

## Rejeneratif Tıpta Kullanılan Organ ve Doku Deselülerizasyon Yöntemleri

### Decellularization Methods of Organ and Tissue for Regenerative Medicine

Esin AKBAY\*

Mehmet Ali ONUR

Hacettepe Üniversitesi, Fen  
Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara,  
Türkiye  
E-mail: akbayesin@gmail.com  
E-mail: mali@hacettepe.edu.tr

#### Öz

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın amacı hasar gören vücut bölgelerinde doku ve organların yeniden yapılandırılmasıdır. Doku mühendisliği yaklaşımının başlıca bileşenleri arasında doku spesifik hücreler, biyomateryaller ve doku oluşumunu destekleyici uygun çevre koşulları sayılabilir. Günümüzde deselülerize doku ve organlar, çok sayıda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Uygulanan deselülerizasyon metotları, ilgili organ ve dokuların çeşidine göre değişmektedir. Dokudan en verimli şekilde hücrelerin uzaklaştırılması, dokunun orijini ile birlikte kullanılacak fiziksel, kimyasal ve biyolojik yollara bağlıdır. Bu noktada derleme kapsamında en yaygın kullanılan deselülerizasyon yöntemleri açıklanmış ve bu yöntemlerin biyolojik doku materyalini nasıl etkilediği nedenleri ile ifade edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Rejeneratif tıp, doku mühendisliği, deselülerizasyon, ekstraselüler matriks, doku iskelesi

#### Abstract

The aim of tissue engineering and regenerative medicine is to rebuild tissues/organs for restoring injured parts of the body. Tissue specific cells, biomaterials and a convenient environment conditions are the most important parts of tissue engineering and regenerative medicine approaches. Nowadays, decellularized tissue and organs are being used successfully in a large number of tissue engineering and regenerative medicine implementations. Decellularization methods are differ in according to the type of the corresponding organs and tissues. The removal of cells from the tissue in the most efficient manner depends on physical, chemical and biological ways to use with the tissue origin. At this point within the scope of the review the most widely used decellularization methods are explained and how these methods affects the biological tissue material is described with reasons.

\*Corresponding author / Sorumlu yazar  
Handling Editor: Ö. F. Çolak

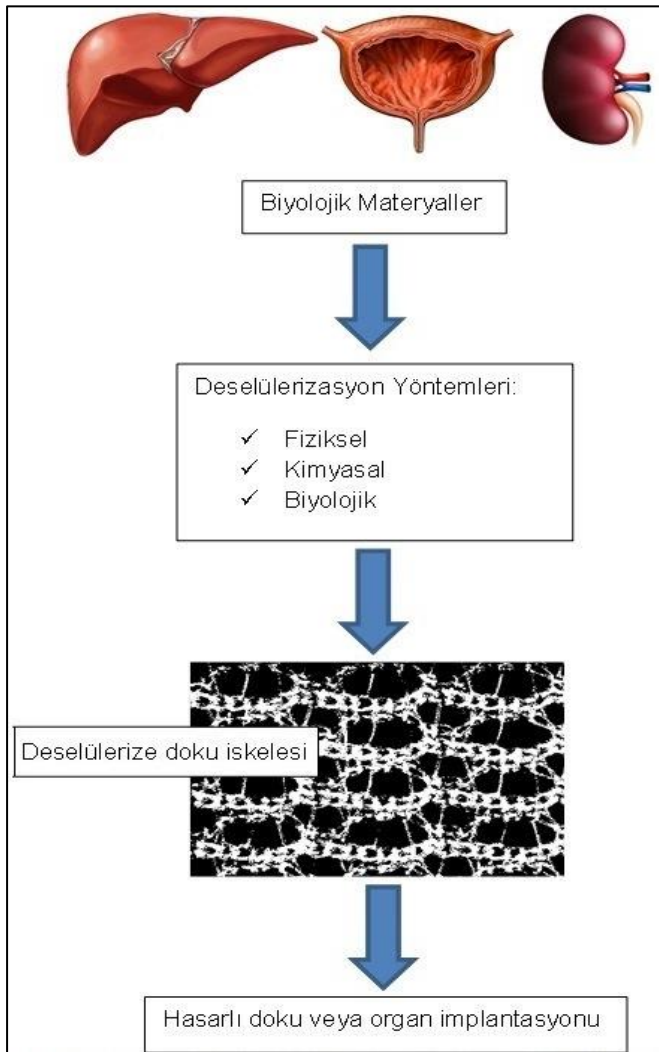
**Keywords:** Regenerative medicine, tissue engineering, decellularization, extracellular matrix, scaffold

