

Biyolojik damarsal greft üretiminde hücresizleştirme metodları; güncel literatür derlemesi

The decellularization methodologies for the production of biologic vascular graft; an updated literature review

Öz

Hücresizleştirme (Decellularization) hücre ve hücre içi organellerin zarlarının bütünlüğünü bozarak DNA, RNA, yağlar, mitokondri ve sitoplazmik zardaki hücre kimliğini taşıyan proteinler ve sitozolik içerik gibi tüm hücresel yapıların temizlenerek, önemli hücre dışı matriks yapılarının üç boyutlu ultrastrüktür, temel matriks proteinleri ve büyüme faktörleri gibi öğelerinin korunması ve sonrasında implantasyon ile in vivo ya da in vitro ortamda dokunun kendine ait özelliklerle başarılı bir şekilde yeniden modellenmesi işlemidir. Bu derleme makalesinin amacı damar dokusunun hücresizleştirilmesi işlemi sırasında kullanılan birçok farklı çeşit yöntemin incelenerek başarılı veya başarısız yönlerinin ortaya konmasıdır.

Anahtar Kelimeler: Hücresizleştirme, doku, yapay organ, hücre dışı matriks

Abstract

Decellularization is disrupting the integrity of cells and intracellular organelles' membranes, cleaning all of the cytosolic content and cellular structures that have the identity of the cells such as DNA, RNA, lipids, proteins and membranes, and preserving the important extracellular matrix structures such as three-dimensional ultrastructure, basic matrix proteins and growth factors. The successful decellularization may ensure a successful recellularization of the tissue after implantation in vivo or in vitro. The aim of this review article is inspecting successful or unsuccessful aspects of the different types of methods used during the decellularization process of the vascular tissue.

Keywords: Decellularization, tissue, artificial organ, extracellular matrix

* Kadir Çeviker,
** Şemanur Özcan
Özseven,
*** Cennet Gülnihal
Şeker,
*** Monira Rahim,
*** Şeyma Kılıçarslan,
**** Rasih Yazkan

* Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Kalp Damar
Cerrahisi AD, Isparta.

** Süleyman Demirel Üniversitesi,
Fen Bilimleri Enstitüsü,
Biyomühendislik A.D. Isparta

*** Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Isparta.

**** Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi
A.D. Isparta

Yazışma Adresi:
Yrd. Doç. Dr. Kadir Çeviker
Süleyman Demirel Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar
Cerrahisi AD, 32260
Çünür, Isparta, Türkiye.
Tel: +90246 211 93 51
Fax: +90 246 232 62 80
e-mail: drkadirce@yahoo.com

Giriş

İnsan hayatını tehdit eden en önemli hastalık grubunun başında tıkaçıcı damar hastalıkları gelmekte ve etiyojiden sorumlu patoloji ateroskleroz olarak bildirilmektedir. Ateroskleroz iskemik kalp hastalığı, inme ve periferik damar hastalığı gibi bir dizi hastalığın tek başına sebebidir. Dünya sağlık örgütünün (WHO) araştırmalarına göre dünya çapında her yıl 17.5 milyon insan kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle yaşamını yitirmektedir. Bu tüm ölümlerin %31'i demektir (1). Tıkaçıcı damar hastalıklarının tedavisinde medikal tedavi ve perkütan girişimsel işlemler yapılmakta, ancak bazı durumlarda bu işlemler yetersiz kalmakta veya alternatif olarak cerrahi işlemlere ihtiyaç duyulmaktadır (2). Yapılacak cerrahi bir işlem olan baypas (tıkalı olan segmentin distaline kanı taşıyacak anatomik ya da ekstra anatomik greft ile ikinci bir yol oluşturmak) seçeneğinde ise damarsal grefte ihtiyaç duyulmaktadır. Baypas cerrahisinde kullanılacak damarsal greft seçenekleri otogreft (safen ven, radyal arter ve internan mamaryen arter gibi), ksenogreft ya da prostetik greft olabilmektedir. Günümüzde en sık kullanılan otojen greft safen ven olmasına rağmen hem elde edilebilmesi için cerrahiye ihtiyaç duyulması hem de sınırlı miktarda bulunması kullanımını kısıtlamaktadır. Prostetik vasküler greftler ise sentetik ve kompozit olarak ayrılmakta ve sentetik olanlar tekstil (Dacron) ve tekstil olmayan [Teflon (PTFE)] olarak 2 grupta sınıflandırılmaktadır. 1950'li yıllarda başarılı baypas işlemlerinin sayısının ve ihtiyaç duyulan greft çeşitliliği ve tiplerinin artması ile birlikte vasküler prostetik greft üretim teknolojisi hızlı bir gelişme göstermiştir (3). PTFE (Politetrafloraetilen) veya Dacron materyalden yapılmış çeşitli çap ve boyda üretilen günümüzde piyasada satılan pek çok çeşit greft mevcuttur. Bu tip yapay greftlerin kolay bulunması bir avantaj olsa bile biyolojik greftlere göre belirgin olarak yüksek enfeksiyon, tromboz ve mekanik hataları bulunmaktadır. En sık rastlanan mekanik hatalar sırasıyla açılma, dikiş çizgisi hatası, yapısal hatalar (delik, yarık ve yırtık) ve sızdırmadır (4). Prostetik greftlerin mekanik hatalarının yanında en önemli handikabı ameliyat sonrası enfeksiyon ve tromboz riskinin otojen grefte göre oldukça yüksek olmasıdır (5). Prostetik greft gibi bir yabancı cismin

varlığı; lokal immün disfonksiyona, bakterinin kolayca tutunabileceği ve kendisine kompleks bir mikroçevre yaratabileceği bir biyofilm tabaka oluşmasına neden olarak enfeksiyona yatkınlığa, sentetik olarak elde edilen greft materyallerinin doku iskeleti olan ekstrasellüler matriksi içermediğinden hücrelerin tutunma ve proliferasyon aşamalarında doğal yapılar kadar uygun desteği verememesinden dolayı da tromboza yatkınlığa sebep olur (6).

İdeal bir greft materyalinin yüksek biyouyumluluğa sahip olması, toksik, antijenik ve karsinojenik etkiye sahip olmaması, kolay elde edilebilir ve maliyeti düşük olması ve lokal enflamasyona dirençli olması gerekmektedir (4,5). Günümüzde greft üretim teknolojisindeki gelişmeler neticesinde greft ilişkili komplikasyonlar hızla azalmakla birlikte hala ideal damarsal proteze ulaşamamıştır (4,7,8).

