

T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**YAPAY İNCE BARSAK SEGMENTİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE  
ÜRETİLMESİ VE YAPISAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ:  
ÖN ÇALIŞMA**

**DR. AHMET ALPTEKİN  
TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ERGUN ERDOĞAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL 2011**

## ÖNSÖZ

Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım süresince gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı, yakın geçmişte emekli olan değerli hocam Prof. Dr. Nüvit SARIMURAT ve şu anda desteğini devam ettiren tez hocam Prof. Dr. Ergun ERDOĞAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca engin bilgi ve görgülerinden yararlandığım başta önceki Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. S. N. Cenk BÜYÜKÜNAL ve şu anki Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Haluk EMİR olmak üzere, değerli öğretim üyeleri Rektör Prof.Dr.Yunus SÖYLET, Prof. Dr. Osman Faruk ŞENYÜZ, Prof. Dr. Sinan CELAYİR, Prof. Dr. Gonca TEKANT'a , ayrıca gece gündüz yılmadan bizlerin iyi bir cerrah olarak yetişmesi için var gücüyle çalışan değerli ağabeyim Doç. Dr. Mehmet ELİÇEVİK'e ve de baş asistanlarım değerli ablam Op. Dr. Rahşan ÖZCAN ile değerli ağabeyim Op. Dr. Şenol EMRE'ye teşekkür ederim

Deney aşaması boyunca ortaklaşa çalıştığımız Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi sayın Burcu BİLTEKİN ve doku kültürü aşamasında bizimle birlikte olan Genetik Araştırma Laboratuvarı Müdürü sayın Uzm. Dr. Özdal ETLİK, Uzm. Biyolog Ramazan ÇELİK ile tüm emeği geçen laboratuvar çalışanlarına, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve deneyimlerimden yaralandığım kıymetli ağabeyim Op.Dr. Mevlit KORKMAZ'a teşekkürü borç bilirim.

Son olarak uzmanlık eğitimim boyunca maddi manevi desteğini hiç eksik etmeyen, hep yanımda olan canım aileme ve klinikte birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, hemşire arkadaşlarıma ve tüm personele ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

**Ahmet ALPTEKİN**

## KISALTMALAR

PGA	: Polyglycolic asid
PLA	: Polylactic asid
PLGA	: Polylactic-co-glycolic asid
DMEM	: Dulbecco's Modifiye Eagl Medium
DMEM-F12	: Dulbecco's Modifiye Eagl Medium + %10 İnaktive FSS
FSS	: Fetal Sığır Serumu
BrdU	: Bromodeoxyuridine
FBS	: Fosfat Buffer Saline, Dengeli fosfat-tuz çözelisi
Chang	: L-Glutamine, FSS , Gentamicin
Hank's	: Dengeli tuz çözeltilisi + serum fizyolojik karışımı solüsyon

# İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ
2. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI
  - 2.1 DOKU MÜHENDİSLİĞİ
  - 2.2 DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE BİYOMATERYALLER
  - 2.3 HÜCRE BESİYERLERİ
  - 2.4. HÜCRE KÜLTÜRÜ
  - 2.5 HÜCRE-POLİMER KOMPLEKSİNİN OLUŞTURULMASI
  - 2.6 İMMÜNHİSTOKİMYASAL BOYAMA
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER
4. BULGULAR
5. TARTIŞMA
6. SONUÇ
7. KAYNAKLAR
8. ÖZET
9. SUMMARY

## 1. GİRİŞ

Total ince bağırsak uzunluğunun %70'inin kaybı masif barsak rezeksiyonudur ve bunun sonucu ortaya çıkan malabsorbsiyon durumu ise kısa bağırsak sendromu (KBS) olarak tanımlanır. KBS özellikle yenidoğan döneminde en sık malrotasyon-volvulus, gastroşizis, intestinal atrezi, nekrotizan enterokolit nedeni ile uygulanan masif bağırsak rezeksiyonları sonrası ortaya çıkar.

Yenidoğanın yaklaşık 200 cm kadar ince bağırsağa sahip olduğu kabul edilmektedir. Hayatın devam ettirilebilmesi için gerekli olan en az bağırsak uzunluğunun sınırı kesin olarak belli değildir. Ancak yenidoğanda ileoçekal valvin sağlam olduğu durumlarda 30 cm'den daha az; ileoçekal valvin olmadığı durumlarda 45 cm'den daha az barsak uzunluğunun varlığında enteral beslenme ile hayatı sürdürmek mümkün değildir. İleoçekal valv transit zamanını uzatır ve yukarıya doğru bakteri kontaminasyonunu ve translokasyonunu engeller. Ayrıca ileumun fonksiyonel kapasitesi jejunumdan daha büyük olduğu için ileum, proksimal barsak kayıplarını daha iyi tolere edebilir.

Klasik olarak bu sendromun ortaya çıkması için ince bağırsak uzunluğunun %70 kadarının kaybının gerekli olduğu düşünülmektedir. KBS olgularının % 50 'sinde sebep nekrotizan enterokolittir. KBS da bağırsak yüzeyini artırıcı farklı cerrahi metodlar vardır, bunlar;

**Plikasyon:** Barsak duvarının inversiyonudur. Barsak akımını düzeltirken absorbtif mukozayı korur ve yüzeyi artırır. Obstruksiyon ve dismotilite bazen plikasyonda devam edebilir. (37)

**Nipple valv:** İntestinal transiti uzatmak için Nipple Valv kullanılabilir. Nipple valv, daha çok Brooke ileostomi gibi yapılır ve enterokolostomiye yerleştirilir. (37)

Böylece proksimal dilatasyon ve mukozal kütlede artış sağlanmaktadır. Fakat Nipple valv ile 8 cm barsak harcanır. Bu nedenle prostetik (protez) Nipple valvler kullanılmaktadır. Protez valvler sadece 2 – 3 cm barsak kullanılırlar. İnce barsak valvlerinin intestinal transiti yavaşlatıp, besinler ve mukozanın temas süresini arttırmaları nedeniyle mukozal adaptasyonu stimüle ettiği kabul edilir.

**Bianchi'nin İntestinal Doubling tekniği:** 1980 de yayınlandı. Bu prosedürde mezenterik damarların ekstramural branşları kullanılarak her iki ince barsak segmentinin kan akımı sağlanmaktadır. Barsak longitudinal olarak bölünür. Böylece barsak uzunluğu 2 katına çıkar. Bianchi prosedüründen hemen sonra emilimin artmasının nedeni, uzatılan ince barsaktaki motilitenin artmasıdır. Mukozal kütle hemen artmaz. 6 – 9 ay sonra mukozal kütle artar ve barsak progresif olarak dilate olur. (38)

**Kimura ve Soper:** Transvers barsak uzatma yöntemini tarif etmişlerdir. Burada, barsağın antimezenterik kısmının kan akımı parazite edilerek karaciğerden yada karın duvarından olması sağlanır. Parazite edilen kan akımı yeterli olduktan sonra barsak transvers olarak bölünmektedir. (39)

Bu ön çalışmamızın amacı yapay ince barsak segmentinin doku kültüründe üretilmesi ve yapısının değerlendirilmesidir. Daha sonra yapılması düşünülen ikinci aşamada ise üretilen bu ince barsak segmentinin kısa barsak sendromu oluşturulan hayvanlara reimplantasyonu ve fonksiyonel olarak değerlendirilmesi planlanmaktadır.

## 2. DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Son zamanlarda doku mühendisliği tekniklerinin gelişimi ile yapay ince barsak segmentinin oluşturulmasına yönelik çalışmalar dikkati çekmektedir. 1900' lü yıllarda başlayan doku ve organ kültürü çalışmaları, 1980 li yıllarda yapay cildin üretilerek yanıklarda kullanılmaya başlanmasıyla, son 20 yılda çok büyük aşamalar katetmiştir. Doku mühendisliği interdisipliner bir bilim dalı haline gelmiştir.(1,2,4,9)

**2.1. Doku Mühendisliği** Eğer bir doku yetersizliği varsa hastanın normal dokusundan bu eksiklik giderilebilir. Bu basit düşünceden dolayı doku mühendisliği ilgi çekici bir bilim dalı olmuştur. Aslında doku mühendisliği çok yeni değildir. 1900 lerin başlarında Alexis Carrel tarafından bugünün doku mühendisliğinin başlangıcını oluşturacak çalışmalar yapılmıştır.(12,15) Daha sonra Charles Lindbergh, Carrel' in öncülüğünde devam etmiştir. Rockefeller Enstitüsünde Newyork' ta invitro canlı doku ve organ elde etmek amacıyla çalışmışlardır. (15,17) 1980 lerin başında yapay cildin hastalarda kullanımı ile doku mühendisliği interdisipliner bir çalışma alanı olmuştur.

Doku mühendisliğinde kullanılacak hücreler, donörün kendisinden elde edilmiş olup, bunlar bireyin kendisinde direkt aynı bölgede implante edilmiş yada kültür ortamında çoğaltılıp geliştirilmiş, destek matriks içinde yerleştirilmiş ve ekspansiyon ( çoğaltılma ) sonrası reimplante edilmiş olmalıdır.

İmplante edilmiş olan doku heterolog, allogenic veya otolog olabilir. İdeal olan bu yaklaşımın kaybedilen doku fonksiyonunu tamamen yerine koyabilmesi ve sınırlı komplikasyona yol açmasıdır.

## 2.2. Doku Mühendisliğinde Biyomateryaller

Biyomateryaller bir hücre bağlantı maddesidir. Hücrelerin geniş dağılımını ve vücutta istenilen alanlarda etkili olmasını sağlayabilmektedir. Biyomateryaller hazırlanmış dokuya klavuz olurlar ve in vivo yapılara karşı mekanik destek sağlarlar. Böylece üretilen doku, gelişimi sırasında istenilen yapıyı sürdürür. Biyomateryaller hücrel fonksiyonları düzenleyen hücrel adhezyon peptidleri ve büyüme faktörleri gibi biyoaktif sinyaller içerebilirler. Bu fonksiyon tamamen araştırmacının arzusu doğrultusunda bu materyellere dışarıdan eklenen maddelerle ilgilidir. Biyomateryalin seçimi ve düzenlenmesi planlanmış doku yapısının gelişmesinde önemlidir.(9)

İdeal biyomateryal biyouyumlu olmalı, hücrel etkileşimi ve doku gelişimini desteklemelidir. Seçilen biyomateryalin biyoçözünürlüğü ve biyoemilimi olmalı, ürünün çözünmesi inflamasyonu ve toksisiteyi provoke etmemeli ve vücuttan metabolik yollarla atılabilmelidir.

