

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

**LAKRİMAL BEZ DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK
UYGUN KSENOJENİK HÜCRE KAYNAĞI ARAŞTIRILMASI**

DR. KIVANÇ KASAL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR- 2019

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**LAKRİMAL BEZ DOKU MÜHENDİSLİĞİNE YÖNELİK
UYGUN KSENOJENİK HÜCRE KAYNAĞI ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ
DR. KIVANÇ KASAL

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. CANAN ASLI YILDIRIM

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimi sürecinde klinik bilgi ve deneyimini benimle paylaşan, manev desteğini her zaman hissettiren, tükenmeyen bir enerji ve sabır ile hastaları için bilimsel anlamda günümüzü takip eden ve hep yenilik peşinde olan, benim göz hastalıkları ile ilgimi katlayan, klinik ve cerrahi anlamda beni cesaretlendiren, tez çalışmamda anlayış ve özveri ile bana destek olan değerli hocam Doç.Dr. Canan Aslı YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimi sürecinde bilimsel, klinik ve cerrahi eğitimimde emeği geçen anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. F.Hakan ÖNER'e, kıymetli hocalarım Prof.Dr. Süleyman KAYNAK'a, Prof.Dr. Ali Osman SAATÇİ'ye, Prof.Dr. İsmet DURAK'a, Prof.Dr. Üzeyir GÜNENÇ'e, Prof.Dr. Ayşe Tülin BERK'e, Prof.Dr. Meltem Söylev BAJİN'e, Prof.Dr. Zeynep ÖZBEK'e, Prof.Dr. Nilüfer KOÇAK'a, Prof.Dr. Aylin YAMAN'a, Prof.Dr. Ahmet MADEN'e, Doç.Dr. Gül ARIKAN'a, Doç.Dr. Arif Taylan ÖZTÜRK'e, Doç.Dr. Ziya AYHAN'a ve Doç.Dr. Mahmut KAYA'ya saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında kendisinden önemli bilgiler edindiğim, laboratuvarının kapılarını bize açan hocam Doç.Dr. Sinan GÜVEN'e, birlikte aynı projede yer almaktan mutluluk duyduğum Ali Kemal BAŞ'a ve Melis ASAL'a değerli katkılarından ötürü teşekkür ederim.

Asistanlık hayatım boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım, hem kişisel hem klinik gelişimim açısından bana katkı sağlayan değerli asistan arkadaşlarıma, birlikte uyum içinde çalıştığım servis, ameliyathane, poliklinik hemşire ve personellerine destekleri için teşekkür ederim.

Beni fedakarlıklarla büyüten ve bana her daim inanan, mesleki başarı ve etik değerler açısından örnek aldığım meslektaşlarım sevgili annem Ayşe KASAL ve babam Bahri KASAL'a, hayat boyu bana destek olan sevgili kardeşim Zeynep KASAL'a, varlığını ruhen hep yanımda hissettiğim 'güzel insan' sevgili teyzem Hatice SEZGEN'e ve benim bugünlere gelmemde büyük katkısı olan sevgili Esra DÜZELTEN'e teşekkür ederim.

Tıp eğitimime başladığım ilk günden uzmanlık sürecimin sonuna geldiğim dönemde yanımdan bir an olsun ayrılmayan, birlikte aynı çatı altında yaşamaktan dolayı gurur duyduğum, sevgisini her daim içimde hissettiren fedakar ve güzel eşim Meltem İZCİ KASAL'a teşekkür ederim.

Kıvanç Kasal

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	3
GİRİŞ VE AMAÇ	5
1. Mevcut Sorun	5
2. Çalışmanın prensibi	6
3. Amaç	6
GENEL BİLGİLER	9
1. Lakrimal Bez (Ana gözyaşı bezi)	9
2. Aksesuar Gözyaşı Bezleri	9
3. Lakrimal bez morfogenezi	10
4. Lakrimal Bez ve Rejenerasyon	12
5. Gözyaşı Filmi	14
5.1. Gözyaşı yapısı	15
5.2. Gözyaşı biyo-belirteçleri	21
6. Kuru Göz Hastalığı	22
6.1. Epidemiyoloji	23
6.2. Semptomlar	24
6.3. Patofizyoloji	24
6.4. Kuru Göz ve İnflamasyon	26
6.5. Sınıflandırma	27
6.6. Tanı	36
6.7. Tedavi	37
7. Doku Mühendisliği	44
8. Lakrimal beze yönelik rejeneratif tıp çalışmaları	52
MATERYAL & YÖNTEM	56
1. Araştırma Tipi	56
2. Araştırma Tarihi ve Yapıldığı Yer	56
3. Evren ve Araştırma Örneği	56
4. Araştırma Materyali	56

5. Araştırma Değişkenleri	56
6. Veri Toplama Yöntemleri.....	56
6.1. Hayvan Deneyleri	56
6.2. Histolojik İnceleme	59
6.3. Mekanik Disseksiyon.....	59
6.4. Enzimatik Reaksiyon	59
6.5. Akış sitometri ve sınıflandırma işlemi	60
6.6. Doku kültürü	60
6.7. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Deneyi.....	65
BULGULAR	67
1. Hayvan Deneyleri.....	67
1.1. Yetişkin Fare Lakrimal Bez Dokusu İzolasyonu	67
1.2. Embriyonik Fare Lakrimal Bez Dokusu İzolasyonu	68
2. Histolojik İnceleme	69
3. Akış Sitometrisi Analizi	70
4. Doku Kültürü Deneyi	71
4.1. Statik Kültür.....	71
4.2. Dinamik Kültür	72
4.3. Doğal ve biomühendislik yaklaşımıyla üretilmiş lakrimal bezin qPCR sonuçları	74
5. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Deneyleri.....	75
5.1. UPKH'lerden lakrimal beze ait epitel hücrelerinin geliştirilmesi.....	75
5.2. UPKH'lerden lakrimal beze ait mezenşimal hücrelerinin geliştirilmesi	76
TARTIŞMA	78
SONUÇLAR	82
KAYNAKLAR.....	83

KISALTMALAR

ANA: Anti nükleer antikor

AYKG: Aköz yetmezlik tipi kuru göz

AQP-5: Aquaporin-5

BrdU: 5-bromo-2'-deoksiüridin

EDM: Eye field

EGF: Epidermal büyüme faktörü

EKG: Evaporatif tip kuru göz

EMG: Epitel mezenşim geçişi

EpCAM: Epithelial cell adhesion molecule

DEQ-5: Kuru Göz Anketi-5

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

GelMA: Jelatin metakrilolil

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

IL: İnterlökin

KGH: Kuru göz hastalığı

Klf4: Kruppel benzeri faktör 4

Krt15: Sitokeratin 15

MMP: Matriks metalloproteinaz

MUC: Müsin

LFB: Lakrimal Fonksiyonel Birim

LKN 1: Lipokalin 1

LTF: Laktoferrin

LYZ: Lizozim

MBD: Meibomian bez disfonksiyonu

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

NSKG: Non Sjögren sendromu kuru göz

ODM: Ocular cell differentiation medium

OSDI: Oküler Yüzey Hastalığı İndeksi

PBS: Fosfat tamponlu çözelti

PMMA: Polimetil metakrilat

SSKG: Sjögren sendromu kuru göz

TEM: Transmisyon elektron mikroskobu

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü-beta

TNF- α : Tümör nekroz faktörü-alfa

UPKH: Uyarılmış pluripotent kök hücre

YKH: Yetişkin tip kök hücreler

ZO-1: Zonula occludens-1

qPCR: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

α -SMA: Alfa-smooth muscle actin



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Hedef 1: UPKH ve embriyonik fare hücrelerinden ve epitel ve mezenşimal kök hücrelerin elde edilmesi.	7
Şekil 2. Hedef 2: Epitel ve mezenşimal hücreler kullanarak mikroakışkan çip içerisinde lakrimal organoid oluşturulması.	8
Şekil 3. Hedef 3: Geliştirilen lakrimal organoidlerin karakterizasyonu.	8
Şekil 4. İnsanda lakrimal bez yerleşimi.	10
Şekil 5. Lakrimal bez embriyogenezinde epitel-mezanşim etkileşimi.	11
Şekil 6. Lakrimal bez organogenezinde büyüme faktörleri ve sinyal yollarını belirten şematik görünüm.	12
Şekil 7. Gözyaşı film tabakasının kompleks hidrate jel yapısı.	16
Şekil 8. Kuru göz hastalığı patofizyolojisini gösteren kısır döngü.	24
Şekil 9. Kuru göz hastalığı sınıflaması.	27
Şekil 10. Kuru göz hastalığında tanısal yaklaşım.	36
Şekil 11. UPKH hücre eldesi ve kullanım alanları.	46
Şekil 12. Organ fizyolojisini ve fonksiyonunu taklit eden akciğer dokusuyla onu besleyen kan damarları arasındaki dinamik biyokimyasal, biyofiziksel ve biyomekanik ilişkileri ölçebilen çipte akciğer sistemi.	50
Şekil 13. GelMA hidrojelinin besin ve oksijen alışverişi yapabilmesi gözenekli yapısı.	52
Şekil 14. Organ germ yöntemi kullanılarak biyomühendislik tabanlı lakrimal bez taslağının geliştirilmesi.	54
Şekil 15. Embriyonik farelerden lakrimal bez izolasyonu.	58
Şekil 16. Liyofilize GelMA.	61
Şekil 17. Epitel ve mezenşimal parçaları basmak için hazırlanan fotomaskeler.	61
Şekil 18. Lakrimal çip katmanları.	62
Şekil 19. Lakrimal çip katmanları.	62
Şekil 20. İkinci seviye inşa edildikten sonra lakrimal çipin son durumu ve her iki parçanın GelMA kapsüllenmesi.	63
Şekil 21. Lakrimal çip tasarımı.	63
Şekil 22. Şırınga pompasının inkübasyon makinesi üzerindeki yerleşimi ve lakrimal çipin inkübasyon makinesi içerisindeki görünümü.	65
Şekil 23. Kısmen göz gelişimini taklit ederek farklılaşan UPKH'lerde oküler hücreyle ilişkili genlerin ekspresyon paterni.	66
Şekil 24. Embriyonik fare lakrimal bezin epitelyal kısmının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.	69
Şekil 25. Erişkin fare lakrimal bezinin ve embriyonik fare lakrimal bezinin histolojik kesiti.	70
Şekil 26. Akış sitometresi analizi.	71
Şekil 27. Fare embriyonik lakrimal bezi hücrelerinin GelMA ile kapsüllenmesi.	72
Şekil 28. Fare embriyonik lakrimal bezi hücrelerinin kapsüllenmesinin floresans mikroskopik görüntülenmesi.	72

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Gözyaşı içeriği	21
Tablo 2. Sjögren sendromu dışı kuru göz hastalığı ile ilişkili durumlar	30



ÖZET

Amaç: Aköz yetmezlik tipi kuru göz hastalığının tedavisinde kullanılması öngörülen, doku mühendisliği yöntemi ile *in vitro* ortamda kök hücrelerden lakrimal bez üretilmesi çalışmaları için uygun ksenojenik hücre kaynağı araştırılması

Klinik ilişki: Kuru göz hastalığı, otoimmün hastalıkların ön planda olduğu aköz yetmezlik tipinde ciddi oküler yüzey rahatsızlıklarına ve muhtemel görme kaybına yol açmaktadır. Topikal suni gözyaşı, immünsupresif ajanlar, punktum tıkaçları vb. mevcut seçenekler tedavide yetersiz kalmaktadır. Hasta bireyin lakrimal bezindeki kök/progenitör hücreler veya cilt fibroblast hücrelerinin yeniden programlanmasıyla oluşan pluripotent kök hücreler kullanılarak yapay lakrimal bez elde edilmesi kuru göz tedavisine yeni bir bakış açısı kazandırmaktadır.

Yöntem: Bu çalışma, hayvan deneyleri ve kök hücre deneyleri olmak üzere iki alanda yürütüldü. İlk olarak yetişkin ve embriyonik farelerden lakrimal bez dokusu disseke edilerek izole edildi. Histolojik, immünohistokimyasal ve akış sitometri incelemeleri yapıldı. Elde edilen hücreler, lakrimal bez morfogenezinin taklit edilmesini amaçlayan, epitel ile mezenşim bölmeleri olan ve dinamik kültür ortamı sağlayan ‘lakrimal çip’ sistemi içinde 14 gün boyunca kültüre edildi. Sonuçlar immünohistokimya ve qPCR yöntemi ile incelendi. İkinci yöntem olarak ise uyarılmış pluripotent kök hücreler, iki farklı protokol doğrultusunda lakrimal bezin ana komponenti olan konjunktiva epitel hücreleri ve perioküler mezenşim hücrelerine farklılaştırıldı. Sonuçlar immünohistokimya yöntemi ile incelendi.

Bulgular: Yetişkin farelerden elde edilen lakrimal bez hücrelerinin proliferasyon kapasitesinin düşük olduğu gözlemlendi. Embriyonik farelerden izole edilen dokuların ışık mikroskobu altında epitel ve mezenşim dokularına ayrılabilirdiği histolojik kesitlerde görüldü. Hücreler, doku iskelesi sağlayan jelatin metakrilat (GelMA) ile karışım haline geldikten sonra fotomaske yardımı ile iç kısımda epitel ve dış kısımda epitel dokusunu çevreleyen mezenşim bölmeleri olacak şekilde ‘lakrimal çip sistemi’ içine yerleştirildi. Jel ile uyum sağladığı görülen hücrelerin 14 gün boyunca canlılıklarını korudukları ve organoid yapısını oluşturdıkları görüldü. İmmünohistokimya incelemede lakrimal beze özgü Aquaporin-5 (AQP-

5) ve Zonula okludens-1 (ZO-1) proteini saptandı. qPCR ile yapılan incelemede gözyaşına özgü lizozim mRNA düzeyinde kontrol grubuna göre oldukça yüksek saptandı.

Uyarılmış pluripotent kök hücre deneyinde, 42 günlük kültür sonucunda önce oküler yüzey ektodermi, ardından konjonktiva epiteli belirteci olan K13 ile boyanan hücreler elde edildi. Kültürün 14. gününde immünohistokimya incelemede FOXC1; qPCR incelemede PITX2 ve LMX1B mezenşim belirteçleri saptandı.

Sonuç: Doku mühendisliği yöntemi ile embriyonik fare hücreleri kullanılarak gözyaşı üretimi yapan lakrimal bez dokusu *in vitro* ortamda oluşturuldu. Uyarılmış pluripotent kök hücreler kullanılarak, biyomühendislik çalışmalarında lakrimal bezi dokusu meydana getirmek üzere kullanılacak epitel ve mezenşim hücreleri elde edildi. Bu bilgiler ışığında yapılacak ileri çalışmalarda, kuru göz hastalığının başlangıç aşamasında hastanın lakrimal bez biyopsisinden izole edilecek kök/progenitor hücreler veya cilt biyopsisinden elde edilen fibroblastlardan türetilen uyarılmış pluripotent kök hücreler kullanılarak *in vitro* ortamda lakrimal bez eldesi ve hasta bireye otolog transplantasyonu, hastalığın ileri aşamalarında ciddi oküler yüzey bozukluklarının oluşmasını ve muhtemel görme kaybı riskini azaltabilecek bir yaklaşım olabilir. Kullanılacak her iki yöntemin de, etik sorunları ve immün yanıt riskini ortadan kaldıracakı düşünülmektedir. Ayrıca *in vitro* ortamda kök hücrelerden üretilen lakrimal bezden, kişiye özel üretilecek ve kompleks içeriğe sahip aköz gözyaşının, topikal olarak kuru göz hastalığı tedavisinde kullanılması mümkün olabilecektir.

Anahtar kelimeler: Lakrimal bez, kuru göz hastalığı, doku mühendisliği, kök hücre.

ABSTRACT

Purpose: Investigation of appropriate xenogenic cell source for *in vitro* lacrimal gland development by using tissue engineering methods, for use in the treatment of dry eye disease.

Clinical relevance: Aqueous deficiency type dry eye disease, which is mostly seen in the setting of autoimmune diseases, leads to serious ocular surface disorders and possible loss of vision. Available options like topical artificial tears, immunosuppressive agents, punctal plugs etc. are insufficient in treatment. Development of an artificial lacrimal gland using stem/progenitor cells localized in patients' lacrimal gland or pluripotent stem cells formed by reprogramming skin fibroblast cells, brings a new perspective to the treatment of dry eye.

Method: This study was conducted in two areas: animal experiments and stem cell experiments. Initially, lacrimal gland tissue was dissected and isolated from adult and embryonic mice. Histological, immunohistochemical and flow cytometry analyses were performed. Harvested cells were cultured in a 'lacrimal chip' system that mimics the morphogenesis of the lacrimal gland with its epithelial and mesenchymal compartments as well as a dynamic culture medium, for 14 days. Results were analyzed by immunohistochemistry and qPCR methods. Secondly, induced pluripotent stem cells (IPSCs) were differentiated into the main components of the lacrimal gland, namely conjunctival epithelial cells and periorbital mesenchymal cells, by using two different protocols. Results were analyzed by immunohistochemistry.

Results: Lacrimal gland cells obtained from adult mice showed low proliferation capacity. Tissues isolated from embryonic mice could be separated into epithelial and mesenchymal tissues under light microscope, verified by the histologic analysis. Cells were mixed with gelatin methacryloyl (GelMA) which acts as tissue scaffold, and then photomasked into the 'lacrimal chip' system that has inner epithelium and outer mesenchymal tissue compartments. Cells were found to be bio-compatible with the gel and were able to maintain their viability for 14 days. They formed appropriate organoid structure. Immunohistochemical analysis revealed lacrimal gland specific Aquaporin-5 (AQP-5) and Zonula occludens-1 (ZO-1)

proteins. Tear-specific lysozyme mRNA levels were found to be significantly higher in qPCR analysis than in the control group.

IPSCs experiment revealed ocular surface ectodermal cells initially, followed by cells that stained by K13, which is an indicator of conjunctival epithelium, at the end of 42 days. On the 14th day of culture, immunohistochemistry analysis revealed FOXC1; qPCR analysis revealed PITX2 and LMX1B, all of which are mesenchymal markers.

Conclusion: Lacrimal gland tissue was produced in *in vitro* conditions, by tissue engineering methods using embryonic mouse cells. IPSCs were used to obtain epithelial and mesenchymal cells to be used in bio-engineering studies to develop lacrimal gland tissue. In the light of these data, obtaining *in vitro* lacrimal gland tissue using stem/progenitor cells isolated from either the lacrimal gland or IPSCs derived from skin fibroblasts at the initial stages of dry eye disease and autologous transplantation to the patient might be a sound approach to reduce the risk of serious ocular surface disorders and possible loss of vision in later stages of the disease. Both methods might eliminate ethical problems and risk of immune responses. Furthermore, it is possible that aqueous tear, which has complex ingredients, to be custom-produced individually for topical use in the treatment of dry eye disease, from the lacrimal gland developed in *in vitro* conditions by using stem cells.

Keywords: Lacrimal gland, dry eye disease, tissue engineering, stem cell.

GİRİŞ VE AMAÇ

1. Mevcut Sorun

Kuru göz hastalığı, oküler rahatsızlık ve ciddi olgularda görme kaybına yol açabilen görme bozuklukları ile karakterize olup günümüzde sıklığı giderek artmaktadır. Aköz yetmezlik ve evaporatif olmak üzere iki ana kategoride incelenmektedir. Aköz yetmezlik tip kuru gözde gözyaşının kısmi veya tam yokluğu söz konusu olup gözyaşı filminde instabilite ve hiperosmolaritenin tetiklediği inflamatuvar bir kısır döngü görülür. Sjögren sendromu, müköz membran pemfigoid, Steven Johnson sendromu gibi ciddi kuru göz tablosu ile seyreden hastalıklarda lakrimal bezin inflamatuvar hücrelerle inflamasyonu görülmekte, fonksiyonel doku yerini geri dönüşü olmayan fibrozise bırakmaktadır. Oküler yüzeyi oluşturan kornea ve konjunktiva epiteli için hayati öneme sahip ve karmaşık bir yapıya sahip olan gözyaşı miktarı giderek azalmakta, punktat epitelyopatiden korneada erimeye uzanan ciddi ön segment sorunları ile karşılaşılmaktadır. Klinik pratikte sıkça kullanılan suni gözyaşı replasmanı içerik bakımından doğal gözyaşı ile karşılaştırıldığında yetersiz kalmakta ve patogeneze yönelik olmadığı için etkisi oldukça sınırlı kalmaktadır. Otolog serum ise büyüme faktörleri, vitamin ve fibronektin içermesinden dolayı gözyaşına fizyolojik olarak daha çok benzemekte olup elde edilme ve saklanma koşullarının pratik olmaması nedeni ile kullanımı sınırlıdır. Gözyaşı drenajını azaltıp, var olan gözyaşının oküler yüzeyde kalma süresini artırmak için punktum tıkaçları kullanılmaktadır. İmmün sistemi baskılayıcı ajanların topikal ve sistemik kullanımı ile inflamasyon baskılanmaya çalışılmakta, ancak lakrimal bez işlevinin korunması anlamında yeterli olmamakta ve hastalarda ilaca bağlı yan etkiler görülebilmektedir. Oküler yüzeyin ıslaklığının devamlılığının sağlanması amacıyla mekanik dakriyorezervuar ve otolog minör veya majör tükrük bezi transplantasyonu seçenekleri düşünülmüş, ancak kompleks cerrahi sürece sahip olmaları ve gelişen komplikasyonlar nedeni ile uygulamaları kısıtlı kalmıştır. Sonuç olarak günümüzde kuru göz hastalığında kısa süre etkili geçici tedaviler sunulmakta, tam anlamıyla tatmin edici ve uzun dönemde kür sağlayan bir seçenek bulunmamaktadır.

Son zamanlarda organanogenez gelişimindeki mekanizmalar ve gen ekspresyonlarının anlaşılması, kök hücre biyolojisi ve doku mühendisliği teknolojilerinin gelişimi sayesinde, bozulmuş organ fonksiyonun yeniden sağlanmasını amaçlayan ‘rejeneratif tıp’ terimi ortaya çıkmıştır [1]. Başlarda dokulardan elde edilen kök hücrelerin enjeksiyonu veya sitokinler ile kök hücrelerin aktivasyonu ile hasarlı dokuların tamiri ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Son yıllarda ise doku mühendisliği yöntemi ile yapay organ geliştirilmesi üzerine ağırlık verilmiştir. Erişkin veya embriyonel lakrimal bezde yerleşimli kök/progenitör hücreler ya da

uyarılmış pluripotent kök hücrelerden *ex vivo* ortamda gözyaşı salgılayabilen üç boyutlu lakrimal bez geliştirilmesi ve laboratuvar ortamında geliştirilen lakrimal bezin hastaya transplantasyonu ile ilgili çalışmalar ciddi kuru göz hastaları için umut vaat etmektedir.

2. Çalışmanın prensibi

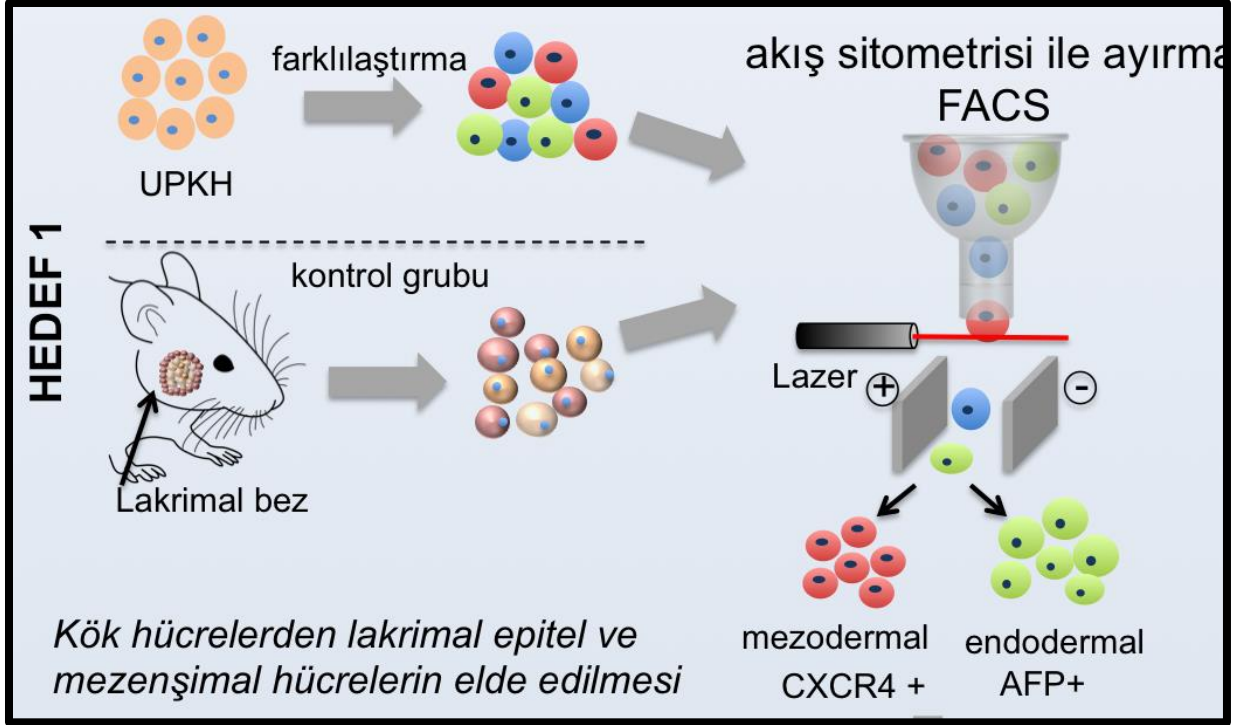
Bu çalışmada doku mühendisliği ilkeleri doğrultusunda organogenez taklit edilerek, çeşitli hücre kaynakları, kültür ortamı ve biyoaktif moleküller kullanılarak *in vitro* ortamda lakrimal bez benzeri doku geliştirilmesi amaçlanmıştır. Literatürde embriyonik fare hücrelerinin işlenerek farklılaşması yoluyla gözyaşı salgılayabilen lakrimal bez dokusu elde edilmiş ve transplantasyon sonrası kuru göz bulgularının düzeldiği belirtilmiştir [2]. Ancak aynı protokolün insan kaynaklı embriyonik hücreleri kullanılarak uygulanması, etik ve immünolojik yanıt sorunlarını beraberinde getirmesi nedeniyle mümkün değildir. Bu nedenle yapay lakrimal bez geliştirilmesi ve transplantasyonu için hücre kaynağı olarak erişkin lakrimal bezden izole edilen kök/progenitör hücrelerin veya uyarılmış pluripotent kök hücrelerin (UPKH) kullanılması düşünülmüştür.

UPKH teknolojisi sayesinde hasta bireyden alınan insan somatik hücreleri yeniden programlanarak pluripotent özellik kazanabilir. Üç germ yaprağına farklılaşma özelliği bulunan hücrelerin, doku mühendisliği yaklaşımıyla tasarlanan mikroakışkan çip kültüründe, belirli transkripsiyon faktörleri ve biyoaktif sinyaller sağlanması yoluyla lakrimal bezin iki ana komponenti olan epitel ve mezenşim hücrelerine dönüştürülmesi ve *in vitro* ortamda gözyaşı salgılayabilen yapay lakrimal organ geliştirilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen dokunun hastanın kendi hücrelerinden kaynaklanması sayesinde etik sorunlar ve immünolojik red riski aşılmış olacak, ayrıca kişiye özgü doğal gözyaşı üretimi saplanmış olacaktır. Projede kullanılacak embriyonik fare lakrimal bezi ve hücrelerinin, en uygun mikroakışkan çip tasarımının yapılması, yapay lakrimal bez gelişimi için gerekli fiziksel ve biyokimyasal koşulların uygunluğunun saptanması, yapay lakrimal bezin fonksiyonlarını değerlendirilmesi için kullanılması planlanmıştır. Ayrıca lakrimal bezden elde edilen kök/progenitör hücrelerin, UPKH'den farklılaştırılarak elde edilecek epitel ve mezenşimal hücreler için pozitif kontrol olarak kullanılması; böylece lakrimal bez doku mühendisliğine yönelik en uygun ksenojenik hücre kaynağının belirlenmesi planlanmıştır.

3. Amaç

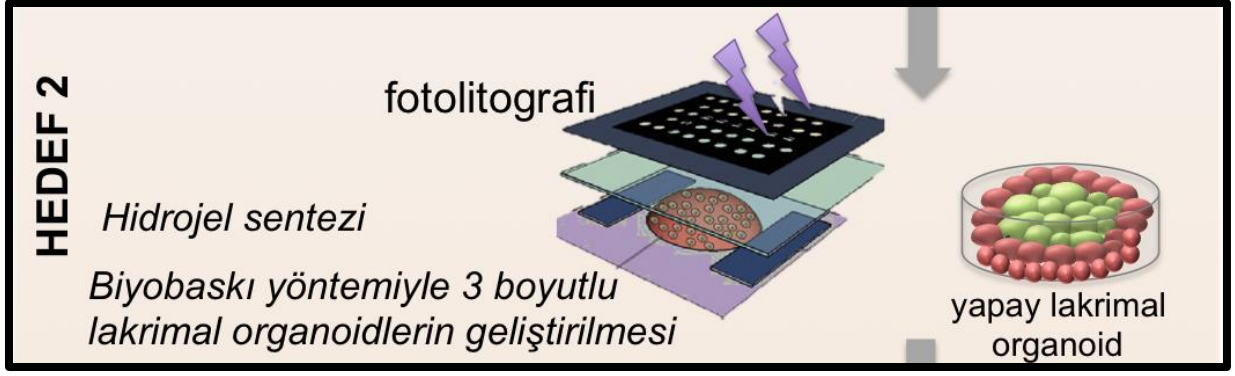
Çalışmanın esas amacı lakrimal bez doku mühendisliğine yönelik en uygun ksenojenik hücre kaynağının belirlenmesidir. Embriyonik fare lakrimal bez hücrelerinden ve UPKH'den *in*

vitro mikroakışkan sistem koşullarında yapay fonksiyonel lakrimal bez geliştirilmesi amacıyla aşağıdaki hedefler tanımlanmıştır.



Şekil 1. Hedef 1: UPKH ve embriyonik fare hücrelerinden ve epitel ve mezenşimal kök hücrelerin elde edilmesi.

- 1.1 Fare lakrimal bezinden epitel ve mezenşimal hücrelerin izole edilmesi.
- 1.2 Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin ektodermal, endodermal ve mezenşimal farklılaştırılması.
- 1.3 Farklılaştırılmış hücrelerden ektodermal ve mezenşimal hücrelerin akış-sitometresi ile ayrıştırılması ve kültür edilmesi.

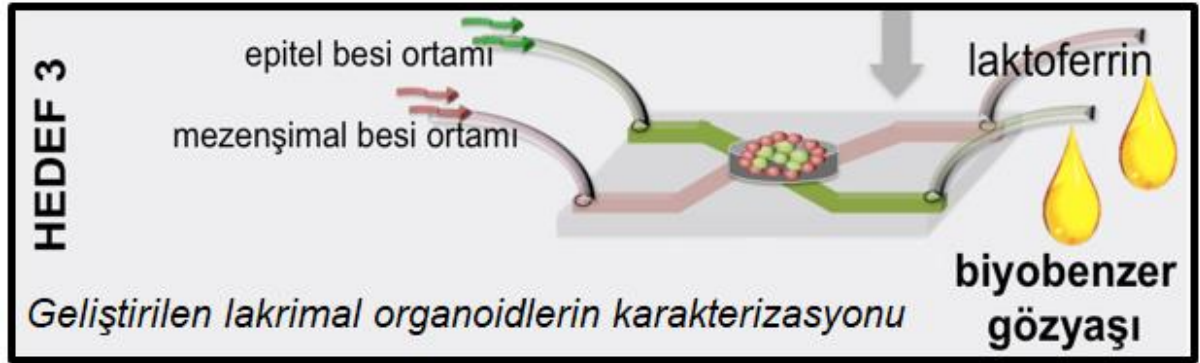


Şekil 2. Hedef 2: Epitel ve mezenşimal hücreler kullanarak mikroakışkan çip içerisinde lakrimal organoid oluşturulması.

2.1 Mikroakışkan çip geliştirilmesi ve hidrojel sentezi

2.2 UPKH ve fareden elde edilen epitel ve mezenşimal hücrelerden organoid oluşturulması

2.3 Lakrimal organoidlerin mikroakışkan çip içerisine yerleştirilmesi ve 3-boyutlu hücre kültürü



Şekil 3. Hedef 3: Geliştirilen lakrimal organoidlerin karakterizasyonu

3.1 Geliştirilen sistem ile UPKH ve fare hücrelerinden elde edilen lakrimal organoidlerin immunohistolojik karakterizasyonu

3.2 UPKH ve fareden elde edilen lakrimal organoidlerin transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile karakterizasyonu

3.3 Elde edilen lakrimal organoidlerin sekresyonunun gözyaşı belirteçlerinin (laktoferrin, lizozimvb.) saptanması

GENEL BİLGİLER

1. Lakrimal Bez (Ana gözyaşı bezi)

Tubuloasiner ekzokrin bez yapısında olup gözyaşı filmindeki aköz tabakanın %95'inin üretilmesinden sorumludur. Gözün üst temporalinde bulunan bez, üst levator palpera kasının aponevrozu ile orbital ve palbepral olmak üzere iki kısma ayrılır. Orbital parça yaklaşık 20 mm uzunluğunda, 12 mm genişliğinde ve 5mm kalınlığındadır [3]. Lobuler asinusların sekresyonu önce interlobuler ince kanalcıklara, daha sonra da yaklaşık 8-12 adet son salgı kanalına akar. Bu kanallardan 3-5 adedi orbital parçayı, 5-7 kadarı da palpebral parçayı drene eder. Orbital parçanın kanalları da palpebral parça içinden geçer ve tüm kanallar ayrı ayrı olmak üzere, üst tars üst kenarının yaklaşık 5 mm kadar üzerinde üst fornikse açılır [4] (Şekil 4).

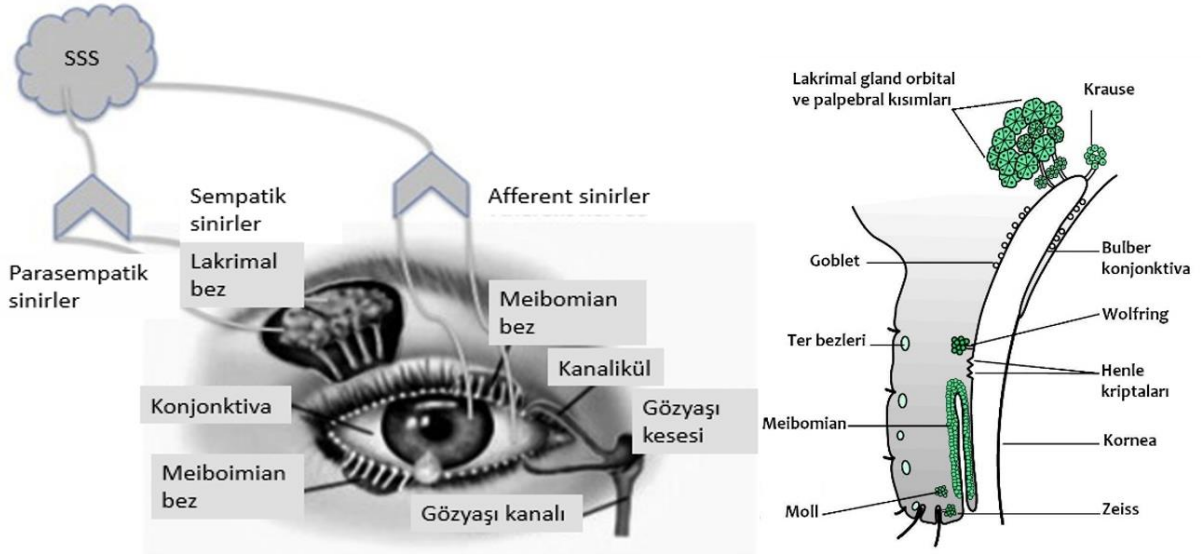
Lakrimal bezde asiner, duktal ve miyoepitelyal hücreler bulunmaktadır. Hücrelerin %80'i asiner hücreler olup lizozim, laktoferrin, büyüme faktörleri (epitelyal, keratosit, transforming alfa) gibi proteinlerin sentezini yapar ve sekresyonunu sağlar. Duktal hücreler ise asiner hücrelerden salınan gözyaşını modifiye edip su ve elektrolitleri salgılar [5]. Alfa düz kas içeren miyoepitelyal hücreler, asiner ve duktal hücreler ile bazal lamina arasında bulunur ve duktusun kasılmasını sağlayarak aköz gözyaşının oküler yüzeye salınmasında rol oynar [6].

