



DESELÜLERİZASYON YÖNTEMLERİ VE DOKULARDA KULLANIMI

İbrahim ÜÇGÜL^a, Sultan ARAS^{b,*}

^a Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü, Isparta, TÜRKİYE

^b Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Isparta, TÜRKİYE

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: sultanaras91@gmail.com

Gönderim Tarihi: 16.11.2017

Kabul Tarihi: 28.11.2017

Özet:

Deselülerize edilmiş doku ve organlar çeşitli doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında başarıyla kullanılmaktadır. Ekstraselüler matristen elde edilen biyolojik bir iskele, işlem görece dokudan hücreleri etkin bir şekilde ortadan kaldıran çeşitli deselülerizasyon yöntemleri ile üretilebilir. Kullanılan deselülerizasyon yöntemleri dokuların ve organların yapısına göre değişir. Hücrelerin bir dokudan çıkarılması, dokunun kaynağına ve kullanılan spesifik fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlere bağlıdır. Bu yöntemlerin her biri geri kalan hücre dışı matrisin (ECM) yapısındaki biyokimyasal bileşimini, dokunun ince yapısını (ultrastrüktürünü) ve mekanik davranışını etkiler. Bu makalede en sık kullanılan deselülerizasyon yöntemleri tanımlanarak ve bu yöntemlerin biyolojik doku iskelesi materyali üzerindeki etkileri ele alınmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Deselülerizasyon, Ekstraselüler Matris, Doku mühendisliği (TE), Deselülerizasyon yöntemleri

DECELLULARIZATION METHODS AND USING OF THE TISSUES

Abstract:

Decellularized tissues and organs have been successfully used in various tissue engineering and regenerative medicine applications. A biological scaffold obtained from the extracellular matrix can be produced by various decellularization methods which efficiently remove the cells from the tissue to be treated. Deceleration methods used vary according to the structure of the tissues and organs. The removal of cells from a tissue depends on the source of the tissue and the specific physical, chemical, and enzymatic methods used. Each of these methods influences the biochemical composition of the remaining extracellular matrix (ECM) structure, the ultrastructure of the tissue (ultrastructural product), and its mechanical behavior. The most commonly used deceleration methods are introduced in this article and the effects of these methods on biological tissue scaffold material are discussed.

Key words: Decellularization Extracellular Matrix, tissue engineering (TE), Decellularization methods

1. GİRİŞ

Doku ve organ nakli çalışmalarının kısıtlı olması, doku mühendisliği (TE) yapıları dahil olmak üzere çeşitli alternatiflerin geliştirilmesine yol açmıştır. Biyo iskelesi tasarımındaki ilerlemelere rağmen, doğal doku ultrastrüktürünü ve biyomekanik özelliklerini etkili bir şekilde taklit eden eşdeğer yapılar bulunmamıştır. Bununla birlikte doku mühendisliğinde biyo iskelesi üretim yöntemlerinden biri olan deselüerizasyon yöntemi sık kullanılan ve en uygun yöntem olarak gözlemlenmiştir (Mertsching vd., 2005; Wilson vd., 2013).

Deselüerizasyon dokunun veya organın kendine özgün mimarisini koruyarak bütün organların hücrelerinden arındırıp, iskeleleri üreten bir yöntemdir. Bu, organ yapısını taklit değil, aynı zamanda hücre dışı matrise (ECM) yardım hücre çoğalması ve farklılaşması içinde kimyasal bileşenleri içerir (Wilson vd., 2013; Hrebikova vd., 2015).

Dokuların deselüerizasyonu için en yaygın kullanılan yöntemler, fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemleri bir arada içerir. Fiziksel işlemde ajitasyon veya sonikasyon, mekanik masaj veya basınç ya da donma ve çözülme içerebilir. Bu yöntemler, ECM hücre içeriğinin sonradan durulama ve çıkarılmasını kolaylaştırmak için hücre zarını bozar. Bu fiziksel işlemler tam deselüerize elde etmek için genellikle yetersizdir ve bir kimyasal işlem ile kombine edilmelidir. Enzimatik işlemler, tripsin gibi kimyasal işlemler veya iyonik çözeltiler, hücre zarının, hücreler arası ve hücre dışı bağlantılarından sorumlu bağlarını bozmaktadırlar. Dokular hem hücre malzemesinden hem de ECM'den oluşur ve ECM'nin doku kaynağına bağlı kompaktlığı değişken derecede düzenlenmiştir. ECM, deselüerizasyon işlemi sırasında kaotropik maddeler ile bütün hücrelerin yeterli sürede işleme maruz kalması malzemenin dokudan çıkarılmasına bir yol sağlamak için kesintiye uğramaktadır. Çoğu deselüerizasyon süreçlerinin amacı kesintileri en aza indirmek ve standart fiziksel özellikleri ve biyolojik özellikleri muhafaza etmektir (Gilbert vd., 2006; Akbay ve Onur, 2016).

Yapılan bu çalışmada deselüerizasyon yöntemleri ve bu yöntemlerin nasıl kullanıldığı, ekstraselüler matris karakterizasyonu ve deselüerizasyon yöntemlerinin dokularda kullanımı tanıtılmıştır.

2. ECM (EKSTRASELÜLER MATRİS) KARAKTERİZASYONU

Bir hücre ile çevresi veya diğer hücreler arasındaki etkileşimler, hücre yüzey proteinleri tarafından yönetilir (Wong, 2009). Hücreler biyolojik ortamlarında nanofiber formdaki proteinlerden oluşan bir ekstraselüler matris (ECM) içerisinde bulunmaktadır (Bayram, 2012). Ekstraselüler matris, çok hücreli bir organizmada bazı hücreler tarafından salgılanan, hücreler arasını dolduran ve tanımlanmış bir alanda hücreleri tutan bağlayıcı madde olarak işlev gören çeşitli proteinler ve polisakkaritler için genel bir terimdir (Wong, 2009; Şen, 2012; Yiğit vd., 2016).

