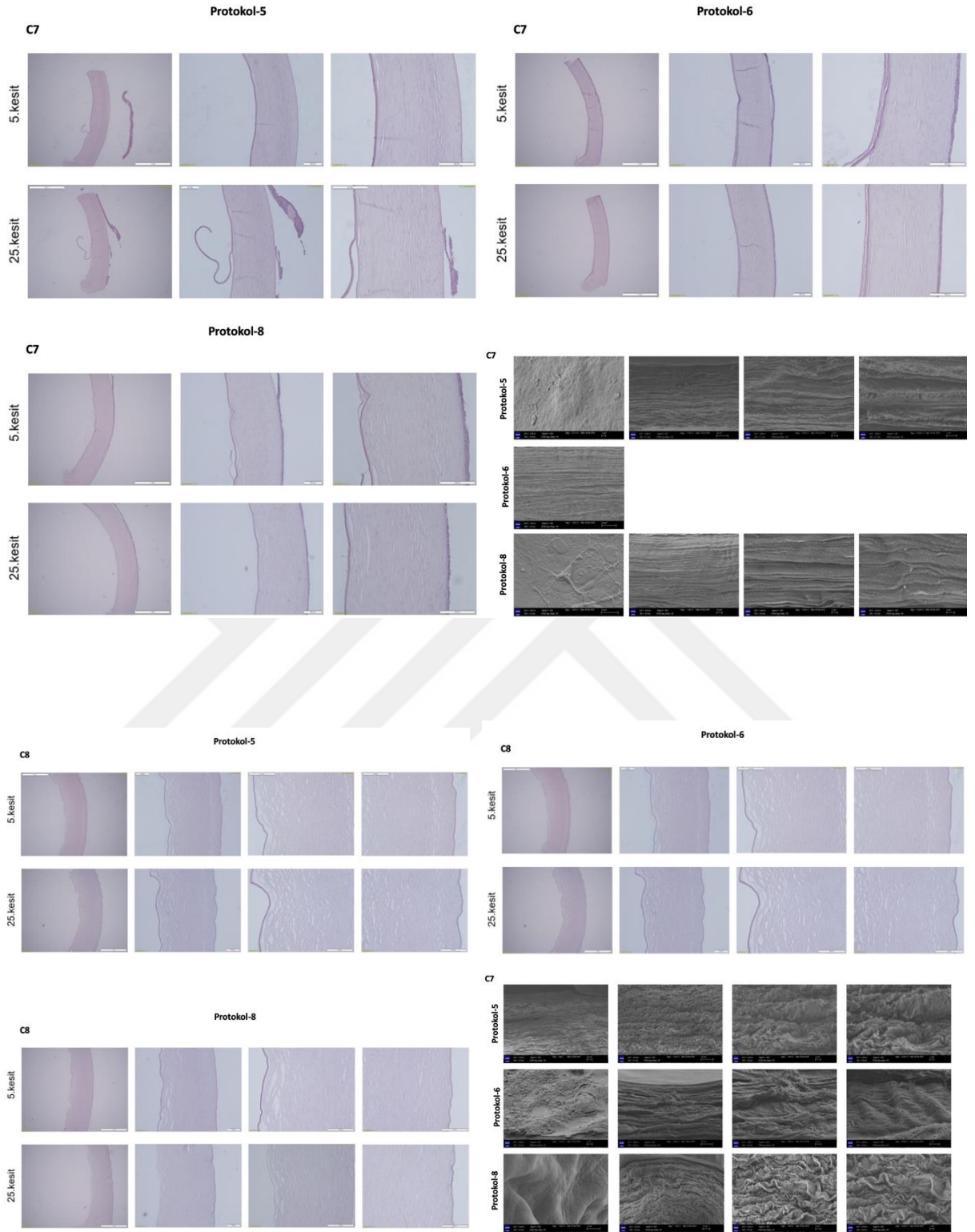
Yeniden yapılan desellülerizasyon optimizasyon çalışmaları 5 ayrı hastanın (C5, C6, C7, C8, C9) korneası kullanılmıştır. Desellülerizasyon işleminde daha önceki protokollerin (Protokol 1-4) inkübasyon süreleri ve kimyasalların konsantrasyonu modifiye (Protokol 5-8) edilmiştir. Bunlara ilave farklı bir protokol (Protokol-9) denemesi daha yapılmıştır (**Şekil 30**). Deney sonunda korneaların yarısı histolojik incelemeler, diğer yarısı ise elektron mikroskopik incelemeler için kullanılmıştır.

C5, C6, C7 ve C8 numaralı hastalara ait kornea örnekleri boyut olarak küçük olduğundan dolayı 3 parçaya ayrılmış ve her parça farklı protokollere (Protokol 5, 6 ve 8) tabi tutulmuştur (**Şekil 31**). Protokol 7 ve Protokol 9 farklı kornea örneklerinde denenmiştir (**Şekil 32**).

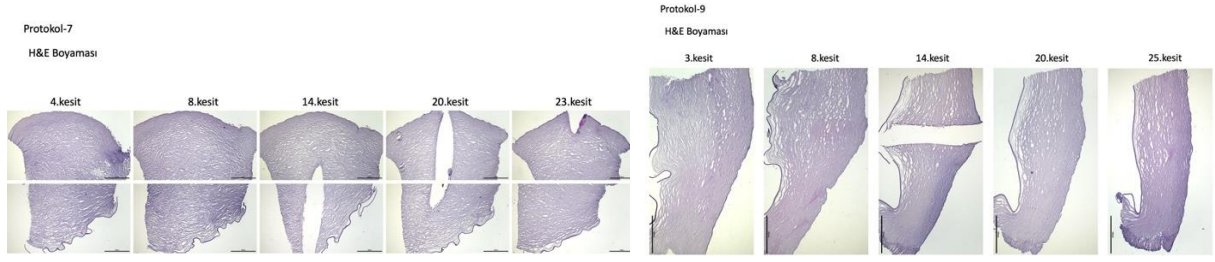


Şekil 30. Kornea desellülerizasyonu için kullanılan protokollerin şeması





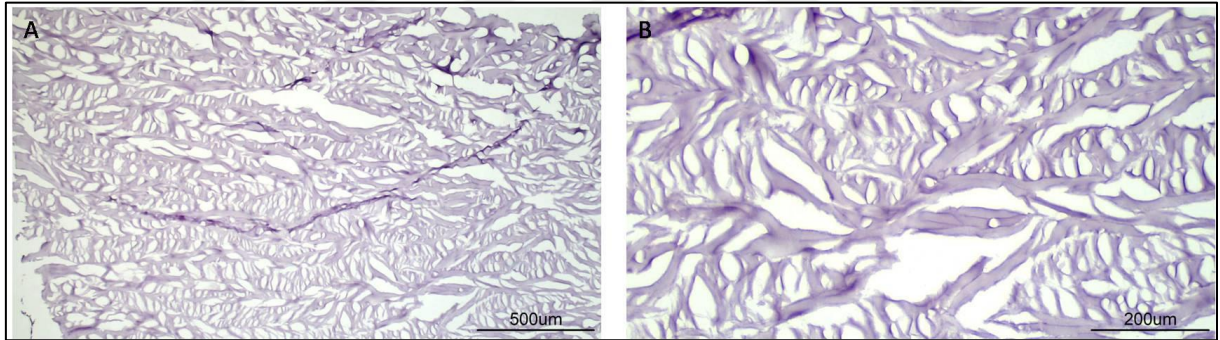
Şekil 31. C5, C6, C7 ve C8 gruplarına ait desellülerize edilmiş korneaların Hematoksilen ve Eozin (H&E) ve taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy = SEM) görüntüleri



Şekil 32. Protokol-7 ve Protokol-9'e ait desellülerize edilmiş korneaların H&E ışık mikroskopik görüntüleri

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, 7. ve 9. Protokole ait görüntülerde uygulanan protokollerin başarılı bir desellülerizasyon gösterdiği gözlenmiştir. 5., 6. ve 8. protokollerde de desellülerize edilen korneaların yapısına bakıldığında tabakalarda hücre gözlenmemiş olup, stroma tabakasındaki kolajenlerinde yapısının deformasyona uğramadığı gözlenmiştir.

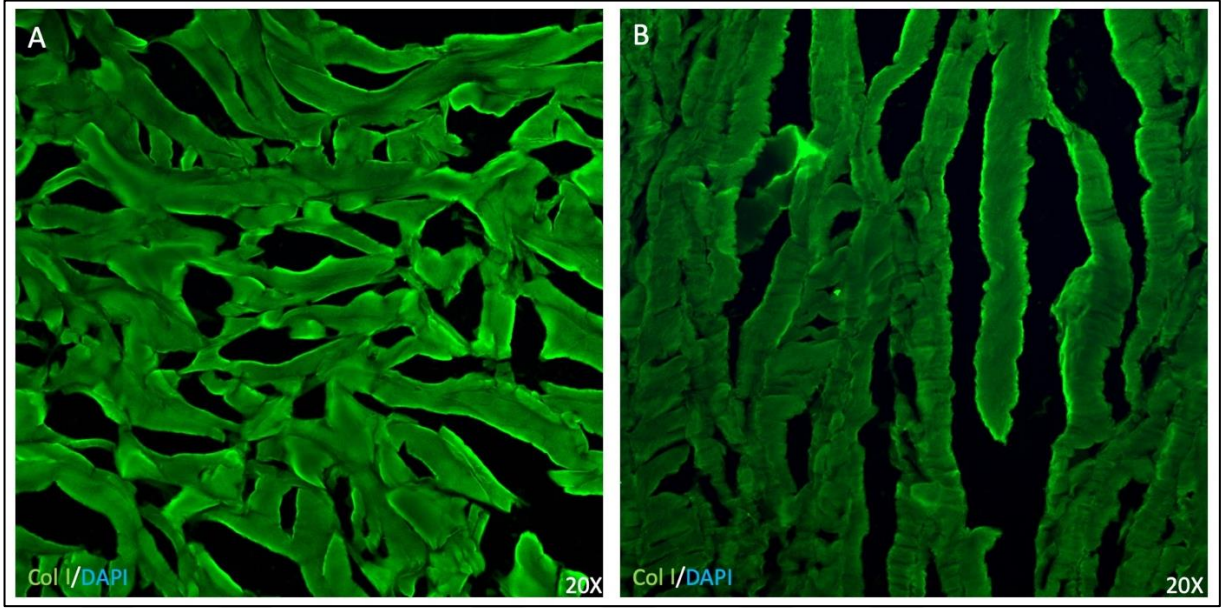
Sonuç olarak en başarılı sonucu veren Protokol-5 ile desellülerizasyon işlemine devam edilmiştir (**Şekil 33**).



Şekil 33. Desellülerize edilen kornealarda H&E boyamasının ışık mikroskobu görüntüleri

Ayrıca immunofloresan yöntemiyle desellülerize edilen korneaların stromal tabaka bütünlüğünün korunup korunmadığını gözlemlemek için kolajen tip I boyaması ve çekirdek boyası olan DAPI ile iskele üzerinde kalan hücre olup olmadığı kontrol edilmiştir (**Şekil 34**).

Yapılan incelemelerde kolajen yapılarının korunduğu ve hücre içermediği gözlenmiştir. Antikorların listesi ve çalışma koşulları **Tablo 1**'de verilmiştir.



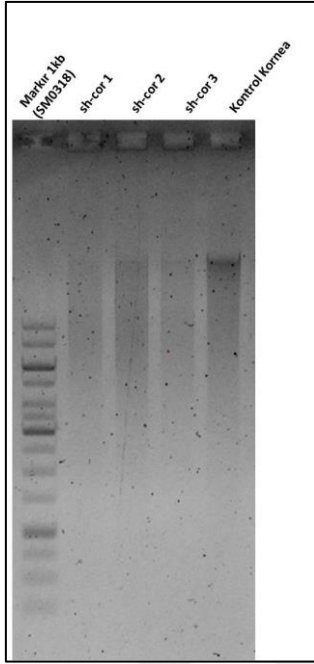
Şekil 34. Desellülerize edilen kornealarda immüno Floresan olarak Col I ve çekirdek boyası olan DAPI ile gösterilmesi. Ölçek barı 20X objektif

Desellülerize edilen kornealarda (koyun ve insan) hücre olup olmadığını test etmek amacıyla bir başka yöntem olan DNA izolasyon işlemi de uygulanmıştır. Desellülerize edilen kornealar DNA izolasyon kiti ile (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, K182001) izole edilmiştir. Elde edilen DNA içerikleri nanodrop cihazı ölçülerek yoğunlukları listelenmiştir (**Tablo 8** ve **Tablo 9**). Aynı zamanda elde edilen DNA'lar agaroz jel üzerinde yürütülmüştür (**Şekil 35** ve **Şekil 36**).

Tablo 8. Desellülerize edilen koyun kornealarında nanodrop ile DNA ölçümü sonuçları

*sh-cor 1	10,0 ng/ µg
*sh-cor 2	16,1 ng/ µg
*sh-cor 3	9,5 ng/ µg
Kontrol kornea	21,4 ng/ µg

*sh-cor 1, 2, 3 ve kontrol kornea: Farklı koyunlara ait kornealar. Desellülerizasyon protokolleri aynı olup farklı koyunların korneaları karşılaştırılmıştır.

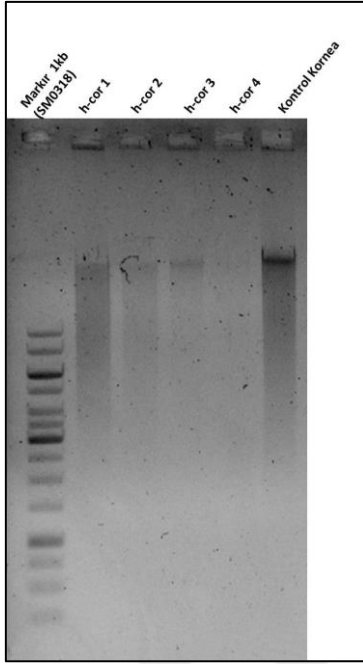


Şekil 35. Desellülerize edilen koyun kornealarından izole edilen DNA'ların jelde görüntülenmesi

Tablo 9. Desellülerize edilen insan kornealarında nanodrop ile DNA ölçümü sonuçları

*h-cor 1	18,5 ng/ µg
*h-cor 2	7,0 ng/ µg
*h-cor 3	3,4 ng/ µg
*h-cor 4	1,8 ng/ µg
Kontrol kornea	30,6 ng/ µg

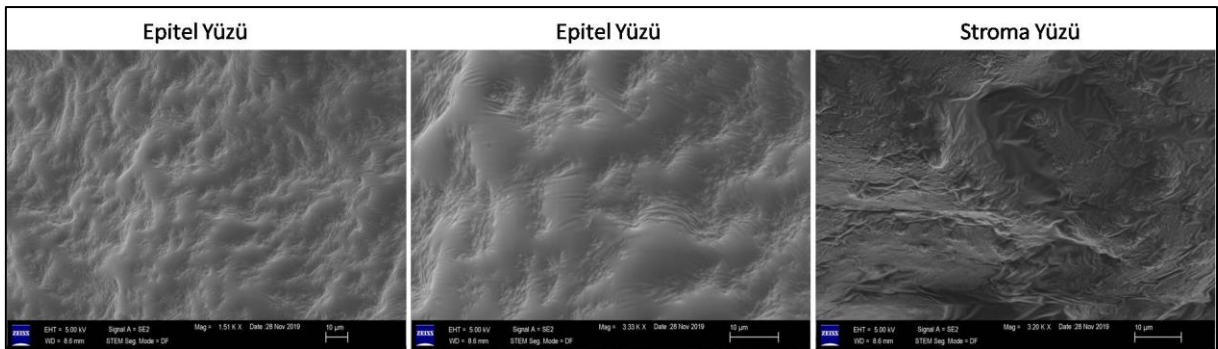
*h-cor 1, 2, 3, 4: Farklı hastalara ait insan korneası. Desellülerizasyon protokolleri aynı olup farklı hastaların korneaları karşılaştırılmıştır.



Şekil 36. Desellülerize edilen insan kornealarından izole edilen DNA'ların jelde görüntülenmesi

4.5.2 Desellülerize Kornea İskelesinin İnce Yapı Analizleri

Desellülerize edilen kornealar aynı zamanda taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenmiştir. Korneanın epitel yüzünde hücre olmadığı gözlenmiş olup hücrelerin üzerine oturduğu Bowman membranı görüntülenmiştir. Stroma yüzünde de kolajen fibril yapıları gözlenmiş olup hücre olmadığı görülmüştür (**Şekil 37**).



Şekil 37. Desellülerize edilen korneaların SEM görüntülemesi

4.6 Desellülerize Kornea İskelesinin Kontrol Hücre Hattı ve Organoid ile Resellülerizasyonu

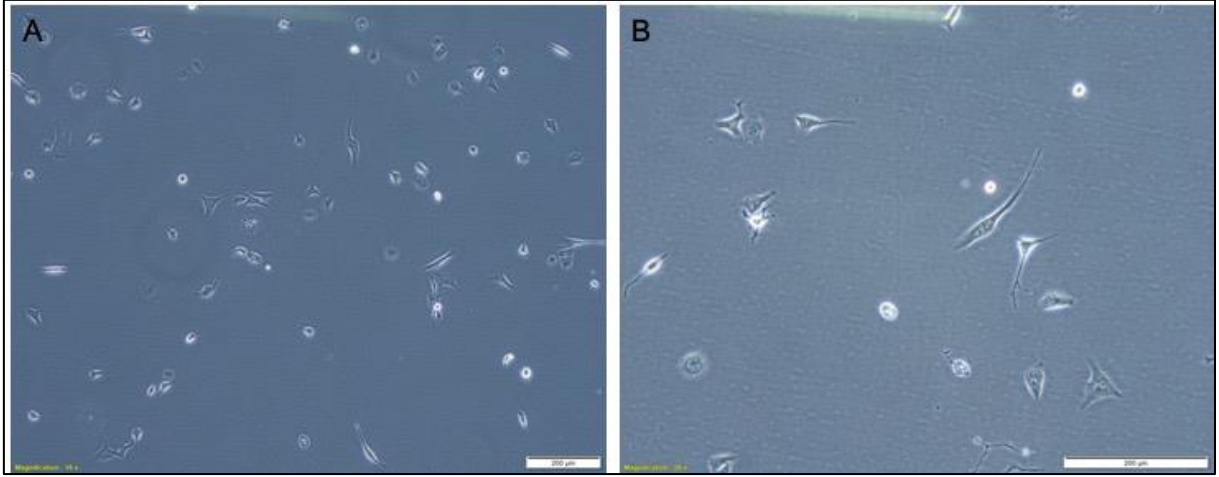
4.6.1 Kontrol Hücre Hattı ile Resellülerizasyonu

Çalışmanın bu aşamasında desellülerize edilecek olan kornea iskeletinin yeniden hücreleştirilmeye (resellülerizasyon) uygun olup olmadığının test edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, kontrol hücre hattı olarak ATCC'den ticari olarak insan keratosit primer hücre hattı (CRL11515) satın alınmıştır. Alınan hücre hattı teslim alındıktan sonra sıvı azot tankı içerisinde kullanılacak zamana kadar depo edilmiştir.

Hücrelerin ekileceği kültür kapları en az 1 saat öncesinden 0,01 mg/mL fibronektin, 0,03 mg/mL sığır tip I kolajen ve 0,01 mg/mL sığır serum albümin ile kaplanmıştır. Sıvı azot tankı içerisindeki vial su banyosu içerisine alınmıştır. Bu aşamalarda hızlı olmak oldukça önemlidir. Yaklaşık 1 dk. su banyosunda tutulan vial, %70 alkol ile silinerek dekontaminasyon sağlanmıştır. Vial içerisindeki hücreler 15'lik falkona aktararak 125g'de 5 dk. santrifüj edilerek pellet haline getirilmiştir. Falkonun dibinde kalan hücre pelleti hücre besiyeri ile pipetaj yapılarak daha öncesinden kaplanan kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler için Keratinocyte-Serum Free Medium (ThermoFisher, cat no #17005-042) içerisinde 5ng/ml human rekombinant EGF, 0,05 mg/ml bovine pituitary ekstraktı, 0,005 mg/ml human rekombinant insülin (ThermoFisher, cat no #12585-014) ve 500ng/ml hydrocortisone (Sigma, cat #H0135) içeren besiyeri kullanılmıştır. Her 2-3 günde bir besiyeri ortamı değiştirilmiştir.

Keratosit hücreleri uygun şartlarda açılmış olup, uygun koşullarda ve uygun besiyeride kültüre edilmiştir. Hücreler 2-3 gün inkübatörde kültüre edildikten sonra %70-80 yoğunluğa (D1-D3) ulaştıklarında pasajlanmıştır. Pasajlama işleminden sonra hücrelerin kültür kaplarına yapışmalarında bir azalma gözlenmiştir (**Şekil 38**). Bu durum da hücrelerin çoğalmalarını eksi yönde etkilemiştir.

Bu yüzden kontrol hücre hattı olarak GFP (+) 3T3 hücrelerini kullanmaya karar verilmiş ve optimizasyon çalışmalarımıza bu hücre hattı ile devam edilmiştir.

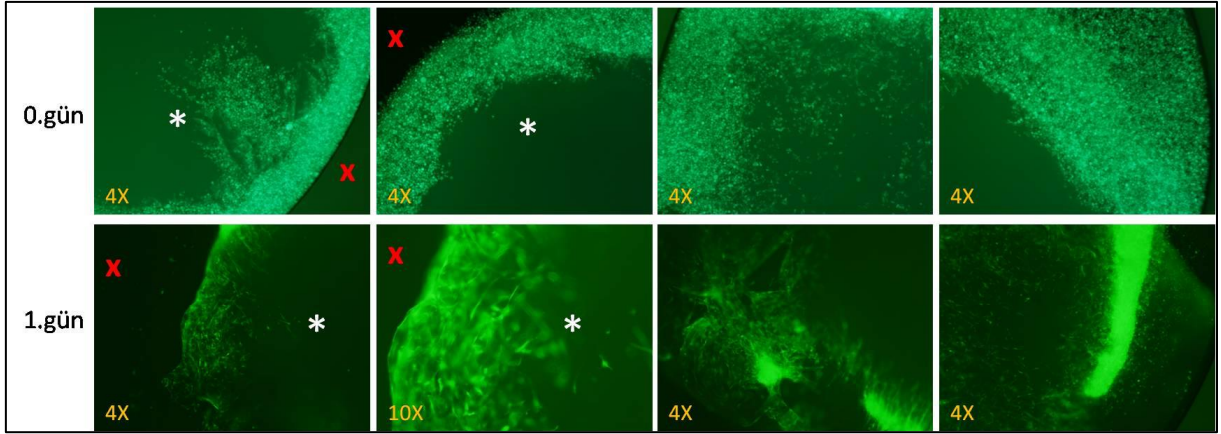


Şekil 38. Keratosit hücrelerinin ışık mikroskobik görüntüleri (Ölçek barı 200µm)

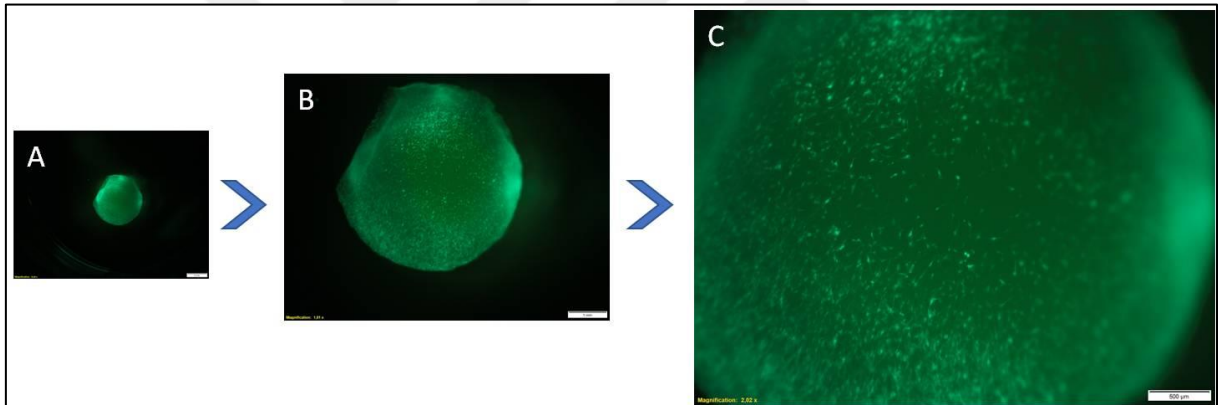
3T3 hücreleri uygun şartlarda açılmış olup, uygun koşullarda ve uygun besiyeride kültüre edilmiştir. Hücreler 2-3 gün inkübatörde kültüre edildikten sonra %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında pasajlanmıştır. Ekim yapılacak hücreler tripsin kullanılarak hücre kültür kaplarından kaldırılmıştır. Kaldırılan hücreler trypan blue boyamasıyla hem canlılıkları kontrol edilmiş hem de hücre sayımı yapılmıştır. Desellülarize kornea iskeleti üzerine ekim yapılacak konsantrasyonda yani 2×10^5 hücre ayarlanıp ayrı ependorflar içerisine koyularak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstteki süpernatant atılmış ve her bir ependorfa 10 µl hücre ortamı (%10 FBS içeren RPMI) konulmuştur.

Tüm bu işlemler devam ederken desellülerize edilen kornealar steril hale getirilerek hücre ekim işlemine hazırlanmıştır.

Hücreler homojen olacak şekilde hafif bir pipetaj sonrasında desellülerize edilen kornealar üzerine ekilmiştir ve inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin tutunabilmeleri için, ekim yapıldıktan sonra 4 saat boyunca hücre ortamı eklenmemiştir. Bu sürenin sonunda kültür kaplarına hücre besiyeri konularak inkübatöre kaldırılmıştır. Farklı günlerde hücrelerin desellülerize kornea üzerindeki tutunma alanları izlenmiş olup floresan ve stereo-floresan mikroskop altında gözlenmiştir (**Şekil 39** ve **Şekil 40**).



Şekil 39. Resellülerize edilen kornea iskeletinin 0. ve 1. günlerde floresan mikroskopta görüntülenmesi. Beyaz asteriks kornea yüzeyi, kırmızı çarpı (X) hücre kültür tabağının tabanı) 4X ve 10X objektif kullanılmıştır.



