



# Deterjan Esash Hücresizleştirilen Tavuk Derisinin Doku İskelesi Olarak Karakterizasyonu

İlyas İnci

İzmir Demokrasi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Dişçilik Hizmetleri Bölümü, Diş Protez Teknolojisi, İzmir 35140, Türkiye,  
(ORCID: 0000-0001-7231-7822), [ilyasinci@gmail.com](mailto:ilyasinci@gmail.com)

(İlk Geliş Tarihi 2 Mart 2021 ve Kabul Tarihi 21 Kasım 2021)

(DOI: 10.31590/ejosat.889435)

**ATIF/REFERENCE:** İnci, İ. (2021). Deterjan Esaslı Hücresizleştirilen Tavuk Derisinin Doku İskelesi Olarak Karakterizasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (27), 1010.1017.

## Öz

Özellikle son yıllarda doku mühendisliği uygulamaları için biyomalzemeler elde etmek amacıyla birçok doku ve organa hücresizleştirme yöntemi uygulanmıştır. Bu çalışmada, potansiyel bir doku iskelesi olarak hücresizleştirilmiş tavuk derisinin hazırlanması ve karakterizasyonu ile ilgili kapsamlı ve ayrıntılı incelemeler gerçekleştirilmiştir. Hücresizleştirme ajanı olarak kullanılan sodyum deoksikolat farklı zaman aralıklarında dokulara uygulanarak hücresizleştirme sürecinde en uygun yöntemin bulunabilmesi amacıyla DNA miktarı tayini, hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması, mekanik özellikler, ekstraselüler matriksin (ESM) korunması ve hücre canlılığı ile ilgili analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hücresizleştirme süresinin uzatılmasının hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması ve dokudan uzaklaştırılan DNA miktarı yönünden avantaj sağlarken diğer taraftan ESM'nin korunması, mekanik özellikler ve hücre canlılığı yönünden dezavantaja sebep olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte hücresizleştirilmiş tavuk derisinin, hücre tutunması, büyümesi ve proliferasyonunu destekleyen özellikte olduğu gösterilerek hazırlanan malzemenin biyouyumlu olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada hücresizleştirilmiş tavuk derisinin kolayca bulunabilen, ucuz ve biyouyumlu bir malzeme olarak, özellikle deri dokusu mühendisliği olmak üzere doku mühendisliği ile ilgili daha ileri çalışmalar için doku iskelesi hazırlanması amacıyla kullanılabilir uygun bir biyomalzeme olduğu gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** doku mühendisliği, hücresizleştirme, tavuk derisi, doku iskelesi, biyomalzeme

## Characterization of Detergent-based Decellularized Chicken Skin as a Tissue Scaffold

### Abstract

Especially in recent years, decellularization method has been applied to many tissues and organs in order to obtain biomaterials for tissue engineering applications. In this study, comprehensive and detailed investigations were carried out on preparation and characterization of decellularized chicken skin as a potential tissue scaffold. Sodium deoxycholate was applied to tissues as a decellularization agent at different time intervals and analysis were performed on DNA quantitation, removal of cellular components, mechanical properties, preserving the extracellular matrix (ECM) and cell viability to find the most appropriate method in the process of decellularization. The results showed that extending the duration of decellularization provides advantages in terms of the removal of cellular components and the amount of DNA removed from the tissue, on the other hand, it causes disadvantages in terms of protection of ECM, mechanical properties, and cell viability. However, the prepared material was proven to be biocompatible by showing that decellularized chicken skin is capable of supporting cell attachment, growth, and proliferation. In conclusion, in this study, it was shown that decellularized chicken skin is an easily available, inexpensive, and biocompatible material that can be used for preparation of tissue scaffold for further studies in tissue engineering, especially in skin tissue engineering.

**Keywords:** tissue engineering, decellularization, chicken skin, tissue scaffold, biomaterial

## 1. Giriş

Doku mühendisliği, biyoyumlu malzemeleri, hücreleri, büyüme faktörleri gibi biyokimyasal sinyal moleküllerini ve mekanik yüklemeye gibi fiziksel faktörleri ve ayrıca bu faktörlerin kombinasyonunu kullanarak doku ve organların üretilmesini amaçlayan bir bilim dalıdır (Berthiaume vd., 2011; Langer & Vacanti, 1993).

Hücreleştirme, özellikle doku mühendisliğinde son yirmi yılda çok yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Hücreleştirmenin temel amacı, ekstraselüler matris (ESM)'nin mekanik bütünlüğünü, yapısal bileşimini ve biyolojik aktivitesini korurken hücreleri ve hücre çekirdeği bileşenlerini etkili bir şekilde dokudan uzaklaştırmaktır (Gilpin & Yang, 2017; Grauss vd., 2003; Liao vd., 2020).

Doku mühendisliğinde kas, deri, kıkırdak, karaciğer, kalp, kemik, vasküler doku, amniyotik membran, perikard, periost, yağ dokusu ve omentum gibi çeşitli organ ve dokular hücreleştirilerek doku iskeleleri ve biyomalzemeler olarak kullanılmıştır (Gilbert vd., 2006; Inci vd., 2020; Liao vd., 2020).

Deri, omurgalılarda organizmayı dış ortama karşı koruyan en dış tabakadır. Vücuttaki kimyasal, termal ve higrometrik süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir işlevi vardır. Kuş derisi, memelilerin derisine kıyasla tüylerin varlığı, kalınlıkları ve yağ bezlerinin olmaması gibi bazı farklılıklar gösterir. Bununla birlikte, tüm yapısal histolojileri ve morfolojileri memeli derisine benzerdir. Kuşlarda başlıca deri katmanları olan epidermis ve dermis, bir bazal membran ile birbirinden ayrılır (Couteaudier & Denesvre, 2014). Tavuk derisi kullanımının, bol ve bulunması kolay bir malzeme kaynağı olması gibi avantajları vardır. Ayrıca tavuk derisi ucuz bir malzeme olduğundan biyomalzeme olarak kullanılması bir diğer avantajdır ancak literatürde sadece Mirzarafie ve arkadaşları tarafından yayınlanan tavuk derisinin hücreleştirilmesine ilişkin bir çalışma bulunabilmiştir (Mirzarafie vd., 2014). Bununla birlikte, yaptıkları çalışma, dokuların hücreleştirildiğini göstermek için yalnızca DNA miktar tayini ve artık dehidrojenaz aktivitesi analizlerini içerdiği için biyomalzeme olarak hücreleştirilmiş tavuk derisinin kullanımına ilişkin çok sınırlı bilgi sağlamıştır.