Doku mühendisliğinde 3 çeşit biyomateryal bulunmaktadır.

a)Doğal yoldan elde edilen materyaller

b)Asellüler doku matriksleri : Mesane submukozası ve ince barsak submukozası

c)Sentetik polimerler : Polyglycolic asid ( PGA ), polylactic asid ( PLA),  
polylactic-co-glycolic asid ( PLGA ).

Sentetik polimerler çok miktarda üretilerek gerilim özellikleri, çözülme hızları ve mikro yapıları kontrol edilmiştir.

Kollajen, bu materyeller arasında insan vücudunda yapısal olarak en yoğun bulunan proteindir. İnsan ya da hayvan dokularından elde edilebilir. Kollajen implantlar birbirini izleyen lizizomal enzim ataklarıyla çözünür. İn vivo rezorbsiyon oranı implantın dansitesi ve intermoleküler bağlantılarının derecesiyle düzenlenir. Daha düşük dansite, büyük interstisyel alan ve hücrel infiltrasyon için genellikle



genişçe porların olduğu durumlarda, implantların yüksek oranda çözünmeleri mümkün olur.

Alginat, yosunlardan elde edilen bir polisakkarittir. Hücresel enjeksiyon aracı ve hücresel immobilizasyon matriksi olarak kullanılmıştır. Alginat nispeten biyouyumlu ve insanda yara kapatıcı materyal olarak FDA onaylıdır. Alginate L-guluronat ve D-mannuronatın kopolimerlerinin ailesindedir.

Alginat jelin fiziksel ve mekanik özellikleri, alginat zincirlerinin polyguluronate bloklarının uzunluğu ve oranı ile doğru orantılıdır .

Asellüler doku matrikslerinin kollajenden zengin olanlarının hazırlanması, dokudan sellüler komponentin alınması ile olur. Matriksler sıklıkla dokunun bir bölümünün mekanik ve kimyasal manipülasyonu ile elde edilir.

Matriks ve implante edilen hücreler biraraya getirildiklerinde aralarında bir ilişki oluşur ve bu ilişki sayesinde doku şekillenmesi olur. (8,13,27)

Doğal alfa hidroksi asitlerden oluşan polyesterler, PGA' nın yanısıra, PLA ve PLGA içerebilirler ve doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılırlar. Bu polimerlerin ester bağları hidrolitik olarak labildir ve enzimatik olmayan hidrolizle çözünürler . PGA, PLA ve PLGA' nın çözünme sonrası ürünleri nontoksiktir ve doğal metabolitleri vücuttan tamamen karbondioksit ve su olarak atılır.

Bu polimerler ısıyla şekillenebilir. Çeşitli tekniklerle mikroyapıları, kabaca görünüşleri ve boyutları şekillendirilerek üç boyutlu yapılar haline kolayca getirilebilir. Doku mühendisliğinde birçok durumda, özellikle yüzey alanı geniş ve gözenekli yapılara ihtiyaç duyulmaktadır. Polianhidrid ve poli orto-esterler gibi biyo çözünürlüğü olan diğer polimerler de doku mühendisliğinde kullanılabilir.(21,25,34)

## 2.3 Hücre Besiyerleri ve Solüsyonlar

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici solusyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar.

Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir. Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır. Standart bir besiyerinde yukarıdaki bileşenlerin sağlanması için temel solüsyonlar ve besiyerleri kullanılır.

### 1) Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) Besiyeri

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır. Kendi ismini taşıyan Minimum Eagle's Medium (MEM) isimli besiyeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solusyonu bugün somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir.

DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukoza, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir.

**DMEM- F 12** Besiyeri (Dulbecco'nun Modifiye Eagl Besiyeri, besleyici karışım F12)

Ek olarak: Hücreler için inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FSS), 100 µg/ml streptomisin, 100 IU/ml penisillin içerir.

## **2) Fetal Bovine Serum**

Serum hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltisidir. Bu protein çözeltisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunur. Hücre çeşidine ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10 'dur.

Serum üretimi pahalı ve zahmetli bir süreçtir. Sığır embriyolarının kanlarının toplanmasıyla hazırlanan serumların üretiminde bir standart yoktur. Farklı hayvanlardan elde edilen serumlar birbirlerinden farklılık gösterirler. Bu da deneylerin sonuçlarını etkilemektedir. Bu dezavantajlarından dolayı bazı laboratuvarlar serumsuz besiyerlerini kullanmaktadırlar. Serum kullanılmayan bir besiyerinin çeşitli büyüme ve tutunma faktörleriyle desteklenmesi gerekir, bu da çalışmaya göre serumdan daha pahalı olabilir.

## **3) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS) Solüsyon:**

Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solusyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. pHı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

#### 4) Tripsin

Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, serin proteaz tipi bir enzimdir, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkar. Laboratuvarımızda %0,25 EDTA'lı tripsin solusyonu kullanılmaktadır.

Tripsin kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar şunlardır:

- 1) -20 °C'de saklanır, daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsinin aktivitesi düşer, bu yüzden oligotlanarak saklanması en uygundur.
  - 2) Serum tripsin inhibitörlerini içerir, hücrelere tripsin uygulanmadan önce mutlaka bir kere Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanmalı ve serum uzaklaştırılmalıdır.
  - 3) Tripsin hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanır. Laboratuvarımızda 100 mm 'lik petripler için 2 ml; 60 mm için 1ml; 35 mm için 0,5 ml tripsin uygulanır.
  - 4) Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre de konduklarında daha çabuk yüzeylerden ayrılırlar.
  - 5) Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin ile hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlar.
  - 6) Hücrelerin yüzeylerden ayrılma hızı değişebilir. Besiyerindeki serum oranı, hücre tipi, petrideki hücre yoğunluğu, tripsinin aktivitesi ve son pasaj üzerinden geçen zamana göre hücreler farklı zamanlarda kalkarlar.
  - 7) Farklı şişelerdeki tripsinler birbirlerine her zaman eş değer olmayabilir.
  - 8) Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FCS 'li besiyeri uygulanmalıdır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar.
- 5) BrdU:** BrdU : 5-Bromo-2 deoxyüridin. İşaretleme antikoru. Reaksiyona girmeyen ancak reaksiyon sonrası işaretli hücrelerde canlılığı göstermek için kullanılır.
- 6) Chang Medyum:** Hücre besi yeri zenginleştirme solüsyonudur. L-Glutamine, Fetal Bovine Serum , Gentamicin 35 mg/mL, Phenol Red 5 µg/mL içermektedir.

## 2.4. Hücre Kültürü

Doğrudan dokudan elde edilen hücre kültürlerine primer hücre kültürleri denir. Primer kültürler elde edildiklerinde dokunun özelliklerini taşırlar. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler, hücre hatları gibi tek tip hücreler değildirler. Primer hücre kültürleri küçük doku parçalarının petri yüzeylerine ekilmesiyle eksplant kültürler halinde ya da enzimatik uygulanmasıyla tek hücre süspansiyonu halinde yapılabilir.

Laboratuvarımızda çoğunlukla kulak dokusundan fibroblast ve kıkırdak primer kültürleri yapılmaktadır. Primer kültürler kontaminasyon riski olan kültürlerdir, bu nedenle çalışmalarda steriliteye özen gösterilmelidir. Kullanılan cerrahi malzemeler sterilize olmalıdır. Tüm işlemler laminar kabin içinde yapılmalıdır.

Kültür besiyeri olarak,

DMEM-F12 Hams 100cc

Fetal sığır serumu (FSS) 10cc

Penisilin / Streptomisin karışımı 1cc

Amfoterisin-B 1cc , L-glutamin 2cc karışımı kullanılır.

Herbiri yaklaşık 1cm<sup>2</sup> olan ince barsak doku örnekleri, bistüri yardımıyla 1cc besiyeri içeren petri kutusu içinde mekanik yolla parçalanarak besiyeri içindeki doku parçaları santrifüj edilir ve üst kısım atılır ve besiyeri ilave edilerek pipet ile karıştırılarak homojen karışım elde edilir.

Hücre kültürü 37 °C de, %5 CO<sub>2</sub> hava karışımında ve %95 oranında nem içeren inkübatörde inkübe edilir..Hücreler tüm besiyerini kapladığında (14-18 gün) ortama BrdU ilave edilerek 24 saat inkübe edilir. Hücreler besiyerlerinden 15 ml' lik santrifüj tüplerine aktararak 3 dk 1500 rpm'de santrifüj edilip, besiyeri tripsin karışımı ayrılarak hücrelerin süspansiyon haline gelmesi sağlanır.

## **2.5. Hücre-polimer Kompleksinin Oluşturulması**

Çalışmada kullanılacak PGA ( Poly-glycolic acid ) biyopolimerleri 1x1.5 cm boyutlarında kesilerek etilen oksit ile sterile edilir. Daha sonra süspansiyon halindeki hücreler sayılarak her polimer üzerine ayrı ayrı ekim yapılır.