Son yıllarda doku mühendisliği tekniklerinin gelişmesi ve bu alanda yapılan çalışmaların artması ile birlikte pek çok dokunun yapı ve fonksiyonları korunarak yenilenmesi ve iyileştirilmesi sağlanmaktadır (9,10). Yenilenebilir biyolojik materyal hazırlanması amacı ile hücre kültürü, iskelet yapı (matriks), sıvı destek ve düzenleyici elemanlar (büyüme faktörleri vs.) ile çevresel faktörlerin (bioreaktörler vs.) geliştirilmesi güncel çalışma konularını oluşturmaktadır (6). Doku mühendisliği çalışmaları genel olarak hücrelerinden arındırılmış matriksler ve hücre/matriks yapıları olarak iki kategoride incelenmektedir (9,11). Bu bağlamda ekstrasellüler matriks (ESM) doku ya da organları meydana getiren hücreler dışındaki birbiri ile ileri derecede organize olmuş tüm yapılara verilen isimdir. Üç boyutlu ESM yapısını oluşturan makromoleküler ana bileşenler kollajen, elastin, fibronektin, laminin, glikoprotein, proteoglikan, ve glikozaminoglikandır ve her dokunun özelliklerine uygun form ve miktarda bir araya gelerek çatı yapıyı oluşturur. ESM hücreler için taşıyıcı biyolojik iskele olması yanında hücre sel büyüme, migrasyon, diferensiyasyon, yaşama, homeostaz ve morfogenez gibi birçok fonksiyona da aracılık eder. ESM bileşiminde bulunan çeşitli biyoaktif moleküler yapılar sayesinde dokuları oluşturan hücrelerin tekrar bir araya gelmesinde ve dinamik hücre sel davranışlarının yeniden düzenlenmesinde ayrıca koruyucu ve destekleyici fonksiyonlara da sahip olması nedeni ile klinikte birçok doku ve organın rejenerasyonunda kullanılmaktadır (12).

Ksenogreft damarların endotelial yüzeyindeki kan grubu antijenlerinin, alıcının doğal antikoları (spesifik bir antijene duyarlılık olmamasına rağmen mevcut olan antikolar) tarafından tanınması ve kompleman ve koagülasyon kaskadını aktive etmesi sonucu greftte tromboz meydana gelebilmektedir. Böyle bir immünolojik ve trombojenik aktivasyondan grefti korumak için uygulanacak işlemlerden birisi vericinin immünolojik özelliklerinin en aza indirildiği hücreleştirme işlemidir. Hücreleştirme ile elde edilen damar greftinin teorik olarak en önemli avantajı sentetik damar greftlerinde görülen enflamatuvar ve pıhtılaşma reaksiyonlarının oluşmamasıdır. Çünkü kök hücreler ve ESM arasındaki etkileşimler, soy-spesifik farklılaşmanın indüklenmesi ve kimyasal/yapısal sinyaller sayesinde mezenkimal kök hücrelerin (MKH) biyolojik fonksiyonlarını sürdürebilmesi ve bu sayede ESM tarafından oluşturulan biyofiziksel ve kimyasal sinyaller ile kök hücre adezyonu, göçü, yayılması, farklılaşması ve matriksin yeniden modellenmesi gibi fonksiyonların başarı ile tamamlandığı bildirilmektedir (13).

Hücreleştirme ana hatları ile fiziksel, kimyasal ya da enzim solüsyonları kullanılarak; ESM korunarak hücre membranına hasar verilmesi, enzimatik işlemler kullanılarak ESM'den hücresel komponentlerin ayrılması, deterjanlar kullanılarak sitoplazmik ve nükleer hücre içeriğinin çözülmesi işlemidir (14). Hücresel yapıların uzaklaştırılması işlemi sayesinde elde edilen, üç boyutlu yapısı iyi korunmuş, hücre ilişkili yüzey molekülleri, proteinleri ve hücre içi komponentlerinden temizlenmiş ESM alıcı hastaya nakledildikten sonra alıcının kendi kök hücreleri tarafından zamanla yeniden yapılandırıldığı için immünolojik ve trombojenik reaksiyon gerçekleşmez. Beklenen yarar greft materyalinin biyoyumunun ve adaptasyonunun tam olmasıdır. Bu durumun diğer bir avantajı da greft yerleştirilmesinden sonra hastanın uzun süreli antikoagulan ya da antiplatelet ilaç kullanma zorunluluğunun ortadan kalkmış olmasıdır. Hücreleştirilmiş vasküler greftin bir diğer avantajı da donör doku bulmanın otogreft temini seçeneklerine göre kolay olmasıdır. Allograft damar transplantasyonu donör olarak kadavra veya başka bir insandan alınan doku gerektirmekte ve 1980'lerden beridir gelişmiş ülkelerde kullanılmaktadır ancak donör bulma zorluğu en önemli dezavantajıdır. Hücreleştirme işleminde

etik çerçeveler içerisinde donör olarak hayvan dokusu da kullanılmakta ve böylece donör dokuya ulaşma kolaylığı sağlamaktadır (2).

Hücreleştirme işlemi bütün bir organa yapıldığı gibi çeşitli doku parçalarına da uygulanabilir. Literatürde kalp, damar, kemik-kıkırdak-yağ doku, ince bağırsak, umbilikal kord ve karaciğer üzerinde yapılmış pek çok başarılı çalışma mevcuttur (9,14,15). Özellikle küçük çaplı hücreleştirilmiş allojenik ve ksenojenik vasküler ESM'lerin işlevsel olarak başarılı bir greft seçeneği olacağı bildirilmektedir. Farklı bölgelerden ve türlerden alınan birçok damar dokusu farklı birçok hücreleştirme tekniği ile incelenmiş ve mekanik ve immünolojik olarak doğal dokuya yakın sonuçlar rapor edilmiştir (16).

1. Vasküler Dokular İçin Hücreleştirme Yöntemi

Hücreleştirme işleminin amacı; organ veya dokuyu hücrelerinden ve nükleer yapısından arındırarak, üç boyutlu yapısını koruyarak ESM elde etmek ve bu yapının mekanik ve biyolojik özelliklerinden faydalanarak greft kullanımına uygun hale getirmektir (17). Böylece sentetik greftlerden üstün yönleri olan ve doğal damara benzer şekilde hücrelerin tutunması ve proliferasyonu için doğal bir destek sağlayan greft elde edilmektedir. Tipik olarak hücreleştirme protokolü fiziksel yöntemler ve iyonik çözeltiler kullanarak hücre membranının lizis edilmesi sonrasında sitoplazma içindeki hücresel komponentlerin ve nükleer elementlerin enzimatik yöntemler ve deterjanlarla ayrılmasıdır (Tablo 1) (17).