Bu çalışmanın amacı, hücreleştirilmiş tavuk derisinin doku mühendisliği uygulamaları için doku iskelesi olarak hazırlanması ve karakterizasyonu ile ilgili incelemeler yaparak bu konuda bilgi sağlamaktır. Hücreleştirilmiş doku iskelesi hazırlanması sırasında en uygun yöntemin bulunması için sodyum deoksikolat'ın farklı zaman aralıklarında dokulara uygulanmasının etkileri karakterizasyon safhasında hücresel bileşenlerin uzaklaştırılması, DNA ölçümü, ESM'nin korunması, hücre canlılığı ve mekanik özellikler gibi çeşitli parametrelere göre karşılaştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Hücreleştirme

Tavuk derileri yerel bir mezbahanedan elde edilmiştir. Dokular, % 1 penisilin/streptomisin (P4333, Sigma-Aldrich) içeren steril fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (D8537, Sigma-Aldrich) ile yıkanmış ve bunun ardından, hücreleştirme işleminden önce tavuk derileri -20°C'de saklanmıştır. Dokuların hücreleştirilmesi, sakrifikasyondan sonra 24 saat içinde gerçekleştirilmiştir.

Tavuk derilerinin hücreleştirilmesinde sodyum deoksikolat (D6750, Sigma-Aldrich) deterjanı hücreleştirme ajanı olarak kullanılmıştır. Hücreleştirme aşamasında 3 farklı grup oluşturulmuştur. Buna göre dokular, 4°C'de 6 saat (Grup 1), 24 saat (Grup 2) ve 48 saat (Grup 3) % 1 (ağırlık/hacim) konsantrasyondaki sodyum deoksikolat çözeltisi kullanılarak hücreleştirilmiştir. Hücreleştirme uygulanan her bir grup için 4 örnek kullanılmıştır (n: 4).

Hücreleştirme çözeltileri her 1 saat, 2 saat ve 3 saatte taze deterjan çözelti hazırlanarak değiştirilmiş ve bunun ardından tüm hücreleştirme protokollerinde çözeltiler her 12 saatte bir değiştirilmiştir. Dokuların deterjan çözeltisi ile muamele edilmesi basamağı bittikten sonra hücreleştirilmiş tavuk derileri, dokudaki deterjanın uzaklaştırılması için 12 saatlik yıkama döngüleri ile 4°C'de 48 saat steril PBS kullanılarak yıkanmıştır. Tüm hücreleştirme ve yıkama basamakları, bir çalkalayıcı kullanılarak 100 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak ise herhangi bir hücreleştirme işlemi uygulanmamış olan doğal tavuk derileri kullanılmıştır (Kontrol Grubu).

Bundan sonraki deneysel kısımların hepsinde her bir grup için 4 örnek kullanılmıştır (n: 4).

### 2.2. Histolojik İncelemeler

Doğal dokular (Kontrol Grubu) ve hücreleştirilmiş tavuk derileri, histolojik değerlendirmeler için kesitler alınmak üzere kriyojenik yöntemle gömülmüştür. Bunun için örnekler kriyokalıplara yerleştirilmiş ve daha sonra kriyo-gömme malzemesi olarak kullanılan Optimal Kesme Sıcaklığı Bileşiği (Tissue-Tek, Sakura) içerisine gömülmüştür. Örnekler kriyostat (Leica CM1950, Leica, Almanya) içinde dondurulmuş ve dokulardan 10 µm kalınlığında kesitler alınmıştır.

Dokunun genel morfolojisini ve hücreleştirme yöntemlerinin etkinliğini belirlemek için Optimal Kesme Sıcaklığı Bileşiği (Tissue-Tek, Sakura) ve kriyostat kullanılarak elde edilen 10 µm kalınlığındaki doku kesitlerinin hematoksilin & eozin (H&E) boyaması yapılmıştır. Kısaca, kesitler PBS ile yıkanmış ve hematoksilin (HHS32, Sigma-Aldrich) ile boyanmıştır. Bir sonraki adımda örnekler musluk suyu ile yıkanmış ve ardından numuneler sırasıyla % 70 ve % 95 etanol ile muamele edilerek dokulardaki su uzaklaştırılmıştır. Daha sonra dokular % 0.25 eozin çözeltisi (HT110132, Sigma-Aldrich) kullanılarak boyanmıştır. Sonraki adımda ise sırasıyla % 70, % 95 ve % 100 etanol kullanılarak örneklerdeki su uzaklaştırılmıştır. Numunelere ksilen (534056, Sigma-Aldrich) ile muamele edilmiş ve ardından Permount (SP15, Fisher Scientific) ile lameller kapatılmıştır.

Dokulardaki glikozaminoglikan (GAG) yoğunluğunu incelemek için bir başka çalışmada bahsedildiği gibi toluidin mavisi (89640, Sigma-Aldrich) ile boyama yapılmıştır (Estes vd., 2010). Kısaca, Optimal Kesme Sıcaklığı Bileşiği (Tissue-Tek, Sakura) ve kriyostat kullanılarak elde edilen 10 µm kalınlığındaki numuneler PBS ile yıkanmış ve ardından % 0.25 (ağırlık/hacim) konsantrasyondaki toluidin mavisi çözeltisi kullanılarak doku kesitleri boyanmıştır. Örnekler distile su ile yıkanmış ve sırasıyla % 95 ve % 100 etanol ile dokulardaki su uzaklaştırılmıştır. Numunelere ksilen (534056, Sigma-Aldrich) uygulanmasından sonra Permount (SP15, Fisher Scientific) ile lameller kapatılmıştır.

### 2.3. DAPI Analizi

Hüresizleştirme etkinliğinin ve dokulardaki kalıntı DNA varlığının değerlendirilmesi için 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (D9542, Sigma-Aldrich) boyaması yapılmıştır. DAPI stok çözeltisi (1 mg/ml) hazırlanmış ve metanol ile seyreltme yapılarak DAPI çalışma çözeltisi (1 µg/ml) elde edilmiştir. Optimal Kesme Sıcaklığı Bileşiği (Tissue-Tek, Sakura) ve kriyostat kullanılarak 10 µm kalınlığında kesit alınarak hazırlanan örnekler, 25 mm x 25 mm boyutlarındaki lamlara (72250-01, Electron Microscopy Sciences) aktarılmıştır. Lam üzerindeki örnekler, 6 kuyucuklu plakaya aktarılmış ve ardından DAPI çalışma çözeltisi kullanılarak yıkanmıştır. Daha sonra numunelerin üzerine kapatacak kadar DAPI çalışma çözeltisi kullanılmış ve 37°C'de 15 dakika inkübasyon yapılmıştır. DAPI çözeltisinin uzaklaştırılmasından sonra örnekler metanol ile muamele edilmiştir. 6 kuyucuklu plakaların kuyucuklarında bulunan ve üzerlerinde numuneler bulunan lamlar kuyucuklardan çıkarıldıktan sonra örnekler bir floresan mikroskobu (Zeiss Axio Scope A1, Zeiss, Almanya) kullanılarak 488 nm emisyon ve 340 nm eksitasyonda analiz edilmiştir.

