

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KOROZİF ÖZOFAJİT MODELİNDE ANNE SÜTÜ
EKSOZOMUNUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Sema TURAL BOZOĞLU

TRABZON - 2022

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL KOROZİF ÖZOFAJİT MODELİNDE ANNE SÜTÜ
EKSOZOMUNUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Sema TURAL BOZOĞLU

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT

TRABZON - 2022

TEŞEKKÜR

Çocuk Cerrahisi eğitimim süresince mesleki bilgi, becerileri ve hayata bakış açısı ile yolumu aydınlatan, her zaman kendisini örnek aldığım, tez çalışmalarımın her aşamasında da destek ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız, değerli hocam Prof. Dr. Haluk SARIHAN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca klinik bilgi, beceri ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Mustafa İMAMOĞLU'na,

Tüm bu süreçte bana hocalığın yanında ablalık yapan, her türlü sıkıntıda varlığını yanımda hissettiğim, hakkını asla ödeyemeyeceğim, tezimin de her aşamasında yol göstericim olan değerli hocam, canım ablam Doç. Dr. Hatice Sonay YALÇIN CÖMERT'e,

Çocuk Cerrahi kliniğimize öğretim üyesi olarak başladığından bu yana bilgilerini, klinik ve tecrübelerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Gül ŞALCI'ya,

Tez çalışmamın histopatolojik değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Doç. Dr. İsmail SAYGIN ve Arş. Gör. Dr. Kübra ÖZTÜRK TÜRKER'e, anne sütü eksozomu üretiminde bol emek harcayan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim görevlisi Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Arş. Gör. Şeniz ERDEM ile Arş. Gör. Neslihan SAĞLAM'a, istatistik değerlendirmesinde desteğini asla unutamayacağım Uzm. Dr. Serdar KARAKULLUKÇU'ya,

Asistanlığım süresince beraber çalıştığım ve çok sevdiğim asistan, hemşire, sekreter, teknisyen ve personel arkadaşlarıma,

Hayatımın her döneminde yanımda olan, bu günlere gelmemde büyük emek gösteren en kıymetlilerim annem Fatma TURAL ve babam Yusuf TURAL'a, sevgi ve destekleriyle bana her daim güç veren canım ablalarım Sevda ve Hilal'e, her daim idolüm olan birtanecik abim Adem'e çok teşekkür ederim.

Son olarak sonsuz sevdiğim canım eşim Ali BOZOĞLU ile tezimi yazma aşamasında hayatımıza giren ve tekmeleriyle yanımda olduğunu hissettiren biricik kızıma çok çok teşekkür ederim.

Dr. Sema TURAL BOZOĞLU
Trabzon, 2022

ÖZET

DENEYSEL KORUZİF ÖZOFAJİT MODELİNDE ANNE SÜTÜ EKSOZOMUNUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Çalışmamızda, koruzif özofagus yanıklarının tedavisinde anne sütü eksozomunun etkinliğinin incelenmesi ve gelecekte yapılacak çalışmalar için anne sütü eksozomunun önemini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada 8'er adet, 4 grup olacak şekilde toplam 32 adet ağırlıkları 190-315 gram arasında değişen Sprague Dawley cinsi ratlar kullanıldı. Deney süresi toplamda 21 gün olarak belirlendi. İşlem öncesi tüm ratlar tek tek tartıldı. Koruzif özofagus yanık modeli oluşturulacak olan gruplardaki ratlara intraperitoneal olarak uygulanan anestezi sonrasında 3 French (F) Fogarti sonda özofagustan geçirilip mideye indirilerek midede balonu şişirildi ve geri çekilerek özofagakardiyak bileşkeye oturtuldu. Daha sonra 4 F nelaton sonda yardımıyla özofagusa 0,5 cc %12,5 sodyum hidroksit (NaOH) verilip 60 saniye beklendikten sonra aspire edilip izotonik serum ile özofagus yıkandı ve sondalar çıkarıldı. Ratlar 12 saat aç bırakıldıktan sonra doğal beslenmelerine döndü. Grup 1'e herhangi bir işlem veya tedavi uygulanmadı ve SHAM grubu olarak belirlendi. Grup 2'ye yanık oluşturulup sonrasında herhangi bir tedavi uygulanmadı. Grup 3'e yanık oluşturulup daha sonra 21 gün boyunca 0,5 cc/gün anne sütü eksozomu verildi. Grup 4'e herhangi bir işlem yapılmayıp 21 gün boyunca 0,5 cc/gün anne sütü eksozomu verildi. 21. günün sonunda tüm denekler tekrar tartıldı ve sakrifiye edilerek biyopsi örnekleri histopatolojik inceleme (inflamasyon, fibrozis ve nekroz açısından) yapılması için patoloji laboratuvarına gönderildi.

Bulgular: Yapılan histopatolojik incelemelerde inflamasyon, fibrozis ve nekroz ayrı ayrı değerlendirilmiş olup inflamasyon ve fibrozis sonuçlarında anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Ayrıca gruplar arası yapılan ikili karşılaştırmalarda da 2. grupta 3. grup arasında fibrozis açısından anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$).

Deney öncesi ve sonrası ratların kiloları karşılaştırıldığında ise grup 1,3 ve 4'te kilo artışı olup, grup 2'deki ratlar iyi beslenemedikleri için kilo kaybı gözlenmiştir. Her bir grup için yapılan istatistiksel değerlendirmeler anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç: Çalışmamızda, koruzif özofagus yanık tedavisinde anne sütü eksozomunun inflamasyon ve fibrozis oluşumu üzerinde etkin olabileceği görülmüştür. Ayrıca korozyon oluşturulup anne sütü eksozomu ile tedavi edilen grupta kilo artışı görülürken, korozyon oluşturulup tedavi verilmeyen grupta ise kilo kaybının görülmesi anne sütü eksozomunun özofagus korozyonuna bağlı striktür oluşumunu azalttığını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Koruzif Özofagus, Anne Sütü Eksozomu, İnflamasyon, Fibrozis.

SUMMARY

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF MOTHER MILK EXOSOME IN EXPERIMENTAL CORROSIVE ESOPHAGITIS MODEL

Aim: In our study, it was aimed to examine the effectiveness of mother milk exosome in the treatment of corrosive esophageal burns and to reveal the importance of mother milk exosome for future studies.

Materials and Methods: A total of 32 Sprague Dawley rats ranging in size from 190-315 gram were studied. We separated the rats for 4 equal groups. The duration of the experiment was determined as 21 days. All rats were weighed individually before the procedure. After the anesthesia applied intraperitoneally to the rats in the groups for which a corrosive esophageal burn model will be created, a 3 French (F) Fogarty catheter was passed through the esophagus, lowered into the stomach, and the balloon in the stomach was inflated and retracted and placed at the esophagus-cardiac junction. Then, 0,5 cc 12,5% sodium hydroxide (NaOH) was injected into the esophagus with the help of a 4 F nelaton catheter, waited for 60 seconds, aspirated, and the esophagus was washed with isotonic serum and the catheters were removed. The rats were provided with natural food after being fasted for 12 hours. Group 1 was not applied to any process or treatment, and was identified as the SHAM group. Group 2 was burned and no treatment was performed afterwards. Group 3 was burned and then 0,5 cc/day mother milk exosome extract was given for 21 days. Group 4 was not applied any process and 0,5 cc/day mother milk exosome extract was given for 21 days. At the end of the 21st day, all subjects were weighed again and sacrificed, and biopsy samples were sent to the pathology laboratory for histopathological examination (in terms of inflammation, fibrosis and necrosis).

Results: The degree of damage in the histopathological examination was graded by examining the presence of inflammation, fibrosis and necrosis. A significant difference was found in the results of inflammation and fibrosis ($p<0.05$). Furthermore, in the bilateral comparisons between the groups, there was a meaningful difference in terms of fibrosis between the 2nd group and 3rd group ($p<0.05$).

When the weights of the rats before and after the experiment were compared, there was weight gain in groups 1, 3 and 4. Since the rats in group 2 were not fed well, weight loss was observed. Statistical evaluations for each group were found to be significant ($p<0.05$).

Conclusion: In our study, it was observed that breast milk exosome may be effective on inflammation and fibrosis formation in the treatment of corrosive esophageal burns. In addition, weight gain was observed in the group treated with breast milk exosome after corrosion. Weight loss was observed in the group in which corrosion was created and no treatment was given. This suggested that breast milk exosome reduces stricture formation due to esophageal corrosion.

Key Words: Corrosive Esophagus, Mother Milk Exosome, Inflammation, Fibrosis.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET.....	II
SUMMARY	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Özofagus Embriyolojisi	4
2.2. Özofagus Anatomisi	4
2.2.1. Özofagusun Bölümleri.....	5
2.2.2. Özofagusun Anatomik Darlıkları.....	6
2.2.3. Özofagusun Sfinkterleri.....	6
2.2.4. Özofagusun Damarları.....	6
2.3. Özofagus Histolojisi	7
2.3.1. Tunika Mukoza	7
2.3.2. Tunika Submukoza	8
2.3.3. Tunika Muskularis	8
2.3.4. Tunika Adventisya	8
2.4. Özofagus Fizyolojisi	8
2.5. Özofagusun Koroziif Madde Yanıkları.....	10
2.5.1. Alkali ve Asidik Koroziif Madde Hasarları.....	12
2.5.2. Koroziif Yanıklardaki Hasarın Dönemleri.....	13
2.5.3. Koroziif Yanık Sonrası Komplikasyonlar	14
2.5.4. Koroziif Özofagusta Tedavi Yaklaşımı	15
2.5.5. Koroziif Özofagus Yanıklarında Koruyucu Hekimlik.....	18
2.6. Eksozom.....	18
2.6.1. Anne Sütü Eksozomu.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Hazırlığı ve Yapılışı	21

3.2. Anne Sütü Eksozomunun Üretimi	21
3.2.1. Anne Sütünün Toplanması ve Eksozom İzolasyonu	21
3.2.2. Anne Sütü Eksozomunun İmmüno blot Yöntemiyle Doğrulanması.....	22
3.2.2.1. SDS-PAGE Aşaması.....	23
3.2.2.2. Western Blot	26
3.2.2.3. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi	27
3.3. Deney Grupları	28
3.4. Deney Sonrası Bakım ve İnceleme	30
3.5. Histopatolojik İnceleme	31
3.6. İstatistiksel Yöntem	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Anne Sütünden Elde Edilen Eksozomların Doğrulanması	33
4.2. Histopatolojik İnceleme	33
4.3. Vücut Ağırlığı	37
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ	47
7. KAYNAKLAR	48

KISALTMALAR DİZİNİ

a	: Arteria
APS	: Amonyum Persülfat
BCA	: Bikinkoninik Asit
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BSA	: Sığır Serum Albumini
Cu¹⁺	: Bakır Katyonu
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EV	: Ekstraselüler Veziküller
F	: French
gl	: Glandula
HCl	: Hidrojen Klorür
lncRNA	: Uzun Kodlamayan RNA
m	: Musculus
miRNA	: Mikro RNA
mRNA	: Mesajcı RNA
n	: Nervus
NAC	: N-Asetil Sistein
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NEK	: Nekrotizan Enterokolit
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
SDS	: Sodyum Dodesil Sulfat
Sİ	: Stenoz İndeksi
ÜDK	: Üst Diş Kavitesi
v	: Vena

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Sık Karşılaşılan Koroziyel Maddeler.....	13
Tablo 2. %5-12'lik (2x1mm) SDS Poliakrilamid Jelinin Hazırlanışı	24
Tablo 3. Çalışma Gruplarının Şematik Gösterimi	28
Tablo 4. Histolojik İnceleme Parametreleri.....	32
Tablo 5. 2. Grubun Histopatolojik Derecelendirme Sonuçları.....	34
Tablo 6. 3. Grubun Histopatolojik Derecelendirme Sonuçları.....	34
Tablo 7. 21. Gün Sakrifiye Edilen Ratlarda, Gruplara Göre İnflamasyon Bulgularının Yüzde Dağılımı ve Gruplar Arası İkili Karşılaştırma.....	35
Tablo 8. 21. Gün Sakrifiye Edilen Ratlarda, Gruplara Göre Fibrozis Bulgularının Yüzde Dağılımı ve Gruplar Arası İkili Karşılaştırma.....	35
Tablo 9. Grup 1 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları	37
Tablo 10. Grup 2 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları	37
Tablo 11. Grup 3 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları	38
Tablo 12. Grup 4 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları	38
Tablo 13. Deney Öncesi ve Sonrası Gruplara Göre Deneklerin Ortalama $\pm$ SS Ağırlıkları	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Akut Özofagus Yanıklarının Endoskopik Bulgulara Göre Derecelendirilmesi (Di Costanzo Sınıflaması).....	11
Şekil 2.	Ekstrasellüler Veziküllerin Biyolojik Olarak Bilinen Farklı Tipleri.....	19
Şekil 3.	Anne Sütü Eksozomlarında Protein Miktarını Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği	23
Şekil 4.	Anne Sütünden Eksozom İzolasyonu ve Doğrulanması	28
Şekil 5.	Ratların Gruplara Ayrılması.....	29
Şekil 6.	Korozif Özofagus Oluşturma Yöntemi (Fogarti yöntemi).....	29
Şekil 7.	Ratların Gavaj ile Beslenmesi	30
Şekil 8.	Laparotomi Yapılan Ratlar ve Eksize Edilen Distal Özofagus Parçası	31
Şekil 9.	Anne Sütü Eksozomlarının Western Blot ile Doğrulanması.....	33
Şekil 10.	Grup 1-A (normal) Özofagusun Histolojik Görünümü (H-E x100)	36
Şekil 11.	Grup 2-C (inflamasyon) Özofagusun Histolojik Görünümü (H-E x100).....	36
Şekil 12.	Grup 2-F (fibrozis) Özofagusun Histolojik Görünümü (H-E x200)	37

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Korozif ajanlar, doku temasıyla yaralanmaya neden olabilen kimyasal maddelerdir. Bu maddelerin yutulması ile özofagusta meydana gelen yanıklara ‘*korozif özofagus yanığı*’ adı verilir. Korozif özofagus yanıkları ölüme neden olabilecek kadar ciddi olabilen yaralanmalardır. Bunlarda hasarın akut dönemi atlatıldığında iyileşme sürecinde özofagusta striktür, motilite bozukluğu, gastroözofageal reflü ve uzun dönemde ise malignite gelişebilir (1).

Bu maddelerin yutulması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde ve genellikle 6 yaşından küçük çocuklarda dünya çapında önemli bir sorundur ve sorun olmaya da devam etmektedir (2-4).

Çocukluktaki korozif madde yutulması genellikle kaza ile olurken, yetişkinlerdeki sebep sıklıkla intihar girişimidir (3, 5). Çocuklar korozif maddeyi ağızlarına aldıklarında tadını alır almaz tükürdüklerinden hasarları daha azdır (6). Yetişkinlerde ise intihar amacıyla daha fazla miktarda alım olduğu için özofagus ve mide hasarı daha fazla olmaktadır (7).

Sodyum hidroksitin (NaOH) 19. yüzyılın başlarında temizlik malzemelerinin içinde yer almaya başlamasıyla hayatımıza giren korozif maddeler özellikle çocuklar için ciddi bir tehlike unsuru olmaya başlamıştır (8, 9). Evlerde kullanılan bu maddelerin renkli kutuları özellikle 4 yaş altındaki çocukların dikkatlerini çekmektedir. Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde; eğitim seviyesinin düşüklüğü ve ekonomik sebepler nedeniyle, fabrika çıkışlı ambalaj yerine boş su veya meyve suyu şişelerine doldurulmuş maddeler tercih edilebilmektedir. Bunların kolay ulaşılabilir yerlerde saklanması da vakaları artıran unsurlardandır (10).

Kazara korozif madde alımlarını önlemek adına ilk adımı 20. yüzyıl başlarında Chevalier Jackson atmıştır. Jackson Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde bu ürünlerin üzerine uygun etiketleme yapılması için halk kampanyası başlatmış olup 1927’de Federal Kostik Kanunu’nun yasalaştırılmasını sağlamıştır (6). Alınan koruyucu önlemler birçok ülkede korozif yaralanmalarının azalmasını sağlamıştır. Fakat çoğu vakaları rapor edilmediği için gelişmekte olan ülkelerde hala istenilen hedefe ulaşılamamıştır. Korozif yaralanmaların çoğu sosyal, ekonomik, eğitimsel

eksikliklerin olduğu ÷lkelerde ve %50-80 arasında çocuk yaş grubunda gör÷lmektedir (11).

Asidik ve alkali ajanların zarar verme mekanizmaları ise farklıdır. Asidik ajanlar ($\text{pH} < 7$) özofagus mukozasında pıhtılaşma (koag÷lasyon) nekrozuna neden olurlar ve yüzeydeki pıhtı daha derine ilerlemeyi engeller. Alkali ajanlar ise ($\text{pH} > 7$) epitel, submukoza ve özofagusun derin kas tabakalarının yıkımını içeren sıvılaşma (likefaksiyon) nekrozuna yol açarlar ve tam kalınlıkta mukozal yaralanma ve hatta perforasyona neden olabilirler (3, 12).

Korozif madde maruziyetinin ilk 4 günü içerisinde değişen derecelerde inflamasyon, doku proteinlerinin koag÷lasyonu, nekroz ve mukozal hemoraji gör÷lebilir. Sonraki 10 gün içerisindeyse gran÷lasyon dokusu, fibroplazi ve kollajen birikimi takip eder. Mukozal reepitelizasyon 3. haftada başlar ve 6. haftada tamamlanır. Bu dönemde fibroblastik proliferasyon ve striktür oluşumu meydana gelir (12).

Korozif yaralanmalar üst gastrointestinal sistemde ve özellikle özofagusta daralmadan perforasyona kadar değişen ciddi morbidite ve nadiren de mortalite nedenleridir. Korozif hasarlanmanın akut döneminde mukozal yanık, perforasyon ve bazen de ölüm gör÷lebilir. Kronik döneminde ise disfaji ve malnütrisyona neden olan striktür ve özofagus karsinomu gelişebilir (5, 13).

