

Tavflan Tapetoretinal Dejenerasyon Modelinde İntravitreal Uygulanan Kemik İligi Mezenkimal Kök Hücre Aracıyla Gen Tedavisi İçin Canlı ve Cansız Ortamda Kanıt: Yeşil Flöresan Protein (YFP) ♦

Gökhan Özge (*), Rıza Güngör (*), Güngör Sobacı (*), Ferit Avcu (**), Murat Demiriz (***), Elvin Akdag (****), Ali Uğur Ural (**)

ÖZET

Amaç: Tavflanlarda tapetoretinal dejenerasyon modelinde kemik iligi mezenkimal kök hücre (MKH) intravitreal uygulamasının etkinliğini göstermiştik (TOD UOK, 2006). Bu çalışmamızda MKH aracıyla gen tedavisinin uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Yöntem-Gereçler: GATA Araştırma Merkezi'nde erişkin Yeni Zelanda albino tavflanın femur proksimal kemik iliginden alınan MKH'ler vücut dışında farklılaştırıldı ve 4. pasajdaki hücreler kullanıldı. Kültür ortamında bu hücrelere plazmid aracı olarak 48 saat içinde 2 defa Yeşil Flöresan Protein (YFP) aktarım sağlandı. Erişkin, pigmentli 3 tavflana intravenöz 40 mg/kg sodyum iyodat-NaIO(3)- enjeksiyonu uygulandı (çalışma grubu). Hemen sonrasında bu tavflanlar yanısıra bir erişkin pigmentli tavflanın (kontrol) sağ gözlerine 2.5×10^5 hücre/0.1ml, sol gözlerine dengeli tuz solüsyonu 0.1ml intravitreal uygulandı. 1, 5, 10 ve 45. günlerde enükleasyon uygulanan tavflanlarda, izlem sürecinde, klinik, Fundus Floresin Anjiyografi (FFA, HRA-2®), Elektoretinografi (ERG, Roland®) ve histopatoloji (immünflöresan) incelemeleri yapıldı.

Bulgular: Birinci günde çalışma grubundaki tavflanlarda anormal ERG b dalga değerleri ve HRA(Heidelberg Retinal Anjiyografi)'da vitreusta YFP'li hücre kümeleri gözlemlendi. Beşinci günde retinada ödem, ERG'de b dalgasında silinme ve FFA'da lokalize hiper ve hipoflöresan odaklar saptandı. Birinci tavflanda uygulanan enükleasyon sonrası immünflöresan yöntemi ile retina da YFP taşıyan hücreler gösterildi. Onuncu günde FFA'da lokalize hiperflöresan ve hipoflöresan odaklarda artış, ERG'de silinme izlenen bir tavflanda canlı ve cansız ortamda uygulanan yöntemler (HRA ve immünflöresan) ile vitreusta ve retinada YFP'li hücrelerin varlığı gösterildi. Kırkbefincinci günde kontrollü gözlemlerde bu hücrelerin retina katmanlarındaki varlığının devam ettiği saptandı.

Sonuçlar: Akut tapetoretinal dejenerasyon modelinde, plazmid aracıyla transfekte edi-

(*) Gata Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Ad, Ankara

(**) Gata Tıp Fakültesi Hematoloji Bd, Ankara

(***) Gata Tıp Fakültesi, Patoloji Ana Bilim Dalı, Ankara

(****) Gata Tıp Fakültesi, Araştırma Merkezi, Ankara

♦ Türk Oftalmoloji Derneği 41.Ulusal Oftalmoloji Kongresi'nde serbest bildiri olarak sunulmuş ve bilimsel araştırma ödülü almıştır.

Yazışma adresi: Asistan Gökhan Özge, Gata Göz Hastalıkları Anabilim Dalı Etik/Ankara
E-posta: dr_gozge@yahoo.com

len ve intravitreal uygulanan allojenik kök hücrelerden retina YFP aktarım sağlanabilmektedir. Bu yöntem, otolog MKH'lerin kullanıma avantajı bulunan retinal dejenerasyon olguları için yeni bir gen tedavisi yaklaşımı olarak geliştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: gen tedavisi, kök hücre, tavflan, tapetoretinal dejenerasyon, yeşil floresan protein (YFP)

SUMMARY

In Vivo and in Vitro Proof for Intravitreal Implanted Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (MSC) Mediated Gene Therapy in Rabbit Tapetoretinal Degeneration Model: Green Fluorescent Protein (GFP)

Purpose: We have shown the efficacy of intravitreal use of bone marrow mesenchymal stem cell (MSC) in rabbit tapetoretinal degeneration model. In this study, the feasibility of MSC mediated gene therapy is investigated.

Material-Methods: In GATA Research Center, MSCs were differentiated in vitro from bone marrow which was obtained from proximal femur of a New Zealand albino rabbit, and the cells from the fourth passage were used. In culture environment, plasmid mediated green fluorescent protein (GFP) transmission to these cells was performed two times in 48 hours. Intravenous 40 mg/kg NAO(3) injection was done to 3 adult pigmented rabbits (study group). Afterwards 2.5×10^5 cell/0,1 ml to right eyes and 0,1 ml balanced salt solution to left eyes intravitreally, were performed in the study and the control eyes (1 pigmented rabbit, two eyes). Clinical, angiographic (FA-HRA 2), ERG and histopathological evaluations were performed during the observation period (1., 5., 10., 45th day).

Findings: On first day, abnormal ERG b-wave amplitudes and cluster of GFP loading cells in the vitreous were observed. On the fifth day, retinal edema, diminished b-wave amplitudes and hypofluorescent and hyperfluorescent areas on FA were noted. Immunofluorescence examination of the first rabbit showed GFP loading cells in the retinal layers. In vivo and in vitro assays done on the 10th day showed GFP loading cells in the vitreous and in the retina which had angiographically increased hypo and hyperfluorescent spots. Our controlled observation showed that these cells were still in the retinal layers on the 45th day.

Results: In this acute tapetoretinal degeneration model intravitreally injected allogenic stem cells transfected by plasmid enabled GFP transmission to the damaged retina. This method may be developed as a new mode of gene therapy in the retinal degeneration patients who has the advantage of using otolog MSCs.

