



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KORNEA ENDOTEL HÜCRELERİNDE TGF- $\beta$  VE  
İNHİBİTÖRLERİNİN HÜCRE PROLİFERASYONU VE  
HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

Ebru AVCI ÖZEN

Haziran 2022  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KORNEA ENDOTEL HÜCRELERİNDE TGF- $\beta$  VE  
İNHİBİTÖRLERİNİN HÜCRE PROLİFERASYONU VE  
HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Ebru AVCI ÖZEN**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emine KILIÇ TOPRAK

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT DÖNMEZ

Denizli, 2022

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öđrenci Adı Soyadı: Ebru AVCI ÖZEN

İmza

## ÖZET

### KORNEA ENDOTEL HÜCRELERİNDE TGF- $\beta$ VE İNHİBİTÖRLERİNİN HÜCRE PROLİFERASYONU VE HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ebru AVCI ÖZEN  
Yüksek Lisans Tezi, Fizioloji AD  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Emine KILIÇ TOPRAK

Haziran 2022, 59 Sayfa

Kornea endotel hücrelerinin in vivo çoğalma kapasiteleri sınırlıdır. Patolojik koşullar altında, endotel hücre kaybı kornea ödemeine bağlı kalıcı görme kaybına neden olur. Kornea endotel yetmezliğinin bugün için tek tedavisi kornea naklidir. Ancak, tüm dünyada kornea donör temininde ciddi sıkıntılar yaşanması araştırmacıları insan kornea hücrelerinin in vitro çoğaltılmasına dayanan hücre temelli tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi yönüne sevk etmektedir. Bu çalışmada TGF- $\beta$ , ITD-1 (TGF- $\beta$  inhibitörü) ve SB431542'nin (TGF- $\beta$  resptör inhibitörü) insan kornea endotel hücrelerinin proliferasyon, fonksiyon ve senesens özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmamızda insan kornea endotel hücre hattı kullanılarak kontrol, TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 deney grupları oluşturuldu. Bu hücre gruplarında proliferasyon yetenekleri BrdU analiziyle, ZO-1 ve COL8A2 kornea endotel hücre belirteçleri RT-PCR ile, hücre yaşlanması SA- $\beta$ -Gal boyamasıyla ve TGF- $\beta$ 1 seviyeleri Elisa yöntemi ile değerlendirildi. Bu çalışmada, TGF- $\beta$ 1'in kornea endotel hücre proliferasyonunu azalttığı; ITD-1 ve SB431542'nin hücre proliferasyonunu artırdığı gösterildi ( $p < 0,05$ ). SB431542 grubunda ZO-1 ve COL8A2 ekspresyon seviyeleri artmış bulundu ( $p < 0,05$ ). Ayrıca SB431542'nin kültür ortamına eklenmesinin insan kornea endotel hücrelerindeki senesens bulgularını erken dönemde azalttığı ancak zaman içerisinde bu etkinin ortadan kalktığı görüldü. Bu bulgular ışığında TGF- $\beta$  insan kornea endotel hücrelerinde proliferasyonu baskılamakta, yaşlanmayı hızlandırmakta ve endotel hücre belirteçlerinin ekspresyonunu azaltmaktadır. Bu noktada ITD-1 ve özellikle SB431542'nin TGF- $\beta$ 'nin insan kornea endotel hücreleri üzerine olumsuz etkilerini engelleyebileceği veya azaltabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmanın sonuçlarının kornea endotel yetmezliğinde hücresel tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayabileceği görüşündeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Kornea, Endotel, Proliferasyon, Hücresel yaşlanma, TGF- $\beta$ , ITD-1, SB431542

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2020SABE026).**

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF TGF- $\beta$  AND TGF- $\beta$  INHIBITORS ON CELL PROLIFERATION AND SENESCENCE IN HUMAN CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS**

AVCI OZEN, Ebru  
M.Sc., Thesis in Physiology  
Supervisor: Assoc. Dr. Emine KILIÇ TOPRAK

June 2022, 59 Pages

The in vivo proliferation capacity of corneal endothelial cells is limited. Under pathological conditions, endothelial cell loss causes permanent vision loss due to corneal edema. Currently, the only treatment for corneal endothelial failure is corneal transplantation. However, serious problems in the supply of corneal donors all over the world lead researchers to develop cell-based treatment approaches based on in vitro proliferation of human corneal endothelial cells. In this study, it was aimed to investigate the effects of TGF- $\beta$ , ITD-1 (TGF- $\beta$  inhibitor) and SB431542 (TGF- $\beta$  receptor inhibitor) on proliferation, function and senescence properties of human corneal endothelial cells. In our study, control, TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 and TGF- $\beta$ 1+SB431542 experimental groups were formed using human corneal endothelial cell line. Proliferation abilities in these cell groups were evaluated by BrdU analysis, corneal endothelial cell markers ZO-1 and COL8A2 by RT-PCR, cell senescence by SA- $\beta$ -Gal staining and TGF- $\beta$ 1 levels by Elisa method. In this study, TGF- $\beta$ 1 reduced corneal endothelial cell proliferation, whereas ITD-1 and SB431542 were shown to increase cell proliferation ( $p < 0.05$ ). ZO-1 and COL8A2 expression levels were increased in the SB431542 group ( $p < 0.05$ ). In addition, it was observed that the addition of SB431542 to the culture medium reduced the senescence findings in human corneal endothelial cells in the early period, but this effect disappeared over time. In the light of these findings, TGF- $\beta$  suppresses proliferation, accelerates senescence and decreases the expression of endothelial cell markers in human corneal endothelial cells. At this point, we think that ITD-1 and especially SB431542 can prevent or reduce the negative effects of TGF- $\beta$  on human corneal endothelial cells. We believe that the results of this study may contribute to the development of cellular therapy approaches in corneal endothelial failure.

Keywords: Cornea, Endothelium, Proliferation, Cellular senescence, TGF- $\beta$ , ITD-1, SB431542

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2020SABE026.**

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini bana sabır ve güler yüzle aktaran, desteğini benden hiç esirgemeyen sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Emine KILIÇ TOPRAK'a,

Öğrenciliğim süresince bana emek veren, herdaim bilgilerini benden esirgemeyen, farklı konulardaki bilgileriyle beni eğiten ve bilgilendiren sevgili hocalarım Prof. Dr. Melek BOR KÜÇÜKATAY ve Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY'a

Tez konumun tasarlanmasında yardımcı olan ve bilgilerini benimle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. İbrahim TOPRAK'a ve 2. tez danışmanım olarak her daim bana destek veren sevgili hocam Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT DÖNMEZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, her konuda bilgi ve becerilerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ'a,

Tüm hayatım boyunca varlıklarını her zaman hissettiğim, benden desteklerini hiç esirgemeyen ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili babam, annem ve kız kardeşime,

Son olarak bana her zaman ilham kaynağı olan, ilgi ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen, sabırla bu yolda beni hep destekleyen moral kaynağım sevgili eşim Uzm. Dr. Mehmet Furkan ÖZEN'e;

Tüm kalbimle teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>xi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>xii</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1 Amaç	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI</b>	<b>3</b>
2.1. Kornea	3
2.1.1. Kornea Histolojisi	4
2.1.1.1. Epitel Tabakası	4
2.1.1.2. Bowman Tabakası	5
2.1.1.3. Stroma	5
2.1.1.4. Dua Tabakası	6
2.1.1.5. Descemet Membranı	6
2.1.1.6. Endotel Tabakası	6
2.1.1.6.1. Kornea Endotel Hücrelerinin Görevleri	8
2.1.1.6.2. Kornea Endotel Tabakası Hasarı	9
2.1.1.6.3. Kornea Endotel Hücre Hasarı ve Yara İyileşme Süreci	9
2.2. Hücresel Yaşlanma (Senesens)	12
2.3. Transforming Growth Factor (TGF) Ailesi	15
2.3.1. TGF-alfa ( $\alpha$ )	15
2.3.2. TGF-beta ( $\beta$ ) Süperailisi	15

2.3.2.1.TGF- $\beta$ Süperaillesinin Sınıflandırılması	16
2.3.2.2. TGF- $\beta$ Sinyalizasyonu	17
2.3.3.TGF- $\beta$ ve Kornea Endotel Hücre İlişkisi	18
2.4. Hipotez	18
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	<b>19</b>
3.1. İnsan Kornea Endotelyal Primer Hücre Dizini ve Kullanılan Çözeltiler	19
3. 2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması	19
3.3. Hücrelerin Çözdürülmesi	20
3.4. Hücrelerin Dondurulması	20
3.5. Hücrelerin Sayımı	21
3.6. Proliferasyon Deneyleri	22
3.6.1. Tedavi Ajanlarının Hazırlanması	25
3.7. Hücre Yaşlanması, TGF- $\beta$ 1 Ölçümleri ve PCR Deney Grupları	25
3.8. Hücre Yaşlanması	26
3.9. TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor- $\beta$ 1) Seviyelerinin Ölçümü	28
3.9.1. Deney Prosedürü	29
3.10. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	31
3.10.1. Total RNA İzolasyonu	31
3.10.2. cDNA Sentezi	32
3.10.3. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	33
3.11. İstatistiksel Analiz	34
<b>4. BULGULAR</b>	<b>35</b>
4.1. BrdU Hücre Proliferasyon Deneyi Sonuçları	35
4.1.1. Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ 1'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	35
4.1.2. Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ inhibitörünün (ITD-1) Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	36
4.1.3. Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörünün (SB431542) Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	36
4.1.4. Kornea Endotel Hücrelerinde Tedavi Gruplarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	37
4.2. Hücresel Yaşlanma Deneyleri	38
4.3. TGF- $\beta$ 1 Seviyesi Ölçümleri	40



4.4. RT-PCR Sonuçları	41
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>43</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>49</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>50</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>59</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1</b> Kornea Tabakaları	4
<b>Şekil 2.2</b> Kornea Endotel Tabakası	7
<b>Şekil 2.3</b> Pompa ve Sızıntı ( <i>pump and leak</i> ) Hipotezi	9
<b>Şekil 2.4</b> Endotel Hücrelerinin Restorasyonu	10
<b>Şekil 2.5</b> Replikatif Yaşlanma (Senesens)	14
<b>Şekil 2.6</b> Hücre Döngüsünün Pozitif ve Negatif Düzenlemesini Gösteren Diyagramlar	16
<b>Şekil 3.1</b> Neubauer Lamı	22
<b>Şekil 3.2</b> 6 Kuyulu Plakalara Ekilmiş Deney Grupları	26
<b>Şekil 3.3</b> TGF- $\beta$ 1 Standart Eğrisi	28
<b>Şekil 3.4</b> TGF- $\beta$ 1 Standartlarının Hazırlanması	30
<b>Şekil 4.1</b> Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ 1'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	35
<b>Şekil 4.2</b> TGF- $\beta$ İnhibitörü Olan ITD-1'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Brdu Analizi ile Belirlenmesi	36
<b>Şekil 4.3</b> TGF- $\beta$ 1 Reseptör İnhibitörü Olan SB431542'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Brdu Analizi ile Belirlenmesi	37
<b>Şekil 4.4</b> TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 Uygulanmasının Hücre Proliferasyonuna Etkisi	38
<b>Şekil 4.5</b> TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 ile İnkübasyonu Yapılan Hücre Gruplarının SA- $\beta$ -Gal Boyaması ile Hücre Yaşlanmasının Görüntülenmesi	39
<b>Şekil 4.6</b> TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 ile 48 Saat İnkübasyon Sonrası TGF- $\beta$ Yüzde Değişimi	40
<b>Şekil 4.7</b> ZO-1 mRNA Ekspresyonunun Rölatif Değişimleri	41
<b>Şekil 4.8</b> COL8A2 mRNA Ekspresyonunun Rölatif Değişimleri	42

**TABLULAR DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 3.1</b> BrdU Kit İçeriğinin Hazırlanması	23
<b>Tablo 3.2</b> SA- $\beta$ -gal Tespit Solüsyonunun Hazırlanması	27
<b>Tablo 3.3</b> TGF- $\beta$ 1 Elisa Kit İçeriğinin Hazırlanması	29
<b>Tablo 3.4</b> cDNA Sentez Karışımı	32
<b>Tablo 3.5</b> cDNA Sentez Protokolü	32
<b>Tablo 3.6</b> Primer Dizileri	33
<b>Tablo 3.7</b> Reaksiyon Bileşenleri (Reaksiyon Karışımı ve Kalıp DNA)	34
<b>Tablo 3.8</b> Gerçek-Zamanlı PCR Protokolü	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ECM	Ekstrasellüler Matriks
FOXC1	Forkhead Box C1 Protein
PITX2	Paired Like Homeodomain 2
PAX6	Paired Box 6
ATP	Adenozin Trifosfat
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaz	Sodyum/Potasyum- ATPaz
H <sub>2</sub> O	Su
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat
TGF-β	Transforming Growth Factor- Beta
EnMT	Endotelyal-Mezenkimal Geçiş
COL1A1	Kolajen Tip I Alfa 1 Zinciri
COL1A2	Kolajen Tip I Alfa 2 Zinciri
SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNAI2	Snail Family Transcriptional Repressor 2
ZEB1	Zinc finger E-box binding homeobox 1
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2
TSP1	Thrombospondin-1
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FGF-2	Fibroblast Büyüme Faktörü-2
IL-1β	İnterlökin-1 Beta
PDGF-BB	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri
TGF-β2	Transforming Growth Factor- Beta 2
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
IGF-I	İnsüline Benzer Büyüme Faktörü-1
IGF-II	İnsüline Benzer Büyüme Faktörü-2
IL-4	İnterlökin-4 Beta
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat

ERK1/2	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinazlar
PI3K/Akt	Phosphatidylinositol 3-kinaz/Protein kinaz B
Cdc42	Cell Division Cycle 42
RhoA	Ras Homoloji Aile Üyesi A
Wnt5a	Wnt Aile Üyesi 5A
GDF	Büyüme Farklılaşma Faktörleri
BMP	Kemik Morfogenetik Proteinleri
MIS	Müllerian İnhibe Edici Madde
CDK	Sikline Bağımlı Kinaz
BMPR2	Kemik Morfogenetik Protein Reseptörü Tip-2
ACVR2B	Activin A Reseptörü Tip IIB
ACVR1B	Activin A Reseptörü Tip IB
ACVR1C	Activin A Reseptörü Tip IC
ZO-1	Zonula Okludens-1
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
pRB	Retinoblastom Proteini
SASP	Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipi
NF-KB	Nükleer Faktör Kabba B
C/EBP $\beta$	CCAAT Arttırıcı Bağlayıcı Protein Beta
SB431542	TGF- $\beta$ 1 Reseptör İnhibitörü
ITD-1	TGF- $\beta$ İnhibitörü
SA- $\beta$ -Gal	Yaşlanma ile İlişkili Beta-Galaktosidaz
GSK3	Glikojen Sentaz Kinaz 3

## 1. GİRİŞ

Kornea gözün "saydam tabakası" olup en yüksek refraktif güce sahiptir. Kornea tabakaları sırasıyla *kornea epitelii*, *bowman tabakası*, *stroma*, *descemet membranı*, *dua tabakası* ve *endotel tabakası* olarak sayılabilir. Endotel tabakası korneanın en iç katmanı olup aköz hümör ile temas halindedir. Büyük çoğunlukla hekzagonal yapıya sahip olan endotel hücrelerinin dizilimi bu tabakaya bal peteği görünümü vermektedir. İnsan kornea endotel hücrelerinin normal koşullar altında in vivo proliferasyon yetenekleri oldukça sınırlıdır ve bu hücreler hücre döngüsünün G1 fazında duraklamışlardır. Bu durumun sıkı sıkıya yerleşmiş olan hücreler arasındaki temas inhibisyonuna (*contact inhibition*) ve TGF- $\beta$  gibi negatif büyüme faktörlerinin ön kamarada yüksek konsantrasyonda bulunmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, kornea endotel hücrelerinin in vitro koşullarda çoğaltılabildiği çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir. Normal koşullar altında, kornea endotel yaralanması durumunda sağlam kalan hücreler genişleyerek ve/veya göç ederek yara iyileşmesini sağlamaktadırlar. Bu süreçte TGF- $\beta$  endotel hücre göçünü uyararak yara iyileşmesinde kritik rol oynamakla birlikte TGF- $\beta$ 'nin hücre proliferasyonunu baskıladığı, endotelyal-mezenkimal dönüşümü (EnMT) ve senesensi indüklediği de düşünülmektedir. Yaralanmanın fizyolojik mekanizmalarla tam olarak iyileştirilemediği durumda kornea endotel yetmezliği ve kalıcı kornea ödemi gelişir. Bu durumun tek tedavisi tam kat veya kısmi kornea naklidir. Son yıllarda kornea donör temininde dünya genelinde ciddi sıkıntılar yaşanmaktadır. Bu nedenle insan kornea endotel hücrelerinin kültür ortamında optimal şekilde çoğaltılmasının önündeki engellerin aşılması önemli bir görme probleminin çözümüne olanak sağlayabilecektir. Literatürde TGF- $\beta$ , bir TGF- $\beta$  inhibitörü olan ITD-1 ve bir TGF- $\beta$  reseptör inhibitörü olan SB431542'nin insan kornea endotel hücreleri üzerine etkilerinin incelendiği kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur.

### 1.1. Amaç

Bu tez çalışmasının amacı TGF- $\beta$ , ITD-1 ve SB431542'nin kornea endotel yetmezliğinin hücre temelli tedavisi için gerekli olan fonksiyonel kornea endotel hücrelerinin kültür ortamında üretilmesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Böylece TGF- $\beta$  inhibisyonunun insan kornea endotel hücrelerinin proliferasyon, fonksiyon ve senesens özellikleri üzerine etkilerinin moleküler mekanizmaları aydınlatılabilecektir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI

### 2.1. Kornea

Göz, dıştan içe doğru *fibröz tabaka (kornea ve sklera)*; *damar tabaka (uvea)* ve *ağ tabaka (retina)* olmak üzere üç katmandan oluşur (Khurana vd 2015). Kornea, ışığın gözün içine girmesine izin veren ve ışık ışınlarının retinanın üzerine odaklanması için lens görevi gören, yaklaşık 43 diyoptrilik (D) kırma gücüne sahip şeffaf bir dokudur (Doughty vd 2002, Teichmann vd 2013). Aynı zamanda, kornea, sklera ile birlikte gözü dış ortamdan gelecek tehlikelere karşı korur. Korneanın ön yüzeyi elips şeklinde olup ortalama yatay çapı 11,7 mm ve dikey çapı 11 mm'dir. Korneanın arka yüzeyi daireseldir ve ortalama çapı 11,5 mm'dir. Kornea kalınlığı merkezde 0,52 mm, periferde ise 0,7 mm'dir. Korneanın 5 mm'lik merkezi alanı, gözün güçlü kırılma yüzeyini oluşturur (Gordon ve Donzis 1985).

Görme işlevi için ana ön koşul, kornea saydamlığının korunmasıdır (Chen vd 2017). Çünkü, insan gözünün toplam kırma gücünün dörtte üçünden kornea sorumludur (Eghrari vd 2015). Korneanın muntazam kollajen organizasyonu ve avasküler yapısı şeffaflığın sağlanmasından sorumlu olan ana etmenlerdir (McKay vd 2019). Gözün önden arkaya doğru kırıcı ortamını oluşturan yapılar şunlardır; gözyaşı film tabakası, kornea, aköz hümör, kristalin lens ve vitröz hümördür (Crooke vd 2008). Sağlıklı bir gözyaşı filmi, oküler yüzeyin beslenmesi, korunması ve normal kornea fonksiyonlarının sağlanmasında önemli bir rol oynar (Yanoff ve Duker 2019). Diğer taraftan, korneanın normal işlevlerini yerine getirebilmesi anatomik, fizyolojik ve biyokimyasal bütünlüğüne ve koordinasyonuna bağlıdır (Walker-Brandreth 2014).

Aköz hümör, göz küresinin ön odasını (kamara) dolduran berrak seröz bir sıvıdır (Roushan 2020). Aköz hümörün normal göz içi basıncının teminindeki rolüne ek olarak tamamen avasküler olan kornea (arka yüzeyi) ve lens (ön yüzeyi) ile yakın ilişkisi

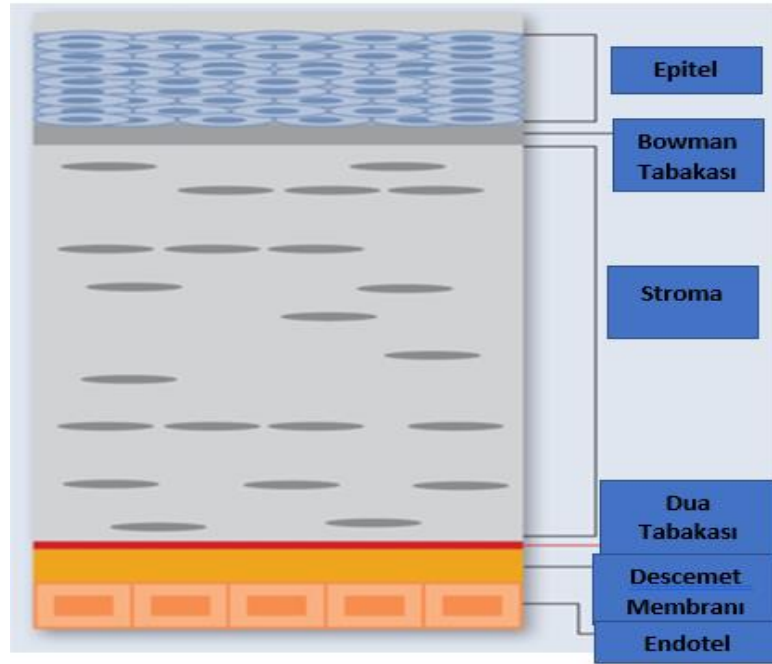


dolayısıyla bu yapıların metabolik fonksiyonlarının devamında önemli bir görevi de mevcuttur (Walker-Brandreth 2014).

Lens ise korneadan sonra en yüksek kırıcı güce sahip göz içi doku olup ışık ışınlarının retinaya odaklanmasında ve akomodasyonda önemli rol oynar. Kornea ile benzer şekilde, lensin saydam yapısının korunması görme fonksiyonları açısından bir zorunluluktur (Chen vd 2017).