Korozif özofajitin tedavisi genellikle konservatiftir; iki veya üç gün oral beslenmenin kesilmesi ile özofagus istirahati ve intravenöz sıvıların verilmesi şeklindedir (14). Ancak ciddi korozif özofagus yanığı tedavisinde amaç yara iyileşmesine katkı sağlamak, perforasyonu önlemek ve darlık oluşumunu azaltmaktır. Darlık oluşumu, ilk yaralanmanın şiddeti ile ilişkili olup oldukça önemli bir komplikasyondur (15). Bu komplikasyonları önlemek amacıyla özellikle antibiyotikler ve steroidlerle beraber pek çok deneysel ilaç tedavileri kullanılmıştır. Ayrıca sık dilatasyon, intraluminal stentler ve özofagus replasmanı gibi fibrozisi önlemek için daha birçok tedavi yöntemi önerilmiş olsa da hala standart bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir (14, 16). Bu nedenle mortalite ve morbidite oranlarını azaltmak için yeni terapötik ajanların geliştirilmesine ve standart bir tedavi protokolüne acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

Eksozomlar, çeşitli hücre türlerinden salgılanan ve biyoaktif bileşenler içerdği tespit edilen nano ölçekli hücre kaynaklı ekstraselüler veziküllerdir (17). Tükürük, idrar, plazma, anne sütü ve daha pek çok vücut sıvılarından elde edilebilen eksozom adındaki keseciklerin genetik malzeme aktarımı, bağışıklığı düzenleyici rolleri ve hücreler arası iletişimi sağlamaları, tedavi amaçlı kullanımlarının mümkün olduğunu göstermektedir. Eksozomlar doğaldırlar ve çok küçük olmaları sayesinde de her türlü vücut engelinden kolaylıkla geçebilmektedirler. Bu faydaları göz önüne alındığında eksozomların tedavi amaçlı kullanımları kaçınılmazdır (18).

Yapılan çok sayıda deneysel ve klinik çalışmaya rağmen mortalite ve morbiditesi yüksek olan ve halk sağlığını ciddi anlamda tehdit eden özofagus korozyonlarının kesin bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır. Anne sütünde de yüksek konsantrasyonda eksozomların olduğu son yıllardaki çalışmalarda kanıtlanmış olup çeşitli deneysel çalışmalarda kullanılmış olsa da özofagus korozyonları üzerine yapılmış bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır. Çalışmamızda NaOH ile özofagus korozyonu oluşturulan deneklere anne sütünden biyokimyasal yöntemlerle elde edilen eksozomdan 21 gün boyunca verilerek histopatolojik yöntemle özofagus hasarının kontrol grubuna göre kıyaslanması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Özofagus Embriyolojisi

Orofarengeal membran ile kloakal membran arasında uzanan primitif barsak tüpü ön, orta ve son olmak üzere üç kısma ayrılır. Embriyo gelişiminin 4. haftasından sonra ön barsakta trakeoözofageal kıvrımları, bu kıvrımlar da birleşerek trakeoözofageal septumu meydana getirir. Gelişimin 6-7. haftaları arasında septumun ventralinden trakeobronşial yapılar oluşurken, dorsalinden ise özofagus oluşmaktadır (19).

İki ayrı kanal haline gelmesine rağmen hala tek bir tüp halinde devamlılık gösteren özofagus ve trakea, bir yandan boyca uzarken bir yandan da özofagusun iki yandan birbirine yaklaşan lateral kıvrımlarının karşı karşıya gelmesiyle birbirinden ayrılmaya başlarlar. Bu ayrılma süreci trakeal bifurkasyonun 4. torakal vertebra seviyesine gelmesine kadar devam eder ve gestasyonun 36. gününde tam olarak tamamlanır (20).

Özofagus epiteli ve bezleri endodermden gelişirken, strüktürel yapısı foregut mezenşimal dokusundan gelişmektedir. Epitel hızla prolifer olurken 4. hafta sonrasında lümen tamamen kapanmakta, 8. hafta sonunda da içi boş organ halini almaktadır (19).

2.2. Özofagus Anatomisi

Özofagus, sindirim sisteminin farinks ile mide arasında yer alan dinamik, musküler ve tübüler bir organdır. Krikoid kıkırdak seviyesinde farinksin alt ucundan başlayıp, mediasten ve diyafragmayı geçtikten sonra kardial bölgede mideyle birleşir. Apendiksten sonra gastrointestinal sistemin en dar yeridir. Özofagusun uzunluğu term yenidoğanda 9-10 cm iken, yetişkinlerde ortalama 25-30 cm'dir. Özofagusun duvar kalınlığı ise 3-4 mm'dir (21).

2.2.1. Özofagusun Bölümleri

Servikal özofagus (C6-T1,2): 6. servikal vertebra ile 1-2. torakal vertebralar arasındaki yaklaşık 5 cm uzunluğundaki kısımdır. Ön komşusu olan trakeaya gevşek bağ dokusu ile tutunur. Trakea ile özofagus arasındaki oluktan nervus (n) laringeus rekürrens iki taraflı olarak yukarı doğru seyreder. Yanlarda arteria (a) karotis komminis ve glandula (gl) tiroideanın lobus dexter ve sinisterinin arka kısımları, arkada servikal vertebra, musculus longus colli ve fascia prevertebralis ile komşudur. Ayrıca sol tarafta duktus thorasicus bulunur (22).

Torakal özofagus (T1,2-T10,11): 1-2. torakal vertebralardan diafragmada özofageal hiatusa kadar uzanan 20 cm uzunluğundaki kısımdır. Üst mediastende trakea ile torakal vertebralar arasında seyreder. Arkus aortanın arka-sağ tarafından geçerek arka mediastinuma gelir. Aşağıda torasik aortayı önden çaprazlar ve 10. torakal vertebra seviyesinde diyafragmadan geçerek karın boşluğuna girer. Burada yukarıdan aşağıya doğru ön tarafında trakea, a. pulmonalis dextra, bronchus principalis sinister, perikardium ve diyafragma ile, sol tarafında arcus aortanın son parçası, a. subclavia sinistra, ductus thoracicus ve n. laryngeus recurrens ile, arkada vertebra, torasik aorta, musculus (m) longus colli, sağ posterior interkostal arterler, ductus thoracicus, vena (v) azygos, v. hemiazygos, v. hemiazygos accessorianın son kısımları ve plevra komşuluk eder. Radix pulmonalisin aşağısında sağ n.vagus özofagusun arkasında, sol n.vagus ise önünde dallanarak seyreder ve bir plexus oluşturur (22).

Abdominal özofagus (T10,11-T12): Hiatus ile kardiya arasındaki 2-5 cm uzunluğundaki kısımdır. Sol kenarı majör kurvatur ve mide fundusundan incisura cardiaca denilen bir çentik ile ayrılır. Sağ kenarı ise minör kurvatur ile devam eder. Karaciğerin sol lobunun arka yüzündeki sulcus özofagus içerisinde seyreder. Abdominal parçasının ön yüzü ve sol tarafı periton ile örtülüdür. Arkasında diyafragmanın crus sinistru ve a. frenica inferior sinistra yer alır (22).

2.2.2. Özofagusun Anatomik Darlıkları

Özofagusun üç yerinde fizyolojik darlık vardır. Bu bölgelerde gıdalar bir süre beklediğinden, korozif maddeler özellikle bu bölgelerde daha fazla yanığa sebep olurlar (23).

Krikofarengial darlık (C6): Üstte krikofaringal kas tarafından oluşturulmuş olup özofagusun en dar kısmıdır. Aynı zamanda burası özofagusun farinkse bağlandığı yerdir. Yaklaşık 1,5 cm'dir. Üst diş kavitesinden (ÜDK) itibaren yaklaşık 15 cm'dir (24).

Bronkoaortik darlık (T4): Sol ana bronşun arkus aortayı çaprazladığı yerdir. ÜDK'dan itibaren yaklaşık 27 cm'dir (24).

Diyafragmatik darlık (T11): Alt özofagus sfinkter mekanizması tarafından oluşturulmuş olup diyafram hiatusundaki kısımdır. ÜDK'dan itibaren yaklaşık 38-40 cm'dir (24).

2.2.3. Özofagusun Sfinkterleri

Üst özofageal sfinkter: Krikoid kıkırdak seviyesinde bulunur. Krikofarengial kasın özofagus etrafında bir halka yaparak aynı kıkırdağa tutunması ile oluşmuştur. Bu sfinkterin amacı lümen içeriğinin oral kavite ve larenkse regürjitasyonunu engelleyerek aspirasyonu önlemektir (25).

Alt özofageal sfinkter: Gerçek bir sfinkter yapısında değildir. Mide ve özofagus arasında yüksek bir basınç zonu oluşturan bu sfinkter, mide içeriğinin özofagusa reflüsünü önleyen en önemli oluşumdur (26).

2.2.4. Özofagusun Damarları

Arterleri: Özofagusun arterial dolaşımı segmenterdir. Servikal özofagus ve üst özofageal sfinkter inferior tiroid arter tarafından beslenir. Torakal özofagus aort ve bronş arterlerinin özofagusa ait dallarından beslenir. Abdominal özofagus ve alt özofagus sfinkteri ise sol gastrik arter ve sol frenik arterin dalları ile beslenir. Özofagusu besleyen arterler submukoza tabakasında sonlanır (23, 27).

Venleri: Özofagusun venleri de segmenterdir. Özofagusu drene eden venler özofagus çevresinde venöz bir ağ oluşturup sonunda azigos ve hemiazigos vene dökülür. Servikal periözofageal venöz plexus, inferior tiroid vene bu ven de sağ veya sol brakiosefalik vene dökülür. Torasik periözofageal venöz plexus, sağ tarafta azigosa, sağ brakiosefalik vene ve bazen de vertebral vene dökülür. Sol tarafta ise hemiazigos, aksesuar hemiazigos, sol brakiosefalik ven ve bazen de vertebral vene dökülür. Özofagusun en alt kısmına ait venöz kan ise sol gastrik ven aracılığıyla portal sisteme drene olur (23, 27).

Lenfatik Akımı: Özofagusun lenfatik drenajı, lamina propria ve submukozadaki zengin lenfatik damar ağı ile bunların birleştiği musküler ve adventisiyal lenfatik damarlar aracılığıyla olur (28). Servikal özofagus lenfatikleri derin servikal lenf nodlarına, torasik özofagus lenfatikleri mediastinal lenf nodlarına, abdominal özofagus segmentinin lenfatikleri ise çölyak lenf nodlarına drene olmaktadır (23).

Sinirleri: Özofagusun sinirleri trunkus sempatikus ve her iki n. vagustan gelir. Özofagusun üst 1/3 kısımdaki çizgili kas innervasyonu n. laryngeus rekurrensler tarafından sağlanır. Bu bölüme aynı zamanda 9-11. kafa çiftlerinden ve trunkus sempatikustan dallar gelir. Parasempatik lifler n. vagustan gelir ve özofagusun peristaltizmi ve submüköz tabakada yer alan bezlerin salgılarını düzenler. Sempatik lifler ise trunkus sempatikusun torasik bölümünden gelir (28).

2.3. Özofagus Histolojisi

Özofagus dört tabakadan oluşur. Bu tabakalar içten dışa doğru;

2.3.1. Tunika Mukoza

Özofagusun lümenine bakan en iç tabakasıdır. Lamina propria ve lamina muscularis mukoza olmak üzere 2 kata sahiptir. Nonkeratinize çok katlı yassı epitel ile örtülü olup özofagogastrik bileşkede ise kolumnar epitel ile devam eder. Özofagusun yassı epiteliyle midenin kolumnar epiteli arasındaki geçiş bölgesi endoskopik olarak tanınabilen referans noktasıdır. Buraya Z hattı denir (29).

2.3.2. Tunika Submukoza

Gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Kollojen lifler, kan damarları, lenf kanalları, sinirler ve derin müköz bezleri içerir. Derin müköz bezler tubuloalveolar yapıdadır. Bu bezlerin yaptığı mukus özofagus içeriğinin ıslak olmasını sağlar. Tunika submucosada bezlerin ve düz kasların fonksiyonlarını idare eden plexus nervorum submucosus (Meissner pleksusu) bulunur (30, 31).

2.3.3. Tunika Muskularis

Dışta longitudinal içte sirküler olmak üzere iki kat kas tabakasından oluşmuştur. Bu kas tabakası, özofagusun proksimal 1/3'lük kısmında çizgili kaslardan, distal 1/3'lük kısmında düz kaslardan, orta 1/3'lük kısmında ise hem çizgili hem de düz kaslardan oluşur. Ganglion hücreleri ve myelinsiz sinir lifleri bir araya gelerek plexus nervorum myentericusu (Auerbach pleksusu) oluşturur. Bu tabaka özofagusun peristaltizminden sorumlu tabakadır (30, 32).

2.3.4. Tunika Adventisya

Gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Özofagusu çepeçevre sarar ve komşu yapılara bağlar. Paraözofageal doku, küçük damarlar, lenfatik kanallar ve sinir lifleri burada yer alır. Ancak abdominal özofagusun dış kısmı tunica serosa (periton) ile kaplıdır. Özofagusun serozasının olmaması, perforasyon ve mediastinit gelişme riskini artırmaktadır (25).

2.4. Özofagus Fizyolojisi

Özofagusun primer fonksiyonu besinlerin farenskten mideye geçişini sağlamaktır. Diğer görevi ise mide içeriğinin istemsiz regürjitasyonunu önlemektir. Yutma işlemi orofarinkste başlatılıp pons ve medulla oblongata tarafından yönetilir. Yutma işleminin 3 fazı vardır: Başlangıç fazı, trigeminal, glossofaringeal ve vagus sinirlerinin afferent uyarıları ile başlar. Efferent lifler trigeminal, glossofaringeal ve

hipoglossal sinirleri ile farinks kaslarına gelir. Yutmanın birinci fazı oral fazdır ve istemlidir. Dilin yukarıya ve geriye basıncı ile lokma sıkıştırılır ve dil lokmayı farinkse doğru iter. Bu fazdan sonra yutma işlemi neredeyse durdurulamaz biçimde ilerlemeye başlar. İkinci fazı farinks fazı olup istemsizdir ve lokma farinkse geldiğinde yutma reseptörleri uyarılarak farinks kaslarında bir dizi otomatik kasılma meydana gelir. Eş zamanlı olarak epiglot trakeayı kapatır ve besinlerin trakeaya girişini önler. Özofagus açılır. Böylece farinksten başlayan peristaltik dalga faringoözofageal sfinkterin açılmasını takiben besinin özofagusa geçişini sağlar. Üçüncü faz ise besinin mideye geçişinin sağlandığı fazdır (33).

Özofagusta lokmanın geçişini sağlayan 2 tip peristaltik kontraksiyon vardır. Primer peristaltizm farinksten başlayıp 5-10 saniyede bir harekete geçip özofagusun alt ucuna kadar ilerleyen dalgalardır. Bu kontraksiyonları sağlayan refleksin afferent uyarıları farinks ve özofagus duvarındaki vagus uçları ile alınır. Yutma merkezinden gelen efferent motor uyarılar da yine aynı sinirin efferent lifleriyle taşınmaktadır. Ayakta duran bir şahıs tarafından yutulan gıda peristaltik dalgalardan daha süratli olarak, yaklaşık 4-8 saniyede özofagusun alt ucuna iletilir. Bu olayda, yer çekiminin de etkisi vardır. Özofagusun sirküler ve longitudinal kas lifleri hem lümenin daralmasını hem de özofagusun kısalmasını sağlar ve bunlar etkili peristaltizm için gereklidir. Sekonder peristaltizm ise özofagus duvarının gerilmesi sonucu miyenterik auerbach pleksuslarının uyarılmasıyla meydana gelir. Yutma olmadan başlayan ilerleyici peristaltik bir dalgadır. Özofagustaki bolusla veya kendiliğinden başlayabilir. Bu tip kontraksiyonlar yalnızca yutma esnasında değil, regurjitasyon hallerinde mide içeriğinin özofagusa çıkması halinde de meydana gelebilir. Primer peristaltik dalgalardan tek farkları, farinksten değil de özofagusta gıdanın bulunduğu yerden başlamış olmalarıdır. Sekonder peristaltik dalgaların aktiviteleri gıdanın tümü mideye ulaşınca kadar devam eder. Bu sırada özofagusun alt bölümünde 30-60 mmHg lik bir basınç artışı meydana gelir ve gevşemiş olan kardias açılarak lokma mideye geçer. Özofagus içi basıncın düşmesi sonucu kardias kendi tonusu ile tekrar kapanarak geri dönüş engellenir (34).

2.5. Özofagusun Koroziif Madde Yanıkları

Koroziif maddeler temas ettikleri dokuyu hasarlayan veya yıkım oluşturan maddelerdir (35). Koroziif özofajit, bu maddelerin içilmesi sonrası özofagusta değişik derecelerde hasarlanmaya neden olan, hatta bazen mortal seyredebilen ve hastaların yaşamları boyunca önemli morbidite gelişmesine de neden olabilen bir tablodur (36).

Koroziif yanıklar iki dönemde zirve yaparlar; olguların %75'ini 5 yaşın altındaki çocuklar oluşturur. Çünkü bu yaş grubundaki çocuklarda fazla merakla öğrenme isteği ve buldukları her şeyi ağızlarına götürmeleri söz konusudur. Bu nedenle de kazara koroziif madde alımı çocuklarda sık görülür. İkinci zirve dönemi ise adolesan ve erken yetişkinlik döneminde görülmektedir ki bu dönemde intihar amaçlı alımlar gündeme gelir (37).

Çocuklar genel olarak koroziif maddeyi yutmadan önce tadını alır almaz tükürürler ve böylece hasar en az seviyede olur. Yetişkinlerde ise genellikle intihar amacıyla alım olduğundan daha fazla miktarda koroziif madde maruziyeti olup, özofagus ve mide hasarı daha fazla olmaktadır (6). Koroziif madde içilmesinde ölüm oranı %10 ile %20 arasındadır ve bu oran intihar amaçlı alımlarında %78'e kadar yükselmektedir (37).

Gelişmiş ülkelerde aileler yoğun eğitim programları yardımıyla bilinçlendirilerek koroziif madde yaralanmalarında %75'lere varan azalma sağlanmıştır. Ancak çoğu vakaların rapor edilmediği gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerde bu durum artarak devam eden ciddi bir sorundur (7).

