

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**İNSAN KORNEA ENDOTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE FARKLI RHO
KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HASAN SAMED AKKAYA**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. İBRAHİM TOPRAK**

DENİZLİ - 2022

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**İNSAN KORNEA ENDOTEL HÜCRELERİ ÜZERİNE FARKLI RHO
KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. HASAN SAMED AKKAYA**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR. İBRAHİM TOPRAK**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 19.11.2020 tarih ve 2020TIPF026 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ – 2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, tezimin her aşamasında bana sabırla yol gösteren mesleğe dair azmini, çalışmalarını, başarılarını örnek aldığım tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. İbrahim TOPRAK'a,

Tez süresince yardımlarını esirgemeyen, tezin yürütülmesinde bilgilerini bana sabırla aktaran Doç. Dr. Emine KILIÇ TOPRAK ve Doç. Dr. Ayşegül ÇÖRT DÖNMEZ'e,

Tezin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Fatih ALTINTAŞ ve Doç. Dr. Onur TOKGÜN'e,

Eğitim dönemim boyunca her zaman bana destek olan bilgi ve deneyimlerini hoşgörüyüyle paylaşan tüm hocalarıma,

Birlikte çalışmaktan gurur duyduğum asistan arkadaşlarıma ve mesai arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim ve çalışma hayatımda her zaman benim yanımda olan, bugünlere gelmemde büyük emeği olan aileme,

Sevgisi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen dayanağım, sevgili eşim Ecem Dilara AKKAYA'ya sonsuz sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

TEŞEKKÜR.....	IV
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
ÖZET.....	XI
SUMMARY	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kornea Anatomisi	3
2.1.1. Kornea İnnervasyonu.....	3
2.1.2. Korneanın Beslenmesi	3
2.2. Kornea Histolojisi.....	4
2.2.1. Kornea Tabakaları	4
2.3. Kornea Endotel Tabaka Fizyolojisi.....	8
2.3.1. Kornea Saydamlığının Sağlanması	9
2.4. Kornea Endotel Tabaka Hastalıkları	10
2.4.1. Fizyolojik Kayıplar.....	10
2.4.2. Kazanılmış Endotel Yetmezlikleri.....	10
2.4.3. Endotel Distrofileri	11
2.5. Kornea Endotel Yetmezliği Tedavisi	12
2.5.1. Penetran Keratoplasti (PK).....	12
2.5.2. Lamellar Keratoplasti.....	12
2.5.3. Kornea Endotel Yetmezliği Tedavisinde Hücre Temelli Yaklaşımlar	15
2.6. RHO/ROCK ve ROCK İnhibitörleri	17
2.6.1. Rho Proteinleri	17
2.6.2. ROCK.....	18
2.6.3. ROCK'ların Fizyopatolojik Rolü ve ROCK İnhibitörleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. İnsan Kornea Endotelial Primer Hücre Dizini ve Kullanılan Çözeltiler	25

3.2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması	25
3.3. Hücrelerin Çözdürülmesi	26
3.4. Hücrelerin Dondurulması	26
3.5. Hücrelerin Sayımı	26
3.8. Human ROCK-2 Seviyelerinin Ölçümü	29
3.8.1. Reaktif Hazırlama	30
3.9. ROCK Aktivitesinin Belirlenmesi	32
3.10. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Deneyi	33
3.11. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	34
3.11.1.Total RNA İzolasyonu.....	34
3.11.2. cDNA Sentezi	34
3.11.3. RT-PCR	35
3.12. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. BrdU Hücre Proliferasyon Deneyi Sonuçları.....	38
4.1.1. Y-27632'nin Farklı Dozlarının İKEH Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	38
4.1.2. RKI-1447'nin Farklı Dozlarının İKEH Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	39
4.1.3. Y-27632 ve RKI-1447 Etkin Dozlarının İKEH Proliferasyonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	40
4.2. ROCK-2 Seviyesi Ölçümleri	41
4.3. ROCK Aktivite Ölçümleri.....	42
4.4. İKEH Yara İyileşmesi Deneyleri	43
4.5. RT-PCR Sonuçları.....	44
5.TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	52
7. KAYNAKÇA	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- D:** Diyoptri
µm: Mikrometre
µM: Mikromolar
DM: Descemet Membranı
KEH: Kornea Endotel Hücresi
İKEH: İnsan Kornea Endotel Hücresi
kda: Kilodalton
ESM: Ekstrasellüler Matriks
GAG: Glikozaminoglikan
FED: Fuchs Endotel Distrofisi
PPD: Posterior Polimorfoz Distrofi
KHED: Konjenital Herediter Endotel Distrofisi
GİB: Göz İçi Basıncı
PDK: Pre-Descemet Katmanı
DK: Dua Katmanı
PK: Penetran Keratoplasti
EK: Endotelyal keratoplasti
DLEK: Derin Lamellar Endotelyal Keratoplasti
DSEK: Descemet Soymalı Endotelyal Keratoplasti
DSAEK: Descemet Soymalı Otomatize Endotelyal Keratoplasti
DMEK: Descemet Membran Endotelyal Keratoplasti
PDEK: Pre-Descemet Endotelyal Keratoplasti
DWEK: Endotelyal Keratoplastisiz Desmatoreksis
DSO: Sadece Descemet Soyma
DMET: Descemet Membran Endotel Transferi
RhoA: Ras Homoloji Aile Üyesi A
ROCK: Rho Kinaz
GAP: GTP'az Aktive Edici Protein
GAİ: GTP'az Ayrıştırıcı İnhibitör
GNDF: Guanin Nükleotid Değişirici Faktör
RBB: Rho Bağlama Bölgesi
TA: Trabeküler Ağ

EdU: Ethynyl-2-deoxyuridine

BrdU: 5-Bromo-2-deoxyuridine

RT-PCR: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
<u>Tablo 2.1</u> ROCK İnhibitorlerinin Seçicilik Özellikleri.....	22
<u>Tablo 3.1</u> cDNA Sentez Karışımı.....	37
<u>Tablo 3.2</u> cDNA Sentez Protokolü.....	37
<u>Tablo 3.3</u> Primer Dizileri.....	37
<u>Tablo 3.4</u> RT-PCR Protokolü.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Kornea Tabakaları.....	4
Şekil 2.2 Kornea Epiteli Kesiti.....	5
Şekil 2.3 Speküler mikroskopi görüntüleri.....	8
Şekil 2.4 Endotel Hücre İyon Transport Sistemi.....	9
Şekil 2.5 Keratoplasti Çeşitleri.....	14
Şekil 2.6 DMET ve DSO uygulaması.....	17
Şekil 2.7 İntrakameral KEH Enjeksiyonu.....	17
Şekil 2.8 Rho Aktivasyonunun Düzenlenmesi.....	19
Şekil 2.9 ROCK-1/ROCK-2 yapısı.....	19
Şekil 2.10 Aktif RhoA-RBB bağlanması.....	20
Şekil 2.11 Aktive ROCK'un etkilediği enzimler.....	21
Şekil 3.1 Neubauer Lamı.....	29
Şekil 3.2 6 Kuyulu Plakalara Ekilmiş Deney Grupları.....	31
Şekil 3.3 Human ROCK-2 Standartlarının Hazırlanması.....	32
Şekil 3.4 ROCK-2 Standart Eğrisi.....	34
Şekil 4.1 Y-27632'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin BrdU Analizi ile Belirlenmesi.....	40
Şekil 4.2 RKI-1447'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin BrdU Analizi ile Belirlenmesi.....	42
Şekil 4.3 Y-27632 ve RKI-1447 Uygulanmasının Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....	43
Şekil 4.4 Y-27632 ve RKI-1447 ile 48 saat inkübasyon sonrası ROCK-2 katlı değişimi.....	44
Şekil 4.5 Y-27632 ve RKI-1447 ile 48 saat inkübasyon sonrası ROCK aktivite değişimi.....	45
Şekil 4.6 Y-27632 ve RKI-1447 ile inkübasyonu yapılan hücre gruplarının iyileşmesi görüntülenmesi.....	46

ÖZET

İnsan Kornea Endotel Hücreleri Üzerine Farklı Rho Kinaz İnhibitörlerinin Etkinliğinin Araştırılması

Dr. Hasan Samed Akkaya

İnsan kornea endotel hücreleri (İKEH) hücre döngüsünün G1/S fazında duraklamıştır ve in vivo proliferasyon kapasiteleri kısıtlıdır. İKEH'lerin kompanse edemediği bir hücre azalma durumunda kalıcı endotel yetmezliğine bağlı kornea ödemi gelişir. Günümüzde kalıcı kornea endotel yetmezliğinin tedavisi penetran veya lamellar kornea naklidir. Her ne kadar yeni tekniklerle bu cerrahilerin komplikasyonları azalmış olsa da dünya genelinde donör yetersizliği büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu sorunların aşılması için hücre temelli yaklaşımların araştırılması hız kazanmaya başlamıştır. Bu alanda ROCK inhibitörlerinin İKEH üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada farklı Rho kinaz (ROCK) inhibitörlerinin (Y-27632 ve RKI-11447) İKEH proliferasyon ve yara iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmamızda insan kornea endotel hücre hattı (Celprogen- 36081-13) kullanılarak kontrol, Y-27632 ve RKI-1447 deney grupları oluşturuldu. Bu hücre gruplarında proliferasyon yetenekleri BrdU analiziyle, yara iyileşmesi ImageJ programı ile, ROCK aktivitesi ve ROCK-2 seviyeleri ELISA yöntemi ile değerlendirildi. BrdU analizi ile RKI-1447'nin etkin dozu 1 µM, Y-27632'nin etkin dozu 10 µM olduğu saptandıktan sonra her iki ROCK inhibitörünün hücre proliferasyonunu kontrol grubundan; RKI-1447'nin ise Y-27632 grubundan daha fazla uyardığı saptandı ($p<0.05$). Yara iyileşmesi deneyinde RKI-1447'nin endotel yara iyileşmesini kontrol ve Y-27632 grubundan daha fazla uyardığı saptandı ($p<0.05$). Y-27632'nin yara iyileşmesini ilk 24 saatte kontrol grubuna göre fazla ($p<0.05$) ancak 48. saatte ise benzer seviyede uyardığı saptandı ($p>0.05$). Tedavi ve kontrol gruplarında ROCK-2 seviyesi ve ROCK aktivitesi ELISA ile çalışıldı. Y-27632 ve RKI-1447 gruplarında ROCK-2 seviyesi ve aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalmış olsa da RKI-1447'nin ROCK aktivitesini Y-27632'ye göre daha fazla azalttığı ($p<0.05$), Y-27632'nin ROCK-2 seviyesini RKI-1447'ye göre daha fazla azalttığı saptandı ($p<0.05$). Bu bulgular sonucunda RKI-1447'nin İKEH proliferasyonu, yara iyileşmesi ve ROCK aktivitesinin baskılanması

açısından Y-27632'den daha potent olduğu anlaşıldı. Halihazırda Y-27632, kalıcı kornea endotel yetmezliği tedavisinde potansiyel bir tedavi ajanı olarak görölmektedir. Bu bulgulara göre Y-27632'den daha potent ve daha spesifik bir ROCK inhibitörü olan RKI-1447 kalıcı endotel yetmezliği tedavisinde etkili olabileceğini görüşünderiz.

Anahtar Kelimeler: Kornea, Endotel, Proliferasyon, Yara iyileşmesi, ROCK inhibitör, Y-27632, RKI-1447

SUMMARY

Investigation of the Effectiveness of Different Rho Kinase Inhibitors on Human Corneal Endothelial Cells

Hasan Samed Akkaya, MD

Human corneal endothelial cells (HCEC) paused in the G1/S phase of the cell cycle and their in vivo proliferation capacity is limited. Currently, the treatment of permanent corneal endothelial insufficiency is penetrating or lamellar corneal transplantation. Although the complications of these surgeries have decreased with new techniques, donor shortage continues to be a major problem worldwide. The search for cell-based approaches to overcome these problems has begun to gain momentum. Studies examining the effects of ROCK inhibitors on HCEC have an important place in this area. In this study, it was aimed to evaluate and compare the effects of different Rho kinase (ROCK) inhibitors (Y-27632 and RKI-11447) on HCEC proliferation and wound healing. In our study, control group using human corneal endothelial cell line (Celprogen-36081-13), experimental groups including Y-27632 and RKI-1447, were formed. In these cell groups, proliferation abilities were evaluated by BrdU analysis, wound healing was evaluated by ImageJ program, ROCK activity and ROCK-2 levels were evaluated by ELISA method. After determining the effective dose of RKI-1447 was 1 μ M and the effective dose of Y-27632 was 10 μ M by BrdU analysis, it was found that both ROCK inhibitors stimulated cell proliferation more than the control group and RKI-1447 stimulated cell proliferation more than the Y-27632 group ($p < 0.05$). In the wound healing experiment, it was determined that RKI-1447 stimulated endothelial wound healing more than the control and Y-27632 groups ($p < 0.05$). Y-27632 was found to stimulate wound healing more than the control group in the first 24 hours ($p < 0.05$). But Y-27632 and control group results were similar in first 48 hours ($p > 0.05$). ROCK-2 level and ROCK activity were analyzed by ELISA in treatment and control groups. Although ROCK-2 level and activity were significantly decreased in Y-27632 and RKI-1447 groups compared to the control group; RKI-1447 decreased ROCK activity more than Y-27632 ($p < 0.05$) and Y-27632 decreased ROCK-2 level more than RKI-1447 ($p < 0.05$). As a result of these findings, RKI-1447 was found to be more potent than Y-27632 in terms of ICH proliferation, wound healing

and suppression of ROCK activity. Currently, Y-27632 is considered a potential therapeutic agent in the treatment of permanent corneal endothelial insufficiency. Considering these findings, we believe that RKI-1447, which is a more potent and more specific ROCK inhibitor than Y-27632, may be effective in the treatment of permanent endothelial insufficiency.

Keywords: Cornea, Endothelium, Proliferation, Wound healing, ROCK inhibitor, Y-27632, RKI-1447

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kornea gözün ön kısmını oluşturan saydam, prolat yapıda, en yüksek refraktif güce sahip kısımdır. Altı tabakadan oluşur. En içte yer alan endotel tabakası, tek kat hekzagonal hücrelerden meydana gelmektedir ve korneanın saydamlığını sağlamada önemli bir role sahiptir. Kornea endotel hücrelerinin in vivo proliferasyon yetenekleri oldukça kısıtlıdır. Bu hücreler aköz sıvısında yüksek konsantrasyonda bulunan inhibitör faktörler ve hücreler arası temas inhibisyonu sebebiyle hücre döngüsünün G1/S fazında duraklamıştır. Doğumda 5000 hücre/mm² olan bu hücreler doğal yaşlanma süreci gibi fizyolojik; veya cerrahi, travma, enfeksiyon, inflamasyon ve endotel distrofisi gibi patolojik sebeplerden dolayı zamanla azalır. Endotel hücre kaybı veya hasarı olduğunda, geriye kalan hücreler, yapısal bütünlüğü korumak için hacimsel olarak büyüyebilir ve boşlukları doldurabilmek için şekillerini değiştirip göç ederler. İnsan kornea endotel hücre (İKEH) sayısı 500 hücre/mm² seviyesinin altına indiğinde, endotel yetmezliğine bağlı kornea ödemi gelişir. Günümüzde kalıcı endotel yetmezliğine bağlı kornea ödeminin tek tedavisi tam kat ya da lamellar keratoplastidir. Her ne kadar son yıllarda endotel ve descemet membran (DM) kompleksinin implantasyonuna yönelik keratoplasti teknikleri yaygın olarak kullanılmaya başlamasına karşın hiçbir cerrahi teknik riskten bağımsız değildir. Ayrıca ister lamellar ister tam kat keratoplasti olsun kornea donör ihtiyacı devam etmektedir. Son yıllarda yapılan hesaplamalara göre dünya genelinde yaklaşık her 70 alıcıya 1 adet kornea dokusu düşmektedir. Bu durum global donör kıtlılığının önemli göstergelerinden bir tanesidir. Bu nedenlerle endotel yetmezliği tedavisi için KEH nakli veya mevcut endotel hücrelerin proliferasyonunu arttırmaya yönelik çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır.

Rho kinaz (ROCK), Rho ailesinin küçük GTPaz proteinlerinden olan RhoA tarafından aktive edilen serin/treonin protein kinazdır. Bu kinazlar düz kas kasılması, hücre apoptozu, adezyonu, migrasyonu ve motilitesinde etkili olup aynı zamanda hücre döngüsünde de görev almaktadır. ROCK ve Rho-GTPaz yolunun anormal işleyişi birçok patolojik durumla ilişkilendirilmiş ve bu sinyal yolağının seçici inhibisyonu çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta veya kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır. Bazı ROCK inhibitörleri glokom tedavisinde onay almasına rağmen kornea endotel yetmezliğinin tedavisinde onay almış ROCK inhibitörü bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı Y-27632 ve RKI-1447 ROCK inhibitörlerinin insan kornea endotel hücre (İKEH) proliferasyonu, yara iyileşmesi üzerine etkilerinin

karşılaştırmalı olarak araştırılmasıdır. Bilindiği kadarıyla bu çalışma RKI-1447'nin İKEH üzerine etkisinin incelenmesi açısından yapılan ilk çalışma olacaktır. Böylece literatürdeki bir boşluğun doldurulması ve endotel yetmezliğinde hücre temelli tedavilerin gelişimi yönünde yeni adımların atılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kornea Anatomisi

Kornea, göz küresinin anterior kısmının 1/6'sını oluşturan saydam, asferik yapıda avasküler bir tabakadır (1). Dikey çapı yaklaşık 10,6-11,6 mm, horizontal çapı 11,6-12,6 mm'dir. Ön yüzey alanı 120-130 mm²'dir ve bu boyutlara postnatal ikinci yılda ulaşır. Kırıcılık indeksi 1.373-1.401 olup, havadan korneaya gelen ışınlar ön yüzde +48.8 diyoptrilik (D), arka yüzde ise -5.8 D kırılmaya uğrarlar. Böylece kornea, gözün tüm optik kırıcılığının %74'ünü oluşturur (2). Kornea periferi merkeze göre daha düz eğime sahiptir. Bu sebeple merkezden perifere doğru kırıcılık azalır. Korneanın merkezi kalınlığı 535-545 µm olup perifere doğru kalınlık artarak 740 µm'ye kadar çıkabilmektedir.

2.1.1. Kornea İnnervasyonu

Kornea innervasyonu vücudumuzdaki diğer dokulara göre daha yoğundur. Örneğin, kornea hassasiyeti deriye göre 300-600 kat daha fazladır. Duyu sinirleri *Nervus Trigemini*'un oftalmik dalından köken alır. Uzun ve kısa siliyer sinirler ora serrata civarında sinir ağı oluşturup radyal olarak kornea stromasına uzanır. Stromaya giren sinirler miyelin kılıflarını kaybettikten sonra stromal, subepitelyal ve intraepitelyal olarak sonlanırlar (1,3). Kornea sinirlerinin özelleşmiş sinir ucu bulunmamaktadır. Korneanın sempatik innervasyonu üst servikal gangliyon liflerinden köken alır. Parasempatik innervasyonun varlığı ise kesin olarak kanıtlanamamıştır (1,3).

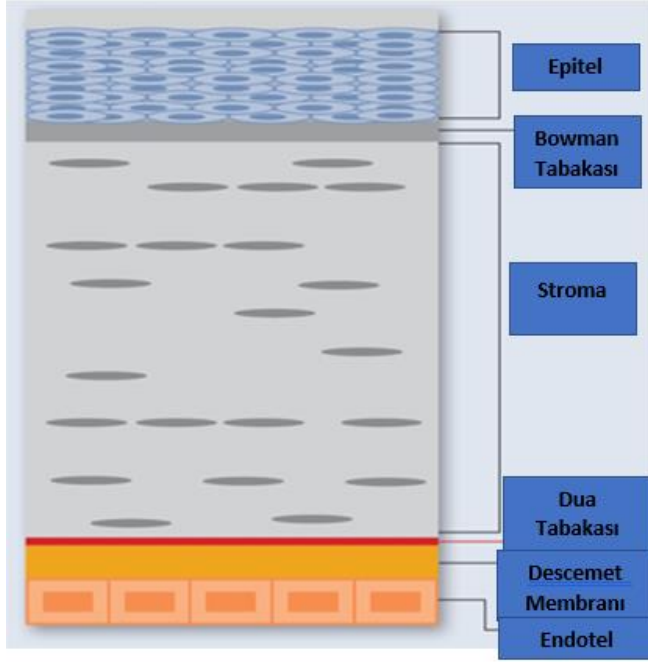
2.1.2. Korneanın Beslenmesi

Kornea avasküler bir yapıya sahiptir. Ön siliyer arterlerden köken alan kapiller damarlar kornea çevresinde sonlanırlar. Kornea, metabolizması için gerekli olan aminoasit ve glukozu hem bu kapillerlerden hem de aköz humörden difüzyon yoluyla elde eder. Oksijen ihtiyacı; merkezde göz yaşında çözünmüş olan oksijenden ve aköz humörden, periferde ise difüzyon ile ön siliyer arter kökenli kapiller damarlardan karşılanır (5). Korneada lenf drenajı yoktur.

2.2. Kornea Histolojisi

Kornea anatomik ve histolojik olarak 6 katmandan oluşur.

