

ORJİNAL YAZI

Fetal ve Erişkin Tavşan Özofagus Düz Kas Hücrelerinin Morfolojik Özelliklerinin ve Büyüme Kinetiklerinin Karşılaştırılması

Mevlit KORKMAZ*, Tahsin YAKUT**, B. Haluk GÜVENÇ***,
Murat YAĞMURCA****, Kemal BAYSAL*****, Barbaros YİĞİT**,
Ayhan BİLİR*****

* Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Afyon.

** Uludağ Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Bursa.

*** Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Kocaeli.

**** Afyon Kocatepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Afyon.

***** Gebze TUBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Moleküler Biyoloji Enstitüsü, Kocaeli.

***** İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZET

Özofagus doku kültür çalışmaları çoğunlukla mukozal değişiklikleri incelemeye yöneliktir. Çalışmamızda, tavşan modelinde *in vitro* fonksiyonel özofagus segmenti hazırlamaya yönelik olarak, fetus ve erişkin distal özofagus düz kas hücrelerinin morfolojik özellikleri ve büyüme kinetiklerinin hesaplanarak karşılaştırılması amaçlandı. Erişkin ve fetus Yeni Zelanda tipi tavşanların özofaguslarının distal 1/3 kısmındaki dokuların kas tabakası kültüre edildi ve üreyen hücreler anti-aktin ve anti-miyozin antikorları ile immünotokimyasal boyama yapılarak tiplendirildi. Popülasyon kinetikleri, popülasyon sayısını ikiye katlama zamanı (Population doubling time, PDT) ve timidinle işaretlenme indeksi (Thymidine labelling index, TLI) kullanarak hesaplandı ve karşılaştırıldı. Trypan blue ile boyanarak hücrelerin canlılık oranları hesaplandı. Heriki hücre popülasyonu, anti-aktin ve anti-miyozin antikorları ile % 90'ın üzerinde pozitif boyandı ve hücrelerin iğ şeklinde, düz kas morfolojisine sahip oldukları görüldü. Fetal ve erişkin hücrelerin PDT değerleri sırasıyla 95,2 ve 145,5 saat, TLI değerleri ise birbirlerine yakın bulundu. Uygun besiyeri ve yeterli doku disseksiyonu ile kolaylıkla izole özofagus düz kas hücre kültürü elde edilebilmektedir. Erişkin özofagus düz kas hücrelerinin, kültür ortamında daha hızlı çoğaldıkları gözlemlendi. Sonuç olarak, farklı dokulardan elde edilen düz kas hücrelerinin kültür ortamında benzer üreme özellikleri gösterdikleri söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Özofagus. Düz kas. Hücre kültürü.

Comparison of the Growth Kinetics and Morphological Characteristics of Adult and Fetal Esophageal Smooth Muscle Cells

SUMMARY

Culture studies of the esophageal tissue have mostly been on the investigation of mucosal changes. In this study, we aimed to form functional esophageal segment *in vitro* and to calculate and compare the growth kinetics of esophageal muscle cells of fetal and adult distal esophagus. The muscular coat of distal 1/3 esophageal segments of adult and fetal New Zealand rabbits were cultured and identified as smooth muscle cells (SMC) by immunostaining for anti-actin and anti-myosin antibodies. Growth kinetics of SMCs were calculated and compared using population doubling time (PDT) and thymidine labeling index (TLI). Viability rates of all cells were calculated using trypan blue. The ratio of cell populations stained with anti-actin and anti-myosin antibodies was higher than 90% and the cells were characteristic spindle shaped, same as the muscle cell morphology. Calculated PDT of fetal and adult SMCs were 145,5 and 95,2 hours respectively and TLI values were found to be similar. Fine dissection of the tissue and appropriate medium is mandatory to achieve isolated esophageal SMCs. The fetal esophageal cells showed proliferation slower than the adults. Conclusion, we can speculate that smooth muscle cells obtained from different tissues act similar in the same culture condition.

Key Words: Esophagus. Smooth muscle cell. Cell culture.

Geliş Tarihi: 09.01.2004

Kabul Tarihi: 19.04.2004

Dr. Tahsin YAKUT
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı,
Tıp Fakültesi, Uludağ Üniversitesi, BURSA
Tel: 0224 442 84 00/1418
Email: tyakut@uludag.edu.tr

Hücre kültür tekniklerinin gelişmesi, dokulardaki fizyolojik ve patolojik değişiklikleri *in vitro* ortamda ve moleküler düzeyde inceleme olanağı sağlamıştır. Bunun yanında çeşitli dokuların replasmanı amacıyla, *in vitro* ortamda yapay doku oluşturma çalışmaları hızla devam etmektedir. Bu araştırmalarda biopsi ile alınan doku, kültür teknikleri ile üretilip çoğaltılarak,

uygun taşıyıcı biopolimerler üzerine aktarılmakta ve doku onarımı amacıyla kullanılmaktadır.

