



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**KOLİT OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ADİPOZ DOKU KAYNAKLI
KÖK HÜCRE TEDAVİSİNDE VERİLME YOLLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI : DENEYSEL ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Adem ŞAFAK

Ankara, 2023



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**KOLİT OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ADİPOZ DOKU KAYNAKLI
KÖK HÜCRE TEDAVİSİNDE VERİLME YOLLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI : DENEYSEL ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sedat Yıldırım

Dr. Adem Şafak

Ankara, 2023

TEŞEKKÜR

Genel Cerrahi alanı uzmanlık eğitiminde bana bildiklerini ve tecrübelerini aktararak benim genel cerrahi uzman hekimi olmamı sağlayan başta saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mehmet Haberal, cerrahi bakış açısını kazandıran kıymetli hocam Prof. Dr. Gökhan Moray, bölüm başkanımız, tez danışmanım ve bize her an doğruyu işaret eden hocam Prof. Dr. Sedat Yıldırım, tez çalışmasına birlikte başladığımız ve desteğini esirgemeyen Doç Dr. Tugan Tezcaner, Doç. Dr. Cem Aydoğan, Doç. Dr. Hüseyin Onur Aydın, Doç. Dr. Emre Karakaya, Doç. Dr. Murathan Erkent, Uzm. Dr. Şener Balas ve Uzm. Dr. Afig Gojayev ve tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda emeği geçen başta tez danışmanım Prof. Dr. Sedat Yıldırım ve hiçbir zaman yardımını esirgemeyen değerli ağabeyim Doç.Dr. Murathan Erkent başta olmak üzere Tıbbi Patoloji Anabilim dalından Doç Dr. Gonca Özgün'e , Biyokimya Anabilim dalından Dr. Öğr. Gör Dr. Eda Özturan Özer'e, Moleküler Biyoloji ve Tıbbi Genetik bölümünden Prof. Dr. Özlem Darcansoy İşeri, Prof. Dr. Erkan Yurtçu, Dr. Öğr. Gör Beyza Gökçınar, Arş. Gör. Mehmet Alp Güner'e, eş kıdemlim ve çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Kübra Topuk'a , Vet. Hekim Sinem Pehlivan, Vet. Hekim Şevval Tarhan'a, araştırma merkezi çalışanları Yusuf Çınar ve Haydar Güler'e teşekkürü bir borç bilirim. Eğitimimde emeği geçen diğer bütün Başkent Üniversitesi çalışanlarına da teşekkür ederim.

Bu eğitim sürecimde her zaman yanımda olan annem Huriye Şafak, babam Rahmi Şafak'a, bana hayatı güzelleştiren ve bir an bile desteğini esirgemeyen canım eşim Seher Şafak'a ve biricik kızlarım Zeynep ve Sevde'ye çok teşekkür ederim.

Dr. Adem Şafak

ÖZET

Adem ŞAFAK

KOLİT OLUŞTURULAN SIÇANLARDA ADİPOZ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRE TEDAVİSİNDE VERİLME YOLLARININ KARŞILAŞTIRILMASI : DENEYSEL ÇALIŞMA

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi

Genel Cerrahi Anabilim Dalı

2023

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH) son yıllarda görülme sıklığı artan ve genç nüfusu etkileyen immünite, genetik ve çevresel faktörlerin neden olduğu bir hastalıktır. Tedavi yöntemleri yıllar geçtikçe artmakta ve İBH üzerine çalışmalar devam etmektedir. Kök Hücrelerin kolit üzerindeki iyileştirici etkisi nedeniyle kök hücre çalışmaları son yıllarda artmaktadır. Bu çalışmalarda İBH benzeri bir kolit modeli kimyasal olarak oluşturulmakta ve kök hücre farklı yollar ile uygulanmaktadır. Kök hücre çoğunlukla lokal yada sistemik yolla verilmektedir. Lokal olarak verilen kök hücreler hücre duvarında hasar yaratmaktadır ve uzun bir kolon segmentinin her alanına uygulanması teknik olarak insanda güçlük yaratmaktadır. Sistemik olarak verilen kök hücreler ise hastalıklı alana düşük konsantrasyonda ulaşmakta, dalak ve akciğer gibi diğer organlarda tutulmaktadır. Bu sebepler sistemik verilen kök hücrelerin etkisi azalmaktadır.

Biz bu çalışmada asetik asit (AA) ile oluşturulan kolit modelinde inferior mezenterik arteri (İMA) selektif perfüze ederek kök hücreyi direkt olarak hastalık oluşturulan sigmoid kolona yüksek konsantrasyonda verdik. Aynı zamanda intra-arteriyal kök hücre uygulamasını barsak duvarına enjekte edilen lokal teknik ile kıyasladık.

Her grupta 6 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan olacak şekilde 5 grup oluşturuldu. Grup 1; kolit kontrol grubu Grup 2; lokal fosfat buffer saline (PBS) grubu Grup 3; lokal kök hücre grubu Grup 4; intra-arteriyal PBS grubu Grup 5; intra-arteriyal kök hücre grubu olarak planlandı. Bütün sıçanlarda rektal lavman yoluyla asetik asit ile kolit oluşturuldu. Tüm sıçanlar kolit oluşturulan gün, kök hücre verilen ameliyat günü (7. gün)

ve sakrifikasyon günü (14. gün) tartıldı. Tüm gruplar ağırlık kaybı, makroskopik laparotomi bulgusu, kan TNF ile uyarılan gen – 6 (TSG-6) düzeyi ve histopatolojik olarak değerlendirildi. TSG-6 kök hücrenin immünmodülasyonuna aracılık eden ve kök hücrenin aktivitesini gösteren bir moleküldür. Aynı zamanda kök hücreler yeşil floresan protein (GFP) ile işaretlenerek floresan mikroskopta incelendi.

Çalışma sonucunda kolit oluşturulan tüm hayvanlarda anlamlı olarak kilo kaybı meydana geldi ($p<0.05$). Yapılan histopatolojik incelemede mukozal hasarın ve iyileşmenin intra-arteriyel grupta anlamlı olarak daha iyi olduğu bulundu ($p<0.05$). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da histopatolojik iyileşmenin intra-arteriyel grupta daha iyi olduğu bulundu ($p>0.05$). Kan TSG-6 düzeyi de intra-arteriyel grupta diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). Laparotomi bulgularında anlamlı olarak farklılık saptanmadı ($p>0.05$). İntra-arteriyel kök hücre grubunda tekniğe bağlı herhangi bir komplikasyon yaşanmadı. İmmünfloresan mikroskopta ise intra-arteriyel olarak verilen kök hücrelerin daha homojen ve diffüz bir şekilde tüm kolona yayıldığı gösterildi.

İntra-arteriyel olarak verilen kök hücreler, lokal olarak verilen kök hücrelerden daha etkili bir şekilde kolona yayılmaktadır. İntra-arteriyle kök hücre uygulaması girişimsel anjiyografik teknikler ile inflamatuvar barsak hastalıkları için güvenli bir tedavi seçeneği olabilir. Bu tedavi için daha fazla deneysel ve klinik çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: kolit modeli, intra-arteriyal kök hücre, yeşil floresan protein

ABSTRACT

Adem Şafak

COMPARISON OF ADMINISTRATION METHODS IN ADIPOSIS TISSUE DELIVERED STEM CELL THERAPY IN RATS WITH COLITIS: EXPERIMENTAL STUDY

Baskent University Faculty of Medicine

Department of General Surgery

2023

Inflammatory bowel diseases (IBD) is a disease whose incidence has increased in recent years and is caused by immunity, genetic and environmental factors affecting the young population. Treatment methods have been increasing over the years and studies on IBD continue. Due to the curative effect of Stem Cells on colitis, stem cell studies have been increasing in recent years. In these studies, an IBD-like colitis model is created chemically and stem cells are applied in different ways. Stem cells are mostly given locally or systemically. Locally administered stem cells cause damage to the cell wall and its application to all areas of a long colon segment is technically challenging in humans. Systemically administered stem cells, on the other hand, reach the diseased area in low concentration and are retained in other organs such as the spleen and lung. For these reasons, the effect of systemically administered stem cells decreases.

In this study, in the colitis model induced by acetic acid (AA), we selectively perfused the inferior mesenteric artery (IMA) and injected the stem cell directly into the disease-induced sigmoid colon in high concentration. We also compared intra-arterial stem cell application with the local technique injected into the intestinal wall.

5 groups were formed with 6 male Wistar-Albino rats in each group. Group 1; colitis control group Group 2; local phosphate buffered saline (PBS) group Group 3; local stem cell group Group 4; intraarterial PBS group Group 5; It was planned as an intra-arterial stem cell group. Colitis was induced in all rats with acetic acid via rectal enema. All rats were weighed on the day of colitis, the day of surgery (day 7), and the

day of sacrifice (day 14), which received stem cells. All groups were evaluated for weight loss, macroscopic laparotomy findings, blood TNF-induced gene-6 (TSG-6) level and histopathologically. TSG-6 is a molecule that mediates the immunomodulation of the stem cell and shows the activity of the stem cell. At the same time, stem cells were labeled with green fluorescent protein (GFP) and examined under a fluorescent microscope.

As a result of the study, significant weight loss occurred in all animals with colitis ($p < 0.05$). In the histopathological examination, mucosal damage and healing were found to be significantly better in the intra-arterial group ($p < 0.05$). Although not statistically significant, histopathological improvement was found to be better in the intra-arterial group ($p > 0.05$). The blood TSG-6 level was also found to be significantly higher in the intra-arterial group compared to the other groups ($p < 0.05$). There was no significant difference in laparotomy findings ($p > 0.05$). There were no complications related to the technique in the intra-arterial stem cell group. In the immunofluorescent microscope, it was shown that the intra-arterially administered stem cells spread to the entire colon more homogeneously and diffusely.

Stem cells given intra-arterially spread to the colon more effectively than stem cells given locally. Intra-arterial stem cell administration may be a safe treatment option for inflammatory bowel diseases with interventional angiographic techniques. More experimental and clinical studies are needed for this treatment.

Keywords: colitis model, intraarterial stem cell, green fluorescent protein

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.Kalın Barsak Embriyolojisi	2
2.2.Kalın Barsak Anatomisi	3
2.3.Kalın Barsak Histolojisi.....	9
2.4.İnflamatuvar Barsak Hastalığı	10
2.4.1.İnsidans ve Epidemiyoloji	10
2.4.2.Etiyoloji	11
2.4.3.Patofizyoloji.....	12
2.4.4.Tanı ve Sınıflandırma	12
2.4.5.Klinik Bulgular	12
2.4.6.Laboratuvar Bulguları.....	13
2.4.7.Görüntüleme	13
2.4.8.Komplikasyonlar	14
2.4.9.Tedavi Yönetimi	14
2.5.Deneysel Kolit Modeli	16
2.5.1.Asetik Asit ile Oluşturulmuş Kolit Modeli.....	16
2.6.Kök Hücre.....	16

2.6.1.Mezenkimal Kök Hücreler	17
2.6.2.Kök Hücrelerin Dokularda Takibi	18
2.6.3.Kök Hücre kaynağı olarak adipoz doku.....	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1.Deney Hayvanlarının Bakımı.....	23
3.2.Deney Hayvanlarında Kolit Oluşturulması.....	24
3.3.Adipoz Doku Temini	26
3.4.Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması ve GFP ile transfeksiyonu	26
3.5.Cerrahi İşlem	28
3.6.Laparotomi Bulgularının Değerlendirmesi	30
3.7.Kan TSG-6 Düzeyi.....	30
3.8.Floresan Mikroskopta Değerlendirme.....	31
3.9.Histopatolojik Değerlendirme.....	31
3.10.İstatistiksel Yöntem	32
4.BULGULAR.....	33
4.1.Kilo Kaybı.....	33
4.2.Histopatolojik değerlendirme	36
4.3.Laparotomi Bulguları	39
4.4.Floresans Mikroskopisi	40
4.5.Kan TSG-6 Düzeyi	41
5.TARTIŞMA.....	43
6.SONUÇ	46
7.KAYNAKLAR.....	47

KISALTMALAR

İBH	:İnflamatuar Barsak Hastalıkları
İMA	:İnferior Mezenterik Arter
AA	:Asetik Asit
PBS	:Fosfatlı Buffer Saline
TSG-6	:TNF ile uyarılan gen – 6
ÜK	:Ülseratif Kolit
CH	:Crohn Hastalığı
MKH	:Mezenkimal Kök Hücre
GFP	:Yeşil Floresan Protein
SMA	:Süperior Mezenterik Arter
SMV	:Süperior Mezenterik Arter
İMV	:İnferior Mezenterik Arter
MP	:Muskülaris Propria
CRP	:C-reaktif Protein
ESH	:Eritrosit Sedimentasyon Hızı
pANCA	:Antinötrofilik Sitoplazmik Antikor
ASCA	:Antisaccharomyces Cerevisiae Antikoru
BT	:Bilgisayarlı Tomografi
MRG	:Manyetik Rezonans Görüntüleme
5-ASA	:5 aminosalisilik asit
CsA	:Siklosporin
TNBS	:Trinitrobenzen Sülfonik Asit
DSS	:Dekstran Sülfat Sodyum
EmKH	:Embriyonik Kök Hücre
ErKH	:Erişkin Kök Hücre
ADKKH	:Adipoz Doku Kökenli Kök Hücre
KİKKH	:Kemik İliği Kökenli Kök Hücre

FBS	:Fetal Bovine Serum
CFSE	:karboksifloresein diasetat süksimidil ester
DİL	:1,1"-dioktadesil-3,3,3"-tetrametilindokarboksiyanin
MHC	:Majör Histocompatibility Complex
ESM	:Ekstraselüler Matrix
İL-1	:İnterlökin-1
İL-6	:İnterlökin-6
TNF	:Tümör Nekrozis Faktör



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İntestinal Sistemin Embriyolojik Gelişimi M.Danowitz	2
Şekil 2. Kolon Anatomisi	4
Şekil 3. Kolonun Kanlanması (F.Netter)	5
Şekil 4. Kolon Venleri (F.Netter)	7
Şekil 5. Kolon Histolojisi	10
Şekil 6. Dil ile işaretlenmiş kök hücrelerin floresan mikroskopunda görünümü	18
Şekil 7. GFP ile işaretlenmiş mezenkimal kök hücreler.....	19
Şekil 8. Hayvanların Gruplandırılması.....	23
Şekil 9. Rektal lavman için kullanılacak katater ve enjektör.	24
Şekil 10. Rektal lavman ile %4'lük asetik asit uygulanması	24
Şekil 11. Ödemli ve inflame sigmoid kolon	25
Şekil 12. 45 derece eğimli masada lavman sonrası beklenilmesi	25
Şekil 13. Adipoz dokunun inguinal bölgeden çıkartılması.....	26
Şekil 14. Kök hücre içeren kültür kabı	27
Şekil 15. Sigmoid kolon duvarına lokal pbs/kök hücre uygulaması	28
Şekil 16. Her iki iliak arterin dönülmesi ve aortun kanülide edilerek kök hücre/pbs uygulanması	29
Şekil 17. Her bir grupta sıçanların kilolarının zamana bağlı değişimi	35
Şekil 18. Her bir gruptaki zaman noktasında sıçanların ağırlığının kutu grafiği	36
Şekil 19. Histopatolojik İnceleme	38
Şekil 20. Floresan Mikroskopik İnceleme	41
Şekil 21. Floresan Mikroskopik İnceleme 2	41

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Campos ve ark'larının hayvanlarda kullandığı makroskopik sınıflandırma	30
Tablo 2. Histopatolojik değerlendirme kriterleri	31
Tablo 3. Deney gruplarının dağılımı	33
Tablo 4. Zamana bağlı olarak her bir grupta hayvanların ağırlık (gram) değişimi	33
Tablo 5. Zamana bağlı her bir grupta hayvanların (gram) ağırlık farkları.	34
Tablo 6. Zaman bağlı olarak her bir grupta hayvanların (gram) ağırlık farkları yüzdesi	34
Tablo 7. Gruplar ile patoloji değişkenleri arasındaki ilişki	37
Tablo 8. 7. gün laparotomi bulguları.....	39
Tablo 9. 14. gün laparotomi bulguları.....	40
Tablo 10. Kan TSG-6 düzeyi	42

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnflamatuvar barsak hastalıkları (İBH) gastrointestinal sisteminin inflamatuvar bozukluklarını içeren hastalık grubudur. Kronik inflamatuvar bir seyir gösteren bu hastalık ülseratif kolit (ÜK) ve Crohn hastalığı (CH) olarak sınıflandırılır (1).

Her iki cinsi eşit oranda etkileyebilir. Sıklıkla 20-30 veya 70-80 yaş aralığında görülmekle beraber herhangi bir yaşta da ortaya çıkabilir. Beyaz ırk ve Yahudilerde sık olarak görülen hastalık A.B.D, Güney Avrupa ve Avustralya’da da fazla görülmektedir. İnsidans 3-15/100.000, prevalans 80-120/100.000 olarak bildirilmektedir. ÜK ilk olarak 1859 yılında Samuel Wilks tarafından tanımlanmıştır. Genellikle rektosigmoid bölgeden başlayarak proksimale doğru ilerler. Rektum ve sigmoid kolona sınırlı kalırsa Ülseratif proktokolit (%40-50), sadece sol kolon tutulumu mevcutsa sol kolit (%30-40), tüm kolon tutulmuşsa pankolit (%20) olarak isimlendirilir (2).

İBH epidemiyolojik, immünolojik, klinik olarak benzerdir. Çalışmalarda genetik olarak yatkın bireylerde, çevresel faktörlerin de etkisi ile normal bağırsak florasına karşı anormal bir immün yanıtın oluşması sonucu meydana geldiği düşünülmektedir (3).

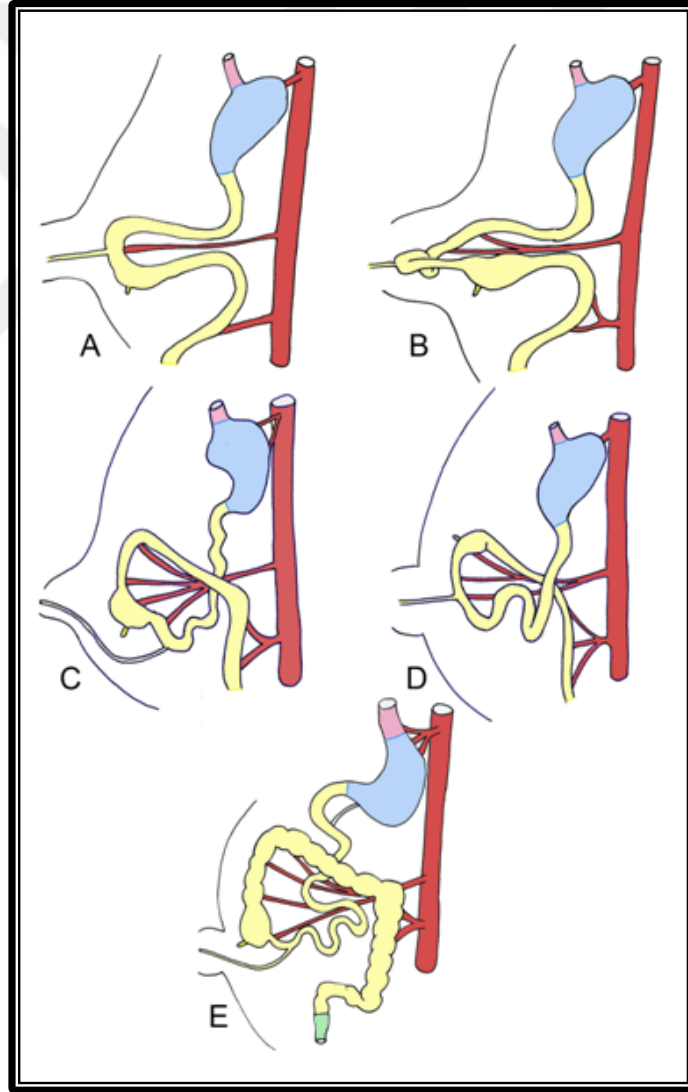
Mezenkimal kök hücreler (MKH) İBH gibi immünite bozukluğunun da eşlik ettiği hastalıklarda umut verici bir tedavi yöntemidir. Yapılan deneysel çalışmalarda kök hücrelerin immünomodülasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. (4-6).