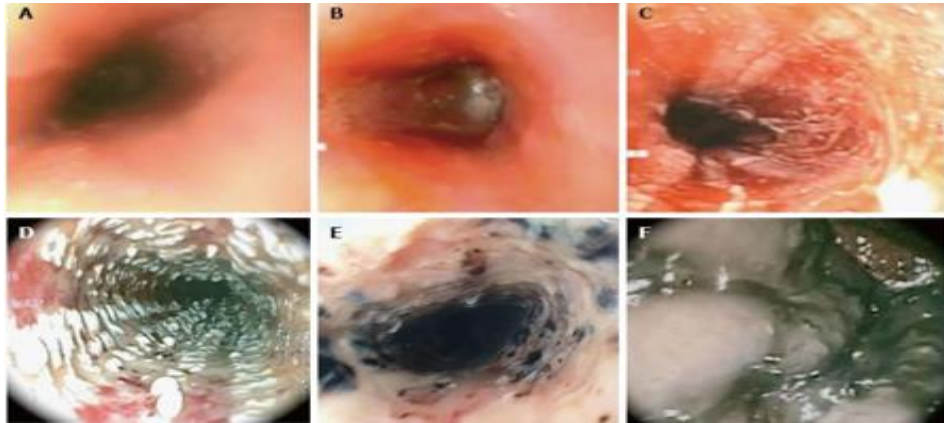
Ülkemizde koroziif maddeler sıvı veya kristal formda, herhangi bir kısıtlama olmadan satılmaktadır. Bu tür koroziif maddelerin çeşitli meyve suyu şişeleri veya içecek kaplarında saklanması, çocukların ulaşabilecekleri yerlere koyulması ve temizlik maddesi kalıntısı olan kapların çocukların ulaşabildiği çöplere atılması önlenemez, ancak sık yapılan hatalardandır (38).

Ülkemize ait geniş bir serinin sunulduğu Karaman ve ark. nın çalışmasında 1990-2012 yılları arasında koroziif madde alımı nedeniyle başvuran 968 hasta retrospektif olarak incelenmiştir. Hastaların yaşları 10 gün ile 17 yaş arasında değişmekteyken, cinsiyet dağılımı %58 erkek, %42 kız olarak saptanmıştır. Koroziif madde %75 vakada alkali, %18 vakada asit özellikte olup, en çok alınan koroziif

maddeler; çamaşır suyu, yağ çözücü, kireç çözücü ve hidroklorik asit olarak bildirilmiştir. Striktür gelişimi en çok kostik soda, amonyum klorür ve yağ çözücü alımı sonrası görülmüş, çamaşır suyu alımına bağlı darlık gelişimi tespit edilmemiştir. Alkali veya asit maddeleri almış olan çocuklarda korozif striktür gelişimi oranı sırasıyla %8,2 ve %2,9 olarak saptanmış, çamaşır suyu içen vakalar dahil edilmediğinde alkali alımı sonrası striktür gelişim oranı %23 olarak bildirilmiştir (39).

Korozif maddenin içilmesi sırasında ilk olarak ağız ve farenks bölgesi, daha sonra da özofagus ve mide etkilenmektedir. Özofagusun st bölümünde çizgili kasların daha yoğun ve klirensin daha yavaş olması nedeniyle hasarlanma en çok bu bölgede görülmektedir (40). zofagustaki hasarın yaygınlığı ve şiddeti; içilen maddenin konsantrasyonuna, miktarına, pH'ına, fiziksel şekline (katı veya sıvı), mukozayla temas süresine veya ikincil enfeksiyonlar gibi birçok faktöre bağlıdır (15, 41).

Özofagus yanıklarının evrelendirilmesine fleksible zofagoskop ile elde edilen sonuçlara göre Di Costanzo ve arkadaşlarının tanımladığı dereceleme sistemi kullanılmaktadır (42) (şekil 1). Özofagoskopi ile yaranın derinliğini saptamak ise mümkün değildir. Bu nedenle endoskopik derecelendirme klinik gidiş ile paralel olarak değerlendirilmelidir.



şekil 1. Akut zofagus Yanıklarının Endoskopik Bulgulara Göre Derecelendirilmesi (Di Costanzo Sınıflaması) (42).

- A: evre 0: Normal mukoza
- B: evre I: Mukozada dem ve eritem
- C: evre IIA: Hemoraji, erozyon, yüzeyel lineer ülserler
- D: evre IIB: Kanama ve dairesel ülserler
- E: evre IIIA: Fokal nekroz, koyu gri veya kahverengimsi siyah ülserler
- F: evre IIIB: Yaygın nekroz, koyu gri veya kahverengi siyah ülserler (42).

Endoskopi esnasında üçüncü derece yanık veya çevresel bir hasar görüldüğü takdirde endoskopi hemen sonlandırılmalı ve tedavi protokolüne hızla başlanmalıdır. Stridorun eşlik ettiği faringeal yanıklarda havayolu obstrüksiyonuna neden olabileceğinden endoskopi kontraendikedir (43).

2.5.1. Alkali ve Asidik Korozyif Madde Hasarları

Alkali alımı akut olarak penetrasyonla sonuçlanan likefaksiyon nekrozuna sebep olur. Vücut sıvıları alkali maddeyi tamponize edene kadar hasar, mukoza ve özofagus duvarını geçerek mediastene doğru hızla ilerler. Granüler veya tablet formundaki alkali maddeler, sıvı olanlara göre daha fazla doku hasarına sebep olurlar. Bunun sebebi de özofagusta kalış süresinin daha fazla olmasıdır. Buna ek olarak alkali maddeler daha güçlü yüzey gerilimine sahip oldukları için dokuda daha uzun süre kalır ve bu da hasar miktarının artmasına neden olur (44).

Asit alımı ise mukozal kan damarlarında tromboz ve bağ dokusunun da desteği ile koruyucu skar oluşturarak süperfisiyal koagülasyon nekrozuna sebep olur. Yutulduğunda orofarinkste ağrıya sebep olduğundan asit maddelerin yutulması sınırlıdır. Ayrıca asidik maddeler baziklere göre daha akışkan oldukları için, özofagustan geçiş süreleri daha hızlıdır. Bu nedenle de özofagus mideye göre daha az hasar görür (45).

Tablo 1. Sık Karşılaşılan Koroziif Maddeler (7)

Koruzik Madde	Tip	Kullanım Alanı
Asitler	Sülfürik asit	Piller
		Endüstriyel temizleyiciler
		Metal kaplayıcılar
	Oksalik asit	Boya incelticiler
		Metal temizleyiciler
	Hidroklorik asit	Solventler
		Metal temizleyiciler
		Tuvalet temizleyiciler
Alkaliler	Pas giderici ürünler	
	Fosforik asit	Tuvalet temizleyiciler
	Sodyum hidroksit	Gidertemizleyici temizlikmaddeleri
		Sabun imalatı
	Potasyum hidroksit	Fırın temizleyiciler
Amonyak	Sodyum karbonat	Deterjanlar
		Sabun üretimi
	Ticari amonyak	Meyve kurutma amaçlı
Deterjanlar	Amonyum hidroksit	Ev temizleyiciler
	Sodyum hipoklorit	Ev temizleyiciler
Ağartıcılar	Sodyum polifosfat	Ev ağartıcıları (çamaşır suyu)
	Potasyum permanganat	Endüstriyel deterjanlar
		Dezenfektanlar, saç boyaları

Ayrıca aşırı sıcak mamalar da koroziif özofajite sebep olabilmektedir.

2.5.2. Koroziif Yanıklardaki Hasarın Dönemleri

Akut dönem (1-4gün): Koroziif maddeye maruz kalınmasının hemen ardından başlayan, hasara karşı inflamatuvar yanıtın rol aldığı ilk dönemdir. Bu dönemde, intraselüler proteinlerin koagülasyonu hücre nekrozu ile sonuçlanır. Nekroz alanını çevreleyen canlı dokularda yoğun inflamatuvar reaksiyon gelişir (46). İnflamasyonla beraber serbest oksijen radikalleri salgılanır. Serbest oksijen radikallerinin ve sitokinlerin oluşumu, akut fazda doku hasarı gelişiminde önemli rol oynarlar (41).

Subakut dönem (4-15 gün): Granülasyon dokusu gelişimi, fibroblastik proliferasyon ve kollajen depolanmasının eşlik ettiği fazdır. Fibroblastlar ve düz kas hücreleri submukoza ve subserozada matriks proteinlerini üretirler. Eğer hasar mukoza tabakasında sınırlı ise onarımı migrasyon ve proliferasyon ile hızla gerçekleştirilerek,

bir hafta içinde sonlandırılabilir. Fakat hasar tam kat gerçekleşirse, fibroblastik aktivite ön plana çıkarak skar oluşumuna neden olur. Kollajen üretiminin artması ile yara gerilimi sağlanarak striktür oluşumuna zemin hazırlanır. Neovaskülarizasyonun eşlik ettiği bu dönem, özofagus dokusunun gerilime en hassaslaştığı dönem olduğu için endoskopiden kaçınılması gerekir (47).

Skatrizasyon dönemi: Üçüncü haftada mukozal reepitelizasyonun başladığı evredir. Akut fibroblastik proliferasyon vardır. Submukoza ve muskularis eksternada striktür formasyonu başlangıcı görülür. Bu dönemde dairesel ve longitudinal kontraksiyonlarla özofagusta daralma ve aynı zamanda kısıalma gözlenir (41, 48).

2.5.3. Korozi Yanık Sonrası Komplikasyonlar

Erken dönem komplikasyonlar

Kimyasal pnömoni, aspirasyon pnömonisi, atelektazi, disfaji, üst gastrointestinal kanamalar, perforasyon, fistül gelişimi ve ölümdür. Özofagus perforasyonu, korozi maddelerin alımıyla oluşan derin yanıklar ve frajil özofagusa uygulanan endoskopik girişimler sonucu meydana gelebilir. Mediastinit, perforasyon veya zayıflamış özofagus duvarından bakteri invazyonu sonucu olur. Özofago-trakeo-bronşiyal ve özofagoaortik fistül, nadir ama hızla ölümcül olan komplikasyonlardır (37).

Geç Dönem Komplikasyonlar

Stiktür oluşumu: Özofagustaki yanığın iyileşme sürecinde yara iyileşmesinin tüm fazları (inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon) görülmektedir. Bu iyileşme sürecinin sonunda da fibrozis, skar oluşumu ve darlık ortaya çıkmaktadır (49). Özofageal striktürler morfolojik olarak basit ve kompleks olarak iki grupta sınıflandırılabilir. Basit striktürler endoskopun geçişine izin veren, kısa, fokal ve açılı olmayan striktürlerdir. Kompleks striktürler ise açılı, uzun (>2 cm), dairesel striktürlerdir ve lümen belirgin olarak daralmıştır (50).

Özofageal motilite bozukluğu: Korozi yanıklarından sonra özofagus motor fonksiyonunda ciddi bozuklukların geliştiği bildirilmiştir. Bu bozuklukların kalıcı olup olmadığı ise tartışmalıdır. Yapılan bir çalışmada ciddi özofageal yanığı bulunan 20

çocukta özofageal motilite çalışması yapılmış ve 7 hastada total motilite kaybı olduğunu tespit edilmiştir. Hastaların tamamında alınan maddenin alkali olduğu, ciddi striktürlerin varlığı ve hastaların dilatasyon programına alındıkları belirtilmiştir. 3 ay sonra yapılan kontrollerde peristaltizm kaybının devam ettiği saptanmıştır. Yazarlar bu kaybın nedenini alkali kostik maddelerin likefaksiyon nekrozuna neden olarak kas tabakasını hasarlamasına bağlamışlardır. Mukozal düzeyde koagülasyon nekrozuna neden olan asidik kostik maddelerde ise akut fazda peristaltizm kaybı olduğunu, ancak kontrollerde peristaltizmin geri döndüğünü göstermişlerdir (51).

Gastroözofageal reflü: İntraabdominal özofageal segmentin uzunluğu alt özofageal sfinkterin düzgün çalışması için önemli bir faktördür. Koroziif madde alımından sonra torasik özofagus kontrakte olur ve intraabdominal özofagus yukarı doğru çekilir. Bunun sonucunda da alt özofageal sfinkter efektif çalışamaz hale gelir ve gastroözofageal reflü de kaçınılmaz bir durumdur (52).

Mide çıkış obstrüksiyonu: Koroziif madde alımı sonrasında erken doyma ve kilo kaybı semptomları mide çıkış obstrüksiyonunu düşündürür. Bu komplikasyon ilk birkaç yıl içerisinde görülebilir. Öncelikle asit alımına spesifik bir komplikasyondur. Ancak alkali hasarı sonrasında da meydana geldiğini rapor etmiş yayınlar mevcuttur (53).

Özofagus karsinomu: Özofagus koroziif hasarının malignite riskini arttırdığı net olarak kabul edilmektedir (54).

2.5.4. Koroziif Özofagusta Tedavi Yaklaşımı

Akut dönemde çocuklarda gelişebilecek şok, larengeal ödem ve aspirasyon pnömonisine karşı önlem alınmalıdır. Genel durumu stabil olgularda akciğer grafisi çekilip mediastinal yapılar ve akciğer parankimi değerlendirilmelidir. Batın muayenesinde olası gastrik perforasyon ve peritonit bulguları bakılmalıdır. Hemogram ve elektrolit değerleri görülmelidir. Aileden çocuğun içtiği maddenin cinsi, yoğunluğu ve miktarı hakkında bilgi alınmaya çalışılmalıdır. Ağız çevresi ve orofarenksin durumu ile aileden alınan bilgiler özofagus yanığı olup olmadığı hakkında bizlere bilgi verebilmektedir (37).

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi kliniğimizde korozif madde alım şüphesi olup acil servise gelen hastaların öncelikle ayrıntılı anamnezleri alınıp fizik muayeneleri yapılır. Akciğer grafisi çekilip, hemogram ve elektrolit değerlerine bakılır. Gerçekten korozif teması düşünülen hastalar yatırılır ve en az 24 saat beslenmeleri kesilir. İntravenöz sıvı replasmanı ve beraberinde ampirik olarak antibiyotik başlanır. Özellikle hipersalivasyonu olan olgular tükürüklerini rahatça yutar hale gelene kadar oral kapalı izlenmeye devam edilir. Tüm olgular ateş, takipne, taşikardi gibi mediastinit bulguları açısından yakın takip edilir. Bir günlük açlık sonrası yutma sorunu olmayan, vital bulguları stabil olgular rejim 1 ile beslenmeye başlanır. Rejim 1'i tolere ettikleri gözlemlenirse rejim 2'ye geçilir ve hastaya antibiyotik reçete edilerek taburcu edilip 3. hafta poliklinik kontrolüne çağırılırlar. Yatışları sırasında aileye olası striktür, perforasyon gibi komplikasyonlar ve semptomları detaylı şekilde anlatılır. Takip sürecinde semptomatik hale gelen tüm olgular tekrar yatırılıp özofagografi çekilirken, gerekli olgulara endoskopi yapılır. Bu olgularda beslenmeyi engelleyecek düzeyde özofagus strüktürü saptanırsa öncelikli olarak beslenmenin devamını sağlayabilmek için Stamm tipi gastrostomi açılır. Cerrahi olarak da kolonik interpozisyon tercih edilir. Diğer stabil olan olgular 3. hafta poliklinik kontrolünde beslenme güçlüğü, solunum sıkıntısı gibi semptomlar açısından sorgulanır ve şüpheli olgulardan özofagografi istenir. 3. hafta sonrasında asemptomatik olgular 3. ay kontrolüne çağırılırlar. Semptomatik olgular ise özofagus grafilerindeki bulgulara göre gerekirse endoskopi yapıp dilatasyon programına alınır. Kronik darlık gelişen olgularda ilk hedef büyüme gelişme eğrilerini bozmayacak şekilde beslenmenin devamının sağlanması ve mümkün olduğunca olguların kendi özofaguslarının korunmasıdır.

Endoskopi; korozif maddenin yutulması sonucu özofagus, mide ve duodenum hasarlarının ciddiyetinin ve lokalizasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir araçtır. Kime ne zaman endoskopi yapılacağı eskiden beri devam eden tartışma konusudur. Kasıtlı olarak korozif madde yutan hastalara acilen endoskopi yapılması konusunda genel bir uzlaşma vardır. Çünkü intihar girişiminde alınan madde miktarı genellikle fazladır. Ancak özellikle çocuklarda görülen korozif maddelerin kazara yutulması durumunda ise endoskopinin uygulanıp uygulanmayacağı belirtilere ve semptomlara bağlıdır (55, 56).

Sistemik steroid uygulanması, korozif özofagus yaralanmalarının tedavisinde en çok tartışma yaratan tedavi yöntemlerindendir. Antiinflamatuvar ilaç olan steroidler yaranın gerilme gücünü, epitelizasyon hızını ve neovaskülarizasyonu azaltarak yara kontraksiyonunu inhibe eder. Bazı çalışmaların sonuçlarına göre ise kortikosteroid kullanımının yararlı olmadığı, tedavi ne olursa olsun korozif özofagus yaralanmalarında değişen oranlarda striktür geliştiği, striktür gelişiminin sadece yanığın ağırlık derecesi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (57, 58). Ayrıca steroid kullanımının striktür ve perforasyon gelişme riskinin yüksek olduğu üçüncü derece yanıklarda septik komplikasyonları arttırdığı ve perforasyon bulgularını gizlediği için önermeyen yayınlar da mevcuttur. Bununla birlikte bazı yazarlar da birinci ve ikinci derece özofagus yanıklarında steroid kullanılması durumunda %0–25, kullanılmadığı durumda ise %88 oranında striktür geliştiğini bildirmişlerdir (59, 60).

Dilatasyonlar, anterograd ya da retrograd yolla yapılabilir. Cheliaver Jackson'ın 1902'de distalden aydınlatmalı özofagoskopu icat etmesiyle dilatasyonlar antegrad olarak ve striktür görülerek yapılmaya başlanmıştır. Tucker ise 1924'te gastrostomi yapılan hastalarda retrograd dilatasyonu geliştirmiştir (61). 1981 yılında ise London tarafından tanımlanan endoskopik ve radyolojik kontrollü balon dilatasyonu yöntemi ile daralan segment radial ve uniform olarak genişletilmeye başlanmıştır (62).

Özofagus yanıklarına bağlı darlıkların klasik tedavisi aralıklı dilatasyonlardır. Belirgin striktür gelişmiş olgularda ise, dilatasyon başarısız kalabilmektedir. Bu durumda cerrahiye başvurulmalıdır. Cerrahi teknikler; özofageal replasman, kolonik interpozisyon, jejunal interpozisyon, gastrik pull-up'tır (38).