## **2.6. İmmünhistokimyasal boyama**

Kesitlerin Parafinden Ayrılması; Toluol 15 dkx2; %100 etanol 5 dkx2, %96 etanol 5 dkx2, %90 etanol 5 dkx2, %70 etanol 5 dkx2, saf su 5dk. PBS ( Fosfat buffer saline) 10 dk bekletilir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' de 5 dk karanlık odada bekletilir. Saf su ile 3 kez yıkanarak Tripsin içinde 30 dk 37 °C etüvde bekletilir. PBS ile yıkama işlemi yapılıp substrat-kromojende ( AEC Substrate System ) 15 dk bekletilerek ve distile su ile yıkanıp Hematoksilen ile zemin boyası yapılır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Deney hayvanı olarak,12 adet erişkin dişi Yeni Zelanda türü tavşan, 6 tane çalışma grubu ve 6 tane kontrol grubu olmak üzere ayrıldı. Tüm cerrahi işlemler intramüsküler ketamin (25mg/kg) ve xylazine (5mg/kg) anestezisi altında yapıldı. Cerrahi işlemler sırasında profilaktik intramüsküler 50 mg/kg seftriakson yapıldı. 4-0 ve 5-0 prolon dikiş ve 3-0, 4-0 ve 5-0 vicryl dikiş kullanıldı.

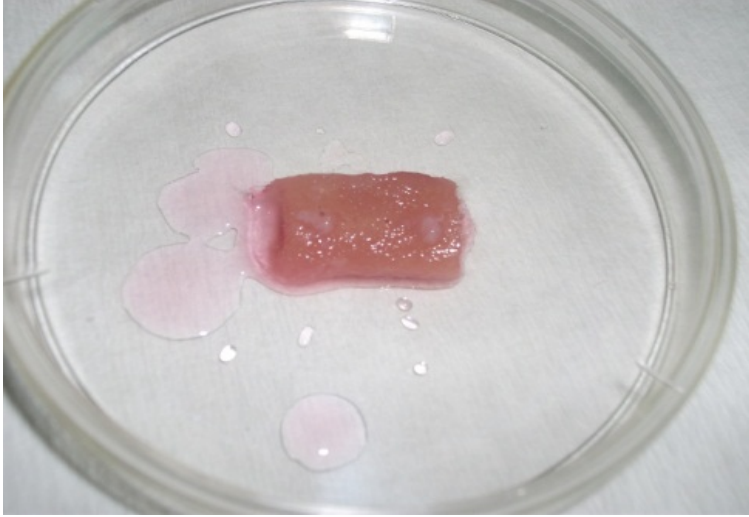
Kültür ve histopatolojik inceleme aşamasında; Hank's dengeli solüsyonu, DMEM, Fetal sığır serumu, Tübüler örgülenmemiş PGA/PLGA polimerler,Dispaz ve kollagenaz tip 1 ile Hematoksilen-esoizin, PAS ve Masson's trikrom boyalar kullanıldı.

**Deney hayvanları:** 12 adet erişkin dişi Yeni Zelanda türü tavşan parça alma ve tekrar implantasyon amacıyla kullanıldı. Tüm cerrahi işlemler intramüsküler ketamin (25mg/kg) ve xylazine (5mg/kg) anestezisi altında yapıldı. Cerrahi işlemler sırasında profilaktik intramüsküler 50 mg/kg seftriakson yapıldı.

**Biyopolimerler:** Biyolojik emilebilir poliglolik ve laktik asit (90/10) polimerlerinden oluşan 2cm uzunluğunda, 5mm iç ve 9mm dış çapı olan tüpler kullanıldı. Polimerler etilen oksitle sterilize edildikten sonra % 0,1 kollajen solüsyonunda 1 saat tutularak kollajenle kaplandı.



**Resim 2:** Biyopolimer iskelet materyali,sterilize edilmiş

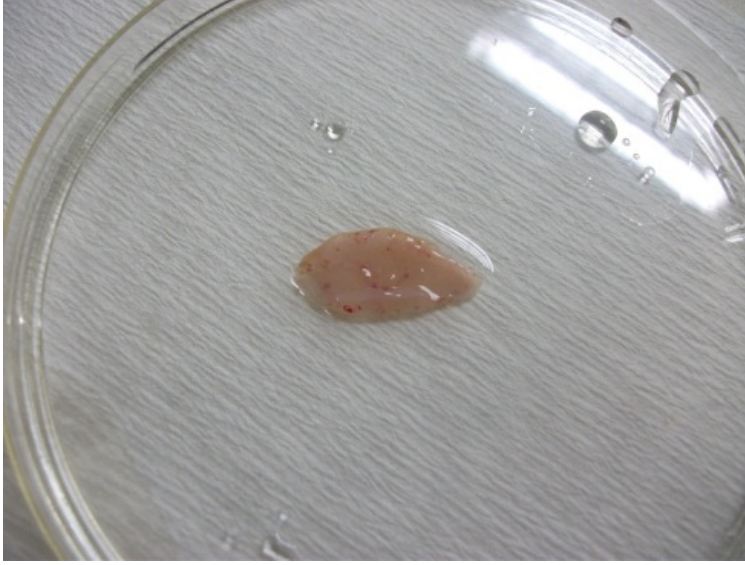


**Resim 3:** Hank's dengeli solüsyondan geçirilmiş biyopolimer materyali



**Organoid ünite izolasyonu ve polimer üzerine ekimi:** İleumdan 10x5mm boyutlarında tam kat biyopsi alınıp Hank's dengeli solüsyonunda birkaç defa yıkandı.

(Resim 2 ve 3)



**Resim 4:** Omentum biyopsi materyali, enzimatik reaksiyona girmemiş

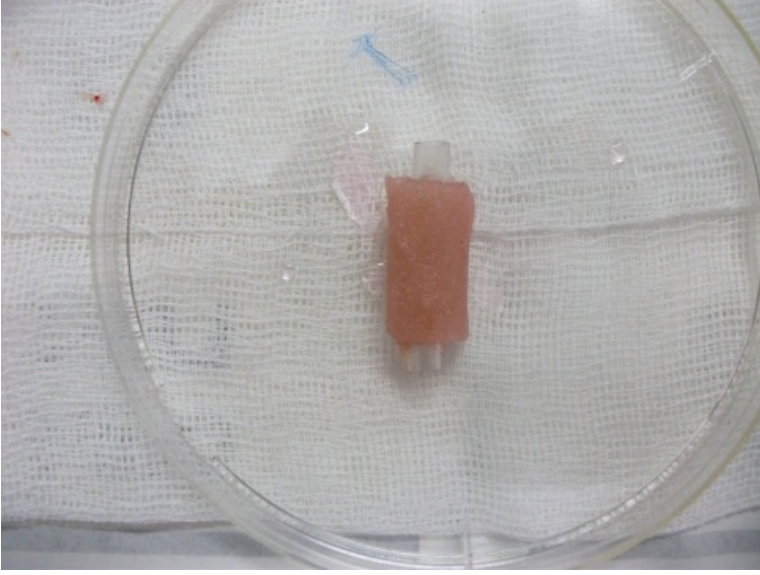
Doku bistüri yardımı ile 2x2mm lik parçalara ayrıldı. Doku parçaları dispaz ve kollajenaz tip I içeren orbital karıştırıcı içinde 37<sup>0</sup>C de 30 dakika bekletilerek enzimatik parçalanma sağlandı.. Süre bitiminde solüsyon 3 defa DMEM besiyeri ile yıkanarak enzimatik aktivite sonlandırıldı. Hücre solüsyonu 5 dakika 150 g de satrifüj edilerek süpernatant atıldı. Çökelti halindeki hücreler DMEM ve %10 FCS ile süspanse edilip pipet yardımıyla polimer tüpün iç yüzeyine yayıldı ve 37<sup>0</sup>C de inkübatör içinde 2 saat bekletilerek hücrelerin polimer liflerine tutunması sağlandı.



**Resim 6:** Biyopolimer üzerine ekim işlemi



**Resim 7:** Ekimi tamamlanmış tübularize biyopolimer ve lümen içi

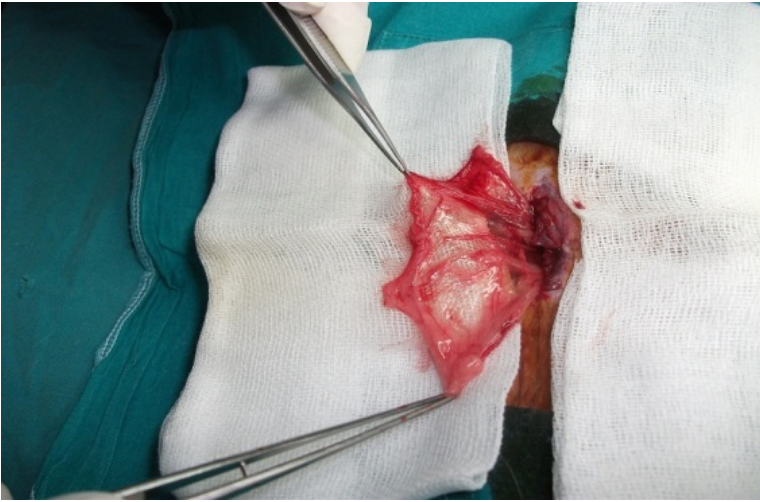


**Resim 8:** Biyopolimer içinden geçirilen lümen koruyucu tüp

**Omentuma implantasyon:** Tavşanlara laparotomi yapılarak omentum bulundu ve damardan zengin omentum bölümünün içine hücre-polimer tüpler sarılarak implante edildi ve 5-0 prolen dikişle tespit edildi. (Resim 9,10) Hücre içermeyen tüpler kontrol grubu olarak implante edildi. İmplantaların yarısı 4 hafta sonra eksize edilerek longitudinal açıldı ve histolojik olarak incelendi.