### 2.4. DNA Miktar Tayini

Bu çalışma basamağında, numunelerin DNA içeriği, floresan test içeren bir DNA miktar tayini kiti ile ölçülmüştür. Hüresizleştirme işlemlerinden sonra, örnekler PBS ile yıkanmış ve Proteinaz K (0.1 mg/ml) (P6556, Sigma-Aldrich) içeren sindirme tampon çözeltisi (10 mM Tris (10812846001, Sigma-Aldrich), % 0.1 Triton X-100 (X-100, Sigma-Aldrich) ve 1 mM etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) (ED, Sigma-Aldrich)) ile muamele edilerek 50°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Süpernatantlar elde edilerek 10 kat seyreltilmiştir. Dokuların DNA içeriğini analiz etmek için floresan test içeren DNA miktar tayini kiti (DNAQF, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Kitte bulunan floresan bir boya olan BisBenzimide Hoechst 33258, çift sarmallı DNA'ya bağlanabildiğinden dolayı floresan analizi yapmak için kullanılmıştır. Kısaca, 100 µg/ml ve 10 µg/ml DNA stok çözeltileri hazırlanmış ve daha sonra stok çözeltiler kullanılarak 0.1-100 ng/µl konsantrasyon aralığında standart çözeltiler hazırlanmıştır. Bir sonraki adımda, bisBenzimide Hoechst 33258 çözeltisi her bir örnekle karıştırılmış ve karışımlar 96 kuyucuklu bir plakaya aktarılmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu plaka, 360 nm'de eksitasyona ve 460 nm'de emisyonu ayarlanmış bir floresan plaka okuyucusunda (Agilent Cary Eclipse, Agilent, A.B.D.) okunmuştur.

### 2.5. Hücre kültürü

Hücre kültürü çalışmalarında, MRC-5 insan fibroblast hücreleri (ATCC-CCL-171, The American Type Culture Collection) kullanılmıştır. Hücreler, % 1 penisilin-streptomisin (P4333, Sigma-Aldrich), % 1 L-glutamin (59202C, Sigma-Aldrich) ve % 10 fetal sığır serumu (FBS) (F0804, Sigma-Aldrich) içeren Dulbecco Modifiye Eagle ortamı (DMEM) (D5671, Sigma-Aldrich) kullanılarak hücre kültür ortamında çoğaltılmıştır. MRC-5 hücre hattı % 95 nem ve % 5 CO<sub>2</sub> koşullarında 37°C'de inkübe edilmiştir. Her 2-3 günde bir hücre kültürü ortamı değiştirilmiştir. Çoğalan hücrelerin başka hücre kültür kaplarına pasajlanması için % 0.25 tripsin ve 1 mM EDTA (SM-2003, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

### 2.6. Hücre Canlılığı

Hüresizleştirilmiş dokuların sitotoksitesisi, 3-(4,5-dimetiltiyazolil-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) (475989, Sigma-Aldrich) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. İlk olarak numuneler 1 mm kalınlığında ve 6 mm çapında kesilmiş, ardından % 70 etanol çözeltisinde 30 dakika bekletilerek steril edilmiş, steril PBS ile üç kez yıkanmış ve 96 kuyucuklu plakaya yerleştirilmiştir (Odabas vd., 2013). % 1 penisilin-streptomisin (P4333, Sigma-Aldrich), % 1 L-glutamin (59202C, Sigma-Aldrich) ve % 10 FBS (F0804, Sigma-Aldrich) ile takviye edilmiş fenol kırmızısı içermeyen DMEM (R7509, Sigma-Aldrich) kültür ortamında 10<sup>4</sup> adet MRC-5 fibroblast hücre boş kuyucuklara ve hüresizleştirilmiş numunelerin üzerine ekilmiştir. 24 saat ve 48 saat inkübasyondan sonra kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücre canlılığını analiz etmek için her bir kuyucuğa steril 50 µl MTT çözeltisi (1 mg/ml) içeren taze kültür ortamı (fenol kırmızısı içermeyen DMEM) aktarılmıştır (Ark vd., 2017). MTT içeren hücre kültür ortamı 3 saat inkübasyondan sonra kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve ardından formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 160 µl dimetil sülfoksit ilave edilmiştir. Absorbans değerleri bir mikro plaka okuyucu (Biotek Epoch, Biotek, A.B.D.) kullanılarak 570 nm'de ölçülmüştür. Boş kuyucuklara ekilen hücrelerin hücre canlılığı değerleri kontrol grubu olarak alınmış ve kontrol grubunun absorbans değeri % 100 hücre canlılığı olarak kabul edilmiştir. Hüresizleştirilmiş örneklerin hücre canlılığı değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

### 2.7. Mekanik Test

Hüresizleştirilmiş ve kontrol numunelerinin çekme testi, dikdörtgen şekilli numuneler kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla; genişlik, kalınlık ve uzunluk ölçüleri sırasıyla 5 mm (± 0,06 mm), 1 mm (± 0,05 mm) ve 30 mm (± 0,09 mm) boyutlarında dikdörtgen şekilli örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra dokulara, 100 N yük hücreli mekanik test makinesi (Shimadzu AG-IS, Shimadzu, Japonya) kullanılarak çekme testi uygulanmıştır. Numunelere 5 mm/dakika hızında tek eksenli çekme kuvveti uygulanmış ve elastik modülü belirlemek amacıyla kuvvet-uzama verileri elde edilmiştir. Gerilme-uzama eğrisinin doğrusal olan kısmının eğimi, örneklerin elastik modül değerleri olarak alınmıştır.

### 2.8. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hüresizleştirilmiş dokuların morfolojisini analiz etmek için SEM kullanılmıştır. Hüresizleştirilmiş örnekler, bir gece boyunca bir liyofilizatör (Christ Alpha 1-4 LD Plus, Christ, Almanya) kullanılarak liyofilize edilmiştir. Bunun ardından, liyofilize edilmiş doku örnekleri, altın/paladyum (40/60) ile kaplanmış ve bir SEM (Zeiss Sigma 300, Zeiss, Almanya) kullanılarak 5 kV'de analiz edilmiştir.