Kalp kapakçıkları, kan damarları, deri, sinirler, iskelet kası, tendon, bağ, ince bağırsak alt mukoza (SIS), idrar kesesi ve karaciğer dâhil olmak üzere, çeşitli dokularda, ECM doku mühendisliği ve rejeneratif ilaç uygulamaları için ele alınmıştır. Bir deselüerizasyon protokolünün amacı, bileşimin biyolojik aktivitesi ve kalan ECM mekanik bütünlüğü üzerinde herhangi bir olumsuz etkisini en aza indirirken, verimli bir şekilde tüm hücre ve hücre membranlarının çıkarılmasıdır (Gilbert vd., 2006; Fu vd., 2014; Akbay ve Onur, 2016).

3. DESELÜERİZASYON YÖNTEMLERİNİN AÇIKLANMASI

En sağlam ve etkili deselüerizasyon yöntemleri fiziksel, kimyasal bileşimi ve enzimatik yaklaşımları içermektedir. Deselüerizasyon yöntemleri genellikle, hücre bileşenlerinin ayrılması ve ardından fiziksel tedaviler veya iyonik çözeltiler kullanılarak hücre membran lizisi ile başlar, ECM kullanıldığında enzimatik işlemler deterjan kullanarak sitoplazmik ve hücre membran bileşenlerin çözünürlüğü ve doku hücrelerinin kalıntılarının kaldırılması ile sonlandırılır. Bu adımların etkinliğini geliştirmek için mekanik çalkalama yapılmaktadır. Deselüerizasyondan sonra kalan tüm kimyasallar, kimyasalın olumsuz konak doku yanıtını önlemek için çıkartılmalıdır. Deselüerizasyon sonucu ECM koruma etkinliği çeşitli yöntemlerle tespit edilebilir. Dokuların çeşitli fiziksel, enzimatik ve kimyasal mekanizmaları aşağıdaki bölümlerde ve tablo 1'de gözden geçirilmiştir.

Tablo 1. Yaygın Olarak Kullanılan Deselüerizasyon Yöntemleri ve Kaotropik Maddeler

YÖNTEM	ETKİ ŞEKLİ	ECM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	KAYNAKLAR
Fiziksel			
Ek bileşenini dondurma	Hücre içi buz kristalleri, hücre zarını bozabilir	ECM, bozulmuş veya hızlı donma sırasında hasar görmüş olabilir.	Jackson vd., 1987 Gulati, 1988
Mekanik kuvvet	Basınçla hücreleri patlama ve doku alınması hücrelerini ortadan kaldırır	Mekanik kuvvet ECM zarar verebilir	Freytes vd., 2004 Lin vd., 2004
Mekanik çalkalama	Hücre parçalama neden olabilir, ancak daha genel olarak kimyasal maddeye maruz kalmasını ve hücre malzemenin çıkartılmasını kolaylaştırmak için kullanılır	Hücre malzeme bertaraf edildiği zaman agresif çalkalama ya da sonikasyon ECM'yi bozabilir	Schenke-Layland vd., 2003 Dahl vd., 2003 Freytes vd., 2004 Lin vd., 2004
Kimyasal			
Alkali; asit	Hücrelerin sitoplazmik eritmesi; nükleik asitleri bozar	Glikoz amino glikan'ları (GAG) kaldırma olasılığı vardır.	Yoo vd., 1998 De Filippo vd., 2002 Freytes vd., 2004
İyonik olmayan deterjanlar			
Triton X-100	Sağlam protein-protein etkileşimlerini bırakırken, lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimlerini bozar	Karışık sonuçlar; dokulara göre verim sağlar, GAG'ları kaldırma olasılığı vardır.	Chen vd., 1999 Cartmell ve Dunn, 2000 De Filippo vd., 2002 Dahl vd., 2003 Grauss vd., 2003 Lin vd., 2004 Woods ve Gratzer, 2005
İyonik deterjanlar			
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sitoplazmik ve hücre membranlar çözünür; proteinleri denatüre olma eğilimindedir	Hücre membranlarında ki kalıntıları ve sitoplazmik proteinleri yok eder; yerli doku yapısını bozabilir GAGlar ve hasarlı kollajenleri giderme eğilimindedir.	Chen vd., 2004 Hudson vd., 2004 Hudson vd., 2004 Lin vd., 2004 Rieder vd., 2004 Woods ve Gratzer, 2005 Ketchedjian vd., 2005
Sodyum deoksikolat		Doku yapısı SDS'den daha yıkıcıdır.	Chen vd., 2004 Hudson vd., 2004 Hudson vd., 2004

			Lin vd., 2004 Rieder vd., 2004 Woods ve Gratzler, 2005 Ketchedjian vd., 2005
Triton X-200		Zwitteriyonik deterjanlar ile kullanıldığında etkili deselülerizasyon uygulanır.	Chen vd., 2004 Hudson vd., 2004 Hudson vd., 2004 Lin vd., 2004 Rieder vd., 2004 Woods ve Gratzler, 2005 Ketchedjian vd., 2005
Zwitteriyonik deterjanlar			
CHAPS (3 - [(3- Kolamidopropil) - dimetilamonyo] - propan sülfonat)	İyonik olmayan ve iyonik deterjanlar özelliklerini gösterir.	Triton X-100 ile verilene benzer bir ECM bozulma ile verimli deselülerizasyon uygulanır.	Dahl vd., 2003
Sülfobetain-10 ve - 16 (SB-10, SB16)		Triton X-200 ile sağlanan hücre çıkarma ve hafif ECM bozulması	Chen vd., 2004 Hudson vd., 2004 Hudson vd., 2004 Lin vd., 2004 Rieder vd., 2004 Woods ve Gratzler, 2005 Ketchedjian vd., 2005
Tri (n-butil) fosfat	Protein-protein etkileşimlerini bozan organik çözücüdür.	Değişken deselülerizasyon; kolajen içeriği kaybı fazla iken mekanik özellikler üzerindeki etki çok azdır	Cartmell ve Dunn, 2000 Woods ve Gratzler, 2005
Hipotonik ve hipertonic çözeltiler	Ozmotik şok ile Hücre parçalama	Hücre erimesi açısından verimli ancak etkili hücre kalıntıları ortadan kaldırmaz	Vyavahare vd., 1997 Goissis vd., 2000 Dahl vd., 2003 Woods ve Gratzler, 2005
EDTA, EGTA	İki değerli metal iyonları bağlanan kenetleme maddeleri ile ECM hücre yapışmasını bozar	Tipik enzimatik yöntemlerle kullanılan hiçbir izoleye maruz kalmaz(örneğin, tripsin)	Bader vd., 1998 Teebken vd., 2000 Gamba vd., 2002
Enzimatik			
Tripsin	C tarafındaki Arg ve Lys peptit bağlarını böler	Uzun süreli maruz kalmada ECM yapısını bozabilir, laminin, fibronektin, elastin ve GAGler kaldırır	Bader vd., 1998 Teebken vd., 2000 Gamba vd., 2002
Endonükleazlar	Ribonükleotid ve deoksiribonükleotid zincirlerinin iç bağların hidrolizini katalize eder.	Dokudan çıkarılması zor ve bağışıklık sistemini uyarabilir.	Courtman vd., 1994 Dahl vd., 2003 Rieder vd., 2004 Woods ve Gratzler, 2005
Eksonükleazlar	Ribonükleotid ve deoksiribonükleotid zincirlerinin terminal bağların hidrolizini katalize eder.		Gilbert vd., 2006