### 2.1.1. Kornea Histolojisi

Kornea histolojik olarak kornea altı ayrı katmandan oluşur. Bunlar önden arkaya doğru; *epitel tabakası*, *bowman tabakası*, *stroma*, *dua tabakası*, *descemet membranı* ve *endotel tabakasıdır* (Sridhar 2018) (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1** Kornea Tabakaları (Khurana vd 2015)'dan modifiye edilmiştir.

#### 2.1.1.1. Epitel Tabakası

Yaklaşık olarak 50 mikron kalınlığında olan bu tabaka dış ortama karşı ilk bariyeri oluşturur. Kornea epitel hücreleri sürekli olarak yenilenmektedir ve tüm kornea epitelinin devir daim süresi yaklaşık bir haftadır (Sridhar 2018). Kornea epitelinin ana işlevleri; dış

ortamdaki toksinlerin ve mikroorganizmaların kornea içersine girmesini önlemek (bariyer görevi), gözyaşı filmi ile bütünleşerek ışığın kırılması için düzgün bir yüzey sağlamak ve ayrıca suyu ve çözünür bileşenleri stroma içersine (veya dışına) aktarmak olarak sıralanabilir (Ghezzi vd 2015).

Epitel tabaka; *süperfisiyel, kanatsı ve bazal hücreler* olmak üzere 3 tip hücre katmanından oluşur (Yanoff ve Duker 2019). Yüzeyde bulunan apikal hücreler yassı hücre yapısındadır ve aralarında desmozomal sıkı bağlantılar bulunur. Apikal yüzde bulunan hidrofobik yapıdaki mikrovilluslar göz yaşı film tabakası stabilitesini sağlar. Orta kısımda 2-3 sıra halinde poligonal yapıda kanat hücreleri bulunur. En altta tek katlı kolumnar yapıda bazal hücreler yer alır. Bu hücreler, birbirlerine *zonula adherens*; altındaki bazal membrana ise *hemidesmozomlarla* bağlıdır (Sridhar 2018). Bazal hücrelerin mitoz ile çoğalabilmektedirler. Mitoza uğrayan hücreler aktin filamanları aracılığıyla yüzeye doğru göç ederek kanatsı ve apikal hücrelere dönüşürler. Bazal membran yaklaşık 40-60 nanometre kalınlığındadır ve bazal hücreler tarafından salınan ekstrasellüler matriksten (ECM) oluşur. Yapısında temel olarak tip IV kollajen ve laminin bulunur. Altındaki Bowman tabakasına sıkıca bağlıdır. Bazal membran, epitel hücrelerinin yapışması ve epitel ile stroma arasındaki hücresel sinyalasyonu düzenlemek için gereklidir (Eghrari vd 2015).

#### **2.1.1.2. Bowman Tabakası**

Kornea epiteli ile alttaki stroma arasındaki geçişi oluşturan çok ince (8-14 mikron) ve dayanıklı bir bağ doku tabakasıdır. Gerçek bir membran olmayıp, stromanın yoğunlaşmış yüzeysel bir parçasıdır. Temel olarak, tip I ve V kollajenlerin yanı sıra proteoglikanlardan oluşur ve hücre içermez. Korneayı enfeksiyon ve travmaya karşı korur. Herhangi bir hasarlanma durumunda ince bir tabaka olarak iyileşir (skar görülebilir) ama eski haline geri dönemez (Sridhar 2018). Bowman tabakasının kalınlığı yaşla birlikte azalır (Meek ve Boote 2004).

#### **2.1.1.3. Stroma**

Yaklaşık 500 mikron kalınlığında, kollajen fibrillerinden oluşan bir tabakadır. Kornea stroması kornea kalınlığının yaklaşık %90'ını oluşturur ve ağırlıklı olarak tip I kollajenden meydana gelmekle beraber tip III, V, VI kollajenleri de içerir. Kollajen lifleri

“*lamel*” adı verilen 200-300'lü paketler halinde düzenlenmiştir. Lamellerin stromadaki düzeni heterojendir. Örneğin, kollajen lifleri ön stromada iç içe geçmiştir, orta ve arka stromada ise paralel seyir gösterir (Morishige vd 2011). Bu lamellerin mükemmel organizasyonu korneanın saydamlığı ve mekanik özelliği bakımından kritik rol oynar. Lameller arasındaki boşluklar, stromanın %20'sini teşkil eden keratositlerle doldurulmuştur. Bu hücreler, kollajen ve proteoglikan sentezi yoluyla lameller organizasyonunun stabilitesinden ve ECM bileşenlerinin düzenlenmesinden sorumludur (Chen vd 2015).

#### **2.1.1.4. Dua Tabakası**

Descemet membranı ile arka stroma arasında bulunan stromanın özelleşmiş halidir. Yaklaşık 10 mikron kalınlıkta olup 3-5 kat kollajen lamellasından oluşmaktadır. Normal stromaya göre daha sert ve çok dirençli bir yapıdır (Dua ve Said 2016).

#### **2.1.1.5. Descemet Membranı**

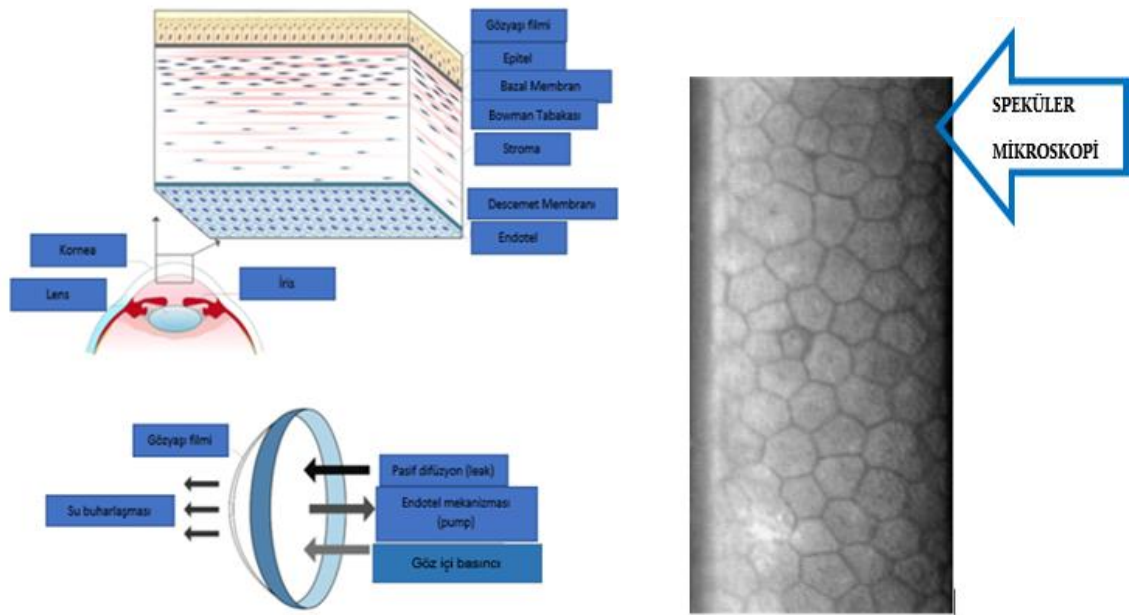
Descemet membranı, endotel hücrelerinin bazal membranından meydana gelir ve stromayı endotel tabakasından ayırır. Yapısında ağırlıklı olarak tip IV kollajen bulunur (Kabosova vd 2007). Kalınlığı çocuklarda yaklaşık 5 mikron iken yaşlılarda 15 mikrona ulaşabilmektedir. Descemet membranı kimyasal ajanlara, travmaya ve patolojik süreçlere karşı oldukça dayanıklıdır. Ancak, stroma ile arasındaki bağlantı çok güçlü olmayıp kolaylıkla stroma arka yüzeyinden ayrılabilir. Diğer taraftan, Bowman tabakasının aksine yenilenebilme özelliği vardır (endotel hücreleri tarafından sentezlenir) (Dua ve Said 2016).

#### **2.1.1.6. Endotel Tabakası**

Bu tabaka tek katlı poligonal (sıklıkla hegzagonal) hücrelerden oluşan bal peteği görünümüne sahip korneanın en iç tabakasıdır (Şekil 2.2). Kornea endotel hücreleri nöral krestten ve mezodermden köken alırlar (Gage vd 2005). Endotel tabakasının gelişimi, FOXC1 (*Forkhead box C1 protein*), PITX2 (*Paired Like Homeodomain 2*) ve PAX6 (*Paired Box 6*) gibi çok çeşitli transkripsiyon faktörlerinin etkisi altında gebeliğin beşinci haftasında başlar.

Endotel tabakası aköz hümör ve diğer kornea tabakalarını birbirinden ayıran bir bariyer görevi görür. Endotel hücreleri arasında *gap junction* ve *tight junction* adı verilen bağlantılar bulunmakla birlikte bu hücreler Descemet membranına *hemidesmozomlar* ile tutunurlar (Bourne 2003). Endotel hücrelerinin arka yüzeylerinde ise  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz aktif transport pompaları yer alır. Sağlıklı bir kornea endotel tabakası kornea hidrasyonunu ideal düzeyde (yaklaşık %78 su) tutmak için gereklidir.

Kornea endotel hücre yoğunluğunun erken yenidoğan döneminde 6000 hücre/ $\text{mm}^2$  civarında olduğu tahmin edilmektedir (Bahn vd 1986, Bourne 2003). Daha sonra, kornea boyutundaki fizyolojik artış ve eşzamanlı hücresel yıpranmanın bir sonucu olarak, erken çocukluk döneminde Kornea endotel hücre yoğunluğu 3000-3500 hücre/ $\text{mm}^2$  seviyesine düşer (Bourne 2003). Kornea endotel hücre yoğunluğu her yıl yaklaşık %0,6 oranında azalır ve 85 yaşındaki bir kişide ortalama Kornea endotel hücre yoğunluğu yaklaşık 2000 hücre/ $\text{mm}^2$ 'dir (Yee vd 1985, Bourne vd 1997, Bourne 2003). Diğer taraftan, yaşlanma ile birlikte endotel hücrelerinin boyut (*polimegatizm*) ve şekil farklılığı (*pleomorfizm*) oranları da değişmektedir. Ancak, normal koşullar altında, bu fizyolojik değişiklikler korneanın normal saydam yapısını ve işlevini etkilemez.



**Şekil 2.2** Kornea Endotel Tabakası (Smeringaiova vd 2021) 'den modifiye edilmiştir.

### 2.1.1.6.1. Kornea Endotel Hücrelerinin Görevleri

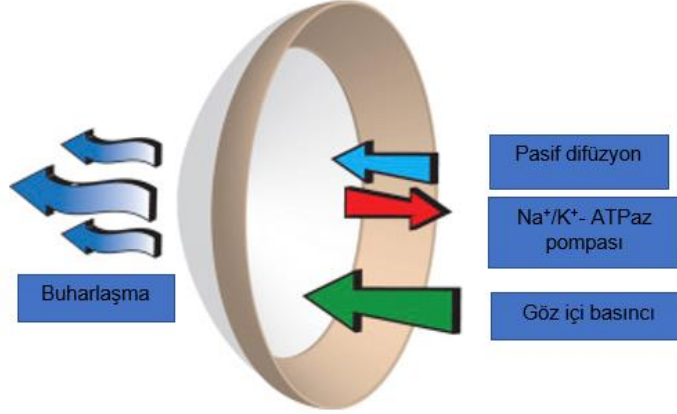
Endotel tabakasının ana işlevi, normal bir görme fonksiyonu için stromayı sınırlı bir hidrasyon seviyesinde ve saydam tutarken aköz humör içerisindeki su ve metabolitlerin stromaya kontrollü geçişine izin vermektir. Kornea endotel hücrelerinin metabolik aktivitesi oldukça yüksektir ve bu nedenle çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve serbest ribozoma sahiptirler. Bu hücreler, glikoz, aminoasit ve oksijen gibi metabolik gereksinimlerini aköz hümörden karşılarlar (Joko vd 2013).

Kornea endotel hücrelerinin en önemli iki özelliği “bariyer” ve “aktif pompa” fonksiyonlarıdır ve şu şekilde özetlenebilir;

**1. Bariyer görevi:** Hücreler arasındaki sıkı bağlantılar suyun aköz hümörden stromaya geçişini belli oranda engelleyerek kontrollü bir bariyer işlevi görür (Mishima 1982).

**2. Aktif pompa görevi:**  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz pompası kornea endotel hücre membranında yoğun bir şekilde bulunan ATP bağımlı bir enzimdir. Bu enzim 1 ATP kullanarak 2 potasyum ( $\text{K}^+$ ) iyonunu hücre içine alır ve 3 sodyum ( $\text{Na}^+$ ) iyonunu hücre dışına atar (Waring 1982). Hücre dışına  $\text{Na}^+$  atılması esnasında su ( $\text{H}_2\text{O}$ ) da beraberinde aköz humör yönünde atılmış olur (Bonanno 2012). Diğer taraftan, kornea endotel hücrelerinde bulunan intrasellüler karbonik anhidraz enzimi  $\text{CO}_2$  ve  $\text{H}_2\text{O}$ 'yu  $\text{H}^+$  ve  $\text{HCO}_3^-$  iyonlarına ayırır.  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  pompası devreye girerek hücre içine  $\text{Cl}^-$  girerken hücre dışına  $\text{HCO}_3^-$  ve  $\text{H}^+$  iyonu çıkar. Oluşan  $\text{HCO}_3^-$  iyonu  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaz pompasının çalışması için gerekli ortamı sağlamış olur (Bonanno 2012).

Özetle, endotel tabakası korneanın aköz hümörden beslenmesinde ve hidrasyon kontrolünde önemli rol oynar. Endotel hücreleri, büyük partiküllerin pinositoz yoluyla veziküller halinde taşınmasını sağlarken; daha küçük yapıdaki besinlerin ve diğer moleküllerin aköz hümörden avasküler olan korneaya sızıntı şeklinde pasif geçişine izin verir (Petroll vd 2009, Smeringaiova vd 2021). Diğer taraftan, endotel hücreleri içindeki iyon taşıyıcıları, bu difüzyon gradyanını aktif olarak dengeler ve substratları stromadan aköz hümöre taşır. Kornea endotelinin bu sızdırıcı etkisi ve aktif pompayla bunu dengeleyerek normal kornea hidrasyonunu (ve dolayısıyla saydamlığını) sağlaması pompa ve sızıntı '*pump and leak*' hipotezi olarak adlandırılır (Bonanno 2012) (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3** Pompa ve Sızıntı (*pump and leak*) Hipotezi (Bogerd vd 2018)' dan modifiye edilmiştir.

Kornea saydamlığının teminindeki diğer önemli faktörler ise sağlıklı oküler yüzey ve göz yaşı filmi, kornea epitelinin bariyer etkisi, göz yaşının kornea yüzeyinden buharlaşması yoluyla stromal dehidratasyona katkıda bulunması, tüm kornea tabakalarında bulunan hücrelerin sıkı paketlenmesi ve hücre organellerinin az sayıda bulunması, avaskülarite ve kornea kollajen lamellerinin karmaşık ve sıkı dizilimi sayesinde stromal moleküllerin görünür ışığın dalga boyundan daha küçük olması olarak sayılabilir (Bonanno 2012, Bogerd vd 2018).

#### 2.1.1.6.2. Kornea Endotel Tabakası Hasarı

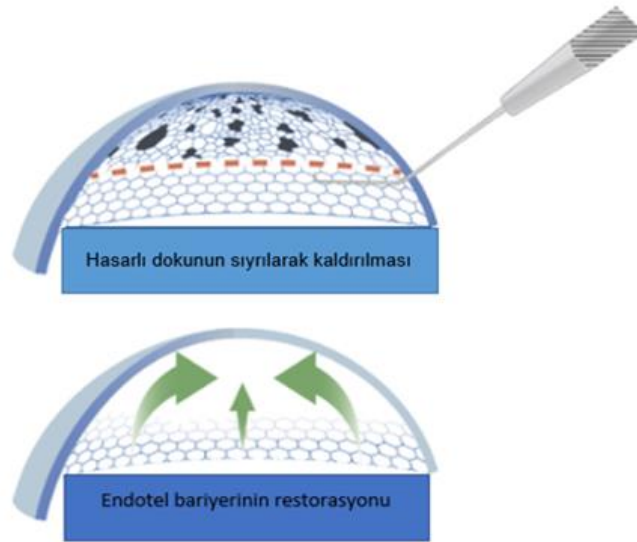
Travma, intraoküler cerrahi ve implantlar, üveit gibi intraoküler inflamatuvar hastalıklar, lazer uygulamaları, göz damlaları içinde bulunan toksik ajanlar, uzun süreli kontakt lens kullanımı, endotelyal distrofiler ve akut glokom atakları gibi durumlar önemli ölçüde endotel hücre kaybı ve kalıcı kornea bulanıklığı ile sonuçlanabilir (Bourne 2003).

Kornea endotel tabakası hasarı olduğunda, geride kalan hücreler, yapısal ve fonksiyonel devamlılığı korumak üzere boyutlarını ve şekillerini değiştirerek hasarlı bölgeye göç ederler (Bogerd vd 2018). Bu durum iki türlü sonuçlanabilir; birincisi, normal kornea fonksiyonu tekrar sağlanır; ikincisi ise, eğer hasarı telafi edebilecek yeterli sayıda normal kornea endotel hücresi yok ise kalıcı kornea ödemi gelişir (Khurana vd 2015).

#### 2.1.1.6.3. Kornea Endotel Hücre Hasarı ve Yara İyileşme Süreci

İnsan kornea endotel hücrelerinin *in vivo* olarak çoğalıp çoğalmadığı konusu literatürde en çok tartışılan konulardan bir tanesi olup genel bilgi bu hücrelerin *in vivo*

bölünme kapasitelerinin çok sınırlı olduğu yönündedir. Bu durum çeşitli hipotezlerle açıklanmaya çalışılmaktadır. Örneğin, yoğun şekilde paketlenmiş hücreler S-fazına geçişi önleyen ve hücreleri G1 fazında durduran sikline bağımlı bir kinaz inhibitörü olan p27kip1'i upregüle ederek güçlü temas inhibisyonu (*contact inhibition*) gösterirler (Matsuda vd 1985, Baldwin ve Marshall 2002, Sumioka vd 2008) (Şekil 2.6). Diğer taraftan, ön kamarada mitozu artıracak pozitif büyüme faktörleri çok düşük konsantrasyonlarda bulunurken, dönüştürücü büyüme faktörü-beta gibi (*transforming growth factor*, TGF- $\beta$ ) gibi hücre stazını zorlayan negatif büyüme faktörleri yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır (Imanishi vd 2000, Baldwin ve Marshall 2002). Ayrıca, bu hücrelerin yoğun ultraviyole ışık maruziyeti ile birlikte yüksek hücre metabolizma hızı stres kaynaklı hücre yaşlanmayı tetikleyen reaktif oksijen türevlerinin (ROS) birikmesine neden olmaktadır (Bogerd vd 2018).



**Şekil 2.4** Endotel Hücrelerinin Restorasyonu (Bogerd vd 2018)'den modifiye edilmiştir.

Kornea endotel hücrelerinin *in vivo* bölünme kapasitelerinin çok kısıtlı olduğu gösterilmiş olsa da temas inhibisyonunun ortadan kaldırıldığı ve uygun büyüme faktörlerinin ortama eklendiği *in vitro* koşullarda bu hücrelerin G1 fazını geçip hücre döngüsünü tamamlayarak çoğalabildiği bilinmektedir (Zavala vd 2013). Günümüz koşullarında, insan donör kornea dokusundan izole edilen endotel hücreleri *in vitro* koşullarda kültüre edilebilmektedir. Ancak, kültüre edilmiş bu hücrelerin süspansiyon halinde hastaya transferi ve enjekte edilen endotel hücrelerinin kornea arka yüzeyine

tutunup yaşamlarını ve işlevlerini sürdürebilmesi konusunda önemli zorluklar mevcuttur. Bu yaklaşımın yerine hastanın geride kalan az sayıdaki sağlam endotel hücrelerinin *in vivo* çoğalmasının uyarılması yönündeki araştırmalar halen devam etmektedir (Joyce 2005, Joko vd 2013).

Normal fizyolojik koşullar altında, kornea endotel tabakası hasarı geliştiğinde, yara iyileşmesi sürecinde bazal membran boyunca fibronektin ve laminin birikir (Sabet ve Gordon 1989). Bu hücre dışı matriks molekülleri, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi dahil olmak üzere, yönlendirilmiş hücre göçü ile bağlantılı sinyalleri teşvik eden kılavuz olarak işlev görürler (Berzat ve Hall 2010). Sağlıklı kalan kornea endotel hücreleri, yara iyileşmesi sürecinde hücre iskeleti değişikliklerine uğrarlar. Bu değişiklikler, hasarlı bölgeyi örtmek ve çokgen bir hücre şekli oluşturmak için aktin yeniden organizasyonu ve hücre sel genişlemeyi içermektedir. Böylece, hasarlı bölge kapatılır ve endotel tabakası bariyer fonksiyonunu yeniden kazanır. Tüm bu bahsedilen hücre sel değişiklikler aynı zamanda endotelyal-mezenkimal geçiş (EnMT) durumu ile uyumludur. Bu süreç, tekli hücre sel yapının bozulmasına ve hücre-hücre temas inhibisyonunun kaybolmasına neden olur (Jiayan Liu vd 2020). EnMT süresince hücreler kendi fonksiyonlarını ve şekillerini kaybederler ve fibroblast benzeri bir fenotipe dönüşürler. Hücreler komşu hücrelerinden ayrılarak Descemet membranı boyunca tek tek kusurlu bölgeye göç ederek bu bölgeyi kapatırlar (Petroll vd 1997, Li vd 2013, Lee vd 2018, Hwang vd 2020, Ong Tone vd 2021). EnMT'nin ayırt edici özelliği, bağlantısal protein E-kadherinin down regülasyonu, fibronektin ve vimentin gibi hücre iskeleti proteinlerinin de up regülasyonu ile birlikte kollajen tip 1 genlerinin (COL1A1 ve COL1A2) artan ekspresyonudur (Lamouille vd 2014). Ayrıca; SNAI1 (*Snail Family Transcriptional Repressor 1*), SNAI2 (*Snail Family Transcriptional Repressor 2*), ZEB1 (*Zinc finger E-box binding homeobox 1*) ve ZEB2 (*Zinc finger E-box binding homeobox 2*) gibi mezenkimal geçiş belirteç genlerinin, tip 1 kollajen ekspresyonunu ve E-kadherinlerin baskılanmasını düzenlediği bilinmektedir (Lee vd 2018).