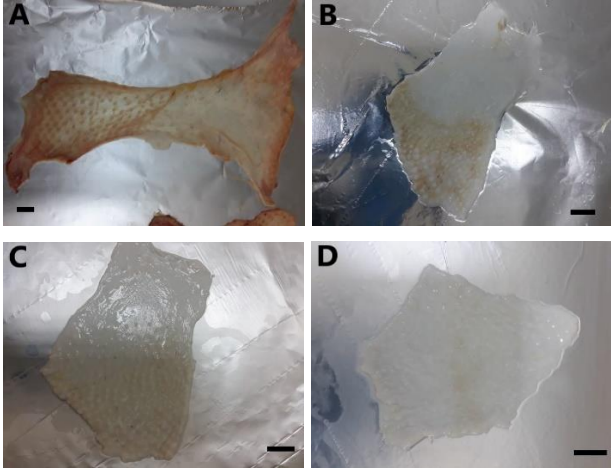
### 2.9. İstatistiksel analiz

DNA miktar tayini, mekanik test ve hücre canlılığı sonuçlarında istatistiksel olarak ikili karşılaştırmalar yapmak için Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Bahsedilen basamaklardaki çalışmalardan elde edilen veriler, iki uçlu olarak değerlendirilmiş ve p < 0.05 olduğunda p değeri anlamlı kabul edilmiştir. Tüm veriler, artı veya eksi standart sapma ile ortalama değerler olarak gösterilmiştir. İstatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics version 25 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır.

### 3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

#### 3.1. Hücresizleştirme

Doğal tavuk derisinin ve hücresizleştirilmiş dokuların makroskopik görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir.



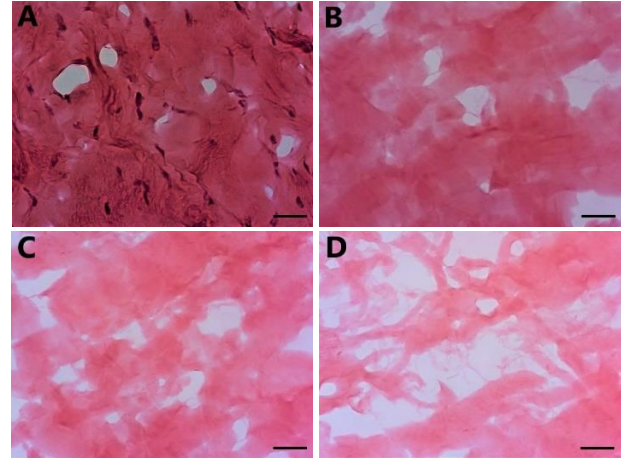
Şekil 1. Kontrol grubu (A), Grup 1 (B), Grup 2 (C) ve Grup 3 (D)'e ait makroskopik görüntüler. Ölçek çubukları 1 cm'yi göstermektedir.

Görüntüler, hücresizleştirme işlemi daha uzun süreler boyunca devam ettirildiğinde, numunelerin renklerinin daha beyaz hale geldiğini ve soluklaştığını göstermiştir. Hücresizleştirme işlemi uygulanmamış dokulara turuncu-açık kahverengi renk veren hücrelerin ve hücresel bileşenlerin Grup 1'deki örneklerle ait Şekil 1B'deki görüntülerde dokuda kaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, hücresel bileşenlerin 24 ve 48 saatlik hücresizleştirme işlemlerinden sonra başarıyla uzaklaştırıldığı elde edilen makroskopik görüntülerle ortaya çıkarılmıştır (Şekil 1C ve Şekil 1D).

#### 3.2. Histolojik İncelemeler

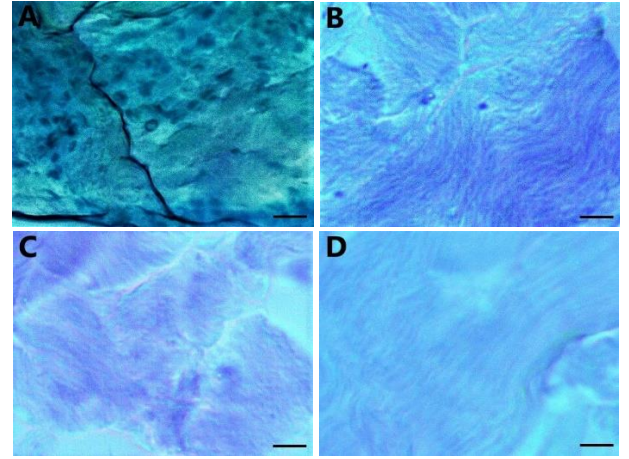
H&E boyama, hücresizleştirme metodlarının etkinliğini ve hücresizleştirilmiş örneklerin morfolojisini belirlemek için yapılmıştır.

Şekil 2A'da hücre çekirdeklerinin doğal tavuk derisinde açıkça görüldüğü, kollajen liflerinin ve ESM'nin kırmızı renkle gözlenebildiği ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte, hücresizleştirilmiş tavuk derilerinde 6 saat, 24 saat ve 48 saat hücresizleştirme işlemlerinden sonra hücrelerin dokulardan tamamen uzaklaştırıldığı gözlenmiştir (Şekil 2B, Şekil 2C ve Şekil 2D). Ayrıca, 48 saatlik hücresizleştirmeden sonra, Şekil 2D'de dokuların renginin çok daha açık hale geldiği görülmüş olup bu durum özellikle kollajen lifler olmak üzere ESM kaybı olduğunu göstermiştir.



Şekil 2. Kontrol grubu (A), Grup 1 (B), Grup 2 (C) ve Grup 3 (D)'e ait H&E boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu 50 µm'yi göstermektedir. Görüntüler 100X büyütme ile alınmıştır.

Doğal tavuk derisi ve hücresizleştirilmiş deri örneklerinde GAG yoğunluğunu incelemek için toluidin mavisi ile boyama yapılmıştır.



Şekil 3. Kontrol grubu (A), Grup 1 (B), Grup 2 (C) ve Grup 3 (D)'e ait Toluidin mavisi boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu 50 µm'yi göstermektedir. Görüntüler 100X büyütme ile alınmıştır.

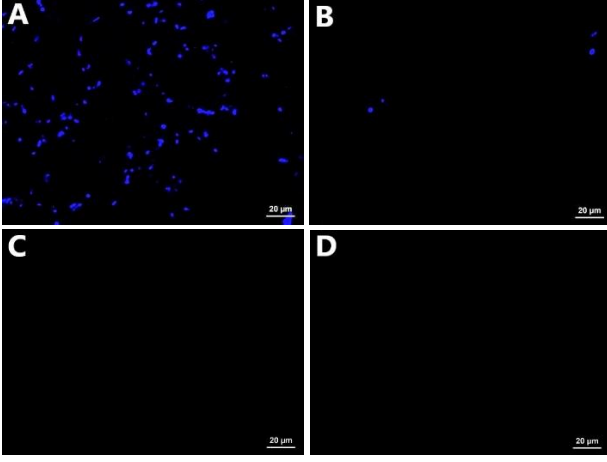
Şekil 3A'da, doğal tavuk derisindeki hücre çekirdeklerinin koyu mavi ile boyandığı gözlenmiştir. Öte yandan, hücresizleştirilmiş örneklerin görüntülerinde hücre bulunamamıştır (Şekil 3B, Şekil 3C ve Şekil 3D). Bu görüntülerle, hücresizleştirme işlemleri sırasında hücrelerin dokulardan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, toluidin mavisi boyama görüntülerinden, hücresizleştirme süresi arttıkça mavi rengin daha açık hale geldiği ve bu nedenle örneklerdeki GAG miktarlarının azaldığı ortaya çıkarılmıştır.