Gözyaşı bezini besleyen arter; oftalmik arterin lakrimal dalıdır. Venler, arterler ile aynı yolu izleyerek superior oftalmik vene drene olur [7].

Refleks gözyaşı sekresyonundan sorumlu olan lakrimal bezin efferent uyarıcı fasiyal sinir içinde seyreden parasempatik liflerdir.

2. Aksesuar Gözyaşı Bezleri

Lakrimal bez yapısına benzeyen aksesuar gözyaşı bezleri, gözyaşı aköz tabakasının %5'ini salgılar [8]. Krause bezleri üst fornikte yaklaşık 40 adet, alt fornikte 6-8 adet olarak bulunur. Wolfring bezleri üst kapakta 2-5 adet, alt kapakta 1-3 adet bulunmakla birlikte boyut olarak Krause bezlerinden biraz daha büyüktür. İnsanda aksesuar gözyaşı bezleri tübüler gland yapısında olup asinus içermez [9]. Aksesuar bezler lakrimal doku kitlesi toplamının yaklaşık %10'unu oluşturur [10] ve ana lakrimal beze benzer şekilde inervasyonu vardır. Bu nedenle refleks stimulasyon yanıtlarının benzer şekilde olduğu varsayılmaktadır [11].



Şekil 4. İnsanda lakrimal bez yerleşimi

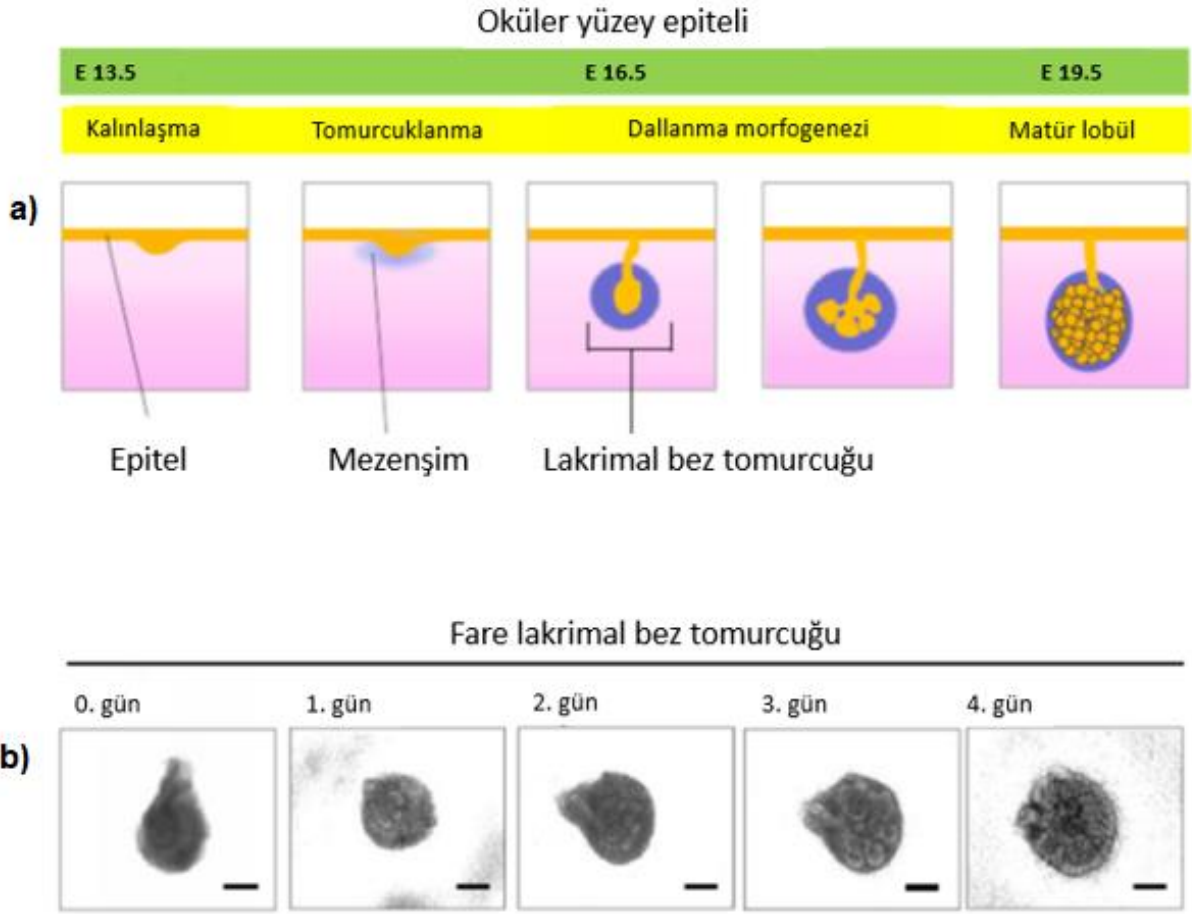
3. Lakrimal bez morfogenezi

Lakrimal bez, ektoderm kaynaklı bir organ olup temel olarak epitelden köken alan glandüler parankim dokusu ve bu yapıyı çevreleyen mezenşimal stroma dokusu olmak üzere iki dokudan meydana gelir. Lakrimal bezin primitif bir tomurcuktan üç boyutlu tübüloalveoler yapıya sahip matür bir organ gelişim süreci, epitel ve çevre mezenşimi arasındaki karşılıklı etkileşimleri içeren üç basamakta incelenir [12]:

1. Varsayımsal glandüler evre: Çevredeki mezenşimal yoğunlaşmayla birlikte superior fornix epitelinin kalınlaşması;

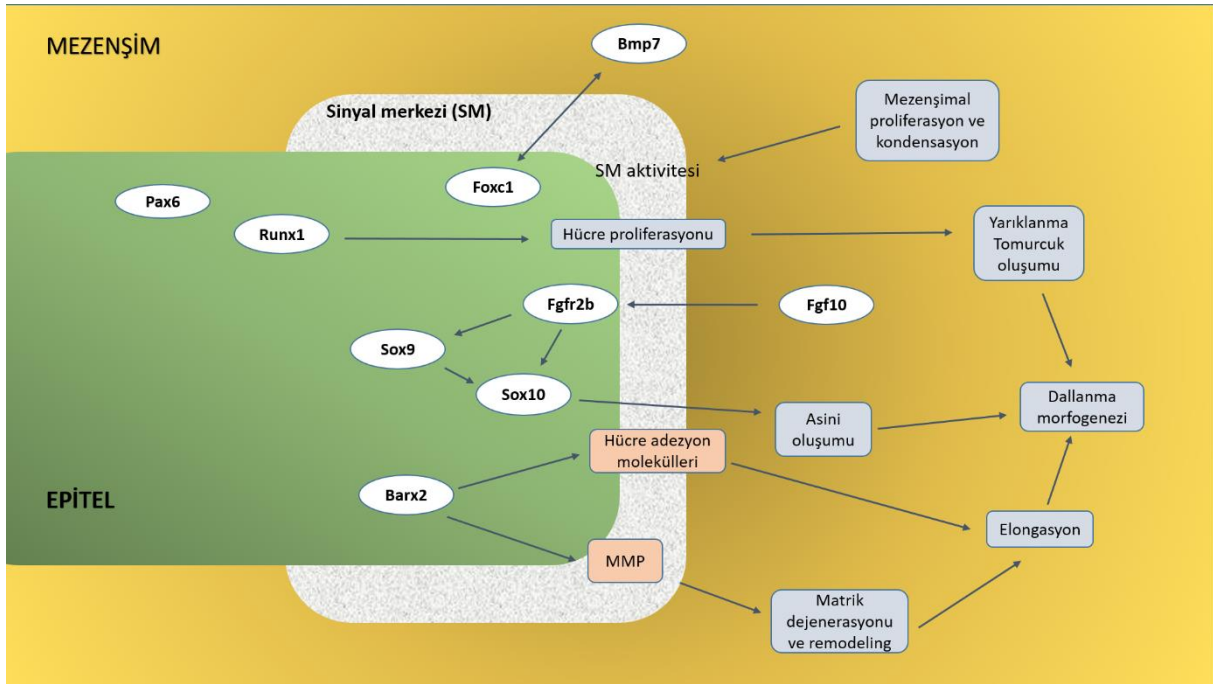
2. Tomurcuk evresi: İlk konjunktival fornikse ait bölgede nodüler oluşumların ortaya çıkması ve epitel tomurcukları içindeki lümenin görünümü

3. Glandüler olgunlaşma dönemi: 9-16 hafta arasında görülür, bezin erişkin morfolojisini almaya başladığı dönem



Şekil 5. Lakrimal bez embriyogenezinde epitel-mezenşim etkileşimi. a) Şematik görünüm. b) İn vitro kültür ortamında lakrimal bezin faz kontrast görüntüleri. Ölçek çizgisi 100 µm [2].

Sıçanlarda lakrimal bez gelişiminde 13. embriyonik günde gözün temporal bölgesinde konjunktiva epitelinin tübüler invajinasyonu gösterilmiştir. Epitel invajinasyonunun uzaması sonucu lakrimal bez tohumu, 16.5. embriyonik günde mezenşim içerisine uzanır. Epitel-mezenşim etkileşimi sonucu hızlıca prolifer olup uzama ve yarık oluşumları ile karakterize dallanma paterni göstererek lobüler bez yapısı oluşturmaya başlar. Ondokuzuncu embriyonik günde lakrimal bezin temel yapısı tamamlanmış olur [13] (Şekil 5). Doğumdan sonra 7. günde gözlerin açılması ile birlikte gözyaşı üretimi başlar.



Şekil 6. Lakrimal bez organogenezinde büyüme faktörleri ve sinyal yollarını belirten şematik görünüm. Epitel ve mezenşim; dallanma morfogenezinde çeşitli protein, gen ve büyüme faktörleri aracılığıyla etkileşimde bulunur. Bmp7 ve Foxc1 mezenşim ile iletişim kurulmasında rol alır. Mezenşimde yer alan Fgf10; Sox9 ve Sox10 aracılığıyla tomurcuk oluşmasını sağlar. Barx2 matriks metalloproteinazları (MMP) aktive ederek epitel büyümesine katkıda bulunur. Runx1 ise epitelde bulunur ve proliferasyonu sağlar [14].

Dallenma morfogenezinde rol alan çeşitli sinyaller lakrimal bez gelişiminin düzenlenmesini sağlar. Embriyonik oküler konjunktivada Pax 6 gen ekspresyonu, lakrimal bez tomurcuğunun oluşmasının ilk basamağıdır. Çevre mezenşimal dokuda yoğun Fgf 10 (Fibroblast growth factor) ekspresyonu epitelden tomurcuk gelişmesine katkıda bulunur. Bu sinyaller ile lakrimal bezin dallanması ve farklılaşmasını sağlayan Sox9 ve Sox10 yolağı aktive edilmiş olur [13]. Epitel gövdesinin genişlemesi (stalk elongation), Barx ekspresyonu sonucu matriks metalloproteinazların düzenlenmesi yolu ile gerçekleşir [15]. ‘Bone morphogenetic protein’ (Bmp) ailesinden olan Bmp 7 sinyali mezenşim kondensasyonu ve proliferasyonunu sağlayarak dallanma sürecinde rol alır [12]. Büyüme faktörleri ve sinyal yolları lakrimal bezin histolojik ve fonksiyonel yapısının sağlanmasında kritik öneme sahiptir (Şekil 6).

4. Lakrimal Bez ve Rejenerasyon

Yetişkin dokularda yerleşmiş olan kök hücreler, herhangi bir doku hasarı sonrasında aktive olarak organ yapı ve fonksiyonunu sağlamakla görevlidir. Bu hücrelerin tespit edilerek hasarlı

dokuların tamirinde kullanılması ile organ fonksiyonunun geri kazanılabileceğine dair çalışmalar mevcuttur.

Tükrük ve meme bezleri gibi lakrimal bez de yaşam boyu yenilenme (rejenerasyon) yeteneklerini korur. Tükrük bezlerinin epitel hücre döngüsü seröz asinuslar için 40-65 gün ve duktus hücreleri için 95 gün olarak saptanmıştır [16]. Tükrük bezleri ile lakrimal bez ektodermal kökenli salgı bezleri olup, lakrimal epitel hücrelerinin de benzer hücre döngüsü hızına sahip olduğu düşünülmektedir. Tükrük bezlerinde duktus ve salgı kanallarının bazal tabakasında kök/progenitör hücre varlığı gösterilmişken, lakrimal bezde miyoepitelyal, duktus epiteli ve mezenşimal hücre olmak üzere üç yerde rejenerasyon kapasitesi olduğu düşünülmektedir [17][18][19][20].

Tükrük bezi, meme bezi, karaciğer ve bağırsak gibi pek çok dokuda saptanan kök veya progenitor hücrelerin, yaşam döngüsü dışında deneysel olarak doku hasarında da aktif rol oynadıkları tespit edilmiştir. Kök veya progenitör hücrelerin asiner ve duktal hücrelere dönüşebilme potansiyeli tespit edilmiştir [21].

Doku hasarının nasıl sonuçlanacağı, epitelyal-mezenşimal etkileşimin nasıl gelişeceği ile ilgilidir. Emriyogenezdeki etkileşimde epitelyal hücreler geri dönüşümlü olarak mezenşimal fenotip kazanıp kök hücre benzeri özellik gösterirlerken, epitelyal-mezenşimal geçiş geri dönüşümsüz olduğunda nedbe (skar) dokusu oluşumu ile sonuçlanan fibrozis oluşur [22].

Bir hipoteze göre epitel kökenli progenitör hücreler, “epitel-mezenşim geçişi” (EMG) yoluyla mezenşim kökenli kök hücrelere dönüşüp, doku onarımı için asiner veya duktal epitel hücrelerine farklılaşmak üzere hasarlı bölgelere göç etmektedir [22]. Lakrimal bez hasarı sonrası doku onarımı sırasında, EMG sonucu vimentin, nestin ve α -SMA eksprese eden mezenşimal kök hücrelerin varlığı tespit edilmiştir.

Nanog, Sox2, Kruppel benzeri faktör 4 (Klf4) gibi pluripotens belirteçlerini eksprese eden ve üç boyutlu kültürde üç germ yaprağına ait çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneği gösteren kök hücreler de, sıçan lakrimal bezinde saptanmıştır [19].

Yapılan bir çalışmada IL-1 enjeksiyonu ile indüklenen lakrimal bez hasarı sonrası 5-bromo-2'- deoksiüridin (BrdU) işaretli hücre sayısında kontrol grubuna göre 7 kat artış olması, bu hücrelerin kök veya progenitör hücre olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca BrdU işaretli hücrelerin bir kısmında proliferasyon belirteci olan ki-67 pozitif bulunmuştur [23]. Tamir

sırasında kök hücre belirteci olan nestin (tip 6 intermediyer filaman proteini) pozitif kök / progenitör hücre sayısında artış görülmüştür [24].

Duktus ligasyonu sonrası lakrimal bez boyut ve ağırlığı belirgin olarak düşerken, inflamatuvar hücre infiltrasyonu sonucu ile oluşturulan lakrimal bez hasarı sonrasında gözyaşı üretimi azalır. Bu yol ile hasar oluşturulmuş lakrimal bezde oküler yüzey kök/progenitör hücre belirteci olan K14, ABCG2, Δ Np63 ve K15 eksprese eden hücreler saptanmıştır [22].

Hasar oluşturulmamış normal fare lakrimal bezinde yapılan araştırmada, c-kit (CD117) ve EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) pozitif hücrelerin potansiyel epitelyal progenitör hücre işareti olabileceği ifade edilmiştir [20].

Embriyonik dönemde immatür lakrimal bezde epitel hücrelerinde görülen sitokeratin 15 (Krt15)'in, matür lakrimal bezde duktusun bazal hücrelerince eksprese edildiği saptanmıştır. Az sayıda olan bu hücre popülasyonunun kök hücre sınıfında değerlendirilebileceği kanısına varılmıştır [25].

5. Gözyaşı Filmi

‘Gözyaşı filmi’ terimi çoğunlukla kapak kenarları arasında kalan ve kornea yüzeyini kaplayan ince sıvı film tabakasını tanımlamakla birlikte açıkta kalan bulber konjunktivayı kaplayan gözyaşı tabakasını da kapsamaktadır; fakat bu bölge korneaya göre görsel işlemlerde çok az öneme sahip olduğundan göz ardı edilmektedir. Gerçekte bu kısım özellikle yukarı bakışta açıkta kalan alanın % 60 kadarını oluşturmaktadır [26].

Stabil preoküler gözyaşı filmi, büyük ölçüde oküler yüzey sağlığının göstergesidir. Bunun nedeni görsel sistemde ışığın girmesi için birincil kırılma yüzeyini gözyaşı oluşturması, içerdiği antimikrobiyal proteinler ve büyüme faktörleri ile korneayı koruması ve nemlendirmesidir[27].

Gözyaşı filmi bileşimi dinamik olup oküler yüzeyin homeostasisini sağlayabilmek için çevresel etmenlere yanıt verebilir. Her göz kırpma ile birlikte gözyaşı oküler yüzeye yayılır; kırpma sonrasında düzenli bir şekilde incelmeye başlar, bir sonraki kırpmaya kadar tam anlamıyla aköz kaplama sağlar. Ardından gelen kırpma ile daha kalın bir tabaka oluşur ve işlem tekrarlanarak devam eder [28].

Toplam gözyaşı hacmini menisküsler, pre-oküler gözyaşı film tabakası ve konjunktiva kesesi oluşturur [29]. Toplam hacim ortalama 10 μ l olarak saptanmıştır. Bu miktar kapak kenarlarının şekline, punktum pozisyonuna ve kapak aralığının yüksekliğine göre kişiden

kişiyeye farklılık göstermektedir [26][30][31]. Optik koherens tomografi ile yapılan ölçümlerde gözyaşı film tabakası kalınlığı ortalama 4.7 µm bulunmuştur [32].

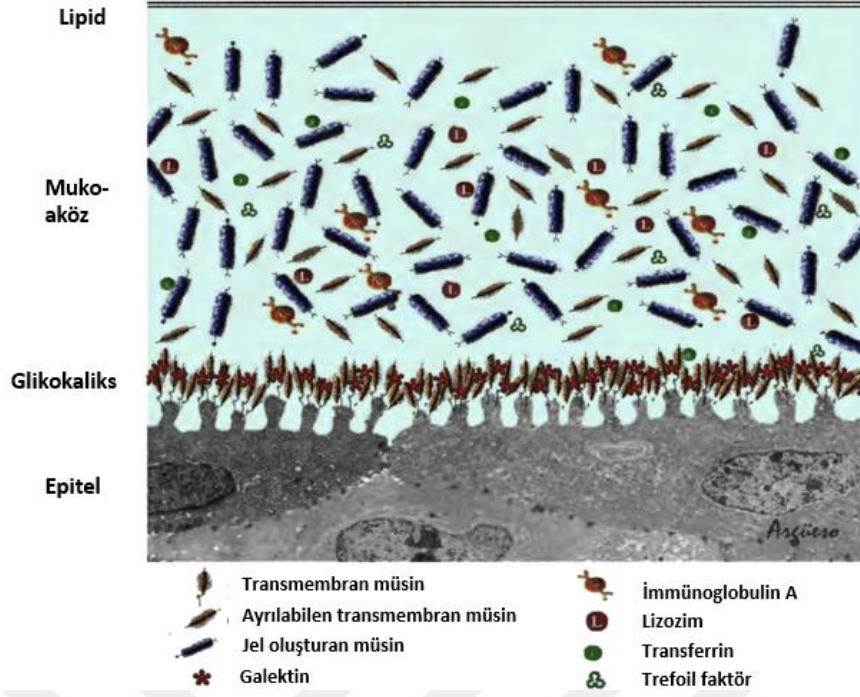
Dinlenme halinde bazal gözyaşı sekresyonunun yardımcı lakrimal bezler tarafından, uyarılmış refleks gözyaşı sekresyonunun ise ana lakrimal bez tarafından sağlandığı bilinmektedir [26]. Uyarılmamış durumda gözyaşı salgılanma hızı 1.2 µl/dakika ve 1.2 ml/gün olduğu kabul edilmiştir [33]. Nazal irritasyonla uyarılmış gözyaşı akım hızı çok daha fazla olup bir dakikadan kısa bir sürede 40-50 µl'ye ulaşmaktadır [34].

Alt gözyaşı menisküsünden elde edilen örneklerde gözyaşı osmolaritesi yaklaşık 320 mOsm/L olarak ölçülmüş olup kornea yüzeyini örten gözyaşı film tabakasının osmolaritesini temsil ettiği kabul edilir [35].

5.1. Gözyaşı yapısı

Gözyaşı filminin gerçek yapısı tartışmalı olmakla birlikte, ilk olarak Wolff tarafından tanımlanan temelde üç tabakalı yapı olarak incelenebilir: Epitel yüzeyini kaplayan ve hücrelerin varsayılan hidrofobitesini azaltan müsin tabaka; bazı besin maddeleri, antimikrobiyal proteinler, uygun osmolarite ve kayganlık sağlayan aköz tabaka; aköz sıvının buharlaşarak kaybını önleyen lipid tabaka [36]. Son yıllardaki görüşe göre, gözyaşı ayrı ayrı tabakalar halinde basit bir yapı olarak görülmeyip, müsin, aköz ve lipid içeriğın birbiri ile etkileştiği '*hidrate jel*' formunda olduğu kabul edilmektedir [37]. Bu tanımlamaya göre lipid tabakasının altında, müsin konsantrasyonunun epitel yüzeyinden aköz yüzeye doğru azalan konsantrasyonda değiştiği bir aköz-müsin jel tabakası bulunmaktadır [38] (Şekil 7).

Aköz-müsin tabakası; çözünebilen müsinler, aköz sıvı, elektrolitler ve çeşitli proteinler içermekte olup kornea epiteli mikropolikalarına, membranla ilişkili müsinlerin oluşturduğu glikokaliks yardımı ile tutunur.



Şekil 7. Gözyaşı film tabakasının kompleks hidrate jel yapısı[39].

5.1.1. Müsin tabaka

Gözyaşı filminin en iç tabakası ve 0,5 μm kalınlığında olup kornea ve konjunktiva epitel hücrelerinin üzerini kaplar [40]. Müsinlerin çoğu holokrin tipte salgı yapan konjunktiva goblet hücreleri tarafından salgılanır. Bazı müsinlerin ise kornea ve konjunktiva epitelince üretildiği, hatta yapılan çalışmalarda lakrimal bezin müsin üretimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir [41][42][43]. Goblet hücreleri yoğunlukla göz kapakları kenarlarında, fornikslerde, tarsın üst kısımlarında (Henle kriptleri) ve korneaskleral limbusta (Manz bezleri) bulunur [44].

Müsinler yüksek oranda karbonhidrat içeren (>%50) yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir. Yüksek glikolizasyon sayesinde negatif bir yük kazanırlar ve hidrofilik aköz tabaka ile karışabilir, oküler yüzeyde su tutabilir hale gelirler [45].

İnsanda 20 adet müsin geni saptanmış olup iki temel tipte incelenir:[46]

1. Transmembran (Epitelyal)
2. Sekretuar (Çözünbilen)

Transmembran müsinler oküler yüzeyde gözyaşı fimine komşu apikal hücre membranı kıvrımlarının (mikroplikaların) uçlarından çıkar ve 200-500 nm uzanarak glikokaliksi oluşturur. Yaralanma ve enfeksiyöz patojenlere karşı savunma hattı görevi görürler [47][48].

Her göz kırpmada veya her göz hareketinde yüzeylerde kayganlaştırıcı bir tabakanın varlığını sağlayacak şekilde sekretuar müsinlerden oluşan jelatinöz bir tabakayı bir arada tutar [26].

Günümüzde 10 adet transmembran müsin tanımlanmıştır. MUC1, MUC4 ve MUC16 kornea ve konjunktivanın yüzeyel hücre membranlarında bulunur, ayrıca gözyaşında çözünebilen formları da mevcuttur [49]. MUC20 insan konjunktivasında en çok eksprese edilen müsinlerden biridir [50]. Transmembran müsinlerin görevleri arasında; glikokaliksi oluşturarak patojenlerin girişine karşı bariyer oluşturmak, hücre içine uzanan sitoplazmik kuyrukları sayesinde sinyal iletimini sağlayarak epitel aktivitesine katkıda bulunmak sayılabilir [45]. Epidermal büyüme faktörü reseptörünü etkileyerek epitel hücre büyümesinde potansiyel rolü olduğu düşünülmektedir [41].

Sekretuar müsinler; büyük jel oluşturucu müsinler ve küçük çözünebilen müsinler olmak üzere iki tipte incelenebilir. Bilinen en büyük glikoprotein olan büyük jel oluşturucu müsinler MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 ve MUC19, küçük çözünebilen müsinler ise MUC7, MUC8 ve MUC9 olmak üzere toplamda 8 adet sekretuar müsin tanımlanmıştır [46]. MUC5AC konjunktiva goblet hücrelerince salgılanan temel sekretuar müsin olup mukus tabakası için yapı iskelesi görevi görür [42]. MUC5AC, ciddi kuru göz belirtileri gösteren kişilerde belirgin olarak düşük saptanmış ve artmış inflamasyon ve stabil olmayan gözyaşı film tabakası ile ilişkili bulunmuştur [51][52]. Küçük çözünebilen müsinlerden olan MUC7'nin antimikrobiyal aktivitesi vardır.

Sekretuar müsinler, anyonik özellikleri ve aralarındaki itici güç nedeni ile glikokaliksi oluşturan moleküller üzerinde kolayca hareket eder, gözyaşı filmi boyunca debrileri toplayan temizleyici gibi davranır ve her göz kırpma ile birlikte nazolakrimal kanaldan uzaklaştırılırlar [48].

Transmembran ve sekretuar müsinler içerdikleri polar bölgeler sayesinde su molekülleri ile bağ kurar ve bu sayede oküler yüzeyde ve gözyaşı film tabakasında birbirlerine çok yakın oldukları halde yapışmazlar [53]. Yapışmanın olmaması gözyaşı filminin yayılabilirliğini sağlayarak göz kırpma sırasında oluşabilecek mikrotravmayı engeller [54]. Kuru göz sendromunda, dehidrate olan müsin polar yükünü kaybeder. Bu durumda müsin molekülleri birbirine ve epitele yapışır, hidrofilik müsin jeli hidrofobik hale döner ve filamanlar oluşur [55].

Müsin tabakanın fonksiyonları:

- 1- Oküler yüzeyin lubrikasyonunu sağlamak; göz kırpması sırasında oluşabilecek travmalardan korumak,
- 2- Hidrofobik olan kornea epitelini hidrofilik hale çevirmek, böylece gözyaşının oküler yüzeye dağılmasını sağlamak,
- 3- Yüzey gerilimini lipid tabakasının yardımı ile azaltmak, bu yolla gözyaşı filminin stabilitesini sağlamak,
- 4- Dökülen epitel hücrelerini, yabancı maddeleri ve bakterileri yakalamaktır.

5.1.2. Aköz Tabaka

Prekorneal gözyaşı film tabakasının en kalın kısmı olup yaklaşık 8 µm'dir ve ana lakrimal bez ile yardımcı gözyaşı bezlerinden (Wolfring ve Krause) aktif olarak salgılanır. Aköz tabakada; elektrolitler, proteinler, büyüme faktörleri, vitaminler, anti bakteriyel moleküller, sitokinler, immünglobulinler ve hormonlar bulunmaktadır. Aköz tabakanın içeriği, oküler yüzeyin beslenmesini ve korunmasını sağlar [56].

Elektrolitler: Lakrimal bezin asiner ve duktal epitel hücrelerinden salgılanır. Gözyaşı film tabakasında en sık bulunan elektrolitler; sodyum, potasyum, klorür ve bikarbonat olup, daha az düzeyde magnezyum ve kalsiyum bulunur [57][58]. Elektrolit konsantrasyonu gözyaşı osmolaritesini belirlemekle birlikte sabit bir pH için tampon görevi de görür [59][60]. Gözyaşı film tabakasının normal pH değeri 7.2-7.6 arasında bulunup göz uzun süre açık kalırsa alkali yöne kayma görülebilir [61].

Gözyaşı osmolaritesi

Osmolarite, bir solüsyon içindeki osmotik olarak aktif partiküllerin toplamını ifade eder. Gözyaşı filmi osmolaritesi, gözyaşı üretimi, buharlaşması, drenajı ve emilimi arasındaki dengeye bir bakış açısı sağlayan tek bir ölçüm olarak tanımlanmıştır [62]. Gözyaşı osmolaritesi normal değerleri 270-315 mOsm/L olup ortalama 300 mOsm/L olarak kabul edilebilir [63]. Plasma osmolaritesi ile gözyaşı osmolaritesi arasında pozitif bir ilişki olup her ikisi kuru göz hastalarında ve sistemik dehidratasyonda artmaktadır [64]–[66]. Gözyaşı osmolaritesinde artış, kuru göz sendromunun evrensel bir özelliği olarak kabul edilir [67]. Bu artış artmış buharlaşmaya ve düşük hacimde buharlaşmanın artan etkisine katkıda bulunur. Ölçülen gözyaşı osmolaritesi değeri ile kuru göz sendromu ciddiyeti doğru orantılıdır [68], [69].

Proteinler: Yapılan çalışmalarda insan gözyaşında albümin, immunoglobulin, histamin, plazminojen aktivatör, histamin, prostoglandinler, proteazlar ve antimikrobiyal proteinler dahil yaklaşık 1800 peptid ve protein saptanmıştır [70]. Gözyaşında bulunan başlıca dört protein şunlardır; lizozim, laktoferrin, lipokalin ve sekretuar immunoglobulin A (sIgA). Lizozim, laktoferrin ve lipokalin, lakrimal bezin asiner hücreleri tarafından salgılanır [26]. Gözler açıkken hücre içi uyarana karşı bir yanıt olarak salgılanırlar ve salgılanma miktarları gözyaşı salgı miktarı ile orantılıdır. Bu nedenle farklı akım hızlarında konsantrasyonları sabit kalır [71], [72]. Lizozim, bakteri hücre duvarlarını eriten antimikrobiyal bir enzimdir. Laktoferrin, metal bağlayıcı protein olup antimikrobiyal özellikleri ve bazı mikroorganizmalara karşı antikor aktivitesini artırıcı özelliği vardır. Lipokalin lipid bağlayıcı protein olup zararlı olabilecek hidrofobik molekülleri toplar, mikrobiyal sideroforları ayırarak bakteriyel ve fungal enfeksiyonları önler [73]. Sekretuar immunoglobulin A ise lakrimal bez interstisyel dokularında ve konjunktiva substansia propriasında yerleşen plazma hücreleri tarafından oluşturulur. İki IgA monomeri ile IgA dimeri oluşturup asiner hücreye geçip, sekretuar komponentin eklenmesi ile sIgA formuna dönüşür[26]. Lokal immunitede önemli rolü olan IgA miktarı, gözyaşı üretim miktarı ve gözyaşı akım hızı azaldığında artar. Göz kapalı iken, gözyaşında IgA miktarının arttığı görülür [74]. Oküler inflamasyon varlığında, gözyaşında IgA miktarı artarak kompleman sistemini aktive eder ve lökositler oküler yüzeye doğru göç eder.

Aköz eksikliği ön planda olan kuru göz sendromunda proteinlerin büyük kısmını oluşturan lizozim, laktoferrin ve lipokalin miktarı azalır [74]. Gözyaşında albümin, IgG, seruloplazmin, transferrin, monomerik IgA gibi yüzeysel kapillerden sızan az miktarda protein bulunur [57]. Kuru göz sendromunda gözyaşı hacminin azalması ve kronik inflame kapillerlerden sızıntı olması nedeniyle serum kaynaklı proteinler olan albümin, IgG ve seruloplazmin konsantrasyonu yükselir [74] [75].

Büyüme faktörleri: Gözyaşında bulunan büyüme faktörleri ve sitokinler, sağlıklı epitel yüzeyi için gerekli olup kornea ve konjunktiva epitelinin çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını sağlar. Gözyaşında saptanan büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörü(EGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF- β), hepatosit büyüme faktörü(HGF), interlokin 1 α ve 1 β , tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) olarak sıralanabilir [76][77]. HGF ve EGF büyük oranda lakrimal

bezden salgılanmakla birlikte az miktarda konjunktiva damarlarından kaynaklanır [77]. TGF- β ise oküler yüzey epitel hücrelerinden, az miktarda da lakrimal bezden kaynaklanır [77].

5.1.3. Lipid Tabaka

Gözyaşı filminin en üst tabakası olup yaklaşık 40 nm inceliktedir [78]. Preokuler gözyaşı filminin hava ile temas eden yüzeyinde yüzey gerilimini düşürür ve oküler yüzeyin üzerine yayılmasını sağlar [79]–[81]. Lipid tabaka gözyaşının buharlaşmasını önler, kornea için pürüzsüz bir optik yüzey oluşturur [82]. Göz kapağı kenarındaki mukokutanöz bileşkede yerleşen holokrin sebace bez yapısında olan Meibomian ve Zeiss bezlerinden salgılanan lipid komplekslerinden meydana gelir [26]. İki tabakadan meydana gelmekte olup, kalın olan dış tabakası; hidrokarbonlar, trigliseritler, yağ esterleri gibi nonpolar lipidlerden, ince olan iç tabakası ise, fosfolipidler gibi polar lipidlerden oluşur [83]. Lipid tabakada bulunan bir gözyaşı proteini olan lipokalin, polar lipidler ile kompleksler oluşturarak film stabilitesine katkı sağlar. Bunun yanında aköz tabakanın yüzey gerilimini azaltır. Lipid tabakasının, işlev görebilmesi için, miktarının yeterli olması ve içeriğindeki lipid fraksiyonlarının oranlarının uygun olması gereklidir [84]. Son zamanlarda lipid tabakadaki lipid içeriğinin yanı sıra lipid tabaka ile ilişkili protein ve müsin maddelerinin de buharlaşmada azalmaya katkıda bulunduğu görüşü hakim olmaktadır [39].

	Konsantrasyon				
Bileşenler	Gözyaşı (bazal)	Serum	Bileşenler	Gözyaşı (bazal)	Serum
Proteinler			Büyüme Faktörleri		
Total protein	7.37 g/L	68-82 g/L	EGF	1.66 ng/ml	0.72 ng/ml
Lizozim	2.39 g/L	4.0-15 g/L	TGF- α (kadın)	247 pg/ml	147 pg/ml
Laktoferin	1.51 g/L	Bilinmiyor	TGF- α (erkek)	180 pg/ml	147 pg/ml
Albumin	54 mg/L	35-55 g/L	TGF- β 1	Bilinmiyor	140.3 ng/ml
IgA	411 mg/L	0.9-4.5 g/L	TGF- β 1b	2.32 ng/ml	
IgD	Bilinmiyor	3.0-300 mg/L	TGF- β 2	55 pg/ml	
IgE	Bilinmiyor	0.25-0.7 mg/L	Vitaminler		
IgG	32 mg/L	8-18 g/L	Vitamin A	16ng/ml	883 ng/ml
IgM	Bilinmiyor	0.37-2.8 g/L	Vitamin C	117 ug/mL	7-20 ug/mL
CuZn-SOD	103 ng/mg protein	Bilinmiyor	Elektrolitler		
Antioksidanlar			Na ⁺	145 mEq/l	135-146 mEq/l
Tirozin	45 uM	77 uM	K ⁺	24.1 mEq/l	3.5-5.0 mEq/l
Glutatyon	107 uM	Bilinmiyor	Ca ⁺²	1.5 mM	1.1 mM
Karbonhidrat			Cl ⁻	128 mM	96-108 mM
Glukoz	26 mg/l	0.6-1.2 gm/l	HCO ₃ ⁻	26 mM	21-29 mM
			PO ₄ ⁻³	0.22 mM	1.42 mM
			SO ₄ ²⁻	0.39 mM	0.53 mM

Tablo 1. Gözyaşı içeriği (CuZn-SOD: Cu, Zn superoksit dismutaz; EGF: Epidermal growth factor; TGF: Transforming growth factor) [85].