Bu çalışmamızda deneysel kolit modeli oluşturularak İBH’da kök hücrelerin verilme yollarının etkisini incelemeyi hedefledik. İntravenöz olarak verilen kök hücreleri hastalıklı alana gitmek dışında karaciğerde ,dalakta ve akciğerde tutulması sebebiyle etkisinin düştüğü bilinmekte (7). Bu da kök hücrelerin etkisini azaltmakta ve hedeflenen organa daha az oranda kök hücre göçüne neden olmaktadır. Biz bu çalışmada selektif intra-arteriyel inferior mezenterik arter (İMA) perfüzyonu sağlanarak kök hücrenin yüksek konsantrasyonda ve etkin bir biçimde verilmesinin kolit üzerinde etkisini incelemeyi ve intra-arteriyel kök hücre uygulamasının direkt kolon duvarına verilen lokal kök hücre tedavisi ile kıyaslamayı amaçladık. Ayrıca izole edilen kök hücreleri yeşil floresan protein (GFP) ile işaretleyerek dokuda takibini hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalın Barsak Embriyolojisi

Kalın barsak orta barsak (midgut), son barsak (hindgut) tan gelişir. Orta barsaktan, ince bağırsaklar ve transvers kolonun proksimali, Son barsaktan transvers kolonun orta kısmından başlayarak anüsün proksimaline kadar kalın barsaklar ve alt ürogenital sistem gelişir. Orta barsak halkasının distal kolu çekum ve apendiksi oluşturacak olan çekal şişkinlik şeklinde gelişir. Son barsak transvers kolonun sol yarısı inen kolon sigmoid rektum ve anal kanalın süperior parçası gelişir. Son barsak inferior mezenterik arterden (İMA) beslenir (8).



Şekil 1. İntestinal sistemin Embriyolojik Gelişimi
M.Danowitz

2.2. Kalın Barsak Anatomisi

Kolon ileumdan anüse kadar yaklaşık 150-200 cm uzunluğunda, 2,5-8 cm çaptadır (Şekil 1). Çekum, çıkan kolon, transvers kolon, inen kolon ve sigmoid kolon ile devam ederek rektumla birleşir (9).

Çekum kalın bağırsağın ilk kısmıdır, ortalama çapı 4-8 cm arasındadır. Terminal ileum çekuma “ileoçekal valf” adı verilen kalınlaşmış bir invajinasyon yoluyla boşalır. İleoçekal valf mekanizmasıyla ileum içeriğinin kolona hızlı geçişi ve regürjitasyonu önlenmiş olur. Appendiks, ileoçekal valfin yaklaşık 3 cm aşağısından çekumdan çıkan ve kör sonlanan bir yapıdır. Çekumun aslında mezenteri yoktur ancak yine de çoğu kaynakta intraperitoneal olarak kabul edilir, çünkü önemli kısmı mobildir (9).

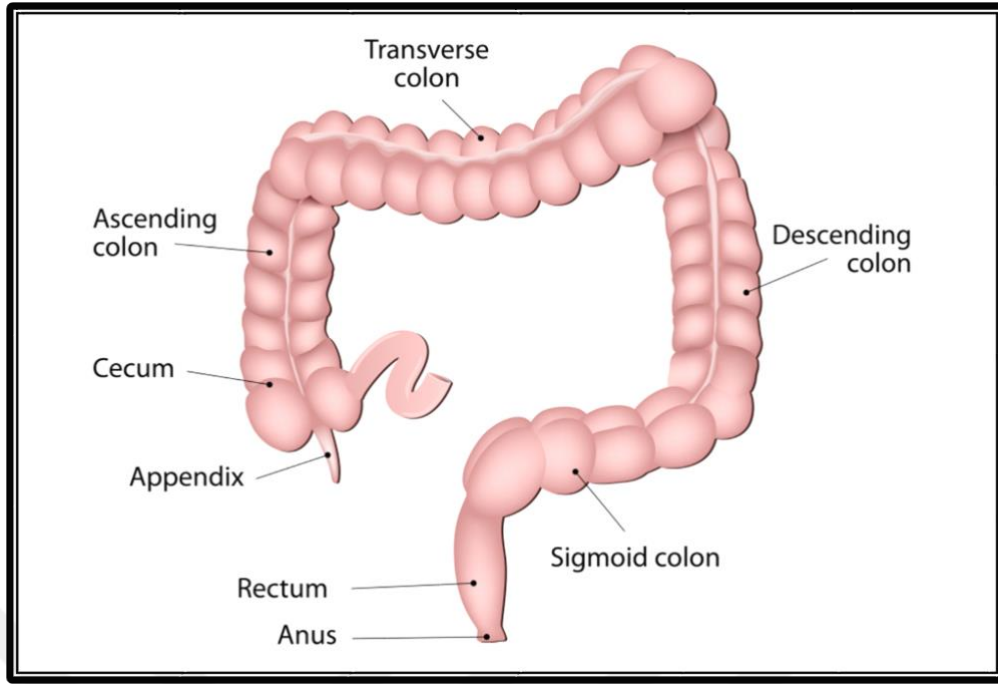
Çıkan kolon, çekumdan karaciğerin sağ lobunun alt yüzüne kadar uzanan yaklaşık 15–20 cm’lik kolon segmentidir. Karaciğer alt yüzünde sola doğru dönerek hepatik fleksurayı yapar. Ön ve yan tarafları peritonla kaplı olup retroperitoneal yerleşimlidir. Doğrultusu aşağıdan yukarıya ve önden arkaya doğru eğiktir (10).

Çıkan kolon arkada iliak kas, iliolumbar ligament, kuadratus lumborum kası, transversus abdominus kasının başlangıcı, sağ böbrek fasyası, uyluğun lateral kutanöz siniri, ilioinguinal ve iliohipogastrik sinirlerle komşudur. Önde ise ince barsaklar, omentum majus ve karın duvarı ile temastadır (11).

Transvers kolon, ortalama 40-50 cm olup kolonun en mobil ve en uzun olan kısmıdır. Hepatik ve splenik fleksuralar arasında uzanır ve intraperitonealdır. Omentum majus transvers kolonun üst kesimine tutunur (12).

İnen kolon, splenik fleksuradan başlayıp pelvis girişinde sigmoid kolona kadar uzanır. Ortalama 25-30 cm uzunluğundadır. İnen kolonun ön yüzü peritonla kaplı olup retroperitoneal yerleşimlidir (10). İnen kolon arkada iliak kas, iliolumbar ligament, kuadratus lumborum kası, transversus abdominus kasının başlangıcı, sol böbrek fasyası, uyluğun lateral kutanöz siniri, ilioinguinal ve iliohipogastrik sinirlerle komşudur. Öndeyse ince barsaklar, omentum majus ve karın duvarı ile temastadır (13).

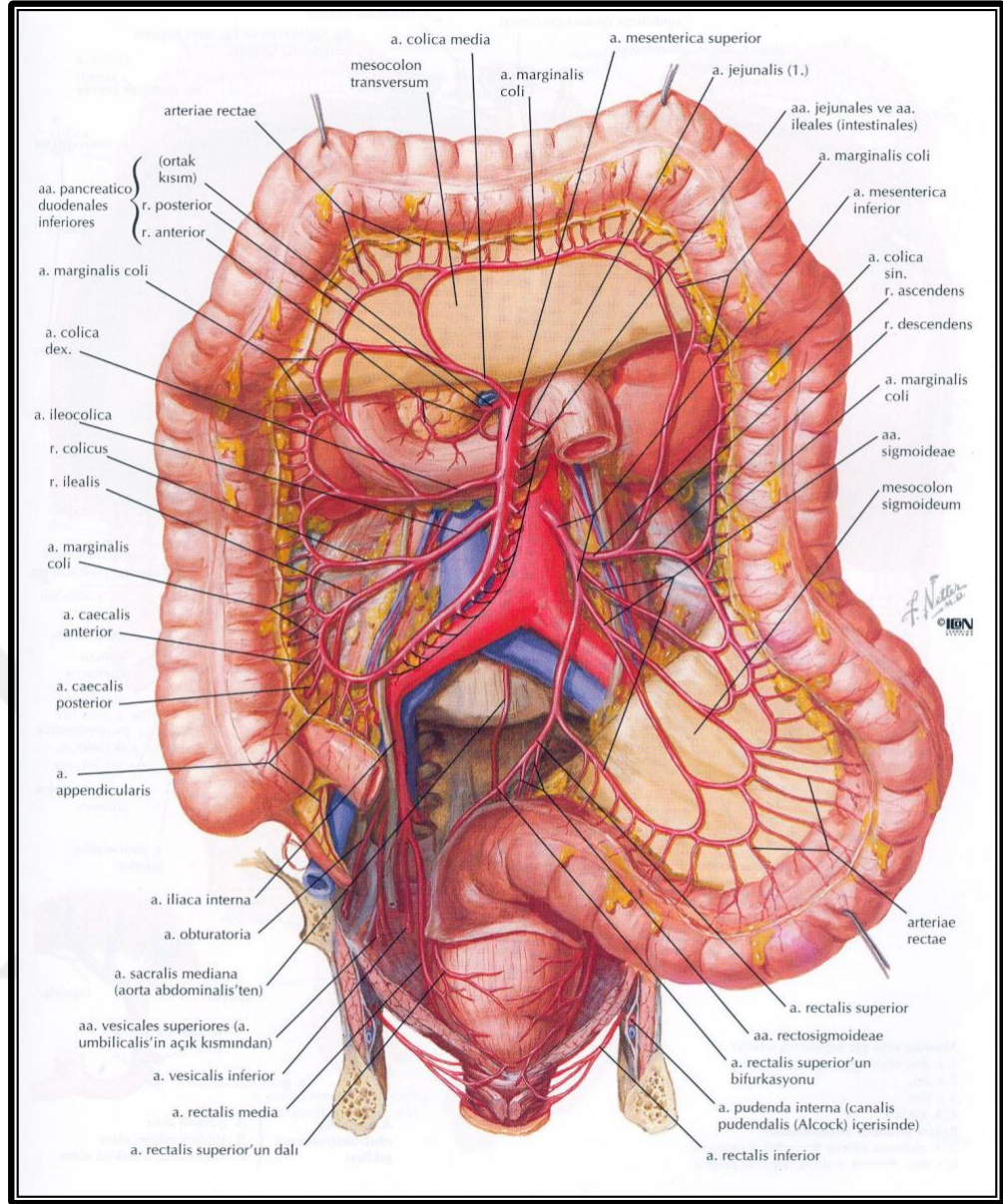
Sigmoid kolon, iliak krest hizasından veya altında kolon mezenteriyle sigmoid kolonu oluşturur. Kolonun bu bölümü aşağı doğru ilerler. Genellikle sakral 3. vertebra hizasında mezonun sonlandığı yerde rektuma döner. Sigmoid kolonun arka tarafındaki yapılar; sol eksternal ve internal iliak damarlar, sol gonodal damarlar, sol üreter ve sakral plexus köklerini içerir (9).



Şekil 2. Kolon Anatomisi

Rektum yaklaşık 12-15 cm uzunluğunda ve sigmoid kolon ile anal kanal arasında uzanır. Rektumun üst 1/3 bölümü ön ve yan yüzlerinde peritonla örtülüdür. Orta 1/3 bölümünün yalnızca ön yüzü periton tarafından çevrilir ve alt 1/3 bölümü peritoneal izdüşümün altındadır. Rektumun proksimali, yaklaşık olarak sakral promontoriumun seviyesinde longitudinal bir kas tabakasını şekillendirmek üzere birleşen kolonun tenya kolileri düzeyi olarak tanımlanır (10).

Anal kanal pelvik diyafram ile anal sınır arasında yaklaşık 4 cm uzunluğundadır. Anatomik anal kanal, anal sınırdan dentat sınıra kadar uzanır. Cerrahi anal kanal ise anal sınırdan puborektalisin rektal tuşe ile palpe edilebilen sirküler alt sınırını oluşturan anorektal halkaya dek uzanan bir yapı olarak tanımlanır. Anorektal halka dentat sınırın 1,5-2 cm üzerindedir (10).



Şekil 3. Kolonun Kanlanması (F.Netter)

Çekum ve çıkan kolon, süperior mezenterik arterin (SMA) iki dalı tarafından beslenir: İleokolik ve sağ kolik arter. Bu arterlerin oluşturduğu arkuslardan çıkan vasa rektalar kolon duvarına mediyal yüzden girerler. Vasa rekta, kolon yüzeyine ulaştığında kısa ve uzun dallara ayrılır. Kısa dallar kolonun mediyal veya mezenterik tarafında, uzun dallar da kolonun lateral ve antimezenterik tarafında dağılırlar. Uzun dallardan ayrılan küçük dallar epiploik apendikslere gönderilir. Transvers kolon da benzer şekilde, SMA'nın dalı olan orta kolik arter tarafından beslenir (14).

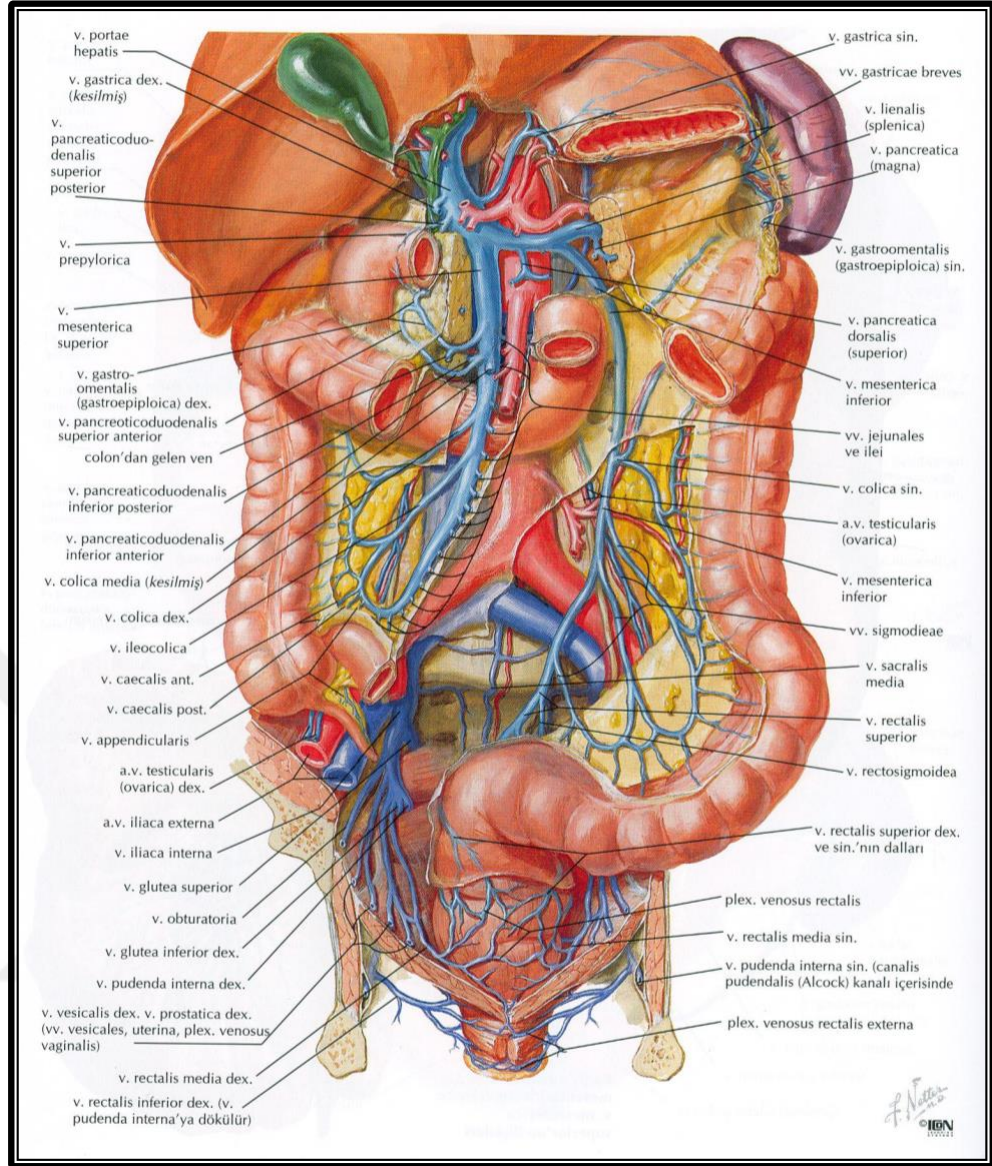
İnferior mezenterik arter (İMA), aortadan üçüncü lumbar vertebranın ve duodenumun transvers segmentinin alt kenarının hizasından veya yakınından çıkar.

İMA'nın dalları, inen kolonda dağılan sol kolik arter, sigmoid kolonda dağılan sigmoidal arter ve rektumda dağılan süperior rektal arterdir. İnsanların %38'inde aksesuar orta kolik arter vardır. Sol kolik arter, insanların %86'sında splenik fleksuraya kadar çıkar, %14'ünde fleksuranın uzağında marjinal arterle birleşir (Şekil 2) (14).

Drummond'un marjinal arteri, ileokolik, sağ kolik, orta kolik, sol kolik ve sigmoidal arter dalları arasındaki bir seri anastomozdan oluşmuş bir arkustur. Marjinal arter, barsak duvarından 1-8 cm uzakta, kalın barsağın mezenterik kenarına hemen hemen paralel bir seyir izler. Süperior rektal arterde sonlanabilir veya sonlanmaz (14).

Rektum ve anal kanalın arterleri; süperior, medial, inferior ve median sakral arterlerdir. Süperior rektal arter İMA'nın terminal dalı olup, arteria iliaka kommünis sinistrayı çaprazladıktan sonra oluşur ve rektumun arka duvarına doğru iner. S3 seviyesinde ikiye ayrılarak üst ve orta rektumu besler. Orta rektal arter, arteria iliaka internadan çıkar, erkekte rektumun kas yapısı ve prostat bezini besler. Kadınlarda bazen olmayabilir, yerini uterin arter alır. Denonvillier fasyası boyunca geçer ve anorektal halka seviyesinde anorektal yüzden rektal duvara girerler. İnferior rektal arter internal pudental arterden çıkar, öne ve mediale doğru ilerleyerek anal kanalın pektinat çizgi distalinde kalan kısmı beslerler (10).

Median sakral arter aort bifurkasyonunun hemen altında çıkar ve periton arkasından alt lomber vertebraların, sakrumun ve koksiksin ön yüzünden aşağı doğru iner. Rektum arka duvarına birkaç küçük dal verir (13).



Şekil 4. Kolon Venleri (F.Netter)

Çekum ve apendiks bölgesindeki venöz dönüş, ileokolik ven yoluyla superior mezenterik vene (SMV) ulaşır. Çıkan kolon ve hepatik fleksuradaki venöz dönüş, vena kolika dekstra yoluyla, transvers kolon venöz dönüşü ise middle kolik ven yoluyla SMV'ye doğrudur. Splenik fleksuradaki venöz dönüş, hem vena kolika media ile hem de vena kolika sinistra yoluyla olmaktadır. İnen kolon venöz dönüşü, vena kolika sinistra yoluyla, sigmoid kolon venöz dönüşü ise vena sigmoidea yoluyla inferior mezenterik vene (İMV) doğrudur. İMV; inen kolon, sigmoid kolon ve proksimal rektumu drene eder. Treitz ligamanının solunda retroperitoneal lokalizasyonda gider, pankreasın posteriorunda splenik venle birleşir (10).

Rektumun venöz drenajı arterlerine paralel seyreder, portal ve sistemik (kaval) dolaşımın her ikisine birden boşalır. Rektumun üst kısmı süperior rektal ven aracılığıyla İMV'ye drene olur. Bu drenaj portal sistemidir. Orta ve alt bölge ise middle rektal ven ve inferior rektal ven aracılığıyla internal pudental vene oradan da internal iliak ven yoluyla sistemik dolaşıma drene olurlar. Süperior rektal ven (portal) ile middle ve inferior rektal venler (sistemik) arasında anastomozlar bulunmaktadır ve bunlar bir portosistemik şant meydana getirirler. Dentat hattın üzerinde üç submukozal hemoroidal yapı vardır. Sol lateral, sağ posterolateral ve sağ anterolateral internal hemoroidal venler süperior rektal vene drene olur. Dentat hattın altında eksternal hemoroid venler pudental venlere drene olur (13).

Kolon, submukoza ve muskularis mukozada lokalize sirküler dizilmiş lenfatik kanallarla çevrilidir. Bu nedenle tümörler barsağı genellikle çepeçevre sarma eğilimindedirler. Bu segmental yapı tümörlerin longitudinal intramural yayılımını sınırlar. Submukozal ve serozal zonlara dairesel ilerlemeler yine anüler lezyonlarla sonuçlanır. Lenfatiklerde arterleri takip eder. Epikolik lenf bezleri küçüktür ve hemen kolon duvarı üzerinde seröz membranın altında yerleşmişlerdir. Parakolik lenf bezleri barsak duvarı ile marjinal arter arasında bulunurlar. Mezokolik (intermezenterik) lenf bezleri kolonun esas damarları SMA, İMA boyunca uzanırlar. Mezenter kökü (principal) lenf bezleri süperior ve inferior mezenterik arter kökü etrafındaki ve aortik düğümler ile sol lomber düğümleri içerir.

Rektum ve anal kanal lenf yolları, biri pektinat çizginin üstünde, diğeri de altında olmak üzere iki duvar dışı plexus oluşturur. Üst plexus, arka rektum düğümlerinden süperior rektal arter boyunca bir düğüm zincirine ve İMA boyunca aortik gangliyonlara drene olur. Orta ve inferior rektal arteri takip eden lenf gangliyonları ise hipogastrik gangliyonlara ve pelvis yan duvarlarında iliaka interna lenf gangliyonlarına drene olur. Rektum alt, anal kanal ve perineal derinin lenfatik drenajı her iki taraf inguinal lenf bezleri ve arteria iliaka interna etrafındaki lenf bezlerine doğru olmaktadır (13).

