



1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**KOROZİF ÖZOFAJİTTE KÖK HÜCRE TEDAVİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Hatice Sonay YALÇIN**

**Ankara, 2011**



1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**KOROZİF ÖZOFAJİTTE KÖK HÜCRE TEDAVİSİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Hatice Sonay YALÇIN**

**Tez Danışmanları: Prof. Dr. Akgün HIÇSÖNMEZ  
Yrd. Doç. Dr. İbrahim ÖTGÜN**

**Ankara, 2011**

## ÖZET

Çalışmamızın amacı ratlarda oluşturulan koroziif özofagusta işaretlenmiş insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrenin etkisini incelemek oldu.

Toplam otuz Wistar-Albino cinsi erişkin dişi ratlar üç eşit gruba bölündüler. Literatürde tanımlanmış standart özofagus kostik yanığı %15'lik Sodyum hidroksit (NaOH) ile oluşturuldu. Birinci gruba (sham grubu) serum fizyolojik kullanıldı. İkinci gruba kök hücre verilmezken; üçüncü gruba işlemten iki saat sonra 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) ile işaretlenmiş insan (erkek) kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (MKH) implante edildi. Deney 21 gün sonra sonlandırıldı ve alınan özofagus dokusu histopatolojik hasar, stenoz indeksi, Y kromozomu için floresan in situ hibridizasyon (FISH) yapılması ve DiI işaretli hücrelerin floresan mikroskopta incelenmesi planlandı.

Yapılan histopatolojik incelemelerde fibrozis, inflamasyon ve nekroz ayrı ayrı değerlendirilmiş olup sadece fibrozis sonuçlarında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0.05$ ). Striktür indekslerinde ise anlamlı sonuçlar sham grubundan dolayı çıkmış olup kök hücre verilen ve verilmeyen grup arasında anlamlı farka rastlanmamıştır. Floresan mikroskobu ile yapılan incelemede özofagus dokusunun epitelinde DiI ile işaretli hücreler görüldü ve FISH sonucunda bir denek dışında diğer tüm ratlarda Y kromozomu gösterilmiştir.

Çalışmamızda insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koroziif özofagus modelinde 21 gün boyunca implante edilen özofagus dokusuna yerleşip canlılığını sürdürmüş olması ve oluşacak fibrozis açısından olumlu yönde etkili olduğu gösterildi.

**Anahtar kelimeler:** koroziif özofagus, kök hücre, fibrozis

## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the efficacy of marked human bone marrow mesenchymal stem cells on prevention of fibrosis development after esophageal caustic injuries in rat.

Thirty Wistar-Albino female rats were divided into three equal groups. A standard esophageal caustic burn which has been defined in literature was produced by 15% sodium hydroxide (NaOH). We used 0.9% saline for the first group (sham group). Second group was only injured but the third group was injured and after two hours human (male) bone marrow mesenchymal stem cells which have been marked with 1,1'-Diiododecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) implanted. Our experiment was terminated after 21 days and we assessed the esophageal tissue by measuring histopathologic damage, stenosis index, fluorescence in situ hybridization (FISH) for Y chromosome and for the cells with marked DiI by fluorescence microscope.

The histopathologic parameters were fibrosis, inflammation and necrosis. There was a significant difference between the groups in fibrosis ( $p < 0.05$ ). There was also a significant difference between the groups in stenosis index; however it was related with the sham group, there was no difference with the second and third group. The DiI marked stem cells were shown with examination by fluorescence microscope. The Y chromosomes were determined in the esophageal tissue by FISH except one of the rats.

In our study we featured that the marked human bone marrow mesenchymal stem cells were seated and lived on the epithelium of esophageal tissue and the positive efficacy in fibrosis with an experimental model of corrosive esophagitis in rats after 21 days.

**Key words:** corrosive esophagitis, stem cells, fibrosis

# İÇİNDEKİLER

|                                                    | <i>Sayfa</i> |
|----------------------------------------------------|--------------|
| Özet                                               | <i>iii</i>   |
| İngilizce özet                                     | <i>iv</i>    |
| İçindekiler dizini                                 | <i>v</i>     |
| Kısaltmalar ve simgeler dizini                     | <i>vi</i>    |
| Şekiller dizini                                    | <i>vii</i>   |
| Tablolar dizini                                    | <i>viii</i>  |
| 1. Giriş ve Amaç                                   | 1            |
| 2. Genel Bilgiler                                  | 2            |
| 2.1. Özofagusun Embriyolojisi ve Histolojij Yapısı | 3            |
| 2.2. Koroşif Özofagus Patofizyolojisi              | 3            |
| 2.3. Koroşif Madde Yanıkları                       | 5            |
| 2.4. Koroşif Özofagusta Klinik ve Yaklaşım         | 6            |
| 2.5. Kök Hücre                                     | 9            |
| 2.6. Özofagus ve Kök Hücre                         | 19           |
| 3. Gereç ve Yöntem                                 | 21           |
| 4. Bulgular                                        | 31           |
| 5. Tartışma                                        | 40           |
| 6. Sonuç ve Öneriler                               | 46           |
| 7. Kaynaklar                                       | 48           |

## KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

|                       |                                                         |
|-----------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>CD</b>             | Clusturs of Differentiation                             |
| <b>CFU-F</b>          | Colony Forming Unit Fibroblast                          |
| <b>°C</b>             | Santigrat                                               |
| <b>cm<sup>2</sup></b> | Santimetre kare                                         |
| <b>DiI</b>            | 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine |
| <b>DMEM</b>           | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                      |
| <b>EDTA</b>           | Ethylenediaminetetraacetic acid                         |
| <b>FBS</b>            | Fötal buzağı serumu                                     |
| <b>FISH</b>           | Floresan in situ Hibridizasyon                          |
| <b>GVHH</b>           | Graft Versus Host Hastalığı                             |
| <b>HCl</b>            | Hidrojen klorür                                         |
| <b>KMY</b>            | Korozif madde yutma                                     |
| <b>MKH</b>            | Mezenkimal kök hücre                                    |
| <b>µg/ml</b>          | Mikrogram bölü mililitre                                |
| <b>µL</b>             | Mikrolitre                                              |
| <b>µM</b>             | Mikrometre                                              |
| <b>µ/ml</b>           | Mikron bölü mililitre                                   |
| <b>mg/kg</b>          | Miligram bölü kilogram                                  |
| <b>ml</b>             | Mililitre                                               |
| <b>mmol/ml</b>        | Milimol bölü mililitre                                  |
| <b>MR</b>             | Manyetik Rezonans                                       |
| <b>NaOH</b>           | Sodyum hidroksit                                        |
| <b>NG2</b>            | Nöral Glial Antijen iki                                 |
| <b>PBS</b>            | Phosphate Buffer Saline                                 |
| <b>rpm</b>            | Revolutions per minute                                  |
| <b>SD</b>             | Standart sapma                                          |
| <b>SI</b>             | Stenoz İndeksi                                          |
| <b>SPSS</b>           | Statistical Package for Social Sciences                 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                    | <i>Sayfa</i>                                                                                                         |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Şekil 3.1.</b>  | Ratların operasyona hazırlanması 25                                                                                  |
| <b>Şekil 3.2.</b>  | Distal özofagusun işlem öncesi hazırlanması 25                                                                       |
| <b>Şekil 3.3.</b>  | İzole distal özofagus duvarının şeffaf şekilde görülünceye kadar % 15'lik NaOH ile doldurulması 26                   |
| <b>Şekil 3.4.</b>  | İzole distal özofagusa DiI ile işaretlenmiş MKH enjeksiyonu 26                                                       |
| <b>Şekil 4.1.</b>  | Birinci pasaj sonrası az sayıdaki fibroblast karakterli adere koloniler 31                                           |
| <b>Şekil 4.2.</b>  | Üçüncü pasaj sonrası çok sayıdaki fibroblast karakterli adere koloniler 31                                           |
| <b>Şekil 4.3.</b>  | Akridin orange yöntemiyle canlılık analizi 32                                                                        |
| <b>Şekil 4.4.</b>  | MKH'in CD 34 ve CD 45 negatif olduğunu gösteren grafik 32                                                            |
| <b>Şekil 4.5.</b>  | MKH'in CD 105 ve NG2 pozitif olduğunu gösteren grafik 32                                                             |
| <b>Şekil 4.6.</b>  | MKH'in CD 105 ve CD 73 pozitif olduğunu gösteren grafik 32                                                           |
| <b>Şekil 4.7.</b>  | Osteojenik diferensiyasyon sonrası kalsiyum fosfat depozitlerinin gösterildiği Alizarin Red S ile boyalı hücreler 33 |
| <b>Şekil 4.8.</b>  | Adipojenik diferansiyasyonun görüldüğü Oil Red O ile boyanmış lipid adipozitler 33                                   |
| <b>Şekil 4.9.</b>  | Floresan mikroskop altında kırmızı parlama yayan DiI ile işaretli MKH 34                                             |
| <b>Şekil 4.10.</b> | Grup II'den histopatolojik görüntü 35                                                                                |
| <b>Şekil 4.11.</b> | Grup II'den histopatolojik görüntü 35                                                                                |
| <b>Şekil 4.12.</b> | 21. gün sakrifiye edilen ratlarda, gruplara göre SI düzeyi dağılımı 37                                               |
| <b>Şekil 4.13.</b> | DiI işaretli MKH'in epitelde daha fazla olmak üzere tüm katlardaki görüntüsü 37                                      |
| <b>Şekil 4.14.</b> | DiI işaretli MKH'in 6. filtrede 560nm dalga boyundaki görüntüsü 37                                                   |
| <b>Şekil 4.15.</b> | DiI işaretli MKH'in epiteldeki görüntüsü 38                                                                          |
| <b>Şekil 4.16.</b> | DiI işaretli MKH'in 6. filtrede 560nm dalga boyundaki görüntüsü 38                                                   |
| <b>Şekil 4.17.</b> | Florasan mikroskobu ile özofagus epiteline yerleşmiş MKH 39                                                          |
| <b>Şekil 4.18.</b> | Hibridizasyon sonucu saptanan X ve Y kromozom sinyallerinin florasan mikroskobundaki görüntüleri 39                  |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                                                            | <i>Sayfa</i> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Tablo 2.1.</b> Başlıca koroziif maddeler ve elde edilebilir ticari formları, kullanım alanları          | 5            |
| <b>Tablo 2.2.</b> Koroziif özofagus hasarının endoskopik derecelendirilmesi                                | 7            |
| <b>Tablo 2.3.</b> Embriyonik kök hücre ve MKH arasındaki temel farklar                                     | 19           |
| <b>Tablo 2.4.</b> Özofagus doku mühendisliğinde son yıllarda yapılan çalışmalar                            | 20           |
| <b>Tablo 4.1.</b> 21. gün sakrifiye edilen ratlarda, gruplara göre fibrozis bulgularının yüzde dağılımı    | 35           |
| <b>Tablo 4.2.</b> 21. gün sakrifiye edilen ratlarda, gruplara göre inflamasyon bulgularının yüzde dağılımı | 36           |
| <b>Tablo 4.3.</b> 21. gün sakrifiye edilen ratların gruplara göre stenozi indeksi (SI) değerleri           | 37           |
| <b>Tablo 4.4.</b> Grup III hibridizasyon sonuçları                                                         | 40           |



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Korozif özofajit, özellikle gelişmekte olan ülkelerde sık karşılaşılan, ev temizliğinde kullanılan yüksek yoğunluktaki kostik maddelerin kaza ile içilmesi sonucu gelişen bir klinik tablodur. Sıklıkla alkali türdeki maddelerle oluşmaktadır (1-3). Erken ve geç komplikasyonları nedeniyle toplum sağlığını ve tedavi maliyetleri nedeniyle ekonomisini tehdit eden problemlerinden biridir (2). Asit veya alkali olabilen korozif maddeler, hiç hasar oluşturmayabildikleri gibi çoğunlukla ağızda ve özofagusta gözlenen ağır yanıklar ve ölüm ile sonuçlanabilecek klinik tablolar oluşturabilmektedirler (4, 5, 6).

Kostik madde içimi sonrasında özofagusta travmatik bir hasarlanma ortaya çıkar. Akut nekrotik faz olarak da bilinen ilk bir ile dört gün içinde iskemik doku hasarı ile birlikte serbest oksijen radikallerine bağlı da doku hasarı ortaya çıkar (3, 13, 14). Bu doku hasarı sonunda inflamasyon ve kollajen artışı ile karakterize fibrozis ortaya çıkarak, korozif özofajitin geç komplikasyonu (3 hafta veya daha erken de gelişebilir) olan striktüre sebep olur (10, 15).

Özofagus striktürü tedavisinde, bujinaj, intraluminal stentler ve cerrahi teknikler yer almaktadır (19).

Kök hücreler, mezenkimal kök hücre (MKH), embriyonik kök hücre, pluripotent kök hücre ve amniotik sıvı kaynaklı kök hücreler olmak üzere elde edilmektedirler. İçlerinden MKH en çok hücre kültüründe üretilip araştırmalarda özellikle doku mühendisliği ve hücre terapisi olarak kullanılan hücrelerdir. MKH'in multipotent kök hücre oldukları; osteoblast, kondrosit, miyosit, adiposit, beta-pankreatik ada hücrelerine ve nöronal hücrelere differensiasyonu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir (18).

Çalışmamızda; kök hücre tedavisinin günümüzde sahip olduğu uygulama yöntemleri ve farklı organ sistemlerinde vermiş olduğu yüz güldürücü sonuçlar göz önünde bulunduruldu. Kök hücre tedavisinin özofagus striktürüne sebep olduğu fibrozisi önleyebilmesi hipotezinden yola çıkılarak; morbiditesi mevcut tedavi seçeneklerinden daha düşük, korozif özofagus striktürü olgularına daha kaliteli yaşam vaat eden bir alternatifte temel atılması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Korozif madde yutma (KMY) bir endüstriyel çağ hastalığıdır (8, 74). Çocukların doğal merakları ve her şeyin tadına bakma eğilimleri; belli kimyasalların evde, el altında oluşuyla bir araya gelince, korozif özofagus hasarı için uygun koşulları oluşturmaktadır. Çocuklarda özofagus yanığı, mutfak ve banyolarda kir, pas, kireç ve yağ çözücü olarak kullanılan asit ve alkali içerikli temizlik malzemelerinin yanlışlıkla, az miktarda da olsa içilmesi sonucu gelişir (27). KMY'ye genellikle alkali türdeki maddeler yol açmaktadır (21, 22, 23, 25). Asit veya alkali olabilen korozif maddeler, hiç hasar oluşturmayaabildikleri gibi çoğunlukla ağızda ve özofagusta gözlenen ağır yanıklardan başlayarak ölümlere varabilecek klinik tablolar oluşturabilmektedirler (21, 22, 23, 25). Bu açıdan erken ve geç komplikasyonları nedeniyle toplum sağlığını ve tedavi maliyetleri nedeniyle ülke ekonomisini tehdit eden problemlerden biridir (22).

Çocuklarda KMY; çocuklara ve erişkinlere yönelik eğitim programlarına, önleyici etiket ve ambalajlara ve hatta korozif maddelerin güçleri ve elde edilebilirliklerine birçok ülkede getirilen yasal sınırlamalara rağmen halen önemli bir sağlık sorunudur (59, 30, 31). Türkiye'de ise korozif maddelere özgü bir düzenleme olmamakla birlikte, tehlikeli maddelerin geneline dair yasalar daha çok maddelerin etiketlenmeleri, etiketleri üzerinde içeriğin doğru yazılması, uyarı yazılarının varlığı konularına odaklanmıştır (32).

Üç yaş altında kostik madde alımı daha çok önlenabilir sınıfa girmektedir. Beş yaş üstü şüpheli kostik madde alımlarına girmekle beraber adölesanlarda ise kasıtlı oluşmaktadır ve alınan miktarda oldukça yüksektir. Üç yaş altı daha çok erkek çocuklarda olmasına karşın adölesanlarda ise kız çocukları daha çok etkilenmektedir. Kostik madde alımlarının yaklaşık %20'si özofagusta herhangi bir derecede yanık hasarı oluşturmaktadır. Fiber-optik endoskopik incelemeler ile erken müdahale olanağı olmasına karşın halen kostik yanıklarda antibiyotik tedavisi, steroid tedavisi, özofagus stenti kullanımı, endoskop zamanı veya sıklığı, özofagus dilatasyonu metodu ve de özofagus replasmanı gerekliliği ile ilgili tam bir tedavi veya korunma yaklaşımı sağlanmış değildir (8).