3.1. Fiziksel Yöntemler

Deselüerizasyonu kolaylaştırmak için kullanılabilen fiziksel yöntemler donma, doğrudan basınç, sonikasyon ve çalkalama içerir. Bu yöntemler arasında en fazla tercih edilen yöntem dondurma yöntemidir. Özellikle bu yöntemlerin tendon, ligament dokusu ile sinir dokusunda kullanıldığı bilinmektedir (Jackson vd., 1990; 1991). Dondurma-çözme (Freeze-Thaw) yöntemi olarak adlandırılan bu yöntemde dokunun -86°C ' ye dondurularak tekrar hızla 37°C 'ye getirilmesi işlemidir. Yöntem sonucunda ECM yapısında minimal hasar söz konusudur. Hücresel protein ve molekülerin tam temizlenmesi için ek işlemlere gereksinim duyulur. Ayrıca bazı dokularda tek dondurma- çözme döngüsü genellikle yeterli olmamakta ve çoklu tekrar yapılması gerekmektedir (Gulati, 1988; Cortiella vd., 2010).

Direk basınç yöntemi hücre lizizi için kullanılan diğer bir fiziksel yöntemdir. Ancak bu yöntemin genelde ECM organizasyonu yoğun olmayan dokularda (karaciğer, akciğer) etkili olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda mekanik güç, mesane ve ince bağırsakta kullanılan deselüerizasyon yöntemlerindedir. Bu yöntemler etkili olup ECM'in üç boyutlu doğal yapısına minimal düzeyde hasar veren yöntemlerdir (Yang vd., 2010).

Hidrostatik basınç uygulama, sonikasyon ve ajitasyon (karıştırma, çalkalama) gibi teknikler genellikle tek başına yeterli hücre parçalanması yapamazlar ancak enzim, hipertonic veya şelatlayıcı ajanlarla kombine edildiğinde oldukça başarılı sonuçlar alınabilmektedir (Schenke-Layland vd., 2003; Yang vd., 2010). Bu yöntemin önemli bir dezavantajı etkili hücre lizizi sırasında dokuların ultrastrüktürel yapısında ve bazal membran bütünlüğünde hasar meydana gelmesidir (Hopkinson vd.,2008).

Isıl olmayan geri dönüşümsüz elektroporasyon yönteminde mikro saniyelik elektrik uyarıları dokuya uygulanarak hücre membranında oluşan elektrik potansiyelinin bozulması sağlanmakta ve membranda çok küçük delikler meydana getirilmektedir. Bu mikroporlar hücre hemostazını bozarak hücrede ölüme sebep olmaktadır. Ancak bu teknikte Hüresizleştirme uygulanacak dokuya göre kullanılan propların küçük olması, işlemin çok uzun zaman alması ve in vivo ortamda yapılması en büyük dezavantajıdır (Lee, 2005; Funamoto vd., 2010; Çeviker vd., 2017).

3.2. Kimyasal Yöntemler

3.2.1. Asit ve alkalın uygulamaları

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

Yapılan çalışmalarda, domuz ince bağırsak submukozası ve mesane tabakaları yaklaşık %0,10-0,15 konsantrasyonda ki PAA ile deselüerize edilmiştir. Bu deselüerizasyon yönteminin bu tür ince ECM yapılarında hücre materyallerinin ortadan kaldırılmasında yüksek bir etkinliğe sahip olduğu, bunun yanı sıra mikroorganizmaları etkileyerek ve mikrobiyal enzimleri okside ederek materyalin dezenfeksiyonunu da sağladığı bildirilmiştir

(Pruss vd., 1999; Hodde ve Hiles, 2002). İnce bağırsak submukozası ve mesane tabakalarında PAA uygulaması sonrasında immunohistolojik boyama yöntemleri kullanılarak kollajenin birçok tipi (I, III, IV, V, VI ve VII gibi) tanımlanmıştır (Badylak vd., 1995; Brown vd., 2006). Aynı zamanda PAA uygulaması sonrasında ECM’de doğal yapıdaki glikozaminoglikanların korunduğu bildirilmiştir (Hodde vd., 1996). Farklı çalışmalarda ise PAA uygulaması sonrasında glikozaminoglikanlardan laminin ve fibronektinin ECM doku yapısında kaldığı gösterilmiştir (Hodde vd., 2002a; Brown vd., 2006). Transforme edici büyüme faktörü beta, fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi ECM’de yer alan büyüme faktörlerinin yapısal ve fonksiyonel yapılarının bozulmadan kaldığı da diğer çalışma grupları tarafından bildirilmiştir (Voytik-Harbin vd., 1997; Hodde vd., 2001). PAA’in biyolojik yapı malzemelerinin mekaniksel davranışlarına herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı da bildirimler arasındadır (Freytes vd., 2004). İnce bağırsak submukozası ve mesane tabakaları ile yapılan in vitro hücre kültürü çalışmaları da bu şekilde elde edilen materyallerin kullanım açısından mükemmel yakın bir doku iskelesi olduklarını tekrarlı çalışmalar ile göstermiştir (Badylak vd., 1999; Hodde vd., 2002a; 2002b).

