

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON İLE TAKVİYE EDİLMİŞ
ENJEKTE EDİLEBİLİR YAĞ, KIKIRDAK VE DERMİS
MATRİKSLERİN REJENERATİF POTANSİYELLERİNİN
İMMÜN BASKILANMIŞ SIÇAN MODELİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Arş. Gör. Dr. Erkan Kerem KAYA

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Fuat USLUSOY

ISPARTA – 2021

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın oluşturulması ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini esirgemeyen, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Fuat USLUSOY'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa Asım AYDIN ve Dr. Öğr. Üyesi Selman Hakkı ALTUNTAŞ'a, asistanlığın zor süreçlerinde her daim yanımda ve ikinci bir ablam olan Dr. Öğr. Üyesi Dudu Dilek YAVUZ'a

Deselülerizasyon aşamalarındaki yardımlarından ötürü Doç. Dr. Aytül BAYRAKTAR'a,

Patolojik ve istatistik inceleme aşamalarındaki yardımlarından ötürü Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum ve gelecekte de birlikte çalışmaktan onur duyacağım asistan arkadaşlarım, Dr. Selçuk YILMAZ, Dr. Murat BİLGİN, Dr. Mustafa ÖZTÜRK, Dr. Muhammed ALHELOU, Dr. Burak ALAN, Dr. Oğuzhan KARAKOÇ, Dr. Muhammed Emin ALDATMAZ, Dr. Yusuf Kürşat BAĞ, Dr. Abidin HASANLI, Dr. Aydın ERDAL'a

Bugünlere gelmemde en büyük katkısı olan öğretilerini pratiğe geçirdiğim babam Muhittin Metin KAYA, biricik annem Aysel KAYA ve sevgili ablam Tuğba KAYA'ya

Sonsuz saygı ve sevgilerimi sunar, teşekkür ederim.

Erkan Kerem KAYA
Isparta - 2021

ÖZET

Stromal Vasküler Fraksiyon ile Takviye Edilmiş Enjektelerde Edilebilir Yağ, Kıkırdak ve Dermis Matrikslerin Rejeneratif Potansiyellerinin İmmün Baskılanmış Sıçan Modelinde Araştırılması

Giriş: İdeal dolgu materyali arayışı çalışmaları günümüzde devam etmektedir. Bu alanda ekstraselüler matriksin (ECM) deselülerizasyon ve reselülerizasyon uygulamaları biyomühendislik alanında dikkat çekmektedir. Deselülerize matrikslerin rezorpsiyon gibi istenmeyen ve öngörülemeyen dezavantajlarını SVF gibi anjiogenik ve büyüme faktörlerinden zengin olan bir hücresel tedavi ile desteklenebilir miyiz? SVF tedavisi laboratuvar koşullarında izole edilen, zaman gerektiren kök hücre izolasyon yöntemlerine cerrahi esnasında akut bir alternatif olabilir mi? Sorularının cevabı araştırıldı.

Materyal ve Metot: Deney için 3 farklı doku (yağ, kıkırdak, dermis) kullanıldı. Her doku ayrı ayrı deselülerize edildi. Ardından liyofilizasyon uygulanarak enjektelerde edilebilir toz forma dönüştürülüp muhafaza edildi. Her doku için farklı 2 grup oluşturuldu. Gruplardan birinde ECM'ler serum fizyolojik ile sulandırılırken diğer grupta ise stromal vasküler fraksiyon ile sulandırıldı. Hayvanlara 2 ay boyunca belirlenen dozda siklosporin ile immünsüpresyon uygulandı. Postoperatif 2. ayda hayvanlar sakrifiye edilerek histopatolojik bulgular değerlendirildi.

Bulgular: Yağ ECM SVF grubunun integrite ve kollajen remodeling sonuçlarında SF grubuna göre anlamlı düzeyde üstün olduğu izlendi. İnflamasyon bulgularında ise SVF grubu anlamlı olarak daha az inflame olarak saptandı. Her iki grup arasında vakuol/kist oluşumu bulguları arasında anlamlı fark bulunmadı. Kıkırdak grubunda SVF grubunun yeniden çekirdek oluşumu, kollajen remodeling ve neovaskülarizasyon sonuçlarında SF grubuna göre anlamlı düzeyde üstün olduğu izlendi. İnflamasyon bulgularında ise her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı. Dermis grubunda ise SVF grubunun fibroblast infiltrasyonu ve kollajen remodeling sonuçlarında SF grubuna göre anlamlı düzeyde üstün olduğu izlendi. İmmunohistokimyasal olarak ise her üç grupta SVF grubu neovaskülarizasyon açısından anlamlı düzeyde SF grubuna göre üstün izlendi.

Tartışma ve Sonuç: Herhangi bir avasküler organik materyal otolog olsa dahi beslenme yetersizliği sebebiyle yüksek oranda rezorbe olmakta ve viabilitesi azalmaktadır. Erken revaskülarizasyon ve erken kapiller ağ desteği ile bu avasküler dolgu materyallerinde rezorbsiyon oranını azaltmak mümkün olmaktadır. Bizim çalışmamızda da SVF grubunda daha iyi kollajen remodelingi olması ve absorpsiyon oranlarının daha düşük olmasını ADSC lerin sekrete etmiş olduğu anjiogenik faktörlere bağlamaktayız. Erken vaskülarizasyon, beslenmenin erken başlaması implante edilen materyalde rezorbsiyon oranlarını azaltmaktadır. Bu sebeple içerisinde ADSC ler ve parakrin faktörler içeren SVF kolay elde edilebilir özelliği ile deselülerize ekstraselüler matrikslerle eş zamanlı uygulanarak rejeneratif potansiyele pozitif katkı sağlayabilen bir kombinasyon olarak karşımıza çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ekstraselüler matriks, hücresizleştirme, stromal vasküler fraksiyon

SUMMARY

Investigation of the Regenerative Potentials of Injectable Fat, Cartilage and Dermis Matrixes Supplemented with Stromal Vascular Fraction in an Immune Suppressed Rat Model

Introduction: The search for the ideal filling material continues today. Decellularization and recellularization applications of the extracellular matrix (ECM) attract attention in the field of bioengineering. Can we support the undesirable disadvantages of decellularized matrices with a cellular therapy such as SVF that is angiogenic and rich in growth factors? Can SVF treatment be an acute alternative to stem cell isolation methods during surgery? The answers to the questions were searched.