5.2. Gözyaşı biyo-belirteçleri

Dokuz adet erken gözyaşı biyo-belirteç adayı immünolojik testler ile belirlenmiştir.

- 1.Epidermal büyüme faktörü (EBF): Sjögren sendromu ve aköz yetmezlik tipi kuru gözde azalır. Meibum bez disfonksiyonuna (MBD) bağlı evaporatif tip kuru gözde ise artar.
- 2.İnterlökün 1α(IL-1α) : Sjögren sendromu ve MBD’de artar.
- 3.İnterlökün 6 (IL-6) : Sjögren sendromunda daha fazla saptanır.
- 4.Laktoferrin (LTF) : Sjögren sendromu ve non Sjögren sendromunda azalır.
- 5.Lipokalin 1 (LKN 1) : Sjögren sendromunda otoantijen olarak kabul edilir. MBD’de seviyesi azalır.
- 6.Matriks metalloproteinaz 9 (MMP 9): Sjögren sendromunda daha fazla saptanır. MBD’de seviyesi pek değişmez.
- 7.MUC5AC: Sjögren sendromunda azalır.
- 8.Plazminojen kaynaklı plazmin aktivitesi (PLG) : Sjögren sendromunda artar.
- 9.Grup 2A Fosfolipaz A2 (PLA2G2A) : Kuru gözde artar.

Kuru göz hastalığında gözyaşı filmi yapısında açıkça değişiklikler görülür. Ancak, gözyaşı film çalışmalarında klinik parametrelerin eksikliği ve gözyaşı filmi yapısının sınırlı anlaşılması, bu değişikliklerin nasıl oluştuğunu, nasıl yorumlanması gerektiğini ve kuru göz patofizyolojisindeki yerinin anlaşılmasını güçleştirmektedir. Gözyaşı filmi biyokimyasını ortaya koyan çalışmalarda bulunan biyobelirteçler, kuru göz tanı, tahmin ve tedavisinde kullanılabilir. Bütünsel bir yaklaşım gözyaşı filmi yapısının ve fonksiyonunun anlaşılması kuru göz hastalarına daha iyi tedavi seçenekleri sunulmasını sağlayacaktır.

6. Kuru Göz Hastalığı

Kuru göz hastalığı (KGH) dünya çapında yüz milyonlarca insanı etkilediği öngörülmekle birlikte oftalmologlara başvurular arasında en sık nedenler arasında yer almaktadır. Güncel tanıma göre; “Kuru göz, oküler yüzeye potansiyel hasarı olabilen, rahatsızlık hissi, görsel bozukluk gibi oküler belirtilerin eşlik ettiği, gözyaşı filmi homeostazı kaybı ile karakterize oküler yüzeyin multifaktöriyel bir hastalığı olup etyolojide gözyaşı film instabilitesi ve hiperosmolarite, oküler yüzey inflamasyonu ve hasarı ile nörosensöryel anomaliler rol oynar.” Tanıma henüz girmese de KGH, klinik olarak sıklıkla kronik ve progresif seyir izlemektedir. KGH vizyon, yaşam kalitesi ve iş verimliliğine olan zararlı etkilerinden dolayı birey ve toplum üzerindeki ekonomik yük oluşturmaktadır. Orta ve şiddetli KGH belirgin ağrı, günlük performans sınırlamaları, canlılığın azalması, genel sağlık kalitesinin bozulması ve sıklıkla depresyon ile ilişkilidir.

Tarihte patolojik olarak kuru göz tanımı, ilk defa İsveçli oftalmolog Henrik S.C.Sjögren tarafından ‘keratokonjonktivitis sikka’ olarak yapılmıştır [27]. Kuru göz için, 2006 yılında gözyaşı kalitesi ve miktarı ilişkisini yansıtan ‘disfonksiyonel gözyaşı sendromu’ ismi önerilmiştir.

“Oküler yüzey” terimi, lakrimal ve Meibomian bezleri, gözyaşı filmi, kornea, konjunktiva ve göz kapaklarını içeren oküler yüzey ve adneks yapılarını tanımlamaktadır. “Homeostasis”, doku ve sıvıların kimyasal bileşimleri ile çeşitli fonksiyonların vücutta dinamik bir denge içinde olması halidir. Homeostazisin bozulması, KGH’de gözlenebilen gözyaşı filmi ve oküler yüzey dengesizliğinin sonucu görülen pek çok belirtiyeye yol açmaktadır. Gözyaşı filmi, oküler yüzey için lubrikasyon ve koruma sağlamada hayati bir role sahip olmakla birlikte optimum görsel performansı sağlayan refraktif kırılma için pürüzsüz yüzey oluşumuna katkı sağlar. KGH’da belirti ve bulgular ile pozitif tanı konulduktan sonra amaç bozulan bu homeostazi restore etmeye yönelik olmaktadır.

6.1. Epidemiyoloji

Standardize tanım ve tanı kriterlerinin belirlenmesinin güçlüğü kuru göz prevalansının saptanmasını zorlaştırmaktadır. Prevalans çalışmalarında hastalığın tanı kriterleri veya bulgu ve semptomlar temel alınarak yapılması, seçilen popülasyonun farklı özelliklerde olması oranı değiştirmektedir. Semptomatik ve asemptomatik seyreden tüm toplum baz alındığında prevalans %5-50 arasında saptanmaktadır. Bazı toplumlarda sadece bulguya dayalı kuru göz tanısı konulduğunda bu oranın %75’e ulaştığı görülmektedir [39]. Genel oftalmoloji kliniklerine başvuran hastaların, tahminen %25’i KGS belirtileri bildirmektedir [86]. Beaver Dam Çalışması’nda ise kuru göz insidansı %13 olarak bulunmuştur.

Semptomatik hastalık ve kuru göz bulgularının saptanmasında yaşla birlikte artış olmaktadır. Öte yandan sadece bulguya dayanan kuru göz prevalansı her dekatta semptomatik hastalığa göre daha büyük artış gösterir. Kadın cinsiyet ve Asya ırkına mensup olmak risk faktörü olarak değerlendirilir. 2007 Kuru Göz Çalıştayı’nda risk faktörleri tutarlı, olası ve kesin olmayan şeklinde üç kategoriye ayrılmıştır. Yaş, cinsiyet, ırk, MBD, bağ dokusu hastalığı, Sjögren sendromu, androjen eksikliği, bilgisayar kullanımı, kontakt lens kullanımı, östrojen replasman tedavisi, hematopoetik kök hücre nakli, belirli çevresel koşullar (kirlilik, düşük nem ve hasta bina sendromu) ve ilaç kullanımı (örneğin; antihistaminikler, antidepresanlar, anksiyolitikler ve izotretinoin) tutarlı risk faktörleri olarak belirlenmiştir. Muhtemel risk

KGH iki ana kategoride incelenir.

1.Aköz yetmezlik tipi KGH (AYKG): Normal buharlaşma koşulları altında lakrimal bezden gözyaşı sekresyonunun azalmasıyla hiperosmolarite ortaya çıkar.

2.Evaporatif tip KGH (EKG): Normal çalışan bir lakrimal bez varlığında gözyaşı filminden aşırı buharlaşma nedeni ile hiperosmolarite görülür.

Bu iki farklı kuru göz hastalığı tipinin net sınırlarla birbirinden ayrılmadığı ve çoğu hastada birlikte bulunabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. KGH’ de kısır döngünün başlangıç noktası olarak kabul edilen artan gözyaşı osmolaritesi, yüzey epitel hücrelerinde MAP kinaz ve NFκB sinyal yollarını aktive ederek inflamatuvar mediatörlerin (interlökin 1, TNF-α) ve proteazların (MMP-9 gibi) salınımına yol açar [89]. Aktive T hücrelerden salınan inflamatuvar mediatörler ile oküler yüzey hasarı pekişir. Bu mediatörler gözyaşı hiperosmolaritesi ile birlikte kornea ve konjunktiva epitel hücreleri ile goblet hücrelerinde apoptozis oluşumuna yol açar. Goblet hücre kaybı, kuru göz hastalığının her formunun bir özelliği olup gözyaşındaki MUC5AC eksikliğiyle karakterizedir. Değişen glikokaliks musin ekspresyonu ile oküler yüzeyin ıslanabilirliğinin azalması, oküler yüzey boyanmasına ve gözyaşı filminin erken parçalanmasına neden olur. Tüm bunların sonucunda KGH’nin karakteristik özelliği olan gözyaşı filmi instabilitesi ortaya çıkar.

Bu durum gözyaşı hiperosmolaritesini daha da arttırarak oküler yüzey hasarına yol açan kısır döngünün tamamlanmasına neden olur. Gözyaşı filmi instabilitesi ve hiperozmolarite ile tetiklenen inflamasyon, aynı zamanda nörojenik kronik inflamasyona ve hastalık şiddetinin artmasına katkıda bulunur [90] (Şekil 8).

Kseroftalmi, oküler alerji, koruyucu madde içeren damla ve kontakt lens kullanımı gibi oküler yüzeyi etkileyen durumlarda gözyaşı ozmolaritesinde artış olmadan da gözyaşı filmi instabilitesi başlayabilir. Bu durumda, gözyaşı kırılma zamanında azalmanın gözyaşı filmi hiperosmolaritesinin birincil temeli olduğu varsayılmaktadır. Hiperosmolarite başlangıçta lokal kırılmalar olarak görülebilirken artan şiddetle, bir noktada gözyaşı menisküsünde tespit edilebilir hale gelebilir. Dolayısıyla aköz tip yetmezlik “oküler yüzey ile ilişkili KGH” olarak değerlendirilebilir.

“MBD ile ilişkili KGH”de ise (EKG) gözyaşı filmindeki lipid tabakası eksikliği sonucu gözyaşı hiperozmolaritesi gelişir. Aköz yetmezlik tipi kuru göz gelişimine sekonder evaporatif etmenler eklenebilir.

AYKG'nin çeşitli nedenleri vardır. Gözyaşı filmi homeostazı için esas olan lakrimal bezin duysal sinir liflerinin bloke olmasından kaynaklanabilir. Bilateral topikal anestezi, hem gözyaşı salgılanmasında hem de göz kırpma oranında azalmaya neden olabilir. Refleks yaşarmanın bloke olması sonucu oluşan kuru gözün nedenleri arasında topikal anesteziklerin kronik olarak kötüye kullanımı, trigeminal sinir hasarı ve LASIK dahil keratorefraktif cerrahi geçirilmiş olması sayılabilir. Lakrimal kanalların tıkanması sonucu gözyaşı aköz tabakasının ile azalmasına neden olan durumlar arasında trahom gibi bir skatrisyel konjunktival hastalık, oküler skatrisyel pemfigoid, eritema multiforme, greft versus host hastalığı ve kimyasal yanıklar gösterilebilir. Anti histaminikler, β -blokerler, anti spazmodikler, diüretikler gibi sistemik ilaçların kullanımı ve bazı psikotrop ilaçlar, lakrimal sekresyonda azalmaya neden olabilir ve kuru göz gelişimi için risk faktörü olarak kabul edilir.

Batı dünyasında AYKG'nin en sık nedeni lakrimal bezin inflamatuvar infiltrasyonu olup, en çok karşılaşılan ciddi otoimmün bozukluklarla ilişkili KGH'de Sjögren sendromu (SSKG) ve daha hafif seyreden non Sjögren sendromu (NSKG) olarak iki ana tipte incelenir. İnflamasyon asiner ve duktal epitel hücre disfonksiyonu veya destrüksiyonu ile potansiyel olarak geri dönüşümlü nörosekretuar bloğa neden olur. Dolaşımdaki antikörler muskarinik (M3) reseptörüne bağlanarak ayrıca bir reseptör bloğuna neden olabilir. Dokulardaki düşük androjen seviyeleri lakrimal bez inflamasyonu için zemin oluşturur.

Epitel hasarı ve kusurlu glikokaliks, gözyaşı hacmi ve goblet hücresinden salınan müsinin kaybı, sürtünme hasarına ve sürtünme ile ilgili semptomlara yol açar. Kuru gözün neden olduğu gözyaşı hiperosmolaritesi ve epitel hasarı kornea sinir uçlarını uyarır ve oküler rahatsızlık belirtileri, artan göz kırpma hızı ve kompensatuvar refleks lakrimal gözyaşı sekresyonunda artışı görülür.

6.4. Kuru Göz ve İnflamasyon

Oküler yüzey (kornea, konjunktiva, aksesuar lakrimal bezler), kirpikli kenardaki meibum bezleri, ana lakrimal bez ve bunlar arasındaki inervasyon (aferent duyu sinirleri, eferent otonomik ve motor sinirler ve gözyaşı salgılayan bezler) bir “*Lakrimal Fonksiyonel Birim (LFB)*” oluşturur. Bu birimin herhangi bir bileşeninin hastalığı veya hasarı gözyaşı film tabakasının durağanlığını bozabilir ve kendini kuru göz olarak gösteren oküler yüzey hastalığına yol açabilir [88]. İnflamasyonu başlatan etmenler arasında hiperosmolarite, oküler yüzeyin kuruması, göz kırpma sırasında oluşan mikrotravma, gözyaşı ve kornea sinir

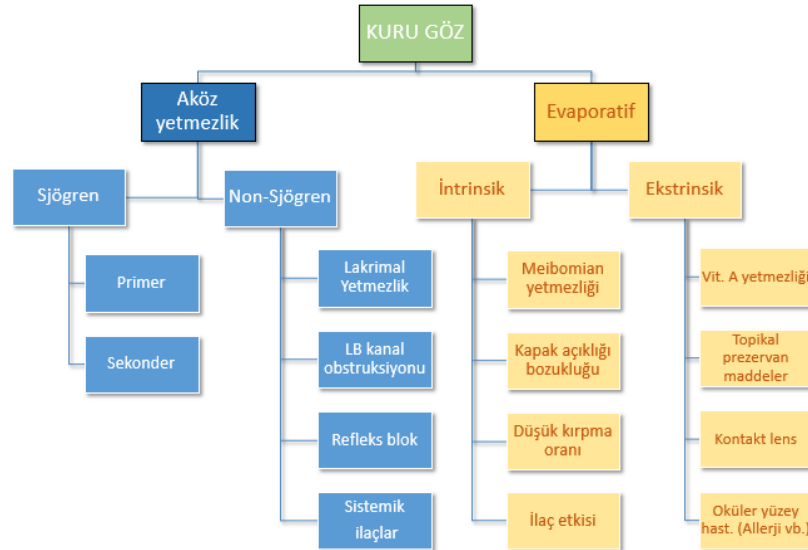
liflerinden salınan destekleyici faktörlerin azalması, gözyaşı bezi ve göz kapaklarından salınan proinflamatuar maddeler olarak sayılabilir [91]. Hasarlanan epitel hücrelerinden açığa çıkan ve dilate konjunktiva damarlarından sızan lenfositlerin ürettiği sitokinlerle, inflamasyon kronik bir sürece girmektedir. Oküler yüzeydeki inflamasyon, epitelde skuamöz metaplaziye, glikokaliks ve goblet hücre kaybına yol açarak oküler yüzeyin ıslanabilirliğinin azalmasına neden olur. Sitokinler, epitelde keratinizasyona, hipoesteziye, müsin ekspresyonunun değişmesine ve kornea neovaskülarizasyonuna yol açarlar[92], [93].

Günümüzde KGH, otoimmün hastalıklarla pek çok ortak yön barındıran bir inflamatuvar hastalık olarak kabul edilmekte olup, yapılan bir çalışmada 220 kuru göz hastasının %25,9’unda altta yatan bir romatolojik durum olduğu bildirilmiştir [94].

Kuru göz hastalığı patogenezindeki inflamatuvar elemanlar, hem hücreler hem medyatörlerdir. Hücreler esas olarak lenfositler, dendritik hücreleri, Langerhans hücreleri, makrofajlar ve T hücreleri (Th1, Th17, Treg) gibi antijen sunan hücrelerdir. Kornea ve konjunktivanın epitel hücreleri de inflamasyona katılır [95]. İnflamatuvar medyatorler ise sık rastlanan inflamatuvar sitokinler, Th1-ilişkili ve Th17-ilişkili sitokinler, kemokinler ve reseptörleri, MMPlar ve salgılanan fosfolipazlardır [96].

6.5. Sınıflandırma

Kuru göz sınıflandırma şemaları, tanı konmasına ve sonuçta uygun tedavi ile hasta iyileşmesini sağlamada rehber olmaktadır (Şekil 9).



Şekil 9. Kuru göz hastalığı sınıflaması [97].

Aköz yetmezlik KGH hastalarının yaklaşık %10'unda KGH'nın tek sebebi olarak görülür [94]. En sık olarak meibum bez disfonksiyonu nedeniyle ortaya çıkan evaporatif tip KGH ve aköz yetmezlik / evaporatif karışık tip KGH ise olguların %80'inden fazlasını oluşturur [97].

6.5.1. *Sjögren sendromu (Sjögren Sendromu'na bağlı Kuru Göz-SSKG)*

Sjögren sendromu (SS), ekzokrin bezlerinin lenfositik hücre infiltrasyonu (ekzokrinopati veya epitelit) ile karakterize kronik ve progresif seyreden otoimmün hastalık olup, otoantikor üretimi, immün kompleks birikimi ve birçok organda lenfositik infiltrasyon nedeniyle sistemik komplikasyonlar görülür [98]. Gözyaşı ve tükürük bezlerinin inflamasyonu sonucu kuru göz ve kuru ağız semptomlarına neden olur [99]. Çoğunlukla kadınlarda (kadın/erkek: 9/1) ve 4.-5. dekatları içinde görülür [100].

SS, primer ve sekonder olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, poliarteritis nodoza, Wegener granulomatozu, sistemik skleroz, primer biliyer skleroz, mikst bağ dokusu hastalığı gibi otoimmün hastalıklara sekonder olarak ortaya çıkabilir.

Oküler semptomlar arasında bulanık görme, yabancı cisim hissi; klinik bulgular arasında gözyaşı filmi instabilitesi, kornea ve konjunktivada boyanma, goblet hücre kaybı ve epitel metaplazisi izlenir. Sjögren sendromunda göz kuruluğu, NonSjögren-KGH'ye göre daha ciddi seyredebilir. Solunum yollarındaki muköz sekresyonların azalması burun, boğaz ve trakeada kuruluğa, ciltteki ekzokrin bezlerin sekresyonunun azalması cilt kuruluğuna ve vajinal kuruluğa neden olabilir [101]. Böbrek, karaciğer, sinir sistemi ve damar tutulumu görülebilir. Semptomların sıklıkla nonspesifik olması ve zaman içinde gelişmesi tanıda gecikmeye neden olabilir. Primer SS'de, sekonder SS'ye göre ektraglandüler belirtiler daha belirgin olup lenfositlerle ilgili bozukluklar daha ağır seyreder [102].

Hastalığın patogenezinde genetik, çevresel faktörler, viral enfeksiyon, androjen profili ve immün sistem bozuklukları arasındaki etkileşimler rol oynar. Genetik olarak HLA DR3 (DRB1*03) taşıyan bireyler SS'ye daha yatkındır. Epstein-Barr virus (EBV), human T-lenfotropik virus (HTLV) tip I, HIV, hepatit C ve Coksakia virüsler etyolojide tetikleyici olarak suçlanmaktadır [103]. Post menapozal kadınlarda daha sık görülmesi seks steroidlerinin koruyucu etkisinin azalması ile açıklanabilir [104].

Gözyaşı kırılma zamanı, SS tanısında özgünlüğü düşük bir test iken; Schirmer testi SS için yüksek özgünlüğe sahip ve uygulaması kolay bir testtir. ANA, anti-Ro (SS-A), anti-La (SS-

B), romatoid faktör antikorları tanısal amaçlı kullanılabilir. Minör tükürük bezi biyopsisi tanıya yardımcı olabilir.

B hücre hiperaktivitesi ve T hücre infiltrasyonu SS patogenezinin merkezinde yer alır. Yapılan bir çalışma immün sistem ile ilgili üç yolağın genindeki bozukluğun SS'ye neden olabileceğini göstermiştir. Bunlar IFN sinyal yolunun aktivasyonu, B hücre fonksiyonu antikor üretimi ve temizleme yolları ve NFkB yolağının aktivasyonu olarak sayılır [105]. SS'de, Th1 lenfosit aracılı immün yanıt daha baskın olup kan, konjunktiva, gözyaşı ve tükürükte IFN-gama seviyesi artar. Yüksek IFN-gama seviyesi daha ciddi klinik seyrin göstergesi olabilir [106]. Th17 aracılı immün yanıt sonucu artan IL-17 seviyesinin patogeneizde rolü olduğu ve lezyon ciddiyeti ile korele olduğu düşünülmektedir. TNF α gibi inflamatuvar sitokinlerin artışı, lakrimal beze karşı immün yanıtın sürmesini sağlayarak bezin fonksiyonlarını bozar [107]. Lakrimal bezin inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile asini ve duktus yapılarının destrüksiyonu aköz gözyaşı kaybına yol açar. Ek olarak sitokin ve antikorlar ile nörotransmitter salınımının inhibisyonu veya inflamasyona bağlı sekretomotor innervasyon hasarı lakrimal sekresyonun azalmasına katkıda bulunur. Konjunktiva epiteli ve lakrimal bez asiner hücrelerinde apoptozis gelişebilir.

Altta yatan tüm bu inflamatuvar nedenlerden dolayı göz kuruluğu, non-Sjögren kuru göz hastalığından daha ağır seyredebilmekte, suni gözyaşı tedavisinin yanı sıra sıklıkla anti-inflamatuvar tedaviye gereksinim duyulmaktadır.

6.5.2. Non-Sjögren Kuru Göz (NSKG)

NSKG, sistemik otoimmün bozukluğun eşlik etmediği doğuştan ve edinilmiş aköz yetmezlik tipi kuru göz hastalığını tanımlamaktadır [104].

Non-Sjögren aköz yetmezlik nedenleri arasında lakrimal bezin sarkoid granülom, lenfoma ve nörofibromlarla infiltrasyonu; gözyaşı bezinin HIV enfeksiyonu ve Steven Johnson sendromu, Muköz membran pemfigoid, greft-versus-host hastalığıyla ilişkili olarak inflamasyonu; mukus üretimindeki yan etkilerine ek olarak gözyaşı yetersizliğine neden olduğu bildirilen vitamin A eksikliği; lakrimal beze giden sekretomotor liflerin engellenmesinden dolayı intermedier ve büyük yüzeyel petrozal sinirin etkilendiği 7. sinir felci, gözyaşı bezi ablasyonu, travma ve radyoterapi bulunmaktadır (Tablo 2).

Birincil lakrimal bez yetersizlikleri
Yaşa bağlı kuru göz Konjenital alakrimi Ailevi disotonomi
İkincil lakrimal bez yetersizlikleri
Lakrimal bez infiltrasyonu Sarkoidoz Lenfoma AIDS Graft versus host hastalığı Lakrimal bez ablasyonu Lakrimal bez denervasyonu
Lakrimal bez kanallarında tıkanıklık
Trahom Mükoz membran pemfigoid Steven Johnson sendromu Kimyasal ve termal yanıklar
Refleks hipo-sekresyon
<u>Refleks duyu bloğu</u> Kontakt lens kullanımı Diyabet Nörotrofik keratit <u>Refleks motor bloğu</u> Yedinci kraniyal sinir hasarı Çoklu nöromatozis Sistemik ilaç maruziyeti

Tablo 2. Sjögren sendromu dışı kuru göz hastalığı ile ilişkili durumlar

A) Primer Lakrimal Bez Yetmezliği

a) Konjenital Alakrima

Çocuklukta veya genc yaşta görülen lakrimal bezin gelişmemesi ile karakterize kuru gözün nadir nedenleri arasında olan kalıtsal bir bozukluktur. Bazen tükrük bezi yokluğu eşlik edebilir. Blefarofimozis, lakrimal-aurikulo-dental-dijital sendrom (LADD), Pierre-Robin sendromu ve Allgrove sendromu ile ilişkili olabilir.

b) Familial Disotonomi (Riley Day Sendromu)

Lakrimal bezin sempatik ve parasempatik innervasyonu ve oküler yüzeyin duyu innervasyonu gelişiminin anormal olduğu otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Gözyaşı bezinden yeterli miktarda gözyaşı salgınamadığı gibi duyu innervasyondaki azalmaya bağlı olarak refleks gözyaşı da azalmıştır.

c) Triple A sendromu (Allgrove sendromu)

Lakrimal bezin konjenital yokluğu ile seyreden otozomal resesif kalıtmıli bozukluktur. Akalazyia, Addison hastalığı, santral nörodejenerasyon ve otonomik disfonksiyon görölür. ALADIN proteini kodlayan AAAS geninde mutasyon sonucu gelişir.

d) Yaşıa Bağlı Kuru Göz

NSKG'ün sen sık görölren formudur. SSKG'ye göre başlangıç yaşı daha geç, lakrimal bez infiltrasyonu daha düşük, ilerleme hızı daha yavaş ve şiddeti daha düşük bir hastalıktır. Yaşlanma bir doku veya organizmanın ömrü boyunca gösterdiği yapı ve işlevdeki biriken değişimler olarak tanımlanabilir. Yaşlanma genetik, hormonal ve immünolojik etkileri aracılığıyla programlı veya aşınma-yıpranma, oksidasyon, çapraz bağlanma, post translasyonel modifikasyon ve somatik mutasyon sonucu hasar temelli gerçekleşebilir.

Yaşıa birlikte görölren lakrimal sekretuar dokunun kaybı, oküler yüzeyden duysal iletinin azalması ve sekretuar nörotransmitterlerin azalması sonucu gözyaşı salınımı azalmaktadır. Fenol kırmızısı ile yapılan bir çalışmada yaşıa birlikte gözyaşı hacminde azalma gözlenmiştir [107]. Mekanik ve kimyasal uyarılara karşı kornea duyarlılığının yaşıa azalması, duysal uyarının şiddetini düşmesine ve gözyaşı salınımının düşmesine neden olur. Birçok çalışmada yaşıa birlikte laktoferrin, lizozim, peroksidaz gibi gözyaşı kaynaklı proteinlerin seviyesinin düştüğü saptanmıştır [108].

Kırk yaşından itibaren lakrimal bezde CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin infiltrasyonunun artması sonucu asiner ve duktus yapılarında destrüksiyon başlar. Histopatolojik olarak interasiner ve periduktal fibrozis, paraduktal kan damarı kaybı ve asiner hücre atrofisi ile ilişkili düşük dereceli dakriyoadenit oluşur [109], [110]. Yaşam boyu maruz kalınan oksidatif stres lakrimal bezde doku hasarına yol açarak gözyaşı hacminde azalma, osmolaritede artış ve korneal boyanmaya neden olabilmektedir. Genç ve yaşı kadavralardan alınan lakrimal bez dokularının karşılaştırıldığı bir çalışmada daha yaşı grupta oksidatif DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu bulguları saptanmıştır [111].

B) Sekonder Lakrimal Bez Yetmezliği

1.Lakrimal Bezin İnfiltrasyonu

Lakrimal bezin infiltrasyonu sonucunda, gözyaşı bezi işlev göremez, gözyaşı sekresyonu azalır ve aköz yetmezlik tipi kuru göz görülür. Bu grup hastalıklar arasında sarkoidoz, lenfoma, viral enfeksiyonlar, greft versus host hastalığı sayılabilir.

a) Sarkoidoz

Başta akciğer olmak üzere birçok dokuda non-kazeifiye granülomlar ile karakterize, kaynağı bilinmeyen kronik progresif bir hastalık olup prevalansı 1-40 /100.000 arasında değişmektedir [112]. Etkilenen diğer organlar karaciğer, dalak, lenf nodları, cilt, tükürük bezi ve lakrimal bezdir. Hastaların yaklaşık %63'ünde lakrimal bezde etkilenme saptanmakla birlikte tipik olarak lakrimal bezde belirgin büyüme gözlenir [113]. Sarkoidoza sekonder kuru göz lakrimal bezde lenfosit infiltrasyonu sonucu gelişir ve oldukça sık görülür. Dolaşımda TNF- α gibi proinflamatuvar sitokin seviyesi artar.

b) Lenfoma

Lakrimal bezin lenfomatöz hücreler tarafından infiltrasyonu sonucu kuru göz gözlenir [114].

c) Viral Enfeksiyon

Hepatit C ile enfekte hastalarda Sjögren sendromunu taklit eden klinik, immünolojik ve histolojik belirtiler gözlenebilir. HIV ile enfekte AIDS hastalarının %38'inde kuru göz görülmekte olup Sjögren sendromundan farklı olarak CD8⁺ T lenfositler, CD4⁺ T lenfositlere göre lakrimal bezde daha baskın olarak rol oynamaktadır [115].

d) Radyasyona ikincil lakrimal bez hasarı

Baş, boyun ve orbitada yerleşimli kitlesel lezyonlarda uygulanan radyoterapi, lakrimal bezde hasar oluşturarak kuru göz komplikasyonuna yol açmaktadır. Birçok çalışmada bu hasarın doz bağımlı olduğu 57 Gy üzerindeki dozda kuru göz gelişmesinin beklendiği belirtilmiştir. Çernobil felaketinde nükleer sızıntıya yakınlığın artması ile orantılı olarak aköz yetmezlik tipi kuru göz şikayetlerinin arttığı gözlenmiştir [116].

2. Lakrimal bez kanallarının obstrüksiyonu

Skatrizan konjonktivitlerde, yoğun oküler yüzey inflamasyonu ve konjunktivada fibrozis gelişimi sonucu ciddi kuru göz tablosu ortaya çıkmaktadır. Lakrimal bez ve aksesuar gözyaşı bezi kanallarının fibrozis ile tıkanması ile aköz tabaka, goblet hücrelerinin fibrozis ve

inflamasyon sonucu hasar görmesi nedeniyle müsin tabaka, meibomian bezi kanallarının tıkanması ile lipid tabaka etkilenir. Korneada opasifikasyon, perforasyon ve körlük ile sonuçlanabilmektedir. Yapılan bir çalışmada skatrizan konjunktivitler arasında müköz membran pemfigoid ilk sırada iken, ardından Steven Johnson sendromu ile graft versus host hastalığı gelmektedir [117]. Termal ve kimyasal yanıklar sonrasında da konjunktivada skatrizasyon görülmektedir.

a) Graft versus Host Hastalığı (GVHH)

Hematolojik malignitelerin tedavisinde kullanılan allojenik hematopoetik kök hücre nakli etkili bir yöntemdir. Nakil sonrası donör T hücreleri, alıcı dokunun antijenleri ile etkileşime girerek inflamasyon gelişimine neden olur. Pek çok sistemik tutulum görülmekle birlikte cilt, gastrointestinal sistem, karaciğer ve göz sık etkilenmektedir. Oküler bulgular işlemden birkaç ay sonra hastaların %40-80'inde görülmektedir [118]. Aktive olmuş T hücreler, epitel-mezenşim dönüşümüne neden olarak lakrimal bez ve oküler yüzeyde immün aracılı fibrozis gelişimine neden olur. Lakrimal bez lenfositik infiltrasyon ve fibrozis sonucu atrofiye gidebilmektedir. Kuru göz en sık görülen oküler komplikasyon olmakla birlikte akut konjunktiva inflamasyonu ile psödo-membranöz veya skatrizan konjonktivit de görülmektedir. Ağır vakalarda persistan epitel defekti, kornea ülseri ve perforasyonu gelişebilmektedir [119].

b) Steven Johnson Sendromu / Toksik epidermal nekroz

Akut başlangıçlı yaşamı tehdit eden kornea ve konjunktivayı içeren müköz membran ve cilt tutulumu yapan ciddi vezikülobüllöz bir hastalıktır. Patogenezinde sitotoksik T hücrelerin rol aldığı tip 4 hipersensitivite mekanizması yer alır [120]. Mukozal yüzeylerde ve ciltte epitel ayrılmasına neden olan geniş çaplı keratinosit ölümü ve epidermal nekroz gözlenir. Tanısal anlamda lezyonlar vücut yüzey alanının %10'dan azını etkilemişse SJS, %30'dan fazlasını etkilemişse TEN, %10 -30 arasında ise SJS/TEN “ara form” olarak adlandırılır. SJS daha çok çocuk ve adolesanlarda görülürken, TEN her yaşta görülebilir. En sık tetikleyen faktörler sulfonamid, penisilin, ampisilin ve izoniazid türevi antibiyotikler, anti-epileptik ajanlar, non-steroid anti inflamatuvar ilaçlar ya da herpes simpleks virüs, streptokok, adenovirüs ve nadiren mikoplazma gibi infeksiyöz mikroorganizmalardır. Oküler hastalığın akut döneminde membranöz keratokonjonktivit, kronik dönemde konjunktivanın subepitelyal fibrozisi sonucu semblefaron, entropion, trikiyazis, limbal kök hücre yetmezliği ile korneal konjunktivalizasyon ve vaskülarizasyon görülmektedir [121]. Hastaların gözyaşında IL-17

seviyesi yüksek, lakrimal bez kaynaklı laktoferrin ve EGF'nin azalmış olduğu gösterilmiştir [122]. Gözyaşı üretiminin tama yakın azaldığı kuru göz olgularında konjunktivanın keratinizasyonu ve skuamöz metaplazi gelişebilmektedir [123].

c) Müköz membran pemfigoid

Mukozal yüzeyleri ve cildi etkileyen kronik progresif otoimmün subepitelyal hastalığıdır. Kadınlar 2 kat daha sık ve 60 yaş üzerinde görülme riski daha fazladır [124]. Hastaların %85'inde oral mukoza, %65'inde konjunktiva, daha az oranlarda nazal mukoza ve cilt tutulumu görülür. Konjunktivanın tutulduğu durumlar “oküler skatrisyel pemfigoid” olarak adlandırmaktadır. Genetik yatkınlık, ilaç yan etkisi ve cerrahi operasyon ile ilişkisi oluğunu gösteren çalışmalar vardır. Epitel bazal laminasına karşı immün toleransın bozulması ve otoantikorların uyardığı kompleman aracılı inflamasyon epitel hücrelerinin bazal tabakadan ayrışmasına neden olur [125]. Klinik seyir SJS'ye göre daha yavaş olup subepitelyal fibrozis kaçınılmazdır. Hastalarda ciddi kuru göz yanında konjunktiva forniksini kısılması, semblefaron, ankiloblefaron, entropion, trikiyazis, korneada skar ve vaskülarizasyon gözlenen bulgular arasında yer alır.

d) Trahom

Çocukluk çağında tekrarlayan Klamidya trachomatis enfeksiyonu sonucu görülen kronik skatrisan keratokonjonktivit olup, gelişmemiş ülkelerde daha sık görülür. Kuru göz tablosunun yanında limbal kök hücre yetmezliği, trikiyazis, tarsal ve bulber konjoktivanın skarlaşmasına ikincil korneal opasite saptanmaktadır.

e) Termal ve kimyasal yanıklar

Yaygın yanıklar sonucu oküler yüzey ve lakrimal bez kanallarında gözlenen fibrotik değişiklikler kuru göze neden olmaktadır [126].