**Resim 9:** Laparotomi ile alınan ince barsak biyopsi materyalinin, implante edileceği damardan zengin omentum kısmının belirlenmesi



**Resim 10:** Damardan zengin omentum bölümünün yayılmış hali



**Resim 11:** Biyopsi materyalinin omentuma gömülme hazırlığı

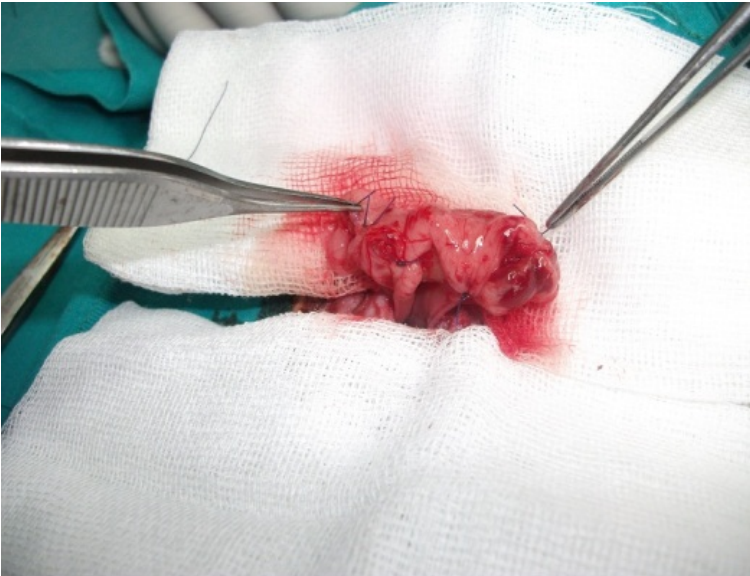


**Resim 12:** Biyopsinin omentuma implantasyonu





**Resim 13:** Omentuma paketlenmiş ince barsak biyopsi materyali



**Resim 14:** İmplantayonun tamamlanmış hali

### **Histolojik ve immunhistokimyasal inceleme:**

Alınan doku örnekleri 3 defa CMFPBS ile yıkandı. Dispase (0,25 mg/ml) ve kollagenaz (800 U/ml) karışımında sallayıcı sıcak su banyosunda, 37° C'de 45 dakika bırakılarak enzimatik parçalanma işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda elde edilen karışım 3 defa DMEM-F12 besiyeri ile yıkanarak enzimatik işlemin sonlandırılması sağlandı. Hücre solüsyonu 5 dakika 150 g de satrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan sonra hücreler %10 FCS içeren DMEM-F12 besiyeri ile pipet yardımıyla karıştırılarak polimer tüpün iç yüzeyine yayıldı. Polimer 4° C'de 1 saat bekletildi ve hücrelerin polimer liflerine tutunması sağlandı.

Alınan BrdU işaretli doku örneğinden rutin takip aşamaları ve parafine gömme işleminin ardından 5µ'luk kesitler alındı. Alınan kesitler Anti BrdU antikoruna kullanılarak immunhistokimya boyama işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda sentez fazında olan BrdU pozitif işaretlenmiş hücrelerin varlığı ışık mikroskopik olarak saptandı ve fotoğraflandı. (Resim 15)

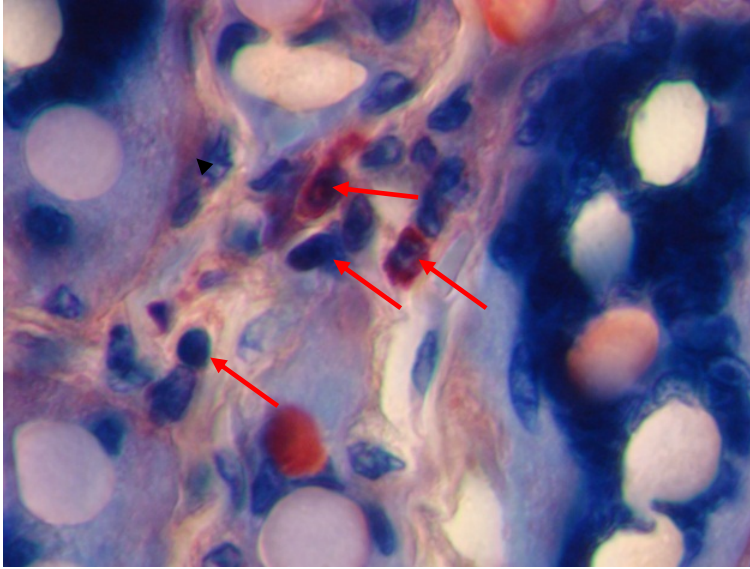
Formaldehitte tespit edilen dokular rutin histolojik takip aşamalarından sonra parafin blok haline getirildi ve bloklardan 5µ'luk kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen-Eosin ve Masson ile boyanarak ışık mikroskopik düzeyde yapısal özellikleri incelendi, fotoğrafları çekildi. (Resim 16, 17, 18)

İmmünohistokimyasal inceleme için alınan doku örneklerinden elde edilen hücre solüsyonu –besiyeri karışımı polimer üzerine yayma işleminden önce 1 saat BrdU ile sallayıcı sıcak su banyosunda, 37° C'de inkübe edildi. Sonrasında BrdU (bromodeoksiürüdin) ile işaretlenmiş hücrelerin bulunduğu solüsyon polimer tüp iç

yüzeyine yayıldı. Polimer 4° C'de 1 saat bekletildi ve hücrelerin polimer liflerine tutunması sağlandı.

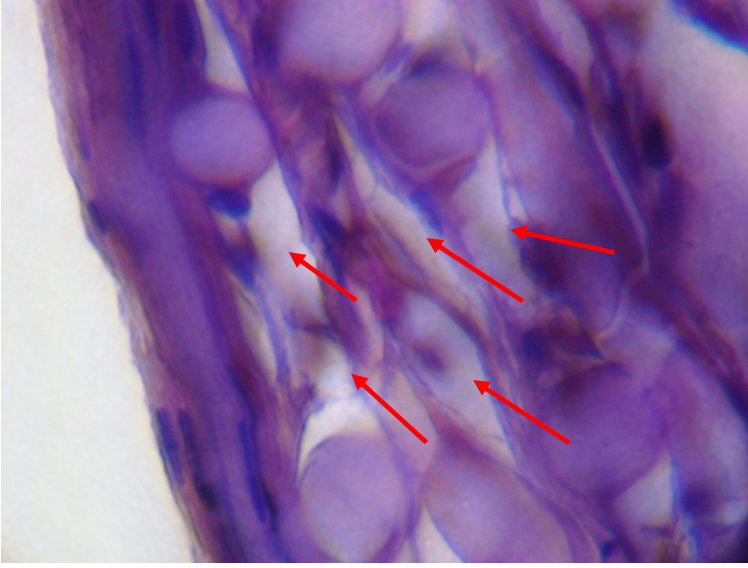
Enzimatik sindirim yapıldıktan sonra 3 defa besiyeri ile yıkanan hücreler pipet ile karıştırılarak içlerinde 5 ml %10 FCS içeren DMEM-F12 besiyerine ekilerek primer kültür işlemi gerçekleştirildi. Ekilen hücrelere 2 gün hiçbir işlem uygulanmadan ekildikleri flaska (kültür kabına) tutunmaları sağlandı. Flaska tutunma işlemi gerçekleştirildikten sonra uygun zamanlarda besiyeri değiştirilerek hücreler için gerekli üreme ortamının sürekliliği sağlandı. Hücreler semikonfluent hale geldiklerinde pasajlama ile yeni kültür kaplarına ekildi bu sırada üreyen hücrelerin fotoğrafları çekildi.

Yeterli miktarda hücre elde edildikten sonra hücreler tripsinle toplanarak falkon tüplerine alındı. Yayma preparat haline getirilen hücreler Hematoksilen-Eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskopunda fotoğraflandırıldı.

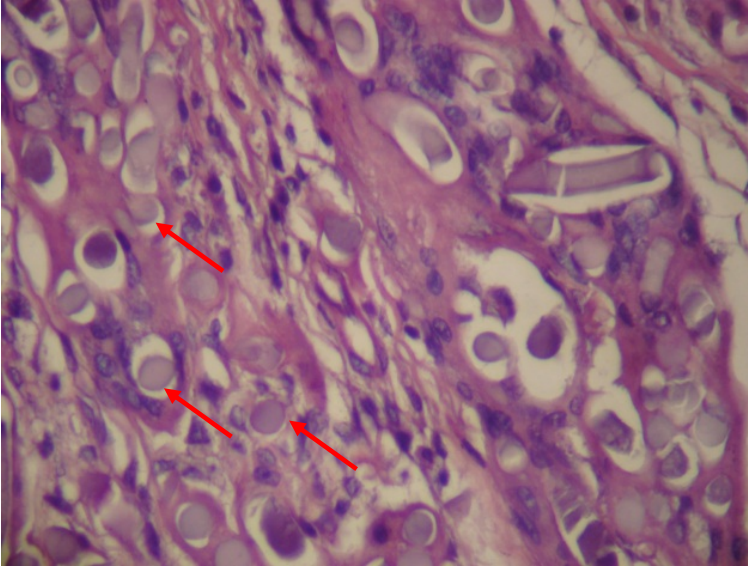


**Resim 15:** Mavi nükleuslu bağ doku hücreleri, BrdU(-) , kırmızı nükleuslu hücreler BrdU(+) işaretlenmiş olarak bulundu.

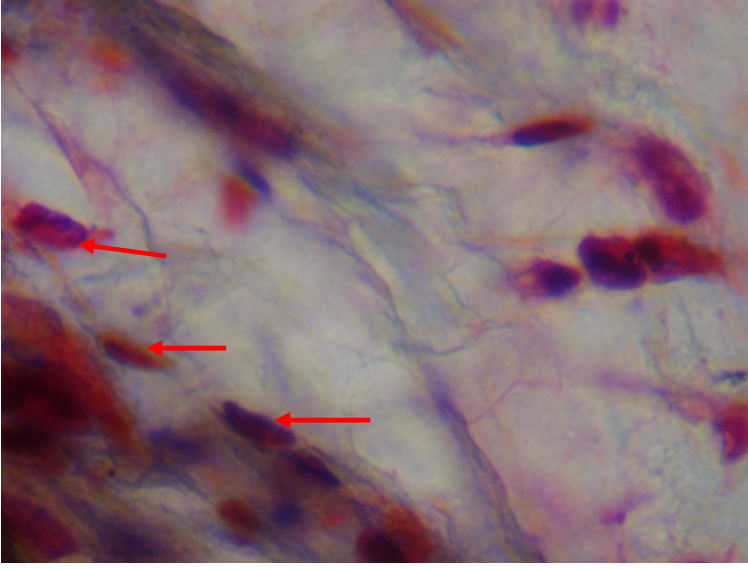




**Resim 16:** Tübularize lümen etrafında lifler arası artmış bağ doku ve epitel hücreleri, polimere tutunan hücreleri göstermektedir.