Özofagusun inflamatuvar ve neoplastik hastalıklarında mukozal değişiklikler, hayvan modellerinde ya da insandan alınan dokularda, *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Tavşan özofagus epitel hücre kültürü yapılarak kültür koşulları tanımlanmış¹, özofagus keratinositleri üretilerek proliferasyon, diferansiyasyon ve neoplastik transformasyonları incelenmiştir². Sağlıklı insandan elde edilen oral ve özofagus mukoza hücrelerinin kültürü yapılarak hücresel özellikleri belirlenmiştir³. Özofagus skuamöz hücre kültürü çalışmalarının prognostik önemi vurgulanmıştır⁴.

Kültür ortamında özofagusun düz kasının hücresel özelliklerinin incelenmesi, kas dokusunu ilgilendiren hastalıklarında ya da replasman amacıyla yapay özofagus segmenti oluşturmada yararlı olabilir. Bu nedenle çalışmamızda, erişkin ve fetus tavşan özofaguslarının distal kas dokusu kültüre edilerek, büyüme kinetikleri ve morfolojik özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda Yeni Zelanda tipi tavşanlar kullanıldı. Sekiz adet erişkin ve 12 adet 26 günlük fetusun özofagus distal 1/3 kısmı laparotomi ile alındıktan sonra laminer hava akımı altında, dokuların kas tabakası mukozadan ayrılarak bistüri ve makas yardımıyla mekanik yolla parçalandı. Dokular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), % 10 fetal bovine serumu (Sigma Chemical Co.) ve penisilin (100U/ml)/ streptomisin (0,1mg/ml) ile kültür flasklarına ekildi. 37°C de, % 5 CO₂'li ve nemli e-tüvde kültüre edildi. Flaskların hücreyle kaplanmasını takiben tiripsin-EDTA (Serva, % 0,025 ve % 0,2) ile hücreler kaldırıldı ve pasaj işlemi yapıldı.

İmmünohistokimyasal boyama: İkinci pasaj hücreleri immünohistokimyasal boyama için kullanıldı. Fare myeloma hücrelerinin füzyonu ile oluşturulmuş olan insan, köpek, tavşan ve fare hücrelerine özgü hSM-V hybridoma kaynaklı monoklonal "anti-myosin" antikoları (Sigma, Mouse IgG1 isotype) ve C-terminal aktin fragmentlerinin immünojen olarak kullanılmasıyla tavşanlardan elde edilen hücrelerine özgü "anti-aktin" antikoları (Sigma) kullanılarak, indirekt immünoperoksidaz yöntemiyle, aktin ve miyozin proteinleri araştırıldı. Peroksidaz aktivitesi 3-amino, 9 etilkarbozol ile gösterildi.

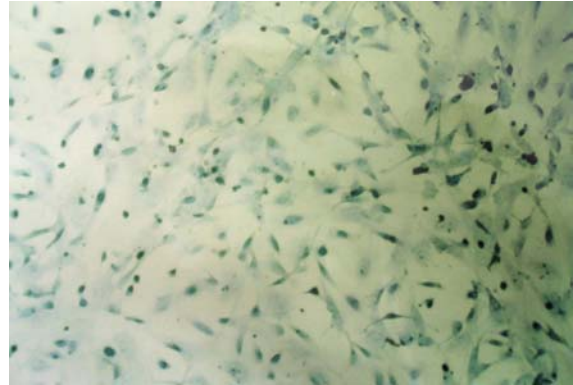
Büyüme kinetikleri: İki hücre popülasyonunun büyüme kinetikleri, popülasyon sayısının ikiye katlanma zamanı (PDT) ve timidinle işaretlenme indeksi (TLI) hesaplanarak karşılaştırıldı. PDT hesaplamak için altı adet kuyucuğu olan plastik kalıplara, herbir kuyucuğa 50.000 hücre olacak şekilde DMEM ile ekim yapıldı. 48. ve 96. saatte erişkin ve fetal hücreler hemositometre ile sayıldı. PDT değeri formülle hesaplandı⁸. TLI değerlerini hesaplamak için hücreler

24 kuyucuklu plastik kalıplara herbir kuyucuğa 50.000 hücre olacak şekilde DMEM ile ekim yapıldı. 48. ve 96. saatlerde lamellere yarım saat önceden 3H-timidin uygulandı ve sentez fazında bulunan hücrelerin DNA'ları işaretlendi. Hazırlanan preparatlara otoradyografi uygulanarak işaretli hücreler sayıldı. Hücreler trypan blue boyanarak canlılık oranları hesaplandı.