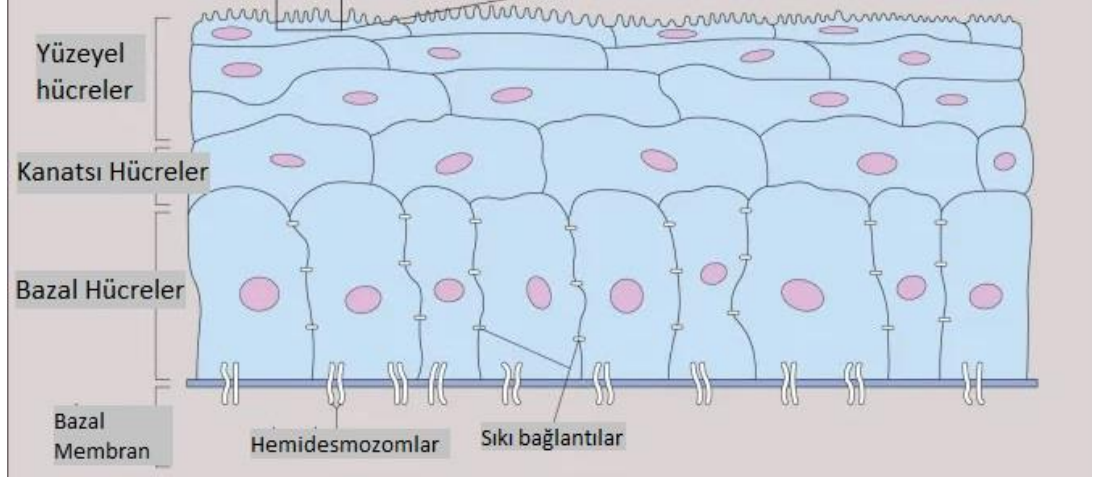
2.2.1. Kornea Tabakaları



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

2.2.1.1. Epitel Tabakası

Epitel tabaka kornea kalınlığının yaklaşık 1/10' unu oluşturur (50 μm). Ön yüzü yaklaşık 7 μm kalınlığında olan gözyaşı film tabakası ile kaplıdır (7). Kornea epiteli ile doğrudan temas halinde olan gözyaşı filminin müsin tabakası, esas olarak konjonktival goblet hücreleri tarafından üretilir. Müsin tabaka göz kapağı açılıp kapanması sırasında, gözyaşı filminin hidrofilik yayılmasını sağlamak için kornea epitel hücresi glikokaliksiyle yakından etkileşime girer. Kök hücreler limbusta yüzeysel olarak bulunurlar ve gerekli durumlarda göç ederek epitel rejenerasyonunu sağlarlar (8).



Şekil 2.2 Kornea Epiteli Kesiti (Yanoff & Duker. Ophthalmology. 3. Baskı)'dan modifiye edilmiştir.

Epitel tabaka; *süperfisiyel*, *kanatsız* ve *bazal* hücreler olmak üzere 3 tip hücre katmanı içerir. Yüzye de bulunan süperfisiyel 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 (9). Bu hücreler, birbirlerine *zonula adherens*; altındaki bazal membrana ise *hemidesmozomlar* ile bağlıdır. Bazal hücrelerin mitoz yapabilme özelliği vardır. Aktin filamanları aracılığıyla mitozu uğrayan hücreler yüzeye doğru göç ederek kanatsız ve süperfisiyel hücrelere dönüşür. Bazal membran, bazal hücreler tarafından salınan ekstrasellüler bir matriksten (ESM) oluşmaktadır. Yapısında ana olarak tip IV kollajen ve laminin bulunur ve altındaki Bowman tabakasına sıkıca bağlıdır. Tüm epitelin baştan sona yenilenmesi 7 gün sürer ve bu süreç travma ya da cerrahi işlemlerden sonra daha hızlıdır (10).

2.2.1.2. Bowman Tabakası:

Bu tabaka yaklaşık 8-14 μm kalınlığındadır. Çoğunlukla Tip 1 ve Tip 3 kollajen liflerden oluşur ve içinde hücre yoktur. Dolayısıyla yenilenme yeteneği yoktur (1). Ama travmaya karşı dayanıklıdır. Travma sonucu ince tabaka olarak iyileşir; ama eski haline geri dönemez (4,11). Bowman tabakasının ön yüzü, üstündeki epitel ve bazal tabakadan kolayca ayrılır. Arka yüzü ise stromal liflerle devamlılık gösterir.

2.2.1.3. Stroma Tabakası:

Kornea kalınlığının %90' ını oluşturur. %78'i sudur ve 450 µm kalınlığındadır. Ağırlıklı olarak tip 1 kollajenden oluşur. Kollajen lifleri, fibril adı verilen yüzeye paralel uzanan demetler halinde bulunur. Bu fibriller paralel düzenlenmiş tabakalar veya lameller halinde paketlenir ve stromada 200-250 kat kollajen lamel mevcuttur. Bu son derece organize ağ, ileri ışık saçılımını azaltır ve korneanın şeffaflığına ve mekanik kuvvetine katkıda bulunur. Bu liflerin arasındaki boşluklarda glikozaminoglikanlar (GAG), keratositler ve diğer hücreler (lenfosit, makrofaj,...) bulunur. Boşluklar arasında bulunan glikozaminoglikanlar, anyonik ortam oluşturup katyon ve su bağlanmasını sağlar. Bu sıvının fazla olması stromal ödem ve kornea kalınlık artışına sebep olmaktadır (11). Keratositler; kollajen ve proteoglikan sentezi yoluyla lameller organizasyonun stabilitesinden ve kornea stroma ESM bileşenlerinin düzenlenmesinden sorumludur (12).

Stromanın yenilenme özelliği yoktur (1). Stromal yaralanma sırasında keratositler hasarlı bölgeye göç edip fibroblastlara dönüşerek kollajen üretimini sağlar ve kornea haze oluşumuna sebep olur (11).Gerek kollajen liflerinin gerekse aralarındaki boşlukların çok düzenli olması ve kornea stromasının nispeten dehidrate olması kornea saydamlığı için çok önemlidir (7).

2.2.1.4. Dua Tabakası:

DM ile arka stroma arasında bulunan stromanın özelleşmiş halidir. 10 µm kalınlıkta olup 3-5 kat kollajen lamelden oluşmaktadır. Normal stromaya göre daha sert ve çok dirençli bir yapıdır (13).

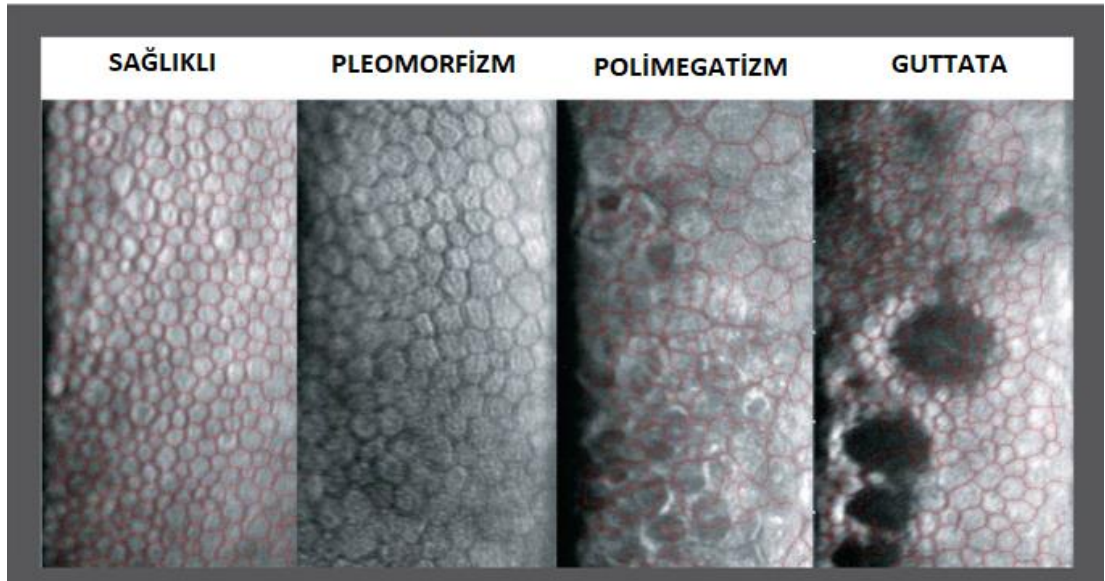
2.2.1.5. Descemet Membranı:

Endotel hücrelerinin bazal membranıdır (14). Kalınlığı doğumda 3-5 µm olup yaşla birlikte 15µm'a kadar ulaşır (7). Travma, cerrahi, Fuchs endotel distrofisi gibi durumlarda kalınlık artar (15). İn utero gelişen, önde yer alan bantlı bölge ve yaşam boyunca endotel tarafından salgılanan arka bantsız bölge olmak üzere iki tabakadan oluşur (3). Elastik özelliğe sahiptir. Yapısında başlıca Tip 4 ve 8 kollajen, laminin ve fibronektin mevcuttur. Bu tabakanın stromaya belirgin yapışıklığı olmadığından stromadan kolayca ayrılabilir (15). Bowman tabakasının aksine travmalardan sonra

endotel tabakası tarafından yenilenebilmektedir. Periferde Schwalbe hattını oluşturarak sonlanır.

2.2.1.6. Endotel Tabakası

En içteki tek katlı poligonal hücrelerden oluşan arka yüzeyleri hegzagonal olup bal peteği görünümündeki tabakadır. Tek bir hücrenin yüksekliği 4-6 μm olup, genişliği 20 μm ' dir. Hücrelerin lateralinde oluklu bağlantı ve sıkı bağlantılar bulunur ve DM'ye *hemidesmozomlar* ile bağlanır. Arka yüzünde mikrovilluslar ve Na^+/K^+ -ATPaz aktif transport pompası bulunur (6). Doğumda 5000 hücre/ mm^2 olan İKEH sayısı, erişkinlerde ortalama 2500 hücre/ mm^2 düzeyindedir ve toplam 350-400 bin hücre bulunmaktadır. Yılda %0,5-0,6 oranında azalarak 80 yaşında bireyde ortalama 1100-2000 hücre/ mm^2 düzeyine düşer. Yaşla birlikte hücre boyut farklılığı olan polimegatizm (Normali 0.25) ve şekil farklılığı olan pleomorfizm oranı (Normali: %75) da değişmektedir (16). Parasentral ve periferik alanlarda endotel hücre sayısı santrale göre daha yüksek oranda olduğu bilinmektedir (14).



Şekil 2.3 Speküler mikroskopi görüntüleri (Rowsey, T.G., Karamichos vd 2017)'den modifiye edilmiştir.

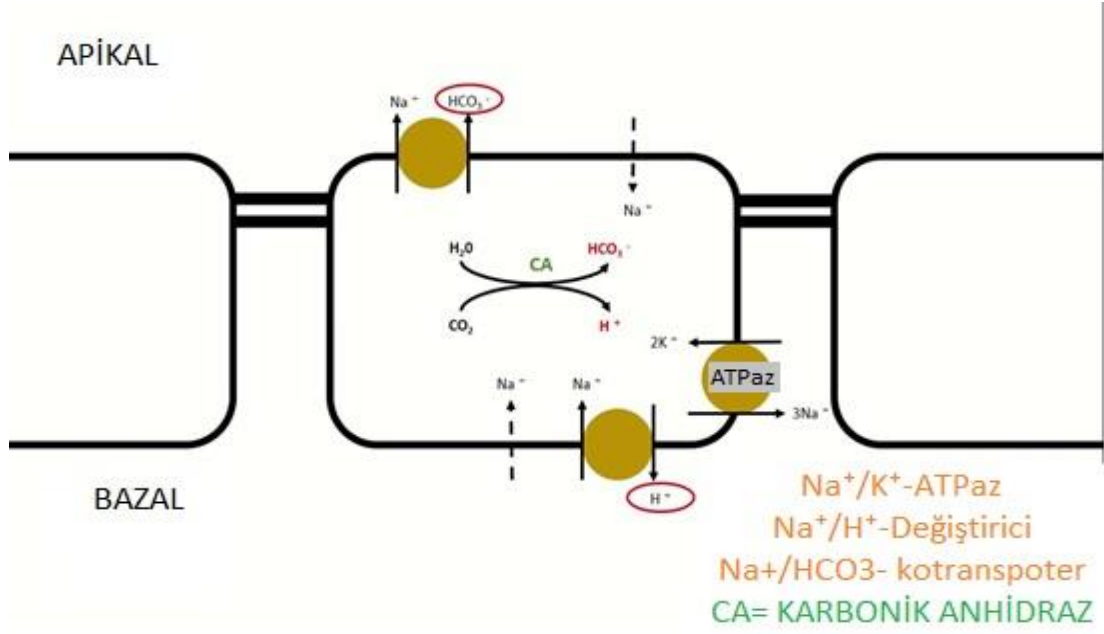
İKEH'lerin hücre döngüsünün G1-S fazında duraklamaları dolayısıyla in vivo proliferasyon göstermediği kabul edilmektedir (2). Bu proliferasyon, hücreden hücreye temas inhibisyonu ve aköz humöre salgılanan ve hücre döngüsünün S fazına girişi engelleyen transforme büyüme faktörü $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) tarafından baskılanmaktadır (17).

2.3. Kornea Endotel Tabaka Fizyolojisi

Endotel hücreleri kornea saydamlığının sağlanmasında önemli bir role sahip olup metabolik aktiviteleri oldukça yüksektir. Dolayısıyla, bu hücreler çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı ve serbest ribozom içermektedirler. Endotel metabolizması için gerekli olan besin ve oksijen aköz humörden karşılanmaktadır (5).

Endotel hücrelerinin başlıca görevleri şunlardır;

- Bariyer görevi: Stroma ve aköz humör arasında anatomik ve fizyolojik bariyer görevi görürler. Hücreler arasındaki sıkı bağlantılar vasıtasıyla suyun aköz ve stroma arasındaki geçişini kontrol ederler (18,19).
- Aktif pompa görevi: Na^+/K^+ -ATPaz pompası hücre membranında bulunan ATP bağımlı bir enzim olup 1 ATP kullanarak 2 K^+ iyonunu hücre içine alır ve 3 Na^+ iyonunu hücre dışına atar (20,21). Bu pompanın hücre dışına Na^+ çıkarması, H_2O 'nun da kotransportunu sağlamaktadır (21). Endotel hücrelerinde bulunan intrasellüler karbonik anhidraz enzimi CO_2 ve H_2O 'yu H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayırır. $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ pompası devreye girerek hücre içine Cl^- girerken hücre dışına HCO_3^- ve H^+ iyonu çıkar. Oluşan HCO_3^- iyonu Na^+/K^+ -ATPaz pompasının çalışması için gerekli ortamı sağlamış olur (20,22).
- Endotel tabakası korneanın aköz humörden beslenmesinde rol oynar. Büyük partiküllerin pinositoz yoluyla aközden veziküller halinde taşınmasını sağlar (23). Daha küçük yapıdaki besinlerin ve diğer moleküllerin aköz humörden avasküler korneaya sızıntı şeklinde geçişine izin verir (24). Kornea endotelinin bu sızdırıcı etkisi ve aktif pompayla bunu dengelemesi '*pump and leak*' hipoteziyle açıklanmaktadır (25).



Şekil 2.4 Endotel Hücre İyon Transport Sistemi (Nadhirah Ahmad Fauzi Notes)'den modifiye edilmiştir.

2.3.1. Kornea Saydamlığının Sağlanması

Kornea saydamlığının sağlanmasında ve korunmasında rol oynayan önemli faktörler şunlardır;

- Göz yaşının kornea yüzeyinden buharlaşması yoluyla dehidrasyona katkıda bulunması,
- Epitel ve endotel tabakalarının bariyer etkileri,
- Hücrelerin sıkı paketlenmesi ve başta mitokondri olmak üzere endotel hariç tüm katmanlarda organellerin seyrek bulunması,
- Avaskülarite,
- Kornea lamellerinin karmaşık dizilimi sayesinde stromal moleküllerin görünür ışığın dalga boyundan daha küçük olması,
- Stromal hidrofilik GAG şişme basıncı,
- Endotelde yer alan Na⁺/K⁺-ATPaz, intrasellüler karbonik anhidraz vb. iyon transport sistemleri gibi pompa mekanizmaları (20,22).

2.4. Kornea Endotel Tabaka Hastalıkları

Travma, intraoküler cerrahi ve intraoküler implantasyonlar, kronik üveit gibi intraoküler inflamasyonlar, lazer uygulamaları, göz damlaları içinde bulunan farmasötik ajanlar, uzun süreli kontakt lens kullanımı, endotel distrofileri, akut glokom atakları veya doğal yaşlanma nedeniyle endotel hücre kayıpları yaşanabilmektedir (26,27,28).

2.4.1. Fizyolojik Kayıplar

Doğumda 5000 hücre/mm² olan İKEH sayısı erişkinlerde 2500 hücre/mm² düzeyindedir. Endotel hücre sayısı yılda %0,5-0,6 oranında azalır ve 80 yaşında bireyde ortalama 1100-2000 hücre/mm² düzeyindedir (16).

2.4.2. Kazanılmış Endotel Yetmezlikleri

2.4.2.1. Cerrahi Travma

Göz içi cerrahisi sırasında kornea endotelinin iyatrojenik olarak hasarlanması, endotel dekompansementasyonuna yol açarak kornea ödemi ve büllöz keratopati olarak adlandırılan klinik tabloya neden olabilmektedir. Büllöz keratopati, korneada aşırı sıvı birikimi ile ilişkili fibrotik hücre dışı matriks proteinlerinin birikmesi, stromal proteoglikanların kaybı, değişmiş matriks metalloproteinaz aktivitesi, integrin, büyüme faktörü ve akuaporinlerdeki anormallikler ile karakterize bir durumdur (4,29). ABD'de her yıl yaklaşık 4 milyon katarakt prosedürü gerçekleştirilmekte ve katarakt cerrahisini takiben kornea ödemi (psödo-fakik büllöz keratopati) tedavi etmek için yaklaşık 4500 keratoplasti prosedürü gerçekleştirilmektedir (30).

2.4.2.2. Keratoplasti Sonrası Endotel Yetmezliği

Kornea nakli başarısızlığının önde gelen nedenlerinden biri, önceki bir immünolojik reddetme olayının klinik kanıtı olsun veya olmasın, endotel dekompansementasyonudur (31). İmmünolojik reddin hızlı teşhisi ve immünespresif tedavi, greft sağ kalımını uzatmaya yardımcı olmaktadır.

2.4.2.3. Lazer İlişkili Endotel Yetmezliği

Kornea dekompanseasyonunun lazer periferik iridotomi ile tedavi edilen açığı kapanma ataklarından sonra meydana gelebildiği uzun zamandır bilinmektedir. Lazer iridotominin direkt olarak, kronik inflamasyonu tetikleyerek veya aköz humör akışı dinamiklerini değiştirerek endotel hücre kaybını artırdığı düşünülmektedir (32). Bu prosedür, Japonya'da kornea endotel yetmezliğinin önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır.

2.4.2.4. Enfeksiyona İkincil Endotel Yetmezliği

Enfeksiyöz ön üveit endotelite neden olarak irreversibl endotel dekompanseasyonuna neden olabilmektedir. Herpes simpleks Virüsü dünya çapında en yaygın neden olarak bilirse de varisella zoster, CMV gibi diğer herpes ailesi virüsleri de endotelit yapabilmektedir (33). Bazı bakteriyel, fungal ve paraziter ajanların oluşturduğu keratitler de kornea endotel yetmezliğine yol açan diğer nedenler arasında yer almaktadır.

2.4.3. Endotel Distrofileri

2.4.3.1. Fuchs Endotel Distrofisi (FED)

FED KEH'lerin bilateral ilerleyici kaybı ile seyreden bir hastalıktır. Yaş ve kadın cinsiyet başlıca risk faktörleri olsa da sigara, UV maruziyeti ve hormonal anormallikler hastalığın şiddetini artırmaktadır (34).

Kornea guttata formasyonu, hastalığın ilk bulgularındandır (35,36) (Bkz. Şekil 2.3). İleri dönem bulguları ise endotelde pigment granülleri (dövülmüş bakır manzarası), stroma ödemi, epitelyal mikrokistler ve büllerdir (37). Büllerin perfore olması sonucu ağrı, kızarıklık, görme kaybı, yabancı cisim hissi atakları meydana gelmektedir. Endotel dekompanseasyonu ve görme kaybı günün erken saatlerinde daha belirgindir. Hastalığa katarakt sıklıkla eşlik etmektedir ve katarakt ameliyatı sonrası endotel kaybı hızlanabilmektedir.

2.4.3.2. Posterior Polimorfoz Distrofi (PPD)

PPD otozomal dominant kalıtılan, sıklıkla bilateral görülen DM ve endotel tabakasının tutulduğu nadir bir kornea hastalığıdır (38). Tanı hayatın ileri yıllarında

konulsa da distrofik mekanizmalar doğumdan itibaren başlar. Klinik bulgular kornea endotelinin asemptomatik düzensizliklerinden semptomatik kornea ödemi ve glokoma kadar değişmektedir. DM'de coğrafik veziküler lezyonlar ve asimetrik diffüz kalınlaşma görülmektedir (39).

2.4.3.3. Konjenital Herediter Endotel Distrofisi (KHED)

Endotelin fokal ya da total yokluğuna ikincil doğumda mevcut olan veya doğumdan kısa bir süre sonra gelişen endotel yetmezliği ile karakterize nadir bir hastalıktır. Hastalığın bulguları nistagmus, kornea ödemi ve buzlu cam benzeri kornea opasitesidir. Otozomal dominant olan CHED1 ve otozomal resesif olan CHED2 olmak üzere iki genetik formu mevcuttur (39,40).

2.5. Kornea Endotel Yetmezliği Tedavisi

Kornea transplantasyonu günümüzde en yaygın ve en başarılı doku nakli çeşididir. 10 yıllık sağ kalım oranları endikasyonuna, oküler komorbiditelere ve diğer faktörlere bağlı olarak %40-%90 arasında değişmektedir (31).

Penetran ve lamellar olmak üzere iki tip keratoplasti çeşidi mevcuttur.

2.5.1. Penetran Keratoplasti (PK)

İlk başarılı PK 1905 yılında Eduard Zirm tarafından yapılmıştır (42). Korneanın immünolojik, enfeksiyöz ya da travma gibi durumlara ikincil tam kat tutulumun olduğu perforasyonlarda, uzun süreli endotel disfonksiyonu sonucu stromal skarlaşma ve neovaskülarizasyonda en sık kullanılan yöntemdir (43). Son zamanlarda, lamellar keratoplasti yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte penetran keratoplastinin endikasyonları sınırlanmasına rağmen özellikle lamellar keratoplasti uygulanamadığı ya da başarısız olduğu durumlarda halihazırda kullanılan bir cerrahi prosedür olmaya devam etmektedir.