**Resim 17:** Zengin bağ doku lifleri arasına barsak epitelinin girmiş olduğu ve bağ doku hücrelerinin çekirdeklerinin gözlemlendiği görüntü



**Resim 18:** Mason boyama ile bol miktarda zengin bağ doku lifleri ve bağ doku hücresi arasında epitel hücreleri

### Hücre Kültürü Aşaması

Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür petrilерinin yüzeyini tamamen kaplamış olmalıdır. Böyle petrilere 'konfluent petrilер' denir. Konfluent petrilерin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanır, PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir. Farklı hücre tiplerinin tripsine duyarlılığı farklıdır. Bu yüzden tripsin uygulanan hücrelerden bazıları 5 dakikadan daha az sürede petri yüzeyinden ayrılabilir. Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Tüpe 2-3 ml daha medyum ilave edilir. Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000-1500 rpm 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır. Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılır ve sayılırlar ve petrilere ekimler yapılır.

Hücre sayılarının hesaplanması; 1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 mikrolitre alınarak ependorf tüpe konur ve üzerine 90 mikrolitre Tripan Blue boyası konarak karıştırılır. Bu karışım Toma lamına konur, toma lamından 5 bölme sayılır, bulunan sayı sulandırma miktarı x50.000 sayısı ile çarpılır. Sonuç olarak 1 ml medyumda kaç milyon hücre olduğu bulunur. Ekim yapılacak sayı belirlenip hücrelerin petriye ekimleri yapılır.

24 kuyuluk kültür kabınının her kuyusuna 125 bin hücre transfer edilmelidir.

Bunun için hücre kültür kabı sayılır ve 500.000 hücre/ml olacak şekilde dilue edilir.

Çalışmamızda;

1. Tavşan bağırsak doku parçaları petriye alındı.
2. Doku parçaları eşit miktarlarda 4 petriye bölündü.
3. Doku parçaları makas yardımıyla parçalandı.
4. I. Flask: Doku parçaları üzerine 4 ml DMEM-F12 medyum eklenerek enjektör içerisine çekildi.  
II. Flask: Doku parçaları üzerine 100 mikrolitre PSA ve 4 ml D-F12 medyum eklenerek enjektör içerisine çekildi.  
III. Flask: Doku parçaları üzerine 100 mikrolitre penisilin, streptomisin, amfoterisin (PSA) ve 4 ml Chang medyum D eklenerek enjektör içerisine çekildi.  
IV. Flask: Doku parçaları üzerine 100 mikrolitre PSA ve 4 ml Chang medyum eklenerek enjektör içerisine çekildi.
5. Flasklar 37°C %5 CO<sub>2</sub> koşulları altında hücrelerin çoğalması için etüve alındı.
6. I. Kontrol : Her bir flask mikroskop altında gözlemlenerek hücre tutunmaları değerlendirildi. DMEM-F12 medyum ile ekim yapılan I.Flaskda birkaç hücre dışında

tutunma olmadığı gözlemlendi. Besleme işlemi yapılmadı. Chang medyum ile ekimi yapılan II-III. Flaskta 14-15 ve IV. Flaskta ise 35-40 arası koloni oluşumu tespit edildi. Bu flasklaraa birer pasaj yapılarak iki yedek flask daha oluşturuldu.

7. II. Kontrol : Her bir flask 4 ml Chang medyum ile beslendi.

Doku parçalarına 100 mikrolitre penisilin, streptomisin, amfoterisin (PSA) ve 4 ml Chang medyum-D eklenerek,Flasklar 37°C %5 CO<sub>2</sub> koşulları altında hücrelerin çoğalması için etüve alındı.

### **İmmünohistokimya Boyama Aşamaları:**

Kesitler 56°C'lik etüvde bir gece bekletildi.

Deparafinize edildi.

2x10 dk toluol , 2x5 dk % 100 alkol, 2x5 dk % 96 alkol, 2x5 dk % 90 alkol, 2x5 dk % 70 alkol, Distile su 5 dk, % 0,5'lik H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 30 dk tutuldu.PBS ile çalkalandı.

Tripsin ile 37 °C'de etüvde 30 dk bekletildi. Distile su ile çalkalandı.

4 N HCl ile 37 °C'de etüvde 30 dk bekletildi. Distile suda çalkalandı.

Non-spesifik blokta 10 dk ve Primer antikorda 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

2 defa PBS ile yıkandı. Biotinylated goat anti Mouse 30 dk bekletildi. 2 defa PBS ile yıkandı. Streptavidin peroxidase 30 dk, 2 defa PBS ile yıkandı.

Chromogen 11 dk oda ısısında ve karanlıkta bekletildi. Distile su ile çalkalandı.

Mayer hematoksilen ile 7 dk boyama yapıldı. Ultramount kapatıcı ile preparatlar kapatıldı.

#### 4. BULGULAR

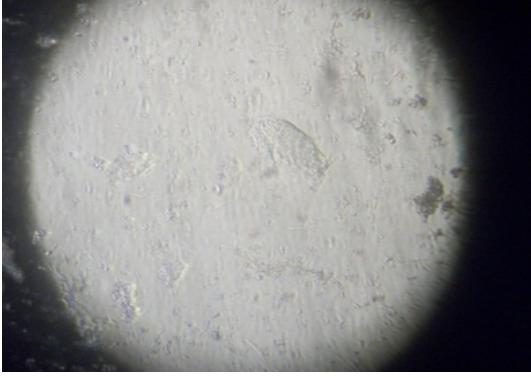
Çalışma grubundan bir hayvan postoperatif 21. gün, kontrol grubunda ise bir hayvan postoperatif 4. günde kaybedildi. Diğer hayvanlar implantların eksizyonuna kadar sağlıklı şekilde yaşadı.

Biyopsi alınan intestinal segmentin sorunsuz iyileşerek, barsak bütünlüğünün korunduğu ikinci laparotomi sırasında gözlemlendi.

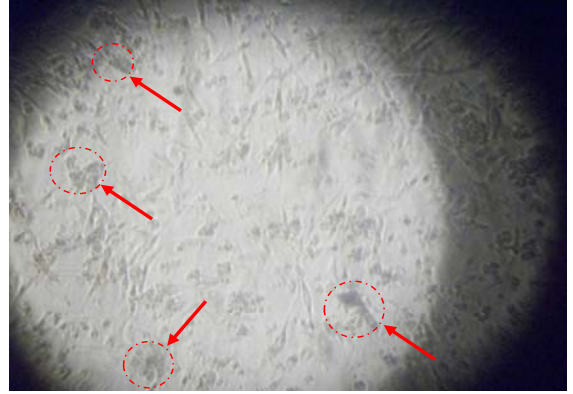
Yaklaşık 1x1 cm lik ince bağırsak biyopsisinin yıkamalardan sonra mekanik parçalamayı takiben dispaz ve kollajenaz ile bir saat enzimatik işlem sonrasında homojen hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hücrelerin ayrıştığı görüldü. Süspansiyondan alınan örneklerin invert mikroskopta boyanmadan canlı incelemesinde küboid yapıda, geniş sitoplazmalı, nükleusu santral yerleşimli epitelyal hücreler başta olmak üzere çeşitli morfolojik özellikte hücreler gözlemlendi. (Resim 19-20-21-22) Süspansiyondan hazırlanan preparatların tripan blue boyama testinde %95 üzerinde canlılık oranı tespit edildi. (Resim 23)

Tübüler yapıdaki polimerlere hücre süspansiyonunun enjeksiyonu ve bir saat 4 °C de bekletilmesinden sonra invert mikroskopta incelemede polimer liflerinin içerisi yoğun hücre bulunduğu tespit edildi. (Resim 24-25)

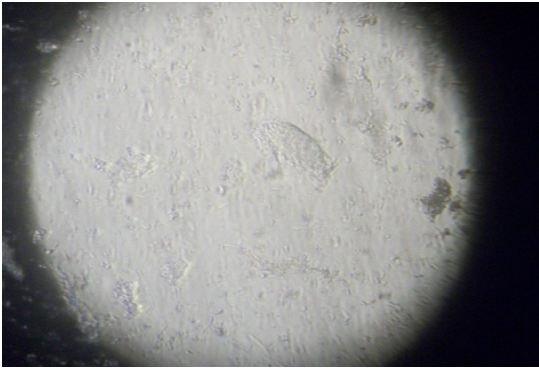
Bir ayın sonunda yapılan laparotomide implantlar omentumda stent etrafında tübüler yapı oluşturduğu, pediküllü flep şeklinde vasküler yapı ile beslendiği görüldü.



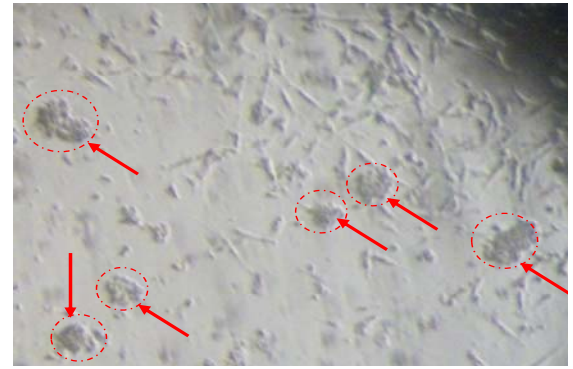
**Resim 19:** Ekim sonrası erken safha ilk görüntü (24. Saat) henüz üreme başlangıcı yok.