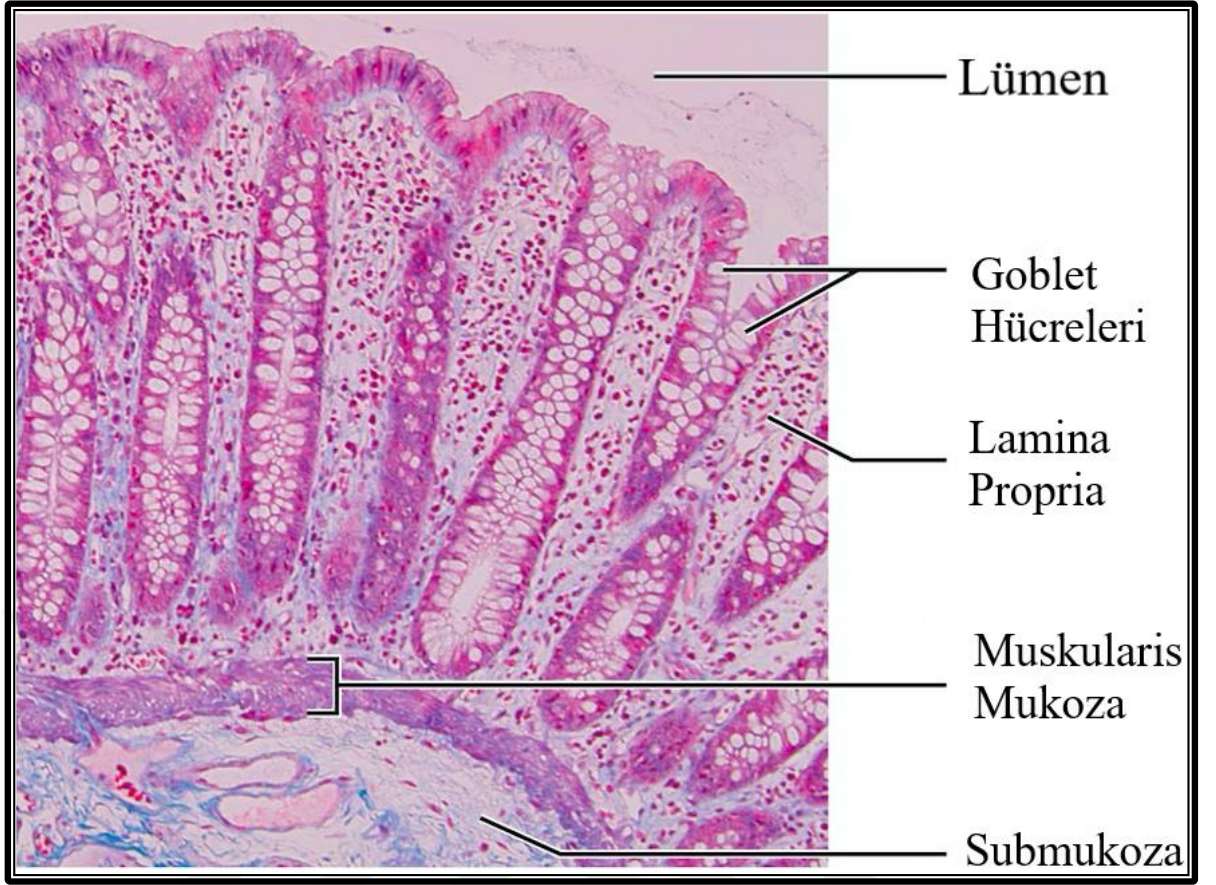
Sempatik sinirler peristaltizmi inhibe ederken, parasempatikler ise stimüle eder. Sağ kolona giden sempatik lifler spinal kordun aşağı altıncı torasik segmentinden kaynaklanır. Torasik splanknik sinirlerle çölyak plexusa sonrada süperior mezenterik plexusa geçerler. Sağ kolonun parasempatikleri sağ vagustan gelir. Sol kolonun ve rektumun sempatik innervasyonu ilk üç lumbal segmentten kaynaklanır. Bu sinirler, preaortik plexuslara katılır ve aorta bifurkasyonunun aşağısında inferior mezenterik plexus adını alır (10).

Sol kolonun parasempatikleri rektumun her iki yanında nervi erigentesleri oluşturmak üzere sakral sinirlerden (S2,S3,S4) gelir. Sakral parasempatiklerin uzantıları splenik fleksura bölgesine hipogastrik plexuslar yoluyla çıkar. Rektumun innervasyonu pelvisin ürogenital organları ile paylaşılır. Torakolumbar segmentlerden çıkan sempatik sinirler inferior mezenterik plexusu oluşturmak üzere inferior mezenterik arterin altında birleşir. Bu saf sempatik sinirler aortik bifurkasyonun altında lokalize süperior epigastrik plexuslara inerler. Daha sonra hipogastrik sinir adıyla ikiye ayrılıp pelvise inerler. Rektum, mesane ve cinsiyet organları hem erkekte hem de kadında hipogastrik sinir yoluyla sempatik innervasyon alırlar. Nervi erigentes (S2, S3, S4)'den çıkan parasempatik lifler, pelvik plexusu oluşturan hipogastrik sinirle, rektumun önü ve yanında birleşir. Buradan çıkan dallar; rektumu, internal anal sfinkteri, prostatı, mesaneyi ve penisi innerve eder. İnternal anal sfinkterin motor innervasyonu kontraksiyona neden olan sempatik ve kontraksiyonu inhibe eden parasempatik liflerledir. Eksternal anal sfinkter ve levator ani kası internal pudental sinirle innerve olur. Rektumun distansiyonu internal sfinkterin relaksasyonu ile sonuçlanır. Eksternal sfinkter istemli olarak kasılır (10).

2.3. Kalın Barsak Histolojisi

Kolon duvarı incebarsak gibi mukoza, tek katlı prizmatik epitel, barsak bezleri, lamina propria, muskularis mukoza, submukoza, muskularis propria ve seroza tabakalarından oluşur (Şekil 5) (15).

Kolon villus ve plika sirkülaris içermez. Lümene bakan yüzeyi düzgündür. Kolonda iç dairesel tabaka devam etmekle beraber longitudinal tabaka teniaları oluşturur. Kolonda villus yoktur buna karşın lamina propriadan muskularis mukozaya dek uzanan barsak bezleri (liberkün kriptaları) içerir (15).



Şekil 5. Kolon Histolojisi

2.4. İnflamatuvar Barsak Hastalığı

İnflamatuvar barsak hastalığı (İBH) barsağın mikroflorasına anormal bir bağışıklık yanıtının olması nedeniyle ortaya çıkan gastrointestinal sistemde tekrarlayan inflamasyon atakları ile seyreden bir hastalıklar grubudur. Barsaktaki inflamasyonun tutulum şekli, derinliği ve barsak dışı tutulumlarının farklılığı nedeniyle iki idiyopatik barsak hastalığına ayrılır (16).

2.4.1. İnsidans ve Epidemiyoloji

Kuzey Amerika’da yapılan bir çalışmada ÜK için yıllık 100.000’de 2,2-19,2 Crohn için 200.000’de 3,1-20,2 civarındadır (17). Amerika’da, 1-1.3 milyon insanın İBH olduğu tahmin edilmektedir (18). İBH insidansı ve prevelansı farklı bölgeler arasında ve zaman içinde karşılaştırılan sistematik bir çalışmada, insidans ve prevelansın batı ülkelerinde yüksek olduğu gösterilmiş (19). İBH, ikinci veya üçüncü dekada sık görülmekle birlikte, 15-30 yaş aralığında pik yapar, ancak her yaşta görülebilir. ÜK insidansı erkeklerde, CH

insidansı kadınlarda daha fazladır. ÜK ve CH benzer karakteristik özelliklere sahiptir; her ikisi de iyileşme ve ataklarla seyretmektedir (20).

Türkiyede yapılan bir çalışmada ÜK için prevalansın en yüksek olduğu yaş aralığı 35-44 yaş Crohn için ise 25-34 yaş aralığı; ÜK ve Crohn da kadınların prevalansın en yüksek olduğu yaş değişmezken erkeklerde prevalansın en yüksek olduğu yaş 45-54 arasında olarak belirlenmiştir (21).

2.4.2. Etiyoloji

İnflamatuvar barsak hastalığında çevresel faktörler, genetik faktörler ve immün yanıtlar ana etiyolojik faktörler olarak kabul edilmiştir (22).

Aile öyküsü her yaşta bireyleri etkilese de erken erişkin yaşamda en önemli faktördür. Genetik olarak duyarlı bir konakçıda mikroplara karşı uygun olmayan ve devam eden bir inflamatuvar yanıtta kaynaklandığı düşünülmektedir. Genom incelemelerinde ÜK ve Crohn Hastalığı arasında 99 risk teşkil eden genomik bölgede benzerlik olduğu görülmüş. Monozigotik ikizlerde Crohn hastalığında %30-35 ile karşılaştırıldığında ÜK % 10-15 benzerlik görülmüş. Yapılan genetik vaka kontrol çalışmalarında aynı etnik kökene ait kohortların popülasyon temelli çalışmalarında Crohn hastalığının daha sık görüldüğü gösterilmiş bu yapılan çalışmalar hem çevresel hem genetik faktörlerin Crohn hastalığında etiyolojik olarak önemli olduğunu göstermektedir (23).

Sigara için yapılan bir mendelien randomize çalışmada sigaranın crohn hastalığı üzerinde %13lük bir etkisi bulunmuş (24). ÜK üzerinde ise koruyucu etkisi olduğunu göstermiş. Obezitenin de İBH üzerine etkisinin olduğuna dair kanıtlar mevcut (25). Yayınlanan bir makalede 71 çevresel faktörün incelendiği 53 adet meta analiz irdelenmiş. İBH riski artıran 9 faktör belirlenmiş; kentsel yaşam, sigara (crohn hastalığı için), apandektomi (crohn hastalığı için), antibiyotik alımı, alkolsüz içecek tüketimi (ülseratif kolit için), vitamin eksikliği ve helicobakter pilori dışı enterohepatik helicobakter türleri. Riski azaltan ise 7 faktör belirlenmiş; fiziksel aktivite (crohn için), emzirme, anne ile yatak paylaşımı (crohn için), çay tüketimi (ülseratif kolit için), yüksek düzeyde folat, yüksek düzeyde d vitamini (crohn için), helicobakter pilori enfeksiyonu (26).

İmmünite üzerine yapılan çalışmalar T Helper 1 (TH1) yanıtına doğru artış gösteren bağışıklık sisteminin bir sonucu olduğu teorisi desteklemektedir. Lökosit artışı

ve apoptozisin düzenleyicisi olan sitokinler İBH üzerinde temel moleküler immün mekanizma olarak düşünülmektedir. Bu nedenle tedavide anti sitokin antikorları olmak üzere bir takım immünsupresif ve immün modölatör ilaçlar kullanılmaktadır (27).

2.4.3. Patofizyoloji

İBH patofizyolojisi tam olarak ortaya konulmamış olmakla birlikte, genetik ve çevresel faktörler, immünpatoloji ve mikrobiyaya farklılıkları sonucunda hasta ile barsak florası arasındaki anormal etkileşim epitel disfonksiyonuna yol açmakta olduğu ve anormal immün cevapla beraber inflamasyonu tetiklediği düşünülmektedir (28).

Crohn hastalığı gastrointestinal sistemin ağızdan anüse kadar herhangi bir bölümünü etkileyen fakat en sık ileumda görülen non kazeifikiye bir granülamatöz inflamasyondur. ÜK ise sadece kolonda sınırlı non-granülamatöz bir inflamasyondur. Her iki durumda da başta nötrofiller olmak üzere daha sonra lenfositlerinde eşik ettiği bir hastalık meydana gelir. Mukozal epitelyal bariyer bozulur, yüzey epitel hücrelerinin emilim fonksiyonu bozulur ve en sık semptom olan kanlı ishal olarak hastalık ortaya çıkar (29).

Crohn hastalığında mukozal hasar, atipik inflamatuvar süreç, %50 non-kazeifikiye granülomlar, fistül formasyonuna da yol açan fissürler görülür. Seroza granüle görünümde ve mat gri renktedir. Muskülaris propiradaki (MP) ödem sebebiyle elastik ve kalındır. Atlayıcı lezyonlar şeklinde tutulum görülür. ÜK'da ise granülom yoktur. Atlayıcı lezyonlar görülmez. İnflamasyon submukozayı geçmez. Mural kalınlaşma olmaz. Kanseri gelişme riski yüksektir. Patolojik özellikleri; mukozal inflamasyon, ülserasyon ve kronik mukozal hasardır (29).

2.4.4. Tanı ve Sınıflandırma

İnflamatuvar barsak hastalığı genellikle crohn ve ÜK olarak ikiye ayrılır. Hastaların bir kısmında ise ayırım yapılamaz ve indeterminate kolit olarak tanımlanır. Özellikle 18 yaş altında bu indeterminate kolit daha sık görülmektedir (30).

2.4.5. Klinik Bulgular

Hastaların genellikle şikayetleri kramp tarzı karın ağrısı, ishal, kanama, perianal apse, fistül ile başvurur. Bazı hastalarda ekstra intestinal şikayetler eşlik eder. Bu

şikayetler ateş, eklem ağrısı, anemi ve tutulan organa bağlı birtakım prezentasyonlardır. İBH'nin tedavi edilmesi çoğu hastada bu ekstra intestinal tutulumları tatmin edici bir şekilde tedavi etmektedir (31).

En sık görülen ekstra intestinal bulgularından biri anemidir. Çoğunlukla kan kaybına bağlı olarak görünmekle beraber emilim problemlerine bağlı demir, folik asit, B12 vitamini eksiklikleri de anemiye sebep olmaktadır. İBH'da kanser riski crohn ve ÜK'da artmakla beraber, özellikle ÜK'da kolorektal kanser sıklığı daha fazladır. İBH'ya bağlı cilt lezyonları arasında perianal fistüller, perianal deri katlantıları, pyoderma gangrenosum, eritema nodosum bulunmaktadır. Ağız ülserleri crohnda daha sık görülür. Üveit ve episklerit İBH'da görülebilen göz lezyonlarındanır. Nadir de olsa, sklerozan kolanjit, hepatit, yağlanma gibi karaciğer problemleri de görülebilmektedir. Ayrıca artrit, ankilozan spondilit, trombozlar, pankreatit, idrarda kalsiyum okzalat ve ürik asit taşları da görülebilmektedir (17).

2.4.6. Laboratuvar Bulguları

Rutin olarak yapılması gereken testler; anemi paneli, c-reaktif protein (CRP), eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), antinötrofilik sitoplazmik antikor (pANCA), antisaccharomyces cerevisiae antikor (ASCA) ve fekal kalprotektindir (32). Fekal kalprotektin 36,5 kD ağırlığında bir çinko bağlayıcı proteindir. İBH'sı olan hastalarda, fekal kalprotektin düzeyinin artması inflame barsak mukozasından nötrofil göçünün artmasına bağlı olarak permeabilite artışı sonucu oluşur (33). pANCA ve ASCA crohn ve ÜK arasındaki ayırıcı ve tanıya yardımcı olmaktadır. pANCA ülseratif kolitte yükselirken ASCA crohn hastalığında yükselmektedir. (34).

2.4.7. Görüntüleme

İBH klinik prezentasyonlarına göre çeşitli tanı araçlarıyla yakalanabilir. Bununla beraber tanı koydurucu esas tanı yöntemi endoskopidir. Endoskopi tanı aracı olmasının yanı sıra tedavi izleminde ve malignite takibinde önem arz etmektedir (35).

Bilgisayarlı tomografi (BT) ile barsak lümeninde daralma, malignite, striktür, enteroenterik fistüllerin görüntülenmesinde yardımcı olur. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ise perianal Crohn tutulumunda perianal abse, fistül gibi perianal komplikasyonların tanımlanmasında önem arz eder. Ayrıca MR enterografi tekniği ile

barsağın 3 boyutlu konfigürasyonu yapılarak endoskopik olarak değerlendirilemeyen yerler değerlendirilir (36,37).

2.4.8. Komplikasyonlar

Crohn hastalığında komplikasyonlar;

Fistül iki döşeyici epitel arasındaki bağlantı olarak tanımlanır. Crohn hastalığında sık görülür. Fistül perianal fistül dışında enteroenterik, enterovajinal ve enterovezikal olabilir. Chrondaki inflamasyonun ilerlemesi veya fibrozisle iyileşmesi sonucu intestinal obstrüksiyon gelişebilir. Tam kat tutulum olduğu için perforasyon meydana gelebilir. Lenfoma büyüme ve gelişme geriliği görülebilir (38).

Ülseratif Kolit komplikasyonları;

Kanama ülseratif kolit ile beraber sık görülür. Toksik megakolon ülseratif kolitin acil tedavi gerektiren en mortal komplikasyonudur. (39).

Ülseratif kolite bağlı kanser gelişimi zamanla artar. Kolorektal kanser gelişme riski 10 yıl sonra %2, 20 yıl sonra % 8 ve 30 yıl sonra % 18 olarak söylenmektedir (40).

2.4.9. Tedavi Yönetimi

İBH'da tek bir tedavi yöntemi tanımlanmamıştır. Hastalık her insanda farklı seyretmekte ve hastalığı her döneminde tedavinin hastaya göre düzenlenmesi gerekmektedir. Montreal sınıflaması ülseratif kolitin yaygınlığı için kullanılmaktadır. Ülseratif proktit, sol kolon tutulumlu kolit ve pankolit olarak sınıflamaktadır (41).

Remisyon: günde üç veya üçten daha az sayıda defekasyon;

Hafif şiddette: günde en fazla dört kez kanlı veya kansız defekasyon olması. Bu grupta nabız, ateş, hemoglobin düzeyi ve sedimentasyon normaldir.

Orta şiddette: günde 4 ile 6 arasında kanlı defekasyon mevcut olup, sistemik semptom yoktur.

Şiddetli: günde 6'dan fazla kanlı defekasyon mevcut olup, genellikle sistemik semptomlar (ateş 37.5 0 C'den fazla, nabız 90/dakikadan fazla), anemi (hemoglobin düzeyi 10.5 g/dL'den düşük) ve artmış sedimentasyon (>30 mm/saat) hızıyla beraberdir (42).

a-) Proktit şeklinde seyreden hafif ve orta şiddetli kolitte topikal tedaviler ilk olarak önerilmektedir (43). Fitil şeklinde 5-Aminosalisilik asit(5-ASA) (Mesalamin 1gr/gün)

ilk tedavi seçeneği olup vakalarda remisyona sağlar. İkinci basamak tedavide ise topikal steroid ile oral mesalamin (2-6 gr/gün) kombinasyonları önerilmektedir (44,45).

b-) Sol kolon tipinde seyreden hafif ve orta şiddetli ülseratif kolitte başlangıçta topikal ve oral mesalamin ile tedaviye başlanır. Kombine tedaviye 10-14 gün sonra yanıt alınamaması durumunda sistemik steroid (40-60 mg/gün tek doz) tedaviye eklenmelidir. 40 mg/gün 30 mg/gün 20 mg/gün gibi tedricen azalan dozlarda 1 ay tedaviye devam edildikten sonra 5mg azaltılarak tedavi kesilir. Şiddetli sol kolon tipinde ise hastaneye yatırarak tedavi başlanması uygundur (44,45).

c-) Pankolit tutulumunda ise topikal tedavi hedefine ulaşamayacağı için topikal tedavi ile beraber oral tedavi başlanmalıdır. Oral (4-6g/gün) sülfasalazin 3/7 veya oral ve topikal mesalamin ile tedavi edilmelidir. Steroid bağımlı veya steroida refrakter olan vakalarda remisyona sağlanması ve remisyona idamesi için azotiopürin veya 6-merkaptopürin eklenmelidir. Cevap alınamaması durumunda tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) antagonistleri denenmelidir (45).

d-) Şiddetli ülseratif koliti olup iv steroid tedavisine gerek duyan vakaların %29'unda kolektomi gerekmektedir. Yedi günlük steroid tedavisinin etkisinin gözlenmediği vakalarda steroid tedavisine devam etmenin anlamı yoktur ve yara iyileşmesini olumsuz etkiler. Bu nedenle üç günlük steroid tedavisine yanıt yoksa kolektomi gündeme gelmelidir. İv steroid tedavisine cevap defekasyon sıklığı serum CRP düzeyi ve karın grafisi ile değerlendirilir. Steroid rezistan vakalarda cerrahiden kaçınmak için siklosporin-a (CsA), takrolimus ve infliksimab denenebilir. İntravenöz CsA özellikle çok etkilidir. Ama bu hastalara daha sonra tekrar cerrahi gerekmektedir. Bu sadece acil ameliyatın elektif cerrahiye bekletilmesi için süre tanır. Steroid tedavisinin kontrendike olduğu vakalarda sürekli intravenöz CsA monoterapisi (4 mg/kg/gün) etkili alternatif tedavi seçeneğidir. Bununla remisyona sağlandıktan sonra kısa sürede azatiopürin (2.5 mg/kg/gün) eklenmeli ve daha sonra intravenöz CsA'dan oral takrolimus tedavisine geçilmeli ve daha sonra 3-6 ayda doz düşürülmelidir. Azatiopürin ve 6-merkaptopürinin etkisi 3 ay gecikebilir. CsA ve takrolimusun idame tedavisinde yeri yoktur (45).