Material and Method: Three different tissues (fat, cartilage, dermis) were used for the experiment. Each tissue was decellularized separately. Then converted into an injectable powder form by lyophilization and preserved. Two different groups were created for each tissue. ECMs were diluted with saline in one of the groups, while in the other group, they were diluted with the stromal vascular fraction. The animals were immunosuppressed with cyclosporine at the determined dose for 2 months. Two months later animals were sacrificed histopathological findings were evaluated.

Results: It was observed that the fat ECM SVF group was significantly superior to the SF group in integrity and collagen remodeling results. In the findings of inflammation, the SVF group was found to be significantly less inflamed. There was no significant difference in vacuole/cyst formation findings between the two groups. In the cartilage group, it was observed that the SVF group was significantly superior to the SF group in terms of renucleation, collagen remodeling and neovascularization results. In the dermis group, it was observed that the SVF group was significantly superior to the SF group in fibroblast infiltration and collagen remodeling results. In all three materials, the SVF group was significantly superior to the SF group in terms of neovascularization in staining with CD34.

Discussion and Conclusion: Any avascular organic material is highly resorbed due to nutritional deficiency and its viability decreases. With early revascularization and early capillary network support, it is possible to reduce the rate of resorption in these avascular filling materials. In our study, we attribute the better collagen remodeling and lower absorption rates in the SVF group because of the angiogenic factors secreted by ADSCs. SVF applied simultaneously with decellularized extracellular matrices contributed positively to the regenerative potential.

Key Words: Decellularization, extracellular matrix, stromal vascular fraction

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yumuşak Doku Dolgu Materyalleri	5
2.2. Yağ Grefti Uygulaması	7
2.3. ADSC (Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre) ve SVF (Stromal Vasküler Fraksiyon).....	8
2.4. Doku Mühendisliği.....	10
2.5. Hücre Dışı Matriks (Ekstraselüler Matriks; ECM)	11
2.6. Deselülerizasyon	12
2.7. Deselülerizasyon Yöntemleri	14
2.7.1. Fiziksel Yöntemler.....	15
2.7.2. Kimyasal Yöntemler	15
2.7.2.1. İyonik Deterjanlar	15
2.7.2.2. Noniyonik Deterjanlar	16
2.7.2.3. Asit ve Alkalın Uygulamaları	16
2.7.2.4. Hipotonik ve Hipertonik Solüsyonlar	17
2.7.2.5. Şelatlayıcı Deterjanlar	17
2.7.2.6. Alkoller ve Diğer Ajanlar	18
2.7.3. Enzimatik Yöntemler	18
2.8. Aselüler Dermal Matriks	20
2.9. Deselülerize Adipoz Matriks	21
2.10. Deselülerize Kartilaj Doku	22
2.11. Deselülerize Materyallerin Hücresel Tedaviler ile Kombine Edilmesi.....	22
3. MATERYAL ve METOT.....	26
3.1. Deselülerizasyon İşlemi	27

3.2. Adipoz Doku Deselüerizasyonu	27
3.3. Kıkırdak Doku Deselüerizasyonu	29
3.4. Dermis Deselüerizasyonu	30
3.5. Histopatolojik Analizler	36
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	62
SONUÇ	69
KAYNAKLAR	71



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Günümüzde kullanılan dolgu materyallerinin içerik ve markaları	8
Tablo 2. Klinikte aktif olarak kullanılmakta olan bazı ECM temelli ticari ürünler ..	13
Tablo 3. Deselülerizasyon yöntemleri ve sınıflandırılması.....	15
Tablo 4. Deney düzeninin şematize edilmiş hali.....	26
Tablo 5. Postoperatif 2. ayda herbir gruptan elde edilen örnek sayılarının dağılımı .	42
Tablo 6. Deselülerize yağ ECM SF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri.....	42
Tablo 7. Deselülerize yağ ECM SVF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri....	42
Tablo 8. Deselülerize kıkırdak ECM SF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri	43
Tablo 9. Deselülerize kıkırdak ECM SVF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri	43
Tablo 10. Deselülerize dermis ECM SF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri	44
Tablo 11. Deselülerize dermis ECM SVF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri	44
Tablo 12. Yağ ECM'nin gruplara göre histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçlarının istatistik analizi. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.	60
Tablo 13. Kıkırdak ECM'nin gruplara göre histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçların istatistik analizi. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.	60
Tablo 14. Dermis ECM'nin gruplara göre histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçların istatistik analizi. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.	61
Tablo 15. ECM ağırlıklarının istatistik analizleri. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.	61