Fibriler olmayan bir kolajen proteini olan Tip VIII kolajen, kornea ve vasküler endotelyal hücreler tarafından eksprese edilir (Li vd 1993).  $\alpha 1(VIII)$  ve  $\alpha 2(VIII)$  (genler: COL8A1 ve COL8A2) olmak üzere iki farklı polipeptit zincirinden oluşan bir heterodimerdir (Sage vd 1983, Plenz vd 2003). Kollajen VIIIa2 (COL8A2), kornea endotelinin temel zarı olan Descemet zarının ana bileşenidir (Gottsch vd 2005). COL8A2, kornea endotel hücre bütünlüğünün ve yapısının korunmasında potansiyel bir role sahiptir (Hara vd 2019). COL8A2, kornea endotel hücre proliferasyonu ile ilişkili olup ekspresyonunun artışı, hücrelerin göçü ve çoğalması için gereklidir (Wang vd 2013).



Sıkı bağlantılar, diğer komşu hücrelerin sıkı bağlantılarıyla doğrudan temas halinde olan proteinlerden ve endotel bariyer fonksiyonunu düzenlemek için bağlantı zarını hücre iskeletine bağlayan komplekslerden oluşur (Elliott vd 1980, Zhu ve Joyce 2004). ZO-1, hücrelerin apikal tarafı boyunca uzanan sıkı bağlantı yüzeyinin önemli bir submembranöz proteindir (González-Mariscal vd 2000, Liu vd 2017). Hücre zarında ZO-1'in uygun sitolokalizasyonu, kornea endotel hücrelerinin altıgen yapısını göstermektedir, hücre bariyeri bütünlüğünün de bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Laing vd 1984, Terry 2006).

Yara iyileşmesi sırasında kornea endotel hücrelerinin göçü ve yayılması bir dizi faktör tarafından uyarılır. ECM proteinleri fibronektin ve TSP-1'in hücre göçünü kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Blanco-Mezquita vd 2013). Endotelial göçü ve yara iyileşmesini desteklediği bilinen büyüme faktörleri arasında EGF, FGF-2, IL-1 $\beta$ , PDGF-BB, TGF- $\beta$ 2 ve VEGF bulunurken, IGF-I ve IGF-II etkisizdir ve IL-4 hücre göçünü azaltır (Soltau ve McLaughlin 1993, Hoppenreijns vd 1996, Thalmann-Goetsch vd 1997, Imanishi vd 2000, Baldwin ve Marshall 2002, Lee ve Heur 2013). Yara iyileşmesi için önemli olan bu faktörlerin alt sinyal yolları çeşitlidir. Örneğin, cAMP yolu, ERK1/2 ve p38 MAP kinaz yoluyla hareket eden prostaglandin E2'nin endotel göçüne ve yara iyileşmesine katıldığı gösterilmiştir (Joyce ve Mekler 1994, Sumioka vd 2008, Chen vd 2009, Joko vd 2013). FGF-2, p38, PI3K/Akt ve protein kinaz C/fosfolipaz A2 dahil olmak üzere çeşitli yollarla hücre göçünü uyarır (Lee vd 2004, Joko vd 2013). IL-1 $\beta$ , hem Cdc42 (Cell Division Cycle 42)'yi aktive eden hem de RhoA'yı etkisizleştiren Wnt5a'nın yanı sıra FGF-2'nin uyarılması yoluyla göçü uyarmaktadır (Jeong ve Kay 2006, Lee vd 2012, Lee ve Heur 2013, Lee vd 2014). IL-1 endotel hücrelerinde hücre göçünü doğrudan ve dolaylı olarak uyaran bir sitokindir.

Yukarıda bahsedildiği üzere, kornea endotel yara iyileşme süreçlerinde çok çeşitli ve birbiriyle bağlantılı karmaşık mekanizmalar rol oynamakla birlikte bu süreçte yer alan ana yollar; Rho/ROCK yolu, fosfoinositol-3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz b (Akt) yolu, Wingless-Inkt yolu ve (TGF- $\beta$ ) yolu olarak sayılabilir.

## **2.2. Hücresel Yaşlanma (Senesens)**

Yaşlanma, genel olarak, ömür boyunca doku ve organların fizyolojik işlevinde, adaptasyonunda ve dayanıklılığında kademeli düşüşün zamana bağlı süreci olarak tanımlanır (López vd 2013, He ve Sharpless 2017).

Hücresel yaşlanma, hücre bölünmesinin durmasıyla karakterize bir durumdur. 1960'ların başlarında, Leonard Hayflick ve Paul Moorhead, hücre kültüründeki normal insan fetal fibroblastlarının, yaşlanmadan önce en fazla 50 kez replike olabildiğini gösterdiler. Bu süreç "*replikatif yaşlanma*" veya "*Hayflick limiti*" olarak bilinir (Liu vd 2019) (Şekil 2.5). Hayflick'in ölümlü hücreleri keşfi, hücresel yaşlanmanın moleküler mekanizmalarının anlaşılmasının önünü açmıştır. Hücresel yaşlanma, çok çeşitli stres indükleyici faktör tarafından başlatılabilir (Li vd 2018). Bu stres faktörleri, diğer pek çok şeyin yanı sıra hem çevresel hem de dahili zarar verici olayları, anormal hücresel büyümeyi, oksidatif stresi ve otofaji faktörlerini içermektedir (Khurana vd 2015). Hücre yaşlanmasının fizyolojik önemi, karsinogenezin önlenmesine ve son zamanlarda ise yaşlanma, büyüme ve doku onarımına atfedilmektedir.

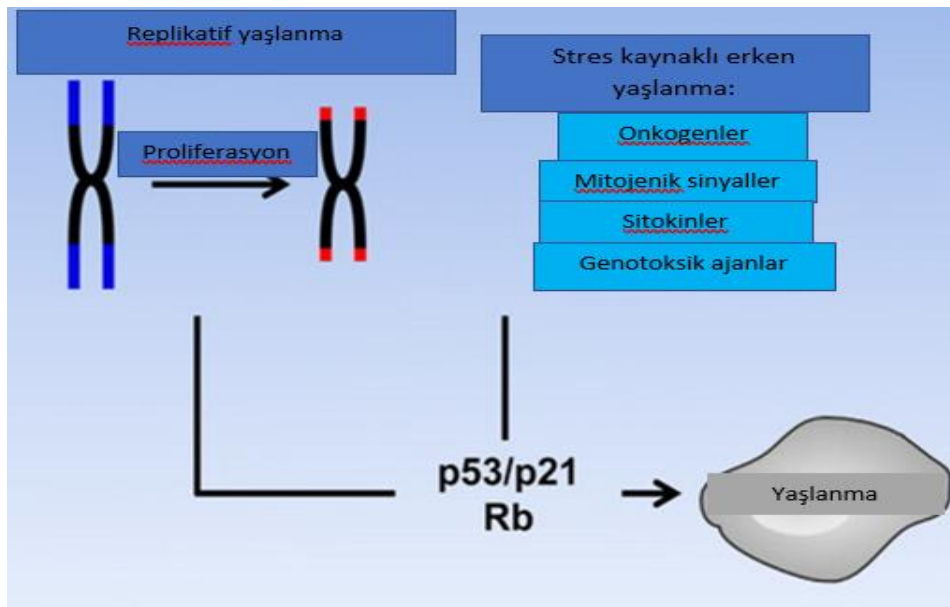
Mekanik olarak, replikatif yaşlanma, telomerlerin kısalmasının neden olduğu bir DNA hasarına yanıt olarak tetiklenebilir. Diğer taraftan, DNA hasarı yüksek ROS düzeyi, onkogen aktivasyonu ve hücre-hücre füzyonu ile ilişkili olabilir. Sıklıkla, hücre yaşlanması çeşitli faktörlerin (yani hem telomer kısalması hem de oksidatif stres) bir araya gelmesiyle gerçekleşir (Liu vd 2019).

Telomerler, hücre bölünmesinin her döngüsü sırasında kısalan kromozomların sonundaki DNA tandem tekrarlarıdır (Liu vd 2019). Her hücre döngüsü ile kromozomal telomerlerin art arda kısalmasının, hücrenin bölünme sayısını sınırlayarak yaşlanmaya katkıda bulunduğu inanılmaktadır. Yeterli kısalmadan sonra, TRF2 gibi telomer yapısını korumaktan sorumlu proteinler yer değiştirir ve bu da telomerin bir çift sarmal kırılma bölgesi olarak tanınmasına neden olur. Bu durum replikatif yaşlanmaya neden olur. Telomer kısalması, progerin gibi dokuyu bozan ve yetmezliğe yatkın hale getiren toksinler üreten kapsamlı RNA değişikliklerini aktive etmektedir (Zhu vd 2015). Normal koşullar altında DNA hasar yanıtı, DNA hasarı (çift sarmal DNA kırıkları gibi) onarılan kadar hücre döngüsü ilerlemesini durdurur. Yaşlanmış hücreler ise endojen DNA onarım aktivitelerine dirençli kalıcı DNA hasar yanıtı sergilerler (Tangvarasittichai 2018). Uzamış DNA hasar yanıtı hem ATM hem de ATR DNA kinazları aktive eder.

Bu iki kinaz tarafından başlatılan fosforilasyon kaskadı, hücre döngüsünün nihai olarak durmasına neden olur. DNA hasarının ciddiyetine bağlı olarak, hücreler artık onarım göremeyebilir ve apoptozis veya hücre yaşlanması sürecine gidebilirler (Jurkunas vd 2010). Memeli hücre kültürü ve dokularındaki bu tür yaşlanmış hücreler, çift sarmal DNA kırıklarını ve DNA hasar yanıtı işaretlerini muhafaza ederler. Çift sarmal DNA kırıklarının yaşlanma sürecinin ana itici güçleri olduğu öne sürülmektedir. Ayrıca, erken yaşlanma hastalıkları ile ilişkili bulunan DNA tamir genlerindeki mutasyonlar, hücre yaşlanmasının yaşlanmadaki rolünü desteklemektedir (Jurkunas vd 2010, Tangvarasittichai 2018).

Hücresel yaşlanmaya yol açan sinyal yolları arasında p53 ve p16Ink4a yolları yer almaktadır (Lu vd 2016). Bu yolların her ikisi de hücresel stresörlere yanıt olarak aktive olur ve hücre döngüsünün inhibisyonuna yol açar. p53, sikline bağımlı kinaz 2 (Cdk 2)'yi deaktive eden p21'i aktive eder (Matthaei vd 2012). Cdk 2 olmadan, retinoblastom proteini (pRB) aktif, hipofosforile formunda kalır ve önemli bir hücre döngüsü düzenleyicisi olan transkripsiyon faktörü E2F1'e bağlanır. Bu, E2F1'in transkripsiyonel hedeflerini bastırır ve G1 fazından sonra hücre döngüsünün durmasına yol açar (Şekil 2.6). Ayrıca, p16Ink4a da sikline bağımlı kinaz 4 (Cdk 4) ve sikline bağımlı kinaz 6'nın (Cdk 6) inaktivasyonu yoluyla pRB'yi de aktive eder (Matthaei vd 2012). p16Ink4a, erken, stres kaynaklı yaşlanmanın indüklenmesinden sorumludur (Lu vd 2016) (Şekil 2.6). Bu geri döndürülemez değildir; p16Ink4a'nın promotor metilasyonu veya p16Ink4a lokusunun silinmesi yoluyla susturulması, yaşlanma p16Ink4a aktivasyonu ile başlatılmışsa hücrenin hücre döngüsüne devam etmesine izin verir (Lu vd 2016).

Yaşlanma ile ilişkili salgı fenotipi (SASP) gen ekspresyonu, en önemlisi NF-KB olan C/EBPβ dahil olmak üzere bir dizi transkripsiyon faktörü tarafından indüklenir (Salotti ve Johnson 2019). Aberran onkogenler, DNA hasarı ve oksidatif stres, NF-kB'nin yukarı akış düzenleyicileri olan mitojenle aktive olan protein kinazları indükler (Zhu vd 2019).



**Şekil 2.5** Replikatif Yaşlanma (Senescens) (Jesus ve Blasco 2012)'den modifiye edilmiştir.

### 2.3. Transforming Growth Factor (TGF) Ailesi

TGF, hücrelerin büyümesini sağlayan polipeptid yapılı bir büyüme faktör topluluğudur. Alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) olarak iki alt grubu mevcuttur (Lee vd 1985).

#### 2.3.1. TGF-alfa ( $\alpha$ )

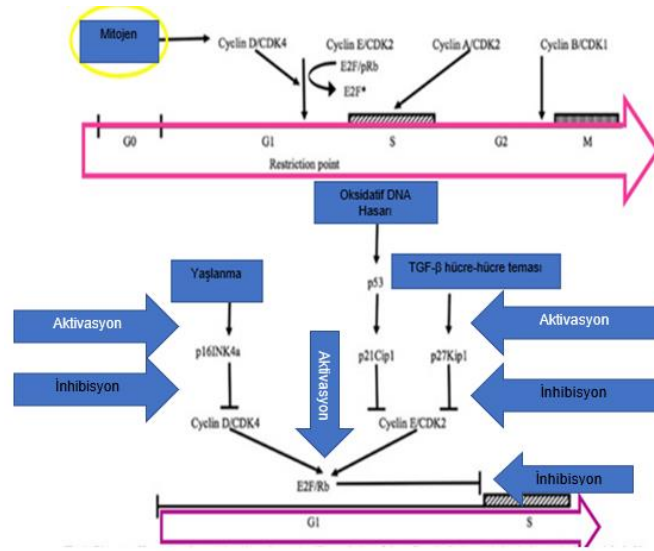
TGF- $\alpha$ , bazı özelleşmiş hücrelerce sentezlenir. Bu hücreler trombositler, keratinositler, bazı indüklenmiş makrofajlar ve beyin hücreleridir. Yapısında üç adet disülfid bağı ve 50 kadar aminoasit ünitesinin birleşmesiyle teşekküllemiş protein yapılı bir biyomoleküldür. TGF- $\alpha$ , epidermal büyüme faktörü (EGF) ile benzerlik göstermektedir. Ancak, EGF'nin nispeten daha otokrin işlev gören çeşidi olduğu düşünülmektedir. EGF reseptörlerine bağlanarak mezenkimal, epitelyal ve endotelial hücre büyümesini ve endotelial hücre kemotaksisini indükleyerek biyolojik etkisini gösterir (Massague 1990).

#### 2.3.2. TGF-beta ( $\beta$ ) Süperailisi

TGF- $\beta$  molekülü, moleküler ağırlığı 25 kilo Dalton (kDa) olan bir dimerdir. Süperaili terimi çok sayıda alt gruba sahip biyomoleküller için kullanılan bir terimdir. TGF- $\beta$  süperailisi hücre siklusu kontrolü, erken gelişimin regülasyonu, farklılaşması, ECM oluşumu, hematopoezis, anjiogenezis, kemotaksis, immün fonksiyonlar ve apoptozis gibi olaylarının düzenlenmesinde rol oynar. İnsan TGF- $\beta$  süperailisi, homodimerik veya heterodimerik salgılanan sitokinleri kodlayan 33 gen içerir (Heldin ve Moustakas 2016, Derynck ve Budi 2019). Bu proteinler, işleme sırasında salgı yolu boyunca parçalanarak ve çoğunlukla tek bir disülfid bağı yoluyla bir arada tutulan olgun dimerik ligandlar üreten bir öncü formda sentezlenir (Dijke ve Arthur 2007, Heldin ve Moustakas 2016). Aktinler, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), büyüme farklılaşma faktörleri (GDF'ler), müllerian inhibe edici madde (MIS), nodal ve TGF- $\beta$  aile üyeleri, moleküler kimliklerinin geçmişine dayalı olarak çeşitli isimler almıştır. TGF- $\beta$ , intrauterin dönemde embriyonun gelişimi ve morfogenezinin gerçekleşmesini sağlarken, erişkin dokularda homeostazisin korunmasında önemli rol oynar.

Anlaşılabacağı üzere TGF- $\beta$ 'nin temel fonksiyonu proliferasyonunu sınırlamak (sitostatik etki) ve farklılaşmayı indüklemektir. TGF- $\beta$  yanıtında, hücre döngüsünün durdurulması geç G1 fazında meydana gelir (Şekil 2.6). Bunun nedeni sikline bağımlı kinaz (CDK) inhibitörlerinin indüksiyonudur (Sporn vd 1986, Coffey vd 1987). TGF- $\beta$  süperailisinin rol aldığı biyolojik sinyaller, çok hücreli organizmaların fizyolojik

gelişiminin her yönünü düzenler ve yaşam boyunca hücresel, doku ve organ fonksiyonlarının iletişimi ve koordinasyonu için oldukça önemlidir (Heldin vd 2016).



**Şekil 2.6** Hücre Döngüsünün Pozitif ve Negatif Düzenlemesini Gösteren Diyagramlar. Springer-Verlag orijinal telif hakkı sahibidir (Joyce 2012).

### 2.3.2.1. TGF- $\beta$ Süperalesinin Sınıflandırılması

TGF- $\beta$  molekülünün TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3 olarak memeli dokusundan izole edilmiş 3 izoformu bulunmaktadır (Lawrence 1996). TGF- $\beta$  süperalesi içinde ilk tanımlanan üye, normal sıçan böbrek hücrelerinden izole edilen TGF- $\beta$ 1 izoformu olmuştur. Bu moleküllerin ortak yapısal özelliği sistin ünitelerini içermesidir (Gaarenstroom ve Hill 2014). Farklı izoformların (TGF- $\beta$  1, 2, 3) etkileri hedef hücrelerin tipine, farklılaşma durumlarına ve diğer sitokinlerin varlığına bağlıdır. Örneğin, *in vitro* TGF- $\beta$  ailesinin kemik ve kıkırdak gibi destekleyici dokulardan kaynaklanan hücreler için mitojenik; diğer birçok hücre için inhibitör etkisi olduğu gösterilmiştir. Yine hücre tipine bağlı olarak uyarıcı veya inhibitör etkiler ile farklılaşmayı düzenlediği, ekstrasellüler matriks oluşumunu uyardığı, bazı hücreler için hücre göçünü sağladığı ve erken embriyogenesis sırasında mezoderm oluşumunu indüklediği gösteren çalışmalar mevcuttur.

### 2.3.2.2. TGF- $\beta$ Sinyalizasyonu

TGF sinyalizasyonu, bir TGF- $\beta$  süperailisi ligandının (BMP, GDF, anti-Müllerian hormon, activin, nodal ve TGF- $\beta$ 'lar) TGF- $\beta$  tip II reseptörüne (TGF $\beta$ RII) bağlanmasıyla başlar. TGF $\beta$ RII, TGF- $\beta$  tip I reseptörünün (TGF $\beta$ RI) fosforilasyonunu katalize eden bir serin/treonin reseptör kinazıdır. Her ligand sınıfı, spesifik bir TGF $\beta$ RII'ye bağlanır. Memelilerde bilinen yedi farklı TGF $\beta$ RI ve beş farklı TGF $\beta$ RII vardır. Fosforilasyona uğrayan TGF $\beta$ RI daha sonra reseptör-tarafından-düzenlenen SMAD'leri (R-SMAD'ler) fosforile eder ve böylece coSMAD SMAD4'ü bağlayabilir hale geçer (Frick vd 2017). R-SMAD/coSMAD kompleksleri, transkripsiyon faktörleri olarak hareket ettikleri ve hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesine katıldıkları çekirdekte birikirler (Munir vd 2004, Zi 2019). TGF- $\beta$  ligandlarından olan activin'in activin A, activin B ve activin AB olmak üzere üç formu mevcuttur. Aktivinler embriyogenez ve osteogenezde rol oynarlar. Ayrıca hipofizer, gonadal ve hipotalamik hormonların yanı sıra insülin gibi birçok hormonu da düzenlerler. Aynı zamanda sinir hücreleri için hayatta kalma faktörleridir.

BMP'ler kemik morfojenetik protein reseptörü tip-2'ye (BMPRII) bağlanırlar. Osteogenez, hücre farklılaşması, ön/arka aks spesifikasyonu, büyüme ve homeostaz dahil olmak üzere çok sayıda hücre fonksiyonunda yer alırlar. Nodal ise activin A reseptörüne tip IIB (ACVR2B) bağlanır. Daha sonra ya activin A reseptörü tip IB (ACVR1B) ile ya da activin A reseptörü tip IC (ACVR1C) ile bir reseptör kompleksi oluştururlar (Munir vd 2004, Zi 2019). TGF- $\beta$ 'lar, BMP'ler gibi, sadece embriyogenez ve hücre farklılaşmasında değil, aynı zamanda apoptozis ve diğer fonksiyonlarda da görev alırlar. TGF- $\beta$  izoformları homodimerik polipeptidlerdir ve TGF $\beta$ RII'ye bağlanırlar. Ortak yapısal elementleri paylaşmalarına karşın TGF $\beta$ RII için farklı bağlanma yatkınlıkları gösterirler. TGF- $\beta$ 1 ve - $\beta$ 3, TGF $\beta$ RII'ye yüksek afinite ile bağlanırken TGF- $\beta$ 2, TGF $\beta$ RII'ye düşük afinite ile bağlanır (Baardsnes vd 2009, Hinck vd 2016).

Önceki çalışmalar, TGF- $\beta$  süperailisi ligandlarının her monomerindeki TGF- $\beta$  reseptörlerinin bağlanma epitoplarının benzersiz olduğunu ve işlevlerinin büyük ölçüde birbirinden bağımsız olduğunu öne sürmektedir (Hinck vd 2016). TGF- $\beta$  ligandlarının reseptörleri için yüksek özgüllüğü, bağlanma epitoplarının yeniden düzenlenmesi yoluyla insan hastalıklarında terapötik uygulamalar için kullanımına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir (Zi 2019).