**Resim 20:** Her bir flaskın mikroskop altında gözlemlenerek hücre çoğalmalarının ve tutunmalarının değerlendirilmesi (14-15 koloni)

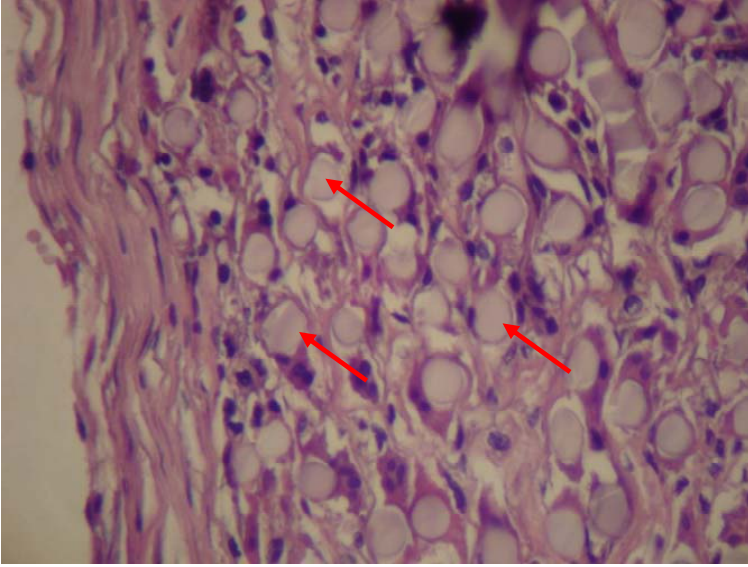


**Resim 21:** Hücre ekimi yapılan ve kültür üremesi olmadan önceki (erken dönem) vasatların mikroskop görüntüsü



**Resim 22:** DMEM-F12 medyum ve Chang medyum ile ekimi yapılan flasklarda 35-40 arası koloni oluşumları tespit edildi.

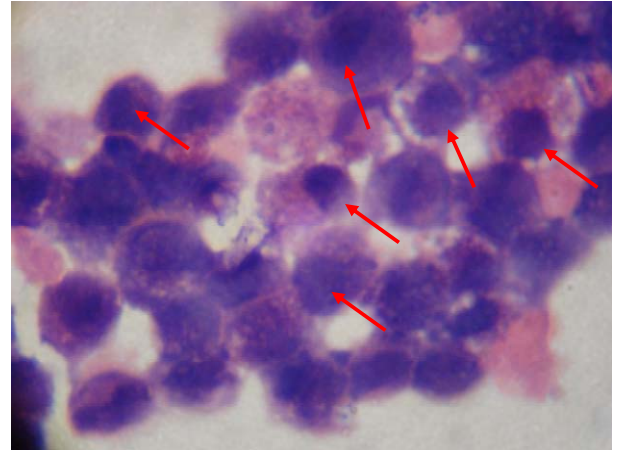




**Resim 23:** Barsak lümenine yakın bağ doku lifleri yassılaşıymış,düzenli sıkı bağ doku hücreleri arasına uzanmış epitel hücreleri



**Resim 24:** Kontrol Grubu; Hücre ekimi yapılmayan grupta sadece omentuma ait gevşek bağ doku hücreleri görüldü, hücre üretmesi gözlenmedi.



**Resim 25:** Primer kültürde üreme gösteren hücrelerin H-E boyaması

## 5. TARTIŞMA

İnce bağırsak uzunluğu ve emilim yüzeyininin yetersiz olduğu durumlarda günümüzde tedavi için en iyi yöntem ince bağırsak transplantasyonu olarak görülmektedir (4,31).

Ancak ince bağırsak transplantasyonunun morbiditesi özefagus, mide gibi diğer gastrointestinal dokulara göre çok daha fazla olmaktadır. (32) Bu nedenle alternatif ve daha iyi bir yöntem olarak intestinal doku mühendisliği çalışmaları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu alanda çalışmalar henüz az olmakla birlikte, araştırmacıların yeni dokular oluşturmadaki çabaları devam ettikçe, yapay ince barsak alanında da gelişmeler kaydedilecektir. (40,41)

İntestinal doku mühendisliği konusundaki ilk çalışma Vacanti ve arkadaşları tarafından 1988 yılında yayınlanmıştır.(34) Fetal intestinal doku örnekleri, tübularize edilmemiş düz polimer yüzey üzerine ekildikten sonra erişkin hayvana implante edilmiş ve intestinal hücrelerin canlılığını devam ettirdikleri gösterilmiştir (27). Daha sonra doku kültür tekniklerindeki gelişmeler sonucunda daha iyi organize olmuş doğala yakın intestinal doku elde etmek mümkün olmuştur (28). Yeni bağırsağın yapısal ve fonksiyonel olarak daha iyi rejenere olduğu, kript ve villus yapılarının olduğu, epitelyal yapıdaki apoptotik aktivitenin, dağılım ve oranının yeterli olduğu gösterilmiştir (29).

Çalışmamızda donör ve alıcı olarak erişkin tavşan kullanılmıştır. İnce bağırsak tam kat doku örneği alınarak enzimatik reaksiyon sonrasında tübularize polimer üzerine implantasyonla yeni bağırsak duvarının oluşturulabileceği gösterilmiştir.

Gastrointestinal dokuların yapısal ve fonksiyonel olarak özgün ve karmaşık yapıya sahip olmaları, bu yapıların in vitro oluşturulmasındaki zorlukların başında

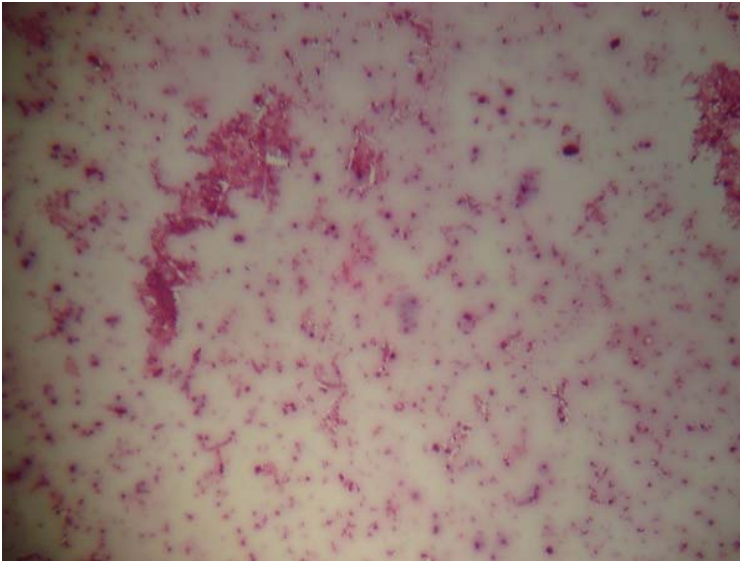


gelir. Tek tür hücre izolasyonu, kültürü ve transplantasyonu pekçok dokunun mühendisliğinde başarı ile uygulanmaktadır ancak gastrointestinal dokular gibi daha karmaşık yapıdaki dokuların in vitro ve in vivo oluşturulmasında zorluklar henüz aşılmaya çalışılmaktadır. (35,36) Bu nedenle Vacanti ve arkadaşları “organoid ünite” adı verilen yöntemi geliştirmişlerdir. (34) Organoid ünite, özellikle gastrointestinal sistem dokularının tam kat biyopsilerinin enzimatik parçalanması ile oluşturulan hücre süspansiyonuna verilen tanımlamadır. Bu hücre süspansiyonunun kültürde bekletilip, polimere ekilerek implante edildikten sonra, epitel hücrelerinin müküler ve bağ dokularının yeniden organize oldukları gösterilmiştir(15). Elde edilen yeni bağırsağın kistik yapıda olduğu, bağırsağa anastomoz edilmeden sadece T- lenfositler mevcutken, anastomoz sonrasında tüm immünolojik hücrelerin yer aldığı gösterilmiştir (23-25).

Bizim çalışmamızda, tübülerize mikroflamen yapıdaki PLGA polimere kollajen emdirilmiş ve üzerine ince bağırsak biyopsisinden hazırlanan “organoid ünite” ekilmiştir. Bir saatlik inkübasyon sonrasında omentuma implante edildiğinde çok iyi vaskülerize olduğu gösterilmiştir.(Resim 27) Histolojik incelemede ise epitelyal hücrelerin lümen iç yüzeyine göç ettiği ancak bir aylık implantasyon süresi yeterli olmadığından reorganizasyonun tamamlanamadığı görülmüştür.(Resim 28)



**Resim 27:** İmplantasyon sonrası vazkularizasyon



**Resim 28:** Epitel hücrelerinin lümen yüzeyine göçü

Doku mühendisliğinde günümüz teknik ve teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde bu sorunlara iyimser fikir ve yaklaşımlar mevcuttur.

Günümüz çalışmaları ise genellikle hücre kaynağı üzerine özellikle kök hücre odaklıdır. Kök hücre araştırmaları kontrollü farklılaşmayı ve transplant reddinin önlenmesini sağlar. Ek olarak çeşitli biyomateryaller anatomik ve fonksiyonel ilerlemeler için incelenmiştir. Yüzey alanını artırmak için glukagon benzeri peptid-2, büyüme hormonu, epidermal growth faktörü gibi büyüme faktörlerinin kullanımı önerilmiştir.(12,20) Kas tabakası arasında sinir dokusunun büyümesini sağlamak için sinir büyüme faktörü (nerve growth factor), angiogenez ve lenfangiogenez için diğer büyüme faktörlerinin de kullanımı önerilmiştir. Transplant reddi immünosüpresyon ya da otolog hücrelerin in vitro üretimi ile önenebilir. Günümüzde çoğu araştırmacı yeni bağırsağın fizyolojisi üzerinde çalışmakta ve bunun klinik olarak uygulanabilir bir seçenek haline getirmek için denemeler yapmaktadır.

