

Ratlarda oluşturulan korozif özofajitin tedavisinde mezenkimal kök hücre kullanımı

Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT*, İbrahim ÖTGÜN**, Abdülkerim TEMİZ***, İlknur KOZANOĞLU****, Zerrin YILMAZ*****, Eylem AKAR ÖZKAN*****, Akgün HİÇSÖNMEZ***

*Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Trabzon, **Memorial Ankara Hastanesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, ***Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, ****Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, *****Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara, *****Özel Anadolu Sağlık Merkezi, Patoloji Anabilim Dalı, Gebze

Özet

Amaç: Çalışmamızın amacı, gönüllü bir donörün kemik iliğinden hücre kültürü ile mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin elde edilerek işaretlenmesi ve daha sonra işaretlenmiş olan bu hücreleri korozif özofajit oluşturulmuş rat özofagusuna implante ederek etkilerini incelemektir.

Gereç ve Yöntemler: Gönüllü erkek donörün kemik iliği aspirasyonu ile elde edilen hücreler, hücre kültürü ile 3 pasaj sonrasında akım sitometri ve hücreler farklılaşmayı (osteojenik ve adipojenik) incelemek için ikiye ayrıldı. Daha sonra hücreler 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) ile işaretlendi ve ratlara enjeksiyon için hazır hale getirildi. Toplam otuz adet Wistar-Albino cinsi erişkin dişi rat üç eşit gruba bölündü. Korozif özofajit modeli literatürde tanımlanmış olan standart %15'lik sodyum hidroksit (NaOH) ile oluşturuldu. Grup I (sham grubu): Kontrol grubu kabul edilip özofajit oluşturulmadı. Grup II: Yalnızca korozif özofajit modeli oluşturuldu. Grup III: Korozif özofajit oluşturulduktan iki saat sonra DiI ile işaretlenmiş MKH'ler özofagusuna implante edildi. İmplantasyondan 21 gün sonra deney sonlandırıldı ve alınan özofagus doku örnekleri, histopatolojik hasar, stenoz indeksi (SI), DiI işaretli hücrelerin floresan mikroskopta görüntülenmesi ve Y kromozomu için floresan in situ hibridizasyon (FISH) yönlerinden incelendi.

Bulgular: Akım sitometri sonuçlarına göre elde edilen hücrelerin MKH oldukları gösterildi. Hücreler farklılaşma yöntemleri ile adipojenik ve osteojenik farklılaşma olduğu gösterildi. Histopatolojik incelemede fibrozis, inflamasyon ve nekroz ayrı değerlendirilmiş olup gruplar arasında yalnızca fibrozis sonuçları açısından anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). SI açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. Floresan mikroskop incelemede özofagus epitelinde DiI ile işaretli hücreler görüldü. Son olarak, FISH yöntemi ile yapılan incelemede biri dışında diğer tüm ratlarda Y kromozomu gösterildi.

Sonuç: Bu çalışma, MKH'lerin korozif özofajite bağlı zedelenmede epitele implante olabileceğini ve fibrozisi azaltarak kısmen iyileştirici bir rol oynayabileceğini desteklemiştir. Bununla beraber MKH implantasyonu diğer histopatolojik bulgular ve SI üzerine anlamlı bir etkide bulunmamış olup MKH'lerin bu amaçla kullanımı için daha ayrıntılı çalışmalara gereksinim vardır.

Anahtar kelimeler: Korozifler, özofajit, mezenkimal kök hücre, fibrozis

Summary

Mesenchymal stem cell therapy in corrosive esophagitis in rats

Objective: The aim of this study was to investigate the efficacy of procure mesenchymal stem cells (MSCs) in tissue culture taken from a volunteer donor's bone marrow which were marked and then implanted in a model of corrosive esophagitis in rats.

Material and Methods: Cell samples from a volunteer male human donor's bone marrow aspiration were prepared for 3 weeks in the cell culture and then they were split in two for flow cytometry and differentiation (adipogenic and osteogenic). Before injection to the rats cells were marked with 1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI). Thirty Wistar-Albino female rats were divided into three equal groups. A standard corrosives esophagitis model was produced by 15% sodium hydroxide (NaOH). Group I (sham group): Only used 0.9% saline and did not form any esophagitis. Group II: Applied only corrosives esophagitis model. Group III: Applied corrosives esophagitis model and two hours later marked MSCs have been implanted. We assessed the esophageal tissue by measuring histopathologic damage, stenosis index (SI), for the cells with marked DiI by fluorescence microscope and fluorescence in situ hybridization (FISH) for Y chromosome.

Results: We have indicated MSCs with flow cytometry. We have represented adipogenic and osteogenic differentiation by using differentiation techniques. The histopathologic parameters were examined by fibrosis, inflammation and necrosis. There was a significant difference between the groups in fibrosis ($p<0.05$). There was not significant difference between the groups for SI. DiI marked stem cells were shown with examination by fluorescence microscope. Finally the Y chromosomes were determined in the esophageal tissue of rats by FISH analysis except one rat.

Conclusion: Results demonstrated that after forming a corrosive esophagitis model in rats; MSCs can be implanted to esophageal epithelium and have partly curative effect by reducing fibrosis. There was no significant difference with other histopathologic findings. Therefore more detailed studies are needed using MSCs in corrosive esophageal injuries.