3.2.2. İyonik olmayan deterjanlar

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

Triton X-100 deselüerizasyon protokolünde en yaygın olarak kullanılan iyonik deterjanlar arasındadır. Dokunun Triton X-100’e maruz bırakılma süresi birkaç saatten 14 güne kadar değişmektedir (Cartmell ve Dunn, 2000; Dahl vd., 2003; Lin vd., 2004; Woods ve Gratzer, 2005). Dokuların Triton X-100 ile muamele edilerek deselüerize edilmesi ile çok farklı sonuçlar elde edilmektedir. Kalp kapakçığının 24 saat Triton X-100 ile deselüerize edilmesi ile kapakçık yapısının korunabildiği ve tüm hücre membranlarının uzaklaştırılabildiği, komşu miyokardiyum ve aortik duvarda ise hücre materyallerine rastlanabildiği bir diğer çalışma ile bildirilmiştir (Grauss vd., 2005). Farklı grupların çalışmalarında ise dört saatin üzerindeki Triton X-100 muamelesi ile kan damarları, tendon ve ligamentlerde hücre kalıntılarının tamamen dokudan uzaklaştırılamadığı gösterilmiştir. Tüm dokularda histolojik boyama sonucunda hücre membranlarına rastlanmış ve ön çapraz bağlarında yapılan immunohistolojik boyama sonucunda bir hücre iskeleti proteini olan vimentine rastlandığı açıklanmıştır (Cartmell ve Dunn, 2000; Dahl vd., 2003; Woods ve Gratzer 2005).

3.2.3. İyonik deterjanlar

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

SDS, dokudan hücresel elemanların uzaklaştırılmasında çok etkili bir yöntemdir. SDS’ı diğer deterjanlardan ayıran özellik, sitoplazmik proteinlerden vimentin dahil tüm hücre kalıntılarının tamamen ortadan kaldırılmasını sağlamasıdır (Woods ve Gratzer, 2005). SDS, ECM’in doğal doku yapısını bozarak glikozaminoglikan konsantrasyonunda azalmaya ve

kollajen birlikteliğinin bozulmasına neden olmaktadır. Ancak SDS ile dokudan kollajen uzaklaştırılması gerçekleşmemektedir (Faulk vd., 2014).

Sodyum deoksikolat da aynı şekilde hücre kalıntıları uzaklaştırmada çok etkili bir yöntem olmasıyla birlikte doku yapısına SDS'e göre çok daha fazla zarar vermektedir. Bu yöntemin tek başına kullanıldığı herhangi bir rapor bulunmadığından, dokudan elde edilen ECM'de sodyum deoksikolatın etkisinin ne kadar olduğu bilinmemektedir. Sodyum deoksikolat sinir dokusu deselüerizasyonunda çok sayıda zwitteriyonik deterjan ile kombin bir şekilde kullanıldığı, kompleks deselüerizasyonun bu kombinasyona Triton X-100'ün de eklenmesi ile başarıldığı açıklanmıştır (Hudson vd., 2004).

3.2.4. Zwitteriyonik deterjanlar

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

3.2.5. Tribütil fosfat (TBF)

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

3.2.6. Hipotonik ve hipertonic solüsyonlar

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

3.2.7. Şelatlayıcı deterjanlar

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikol bistetraasetik asit (EGTA) gibi şelatlayıcı ajanlar halka şeklinde kompleks bir moleküler yapıya sahip olup merkezi metal iyonlara kararlı bir şekilde bağlanarak bu iyonların izole edilebilmesini sağlamaktadırlar. Hücre-ECM adezyonunda görevli çift değerlikli kationların (Örneğin; Ca⁺² ve Mg⁺²) bağlanmasıyla, bu ajanlar dokudan hücrel materyallerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. EDTA genellikle tripsin kombinasyonu ile kullanılan bir yöntem olarak bildirilmiştir (Khorramirouz vd., 2014).

3.2.8. Alkoller ve diğer ajanlar

İzopropanol, aseton, etanol, metanol ve gliserol gibi ajanlar hücrelerde dehidrasyon ve liziz 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 ECM yapısında hasara yol açmasıdır (Cole, 1984; Gorschewsky vd., 2005).

Aseton özellikle lipidlerin ECM yapısından uzaklaştırılmasında kullanılabilir ancak alkollere benzer şekilde dokunun protein yapısında bozulmaya sebep olabilir (Gilbert vd., 2006).

3.3. Biyolojik Yöntemler

3.3.1. Enzimler

Nükleaz, tripsin, kollajenaz, lipaz, dispaz, termolizin ve α -galaktozidaz Hücresizleştirme işleminde kullanılan enzimlerdir. Özellikle hücre artıklarının ve istenmeyen ECM yapı elemanlarının 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 lizizi sonrasında ortaya çıkan DNA ve RNA nükleik asitlerinin ve nükleotidlerinin parçalanmasını sağlar (Elder vd., 2010; Funamoto vd., 2010; Peterson vd., 2010; Yang vd., 2010). Benzonaz gibi endonükleazlar ve kısıtlaması olmayan (non-restriction) endonükleazlar ekzonükleazlara göre DNA parçalanmasında çok daha etkilidir (Cole, 1984; Peterson vd., 2010).

Serin proteaz olan Tripsin, enzimatik hücresizleştirmede sıkça kullanılan enzimdir. Tripsin ile yapılan hücresizleştirmede ECM yapısında bulunan GAG'ların korunmasına rağmen kollajen ve elastinin tripsine dirençlerinin az olması, tripsinin dikkatli kullanılmasını gerektirir (Yang vd.,2010; Crapo vd., 2011). Diğer bir dezavantajı ise etki süresinin uzun olmasıdır. Özellikle kalın dokularda bu süre çok daha fazla artar. Ancak bu şekilde kalın dokuların hücresizleştirilmesinde, diğer ajanların daha derine penetre olabilmeleri için tripsin kullanımı kaçınılmaz olabilir (Xu vd., 2014).

Kollajenazlar, özellikle kollajenin gerekli olmadığı ECM olan dokuların hücresizleştirilmesinde kullanılabilir. Lipazlar ise lipidlerin uzaklaştırılmasında etkilidir ancak tüm lipidlerin uzaklaştırılmasında yalnız başına yetersizdir (Flynn, 2010; Brown vd., 2011). Ksenojenik dokuların hücre yüzeylerinde bulunan immunojenik hücre yüzey antijeni olan galaktoz- α -(1,3)-galaktoz (Gal epitop) uzaklaştırılması için α -galaktozidaz kullanılabilir (Xu vd., 2008).