Gelecekte;

Anti-TNF tedaviler üzerine çalışmalar devam etmektedir (46). Certolizumab, etanersept, adalimumab kullanılmaktadır. Natalizumab (anti integrin) , visilizumab (anti CD3), fontolizumab (anti inf-gama), alicaforsen (insan ICAM1an karşı oligonükleotid), basiliksimab (anti-IL2) çalışılmaktadır (45).

Alternatif tedavi olarak ülseratif kolitte, trichurius suis yumurtaları remisyon için çalışılmış ve anlamlı fayda sağlamış. Rektal bizmut subnitratın mukusu parçaladığı ve doku prostanglandinini arttırarak koruyucu etki sağladığı gösterilmiş. Bifidobacterium florayı etkileyerek probiyotik potansiyelinin faydalığı olduğu gösterilmiş (45).

2.5. Deneysel Kolit Modeli

Deneysel kolit modelleri İBH'nın etiyolojisini aydınlatmak, tedavi yöntemlerini geliştirmek üzere uzun süredir sık kullanılmaktadır (47,48). Kolit oluşturmak için kullanılan en sık yöntem kimyasal kolit modelleridir. Trinitrobenzen Sulfonik asit (TNBS), Dextran sülfat sodyum (DSS), asetik asit (AA), oksazolon ve indometasin en sık kullanılan materyallerdir (49–51). Kolit modelleri İBH'nın morfolojik, histolojik, patolojik yönlerini taklit eder (52).

2.5.1. Asetik Asit ile Oluşturulmuş Kolit Modeli

Asetik asit (%4'lük) ile kolon mukozası irrite edilerek histopatolojik olarak İBH'ı taklit eden bir kolit modeli güvenle oluşturulabilir. Yapılan çalışmalarda %4'lük AA ile 15-45 sn arasındaki maruziyetin kolit oluşturmak için yeterli olduğu görülmüş (53–55).

2.6. Kök Hücre

Kök hücrelerinin rejenerasyon ve diferansiyasyon yeteneklerinin olması onları diğer hücrelerden ayırır. Kök hücrelerin bu özellikleri organ veya hücre disfonksiyonuna yol açan spesifik hastalıklar üzerinde çalışmalara yol açmıştır. Embriyonik kök hücreler ve erişkin tip kök hücreler olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Embriyonik kök hücre (EmKH) blastosistin iç hücre kütesinden elde edilir. Erişkin kök hücre (ErKH) erişkin dokusunda mezenkimal alanlardan izole edilir. ErKH etik olarak embriyonik kök hücrelere göre

kullanımı daha uygundur. Mezenkimal kök hücre (MKH) göbek bağı, endometriyal polip, kemik iliği, yağ dokusu gibi çeşitli dokulardan elde edilebilir (56,57).

Erişkin bir kök hücrenin bir dokudan diğerine dönüşme özelliğine plastisite denir. Uygun çevresel şartlar sağlandığında erişkin kök hücreleri genetik olarak yeniden programlanarak diğer dokuların karakteristik özelliğini kazanabilirler (58). İlk olarak denenen kök hücre kemik iliği kaynaklı kök hücreler olup bazı hastalıkların tedavilerinde kullanılmıştır.

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre ise totipotent, multipotent ve pluripotent olarak üçe ayrılır. Totipotent hücreler sınırsız diferansiyasyon yapabilen embriyonik hücrelerdir. Örnek olarak 4-8 hücreli blastomerler verilebilir. Pluripotent hücreler totipotent hücreler gibi tüm hücrelere diferansiye olamaz fakat bir çok hücreye diferansiye olabilirler. Pluripotent blastosist sonrası fetusta bulunan hücrelerdir. Multipotent hücreler gelişmenin daha ileri safhasındaki hücrelerdir. Bunlar kemik iliği ve mezenkimal dokulardaki yetişkin kök hücrelerdir (58–60).

2.6.1. Mezenkimal Kök Hücreler

MKH'lerin izolasyonun kolaylığı kendi kendini yenileme kapasiteleri ve multipotent olması onu kök hücre çalışmaları ve tedavisi için umut verici bir seçenek olarak öne çıkarır. Çalışma için gerekli olan kök hücrelerin kolay ve çok miktarda elde edilmesi önemlidir. Bu sebeple de adipoz doku kökenli kök hücreler(ADKKH) daha sık kullanılmaktadır. Adipoz kök hücreler, osteoartrit, diabetes mellitus, kalp hastalığı ve mastektomi ve yüz onarımı sonrası yumuşak doku rejenerasyonu ve rekonstrüksiyonunu ele alan çalışmalarda kullanılmıştır. Yağ dokusu çalışmaları için en sık ratlar kullanılmıştır (5,61).

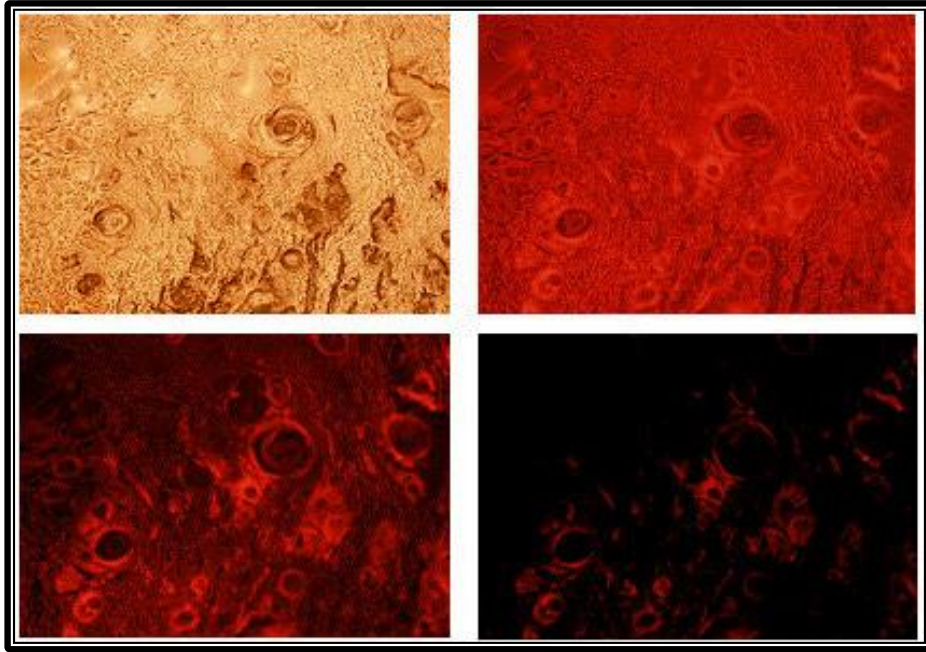
ADKKH ve kemik iliği kökenli kök hücreler (KİKKH) arasında farklılıklar mevcuttu. Kültüre edilen bu hücrelerden stromal kökenli hücreler kültür kabına yapışmışken hemotopoietik kökenli kök hücrelerin ise yapışmadığı bilinmektedir. Kemik iliği kökenli stromal kök hücreler, hematopoezi indüklemek amacıyla kullanıma girerken daha sonraları yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla kas, kıkırdak, kemik, sinir, karaciğer, kalp, beyin, adipoz doku, böbrek, akciğer ve bağırsakların da olduğu çeşitli hematopoetik olmayan dokuların parankim hücrelerine farklılaştıkları gösterilmiştir (62–64).

MKH'ler doku mühendisliği, immunosupresyon, hücre terapileri ve gen terapileri gibi birçok alanda kullanılmaktadır (65). Kök hücreler bu etkilerini apoptoza direnç, bir takım growth faktörlerin ve hormonların salınımı, mikrovasküler yapıda artış ile meydana getirir (66–68).

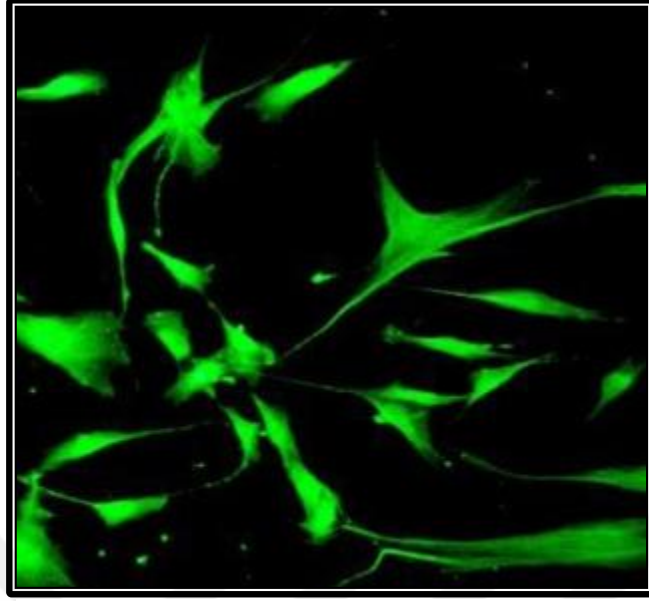
Işık mikroskopi altında kök hücreler iğsi şekilde gözükmektedir. Bu hücrelerin in vitro kültür ortamında çoğalmaları için özel koşullar gerekmemektedir. %10 Fetal bovine serumu (FBS) içeren kültür ortamında plastik tabanına yapışma göstermiş olan hücreler, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler (69).

2.6.2. Kök Hücrelerin Dokularda Takibi

Kök hücrelerin doku içerisinde takibi için farklı yollar denenmiştir. Buna karşın en sık kullanılan yöntem; karboksiflorescein diasetat süksinimidil ester (CFSE), 1,1''-Dioktadesil-3,3,3'',3''-tetrametilindokarbosiyanin (DiI) ile işaretlenmesidir. Bu kalıcı olmamakla birlikte kısa süreli çalışmalarda kök hücrenin takibinin yapılmasında fayda sağlar. Kalıcı olarak takip edilmek istenen hücrelerde ise yeşil floresan proteini (GFP) kök hücre transfekte edilerek floresan mikroskop altında incelenebilir (70,71).



Şekil 6. DiI ile işaretlenmiş kök hücrelerin floresan mikroskopunda görünümü



Şekil 7. GFP ile işaretlenmiş mezenkimal kök hücreler

2.6.3. Kök Hücre kaynağı olarak adipoz doku

Kök hücre ile yapılan çalışmalarda kök hücre kaynağı olarak ilk kemik iliği kullanılmıştır. Kemik iliği dışında da çalışmalar yapılmış ve Zuk ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada adipoz dokunun mezenkimal doku bakımından çok zengin olduğu gösterilmiştir (72). Yağ dokusundan izole edilen kök hücrelerin tercih edilmesinin nedenleri; yüksek volümde kök hücre izolasyonu (santimetreküp başına 100 ila 1000 kat daha fazla), doku diseksiyonunun kolaylığı, kök hücrelerin daha kolay kimyasal tekniklerle izole edilmesidir. Ayrıca adipoz doku kökenli kök hücreler (ADKKH) osteojenik, kondrojenik, adipojenik, kardiyomiyositik, hepatik ve nörojenik farklılaşma dahil olmak üzere birçok farklılaşma yeteneğine sahiptir (73).

MKH'ler için en önemli özelliklerden biriside immünojenik olmamasıdır. Majör Histocompatibility Complex(MHC) I sundukları buna karşın MHC II den yoksun oldukları ve T hücre inaktivasyonuna ve immünsupressif özelliklere yol açtığı bilinmektedir. Bir diğer özellik ise MKH'lerin hematopoez, anjiyogenez, immün ve inflamatuvar modülasyon dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde yer alan farklı sitokin, kemokin ve ekstraselüler matriks (ESM) proteini salgılamalarıdır. Bu hem allojenik transplantasyon açısından önemlidir hem de immünmodülasyonun tedavi edici etkisinden faydalanılmasını sağlamaktadır (74).

ADKKH'ler belirli yüzey molekülleri ile spesifik olarak izole edilebilir. Hücre yüzey moleküllerinden CD13 CD29 CD44 CD73 CD90 pozitif iken, CD10 CD14 CD24 CD31 CD34 CD36 CD38 negatif olarak tanımlanır (75). ADKKH'ler yaşlı donörlere kıyasla genç donörlerde daha yüksek proliferasyon oranına sahiptir. Buna karşın yaşlı donör olsa dahi diferansiyasyon özelliği korunmuştur (76). ADKKH'ler makrofaj bağışıklığını uyarır ve T ve Dentritik hücreleri inhibe ederek anjiyogenezisi indükler. Apoptozu azaltır ve anti-inflamatuar süreci tetikler (74).

Tümör nekroz faktör ile uyarılan gen-6 (TSG-6) doku koruyucu ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğu düşünülen inflamasyonla alakalı salgılanan bir proteindir. MKH'lerin immünmodülatör ve protektif fonksiyonlarına yardım eder (77). Yapılan deneysel kolit modelinde TSG-6 verilen ratlarda kolitte azalma olduğu gösterilmiş. Yapılan bir çalışmada ise TSG-6'nın İnterlökin-1 (İL-1), İnterlökin-6 (İL-6) ve Tümör Nekrozis Faktör (TNF) üretimini azaltarak antiinflamatuvar süreci tetiklediği gösterilmiş (78,79).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nda çalışmamız değerlendirildi ve DA 22/13 numarasıyla onaylandı. Çalışmada kullanılan sıçanlar Başkent Üniversitesi Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Deney Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Ünitesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmamızda kolit oluşturulan sıçanlarda adipoz doku kaynaklı kök hücre tedavisinde verilme yollarının karşılaştırılması planlandı.

Çalışmada ağırlığı 300-450 gram (ortalama 375 gram) olan toplam 36 adet erkek Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Her grupta 6 sıçan olacak şekilde toplam 5 grup oluşturuldu. Kalan 6 sıçan ise kök hücre eldesi için kullanıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu n:6): Rektal yoldan AA verilerek 14. Günde sakrifiye edildi. Tıbbi Biyokimya ABD tarafından kan TSG-6 düzeyi tayini için kan örneği alındı. Sigmoid kolon çıkartılarak histopatolojik inceleme için Patoloji ABD tarafından hemotoksilen-eozin ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

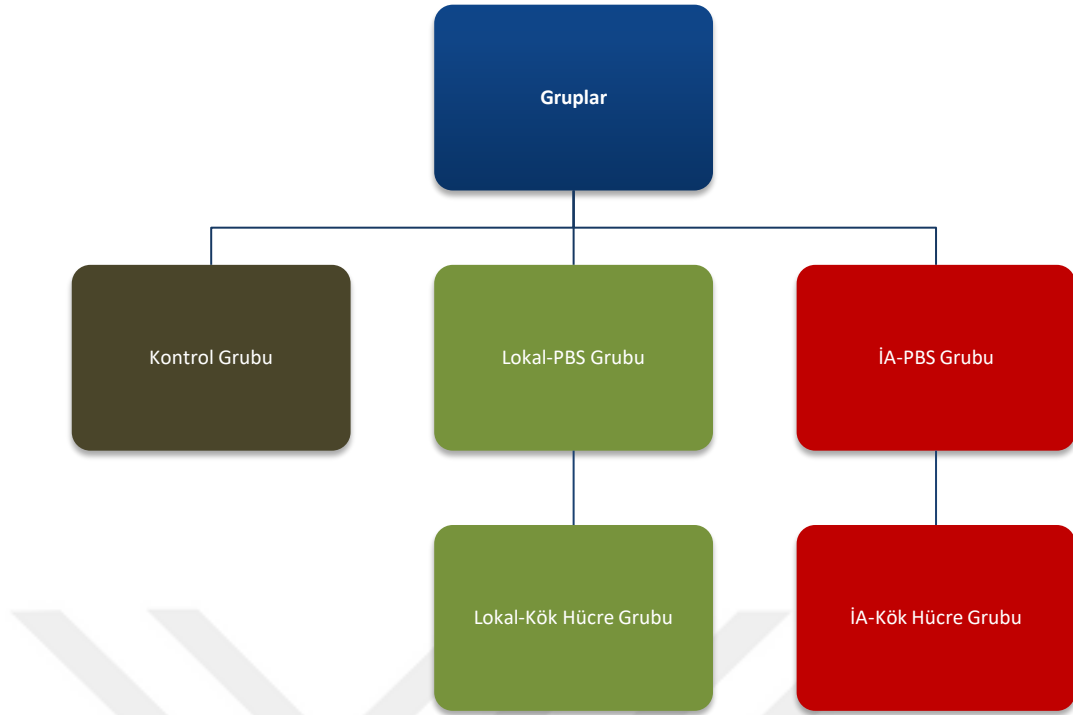
Grup 2 (Lokal-PBS grubu n:6): Rektal yoldan AA uygulandıktan 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi yapılarak kalın barsak duvarına çepeçevre kök hücre içermeyen 0.15 cc PBS verildi ve postoperatif 7. günde sakrifiye edildi. Tıbbi Biyokimya ABD tarafından kan TSG-6 düzeyi tayini için kan örneği alındı. Sigmoid kolon çıkartılarak histopatolojik inceleme için longitudinal olarak ikiye bölündü. Bir kısmı Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD tarafından floresan mikroskopta incelendi. Bir kısmı Patoloji ABD tarafından hemotoksilen-eozin ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

Grup 3 (Lokal-Kök Hücre grubu n:6): Rektal yoldan AA uygulandıktan 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi yapılarak kalın barsak duvarına çepeçevre 6×10^6 adet/kg kök hücre içeren 0.15 cc PBS verildi ve postoperatif 7. günde sakrifiye edildi. Tıbbi Biyokimya ABD tarafından kan TSG-6 düzeyi tayini için kan örneği alındı. Sigmoid kolon çıkartılarak histopatolojik inceleme için longitudinal olarak ikiye bölündü. Bir kısmı Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD tarafından floresan mikroskopta incelendi. Bir kısmı Patoloji ABD tarafından hemotoksilen-eozin ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

Grup 4 (İA-PBS grubu n:6): Rektal yoldan AA uygulandıktan 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi yapılarak her iki ana iliak arter askıya alınıp aorta

kanülize edilerek sigmoid kolonu perfüze edecek şekilde kök hücre içermeyen 1.5 cc PBS verildi. İMA'nın kanülizasyonu mümkün olmadığı için iliak arterler askıya alınarak aorta kanülize edilerek İMA'nın perfüzyonu sağlandı. Postoperatif 7. günde sakrifiye edildi. Tıbbi Biyokimya ABD tarafından kan TSG-6 düzeyi tayini için kan örneği alındı. Sigmoid kolon çıkartılarak histopatolojik inceleme için longitudinal olarak ikiye bölündü. Bir kısmı Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD tarafından floresan mikroskopta incelendi. Bir kısmı Patoloji ABD tarafından hemotoksilen-eozin ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.

Grup 5(İA-Kök Hücre grubu n:6): Rektal yoldan AA uygulandıktan 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi yapılarak her iki ana iliak arter askıya alınıp aorta kanülize edilerek sigmoid kolonu perfüze edecek şekilde 6×10^6 adet/kg kök hücre içeren 1.5 cc PBS verildi. İMA'nın kanülizasyonu mümkün olmadığı için iliak arterler askıya alınarak aorta kanülize edilerek İMA'nın perfüzyonu sağlandı. Postoperatif 7. günde sakrifiye edildi. Tıbbi Biyokimya ABD tarafından kan TSG-6 düzeyi tayini için kan örneği alındı. Sigmoid kolon çıkartılarak histopatolojik inceleme için longitudinal olarak ikiye bölündü. Bir kısmı Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD tarafından floresan mikroskopta incelendi. Bir kısmı Patoloji ABD tarafından hemotoksilen-eozin ile boyandıktan sonra patolojik olarak değerlendirildi.



Şekil 8. Hayvanların Gruplandırılması

ADKKH eldesi için 6 adet sıçan kullanıldı. Sıçanların inguinal bölgelerinden eksize edilen adipoz dokular uygun işlemlerden geçirilerek MKH izolasyonu ve hazırlanması tamamlandı. Çalışma grubundaki sıçanların bir kısmına hazırlanan kök hücreler verildi. Adipoz doku eldesi amacıyla kullanılan 6 adet sıçan 150 mg/kg ketamin hidroklorür intraperitoneal olarak verilerek sakrifiye edildi.

GFP işaretli ADKKH'lerin takibi için floresan mikroskopta inceleme yapıldı.

Denek sayıları ve çalışma süresi belirlenirken literatürde daha önce kolit oluşturulmuş kolon üzerinde yapılan çalışmalar örnek alındı (51). Denek sayısı, Başkent Üniversitesi Biyoistatistik ABD tarafından yapılan güç analiz sonucunda 10 ile 20 arasında bir değer uygun bir değer olmakla birlikte çalışmada olası kayıplar düşünülerek, her bir grupta bir denek daha fazla alınarak toplam 30 denek üzerinden % 95 güvenilirlik sağlanacak şekilde belirlendi. Yapılan ön analizlerin sonucunda her ana grupta 6 denekten oluşan 5 grup olacak şekilde toplam çalışma süresi 14 gün olarak belirlendi.