Key Words: Gene therapy, stem cell, rabbit, tapetoretinal degeneration, green fluorescent protein GFP

GİRİŞ

Retinanın kalıtsal ve edinsel kökenli dejeneratif hastalıkları tüm toplumlarda önde gelen körlük nedenidir. Günümüzde bu hastalıkların kökten tedavileri konusunda somut gelişmeler izlenmektedir. Bunlar arasında kök hücre aracı tedavi arayışları önde gelmektedir. Bu hücrelerin özgün hücre tiplerine dönüşme potansiyeli hücre replasmanı tedavisinde yeni bir çığır açmakla birlikte uygun koşullar altında genetik olarak modifiye edilebilmeleri yeni bir dönemin iftiharçisi olabilir (1-3). Bu hücrelerin hemen her organda buldukları ve doku yenilenmesinde görev aldıkları bilinmektedir. Multipotent olan bu hücre grubunun ortamdaki uygun uyaranlar ile

pek çok iflevsel hücre tipine farklılaşabileceği gösterilmiştir (4,5). Varlığı son yıllardaki çalışmalarıyla kanıtlanmış olan göz içi dokular ile retinadaki kök hücrelerin miktarının azlığı ve teminindeki zorluklar, bunların tedavi amaçlı uygulamalarını zorlaştırmaktadır. Halen klinik uygulanmada temini kolay ve etkinliği kanıtlanmış olan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin (K-MKH) kas, cilt ve nöron hücrelerine dönüştüğü ve koroid neovasküler membran (KNM) gelişiminde de rol aldığı gösterilmiştir (4,6). nsında bu hücrelerin temini kolaydır ve otojenik ya da allojenik bafırları klinik uygulamaları da vardır. Genetik olarak modifiye edilebilen bu hücreler, retina dejenerasyon ve distrofilerinin tedavisinde bir umut kaynağı olabilir.

Tavflanlardaki tapetoretinal dejenerasyon modelinde K α -MKH'lerin intravitreal implantasyonundaki tedavi etkinliğini göstermiştik (7). Aynı modelde gerçekleştirdiğimiz bu çalışmamızda, döl ortamda YFP (Yeşil Flöresan Protein) üretmek üzere plazmid aracılı olarak modifiye edilen bu hücrelerin intravitreal implantasyonundaki tedavi etkinliği araştırılmaktadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Nisan-Mayıs 2007 tarihlerinde Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi. Çalışma için GATA Hayvan Çalışmalar Etik Kurulu'nun onayı alındı. Uygulamalar:

1. K α -MKH'lerin elde edilmesi:

GATA Araştırma Merkezi'nde erişkin bir Yeni Zelandalı albino tavflanın femur proksimalinden alınan kemik iliği stromal hücrelerden in-vitro koşullarda K α -MKH diferansiyasyonu edildi ve 4. pasajdaki hücreler kullanıldı. Bu amaçla hücresel içerik 1:1 oranında düşük glukozlu DMEM (Dulbecco'nun hücre kültür ortamı) ortamında seyreltildi. Elde edilen süspansiyon 15ml Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, İsveç) üstünde toplandı ve oda sıcaklığında 800 devirde santrifüj iflemi uygulandı. Üstteki kısım ara yüzey ile birlikte 0.1 ml PBS (fosfat tamponlu tuzlu su solusyonu) ile seyreltilip 800 devirde 10 dakika santrifüj iflemi uygulandı. Üst kısım atılıp 1ml'lik kısım da pellet karıştırıldı. Nükleuslu hücreler sayıldı ve kültür ortamında (2mg/ml L-glutamin 50mg/ml streptomisin ve %10 oranında serum inaktivasyonu buzdağı serumu içeren DMEM solusyonu) 1×10^7 /ml olacak şekilde süspanse edildi ve 100ml'lik kültür tabaklarında 3×10^6 hücre/cm² olacak şekilde ekildi. Bu hücreler 3 gün kültür ortamında tutuldu ve yapılmayan hücreler 3 kez yıkılarak ortamdan uzaklaştırıldı. Kültür ortamında yeterince yoğunlaşan (konfluent) hücrelere tripsin-EDTA uygulanarak üreme ortamından ayrışmaları sağlandı.

2. K α -MKH'lerde YFP Plazmid vektör transfeksiyonu:

Transfeksiyon uygulamaları için K α -MKH kültürlerinde 4. pasajdaki hücreler kullanıldı. Gen ekspresyonu için YFP olarak, Monster Green™ Flöresan protein pHMGFP (Promega, USA) kullanıldı. Kültür ortamında bu hücrelere plazmid aracılı olarak 48 saat içinde iki defa Yeşil Flöresan Protein (YFP: GFP) aktarımı sağlandı. Daha önceden tanımlanmış protokole (8) uygun olarak yapılan ön çalışmalarla K α -MKH'lerinde yüksek transfeksiyon etkinliği sağlayan parametreler belirlendi. K-

saca, bir gün önceden kültür ortamından alınarak serum ve antibiyotik içeren taşıma ortamlarına geçirilen hücreler 10ml'lik tüplerde yıkama ve santrifüjleme iflemleri ile kültür ortamından uzaklaştırıldı. Hücrelerin ekimi, seyreltilmesi, inkübasyonu ile hazırlanan DNA-Enhans solusyonunun pipetle karıştırılması, çalkalanması sonrasında elde edilen efektif reagent içeren karışım, 60ml kültür ortamı için 1µg (mikrogram) plazmid DNA'sına 8 µg Enhans ve 25 µg Effektan Reagan olacak şekilde uygulandı.

3. Tapetoretinal dejenerasyon modelinde uygulamalar:

Üç erişkin (3-3.5 kg) pigmentli tavflana kulaktan intravenöz yolla, dengeli tuz solusyonundaki (FTS) %1'lik sodyum iyodat (NaIO₃), Sigma, St Louis, MO) solusyonundan 40 mg/kg dozunda enjeksiyon uygulandı (çalışma grubu). Hemen sonrasında bu tavflanlar yan sıra bir erişkin pigmentli tavflan (kontrol tavflan) sağ gözlerine 2.5×10^5 (5) hücre/0.1ml, sol gözlerine 0.1ml FTS uygulandı. Bunun için %0.5 tropicamide (Tropamid®, Bilim, İstanbul, Türkiye) ile pupiller midriyazisi ve Betadine %10 solusyon ile konjunktival sterilizasyon sağlandı. 30 G iğne ile limbustan 1.5 mm geriden ve üst temporalden kontrollü olarak intravitreal enjeksiyon uygulandı. Bazal değerleri belirlemek üzere tedavi öncesinde ve tedavi sonrası 1., 5., 10., ve 45. günlerde oftalmoskopik, anjiyografik, elektrofizyolojik ve immünflöresan incelemeler yapıldı. Bu amaçla kliniğimizde mevcut görüntüleme sistemleri (Zeiss HRA™, Roland Elektrodiagnostik ünit™) kullanıldı. Histopatolojik inceleme için intrakardiyal embolizasyon ile feda edilen tavflan gözlerinde enükleasyonu takiben gözlerin gözdeğirisi bağ ve kas dokular yan sıra Ora Serrata önündeki dokular makroskopik olarak ayrıştırdı ve bu dokulardan hazırlanan parafin bloklarından 5 mikronluk transvers kesitler alındı. Bu örnekler immünflöresan mikroskop ve Hemotoksilen-Eozin ile boyama sonrası ışık mikroskopu ile retina katmanları incelendi.