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. ECM bileşenlerinin şematik görünümü.....	12
Resim 2. (a) Doğal Domuz Aort Kapağı (B) Deselülerize Hali	14
Resim 3. Önkol 3.Derece yanığı sonrası Alloderm ile rekonstrüksiyon ⁴⁹	14
Resim 4. A. Hastadan alınan taze yağ dokusu 4x2x1 cm boyutlarında.....	28
Resim 5. Deselülerizasyonun farklı aşamalarındaki yağ dokuların görünümü	29
Resim 6. Kıkırdak deselülerizasyon işleminin çeşitli aşamalarda görünümü	30
Resim 7. A. Abdominoplasti operasyonu sonrası üstte hastadan alınan taze tam kat deri görünümü, altta ise dezepitelize hali görülmekte	31
Resim 8. Dermis deselülerizasyon çalışmalarının çeşitli aşamalarındaki görünümü... ..	32
Resim 9. A. Deselülerize yağ ECM nin liyofilizasyon sonrası görünümü ve toz formu	32
Resim 10. SVF'nin 10 ve 20 cc enjektörlerde elde edilmiş görünümü. Mavi ok oil tabaka, kırmızı ok stromal vasküler fraksiyon.	33
Resim 11. A. Serum Fizyolojik ve stromal vasküler fraksiyon ile zenginleştirilmiş ECM'lerin insülün enjektöründe enjeksiyon öncesi görüntüleri	34
Resim 12. Kırmızı ok abseleşen örneğin dışardan görünümü, mavi ok yabancı cisim reaksiyonu göstermemiş örneğin 2 ay sonraki görünümü	41
Resim 13. A. Enjeksiyondan hemen sonraki görünüm	41
Resim 14. Pre-operatif örneklerin işaretlenmesi ve görünümü	45
Resim 15. A. Resim üst bölgesinde izlenen SF grubu materyali daha litik olarak gözlenmekte B. Resim alt tarafında görünen SVF grubu materyalinin daha homojen SF grubu ise kapsüler yapıda izlenmekte.....	46
Resim 16. Dorsum posteriora enjekte edilen SVF grubunun morfolojik olarak insan adipoz dokusuna benzerliği	46
Resim 17. Kıkırdak Matrikslerde kapsüler görünüm	47
Resim 18. Kıkırdak Matrikslerde homojen ve viabilitesi yüksek örneklerden görünüm	47
Resim 19. Kıkırdak Matrikslerin daha kapsüler olan görüntüleri	48
Resim 20. A ve B. SF grubundan örneklerin daha litik ve nekrotik görünüm C. SVF grubu örneğinin yakından görünümü.....	48
Resim 21. Dermis örneklerinin Görünümü	49
Resim 22. Yağ greftinin deselülerize olmuş mikroskobik görünümü	49
Resim 23. Kıkırdak ECM'nin deselülerize olmuş mikroskobik görünümü	50
Resim 24. Deselülerize olmuş dermis kesitlerinde kollajen liflerin (oklar) mikroskobik görünümü, (A) H&E ve (B) MTK, Barlar= 50µm.	50

Resim 25. Yağ ECM'nin mikroskopik görünümü.....	51
Resim 26. Yağ ECM'nin mikroskopik görünümlerinin büyük büyütmedeki görünümü.	51
Resim 27. Gruplara göre yağ ECM'nin kollajen miktarlarının görünümü.....	52
Resim 28. Gruplara göre yağ ECM'nin kollajen miktarlarının yakından görünümü	52
Resim 29. Gruplara göre yağ dokusunun CD34 immuno reaksiyonları.....	53
Resim 30. Gruplara göre yağ dokusunun CD34 immunoekspresyonlarının büyütülmüş görünümü.	53
Resim 31. Gruplara göre kıkırdak ECM görünümü.	54
Resim 32. Gruplara göre kıkırdak ECM yakından görünümü.....	54
Resim 33. Kıkırdak ECM gruplara göre görünümü.	55
Resim 34. Kıkırdak ECM büyütülmüş görünümü.....	55
Resim 35. Gruplara göre kıkırdak ECM CD34 immunoreaksiyonu.	56
Resim 36. Gruplara göre kıkırdak greftinde CD34 immunoreaksiyonunun büyütülmüş görüntüsü.....	56
Resim 37. Grupların histopatolojik görünümleri.....	57
Resim 38. Grupların histopatolojik görünümleri büyütülmüş görüntüleri	57
Resim 39. Gruplara göre kollajen miktarlarının görünümü.....	58
Resim 40. Gruplara göre kollajen miktarlarının büyütülmüş görünümü.....	58
Resim 41. Gruplarının CD34 immunohistokimya bulguları.	59
Resim 42. CD34 immunohistokimya bulguların büyük büyütmedeki görünümü.....	59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- ADM** :Aselüler Dermal Matriks
SF : Serum fizyolojik
FDA : U.S Food and Drug Administration
ADSC : Adipose Tissue derived Stem Cell (Yağ Dokusundan Gelişen Kök Hücre)
PRP : Platelet Rich Plasma(Plateletten Zengin Plazma)
SVF : Stromal Vascular Fraction (Stromal Vasküler Fraksiyon)
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor(Vasküler Endotelin BüyümeFaktörü)
TGF- β : Transforming Growth Factor Beta
FGF. : Fibroblast Growth Factor
PDGF : Platelet Derive Growth Factor
DAM : Deselülerize Adipoz Matriks
ECM : Ekstraselüler Matriks
MSC : Mezenkimal stem cell (Mezenkimal Kök Hücre)
MTK : Masson Trikrom
H&E : Hematoksilen Eozin
SDS : Sodyum Dodesil Sülfat
PAA : Perasetik Asit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plastik cerrahlar yaşlılığın etkilerini geri döndürmek amacı ile insizyon yapılmayan birçok metod uygulamaktadır. Bunlardan biride yumuşak doku dolgu materyalleridir. Çok sayıda bulunan dolgu materyallerinin her birinin kendine has kimyasal bileşeni, etki süreleri ve endikasyonları vardır.

Amerikan Plastik Cerrahi Derneği verilerine göre yumuşak doku dolgu materyalleri kullanımı 2000-2016 yılları arasında %298 oranında artmıştır. Aynı yıllar arasında uygulanan kozmetik cerrahi uygulamaları ise tersine %6 oranında azalma göstermiştir¹. İstatistik verilerinin gösterdiği üzere insanlar artık cerrahi gibi riskli ve radikal değişimler yerine minimal invaziv çözümleri tercih etmektedir.

Estetik cerrahide FDA tarafından onaylanmış yumuşak dolgu materyali olarak kullanılan hyaluronik asit, kollajen, kalsiyum hidroksiapatit ve poly-L-laktik asit içeren bir çok ürün bulunmaktadır. Bu dolgu materyallerinin inflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu, kısa sürede emilmeleri, sık enjeksiyon tekrarı gerektirmeleri, biyolojik doku özelliği göstermemeleri, pahalı olmaları gibi birçok dezavantajları vardır². Bu dezavantajların önüne geçmek amacı ile ideal bir dolgu materyali arayış çalışmaları hızla devam etmekte ve bu alanda biyomühendislik ve deselülerize matriks ürün çalışmaları dikkat çekmektedir.

