



Limbal Kök Hücre Yetmezliği ve Tedavisinde Kök Hücre Nakli

Limbal Stem Cell Deficiency and Treatment with Stem Cell Transplantation

Özlem Barut Selver*, Ayşe Yağcı*, Sait Eğrilmez*, Mehmet Gürdal**, Melis Palamar*, Türker Çavuşoğlu***, Utku Ateş****, Ali Veral*****, Çağrı Güven*****, Jose Mario Wolosin*****

*Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

**Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

***Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

****İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

*****Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

*****Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

*****Mount Sinai Icahn Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı ve Black Family Kök Hücre Enstitüsü, New York, ABD

Öz

Görme fonksiyonunun iyi olabilmesinin ilk koşulu, korneanın saydam olmasıdır. Korneanın saydam olabilmesi için ise diferansiyasyonunu tamamlamış yüzeysel hücrelerin dökülmesi ile sürekli yenilenen epitel tabakasının düzenli ve avasküler yapısını koruması zorunludur. Yenilenen epitel hücrelerinin kaynağı, limbus bölgesinde yerleşen kök hücrelerdir. Kornea vaskülarizasyonu ve opaklaşma ile giden körlük, tüm dünyadaki körlüklerin yaklaşık olarak %10'unu oluşturmaktadır (6-10 milyon kişi) ve limbal kök hücre yetmezliğinde bu türde körlük yapan faktörlerin başında gelmektedir. Kimyasal/ısı yanıkları, Steven Johnson sendromu, konjenital/genetik anomaliler gibi birincil veya ikincil herhangi bir nedenle limbal kök hücrelerin fonksiyonunu kaybetmesi, konjonktiva epitelinin kornea üzerine yürütmesine, skar-vaskülarizasyon gelişimiyle ciddi görme kaybı oluşmasına neden olmaktadır. Günümüzde bu patolojinin etkin tedavi seçenekleri sınırlıdır. Tek gözün etkilendiği olgularda diğer gözden otolog limbal doku transplantasyonu ile görmenin tekrar elde edilmesine çalışılmaktadır. Ancak sağlam gözü aynı hastalık açısından riske atmamak için, mümkün olduğunca küçük doku kullanılmakta ve tedavinin tekrarlanması kaçınılmaktadır. *In vivo* olarak limbal epitel hücrelerin yalnızca %1-2'si kök hücredir. Klinik başarıda en önemli etken nakledilen dokunun yeterli miktarda kök hücre içermesidir. Bu sebeplerle, kök hücrelerini kültür ortamında korumak ve çoğaltmak adına çeşitli girişimlerde bulunmaktadır. İlk kez limbal kök hücrelerin *in vitro* çoğaltılabileceğini ve limbal kök hücre yetmezliği tedavisinde kullanılabileceğini gösterilmesinden sonra günümüze kadar geçen 20 yılda, limbal epitel hücre kültürlerinde birçok farklı yöntem kullanılmıştır. Bu uygulamalar içinde en başarılı ve sıklıkla kullanım bulan yöntem, limbal biyopsinin biyo-uyumlu bir materyal üzerinde (tercihen insan amniyon membranı) eksplant kültür olarak çoğaltılması ve bu dokunun (kültüre edilmiş limbal epitelyal hücre) cerrahi olarak nakledilmesidir. Günümüzde hücrel ürün kullanımına ilişkin değişen yasal düzenlemeler sonucu ülkemiz ve tüm dünyada artık kültüre edilmiş limbal epitelyal hücre naklinin iyi laboratuvar uygulamaları kapsamında, hayvansal ürünlerden arındırılmış ürünlerle (xenofree) hazırlanarak kullanımı yaygın kabul görmektedir.

Anahtar Kelimeler: Limbal kök hücre yetmezliği, kültüre edilmiş hücreler, kök hücre nakli

Abstract

The cornea is the outermost tissue of the eye and it must be transparent for the maintenance of good visual function. The superficial epithelium of the cornea, which is renewed continuously by corneal stem cells, plays a critical role in the permanence of this transparency. These stem cells are localized at the cornea-conjunctival transition zone, referred to as the limbus. When this zone is affected/destroyed, limbal stem cell deficiency ensues. Loss of limbal stem cell function allows colonization of the corneal surface by conjunctival epithelium.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Özlem Barut Selver, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Tel.: +90 352 437 49 01 E-posta: ozlem.barut@deu.edu.tr **ORCID-ID:** orcid.org/0000-0003-3333-3349

Geliş Tarihi/Received: 28.11.2016 **Kabul Tarihi/Accepted:** 06.02.2017

©Telif Hakkı 2017 Türk Oftalmoloji Derneği
Türk Oftalmoloji Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından basılmıştır.