3.3.2. Non-enzimatik ajanlar

Şelasyon yapıcı ajanlar olan etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetra asetik asit (EGTA) metal iyonlarını uzaklaştırarak hücrelerin ECM proteinlerinden uzaklaştırılmasında kullanılır (Klebe, 1974; Gailit, 1988). 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 yöntemlerde tripsin ya da deterjanlar ile kombine halde kullanılmalıdır (Sasaki vd., 2009; Funamoto vd., 2010; Gui vd., 2010; Reing vd., 2010; Crapo vd., 2011; Xu vd., 2014).

Fenilmetilsülfonil florid (PMSF), aprotonin ve löpeptin gibi serin proteaz inhibitörleri ECM’de oluşması muhtemel istenmeyen zararları engeller (Gorschewsky vd., 2005; Gilbert vd., 2008; Alhamdani vd., 2010; Gui vd., 2010; Reing vd., 2010). Aksi takdirde hücre ölümü sırasında hücre içerisinde ki proteazlar salınabilir.

Penisilin, streptomisin, amfoterisin B ve sodyum asid gibi antibiyotikler ve antimikotikler Hüresizleştirme süresince mikrobiyal kontaminasyonu engellemek için kullanılır fakat biyolojik iskelelerde tekrar hücrelendirme sırasında potansiyel bir engel oluşturabilir (Crapo vd., 2011).

3.4. Proteaz inhibitörleri

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

3.5. Antibiyotikler

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

3.6. Deselüerizasyon Sonucu Artık Kimyasalların Uzaklaştırılması

Yukarıda açıklanan deselüerizasyon yöntemleri, hücrelere zarar verme yetenekleri nedeniyle kullanılan çok çeşitli kimyasalları içerir. Eğer kimyasallar, muamele sonrasında yüksek konsantrasyonlarda dokuda kalırsa, iskele in vivo yerleştirildiğinde konak hücreleri için toksik olacağı muhtemeldir. Deselüerize edilmiş iskelet materyalinde kalıntı kimyasalların varlığını ölçmek için analizlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Benzer şekilde, yukarıda tarif edilen bazı işlemler sığır kaynaklarından (yani, DNaz, RNaz, tripsin) türetilmiş enzimleri de içerir (Gilbert vd., 2006).

4. DESELÜERİZASYON YÖNTEMLERİNİN DOKULARDA KULLANIMI

Her doku türü spesifik bir yapıya ve farklı bileşime sahiptir, bu nedenle her doku türü için yalnızca bir standart protokolün kullanılması mümkün değildir. Uygulanacak deselüerizasyon yönteminin seçimi, işlem görece doku türüne ve doku kompozisyonuna bağlıdır (Hrebikova vd., 2015). Tablo 2’de bazı doku ve organlara uygun deselüerizasyon yöntemleri verilmiştir.

Tablo 2. Bazı Doku ve Organlara Göre Deselüerizasyon Yöntemleri

DOKU VE ORGAN TÜRÜ	DESELÜERİZASYON YÖNTEMİ
İnce tabakalı dokular (perikard)	1) Dondurmak 2) Ozmotik Solüsyonlar 3) Enzim 4) Kimyasal
Daha kalın tabakalı dokular (dermis)	1) Dondurmak 2) Enzim 3) Alkol 4) Kimyasal
Amorf dokular	1) Dondurmak 2) Mekanik Bozulma 3) Alkol 4) Enzimatik 5) Kimyasal
Organ deselüerizasyonu (Trake vb.)	1) Dondurmak 2) Ozmotik Solüsyonlar 3) Deterjan 4) Enzimatik 5) Ozmotik Çözeltiler
Organ deselüerizasyonu (karaciğer vb.)	1) Dondurmak 2) Ozmotik Solüsyonlar 3) Deterjan

5. SONUÇ

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta hücre dışı matris (ECM), deselüerizasyon işleminden türetilmiş bir biyolojik iskele olarak doku ve organlarda kullanılabilir. Deselüerizasyonun asıl amacı, ECM'nin yapısal ve fonksiyonel proteinler, glikozaminoglikanlar, büyüme faktörleri vb. yer alan üç boyutlu yapısının korunmasıdır. Deselüerizasyon sürecinin etkinliği, doku yoğunluğu ve organizasyonu, hücre giderme yöntemi, biyolojik bileşenler ve hedef klinik uygulamalar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Deselüerizasyon yöntemlerinde sadece tek tip yöntem kullanmak uygun olmayıp; fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kombinasyonu hücre çıkarımı ile ilgili daha iyi bir sonuç sağlamaktadır. Optimal deselüerizasyon yönteminin geliştirilmesi büyük çabalar gerektirir ve hala doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta çalışmalar devam etmektedir.

Teşekkürler: 4894-YL1-17 No’lu Proje ile çalışmamızı maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı’na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Affonso da Costa, F.D., Dohmen, P.M., Lopes, S.V., Lacerda, G., Pohl, F., Vilani, R., Affonso Da Costa, M.B., Vieira, E.D., Yoschi, S., Konertz, W., Affonso da Costa, I., 2004. Comparison of Cryopreserved Homografts and Decellularized Porcine Heterografts Implanted in sheep. *Artif Organs*, 28, 366–370.

Akbay, E., Onur, M.A., 2016. Rejeneratif Tıpta Kullanılan Organ ve Doku Deselüerizasyon Yöntemleri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 1(2), 96-102.

Alhamdani, M.S.S., Schroder, C., Werner, J., Giese, N., Bauer, A., Hoheisel, J.D., 2010. 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*, 9, 963–971.

Bader, A., Schilling, T., Teebken, O.E., Brandes, G., Herden, T., Steinhoff, G., Haverich, A., 1998. Tissue Engineering of Heart Valves—Human Endothelial Cell Seeding of Detergent Acellularized Porcine Valves. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 14, 279–284.