Key words: Corrosives, esophagitis, mesenchymal stem cells, fibrosis

Adres: Uzm. Dr. Hatice Sonay Yalçın Cömert, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Trabzon

Alındığı tarih: 24.11.2014

Kabul tarihi: 29.05.2015

Giriş

Korozif özofajit, özellikle gelişmekte olan ülkelerde sık karşılaşılan, ev temizliğinde kullanılan yüksek yoğunluktaki kostik maddelerin kaza ile içilmesi sonucu gelişen bir klinik tablodur. Sıklıkla alkali türdeki maddelerle oluşmaktadır (6,18). Asit veya alkali olabilen korozif maddeler, hiç hasar oluşturmayabildikleri gibi çoğunlukla ağızda ve özofagusta gözlenen ağır yanıklar ve ölüm ile sonuçlanabilecek klinik tablolar oluşturabilmektedirler (4,7,16). Akut nekrotik faz olarak da bilinen ilk bir ile dört gün içinde iskemik doku hasarı ile birlikte serbest oksijen radikallerine bağlı da doku hasarı ortaya çıkar (6,15,19). Bu doku hasarı sonunda inflamasyon ve kollajen artışı ile karakterize fibrozis ortaya çıkarak, korozif özofajitin geç komplikasyonu (3 hafta veya daha erken de gelişebilir) olan striktüre neden olur (2,11). Özofagus striktürü tedavisinde, bujinaj, intraluminal stentler ve cerrahi teknikler yer almaktadır (21).

Kök hücreler; mezenkimal kök hücre (MKH), embriyonik kök hücre, pluripotent kök hücre ve amniotik sıvı kaynaklı kök hücreler olmak üzere elde edildikleri bölgelere göre sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar arasında klinikte en sık kullanılan hücreler MKH'dir ve en çok doku mühendisliği ve kök hücre tedavisinde kullanılmaktadır.

Çalışmamızda; kök hücre tedavisinin günümüzde sahip olduğu uygulama yöntemleri ve farklı organ sistemlerinde vermiş olduğu anlamlı sonuçlar göz önünde bulunduruldu. Amacımız, gönüllü bir donörün kemik iliğinden hücre kültürü ile MKH'lerin elde edilmesi, işaretlenmesi ve daha sonra bu hücreleri korozif özofajit oluşturulmuş rat özofagusuna implante ederek etkilerini incelemektir.

Gereç ve Yöntem

Bu deneysel çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'nda yapılmış olup çalışmada kullanılan ratlar aynı merkezden temin edilmiştir. Mononükleer hücre izolasyonu, kültürü, tripsinizasyon, akım sitometri, MKH'in farklılaşması ve 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI; İnvitrogen, A.B.D.) ile işaretlenmesi Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi

Hematoloji Laboratuvarı'nda, histopatolojik incelemelerde Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda ve genetik işlemler için gerekli incelemeler Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik kurul onay numarası: 0939, tarihi: 14.12.2009).

Mezenkimal Kök Hücrenin İdentifikasyonu ve İşaretlenmesi

Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji Laboratuvarı'nda kök hücre kültürü yalnızca insandan üretilmekte olup laboratuvarında herhangi hayvan örnekleri kullanılmamaktadır. Bu yüzden çalışmamızda donör olarak 27 yaşındaki sağlıklı, erkek M.K. adlı hastadan etik kurul onaylı rapora imzası alınarak 09.08.2010 tarihinde lokal anestezi altında krusta ilikadan 20 ml kemik iliği 20 µ/ml non-prezervatif heparin (Sigma, Almanya) içine aspire edildi. İzole edilen hücre süspansiyonu 14 gün boyunca kültür ortamında 3 pasaj sonucunda mililitresinde 1×10^4 hücre olacak şekilde süspansiyon hazırlanarak süspansiyon hacmine göre flask miktarına karar verilip ekim yapıldı.

Tripsinizasyon sonrası hücre sayımı için süspansiyondan 10 µl alınarak Thoma lamında (Marienfeld, Almanya) sayım yapıldı. Canlılık için her pasajda Nikon Eclipse E600 floresan mikroskobu (Tokyo, Japonya) kullanılarak Acridine Orange (Sigma, Germany) / Ethidium Bromide (Sigma, Almanya) ile analiz edildi.

Hücre kültüründen elde edilen MKH her bir tüpe CD105 / CD73 / CD 34 / CD45 monoklonal antikorlardan ve nöral glial antijen ikiden (NG2) 10^3 ar µl konuldu ve üzerine hücre sayısı 5×10^5 olacak şekilde MKH süspansiyonu eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dk. inkübe edildikten sonra akım sitometride analiz edildi. Akım sitometrik çalışmalar için, FACS CANTO II (Becton Dickinson, Bioscience Pharmingen, San Diago, CA, A.B.D.) cihazı kullanıldı. Analizler FACS Diva (Becton Dickinson, San Diago, CA, A.B.D.) yazılımı kullanılarak çözümlendi.