### 1. Giriş

Son zamanlarda organ transplantasyonu, son dönem organ hastalıklarında "altın standart tedavi" yöntemi haline gelmiştir (Badylak 2004). Günümüzde son dönem organ hastalığı prevalansı çok yüksektir. Buna nazaran transplantasyon için uygun organ veya dokuya olan ihtiyaç, donör sayısından çok daha fazladır. Karşılaşılan donör sorunu, araştırma dünyasını transplantasyonda kullanılacak organların laboratuvar koşullarında farklı yöntemlerle elde edilmesine yönelik doku mühendisliği ve rejeneratif tıp tabanlı stratejilerin keşfine yöneltmiştir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın genel olarak amacı; hasarlı doku ve organların farklı yollar kullanılarak yeniden yapılandırılmasıdır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımlarının başlıca bileşenleri; doku spesifik hücreler, biyomateryaller ve

doku oluşumunu destekleyici uygun çevre koşullarıdır (He ve Callanan 2013). Deselülerize biyomateryaller, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu biyomateryallerin özellikleri geniş çapta bilinmekte ve üzerine birçok çalışma bulunmaktadır (Muratov vd. 2010; Cheng vd. 2013; Sano vd. 2013). Kullanılan deselülerizasyon metotları, ilgili biyomateryalin (doku veya organın) kökenine göre değişmektedir. Doku veya organ deselülerizasyonu sonucunda elde edilen biyolojik kökenli doku iskeleleri uzun zamandır hem deney hayvanlarında gerçekleştirilen pre-klinik çalışmalarında hem de klinik uygulamalarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Badylak 2004; Lee 2004; Kolker vd. 2005) (Şekil 1). Ekstraselüler matriksi (ESM) oluşturan

yapısal ve fonksiyonel protein karışımının elde edilebilmesi için deselülerizasyon yöntemi ile doku ya da organdan hücrelerin uzaklaştırılması gerekmektedir. ESM'in doku/organ kökeni, doku orijininin türü, deselülerizasyon yöntemi ve elde edilen biyolojik doku iskelesinin sterilizasyon metotları çok geniş bir yelpazeye sahiptir. Tüm bu faktörler ESM'in bileşimini ve en küçük yapısını buna bağlı olarak da ESM'in implantasyonu sonrasında alıcının bu yapıya tepkisini etkilemektedir (Sano vd. 2013). Bu derlemede doku deselüerizasyonunda kullanılan yöntemler ve bu deselüerizasyon yöntemlerinin biyolojik kompozisyona ve ESM doku iskelesi materyalinin mekanik davranışına etkileri üzerine yapılan araştırmalar incelenerek tartışılmıştır.



**Şekil 1.** Doku deselüerizasyon yöntemlerinin şematik özeti. Doku veya organ deselüerizasyonu sonucunda elde edilen biyolojik kökenli doku iskeleleri hasarlı vücut bölgelerinin iyileşmesinde kullanılmaktadır.

### 1.1. ESM'in Deselüerize Edilmesinin Gerekçeleri

Allojenik ve ksenojenik hücresel ajanlar, alıcı tarafından yabancı olarak kabul edilmekte ve bu nedenle inflamatuvar cevaba veya dokunun immun olarak reddine neden olmaktadır. Buna karşılık yapılan çalışmalarda, ESM'in komponentlerinden özellikle kollajen fibrillerinin

cDNA kütüphanelerinin taranması sonucunda türler arasında yakın benzerlikleri olduğu belirtilmiştir (Constantinou ve Jimenez 1991; Exposito vd. 1992). Bu bilgi ışığında bugüne kadar kalp kapakçıkları (Kasimir vd. 2003; Schenke-Layland vd. 2003; Rieder vd. 2004; Grauss vd. 2005), kan damarları (Conklin vd. 2002; Dahl vd. 2003; Uchimura vd. 2003), deri (Chen vd. 2004), sinir (Hudson vd. 2004; Kim vd. 2004), iskelet kası (Borschel vd. 2004), tendon (Cartmell ve Dunn 2000), ligament (Woods ve Gratzer 2005), ince bağırsak submukozası (Badylak vd. 1995; Kropp vd. 1995), idrar kesesi (Freytes vd. 2004; Gilbert vd. 2005) ve karaciğerinde (Lin vd. 2004) bulunduğu çok sayıda dokudan elde edilen ESM'in doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıp uygulamalarında kullanıldığı bilinmektedir. Deselüerizasyon metotlarının genel amacı;

- i. Tüm hücrelerin ve nükleer materyallerin en iyi şekilde ortadan kaldırılması
- ii. Elde edilen ESM'in kompozisyonunda, biyolojik aktivitesinde ve mekanik bütünlüğünde karşılaşılabilecek olumsuz etkilerin en aza indirgenmesidir.

Hücrelerin ortadan kaldırılmasına yönelik kullanılan yöntemlerin genelini, işlem basamakları sırasında ESM mimarisinin doğal üç boyutunu az ya da çok değiştirdiği bilinmektedir. Doku deselüerizasyonu için yararlanılan yöntemlerden en çok tercih edileni fiziksel ve kimyasal uygulamaların birlikte kullanımınıdır. Fiziksel muamele yöntemleri; agitasyon veya sonikasyon, mekaniksel basınç, dondurma ve çözündürme olarak sıralanabilir. Bu teknikler hücre membran bütünlüğünü bozarak, hücre içeriğinin salınmasını ve sonraki aşamalarda kullanılan çalkalama ile ESM'den hücre içeriğinin ortadan kaldırılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu fiziksel yöntemler genellikle hücrelerin tamamen ortadan kaldırılması için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle fiziksel yöntemler kimyasal tekniklerle desteklenmektedir. Tripsin gibi enzimatik uygulama ve iyonik solüsyonlar veya deterjanlar gibi kimyasal uygulamalar, hücre membranını tahrip ederek intraselüler ve ekstraselüler bağlantılardan sorumlu zincirlerin kırılmasını sağlarlar (Grauss vd. 2005).