### 2.3.3.TGF- $\beta$ ve Kornea Endotel Hücre İlişkisi

Kornea endotel hücreleri, EGF, FGF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\alpha$ , HGF, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), keratinosit büyüme faktörü ve reseptörlerini sentezlemektedir (Wilson vd 1994, Uttamsingh vd 2007, Hata ve Chen 2016). Ön kamarada mitozu uyaracak pozitif büyüme faktörleri düşük konsantrasyonlarda bulunurken, TGF- $\beta$  gibi negatif büyüme faktörleri yüksek miktarda bulunur (Bogerd vd 2018). TGF- $\beta$ 1 ve TGF- $\beta$ 2, G1 fazı inhibitörü olan p27'nin up regülasyonunu sağlayarak (Kikuchi vd 2006) kornea endotel hücrelerinin S fazına girişini baskılar ve hücre proliferasyonunu bloke eder (Joyce vd 1996, Harris ve Joyce 1999, Kikuchi vd 2006). Diğer taraftan, TGF- $\beta$ 'nin kornea endotelinin yara iyileşmesi sırasında hücre göçünü arttırdığı bilinmektedir (Zhu vd 2012, Joko vd 2013). TGF- $\beta$ 1, kornea endotel hücrelerinin mezenkimal dönüşümünü indüklemektedir (EnMT). Primat ve insan kornea endotel hücrelerine TGF- $\beta$ 1 ilavesinin doza bağlı bir şekilde endotel fenotipinin kaybına neden olduğu gösterilmiştir (Okumura vd 2013). TGF- $\beta$ 1 ayrıca hücre morfolojisini endotelden fibroblast benzeri fenotipe dönüştürür. Bazı çalışmalarda EGF'nin bazı epitel hücrelerinde EnMT'yi indüklemek için TGF- $\beta$ 1 ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Jampel vd 1990, Kikuchi vd 2006). Son zamanlarda, bir TGF $\beta$ RI kinaz inhibitörü olan SB431542'nin kornea endotel hücrelerinde TGF- $\beta$  yolunu bloke ederek EnMT'yi durdurduğu, hücre şeklinin korunmasına katkıda bulunduğu ve ayrıca ZO-1 ve Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Okumura vd 2013, Roy vd 2015).

### 2.4. Hipotez

Hipotez 1: TGF- $\beta$  inhibitörü (ITD-1) ve TGF- $\beta$  reseptör inhibitörü (SB431542) kornea endotel hücrelerinin proliferasyonunu artırır.

Hipotez 2: TGF- $\beta$  inhibitörü (ITD-1) ve TGF- $\beta$  reseptör inhibitörü (SB431542) kornea endotel hücrelerinin yaşlanmasını önler.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. İnsan Kornea Endotelial Primer Hücre Dizini ve Kullanılan Çözeltiler

İnsan kornea endotelial primer hücre hattı, Celprogen firmasından T25 hücre flaskında canlı hücre olarak temin edildi (Celprogen- 36081-13-T25; Pasaj 2). Yaklaşık %95 oranında adherent, %5 oranında süspansiyon olan hücre popülasyonunun kültür ortamı 24-48 saatte bir hücre kültürü ortamı değiştirildi.

1. Serum içeren HCEC medyum (Celprogen, M36081- 13S)
2. Serumsuz HCEC medyum (Celprogen, M36081-13)
3. Ekstraselüler matriks ile kaplı flask (Celprogen, E36081-13-T25)
4. Ekstraselüler matriks ile kaplı 6-well-plate (Celprogen, E36081-13-6-well)
5. Ekstraselüler matriks ile kaplı 96-well-plate (Celprogen, E36081-13-96-well)
6. Dondurma medyum (Celprogen, M36081-13FM)
7. EDTA içeren 1X PBS solüsyonu (Celprogen- P1408-013)
8. 1X Tripsin EDTA Solüsyonu (Celprogen- T1509-014)
9. TGF- $\beta$  İnhibitör (ITD-1) (Cayman-23326)
10. TGF- $\beta$ 1 Reseptör İnhibitörü (SB431542): (Cayman-13031)
11. TGF- $\beta$ 1 (Peprotech HEK 293 derived)

#### 3. 2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması

İnsan kornea endotel hücreleri steril besiyerinde, +37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler 2 günde bir besi yeri değiştirilerek takip edildi. Hücreler %60 ila %70 doluluğa ulaştıkları, yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. T25'lik flasklarda pasajlama işlemi için;

1. Flaskta mevcut halde bulunan medyum çekildi ve 1X PBS steril solüsyonuyla 2 ml PBS ile, 2-3 dk 1 kez yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı.



2. Flaska damla damla 2 ml tripsin eklenerek flaksın her tarafını kaplaması sağlandı. Ardından tripsinizasyon işleminin gerçekleşmesi için 3-4 dk inkübatörde bekletildi.

3. Süre bitiminde flaskın kenarına nazikçe vurulup kalan hücrelerin de zeminden uzaklaştırılması sağlandı ve invert mikroskopta (Olympus, CKX41SF Ters Faz Kontrast Mikroskobu) değerlendirilerek hücrelerin yüzdüğü teyit edildi.

4. Tripsin aktivasyonunu durdurmak için tripsinle eşit hacimde 2 ml serumlu medyum flaska eklendikten sonra flask içeriği nazikçe tüm alt duvarı yıkayacak şekilde birkaç kez pipetaj yapıldı ve ortam nötralize edildi.

5. Sonrasında hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril falkon tüplerinde toplandı ve 100 g'de 7 dakika santrifüjlendi.

6. Santrifüj sonrası tüplerin üstünde kalan süpernatant atıldı, altta kalan pellet üzerine 500 µl taze serumlu medyum eklenerek resüspanse edildi.

7. Elde edilen hücre süspansiyonu, üzerine 5 ml taze serumlu medyum eklenerek T25 flasklara pasajlandı.

8. Hücreler, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş bir inkübatörde inkübe edildi ve her 24 ila 48 saatte bir medyum değiştirilerek takip edildi.

### **3. 3. Hücrelerin Çözdürülmesi**

Hücre kültürünün canlılığını korumak ve kültürün daha hızlı iyileşmesini sağlamak için hücrelerin doğru şekilde çözülmesi hayati önem taşımaktadır. DMSO gibi bazı kriyoprotektanlar 4°C'nin üzerinde toksiktir, bu nedenle hücrelerin hızlı bir şekilde çözülmesi (<1 dakika) ve toksik etkileri en aza indirmek için büyüme medyumunda serumla seyreltilmesi önemlidir. Kısaca, donmuş hücreleri içeren kriyotüp kuru buzdan veya sıvı nitrojen buhar fazından çıkartıldı ve hemen bir çalkalayıcıda 37°C'lik su banyosuna alındı. Kriyotüp 37°C'lik su banyosunda hafifçe döndürülerek hücre hızlı bir şekilde çözdürüldü (<1-2 dakika). Tüpe %70'lik alkol püskürtüldü ve çözülmüş tüp flaska alındı.

### **3. 4. Hücrelerin Dondurulması**

Daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere hücrelerin bir kısmı stoklandı. Bunun için başlangıçtaki basamaklar hücrelerin pasajlanması işlemleri ile aynı olmak üzere;

1. T25 flaskta %70-80 konfluent olduktan sonra hücrelerin üzerindeki besi yeri çekildi ve 2 ml PBS flaskın duvarından yavaşça verilerek flaskın tüm yüzeyini kaplaması sağlanarak yıkama işlemi yapıldı ve PBS geri çekildi.

2. T75 flask için 2 ml tripsin damla damla eklenerek hücreler kaldırıldı. Flask 2 dk boyunca inkübatörde bekletildi.

3. İşlem sonunda zemine yapışık hücre kalmadığı invert mikroskopla gözlemlendikten sonra 4 ml taze serumlu medyum eklendi ve enzim aktivasyonu durduruldu.

4. Hücreleri dondurmak için de hücre sayımı yapıldı.

5. Dondurmak için hedeflenen hücre sayısı 500.000-1.000.000 arası olarak kabul edildi. Hücreler sayıldıktan sonra, uygun miktarlar kriyotüplere aktarıldı ve üzerlerine dondurma medyumunu eklendi (Her bir kriyotüp toplam 1 ml oldu).

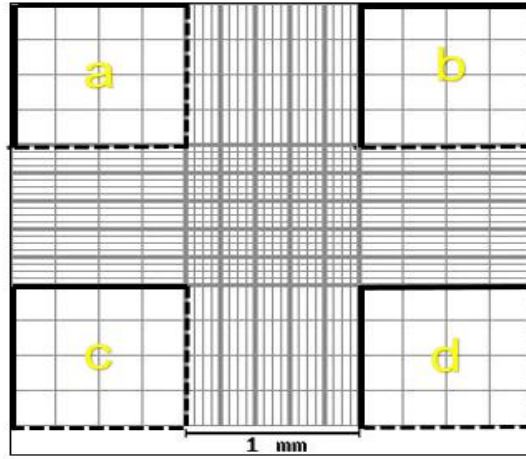
6. Kademeli dondurma yapmak için izopropil alkol içeren dondurma kabı (*freezing container*) içinde en az 4 saat  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de tutularak daha sonra  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmak üzere kaldırıldı.

### 3.5. Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı yukarıda anlatılan şekilde tripsinize edilip daha sonra nötralize edilen flasktan yapıldı. Flask içerisinde homojenize edilen medyum ve hücre karışımından 0,5 ml bir ependorfa alınarak sayım işlemine geçildi.

Hücre sayımı bu ependorftan 10  $\mu\text{L}$  pipetaj ile alınarak Neubauer lamında yapıldı. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi Neubauer lamında harflerle belirtilen karelerin hacmi  $1\text{ mm}^3$  tür. Bu dört alandaki sayıma karelerin sol ve üst kenarlarının üzerindeki hücreler dahil edildi.

Tüm bu alanlardaki hücreler (N) sayıldı.  $N = a+b+c+d$ ;  $1\text{ mm}^3$  teki hücre sayısı =  $(N/4) \times 10^4$  formülüne göre hesaplandı.



Neubauer lameli  
 SAYILAN ————  
 SAYILAMAYAN - - - - -

**Şekil 3.1** Neubuer Lamı

### 3.6. Proliferasyon Deneyleleri

#### Deney Grupları

1. Kontrol
2. TGF-  $\beta$ 1 (1 ng/ml)
3. TGF-  $\beta$ 1 (2 ng/ml)
4. TGF-  $\beta$ 1 (5 ng/ml)
5. TGF-  $\beta$ 1 (10 ng/ml)
6. TGF- $\beta$  inhibitör (ITD-1) (1  $\mu$ M)
7. TGF- $\beta$  inhibitör (ITD-1) (3  $\mu$ M)
8. TGF- $\beta$  inhibitör (ITD-1) (10  $\mu$ M)
9. TGF- $\beta$  inhibitör (ITD-1) (30  $\mu$ M)
10. TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörü (SB431542) (1  $\mu$ M)
11. TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörü (SB431542) (3  $\mu$ M)
12. TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörü (SB431542) (10  $\mu$ M)
13. TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörü (SB431542) (30  $\mu$ M)

Proliferasyon deneyleleri sonucunda seçilen dozlardaki TGF-  $\beta$ 1, ITD-1 ve SB431542 kombine uygulandı.

1. TGF-  $\beta$ 1 (2 ng/ml)+TGF- $\beta$  inhibitör (10  $\mu$ M)
2. TGF-  $\beta$ 1 (2 ng/ml)+TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörü (10  $\mu$ M)

## BrdU Testi

1. Her grup üçlü olarak 96 kuyulu plakalara daha önce bahsettiğimiz şekilde her kuyuda 20.000 hücre olacak şekilde ekim gerçekleştirildi.
2. Hücreler konfluent olunca deneyler için bahsedilen dozlarda, 24 saat ve 48 saat olacak şekilde serumsuz medyum içerisinde tedavi ajanları ile, 37°C'de CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübe edildi.
3. Hücrelerde proliferasyon ölçümleri, ab126556 BrdU Hücre Proliferasyon ELISA Kiti (Kolorimetrik) kullanılarak yapıldı (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1** BrdU Kit İçeriğinin Hazırlanması

	Miktar	Saklama Koşulları
500X BrdU Reaktif	15 µL	+2 - 8°C
Sabitleme Solüsyonu	2 x 20 mL	+2 - 8°C
Önceden seyreltilmiş anti-BrdU Antikoru	20 ml	- 20°C
Solüsyonu Durdurma	25 ml	+2 - 8°C
Peroksidaz Keçi anti-fare IgG (2.000X)	15 µL	- 20°C
Konjugat Seyreltici	25 ml	+2 - 8°C
TMB Peroksidaz Substratı	25 ml	+2 - 8°C
Plaka Yıkama Solüsyonu (50X)	90 ml	+2 - 8°C

### **Reaktiflerin Hazırlanması**

Tüm reaktifler kullanımdan 4 saat önce oda sıcaklığına (18-25°C) getirildi.

#### **1. 1X BrdU Reaktif**

3 mL hücre ortamına 6 µL BrdU stoku ekleyerek 500X konsantre stoğu 500 kat seyreltildi.

#### **2. 1X Plaka Yıkama Tamponu**

50X Plaka Yıkama Konsantresini 40 mL'ye 1.960 mL distile su ekleyerek 50 kat seyreltildi.

#### **3. Peroksidaz Keçi Anti-Fare IgG Konjugatı**

Sağlanan Konjugat Seyrelticiden 12 mL'ye 6 µL ekleyerek Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG Konjugatını 2.000 kat seyreltildi. Seyreltikten sonra, bu çözelti 0,22 µm'lik bir şırınga filtresi kullanılarak filtrelendi.

#### 4. Sabitleme Solüsyonu

Reaktif kullanıma hazırды.

#### 5. Önceden Seyreltilmiş Anti-BrdU Dedektör Antikoru

Reaktif kullanıma hazırды.

#### Deney Prosedürü

- Hücre Ekimi:** Steril bir 96 kuyulu plaka kullanılarak, hücre kültürü ortamında  $2 \times 10^5$  hücre/kuyu olacak şekilde ekim yapıldı. Plakadaki kuyuların bir kısmı birkaç kontrol için ayrıldı. Bunlar, hücresiz (yalnızca ortam içeren) ve hücre içeren ancak BrdU reaktifi olmayan kuyular şeklindeydi.
- Tedavi Ajanlarının Eklenmesi:** Tedavi ajanları BrdU analizi ile seçilen son konsantrasyonlarında medyum içerisinde çözünerek tabanı hücre ile kaplı test kuyularının üstüne  $100 \mu\text{L}/\text{kuyu}$  olacak şekilde eklendi.
- BrdU'nun Eklenmesi:** Test kuyularına 1X BrdU  $20 \mu\text{L}$  hacimde eklendi. Test 2-24 saat inkübe edildi.
- Fiksasyon Basamağı:** BrdU'yu hücre içine alan proliferatör hücrelerin anti-BrdU monoklonal antikoru ile işaretlenmeleri için, hücrelerin fikse edilmesi ve DNA'nın denature edilmesi gerekmektedir. Kuyucuklardaki medyum aspire edildikten sonra  $200 \mu\text{L}/\text{kuyu}$  olacak şekilde fiksasyon solüsyonu eklendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde, fiksasyon solüsyonu aspire edildi ve plaka kurutuldu. Bu aşamada fiksasyonu tamamlanan hücre plakaları  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanabilmektedir.
- Yıkama:** Plakalar 1X Yıkama tamponu ile üç kez yıkandı. Son yıkamadan sonra, yıkama solüsyonu aspire edildi ve kâğıt havlu üzerinde kurutuldu.
- Dedektör Antikoru Eklenmesi:**  $100 \mu\text{L}/\text{kuyucuk}$  anti-BrdU monoklonal dedektör antikoru eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.
- Yıkama:** Adım 5'teki gibi yıkandı.
- Peroksidaz Keçi Anti-Fare igG Konjugat Hazırlanması ve Eklenmesi:**  $100 \mu\text{L}/\text{kuyu}$  olacak şekilde 1X Peroxidase Keçi Anti-Fare IgG Konjugatı ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- Yıkama:** Adım 5'teki gibi yıkandı. Sonra tüm plaka distile su ile dolu bir beher içerisine daldırılarak son yıkama gerçekleştirildi ve kurumaya bırakıldı.
- TMB Peroksidaz Substratının Eklenmesi:**  $100 \mu\text{L}/\text{kuyu}$  olacak şekilde, TMB Peroksidaz Substratı eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Pozitif kuyucuklar, proliferatör hücreler mavi renkte görüldü.

**11. Durdurma Solüsyonu Eklenmesi ve Plakanın Okunması:** Her kuyuya 100 µL durdurma solüsyonunu eklenerek reaksiyon durduruldu. Pozitif kuyuların rengi maviden parlak sarıya değişti. 450 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrik mikrotitre plaka okuyucu kullanarak optik dansite belirlendi.

### 3.6.1. Tedavi Ajanlarının Hazırlanması

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$  formülü ile hesaplandı.

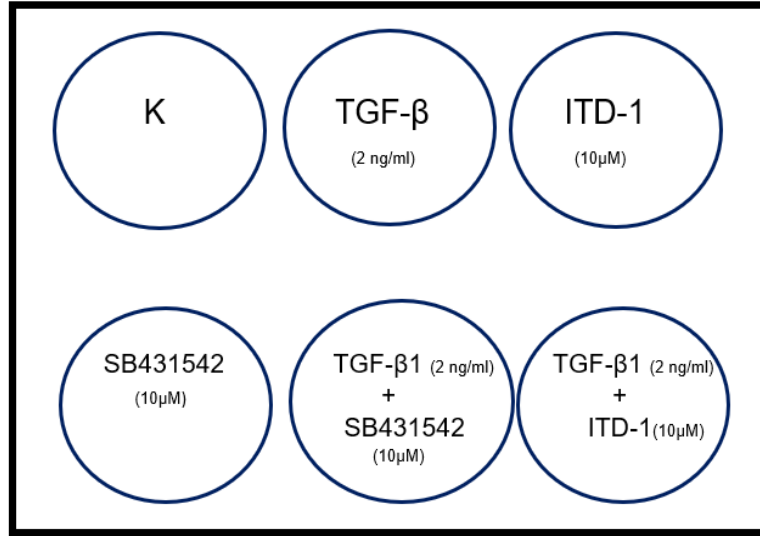
1. **TGF-β1:** 10 µg TGF-β1, 100 µl serumsuz medyum içerisinde çözüldü ve stok 100 µg/ml olarak hazırlandı. 2 ng/ml istenen konsantrasyon son volüm 1500 µl olacak şekilde hazırlandı.
2. **TGF-β İnhibitör (ITD-1):** 10 mg ITD-1, 500 µl DMSO içerisinde çözüldü ve stok 24070 µM olarak hazırlandı. 10 µM istenen konsantrasyon son volüm 1500 µl olacak şekilde hazırlandı.
3. **TGF-β1 Reseptör İnhibitörü (SB431542):** 10 mg SB431542, 500 µl DMSO içerisinde çözüldü ve stok 52029 µM olarak hazırlandı. 10 µM istenen konsantrasyon son volüm 1500 µl olacak şekilde hazırlandı.

### 3.7. Hücre Yaşlanması, TGF- β1 Ölçümleri ve PCR Deney Grupları

1. **Kontrol Grubu:** Sadece medyumla takip edilen hücreler
2. **TGF-β1 Grubu:** 2 ng/ml TGF- β1 ile muamele edilen hücreler (Peprotech, cat no#100-21)
3. **TGF-β İnhibitör Grubu:** 10µM TGF- β inhibitörü ile muamele edilen hücreler (Cayman, ITD 1, SB154352, #23326)
4. **TGF-β1 Reseptör İnhibitörü Grubu:** 10µM TGF- β reseptör inhibitörü ile muamele edilen hücreler (Cayman, SB431542 (hydrate), #13031)
5. **TGF-β1+TGF-β İnhibitör Grubu:** 2 ng/ml TGF- β1 ve 10µM TGF- β inhibitörü ile muamele edilen hücreler
6. **TGF-β1+TGF-β1 Reseptör İnhibitörü Grubu:** 2 ng/ml TGF- β1 ve 10µM TGF- β reseptör inhibitörü ile muamele edilen hücreler

Bu deney grupları için hücreler, 6 kuyulu plakalara Şekil 3.2'de gösterildiği gibi serumlu besiyeri içerisinde ekim gerçekleştirildi.

Hücreler konfluent olunca deneyler için bahsedilen dozlarda ve sürelerde serumsuz medyum içerisinde tedavi ajanları uygulandı.



**Şekil 3.2** 6 Kuyulu Plakalara Ekilmiş Deney Grupları

### 3.8. Hücre Yaşlanması

Yaşlanma fenotipinin klasik bir özelliği, yaşlanma ile ilişkili  $\beta$ -galaktosidaz (SA- $\beta$ -gal) aktivitesinin indüklenmesidir. Normal hücrelerde  $\beta$ -galaktosidaz, lizozomlarda pH 4.0'de aktive olurken yaşlanan hücrelerde pH 6.0'da aktivite gösterdiği için bu pH'da tespit edilebilmektedir. Bunun nedeni senesens ile birlikte lizozomların yapısındaki genişleme olabilmesidir. SA- $\beta$ -Gal, senesensin tespiti için 'altın standart' olarak da kabul edildiği için bu teknik kullanıldı. SA- $\beta$ -gal, yalnızca yaşlanan hücrelerde bulunan, hareketsiz veya çoğalan hücrelerde bulunmayan bir aktivitedir.

Çalışmamızda 1. ve 7. günlerde SA- $\beta$ -Gal boyaması ile hücre yaşlanması görüntülendi. Tüm solüsyonlar kullanımdan hemen önce hazırlandı (Tablo 3.2). Hücresel yaşlanma belirleyici olarak ticari bir kit (Merck Millipore- *Cellular Senescence Assay Kit*-KAA002) kullanıldı.