Badylak, S.F., Tullius, R., Kokini, K., Shelbourne, K.D., Klootwyk, T., Voytik, S.L., Kraine, M.R., Simmons, C., 1995. The Use of Xenogeneic Small Intestinal Submucosa as a Biomaterial for Achilles Tendon Repair in a Dog Model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 977–985.

Bayram, C., 2012. Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu. *Nanoteknoloji ve Nanotıp Bilim Dergisi (N@nobülten)*, 18-27.

Brown, B.N., Freund, J.M., Han, L., Rubin, J.P., Reing, J.E., Jeffries, E.M., Wolf, M.T., Tottey, S., Barnes, C.A., Ratner, B.D., Badylak, S.F., 2011. Comparison of Three Methods for the Derivation of a Biologic Scaffold Composed of Adipose Tissue Extracellular Matrix. *Tissue Engineering Part C Methods*, 17(4), 411-421.

Brown, B., Lindberg, K., Reing, J., Stolz, D.B., Badylak, S.F., 2006. The Basement Membrane Component of Biologic Scaffolds Derived From Extracellular Matrix. *Tissue Engineering*, 12, 519-526.

Cartmell, J.S., Dunn, M.G., 2000. Effect of Chemical Treatments on Tendon Cellularity and Mechanical Properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49, 134–140.

Chen, F., Yoo, J.J., Atala, A., 1999. Acellular Collagen Matrix as a Possible “off the shelf” Biomaterial for Urethral Repair. *Urology*, 54, 407–410.

Chen, R.N., Ho, H.O., Tsai, Y.T., Sheu, M.T., 2004. Process Development of an Acellular Dermal Matrix (ADM) for Biomedical Applications. *Biomaterials*, 25, 2679–2686.

Chen, V.J., Ma, P.X., 2004. Nano-Fibrous Poly(L-Lactic Acid) Scaffolds With Interconnected Spherical Macropores. *Biomaterials*, 25, 2065-2073.

Cole, M.B.J., 1984. Alteration of Cartilage Matrix Morphology with Histological Processing. *Journal of Microscopy*, 133, 129–40.

Cortiella, J., Niles, J., Cantu, A., Brettler, A., Pham, A., Vargas, G., Winston, S., Wang, J., Walls, S., Nichols, J.E., 2010. Influence of Acellular Natural Lung Matrix on Murine Embryonic Stem Cell Differentiation and Tissue Formation. *Tissue Engineering Part A*, 16(8), 2565-2580.

Courtman, D.W., Pereira, C.A., Kashef, V., McComb, D., Lee, J.M., Wilson, G.J., 1994. Development of a Pericardial Acellular Matrix Biomaterial: Biochemical and Mechanical Effects of Cell Extraction. *Journal of Biomedical Materials Research*, 28, 655–666.

Crapo, P.M., Gilbert, T.W., Badylak, S.F., Badylak, D.V.M., 2011. An Overview of Tissue and Whole Organ Decellularization Processes. *Biomaterials*, 32, 3233–3243.

Çeviker, K., Özseven, Ö.S., Şeker, G.C., Rahim, M., Kılıçarslan, Ş., Yazkan, R., 2017. Biyolojik Damarsal Greft Üretiminde Hücreleştirme Metodları; Güncel Literatür Derlemesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 24(1), 12-23.

Dahl, S.L., Koh, J., Prabhakar, V., Niklason, L.E., 2003. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*, 12, 659–666.

De Filippo, R.E., Yoo, J.J., Atala, A., 2002. Urethral Replacement Using Cell Seeded Tubularized Collagen Matrices. *The Journal of Urology*, 168, 1789–1792

Elder, B.D., Kim, D.H., Athanasiou, K.A., 2010. Developing an Articular Cartilage Decellularization Process Toward Facet Joint Cartilage Replacement. *Neurosurgery*, 66, 722–727.

Falke, G., Yoo, J.J., Kwon, T.G., Moreland, R., Atala, A., 2003. Formation of Corporal Tissue Architecture In Vivo Using Human Cavernosal Muscle and Endothelial Cells Seeded on Collagen Matrices. *Tissue Engineering*, 9, 871–879.

Faulk, D.M., Carruthers, C.A., Warner, H.J., Kramer, C.R., Reing, J.E., Zhang, L., D'Amore, A., Badylak, S.F., 2014. The Effect of Detergents on the Basement Membrane Complex of a Biologic Scaffold Biomaterial. *Acta Biomaterial*, 10, 1-21.

Fermor, H.L., Russell, S.L., Williams, S., Fisher, J., Ingham, E., 2015. Development and Characterisation of a Desellularised Bovine Osteochondral Biomaterial for Cartilage Repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26, 186.

Flynn, L.E., 2010. The Use of Decellularized Adipose Tissue to Provide an Inductive Microenvironment for the Adipogenic Differentiation of Human Adiposederived Stem Cells. *Biomaterials*, 31, 4715–4724.

Freytes, D.O., Badylak, S.F., Webster, T.J., Geddes, L.A., Rundell, A.E., 2004. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 25, 2353–2361.

Fu, R.H., Wang, Y.C., Liu, S.P., Shih, T.R., Lin, H.L., Chen, Y.M., Sung, J.H., Lu, C.H., Wei, J.R., Wang, Z.W., Huang, S.J., Tsai, C.H., Shyu, W.C., Lin, S.Z., 2014. Decellularization and Recellularization Technologies in tissue Engineering. *Cell Transplantation*, 23, 621–630.

Funamoto, S., Nam, K., Kimura, T., Murakoshi, A., Hashimoto, Y., Niwaya, K., Kitamura, S., Fujisato, T., Kishida, A., 2010. The Use of High-Hydrostatic Pressure Treatment to Decellularize Blood Vessels. *Biomaterials*, 31(13), 3590-3595.

Gailit, J., Ruoslahti, E., 1988. Regulation of the Fibronectin Receptor Affinity by Divalent Cations. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 12927–12932.

Gamba, P.G., Conconi, M.T., Lo Piccolo, R., Zara, G., Spinazzi, R., Parnigotto, P.P., 2002. Experimental Abdominal Wall Defect Repaired with Acellular Matrix. *Pediatric Surgery International*, 18, 327–331.

Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., Badylak, S.F., 2006. Decellularization of Tissue and Organs. *Elsevier Biomaterials*, 27, 3675-3683.