Çalışma grubundaki tavflanlar ve kontrol tavflan sağ ve sol gözlerindeki bulgular grup içi ve gruplar arası değişiklikler bakımından karşılaştırıldı.

BULGULAR

Kültür ortamında YFP-plazmid ile transfekte K α -MKH gözlenmektedir (fiekil 1).

Birinci günde kontrol ve çalışma grubundaki ERG (Elektroretinografi) kayıtları fiakil 2'de izlenmektedir. HRA ile otoflöresan modda gözlem yapıldığında kontrol ve çalışma grubundaki tüm tavflanlarda intravitreal YFP'li hücreler saptandı (fiekil 3a, 3b).

Beflinci günde retinada ödem, ERG'de b dalgasında silinme ve FFA'da lokalize hiper ve hipoflöresan odaklar belirginleşme gözlemlendi. HRA'da vitreusta ve retinada fotoreseptör ve RPE katmanında YFP eksprese eden hücreler saptandı (fiekil 4a, 4b).

Onuncu günde FFA'da lokalize hiperflöresan ve hipoflöresan odaklarda artış (fiekil 5a) ile ERG de silinme izlenen bir tavflanda canlı ve cansız ortamda uygulanan yöntemlerle (HRA ve immünflöresans) vitreusta ve retinada yaygın YFP'li hücre kümelerinin varlığı gösterildi (fiekil 5b).

Kırkbeflinci günde gözlemlerde retinanın minimal pigmentasyon değişiklikleri ile birlikte normaldekine benzer görünüme kavuştuğu ve bu hücrelerin retina katmanlarındaki varlığının devam ettiği saptandı (fiekil 6a, 6b).

Kontrol tavflan gözünde 15.gün muayenesinde izlenebilen YFP'li hücrelerin 45.günde kaybolduğu saptandı.

TARTIŞMA

Kemik iliği kök hücrelerin retina nöron hücrelerine transdiferansiyasyonu ile vasküler ve nörotropik etkinlikleri gösterilmiştir (9). Amfibiyandakinin aksine insan retina nöral hücreleri apoptosise uğrayıp kaybolduğunda kayıpların rejenerasyonla karşılanamadığı bilinmektedir. Son yıllarda insanda retinal nöral kök hücreleri (RNKH) ve bunlara öncülük eden embriyonik kök hücreler (EKH), nöral kök hücreler (NKH) ve retinal kök hücreler (RKH) gösterilmiştir (10,11). Ancak bu kök hücre gruplarının tedavi maksatlı uygulamalarında ciddi sorunlar gözlenmesi olduğu vardır. EKH'de MHC (Major Histocompatibility Complex) sisteminin dşlayıcı etkisi yan sıra teratom geliştirebilme riski vardır (12); NKH'nin ise Hipokampus'tan temini zordur. Sıklıkla Korpus Siliare'de bulundukları gösterilmiş olan RNKH (retinal nöral kök hücre)'nin sayıları oldukça sınırlı olup temini zordur. Günümüzde, uygulanması kolay ve hematoloji pratiğinde etkinliği kanıtlanmış olan kemik iliği kökenli kök hücrelerinden evrensel boyuttaki beklentiler, Kociok'un "Hastanın kendi kök hücresi retinitis pigmentosa ve diğer göz hastalıklarında koni görüflünü koruyabilir mi?" başlıklı makalesinde ifadesini bulmuştur (13). K<-MKH gibi erişkin kök hücre grubunda etkin transfeksiyon yöntemlerinin geliştirilmiş olması bu sorunun yanının olumlu olacağına inancımız arttırmaktadır (2).

Kemik iliği kök hücrelerin kemirici ve insanlarda hemopoetik kök hücreler yan sıra mezenkimal kökenli kas, cilt ve nöron hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir

(4). Koroid neovasküler membran (KNM) gelişiminde K<-MKH katkısının gösterilmesi dikkat çekicidir (11). Japon araştırmacılar, retina yaralanması şaşanlarda K<-MKH'lerin yaralanması alana lokalizasyonu ile birlikte retina sinir hücresine dönüştüğünü göstermişlerdir (14). Aynı araştırmacı grup B6 transjenik fare gözlerine retina fotokoagulasyonu ile birlikte intravitreal kök hücre transplantasyonu uyguladıklarında bunların retinal nöron hücrelerine dönüştüklerini ve bu transforme hücrelerin 1 yıl süreyle iflevselliklerinin devam ettiğini saptamışlardır. Fotokoagulasyon ile uyarılmıy kontrol gözlerde ise nöronal hücrelere dönüflüm daha kısa süreli ve daha az sayıda olmuştur (15).

Kemiricilerde sodyum iyodat ile tapetoretinal dejenerasyon gelişimi, uzun yıllar içinde oldukça iyi tanımlanmış örnek bir modeldir. Enzmann ve arkadaşları B6 transjenik fare sujunda yaptıkları özgün çalışmada RPE (Retina Pigment Epiteli)'nin anatomik değişikliklerine etkilik eden iflevsel değişikliklerin uygulanan sodyum iyodat dozu ve uygulama sonrası süre ile dogrusal etkiliklenim gösterdiğini bildirmişlerdir (16). Çalışmamız tavflan retinasının geç dönemde kendini yenileme olasığna karşı 45 günlük dönem için planlanmış ve sodyum iyodatın etkinliği kanıtlanmış olan 40mg/kg dozu uygulanmıştır. Bu modeldeki tomografik, fundoskopik, anjiyografik, elektrodyagnostik ve histopatolojik değişiklikler geçen yılki Türk Oftalmoloji Derneği Ulusal Kongresinde sunulmuştur (7). Kısaca, bu çalışmamızda önceki çalışmamızdakine benzer şekilde 1. günde ERG ile tanımlanan iflevsel değişiklikler gözlenmiştir (fiekil 1). Beflinci günden itibaren OKT (Optikal Koherens Tomografi) retinada kalınlıkmay göstermiş ve FFA'da 1. haftada RPE defektleri oluşmuştur, 2. haftadan itibaren tüm retinada yerleşmiştir. Geçen yılki gözlemimize dekine benzer tarzda K<-MKH uygulanan gözlerde kayda değer enflamasyon gözlenmemiştir. Bunda K<-MKH'lerin varolduğu ileri sürülen antienflamatuvar etkilerinin rolü bulunabilir (5). K<-MKH'lerin intravitreal implante edildiği gözlerde fonksiyonel kazanç elde edilmesinde bu hücrelerin retinaya migrasyonu ve transdiferasyonunun rolü bulunabileceği bildirilmiştir (17). Retinanın kalıtsal ve edinsel pek çok hastalığında RPE yapısal ve iflevsel bozukluklar göstermektedir. Fötal yada embriyonik hücre transplantasyonu yan sıra erişkin RPE hücreleri ile RPE yapısal ve iflevsel bozukluklarının giderilmesi çalışmalarıında karşılaşılan sorunlar, üzerinde yoğun çalışmalar yapıldığı subretinal RPE transplantasyonu benzeri yöntemlerin klinik uygulamaya geçirilmesini güçleştirmektedir. Bu sorunların başında progenitor hücrelerin nitelik ve niceliksel olarak yetersiz kalması, retinaya ulaştırılmaması yada reorganizasyonu olamaması gelmektedir. Bu zorluklar, K<-MKH'lerin intravitreal imp-