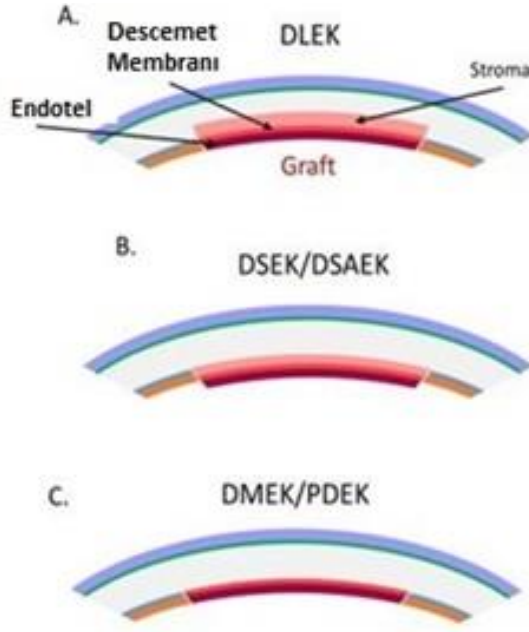
2.5.2. Lamellar Keratoplasti

2.5.2.1. Endotelyal Keratoplasti (EK)

Son yirmi yıldaki gelişmelerle birlikte, kornea endotel hastalıklarının tedavisinde EK teknikleri penetran keratoplastinin yerini almaya başlamıştır. PK ile karşılaştırıldığında EK, alıcı doku için yabancı antijen yükünü azaltmakta, astigmatizmayı en aza

indirmekte, daha erken görsel düzelme sağlamakta ve tam kat bir korneal kesi yapılmadığından kornea dayanıklılığını bozmamaktadır (41,44-46).

Günümüzde klinik kullanımda olan birçok EK tekniği mevcuttur (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Keratoplasti Çeşitleri (Moshirfar & Thomson)'dan modifiye edilmiştir.

A. DLEK B. DSEK/DSAEK C. DMEK/PDEK

Bu prosedürler, korneanın DM ve endotel tabakasının bir kornea kesisi yoluyla çıkarılmasını ve bir donör korneanın iç kısmından elde edilen dairesel bir greftin ön kamaraya yerleştirildikten sonra alıcı korneanın posterior kısmına apozisyonunu içermektedir. Bu prosedürlerin temel amacı, endotel fonksiyonunun ve kornea saydamlığının geri kazanılması suretiyle görme fonksiyonunun geri kazandırılmasıdır (47).

Derin Lamellar Endotelyal Keratoplasti (DLEK)

İlk DLEK ameliyatı Terry tarafından ABD'de 2000 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu prosedürde üst limbusun 1 mm periferinde sklerada 5 mm'lik (ilk cerrahilerde 9.0 mm) bir kesi oluşturulur %75-85 kornea derinliğine kadar derin bir skleral-kornea lameller cep oluşturmak için keskin bir hilal bıçak kullanılır. Daha sonra kesi özel bir kavisli bir stromal disektör ile limbusa kadar 360° uzatılarak derin lamellar korneal cep oluşturulur. Özel bir intrastromal trepan (Terry Trepan) stromal cebe yerleştirilir ve ön kamaraya viskoelastik enjekte edildikten sonra trepanasyon ile ön kamaraya girilir.

Özel kavisli intrastromal makas (Cindy Scissors) ile rezeksiyon tamamlanır ve hasarlı posterior kornea çıkartılır. Benzer bir yöntemle donör dokudan posterior korneal disk elde edilir. Ön kamaradan viskoelastik çıkarılır, hava enjekte edilir. Daha sonra posterior donör disk viscoelastik kaplı özel bir spatula ile ön kamaraya alınır ve alıcı stromal yatağa yerleştirilir. Donör disk hava ile desteklenmektedir. Üst skleral yara yeri suture edilir ve ön kamaradan hava boşaltılarak GİB normale getirilir (48,49,50). İlk operasyonun 13. gününde korneal saydamlık sağlanmış olsa da bu cerrahinin tekniğinin zor olması nedeniyle genel kabul görme oranı düşüktür.

Descemet Soymalı Otomatize Endotelyal Keratoplasti (DSAEK)

Teknik ilk olarak Melles tarafından Descemet Soymalı Endotelyal Keratoplasti (DSEK) olarak geliştirilse de daha sonra mikrokeratomun kullanıldığı ve daha iyi görsel sonuçların elde edildiği Descemet Soymalı Otomatize Endotelyal Keratoplasti (DSAEK) halini almıştır. Limbusta 3-5 mm'lik bir kesi oluşturulduktan sonra ters sinskey kancası ve forseps kullanarak *desmatoreksis* olarak bilinen posterior stromayı içermeyecek şekilde patolojik descemet ve endotel soyulması işlemi yapılır. Ön kamaraya viskoelastik veya hava enjekte edilerek görüntü iyileştirilir (48,51). Bir miktar donör stroma, DM ve endotel tabakası içeren korneal greft ön kamaraya alındıktan sonra hava veya gaz kabarcığı yardımıyla alıcı korneanın iç duvarına yapıştırılır. Özellikle sıg ön kamaralı hastalarda greftin ön kamaraya yerleştirilmesi sırasında primer greft yetmezliğine yol açabilecek travmatik hücre kaybından kaçınmak önemlidir (51,52).

Descemet Membran Endotelyal Keratoplasti (DMEK)

Bu teknikte DSAEK'teki gibi insizyon ve *desmatoreksis* yapılır. Ama çok daha ince ve hiç stroma içermeyen bir greft kullanılmaktadır. Greft, bir enjektöre yerleştirilir ve endotel yüzü lense bakacak şekilde ön kamaraya alınır (54). Greftin yerleştirilmesi ve çeşitli manevralar yardımıyla açılmasının ardından bir hava (veya gaz) kabarcığı ile posterior korneaya yapıştırılması sağlanır (55).

DSAEK ve DMEK'te en sık görülen erken ameliyat sonrası komplikasyon greft ayrılmasıdır. DSAEK'te bu komplikasyon spontan olarak düzelebilese de DMEK'te oldukça ince olan greftin katlanması sebebiyle spontan düzelleme beklenmez ve bunu önlemek için uzun etkili gazlar (örneğin; sülfür hekzaflorid) kullanılmaktadır. Pupiller blok ve akut glokom krizi riski daha fazla hava (gaz) kullanıldığı için DMEK'te (özellikle 3'lü prosedürde) daha yüksektir. Bu durumun önlenmesi için periferik iridotomi ve ön

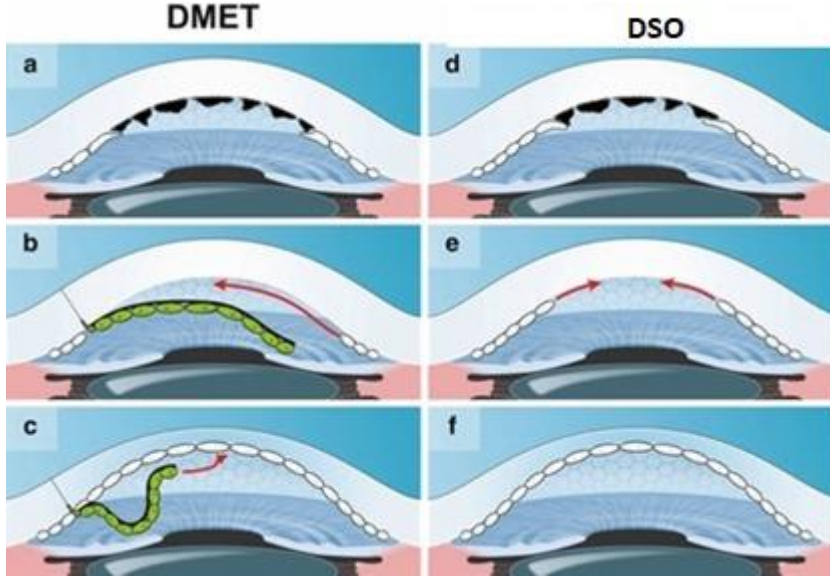
kamaradaki hava miktarının azaltılması faydalı olabilmektedir (56,57). Birincil greft başarısızlık oranının DMEK için ortalama %1,7 ve DSEK için ortalama %5 olduğu bildirilmiştir (58). Literatüre bakıldığında, DMEK hızlı ve etkili görsel düzelme sonuçlarına sahip olsa da dik öğrenme eğrisi ve görece yüksek komplikasyon riski dezavantajları arasında sayılmaktadır (47,59).

Pre-Descemet Endotelial Keratoplasti (PDEK)

DMEK tekniğine benzer olan bu teknikte DMEK'teki greft içeriği olan endotel tabakası ve DM'ye ek olarak yaklaşık 10-20 µm kalınlığındaki Dua tabakası da mevcuttur. PDEK yöntemi ile greft dokunun nakli DMEK'e göre daha kolay olmasının yanında DM'nin Dua tabakasıyla desteklenmesi sebebiyle DMEK'te her zaman mümkün olmayan görece olarak daha yüksek endotel hücre sayılarına sahip daha genç donör kornealarının kullanımına izin vermektedir (13,61).

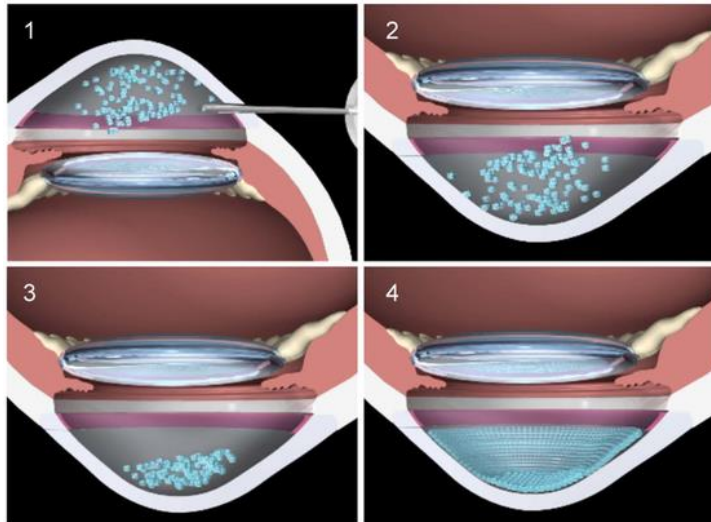
2.5.3. Kornea Endotel Yetmezliği Tedavisinde Hücre Temelli Yaklaşımlar

Tüm endotelial keratoplasti tekniklerinde, kornea şeffaflığının geri kazanılabilmesi için, donör ve alıcı dokular arasında tam bir apozisyon zorunludur (47). Genel bilgi olarak, greft ayrılması bu cerrahi için bir komplikasyon kabul edilir ve kornea saydamlığı kaybedilir. Bununla birlikte son zamanlarda yayımlanan çalışmalar tam bir greft-alıcı yatak apozisyonunun her zaman gerekli olmayabileceğini göstermektedir. Bu durum keratoplasti dışı hücre temelli tekniklerin başlangıcını oluşturmuştur. Keratoplasti dışı cerrahi tekniklerden olan *Endotelial Keratoplastisiz Desmatoreksis (DWEK)/Sadece Descemet Soyma (DSO)*, hastalıklı endotel ve Descemet dokusunun desmatoreksis yöntemiyle çıkarımı ve periferde bulunan sağlıklı endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve/veya yara iyileşmesinin uyarılması esasına dayanmaktadır (62,63). Bu prosedürle ek olarak intrakameral veya topikal uygulanan ROCK inhibitörleri, yukarıda bahsedilen endotel hücre proliferasyonu ve yara iyileşmesini artırdığı bildirilmiştir (64-67). Descemet Membran Endotel Transferi (DMET) yönteminde ise desmatoreksisten sonra bir korneal greft ön kamaraya enjekte edilir ve insizyon alanına sabitlenir. Bu yöntemde endotel hücre repopülasyonu sadece sağlıklı periferik endotel hücrelerinden değil aynı zamanda greftten de elde edilmektedir (47) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 DMET ve DSO uygulaması (*Bruinsma vd 2013*) 'dan modifiye edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda in vitro ortamda doku mühendisliği tekniği ile elde edilmiş KEH'lerin santral endotelin uzaklaştırılması sonrasında doğrudan ön kamaraya enjeksiyonu ya da bir hücre kültürü plakası (amniyon, Tip 1 kollajen vb.) halinde posterior korneaya transplantasyonu esasına dayanan yöntemler oldukça başarılı olmuştur (68,69,70). Ön kamaraya uygulanan KEH enjeksiyonlarının ROCK inhibitörleri ile kombine edilmesi; KEH'lerin adezyonunu, proliferasyonunu ve kornea şeffaflığını artırmıştır (71-74) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 İntrakameral KEH Enjeksiyonu (*Okumura vd 2016*)'dan modifiye edilmiştir.

2.6. RHO/ROCK ve ROCK İnhibitörleri

2.6.1. Rho Proteinleri

Rho proteinleri tüm ökaryot hücrelerde bulunan küçük G proteini ailesidir. Rho ailesinin üyeleri RhoA, RhoB, RhoC, Rac ve Cdc42'dir. RhoA, vücutta en çok eksprese edilen Rho proteini alt tipi olmasına rağmen; RhoA, RhoB, RhoC proteinlerinin efektör bölgelerinin aminoasit dizilişleri aynıdır, hücresel fonksiyonları ise benzerdir (77). Rho proteinleri, sitoplazmada bulunan GDP/GTP-bağlayıcı proteinlerdir ve GTP-az aktivitesi içermektedir. Ayrıca başlıca hücre-iskelet kontrolü olmak üzere, stres liflerinin yapılanmasından, hücrelerin (başta fibroblastlar olmak üzere trombositler, lenfositler vb.) fokal adezyonundan, migrasyonundan, hücre döngüsü-sitokinezisten, düz kas kasılmasında Ca^{+2} duyarlılığının düzenlenmesinden ve vazodilatasyonun inhibisyonundan sorumludurlar (78).

2.6.1.1. Rho Aktivitesinin Düzenlenmesi

Rho proteininin aktivitesi döngüsel olarak düzenlenmekte ve GTP bağlı aktif ya da GDP bağlı inaktif formda bulunmaktadır. Rho aktivitesinin GTP'az aktive edici protein (GAP) ve GTP'az ayrıştırıcı inhibitör (GAİ) olmak üzere iki negatif ve guanin nükleotid değiştirici faktör (GNDF) olmak üzere bir pozitif düzenleyicisi mevcuttur (79) (Şekil 2.8).

- 1) GTPaz Aktive edici Protein (GAP): İntrinsik GTPaz aktivitesini artırarak GTP nin hidrolize olmasına sebep olmaktadır ve GTP bağlı Rho'yu inaktive etmektedir.
- 2) GTPaz Ayrıcı İnhibitör (GAİ): Nükleotid bağlanmasını bloke ederek Rho proteini aktivasyonunu inhibe etmektedir.
- 3) Guanin Nükleotid Değiştirici Faktör (GNDF): Hücrelerin bazı agonistlerle stimüle edilmesi durumunda Rho spesifik GNDF'ler, GDP ayrışmasını ve GTP bağlanmasını başlatarak Rho aktivasyonunu sağlamaktadır.

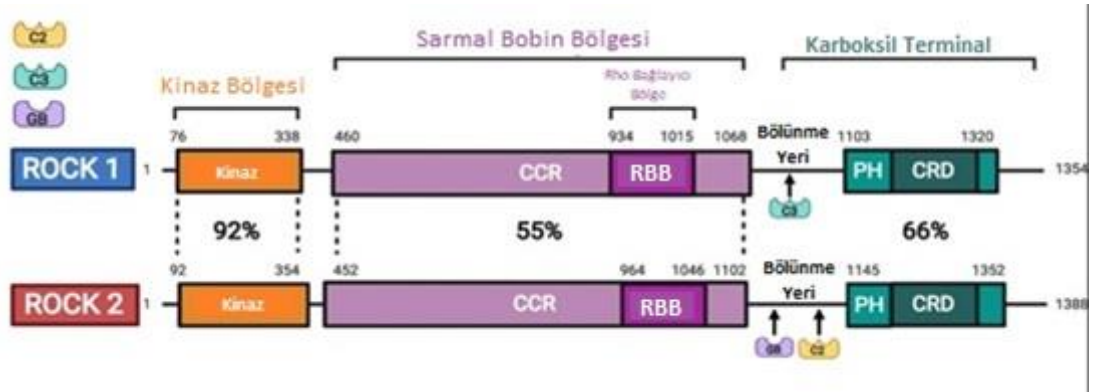


Şekil 2.8 Rho Aktivasyonunun Düzenlenmesi

Rho aktivasyonu GDNF, GAP aracılığıyla; ya biyoaktif molekül reseptörlerinin (endotelin-1, noradrenalin, trombin, anjiyotensin II, lizofosfatidik asit, TGF- β ve sitokinler) uyarılmasıyla ya da ESM ile bağlandıktan sonra integrin aktivasyonu yoluyla sağlanmaktadır.

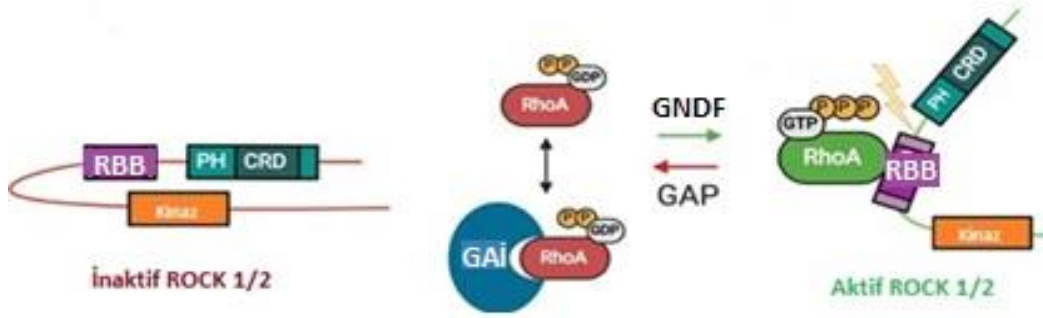
2.6.2. ROCK

ROCK, RhoA tarafından aktive edilen yaklaşık 160 kDa ağırlığında olan bir serin/treonin protein kinazdır (80,81). ROCK-1 ve ROCK-2 olmak üzere iki major izoformu bulunmaktadır. Bu enzimlerin genel amino asit dizilimlerinin yaklaşık %65'i ve kinaz alanlarının %92'si aynıdır (6,76) (Şekil 2.9). İnsanda ROCK-1, 18. kromozomda ve ROCK-2, 2. kromozomda bulunmaktadır. Her iki enzim de tüm hücrelerde eksprese edilmesine rağmen ROCK-1 böbrek, akciğer, karaciğer, dalak ve testiste; ROCK-2 ise beyin ve kas hücrelerinde daha yoğun olarak bulunmaktadır (82,83). ROCK'ların yapısında ortak olarak Rho bağlama bölgesi (RBB) içeren sarmal yapıyla birbirine bağlanan bir N-terminal kinaz alanı ve bir C-terminali inhibitör alanı mevcuttur (6).



Şekil 2.9 ROCK-1/ROCK-2 yapısı (Al-Humimat G vd 2021)'den modifiye edilmiştir (76).

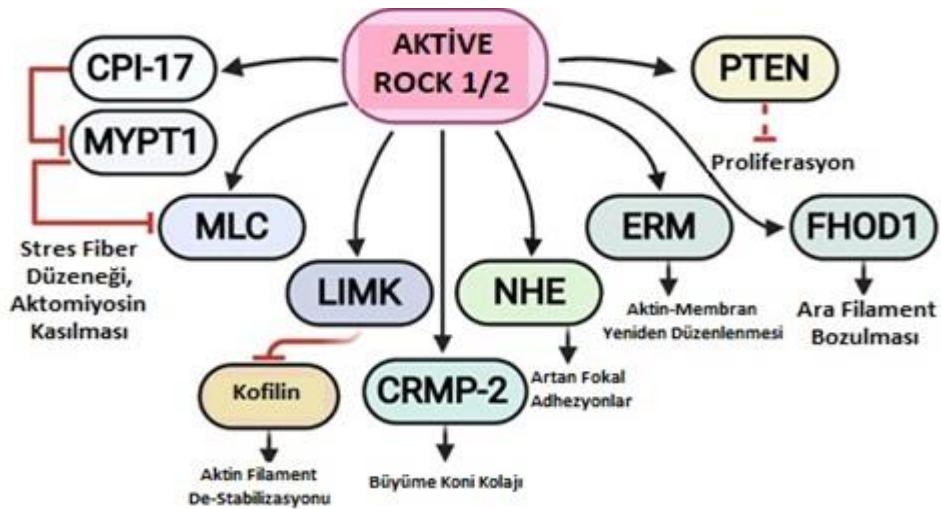
ROCK, iki farklı şekilde aktive olabilmektedir. GTP bağlı aktif bir Rho'nun ROCK üzerinde bulunan RBB alanına bağlanması, katalitik alan ile ROCK'un inhibitör C-terminal alanı arasındaki etkileşimi bozarak ve enzimi aktive etmektedir (84,85).



Şekil 2.10 Aktif RhoA-RBB bağlanması (Al-Humimat G vd 2021)'den modifiye edilmiştir (76).

Ayrıca ROCK, inhibitör C-terminal alanının proteolitik bölünmesiyle de aktive olmaktadır. Bu ikinci aktivasyon şekli apoptoz sırasında meydana gelmektedir.