H&E boyama görüntüleriyle gösterildiği gibi (Şekil 2), hücreler ve hücresel bileşenler 6 saat, 24 saat ve 48 saat sonra hücresizleştirilmiş numunelerden başarıyla uzaklaştırılmıştır. Ayrıca, toluidin mavisi ile yapılan boyama sonuçları incelendiğinde, numunelerde GAG yoğunluğunun azalmasının bir göstergesi olarak hücresizleştirme süresi arttıkça mavi rengin daha açık hale geldiği gösterilmiştir (Şekil 3). Tavassoli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sığır eklem kıkırdağının hücresizleştirilmesi için 1, 4 ve 8 saat süreyle hücresizleştirme ajanı olarak % 2.5 konsantrasyonda sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi uygulanmış ve hücresizleştirme süresi arttırıldıkça

dokuların GAG içeriklerinin azaldığı ortaya çıkarılmıştır (Tavassoli vd., 2015).

### 3.3. DAPI Analizi

DAPI boyaması, hüresizleştirme yöntemleri uygulanmış dokular üzerinde hüresizleştirme etkinliğini analiz etmek için yapılmıştır.



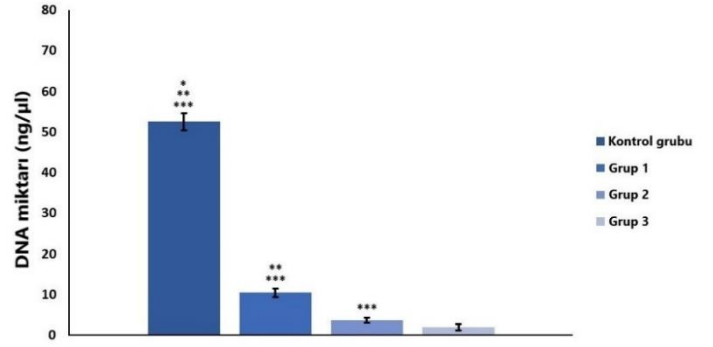
Şekil 4. Kontrol grubu (A), Grup 1 (B), Grup 2 (C) ve Grup 3 (D)'e ait DAPI boyama görüntüleri. Görüntüler 40X büyütme ile alınmıştır.

Şekil 4A'da, doğal tavuk derisinde hücre çekirdekleri olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, Grup 1'e ait sonuçları gösteren Şekil 4B'de 6 saat sonra hüresizleştirilmiş numunelerde birkaç hücre çekirdeği olduğu ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, 24 saat (Şekil 4C) ve 48 saat (Şekil 4D) süresince hüresizleştirilmiş örneklerden elde edilen sonuçlar bu dokularda hiçbir DNA kalıntısı olmadığını göstermiştir. Alshaiikh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (Alshaiikh vd., 2019) 10 saat boyunca % 0.5 konsantrasyonda sodyum deoksikolat ile hüresizleştirilen fare ovariumunda DAPI boyaması sonucunda DNA kalıntıları gözlenmediği bildirilmiştir. Bahsi geçen çalışmada elde edilen DAPI boyama sonuçları ile sunulan çalışmada elde edilen DAPI boyama sonuçlarının birbiriyle tutarlı olduğu ortaya çıkmıştır.

### 3.4. DNA Miktar Tayini

Örneklerin DNA içerikleri Şekil 5'te gösterilmiştir. Hüresizleştirilmiş tüm dokuların, kontrol grubu olan doğal tavuk derisine ( $52.5 \pm 2.1$  ng/ $\mu$ l) kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük DNA miktarlarına sahip oldukları elde edilen sonuçlarla ortaya çıkarılmıştır ( $p < 0.05$ ). 6 saat boyunca hüresizleştirme işlemi uygulanan Grup 1'den ( $10.5 \pm 1.1$  ng/ $\mu$ l) elde edilen sonuçlar, 24 saat ( $3.7 \pm 0.5$  ng/ $\mu$ l) ve 48 saat ( $1.9 \pm 0.8$  ng/ $\mu$ l) süresince hüresizleştirme yapılan dokulardaki veriler ile karşılaştırıldığında Grup 1'deki örneklerin Grup 2 ve Grup 3'teki numunelere göre anlamlı olarak daha yüksek DNA içeriğine sahip olduğu gösterilmiştir ( $p < 0.05$ ). Buna ek olarak, DNA miktar tayini sonuçları sayesinde, Grup 2'nin, Grup 3 ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha fazla DNA içeriğine sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır ( $p < 0.05$ ). Bu sonuçlar ışığında, Grup 3'teki dokuların en düşük DNA içeriğine sahip olduğu bulunmuştur.

48 saat boyunca hüresizleştirilmiş örneklerin en düşük DNA içeriklerine sahip olması nedeniyle, DNA miktar tayini verilerinin histolojik analiz sonuçlarıyla tutarlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 5).

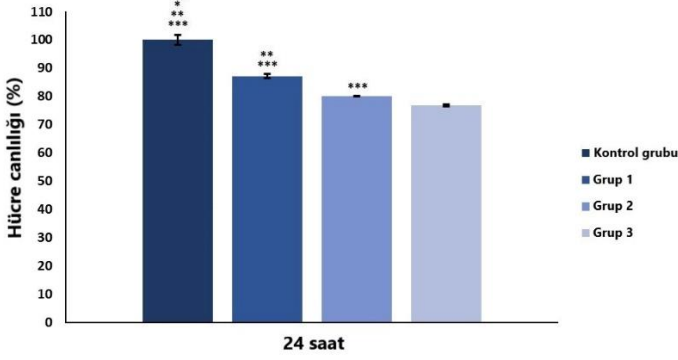


Şekil 5. Doğal tavuk derisi (kontrol grubu) ve hüresizleştirme işlemleri uygulanmış dokulardaki DNA miktar tayini çalışmasının sonuçları (\*\*\*, Grup 3 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*\*, Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ).