Deselülerizasyon temel olarak bir doku veya organda mevcut olan hücre ve nükleer bileşenlerin başarıyla çıkarılması ve doğal 3 boyutlu bir hücre iskelesi elde etme yöntemidir. ECM'nin biyomekanik özelliklerinin, kollajen yapısının ve ECM yapısında mevcut olan büyüme faktörlerinin (VEGF, FGF, TGF beta) olabildiğince en üst seviyede korunması gerekmektedir³. Bu yöntemin geliştirilmesinde, günümüzde kullanılan doğal olmayan, sentetik dolgu ürünlerinin varlığı ve bu ürünlerin yetersizliği etkili olmuştur. Doğal olan, sentetik olmayan, doku uyumu yüksek ve biyoaktif mediatörler içeren bir iskele üretebilmek amacıyla doku mühendisleri bu alana yönelmiştir.

Günümüzde ince bağırsak submukozası, kalp kapağı, kıkırdak, deri, kemik, tendon, mesane duvarı, damar, kas, yağ gibi dokular başta olmak üzere birçok doku

tipi klinik öncesi doku mühendisliği çalışmalarında başarı ile kullanılmıştır. Bu başarılı çalışmalar ışığında geliştirilen bazı ürünler klinik kullanımda yerini almıştır⁴.

Doku mühendisliği geliştirilen hücre iskeleleri, kök hücreler ve hücre diferansiasyonuna yön veren sinyallerin kullanıldığı disiplinlerarası bir yaklaşımdır. Özel şartlar altında hücrelerin farklılaştırılarak çoğaltılması ve sonuç olarak biyolojik olarak aktif bir doku ya da organ oluşturulması amaçlanmaktadır⁵. Yeni doku veya organ oluşturulması aşamalarında ekstraselüler matriks ürünleri, kök hücreler ve diferensiasyon sağlayan mediatörlerin kombinasyonu sıkça uygulanmaktadır. Bu aşamalar kısaca donör dokunun deselülerizasyonu, reselülerizasyon ve hasarlı dokuda kullanımı olarak özetlenebilir.

Günümüzde abdominoplasti, liposuction, vücut şekillendirme gibi birçok operasyon sonrası çok fazla miktarda yağ ve deri dokusu atık olarak elde edilmektedir. Bu elde edilen fazla atık dokular yağ grefti uygulamaları ile ilgili çok fazla bilimsel araştırma yapılmasına olanak sağlamıştır. Bu araştırmalarla yağ grefti konsepti belli standartlara ulaşmış ayrıca yağ greftinin hücresel komponenti olan SVF üzerine de bilgi dağarcığı gittikçe genişlemiştir. Diğer yandan yağ dokunun hücresiz komponenti olan ekstraselüler matrikside son dönemde gittikçe artan şekilde ilgi odağı olmaktadır⁶. Deselülerizasyon uygulanan ekstraselüler matriksin tek başına veya hücre kültürü, SVF, yağ grefti ile zenginleştirilip uygulamalarını içeren biyomühendislik çalışmaları ile daha biyoaktif, uzun ömürlü ve stabil bir dolgu materyali arayışı sürmektedir.

Çalışmamızda insan abdominoplasti materyalinden elde edilen deri, yağ dokuları ile sığır diz ekleminden elde edilen hyalin kıkırdak dokularına deselülerizasyon işlemi uygulayarak elde edilen deselülerize ekstraselüler matriksleri liyofilize ederek uzun ömürlü saklanabilir toz forma dönüştürmektir. Elde edilen enjekte edilebilir deselülerize materyallerin rezorpsiyon ve nekrozdan dolayı oluşan handikaplarını gidermek için hem ucuz hem pratik ve vakit tasarrufu sağlayan mekanik yöntem ile elde edilen SVF ile zenginleştirme işlemi planlanladı.

Bu çalışmanın amacı olarak şu sorulara cevap aramaktayız; günümüz şartlarında kullanılan dolgu materyallerine alternatif olabilecek, dolgu materyallerinin eksik yönlerini giderebilecek, biyoaktif, ucuz maliyetli daha üstün bir dolgu materyali üretilebilir mi? Aynı zamanda dolgu materyali olarak kullanılan deselülerize

matrikslerin rezorpsiyon gibi istenmeyen ve öngörülemeyen dezavantajlarını SVF gibi anjiogenik ve büyüme faktörlerinden zengin olan bir hücresel tedavi ile desteklenebilir mi? SVF tedavisi laboratuvar koşullarında izole edilen, zaman gerektiren kök hücre izolasyon yöntemlerine cerrahi esnasında akut bir alternatif olabilir mi?



2. GENEL BİLGİLER

Güncel plastik cerrahi tedavi yaklaşımında yumuşak doku defektleri ve onarımı çok büyük bir yer tutmaktadır. Bu tedavi yöntemleri bir tarafta cilt, ciltaltı yağ doku, kas, kemik ve kıkırdak dokuların geniş defektlerini onarmakta kullanıldığı gibi diğer tarafta kozmetik bir yaklaşımla dudak volümünü arttırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Çok geniş bir hasta yelpazesine sahip olan plastik cerrahi bölümü bu farklı hasta gruplarına farklı tedavi yöntemleri ile yaklaşımı gerektirmektedir.

Olaya rekonstrüktif açıdan bakacak olursak konjenital defetkli hastalar, travma, tümör rezeksiyon sonrası, 3. derece yanık hastaları, hemifasiyal atrofi ve meme kanseri sonrası mastektomi uygulanan hastalar gibi geniş bir hasta grubuyla karşılaşmaktadır. Bu grup hastalarda rekonstrüktif merdiven izlenerek basitten karmaşığa doğru giden tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yaklaşım basit primer sütürasyon ile başlayıp, bir çok farklı dokunun avasküler greftleri (yağ, deri, kemik, kıkırdak), serbest flepler, kompozit doku nakilleri gibi kompleks tedavileri içermektedir. Bunun yanında protezler ve implantlarda kullanılan yöntemlerdendir.

