

Trakeal Transplantasyon Modelinde İmmunosupresyonun Epitelyal Canlılık ve Ultrastrüktürel Etkileri

Dr. Yener Yörük*, Dr. Selçuk Köse*, Dr. Latife Candan**, Dr. Gülara Hüseynova**

ÖZET

Heterotopik trakeal allograflar ratların batinlarına omentopeksi ile implante edildi. Bir gruba siklosporin 15 mg/kg, diğer gruba siklosporin 15 mg/kg + metilprednizolon 2 mg/kg intraperitoneal olarak 15 gün boyunca uygulandı. Onbeş gün sonra sakrifiye edilen ratlarda ışık mikroskopunda trakeal epitelin canlılık derecesi skorlandı ve epitel kalınlıkları ölçüldü. Elektron mikroskopunda ise trakeal epitel hücrelerindeki ultrastrüktürel değişiklikler ve buna göre aktivasyonları belirlendi. Tek başına siklosporin ile immüsupresyon uygulanan ratlardaki trakeal epitel hücrelerinin canlılık derecesi, epitel kalınlığı ve ultrastrüktürel olarak aktivasyonları, kombine immüsupresyon uygulanan gruba ($p=0,034$) ve diğer kontrol gruplarına ($p=0,039$) göre daha yüksek oranda tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Trakeal epitel, transplantasyon, omentopeksi, ultrastrüktür

GİRİŞ

Solunum epitelinin canlılığının korunması akciğer transplantasyonunda ve geliştirilecek hava yolu suni greftlerinin epitelizeasyonunda klinik önem taşımaktadır (1). Solunum epitelinin canlılığının korunmasında neovaskülarizasyonun sağlanması ve doku rejeksiyonunun önlenmesi önemli etkenlerdendir (2,3). Epitel canlılığının korunmasında omentumun anastomoz bölgesi üzerine çepeçevre sarılması olan omentopeksi uygulanması başta gelen seçeneklerdendir (4,5,6,7). Torasik cerrahide bronkoplevral fistül ve özofageal perforasyon tamirinde, bronşial güdüklerin ve hava yolu anastomozlarının korunmasında, postrezeksiyonel enfekte boşlukların tedavisinde ve göğüs duvarı defektlerinin rekonstrüksiyonlarında kullanılmaktadır (8). Doku rejeksiyonunun önlenmesinde kullanılan farmakolojik ajanlar özellikle kortikosteroidler, epitelizeasyonun korunmasında negatif etki gösterebilmektedir (3). Tasarlanan rat heterotopik trakeal allogreft transplantasyon modeli ile epitel canlılığının korunması ve immüsupresyon arasındaki ilişki kalitatif ve kantitatif olarak ışık mikroskopisi ölçümleri ile ve ultrastrüktürel hasar elektron mikroskopisi ile irdelendi (9).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada farklı genetik yapıda olan 14 adet Sprague - Dowley(SD) ve 16 adet Wistar Albino(WA) cinsi rat kullanıldı.

* Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi AD, Edirne

** Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji AD, Edirne

SUMMARY

Effects of immunosuppression on epithelial viability in tracheal transplantation model

Heterothopic tracheal allografts were implanted into the abdomen of rats with omentopexy. Cyclosporin 15 mg/kg and cyclosporin 15 mg/kg + methylprednisolone 2 mg/kg were given into peritoneum for 15 days in different groups. Tracheal epithelial viability was scored and epithelial thickness was measured in light microscopy after 15th day sacrifice. Ultrastructural features and activities of tracheal epithelial cells were examined. Tracheal epithelial viability in cyclosporin immunosuppressed rats and ultrastructural activity were found to be higher than combined immunosuppressed group ($p=0,034$) and other control groups ($p=0,039$).