3.Refleks hiposekresyon

Gözyaşı üretimi sinir sistemi tarafından düzenlenmektedir. Kornea ve konjunktivadan trigeminal sinir aracılığıyla gelen afferent lifler beyne uzanır, buradaki lakrimal bezde işlendikten sonra efferent lifler fasyal sinir aracılığıyla parasempatik ve sempatik uyarı ile etki gösterir. Bu yolla gelişen herhangi bir bozulma kuru göz gelişimi ile sonuçlanmaktadır.

a) Refleks duyu bloğu

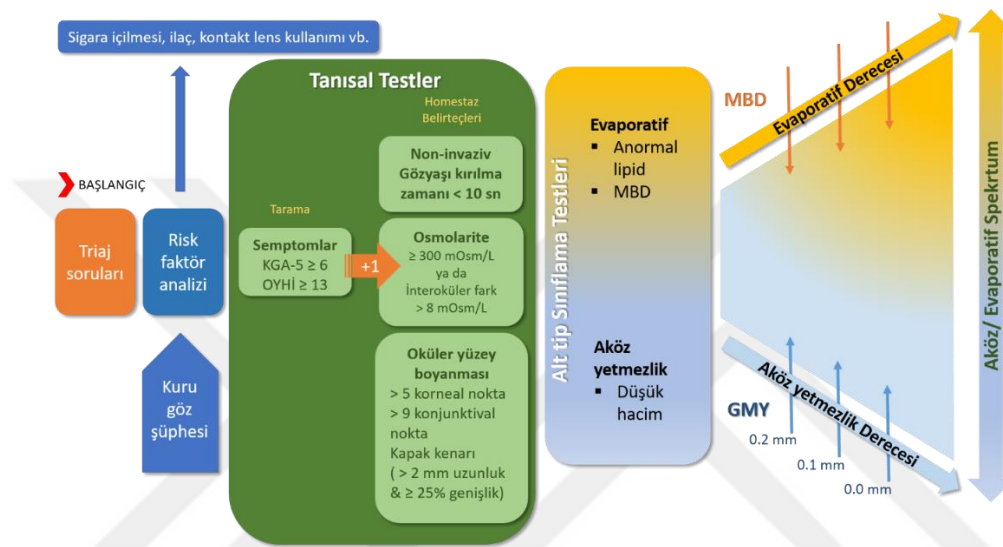
Cerrahi operasyon veya travma sonrası oluşan trigeminal sinir hasarı görülen olgularda gözyaşı üretiminde bozulma gözlenir. Kontakt lens kullanan bireylerde kornea hassasiyetinin azaldığı ve kuru göz şikayetlerinin geliştiği görülmüştür. Keratorefraktif cerrahi uygulanan hastalarda flep hazırlama aşamasında korneal afferent liflerin kesilmesi sonucu afferent uyarı azalmakta ve gözyaşı sekresyonu düşmektedir. Korneal sinir uçlarından epitel proliferasyonu ve migrasyonu için gerekli NGF, Substans P, CGRP, IGF-1 gibi nörotrofik faktörler salgılanmaktadır. Herpes zoster keratokonjonktiviti veya herpes simpleks keratitinde bu faktörlerin salgılanmasının bozulması ve kornea hassasiyetinin azalması sonucu nörotrofik keratit gelişebilir. Bu olgularda punktat epitel yopati, persistan epitel defekti, neovaskülarizasyon ile birlikte korneal opasite ve korneal ülserasyon karşımıza çıkmaktadır. Diyabet hastalarında lakrimal bezin mikrovasküler hasarı ve otonomik nöropati nedeni ile refleks yaşarmanın azalması sonucu kuru göz şikayetleri görülür. Göz kuruluğunun ciddiyeti, periferik nöropati ile diyabetik retinopati derecesi ile koreledir.

b) Refleks motor bloğu

Schwannoma gibi serebellopontin köşe yerleşimli tümörlerin cerrahi eksizyonu sırasında farklı seviyelerde 7. kraniyal sinir içinde seyreden parasempatik sinir liflerinin hasar görmesi gözyaşı salınımının azalması ile sonuçlanır. Yedinci kraniyal sinir hasarına ikincil gelişen lagofthalmus kuru göz semptom ve bulgularına yol açar. Antihistaminik, antidepresan, antipsikotik, antihipertansif, antispazmodik ilaçlar ve kemoterapötik ajanlar antikolinerjik etkileri nedeni ile gözyaşı sekresyonunu olumsuz yönde etkiler.

Evaporatif tip kuru göz, toplumda daha sık olarak görülmektedir. Göz kırpma refleksinin azalması, başka nedenlerle göz kapaklarının açık kalması veya kirpik diplerindeki meibomian bezlerin fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak gözyaşının en dışta bulunan yağlı tabakasının eksik olması gibi nedenlerle, gözyaşının olması gerekenden fazla buharlaşması sonucu ortaya çıkan kuru göz tipidir. Meibum bez disfonksiyonu, KGH'nin en sık sebebidir. MBD komplike ve multifaktöriyel bir hastalık olup göz kapağı inflamasyonu, konjunktiva inflamasyonu, kornea hasarı, mikrobial değişiklikler ve gözyaşı filminin durağan olmaması gibi farklı patofizyolojik mekanizmanın herhangi bir kombinasyonu ile geliştiği düşünülmektedir [127].

Günümüzde kuru göz için oküler yüzey ve göz kapağı belirtileri, görme bozukluğu, gözyaşı filmi stabilitesi, ozmolarite, gözyaşı hacmi, oküler yüzey hasarı, oküler yüzeyin inflamasyonu gibi parametreleri değerlendiren tanısal testler bulunmaktadır. Bu testlerin duyarlılık ve özgüllükleri seçilen popülasyon ve kuru göz hastalarının dahil edilme kriterlerine ve hastalık ciddiyeti ile ilişkili olarak değişmektedir. Klinik olarak kullanılan testlerin tanı koyma yeteneğinin güçlü, tarafsız, minimal invazif ve kolay uygulanabilir olması beklenir.



Şekil 10. Kuru göz hastalığında tanısal yaklaşım (GMV: Gözyaşı menisküs yüksekliği) [128].

Öncelikle kuru gözü taklit eden durumları dışlamak amacıyla hastaya sorular yöneltilerek triaj yapılır. Kuru Göz Anketi-5 (DEQ-5) veya Oküler Yüzey Hastalığı İndeksi (OSDI, OYHI) anketleri yapılarak kuru göz belirtileri, DEQ-5 ileriapılarak kuru gözü (OSDİmları dışlamak amacıyla hastaya sorular yöneltilerek triaj yapılır.gkuru göz klinik bulguları açısından ayrıntılı muayene yapılır. Hastada bu iki anketten birinde anlamlı skor bulunması ve homeostazis belirteçlerinden en az birinin pozitif olması durumunda “kuru göz kesin” tanısı konulmaktadır.

Günlük pratikte üç kinik test homeostazın bozulduğunu göstererek tanıyı doğrulamada yardımcı olur. Birincisi non-invaziv (floresein kullanılmaksızın) gözyaşı kırılma zamanı olup 10 saniyenin altında olması kuru göz için anlamlıdır. Floresein ile oküler yüzey boyandıktan sonra kobalt mavisi ışık altında yapılan test invaziv gözyaşı kırılma zamanı testi olarak adlandırılır. Göz kırpması sonrası oküler yüzeyde ilk siyah alanın ortaya çıkmasına kadar geçen

süre ölçülür. Floresein kullanılmaması nedeniyle non-invaziv GKZ testi olarak adlandırılan alternatif yöntemde, floresein damlatılması sırasında ortaya çıkan refleks yaşarma etkisini ortadan kaldırdığı kabul edilmektedir. Kornea yüzeyinden yansıtılan düzenli paternin göz kırpma sonrası bozulmasına kadar geçen süre ölçülür. İkincisi gözyaşı ozmolaritesi olup, gözlerden birinde 308 mOsm/L ve üzerinde olması ya da iki göz arasındaki gözyaşı ozmolarite farkının 8 mOsm/L'nin üzerinde olması değerlidir. Üçüncüsü oküler yüzeyin değerlendirilmesi olup kornea, konjunktiva, kapak kenarının floresein ile boyanması ile yapılır. Korneada 5'ten fazla, konjunktivada 9'dan fazla nokta-leke tarzında boyanma veya kapak kenarında 2 mm ve üzeri uzunlukta ve kapak genişliğinin %25'inden geniş boyanma pozitif bulgu olarak kabul edilir. Lissamin yeşili ile hasarlı musin tabakası olan alanlar boyanır. Palpebral aralığın boyanması kuru göz tanısını destekler. Rose Bengal boyası ile ölü epitel hücreleri ve lipid ile kontamine mukus partikülleri boyanır. Kuru gözün, aköz yetmezlik ile evaporatif spektrumun neresinde olduğunun saptanması ve ciddiyetinin belirlenerek tedaviye yön verilmesi amacıyla gözyaşı hacim ölçümü, mebiografi, lipid interferometri gibi ileri yöntemler uygulanabilir (Şekil 10).

6.7. Tedavi

Multifaktöryel etyolojiye sahip olması nedeni ile kuru göz hastalığının tedavisi karmaşık olup ve oftalmologlar arasında farklı yaklaşımlar görülmektedir. Son yıllarda kuru göz patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması tedavi stratejilerinin değişmesine katkı sağlamıştır. Ortak hedef oküler yüzeyde homeostasisi yeniden sağlamak, inflamasyon kısır döngüsünü kırmak ve oküler yüzey konforunun uzun süre korunabilmesidir. Günümüzde farklı mekanizmalar ile etkisini gösteren çok sayıda tedavi seçeneği bulunmakta olup birbirlerine oranla avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Evaporatif ve/veya aköz yetmezlik kuru göz ayırıcı tanısı yapılması tedavinin temelini oluşturmaktadır. Hasta anamnezi alınıp, risk analizi ve tanı testleri uygulandıktan sonra uygun basamakla tedaviye başlanmalıdır. Farklı faktörlerin etkili olması nedeniyle tek bir tedavi yöntemi başarılı olmayabilir. Verilen tedaviye cevap alınamadığında veya ciddi kuru göz saptanan olgularda bir üst tedaviye geçilebilir ya da devam eden tedavinin yanına diğer tedavi seçenekleri eklenebilir. Aköz yetmezlik tipi kuru gözde suni gözyaşı preparatları pratikte en sık kullanılan ajanlar olmakla birlikte, biyolojik ajanlar, topikal antiinflamatuvar ajanlar, sekretogoglar ve cerrahi yöntemler tedavi seçenekleri arasında sayılabilir.

6.7.1.Suni gözyaşı

Suni gözyaşı ajanları altta yatan fizyopatoloji yönelik olmayıp gözyaşı filminin replasmanı veya desteklenmesi amacıyla palyatif olarak uygulanmaktadır. Lubrikan ajan formülasyonları ozmolarite, pH ve viskozite değişiklikleri göstermekle birlikte major komponentleri genellikle benzer olup büyük çoğunluğu aköz komponent oluşturmaktadır. Piyasada içerik olarak farklı çok sayıda preparat bulunmaktadır. Suni gözyaşı ile oküler yüzey nemlenmesi sağlanmakta, gözyaşı osmolaritesi azaltılmakta ve inflamatuvar ajanlar dilüe edilmektedir [128]. Gözyaşı su, elektrolitler, protein, lipid ve büyüme faktörleri içeren kompleks bir yapıya sahip olup bu içerik suni gözyaşı preparatlarında bulunmamaktadır. Ayrıca, gözyaşı oküler yüzeye devamlı salgılanırken, suni gözyaşları belli aralıklarla kullanıldığı için oküler yüzeyin uzun süreli nemli kalması sağlanamamaktadır. Gözyaşı filmi kalınlığının sağlanması, gözyaşının oküler yüzeyde kalış süresinin artırılması ve goblet hücre yoğunluğunun artırılması gibi mekanizmalarla etki gösteren vizkozite artırıcı ajanlar kullanılmaktadır. Karbomer 940 (poliakrilik asit), karboksimetil selluloz (CMC), dekstran, hiyaluronik asit (HA), HP-guar, hidroksipropil metilselluloz (HPMC), polivinil alkol (PVA), polivinilpirolidon (PVP) ve polietilen glikol, gözyaşı preparatlarında kullanılan başlıca vizkozite artırıcı ajanlardır. Vizkozitenin artışı ile geçici bulanık görme, göz kapakları ve kirpiklerde birikinti oluşumu hasta uyumunu azaltabilir. Bundan dolayı yüksek vizkoziteli suni gözyaşlarının gece kullanımı daha uygundur. Kuru gözde artan gözyaşı ozmolaritesini dengelemeye yönelik hipotonik lubrikan ajanlar kullanılabilir. Yapılan az sayıda çalışmada kuru gözde ortaya çıkan yüzey değişikliklerini geri çevirebildiği, goblet hücre sayısını arttırdığı, semptom ve bulguları düzelttiği gösterilmiştir [129]. Ozmoprotektif ajanlar arasında sayılan trehaloz, disakkarid yapısında olup çok yüksek su tutma kapasitesi, biyoproteksiyon ve osmoproteksiyon sağlayarak kornea ve konjunktiva hücrelerinin canlı kalmasına katkıda bulunur [130]. Kuru göz hastalarında serbest oksijen radikallerinin katkısının gösterilmesi ile antioksidanların topikal tedavide kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda asetilsistein, vitamin A, quersetin, visomitin ve selenoprotein gibi antioksidan ajanların kuru göz semptom ve bulgularında iyileşme sağladığı gösterilmiştir [131]–[134].

Tek dozluk preparatlar, koruyucu madde içermemekte ancak maliyeti daha yüksek olup hasta kullanımı açısından daha fazla beceri gerektirmektedir. Multidoz suni gözyaşı preparatlarının kullanımını kısıtlayan önemli nedenlerden biri ise koruyucu içermeleridir. Bakteri kontaminasyonunu ve bakterilerin çoğalmasını engellemek için kullanılan koruyucu maddelere uzun süre maruziyet sonucu oküler yüzeyde toksik değişiklikler gözlenmektedir. En sık kullanılan koruyucu madde benzalkonyum klorid (BAK) olup yapılan çalışmalarda

kornea ve konjunktiva hücre apoptozisine neden olduğu, kornea iyileşmesini geciktirdiği, kornea sinirlerinde tahribata yol açtığı, gözyaşı film stabilitesini bozduğu ve goblet hücre kaybına neden olduğu saptanmıştır [135][136]. Kronik koruyucu maruziyeti sonrası gelişen toksisite riskini azaltmak amacıyla sodyum klorit (Purite), sodyum perborat (GenAqua), polikuaterniyum-1 (Polyquad) ve SofZia gibi prezervan maddeler geliştirilmiştir. Sodyum klorit ultraviyole ışığına maruz kaldığında klor iyonlarına ve suya, sodyum perborat ise gözyaşı filmi ile temas ettiğinde su ve oksijene dönüşmektedir. Yine de bu ajanların kronik kullanımı sonrasında oküler yüzeye toksik etkileri olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Suni gözyaşı ajanlarının aktivitesi ve stabilizasyonu için gereken pH değeri tamponlayıcı ajanlar ile sağlanır. Fosfat, borat ve sitrat en sık kullanılan tamponlayıcı ajanlardır, uzun süre ve yoğun kullanımda bu ajanlara bağlı korneada kalsifikasyon ya da epitel toksisitesi gibi yan etkiler ortaya çıkabilmektedir. Gözyaşı tabakası sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum ve klor gibi elektrolitler açısından oldukça zengin olup oküler hemostazise katkıda bulunurlar. Özellikle potasyum, kornea kalınlığını korumak ve saydamlığını sağlamak için önem taşımaktadır [137]. Gözyaşına benzer elektrolit içeriğine sahip suni ajanlar bulunmaktadır.

6.7.2.Biyolojik gözyaşı destekleri

a) Otolog serum

Otolog serum; albumin, fibronektin, büyüme faktörleri (epidermal growth factor, nerve growth factor) açısından zengin olup biyokimyasal olarak insan gözyaşına oldukça benzerdir. Steven Johnson sendromu, Sjögren sendromu ve kimyasal yanıklar gibi ciddi oküler yüzey hastalıklarında kullanım alanı bulmaktadır. Otolog serumun, proinflamatuvar sitokin salgısını azalttığı, goblet hücre sayısını ve konjunktivada musin ekspresyonunu artırdığı ve kornea iyileşmesini hızlandığı gösterilmiştir. HIV ve hepatit gibi kan yoluyla bulaşan hastalıkların transmisyon riski, +4°C’de saklandığında zamanla büyüme faktörü konsantrasyonunun azalması, uzun süre kullanımında maliyetinin yüksek olması ve kontaminasyon riski nedeniyle pratik kullanımı sınırlıdır.

b) Erişkin allojenik serum

Kronik anemisi veya sistemik inflamasyonu olan, çok yaşlı veya infant hastalar gibi periferik venöz kan örneği almanın uygun olmadığı durumlarda allojenik serum kullanımı bir seçenek olabilir. Daha önce saklanmış olan kandan elde edilebilmesi mümkün olduğundan hazırlaması daha kolaydır. Teorik olarak yabancı antijenler içerdiği için immün yanıt riski mevcuttur ancak ABO uyumlu donörlerin kullanılması bu riski azaltmaktadır. Graft versus host

hastalarında yapılan çalışmada korneada boyanma, gözyaşı ozmolaritesi ve goblet hücre dansitesinde iyileşme gözlenmiştir [138].

c) Umbilikal kord serumu

Birden fazla donörden fazla miktarda (250ml'ye kadar) elde edilebilmesi ve birden fazla hastada kullanılabilmesi nedeniyle otolog serumu göre daha avantajlıdır. Sistemik ve kronik hastalığı olan otolog serumun elde edilmesinin uygun olmadığı olgularda kullanılabilir. Büyüme faktörleri olan EGF, NGF, TGF beta'nın umbilikal kord serumundaki miktarları periferik venöz kana oranla daha yüksektir. Konvansiyonel tedaviye dirençli kuru göz hastalarında ve GVHH görülen olgularda topikal kullanımı sonucu oküler yüzeyde iyileşme sağlanmıştır[139].

6.7.3.Punktal oklüzyon

Bir veya her iki punktumun geçici veya kalıcı olarak tıkanması ile gözyaşı drenajının engellenip, varolan gözyaşının oküler yüzeyde kalması hedeflenmektedir. Oküler yüzeyde aköz komponentin kalmasının fayda sağlanacağı düşünülen aköz yetmezlik tip kuru göz hastalarında uygulanabilmektedir. Oklüzyon çoğunlukla tıkaçlar ile yapılmakta olup cerrahi seçenekler mevcuttur. Geçici tıkaçlar kollajen yapısında olup emilebilir özelliktedir. Kalıcı tıkaçların çoğu silikon yapıda olup farklı tasarıma sahiptir. Bu uygulamanın en sık komplikasyonu %60 oranı ile spontan tıkaç ekstrüzyonudur. Bunun yanında enfeksiyon, tıkaçın kanaliküle migrasyonu, piyojenik granülom, punktal genişleme ve tümör gelişimi gibi olumsuz sonuçlar görülebilmektedir. Punktum oklüzyonu, pro-inflamatuvar sitokinlerin oküler yüzeyde kalma süresini arttıracak için; işlem öncesinde inflamasyon kontrol altına alınmalıdır [140].

Tıkaçın tolere edilemediği ya da gözyaşı miktarının uzun vadede yetersiz olacağı öngörülen olgularda pek çok farklı cerrahi teknikle kalıcı oklüzyon sağlanabilir. Termal koterizasyon, konjunktiva grefti veya flep ile oklüzyon, punktal tıkaç suturasyonu ve punktum ligasyonu cerrahi seçenekler arasında yer almaktadır. Kalıcı oklüzyonda epifora, potansiyel bir komplikasyon olup bundan kaçınmak için inkomplet oklüzyon yapılması önerilmektedir.

6.7.4. Gözyaşı üretiminin uyarılması

Diqualasol tetrasodyum, purinerjik P2Y2 agonisti olup konjunktiva epitel ve goblet hücrelerinden aköz ve musin sekresyonunu uyararak etki gösterir. Hücre içi kalsiyum miktarını artırıp EBF reseptör sinyal yolunun uyarılması ile hücre çoğalması ve göçünü uyararak kornea iyileşmesine olumlu katkıda bulunur [141] . Yapılan az sayıda çalışmada kornea ve konjunktiva boyanmasını azalttığı bildirilmiş olup Japonya ve Güney Kore’de kuru göz tedavisinde kullanılmakla birlikte FDA onayı henüz alamamıştır.

Topikal rebamipid, insan kornea epitelinde musin benzeri glikoprotein üretimini artırmakta olup epidermal büyüme faktörü reseptörü aktivasyonu yoluyla MUC1, MUC4 ve MUC16 ekspresyonunun arttırarak musin üretimini uyarmaktadır. Yapılan bir çalışmada korneal ve konjunktiva boyanmasını azalttığı, gözyaşı kırılma zamanını uzattığı ve sübjektif yakınmaları azalttığı saptanmıştır[142].

Pilokarpin ve sevimelin muskarinik reseptör agonisti olup oral sekretegoglar sınıfındadır. Sjögren sendromunda sekretuar bezlerdeki muskarinik asetilkolin reseptörlerine bağlanan otoantikörler ile yarışarak parasempatometik etki gösterirler. Oral pilokarpin kuru göz semptomlarını ve kornea boyanmasını azaltmakta, ancak gözyaşı üretiminde artış sağlamamaktadır[143]. Oral sevimelin, göz ve ağız kuruluğu semptomlarını azaltmakta, gözyaşı ve tükürük sekresyonunu artırmaktadır [144]. Kullanımını kısıtlayan yan etkileri arasında aşırı terleme, baş ağrısı, karın ağrısı ve bulantı yer alır. Oral sekretegoglar her ne kadar kuru göz semptomlarını azaltsa da esas etkinlikleri ağız kuruluğu üzerinedir[145].

6.7.5. Anti inflamatuvar tedavi

Topikal kortikosteroidler inflamatuvar sitokin ekspresyonunu, MMP-9 ve MAP kinaz yolunu baskılayarak kuru gözdeki inflamatuvar kısır döngünün kırılmasını sağlamaktadır. Hayvan deneyinde topikal metilprednizolon kullanımı sonucu korneal epitel hücrelerin deskuamasyonu azalmış ve epitel bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir. Uzun süreli kullanımı sonucu göz içi basınç artışı, katarakt ve fırsatçı enfeksiyon gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle orta-ciddi kuru göz hastalarında kısa süreli kullanımları (2 hafta ve sonrasında azaltma şeması uygulanarak) ya da siklosporin A tedavisi öncesi semptom ve bulguların hızlı giderilmesi amacıyla kullanımları uygun görülmektedir.

Siklosporin A; lenfositlerde IL-2 aktivasyonunu inhibe eden immünmodulator bir ajandır. Sistemik olarak organ nakli rejeksiyon tedavisinde ve otoimmün hastalıklarda kullanılmaktadır. 2003 yılında orta-ciddi kuru göz hastalarında kullanılması onaylanmıştır. Topikal siklosporin A uygulaması sonucu Schirmer testi değerlerinde artış, gözyaşı osmolaritesinde düşüş ve gözyaşında inflamasyon belirteçlerinde azalma saptanmıştır [146], [147]. Ayrıca lakrimal bez ve konjunktiva epitel hücreleri üzerinde anti-apoptotik etkisi olduğu ve konjunktival goblet hücre sayısını artırdığı gösterilmiştir [148], [149]. Siklosporin A etkisinin gözlenebilmesi için en az 6 aylık bir tedavi gerekmekte olup, ilaç bırakıldıktan sonra kuru göz belirti ve bulguları tekrarlayabilmektedir.

Takrolimus, T lenfosit aktivasyonu inhibe ederek etki göstermektedir; İmmünsüpresif etki potansiyeli siklosporin A'dan çok daha fazladır. Ciddi kuru göz ile seyreden GVHH'de, siklosporin A'ya yanıt alınamayan Sjögren sendromunda ve siklosporin A intoleransı olan olgularda kullanılmaktadır.

Diklofenak, ketolarak, indometazin non-steroid anti-inflamatuvar ajanlar grubunda olup kuru göz tedavisinde kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada diklofenak hiperosmolaritenin uyardığı apoptozisi baskılamıştır. Ancak ciddi kuru göz olgularında korneada erime geliştiği görülmüştür.

6.7.6. *Biyolojik ajanlar*

Kuru göz patogenezinde önemli rol oynayan inflamasyonun baskılanması amacı ile çeşitli biyolojik ajanlar geliştirilmektedir. Lubricin, IL-1 reseptör antagonisti, anti-IL-17 ve anti-TNF- α inflamatuvar hücre ve sitokinler üzerinden etki gösteren anti inflamatuvar biyolojik ajanlardır.

6.7.7. *Mekanik dakriyorezervuar*

Schirmer testi ≤ 1 mm olan ciddi kuru göz durumunda topikal suni gözyaşının çok sık damlatılması gerekmekte olup bireyin günlük yaşam kalitesi belirgin etkilenir. Islanabilirliğin sürekli sağlanması amacıyla suni gözyaşı rezervuarı bulunduran ve kateter aracılığıyla oküler yüzeye ulaşmasını sağlayan mekanik cihaz geliştirilmiştir. Çalışma prensibi diabet hastalarında kullanılan mikroiñfüzyon pompasına benzemektedir. 60 ml kapasiteki suni gözyaşı rezervuarı karın ön duvarında subkutan olarak yerleştirilir. Burdan başlayan silikon

kateter toraks ön duvarı, boyun ve zigoma üzerinden üst konjunktival fornikse ulaşır. Yapılan insan çalışmasında kuru göz semptomlarında iyileşme, korneada boyanma ile konjunktivada hiperemide azalma ve gözyaşı kırılma zamanında uzama saptanmıştır [150].

6.7.8. Tükrük bezi transplantasyonu

Tükrük ve gözyaşı içerik olarak bir takım benzerlik ve farklılıklar gösterir. İşlevsel tükrük bezi transplantasyonu sonucunda oküler yüzeyin devamlı nemli kalması ve kornea ve konjunktiva epitelini besleyici faktörlerin salgılanması amaçlanmaktadır. Konjunktival lakrime, skleriyel konjunktivite bağlı aköz yetmezlik ve lakrimal dokunun cerrahi ve radyasyona bağlı hasarı gibi durumlarda uygulanabilmektedir.

Majör tükrük bezlerinden olan parotis, submandibuler ve sublingual bezler ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Sublingual bez transplantasyonunda vasküler bağlantının cerrahi olarak sağlanması mümkün olmamakta, bu durum beslenme yetersizliği nedeniyle bezin işlevini yitirmesine yol açmaktadır. Parotis bezi sekretuar kanalının alt konjunktiva forniksine transpozisyonu ile saf seröz sekresyon sağlanmaktadır. Ancak bu hastalarda gustatuar reflekse bağlı şiddetli epifora gözlenmekte, aşırı sekresyon durumunda blefarit ve keratit geliştiği ifade edilmiştir.

Submandibüler bezin salgısı seromüsinöz özellikte olup gözyaşına en benzer tükrük içeriğidir. Mikrovasküler anastomoz ve sekretuar kanalın üst temporal konjunktiva forniksine bağlanması ile birlikte submandibüler bezin transplantasyonu ile bazal sekresyon sağlandığı, bezin canlılığını en az 6 ay boyunca koruduğu gözlenmiştir [151]. Yapılan çalışmalarda 5 yıl sonunda greft canlılığı %66 ile %100 arasında bildirilmiştir. Hastaların takibinde kuru göz semptomlarının azaldığı, Schirmer testi değeri ve gözyaşı kırılma zamanında iyileşme olduğu görülmüştür. Ancak sekresyonun doğal gözyaşına göre hiposmolar olması nedeni ile korneada mikrokistik epitel ödemi gelişebilir. Transplantasyon sonrası oral mukoza florası üyelerinin oküler yüzeye veya orbitaya yayılma ihtimali diğer bir sorundur.

Minör tükrük bezleri dudak, yanak ve damakta çok sayıda bulunmakta olup müsinöz karakterde salgı yapar. Dudak mukozası greftinin konjunktiva forniksine yerleştirilmesi yoluyla yapılan transplantasyon ileri derece kuru göz hastalarında tedavi seçeneği olmaktadır. Bez yoğunluğunun daha fazla olması ve kolay ulaşılabilir olması nedeniyle alt dudak grefti daha çok tercih edilmektedir. Steven Johnson sendromu gelişen hastalarda yapılan transplantasyon sonrası gözyaşı volümünün arttığı, korneanın saydamlaştığı, görme keskinliğinde düzelme olduğu ve suni göz yaşı kullanımında azalma olduğu gözlenmiştir[152].

7. Doku Mühendisliği

Fonksiyonunu kaybetmiş, hasarlı doku veya organların yerine yenisinin nakil edilmesi işlemine “transplantasyon” adı verilmekte olup doku veya organ hastanın kendisinden alınıp yerleştirilirse “oto-transplantasyon”, başka bir sağlıklı bireyden alınıp hastaya yerleştirilirse “allo-transplantasyon” olarak adlandırılmaktadır. Transplantasyon cerrahilerinin, greftin alındığı bölgede görülen komplikasyonlar, doku veya organların rejenerasyon kapasitesinin azlığı ve miktar yetersizliği, alıcıda immün yanıt gelişmesi ve kişiler arasında hastalık taşınması gibi sorunları mevcuttur. Son zamanlarda tüm bu kısıtlayıcı etmenler göz önünde alındığında, transplantasyonu planlanan doku veya organların doğal yapıya uygun ve fonksiyonel biçimde laboratuvar ortamında üretilmesini amaçlayan doku mühendisliği gündeme gelmektedir[153].

Doku mühendisliği; kaybedilmiş veya hasarlı dokuların işlevlerini yerine getiren, sürdürülebilir kılan ve yeniden modellemeyi hedefleyen biyolojik bilimler, mühendislik bilimleri ve tıbbi bilimlerin iç içe geçtiği bir uygulama alanıdır. Bu yöntemde özetle; hastalığın başlangıcında sağlıklı dokudan hücreler izole edilir ve kök/progenitör hücrelerin varlığı tespit edilir. Hücreler *in vitro* ortamda çoğaltılarak doku iskelesi üzerine ekilir. Organogenez için gerekli vital şartlar sağlanır; dokuya spesifik büyüme faktörleri, sitokinler gibi biyoaktif moleküller eklenerek laboratuvar ortamında fonksiyonel doku elde edilir. Sonunda hasarlı organ yerine, geliştirilmiş yapay doku transplante edilir. Hücre kaynağı olarak hastanın sağlıklı kalan bölgesinden alınan primer hücreler veya kendini yenileyebilme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücreler kullanılabilmektedir.

Pluripotent Kök Hücreler

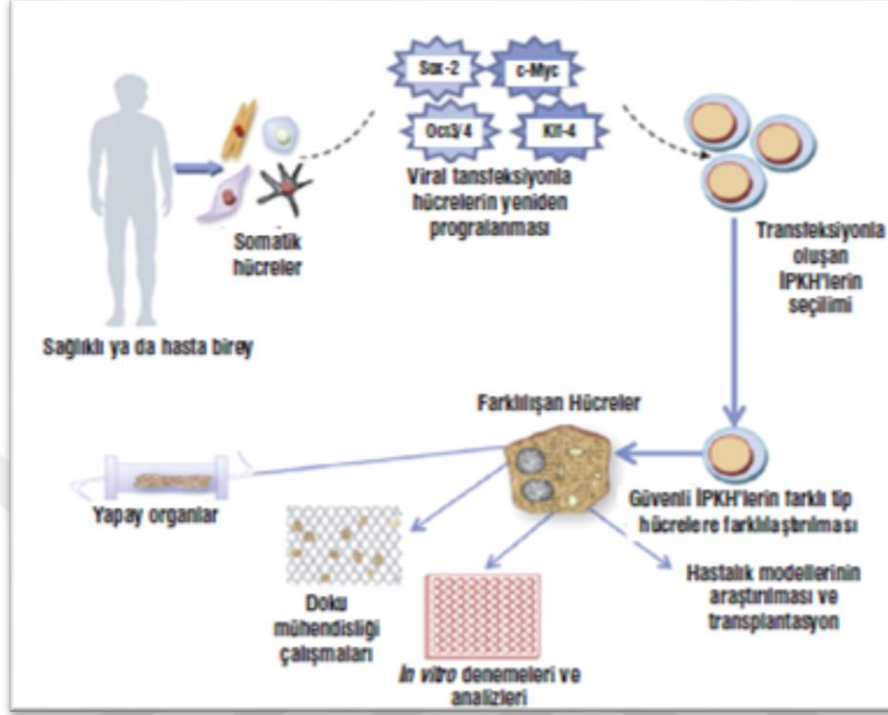
Kendini sınırsız yenileme yeteneği olan kök hücreler, uygun uyaranların etkisi altında hem simetrik bölünme özelliğiyle farklılaşıp hedeflenen hücre tipine dönüşebilir hem de asimetrik bölünme özelliğiyle kendi kopyasını ve öncül hücreyi oluşturabilirler [154]. Kök hücrelerin diğer kök hücrelerle ve çevredeki farklılaşmış hücrelerle arasındaki ilişkiler ile ortamdaki adezyon molekülleri, ekstraselüler matriks bileşenleri, büyüme faktörleri, sitokinler, mikroçevre koşulları (pH, metabolitler, iyonik ortam vb.), kök hücrelerin çoğalma veya farklılaşmaları üzerinde etkili olmaktadır. Farklılaşma (plastisite) yeteneğine göre farklı nitelikte kök hücreler bulunmaktadır. Zigot oluşumundan blastokist evresine kadar embriyonun en erken evresinde görülen hücreler totipotent karakterde olup embriyoyu ve

embriyo dışı plasenta ve amniotik membran gibi yapıları meydana getirir. Embriyonun blastokist evresinde iç hücre kitlesinde hücreler ise pluripotent özellikte olup ektoderm, mezoderm ve endodermden gelişen hücelere dönüşerek doku ve organları oluştururlar. Tek bir germ tabakasına farklılaşmaya programlanmış kendini yenileme özelliğine sahip yetişkin tip kök hücreler (YKH) ise multipotent olarak adlandırılır. YKH'ler, doku ya da organlarda nadir bulunurlar ve hücre ölümü veya doku hasarı geliştiğinde kısmen dokuyu tamir etmekle görevlidirler. "Hematopoetik ve mezenşimal kök hücreler" erişkin dokuda görülmektedir. Mezenşimal kök hücreler (MKH) uygun sinyaller altında hedef doku/organ yapısına farklılaşabilme yetenekleri ile rejeneratif tıp çalışmalarında potansiyel kaynak olarak tercih edilmektedir [155]. MKH'ler sitokin ve kemokin gibi mediatörler salgılayarak immün sistemin regülasyonunda, diğer hücrelerin farklılaşmasında ve çeşitli bölgelere yöneliminde rol oynar. Özelleşmiş bir doku veya organda, iki veya daha fazla hücre hattına farklılaşabilen, kendini yenileme özelliğine sahip kök hücreler oligopotent, sadece tek bir hücre serisine dönüşebilen kendini yenileme özelliğine en az sahip olan kök hücreler ise unipotent olarak adlandırılır.

Son yıllarda embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin keşfi ile birlikte izole edilen kök hücrelerin istenilen hücre dizisine farklılaştırılması teknolojisi sonucu uygun ortam ve sinyaller sağlanarak sağlıklı fonksiyonel doku veya organ elde edilmesi, hasta bireye transplantasyonu ile kür sağlanması gündeme gelmiştir. Embriyonik kök hücreler (EKH), rejeneratif tıp alanında istenilen hücre tipinin elde edilmesi ve geri dönüşümsüz doku ve organ hasarının görüldüğü hastalıklarda hücresele tedavi için kaynak olarak kullanılmaları açısından oldukça önemlidir [156] (Şekil 11). Ancak EKH'lerin izolasyonu için embriyo üzerinde işlem uygulanması insan kaynaklı çalışmaların yapılmasında etik sorunlar ve non otolog hücrelerin nakli sonrasında gelişebilecek immün yanıt nedeniyle klinik kullanımları sınırlı kalmaktadır.

Embriyonal dönemde önemli olan dört transkripsiyon faktörü geninin, erişkin somatik hücrelerine aktarılması yoluyla hücrelerin yeniden programlanması sonucu EKH benzeri fonksiyonları olan hücreler elde edilmiştir. Uyarılmış pluripotent kök hücre-UPKH (induced pluripotent stem cell-IPSC) olarak adlandırılan bu hücreler uygun koşullar altında kendini çoğaltma ve ektoderm, mezoderm ve endodermden gelişen tüm hücelere farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Yamanaka ve ark. retroviral gen aktarım metodunu kullanarak Oct $\frac{3}{4}$, Sox-2, Klf-4, c-Myc transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu ile fare cilt fibroblast hücrelerini pluripotent kök hücreye dönüştürerek UPKH elde etmiştir [157]. Yu ve ark. ise Sox2, Oct $\frac{3}{4}$,

Nanog ve Lin28 transkripsiyon faktörlerini kullanarak UPKH elde etmiştir [158]. c-Myc'nin bir onkogen olması nedeniyle, c-Myc geni aktarılmadan hücrelerin farklılaştırılması yönünde çalışmalar yapılmıştır [159].