## 2.1. Özofagusun Embriyolojisi ve Histolojik Yapısı

Özofagus ve trakea embriyonik foreguttan gelişir. Karina seviyesinde bronşiyal yapılar belirginleştiği yerde özofagus ve trakea birbirinden ayrılır. Özofagusun kas yapısı içte sirküler, dışta ise longitudinal kaslardan oluşur. Özofagusun proksimal 1/3'ü çizgili kastan oluşur ve istemli çalışırken; 2/3 distali ise düz kastan oluşur ve otonom sinir sistemi kontrolü altındadır. Özofagus anatomik olarak; servikal, torasik ve abdominal özofagus olmak üzere 3 bölüme ayrılır (38).

Özofagus lümen yüzeyi; keratinize olmayan, çok katlı yassı epitelle örtülüdür. Özofagus duvarı, genelde sindirim sisteminin diğer kısımlarının benzer katmanlardan oluşur. Submukozada, mukus salgılayan özofageal bez grupları; mide yakınında, lamina propriadaki özofageal kardiyak bezler, yiyeceklerin sindirimlerinin devamı için mideye iletimi esnasında kayganlaştırıcı etki sağlar; özellikle akut obstrüktif durumlarda yoğun kıvamlı balgam üretirler. Musküler tabaka; distal uçta sadece düz kas hücrelerinden oluşurken; orta kesimde hem düz, hem çizgili kas hücreleri; proksimal uçta ise sadece çizgili kas hücreleri bulunur.

İntermusküler (*Auerbach*) ve submukozal (*Meissner*) pleksuslarda; gangliyon hücreleri; nöronların birbirleriyle; parasempatik vagus, sempatik trunkuslar ve çölyak pleksus aracılığıyla bağlantılı olduğu yaygın bir ağ içerir. Gastrointestinal sistemin diğer kesimlerinin aksine, özofagus; laterallerde sağ ve sol mediastinal plevra, kısa abdominal kesimde de anterior ve laterallerde peritonla yakın komşulukta olsa da, serozal katmandan yoksundur; dış yüzeyi, çevre dokularla aradaki boşluğu dolduran gevşek bağ dokusu, *tunica adventitia* ile kaplıdır (8, 11, 12)

## 2.2. Korozi Özofagus Patofizyolojisi

Ağıza alınan ve yutulan genellikle sıvı formundaki kuvvetli alkaliler sıklıkla torasik özofagusta tam tabaka ve çepeçevre yanıklara neden olur. Çocuklarda bu olay kural olarak daima kazadır; ancak çocuk ağzına aldığı maddenin yakıcı tadını fark edinceye kadar birkaç mililitre kostik sıvı yutma refleksi başlamış olması nedeni ile özofagusa doğru hareket eder. Bolusun hızı, özofagusun faringeal ve servikal parçalarındaki güçlü kas yapısı nedeni ile torasik özofagusa göre nispeten daha hızlıdır. Buna bağlı olarak ilk derin

yanık torasik özofagusun başında sternal çentik düzeyinde olur. İkinci muhtemel yer bronkoaortik darlık çevresidir. Çocuklarda daha distal özofagusun da tahrip olması içilen maddenin sınırlı olması nedeni ile daha seyrektr. Distal özofagus darlıkları daha çok peptik özofajit kökenlidir. Bu durum, kostik özofagus yanıklarından sonra gelişebilecek bir gastroözofageal reflüye de bağlı olabilir.

Hasarın tipi maddenin asit veya alkali oluşuna göre değişmektedir. Asit içiminden sonra oluşan hasar daha çok mukozada sınırlı olmakla beraber koagülasyon nekrozu oluşmaktadır. Alkali içiminden sonra ise likefaksiyon nekrozu oluşur ve hasar epitel ve submukozada sınırlı kalmayıp kaslara kadar uzanır. Hemoraji, tromboz ve ödemin eşlik ettiği inflamasyon ilk 24 saatte görülür (8, 48, 50). Yanığın derecesine göre inflamasyon perforasyon oluşturacak kadar kaslara doğru ilerler. 48 saatten sonra submukozadaki damarlarda lokal nekroz ve gangrene neden olabilecek tromboz gelişir. Tam kat hasarlarda bakteriyel kontaminasyona bağlı mediastinumda intramural apseler oluşabilmektedir. Birinci haftanın sonu ve ikinci haftanın başında yani subakut dönemde hasarlı doku düzelir, ödem azalır ve neovaskülarizasyon başlar. Submukozada fibroblast formasyonu ile skar oluşumu ve sonrasında striktürün meydana gelmesi üçüncü haftada olur. Mukozal re-epitelizasyon üçüncü haftada başlar ve altı haftaya kadar devam eder. Bu dönemde özofagusta lümeni daraltan adezyonlar oluşabilir. Transmural hasarlanmalarda meydana gelebilecek mediastinite bağlı trakeaözofageal veya aortoözofageal fistüller gelişebilir. Yara epitelize olduktan sonra nedbenin son şeklini alması için gerekli reaksiyonlar, insanlarda iki yıla kadar sürebilmektedir (51, 52, 53, 54). İlk üç ayda maksimum seviyeler çıkan kollajen birikimi ikinci yılın sonlarına doğru normal doku kollajeni düzeylerine ve tipine inmektedir. Bu dönemden sonra nedbe dokusu stabildir. Bu bilgiler ışığında, eğer nedbeleşmiş özofagus lümeni iki yıla yakın sürebilecek bu remodelizasyon döneminde devamlı olarak açık tutulabilirse daralmanın tekrarlamayacağı sonucuna varılabilir (7, 8).

Hayvan deneylerinde skar gelişimini azaltmak ve inflamatuvar cevabı değiştirmek için değişik çalışmalarda steroidin faydası gösterilmiştir. Ancak bu güne kadar geline süreçte klinik çalışmalarda, steroidin darlık gelişiminde ciddi bir engelleyici rolünün olmadığı saptanmıştır (46, 55, 56, 57, 58).

### 2.3. Koroziif Madde Yanıkları

Koroziif maddelere bağlı gelişen özofagus yanıkları en ağır şekilde sıvı ve granül formlardaki güçlü alkali veya asit maddelere bağlı gelişmektedir (50). Başlıca koroziif maddeler, elde edilebilir ticari formları ve kullanım alanları tablo 2.1’de gösterilmiştir. Evde kullanılan temizlik malzemeleri, bulaşık makinesi deterjanları ve diğer temizlik malzemeleri en çok koroziif yanık oluşturan maddeler olmakla beraber özofagusta nekroz ya da striktür oluşturmaksızın sadece mukazol hasara neden olurlar. İçilen maddenin likit ya da granül oluşu ve de pH’sı hasarın oluşmasında önemli rol oynamaktadır. Örneęin; içilen maddenin pH’sı 12’den fazla veya 1,5’den az ise hasar daha fazla olmaktadır. Kristal kuru temizleyiciler (sodyum hidroksitten zengin) orofarenks ve üst özofagusta daha çok hasar oluştururken; yüksek konsantrasyonlu kostik likitler orofarenksten hızlıca geçtikleri için daha çok özofagus girişı, orta ve özofagogastrik bileşkede hasar oluşturmaktadırlar (8, 34, 35, 36, 59).

Alkali solüsyonlar tatsız olmalarına karşın asitli solüsyonların acımsı tatlarından dolayı daha az alınır; fakat alındıkları zaman da mide antrumunda ciddi hasara neden olurlar. Sodyum ve potasyum hidroksit içeren piller de çok nadir olsa da özofagusta korozyon oluşturmaktadır; fakat küçük olmalarından dolayı genellikle özofagustan mideye direk geçerler (8).

**Tablo 2. 1.** Başlıca koroziif maddeler ve elde edilebilir ticari formları, kullanım alanları\*

\* Grossfeld JL, O’Neill JA, Jr, Fonkalsrud EW, et al. Pediatric Surgery, 6th edition. Mosby Inc. 2006: s.1083

| Koroziif madde             | Elde edilebilir ticari form, kullanım alanları                  |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Sülfürik asit              | Piller, endüstriyel temizlik maddeleri, metal kaplama maddeleri |
| Oksalik asit               | Tiner, boya çıkarıcılar, metal temizleyicileri                  |
| Hidroklorik asit           | Çözücüler, metal temizleyicileri, antipas bileşikler            |
| Fosforik asit              | Tuvalet temizleyicileri                                         |
| Sodyum hidroksit           | Lavabo açıcılar, sabun üretim hammaddesi                        |
| Potasyum hidroksit         | Ocak temizleyicileri, çamaşır deterjanları                      |
| Sodyum karbonat            | Sabun üretimi, çiftliklerde meyve kurutma                       |
| Amonyak, amonyum hidroksit | Ev temizlik maddeleri                                           |
| Sodyum hipoklorit          | Çamaşır suyu, beyazlatıcı, ev temizlik maddeleri                |
| Sodyum polifosfat          | Endüstriyel deterjanlar                                         |
| Potasyum permanganat       | Dezenfektanlar, saç boyaları                                    |

## 2.4. Koroziif Özofagusta Klinik ve Yaklaşım

Kostik madde içimi sonrası çocuklarda çok az semptom ve belirti oluşur. Sadece 1/4'ünde belirgin belirtiler oluşur. Sıklıkla bulantı, kusma, yutma güçlüğü veya ağrılı yutma, mukozal kanamalar ve solunum yollarını da etkilediği takdirde solunum sıkıntısı bulguları ile başvururlar (24, 25, 26). Hasarın ciddiyeti içilen maddenin çeşidine ve konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Görülebilen orofarengeal belirti olmaksızın oluşan özofageal yanıklar sadece %5 civarında meydana gelmekte ve tanı ve tedavi gerektirmemektedir. Belirti ve semptomlar orofarenkste meydana gelen inflamasyona bağlı mukozal ödemin neden olduğu ağız ve retrosternumda ağrıdır. Ajitasyon ve taşikardi eşlik edebilir. Yutma güçlüğü ve tükürüğünü yutamama farenksin posteriorunda veya özofagusun proksimal kısmında çok ciddi hasar oluştuğunu gösterir. Çok nadir de olsa özofagus perforasyonu ve buna bağlı mediastinit, peritonit ve şok tablosu gelişebilmektedir (8, 38, 39, 40).

Çeşitli çalışmalar hastaların klinik belirtilerinin yanığın ağırlığını ve komplikasyon ihtimallerini belirlemede gösterge olamayacaklarını ortaya koymuştur (22, 24, 25, 26). Yanığın derinliğinin ve yaygınlığının belirlenmesi ilk 24–48 saat içinde yapılan üst gastrointestinal sistem endoskopik muayenesi ile tedavinin bu bulgulara göre düzenlenmesi gerektiği genel olarak kabul edilen bir görüştür (21, 22, 25).

Kostik madde içimi sonrası ilk önce diğer acil durumlarda da olduğu gibi havayolu açıklığını sağladıktan sonra oksijenizasyonun ve kardiyovasküler sistemi stabil olmasını sağlamaktır. Daha sonra alınan kostik maddenin içeriği ve konsantrasyonu belirlenmeli ve zehir danışma merkezleri tarafından onaylanmalıdırlar. Alınan hikâye ve yapılan fiziksel inceleme eğer şüpheli ise üst gastrointestinal endoskopik inceleme mutlak yapılmalıdır. İlk 24–48 saate fiber-optik endoskopi tercih edilmelidir (8, 41, 42). Merkezimizde koroziif madde yutma şüphesi dahi tanısız özofagoskopi endikasyonu olarak kabul edilmektedir.

Özofagusun teknesyum işaretli sukralfat radyonükleik incelemesi de yapılabilir ve sukralfat adezyonunun olmaması belirgin hasarın meydana gelmediği anlamına gelmektedir (9). Yapılan endoskopi ile meydana gelen hasarın derecesi belirlenmektedir.

Endoskopik bulgulara göre koroziif özofagusun derecelendirilmesi tablo 2.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.2.** Koroziif özofagus hasarının endoskopik derecelendirilmesi\*

\* Grossfeld JL, O’Neill JA, Jr, Fonkalsrud EW, et al. Pediatric Surgery, 6th edition. Mosby Inc. 2006: s.1084

| Derece | Endoskopik bulgular                                                                                     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0      | Normal                                                                                                  |
| I      | Mukozal ödem ve hiperemi                                                                                |
| IIa    | Doku kırılganlığı: kanama; eroziif veziküler lezyonlar, eksuda veya beyaz membranlar; yüzeysel ülserler |
| IIb    | IIa’ya ek olarak; derin, aralıklı veya çevresel ülserasyon                                              |
| IIIa   | Yer yer küçük nekroz alanları; kahverengi, siyah veya gri renk değişikliği alanları                     |
| IIIb   | Yaygın nekroz                                                                                           |

Endoskopi sırasında üçüncü derece yanık veya çepeçevre bir hasar görüldüğü takdirde endoskopi hemen sonlandırılmalı ve tedaviye hemen başlanmalıdır. Stridorun eşlik ettiğı farengeal yanıklarda havayolu obstrüksiyonuna neden olabileceğı için endoskopi kontraendikedir. Boyun, göğüs ve karını içeren direk grafiler çekilmelidir. Ateş, sepsis ve akut karın bulguları varsa perforasyonu gösterebilmek için suda çözünür opak madde ile özofagogram çekilmelidir. Perforasyonun düşünülmediğı diğer durumlarda özofagogram tedavi protokolünün belirlemesi amacı ile 10–14 gün sonra çekilmelidir (8).

Birinci derece yanığı olan hastalar için özel bir tedavi gerekli değildir. Oral beslemeye sıvılarla başlanır ve sonra katılara geçilir. Katı yiyecekleri tolere ederse hasta taburcu edilebilir. Orta dereceli (IIa) veya ağır (IIb ve IIIa) hasar, striktür oluşumunu engellemeye yönelik ek tedavi gerektirir (29). Bunlarda tedavi seçenekleri ise halen tartışma konusudur.

Derecesi IIIb olan hasar çocukluk çağında ender olup, genelde intihar girişiminde bulunmuş adölesanlarda görülür. Yaygın nekroz ve perforasyon halinde, özellikle mide de hasarlı ise, acil ve agresif cerrahiye ihtiyaç duyulabilir (33, 43, 44, 45).

Sistemik steroid kullanımı ile inflamasyonun baskılandığı deneysel hayvan çalışmalarında gösterilmiştir. Fakat klinik çalışmalarda striktür oluşumunun engellenmesi için steroidin dozu ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar gösterilememiştir. Yüksek doz steroidin (4 ila 6 hafta boyunca 1 mg/kg deksametazon) faydalı olduğunun gösterildiğı yayınların olmasına karşın bu serilerde hasta sayısının az olması ve enfeksiyon, osteit, peptik ülser ve osteoporoz gibi morbiditeye neden olmaları belirgin olarak gösterilmiştir (8).

Ciddi yanığı olan hastalarda yerleştirilebilirse eğer nazogastrik tüp takılıp erken enteral beslenme sağlanabilir. Ayrıca bu tüp dilatasyon için rehber olarak da kullanılabilir. Antifungaller, antiasitler ve asit sekresyon inhibitörleri ( H<sub>2</sub> reseptör blokörleri veya proton pompa inhibitörleri) yaygın olarak kullanılmakta olmalarına karşın yararlı oldukları gösterilememiştir (8).

Hastaya 10–14 gün içinde yapılan kontrastlı özofagogramda striktür olduğu görülürse hasta dilatasyon programına alınmalıdır. Dilatasyon için; civalı bujiler, fleksible bujiler, rehber telli metal bujiler veya çeşitli balonlu dilatatörler kullanılmaktadır. Dilatasyonlar mutlaka çok dikkatli yapılması gerektiği gibi ilk dilatasyon körleme yapılmamalıdır. Dilatasyon yapılan hastaların kötü prognostik faktörleri; 3.derece özofagus yanıkları, özofagusta ülser oluşmuş hastalar, fibrotik striktürlü hastalar, 5cm'den daha uzun segmentte striktür oluşmuş hastalar ve 9–12 ay boyunca dilatasyona rağmen cevap alınamayan hastalardır.

Dilatasyona cevap vermeyen olgularda definitif cerrahi yapılmalıdır. İzole veya lokal striktür gelişen hastalara cerrahi rezeksiyon ve uç-uca anastomoz yapılabilir. Son yıllarda silikon veya politetrafloroetilen içeren özofagus stentleri kullanılmaktadır. En az altı hafta boyunca özofagusta tutulması gereken stentler özofagusta aşırı inflamasyon veya gastroözofageal reflüye neden olabilmektedirler. Uzun dönemde akalazya benzeri semptomlar, karsinom veya Barrett's özofagus gibi hastalıkların 15 ile 40 yıl içinde gelişebileceği bildirilmiştir (94).