Key Words: Tracheal epithelium, transplantation, omentopexy, ultrastructure

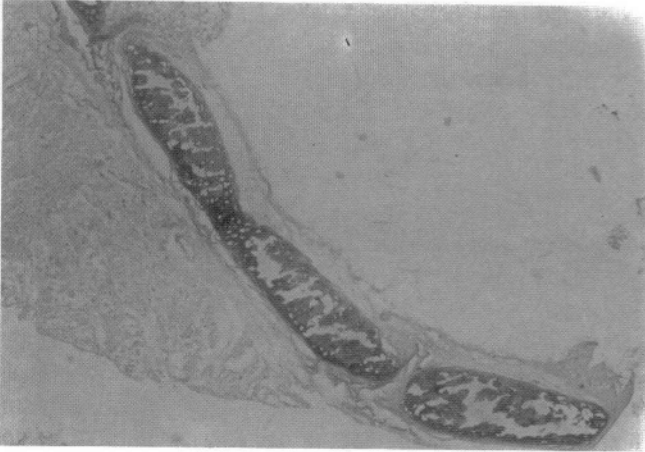
	Siklosporin	M.Prednizolon	Grup		
			n	Verici (mg/kg/gün)	Alıcı (mg/kg/gün)
1	SD	SD	4
2	SD	WA	6
3	SD	WA	5	15
4	SD	WA	5	15	2

n : Trakeal transplantasyon yapılan alıcı sayısı.

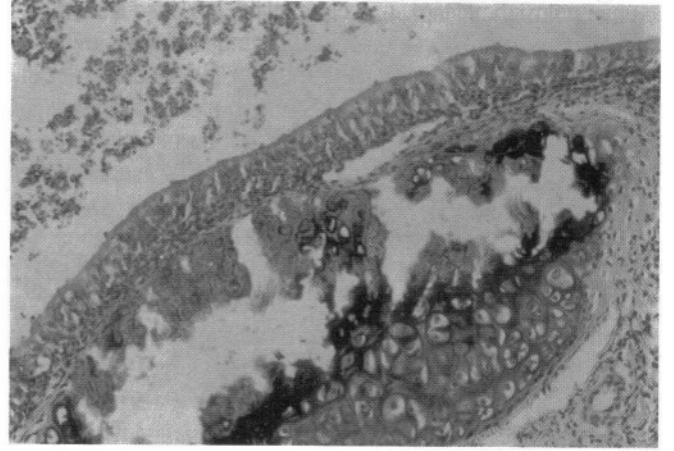
Tablo 1 : Deneysel dizayn

Ratların ortalama ağırlığı 260 gr (210 - 300 gr) olarak tespit edildi. Çalışmada ratlar için modifiye edilen omentopeksi ile yapılan heterotopik trakeal transplant modeli gerçekleştirildi (9). Toplam 10 adet SD ratının çıkarılan trakeal segmentleri 4 adet SD ve 16 adet WA cinsi ratların omentumlarına implante edildi. Ratlar deneysel gruba randomize olarak seçildiler. Deneysel dizayn Tablo 1.'de sunulmuştur.

SD ratları, yüksek doz intraperitoneal thiopental sodyum ile sakrifiye edildi. Servikal bölge traşi ve dezenfeksiyonu sonrası steril olarak trakea eksplore edildi ve 1 cm'lik bir segment eksize edildi. Bu segment 2 ayrı alıcıya implante edilmek üzere 2 eşit parçaya bölündü ve % 0.09'luk steril izotonik solüsyonuna bırakıldı. Alıcı ratlara intraperitoneal olarak solunum



Resim 1 : Işık mikroskopunda grade 0 olarak trakeal epitelin görülmesi (H.E.,x40).



Resim 2 : Işık mikroskopunda grade 4 çok katlı silialı kuboid epitel (H.E.,x40).