Ekstraselüler matriks; hücrelerin arasında bulunan, çeşitli protein ve polisakkaritlerden oluşmuş hücrelerin desteklediği ortamdır. Dokulardaki hücrelere iskelet görevi görerek hücrelerin şekil ve fonksiyonunda, gelişiminde, çoğalmasında, canlılığını sürdürmesinde ve göçünde görev yapmaktadır. ESM'yi oluşturan moleküller glikozaminoglikanlar (GAG) ve fibröz proteinlerdir. Bu moleküller hücrelerin tutunması ve göçü için uygun desteği sağladığından, ESM yapısındaki bu molekülleri korunması hücreleştirme yönteminin önemli bir aşamasını oluşturmaktadır (17).

Tablo 1. Hüresizleştirme işleminde kullanılan teknikler

Fiziksel	Kimyasal	Enzimatik
<ul style="list-style-type: none"> Mekanik Çalkalama 	<ul style="list-style-type: none"> Alkali-asit çözeltiler; Deoksikolik Asit, Perasetik Asit, Amonyum Hidroksit 	<ul style="list-style-type: none"> Tripsin Lipaz Termolizin α-galaktozidaz Dispaz Kollajenaz
<ul style="list-style-type: none"> Sıcaklık (Çok tekrarlı dondurma/çözme) 	<ul style="list-style-type: none"> Hipotonik ve Hipertonik Çözeltiler; EDTA, EGTA 	<ul style="list-style-type: none"> Endonükleazlar (Benzoaz)
<ul style="list-style-type: none"> Sonikasyon 	<ul style="list-style-type: none"> İyonik Olmayan Deterjanlar; Triton X-100, oktil gluko pironidaz (OGP) 	<ul style="list-style-type: none"> Ekzonükleazlar
<ul style="list-style-type: none"> Non-termal geri dönüşümsüz elektroporasyon (NTIRE) 	<ul style="list-style-type: none"> İyonik Deterjanlar; Sodyum-Dodesil Sülfat (SDS), sodyum deoksi kolat, Triton X-200 	
<ul style="list-style-type: none"> Basınç-Kuvvet 	<ul style="list-style-type: none"> Zwitteriyonik Deterjanlar; CHARPS, Sülfobetain -10 ve 16 (SB-10, SB-16), Tri(n-butil) fosfat Alkoller Diğer çözücüler (Aseton vb) 	

1.1 Hüresizleştirme Yönteminin Aşamaları

1.1.1 Doku Elde Edilmesi ve Hüresizleştirme İşlemine Hazırlık

Ekstra selüler matriks iskeleleri; memeli dokularının (domuz, sığır, koyun vb) ya da insan kadavrası dokularının hüresizleştirilmesi ile hazırlanmaktadır. Etik kurallar çerçevesinde memeli canlılardan (domuz, sığır, koyun... vb) elde edilen abdominal ve karotid arterlerin etrafındaki gevşek bağ dokusu mekanik olarak dikkatli bir şekilde temizlenir. Elde edilen materyal bakteriyel kontaminasyonu engellemek için çeşitli antibiyotikler (%1 penisilin, %1 streptomisin, %1 amfoterisin B gibi) içeren fosfat tamponlu saline (PBS; fosfat tampon, potasyum klorid ve sodyum klorid) ile yıkanır (lüzum halinde -80 0C derecede saklanabilir) (18). PBS birçok hücre için izotoniktir ve toksik özellikler içermemektedir. Bu özelliğinden dolayı belirli maddelerin seyreltilmesi, kullanılacak alet ve teçhizatın yıkanması, dokuların işlemin farklı basamakları arasında yıkarken, bu işlem basamaklarında kullanılan kimyasal, enzim ve oluşan atıkların yıkanması işlemleri PBS ile yapılmaktadır.

Ayrıca bazı durumlarda PBS'ye ek olarak etilen diamine tetra asetik asit (EDTA) eklenmesi hücrelerin ayrıştırılmasında etkili bulunmaktadır. PBS birçok farklı yolla hazırlanmaktadır. Bu formülasyonlardan bazıları potasyum içerirken bazıları kalsiyum ve magnezyum içermektedir. Goods ve ark. tarafından 20 farklı çeşit tamponlama sıvısı tanımlanmış ve çeşitli biyokimyasal ve biyolojik araştırmalarda kullanılmıştır (19). İdeal tamponlama sıvısı özellikleri; pH, çözme ve çözünme, membrane geçirgenliği, tuz etkisi, katyon ilişkileri, stabilite, kimyasal geçimlilik, optik absorbans ve hazırlama kolaylığı olarak belirtilmiştir. Dokuların özelliklerine göre bu tamponlama sıvıları seçilerek kullanılabilir ancak Goods ve ark tarafından mükemmel tamponlama sıvısı bulunmadığı vurgulanmaktadır (19).

1.1.2 Hücre Membranının Parçalanması

Bu aşama kullanılacak olan yöntemlerin seçimine göre farklılık göstermektedir ancak amaç hücre membranının parçalanmasıdır. Bu amaçla fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler tek tek ya da kombine halde kullanılabilir (17).

1.1.2.1 Fiziksel Metodlar;

1. Sıcaklık: Dondurma- çözme (Freeze- Thaw) yöntemi olarak adlandırılan bu yöntemde dokunun -86 C'ye dondurularak tekrar hızla 37 C'ye getirilmesi işlemidir. Genel olarak ESM yapısına minimal hasar söz konusudur. Genellikle birçok dokuda etkili bir hücre lizisi sağlamasına rağmen yalnız başına hücre içeriklerinin immünolojik yanıt uyandırmayacak şekilde tam olarak temizlenmesi mümkün olmaz. Dolayısı ile hücre protein ve molekülerin tam temizlenmesi için ek işleme gereksinin duyulur. Ayrıca bazı dokularda tek dondurma- çözme döngüsü genellikle yeterli olmamakta ve çoklu tekrar yapılması gerekmektedir (20–22).

2. Basınç ve mekanik güç uygulama: Hidrostatik basınç uygulama, sonikasyon (selenleme) ve ajitasyon (karıştırma, çalkalama) gibi teknikler genellikle tek başına yeterli hücre parçalanması yapamazlar ancak enzim, hipertonic saline veya şelatlaştırıcı ajanlarla kombine edildiğinde oldukça başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Bu yöntemin önemli bir dezavantajı etkili hücre lizisi sırasında dokuların ultrastrüktürel yapısında ve bazal membran bütünlüğünde hasar meydana gelmesidir (23). Sinir dokusu, bağ dokusu ve tendonlarda hücresizleştirme için genellikle yüksek sıcaklıktan hızla düşük sıcaklığa geçirilmesi (snap freezing) işlemi uygulanır. Hidrostatik basınç kornea ve kan damarı gibi dokularda diğer tekniklere göre hızlı ve etkili bir hücre lizisi sağlamasına rağmen basınç nedeni ile oluşan hücre içi buz kristalleri ESM yapısında bozulmaya sebep olabilir. (24,25).