Estetik tarafta ise gelişen sağlık hizmetleri sonucu toplumdaki sağlıklı yaşlı birey sayısı gittikçe artmaktadır. Daha sağlıklı ve uzun yaşam sürmeye başlayan bireyler yaşlanmanın gözle görülür belirtilerini azaltmak amacıyla plastik cerrahlara başvurumaktadırlar⁷. Yaşlanma süreci kompleks bir süreç olup 3 önemli komponente sahiptir. Bunlar yüzde volüm kaybı, fasiyal kasların hareketleri oluşan statik ve dinamik çizgiler ve yerçekimi etkisi ile oluşan laksisitedir⁸. Geleneksel olarak fasiyal rejuvenasyon cerrahi olarak cilt eksizyonu ve yüzeysel cilt yenileme üzerine odaklanmıştır. Fakat son yıllarda bu yaklaşım değişerek gerek hastaların istekleri gerekse donör saha morbiditesi yaratmamak amacıyla yerini gittikçe artan sayıdaki minimal invaziv işlemlere bırakmaktadır⁹.

Amerikan Plastik cerrahi Derneği verilerine göre yumuşak doku dolgu materyalleri kullanımını 2000-2016 yılları arasında %298 oranında artmıştır. Aynı yıllar arasında uygulanan kozmetik cerrahi uygulamaları ise tersine %6 oranında azalma göstermiştir¹.

2.1. Yumuşak Doku Dolgu Materyalleri

Plastik cerrahlar yaşlılığın etkilerini geri döndürmek amaçlı insizyon yapılmayan birçok method uygulamaktadır. Bunlardan biride yumuşak doku dolgu materyalleridir. Çok sayıda bulunan dolgu materyallerinin herbirinin kendine has kimyasal bileşeni, etki süreleri ve endikasyonları vardır.

İdeal dolgu materyalini bulma çalışmaları yaklaşık yüzyıl önce başladı. Yumuşak doku agumentasyonu 1893'te ilk Neuber tarafından fasiyal defektlere uygulanan otolog yağ tranferi ile tanımlandı¹⁰. Ardından 1940 lara gelindiğinde estetik amaçlı sıvı silikon kullanımı Almanya ve Japonya'da başladı. 1960 lı yıllara kadar Amerika dahil birçok ülkede başarılı bir şekilde kullanıldı. Başarılı kullanımlara rağmen artan sayıda bildirilen yan etkiler ve komplikasyonlar nedeniyle FDA tarafından kozmetik amaçlı kullanımlar için onaylanmadı¹¹.

1980 lere gelindiğinde ise yumuşak doku dolgu materyali olarak sığır kollajeni kullanımı yeni bir alan açtı. 1981 de Zyderm 1985 te ise Zyplast FDA onayı aldı. Zyderm %3,5 sığır dermal kollajeni içerirken Zyplast ise %3,5 glutaraldehit ile çapraz bağlanmış sığır dermal kollajeni içermektedir. Her iki materyalde sığır kollajeni içerdiği için alerjik reaksiyona karşı işlemden 1 ay öncesinde 2 hafta arayla 2 adet cilt testi uygulanması dezavantajına sahiptir. Bu teste rağmen %3 hastada hipersensitivite reaksiyonları gelişmektedir¹².

Sığır kollajeni sonrasında insan kadavralarından deselülerizasyon ile elde edilen allojenik kollajen üzerine yoğunlaşmıştır. Alloderm rekonstrüktif ve estetik cerrahide birçok endikasyonda kullanılan bir allojenik aselüler dermal matrikstir. Cymetra ise 2000 yılında FDA tarafından onaylanmış Alloderm'in mikronize formudur. Zyderm ve Zyplast'tan avantajı MHC 1 ve 2 ortadan kalktığı için herhangi bir immün yanıt oluşturmamakta ve işlem öncesi cilt testine ihtiyaç duyulmamaktadır.

2003 yılında ise Cosmoderm ve Cosmoplast FDA den onay almıştır. Bu iki materyalde insan dermal fibroblastlarının kültürde çoğaltılıp doğal kollajenin elde edilip saflaştırılmasından oluşmaktadır.

2000'li yılların başlarında allojenik ve zenojenik kollajenler yerlerini hyalüronik asit bazlı dolgu ürünlerine bıraktı.

1981'de Zyderm'in FDA den aldığı onay sonrası alloplastik ve implante edilebilir dolgu materyalleri üzerine gittikçe artan sayıda çalışma yapılmıştır. Hatta bu dönemde otolog yağ greftlerine de yeniden bir ilgi oluşmuştur¹³. Artan sayıda çalışmaya rağmen 2000 yılına kadar sığır kollajeni FDA tarafından onaylı tek dolgu materyaliydi. Bu durum taki 2003 yılında ilk hyaluronik asit dolgu (Restylane; Galderma) FDA tarafından onaylanana kadar devam etti. Bu onay sonrası minimal invaziv işlemler dramatik bir şekilde artış göstermiştir.

Hyaluronik asitin biyolojik ve immünolojik özelliklerinin anlaşılıp dermal dolgu olarak ilk kullanılması 1989 yılında Endre Balazs tarafından gerçekleştirildi. Bu dönemde orataya çıkan zorluk ise katabolizmasının çok hızlı olması 24 saatten kısa bir sürede ciltte etkisini kaybetmesi idi¹⁴.

Restylane ilk olarak 1996'da hayvansal kaynaklı olamayan streptokok türlerinden fermantasyon ile elde edilerek üretilmiştir. Fermete edilmiş materyal glikozaminoglikan zincirlerinin çapraz bağlanması ile daha stabilize bir forma dönüştürülmektedir. Bunun sonucu olarak ise hyaluronik asit immün veya alerjik reaksiyonlara nadiren yol açmaktadır¹⁵. Hyaluronik asit enjeksiyon öncesinde cilt testi gerektirmemesi, hipersensitivite reaksiyonlarının minimal izlenmesi, kalıcı olmaması ve 6-12 ay gibi bir süre boyunca kalıcılık sağlaması gibi avantajları vardır¹⁶.

Hyaluronik asitler dışında bahsedilebilecek bir başka grup dolgu materyalide alloplastik dolgu materyali grubudur. Dolgu materyallerinin kalıcılık süresini arttırmak amacıyla yapılan çalışmalarda geliştirilmiş ürünlerdir. Bu amaçla rezorbe olabilen veya rezorbe olamayan sentetik bazlı maddeler kullanılmaktadır.