Üçüncü pasaja ulaşan MKH iki flaska farklılaşma amacıyla ayrıldı. Adipojenik farklılaşma için $0,5 \mu\text{M}$

methyl-isobutylxanthine (Sigma, Almanya), 10 µg/mL insan rekombinant insulin (Lilly France SAS, Fegersheim, Fransa) ve 1 µM deksametazon (Fluka, Deva Holding, İstanbul, Türkiye) ortama eklendi. Osteojenik farklılaşma için MKH 21 gün boyunca osteojenik farklılaşma ortamı (Stemcell Technologies, Kanada) içeren kültür ortamı ile inkübe edildi. Üçüncü pasaj sonrasında süspansiyon, hayvan uygulaması için her bir vialde 500 µl hacim (toplam 800.000 hücre) olacak şekilde pasajlandı ve injeksiyona hazır hale getirildi. Süspansiyon içerisinden 20 µl alınarak preparat hazırlandı.

Deney Hayvanları

Çalışmamızda 10'ar adet, ağırlıkları 200-250 g arasında değişen Wistar-Albino cinsi dişi ratlardan oluşan üç grup kullanıldı. Özofajit modeli literatürdeki klasik Gehanno ve Guedon modelinin modifikasyonu örnek alınarak oluşturuldu⁽⁹⁾. Deney süresi üç hafta olarak belirlendi. Anestezi için 60 mg/kg ketamin hidroklorür (HCl, Ketazol % 10, Richter Pharmaag Wels Avusturya) ve 6 mg/kg xylazin HCl (Rompun, % 2 Bayer Healthcare Llc. Animal Health division 12707, Shawnee, Kansas 66201, A.B.D.) intraperitoneal olarak uygulandı. Asepsi ve antisepsi deneğin karın cildi tıraşlandıktan sonra povidon iyodür ile temizlenerek yapıldı.

Gruplar

Gruplar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Deney grupları.

| | |
|----------|--|
| Grup I | Kontrol Grubu (SHAM) (n=10) |
| Grup II | Yalnızca korozif özofajit oluşturulan grup (n=10) |
| Grup III | Korozif özofajit oluşturulduktan iki saat sonra DiI ile işaretlenmiş MKH'lerin özofagusa implante edildiği grup (n=10) |
| Toplam | 30 rat |

Grup I: Kontrol grubu (SHAM) (n=10)

Göbek üstü median laparotomi ile karına girildi. Abdominal özofagus gastroözofageal bileşke seviyesinden 2/0 ipek ile bağlandı. 4F feeding sonda ağız yoluyla distal özofagusa kadar ilerletildi. Özofagus karın içine doğru çekilerek gastroözofageal

bileşkenin yaklaşık 2 cm üstünden tekrar 2/0 ipek ile bağlandı. İzole edilen özofagus segmenti, duvarı şeffaf şekilde görülünceye kadar, izotonik serum (% 0,9 NaCl) ile dolduruldu. 90 saniye beklendikten sonra işlem sonlandırıldı. İpek sütürler alındı. Karın katları 4/0 ipek sütür ile anatomik planda kapatıldı.

Grup II: Yalnızca korozif özofajit oluşturulan grup (n=10)

Sham grubunda uygulanan işlemlerin aynısı gerçekleştirildi. Farklı olarak distal özofagusa izotonik serum yerine deneklere % 15'lik NaOH özofagus duvarı şeffaf şekilde görülünceye kadar verildi. 90 saniye beklendikten sonra aspire edildi. Ardından distile su ile 60 saniye irrije edilip işleme son verildi.

Grup III: Korozif özofajit oluşturulduktan iki saat sonra DiI ile işaretlenmiş MKH'lerin özofagusa implante edildiği grup (n=10)

Grup II'de uygulanan işlemlerin aynısı gerçekleştirildi. İki saat sonra özofagusun korozyon oluşturulan gastroözofageal bileşkenin yaklaşık 2 cm üstündeki segmentine 26 gauge enjektör ile toplam 500 mikrolitre 800.000 insan (erkek) kemik iliğinden elde edilmiş DiI ile işaretli MKH, her kadrandan 100 mikrolitre olarak özofagusun tüm katlarına sirküler olarak implante edildi.

Bütün deneklere girişimden sonraki üç gün analjezi amacı ile 0,05 mg/kg fentanyl (Fentanyl-Janssen 2 ml, Manufactured by: Janssen Pharmaceutica N.V. Turnhoutseweg 30-B-2340 Beerse-Belçika) intraperitoneal ve 3 hafta boyunca dehidratasyonu engellemek amacı ile intraperitoneal yolla her gün 5 ml %5 dekstrozu izotonik verildi. Hayvanların beslenmesine çalışma süresince standart yem ve su ile devam edildi.

Sakrifikasyon üçüncü haftanın sonunda kuyruk veninden verilen 150 mg/kg pentobarbitürat (Pental Sodyum 0,5 g İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk AŞ. Topkapı, İstanbul) ile sağlandı. Distal özofagus inceleme amacı ile eksize edilerek histopatolojik ve genetik işlemler uygulandı.

Histopatolojik İnceleme

Biyopsi örnekleri % 10'luk formalin solüsyonu içerisinde fikse edilerek patoloji laboratuvarına gönderildi. Materyallerin tamamına enine kesit uygulandı ve doku takibine alındı. Doku takibinden sonra parafin bloğa gömülen dokulardan 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eozin ve Masson trikrom ile boyandı. Histolojik incelemede hasarlanmanın derecesi; inflamasyon, fibrozis ve nekroz varlığı incelenerek derecelendirildi. Histopatolojik derecelendirme Tablo 2'de sunulmuştur.