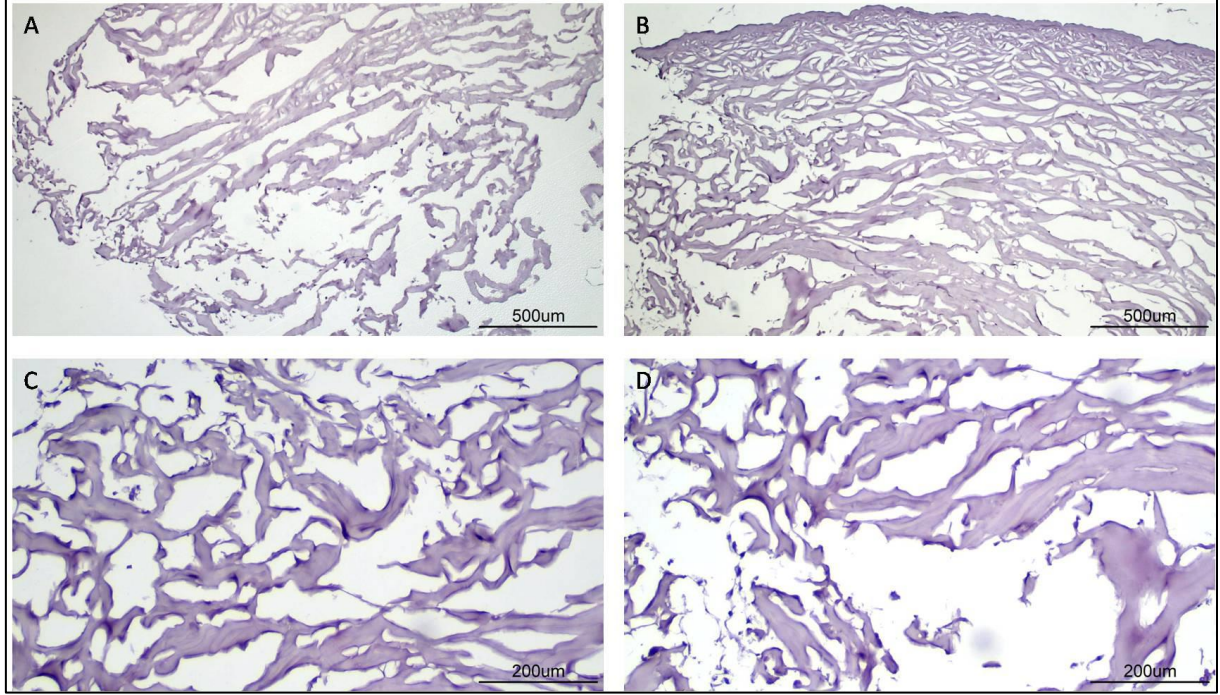
Şekil 40. Resellülerize edilen kornea iskeleti 3. günde stereofloresan mikroskopta görüntülenmesi (Ölçek barı Şekil. A 2mm, Şekil. B 1mm, Şekil. C 500µm)

4.6.1.1 Resellülerize Kornea İskelesinin Histolojik Kalite Kontrolü

Resellülerize edilen kornealar histolojik incelemeler için %4'lük paraformaldehit ile fikse edilmiştir. Fikse edilen örnekler %30 sükröz içerisinde 1 gece bekletildikten sonra ertesi OCT materyali içerisine gömülmüştür. Daha sonra bu örneklerden 7µm kalınlığında frozen kesitler alınmıştır.

Hematoksilen boyaması için kesitler 20 dk. oda sıcaklığında kurutulduktan sonra PBS ile yıkanmıştır. Rehidre edilen kesitler hematoksin ile 5 dk. boyandıktan sonra

akarsu altında mordantlanması sağlanmıştır. Ardından eozin ile 1 dk. boyanan kesitler dehidre edilip şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapaması yapılmıştır. Işık mikroskopunda görüntülenmiştir (**Şekil 41**). Buna göre, hücre çekirdeklerinin varlığı bize hücrelerin iskelete tutunduklarını göstermiştir.

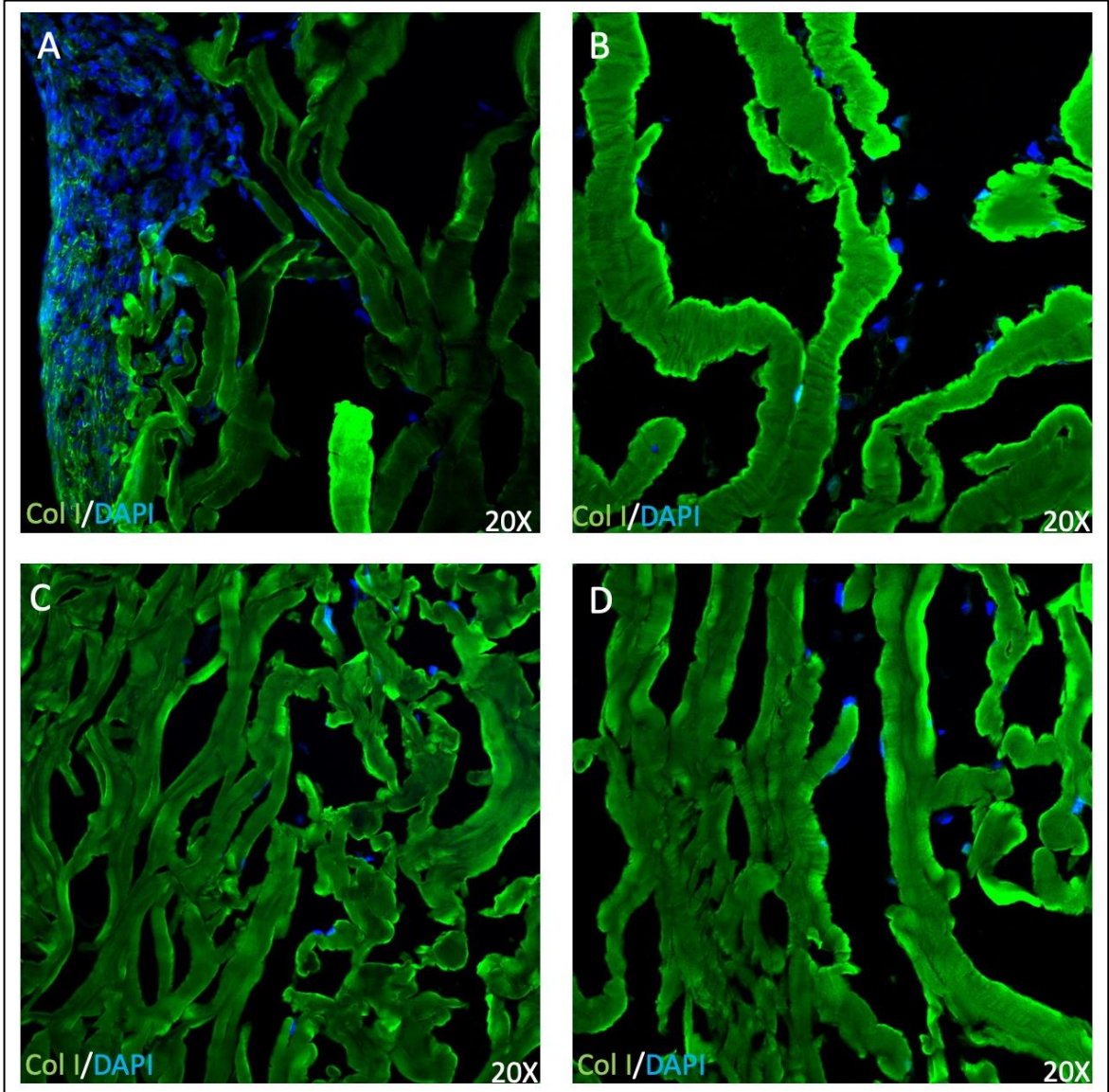


Şekil 41. Resellülerize edilen kornea iskeletinin H&E boyaması görüntüleri (Ölçek çubuğu; Şekil A, B 500 µm, Şekil C, D 200 µm)

4.6.1.2 Resellülerize Kornea İskelesinin İmmunofloresan Analizleri

İmmunofloresan yöntemiyle resellülerize edilen korneaların stromal tabaka bütünlüğünün korunup korunmadığını gözlemlemek için kolajen tip I boyaması ve çekirdek boyası olan DAPI ile iskele üzerinde hücre olup olmadığı kontrol edilmiştir. Buna göre, kolajen yapılarının korunduğu ve hücrelerin bu yapıya yer yer farklı yoğunluklarda tutunduğu gözlenmiştir (**Şekil 42**).

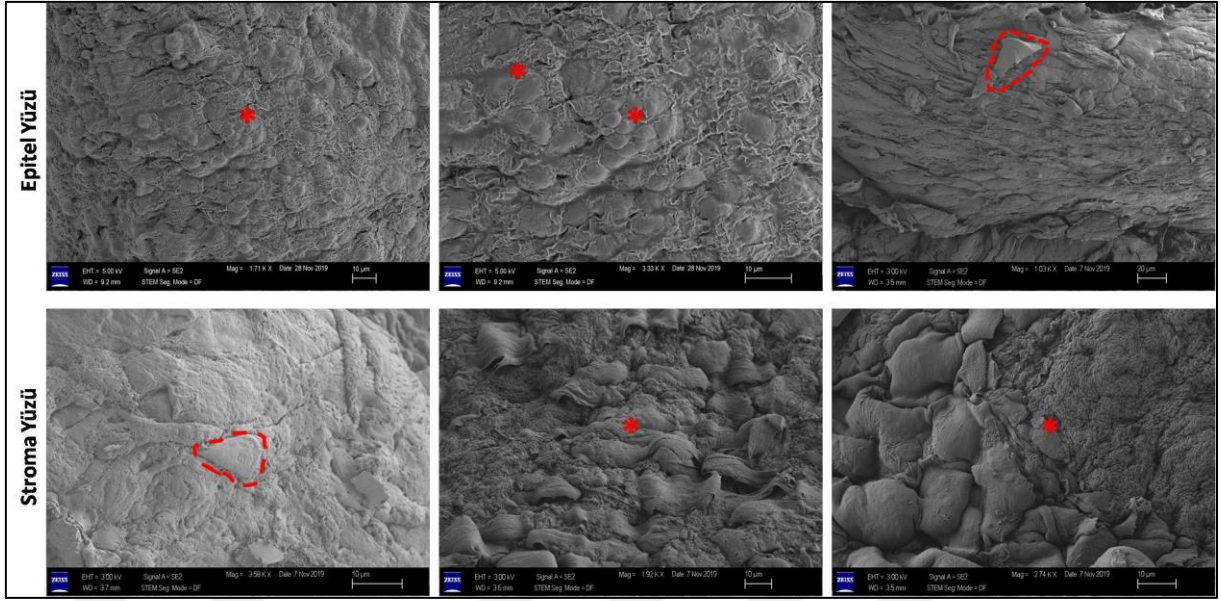
Antikorların listesi ve çalışma koşulları **Tablo 1**'de verilmiştir.



Şekil 42. Resellülerize edilen kornea iskeletinin farklı alanlarından alınan Col I ve DAPI ile boyamaları floresan mikroskobu görüntüleri. Ölçek çubuğu 20X objektif (Yeşil: Col I (+) kolajen fiberler ve Mavi: DAPI ile boyanan hücre çekirdekleridir)

4.6.1.3 Resellülerize Kornea İskelesinin İnce Yapı Analizleri

Resellülerize edilen kornea iskeleti aynı zamanda taramalı elektron mikroskobunda (SEM) incelenmiştir. Yapılan incelemelerde ekilen 3T3 hücrelerinin kornea iskelesine tutunduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda kolajen fibrillerin yapısını koruduğu gözlenmiştir (**Şekil 43**).

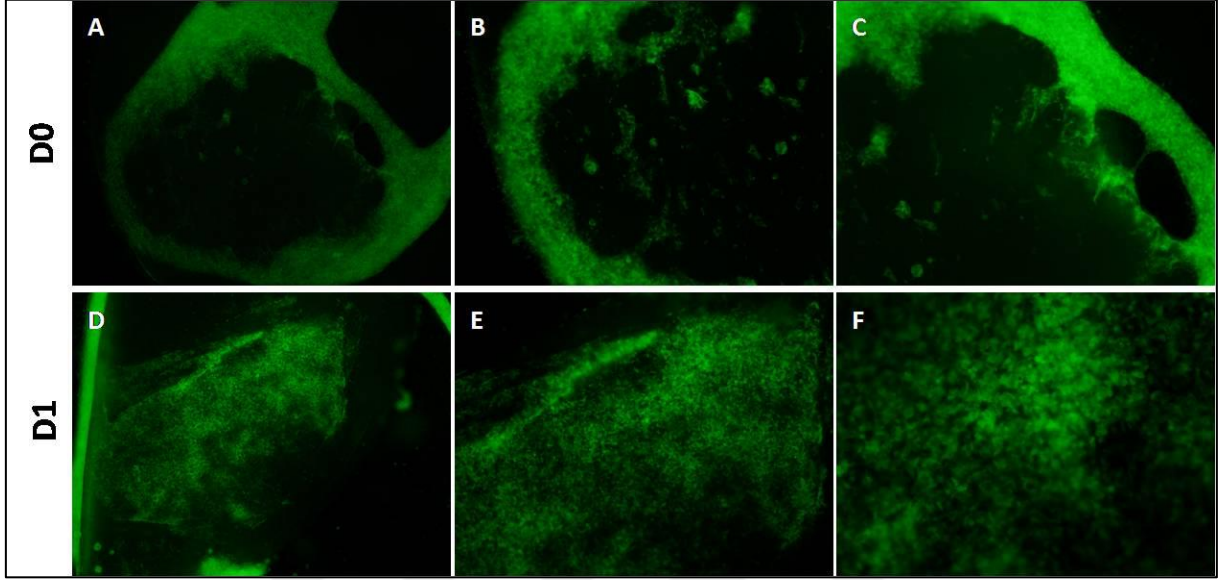


Şekil 43. Resellülerize edilen korneaların SEM görüntülemesi (kırmızı işaretler hücreleri göstermektedir).

4.6.2 Organoid ile Resellülerizasyonu

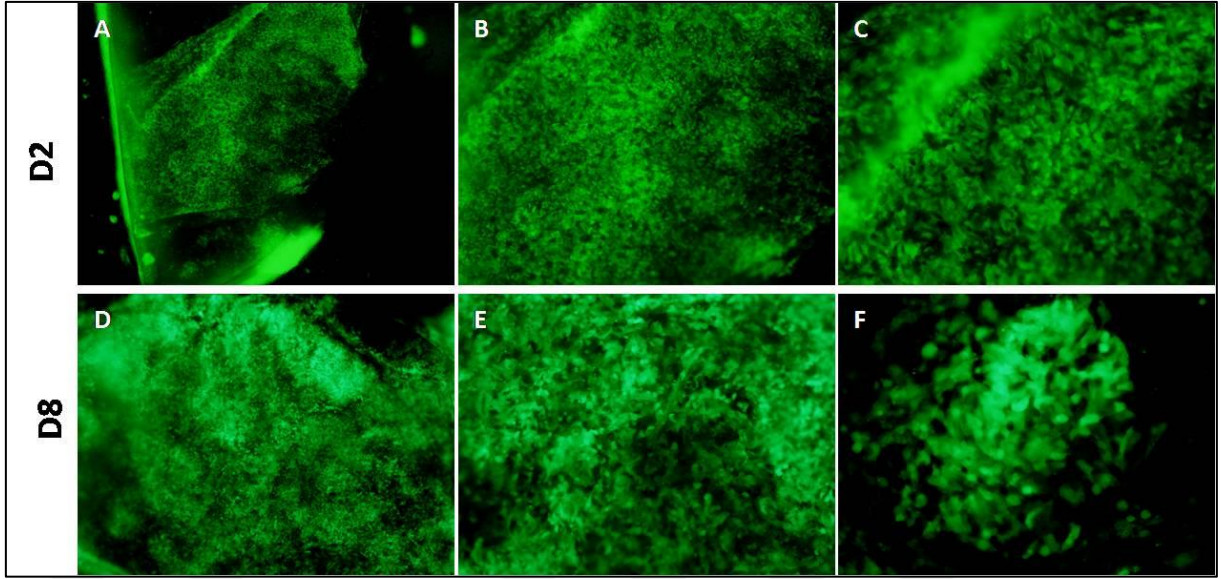
Kontrol hücre hattıyla yapılan optimizasyon çalışmalarından sonra GFP (+) işaretli İPKH hücreleri ve GFP işaretli olmayan İPKH'lerden farklılaştırma yoluyla elde edilen nöral ve retinal hücreler ile resellülerizasyon deneylerine başlanmıştır. Burada amaç resellülerizasyon için en uygun farklılaşma basamağını belirleyebilmektir. Bunun içinde oldukça uzun süren farklılaştırma protokolünün önemli basamaklarındaki günleri belirleyip o günlerde hücreleri desellülerize kornea iskeleti üzerine yerleştirmektir. Kornea organoidlerini hücre kültüründe elde ettiğimizde bu yapıların olgunlaştıkça daha dayanıklı (kolajen fibrillerden kaynaklı) ve büyük boyutlara ulaştığını gözlemledik. Bu yapıların desellülerize kornea iskelesi üzerine yapışması ve kültüre edilmesi oldukça zordur. O yüzden farklılaşma basamağında korneal farklılaşma kısmına gelmeden önce hücreleri alıp iskele üzerine ekmemiz gerektiğine karar verilmiştir. Bunun için nöral farklılaşma basamağından hemen sonra ve retinal farklılaştırma basamağının ilk haftalarında hücreleri iskele üzerine ekilmiştir.

Desellülerize kornea iskelesine GFP işaretli İPKH hücreleri 2×10^5 olacak şekilde ekilerek korneal farklılaştırma basamakları uygulanmıştır. İPKH hücreleri 0. ve 1. günlerinde takip edilerek floresan mikroskobunda görüntülenmiştir (**şekil 44**).

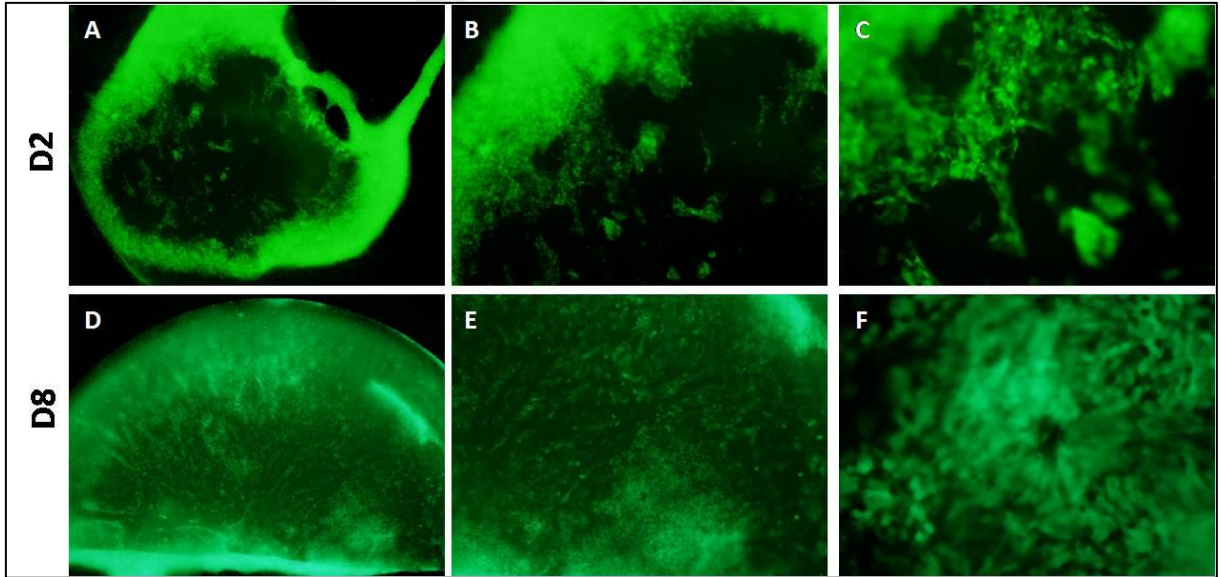


şekil 44. GFP(+) İPKH'lerin kornea iskelesi üzerindeki floresan mikroskobu görüntüleri

Ertesi gün hücreler nöral farklılaştırma basamağına geçirilmiştir. 2-8 gün sonra retinal farklılaştırma protokolü uygulanmıştır. Her iki protokolde denenmiş olup hücrelerin morfolojik değişimleri ve hücrelerin bir araya gelerek kümeler oluşturması floresan mikroskobunda görüntülenmiştir (**şekil 45** ve **şekil 46**).

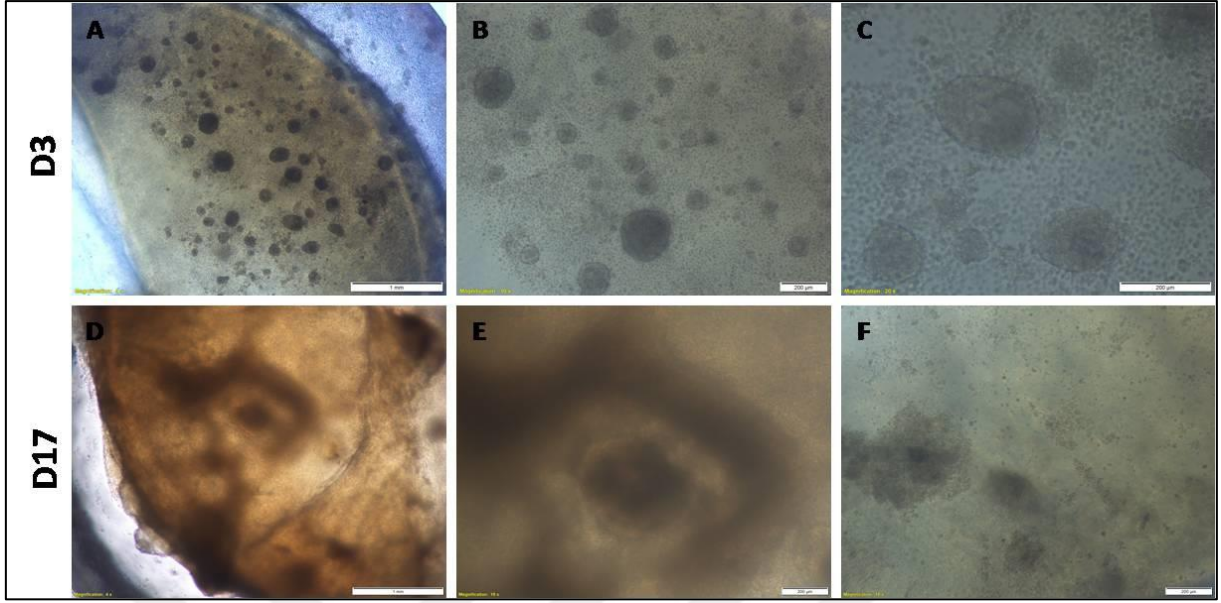


Şekil 45. Susaimanickam protokolü (Protokol-1) uygulanan İPKH hücrelerinin farklı günlerdeki görüntüleri (A; 2x, B, C, D ve E; 4x ve F; 10x büyütme)



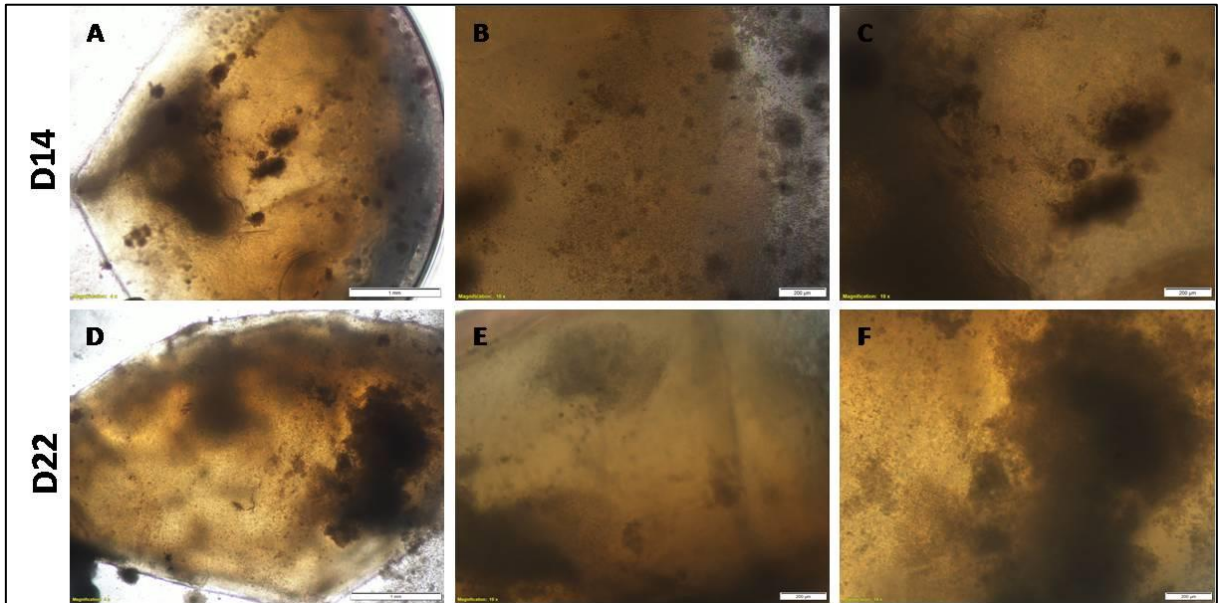
Şekil 46. Foster protokolü (Protokol-2) uygulanan İPKH hücrelerinin farklı günlerdeki görüntüleri. (A ve D; 2x, B, C ve E; 4x ve F; 10x büyütme)

GFP işaretli olmayan İPKH hücrelerinden Protokol-1 ve Protokol-2 ye göre farklılaştırma basamakları uygulanmıştır. Protokol-1'e göre; nöral farklılaştırma süresinin sonunda yani 2. günün sonunda hücreler, hücre kültür kaplarından kaldırılarak iskele üzerine ekilmiştir. Farklı günlerde ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (**Şekil 47**).



Şekil 47. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi.