Şekil 11. UPKH hücre eldesi ve kullanım alanları [155].

İnsanlarda embriyo evresindeki organogenez taklit edilerek belirli bir protokol doğrultusunda UPKH'lerin herhangi bir hücre tipine farklılaşması, hasarlı doku/organın rejenerasyonu veya transplantasyonu açısından büyük umut doğurmaktadır. Hastaya özgün UPKH elde edilebilmesi etik sorunları ve immünolojik yanıt riskini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca *in vitro* genetik hastalık modeli oluşturulması ile patogenezin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır. İlaç etkinliği ve toksikoloji araştırmalarında UPKH kaynaklı doku/organ modeli kullanılabilmektedir.

Hücreyel Kaynak

Günümüze dek, hücreyel kaynak olarak yüksek oranda pluripotent kök hücre elde edilebilmesi nedeniyle çalışmalarda çoğunlukla cilt fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Cilt biyopsisine ihtiyaç duyulması, enfeksiyon riski, cilt hücrelerinin ultraviyole maruziyeti nedeniyle mutasyona uğrayabilmesi ve primer hücre kültürünün eldesi için 3-4 hafta gibi uzun bir zamana ihtiyaç duyulması gibi nedenlerden dolayı alternatif kaynaklara yönelim olmaktadır. Elde edilmesi daha kolay olan periferik kan hücreleri hedeflenmiştir. Granülosit, monosit, B ve T lenfosit ile progenitör hücreler gibi çekirdekli kan hücreleri yeniden programlanarak

pluripotent özellik kazanmaktadır [160]. Mezenşimal kök hücre gibi erişkin somatik kök/progenitör hücreler, izolasyon ve manipölasyon tekniğinin daha kolay belirli olmasından dolayı tercih edilmektedir. Matür somatik hücrelere göre daha çok köklülük göstermeleri sayesinde pluripotent özellik kazandırılması daha kolay ve etkili olmaktadır. Farklılaştırılması planlanan hücre ile oluşturulması hedeflenen hücrenin aynı germ tabakasından köken alması yeniden programlanma etkisini artırmaktadır. UPKH'lerin tekrarlayan pasajı, transkripsiyonel ve epigenetik hafızasını zayıflatıp pluripotens yeteneğinin azalarak maturasyona neden olmaktadır.

Gen Aktarımı

Yeniden programlama işleminde farklı gen aktarım yöntemleri uygulanabilmektedir. Retrovirus ve lentiviruslar ile yapılan gen aktarımında, virusun genetik materyaline, aktarılmak istenen gen bölgesi yerleştirilir. Virus hücre içine girdikten sonra hücre genomuna entegre olur ve taşıdığı transkripsiyon faktörleri sayesinde pluripotent özellik kazandırılmış olur. Ancak virus genomunun aktarılan hücrede aktif bir genin ortasına yerleşerek istenmeyen mutasyonlara neden olabilmesi bu yöntemin dezavantajıdır. Genoma entegre olmayan viral gen aktarımı olarak Adeno virus ve Sendai virus kullanılmaktadır. Son yıllarda viral olmayan gen aktarım yöntemleri gündeme gelmiştir [161]. Transkripsiyon faktörlerinin plazmidler ile taşınması sonucu UPKH elde edilmiştir [162]. Bu yöntem daha basit olup daha az zaman alması ve viral partiküllerle çalışılmaması açısından avantaj sağlamaktadır. Viral vektörün kullanılmadığı gen aktarım yöntemleri arasında; episomal, piggy-BAC retrotranspozisyon, sentetik mRNA, rekombinan protein ve küçük molekül yöntemleri karşımıza çıkmaktadır [163]. İndüksiyon amacıyla kullanılan rekombinan protein ve sitokin gibi mediatörlerin uygun miktar ve frekansının belirlenerek sürecin optimize edilmesi için çalışmalara gereksinim vardır.

UPKH Karakterizasyonu

Hasta veya sağlıklı bireyden kaynak hücreler (fibroblastlar, periferik kan hücreleri vs.) elde edilir. Tanımlı transkripsiyon faktörlerinin gen aktarımı yapılmasıyla hücre yeniden programlanır ve UPKH meydana gelir. Kültüre edilen hücrelerin pluripotent karakterde olduğunu gösteren çeşitli incelemeler yapılır [164]. Morfolojik olarak incelendiğinde EKH'lere benzer şekilde kültür plağına sıkı şekilde yapışık, keskin sınırlı ve yoğun koloniler oluşturan, yuvarlak şekilli, büyük nükleol ve dar sitoplazma içeren hücreler görülmektedir. Alkalen fosfataz aktivitesine sahip olması nedeni ile kültür plakları ALP boyası ile

boyanmaktadır. UPKH'lerin, insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotens belirteçleri olan Oct3/4, Nanog, E-Ras, Cripto, Dax1, Zfp296 ve SSEA-1 eksprese etmekte olduğu gösterilmiştir.

Pluripotens belirteçleri pozitif saptanan UPKH'ler *in vitro* ve *in vivo* farklılaşma testlerine tabi tutulur. *In vitro* hücre kültüründe embriyoid cisimleri oluşturdıkları gözlenmektedir. *In vivo* farklılaşma testinde, UPKH'ler ağır kombine immün yetmezlikli (SCID) farelere enjekte edildikten sonra pluripotent karakterde olan hücrelerin çoğalarak üç germ tabakasından kaynaklanan teratom benzeri yapı oluşturduğu saptanmaktadır. Son olarak UPKH'ler gelişmekte olan embriyoya aktarıldıklarında kimerik canlılar oluşturabildikleri görülmektedir.

Kullanım Alanları

Etik kurallar nedeniyle yeterli miktarda ve istenilen zamanda insan kaynaklı deneysel materyal elde edilememesi, araştırmaların önündeki en önemli engellerden biri olmaktadır. UPKH teknolojisi ile bu sorunlar aşılabilir hastalıklara özgü deneysel modeller ve hastaya özgü UPKH'ler üretilebilmektedir. Günümüzde amiotrofik lateral skleroz, spinal musküler atrofi, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Duchenne musküler distrofi, juvenil diabetes mellitus, Trizomi 21 için deneysel amaçlı UPKH tabanlı hastalık modelleri oluşturulmuştur. Hastalık modelleri hastalığın patogenezinin araştırılmasında ve tedaviye yönelik ilaç geliştirme çalışmalarına yardımcı olmaktadır.

Genetik hastalıklarda anormal gen dizilimi ve ekspresyonu saptanıp uygun stratejiler ile onarılmakta ve UPKH'lerin normal genetik materyal taşıması sağlanabilmektedir. Mutasyonlara bağlı oluşan tek gen hastalıkları UPKH'ler kullanılarak tedavi edilebilmektedir. Bir çalışmada orak hücre anemisi benzeri tablo oluşturulmuş farelerde, bu teknoloji kullanılarak orak hücre anemisinde etkilenen β -globin gen bölgesine ait mutasyonun düzeltilerildiği gösterilmiştir [165].

Günümüzde allojenik organ transplantasyonu, belirli hastalıklarda geçerli bir tedavi yöntemi olmakta ancak donör yetersizliği ve immün ret yanıtı gelişmesi nedeniyle kullanımı ve etkinliği kısıtlanmaktadır. Hasta bireyden izole edilen UPKH'lerden farklılaşma ile elde edilecek hücre ve dokular, hasta ile aynı HLA doku antijeni taşıdığından doku reddi problemi olmamaktadır. Rejeneratif tıp uygulamalarında temel hedef, UPKH kullanarak hastalara transplante edilecek hücre veya dokuları yapay olarak elde etmektir.

Fare ve insan UPKH'lerinden oluşturulan kardiyovasküler öncül hücreler, SCID (Ciddi kombine immün yetmezlikli) farenin sol ventrikül duvarına enjekte edildiğinde

kardiyomyosit, düz kas hücresi ve endotel olmak üzere üç farklı hücre dizisi geliştiği görülmüştür [166]. Miyokard enfarktüsüne bağlı hasar gören kalp kasının hücresel tedaviyle onarımı sonucu tekrar fonksiyon kazanabileceği öngörülmüştür.

Nörodenejeneratif hastalıklarda, kişiye özgün uygun nöron hücrelerinin elde edilmesi tedavide yeni yaklaşım protokollerini ortaya çıkartabilir. Bu amaçla nöroektoderm kökenli saç kılından alınan keratinositlerden elde edilen UPKH'lerin tekrar programlanması ile insan nöron hücrelerine benzer hücreler elde edilmiştir [167].

Fare UPKH'lerinden türetilen hepatosit benzeri hücrelerde alfa fetoprotein (AFP), albümin, CK7, CK8, CK18 gibi karaciğer hücre belirteçleri saptanmıştır. Hepatik farklılaşmanın kanıtı olarak oluşan hücrelerde LDL'nin içe alımı, glikojen depolanması ve üre sekresyonu gerçekleştiği gözlenmiştir [168].

UPKH'lerden farklılaşan osteoblastların oluşturduğu dokuda kalsiyum birikimi, alkalin fosfataz aktivitesi ve tip 1 kollajen ekspresyonu görülür. Kemiğe benzer dokunun transplantasyonu ile hasarlı kemik dokusunun onarılabileceği, kemik fonksiyonun yeniden kazanılabileceği ifade edilmiştir [169].

UPKH'lerden farklılaşan retina pigment epitel hücrelerinin retinal distrofi modeli oluşturulmuş sıçanlara transplantasyonu sonrasında, kısa dönemde dış nükleer tabakada fotoreseptör varlığı, uzun dönemde ise fotoreseptör tabakanın dış segmentinde rodopsin saptanmasına dayanan görsel fonksiyon gelişimi gözlenmiştir [170].

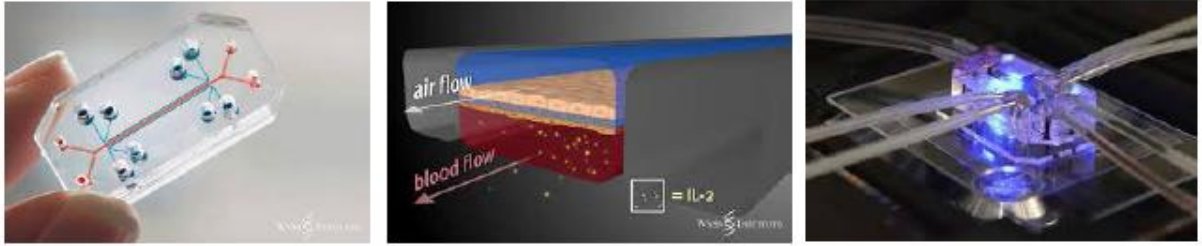
Mikroakışkan sistemler (Çipte Organ)

Kontrollü bir mikroçevrede yaşayan biyomühendislik yoluyla üretilmiş organ yapılarını barındıran ve gerçek zamanlı izlem altında canlı koşullarda organların dinamik, fonksiyonel ve patofizyolojik özelliklerini göstermek amacıyla tasarlanmış mikroakışkan aygıt, 'çipte organ' (organ-on-a-chip) olarak tanımlanmaktadır. Doku mühendisliği, mikroakışkanların üretimi ve kök hücre ile hücre sinyal ve biyomekaniği hakkındaki gelişmelerin birleşmesi çipte organ teknolojisinin ortaya çıkmasını sağlamıştır [171].

Doku mühendisliği yönteminde cam veya polimer malzemeler içerisinde özel tasarım kanallar açılıp, mikroakışkan sistemler ile doku iskelesini oluşturan biyomalzemelerin kombine edilmesi sonucunda hücreler, üç boyutlu bir yapı oluşturmak üzere fizyolojik koşullara daha yakın şekilde kültür edilmektedir. Statik kültür, klasik anlamda durağan kültür şartları olup seçilen hücreye uygun substrat yüzeyinde üretim gerçekleşmektedir. Dinamik kültür şartlarında ise biyoreaktör kullanımı ve fizyolojik şartlara daha uygun bir çevre oluşturulması

ile üretim yapılmaktadır. Mikroakışkan akımının kontrol edilmesi, kültür ortamında optimal besin, oksijen, pH ve sıcaklık gibi biyokimyasal şartların uzun süreli ve tekrarlanabilir şekilde uygulanması sağlar. Bu sistem sayesinde hücre proliferasyon ve ekstrasellüler matriks sentez hızının artırılması ile doku büyümesi ve organizasyonu, sağlıklı dokuların uzun süre canlılığını koruması; immün sistem hücreleri, antikorlar, biyokimyasal sinyal molekülleri dolaşımı ve metabolitlerin uzaklaştırılması mümkün olur. Ayrıca analiz için kültürden sekresyon örneği elde edilmesi sağlanmış olur.

“Çipte organ” yöntemi ile farklı özelliklerdeki hücrelerden yeni doku-doku arayüzü oluşturulup, hücreler birlikte kültüre edilebilirler. Günümüzde “çipte organ” sistemleri, tek bir doku veya organın temel fonksiyonlarını taklit eden “tek organlı sistemler” veya tek bir sistem içinde birkaç organ modelinin sistemik etkileşimini ve tepkisini ölçmek için birden fazla çipi birleştiren “çok organlı platformlar” olarak çalışılmaktadır. Çipte organ modellerinin hayvan modelleri üzerinde yapılan ilaç ve toksisite deneylerinin yerini alması, oluşturulan hastalık modelleri ile patogenezin daha iyi anlaşılması ve üretilen doku ve organların transplantasyonu gibi tedavi yöntemlerini sunması beklenmektedir.



Şekil 12. Organ fizyolojisini ve fonksiyonunu taklit eden akciğer dokusuyla onu besleyen kan damarları arasındaki dinamik biyokimyasal, biyofiziksel ve biyomekanik ilişkileri ölçebilen çipte akciğer sistemi[173].

Mikroakışkan sistemler basit bir plastikten (örneğin polimetil metakrilat-PMMA) endüstriyel sınıf bir lazer kesici ile veya yumuşak litografi teknikleriyle silikondan (örneğin polidimetilsiloksan-PDMS) imal edilebilir. Her iki sistemin birbirine kıyasla avantaj ve dezavantajları bulunur. PMMA sistemlerinin üretimi, PDMS sistemlerine göre daha kolay ve ucuzdur, ancak PDMS sistemleri çok daha hassas tasarım seçeneklerine sahiptir ve sistemler üzerinde daha fazla kontrol sağlar.

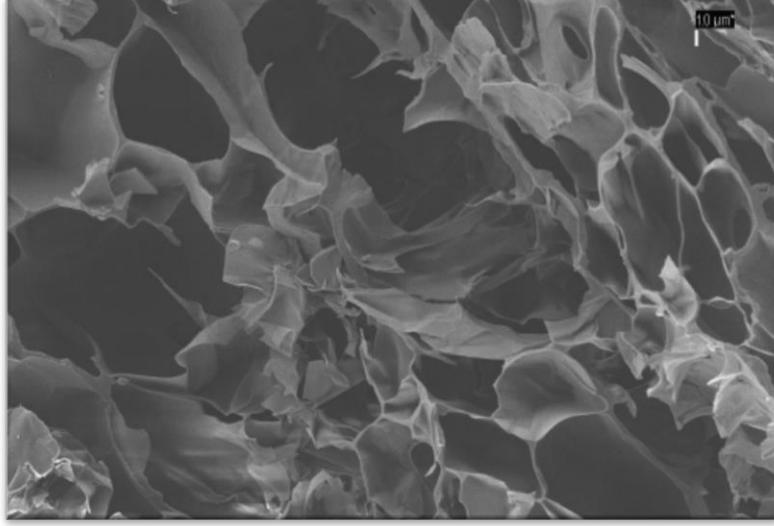
Mikroakışkan sistemlerin modifikasyonu ile çipte akciğer, kalp, karaciğer ve bağırsak hücrelerinin geliştirilmesi mümkün olmaktadır (Şekil 12). Son zamanlarda kanser araştırma platformu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kanser hücrelerinin karakterizasyonu ile

kanser göçü ve metastazının incelenmesi için özel mikroakışkan platformları, tek hücre analizi amaçlı son teknoloji platformlar yeni tanı yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlar [172].

Biyomalzemeler

Doku ve organlarda bulunan mevcut hücreler tarafından salgılanan ekstraselüller matriks (ESM), hücreler için fiziksel destek sağlamasının yanı sıra hücreler tarafından salgılanan ekstraselüller matriks (ESM), hücreler için fiziksel destek sağlamasının yanı sıra """, "family": "Zhang", "given": "Boyang", "non-dropping-particlfiziksel uyarılarda bulunur. ESM, doku mühendisliğinde *in vitro* ortamda biyomalzemeler ile doku iskelesi oluşturularak taklit edilmeye çalışılır. Bu iskelelere hücreler tutunurlar, ortama kemokin, sitokin gibi biyaktif moleküllerin eklenmesi veya mevcut hücreler tarafından salgılanması ile doku modellenmesi sağlanır [173]. Doku iskelesinin kurulmasında kullanılacak malzemelerin özellikleri önem taşır. Biyomalzemeler; hedef dokunun iyileştiği hızla orantılı olarak bozunma gösteren biyobozunur nitelikte olmalıdır. Yeni doku gelişip hücreler ESM oluşturacak kapasiteye ulaştıktan sonra iskeleye ihtiyaç duyulmayacaktır. Hücre adezyonu ve fonksiyonunu sağlayan yüzey kimyasına sahip olup vücut içine yerleştirildiğinde istenmeyen doku tepkilerine yol açmamalı yani biyouyumlu olmalıdır. Dokunun mekanik özelliklerine uygun olup iyileşme sürecinde yapısal bütünlüğünü korumalı (biyouyumlu), dokunun yapı içerisine gelişmesine izin verecek ölçüde gözenekli olmalı, toksik, antijenik ve mutajenik özellik göstermemelidir [174].

Hidrojel, hidrofilik polimerlerden oluşan üç boyutlu ağ yapısında olup %90-99 oranında su absorbe etme kapasitesindedir. Küçük molekül ve sitokin, büyüme faktörleri gibi biyopartiküllerin içinden geçmesine olanak sağlayan mikroporlar bulundurur. Aköz doğası ve yüksek permabilite özelliklerinin birleşimi, üç boyutlu kültürde hücrelerin optimal biçimde kapsüllenmesini sağlar. Besin ve oksijenin yoğun jel içerisindeki difüzyonu, alt katmanlara inildikçe azalmakta olup, yoğun jel içinde oluşturulan mikrokanallar, dallanan damarlar gibi işlev görüp sirkülasyonun sağlanmasına katkıda bulunur. Sentetik ve doğal polimer yapısında olabilir. Kollajen, hyaluronik asit, fibrin, agaroz ve kitosan gibi doğal polimerler, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımlarında hidrojel üretimi için en yaygın kullanılanlardır. Sentetik polimerlere polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), polikaprolakton (PCL), polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) örnek olarak verilebilir.



Şekil 13. GelMA hidrojelinin besin ve oksijen alışverişi yapabilmesi gözenekli yapısı. GelMA hidrojelinin besin ve oksijen alışverişi yapabilmesi gözenekli yapısı sayesinde mümkün olmaktadır. Bu çalışmada hidrojel gözenekliliği taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendiğinde açıkça görülmektedir. 525x büyütme. Ölçek 10µm.

Jelatin-metakriloil (GelMA), araştırma alanında en yaygın kullanılan fotopolimerize edilebilir hidrojellerden biridir. Esas olarak insan vücudunda en bol bulunan protein olan jelatinden meydana gelir. Jelatin, RGD (Arg-Gly-Asp) dalları nedeniyle hücre tutunmasını sağlar ve hücre çoğalmasını, fonksiyonunu ve farklılaşmasını destekler (Şekil 13). Bununla birlikte, tek başına jelatin, fiziksel bir hidrojel oluşturmak için çok katı koşullara sahiptir ve göreceli olarak düşük dayanıklılığa sahiptir [175].

Fotopolimerizasyon, fotobaşlatıcının uygun bir dalga boyundaki ışık absorpsiyonu sonucunda oluşan primer radikallerin çok fonksiyonlu akrilatları çapraz bağlı yapılara dönüştürmesi işlemidir. Jelatinin yapısı, metakrilik asitin (MA) kimyasal modifikasyonu sayesinde foto çapraz bağlanma yoluyla stabilize edilir ve sertliği artırılır[176]. GelMA, bir foto başlatıcı yardımı ile UV ışığı altında çapraz bağlanır. Seçilen fotobaşlatıcı değerleri toksisite açısından en düşük düzeyde olacak şekilde ayarlanır.

8. Lakrimal bez yönelik rejeneratif tıp çalışmaları

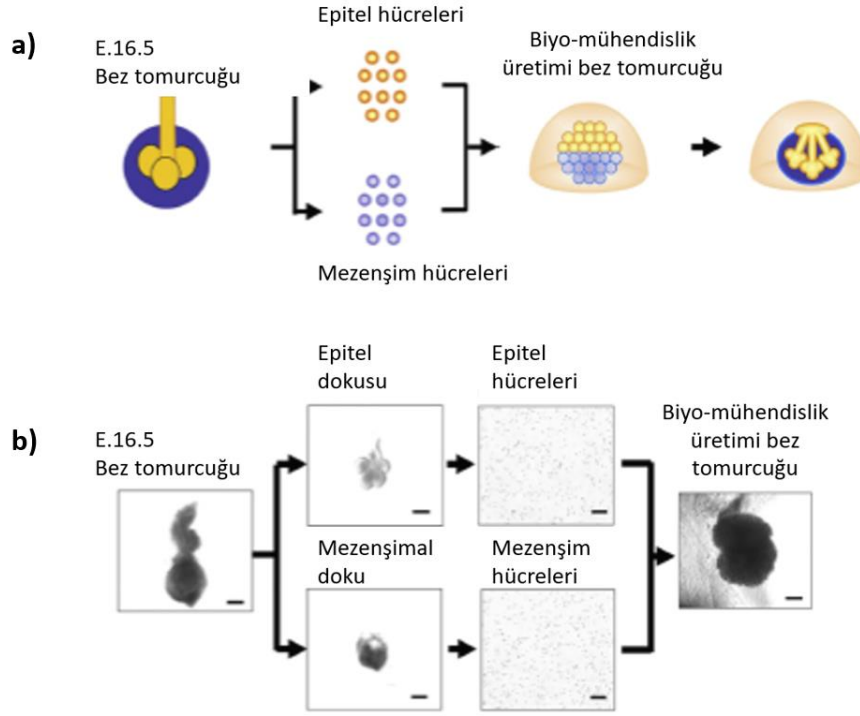
Kronik kuru göz sendromunun uzun soluklu etkin tedavisinde lakrimal bez rejenerasyonunu sağlayan hücresel ve doku düzeyinde yapılan çalışmalar önemli bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Doku mühendisliği ilkelerini kullanarak, işlevsel bir yapay lakrimal bez oluşturulması ve hasarlı organın yerini alacak şekilde transplantasyonu amaçlanmaktadır. Lakrimal bez rejenerasyonu kompleks bir uğraş olup kullanılacak hücre kaynağı ile doku iskelesinin seçimi, hücre ile doku iskelesinin uyumu ve sürdürülebilirliği, yapay lakrimal

bezin kan damarları ve duysal/motor sinir lifleriyle bütünleşmesi gibi çeşitli etmenler göz önünde bulundurulmalıdır. Çeşitli kültür yöntemleriyle 2 veya 3 boyutlu lakrimal bez benzeri yapılar ve organ germ yöntemi ile biyomühendislik sisteminden faydalanarak yapay lakrimal bez üretimi gerçekleştirilmiştir.

Amniyotik membran, epitel hücrelerinin adezyon, proliferasyon, migrasyon ve differansiasyonu sağlayan uygun bir ortam sağlamaktadır. Doku iskelesinin amniotik membran olarak kullanıldığı bir çalışmada asiner hücreler, kültüre edildiklerinde boyutlarını artırıp katmanlaşma göstererek hücre kümeleri meydana getirmiştir. İki boyutlu lakrimal bez yapıları incelendiğinde hücrelerin santral lümen, bazal yerleşimli nükleus, apikal sekretuar granüller ve mikrovillus gibi asiner hücre özellikleri gösterdiği görülmüştür. Karbakol stimülasyonu sonucu β hegzominidaz salınım yanıtı gözlenmiş olup yapıların işlevsel olduğu gösterilmiştir. Ancak zamanla hücre kümeleri santralde canlılığını kaybetmiş olup sekretuar aktivitesinde düşüş gözlenmiştir [177].

Tavşan lakrimal bezinden izole edilen hücrelerle, rotatuar hücre kültür yöntemi kullanılarak yer çekiminin minimize edildiği bir ortamda üç boyutlu lakrimal bez yapısı oluşturulmuştur. Bu sistemde 7. günde asiner hücre özellikleri gösteren ortalama 384μ çapında lakrimal sferoid agregatları görülmüş olup karbakol stimülasyonuna β -hegzominidaz salınımı ile yanıt verdiği, fonksiyonel olduğu saptanmıştır. Rotatuar hücre kültürü sisteminde düşük gerilim kuvvetli bir ortam oluşturularak hücre-hücre teması ve üç boyutlu doku yapısı desteklenmiştir. Besinlerin ve metabolik atıkların yüksek oranda transferi sağlanır. Ancak sferoidin büyümesi ile orantılı olarak santral apoptozis gözlenmiş olup transplantasyon açısından uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Üç boyutlu doku iskelesi görevi gören ekstrasellüler matriksin eksikliği nedeniyle hücre proliferasyonu, migrasyonu ve differensiasyonunun sağlıklı biçimde yapılamadığı ve doku santraline yeterli besin ve oksijen desteğinin sağlanamadığı kanısına varılmıştır [177].

Hasarlı doku veya organın organogenez sürecindeki gelişimin taklit edilerek yapay organ geliştirilmesi organ germ yönteminin temelini oluşturmaktadır. Bu yöntem ile diş ve kıl folikülü gibi ektodermal organlar geliştirilmiş olup, tükrük bezi ve lakrimal bez gibi ektodermal sekretuar organların *in vitro* ortamda geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Biyomühendislik yöntemi ile yapay organ elde edilmesinde multisellüler birleşme, epitel-mezenşim etkileşimi ve kollajen jel matriksin rolü olduğu ortaya koyulmuştur. Lakrimal bez rejenerasyonu için bu yöntemin etkinliğini araştırmak amacıyla 16.5 günlük embriyonik farenin lakrimal bezinden epitel ve mezenşim hücreleri izole edilerek kültüre edilmiş; Hücrelerin aynı organogenez sürecinde olduğu gibi başarılı şekilde dallanma morfogenezi, sap elongasyonu ve yarık oluşumu gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 14) [2].



Şekil 14. Organ germ yöntemi kullanılarak biyomühendislik tabanlı lakrimal bez taslağının geliştirilmesi. a) Şematik görünüm. b) Faz kontrast görüntüleri. Ölçek, 100 µm.[2]

Biyomühendislik yoluyla oluşturulan lakrimal bez, aköz yetmezlikli fareye transplante edildiğinde yapay duktus ile oküler yüzeyin integre olduğu, yapay organın histolojik incelemesinde sekretuar yapıda olduğu görülmüştür. Oküler yüzeyin soğuk uyarana karşı gözyaşı sekrete etmesi, transplantın oküler yapılar ve sinir sistemi ile integrasyon sağladığının göstergesi olmuştur. Aköz yetmezliğe bağlı oküler yüzey problemlerinin hayvan modelinde transplantasyon sonrası düzeldiği saptanmıştır [2].

İnsan uyarılmış pluripotent kök hücrelerinin kullanılmasıyla göz gelişiminin *in vitro* simülasyonu sağlanmıştır. Embriyo gelişimi sırasında eksprese edilen çeşitli transkripsiyon faktörleri ve biyoaktif moleküllerin salınımı sonucu hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması ile karakterize organogenezin taklit edilmesi yoluyla UPKH'lerinde göze spesifik hücre hatları elde edilebileceği gösterilmiştir.

Lakrimal bez ektoderm kaynaklı olup embriyogenez sırasında konjunktiva epiteli ve perioküler mezenşim olmak üzere iki ayrı dokunun etkileşimi ile geliştiği bilinmektedir. Lakrimal bez gelişimi, perioküler mezenşimden salınan Fgf10'un indüklediği konjunktiva epitelinin kalınlaşması ile başlar. Dallanma süreci Bmp7 sinyallerinin ek etkisi altında

şekillenir. Bmp7 sinyalleri, Foxc1'in aracılığıyla, dallanma morfogenezisi sırasında mezenşimal yoğunlaşma için önemlidir. Hem FGF hem de BMP sinyali, mezenşimde Wnt sinyali ile dengelenir. Yapılan bir çalışmada, insan EKH'lerinde transkripsiyon faktörü kodlu sentetik mRNA'lar kullanılarak PAX6, FOXC1 ve SIX1'in aşırı ekspresyonu, hücrelerin lakrimal bez epitel hücrelerine doğru farklılaşmasıyla sonuçlanmıştır. Bu lakrimal epitel benzeri hücrelerde; immatür lakrimal bez epitel belirteçi KRT15, dallanma morfogenezi belirteçi BARX2 ve gözyaşı sekresyonu belirteçi AQP5 ve laktoferrin saptanmıştır [178].



MATERYAL & YÖNTEM

1. Araştırma Tipi

Bu çalışma *in vitro* ortamda deneysel bir çalışma olarak gerçekleştirildi.

2. Araştırma Tarihi ve Yapıldığı Yer

Bu araştırma, Tübitak 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında desteklenen 117S264 numaralı “Doku Mühendisliği Yöntemiyle Kök Hücreler Kullanarak Lakrimal Bezin Geliştirilmesi” isimli proje bünyesinde gerçekleştirildi.

Tüm çalışmalar Eylül 2016 ile Kasım 2019 tarihleri arasında İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi’nde (İBG) gerçekleştirildi. Hayvan deneyleri, 07/12/2016 tarihli, 16/2016 Protokol No’lu T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İBG-HADYЕК) Onayı ardından gerçekleştirildi.

3. Evren ve Araştırma Örneği

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda erişkin ve embriyonik fare örnekleri ile insan kaynaklı uyarılmış pluripotent kök hücreler kullanıldı.

4. Araştırma Materyali

Bu çalışmada mikroakışkan çip sisteminin kurulunun sağlanması ve etkinliğinin gösterilmesi amacıyla NIH / 3T3 fare fibroblast hücreleri ile primer yetişkin ve embriyonik fare lakrimal bezi hücreleri kullanıldı. NIH / 3T3 fare fibroblast hücreleri, 2016 yılında Prof. Dr. Neşe Atabey’den elde edildi. Primer hücreler, bulgular bölümünde detaylı olarak bulunabilen çeşitli tarihlerde araştırma ekibi tarafından yetişkin ve embriyonik farelerin lakrimal bezlerinden izole edildi.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler, cilt fibroblast hücrelerinin yeniden programlanması ile hazırlanmış olup Doç. Dr. Tamer Önder tarafından Koç Üniversitesi Kök Hücre Laboratuvarı’ndan sağlandı.

5. Araştırma Değişkenleri

Bağımsız değişkenler: Erişkin ve embriyonik fare lakrimal bez hücreleri, UPKHler

Bağımlı değişkenler: Gözyaşı belirteçleri (laktoferrin, akuaporin, lizozim)

6. Veri Toplama Yöntemleri

6.1. Hayvan Deneyleri

DEÜ-İBG HADYЕК (16/2016) etik kurul onayına göre lakrimal bez hücrelerini elde etmek için, doku kaynağı olarak hem yetişkin (BALB / c ve NSG) hem de embriyonik fareler

(BALB / c, NSG, C57BL / 6) lakrimal bez dokusu kaynağı olarak kullanıldı. Bütün hayvanlar IBG Vivarium biriminden elde edildi. İlk önce farklı yaşlarda rastgele fareler kullanıldı. Yetişkin ve hamile fareler, IBG Vivarium biriminde standart koşullar altında tutuldu ve lakrimal bezlerin diseksiyonu öncesinde sakrifiye edildi. Hayvan laboratuvarı ameliyathanesinde, cerrahi aletlerin sterilizasyonu sağlandıktan sonra, farelerin sakrifikasyon işlemi, artan CO₂ inhalasyonu ile gerçekleştirildikten sonra servikal dislokasyon ile konfirme edildi. Sakrifiye edildikten sonra hem yetişkin hem de hamile fareler, olası herhangi bir doku kontaminasyonunu önlemek için etanol ile dezenfekte edildi. Yetişkin ve hamile farelerin tüm sakrifiye etme ve diseksiyon prosedürleri laminar akım kabini içinde yapıldı.

6.1.1. Yetişkin Farede Lakrimal Bez Örneği Elde Edilmesi

Yetişkin farede lakrimal bez ekstraorbital ve intraorbital olmak üzere iki adet olup, ekstraorbital lakrimal bez oldukça belirgindir. Eksizyonel yöntem ile ulaşılması daha mümkün olduğu için bu çalışmada ekstraorbital lakrimal bez dokusu hedeflenmiştir. Bisturi ve cerrahi makasla gözün posterioru ve kulak anterioru arasındaki deriye lineer eksizyon yapıldıktan sonra künt diseksiyon ile lakrimal bez dokusuna ulaşıldı. Derinin çıkarılmasından sonra, açığa çıkan lakrimal bez dokusu forseps ile kolayca çıkarıldı. Toplanan lakrimal bezler, DMEM / F-12 ortamı ve HEPES tamponu içeren buz üzerinde bir santrifüj tüpünde toplandı. Farenin arda kalan dokuları “Hayvan Barınağı Yönetmelikleri”ne göre imha edildi.

6.1.2. Embriyonik Farelerde Lakrimal Bez Örneği Elde Edilmesi

Dişi BALB/c farelerin gebeliğinin belirlendiği vajinal tıkaç günü 1. gün olarak belirlendi ve 16. günde lakrimal bez izolasyonu için sakrifikasyon yapıldı. Farenin ventral yüzü %70 etanol ile dezenfekte edildi. Abdominal ciltte orta hatta steril cerrahi makas ile vertikal kesi yapıldıktan sonra periton da aynı hatta kesildi ve abdominal boşluğa ulaşıldı. Uterusun 2 boynuzu, bağlı olan mezometriumdan kesilerek serbestleştirildi ve soğuk FTS (PBS, Fosfat Tamponlu Salin) çözeltisine yerleştirildi.



Şekil 15. Embriyonik farelerden lakrimal bez izolasyonu. A) Sakrifiye edilen hamile fareler, diseksiyon için hazırlanmaktadır. B) Yetişkin farede lakrimal bez diseksiyonu C) Dissekte fare embriyoları 1 kere PBS içinde yıkandı. D) Embriyonik farenin genel görünümü. E) Embriyonik farenin gövdesinden ayrılan baş kısmı. F) Lakrimal bezin fare embriyosu başındaki lokalizasyonu.

Forseps yardımı ile embriyolar amniyotik keselerinden çıkartıldı ve soğuk PBS içeren 2. steril petri kabına yerleştirildi. Bu manipülasyonlar sırasında embriyonun başına herhangi bir cerrahi alet ile dokunulmamasına özen gösterildi. Embriyo, transiluminasyon zemini olan diseksiyon mikroskobuna yatırıldı. Bir adet 15 derece steril bistüri kullanılarak embriyonun başı, alt manibulanın hemen altından vücuttan ayrıldı. Başı döndürülerek mandibulanın diseksiyon zemini üzerine oturması sağlandı. Forseps ile baş stabilize edilerek bir bistüri ile beyin dorsal $\frac{1}{4}$ 'ü uzaklaştırıldı. Ardından bistüri ile embriyonun burnu, her 2 göz arasından kesildi. Bu kesi, kafanın merkezine doğru ilerletildi. Böylece her bir göz kafanın ayrı yarısında kalacak şekilde 2 eşit parçaya bölünmüş oldu. Kafanın bir yarısı, gözün alt posterior köşesinde kalan lakrimal bez mikroskopun merkezine alınacak şekilde yerleştirildi. Cilt, gözün alt posteriorundan forseps ile kavranıp çekilerek diseke edildi, göz bütünü (glob) ve lakrimal bez açığa çıkarıldı. Daha koyu ve yoğun mezenşimal doku içerisinde, gözden köken alan bir kanal üzerindeki açık renkli tomurcuk olarak lakrimal bez bu aşamada farkedilebildi. Lakrimal bez ve beze ait mezenşim, etrafında çevreleyen dokudan kibarca serbestleştirildi. Bu işlemde lakrimal kese veya kanalının forseps ile kavranmamasına, sıkıştırılmamasına özen gösterildi.