inhibisyonu gerçekleştirilmeden 3 mg/kg ketamin ile anestezi uygulandı. Batın bölgesi traşı ve dezenfeksiyonu sonrası prosedür steril olarak gerçekleştirildi. Profilaktik antibiotik uygulaması yapılmadı. Rata median laparotomi insizyonu uygulanarak periton boşluğuna ulaşıldı. Verici rattan çıkarılan ve 2 eşit parçaya bölünen trakeanın bir parçası omentuma 6/0 polipropilen absorbe olmayan sütür ile fikse edildi. Daha sonra aynı sütür ile kontinü olarak omentumla tamamen kaplanacak şekilde trakeal implant sarıldı ve tekrar periton boşluğuna yerleştirildi. Birinci ve 2. gruplar kontrol grupları olması nedeniyle immüno-supresyon uygulanmadı. Üçüncü grup sadece siklosporin alan gruptu. Bu gruba castor yağında seyreltilmiş siklosporinden 15 mg/kg subkutan olarak ameliyattan hemen sonra başlandı ve hayvanın yaşatıldığı 15 gün boyunca her gün uygulandı. Dördüncü gruptaki ratlara da siklosporin dozu aynen uygulandı. Buna ek olarak, steril su ile 2 mg/ml oranında seyreltilen metilprednizolondan 2 mg/kg/gün dozunda subkutan olarak verildi. Metilprednizolona da siklosporinle beraber operasyondan hemen sonra başlandı ve 15 gün boyunca devam edildi. Trakeal implantasyon yapılan ratlar 15 gün sonra subkutan yüksek doz thiopental sodyum ile sakrifiye edildi. Daha sonra trakeal implant, sarıldığı omentumla birlikte çıkarıldı. Çıkarılan materyallerden doku örnekleri alındı. Alınan örnekler rutin doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan elde edilen 0,4µm kalınlıktaki kesitler hematoxilen - eosin (H.E.) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Ratlarda normal trakea epiteli silialı kolumnar epiteldir (9,10). Kartilaj üzerindeki epitelin niteliğine ve yeni gelişen bu epitelin kalınlığına göre epitel canlılığı değerlendirildi. Bu derecelendirmeye göre; epitel seçilemiyorsa grade 0 (Resim 1), tek sıra belirsiz epitel varsa grade 1, bir veya iki sıra epitel varsa grade 2, siliasız kolumnar epitel varsa grade 3, silialı kolumnar epitel varsa grade 4 (Resim 2) olarak skorlandı. Epitel kalınlığı, x 40 büyütme alanında 1 kare=12,5 µm olarak ölçüm yapmaya elverişli, bölmeli okuler lens ile ölçüldü. Elektron mikroskopik inceleme için alınan örnekler önce % 2,5'lik Milloning fosfat tamponlu

glutaraldehit ve sonra %1'lik osmium tetroksit ile fikse edildi. Dehidratasyonu takiben Epon 812 ile bloklandı. Kesitler, uranilasetat ve Reynold'un kurşun sitrat boyası ile boyandıktan sonra Zeiss-EM-9 elektron mikroskobu ile incelendi. Epitelial kalınlık değerlerinin istatistiki değerlendirmesi 4 grubun birbiriyle ve 1,3,4. grupların birbiriyle karşılaştırılması Kruskal - Wallis (Nonparametrik ANOVA) testi, 3 ve 4. grubun kendi arasında karşılaştırılması Mann - Whitney U testi (Bağımsız gruplarda non parametrik t testi) kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

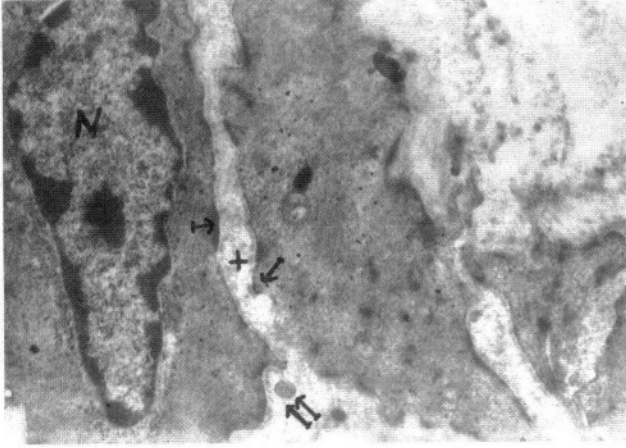
Siklosporin A + metilprednizolon uygulanan gruptan bir denek yaygın intraabdominal enfeksiyon sonucu öldü. Sakrifikasyon sonrası gene aynı gruptan bir denekte de abdominal kavitede enfeksiyon saptandı. Işık mikroskopunda incelenen materyallerde trakeal epitel alanlarının çoğunluğunu oluşturan epitel derecesine göre değerlendirildi. Buna göre tüm

GRUP	Skor ortalaması
1. Grup	2
2. Grup	1.5
3. Grup	4
4. Grup	2

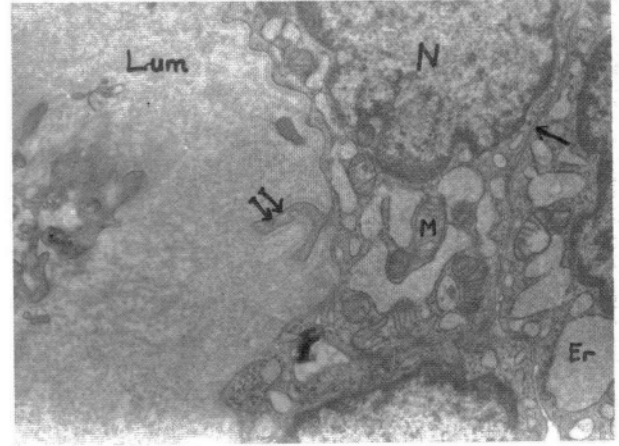
Tablo 2 : Gruplara göre epitelyal canlılık skorlaması