Diğer cerrahi teknikler ise; kolon interpozisyonu, gastrik pull up transpozisyonu ve jejunal interpozisyonudur. Bu tür ameliyatların morbidite ve mortalite riskleri olmakla beraber uzun dönemdeki karsinom riski ile kıyaslandığında daha düşük kabul edilmektedir (8).

*“En iyi özofagus hastanın kendi özofagusudur”* kavramından hareket edersek özgün özofagus lümeninin korunması için her şeyin denenmesi gerektiği açık olarak ortaya çıkmaktadır. Kostik özofagus striktürünün tedavisindeki en son seçenek interpozisyon ameliyatları olmalıdır. Özofagus kullanılmayacak kadar tahrip olmuşsa ve daralmış özofagusun lümeni bilinen bütün yöntemler denenmesine rağmen açık tutulamıyorsa gastrointestinal kanalın bir başka yerinden tübüler bir yapı ile daralan kısmın devre dışı



bırakılması mümkündür. Bu amaçla kullanılabilen cerrahi yöntemler, sağ ve sol kolon segmentleri kullanılarak yapılan retrosternal veya intratorasik kolon interpozisyonu, izoperistaltik veya ters gastrik tüpler ve gastrik interpozisyon veya çocuklarda çok popüler olmayan jejunal transplantlardır.

Kolon, peptik ülserasyona dayanıklı olması ve damar yapısı özellikleriyle iyi bir greft olarak kabul edilir. Kolon kullanılan olgularda greft daha yaygın olarak boyuna retrostrenal planda getirilir ve üst uç servikal özofagusa, alt ucu da antruma anastomoz edilir. Kısa segment özofagus darlıklarında striktür rezeke edildikten sonra özofagusun devamlılığı uç uca yapılacak bir primer anastomoz ile sağlanabilir.

Klasik gastrik tüp ameliyatları ve gastrik transpozisyon, mide damar yapısının diğer bağırsak segmentlerinin damar yapılarına kıyasla daha geniş çaplı ve daha az frajil olmasından dolayı kolay görülse de trunkal vagotomi ve piloromiyotomi veya piloroplastiyi gerektirdiğinden fizyolojiye aykırı bir özofagoplasti yöntemidir. Sonuç olarak rekonstruktif ameliyatlar zor işlemlerdir ve en iyi ellerde dahi başarısızlık riskine sahiptir. Akut greft nekrozu, anastomoz darlıkları, yutma güçlüğüne devam etmesi veya uzun dönemde ortaya çıkabilecek gastroözofageal reflü gibi başarısızlık riskleri vardır. Bunun için asla unutulmamalıdır ki en iyi özofagus hastanın kendi özofagusudur ve korunması için her şey denenmelidir (7).

## **2.5. Kök Hücre**

### **2.5.1. Kök Hücre Tanımı ve Tarihçesi**

Kök hücre, bir canlının vücudunda çok uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve bu sayede farklılaşmış hücreler oluşturabilen farklılaşmamış hücrelere verilen addır. Bir başka deyişle farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip olan hücrelere kök hücre denir. Vücudumuzdaki kas, karaciğer, cilt hücreleri gibi hücrelerin hedefleri bellidir ve bu hücreler bölündükleri zaman yine kendileri gibi bir hücre oluştururlar. Oysa kök hücrelerin bu hücrelerden farklı olarak belirlenmiş bir fonksiyonları yoktur. Bu yüzden aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Bunu belirleyen en önemli etkenler de genler ve dış uyaranlardır (60–65). Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda ölüm ya da hasar meydana gelince

kök hücreler hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye dönüşüm gösterirler. Sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu, tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip ilk embriyonel hücreye “totipotent” hücre denir. Döllenmeyi takiben ilk 4–5 gün içerisinde bu hücreler aynı güce sahip olup her biri tek başına bir organizma meydana getirebilme yeteneğinde hücrelerdir. Yaklaşık beş gün sonrasında oluşan hücre kitlesine de blastosist denir ve içindeki hücreler de vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Ancak bu hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturmazlar. Bu nedenle bu hücrelere “pluripotent” hücre denir. Bu aşamadan sonra hücreler daha özel fonksiyonlara sahip olmakta ve erişkin kök hücreleri oluşturmaktadırlar. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere ise “multipotent” hücre denmektedir. Buna en iyi örnek hem çocukluk döneminde hem de erişkin dönemde kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerdir. İnsan vücudunda ancak birkaç hücre türüne dönüşebilen bu hücreler, laboratuvar koşullarında gerekli destekleyici ortam ve sinyaller sağlandığında çok daha fazla hücre türüne dönüşebilmektedir (85–89).

Hücresel düzeyde tarihsel bir bakış açısı getirildiğinde 19. yüzyılın unutulmaz bilim adamları arasında yerini alan patoloji biliminin mimarlarından aynı zamanda klinisyen, antropolojist ve politikacı Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821–1902) “her hücrenin bir başka hücreden köken aldığını” tanımlamıştır. Virchow’un öğrencisi, Julius Cohnheim (1839–1884) ise bütün hücrelerin dolaşımdan dolayısı ile kemik iliğinden köken aldığını öne sürmüştür.

İlk olarak 1967 yılında tanımlanan embriyonel karsinoma hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması da bu alanda ileri doğru atılmış önemli bir adımdır ve o zamandan beri insan ve fare teratokarsinomlarından çok sayıda hücre serisi tanımlanmıştır (84).

Aynı zaman döneminde; in vitro fertilizasyon kliniklerinden alınan fazla embriyolar kullanılarak insan embriyonik kök hücrelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar da başlamıştır. 1998’de ilk insan embriyonik kök hücreleri kültüre edilebilmiştir. Bu kök hücrelerin gelecekte hastalık tedavisi için kullanılabilecek olması büyük bir heyecan yaratırken, henüz çözümlenmemiş etik sorunlar ciddi bir direnç yaratmıştır. Bu hücrelere karşı gösterilen etik reaksiyonlar sonucu, erişkin kök hücreleri ile ilgili çalışmalar da yoğunlaşmış ve bu hücrelerin belirgin plastisiteleri “kemik iliğinden kas”, “beynin kana

çevrilmesi”, “kanın beyne çevrilmesi” gibi başlıkların görülmesine neden olmuştur. Bu ilk çalışmalardan sonra erişkin ve embriyonik kök hücrelerle ilgili çok sayıda yayın ortaya çıkmıştır.

### **2.5.2. Mezenkimal Kök Hücre Tanımı**

MKH, erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MKH’lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde bulundukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar. Doku mikroçevresinin önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımalarından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadırlar. MKH’in, elde edildikleri dokularda çok az sayıda olmaları nedeniyle in vitro hücre kültür ortamında çoğaltılmalarının gerekliliği, bu kök hücrelerin temel bilim araştırmalarında ve klinik kullanımdaki en önemli dezavantajıdır (80–83). Bu durum hücrelerin kültür ortamında pasajlanmaları sonucu maruz kaldıkları çeşitli uyaranlar ve faktörlerin etkisiyle fenotipik, immünolojik ve diğer biyolojik özelliklerinde farklılıklara yol açmaktadır. MKH ile yapılan temel araştırmaların tamamına yakın bir kısmında in vitro kültür ortamında geliştirilen hücreler kullanıldığı için, detaylı çalışılmış da olsa, bu hücrelerin tanımlanmış özelliklerinin in vivo özelliklerini yansıtmaktan oldukça uzak olduğu bilinmektedir. Bu durum özellikle klinik uygulamalar için dezavantaj oluşturmaktadır. Kültür ortamında pasajlanarak çoğaltılmaya bağlı hücre yaşlanması, sitogenetik bozukluk ve düşük de olsa malign dönüşüm riski bulunmaktadır. Aynı zamanda klinik kullanıma uygun kalitede hücre geliştirilmesi için uluslararası kabul edilen akreditasyon koşullarına uygun hücre işleme laboratuvarlarını oluşturmadaki zorluklar, bu hücrelerin klinikte yaygın kullanımına engel teşkil etmektedir.

MKH bağ dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilir. Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler. Bu hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein, fetal buzağı serumu (FBS) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine

farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Yıllar sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan pluripotent kök hücreler olduğu, her üç germ yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur. Önceleri, CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve “kemik iliği stromal fibroblast”ları denilen bu hücreler daha sonra MKH olarak tanımlanmışlardır. Birçok laboratuvar, birbirinden çok da önemli farklılıklar içermeyen protokolleri izleyerek MKH izolasyonu ve bu hücrelerin çoğaltılması, farklılaşmaya yönlendirilmesi için çeşitli metotlar kullanmaktadır. Bu nedenlerden ötürü Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği, hem temel araştırmalar hem de pre-klinik çalışmalar için insan MKH’lerini tanımlamada gerekli kriterleri önermiştir. MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışması, stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (65, 66, 78, 79).

### **2.5.3. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları**

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH’ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda  $1 \times 10^6$  mononükleer hücreye karşı ortalama iki ile 100 arasında değişen sayıda MKH mevcut olduğu gösterilmiştir (67, 68, 70, 71). Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Solid dokulardan hücre izolasyonunda enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kemik ve periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvı, hatta periferik kandan da adezyon özellikleri nedeniyle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür (74, 75, 76). MKH’in, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik doku kültür kaplarına yapışabilme, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır. Bu özellikler büyük ölçüde benzerlik gösterir. Ancak farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özelliklerinde, köken alınan doku tipine göre bazı değişiklikler olabildiği de gösterilmiştir. Bulundukları mikroçevreye ve organizmada ihtiyaç duyulma haline bağlı olarak, MKH’lerin biyolojik özellikleri ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler olduğu da gösterilmiştir. Bununla ilişkili olarak da spesifik bir dokunun onarımı için, o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımının avantajları olacağı gündeme gelmiştir. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan nonhematopoetik ve MKH karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir (69,

72, 73). Özellikle ağır hasar olan durumlarda, kemik kırığı, multiorgan yetmezliği hallerinde periferik kandan MKH izole edildiği gösterilmiştir. MKH ile yapılan çalışmalar hep in vitro olduğundan, hücrelerin dokularda yerleşimi, niş bölgeleri detaylı incelenmemiştir; yine de özellikle son zamanlardaki çalışmalarda, hücrelerin dokularda perisitler gibi perivasküler yerleşimde olduğu, komşu hücrelerin olgunlaşma, farklılaşma ya da sessiz kalma gibi hücresel fonksiyonlarını koordine ettikleri bildirilmiştir (68, 70, 89).

MKH, kemik iliği de dâhil olmak üzere dokularda çok az sayıda bulunmaktadır. Ayrıca adeziv özelliklerine bağlı olarak bulundukları dokulardan yeterli sayıda elde edilmelerinde zorluklar vardır. Gerek klinik uygulama, gerekse temel bilim araştırmalarında yeterli hücre sayılarına ulaşabilmek için in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Bu hücrelerin in vitro çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücreler oldukları, kültürde proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini korudukları bilinmektedir. Kültür ortamında çoğaltılan MKH ışık veya faz kontrast mikroskop ile incelendiğinde hücrelerin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları dikkati çekmektedir.

Hücrelerin in vitro kültür ortamında çoğalması için çok özel koşullar gerekmemektedir. Bunun için %10–15 FBS içeren kültür ortamında plastik flask tabanına yapışma göstermiş olan hücreler, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler. Farklı dokulardan MKH kültürü hazırlığı için eritrositlerin uzaklaştırılması veya solid dokularda hücre süspansiyonu hazırlanması gerekmektedir. Kemik iliğinden izolasyon için dansite gradient yöntemi ile mononükleer hücre süspansiyonu hazırlanırken diğer dokulara genellikle enzimatik ayrıştırma uygulanmaktadır. Süspansiyon haline getirilen hücreler kültür vasatı içinde, kültür kaplarına konularak %5 CO<sub>2</sub> içeren 37 °C'lik ve %95 nemli inkübatörde inkübasyona bırakılır. Ekilen heterojen hücre topluluğu içinde bulunan çok az sayıdaki MKH'lerin çoğaltılması için büyüme faktörleri ve diğer uyarıların eklenmesi gerekmemekte, ancak serum içeren bir ortam hazırlanmaktadır. Bu amaçla, en sık olarak kullanılan yöntem, %10–15 FBS gibi yüksek oranlarda kültür vasatına eklenmesidir. Mezenkimal kök hücreler, standart kültür koşulları altında plastik doku kültür kaplarına yapışmaktadır. Bununla birlikte MKH'ler, çok özel koşullar sağlanarak doku kültür flasklarına yapışma sağlanmadan da çoğaltılabilmektedirler. Standart şartlarda kültüre bırakılan hücre topluluğu içinden küçük bir kısmı, saatler içerisinde plastik kabın tabanına adezyon göstermeye başlamaktadır. 24–48 saat sonra yapışmayan hücrelerin

uzaklaştırılmasını takiben ve çoğalmaya başlayan hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında %0,25 tripsin ile yapışan hücreler kaldırılarak düşük konsantrasyonlarda yeni kültür kaplarına ekim yapılarak çoğaltılır. Devam eden pasajlarda yaklaşık 7–10 günde bir, hücreler pasajlanarak istenen sayıya ulaşmak için çoğaltılır. Kültürler sırasında günde bir taze vasat eklenerek en uygun kültür şartları temin edilmeye çalışılır. İstenilen aşamada hücreler, yedekleme, ileri çalışmalar veya klinik uygulamalarda kullanılmak amacıyla dondurularak saklanabilir. Hücreler önce –80 °C’ de 24 saat bekletilir sonra da sıvı nitrojene konularak saklanır. Klinik amaçlı kullanılacak hücrelerin dondurulmasında ise kontrollü dondurucular kullanılabilir. Hücrelerin çoğalma hızı; ekimde hücre dansitesi, kültür vasatı özellikleri, hücrelerin alındığı doku, verici yaşı, hayvan türü ve ortam koşullarına bağlı olarak değişim göstermektedir. Kültürde hücre sayısının ikiye katlanma zamanının yaklaşık 30–36 saat olduğu bildirilmiştir. Hücrelerin ilerleyen pasajlara kadar çoğalma ve diğer özelliklerini taşıdıkları bilinmektedir. Sıçan kemik iliği kaynaklı MKH ile yapılan çalışmalarda, düşük ve yüksek hücre yoğunluğunun büyüme kinetiğini ve farklılaşma potansiyellerini nasıl etkilediği araştırılmıştır (63, 82, 86). İlk pasaj sonrası MKH kültürlerinde genellikle morfolojik olarak homojen görünüm elde edilse de, hücrelerin tek tek düşürülerek oluşturulan klonal hücre analizlerinde, çoğalma özellikleri yönünden heterojen hücre popülasyonları dikkati çekmektedir. Hücrelerde bu istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek amacıyla MKH’lerin ideal olarak pasaj üçten sonra kullanılması tercih edilmemektedir (70, 79). Bu durum özellikle klinik uygulamalarda önem taşımaktadır.

Heterojen hücre topluluğu ile başlanan kültürlerde MKH popülasyonunu diğer hücre popülasyonlarından ayırt etmek için hematopoetik kök hücreler veya hücrelerin izole edildiği dokuya özgü antijenlerin negatif olması gerekmektedir. Bu hücrelerin, dokuya özgü antijenleri taşımadıkları, buna karşın adezyon, hücre-hücre, hücre-hücre dışı matriks ilişkilerinde rol oynayan, ve stromaya özgü antijenleri yüksek oranda eksprese ettikleri bilinmektedir. Sadece MKH’leri tanımlayan spesifik bir antijen henüz tanımlanmamıştır. Kemik iliğinden elde edilmiş ve kültürde çoğaltılmış MKH’lerin akım sitometri ile immünofenotipik özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. CD34 (Clusters of Differentiation) antijenik olarak bu hücrelerin gösterilmesinde kullanılan önemli bir belirleyicidir. MKH antijenik olarak tanımlayıcı bir belirleyicileri yoktur. CD105, CD73, CD90 gibi belirleyicileri bulunduran CD45 negatif hücrelerdir. Buna karşın, MKH’ler stroma ile ilgili antijenlerden tipik kabul edilenlerden CD73, CD 90, CD29, CD44 pozitifdir (90, 97).