ROCK, GTP bağlı aktif RhoA tarafından aktive edildiğinde, adducin, ezrin-radiksin-moesin (ERM) proteinlerini, LIM kinaz, miyozin hafif zincir fostataz (MLCP) ve Na/H exchanger (NHE) 1'in serin-treonin fosforilasyonu ile hücre kontraksiyonunu düzenlemektedir (86,87) (Şekil 2.11). Miyozin hafif zincir fosfatazlar fosforillenecek şekilde inhibe olur ve sonuçta miyozin aktive olarak, aktin miyozin flamanlarının yapılanmasına yol açmaktadır (88). ROCK tarafından aktive olan bu moleküller aktin iskeletinin modülasyonu, düz kas kasılması, hücre büyümesi, adezyonu, migrasyonu, motilitesi, gen ekspresyonu, ESM'nin yeniden düzenlenmesi ve hücre apoptozisi gibi birçok farklı hücresel fonksiyonlarda etkili olmaktadır (84,89-91).



Şekil 2.11 Aktive ROCK'un etkilediği enzimler (Al-Humimat G vd 2021)'den modifiye edilmiştir (76).

2.6.3. ROCK'ların Fizyopatolojik Rolü ve ROCK İnhibitörleri

1995 yılında keşfedilmelerinden bu yana, ROCK enzim ailesi, terapötik hedefler olarak birçok araştırmmanın konusu olmuştur. Çok sayıda ROCK inhibitörü mevcut olmasına karşın en bilinenleri arasında HA1077(fasudil), hidrosifasudil, ripasudil, H1152, netarsudil, AT-13148, RKI-1447, ITRI-E-212, Thiazovivin, GSK-429286A, Y-39983, Y-27632 yer almaktadır.

ROCK ve Rho-GTPaz yolunun anormal işleyişi, kardiyovasküler hastalıklar (77,92-99), solunum sistemi hastalıkları (100,101), ürogenital sistem hastalıkları (88,102,103), nöronal dejenerasyon (105), insülin direnci (106), karsinogenez (107-110), osteoporoz, böbrek yetmezliği ve göz hastalıkları gibi birçok patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple bu sinyal yolağının seçici inhibisyonu, bu hastalıkların tedavisi için umut verici olmuştur.

Literatürde sıklıkla kullanılan ROCK inhibitörlerinin seçicilik özellikleri Tablo 2.1'de sunulmuştur.

Tablo 2.1 ROCK İnhibitörlerinin Seçicilik Özellikleri

ROCK İnhibitörleri	ROCK	ROCK1	ROCK2
Y27632 2HCl		++	+
Y27632		++	+
RKI-1447		+++	+++
H-1152 dihydrochloride		-	+++
Ripasudil (K-115) hydrochloride dihydrate		++	++
Netarsudil (AR-13324) 2HCl	++++	-	-
Y-39983 HCl	++++		
WAY-624704	+++		
Thiazovivin	+		
Fasudil (HA-1077) HCl			+
GSK429286A		+++	++
Azaindole 1 (TC-S 7001)		++++	++++
Hydroxyfasudil (HA-1100) HCl		+	+
GSK269962A HCl		++++	++++
Belumosudil (KD025)			++
AT-13148		+++	++++

2.6.3.1. Kardiyovasküler Sistem

ROCK bağımlı sinyal yolağı, vasküler fonksiyonları düzenleyen temel düzenleyici olarak bilinmektedir. Bu sinyal yolağı, vasküler duvarda aktin hücre iskeleti organizasyonu, vasküler düz kas kasılması, kapiller permeabilite artışı, trombosit agregasyonu, nötrofil kemotaksisi, hücre adezyonu ve hareketliliğine aracılık etmektedir (77). Anormal ROCK aktivitesi, serebral ve koroner vazospazm (93,94), hipertansiyon (95) ve pulmoner hipertansiyonda (99) gözlenen anormal düz kas kasılmasını tetiklemektedir. (96). Bu yolak aynı zamanda vasküler inflamasyon ve remodelling, iskemi-reperfüzyon hasarı ve ateroskleroz, trombüsün şekillenmesinde de görev almaktadır (96-98). ROCK inhibisyonu, nitrik oksit (NO) salgılanması yoluyla serebral, koroner, pulmoner kan akışında artışa, vazodilatasyona ve iskemi oluşumunda azalmaya yol açmaktadır (92).

2.6.3.2. Solunum Sistemi

Hayvan modellerinde RhoA'nın Ca^{+2} aracılıklı bronkokonstriksiyonda rol aldığı düşünülmektedir (100). ROCK inhibitörü olan Y-27632'nin beta-adrenoreseptörlerden bağımsız bir mekanizmasıyla teofilinden daha güçlü bir bronkodilatör etki gösterdiği çalışmalar mevcuttur (101).

2.6.3.3. Ürogenital Sistem

İnsan gebe myometriyumunda RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 ekspresyonlarının olduğu ve preeklampsi patofizyolojisinde özellikle ROCK-2 ekspresyonunun çok arttığı gösterilmiştir ve Y-27632'nin oksitosinle oluşan miyometriyum kasılmasını azalttığı gösterilmiştir (102). Rho/ ROCK yolağı aynı zamanda mesane ve kavernoöz doku kontraksiyonunda ve düzenlenmesinde görev almaktadır (103). Eretil disfonksiyona yönelik çalışmalarda ROCK inhibitörü Fasudil, kavernoöz dokudaki ROCK aktivitesini ve total NO sentaz ekspresyonlarını normalize ettiği ve Y-27632 kavernoöz dokuda noradrenerjik sinir stimülasyonu ve kontraksiyonlarını inhibe ettiği bildirilmiştir (88).

2.6.3.4. Karsinogenez

Rho/ROCK yolağının aktivasyonunun, tümör hücre adezyon ve invazyonuna neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu yolağı inhibe eden ROCK inhibitörlerinin, meme, kolorektal kanser ve medulloblastom gibi kanser türlerinde tümör boyutunu

azalttığı ve tümör invazyonu baskıladığı gösterilmiştir. (107-110).

2.6.3.5. Sinir Sistemi

Çeşitli çalışmalarda ROCK inhibitörlerinin nöronal fonksiyonları düzenlediği ve nörorejeneratif tedavi edici ajan olabileceği öne sürülmüştür ve spinal kord yaralanmasında, alzheimer hastalığında, multipl sklerozda, nöropatik ağrı ve diğer nörolojik hastalıklarda başarılı bir tedavi olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir (105).

2.6.3.6. Endokrin Sistem

Yapılan bazı çalışmalarda ROCK inhibitörleri olan Fasudil ve GSK-429286A Tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan metformin ve tolbutamid ilaçları ile etkinlik açısından yüksek benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (106). Ayrıca, ROCK inhibitörlerinin vasküler düz kas üzerine etkileri, VEGF salınımını baskılaması, oksidatif stres ve nörodejenerasyonu engellemesi yoluyla diyabetik retinopatide faydalı olabileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur (111).

2.6.3.7. Göz Hastalıkları

Rho/ROCK sinyal yolağının hücre proliferasyonu, epitel farklılaşması, hücre göçünün modülasyonu ve hücre adezyonu da dahil olmak üzere tüm kornea katmanlarında bir dizi olayı düzenlediği gösterilmiştir. Her iki ROCK izoformu da kornea yara iyileşmesinde epitel hücre çoğalması ve stromada bulunan keratositlerin fibroblast ve myofibroblastlara farklılaşmasında görev almaktadır (112-114). Bu verilere dayanarak ROCK inhibitörlerinin İKEH yara iyileşmesi üzerinde potansiyel etkileri son yıllarda önemli bir araştırma konusu olmuştur. Ayrıca, ROCK inhibitörlerinin trabeküler ağ (TA) üzerindeki etkilerinden dolayı glokom alanında literatürde çok sayıda çalışma mevcut olup bu moleküllerin bazıları göz damlası olarak klinik kullanıma girmiştir. Diğer taraftan, bazı ROCK inhibitörlerinin anti-anjiyojenik etkileri dolayısıyla retinal hipoksik neovasküler hastalıklarda etkili olabileceği bildirilmektedir (115).

Glokom

TA trabeküositler, ESM ve boş alanlardan oluşan karmaşık bir dokudur. Rho ve ROCK sinyal yolları TA'da eksprese edilmektedir ve kalsiyumdan bağımsız bir şekilde düz kas duyarlılığını, miyozin hafif zincirinin fosforilasyonu yoluyla TA'nın

kasılmasını ve LIMK/kofilin yollarıyla TA hücrelerinde stres liflerinin düzenlenmesini sağlamakta ve fokal adezyonlar oluşturarak dışa akış direncini artırmaktadır. ROCK inhibitörleri ise TA ve *schlemm* kanal hücrelerinin hücre iskeleti üzerinde etki göstererek aktin stres liflerinin yoğunluğunu azaltmaktadır. Bu moleküller schlemm kanalındaki endotel hücrelerin geçirgenliğini ve dolayısıyla konvansiyonel dışa akışı artırarak göz içi basıncı azaltmaktadır (116-121,128). Buna ek olarak ROCK inhibitörlerinden norepinefrin transport inhibisyon özelliği olan Netarsudil, aköz üretimi azaltmakta ve episeklral venöz basıncı düşürmektedir (122).

Randomize klinik çalışmalar da topikal ROCK inhibitörlerinin GİB'i düşürmede etkin olduğunu doğrulamıştır. Her ne kadar klinik kullanımları daha çok yardımcı tedavi olarak kalsa da ROCK inhibitörleri hem monoterapi olarak hem de diğer tedavilerle kombinasyon halinde GİB'de stabil bir azalma sağlamaktadır (121).

Primer açık açılı glokom tedavisi için netarsudil ve ripasudil, etkinlik ve güvenlik profilleri göze alınarak *Food and Drug Administration*(FDA) onayı almıştır. Ancak, ROCK inhibitörlerinin üveitik glokom, steroid duyarlı glokom ve psödoeksfolyasyon glokomu gibi bazı glokom çeşitlerine yönelik yapılan çalışmalarda etkinliğinin yetersiz olduğu görülmüştür (123-125).

KEH Yetmezliği

Birçok dokuda olduğu gibi İKEH'de de RhoA, ROCK-1 ve ROCK-2 ekspresyonu mevcuttur (126). Kornea endotel yetmezliği patofizyolojisinde Rho/ROCK sinyal yolağı; LIMK2/kofilin yolu, miyozin hafif zinciri ve CPI-17 molekülleri üzerinden; aktomiyozin stres liflerinin oluşumu, ESM üretimi, fokal adezyon, hücre kontraksiyonu, KEH apoptozisinin uyarılması ve hücre döngüsünün duraklaması yoluyla etki göstermektedir (72,126-129). ROCK inhibitörleri, fosfatidilinositol 3-kinaz sinyal yolağı üzerinden G1 fazını düzenleyen proteinlerden ilki olan Siklin D'nin uyarılması ve ikincisi olan p27'nin inhibe edilmesi yoluyla indüklenen KEH apoptozisinin inhibisyonu, KEH proliferasyonu ve aktomiyozin kasılmasını baskılayarak İKEH'lerin adezyonu ve yara iyileşmesini sağlamaktadır (130,131).

İn vitro kültürlenmiş İKEH'ler üzerinde yapılan ROCK inhibitörü çalışmalarında ROCK inhibitörlerinin; kornea yara iyileşmesini hızlandırdığı, pleomorfizm-polimegatizmi azalttığı, sıkı bağlantı adezyon moleküllerinin ve Na⁺/K⁺-ATPaz iyonik pompasının ekspresyonunu artırdığı, endotel-mezenkimal geçişin inhibisyonunu sağladığını (132) ve KEH yara iyileşmesini (133) ve proliferasyonu artırdığını göstermektedir (126,73).

Kornea endotel hastalığının hayvan modelleriyle yapılan in vitro ve in vivo çalışmalara ek olarak, klinik kanıtlar kornea endotel hastalığı ve transplantasyon cerrahilerinde topikal veya ön kamaraya enjekte edilen ROCK inhibitörlerinin giderek artan klinik yararlılığını göstermektedir.

FED ve iyatrojenik büllöz keratopati hastalarında yapılan bir çalışmada hastalıklı endotel dokunun eksizyonu ile birlikte bir ROCK inhibitörü olan Y-27632'nin bir hafta boyunca günde altı defa topikal uygulanması; endotel hücre sayısında artış, pakimetride ölçülen kornea ödeminin gerilemesi ve görme artışıyla sonuçlanmıştır (134). Klinik kanıtlar, FED hastalarının DWEK ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilir olduğunu gösterse DWEK'ten fayda görmeyen Fuchs distrofilisi bir hasta grubunda ek olarak topikal ROCK inhibitörü (Y-27632 veya ripasudil) tedavisi verilmiş ve bu ROCK inhibitörlerinin başarısız DWEK hastalarında potansiyel olarak yararlı bir kurtarma ajanı olabileceği anlaşılmıştır (67).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İnsan Kornea Endotelyal Primer Hücre Dizini ve Kullanılan Çözeltiler

İnsan kornea endotelyal primer hücre hattı, T25 hücre flaskında canlı hücre olarak temin edildi (Celprogen- 36081-13-T25; Pasaj 2). Yaklaşık %95 oranında adherent, %5 oranında süspansiyon olan hücre popülasyonunun ortamı 24-48 saatte bir değiştirildi. Kullanılan medyum, çözelti ve malzemeler şu şekildedir.

- 1) Serum içeren İKEH medyum (Celprogen, M36081-13S)
- 2) Serumsuz İKEH medyum (Celprogen, M36081-13)
- 3) ESM ile kaplı flask (Celprogen, E36081-13-T25)
- 4) ESM ile kaplı 6-kuyu-plaka (Celprogen, E36081-13-6)
- 5) ESM ile kaplı 96-kuyu-plaka (Celprogen, E36081-13-96)
- 6) Dondurma medyum (Celprogen, M36081-13FM)
- 7) EDTA içeren 1X PBS çözeltisi (Celprogen- P1408-013)
- 8) 1X Tripsin EDTA çözeltisi (Celprogen- T1509-014)
- 9) Y-27632 2HCl (Selleckchem-S1049)
- 10) RKI-1447 (Selleckchem-S7195)

3.2. Hücrelerin Çoğaltılması ve Pasajlanması

İKEH, steril besiyerinde, +37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe kültür edilerek çoğaltıldı. Hücreler %60-70 doluluğa ulaştıkları zaman, yapıştıkları flasktan kaldırılarak yeni flasklara pasajlandı. T25'lik flasklarda pasajlama işlemi için;

- 1) Flaskta mevcut halde bulunan medyum çekilerek 2 ml PBS (1X) ile, 2-3 dk boyunca yıkandı ve PBS ortamdan uzaklaştırıldı.
- 2) Flaska 2 ml tripsin damla damla eklendi ve 3-4 dk inkübatörde bekletildi.
- 3) İvert 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 birkaç kez pipetaj yapılarak ortam nötralize edildi.
- 5) Sonrasında hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril falkon tüplerinde toplandı ve 100 g'de 7 dakika santrifüj yapıldı.

- 6) Santrifüj sonrası altta kalan pellet üzerine 500 µl taze serumlu medyum eklendi ve resüspanse edildi.
- 7) Elde edilen hücre süspansiyonunun üzerine 5 ml taze serumlu medyum ilave edilerek T25 flasklara pasajlama yapıldı.

3.3. Hücrelerin Çözdürülmesi

Donmuş hücreleri içeren kriyotüp -80°C'den çıkartıldı ve kriyotüp 37°C'lik su banyosunda hafifçe döndürülerek hücreler hızlı bir şekilde çözdürüldü.

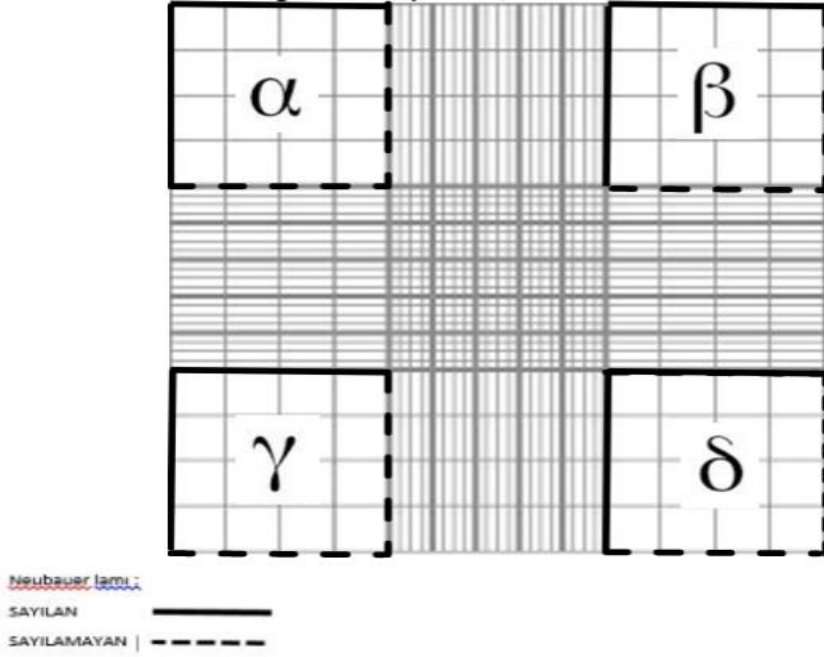
3.4. Hücrelerin Dondurulması

- 1) T25 flaskta %70-80 konfluent olduktan sonra hücrelerin üzerindeki besi yeri çekildi, 2 ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı ve PBS geri çekildi.
- 2) T75 flask için 2 ml tripsin eklenerek flask 2 dk boyunca inkübatörde bekletildi ve hücrelerin yapışma yerlerinden kaldırılması sağlandı.
- 3) Zemine yapışık hücre kalmadığı invert mikroskopla gözlemlendikten sonra 4 ml taze serumlu medyum eklendi.
- 4) Hücreleri dondurmak için hedeflenen hücre sayısı 500 bin-1 milyon arası olarak kabul edildi ve üzerine dondurma medyumunu eklenerek kriyotüplerde donduruldu.
- 5) Sonrasında izopropil alkol içeren dondurma kabı içinde en az 4 saat -20°C'de tutuldu ve sonra -80°C'de saklandı.

3.5. Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı yukarıda anlatılan şekilde tripsinize edilip, nötralize edilen flask içerisinden yapıldı. Homojenize edilen medyum ve hücre karışımından 0,5 ml, bir endorfa alındı ve 10 µL pipetaj ile alınarak Neubauer lamında hücre sayımı yapıldı. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi Neubauer lamında harflerle belirtilen karelerdeki alanlar ve karelerin sol ve üst kenarlarının üzerindeki hücreler de sayıldı.

Tüm bu alanlardaki hücreler (N) sayıldı. $N = \alpha + \beta + \gamma + \delta$; 1 mm³'teki hücre sayısı = $(N/4) \times 10^4$ formülüne göre hesaplandı.



Şekil 3.1 Neubauer Lamı

3.6. Proliferasyon DeneYleri

Deney Grupları

1. Kontrol
2. ROCK İnhibitör (Y-27632) (1 μ M)
3. ROCK İnhibitör (Y-27632) (3 μ M)
4. ROCK İnhibitör (Y-27632) (10 μ M)
5. ROCK İnhibitör (Y-27632) (30 μ M)
6. ROCK İnhibitör (RKI-1447) (0,1 μ M)
7. ROCK İnhibitör (RKI-1447) (0,5 μ M)
8. ROCK İnhibitör (RKI-1447) (1 μ M)
9. ROCK İnhibitör (RKI-1447) (10 μ M)
10. ROCK İnhibitör (RKI-1447) (30 μ M)

BrdU Testi

- 1) 96 kuyulu plakalara, her kuyuda 20 bin hücre olacak şekilde her gruptan üç deneme yapmak üzere ekim gerçekleştirildi.
- 2) Hücreler konfluent olunca deneyler için bahsedilen dozlarda, 24 saat ve 48 saat olacak şekilde serumsuz medyum içerisinde tedavi ajanları ile inkübe

edildi.

- 3) Hücrelerin proliferasyon ölçümleri, ab126556 BrdU Hücre Proliferasyon ELISA Kiti (Kolorimetrik) ile yapıldı.

Reaktiflerin Hazırlanması

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

1) 1X BrdU Reaktifi

3 mL hücre ortamına 6 µL BrdU stok eklendi.

2) 1X Plaka Yıkama Tamponu

50X plaka yıkama tamponu 50 kat seyreltildi.

3) Peroksidaz Keçi Anti-Fare IgG Konjugatı

12 mL konjugat seyrelticiye, 6 µL eklenerek 2.000 kat seyreltildi ve bu çözelti 0,22 µm'lik filtre ile filtrelendi.

Deney Prosedürü

- 1) **Hücre ekimi:** 96 kuyulu plakalara 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde, ekim gerçekleştirildi.
- 2) **Tedavi ajanlarının eklenmesi:** Tedavi ajanları BrdU analizi ile seçilen son konsantrasyonlarda 100 µL/kuyu olacak şekilde ilave edildi.
- 3) **BrdU'nun eklenmesi:** Test kuyularına 1X BrdU 20 µL hacimde ilave edilerek 2-24 saat inkübasyon gerçekleştirildi.
- 4) **Fiksasyon basamağı:** Medyum aspire edildi. Sonra 200 µL/kuyu fiksasyon çözeltisi eklendi ve oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
- 5) **Yıkama:** Plakalar 1X yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- 6) **Dedektör antikoru eklenmesi:** Anti-BrdU monoklonal dedektör antikoru 100 µL/kuyu olacak şekilde eklendi ve oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.
- 7) **Yıkama:** Plakalar 1X yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- 8) **Peroksidaz keçi anti-fare IgG konjugat hazırlanması ve eklenmesi:** 1X peroksidaz keçi anti-fare IgG konjugatı her kuyuya 100 µL eklendi.
- 9) **Yıkama:** Plakalar 1X Yıkama Tamponu ile üç kez yıkandı. Son yıkamadan sonra yıkama çözeltisi aspire edildi ve kağıt havlu üzerinde kurutuldu. Sonra tüm plaka distile su ile dolu bir beher içerisine daldırılarak son yıkama gerçekleştirildi ve kurumaya bırakıldı.

- 10) **TMB peroksidaz substratının eklenmesi:** TMB peroksidaz substrat 100 µL/kuyu olacak şekilde eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 11) **Stop çözeltisi eklenmesi ve plakanın okunması:** Her kuyuya 100 µL stop çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. 450 nm dalga boyunda plaka okuyucu kullanarak optik dansite (OD) belirlendi.