Tablo 2. Histopatolojik derecelendirme.

| İnflamasyon derecelendirmesi | Fibrozis derecelendirmesi | Nekroz derecelendirmesi |
|---|--|--|
| Derece 0: İnflamasyon yok | Derece 0: Fibrozis yok (normal olarak mukozaya ve submukozada gevşek bağ dokusu izlenir) | Derece 0: Nekroz yok |
| Derece 1: Mukozal - submukozal inflamatuvar reaksiyon | Derece 1: Mukozaya ve submukozada artmış fibroblast proliferasyonu | Derece 1: Mukozal yüzey epitelinde erozyon - nekroz |
| Derece 2: Mukozaya, submukozaya ve muskularis propriada inflamatuvar reaksiyon | Derece 2: Mukozaya ve submukozaya yanı sıra muskularis propria tabakasını da kısmen veya tamamen ortadan kaldıran artmış fibroblast proliferasyonu | Derece 2: Mukozaya ve submukozayı kısmen veya tamamen içeren nekroz |
| Derece 3: Adventisya dahil özofagus duvarının tüm katlarında inflamatuvar reaksiyon | Derece 3: Adventisya dâhil özofagus duvarının tüm katlarında artmış fibroblast proliferasyonu | Derece 3: Mukozaya ve muskularis mukozanın yanı sıra muskularis propriayı da kısmen veya tamamen içeren nekroz |

Işık mikroskopik incelemede özofagus duvar kalınlığı ve lümen çapı ölçülerek kaydedildi. Stenoz indeksi (SI) özofagus duvar kalınlığının lümen çapına bölünmesi ile hesaplandı⁽¹⁰⁾. Bu formül ilk kez Berthet ve arkadaşları tarafından sıçan özofagusunda kostik yanık şiddetini sınıflamak için kullanılmış ve halen kullanılmaktadır⁽³⁾.

Floresan Mikroskopik ve Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) İncelemeleri

Parafine gömülü özofagus dokusundan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler, eosin kullanılmama-

dan yalnızca hemotoksilen ile boyanıp (DiI ile işaretli hücrelerin, eosinin bırakacağı kırmızı renk ile karışmaması için) floresan mikroskobunda incelenmek üzere hazır hale getirildi.

Parafine gömülü özofagus dokusundan 3 mikron kalınlığında kesitler alındı. Parafin doku kesitlerine FISH yöntemi uygulanmadan önce parafine gömülmüş dokuları açığa çıkarmak ve daha iyi bir hibridizasyon sağlamak için deparafinizasyon uygulandı. Bunun için içerisinde; pretreatment solüsyonu, proteaz buffer II, proteaz bulunan parafin pretreatment reagent kit II (Vysis) kullanıldı.

Hibridizasyon işlemi için -20°C'de saklanan Cep X SO ve Cep Y SG DNA Probe Kit (Vysis, Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL 60018 A.B.D.) kullanıldı. Floresan mikroskopta kullanılan probaya uygun filtreler ile preparatlar değerlendirildi ve CytoVision görüntü analiz sistemi kullanılarak sinyallerin gözlemlendiği hücreler kaydedildi.

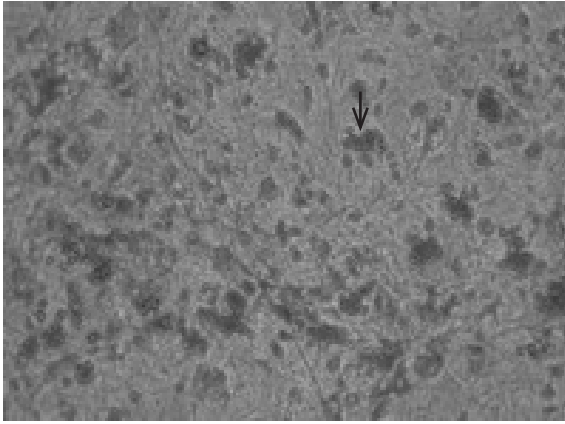
İstatistiksel Analiz

Çalışmanın verileri Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 17.0 istatistik paket programına aktararak analiz edilmiştir. Doku fibrozis, inflamasyon ve nekroz düzeyleri ortalama \pm standart sapma (SD) cinsinden sunulmuştur. Gruplar arası ikili ve üçlü karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi, ki-kare testi ve Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi " $p < 0,05$ " olarak belirlenmiştir.

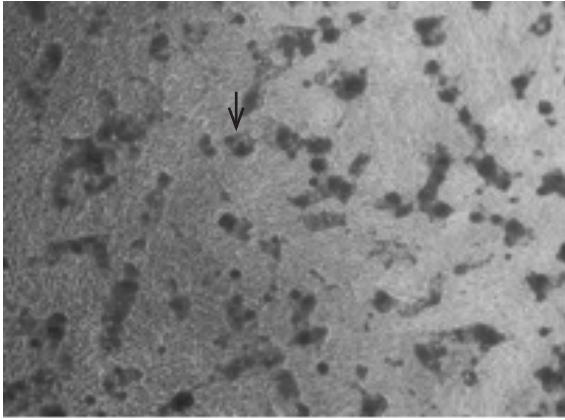
Bulgular

Akım sitometri değerlendirme sonuçlarına göre, hücrelerin CD45 ve CD34 için negatif, ancak CD73, CD105 ve NG2 için pozitif oldukları saptandı. Bu sonuçlara göre hücrelerin MKH ile uyumlu oldukları gösterildi.