Ayrıca, DNA miktar tayini çalışmasında, 6 saat süreyle hüresizleştirilmiş dokuların (Grup 1), 24 saat ve 48 saat süreyle hüresizleştirme işlemleri uygulanan örneklerle kıyasla daha yüksek miktarlarda DNA'ya sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu nedenle, bu sonuçlar DAPI boyama sonuçlarını desteklemektedir çünkü 6 saat süreyle hüresizleştirilmiş dokuların DAPI boyama görüntülerinde bazı hücelere ait hücre çekirdekleri gözlenmiştir (Şekil 4B). Mirzarafie ve arkadaşları, tavuğun tendon, deri ve kaslarını hüresizleştirmek için SDS ve Triton X-100 deterjanlarını kullanmıştır. Fakat çalışmaları sınırlı bilgi sağlamıştır çünkü hüresizleştirme basamağında sonra dokulardaki hücrelerin uzaklaştırılmasını göstermek için yalnızca DNA miktar tayini ve MTT testi yapmışlardır (Mirzarafie vd., 2014). Söz konusu çalışmada, hüresizleştirme işlemlerinden sonra DNA içeriğinin neredeyse % 94'ünün dokulardan uzaklaştırıldığı rapor edilmiş olup bu bulguların, sunulan çalışmanın DNA içeriği verilerini desteklediği görülmektedir. Mirzarafie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya kıyasla, sunulan bu çalışmanın hüresizleştirilmiş tavuk derisinin doku mühendisliği uygulamalarında doku iskelesi olarak kullanılması amacıyla hüresizleştirilmiş tavuk derisinin hazırlanması ve karakterizasyonu hakkında daha kapsamlı ve ayrıntılı bilgiler sağladığının vurgulanması gerekmektedir çünkü Mirzarafie ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sadece DNA ölçümü ile sınırlıdır. Başka bir çalışmada, hüresizleştirilmiş perikardın DNA içeriğinin 20 ng/mg DNA olduğu, ancak doğal perikardın DNA miktarının yaklaşık 2150 ng/mg olduğu ortaya çıkarılmıştır (Rajabi-Zeleti vd., 2014). Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada 24 saat boyunca % 1 SDS ve nükleaz çözeltileri kullanılarak hüresizleştirme işlemi ile insan perikardındaki DNA'nın yaklaşık % 99'unun uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (Jalili-Firoozinezhad vd., 2016). Bahsedilen çalışmaların DNA miktar analizi değerlerinin, sunulan çalışmanın DNA miktar tayini sonuçları ile tutarlı olduğu ortaya çıkmaktadır.

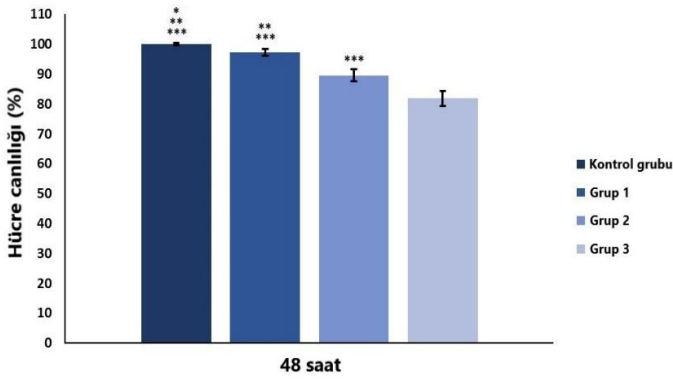
### 3.5. Hücre Canlılığı

Çalışmanın bu basamağında, hüresizleştirilmiş dokuların üzerine ekilen hücrelerdeki hücre canlılığı seviyeleri 24 ve 48 saatlik süreler sonunda MTT testi ile belirlenmiştir. Hücre kültürü plakası kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Numunelerin 24 ve 48 saat sonundaki MTT analiz sonuçları sırasıyla Şekil 6 ve Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 6. Kontrol grubunun ve hücreleştirme işlemleri uygulanmış numunelerin 24 saatlik hücre canlılığı sonuçları (\*\*\*, Grup 3 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*\*, Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ).

Şekil 6'da hücreleştirilmiş tüm dokulardaki 24 saatlik hücre canlılığı sonuçlarının, kontrol grubuna (hücre kültürü plakası) göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir ( $p < 0.05$ ). Grup 1'deki örnekler ekilen hücrelerin 24 saatlik hücre canlılığı değerleri (%  $87.1 \pm 0.8$ ), 24 saat (Grup 2) ve 48 saat (Grup 3) süresince hücreleştirme işlemine uğrayan dokular üzerinde çoğaltılan hücrelerin hücre canlılığı seviyelerine göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Ayrıca, Grup 2'deki 24 saatlik hücre canlılığı düzeyi (%  $80.0 \pm 0.1$ ), Grup 3'teki 24 saatlik hücre canlılığı değerleri (%  $76.8 \pm 0.5$ ) ile karşılaştırıldığında, Grup 2'deki hücre canlılığı seviyesinin Grup 3'e göre anlamlı olarak daha yüksek çıktığı gösterilmiştir ( $p < 0.05$ ).



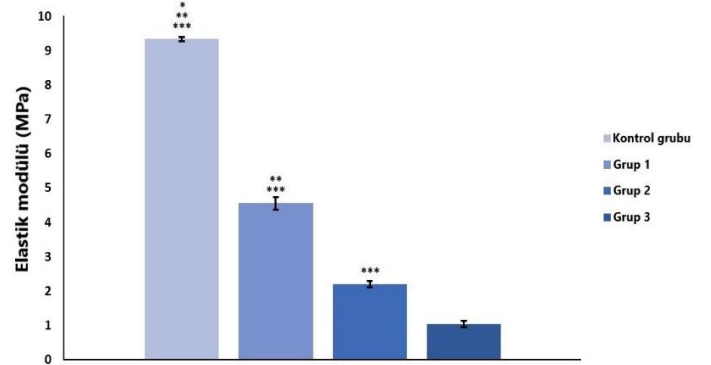
Şekil 7. Kontrol grubunun ve hücreleştirme işlemleri uygulanmış numunelerin 48 saatlik hücre canlılığı sonuçları (\*\*\*, Grup 3 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*\*, Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ).

48 saatlik hücre canlılığı analizi sonuçlarında (Şekil 7), kontrol grubundaki (hücre kültürü plakası) hücrelerin hücre canlılığı seviyelerinin, hücreleştirme işlemine tabi tutulan tüm örneklerden anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Grup 1'deki dokular üzerinde çoğaltılan hücrelerin 48 saatlik hücre canlılık seviyelerinin (%  $97.2 \pm 1.1$ ), 24 saat (Grup 2) ve 48 saat (Grup 3) süreyle hücreleştirme işlemi uygulanan örneklerdeki 48 saatlik hücre canlılığı seviyelerine göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu ortaya çıkarılmıştır ( $p < 0.05$ ). Diğer taraftan, Grup 2'ye ait 48 saatlik hücre canlılığı verilerinin (%  $89.5 \pm 2.0$ ), Grup 3'e göre (%  $81.8 \pm 2.6$ ) anlamlı olarak daha fazla olduğu gösterilmiştir ( $p < 0.05$ ).