#### 2.5.4. Mezenkimal Kök Hücrenin Farklılaşma Potansiyeli

MKH'in, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Caplan ve arkadaşlarının ardından çeşitli araştırmacılar in vitro koşullarda uygun stimulanlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir (73). İlerleyen zamanda MKH'lerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epitelooid hücrelere dönüşüm olduğu, yine uygun koşullar sağlandığında, nöronal hücreler geliştiği de gösterilmiştir (16, 99, 101). Farklılaşma potansiyeli ile ilgili diğer bir konu ise, MKH'in, adiposit, osteosit gibi kendi kökeninden değil de farklı bir doku hücresine (hepatosit, pankreas beta hücresi gibi) dönüşebilmesidir. Farklılaşma oranının in vivo koşullarda çok düşük olduğu, ancak çok az sayıda hücrede farklılaşma gelişebildiği, o nedenle de bu mekanizmanın hasar tamirinde ancak sınırlı bir etkisi olabileceğidir (81, 90, 97). Bağ doku dışındaki dokularda hasar onarımındaki temel mekanizmaların yukarıda bahsedilen destek hücresi, immünmodulator özellikleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. MKH, in vitro ortamda kolaylıkla farklılaşmaya yönlendirilebilmektedir. Adipojenik ve osteojenik farklılaşma özelliklerin in vitro gösterilmesinin MKH tanımlaması için şart olduğu bildirilmiştir (107).

Adipojenik farklılaşma için %90–100 oranında konfluent olana kadar geliştirilen MKH'ler üzerine, büyüme vasatı yerine Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisinde %10 FBS, 1 µM deksametazon, 60 µM indometazin, 500 µM izobütilmetilksantin ve 5 µg/ml insülin ile hazırlanan adipojenik kokteyl konularak farklılaşma uyarılır. Üç hafta sonra analiz edilir.

Osteojenik farklılaşma için %50–60 oranında konfluent olana kadar geliştirilen MKH'ler üzerine, büyüme vasatı yerine, DMEM içerisinde %10 FBS, 100 µM deksametazon, 10 µM betagliserofosfat ve 0,2 µM askorbik asit ile hazırlanan osteojenik farklılaşma vasatı konularak farklılaşma uyarılır. Üç hafta sonra kültürdeki ekstraselüler matrikste kalsifikasyon, kalsiyum fosfat depoları belirgin olarak tespit edilir.

MKH'lerin, kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizilerine de farklılaşabilme niteliği, özellikle rejeneratif tıp ile ilgili dallarda çok ilgi uyandırmış ve bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kök hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliğini tanımlamaktadır. Kemik iliği kökenli kök hücreler ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin miyoblast, endotel, hepatik, kardiak, renal ve nöral hücrelere farklılaşabildiği gösterilmiştir (104, 105, 106).

Hücrelerin bu çok yönlü farklılaşması heyecan verici olsa da dokuda çok az sayıda hücrede farklılaşma gözlenmiş olması, hasar tamirinde diğer mekanizmaların rolünü akla getirmiştir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda ise, allojenik kemik iliği nakli yapılan osteogenezis imperfekta hastalara MKH verilmesinden sonra, kemiklerde verici kökenli osteositlerin varlığı gösterilmiş ve hastalarda klinik cevap elde edilmiştir. Başka bir çalışmada ise akut greft versus host hastalığı (GVHH) nedeniyle anne kökenli MKH verilen hastanın bağırsak epitel hücreleri arasında verici kökenli hücrelere rastlanmış olması, intravenöz yolla verilen MKH'lerin bağırsak epitel hücrelerine dönüştüğünü göstermiştir (73).

Hasarın iyileştirilmesinde etkili mekanizmalar; MKH'in farklılaşarak olgun fonksiyonel hücrelere dönüşmesi, hasarlı hücre-MKH füzyonu sonucu hücre fonksiyonunun yeniden kazanılmasıdır. MKH'in hasarlı dokuda hücre-hücre, hücre-ekstraselüler matriks ilişkileri ve çözünür faktörlerin (büyüme faktörü, sitokin, kemokin vs.), parakrin faktörlerin, enzimlerin salınımı veya immünmodülatör, antiinflamatuvar, antiapoptotik, angiogenik etki göstermek yoluyla hasarın giderilmesine katkıları olarak sayılabilir. Burada en önemli mekanizmanın çözünür faktörler ve hücreler ile adeziv ilişkiler ile olduğu düşünülmektedir.

MKH'in bulundukları bölgelerdeki nişlerinden, hasarlı dokuya doğru mobilizasyonu, migrasyonu gerekmektedir. Bunu sağlayan uyarının da, hasarlı dokunun değişen mikroçevresinden geldiği gösterilmiştir. Ayrıca, hücrelerin hasarlı bölgeye hareketini sağlayan bu uyarıların büyük ölçüde MKH tarafından sağlandığı da düşünülmektedir.

Kas ve iskelet sisteminde rejenerasyondan sorumlu kök hücrelerin kaynağı kemik iliğinde, peritrabeküler dokular, kırıkta, kas, yağ ve perisitler gibi bağ ve destek dokusu kök hücreleri şeklinde multipotent hücreler olduğu bilinmektedir. Sindirim kanalı, çok çeşitli tipte epitel yapılara sahiptir. Yassı epitel mukozalarda bazal tabakada kök hücreler



bulunurlar. Özofagusun niş bölgesi epitel bölgesidir. Mide mukozasında bezlerin açılış bölgesinde yerleşen kök hücreler derinde bezlere, yüzeye doğru da mukus yapan döşeyici epitele farklılaşacak şekilde iki yönlü ilerlerler. İnce ve kalın bağırsakta kök hücre niş bölgesi kript tabanında yer alır. Sonuç olarak erişkin dokulardaki kök hücreler bu dokuların yenilenmesini kontrol ederler. Tüm dokularda kök hücreler özel damarlanan niş bölgesi olarak isimlenen bir mikro çevrede bulunurlar. Bu sayede dışardan ve içeren gelen uyarılarla niş bölgesinde de yenilenme kontrolü gerçekleşmektedir (68, 74, 87, 88).

### **2.5.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Verildiği Dokulardaki Takibi**

In vivo uygulamalarda MKH infüzyonu veya dokuya implantasyonundan klinik yarar elde edilse de, bu hücrelerin verildikten sonraki durumu, hasarlı dokuya göç, yerleşim özellikleri, orada çoğalmaları, farklılaşma özellikleri, kısacası hücrelerin infüzyonu takiben kaderi detaylı incelenmemiştir. Çalışmaların çoğunda hücre infüzyonunu takiben hücrelerin, dokularda veya kanda tespitinde zorlukla karşılaşılmaktadır. Farklı cinsiyette vericiden yapılan kök hücre infüzyonu sonrası hasarlı dokuda verici cinsiyetine ait hücrelerin gösterilmesi, farklı türler arasındaki nakillerde verici türüne ait spesifik belirteçlerin kullanılması, bu amaçla uygulanan yöntemlerdir. Hücrelerin yeşil floresan protein ile transfekte edilmesi ve floresan hücrelerin dokularda takibi ise en çok uygulanan yöntemlerden biridir. Genetik işaretleme kalıcı olması yönünden tercih edilen bir yöntemdir. Kısa süreli deneysel çalışmalarda 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) gibi geçici floresan işaretlemeler de kullanılabilir. Dokularda yapılan histopatolojik incelemeler, infüze edilen hücrelerin gösterilmesi konusunda genellikle yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda hücrelerin in vivo takibi ilgi çekmektedir. Bu amaçla MKH'lerin lusiferaz ile işaretlenerek biyoluminesans cihazı ile in vivo takibi, ya da süper manyetik demiroksit nanopartikülleri ile işaretlenerek manyetik rezonans altında (MR) in vivo görüntülenmesi de giderek artan yöntemlerdir. Demir oksit ile işaretlemeye kullanılan demir oksit partikülleri, insanda MR çekimi esnasında da kullanıldığından in vivo hücre takibi için ilgi çekmektedir (107, 108).

### **2.5.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı**

2000'li yılların başlarından itibaren klinik uygulamaları başlanmış olan MKH tedavileri, halen başlıca hematopoetik kök hücre nakil hastalarında olmak üzere kullanıma girmiş,

dünyada 200'ün üzerinde hastaya bu tedavilerin uygulandığı bildirilmiştir. Hücresel tedaviler içinde MKH tedavileri, klinik kullanım için en avantajlı hücreler arasında yer almakla birlikte, özellikle ilerlemiş pasaj hücrelerinin kullanımı ile sitogenetik bozukluk, hatta malignite riski bulundurabileceği de dikkate alınmalıdır. Klinik uygulamalar MKH ile in vitro ve in vivo deneysel araştırmalar çok sayıda olsa da, rapor edilen klinik uygulama sayısı az olup giderek artmaktadır. Mezenkimal kök hücre klinik uygulamalarında, özellikle immünmodulator etkilerinin ön plana çıktığı akut GVHH ve Crohn hastalığı en çok yarar görenleridir (71, 72, 73, 77).

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım açısından avantajları:

- 1- Farklılaşma yeteneklerinin fazla olması;
  - a) Kendi köken aldığı konnektif doku hücreleri olan kas, yağ, kemik, kıkırdak, stromal hücreler, tendon, ligament gibi.
  - b) Diğer doku hücrelerine farklılaşma özelliği: Nöron, hepatik, pankreatik hücre gibi.
- 2- Hasarlı hücre ile füzyon yeteneği olması,
- 3-Biyoaktif maddeler, çözünür faktörler (büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler gibi) salgılayarak hasarlı hücre veya doku tamirine katkı sağlaması,
- 4- Migrasyon özellikleri sayesinde hasarlı dokuya ulaşabilmeleri,
- 5- Immüsupresif özellikte olmaları,
- 6- Anjiojenik, antiapoptotik, anti-inflamatuvar özelliklerinin olmaları.

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım açısından dezavantajları:

Birçok avantajı olduğu gösterilen bu hücrelerin klinik kullanım açısından en önemli dezavantajı, sayılarının çok az olması nedeniyle in vitro kültür ortamında haftalarca süren kültürlerde çoğaltılması gereğidir. Hücre hazırlığında gerekli tüm in vitro işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda yapılması gerekmektedir. Hücrelerin kalite kontrolleri yapılmış olarak haftalar süren kültür ortamında çoğaltılabilmeleri için, en başta, dış ortamdan gelebilecek enfeksiyonların önlenmesi, ayrıca işlemlerden geçirilirken hücrelerde stres oluşmasına bağlı gelişebilecek istenmeyen etkilerin (örn. kanser geliştirme potansiyeli, hedeflenen dışında başka hücre gelişmesi gibi) önlenmesi gerekmektedir. O nedenle halen dünyada MKH'lerin klinikte kullanımına ait bildirilen çalışma sayısı fazla değildir.

Mezenkimal kök hücreler, hastalarda intravenöz yolla, kateter yolu ile veya direkt olarak hasar bulunan bölgeye enjeksiyon veya cerrahi esnasında verilebilmektedir. Hücrelerin lezyon bulunan alana direkt implantasyonu ile daha verimli sonuçlar elde edilebileceği hayvan deneylerinde bildirilmişse de, sistemik veya lokal verilişte benzer sonuçların olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (80, 88). Klinik uygulamalarda ise daha ziyade sistemik yolla veriliş tercih edilmektedir.

**Tablo 2.3.** Embriyonik kök hücre ve MKH arasındaki temel farklar

| Hücre                | Kaynak        | Özellik     | Ekspansiyon | Tümörojenik Özellik | Etiksel problem |
|----------------------|---------------|-------------|-------------|---------------------|-----------------|
| Embriyonik kök hücre | Embriyo       | Pluripotent | Sınırsız    | Var                 | Var             |
| Mezenkimal kök hücre | Yetişkin doku | Multipotent | Sınırlı     | Yok                 | Yok             |

## 2.6. Özofagus ve Kök Hücre

Kök hücre tedavilerinde en büyük ilgi uyandıran rejeneratif tıp alanıdır. Tıbbın hemen her alanını kapsamaktadır. Ortopedide menisküs hasarı tamiri, osteoporoz tedavisinden diş hekimliğinde implantlar, kardiyolojide miyokard enfarktüsü, spinal kord yaralanmaları, plastik cerrahide yanık tedavisine kadar çok geniş potansiyel kullanım alanı mevcuttur.

Özofagus doku mühendisliğinde, ototransplantasyona yönelik yapay özofagus segmentinin oluşturulması hedeflenmiştir. Absorbe olan ya da olmayan sentetik ve biyolojik materyaller tübülerize edilerek özofagus replasmanında kullanılmıştır. İlk çalışmalar hücre ekilmeden yapılmıştır. Tübüler yapılarda kontraksiyon ve sızmanın sık görülmesi üzerine, matriks üzerine hücre kaplanarak replasman gerçekleştirilmiştir (91).

Özofagus rejenerasyonunda gelecekte yapılacak yeni çalışmalar sayesinde yeni hücre kaynakları sağlanması hedeflenmektedir. Bu kaynakların başında mezenkimal kök hücreler, embriyonik kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve amniyon sıvısı kök hücreleri olacaktır. Bunların içinde mezenkimal kaynaklı kök hücreler üzerinde en çok durulan ve araştırılan hücreler olmuştur. MKH multipotent özelliklerinden dolayı

osteoblasta, kondrositlere, miyosite, adipozitlere, pankreas ada hücrelerine ve nöral hücrelere differansiye olabilirler.

2004 yılında Epperly ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yetişkin fare kemik iliğinden izole edilen özofagus progenitör hücrelerin radyasyon uygulanmış fare özofagusunda proliferere olduğu gösterilmiş ve hücrelerin özofagus skuamöz epiteline differansiye oldukları ispatlanmıştır (105).

**Tablo 2.4.** Özofagus doku mühendisliğinde son yıllarda yapılan çalışmalar\*

\* Tissue engineering: an option for esophageal replacement?, Augusto Zani,<sup>a</sup> Agostino Pierro,<sup>a</sup> Nicola Elvassore,<sup>b</sup> Paolo De Coppi, MD, PhD, Seminars in Pediatric Surgery (2009) 18, 57-62

| Yazar           | Yıl  | Materyal                                | Hücre                            | Çalışma türü             |
|-----------------|------|-----------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Takimoto        | 1998 | Silikon tüp                             | Yok                              | Köpek, in vivo           |
| Shinhar         | 1998 | Vicryl® yama                            | Yok                              | Köpek, in vivo           |
| Badylak         | 2000 | ECM: SIS, mesane submukozası            | Yok                              | Köpek, in vivo           |
| Lopes           | 2006 | Domuz, SIS                              | Yok                              | Sıçan, in vivo           |
| Lynen<br>Jansen | 2004 | Vicryl® ve polyvinylidene fluoride yama | Yok                              | Tavşan, in vivo          |
| Isch            | 2001 | Desellülerize insan kollajeni           | Yok                              | Köpek, in vivo           |
| Bhrany          | 2006 | Sıçan desellülerize özofagus            | Sıçan özofagus epitel hücreleri  | Sıçan, in vivo, in vitro |
| Ozeki           | 2006 | Sıçan desellülerize özofagus            | Özofagus epitel hücreleri        | İn vitro                 |
| Urita           | 2007 | Gastrik ECM                             | Yok                              | Sıçan, in vivo           |
| Watanabe        | 2005 | Gorteks vasküler greft                  | Yok                              | Keçi, in vivo            |
| Grikcheit       | 2003 | Organoid ünite                          | Sıçan özofagus tam kat hücreleri | Sıçan, in vivo           |
| Hayashi         | 2004 | Domuz kollajen tabaka                   | İnsan epitel, kas, fibroblast    | Sıçan, in vivo           |
| Beackstead      | 2005 | Alloderm, PLLA, PLGA, PCL/PLLA          | Sıçan özofagus epitel hücreleri  | İn vitro                 |
| Marzora         | 2006 | Domuz desellülerize özofagus            | Otolog düz kas hücreleri         | Domuz, in vivo, in vitro |

Çalışmamızda daha önce literatürde yayınlanmamış ratlarda oluşturulan korozif özofagusa insan mezenkimal kök hücre implantasyonu ile hücrelerin üç hafta boyunca canlılığını koruyup özofagusa yerleşip oluşacak striktörü önlemeye olumlu etkisini göstermeyi amaçladık.



### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırma Yeri ve Ortamı**

Bu deneysel çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı'nda yapılmış olup çalışmada kullanılan ratlar aynı merkezden temin edilmiştir. Mononükleer hücre izolasyonu, MKH kültürü, tripsinizasyon, hücre sayımı ve canlılık, akım sitometri, MKH'in diferensiyasyonu ve MKH'in 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI; Invitrogen, USA) ile işaretlenmesi Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Hematoloji Laboratuvarı'nda, histopatolojik incelemelerde Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda ve genetik işlemler için gerekli incelemeler Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Etik kurul onay numarası: 0939, tarihi: 14.12.2009).