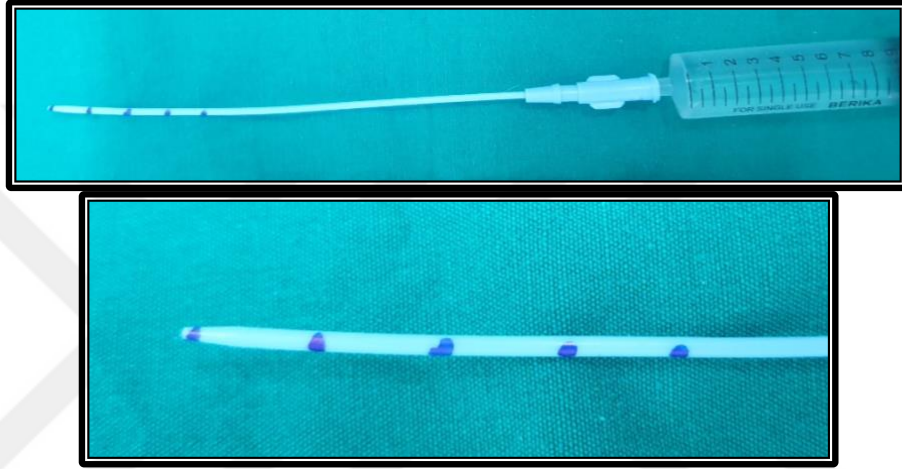
3.1. Deney Hayvanlarının Bakımı

Tüm deney hayvanlarına 12 saat karanlık 12 saat aydınlık olacak şekilde eşit oda şartları sağlandı. Oda ısısı 18-20 °C arasında sabitlendi. Sıçanlar yem ve musluk suyu ile

beslendi. Hipotermi oluşmasını engellemek için sıçanlar ışık kaynağı altında ameliyat edildi ve uyanma esnasında da bu uygulamaya devam edildi.

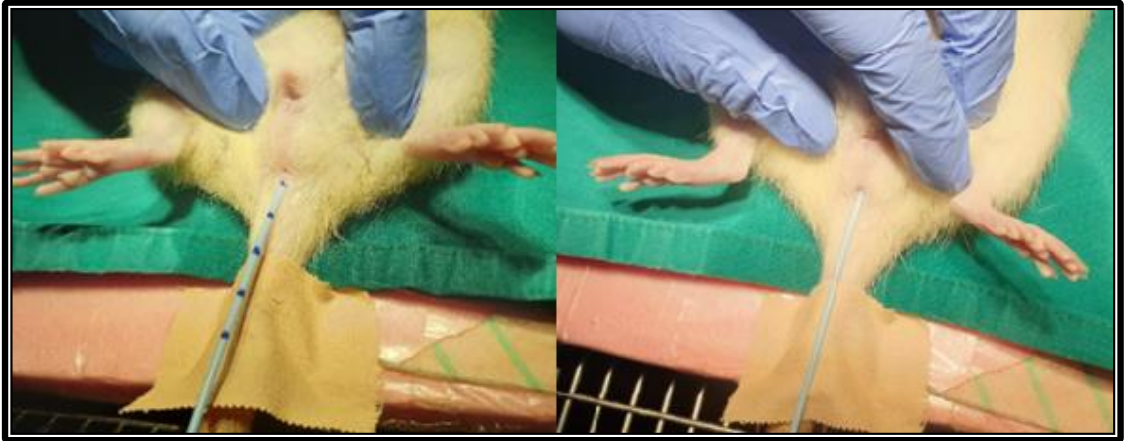
Toplam 14 gün ve toplam 30 sıçanla çalışıldığından deneklerin karışmaması için, hayvanların barındırıldığı kafeslerin üzerine grup numaraları yazıldı ve her gruptaki sıçanın kuyrukları farklı renkler ile işaretlendi. Tüm hayvanlar cerrahi sonrası dönemde cilt altı 0.02 mcg/kg fentanil ile analjezi uygulandı. Çalışma sonucunda tüm sıçanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

3.2. Deney Hayvanlarında Kolit Oluşturulması



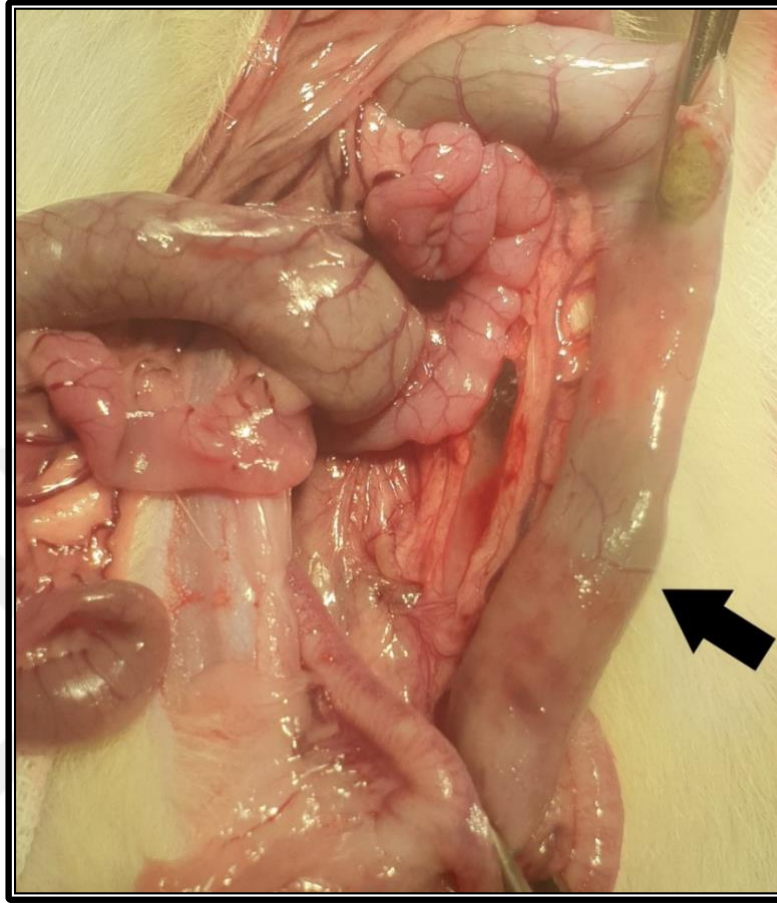
Şekil 9. Rektal lavman için kullanılacak katater ve enjektör. Her bir mavi çizgi 1 cm göstermektedir.

Tüm deney grubundaki sıçanların işlem öncesi barsaklarını boşaltmak için arka ayakları üzerinde kuyruğundan tutulup zıplatılarak defekasyon refleksi uyarılarak barsaklar boşaltıldı. İntraperitoneal olarak 0.04 mg/gr ketamin ve 0.005 mg/gr ile anestezi sağlanarak işleme başlandı. Kolit oluşturmak için 45 derece eğimli rampada baş



Şekil 10. Rektal Lavman ile %4'lük asetik asit uygulanması

aşağı pozisyonda anal kanala yerleştirilen 1.5 mm kalınlığında 6 cm (rektum içerisinde uzanan kısmı) uzunluğunda kateter ile 1.5 cc %4'lük AA solüsyonu ile kolit oluşturulması için verildi. 20 sn bu pozisyonda tutularak katater çekildi (Şekil 9,10,12).



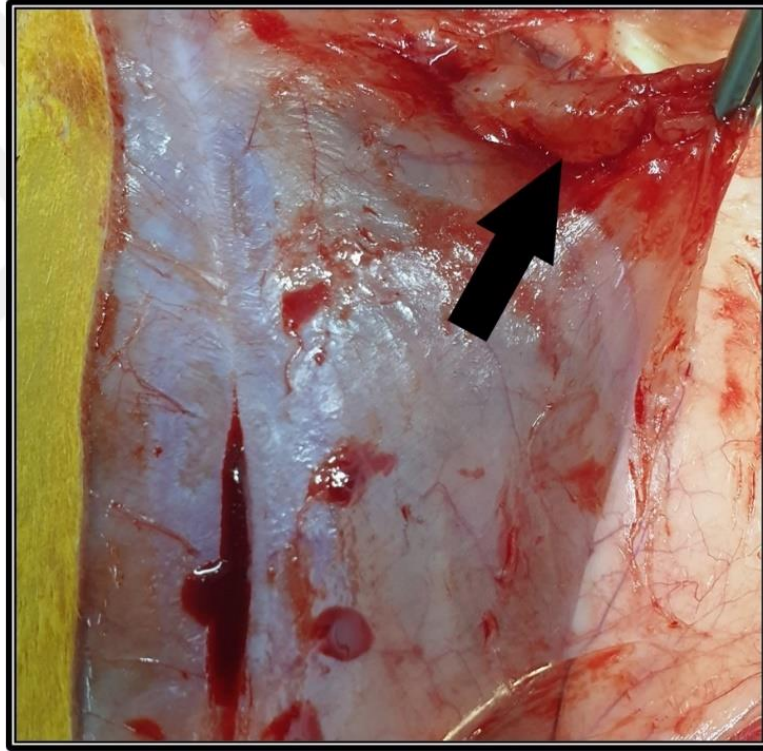
Şekil 12. Ödemli ve inflame sigmoid kolon (Siyah ok sigmoid kolonu göstermektedir)



Şekil 11. 45 derece eğimli masada lavman sonrası beklenilmesi

3.3. Adipoz Doku Temini

6 adet sıçan adipoz doku temini için kullanıldı. Anesteziyi takiben cerrahi loj traş edildi. Cilt sterilizasyonu sağlandı. Sırtüstü pozisyonda cerrahi masaya flaster ile tesbitlendi. Ksifoidden pubise uzanan insizyonla cilt cilt altı geçildi. Keskin diseksiyon ile bilateral inguinal bölgelere uzanılarak yağ dokuları izole edildi. İnguinal yağ yastıkçıları çıkartıldı. 6 sıçandan 90 gram yağ doku elde edildi (Şekil 13). Eksize edilen yap dokular serum fizyolojik ile yıkanarak steril kaplara alındı. Steril kap içerisine %80 DMEM High Glucose (Diagnovum ®) + %10 penisilin/streptomisin (Capricorn SCI ®) + %10 amfoterisin B (Wisent Multicell ®) içeren solüsyon eklenerek besiyeri hazırlandı.



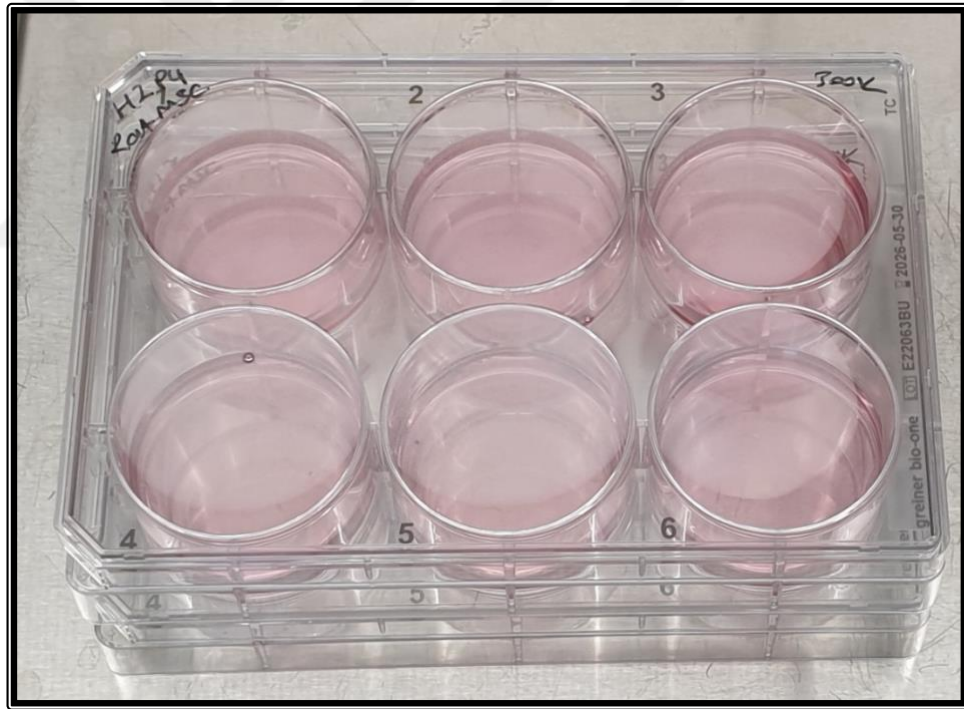
Şekil 13. Adipoz dokunun inguinal bölgeden çıkartılması

3.4. Adipoz Doku Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması ve GFP ile transfeksiyonu

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu için alınan dokular bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı. Vasküler yapılar bu sırada uzaklaştırıldı. 2 mg/ml kollajenaz tip 1 (Triogen ®) içeren DMEM ile 37°C’de 1 saat sallanara karıştırıldı. Kollajenaz

%10'luk Fetal Bovine Serum (Capricorn SCI ®) ile nötralize edildi. PBS ile 600 g'de 7 dk santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant atılarak, kök hücre içeren pellet PBS ile süspansiyon edildi. Hücre canlılığı ve trypan blue ve thoma lamı ile belirlendi.

Transfeksiyon için memeli promotörü altında güçlendirilmiş yeşil floresan protein (EGFP) içeren ekspresyon vektörü pEGFP-N2 kullanıldı. Toplam 12 hayvan için 12 adet hücre kültür kabına (CyrtoObe Well Plate ®) 6×10^5 adet kök hücre ekildi ve %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren L-glutaminli DMEM'de kültür kabının %50-60'ını kaplayana kadar 37°C'da, %5'lik CO₂'li inkübatörde kültüre edildi. Transfeksiyon öncesi besiyeri atılarak hücreler yüzeyden PBS ile yıkandı. Optimizasyon sonuçlarına göre belirlenen 1,25-2,5 µg pEGFP-N2 OPTI-MEM I besiyeri (ThermoFisher) içerisinde kullanıcı protokolüne uygun olarak (12 microlitre lipofectamin ile 6×10^5 hücre transfekte edildi) Lipofectamine™ Stem Reagent (ThermoFisher) ile karıştırıldı ve 10 dk inkübe edildi.



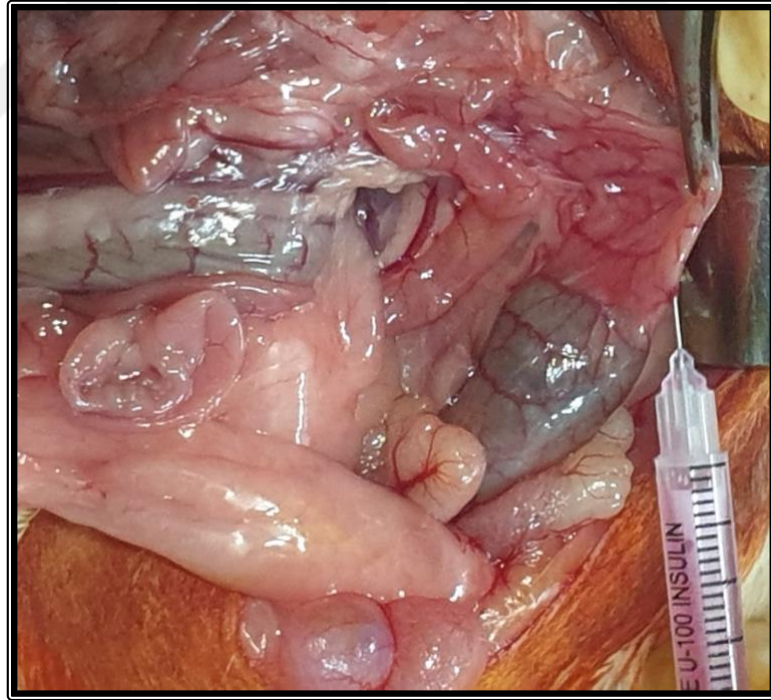
Şekil 14. Kök Hücre İçeren Kültür Kabı

Daha sonra DNA-lipit karışımı hücelere eklendi ve hücreler 24-48 saat aralığında 37°C'da CO₂'li etüvde inkübe edildi. 24-48 saat aralığında hücreler FITC (525nm) filtresi kullanılarak floresan inverted mikroskopta incelendi (Leica, Almanya). GFP ile işaretli hücre miktarına göre inkübasyon süresi değerlendirildi ve her kuyucukta 3×10^6 adet kök hücre sayıldı (Şekil 14). Hücreler cerrahi işlem sırasında tripsin ile kaldırılarak işlem için enjektörlere alındı.

3.5. Cerrahi İşlem

Sıçanlara, periton içine 0.06 mg/gr ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc), 0.007 mg/gr ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer inc) uygulanarak anestezi verildi. Anestezi derinliği ekstremitelerden çekme yanıtı ile değerlendirildi. Hayvanlar uyuduktan sonra ameliyat alanları elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi ve cerrahi masaya sırtüstü gelecek şekilde dört ekstremiteden flaster ile tespit edildi. Ameliyat alanı %10 povidon-iodin (Batticon antiseptik solüsyon, Adeka Ltd. Türkiye) ile temizlendi ve cerrahi boyunca sterilite koşulları sağlandı. Cerrahi işlemlerin tümü aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi.

Kontrol grubundaki sıçanlar 14. gün anestezi verilmesini takiben ksifoidin 1 cm altından başlayarak pubisin 1 cm üzerine gelecek bir insizyon kullanılarak cilt ciltaltı geçildi. Fasya açılarak laparotomi tamamlandı. Sigmoid kolon rezeke edilerek mikroskopik inceleme için ayrıldı. Kalpten intrakardiyak olarak kan alındı. Hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

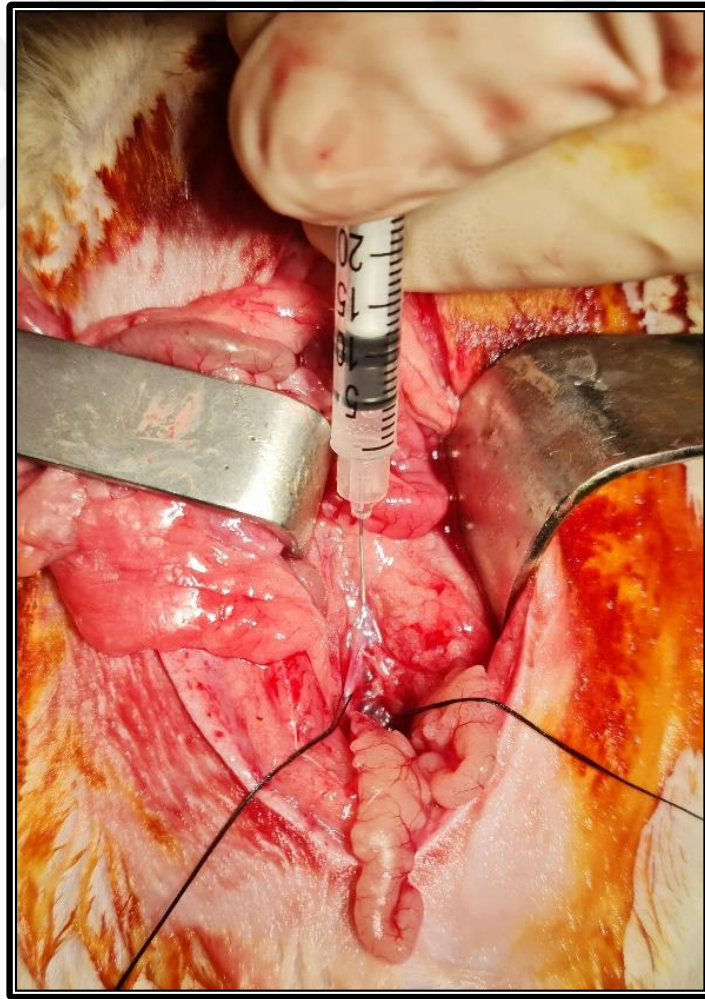


Şekil 15. Sigmoid kolon duvarına lokal pbs/kök hücre uygulaması

Lokal kök hücre grubunda ve ise (Grup 2 ve Grup 3) 7. gün anestezi verilmesini takiben ksifoidin 1 cm altından başlayarak pubisin 1 cm üzerine gelecek bir insizyon kullanılarak cilt ciltaltı geçildi. Sigmoid kolon duvarına 2 mm aralıklarla 1.5 cc PBS ve ADKKH-PBS subserozal (6×10^6 adet/kg kök hücre) olarak verildi (Şekil 15). Fasya ve cilt kapatılarak ameliyat sonlandırıldı. Postoperatif 7. gün tekrar laparotomi yapıldı.

Sigmoid kolon rezeke edilerek mikroskopik inceleme için ayrıldı. Kalpten intrakardiyak olarak kan alındı. Hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.

