

# Kornea Epitel Hücre Bankası Oluşturulmasında Uygulama Araştırmasının Ön Sonuçları

Mehmet Okka (\*), T. Murad Aktan (\*\*)

## ÖZET

**Amaç:** Kornea epitel hücrelerinin doku organizasyonundan hücre süspansiyonu haline getirilmesi ve bu süspansiyonun dondurularak hücre bankasının kurulması amaçlanmıştır

**Gereç ve Yöntem:** Tavşan korneaları 360° limbal insizyonla çıkartıldı ve transfer mediyumu olan DMEM içerisinde toplandı. Korneaların epitel tabakası iki ayrı seperasyon protokolü ile ayrıştırıldı ve hızlı bir dondurma protokolü uygulandı.

**Bulgular:** Sonuç olarak tek hücre süspansiyonu değil klamp şeklinde dondurmanın daha uygun olacağı, çözme sonrası tek hücre süspansiyonunun yapılmasının epitel hücreindeki canlılık oranını artıracığını önermekteyiz .

**Tartışma:** Başarılı bir kornea hücre bankası protokolü geliştirildikten sonra bu hücrelerin ısıtılıp ileri derecedeki kornea epitel erezyonlarında kullanımının allo- ve ksenografik araştırmasına geçilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Kornea epitel hücresi, Hücre bankası.

## SUMMARY

### The Preliminary Results for Corneal Epithelial Cell Banking Application Reseaching

**Purpose:** The aim of our work is to gain a single cell suspension from corneal tissue and set up a corneal epithelium cell bank.

**Materials and Method:** Rabbit corneas were obtained by 360° limbal incision and these tissues were placed in transfer medium DMEM. Corneal epithelium tissue separation was done with two different protocols and the yield was freezed with a very rapid technique.

**Results:** In conclusion it is suggested that by freezing cells in clamp formation can give a higher rate in viability after thawing.

**Discussion:** After developing a proper protocol for corneal cell banking we plan to explore the effectiveness of these cells after thawing for severe corneal epithelial erosion and allo-, xenografic applications.

**Key Words:** corneal epithelial cell, Cell Bank

(\*) Selçuk Üniversitesi Tıp Fak. Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.  
(\*\*) Selçuk Üniversitesi Tıp Fak. Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yrd. Doç. Dr.

Mecmuaya Geliş Tarihi: 07.06.2000  
Düzeltilmeden Geliş Tarihi: 12.06.2000  
Kabul Tarihi: 15.06.2000

## GİRİŞ

Gözün kornea dokusunun organizasyon özellikleri gerek histolojik, gerekse embriyolojik açıdan derideki epitel dermis yapılanmasına benzer özellikler gösterir. Kornea epitel hücreleri arasında dezmozom bağlantıları zengin olup tabanda epitel tabakasının kök hücreleri bulunur. Epitel bazal membran üzerindedir ve bazal epitel hücreleri hemidezmozomlarla bağlantıdadır. Epitel hücrelerinde keratofilamentler bulunur (1). Embriyolojik açıdan deri gibi korneada da ektodermal ve mezodermal dokuların oluşturduğu bir yapılanma söz konusudur. Kornea epiteli yüzey ektoderminden gelişir. Kornea epiteli ile endotelyumu arasına mezodermal fibroblastlar göç eder ve korneal stromayı bu fibroblastlarla yaptıkları proteoglikan ve kollojen salgısı oluşturur. Kollojenlerin orthogonal tabakalar halinde düzenlenmiş olması sayesinde saydam özellik gerçekleşir (2).

Deri için epitelin dermisten ayrıştırılıp epitelin tek hücre süspansiyonu meydana getirilmekte ve ileri derecedeki deri hasarlarında kültüre edilip başarı ile uygulanmaktadır. Klinik kullanımda epitel hücre bankalarının oluşturulması da gündeme gelmiştir. Ksenograftik hücre uygulamaları ve ileri gen tedavi teknikleri de epitelde uygulanmıştır (3,4,5,6). Deri ve kornea arasındaki benzerlikten yola çıkılarak ekibimiz deri epiteli için kullanılan izolasyon tekniğinin kornea için uygulanabilirliğini değerlendirdi.

