

MEKANİK VE ENZİMATİK YÖNTEM İLE İZOLE EDİLEN STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ

IN VITRO INVESTIGATION OF THE EFFECT OF STROMAL VASCULAR FRACTION ISOLATED BY MECHANICAL AND ENZYMATIC METHODS ON WOUND HEALING

Kemal Tunç TİRYAKI¹ 

¹Cellest Klinik, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Uzmanı, İstanbul, Türkiye

ORCID IDs of the authors: K.T.T 0000-0002-7710-2414

Cite this article as: Tiryaki KT. In vitro investigation of the effect of stromal vascular fraction isolated by mechanical and enzymatic methods on wound healing. J Ist Faculty Med 2020;83(3):241-6. doi: 10.26650/IUITFD.2019.0051

ÖZET

Amaç: Yağ dokusundan elde edilen Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) hücre süspansiyonun yara iyileşmesindeki rolü gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Bu çalışmada enzimatik ve mekanik yöntemler ile izole edilen SVF hücre popülasyonunun yara iyileşmesindeki rolü incelenecektir.

Gereç ve Yöntem: 10 farklı hastadan yağ alma yöntemi ile elde edilen yağ dokusu (eşit miktarda iki farklı gruba bölüldükten sonra) mekanik ve enzimatik yöntemler kullanılarak SVF hücre kokteyli izole edilmiştir. İzolasyon sonrasında hücre canlılığı ve hücre sayısı akış sitometrisi kullanılarak sayılmış, hücre proliferasyon hızları WST-1 testi ile ölçümlenmiştir. Yara iyileşmesinde *in-vitro* model olarak kullanılan Scratch Assay testi her iki grup ile elde edilen hücre kokteylleri ile gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonrasında, yara iyileşmesinde rol aldığı bilinen kolajen tip 1 geninin ifade edilme seviyesi her iki grup içinde ölçümlenmiştir.

Bulgular: Enzimatik yöntem ile elde edilen SVF (E-SVF) hücre kokteyli $1,52 \times 10^6$ /ml ($\pm 3,63$, $n=10$, $p=0,015$) iken, mekanik yöntem ile elde edilen SVF (M-SVF) hücre kokteyli sayısı $0,67 \times 10^6$ /ml ($\pm 1,69$, $n=10$, $p=0,015$) olarak ölçümlenmiştir. İki farklı yöntem ile izole edilen SVF hücre kokteylinin izolasyon sonrası hücre canlılıkları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. M-SVF hücre kokteylinin, E-SVF ile karşılaştırıldığında %10 daha fazla hücre proliferasyon hızına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, M-SVF hücrelerinin migrasyon hızlarının ve *Col1* gen seviyelerinin E-SVF hücrelerine oranla daha fazla olduğu saptanmıştır.

Sonuç: M-SVF hücre kokteylinin hücre sayısının E-SVF hücre kokteylinin hücre sayısından az olmasına rağmen, M-SVF hücre kokteylinin kolajen tip 1 gen seviyesinin arttığı görülmüş, böylece M-SVF hücre kokteylinin daha yüksek yara iyileşme özelliklerine sahip olduğunu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Stromal vasküler fraksiyon, kök hücre, yara iyileşmesi

ABSTRACT

Objective: The role of Stromal Vascular Fraction (SVF) cell suspension obtained from adipose tissue in wound healing is gaining importance day by day. In this study, the role of SVF cell population, isolated by enzymatic and mechanical methods in wound healing, will be examined in vitro.

Material and Method: An SVF cell cocktail was isolated by mechanical and enzymatic methods after adipose tissue was obtained from 10 different patients by the liposuction method (the adipose tissue was divided into two equal groups for enzymatic and mechanical methods). After the isolation process is done, cell viability and cell number were counted using flow cytometry, and cell proliferation rates were measured by WST-1 assay. The Wound Healing Scratch Assay test, which is used as an in vitro model for wound healing, was performed with cell cocktails obtained from both groups. After isolation, the level of expression of the collagen type 1 gene, known to be involved in wound healing, was measured in both groups.