#### **3.2. Deney Hazırlığı:**

Araştırmada 10'ar adet, ağırlıkları 200–250 gr arasında değişen Wistar-Albino cinsi dişi ratlardan oluşan üç grup kullanıldı. Özofajit modeli literatürdeki klasik Gehanno ve Guedon modelinin modifikasyonu örnek alınarak oluşturuldu (19). Deney süresi üç hafta olarak belirlendi. Anestezi için 60 mg/kg ketamin hidrojen klorür (HCl, Ketazol %10, Richter Pharmaag Wels Austria) ve 6 mg/kg xylazin HCl (Rompun, %2 Bayer Healthcare Llc. Animal Health division 12707, Shawnee, Cansas 66201, ABD) intraperitoneal olarak uygulandı. Asepsi ve antisepsi deneğin karın cildi tıraşlandıktan sonra batikon ile temizlenerek yapıldı.

#### **3.3. Mezenkimal kök hücrenin hazırlanması:**

##### **3.3.1. Mononükleer hücre izolasyonu:**

27 yaşındaki sağlıklı, erkek M.K. adlı hastadan etik kurul onaylı rapora imzası alınarak 09.08.2010 tarihinde lokal anestezi altında krsta ilikadan 20 cc kemik iliği 20 µ/ml non-prezervatif heparin (Sigma, Germany) içine aspire edildi. Daha sonra kemik iliği

aspirasyonu steril serum fizyolojik ile 1/2 oranında dilüe edildi. 15 ml konik falkon tüplere kemik iliği volümünün 1/3'ü oranında Ficoll-Poques Plus (GE Healthcare, Sweden) konuldu. Steril bir pipetle dilüe edilmiş olan kemik iliği, ficoll üzerine dikkatli ve nazik bir şekilde ilave edildi ve oda sıcaklığında 400 rpm 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında en üstte plazma, ortada mononükleer hücreler, bunların altında ficoll ve en altta da eritrosit ve granülositler kümeleştiği görüldü. Steril bir pipet yardımıyla mononükleer hücrelerin bulunduğu katman dikkatli bir şekilde alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve toplanan hücreler beş kat daha fazla hacimde steril serum fizyolojik ile en az iki kere yıkılarak ficollden arındırıldı. Son yıkamada supernatan atıldı ve istenilen sayıda hücre içeren hücre süspansiyonu hazır hale getirilmiş oldu.

### **3.3.2. Mezenkimal kök hücre kültürü:**

İzole edilen hücre süspansiyonu için hücre konsantrasyonu %10 fetal bovine serum (FBS, - Invitrogen, Gibco, UK) ve 100 µ/ml antibiyotik ( penisilin/streptomisin- STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) ve 2 mmol/100mL L-glutamin (Stemcell Technologies, Canada) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, low glucose, Stemcell Technologies, Canada) ile ml'de  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan solusyon 10 ml'si 25 cm<sup>2</sup> flaklara (Becton Dickinson, USA ) aktarıldı. Flaklar 37 °C'de, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 48–72 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 48-72'nci saatinde medyum flask içerisinden alındı ve adere olmayan hücreler ortamdan uzaklaştırılıp 10 ml taze medyum flask içerisine eklendi. Her üç günde bir flask içeriği alınarak taze 10 ml medyum ile yenilendi ve fotoğrafları çekildi. İnkübasyonun 7. gününde flaklar invert mikroskop ile incelenerek oluşan fibroblast karakterli adere koloniler değerlendirildi.

### **3.3.3. Tripsinizasyon:**

İnkübasyonun 14. günde flakın %75–80 hücrelerle kaplandığı görüldükten sonra medyum aspire edilerek 10 ml %0,25'lik tripsin Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Stemcell Technologies, Canada) flask içerisine konulur ve dört dakika 37 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda flask içerisine %2 oranında FBS eklenerek tripsin inaktive edildi ve hücreler alınarak 50 ml tüplere aktarıldı. Daha sonra yıkama için üzerlerine serum fizyolojik eklenerek süspanse edilip 400 rpm, +4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatan alındı

ve hücreler tekrar süspansiyon edilerek santrifüj işlemi tekrarlandı. Yıkama sonrası bir miktar medyum ile hücre süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan az miktarda hücre sayımı ve akım sitometri için örnek alındı. Süspansiyonun mililitresinde  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde süspansiyon hazırlanarak süspansiyon hacmine göre flask miktarına karar verilip ekim yapıldı. Birinci pasaj sonrası her üç günde bir taze medyum ile besleme yapıldı ve flaskın %75'i hücre ile kaplandığı zaman aynı işlemler tekrarlanarak 2. ve 3. pasajlar yapıldı.

### **3.3.4. Hücre sayımı ve canlılık:**

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

### **3.3.5. Akım sitometri**

Hücre kültüründen elde edilen MKH Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, Germany) ile bir kez 300 rpm beş dakika yıkandı. Süpernatant atıldıktan sonra hücre pelleti 1 ml PBS ile resüspanse edildi. Hücre sayımı yapılarak µl'deki hücre sayısı belirlendi. Her bir tüpe CD105 / CD73 / CD 34 / CD45 monoklonal antikorlardan ve nöral glial antijen ikiden (NG2) 10'ar µl konuldu ve üzerine hücre sayısı  $5 \times 10^5$  olacak şekilde MKH süspansiyonu eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildikten sonra akım sitometride analiz edildi. Akım sitometrik çalışmalar için, FACS CANTO II (Becton Dickinson, Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) cihazı kullanıldı. Analizler FACS Diva (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) software kullanılarak çözümlendi.

### **3.3.6. Mezenkimal kök hücrelerin diferensiyasyonu:**

Üçüncü pasaja ulaşan MKH iki flaska diferensiyasyon amacıyla ayrıldı. Flasklardan biri, adipoz dokuya diğeri osteoid dokuya diferansiyasyon amacıyla ayrıldı. Adipojenik diferansiyasyon amacı ile 0,5 µM methyl-isobutylxanthine (Sigma, Germany), 10 µg/mL insan rekombinant insulin (Lilly France SAS, Fegersheim, France) ve 1 µM deksametazon (Fluka, Deva Holding, Istanbul, Turkey) medyuma eklendi. Son olarak 21. gün Oil Red O (Sigma,



Germany) ile boyanmış lipid adipozitler görüldü. Hücreler Nikon Eclipse TS 100 invert mikroskop (Japan) ile gösterildi.

Ostejenik diferensiyasyon için MKH 21 gün boyunca ostejenik diferensiyasyon medyumunu (Stemcell Technologies, Canada) içeren kültür medyumunu ile inkübe edildi. Hücreler kalsiyum fosfat depozitlerinin gösterilebilmesi için Alizarin Red S (Sigma, Germany) ile boyandı.

### **3.3.7. Mezenkimal kök hücrelerin 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (Dil; Invitrogen, USA) ile işaretlenmesi:**

Üçüncü pasaj sonrasında tripsinizasyon ile elde edilen hücreler mililitrede  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde serum içermeyen medyum ile süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspanسیونunun içerisine mililitre başına 5  $\mu$ l Vybrant Dil Cell-Labeling Solution (Invitrogen, USA) eklendi ve hafifçe pipetaj ile karıştırıldı. 20 dakika 37 °C inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yıkama amacıyla 1500 rpm beş dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant alınarak serum fizyolojik eklendi ve tekrar süspanسیون haline getirildi. Bu yıkama işlemi iki defa daha yapılarak son aşamada süpernatant alındı ve 5 ml serum fizyolojik ile süspanse edildi. Hücre sayımı yapılarak mililitrede  $2 \times 10^6$  hücre olacak şekilde süspanسیونu serum fizyolojik eklendi. Süspanسیون, hayvan uygulaması için her bir vialde 500  $\mu$ l hacim (toplam 800.000 hücre) olacak şekilde pasajlandı ve enjeksiyona hazır hale getirildi. Süspanسیون içerisinden 20  $\mu$ l alınarak preparat hazırlandı.

### **3.4. Deney grupları**

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

Göbek üstü median laparotomi ile karına girildi. Abdominal özofagus gastroözofagial bileşke seviyesinden 2/0 ipek ile bağlandı (bağlama esnasında dokunun kesilmesini engellemek amacı ile kalın ipek kullanılması amaçlandı). 4F feeding sonda ağız yoluyla distal özofagusa kadar ilerletildi (denek uyanık halde sonda geçirilmeye çalışıldığında denegin plastik yapıdaki sondayı zedeleme, delme ve kimyasal maddenin verilmesi sırasında özofagus dışı bölgelerde de yanık oluşturma ihtimali gelişebileceğinden dolayı sondanın denek anestezi altındayken yerleştirilmesi planlandı). Özofagus karın içine doğru çekilerek gastroözofageal bileşkenin yaklaşık 2 cm üstünden tekrar 2/0 ipek ile bağlandı.

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

Grup II: Özofajit oluşturulan grup (n=10)

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

Grup III: Özofajit oluşturulup, insan (erkek) kemik iliğinden elde edilmiş Diİ ile işaretli MKH'in özofaguslarına implante edilen grup (n=10)

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

**Şekil 3.1.** Ratların operasyona hazırlanması **Şekil 3.2.** Distal özofagusun işlem öncesi hazırlanması

\* Ok; distal özofagusu işaret etmektedir.

### 3.5. Deney sonrası bakım

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

### 3.6. Deney sonu inceleme

Sakrifikasyon üçüncü haftanın sonunda kuyruk veninden verilen 150 mg/kg pentobarbitürat (Pental Sodyum 0.5gr İ.E. Ulagay İlaç Sanayi Türk AŞ. Topkapı, İstanbul ) ile sağlandı. Distal özofagus inceleme amacı ile eksize edilerek histopatolojik ve genetik işlemler uygulandı. Histopatolojik inceleme için iki yöntem kullanıldı; birincisi Hemotoksilen-Eosin ve Mason trikrom boyası ile inflamasyon derecesi ve fibrozis derecesi ile özofagus striktür indeksi gösterildi. İkinci olarak immunofloresan mikroskop ile DiI-pozitif hücreler ve yerleştikleri özofagusda gösterilerek direkt differensiasyona bakıldı. Genetik işlem olarak ise Y kromozomu için floresan in situ hibridizasyon (FISH) yapılması ve böylelikle özofagusa tutunan mezenkimal kök hücreler gösterildi.

### 3.7. Histopatolojik inceleme

Biyopsi örnekleri %10'luk formalin solüsyonu içerisinde fikse edilerek patoloji laboratuvarına gönderildi. Materyallerin tamamına enine kesit uygulandı ve doku takibine alındı. Doku takibinden sonra parafin bloğa gömülen dokulardan 5 mikron kalınlığında kesitler hazırlanarak Hematoksilen-Eozin ve Mason trikrom ile boyandı. Işık mikroskopik olarak bu kesitler incelendi. Histolojik incelemede hasarlanmanın derecesi; enflamasyon, fibrozis ve nekroz varlığı incelenerek derecelendirildi. Buna göre bulgular şu şekilde sınıflandırıldı;

Enflamasyon derecelendirmesi:

Gr 0: Enflamasyon yok

Gr 1: Mukozal - submukozal inflamatuvar reaksiyon

Gr 2: Mukoza, submukoza ve muskularis propriada inflamatuvar reaksiyon

Gr 3: Adventisya dahil özofagus duvarının tüm katlarında inflamatuvar reaksiyon

Fibrozis derecelendirmesi:

Gr 0: Fibrozis yok (normal olarak mukoza ve submukozada gevşek bağ dokusu izlenir)

Gr 1: Mukoza ve submukozada artmış fibroblast proliferasyonu

Gr 2: Mukoza ve submukoza yanı sıra muskularis propria tabakasını da kısmen veya tamamen ortadan kaldıran artmış fibroblast proliferasyonu

Gr 3: Adventisya dâhil özofagus duvarının tüm katlarında artmış fibroblast proliferasyonu

Nekroz derecelendirmesi:

Gr 0: Nekroz yok

Gr 1: Mukozal yüzey epitelinde erozyon - nekroz

Gr 2: Mukoza ve submukozayı kısmen veya tamamen içeren nekroz

Gr 3: Mukoza ve muskular mukozanın yanı sıra muskularis propriayı da kısmen veya tamamen içeren nekroz

Işık mikroskopik incelemede özofagus duvar kalınlığı ve lümen çapı ölçülerek kaydedildi.

Stenoz indeksi (SI): Duvar kalınlığı / lümen çapı formüllü ile hesaplandı (93). Bu formül ilk kez Berthet ve arkadaşları tarafından sıçan özofagusunda kostik yanık şiddetini sınıflamak için kullanılmış ve halen kullanılmaktadır (106).

### **3.8. Florasan mikroskobu ile değerlendirme:**

Parafine gömülü dokudan 5 mikron kalınlığında alınan kesitler sadece Hemotoksilen boyası ile boyanarak florasan mikroskobu ile değerlendirildi. Alınan özofagus kesitinde DiI ile işaretli hücreler gösterildi.

### **3.9. Genetik işlemler**

#### **3.9.1. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemi**

Parafine gömülü özofagus dokusundan 3 mikron kalınlığında kesitler alındı. Parafin doku kesitlerine FISH yöntemi uygulanmadan önce parafine gömülmüş dokuları açığa çıkarmak ve daha iyi bir hibridizasyon sağlamak için deparafinizasyon uygulandı. Bunun için

içerisinde; pretreatment solusyonu, proteaz buffer II, protez bulunan paraffin pretreatment reagent kit II (Vysis) kullanıldı.

Deparafinizasyon için kullanılacak solüsyonlar kit içindeki kullanım talimatlarına göre hazırlandı. Ön hazırlık aşamasında üç ayrı şaleye hemode clearing solüsyonu,  $80 \pm 1$  °C su banyosunda bir şaleye pretreatment solüsyon 50 ml kadar koyuldu. Kullanmadan 30 dakika önce içine proteaz (250 mg) eklenen proteaz buffer (62,5 ml) bir şale içinde  $37 \pm 1$  °C su banyosuna koyuldu. En son olarak da distile su şalesi oda ısısında kullanılmak üzere hazırlandı.

### **3.9.2. Deparafinizasyon ve fiksasyon işlemleri**

Üç mikron kalınlığındaki parafin blok doku kesitleri 56 °C de bir gece bekletildi. Ertesi gün preparatlar hemode clearing solüsyonda beş dakika oda sıcaklığında üç kez her seferinde taze solüsyon kullanılarak bekletildi. Daha sonra suyu uzaklaştırmak için preparat bir dakika %100 etanolde bekletildi. Bu işlem iki kez yapıldı ve preparat 2–5 dakika kurutuldu. Preparat 80 °C deki pretreatment solüsyonda 10 dakika bekletildikten sonra distile suda üç dakika süre ile tutuldu. Ardından distile sudan çıkartılıp, 37 °C su banyosunda bulunan proteaz solüsyonunda 15 dakika bekletildikten sonra, üç dakika distile suda yıkandı ve çıkarılarak kurutuldu. Deparafinizasyon işlemi böylece tamamlandı.

Fiksasyon işlemi için preparatlar önce sırasıyla %70, %85 ve %100 alkol serisinden birer dakika süre ile geçirildi. Sonra %10 formalin solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Son olarak da distile suda üç dakika bekletildi ve kurutuldu.

### **3.9.3. Hibridizasyon**

Hibridizasyon işlemine başlamadan önce preparat yine alkol serisinden geçirildi ve kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra proba hibridizasyon aşamasına geçildi. -20°C’de saklanan Cep X SO ve Cep Y SG DNA Probe Kit (Vysis, Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL 60018 USA) kullanılmadan 5 dakika önce çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Eriyen prob vortekslendikten sonra mini santrifüj cihazında yaklaşık 15 saniye çevrildi. Uygulanacak alan büyüklüğüne göre önerilen miktarda (5 µl) prob mikropipetle alındı ve koruyucu zarı sıyrılmış plastik lamelin (Hybrislip) üzerine damlatıldı. Örnek

preparat lamelin üzerine kapatılıp probun lamin üzerinde dağılması beklendi. Kenar kısımlara “*rubber cement*” (Fixogum) sürülerek hava alması engellendi. Preparat hibridizasyon cihazına (Hybrite) konularak. 75°C’de 5 dakika denatürasyon, 37°C’de 16–20 saat hibridizasyon olan program uygulanarak hibridizasyon yapıldı. Ertesi sabah yıkama işlemine geçildi.