## METOD ve MATERYAL

6 adet erkek tavşan intramuskuler olarak uygulanan 2cc ketamin ve 1cc rompun ile anestezi altına alındı. Her iki gözde kantotomi sonrasında kapaklar blafarosta kullanılarak serbestlendikten sonra kornealar 360° limbal insizyonla alındı. Kornealar önce steril serum fizyolojik ile yıkandı ve 10 ml DMEM (Sigma Kat.No.:D-5796) içerisine alındı. 6 deneğin sağ ve sol gözlerine ait kornealar 1. ve 2. gruba rastgele olarak dağıtıldı, sonuçta 12 adet kornea incelendi.

Steril koşullarda kornea dokusu iki ayrı grupta işleme tabi tutuldu. 1.grupta Tripsin-EDTA(TE) (Sigma Kat.No.: T-4174 ) %13 olacak şekilde, 37°C'lik %5 CO<sub>2</sub> ve %100 nem ortamının sağlandığı inkübatörde 50 dakika bekletildi. 2.gruba ise yine aynı koşullar sağlandı ancak TE %8 oranında uygulandı. TE bir gece önceden gazlanmış DMEM mediyumu içerisine uygulamadan hemen önce olacak şekilde ilave edildi. Her bir kornea tek başına 7-8 ml olacak şekilde bu enzim solüsyonu içerisinde bekletildi.

Epitel ayrıştırmasında enzimin etkisi, epitel ve stromanın birbirinden ayrılmasının başlamasının gözlenmesi

ile başlar. Kornea dokusunun her iki grupta da 50. dakika sonunda epitel ve stromasının özellikle uçlarda ayrılmalar yaptığı gözlemlendi. Bu şekildeki epitel tabakası uçlarından ince pens yardımı ile tutularak kaldırıldı ve sonuçta tüm epitel tabakası 7-9 parça halinde %10 Fetal Calf Serum (FCS, Sigma Kat.No.: F-4135) ihtiva eden DMEM içerisine alındı. Bu son serum TE enziminin yıkıcı etkisini durdurur. 15 ml %10 FCS'lı DMEM içerisindeki kornea parçaları 5 dakika bekletildikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi. Sonra pellet üzerindeki süpernatant atıldı ve tekrar 1000 rpm'de 10 dakika %5 FCS'lı DMEM içerisinde santrifüje edildi. Sonuçta süpernatant atıldı ve pellet 1.0 ml DMEM ile süspansiyon haline getirildi.

Takip eden aşamada enzim sonrası mekanik ayrıştırmayı sağlayacak olan pipetting uygulandı. 0.5 ml pipet ucu yardımı ile süspansiyon 13-15 dakika pipete çekilip verilerek epitel klamplarının dağılması sağlandı. Bu aşamada kritik öneme sahip ve dikkat gösterilmesi gereken durum köpüklenme yapılmamasıdır. Aksi takdirde epitel hücreleri tüp duvarına yapışmakta ve kaybolmaktadır. Ayrıca köpüklenme serbest oksijen radikallerinin oluşmasını sağlayarak hücrelerin ortam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Takiben söz konusu hücre süspansiyonu 10 ml DMEM içerisine konuldu ve 37°C'ye ayarlanmış manyetik karıştırıcı içerisinde düşük rotasyon hızında 20 dakika işleme tabi tutuldu. İşlem sonrası santrifüj 1000 rpm'de 10 dakika yapılarak sonuçta süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1.0 ml olacak şekilde DMEM ilavesi yapıldı (7).

Söz konusu son süspansiyon ürünü lam lamel alanında yapılan incelemede tek tek ayrılmış olarak epitel hücreleri gözlemlendi. Süspansiyondaki hücrelerin canlılığı Eosin-Y (%0.5) viabilite testi ile resim 1'de sunulduğu gibi belirlendi ve Makler sayım kamarası ile mevcut hücre sayısı hesaplandı.