#### Kit Bileşenleri

1. 100X Sabitleme Solüsyonu: (Part No. 2004755), 1.5 mL
2. 10X Boyama Solüsyonu A: (Part No. 2004756), 15 mL
3. 10X Boyama Solüsyonu B: (Part No. 2004754), 15 mL
4. X-gal (5-Bromo-4-Chloro3-Indolyl  $\beta$ -DGalactopyranoside) Solüsyonu: (Part No. 2004752), 1.5 mL

**Tablo 3.2** SA- $\beta$ -gal Tespit Solüsyonunun Hazırlanması

Reaktifler	1 kuyu (35 mm)	5 kuyu (35 mm)	10 kuyu (35 mm)
Boyama Solüsyonu A (10X)	200 $\mu$ L	1 ml	2 ml
Boyama Solüsyonu B (10X)	200 $\mu$ L	1 ml	2 ml
X-Gal	50 $\mu$ L	250 $\mu$ L	500 $\mu$ L
PBS	1,55 mL	7,75 mL	15,5 mL
<b>Toplam</b>	<b>2 ml</b>	<b>10 ml</b>	<b>20 ml</b>

6 kuyulu plakalara daha önce bahsettiğimiz şekilde serumlu besi yeri içerisinde hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücreler konfluent olunca, tedavi ajanları ile deney gruplarında belirtilen şekilde inkübasyon gerçekleştirildi. İlaç inkübasyonları sonrası 1. günde büyüme ortamı hücrelerden aspire edilerek aşağıda belirtilen basamaklar sırası ile uygulandı. 7 günlük hücre yaşlanması deneyi için ilaçların etkinlik kaybının önüne geçebilmek adına ilaç inkübasyonunun 3. gününde hücrelerin içerisinde bulunduğu ilaçlı serumsuz medyumlar yenilendi.

### Deney prosedürü

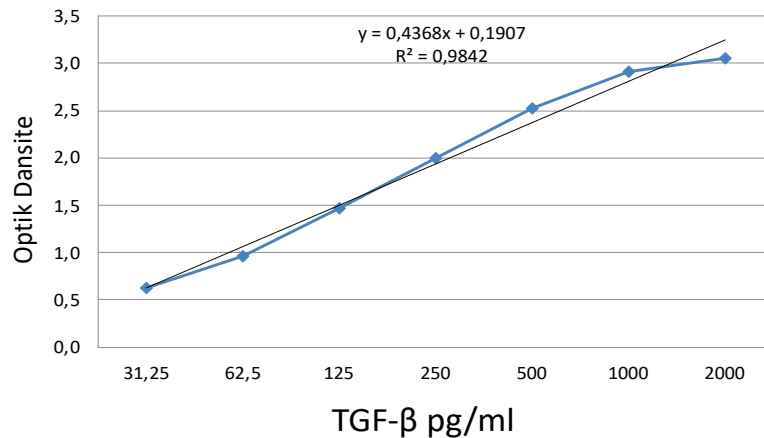
1. Hücreler 2 mL 1X PBS ile bir kez yıkandı ve PBS aspire edildi.
2. Kuyu başına 1 mL 1X fiksasyon solüsyonu eklendi. 10-15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Fiksasyon Solüsyonu aspire edildi ve hücreler 2 mL 1X PBS ile iki kez yıkandı. Her yıkamadan sonra aspire edildi.
4. Tablo 3.2'de gösterildiği gibi SA- $\beta$ -gal Ölçüm Solüsyonu, Boyama Solüsyonları A ve B, X-Gal ve PBS'yi karıştırarak taze olarak hazırlandı. Her kuyuya, 2 mL 1XSA- $\beta$ -gal Ölçüm Solüsyonu eklendi.
5. Hücreler 37°C'de CO<sub>2</sub>'siz inkübatörde ışıktan korunarak gece boyunca inkübe edildi.
6. Ertesi gün, 2 mL PBS ile iki kez hücreler yıkandı. Her yıkamadan sonra aspire edildi.



7. Işık mikroskobu (Olympus, CKX41SF Ters Faz Kontrast Mikroskobu) altında maviye boyanan hücreler görüntüledi.
8. Uzun süreli saklama için, boyanan hücreler, 1X PBS içinde seyreltilmiş %70 gliserol ile kaplandı ve 4-8°C'de saklandı.

### 3.9. TGF-β1 (Transforming Growth Factor- β1) Seviyelerinin Ölçümü

Transforming Growth Factor -Beta 1 (TGF-β1) Elisa kiti (Elabscience, E-EL-H0110, Human TGF-β1 ELISA kit) kullanılarak ölçümler gerçekleştirildi. Bu kit, sandviç enzim bağlı immünosorbent yöntemi prensibini kullanmaktadır (Tablo 3.3). Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, TGF -β1'e özgü bir antikora önceden kaplanmıştı. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plaka kuyularına eklendi ve spesifik antikor ile birleştirildi. Daha sonra, TGF -β1 ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü biyotinlenmiş bir saptama antikor, her bir mikro-plaka kuyusuna eklendi ve inkübe edildi. Serbest bileşenler yıkandı. Substrat çözeltisi her kuyuya eklendi. Yalnızca TGF-β1, biyotinlenmiş saptama antikor ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renkte görüntüledi. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve renk sarıya döndü. Optik dansite (OD), 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. OD değeri, TGF-β1 konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak numunelerdeki TGF-β1 konsantrasyonu hesaplandı (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3** TGF-β1 Standart Eğrisi

**Tablo 3.3** TGF- $\beta$ 1 Elisa Kit İçeriğinin Hazırlanması

Bileşenler	Özellikler	Depolanması
Mikro ELISA Plakası	96 kuyu	-20 °C, 6 ay
Referans Standartı	2 vial	
Konsantre Biotinlenmiş Saptama Ab (100x)	1 vial, 120 $\mu$ L	
Konsantre HRP Konjugatı (100x)	1 vial, 120 $\mu$ L	-20 °C, 6 ay
Referans Standartı ve Örnek Seyreltici	1 vial, 20 mL	4 °C, 6 ay
Biotinlenmiş Saptama Ab Seyreltici	1 vial, 14 mL	
HRP Konjugat Seyreltici	1 vial, 14 mL	
Konsantre Yıkama Tamponu (25x)	1 vial, 30 mL	
Aktivatör reaktifi 1 (1M HCL)	1 vial, 5 mL	Oda sıcaklığı, 6 ay
Aktivatör reaktifi 2 (1.2M NaOH/ 0.5M HEPES)	1 vial, 5 mL	
Substrat Reaktifi	1 vial, 10 mL	4 °C
Durdurma solüsyonu	1 vial, 10 mL	6 °C

6 kuyulu plakalara daha önce bahsettiğimiz şekilde serumlu besi yeri içerisinde  $10^6$  hücre/500  $\mu$ l hücre ekimi gerçekleştirildi. Hücreler konfluent olunca, tedavi ajanları ile deney gruplarında belirtilen şekilde 48 saat CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37°C'de inkübasyon gerçekleştirildi. İlaçlarla 48 saat inkübasyon sonrası hücreler, 500  $\mu$ l PBS ile yıkandı ve üzerine 1000  $\mu$ l PBS eklenip hücre kazıyıcı (scraper) kullanılarak kaldırıldı ve ependorflara aktarıldı. Mikrosantrifüj ile 500 g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Ependorflardaki pelletlerin üzerine 500  $\mu$ L RIPA Lizis Buffer eklenerek, her bir ependorf vortekslendi ve -80 °C'ye kaldırıldı.

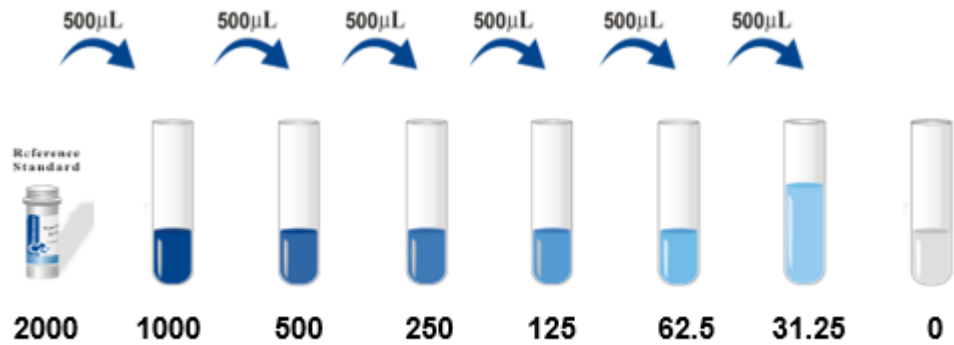
### 3.9.1. Deney Prosedürü

Kit içeriğinde bulunan tüm reaktifler, kullanmadan önce tüm reaktifleri oda sıcaklığına (18~25 °C) getirildi.

- 1. Yıkama Tamponu:** 30 mL konsantre yıkama tamponu, 720 mL distile su ile seyreltildi.
- 2. Standart Çalışma Solüsyonu:** Standart 10.000 g'de 1 dakika santrifüjlendi. 1.0 mL referans standart & örnek seyreltici eklendi ve 10 dakika bekletildi sonra birkaç kez nazikçe alt-üst edildi. Tamamen eridikten sonra pipetle iyice karıştırıldı. Bu sulandırma ile 10 pg/mL'lik bir çalışma solüsyonu elde edildi.

Ardından önerilen şekilde seri dilüsyon yapıldı 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 pg/mL.

- Seyreltme Yöntemi:** 7 tane ependorf tüpü alındı, her tüpe 500µL referans standart & örnek seyreltici eklendi. İlk tüpe 2000 pg/mL çalışma solüsyonundan 500µL pipetlendi ve 1000 pg/mL çalışma solüsyonu elde edildi. Bu adıma göre önceki tüpten ikinci tüpe solüsyondan 500 µL sırasıyla pipetlendi (Şekil 3.4). Son tüp boş olarak kabul edildi.



**Şekil 3.4** TGF-β1 Standartlarının Hazırlanması

- Biyotinlenmiş Ab Çalışma Solüsyonu:** 100µL/kuyu olacak şekilde eklendi. 100X Konsantre Biyotinlenmiş Saptama Ab'yi Biyotinlenmiş tespit Ab Seyreltici ile 1X çalışma solüsyonuna seyreltildi.
- Konsantre HRP Konjugat Çalışma Solüsyonu:** 100µL/kuyu olacak şekilde eklendi. 100X Konsantre HRP Konjugatı, Konsantre HRP Konjugat Seyreltici ile 1X olarak seyreltildi.

### Ölçüm Prosedürü

- Her kuyu için 100 µl hazırlanan standartlar ve örnekler duplike şekilde kuyulara eklendi.
- Plaka, üzeri kapatılarak, 37 °C'de 90 dakika inkübe edildi.
- Sonrasında, içindeki sıvı aspire edildi ve her kuyuya 100 µL 1X biyotinlenmiş Ab çalışma solüsyonu eklendi. Plaka yeniden 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Kuyular içindeki sıvı aspire edilerek 350 µL yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
- Sonra, her kuyuya 100 µL 1X HRP Konjugat çalışma solüsyonu eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

6. 30 dakika sonrasında, 5 kez yukarıda belirtilen şekilde yıkama gerçekleştirildi.
7. Her bir kuyucuğa 90 µL Substrate Reaktifi eklendi. 37°C'de ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi.
8. Son olarak, her bir kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi.
9. 450 nm'ye ayarlanmış mikropilaka okuyucu ile her kuyunun optik dansitesi (OD değeri) belirlendi.

**Sonuçların Hesaplanması:** Her standart ve numune için çift okumaların ortalamasını alındı. Standart konsantrasyon X ekseninde ve OD değerleri y ekseninde olacak şekilde excell programında standart eğri çizilerek hesaplama yapıldı.

### 3.10. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Gen ekspresyon düzeylerini belirlemek için yapılan PCR deneylerinde, hücre içerisindeki TGF-β1, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP-az, ZO-1, COL8A2 (tip 8 kollojen α2), Aquaporin 1, E-cadherin, SLC4A11 (*solute carrier family 4 member 11*) ve GAPDH genlerine ait mRNA miktarları belirlendi. Total RNA içerisindeki mRNA'lardan RT-PCR ile daha stabil cDNA'lar sentezlendi ve sonuçlar GAPDH ile oranlanarak değerlendirildi.

#### 3.10.1.Total RNA İzolasyonu

Tedavi ajanları ile 48 saat inkübe edildikten sonra 6 kuyulu plakaların üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı. Hücreler, 500 µl PBS ile yıkandı ve üzerine 1000 µl PBS eklenip hücre kazıyıcı (scraper) kullanılarak kaldırıldı ve ependorflara aktarıldı. Mikrosantrifüj ile 300 g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Ependorflardaki pelletlerin üzerine 500 µL Trizol (TRizol<sup>(R)</sup> Reagent, ambion by life technologies, ref 15596018) ilave edildi ve her bir ependorf vorteksledi. Hücreler, saf bir RNA eldesi için ticari kit ile total RNA izolasyonu işlemine kadar örnekler -80°C'de saklandı.

1. Trizol ile toplanan hücre pelletleri -80°C'den alındı.
2. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Ependorfların üzerine 500 µl trizol için 200 µl kloroform eklendi. 15 sn vorteksledi ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. 4°C'de 12,000 xg 15 dk santrifüj edildi. Sıvı faz yeni tüpleri alındı.

5. Örneklerin üzerine 500 µl izopropanol eklendi. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
6. 4°C'de 12,000 xg de 10 dk santrifüj edildi. Ve sonra üzeri döküldü.
7. Tüpte kalan pelletin üzerine 1 ml %75 etanol eklendi ve vortekslendi.
8. 7,500 xg de 5 dk 4°C'de santrifüj edildikten sonra üzeri döküldü.
9. Daha sonra ependorf tüpler kurumaya bırakıldı.
10. 25 µl nükleaz free water eklenerek pipetaj yapıldı.
11. Heat block da 60°C'de 10 dk inkübe edildi.
12. Son aşamada cDNA sentez aşamasına geçildi.

### 3.10.2. cDNA Sentezi

Elde edilen Total RNA, cDNA sentez kiti [A.B.T.™ cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity)] kullanılarak kit protokolüne uygun olarak cDNA'ya çevrildi. cDNA sentez aşamaları Tablo 3.4'te verilmiştir.

**Tablo 3.4** cDNA Sentez Karışımı

20 µl Ters Transkriptaz Reaksiyonu için	Hacim
10X Reaksiyon Buffer	2 µl
dNTP karışımı (her biri 2,5 mM)	1 µl
Random (rastgele) heksamer (50 µM)	2 µl
Ters transkriptaz (200 U/µl)	1 µl
RNaz İnhibitörü	0.5 µl
RNaz içermeyen Su	3.5 µl
Total RNA	10 µl

Tablo 3.5'te gösterilen reaksiyon koşullarına uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirilerek, elde edilen örnekler PCR için kullanılmak üzere -20 derecede saklandı.

**Tablo 3.5** cDNA Sentez Protokolü

RT aşamaları	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
Aşama 1	25	10 dk	1
Aşama 2	37	120 dk	1
Aşama 3	85	5 dk	1
Aşama 4	4	∞	1

### 3.10.3. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri Tablo 3.6'da gösterildi. Diziler temin edildikten sonra firmanın gönderdiği protokole uygun miktarlarda nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı. Ardından her birinin konsantrasyonu 100 µm olan stoklardan 10 kat dilüe edilip ara stok oluşturularak -20°C'de muhafaza edildi.

**Tablo 3.6** Primer Dizileri

Primer adı	Forward (sense)	Reverse (antisense)
ZO-1	ACCAGTAAGTCGTCCTGATCC	TCGGCCAAATCTTCTCACTCC
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaz	CTGTGGATTGGAGCGATTCTT	TTACAACGGCTGATAGCACCA
AQP-1	CATTTAGAGGGTGAAGGAGAAA	GAGGGAGTAGAGAACTGAAGA
COL8A2	CGACCTGAAAGCACGTCCAC	AGAGGCATTTCACTAGCAGCA
TGF- β1	CCCAGCATCTGCAAAGCTC	GTCAATGTACAGCTGCCGCA
SLC4A11	GGACATCGCACGCAGGTT	CGTCATTGAGAGACCCGAAAG
E-Cadherin	CGACCCAACCCAAGAATCTA	AGGCTGTGCCTTCCTACAGA
GAPDH	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA

Bu çalışmada 96 kuyucuklu mikrolaka okuyabilen PicoReal 96 Real-Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*) kullanılmış olup amplifikasyon ürünlerinin artışı anlık olarak takip edilebilmektedir. Sistemde, SYBR Green RealQ Plus 2x Master Mix Green Without ROX™ metodu kullanılmıştır. Primerlerin bağlanması ile az sayıdaki boya molekülü çift sarmal DNA'ya bağlanır. DNA'ya bağlanan SYBR Green moleküllerinin uyarılması, etkili şekilde ışık saçımının artmasına neden olur. Uzama aşamasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanır. Her bir siklus sonunda veri toplanarak, ışımadaki artış anlık olarak bilgisayar ekranından izlenir. Gerçek-zamanlı PCR ile kontrol grubu ve deney grupları arasındaki gen ekspresyonlarının nasıl değiştiği belirlendi. Her kuyudaki reaksiyon bileşimi Tablo 3.7'de gösterildi.

**Tablo 3.7** Reaksiyon Bileşenleri (Reaksiyon Karışımı ve Kalıp DNA)

Bileşen	Hacim/reaksiyon*	Son konsantrasyon
RealQ Plus 2x Ana Karışım	5 µl	1x
Primer F (10 µM)	0.5 µl (0.25 – 2 µl)	0.5 µM (0.1 – 0.8 µM) **
Primer R (10 µM)	0.5 µl (0.25 – 2 µl)	0.5 µM (0.1 – 0.8 µM) **
PCR-Grade H <sub>2</sub> O	3.5 µl	-
Kalıp DNA	0.5 µl	-
TOTAL Hacim***	10 µl	-

Elde edilen cDNA'lara gerçek-zamanlı PCR uygulandı. Uygulanan PCR protokolü aşağıda Tablo 3.8'de detaylandırıldı.

**Tablo 3.8** Gerçek-Zamanlı PCR Protokolü

Döngü	Döngü süresi	Sıcaklık
1 <sup>a</sup>	15 dakika	95 °C
40	15 – 30 dakika <sup>b</sup>	95 °C
	30 dakika <sup>c</sup>	55 – 65 °C <sup>d</sup>
	30 dakika	72 °C

Bu program cihaza uygulanarak reaksiyon gerçekleştirildi. Sonuçlar elde edildi ve elde edilen Ct değerlerinden istatistiksel analiz yapıldı. Sonuçlar GAPDH ve Beta-aktin ile normalize edilerek Ardından,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü ile hesaplama yapıldı. Çıkan sonuçların ortalaması alınarak gen ekspresyonunun gruplar arasındaki rölatif değişimleri bulundu.

### 3.11. İstatistiksel Analiz

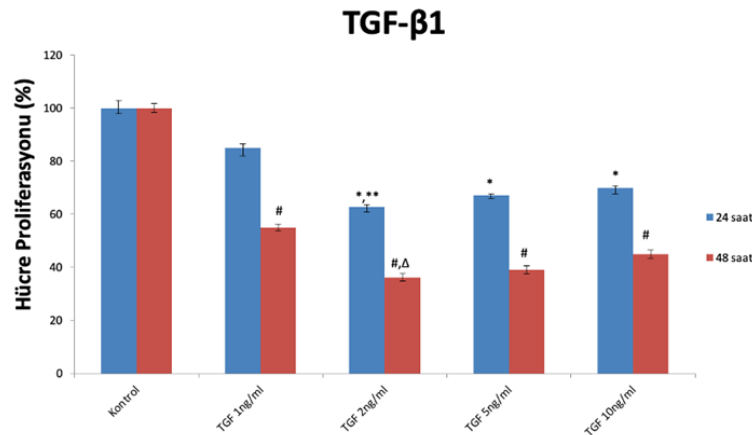
Veriler SPSS 25.0 (*IBM SPSS Statistics 25 software* (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart hata ile ifade edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları test etmek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Varyansların normalliğini ve homojenliğini test etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Anlamlı farklılıklar, *post hoc Tukey-HSD* testi ile test edildi. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. BrdU Hücre Proliferasyon Deneyi Sonuçları

#### 4.1.1. Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ 1'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Kornea endotel hücreleri TGF- $\beta$ 1'in 1-2-5-10 ng/ml arasında değişen dozları ile 24 ve 48 süresince inkübe edildi. Hücrelerin proliferasyon yeteneği BrdU analizi ile saptandı. Kornea endotel hücrelerinde 3 bağımsız TGF- $\beta$ 1 deneyi yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı. 2, 5 ve 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sonrasında hücre proliferasyonunu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttı ( $p < 0,05$ ). Ayrıca 2 ng/ml TGF- $\beta$ 1 hem 24 hem de 48 saat inkübasyon sonrasında hücre proliferasyonunu 1 ng/ml TGF- $\beta$ 1'e göre anlamlı düzeyde düşürdü ( $p < 0,05$ ). Bu nedenle Elisa ve RT-PCR deneyleri için 2 ng/ml TGF- $\beta$ 1 etkin doz olarak, 48 saat ise etkin süre olarak seçildi ve hücrelerin inkübasyonunda kullanıldı (Şekil 4.1).



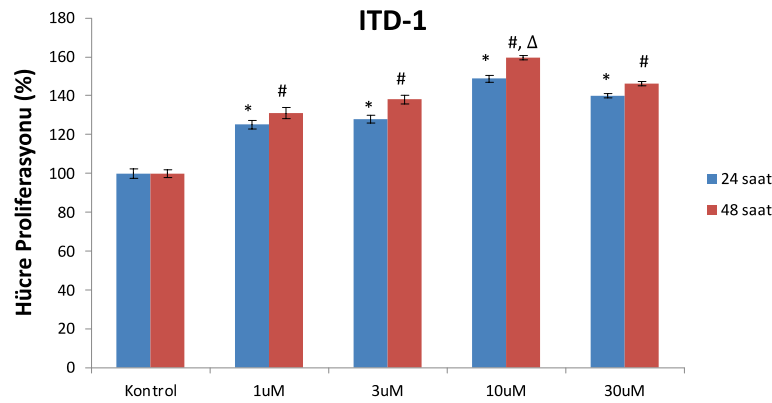
**Şekil 4.1** Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ 1'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

(TGF- $\beta$ 1'in (1-2-5-10 ng/ml) farklı dozlarında 24 ve 48 saat inkübasyonu; Ortalama  $\pm$  standart hata; n=3, \* $p < 0,05$  24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; \*\* $p < 0,05$  24 saat inkübasyon sonrası TGF- $\beta$ 1 1 ng/ml grubundan fark; # $p < 0,05$  48 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark;  $\Delta p < 0,05$  48 saat inkübasyon sonrası TGF- $\beta$ 1 1 ng/ml grubundan fark)



#### 4.1.2. Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ İnhibitörünün (ITD-1) Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Kornea endotel hücreleri, TGF- $\beta$  inhibitörünün (ITD-1) 1-3-10-30  $\mu$ M arasında değişen dozları ile 24 ve 48 saat süresince inkübe edildi. Hücre proliferasyonu BrdU analizi ile saptandı. Hücre proliferasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1, 3, 10 ve 30  $\mu$ M'lık dozlarda hem 24, hem de 48 saat inkübasyon sonrası istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ). Ayrıca 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 10  $\mu$ M ITD-1'in hücre proliferasyonunu aynı sürede 1-3-30  $\mu$ M ITD-1 ile inkübe edilen gruplara göre anlamlı düzeyde arttırdığı saptandı ( $p < 0,05$ ). Bu nedenle Elisa ve RT-PCR deneyleri için 10  $\mu$ M ITD-1 etkin doz olarak, 48 saat ise etkin süre olarak seçildi ve hücrelerin inkübasyonunda kullanıldı (Şekil 4.2).