Over 6 million people worldwide are affected by corneal blindness, and limbal stem cell deficiency is one of the main causes. Fortunately, it is becoming possible to recover vision by autologous transplantation of limbal cells obtained from the contralateral eye in unilateral cases. Due to the potential risks to the donor eye, only a small amount of tissue can be obtained, in which only 1-2% of the limbal epithelial cells are actually limbal stem cells. Vigorous attempts are being made to expand limbal stem cells in culture to preserve or even enrich the stem cell population. *Ex vivo* expanded limbal stem cell treatment in limbal stem cell deficiency was first reported in 1997. In the 20 years since, various protocols have been developed for the cultivation of limbal epithelial cells. It is still not clear which method promotes effective stem cell viability and this remains a subject of ongoing research. The most preferred technique for limbal cell culture is the explant culture model. In this approach, a small donor eye limbal biopsy is placed as an explant onto a biocompatible substrate (preferably human amniotic membrane) for expansion. The outgrowth (cultivated limbal epithelial cells) is then surgically transferred to the recipient eye.

Due to changing regulations concerning cell-based therapy, the implementation of cultivated limbal epithelial transplantation in accordance with Good Laboratory Practice using xenobiotic-free systems is becoming widely accepted both in Turkey and worldwide.

Keywords: Limbal stem cell deficiency, cultured cells, stem cell transplantation

Giriş

Limbal Kök Hücre Yetmezliği

Limbal kök hücre yetmezliği (LKHY), etiolojisinde birçok faktörün yer aldığı, korneanın rejeneratif yeteneğini kısmen ya da tamamen kaybetmesi ile ortaya çıkan karmaşık bir patolojidir.¹ Limbal bölgenin ciddi hasarlanmasını takiben gelişen kök hücre kaybı, kalıcı korneal epitel defektleri ve konjonktivalizasyona bağlı görme kaybı ile sonuçlanmaktadır (Resim 1).²

Etiyoloji

LKHY'ye neden olan durumlar, birincil ve ikincil nedenler olarak başlıca ikiye ayrılmaktadır (Tablo 1). Klinikte, sekonder nedenler, etiolojide genetik faktörlerin rol oynadığı primer nedenlerden (örneğin; aniridi, Resim 2) daha sık olarak karşımıza çıkmaktadır.^{3,4}

Semptom ve Bulgular

LKHY'deki semptomlar, nonspesifik olup bu semptomlar arasında azalmış görme keskinliği, fotofobi, sulanma, blefarospazm, kronik enflamasyona bağlı kızarıklık ve epitelyopati nedeni ile tekrarlayan ağrı atakları bulunmaktadır.^{4,5}

Biyomikroskopik muayenede, kornea epitelinin donuk ve düzensiz reflesi görülür. LKHY ağırlığına bağlı olarak, kalın fibrovasküler pannus oluşumu, kronik keratit,

skarlaşma ve kalsifikasyon ortaya çıkabilmektedir. Korneanın konjonktivalizasyonu sonucundaki geçirgenlik artışına bağlı olarak, korneanın floresein tutulumu da sıklıkla anormal olmaktadır.⁴

Tanı

LKHY'de, kesin tanı konulması önem taşımaktadır. Kesin tanı konulamaması, bu hastalıkta sonuçları oldukça kötü olan kornea transplantasyonu uygulamasının yapılmasına neden olabilmektedir.⁶

LKHY'nin tüm bulgularına rağmen, tanıda yalnızca konjonktivalizasyon ve korneal yüzey üzerine goblet hücre göçü özellik taşımaktadır. Konjonktivalizasyonun klinik bulguları arasında, Vogt limbal palizatlarında bozulma veya korneada gecikmiş floresein boyanması sayılabilir. Konjonktivalizasyonun asıl tanısı, impresyon sitolojisi ile korneada goblet hücrelerinin varlığının gösterilmesi yoluyla konulabilmektedir (Resim 3).¹

Tedavi Yöntemleri

LKHY tedavisinde, çeşitli yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlar arasında otolog ve allogreft limbal greft transplantasyonları ile



Resim 1. Kimyasal yaralanmaya (aseton) bağlı olarak gelişen limbal kök hücre yetmezliği olgusuna ait fotoğrafta konjonktivalizasyon ve kornea merkezine doğru ilerleyen belirgin vaskülarizasyon izlenmektedir

Tablo 1. Limbal kök hücre yetmezliği nedenleri sınıflandırması

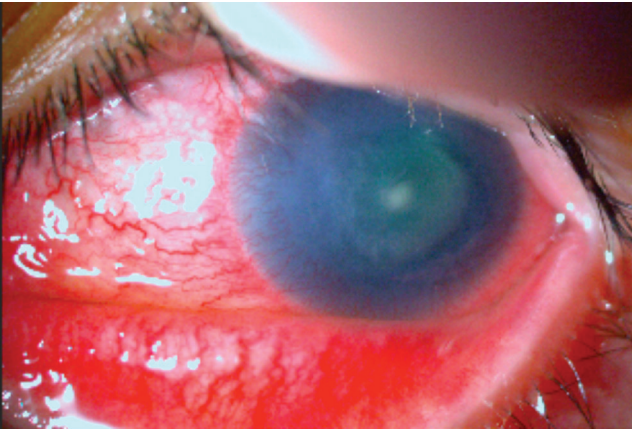
Birincil LKHY	İkincil LKHY
Aniridi	Travmatik
Konjenital eritrokeratodermi	Kimyasal yanıklar
Kseroderma pigmentozum	Termal yanıklar
Peters anomalisi	Edinsel
Turner sendromu	Oküler yüzeyin skatrisyel hastalıkları
Keratit - İktiyoz - Sağırılık sendromu	Vernal keratokonjonktivit
	Ultraviyole
	İyonizan radyasyon
	Limbal bölgeye uygulanan cerrahiler
	Kontakt lens kullanımı
	Prezervan madde toksisitesi
	Yaşlanma
	İatrojenik
	Kriyoterapi
	Kemoterotopik ajanlar
	Enfeksiyöz
	Viral
	Bakteriyel
	Parazitik
	Onkolojik
	Oküler yüzey tümörleri