Results: While the SVF (E-SVF) cell cocktail obtained by the enzymatic method was $1,52 \times 10^6$ /ml ($\pm 3,63$, $n=10$, $p=0,015$), the number of SVF (M-SVF) cell cocktails obtained by mechanical method was $0,67 \times 10^6$ /ml ($\pm 1,69$, $n=10$, $p=0,015$). No significant difference was observed between cell viability of SVF cell cocktails isolated by two different methods. The M-SVF cell cocktail had a 10% higher cell proliferation rate compared to E-SVF. Furthermore, M-SVF cell migration rates and *Col1* gene levels were found to be higher than E-SVF cells.

Conclusion: Although the cell number of the M-SVF cell cocktail was less than the cell number of the E-SVF cell cocktail, the collagen type 1 gene level of the M-SVF cell cocktail was found to be higher, so the M-SVF cell cocktail had higher wound healing properties.

Keywords: Stromal vascular fraction, wound healing, stem cell

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: tunc@tunctiryaki.com

Başvuru/Submitted: 10.07.2019 • Revizyon Talebi/Revision Requested: 18.09.2019 •

Son Revizyon/Last Revision Received: 20.09.2019 • Kabul/Accepted: 24.10.2019 • Online Yayın/Published Online: 25.10.2019

©Telif Hakkı 2020 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2020 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

GİRİŞ

Yara iyileşmesi; homeostaz, inflamasyon, proliferasyon ve matürasyon adı verilen dört farklı evreden oluşan fizyolojik bir süreçtir (1). Her ne kadar yara iyileşmesi uzun yıllardır çalışılıyor olsa da geliştirilen yara tedavi yöntemlerinin çoğu yüksek maliyetli, düşük etkinlikte ve yan etkileri olması sebebiyle yeterince tatmin edici bulunmamaktadır (2).

Yağ doku kaynaklı SVF olarak adlandırılan heterojen hücre popülasyonu, epitelizasyon, anjiyogenez ve immüno-modülasyon gibi kesin fizyolojik gerekliliklere dayalı yara iyileşmesi için en umut verici terapötik stratejilerden biri olarak bilinir. Ancak, bazı dezavantajların halen çözülmesi gerekmektedir. Örneğin; kolajenaz enziminin SVF izolasyonunda kullanılması biyolojik kontaminasyon riskini artırabilir. Ayrıca bazı ülke regülasyonları enzim kullanımı ile ilgili birçok kısıtlama getirmiştir (3).

Yağ dokusu, çoğunlukla adipositlerden oluşmasına rağmen önemli bir mezenkimal kök hücre rezervi olarak bilinmektedir. SVF, cerrahi yöntemler ile toplanılan yağ dokusunun yıkımı sonucunda elde edilen, mezenkimal kök hücre, mezenkimal hücrelerin yansira pre-adiposit, endotel hücreleri, hematopoietik hücreleri, fibroblast ve perisitleri içeren heterojen bir hücre kokteylidir. SVF, kök hücre konsepti içinde önemli bir yere sahip plastik cerrahi ve diğer klinik branşlarda kullanımı olan son derece güncel bir gelişmedir (4). SVF, plastik cerrahi için rutin bir işlem olan lipoaspirasyon işlemi sonucunda elde edilen lipoaspiratın izolasyonundan sonra kolaylıkla elde edilebilmektedir.

SVF elde edilmesi için izolasyon yöntemleri temelde, manuel yöntem (enzimatik yöntem), otomatik cihazlar ve mekanik ayrıştırma yöntemi olarak üçe ayrılabilir. Genellikle, laboratuvar ortamında enzim kullanılarak gerçekleştirilen SVF izolasyonu enzimatik izolasyon yöntemi olarak bilinmektedir. Enzimatik yöntem ile izole edilen Lipoaspiratın gramı başına yaklaşık 100,000- 1,300,000 çekirdekli hücre, %80'den fazla canlılıkla elde edilebilir. Ancak, bu yöntem pahalı, zaman alıcı (90-120 dakika) ve yasal ve idari kaygıları artırıcı durumdadır (3).