3. Non-termal geri dönüşsüz elektroporasyon: Bu yöntemde mikro saniyelik elektrik uyarıları dokuya uygulanarak hücre membranında oluşan elektrik potansiyelinin bozulması sağlanmakta ve membranda çok küçük delikler meydana getirilmektedir. Bu mikro-porlar hücre hemostazını bozarak hücrede ölüme sebep olmaktadır. Ancak bu teknikte hücresizleştirme uygulanacak dokuya göre kullanılan propların küçük olması, işlemin çok uzun zaman alması ve in vivo ortamda yapılması en büyük dezavantajdır (25,26).

1.1.2.2 Kimyasal Metotlar

a. Alkali ve Asit Solüsyonlar: Alkali ve asitler nükleik asit gibi biyomoleküllerde ve sitoplazmik hücre içeriğinde hidrolitik ayrışmaya sebep olur. Asidik solüsyonlardan paretik asit ESM yapısında ve ultrastrüktüründe minimal etki göstererek hücrelerin arta kalan nükleik asitlerinin temizlenmesinde kullanılır (9,27–29). Asetik asit ESM yapısındaki kollajene zarar verdiği için ESM dayanıklılığını azaltabilir ancak sülfatlanmış glikozaminoglikanlara etkisi yoktur. Kalsiyum hidroksit, sodyum sülfid ve sodyum hidroksit gibi bazlar ESM yapısındaki kollajen fibrillerinin ve çapraz bağlarının parçalanmasında etkilidir (30). Bunun yanında ESM yapısındaki büyüme faktörlerinin yok olmasına sebep olur. Alkali solüsyonlar kimyasal solüsyonlar içinde ve enzimatik ajanlara göre daha fazla ESM yapısında bozulmaya sebep olur (31,32).

b. Deterjanlar: İyonik, non-iyonik ve çift kutuplu (zwitterionic) deterjanlar lipid-lipid ve lipid-protein yapılar ile reaksiyona girerek hücre membranını eritir ve proteinlerden DNA yapısını çözer fakat protein-protein yapısını, dokunun veya organın fonksiyonel yapısını bozamaz [32, 33]. Ancak bu etki maruz kalma süresi, dokunun tipi ve yapısı ve doku vericisinin yaşı ile ilişkili olarak değişkenlik gösterebilir (34,35). Triton X-100 en yaygın kullanılan non-iyonik deterjandır. Triton X-100 enzimatik ve osmotik etki ile hücre artıklarının temizlenemediği kalp kapağı gibi kalın dokularda bile etkili bir hücresizleştirme sağlayabilir. En yaygın kullanılan iyonik deterjanlar sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum deoksikolat ve Triton X-200 'dür. SDS hücrenin sitoplazma ve çekirdek membranı çözmede triton X-100'den daha etkilidir ancak protein-protein ile reaksiyona girerek ESM ilişkili proteinlerin yapısını bozar, GAG konsantrasyonunun azalmasına, kollajenin ve büyüme faktörlerinin tamamen kaybolmasına sebep olur. Genellikle böbrek gibi yoğun (dense) dokulardan nükleik asitleri uzaklaştırmada oldukça etkilidir. Bu ajanlar içerisinde SDS dokudan hücre bileşenlerinin temizlenmesinde, sitoplazma proteinlerinin ve nükleer kalıntıların tamamen temizlenmesinde diğer deterjanlara nazaran çok daha verimlidir. Çift kutuplu deterjanlardan birisi olan 3-[(3- kolamidopropil)

dimetilamonyo]-1-propansülfonat (CHAPS) non-iyonik ve iyonik özellikler sergiler. Özellikle akciğer gibi ince dokulu organların hücreleştirilmesinde etkilidir ancak daha kalın dokularda ya da aselüler organlarda çok etkili değildir. Deterjanların kullanıldığı hücreleştirme protokollerinde özellikle dikkat edilmesi gereken nokta işlem sonrası kalan artık kimyasalların ESM'ye penetrasyonlarıdır. Bu kimyasallar alıcıda sitotoksiteye sebep olabilir. Yoğun ve kalın dokularda derinlere penetre olan bu ajanların tamamen temizlenmesinde altıdan fazla durulama işlemi yapılmalıdır (9).

c. Alkoller: İzopropanol, etanol, metanol ve gliserol gibi ajanlar hücrelerde dehidrasyon ve lizis yaparak etkilidir. Özellikle dokunun kalsifikasyonuna sebep olan fosfolipidlerin uzaklaştırılmasında alkoller lipaz gibi enzimatik ajanlardan daha çok etkilidir. Dikkat edilmesi gereken husus alkollerin proteinlerde çökmeye sebep olmasından dolayı ESM yapısında hasara yol açmasıdır (36,37).

d. Diğer Ajanlar: Aseton özellikle lipidlerin ESM yapısından uzaklaştırılmasında kullanılabilir ancak alkollere benzer şekilde dokunun protein yapısında bozulmaya sebep olabilir. Organik bir çözücü olan Tributyl fosfat (TBP) özellikle tendon gibi yoğun dokuların hücreleştirilmesinde kullanılabilir. Bu tip dokulardaki etkinliği Triton X-100 ve SDS gibi deterjanlardan çok daha fazla olduğu ve ESM'nin mekanik ve yapısal özelliklerini daha iyi koruduğu gösterilmiştir (9).

1.1.2.3 Biyolojik Ajanlar

e. Enzimler: Nükleaz, tripsin, kollajenaz, lipaz, dispaz, termolizin ve α -galaktozidaz hücreleştirme işleminde kullanılan enzimlerdir. Özellikle hücre artıklarının ve istenmeyen ESM yapı taşlarının seçici olarak temizlenmesinde faydalıdır. Ancak sadece enzimatik yöntem hücrenin tamamen temizlenmesinde tam etkili olmadığı gibi kullanılan enzim artıkları da tekrar hücrelendirme işleminde sorun yaratabilir veya kendileri immün sistemi aktive edebilir. DNaz ve RNaz gibi nükleazlar hücre lizisi sonrasında ortaya çıkan DNA ve RNA nükleik asitlerinin ve nükleotidlerinin parçalanmasını sağlar (25,35,38,39). Benzonaz gibi endonükleazlar ve kısıtlaması olmayan (non-restriction) endonükleazlar

ekzonükleazlara göre DNA parçalanmasında çok daha etkilidir (37, 38).