### 1.2. Deselüerizasyon Protokollerinin Tanımlanması

Genel olarak en güçlü ve etkili deselüerizasyon basamakları aşağıdaki gibidir;

- i. Fiziksel yöntemlerden biri ile birlikte iyonik solüsyonlar kullanılarak hücre membranının lizisi gerçekleştirilir.
- ii. ESM'den nükleer komponentlerin uzaklaştırılması için enzimatik yöntemler kullanılır.
- iii. Deterjanlar; sitoplazmik ve nükleer komponentlerin çözülmesi için kullanılır.
- iv. Hüresel kalıntılar dokudan tamamen arındırılır (Akabay ve Onur 2016) (Tablo 1).

Deselüerizasyon işlemlerinin asıl amacı, ESM'in en az şekilde zarar görmesi ve doğal mekanik-biyolojik özelliklerinin bozulmadan korunmasını sağlamaktır (Scarritt vd. 2015).

**Tablo 1:** Doku deselüerizasyonunda kullanılan yöntemlerin özeti

Kimyasal	Fiziksel	Biyolojik	Proteaz İnhibitörleri	Antibiyotikler
Alkalın-asit uygulaması	Dondurma	Proteolitik enzimler		
İyonik olmayan deterjanlar	Direk Basınç	Kalsiyum şelatlayıcı ajanlar		
İyonik deterjanlar	Sonikasyon			
Zwitteriyonik deterjanlar	Agitasyon			
Tribütil fosfat				
Hipotonik ve hipertonic uygulamaları				
Şelatlayıcı deterjanlar				

### 1.2.1. Fiziksel Yöntemler

Dondurma, direk basınç uygulaması, sonikasyon ve agitasyon yöntemleri doku deselüerizasyonunu sağlayan fiziksel metotlardır. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem dondurarak patlatma yöntemidir. Özellikle bu yöntemlerin tendon, ligament dokusu ile sinir dokusunda kullanıldığı bilinmektedir (Jackson vd. 1990; 1991). Bir dokunun hızlı bir şekilde dondurulması, hücre membran bütünlüğünü bozan ve bunun sonucunda hücrenin lizisine neden olan hücre içi buz kristallerinin oluşumuna neden olur. Buradaki püf nokta sıcaklık değişim derecesinin çok dikkatlice kontrol edilmesi ve ESM yapısında herhangi bir bozulmaya yol açabilecek buz kristallerinin oluşumunun engellenmesidir. Dondurma yöntemi hücre lizisi için etkili bir metot olsa da hücrel materyallerin dokudan tamamen uzaklaştırılması diğer deselüerizasyon yöntemlerinin de kullanılması ile gerçekleşmektedir (Gulati 1988; Jackson vd. 1990;1991; Roberts vd. 1991). Direk basınç yöntemi hücre lizisi için kullanılan diğer bir fiziksel yöntemdir. Ancak bu yöntemin genelde ESM organizasyonu yoğun olmayan dokularda (karaciğer, akciğer) etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda mekanik güç, mesane ve ince bağırsakta kullanılan deselüerizasyon yöntemlerindedir. Bu yöntemler etkili olup ESM'in üç boyutlu doğal yapısına minimal düzeyde hasar veren yöntemlerdir (Yang vd. 2010).

Mekanik agitasyon ve sonikasyon yöntemlerinden, hücre lizisinde ve hücrel atıkların uzaklaştırılmasında kimyasal yöntemlerle birlikte eş zamanlı olarak yararlanılmaktadır (Schenke-Layland vd. 2003; Yang vd. 2010).

### 1.2.2. Kimyasal Yöntemler

#### 1.2.2.1. Asit ve Alkalın Uygulamaları

Asit ve alkalın uygulamaları deselüerizasyon protokollerinde hücrenin sitoplazmik komponentlerini çözmek ve eş zamanlı olarak RNA ve DNA gibi nükleik asitleri uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Asetik asit, perasetik asit (PAA), hidroklorik asit, sülfürik asit ve amonyum hidroksit hücre membranı ve intraselüler organelleri etkili bir şekilde parçalayan alkalın ve asit örnekleridir (Yoo vd. 1998; Falke vd. 2003; Freytes vd. 2004).

Yapılan çalışmalarda, domuz ince bağırsak submukozası ve mesane tabakaları yaklaşık %0.10-0.15