lantasyonu ile aflılabılır gözükmeıktedir. Ancak, bu yöntemin oftalmolojide uygulanmasında gözün özgün anatomik iflevsel bütünlüğü, örneğın kan-retina ve kanaköz bariyerleri yanşıra gözün immün özgünlüğünün dikkate alınması gerektiğini düftündük. Bu maksatla, baflangıç aflamasında bu yöntemin uygulanabilirliğinin irdelendiğı bu çalışmamızın sonuç hedefi, bu yöntemin klinik uygulamaya geçirilmesidir. Yöntemin pratikte uygulanabilirliğini araştırmak üzere, temini, muayenesi ve izleminin kolaylığı ile öteden beri prelinik çalışmalarda kullandığımız ve insandakine yakın boyutta gözü olan tavflan, denek olarak seçilmiştir. Bu amaçla, tapetoretinal dejenerasyon olufturduğu kaynakçada iyi tanımlanmış olan sodyum iyodat modeli kullanılmıştır. Oksidasyon yoluyla etkili olduğu bilinen sodyum iyodatla tepkimeye girmesi için retinasında melanin içeren pigmente tavflanlar seçilmiş, böylece insandakine benzer bir konum sağlanmıştır. K<MKH temin etmek üzere GATA Araştırma Laboratuvarında üretimi gerçekleştiren Yeni Zelanda tipi albino tavflanın proksimal femurundan alınan kemik iligi stromal hücrelerden in-vitro kofullarda mezenkimal kök hücreler diferansiye edilmiş ve yenilenme potansiyellerini kaybetmemeleri için 4. pasajdaki hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler in vitro kofullarda YFP protein sentezleyen plazmidler aracılığı ile transfekte edilmiştir.

YFP proteini retinaya gen transferinin araştırıldığı kontrollü gözlemlerde tanımlayıcı olarak kullanılmaktadır. Bu geni içeren hücreler mavi ışık altında yeşil flörensans ile mikroskop altında izlenebilmektedir. Gen transferinin yapıldığı hücreler canlı ortamda izlenerek, gen aktarımının etkinliği mevcut organizmaya zarar vermeden kanıtlanabilmektedir. Çalışmamızda, tapetoretinal dejenerasyona uğrayan katmanda YFP eksprese eden bu hücrelerin varlığını kanıtlanmasında K<MKH'lerin bu maksatla uygulanabileceğini göstermektedir. Kontrol tavflandakinin aksine vitreustaki MKH'lerin akut dejenerasyona uğrayan gözde retinaya göç etmeleri ve bu hücrelerin retinanın rejenerasyonu aflamasındaki fonksiyonel katkı düftündürücüdür.

Liposomal transfeksiyon yöntemi, dđl ortamda transfeksiyonun gerçekleştirilmesinde günümüzde etkin bir yöntem olarak oldukça sık olarak uygulanmaktadır. Nükleotransfeksiyon olarak da adlandırılan bu yöntemin diğerleri ile kıyaslandığında en etkin gen transfer yöntemi olduğu bildirilmiştir (3). Bununla birlikte, bu yöntemin hücreye özgün olarak farklılıklar gösterebildiğı ve gen transferi aflamasında toksik olmayan en etkin karflımın elde edilmesi gerektiğı bilinmektedir. Bunun için çalışmamızda, ön çalışmalarla transfeksiyon etkinliği daha önceden kanıtlanmış olan protokole uygun YFP transfeksiyon yöntemi uygulanmıştır.

K<MKH teminindeki sorunlar nedeniyle çalışmamızda denek sayısı sınırlı tutulmuş (3 adet), etik nedenler ve kontrol sağlanabilmesi bakımından sol gözle plasebo iflem (FTS) uygulanmıştır. Aynı nedenle otojen yerine allojenik transplantasyon uygulanarak bu yöntemin tedavideki etkinliği araştırılmıştır. Çalışmamız allojenik K<MKH intravitreal uygulandığında immün redde uğrayamayacaklarını göstermektedir. Bu durum K<MKH uygulandığı diğer çalışmalarda da izlenmiş olup bunun bu hücrelerin immünoşüpressif etkisinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (5).

Kontrol tavflan gözünde daha önceki çalışmamızdaki benzer kayda değer bir yapısal değiflik gözlenmedi. Bununla birlikte vitreustaki YFP hücre yoğunluğunu giderek azalmakla birlikte 45 günlük takipte retinada yerleşmedikleri gözlendi. Nd:YAG hasarı olufturulan sıçan gözlerindeki 50 günlük takiplerde, normaldekine kıyasla intravitreal K<MKH uygulanan tarafta retinaya kök hücre geçifi ve antiapoptotik gen aktarım gözlenmiştir (9). Li ve arkadaşları, RPE'den salınan kemoatraktanların (SDF: stromal kökenli büyüme faktörü ve C3: kompleman 3) K<MKH'lerin migrasyonu ve transdiferasyonunu sağladığı göstermişlerdir (18). Obata ve arkadaşları tavflan sodyum iyodat mododelinde, fibroblast ve vasküler endotel hücrelerinden farklı olarak RPE üzerinde stimulan etkisi olan doku faktör plazminojen yol inhibitörü (TFPI) nün intravitreal uygulandığı tarafta RPE katmanının korunduğunu, bu korumanın kalıtsal retina dejenerasyonlu RCS sıçanlarda kısmen gerçekleştiniğini göstermişlerdir (19). Hayvan modellerinde büyüme faktörlerinin retinaya dejenerasyon gelişiminden korudukları gösterilmiştir (20). Bununla birlikte bu faktörlerin uygulanmasında karflılaşan en önemli sorun ortamdaki homeostazisin bozularak istenmeyen hücre grupları, örneğın, fibroblastlar üzerinde trofik etki gösterebilme olasılıklarıdır. K<MKH'lerin edinsel faktörler yanşıra kalıtsal faktörler ile ortama çağrıldığı, migrasyona ve transdiferansiasyona zorlandığı gösteren çalışmalar vardır (21). Daha ileri çalışmalarla bu faktörler daha iyi tanımlanabilir ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak rejenere olan hücrelerin kök hücre ile ilifkileri tam olarak ortaya konabilir.