Enzim yönteminin dezavantajları göz önünde tutularak, klinik ortamında ve cerrahide kullanılmak üzere SVF izole eden otomatik cihazlar yaygınlaşmaya başlamıştır. Otomatik cihazların temel avantajları arasında kapalı ortam olması, kontaminasyon riskinin minimum olması, klinik uygulamada standardizasyon sağlanması ve uygulamanın ameliyat ortamında veya klinikte gerçekleşiyor olması gibi sebepleri ile avantaj oluşturmuştur. Fakat bahsi geçen otomatik bu cihazların çok maliyetli oluşlarından ve cihazı kullanacak ekstra bir kullanıcıya ihtiyaç duyulmasından dolayı fazla yaygınlaşmamıştır. Bu nedenle, SVF'in mekanik izolasyonu araştırılmaya başlanmıştır. Bu bakış

açısı ile birlikte birçok mekanik ayrıştırma yöntemi denenmiştir. Bu yöntemler arasında sadece çalkalama, titreşim, santrifüjleme yöntemlerine dayanan mekanik izolasyonlar gerçekleştirilmiştir.

Fakat mekanik izolasyon yöntemleri, enzimatik izolasyon teknikleriyle kıyaslandığında hücre sayısı ve canlılık açısından çok düşük kalmıştır (5). Daha sonra yapılan çalışmalarda, hücre sayısı ve canlılığının az olduğu mekanik izolasyon yöntemlerinde hücre aktivitesinin, enzimatik yöntemler kullanılarak ayrıştırılan hücre popülasyonlarından daha fazla olduğu gösterilmiştir (6).

Bu çalışmada; literatürde daha önce yara iyileşmesindeki etkinliği kanıtlanmış olan yağ dokusu kullanılarak mekanik ve enzimatik yöntem ile izole edilen SVF'in yara iyileşmesi üzerindeki etkisinin *in vitro* incelenmesi hedeflenmiştir (7, 8, 11).

GEREK VE YÖNTEM

Hücre izolasyon yöntemi

Bu çalışma için 26-52 yaşları arasında 25-27 kg/m² BMI aralığında liposakşın yağ alımı operasyonu geçiren toplamda 10 kadın seçilmiş ve kurumsal inceleme kurumumuz tarafından onaylanmıştır. 2 mm çapında çok delikli bir kanül kullanarak her hastanın lateral kalça bölgesinden 20 ml lipoaspirat yağ dokusu toplanmıştır. Dekantasyon sonrası, yağ doku iki eşit parçaya bölünmüş, enzimatik ve mekanik yöntemler ile SVF izolasyonu için 2 farklı gruba ayrılmıştır.

Enzimatik İzolasyon (E-SVF)- Enzimatik izolasyon için ayrılan 10 ml yağ doku, 0.1 U/mL konsantrasyonunda ve 1:1 (h/h) oranda GMP dereceli kolajenaz NB6 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Almanya) kullanılarak 30 dakika boyunca 37°C su banyosunda sabit hız ile çalkalanmıştır. Çalkalama sonunda adipoz doku PBS solüsyonu ile yıkanmış ve 5 dakika boyunca 300 G'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant (yağ hücreleri ve yıkama/enzim sıvısı) atılmış ve üzerine 10 PBS eklenerek SVF hücreleri homojenize edilmiştir. Daha sonra, homojenize edilen hücre süspansiyonu 70 µm'lik steril süzgeçten (BD, LSR00159) geçirilmiştir.

Mekanik Yöntem ile SVF İzolasyonu (M-SVF)- Mekanik sindirim için ayrılmış olan 10 ml yağ doku üç yollu musluk yardımı ile 20 cc'lik luer-lock bağlantılı şırıngalara aktarılmıştır. Döner bir göbek yoluna sahip üç luer-lock portunda 3 farklı filtre bulunan küp şeklinde bir aparat kullanılarak mekanik izolasyon gerçekleştirilmiştir. Yağ doku dolu enjektör birinci porta yerleştirilmiş, boş enjektör ise ikinci porta yerleştirilmiştir. Portların birinde 1000 mikron deliklere sahip bir filtre bulunmaktadır. Bu iki port arasında adipoz doku 10 kez ileri geri geçirilerek küçük parçalara ayrılmıştır. Dönen göbek yolu ikinci ve üçüncü portlar arasında bulunan 750 mikronluk filtreye doğru çevrilmiştir. Yağ doku