Etrafındaki dokulardan uzaklaştırılan lakrimal bez, gözün lakrimal bez kanalı dibindeki epitelinden tutularak ortamdan tamamen ayrıldı. Kapsüllenme deneyleri için lakrimal bez epitelyal ve mezenşimal parçalarına disseksiyon ile ayrılmış olarak izole edilmiş oldu (Şekil 15).

İzole edilen lakrimal bezler, DMEM / F-12 ortamı ve HEPES tamponu içeren buz üzerinde bir santrifüj tüpünde toplandı. Aynı işlem embriyonun diğer lakrimal bezi ve diğer tüm embriyolar için tekrarlandı. Anne farenin ve embriyonun arda kalan dokuları “Hayvan Barınağı Yönetmelikleri”ne göre imha edildi.

6.2. Histolojik İnceleme

Tüm histolojik örnek hazırlıkları (parafine gömme, kesit alımı ve histolojik boyama) IBG histopatoloji teknisyeni tarafından yapıldı. Kısaca, doku parçaları, 5 ml'lik santrifüj tüplerinin bir kapağının içine ‘optimal cutting temperature’ (OCT) bileşiğine gömüldü. Doku parçalarını dökülmüş OCT bileşiğinin ortasına hizaladıktan sonra, numuneler -80 ° C'de 1 gün boyunca donduruldu. Daha sonra hazırlanan örneklerden kesitler alınarak izole edilen erişkin ve embriyonik lakrimal bez dokuları hematoksin ve eozin boyama yapılarak histolojik olarak incelendi.

6.3. Mekanik Disseksiyon

Erişkin fareden izole edilen lakrimal bez dokusu, boyutunun büyük olması nedeni ile enzimatik reaksiyon öncesi bisturi ve penset yardımı ile daha küçük parçalara ayrıldı. Embriyonik farede izole edilen lakrimal bez dokusu için böyle bir işleme gerek duyulmadı.

6.4. Enzimatik Reaksiyon

Toplanan doku parçaları enzimatik reaksiyon adımları için 1.5 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Parçalar, iki kez 100 U / ml kollejenaz II ile 15 dakika boyunca ve daha sonra 10 dakika boyunca tripsin-EDTA ile işlendi. Tüm reaksiyonlar, 37°C'de inkubasyon makinesinin içine konulan tüp döndürücü ile yapıldı. Her enzimatik reaksiyondan sonra, parçalar 0.7 g'de 5 dakika santrifüj edildi, sonra süpernatant atıldı ve taze hazırlanmış enzim eklendi. Nihai sindirimden sonra, karışım 70 µm'lik bir hücre süzgecinden süzüldü. Karışım süzgeçten kültür ortamı ile yıkandı ve 50 ml santrifüj tüpüne toplandı. Karışım 0.7 g'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı ve hücre sayımı için taze kültür ortamı eklendi. Hemasitometre ile hücreler sayıldıktan sonra daha sonra kullanıma hazır hale gelmiş oldu.

6.5. Akış sitometri ve sınıflandırma işlemi

İzolasyon deneylerinden elde edilen epitelyal ve mezenşimal hücre oranını tespit etmek ve enkapsülasyon deneyi için sınıflandırmak amacıyla akış sitometrisi tekniği kullanıldı. Analiz ve sınıflandırma deneyleri için sırasıyla Canto II Analyzer (BD) ve Aria III Sorter (BD) kullanıldı. Hem analiz hem de sınıflandırma deneylerinde, mezenşimal hücreleri saptamak için fikoeritrin bağlı CD90 antikoru (Abcam ab24904) ve epitelyal hücreleri saptamak için allofikosiyinin bağlı EpCAM (Biolegend 118213) antikoru kullanıldı. Her iki antikorun kontrol grubu olarak, allofikosiyinin bağlı IgG (Biolegend 400511) ve fikosiyinin bağlı IgG (Biolegend 400707) kullanıldı.

6.6. Doku kültürü

Bu çalışmada statik kültür ve biyomühendisliği doku kültürü olmak üzere iki ana doku kültürü yöntemi kullanıldı. Statik kültür klasik bir yöntem olup asıl hedef biyo-mühendislik doku kültürü yöntemini uygulamak idi.

6.6.1. Biyo-mühendislik Doku Kültürü

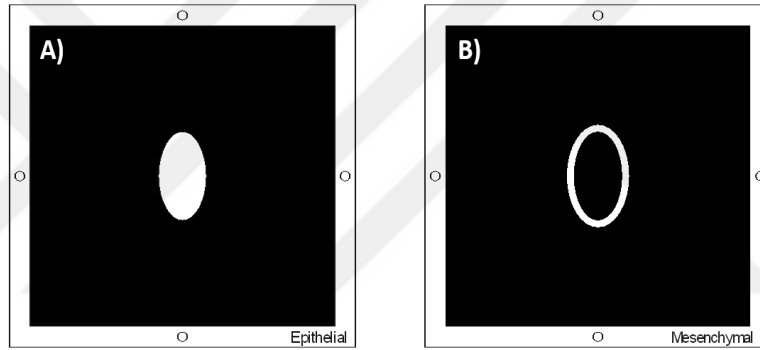
Biyo-mühendislik doku kültüründe, biyomateriyal içerisinde büyüyen ve gelişen hücreler, statik ve dinamik olmak üzere iki farklı koşul altında kültüre edildi. Biyo-mühendislik doku kültürünü başarılı bir şekilde gerçekleştirmek için gereken üç öge olan biyomateriyal, kültür yeri (statik kültür için geleneksel kültür kabı veya cam slayt, dinamik kültür için mikroakışkan sistem) ve kullanıma uygun hücreler hazırlandı.

6.6.1.1. Doku İskelesi

Bu çalışmada 3B mikroakışkan doku kültür sistemi için hücre / doku iskelesi olarak biyouyumlu ve biyobozunur karakterde olan jelatin bazlı bir hidrojel olan jelatin metakrililol (GelMA) kullanıldı (Şekil 16). Hidrojel GelMA doğası gereği, ultra viyole (UV) ışık varlığında çapraz bağlanmaya uğrayarak jelleşme göstermektedir (Foto-başlatma). Bu işlem için ayarlanabilir bir UV ışık kaynağı (OmniCure 2000) kullanıldı. Foto-başlatma işlemi öncesinde epitel ve mezenşimal bölgeler için farklı paterndeki fotomaskeler, GelMA çözeltisi üzerine yerleştirildi.(Şekil 17). UV ışığa maruz kalan bölgelerde GelMA çapraz bağlanmaya uğrayıp hidrojel oluştururken, maruziyetin olmadığı alanlarda maske sayesinde çapraz bağlanma gerçekleşmedi. İşlem sonrasında bir kere PBS ile yıkama ile çapraz bağlamaya uğramamış GelMA uzaklaştırıldı ve üç boyutlu doku iskelesi elde edilmiş oldu.



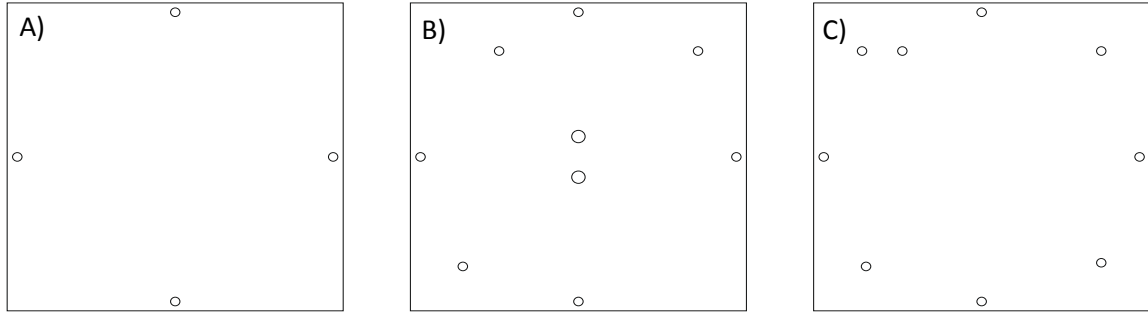
Şekil 16. Liyofilize GelMa.



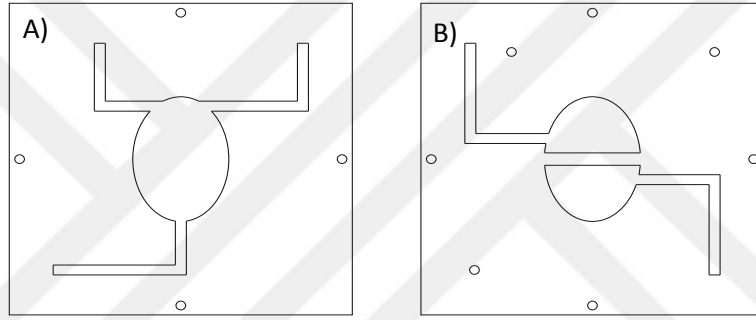
Şekil 17. Epitel ve mezenşimal parçaları basmak için hazırlanan fotomaskeler. Sırasıyla A) epitel ve B) mezenşimal parçalarını basmak için karşılık gelen fotomaskeler. Fotomaskeler asetat kağıttan yapılmıştır. Fotomaskeler, 3B yapay doku bölmelerini hassas bir şekilde lakrimal çip üzerindeki karşılık gelen noktalara basmak için kullanıldı.

6.6.2.2. Lakrimal Çip Sistemi

Mikroakışkan sistem, lakrimal bezin ana komponenti olan epitel ve mezenşimal hücreler için iki farklı kültür ortamı sağlamak için tasarlandı. Sistem ve bileşenleri CorelDRAW X7 yazılımında tasarlanarak, bu çalışmada mikroakışkan sistem “lakrimal çip” olarak adlandırıldı. Mikroakışkan sistem, tıbbi sınıf polistiren ve 1.5 mm kalınlıkta polimetil metakrilat (PMMA) ana parçalarının yanı sıra çift taraflı yapıştırıcı (DSA), epoksi tutkal ve borosilikat mikro tüplerden oluşturuldu. Mikroakışkan sistemin imalatı için kullanılan tüm malzemeler, son kullanımdan önce bir hücre kültürü sınıfı laminar akış başlığı içinde % 70 etanol ve UV maruziyeti ile sterilize edildi.



Şekil 18. Lakrimal çip katmanları. A) Sırasıyla alt (1. seviye), B) orta (3. seviye) ve C) üst tabaka (5. seviye). Orta ve üst kısımlar PMMA'dan, alt kısım polistirenden yapılmıştır.

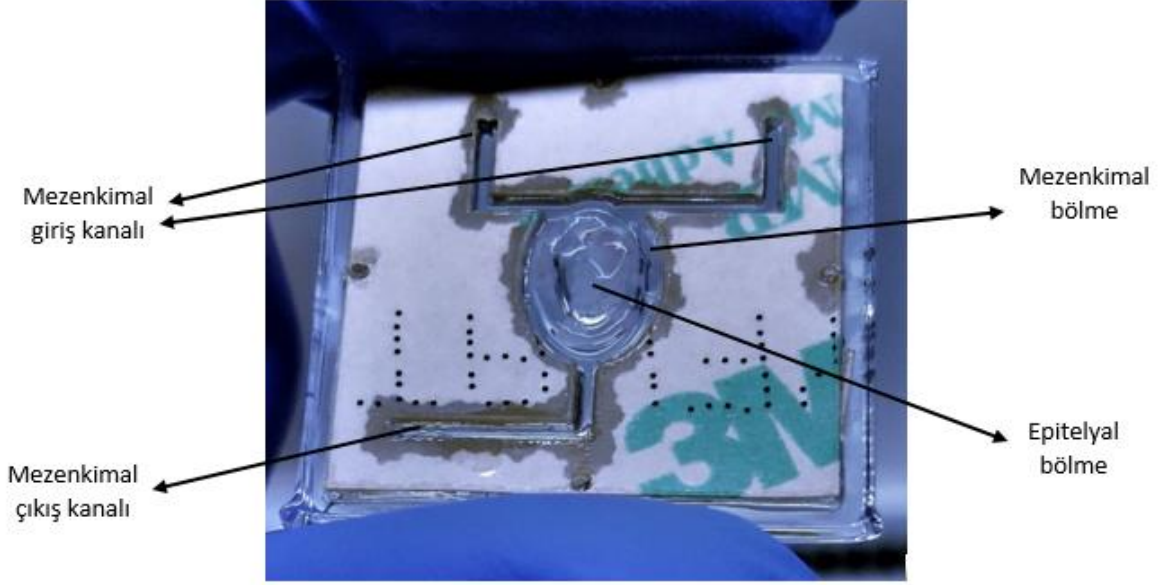


Şekil 19. Lakrimal çip katmanları A) Birinci bölüm (2. seviye) üç boyutlu yapıya yükseklik verir ve mezenşimal yolları oluşturur, B) ikinci bölüm (4. seviye) ise epitel yollarını oluşturur.

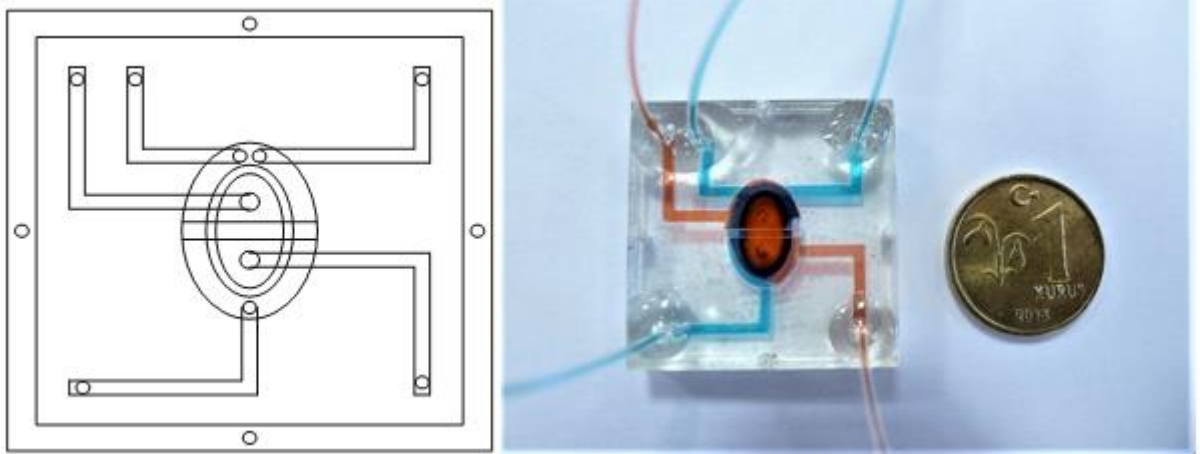
Sistem 5 ana bölümden oluşturuldu. Aşağıdan yukarı doğru sıralandığında;

1. seviye, medikal sınıf polistirenden yapıldı ve sistemin tabanı olarak tasarlandı.
2. seviye, ana kültür alanı ve mezenşimal kanal rotalarını içeren DSA'dan yapıldı. Bu seviye 5 kat DSA'dan oluşturuldu. Epitelyal kısma karşılık gelen fotomaskeyle basım işlemi 1. katta ve dış mezenşimal kısma karşılık gelen fotomaskeyle basım işlemi ise 5.katta gerçekleştirildi. Epitel ve mezenşimal bölmeler arasındaki yükseklik farkı nedeniyle, mezenşimal bölme izole kültür koşulu sağlayarak epitel bölmesini çevreleyen bir duvar görevi gördü.
3. seviye, PMMA'dan yapıldı ve epitel bölmesi için kültür delikleri içeriyordu.
4. seviye, epitel kanal yollarına sahipti ve 2 katmanlı DSA'dan yapıldı.
5. seviye PMMA yapısındaydı ve en üstte kapak görevi gördü (Şekil 18 ve 19).

Birincisi hariç tüm seviyelerde tüp giriş delikleri bulunduruldu. Mezenşimal bölme için üç (2 giriş, 1 çıkış) ve epitel bölmesi için iki (1 giriş, 1 çıkış) olmak üzere toplamda 5 adet tüp bağlantısı mevcuttu (Şekil 20 ve 21).



Şekil 20. İkinci seviye inşa edildikten sonra lakrimal çipin son durumu ve her iki parçanın GelMA kapsüllemesi. İç epitel bölmesi, epitel kültür ortamının izolasyonu için oval bir duvar görevi gören dış mezenşimal bölme ile çevrilidir. Çipin kapatılmasından sonra mezenşimal kısım dış kanallardan temin edildi. Epitelial kısım, 3. seviyeden aşağı akan 4. seviyedeki yollardan sağlandı. 3. Seviyedeki deliklerden biri iç epitelial kısma giriş sağlarken, bir diğeri drenajı sağlar.



Şekil 21. Lakrimal çip tasarımı. Lakrimal çip , mavi (mezenşimal bölme ve yollar) ve kırmızı (epitel bölme ve yollar) gıda boyaları ile eş zamanlı olmayan akış performansı için test edilmiştir. Üst kanallar girişler (besleme kanalları) ve alt kanallar çıkışlar (drenaj kanalları) olarak işlev görür. Boyutunun karşılaştırılması amacıyla yanına 1 Kuruş (17mm çapında) yerleştirilmiştir.

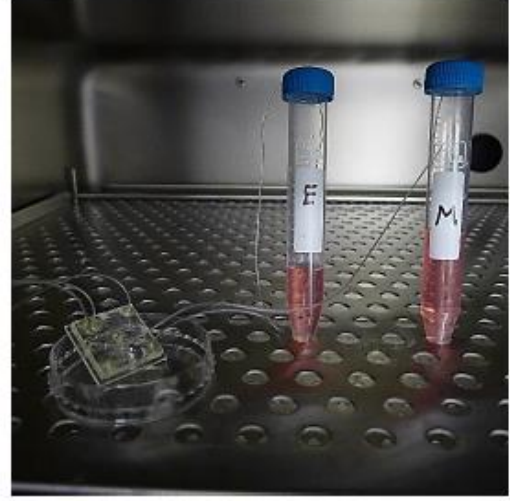
6.6.1.3. Statik ve Dinamik Kültür

Statik kültür deneyi, GelMA hidrojelini ile hücrelerin biyouyumluluğunu araştırmak, dinamik kültür deneyi ise epitelyal ve mezenşimal hücrelerin fonksiyonel ilişkisini sağlayabilmek için gerçekleştirildi.

Her iki tür yöntemde biyo-mühendislik doku kültürünün ilk adımı, GelMA hidrojelinde hücrelerin kaps llenmesidir. Sayılan hücreler 5 dakika boyunca 600 g kuvvetinde santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Daha sonra hücreler, istenen konsantrasyonlarda önceden hazırlanmış GelMA hidrojeliniyle yeniden süspansiyon edildi. 1-10 milyon hücre/ml konsantrasyonlarında karışımlar oluşturuldu. Yeni oluşan süspansiyon hafif karıştırıldıktan sonra UV ışık ile çapraz bağlama işlemi için hazır hale getirilmiş oldu.

Cam sisteminde birbirine paralel iki cam lam bir petri kabına yapıştırıldı.    nc  bir lam bu iki lam üzerine yerleştirilip sabitlenerek petri kabı ile cam arasında potansiyel bir aralık sağlanmış oldu. GelMA ile hücre karışımı, bu aralığa doldurulup ardından UV ışık ile çapraz bağlama yapılarak kapsüllenme işlemi gerçekleştirildi. Cam slayt sisteminde çapraz bağlanmış GelMA 3. cam lamına yapışmaktadır. Sonunda petri kabının içindeki 3 boyutlu doku iskelesi içerisindeki hücre karışımı (cam slaytın yüzeyinde), tüm yapıyı kapsayacak kadar kültür ortamına konularak inkübasyon makinesinin içine yerleştirilerek statik kültür deneyi yapıldı.

Dinamik kültür için biyo-mühendislik 3B lakrimal bez kültürü için özel olarak tasarlanan “lakrimal  ip” adı verilen mikroakışkan sistem kullanıldı. Epitelyal ve mezenşimal fotomaskeler kullanılarak lacrimal çipin polistiren yüzeyinde kapsüllenme işlemi gerçekleştirildi. Bu kapalı sisteme, besleme ve boşaltma görevi gören özel borosilikat mikro boruları bağlandı. Lakrimal  ip, üzerindeki üç adet giriş kanalından sisteme sürekli kültür ortamı akışı sağlayan şırınga pompasına (Harvard Aparatı) yerleştirildi. Lakrimal çipin iki çıkış kanalından, E (epitel) ve M (mezenşimal) bölgelerden gelen kullanılmış kültür ortamının dışa drenajı sağlandı. Sistem kültür sırasında inkübasyon makinesinin içerinde yer aldı (şekil 22).



Şekil 22. Şırınga pompasının inkübasyon makinesi üzerindeki yerleşimi ve lakrimal çipin inkübasyon makinesi içerisindeki görünümü

Tüm kinetik deneyler, 1 ile 4 hafta arasında bir süre boyunca gerçekleştirildi.

6.7. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Deneyi

Uyarılmış pluripotent kök hücreler, lakrimal bez gelişiminde rol alan iki komponente dönüşmek için farklılaştırıldı:

- 1) Lakrimal bez epitelinin öncüllerini oluşturacak oküler ektodermal hücreler
- 2) Lakrimal bez mezenşimini oluşturacak olan perioküler mezenşim hücreleri.

Bu gelişim sürecinin, epitel için PAX6 ve P63, mezenşim için FOXC1 ekspresyonunun saptanması ile izlenmesi planlandı.

6.7.1. UPKH'lerden Lakrimal Epitel Hücrelerinin Elde Edilmesi

Li ve arkadaşlarının protokolü uygulanarak, çok bölgeli oküler hücreler (ÇBOH) olarak isimlendirilen ve göz gelişimini taklit eden, anterior nöroektoderm ve nöral retina, retina pigment epiteli, yüzey ektodermi, nöral krest ve lense ait göz alanı ("eye field") hücreleri barındıran, 2,5 boyutlu bölgelerin elde edilmesi planlandı (Şekil 23) [179]. Oküler yüzey ektodermi hücrelerinin mekanik izolasyonu ile UPKH'lerden konjunktiva epiteli ve sonrasında lakrimal bez epitelini oluşturacak hücrelerin elde edilmesi planlandı.



Şekil 23. Kısmen göz gelişimini taklit ederek farklılaşan UPKH’lerde oküler hücreyle ilişkili genlerin ekspresyon paterni. CEn, kornea endoteli; CEP, kornea epiteli; LE, lens; NC, nöral krest; NR, nöral retina; OSE, oküler yüzey ektodermi; RPE, retina pigment epiteli [179].

İnsan kaynaklı Nanog⁺ ve Oct4⁺ UPKH’ler matrijel kaplanmış kültür kabında serum içermeyen mTeSR1 ortamında muhafaza edildi. Yedi gün boyunca “göz alanı farklılaşma ortamı” ve nörobazal ortamda kültüre edildi. Ardından “oküler hücre farklılaşma ortamı”na koyularak yaklaşık 3-4 hafta boyunca kültüre edildi. İmmunfloresan boyama ile bölge 3 hücrelerinin, yüzey ektodermal belirteçi PAX6 ve P63’ü ve ayrıca periferik bölgede epitelyal progenitör hücrelerin bir belirteçi olan K13’ü eksprese edip etmediği incelendi. Bölge 3’te yer alan hücrelerin mikroskop altında cam iğne yardımıyla mekanik olarak izolasyonu ve kültüre edilmesi denendi.

6.7.2.UPKH’lerden Lakrimal Mezenşim Hücrelerinin Elde Edilmesi

Lovatt ve arkadaşlarının protokülü uygulanarak, UPKH’ler perioküler mezenşim transkripsiyon faktörlerini ifade eden nöral krest hücrelerine farklılaştırıldı [180]. Perioküler mezenşime özgü FOXC1, PITX2, LMX1B belirteçleri, immunositokimya boyaması ve qPCR ile gösterildi.

BULGULAR

1. Hayvan Deneyleri

Yaşlı ve genç farelerin hücrelerinin kültür davranışlarını karşılaştırıldığında, genç farelerin hücrelerinin yaşlılara göre daha hızlı proliferasyon eğiliminde oldukları gözlemlendi. Bu sonuca dayanarak maksimum proliferasyon kapasitesi için embriyonik fare hücrelerinin çalışmaya dahil edilmesine karar verildi.

Aynı boyutlarda kültür plakalarına benzer sayıda hücre ekildiğinde embriyonik farelerden alınan hücreler, en genç yetişkin farelerden elde edilen hücrelerden neredeyse 3 kat daha hızlı bir şekilde birleştiler. Bu gözlem nedeniyle daha iyi sonuçlar elde edilmesi amacıyla embriyonik fareden izole edilen lakrimal bez hücreleri ile deneyler sürdürüldü.

1.1. Yetişkin Fare Lakrimal Bez Dokusu İzolasyonu

İlk dört izolasyon deneyi, lakrimal bez dokusu ekstraksiyonunda deneyim kazanılması ve enzimatik izolasyon protokolünün optimize edilmesi ile hücre ve doku kültürü deneyleri için yeterli miktarda hücre elde etmek için yeterli miktarda lakrimal bezin belirlenmesi için yapıldı. Ardından sırasıyla hücre kültürü deneyleri, statik doku kültürü deneyleri ve dinamik kültür deneyleri için izolasyonlar yapıldı.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 1 (LB İZO 1) : 10.02.2017

2 fare, 4 lakrimal bez. İzole edilen hücreler kuyu kültür plağına gözlem amacıyla ekildi.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 2 (LB İZO 2) : 17.02.2017

2 fare, 4 lakrimal bez. İzole edilen hücreler kuyu kültür plağına gözlem amacıyla ekildi.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 3 (LB İZO 3) : 15.03.2017

2 fare, toplam 4 lakrimal bez. İzole edilen hücreler kuyu kültür plağına gözlem amacıyla ekildi. 1 hafta sonra kontaminasyon görüldü.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 4 (LB İZO 4) : 15.12.2017

2 fare, 4 lakrimal bez. İzole edilen hücreler kapsülleme deneyi için yeterli hücre elde edebilmek amacıyla kuyu kültür plağına ekildi.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 5 (LG ISO 5) : 20.12.2017

2 fare, 4 lakrimal bez. Farklı olarak hücre izolasyonunun yanında eksplant kültür metodu denenmesine karar verildi. Hücreler statik kapsülleme deneyi için kullanıldı.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 6 (LB İZO 6) : 28.12.2017

1 fare, 2 lakrimal bez. Lakrimal bez sayısının azlığından dolayı elde edilen dokular ile sadece ekplant kültürü yapıldı. Hücreler statik kapsülleme deneyi için kullanıldı.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 7 (LB İZO 7) 18.01.2018

Bu deneyde, yaş farkının hücre çoğalmasında önemli bir faktör olduğu fark edildi. 2 yaşlı (9 aydan büyük) ve 2 genç (yaklaşık 2 haftalık) fare vardı ve aradaki farkı görebilmek için elde edilen doku ayrı ayrı kültürlerle ekildi. Hem eksplant kültürü hem de izolasyonu yapıldı. Statik kapsülleme deneyleri için hücreler kullanıldı.

- Lakrimal Bez İzolasyonu (LB İZO 8) 09.02.2018

3 fare (2 genç, 1 yaşlı), 6 lakrimal bez. Hücre izolasyonu ve statik kültür yapıldı. Ancak 2 hafta sonra kontaminasyon görüldü.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 9 (LB İZO 9) 02.03.2018

1 fare (1 yaşlı), 2 lakrimal bez. Yetersiz hücre verimi nedeniyle bu deneyden itibaren statik kültür yöntemi kullanımından vazgeçildi.

- Lakrimal Bez İzolasyonu 10 (LB İZO 10) 26.03.2018

2 fare (hepsi genç), 4 lakrimal bez. Bu deneyden izole edilen tüm hücreler, lakrimal çipte dinamik kapsülleme deneyleri için kullanıldı.

1.2. Embriyonik Fare Lakrimal Bez Dokusu İzolasyonu

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 1 (LB İZO E1) : 14.04.2018

Birinci izolasyon deneyinde izole edilmiş hücrelerin popülasyon profillerinin tespiti için FACS analizi gerçekleştirildi. Ayrıca, lakrimal çipte dinamik kapsülleme deneylerini gerçekleştirmek için kullanıldı. Hücrelerin geri kalanı, gelecekteki hücre ve doku kültürü deneyleri için stok olarak donduruldu.

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 2-3 (LB İZO E 2-3) : 26.05.2018 – 27.05.2018

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 4 (LG ISO E4) : 24.09.2018

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 5 (LG ISO E5) : 25.09.2018

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 6 (LG ISO E6) : 26.09.2018

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 7 (LG ISO E7) : 25.10.2018

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 8 (LG ISO E8) : 23.11.2018

- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 9 (LG ISO E9) : 06.02.2019
- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 10 (LG ISO E10) : 15.02.2019
- Lakrimal Bez İzolasyonu Embriyonik 11 (LG ISO E11) : 17.02.2019

4. izolasyon deneyinden itibaren yapılan çalışmalarda elde edilen hücreler, lakrimal çip kültürü ve görüntüleme incelemelerinde kaynak olarak kullanıldı.

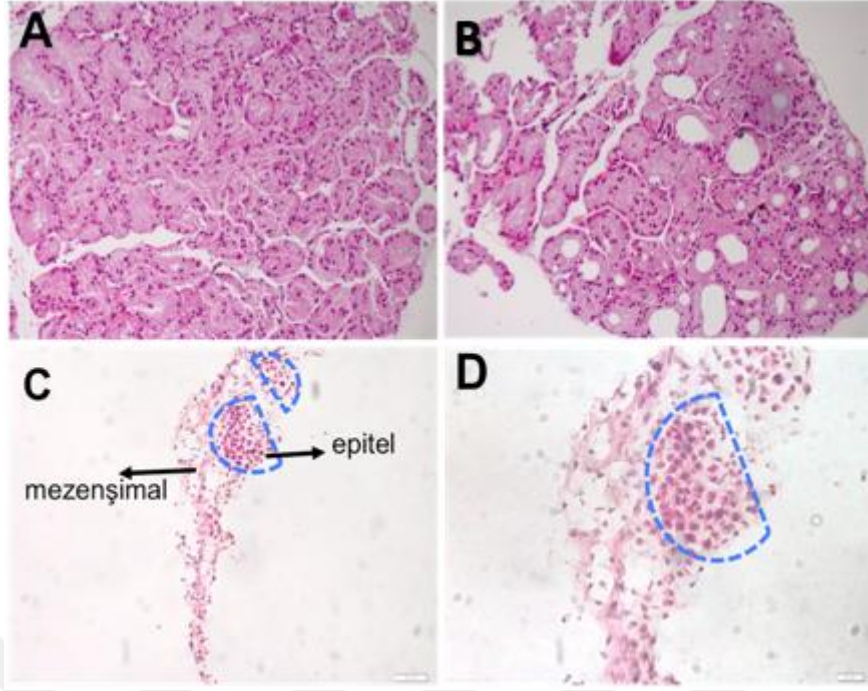
2. Histolojik İnceleme

İzole edilen dokuların yetişkin ve embriyonik farelerin lakrimal bezi olduğunu doğrulamak için eksize edilen parçalar üzerinde histolojik inceleme yapıldı. Hem yetişkin hem de embriyonik lakrimal bez yapıları şekilde kolayca gözlenebildi. Sirküler glandüler asinus ve uzun duktus yapıları saptandı.

Işık mikroskobu altında embriyonik lakrimal bezin epitelyal kısmını oluşturan asini ve duktus yapıları gösterildi (Şekil 24 ve 25).



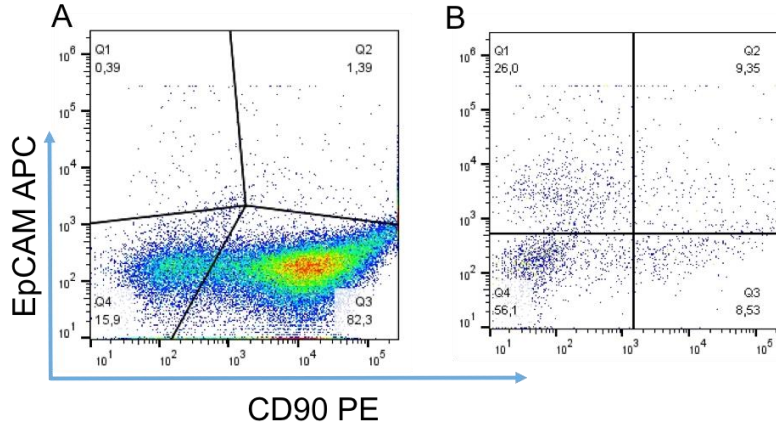
Şekil 24. Embriyonik fare lakrimal bezin epitelyal kısmının ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. 4x büyütme.



Şekil 25. Erişkin fare lakrimal bezinin ve embriyonik fare lakrimal bezinin histolojik kesiti. A ve B) Erişkin fare lakrimal bezinin hematoksin ve eozin boyaması.4x büyütme. C ve D) Embriyonik fare lakrimal bezi.4x büyütme.

3. Akış Sitometrisi Analizi

Tüm FACS (Fluorescence activated cell sorting) deneyleri sırasında epitel hücreleri, APC floresan konjugat boyası olan EpCAM antikoru ile işaretlenirken, mezenşimal hücreler, PE floresan konjugat boyası ile CD90 antikoru ile işaretlendi. Lakrimal dokudaki gerçek epitel/mezenşimal hücre oranını tespit etmek için taze olarak izole edilmiş hücreler petri kabına ekilmeden doğrudan analiz edildiğinde CD90+ mezenşimal hücrelerin %17.8 oranında, EpCAM+ epitel hücrelerin ise %35.5 olduğu görüldü (Şekil 26). Yapılan bu deney FACS yöntemi ile epitel ve mezenşimal hücre ayrıştırılmasının sadece taze izole edilmiş hücrelerle mümkün olabileceği sonucunu verdi. Ancak taze izole edilen hücrelerin sayısının oldukça az olup FACS ile ayrıştırmada çok etkin sonuçların alınamayabileceği düşünüldü.



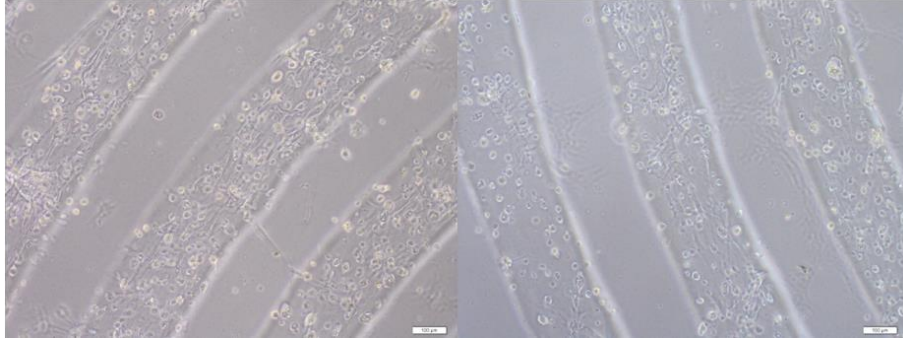
Şekil 26. Akış sitometresi analizi. A) petri kabında çoğaltılmış hücreler, B) Doğrudan izolasyon sonrası analiz edilen hücreler (Grafiklerin 1. çeyrek alanı (Q1) epitelyal hücre popülasyonunu temsil ederken, 3. çeyrek alanı (Q3) mezenşimal hücre popülasyonunu temsil eder.)