LKHY: Limbal kök hücre yetmezliği

Tablo 2. Literatürde kültüre edilmiş limbal epitel nakli uzun dönem sonuçlarını prospektif olarak değerlendiren çalışmalarda yöntemlerin özellikler

Yazar	Yıl	Biyopsi orijini	Olgu sayısı	Kültür tipi	Kültür ortamı	Kültür materyali	Takip süresi (Ay)	Başarı oranı
Pauklin ve ark. ⁴⁴	2010	30 Otolog 14 Allojenik	44	Eksplant	Otolog serum	iAM	28,5	%84,1
Schwab ve ark. ⁵³	2000	10 Otolog 4 Allojenik	14	Süspansiyon	Siğır serumu	iAM	13	%71,4
Tsai ve ark. ¹⁷	2000	6 Otolog	6	Eksplant	Siğır serumu	iAM	15	%100
Prabhasawat ve ark. ⁵⁴	2012	12 Otolog 7 Allojenik	19	Eksplant	Serumsuz	iAM	26,1	%73,7
Shortt ve ark. ⁴²	2008	7 Otolog 3 Allojenik	10	Süspansiyon	Siğır serumu	iAM	9,3	%60
Kolli ve ark. ⁵⁵	2010	8 Allojenik	8	Eksplant	Otolog serum	iAM	19	%100
Zakaria ve ark. ⁵⁶	2014	15 Otolog 3 Allojenik	18	Eksplant	Ticari insan serumu	iAM	22	%66,7

iAM: İnsan amniyon membrane

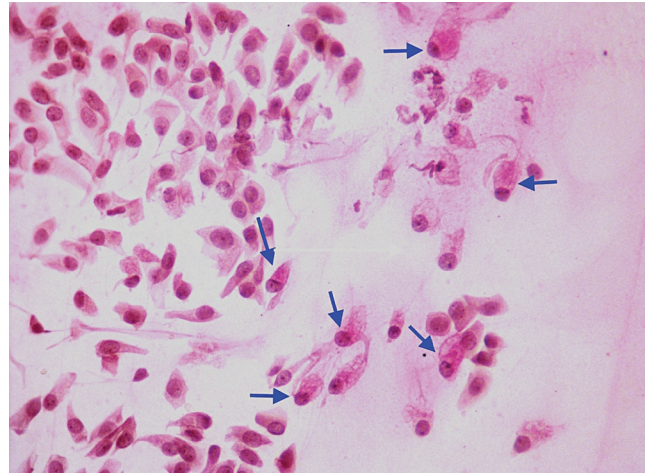
**Resim 2.** Aniridili bir olguya ait limbal kök hücre yetmezliği bulguları izlenmektedir. günümüzde giderek önem kazanan kültüre edilmiş limbal epitel hücre (KLEH) transplantasyonu yer almaktadır.⁶

Tek taraflı LKHY’de, literatürde %80 düzeylerini geçen başarı oranı bildirilen otolog limbal greftler kullanılabilir. ^{7,8} Otolog limbal greftlerde her ne kadar kesin olarak kanıtlanmış olmasa da verici yatakta LKHY gelişme riski, yeterli donör doku elde edilmesini kısıtlamaktadır.⁹

Bilateral LKHY’de, allogreft kullanımı söz konusu olmakla birlikte yöntemin başarısı immün reaksiyon ve allogreft rejeksiyonu riski nedeni ile kısıtlıdır.^{5,6} Keratolimbal allogreftlerin uzun dönem başarı beklentisi düşük olup yaklaşık olarak %50 oranında bildirilmektedir.^{10,11}

Her ne kadar birçok cerrahi yöntem bulunsu da, ciddi LKHY olan hastalarda, özellikle de bilateral olgularda, halen güvenilir ve etkin bir tedavi yöntemi mevcut değildir.⁶ Tüm bu nedenlerle, limbal hücre kültürü gibi yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi kaçınılmaz hale gelmiştir.^{12,13,14,15,16,17}

Son yıllarda klinik uygulamalarda yer almaya başlayan görece yeni hücresel tedavi yaklaşımlarının, biyolojik arka