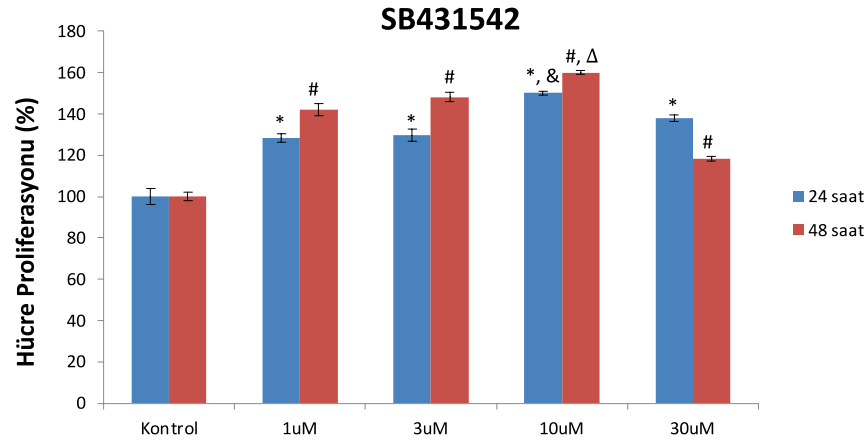
**Şekil 4.2** TGF- $\beta$  İnhibitörü Olan ITD-1'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin BrdU Analizi ile Belirlenmesi

(ITD-1'in (1-3-10-30  $\mu$ M) farklı dozlarında 24 ve 48 saat inkübasyonu; Ortalama  $\pm$  standart hata; n=3, \* $p < 0,05$  24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; # $p < 0,05$  48 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark;  $\Delta p < 0,05$  48 saat inkübasyon sonrası 1-3-30  $\mu$ M gruplarından fark)

#### 4.1.3. Kornea Endotel Hücrelerinde TGF- $\beta$ 1 Reseptör İnhibitörünün (SB431542) Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Kornea endotel hücreleri, TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörünün (SB431542) 1-3-10-30  $\mu$ M arasında değişen dozları ile 24 ve 48 saat süresince inkübe edildi. Hücre proliferasyonu BrdU analizi ile saptandı. Hücre proliferasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 1, 3, 10 ve 30  $\mu$ M'lık dozlarda hem 24, hem de 48 saat inkübasyon sonrası istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ). Ayrıca 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 10  $\mu$ M SB431542'nin hücre proliferasyonunu aynı sürede 1-3-30  $\mu$ M gruplarına göre anlamlı düzeyde arttırdığı saptandı ( $p < 0,05$ ). Bu

nedenle Elisa ve RT-PCR deneyleri için 10  $\mu$ M SB431542 etkin doz olarak, 48 saat ise etkin süre olarak seçildi ve hücrelerin inkübasyonunda kullanıldı (Şekil 4.3).

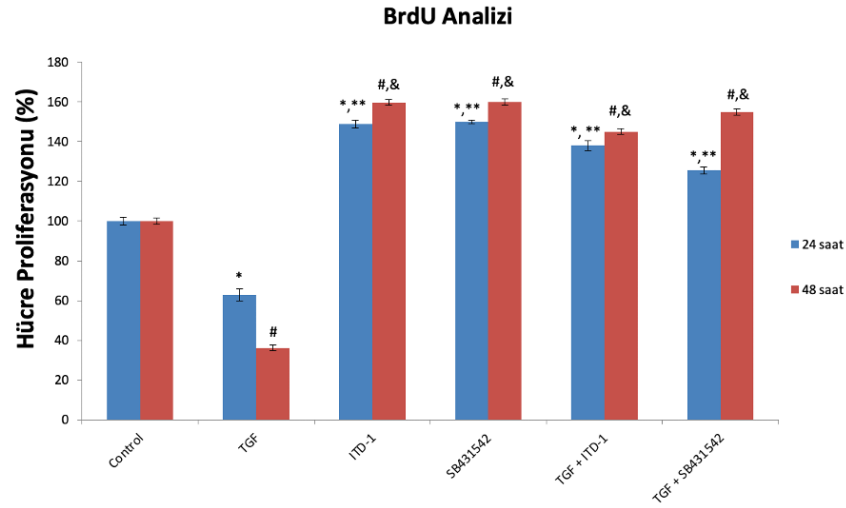


**Şekil 4.3** TGF- $\beta$ 1 Reseptör İnhibitörü Olan SB431542'in Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin BrdU Analizi ile Belirlenmesi

(SB431542'nin (1-3-10-30  $\mu$ M) farklı dozlarında 24 ve 48 saat inkübasyonu; Ortalama  $\pm$  standart hata; n=3; \*p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; #p<0,05 48 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; &p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası 1-3-30  $\mu$ M gruplarından fark; Δp<0,05 48 saat inkübasyon sonrası 1-3-30  $\mu$ M gruplarından fark)

#### 4.1.4. Kornea Endotel Hücrelerinde Tedavi Gruplarının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Kornea endotel hücrelerinde TGF- $\beta$ 1, ITD-1 ve SB431542 için belirlenen etkin dozlar kombine olarak uygulanarak 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında meydana getirdikleri hücre proliferasyonu değişiklikleri BrdU analizi ile belirlendi. Hücreler TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml), ITD-1 (10  $\mu$ M), SB431542 (10  $\mu$ M), TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+ITD-1 (10  $\mu$ M), ve TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+SB431542 (10  $\mu$ M) ile 24 ve 48 saat süresince inkübe edildi. Kornea endotel hücrelerinde 3 bağımsız deney yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı. Kontrol grubuna göre TGF- $\beta$ 1 grubu hariç diğer tüm gruplarda, hem 24 saat, hem de 48 saat inkübasyon sonrası anlamlı artış bulundu (p<0,05). Ayrıca, TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml) uygulanan grupta hücre proliferasyonu, hem 24 saat hem de 48 saat inkübasyon ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0,05). Bununla birlikte ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 gruplarında hücre proliferasyonu hem 24 hem de 48 saatte TGF- $\beta$ 1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olarak bulundu (p<0,05) (Şekil 4.4).

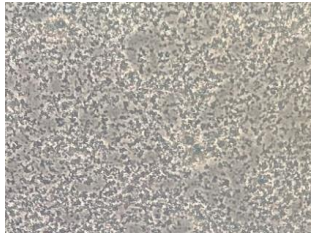
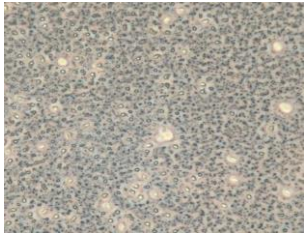
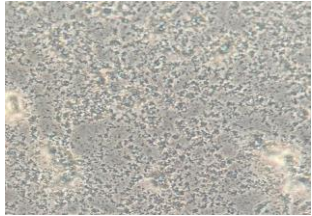
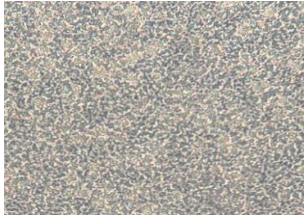
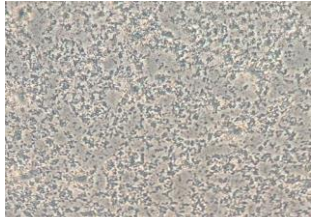
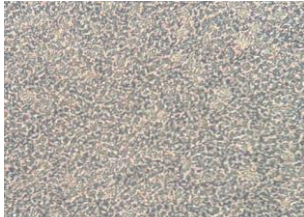
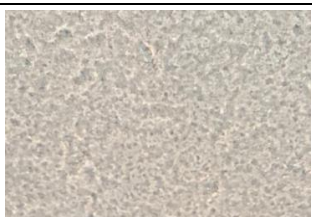
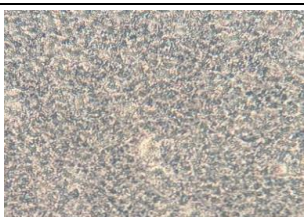
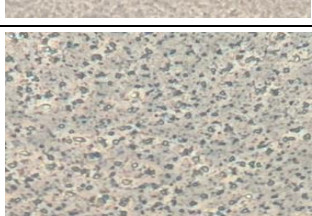
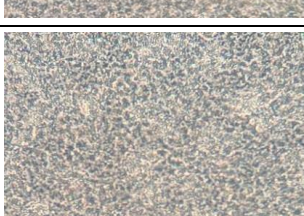
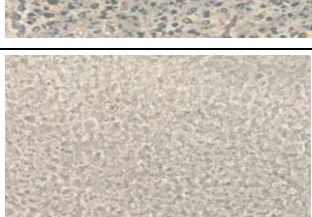
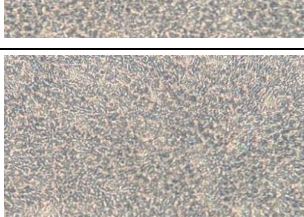


**Şekil 4.4** TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 Uygulanmasının Hücre Proliferasyonuna Etkisi

(TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml), ITD-1 (10  $\mu$ M), SB431542 (10  $\mu$ M), TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+ITD-1 (10  $\mu$ M), ve TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+SB431542 (10  $\mu$ M) uygulamaları; Ortalama  $\pm$  standart hata; n=3, \* p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; #p<0,05 48 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark, \*\*p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası TGF- $\beta$ 1 grubundan fark; &p<0,05 48 saat inkübasyon sonrası TGF- $\beta$ 1 grubundan fark)

#### 4.2. Hücresel Yaşlanma Deneyleri

TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml), ITD-1 (10  $\mu$ M), SB431542 (10  $\mu$ M), TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml) + ITD-1 (10  $\mu$ M), ve TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+SB431542 (10  $\mu$ M) ile inkübasyonu yapılan hücre grupları 1. ve 7. gün sonunda fikse edilerek SA- $\beta$ -Gal boyaması yapıldı. 7 günlük inkübasyon sonucunda hücre yaşlanması ile orantılı olan mavi rengin yoğunluğu artmış olarak gözlemlendi (Şekil 4.5).

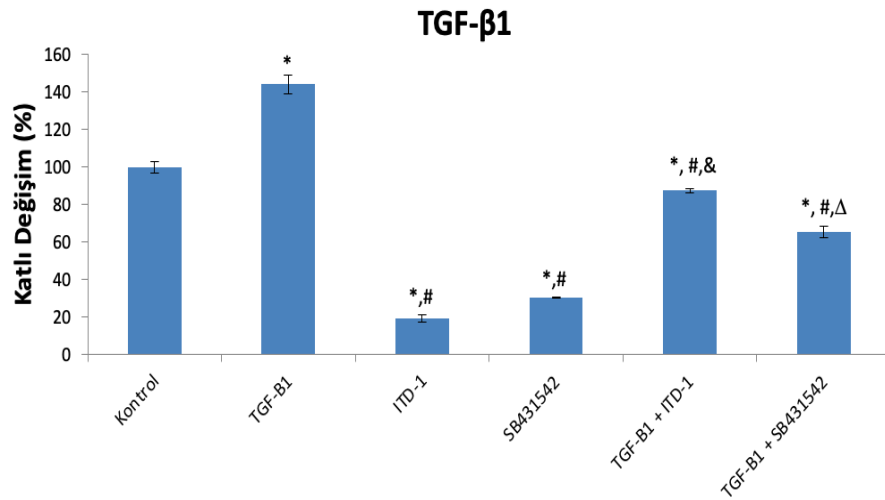
	1. Gün	7.Gün
KONTROL		
TGF- β1		
ITD-1		
SB431542		
TGF-β1+ITD-1		
TGF-β1+SB431542		

**Şekil 4.5** TGF-β1, ITD-1, SB431542, TGF-β1+ITD-1 ve TGF-β1+SB431542 ile İnkübasyonu Yapılan Hücre Gruplarının SA-β-Gal Boyaması Hücre Yaşlanmasının Görüntülenmesi

(TGF-β1 (2 ng/ml), ITD-1 (10 µM), SB431542 (10 µM), TGF-β1 (2 ng/ml)+ITD-1 (10 µM), ve TGF-β1 (2 ng/ml)+SB431542 (10 µM) ile inkübasyonu yapılan hücre gruplarında 1. ve 7. günlerde SA-β-Gal boyaması) (20X büyütme)

### 4.3.TGF- $\beta$ 1 Seviyesi Ölçümleri

Kornea endotel hücrelerinde TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml), ITD-1 (10  $\mu$ M), SB431542 (10  $\mu$ M), TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+ITD-1 (10  $\mu$ M), ve TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+SB431542 (10  $\mu$ M) ile 48 saat inkübasyonu takiben TGF- $\beta$ 1 seviyeleri ölçüldü. TGF- $\beta$ 1 seviyesi kontrol grubu ile kıyaslandığında yüzde 44,23 oranında artarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olarak saptandı ( $p<0,05$ ). ITD-1 ve SB431542 inkübasyonlarında kontrol grubu ile kıyaslandığında, TGF- $\beta$ 1 seviyelerinin sırasıyla %80,57 ve %69,52 oranında azalarak istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olarak saptandı ( $p<0,05$ ). TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 ile inkübe edilen gruplarda ise, kontrol grubu ile kıyaslandığında TGF- $\beta$ 1 seviyelerinin sırasıyla %12,64 ve %35,76 oranında azalarak istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olarak saptandı ( $p<0,05$ ). TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 grupları TGF- $\beta$ 1 grubu ile kıyaslandığında sırasıyla %56,87 ve %79,99 oranında azaldığı saptandı. TGF- $\beta$ +ITD-1 grubu yalnızca ITD-1 ile inkübe edilen grup ile karşılaştırıldığında %67,93 oranında TGF- $\beta$ 1 artışı gözlemlendi ( $p<0,05$ ). TGF- $\beta$ 1+SB431542 grubu yalnızca SB431542 ile inkübe edilen grup ile karşılaştırıldığında %33,76 oranında TGF- $\beta$ 1 artışı gözlemlendi ( $p<0,05$ ) (Şekil 4.6).



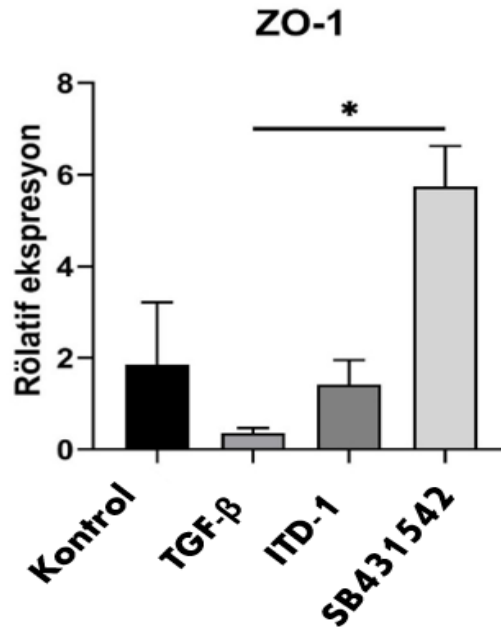
**Şekil 4.6** TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 ile 48 Saat Inkübasyon Sonrası TGF- $\beta$  Yüzde Değişimi

(TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml), ITD-1 (10  $\mu$ M), SB431542 (10  $\mu$ M), TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+ITD-1 (10  $\mu$ M), ve TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+SB431542 (10  $\mu$ M) ile 48 saat inkübasyon sonrası TGF- $\beta$  yüzde değişimi. Ortalama  $\pm$  standart hata; n=3, \* $p<0,05$  kontrol grubundan fark; # $p<0,05$  TGF- $\beta$  grubundan fark; & $p<0,05$  ITD-1 grubundan fark;  $\Delta p<0,05$  SB431542 grubundan fark)

#### 4.4. RT-PCR Sonuçları

Kornea endotel hücrelerinde, hedef genler olan TGF- $\beta$ 1, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz, ZO-1, COL8A2, Aquaporin 1, E-cadherin, SLC4A11 ve GAPDH mRNA ekspresyonları incelendi. Ancak ZO-1 ve Col8A2 dışındaki primerler ile yapılan analizlerde herhangi bir net veri elde edilemedi. Firma ve genetik anabilim dalı ile yapılan görüşmeler sonucunda özellikle cDNA sentez kiti ve primerlerde sorun olabileceği sonucuna varıldı, bu konudaki analizlerin daha sonra tekrar edilmesi için örnekler -80 dereceye kaldırıldı.

ZO-1 ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da kontrol grubuna göre, TGF- $\beta$  ve ITD-1 grubunda düşük, SB431542 grubunda ise yüksek bulundu. Ayrıca, SB431542 grubunun ZO-1 ekspresyon seviyeleri TGF- $\beta$  grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.7).

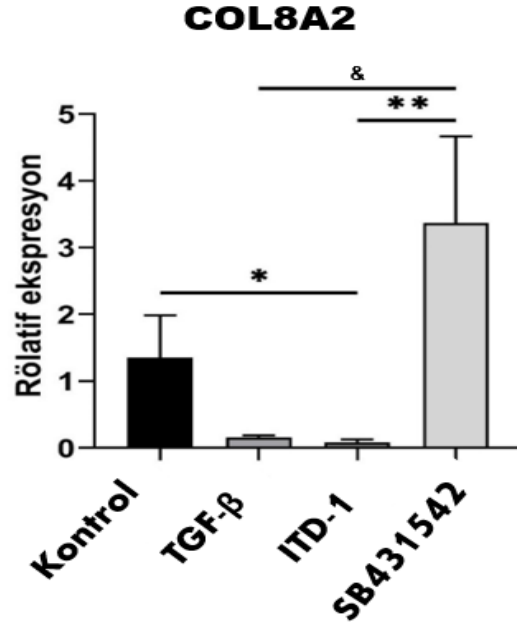


**Şekil 4.7** ZO-1 mRNA Ekspresyonunun Rölatif Değişimleri

(K: Kontrol, TGF-beta: Transforming growth factor, ITD-1: TGF- $\beta$  inhibitörü, SB431542: TGF- $\beta$  reseptör inhibitörü, ZO-1: Zonula occludens-1: Ortalama  $\pm$  standart hata; n=3, \* $p < 0,05$  TGF- $\beta$  grubundan fark)

COL8A2 ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da kontrol grubuna göre, TGF- $\beta$  grubunda düşük, SB431542 grubunda ise yüksek bulundu.

Ayrıca, ITD-1 grubunun COL8A2 ekspresyon seviyeleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p < 0,05$ ). SB431542 grubunun COL8A2 ekspresyon seviyeleri TGF- $\beta$  ve ITD-1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ( $p < 0,05$ ) (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8** COL8A2 mRNA Ekspresyonunun Rölatif Değişimleri

(K: Kontrol, TGF-beta: Transforming growth factor, ITD-1: TGF-β inhibitörü, SB431542: TGF-β reseptör inhibitörü, COL8A2: Collagen Type VIII Alpha 2 Chain; Ortalama ± standart hata; n=3, \*p<0,05 kontrol grubundan fark; &p<0,05 TGF-β grubundan fark; \*\*p<0,05 ITD-1 grubundan fark)

## 5. TARTIŞMA

Kornea endotel hücre sayısı herhangi bir nedenle azaldığında, yara onarımı sadece geride kalan sağlam hücrelerin genişlemesine ve göçüne bağlıdır (Joyce vd 1996). TGF- $\beta$ , kornea endotel hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebilmesine ve nihayetinde hücre morfolojisi ve fonksiyon değişikliğini indükleyebilmesine rağmen, TGF- $\beta$  sinyal yolu, özellikle hücre göçü (mitojenle aktive olan protein kinaz 1'i aktive ederek) sırasında kornea endotelial yara iyileşmesi için vazgeçilmezdir (Zhu vd 2012, Joko vd 2013). Daha da önemlisi TGF- $\beta$  aköz hümör içerisinde bulunan ve hücre proliferasyonunu uyaran temel fibroblast büyüme faktörünü (bFGF) dengelemektedir. Bu iki faktör arasındaki etkileşim, *in vivo* kornea endotel hücre sayısının düzenlenmesi bakımından anahtar rol oynamaktadır (Faye vd 2021).

TGF- $\beta$ 'nin üç izoformu da (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 ve - $\beta$ 3) aköz hümörde fizyolojik olarak mevcuttur (Jampel vd 2009). TGF- $\beta$ 1 ve - $\beta$ 2'nin bir G1 fazı inhibitörü olan p27(Kip1)'nin up regülasyonunu uyararak kornea endotel hücrelerinin S fazına girişini baskıladığı ve dolayısıyla proliferasyonu bloke ettiği düşünülmektedir (Harris ve Joyce 2004, Kikuchi vd 2006).

Bu çalışmada TGF- $\beta$ 1, bir TGF- $\beta$  inhibitörü (ITD-1) ve bir TGF- $\beta$  reseptör inhibitörü (SB431542)'nin insan kornea endotel hücrelerinin proliferasyon ve senesens özellikleri üzerine etkileri araştırıldı. TGF- $\beta$ 1 ile 1-2-5-10 ng/ml; TGF- $\beta$  inhibitörü (ITD-1) ile 1-3-10-30  $\mu$ M ve TGF- $\beta$ 1 reseptör inhibitörü (SB431542) ile 1-3-10-30  $\mu$ M arasında değişen dozlarda 24 ve 48 saat süresince inkübe edilen kornea endotel hücrelerinde proliferasyon özellikleri BrdU analizi ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar eşliğinde ve uygulanan tedavi ajanlarına göre, kontrol, TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml), ITD-1 (10  $\mu$ M), SB431542 (10  $\mu$ M), TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+ITD-1 (10  $\mu$ M), ve TGF- $\beta$ 1 (2 ng/ml)+SB431542 (10  $\mu$ M) olmak üzere altı çalışma grubu oluşturuldu. Her hücre grubunun proliferasyon yetenekleri tedavi ajanıyla 48 saat inkübasyonu takiben BrdU analizi ile değerlendirildi. ITD-1, bir TGF- $\beta$  inhibitörüdür ve TGF- $\beta$ RII'nin proteozomal bozulmasını indükleyerek hücre yüzeyinden uzaklaştırır. ITD-1'in memeli hücrelerinde Smad2/3'ün TGF- $\beta$  yoluyla fosforilasyonunu spesifik olarak bloke ettiği ve yaklaşık %83 oranında inhibisyon sağladığı gösterilmiştir (Willems vd 2012).