Histolojik inceleme: Hücrelerin yapısal özellikleri, canlı ve boyanmamış şekilde diyaframlı ve diyaframsız olarak ışık mikroskobu altında incelendi.

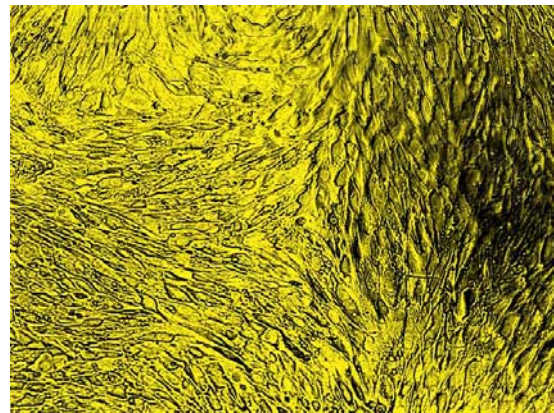
Bulgular

Fetus ve erişkin hücre içeren preparatlar, % 90'ın üzerinde anti-aktin antikoları ve anti-miyozin antikoları (Şekil 1) ile pozitif boyandı. Hücrelerin, nükleusu oval ve santral yerleşimli olan iğ şeklinde tipik düz kas morfolojisi gösterdiği ve flask üzerinde tepe-vadi görünümü ile düzensiz yüzey oluşturdularını izlendi (Şekil 2). Fetal ve erişkin hücrelerin fenotipinde bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 1:

Dokudan üreyen hücrelerin immunohistokimyasal olarak anti-miyozin antikoları ile pozitif boyandığını gösteren resim.



Şekil 2:

Dokudan üreyen hücrelerin ışık mikroskobunda boyanmadan, yeşil diyaframla elde edilen görüntüsü.

Fetal ve Erişkin Özofagus Kas Hücrelerinin Karşılaştırılması

PDT değerleri aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$t_D = \frac{0,693}{\ln\left(\frac{X}{X_0}\right)} \times \Delta t$$

t_D : PDT

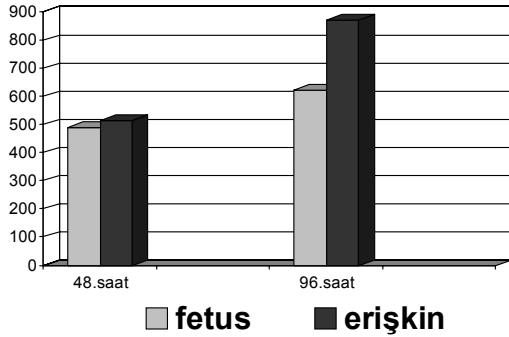
X: İşlem sonu hücre sayısı

X_0 : Başlangıç hücre sayısı

Δt : Toplam süre

Fetal özofagus düz kas hücrelerinin PDT değerleri 148,5 saat, erişkin hücrelerin ise 95,2 saat bulundu. Fetal hücrelerin daha yavaş çoğaldıkları görüldü (Şekil 3).

Kültür sonrası hücre sayısı

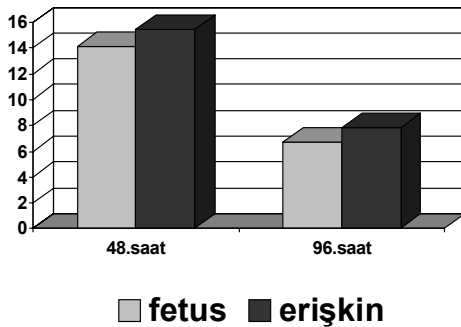


Şekil 3:

Fetal ve erişkin özofagus hücrelerinin 48. ve 96. saatte sayım sonuçları.

TLI oranlarının 48. ve 96. saatte, sırasıyla erişkin hücrelerde 15,4 ve 7,8, fetal hücrelerde ise 14,1 ve 6,7 olarak bulundu (Şekil 4).