Korozif madde alımlarında bazı kontrendike durumlar vardır; kusmaya neden olan emetikler kullanılmamalıdır. Çünkü özofagus ve orofarinksin korozif maddeye tekrar maruz kalmasına ve hasarın artmasına neden olur. Ayrıca nötralize edici ajanlar (zayıf asit veya baz) kullanılmamalıdır. Çünkü hasar genel olarak anlıktır ve dahası nötralizasyon işlemi esnasında oluşan reaksiyon ısı üretimine neden olur. En önemlilerinden birisi de nazogastrik sonda takılmamalıdır. Çünkü öğürmeye ve kusmaya neden olup hasarı arttırabilir. Hatta zayıflamış olan özofagus ve midenin perforasyonuna dahi neden olabilir (63, 64).

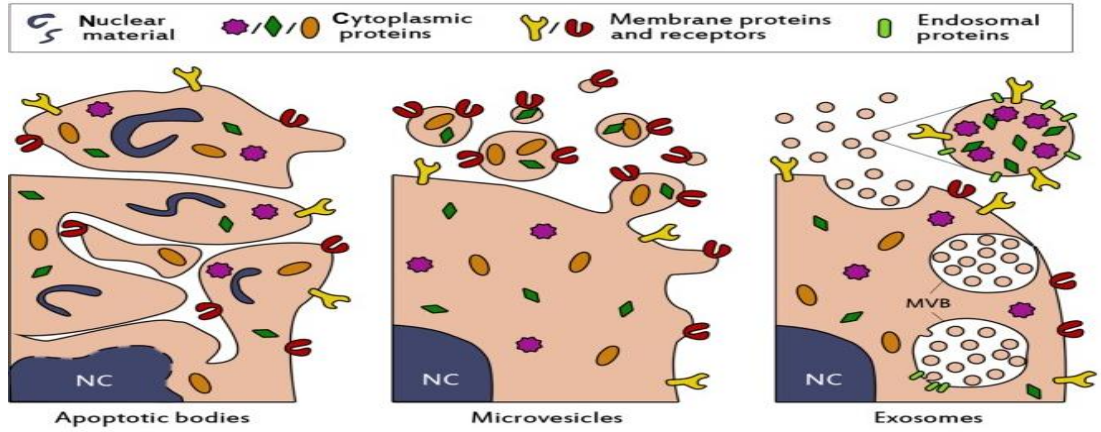
2.5.5. Koroziif Özofagus Yanıklarında Koruyucu Hekimlik

Ülkemizde konu ile ilgili yasal düzenlemeler olmasına rağmen, koroziif özofagus yanıkları çocukluk çağının ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda koroziif özofagus yanıklarının eğitim düzeyi düşük ailelerin çocuklarında daha yaygın olduğu saptanmıştır. Temizlik malzemelerinin üzerindeki yazıların çok küçük harflerle yazılmış olması ve toplumun kutu üzerindeki yazıları okumak gibi bir alışkanlığının olmaması sorunu daha da büyötmektedir. Ayrıca temizlik malzemeleri üreten firmaların ürünlerin üzerine çocuklar için ilgi çekici olabilecek renkli etiketler yapıştırmaları önlenmeli, kapakların sadece yetişkinler tarafından açılabilircek şekilde dizayn edilmesi sağlanmalıdır. Küçük atölyelerde üretilen isimsiz, açık ve kiloyla satılan temizlik maddeleri meşrubat ve su şişelerinde satılmakta olup bu şişeler de çocuklar tarafından yanlışlıkla içilebilmektedir. Bu nedenle ailelerin bu tür maddeleri doğru biçimde ve çocukların ulaşamayacağı yerlerde saklamaları konusunda ciddi eğitimden geçmeleri gerekmektedir (37).

2.6. Eksozom

Ekstraselöler veziköller (EV), hücre dışı ortama salgılanan mikroRNA (miRNA), mesajcı RNA (mRNA), DNA ve proteinler gibi hücreye özgü biyomolekülleri taşıyan lipit tabakalı nano veziköllerdir. EV' ler serum, plazma, idrar, amniyotik sıvı, sinoviyal sıvı, anne sütü ve tükürük gibi tüm vücut sıvılarından elde edilebilmektedir. EV' lerin hücreler arası haberleşme, genetik materyal taşıma, sinyal iletimi ve bağışıklığı düzenleme gibi önemli biyolojik görevleri olduğu bilinmektedir (65).

EV'ler biyolojik oluşumları, boyutları ve hücrel kökenlerine göre apoptotik cisimler (apoptozomlar), mikroveziköller ve eksozomlar olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. Ekstrasellüler Veziküllerin Biyolojik Olarak Bilinen Farklı Tipleri (66)

Apoptotik cisimler: Normal hücrelerin ölüm mekanizması olan apoptozis sonucu ortama bırakılan veziküllerdir. En büyük ekstraselüler vezikül grubudur. 50 ila 5000 nanometre (nm) arasında değişen bir çapa sahiptirler.

Mikroveziküller: Plazma membranından tomurcuklanma yoluyla oluşan veziküllerdir. 50 ila 1000 nm arasında bir boyuta sahiptirler.

Eksozomlar: Tüm hücreler tarafından ortama salınan, 40 ila 100 nm arasında çapa sahip olan en küçük ekstraselüler vezikül grubunu oluşturmaktadırlar (67).

2.6.1. Anne Sütü Eksozomu

Eksozomlar, tüm vücut sıvılarından elde edilebilen ekstraselüler keseciklerdir. Daire benzeri bir morfolojidedirler ve çift fosfolipit tabaka ile çevrilidirler (65).

İçlerinde proteinler, lipitler, mRNA'lar, miRNA'lar, lncRNA'lar (uzun kodlamayan RNA) ve DNA fragmanları gibi birçok biyomolekül taşırlar (68).

1980'li yıllarda ilk keşiflerini takiben sadece istenmeyen molekülleri hücre dışına ataktan sorumlu hücre artıkları olarak bilinseler de son 20 yılda yapılan çalışmalar bu keseciklerin önemli fizyolojik görevleri olduğunu ortaya koymuştur. Hücreler arası haberleşme, sinyal iletimi, genetik malzeme aktarımı ve bağışıklal yanıtın düzenlenmesi gibi birçok biyolojik işlevde önemli rol üstlendikleri yapılan çalışmalar ile gözler önüne serilmiştir (18).

Eksozomlar yapıları gereği yapay taşıyıcılara göre oldukça önemli faydalar içermektedirler. Doğal olmaları en önemli faydaları olmakla birlikte, hücre dışı ortama

salınan eksozomların serum (69), plazma (70), idrar (71), amniyotik sıvı (71), sinoviyal sıvı (72), anne sütü (73) , tükürük (73), beyin omurilik sıvısı (BOS) (74), insan sperması (75) gibi vücut sıvılarından telde edilebilmeleri hem düzgün biyodağılımlarının olduğunu hem de vücut sıvılarında kararlı bir yapıya sahip olduklarını göstermektedir. Ayrıca çok küçük olmaları sayesinde her türlü vücut engelinden geçebilmektedirler. Bu faydaları göz önüne alındığında eksozomların tedavi edici amaçlı kullanımları yaygınlaşmaktadır (18).

Eksozomların içerikleri, bunları salgılayan hücrelerin kökeni ve patofizyolojisi ile yakından ilgilidir. Isı-şok proteinleri, hücre iskelet sistemi proteinleri, tetraspanin ailesine dahil olan proteinler tüm eksozomlarda görülür. Özellikle CD9 ve CD63 tetraspaninler eksozomları diğer ekstrasellüler veziküllerden ayırmada kullanılan membran proteinleridir. Eksozomlarda bu genel proteinlerin yanı sıra köken aldıkları hücrelere spesifik olan proteinler de yer almaktadır. Örneğin dendritik hücrelerden köken alan eksozomlarda CD80, CD86 yüzey antijenleri bulunurken, kanser hücrelerinden köken alan eksozomlarda çeşitli tümör antijenleri bulunmaktadır (68).

Eksozomların lipid içeriği hücre membranının lipid içeriğinden farklıdır. Eksozomları çevreleyen lipid tabakada hücre membranına göre sfingomyelin, seramid, kolesterol ve gliserolfosfolipidler daha fazla bulunmaktadır. Bu lipid tabakası hem eksozom stabilitesinin korunmasını sağlamakta hem de hücre tarafından eksozomun salınımını kolaylaştırmaktadır (76).

Anne sütünün yüksek konsantrasyonlarda eksozom içerdiği bilinmektedir (77). Anne sütünden üretilen eksozomlar üzerinde yakın zamanda yapılan proteomik çalışma, bu veziküllerin gastrointestinal ve bağışıklık sisteminin gelişimini destekleyebileceğini gündeme getirmiştir (78).

Pek çok çalışmada süttten üretilen eksozomların bağırsak epitel hücre canlılığını ve proliferasyonunu arttırdığını, bağırsak kök hücre aktivitesini de uyardığını göstermiştir (77). Yani anne sütü eksozomlarının nekrotizan enterokolite (NEK) karşı faydalı etkileri bildirilmiştir (17, 77, 79, 80).

Çalışmamızda kullandığımız anne sütü eksozomu, onam formları imzalatılarak gönüllü annelerden alınan taze sütün pek çok biyokimyasal işlevlerden geçmesiyle elde edilmiş olup gastrointestinal sistemin bir parçası olan özofagusun korozyon sonucu harabiyetinde pozitif bulgular bulmak amaçlanarak kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Deney Hayvanları Etik Kurulunun 2020/21 protokol numaralı onayı ile Karadeniz Teknik Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda 8'er adet, ağırlıkları 190-315 gr arasında değişen, Sprague Dawley cinsi ratlarla 4 grup şeklinde çalışılmış olup deneyde kullanılan ratlar aynı merkezden temin edilmiştir. Deney hayvanlarının histopatolojik incelemeleri KTÜ Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Anne sütü eksozomu ve %12,5 NaOH çözeltisi KTÜ Biyokimya Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır. Çalışmamız Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

3.1. Deney Hazırlığı ve Yapılışı

Araştırmada 8'er adet, ağırlıkları 190-315 gr arasında değişen, Sprague Dawley cinsi ratlardan oluşan 4 grup kullanıldı. Deney süresi 21 gün olarak belirlendi. Çalışma gününe kadar ratlar 22 ± 2 °C sabit oda sıcaklığı, %60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık standart laboratuvar şartlarında kafeslerde 8'er adet ve altlarında talaş olacak şekilde barındırıldı. Ratlar işlemiden 6 saat öncesine kadar standart rat yemi ve su ile beslendiler. İşlem öncesi tüm ratlar tek tek tartıldı. Deney süresince kontrol ve bakımları aralıksız ve düzenli olarak yapıldı. Anestezi için 50 mg/kg ketamin hidrojen klorür ve 10 mg/kg xylazin HCl intraperitoneal olarak uygulandı. Özofagus yanık modeli oluşturmak için de %12,5 NaOH kullanıldı.

3.2. Anne Sütü Eksozomunun Üretimi

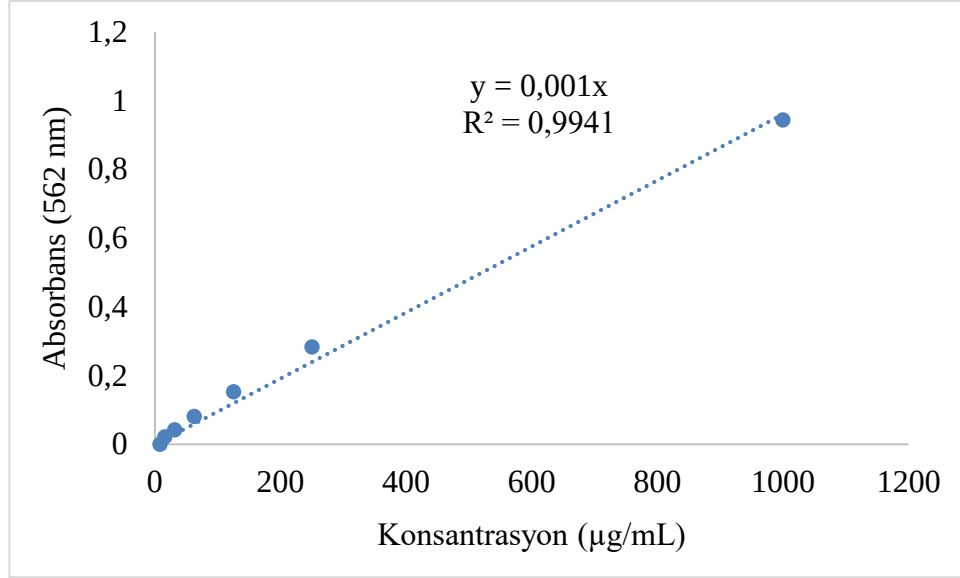
3.2.1. Anne Sütünün Toplanması ve Eksozom İzolasyonu

KTÜ Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi Servisinde yatan sağlıklı gönüllü annelerden (onam formu imzalatılıp) yaklaşık 200-300 mL anne sütü alındı. Alınan anne sütü örnekleri analiz edilene kadar -80 °C'de saklandı. Depolanan ham anne sütü örnekleri (yaklaşık 200-300 mL) buz üzerinde çözüldü. Anne sütünden eksozom

izolasyonu diferansiyel santrifüj ve ultrasantrifüj ile yapıldı. Anne sütü örnekleri, santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra, süt lipid tabakasını ayırmak için +4°C, 10 dakika, 3,000×g'de (F0650 rotor, Beckman Coulter Instruments, USA) santrifüj edildi. Ardından, büyük hücresel kalıntıları ve kalan lipidleri uzaklaştırmak için +4°C, 30 dakika, 5,000×g'de (F0650 rotor, Beckman Coulter Instruments, USA) santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süt süpernatanı yeni bir tüpe alınarak +4°C, 10 dakika, 12,000×g'de (F0650 rotor, Beckman Coulter Instruments, USA) daha küçük hücresel kalıntıları ve apoptotik hücreleri uzaklaştırmak için santrifüj edildi. Santrifüj edilen süt süpernatanı ham eksozom izole etmek için JS 24.15 rotorunda (Beckman Coulter Instruments, USA) +4°C, 2 saat, 110,000×g'de ultrasantrifüj edildi. Ham eksozom pelleti fosfat tamponlu salin (PBS) (pH 7.4) içerisinde süspanse edildi ve izole edilen eksozomlar hem deney aşamalarında kullanılmak üzere hem de doğrulanması için -80°C'de saklandı. Deneyde kullanılacak olan anne sütü eksozomlarının protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) yöntemiyle 1 µg/mL olacak şekilde ayarlandı.

3.2.2. Anne Sütü Eksozomunun İmmünoelot Yöntemiyle Doğrulanması

Anne sütü eksozom proteinlerinin eldesi için proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli (PPC1010, SIGMA) içeren RIPA lizis solüsyonu (SE3924401, SERVA) eklenerek eksozomlar 15 dakika buz üzerinde bekletildi. Sonrasında 15,000xg, +4°C 15 dakika santrifüj edilerek protein elde edildi ve konsantrasyonları BCA kiti (LOT: UD282967, Thermo Scientific, USA) kullanılarak analiz edildi. Bu yöntem, alkali ortamda mevcut proteinler tarafından Cu²⁺'nin Cu¹⁺'e indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan bakır katyonunun (Cu¹⁺) BCA ile reaksiyona girmesiyle kolorimetrik tayin gerçekleştirilir. Çalışmada standart olarak 2 mg/mL konsantrasyonda sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Anne sütü eksozom proteinlerinden elde edilen protein fazların konsantrasyonları sırasıyla Şekil 3'teki standart grafiğine göre µg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 3. Anne Sütü Eksozomlarında Protein Miktarını Hesaplamak İçin Kullanılan Standart Grafiği

3.2.2.1. SDS-PAGE Aşaması

Anne sütü eksozomlarından elde edilen total proteinlerle SDS-PAGE aşaması, Laemmli tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirildi (81).

Kullanılan Çözeltiler

Ayrırma Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 8.8): 44.2 g Tris HCl 180 mL deiyonize suda çözüldü, pH 8.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 200 ml'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Yükleme Jel Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 6.8): 22.1 g Tris HCl 90 mL deiyonize suda çözüldü, pH 6.8'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

%10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS): 2 g SDS 20 mL deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

SDS-PAGE Tank Tamponu (10 X): 30.3 g Tris HCl, 144 g glisin ve 10 g SDS (%0,1 w/v) 1 L deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı. Çalışma çözeltisi deiyonize su ile 1X olacak şekilde sulandırıldı.

%10 (w/v) Amonyum Persülfat (APS): 100 mg APS 1 mL deiyonize suda çözüldü ve 4 °C'de saklandı.

SDS PAGE Numune Yükleme Tamponu (5X): 0.67 mL yükleme tamponu, 5 mL gliserol, 0.5 g SDS, 5 mg bromfenol mavisi, 0.5 mL 2-merkaptetanol, 3.8 mL deiyonize su içerisinde çözüldü ve aligotlanarak -20 °C’de saklandı.

Sabitleme Çözeltisi: %50 izopropanol, %10 TCA ve %40 saf su içerecek şekilde hazırlandı (jeldeki proteinlerin sabitleştirilmesi için kullanılır.).

Renklendirme Çözeltisi: 0.66 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 120 mL metanol, 24 mL asetik asit ve 120 mL saf su ilavesi ile hazırlandı.

Renksizleştirme Çözeltisi: %7,5 asetik asit, %5 metanol ve %87,5 saf su içerecek şekilde hazırlandı.

SDS- PAGE Jellerinin Hazırlanması

Çalışmalarda %8’lik ayırma jeli ve %15’lik yükleme jeli kullanıldı.