dolu enjektör ikinci porta, boş enjektör ise üçüncü porta bağlanmış ve bu filtre arasında 10 defa geçirilmiştir. Böylece yağ doku daha küçük parçalara ayrılmıştır. Aynı işlem üçüncü ve dördüncü port arasında bulunan 500 mikronluk filtre için de tekrarlanmıştır. Böylece yağ doku tam olarak parçalanmıştır. Parçalanmış yağ doku üzerine 1:3 oranda kalsiyum-magnezyum (Ca-Mg) dengeli bir tampon çözeltisi eklenmiş ve 10 dakika boyunca oda ısısında inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Bu tampon çözeltisini eklemenin asıl amacı eritrositlerden kurtulmak ve kontaminasyonu engellemektir. Santrifüj işlemi ve kapalı ortamı sağlamak amacıyla, 20 cc luer-lock şırıngaların gövde kısımları, içbükey, hücre yapışkanlığına sahip özel yapılmış ayrılabılır pistonlarla değiştirilmiştir. Parçalanmış yağ doku bu pistonlara aktarılmış, pistonların baş kısımları çıkartılarak 2000 G'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sırasında SVF'in içbükey contalar içinde birikebilmesi için luer-lock uçları içe doğru yerleştirilmiştir. Santrifüj sonrasında, pistonların çıkartılmış baş kısımları tekrar takılmış ve hücre pelleti dışındaki yağ doku ve tampon çözeltisi bir üç yollu musluk yardımı ile boş bir enjektöre aktarılmıştır. Hücre pelleti salin solüsyonu ile homojen haline getirilmiştir.

Hücre sayısı ve canlılığı analizi

E-SVF ve M-SVF ile izole edilen hücre popülasyonunun toplam çekirdekli hücre sayısı ve canlılığı, kırmızı kan hücresi lizizinden sonra akış sitometresi (Muse CellTM Analyzer) ile ölçümlenmiştir.

Hücre proliferasyonu testi

Yukarıda 2 farklı yöntem ile izole edilen SVF hücre popülasyonu, hücre kültürü koşullarında büyütülmüştür. Hücre proliferasyonu analizi için, iki farklı yöntem ile izole edilen hücre kokteyllerinden 3×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde, 96 oyuklu hücre kültür kaplarına ekilerek, %10'luk fetal sıgır serumu (Gibco, UK) ile desteklenmiş düşük glukozlu DMEM besiyerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Hücre proliferasyonu testi, literatürde belirtilen WST-1 testi (BioVision, CA) ile değerlendirilmiştir (9). WST-1 test sonuçları Absorbans değeri, 540 nm'de spektrotometre kullanılarak ölçümlenmiştir. Bu deney, 3 biyolojik tekrar yapılarak tamamlanmıştır. Kontrol grubu olarak ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır.

Yara iyileşmesi scratch assay

İki farklı yöntem ile izole edilen SVF hücre popülasyonu 6 oyuklu hücre kültürü tabaklarına (TPP, İsviçre) 1×10^6 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda ekilmiştir. 1000 µL steril uç kullanılarak, yara iyileşmesi modeli oluşturulmuştur. İki grup da %2 FBS içeren taze besiyeri ile beslenmiştir. Hücreler inkübatörde 24 saat inkübe edilerek, yara kapanması invert ters mikroskop (Nikon Eclipse TE200: Nikon, Tokyo, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Kontrol grubu olarak ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş

ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır.

Gerçek zamanlı PZR ile gen ekspresyonu analizi

Yara iyileşmesinde etkin role sahip Kolajen tip I primeri, Ulusal Biyoteknoloji Merkezi'nden (Bethesda, MD, ABD) Primer-BLAST yazılımı kullanılarak tasarlanmıştır. İki farklı metotla izole edilen SVF hücre popülasyonlarından toplam RNA izolasyonu, üreticinin protokolüne göre Total RNA Saflaştırma Arıtma Kiti (Norgen, CAN) kullanılarak izole edilmiştir. RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi için QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Fransa) kullanılmıştır. Kollajenaz tip 1 geninin mRNA ekspresyon seviyesi, QuantiTect SYBR Green PCR kiti (Qiagen, Fransa) kullanılmıştır. Reaksiyonlar üreticinin protokolüne göre iCycler RT-PCR sistemi (Bio-Rad, Hercules, CA) kullanılarak okutulmuştur. Analiz sırasında, 18S rRNA referans geni olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipoz kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz için yüzde bazında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve GraphPad Prism 5 (GraphPad, La Jolla, CA) yazılımı kullanılmıştır. $P \leq 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Hücre sayısı ve canlılığı analizi