Radiesse sentetik kalsiyum hidroksiapatit kristallerinin akışkan bir jel ile karıştırılması ile elde edilmiş bir üründür. Kalsiyum hidroksi apatit düşük çözünme süresi ve yüksek dansitesi nedeniyle ortalama 2 yıl kalıcılık sağlamaktadır.

Sculptra ise bir başka alloplastik materyaldir. Biyoçözünür sentetik bir polimer olan poly-L-Lactic asitten oluşmaktadır. Poly-L-lactic acid günümüzde birçok eriyebilen sütür materyalinde kullanılmaktadır.2004 yılında HIV'e bağlı yüz bölgesindeki lipoatrofilerde kullanılmak amacıyla FDA tarafından onaylanmıştır.

Artecoll ise polimetilmetakrilat ve sığır kollajeni içeren kalıcı bir dolgu materyalidir.

Yukarıda Bahsedildiği gibi estetik cerrahide FDA tarafından onaylanmış yumuşak dolgu materyali olarak kullanılan hyaluronik asit, kollajen, kalsiyum hidroksiapatit ve poly-L-laktik asit içeren birçok ürün bulunmaktadır. Bu ürünlerin birçoğu yüz bölgesinde oluşan cilt çöküntüleri ve katlantıları düzeltmek amaçlı 1-2 ml civarında kullanılmaktadır. Bu ürünleri pahalılıkları nedeniyle yüksek volümlerde defekt içeren meme rekonstrüksiyonu gibi durumlarda kullanmak mantıklı gözükmemektedir. Zira 1 ml hyaluronik asitin ortalama uygulama fiyatı 350-700€ civarındadır. Bu üründen meme rekonstrüksiyonu amaçlı 350 ml kullanılma durumunda 245000€ kadar ulaşan çok yüksek maliyetler ortaya çıkmaktadır¹⁷. Bu dolgu materyallerinin inflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu, kısa sürede emilmeleri, sık enjeksiyon tekrarı gerektirmeleri, biyolojik doku özelliği göstermemeleri, pahalı olmaları gibi birçok dezavantajları vardır².

2.2. Yağ Grefti Uygulaması

1893'te ilk Neuber tarafından fasiyal defektlere uygulanan otolog yağ tranferi ile başlayan otolog yağ greft uygulaması uzun yıllar kullanılmasına karşın yöntemin standardize olmaması ve yüksek rezorbsiyon nedeniyle gereken öneme sahip olamamıştır. Bu durum 1980'lerde liposuction yönteminin bulunması ile boyut değiştirmiştir. 1980 'lerin sonunda ise ilk olarak uzun dönem sonuçlarda Abel Chajchir tarafından başarı sağlanmıştır¹⁸. 1990'lara gelindiğinde ise Sydney Coleman tarafından yöntem sistematikleştirilmiştir. Düşük negatif basınçla aspirasyon, santrifüj ile saflaştırma, düşük basınçla ve tüneller oluşturacak şekilde enjeksiyon uygulanarak başarılı sonuçlar alındı.¹⁹ Bu tünellere düşük basınç altında sınırlı miktarda enjeksiyonlarla yağ greftlerinin sağkalım oranı artmaktave fibrozis, kist, kalsifikasyon gibi istenmeyen iskemi sonuçları azalmaktadır. 2000li yıllara gelindiğinde Coleman öncülüğündeki yağ grefti uygulamaları sonucu artan oranda başarılı sonuçlar işlemi tekrar popülerize etmiştir. Günümüzde yağ grefti uygulamaları düşük maliyeti, kolay elde edilebilmesi, biyolojik olması, yan etklerinin az olması sebebiyle sentetik dolgulara tercih edilmektedir²⁰. Bu başarılı uygulama ve sonuçlara rağmen otolog yağ grefti uygulamasında en büyük problemlerden biri öngörülemeyen greft rezorbsiyon ve nekroz oranlarıdır. Rezorbsiyon 4-6 ay arasında gerçekleşmektedir²¹. %90'a varan rezorbsiyon oranı bildiren deneysel çalışmalar bulunmaktadır²²²³²⁴. Klinik

çalışmalarda ise bu oran %40-60 arasındadır²⁵. Bu tahmin edilemeyen rezorbsiyon ve nekroz oranları yetersiz doku agumentasyonuna ve sonuç olarakta ikincil cerrahi girişimlere sebebiyet vermektedir. Günümüzde sık olarak kullanılan dolgu materyallerinin içerik ve markalarının tablolaştırılmış hali aşağıda görülmektedir.

Tablo 1. Günümüzde kullanılan dolgu materyallerinin içerik ve markaları

Dolgu Tipi	Ürün İsmi	Etki Süresi	FDA Onay Durumu
Otolog Dolgu Materyalleri	Yağ Grefti	Aylar ve yıllar arası değişken	FDA onayı yok
Sığır Kollajeni	Zyderm	2-4 ay	FDA Onaylı
	Zyplast(%3.5 çapraz bağlı)	2-6 ay	FDA Onaylı
Kadavra Kaynaklı Kollajen	Alloderm	6-12 ay	FDA Onaylı
	Cymetra(Alloderm'in mikronize enjektabil formu)	3-6 ay	FDA Onaylı
Hücre Kültürü ile Üretilen Kollajen	Cosmoderm	3-4 ay	FDA Onaylı
	Cosmoplast (35mg/ml çapraz bağlı)	3-4 ay	FDA Onaylı
Hyaluronik Asitler	Restylane	6-12 ay	FDA Onaylı
	Perlane	6-12 ay	FDA Onaylı
	Captique	3-6 ay	FDA Onaylı
	juvederm	3-6 ay	FDA Onaylı
Sentetik Dolgular	Sculptra(Poly-L-Laktik asit)	1-2 yıl	Lipoatrofide FDA Onaylı FDA Onaylı
	Radiesse(Kalsiyum Hidroksi Apatit) Artecoll(Polimetilmetakrilat)	1-2 yıl	FDA Ön onaylı
	Sıvı Silikon	%50 rezorbsiyon sonrası kalıcı	FDA Onayı Yok