Biyomateryallerin dokunun üç boyutlu yapısının oluşturulmasında ve yeni dokunun büyüüp gelişmesinde çok önemli fonksiyonları vardır. Mikroflamen ya da nanoflamen yapıda sentez edilen biyomateryaller hem hücrelerin taşınmasına hem de içinde dokunun büyümesine yardımcı olur. Aslında doku kendi çevresel yapısını oluşturuncaya kadar ekstrasellüler matriks görevini yerine getirirler. İdeal biyomateryal biyolojik uyumlu, nontoksik, kolayca ve istenen sürede biyolojik yıkılıp absorbe olabilen yapıda olmalıdır. Doku mühendisliğindeki başarıda uygun biyomateryalin seçimi büyük önem taşır. Thompson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (16), prostetik materyallerin intestinal mukoza büyümesine etkilerini görmek için Dacron, PTFE (politetrafloroetilen) ve PGA tüpleri ince bağırsağa anastomoz yapılmış ve PGA tübün absorbe olduğu ve tübün %15 kadarında yeni mukozanın oluştuğu gösterilmiştir (33). Vacanti ve arkadaşları (34) ise kollajenle

kaplanmış PLGA polimerlerinin intestinal organoidlerin tutunmasını ve çoğalmalarını çok iyi desteklediği, yeni intestinal segmentin tam kat duvar yapısını oluşturduğu gösterilmiştir. Böylece polimer yüzeyin ekilecek hücre türüne göre uygun olarak kaplanmasının destek ve proliferasyonu etkilediği gösterilmiştir (5,32).

Çalışmamızda erişkin tavşan ince bağırsağından elde ettiğimiz hücrelerin tübüler PLGA biyopolimer iskelet yapı üzerine ekimini yaptık. Parça alınan intestinal segmentin sorunsuz iyileşerek, bağırsak bütünlüğünün korunduğu ikinci laparotomi sırasında gözlendi. Bir ayın sonunda yapılan laparotomide implantlar omentumda stent etrafında tübüler yapı oluşturduğu, pediküllü flep şeklinde vasküler yapı ile beslendiği görüldü. Bu yeni segmentin yapısal özelliklerini histopatolojik olarak inceleyerek normal bağırsak dokusunun biyopolimer lifleri üzerine tutunmalarını ve bunların üremelerini laboratuvar incelemesinde tesbit ettik. Ancak implantın yeniden organize olarak doğal intestinal duvar yapısını oluşturabilmesi için yeterince beklenmesi gerektiğini gördük. Bu sürenin yeterli olmamasında, erişkin doku örneğinin kullanılması ve bunların proliferasyon hızının fetal ya da yenidoğan dokularına göre daha yavaş olmasının da etkili olabileceği düşündük.

## 6. SONUÇ

Deney hayvanları, laparotomiden itibaren implantlarından eksizyonlarına kadar sağlıklı şekilde yaşadı. Çalışma grubundan bir hayvan postoperatif 21. gün, kontrol grubunda ise bir hayvan postoperatif 4. günde kaybedildi. Parça alınan intestinal segmentin sorunsuz iyileşerek, barsak bütünlüğünün korunduğu ikinci laparotomi sırasında gözlemlendi.

Alınan örneklerin invert mikroskopta boyama yapılmadan canlı incelemesinde küboid yapıda, geniş sitoplazmalı, nükleusu santral yerleşimli epitelyal hücreler başta olmak üzere çeşitli morfolojik özellikte hücreler gözlemlendi.

Süspansiyondan hazırlanan preparatların tripan blue boyama testinde %95 üzerinde canlılık oranı tespit edildi. Tübüler yapıdaki polimerlere hücre süspansiyonunun enjeksiyonu ve bir saat 4 °C de bekletilmesinden sonra invert mikroskopta incelemede polimer liflerinin içerisi yoğun hücre bulunduğu tespit edildi.

Bir ayın sonunda yapılan laparotomide implantlar omentumda stent etrafında tübüler yapı oluşturduğu ve pediküllü flep şeklinde vasküler yapı ile beslendiği tesbit edildi.. Biz bu yeni segmentin yapısal özelliklerini histopatolojik olarak inceleyerek normal bağırsak dokusunun biyopolimer lifleri üzerine tutunmalarını ve bunların canlılığını genetik laboratuvar incelemesinde tesbit ettik.

Günümüzde bir çok araştırmacı neointestine nin fizyolojisi üzerinde çalışmakta ve klinik olarak yaşanabilir bir seçenek haline getirmek için denemeler yapmaktadır.

İntestinal doku mühendisliğinin iyileştirilebilmesi ve daha ileri götürülebilmesi için şu sorunların çözülmesi gerekmektedir:

1. Barsak kompleks bir organ olduğu için, uygulanan teknikler farelerde kısa barsak sendromunun klinik bulgularını iyileştirmeye yardımcı olmuştur ancak genetik açıdan insan daha kompleks olduğu için daha fazla emici yüzey gerektiren insan

bağırsağında benzer sonuçlar almak daha zordur. İnsanda kısa bağırsak sendromunun üstesinden gelebilmek için, yeterli emici yüzeye sahip bir bağırsak oluşturabilir miyiz?

2. Bağırsak emilim dışında peristalsizm de gösterir ki doku mühendisliği sonucu oluşturulan intestinal yapılar morfolojik ve fonksiyonel olarak peristaltizmi kaybeder. Çoğu intestinal yapılar aperistaltizm nedeniyle barsak tıkanmasına yol açar ki bu da yeni oluşturulan intestinal dokuda sinir hücrelerinin üretilmesinin zorluğuna bağlıdır.

3. Diğer potansiyel sorun transplant reddidir. Donör hücreler nerden alınmalı? Eğer başka insan donörden kullanılırsa transplant prosedürü gerekecek ve immünosüpresyon uygulamak gerekecek. Teoride bu sorunla kısa bağırsak sendromlu hastanın kendi hücrelerinden donasyon yaparsak başa çıkabiliriz.

4. İntestinal adaptasyon mekanizmaları üzerinde çalışan Dr. Brad Warner, bu oluşturulan intestinal dokunun azalmış emici yüzeyeyle başa çıkabileceği veya bağırsak içeriğinin geçiş hızını azaltabileceği konusunu öne sürmüştür (30).

Doku mühendisliğinde günümüz teknik ve teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde bu sorunlara iyimser fikir ve yaklaşımlar mevcuttur.

Doku mühendisliği hücrelerin, biyomateryalin ve biomoleküllerin kullanımına odaklıdır. Günümüz çalışmaları ise genellikle hücre kaynağı üzerine özellikle kök hücre odaklıdır. Kök hücre araştırmaları kontrollü farklılaşmayı ve transplant reddinin önlenmesini sağlar. Ek olarak çeşitli biyomateryaller anatomik ve fonksiyonel ilerlemeler için incelendi. Yüzey alanını artırmak için glukagon benzeri peptid-2, büyüme hormonu, epidermal growth faktörü gibi büyüme faktörlerinin kullanımı önerildi. Kas tabakası arasında sinir dokusunun büyümesini sağlamak için sinir büyüme faktörü (nerve growth factor) kullanımı önerildi.(12) Angiogenez ve lenfangiogenez için diğer büyüme faktörlerinin de kullanımı önerildi.(27) Transplant

reddi ile immünosüpresyon ya da homolog hücrelerin in vitro üretimi ile başa çıkılabilir.

Sonuç olarak, doku mühendisliği laboratuvar tekniklerini kullanarak hızla ilerleme potansiyeline sahiptir. Doku mühendisliği temelli oluşturulan neo-intestine , hipofonksiyonla başa çıkmak için bir model sağlar. Bu stratejinin insanlara uygulanmasında pratik kısıtlamalara rağmen, önümüzdeki yıllarda tıpta olan sürekli gelişmeler bunu tedavide alternatif hale getirecektir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Evans GS, Flint N, Somers AS**, The development of a method for the preparation of rat intestinal epithelial cell primary cultures. *J Cell Sci.* 1992;101:219.
2. **Grikscheit TC, Ochoa ER, Ramsanahie A**, Tissue engineered colon, characterization and comparison to native colon. Owen Wangenstein Surgical Forum Abstracts of the American College of Surgeons 87th Annual Clinical Congress 2001;LII:55–56.
3. **Tracy C. Grikscheit, Erin R Ochoa, Anthony Ramsanahie, Eben Alsberg, David Mooney, Edward E Whang, Joseph P. Vacanti**. Tissue-Engineered Large Intestine Resembles Native Colon With Appropriate In Vitro Physiology and Architecture. *Ann Surg* 2003;238: 35–41.
4. **Perez A, Grikscheit TC, Blumberg RS, Ashley SW, Vacanti JP, Whang EE**. Tissue-engineered small intestine. *Transplantation* 2002 vol 74, no: 5, p 619-623,
5. **M Korkmaz, T Yakut, A Narçı, B H Güvenc, T Gülten, M Yağmurca, B Yiğit, A Bilir**. Esophageal muscle cell interaction with biopolymers. *Med Sci Monit.* 2007 Feb;13(2)
6. **Sarımurat N, Celayir S, Eliçevik M, Dervişoğlu S, ark**. Congenital short bowel syndrome associated with appendiceal agenesis and functional obstruction. *J Pediatr Surg* 1998; 33: 666-667.
7. **Grikscheit TC, Siddique A, Ochoa ER, Srinivasan A, Alsberg E, Hodin RA**, Tissue-engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection. *Ann Surg* 2004;240: 748–54.
8. **Choi RS, Riegler M, Pothoulakis C, Kim BS, Mooney D, Vacanti M**, .Studies of brush border enzymes, basement membrane components, and electrophysiology of tissue-engineered neointestine. *J Pediatr Surg* 1998;33:991–6.
9. **Warner BW**. Tissue engineered small intestine: a viable clinical option?  
*Ann Surg* 2004;240:755–6.



- 10. Grikscheit TC, Ogilvie JB, Ochoa ER,** Tissue engineered colon functions in vivo. *Surgery*. 2002;132:200–204.
- 11. Perez A, Grikscheit TC, Blumberg RS,** Tissue-engineered small intestine: ontogeny of the immune system. *Transplantation*. 2002;74: 619–623.
- 12. Nightingale JM, Kamm MA, van der Sijp JR,** Gastrointestinal hormones in short bowel syndrome. Peptide YY may be the ‘colonic brake’ to gastric emptying. *Gut*. 1996;39:267–272.
- 13. Folch A, Ayon A, Hurtado O, Schmidt MA & Toner M** Molding of deep polydimethylsiloxane microstructures for microfluidics and biological applications. *Journal of Biomechanical Engineering* 1999 121, 28–34.
- 14. Grikscheit T & Vacanti JP** The history and current status of tissue engineering: the future of pediatric surgery. *Journal of Pediatrics Surgery* 2002 37, 277
- 15. Kaihara S, Benvenuto M, Choi RS, Mooney DJ, Taylor GA & Vacanti JP** Regenerative signals for tissue engineered small intestine *Transplantation Proceedings* 1999 31,657–660.
- 16. O'Brien DP, Nelson LA, Huang FS, Warner BW.** Intestinal adaptation: structure, function, and regulation. *Pediatr Surg* 2001; 10: 56-64.
- 17. Cheng H, Leblond CP.** Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* 1974; 141: 537–61.
- 18. Marshman E, Booth C, Potten C.**The intestinal epithelial stem cell.2002;24:91-8
- 19. Potten CS.** Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond* 1998; 353:821-30.
- 20. Booth C, Pritchard DM.** The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 1997; 78: 219-43.