**Resim 3.** İmpresyon preparatında goblet hücreleri (ok) ve skuamöz hücreler (PASx100)

planları halen net olarak bilinmemektedir. Özellikle limbal kök hücrelerin karakteri ve mikro çevreleri, günümüz limbal kök hücre kültürü çalışmalarının en önemli araştırma konuları arasındadır.¹⁸ Kültür ortamında üretilen limbal kök ya da öncül hücrelerin transplantasyonuna dayalı geliştirilmiş ve halen geliştirilmekte olan tekniklerin, halen hangi yöntemin en uygun olduğu tartışmalı olsa da yaklaşık allojenik olanda %73 otolog olanda ise %77 başarı oranı¹⁹ ile ciddi oküler yüzey hastalıklarının tedavisinde kullanılabilir olduğu gösterilmektedir.^{12,16,20}

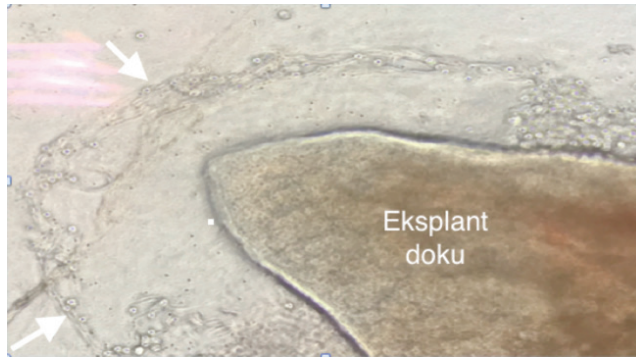
İlk kez 1997 yılında Pellegrini ve ark.¹³, *Lancet* dergisinde yayınladıkları çalışmalarında, limbal kök hücrelerin “feeder layer” (besleme tabakası) üzerinde üretilbildiğini bildirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda araştırmacılar, insan amniyon membran (iAM) üzerinde üretilen otolog limbal epitel hücrelerini kornea rekonstrüksiyonunda kullanmışlardır.¹⁷ Fakat bu yaklaşımlar tamamıyla stratifiye olmuş ve iyi differansiye epitel tabakalarının oluşmasını sağlayamamıştır. Limbal kök

hücreye özgü işaretleyiciler tam olarak belirlenemediğinden, bu hücrelerin fiziksel izolasyonu yeteri derecede yapılamamaktadır. Dolayısıyla çalışmalar çoğunlukla, limbal epitel hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan genleri kontrol eden, kök hücre ortamını oluşturacak mikro çevrenin karakterizasyonu ve limbal bazal epitelde bulunan geçici çoğalan hücrelerin farklılaşması için gerekli sinyallerin bulunması yolunda olmuştur.^{21,22,23,24}

Günümüzde uygulaması yaygınlaşan KLEH nakli, halen var olan tekniklerle geliştirilebilmiş en ileri tedavi yöntemidir. Kök hücre ve mikro çevreye ait özelliklerin daha iyi tanımlanabilmesiyle ve yeni kök hücre kaynaklarının bulunması ve geliştirilmesi ile gelecekte daha iyi klinik sonuçların alınabileceği ideal tedavilerin gelişmesi mümkün olacaktır.^{3,25,26}

Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Hücreleri

Kültür için doku kaynakları: KLEH için temel doku kaynaklarını, unilateral olgularda genellikle hastanın sağlam



Resim 4. 40x objektifle çekilen *inverted* ışık mikroskobu (olympus; CKX41) görüntüsü. Eksplant biyopsi dokusu ve bu doku kenarlarından insan amniyon membran üzerine doğru büyümekte olan hücreler izlenmekte (beyaz oklar)

olan diğer gözünden alınan otolog limbal biyopsi dokuları, bilateral olgularda ise yaşayan akrabadan ya da kadavradan alınan allojenik limbal biyopsi dokuları oluşturmaktadır.^{27,28,29}

Kültür metodu: Yaklaşık 1x2 mm boyutlarındaki limbal biyopsi verici gözden alındıktan sonra kültür işlemleri amacıyla laboratuvar ortamına transfer edilmektedir. Başlıca kültür metotları, hücre süspansiyon kültürü ve eksplant kültür olarak ikiye ayrılmaktadır.³⁰

a. Süspansiyon kültürü: Bu yöntemde, limbal bölgeden alınan biyopsi örneği dispaz, tripsin, kollajenaz gibi enzimlerle parçalanarak tek tek hücre yapısına dönüştürülmektedir. Elde edilen tek hücreler, kültür ortamında çoğaltılmaktadır.^{31,32}