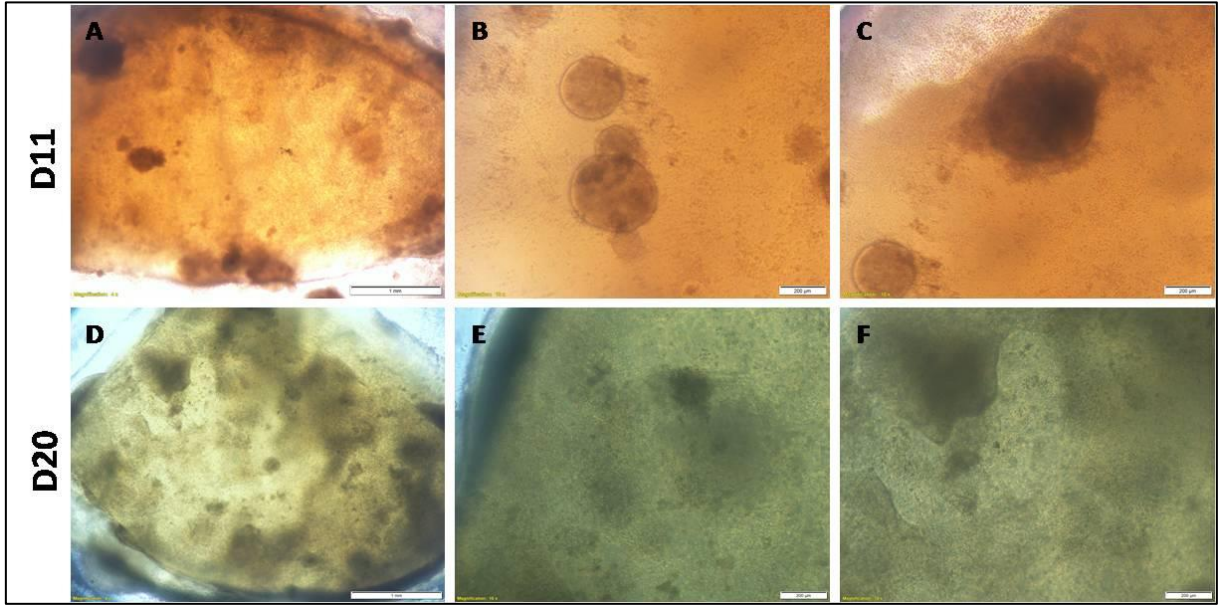
GFP işaretli olmayan İPKH hücreleri, Protokol-1'e göre retinal farklılaştırmanın başlarında (D13) hücre kültür kaplarından kaldırılarak iskele üzerine ekilmiştir. Farklı günlerde ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (**Şekil 48**).



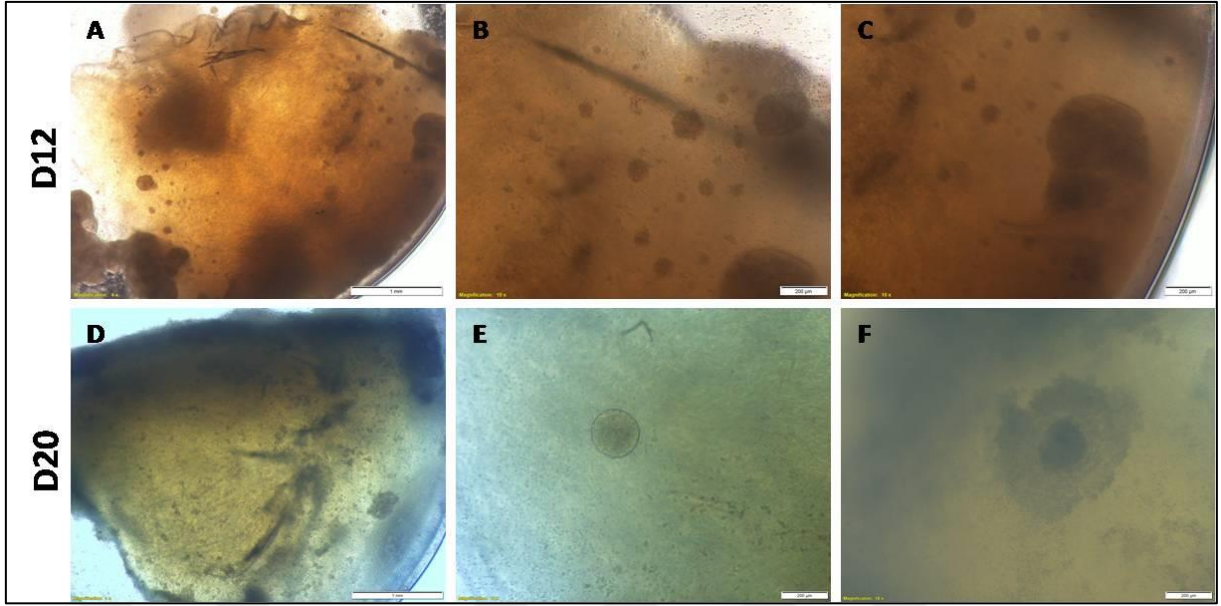
Şekil 48. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi

GFP işaretli olmayan İPKH hücrelerinden Protokol-2 ye göre nöral farklılaştırma süresi içerisinde 5. gündeki hücreler, hücre kültür kaplarından kaldırılarak iskele üzerine ekilmiştir. Farklı günlerde ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (**Şekil 49**).

GFP işaretli olmayan İPKH hücrelerinden Protokol-2 ye göre retinal farklılaştırma süresi içerisinde 13. gündeki hücreler, hücre kültür kaplarından kaldırılarak iskele üzerine ekilmiştir. Farklı günlerde ışık mikroskopunda görüntülenmiştir (**Şekil 50**).



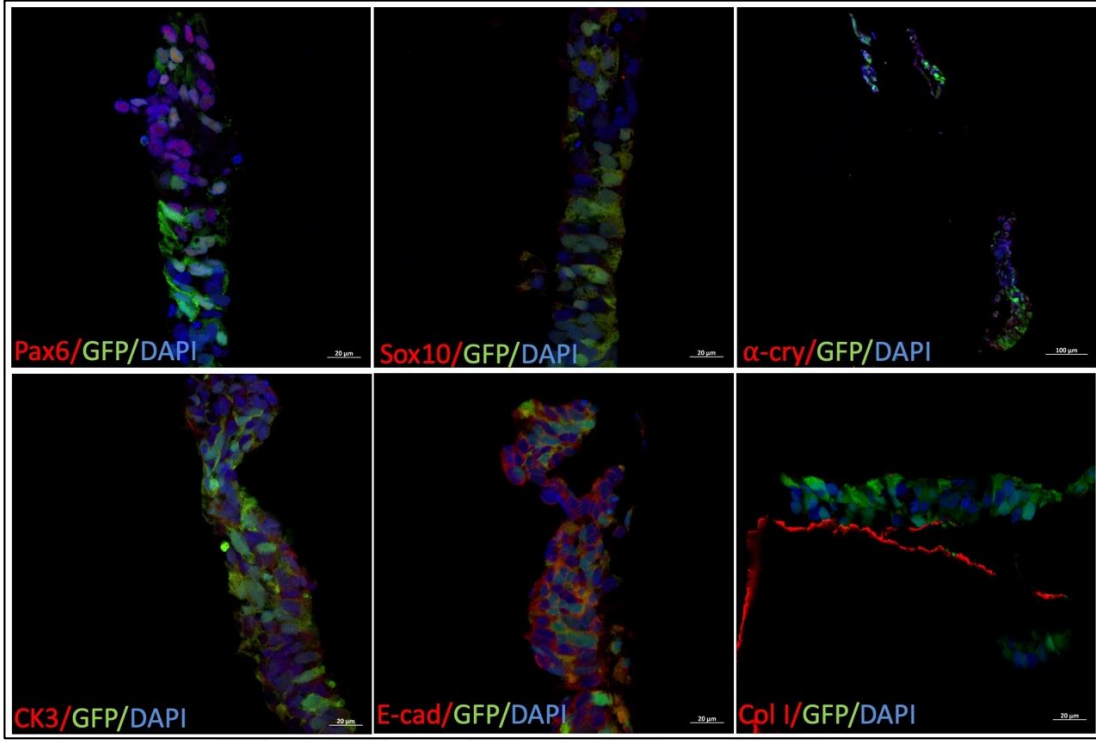
Şekil 49. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 5. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi



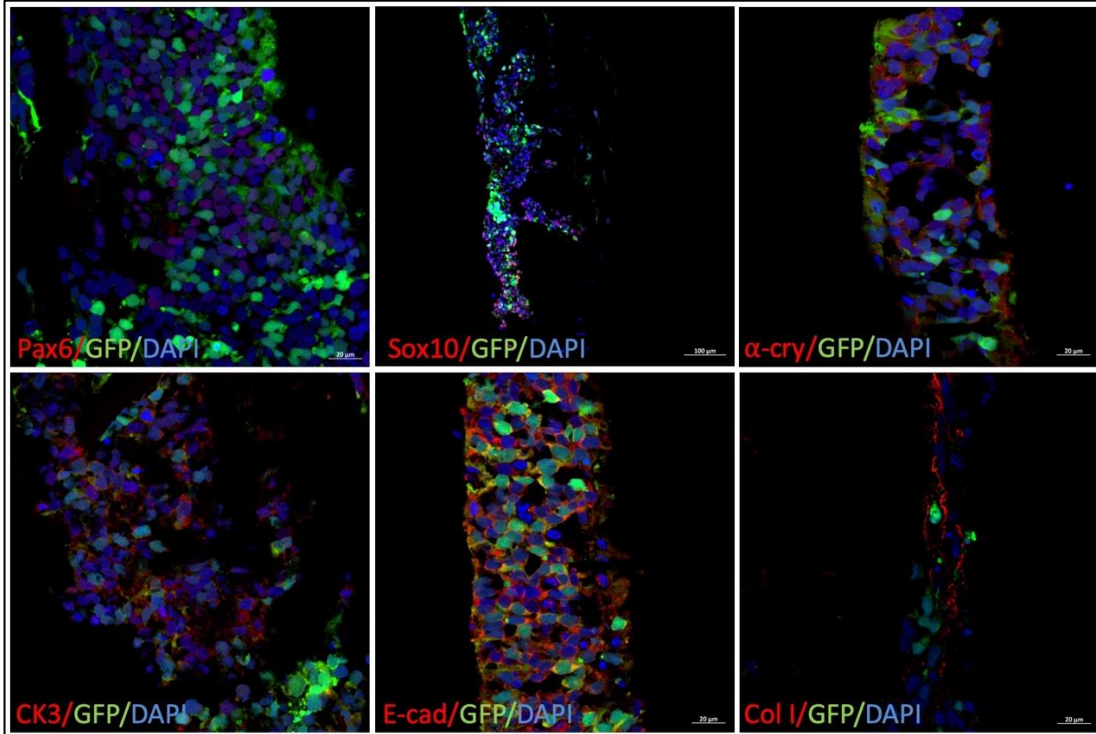
Şekil 50. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin farklı günlerdeki ışık mikroskopik görüntülenmesi

4.6.2.1 Resellülerize Kornea İskelesinin İmmunofloresan Analizleri

GFP (+) işaretli İPKH'lerin ekildiği desellülerize kornea iskeleleri farklılaşma basamaklarının 30. günde (D30) immunofloresan analizler için %4 PFA ile fikse edilmiş ve cryostat cihazında kesitler alınmıştır. Protokol-1 ve Protokol-2 deneylerinden elde edilen sonuçları incelediğimizde, her iki protokolde de İPKH'lerin desellülerize kornea iskelesine tutunduğu, sağlıklı bir şekilde yaşamaya devam ettiği ve bulunduğu ortamda farklılaşma kabiliyeti gösterdiği gözlenmiştir. Tüm bu analizleri farklılaşmanın her basamağına özgü spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak gözlemlenmiştir (**Şekil 51** ve **Şekil 52**).

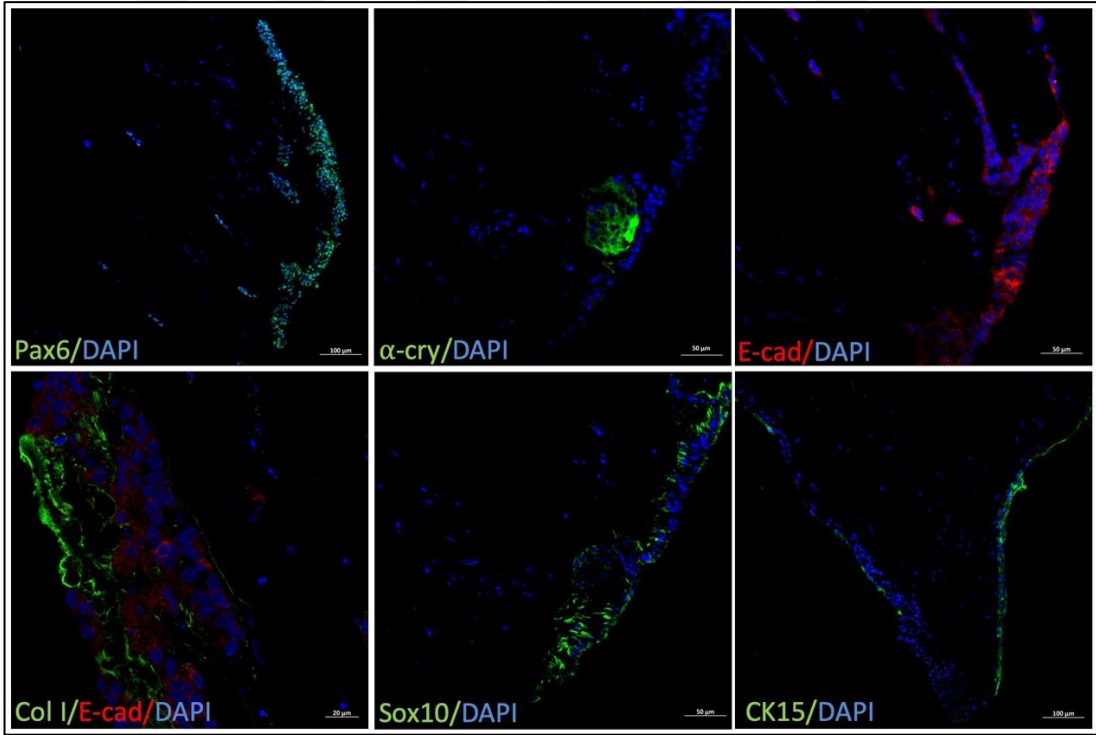


Şekil 51. Protokol-1'e göre GFP (+) işaretli hücrelerin D30'da farklılaşmanın belirli basamakları için spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.

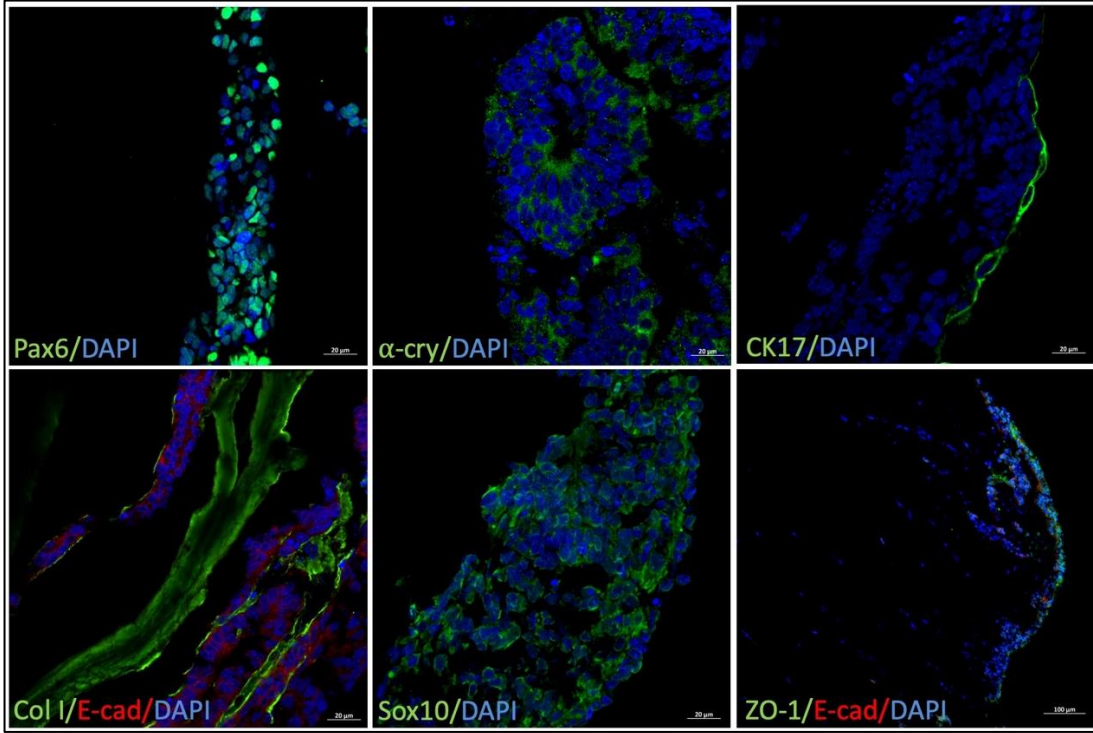


Şekil 52. Protokol-2'ye göre GFP (+) işaretli hücrelerin D30'da farklılaşmanın belirli basamakları için spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.

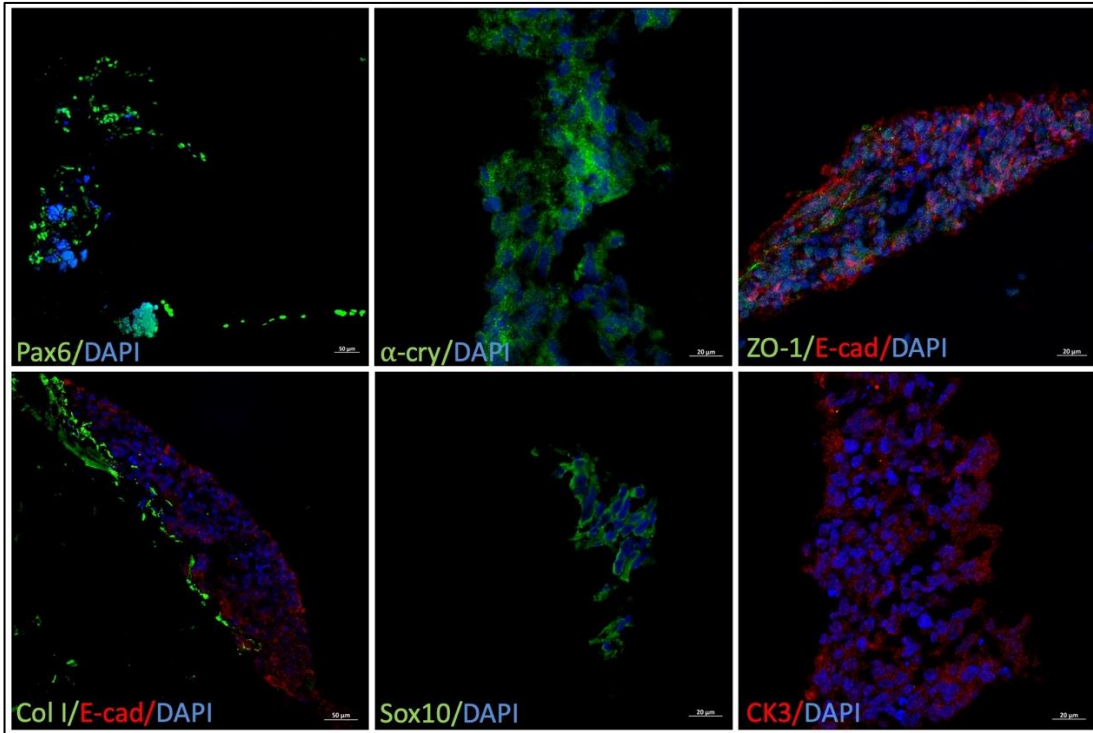
GFP işaretli olmayan İPKH hücrelerinden Protokol-1 ve Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın farklı günlerinde (Protokol-1'e göre farklılaşmanın 2. ve 13. günlerinde, Protokol-2'ye göre ise farklılaşmanın 5. ve 13. günlerinde) hücreler desellülerize kornea iskeleleri üzerine ekilmişti. Bu deneylerden elde edilen kornea iskeleleri farklılaşmanın 40. gününde (D40) immunofloresan analizler için %4 PFA ile fikse edilmiş ve cryostat cihazında kesitler alınmıştır. Protokol-1 ve Protokol-2 deneylerinden elde edilen sonuçları incelediğimizde, her iki protokolda de farklılaşma basamağındaki hücrelerin desellülerize kornea iskelesine tutunduğu, sağlıklı bir şekilde yaşamaya devam ettiği ve bulunduğu ortamda farklılaşma kabiliyetine devam ettiği gözlenmiştir. Tüm bu analizleri farklılaşmanın her basamağına özgü spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak gözlemlenmiştir (**Şekil 53-Şekil 56**).



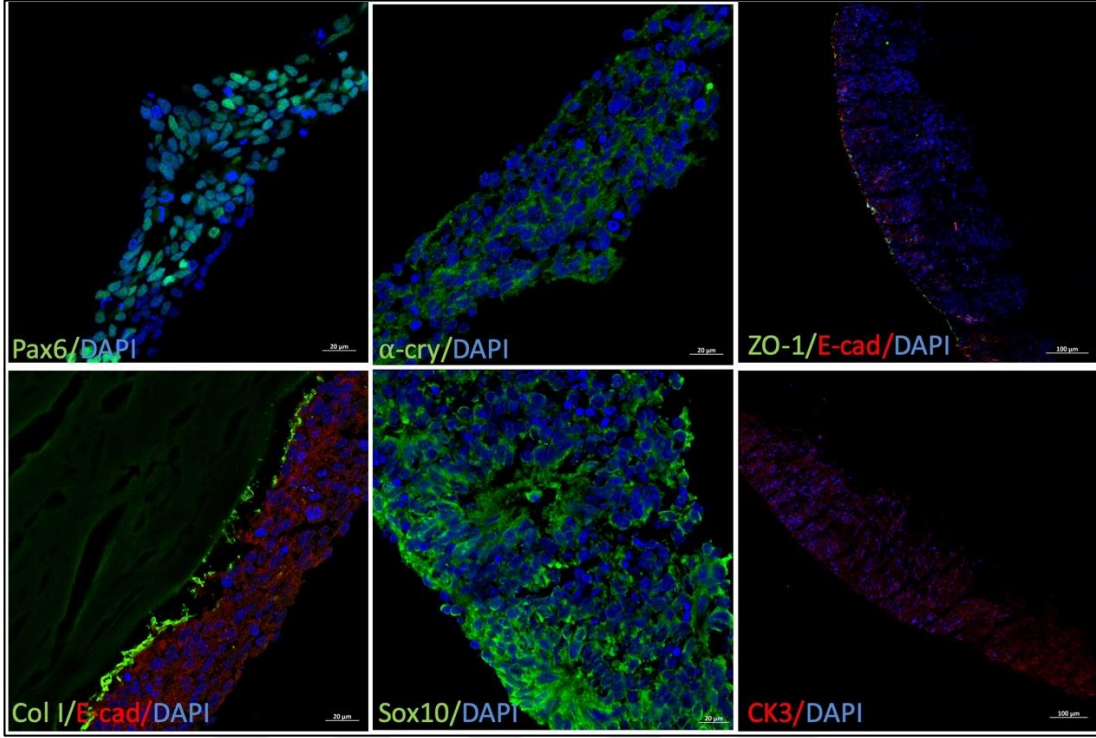
Şekil 53. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.



Şekil 54. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi



Şekil 55. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 5. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.

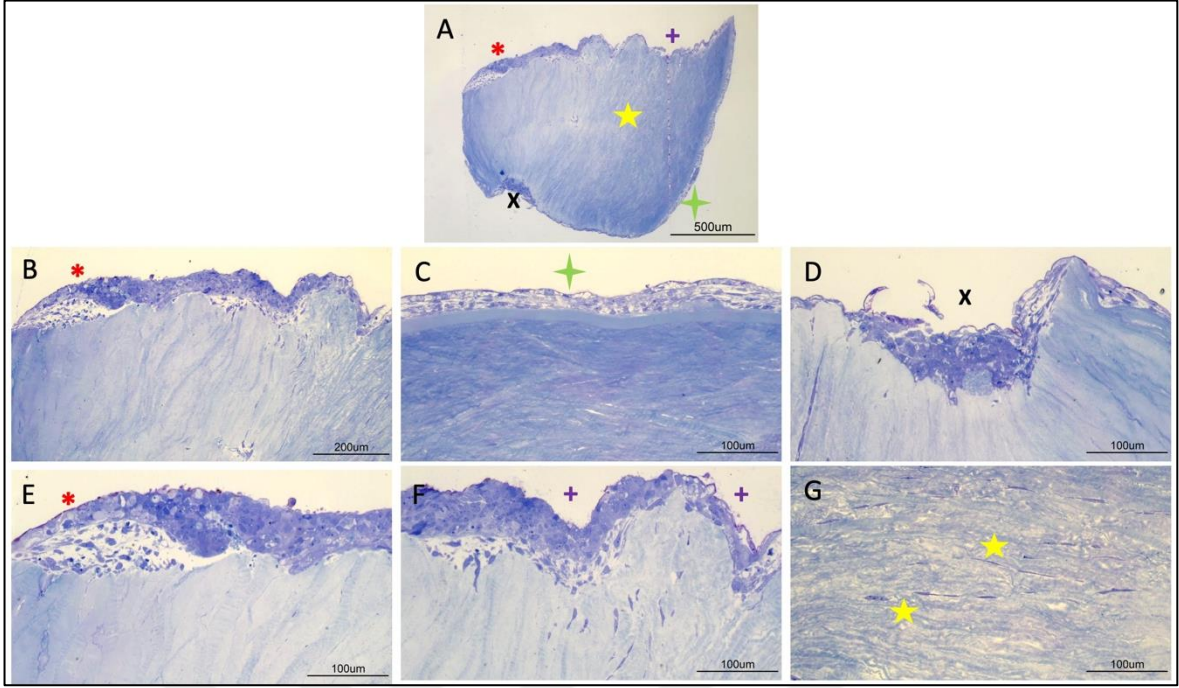


Şekil 56. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta spesifik belirteçlerle immunofloresan olarak görüntülenmesi.