Gözün immün özgünlüğünün, dđl ortamlardan soyutlanmış anatomik ve iflevsel düzeneginin kök hücre ve gen tedavileri için uygun bir ortam olufturduğu bilinmektedir (22). Kök hücre araçlı yöntemlerle istenilen hücre tipinin, eksikliği duyulan alanda yeniden kazanılması mümkündür. Ancak, bunun için uygun bir uyaran ortama gereksinim duyulmaktadır (23). Retina distrofi ve dejenerasyonlar böyle bir ortamı sağlayabilir. Giderek saflaştırılan ve kolaylaştırılan kök hücre üretme teknikleri gündemdedir. Bu maksatla CNTF (Siliyer nörot-

fişkil 1. <n-vitro plazmid aracılı> YFP aktarılan K<-MKH

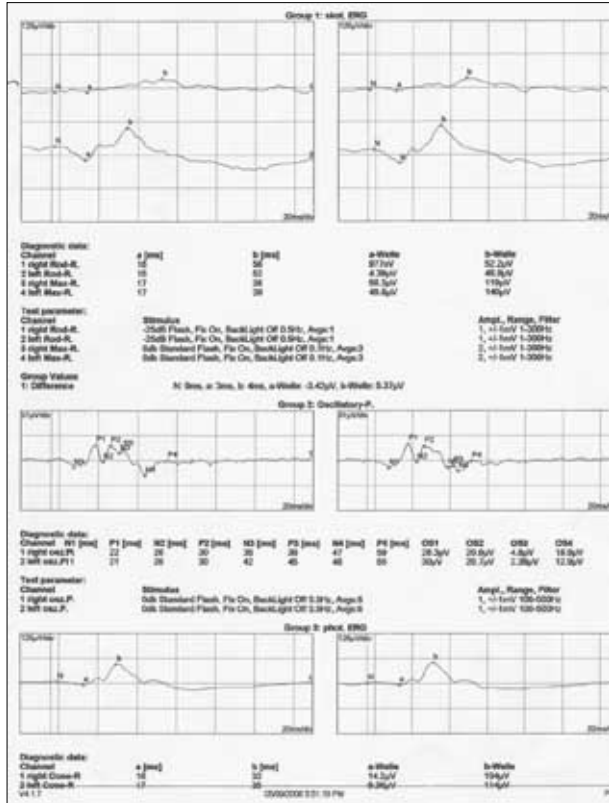


rik faktör), bFGF (bazik fibroblast grovt faktör), EGF (epidermel grovt faktör) ve aköz hüme ile RPE'nin kullanıldığı bilinmektedir (24,25) Memelilerde iris dokusunda retinal doğurgan kök hücre varlığı ve bunların fotoreseptörlere dönüşümü gösterilmiştir (26).

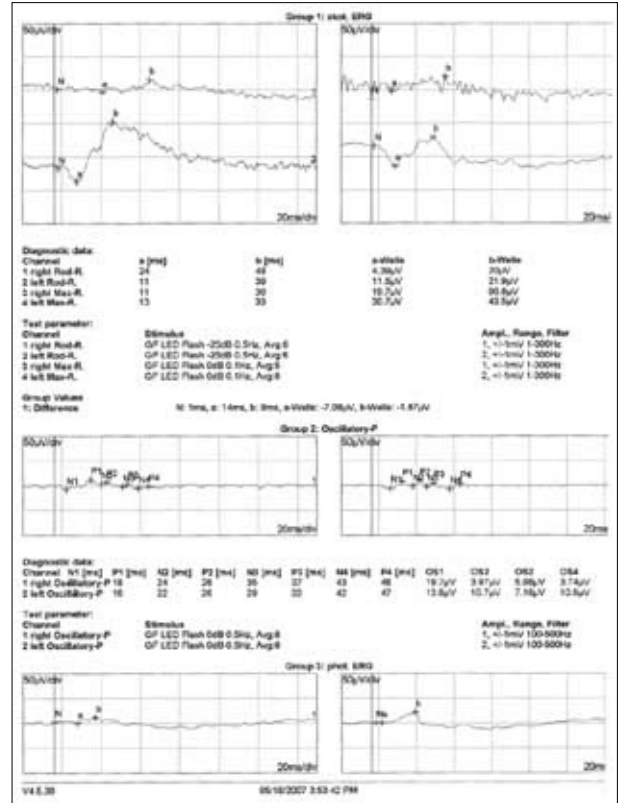
Günümüzde gen transfer yöntemlerindeki hızlı gelişmeler dikkat çekicidir (27). Moleküler tanımlayıcı yöntemlerdeki gelişmeler, insanda retina özgün genlerin tanımlanmasını kolaylaştırmıştır. İlerde amfibianlardaki ömür boyu retinal nöronların oluşumunu sağlayan moleküler mekanizmaların (regülatör genlerin) aydınlatılması ile insanda sürekli retina rejenerasyonu için bu moleküllerin gen transferi ile kalıcı tedaviler sağlanabilir.