Serin proteaz olan Tripsin, enzimatik hücreleştirmede sıkça kullanılan enzimatik ajandır. Tripsin ile yapılan hücreleştirmede ESM yapısında bulunan GAG'ların korunmasına rağmen kollajen ve elastinin tripsine dirençlerinin az olması, tripsinin dikkatli kullanılmasını gerektirir [9, 39]. Diğer bir dezavantajı ise etki süresinin uzun olmasıdır. Özellikle kalın dokularda bu süre çok daha fazla artar. Ancak bu şekilde kalın dokuların hücreleştirilmesinde, diğer ajanların daha derine penetre olabilmeleri için tripsin kullanımı kaçınılmaz olabilir (40).

Kollajenazlar, özellikle kollajenin gerekli olmadığı ESM olan dokuların hücreleştirilmesinde kullanılabilir. Lipazlar ise lipidlerin uzaklaştırılmasında etkilidir ancak tüm lipidlerin uzaklaştırılmasında yalnız başına yetersizdir (21,41). Ksenojenik dokuların hücre yüzeylerinde bulunan immunojenik hücre yüzey antijeni olan galaktoz- α -(1,3)-galaktoz (Gal epitop) uzaklaştırılması için α -galaktozidaz kullanılabilir (42).

f. Non-enzimatik ajanlar: Şelasyon yapıcı ajanlar olan etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) metal iyonlarını uzaklaştırarak hücrelerin ESM proteinlerinden uzaklaştırılmasında kullanılır (43,44). Ayrıca yapısal olarak protein- protein ilişkisinin de bozulmasına sebep olur. Bu ajanlar yalnız başına, çalkalama yapılsa dahi yüzeysel hücrelerin yok edilmesinde bile etkili olamaz dolayısı ile genellikle protokollerde tripsin ya da deterjanlar ile kombine halde kullanılmalıdır (9,24,25,31,40,45).

Fenilmetilsülfonil florid (PMSF), aprotonin ve löpeptin gibi serin proteaz inhibitörleri ESM'de oluşması muhtemel istenmeyen zararları engeller (27, 31, 34–36, 45). Aksi takdirde hücre ölümü sırasında intraselüler proteazlar salınabilir.

Penisilin, streptomisin, amfoterisin B ve sodyum asid gibi antibiyotikler ve antimikotikler hücreleştirme süresince mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için kullanılır fakat biyolojik iskelelerde tekrar hücrelendirme sırasında potansiyel bir engel oluşturabilir (9).

2. Ajanların Farklı Dokularda Uygulama Teknikleri

Hücreleştirme ajanlarının seçimi dokunun kalınlık ve yoğunluk gibi karakterlerine bağlıdır. Hücreleştirmede temel nokta hücre zarlarının bütünlüğünün bozularak önemli ESM bileşenlerinin korunmasına odaklanır. Hücreleştirme işlemi sürecinde üç boyutlu ultra yapı ve doğal ESM öğelerinin korunması, dokuların başarılı bir şekilde yeniden modellenmesi için zemin oluşturur. Hücreleştirme sırasında temel matriks ve zar proteinlerini ve büyüme faktörü vb. gibi özellikli proteinleri korumak gerekir. Ancak hücreleştirme sırasında kullanılan tüm metotlar kaçınılmaz olarak ESM'yi bir dereceye kadar parçalar (9). ESM biyoiskelesi üretmek için doku ve organların hücreleştirilmesi, doğal ESM yapısının korunmasının yanında DNA, mitokondri ve sitoplazma zarı, yağlar ve sitozolik içerik gibi tüm hücre yapılarının ortadan kaldırılmasını gerektirir. Bu hücre kalıntı ve bileşenler yeteri miktarda ortadan kaldırılamaz ise dokunun uygulandığı alıcıda inflamatuvar etki oluşturabilir ve sonuçta tekrar hücre yerleştirilmesini engelleyebilir. Dokunun hücre yoğunluğu, matriks yoğunluğu, kalınlığı ve morfolojisi doku ve organ hücreleştirmesinin başarısını etkileyebilir ve dolayısıyla en son elde edilen ESM iskele yapısının bütünlüğünü ve fiziksel özelliklerini de değiştirebilir (14).

Hücreleştirme işlemine yardımcı olabilmesi için dokuya doğrudan fiziksel kuvvet uygulanabilir. Mesane, ince barsak, perikardiyum ve amnion zarı gibi ince plaka halindeki dokular için en yaygın olarak kullanılan hücreleştirme teknikleri, kas ya da submukoza gibi istenmeyen katmanların mekanik uzaklaştırılması, donma-çözülme ve kolayca ortamdaki uzaklaştırılan deterjan ya da asitlere bir miktar maruz bırakılması ve sonrasında durulama (9,23,39). Deri gibi daha kalın doku tabakaları için daha yoğun ve uzun süre kimyasal ajanlar uygulamak ve daha uzun durulama süreleri gerekir (42,47). Yağ dokusu, beyin ve pankreas gibi yağlı amorf organ ve dokularda sıklıkla alkol gibi yağ çözücüler eklemek gerekir (21,41). Programlanan hücreleştirme protokolünün karmaşıklığı ve uzunluğu, işlem gören

dokunun yapısal ve biyolojik dayanıklılık derecesi ile doğru orantılıdır. Bu durum özellikle kompozit dokular ve tüm organlar için gereklidir (48).

Tüm bu işlemler steril ortamda 37 0C yapılmaktadır. Ayrıca bazı durumlarda hücreleştirilmiş arter bu işlem sonrasında sterilize edilerek kullanıma uygun hale getirilir ve elde edilen hücreleştirilmiş dokunun uygunluğu için gerekli teknik analizleri yapmak üzere – 80 0C'de saklanabilir (9).