Literatürde ITD-1'in insan kornea endotel hücreleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte bu molekülün diğer dokulardaki ve kanser hücrelerindeki etkilerini bildiren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Örneğin, Yan ve ark. ITD-1'in Smad2'nin fosforilasyonu yoluyla insan glioma hücrelerinde EMT ile ilgili proteinlerin ekspresyonunu ve bu hücrelerin invazyon yeteneğini inhibe ettiğini saptamışlardır (Yan vd 2022). Mingyuan ve ark. ise hipoksik koşullar altında dermal fibroblastlarda (insan) ITD-1'in TGF- $\beta$ RII'yi inhibe ederek p-Smad2/3 seviyelerinde ve kollajen birikiminde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (Mingyuan vd 2017).

Bu çalışmada literatürde ilk kez ITD-1'in insan kornea endotel hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında insan kornea endotel hücre proliferasyonunun tüm ITD-1 dozlarında 24 ve 48 saat inkübasyon sonrasında anlamlı ölçüde artmış olduğu saptandı. Ayrıca, 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 10  $\mu$ M ITD-1'in aynı süre içerisinde 1, 3 ve 30  $\mu$ M ITD-1 gruplarına göre hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde daha fazla arttırdığı gözlemlendi. Diğer taraftan, ITD-1'in tek başına ve TGF- $\beta$ 1 ile birlikte uygulandığı iki grupta da hücre proliferasyonunun TGF- $\beta$ 1 ve kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı seviyede artmış olduğu görüldü. ITD-1 ile benzer şekilde bir TGF- $\beta$  reseptör inhibitörü olan SB431542'nin 1, 3, 10 ve 30  $\mu$ M arasında değişen dozlarına 24 ve 48 saat maruz bırakılan kornea endotel hücrelerinde hücre proliferasyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artış gösterdi. Diğer taraftan, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda 10  $\mu$ M SB431542 uygulanan hücrelerde proliferasyon oranının 1, 3, ve 30  $\mu$ M SB431542 uygulanan hücelere göre anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu bulundu. Ayrıca, SB431542'nin tek başına ve TGF- $\beta$ 1 ile birlikte uygulandığı iki hücre grubunda da hücre proliferasyonunun kontrol ve TGF- $\beta$ 1 gruplarına göre istatistiksel anlamlı seviyede artmış olduğu görüldü. Bu sonuçların, ITD-1 ve SB431542'nin TGF- $\beta$ 1'in kornea endotel hücre proliferasyonu üzerindeki baskılayıcı etkisini inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kornea endotel hücreleri, normal hücre kültürü koşulları altında morfolojik değişime uğramaktadır. Bu hücreler her ne kadar tek kat olarak organize olmuş normal poligonal bir fenotipe sahip olsalar da uzun süreli kültür veya alt kültürden sonra önemli ölçüde EnMT'ye uğrarlar. Bu nedenle, normal fizyolojik fonksiyona sahip kornea endotel hücrelerinin kültüre edilmesi oldukça zordur (Joyce 2003, 2005).

TGF- $\beta$ 'nin epitelyal mezenkimal transformasyon (EMT) sürecini başlatabildiği ve sürdürebildiği iyi bilinmektedir (Wendt vd 2009, Xu vd 2009). Smad2/3, EMT'de TGF- $\beta$  için hücre yüzeyi reseptörlerinin alt yollarındaki sinyal molekülleridir (Kaimori vd 2007). Epitelyal hücelere benzer şekilde ve yukarıda bahsedildiği üzere TGF- $\beta$ , kornea endotel hücrelerinde de hücre döngüsünü inhibe eder, ancak TGF- $\beta$ 'nin EnMT'ye nasıl yol açtığı ve bunu nasıl devam ettirdiği tam olarak bilinmemektedir. Fuchs endotelial kornea

distrofisi, psödoeksfoliasyon sendromu, endotelitis, cerrahiye bağlı kornea endotel hasarı ve kornea travması gibi kornea endotel disfonksiyonlarında EnMT gözlenmektedir (Naumann ve Schlötzer-Schrehardt 2000, Kawaguchi vd 2001, Koizumi vd 2008, Song vd 2010). Beaulieu Leclerc ve ark. TGF- $\beta$ 1'in kornea endotel hücrelerinin proliferasyon ve olgunlaşma evreleri sırasında hücre fenotipi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında; aktif proliferasyon fazı sırasında TGF- $\beta$ 1 eklenmesinin fibroblastik yapıda kornea endotel hücre proliferasyonuna neden olduğunu ve EGF varlığından bağımsız olarak hücre bağlantı belirteçleri olan ZO-1 ve N-cadherin'in kaybına neden olduğunu göstermişlerdir (Beaulieu Leclerc vd 2018). Buna karşılık, az sayıda mitojen içeren olgunlaşma ortamına TGF- $\beta$ 1 eklenmesi endotelial hücre fenotipine ve fonksiyonel hücre bağlantılarına yol açmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, Beaulieu Leclerc ve ark. kornea endotel hücre kültüründe hücrelerin olgunlaşma fazı sırasında TGF- $\beta$ 1'in eklenmesinin fonksiyonel bir endotelial bariyer oluşumunu (normal pompa ve sızıntı fonksiyonuna sahip) teşvik edebileceğini belirtmişlerdir (Beaulieu Leclerc vd 2018).

Okumura ve ark.'nın çalışmasında hem primat hem de insan kornea endotel hücrelerinin kültür koşullarında iki farklı fenotip gösterdiği (temas inhibisyonlu poligonal tek tabaka fenotipi ve fibroblastik fenotip); ancak TGF- $\beta$  reseptörünün seçici bir inhibitörü olan SB431542'nin kullanımının fibroblastik fenotipi temas inhibisyonlu fonksiyonel poligonal tek tabaka fenotipine dönüşüm yönünde etkilediği saptanmıştır (Okumura vd 2013, 2015). Ayrıca, dönüşüm gösteren bu hücrelerde ZO-1 ve Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz ekspresyonunun devam ettiği, tip 1 kollajen ve fibronektin ekspresyonu gibi fibroblastik aktivitelerin büyük ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında, Okumura ve ark.'ları TGF- $\beta$  reseptör inhibitörünün kornea endotel hücrelerinin etkin bir şekilde *in vitro* genişlemesini sağlamak üzere kullanılabileceğini savunmaktadırlar (Okumura vd 2013, 2015).

Ancak, Okumura ve ark.'nın aksine Bartakova ve ark. SB431542'nin hücre kültürü ortamına eklendiğinde benzer etkiyi göstermemesinin yanısıra, yüksek konsantrasyonlarda fibroblastik morfolojiyi indüklediğini göstermişlerdir ve düşük mitojenik ikili ortam hücre kültürü yaklaşımının kullanılmasının, güvenilir bir endotelial hücre terapi ürününün yüksek ölçekli üretimine yönelik önemli bir adım olabileceğini belirtmişlerdir (Okumura vd 2013, 2015, Bartakova vd 2018). Bartakova ve ark. ile benzer şekilde Toda ve ark. olgun insan kornea endotel hücre işlevlerine sahip ve hücre enjeksiyon tedavisi için uygun yeniden üretilebilir homojen hücre alt popülasyonunu başarılı bir şekilde elde etmek için uygun kültür protokollerini araştırdıkları çalışmalarında ortamda SB431542 varlığının geri kazanılan kornea endotel hücrelerinin sayısını büyük ölçüde azalttığını; ancak bir Rho ile ilişkili protein kinaz (ROCK) inhibitörü olan Y-27632'nin sürekli mevcudiyetinin E-oranlarını (CD işaretçileri tarafından belirlenen

efektör hücrelerin oranı) büyük ölçüde arttırdığını saptamışlardır (Bartakova vd 2018, Toda vd 2017). Wang ve ark.'da TGF- $\beta$ 1'in doza bağlı bir şekilde kornea endotel hücre proliferasyonu üzerinde inhibitör etki gösterdiğini doğrulamışlardır ve bir GSK3 inhibitörü ve Wnt aktivatörü olan CHIR99021'in TGF- $\beta$ 1 ile indüklenen korneal EnMT'yi inhibe ettiğini göstermişlerdir (Wang vd 2022).

Yukarıda belirtildiği üzere kornea endotel hücrelerinin fenotip ve fonksiyonları proliferasyon sürecinde değişebilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada proliferasyon olan hücrelerin normal endotel hücre fonksiyonlarına sahip olup olmadığını değerlendirmek üzere kontrol, TGF- $\beta$ 1, ITD-1 ve SB431542 gruplarında ZO-1 ve COL8A2 ekspresyon düzeyleri ölçüldü. SB431542 grubunda ZO-1 ekspresyon seviyeleri TGF- $\beta$ 1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. COL8A2 ekspresyonu açısından bakıldığında SB431542 grubunun COL8A2 ekspresyon seviyesi TGF- $\beta$  ve ITD-1 gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti. Diğer taraftan, ITD-1 grubunun COL8A2 ekspresyonu kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük saptandı. Bu sonuçlara göre SB431542'nin insan kornea endotel hücrelerinde ZO-1 ve COL8A2 gen ekspresyonunu arttırarak bu hücrelerin normal endotel fonksiyonlarını gösterebilmesini kolaylaştırdığı düşünülmüştür. Çünkü ZO-1, normal kornea endotel hücrelerin apikal sıkı bağlantı yüzeyinin önemli bir submembranöz proteindir ve COL8A2 ise yine endotel hücreleri tarafından üretilen bir kollajen olup kornea endotel hücre bütünlüğünün ve yapısının korunmasında potansiyel bir role sahiptir (González-Mariscal vd 2000, Wang vd 2013, Liu vd 2017). Yine bu çalışmada, ZO-1 ekspresyonu bakımından SB431542 ile ITD-1 ile arasında istatistiksel farklılık olmamasına karşın, SB431542'nin COL8A2 ekspresyonunu arttırma bakımından ITD-1'den anlamlı düzeyde üstün olduğu görülmüştür.

Literatür değerlendirildiğinde kornea endotel yetmezliğinin hücre bazlı tedavisi insan kornea endotel hücresi işlevlerinin optimize edildiği ve EnMT'nin en aza indirildiği hücre kültürü yaklaşımına bağlı olduğu anlaşılmaktadır. TGF- $\beta$ 'nin tüm işlevleri göz önüne alındığında EnMT'yi önlemek adına TGF- $\beta$ 'nin tamamen inhibe edilmesi kornea endotel hücrelerinin fizyolojik fonksiyonlarında da önemli değişikliklere neden olacağından pratik bir yaklaşım olmayacaktır. Ancak, mevcut çalışmanın sonuçlarına da dayanarak SB431542'nin fizyolojik fonksiyonların korunduğu insan kornea endotel hücrelerinin kültür ortamında üretilebilmesine hizmet edebileceği düşünülebilir.

Diğer taraftan, TGF- $\beta$  hücre proliferasyonu, hücre döngüsü regülasyonu, ROS üretimi, DNA hasarı onarımı, telomer regülasyonu ve otofaji gibi yaşlanma süreçlerinin çeşitli yönleriyle ilgili birçok düzenleyiciyi kontrol etmektedir ve TGF- $\beta$  sinyalizasyonunun hücre senesens gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Hücre senesens, çoğalma kapasitesinin kaybı, hücre döngüsünün durması, hücre şekli değişiklikleri,

metabolik yeniden programlama ve SASP salınımı gibi durumlar ile birlikte. Aslında bu değişikliklerden bazıları, kornea endotel hasarının tamirinde kornea endotel hücrelerinde görülen değişiklikler ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenle, hücre senesensin inhibisyonunun, kornea endotel hücrelerinin rejenerasyonu için anahtar bir mekanizma olabileceği öne sürülmektedir (Bae vd 2021).

Bae ve ark. TGF- $\beta$ 1'in insan kornea endotel hücrelerinde yaşlanmayı indüklediğini göstermişlerdir (Bae vd 2021). SA- $\beta$ -gal boyanması, hücre yaşlanmanın bir belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Bae ve ark. çalışmasında TGF- $\beta$ 1 uygulaması sonrasında hücre büyümesi, ROS seviyelerinde artış ve mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonu gibi senesens ilişkili diğer değişikliklerle birlikte SA- $\beta$ -gal ile boyanmış hücrelerin oranı da artmış olarak bulunmuştur (Bae vd 2021). Diğer taraftan, aynı çalışmada miR-30c-1'in TGF- $\beta$ 1 ilişkili hücre yaşlanmasını iyileştirerek ve hücre ölümünü azaltarak insan kornea endotel hücrelerinin çoğalmasını desteklediği bulunmuştur. Benzer şekilde, Li ve ark. kronik korneal greft yetmezliğinde TGF- $\beta$  seviyesinin kornea endotel hücrelerinde arttığını ve bu durumun mitokondriyal ROS üretiminde artışa ikincil olarak kornea endotel hücrelerinde senesens ve yüksek pozitif SA- $\beta$ -gal oranına yol açtığını göstermişlerdir (Li vd 2018).

Kornea endotel hücre senesensinin önlenmesi veya iyileştirilmesi üzerine çeşitli çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, Wei ve ark. kojic asitin hücre kültüründe kornea endotel hücrelerde senesensin inhibe ettiğini saptamışlardır (Wei vd 2019). Hongo ve ark. ise kültür stresinin neden olduğu p38 MAPK aktivasyonunun hücre yaşlanmayı indükleyen nedensel bir faktör olabileceğini ve bir p38 MAPK inhibitörü olan SB203580'in senesensin önleyerek yeterli sayıda fonksiyonel kornea endotel hücresi elde edilmesine katkı sağladığını göstermişlerdir (Hongo vd 2017).

Çalışmamızda, TGF- $\beta$ 1, ITD-1, SB431542, TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 ile muamele edilen insan kornea endotel hücre gruplarının 1. ve 7. günde SA- $\beta$ -Gal boyanması ile senesens özellikleri değerlendirildi. Buna göre, 1.gün görüntülerine bakıldığında SB431542 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 uygulanan hücrelerde SA- $\beta$ -Gal boyanan hücre yoğunluğunun kontrol, TGF- $\beta$ 1, ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+ITD-1 gruplarına göre daha az olduğu izlenmekle birlikte 7.gün senesens görüntülerinin tüm gruplarda benzer olduğu gözlemlendi. Bu bulgulara bakarak tedavi devamlılığı ile ilişkili olarak SB431542 uygulamasının insan kornea endotel hücre kültüründe senesens üzerine olumlu etkileri olabileceği kanısına varılmıştır.

Bu çalışmada ayrıca tüm gruplarda uygulanan tedavi ajanlarının TGF- $\beta$ 1 seviyeleri üzerine etkileri de ayrıca değerlendirildi. TGF- $\beta$ 1 grubunda TGF- $\beta$ 1 seviyesi kontrol grubuna göre yaklaşık %44 oranında istatistiksel anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Sadece ITD-1 veya SB431542 uygulanan hücre gruplarında TGF- $\beta$ 1 seviyesi

kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %80 ve %69 oranında anlamlı seviyede düşük olarak saptandı. TGF- $\beta$ 1+ITD-1 ve TGF- $\beta$ 1+SB431542 ile inkübe edilen gruplarda ise, kontrol grubu ile kıyaslandığında TGF- $\beta$ 1 seviyelerinin sırasıyla yaklaşık %12 ve %35 oranında azalarak istatistiksel anlamlı seviyede düşük olarak bulundu. Aynı gruplar TGF- $\beta$ 1 grubu ile kıyaslandığında ise TGF- $\beta$ 1 seviyesinin yaklaşık %56 ve %79 oranında azalmış olduğu görüldü. TGF- $\beta$ +ITD-1 grubu yalnızca ITD-1 ile inkübe edilen grup ile karşılaştırıldığında %67,93 oranında TGF- $\beta$  artışı gözlemlendi. TGF- $\beta$ 1+SB431542 grubu yalnızca SB431542 ile inkübe edilen grup ile karşılaştırıldığında ise bu oran %33,76 idi.

Tez çalışmamızın tüm sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, insan kornea endotel hücre kültür ortamının ITD-1 ve SB431542 ile muamelesi TGF- $\beta$  seviyesini azaltmakla birlikte hücrelerin proliferasyonu, fonksiyonu ve yaşlanması üzerine farklı etkiler yaratmıştır. Bu bulguların TGF- $\beta$  sinyalizasyon yollarının karmaşık yapısı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

## 6. SONUÇLAR

TGF- $\beta$ 1'in insan kornea endotel hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve kültür ortamında EnMT sürecini indüklediği; ancak diğer taraftan yara iyileşmesi sürecinde hücre göçünü kolaylaştırdığı bilinmektedir.

1. Bu çalışmada hücre kültürü ortamında TGF- $\beta$ 1'in insan kornea endotel hücre proliferasyonunu azalttığı; ancak bir TGF- $\beta$  inhibitörü olan ITD-1 ve bir TGF- $\beta$  reseptör inhibitörü olan SB431542'nin tek başlarına veya TGF $\beta$ -1 ile birlikte uygulandıklarında hücre proliferasyonunu arttırdığı gösterildi.
2. Sadece SB431542 uygulanan hücrelere bakıldığında hücre proliferasyon oranının artmasının yanı sıra normal kornea endotel fonksiyonlarının göstergesi olarak ZO-1 ve COL8A2 ekspresyonlarının artmış olduğu görüldü.
3. Diğer taraftan SB431542 ile ITD-1 ile arasında ZO-1 ekspresyonu bakımından anlamlı farklılık bulunmamasına karşın, SB431542'nin COL8A2 ekspresyonunu artırma bakımından ITD-1'den üstün olduğu görüldü.
4. Hücre senesens bakımından SB431542'nin kültür ortamına eklenmesinin insan kornea endotel hücrelerindeki senesens bulgularını erken dönemde azalttığı ancak zaman içerisinde bu etkinin ortadan kalktığı görüldü.
5. Tüm bulgular ışığında TGF- $\beta$  insan kornea endotel hücrelerinde proliferasyonu baskılamakta, yaşlanmayı hızlandırmakta ve EnMT sürecini uyarmaktadır; ancak bunlarla birlikte olumlu fizyolojik etkileri sebebiyle bu molekülün tam inhibisyonu bir tedavi yaklaşımı olarak kullanılamamaktadır.
6. Diğer taraftan her ne kadar insan kornea endotel hücreleri kültür ortamında çoğaltılabiliyor olsalarda bu süreç içerisinde EnMT ve senesens gibi faktörler kornea endotel yetmezliğinin hücre temelli tedavisinde kullanılmak üzere yeterli sayıda fonksiyonel endotel hücrelerinin elde edilmesini sınırlamaktadır.
7. Bu noktada ITD-1 ve özellikle SB431542'nin kullanılmasının önemli fayda sağlayabileceğini düşünmekteyiz.
8. Ancak, bu konunun tam olarak aydınlatılması için ITD-1 ve SB431542 inhibitörlerinin insan kornea endotel hücreleri üzerine etkilerinin incelendiği in vivo ve in vitro çalışmaların artmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

Baardsnes J, Hinck CS, Hinck AP, O'Connor-McCourt MD. T $\beta$ R-II Discriminates the High- and Low-Affinity TGF- $\beta$  Isoforms via Two Hydrogen-Bonded Ion Pairs. *Biochemistry* 2009; 48 (10): 2146–2155.

Bae Y, Hwang JS, Shin YJ. miR-30c-1 encourages human corneal endothelial cells to regenerate through ameliorating senescence. *Aging* 2021; 13 (7): 9348–9372.

Bahn CF, Glassman RM, MacCallum DK, Lillie JH, Meyer RF, Robinson BJ, Rich NM. Postnatal development of corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27 (1): 44–51.

Baldwin HC, Marshall J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. *Acta Ophthalmol Scand* 2002; 80 (3): 238–247.

Bartakova A, Kuzmenko O, Alvarez-Delfin K, Kunzevitzky NJ, Goldberg JL. A Cell Culture Approach to Optimized Human Corneal Endothelial Cell Function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59 (3): 1617–1629.

Beaulieu Leclerc V, Roy O, Santerre K, Proulx S. TGF- $\beta$ 1 promotes cell barrier function upon maturation of corneal endothelial cells. *Sci Rep*. 2018 Mar 13;8(1): 4438.

Berzat A, Hall A. Cellular responses to extracellular guidance cues. *EMBO J*. 2010; 29 (16): 2734-45.

Blanco-Mezquita JT, Hutcheon AEK, Zieske JD. Role of thrombospondin-1 in repair of penetrating corneal wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54 (9): 6262–6268.

Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res* 2012; 95 (1): 2–7.

Bogerd B, Dhubhghaill SN, Koppen C, Tassignon MJ, Zakaria N. A review of the evidence for in vivo corneal endothelial regeneration. *Surv Ophthalmol* 2018; 63 (2): 149–165.

Bourne WM. Biology of the corneal endothelium in health and disease. *Eye (Lond)* 2003; 17 (8): 912–918.

Bourne WM, Nelson LR, Hodge DO. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38 (3): 779–782.

Chen S, Mienaltowski MJ, Birk DE. Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly. *Exp Eye Res* 2015; 133: 69–80.

Chen W, Tan X, Chen X. Anatomy and Physiology of the Crystalline Lens. ***Pediatric Lens Diseases*** 2017; 21–28.

Chen WL, Lin CT, Li JW, Hu FR, Chen CC. ERK1/2 Activation Regulates the Wound Healing Process of Rabbit Corneal Endothelial Cells. ***Curr Eye Res*** 2009; 34 (2): 103–111.

Coffey RJ, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. ***Nature*** 1987; 328 (6133): 817–820.