3.6.1. Tedavi Ajanlarının Hazırlanması

$C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülü ile hesaplandı.

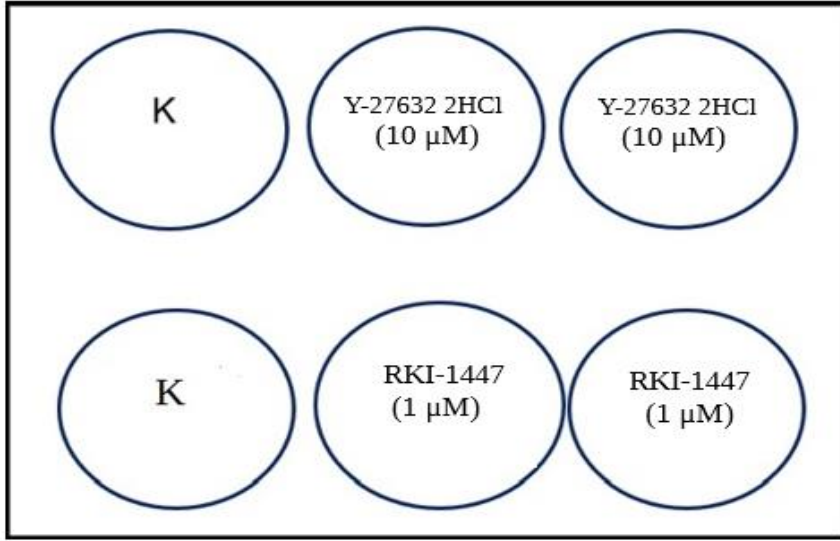
- 1) **1.ROCK İnhibitör (Y-27632):** 5 mg Y-27632, 357 µl distile su içerisinde çözüldü ve stok 14 mg/ml olarak hazırlandı. 10 µM istenen konsantrasyon son volüm 1500 µL olacak şekilde hazırlandı.
- 2) **2.ROCK İnhibitör (RKI-1447):** 10 mg RKI-1447, 154 µl DMSO içerisinde çözüldü ve stok 200000 µM olarak hazırlandı. 1 µM istenen konsantrasyon son volüm 1500 µL olacak şekilde hazırlandı.

3.7. Human ROCK-2 Seviyeleri, ROCK Aktivite Ölçümü ve PCR Deneyleri İçin Gruplar

- 1) **1.Kontrol grubu:** Sadece medyumla takip edilen hücreler
- 2) **2.ROCK İnhibitör (Y-27632):** 10 µM Y-27632 2HCl ile muamele hücreler (Selleckchem-S1049)
- 3) **3.ROCK İnhibitör (RKI-1447):** 1 µM RKI-1447 ile muamele edilen hücreler (Selleckchem-S7195)

3.8. Human ROCK-2 Seviyelerinin Ölçümü

6 kuyulu plakalara serumlu besi yeri içerisinde hücreler 10^6 hücre/2000 µL hücre ekimi gerçekleştirildi (Şekil 3.2)



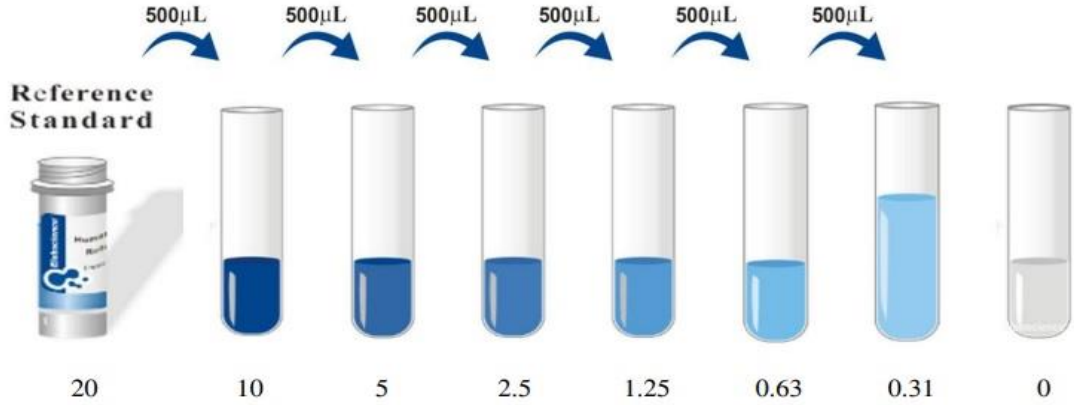
Şekil 3.2 6 Kuyulu Plakalara Ekilmiş Deney Grupları

Hücreler konfluent olunca, tedavi ajanları ile deney gruplarında belirtilen şekilde 48 saat CO₂ inkübatöründe 37°C'de inkübasyon gerçekleştirildi. Sonrasında, medyumlar çekildi ve hücrelerin üzerine 1000 µL PBS eklenip hücre kazıyıcı kullanılarak kaldırıldıktan sonra ependorflara aktarıldı. Mikrosantrifüj ile 500 g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Ependorflardaki pelletlerin üzerine 500 µL *RIPA Lysis Buffer* eklenerek her bir ependorf vortekslendi ve -80 °C'ye kaldırıldı. Kaldırılan bu numunelerden *Human ROCK-2* ELISA kiti (Elabscience, E-EL-H0923, *Rho Associated Coiled Coil Containing Protein Kinase 2*) ve ROCK aktivite kiti (Cell Biolabs STA-416), çalışıldı.

3.8.1. Reaktif Hazırlama

- 1) Kit içeriğinde bulunan tüm reaktifler, kullanılmadan önce oda sıcaklığına (18~25 °C) getirildi.
- 2) **Yıkama tamponu:** 30 mL konsantre yıkama tamponu, 720 mL distile su ile seyreltili.
- 3) **Standart çalışma çözeltisi:** Standart 10.000 g'de 1 dakika santrifüjlendi üzerine 1.0 mL referans standart & örnek seyreltici eklendi ve 10 dakika bekletildi. Sonra birkaç kez nazikçe alt-üst edildi. 7 tane ependorf tüpü alındı, her tüpe 500 µL referans standart ve örnek seyreltici eklendi. İlk tüpe 20 ng/mL çalışma çözeltisinden 500 µl pipetlendi ve 10 ng/mL çalışma çözeltisi elde edildi. Bu adıma göre önceki tüpten ikinci tüpe çözeltiden

500 µL sırasıyla pipetlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Human ROCK-2 Standartlarının Hazırlanması

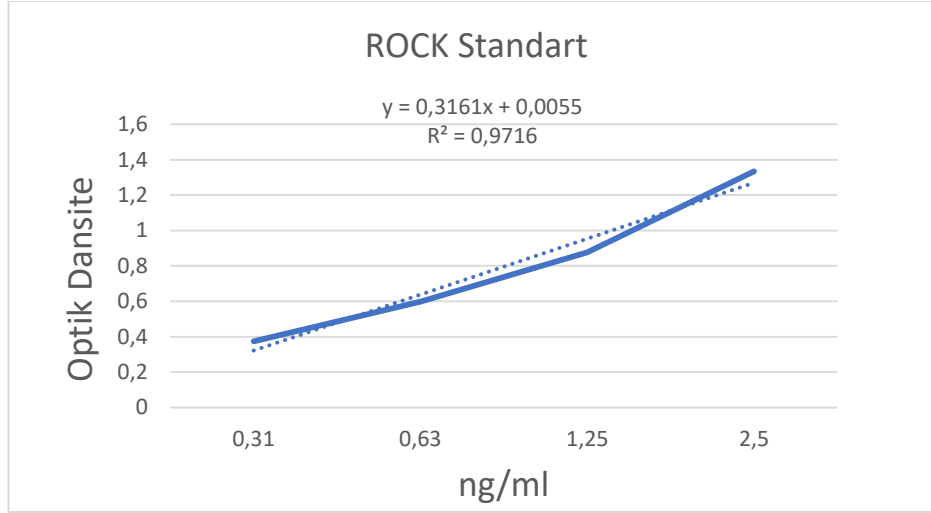
- 4) **Biyotinlenmiş Ab çalışma çözeltisi:** 100µL/kuyu olacak şekilde eklendi. Konsantre biyotinlenmiş saptama Ab 800xg'de 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Ardından 100x konsantre biyotinlenmiş saptama Ab' yi biyotinlenmiş saptama Ab seyreltici ile 1x çalışma çözeltisine seyreltildi.
- 5) Konsantre HRP konjugat çalışma çözeltisi: 100µL/kuyu olacak şekilde eklendi. 100X konsantre HRP konjugatı, konsantre HRP konjugat seyreltici ile 1X olarak seyreltildi.

Ölçüm Prosedürü

- 1) 100 µL hazırlanan standartlar ve örnekler duplike şekilde kuyulara eklendi.
- 2) Hemen her kuyuya 100 µL biyotinlenmiş saptama Ab çalışma çözeltisi eklendi. 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- 3) Her kuyuya 350 µL yıkama tamponu eklendi. Bu yıkama adımı üç kez tekrarlandı.
- 4) Her kuyuya 100 µL Human ROCK-2 ve *Avidin-Horseradish Peroxidase* (HRP) konjugatına özgü çalışma çözeltisi eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 5) Çözelti her kuyudan boşaltılarak, yıkama işlemini 3. adımda gerçekleştirildiği gibi beş kez tekrarlandı.
- 6) Her kuyucuğa 90 µL Substrat Reaktif eklendi. 15 dakika süreyle 37°C'de karanlık ortamda inkübe edildi.
- 7) Son olarak, her bir kuyucuğa 50 µL stop çözeltisi eklendi.
- 8) 450 nm'ye ayarlanmış mikropłaka okuyucu ile her kuyunun OD değeri belirlendi.

Sonuçların Hesaplanması

Her standart ve numune için çift okumaların ortalamasını alındı. Ardından ortalama sıfır standart OD çıkarıldı. X ekseninde standart konsantrasyon ve y ekseninde OD değerleri ile log-log ekseninde dört parametrelili bir lojistik eğri çizildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 ROCK-2 Standart Eğrisi

3.9. ROCK Aktivitesinin Belirlenmesi

Cell Biolabs'ın 96 kuyulu ROCK aktivite test kiti (STA-416), ROCK tarafından Thr696'daki MYPT1'in spesifik fosforilasyonunu saptamak için geliştirilmiş enzim immünoanaliz prensibine uymaktadır. 96 kuyulu mikropalakalar bir rekombinant MYPT1 ile önceden kaplanmıştır. Bu test kiti, fizyolojik substrat kullanarak ROCK aktiviteyi saptayan izotopik olmayan, hassas ve spesifik bir yöntem sağlar.

Reaktiflerin Hazırlanması

- DTT ve ATP içeren 10X kinaz reaksiyon tamponu: 970 μ L 10X kinaz tamponuna 10 μ L 1M DTT ve 20 μ L 100 mM ATP çözeltisi eklendi.
- Seyreltilmiş aktif ROCK-2 pozitif kontrol: 172 μ L deiyonize suya 8 μ L aktif ROCK-2 ve 20 μ L 10X kinaz tamponu eklendi.
- 1X yıkama tamponu: 10X yıkama tamponu konsantresi deiyonize suyla 1X'e seyreltildi.
- Anti-Phospho-MYPT1 (Thr696) antikoru ve HRP-konjuge ikincil antikor:

Kullanımdan hemen önce anti-fosfo-MYPT1 (Thr696) antikorunu, 1:1000 ve HRP-konjuge ikincil antikorunu ve 1:1000 test seyreltici ile seyreltildi.

Test Protokolü

- 1) Hücre lizatlarından elde ettiğimiz numuneler duplike olarak test edildi.
- 2) Rekombinant MYPT1 ile önceden kaplanmış 96 kuyunun her birine 90 µL seyreltilmiş aktif ROCK-2 pozitif kontrol ve numuneler eklendi.
- 3) Sonrasında DTT ve ATP içeren 10X kinaz reaksiyon tamponundan 10 µL eklendi.
- 4) Plaka üzeri kapatılarak 30°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 5) Kuyular içindeki sıvı aspire edilerek, her kuyuya 50 µL 0,5 M EDTA (pH 8.0) eklenerek kinaz reaksiyonu durduruldu.
- 6) Sonrasında kuyu başına 250 µL 1X yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- 7) Her bir kuyuya 100 µL seyreltilmiş anti-fosfo-MYPT1 (Thr696) antikorunu eklendi.
- 8) Plaka üzeri kapatılarak oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde bir saat inkübe edildi.
- 9) Kuyu içeriği aspire edildi. Kuyu başına 250 µL 1X yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- 10) Her kuyucuğa 100 µL seyreltilmiş HRP konjuge ikincil antikor eklendi.
- 11) Plaka üzeri kapatılarak oda ısısında orbital çalkalayıcı üzerinde bir saat inkübe edildi.
- 12) Kuyu içeriği aspire edildi. Kuyu başına 250 µL 1X yıkama tamponu ile üç kez yıkandı.
- 13) Tüm kuyulara 100 µL substrat çözeltisi eklendi, orbital çalkalayıcıda 20 dakika inkübe edildi.
- 14) Her kuyuya 100 µL stop çözeltisi ekleyerek enzim reaksiyonu durduruldu.
- 15) 450 nm'ye ayarlanmış spektrofotometrede her kuyunun OD değeri belirlendi.

3.10. Yara İyileşmesi (Wound Healing) Deneyi

Belirlenen doz ve sürelerde İKEH'lere tedavi ajanları uygulandı. Sonrasında yara iyileşmesi deneyleri için bir pipet ucu vasıtasıyla yara bölgesi çizimi gerçekleştirildi. Çizilen yara bölgesi içindeki alan ImageJ programı ile hesaplandı ve yara iyileşmesi süresi takip edildi.

3.11. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

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

3.11.1.Total RNA İzolasyonu

Tedavi ajanları ile 48 saat inkübe edildikten sonra 6 kuyulu plakaların üzerindeki besi yeri uzaklaştırıldı. Hücreler, hücre kazıyıcı kullanılarak kaldırıldı ve mikrosantrifüj ile 300 g'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant atıldı. Ependorflardaki pelletlerin üzerine 500 µL Trizol (TRizol^(R) Reagent, ambion by life technologies, ref 15596018) ilave edildi. Hücreler, saf bir RNA eldesi için -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 100 µL kloroform eklendi.
- 4) 4°C'de 12,000 xg 15 dk santrifüj edildi. Sıvı faz yeni tüplere alındı.
- 5) Örneklerin üzerine 500 µL izopropanol eklendi.
- 6) 4°C'de 12,000 xg de 10 dk santrifüj edildi ve üzeri döküldü.
- 7) Tüpte kalan pelletin üzerine 1 ml %70 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'ta* 60°C'de 10 dk inkübe edildi.
- 12) Son aşamada cDNA sentez aşamasına geçildi.

3.11.2. cDNA Sentezi

Elde edilen Total RNA, cDNA sentez kiti [*A.B.T.*TM *cDNA Synthesis Kit with RNase Inh. (High Capacity)*] kullanılarak cDNA'ya çevrildi.

cDNA sentez aşamaları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 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 3.2'ye uygun olarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Tablo 3.2 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

3.11.3. RT-PCR

PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri Tablo 3.3'te gösterildi.

Tablo 3.3 Primer Dizileri

Primer adı	Forward (sense)	Reverse (antisense)
ZO-1	ACCAGTAAGTCGTCCTGATCC	TCGGCCAAATCTTCTCACTCC
Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz	CTGTGGATTGGAGCGATTCTT	TTACAACGGCTGATAGCACCA
AQP-1	CATTTAGAGGGTGAAGGAGAAA	GAGGGAGTAGAGAAGTGAAGA
COL8A2	CGACCTGAAAGCACGTCCAC	AGAGGCATTTTCAGTAGCAGCA
TGF- β 1	CCCAGCATCTGCAAAGCTC	GTCAATGTACAGCTGCCGCA
SLC4A11	GGACATCGCACGCAGGTT	CGTCATTGAGAGACCCGAAAG
E-Cadherin	CGACCCAACCCAAGAATCTA	AGGCTGTGCCTTCTACAGA
GAPDH	CAGCCTCAAGATCATCAGCA	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA

Bu çalışmada 96 kuyucuklu mikroplaka 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 kullanılmaktadır. Primerlerin bağlanması ile az sayıdaki boya molekülü çift sarmal DNA'ya bağlanmaktadır. DNA'ya bağlanan *SYBR Green* moleküllerinin uyarılması, etkili şekilde ışık saçılımının artmasına neden olmaktadır. Uzama aşamasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanmaktadır. RT-PCR ile kontrol grubu ve deney grupları arasındaki gen ekspresyonlarının nasıl değiştiği belirlendi.

Elde edilen cDNA'lara RT-PCR uygulandı. Uygulanan PCR protokolü Tablo 3.4'te detaylandırıldı.

Tablo 3.4 RT-PCR Protokolü

Döngü	Döngü süresi	Sıcaklık
1 ^a	15 dakika	95 °C
40	15–30 dakika ^b 30 dakika ^c 30 dakika	95 °C 55–65 °C ^d 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.

3.12. İstatistiksel Analiz

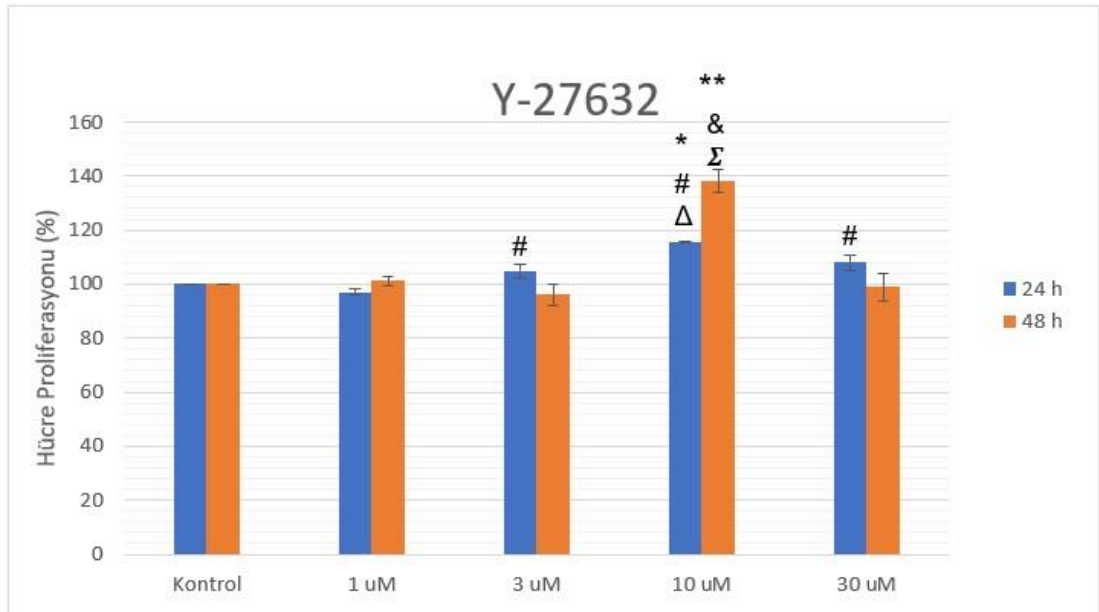
Veriler SPSS 25.0 (*IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)*) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart hata ile ifade edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları test etmek için tek/ çift yönlü varyans analizi (*ANOVA*) kullanıldı.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

4. BULGULAR

4.1. BrdU Hücre Proliferasyon Deneyi Sonuçları

4.1.1. Y-27632'nin Farklı Dozlarının İKEH Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

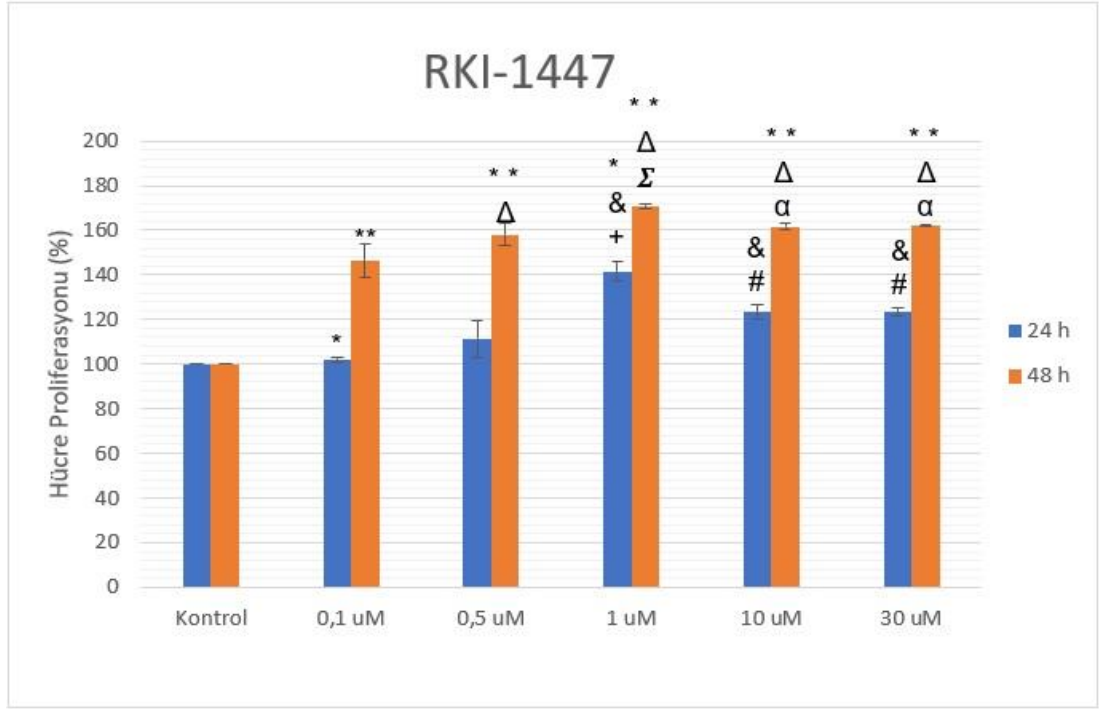
İKEH Y-27632'nin 1-3-10-30 μM arasında değişen dozları ile 24 ve 48 süresince inkübe edildi. Hücrelerin proliferasyon yeteneği BrdU analizi ile saptandı. İKEH kültüründe 3 bağımsız Y-27632 deneyi yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı. 10 μM Y-27632 24 saat inkübasyon sonrasında hücre proliferasyonunu kontrol, 1 μM ve 3 μM gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdı ($p < 0,05$). Ayrıca 3 μM ve 30 μM Y-27632 24 saat inkübasyon sonrasında hücre proliferasyonunu 1 μM 'a göre anlamlı düzeyde artırdı ($p < 0,05$). Buna ek olarak 10 μM Y-27632 48 saatte 1,3 ve 30 μM 'a göre hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde artırdı ($p < 0,05$). Bu nedenle ELISA ve RT-PCR deneyleri için 10 μM Y-27632 etkin doz olarak, 48 saat ise etkin süre olarak seçildi ve hücrelerin inkübasyonunda kullanıldı (Şekil 4.1)