3. Hücreleştirilmiş ESM'nin Klinik Uygulama İçin Sterilizasyonu

ESM içeren biyolojik iskelelerin alıcıya implantasyon ya da in vitro kullanım öncesinde endotoksinler için depirojenasyon ve ortamda bulunan viral ve bakteriyel DNA'ların uzaklaştırılması için ise sterilizasyon gibi işlemlerden geçirilmeleri gerekir. Biyolojik iskeleler çeşitli asit ve çözücü ile inkübe edilerek basitçe sterilize edilebilir (49). Ancak bu yöntemler yeteri kadar penetrasyon sağlamadığı gibi önemli ESM içeriklerine de zarar verebilir (28,30,36). Etilen oksit, gama ışınlanması ve elektron ışınlanması tercih edilen yöntemler olmasına rağmen ESM'nin ultra yapı ve mekanik özelliklerini değiştirdikleri bilinen, sterilizasyon metotlarıdır. Etilen oksit bazı dokularda ESM mekanik özelliklerini değiştirirken bazı dokularda değişiklik yapmaz ancak etilen oksit uygulaması implantasyon sonrası biyolojik yapı fonksiyonlarının zayıflamasına neden olarak istenmeyen konak immün cevaplarına sebep olur. Gama radyasyonu, kollajen gibi önemli ESM yapısal proteinlerinin çökmesine ve denaturasyonuna sebep olabilir (50). Bu işlem maruziyet oranı ile azaltılamaz ve düşük dozlarda bile meydana gelebilir. Gama ışınlanması ortamda kalan yağların sitotoksik olmasına neden olur ve ESM 'nin enzimatik yıkımını hızlandırır (50). ESM'nin sterilize edilmesi için yeni bir yöntem olarak süper kritik CO2 kullanılmaktadır. Süperkritik akışkanların reaktif olmayan doğası ve alt tabakalara kolayca nüfuz etme kabiliyeti vardır. Ancak ultra yapı ve protein profillerini değiştirmezler. Bu nedenle sterilizasyon için cazip bir yöntemdir (51).

4. Hücreleştirilmiş ESM'nin Uygunluğunun Kontrolü

ESM içindeki hücresele artık maddeler; in vitro veya in vivo hücre uyumsuzluğu ve yerleştirildiği organizmada immün yanıtın aktive edilmesi gibi sorunlara sebep olur. Hücreleştirme teknikleri hücre materyallerinin tamamını uzaklaştırmaya da çift sarmal DNA, mitokondri ya da fosfolipid gibi membranlı organeller ve hücre ile ilgili moleküler bileşenlerin belirgin şekilde uzaklaştırılmasına olanak sağlar. Başarılı bir tekrar hücrelendirme sağlamak için ESM içerisinde arta kalan hücresele maddelerin eşik konsantrasyonu yeterli şekilde araştırılmamıştır ancak ESM'nin elde edildiği kaynağa ve dokuya ve ESM'nin yerleştirildiği konak immün fonksiyonuna bağlı olarak değişiklikler gösterebilir. Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre başarılı bir hücreleştirme işlemi için minimum kriterler;

- I. <50 ng dsDNA / ESM kuru ağırlık (mg),
- II. < 200 bp DNA parça uzunluğu,
- III. Histopatolojik doku kesitlerinde 4',6-diamidin-2- fenil indol (DAPI) veya hematoksilen ve eozin boyamaları ile nükleer materyalin görülmemesi olarak belirtilmektedir (52,53).

Doku hücreleştirmesinin standart bir protokol ile yapılması birçok fayda sağlar:

- 1) Tanımlanan yeni hücreleştirme tekniklerinin etkinliğinin araştırmacılar tarafından değerlendirme olanağı sunması ve hücreleştirilmiş dokulardan üretilen, ESM içeren ürünlerin tanımlanmasına izin vermesi,
- 2) Farklı ESM ürünlerinin uygun şekilde karşılaştırılmasını sağlaması,
- 3) DNA kalıntılarının sebep olduğu değişik hücre ve konak cevaplarını en aza indirerek, uygulandığı in vitro ve in vivo ortamlarda elde edilen sonuçlarla yorumlanmasına olanak sağlaması,
- 4) Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanlarında ESM ürünlerinin klinik uygulamalarda başarılı olarak kullanılmasının önünü açması.

Çalışmalardan elde edilen kanıtlar; dokuların hücre zarı ve hücresele içerikleri ile ESM'in konakta yarattığı immün cevap ve reseptörizasyon başarısının bağlantılı olduğunu kanıtlamaktadır, ve ortaya konan hücreleştirme metodlarının standartlaştırılması ile,

birçok yöntemin modifiye edilmesi ya da yenisinin tanımlanması, ESM ürünlerinin kalite ve tutarlılığının artırılması sağlanacaktır. Örnek olarak kalp kapağı ya da biyolojik damar ürünlerinde bulunan fosfolipidler ile bu dokuların kalsifikasyonu ilişkilendirilmiş ve özellikle bu dokuların hücreleştirilmesi sırasında fosfolipidleri azaltacak yeni bir metod eklenmesi sağlanmıştır.

5. Hücreleştirmede Karşılaşılan Sorunlar

Doku veya organların hücreleştirme işlemleri sırasında çeşitli deterjanlara maruz kalması mekanik özellikler ve hücresele cevap gibi birçok önemli parametresini etkilemektedir (9). Doku tipi, hücresele özellikler, doku çeşitliliği, dokunun kullanım süresi, donör yaşı ile bu etkiler artmaktadır. Özellikle iyonik deterjanların kullanılarak birkaç deterjanın kombine edilmesi protein-protein yapısının daha çok bozulmasına yol açar ve ESM'de protein kaybını artırır (54,55). Hücreleştirme işlemi sırasında adeziv proteinlerin ve glikozaminoglikanların zarar görmesi, iskelenin kendi biyo-aktivitesini değiştirip iskele üzerine yeni hücrelerin göçünü yavaşlatabilmektedir. Kollajen ağda ve 3 boyutlu ultrastrüktürel yapıda bozulma sonucu; mekanik özellikleri zayıflayarak, germe, çekme, dikiş ve basınç gibi etkilere karşı dayanıklılığı azalmaktadır. Yoğun kimyasal kullanımı gerektiren yöntemler; ESM iskelelerinin in vivo ortamda maruz kaldığı doğal enzimatik aktivite sonucu bozulma direncini düşürmekte ve bu da iskelelerin mekanik dayanıklılığında azalmalara sebebiyet vermektedir (38,54).

Kimyasal yöntemlerden özellikle asitler ve bazlar kollajen yapıya zarar vermektedir ancak glikozaminoglikanları büyük oranda koruduğu görülmüştür (9). Alkoller ESM yapısında kalsifikasyona sebep olmakta ve aseton ise asit ve bazlar gibi ESM'ye direkt zarar vermektedir (54) Tendon gibi yoğun dokuların hücreleştirilmesi için virüsidal özelliklere sahip organik bir çözücü olan Tributit fosfat (TBP)'in SDS ve Triton X-100 gibi deterjanlara göre ESM yapısının doğal ve mekanik özelliklerinin korunmasında daha etkili olduğu görülmüştür (9). Enzimler diğer biyolojik ajanlar gibi tek başlarına hücreleştirme işlemi için yeterli olmamaktadır. Enzim olmayan biyolojik ajanlar EDTA

ve EGTA ise metal iyonları ayırma yoluyla proteinleri ESM'den ayırmakta fakat yine tek başlarına yeterli değildir. Genelde durulama işleminde PBS ile kullanılmaktadırlar (23).