Tablo 2. %5-12’lik (2x1mm) SDS Poliakrilamid Jelinin Hazırlanışı

Kimyasallar	%5’lik Yükleme Jeli (mL)	%12’lik Ayırma Jeli (mL)
ddH₂O	3,08 ml	4,34 ml
Acrylamid (%40 mix)	0,56 ml	3,00 ml
0.5 M Tris-HCl pH: 6.8	1,25 ml	-
1.5 M Tris-HCl pH: 8.8	-	2,50 ml
%10 SDS	0,05 ml	0,10 ml
%10 APS	0,05 ml	0,10 ml
TEMED	3 µl	10 µl

Camlar, kontaminasyonları veya jel kalıntılarını engellemek için önce saf su ile ardından %70’lik etil alkol ile temizlendi. Temizlenen camlar peçete ile kurulandı. Uzun ve kısa camlar birleştirilerek jel hazırlama standına yerleştirildi. Bu sırada jelin alt kısımdan sızmasına dikkat edildi. Öncelikle ayırma jeli yüklenmektedir. Gereksinim duyulan ayırma jeli yüzdesine göre jellerin hazırlanması için gerekli olan kimyasallar kabin içerisine yerleştirildi. Kimyasallar yukarıda Tablo 2’de verilen sıraya ve miktarlara göre 50 mL falkonda karıştırılarak istenilen yüzdeye göre hazırlandı. SDS ve APS ekledikten sonra karışımın homojen hale gelmesi için dairesel biçimde bir hareket yapılarak karıştırıldı. Polimerleşmeyi sağlayacak olan TEMED eklenmeden önce jeli dökmek için kullanılacak pipet 1 mL’e ayarlandı. TEMED eklendikten sonra birkaç kez pipetaj yapılarak TEMED’in homojen bir biçimde yayılması sağlandı. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı. Hazırlanan karışım, camlar

arasına hava kabarcığı bırakmadan aktarıldı. Jel, kısa camın üst kısmından 1 cm aşağısına kadar eklendi. Bu kısma soğuk izopropanal eklenerek üst kısmın düz bir şekilde polimerleşmesi sağlandı. Falkonda arta kalan jel baz alınarak polimerizasyonun tamamlanıp tamamlanmadığı kontrol edildi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dakika).

Ayırma jeli polimerleştikten sonra, jelin üzerindeki izopropanol (bütanol su karışımı da olabilir) dökülerek uzaklaştırıldı. Geriye kalan az miktardaki izopropanol kâğıt mendile emdirilerek jelin üzerinden alındı. Ayırma jeline benzer şekilde Tablo 4'te verilen sıraya ve miktarlara göre hazırlanan yükleme jeli hızlı biçimde camlar arasında kalan 1 cm'lik boşluğa aktarıldı. Alkolle dezenfekte edilen tarak dikkatlice camlar arasına yerleştirildi. Polimerizasyon için beklendi (Polimerleşme yaklaşık 30-60 dakika). Bu şekilde hazırlanan jel hemen kullanılacağı gibi ıslak bir peçeteye ardından streç filme sarılıp kurumasına izin verilmezse bir haftaya kadar 4 °C'de saklanabilir.

SDS-PAGE

Polimerizasyonun tamamlanmasından ardından camlar tanktaki haznesine dikkatlice yerleştirildi. Tank tamponu tank üzerinde belirtilen noktalara kadar dolduruldu. Tarak tanka tampon doldurulduktan sonra kuyucuklara zarar vermeden çıkartıldı. Kuyucuklara tamponla birkaç kez pipetaj yapıldı. Bu şekilde jel, örneklerin yüklenmesi için hazır hale getirildi.

Yürütülecek proteinlerin (örneklerin) üzerine uygun miktarda yükleme boyası eklendi [1:4 (yükleme boyası (5x): numune)]. Örnek-yüklem boyası karışımı 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı (denatürasyon için). Kuyucuklara maksimum 35 µg örnek ve aynı şekilde markır yüklendi. Tanka bir buz aküsü atılarak aşırı ısınma engellendi. Örnekler 70 Voltta 15 dakika ardından 100 Voltta yaklaşık 1-1,5 saat (60-90 dakika) yürütüldü. Yürüme, markırın yürüme hızı kontrol edilerek ayarlandı.

Yürütme işlemi biten jel tanktan çıkarıldı. Saf suyla yıkandı. İki cam arasına spatula sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrıldı. Jelin artık kısımları (yüklem jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı. Jel sabitleştirme çözeltisine alınıp bu çözeltide 30-40 dakika çalkalanarak proteinlerin jele sabitlenmesi sağlandı. Ardından jel başka bir kaba alınıp üzerini örtecek kadar renklendirme çözeltisi ilave

edilip 1-2 saat çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkartılıp renksizleştirme çözeltisine alındı. Belirli aralıklarla çözelti değiştirilip jelin zemin rengi açılıp protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içerisinde çalkalandı. Son olarak jel saf su içine alınıp görüntülendi.

3.2.2.2. Western Blot

Kullanılan Çözeltiler

Transfer Tamponu: 3 g Tris ve 14.4 g glisin 700 mL deiyonize su içerisinde çözöldü 200 mL metanol eklendi ve hacmi 1L'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

TBS (10X): 31.52 g Tris HCl ve 80 g NaCl çözölerek toplam hacim deiyonize su ile 900 ml'ye tamamlandı pH 7.6'ya ayarlanarak son hacim 1L'ye tamamlandı.

TBST: 100 mL 10X TBS ve 1 mL Tween-20 1 L deiyonize suda dilue edildi.

Bloklama Çözeltisi (%5 BSA-TBST / Süt Tozu-TBST): 5 g BSA veya süt tozu 100 mL 1X TBST içerisinde çözölerek 4 °C'de saklanır. Gerekli durumda BSA ve süt tozu birlikte kullanılabilir.

Primer Antikor: Bloklama tamponu ile primer antikor için üretici firmanın tavsiye ettiğı oranda seyreltilerek hazırlandı.

Sekonder Antikor: Bloklama tamponu ile sekonder antikor için tavsiye edilen oranlarda seyreltilerek hazırlandı.

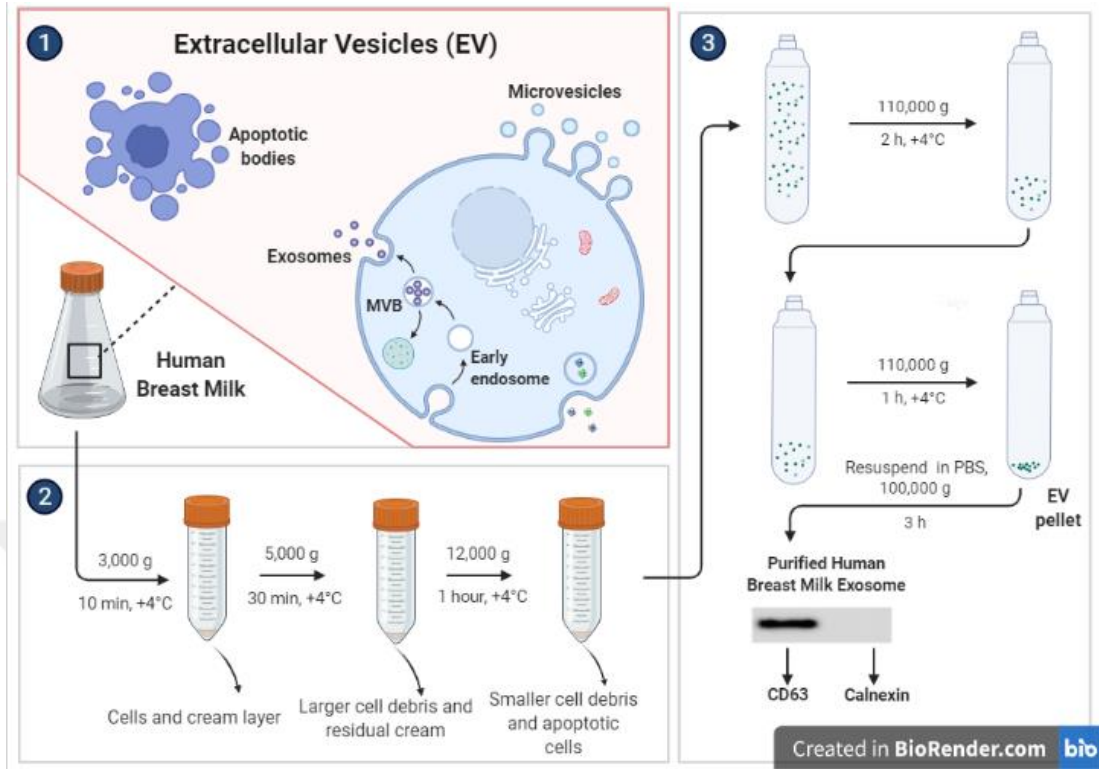
Deneyin Yapılışı: Yukarıda anlatıldığı gibi SDS-PAGE işlemi aynı şekilde gerçekleştirildi. Yürütölecek proteinlerin miktarları primer antikoron ölçebileceğı ve üretici firma tarafından tavsiye edilen konsantrasyon değeri kontrol edilerek belirlendi. Örneklerin üzerine uygun miktarda yükleme boyası eklenerek yürütöldü. Fakat sabitleştirme çözeltisine alınmadan membrana transfer edildi. Kaset açılıp kasetin siyah kısmından başlayarak üzerine transfer tamponu ile ısıtılan siyah sünger yerleştirildi. İki cam arasına spatula sokularak camlar birbirinden dikkatlice ayrılıp, jelin artık kısımları (yükleme jeli, jelin kenar kısımları gibi) spatula ile kesilip atıldı. Jelin sağ alt tarafı işaretlemek amacıyla hafifçe kesildi. Transfer tamponu ile ısıtılan 2 tane ince Whatman kâğıdı siyah sünger üzerine yerleştirildi. Jel uygun biçimde Whatman kâğıtlarının üzerine, nitroselölöz membran jelin üzerine yerleştirildi

(membran ile jel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilir). Son olarak transfer tamponu ile ıslatılmış 2 tane ince Whatman kâğıdı membran üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek sandviç oluşturuldu. Sandviç oluşturulduktan sonra tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir ile hafif basınç uygulanarak sandviç üzerinde yuvarlandı. Siyah sünger en üste konularak kaset kapatıldı. Kutuplara dikkat edilerek bu kaset tanka yerleştirildi. Tank transfer tamponu ile doldurulup içine ısınmayı engellemek için bir buz aküsü konuldu. Transfer işleminin gerçekleşmesi için 100 voltta 1 saat 15 dakika yürütüldü.

3.2.2.3. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmünokimya ile Görüntülenmesi

Bloklama işlemi bittikten sonra membran, bloklama için hazırlanan 10 mL bloklama çözeltisi 50 mL'lik falkon içerisine yerleştirilip, oda sıcaklığında 1 saat roller mikserde inkübasyona bırakıldı. Bloklanan membran, taze olarak üretici firmanın önerdiği gibi bloklama çözeltisinde seyreltilerek hazırlanan primer antikor çözeltileri (pozitif eksozom membran belirteci olarak anti-CD63 ve negatif belirteç olarak ise anti-kalneksin antikor çözeltisi) içerisinde roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikorla inkübasyonun ardından membran 3 defa 10'ar dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Daha sonra membran primer antikora uygun bloklama tamponuyla üretici firmanın önerdiği gibi bloklama tamponuyla 10000 kat seyreltilerek hazırlanan sekonder antikor çözeltisi ile roller mikserde 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar 3 defa 10'ar dk TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkandı. Üçüncü yıkamadan sonra membran pens ile kenarından tutularak bir kurulama kâğıdı üzerinde kenarından değdirilerek kuruması sağlandı ve temiz bir kaba aktarıldı. İmmünokimya ile saptamak için hazırlanan 1 mL ECL solüsyonu ile muamele edildi (3 dakika). Üzeri şeffaf plastik bir membranla kapatılarak ve hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kemilünesans görüntüleme yapıldı.

Bu bölümde anlatılan anne sütünden eksozom izolasyonu ve doğrulanması uygulamaları aşağıdaki şekilde özetlenmiştir. Şekil 4 <https://app.biorender.com> web sitesinde hazırlanmıştır.



Şekil 4. Anne Sütünden Eksozom İzolasyonu ve Doğrulanması

3.3. Deney Grupları

Deney hayvanları her grup 8 adet hayvandan oluşacak şekilde 4 grup oluşturuldu. Çalışma gruplarının şematik gösterimi Tablo 3’te sunulmuştur.

Tablo 3. Çalışma Gruplarının Şematik Gösterimi

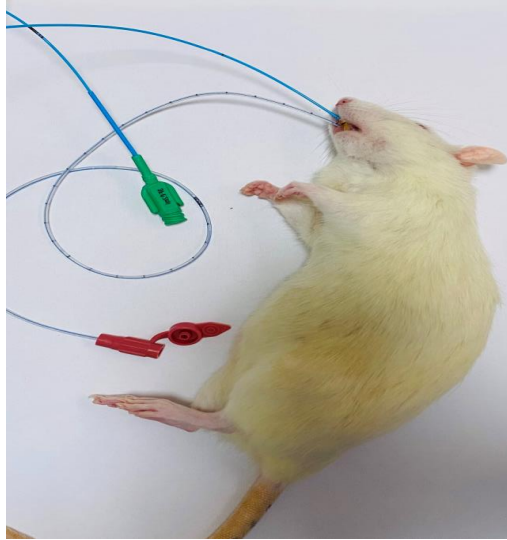
Deney ve Kontrol Grupları			Hayvan Sayısı
Grup 1	Sham Grubu		8
Grup 2	Kontrol grubu özofagusta korozyon oluşturulan grup		8
Grup 3	Özofagusta korozyon oluşturulan+anne sütü eksozomu verilen grup		8
Grup 4	Anne sütü eksozomu verilen grup		8

Korozif özofagus yanık modeli oluşturulacak olan 2 ve 3. gruplarda ratlara intraperitoneal olarak uygulanan anestezi sonrasında 3F fogarti sonda özofagustan geçirilip mideye indirilerek midede balonu şişirildi ve geri çekilerek özofagakardiyak

bileşkeye oturtuldu. Daha sonra 4F nelaton sonda yardımıyla özofagusa 0,5 cc %12,5 NAOH verilip 60 sn beklendikten sonra aspire edilip izotonik serum ile özofagus yıkandı ve nelaton sonda çıkarıldı. Fogarti sondanın da balonu indirilerek çıkarıldı ve ratlar 12 saat aç bırakıldıktan sonra doğal beslenmelerine dönüldü. Ratların gruplara ayrılması ve koroziif özofagus oluşturma yöntemi Şekil 5 ve 6'da sunulmuştur.



Şekil 5. Ratların Gruplara Ayrılması



Şekil 6. Koroziif Özofagus Oluşturma Yöntemi (Fogarti yöntemi)

3.4. Deney Sonrası Bakım ve İnceleme

Bütün deneklere girişimden sonraki üç gün analjezi amacı ile oral 200 mg dozunda parasetamol verildi ve dehidratasyonu önlemek için de intraperitoneal 2'şer cc serum fizyolojik uygulandı.

Deney yapıldıktan sonraki günden itibaren 21 gün boyunca grup 3 ve grup 4'ün özofaguslarına gavaj yoluyla 0,5 cc anne sütü ekzozomu verilerek, hayvanların beslenmesine çalışma süresince standart yem ve su ile devam edildi. Ratların 21 gün boyunca gavaj ile beslenmeleri Şekil 7'de sunulmuştur.



Şekil 7. Ratların Gavaj ile Beslenmesi

Sakrifikasyon 21.günün sonunda tüm ratlar tekrar tartıldıktan sonra kuyruk veninden verilen 150 mg/kg pentobarbitürat ile sağlandı. Laparotomi yapılan ratların distal özofagusları inceleme amacı ile eksize edildi (Şekil 8). %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde fikse edilerek patoloji laboratuvarına gönderildi. Histopatolojik işlemler uygulandı ve inceleme için Hemotoksilen-Eosin ile hazırlanan preparatlarda hasarlanma; inflamasyon, fibroz ve nekroz derecelendirilmesi yapılarak değerlendirildi.



Şekil 8. Laparotomi Yapılan Ratlar ve Eksize Edilen Distal Özofagus Parçası (Cerrahi Malzeme ile Gösterilen Yer Distal Özofagus Bölgesi)

3.5. Histopatolojik İnceleme

Alınan distal özofagus biyopsi örnekleri %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde fikse edilerek patoloji laboratuvarına gönderildi. Materyallerin tamamına enine kesit yapıldı ve doku takibine alındı. Doku takibinden sonra parafin bloğa gömülen dokulardan 5 mikron kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Bu kesitler ışık mikroskopisinde incelendi. Histolojik incelemede hasarlanmanın derecesi; inflamasyon, fibroz ve nekroz varlığı incelenerek derecelendirildi. Histolojik inceleme parametreleri Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4. Histolojik İnceleme Parametreleri (82)

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

3.6. İstatistiksel Yöntem

Verilerin analiz aşamasında SPSS 22,0 istatistik paket programı kullanılmıştır. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum olarak verilmiştir. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Fisher-Freeman-Halton Exact testi kullanılmıştır. Deney başlangıç ve deney sonu ağırlıkları arasındaki karşılaştırmalar için bağımlı gruplarda T testi kullanılmıştır. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

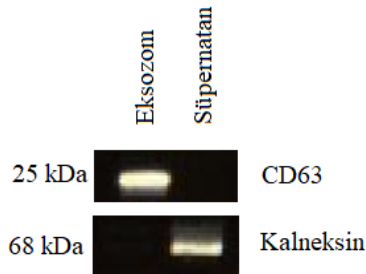
4. BULGULAR

Çalışmamızda cerrahi olarak korozif özofagus hasarı oluşturulan ratların özofagus distal kısımları işlemden sonraki 21. günde çıkarılarak histopatolojik incelemeleri yapıldı. Ayrıca işlem öncesi ve 21. günün sonunda tüm ratlar tartıldı.

Çalışma süresince grup 2’den bir tane (post-operatif beşinci gün), grup 3’ten bir tane (post-operatif dördüncü gün) ve grup 4’ten de bir tane (post-operatif onbirinci gün) olmak üzere toplam üç rat 21.günü tamamlayamayıp çeşitli nedenlerden dolayı (cerrahi komplikasyonlar, yeterli beslenememe veya ileri nekroz ve özofagus perforasyonuna bağlı) kaybedildi.

4.1. Anne Sütünden Elde Edilen Eksozomların Doğrulanması

Anne sütünden elde edilen eksozomların varlığı, eksozom membran belirteçleri CD63 ve negatif marker kalneksin Western Blot yöntemi ile doğrulandı (Şekil 9).