E-SVF yöntemi ile izole edilen hücre popülasyonunun toplam çekirdekli hücre sayısı $1,52 \times 10^6$ iken M-SVF ile izole edilen hücre popülasyonunun toplam çekirdekli hücre sayısı $0,67 \times 10^6$ olarak ölçümlenmiştir. İzolasyon sonrasında elde edilen hücre popülasyonlarının hücre canlılıkları E-SVF grubunda %96,6 iken M-SVF grubunda %97,5 dur. Hücre canlılıkları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 1).

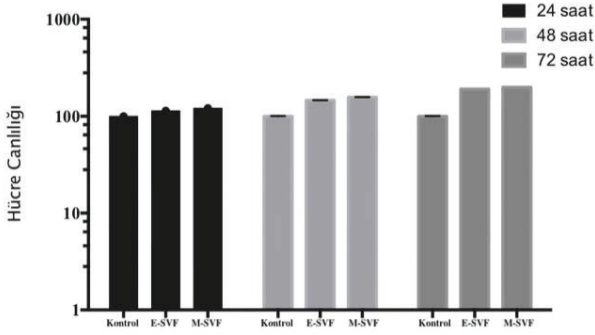
	Hücre Sayısı/cc (10^6)	Hücre Canlılığı (%)	
A	M-SVF	0,67	97,5
	E-SVF	1,52	96,6



Şekil 1: a. Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücre kokteyli hücre sayısı ve hücre canlılığı sonuçları b. Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücre kokteyli çekirdekli hücre boyaması ardından faz-kontrast mikroskopu altındaki görüntüleri.

Hücre proliferasyonu testi

Yukarıda bahsedildiği üzere, M-SVF ile izole edilen hücre popülasyonunun *in vitro* yara iyileşmesi modelinde hücre proliferasyonunun kontrol grubuna ve E-SVF grubuna kıyasla daha fazla olduğu saptanmıştır. E-SVF grubunda A490 nm değeri 72. Saat sonunda $199 \pm 0,3$, M-SVF grubunda $191 \pm 0,1$ kontrol grubunda ise $100 \pm 0,1$ olarak tespit edilmiştir ($P \leq 0,05$). Hücre popülasyonu Şekil 2'de görüldüğü üzere mekanik yolla elde edilen hücrelerin proliferasyonu E-SVF ile izole elde edilen hücrelere oranla daha fazla bulunmuştur.



Şekil 2: Hücre proliferasyonu WST-1 testi ile gerçekleştirilmiştir. Analiz mekanik yöntem ve enzimatik yöntem ile izole edilen SVF hücre kokteylinin 24., 48. ve 72. saat sonrası ölçümlerinin göstermektedir.

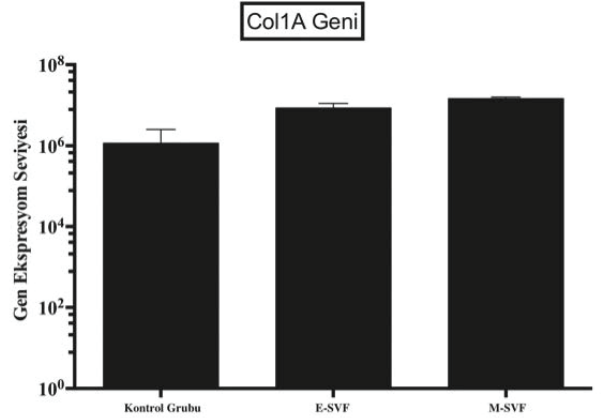
Yara iyileşmesi scratch assay

İki farklı yolla elde edilen SVF hücre popülasyonunun yara iyileşme sürecindeki etkilerini gözlemleyebilmek ve hücrelerin migrasyon özelliklerindeki muhtemel değişimi incelemek amacı ile, 6 kuyucuklu kültür tabaklarına 100,000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiştir (10,11). Hücreler kap yüzeyini tam olarak kapladıklarında 200 µL pipet ucu yardımıyla kabın tam ortasında steril koşullarda bir yarığın oluşturulmuştur. Oluşturulan bu yarığın