2.3. ADSC (Adipoz Doku Kaynaklı Kök Hücre) ve SVF (Stromal Vasküler Fraksiyon)

Milenyum başlangıcında Pittsburg Üniversitesi'nden bir grup araştırmacı önemli bir buluşa imza attı. Adipoz dokunun vücuttaki en büyük mezenkimal kök hücre kaynağı olduğu ve bu kök hücrelerin mezenkimal kökenli adiposit, kondrosit, osteoblast ve myoblast gibi hücrelere diferansiye olabildiği gösterildi. Bu kök hücrelere adipoz doku kaynaklı kök hücre (ADSC) adı verildi^{26,27}. Bu keşif sonrası ADSC'lerin parakrin etkileri, rejeneratif potansiyelleri ve multipotent özellikleri geniş bir şekilde araştırılmıştır²⁶. Bu gelişme sonrasında yağ doku plastik cerrahinin ilgi alanından öte rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi birçok alanın ilgi odağı olmuştur. Aynı zamanda yağ doku kemik iliğine alternatif bir kök hücre kaynağı olarak dikkat çekmiştir. Kemik iliği kayıtlara geçen ilk mezenkimal kök hücre (MSC) kaynağıdır. Fakat klinik olarak fazla invaziv bir prosedür olması, artan yaş ile

diferensiasyon potansiyelinin azalması gibi handikapları vardır²⁸. Adipoz doku kaynaklı kök hücreler kemik iliğine kıyasla hem daha invaziv olmayan bir şekilde elde edilmesi hem de daha yüksek miktarlarda hücre izolasyonu sağlaması ile üstün gözükmetedir²⁷. Yapılan çalışmalarda yağ dokudan kemik iliğine oranla daha yüksek miktarda kök hücre elde edildiği izlenmiştir. Elde edilen kök hücrelerin diferensiasyon ve kültür ortamında çoğalma potansiyellerinin ise eşit olduğu gözlemlenmiştir²⁸.

Zuk ve arkadaşlarının çalışmaları sonrasında ADSC ve SVF tedavileri ve kullanımları hız kazanmıştır. Rejeneratif özelliklerin sadece ADSC'lere ait olmadığı ADSC'lerin izole edildiği stromal vasküler fraksiyon (SVF) adı verilen karışık hücre grubunun da bu özelliklere sahip olduğu anlaşılmıştır.

Lipoaspirattan enzimatik ya da mekanik yolla elde edilen SVF mezenkimal kök hücreler, endotelial progenitor hücreler, preadipositler, düz kas hücreleri, perisitler, T regülatuar hücreler, antiinflamatuvar M2 makrofajlar ve stromal komponentler içeren bir rejeneratif karışımdır²⁹. SVF enzimatik ya da mekanik yolla elde edilirken manuel veya otomatize kapalı sistemler ile elde edilebilir. En sık kullanılan yöntem lipoaspiratı yıkama, kollajenaz enzimi ile muamele ve sonrasında santrifüj ile svf eldesidir. Enzimatik yöntem zenojenik enzim kullanımı sebebiyle enfeksiyona ve immün reaksiyona yol açma riski içermektedir³⁰. Mekanik yöntemde ise alınan lipoaspiratın çeşitli yöntemlerle parçalanması sonrasında santrifüjleme ile SVF izole edilmektedir.

Mekanik yol kısa sürede elde edilmesi, ekonomik olması, operasyon süresini uzatmaması gibi avantajlara sahiptir^{31,32}. Enzimatik yöntemin daha çok SVF hücresi izole ettiği bilinsede mekanik yöntemlede benzer popülasyonda yüksek hücre viabilitesine ve pluripotentense sahip SVF hücresi elde edilebilmektedir³³. Domenis ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ticari olarak ulaşılabilir mekanik ve enzimatik SVF izole etme preparatları karşılaştırılmış. Elde edilen SVF yağ grefti ile meme rekonstrüksiyonu uygulanan hastalarda kullanılmıştır. Mekanik yöntemin daha az oranda CD45, CD31 ve CD34 hücreler içerdiği tespit edilmiş. Bu durumdan mekanik yöntemin adipojenik, myojenik ve vaskülojenik diferansiasyonunun daha düşük olduğu anlaşılmıştır. 1 yıl sonunda hem enzimatik hem mekanik yöntemde sade lipoenjeksiyon yapılan gruba göre anlamlı volüm devamlılığı sağlandığı gözlenmiş. Meme ciltaltı kalınlığında ise enzimatik ve mekanik yöntemler arasında anlamlı fark

saptanmamıştır³⁴. Burdan yola çıkarak çalışmamızda hem ucuz hem pratik ve vakit tasarrufu sağlayan mekanik yöntem ile SVF eldesi kullanıldı.

Günümüzde ADSC ve SVF tedavileri multiple skleroz, Crohn hastalığı, periferik nöropati, osteoartrit, diabetik ayak, sinir iyileşmesi, iskemik kalp hastalıkları, yara iyileşmesi gibi birçok farklı alanda deneysel ve klinik olarak incelenmektedir^{29,35,36}.

Otolog yağ greftinin rezorbsiyon ve nekrozdan dolayı oluşan handikapını gidermek için araştırmacılar yağ greftini çeşitli kök hücreler ile zenginleştirip greft tutulum oranını yükseltmeyi amaçlamışlardır. Bu platformda ADSC ile zenginleştirme, SVF ile zenginleştirme gibi teknikler uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır. 2006 yılında ilk olarak Matsumoto hücre ile zenginleştirilmiş lipotransfer konseptini fare modelinde ortaya koymuştur³⁷. Bu çalışmada SVF ile zenginleştirilmiş yağ grefti grubunun %35 daha fazla yağ grefti sağkalımı sağladığı ve daha fazla mikrovaskülariteye sahip olduğu izlenmiştir³⁷. ADSC ve SVF ile zenginleştirilmiş yağ grefti uygulamasının izole yağ grefti uygulamasına göre daha yüksek greft sağkalımı sağladığı sonrasında da birçok çalışma ile gösterilmiştir³⁸⁻⁴⁰.