Şekil 9. Anne Sütü Eksozomlarının Western Blot ile Doğrulanması

4.2. Histopatolojik İnceleme

Histopatolojik incelemede hasarlanmanın derecesi; inflamasyon, fibrozis ve nekroz varlığı açısından değerlendirildi. Derecelendirme Tablo 4’e göre yapıldı. 1. grup olan sham grubunun ve 4. grup olan sadece anne sütü eksozomu verilen grubun histopatolojik olarak inflamasyon, fibrozis ve nekroz dereceleri 0 olarak değerlendirilmiştir. Özofaguslarında korozyon oluşturulan 2. grup ve özofaguslarında korozyon oluşturulup 21 gün boyunca anne sütü eksozomu verilen 3. grubun

inflamasyon ve fibrozis açısından histopatolojik değerlendirmeleri Tablo 5 ve 6’da sunulmuştur.

Tablo 5. 2. Grubun Histopatolojik Derecelendirme Sonuçları

Grup 2	İnflamasyon	Fibrozis
2A	2	1
2B	1	1
2C	3	2
2D	2	1
2E	1	0
2F	1	1
2G	1	1

Tablo 6. 3. Grubun Histopatolojik Derecelendirme Sonuçları

Grup 3	İnflamasyon	Fibrozis
3A	0	0
3B	1	0
3C	0	0
3D	0	0
3E	1	0
3F	0	0
3G	1	0

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.

Deneyin 21. gününde sakrifiye edilen rat gruplarının histopatolojik değerlendirmesinde, inflamasyon ve fibrozis bulgularının yüzde dağılımı ayrı ayrı hesaplanmıştır. Tablo 7’de inflamasyon, Tablo 8’de ise fibrozis bulgularının yüzde dağılımı ve gruplar arasındaki ikili karşılaştırmaları sunulmuştur.

Tablo 7. 21. Gün Sakrifiye Edilen Ratlarda, Gruplara Göre İnflamasyon Bulgularının Yüzde Dağılımı ve Gruplar Arası İkili Karşılaştırma

		Grup				p
		1	2	3	4	
İnflamasyon	Var	0 (%0.0) ^a	7 (%100.0) ^b	4 (%57.1) ^{a,b}	0 (%0.0) ^a	<0.001
	Yok	8 (%100.0) ^a	0 (%0.0) ^b	3 (%42.9) ^{a,b}	7 (%100.0) ^a	
	Toplam Sayı	8	7	7	7	

Gruplar içerisinde derecelendirmede istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmemiş olsa da inflamasyon varlığı-yokluğu şeklinde yapılan hesaplamalarda istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$).

Ayrıca inflamasyon açısından ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırmada 1. grupta 2. grup arasında ve 2. grupta 4. grup arasında da anlamlı fark bulunmuştur (Tabloda yer alan a ve b'ler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil etmektedir). Fakat çalışmamızda 2. grupta sayısal olarak inflamasyon görülen rat sayısı 3. gruba göre yüksek olmasına rağmen bu değerlerin istatistiksel olarak incelenmesinde anlamlı bir farklılık gösterilemedi. Bunun sebebinin hayvan hakları nedeniyle oluşturulan gruplardaki rat sayısının minimalde tutulmuş olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Tablo 8. 21. Gün Sakrifiye Edilen Ratlarda, Gruplara Göre Fibrozis Bulgularının Yüzde Dağılımı ve Gruplar Arası İkili Karşılaştırma

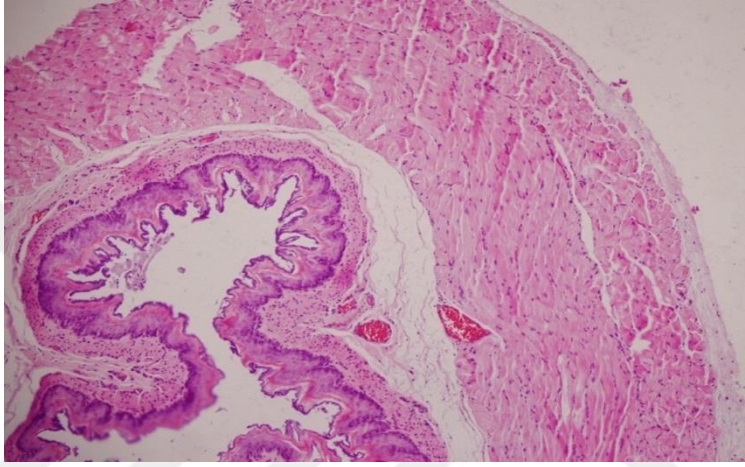
		Grup				p
		1	2	3	4	
Fibrozis	Var	0 (%0.0) ^a	6 (%85.7) ^b	0 (%0.0) ^a	0 (%0.0) ^a	<0.001
	Yok	8 (%100.0) ^a	1 (%14.3) ^b	7 (%100.0) ^a	7 (%100.0) ^a	
	Toplam Sayı	8	7	7	7	

Gruplar içerisinde derecelendirmede istatistiksel olarak anlamlı farklar görülmemiş olsa da fibrozis varlığı-yokluğu şeklinde yapılan hesaplamalarda istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.001$).

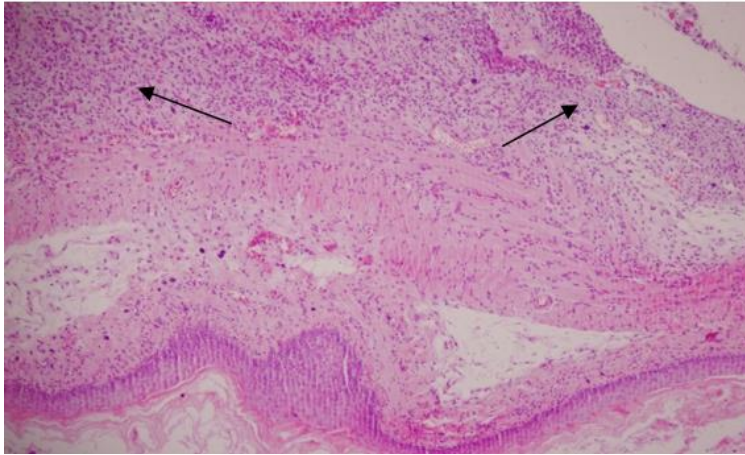
Ayrıca gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda 2. grup ile 1,3 ve 4. grup arasında fibrozis yüzdeleri açısından istatistiksel olarak önemli düzeyde fark vardır. 2.

gruptaki fibrozis yüzdesi diğer gruplardan anlamlı derecede fazlaydı (Tabloda yer alan a ve b'ler gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı temsil etmektedir).

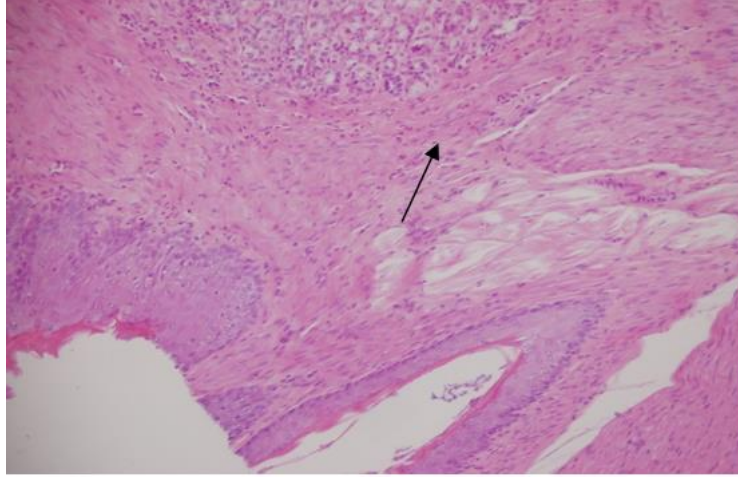
Deneyin 21. gününde sakrifiye edilen rat gruplarının histopatolojik değerlendirmelerinin spesmen görüntüleri Şekil 10, 11 ve 12'de sunulmuştur. Şekil 10'da grup 1-A normal özofagusun histolojik görünümü olup, Şekil 11'de grup 2-C'ye ait spesmenin adventisya dahil özofagus duvarının tüm katlarında inflamatuvar reaksiyonu, Şekil 12'de ise grup 2-F'ye ait fibrozis bulguları mevcuttur.



Şekil 10. Grup 1-A (normal) Özofagusun Histolojik Görünümü (H-E x100)



Şekil 11. Grup 2-C (inflamasyon) Özofagusun Histolojik Görünümü (H-E x100)



Şekil 12. Grup 2-F (fibrozis) Özofagusun Histolojik Görünümü (H-E x200)

4.3. Vücut Ağırlığı

Denekler, ilk olarak çalışma başlangıcında ve en son çalışmanın sonunda aynı tartı ile tartıldılar. Deney başlangıç ve deney sonu ağırlıkları Tablo 9,10,11 ve 12’de gösterilmiştir. Gruplara göre ortalama ağırlıkları ise Tablo 13’de sunulmuştur.

Tablo 9. Grup 1 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları

Grup 1	Deney Başlangıç Ağırlıkları (gr)	Deney Sonu Ağırlıkları (gr)
1A	224	232
1B	250	261
1C	241	250
1D	220	225
1E	190	196
1F	263	269
1G	240	242
1H	233	238

Tablo 10. Grup 2 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları

Grup 2	Deney Başlangıç Ağırlıkları (gr)	Deney Sonu Ağırlıkları (gr)
2A	222	213
2B	234	230
2C	228	220
2D	250	241
2E	252	255
2F	236	232
2G	261	255

Tablo 11. Grup 3 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları

Grup 3	Deney Başlangıç Ağırlıkları (gr)	Deney Sonu Ağırlıkları (gr)
3A	206	220
3B	218	222
3C	215	230
3D	253	264
3E	223	232
3F	272	290
3G	226	237

Tablo 12. Grup 4 Ratların Deney Başlangıç ve Deney Sonu Ağırlıkları

Grup 4	Deney Başlangıç Ağırlıkları (gr)	Deney Sonu Ağırlıkları (gr)
4A	246	255
4B	251	264
4C	265	274
4D	315	339
4E	210	220
4F	250	260
4G	200	212

Tablo 13. Deney Öncesi ve Sonrası Gruplara Göre Deneklerin Ortalama $\pm$ SS Ağırlıkları

	Deney Başlangıç Ağırlıkları (gr) Ort $\pm$ SS Medyan (Min – Maks)	Deney Sonu Ağırlıkları (gr) Ort $\pm$ SS Medyan (Min – Maks)	P
Grup 1	232,6 $\pm$ 22,0 236,5 (190-263)	239,1 $\pm$ 22,7 240 (196-269)	0.012
Grup 2	240,4 $\pm$ 14,2 236 (222-261)	235,1 $\pm$ 16,2 232 (213-255)	0.027
Grup 3	230,4 $\pm$ 23,5 223 (206-272)	242,1 $\pm$ 25,6 232 (220-290)	0.018
Grup 4	248,1 $\pm$ 37,7 250 (200-315)	260,6 $\pm$ 41,6 260 (212-339)	0.018

Grup 1, 3 ve 4'te istatistiksel olarak anlamlı derecede kilo artışı olup, grup 2'de korozif oluşturulan deneklerde ise iyi beslenme sağlanamadığından istatistiksel olarak anlamlı derecede kilo kaybı gözlenmiştir ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Korozif madde alımı özellikle gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmekte olup pediatrik morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir (83).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, her yıl binlerce çocuk özofagus yanıkları ve bunların komplikasyonlarının etkisi altındadır. Ülkemizde sağlık verilerinin merkezi bir sistemde toplanamaması nedeniyle kesin insidans tam olarak bilinmemekle beraber, ABD verilerine göre; özofagus yanıkları yılda 5.000 ile 15.000 kişiyi etkilemektedir (84). Kliniğimize ise yıllık korozif madde içme şikayetiyle başvuran çocuk sayısı yaklaşık 90 civarındadır.

Çocuklar korozif maddeleri genellikle yanlışlıkla ağızlarına aldıklarından, yuttukları miktarda genellikle sınırlı olmaktadır. Ancak ağızlarına aldıkları maddenin yakıcı tadını fark edinceye kadar yutma refleksleri çoktan başlamış olur. İlk olarak ağız ve farenks bölgesi, daha sonra da özofagus ve mide etkilenmektedir. Özofagusun üst bölümünde çizgili kasların daha yoğun ve klirensin daha yavaş olması nedeniyle hasarlanma en çok bu bölgede görülmektedir (40). Doku tahribatının şiddeti ise; yutulan maddenin türü, miktarı, konsantrasyonu, fiziksel şekli (katı veya sıvı) ve mukoza ile temas süresi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (3).

Kuvvetli bir korozif madde olan NaOH'in endüstrinin bir yan ürünü olarak ortaya çıkmasından önce özofagus yanığı olguları daha nadir görülmekteydi. Ancak daha sonra özellikle temizlik ajanı olarak kullanılmasıyla günlük hayatımıza giren korozif maddeler, çeşitli formlarda ve denetimsiz olarak pet şişelerde evlere girerek tehlike unsuru olmaya başlamışlardır (48). Ayrıca başvuruların en sık görüldüğü mevsim de yapılan bir çalışmada yaz ayları (%34,4) olarak bulunmuştur (85). Bunun nedeni ise, annelerin kış mevsimine girmeden önce evlerinde büyük bir temizlik yapmaları, boya badananın ve ev taşımalarının yine yaz aylarında daha sık olması ya da yaz aylarında çocukların artmış susama hissi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Özofagus hasarının erken evrelerinde eozinofilik nekroz ile beraber hemorajik konjesyon vardır. Trombozu takiben dokuya kan akışı azalır, oksidatif stres meydana gelir ve inflamasyon daha da kötü bir hal alır. Üçüncü haftadan sonra da ortaya çıkan

kollajen birikimi ve fibrozis ile striktür kaçınılmaz son olur (14). Bu yüzden literatürde yapılan çalışmaların çoğunun amacı gelişecek olan inflamasyonu baskılamak ve fibrozisi azaltarak strüktür oluşumunu engellemek yönünde olmuştur.

Özofagusun korozif yanıkları, etkili tedavi seçeneklerinden yoksun ciddi bir sağlık sorunudur. Korozif özofajit tablosunun tedavisi genellikle konservatiftir; iki veya üç gün oral beslenmenin kesilmesi ile özofagus istirahati ve idame için intravenöz sıvıların verilmesi şeklindedir. Hastalara daha fazla zarar gelmesini önlemek için geniş spektrumlu antibiyotikler, steroidler, antireflü tedavisi, erken stentleme ve erken dilatasyonlar kullanılan tedaviler içerisinde olmasına rağmen özofagus darlığı oluşumunu önlemek için hala evrensel olarak kabul edilmiş bir koruyucu tedavi yoktur. Bu nedenle korozif özofajit üzerine yapılan çalışmalar hız kesmeden devam etmektedir.

Karaman ve arkadaşlarının 968 hasta üzerinde yaptıkları geniş bir retrospektif çalışmada alkali veya asit maddeleri almış olan çocuklarda korozif striktür gelişim oranı sırasıyla %8,2 ve %2,9 olarak saptanmıştır. Ancak çamaşır suyu içen vakalar dahil edilmediğinde alkali alımı sonrası striktür gelişim oranı %23'lere çıkmıştır (39). Bu klinik veriler, özofagus yanığı sonrası morbidite ve mortaliteyi etkileyen en önemli değişkenin özofagus darlığı olduğunu göstermektedir.

Literatüre bakıldığında, korozif yanık deney modeli oluşturulmasında üç çeşit yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntem Gehanno ve Guedon modeli olarak bilinir. Bu yöntemde median laparotomi kesisi yapıp özofagus distal kısmı çevre dokulardan izole edilir. Abdominal özofagus gastroözofageal bileşke seviyesinden bağlanır. Ardından oral yoldan beslenme sondası yoluyla korozif ajan verilir ve özofagus üzerinden tekrar sütüre edilerek korozif yanık oluşturulur (86). İkinci yöntemde ise, bir sıçanın batin ve toraksına diseksiyon uygulanarak ağız kenarından proksimal özofagusa olan mesafe ölçülür ve beslenme sondasında işaretlenir. Diğer tüm deneklere de beslenme sondası yoluyla, belirlenen seviyeden korozif madde verilir (47). Daha yeni olan üçüncü model ise Şentürk ve ark. tarafından tanımlanmış bir yöntem olup, sıçan özofagusunda fogarti katateri adı verilen özel bir katater özofagus yoluyla mideye gönderilmiş, midede şişirilerek geri çekilmiş ve özofagusu tam tıkaması sağlanarak yanından gönderilen beslenme sondası ile verilen korozif maddenin özofagusta kalması sağlanmıştır (87). Bizim çalışmamızda da kullandığımız

üçüncü yöntemin avantajı deneyin hiçbir aşamasında cerrahi girişim ihtiyacı olmaması nedeniyle uygulama kolaylığı ve deneklerde ek bir stres oluşturulmamış olmasıdır.

Ayrıca çalışmamızda yanık modeli yapılırken kullandığımız NaOH'in seçilme nedeni; klinikte karşılaşılan korozif özofajit tablosunun %75-90'ından potasyum hidroksit, sodyum hidroksit ve sodyum hipoklorit gibi alkaliler, %15'inden asitlerin sorumlu olmasıdır (88). Hem de erimiş NaOH'in su gibi saydam, kokusuz ve tatsız olmasından dolayı çocuklar tarafından yanlışlıkla su yerine çok kolay içilebilmesidir. Birkaç damlanın özofagusa teması dahi özofagusta yanığa sebep olmaktadır (48).

Korozif özofajit üzerine bu kadar çok çalışma yapılmasının sebebi "*En iyi özofagus hastanın kendi özofagusudur*" görüşünün önemini vurgulamaktadır. Çünkü özgün özofagus lümeni oldukça değerlidir ve bunun korunması için de her şeyin denenmesi gerektiği çok açıktır. Bu nedenle korozif özofagus striktürünün tedavisinde mümkün olduğunca en son seçenek interpozisyon ameliyatları olmalıdır.

Korozif özofajitle ilgili en çok çalışılan ajanlardan olan steroidin değişik serilerde skar gelişimini azaltmada ve inflamatuvar cevabı değiştirmede faydalı olduğu bildirilmekle beraber (89-92), darlık gelişiminde ciddi bir rolünün olmadığını saptayan çalışmalar da mevcuttur (93-95).