Gilbert, T.W., Wognum, S., Joyce, E.M., Freytes, D.O., Sacks, M.S., Badylak, S.F., 2008. Collagen Fiber Alignment and Biaxial Mechanical Behavior of Porcine Urinary Bladder Derived Extracellular Matrix. *Biomaterials*, 29, 4775–4782.

Goissis, G., Suzigan, S., Parreira, D.R., Maniglia, J.V., Braile, D.M., Raymundo, S., 2000. Preparation and Characterization of Collagen–Elastin Matrices From Blood Vessels Intended as Small Diameter Vascular Grafts. *Artif Organs*, 24, 217–223.

Gorschewsky, O., Klakow, A., Riechert, K., Pitzl, M., Becker, R., 2005. Clinical Comparison of the Tutoplast Allograft And Autologous Patellar Tendon (Bonepatellar Tendon-Bone) for the Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament: 2- and 6-Year Results. *The American Journal of Sports Medicine*, 33, 1202–1209.

Grauss, R.W., Hazekamp, M.G., Oppenhuizen, F., van Munsteren, C.J., Gittenberger-de Groot, A.C., DeRuiter, M.C., 2005. Histological Evaluation of Decellularised Porcine Aortic Valves: Matrix Changes Due to Different Decellularisation Methods. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 27, 566–571.

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, 2003–2010.

Gui, L., Chan, S., Breuer, C.K., Niklason, L.E., 2010. Novel Utilization of Serum in Tissue Decellularization. *Tissue Engineering Part C, Methods*, 16, 173–184.

Gulati, A.K., 1988. Evaluation of Acellular and Cellular Nerve Grafts in Repair of Rat Peripheral Nerve. *Journal of Neurosurgery*, 68, 117–123.

Hilbert, S.L., Yanagida, R., Souza, J., Wolfenbarger, L., Jones, A.L., Krueger, P., Stearns, G., Bert, A., Hopkins, R.A., 2004. Prototype Anionic Detergent Technique Used to Decellularize Allograft Valve Conduits Evaluated in the Right Ventricular Outflow Tract in Sheep. *The Journal of Heart Valve Disease*, 13, 831–840.

Hodde, J.P., Badylak, S.F., Brightman, A.O., Voytik-Harbin, S.L., 1996. Glycosaminoglycan Content of Small Intestinal Submucosa: A Bioscaf- Fold For Tissue Replacement. *Tissue Engineering*, 2, 209–217.

Hodde, J., Hiles, M., 2002. Virus Safety of a Porcine-Derived Medical Device: Evaluation of a Viral Inactivation Method. *Biotechnology and Bioengineering*, 79, 211–216.

Hodde, J., Record, R., Tullius, R., Badylak, S., 2002a. Fibronectin Peptides Mediate HMEC Adhesion to Porcine-Derived Extracellular Matrix. *Biomaterials*, 23, 1841–1848.

Hodde, J.P., Record, R.D., Tullius, R.S., Badylak, S.F., 2002b. Retention of Endothelial Cell Adherence to Porcine-Derived Extracellular Matrix After Disinfection and Sterilization. *Tissue Engineering*, 8, 225–234.

Hopkinson, A., Shanmuganathan, V.A., Gray, T., Yeung, A.M., Lowe, J., James, D.K., Dua, H.S., 2008. Optimization of Amniotic Membrane (AM) Denuding for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part C Methods*, 14(4), 371-381.

Hudson, T.W., Liu, S.Y., Schmidt, C.E., 2004. Engineering an Improved Acellular Nerve Graft Via Optimized Chemical Processing. *Tissue Engineering*, 10, 1346–1358.

Hudson, T.W., Zawko, S., Deister, C., Lundy, S., Hu, C.Y., Lee, K., Schmidt, C.E., 2004. Optimized Acellular Nerve Graft is Immunologically Tolerated and Supports Regeneration. *Tissue Engineering*, 10(11-12), 1641-1651.

Hrebikova, H., Diaz, D., Mokry, J., 2015. Chemical Decellularization: A Promising Approach For Preparation Of Extracellular Matrix. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 159(1):12-17

Jackson, D.W., Grood, E.S., Arnoczky, S.P., Butler, D.L., Simon, T.M., 1987. Cruciate Reconstruction Using Freeze Dried Anterior Cruciate Ligament Allograft and A Ligament Augmentation Device (LAD). An Experimental Study in a Goat Model. *The American Journal of Sports Medicine*, 15, 528–538.

Jackson, D.W., Windler, G.E., Simon, T.M., 1990. Intraarticular Reaction Associated with the Use of Freeze-Dried, Ethylene Oxide-Sterilized Bone–Patella Tendon–Bone Allografts in the Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament. *The American Journal of Sports Medicine*, 18, 1–10.

Jackson, D.W., Grood, E.S., Cohn, B.T., Arnoczky, S.P., Simon, T.M., Cummings, J.F., 1991. The Effects of in Situ Freezing on the Anterior Cruciate Ligament. An Experimental Study in Goats. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 73, 201–213.

James, G.T., 1978. Inactivation of the Protease Inhibitor Phenylmethylsulfonyl Fluoride in Buffers. *Anal Biochemistry*, 86, 574-579.

Ketchedjian, A., Jones, A.L., Krueger, P., Robinson, E., Crouch, K., Wolfenbarger, L. Jr, Hopkins, R., 2005. Recellularization of Decellularized Allograft Scaffolds in Ovine Great Vessel Reconstructions. *The Annals of Thoracic Surgery*, 79(3), 888-896.

Klebe, R.J., 1974. Isolation of a Collagen-Dependent Cell Attachment Factor. *Nature*, 250, 248–51.

Khorramirouz, R., Sabetkish, S., Akbarzadeh, A., Muhammadnejad, A., Heidari, R., Kajbafzadeh, A.M., 2014. Effect of Three Decellularisation Protocols on the Mechanical Behaviour and Structural Properties of Sheep Aortic Valve Conduits. *Advances in Medical Sciences*, 59, 299-307.

Lee, R.C., 2005. Cell Injury by Electric Forces. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066, 85–91.

Lin, P., Chan, W.C., Badylak, S.F., Bhatia, S.N., 2004. Assessing Porcine Liverderived Biomatrix For Hepatic Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 10, 1046–1053.