GRUP	Epitelial kalınlık ortalaması (µm)
1. Grup	20,25 ± 24,6
2. Grup	4,1 ± 6,45
3. Grup	35 ± 14,33
4. Grup	13 ± 12,8

Tablo 3 : Grupların epitelial kalınlık ortalamaları



Resim 3 : Grade 2 epitelyal hücrelerin elektron mikroskopik görünümü. Epitelyal hücre aralıklarının genişlemesi görülüyor(+). Dış membranlarında izlenen desmozomların bozulması dikkati çekmektedir (↓). Apikal bölümlerinde seyrek olarak dış membranların çıkıntılar gözlenmektedir (↑↑). Kaba kromatinli nüve (N) ve sitoplazmik yapılar (St) izlenmektedir (X5000)



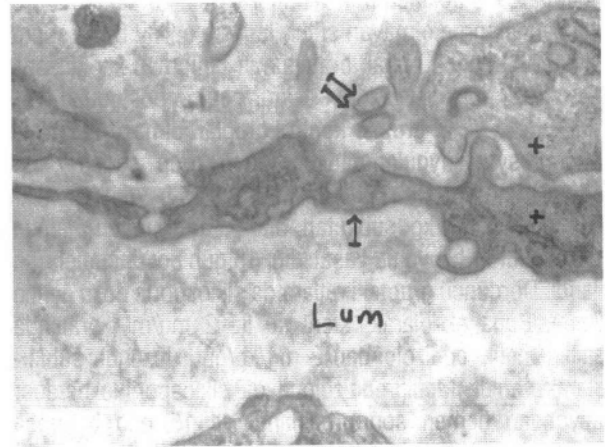
Resim 4 : Grade 4 epitelyal hücrelerin elektron mikroskopik görünümü. Epitelyal hücreler sık bağlı olarak izlenmektedir. Desmozomların (↓), Mitokondrilerin (M) ve diğer organellerin gelişmesi dikkati çekmektedir. Düzensiz nükleuslar (N), genişlemiş endoplazmik retikulum (Er) görülüyor. Apikal bölümde (Lum) lümeneye doğru epitelyal hücrelerin mikrovillüsleri izlenmekte (↑↑). (X15.000)

gruplarda en sık rastlanan epitel dereceleri Grade 0, 2 ve 4 olarak belirlendi. Denek gruplarına göre trakeal epitel skorlaması Tablo II'te gösterilmiştir. Bu bulgular sonucunda belirgin olarak en yüksek epitel canlılık derecesi, siklosporin A ile immünsupresyon uygulanan III. grupta rastlandı. Siklosporin A+ metilprednizolonla kombine immünsupresyon uygulanan gruptaki epitel canlılık derecesi I. kontrol grubundan daha düşük bulundu. En düşük dereceye ise beklendiği üzere II. kontrol grubunda rastlandı.

Epitel kalınlık ölçüm sonuçları da epitel canlılık dereceleriyle doğru orantılı bulundu. Burada da en yüksek epitel kalınlık değerleri III. grupta tespit edildi. Denek gruplarının epitel kalınlık ortalamaları Tablo III'te sunulmuştur.

Dört grubun birbiriyle karşılaştırılması sonucunda $\chi^2 = 8,382$ ve $p = 0,039$ değerleri ile anlamlı bir sonuç elde edilmiştir. İkinci grup dışarda bırakılarak 1,3 ve 4. grup arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p = 0,170$). Üçüncü ve 4. grup kendi arasında karşılaştırıldığında ise aradaki fark önemlidir ($z = 2,124$ $p = 0,034$).