TLI değeri (%)



Şekil 4:

Fetal ve erişkin özofagus hücrelerinin TLI değerleri % olarak verilmiştir.

Çalışmalarda hücrelerin canlılık oranlarının % 90'ın üzerinde olduğu tespit edildi.

Tartışma

Günümüz araştırmacıları, hücre kültür tekniklerini kullanarak çeşitli dokuların laboratuarda üretilip karakterize edilmesi ve transplantasyona hazır hale getirilmesi çalışmalarına yönelmişlerdir⁵. Doku mühendisliği olarak adlandırılan bu çalışma alanında, fetal yada erişkin cilt⁶, karaciğer⁷, pankreas⁸ ve mesane⁹ doku örnekleri kültür ortamında çoğaltılarak replasman amacıyla kullanılmıştır.

Özofagusun, tümör, uzun segment atrezi, kostik yanıklar gibi replasman gerekebilecek durumlarda halen gastrointestinal segmentler kullanılmaktadır¹⁰. Bu yapıya alternatif olarak, ototransplantasyona yönelik yapay özofagus segmenti hazırlama çalışmaları deneysel şartlarda hızla devam etmektedir. Bu çalışmalarda çoğunlukla mukoza hücreleri kullanılmıştır. Poliglukolik asit ve kollajen üzerinde fibroblast ve özofagus mukoza epitelini üretilerek yapay özofagus segmenti oluşturulmuştur. Oluşturulan yapı tübülerize edilerek atimik ratlara implante edilmiş ve 14.günde stenoz olmadan tübüler yapının korunduğu gösterilmiştir¹¹. Kollajen yüzeyde kültüre edilen özofagus mukoza hücreleri, atimik ratların latissimus dorsi kası üzerine ekilmiş ve hücrelerin gelişme gösterdikleri tespit edilmiştir¹². Grikscheit ve ark. fetal özofagus dokusundan enzimatik parçalama yoluyla elde ettikleri hücreleri poliglukolik asit polimerleri üzerine ekerek, omentuma sarılı bir özofagus segmenti elde etmişlerdir. Bu segmenti abdominal özofagusa anastomoz yaparak özofagus bütünlüğünün oluştuğunu göstermişlerdir¹³. Yamataka ve ark. ise fetal ratlardan elde ettikleri özofagus segmentini erişkin ratların omentumuna implante etmiş ve burada gelişimini sürdürdüğünü göstermişlerdir¹⁴.

Fonksiyonel yapıyı oluşturan ve rejenerasyonu daha güç olan kas tabakasının kültürü ve fenotipik özelliklerini araştıran çalışmalar daha az sayıdadır. İnsan özofagus düz kas hücrelerinin kültür ortamında, muskarinik reseptör ekspresyonu ve fonksiyonları araştırılmış ve beş alt grup reseptörün ekspresyonu gösterilmiştir¹⁵. Yaptığımız çalışmada, türdeş fetal ve erişkin özofaguslardan izole edilen düz kas hücrelerinin popülasyon kinetikleri ve morfolojik özellikleri incelenmiştir.

İn vitro şartlarda özofagus düz kas hücrelerinin, mesane düz kas hücrelerine benzer, iç şekilli, santral yerleşimli nükleusu olan morfolojik yapı gösterdikleri izlenmiştir¹⁶. Fetus ve erişkin hücrelerde yapısal farklılık saptanamamıştır. Yapılan tripan blue testi ile kültür sonucu elde edilen hücrelerin canlılığının yüksek oranda olduğu gösterilmiştir.

Stromal kontaminasyon, selektif hücre kültürü çalışmalarında günümüzde de sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Dokunun iyi şekilde diseksiyonu ve kültüre edilecek hücreler için uygun besiyerinin se-

çimi, bu güçlüğü aşmak için gereklidir¹⁶. Çalışmamızda preparatların anti-aktin ve anti-miyozin ile yüksek oranda pozitif boyanması, belirgin stromal kontaminasyon olmadığını göstermiştir.

Hücrelerin popülasyon kinetiklerini hesaplamak için sıklıkla PDT ve TLI değerleri kullanılmaktadır. DNA sentez fazındaki (S-fazı) hücrelerin 3H-Timidinle işaretlenerek, işaretlenmemiş hücelere bölümü ile TLI elde edilir. PDT, kültürü yapılan hücrelerin sayıca iki katına ulaşmaları için geçen süreyi standart hale getirerek göstermektedir. Bu değerler üretilecek dokunun kültür şartlarında davranışlarını, istenen doku kitlesi için gereken yaklaşık süreyi ve maliyeti belirlemek için yararlı olabilir.