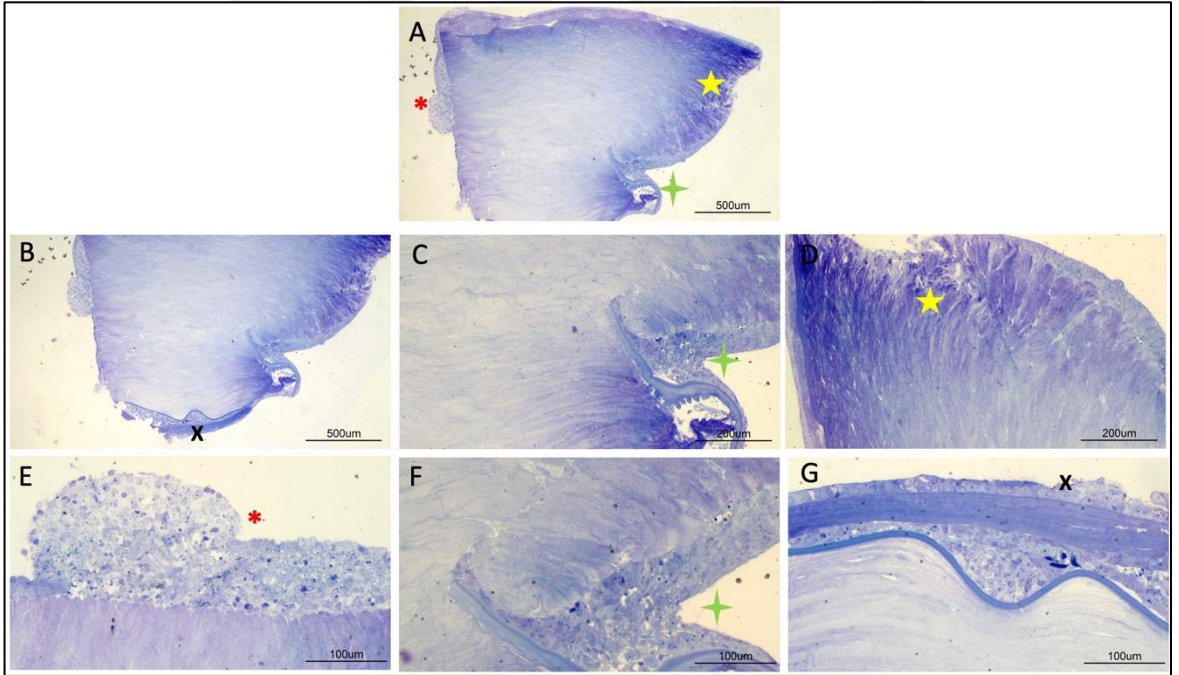
4.6.2.2 Resellülerize Kornea İskelesinin İnce Yapı Analizleri

Resellülerize edilen kornea iskelelerinden immunofloresan analizlerine paralel olarak ince yapı analizleri için de kornea iskeleleri %2,5 gluteraldehitte fikse edilmiştir. %1 osmiyum tetraoksitle post-fiksasyonu sağlandıktan sonra epon: propilen oksit karışımlarında 30 dk. bekletildikten sonra saf eponda 2 gün boyunca 63°C etüvde polimerleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra bu yapılardan ultramikrotom (Ultratom, Leica EM UC7) aracılığıyla yarı ince (800nm) kesitler alınmış ve toluidine mavisi boyasıyla boyanmıştır (**Şekil 57-Şekil 59**).

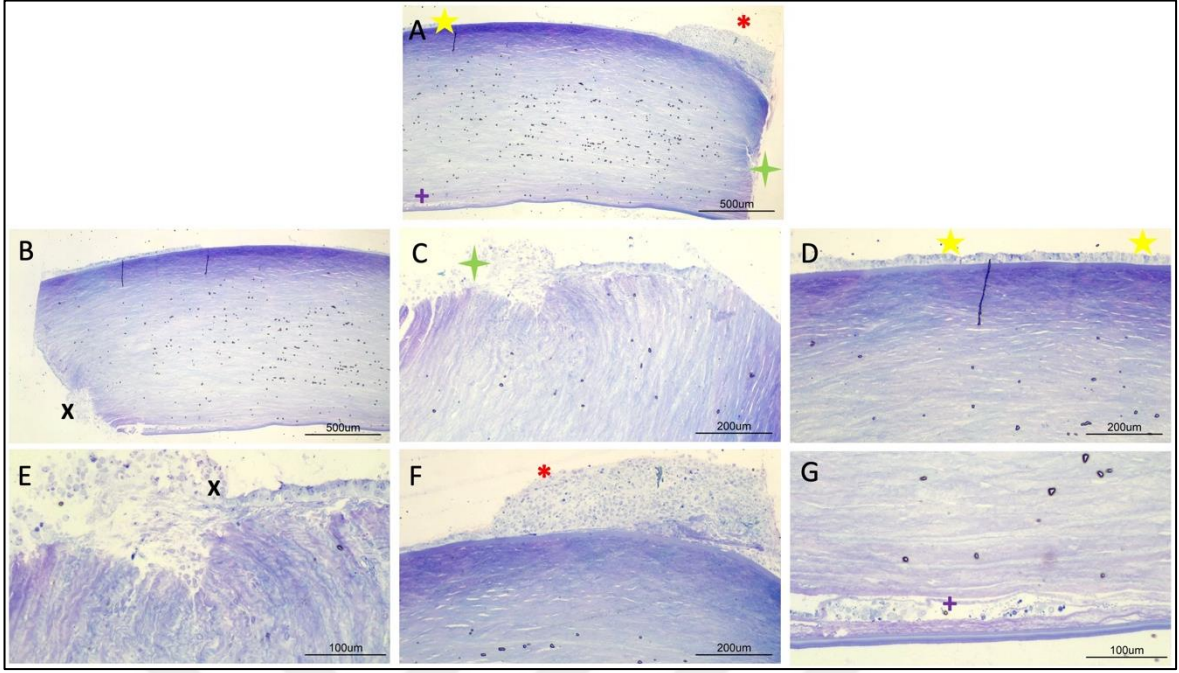
Elde edilen yarı ince kesitlerinde hücrelerin kornea iskelesine tutunduğu ve farklı hücre tiplerini oluşturduğu gözlenmiştir. Bazı bölgelerde 2-3 sıralı epitel benzeri hücre tabakası bulunurken bazı bölgelerde 5-7 sıralı epitel hücre tabakası gözlenmiştir. İskele yapısı içerisindeki stroma tabakasında ise keratosit benzeri hücreler gözlenmiştir.



Şekil 57. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin D40'ta yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi.

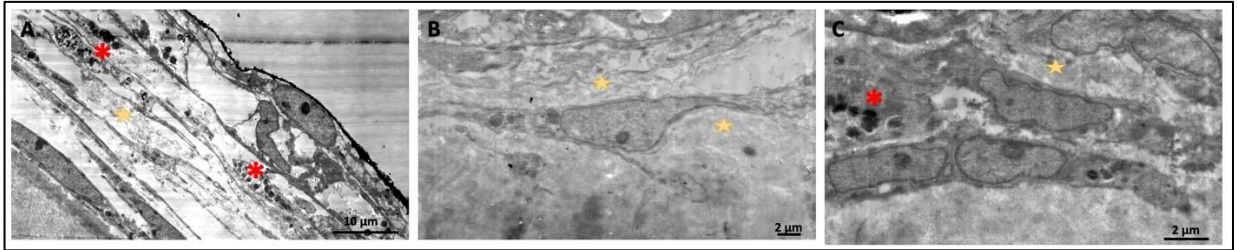


Şekil 58. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta yarı ince kesitlerinin ışık mikroskopunda görüntülenmesi.

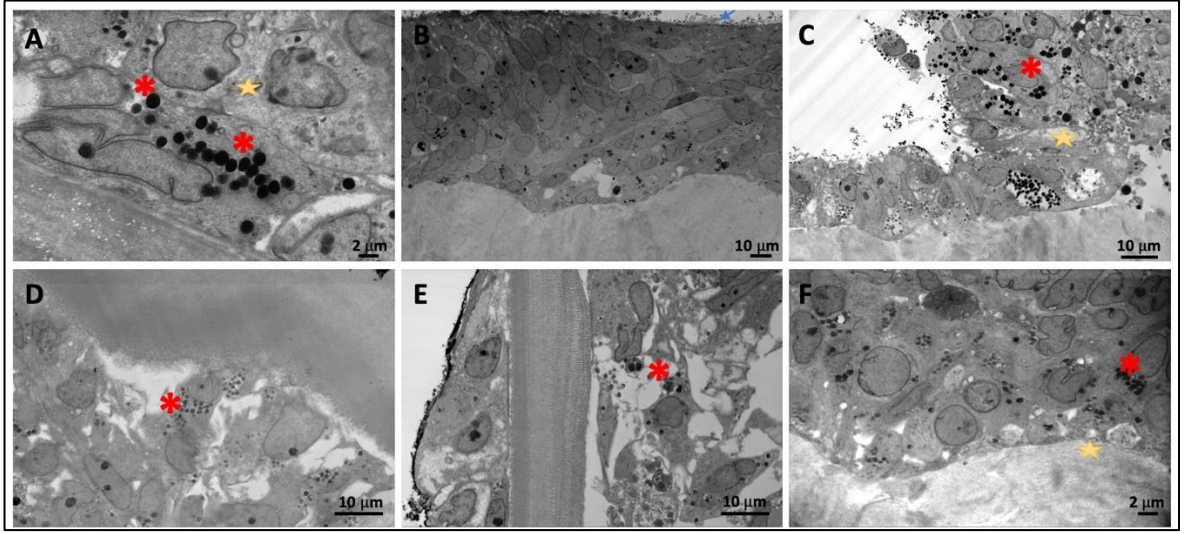


Şekil 59. Protokol-2'ye göre farklılaştırmanın 5. gününde ekilen hücrelerin D40'ta yarı ince kesitlerinin ışık mikroskobunda görüntülenmesi.

Yarı ince kesitler ile inceleme yapacağımız bölgeleri belirledikten sonra ince kesitler olarak gridler üzerine yerleştirdik ve elektron mikroskobunda inceledik. Elde ettiğimiz sonuçlarda; hücrelerin kornea iskelesine yerleşip invaze olduğu, hücrelere yakın konumlu prokolajen paketlerin olduğu ve hücreler arası alanda kolajenlerin sentezlenmiş olduğunu gözlemledik. Farklı hücre tiplerinin olduğunu, yüzeye yakın olan hücrelerin apikal kısımlarında mikrovillus yapılarının olduğunu gözlemledik.



Şekil 60. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 2. gününde ekilen hücrelerin D40'ta ince kesitlerinin elektron mikroskobunda görüntülenmesi (kırmızı asteriks(*): prokolajen paketleri, sarı yıldız(★): kolajenleri işaret etmektedir.)



Şekil 61. Protokol-1'e göre farklılaştırmanın 13. gününde ekilen hücrelerin D40'ta ince kesitlerinin elektron mikroskopunda görüntülenmesi (kırmızı asteriks (*): prokolajen paketleri, sarı yıldız (★): kolajenleri, mavi ok(↓): mikrovillusları işaret etmektedir.)

5. TARTIŞMA

Kornea, ışığın göze girdiği oküler yüzeydeki şeffaf ve avasküler bir dokudur. Epitel, stroma ve/veya endotel tabakasındaki bir hasar görme bozukluğuna sebep olmaktadır. Korneayı çevreleyen limbus, korneanın farklı bölümlerini yenileyen kök hücreleri barındırmaktadır [94, 102]. Limbal kök hücre eksikliği (LKHE) olan hastalarda otolog ya da allojenik erişkin limbal greftleri kullanılarak standart bir hücre tedavi yöntemi geliştirilmiştir [104-106]. Bununla birlikte bilateral epitel defektlerinde stromal ve endoteliyal hücre tabakalarını etkileyen koşullarda, embriyonik kök hücreler (EKH) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler çeşitli kornea hücre tiplerini oluşturmak için alternatif kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir [111, 113]. Yakın zamanda Hayashi ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada, iPKH' den lens epiteli, retina hücreleri, pigmente nöral krest hücreleri ve kornea epiteli koordineli bir şekilde 2B kültür sisteminde oluşturulmuştur [115]. Bununla birlikte dokuya spesifik hücrelerin düzgün tabakalar oluşturmada, 2B kültürler oldukça sınırlandırıcı olduğundan, 3B kültür sistemine ihtiyaç duyulmuştur. Bu yöntem, in vitro olarak kompleks yapıları üretmek için progenitor hücrelerin farklılaşma ve kendi kendini organize etme kapasitesinden yararlanmaktadır. Bu yapıların geliştirilmesi hastalık modellemesi, ilaç geliştirilmesi ve organ replasman tedavilerine katkıda bulunacaktır [119, 120].

Kornea'nın keratokonus gibi şekilsel anomalileri, kalıcı kornea ödemi, keratitler veya kazalar, kimyasal yanıklar ve yaralanmalar sonucu gelişen lekeler (opasiteler), kalıtsal kornea lekeleri, uzun süreli kontakt lens kullanımına bağlı kornea hasarları gibi çok sayıda patolojik durumda korneada geri dönüşümsüz hasar oluşabilmektedir. Bu hastalarda sıklıkla tek tedavi seçeneği cerrahi, yani kornea nakli (keratoplasti) ile olmaktadır. Kornea nakli, hastalıklı korneanın kadavradan alınan kornea dokusu ile değiştirilmesidir. Ancak nakil dokusunun immunolojik reddinin ameliyat sonrası erken veya geç dönemlerde gerçekleşme riski vardır. İmmunolojik reddin baskılanması için kullanılan damla şeklinde veya sistemik verilen kortizon tedavilerinin ise, ciddi yan etkileri olabilmektedir. Bunun yanı sıra nakledilmek üzere kadavradan kornea temininde büyük zorluklar yaşanmakta ve pek çok hasta yıllarca kornea transplantasyonu için beklemektedir.

Dünya Sağlık Örgütü, 2009 yılı verilerine göre dünya üzerinde yaklaşık 8 milyon insan kornea kaynaklı kördür. Bunların yaklaşık 1,5 milyonu çocuk hastalardır ve acilen kornealarının değiştirilmesine ihtiyaç vardır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılı tahminlerine göre tüm dünyada, korneadan kaynaklanan sebeplerle her iki gözü kör olan 4,9 milyon, sadece tek gözü kör olan 10 milyon insan bulunmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008'den 2012'ye kornea nakli sayısında %31 artış (52,487'den 68,681'e) görülmekle birlikte; 2023 yılına kadar verici toplumda %16'lık bir artış, kornea ihtiyacında ise %133'lük bir artış olacağı ve kornea havuzunun nakil bekleyen hastaların ihtiyacını karşılamada yetersiz kalacağı tahmin edilmektedir. Kornea bankacılığının daha az geliştiği ülkelerde ise durum çok daha vahim görülmektedir.

Son yıllarda doku mühendisliği, kornea hasarlanmasında kadavradan elde edilen kornea transplantasyonun yerine geçebilecek matriks yapıları geliştirmeye başlamıştır. Doku mühendisliği insan vücudunda kornea dahil olmak üzere hasarlı dokuların yerini alabilecek yapay dokular ve organlar üretmekte ve geliştirmektedir [153, 154]. Fibrin, fibrin-agaroz, kolajen olmak üzere farklı biyomalzemelerden kornea matriksi oluşturulmuştur [155, 156]. Fakat oluşturulan bu yapıların biyoyumluluk, şeffaflık, esneklik ve yeterli dikiş kolaylığı gibi sorunlar ve yüksek maliyetler nedeniyle tedavide kullanılabilir olma yolunda sınırlılıklar içermektedir. Ayrıca farklı biyomalzemelerden elde edilen yapay kornealarda histolojik olarak korneanın tüm tabakalarını içeren heterojen yapılar elde edilsede, fibriller yapının düzgün olmaması kornea stromasının şeffaflığını belirgin derecede azaltabilmektedir. Anlatılan tüm bu sorunlara çözüm aramak için literatürde hücresel tedavi ve doku mühendisliği deneyimleri ile alternatif tedavi yöntemi üretilmeye çalışılmaktadır.

Doku mühendisliğinde, organ yetmezliği gibi durumlarda fonksiyonel organ replasmanı için gelecek vaad eden bir yaklaşım ortaya çıkmıştır. Kalp, karaciğer, akciğer gibi allojenik ya da zenojenik donör organların desellülerize (hücresizleştirme) edilmesi ile dokunun kendi doğal 3 boyutlu (3B) biyolojik yapısının korunması sağlayan ve bu 3B yapı iskelesine işlevsel parenkimal hücreler veya seçilmiş progenitör hücre popülasyonu ekilerek işlevsel bir doku/organ bütünlüğünün oluşmasını sağlayan teknikler geliştirilmeye başlanmıştır [157-160]. Bu üç boyutlu iskele yapılarına ekilen hücrelerin kendi kendine etkileşimleriyle doku matriksini oluşturduğu gözlenmiştir [149,

152]. Böylece hasarlı ya da işlevini tamamen kaybetmiş dokuların yerine yine doku ya da organın kendi doğal 3B iskelesi kullanılarak ona doğal ortamını sunan matriksler kullanılabilir hale gelmiştir. Bu bağlamda desellülerize edilmiş aselüler kornea yapıları insanlara kornea nakillerinde alternatif bir çözüm oluşturabilir.

Doku mühendisliğinde kornea desellülerizasyonu için oldukça fazla protokol bulunmaktadır. Yourek ve ark.'nın yaptığı çalışmada korneaların desellülerizasyonunda bir deterjan olan SDS kullanılmış olup, farklı konsantrasyonlarda denemeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda kornea desellülerizasyonunda kısmi başarı sağlanmış olup, hücresel kalıntıların kabul edilebilir seviyede olduğu gösterilmiştir. Sasaki ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmalarda ise korneaları desellülerize etmek için yine SDS kullanılmış fakat protokol süreleri ve ortam sıcaklığı gibi farklılıklar nedeniyle daha başarılı sonuç alınmıştır. Bizde çalışmamızda Sasaki ve ark. ile Spaniol ve ark.'nın uygulamış olduğu protokolleri denemiş ve desellülerize kornea iskeleleri elde etmiş olduk. En başarılı sonuçları Sasaki ve ark.'nın protokollerinden elde etmiş olduk. Fakat bazı örneklerimizde aynı sonuçları almadığımız için bu protokollerde modifikasyona giderek yeni bir protokol oluşturduk. Tüm korneaları bu yeni protokolü kullanarak desellülerize ettik. Desellülerize edilen kornealarda histolojik kontrol analizleri ve DNA içeriği analizleri yapıldı ve oldukça başarılı sonuçlar elde ettik.

Hücresel tedaviler son yıllarda spinal yaralanmalar, böbrek hastalıkları, Parkinson hastalığı, Maküler dejenerasyon, kalp rahatsızlıkları ve kanser gibi kesin tedavisi bulunmayan pek çok genetik ve metabolik hastalıklar için önemli bir tedavi potansiyeline sahiptirler [109]. Bu tip tedavilerde kullanılacak hücrelerin hasarlı dokulara yerleşerek dokunun normal işlevini yerine getirmesi beklenmektedir. Ayrıca kişinin kendi hücreleri kullanıldığı için immun yanıt oluşturmayacak olması önemli avantajlarından biridir. Son yıllarda hücresel tedavi anlamında oldukça önemli gelişmeler gözlenmektedir. Bunlardan biri, somatik yani farklılaşmasını tamamlamış bir vücut hücresinin geri programlama tekniğiyle kök hücreye/ indüklenmiş pluripotent kök hücreye (iPKH) dönüştürülmesi diğeri ise hücrelerin 3B ortamlarda üretilerek, kaynak aldığı organa benzeyen organımsı yapıları oluşturan organoid teknolojisidir [114]. Kişiye özgü olarak üretilen, indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH)

kişisel tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde, kişiye özel ilaç taramalarında ve rejeneratif tıpta uygulanabilirlik potansiyellerine sahiptirler. Ancak uygulanabilirliğin önünde birtakım engeller bulunmaktadır. Hücrelerin *in vitro* koşullarda iki boyutlu (2B) büyütülürken çok düşük verimlilikte, miktarda ve kalitede elde edilmeleridir. Son yıllarda geliştirilen organoid modellerinde, hücrelerin, 3B ortamlarda üretilerek, kaynak aldığı organa benzeyen epitel organ parçacıklarını oluşturmasını sağlamıştır. Hastadan alınan hücrelerden laboratuvar koşullarında elde edilen bu organoidlerin, çok miktarda tekrar tekrar elde edilebilmeleri ve köken aldıkları hücreler ile genetik olarak aynı olmalarından dolayı, tedavide kullanımları mümkün olabilir. Beyin, kolon, karaciğer gibi dokuların organoidleri hastalıkların modellenmesi ve tedaviye yönelik stratejilerin geliştirilmesinde model olarak kullanılmaya başlanmıştır [119].

Bilateral limbal defektlerde, İPKH'lerden elde edilen kornea epitel hücreleri, allojenik limbal greftlemenin alternatifi haline gelmiştir. Kornea organoidlerinin oluşturulması ile ilgili protokoller ise son 1-2 yılda literatürde bulunabilir olmuştur. Susaimanickam ve ark., İPKH'lerden karmaşık, 3B kornea organoidleri üretmek için etkili bir metodu tanımladılar. Organoidler *in vitro* olarak olgunlaşabildi ve normal korneal gelişim basamaklarını embriyonik gelişimindeki gibi tekrar özetledi. Kültür ortamında elde edilen bu organoidler 10 haftalık olgunlaşma sürecinde 1 ila 7 mm çapına ulaşmıştır. Ayrıca elde edilen bu kornea organoidlerde *in vivo*da olduğu gibi olgun korneaya spesifik KR3, KR12, PAX6, p63 gibi belirteçlerin eksprese edildiği gözlenmiştir. Bu tür protokolün uygulanmasıyla karmaşık hücre zenginleştirme protokollerine olan ihtiyacı azalmıştır. Aynı zamanda temel araştırma ihtiyaçları ve zenginleştirilmiş kornea epitel hücre tabakaları kültürleri oluşturmak için daha basit bir yöntem sunmaktadır [161] .

Foster, J.W. ve ark. 2016'da yaptıkları çalışmada oluşturdukları kornea organoid yapılarında, kornea stromasında kolajen fibrillerin elektron mikroskopik incelemesinde fibriller yapının oluştuğunu fakat bu dizilimin ve açisal düzenlenimin korneanın doğal yapısına uygun olmadığını gözlemlemişlerdir [162]. Kolajenlerin bu dizilimi korneanın şeffaf yapısının oluşmasında oldukça önemlidir.

Susaimackam ve Foster'ın yapmış olduğu bu iki ayrı çalışmalarda histolojik olarak korneanın tüm tabakalarını içeren heterojen yapılar elde edilsede, fibriller yapının düzgün olmaması kornea stromasının şeffaflığını belirgin derecede azaltabilmektedir [161, 162].

Wahlin ve arkadaşları, dış segment benzeri yapılara sahip rodlar ve konlar dahil olmak üzere fotoreseptörlere benzeyen hücreler içeren 3B retinalar üretmek için modifiye edilmiş bir yaklaşım geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada iPKH'ler, bir matrigel içerisinde (ECM) Wnt sinyal inhibisyonu ve gelişmekte olan nöral veziküllerin manuel diseksiyonu ve ardından retinoik asit ve Notch sinyal inhibisyonu kullanılarak maruz kalınarak anterior nöral bağlılığı desteklemek için kullanıldı. Bu yaklaşım güvenilir bir şekilde 3B optik veziküller ve diğer n nöral vezikül üretirken, az sayıda (ancak tekrarlanabilir) vakada toplanmış hücreler yarı saydam organoidlere dönüştü. Burada sunulan sonuçlar, bu yarı saydam organoidlerin kornea özelliklerini yansıttığını göstermektedir. En önemlisi, bu organoidlerin kornea epiteli, stroma ve endoteline benzeyen tabakalı ve organize yapılara dönüştüklerini ve stromal ECM kolajen fibrilleri biriktirdiklerini göstermiştir. Böylelikle organoidlerin sağlıklı transplantasyonu için bir yüzey üzerinde ve/veya içerisinde üretilip, yama şeklinde nakledilmesi ile ilgili yöntemlerin geliştirilmesine büyük ihtiyaç vardır.

Biz de çalışmamızda elde ettiğimiz kornea organoidlerinde hem immunofloresan boyamalarında hem de ultrasütrüktürel incelemelerde kolajen demetlerini, prokolajen pakatlerini gözlemledik. Kolajen demetlerinin epitelin altında bulunan stroma tabakasında olduğunu ve yakınında keratosit hücrelerinin varlığını tespit ettik. Bu da bize hücrelerin keratosit hücrelerine farklandığını ve fonksiyonel olarak kolajen sentezi yapabildiğini göstermiştir.

Susaimanickam ve ark.'nın 2017 yılında yaptığı çalışmada göz öncül yapılarının geliştiğini ve kornea yapısının şekillendiğini gözlemlemişlerdir. Oluşan yapılarda i sıvının varlığı, gelişmekte olan kornealar için dairesel ve dışbükey bir şekil oluşturulmasına yardımcı gibi görünmektedir. Ayrıca oluşan yapılarda farklı tipte epitel tabakalarının oluştuğu ve epitel hücrelerinin farklı morfolojide olduğunu gözlemlemişlerdir. Nöral krest benzeri hücrelerinin ayrıca kalın stroma altında VIM+,

CD200+ endotel benzeri hücrelerin bir tek tabakasının oluşumuna katkıda bulunduğu ve böylece tam bir ön segment benzeri yapının oluşmasını sağladığı gösterilmiştir. Korneanın stroma tabakasında kolajen sentezinin gerçekleştiğini ve bu kolajenlerin düzensiz bir şekilde konumlandığını gözlemlemişlerdir [161].

Biz de çalışmamızda elde ettiğimiz kornea organoidlerinde epitel tabakalarının bazı bölgelerde 2-3 sıralı, bazı bölgelerde ise 5-7 sıralı olduğunu gözlemledik. Çok sıra tabakalı olan bu epiteller yassı tip epitele sahipti. Epitel geçiş bölgelerinde gözün konjunktiva bölgesine ait kısımda ise epitel hücrelerinin daha yüksek (silindirik) ve apikal kısımlarında glikojen depolandığını yapılan boyamalarda (PAS) gözlemledik.