Hücreleştirilmiş tavuk derilerinin hücre canlılığı çalışmaları sonucunda, hazırlanan dokuların bir doku iskelesi olarak kabul edilebilir düzeyde hücre canlılığını destekledikleri bulunmuştur çünkü 48 saat sonundaki MTT değerlerine göre hücreleştirilmiş dokular içerisinde en yüksek hücre canlılığı değerine sahip grup olan Grup 1'de bu değer yaklaşık % 97 ve en düşük grup olan Grup 3'te yaklaşık % 81 seviyelerinde olduğu gösterilmiştir. 48 saatlik MTT verilerine göre (Şekil 7), 6 saat süresince hücreleştirilmiş numunelerin 24 saat ve 48 saat boyunca sodyum deoksikolat ile muamele edilen numunelere göre daha yüksek hücre canlılığı gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, hücreleştirme süreci daha uzun süre devam ettirildiğinde hücre canlılığı değerlerinin azaldığı elde edilen bulgulardan açıkça görülmektedir çünkü en düşük hücre canlılığı verileri Grup 3'ten elde edilmiştir. Dokuların hücreleştirme ajanları ile daha uzun süreler maruz bırakılmaları ile GAG ve ESM proteinlerinin kaybedilmesi, MTT sonuçları için bir açıklama olabilir çünkü daha uzun periyotlarda hücreleştirilmiş dokuların üzerine ekilen hücrelerin bağlanma bölgeleri bulmaları daha zor olabilir. Fare ovaryumunun hücreleştirilerek doku iskelesi olarak kullanılmasını amaçlayan bir çalışmada hücreleştirme ajanları olarak sodyum deoksikolat, SDS ve Triton X-100 kullanılarak bunların doku üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır (Alshaiikh vd., 2019). Buna göre hücreleştirme sürecinde SDS uygulanmasının doku bütünlüğü ve ESM üzerinde olumsuz etkileri olduğu gösterilirken sodyum deoksikolat kullanılmasının doku yapısını daha iyi koruduğu bildirilmiştir. Diğer taraftan, Triton X-100 kullanımının fare ovaryumunun hücreleştirilmesinde etkili olmadığı rapor edilmiştir. Literatürdeki bu çalışma, sunulan çalışmada sodyum deoksikolat kullanılmasını destekleyici yönde sonuçlar sunmuştur.

### 3.6. Mekanik Test

Örneklerin elastik modülü değerleri, 6 saat, 24 saat ve 48 saat boyunca hücreleştirilmiş dokulara uygulanan çekme testi sonuçlarıyla belirlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Kontrol grubunun ve hücreleştirme işlemleri uygulanmış numunelerin elastik modülü değerleri (\*\*\*, Grup 3 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*\*, Grup 2 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ; \*, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark vardır  $p < 0.05$ ).

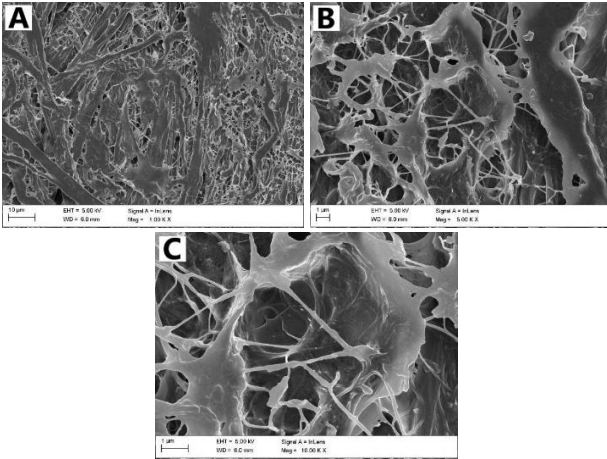
Mekanik analiz sonuçları incelendiğinde, kontrol grubu olan doğal tavuk derisinin ( $9.34 \pm 0.1$  MPa) hücreleştirilmiş tüm dokulara göre anlamlı seviyede daha yüksek elastik modülüne sahip olduğu gösterilmiştir ( $p < 0.05$ ). Grup 1'deki numunelerin ( $4.56 \pm 0.2$  MPa), 24 saat (Grup 2) ve 48 saat (Grup 3) süresince hücreleştirilmiş örneklerle kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek elastik modülü gösterdiği ortaya çıkarılmıştır ( $p < 0.05$ ). Ayrıca

Grup 2'ye ait elastik modülü verileri ( $2.2 \pm 0.1$  MPa), Grup 3'teki elastik modülü değerleri ( $1.0 \pm 0.1$  MPa) ile karşılaştırıldığında aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Mekanik test sonuçlarına göre, Grup 3'ün en düşük elastik modülü değerlerine sahip olduğu gösterilmiştir.

Mekanik test sonuçlarına göre, hücreleştirme sırasında numunelerin elastik modüllerinin azaldığı gösterilmiştir. Mekanik testler analiz edildiğinde, doğal tavuk derisinin, hücreleştirilmiş tüm dokularla karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek elastik modülüne sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 8). Elastik modülün azalması, hücreleştirme sırasında ESM'deki GAG ve proteinlerin kaybı ile açıklanabilir. Evans ve arkadaşları, hücreleştirilmiş karaciğer ve doğal karaciğer dokusunun elastik modülü değerlerinin sırasıyla 1.18 kPa ve 10.5 kPa olduğunu bildirmiştir (Evans vd., 2013). Buna ek olarak, Vishwakarma ve arkadaşları 4 saatlik hücreleştirmeden sonra hücreleştirilmiş meninkslerin gerilme mukavemetinin (yaklaşık 2.8 MPa), doğal meninkslerin gerilme mukavemetinden (yaklaşık 4.8 MPa) önemli ölçüde daha düşük olduğunu göstermiştir (Vishwakarma vd., 2018). Bu çalışmaların sonuçlarının, sunulan çalışmanın mekanik test verileri ile uyumlu olduğu açıktır. Sunulan çalışmada, hücreleştirilmiş tavuk derisi örneklerine ait elde edilen mekanik sonuçlar umut verici olarak görülmektedir. Bu sebeple, bu malzemenin deri hasarlarının onarılmasında bir biyomalzeme olarak kullanılma potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

### 3.7. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hücreleştirilmiş örneklerin SEM görüntüleri Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. 24 saat boyunca hücreleştirme işlemi uygulanmış tavuk derisinin 100X büyütme (A), 500X büyütme (B) ve 1000X büyütme (C) SEM görüntüleri.