- 21. Tavakkolizadeh A, Berger UV, Stephen AE,** Tissueengineered neomucosa: morphology, enterocyte dynamics, and SGLT1 expression topography. Transplantation 2003; 75: 181-5.
- 22. De Ugarte DA, Choi E, Weitzbuch H,** Mucosal regeneration of a duodenal defect using small intestine submucosa. Am Surg 2004; 70:49-51. [52] Jeppesen PB. Clinical significance of GLP-2 in short-bowel
- 23. Demirbilek S, Kanmaz T, Ozardali I, Edali MN, Yucesan S.** Using porcine small intestinal submucosa in intestinal regeneration. Pediatr Surg Int 2003; 19: 588-92.
- 24. Chen MK, Badylak SF.** Small bowel tissue engineering using small intestinal submucosa as a scaffold. J Surg Res 2001; 99: 352-8.
- 25. Hori Y, Nakamura T, Matsumoto K, Kurokawa Y, Satomi S, Shimizu Y.** Tissue engineering of the small intestine by acellular collagen sponge scaffold grafting. Int J Artif Organs 2001; 24: 50-
- 26. Kawaguchi AL, Dunn JC, Fonkalsrud EW.** *In vivo* growth of transplanted genetically altered intestinal stem cells. J Pediatr Surg 1998; 33: 559-63.
- 27. Elcin YM, Dixit V, Gitnick G.** Extensive *in vivo* angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: Implications for tissue engineering and wound healing. Artif Organs 2001; 25: 558-65.
- 28. Powell DW,** Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West engineering scaffolds. Biomaterials 2004; 25: 5857-66.
- 29. Tait IS, Penny JI, Campbell FC.** Does neomucosa induced by small bowel stem cell transplantation have adequate function? Am J Surg 1995; 169: 120-25.
- 30. Kim SS, Kaihara S, Benvenuto MS,** Effects of anastomosis of tissue-engineered neointestine to native small bowel. J Surg Res 1999; 87: 6-13.

- 31. Abu-Elmagd K, Reyes J, Bond G,** Clinical intestinal transplantation Ann Surg 2001;234(3): 404.
- 32. Tavakkolizadeh A, Stephen A, Kaihara S,** Proliferation and apoptosis in the tissue-engineered intestine. Surg Forum 2000;51:59.
- 33. Mooney DJ, Mazzoni CL, Breuer C,** Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. Biomaterials 1996;17(2):115.
- 34. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R.** Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. J Pediatr Surg 1988;23(1 pt 2):3.
- 35. Korkmaz M, Güvenç BH, Bilir A, Yılmaz OK, Kumbasar A, Caferler J, Baysal K.** Isolation and culture of adult and fetal rabbit bladder smooth muscle cells and their interaction with biopolymers. J Pediatr Surg, 38:21-24, (2003).
- 36. Ayhan Bilir, Mine Erguven, Aydın Zilan, Gulperi Oktem, Seval Korkmaz, Mevlit Korkmaz.** Evaluation and Comparison of In Vitro Biocompatibility of Poly (Glycolic Acid) and Poly(Lactide-Co-Glycolide Acid) on Mature Spheroids of Tumorigenic and Non-Tumorigenic Cell Lines Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi.(31) 1, 2011.
- 37. Warner BW, Chaet MS.** Nontransplant surgical options for management of the short bowel syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1993;17:1–12.
- 38. Bianchi A.** Experience with longitudinal intestinal lengthening and tailoring. Eur J Pediatr Surg 1999;9:256–9.
- 39. Warner BW, Vanderhoof JA, Reyes JD.** What's new in the management of short gut syndrome in children. J Am Coll Surg 2000;190:725–36.

**40. Ali Tolgay,** Gastrik seromuskuler pediküllü patch kullanılarak intestinal neomukoza oluşumu, Deneysel çalışma, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul 1997

**41. Hakan Samsun,** Deneysel hipospadyas modelinde doku kültürü ile oluşturulmuş üretraepiteli ile onarım, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul 2007

## 8.ÖZET

### **YAPAY İNCE BAĞIRSAK SEGMENTİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE ÜRETİLMESİ VE YAPISAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ: ÖN ÇALIŞMA**

Kısa bağırsak sendromu, geniş barsak rezeksiyonu ya da bağırsakların konjenital kısalığı sonrası malabsorbsiyon ve buna bağlı malnütrisyonla karakterize klinik tablodur. Bağırsak uzunluğunu artırıcı cerrahi tekniklerin gelişmesiyle bu hastalar geçmişe göre daha iyi yaşam şansına sahip olmaktadır. Buna rağmen hastalığın erken ve geç dönem problemlerinin devam etmesi ve transplantasyon olanaklarının sınırlı olması, araştırmacıların yeni yöntemler aramasına neden olmaktadır. Son zamanlarda doku mühendisliği tekniklerinin gelişimi ile yapay ince barsak segmentinin oluşturulmasına yönelik çalışmalar dikkati çekmektedir.

Çalışmamızda tavşan ince bağırsağı biyopsi materyalinden elde edilen hücrelerin tübüler biyopolimer matriks üzerine ekilerek yapay bağırsak segmentinin elde edilmesini ve bu yeni segmentin yapısal özelliklerinin incelenmesini amaçladık.

Biz bu çalışmamızda tavşan ince bağırsağı biyopsi materyalinden elde ettiğimiz hücrelerin tübüler biyopolimer matriks üzerine ekimini yaptık. Biyopsi alınan intestinal segmentin sorunsuz iyileşerek, barsak bütünlüğünün korunduğu ikinci laparotomi sırasında gözlendi. Deney hayvanları, implantlarından eksizyonlarına kadar sağlıklı şekilde yaşadı. Çalışma grubundan bir hayvan postoperatif 21. gün, kontrol grubunda ise bir hayvan postoperatif 4. günde kaybedildi. Parça alınan intestinal segmentin sorunsuz iyileşerek, bağırsak bütünlüğünün korunduğu ikinci laparotomi sırasında gözlendi.

Kültür aşamasında ,flasklar 37°C %5 CO<sub>2</sub> koşulları altında hücrelerin çoğalması için etüve alındı. Her bir flask mikroskop altında gözlemlenerek hücre tutunmaları değerlendirildi. DMEM-F12 medyum ile ekim yapılan I.Flaskda birkaç hücre dışında tutunma olmadığı gözlemlendi. Chang medyum ile ekimi yapılan II-III. Flaskta 14-15 ve IV. Flaskta ise 35-40 arası koloni oluşumu tespit edildi. Bu flasklara birer pasaj yapılarak iki yedek flask daha oluşturuldu. Alınan örneklerin invert mikroskopta boyama yapılmadan canlı incelemesinde küboid yapıda, geniş sitoplazmalı, nükleusu santral yerleşimli epitelyal hücreler başta olmak üzere çeşitli morfolojik özellikte hücreler gözlemlendi.

Süspansiyondan hazırlanan preparatların tripan blue boyama testinde %95 üzerinde canlılık oranı tespit edildi. Tübüler yapıdaki polimerlere hücre süspansiyonunun enjeksiyonu ve bir saat 4 °C de bekletilmesinden sonra invert mikroskopta incelemede polimer liflerinin içerisi yoğun hücre bulunduğu görüldü. Tutunma gösteren hücrelerin pediküllü flep şeklinde vasküler yapı ile beslendiği görüldü. Biz bu yeni segmentin yapısal özelliklerini histopatolojik olarak inceleyerek normal barsak dokusunun biyopolimer lifleri üzerine tutunmalarını ve bunların canlılığını genetik laboratuvar incelemesinde tesbit ettik.

## 9. SUMMARY

### **Artificial Creation of The Small Bowel Segment and Structural Evaluation:**

#### ***Preliminary Study***

Short bowel syndrome, large bowel resection or congenital intestinal malabsorption after shortening and associated clinical condition characterized malnutrition. Total parenteral nutrition be widely applied to increase the length of the intestine and the remaining development of surgical techniques according to as these patients have a better change of living. Despite this problem early and late periods of the disease and transplantation will continue to be limited opportunities, has led researchers to search new methods. Recently with the development of tissue engineering techniques to create an artificial bowel segment studies is remarkable. In our study, cells derived from rabbit small intestine biopsy of the tubular matrix of biopolymers can be added on to obtain an artificial bowel segment, and investigate the structural properties of this new segment.

In our study we cultured cells obtained from intestines of rabbits on to the biopolymer matrix. At second look we observe that the intestinal segment biopsy taken seems healthy and intact. All rabbits were healthy through all study. One in study group at postoperative 21st day and one in control group at postoperative 4th day died. At second look we observe that the intestinal segment biopsy taken seems healthy and intact.

All flasks cultured at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> conditions. Every flask was observed at microscope. At 1st flask that cultured with DMEM –F12 and flasks that cultured with changed media colonisation was observed, 14-15 colony at 2-3rd flasks and 35-40 colony at 4th flasks. At microscopic investigation without dye cuboid in shape with large cytoplasm and centrally localised nucleus was observed.

With tripan blue dye over 95% vitality was confirmed. After cell enjection to the tubularised polymers and waiting for an hour at 4°C many cells observed between polymerised fibers. Those cells were observed to have pedicles for getting nutrition. We confirmed this new segment's vitality at genetic investigations.