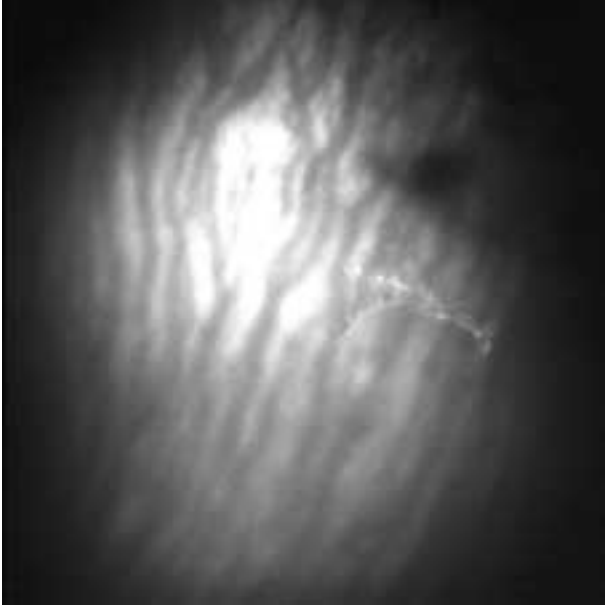
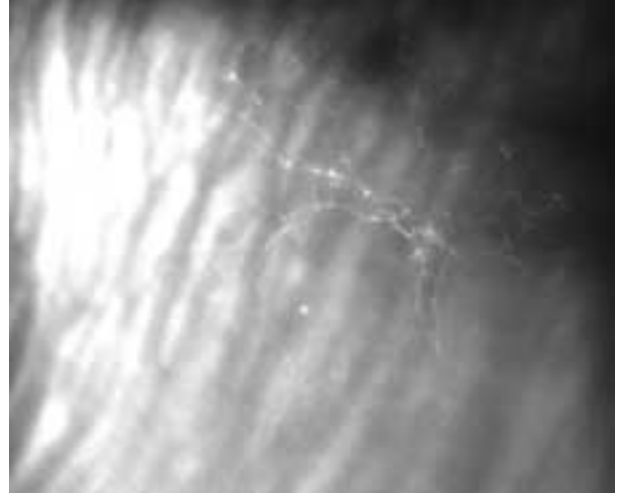
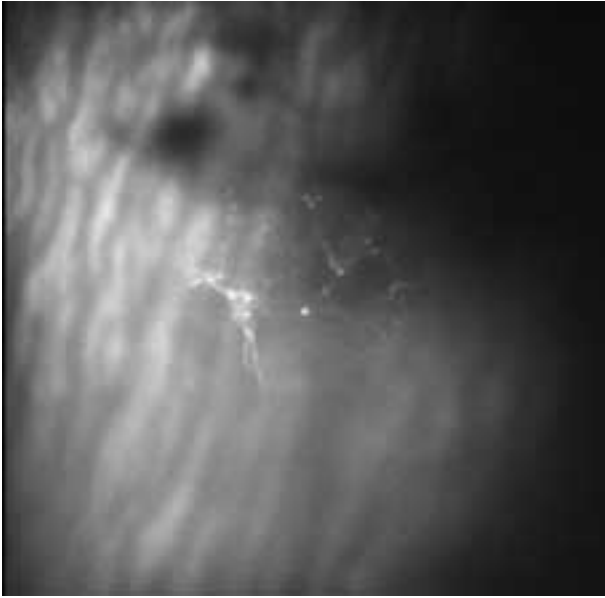
KNM (Koroid Neovasküler Membran)ların oluşumunda etkin rol aldığı gösterilen MKH'lerin endotel hücre matürasyonu ile bu hücrelerin hipoksik hasara karşı stabilizasyonunu sağladıkları, besledikleri retinal nöronları apoptosiden korudukları bilinmektedir. Böyle bir yaklaşıma retina iskemik hasara bağlı neovaskularizasyon gelişimi için koruyucu tedavi yaklaşımı sağlayabileceği öne sürülmektedir (28). Örneğin, yafa bağlı maküla dejenerasyonundaki KNM için antiangiyojenetik gen transferi ile birlikte uygulanabildiğinde böyle bir yaklaşım kökten tedavi olarak sunulabilir. K<-MKH'leri sıçan prematür retinopati modelinde uygulayan Ritter ve arkadaşları, bu hücrelerin iskemik alanlara göçüyle birlikte neovaskularizasyon gelişimini önlediklerini bildirmektedirler (29). Halen bu amaçla destrüktif

fişkil 2a. Kontrol ERG (13.gün)



fişkil 2b. Çalşıma, ERG (1.gün)



fişkil 3a. Kontrol, intravitreal YFP-MKH (1.gün)*fişkil 4a. Çalışma, intravitreal YFP-MKH (5.gün)**fişkil 3b. Çalışma, intravitreal YFP-MKH**fişkil 4b. Çalışma, intraretinal YFP-MKH*

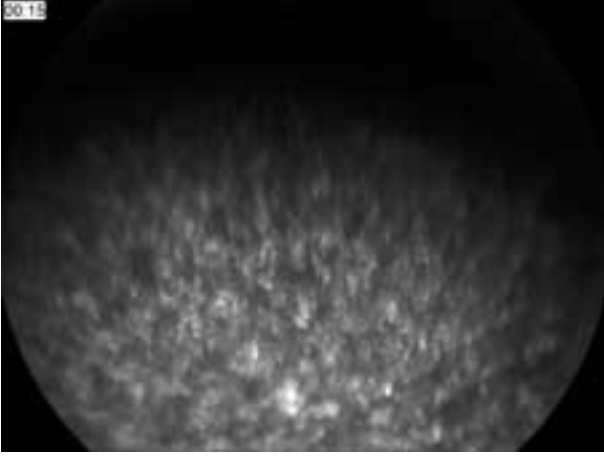
uygulamalara başlıvurulduğu göz önüne alınırsa benzer bir tedavi yaklaşımının klinik uygulamaya geçirilmesi- nin avantajlar› daha iyi anlaşılabilir.

Tüm bu ümit verici gelişmelerle birlikte göz önüne alınmas› zorunlu koşullar da vardır. Allojenik MKH uygulamalarında immün red gözlenebildiği de bildirilmiştir (30) Henüz, KH tanımlayıcı moleküller tam olarak ortaya konamamıştır; transplantasyon yada gen transferi için en uygun hücre tipi bilinmemektedir. En uygun uy-

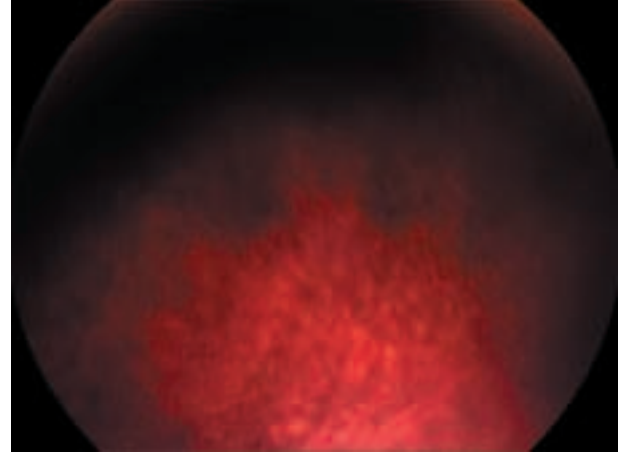
gulama flekli (intravitreal, subretinal) bilinmemektedir. Dönör yaşının rolü (31), uygulama için en uygun zamanlama, hastalıkl› ortamdaki yeni homeostazis ile bu uygulamaların uzun dönem etkinlik, emniyetleri ve olası tümörojenik potansiyelleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Karşılaştırılmalı bir çalışmada fotoreseptörlere transdiferansiyasyon sağlanabilmesi bakımından retinal KH'lerin daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (32) Arnhold ve arkadaşlarının yakın zamandaki çalışmalarında, doğuştan rodopsin yokluğu ile karakterize RCS (Royal Collage of Surgeon) kör sıçan modelinde, KKH'lerin transplantasyonunda, bu hücrelerin RPE ve nöroretinal katmanlara entegrasyonu, nöral ve glial hü-