konsantrasyondaki PAA ile deselüerize edilmiştir. Bu deselüerizasyon yönteminin bu tür ince ESM yapılarında hücre materyallerinin ortadan kaldırılmasında yüksek bir etkinliğe sahip olduğu, bunun yanı sıra mikroorganizmaları etkileyerek ve mikrobiyal enzimleri okside ederek materyalin dezenfeksiyonunu da sağladığı bildirilmiştir (Pruss vd. 1999; Hodde ve Hiles 2002). İnce bağırsak submukozası ve mesane tabakalarında PAA uygulaması sonrasında immunohistolojik boyama yöntemleri kullanılarak kollajenin birçok tipi (I, III, IV, V,VI ve VII gibi) tanımlanmıştır (Badylak vd. 1995; Brown vd. 2006). Aynı zamanda PAA uygulaması sonrasında ESM'de doğal yapıdaki glikozaminoglikanların korunduğu bildirilmiştir (Hodde vd. 1996). Farklı çalışmalarda ise PAA uygulaması sonrasında glikozaminoglikanlardan laminin ve fibronektinin ESM doku yapısında kaldığı gösterilmiştir (Hodde vd. 2002a; Brown vd. 2006). Transforme edici büyüme faktörü beta, fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi ESM'de yer alan büyüme faktörlerinin yapısal ve fonksiyonel yapılarının bozulmadan kaldığı da diğer çalışma grupları tarafından bildirilmiştir (Voytik-Harbin vd. 1997; Hodde vd. 2001). PAA'nin biyolojik yapı malzemelerinin mekaniksel davranışlarına herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı da bildirimler arasındadır (Freytes vd. 2004). İnce bağırsak submukozası ve mesane tabakaları ile yapılan in vitro hücre kültürü çalışmaları da bu şekilde elde edilen materyallerin kullanım açısından mükemmel yakın bir yapı iskelesi olduklarını tekrarlı çalışmalar ile göstermiştir (Badylak vd. 1999; Hodde vd. 2002a; 2002b).

#### 1.2.2.2. İyonik Olmayan Deterjanlar

İyonik olmayan deterjanlar deselüerizasyon protokollerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bunun en önemli nedeni göreceli olarak diğer yöntemlere göre doku yapısı üzerine daha hafif bir etkisi olmasıdır. İyonik olmayan deterjanların lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimini bozduğu ancak protein-protein bağlantısını etkilemeyerek doku ya da organdaki proteinin fonksiyonel konformasyonunu bozmadığı bildirilmiştir (Seddon vd. 2004).

Triton X-100 deselüerizasyon protokolünde en yaygın olarak kullanılan iyonik deterjanlar arasındadır. Dokunun Triton X-100'e maruz bırakılma süresi birkaç saatten 14

güne kadar değişmektedir (Cartmell ve Dunn 2000; Dahl vd. 2003; Lin vd. 2004; Woods ve Gratzer 2005). Dokuların Triton X-100 ile muamele edilerek deselülerize edilmesi ile çok farklı sonuçlar elde edilmektedir. Kalp kapakçığının 24 saat Triton X-100 ile deselülerize edilmesi ile valvular yapının korunabildiği ve tüm nükleer materyalin uzaklaştırılabildiği, komşu miyokardiyum ve aortik duvarda ise hücresele materyallere rastlanabildiği bir diğer çalışma ile bildirilmiştir (Grauss vd. 2005). Farklı grupların çalışmalarında ise dört saatin üzerindeki Triton X-100 muamelesi ile kan damarları, tendon ve ligamentlerde hücresele kalıntıların tamamen dokudan uzaklaştırılmadığı gösterilmiştir. Tüm dokularda histolojik boyama sonucunda nükleer materyallere rastlanmış ve ön çapraz bağlarında yapılan immunohistolojik boyama sonucunda bir hücre iskeleti proteini olan vimentine rastlandığı açıklanmıştır (Cartmell ve Dunn 2000; Dahl vd. 2003; Woods ve Gratzer 2005).

Triton X-100 ile deselülerizasyon çalışmalarında, glikozaminoglikan bileşimi açısından da dokular arasında farklı sonuçlar elde edildiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Kalp kapakçığında 24 saat muamele sonrasında glikozaminoglikanlar tamamen uzaklaştırılırken, ön çapraz bağlar üzerine dört günlük uygulama sonucunda sülfat glikozaminoglikanların içeriğinde herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Triton X-100 etkili bir deselülerizasyon yöntemi olmakla birlikte etkili olmasındaki en önemli nokta deselülerizasyon protokolündeki diğer yardımcı metotlarla desteklenmesidir (Akhyari vd. 2010, Du vd. 2013, Methe vd. 2014).

### 1.2.2.3. İyonik Deterjanlar

İyonik deterjanlar, sitoplazmik ve nükleer hücre membranının çözünmesinde etkili bir yöntemdir, ancak protein-protein etkileşimini bozarak protein denatürasyonuna neden olmaktadır (Seddon vd. 2004). Bilinen en yaygın iyonik deterjanlar; sodyum dodesil sülfat (SDS) ve sodyum deoksikolat ile Triton X-200'dür (Rieder vd. 2004; Chen vd. 2004; Hudson vd. 2004; Lin vd. 2004; Woods ve Gratzer 2005).

SDS, dokudan hücresele elemanların uzaklaştırılmasında çok etkili bir yöntemdir. SDS'ı diğer deterjanlardan ayıran özellik, sitoplazmik proteinlerden vimentin dahil tüm nükleer kalıntıların tamamen ortadan kaldırılmasını sağlamasıdır (Woods ve Gratzer 2005). SDS, ESM'in doğal doku yapısını bozarak glikozaminoglikan konsantrasyonunda azalmaya ve kollajen birlikteliğinin bozulmasına neden olmaktadır. Ancak SDS ile dokudan kollajen uzaklaştırılması gerçekleşmemektedir (Faulk vd. 2014).