Susaimackam ve Foster'ın yapmış olduğu çalışmalarda İPKH hücreleri ile kornea hücreleri qPCR yöntemiyle gen ekspresyon analizlerini incelediğinde, İPKH hücrelerinin *OCT4*, *cMYC*, *KLF-4* gibi genleri eksprese ederken kornea hücrelerinin bu genleri eksprese etmediğini gözlemlemişlerdir. Kornea hücrelerinin ise İPKH hücrelerinden farklı olarak *KR3*, *KR12* genlerini eksprese ettiğini gözlemlemişlerdir.

Foster ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmada, İPKH'lerden göz yapılarının geliştirilmesi sırasında kornea organoidlerinin ortaya çıkması, göz gelişimini düzenleyen sinyaller doğrultusunda geliştiğini göstermektedir. Omurgalı göz alanı RX, PAX6 ve SIX3 transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu altında gelişir. Retinoik asit sinyali ayrıca optik veziküllerden optik kap oluşumuna katılır.

Biz de literatürde yer alan bu çalışmalara paralel olarak 3B ortamda kornea organoidlerini elde ettik. Elde ettiğimiz bu organoidlerde *P63α*, *P63*, *KR3* gibi matür kornaya spesifik genlerin qPCR analizleriyle eksprese olduğunu gözlemledik. Ayrıca hem immunofloresan hem de immunohistokimyasal analizlerle PAX6, *p63α*, *KR3* gibi proteinlerin eksprese olduğunu gözlemledik. Elde ettiğimiz kornea organoidlerinde yaptığımız ince yapı analizlerinde ise literatürde yer alan diğer protokollere nazaran daha verimli kornea organoidlerini oluşturduğumuzu gözlemledik. Bunları hem karakterizasyon analizleriyle hem de ince yapı analizleriyle göstermiş olduk.

Elde edilen kornea organoidlerinde hücreler arasında bol miktarda kolajen sentezinin gerçekleştiğini, prokolajen paketlerinin oluştuğunu gözlemledik. Kornea organoidlerinden elde edilen qPCR analizlerinde *KR3*, *KR12* genlerinin ekspresyonunun İPKH hücrelerine kıyasla oldukça fazla miktarda eksprese edildiğini gözlemledik.

Bu tez çalışmasında korneaya yönelik yeni bir biyomalzeme geliştirilmeden, deselülarize gerçek kornea dokusunu in vitro sistemde dokunun kendi iskelesinde kültüre edilmesi hedefledik. Bu şekilde, korneanın en doğal ortamını sunan yapı üzerinde geliştirilen organoidlerin histomorfolojik ve/veya histokimyasal ve ultrasütrüktürel olarak kornea yapısını ve/veya spesifik gen ekspresyonu (*P63*, *KR3*, *KR12*) oluşturmaları analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda geliştirilmiş korneanın, kornea hasarı ve/veya kornea hastalıklarında kişiselleştirilmiş tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda bu yöntemin özgün olması ve patentlenebilir değerinin olması da önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sağlıklı kişilerden elde edilen İPKH kaynaklı *in vitro* 3B kornea organoid modelleri oluşturulmuştur. Oluşturulan kornea organoidler in vivodaki dokuyu taklit ederek tüm farklılaştırma basamaklarına özgü spesifik belirteçleri eksprese etmiş ve fonksiyonel özellik gösterdiklerini kanıtlamıştır. Korneanın şeffaflığını sağlayan kolajen demetlerinin bol miktarda salgılandığı ve yapı içerisinde konumlandığı gözlenmiştir.

Desellülerize kornea iskelesi bu organoidler için kültüre edilmesi ve yerleşmesi açısından uygun bir ortam sağlamıştır ve embriyonel gelişimi taklit ederek, moleküler olarak Col I, KR3, PAX6, P63 ifade etmiştir.

Her ne kadar in vivoyu taklit etse de hücreSEL ve yapısal olarak sağlıklı bir insanın korneasının şeffaflığına ulaşamamıştır. Elde ettiğimiz korneanın uzaysal geometrisinde de deformasyonlar oluşmuştur.

Sonuç olarak farklı doku mühendisliği yaklaşımı ve farklı protokollerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Oluşturulan bu kornea organoidleri; hücreSEL tedaviler, gen mutasyon taramaları, hastalık modellemeleri ve ilaç taramaları, biyobankalama, omik profillemeye gibi alanlarda kullanılma potansiyeline sahiptirler.

7. KAYNAKLAR

1. Notara, M., et al., *In sickness and in health: corneal epithelial stem cell biology, pathology and therapy*. Experimental eye research, 2010. **90**(2): p. 188-195.
2. Kornea, B.Ü., *Göz hastalıkları'nda*. Ankara: Palme Yayıncılık, 1998: p. 69-73.
3. Nishida, T. and S. Saika, *Cornea and sclera: anatomy and physiology*. Cornea—Fundamentals, Diagnosis and Management. Mosby Elsevier, 2010: p. 3-24.
4. Mishima, S., *Corneal thickness*. Survey of ophthalmology, 1968. **13**(2): p. 57-96.
5. Kaufman, P.L., et al., *Adler's Physiology of the Eye (Physiology of the Eye)*. 2011: Elsevier Health Sciences.
6. Arffa, R.C. and M. Grayson, *Grayson's Diseases of the Cornea*. 1997: Mosby Incorporated.
7. Lwigale, P.Y., *Corneal Development: Different Cells from a Common Progenitor*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015. **134**: p. 43-59.
8. Graw, J., *Eye development*, in *Current topics in developmental biology*. 2010, Elsevier. p. 343-386.
9. Collomb, E., et al., *The corneal epithelium and lens develop independently from a common pool of precursors*. Developmental Dynamics, 2013. **242**(5): p. 401-413.
10. Le Douarin, N., N.M. LeDouarin, and C. Kalcheim, *The neural crest*. 1999: Cambridge university press.
11. LaBonne, C. and M. Bronner-Fraser, *Neural crest induction in Xenopus: evidence for a two-signal model*. Development, 1998. **125**(13): p. 2403-2414.
12. García-Castro, M.n.I., C. Marcelle, and M. Bronner-Fraser, *Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer*. Science, 2002. **297**(5582): p. 848-851.
13. Patthey, C., T. Edlund, and L. Gunhaga, *Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate*. Development, 2009. **136**(1): p. 73-83.
14. Knecht, A.K. and M. Bronner-Fraser, *Induction of the neural crest: a multigene process*. Nature Reviews Genetics, 2002. **3**(6): p. 453.
15. Stuhlmiller, T.J. and M.I. García-Castro, *Current perspectives of the signaling pathways directing neural crest induction*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. **69**(22): p. 3715-3737.
16. Johnston, M., et al., *Origins of avian ocular and periocular tissues*. Experimental eye research, 1979. **29**(1): p. 27-43.
17. Creuzet, S., C. Vincent, and G. Couly, *Neural crest derivatives in ocular and periocular structures*. International Journal of Developmental Biology, 2003. **49**(2-3): p. 161-171.
18. Le Douarin, N.M. and M.-A.M. Teillet, *Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neurectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique*. Developmental biology, 1974. **41**(1): p. 162-184.
19. D'AMICO MARTEL, A., *AN AUTORADIOGRAPHIC ANALYSIS OF THE DEVELOPMENT OF THE CHICK TRIGEMINAL GANGLION*. 1980.

20. Lwigale, P.Y., G.W. Conrad, and M. Bronner-Fraser, *Graded potential of neural crest to form cornea, sensory neurons and cartilage along the rostrocaudal axis*. Development, 2004. **131**(9): p. 1979-1991.
21. Jasrapuria-Agrawal, S. and P.Y. Lwigale, *Neural Crest Cells in Ocular Development*, in *Neural Crest Cells*. 2014, Elsevier. p. 189-203.
22. Hay, E.D., *Fine structure of the developing avian cornea*. Monographs in developmental biology, 1969: p. 1-144.
23. Hayashi, M., et al., *Secretion of collagen types I and II by epithelial and endothelial cells in the developing chick cornea demonstrated by in situ hybridization and immunohistochemistry*. Development, 1988. **103**(1): p. 27-36.
24. Hay, E.D., *Development of the vertebrate cornea*, in *International review of cytology*. 1980, Elsevier. p. 263-322.
25. Birk, D.E. and R.L. Trelstad, *Extracellular compartments in matrix morphogenesis: collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts*. The Journal of cell biology, 1984. **99**(6): p. 2024-2033.
26. Cai, C.X., et al., *Cellular invasion and collagen type IX in the primary corneal stroma in vitro*. Developmental Dynamics, 1994. **201**(3): p. 206-215.
27. Svoboda, K.K., et al., *Embryonic chicken cornea and cartilage synthesize type IX collagen molecules with different amino-terminal domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1988. **85**(20): p. 7496-7500.
28. Dhouailly, D., D.J. Pearton, and F. Michon, *The vertebrate corneal epithelium: from early specification to constant renewal*. Developmental Dynamics, 2014. **243**(10): p. 1226-1241.
29. Trelstad, R.L., *The Golgi apparatus in chick corneal epithelium: changes in intracellular position during development*. The Journal of cell biology, 1970. **45**(1): p. 34-42.
30. Tanifuji-Terai, N., et al., *Expression of keratin 12 and maturation of corneal epithelium during development and postnatal growth*. Investigative ophthalmology & visual science, 2006. **47**(2): p. 545-551.
31. Zieske, J.D., *Corneal development associated with eyelid opening*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(8-9): p. 903-11.
32. Rodrigues, M., et al., *Suprabasal expression of a 64-kilodalton keratin (no. 3) in developing human corneal epithelium*. Differentiation, 1987. **34**(1): p. 60-67.
33. Lwigale, P.Y., P.A. Cressy, and M. Bronner-Fraser, *Corneal keratocytes retain neural crest progenitor cell properties*. Developmental biology, 2005. **288**(1): p. 284-293.
34. Bronner-Fraser, M., J.J. Wolf, and B.A. Murray, *Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube*. Developmental biology, 1992. **153**(2): p. 291-301.
35. Nakagawa, S. and M. Takeichi, *Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins*. Development, 1995. **121**(5): p. 1321-1332.
36. Rogers, C.D., A. Saxena, and M.E. Bronner, *Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT*. J Cell Biol, 2013. **203**(5): p. 835-847.
37. Hatta, K., et al., *Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos*. Developmental biology, 1987. **120**(1): p. 215-227.

38. Taneyhill, L.A. and A.T. Schiffmacher, *Cadherin dynamics during neural crest cell ontogeny*, in *Progress in molecular biology and translational science*. 2013, Elsevier. p. 291-315.
39. Wulle, K.G., *Electron microscopy of the fetal development of the corneal endothelium and Descemet's membrane of the human eye*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1972. **11**(11): p. 897-904.
40. Wulle, K.G., K.W. Ruprecht, and L.C. Windrath, *Electron microscopy of the development of the cell junctions in the embryonic and fetal human corneal endothelium*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1974. **13**(12): p. 923-934.
41. Silla, Z.T., et al., *Signals from the lens and Foxc1 regulate the expression of key genes during the onset of corneal endothelial development*. Experimental cell research, 2014. **322**(2): p. 381-388.
42. Reneker, L.W., et al., *Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development-a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis*. Development, 2000. **127**(3): p. 533-542.
43. Coulombre, A.J. and J.L. Coulombre, *Corneal development. I. Corneal transparency*. Journal of cellular and comparative physiology, 1958. **51**(1): p. 1-11.
44. Fitch, J.M., et al., *The spatial organization of Descemet's membrane-associated type IV collagen in the avian cornea*. The Journal of cell biology, 1990. **110**(4): p. 1457-1468.
45. Connon, C.J., et al., *Proteoglycan alterations and collagen reorganisation in the secondary avian cornea during development*. Ophthalmic research, 2003. **35**(4): p. 177-184.
46. Funderburgh, J.L., B. Caterson, and G.W. Conrad, *Keratan sulfate proteoglycan during embryonic development of the chicken cornea*. Developmental biology, 1986. **116**(2): p. 267-277.
47. Doane, K.J., et al., *Spatial and temporal variations in extracellular matrix of periocular and corneal regions during corneal stromal development*. Experimental eye research, 1996. **62**(3): p. 285-292.
48. DUNLEVY, J.R., et al., *Expression of the keratan sulfate proteoglycans lumican, keratocan and osteoglycin/mimecan during chick corneal development*. Experimental eye research, 2000. **70**(3): p. 349-362.
49. Conrad, A.H. and G.W. Conrad, *The keratocan gene is expressed in both ocular and non-ocular tissues during early chick development*. Matrix Biology, 2003. **22**(4): p. 323-337.
50. Quantock, A.J., et al., *Collagen organization in the secondary chick cornea during development*. Investigative ophthalmology & visual science, 2003. **44**(1): p. 130-136.
51. Gordon, M.K., D.R. Gerecke, and B.R. Olsen, *Type XII collagen: distinct extracellular matrix component discovered by cDNA cloning*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(17): p. 6040-6044.
52. Fitch, J.M., C.M. Linsenmayer, and T.F. Linsenmayer, *Collagen fibril assembly in the developing avian primary corneal stroma*. Investigative ophthalmology & visual science, 1994. **35**(3): p. 862-869.

53. Young, B.B., et al., *The roles of types XII and XIV collagen in fibrillogenesis and matrix assembly in the developing cornea*. Journal of cellular biochemistry, 2002. **87**(2): p. 208-220.
54. Quantock, A.J. and R.D. Young, *Development of the corneal stroma, and the collagen–proteoglycan associations that help define its structure and function*. Developmental Dynamics, 2008. **237**(10): p. 2607-2621.
55. Hart, G.W., *Biosynthesis of glycosaminoglycans during corneal development*. Journal of Biological Chemistry, 1976. **251**(21): p. 6513-6521.
56. Chakravarti, S., et al., *Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma*. Investigative ophthalmology & visual science, 2000. **41**(11): p. 3365-3373.
57. Zhang, Y., et al., *Detection and quantification of sulfated disaccharides from keratan sulfate and chondroitin/dermatan sulfate during chick corneal development by ESI-MS/MS*. Investigative ophthalmology & visual science, 2005. **46**(5): p. 1604-1614.
58. Liu, C.-Y., et al., *Keratocan-deficient mice display alterations in corneal structure*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(24): p. 21672-21677.
59. Tasheva, E.S., et al., *Mimecan/osteoglycin-deficient mice have collagen fibril abnormalities*. Mol Vis, 2002. **8**(10): p. 407-415.
60. McKee, H.D., et al., *Dissection plane of the clear margin big-bubble in deep anterior lamellar keratoplasty*. Cornea, 2013. **32**(4): p. e51-e52.
61. Dua, H.S., et al., *Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer)*. Ophthalmology, 2013. **120**(9): p. 1778-1785.
62. Sack, R.A., et al., *Host-defense mechanism of the ocular surfaces*. Bioscience reports, 2001. **21**(4): p. 463-480.
63. Hanna, C., D.S. Bicknell, and J.E. O'BRIEN, *Cell turnover in the adult human eye*. Archives of ophthalmology, 1961. **65**(5): p. 695-698.
64. Pfister, R.R., *The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscopic study*. Investigative ophthalmology & visual science, 1973. **12**(9): p. 654-668.
65. Argüeso, P. and I.K. Gipson, *Epithelial mucins of the ocular surface: structure, biosynthesis and function*. Experimental eye research, 2001. **73**(3): p. 281-289.
66. Wiley, L., et al., *Regional heterogeneity in human corneal and limbal epithelia: an immunohistochemical evaluation*. Investigative ophthalmology & visual science, 1991. **32**(3): p. 594-602.
67. Mishima, S., *Some physiological aspects of the precorneal tear film*. Archives of ophthalmology, 1965. **73**(2): p. 233-241.
68. Komai, Y. and T. Ushiki, *The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera*. Investigative ophthalmology & visual science, 1991. **32**(8): p. 2244-2258.
69. Nakayasu, K., et al., *Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas*. Ophthalmic research, 1986. **18**(1): p. 1-10.
70. Wilson, S.E. and J.-W. Hong, *Bowman's layer structure and function: critical or dispensable to corneal function? A hypothesis*. Cornea, 2000. **19**(4): p. 417-420.
71. Hayashi, S., T. Osawa, and K. Tohyama, *Comparative observations on corneas, with special reference to Bowman's layer and Descemet's membrane in mammals and amphibians*. Journal of morphology, 2002. **254**(3): p. 247-258.

72. Lagali, N., J. Germundsson, and P. Fagerholm, *The role of Bowman's layer in corneal regeneration after phototherapeutic keratectomy: a prospective study using in vivo confocal microscopy*. Investigative ophthalmology & visual science, 2009. **50**(9): p. 4192-4198.
73. Boote, C., et al., *Collagen fibrils appear more closely packed in the prepupillary cornea: optical and biomechanical implications*. Investigative ophthalmology & visual science, 2003. **44**(7): p. 2941-2948.
74. Meek, K.M. and C. Boote, *The organization of collagen in the corneal stroma*. Experimental eye research, 2004. **78**(3): p. 503-512.
75. Gipson, I. and N. Joyce, *Anatomy and cell biology of the cornea, superficial limbus, and conjunctiva*. Principles and Practice of Ophthalmology. Philadelphia: WB Saunders, 2000: p. 612-629.
76. Giraud, J., et al., *Statistical morphometric studies in normal human and rabbit corneal stroma*. Experimental eye research, 1975. **21**(3): p. 221-229.
77. Hamada, R., et al., *Quantitative analysis on the ultrastructure of human fetal cornea*. The structure of the eye, Tokyo, 1976: p. 49-62.
78. Jester, J.V., et al., *The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'*. Journal of cell science, 1999. **112**(5): p. 613-622.
79. Robert, L., et al., *Corneal collagens*. Pathologie Biologie, 2001. **49**(4): p. 353-363.
80. Kielty, C.M. and M.E. Grant, *The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix*. Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects, 2002: p. 159-221.
81. Royce, P.M. and B. Steinmann, *Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects*. 2003: John Wiley & Sons.
82. Michelacci, Y.M., *Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2003. **36**(8): p. 1037-1046.
83. Meek, K.M., *Corneal collagen—its role in maintaining corneal shape and transparency*. Biophysical reviews, 2009. **1**(2): p. 83-93.
84. Borcharding, M.S., et al., *Proteoglycans and collagen fibre organization in human corneoscleral tissue*. Experimental eye research, 1975. **21**(1): p. 59-70.
85. Freund, D., et al., *Ultrastructure in anterior and posterior stroma of perfused human and rabbit corneas. Relation to transparency*. Investigative ophthalmology & visual science, 1995. **36**(8): p. 1508-1523.
86. Gyi, T.J., K.M. Meek, and G.F. Elliott, *Collagen interfibrillar distances in corneal stroma using synchrotron X-ray diffraction: a species study*. International Journal of Biological Macromolecules, 1988. **10**(5): p. 265-269.
87. Meek, K.M. and D.W. Leonard, *Ultrastructure of the corneal stroma: a comparative study*. Biophysical journal, 1993. **64**(1): p. 273-280.
88. Goh, K., et al., *Ageing changes in the tensile properties of tendons: influence of collagen fibril volume fraction*. Journal of biomechanical engineering, 2008. **130**(2).
89. Parry, D.A., *The molecular fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue*. Biophysical chemistry, 1988. **29**(1-2): p. 195-209.

90. Johnson, D.H., W.M. Bourne, and R.J. Campbell, *The ultrastructure of Descemet's membrane: I. Changes with age in normal corneas*. Archives of ophthalmology, 1982. **100**(12): p. 1942-1947.
91. Kanski, J.J. and B. Bowling, *Clinical ophthalmology: a systematic approach*. 2011: Elsevier Health Sciences.
92. Lim, M., et al., *Growth factor, cytokine and protease interactions during corneal wound healing*. The ocular surface, 2003. **1**(2): p. 53-65.
93. Davanger, M. and A. Evensen, *Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium*. Nature, 1971. **229**(5286): p. 560-561.
94. Schermer, A., S. Galvin, and T.-T. Sun, *Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells*. The Journal of cell biology, 1986. **103**(1): p. 49-62.
95. Zieske, J.D., G. Bukusoglu, and M.A. Yankauckas, *Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells*. Investigative ophthalmology & visual science, 1992. **33**(1): p. 143-152.
96. Schofield, R., *The stem cell system*. Biomedicine & pharmacotherapy= Biomedecine & pharmacotherapie, 1983. **37**(8): p. 375-380.
97. Yuan, S. and G. Fan, *Stem cell-based therapy of corneal epithelial and endothelial diseases*. Regenerative medicine, 2015. **10**(4): p. 495-504.
98. Nowell, C.S. and F. Radtke, *Corneal epithelial stem cells and their niche at a glance*. J Cell Sci, 2017. **130**(6): p. 1021-1025.
99. Schlötzer-Schrehardt, U. and F.E. Kruse, *Identification and characterization of limbal stem cells*. Experimental eye research, 2005. **81**(3): p. 247-264.
100. Majo, F., et al., *Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 250.
101. Nakatsu, M.N., et al., *Human limbal mesenchymal cells support the growth of human corneal epithelial stem/progenitor cells*. Investigative ophthalmology & visual science, 2014. **55**(10): p. 6953-6959.
102. Cotsarelis, G., et al., *Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells*. Cell, 1989. **57**(2): p. 201-209.
103. Holland, E.J. and G.S. Schwartz, *Epithelial stem-cell transplantation for severe ocular-surface disease*. 1999, Mass Medical Soc.
104. Rama, P., et al., *Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration*. New England journal of medicine, 2010. **363**(2): p. 147-155.
105. Basu, S., et al., *Clinical outcomes of penetrating keratoplasty after autologous cultivated limbal epithelial transplantation for ocular surface burns*. American journal of ophthalmology, 2011. **152**(6): p. 917-924. e1.
106. Basu, S., et al., *Simple limbal epithelial transplantation: long-term clinical outcomes in 125 cases of unilateral chronic ocular surface burns*. Ophthalmology, 2016. **123**(5): p. 1000-1010.
107. Hertsenberg, A.J. and J.L. Funderburgh, *Stem cells in the cornea*, in *Progress in molecular biology and translational science*. 2015, Elsevier. p. 25-41.
108. Utine, C.A., C.E. Durmaz, and N. Kocak, *Corneal matrix repair therapy with the regenerating agent in neurotrophic persistent epithelial defects*. International journal of ophthalmology, 2017. **10**(12): p. 1935.
109. Yamanaka, S., *Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): p. 678-684.

110. Rama, P., et al., *Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration*. 2010. **363**(2): p. 147-155.
111. Shalom-Feuerstein, R., et al., *Pluripotent stem cell model reveals essential roles for miR-450b-5p and miR-184 in embryonic corneal lineage specification*. 2012. **30**(5): p. 898-909.
112. Sareen, D., et al., *Differentiation of human limbal-derived induced pluripotent stem cells into limbal-like epithelium*. 2014. **3**(9): p. 1002-1012.
113. Ahmad, S., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche*. 2007. **25**(5): p. 1145-1155.
114. Sato, T., et al., *Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche*. Nature, 2009. **459**(7244): p. 262-5.
115. Hayashi, R., et al., *Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function*. Nature, 2016. **531**(7594): p. 376.
116. Hiler, D., et al., *Quantification of retinogenesis in 3D cultures reveals epigenetic memory and higher efficiency in iPSCs derived from rod photoreceptors*. Cell stem cell, 2015. **17**(1): p. 101-115.
117. Kaewkhaw, R., et al., *Transcriptome dynamics of developing photoreceptors in three-dimensional retina cultures recapitulates temporal sequence of human cone and rod differentiation revealing cell surface markers and gene networks*. Stem cells, 2015. **33**(12): p. 3504-3518.
118. Völkner, M., et al., *Retinal organoids from pluripotent stem cells efficiently recapitulate retinogenesis*. Stem cell reports, 2016. **6**(4): p. 525-538.
119. Lancaster, M.A. and J.A. Knoblich, *Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies*. Science, 2014. **345**(6194): p. 1247125.
120. Nakano, T., et al., *Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs*. Cell stem cell, 2012. **10**(6): p. 771-785.
121. Parfitt, D.A., et al., *Identification and correction of mechanisms underlying inherited blindness in human iPSC-derived optic cups*. Cell stem cell, 2016. **18**(6): p. 769-781.
122. Lancaster, M.A. and J.A. Knoblich, *Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells*. Nat Protoc, 2014. **9**(10): p. 2329-40.
123. Moore, K.A., H. Ema, and I.R. Lemischka, *In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells*. Blood, 1997. **89**(12): p. 4337-4347.
124. Hendry, C.E. and M.H. Little, *Reprogramming the kidney: a novel approach for regeneration*. Kidney international, 2012. **82**(2): p. 138-146.
125. Hambiliki, F., et al., *Co-localization of NANOG and OCT4 in human pre-implantation embryos and in human embryonic stem cells*. Journal of assisted reproduction and genetics, 2012. **29**(10): p. 1021-1028.
126. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154.
127. Williams, R.L., et al., *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 684.
128. Beltrami, A.P., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell, 2003. **114**(6): p. 763-776.

129. Friedenstein, A.J., J. Gorskaja, and N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Experimental hematology, 1976. **4**(5): p. 267-274.
130. Polisetty, N., et al., *Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye*. Molecular vision, 2008. **14**: p. 431.
131. Zuk, P.A., et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Molecular biology of the cell, 2002. **13**(12): p. 4279-4295.
132. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-317.
133. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Communication and Signaling, 2011. **9**(1): p. 12.
134. Katikireddy, K.R., R. Dana, and U.V. Jurkunas, *Differentiation potential of limbal fibroblasts and bone marrow mesenchymal stem cells to corneal epithelial cells*. Stem Cells, 2014. **32**(3): p. 717-729.
135. Pellegrini, G., et al., *Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface*. The Journal of cell biology, 1999. **145**(4): p. 769-782.
136. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. cell, 2006. **126**(4): p. 663-676.
137. Aoi, T., et al., *Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells*. Science, 2008. **321**(5889): p. 699-702.
138. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. nature, 2007. **448**(7151): p. 313.
139. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. cell, 2007. **131**(5): p. 861-872.
140. Hanna, J., et al., *Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1920-1923.
141. Lanza, R., et al., *Essentials of stem cell biology*. 2005: Elsevier.
142. Hachitanda, Y. and M. Tsuneyoshi, *Neuroblastoma with a distinct organoid pattern: a clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study*. Human pathology, 1994. **25**(1): p. 67-72.
143. Xinaris, C., et al., *In vivo maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions*. Journal of the American Society of Nephrology, 2012. **23**(11): p. 1857-1868.
144. de la Cruz Cardona, J., et al., *Transparency in a fibrin and fibrin–agarose corneal stroma substitute generated by tissue engineering*. Cornea, 2011. **30**(12): p. 1428-1435.
145. Garzon, I., et al., *In vitro and in vivo cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa*. Journal of periodontal research, 2009. **44**(5): p. 588-597.
146. Fagerholm, P., et al., *Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold*. Biomaterials, 2014. **35**(8): p. 2420-2427.
147. Lawrence, B.D., et al., *Silk film biomaterials for cornea tissue engineering*. Biomaterials, 2009. **30**(7): p. 1299-1308.