Bir şaleye rapid wash solüsyonu doldurulduktan sonra ağzı kapalı olarak su banyosuna konuldu ve 73 °C’ye gelmesi beklendi. Preparatlarının üzerindeki plastik lameller sıcak yıkama solusyonuna daldırılarak kendiliğinden ayrılması sağlandı. Yıkama işlemi biten preparatlar dikey olarak kurutuldu. İşlemi biten prepatlar kapalı ışık görmeyen preparat kutusunda +4°C’de saklanarak floresan mikroskopta incelemeye hazır hale getirildi. Floresan mikroskopta kullanılan proba uygun filtreler ile preparatlar değerlendirildi ve cytovysion görüntü analiz sistemi kullanılarak sinyallerin gözlendiği hücreler kaydedildi.

### **3.10. İstatistik hesaplamalar**

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

## 4. BULGULAR

Çalışmamızda cerrahi olarak kostik özofagus hasarı oluşturulan ratların özofagus distal kısımları işlemiden sonraki 21. günde çıkarılarak histopatolojik incelemeleri ve genetik incelemeleri yapıldı. Deney süresince toplam 30 rat kullanıldı.

Grup I'den iki tane (post-operatif yedinci ve dokuzuncu günler), grup II'den dört tane (post-operatif yedinci, sekizinci, 12. ve 15. günler) ve grup III'den bir tane (15.gün) olmak üzere toplam yedi rat 21.günü tamamlayamayıp çeşitli nedenlerden dolayı (cerrahi komplikasyonlar, özofagusta gelişen sitriktür ve buna bağlı yeterli beslenememe veya ileri nekroz ve özofagus perforasyonuna bağlı) kaybedildi.

### 4.1. Mezenkimal kök hücrenin değerlendirilmesi

#### 4.1.1. Hücre sayımı ve canlılık

Mezenkimal kök hücreler kültürde üretildikten sonra üçüncü pasaj sonunda hücre sayımı yapıp ve canlılığı kontrol edildi. Yeşil hücreler canlı, turuncu hücreler ölü olarak değerlendirildi. Fotoğrafları Nikon Coolpix 4500 (Tokyo, Japan) kamera ile çekildi.

**Şekil 4.3.** Akridin orange yöntemiyle canlılık analizi (Florasan mikroskop, X 20, Nikon Coolpix 4500, Tokyo, Japan).

**Şekil 4.4.** MKH'in CD 34 ve CD 45 negatif olduğunu gösteren grafik

#### 4.1.2. Akım sitometri sonuçları

Hücre kültüründen elde edilen MKH akım sitometri ile değerlendirildi. Değerlendirme sonucu CD45 ve CD34'den negatif ancak CD73, CD105 ve NG2'den pozitif çıktı. Akım sitometri sonuçları şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da gösterilmiştir.

#### 4.2.3. Mezenkimal kök hücre diferensiyasyonu

Mezenkimal kök hücrelerin bir kısmı osteojenik ve adipojenik diferensiyasyon gösterilmesi amacı ile ayrıldı ve ayrı ayrı boyandılar. Adipojenik diferansiyasyon amacı mezenkimal kök hücreler Oil Red O ile boyandı ve lipid adipozitler görüldü. Ostejenik diferensiyasyon için mezenkimal kök hücreler 21 gün boyunca ostejenik diferensiyasyon medyumunu içeren kültür medyumuna ile inkübe edildi. Hücreler kalsiyum fosfat depozitlerinin gösterilebilmesi için Alizarin Red S ile boyandı. Hücreler Nikon Eclipse TS 100 invert mikroskop (Japan) ile gösterildi.

#### 4.2.4. DiI işaretli mezenkimal kök hücrelerin gösterilmesi

Hücre kültürü sonucu elde edilen mezenkimal kök hücreler enjeksiyon öncesi DiI ile işaretlendi. Floresan mikroskop altında kırmızı parlama yayan hücreler tespit edildi ve fotoğraflandı.

**Şekil 4.9.** Floresan mikroskop altında kırmızı parlama yayan DiI ile işaretli MKH

#### 4.2. Histolojik bulgular

Histolojik incelemede hasarlanmanın derecesi; inflamasyon, fibrozis ve nekroz varlığı açısından değerlendirildi. Deneyin 21. gününde sakrifiye edilen rat gruplarının histopatolojik değerlendirmesinde, inflamasyon ve fibrozis bulgularının yüzde dağılımı ayrı ayrı hesaplanmıştır. Tablo 4.1’de gruplara göre fibrozis bulgularının yüzde dağılımı sunulmuştur.

Gruplar içerisinde fibrozis gradeleri ile hesaplama yapıldığında anlamlı farklar görülmemiştir. Fakat fibrozis varlığı ve yokluğu şeklinde yapılan hesaplamalarda anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0.05$ ).

**Tablo 4.1.** 21. gün sakrifiye edilen ratlarda, gruplara göre fibrozis bulgularının yüzde dağılımı

| Grup     | Sayı | Fibrozis |           |
|----------|------|----------|-----------|
|          |      | Var (%)  | Yok (%)   |
| Grup I   | 8    | -        | 8 (100.0) |
| Grup II  | 6    | 2 (33.3) | 4 (66.7)  |
| Grup III | 9    | -        | 9 (100.0) |



|  |  |                            |
|--|--|----------------------------|
|  |  | $\chi^2 = 6.206$ $p=0.045$ |
|--|--|----------------------------|

İnflamasyon açısından yapılan hesaplamalarda fibroziste olduğu gibi grupların gradeleri ile yapılan hesaplamalarda anlamlı farklar görülmemiştir. Fakat fibrozisten farklı olarak inflamasyon varlığı ve yokluğu şeklinde yapılan hesaplamalarda anlamlı fark yine görülmemiştir ( $p>0.05$ ). Tablo 4.2’de gruplara göre fibrozis bulgularının yüzde dağılımı sunulmuştur. Grup 3’te yalnızca bir hayvanda inflamasyon bulgusu saptanmıştır.

**Tablo 4.2.** 21. gün sakrifiye edilen ratlarda, gruplara göre inflamasyon bulgularının yüzde dağılımı

| Grup     | Sayı | İnflamasyon      |           |
|----------|------|------------------|-----------|
|          |      | Var (%)          | Yok (%)   |
| Grup I   | 8    | -                | 8 (100.0) |
| Grup II  | 6    | 5 (83.3)         | 1 (16.7)  |
| Grup III | 9    | 1 (11.1)         | 8 (88.9)  |
|          |      | $\chi^2 = 1.308$ | $p=0.520$ |

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

Korozif özofajitin geç komplikasyonu olan darlık üç hafta veya daha erken de gelişebilmektedir. Deney gruplarının ortalama stenoz indeksi (SI) değerleri, Tablo 4.3’de sunulmuştur. SI düzeyleri karşılaştırıldığında, grup II ile grup III arasında yakın sonuçlar çıkmış olup; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. En

düşük düzey grup I’de görüldü ve sonuçlara bakıldığında grup I’den kaynaklanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Gruplara göre SI düzeyi dağılımı Şekil 4.12’de grafik olarak sunulmuştur.

**Tablo 4.3.** 21. gün sakrifiye edilen ratların gruplara göre stenoz indeksi (SI) değerleri

| Grup           | Sayı | Ortalama $\pm$ SD | Ortanca (minimum-maksimum) |
|----------------|------|-------------------|----------------------------|
| Grup I         | 8    | 0.22 $\pm$ 0.06   | 0.22 (0.16-0.29)           |
| Grup II        | 6    | 0.37 $\pm$ 0.11   | 0.37 (0.21-0.54)           |
| Grup III       | 9    | 0.36 $\pm$ 0.11   | 0.34 (0.23-0.53)           |
| <b>p=0.019</b> |      |                   |                            |

\* Kruskal Wallis testi

**Şekil 4.12.** 21. gün sakrifiye edilen ratlarda, gruplara göre SI düzeyi dağılımı

#### 4.3. Florasan mikroskobu ile değerlendirme

Parafine gömülü özofagus dokusundan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler sadece Hemotoksilen boyası ( Eosin ile özellikle boyama yapılmadı; eosinin bırakacağı kırmızı renk ile DiI ile işaretli hücreler ile karışmaması için) ile boyandıktan sonra DiI ile işaretli MKH’in özofagus dokusunda hangi bölgeye daha çok yerleşip canlılığını sürdürdüğünü incelemek üzere florasan mikroskobu ile görüntülenip fotoğrafları çekildi. (Nikon Eclipse 80i)

**Şekil 4.13.** DiI işaretli MKH’in epitelde daha fazla olmak üzere tüm katlardaki görüntüsü (Florasan mikroskop H x 4)

**Şekil 4.14.** DiI işaretli MKH’in 6. filtrede 560nm dalga boyundaki görüntüsü (Florasan mikroskop H x 4)

#### 4.4. Genetik İşlemler

Alınan özofagus kesitlerindeki dokularda Y kromozomunu gösterebilmek FISH yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için öncelikle deparafinizasyon işlemi uygulandı. Ardından fiksasyon işlemi gerçekleştirilip hibridizasyon yöntemi uygulandı.

Yapılan hibridizasyon sonuçlarına göre 2 hayvanda birinci hibridizasyonda X ve Y sinyali saptanırken 7 hayvanda ikinci hibridizasyonda X ve Y sinyaline rastlandı. Dördüncü denekte her iki hibridizasyon sonucunda da X veya Y sinyaline rastlanmadı. Tablo 4'te hibridizasyon sonuçları sunulmuştur.

**Tablo 4.4.** Grup III hibridizasyon sonuçları

| Grup III | 1.Hibridizasyon | 2.Hibridizasyon | Kök hücre |
|----------|-----------------|-----------------|-----------|
| 1. rat   | Sinyal yok      | X ve Y sinyali  | +         |
| 2. rat   | X ve Y sinyali  | Yapılmadı       | +         |
| 3. rat   | Sinyal yok      | X ve Y sinyali  | +         |
| 4. rat   | Sinyal yok      | Sinyal yok      | -         |
| 5. rat   | Sinyal yok      | X ve Y sinyali  | +         |
| 6. rat   | Sinyal yok      | X ve Y sinyali  | +         |
| 7. rat   | Sinyal yok      | X ve Y sinyali  | +         |
| 8. rat   | X ve Y sinyali  | Yapılmadı       | +         |
| 9. rat   | Sinyal yok      | X ve Y sinyali  | +         |
| 10. rat  | Sinyal yok      | X ve Y sinyali  | +         |

Florasan mikroskobu ile yapılan değerlendirmede özofagus lümen altında atipik büyük hücreler görülmüştür ve X sinyali kırmızı ile Y sinyali yeşil renk ile değerlendirilip fotoğrafları çekilmiştir ( Şekil 18 ve Şekil 19).

**Şekil 4.17.** Florasan mikroskobu ile özofagus epiteline yerleşmiş MKH (Kırmızı oklar ile işaretli, Nikon Eclipse).

**Şekil 4.18.** Hibridizasyon sonucu saptanan X ve Y kromozom sinyallerinin florasan mikroskobundaki görüntüleri (Sentromer X kromozomu (CEP X) kırmızı ile işaretli, Sentromer Y kromozomu (CEP Y) yeşil ile işaretli, Nikon Eclipse).

## 5. TARTIŞMA

Çocuk cerrahlarının çoğunun ortak görüşü “*En iyi özofagus hastanın kendi özofagusudur*”. Korozif özofagus yaralanmalarına yönelik yapılan çalışmalara bakıldığında iki önemli faktörün dikkat çekici olduğu görülmektedir. Birincisi, bu konuda araştırma yapılan ülkelerin genellikle sorunun daha sık yaşandığı gelişmekte olan ülkeler olmasıdır. Diğer önemli nokta ise yapılan bu çalışmaların daha çok geç dönemde gelişen darlığın önlenmesine yönelik çalışmalar olduğudur (24, 58, 109, 110, 111, 112). Tüm çalışmalarda kabul gören görüş ilk anda gelişen hasarın derecesinin, daha sonra ortaya çıkan darlık derecesini doğrudan etkilediğidir. Özofagus hasarlanmasında erken dönemde ön planda olan patoloji; kanama, tromboz ve ödemle beraber seyreden inflamasyondur. Yaralanmanın birinci ve ikinci haftalarında submukozal damarlarda tromboz ve bu tromboza bağlı nekroz ile ödemde artış izlenir. Üçüncü haftadan itibaren ise fibroblastların submukozaya yerleşmesiyle, fibrozis ve hasarlanmanın derecesine göre darlık gelişmeye başlar (46, 55, 57, 58).

Korozif özofagus darlığı olgularının bir kısmı; değişen sıklık ve sayılarda balon veya buji dilatasyonları ile tedavi edilebilmekte, önemli bir kısmında ise dilatasyonların etkisiz oluşu nedeniyle özofageal replasman seçeneklerine başvurulmaktadır. Özofagus dilatasyonları belli periyotlarda tekrarlanma ihtiyacı olduğundan, hastalar her seferinde genel anestezi almakta, entübe olmakta, özofageal perforasyon gibi komplikasyon riskleriyle karşı karşıya kalmaktadırlar. Özofageal replasman uygulanan hastalarda ise çok uzun süreli, pahalı, uzun hospitalizasyon gerektirebilecek, birçok komplikasyon potansiyeli olan, ağır ameliyatlardan sonrası farinks ile mide arasındaki devamlılık sağlansa da, replasman için kullanılan organa bağlı dezavantajlar, hastaya kendi özofagusunu aratmaktadır. Ağız ile mide arasındaki en iyi yol hastanın kendi özofagusudur.

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

Hastaların kendi özofagusu korunurken beslenme zorluğu, disfaji ve tekrarlayan özofagus dilatasyonları gibi başka problemler ortaya çıkmaktadır. Bunların dışında sık sık hastaneye gitme, tekrarlayan anestezi ve kan verme, diğer çocuklardan farklı beslenme gibi sosyal ve psikolojik nedenler de vardır. Kostik madde içimine bağlı karsinom gelişimi %20–40 arası olduğu gösterilmiş (94,95).

Çocuklarda ilk başarılı kolon replasmanı 1955 yılında Dale tarafından yapılmıştır (96). Literatürde yapılan bir çalışmada interpozisyon yapılan hastaların kendi özofagusları Barrett's özofagus veya karsinom riskinden dolayı çıkarılmalıdır sonucuna varılmıştır (94).

Özofagus rejenerasyonunda gelecekte yapılacak yeni çalışmalar sayesinde yeni hücre kaynakları sağlanacaktır. Bu kaynakların başında mezenkimal kök hücreler, embriyonik kök hücreler, pluripotent kök hücreler ve amniyon sıvısı kök hücreleri olacaktır. Bunların içinde mezenkimal kaynaklı kök hücreler üzerinde en çok durulan ve araştırılan hücreler olmuştur. Mezenkimal kaynaklı kök hücreler multipotent özelliklerinden dolayı osteoblasta, kondrositlere, miyosite, adipositlere, pankreas ada hücrelerine ve nöral hücrelere differensiyase olabilirler (91). 2004 yılında Epperly ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, yetişkin fare kemik iliğinden izole edilen özofagus progenitor hücrelerin radyasyon uygulanmış fare özofagusunda proliferasyon olduğu gösterilmiş ve hücrelerin özofagus skuamöz epiteline differansiye oldukları belirtilmiştir (105).

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin verildikleri organda kolonize olup, proliferasyon ve differansiye oldukları gösterilmiştir. Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin kas, kıkırdak, kemik, kardiyomiyosit ve başka dokulara differansiye olduğu gösterilmiştir. Kemik iliği kaynaklı hücrelerin kemik, hepatik, kardiyak, nöral ve vasküler endotel dokularına dönüştükleri gösterilmiş; fakat malign transformasyon, tümör vaskülarizasyonu ve neoplastik hücre migrasyonuna neden olabilecekleri de gösterilmiştir (90).

Güçlü alkali içimi özofagusta yanık oluşturmaktadır. Erken dönemde, ağrı, disfaji, bulantı, hematemez gibi bulgulara rastlanırken, ciddi olgularda perforasyon, mediastinit, sepsis ve şok tablosu gelişebilmektedir. Özofageal striktür IIb ve III. derece koroziöz özofagusların geç dönem komplikasyonudur. Striktür tipik olarak kolajen ile depolanmış fibroblastların

yoğun olduğu özofagusun proliferasyon evresinde oluşur. Dönem olarak yaklaşık yanık oluşumundan 1 ile 3 ay arasına denk gelmektedir ve 1/3 hastada meydana gelir. Verilen yüksek doz (1g/1.73m<sup>2</sup>) sistemik steroidin granülasyonu ve fibroblast doku reaksiyonunu azaltarak striktür gelişiminin ciddiyetini ve sayısını azalttığını gösteren yayınlar vardır. Fakat erken (ilk 24 saat) veya geç (21 günden önce veya geç) tedavi arasında belirgin farka rastlanmamıştır. Verilen yüksek doz steroidin mediastinit bulgularını maskeleymesi ve lokal enfeksiyon riskini artırması ve lokal enfeksiyonun da striktür oluşumuna neden olması gibi dezavantajlardan dolayı kullanımını kısıtlanmıştır (92).