Elektron Mikroskopik Bulgular: Işık mikroskopunda Grade 2 ve 4 durumundaki trakeal epitelyal hücreler elektron mikroskopunda ultrastrüktürel olarak incelendi. Grade 2 durumunda olan epitelyal hücreler ultrastrüktürel olarak birbirinden çok ayrıntılı olarak izlendiler. Hücre aralıklarında ödem dikkati çekti ve buna bağlı olarak hücre kontaktların (desmozomların) bozulması gözlemlendi. Epitelyal hücrelerin dış membranlarında çıkıntılar görülmemektedir, sadece apikal bölümlerde çok seyrek olarak izlendi. Nükleuslar kaba kromatinli, sitoplazmada filamentler ve diğer organeller tespit edildi (Resim 3). Grade 4 epitelyal hücrelerin apikal bölümlerinde çok miktarda mikrovillüsler ve silialar gözlemlendi. Sitoplazmada mitokondrilerin şiştiği, sayıca arttığı, endoplazmik retikulumun genişlediği



Resim 5 : Grade 4 durumunda olan epitelyal hücrelerde mikrovillüslerin ve siliaların elektron mikroskopisi. Mikrovillüsler (↑) ve silialar (↑↑) görülmektedir. Sitoplazmada ince flamenlerin ve yuvarlak veziküllerin gelişmesi gözlenmekte (+). Trakea lümeni(T). (X100.000)

dikkati çekti. Epitelyal hücreler birbiriyle dış membranlar vasıtasıyla sıkı bir şekilde bağlıydılar. Hücre kontaktları (desmozomlar) bozulmamıştı. Nükleusların aktivitesini gösteren ince kromatin, dış membranların invajinasyonları gözlenmekteydi (Resim 4). Büyük büyütmede mikrovillüsler ve silialar daha ayrıntılı görüldü. Sitoplazmik çıkıntılar apikal ve bazal bölümlerinde gelişmiş veziküller ve filamentler izlenmekteydi (Resim 5). Elektron mikroskopik incelemelerin sonucunda Grade 4 trakeal epitel hücrelerinde nükleusların ince kromatini, sitoplazmik organellerin sayıca artışı, mikrovillüslerin içindeki fibril-

lerin ve veziküllerin gelişmesi bu hücrelerin aktivitesini göstermektedir. Grade 2 trakeal epitel hücrelerinde ise ultrastrüktürel bozukluklar, ödem, organellerin ve mikrovillüslerin gelişmemesi, kaba kromatinli nükleuslar bize göre bu hücrelerin aktivitesinin azaldığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Cartier ve arkadaşları omentumdan salınan anjiyogenik potansiyel lipid yapısında bir maddenin varlığını ortaya koymuşlardır (10). Bu da omentopeksi sonrası neovaskülarizasyon mekanizmasını açıklamaktadır. Lima ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada transplant bronşunun omental pediküllü flep ile revaskülarize olduğu gösterilmiştir (2). Ayrıca yapılan çalışmalarda omentopeksi uygulanan anastomozların 4 gün içinde, omentopeksi uygulanmayan anastomozların ise 12 - 30 gün içinde revaskülarize olduğu bildirilmektedir (7,11). Albes ve arkadaşları tavşanlarda trakeal omentopexi batında omentuma ve cilt altına implante etmişler, bazik fibroblast büyüme faktörüyle birlikte omentuma implante edilen greftlerin ışık ve elektron mikroskopu incelemelerinde kontrol grubuna göre epitel canlılığında belirgin bir fark olduğunu belirtmişlerdir (12). Benzer bir çalışma da Toronto transplantasyon grubu tarafından yapılmış ve bazik fibroblast büyüme faktörüyle birlikte omentopeksi yapılan grupta, sadece omentopeksi yapılanaya göre daha yüksek oranda trakeal epitel canlılığı görmüşlerdir (13).

Çalışmamızda rat omentumuna implante edilen heterotopik trakeal allogreftlerin canlılığını araştırmak amacıyla implante edilen trakea epitelinin kalitatif ve kantitatif ölçümleri yapıldı. Yapılan ölçümlere göre, rejeksiyon sonucunda heterotopik trakeal greft epitelinde canlılığın bozulduğu tespit edildi. Ayrıca uygulanan immüsupresyon rejiminin epitel rejenerasyonundaki önemi görüldü.