148. Ott, H.C., et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. Nature medicine, 2008. **14**(2): p. 213.
149. Uygun, B.E., et al., *Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix*. Nature medicine, 2010. **16**(7): p. 814.
150. Petersen, T.H., et al., *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation*. Science, 2010. **329**(5991): p. 538-541.
151. Badylak, S.F., D. Taylor, and K. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. Annual review of biomedical engineering, 2011. **13**: p. 27-53.
152. Cortiella, J., et al., *Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation*. Tissue Engineering Part A, 2010. **16**(8): p. 2565-2580.
153. Alaminos, M., et al., *Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold*. 2006. **47**(8): p. 3311-3317.
154. Alaminos, M., et al. *Differentiation capability of human umbilical cord stem cells to cornea epithelium*. in *Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society, European Chapter Meeting (TERMIS-EU)*. 2014.
155. Lawrence, B.D., et al., *Silk film biomaterials for cornea tissue engineering*. 2009. **30**(7): p. 1299-1308.
156. Fagerholm, P., et al., *Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold*. 2014. **35**(8): p. 2420-2427.
157. Uygun, B.E., et al., *Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix*. 2010. **16**(7): p. 814.
158. Petersen, T.H., et al., *Tissue-engineered lungs for in vivo implantation*. 2010. **329**(5991): p. 538-541.
159. Ott, H.C., et al., *Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart*. 2008. **14**(2): p. 213.
160. Badylak, S.F., D. Taylor, and K.J.A.r.o.b.e. Uygun, *Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds*. 2011. **13**: p. 27-53.
161. Susaimanickam, P.J., et al., *Generating minicorneal organoids from human induced pluripotent stem cells*. 2017. **144**(13): p. 2338-2351.
162. Foster, J.W., et al., *Cornea organoids from human induced pluripotent stem cells*. 2017. **7**: p. 41286.

8. EKLER

8.1 Etik Kurul

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	3438-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Alper BAĞRIYANIK Histoloji ve Embriyoloji A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	*
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	*
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/17-44	Tarih:22.06.2017
	Prof.Dr.Alper BAĞRIYANIK'ın sorumlusu olduğu "İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katıbaşı
Prof.Dr.Ş.Rayhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katıbaşı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	Katıbaşı
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
Prof.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	Katıbaşı
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

DOSYA NO:	3438-GOA
ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐ DOKTORA ☒ YÜKSEKLİSANS ☐
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Alper BAĞRIYANIK Histoloji ve Embriyoloji A.D
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	Araştırmacı dilekçesi	10.04.2018		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/10-42	Tarih:12.04.2018
	Prof.Dr.Alper BAĞRIYANIK'ın sorumlusu olduğu "İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait 10.04.2018 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak;	
	-Araştırmanın örneklemini; Enfekte olmayan kornea patolojileri nedeniyle göme taşıhı amacıyla gerçekleştirilen kornea dokularının kullanılması, -Araştırmaya katılacak gönüllülerin kadın ve erkekten oluşacağı ve yaş sınırlaması olmadığı, -Araştırmada enfekte olmayan korneaların çalışmaya dahil edilmesi, enfekte olan korneaların ise çalışma dışı olarak değerlendirilmesi, ile ilgili belgeler incelenerek bilgilendirilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	Gül Ergör
Prof.Dr.Nejat SARIOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	N. Sarioğlu
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	M. Refik Mas
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	M. Kıray
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	S. Özkardeşler
Prof.Dr.Süleyman SARIOĞLU	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	S. Sarioğlu
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	B. Kara
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	A. Abacı
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	M. Bektaş
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	Y. Soysal
Üzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	Katılmadı
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	M. Erhan Özkul

8.2 Özgeçmiş



NEVİN ERSOY

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	24958913922
Doğum Tarihi	18/09/1987
İletişim Adresi	120/1 SOK NO:1 D:1 EVKA-3 BORNova/İZMİR
Telefon	(232) 412 45 61
E-posta	nevinersoy@gmail.com
Web Adresi	

Öğrenim Bilgileri

01 Ocak 2014 - Şu Anda (6 yıl)	Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (DR)
01 Eylül 2011 - 10 Ocak 2014 (2 yıl 5 ay)	Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (YL) Tez Başlığı: Over Torsiyon/ Detorsiyonunda Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi Tez Konusu: İskemi-reperfüzyon modelinde ovaryum dokusuna mezenkimal kök hücrelerin etkisi araştırılmıştır. Tarih: 2014 Tez Danışmanı: HÜSNÜ ALPER BAĞRIYANIK
01 Eylül 2006 - 01 Haziran 2010 (3 yıl 10 ay)	Lisans, İkinci Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Yabancı Dil Bilgileri	İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

N. G. Y. ASLİER, A. A. TAGAÇ, S. M. DURANKAYA, M. CALIŞIR, N. ERSOY, G. KIRKIM, K. YURDAKOC, H. A. BAĞRIYANIK, O. YILMAZ, S. SUTAY & E. A. GÜNERİ, Dexamethasone-loaded chitosan-based genipin-cross-linked hydrogel for prevention of cisplatin induced ototoxicity in Guinea pig model, INTERNATIONAL

JOURNAL OF PEDIATRIC OTORHINOLARYNGOLOGY, 2019, 0165-5876, 122, 60-69.

B. ARIÖZ, B. TASTAN, E. TARAKÇIOĞLU, K. U. TUFEKÇİ, M. OLCUM, N. ERSOY, A. BAGRIYANIK, K. GENC & S. GENC, Melatonin Attenuates LPS-Induced Acute Depressive-Like Behaviors and Microglial NLRP3 Inflammasome Activation Through the SIRT1/Nrf2 Pathway, FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, 2019, 1664-3224, 10.

S. AKBARI, G. G. SEVİNC, N. ERSOY, O. BASAK, K. KAPLAN, K. SEVİNC, E. OZEL, B. SENGUN, E. ENUSTUN, B. OZCİMEN, A. BAGRIYANIK, N. ARSLAN, T. T. ONDER & E. ERDAL, Robust, Long-Term Culture of Endoderm-Derived Hepatic Organoids for Disease Modeling, STEM CELL REPORTS, 2019, 2213-6711, 13, 4, 627-641.

N. ERSOY, Two Layered Scaffolds (Loofah/PLLA/Cellulose/Chitin) for Repair of Osteochondral Defect, Journal of Tissue Science & Engineering, 2017, 2157-7552, 8, 3, 210.

I. A. CETİN, I. A. CETİN, B. M. ATASOY, B. M. ATASOY, S. CİLAKER, S. CİLAKER, L. Z. A. ALİCİKUS, L. Z. A. ALİCİKUS, M. KARAMAN, M. KARAMAN, N. ERSOY, N. ERSOY, A. N. DEMİRAL, A. N. DEMİRAL, O. YILMAZ & O. YILMAZ, A Diet Containing Beta-Hydroxy-Beta-Methylbutyrate, L-Glutamine and L-Arginine Ameliorates Chemoradiation-Induced Gastrointestinal Injury in Rats, RADIATION RESEARCH, 2015, 0033-7587, 184, 4, 411-421.

H. A. BAGRIYANIK, H. A. BAGRIYANIK, N. ERSOY, N. ERSOY, C. CETİNKAYA, C. CETİNKAYA, E. İKİZOĞLU, E. İKİZOĞLU, D. KUTRİ, D. KUTRİ, T. OZCANA, T. OZCANA, L. G. KAMANGA, L. G. KAMANGA, M. KIRAY & M. KIRAY, The effects of resveratrol on chronic constriction injury of sciatic nerve in rats, NEUROSCIENCE LETTERS, 2014, 0304-3940, 561, 123-127.

Bildiriler

N. ERSOY, S. AKBARI, E. KAHRAMAN, S. GÜVEN, C. A. YILDIRIM, Ş. E. ERDAL, BAGRIYANIK & H. A. BAGRIYANIK, İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre Kaynaklı Kornea Organoidleri, Sözlü Sunum, 3. Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, 12 Nisan 2019, 14 Nisan 2019.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), BURSİYER, İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (İPKH) Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: TÜBİTAK BİLİM KURULU (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

2135182, Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin (UPKH) Üretim ve Farklılaştırma Teknolojilerinin Geliştirilmesi ve Deneysel Hücre Tedavilerinde Uygulanması, 1003 - Öncelikli Alanlar (2. Aşama), Burslu, Sonuçlandı, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 01.12.2015 - 01.04.2018, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.10.2014 - 01.04.2018.
2175654, İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (İPKH) Kaynaklı Kornea Organoid Modellerinin Geliştirilmesi, 1001 - Araştırma, Burslu, Yürürlükte, ARDEB, SBAG - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu, Projeye Katılma/Ayrılma Tarihleri: 27.06.2018 - 01.06.2020, Proje Başlangıç/Bitiş Tarihleri: 01.06.2018 - 01.06.2020.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

Robust, Long-Term Culture of Endoderm-Derived Hepatic Organoids for Disease Modeling

Sohail Akbari,^{1,2,10} Gülben Gürhan Sevinç,^{3,10} Nevin Ersoy,⁴ Onur Basak,^{5,6} Kubra Kaplan,^{1,7} Kenan Sevinç,³ Erkin Ozel,³ Berke Sengün,³ Eray Enüstün,³ Burcu Özcimen,³ Alper Bağrıyanık,^{1,4,8} Nur Arslan,^{1,9} Tamer Tevfik Önder,^{3,11,*} and Esra Erdal^{1,2,11,*}

¹Imir Biomedicine and Genome Center, 35340 Imit, Turkey

²Department of Medical Biology and Genetics, Health Science Institute, Dokuz Eylül University, 35340 Imit, Turkey

³Faculty of Medicine, Koç University, 34450 Istanbul, Turkey

⁴Department of Histology and Embryology, Health Science Institute, Dokuz Eylül University, 35340 Imit, Turkey

⁵Halsbrocht Institute, University Medical Center Utrecht, 3584 CT Utrecht, the Netherlands

⁶Department of Translational Neuroscience, Brain Center Rudolf Magnus, University Medical Center Utrecht, 3584 CG Utrecht, the Netherlands

⁷Department of Genome Sciences and Molecular Biotechnology, Imit International Biomedicine and Genome Institute, Dokuz Eylül University, 35340 Imit, Turkey

⁸Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, 35340 Imit, Turkey

⁹Department of Pediatric Gastroenterology and Metabolism, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, 35340 Imit, Turkey

¹⁰Co-first author

¹¹Co-senior author

*Correspondence: t.onder@ku.edu.tr (T.T.O.), esra.erdal@deu.edu.tr (E.E.)

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.007>

SUMMARY

Organoid technologies have become a powerful emerging tool to model liver diseases, for drug screening, and for personalized treatments. These applications are, however, limited in their capacity to generate functional hepatocytes in a reproducible and efficient manner. Here, we generated and characterized the hepatic organoid (eHEPO) culture system using human induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived EpCAM-positive endodermal cells as an intermediate. eHEPOs can be produced within 2 weeks and expanded long term (>16 months) without any loss of differentiation capacity to mature hepatocytes. Starting from patient-specific iPSCs, we modeled cirrhosis type 1, a urea cycle disorder caused by mutations in the argininosuccinate synthetase (ASS1) enzyme. The disease-related ammonia accumulation phenotype in eHEPOs could be reversed by the overexpression of the wild-type ASS1 gene, which also indicated that this model is amenable to genetic manipulation. Thus, eHEPOs are excellent unlimited cell sources to generate functional hepatic organoids in a fast and efficient manner.

INTRODUCTION

Cellular therapies provide promising treatment options for liver pathologies ranging from cancer to genetic metabolic diseases. One of the main difficulties associated with cellular therapy approaches is the generation and expansion of mature autologous hepatocytes. While the ability to derive patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) have solved the problem of generating autologous cells, differentiation and expansion of mature patient-specific hepatocytes remain a challenge.

Hepatocyte-like cells can be derived from human iPSCs (hiPSCs) via their stepwise differentiation. Initial studies focused on developing differentiation protocols to achieve hepatocyte-like cells in standard two-dimensional (2D) conditions (Chen et al., 2012; Liu et al., 2011; Si-Tayeb et al., 2010). Such stepwise protocols utilize cocktails of growth factors/cytokines to recapitulate embryonic liver development *in vitro*, from definitive endoderm to hepatic progenitors and then to functional hepatocytes. However, the cell populations produced by these different protocols vary considerably in their maturation status and, in most cases, represent immature hepatocytes. This is in part due

to the absence of tissue-specific architecture, mechanical and biochemical cues, and cell-cell communication under 2D conditions (Luo et al., 2018; Pampaloni et al., 2007). To overcome these limitations, an alternative approach has been utilized to induce human iPSCs into hepatic endodermal cells and then mix them in a three-dimensional (3D) co-culture system with stromal cells to generate liver bud-like aggregates (Takebe et al., 2013, 2017). This liver bud-like structure is able to vascularize and perform hepatic functions after transplantation into mice. However, the long-term stability and expansion of such structures is currently unknown.

A 3D organoid culture system of adult hepatic stem/progenitor cells has been recently developed. These cultures are derived from Lgr5-positive cells sorted from injured murine liver and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)-positive ductal cells from intact human liver (Broutier et al., 2016; Huch and Dölle, 2016; Huch et al., 2013, 2015). During liver development and homeostasis, EpCAM has a dynamic expression pattern, and its expression in immature cells is gradually lost upon their maturation into hepatocytes (Schmelzer et al., 2007). EpCAM is expressed in mouse liver bud at embryonic day 9.5 (E9.5),





and EpCAM⁺Dlk1⁺ hepatoblasts with high proliferation potential have the capacity to differentiate into bile duct and hepatocytes (Tanaka et al., 2009). Additionally, in zebrafish only EpCAM⁺ endodermal cells are able to license hepatic development by sequestering Kremen1 on the cell membrane and allowing the formation of Lrp6 signalosomes to activate Wnt2bb target genes (Lu et al., 2013). Whether human EpCAM⁺ endodermal cells that arise during development can form liver organoids remains unknown.

Here, we report an hiPSC-derived hepatic organoid culture system for producing functional hepatocytes using EpCAM-positive endodermal cells as an intermediate. These endoderm-derived hepatic organoids (eHEPOs) could be produced within 14 days and expanded for more than 1 year without any loss in culture efficiency. Using eHEPOs, we modeled the urea cycle disorder citrullinemia, demonstrating the power of this system for disease modeling. Finally, we performed ectopic expression of wild-type allele of the disease-causing gene, *ASS1*, in eHEPOs, which rescued the phenotype of the disease and showed that eHEPOs are amenable to genetic manipulation.

RESULTS

Endodermal Progenitors Generated from hiPSCs

To test whether hepatic organoids can be generated from iPSCs, we first derived transgene-free iPSCs from a healthy donor via non-integrative episomal plasmid-based reprogramming of dermal fibroblasts (Fidan et al., 2015). Teratoma formation in immunocompromised mice confirmed the pluripotency of the iPSCs (Figure S1). iPSCs expanded in feeder-free culture were incubated with modified endodermal induction medium containing activin A, Wnt3a, and R-spo1 (Chen et al., 2012; Si-Tayeb et al., 2010). After 5 days, cells no longer exhibited typical embryonic stem cell morphology and adopted a polygonal shape (Figure 1A). Immunostaining revealed that almost all of the cells were positive for the endoderm markers SOX17, FOXA2, and EpCAM at day 5, indicating that the hiPSCs efficiently differentiated into definitive endoderm during the 2D monolayer endodermal induction period (Figure 1B). Additionally, the flow-cytometry analyses showed that only about 65% of populations are CXCR4⁺/EpCAM⁺ (Figure 1B) and approximately 75% of populations are FOXA2⁺/SOX17⁺ at day 5 (Figure S2). Notably, percentages of CXCR4⁺/EpCAM⁺ endodermal cells derived from three independent iPSC lines (WT1, WT2, and WT3) were not significantly different from each other after independent differentiations, which indicated the reproducibility of endodermal induction step of our protocol (Figure 1B). Notably, modification of the endoderm induction medium

by adding R-spondin1, a well-known Wnt signal potentiator (Carmon et al., 2011; de Lau et al., 2011; Planas-Paz et al., 2016), caused a 15%–20% increase in the number of EpCAM⁺ cells differentiated from three independent iPSC lines from healthy donors (Figure 1C). Moreover, there were no morphological changes among these EpCAM⁺ cell populations (Figure 1C). Thus, our modified protocol allows for efficient generation of endodermal progenitor populations.

Generation of Organoids from Endodermal EpCAM⁺ Cells

We inoculated fluorescence-activated cell sorting (FACS)-purified EpCAM⁺ or EpCAM[−] endodermal progenitors in the liver organoid expansion medium as defined in adult liver organoid cultures. As early as 1 week, EpCAM⁺ endodermal cells generated 3D hollow structures similar to the adult stem cell-derived liver organoids, while EpCAM[−] cells lacked this ability. When culturing EpCAM⁺-derived organoids, structures with round-shaped organoid morphology, approximately 100 nm in diameter with distinct edges, were observed (Figure 2A). Notably, organoid cultures could be passaged every 7–10 days at 1:5 ratio and could be expanded for >9 months without any loss of phenotypic characteristics and differentiation capacity at late passages (passage >30) (Figure 2A). To determine the stability of EpCAM⁺ endoderm cell-derived organoids cultured in expansion medium (EM) conditions, we analyzed the phenotypic characteristics for different markers (AFP⁺, HNF4α⁺, FOXA2⁺, EpCAM⁺, and CK19⁺) by flow cytometry at various time points (passages 6, 21, and 48). Percentages of subpopulations expressing EpCAM and FOXA2 (endoderm markers), α-fetoprotein (AFP) (fetal liver marker), and hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) (hepatic marker) did not change significantly at different passages including young and old organoids, while CK19 (hepatoblast/cholangiocyte marker) expression decreased in old organoids in EM conditions (Figure 2B). These findings supported that EM mostly maintains stable status of progenitor cells in organoid culture over the long term. Concerning structural organization, the organoids from early passage comprised CK19⁺ cells surrounding tightly self-organized ductal-like structures, indicating that cells with hepatoblast and/or bile duct progenitor characteristics persist in these structures. For the late-passage organoids, CK19⁺ cells are more likely distributed evenly throughout the organoid as well as ductal specific locations (Figure 2C). In addition, EpCAM⁺ cells were still present in the organoids both from early and late passages, showing the persistence of precursor cells of liver. Notably, HNF4α staining showed that organoids have already committed toward hepatic lineage both in whole-mount and frozen-section staining of early and late passages, respectively. Both early- and late-passage

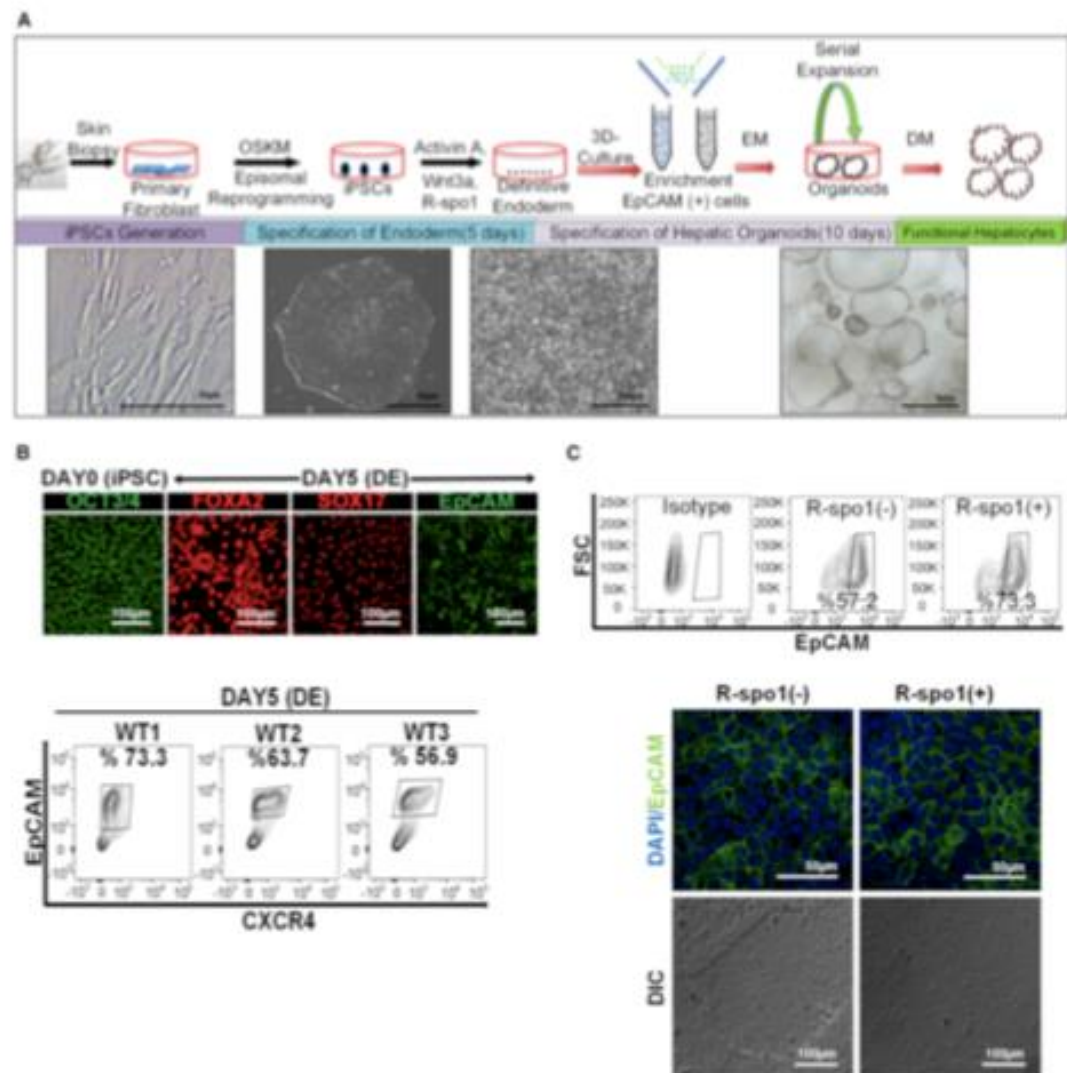
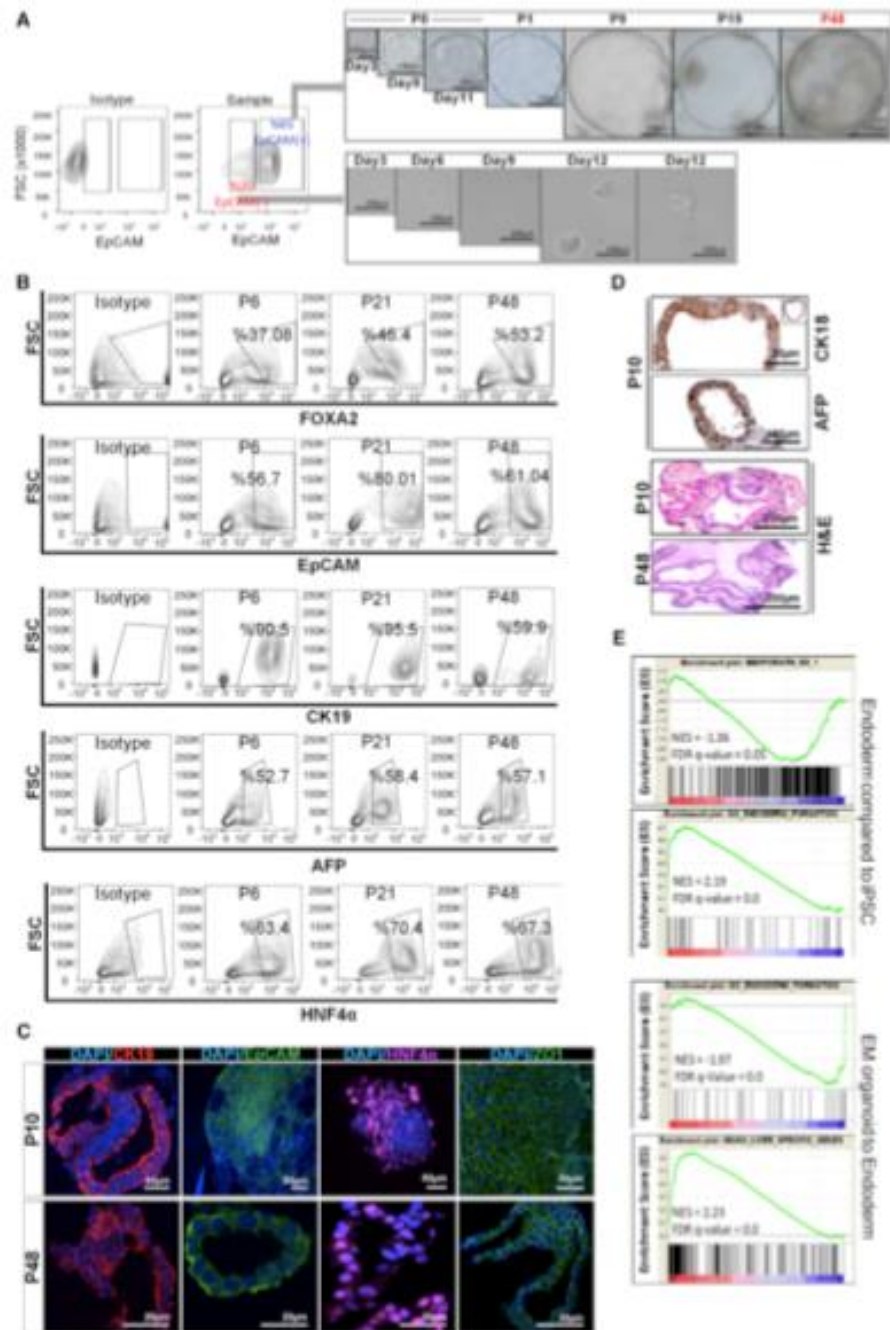


Figure 1. Generation of EpCAM⁺ Progenitors from hiPSCs as an Intermediate of Endoderm-Derived Hepatic Organoids

(A) Schematic representation and timeline of organoid culture establishment.