Çalışmamızda fetal özofagus düz kas hücreleri PDT değerlerinin, erişkinlerden daha yüksek olması bu hücrelerin bu kültür şartlarında daha yavaş çoğaldıklarını göstermektedir. Benzer sonuçlar, aynı ve farklı türler arasında, erişkin ve fetus mesane düz kas hücrelerinin PDT değerlerinde de elde edilmiştir^{17,18}. TLI değerleri ise birbirine yakın bulunmuş ve bu sonuçlar S-fazındaki her hücrenin bölünmeyi tamamladığını düşündürmektedir.

Özofagus kasının hücre kültür çalışmaları, hem kas tabası içeren yapay segment oluşturmaya hem de kas dokusunu ilgilendiren hastalıkların in vitro şartlarda incelenmesine olanak sağlamaktadır. İn vitro koşullarda oluşturulan özofagus dokusunun, iyi gelişmiş bir kas tabakası içermesi, transplantın yapısal ve fonksiyonel adaptasyonunu kolaylaştıracağını düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Stef J, Zboralske FF, Karasek MA. In vitro culture of rabbit esophageal epithelial cells. *Gastroenterology* 1981;81:30-6.
2. Compton CC, Warland G, Nakagawa H, Opitz OG, Rustgi AK. Cellular characterization and successful transfection of serially subcultured normal human esophageal keratinocytes. *J Cell Physiol* 1998;177:274-81.
3. Oda D, Savard CE, Eng L, Sekijima J, Haigh G, Lee SP. Reconstituted human oral and esophageal mucosa in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998;34:46-52.
4. Shimada Y, Imamura M. Prognostic significance of cell culture in carcinoma of the esophagus. *Br J Surg* 1993;80:605-7.
5. Baskin LS, Howard PS, Duckett JW, Snyder HM, Macarak EJ. Bladder smooth muscle cells in culture: I. Identification and characterization. *J Urol* 1993;149:190-3.
6. Korkmaz M, Guvenc BH, Bilir A, Karal-Yilmaz O, Kumbasar A, Caferler J, Baysal K. Isolation and culture of adult and fetus rabbit bladder smooth muscle cell and their interaction with biopolymers. *J Pediatr Surg* 2003;38:21-3.
7. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Ped Surg* 1988;23:3-9.
8. Wang J, Krysiak PS, Laurier LG, Sims SM, Preiksaitis HG. Human esophageal smooth muscle cells express muscarinic receptor subtypes M(1) through M(5). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:1059-69.
9. Yamataka A, Kato Y, Ohshiro K, Miyazaki E, Wang K, Miyano T. Fetal esophageal transplantation in rats: A treatment option for long-gap esophageal atresia. *Journal of Pediatr Surg* 1999;34:1638-40.
10. Grikscheit T, Ochoa ER, Srinivasan A, Gaissert H, Vacanti JP. Tissue-engineered esophagus: Experimental substitution by onlay patch or interposition. *J Thoracic and Cardiovasc Surg* 2003;126:537-44.
11. Sato M, Ando N, Ozawa S, Nagashima A, Kitajima M. A hybrid artificial esophagus using cultured human esophageal epithelial cells. *ASAIO J* 1993;39:554-7.
12. Miki H, Ando N, Ozawa S, Sato M, Hayashi K, Kitajima M. An artificial esophagus constructed of cultured human esophageal epithelial cells, fibroblasts, polyglycolic acid mesh, and collagen. *ASAIO J* 1999;45:502-8.
13. West KW, Vane DW, Grosfeld JL. Esophageal replacement in children: experience with thirty-one cases. *Surgery* 1986;100:751-7.
14. Fauza DO, Fishman SJ, Mehegan K, Atala A. Videofoscopically assisted fetal tissue engineering: Bladder augmentation. *J Pediatr Surg* 1998;33:7-12.
15. Sun AM, O'Shea GM, Goosen MFA. Injectable microencapsulated islet cells as a bioartificial pancreas. *Appl Biochem Biotech* 1984;10:87-91.
16. Takahashi M, Matsue H, Matsushita M, Sato K, Nishikawa M, Koike M, Noto H, Nakajima Y, Uchino J, Komai T. Does a porcine hepatocyte hybrid artificial liver prolong the survival time of anhepatic rabbits? *ASAIO J* 1992;38:472-5.
17. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H. Grafting of burns with culture epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981;1:75-9.
18. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-8.