Crooke A, Guzmán-Aranguez A, Peral A, Abdurrahman MKA, Pintor J. Nucleotides in ocular secretions: Their role in ocular physiology. ***Pharmacol & Ther*** 2008; 119 (1): 55–73.

de Jesus BB, Blasco MA. Assessing cell and organ senescence biomarkers. ***Circ Res*** 2012; 111 (1): 97–109.

Derynck R, Budi EH. Specificity, versatility, and control of TGF- $\beta$  family signaling. ***Sci Signal***. 2019 Feb 26;12(570): eaav5183.

Doughty MJ, Laiquzzaman M, Müller A, Oblak E, Button NF. Central corneal thickness in European (white) individuals, especially children and the elderly, and assessment of its possible importance in clinical measures of intra-ocular pressure. ***Ophthalmic Physiol Opt*** 2002; 22 (6): 491–504.

Dua HS, Said DG. Clinical evidence of the pre-Descemets layer (Dua's layer) in corneal pathology. ***Eye*** 2016; 30 (8): 1144-5.

Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. ***Prog Mol Biol Transl Sci*** 2015; 134: 7–23.

Elliott GF, Goodfellow JM, Woolgar AE. Swelling studies of bovine corneal stroma without bounding membranes. ***J Physiol*** 1980; 298 (1): 453–470.

Faye PA, Poumeaud F, Chazelas P, Duchesne M, Rassat M, Miressi F, Lia AS, Sturtz F, Robert PY, Favreau F, Benayoun Y. Focus on cell therapy to treat corneal endothelial diseases. ***Exp Eye Res*** 2021; 204: 108462.

Frick CL, Yarka C, Nunns H, Goentoro L. Sensing relative signal in the Tgf- $\beta$ /Smad pathway. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 2017; 114 (14): E2975–E2982.

Gaarenstroom T, Hill CS. TGF- $\beta$  signaling to chromatin: how Smads regulate transcription during self-renewal and differentiation. ***Semin Cell Dev Biol*** 2014; 32: 107–118.

Gage PJ, Rhoades W, Prucka SK, Hjalt T. Fate Maps of Neural Crest and Mesoderm in the Mammalian Eye. ***Invest Ophthalmol Vis Sci*** 2005; 46 (11): 4200–4208.

Ghezzi CE, Rnjak-Kovacina J, Kaplan DL. Corneal tissue engineering: recent advances and future perspectives. ***Tissue Eng Rev*** 2015; 21 (3): 278–287.

González-Mariscal L, Betanzos A, Ávila-Flores A. MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. ***Semin Cell Dev Biol*** 2000; 11 (4): 315–324.



- Gordon RA, Donzis PB. Refractive development of the human eye. **Arch Ophthalmol** 1985; 103 (6): 785–789.
- Gottsch JD, Sundin OH, Liu SH, Jun AS, Broman KW, Stark WJ, Vito ECL, Narang AK, Thompson JM, Magovern M. Inheritance of a Novel COL8A2 Mutation Defines a Distinct Early-Onset Subtype of Fuchs Corneal Dystrophy. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2005; 46 (6): 1934–1939.
- Hara S, Kawasaki S, Yoshihara M, Winegarner A, Busch C, Tsujikawa M, Nishida K. Transcription factor TFAP2B up-regulates human corneal endothelial cell-specific genes during corneal development and maintenance. **J Biol Chem** 2019; 294 (7): 2460-2469.
- Harris DL, Joyce NC. Transforming growth factor-beta suppresses proliferation of rabbit corneal endothelial cells in vitro. **J Interferon Cytokine Res** 1999; 19 (4): 327–334.
- He S, Sharpless NE. Senescence in Health and Disease. **Cell** 2017; 169 (6): 1000-1011.
- Heldin CH, Lu B, Evans R, Gutkind JS. Signals and Receptors. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2016 Apr 1;8(4): a005900.
- Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2016 Aug 1;8(8): a022053.
- Hinck AP, Mueller TD, Springer TA. Structural Biology and Evolution of the TGF- $\beta$  Family. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2016 Dec 1;8(12): a022103.
- Hongo A, Okumura N, Nakahara M, Kay EP, Koizumi N. The Effect of a p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor on Cellular Senescence of Cultivated Human Corneal Endothelial Cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2017; 58 (9): 3325–3334.
- Hoppenreijts VPT, Pels E, Vrensen GFJM, Frits Treffers W. Corneal endothelium and growth factors. **Surv Ophthalmol** 1996; 41 (2): 155–164.
- Hwang JS, Yi HC, Shin YJ. Effect of SOX2 Repression on Corneal Endothelial Cells. **Int J Mol Sci** 2020; 21 (12): 1–13.
- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. **Prog Retin Eye Res** 2000; 19 (1): 113–129.
- Jampel HD, Roche N, Stark WJ, Roberts AB. Transforming growth factor-beta in human aqueous humor. **Curr Eye Res** 1990; 9 (10): 963–969.
- Jeong GL, Kay EDP. FGF-2-Induced Wound Healing in Corneal Endothelial Cells Requires Cdc42 Activation and Rho Inactivation through the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2006; 47 (4): 1376–1386.
- Joko T, Shiraishi A, Akune Y, Tokumaru S, Kobayashi T, Miyata K, Ohashi Y. Involvement of P38MAPK in human corneal endothelial cell migration induced by TGF- $\beta$  (2). **Exp Eye Res** 2013; 108: 23–32.
- Joyce NC, Mekler B. PGE2: a mediator of corneal endothelial wound repair in vitro. **Am J Physiol**. 1994 Jan;266(1 Pt 1): C269-75.

Joyce N C, Navon SE, Roy S, Zieske JD. Expression of cell cycle-associated proteins in human and rabbit corneal endothelium in situ. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37 (8): 1566–1575.

Joyce Nancy C. Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22 (3): 359–389.

Joyce Nancy C. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res* 2005; 81 (6): 629–638.

Joyce Nancy C. Proliferative Capacity Of Corneal Endothelial Cells *Exp Eye Res* 2012; 95 (1): 16-23.

Joyce Nancy C, Meklir B, Joyce SJ, Zieske JD. Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37 (4): 645–655.

Jurkunas U v, Bitar MS, Funaki T, Azizi B. Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. *Am J Pathol* 2010; 177 (5): 2278–89.

Kabosova A, Azar DT, Bannikov GA, Campbell KP, Durbeej M, Ghohestani RF, Jones JCR, Kenney MC, Koch M, Ninomiya Y, Patton BL, Paulsson M, Sado Y, Sage EH, Sasaki T, Sorokin LM, Steiner-Champlaud MF, Sun TT, SundarRaj N, Timpl R, Virtanen I, Ljubimov A v. Compositional Differences between Infant and Adult Human Corneal Basement Membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48 (11): 4989-99.

Kaimori A, Potter J, Kaimori JY, Wang C, Mezey E, Koteish A. Transforming growth factor-beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro. *J Biol Chem* 2007; 282 (30): 22089–22101.

Kawaguchi R, Saika S, Wakayama M, Ooshima A, Ohnishi Y, Yabe H. Extracellular matrix components in a case of retrocorneal membrane associated with syphilitic interstitial keratitis. *Cornea* 2001; 20 (1): 100–103.

Khurana AK, E Khurana Bhawna, E Khurana Aruj K. Systemic Ophthalmology. *Comp Ophthalmol* 6th edition 2015; (September 30,2015): 3-433.

Kikuchi M, Zhu C, Senoo T, Obara Y, Joyce NC. p27kip1 siRNA Induces Proliferation in Corneal Endothelial Cells from Young but Not Older Donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47 (11): 4803–4809.

Koizumi N, Suzuki T, Uno T, Chihara H, Shiraishi A, Hara Y, Inatomi T, Sotozono C, Kawasaki S, Yamasaki K, Mochida C, Ohashi Y, Kinoshita S. Cytomegalovirus as an etiologic factor in corneal endotheliitis. *Ophthalmology*. 2008 Feb;115(2): 292-297.

Laing RA, Neubauer L, Oak SS, Kayne HL, Leibowitz HM. Evidence for Mitosis in the Adult Corneal Endothelium. *Ophthalmology*. 1984; 91 (10): 1129–1134.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014 15:3 2014; 15 (3): 178–196.

Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Euro Cyto Netw* 1996; 7 (3): 363–374.

Lee A, Derricks K, Minns M, Ji S, Chi C, Nugent MA, Trinkaus-Randall V. Hypoxia-induced changes in Ca<sup>2+</sup> mobilization and protein phosphorylation implicated in impaired wound healing. **Am J Physiol Cell Physiol** 2014; 306 (10): C972-85.

Lee DC, Rochford R, Todaro GJ, Villarreal LP. Developmental expression of rat transforming growth factor- $\alpha$  mRNA. **Mol Cell Biol** 1985; 5 (12): 3644-6.

Lee HT, Lee JG, Na M, Kay EDP. FGF-2 induced by interleukin-1 $\beta$  through the action of phosphatidylinositol 3-kinase mediates endothelial mesenchymal transformation in corneal endothelial cells. **J Biol Chem** 2004; 279 (31): 32325–32332.

Lee JG, Heur M. Interleukin-1 $\beta$  enhances cell migration through AP-1 and NF- $\kappa$ B pathway dependent FGF2 expression in human corneal endothelial cells. **Biol Cell** 2013; 105 (4): 175-89.

Lee JG, Jung E, Heur M. Fibroblast growth factor 2 induces proliferation and fibrosis via SNAI1-mediated activation of CDK2 and ZEB1 in corneal endothelium. **J Biol Chem** 2018; 293 (10): 3758-3769.

Lee JG, Ko MHK, Kay EDP. Endothelial mesenchymal transformation mediated by IL-1 $\beta$ -induced FGF-2 in corneal endothelial cells. **Exp Eye Res** 2012; 95 (1): 35–39.

Li C, Dong F, Jia Y, Du H, Dong N, Xu Y, Wang S, Wu H, Liu Z, Li W. Notch Signal Regulates Corneal Endothelial-to-Mesenchymal Transition. **Am J Pathol** 2013; 183 (3): 786–795.

Li J, Akiyama R, Kuang K, Fischbarg J. Effects of BSS and BSS + irrigation solutions on rabbit corneal transendothelial electrical potential difference. **Cornea** 1993; 12 (3): 199–203.

Li Z, Liu T, Ma J, Guo Q, Ma L, Lv Q, Jiang Y, Wei C, Zhang J. TGF- $\beta$  induces corneal endothelial senescence via increase of mitochondrial reactive oxygen species in chronic corneal allograft failure. **Aging (Albany NY)** 2018; 10 (11): 3474-3485.

Liu Jiayan, Wen Y, Luo W, Liu Y, Sha X. Human Amniotic Epithelial Cells Promote the Proliferation of Human Corneal Endothelial Cells by Regulating Telomerase Activity via the Wnt/ $\beta$ -catenin Pathway. **Curr Eye Res** 2020; 159–167.

Liu J, Wang L, Wang Z, Liu JP. Roles of Telomere Biology in Cell Senescence, Replicative and Chronological Ageing. **Cells**. 2019 Jan 15;8(1): 54.

Liu Y, Sun H, Hu M, Zhu M, Tighe S, Chen S, Zhang Y, Su C, Cai S, Guo P. Human Corneal Endothelial Cells Expanded *In Vitro* Are a Powerful Resource for Tissue Engineering. **Int J Med Sci**. 2017 Feb 7;14(2): 128-135.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The Hallmarks of Aging. **Cell** 2013; 153 (6): 1194-217.

Lu WJ, Tseng SC, Chen S, Tighe S, Zhang Y, Liu X, Chen SY, Su CW, Zhu YT. Senescence Mediated by p16<sup>INK4a</sup> Impedes Reprogramming of Human Corneal Endothelial Cells into Neural Crest Progenitors. **Sci Rep**. 2016 Oct 14; 6: 35166.

Massague J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol** 1990; 6: 597–641.

Matsuda M, Sawa M, Edelhauser HF, Bartels SP, Neufeld AH, Kenyon KR. Cellular migration and morphology in corneal endothelial wound repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26 (4): 443–449.

Matthaei M, Meng H, Meeker AK, Eberhart CG, Jun AS. Endothelial Cdkn1a (p21) Overexpression and Accelerated Senescence in a Mouse Model of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53 (10): 6718-27.

McKay TB, Seyed-Razavi Y, Ghezzi CE, Dieckmann G, Nieland TJF, Cairns DM, Pollard RE, Hamrah P, Kaplan DL. Corneal pain and experimental model development. *Prog Retin Eye Res* 2019; 71: 88-113.

Meek KM, Boote C. The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res* 2004; 78 (3): 503–512.

Mingyuan X, Qianqian P, Shengquan X, Chenyi Y, Rui L, Yichen S, Jinghong X. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  activates transforming growth factor- $\beta$ 1/Smad signaling and increases collagen deposition in dermal fibroblasts. *Oncotarget* 2017; 9 (3): 3188–3197.

Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium. *Ophthalmology* 1982; 89 (6): 525–530.

Morishige N, Takagi Y, Chikama T ichiro, Takahara A, Nishida T. Three-Dimensional Analysis of Collagen Lamellae in the Anterior Stroma of the Human Cornea Visualized by Second Harmonic Generation Imaging Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52 (2): 911–915.

Munir S, Xu G, Wu Y, Yang B, Lala PK, Peng C. Nodal and ALK7 inhibit proliferation and induce apoptosis in human trophoblast cells. *J Biol Chem* 2004; 279 (30): 31277–31286.

Naumann GOH, Schlötzer-Schrehardt U. Keratopathy in pseudoexfoliation syndrome as a cause of corneal endothelial decompensation: a clinicopathologic study. *Ophthalmology* 2000; 107 (6): 1111–1124.

Okumura N, Kay EP, Nakahara M, Hamuro J, Kinoshita S, Koizumi N. Inhibition of TGF- $\beta$  signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. *PLoS One*. 2013;8(2): e58000.

Okumura N, Minamiyama R, Ho LTY, Kay EP, Kawasaki S, Tourtas T, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE, Young RD, Quantock AJ, Kinoshita S, Koizumi N. Involvement of ZEB1 and Snail1 in excessive production of extracellular matrix in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Lab Invest* 2015; 95 (11): 1291–1304.

Ong Tone S, Wylegala A, Böhm M, Melangath G, Deshpande N, Jurkunas U v. Increased Corneal Endothelial Cell Migration in Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy: A Live Cell Imaging Study. *Ophthalmol Sci* 2021; 1 (1): 100006.

Petroll WM, Barry-Lane PA, Cavanagh HD, Jester J v. ZO-1 Reorganization and Myofibroblast Transformation of Corneal Endothelial Cells after Freeze Injury in the Cat. *Exp Eye Res* 1997; 64 (2): 257–267.

Petroll WM, Hsu JKW, Bean J, Cavanagh HD, Jester J v. The spatial organization of apical junctional complex-associated proteins in feline and human corneal endothelium. *Curr Eye Res* 2009; 18 (1): 10–19.

Plenz GAM, Deng MC, Robenek H, Völker W. Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. **Atherosclerosis** 2003; 166 (1): 1–11.

Roushan R. A critical review of pachaka pitta in modern physiological perspective. **Int J Res. Ayurveda Pharm.** 2020; 10 (1): 18-20.

Sabet MD, Gordon SR. Ultrastructural immunocytochemical localization of fibronectin deposition during corneal endothelial wound repair. Evidence for cytoskeletal involvement. **Biol Cell** 1989; 65 (2): 171–179.

Sage H, Trueb B, Bornstein P. Biosynthetic and structural properties of endothelial cell type VIII collagen. **J Biol Chem** 1983; 258 (21): 13391–13401.

Salotti J, Johnson PF. Regulation of senescence and the SASP by the transcription factor C/EBP $\beta$ . **Exp Gerontol.** 2019 Dec; 128: 110752.

Smeringaiova I, Paaske Utheim T, Jirsova K. Ex vivo expansion and characterization of human corneal endothelium for transplantation: a review. **Stem Cell Res Ther** 2021; 12 (1): 1–21.

Soltau JB, McLaughlin BJ. Effects of growth factors on wound healing in serum-deprived kitten corneal endothelial cell cultures. **Cornea** 1993; 12 (3): 208–215.

Song JS, Lee JG, Kay EDP. Induction of FGF-2 Synthesis by IL-1 $\beta$  in Aqueous Humor through P13-Kinase and p38 in Rabbit Corneal Endothelium. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2010; 51 (2): 822–829.

Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming Growth Factor- $\beta$ : Biological Function and Chemical Structure. **Science** 1986; 233 (4763): 532–534.

Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. **Indian J Ophthalmol** 2018; 66 (2): 190–194.

Sumioka T, Ikeda K, Okada Y, Yamanaka O, Kitano A, Saika S. Inhibitory effect of blocking TGF-beta/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium. **Mol Vis.** 2008; 14: 2272-81.

Tangvarasittichai O, Tangvarasittichai S. Oxidative Stress, Ocular Disease and Diabetes Retinopathy. **Curr Pharm Des** 2018; 24 (40): 4726–4741.

Teichmann J, Valtink M, Nitschke M, Gramm S, Funk RHW, Engelmann K, Werner C. Tissue Engineering of the Corneal Endothelium: A Review of Carrier Materials. **J Funct Biomater** 2013; 4 (4): 178-208.

Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8 (11): 857–869.

Terry MA. Endothelial keratoplasty: History, current state, and future directions. **Cornea** 2006; 25 (8): 873–878.

Thalman-Goetsch A, Engelmann K, Bednarz J. Comparative study on the effects of different growth factors on migration of bovine corneal endothelial cells during wound healing. **Acta Ophthalmol Scand** 1997; 75 (5): 490–495.

Toda M, Ueno M, Hiraga A, Asada K, Montoya M, Sotozono C, Kinoshita S, Hamuro J. Production of Homogeneous Cultured Human Corneal Endothelial Cells Indispensable for Innovative Cell Therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017 Apr 1;58(4):2011-2020.

Uttamsingh S, Bao X, Nguyen KT, Bhanot M, Gong J, Chan JLK, Liu F, Chu TT, Wang LH. Synergistic effect between EGF and TGF- $\beta$ 1 in inducing oncogenic properties of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2007; 27 (18): 2626–2634.

Walker-Brandreth K. Ophthalmology, 4th ed. *Optomet Vis Sci* 2014; 91 (7): e193.

Wang W, Xu G, Ding CL, Zhao LJ, Zhao P, Ren H, Qi ZT. All-trans retinoic acid protects hepatocellular carcinoma cells against serum-starvation-induced cell death by upregulating collagen 8A2. *J FEBS* 2013; 280 (5): 1308–1319.

Wang Y, Jin C, Tian H, Xu J, Chen J, Hu S, Li Q, Lu L, Ou Q, Xu G tong, Cui H. CHIR99021 balance TGF $\beta$ 1 induced human corneal endothelial-to-mesenchymal transition to favor corneal endothelial cell proliferation. *Exp Eye Res* 2022; 219: 108939.

Waring GO. Posterior Collagenous Layer of the Cornea: Ultrastructural Classification of Abnormal Collagenous Tissue Posterior to Descemet's Membrane in 30 Cases. *Arch Ophthalmol*. 1982; 100 (1): 122–134.

Wei X, Luo D, Yan Y, Yu H, Sun L, Wang C, Song F, Ge H, Qian H, Li X, Tang X, Liu P. Kojic acid inhibits senescence of human corneal endothelial cells via NF- $\kappa$ B and p21 signaling pathways. *Exp Eye Res* 2019; 180: 174–183.

Wendt MK, Allington TM, Schiemann WP. Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition by TGF- $\beta$ . *Future Oncol* 2009; 5 (8): 1145-68.

Willems E, Cabral-Teixeira J, Schade D, Cai W, Reeves P, Bushway PJ, Lanier M, Walsh C, Kirchhausen T, Izpisua Belmonte JC, Cashman J, Mercola M. Small molecule-mediated TGF- $\beta$  type II receptor degradation promotes cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 11 (2): 242–252.

Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 2009; 19 (2): 156–172.

Yan T, Tan Y, Deng G, Sun Z, Liu B, Wang Y, Yuan F, Sun Q, Hu P, Gao L, Tian D, Chen Q. TGF- $\beta$  induces GBM mesenchymal transition through upregulation of CLDN4 and nuclear translocation to activate TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal pathway. *Cell Death Dis*. 2022 Apr 13;13(4): 339.

Yanoff MD, Duker J. Rhegmatogenous Retinal Detachment. Ophthalmology Fifth Edition. *Elsevier* 2019; pp, 806-812.

Yee RW, Matsuda M, Schultz RO, Edelhauser HF. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Curr Eye Res* 1985; 4 (6): 671–678.

Zavala J, López Jaime GR, Rodríguez Barrientos CA, Valdez-Garcia J. Corneal endothelium: developmental strategies for regeneration. *Eye (Lond)* 2013; 27 (5): 579–588.

Zhu C, Joyce NC. Proliferative Response of Corneal Endothelial Cells from Young and Older Donors *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45 (6): 1743–1751.

Zhu Y, Li XY, Wang J, Zhu YG. Bradykinin alleviates DR retinal endothelial injury by regulating HMGB-1/NF- $\kappa$ B pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23 (13): 5535–5541.

Zhu YT, Chen HC, Chen SY, Tseng SCG. Nuclear p120 catenin unlocks mitotic block of contact-inhibited human corneal endothelial monolayers without disrupting adherent junctions. *J Cell Sci* 2012; 125 (Pt 15): 3636–3648.

Zhu YT, Tighe S, Chen SL, John T, Kao WY, Tseng SCG. Engineering of Human Corneal Endothelial Grafts. *Curr Ophthalmol Rep* 2015; 3 (3): 207–217.

Zi Z. Molecular Engineering of the TGF- $\beta$  Signaling Pathway. *J Mol Biol* 2019; 431 (15): 2644–2654.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

01.01.1991 tarihinde Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde dünyaya gelen Ebru AVCI ÖZEN ilk öğrenimini, orta öğrenimini ve lise öğrenimini Kuzey Kıbrıs Bülent Ecevit Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2016 yılında Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü bitirmiş; 2017-2018 yılları arasında Denizli'de özel bir lisede biyoloji öğretmenliği yapmıştır.2018-2019 yılları arasında Denizli'de özel bir Tıp Dershanesinde Biyolog olarak görev almıştır 2019 yılının Eylül ayında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Evli olan Ebru AVCI ÖZEN 2020 yılının Eylül ayından itibaren Açıköğretim Anadolu Üniversitesi Laboratuvar ve Veteriner Sağlık Bölümünde eğitim görmektedir.