(B) Upper panel: expression of OCT3/4 (pluripotency marker), FOXA2, SOX17, and EpCAM (endoderm markers), in the different stages by immunostaining (20X magnification). Lower panel: flow-cytometric analysis of EpCAM and CXCR4 to assess the efficiency of endoderm generation at day 5. Three independent healthy iPSC lines (wild-type 1 [WT1], WT2, WT3) were tested for endoderm induction based on EpCAM and CXCR4 positivity ($n = 3$ for each experiment).

(C) Upper panel: representative flow-cytometric analysis with isotype control demonstrating the increase in EpCAM-expressing cell number with addition of R-spo1. Experiments were performed in triplicates for three different iPSC lines derived from healthy donors. Lower panel: effect of R-spo1 on the morphology of iPSC derived endodermal cells on 2D culture. DIC, differential interference contrast.



(legend on next page)



organoids have cubical/polyhedral epithelial cells expressing ZO-1 in a similar pattern, providing evidence for the presence of cell-cell interactions via tight junctions (Figure 2C). Of note, cell density of late-passage organoids was rather less than that of their young counterparts.

Further immunohistochemical analysis of organoids showed that CK18⁺ and AFP⁺ cells form pseudostratified epithelial structures as observed in epithelium development (Figure 2D). Hematoxylin-eosin staining showed that the typical structural organization including pseudostratified epithelial and ductal-like structure did not change in long-term organoids at passage 48 (Figure 2D).

To gain a global understanding of eHEPO differentiation, we performed RNA sequencing of iPSCs, endodermal progenitors, and organoids cultured in EM conditions and performed an unbiased characterization of their identity at whole-transcriptome level (see Experimental Procedures). Gene set enrichment analysis (GSEA) indicated that gene sets of gastrulation, endoderm formation, and endoderm development were highly enriched upon endoderm induction from iPSCs. Conversely, pluripotency-associated genes were downregulated at the same stage (Figure 2E). Upon EM induction, endoderm specific genes were downregulated and liver-specific gene sets were induced (Figure 2E). Taken together, these data indicate that this protocol faithfully simulates the stepwise developmental process of hepatic differentiation.

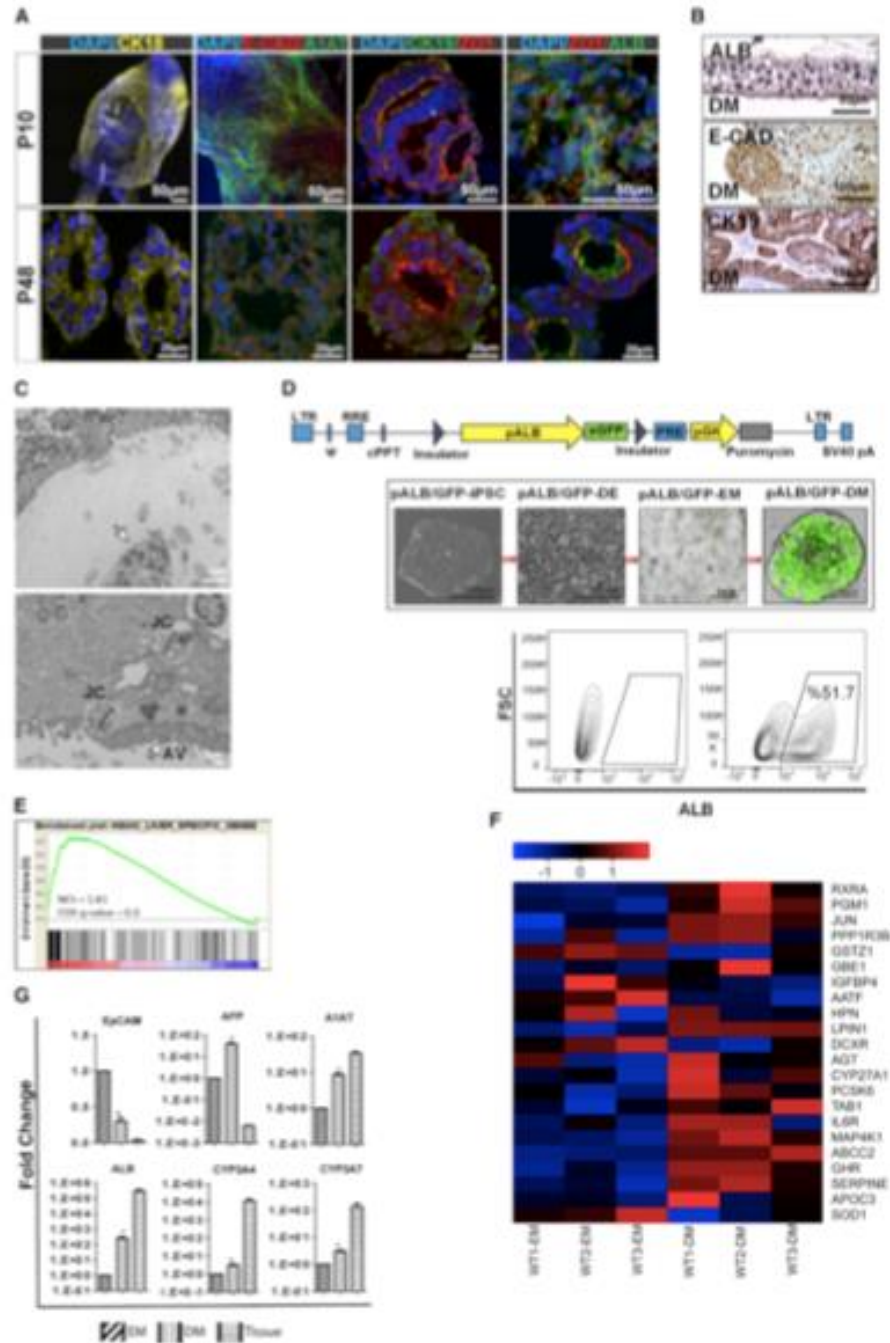
In Vitro Differentiation of Organoids into Mature Hepatocytes

To further the maturation of the emerging hepatic cells, we cultured organoids in differentiation medium (DM) for 10–14 days (Huch et al., 2015) and analyzed the expression of liver-specific genes and structural organization by immunostaining. Here, we performed immunostaining in both early-passage (p10) and late-passage (p48) organoids at DM conditions for CK18, ZO-1, E-CAD, CK19, ALB, and A1AT. All differentiated organoids are similarly composed of ALB⁺ and CK18⁺ hepatocytes with typical polar structure and ZO-1 expression, indicating the existence of tight junctions separating apical and basolateral domains. Besides, the E-CAD staining pattern indicates the liver epithelial

phenotype of organoids. ALB and A1AT staining provides evidence for hepatocyte maturation, still expressed even in late passages. Meanwhile, the presence of CK19⁺ cells, especially around lumen-like structures, suggests the existence of the cholangiocyte-like and/or progenitor cell population in differentiated organoids (Figure 3A). Further immunohistochemical analysis also revealed that organoids have both ALB⁺ and CK19⁺ cells, indicating mature hepatocytes and cholangiocytes in ductal-like structure, respectively. Also, E-CAD⁺ cells represented polygonal epithelioid structures reflecting a hepatocyte-like phenotype (Figure 3B). Ultrastructural analysis of organoids demonstrated the presence of a layer of live cells with apical and basolateral polarity and a luminal area containing the residual of apoptotic and multivesicular bodies (Figure 3C). Of note, the junctional complex between cells was defined by the characteristic of epithelial cells surrounding the lumen (Figure 3C). To further characterize the maturation of the iPSC eHEPOs, we developed an albumin-GFP reporter system. An albumin enhancer/promoter driving GFP expression was cloned into a lentiviral backbone between two flanking insulator elements and was integrated into hiPSCs, which enabled us to monitor real-time differentiation of iPSCs to mature hepatocytes in organoids. Organoids were established from reporter bearing iPSCs which, after 5 days in DM culture conditions, became GFP positive (Figure 3D). We also quantified a number of ALB⁺ cells within organoids from three independent differentiations starting from a single iPSC reporter line. There was no significant difference in the number of ALB⁺ cells (Figure 3D). For a detailed assessment of the differentiation status of organoids, we generated global expression profiles after DM induction. GSEA analysis showed that liver-specific genes were highly upregulated upon culture in DM conditions (normalized enrichment score [NES] 1.81, false discovery rate [FDR] q value = 0). This finding supports our hypothesis that liver-specific genes are further upregulated in DM conditions compared with EM conditions (Figure 3E). Most of the key enzymes and receptors involved in different aspects of liver function including glucose homeostasis (*DCXR*, *IGFBP4*, *PGMT*), lipid metabolism (*RXRA*, *GHR*, *SOD1*, *APOC3*, *APOB*, *APOA1*,

Figure 2. Establishment of Endoderm-Derived Hepatic Organoids

- (A) Organoid formation potency of sorted EpCAM⁺ and EpCAM[−] cells and bright-field images of organoid culture from various passages, where P indicates passage number.
(B) Phenotypic characterization of endoderm-derived WT organoid culture at different passage numbers (p6, p21, and p48) during expansion on EM.
(C) Confocal images of organoids for EpCAM, CK19, and HNF4α. Nuclei were co-stained with DAPI. In the dataset for p10 organoids, EpCAM \ HNF4α and ZO-1 were stained in the whole-mount organoids. The others were stained from frozen sections.
(D) Immunohistochemical staining of CK18 and AFP in organoids. H&E indicates hematoxylin-eosin staining.
(E) GSEA plots for differentially expressed genes during iPSC to endoderm induction and endoderm to organoid differentiation. NES and FDR q values are listed for each gene set analyzed.



(legend on next page)



LPIN1), and gluconeogenesis (*PPP1R3B*, *G6P1*) were induced upon DM culture (Figure 3F). qPCR validation of RNA-sequencing data confirmed the upregulation of mature hepatocyte markers such as *ALB*, *A1AT*, *CYP3A7*, and *CYP3A4* and downregulation of the endoderm stage marker *EpCAM*, albeit to a lower extent when compared with freshly harvested adult human liver tissue (Figure 3G).

In Vitro and In Vivo Functionality of eHEPOs

We showed that mature eHEPOs in DM from various passages secreted significant amounts of albumin to the medium, indicative of hepatocyte functionality. However, the secreted albumin level in DM conditions was gradually decreased depending on the age of organoid in the culture (Figure 4A). Upon differentiation, organoids also gained mature hepatocyte functions such as CYP3A4 activity, low-density lipoprotein (LDL) uptake, and glycogen storage (Figures 4B–4D). The late-passage eHEPOs (p48) still demonstrated liver functions such as LDL uptake and glycogen storage, similar to their early-passage counterparts (Figures 4C and 4D).

To test the ability of the human mature eHEPOs to engraft as functional hepatocytes *in vivo*, we first produced eHEPOs from healthy donor iPSCs stably transduced with a GFP expression vector. NSG mice then were treated with dimethylnitrosamine (DMN) for 14 days to induce acute liver damage. Finally, we injected 2 million eHEPO cells intrasplenically to the mice with damaged liver, whereby 32 days after transplantation, engraftment of human cells was demonstrated by immunostaining of GFP and human-specific albumin antibodies separately (Figures 4E and S3). Human ALB⁺ cells were located around the interlobular veins as well as throughout the parenchyma. These results indicate that the mature, functional hepatocytes from eHEPO cultures have the ability to engraft in the mouse liver.

Disease-Specific eHEPOs

We next investigated whether the eHEPO system can be utilized for disease modeling. To this end, we generated

iPSC lines from two patients who presented with neonatal hyperammonemia and were clinically diagnosed with classical citrullinemia type 1 (CTLN1). CTLN1 is an autosomal recessive urea cycle disorder caused by defects in the argininosuccinate synthetase (ASS1) enzyme due to mutations in the *ASS1* gene (Quinonez and Thoenen, 2016). An impairment of ASS1 function can lead to a wide spectrum of phenotypes, from life-threatening neonatal hyperammonemia to a later onset with mild symptoms. Patient-specific iPSCs were grown under feeder-free conditions and displayed typical PSC morphology (Figure 5A). PCR amplification and sequencing of all coding exons of *ASS1* indicated that both the patients' fibroblasts and iPSCs harbored homozygous G390R mutations in exon 15, which is one of the most common mutations in classical citrullinemia (Figures S4 and S5) (Kose et al., 2017; Quinonez and Thoenen, 2016). Established iPSC lines were devoid of episomal vector sequences as shown by genomic DNA PCR (Figure 5C). One iPSC clone from each patient was further analyzed by chromosomal G-banding and was confirmed to have a normal karyotype (Figure 5D). CTLN-iPSCs were positive for pluripotency markers OCT4, NANOG, and SSEA-4 by immunofluorescence (Figure 5E). RT-PCR analyses indicated a high expression of *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, and *LIN28* mRNA in patient-derived iPSCs, but not in the original dermal fibroblasts (Figure 5F). As expected, ASS1 protein expression was detected in the healthy donor-derived iPSCs but was undetectable in patient-specific iPSCs (Figure 5G). Finally, both of the CTLN-iPSC lines formed well-differentiated teratomas containing cells derived from all three germ layers (Figure 5H). Taken together, these data confirm the pluripotency of citrullinemia patient-derived iPSCs.

Following the protocol described above, we successfully generated CTLN organoids that could be passaged for more than 6 months in culture (Figure 6A). The comparison of CTLN and the wild-type organoids with respect to the internal structural organization revealed that both have

Figure 3. In Vitro Differentiation of Endoderm-Derived Hepatic Organoids into Mature Hepatocytes

(A) Confocal images of organoids cultured for 10–14 days in DM conditions stained for CK18, E-cadherin, A1AT, ZO1, and ALB. Nuclei were stained with DAPI. In the dataset for p10 organoids, CK18, E-CAD/A1AT, and ZO-1/ALB were stained in the whole-mount organoids. The others were stained from frozen sections.

(B) Immunohistochemical staining of organoids for ALB, CK19, and E-cadherin.

(C) Transmission electron microscopy image of an endoderm-derived hepatic organoid (eHEPO). Arrow shows apoptotic and multivesicular bodies (upper panel). White circles and arrow indicate intercellular junctional complexes (JC) and apical villus (AV), respectively (lower panel).

(D) Lentiviral albumin promoter-GFP reporter to monitor albumin expression in organoids. Representative bright-field and fluorescence microscopy images of pALB-GFP reporter-bearing iPSCs at the indicated stages of differentiation. Flow-cytometry analysis to quantify ALB⁺ cells within organoid.

(E) GSEA analysis of differentially regulated genes in DM versus EM conditions. NES and FDR q value are listed for the liver-specific geneset analyzed.

(F) Heatmap showing the expression of EM- and DM-related genes.

(G) qPCR-based mRNA expression analysis of indicated genes in EM and DM organoids as well as human liver tissue. Fold changes were calculated as DM/EM and/or tissue/EM ($n = 4$ for each of three separate differentiation) (* $p \leq 0.05$).

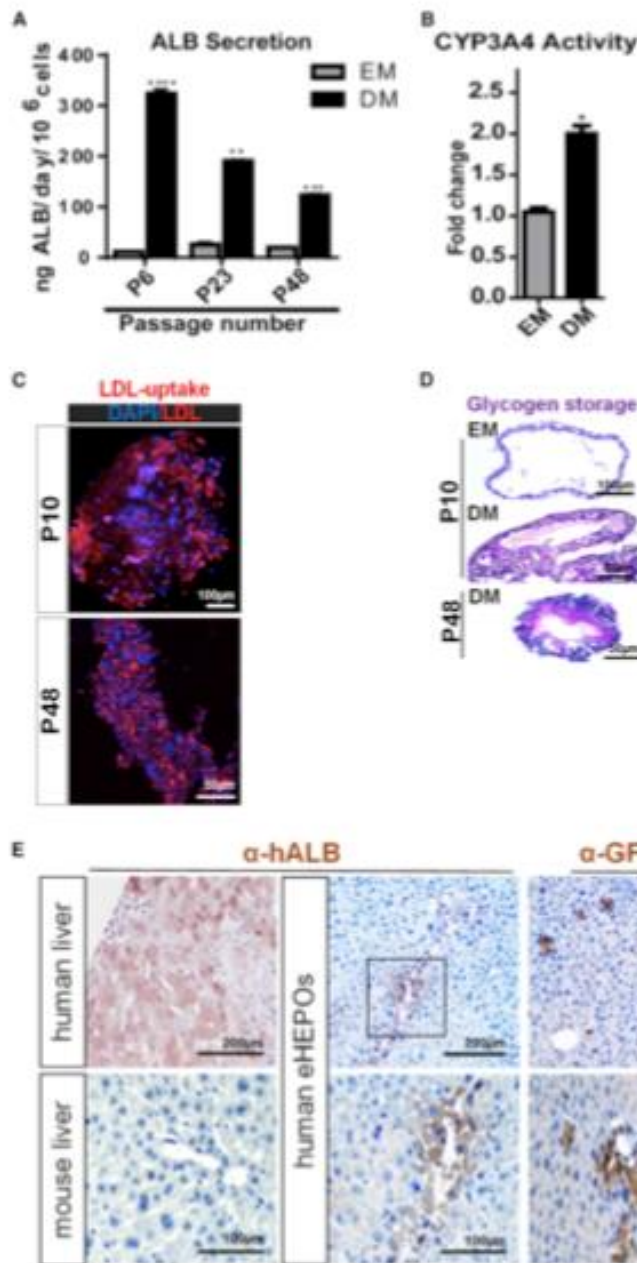


Figure 4. In Vitro and In Vivo Functionality of Endoderm-Derived Hepatic Organoids

(A) Albumin secretion of the WT organoids from different passage numbers (p6, p23, p48) cultured in EM and DM conditions as measured by ELISA. Data are shown as mean $\pm$ SD of $n = 3$, given as ngALB/day/million cells.

(B) CYP3A4 activity in organoids cultured in EM and DM conditions expressed as RLU/mL/million cells.

(C) Uptake of low-density lipoprotein (LDL) detected on day 14 by immunofluorescence staining in WT DM organoids from p10 and p48.

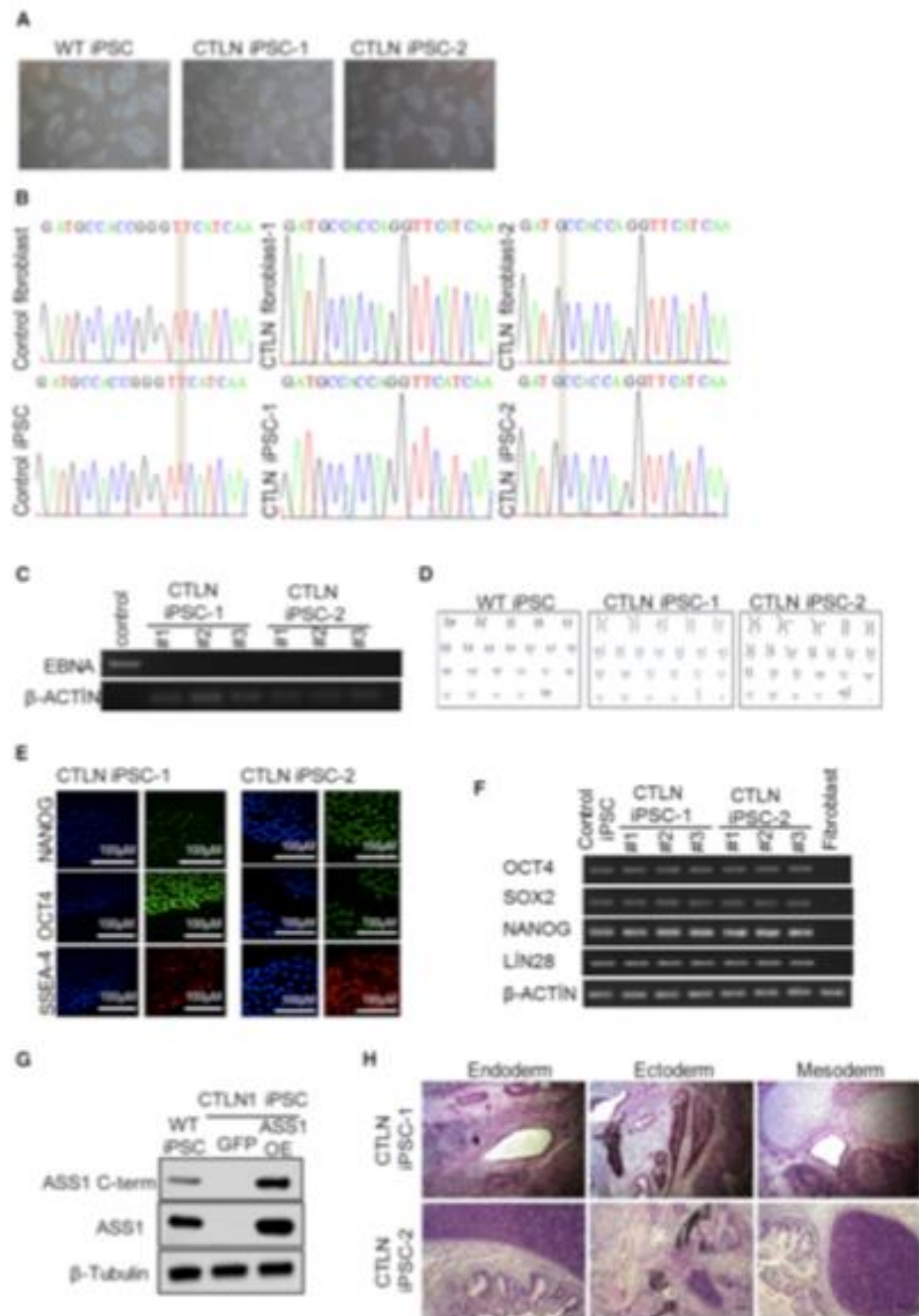
(D) Glycogen storage function of WT DM organoids from p10 and p48 by periodic-acid-Schiff (PAS) staining (magenta). EM condition was used as undifferentiated control.

(E) Immunohistochemistry with anti-GFP and anti-human albumin antibodies in DMN-treated NSG mouse liver sections transplanted with mature eHEPOs. The presence of GFP⁺ and human ALB⁺ cells demonstrates engraftment of hepatocytes into mouse liver.

Error bars in (A) and (B) denote $\pm$ SD of three independent experiments (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

similar structure resembling typically spherical shape(s) containing a series of lumen structures (Figure S5A). They have single-layer and/or pseudostratified epithelium as

well as CK19⁺ cells lining mainly lumens (Figure S5B). To analyze the impact of ASS1 mutations in eHEPOs, we cloned full-length ASS1 cDNA into a GFP-containing lentiviral



(legend on next page)



vector and transduced it to patient-derived iPSCs. In parallel, patient-derived iPSCs were transduced by an empty GFP vector to produce CTLN-GFP organoids as control. For phenotypic characterizations of eHEPO clones, immunofluorescence staining of HNF4 α , ZO-1, ALB, CK18, and CK19 demonstrated a similar pattern/structure between healthy donor-derived organoids and CTLN organoids (Figure 6B).

To understand hepatic maturation efficiency of CTLN-GFP and CTLN-ASS1-O/E organoids, we tested liver functions defined for wild-type organoids (from healthy donors). For both eHEPO clones, DM-mediated maturation induced a significant increase in albumin secretion, and albumin levels were comparable with each other (Figure 6C). Furthermore, CTLN-GFP and CTLN-ASS1-O/E eHEPOs had capacity for LDL uptake and glycogen storage in DM conditions (Figure 6D).

RNA sequencing of patient-derived cultures and k-means clustering of Pearson correlation of whole transcriptomes showed clear separation of organoids from less differentiated cell types (Figure 6E). While iPSCs and endodermal cells were similar in molecular identity, they still clustered separately, indicating proper discrimination of cell types (Figure 6E). Most importantly, patient-derived cells were almost indistinguishable from their healthy counterparts. DM cultures of healthy and CTLN patient-derived organoids were almost identical (two genes with FDR < 0.01), indicating that CTLN disease-specific mutation does not affect the differentiation capacity of patient-derived cells.

In patients, ASS1 mutation causes accumulation of ammonia and decreases ureagenesis. We next examined these phenotypes in patient-derived eHEPOs and asked whether the re-expression of wild-type ASS1 can rescue disease-related phenotypes in our hepatic organoid model. The healthy donor-derived organoids had significantly less ammonia compared with CTLN patient organoids while re-expression of wild-type ASS1 in CTLN organoids rescued this defect (Figure 6F). In parallel, we also measured urea levels in media and observed that CTLN1-GFP organoids had lower levels of ureagenesis compared with healthy organoids and, importantly, ASS1 overexpression partially rescued this phenotype (Figure S6). Taken together, these

data indicate that hepatic organoids can faithfully recapitulate the urea cycle-related disease phenotype, and restoration of gene function can be carried out in the eHEPO model.

DISCUSSION

Hepatocyte-like cells differentiated from iPSCs have been used to model several liver-related diseases, including α 1-antitrypsin deficiency, citrin deficiency, and CTLN1, highlighting the pathophysiology to pursue new medical strategies (Kim et al., 2016; Yoshitoshi-Uebayashi et al., 2017; Yusa et al., 2011). Although these models represent the phenotype of disease in a dish, the major limitation is the lack of protocols that produce fully functional mature hepatocytes (Baxter et al., 2015; Gieseck et al., 2014; Godoy et al., 2015). Additionally, to our knowledge long-term expansion/maintenance of these cells without losing function is very limited, and freeze/thawing of these cells in 2D culture is another major challenge in the field.

The 3D cell-culture models have recently become important for hepatic functional studies because they often induce levels of cell differentiation and tissue organization with proper cell-cell contact not observed in conventional 2D culture systems (Duval et al., 2017; Pampaloni et al., 2007). Studies have shown that the gene expression profiles (Godoy et al., 2015) as well as the responses to drug toxicity (Takayama et al., 2013) in the multicellular spheroid 3D models resemble more closely the *in vivo* situation.