Çalışmamızda yüksek doz siklosporin A uygulanan olgular-daki trakeal canlılığın, siklosporin A + metilprednizolon uygulanan ve immunosupresyon uygulanmayan gruba göre daha yüksek oranda olduğunu gördük. Bu grupta trakeal epitel kalınlığının diğer gruplara göre daha fazla olduğu ve ultrastrüktürel morfolojinin korunduğu tespit edildi. Davreux ve arkadaşlarının çalışmasında ise rat omentumuna omentopeksi ile implante edilen heterotopik trakeal allogreftlerde, siklosporin A + metilprednizolon kombinasyon grubunda trakeal epitel canlılık derecesi ve kalınlığının daha yüksek oranda görüldüğü bildirilmiştir (9). Buna karşın, Goldberg ve arkadaşları, köpek allotransplantasyonu sonrası uygulanan immüsupresyonda siklosporin A ile azatioprin + metilprednizolonu karşılaştırmışlar ve metilprednizolon eklenen gruptaki bronşial ayrılma kuvvetini diğer gruba göre daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca anastomoz bölgesinin elektron mikroskopik incelemelerinde de siklosporin verilen grupta diğerine göre kollajen lif kalınlığı ve yoğunluğunun daha az olduğunu görmüşlerdir (3). Çalışmamızda da sadece siklosporin A ile immüsupresyon uygulanan gruplardaki elektron mikroskopik incelemelerde trakeal epitel hücrelerin normal morfolojisini ve fonksiyonlarını koruduğunu, buna karşılık siklosporin A + metilprednizolon kombinasyonunda ve kontrol gruplarında hücre morfolojisi ve aktivitesinin daha az korunduğu tespit edilmiştir. Akciğer transplantasyonu sonrası immunosupresyonda kortikosteroid kullanımının solunum yolu epiteli üzerine yapabileceği olumsuz etkiler klinik olarak değerlendirilmelidir. Bu sonuçlara göre akciğer transplantasyonunda trakeal veya bronşial anastomozda uygulanan omentopeksinin önemi bir kez daha vurgulanmış, ayrıca immüsupresyon tedavisine kortikosteroid eklenmesinin anastomoz bölgesindeki epitelizasyona olumsuz etkilerinin göz önünde tutulması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Novick RJ.: New trends in lung preservation : A collective review. J Heart Lung transplant, 1993; 12: 5.
2. Lima O, Goldberg M, Peters WJ, et al: Bronchial omentopexy in canine lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg 1982; 83 : 4 1 8.
3. Goldberg M, Lima O, Morgan E, et al. : A comparison between cyclosporin A and methylprednisolone plus azathioprine on bronchial healing following canine lung autotransplantation. J Thorac Cardiovasc Surg, 1983; 85: 821 - 826.
4. Shennib H, Massard : Airway complications in lung transplantation. Ann Thorac Surg, 1994; 57: 506 - 511.
5. Date H, Trulock EP, Arcidi JM, et al: Improved airway healing after lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995; 110: 1424 - 1433.
6. Morgan E, Lima O, Goldberg M, et al: Successful revascularization of totally ischemic bronchial autografts with omental pedicle flaps in dogs. J Thorac Cardiovasc Surg, 1982; 84: 204 - 210.
7. Morgan E, Lima O, Goidberg M, et al: Improved bronchial healing in canine left lung reimplantation using omental pedicle wrap. J Thorac Cardiovasc Surg, 1983; 85: 134 - 139.
8. Dubois P, Choiniere L, Cooper JD : Bronchial omentopexy in canine lung allotransplantation. Ann Thorac Surg, 1984; 38: 211 - 214,.
9. Davreux CJ, Chu NH, Waddell TK, et al: Improved tracheal allograft viability in immunosuppressed rats. Ann Thorac Surg, 1993; 55: 131-134.
10. Cartier R, Brunette I, Hashimoto K , et al: Angiogenic factor: A possible mechanism for neovascularization produced by omental pedicles. J Thorac Cardiovasc Surg, 1990; 99: 264 -268.
11. Siegelman SS, Hagstrom IWC : Restoration of bronchial artery circulation after canine lung allotransplantation. J Thorac and Cardiovasc Surg 1977; 73: 792.
12. Albes JM, Klenzner T, Kotzerge J, et al: Improvement of tracheal autograft revascularization by means of fibroblast growth factor. Ann Thorac Surg, 1994; 57: 444 - 449.
13. Olech VM, Keshavjee SH, Chamberlain DW, et al: Role of basic fibroblast growth factor in revascularization of rabbit tracheal autografts. Ann Thorac Surg, 1991; 52: 258 - 264