Kostik özofagus yanıklarının %29'unda medikal komplikasyon; %20'sinde ciddi özofageal striktür oluşmaktadır. Striktür indeksi; özofagus duvar kalınlığı ve lümen çapı ölçülerek hesaplanmaktadır (Striktür indeksi = duvar kalınlığı / lümen çapı) (93).

Mezenkimal kök hücreler kendini yenileyebilme ve birçok hücre tipine differansiye olabilme kapasitesine sahiptir. Bu hücreler; osteosit, adiposit, kondrosit, miyosit, kardiyomiyosit ve nöron hücreleridir. MKH, doku mühendisliğinde ve hücreye dayalı tedavilerde değeri giderek artmıştır. MKH'nin kemik iliğinden izole edilmesi ve yaş ilerledikçe differansiasyon potansiyelinde azalma gibi dezavantajlarından dolayı başka dokulardan izole edilmeye çalışılmıştır. Bu dokular; periost, kemiğin trabeküler tabakası, adipöz doku, sinovyum, iskelet kası, süt dişi, fatal pankreas, akciğer, karaciğer, amnion sıvısı, plasenta, umbilikal kord arter ve veni, Wharton's jeli ve umbilikal kordur (97).

CD34 tanımlanan ilk hematopoetik hücre yüzey antijenidir ve hematopoetik kök hücre belirteci olarak kullanılmaktadır. Standart flow sitometri tekniği ile tipik hücre yüzey epizot profilleri belirlenir; CD13, 29, 31, 34, 45, 63, 73, 90, 105, 133, 271 (97).

%90 ve üzerinde CD73 ve 105 pozitif yüzey antijeni saptanırken %99 CD 34 ve 45 negatif bulunmuştur (97). Merkezimizde Kozanoğlu İ ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada da NG2 yüzey antijeninin de bir pozitif mezenkimal kök hücre markeri olduğu gösterilmiştir (107).

Mezenkimal kök hücreler hematopoetik antijen sentezleyemezler ve özel in vitro koşullarda fibroblast, miyofibroblast, osteoblast, adiposit ve kondroblastta differansiye olabilen hücrelerdir. Aynı zamanda “multipotent mezenkimal stromal hücreler” ve

“multipotent stromal hücreler” olarak da adlandırılmaktadırlar. Pluripotent kök hücreler her üç germ yaprağına dönüşebilirken, multipotent kök hücreler sadece yakın ilişkide olduğu yolaktaki hücreler differansiye olabilmektedir (98).

Uluslar arası Hücresel Terapi Topluluğu MKHyi tanımlamak için en az 3 kriterin olması gerektiğini belirtmiştir;

- 1- Standart hücre kültürlerinde plastik – adherent olmaları
- 2- CD105, 73, 90 pozitif; CD34, 45, 14 ve 11b negatif olmaları
- 3- Özel in vitro koşullarda fibroblast, osteoblast, adiposit ve kondroblasta differansiye kapasitesinin olmasıdır (98).

Genetik instabilite ve malign transformasyon dezavantajları da vardır (98). MKH, kemik iliğinden, umbilikal kord kanından, dermis ve iskelet kasının konnektif dokusundan, adipoz dokudan, sinovyal dokudan veya periostal dokudan izole edilebilmektedir.

MKH, in vitro koşullarda yaklaşık 8–15 pasaj gibi limitli bir periyotta pasajlanırlar. Bu dönem 25–40 doublinge denk gelir ve proliferasyon biter ve hücrelerin giderek büyümesi, gerginliğini yitirmesi ve proliferasyon hızının yavaşlaması gibi dejenerasyon başlar (98). Çalışmamızda MKH’ler; diğer çalışmalarda önerilen en iyi sonuçların elde edilebileceği olan üçüncü pasajı tamamlanmasının ardından enjekte edilmişlerdir.

Kök hücreler proliferasyon olabilen, kendini yenileyebilen ve birçok hücre tipine ve dokulara differansiye olabilen immatür hücreler olarak tanımlanır. Embriyonik kök hücreler pluripotent olup tüm hücre bütün hücre çeşitlerine dönüşebilme özelliğine sahiptir. Fakat multipotent olanlar yani MKH sadece belirli tipteki hücrelere differansiye olabilirler. MKH, beyin, kemik ve kemik iliği, adipoz doku, umbilikal kord kanı, süt dişleri, sinovyum, kan damarları ve kandan izole edilebilmektedir. Son yıllarda MKH hücreye dayalı tedavilerde klinik açıdan önemli bir yer teşkil etmektedir. Aynı zamanda kolay izole edilebilmeleri, in vitro koşullarda kültür edilebilmeleri ve herhangi bir etik açıdan sorun oluşturmamaları gibi avantajlara sahiptir. Sonuç olarak MKH rejeneratif tıpta çok önemli bir yere sahip ve bu yüzden daha fazla ayrıntılı biyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin araştırılması gerekmektedir (100).

Literatürde yapılan bir çalışmada kemik iliği kaynaklı MKH in vitro ve in vivo iskelet ve düz kasa rejenere olabilme kapasitesi göstererek gastroözefageal bileşkede kullanılmıştır. Aynı zamanda hem kas progenitör hücrelerini hem de kemik iliğinden izole edip intravenöz enjeksiyon uygulayıp sonuçlarını kıyaslanmıştır (101).

Kemik iliği kaynaklı hücrelerin pluripotent oluşları tartışılmakla beraber birçok non-hematopoetik dokuda, doku onarımında rol oynadığı gösterilmiştir (102). Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, hasarlanan dokudaki iyileşmeyi, proliferasyon ve differansiasyonu organın kendisi kadar kemik iliği kaynaklı multi-potensiyel progenitör hücreler de sağlamaktadır (103).

Krause ve arkadaşları kemik iliği kaynaklı hematopoetik kök hücre transplante edilen farelerin akciğer, safra yolları ve gastrointestinal sisteminde kemik iliği kaynaklı epitel hücrelerini göstermişlerdir. Bu makalede insanda kemik iliği kaynaklı hücrelerin gastrointestinal sistem epitelinin her yerinde rejenere olabildiğini göstermişler. Aynı zamanda kemik iliği kaynaklı hücrelerin gastrointestinal sistem epitelindeki inflamasyon ve rejenerasyonda rol oynadığını da gösterilmiştir (104).

Beyin, karaciğer ve iskelet kası da dahil olmak üzere birçok non-hematopoetik organdan in vivo koşullarda kendini yenileyebilme ve özel organ rekonstrüksiyon özelliği olan hücrelerin izole edilebildiği gösterilmiştir. Aynı zamanda bir non-hematopoetik organın bir diğerine transdifferansiye olduğu da gösterilmiştir (kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrenin astrosite ve nöral kök hücrenin iskelet kasına differansiasyonu). Bu makalede radyasyon ile hasarlanmış farede özofagus skuamöz epitelinden üretilen progenitör hücreler ile kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin intravenöz verilip sonuçları incelenmiş. Her iki grupta da migrasyon ve proliferasyonu gösterebilmişler (105).

Çalışmamızda kostik hasar oluşturulan ratların hemen hepsinde az veya çok makroskopik hasar bulguları gözlemlendi. SHAM gruplarına göre, %15 NaOH verilip kök hücre enjeksiyonu yapılmayan ratlarda makroskopik bulgular belirgindi. Mikroskopik olarak da inflamasyon, fibrozis ve nekroz bulguları gözlemlendi. Geç dönemde gelişen özofageal striktürü de dikkate aldığımızda bulgularımız korozif özofagus yanığı modelinin başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir. %15 NaOH verilip kostik hasar meydana getirilip 2 saat sonra MKH enjeksiyonu yapılan ratların 21 gün sonra yapılan eksizyonlarında



makroskopik olarak patolojik bulguya rastlanmadı. 21 günlük takibimizde on rattan sadece bir kaybımız olması ve beslenmelerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmaması verilen MKH'nin enjekte edildiği korozyon bölgesine yerleşip yara iyileşmesi ve striktür gelişimini engellediği görüşüne sahip olmamızı neden olmuştur. Aynı zamanda 21 gün sonra yapılan florasan mikroskobu ile incelemede o bölgede gerek DiI ile işaretli MKH'nin özellikle özofagusun epitel bölgesinde canlılığını sürdürmesi ve genetik işlemler sonucu aynı bölgede Y kromozomunun varlığı sonuçlarımızı desteklemektedir.

MKH in vivoda direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde fonksiyon gösterirler. Direkt etki olarak epitelium hücresi, endotel hücresi, kas ve sinir hücresi gibi bir takım hücelere differensiyasyon özelliğine sahip olmasıdır. İndirekt etkileri ise; verildiği veya yerleştiği bölgenin kendi kök hücresi gibi fonksiyon göstermek, makrofaj, fibroblast veya PMNL hücreleri gibi etki göstermek veya apoptozise uğrayıp GH ve sitokin salgılanmasıdır.

DiI işaretli kök hücreler dokularda florasan mikroskobu ile direkt Hemotoksilen boyası ile gösterilebildiği gibi bir takım markerlar kullanılarak da dokunun hangi bölgesine yerleştikleri gösterilebilir:

Epitelium için anti-sitokeratin Ab

Submukoza için anti- kolajen Ab

Kas tabakası için anti-miyozin heavy chain Ab

Adventisa tabakası veya endotel- damardan zengin olduğu için ve damar duvarındaki perisite spesifik için anti VWF Ab kullanılmaktadır.

DiI işaretli MKH'in gösterilebilmesi için florasan mikroskobunda 560nm'de altıncı filtrede bakılması gerekir. Bizim çalışmamızda sadece hemotoksilen ile boyanıp ayrıca antijen kullanılmamıştır. Fakat MKH'nin büyük bir kısmı o bölgenin kendi kök hücrelerinin niş bölgesi olan epitele yerleştikleri hemotoksilen boyası ile de gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin özofagus epitel hücrelerine differansiye potansiyelini özel markerlar kullanarak gösterme olanağımız olmadığı için sadece canlı hücrelerin varlığını ve özofagus striktürüne etkisi gösterilmiştir.

Sonuç olarak literatürde çalışmamızın benzerine rastlamamış olmakla beraber “*En iyi özofagus hastanın kendi özofagusudur*” görüşünden yola çıkarak son yıllarda özellikle mezenkimal kaynaklı kök hücre ile yapılan çalışmaların yüzgüldürücü sonuçlarından destek

olarak böyle bir çalışma yapılmış olup olumlu sonuçlar alınmıştır. Organ hasarlanmasında kök hücre kullanımı için kat edilecek çok yol olmasına rağmen bulgularımız umut vericidir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

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

Şu sonuçlar elde edilmiştir:

- 1- Yapılan histopatolojik incelemelerde fibrozis, inflamasyon ve nekroz ayrı ayrı değerlendirilmiş olup sadece fibrozis sonuçlarında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0.05$ ).
- 2- Striktür indekslerinde ise anlamlı sonuçlar sham grubundan dolayı çıkmış olup kök hücre verilen ve verilmeyen grup arasında anlamlı farka rastlanmamıştır.
- 3- Floresan mikroskopu ile yapılan incelemede özofagus dokusunun epitelinde DiI ile işaretli hücrelerin yerleştiği ve de canlılığını koruduğu görüldü.
- 4- FISH tekniği ile bir rat dışında diğer tüm ratlarda Y kromozumu gösterilmiştir.
- 5- İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin korozif özofagus modelinde 21 gün boyunca implante edilen özofagus dokusuna yerleşip canlılığını sürdürmüş olması ve oluşacak fibrozis açısından olumlu yönde etkili olduğu gösterildi.
- 6- Mezenkimal kök hücrelerin özofagus epitel hücrelerine differansiye potansiyelini gösterme olanağımız olmadığı için sadece canlı hücrelerin varlığını ve özofagus striktürüne etkisi gösterilmiştir.
- 7- Mezenkimal kök hücrelerin in vitro ve klinikte yaygın kullanılması ve olumlu sonuçların alınmasına dayanarak ileriye dönük yeni çalışmaların yapılması gerektiğini öne sürmekteyiz.

## 7. KAYNAKLAR

1. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (Çev. Ed:İde T). Principles of laboratory Animal Science (Laboratuvar hayvanları Biliminin Temel ilkeleri). Medipres-Ankara, 2003
2. Huang YC, Ni YH, Lai HS, Chang MH. Corrosive esophagitis in children. *Pediatr Surg Int* 2004 20(3):207–10.
3. de Jong AL, Macdonald R, Ein S, Forte V, Turner A. Corrosive esophagitis in children: a 30-year review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2001 Mar;57(3):203–11.
4. Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M. Trapidil, an Inhibitor for Phosphodiesterase and Platelet-Derived-Growth Factor, Ameliorates Corrosive Esophageal Burn in Rats. *Tohoku J Exp Med*. 2005 Nov;207(3):203–8.
5. Chiu HM, Lin JT, Huang SP, Chen CH, Yang CS, Wang HP. Prediction of bleeding and stricture formation after corrosive ingestion by EUS concurrent with upper endoscopy. *Gastrointest Endosc*. 2004 Nov;60(5):827–33.
6. Dogan Y, Erkan T, Cokugras FC, Kutlu T. Caustic gastroesophageal lesions in childhood: an analysis of 473 cases. *Clin Pediatr (Phila)*. 2006 Jun;45(5):435–8.
7. A. Can Başaklar, Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006
8. Grossfeld JL, O'Neill JA, Jr, Fonkalsrud EW, et al. *Pediatric Surgery*, 6th edition. Mosby Inc. 2006
9. Millar AJ, Numanoglu A, Mann M, Marven S, Rode H. Detection of caustic oesophageal injury with technetium 99m-labelled sucalfate. *J Pediatr Surg*. 2001 Feb;36(2):262–5.
10. Bakan V, Demirtas I, Dulger H. The antioxidant paradox or antioxidant damage. *Pediatr Surg Int*. 2004 Dec;20(11–12):903.
11. A, Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*, 8th edition. Appleton & Lange 1995
12. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology*, 8th edition. Appleton & Lange 1995
13. Yagmurlu A, Aksu B, Bingol-Kologlu M, Renda N, Altinok G, Fitoz S, Gokcora IH, Dindar H. A novel approach for preventing esophageal stricture formation: sphingosylphosphorylcholine-enhanced tissue remodeling. *Pediatr Surg Int*. 2004 Oct; 20(10):778–82.
14. Ozel SK, Dagli TE, Yuksel M, Kiyan G, Kotiloglu E. The Roles of Free Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Endothelin in Caustic Injury of Rat Esophagus. *J Pediatr Surg*. 2004 September; 39(9):1381–1385.
15. Jutley RS, Youngson GG, Ermin O, Ninan GK. Serum Cytokine Profile in Reflux Nephropathy. *Pediatr Surg Int*. 2000; 16(1–2): 64–68.