Yükselen ve ark. sitoprotektif ve antioksidan özellikleri nedeniyle trimetazidini kullanmış, hasar alanında nötrofil infiltrasyonunu inhibe ederek serbest oksijen radikal formasyonunu önlediğini ve bu sayede özofagus yanığı sonrası fibrozisi azalttığını göstermişlerdir (96).

Türkyılmaz ve ark. nın 2005 ve 2009'da yaptıkları çalışmalarda, mitomisin-C'nin, doza bağımlı olarak DNA ve DNA'ya bağımlı RNA sentezini engelleyerek hem fibroblastların çoğalmasını, hem de bu hücrelerin kollajen üretimini baskılayarak korozif özofagus darlığı oluşumunu engellemede etkili olduğu gösterilmiştir (97, 98).

Cömert ve ark. kök hücrelerin prolifere olabilen, kendini yenileyebilen ve birçok hücre tipine ve dokulara differansiye olabilen immatür hücreler olmalarından faydalanarak korozif özofajit modelinde fibrozis üzerine anlamlı sonuçlar elde etmişlerdir (99).

Koltuksuz ve ark. kafeik asit fenetil ester ve epidermal büyüme faktörünün (EGF) striktür gelişimi üzerine olumlu etkilerini göstermiş ve bu etkilerin, kafeik asit fenetil esterin antiinflamatuvar, immünomodülatör, antioksidan özelliklerine ve

EGF'nin yara iyileşmesini destekleyici ve özofagusu yaralanmalara karşı koruyucu etkilerinden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (100).

Sümeli ve ark. kantaron yağının inflamasyonu azaltması, rejenerasyonu hızlandırması, özofagus duvarında kaygan yüzey oluşturarak çeşitli patojenlerin yaraya penetre olmasını engelleme özelliklerinden dolayı korozif özofajit oluşturdıkları modelde inflamasyon ve fibrozis üzerine olumlu yanıtlar almışlardır (101).

Öztan ve ark. korozif özofajitlerde striktürü önlemek amacıyla, yara iyileşmesi ve reepitelizasyon üzerine yararlı etkileri olan ve skar oluşumunu engelleyen plateletten zengin plazma kullanmışlar ve sonuç olarak da oksidatif stresin azaldığını, mukozal iyileşmenin olduğunu ve striktür gelişiminin azaldığını rapor etmişlerdir (14).

Şeref ve ark. yaptıkları çalışmada kontratubexin antioksidan, antienflamatuar, yara iyileştirici, fibroblast oluşumunu inhibe edici etkileri ile tedavi gruplarında yanık grubuna göre hidroksiprolin düzeylerini düşürerek, histopatolojik hasarlanmayı azaltıp belirgin stenozu önleyerek darlığı azaltıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir (102).

Ocakçı ve ark. potent bir antioksidan olan nontoksik selenoorganik bileşen olan ebselenin deneysel özofageal striktür modelinde lipid peroksidasyonunu, stenoz indeksi (Sİ), histopatolojik hasarı ve ağırlık kaybını azalttığını göstermişlerdir (103).

Gemici ve ark. ise yapmış olduğu çalışmada Sİ'nin ve histopatolojik doku hasarının bal verilen grupta anlamlı derecede düşük çıkması, balın korozif özofajit oluşturulan sıçanlarda doku hasarını azalttığı ve striktür oluşumunu önlediği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Ancak yapılan çalışmada prednisolonun etkinliği gösterilememiştir (104).

D-penisilamin (86), beta-amino propio nitril (105), N-asetil sistein (NAC) (106), vitamin E ve C (107), halofuginone (108), omeprazol (109), heparin (110), glukagon benzeri peptid-2 (12), dimetil sulfoksit (41), oral tamoksifen (111), metilen mavisi (112), estradiol ve progesteron (113), poliansatüre fosfotidilkolin (114), ursodeoksikolik asit (115), keratinosit büyüme faktörü (116) ve daha pek çok ajanın deneysel olarak korozif özofagusta striktür gelişimi üzerine faydalı etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur.

Korozif özofagus yanıklarının tedavisi için pek çok çalışma yapılmış ve çeşitli ajanlardan olumlu deneysel sonuçlar alınmıştır. Ancak henüz klinik uygulamaya

girmiş rutin bir tedavi protokolü geliştirilememiştir. Bizler de korozif özofagus ile ilgili yapılan tüm çalışmalar ışığında ratlarda korozif özofajit modeli yaparak literatürdeki yara iyileşme sürecini de göz önünde bulundurarak 21 günlük anne sütü eksozomu tedavisi planladık. Eksozomun anne sütünden elde ediliyor olması ve de doğal olması nedeni ile klinikte de rahatlıkla kullanılabilir bir madde olduğunu düşünmekteyiz. Amacımız korozif özofajitte yanığın ilerlemesi ve striktür gelişmesini engellemek için yeni bir kapı aralamak olup çalışmamızda da gösterildiği gibi gerek inflamasyon gerekse de fibrozis sonuçlarında elde ettiğimiz anlamlı sonuçlar, böyle oldukça sık görülen ve morbiditesi yüksek hastalık olan korozif özofagus hasarlarında umut vaat edici olmuştur.

Eksozomlar, çeşitli hücre türlerinden salgılanan ve biyoaktif bileşenler içerdiği gösterilen nano ölçekli hücre kaynaklı ekstraselüler veziküllerdir (17). Ciddi bir hücre-hücre iletişim habercisi olup, hücreler arası iletişime ve immun cevaba aracılık etmek için hücreler arasında taşınabilen proteinler, lipidler ve genetik materyaller içermektedirler (79). Doğal taşıyıcı olarak var olmaları, biyodağılımlarının ve plazmadaki kararlılıklarının yüksek olması, oldukça da küçük olmaları sayesinde her türlü vücut engelinden geçebilecek olmaları onları tedavi edici uygulamalar için oldukça uygun bir aday haline getirmektedir (18). Tükürük, idrar, plazma ve anne sütü gibi pek çok sayıda vücut sıvısında bulunurlar. Anne sütünden üretilen eksozomlardaki proteomik üzerine yakın zamanda yapılan bir çalışma, bu veziküllerin gastrointestinal ve bağışıklık sisteminin gelişimini destekleyebileceğini öne sürmüştür (78). Bu da bizi çalışmamızda anne sütü eksozomu kullanmaya teşvik etmiştir.

Admyr ve ark. yaptıkları bir çalışmada insan anne sütündeki eksozomların bebeğin bağışıklık sistemini etkileme potansiyeline sahip olduğunu göstermişlerdir (117).

Hock ve ark. ratların sütünden ürettikleri eksozomların bağırsak epitel hücre canlılığını arttırdığını, proliferasyonu arttırdığını ve bağırsak kök hücre aktivitesini uyardığını göstermişlerdir (77). Li ve ark. ise sığır sütünden elde ettikleri eksozom ile deneysel NEK modelinde goblet hücresi üretimini ve endoplazmik retikulum işleyişini artırarak bağırsak hasarını önlediklerini göstermişlerdir (80).

Martin ve ark. çalışmalarında insan anne sütünden ürettikleri eksozomların intestinal epitel hücrelerinde oksidatif strese bağlı hasarı azalttığını göstererek NEK tedavisi için anne sütü eksozomunun olumlu sonuçlarını sunmuşlardır (78).

Miyake ve ark. ise hem ham hem de pastörize süt kıyaslaması amacı ile bunlardan elde edilen eksozomların bağırsak epitel hasarını ve iltihabı azalttığını ve ayrıca bağırsak mukus üretimini eski haline getirerek NEK’de faydalı etkiler göstermişlerdir. İnsan sütünden türetilen eksozomların bu faydalı özelliklerinin pastörizasyonla değişmediğini göstermişlerdir (17).

Gao ve ark. ise yaptıkları çalışmada farklı periyotlardaki anne sütünün NEK’deki barsak hasarı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kolostrum, geçiş ve olgun insan sütünden üretilen eksozomların tedavilerinin tümü inflamatuvar hasarı önlerken, kolostrumdan üretilen eksozomlar, inflamatuvar sitokini azaltmada en etkili bulunmuştur (79).

Eksozomlar ayrıca kanserin tanısında, tedaviye verilen cevabın ve prognozun izlenmesinde biyobelirteç olma özelliğindedirler. Çünkü eksozomlar köken aldıkları kanser hücrelerini yansıtmaktadırlar. Yapılan bir derlemede eksozomların hücreler arası iletişiminin dışında sinyal iletimi, genetik madde aktarımı, bağışıklık yanıtının düzenlenmesi gibi birçok biyolojik işlevde de rol oynadığını belirtip çeşitli kanserlerde eksozomların lokal ve sistemik olarak immün yanıtı değiştirmesiyle yeni bir tedavi yaklaşımı olabileceği düşünülmüştür (118).

Yapılan literatür taramasında anne sütünün zengin bir eksozom kaynağı olduğu görülmüştür (17, 77). Ancak pek çok çalışmada kullanılmasına rağmen özofagus korozyonları üzerindeki etkinliği ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda anne sütü eksozomunun antiinflamatuvar etkisi ile korozif özofagus yanığı tedavisi üzerindeki etkinliğini araştırmak amaçlandı.

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmada öncelikle KTÜ Biyokimya Anabilim Dalında üretilen anne sütü eksozomunun varlığı, CD63 olması ve kalneksin olmaması ile Western Blot yöntemi kullanılarak doğrulanmıştır.

Deney aşamasına geçildiğinde %12,5 NaOH verilip korozif hasar oluşturulan ve tedavi verilmeyen ratların 1 tanesi hariç hepsinde az veya çok makroskopik hasar bulguları gözlemlendi. Mikroskopik olarak da tüm ratlarda değişik derecelerde

inflamasyon görüldü. Yalnız 1 ratta fibrozis görülmemiş olup onda düşük grade inflamasyon görüldü. Erken dönemde bu denekte iyileşme olduğu düşünüldü. Sonuç olarak oluşturduğumuz bu modelin uygun olduğu kanıtlanmış oldu.

%12,5 NaOH verilip korozif hasar meydana getirildikten sonra 21 gün boyunca anne sütü eksozomu verilen grup 3'teki ratlarda ise makroskopik olarak patolojik bulguya rastlanmadı. Mikroskopik olarak da 3 ratta 1. derece inflamasyon gözlemlendi. Ancak hiçbirinde fibrozis görülmedi. Böylece Gao ve arkadaşlarının çalışmasında gösterdikleri gibi ekzosomun inflamasyonu azalttığı yönündeki sonuçları bizim çalışmamızda da göstermiş olduk.

2 ve 3. gruplardaki inflamasyon varlığı açısından yapılan değerlendirmeler istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı bulunmuştur. Gruplar arası karşılaştırmalarda da inflamasyon açısından bakıldığında 1. grup ile 2. grup ve 2. grup ile 4. grup arasında anlamlı sonuçlar görülmüştür. Ancak 2. grup ile 3. grup arasında sayısal olarak anlamlı farklılık olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara rastlanmamıştır. Bunun sebebinin hayvan hakları nedeniyle oluşturulan gruplardaki rat sayısının minimalde tutulmuş olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

2 ve 3. gruplardaki fibrozis varlığı açısından yapılan değerlendirmeler de istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı bulunmuştur. Gruplar arası fibrozis açısından karşılaştırmada ise 2. grup ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli düzeyde fark saptanmıştır. Özellikle 2. grup ile 3. grup arasındaki anlamlı fark bizler için umut kaynağı olmuştur. Literatürde henüz ekzosomun fibrozis üzerine etkisinin gösterildiği bir çalışmaya rastlanmamış olup bizim çalışmamız ekzosomun dokuda fibrozisi azalttığı yönündeki ilk çalışma olmuştur. Bu açıdan daha pek çok çalışmaya da kapı aralanmıştır.

Yaptığımız çalışma sonucunda kanıtlanmış bir şey olmasa da anne sütü eksozomunun sitokin göçünü azaltıyor olabileceği, membranöz stabilizasyonu sağlayıp kapiller kaçağı önleyebileceği, belki de fibroblast göçünü azaltıp fibrin oluşumunu engelleyerek inflamasyon bölgesine göç eden sinyalleri azaltıyor olabileceğinden şüphelenmekteyiz.

Korozif özofagus yanıklarına bağlı darlıkların net bir klinik sonucu da beslenme güçlüğü ve buna bağlı vücut ağırlığı kaybıdır (84). Bizim çalışmamızda 1. grup ratlarda kilo artışı, 2. grup ratlarda kilo kaybı, 3. grup ratlarda kilo artışı ve 4.

grup ratlarda kilo artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sadece korozyon oluşturduğumuz 2. gruptaki ratların anlamlı kilo kaybı bizlere özofaguslarındaki hasar nedeniyle beslenememelerini düşündürmekte olup, korozyon oluşturup 21 gün anne sütü eksozomu ile beslediğimiz ratların anlamlı kilo artışı sevindirici bulgularımızdan olmuştur. Elde ettiğimiz bu sonucu ekzosomun daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan bağışıklık sisitemini güçlendirici etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Ayrıca dikkatimizi çeken bir diğer sonuç da 21 gün boyunca anne sütü eksozomu ile beslediğimiz 4. gruptaki ratların ortalama kilo artışının, kontrol grubumuz olan 1. grup ratlarından oldukça fazla olmasıydı. Anne sütü eksozomunun antiinflamatuvar etkisi ile korozif özofajitteki faydalarının yanında, anne sütünün besleyici özelliklerinden de faydalanmış olduğumuzu görmemiz çalışmamızdaki diğer bir kazancımız olmuştur.

Sonuç olarak literatürde çalışmamızın benzerine rastlamamış olmakla beraber son yıllarda özellikle anne sütü eksozomu ile yapılan çalışmaların da yüz güldürücü sonuçlarından destek alarak böyle bir çalışma yapılmış olup olumlu sonuçlar alınmıştır. Anne sütü eksozomu için kat edilecek çok yol olmasına rağmen bulgularımız umut verici olup ileriye dönük yeni çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Korozif özofagus yanığı en çok çalışılan deneysel modellerden biri olmasına rağmen, hala rutin bir tedavi protokolü maalesef yoktur. Eksozomların doğal olmaları, plazmadaki biyodağılımının ve kararlılığının yüksek olması, oldukça küçük boyutta olup her türlü vücut engelinden geçebilmeleri, taşıdıkları kargo ve bağışıklığı düzenleyici rolleri bu nanokeseciklerin tedavi amaçlı kullanımlarının mümkün olduğunu ortaya koymaktadır. Pek çok vücut sıvısından üretilen eksozomların anne sütünden de üretilerek korozif özofajit tedavisine umut kaynağı olabileceğini düşündük. Anne sütü eksozomu pek çok alanda kullanılmış olsa da korozif özofajit modelinde ilk defa kullanılmış olup yüz güldürücü sonuçlar ortaya koyulmuştur.

1. Yapılan histopatolojik incelemelerde fibrozis, inflamasyon ve nekroz ayrı ayrı değerlendirilmiş olup inflamasyon ve fibrozis sonuçlarında istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.
2. Gruplar arasında yapılan inflamasyon açısından karşılaştırmada 2. grup ile 1 ve 4. grup arasında anlamlı fark saptanmış ancak 2. grup ile 3. grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.
3. Gruplar arasında yapılan fibrozis açısından karşılaştırmada 2. grup ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark saptanmıştır.
4. Deney öncesi ve deney sonrası 2. grupta kilo kaybı gözlenirken diğer gruplardaki kilo artışı anlamlı bulunmuştur.
5. Anne sütü eksozomunun pek çok alanda kullanılmaya başlanması ve olumlu sonuçların alınmasına dayanarak ileriye dönük yeni çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Chibishev A, Simonovska N, Shikole A. Post-corrosive injuries of upper gastrointestinal tract. *Prilozi*. 2010;31(1):297-316.
2. Cevik M, Demir T, Karadag CA, Ketani MA, Celik H, Kaplan DS, et al. Preliminary study of efficacy of hyaluronic acid on caustic esophageal burns in an experimental rat model. *J Pediatr Surg*. 2013;48(4):716-23.
3. Ciftci OD, Gul SS, Aciksari K, Maman A, Cavusoglu T, Bademci R, et al. The diagnostic utility of scintigraphy in esophageal burn: a rat model. *J Surg Res*. 2016;200(2):495-500.
4. Millar AJ, Cox SG. Caustic injury of the oesophagus. *Pediatr Surg Int*. 2015;31(2):111-21.
5. Agarwal A, Srivastava DN, Madhusudhan KS. Corrosive injury of the upper gastrointestinal tract: the evolving role of a radiologist. *Br J Radiol*. 2020;93(1114):20200528.
6. Riffat F, Cheng A. Pediatric caustic ingestion: 50 consecutive cases and a review of the literature. *Dis Esophagus*. 2009;22(1):89-94.
7. Contini S, Scarpignato C. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: a comprehensive review. *World J Gastroenterol*. 2013;19(25):3918-30.
8. Melek M, Edirne Y, Cobanoğlu C, Ceylan A, Ceylan A. An Analysis Of Corrosive Substance Ingestion Of Children In Eastern Turkey. *Eastern Journal of Medicine*. 2008;13(1-2):1-6.
9. Gün F, Çelik A, Salman T. Çocuklara Asit Maddelerin Alımı Sonucu Gelişen Mide Hasarı. *Çocuk Dergisi*. 2003;3(1):39-43.
10. Aydın E, Özcan R, Emre Ş, Eliçevik M. Çocukluk Çağında Koroziv Madde İçimi: Altıyüz Seksenbir Olgunun Değerlendirilmesi. *Çocuk Cerrahisi Dergisi*. 2012;26(1-2):26-31.
11. Arnold M, Numanoglu A. Caustic ingestion in children-A review. *Semin Pediatr Surg*. 2017;26(2):95-104.
12. Tekin M, Topaloglu N, Kucuk A, Deniz M, Yildirim S, Erdem H. Protective effect of glucagon-like peptide-2 in experimental corrosive esophagitis. *Dis Esophagus*. 2015;28(3):258-61.