Adipojenik farklılaşmanın olduğunu gösteren 21. gün Oil Red O (Sigma, Almanya) ile boyanmış lipid adipozitetleri Nikon Eclipse TS 100 invert mikroskop (Japonya) ile gösterildi. Osteojenik farklılaşmanın olduğunu gösteren Alizarin Red S (Sigma, Almanya) ile boyalı kalsiyum fosfat depozitleri Nikon Eclipse TS 100 invert mikroskop (Japonya) ile gösterildi (Resim 1a ve 1b).



Resim 1a. Adipojenik farklılaşmayı gösteren Oil Red O ile boyanmış lipid adipoziteri.



Resim 1b. Osteojenik farklılaşmayı gösteren Alizarin Red S ile boyalı kalsiyum fosfat depozitleri.

Deney sonundaki rat sayıları Tablo 3’de özetlenmiştir. Histolojik incelemede hasarlanmanın derecesi; inflamasyon, fibrozis ve nekroz varlığı bulgularının yüzde dağılımı ayrı ayrı hesaplanmıştır. Tablo 4’de gruplara göre fibrozis bulgularının yüzde dağılımı sunulmuştur. Gruplar içerisinde fibrozis dereceleri ile hesaplama yapıldığında anlamlı farklar görülmemiştir. Fakat fibrozis varlığı ve yokluğu şeklinde yapılan hesaplamalarda, anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$). İnflamasyon açısından yapılan hesaplamalarda gruplar içerisinde anlamlı farklar görülmemiştir ($p > 0,05$). Tablo 5’de gruplara göre inflamasyon bulgularının yüzde dağılımı sunulmuştur. Grup 3’te yalnızca bir hayvanda inflamasyon bulgusu saptanmıştır.

Tablo 3. Ratların sayısı.

| Gruplar | Başlangıç | 21. gün |
|----------|-----------|---------|
| Grup I | 10 | 8 |
| Grup II | 10 | 6 |
| Grup III | 10 | 9 |

Tablo 4. Gruplara göre fibrozis bulgularının yüzde dağılımı.

| Gruplar | Sayı | Fibrozis Var (%) | Fibrozis Yok (%) |
|----------|------|------------------|------------------|
| Grup I | 8 | - | 8 (100,0) |
| Grup II | 6 | 2 (33,3) | 4 (66,7) |
| Grup III | 9 | - | 9 (100,0) |

$\chi^2 = 6,206$ $p = 0,045$

Tablo 5. Gruplara göre inflamasyon bulgularının yüzde dağılımı.

| Gruplar | Sayı | İnflamasyon Var (%) | İnflamasyon Yok (%) |
|----------|------|---------------------|---------------------|
| Grup I | 8 | - | 8 (100,0) |
| Grup II | 6 | 5 (83,3) | 1 (16,7) |
| Grup III | 9 | 1 (11,1) | 8 (88,9) |

$\chi^2 = 1,308$ $p = 0,520$

Hesaplamalar 21. güne göre yapıldığı ve de deney boyunca yaşayan hayvanların hiçbirinde nekroz görülmediği yalnızca erken dönemde kaybedilen hayvanlarda nekroz saptandığı için nekroz açısından yüzde dağılımı hesaplanamamıştır.

Deney gruplarının ortalama SI değerleri, Tablo 6’da sunulmuştur. En düşük düzey Grup I’de görülmüş olup, tüm gruplar içerisinde SI düzeyleri açısından, kontrol grubundan dolayı anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$). Fakat Grup II ile Grup III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

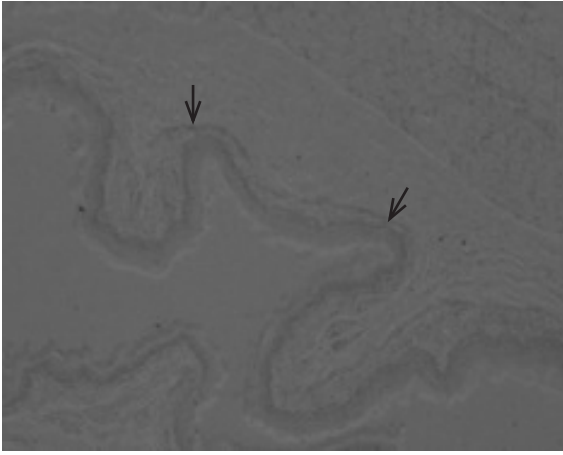
Tablo 6. Stenoz indeksi (SI) değerleri.

| Gruplar | Sayı | Ortalama±SD | Ortanca (minimum-maksimum) |
|----------|------|-------------|----------------------------|
| Grup I | 8 | 0,22±0,06 | 0,22 (0,16-0,29) |
| Grup II | 6 | 0,37±0,11 | 0,37 (0,21-0,54) |
| Grup III | 9 | 0,36±0,11 | 0,34 (0,23-0,53) |