16. Man Jeong Paik, Wen Yu Li, Young Hwan Ahn, Phil Hyu Lee, Sangdun Choi, Kyoung Rae Kim, Yong Man Kim, Oh Young Bang, Gwang Lee. The free fatty acid metabolome in cerebral ischemia following human mesenchymal stem cell transplantation in rats. *Clinica Chimica Acta* 402 (2009) 25-30.
17. Fahri Şahin, Güray Saydam, Serdar Bedii Omay, Kök Hücre Plastisitesive Klinik Pratiktekök Hücre Tedavisi, *Türk Hematoloji- Onkoloji Dergisi*, Sayı / Number: 1 Cilt / Volume: 15 Yıl / Year: 2005
18. Augusta Zani, Agostino Pierro, Nicola Elvassore, Paolo De Coppi, MD, PhD. Tissue Engineering: An Option For Esophageal Replacement?. *Seminars in Pediatric Surgery* (2009) 18, 57-62
19. Vahit Yukselen, Ali Onder Karaoglu, Cigdem Yenisey, Muge Tuncyurek, Omer Ozutemiz. Trimetazidine reduces the degree of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Journal of Pediatric Surgery* (2005) 40, 505-509
20. Ahmet Guven, Suzi Demirbag, Bulent Uysal, Turgut Topal, Esra Erdogan, Ahmet Korkmaz, Haluk Ozturk. Effect of 3-amino benzamide, a poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitor, in experimental caustic esophageal burn. *Journal of Pediatric Surgery* (2008) 43, 1474-1479
21. Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC (Çev. Ed: İde T). Principles of laboratory Animal Science (Laboratuvar hayvanları Biliminin Temel ilkeleri). Medipres-Ankara, 2003
22. Huang YC, Ni YH, Lai HS, Chang MH. Corrosive esophagitis in children. *Pediatr Surg Int* 20(3): 207–10, 2004
23. De Jong AL, Macdonald R, Ein S, Forte V, Turner A. Corrosive esophagitis in children: a 30-year review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.*; 57(3): 203–11, 2001
24. Somuncu S, Cakmak M, Erdogan S, Caglayan O, Akman H, Kaya M. Trepidil, an inhibitor for phosphodiesterase and platelet-derived-growth factor, ameliorates corrosive esophageal burn in rats. *Tohoku J Exp Med.*; 207(3): 203–8, 2005
25. Chiu HM, Lin JT, Huang SP, Chen CH, Yang CS, Wang HP. Prediction of bleeding and stricture formation after corrosive ingestion by EUS concurrent with upper endoscopy. *Gastrointest Endosc.*; 60(5): 827–33, 2004
26. Dogan Y, Erkan T, Cokugras FC, Kutlu T. Caustic gastroesophageal lesions in childhood: an analysis of 473 cases. *Clin Pediatr (Phila).*; 45(5): 435–8, 2006
27. Gupta SK, Croffie JM, Fitzgerald JF. Is esophagogastroduodenoscopy necessary in all caustic ingestions? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*; 32(1): 50–3, 2001
28. Kamijo Y, Kondo I, Kokuto M, Kataoka Y, Soma K. Miniprobe ultrasonography for determining prognosis in corrosive esophagitis. *Am J Gastroenterolgy*; 99(5): 851–854. 2004
29. Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar lined lower esophagus: An acquired lesion with malignant predisposition: Report of 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 70: 826, 1975
30. Spitz L, Lakhoo K. Caustic ingestion. *Arch Dis Child*; 68: 157, 1993
31. Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Chlorine bleach ingestion in children: a review of 80 cases. *The Turkish Journal of Pediatrics*; 30: 105-108, 1988

32. Kuvvetli asit veya baz içeren temizlik ürünlerinin üretimine, ithalatına ve bildirim esaslarına dair tebliğ. Resmi Gazete; sayı: 27527; 2010
33. Boybeyi Ö, Karnak İ, Tanyel FC, Şenocak ME. Management of unusually extensive esophagogastric corrosive injuries: emergency measures and gastric reconstruction. J Pediatr Surg; 44; 1022-1026, 2009
34. Haller JA JR, Andrews HG, White JJ, Tamer MA, Cleveland WW. Pathophysiology and management of acute corrosive burns of the esophagus: Results and treatment of 285 children. J Pediatr Surg; 6: 578, 1971
35. Ashcraft KW, Padula RT. The effect of dilute corrosives on the esophagus. Pediatrics; 53: 226, 1974
36. Haller JA Jr, Bachman K. The comparative effect of current therapy on experimental burns of the esophagus. Pediatrics; 34: 236, 1964
37. Kirsch MM, Ritter F. Caustic ingestion and subsequent damage to the oropharyngeal and digestive passages. Ann Thorac Surg; 21: 74, 1976
38. Ashcraft KW, Holcomb GW, Murphy JP. Pediatric Surgery. Fourth edition. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005.
39. Oakes DD, Sherck JP, Mark JBD. Lye ingestion: Clinical patterns and therapeutic implications. J Thorac Cardiovasc Surg; 83: 194, 1982
40. Curtis JA, Cormode E, Laski B, Toole J, Howard N. Endocrine complications of topical and intralesional corticosteroid therapy. Arch Dis Child; 57: 204, 1982
41. Di Constanzo J, Noirclerc m, Jouglard J, Escoffier JM, Cano N, Martin J, Gauthier A. New therapeutic approach to corrosive burns of the upper gastrointestinal tract Gut; 21: 370, 1980
42. Othersen BH Jr, Parker EP, Smith CD. The surgical management of esophageal stricture in children. Ann Surg; 207:590, 1988
43. Estrera A, Taylor W, Mills LJ, Platt MR. Corrosive burns of esophagus and stomach: A recommendation for an aggressive surgical approach. Ann Thorac Surg; 41: 276, 1986
44. Allen RE, Thoshinsky MJ, Stallone RJ, Hunt TK. Corrosive injuries of the stomach. Arch Surg; 100: 409, 1970
45. Marshall F. Caustic burns of the esophagus: Ten-year results of aggressive care. South Med J; 72: 1236, 1979
46. Gunnarson M: Local corticosteroid treatment of caustic injuries of the esophagus. Ann Otol Rhinol Laryngol 108: 1088-1090, 1999.
47. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Akıllıoğlu İ: Reactive oxygen radical levels in caustic esohagus burns. J Pediatr Surg 34(3): 495-507, 1999
48. Koloğlu MB, Tanyel C, Müftüoğlu S, Renda N, Çakar N, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A: The preventive effect of heparin on stricture formation after caustic esophagial burns. J Pediatr Surg 34 (2): 291-294, 1999
49. Christensen HBT: Epidemiology and prevention of caustic ingestion. Acta pediatr 83: 212, 1994
50. Millar AJW, Cywes S: Caustic strictures of the esophagus, in O'Neill J, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG (eds): Pediatric surgery. Mosby-Year Book inc. p: 969-979, 1998
51. Kirsch MM, Ritter F: Caustic ingestion and subsequent damage to the digestive passages. Ann Thorac Surg 21:74,1976
52. Kouichinou W, Kamisaki Y, Ohkura T, Kanda G, Nakamoto K, Kishimoto Y, Ashida K: Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia reperfusion in rats. Am J Physiol 274: 465-471,1998

53. Burford TH, Webb WR, Ackerman L: Caustic burns of the esophagus and their surgical management: A clinico-experimental correlation. *Ann surg* 161: 488-503, 1991
54. Wetscher GJ, Pedikis G, Stinson R, Redmond EJ, Hinder RA: Esophagitis in Sprague-Dawley rats is mediated by free radicals *Dig Dis Sci* 40(6): 1297-1303, 1995
55. Ulman İ, Mutaf O: A critique of systemic steroids in the management of caustic esophageal burns in children. *Eur J Pediatric surgery* 8: 71-74, 1998
56. Bautista A, Varela R, Villanueva A, Estevez E, Tojo R, Cadranet S: Effect of prednisolone and dexametasone in children with alkali burns of the esophagus. *Eur J Pediatr Surg* 6: 198-203, 1996
57. Anderson KD, Rouse TM, Randolph JG: A controlled trial of corticosteroids in children with corrosive injury of the esophagus. *N Engl J Med* 323: 637-640, 1990
58. Çakmak M, Naycı A, Renda N, Ereku S, Yücesan S: The effect of corticosteroids and pentoxifylline in caustic esophageal burns. *Int Surg* 82: 371-375, 1997
59. Leape LL, Ashcraft KW, Scarpelli DG, Holder TM. Hazard to health-liquid lye. *N. Engl J Med*; 284:578, 1971
60. Owen, M.E. (1998) The marrow stromal system. In *Marrow Stromal Cell Culture*. (Eds. Beresford, J.N., Owen, M.E.) 1-10, Cambridge Univ. Press.
61. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. 8: 315 -7 .
62. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C. et al. (1999 ) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143 -147 .
63. Prockop, D.J. (1997 ) Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. *Science*, 2 : 71-4.
64. Majumdar, K.M., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., Gerson, S.L. (1 8) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 176 :57 -66 .
65. Krause, D.S. (2002) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 9(11): 754-8.
66. Phinney, D.G. (2007 ) Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: Clues to their therapeutic efficacy. *Cell Cycle*. 6(23 ): 2884-9.
67. Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L. et al. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41- 9.
68. Le Blanc, K., Ringden, O. (2005 ) Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 11(5): 21- 34.
69. Caplan, A.I., Dennis, J.E. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell Biochem.* 1; 98 ( 5): 1076 -84.
70. Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Fitzpatrick, L.A. et al. (1999 ) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med.* 5: 309 -13.
71. Koc, O.N., Gerson, S.L., Cooper, B.W. et al. (2000) Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow

- mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *Clin. Oncol.* 18(2): 307 -16.
72. Koc, O., Day, J., Nieder, M. et al. (2002) Allogenic mesenchymal stem cell infusion for the treatment of metachromatic leuokodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplantation*, 30: 215 -22.
  73. Ringden, O., Uzunel, M., Rasmusson, I. et al. (2006) Mesenchymal stem cells for treatment of therapy- resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 81(10): 1390-7.
  74. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S. et al (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 410( 6829 ): 701-5.
  75. Liang, J., Zhang, H., Hua, B. et al. (2009) Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 15 (5 ): 644-6.
  76. Sueblinvong, V., Weiss, D.J. Cell therapy approaches for lung diseases: current status. *Curr Opin Pharmacol.* 2009 Apr 4.
  77. Jethva, R., Otsuru, S., Dominici, M. et al. (2009) Cell therapy for disorders of bone. *Cytotherapy*. 11(1): 3-17. Review.
  78. Xu, W.T., Bian, Z.Y., Fan, Q.M. et al. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 2009 Mar 31.
  79. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B. et al. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*; 363(1): 1439 -41.
  80. Amabile, G, Meissner, A. (2009) Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol. Med* 15 : 59–68.
  81. Bapat, S. (2009 ) *Cancer Stem Cells. Identification and Targets*, Wiley & Sons Inc, USA.
  82. Can, A., Karahuseyinoglu, S. (2007 ) Concise review: Human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* 25 : 2886 –2895 .
  83. Can, A. (2008) Haematopoietic stem cells niches: Interrelations between structure and function. *Trans Apheresis Sci.* 38; 261–268.
  84. Lanza, R. (2006 ) *Essential of Stem Cell Biology*, Elsevier Academic Press.
  85. Sato, N., Sanjuan, I.M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F., Brivanlou, A.H. (2003 ) Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev. Biol.* 260: 404–13.
  86. Sell, S. (2004) *Stem Cells Handbook*. Humana Press, Totowa.
  87. Sullivan, S., Cowan, C.A., Eggan, K. (2007 ) *Human Embryonic Stem Cells. The Practical Handbook*, John Wiley & Sons Ltd., England.



88. Svendsen, C.N., Ebert, A.D. (2008) Encyclopedia of Stem Cell Research. Vol 1 &2. SAGE Publications, USA.
89. Wobus, A.M., Boheler, K.R. (2006 ) Stem Cells, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
90. Yan Li, John M. Wo, Susan Ellis, Mukunda B. Ray, Whitney Jones, And Robert C.G. Martin, Original Research Report, Morphological Transformation in Esophageal Submucosa by Bone Marrow Cells: Esophageal Implantation under External Esophageal Perfusion, Stem Cells And Development 15:697–705 (2006)
91. Augusto Zani,<sup>a</sup> Agostino Pierro,<sup>a</sup> Nicola Elvassore,<sup>b</sup> Paolo De Coppi, MD, PhD, Tissue engineering: an option for esophageal replacement?, Seminars in Pediatric Surgery (2009) 18, 57-62
92. Yvan Vandenplas, Bruno Hauser, Thierry Devreker, Daniel Urbain, and Hendrik Reynaert, Case Report A Biodegradable Esophageal Stent in the Treatment of a Corrosive Esophageal Stenosis in a Child, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 49:254–257 # 2009
93. Vahit Yukselen, Ali Onder Karaoglu, Cigdem Yenisey, Muge Tuncyurek, Omer Ozutemiz, Trimetazidine reduces the degree of fibrosis in alkali burns of the esophagus, Journal of Pediatric Surgery (2005) 40, 505–509
94. Gs Arul, D Parikh, Oesophageal replacement in children, Ann R Coll Surg Engl 2008; 90:7 –12
95. Kim YT, Sung SW, Kim JH., Is it necessary to resect the diseased esophagus in performing reconstruction for corrosive esophageal stricture?, Eur J Cardiothorac Surg, 2001; 20: 1–6 .)
96. Dale WA, Sherman CD., Late reconstruction of congenital oesophageal atresia by intrathoracic colon transplantation., J Thorac Cardiovasc Surg 1955; 29: 344
97. Ikuo Ishige, Tokiko Nagamura-Inoue, Masaki J. Honda, Ratanakanit Harnprasopwat, Michiko Kido, Mitsuhiro Sugimoto, Hiromitsu Nakauchi, Arinobu Tojo, Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord, Int J Hematol (2009) 90:261–269
98. AD Ho, W Wagner, and W Franke, Heterogeneity of mesenchymal stromal cell Preparations, Cytotherapy (2008) Vol. 10, No. 4, 320-330
99. Jakob Reiser, Xian-Yang Zhang, Charles S Hemenway, Debasis Mondal, Leena Pradhan, and Vincent F La Russa, Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases, Expert Opin Biol Ther. 2005 December ; 5(12): 1571–1584
100. Fares Zeidán-Chuliá, Mami Noda, “Opening” The Mesenchymal Stem Cell Tool Box European Journal of Dentistry, July 2009 - Vol.3; 240-249

101. Francesco Fascetti-Leon, M.D., Alberto Malerba, Ph.D., Luisa Boldrin, Ph.D., Erika Leone, M.D., Pietro Betalli, M.D., Alessandra Pasut, M.D., Giovanni Franco Zanon, M.D., Pier Giorgio Gamba, M.D., Libero Vitiello, Ph.D., and Paolo De Coppi, M.D., Ph.D., Murine Muscle Precursor Cells Survived and Integrated in a Cryoinjured Gastroesophageal Junction, *Journal of Surgical Research* 143, 253–259 (2007)
102. Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe, Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia, *Journal of Gastroenterology* 2004; 39:1-6
103. G. Sarosi, G. Brown, K. Jaiswal, L. A. Feagins, E. Lee, T. W. Crook, R. F. Souza, Y. S. Zou, J. W. Shay, Stuart Jon Spechler, Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus, *Diseases of the Esophagus* (2008) 21, 43–50
104. Okamoto R, Yajima T, Yamazaki M, Kanai T, Mukai M, Okamoto S, Ikeda Y, Hibi T, Inazawa J, Watanabe M., Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract, *Nature Medicine*, Volume 8; Number 9, September 2002, 1011-1017
105. Epperly MW, Guo H, Shen H, Niu Y, Zhang X, Jefferson M, Sikora CA, Greenberger JS., Bone marrow origin of cells with capacity for homing and differentiation to esophageal squamous epithelium, *Radiat Res.* 2004 Sep;162(3): 233-40.
106. Berthet B, Costanzo J, Arnaud C, Assadourian R: Influence of epidermal growth factor and interferon on healing of esophageal corrosive burns in the rat. *Br J Surg*, 81: 395-398, 1994
107. Kozanoglu I, Boga C, Ozdogu H, Sozer O, Maytalman E, Yazici AC, Sahin FI., Human bone marrow mesenchymal cells express NG2: possible increase in discriminative ability of flow cytometry during mesenchymal stromal cell identification, *Cytotherapy*. 2009;11(5):527-33.
108. Kozanoglu I, Boga C, Ozdogu H, Maytalman E, Ovali E, Sozer O., A detachment technique based on the thermophysiologic responses of cultured mesenchymal cells exposed to cold, *Cytotherapy*. 2008;10(7):686-9.
109. Yukselen V, Karaoglu AO, Yenisey C, Tuncyurek M, Ozutemiz O. Trimetazidine reduces the degree of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Journal of Pediatric Surgery*; 40, 505-509, 2005
110. Guven A, Demirbag S, Uysal B, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Ozturk H. Effect of 3-amino benzamide, a poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibitor, in experimental caustic esophageal burn. *Journal of pediatric Surgery*; 43, 1474-79, 2008
111. Yukselen V, Karaoglu AO, Ozutemiz O, Yenisey C, Tuncyurek M. Ketotifen ameliorates development of fibrosis in alkali burns of the esophagus. *Pediatr Surg Int.*; 20(6): 429–33, 2004
112. Ozcelik MF, Pekmezci S, Sarıbeyoglu K, Unal E, Gumuştas K, Doğusoy G: The effect of halofuginone, a spesific inhibitor of collagen type I synthesis, in the prevention of esophageal strictures related to caustic injury. *The american journal of surgery*. 187, 257-260, 2004