13. Erbas M, Kiraz HA, Kucuk A, Topaloglu N, Erdem H, Sahin H, et al. Effects of tenoxicam in experimental corrosive esophagitis model. *Dis Esophagus*. 2015;28(3):253-7.
14. Oztan MO, Arslan FD, Oztan S, Diniz G, Koyluoglu G. Effects of topical application of platelet-rich plasma on esophageal stricture and oxidative stress after caustic burn in rats: Is autologous treatment possible? *J Pediatr Surg*. 2019;54(7):1397-404.
15. Sen Tanrikulu C, Tanrikulu Y, Kilinc F, Bahadir B, Can M, Kokturk F, et al. The protective and anti-inflammatory effect of methylene blue in corrosive esophageal burns: An experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2019;25(4):317-23.
16. Guven A, Demirbag S, Uysal B, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, et al. Effect of 3-amino benzamide, a poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitor, in experimental caustic esophageal burn. *J Pediatr Surg*. 2008;43(8):1474-9.
17. Miyake H, Lee C, Chusilp S, Bhalla M, Li B, Pitino M, et al. Human breast milk exosomes attenuate intestinal damage. *Pediatr Surg Int*. 2020;36(2):155-63.
18. Kahraman T, Güçlüler G, Gürsel I. Eksozomlar: Tanı ve Tedavide Kullanılabilen Doğal Nanokesecek Adayları. *Turkish Journal of Immunology* 2014;2(2):34-40.
19. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Başaklar AC, editor. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
20. Başaklar AC. Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
21. Standring S. Gray's anatomy. London: Elsevier; 2008.
22. Sancak B, Cumhuri M. Özefagus ve Mide. Fonksiyonel Anatomi. Ankara: ODTÜ Yayıncılık; 2010. p. 201-4.
23. Yıldırım M. Topografik Anatomi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2000.
24. Ökten İ. Toraks Anatomisi. Ankara: Sim Matbaacılık; 2003.
25. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology. Canada: Elsevier; 2013.
26. Solak H. Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Cerrahisi 1992.

27. Kuo B, Urma D. Esophagus-Anatomy and Development. GI Motility online 2006.
28. Naharcı İ, Tüzün A. Kostik Özofagus Yaralanmaları. Güncel Gastroenteroloji Dergisi. 2005;4:226-32.
29. Yigit R. Kontrol Sistemleri, Sindirim ve Boşaltım Fizyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2001.
30. Baysungur V. Göğüs Cerrahisi "Kırmızı Kitap". In: Yüksel M, Balcı AA, editors. Özofagusun Gelişimi, Anatomi ve Fizyolojisi 1. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2015. p. 875-81.
31. Yüksel M, Akgül AG. Özofagus: Embriyoloji-Damarlanma-Inervasyon-Anatomi. In: Yüksel M, Başoğlu A, editors. Özofagus Hastalıklarının Tıbbi ve Cerrahi Tedavisi. İstanbul: Bilmedya Grup; 2002. p. 1-19.
32. Ross MH, Pawlina W. Histology. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
33. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2007.
34. Goyal RK, Chaudhury A. Physiology of normal esophageal motility. J Clin Gastroenterol. 2008;42(5):610-9.
35. Hugh TB, Kelly MD. Corrosive ingestion and the surgeon. J Am Coll Surg. 1999;189(5):508-22.
36. Koçak E. Özofagus'un acil problemleri. Endoskopi Gastrointestinal 2010;18(2):46-51.
37. Güven A. Çocukları Evde Bekleyen Tehlike: Korozi Özofagus Yanıkları. TAF Prev Med Bull 2008;7(6):535-40.
38. Kasap E, Özütemiz AÖ. Pet Şişedeki Tehlike: Korozi Özofajit. Güncel Gastroenteroloji Dergisi. 2006;10(1):29-35.
39. Karaman I, Koc O, Karaman A, Erdogan D, Cavusoglu YH, Afsarlar CE, et al. Evaluation of 968 children with corrosive substance ingestion. Indian J Crit Care Med. 2015;19(12):714-8.
40. de Jong AL, Macdonald R, Ein S, Forte V, Turner A. Corrosive esophagitis in children: a 30-year review. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2001;57(3):203-11.
41. Kilincaslan H, Karatepe HO, Sarac F, Olgac V, Kemik AS, Gedik AH, et al. Protective effect of dimethyl sulfoxide on stricture formation in corrosive esophageal burns in rats. Eur J Pediatr Surg. 2014;24(5):403-9.

42. De Lusong MAA, Timbol ABG, Tuazon DJS. Management of esophageal caustic injury. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2017;8(2):90-8.
43. Millar AJW, Numanoglu A, Rode H. Caustic Strictures of the Esophagus. In: Grosfeld JL, O'Neill JA, Jr., Coran AG, Fonkalsrud EW, editors. *Pediatric Surgery*. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p. 1082-89.
44. Lee WC, Lee TH, Cho JH. White esophageal mucosa and black gastric mucosa: upper gastrointestinal injury due to hydrochloric Acid ingestion. *Clin Endosc.* 2014;47(1):119-20.
45. Adakan Y, Çekin AH. Kostik Maddelerin Neden Olduğu Üst Sindirim Kanalı Yaralanmaları. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi.* 2014;18(3):366-72.
46. Baskin D, Urganci N, Abbasoglu L, Alkim C, Yalcin M, Karadag C, et al. A standardised protocol for the acute management of corrosive ingestion in children. *Pediatr Surg Int.* 2004;20(11-12):824-8.
47. Aksu B, İnan M. Çocuklarda Koroziv Özofagus Yanıkları. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2002;19(3-4):183-8.
48. Kikendall JW. Caustic ingestion injuries. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991;20(4):847-57.
49. Özcan R, Yılmaz E, Günay C, Eliçevik M. Koroziv Madde İçimine Bağlı Özofagus Darlığı Gelişimi ve HLA İlişkisinin İncelenmesi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni.* 2017;48(3):84-8.
50. Lew RJ, Kochman ML. A review of endoscopic methods of esophageal dilation. *J Clin Gastroenterol.* 2002;35(2):117-26.
51. Genc A, Mutaf O. Esophageal motility changes in acute and late periods of caustic esophageal burns and their relation to prognosis in children. *J Pediatr Surg.* 2002;37(11):1526-8.
52. Mutaf O, Genc A, Herek O, Demircan M, Ozcan C, Arikan A. Gastroesophageal reflux: a determinant in the outcome of caustic esophageal burns. *J Pediatr Surg.* 1996;31(11):1494-5.
53. Ramasamy K, Gumaste VV. Corrosive ingestion in adults. *J Clin Gastroenterol.* 2003;37(2):119-24.
54. Jones AB. Caustic ingestions. *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy.* 2002;4(4):196-200.
55. Celik B, Nadir A, Sahin E, Kaptanoglu M. Is esophagoscopy necessary for corrosive ingestion in adults? *Dis Esophagus.* 2009;22(8):638-41.

56. Lamireau T, Rebouissoux L, Denis D, Lancelin F, Vergnes P, Fayon M. Accidental caustic ingestion in children: is endoscopy always mandatory? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33(1):81-4.
57. Ferguson MK, Migliore M, Staszak VM, Little AG. Early evaluation and therapy for caustic esophageal injury. *Am J Surg.* 1989;157(1):116-20.
58. Tiryaki T, Livanelioglu Z, Atayurt H. Early bougienage for relief of stricture formation following caustic esophageal burns. *Pediatr Surg Int.* 2005;21(2):78-80.
59. Hawkins DB, Demeter MJ, Barnett TE. Caustic ingestion: controversies in management. A review of 214 cases. *Laryngoscope.* 1980;90(1):98-109.
60. Middelkamp JN, Cone AJ, Ogura JH, Higgins CR, Jr., Lowe GA. Endoscopic diagnosis and steroid and antibiotic therapy of acute lye burns of the esophagus. *Laryngoscope.* 1961;71:1354-62.
61. Tucker JA, Yarrington CT, Jr. The treatment of caustic ingestion. *Otolaryngol Clin North Am.* 1979;12(2):343-50.
62. London RL, Trotman BW, DiMarino AJ, Jr., Oleaga JA, Freiman DB, Ring EJ, et al. Dilatation of severe esophageal strictures by an inflatable balloon catheter. *Gastroenterology.* 1981;80(1):173-5.
63. Fishman D. Caustic Esophageal Injury in Children 2017 Mar 01. Available from: www.uptodate.com.
64. Triadafilopoulos G. Caustic Esophageal Injury in Adults 2017 May 23. Available from: www.uptodate.com.
65. Inanır C, Ekici L. Eksozomlar: Kompozisyonları, Biyolojik Fonksiyonları ve Biyoaktif Bileşiklerin Taşınmasındaki Potansiyelleri. *Akademik Gıda.* 2020;18(4):421-32.
66. Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: a novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:1525-41.
67. Liu Q, Li S, Dupuy A. Exosomes as New Biomarkers and Drug Delivery Tools for the Prevention and Treatment of Various Diseases: Current Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021;22(15):7763.
68. Bozkurt S. Eksozomlar ve Kanserdeki Roller. *Dicle Medical Journal.* 2018;45(2):209-17.

69. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110(1):13-21.
70. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* 2005;17(7):879-87.
71. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* 2007;72(9):1095-102.
72. Skriner K, Adolph K, Jungblut PR, Burmester GR. Association of citrullinated proteins with synovial exosomes. *Arthritis Rheum.* 2006;54(12):3809-14.
73. Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med.* 2011;9:9.
74. Yagi Y, Ohkubo T, Kawaji H, Machida A, Miyata H, Goda S, et al. Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes. *Neurosci Lett.* 2017;636:48-57.
75. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate.* 2009;69(2):159-67.
76. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 2007;89(2):205-12.
77. Hock A, Miyake H, Li B, Lee C, Ermini L, Koike Y, et al. Breast milk-derived exosomes promote intestinal epithelial cell growth. *J Pediatr Surg.* 2017;52(5):755-9.
78. Martin C, Patel M, Williams S, Arora H, Brawner K, Sims B. Human breast milk-derived exosomes attenuate cell death in intestinal epithelial cells. *Innate Immun.* 2018;24(5):278-84.
79. Gao R, Zhang R, Qian T, Peng X, He W, Zheng S, et al. A comparison of exosomes derived from different periods breast milk on protecting against intestinal organoid injury. *Pediatr Surg Int.* 2019;35(12):1363-8.
80. Li B, Hock A, Wu RY, Minich A, Botts SR, Lee C, et al. Bovine milk-derived exosomes enhance goblet cell activity and prevent the development of experimental necrotizing enterocolitis. *PLoS One.* 2019;14(1):e0211431.

81. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
82. Berthet B, di Costanzo J, Arnaud C, Choux R, Assadourian R. Influence of epidermal growth factor and interferon gamma on healing of oesophageal corrosive burns in the rat. *Br J Surg*. 1994;81(3):395-8.
83. Bakan V, Garipardic M, Okumus M, Ciralik H, Atli Y, Ozbag D, et al. The protective effect of erythropoietin on the acute phase of corrosive esophageal burns in a rat model. *Pediatr Surg Int*. 2010;26(2):195-201.
84. Mutaf O. Çocuklarda kostik özofagus yanıkları. *Pediatric Cerrahi Dergisi*. 1988;2:69-85.
85. Çam H, Kıray E, Taştan Y, Özkan HÇ. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Acil servisinde izlenen zehirlenme olguları. *Türk Pediatri Arşivi*. 2003;38(4):233-9.
86. Gehanno P, Guedon C. Inhibition of experimental esophageal lye strictures by penicillamine. *Arch Otolaryngol*. 1981;107(3):145-7.
87. Ciftci AO, Senocak ME, Buyukpamukcu N, Hicsonmez A. Gastric outlet obstruction due to corrosive ingestion: incidence and outcome. *Pediatr Surg Int*. 1999;15(2):88-91.
88. Peter ML, Eisenstein AM. Caustic injury to the upper gastrointestinal tract. In *Sleisenger and Fordtran's gastrointestinal and liver disease*. 6th edition ed: W. B. Saunders company; 1998. p. 335-42.
89. Bautista A, Varela R, Villanueva A, Estevez E, Tojo R, Cadranel S. Effects of prednisolone and dexamethasone in children with alkali burns of the oesophagus. *Eur J Pediatr Surg*. 1996;6(4):198-203.
90. Gunnarsson M. Local corticosteroid treatment of caustic injuries of the esophagus. A preliminary report. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1999;108(11 Pt 1):1088-90.
91. Hildmann H, Schmoldt U, von Muhlendahl KE. [Steroid therapy in caustic lesions of the oesophagus]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*. 1982;61(6):288-90.
92. Howell JM, Dalsey WC, Hartsell FW, Butzin CA. Steroids for the treatment of corrosive esophageal injury: a statistical analysis of past studies. *Am J Emerg Med*. 1992;10(5):421-5.
93. Anderson KD, Rouse TM, Randolph JG. A controlled trial of corticosteroids in children with corrosive injury of the esophagus. *N Engl J Med*. 1990;323(10):637-40.

94. Pelclova D, Navratil T. Do corticosteroids prevent oesophageal stricture after corrosive ingestion? *Toxicol Rev.* 2005;24(2):125-9.
95. Ulman I, Mutaf O. A critique of systemic steroids in the management of caustic esophageal burns in children. *Eur J Pediatr Surg.* 1998;8(2):71-4.
96. Yukselen V, Karaoglu AO, Yenisey C, Tuncyurek M, Ozutemiz O. Trimetazidine reduces the degree of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *J Pediatr Surg.* 2005;40(3):505-9.
97. Turkyilmaz Z, Sonmez K, Demirtola A, Karabulut R, Poyraz A, Gulen S, et al. Mitomycin C prevents strictures in caustic esophageal burns in rats. *J Surg Res.* 2005;123(2):182-7.
98. Turkyilmaz Z, Sonmez K, Karabulut R, Gulbahar O, Poyraz A, Sancak B, et al. Mitomycin C decreases the rate of stricture formation in caustic esophageal burns in rats. *Surgery.* 2009;145(2):219-25.
99. Cömert HSY, Ötgün İ, Temiz A, Kozanoğlu İ, Yılmaz Z, Hiçsönmez A, et al. Ratlarda Oluşturulan Korozif Özofajitin Tedavisinde Mezenkimal Kök Hücre Kullanımı. *Çocuk Cerrahisi Dergisi.* 2014;28(1):1-8.
100. Koltuksuz U, Mutus HM, Kutlu R, Ozyurt H, Cetin S, Karaman A, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats. *J Pediatr Surg.* 2001;36(10):1504-9.
101. Sumeli R, Comert HSY, Sarihan H, Imamoglu M, Saygin I. Effectiveness of *Hypericum perforatum* Extract in the Treatment of Corrosive Esophageal Burns. *J Invest Surg.* 2022;35(3):647-52.
102. Seref K, Sonmez K, Gulburun MA, Ekinci O, Oge CB, Gulbahar O, et al. Protective Effects of Contractubex(R) on Stricture Formation after Experimental Corrosive Esophageal Burns in Rats. *Arch Med Res.* 2020;51(7):664-9.
103. Ocakci A, Coskun O, Tumkaya L, Kanter M, Gurel A, Hosnuter M, et al. Beneficial effects of Ebselen on corrosive esophageal burns of rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2006;70(1):45-52.
104. Gemici E, Sürek A, Çikot M, Sakız D, Karabulut M, Gönenç M, et al. The comparison of prednisolone and honey activities in the experimental corrosive esophagitis model. *Journal of Surgery and Medicine.* 2020;4(2):108-11.
105. Madden JW, Davis WM, Butler C, 2nd, Peacock EE, Jr. Experimental esophageal lye burns. II. Correcting established strictures with beta-aminopropionitrile and bougienage. *Ann Surg.* 1973;178(3):277-84.

106. Liu AJ, Richardson MA. Effects of N-acetylcysteine on experimentally induced esophageal lye injury. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1985;94(5 Pt 1):477-82.
107. Gunel E, Caglayan F, Caglayan O, Canbilen A, Tosun M. Effect of antioxidant therapy on collagen synthesis in corrosive esophageal burns. *Pediatr Surg Int*. 2002;18(1):24-7.
108. Ozcelik MF, Pekmezci S, Saribeyoglu K, Unal E, Gumustas K, Dogusoy G. The effect of halofuginone, a specific inhibitor of collagen type 1 synthesis, in the prevention of esophageal strictures related to caustic injury. *Am J Surg*. 2004;187(2):257-60.
109. Topaloglu B, Bicakci U, Tander B, Ariturk E, Kilicoglu-Aydin B, Aydin O, et al. Biochemical and histopathologic effects of omeprazole and vitamin E in rats with corrosive esophageal burns. *Pediatr Surg Int*. 2008;24(5):555-60.
110. Bingol-Kologlu M, Tanyel FC, Muftuoglu S, Renda N, Cakar N, Buyukpamukcu N, et al. The preventive effect of heparin on stricture formation after caustic esophageal burns. *J Pediatr Surg*. 1999;34(2):291-4.
111. Elmas O, Cevik M, Demir T, Ketani MA. Effect of oral tamoxifen on the healing of corrosive oesophageal burns in an experimental rat model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2014;19(3):351-6.
112. Kilincaslan H, Karatepe HO, Kilic E, Aydogdu I, Gedik AH, Olgac V, et al. Beneficial effects of methylene blue on the acute phase of corrosive esophageal burn in rats. *Eur J Pediatr Surg*. 2015;25(3):299-304.
113. Demirbilek S, Bernay F, Rizalar R, Baris S, Gurses N. Effects of estradiol and progesterone on the synthesis of collagen in corrosive esophageal burns in rats. *J Pediatr Surg*. 1994;29(11):1425-8.
114. Demirbilek S, Aydin G, Yucesan S, Vural H, Bitiren M. Polyunsaturated phosphatidylcholine lowers collagen deposition in a rat model of corrosive esophageal burn. *Eur J Pediatr Surg*. 2002;12(1):8-12.
115. Ku Cu KA, Topaloglu N, Yildirim S, Tekin M, Erbas M, Kiraz HA, et al. Protective effects of ursodeoxycholic acid in experimental corrosive esophagitis injury in rats. *Ann Ital Chir*. 2017;88:82-6.
116. Numanoglu KV, Tatli D, Bektas S, Er E. Efficacy of keratinocyte growth factor (palifermin) for the treatment of caustic esophageal burns. *Exp Ther Med*. 2014;8(4):1087-91.

117. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Lahesmaa R, Norman M, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol.* 2007;179(3):1969-78.
118. Bolkent S. Kanserde Yeni Hedef: Mikroveziküller ve Eksozomlar. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi.* 2021;84(1):130-4.