Fiziksel yöntemlerden en çok bilinen ve uygulanan dondurma-çözme (freze-thaw) yöntemi ESM'de önemli bir protein kaybına sebep olmaz fakat genel olarak istenmeyen hücreleri uzaklaştırmada etkili olmadığından tercih edilmemektedir (49). Basınç-kuvvet uygulaması hücresizleştirme için etkili olabilir fakat ESM yapısında mekanik bozulmalara sebep olur (20). Non-termal geri dönüşsüz elektroporasyon (NTIRE) yönteminde ise önemli bir miktar hücre kalıntısı kaldığı tespit edilmiş ve tek başına kullanılması önerilmemektedir (26).

6. Sonuç

Hücresizleştirme yöntemlerinin henüz gelişme aşamasında olmasına ve bu yöntemler ile elde edilen biyolojik vasküler greftlerin hala beklenen seviyede olmamasına rağmen biyoyumluluğu yüksek, immün sistem tarafından reddedilmeyen, antijenik ve karsinojenik etkiye sahip olmayan dahası endüstriyel anlamda maliyeti düşük vasküler greft elde edilmesi kardiyovasküler hastalıkların cerrahi tedavisinde kullanılmak üzere alternatif bir materyal olarak önemini korumaktadır. Yapılan çalışmalar neticesinde ortaya çıkan bilgi birikimi, kullanılan kimyasal maddeler, fiziksel metotlar ve biyolojik ajanlara her geçen gün bir yenisi daha eklenmektedir. Ancak hücresizleştirme tekniğindeki en büyük zorluk hücresizleştirilecek doku veya organa göre doğru yöntem ve hücresizleştirme protokolünün seçimidir. Henüz ESM yapısını tam olarak koruyan ve sadece istenmeyen hücre ve içeriklerini uzaklaştırarak tam bir hücresizleştirilmiş doku veya organ veren bir yöntem mevcut değildir ancak genel olarak hücresizleştirme işleminde birkaç farklı yöntemin bileşimlerinin (deterjan yanında enzimler, hiper/hipo-tonik sıvılar yanında enzim, fiziksel yöntemlerin yanında EDTA gibi enzim olmayan ajanlar gibi) DNA'nın uzaklaşmasını en üst düzeyde sağladığı ve ESM'nin yapısına (ultrastrüktür) en az hasarı vererek ESM'nin en büyük bileşeni olan glikozaminoglikanların ve büyüme faktörlerinin korunmasını sağladığı söylenebilir.

Kaynakça

1. World Health Organization. WHO I Cardiovascular diseases (CVDs). WHO 2016:webpage. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> (Erişim Tarihi Ekim 5, 2016).
2. Arslan YE, Hız MM, Arslan TS. The Use of Decellularized Animal Tissues in Regenerative Therapies. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2015;21:139–45. doi:10.9775/kvfd.2014.11663.
3. Erdogan A, Eser İ, Türk T, Ugur G, Demircan A. Prostetik Vasküler Greft Cinsleri ve Uzun Dönem Sonuçları. *Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg* 2002;10:37–41.
4. Eren S, Ulcay Y. Yapay Tekstil Damarları. *Electronic Journal of Textile Technologies* 2010;4:35–47.
5. Gökşin İ, Önem G, Baltalarlı A, Özcan V, Gürses E, Evrengül H, et al. Ekstremitte Revaskülarizasyonu İçin Alternatif Yaklaşım : Ekstra- anatomik Bypass Greftleme. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2004;40–6.
6. Yiğit A, Yiğit B, Koşar PA, Savaş HB, Korkmaz M. Doku Mühendisliğinde Deselülerizasyon Metodları ile Ekstraselüler Matriks (ECM) Eldesi ve Tıbbi Tedavide Uygulama Alanları. *Chemistry and Industry* 2016;2:29–43.
7. Vohra R, Thomson GJ, Carr HM, Sharma H, Walker MG. Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. *The British Journal of Surgery* 1991;78:417–20.
8. Tiwari A, Salacinski H, Seifalian AM, Hamilton G. New prostheses for use in bypass grafts with special emphasis on polyurethanes. *Cardiovascular Surgery (London, England)* 2002;10:191–7.
9. Crapo PM, Gilbert TW, Badyak SF, Badyak DVM. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 2011;32:3233–43. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.An.
10. Badyak SF, Taylor D, Uygun K. Whole Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annual Review of Biomedical Engineering* 2010;13:110301095218061. doi:10.1146/annurev-bioeng-071910-124743.
11. He M, Callanan A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Engineering Part B, Reviews* 2013;19:194–208. doi:10.1089/ten.TEB.2012.0340.
12. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos

- NK. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016;97:4–27. Doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001
13. He H, Liu X, Peng L, Gao Z, Ye Y, Su Y, et al. Promotion of hepatic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on decellularized cell-deposited extracellular matrix. *BioMed Research International* 2013;2013:406871. doi:10.1155/2013/406871.
 14. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 2006;27:3675–83. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
 15. Katsimpoulas M, Morticelli L, Michalopoulos E, Gontika I, Stavropoulos-Giokas C, Kostakis A, et al. Investigation of the Biomechanical Integrity of Decellularized Rat Abdominal Aorta. *Transplantation Proceedings* 2015;47:1228–33. doi:10.1016/j.transproceed.2014.11.061.
 16. Catto V, Farè S, Freddi G, Tanzi MC, Catto V, Farè S, et al. Vascular Tissue Engineering: Recent Advances in Small Diameter Blood Vessel Regeneration. *ISRN Vascular Medicine* 2014;2014:1–27. doi:10.1155/2014/923030.
 17. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Shih TR, Lin HL, Chen YM, et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplantation* 2014;23:621–30. doi:10.3727/096368914X678382.
 18. Pellegata AF, Asnaghi MA, Stefani I, Maestroni A, Maestroni S, Dominioni T, et al. Detergent-enzymatic decellularization of swine blood vessels: insight on mechanical properties for vascular tissue engineering. *BioMed Research International* 2013;2013:918753. doi:10.1155/2013/918753.
 19. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 1966;5:467–77.
 20. Gulati AK. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *Journal of Neurosurgery* 1988;68:117–23. doi:10.3171/jns.1988.68.1.0117.
 21. Flynn LE. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 2010;31:4715–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.046.
 22. Cortiella J, Niles J, Cantu A, Brettler A, Pham A, Vargas G, et al. Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation. *Tissue Engineering Part A* 2010;16:2565–80. doi:10.1089/ten.tea.2009.0730.
 23. Hopkinson A, Shanmuganathan VA, Gray T, Yeung AM, Lowe J, James DK, et al. Optimization of amniotic membrane (AM) denuding for tissue engineering. *Tissue Engineering Part C, Methods* 2008;14:371–81. doi:10.1089/ten.tec.2008.0315.
 24. Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S, et al. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Molecular Vision* 2009;15:2022–8.
 25. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials* 2010;31:3590–5. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.073.
 26. Lee RC. Cell injury by electric forces. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2005;1066:85–91. doi:10.1196/annals.1363.007.
 27. Gilbert TW, Wognum S, Joyce EM, Freytes DO, Sacks MS, Badylak SF. Collagen fiber alignment and biaxial mechanical behavior of porcine urinary bladder derived extracellular matrix. *Biomaterials* 2008;29:4775–82. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.08.022.
 28. Hodde J, Janis A, Ernst D, Zopf D, Sherman D, Johnson C. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: part I. Composition and matrix architecture. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 2007;18:537–43. doi:10.1007/s10856-007-2300-x.
 29. Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnology and Bioengineering* 2002;79:211–6. doi:10.1002/bit.10281.
 30. Gorschewsky O, Puetz A, Riechert K, Klakow A, Becker R. Quantitative analysis of biochemical characteristics of bone-patellar tendon-bone allografts. *Bio-Medical Materials and Engineering* 2005;15:403–11.
 31. Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX, et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 2010;31:8626–33. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.083.
 32. Dong X, Wei X, Yi W, Gu C, Kang X, Liu Y, et al. RGD-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 2009;20:2327–36.