Sodyum deoksikolat da aynı şekilde hücresele kalıntıları uzaklaştırmada çok etkili bir yöntem olmasıyla birlikte doku yapısına SDS'e göre çok daha fazla zarar vermektedir. Bu yöntemin tek başına kullanıldığı herhangi bir rapor bulunmadığından, dokudan elde edilen ESM'de sodyum deoksikolatın etkisinin ne kadar olduğu bilinmemektedir. Sodyum deoksikolat sinir dokusu deselülerizasyonunda çok sayıda zwitteriyonik

deterjan ile kombin bir şekilde kullanıldığı, kompleks deselülerizasyonun bu kombinasyona Triton X-100'un de eklenmesi ile başarılı olduğu açıklanmıştır (Hudson vd. 2004).

### 1.2.2.4. Zwitteriyonik Deterjanlar

Zwitteriyonik deterjanlar hem iyonik hem de iyonik olmayan deterjan özelliği gösterirler. Bu deterjanların protein denatüre etme gücü iyonik olmayan deterjanlara göre çok daha fazladır (Seddon vd. 2004). Zwitteriyonik deterjanlardan 3-[(3-kolamidopropil)-dimetilamonyo]-1-propansulfonat (CHAPS) kan damarlarının deselülerizasyonunda (Dahl vd. 2003), sülfobetain-10 (SB-10) ve sülfobetain-16 (SB16) ise sinir deselülerizasyonunda kullanılmaktadır. CHAPS ile muamele edilen arter dokusunun histolojik incelemesinde kollajen ve elastin morfolojisinin normal olduğu ve doğal damar yapısındaki kollajen yapısının korunduğu gösterilmiştir. Aynı çalışma ile periferik sinir deselülerizasyonunda SB-10 ve SB-16'nın iyonik bir deterjan olan Triton X-200 ile kombin edilerek kullanıldığı bildirilmiştir. Bu kombinasyon uygulamasının sinir ESM yapısına Triton X-100 ve sodyum deoksikolatın birlikte uygulanmasından daha az zarar verdiği de bildirimler arasındadır (Hudson vd. 2004).

### 1.2.2.5. Tribütül Fosfat (TBF)

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda TBF'in kosmotropik ajan olarak tendon ve ligament greftlerinin deselülerizasyonunda da kullanıldığı bildirilmiştir. TBF uygulaması ile sıçan kuyruk tendonundan tüm nükleer kalıntıların uzaklaştırıldığı, ancak kemik ligament bağlanma noktalarında bu uzaklaştırma işleminde sorunların gözlemlendiği açıklanmıştır. Aynı çalışmalarda, TBF uygulaması ile tendondan izole edilen kollajen fibrillerinin gerilme gücünde herhangi bir kayıp gözlenmediği de bildirilmiştir (Cartmell ve Dunn 2000; Woods ve Gratzer 2005). TBF'in kosmotropik ajan olarak deselülerizasyon işleminden elde edilen ESM'in mekaniksel davranışına minimal bir etki yaptığı için ümit verici bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Woods ve Gratzer 2005).

### 1.2.2.6. Hipotonik ve Hipertonik Solüsyonlar

Deiyonize su ya da düşük iyonik içerikli solüsyonlar gibi hipotonik ve hipertonik solüsyonlarla yapılan osmotik şok uygulaması organ ve dokularda hücre lizisine neden olmaktadır (Goissis vd. 2000; Dahl vd. 2003; Woods ve Gratzer 2005). Sırasıyla 11 saatlik hipotonik solüsyon ve 11 saatlik hipertonik solüsyon muamelesi sonucunda hücre lizisinin gerçekleştiği ancak dokulardan ortaya çıkan hücre kalıntılarının tamamen uzaklaştırılmadığı bildirilmiştir (Dahl vd. 2003). Aynı çalışmada bu yöntem ek olarak, hücresele kalıntıların tamamen uzaklaştırılması için biyolojik ve kimyasal uygulamaların gerekliliğine değinilmiştir.

### 1.2.2.7. Şelatlayıcı Deterjanlar

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikol bistetraasetik asit (EGTA) gibi şelatlayıcı ajanlar halka şeklinde kompleks bir moleküler yapıya sahip olup merkezi metal iyonlara kararlı bir şekilde bağlanarak bu iyonların izole edilebilmesini sağlamaktadırlar. Hücre yüzey reseptörünün kollajen ve fibronektini Arg-Gly-Asp dizisinden tanıyıp bağlanabilmesi için  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  gibi divalent katyonların gerekliliği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Gailit ve Ruoslahti 1988; Moore vd. 1994). Hücre-ESM adezyonunda görevli divalent katyonların bağlanmasıyla, bu ajanlar dokudan hücre materyallerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. EDTA genellikle tripsin kombinasyonu ile kullanılan bir yöntem olarak bildirilmiştir (Khorramirouz vd. 2014).

### 1.2.3. Biyolojik Yöntemler

Deselülerizasyon uygulamasında kullanılan biyolojik tekniklere proteaz dijesyonu, kalsiyum şelatlayıcı ajanlar ve nükleaz enzimlerinin kullanımı örnek olarak verilebilir (Teebken vd. 2000; Gamba vd. 2002; McFetridge vd. 2004). Deselülerizasyon protokollerinde proteolitik enzimlerden en çok kullanılanı tripsindir. Tripsin, prolinin yan kalıntısı olduğu durumlarda arjinin ve lizinin karbon tarafından peptid bağlantılarını ikiye ayırma özelliği taşır (Voet vd. 2002).