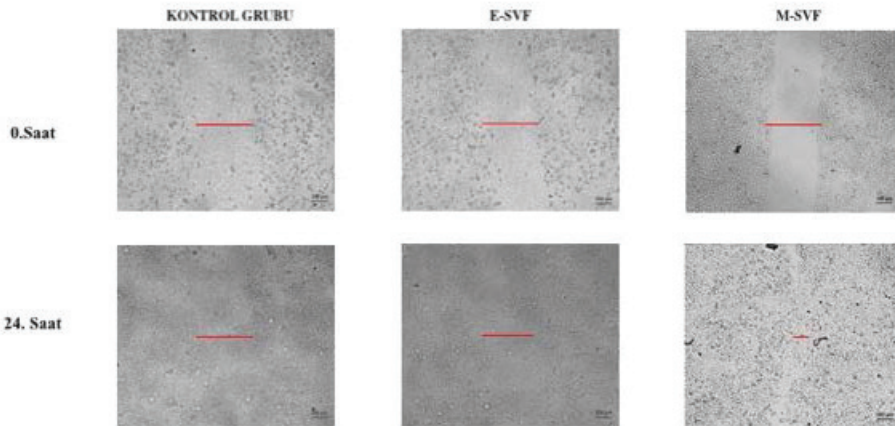
kapanma hızı ve aralığı ışık mikroskobu yardımıyla 24, 48 ve 72. saatlerde ölçümlenmiştir. M-SVF ile elde edilen hücre kokteylinin migrasyon eğilimi bir diğer deyişle yara iyileşmesi potansiyellerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 3).

Gerçek zamanlı PZR ile gen ekspresyonu analizi

Gerçek zamanlı PZR deneyi, anlatımı yapılan gen miktarlarının belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir (12). Floresan ışık veren boya (SYBR) DNA ya bağlanarak yeterli miktarda ürün oluştuğu zaman ışık verir ve gen anlatımı belirlenir. (13) Yukarıda bahsedilen hücre canlılığı ve yara kapanması analizlerinin sonuçlarına anlamlı olarak, yara iyileşmesinde rol aldığı bilinen kolajen tip 1 geninin ifade edilme seviyesi M-SVF ile elde edilen hücre popülasyonunun, E-SVF ile elde edilen hücre popülasyonundan 1,5 kat daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. (Kontrol; $1,15 \times 10^6 \pm 1,3$; E-SVF; $8,5 \times 10^6 \pm 2,4$; M-SVF; $1,4 \times 10^7 \pm 1,2$; $P \leq 0,05$) (Şekil 4).



Şekil 4: Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücrelerin kolajen tip1 seviyesinin 18sRNA referans genine oranla ifadesinin qz-PZR ile tespiti.



Şekil 3: Mekanik izolasyon ve enzimatik izolasyon sonrası elde edilen hücrelerin çizik analizi ve yara kapanma oranları. Kontrol: ATCC (American Type Culture Collection) sipariş edilmiş ve büyüme ortamıyla muamele edilmiş adipose kaynaklı kök hücreler, görüntüler invert mikroskopunda, büyütme oranı 40x olarak alınmıştır.

Bu sonuçlardan yola çıkarak, yağ dokudan mekanik yol ile elde edilen SVF hücre kokteylinin, enzimatik yolla elde edilen hücrelere göre yara iyileştirici özelliğinin daha fazla olduğu yapılan deneylerce gözlemlenmiştir.