The recent availability of stem cell-derived organoid systems to provide 3D self-organized tissue models provides a compelling new class of biological model to serve as both tissue and organ proxies (Lancaster and Knoblich, 2014). Organoids recapitulate a large number of biological parameters including the spatial organization of heterogeneous tissue-specific cells, cell-cell interactions, cell-matrix interactions, and certain physiological functions generated by tissue-specific cells within the organoid. Researchers are toiling to refine organoid culture systems to make them more complex, more mature, and more reproducible.

Figure 5. Derivation and Characterization of Citrullinemia-Specific iPSCs

- (A) Morphology of WT iPSC, CTLN iPSC-1, and CTLN iPSC-2.
- (B) Sequence analysis of ASS1 exon15 mutations in healthy and patient-derived fibroblasts and the iPSCs.
- (C) PCR-based integration analysis of the episomal reprogramming vectors.
- (D) Karyotype analysis of WT iPSC, CTLN iPSC-1, and CTLN iPSC-2.
- (E) Immunofluorescence images of iPSCs stained for NANOG, OCT4, and SSEA-4. Cell nuclei were counterstained with Hoechst. Scale bars, 100 μ m.
- (F) mRNA expression levels of pluripotency-related genes.
- (G) Western blot for ASS1 using two independent antibodies in WT iPSCs, CTLN1 iPSC-overexpressing GFP, or ASS1 cDNA (OE).
- (H) Teratoma formation of CTLN iPSC-1 and CTLN iPSC-2 in SCID mice. Scale bars, 100 μ m.

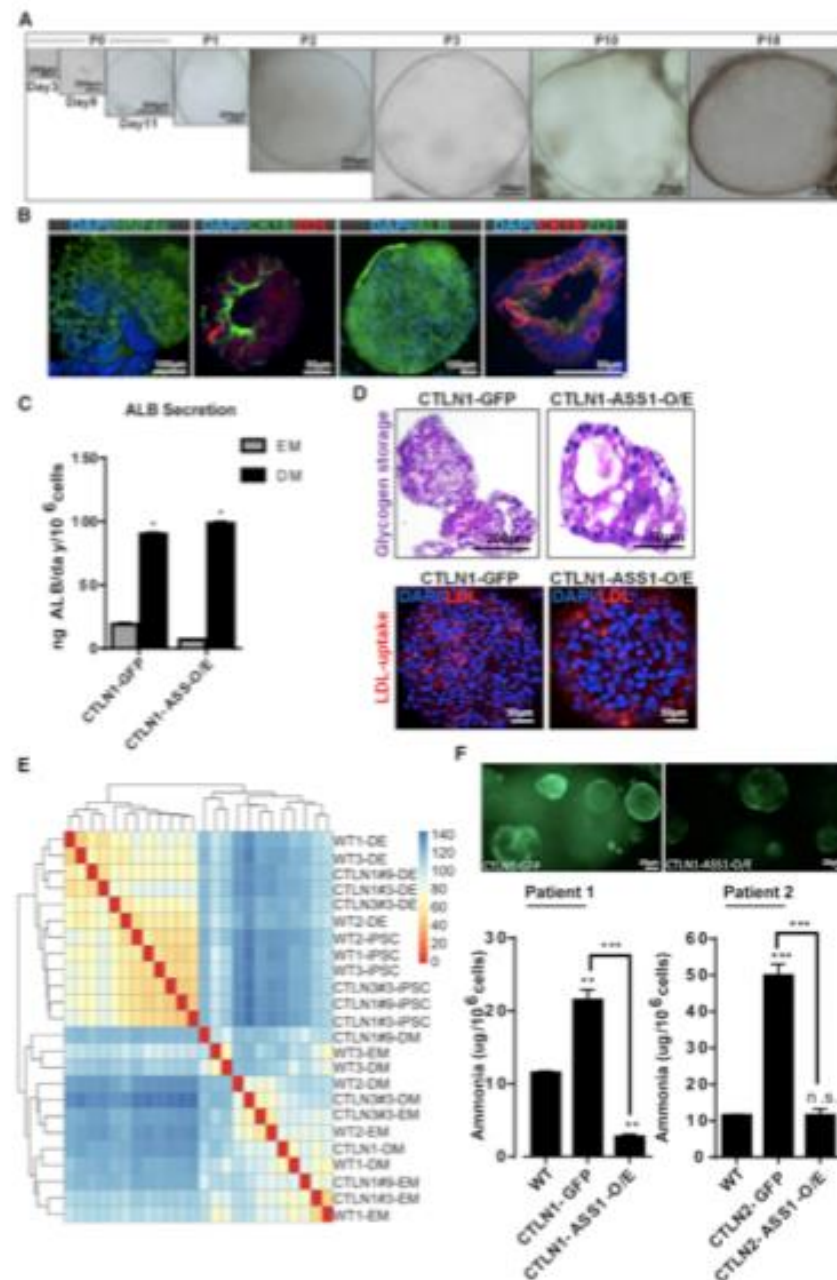


Figure 6. Endoderm-Derived Hepatic Organoids for Modeling Citrullinemia

(A) Bright-field image of citrullinemia patient-derived hepatic organoid cultures.

(B) Confocal images of CTLN organoids stained for HNF4α, CK18, ZO-1, CK19, and ALB. Nuclei were stained with DAPI. In the dataset for CTLN organoids, HNF4α and ALB were stained in the whole-mount organoids. The others were stained from frozen sections.

(legend continued on next page)



Here, we developed a novel hiPSC-derived 3D organoid culture system for producing functional hepatocytes using EpCAM⁺ endodermal cells as an intermediate. EpCAM has been identified as a surface marker on human hepatic stem/progenitor cells (Dollé et al., 2014; Schmelzer et al., 2006; Yoon et al., 2011), and freshly isolated EpCAM⁺ cells from either fetal or postnatal livers have been shown to be expandable in culture and have the ability to form human liver tissue after transplantation into livers of NOD/SCID mice (Schmelzer et al., 2007). Moreover, endoderm-specific EpCAM is a key regulator of licensing hepatic commitment in zebrafish embryos (Lu et al., 2013). EpCAM⁺ liver stem cells isolated from adult liver can be expanded in long-term organoid culture in a genome-stable manner. Based on these findings, we hypothesized that freshly isolated EpCAM⁺ progenitor cells from iPSC-derived endoderm may be used as cell sources to generate hepatic organoids in a more simple and reproducible manner, yielding more mature cell types. To test this, we sorted EpCAM⁺ cells after endoderm induction from iPSCs and used them to make 3D organoids. At the initial step of our protocol, we added R-spo1 as a secreted Wnt pathway agonist to the endoderm induction culture consisting of activin A and Wnt3a to obtain increased numbers of EpCAM⁺ cells. We showed that only freshly isolated EpCAM⁺ endodermal cells can readily make 3D organoids within 8–10 days in EM culture conditions while their EpCAM[−] counterparts cannot do so. Of note, these eHEPOs have been expanded over a longer term in culture (up to passage 48) and still produced albumin after differentiation by Huch's DM. Notably, we showed that organoids that originated from endoderm could be produced in Huch's medium, which was originally defined only for organoids derived from adult stem cells. We also transplanted eHEPOs into NSG mice and showed human-specific ALB⁺ hepatocytes embedded in mouse liver. Finally, we used this technology to model liver metabolic disease—citrullinemia—and showed the pathophysiological phenotype of disease as evidenced by a decrease in ammonia detoxification capacity. The rescue of disease phenotype via overexpression of the wild type of the *ASS1* gene also demonstrates the potential of eHEPOs in the treatment of disease via genetic manipulation.

Recently, Guan et al. developed a model system whereby iPSC lines differentiate into 3D human hepatic organoids, and introduced certain known mutations to model genetic diseases such as Alagille syndrome and tetralogy of Fallot (Guan et al., 2017). In this model, iPSCs were first differentiated to hepatoblasts by a modified Hannan 2D hepatocyte differentiation protocol for 9 days. Cells were then cultured in suspension for an additional 12 days until large and complex structures with limited oxygen and nutrient availability in their centers formed. Since these hepatic organoid (HO1) structures were not suitable for further differentiation, single-cell dissociation was obligatory in this protocol. The dissociated cells could be grown further and differentiated toward hepatic organoids (HO2) for an additional 30 days while maintaining their ability to form organoids with luminal structures over a 4-month period. In our protocol, eHEPOs expressed CK18 (hepatocyte-like cell marker) and CK19 (bile duct-like cell) as well as bipotent markers such as AFP and HNF4α at an early time point starting at day 10. However, in Guan's protocol, only parenchymal type HO1, the minor type, expressed mature hepatocyte markers such as A1AT and albumin after day 50. eHEPOs offer the possibility to obtain more clonal parenchymal types from hepatic organoids in an efficient way. In addition, the long duration of organoid formation from earlier 3D models may render them inconvenient in comparison with our robust eHEPO model to procure functional hepatocytes from hiPSCs. Furthermore, our extensive transcriptomic analyses further validate the fidelity of differentiation from eHEPOs at various steps. We anticipate that generation of eHEPOs from a diverse set of genetic metabolic and chronic diseases will significantly accelerate the development of new therapeutic strategies against such diseases.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Derivation of Human Fibroblasts and iPSC Generation

After informed consent was obtained from citrullinemia patients and healthy donors, skin-punch biopsies were taken according to a protocol approved by the relevant Institutional Review Boards of Dokuz Eylül University and Koç University. Human primary fibroblast cultures and iPSCs were generated and characterized as described in [Supplemental Information](#).

(C) *In vitro* functionality of CTLN-GFP and CTLN-ASS-Q/E organoids. Albumin secretion of CTLN1-GFP and CTLN1-ASS-Q/E organoids at p10 cultured in EM and DM conditions measured by ELISA. Error bars denote $\pm$ SD of three independent experiments.

(D) Glycogen storage function of CTLN1-GFP and CTLN1-ASS-Q/E organoids at p10 in DM condition by PAS staining. LDL uptake of CTLN1-GFP and CTLN1-ASS-Q/E organoids at p10 in DM condition.

(E) Cluster heatmap of WT and CTLN-iPSCs endoderm and organoids.

(F) Ammonia detoxification capacity of healthy donor (WT indicates organoids with wild-type *ASS1* gene) and patient-derived mature eHEPOs expressing either GFP (control) or *ASS1-Q/E* as determined by ammonia elimination assay. Data are shown as $\pm$ SD of three independent experiments in two different patient-derived eHEPOs given as μ g/day/million cells (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).



Mutation Analysis of iPSCs

The CTLN1 patients whose fibroblasts were reprogrammed carry homozygous ASS-p-G390R (c.1168G>A) mutations in the *ASS1* gene. Genomic DNAs were amplified by PCR using the following primers: Exon15-Fwd, CAG TCC TCC CTT CAA GCA GA; Exon15-Rev, GCA GTC AAG GTC GCATCAAA. Sanger sequencing was performed, which confirmed the presence of homozygous single-nucleotide mutation that leads to ASS-p-G390R (c.1168G>A).

In Vitro Differentiation of Human iPSCs into Definitive Endoderm

When iPSCs had attained a confluence of 70%, the mouse embryonic fibroblast-conditioned medium was replaced with Roswell Park Memorial Institute/B27 with 100 ng/mL activin A (Pepro-Tech), 50 ng/mL Wnt3a (R&D Systems), and 5 ng/mL R-spo1 (R&D Systems) for 5 days.

Organoid Culture of EpCAM⁺ Hepatic Progenitors

After 4 days of 2D monolayer induction of definitive endoderm, cells were harvested and trypsinized by TrypLE (Gibco) for 3–4 min at 37°C. The dissociated cells were washed with PBS and stained with anti-human CD326 (EpCAM) (Milteny) antibody and sorted on a BD FACSARIA III sorter. EpCAM⁺ cells were mixed with Matrigel (BD Biosciences) and seeded onto 24-well plates at ratios of 3,000, 5,000, or 10,000 cells per well. Non-attachment plates were used in all procedures (Sarstedt). After Matrigel had solidified, culture medium was added. Culture medium termed EM comprised AdDMEM/F12 (Invitrogen) supplemented with 1% B27 (Gibco), 1.25 mM N-acetylcysteine (Sigma), 10 nM gastrin (Sigma), and the growth factors: 50 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (Pepro-Tech), 10% R-spo1 conditioned medium (home-made), 100 ng/mL fibroblast growth factor 10 (FGF10) (Pepro-Tech), 25 ng/mL hepatocyte growth factor (HGF) (Pepro-Tech), 10 mM nicotinamide (Sigma), 5 μ M A83.01 (Tocris), and 10 μ M forskolin (Tocris). Only for the first 3 days, the medium was supplemented with 5% Noggin and 30% Wnt conditioned medium (both prepared as described by Barker et al., 2010), and 10 μ M Y27632 (Sigma-Aldrich). After 10–11 days, organoids were removed from the Matrigel and mechanically dissociated into small fragments before transferring to fresh Matrigel-containing dishes. In each passage, split ratio was 1:4 to 1:8, which was performed in once every 7–10 days for 9–12 months.

Hepatocyte Differentiation and In Vitro Functional Studies

To induce differentiation, we cultured organoids for 3–5 days with EM in fresh Matrigel as described above, supplemented with bone morphogenetic protein 7 (BMP7) (25 ng/mL). Medium was then replaced with DM, which comprised AdDMEM/F12 medium supplemented with 1% B27 and containing EGF (50 ng/mL), gastrin (10 nM, Sigma), HGF (25 ng/mL), FGF19 (100 ng/mL), A8301 (500 nM), DAPT (10 μ M), BMP7 (25 ng/mL), and dexamethasone (30 μ M). This medium was refreshed every 3 days for 10 days.

Transplantation

Immunodeficient NSG mice (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME,

USA). Animals were housed and maintained under specific pathogen-free conditions in accordance with institutional guidelines under approved protocols in IBG-Vivarium Mouse Facility.

Six- to 8-week-old NSG mice received DMN (7.5 mg/kg, Sigma; 1.0% dissolved in saline, intraperitoneally) for 3 consecutive days per week for 2 weeks. After a 2-week treatment, 1 day after the final DMN injection the mice were anesthetized (ketamine 100 mg/kg, xylazine 8 mg/kg), and 2×10^6 iPSC-derived organoid cells transduced by a GFP-containing vector in 30 μ L of cell suspension were transplanted intrasplenically to DMN-treated mice. Mice were sacrificed, and liver samples were obtained 10 days and 32 days after transplantation.

Messenger RNA Sequencing

Messenger RNA sequencing was performed using the CELSeq2 method (Basak et al., 2017; Hashimshony et al., 2016). In brief, total RNA was extracted with an RNeasy mini kit (Qiagen). Ten nanograms of total RNA per sample was precipitated with 2 μ g of GlycoBlue (Ambion) overnight at –80°C. The pellet was dissolved in 4-UMI barcode containing primers and incubated at 70°C for 2 min. Deoxynucleotide triphosphates (Promega) were added and the mRNA was reverse transcribed using the SuperScript II reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific). The second strand was synthesized using the DNA ligase I (Thermo Fisher Scientific). Samples were pooled for *in vitro* transcription through the T7 binding sequence (Ambion Megascript kit). Amplified RNA was converted to cDNA using the SuperScript II reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific). DNA libraries were generated using Pfuusion Polymerase (NEB) and the Illumina TruSeq small adapter primers (Hashimshony et al., 2016). Ampure XP beads (Beckman Coulter) were used for nucleic acid clean-up of double stranded DNA, amplified RNA, and the final DNA library. Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq4000 using 150-bp paired-end sequencing at GenomeScan. All the samples were sequenced in a single run to an average depth of ~10 million reads per sample. Reads were mapped to the latest human coding transcriptome and normalized as described elsewhere (Basak et al., 2017). The data were processed using the DESeq2 package (Love et al., 2014). For heatmaps, the values of the variance stabilizing transformation of the data are displayed (see DESeq2 manual). For the cluster heatmap, k-means clustering of the Pearson correlation of the whole transcriptome of the samples is displayed.

For additional and detailed experimental information about *in vitro* functional assays (periodic acid-Schiff staining, LDL uptake, measurement of CYP3A4 activity, RNA isolation and real-time PCR, ammonia elimination, determination of albumin secretion, immunostaining, transmission electron microscopy, and flow cytometry analysis), please refer to Supplemental Information.

Data Analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). Differences between groups were considered significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, and *** $p < 0.0001$.

ACCESSION NUMBERS

The datasets generated in the current study are available in the GEO repository, accession number GEO: GSE120145.



SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.007>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E. Erdal, T.T.O., and S.A. conceived the presented idea, and designed and analyzed experiments. G.G.S. performed the experiments for the production and characterization of iPSCs. B.S. and B.O. assisted in iPSC experiments. S.A. designed and performed all experiments related to 3D liver organoid culture and disease modeling including FACS, immunostaining, confocal imaging, and *in vitro* assays. A.B. and N.E. performed organoid transplantation in the DMN induced animal model and all *in vivo* assays. S.A. and K.K. performed *in vitro* functional assays and analyzed the data. E. Enustan prepared the ALB promoter GFP reporter plasmid. S.A., K.K., and N.E. also performed all revision experiments. E.O. prepared the AS1 lentiviral expression vector. S.A., T.T.O., and E. Erdal together with O.B. designed RNA-sequencing experiments. O.B. supervised next-generation sequencing. S.A. prepared RNAs. O.B. and K.S. performed bioinformatics analyses. N.A. provided human donor biopsies and patient material. S.A. cultured biopsy material and performed primary fibroblast culture. S.A. and K.K. performed patient phenotype rescue assays. G.G.S., S.A., and T.T.O. prepared all figures. E. Erdal, T.T.O., S.A., G.G.S., and O.B. wrote the paper. All authors commented on the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank to Prof. Dr. Hans Clevers (Hubrecht Institute/KNAW, Utrecht, the Netherlands) for hosting S.A. in the Hubrecht Institute (Utrecht, the Netherlands) and for the kind gift of L-Wnt3a and Noggin cell lines. We are also immensely grateful to the members of Clevers Lab for sharing their experience about organoid culture. Finally, we would gratefully like to thank Melek Ucuca and Muge Ozkan for their help in interpreting the imaging and flow-cytometry data, respectively. This research was supported by TUBITAK (The Scientific and Technological Research Council of Turkey) via projects SBAG-1155465 and SBAG-2135182 and by an EMBO installation grant no. 2543 (T.T.O.). K.S. was supported by a TUBITAK BİDEB Scholarship. The authors gratefully acknowledge use of the services and facilities of the Koç University Research Center for Translational Medicine (KUTTAM) and of the Izmir Biomedicine and Genome Center, both funded by the Republic of Turkey Ministry of Development. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the Ministry of Development.

Received: December 3, 2018

Revised: August 10, 2019

Accepted: August 16, 2019

Published: September 12, 2019

REFERENCES

Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J.H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., and van den Born, M. (2010). Lgr5⁺ stem cells drive self-renewal in the

stomach and build long-lived gastric units *in vitro*. *Cell Stem Cell* 6, 25–36.

Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., van Oudenaarden, A., and Clevers, H. (2017). Induced quiescence of Lgr5⁺ stem cells in intestinal organoids enables differentiation of hormone-producing enteroendocrine cells. *Cell Stem Cell* 20, 177–190.e4.

Baxter, M., Withey, S., Harrison, S., Segeritz, C.-P., Zhang, F., Atkinson-Dell, R., Rowe, C., Gerrard, D.T., Sison-Young, R., and Jenkins, R. (2015). Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J. Hepatol.* 62, 581–589.

Broutier, L., Andersson-Rolf, A., Hindley, C.J., Boj, S.F., Clevers, H., Koo, B.K., and Huch, M. (2016). Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nat. Protoc.* 11, 1724–1743.

Cannon, K.S., Gong, X., Lin, Q., Thomas, A., and Liu, Q. (2011). R-spondin function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/β-catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 11452–11457.

Chen, Y.F., Tseng, C.Y., Wang, H.W., Kuo, H.C., Yang, V.W., and Lee, O.K. (2012). Rapid generation of mature hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells by an efficient three-step protocol. *Hepatology* 55, 1193–1203.

de Lau, W., Barker, N., Low, T.Y., Koo, B.K., Li, V.S., Teunissen, H., Kujala, P., Haeghebarth, A., Peters, P.J., and van de Wetering, M. (2011). Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* 476, 293.

Dollé, L., Theise, N.D., Schmelzer, E., Boulter, L., Gires, O., and van Grunsven, L.A. (2014). EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 308, G233–G250.

Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A.F., Fredberg, J., and Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology* 32, 266–277.

Fidan, K., Kavaklıoğlu, G., Brahami, A., Özlü, C., Ay, N.Z., Ruacan, A., Gül, A., and Onder, T.T. (2015). Generation of integration-free induced pluripotent stem cells from a patient with Familial Mediterranean Fever (FMF). *Stem Cell Res.* 15, 694–696.

Gieseck, R.L., III, Hannan, N.R., Bort, R., Hanley, N.A., Drake, R.A., Cameron, G.W., Wynn, T.A., and Valier, L. (2014). Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture. *PLoS One* 9, e86372.

Godoy, P., Schmidt-Heck, W., Natarajan, K., Lucendo-Villarin, B., Szkolnicka, D., Asplund, A., Björquist, P., Widera, A., Stöber, R., and Campos, G. (2015). Gene networks and transcription factor motifs defining the differentiation of stem cells into hepatocyte-like cells. *J. Hepatol.* 63, 934–942.

Guan, Y., Xu, D., Garfin, P.M., Ehmer, U., Hurwitz, M., Enns, G., Michie, S., Wu, M., Zheng, M., and Nishimura, T. (2017). Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. *JCI Insight* 7, e94954.

Hashimshony, T., Senderovich, N., Avital, G., Klochendler, A., de Leeuw, Y., Anavy, L., Gennert, D., Li, S., Livak, K.J., Rozenblatt-Rosen, O., et al. (2016). CEL-Seq2: sensitive highly-multiplexed single-cell RNA-Seq. *Genome Biol.* 17, 77.



- Huch, M., and Dorrell, L. (2016). The plastic cellular states of liver cells: are EpCAM and Lgr5 fit for purpose? *Hepatology* 64, 652–662.
- Huch, M., Dorrell, C., Boj, S.F., van Es, J.H., Li, V.S., van de Wetering, M., Sato, T., Hamer, K., Sasaki, N., Finegold, M.J., et al. (2013). *In vitro* expansion of single Lgr5⁺ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature* 494, 247–250.
- Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Versteegen, M.M., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S.A., de Lagt, J., et al. (2015). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell* 160, 299–312.
- Kim, Y., Choi, J.-Y., Lee, S.-H., Lee, B.-H., Yoo, H.-W., and Han, Y.-M. (2016). Malfunction in mitochondrial β -oxidation contributes to lipid accumulation in hepatocyte-like cells derived from citrin deficiency-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 25, 636–647.
- Kose, E., Unal, O., Bulbul, S., Gunduz, M., Haberle, J., and Arslan, N. (2017). Identification of three novel mutations in fourteen patients with citrullinemia type 1. *Clin. Biochem.* 50, 686–689.
- Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345, 1247125.
- Liu, H., Kim, Y., Sharik, S., Marchionni, L., and Jang, Y.-Y. (2011). *In vivo* liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci. Transl. Med.* 3, 82ra39.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Lu, H., Ma, J., Yang, Y., Shi, W., and Luo, L. (2013). EpCAM is an endoderm-specific Wnt derepressor that licenses hepatic development. *Dev. Cell* 24, 543–553.
- Luo, Y., Lou, C., Zhang, S., Zhu, Z., Xing, Q., Wang, P., Liu, T., Liu, H., Li, C., and Shi, W. (2018). Three-dimensional hydrogel culture conditions promote the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocytes. *Cytotherapy* 20, 95–107.
- Pampaloni, F., Reynaud, E.G., and Stelzer, E.H. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 839.
- Planas-Paz, L., Orsini, V., Boulter, L., Calabrese, D., Pákolet, M., Nigsch, F., Xie, Y., Roma, G., Donovan, A., and Marti, P. (2016). The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat. Cell Biol.* 18, 467.
- Quinones, S.C., and Thoenes, J.G. (2016). Citrullinemia type 1. In *GeneReviews*® [Internet], M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (University of Washington), pp. 1993–2018.
- Schmelzer, E., Wauthier, E., and Reid, L.M. (2006). The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 24, 1852–1858.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H.L., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., et al. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J. Exp. Med.* 204, 1973–1987.
- Si-Tayeb, K., Noto, F.K., Nagaoka, M., Li, J., Battle, M.A., Duris, C., North, P.E., Dalton, S., and Duncan, S.A. (2010). Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 297–305.
- Takayama, K., Kawabata, K., Nagamoto, Y., Kishimoto, K., Tashiro, K., Sakurai, F., Tachibana, M., Kanda, K., Hayakawa, T., and Furue, M.K. (2013). 3D spheroid culture of hESC/iPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 34, 1781–1789.
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., and Koike, N. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481–484.
- Takebe, T., Sekine, K., Kimura, M., Yoshizawa, E., Ayano, S., Koido, M., Funayama, S., Nakanishi, N., Hsu, T., and Kobayashi, T. (2017). Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 21, 2661–2670.
- Tanaka, M., Okabe, M., Suzuki, K., Kamiya, Y., Tsukahara, Y., Saito, S., and Miyajima, A. (2009). Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech. Dev.* 126, 665–676.
- Yoon, S.M., Gerasimidou, D., Kuwahara, R., Hytiroglou, P., Yoo, J.E., Park, Y.N., and Theise, N.D. (2011). Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) marks hepatocytes newly derived from stem/progenitor cells in humans. *Hepatology* 53, 964–973.
- Yoshitoshi-Uebayashi, E.Y., Toyoda, T., Yasuda, K., Kotaka, M., Nomoto, K., Ohta, K., Yasuchika, K., Okamoto, S., Takubo, N., and Nishikubo, T. (2017). Modeling urea-cycle disorder citrullinemia type 1 with disease-specific iPSCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 613–619.
- Yusa, K., Rashid, S.T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P.-Q., Paschon, D.E., Miranda, E., Ordóñez, A., Hannan, N.R., and Rouhani, F.J. (2011). Targeted gene correction of α 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 478, 391.