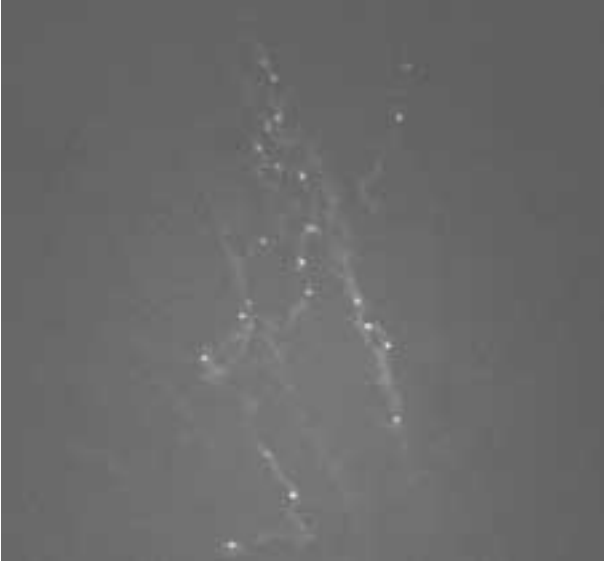
fiakil 5a. Çalıtma, FFA (10.gün)



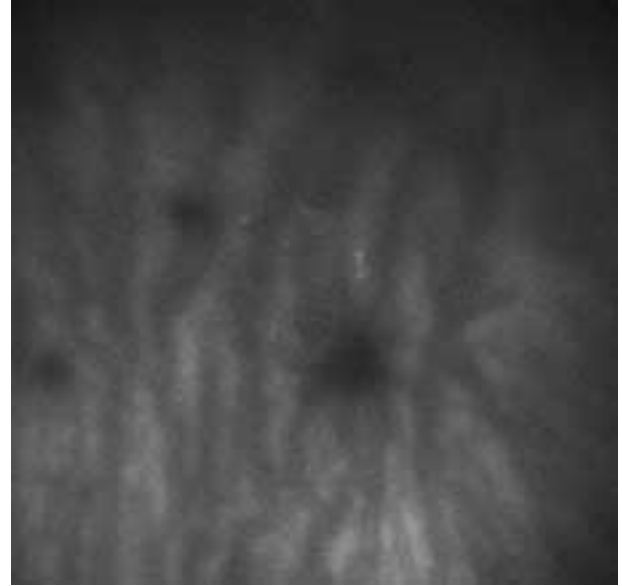
fiakil 6a. Çalıtma, fundus görünümü (45.gün)



fiakil 5b. Çalıtma, immun flöresans (10.gün)



fiakil 6b. Çalıtma, HRA, otoflöresans



relere transdiferansiyasyonu ile iflevsel baflları bildirmektedirler (33). Yakın zamanda yayınlanan çalıtmasında Inoue ve arkadaşları K-MKH'lerin subretinal transplantasyonunda baflları sonuçlar alındığı bildirilmektedirler (34).

K-MKH'lerin tedavi maksatlı ilk in vivo uygulamaları Kicic ve arkadaşları ile Tomita ve arkadaşlarına aittir (32,35). Onlar, mekanik debrütmanı sıçan gözlerinde bu hücrelerin retinanın özellikle dfl nükleer katmanında yoğunlaftığı ve bunların retinal nöral hücrelere dönüftüğünü göstermişlerdir (32). Çalıtımadaki gözlemimiz benzerlik göstermektedir. Çalıtımadaki, daha homojen retina hasar oluşturmamak ve kalıtsal model-

lerdekine benzerlik göstermesi bakımından sodyum iyodat ile tapetoretinal dejenerasyon modeli kullanılmıştır.

Bu çalıtımadaki gözlemlerimiz, intravitreal K-MKH implantasyonunun tapetoretinal dejenerasyon ile seyreden hastalıklarda etkin bir yöntem olarak uygulanabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, ileri emniyet ve etkinlik çalıtımlarına gereksinim duyulduğu da göz ardı edilemez. Çalıtımadaki bu etkinliğin allojenik transplantasyonlarda gözlenmesi anlamlıdır. Allojenik transplantasyon modeli üzerine kurulmuş bu çalıtımda, albino tavflan kemik iliğinden alınan ve plazmid aracı YFP transdüksiyonu sağlanan kök hücreler, pigmentli tavflanda oluşturulan tapetoretinal dejenerasyonlu

gözlerde intravitreal uygulandığında, retinadaki tedavi edici etkinliğin kök hücre aracılığıyla olduğu, bu hücrelerden olan tanrı gen ekspresyonu ile kanıtlanmıştır. Bununla ilgili ileri çalışmalarımız halen devam etmekte olup dejeneren RPE modelinde kök hücrenin pigment epiteline dönüşümü sağlandığında olufları RPE tabakasının melanosit içeriğinin bu tedavinin etkinliği için histolojik bir parametre olarak da değerlendirilmesi planlanmıştır.

şnşanda, intravitreal uygulamadaki tecrübelerimiz, hayvandan daha kolay olog K-MKH temin edebilme olasılığımız ve bu tedaviden beklentilerimizin büyüklüğü, in-vivo etkin ve emniyetli olduğunu gösterdiğimiz bu yöntemin kliniğe uyarlanabilmesi doğrultusunda ileri prelinik doz ve emniyet çalışmalarını yapmasını zorunlu kılmaktadır. Bu yöntemin kalıtsal tipteki tapetoretinal dejenerasyonlar üzerindeki etkinlik ve emniyetini belirlemek üzere ileri prelinik çalışmalar planlanmıştır.