TARTIŞMA

Cilt bütünlüğü, dokuda herhangi bir bozulma durumunda cildin sürekliliğini korumak için iş birliği yapan sitokinlerden ve büyüme faktörlerinden kaynaklanan uyarılar kadar içsel ve dışsal faktörler dizisi ile sağlanır. Ayrıca, kollajen gibi hücre dışı matriks bileşenleri, yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. Yara iyileşme süreci, önceden şekillendirilmiş fibrin pıhtının kollajen matriks tip I ile değiştirilmesini gerektirir. Hücreler tarafından üretilen kollajen, cilt iyileşmesi sırasında hem hücre yapışmasını hem de hücre göçünü kontrol eder. Hücre göçü ve proliferasyon yara iyileşme oranını sınırlayan faktörlerdir. Bu çalışmada enzimatik ve mekanik yöntemler ile izole edilen SVF hücre kokteyl kullanılarak bahsi geçen faktörler uyarlanmaya çalışılmıştır. M-SVF hücre sayısı, E-SVF hücre sayısının %30-50'si kadar olduğu görülmektedir. Sadece hücre sayısı açısından bakıldığında enzimatik yöntem ile izole edilen SVF hücre kokteyli bir avantaj sayılabilir. Ancak, ileri çalışmalar yapıldığında, bulgularımız M-SVF hücre kokteylinin izolasyon sonrası hücre sayısının daha az olmasına rağmen, hücre bölünme hızının daha yüksek olduğunu ve buna ek olarak kollajen tip I gen ifadesi düzeyini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, bu artışın kollajen üretimiyle sonuçlandığını ve yara iyileşme sürecinde hücrelerinin çoğalmasında ve göçünü arttırdığını kuvvetle vurgulamaktadır.

Mekanik izolasyon, adipositlerin, adipoz matriksinden ayrılması sonucu SVF hücrelerinin santrifüj yöntemi ile çökmeye dayanır. Bazı çalışmalar, mekanik manipülasyonun ve mekanik kuvvetlerin, hücre işlevselliğini ve etkinliğini pozitif anlamda etkileyebileceğini göstermiştir (8). Hücre aktivitesinin artması, hücrelerin gen ekspresyon seviyelerinde artışa ve buna bağlı olarak protein sentezinin daha fazla olmasını sağlar.

Enzimatik yöntemlerde kullanılan enzim kimyasalının, Clostridium gibi bakterilerin patogenezi sonucu elde edilmekte ve bu enzimin insan sağlığı üzerinde etkisi tam olarak bilinmemektedir. Bu sebepten dolayı birçok ülkede bu kimyasalın insan doku ve hücrelerinin işlenmesinde kullanılması önerilmemektedir (14). Enzimatik SVF izolasyonunun dezavantajlarının üstesinden gelmek için, birçok mekanik SVF izolasyon metodu ortaya çıkmıştır. Mekanik izolasyon yöntemi, ameliyathane ortamında gerçekleştirebileceğinden enzimatik izolasyon yöntemlerine oranla daha kolay, daha kısa ve tercih edilebilir bir yöntem olarak değerlendirilebilir. Mekanik izolasyonun dezavantajı ise enzimatik yöntem ile elde edilen hücre sayısının en fazla %10 kadar hücre sayısı izole edebilmektir (15). Geliştirilen yeni mekanik izolasyon

yöntemleri ile birlikte bu oran %50-60'a kadar yükselmiştir (16, 17). Ayrıca Banyard DA ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada hücre sayısının etkisinin çok önemli olmadığı, hücre aktivitesinin daha önemli olduğu vurgulanmıştır (8). Bu ışık çerçevesinde bakıldığında mekanik izolasyon yöntemi ile elde edilen SVF hücre kokteylinin yara iyileşmesinde çok büyük umut vaat ettiği ön görülmektedir.

SONUÇ

Bu çalışmada, in vitro yara iyileşme modeli kullanılarak 2 farklı yöntemle elde edilen kök hücrelerin karşılaştırmalı yara iyileştirici tedavisinin potansiyel kullanımı belirlenmiştir.

Sonuçlarımız, M-SVF hücre kokteylinin kollajen tip 1 gen seviyesinin arttığı görülmüş, böylece M-SVF hücre kokteylinin daha yüksek yara iyileşme özelliklerine sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Tüm bu bilgiler sonucunda bulgular, cilt yaralanmalarının tedavisi için mekanik yöntem kullanılarak elde edilen SVF kokteylinin alternatif bir tedavi olmasını öngörmektedir.

Etik Komite Onayı: Etik komite onayı bu çalışma için, yerel etik komiteden alınmıştır.