İntraarteriyal kök hücre grubunda ise (Grup 4 ve Grup 5) 7. Gün anestezi verilmesini takiben ksifoidin 1 cm altından başlayarak pubisin 1 cm üzerine gelecek bir insizyon kullanılarak cilt cilt altı geçildi. Sigmoid kolon ortaya konularak İMA tanımlandı. Her iki iliak arter askıya alınarak bulldog klemp ile kapatıldı. Aorta İMA dalının üzerinden anterior yüzden 30G iğne ile 30 derecelik bir açı ile kanülize edilerek 1.5 cc PBS ve ADKKH-PBS (6×10^6 adet/kg kök hücre) solüsyonu ile perfüze edildi (Şekil 16). Bulldog klemppler açıldı. Aortada meydana gelebilecek kanama için bası ile hemostaz sağlandı. Fasya ve cilt kapatılarak ameliyat sonlandırıldı. Postoperatif 7. gün tekrar laparotomi yapıldı. Sigmoid kolon rezeke edilerek mikroskopik inceleme için ayrıldı. Kalpten intrakardiyak olarak kan alındı. Hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi.



Şekil 16. Her iki iliak arterin dönülmesi ve aortun kanülize edilerek kök hücre/pbs uygulanması

3.6. Laparotomi Bulgularının Değerlendirmesi

Hayvanlara 7. günde kök hücrelerin uygulanması sırasında ve sakrifikasyon işlemi sırasında yapılan laparotomi sürecinde bulgular değerlendirildi. Osame ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kolon duvarı makroskopik olarak değerlendirilmiş (80). Bizde kolonda ödem, peritonit varlığı ve iskemiye değerlendirdik. 14. Günde makroskopik olarak mukozayı da Campos ve arkadaşlarının kullandığı sınıflamaya göre değerlendirdik (81). Ayrıca intra-arteriyel kök hücre grubunda hematoma varlığını inceledik.

Tablo 1: Campos ve arkadaşlarının hayvanlarda kullandığı makroskopik sınıflandırma

DERECE	BULGULAR
0	Normal mukoza görünümü
1	Eritemli alanlar
2	Lineer ülserasyonlar, granüler zemin
3	15 mm – 45 mm arasında ülserli mukoza adacıkları
4	45 mm üstü yaygın düzensiz ve multipl ülserler, irregüler zemin

3.7. Kan TSG-6 Düzeyi

Serum örneklerinde TSG-6 analizleri BT-Lab (China) marka ticari kit (Katalog no: E2308Ra) kullanılarak ELISA yöntemiyle belirlenmiştir.

TSG-6 analizi “sandwich ELISA” yöntemi prensibine dayanmaktadır. Rat TSG-6’ya özgü monoklonal antikor kaplı kuyucuklara belirtilen hacimlerde örnek/standart/kontrol, biotinleşmiş antikor ve streptavidin-HRP eklenerek 37 °C’de bir saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara ticari kitle belirtilen yıkama prosedürü uygulanarak bağlanmayan kısımların uzaklaştırılması sağlanmış ve ardından tüm kuyucuklara substrat solüsyonları eklenerek yeniden 37 °C’de on dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan mavi renk stop çözeltisinin eklenmesiyle sarıya dönüşmüş ve tepkime durdurulmuştur. Oluşan rengin absorbansı ELISA okuyucusunda 450 nm’de ölçülmüş ve standart eğri kullanılarak örnek derişimleri hesaplanmıştır. Sonuçlar ng/ml olarak ifade edilmiştir. Yöntemin analitik duyarlılığı 0.049 ng/ml ‘dir.

3.8. Floresan Mikroskopta Değerlendirme

Parafin bloklar halinde hazırlanan doku örnekleri 24 saatlik formol ile takibe alındı. Sonrasında alınan kesitler floresan mikroskop altında incelenerek kök hücrelerin dağılımı değerlendirildi.

3.9. Histopatolojik Değerlendirme

Yapılan çalışmalarda kolit oluşturulan hayvanlarda mikroskobik olarak submukozal ödem, kriptit, kript absesi, inflamatuvar hücre yoğunluğu, goblet hücre kaybı gibi birçok parametre incelenmiş (51,82–84). Bizde bu çalışmalar baz alınarak mukozal yapı kaybı, ülserasyon, inflamasyonun şiddeti, kriptit, kript absesi, mukozal hasarın derinliği ve rejenerasyonu değerlendirmeyi planlandık.

Parafin bloklar halinde hazırlanan doku örnekleri 24 saatlik formol ile takibe alındı. Sonrasında Hemotoksilen-Eozin ile boyanarak ışık mikroskopisi altında patolog tarafından mukozal yapı kaybı, ülserasyon, mukozal hasar derinliği, inflamasyon, rejenerasyon, kriptit, kript absesi incelendi.

Mukozal kayıp, kayıp alanının büyüklüğü göz önünde bulundurularak 1-2-3 olarak skorlandı. Mukozal hasar derinliği sadece mukozayı etkiliyorsa 1, mukoza ve submukozayı etkiliyorsa 2, tam kat ise 3 olarak skorlandı. İnflamasyon akut inflamasyonun varlığı ve yaygınlığına göre 1-2-3 olarak skorlandı. Rejenerasyon yanıtı yoksa 0, mukozal hasar alanının kenarından epitelizasyon başlamışsa 1, epitelizasyon var ancak kript kaybı mevcut ise 2, epitelizasyon komplete yakın ise 3, komplet epitelizasyon mevcut ise 4 olarak skorlandı.

Tablo 2. Histopatolojik Değerlendirme Kriterleri

Skorlama	0	1	2	3	4
Mukozal Kayıp	Kayıp yok	Az miktarda kayıp	Orta miktarda kayıp	Tam mukozal kayıp	
Ülserasyon	Yok	Var			
Mukozal Hasar	Hasar yok	Mukozal hasar	Submukozaya ulaşan hasar	Tam kat hasar	
Derinliği					
İnflamasyon	Yok	Az	Orta	Şiddetli	
Rejenerasyon	Rejenerasyon yok	Kenardan başlayan epitelizasyon	Epitelizasyon var ama kript kaybı mevcut	Tama yakın rejenerasyon	Tam rejenerasyon
Kriptit	Yok	Var			
Kript Apsesi	Yok	Var			

3.10. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 25.0 programı ile gerçekleştirildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu histogram grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Tanımlayıcı analizler sunulurken ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen (nonparametrik) değişkenler ikiden fazla grup arasında değerlendirilirken Kruskal Wallis Testi kullanıldı.

Gruplar arasındaki farklılıklar Benferroni Metodu ile belirlendi. Sıçanların 0., 7. ve 14. gün ağırlık ölçümlerinin zamana bağlı değişimini belirlemek amacıyla Friedman Testi kullanıldı. Farklı bulunan ölçümleri belirlemek için Wilcoxon Sıra Sayıları Testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişki Fisher's Exact Testi ile değerlendirildi. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Deney hayvanlarında kolit modeli oluşturulmasından sakrifikasyonlarının tamamlanmasına kadar geçen süreçte herhangi bir hayvan çalışma dışı bırakılmadı ve herhangi bir hayvan ölmedi.

Tablo 3. Deney Gruplarının Dağılımı

		n	%
1	TNBS uygulamasından 14 gün sonra anestezi sakrifiyesi ve hitopatolojik inceleme	6	(20,00)
2	TNBS uygulamasından 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi ile kalın barsak duvarına çepeçevre kök hücre içermeyen 1 cc PBS verilecek ve sıçanlar postoperatif 7. günde sakrifiye edilecek ve hitopatolojik inceleme	6	(20,00)
3	TNBS uygulamasından 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi ile kalın barsak duvarına çepeçevre kök hücre içeren 1 cc PBS verilecek ve sıçanlar postoperatif 7. günde sakrifiye edilecek ve hitopatolojik inceleme	6	(20,00)
4	TNBS uygulamasından 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi ile inferior mesenterik arterden kök hücre içermeyen 1 cc PBS verilecek ve sıçanlar postoperatif 7. günde sakrifiye edilecek ve hitopatolojik inceleme	6	(20,00)
5	TNBS uygulamasından 7 gün sonra anestezi altında orta hat laparotomi ile inferior mesenterik arterden kök hücre içeren 1 cc PBS verilecek ve sıçanlar postoperatif 7. günde sakrifiye edilecek ve hitopatolojik inceleme	6	(20,00)

4.1. Kilo Kaybı

Hayvanların 0 7 ve 14. Gün ağırlıkları kaydediliş olup ortalama ağırlıkları tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Zamana bağlı olarak her bir grupta hayvanların ağırlık (gram) değişimi

Friedman Testi, Kruskal Wallis Testi, Harfler her bir satırdaki zamana bağlı anlamlı farklılığı gösterir^{a,b,c}. [Ort.±ss|Medyan(Min.-Mak.)]

	0.Gün	7.Gün	14.Gün	p değeri
1	371,67±54,31 384 (304-454) ^a	346±53,42 349 (276-424) ^b	349,17±52,78 354,5 (279-420) ^b	0,009
2	343,67±25,88 352,5 (303-372) ^a	324,5±23,99 331,5 (291-353) ^b	325,5±28,65 332,5 (290-360) ^b	0,009
3	378,5±9,95 380 (360-388) ^a	351,33±14,67 355 (325-366) ^b	366±15,21 370,5 (339-379) ^c	0,002
4	357,33±19,93 361 (333-385) ^a	332,5±23,26 336,5 (302-365) ^b	335,17±25,47 340 (299-369) ^b	0,009
5	359,67±24,04 355 (340-405) ^a	339±22,82 331,5 (320-380) ^b	349±24,04 350 (320-389) ^c	0,006

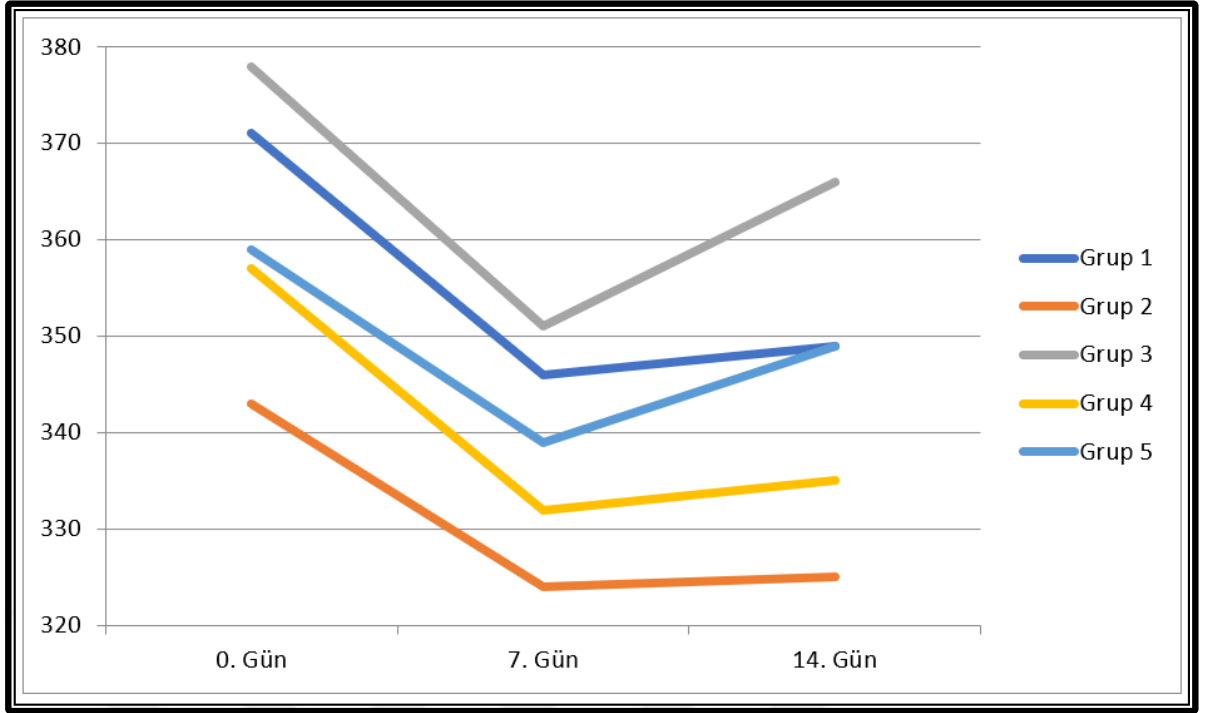
Tablo 5. Zamana bağı her bir grupta hayvanların (gram) ağırlık farkları.
(-) sembolü ağırlık kaybını, (+) sembolü ağırlık kazanımını gösterir

	0.Gün-7.Gün Ağırlık Farkı	0.Gün-14.Gün Ağırlık Farkı	7.Gün-14.Gün Ağırlık Farkı
1	-25,67	-22,50	+3,17
2	-19,17	-18,17	+1,00
3	-27,17	-12,50	+14,67
4	-24,83	-22,17	+2,67
5	-20,67	-10,67	+10,00

Tablo 6. Zaman bağı olarak her bir grupta hayvanların (gram) ağırlık farkları yüzdesi
(-) sembolü ağırlık kaybını, (+) sembolü ağırlık kazanımını gösterir

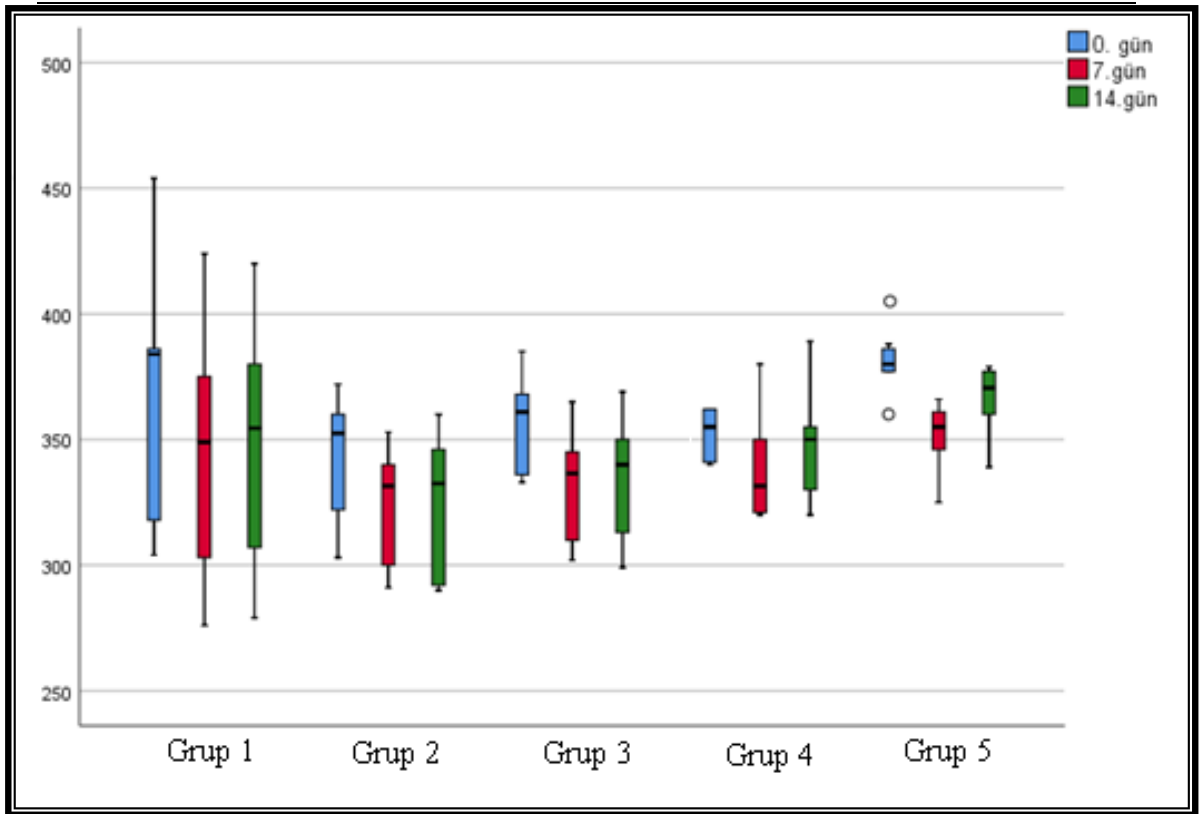
	0.Gün-7.Gün Ağırlık Farkı Yüzdesi	0.Gün-14.Gün Ağırlık Farkı Yüzdesi	7.Gün-14.Gün Ağırlık Farkı Yüzdesi
1	-%6,90583	-%6,053812	+%0,91522
2	-%5,57711	-%5,28613	+%0,30817
3	-%7,177455	-%3,30251	+%4,17457
4	-%6,949627	-%6,203358	+%0,80201
5	-%5,746061	-%2,965709	+%2,94985

Grup 1,2,3,4 ve 5'in kendi içerisinde sıçanların ağırlık bakımından zamana bağı değişimi araştırılmıştır. 1. grupta sıçanların 7. ve 14. gün ağırlık ölçümleri, 0. gün ağırlık ölçümlerine göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). 7. günde sıçanlar %6,9 ağırlık kaybı yaşarken, 14. günde sıçanlar %6,05 ağırlık kaybı yaşamıştır. 2. ve 4. grupta da sıçanların 7. ve 14. gün ağırlık ölçümleri 0. gün ağırlık ölçümlerine göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0,05$). 2. grupta, 7. günde sıçanlar %5,58 ağırlık kaybı yaşarken, 14. günde sıçanlar %5,29 ağırlık kaybı yaşamıştır. 4. grupta ise, 7. günde sıçanlar %6,95 ağırlık kaybı yaşarken, 14. günde sıçanlar %6,20 ağırlık kaybı yaşamıştır. Bunun anlamı, 0. günden sonra 1. 2. ve 4. grupta sıçanlar 7. güne kadar anlamlı düzeyde ağırlık kaybı yaşamışlardır. 14. günde sıçanlar, 7. güne göre ağırlık kazanmışlardır, ancak bu artış küçük düzeyde olup anlamlı değildir. 3.grupta, 7. (%7,18 ağırlık kaybı) ve 14. (%3,30 ağırlık kaybı) günde sıçanların ağırlığı, 0. Gün ağırlık ölçümüne göre anlamlı düzeyde düşük gözlemlenmiştir, ancak 14. günde (%4,17 ağırlık alımı) sıçanların ağırlığı 7. güne göre anlamlı düzeyde yüksektir. 5. grupta da 3. gruptaki ağırlık değişim durumu söz konusudur. 7. (%5,75 ağırlık kaybı) ve 14. (%2,97 ağırlık kaybı) günde sıçanların ağırlığı, 0. gün ağırlık ölçümüne göre anlamlı düzeyde düşük gözlemlenmiştir, ancak 14. günde (%2,95 ağırlık alımı) sıçanların ağırlığı 7. güne göre anlamlı düzeyde yüksektir. 3. ve 4. grupta da sıçanların ağırlığı 7. günde anlamlı düzeyde azalmış iken 14. günde anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0,05$) (Tablo 4,5,6).



Şekil 17. Her bir grupta sıçanların kilolarının zamana bağlı değişimi

Ayrıca, gruplar arasında her bir zaman noktasındaki kilo ölçümleri arasındaki farklılıklar araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, 1. 2. 3. 4. ve 5. grubun gruplarına göre 0. gün ağırlık ölçüm düzeyleri farklılaşmamaktadır. Benzer olarak, gruplara göre 7. ve 14. gün ölçüm düzeyleri de anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. 0. 7. ve 14. günlerde ağırlık açısından 2. ve 3., 4. ve 5, 4. ve 3. grupları arasında anlamlı düzeyde artış ya da azalış söz konusu değildir (Şekil 3,4,5) ($p>0,05$).