4. Doku Kültürü Deneyi

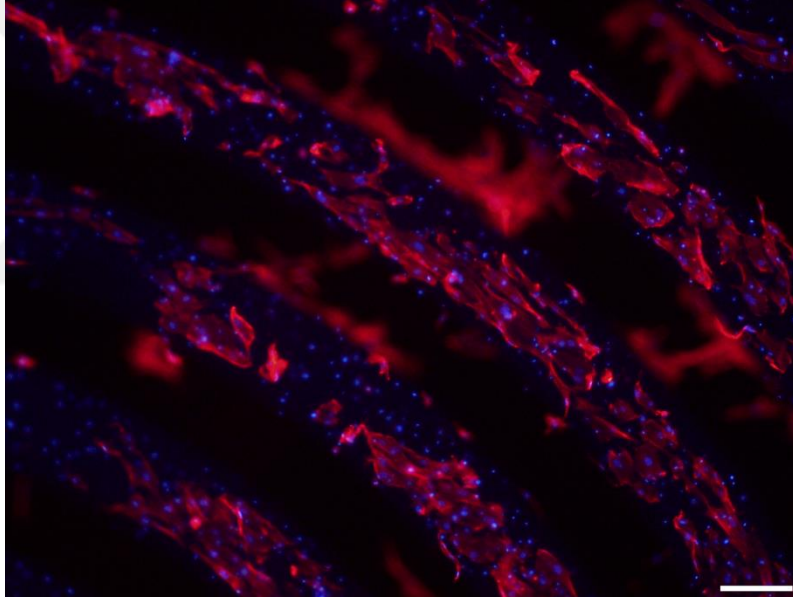
Biyo-mühendisliği doku kültürü deneylerinde erişkin lakrimal bez hücrelerinin büyük çoğunluğu, kontaminasyon ve yetersiz hücre verimi nedeniyle kullanılamadı. Kullanılan hücrelerin canlı hücre yoğunluğunun düşük olması ve yaşlı hücrelerin zayıf proliferasyon kapasitesine sahip olması, kapsülleme işleminin başarısız olmasının nedenleri olarak düşünüldü.

4.1. Statik Kültür

İlk olarak yapılan statik kültür deneyinde kapsüllenmiş fare embriyonik lakrimal bez hücreleri, ışık mikroskobu altında gözlemlendi (Şekil 27). Beşinci günde besinlerin kullanıldığı anlamına gelen kültür ortamının rengini değiştirmesi ve hücrelerde morfolojik değişiklikler gözlemlendi. Bunlar, hücre canlılığının açık belirtileri olup, doku iskelesini oluşturan hidrojel GelMA'nın embriyonik lakrimal bez hücreleriyle biyolojik olarak uyumlu olduğunu ve kapsülleme parametrelerinin (foto çapraz bağlama sırasında UV gücü ve süresi) güvenli aralıkta olduğunu göstermekteydi. Üç boyutlu yapıdaki hücre yerleşimini daha iyi gösterebilmek için 10. günde kırmızı phalloidin (aktin filamentleri) ve mavi DAPI (çekirdek) ile boyandı (Şekil 28).



Şekil 277. Fare embriyonik lakrimal bezi hücrelerinin GelMA ile kapsüllenmesi. Kapsülleme sonrası 5. gün. 5×10^6 hücre/ml. 10x büyütme.

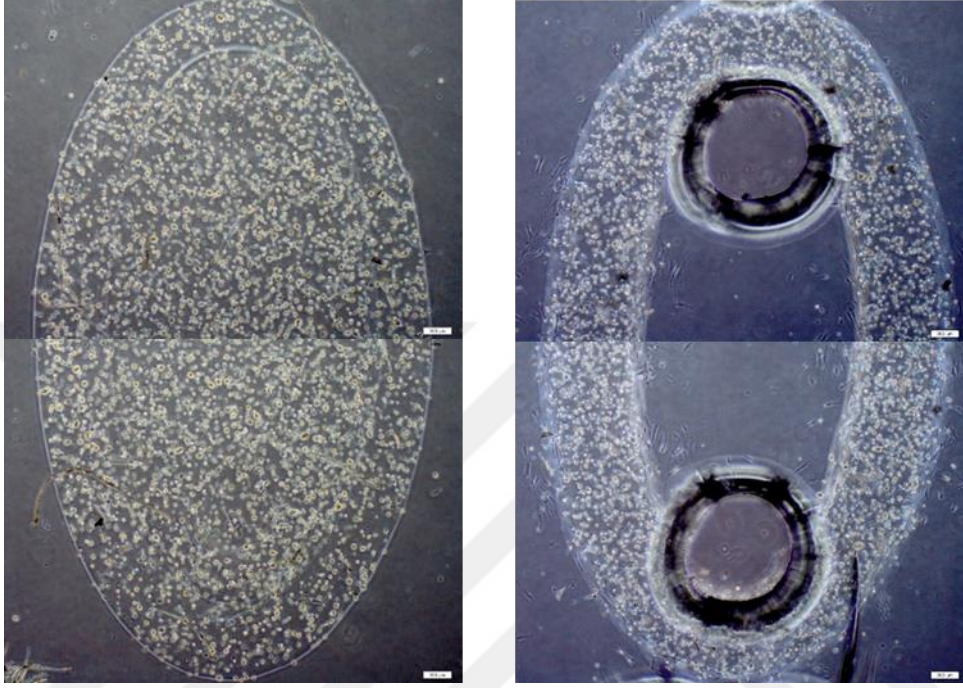


Şekil 288. Fare embriyonik lakrimal bezi hücrelerinin kapsüllenmesinin floresans mikroskopik görüntülemesi. (Kırmızı renk: Phalloidin, mavi renk: DAPI) Kapsülleme sonrası 10. Gün. 5×10^6 hücre/ml. 4x büyütme.)

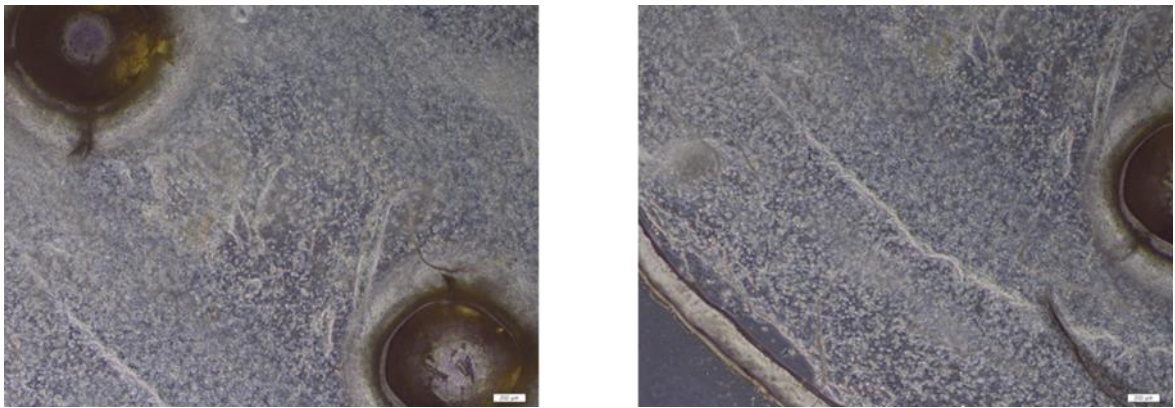
4.2. Dinamik Kültür

Statik kültürün olumlu sonuç vermesinin ardından kinetik kültür için çalışma başlatıldı. Embriyonik fare lakrimal bez hücreleri lakrimal çip ortamına fotomaske ile GelMA içine

kapsüllenerek ekildi. Şekil 7 ve 8’de 0. gün ve 7. günde lakrimal  ip görüntüleri gözlendi. Sistem 14 gün boyunca başarıyla kültürlendi (Şekil 29 ve 30).



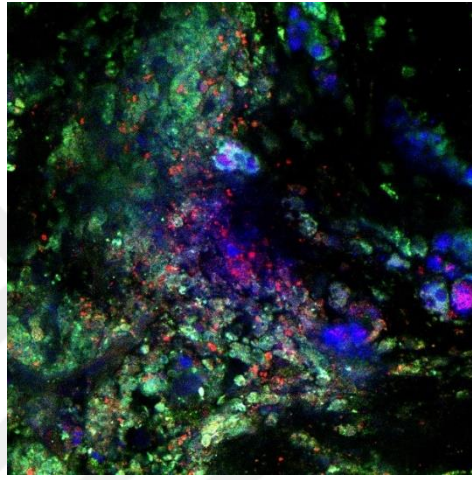
Şekil 29. Fare embriyonik lakrimal bezi hücreleri kapsüllenmesi. LC v5.0’da yapıldı. Kaps llemeden sonraki gün, montajdan  ncekig r n m. Her iki bölümde 5×10^6 hücre/ml yoğunluğu mevcuttu. 4x büyütme.



Şekil 30. Birleştirilmiş mikroakışkan sistem içerisinde geliştirilen lakrimal bez benzeri doku oluşumu. Kaps llemeden sonraki 7. gün. 10^7 hücre/ml.

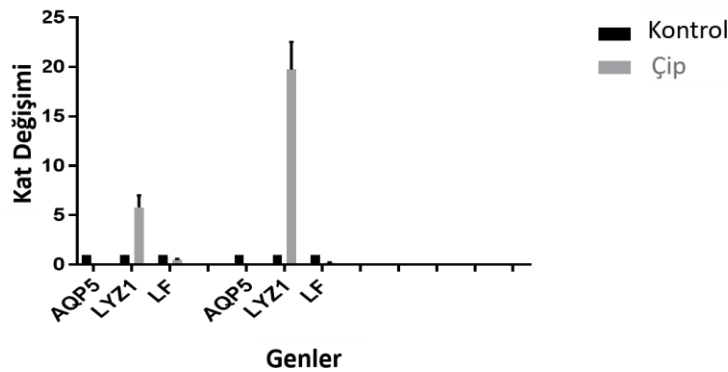
Akış sitometrisi ile hücrelerin epitelial ve mezenşimal olarak sınıflandırmasında istenen verimin alınamaması nedeniyle stereo-mikroskop altında diseksiyon sırasında dokunun epitelial ve mezenşimal olarak ayrılması ve sonrasında tüm doku parçalarının kapsüllenmesi yöntemine karar verildi.

Dokuların lakrimal çipe uygun kapsülleme ve kültüre edilmesi sonucunda elde edilen biyo mühendislik yöntemi ile üretilmiş lakrimal bez dokusunda hücresel fonksiyon göstergesi olan AQP-5 (Su kanalı proteini) ve ZO-1 (Epitelial sıkı bağlantı proteini) gibi proteinlerin varlığı gösterildi (Şekil 31).



Şekil 31. Lakrimal çipte 2 hafta boyunca kültürlen farklı fare embriyonal lakrimal bez dokusu parçalarının konfokal mikroskopi görüntüsü. AQP5 yeşil, ZO-1 kırmızı, çekirdek boyası olan DAPI mavi renktedir. 25x büyütme.

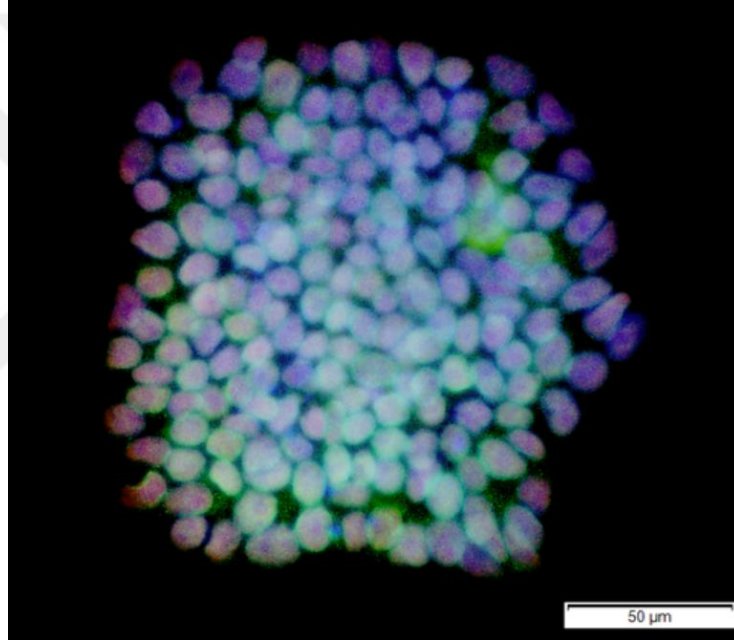
4.3. Doğal ve biomühendislik yaklaşımıyla üretilmiş lakrimal bezin qPCR sonuçları



Şekil 32. Lakrimal çipte gelişen dokunun lakrimal beze özgü belirteçler açısından qPCR incelemesi.

Lakrimal çipte 14. gün sonunda geliştirilen lakrimal bez benzeri dokunun gözyaşı sekresyonunu göstermek amacıyla aquaporin 5, lizozim ve laktoferrin mRNA düzeyleri qPCR yöntemi ile ölçüldü. Kontrol grubu olarak izolasyondan hemen sonra elde edilen naif embriyonik fare lakrimal bez dokusu kullanıldı. AQP5 mRNA düzeyinin çipte daha az olduğu gözlemlendi. Lizozim düzeyinin lakrimal çipte gelişen dokuda, kontrol grubuna göre yüksek oranda artmış olduğu gözlemlendi. Öte yandan benzer bir artış laktoferrin düzeyinde tespit edilemedi (Şekil 32).

5. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Deneyleri
Elde edilen uyarılmış pluripotent kök hücrelerin, immunfloresan boyama ile pluripotensi belirteçleri olan Oct4 ve Nanog eksprese ettiği saptandı (Şekil 33).

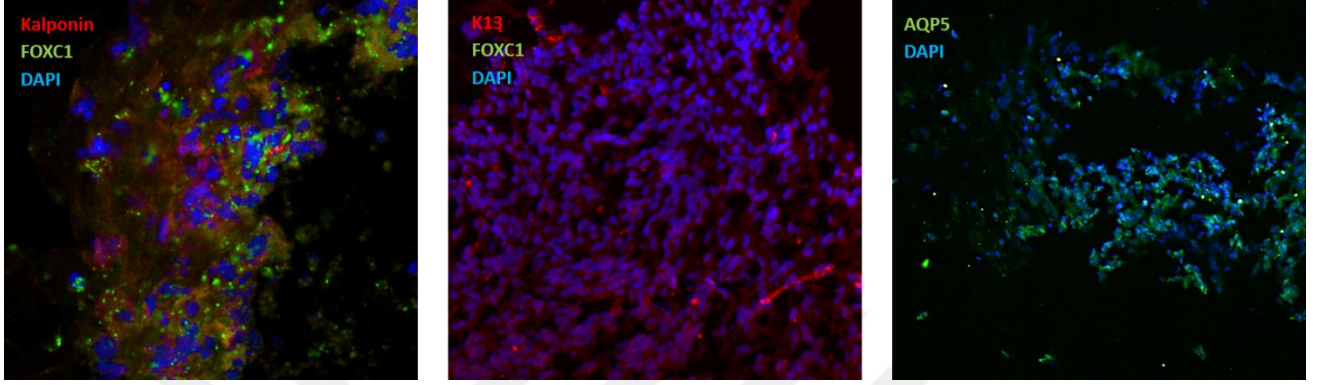


Şekil 33. UPKH kolonilerinin immunfloresan boyama paterni. Kırmızı: Nanog. Yeşil: Oct 4. Mavi: DAPI. 20x büyütme. Ölçek 50 µm.

5.1. UPKH'lerden lakrimal beze ait epitel hücrelerinin geliştirilmesi

UPKH'lar 1%'lik Matrigel üzerine ekilip hücrelerin yüzeyi iki gün üst üste 2%lik Matrigel ile kaplanarak 2.5 boyutlu yapı oluşturuldu. EDM'in içerisinde 2 gün kültür edildikten sonra anterior nöroektoderm, 7. günün sonunda ise göz kök hücreleri oluşturuldu. 7. günden sonra EDM'den ODM'e değiştirilen ortamda hücreler 14 gün daha kültür edildiklerinde ÇBOH elde edilebildi. WT1 UPKH klonuyla uzun süreli (42 gün) kültürde ÇBOH'lerin doku benzeri yapılar oluşturduğu ve nöronal farklılaşmaya yatkın olduğu görüldü. Konjonktiva belirteci

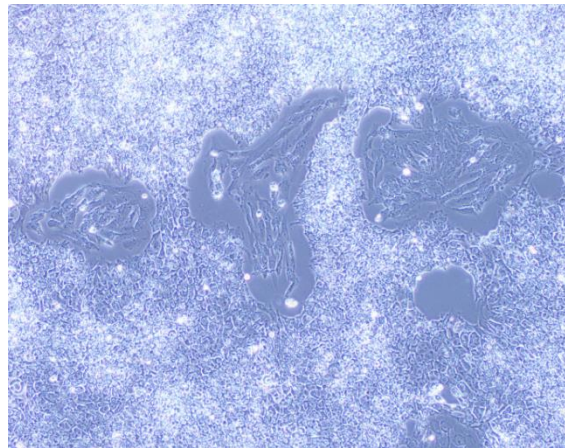
olan K13'le yapılan immunohistokimya boyamaları sayesinde, ÇBOH'lerin uzun süreli kültürde konjonktiva epiteline farklılaşabildiği düşüncesini doğruladı. ÇBOH'lerin p75 ve FOXC1 proteinlerini ifade eden olası perioküler mezenşim hücrelerine de farklılaşmış olduğu gözlemlendi. Yapılan boyamalarda lakrimal beze özgü AQP5 proteinin yapılarda bulunduğu saptandı (Şekil 34).



Şekil 34. Uzun süreli kültür edilen ÇBOH'ların oküler yüzey ektodermi, konjonktiva epiteli (K13), lakrimal bez epiteli (Kalponin ve AQP5) ve perioküler mezenşim (FOXC1) belirteçleri ve çekirdek boyası olan DAPI ile boyanması.

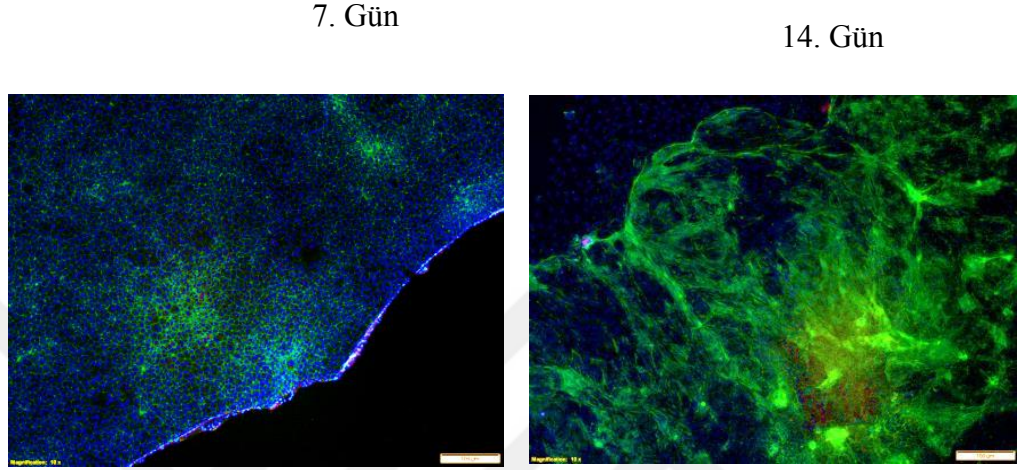
5.2. UPKH'lerden lakrimal beze ait mezenşimal hücrelerinin geliştirilmesi

UPKH'ler perioküler mezenkim transkripsiyon faktörlerini ifade eden nöral krest hücrelerine farklılaştırıldı. WT1 hücreleriyle yapılan farklılaşma sırasında, mezenşim benzeri hücreler içeren adacıkların oluştuğu gözlemlendi (Şekil 35).

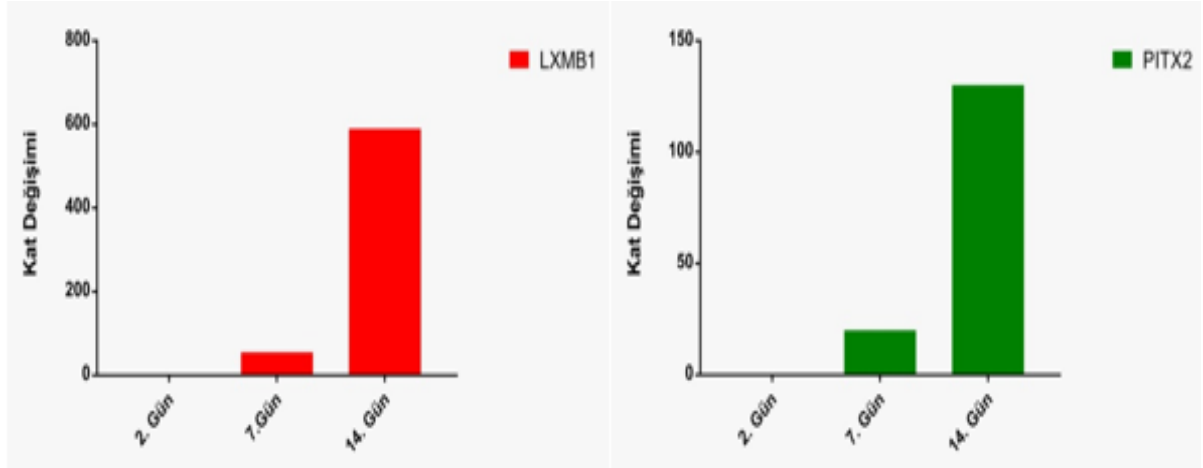


Şekil 35. WT1 hücreleriyle yapılan farklılaşma sırasında oluşan mezenşim benzeri hücre adacıkları.

UPKH'lerin perioküler mezenşime farklılaşması, immünohistokimya boyamada FOXC1 proteini gösterilmesi (Şekil 36) ve qPCR'da LXMB1 ve PITX2 ekspresyonu artışının görülmesi ile saptandı (Şekil 37).



Şekil 36. Perioküler mezenşime farklılaşan UPKH'lerin FOXC1 proteinine karşı immünohisto-kimya boyaması (Kırmızı: FOXC1, Yeşil: Phalloidin 488, Mavi: DAPI).



Şekil 37. Perioküler mezenşim belirteçlerinin mRNA seviyelerindeki değişimin qPCR ile belirlenmesi. 14. günde LXMB1 ve PITX2 ekspresyonunun belirgin olarak arttığı gösterilmiştir.

Farklılaşma protokolünün sonlanmasından 2 gün sonra hücreler yüzeyden alınıp GelMA kaplı lakrimal çipe ekildi ve UV uygulaması ile kapsüllendi. Mikroakışkan çipteki hücrelerin

proliferasyon belirteci Ki 67 ile boyandığında canlılıklarını korudukları ve sayıca çoğaldıkları gösterildi.

TARTIŞMA

Ciddi aköz yetmezlik tipi kuru göz hastalığının nedeni, lakrimal bez yetmezliğine bağlı gözyaşı sekresyonunun azalmasıdır. Steven Johnson sendromu, Sjögren sendromu, müköz membran pemfigoid gibi otoimmün kaynaklı hastalıklarda, lakrimal bezde çoğunlukla T hücre aracılı kronik inflamasyon sonucu fibrozis ve atrofi gelişir. Buna bağlı olarak gözyaşı sekresyonu belirgin şekilde azalır veya tamamen kesilir. Hastalarda ciddi oküler yüzey bozuklukları, ağrı, enfeksiyon riski ve sonunda körlükle sonuçlanabilen görme kaybı görülebilir. Çok sık suni gözyaşı damla uygulaması, topikal veya sistemik anti inflamatuvar ajanların kullanımına rağmen sıklıkla belirtiler gerilememekte ve oküler yüzey sorunları çözümlenememektedir. Tükrük bezlerinin ototransplantasyonu üzerine yapılan çalışmalarda, elde edilen sekresyonun gerçek gözyaşı içeriğine ulaşamadığı ve oral flora kaynaklı bakteriyel / fungal kontaminasyon riski taşıdığı bildirilmektedir. Günümüzde, ciddi lakrimal bez harabiyetine / disfonksiyonuna bağlı aköz yetmezlik tipi kuru gözün tam anlamıyla hiçbir iyileştirici tedavi stratejisi mevcut olmadığı görülmektedir. Buradan hareketle kök hücrelerden doku mühendisliği yaklaşımları ile *in vitro* ortamda gerçek lakrimal bez dokusu elde edilmesi ve doğal gözyaşı elde edilmesinin bu sorunu ortadan kaldıracacağı düşünülmüştür. Bu çalışmada klinik oftalmoloji ve biyomühendislik alanlarında işbirliği yaparak, kök veya progenitor hücrelerden fonksiyonel lakrimal bez elde edilmesinin yolları irdelenmiştir.

Otoimmün hastalık başlangıcında, hasta bireyin henüz sağlam olan lakrimal bezinden alınacak kök hücrelerin *in vitro* ortamda kültüre edilerek lakrimal bez benzeri organoid geliştirilmesi; veya hasta bireyin somatik matür hücresinin yeniden programlanarak pluripotent hale getirilmesi ve bu hücrelerin uygun bir şekilde bir araya getirilip lakrimal bez benzeri doku elde edilmesi düşünülmüştür. Her iki yöntem sonucunda elde edilecek fonksiyonel lakrimal bezin hasta bireye oto-transplantasyonu sonrasında elde edilecek gözyaşı salgısının oküler yüzey sorunlarını kökten çözebileceği öngörülmüştür. *In vitro* ortamda üretilen lakrimal bezin doğal gözyaşı salgısının topikal damla olarak uygulanmasının da tedavide etkin rol oynayabileceği düşünülmüştür.

Hasta bireyden lakrimal bez biyopsi yapılması ile elde edilecek kök hücrelerin kullanılması yönteminin geçerliliğinin test edilmesi amacıyla bu çalışmada 17 ve 18 günlük embriyonik

fare lakrimal bez hücreleri kullanıldı. Yapılan bir çalışmada doku mühendisliği yöntemiyle *in vitro* lakrimal bez geliştirilmesi amacıyla E16.5 günlük embriyonik fareden izole edilen lakrimal bez hücreleri kullanıldığı görülmüştür. Biz de, izole edilebilen lakrimal bez dokusunun histolojik kesitlerde ve akış sitometrisi ile yapılan ölçümlerde epitel ve mezenşim dokusundan oluştuğunu gösterdik. Ancak, akış sitometresinde elde edilen epitel ve mezenşimal hücre veriminin düşük olması nedeniyle, ışık mikroskobu altında makroskopik olarak epitel ve mezenşim olarak iki gruba ayırıp, lakrimal çip içerisine yerleştirdik. Lakrimal çip tasarımı, lakrimal bez gelişimindeki tübüler invajinasyon ve dallanma morfogenezinin taklit ederek, epitel hücreleri merkeze koyup çevresini mezenşim hücreler ile saracak şekilde planlandı. Doku iskelesi olarak kullanılan GelMA hidrojeline ultraviyole ışın verilmesi ile çapraz bağların oluşarak hücrelerin enkapsüle edilebildiği, geliştirilen gözenekli üç boyutlu doku iskelesi içinde hücrelerin canlılıklarını korudukları görüldü. Epitel ve mezenşim bölümleri arasında kesin bir sınır oluşturularak temas sağlandığı ve bu durumun lakrimal bez gelişiminde kilit rol oynayan epitel-mezenşim etkileşimine imkan sağladığı düşünüldü. Dinamik besiyeri ortamı akışı sağlanması sonrasında epitel ve mezenşim hücrelerinin canlılığının devam etmesi, hidrojel doku iskelesi ile biyouyumluluğun sağlandığı, antijenik veya mutajenik etki görülmediğinin kanıtı olarak görüldü. Dinamik kültürün 14. gününde izole edilen dokuda lakrimal bez yapısında bulunan AQP5 ve ZO1 proteinleri immünohistokimyasal boyama yöntemiyle gösterildi. Lakrimal çipten elde edilen dokularda yapılan PCR analizinde *in vitro* ortamda üretilmiş lakrimal organoidde belirgin şekilde gözyaşı belirteci olan lizozim proteinine ait mRNA artışı saptandı. Aynı artışın AQP5'te görülememesinin nedeni olarak, AQP5'in lakrimal bez gelişimi sırasında daha erken safhada sentezlenmesi ve iki haftalık kültür sonrasındaki dokuda mRNA düzeyinde değil protein olarak yer alması düşünüldü. Gözyaşı yapısında yer alan önemli bir protein olan lizozimin mRNA düzeyindeki artışı, dokunun fonksiyonel olduğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. Öte yandan benzer bir artış laktoferrin düzeyinde tespit edilemedi. Bu durum ise laktoferrinin lakrimal bez gelişiminde daha erken dönemde salgılanabilme olasılığı ile açıklandı. Lakrimal çip deneyinin daha ileri aşamasında elde edilebilecek gözyaşı salgısında laktoferrin protein düzeyinin saptanmasının daha kesin kanıt olacağı düşünüldü. Literatürde amniotik membran ve rotatuar hücre kültürü yönteminde lakrimal bez benzeri yapıda organoid elde edilmiş, gözyaşı salgısı β -hekzominidaz ile saptanmıştır. Ancak statik kültür ortamında geliştirilen bu yapı iki boyutlu olup, besin ve oksijen difüzyonunun santrale doğru azalması nedeniyle, hücrelerde apoptozis görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise hidrojinin porlu yapısı nedeniyle hücrelerin besin ve oksijene ulaşımı homojen şekilde sağlanmış ve üç boyutlu organoid yapısı elde edildi.

Lakrimal bezde yüksek rejenerasyon kapasitesi olan kök veya progenitör hücrelerin varlığı birçok hayvan çalışmasında gösterilmiştir. Embriyonik fare hücreleriyle yaptığımız deney, kaynak olarak insan lakrimal bez kök hücrelerinin kullanılacağı çalışmalar açısından bir prototip oluşturmaktadır. Ancak erişkin ve embriyonik fare dokularıyla yapılan çalışmalar karşılaştırıldığında, erişkin hücrelerin proliferasyon kapasitesinin zayıf olduğu ve istenilen verimin elde edilemediğini gözledik. Bu durum ileride yapılacak çalışmalarda insan erişkin lakrimal biyopsi hücreleri ile çalışmanın bir zorluğu olarak karşımıza çıkabilir.

Bu çalışmada incelenen ikinci yöntem uyarılmış pluripotent kök hücreler kullanılarak *in vitro* ortamda fonksiyonel lakrimal bez oluşturulması temeline dayanmaktadır. Literatürde yeniden programlanma yöntemi ile elde edilen hücrelerden fonksiyonel cilt, karaciğer, böbrek, kemik, kalp kası hücreleri elde edilmiştir; ancak lakrimal bez geliştirilmesine yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Bizim çalışmamızda öncelikle UPKH'lerden iki farklı protokol ile ayrı ortamlarda epitel ve mezenşim hücrelerinin üretilmesi hedeflendi. Nanog+ ve Oct4+ UPKH'lerin herhangi bir büyüme faktörü ve hormonal uyarı verilmeksizin kültüre edildiğinde kendiliğinden anterior nöroektoderm hücrelerine, ardından oküler yüzey ektodermine dönüştüğü gözlemlendi. Lakrimal bez gelişimin ilk basamağının konjoktivanın kalınlaşması olduğu bilindiğinden, elde edilen oküler yüzey ektoderminden konjunktiva epiteli oluşturulması öngörüldü. Perioküler mezenşim dokusunun, UPKH'lerin nöral krest hücrelerine dönüştürülmesi yoluyla elde edilebileceği görüldü. Devam eden çalışmalarda geliştirilen epitel ve mezenşim dokularının bir araya getirilerek lakrimal bez organoidi oluşturulması hedeflendi.

Yapılan deneyde UPKH'lerin çevre ortamından çok kolay etkilendiği, bu nedenle manipülasyonunun çok daha zor olduğu görüldü. Yüksek proliferasyon ve diferansiasyon kapasitesi olan hücrelerin kontrolünün kaybedilmesi sonucu kanser hücrelerine dönüştüğü yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu durum UPKH'lerden elde edilen doku veya organın transplantasyonu işlemini kısıtlamaktadır.

Hem lakrimal bez kök hücreleri hem de UPKH'ler hasta bireyin kendisinden elde edilmesi bakımından etik sorunları geride bırakmaktadır. Hasta ile aynı antijenik ve genetik yapıyı içermesi nedeniyle transplantasyon sonrası izlemde büyük sorun oluşturan immünolojik red riskin ortadan kalkacağı düşünülmektedir.

İnsandan elde edilecek kök hücreler sayesinde hasta bireyle aynı genetik yapıyı içeren kuru göz hastalık modelleri geliştirilerek, hastalık patogenezinin daha iyi anlaşılması sağlanabilir.

Ayrıca deneylerde kullanılan hayvan sayısı azaltılabilir. İlaç araştırmalarında bu modellerin kullanılması ile insanlar üzerinde deneme yapılmadan *in vivo* etki anlaşılmaya çalışılabilir.

Her iki yöntemde elde edilecek lakrimal bez organoidinin işlevselliği, gözyaşı sekresyonu belirteci olan laktoferrin, lizozim, lipokalin vb. proteinleri ile tayin edilebilir. Elde edilecek aköz içeriğe sahip doğal gözyaşı hastada kullanılarak, kuru göz hastalığı belirtilerini ve oküler yüzey bulgularını geriletmekte başarılı olabilir.



SONUÇLAR

1. Yetişkin farelerden elde edilen erişkin lakrimal bez hücrelerinin proliferasyon kapasitesinin ve doku mühendisliğinde kullanılmak üzere kök hücre elde etme veriminin düşük olduğu gözlemlendi.
2. Doğuma yakın (E 17-20. gün) embriyonik farelerden elde edilen lakrimal bez hücrelerinin, doku mühendisliği deneyleri için daha uygun olduğu gözlemlendi.
3. Embriyonik farelerden izole edilen dokuların ışık mikroskobu altında epitel ve mezenşim dokularına ayrılabilirdiği histolojik kesitlerde görüldü.
4. FACS yöntemi ile epitel ve mezenşimal hücre ayrıştırılmasının sadece taze izole edilmiş hücrelerle mümkün olabileceği gözlemlendi.
5. Embriyonik farelerden elde edilen epitelyal ve mezenşimal lakrimal bez hücrelerinin, doku iskelesi görevi yapan hidrojel jelatin metakrilat (GelMA) biyomalzemesi ile uyum sağladığı ve jel içinde yaşayabildikleri görüldü.
6. Doku iskelesi sağlayan jelatin metakrilat (GelMA) ile karışım haline getirilen embriyonik lakrimal bez hücrelerinin, iç kısımda epitel ve dış kısımda mezenşim bölmeleri olacak şekilde tasarlanan 'lakrimal çip sistemi' içinde, 14 gün boyunca canlılıklarını korudukları ve organoid yapısını oluşturdıkları gözlemlendi.
7. Lakrimal çip sisteminde oluşan organoid yapısında, lakrimal beze özgü Aquaporin-5 (AQP-5) (su kanalı) ve Zonula okludens-1 (ZO-1) (epitelyal sıkı bağlantı) proteinleri saptandı. qPCR ile yapılan incelemede gözyaşına özgü lizozim mRNA düzeyinde kontrol grubuna göre oldukça yüksek saptandı. Laktoferrin mRNA düzeyinde ise artış saptanmadı.
8. Uyarılmış pluripotent kök hücre deneyinde, 42 günlük kültür sonucunda önce oküler yüzey ektodermi, ardından konjonktiva epiteli belirteci olan K13 ile boyanan hücreler elde edildi. Kültürün 14. gününde immünohistokimya incelemede FOXC1; qPCR incelemede PITX2 ve LMX1B mezenşim belirteçleri saptandı.
9. Uyarılmış pluripotent kök hücrelerin çevre ortamından çok kolay etkilendiği, bu nedenle manipülasyonunun çok daha zor olduğu, deney sürelerinin daha uzun sürdüğü gözlemlendi.