Bundan sonra çalışmamızda ikinci parametre olan dondurup saklama tekniğine geçildi. Kornea epitel hücre süspansiyonu 800 rpm'de 10 dakika olacak şekilde santrifüje edildi, oluşan süpernatant atıldı ve pellet üzerine %10 FCS'lı DMEM'den 250 mikrolitre ilave edildi köpürme yapmadan homojenize edildi. Bu süspansiyonun üzerine bir kriyoprotektant olan Test Yolk Buffer (TYB) (Irvine Scientific Kat.No.: 9971)'dan 250 mikrolitre damla damla olacak şekilde toplam 4-6 dakika yayararak ilave edildi. İlave yapılırken sürekli hafif rotasyon ve çalkalama yapmak kritik öneme sahiptir. Bu süre yayımı ve hareket desteği yapılmasının sebebi TYB'nin yüksek ozmolarite etkisinin hücreleri şoka uğratıp ani su kaybı ile ölümlerine sebep olmasını önlemektir.

Hücre süspansiyonuna kriyoprotektant ilavesi tamamlandıktan sonra strawlara çekildi ve açık olan uç plastik bilye ile kapatıldı. Straw sıvı azot buharına 10 cm üstünde olacak şekilde 15 dakika bekletildi. Süre sonunda direk sıvı azota daldırıldı (8) ve bu şekilde 3 hafta bekletildikten sonra straw oda ısısında hızlıca ısıtıldı, buz sıvı haline getirildi.

Isıtma gerçekleştikten sonra toplam 500 mikrolitre olan sıvı 37.0°C'deki 5.0 ml DMEM içerisine konuldu, homojenize edildi ve 1200 rpm'de 10 dakika süre ile iki defa santrifüje edildi. Son pellet üzerine 1.0 ml DMEM ilavesi yapılarak Eosin-Y ile viabilite testi uygulandı ve Makler sayım kamerası ile toplam hücre sayısı belirlendi.

### BULGULAR

1.grupta ve 2.grupta tripsinizasyondan sonra elde edilen toplam hücre sayıları aşağıda belirtilmiştir.

#### 1.grup:

1.Kornea'dan: 550.000	4.Kornea'dan: 445.000
2.Kornea'dan: 375.000	5.Kornea'dan: 485.000
3.Kornea'dan: 460.000	6.Kornea'dan: 525.000
Toplam: 2.840.000*	Epitel hücresi elde edildi.
Kornea başına:(*/6):	473.000

#### 2.grup:

1.Kornea'dan: 575.000	4. Kornea'dan: 510.000
2.Kornea'dan: 390.000	5. Kornea'dan: 490.000
3.Kornea'dan: 470.000	6. Kornea'dan: 435.000
Toplam: 2.870.000*	Epitel hücresi elde edildi.
Kornea başına:(*/6):	478.000

Her iki grupta elde edilen toplam hücre sayısı aynı kabul edildi.

Ancak gruplar arası Eosin-Y ile yapılan viabilite testinde canlılık oranında belirgin farklılık gözlemlendi. Sonuçlar aşağıda sunulmuştur:

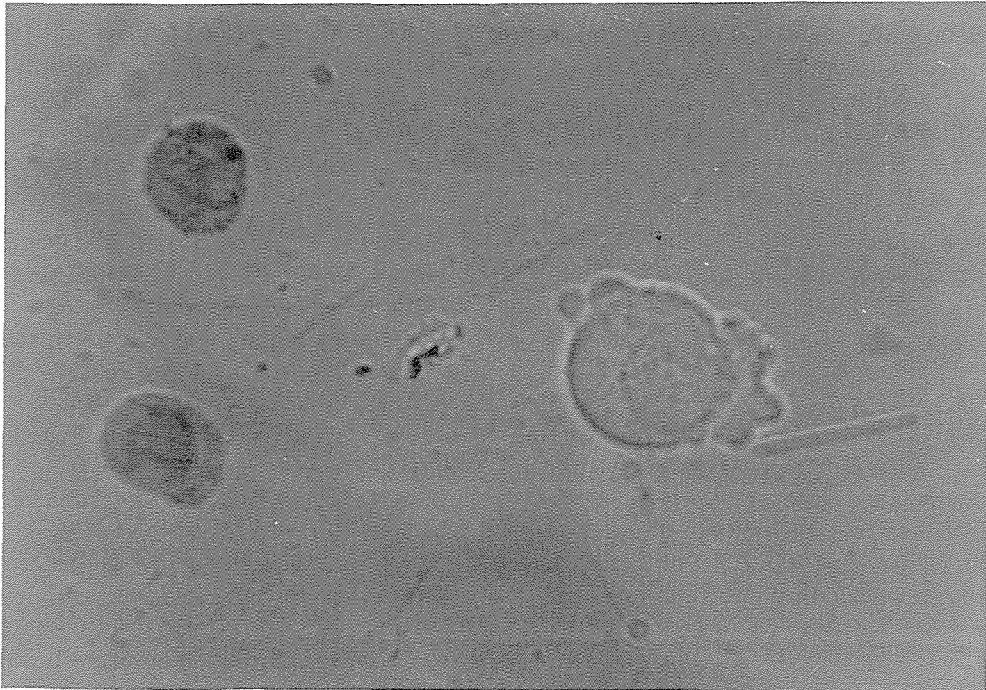
#### 1.grup:

1.Canlılık sonucu: %2	4.Canlılık sonucu: %4
2.Canlılık sonucu: %2	5.Canlılık sonucu: %2
3.Canlılık sonucu: %5	6.Canlılık sonucu: %3
Sonuçta oran: %3	

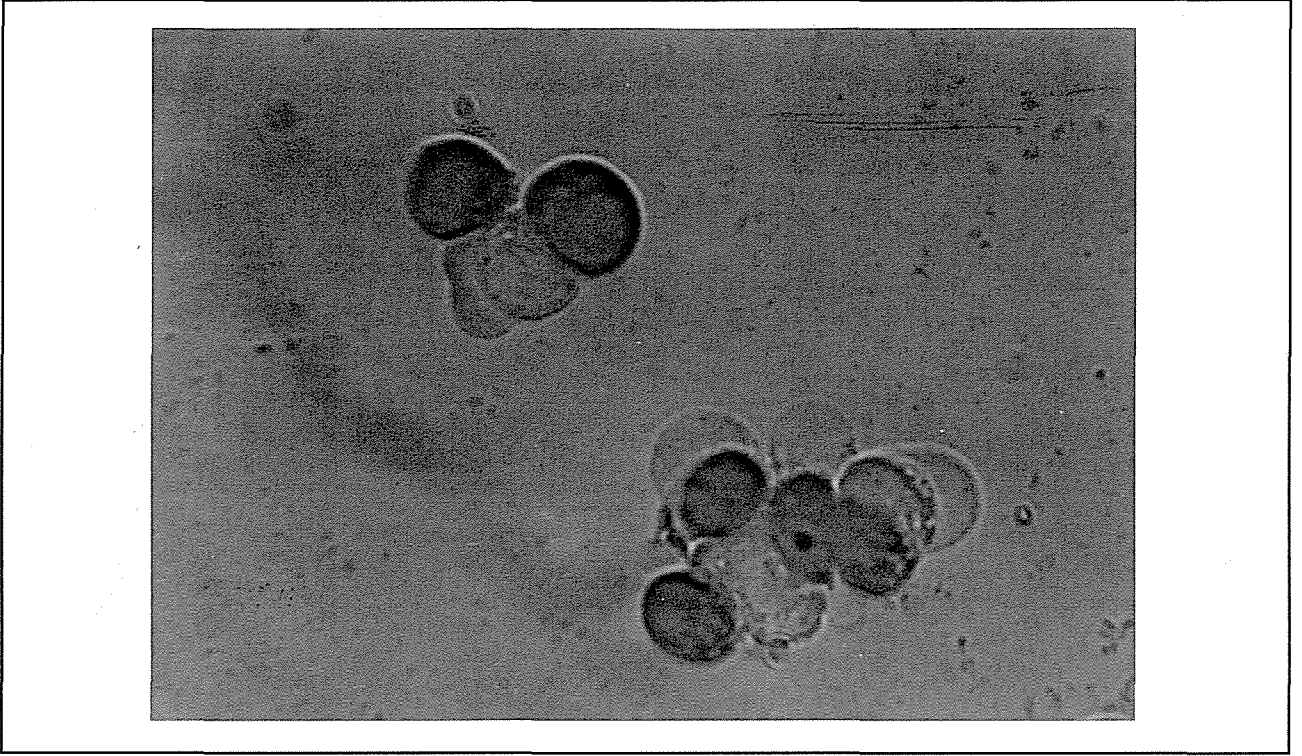
#### 2.grup:

1.Canlılık sonucu: % 44	4.Canlılık sonucu: %30
2.Canlılık sonucu: %29	5.Canlılık sonucu: %43
3.Canlılık sonucu: %38	6.Canlılık sonucu: %39
Sonuçta oran: %37	

**Resim 1.** Hücre süspansiyonunda canlı hücreler Eosin-Y boyasını almadan , sağlam konturları ile gözlenirken boyayı almış kırmızı renkli ölü hücreler belirgin olarak ayırt edilmekte. x40 mikroskopik objektif büyütmesi



**Resim 2.** Klamp şeklindeki hücre topluluğunda, ölü hücreler boyayı almış olarak kırmızı renkte gözlenmekte. x40 mikroskopik objektif büyütmesi



1.gruptaki düşük viabilite oranı dondurma işlemi yapılmasını gereksiz kıldı. 2.grup'ta incelenen hücreler dondurma işlemine alındı ve 4. hafta sonunda ısıtma işlemi sonrası canlılıkları ortaya konuldu.

2.grup dondurma öncesi toplam hücre sayısı 2.870.000 olarak hesaplandı, ısıtma işlemi takiben 30. dakikada toplam hücre sayısı 1.320.000 olarak belirlendi canlılığın bu grup için %37 olduğu belirlendi.

Isıtma sonrası hücre klamplarının oluştuğu ve bu şekildeki hücre gruplarında canlılık oranının tek tek halde bulunanlara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Yapılan genel bir hesaplamada tek tek hücre süspansiyonu özelliği taşıyan hücrelerde canlılık oranı yaklaşık %11, klamp (resim 2) halindeki hücrelerde ise yaklaşık %35 olarak belirlendi.

## TARTIŞMA

Çalışmada uygulanan teknik asıl olarak insan deri epitelini elde etmede başarılı olarak kullanılmaktadır. Dondurma işleminde uygulanan protokol ekibimizin ilk defa denediği ancak belirgin oranda sonuç alındığı için vurgulanmıştır.

Kullanılan transfer mediumu DMEM'in insulin ve EGF (9) gibi özelliklerden yoksun olması sonucu olum-

suz yönde etkileyen bir faktördür. Ancak kısa süreli bir uygulama söz konusu olduğu için göz ardı edilebileceği düşüncesindeyiz. İlave edilmesi düşünülen söz konusu maddelerin uzun süreli tekniklerde mutlaka kullanılması gerekmekte aksi takdirde epitel hücreleri açıklık çekmekte ve ölüme gitmektedir.

Çalışmada bir enzim olan Trypsin-EDTA'nın ne oranda kullanılacağı yaklaşık olarak belirlenmiştir. Proteolitik özellik taşıyan enzim 37°C'de oldukça etkin olduğu için bazı ekipler 4°C'de daha uzun süre bekleterek işlem yaparlar ancak elimizdeki dokunun hücre sayısı düşük olduğundan daha hızlı olan teknik sık sık kontrol edilerek tercih edildi. Kornea hücrelerinin deri epitel ve oral mukoza hücrelerinden daha hassas (10) olduğu göz önüne alınırsa enzimin yıkıcı etkisinden korumanın başarılı bir protokol uygulayabilme açısından önemi ortaya çıkmaktadır.

Çalışmada kullanılan TYB spermatozoa dondurma tekniğinde yaygın kabul görmüş ve başarıyla kullanılan bir kriyoprotektant'dır. TYB içerik olarak penisilin ve streptomycin antibiyotik destekli, esas donma kristalizasyon hasarından koruyucu etkisi gliserol ve ısı ile inaktive edilmiş yumurta sarısından oluşan kompleks bir mediumdur (8). Ekibimizin daha önceki uygulamalarında deri epitelinde TYB kullanıldı ve umut verici sonuç-