Biyolojik uygulamaların hücre materyallerin uzaklaştırılması ve ayrılmasındaki etkinliği birçok farklı dokuda çalışılmıştır. Bazı çalışmalar domuz pulmoner kapakçıklarından 24 saatlik agitasyon yöntemi ile birlikte %0.05 tripsin ve %0.02 EDTA muamelesi sonrasında hücre kalıntılarının uzaklaştırılmasındaki başarısını gösterirken (Schenke-Layland vd. 2003), bazı çalışmalar etkinlik derecesinin daha az olduğunu bildirmiştir (Grauss vd. 2005). Bu çalışmalardan domuz aortik kapakçıklarında yapılan çalışmada, %0.5 tripsin, %0.05 EDTA, %0.02 gentamisin, %0.02 mg/ml deoksiribonükleaz ve 20 µg/ml ribonükleaz ile yaklaşık 17 saat 37°C'de agitasyon yöntemi ile yapılan deselülerizasyon denemesi sonucunda hücrelerin tamamen ortamdaki uzaklaştırıldığı ancak hücre kalıntılarının dokudan uzaklaştırılmadığı bildirilmiştir (Grauss vd. 2005).

Enzimatik yöntemler, doku ve organlardaki ESM bileşenlerine zarar veren bir etkiye sahiptir. Uzun süreli tripsin uygulamasının normal pulmoner kapakçıklardaki ESM yapısına zarar verdiği ancak dokudaki kollajen miktarında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir (Schenke-Layland vd. 2003). Aynı zamanda tripsin uygulamasından sonra ESM'deki laminin ve fibronektin bileşenlerinin büyük ölçüde azaldığı, elastin ve glikozaminoglikanlar üzerinde de zamana bağlı olarak önemli derecede bir azalma olduğu bildirilmiştir (Grauss vd. 2005). Enzimatik deselülerizasyon protokollerinde elde edilen ESM'in in vitro ortamda endotelial hücre büyümesini desteklediği açıklanmıştır (Schenke-Layland vd. 2003; Grauss vd. 2005 ).

### 1.2.4. Proteaz İnhibitörleri

Deselülerizasyon protokollerinde sırasında hasar gören hücrelerden çok sayıda proteaz salınabilmektedir. Uzun süreli kimyasal uygulamaları sonrasında ortamda beliren proteazlar ESM'in doğal yapısına zarar verebilir. Bu nedenle dokuların deselülerizasyonu için kullanılan solüsyonların içine proteaz inhibitörlerinden fenil metil sülfonil florid, aprotinin veya löpeptin eklenebilmektedir (Fermor vd. 2015). Tampon solüsyonunun pH'ı 7-8 arasında tutulursa yine proteaz aktivitesi durur. Bunlara ek olarak lizis solüsyonunun sıcaklığının ve süresinin kontrolü de proteaz aktivitesini sınırlamaktadır (James 1978).

### 1.2.5. Antibiyotikler

Uzun süreli kimyasal deselülerizasyon uygulamaları sonrasında karşılaşılan bir diğer sorun, elde edilen ESM materyalinin kontaminasyonuna yol açacak bakteri varlığının ortaya çıkma ihtimalidir. Bu nedenle uygulanan birçok protokole kullanılan deselülerizasyon solüsyonları içine penisilin, streptomisin veya amfoterisin-B eklenmektedir (Affonso da Costa vd. 2004; Hilbert vd. 2004; Woods ve Gratzer 2005).

## 2. Sonuç

Bütün deselülerizasyon protokollerine bakıldığında büyük çoğunluğunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik uygulamaların bulunduğu bir kombin uygulama ile en etkin olabildiği ve uygulanacak protokolün ilgili dokuya göre modifiye edilmesi gerektiği anlaşılmaktadır. Genel olarak elde edilecek ESM'in yapısal ve fonksiyonel özelliğine en az şekilde hasar veren ama aynı zamanda en iyi şekilde hücre materyalleri uzaklaştırabilen yöntemin kullanılması gerekmektedir. Tipik olarak tercih edilecek olan yöntemde ilk olarak hipotonik veya hipertonic solüsyonlardan sonra toksik olmayan zwitteriyonik deterjanlar kullanılmalıdır. Eğer gerekli ise deterjan muamelesi öncesinde enzimatik bir yöntem olan tripsin/EDTA kullanılarak ESM'deki hücre membranını destekleyen bağlantıların kırılması kolaylaştırılabilir. Bu yöntemlerin yetersiz kaldığı durumlarda hücre materyallerin ortadan kaldırılması için iyonik deterjanlardan SDS, deoksikolat veya Triton X-200 protokole eklenebilir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalara bakılırsa kullanılan tüm kombinasyonlara rağmen doku ya da organdan %100 hücrelerin uzaklaştırılması mümkün değildir. Ancak buna rağmen dokuda bulunan hücrelerin büyük bir oranını ortadan kaldıran metotlarla, elde edilen biyolojik yapı malzemesinin implantasyonunun güvenilir olduğu gösterilmiştir. Doğal olarak elde edilmiş çok sayıda ESM yapı malzemesi ve bu malzemelerin elde edilmesinde kullanılan deselülerizasyon protokollerinde günümüzde insan sağlığında kullanılmak üzere piyasada bulunmaktadır (insan dermisi, domuz ince bağırsak submukozası, domuz idrar kesesi ve domuz kalp kapakçıkları). Büyüyen artan biyolojik yapı malzemesi listesine bakılacak olursa deselülerizasyon