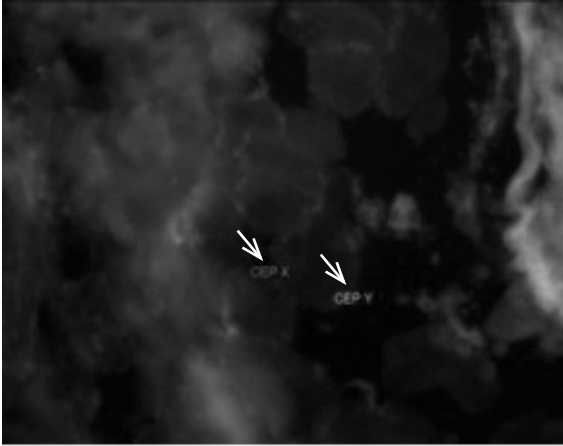
$p = 0,019$

Floresan mikroskopu ile DiI ile işaretli MKH’lerin özofagus epitelinin hemen altında yerleştikleri ve 21 gün sonra halen canlılıklarını sürdürmüş oldukları görüldü (Nikon Eclipse 80i, Resim 2).

Grup III’ün FISH sonuçlarına göre 9 hayvanda hem X ve hem de Y sinyali saptanırken dört numaralı denekte X veya Y sinyaline rastlanmadı. Floresan mikroskopu ile yapılan değerlendirmede atipik büyük hücreler görülmüştür ve X sinyali kırmızı ile Y sinyali yeşil renk ile değerlendirilip fotoğrafları çekilmiştir (Resim 3).



Resim 2. Grup III'den 8 numaralı rattan alınan özofagusun Dil işaretli MKH'in epitelde daha fazla olmak üzere mikroskopik görüntüsü.



Resim 3. Grup III'den 4 numaralı rattan alınan özofagusun hibridizasyon sonucu saptanan X ve Y kromozomu sinyallerinin florasan mikroskopundaki görüntüleri.

Tartışma

Çocuk cerrahlarının çoğunun ortak görüşü “En iyi özofagus hastanın kendi özofagusudur”. Korozif özofagus yaralanmalarına yönelik yapılan çalışmalara bakıldığında iki önemli faktörün dikkat çekici olduğu görülmektedir. Birincisi, bu konuda araştırma yapılan ülkelerin genellikle sorunun daha sık yaşandığı gelişmekte olan ülkeler olmasıdır. Diğer önemli nokta ise yapılan bu çalışmaların daha çok geç dönemde gelişen darlığın önlenmesine yönelik çalışmalar olduğudur (10,14,16,20-22). Tüm çalışmalarda kabul gören görüş ilk anda gelişen hasarın derecesinin, daha sonra ortaya çıkan darlık derecesini doğrudan etkilediğidir. Özofagus hasarlanmasında erken dönemde ön planda olan patoloji; kanama, tromboz ve ödemle beraber

seyreden inflamasyondur. Yaralanmanın birinci ve ikinci haftalarında submukozal damarlarda tromboz ve bu tromboza bağlı nekroz ile ödemde artış izlenir. Üçüncü haftadan itibaren ise fibroblastların submukozaya yerleşmesiyle, fibrozis ve hasarlanmanın derecesine göre darlık gelişmeye başlar (1,5,17,22).

Korozif özofagus darlığı olgularının bir kısmı; değişen sıklık ve sayılarda balon veya buji dilatasyonları ile tedavi edilebilmekte, önemli bir kısmında ise dilatasyonların etkisiz oluşu nedeniyle özofageal replasman seçeneklerine başvurulmaktadır. Özofageal replasman uygulanan hastalarda ise çok uzun süreli, pahalı, uzun hastanede kalış gerektirebilecek, birçok komplikasyon potansiyeli olan, ağır ameliyatlardan sonrası farinks ile mide arasındaki devamlılık sağlansa da, replasman için kullanılan organa bağlı dezavantajlar, hastaya kendi özofagusunu aratmaktadır.

Çalışmamızda kök hücre tedavisinin günümüzde sahip olduğu uygulama yöntemleri ve farklı organ sistemlerinde vermiş olduğu yüz güldürücü sonuçlar göz önünde bulunduruldu. Kök hücrenin korozif madde yutmaya bağlı özofagus striktürüne neden olduğu fibrozisi önleyerek, özofagusun mukoza dokusu gelişiminin sağlanabileceği hipotezinden yola çıkılmış; morbiditesi mevcut tedavi seçeneklerinden daha düşük, korozif özofagus striktürü olgularına daha kaliteli yaşam vaat eden bir alternatif temel atılması hedeflenmiştir.

Özofagus yenilenmesinde gelecekte yapılacak yeni çalışmalar sayesinde yeni hücre kaynakları sağlanacaktır. Bu kaynakların başında MKH, embriyonik kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve amniyon sıvısı kök hücreleri olacaktır. Bunların içinde MKH üzerinde en çok durulan ve araştırılan hücreler olmuştur. MKH multipotent özelliklerinden dolayı osteoblasta, kondrositlere, miyosite, adipositlere, pankreas ada hücrelerine ve nöral hücrelere farklılaşabilme özelliğine sahiptirler (22). 2004 yılında Epperly ve ark.'nın (8) yaptığı bir çalışmada, yetişkin fare kemik iliğinden izole edilen özofagus progenitör hücrelerin radyasyon uygulanmış fare özofagusunda proliferatif olduğu gösterilmiş ve hücrelerin özofagus skuamöz epiteline farklılaştığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada Malvasio ve ark. (13) çeşitli oranlarda sodyum hidroksite maruz bırakılan koyun özofagusunda düşük doz sodyum hidroksit uygulanan dokularda canlı özofa-

gus epitel hücrelerini izole edilmiş ve özefagus doku mühendisliği ile alternatif hücre kaynağı olabileceğini savunulmuştur. Çalışmamızda merkezimizdeki kısıtlamalardan dolayı donör insandan seçilip ratlara uygulanmak zorunda kalmıştır ve özefagus yerine kemik iliğinden MKH üretilmiştir.