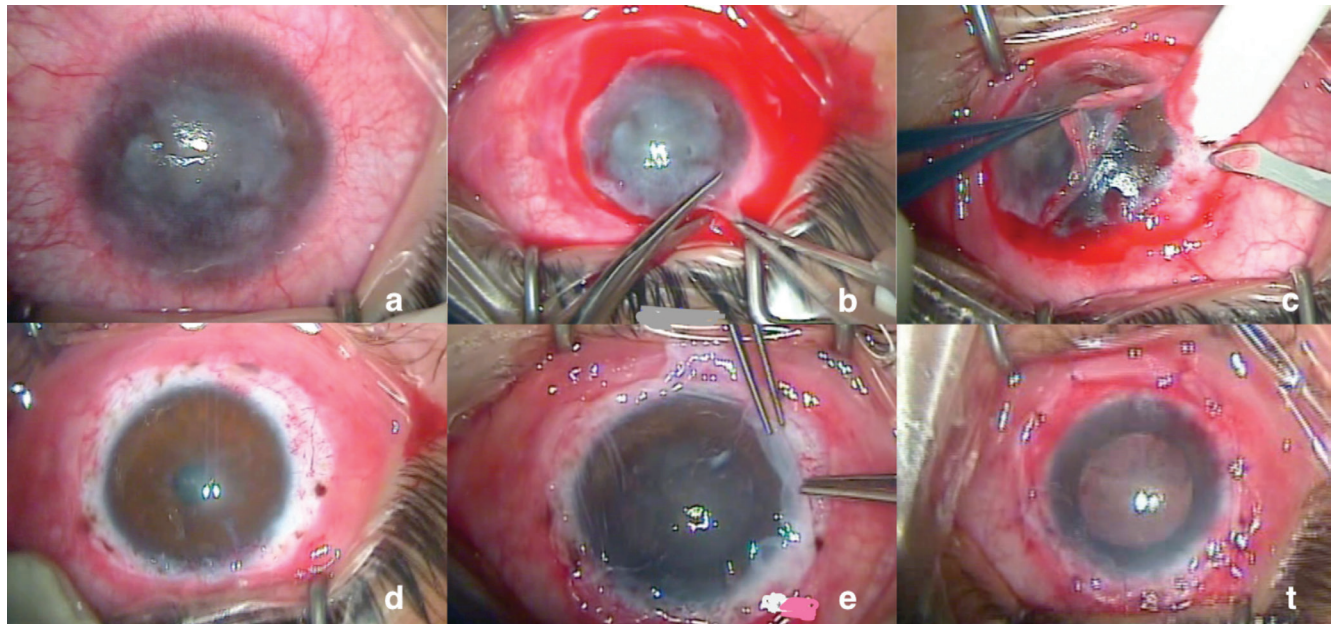
b. Eksplant kültürü: Bu yöntem eksplant dokunun bir yüzey materyali üzerine yerleştirilerek, hücrelerin dokudan yüzey materyali üzerine doğru çoğalarak büyümesi (Resim 4) şeklinde yapılmaktadır.³³

Her iki kültür yönteminde de *in vitro* büyümeyi güçlendirmek için çeşitli kültür bileşenleri kullanılır.

Kültür Bileşenleri

a. 3t3 hücreleri: 3t3 hücreleri, fare fibroblastları olup kültürde epitel tabakası oluşumunu sağlaması amacıyla yaygın kullanım bulmuştur. Ancak bu hücrelerin kullanımı teorik olarak hayvansal hücre transplantasyonu, enfeksiyon ve rejeksiyon riskini arttırması ve mikrokimerizm gibi riskleri taşımaktadır. Bu nedenle klinik uygulamalarda çok fazla tercih edilmemektedir.³⁴

b. iAM: iAM, immünojenik olmayan ve yara iyileşmesinde çok uzun yıllardır klinik pratikte de kullanılan bir biyo-membrandır.³⁵ Araştırmacıların çoğu, morfolojik çalışmaların deepitelize iAM kullanımının, limbal epitel büyümesini daha iyi desteklediğini göstermesi nedeniyle membranı deepitelize



Resim 5. Kültüre edilmiş limbal epitel hücre nakli aşamaları izlenmekte

haliyle kullanmayı tercih etmektedir.¹⁴ Halen KLEH nakli klinik pratiğinde en çok kullanılan yüzey yapısı olsa da, iAM'nin, biyolojik değişkenliğinin olması, kesinleşmiş bir hazırlama standardizasyonunun bulunmaması ve teorik olarak enfeksiyon riski taşıması gibi dezavantajları mevcuttur.^{19,36,37}

c. Fibrin jel: Fibrin jel, fibrinojenden oluşan biyo-emilimi olan bir membrandır. iAM gibi yine insan kökenli fibrinojen içerdiği için teorik olarak enfeksiyon bulaş riski dışlanamamaktadır.^{38,39,40}

Kültür ortamı: Limbal epitel hücre kültürü sürecinde epitel çoğalmasının ve büyümenin sağlanması amacıyla kültür ortamı, serum ile zenginleştirilmektedir. Bu amaçla çok uzun yıllar sığır serumu kullanılmış olsa da^{13,41,42} son yıllardaki yasal düzenlemeler ile hayvansal ürünlerden arındırılmış kültür hazırlanmasının ön plana çıkması nedeni ile otolog serum kullanımı hız kazanmıştır.^{43,44}

Kültür süresi: Kültür süresi yaklaşık 2 hafta olmakla beraber, "air lifting" denilen ve kültürü hava sıvı ara yüzeyi ile temasta bırakarak kültür epitelinin çok katlı hale getirilmesi yönteminin kullanıldığı durumlarda bu süre uzamaktadır.^{19,39,40,44,45,46}