Şekil 4.1 Y-27632'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin BrdU Analizi ile Belirlenmesi [Y-27632'nin (1-3-10-30 μM) 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 Y-27632 1 μM grubundan fark; $\Delta p < 0,05$ 24 saat inkübasyon sonrası Y-27632 3 μM grubundan fark; ** $p < 0,05$ 48 saat inkübasyon sonrası Y-27632 1 μM grubundan fark, & $p < 0,05$ 48 saat inkübasyon sonrası Y-27632 3 μM grubundan fark, $\Sigma p < 0,05$ 48 saat inkübasyon sonrası Y-27632 30 μM grubundan fark]

4.1.2. RKI-1447'nin Farklı Dozlarının İKEH Proliferasyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

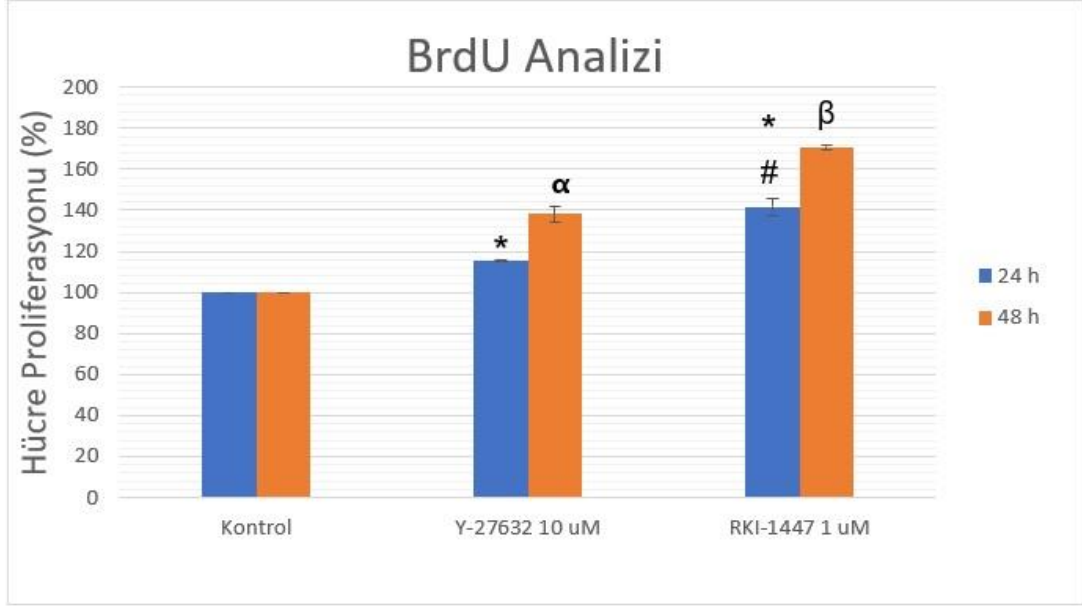
İKEH, RKI-1447'nin 0,1-0,5-1-10-30 μM arasında değişen dozları ile 24 ve 48 saat süresince inkübe edildi. Hücre proliferasyonu BrdU analizi ile saptandı. Hücre proliferasyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,1 ve 1 μM 'lık dozlarda 24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli ölçüde yüksek bulundu ($p<0,05$). Ayrıca 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 1 μM , 10 μM ve 30 μM ile inkübasyon sonrası RKI-1447'nin hücre proliferasyonu aynı sürede 0,1 μM ile inkübe edilen gruba göre anlamlı düzeyde artırdığı saptandı ($p<0,05$). 1 μM RKI-1447 ile inkübe edilen grup 24 saate 0,5-10-30 μM ile inkübe edilen gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Ayrıca 48 saatlik 0,1-0,5-1-10-30 μM dozlarda RKI-1447 inkübasyon süresi sonunda hücre proliferasyonunu aynı sürede kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttırdığı saptandı ($p<0,05$). 0,5-1-10-30 μM dozlarda uyguladığımız RKI-1447 48 saat inkübasyonda 0,1 μM 'a göre istatistiksel olarak hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde artırdı ($p<0,05$). Bunun yanı sıra 1 μM RKI-1447 grubu 48 saatte 0,5-10-30 μM gruplarından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). Bu nedenle ELISA ve RT-PCR deneyleri için 1 μM RKI-1447'nin etkin doz olarak, 48 saat ise etkin süre olarak seçildi ve hücrelerin inkübasyonunda kullanıldı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 RKI-1447'nin Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisinin BrdU Analizi ile Belirlenmesi [RKI-1447'nin (0,1-0,5-1-10-30 µM) farklı dozlarında 24 ve 48 saat inkübasyonu; Ortalama ± standart hata; n=3, *p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; &p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası 0,1 µM dozdan fark; +p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası 0,5 µM grubundan fark; #p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası 1 µM grubundan fark; **p<0,05 48 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; Δp<0,05 48 saat inkübasyon sonrası 0,1 µM grubundan fark; Σp<0,05 48 saat inkübasyon sonrası 0,5 µM grubundan fark; αp<0,05 48 saat inkübasyon sonrası 1 µM grubundan fark]

4.1.3. Y-27632 ve RKI-1447 Etkin Dozlarının İKEH Proliferasyonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Y-27632 ve RKI-1447 için yukarıda belirlenen etkin dozlar kullanılarak 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında İKEH proliferasyonu değişiklikleri BrdU analizi ile belirlendi ve gruplar arasında karşılaştırıldı. Hücreler Y-27632 (10 µM) ve RKI-1447 (1 µM) ile 24 ve 48 saat süresince inkübe edildi. Üç bağımsız deney yapıldı ve yapılan tüm deneylerin ortalaması alındı. Y-27632 ve RKI-1447 24 ve 48 saat sonrasında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdı (p<0,05). Diğer taraftan, hem 24 hem de 48 saatte, RKI-1447'nin hücre proliferasyonunu Y-27632'ye göre daha fazla artırdığı saptandı (p<0,05) (Şekil 4.3).

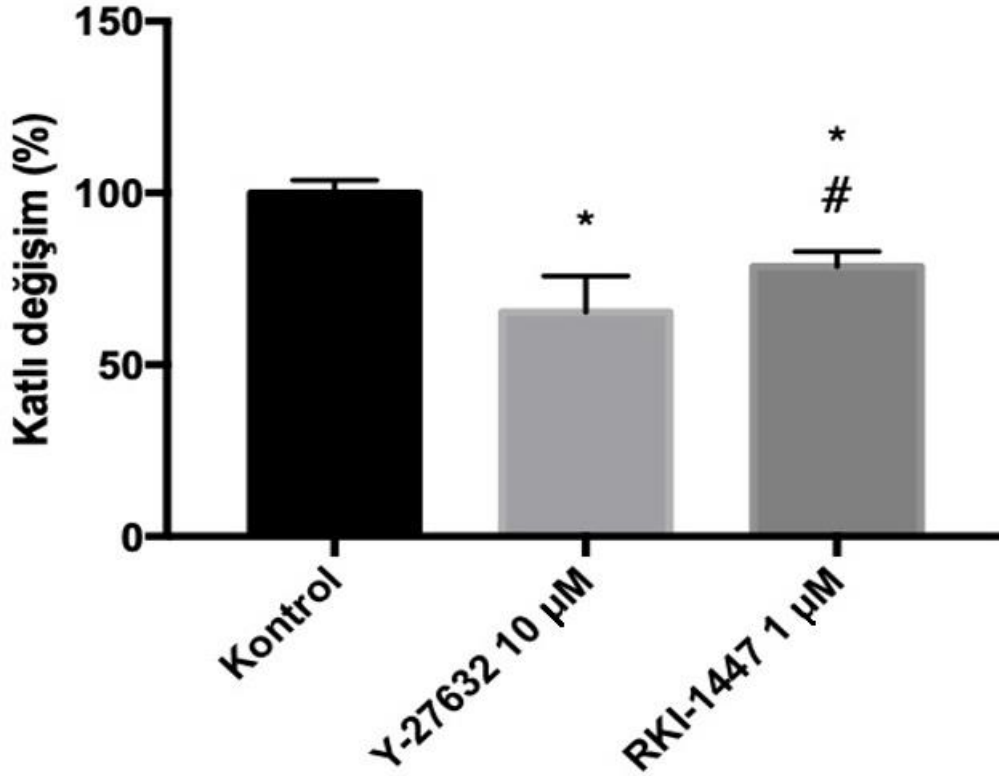


Şekil 4.3 Y-27632 ve RKI-1447 Uygulanmasının Hücre Proliferasyonuna Etkisi [Y-27632 (10 µM) ve RKI-1447 (1 µM) 24 saat ve 48 saat inkübasyonları; Ortalama ± standart hata; n=3, *p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark; ^αp<0,05 48 saat inkübasyon sonrası kontrol grubundan fark, #p<0,05 24 saat inkübasyon sonrası Y-27632 grubundan fark; ^βp<0,05 48 saat inkübasyon sonrası Y-27632 grubundan fark]

4.2. ROCK-2 Seviyesi Ölçümleri

İKEH'de Y-27632 (10 µM) ve RKI-1447 (1 µM) ile 48 saat inkübasyonu takiben ROCK-2 seviyeleri ölçüldü. ROCK-2 seviyesi kontrol grubu ile kıyaslandığında Y-27632 ve RKI-1447 inkübasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olduğu saptandı (p<0,05). Bunun yanı sıra Y-27632 ile inkübe edilen grupta RKI-1447 grubuna göre daha düşük ROCK-2 seviyeleri gözlemlendi (p<0,05) (Şekil 4.4).

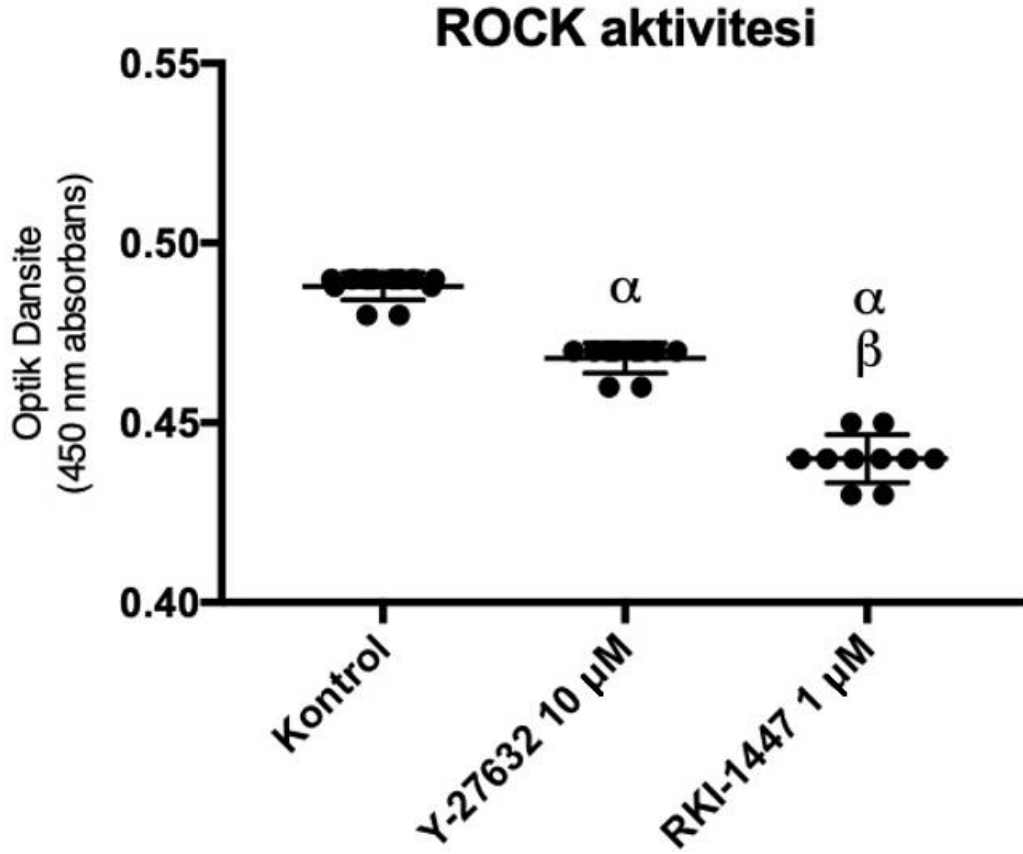
ROCK 2



Şekil 4.4 Y-27632 ve RKI-1447 ile 48 saat inkübasyon sonrası ROCK-2 katlı değişimi [Y-27632 (10 µM) ve RKI-1447 (1 µM) 48 saat inkübasyonları; Ortalama ± standart hata; n=3, *p<0,05 kontrol grubundan fark; #p<0,05 Y-27632 grubundan fark]

4.3. ROCK Aktivite Ölçümleri

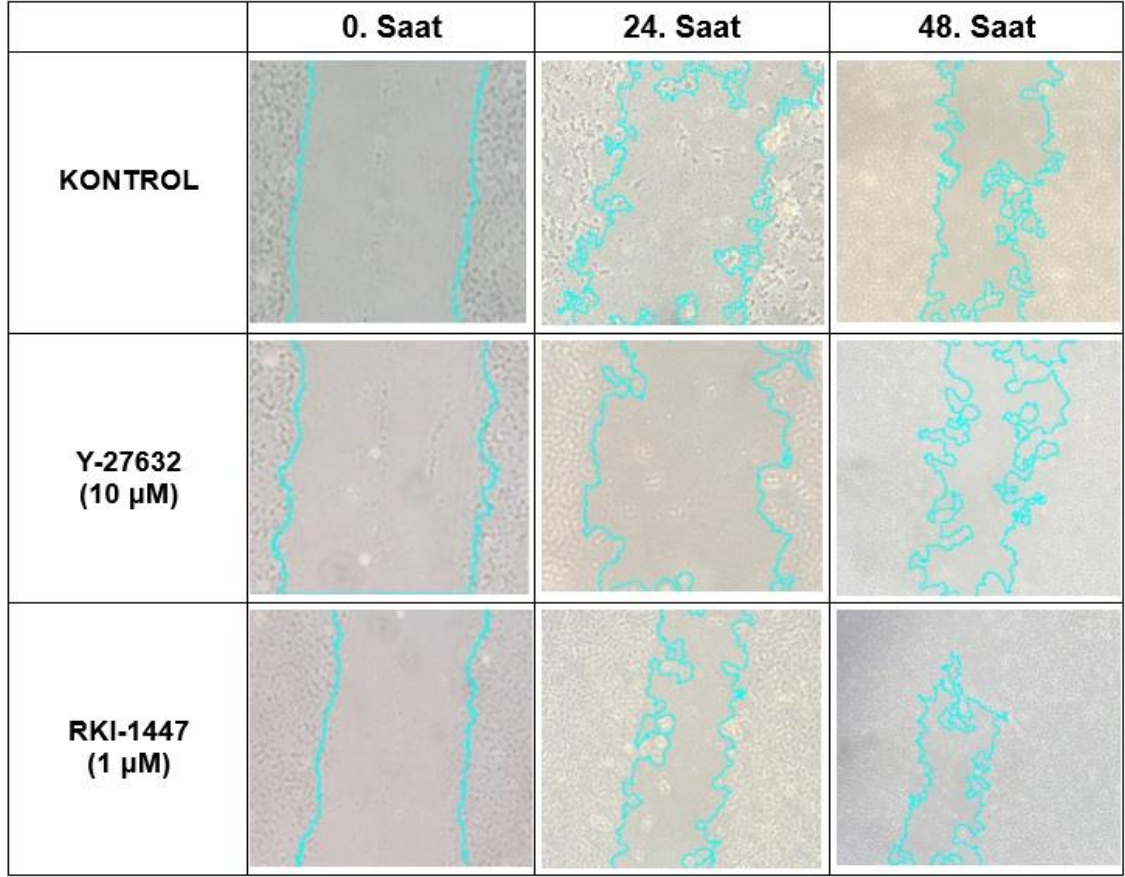
İKEH'de Y-27632 (10 µM) ve RKI-1447 (1 µM) ile 48 saat inkübasyonu takiben ROCK aktiviteleri ölçüldü. ROCK aktivitesi kontrol grubu ile kıyaslandığında Y-27632 ve RKI-1447 inkübasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olduğu saptandı (p<0,05). Bunun yanı sıra RKI-1447 ile inkübe edilen grupta Y-27632 grubuna göre daha düşük ROCK aktivitesi gözlemlendi (p<0,05) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Y-27632 ve RKI-1447 ile 48 saat inkübasyon sonrası ROCK aktivite değişimi [Y-27632 (10 µM) ve RKI-1447 (1 µM) 48 saat inkübasyonları; Ortalama ± standart hata; n=3, ^αp<0,05 kontrol grubundan fark; ^βp<0,05 Y-27632 grubundan fark]

4.4. İKEH Yara İyileşmesi Deneyleri

Yapmış olduğumuz İKEH yara iyileşmesi deneylerinde kontrol, Y-27632(10 µM) ve RKI-1447(1 µM) grupları 24 saat ve 48 saat şeklinde takip edildi. Yara iyileşmesi kontrol grubunda ilk 24 saatte %10, ilk 48 saatte %47 iken Y-27632 grubunda ilk 24 saatte %17, ilk 48 saatte %47 olarak saptandı. RKI-1447 grubunda ise yara alanı ilk 24 saatte %60, ilk 48 saatte %78 oranında iyileşti. Veriler birlikte değerlendirildiğinde RKI-1447 uygulanan grupta hücrelerin iyileşme kapasitesinin hem kontrol hem Y-27632 grubuna göre yüksek olduğu; Y-27632 grubunda ise yara iyileşme oranının ilk 24 saatte kontrol grubuna göre yüksek ancak 48. saatte benzer seviyede olduğu saptandı. (Şekil 4.6)



Şekil 4.6 Y-27632 ve RKI-1447 ile inkübasyonu yapılan hücre gruplarının yara iyileşmesi görüntülenmesi

4.5. RT-PCR Sonuçları

İKEH'lerde, hedef genler olan TGF- β 1, Na⁺-K⁺-ATPaz, ZO-1, COL8A2, Aquaporin 1, E-cadherin, SLC4A11 ve GAPDH mRNA ekspresyonları incelendi. Ancak 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.

Tüm bu verilerimize ek olarak tezimizde ayrıca RhoA inhibitörü olan C3'ün tedavi ajanı olarak kullanılması, hücre döngüsü analizi ve immünohistokimyasal analizlerin yapılması da planlanmıştı; ancak tüm dünyayı etkisi altına alan COVID-19 pandemisi, fiyat dalgalanmaları, üretim ve lojistik sorunlar nedeniyle gerekli malzemelerin temini konusunda gecikmeler ve kısıtlılıklar yaşanmış olup bu analizler gerçekleştirilememiştir.

Yukarıda bahsedilen kısıtlamaların giderilerek analizlerin daha sonra tekrar edilebilmesi için hücreler -80 dereceye dondurularak kaldırılmıştır.

5.TARTIŞMA

İKEH'ler hücre döngüsünün G1/S fazında duraklamıştır ve in vivo proliferasyon kapasiteleri kısıtlıdır (2). Bu nedenle, herhangi bir sebeple endotel hücre sayısı azaldığında veya endotel tabakası hasarlandığında geride kalan sağlam hücreler hacimsel olarak büyümekte ve hasarlı bölgeye göç ederek endotel fonksiyonlarının devamını temin etmektedirler. Eğer, hasarlı bölge bu mekanizmalar ile tamir edilemezse endotel yetmezliği ve buna bağlı kornea ödemi gelişir.

Geçmişte kalıcı endotel yetmezliğine bağlı kornea ödeminin tek tedavisi tam kat PK iken son yıllarda yerini EK'ye bırakmaya başlasa da dünya genelinde donör yetersizliği sorunu devam etmektedir (44-46). Bu nedenle endotel yetmezliği tedavisi için mevcut İKEH'lerin proliferasyonunun in vivo uyarılması ve kültüre edilmiş İKEH'lerin göz içine transferi (direkt enjeksiyon veya taşıyıcı bir plaka üzerinde) gibi hücre temelli tedavi yaklaşımlarına yönelik araştırmalar son yıllarda hız kazanmıştır (68-74). Bu alanda ROCK inhibitörlerinin İKEH üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar önemli bir yer tutmaktadır.

Bu tez çalışmasında daha önceden birçok çalışmada kullanılmış olan Y-27632 ve daha önce İKEH üzerine etkinliği hiç araştırılmamış olan RKI-1447'nin İKEH proliferasyonu ve endotel yara iyileşmesi üzerine olan etkinliği karşılaştırıldı.

Çalışmada öncelikle Y-27632'nin 1-3-10-30 µM arasında değişen dozları BrdU testi ile değerlendirilmiş olup 10 µM'nin en etkin doz olduğu saptandı. Benzer şekilde RKI-1447'nin 0,1-0,5-1-10-30 µM arasında değişen dozları test edildikten sonra 1 µM RKI-1447'nin İKEH proliferasyonu için en etkili doz olduğu tespit edildi.