Şekil 18. Her bir gruptaki zaman noktasında sıçanların ağırlığının kutu grafiği

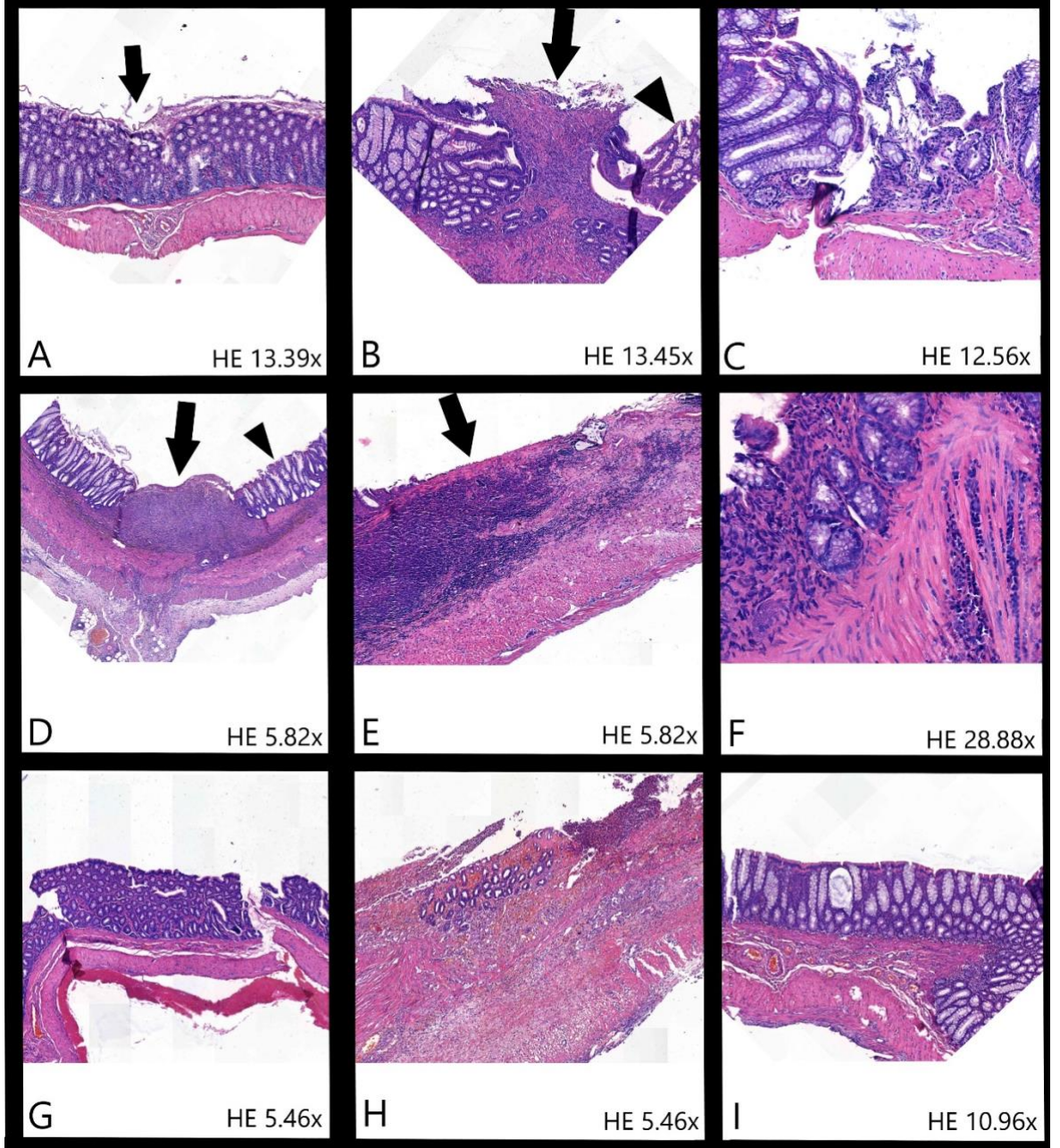
4.2. Histopatolojik değerlendirme

Gruplar arasında mukozal kayıp değişkeninin hafif, orta ve şiddetli sınıfları açısından anlamlı ilişki gözlenmemiştir. Ancak, 5. grupta mukozal kayıp olmama oranı (%83,33), 1. ve 2. gruplara göre anlamlı olarak daha yüksektir. Mukozal kayıp açısından 3. ve 2. grup , 5. ve 4. grup , 5. ve 3. gruplar istatistiksel olarak farklılaşmamaktadır ($p>0,05$). 1. grupta ülserasyon oranı (%66,67) diğer gruplara göre daha yüksektir.

Tablo 7. Gruplar ile patoloji değişkenleri arasındaki ilişki

		Grup 1		Grup 2		Grup 4		Grup 3		Grup 5		p value
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Mukozal Kayıp	Yok	-	-	-	-	1	(16,67)	1	(16,67)	5	(83,33)	0,039
	Hafif	4	(66,67)	4	(66,67)	1	(16,67)	3	(50,00)	-	-	
	Orta	1	(16,67)	1	(16,67)	1	(16,67)	1	(16,67)	1	(16,67)	
	Şiddetli	1	(16,67)	1	(16,67)	3	(50,00)	1	(16,67)	-	-	
Ülserasyon	Yok	2	(33,33)	5	(83,33)	3	(50,00)	4	(66,67)	5	(83,33)	0,447
	Var	4	(66,67)	1	(16,67)	3	(50,00)	2	(33,33)	1	(16,67)	
Mukozal Hasar Derinliği	Yok	-	-	1	(16,67)	1	(16,67)	1	(16,67)	-	-	0,837
	Mukoza	2	(33,33)	4	(66,67)	2	(33,33)	1	(16,67)	3	(50,00)	
	Submukoza	3	(50,00)	1	(16,67)	1	(16,67)	3	(50,00)	2	(33,33)	
	Trasnmural	1	(16,67)	-	-	2	(33,33)	1	(16,67)	1	(16,67)	
İnflamasyon	Yok	-	-	1	(16,67)	-	-	-	-	-	-	0,611
	Hafif	3	(50,00)	2	(33,33)	1	(16,67)	4	(66,67)	4	(66,67)	
	Orta	2	(33,33)	3	(50,00)	3	(50,00)	1	(16,67)	2	(33,33)	
	Şiddetli	1	(16,67)	-	-	2	(33,33)	1	(16,67)	-	-	
Rejenerasyon	Yok	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,539
	Kenardan başlayan epitelizasyon	1	(16,67)	-	-	2	(33,33)	2	(33,33)	1	(16,67)	
	Epitelizasyon var kript kaybı mevcut	1	(16,67)	1	(16,67)	-	-	1	(16,67)	-	-	
	Tama yakın epitelizasyon	3	(50,00)	4	(66,67)	1	(16,67)	1	(16,67)	1	(16,67)	
	Tam epitelizasyon	1	(16,67)	1	(16,67)	3	(50,00)	2	(33,33)	4	(66,67)	
Kript	Yok	1	(16,67)	4	(66,67)	3	(50,00)	3	(50,00)	3	(50,00)	0,587
	Var	5	(83,33)	2	(33,33)	3	(50,00)	3	(50,00)	3	(50,00)	
Kript absesi	Yok	6	(100,0)	6	(100,0)	6	(100,0)	5	(83,33)	3	(50,00)	0,090

Mukozal hasar derinliği ve rejenerasyon ile deney grupları arasında anlamlı ilişki gözlemlenmemiştir. 4. grupta hafif inflamasyon (%16,67), 3. grupta orta inflamasyon (%16,67) oranları diğer gruplara göre daha düşük bulunmuştur, 1. grupta kriptit olma oranı (%83,33) ve 5. grupta kript apsesi olma oranı (%50) diğer gruplara göre daha yüksektir ancak bu farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$) (Tablo 7).



Şekil 19. **A:** Komplete yakın rejenerasyon (ok rejenerasyonun yoğun olduğu alanı göstermekte, **B:** Yüzeysel ülserasyon (ok) kenardan başlayan epitelizasyon (ok başı), **C:** Hafif dereceli mukozal kayıp ve minimal inflamasyon, **D:** Yüzeysel ülserasyon(ok) orta dereceli mukozal kayıp(ok başı), **E:** Yaygın mukozal kayıp (ok lüminal yüzü göstermekte), **F:** Mukozayı ve submukozayı tutan inflamasyon, **G:** Minimal inflamasyonun eşlik ettiği dokuda epitelizasyonun tam olarak rejenerasyonu gözükmemekte, **H:** Tam kat kolon duvarında hasar ve tam kat şiddetli inflamasyon, **I:** Mukozada ve lamina propriyada yerleşen inflamatuvar infiltrasyon ile karakterli orta şiddette inflamasyon

Gruplar arasında mukozal kayıp değişkeninin hafif, orta ve şiddetli sınıfları açısından anlamlı ilişki gözlenmemiştir. Ancak 5. grupta mukozal kayıp olmama oranı (%83,3) 1. grup ve 2. gruba göre anlamlı olarak daha yüksektir. 1. grupta ülserasyon oranı (%66,67) diğer gruplara göre daha yüksektir. Mukozal hasar derinliği ve rejenerasyon ile deney grupları arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir. 5. grupta kript apsesi olma oranı (%50) diğer gruplara göre daha yüksektir ancak bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$).

4.3.Laparotomi Bulguları

Gruplarda şiddetli düzeyde kolonda ödem bulgusu gözlenmemiştir. Kolonda ödem ile grup arasında anlamlı ilişki yoktur. Benzer olarak, peritonit ile gruplar arasında da anlamlı ilişki yoktur ($p>0,05$). Kolonda ödem ve peritonit açısından 3. ve 2. grup , 5. ve 4. grup, 5. ve 3. gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. 7. günde sıçanlarda iskemi bulgusu da gözlenmemiştir (Tablo 8).

Tablo 8. 7. gün laparotomi bulguları

7. Gün Laparotomi Bulguları		Grup 2		Grup 3		Grup 4		Grup 5		p value
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Kolonda ödem	Yok	-	-	-	-	-	-	-	-	1,000
	Az	4	(66,67)	4	(66,67)	4	(66,67)	3	(50,00)	
	Orta	2	(33,33)	2	(33,33)	2	(33,33)	3	(50,00)	
	Şiddetli	-	-	-	-	-	-	-	-	
Peritonit	Yok	4	(66,67)	3	(50,00)	4	(66,67)	4	(66,67)	1,000
	Var	2	(33,33)	3	(50,00)	2	(33,33)	2	(33,33)	
İskemi	Yok	6	(100,00)	6	(100,00)	6	(100,00)	6	(100,00)	-
	Var	-	-	-	-	-	-	-	-	

Laparotomi bulguları 14. gün açısından değerlendirildiğinde, gruplarda şiddetli düzeyde kolonda ödem gözlenmemiştir. Kolonda ödem ile gruplar arasında anlamlı ilişki yoktur ($p>0,05$). Ayrıca peritonit ve iskemi ile gruplar arasında da anlamlı ilişki yoktur. Kolonda ödem, peritonit ve iskemi açısından 3. ve 2., 5. ve 4., 5. ve 3. gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. Normal makroskobik mukoza oranı 5. grupta (%83,33), 1., 2. ve 4. gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksektir ($p<0,05$). Eritimli alanlar makroskobik mukoza oranı 4. grupta (%83,33), 5. gruba göre (%0) anlamlı düzeyde yüksektir. Lineer ülser sınıfında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 6). Hayvanların hiçbirisinde hematoma meydana gelmemiştir.

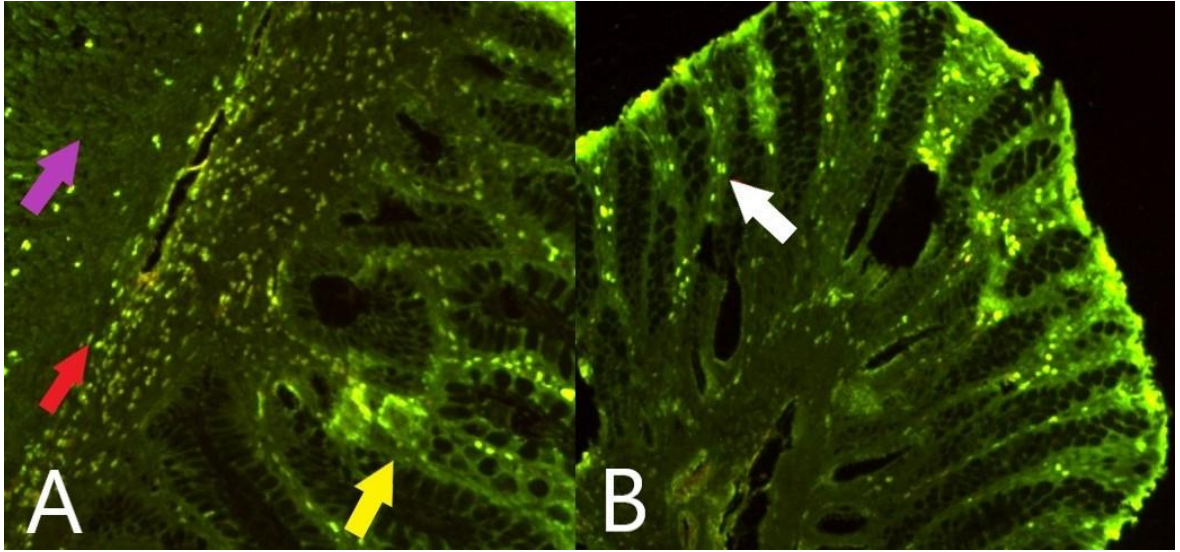
Laparotomi 7. Gün ve 14. Gün kolonda ödem bulgularında bir değişiklik söz konusu değildir. 14. Gün peritonit varlığında 2. ve 4. gruplarda artış vardır. 7. Gün laparotomi bulgularında iskemi hiç gözlenmez iken 14. Gün laparotomi bulgularında 4. ve 5. gruplarda iskemi gözlenmiştir.

Tablo 9. 14. gün laparotomi bulguları

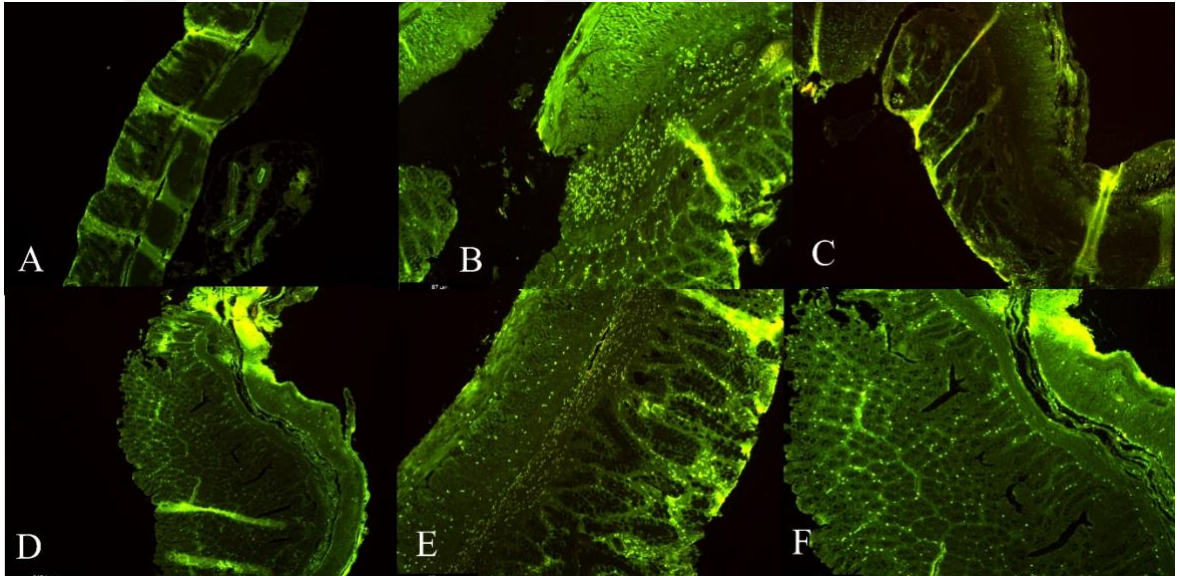
14. Gün Laparotomi Bulguları		Grup 1		Grup 2		Grup 3		Grup 4		Grup 5		p value
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Kolonda ödem	Yok	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97
	Az	4	(66,67)	4	(66,67)	3	(50,00)	4	(66,67)	5	(83,33)	
	Orta	2	(33,33)	2	(33,33)	3	(50,00)	2	(33,33)	1	(16,67)	
	Şiddetli	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Peritonit	Yok	2	(33,33)	2	(33,33)	3	(50,00)	3	(50,00)	4	(66,67)	0,91
	Var	4	(66,67)	4	(66,67)	3	(50,00)	3	(50,00)	2	(33,33)	
İskemi	Yok	6	(100,0)	6	(100,0)	6	(100,0)	5	(83,33)	5	(83,33)	1,00
	Var	-	-	-	-	-	-	1	(16,67)	1	(16,67)	
Makrosk opik Mukoza	Normal	-	-	-	-	2	(33,33)	-	-	5	(83,33)	0,009
	Eritemli alanlar	3	(50,00)	4	(66,67)	3	(50,00)	5	(83,33)	-	-	
	Lineer ülser	3	(50,00)	2	(33,33)	1	(16,67)	1	(16,67)	1	(16,67)	
	15-45 mm arası ülser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	45 mm üstünde ülser	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

4.4.Florens Mikroskopisi

GFP ile işaretlenmiş kök hücreler floresan mikroskop altında dokular içerisinde verdiği ışığa ile takip edildi. GFP işaretli kök hücreler kas tabakasına, submukozada ve mukozada seçilebilmektedir (Şekil 20). Lokal kök hücre grubu incelendiğinde GFP ile işaretli kök hücrelerin heterojen bir dağılıma sahip olduğu görüldü. Verilen kök hücreler genellikle iğne giriş yerlerine yakın alanda dokuya penetre olduğu iğne girişine uzak alanların ise kök hücreden fakir olduğu görüldü. İntra-arteryel verilen kök hücrelerin ise diffüz ve homojen bir şekilde yayıldığı görüldü (Şekil 21).



Şekil 20. A: Kas tabakası (mor ok), Submukoza ve infiltre eden GFP işaretli kök hücreler (kırmızı ok), Epitel hücreleri arasındaki GFP işaretli kök hücreler (sarı ok), **B:** Epitel hücreleri arasında GFP nedeniyle floresan mikroskop altındaki parlaması (beyaz ok)



Şekil 21. A: Lokal kök hücre grubunda bazı alanlarda kök hücre seçilemiyor (heterojen dağılım), **B:** Lokal kök hücre grubundaki enjeksiyon sahasındaki kök hücrelerin yoğunlaştığı seçilmekte, **C:** Lokal kök hücre grubunda heterojen dağılım seçilebilmekte, **D,E,F:** İntra-arteryel grupta mukozada submukozada ve kas tabakası arasında homojen ve yüksek yoğunlukta dağılan kök hücreler seçilebilmektedir.

4.5. Kan TSG-6 Düzeyi

1. ve 5. grupların TSG-6 kan ölçüm düzeyleri, 3. ve 4. gruplarının TSG-6 ölçüm düzeylerinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$).

Tablo 10. Kan TSG-6 düzeyi

	Kan TSG-6 Düzeyi	p value
Grup 1	4445±634,19 4297,5 (3876-5543) ^b	0,027
Grup 2	3628,33±388,30 3556 (3176-4237) ^{a,b}	
Grup 4	3348,83±637,62 3236,5 (2765-4587) ^a	
Grup 3	3247,17±955,77 3146 (1878-4599) ^a	
Grup 5	4287,33±667,80 4570,5 (3261-4835) ^b	

2. grubun TSG-6 kan ölçümü diğer grupların kan ölçüm düzeyi ile benzerdir. Yani, 2. ve 3. grupların kan TSG-6 ölçüm düzeyleri anlamlı olarak farklılaşmamaktadır. 5 grubun kan TSG-6 ölçüm düzeyi ise 3. ve 4. gruplara göre anlamlı düzeyde yüksektir (Tablo 5, Şekil 6).

5. TARTIŞMA

İnflamatuvar barsak hastalığı son yıllarda sık görülen ve daha çok gençleri etkileyen bir hastalık grubudur. Patofizyolojisi tam olarak ortaya konulmamıştır. İmmünsistem ve mukozal epitelin arasındaki iletişim bozukluğuna bağlı anormal bir cevap durumunda ortaya çıkar (85). Çoğunlukla üretkenliğin üst düzeyde olduğu yaş grubunda görülmesi nedeniyle iş gücü kaybına neden olmaktadır. İBH'ı tedavi protokolleri giderek genişletilmekle birlikte tedaviye yönelik çalışmalar yapılmaya devam etmektedir. İBH ortak özelliği inflamasyondur. Bu inflamasyonu taklit edebilecek birçok kolit modeli oluşturulup bu alanda çalışmalar yapılmaktadır. Biz çalışmamızda kolit oluşturmak için %4'lük asetik asit kullanıldı. Asetik asitin kolit modelini oluşturduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (53–55).

Kök hücrelerin inflamasyonu düzenleyici etkisi bilinmektedir. ADKHH'lerin kolay elde edilmesi ve diferansiyasyon kapasitesi nedeniyle birçok gastrointestinal çalışmada kullanılmış ve faydaları gösterilmiştir (86). ADKHH'ler KİKKH'den daha kolay izole edilebilir. Yapılan çalışmalarda ADKHHlerin daha etkili olduğu görülmüştür. Bizde bu sebepler ADKHH tercih ettik (87,88).

İBH atağı geçiren hastalar genellikle beslenmenin azalması ve inflamasyon nedeniyle oluşan katabolizma nedeniyle kilo kaybederler. Ratlar yapılan deneylerde de oluşturulan kolit modeliyle meydana gelen kilo kaybı bu duruma benzerdir (89,90). Tüm hayvanlar 7. Güne kadar anlamlı olarak kilo kaybetmişlerdir. Bunu tüm hayvanlarda meydana getirilen kolitin bir bulgusu olarak kabul etmekteyiz. Kök hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 14. Günde 7. Güne göre kilo artışı mevcuttur. Bu kilo artışının istatistiksel olarak anlamlı olmamasının sebebinin hayvanların tedavisi için beklenen sürenin kısa tutulmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Deney süresi 21 gün olarak belirlense idi kök hücre grubundaki hayvanların kilo almaya devam edeceklerini düşünmekteyiz.