Kültüre Edilmiş Limbal Hücre Nakli

a. Oküler yüzeyin hazırlanması: LKHY bulunan göze (Resim 5a), KLEH nakli öncesi, peritomi yapılır (Resim 5b), oküler yüzeydeki fibrovasküler pannus dokusu temizlenir (Resim 5c), gerekli olan durumlarda yüzeyel keratektomi yapılır. Kanama kontrolü koter ile sağlandıktan sonra oküler yüzey KLEH nakline hazır hale gelir (Resim 5d).

b. KLEH nakli: KLEH laboratuvarından ameliyathaneye transfer edildikten sonra, hazırlanmış oküler yüzeye epitel tarafı üstte olacak şekilde nakledilir. Genellikle 10-0 naylon sütürler ile kornea ve veya episkleraya tespit edilir (Resim 5e).

c. Koruyucu membran/Kontakt lens uygulaması: KLEH nakli tamamlandıktan sonra genellikle bir koruyucu iAM veya bazı araştırmacılar tarafından da bandaj lens kullanımı nakledilen hücrelerin kapak hareketine bağlı negatif etkilenmesini önlemek adına kullanılmaktadır. Eğer iAM kullanılıyorsa, bu zar konjonktivaya 8-0 vicryl sütürlerle tespit edilir (Resim 5f).^{19,28,47}

Literatürde LKHY'de KLEH nakli sonuçlarını değerlendiren prospektif özellikte ve uzun süreli takibi bulunan çalışmalara ait uygulamaların özellikleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Yeni Düzenlemeler

Günümüzde dünyada kullanımı giderek yaygınlaşan hücresel tedavi yöntemlerinin uygulanmasında yeni standardizasyonların geliştirilmesi kaçınılmazdır.⁴⁸ Ksenojenik (hayvansal kaynaklı) maddelerin kullanımı prion gibi bir takım hastalıkların bulaşına, tümörojenik etki oluşmasına veya immün reaksiyona yol açabildiğinden, KLEH prosedürlerinde, hayvansal ürünlerden arındırılmış yöntemlerin geliştirilmesi ihtiyacı ortaya çıkmıştır.^{25,34,49,50} Ayrıca yine işlenmiş tıbbi ürünlerin insana nakli söz konusu olduğunda toplum sağlığını korumak adına bu uygulamaların, iyi laboratuvar uygulamaları altında yapılması gerekmekte olup ve bu gereklilik çoğu Avrupa ülkesinde

yasallaştırılmıştır.^{39,40,43,51}

Türkiye'de de Sağlık Bakanlığı'nın İnsan Doku ve Hücreleri ile Bunlarla İlgili Merkezlerin Kalite ve Güvenliği Hakkında Yönetmeliği 27 Ekim 2010 tarihli resmi gazetede yayımlanmıştır.⁵²

Sonuç

Oküler yüzeye ait iyileşme ve homeostazın regülasyonu sürecinde epitelizeasyonun sürekliliğini sağlayacak dinamik dengeler önem taşımaktadır. Bu dinamik dengelerin bozulması ile ortaya çıkan, görme yetisinin yanı sıra ağrılı ve yorucu bir süreç ile yaşam kalitesi azaltan LKHY'de çözüme yönelik temel ve klinik bilimlerin multidisipliner olarak yürüttükleri çalışmalar yoğun olarak sürmektedir. Oküler yüzey homeostazını oluşturarak enflamasyonu baskılayan, rejenerasyonu güçlendiren ve neovaskülarizasyonu inhibe eden hedefe yönelik etkili yöntemlerinin geliştirilmesinin cerrahi başarıyı arttırması beklenir. Bu amaçla, alınan kök hücrelerin üzerinde proliferere olacağı ideal taşıyıcı ve limbal mikro çevreyi tanımlama ve uygulama konusundaki gelişmelerin, KLEH içindeki kök hücre popülasyonunun sayı ve kalitesinde sağlayacağı iyileşme ile greft başarısını arttıracağını varsaymak günümüzde hayal olmaktan çıkmıştır. Oküler yüzey restorasyonunda, özellikle de otolog hücre kaynağının olmadığı bilateral olgularda, limbal kök hücre dışındaki kök hücre kaynaklarının (örneğin; indüklenmiş pluripotent kök hücreler) biyolojik davranış modelleri modifiye edilerek limbal kök hücreye dönüşebilirliğinin sağlanması ve doku mühendisliği tekniklerindeki gelişmeler ile bu karmaşık patolojinin tedavisinde yeni ufuklar açılması muhtemeldir.