KAYNAKÇA

- Lakshminpathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Kaufman DS, Verfaillie CM, Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells*. 2004;22(4):531-43.
- Okazaki A, Jo J, Tabata Y. A reverse transfection technology to genetically engineer adult stem cells. *Tissue Eng*. 2007 Feb;13(2):245-51.
- Wang F, Xia X, Hu H, Li L, Tian Y, Chen X, Huang Q. Liposome-mediated gene transfer into retina. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2002 Sep;38(9):520-2.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain : expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290:1775-1779.
- Le Blanc K, Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18:586-591.
- Li Y, Reza RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V: Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Apr;47(4):1646-52.
- Özge G, Sobacı G, Avcu F, Safalı M, Pamuk K, Ural AU. Tavfları Tapetoretinal Dejenerasyon Modelinde Kemik İliğı Mezankimal Kök Hücre İntravitreal İmplantasyonunun Uygulanabilirliğinin Araştırılması. *TOD 40. Ulusal Oftalmoloji Kongresi Program ve Özet Kitabı* (Antalya). sf:145; 2006.
- Baran Y, Ural AU, Avcu F, Sarper M, Elçi P, Pekel A: Mezankimal Kök Hücrelerin in vivo takibinde yefil floresan protein aktarılmasını optimizasyonu. 33. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2007, Ref No:107.
- Zhang J, Shan Q, Ma P, Jiang YM, Chen P, Wen JX, Zhou Y, Qian HW, Pei XT. Observation of bone marrow mesenchymal stem cells after subretinally transplanted into laser-injured rat retina. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2003 Nov 25;83(22):1993-8. Chinese.
- Hara A, Niwa M, Kunisada T, Y oshimura N, Katayama M, Kozawa O et al. Embryonic stem cells are capable of generating a neuronal network in adult mouse retina. *Brain Res* 2004; 999:216-221.
- Young MJ: Stem cells in the mammalian eye: a tool for retinal repair. *APMIS*. 2005 Nov-Dec;113(11-12):845-57.
- Koch CA, Jordan CE, Platt JL. Complement-Dependent Control of Teratoma Formation by Embryonic Stem Cells. *J Immunol* 2006; 177: 4803-4809.
- Kociok N. Can the injection of the patient's own bone marrow-derived stem cells preserve cone vision in retinitis pigmentosa and other diseases of the eye? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* . 2005; 243:187-188.
- Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takabashi K, Kluchi K, Oyaizu H. Bone marrow-derived stem cells can differentiate into injured rat retina. *Stem Cells* 2002; 20:279-283.
- Minamino K, Adachi Y, Yamada H et al: Long-term survival of bone marrow-derived retinal nerve cells in the retina. *Neuroreport*. 2005 Aug 22;16(12):1255-9.
- Enzmann V, Row BW, Yamauchi Y, Kheirandish L, Gozal D, Kaplan HJ, McCall MA: Behavioral and anatomical abnormalities in a sodium iodate-induced model of retinal pigment epithelium degeneration. *Exp Eye Res*. 2006 Mar;82(3):441-8.
- Arnhold S, Absenger Y, Klein H, Addicks K, Schraermeyer U. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007; 245: 3; 414-422.
- Li Y, Reza RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ, Enzmann V. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(4):1646-52.
- Obata R, Yanagi Y, Tamaki Y, Hozumi K, Mutoh M, Tanaka Y: Retinal degeneration is delayed by tissue factor pathway inhibitor-2 in RCS rats and a sodium-iodate-induced model in rabbits. *Eye*. 2005 Apr;19(4):464-8.
- Ohtaka K, Machida S, Ohzeki T, Tanaka M, Kurosaka D, Masuda T, Ishii T: Protective effect of hepatocyte growth factor against degeneration of the retinal pigment epithelium and photoreceptor in sodium iodate-injected rats. *Curr Eye Res*. 2006 Apr;31(4): 347-55.
- De Becker A, Van Hummelen P, Bakkus M, Vande Broek I, De Wever J, De Waele M, Van Riet I. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*. 2007 Apr;92(4):440-9.
- Sobacı G. Oftalmolojide gen tedavisi in Oftalmik ilaçlar, eds: Oto S, Yılmaz G, Aydın P, Günefl Kitabevi, Ankara 2003.
- Hori Y, Inoue S, Hirano Y, Tabata Y: Effect of culture

- substrates and fibroblast growth factor addition on the proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2004; 10: 995-1005.
24. Yang J, Klassen H, Pries M, Wang W, Nissen MH. Aqueous Humor Enhances the Proliferation of Rat Retinal Precursor Cells in Culture and this Effect is Partially Reproduced by Ascorbic Acid. *Stem Cells*. 2006 dec; 24(12): 2766-75.
 25. Jérôme R, Valérie B, Sylvie T, Anni H, José-Alain S, Xavier G, Olivier G. Involvement of Pleiotrophin in CNTF-mediated differentiation of the late retinal progenitor cells. *Dev Biol*. 2006;298:527-39.
 26. Abe T, Yoshida M, Yoshioka Y, Wakusawa R, Tokita-Ishikawa Y, Seto H, Tamai M, Nishida K. Iris pigment epithelial cell transplantation for degenerative retinal diseases. *Prog Retin Eye Res*. 2007 May;26(3):302-21.
 27. Sobac G. 2000'li yıllara girerken retina hastalıklarının tedavisi: *Retina-Vitreus* 2000;8(2): 187-196.
 28. Friedlander M, Dorrell M, Ritter, M, Marchetti, V, Moreno S, El-Kalay, M, Bird, A, Banin E, Aguilar E. Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 2007; 10 (2): 89-101.
 29. Ritter, M, Banin E, Aguilar EA, Dorrell MI, Moreno S.K, Friedlander M. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J. Clin. Invest.* 116:3266-3276 (2006).
 30. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm* 2005; 2: 8.
 31. Gudrun UM, Ramesh RB. Donor site, age, and health affect fibroblast growth in culture. *In vitro Cell Dev Biol Anim*. 1995 Jul-Aug;31(7):494-6.
 32. Kicic A, Shen WY, Wilson AS, Constable JJ, Robertson T, Rakoczy PA. Differentiation of Marrow Stromal Cells into Photoreceptors in the Rat Eye. *J Neuroscience* 2003; 23(21):7742-7749.
 33. Arnhold S, Heiduschka P, Klein H, Absenger Y, Basnagolu S, Kreppel F, Henke-Fahle S, Kochanek S, Bartz-Schmidt KU, Addicks K, Ulrich S. Adenovirally Transduced Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Pigment Epithelial Cells and Induce Rescue Effects in RCS Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47:4121-4129.
 34. Inoue Y, Iriyama A, Ueno S, Takahashi H, Kondo M, Tamaki Y, Araie M, Yanagi Y. Subretinal transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells delays retinal degeneration in the RCS rat model of retinal degeneration. *Exp Eye Res*. 2007; 85(2):234-41.
 35. Tomita N, Higaki J, Kaneda Y, Yu H, Morishita R, Mikami H, Ogihara T. Hypertensive rats produced by in vivo introduction of the human renin gene. *Circ. Res.* 1993; 73:898-905.