MKH, beyin, kemik ve kemik iliği, adipoz doku, umbilikal kord kanı, süt dişleri, sinovyum, kan damarları ve kandan izole edilebilmektedir. Aynı zamanda kolay izole edilebilmeleri, in vitro koşullarda kültür edilebilmeleri ve herhangi bir etik açıdan sorun oluşturmamaları gibi avantajlara sahiptir. MKH rejeneratif tıpta çok önemli bir yere sahip ve bu yüzden daha fazla ayrıntılı biyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin araştırılması gerekmektedir⁽²³⁾.

Çalışmamızda hücreleri akım sitometri ile değerlendirilip CD45 ve CD34'den negatif ancak CD73, CD105 ve NG2'den pozitif çıkması ile elde ettiğimiz hücrelerin MKH olduklarını gösterdiğimiz gibi adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı da göstererek bulgularımızı desteklemiş olduk. Fakat yine merkezimizdeki kısıtlamalardan dolayı çalışmamızda kas farklılaşması gösterilemedi. Literatürde yapılan bir çalışmada kemik iliği kaynaklı MKH'in in vitro ve in vivo iskelet ve düz kasa rejenerasyon kapasitesi göstererek gastroözofageal bileşkede kullanılmıştır. Çalışmalarında kas progenitör hücrelerinden ve kemik iliğinden izole ettikleri MKH'i intravenöz enjeksiyon yolla uygulayıp; sonuçlarını kıyaslanmıştır⁽⁹⁾.

Çalışmamızda kostik hasar oluşturulan ratların hemen hepsinde az veya çok mikroskopik hasar bulguları gözlemlendi. SHAM grubuna göre, % 15 NaOH verilip kök hücre enjeksiyonu yapılmayan ratlarda inflamasyon, fibrozis ve nekroz gibi mikroskopik bulgular belirgindi. Geç dönemde gelişen özofageal striktürü de dikkate aldığımızda bulgularımız korozif özofagus yanığı modelinin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. MKH enjeksiyonu yapılan ratların eksizyonlarında makroskopik olarak patolojik bulguya rastlanmadı. Yirmi bir günlük takibimizde on ratın yalnızca bir kaybımız olması ve beslenmelerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmaması, MKH'lerin enjekte edildiği korozyon bölgesine yerleşip stenoz gelişimini engellediği düşündürmektedir. Aynı zamanda 21 gün sonra yapılan floresan mikroskopu ile incelemede o bölgede gerek Diİ ile işaretli MKH'nin

özellikle özofagusun epitel bölgesinde canlılığını sürdürmesi sonuçlarımızı desteklemektedir.

Diİ işaretli MKH'in gösterilebilmesi için floresan mikroskopunda 560 nm'de altıncı filtrede bakılması gerekir. Bizim çalışmamızda yalnızca hemotoksilen ile boyanıp ayrıca antijen kullanılmamıştır. Fakat MKH'nin büyük bir kısmı o bölgenin kendi kök hücrelerinin niş bölgesi olan epitele yerleştikleri hemotoksilen boyası ile de gösterilmiştir. MKH'in özofagus epitel hücrelerine farklılaşma potansiyeli özel belirteçler kullanılarak gösterilmektedir. Merkezimizde yalnızca canlı hücrelerin varlığı ve özofagus stenozuna etkisi gösterilebilmiştir. Kantarcıoğlu ve ark.⁽¹²⁾ 2014 yılında yapmış oldukları çalışmamıza çok benzer bir deneysel çalışmada ise ratlarda oluşturulan özofagus kostik hasardan sonra kuyruk veninden verilen Diİ ile işaretlenmiş MKH'in pozitron emisyon tomografisi ile özofagusun epitel ve kas tabakasına yerleştikleri gösterilmiş fakat çalışmamızdan farklı olarak histopatolojik bulgularda anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. Bu farklılığın, çalışmamızda, MKH'leri daha yüksek bir etki potansiyeline sahip olan lokal yolla uygulamamızdan kaynaklandığını düşünüyoruz.

Sonuç olarak, "En iyi özofagus hastanın kendi özofagusudur" görüşünden yola çıkarak böyle bir çalışma yapıldı. Çalışmamızda insan kaynaklı üretilen MKH'nin öncelikle akım sitometri özelliklerini ve farklılaşmasını göstererek kök hücre olduklarını gösterdik. Bu hücreler Diİ ile işaretlenip floresan mikroskopunda gösterildi. FISH analizi ile dişi ratlarda dokuya yerleşmiş olan erkek donörden elde edilen MKH'deki Y kromozomunu gösterdik. Son olarak, histopatolojik olarak yalnızca fibrozisin engellenmesi konusunda anlamlı sonuçlar elde ettik. Organ hasarlanmasında kök hücre kullanımı için kat edilecek çok yol olduğunu ve ileriye dönük allogreft donör kullanılarak yeni çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Anderson KD, Rouse TM, Randolph JG. A controlled trial of corticosteroids in children with corrosive injury of the esophagus. *The New England Journal of Medicine* 1990;323:637. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199009063231004>
2. Bakan V, Demirtas I, Dulger H. The antioxidant paradox or antioxidant damage. *Pediatric Surgery International* 2004;11-12:903.