Etik

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu ve Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: Özlem Barut Selver, Ayşe Yağcı, Sait Eğrilmez, **Dizayn:** Özlem Barut Selver, Mehmet Gürdal, Utku Ateş, Sait Eğrilmez, **Veri Toplama veya İşleme:** Özlem Barut Selver, Ayşe Yağcı, **Analiz veya Yorumlama:** Özlem Barut Selver, Ayşe Yağcı, Sait Eğrilmez, Jose Mario Wolosin, **Literatür Arama:** Özlem Barut Selver, Mehmet Gürdal, Ayşe Yağcı, Melis Palamar, **Yazan:** Özlem Barut Selver, Ayşe Yağcı Sait Eğrilmez, Mehmet Gürdal, Melis Palamar, Türker Çavuşoğlu, Utku Ateş, Ali Veral, Çağrı Güven, Jose Mario Wolosin.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

Kaynaklar

1. Liang L, Sheha H, Li J, Tseng SC. Limbal stem cell transplantation: new progresses and challenges. Eye (Lond). 2009;23:1946-1953.
2. Shapiro MS, Friend J, Thoft RA. Corneal re-epithelialization from the conjunctiva. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1981;21:135-142.

3. Khan-Farooqi H, Chodosh J. Autologous Limbal Stem Cell Transplantation: The Progression of Diagnosis and Treatment. *Semin Ophthalmol*. 2016;31:91-98.
4. Dua HS. Stem cells of the ocular surface: scientific principles and clinical applications. *Br J Ophthalmol*. 1995;79:968-969.
5. Espana EM, Grueterich M, Romano AC, Touhami A, Tseng SC. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2002;109:2004-2010.
6. Daniels JT, Dart JK, Tuft SJ, Khaw PT. Corneal stem cells in review. *Wound Repair Regen*. 2001;9:483-494.
7. Cauchi PA, Ang GS, Azuara-Blanco A, Burr JM. A Systematic Literature Review of Surgical Interventions for Limbal Stem Cell Deficiency in Humans. *Am J Ophthalmol*. 2008;146:251-259.
8. Kenyon KR, Tseng SC. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1989;96:709-722.
9. Jenkins C, Tuft S, Liu C, Buckley R. Limbal transplantation in the management of chronic contact-lens-associated epitheliopathy. *Eye (Lond)*. 1993;7:629-633.
10. Lim P, Fuchsluger TA, Jurkunas UV. Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin Ophthalmol*. 2009;24:139-148.
11. Solomon A, Ellies P, Anderson DE, Touhami A, Grueterich M, Espana EM, Ti SE, Goto E, Feuer WJ, Tseng SC. Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2002;109:1159-1166.
12. Koizumi N, Inatomi T, Suzuki T, Sotozono C, Kinoshita S. Cultivated Corneal Epithelial Transplantation for Ocular Surface Reconstruction in Acute of Stevens Johnson Syndrome. *Arc Ophthalmol*. 2001;119:298-300.
13. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997;349:990-993.
14. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2506-2513.
15. Grueterich M, Espana EM, Tseng SC. Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche. *Surv Ophthalmol*. 2003;48:631-646.
16. Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S. Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease. *Cornea*. 2003;22:70-71.
17. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *N Engl J Med*. 2000;343:86-93.
18. Schlötzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE. Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res*. 2007;85:845-860.
19. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. *J Cell Biochem*. 2011;112:993-1002.
20. Zhao Y, Ma L. Systematic review and meta-analysis on transplantation of ex vivo cultivated limbal epithelial stem cell on amniotic membrane in limbal stem cell deficiency. *Cornea*. 2015;34:592-600.
21. Wolosin JM, Schürte M, Zieske JD, Budak MT. Changes in connexin43 in early ocular surface development. *Curr Eye Res*. 2002;24:430-438.
22. Li DQ, Chen Z, Song XJ, de Paiva CS, Kim HS, Pflugfelder SC. Partial enrichment of a population of human limbal epithelial cells with putative stem cell properties based on collagen type IV adhesiveness. *Exp Eye Res*. 2005;80:581-590.
23. Papini S, Rosellini A, Nardi M, Giannarini C, Revoltella RP. Selective growth and expansion of human corneal epithelial basal stem cells in a three-dimensional-organ culture. *Differentiation*. 2005;73:61-68.
24. Selver OB, Durak I, Gürdal M, Baysal K, Ates H, Ozbek Z, Wang Z, Wu A, Wolosin JM. Corneal recovery in a rabbit limbal stem cell deficiency model by autologous grafts of tertiary outgrowths from cultivated limbal biopsy explants. *Mol Vis*. 2016;22:138-149.
25. Nakamura T, Kinoshita S. New hopes and strategies for the treatment of severe ocular surface disease. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011;22:274-278.
26. Holland EJ. Management of Limbal Stem Cell Deficiency : A Historical Perspective , Past , Present , and Future. *Cornea*. 2015;34:9-15.
27. Daya SM, Chan CC, Holland EJ; Members of The Cornea Society Ocular Surface Procedures Nomenclature Committee. Cornea Society Nomenclature for Ocular Surface Rehabilitative Procedures. *Cornea*. 2011;30:1115-1119.
28. Burman S, Sangwan V. Cultivated limbal stem cell transplantation for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol*. 2008;2:489-502.
29. Durak İ, Selver ÖB, Erdal E, Kunter İ, Söylemezoğlu ZÖ, Wolosin JM. Limbal Kök Hücre Yetmezliğinde Kültüre Edilmiş Limbal Epitel Hücreleri ile Oküler Yüzey Rekonstrüksiyonunun Bir Yıllık Sonuçları. *Turk J Ophthalmol*. 2012;42: 172-176.
30. Meyer-Blazejewska EA, Kruse FE, Bitterer K, Meyer C, Hofmann-Rummelt C, Wünsch PH, Schlötzer-Schrehardt U. Preservation of the limbal stem cell phenotype by appropriate culture techniques. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:765-774.
31. Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S. An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:2114-2121.
32. Zhang X, Sun H, Tang X, Ji J, Li X, Sun J, Ma Z, Yuan J, Han ZC. Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;80:227-233.
33. Selver OB, Barash A, Ahmed M, Wolosin JM. ABCG2-dependent dye exclusion activity and clonal potential in epithelial cells continuously growing for 1 month from limbal explants. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:4330-4337.
34. Schwab IR, Johnson NT, Harkin DG. Inherent risks associated with manufacture of bioengineered ocular surface tissue. *Arch Ophthalmol*. 2006;124:1734-1740.
35. Dua HS, Gomes JA, King AJ, Maharajan VS. The amniotic membrane in ophthalmology. *Surv Ophthalmol*. 2004;49:51-77.
36. Levis H, Daniels JT. New technologies in limbal epithelial stem cell transplantation. *Curr Opin Biotechnol*. 2009;20:593-597.
37. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, Wilshaw SP, Kearney JN, Tuft SJ, Daniels JT. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials*. 2009;30:1056-1065.
38. Li Y, Meng H, Liu Y, Lee BP. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. *Sci World J*. 2015;2015:685-690.
39. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *N Engl J Med*. 2010;363:147-155.
40. Rama P, Bonini S, Lambiasi A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, Pellegrini G. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*. 2001;72:1478-1485.
41. Sangwan VS, Matalia HP, Vemuganti GK, Fatima A, Ifthekar G, Singh S, Nutheti R, Rao GN. Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian J Ophthalmol*. 2006;54:29-34.
42. Shortt AJ, Secker GA, Rajan MS, Meligonis G, Dart JK, Tuft SJ, Daniels JT. Ex Vivo Expansion and Transplantation of Limbal Epithelial Stem Cells. *Ophthalmology*. 2008;115:1989-1997.
43. Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*. 2010;28:597-610.
44. Pauklin M, Fuchsluger TA, Westekemper H, Steuhl KP, Meller D. Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency. *Dev Ophthalmol*. 2010;45:57-70.
45. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Ang LP, Koizumi N, Yokoi N, Kinoshita S. Transplantation of Autologous Serum-Derived Cultivated Corneal Epithelial Equivalents for the Treatment of Severe Ocular Surface Disease. *Ophthalmology*. 2006;113:1765-1772.
46. Colabelli Gisoldi RA, Pocobelli A, Villani CM, Amato D, Pellegrini G. Evaluation of molecular markers in corneal regeneration by means of autologous cultures of limbal cells and keratoplasty. *Cornea*. 2010;29:715-722.

47. Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*. 2010;28:597-610.
48. Menzel-Severing J, Kruse FE, Schlötzer-Schrehardt U. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction: present and future. *Can J Ophthalmol*. 2013;48:13-21.
49. Basu S, Fernandez MM, Das S, Gaddipati S, Vermuganti GK, Sangwan VS. Clinical outcomes of xeno-free allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation for bilateral limbal stem cell deficiency. *Br J Ophthalmol*. 2012;96:1504-1509.
50. Zamudio A, Wang Z, Chung SH, Wolosin JM. Inhibition of TGF β cell signaling for limbal explant culture in serumless, defined xeno-free conditions. *Exp Eye Res*. 2016;145:48-57.
51. Ramírez BE, Sánchez A, Herreras JM, Fernández I, García-Sancho J, Nieto-Miguel T, Calonge M. Stem Cell Therapy for Corneal Epithelium Regeneration following Good Manufacturing and Clinical Procedures. *Biomed Res Int*. 2015;2015:408-495.
52. T.C. Sağlık Bakanlığı. İnsan Doku Ve Hücreleri İle Bunlarla İlgili Merkezlerin Kalite ve Güvenliği Hakkında Yönetmelik. *Resmî Gazete*. 2010;27742.
53. Schwab IR, Reyes M, Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease. *Cornea*. 2000;19:421-426.
54. Prabhasawat P, Ekpo P, Uiprasertkul M, Chotikavanich S, Tesavibul N. Efficacy of cultivated corneal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction. *Clin Ophthalmol*. 2012;6:1483-1492.
55. Kolli S, Ahmad S, Lako M, Figueiredo F. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells*. 2010;28:597-610.
56. Zakaria N, Possemiers T, Dhubhghaill SN, Leysen I, Rozema J, Koppen C, Timmermans JP, Berneman Z, Tassignon MJ. Results of a phase I/II clinical trial: standardized, non-xenogenic, cultivated limbal stem cell transplantation. *J Transl Med*. 2014;12:58.