Y-27632, ROCK-1 ve ROCK-2' yi inhibe etmektedir. Y-27632, Ca²⁺ duyarlılığını seçici olarak inhibe ederek çeşitli agonistler tarafından indüklenen düz kas kasılmasını engellemekte, kültürlenmiş hücrelerde Rho kaynaklı stres liflerinin oluşumunu baskılamakta ve aktomiyozin aktivasyonunu bloke etmektedir (92). RKI-1447 ise ROCK-1 ve ROCK-2 üzerinden etki eden oldukça potent ve selektif bir ROCK inhibitörüdür. RKI-1447, lizofosfatidik asit (LPA) stimülasyonunun ardından ROCK-1/ROCK-2 aracılı hücre aktin stres lifi oluşumunu inhibisyonda oldukça seçici etkiye sahiptir. RKI-1447, insan kanser hücrelerinde ROCK substratları olan MLC-2 ve MYPT-1'in fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Ancak diğer ROCK inhibitörlerinden farklı olarak 10 µM kadar yüksek konsantrasyonlarda bile diğer kinazların fosforilasyon seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmamaktadır. Bu durum da RKI-1447'nin selektifliğini ve yan etki riskinin düşük olmasını kanıtlamaktadır (108,115).

Bu çalışmada Y-27632 ve RKI-1447 için yukarıda bahsedilen etkin dozlar

kullanılarak 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında İKEH proliferasyonu değişiklikleri BrdU analizi ile belirlendi ve gruplar arasında karşılaştırıldı. Y-27632 ve RKI-1447 24 ve 48 saat sonrasında kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde artırdı. Diğer taraftan, hem 24 hem de 48 saatte, RKI-1447'nin hücre proliferasyonunu Y-27632'ye göre daha fazla artırdığı saptandı.

Literatüre bakıldığında, çalışmaların büyük çoğunluğu Y-27632'nin İKEH üzerine olan etkilerine odaklanmıştır. Örneğin, Bi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada İKEH kültüründen 36 saat sonra değerlendirilen hücre proliferasyon testinde Y-27632 uygulanan İKEH'lerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek Ki67 pozitif hücrelerin varlığı saptanmıştır. Bahsedilen çalışmada Ki67 hücresel proliferasyon işareti olarak kullanılmıştır (75). Okumura ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada Y-27632 ve diğer bir ROCK inhibitörü olan Y-39983'ün kültüre edilmiş İKEH ve maymun KEH'lerinin proliferasyon özellikleri üzerine etkileri EdU ve BrdU testleriyle değerlendirilmiş, 0,3 ve 3,0 µM konsantrasyonlarda Y-39983'ün kontrol grubuna göre belirgin düzeyde proliferasyonu artırdığı, 10 µM Y-27632 ile benzer etki gösterdiği bulunmuştur (130). Mishan ve arkadaşları tarafından yapılan bir İKEH kültürü çalışmasında da Y-27632'nin kontrol grubuna göre hücre proliferasyonu ve canlılığını artırdığı gözlenmiştir (104).

Diğer taraftan, Pipparelli tarafından yapılan çalışmada Y-27632'nin İKEH'ler üzerine etkisi araştırılmıştır. Yara iyileşmesi deneyinde Y-27632 eklenmiş ortamda kontrol grubuna göre fibroblastik görünümde hücre sayısı belirgin oranda artmış ve EdU pozitif hücre sayısı azalmıştır. Bu durum Y-27632 ile muamele edilen İKEH'lerde proliferasyonun tetiklenmediği aksine inhibe edildiği göstermektedir (133). Bu çelişki daha sonra Peh ve meslektaşlarının yapmış olduğu, genç donörlerden elde edilen İKEH'lerin Y-27632'ye daha duyarlı olduğunu ve ROCK inhibisyonunun etkisinin korneanın durumuna bağlı olarak değişebileceğini öne sürdüğü çalışmada açıklanmıştır. Aynı çalışmada BrdU testinde 48 saatlik değerlendirmede Y-27632'nin kontrol grubuna göre hücre proliferasyonu ve adezyonu artırdığı saptanmıştır. Ancak, deneyler 60 yaş üstü bireylerden elde edilen kornea kaynaklı hücreler ile tekrarlandığında Y-27632 grubu ve kontrol grubu arasında belirgin bir fark saptanmamıştır (135).

Literatürde ROCK inhibitörlerinden RKI-1447'nin İKEH üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte oküler hipertansiyon ve bazı kanser türleri üzerine sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Örneğin, Dang ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği pigmenter glokom domuz modeli deneyinde ön kamaraya enjekte

edilen RKI-1447'nin TA yapısında belirgin mikro-makroskopik histolojik değişiklik oluşturmada stres liflerini baskılayarak ve fagositoz etkisini artırarak intraoküler basıncı kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde düşürdüğü saptanmıştır. Aynı çalışmada RKI-1447 trabeküler dışı akımı %38.25 artırmış ve GİB'i %33.58 oranında düşürmüştür (128).

Patel ve arkadaşlarının transgenik fare-meme kanseri modeli çalışmasında RKI-1447 tümör boyutunu %87 oranında küçülmüş, tümör aktivitelerini ve invazyonunu baskılamıştır (108). Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ROCK sinyal yolunun RKI-1447 tarafından inhibisyonunun, hücre iskeleti ile ilişkili mitokondriyal disfonksiyon ve hücrel biyoenerjetik bozulma yoluyla kolorektal kanseri baskılayabildiğini gösterilmiştir (109).

Dyberg ve arkadaşlarının fare medulloblastom çalışmasında RKI-1447 kontrol grubuna göre tümör hücre proliferasyonunu ve boyutunu istatistiksel olarak azaltmıştır. Bahsedilen çalışma ROCK inhibisyonunun medulloblastomda, özellikle metastatik hastalığı olan çocuklar için potansiyel yeni bir terapötik seçenek sunduğunu göstermektedir (110).

Tüm bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, literatürde RKI-1447'nin kullanıldığı oldukça kısıtlı sayıda bilimsel araştırma olduğu açıktır. Yukarıda bahsedilen glokom modeli çalışmasında görüldüğü üzere RKI-1447, Y-27632 ile benzer şekilde stres liflerinin azalmasına yol açmaktadır. Diğer taraftan RKI-1447'nin normal hücrelerden tamamen farklı hücrel özelliklere sahip ve kontrolsüz bölünme yeteneğine sahip kanser hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkisi çalışmamızda bulduğumuz RKI-1447'nin fizyolojik normlara sahip İKEH proliferasyonunu uyarması ile karşılaştırılmamalıdır. ROCK inhibitörlerinin birçok kanser hücresinde hücre döngüsünün ilerlemesini baskılayıp, aksine KEH'lerde duraklamış olan hücre döngüsünü ilerletmesi Okumura ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada açıklanmıştır (130). Bahsedilen çalışmada Siklin D ve p27, hücre döngüsünün G1/S ilerlemesinin düzenleyicileridir. Ayrıca, ROCK inhibitörlerinin fosfatidilinositol 3-kinaz sinyalinin aktivasyonu yoluyla Siklin D seviyelerini artırıp ve p27kip1'in fosforilasyonunu baskıladığı gösterilmiştir.

Bu tez projesinde Y-27632 ve RKI-1447'nin İKEH proliferasyonu uyardığı saptanmış olmasına karşın bu hücrelerin endotel yara iyileşmesi üzerine etkileri de ayrıca önem taşımaktadır. Bu amaçla yapmış olduğumuz İKEH yara iyileşmesi deneylerinde kontrol, Y-27632 ve RKI-1447 grupları 24 saat ve 48 saat sonra değerlendirildi. Yara iyileşmesi kontrol grubunda ilk 24 saatte %10, 48 saatte %47

iken Y-27632 grubunda ilk 24 saatte %17, ilk 48 saatte %47 olarak saptandı. RKI-1447 grubunda ise yara alanı ilk 24 saatte %60, 48 saatte %78 oranında iyileşti. Veriler birlikte değerlendirildiğinde RKI-1447 uygulanan grupta hücrelerin iyileşme kapasitesinin hem kontrol hem Y-27632 grubuna göre yüksek olduğu; Y-27632 grubunda ise yara iyileşme oranının ilk 24 saatte kontrol grubuna göre yüksek ancak 48. saatte benzer seviyede olduğu saptandı. Bu bulgular İKEH proliferasyonu ve aynı zamanda endotel yara iyileşmesi üzerine RKI-1447'nin Y-27632 üzerine üstün olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Literatürde incelendiğinde, RKI-1447 ve Y-27632'nin karşılaştırıldığı göz hastalıklarına ait bir çalışma olmamasına karşın, Y-27632'nin İKEH yara iyileşmesi üzerine etkileri bazı çalışmalar tarafından incelenmiştir. Örneğin, bir İKEH yara iyileşmesi çalışmasında Y-27632 eklenmiş ortamda kontrol grubuna göre daha hızlı bir iyileşme gözlenmiştir. Literatürde RKI-1447'nin KEH proliferasyonu ve endotel yara iyileşmesine üzerine etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamakla beraber Dang ve arkadaşlarının yaptığı oküler hipertansiyon modeli çalışmasında da RKI-1447 molekülünün TA hücrelerinde motilite (migrasyon) üzerine etkisinin olmadığı saptanmıştır (128).

Bu tez çalışmasında ise Y-27632'nin İKEH proliferasyonunu uyardığını; İKEH yara iyileşmesini hızlandırırsa da 48 saat sonra kontrol grubu ile benzer olduğu saptandı. Diğer taraftan RKI-1447'nin etkin dozlarında yapılan testlerde hem proliferasyon hem de yara iyileşmesini Y-27632'den daha belirgin şekilde uarması RKI-1447'nin Y-27632'ye göre daha potent olduğunu düşündürmektedir. Bu durumu incelemek üzere çalışmamızda ROCK-2 seviyesi ve ROCK aktivitesi de ayrıca araştırılmış, her ne kadar ROCK-2 seviyesi ve ROCK aktivite düzeyleri Y-27632 ve RKI-1447 gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalmış olsa da RKI-1447'nin ROCK aktivitesini Y-27632'ye göre daha fazla azalttığı ve Y-27632 grubunda ROCK-2 seviyesi RKI-1447 grubuna göre daha az olduğu saptandı. Her ne kadar bir göz hastalıkları ve karşılaştırma çalışması olmamasına karşın Patel ve arkadaşlarının transgenik fare-meme kanseri modeli çalışması da RKI-1447'nin ROCK-1 ve ROCK-2'yi güçlü bir şekilde inhibe ettiğini ortaya koymuştur (108,115).

Klinik kullanım açısından bakıldığında, Y-27632'nin in vivo İKEH proliferasyonu ve yara iyileşmesini uyardığını gösteren birkaç klinik çalışma literatürde yer almaktadır. Okumura ve arkadaşlarının yaptığı ilk klinik çalışmada daha önceden DSAEK ameliyatı için listeye alınan 8 hastanın 8 gözü dahil edilmiştir. Hastalar hem periferik

hem santral ödem mevcut olan “yaygın kornea ödemi” grubu ve sadece merkezi kornea ödemi mevcut olan geç başlangıçlı FED tanısı konan “merkezi kornea ödemi” grubu olarak sınıflandırılmıştır. Klinik çalışma başlamadan önce 10 sağlıklı gönüllü üzerinde faz 1 çalışması yürütülmüş ve 7 gün boyunca günde 6 kez uygulanan Y27632'nin hiçbir sistemik veya lokal yan etkiye neden olmadığını doğrulanmıştır. Daha sonra 8 gözün hastalıklı endotel tabakası transkorneal dondurma yöntemiyle soyulduktan sonra 7 gün boyunca günde 6 kez Y-27632 içeren göz damlası ile tedavi edilmiştir. Hiçbir hastada tedaviye bağlı GİB artışı veya başka bir komplikasyon saptanmamıştır. Santral kornea ödemi olan 4 gözün hepsinde 6 ay sonunda korneal ödemde gerileme saptanmış ve aralarından birinde belirgin kornea saydamlığı ve görme keskinliği artışı sağlanmıştır. Diffüz kornea ödemi olan gözlerde ise anlamlı iyileşme saptanamamıştır (136) Bu durumun diffüz kornea ödemi olan gözlerde yeterli sayıda sağlam periferik endotel hücrelerinin bulunmamasından kaynaklandığı ifade edilmiştir. Yeterli sağlam periferik endotel hücresi olan gözlerde ise Y-27632'nin hücre proliferasyonu ve yara iyileşmesini uyardığı düşünülmektedir. Bahsedilen öncü klinik çalışma, özellikle FED mevcut hastaların, keratoplastiye alternatif olarak transkorneal dondurma/ROCK inhibitörü göz damlası tedavisi uygulanması konusunda cesaret vermektedir.

Kinoshita ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir klinik çalışmada ise 11 psödotakik büllöz keratopati tanılı hastanın santral hasarlı DM ve endotel tabakası mekanik olarak çıkarıldıktan sonra donör korneadan elde edilmiş İKEH'ler Y-27632 ile muamele edildikten sonra tüm hastaların ön kamarasına uygulanmış ve 3 saat boyunca yüzüstü pozisyon verilmiştir. Hücre enjeksiyonundan 24 hafta sonra, speküler mikroskopik incelemede, tedavi edilen 11 gözün 11'inde istenilen İKEH yoğunluğu (>500 hücre/mm²) elde edilmiş olup ortalama 1924 hücre/mm² saptanmıştır. İşlem öncesi ortalama kornea kalınlığı 743 μ m (637 ila 964) iken işlemden 24 hafta sonra yapılan değerlendirmede ortalama 549 μ m saptanmıştır ve 11 gözün 10'unda istenilen kalınlık (<630 μ m) elde edilmiştir. İşlem sonrası 24. Haftada 11 gözün 9'unda en iyi düzeltilmiş görme keskinliğinde iki satır veya daha fazla önemli bir iyileşme elde edilmiştir. Çalışma sonuçları 2 yıl geçmesine rağmen geçerliliğini korumaktadır (74) Bahsedilen çalışma karşılaştırma yapılacak kontrol grubu barındırmamasına karşın Y-27632'nin hücre proliferasyonunu ve yara iyileşmesini in vivo uyardığını gösteren önemli bir insan çalışmasıdır.

Bu çalışmada RKI-1447'nin İKEH proliferasyonu, yara iyileşmesi ve ROCK aktivitesinin baskılanması açısından Y-27632'den daha potent olduğu gösterildi.

Halihazırda Y-27632'nin etkinliği in vitro ve in vivo çalışmalar tarafından desteklenmektedir. Mevcut durumda Y-27632, kalıcı kornea endotel yetmezliği tedavisinde potansiyel bir tedavi ajanı olarak grlmektedir. Bu bulgular doğrultusunda Y-27632'den daha potent ve daha spesifik bir ROCK inhibitörü olan RKI-1447 kalıcı endotel yetmezliği tedavisinde gelecek vaat etmektedir. Yine de RKI-1447'nin endotel yetmezliği tedavisinde etkinliğinin ve Y-27632'nin etkinliğine olan üstünlüğünün kanıtlanması için ileri in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇLAR

Günümüzde kalıcı kornea endotel yetmezliğinin tek tedavisi penetran ya da kısmi kalınlıklı kornea naklidir. Her ne kadar yeni tekniklerle bu cerrahilerin komplikasyonları azalmış olsa da küresel donör yetersizliği büyük bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu sorunun aşılması için hücre temelli yaklaşımların araştırılması hız kazanmaya başlamıştır. Bu tedavilerin başında gelen ROCK inhibitörlerinden Y-27632'nin birçok çalışmada etkinliği gösterilmiştir. Bu çalışmada ise daha önceden İKEH üzerine etkinliği bilinmeyen ROCK inhibitörü olan RKI-1447'nin İKEH üzerine etkinliği ilk kez araştırıldı ve ayrıca daha önceden etkin olduğu bilinen Y-27632 ile karşılaştırıldı.

1. Bu çalışmada ROCK inhibitörü olan Y-27632 ve RKI-1447'nin İKEH'lerde hücre proliferasyonunu artırdığı saptandı.
2. RKI-1447'nin hücre proliferasyonunu Y-27632'den daha fazla uyardığı saptandı.
3. Y-27632'nin İKEH yara iyileşmesini ilk 24 saatte artırmış olsa da 48 saatte kontrol grubundan farklı olmadığı anlaşıldı.
4. RKI-1447'nin hem 24 saatte hem de 48 saatte İKEH yara iyileşmesini hem kontrol grubundan hem de diğer ROCK inhibitörü Y-27632'den daha fazla uyardığı gösterildi.
5. Y-27632 ve RKI-1447'nin ROCK-2 seviyesi ve aktivasyonunu belirgin olarak baskıladığı saptandı.
6. RKI-1447'nin ROCK-2 aktivasyonunu Y-27632'den daha fazla baskıladığı ve Y-27632'nin ROCK-2 seviyesini RKI-1447'den daha fazla baskıladığı saptandı.
7. RKI-1447'nin ROCK aktivitesi inhibisyonu, İKEH proliferasyonu ve yara iyileşmesinde Y-27632'den daha etkin olduğu gösterilmiştir.
8. Bu noktada endotel yetmezliği tedavisi için RKI-1447'nin, Y-27632'den daha etkin potansiyel bir ajan olabileceği düşünülebilir. Ancak, bu konunun tam olarak aydınlatılması için ROCK inhibitörü RKI-1447'nin İKEH üzerine etkilerinin incelendiği in vitro ve in vivo çalışmaların devamına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

1. Kanski JJ, Bowling B. Klinik Oftalmoloji Sistematiik Yaklaşım: Güneş Tıp Kitabevleri; 2011.
2. Özkan Ş. Kornea. Göz Hastalıkları. Özkan Ş PH, Oğuz V, Akar S, editor: İstanbul Üniversitesi Basımevi; 1997
3. Y. A. Akova, Ed., "Temel Göz Hastalıkları," in Temel Göz Hastalıkları, 3. baskı., Ankara: güneş kitabevi, 2015, pp. 145–180.
4. Obata H, Tsuru T. Corneal wound healing from the perspective of keratoplasty specimens with special reference to the function of the Bowman layer and Descemet membrane. *Cornea*. 2007 Oct;26(9 Suppl 1):S82-9.
5. Pepose JS, Ubels JL: Cornea and Sclera. Adler's Physiology of the Eye. 10th ed. St. Louis Mosby 2003; 59-92.
6. Kaufman H.E., Capella J.A., Robbins J.E. The human corneal endothelium. *Am. J. Ophthalmol.* 1966;61:835–841.
7. Farjo AA, Brumm MV, Soong HK. Corneal anatomy, physiology and wound healing. *Ophthalmology* 2014; 4.1, 163-167.e1.
8. Sun TT, Lavker RM. Corneal epithelial stem cells: past, present, and future. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2004 Sep;9(3):202-7.
9. American Academy of Ophthalmology. Oftalmolojinin Esas ve İlkeleri. Güneş Tıp Kitabevleri; 2009
10. Teichmann J, Valtink M, Nitschke M, Gramm S, Funk RH, Engelmann K, Werner C. Tissue engineering of the corneal endothelium: a review of carrier materials. *J Funct Biomater.* 2013 Oct 22;4(4):178-208.
11. Rapuano CJ, Fishbaugh JA, Strike DJ. Nine point corneal thickness measurements and keratometry readings in normal corneas using ultrasound pachymetry. *Insight.* 1993 Dec;18(4):16-22.
12. S. Chen, M. J. Mienaltowski, and D. E. Birk, "Regulation of corneal stroma extracellular matrix assembly," *Experimental eye research*, vol. 133, pp. 69–80, Apr. 2015
13. Dua HS, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology.* 2013 Sep;120(9):1778-85.
14. Arıcı C, Aslan OS, Dikkaya F. Corneal endothelial cell density and morphology in healthy Turkish eyes. *J Ophthalmol* 2014;2014:852624.
15. Maurice DM. The cornea and sclera. In: Daveson, H. ed. *The Eye, Vol.1b, Vegetative Physiology and Biochemistry.* 3rd edition. Orlando: Academic Press;1984: 1–158.