Hücreleştirme işlemi sırasında hücrelerin uzaklaştırılmış olduğu bu görüntülerle doğrulanmıştır. SEM görüntüleri ile hücreleştirilmiş dokuların fiber organizasyonu ve yapıları gösterilmiştir. Ayrıca bu görüntülerle, dokuların ESM yapıları ve fiberler arası boşlukları ortaya çıkarılmıştır. Sodyum deoksikolat ile hücreleştirilmiş dokulardaki fiber yapılarının ve genel morfolojilerinin iyi bir şekilde korunduğu bulunmuştur. Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tavşan trakesi % 4 sodyum deoksikolat kullanılarak 4 saat süresince 6 tekrar veya 7 tekrar olacak şekilde toplamda 24 saat veya 28 saat hücreleştirildiğinde, elde edilen SEM görüntüleriyle trake

dokusunun yapısının büyük oranda korunduğu gösterilmiştir (Sun vd., 2015). Bu sonuç ile sunulan çalışmadaki SEM görüntülerinden elde edilen sonuçların birbiriyle tutarlı olduğu görülmüştür.

## 4. Sonuç

Bu çalışmada hücreleştirilmiş tavuk derisinin hazırlanması ve karakterizasyonu detaylı ve kapsamlı bir şekilde yapılmıştır. Sodyum deoksikolat uygulanmasının hücreleştirme sürecinde doku yapısı ve morfolojisini genel olarak koruyarak hücreleri ve hücresel bileşenleri dokudan etkili bir şekilde uzaklaştırdığı ortaya çıkarılmıştır. Hücreleştirilmiş tavuk derisinin, hücre tutunması, büyümesi ve proliferasyonunu destekleyen özellikte olduğu gösterilerek hazırlanan malzemenin biyoyoumlu olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen verilerle kolayca bulunabilen, ucuz ve biyoyoumlu bir malzeme olan hücreleştirilmiş tavuk derisinin, özellikle deri dokusu mühendisliği olmak üzere doku mühendisliği ile ilgili daha ileri çalışmalar için doku iskelesi hazırlanması amacıyla kullanılacak uygun bir biyomalzeme olduğu gösterilmiştir.

## Kaynakça

- Alshaikh, A. B., Padma, A. M., Dehlin, M., Akouri, R., Song, M. J., Brännström, M., & Hellström, M. (2019). Decellularization of the mouse ovary: Comparison of different scaffold generation protocols for future ovarian bioengineering. *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0531-3>
- Ark, M., Ozdemir, A., Şimay Demir, Y. D., & İbişoğlu, B. (2017). *Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Protokolleri*.
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: History, progress, and challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2, 403-430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
- Couteaudier, M., & Denesvre, C. (2014). Marek's disease virus and skin interactions. *Veterinary Research*, 45, 36. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-36>
- Estes, B. T., Diekman, B. O., Gimble, J. M., & Guilak, F. (2010). Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nature Protocols*, 5(7), 1294-1311. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.81>
- Evans, D. W., Moran, E. C., Baptista, P. M., Soker, S., & Sparks, J. L. (2013). Scale-dependent mechanical properties of native and decellularized liver tissue. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 12(3), 569-580. <https://doi.org/10.1007/s10237-012-0426-3>
- Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., & Badyrak, S. F. (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19), 3675-3683. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.014>
- Gilpin, A., & Yang, Y. (2017). Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed Research International*, 2017, 9831534. <https://doi.org/10.1155/2017/9831534>

- Grauss, R. W., Hazekamp, M. G., van Vliet, S., Gittenberger-de Groot, A. C., & DeRuiter, M. C. (2003). Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 126(6), 2003-2010. [https://doi.org/10.1016/s0022-5223\(03\)00956-5](https://doi.org/10.1016/s0022-5223(03)00956-5)
- Inci, I., Norouz Dizaji, A., Ozel, C., Morali, U., Dogan Guzel, F., & Avci, H. (2020). Decellularized inner body membranes for tissue engineering: A review. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 31(10), 1287-1368. <https://doi.org/10.1080/09205063.2020.1751523>
- Jalili-Firoozinezhad, S., Rajabi-Zeleti, S., Marsano, A., Aghdami, N., & Baharvand, H. (2016). Influence of decellularized pericardium matrix on the behavior of cardiac progenitors. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(14). <https://doi.org/10.1002/app.43255>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5110), 920-926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Liao, J., Xu, B., Zhang, R., Fan, Y., Xie, H., & Li, X. (2020). Applications of decellularized materials in tissue engineering: Advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(44), 10023-10049. <https://doi.org/10.1039/D0TB01534B>
- Mirzarafie, A., Grainger, R. K., Thomas, B., Bains, W., Ustok, F. I., & Lowe, C. R. (2014). A fast and mild decellularization protocol for obtaining extracellular matrix. *Rejuvenation Research*, 17(2), 159-160. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.1488>
- Odabas, S., Feichtinger, G. A., Korkusuz, P., Inci, I., Bilgic, E., Yar, A. S., Cavusoglu, T., Menevse, S., Vargel, I., & Piskin, E. (2013). Auricular cartilage repair using cryogel scaffolds loaded with BMP-7-expressing primary chondrocytes. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7(10), 831-840. <https://doi.org/10.1002/term.1634>
- Rajabi-Zeleti, S., Jalili-Firoozinezhad, S., Azarnia, M., Khayyatan, F., Vahdat, S., Nikeghbalian, S., Khademhosseini, A., Baharvand, H., & Aghdami, N. (2014). The behavior of cardiac progenitor cells on macroporous pericardium-derived scaffolds. *Biomaterials*, 35(3), 970-982. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.045>
- Sun, F., Pan, S., Shi, H. C., Zhang, F. B., Zhang, W. D., Ye, G., Liu, X. C., Zhang, S. Q., Zhong, C. H., & Yuan, X. L. (2015). Structural integrity, immunogenicity and biomechanical evaluation of rabbit decellularized tracheal matrix. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, (103A), 1509-1519. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35273>
- Tavassoli, A., Matin, M. M., Niaki, M. A., Mahdavi-Shahri, N., & Shahabipour, F. (2015). Mesenchymal stem cells can survive on the extracellular matrix-derived decellularized bovine articular cartilage scaffold. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(12), 1221-1227.
- Vishwakarma, S. K., Bardia, A., Lakkireddy, C., Paspala, S. A. B., & Khan, A. A. (2018). Bioengineering Human Neurological Constructs Using Decellularized Meningeal Scaffolds for Application in Spinal Cord Injury. *Frontiers in*