protokollerinin daha da ileriye taşınacağı ve bu protokollerin klinikte daha çok ve güvenilir şekilde kullanılacağı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Affonso da Costa FD, Dohmen PM, Lopes SV, Lacerda G, Pohl F, Vilani R, Affonso Da Costa MB, Vieira ED, Yoschi S, Konertz W, Affonso da Costa I. 2004.** Comparison of cryopreserved homografts and decellularized porcine heterografts implanted in sheep. *Artif Organs*, 28:366–370.
- Akbay E, Onur MA. 2016.** Scaffold technologies: Using a natural platform for stem cell therapy. *MEDJ*, 31:205–212.
- Akhyari P, Kamiya H, Gwanmesia P, Aubin H, Tschierschke R, Hoffmann S, Karck M, Lichtenberg A. 2010.** *In vivo* functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 38:539–546.
- Badylak S, Liang A, Record R, Tullius R, Hodde J. 1999.** Endothelial cell adherence to small intestinal submucosa: an acellular bioscaffold. *Biomaterials*, 20:2257–2263.
- Badylak SF, Tullius R, Kokini K, Shelbourne KD, Klootwyk T, Voytik SL, Kraine MR, Simmons C. 1995.** The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model. *J Biomed Mater Res*, 29:977–985.
- Badylak SF. 2004.** Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunol*, 12:367–377.
- Borschel GH, Dennis RG, Kuzon Jr WM. 2004.** Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg*, 113:595–602.
- Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. 2006.** The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng*, 12:519–526.
- Cartmell JS, Dunn MG. 2000.** Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*, 49:134–140.
- Chen RN, Ho HO, Tsai YT, Sheu MT. 2004.** Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, 25:2679–2686.
- Cheng Y, Wang Y, Kang YZ, Hu PY, Gao Y, Pan MX. 2013.** *In vitro* culture of tumour-derived hepatocytes in decellularised whole-liver biological scaffolds. *Digestion*, 87:189–195.
- Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, Zhong DS, Chen C. 2002.** Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft. *Med Eng Phys*, 24:173–183.
- Constantinou CD, Jimenez SA. 1991.** Structure of cDNAs encoding the triple-helical domain of murine alpha 2 (VI) collagen chain and comparison to human and chick homologues. Use of polymerase chain reaction and partially degenerate oligonucleotide for generation of novel cDNA clones. *Matrix*, 11:1–9.
- Dahl SL, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. 2003.** Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*, 12:659–666.
- Du L, Wu X, Pang K, Yang Y. 2013.** Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. *Br J Ophthalmol*, 95:410–414.
- Exposito JY, D'Alessio M, Solursh M, Ramirez F. 1992.** Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen. *J Biol Chem*, 267:15559–15562.
- Falke G, Yoo JJ, Kwon TG, Moreland R, Atala A. 2003.** Formation of corporal tissue architecture *in vivo* using human cavernosal muscle and endothelial cells seeded on collagen matrices. *Tissue Eng*, 9:871–879.
- Faulk DM, Carruthers CA, Warner HJ, Kramer CR, Reing JE, Zhang L, D'Amore A, Badylak SF. 2014.** The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold biomaterial. *Acta Biomater*, 10:1–21.
- Fermor HL, Russell SL, Williams S, Fisher J, Ingham E. 2015.** Development and characterisation of a desellularised bovine osteochondral biomaterial for cartilage repair. *J Mater Sci: Mater Med*, 26:186.
- Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ, Geddes LA, Rundell AE. 2004.** Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 25:2353–2361.
- Gailit J, Ruoslahti E. 1988.** Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem*, 263:12927–12932.
- Gamba PG, Conconi MT, Lo Piccolo R, Zara G, Spinazzi R, Parnigotto PP. 2002.** Experimental abdominal wall defect repaired with acellular matrix. *Pediatr Surg Int*, 18:327–331.
- Gilbert TW, Stolz DB, Biancanello F, Simmons-Byrd A, Badylak SF. 2005.** Production and characterization of ECM powder: implications for tissue engineering applications. *Biomaterials*, 26:1431–1435.
- Goissis G, Suzigan S, Parreira DR, Maniglia JV, Braile DM, Raymundo S. 2000.** Preparation and characterization of collagen–elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artif Organs*, 24:217–223.
- Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, van Munsteren CJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC. 2005.** Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardiothorac Surg*, 27:566–571.
- Gulati AK. 1988.** Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg*, 68:117–123.
- He M, Callanan A. 2013.** Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Engineering Part B*, 19:1–15.
- Hilbert SL, Yanagida R, Souza J, Wolfenbarger L, Jones AL, Krueger P, Stearns G, Bert A, Hopkins RA. 2004.** Prototype anionic detergent technique used to decellularize allograft valve conduits evaluated in the right ventricular outflow tract in sheep. *J Heart Valve Dis*, 13:831–840.
- Hodde J, Hiles M. 2002.** Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnol Bioeng*, 79:211–216.
- Hodde J, Record R, Tullius R, Badylak S. 2002a.** Fibronectin peptides mediate HMEC adhesion to porcine-derived extracellular matrix. *Biomaterials*, 23:1841–1848.
- Hodde JP, Badylak SF, Brightman AO, Voytik-Harbin SL. 1996.** Glycosaminoglycan content of small intestinal submucosa: a bioscaffold for tissue replacement. *Tissue Eng*, 2:209–217.

- Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF. 2001.** Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothelium*, 8:11–24.
- Hodde JP, Record RD, Tullius RS, Badylak SF. 2002b.** Retention of endothelial cell adherence to porcine-derived extracellular matrix after disinfection and sterilization. *Tissue Eng*, 8:225–234.
- Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. 2004.** Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng*, 10:1346–1358.
- Jackson DW, Grood ES, Cohn BT, Arnoczky SP, Simon TM, Cummings JF. 1991.** The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. An experimental study in goats. *J Bone Joint Surg Am*, 73:201–213.
- Jackson DW, Windler GE, Simon TM. 1990.** Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone–patella tendon–bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med*, 18:1–10.
- James GT. 1978.** Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Anal Biochem*, 86:574–579.
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Silberhumer G, Wolner E, Weigel G, Simon P. 2003.** Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs*, 26:421–427.
- Khorramirouz R, Sabetkish S, Akbarzadeh A, Muhammadnejad A, Heidari R, Kajbafzadeh AM. 2014.** Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits. *Adv Med Sci*, 59:299–307.
- Kim BS, Yoo JJ, Atala A. 2004.** Peripheral nerve regeneration using acellular nerve grafts. *J Biomed Mater Res A*, 68:201–209.
- Kolker AR, Brown DJ, Redstone JS, Scarpinato VM, Wallack MK. 2005.** Multilayer reconstruction of abdominal wall defects with acellular dermal allograft (AlloDerm) and component separation. *Ann Plast Surg*, 55:36–41.
- Kropp BP, Eppley BL, Prevel CD, Rippey MK, Harruff RC, Badylak SF, Adams MC, Rink RC, Keating MA. 1995.** Experimental assessment of small intestinal submucosa as a bladder wall substitute. *Urology*, 46:396–400.
- Lee MS. 2004.** GraftJacket augmentation of chronic Achilles tendon ruptures. *Orthopedics*, 27:151–153.
- Lin P, Chan WC, Badylak SF, Bhatia SN. 2004.** Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng*, 10:1046–1053.
- McFetridge PS, Daniel JW, Bodamyali T, Horrocks M, Chaudhuri JB. 2004.** Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*, 70:224–234.
- Methe K, Backdahl H, Johansson BR, Nayakawde N, Dellgren G, Sumitran-Holgersson S. 2014.** An alternative approach to decellularize whole porcine heart. *BioResearch*, 3:327–338.
- Moore R, Madara JL, MacLeod RJ. 1994.** Enterocytes adhere preferentially to collagen IV in a differentially regulated divalent cation-dependent manner. *Am J Physiol*, 266: 1099–1107.
- Muratov R, Britikov D, Sachklov A, Akatov V, Soloviev V, Fadeeva I, Bockeria L. 2010.** New approach to reduce allograft tissue immunogenicity. *Experimental data. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, 10:408–412.
- Pruss A, Kao M, Kiesewetter H, von Versen R, Pauli G. 1999.** Virus safety of avital bone tissue transplants: evaluation of sterilization steps of spongiosa cuboids using a peracetic acid–methanol mixture. *Biologicals*, 27:195–201.
- Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, Weigel G. 2004.** Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 127:399–405.
- Roberts TS, Drez Jr D, McCarthy W, Paine R. 1991.** Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone–patellar tendon–bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med*, 19:35–41.
- Sano H, Orbay H, Terashi H, Hyakusoku H, Ogawa R. 2013.** Acellular adipose matrix as a natural scaffold for tissue engineering. *JPRAS*, 67:99–106.
- Scarritt ME, Pashos NC, Bunnell BA. 2015.** A review of cellularisation strategies for tissue engineering of whole organs. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 3:43–60.
- Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, König K, Riemann I, Halbhuber KJ, Wahlers T, Stock UA. 2003.** Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*, 143:201–208.
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. 2004.** Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*, 1666:105–117.
- Teebken OE, Bader A, Steinhoff G, Haverich A. 2000.** Tissue engineering of vascular grafts: human cell seeding of decellularised porcine matrix. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 19:381–386.
- Uchimura E, Sawa Y, Taketani S, Yamanaka Y, Hara M, Matsuda H, Miyake J. 2003.** Novel method of preparing acellular cardiovascular grafts by decellularization with poly(ethylene glycol). *J Biomed Mater Res A*, 67:834–837.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW. 2002.** *Fundamentals of biochemistry*. New York: Wiley.
- Voytik-Harbin SL, Brightman AO, Kraine MR, Waisner B, Badylak SF. 1997.** Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa. *J Cell Biochem*, 67:478–491.
- Woods T, Gratzner PF. 2005.** Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone–anterior cruciate ligament–bone graft. *Biomaterials*, 26:7339–7349.
- Yang B, Zhang Y, Zhou L, Sun Z, Zheng J, Chen Y, Dai Y. 2010.** Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Engineering: Part C*, 16:1201–1211.
- Yoo JJ, Meng J, Oberpenning F, Atala A. 1998.** Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells. *Urology*, 51:221–225.