lar alındı. Bu çalışmalardan alınan sonuçlarla kornea epitel hücreleri denendi ve dikkate değer başarı elde edildi. Kornea epitel hücrelerinin bir kısmı ısıtma sonrası tek tek değil de hücre yığını olan klamp halinde olduğu gözlemlendi. Klamlarda bulunan hücrelerin canlılık oranının daha yüksek olması dondurma aşamasından önce tek hücre değil de klamp şekline getirip dondurma yapılmasının başarıyı arttıracak kanaatine varıldı. Epitel tabakasının klamp haline getirilmesi hem tripsinizasyon süresinin hem de manyetik karıştırıcıdaki sürenin azalması ile kolaylıkla sağlanır. Sonuç olarak canlılık oranının buna bağlı olarak artırması beklenmektedir.

Kornea epitel hücre manipülasyonunda başarılı olacak bir tekniğin geliştirilmesi birçok olanak sağlamaktadır. Örneğin, teknolojik gelişmeler deri epiteli ile paralel olarak incelenirse mezodermal komponentin sıvı formunun bazal hücrelerle kombinasyonun stroma hasarlarında tedavi olanağı getirmesi beklenmektedir (9), değişik patojenlerin hasar çalışması yapılabileceği gibi farmakolojik ajanların (11,12), fiziksel etkiler -ultraviyole ışınlarının (11-13) etkileri değerlendirilebilecektir. Epitel hücrelerinin apoptotik özellikleri kültür ortamında incelenerek doku hücre kinetiği daha iyi anlaşılacak ve tedavi protokollerini etkileyecektir (14,15).

#### KAYNAKLAR

1. Toichiro Kuwabara: The Eye Ed. Leon Weiss, Cell and Tissue Biology 5. baskı. Münih. Urban&Schwarzenberg Inc., 1988, Ch.36, pp: 1073-79
2. Kurt E Johnson: Development of the Eye Ch.20 . Human Development Anatomy Wiley, , Pennsylvania, Medical Publish.. 1988, pp: 345.
3. Compton CC, Gill JM, Bradford DA, Regauer GG, O'Connor NE: Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. A light, electron microscopic and immunohistochemical study. Laboratory Investigation, 1989,60:600-12.
4. Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell, 1975, 6:331-44
5. Lindberg K, Rheinwald JG: Three distinct keratinocyte subtypes identified in human oral epithelium by their patterns of keratin expression in culture and in xenografts. Differentiation. 1990,45: 230-41.
6. Greenhalgh DA, Rothnagel JA, Quintanilla MIA targeted v-Ha-ras oncogene induces epidermal hyperplasia, hyperkeratosis and papillomas in transgenic mice. Molecular Carcinogenesis., 1993,7:99-119.
7. Gratiella Pellegrini (De Luca), (Kişisel görüşme) Institute'de Dermo Patologica (IDI), Pomezia, Roma, 1997.
8. Weidel L, Prins GS: Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. J Androl.. 1987,8: 41-46.
9. Tanczos E, Horch RE, Bannasch H, Andree C, K-J Walgenbach, Voigt M, Stark GB: Keratinozytentransplantation und Tissue Engineering. Zentralbl Chir.,1999,124, 2: 85-90.
10. Mori Y, Shimomura Y, Inoue Y, Kinoshita S: Susceptibility of cultured rabbit corneal epithelial cells to various herpes simplex virus isolates. Jpn J Ophthalmology, 1996,40:3, 367-70.
11. Shimmur S, Tsubota K: Ultraviolet B-induced mitochondrial dysfunction is associated with decreased cell detachment of corneal epithelial cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci., 1997, 38:3 Mar : 620-6.
12. Nakamura M, Nishida T, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ: Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea. Exp Eye Res. Sep., 1997, 65:3, 321-9.
13. Saika S, Kawashima Y, Okada Y, Tanaka SI, Yamanaka O, Ohnishi Y, Ooshima A: Recombinant TIMP-1 and -2 enhance the proliferation of rabbit corneal epithelial cells in vitro and the spreading of rabbit corneal epithelium in situ. Curr Eye Res, Jan., 1998,17:1, 47-52.
14. Ren H, Wilson G: Apoptosis in the corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci, May., 1996,37:6,1017-25.
15. Cuono C, Langdon R, McGuire J: Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. Lancet. 1986,1123-4