16. Bourne W.M., Nelson L.R., Hodge D.O. Central corneal endothelial cell changes over a ten-year period. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997;38:779–782.
17. Lu Q., Fuchsluger T.A., Jurkunas U.V. Regulation of corneal endothelial cell proliferation. In: Dartt D.A., Besharse J.C., Dana R., editors. *Encyclopedia of the Eye*. Elsevier; Boston, MA, USA: 2010. pp. 15–20.
18. Edelhauser HF. The balance between corneal transparency and edema: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 May;47(5):1754-67.
19. Hogan M.J., Alvarado J.A., Weddell J. *Histology of the Human Eye*. W.B. Saunders Company; Philadelphia, PA, USA: 1971. p. 687.
20. Hatou S, Higa K, Inagaki E, Yoshida S, Kimura E, Hayashi R, et al. Validation of Na,K-ATPase pump function of corneal endothelial cells for corneal regenerative medicine. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013 Dec;19(12):901-10.
21. Skou JC, Esmann M. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 1992 Jun;24(3):249-61.
22. B. Winkler, M. Riley, M. Peters, F. Williams Chloride is required for fluid transport by the rabbit corneal endothelium *Am. J. Physiol.*, 262 (1992), pp. C1167-C1174
23. Waring GO 3rd. Posterior collagenous layer of the cornea. Ultrastructural classification of abnormal collagenous tissue posterior to Descemet's membrane in 30 cases. *Arch Ophthalmol.* 1982 Jan;100(1):122-34.
24. Bourne, W. M., "Biology of the corneal endothelium in health and disease.," *Eye* (London, England), Vol. 17, no. 8, pp. 912–8, 2003.
25. D. Maurice *The Cornea and Sclera* Academic Press, New York (1981)
26. 12. Sugar J, Mitchelson J, Kraff M: The effect of phacoemulsification on corneal endothelial cell density. *Arch Ophthalmol* 1978; 96:446-48.
27. Ventura AS, Walti R, Bohnke M: Corneal thickness and endothelial density before and after cataract surgery. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:18-20.
28. Carlson KH, Bourne WM, Brubaker RF. Effect of long-term contact lens wear on corneal endothelial cell morphology and function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1988 Feb;29(2):185-93.
29. R. Narayanan, R.N. Gaster, M.C. Kenney Pseudophakic corneal edema a review of mechanisms and treatments *Cornea*, 25 (2006), pp. 993-1004
30. Eye Bank Association of America 2019 Eye Banking Statistical Report Eye Bank Association of America, Washington, D.C (2020), p. 19 2017
31. R.W. Thompson Jr., M.O. Price, P.J. Bowers, F.W. Price Jr. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty *Ophthalmology*, 110 (2003), pp. 1396-1402

32. Park HY, Lee NY, Park CK, Kim MS. Long-term changes in endothelial cell counts after early phacoemulsification versus laser peripheral iridotomy using sequential argon:YAG laser technique in acute primary angle closure. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2012 Nov;250(11):1673-80.
33. Takase H, Kubono R, Terada Y, Imai A, Fukuda S, Tomita M, et al. Comparison of the ocular characteristics of anterior uveitis caused by herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and cytomegalovirus. *Jpn J Ophthalmol.* 2014 Nov;58(6):473-82.
34. Liu C, Miyajima T, Melangath G, Miyai T, Vasanth S, Deshpande N, et al. Ultraviolet A light induces DNA damage and estrogen-DNA adducts in Fuchs endothelial corneal dystrophy causing females to be more affected. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020 Jan 7;117(1):573-583.
35. Nanda GG, Alone DP. REVIEW: Current understanding of the pathogenesis of Fuchs' endothelial corneal dystrophy. *Mol Vis.* 2019;25:295-310.
36. S. Ong Tone, V. Kocaba, M. Böhm, A. Wylegala, T.L. White, U.V. Jurkunas. Fuchs endothelial corneal dystrophy: the vicious cycle of Fuchs pathogenesis. *Progress in retina and eye research Prog. Retin. Eye Res.* (2020),
37. Adamis AP, Filatov V, Tripathi BJ, Tripathi RC. Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea. *Survey of ophthalmology.* 1993;38(2):149-68.
38. Krachmer JH. Posterior polymorphous corneal dystrophy: a disease characterized by epithelial-like endothelial cells which influence management and prognosis. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1985;83:413-75.
39. Lin ZN, Chen J, Cui HP. Characteristics of corneal dystrophies: a review from clinical, histological and genetic perspectives. *Int J Ophthalmol.* 2016;9(6):904-13.
40. Feizi S. Corneal endothelial cell dysfunction: etiologies and management. *Ther Adv Ophthalmol.* 2018 Dec 7;10:2515841418815802.
41. Price MO, Gupta P, Lass J, Price FW Jr. EK (DLEK, DSEK, DMEK): New Frontier in Cornea Surgery. *Annu Rev Vis Sci.* 2017 Sep 15;3:69-90.
42. Zirm EK. Eine erfolgreiche totale Keratoplastik (A successful total keratoplasty). 1906. *Refract Corneal Surg.* 1989 Jul-Aug;5(4):258-61.
43. Hos D, Matthaei M, Bock F, Maruyama K, Notara M, Clahsen T, et al. Immune reactions after modern lamellar (DALK, DSAEK, DMEK) versus conventional penetrating corneal transplantation. *Prog Retin Eye Res.* 2019 Nov;73:100768.
44. Price MO, Gupta P, Lass J, Price FW. EK (DLEK, DSEK, DMEK): New Frontier in Cornea Surgery. *Annu Rev Vis Sci.* 2017 Sep 15;3:69-90.
45. Moshirfar M, Ding Y, Shah TJ. A Historical Perspective on Treatment of Fuchs' Endothelial Dystrophy: We have Come a Long Way. *J Ophthalmic Vis Res.* 2018 Jul-Sep;13(3):339-343.

46. Zhang J, Patel DV, McGhee CNJ. The Rapid Transformation of Transplantation for Corneal Endothelial Diseases: An Evolution From Penetrating to Lamellar to Cellular Transplants. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2019 Nov-Dec;8(6):441-447.
47. Moshirfar M, Thomson AC, Ronquillo Y. Corneal Endothelial Transplantation. 2022 May 1. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan.
48. Melles GR, Wijdh RH, Nieuwendaal CP. A technique to excise the descemet membrane from a recipient cornea (descemetorhexis). *Cornea*. 2004 Apr;23(3):286-8.
49. Terry MA, Ousley PJ. Deep lamellar endothelial keratoplasty in the first United States patients: early clinical results. *Cornea*. 2001 Apr;20(3):239-43.
50. Terry MA. Deep lamellar endothelial keratoplasty (DLEK): pursuing the ideal goals of endothelial replacement. *Eye (Lond)*. 2003 Nov;17(8):982-8.
51. Price FW Jr, Price MO. Descemet's stripping with endothelial keratoplasty in 200 eyes: Early challenges and techniques to enhance donor adherence. *J Cataract Refract Surg*. 2006 Mar;32(3):411-8.
52. Alkatan H, Al-Rajhi A, Al-Shehri A, Khairi A. Histopathological findings of failed grafts following Descemet's stripping automated endothelial keratoplasty (DSAEK). *Saudi J Ophthalmol*. 2012 Jan;26(1):79-85.
53. Dirisamer M, Ham L, Dapena I, van Dijk K, Melles GR. Descemet membrane endothelial transfer: "free-floating" donor Descemet implantation as a potential alternative to "keratoplasty". *Cornea*. 2012 Feb;31(2):194-7.
54. Parekh M, Ruzza A, Ferrari S, Busin M, Ponzin D. Preloaded Tissues for Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2016 Jun;166:120-125.
55. Price MO, Giebel AW, Fairchild KM, Price FW. Descemet's membrane endothelial keratoplasty: prospective multicenter study of visual and refractive outcomes and endothelial survival. *Ophthalmology*. 2009 Dec;116(12):2361-8.
56. Trindade BLC, Eliazar GC. Descemet membrane endothelial keratoplasty (DMEK): an update on safety, efficacy and patient selection. *Clin Ophthalmol*. 2019;13:1549-1557.
57. Gonzalez A, Price FW, Price MO, Feng MT. Prevention and Management of Pupil Block After Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty. *Cornea*. 2016 Nov;35(11):1391-1395.
58. Deng SX, Lee WB, Hammersmith KM, Kuo AN, Li JY, Shen JF, et al. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Safety and Outcomes: A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 2018 Feb;125(2):295-310.
59. Pavlovic I, Shajari M, Herrmann E, Schmack I, Lencova A, Kohnen T. Meta-

Analysis of postoperative outcome parameters comparing descemet membrane endothelial keratoplasty versus descemet stripping automated endothelial keratoplasty. *Cornea* 2017;36:1445–14

60. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. Cell-based approach for treatment of corneal endothelial dysfunction. *Cornea*. 2014 Nov;33 Suppl 11:S37-41.
61. Agarwal A, Dua HS, Narang P, Kumar DA, Agarwal A, Jacob S, Agarwal A, Gupta A. Pre-Descemet's endothelial keratoplasty (PDEK). *Br J Ophthalmol* 2014;98:1181–1185
62. Shah RD, Randleman JB, Grossniklaus HE. Spontaneous corneal clearing after Descemet's stripping without endothelial replacement. *Ophthalmology*. 2012 Feb;119(2):256-60.
63. Kocaba V, Katikireddy KR, Gipson I, et al. Association of the gutta-induced microenvironment with corneal endothelial cell behavior and demise in fuchs endothelial corneal dystrophy. *JAMA Ophthalmol* 2018; 136:886–892.
64. Okumura N, Inoue R, Okazaki Y, Nakano S, Nakagawa H, Kinoshita S, et al. Effect of the Rho Kinase Inhibitor Y-27632 on Corneal Endothelial Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Sep;56(10):6067-74.
65. Garcerant D, Hirschall N, Toalster N, Zhu M, Wen L, Moloney G. Descemet's stripping without endothelial keratoplasty. *Curr Opin Ophthalmol*. 2019 Jul;30(4):275-285.
66. Macsai MS, Shiloach M. Use of topical Rho kinase inhibitors in the treatment of Fuchs dystrophy after descemet stripping only. *Cornea* 2019; 38:529–534.
67. Moloney G, Petsoglou C, Ball M, Kerdraon Y, Höllhumer R, Spiteri N, et al. Descemetorhexis Without Grafting for Fuchs Endothelial Dystrophy- Supplementation With Topical Ripasudil. *Cornea*. 2017 Jun;36(6):642-648.
68. Mimura T, Yamagami S, Yokoo S, et al. Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:2992–2997.
69. Ishino Y, Sano Y, Nakamura T, Connon CJ, Rigby H, Fullwood NJ, et al. Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Mar;45(3):800-6.
70. Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, Okahara N, Tsuchiya H, Torii R, et al. Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Oct;48(10):4519-26.
71. Han SB, Liu YC, Mohamed-Noriega K, Mehta JS. Application of Novel Drugs for Corneal Cell Regeneration. *J Ophthalmol*. 2018 May 2;2018:1215868.
72. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Tsuchiya H, et al. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am J Pathol*. 2012 Jul;181(1):268-77.

73. Okumura N, Sakamoto Y, Fujii K, Kitano J, Nakano S, Tsujimoto Y, et al. Rho kinase inhibitor enables cell-based therapy for corneal endothelial dysfunction. *Sci Rep*. 2016 May 18;6:26113.
74. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H, et al. Injection of Cultured Cells with a ROCK Inhibitor for Bullous Keratopathy. *N Engl J Med*. 2018 Mar 15;378(11):995-1003.
75. Bi YL, Zhou Q, DU F, Wu MF, Xu GT, Sui GQ. Regulation of functional corneal endothelial cells isolated from sphere colonies by Rho-associated protein kinase inhibitor. *Exp Ther Med*. 2013 Feb;5(2):433-437.
76. Al-Humimat G, Marashdeh I, Daradkeh D, Kooner K. Investigational Rho Kinase Inhibitors for the Treatment of Glaucoma. *J Exp Pharmacol*. 2021 Feb 25;13:197-212.
77. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001 Jan;22(1):32-9.
78. Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T, Kuroda S. Involvement of rho p21 in the GTP enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem*. 1992;267:8719-8722.
79. Burridge K, Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):167-79.
80. Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A, Fujita A, et al, The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J*. 1996 Apr 15;15(8):1885-93.
81. Cherfls J, Zeghouf M. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*. 2013;93:269–309.
82. Thumkeo D, Keel J, Ishizaki T, Hirose M, Nonomura K, Oshima H, et al. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23:5043–5055
83. Fujisawa K, Fujita A, Ishizaki T, Saito Y, Narumiya S. Identification of the Rhobinding domain of p160ROCK, a Rho-associated coiled-coil containing protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271:23022–23028
84. Rao V, Epstein D. . Rho GTPase/Rho kinase inhibition as a novel target for the treatment of glaucoma. *BioDrugs Clin Immunother Biopharm Gene Ther*. 2007; 21: 167– 177.
85. Bivalacqua TJ, Champion HC, Usta MF, Celtek S, Chitale K, Webb RC, et al. RhoA/Rho-kinase suppresses endothelial nitric oxide synthase in the penis: a mechanism for diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jun 15;101(24):9121-6.

86. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of ROCKs in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology Cell Physiology*. 2006; 290:C661-668
87. Tominaga T, Barber DL. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell*. 1998 Aug;9(8):2287-303.
88. Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol*. 2000 Jan 15;522 Pt 2(Pt 2):177-85.
89. Wilson KF, Erickson JW, Antonyak MA, Cerione RA. Rho GTPases and their roles in cancer metabolism. *Trends in Molecular Medicine* February 2013; 19(2): 74-82.
90. Feng Y, LoGrasso P, Defert O, Li R. Rho kinase (ROCK) inhibitors and their therapeutic potential. *J Med Chem*. 2016; 59: 2269– 2300.
91. Moura-Coelho N, Tavares Ferreira J, Bruxelles CP, Dutra-Medeiros M, Cunha JP, Pinto Proença R. Rho kinase inhibitors-a review on the physiology and clinical use in Ophthalmology. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019 Jun;257(6):1101-1117.
92. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990-994.
93. Sato M, Tani E, Fujikawa H, Kaibuchi K. Involvement of Rho-kinase-mediated phosphorylation of myosin light chain in enhancement of cerebral vasospasm. *Circ Res*. 2000 Aug 4;87(3):195-200.
94. Masumoto A, Mohri M, Shimokawa H, Urakami L, Usui M, Takeshita A. Suppression of coronary artery spasm by the Rho-kinase inhibitor fasudil in patients with vasospastic angina. *Circulation*. 2002 Apr 2;105(13):1545-7.
95. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*. 2001 Dec 1;38(6):1307-10.
96. Wolfrum S, Dendorfer A, Rikitake Y, Stalker TJ, Gong Y, Scalia R, et al. Inhibition of Rho-kinase leads to rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt and cardiovascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Oct;24(10):1842-7.
97. Rikitake Y, Kim HH, Huang Z, Seto M, Yano K, Asano T, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*. 2005 Oct;36(10):2251-7.
98. Yao L, Romero MJ, Toque HA, Yang G, Caldwell RB, Caldwell RW. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res*. 2010;1(4):165-170.

99. Raja SG. Evaluation of clinical efficacy of fasudil for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2012 Aug;7(2):100-4.
100. Chiba Y, Misawa M. Probable involvement of the augmented agonist-induced Ca²⁺ sensitization of airway smooth muscle contraction in the pathogenesis of airway hyperresponsiveness. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1999;114(3):185-190.
101. Lizuka K, Shimizu Y, Tsukagoshi H, Yoshii A, Harada T, Dobashi K, Murozono T, Nakazawa T, Mori M. Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2000 Oct 13;406(2):273-9.
102. Moran CJ, Friel AM, Smith TJ, Cairns M, Morrison JJ. Expression and modulation of Rho kinase in human pregnant myometrium. *Mol Hum Reprod.* 2002;8(2):196-200.
103. Wibberley A, Chen Z, Hu E, Hieble JP, Westfall TD. Expression and functional role of Rho-kinase in rat urinary bladder smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2003;138(5):757-766.
104. Mishan MA, Balagholi S, Chamani T, Feizi S, Soheili ZS, Kanavi MR. Potential Effect of Human Platelet Lysate on *in vitro* Expansion of Human Corneal Endothelial Cells Compared with Y-27632 ROCK Inhibitor. *J Ophthalmic Vis Res.* 2021 Jul 29;16(3):349-356.
105. Mueller BK, Mack H, Teusch N. Rho-kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:387-398.
106. Özdemir A, Ark M. A novel ROCK inhibitor: off-target effects of metformin. *Turk J Biol.* 2021 Feb 9;45(1):35-45.
107. Ying H, Biroc SL, Li WW, Alicke B, Xuan JA, Pagila R, et al. The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(9):2158-2164.
108. Patel RA, Forinash KD, Pireddu R, Sun Y, Sun N, Martin MP, et al. RKI-1447 is a potent inhibitor of the Rho-associated ROCK kinases with anti-invasive and antitumor activities in breast cancer. *Cancer Res.* 2012 Oct 1;72(19):5025-34.
109. Li L, Chen Q, Yu Y, Chen H, Lu M, Huang Y, Li P, Chang H. RKI-1447 suppresses colorectal carcinoma cell growth via disrupting cellular bioenergetics and mitochondrial dynamics. *J Cell Physiol.* 2020 Jan;235(1):254-266.
110. Dyberg C, Andonova T, Olsen TK, Brodin B, Kool M, Kogner P, et al. Inhibition of Rho-Associated Kinase Suppresses Medulloblastoma Growth. *Cancers (Basel).* 2019 Dec 26;12(1):73.
111. Yamaguchi M, Nakao S, Arita R, Kaizu Y, Arima M, Zhou Y, et al. Vascular Normalization by ROCK Inhibitor: Therapeutic Potential of Ripasudil (K-115) Eye Drop in Retinal Angiogenesis and Hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016 Apr 1;57(4):2264-76.

112. Yin J, Yu FS. Rho kinases regulate corneal epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Aug;295(2):C378-87.
113. Anderson S, DiCesare L, Tan I, Leung T, SundarRaj N. Rho-mediated assembly of stress fibers is differentially regulated in corneal fibroblasts and myofibroblasts. *Exp Cell Res*. 2004 Aug 15;298(2):574-83.
114. Harvey SAK, Anderson SC, SundarRaj N (2004) Downstream effects of ROCK signaling in cultured human corneal stromal cells: microarray analysis of gene expression. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 45(7):2168–2176.
115. Pireddu R, Forinash KD, Sun NN, Martin MP, Sung SS, Alexander B, Zhu JY, Guida WC, Schönbrunn E, Sebt SM, Lawrence NJ. Pyridylthiazole-based ureas as inhibitors of Rho associated protein kinases (ROCK1 and 2). *Medchemcomm*. 2012 Jun 1;3(6):699-709.
116. Renieri G, Choritz L, Rosenthal R, Meissner S, Pfeiffer N, Thieme H. Effects of endothelin-1 on calcium-independent contraction of bovine trabecular meshwork. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008 Aug;246(8):1107-15.
117. Inoue T, Tanihara H. Rho-associated kinase inhibitors: a novel glaucoma therapy. *Prog Retin Eye Res*. 2013 Nov;37:1-12.
118. Rao PV, Deng PF, Kumar J, Epstein DL. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001 Apr;42(5):1029-37. Erratum in: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Jul;42(8):1690.
119. Ashwinbalaji S, Senthilkumari S, Gowripriya C, Krishnadas S, Gabelt BAT, Kaufman PL, et al. SB772077B, A New Rho Kinase Inhibitor Enhances Aqueous Humour Outflow Facility in Human Eyes. *Sci Rep*. 2018 Oct 19;8(1):15472.
120. Kaneko Y, Ohta M, Inoue T, Mizuno K, Isobe T, Tanabe S, et al. Effects of K-115 (Ripasudil), a novel ROCK inhibitor, on trabecular meshwork and Schlemm's canal endothelial cells. *Sci Rep*. 2016 Jan 19;6:19640.
121. Inoue T, Tanihara H. Ripasudil hydrochloride hydrate: targeting Rho kinase in the treatment of glaucoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2017 Oct;18(15):1669-1673.
122. Wang RF, Williamson JE, Kocczynski C, Serle JB. Effect of 0.04% AR-13324, a ROCK, and norepinephrine transporter inhibitor, on aqueous humor dynamics in normotensive monkey eyes. *J Glaucoma*. 2015 Jan;24(1):51-4.
123. Sagawa H, Terasaki H, Nakamura M, Ichikawa M, Yata T, Tokita Y, et al. A novel ROCK inhibitor, Y-39983, promotes regeneration of crushed axons of retinal ganglion cells into the optic nerve of adult cats. *Exp Neurol*. 2007 May;205(1):230-40.
124. Shaw PX, Sang A, Wang Y, Ho D, Douglas C, Dia L, et al. Topical administration of a Rock/Net inhibitor promotes retinal ganglion cell survival and axon regeneration after optic nerve injury. *Exp Eye Res*. 2017 May;158:33-42.

125. Sanjari N, Pakravan M, Nourinia R, Esfandiari H, Hafezi-Moghadam A, Zandi S, et al. Intravitreal Injection of a Rho-Kinase Inhibitor (Fasudil) for Recent-Onset Nonarteritic Anterior Ischemic Optic Neuropathy. *J Clin Pharmacol*. 2016 Jun;56(6):749-53.
126. Meekins LC, Rosado-Adames N, Maddala R, Zhao JJ, Rao PV, Afshari NA. Corneal Endothelial Cell Migration and Proliferation Enhanced by Rho Kinase (ROCK) Inhibitors in In Vitro and In Vivo Models. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Dec 1;57(15):6731-6738.
127. Okumura N, Kinoshita S, Koizumi N. Application of Rho Kinase Inhibitors for the Treatment of Corneal Endothelial Diseases. *J Ophthalmol*. 2017;2017:2646904.
128. Dang Y, Wang C, Shah P, Waxman S, Loewen RT, Loewen NA. RKI-1447, a Rho kinase inhibitor, causes ocular hypotension, actin stress fiber disruption, and increased phagocytosis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2019 Jan;257(1):101-109.
129. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, Sakamoto Y, Takahashi H, Hirata K, et al. Enhancement of corneal endothelium wound healing by Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor eye drops. *Br J Ophthalmol*. 2011 Jul;95(7):1006-9.
130. Okumura N, Nakano S, Kay EP, Numata R, Ota A, Sowa Y, et al. N. Involvement of cyclin D and p27 in cell proliferation mediated by ROCK inhibitors Y-27632 and Y-39983 during corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Jan 15;55(1):318-29.
131. Peh GS, Adnan K, George BL, Ang HP, Seah XY, Tan DT, et al. The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach. *Sci Rep*. 2015 Mar 16;5:9167.
132. Wu Q, Ouyang C, Xie L, Ling Y, Huang T. The ROCK inhibitor, thiazovivin, inhibits human corneal endothelial-to-mesenchymal transition/epithelial-to-mesenchymal transition and increases ionic transporter expression. *Int J Mol Med*. 2017 Oct;40(4):1009-1018.
133. Pipparelli A, Arsenijevic Y, Thuret G, Gain P, Nicolas M, Majo F. ROCK inhibitor enhances adhesion and wound healing of human corneal endothelial cells. *PLoS One*. 2013 Apr 23;8(4):e62095.
134. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Kinoshita S. New therapeutic modality for corneal endothelial disease using Rho-associated kinase inhibitor eye drops. *Cornea*. 2014 Nov;33 Suppl 11:S25-31.
135. Peh GS, Adnan K, George BL, Ang HP, Seah XY, Tan DT, Mehta JS. The effects of Rho-associated kinase inhibitor Y-27632 on primary human corneal endothelial cells propagated using a dual media approach. *Sci Rep*. 2015 Mar 16;5:9167.
136. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, Ueno M, Sakamoto Y, Nakamura S, Hamuro J, Kinoshita S. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013 Apr 3;54(4):2493-502.