KAYNAKLAR

- [1] A. Atala, "Tissue engineering, stem cells and cloning: current concepts and changing trends," *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 5, no. 7, pp. 879–892, 2005.
- [2] M. Hirayama *et al.*, "Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ," *Nat. Commun.*, vol. 4, pp. 1–10, 2013.
- [3] C. D. Conrady, Z. P. Joos, and B. C. K. Patel, "Review: The Lacrimal Gland and Its Role in Dry Eye.," *J. Ophthalmol.*, vol. 2016, p. 7542929, 2016.
- [4] Duman S. *Lakrimal sistem hastalıkları. In: Aydın P, Akova YA, eds. Temel Göz Hastalıkları, 1 ed. Ankara: Güneş Kitapevi, 2001; chap. 20. .*
- [5] D. A. Dartt, "Regulation of Tear Secretion," 1994, pp. 1–9.
- [6] D. Y. Shu and F. J. Lovicu, "Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 60, pp. 44–65, 2017.
- [7] B. N. Lemke and M. J. Lucarelli, "Anatomy of the ocular adnexa, orbit, and related facial structures," in *Smith and nesi's ophthalmic plastic and reconstructive surgery*, Springer, 2012, pp. 3–58.
- [8] "Katowitz A.J et all: Fundamentals and Principles of Ophthalmology. American Academy of Ophthalmology. 2007; 1: 149- 3."
- [9] P. Seifert, M. P. D. Spitznas, F. A. K. A. Koch, and A. Cusumano, "The architecture of human accessory lacrimal glands.," *undefined*, 1993.
- [10] M. R. Allansmith, G. Kajiya, M. B. Abelson, and M. A. Simon, "Plasma Cell Content of Main and Accessory Lacrimal Glands and Conjunctiva," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 82, no. 6, pp. 819–826, Dec. 1976.
- [11] P. SEIFERT and M. SPITZNAS, "Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) Innervation of the Human Eyelid Glands," *Exp. Eye Res.*, vol. 68, no. 6, pp. 685–692, Jun. 1999.
- [12] C. Dean, M. Ito, H. P. Makarenkova, S. C. Faber, and R. A. Lang, "Bmp7 regulates branching morphogenesis of the lacrimal gland by promoting mesenchymal proliferation and condensation," *Development*, vol. 131, no. 17, pp. 4155–4165, Sep. 2004.
- [13] H. P. Makarenkova *et al.*, "FGF10 is an inducer and Pax6 a competence factor for

- lacrimal gland development,” *Development*, vol. 127, no. 12, pp. 2563–2572, 2000.
- [14] M. Hirayama, T. Kawakita, K. Tsubota, and S. Shimmura, “Challenges and Strategies for Regenerating the Lacrimal Gland,” *Ocul. Surf.*, vol. 14, no. 2, pp. 135–143, 2016.
- [15] C. Tsau, M. Ito, A. Gromova, M. P. Hoffman, R. Meech, and H. P. Makarenkova, “Barx2 and Fgf10 regulate ocular glands branching morphogenesis by controlling extracellular matrix remodeling,” *Development*, vol. 138, no. 15, pp. 3307–3317, 2011.
- [16] “Berthong M. Pathologic changes secondary to radiation. *World J Surg* 1986;10:155e70.”
- [17] Y. Ueda, Y. Karasawa, Y. Satoh, S. Nishikawa, J. Imaki, and M. Ito, “Purification and characterization of mouse lacrimal gland epithelial cells and reconstruction of an acinarlike structure in three-dimensional culture,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, no. 5, pp. 1978–1987, 2009.
- [18] M. Hirayama, T. Kawakita, S. Shimmura, and K. Tsubota, “The Bioengineered Lacrimal Gland Using Cells Derived from Different Transgenic Mice: as a Novel Experimental Model for a Lacrimal Gland Biological Analysis,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 55, no. 13, p. 1300, 2014.
- [19] P. Ackermann *et al.*, “Isolation and investigation of presumptive murine lacrimal gland stem cells,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 8, pp. 4350–4363, 2015.
- [20] A. Gromova *et al.*, “Lacrimal gland repair using progenitor cells,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 88–98, 2017.
- [21] Y. Hisatomi *et al.*, “Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages,” *Hepatology*, vol. 39, no. 3, pp. 667–675, 2004.
- [22] T. Kawakita, “Regeneration of Lacrimal Gland Function to Maintain the Health of the Ocular Surface,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 59, no. 14, pp. DES169-DES173, 2018.
- [23] S. You, A. Tariq, C. L. Kublin, and D. Zoukhri, “Detection of BrdU-label Retaining Cells in the Lacrimal Gland: Implications for Tissue Repair.”
- [24] S. You, C. L. Kublin, O. Avidan, D. Miyasaki, and D. Zoukhri, “Isolation and

- propagation of mesenchymal stem cells from the lacrimal gland,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 2087–2094, 2011.
- [25] M. Hirayama, Y. Liu, T. Kawakita, S. Shimmura, and K. Tsubota, “Cytokeratin expression in mouse lacrimal gland germ epithelium,” *Exp. Eye Res.*, vol. 146, pp. 54–59, 2016.
- [26] J. Tiffany, “The normal tear film,” *Dev. Ophthalmol.*, 2008.
- [27] F. J. Holly and M. A. Lemp, “Tear physiology and dry eyes,” *Survey of Ophthalmology*. 1977.
- [28] M. A. Lemp, “Advances in Understanding and Managing Dry Eye Disease,” *Am. J. Ophthalmol.*, 2008.
- [29] G. Soyugelen Demirok, C. Gürdal, Ö. Saraç, B. Bostanci Ceran, and I. Can, “Kuru göz hastalarında optik koherans tomografi ile gözyaşı menisküs parametrelerinin değerlendirilmesi,” *Türk Oftalmoloji Derg.*, 2013.
- [30] N. Yokoi, A. J. Bron, J. M. Tiffany, K. Maruyama, A. Komuro, and S. Kinoshita, “Relationship between tear volume and tear meniscus curvature,” *Arch. Ophthalmol.*, 2004.
- [31] J. B. Anthony, John M. Tiffany, N. Yokoi, and M. S. Gouveia, “Using Osmolarity to Diagnose Dry Eye: A Compartmental Hypothesis and Review of Our Assumptions,” 2017.
- [32] R. M. Werkmeister *et al.*, “Measurement of tear film thickness using ultrahigh-resolution optical coherence tomography,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2013.
- [33] W. D. Mathers and T. E. Daley, “Tear flow and evaporation in patients with and without dry eye,” *Ophthalmology*, 1996.
- [34] R. J. Fullard and D. L. Tucker, “Changes in human tear protein levels with progressively increasing stimulus,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1991.
- [35] J. Wang, J. Aquavella, J. Palakuru, S. Chung, and C. Feng, “Relationships between central tear film thickness and tear menisci of the upper and lower eyelids,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2006.
- [36] M. G. Doane, “Abnormalities of the Structure of the Superficial Lipid Layer on the in

- Vivo Dry-Eye Tear Film,” 1994, pp. 489–493.
- [37] I. K. Gipson and P. Argüeso, “Role of Mucins in the Function of the Corneal and Conjunctival Epithelia,” *Int. Rev. Cytol.*, 2003.
 - [38] I. Cher, “A new look at lubrication of the ocular surface: Fluid mechanics behind the blinking eyelids,” *Ocul. Surf.*, 2008.
 - [39] M. D. P. Willcox *et al.*, “TFOS DEWS II Tear Film Report,” *Ocul. Surf.*, vol. 15, no. 3, pp. 366–403, Jul. 2017.
 - [40] C. chyou W. Chao, J. P. Vergnes, I. L. Freeman, and S. I. Brown, “Biosynthesis and partial characterization of tear film glycoproteins. Incorporation of radioactive precursors by human lacrimal gland explants in vitro,” *Exp. Eye Res.*, 1980.
 - [41] K. L. Carraway, V. P. Ramsauer, B. Haq, and C. A. Carothers Carraway, “Cell signaling through membrane mucins,” *BioEssays*. 2003.
 - [42] T. Inatomi, S. Spurr-Michaud, A. S. Tisdale, Q. Zhan, S. T. Feldman, and I. K. Gipson, “Expression of secretory mucin genes by human conjunctival epithelia,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1996.
 - [43] M. M. Jumblatt, R. W. McKenzie, and J. E. Jumblatt, “MUC5AC mucin is a component of the human precorneal tear film,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1999.
 - [44] W. Tasman and E. Jaeger, *Duane’s Ophtalmology*. 2007.
 - [45] I. K. Gipson, Y. Hori, and P. Argüeso, “Character of ocular surface mucins and their alteration in dry eye disease,” *Ocular Surface*. 2004.
 - [46] A. P. Corfield, “Mucins: A biologically relevant glycan barrier in mucosal protection,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 1, pp. 236–252, Jan. 2015.
 - [47] L. Kautto *et al.*, “Glycan involvement in the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to tears,” *Exp. Eye Res.*, vol. 145, pp. 278–288, Apr. 2016.
 - [48] I. K. Gipson, “The ocular surface: The challenge to enable and protect vision. The Friedenwald lecture,” in *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2007.
 - [49] S. Spurr-Michaud, P. Argüeso, and I. Gipson, “Assay of mucins in human tear fluid,” *Exp. Eye Res.*, vol. 84, no. 5, pp. 939–950, May 2007.

- [50] F. Mantelli, L. Schaffer, R. Dana, S. R. Head, and P. Argu`eso, "Glycogene Expression in Conjunctiva of Patients with Dry Eye: Downregulation of Notch Signaling," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 50, no. 6, p. 2666, Jun. 2009.
- [51] J. Zhang, X. Yan, and H. Li, "Analysis of the correlations of mucins, inflammatory markers, and clinical tests in dry eye.," *Cornea*, vol. 32, no. 7, pp. 928–32, Jul. 2013.
- [52] S. Shimazaki-Den, M. Dogru, K. Higa, and J. Shimazaki, "Symptoms, visual function, and mucin expression of eyes with tear film instability.," *Cornea*, vol. 32, no. 9, pp. 1211–8, Sep. 2013.
- [53] I. K. Gipson and T. Inatomi, "Mucin genes expressed by the ocular surface epithelium," *Progress in Retinal and Eye Research*. 1997.
- [54] A. P. Corfield, S. D. Carrington, S. J. Hicks, M. Berry, and R. Ellingham, "Ocular mucins: Purification, metabolism and functions," *Progress in Retinal and Eye Research*. 1997.
- [55] A. Sharma, "Energetics of corneal epithelial cell-ocular mucus-tear film interactions: Some surface-chemical pathways of corneal defense," *Biophys. Chem.*, 1993.
- [56] G. W. Cibis, *Fundamentals and principles of ophthalmology*. American Academy of Ophthalmology, 2007.
- [57] M. E. Johnson and P. J. Murphy, "Changes in the tear film and ocular surface from dry eye syndrome," *Progress in Retinal and Eye Research*. 2004.
- [58] J. M. Tiffany, "Tears in health and disease," *Eye*. 2003.
- [59] L. G. Carney and R. M. Hill, "Human Tear pH: Diurnal Variations," *Arch. Ophthalmol.*, 1976.
- [60] W. G. Bachman and G. Wilson, "Essential ions for maintenance of the corneal epithelial surface," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1985.
- [61] F. H. Fischer and M. Wiederholt, "Human precorneal tear film pH measured by microelectrodes," *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 218, no. 3, pp. 168–170, Mar. 1982.
- [62] A. Tomlinson and S. Khanal, "Assessment of Tear Film Dynamics: Quantification Approach," *Ocul. Surf.*, vol. 3, no. 2, pp. 81–95, Apr. 2005.

- [63] A. Tomlinson, S. Khanal, K. Ramaesh, C. Diaper, and A. McFadyen, "Tear Film Osmolarity: Determination of a Referent for Dry Eye Diagnosis," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 47, no. 10, p. 4309, Oct. 2006.
- [64] N. P. Walsh, M. B. Fortes, and M. Esmaeelpour, "Influence of Modest Changes in Whole-Body Hydration on Tear Fluid Osmolarity: Important Considerations for Dry Eye Disease Detection," *Cornea*, vol. 30, no. 12, pp. 1517–1517, Dec. 2011.
- [65] N. P. Walsh *et al.*, "Is Whole-Body Hydration an Important Consideration in Dry Eye?," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 53, no. 10, p. 6622, Sep. 2012.
- [66] M. B. Fortes *et al.*, "Tear fluid osmolarity as a potential marker of hydration status.," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 43, no. 8, pp. 1590–7, Aug. 2011.
- [67] A. Lemp, "Report of the National Eye Institute/Industry workshop on clinical trials in dry eyes," *Eye Contact Lens*, vol. 21, no. 4, pp. 221–232, 1995.
- [68] M. Suzuki *et al.*, "Tear Osmolarity as a Biomarker for Dry Eye Disease Severity," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 51, no. 9, p. 4557, Sep. 2010.
- [69] B. D. Sullivan *et al.*, "An Objective Approach to Dry Eye Disease Severity," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 51, no. 12, p. 6125, Dec. 2010.
- [70] G. A. de Souza, L. M. Godoy, and M. Mann, "Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors," *Genome Biol.*, vol. 7, no. 8, p. R72, Aug. 2006.
- [71] T. L. Burgess and R. B. Kelly, "Constitutive and regulated secretion of proteins," *Annu. Rev. Cell Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 243–293, 1987.
- [72] D. A. Dartt, "Signal transduction and control of lacrimal gland protein secretion: a review," *Curr. Eye Res.*, vol. 8, no. 6, pp. 619–636, 1989.
- [73] M. Fluckinger, H. Haas, P. Merschak, B. J. Glasgow, and B. Redl, "Human tear lipocalin exhibits antimicrobial activity by scavenging microbial siderophores," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004.
- [74] R. J. Fullard and C. Snyder, "Protein levels in nonstimulated and stimulated tears of normal human subjects.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 31, no. 6, pp. 1119–1126, 1990.

- [75] I. A. Mackie and D. V. Seal, "Diagnostic implications of tear protein profiles," *Br. J. Ophthalmol.*, 1984.
- [76] Q. Li *et al.*, "Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 37, no. 5, pp. 727–739, 1996.
- [77] G. van Setten, K. Tervo, I. Virtanen, A. Tarkkanen, and T. Tervo, "Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor in the lacrimal and submandibular glands of rats," *Acta Ophthalmol.*, vol. 68, no. 4, pp. 477–480, 1990.
- [78] P. E. King-Smith, E. A. Hinel, and J. J. Nichols, "Application of a Novel Interferometric Method to Investigate the Relation between Lipid Layer Thickness and Tear Film Thinning," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 51, no. 5, p. 2418, May 2010.
- [79] C.-C. Peng *et al.*, "Flow Evaporimeter To Assess Evaporative Resistance of Human Tear-Film Lipid Layer," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 53, no. 47, pp. 18130–18139, Nov. 2014.
- [80] A. J. Bron, J. M. Tiffany, S. M. Gouveia, N. Yokoi, and L. W. Voon, "Functional aspects of the tear film lipid layer," *Exp. Eye Res.*, vol. 78, no. 3, pp. 347–360, Mar. 2004.
- [81] E. Knop, N. Knop, T. Millar, H. Obata, and D. A. Sullivan, "The International Workshop on Meibomian Gland Dysfunction: Report of the Subcommittee on Anatomy, Physiology, and Pathophysiology of the Meibomian Gland," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 52, no. 4, p. 1938, Mar. 2011.
- [82] A. J. Bron, J. M. Tiffany, S. M. Gouveia, N. Yokoi, and L. W. Voon, "Functional aspects of the tear film lipid layer," *Exp. Eye Res.*, vol. 78, no. 3, pp. 347–360, Mar. 2004.
- [83] J. P. McCulley and W. Shine, "A compositional based model for the tear film lipid layer.," *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, vol. 95, pp. 79-88; discussion 88-93, 1997.
- [84] B. Nagyová and J. M. Tiffany, "Components responsible for the surface tension of human tears.," *Curr. Eye Res.*, vol. 19, no. 1, pp. 4–11, Jul. 1999.
- [85] A. Higuchi, "Autologous Serum and Serum Components," *Invest. Ophthalmol. Vis.*

- Sci.*, vol. 59, no. 14, pp. DES121-DES129, 2018.
- [86] M. J. Doughty, D. Fonn, D. Richter, T. Simpson, B. Caffery, and K. Gordon, "A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients presenting to optometric practices across Canada.," *Optom. Vis. Sci. Off. Publ. Am. Acad. Optom.*, vol. 74, no. 8, pp. 624–631, 1997.
 - [87] S. E. Wilson and R. D. Stulting, "Agreement of physician treatment practices with the international task force guidelines for diagnosis and treatment of dry eye disease," *Cornea*, vol. 26, no. 3, pp. 284–289, 2007.
 - [88] D. Canan and A. Utİne, "Kuru Göz Oluşum Mekanizması ve Sınıflandırılması," pp. 1–8.
 - [89] C. S. De Paiva *et al.*, "Corticosteroid and doxycycline suppress MMP-9 and inflammatory cytokine expression, MAPK activation in the corneal epithelium in experimental dry eye," *Exp. Eye Res.*, vol. 83, no. 3, pp. 526–535, 2006.
 - [90] C. Baudouin *et al.*, "Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: proceedings of the OCEAN group meeting," *Ocul. Surf.*, vol. 11, no. 4, pp. 246–258, 2013.
 - [91] M. Rolando and M. Zierhut, "The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 45, pp. S203–S210, 2001.
 - [92] M. R. Dana, S.-N. Zhu, and J. Yamada, "Topical modulation of interleukin-1 activity in corneal neovascularization.," *Cornea*, vol. 17, no. 4, pp. 403–409, 1998.
 - [93] S. E. Moss, R. Klein, and B. E. K. Klein, "Prevalence of and risk factors for dry eye syndrome," *Arch. Ophthalmol.*, vol. 118, no. 9, pp. 1264–1268, 2000.
 - [94] E. K. Akpek, A. Klimava, J. E. Thorne, D. Martin, K. Lekhanont, and A. Ostrovsky, "Evaluation of patients with dry eye for presence of underlying Sjögren's syndrome," *Cornea*, vol. 28, no. 5, p. 493, 2009.
 - [95] S. P. Epstein, N. Gadaria-Rathod, Y. Wei, M. G. Maguire, and P. A. Asbell, "HLA-DR expression as a biomarker of inflammation for multicenter clinical trials of ocular surface disease," *Exp. Eye Res.*, vol. 111, pp. 95–104, 2013.
 - [96] Y. Wei and P. A. Asbell, "The core mechanism of dry eye disease (DED) is

- inflammation,” *Eye Contact Lens*, vol. 40, no. 4, p. 248, 2014.
- [97] M. A. Lemp, L. A. Crews, A. J. Bron, G. N. Foulks, and B. D. Sullivan, “Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort: a retrospective study,” *Cornea*, vol. 31, no. 5, pp. 472–478, 2012.
- [98] N. Thompson, D. A. Isenberg, E. C. Jury, and C. Ciurtin, “Exploring BAFF: its expression, receptors and contribution to the immunopathogenesis of Sjögren’s syndrome,” *Rheumatology*, vol. 55, no. 9, pp. 1548–1555, 2016.
- [99] “7. Perry HD. Dry eye disease: Pathophysiology, classification, and diagnosis. *Am J Manag Care* 2008; 14(3): 79-87.”
- [100] R. Patel and A. Shahane, “The epidemiology of Sjögren’s syndrome. *Clin Epidemiol* 6: 247–255.” 2014.
- [101] “Aslan Bayhan S, Gürdal C. Sistemik Hastalıklar ve Kuru Göz. *T Klin J Ophthalmol-Special Topics* 2013; 6:8-12.”
- [102] “The definition and classification of dry eye disease: Report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop (2007). *Ocul Surf* 2007;5:75-92.”
- [103] T. Kaşifoğlu and C. Korkmaz, *Romatoloji Atlası*. 2011.
- [104] A. J. Bron *et al.*, “TFOS DEWS II pathophysiology report,” *Ocul. Surf.*, vol. 15, no. 3, pp. 438–510, 2017.
- [105] P. D. Burbelo, K. Ambatipudi, and I. Alevizos, “Genome-wide association studies in Sjögren’s syndrome: what do the genes tell us about disease pathogenesis?,” *Autoimmun. Rev.*, vol. 13, no. 7, pp. 756–761, 2014.
- [106] S. C. Pflugfelder *et al.*, “Aqueous tear deficiency increases conjunctival interferon- γ (IFN- γ) expression and goblet cell loss,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 12, pp. 7545–7550, 2015.
- [107] C. A. Utine and E. K. Akpek, “Sjögren Sendromu ve İlişkili Kuru Göz Sendromunun İmmunopatolojisi,” *Turkish J. Ophthalmol. Oftalmol. Derg.*, vol. 40, no. 2, 2010.
- [108] J. I. McGill, G. M. Liakos, N. Goulding, and D. V Seal, “Normal tear protein profiles and age-related changes,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 68, no. 5, pp. 316–320, 1984.

- [109] M. Nasu, O. Matsubara, and H. Yamamoto, "Post- mortem prevalence of lymphocytic infiltration of the lacrimal gland: A comparative study in autoimmune and non-autoimmune diseases," *J. Pathol.*, vol. 143, no. 1, pp. 11–15, 1984.
- [110] H. Obata, S. Yamamoto, H. Horiuchi, and R. Machinami, "Histopathologic study of human lacrimal gland: statistical analysis with special reference to aging," *Ophthalmology*, vol. 102, no. 4, pp. 678–686, 1995.
- [111] T. Kojima *et al.*, "Age-related dysfunction of the lacrimal gland and oxidative stress: evidence from the Cu, Zn-superoxide dismutase-1 (Sod1) knockout mice," *Am. J. Pathol.*, vol. 180, no. 5, pp. 1879–1896, 2012.
- [112] "Bresnitz EA, Strom BL. Epidemiology of sarcoidosis. *Epidemiol Rev* 1983;5: 124e56."
- [113] S. Pasadhika and J. T. Rosenbaum, "Ocular Sarcoidosis," *Clin. Chest Med.*, vol. 36, no. 4, pp. 669–683, Dec. 2015.
- [114] "Heath P. Ocular lymphomas. *Am J Ophthalmol* 1949;32:1213e23."
- [115] S. Itescu *et al.*, "A diffuse infiltrative CD8 lymphocytosis syndrome in human immunodeficiency virus (HIV) infection: a host immune response associated with HLA-DR5," *Ann. Intern. Med.*, vol. 112, no. 1, pp. 3–10, 1990.
- [116] D. Gamus, Z. Weschler, S. Greenberg, and A. Romano, "Decreased tear secretion in Chernobyl children: external eye disorders in children subjected to long-term low-dose radiation," in *Lacrimal Gland, Tear Film, and Dry Eye Syndromes*, Springer, 1994, pp. 513–516.
- [117] C. F. Radford, S. Rauz, G. P. Williams, V. P. J. Saw, and J. K. G. Dart, "Incidence, presenting features, and diagnosis of cicatrising conjunctivitis in the United Kingdom," *Eye*, vol. 26, no. 9, p. 1199, 2012.
- [118] S. Herretes *et al.*, "Recruitment of donor T cells to the eyes during ocular GVHD in recipients of MHC-matched allogeneic hematopoietic stem cell transplants," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, no. 4, pp. 2348–2357, 2015.
- [119] E. Erdem and M. Yagmur, "Oküler Graft Versus Host Hastalığı," *Arşiv Kaynak Tarama Derg.*, vol. 23, no. 3, pp. 484–491.

- [120] S. Kohanim *et al.*, “Stevens-Johnson syndrome/toxic epidermal necrolysis—a comprehensive review and guide to therapy. I. Systemic disease,” *Ocul. Surf.*, vol. 14, no. 1, pp. 2–19, 2016.
- [121] K. Tsubota *et al.*, “Treatment of severe ocular-surface disorders with corneal epithelial stem-cell transplantation,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 340, no. 22, pp. 1697–1703, 1999.
- [122] Y. Ohashi *et al.*, “Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 136, no. 2, pp. 291–299, 2003.
- [123] J. S. López-García, L. R. Jara, C. I. García-Lozano, E. Conesa, I. E. de Juan, and J. M. del Castillo, “Ocular features and histopathologic changes during follow-up of toxic epidermal necrolysis,” *Ophthalmology*, vol. 118, no. 2, pp. 265–271, 2011.
- [124] M. S. Greenberg, “Ulcerative vesicular and bullous lesions,” *Burket’s oral Med. diagnosis Treat.*, 2003.
- [125] H.-H. Xu, V. P. Werth, E. Parisi, and T. P. Sollecito, “Mucous membrane pemphigoid,” *Dent. Clin.*, vol. 57, no. 4, pp. 611–630, 2013.
- [126] M. A. Lemp, “Basic principles and classification of dry eye disorders,” in *The dry eye*, Springer, 1992, pp. 101–131.
- [127] “Baudouin C, Messmer EM, Aragona P. et al. Revisiting the vicious circle of dry eye disease:a focus on the pathophysiology of meibomiangland dysfunction. Br J Ophthalmol Published Online First. (January 18, 2016) doi:10.1136/bjophthalmol-2015-307415.”
- [128] M. Oechsner and S. Keipert, “Polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone bipolymeric systems. I. Rheological and mucoadhesive properties of formulations potentially useful for the treatment of dry-eye-syndrome,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 47, no. 2, pp. 113–118, 1999.
- [129] P. Troiano and G. Monaco, “Effect of hypotonic 0.4% hyaluronic acid drops in dry eye patients: a cross-over study,” *Cornea*, vol. 27, no. 10, pp. 1126–1130, 2008.
- [130] W. Chen *et al.*, “Trehalose protects against ocular surface disorders in experimental murine dry eye through suppression of apoptosis,” *Exp. Eye Res.*, vol. 89, no. 3, pp. 311–318, 2009.

- [131] V. V Brzheskiy *et al.*, “Results of a multicenter, randomized, double-masked, placebo-controlled clinical study of the efficacy and safety of Visomitin eye drops in patients with dry eye syndrome,” *Adv. Ther.*, vol. 32, no. 12, pp. 1263–1279, 2015.
- [132] E. C. Kim, J.-S. Choi, and C.-K. Joo, “A comparison of vitamin a and cyclosporine a 0.05% eye drops for treatment of dry eye syndrome,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 147, no. 2, pp. 206–213, 2009.
- [133] T. Hongyok, J. J. Chae, Y. J. Shin, D. Na, L. Li, and R. S. Chuck, “Effect of Chitosan-N-Acetylcysteine Conjugate in a Mouse Model of Botulinum Toxin B–Induced Dry Eye,” *Arch. Ophthalmol.*, vol. 127, no. 4, pp. 525–532, 2009.
- [134] A. Higuchi, K. Takahashi, M. Hirashima, T. Kawakita, and K. Tsubota, “Selenoprotein P controls oxidative stress in cornea,” *PLoS One*, vol. 5, no. 3, p. e9911, 2010.
- [135] W. Chen *et al.*, “Changes in rabbit corneal innervation induced by the topical application of benzalkonium chloride,” *Cornea*, vol. 32, no. 12, pp. 1599–1606, 2013.
- [136] Z. Lin *et al.*, “A mouse model of limbal stem cell deficiency induced by topical medication with the preservative benzalkonium chloride,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 9, pp. 6314–6325, 2013.
- [137] K. Green, D. L. MacKeen, T. Slagle, and L. Cheeks, “Tear potassium contributes to maintenance of corneal thickness,” *Ophthalmic Res.*, vol. 24, no. 2, pp. 99–102, 1992.
- [138] K.-S. Na and M. S. Kim, “Allogeneic serum eye drops for the treatment of dry eye patients with chronic graft-versus-host disease,” *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 28, no. 5, pp. 479–483, 2012.
- [139] K.-C. Yoon, H. Heo, S.-K. Im, I.-C. You, Y.-H. Kim, and Y.-G. Park, “Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 144, no. 1, pp. 86–92, 2007.
- [140] L. Tong, R. Beuerman, S. Simonyi, D. A. Hollander, and M. E. Stern, “Effects of punctal occlusion on clinical signs and symptoms and on tear cytokine levels in patients with dry eye,” *Ocul. Surf.*, vol. 14, no. 2, pp. 233–241, 2016.
- [141] Y.-S. Byun *et al.*, “Diquafosol promotes corneal epithelial healing via intracellular calcium-mediated ERK activation,” *Exp. Eye Res.*, vol. 143, pp. 89–97, 2016.

- [142] S. Kinoshita *et al.*, “A multicenter, open-label, 52-week study of 2% rebamipide (OPC-12759) ophthalmic suspension in patients with dry eye,” *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 157, no. 3, pp. 576–583, 2014.
- [143] O. M. A. Ibrahim, M. Dogru, S. Kawashima, T. H. Wakamatsu, K. Tsubota, and H. Fujishima, “Visante optical coherence tomography and tear function test evaluation of cholinergic treatment response in patients with Sjögren syndrome,” *Cornea*, vol. 32, no. 5, pp. 653–657, 2013.
- [144] D. Petrone, J. J. Condemi, R. Fife, O. Gluck, S. Cohen, and P. Dalgin, “A double-blind, randomized, placebo- controlled study of cevimeline in Sjögren’s syndrome patients with xerostomia and keratoconjunctivitis sicca,” *Arthritis Rheum.*, vol. 46, no. 3, pp. 748–754, 2002.
- [145] E. K. Akpek, K. B. Lindsley, R. S. Adyanthaya, R. Swamy, A. N. Baer, and P. J. McDonnell, “Treatment of Sjögren’s syndrome–associated dry eye: An evidence-based review,” *Ophthalmology*, vol. 118, no. 7, pp. 1242–1252, 2011.
- [146] B. D. Sullivan *et al.*, “Clinical utility of objective tests for dry eye disease: variability over time and implications for clinical trials and disease management,” *Cornea*, vol. 31, no. 9, pp. 1000–1008, 2012.
- [147] K. S. Kunert, A. S. Tisdale, M. E. Stern, J. A. Smith, and I. K. Gipson, “Analysis of topical cyclosporine treatment of patients with dry eye syndrome: effect on conjunctival lymphocytes,” *Arch. Ophthalmol.*, vol. 118, no. 11, pp. 1489–1496, 2000.
- [148] K. Sall, O. D. Stevenson, T. K. Mundorf, B. L. Reis, and C. P. 3 S. Group, “Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic emulsion in moderate to severe dry eye disease,” *Ophthalmology*, vol. 107, no. 4, pp. 631–639, 2000.
- [149] J. Gao *et al.*, “Mitochondrial permeability transition pore in inflammatory apoptosis of human conjunctival epithelial cells and T cells: effect of cyclosporin A,” *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 54, no. 7, pp. 4717–4733, 2013.
- [150] J. Murube, E. Murube, L. ChenZhuo, and L. Rivas, “Subcutaneous abdominal artificial tears pump-reservoir for severe dry eye,” *Orbit*, vol. 22, no. 1, pp. 29–40, 2003.
- [151] J. Lasudry, “Experimental approach to surgical treatment of lacrimal insufficiency by

- microvascular submandibular salivary gland autotransplantation.,” *Bull. Soc. Belge Ophthalmol.*, vol. 245, pp. 45–51, 1992.
- [152] D. R. Marinho, T. G. Burmann, and S. Kwitko, “Labial salivary gland transplantation for severe dry eye due to chemical burns and Stevens-Johnson syndrome,” *Ophthalmic Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 26, no. 3, pp. 182–184, 2010.
- [153] J. P. Glotzbach, V. W. Wong, G. C. Gurtner, and M. T. Longaker, “Regenerative medicine,” *Curr. Probl. Surg.*, vol. 3, no. 48, pp. 148–212, 2011.
- [154] E. Ergin, Y. Ekici, and F. B. Ataç, “Doku Mühendisliği ve Uygulama Alanları,” *Türkiye Klin. Tip Bilim. Derg.*, vol. 38, no. 1, pp. 70–78, 2018.
- [155] A. Khademhosseini and R. Langer, “A decade of progress in tissue engineering,” *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 10, p. 1775, 2016.
- [156] H. B. ÖZEL, E. OZAN, and D. Ö. DABAK, “Embriyonik kök hücreler,” *Turkiye Klin. J. Med. Sci.*, vol. 28, no. 3, pp. 333–341, 2008.
- [157] S. Yamanaka, “Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors,” *Cell Prolif.*, vol. 41, pp. 51–56, 2008.
- [158] J. Yu *et al.*, “Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells,” *Science (80-.)*, vol. 318, no. 5858, pp. 1917–1920, 2007.
- [159] M. Nakagawa *et al.*, “Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 1, p. 101, 2008.
- [160] X.-B. Zhang, “Cellular reprogramming of human peripheral blood cells,” *Genomics. Proteomics Bioinformatics*, vol. 11, no. 5, pp. 264–274, 2013.
- [161] P. P. Denèfle, “Introduction to gene therapy: a clinical aftermath,” in *Viral Vectors for Gene Therapy*, Springer, 2011, pp. 27–44.
- [162] K. Okita, M. Nakagawa, H. Hyenjong, T. Ichisaka, and S. Yamanaka, “Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors,” *Science (80-.)*, vol. 322, no. 5903, pp. 949–953, 2008.
- [163] H. AVCILAR, B. SARAYMEN, O. Ö. ÖZTURAN, and M. Y. KÖKER, “Embriyonik Kök Hücreler ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler,” *Asthma Allergy Immunol. Allerji Immunoloji*, vol. 16, no. 1, 2018.

- [164] M. Martí *et al.*, “Characterization of pluripotent stem cells,” *Nat. Protoc.*, vol. 8, no. 2, p. 223, 2013.
- [165] L. Ye, J. C. Chang, C. Lin, X. Sun, J. Yu, and Y. W. Kan, “Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 24, pp. 9826–9830, 2009.
- [166] A. Moretti *et al.*, “Induced pluripotent stem cells as a source for multipotent ISL1+ cardiovascular progenitors,” 2009.
- [167] I. Petit *et al.*, “Induced pluripotent stem cells from hair follicles as a cellular model for neurodevelopmental disorders,” *Stem Cell Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 134–140, 2012.
- [168] W. Li *et al.*, “Generation of functional hepatocytes from mouse induced pluripotent stem cells,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 222, no. 3, pp. 492–501, 2010.
- [169] F. Li, S. Bronson, and C. Niyibizi, “Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 109, no. 4, pp. 643–652, 2010.
- [170] A.-J. Carr *et al.*, “Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat,” *PLoS One*, vol. 4, no. 12, p. e8152, 2009.
- [171] M. Mastrangeli, S. Millet, and J. van den Eijnden-van Raaij, “Organ-on-Chip In Development: Towards a roadmap for Organs-on-Chip,” 2019.
- [172] B. Zhang, A. Korolj, B. F. L. Lai, and M. Radisic, “Advances in organ-on-a-chip engineering,” *Nat. Rev. Mater.*, vol. 3, no. 8, p. 257, 2018.
- [173] “Yi S, Ding F, Gong L, Gu X. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2017;12(3):233-46.”
- [174] D. Thomas *et al.*, “Scaffold and scaffold- free self- assembled systems in regenerative medicine,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 113, no. 6, pp. 1155–1163, 2016.
- [175] H. Shirahama, B. H. Lee, L. P. Tan, and N.-J. Cho, “Precise tuning of facile one-pot gelatin methacryloyl (GelMA) synthesis,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 31036, 2016.
- [176] D. Loessner *et al.*, “Functionalization, preparation and use of cell-laden gelatin

- methacryloyl-based hydrogels as modular tissue culture platforms,” *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 4, p. 727, 2016.
- [177] S. Schrader, T. Wedel, C. Kremling, H. Laqua, and G. Geerling, “Amniotic membrane as a carrier for lacrimal gland acinar cells,” *Graefe’s Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 245, no. 11, pp. 1699–1704, 2007.
- [178] M. Hirayama *et al.*, “Identification of transcription factors that promote the differentiation of human pluripotent stem cells into lacrimal gland epithelium-like cells,” *npj Aging Mech. Dis.*, vol. 3, no. 1, p. 1, 2017.
- [179] Z. Li *et al.*, “Rapid Differentiation of Multi-Zone Ocular Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells and Generation of Corneal Epithelial and Endothelial Cells,” *Stem Cells Dev.*, vol. 28, no. 7, pp. 454–463, 2019.
- [180] M. Lovatt, G. H.-F. Yam, G. S. Peh, A. Colman, N. R. Dunn, and J. S. Mehta, “Directed differentiation of periocular mesenchyme from human embryonic stem cells,” *Differentiation*, vol. 99, pp. 62–69, 2018.