Mertsching, H., Walles, T., Hofmann, M., Schanz, J., Knapp W.H., 2005. Engineering Of A Vascularized Scaffold For Artificial Tissue And Organ Generation. *Biomaterials*, 26, 6610–6617

Petersen, T.H., Calle, E.A., Zhao, L., Lee, E.J., Gui, L., Raredon, M.B., Gavrilov, K., Yi, T., Zhuang, Z.W., Breuer, C., Herzog, E., Niklason, L.E., 2010. Tissue-Engineered Lungs for In Vivo Implantation. *Science (New York, NY)*, 329, 538–541.

Pruss, A., Kao, M., Kiesewetter, H., von Versen, R., Pauli, G., 1999. Virus Safety of Avital Bone Tissue Transplants: Evaluation of Sterilization Steps of Spongiosa Cuboids Using a Peracetic Acid–Methanol Mixture. *Biologicals*, 27, 195–201.

Reing, J.E., Brown, B.N., Daly, K.A., Freund, J.M., Gilbert, T.W., Hsiong, S.X., Huber, A., Kullas, K.E., Tottey, S., Wolf, M.T., Badylak, S.F., 2010. The Effects of Processing Methods Upon Mechanical and Biologic Properties of Porcine Dermal Extracellular Matrix Scaffolds. *Biomaterials*, 31(33), 8626-8633.

Rieder, E., Kasimir, M.T., Silberhumer, G., Seebacher, G., Wolner, E., Simon, P., Weigel, G., 2004. Decellularization Protocols of Porcine Heart Valves Differ Importantly in Efficiency of Cell Removal and Susceptibility of the Matrix to Recellularization With Human Vascular Cells. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127(2), 399-405.

Sasaki, M., Kleinman, H.K., Hubert, H., Deutzmann, R., Yamada, Y., 1988. Laminin, a Multidomain Protein. *The Journal Of Biological Chemistry*, 263(32), 16536-16544.

Schenke-Layland, K., Vasilevski, O., Opitz, F., Konig, K., Riemann, I., Halbhuber, K.J., Wahlers, T., Stock, U.A., 2003. Impact of Decellularization of Xenogeneic Tissue on Extracellular Matrix Integrity for Tissue Engineering of Heart Valves. *Journal of Structural Biology*, 143, 201–208.

Seddon, A.M., Curnow, P., Booth, P.J., 2004. Membrane Proteins, Lipids and Detergents: not Just a Soap Opera. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666, 105–117.

Şen, F., 2012. Matriks Metalloproteinaz-3 (MMP-3) ve Matriks Metalloproteinaz-9 (MMP-9) Gen Polimorfizminin Akut Miyokard İnfarktüsüne Olası Etkileri. Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 104 s., Mersin.

Teebken, O.E., Bader, A., Steinhoff, G., Haverich, A., 2000. Tissue Engineering of Vascular Grafts: Human Cell Seeding of Decellularised Porcine Matrix. *European Journal of Vascular Endovascular Surgery*, 19, 381–386.

Woods, T., Gratzner, P.F., 2005. Effectiveness of Three Extraction Techniques in the Development of a Decellularized Bone–Anterior Cruciate Ligament–Bone Graft. *Biomaterials*, 26, 7339–7349.

Wong, E.V., 2009. *Cells: Molecules and Mechanisms*. Axolotl Academic Publishing Company, 271 p., Louisville, Kentucky/USA.

Wilson, S.L., Sidney, L.E., Dunphy, S.E., Rose J.B., Hopkinson A., 2013. Keeping an Eye on Decellularized Corneas: A Review of Methods, Characterization and Applications. *Biomater*, 4, 114-161; doi:10.3390/jfb4030114

Xu, J., Mosher, D., 2011. Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins. *The Extracellular Matrix: an Overview, Biology of Extracellular Matrix*, Mecham, R. (Ed), 426, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Xu, H., Xu, B., Yang, Q., Li, X., Ma, X., Xia, Q., Zhang, Y., Zhang, C., Wu, Y., Zhang, Y., 2014. Comparison of Decellularization Protocols for Preparing a Decellularized Porcine Annulus Fibrosus Scaffold. *PloS One*, 9, 1–13.

Xu, H., Wan, H., Sandor, M., Qi, S., Ervin, F., Harper, J.R., Silverman, R.P., McQuillan, D.J., 2008. Host Response to Human Acellular Dermal Matrix Transplantation in a Primate Model of Abdominal Wall Repair. *Tissue Engineering Part A*, 14(12), 2009-2019.

Voytik-Harbin, S.L., Brightman, A.O., Kraine, M.R., Waisner, B., Badylak, S.F., 1997. Identification of Extractable Growth Factors From Small Intestinal Submucosa. *Journal of Cellular Biochemistry*, 67, 478–491.

Vyavahare, N., Hirsch, D., Lerner, E., Baskin, J.Z., Schoen, F.J., Bianco, R., Kruth, H.S., Zand, R., Levy, R.J., 1997. Prevention of Bioprosthetic Heart Valve Calcification by Ethanol Preincubation. Efficacy and Mechanisms. *Circulation*, 95, 479–488.

Yang, B., Zhang, Y., Zhou, L., Sun, Z., Zheng, J., Chen, Y., Dai, Y., 2010. Development of a Porcine Bladder Acellular Matrix with Well-Preserved Extracellular Bioactive Factors for Tissue Engineering. *Tissue Engineering: Part C*, 16, 1201-1211.

Yang, X., Yuan, M.L., Li, W., Zhang, G.Y., 2004. Synthesis and Properties of Collagen/Polylactic Acid Blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 94, 1670-1675

Yiğit, A., Yiğit, B., Koşar, Aslan, P., Savaş, H.B., Korkmaz, M., 2016. Doku Mühendisliğinde Deselülerizasyon Metotları ile Ekstraselüler Matriks (ECM) Eldesi ve Tıbbi Tedavide Uygulama Alanları. *Kimya ve Sanayi Dergisi*, 2(6), 29-43.

Yoo, J.J., Meng, J., Oberpenning, F., Atala A., 1998. Bladder Augmentation Using Allogenic Bladder Submucosa Seeded with Cells. *Urology*, 51, 221–225