TSG-6 doku koruyucu ve anti-inflamatuvar özelliklere sahip olduğu bilinen inflamasyonla ilişkili salgılanan bir proteindir. TSG-6 mezenkimal kökenli kök hücrelerin immünmodülatör ve protektif etkilerinden sorumlu olduğu düşünülmektedir

(77,91–93). Yamei ve arkadaşlarının yayımladığı bir makalede, TSG-6'nın lökositlerin migrasyonunu, lenfosit adhezyonunu ve kemokinlerle uyarılan endotelial geçişi regüle ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca siklooksijenaz enzimini regüle ederek anti-inflamatuar etkiyi arttırdığını bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada intra-arteriyel olarak kök hücre verilen grupta TSG-6 düzeyi anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Bu durumun hastalıklı bölgeye diffüz ve homojen bir şekilde kök hücrenin uygulanmış olmasına ve vasküler aks ile ulaştırılan kök hücrelerin immünmodülasyon için daha hızlı adapte olmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Kontrol kolit grubunda da diğer gruplara göre TSG-6 düzeyi daha yüksek bulundu. Bu gruptaki hayvanların 7. Günde laparotomi geçirmemiş olmasının TSG-6 düzeyini etkilediğini düşünmekteyiz.

Hayvanlar laparotomi sırasında makroskopik olarak değerlendirilmiştir. Biz burada campos ve ark.'ın yaptığı skorlamayı kullandık. Makroskopik olarak kolonda ödem ve peritonit bulgularında anlamlı bir farklılık gösterilemedi. İskemi ise hiçbir hayvanda meydana gelmedi. İskeminin olmaması intra-arteriyel tekniğin herhangi bir tromboz yaratmadığını gösterdi. Verilen kök hücre yoğunluğunun da iskemi yaratacak majör bir vasküler yaralanma meydana getirmediğini gösterdi. Kolit modelinde iskemiye yol açmadığı düşünülmüştür. Ayrıca gruplar hematom açısından değerlendirildi. Hiçbir hayvanda hematom meydana gelmedi. Buda tekniğin güvenli olduğunu göstermektedir.

Hemotoksilen-eozin ile yaptığımız histopatolojik incelememizde, gruplar arasında mukozal kayıp, ülserasyon, mukozal hasarın derinliği, inflamasyonun şiddeti, rejenerasyonun durumu, kriptit ve kript apsesini değerlendirdik. Yaptığımız çalışmada intra-arteriyel grupta mukozal kayıp anlamlı derecede daha az bulundu. Ancak diğer parametrelerde gruplar farklılaşmamaktadır. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da intra-arteriyel kök hücre grubunda, bu grubun kontrol grubuna göre daha az ülserasyonun olduğu mukozal hasar derinliğinin daha az olduğu, tam kat rejenerasyon olan hayvanların iki kat fazla olduğu bulundu.

Yapılan floresan mikroskopisinde ise lokal olarak verilen kök hücrelerin hastalıklı alana gittiği gösterilmiş olmakla beraber kolon duvarına multipl enjeksiyonlar

gerektirmesi, iğnenin yarattığı travmanın kolonda ikincil bir travmatik süreç yaşattığını düşünmekteyiz. Ayrıca kök hücrelerin enjeksiyon yapılan alanın etrafında yoğun olması enjeksiyon sahasına uzak alanlarda az olması nedeniyle heterojen dağılım göstermektedir. İntra-arteryal kök hücre grubunda ise İMA'dan verilen kök hücrelerin tüm sigmoid kolona yayıldığı yapılan incelemede görülmektedir. Bu yayılım homojen olmakla birlikte vasküler ağın yoğun olduğu submukozada ağırlıklı bulunmaktadır. Bu teknik ile yüksek konsantrasyonda ve etkin bir şekilde tüm kolona yayıldığı görüldü.



6. SONUÇ

Sıçanlarla yaptığımız bu deneysel kolit modelinde kök hücrelerin kullanım tekniklerini etkileri ve sonuçları ile beraber karşılaştırdık. Bu deneysel çalışmanın sonuçlarına göre

- Kolit modelinin tüm hayvanlarda kilo kaybına yol açmasına rağmen kök hücre grubunda anlamlı olarak kilo artışı meydana gelmedi.
- İntra-arteryel kök hücre verilmesi histolojik olarak mukozal kaybı azalttığı ve mukozal iyileşmeyi anlamlı olarak arttırdığı saptandı. Anlamlı olmasa da inflamasyonun şiddetinin daha az, rejenerasyon kapasitesinin daha yüksek ve mukozal hasar derinliğinin daha az olduğu saptandı.
- İntra-arteryel kök hücre uygulamasının iskemi ve hematoma neden olmadığı saptandı.
- Kan TSG—6 düzeyinin ise intra-arteryel grupta anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu.
- Floresan mikroskop incelemesinde ise intra-arteriyel verilen kök hücrelerin kolona daha iyi penetre olduğu, diffüz ve homojen bir şekilde yayıldığı görüldü.

İnflamatuvar barsak hastalıklarında kolonun tutulan segmentine bağlı olarak intra-arteryel kök hücre enjeksiyonu etkili ve güvenli bir tedavi yöntemi olabilir. İnsanlarda yapılabilecek girişimsel anjiyografi tekniği ile kolik arterler kanülie edilerek verilen kök hücre kalıcı ve etkili bir tedavi yöntemi olabilir. Bu tedavi yöntemi için daha fazla deneysel ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An Update on Inflammatory Bowel Disease. Prim Care. Aralık 2017;44(4):673-92.
2. Aytaç B, Yerci Ö. Ülseratif kolitte histopatolojik değerlendirme. Turk Klin. 2009;J Gastroenterohepatol-Special Topics(2):41-6.
3. Ek WE, D'Amato M, Halfvarson J. The history of genetics in inflammatory bowel disease. Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol. 2014;27(4):294-303.
4. Guo G, Tan Z, Liu Y, Shi F, She J. The therapeutic potential of stem cell-derived exosomes in the ulcerative colitis and colorectal cancer. Stem Cell Res Ther. 01 Nisan 2022;13(1):138.
5. Minteer D, Marra KG, Rubin JP. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Biology and Potential Applications. İçinde: Weyand B, Dominici M, Hass R, Jacobs R, Kasper C, editörler. Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application I [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2013 [a.yer 08 Eylül 2022]. s. 59-71. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology). Erişim adresi: https://doi.org/10.1007/10_2012_146
6. Xu J, Wang X, Chen J, Chen S, Li Z, Liu H, vd. Embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells promote colon epithelial integrity and regeneration by elevating circulating IGF-1 in colitis mice. Theranostics. 2020;10(26):12204-22.
7. Hawkey CJ, Hommes DW. Is Stem Cell Therapy Ready for Prime Time in Treatment of Inflammatory Bowel Diseases? Gastroenterology. 01 Ocak 2017;152(2):389-397.e2.
8. Keith L. Moore. Kalın Barsağın Embriyolojik Gelişimi. İçinde: The Developing Human Embriyology Clinically Priented Embryology. 8. Edition.
9. Skandalakis JE. Colon Anatomy. İçinde: Surgical Anatomy and Tecnique Springer. 3th edition. New York; 2009. s. 17;415-495.
10. Brandt CP, Malangoni MA, Priebe PP, Temes TT. Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 5th Edition. Ann Surg. Ağustos 2002;236(2):261.
11. Menteş B, İrkörücü O. Kolon Fizyolojisi. İçinde: Kolon Rektum ve Anal Bölge Hastalıkları. İstanbul; 2004. s. 31-7.
12. Townsend MC. Modern Cerrahi Pratiğin Biyolojik Temelleri. İçinde: 17. bs Ankara: Nobel; 2010. s. 1401-83. (Bölüm 12).
13. Skandalakis JE. Colon Anatomy. İçinde: Surgical Anatomy and Tecnique Springer. 3th edition. New York; 2009. s. 401-70.
14. Skandalakis JE. Colon Anatomy. İçinde: Surgical Anatomy/Land intestine and anorectum. 3th edition. New York; 2004. s. 861-1002. (McGraw-Hill's Access Surgery; c. 1).
15. Victor P. Eroschenko. diFiore Histoloji Atlası. İçinde: 10. baskı. Palme: H. İbrahim Somyürek; 2008. s. 253-78.
16. McDowell C, Farooq U, Haseeb M. Inflammatory Bowel Disease. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [a.yer 03 Eylül 2022]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470312/>
17. Su HJ, Chiu YT, Chiu CT, Lin YC, Wang CY, Hsieh JY, vd. Inflammatory bowel disease and its treatment in 2018: Global and Taiwanese status updates. J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi. Temmuz 2019;118(7):1083-92.
18. Russel null. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? Eur J Intern Med. Ağustos 2000;11(4):191-6.

19. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int J Clin Exp Med*. 15 Aralık 2015;8(12):22529-42.
20. Özgürsoy Uran B, YÜKSEL E, ünsal avdal E, Arkan B. İnflamatuvar barsak hastalıklarında epidemiyolojik özellikler ve hastalık farkındağı; İzmir örneğı ile kesitsel bir çalışma. *Akad Gastroenteroloji Derg*. 30 Aralık 2019;1-7.
21. Can G, Poşul E, Yılmaz B, Can H, Korkmaz U, Ermiş F, vd. The Rates of Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Diseases in Bolu/Düzce Region: Retrospective Cohort Study Between 2004-2013. *Abant Med J*. 01 Ocak 2015;4:210-20.
22. Ko JK, Auyeung KK. Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy. *Curr Pharm Des*. 2014;20(7):1082-96.
23. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*. 15 Haziran 2011;474(7351):307-17.
24. Carreras-Torres R, Ibáñez-Sanz G, Obón-Santacana M, Duell EJ, Moreno V. Identifying environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: a Mendelian randomization study. *Sci Rep*. 06 Kasım 2020;10(1):19273.
25. Singh S, Dulai PS, Zarrinpar A, Ramamoorthy S, Sandborn WJ. Obesity in IBD: epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Şubat 2017;14(2):110-21.
26. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*. Eylül 2019;157(3):647-659.e4.
27. Neuman MG. Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res J Lab Clin Med*. Nisan 2007;149(4):173-86.
28. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol WJG*. 07 Ocak 2014;20(1):91-9.
29. Vinay Kumar MBBS. Robbins Temel Patoloji. İçinde: Robbins Temel Patoloji. 8. bs İstanbul: Nobel; 2008. s. 611-7.
30. Yu YR, Rodriguez JR. Clinical presentation of Crohn's, ulcerative colitis, and indeterminate colitis: Symptoms, extraintestinal manifestations, and disease phenotypes. *Semin Pediatr Surg*. Aralık 2017;26(6):349-55.
31. Rogler G, Singh A, Kavanaugh A, Rubin DT. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Current Concepts, Treatment, and Implications for Disease Management. *Gastroenterology*. Ekim 2021;161(4):1118-32.
32. Matowicka-Karna J. Markers of inflammation, activation of blood platelets and coagulation disorders in inflammatory bowel diseases. *Postepy Hig Med Doswiadczalnej Online*. 13 Nisan 2016;70:305-12.
33. Konikoff MR, Denson LA. Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. Haziran 2006;12(6):524-34.
34. Lawrance IC, Murray K, Hall A, Sung JJY, Leong R. A prospective comparative study of ASCA and pANCA in Chinese and Caucasian IBD patients. *Am J Gastroenterol*. Kasım 2004;99(11):2186-94.
35. Klinger AL, Kann BR. Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease. *Surg Clin North Am*. Aralık 2019;99(6):1063-82.
36. Guglielmo FF, Anupindi SA, Fletcher JG, Al-Hawary MM, Dillman JR, Grand DJ, vd. Small Bowel Crohn Disease at CT and MR Enterography: Imaging Atlas and Glossary of Terms. *Radiogr Rev Publ Radiol Soc N Am Inc*. Nisan 2020;40(2):354-75.

37. Sheedy SP, Bruining DH, Dozois EJ, Faubion WA, Fletcher JG. MR Imaging of Perianal Crohn Disease. *Radiology*. Mart 2017;282(3):628-45.
38. Freeman HJ. Natural history and long-term clinical course of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 07 Ocak 2014;20(1):31-6.
39. Autenrieth DM, Baumgart DC. Toxic megacolon. *Inflamm Bowel Dis*. Mart 2012;18(3):584-91.
40. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*. 07 Temmuz 2008;14(25):3937-47.
41. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. Haziran 2006;55(6):749-53.
42. Kornbluth A, Sachar DB, Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. Mart 2010;105(3):501-23; quiz 524.
43. Regueiro MD. Diagnosis and treatment of ulcerative proctitis. *J Clin Gastroenterol*. Ekim 2004;38(9):733-40.
44. Gisbert JP, Gomollon F, Mate J, Pajares JM. Role of 5-aminosalicylic acid (5-ASA) in treatment of inflammatory bowel disease: a systematic review [Internet]. Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]. Centre for Reviews and Dissemination (UK); 2002 [a.yer 06 Eylül 2022]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK69481/>
45. Muhsin Kaya. Ülseratif Kolitte Güncel Tedavi. *Güncel Gastroenteroloji*. Haziran 2012;16(2):136-7.
46. Pugliese D, Felice C, Papa A, Gasbarrini A, Rapaccini GL, Guidi L, vd. Anti TNF- α therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future. *Expert Rev Clin Immunol*. Mart 2017;13(3):223-33.
47. Yamada Y, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative analysis of two models of colitis in rats. *Gastroenterology*. Mayıs 1992;102(5):1524-34.
48. MacPherson BR, Pfeiffer CJ. Experimental production of diffuse colitis in rats. *Digestion*. 1978;17(2):135-50.
49. Neurath M, Fuss I, Strober W. TNBS-Colitis. *Int Rev Immunol*. 01 Ocak 2000;19(1):51-62.
50. Martin JC, Bériou G, Josien R. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis in the Rat. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2016;1371:197-203.
51. Antoniou E, Margonis GA, Angelou A, Pikouli A, Argiri P, Karavokyros I, vd. The TNBS-induced colitis animal model: An overview. *Ann Med Surg*. 19 Ağustos 2016;11:9-15.
52. Adams SM, Bornemann PH. Ulcerative colitis. *Am Fam Physician*. 15 Mayıs 2013;87(10):699-705.
53. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Ciralik H, Kantarceken B, Buyukbese MA. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats. *Tohoku J Exp Med*. Haziran 2005;206(2):131-9.
54. Sharon P, Stenson WF. Metabolism of arachidonic acid in acetic acid colitis in rats. Similarity to human inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. Ocak 1985;88(1 Pt 1):55-63.
55. Owusu G, Obiri DD, Ainooson GK, Osafo N, Antwi AO, Duduyemi BM, vd. Acetic Acid-Induced Ulcerative Colitis in Sprague Dawley Rats Is Suppressed by

- Hydroethanolic Extract of *Cordia vignei* Leaves through Reduced Serum Levels of TNF- α and IL-6. *Int J Chronic Dis.* 2020;2020:8785497.
56. Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14.
 57. Laplane L, Solary E. Towards a classification of stem cells. *eLife.* 8:e46563.
 58. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng.* Temmuz 2005;100(1):12-27.
 59. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. 28. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol.* Şubat 2003;111(2 Suppl):S745-753.
 60. Vats A, Tolley N, Polak J, Buttery L. Stem cells: Sources and applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 01 Eylül 2002;27:227-32.
 61. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med.* 26 Ekim 2017;6(12):2173-85.
 62. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol.* Nisan 2003;56(2):86-96.
 63. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2001;19(3):180-92.
 64. Hawley RG, Sobieski DA. Stem cell bouillabaisse-potpourri. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2002;20(5):360-3.
 65. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.* Kasım 2009;132(5):533-46.
 66. Karaoz E, Ayhan S, Gacar G, Aksoy A, Duruksu G, Okçu A, vd. Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy.* Mayıs 2010;12(3):288-302.
 67. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, vd. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* Ocak 2008;121(1):59-69.
 68. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Ann Plast Surg.* Mayıs 2005;54(5):546-52.
 69. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods San Diego Calif.* Haziran 2008;45(2):115-20.
 70. Pérez-Castrillo S, González-Fernández ML, Gutiérrez-Velasco L, Villar-Suárez V. Isolation and morphological characterization of equine mesenchymal stem cells from harvested adipose tissue and bone marrow and stably transfected with green fluorescent protein. *Am J Vet Res.* Eylül 2021;82(9):770-6.
 71. Cannon B, Nedergaard J. Developmental biology: Neither fat nor flesh. *Nature.* 21 Ağustos 2008;454(7207):947-8.
 72. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, vd. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* Nisan 2001;7(2):211-28.

73. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, vd. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther.* 19 Haziran 2018;9(1):168.
74. Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative Capacity of Adipose Derived Stem Cells (ADSCs), Comparison with Mesenchymal Stem Cells (MSCs). *Int J Mol Sci.* 22 Mayıs 2019;20(10):2523.
75. Ryu JS, Jeong EJ, Kim JY, Park SJ, Ju WS, Kim CH, vd. Application of Mesenchymal Stem Cells in Inflammatory and Fibrotic Diseases. *Int J Mol Sci.* 07 Kasım 2020;21(21):8366.
76. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg.* Kasım 2005;116(6):1686-96.
77. Day AJ, Milner CM. TSG-6: A multifunctional protein with anti-inflammatory and tissue-protective properties. *Matrix Biol.* 01 Mayıs 2019;78-79:60-83.
78. An JH, Li Q, Ryu MO, Nam AR, Bhang DH, Jung YC, vd. TSG-6 in extracellular vesicles from canine mesenchymal stem/stromal is a major factor in relieving DSS-induced colitis. *PLoS ONE.* 10 Şubat 2020;15(2):e0220756.
79. Yang H, Wu L, Deng H, Chen Y, Zhou H, Liu M, vd. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by bone marrow mesenchymal stem cells attenuates neuropathic pain by inhibiting the TLR2/MyD88/NF- κ B signaling pathway in spinal microglia. *J Neuroinflammation.* 11 Mayıs 2020;17:154.
80. Ahmed O, Farid A, Elamir A. Dual role of melatonin as an anti-colitis and anti-extra intestinal alterations against acetic acid-induced colitis model in rats. *Sci Rep.* 15 Nisan 2022;12(1):6344.
81. Campos FG, Waitzberg DL, Logulo AF, Cukier C, Soares SR, Oliveira TS, vd. [Technical and histological standardization of experimental colitis with trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)]. *Rev Hosp Clin.* Ağustos 1997;52(4):180-6.
82. Celani LMS, Egito EST, Azevedo ÍM, Oliveira CN, Dourado D, Medeiros AC. Treatment of colitis by oral negatively charged nanostructured curcumin in rats. *Acta Cir Bras.* 2022;37(6):e370602.
83. Aryannejad A, Tabary M, Noroozi N, Mashinchi B, Iranshahi S, Tavangar SM, vd. Anti-inflammatory Effects of Ivermectin in the Treatment of Acetic Acid-Induced Colitis in Rats: Involvement of GABAB Receptors. *Dig Dis Sci.* Ağustos 2022;67(8):3672-82.
84. Gao F, Cui D, Zuo D, Shou Z, Yang J, Yu T, vd. BMSCs improve TNBS-induced colitis in rats by inducing Treg differentiation by expressing PD-L1. *Biotechnol Lett.* Kasım 2022;44(11):1263-75.
85. Ito H, Hirotani T, Yamamoto M, Ogawa H, Kishimoto T. Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody inhibits leukocyte recruitment and promotes T-cell apoptosis in a murine model of Crohn's disease. *J Gastroenterol.* 01 Ocak 2002;37(14):56-61.
86. Heidari N, Abbasi-Kenarsari H, Namaki S, Baghaei K, Zali MR, Ghaffari Khaligh S, vd. Adipose-derived mesenchymal stem cell-secreted exosome alleviates dextran sulfate sodium-induced acute colitis by Treg cell induction and inflammatory cytokine reduction. *J Cell Physiol.* Ağustos 2021;236(8):5906-20.
87. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 20 Eylül 2012;21(14):2724-52.

88. Mazini L, Rochette L, Admou B, Amal S, Malka G. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 14 Şubat 2020;21(4):1306.
89. Davis J, Kellerman R. Gastrointestinal Conditions: Inflammatory Bowel Disease. *FP Essent.* Mayıs 2022;516:23-30.
90. Yan YX, Shao MJ, Qi Q, Xu YS, Yang XQ, Zhu FH, vd. Artemisinin analogue SM934 ameliorates DSS-induced mouse ulcerative colitis via suppressing neutrophils and macrophages. *Acta Pharmacol Sin.* Ekim 2018;39(10):1633-44.
91. Usunier B, Brossard C, L'Homme B, Linard C, Benderitter M, Milliat F, vd. HGF and TSG-6 Released by Mesenchymal Stem Cells Attenuate Colon Radiation-Induced Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 11 Şubat 2021;22(4):1790.
92. Gong SC, Yoon Y, Jung PY, Kim MY, Baik SK, Ryu H, vd. Antifibrotic TSG-6 Expression Is Synergistically Increased in Both Cells during Coculture of Mesenchymal Stem Cells and Macrophages via the JAK/STAT Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 28 Ekim 2022;23(21):13122.
93. Jiang Y, Glasstetter LM, Lerman A, Lerman LO. TSG-6 (Tumor Necrosis Factor- α -Stimulated Gene/Protein-6): An Emerging Remedy for Renal Inflammation. *Hypertens Dallas Tex* 1979. Ocak 2023;80(1):35-42.