Bilgilendirilmiş Onam: Katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- K.T.T.; Veri Toplama- K.T.T.; Veri Analizi/Yorumlama- K.T.T.; Yazı Taslağı- K.T.T.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- K.T.T.; Son Onay ve Sorumluluk- K.T.T.; Malzeme ve Teknik Destek- K.T.T.; Süpervizyon- K.T.T.

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Finansal Destek: Yazar finansal destek beyan etmemiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the local ethics committee.

Informed Consent: Written consent was obtained from the participants.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Conception/Design of Study- K.T.T.; Data Acquisition- K.T.T.; Data Analysis/Interpretation- K.T.T.; Drafting Manuscript- K.T.T.; Critical Revision of Manuscript- K.T.T.; Final Approval and Accountability- K.T.T.; Technical or Material Support- K.T.T.; Supervision- K.T.T.

Conflict of Interest: Author declared no conflict of interest.

Financial Disclosure: Author declared no financial support.

KAYNAKLAR

1. Balekar N, Katkam NG, Nakpheng T, Jehtae K, Srichana T. Evaluation of the wound healing potential of *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *J Ethnopharmacol* 2012;141(3):817-24. [\[CrossRef\]](#)
2. Yates CC, Hebda P, Wells A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2012;96(4):325-33. [\[CrossRef\]](#)
3. Aronowitz JA, Ellenhorn JD. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:932e-939e. [\[CrossRef\]](#)
4. Condé-Green A1, Baptista LS, de Amorin NF, de Oliveira ED, da Silva KR, Pedrosa Cda S, et al. Effects of centrifugation on cell composition and viability of aspirated adipose tissue processed for transplantation. *Aesthet Surg J* 2010;30:249-55. [\[CrossRef\]](#)
5. Condé-Green A, Kotamarti VS, Sherman LS, Keith JD, Lee ES, Granick MS. Shift toward Mechanical Isolation of Adipose-derived Stromal Vascular Fraction: Review of Upcoming Techniques. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2016;4:e1017. [\[CrossRef\]](#)
6. Tiryaki T. A novel three-step mechanical digestion method for ADSC. Oral presentation at the 14th Annual International Federation of Adipose Therapeutics and Science IFATS meeting. 2016 Nov 17-20, San Diego, California.
7. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg* 2013;132:1017-26. [\[CrossRef\]](#)
8. Banyard DA, Sarantopoulos CN, Borovikova AA, Qiu X, Wirth GA, Paydar KZ, et al. Phenotypic analysis of stromal vascular fraction after mechanical shear reveals stress-induced progenitor populations. *Plast Reconstr Surg* 2016;138:237e-247e. [\[CrossRef\]](#)
9. Koçak P, Canikyan S, Batukan M, Attar R, Şahin F, Telci D. Comparison of enzymatic and nonenzymatic isolation methods for endometrial stem cells. *Turk J Biol* 2016;40(5):1081-9. [\[CrossRef\]](#)
10. Lauffenburger, DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell J* 1996;84(3):359-69. [\[CrossRef\]](#)
11. Martin P, Martin P. Wound healing aiming for perfect skin Regeneration. *Science* 1997;276(5309):75-81. [\[CrossRef\]](#)
12. Demirci S, Doğan A, Demirci Y, Şahin F. In vitro wound healing activity of methanol extract of *Verbascum speciosum*. *Int J Appl Res Nat Prod* 2014;7(3):37-44.
13. Şahin F, Koçak P, Yıldırım GM, Özkan İ, Yıldırım E, Kala E. In Vitro Wound Healing Activity of Wheat-Derived Nanovesicles. *Appl Biochem Biotechnol* 2018;188(2):381-94. [\[CrossRef\]](#)
14. Lockhart RA. Tissue Dissociation Enzymes for Adipose Stromal Vascular Fraction Cell Isolation: A Review, *J Stem Cell Res Ther* 2015;5:12. [\[CrossRef\]](#)
15. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of Stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus* 2015;4:713. [\[CrossRef\]](#)
16. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat Grafting: Basic Research and Clinical Applications. *Plast Reconstr Surg* 2013. [\[CrossRef\]](#)
17. Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived Stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:145. [\[CrossRef\]](#)