- <http://dx.doi.org/10.1007/s00383-002-0947-4>
3. Berthet B, Costanzo J, Arnaud C, et al. Influence of epidermal growth factor and interferon on healing of esophageal corrosive burns in the rat. *British Journal of Surgery* 1994;1:395.
<http://dx.doi.org/10.1002/bjs.1800810325>
 4. Chiu HM, Lin JT, Huang SP, et al. Prediction of bleeding and stricture formation after corrosive ingestion by EUS concurrent with upper endoscopy. *Gastrointestinal Endoscopy* 2004;60(5):827.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5107\(04\)02031-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5107(04)02031-0)
 5. Çakmak M, Naycı A, Renda N. The effect of corticosteroids and pentoxifylline in caustic esophageal burns. *International Surgery* 1997;82:371.
 6. De Jong AL, Macdonald R, Ein S, et al. Corrosive esophagitis in children: a 30-year review. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2000;57(3):203.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5876\(00\)00440-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-5876(00)00440-7)
 7. Dogan Y, Erkan T, Cokugras FC ve ark. Caustic gastroesophageal lesions in childhood: an analysis of 473 cases. *Clinical Pediatrics (Philadelphia)*; 2006;45(5):435.
<http://dx.doi.org/10.1177/0009922806289618>
 8. Epperly MW, Guo H, Shen H, et al. Bone marrow origin of cells with capacity for homing and differentiation to esophageal squamous epithelium. *Radiation Research* 2004;162(3):233.
<http://dx.doi.org/10.1667/RR3224>
 9. Fascetti-Leon F, Malerba A, Boldrin L, et al. Murine muscle precursor cells survived and integrated in a cryoinjured gastroesophageal junction. *Journal of Surgical Research* 2007;143:253.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2007.02.007>
 10. Guven A, Demirbag S, Uysal B ve ark. Effect of 3-amino benzamide, a poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitor, in experimental caustic esophageal burn. *Journal of Pediatric Surgery* 2008;43:1474.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2007.10.001>
 11. Jutley RS, Youngson GG, Ermin O, et al. Serum cytokine profile in reflux nephropathy. *Pediatric Surgery International* 2000;16(1-2):64.
<http://dx.doi.org/10.1007/s003830050017>
 12. Kantarcioglu M, Caliskan B, Demirci H ve ark. The efficacy of mesenchymal stem cell transplantation in caustic esophagus injury: an experimental study. *Stem Cells International* 2014;9:39674.
 13. Malvasio V, Ainoedhofer H, Ackbar R, et al. Effects of sodium hydroxide exposure on esophageal epithelial cells in an in vitro ovine model: implications for esophagus tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery* 2012;47:874.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2012.01.033>
 14. Ozelik MF, Pekmezci S, Saribeyoglu K ve ark. The effect of halofuginone, a specific inhibitor of collagen type I synthesis, in the prevention of esophageal strictures related to caustic injury. *The American Journal of Surgery* 2004;187:257.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.amjsurg.2003.11.008>
 15. Ozel SK, Dagli TE, Yuksel M ve ark. The roles of free oxygen radicals, nitric oxide, and endothelin in caustic injury of rat esophagus. *Journal of Pediatric Surgery* 2004;39(9):1381.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.05.014>
 16. Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S ve ark. Trapidil, an inhibitor for phosphodiesterase and platelet-derived-growth factor, ameliorates corrosive esophageal burn in rats. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2005;207(3):203.
<http://dx.doi.org/10.1620/tjem.207.203>
 17. Ulman I, Mutaf O. A critique of systemic steroids in the management of caustic esophageal burns in children. *European Journal of Pediatric Surgery* 1998;8:71..
<http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1071124>
 18. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (Çev. Ed:İde T). Principles of Laboratory Animal Science (Laboratuvar hayvanları biliminin temel ilkeleri). Ankara, Medipres 2003
 19. Yagmurlu A, Aksu B, Bingol-Kologlu M ve ark. A novel approach for preventing esophageal stricture formation: sphingosylphosphorylcholine-enhanced tissue remodeling. *Pediatric Surgery International* 2004;20(10):778.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00383-004-1145-3>
 20. Yukselen V, Karaoglu AO, Ozutemiz O ve ark. Ketotifen ameliorates development of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Pediatric Surgery International* 2004;20(6):429.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00383-004-1170-2>
 21. Yukselen V, Karaoglu AO, Yenisey C ve ark. Trimetazidine reduces the degree of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Journal of Pediatric Surgery* 2005;40:505.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.11.036>
 22. Zani A, Pierro A, Elvassore N, et al. Tissue engineering: an option for esophageal replacement?. *Seminars in Pediatric Surgery* 2009;18:57.
<http://dx.doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2008.10.011>
 23. Zeidán-Chuliá F, Noda M. "Opening" the mesenchymal stem cell tool box. *European Journal of Dentistry* 2009;3:240.