- doi:10.1007/s10856-009-3791-4.
33. Patel N, Solanki E, Picciani R, Cavett V, Caldwell-Busby JA, Bhattacharya SK. Strategies to recover proteins from ocular tissues for proteomics. *Proteomics* 2008;8:1055–70. doi:10.1002/pmic.200700856.
 34. Alhamdani MSS, Schroder C, Werner J, Giese N, Bauer A, Hoheisel JD. Single-step procedure for the isolation of proteins at near-native conditions from mammalian tissue for proteomic analysis on antibody microarrays. *Journal of Proteome Research* 2010;9:963–71. doi:10.1021/pr900844q.
 35. Elder BD, Kim DH, Athanasiou KA. Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement. *Neurosurgery* 2010;66:722–7; discussion 727. doi:10.1227/01.NEU.0000367616.49291.9F.
 36. Gorschewsky O, Klakow A, Riechert K, Pitzl M, Becker R. Clinical comparison of the Tutoplast allograft and autologous patellar tendon (bone-patellar tendon-bone) for the reconstruction of the anterior cruciate ligament: 2- and 6-year results. *The American Journal of Sports Medicine* 2005;33:1202–9. doi:10.1177/0363546504271510.
 37. Cole MBJ. Alteration of cartilage matrix morphology with histological processing. *Journal of Microscopy* 1984;133:129–40.
 38. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, Lee EJ, Gui L, Raredon MB, et al. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science (New York, NY)* 2010;329:538–41. doi:10.1126/science.1189345.
 39. Yang B, Zhang Y, Zhou L, Sun Z, Zheng J, Chen Y, et al. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Engineering Part C, Methods* 2010;16:1201–11. doi:10.1089/ten.TEC.2009.0311.
 40. Xu H, Xu B, Yang Q, Li X, Ma X, Xia Q, et al. Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold. *PLoS ONE* 2014;9:1–13. doi:10.1371/journal.pone.0086723.
 41. Brown BN, Freund JM, Han L, Rubin JP, Reing JE, Jeffries EM, et al. Comparison of three methods for the derivation of a biologic scaffold composed of adipose tissue extracellular matrix. *Tissue Engineering Part C, Methods* 2011;17:411–21. doi:10.1089/ten.TEC.2010.0342.
 42. Xu H, Wan H, Sandor M, Qi S, Ervin F, Harper JR, et al. Host response to human acellular dermal matrix transplantation in a primate model of abdominal wall repair. *Tissue Engineering Part A* 2008;14:2009–19. doi:10.1089/ten.tea.2007.0316.
 43. Klebe RJ. Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature* 1974;250:248–51.
 44. Gailit J, Ruoslahti E. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *The Journal of Biological Chemistry* 1988;263:12927–32.
 45. Gui L, Chan S a, Breuer CK, Niklason LE. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Engineering Part C, Methods* 2010;16:173–84. doi:10.1089/ten.tec.2009.0120.
 46. Wicha MS, Lowrie G, Kohn E, Bagavandoss P, Mahn T. Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982;79:3213–7.
 47. Reing JE, Brown BN, Daly KA, Freund JM, Gilbert TW, Hsiong SX, et al. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 2010;31:8626–33. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.083.
 48. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in Molecular Medicine* 2011;17:424–32. doi:10.1016/j.molmed.2011.03.005.
 49. Fermor HL, Russell SL, Williams S, Fisher J, Ingham E. Development and characterisation of a decellularised bovine osteochondral biomaterial for cartilage repair. *Journal of Materials Science Materials in Medicine* 2015;26:186. doi:10.1007/s10856-015-5517-0.
 50. Hogg P, Rooney P, Leow-Dyke S, Brown C, Ingham E, Kearney JN. Development of a terminally sterilised decellularised dermis. *Cell and Tissue Banking* 2015;16:351–9. doi:10.1007/s10561-014-9479-0.
 51. Zheng MH, Chen J, Kirilak Y, Willers C, Xu J, Wood D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains porcine DNA: possible implications in human implantation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 2005;73:61–7. doi:10.1002/jbm.b.30170.
 52. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 2010;140:619–30. doi:10.1016/j.cell.2010.02.014.
 53. Gouk S-S, Lim T-M, Teoh S-H, Sun WQ. Alterations of human acellular tissue matrix by gamma irradiation:

histology, biomechanical property, stability, in vitro cell repopulation, and remodeling. *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 2008;84:205–17. doi:10.1002/jbm.b.30862.

54. Moroni F, Mirabella T. Decellularized matrices for cardiovascular tissue engineering. *American Journal of Stem Cells* 2014;3:1–20. doi:10.1517/14712598.2010.534079.
55. Zhou J, Ye X, Wang Z, Liu J, Zhang B, Qiu J, et al. Development of decellularized aortic valvular conduit coated by heparin-sdf-1 α multilayer. *Annals of Thoracic Surgery* 2015;99:612–8. doi:10.1016/j.athoracsur.2014.09.001.