6 kişilik küçük bir hasta grubunun incelendiği klinik çalışmada ise Charles-de-Sa SVF ve ADSC ile zenginleştirilmiş yağ Greftlerini aynı hastanın sağ ve sol preaurikuler bölgelerine enjekte etmiştir. Histolojik ve klinik olarak iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Hem SVF grubunda hem de ADSC grubunda yaşlanma bulgularının geri döndüğü, yeni elastik lif oluşumu izlendiği, vaskülaritenin arttığı ve kollajen remodelingi olduğu histolojik olarak gözlenmiştir. Klinik olarak ise her iki grupta da hasta ciltlerinin daha hidrate olduğu izlenmiştir. Yazar bu durumun kozmetik cerrahi açısından umut vaad eden bir gelişme olduğunu vurgulamıştır⁴¹. Zira SVF eldesi ADSC eldesine göre çok daha ucuz, kolay, hızlı ve basit olarak gerçekleştirilmektedir

2.4. Doku Mühendisliği

Günümüzde doku ya da organ nakilleri birçok yöntem kullanılarak tedavi edilmektedir. Bu tedavi sırasında karşılaşılan en büyük problem ise donör sayılarının yetersiz olması, donör saha morbiditeleri, immün cevap oluşumu, doku reddi gelişmesi

gibi problemler gösterilebilir. Sıkça uygulanmakta olan bu tedavi modellerinin bir üst basamağı ise doku mühendisliği olarak karşımıza çıkmaktadır. Doku mühendisliği geliştirilen hücre iskeleleri, kök hücreler ve hücre diferensiasyonuna yön veren sinyallerin kullanıldığı disiplinlerarası bir yaklaşımdır. Özel şartlar altında hücrelerin farklılaştırılarak çoğaltılması ve sonuç olarak biyolojik olarak aktif bir doku ya da organ oluşturulması amaçlanmaktadır⁵.

Hedeflenen doku veya organ üretiminde biyoiskeleler iskelet yapısı fonksiyonu görüp hücrelerin proliferasyonu, adezyonu, kontak inhibisyonu gibi birçok aşamada etkin bir öneme sahiptir⁴². İdeal bir biyoiskelenin üretilecek dokuya uygun bir üç boyutlu bir mikroçevre oluşturması, biyoçözünür olması, uygun mekanik özelliklere sahip olması, hücreler arası etkileşimleri organize edebilmesi ve hücre dışı ortamı laboratuvar koşullarında taklit edebilmesi istenmektedir⁴³.

Doku mühendisliği çalışmaları ECM(Ekstraselüler Matriks)'nin eşsiz biyoaktif içeriğini, üç boyutlu yapısını ve mekanik özelliklerini simüle etmede yetersiz kalmaktadır. Bu probemi çözmek için geliştirilen deselülerizasyon yöntemlerinde organlar ya da dokular hücreleştirilerek korunmuş yapıda bir ECM eldesi sağlanabilmektedir. Fakat bu yöntemde uygun doku teminindeki zorluklar, immün yanıt gelişmesi, 3 boyutlu yapının devam ettirilememesi gibi zorluklardan dolayı etkin bir şekilde kullanımı halen sınırlıdır⁴⁴.

2.5. Hücre Dışı Matriks (Ekstraselüler Matriks; ECM)

Hücreler biyolojik ortamlarında nanolif formdaki proteinlerden oluşan mekanik ve yapısal destek sağlayan bir ekstraselüler matriks içerisinde yaşamaktadırlar. Ekstraselüler matriks başlangıçta bir iskelet olarak düşünülmüşse de aslında hücreler ve dokular arası madde alışverişini sağlayan, hücre yapışması, göçü, çoğalması ve farklılaşmasını düzenleyen dinamik bir üç boyutlu ortam olarak kabul edilmektedir⁴⁵.

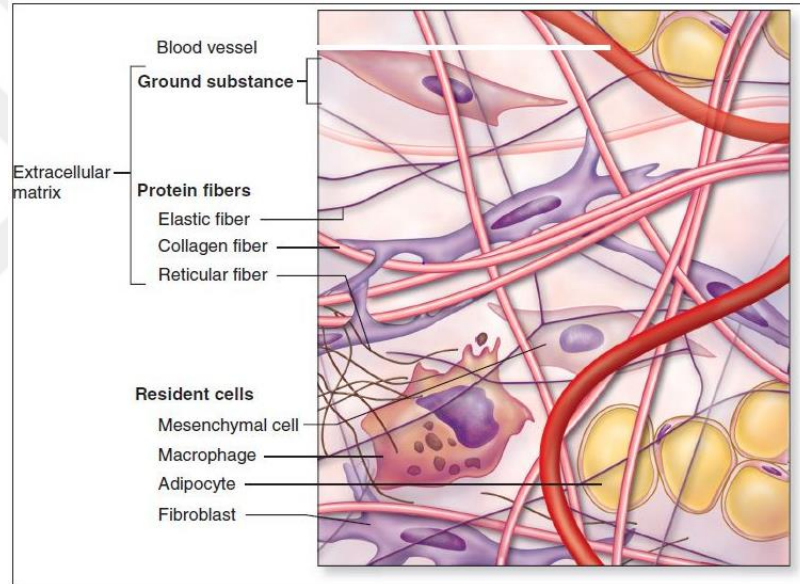
ECM, temel olarak kollajen, fibronektin, elastin, laminin, glikozaminoglikanlar ve diğer glikozillenmiş proteinler gibi yapısal ve fonksiyonel biyomoleküllerden oluşan eşsiz bir yapıdır. Doku gelişimleri sırasında hücreler arası etkileşimler sonucu her dokuda farklı topoloji, kompozisyon ve özelliklere sahip olur.

Kemik ve dişte kalsifiye, korneada şeffaf tendonlarda ise lifli ve çok sağlam bir yapıdadır. Bu özelliklere dikkat edildiğinde ECM, hücre nişinin anahtar bileşeni olup etkileşimler, sinyal yolları ile hücresel yanıtları etkiler ve düzenler⁴⁶.

ECM yapısında başlıca 2 tip protein vardır. Bunlar fibröz proteinler ve glikozaminoglikanlardır.

Fibröz Proteinler: Kollajen, elastin, fibronektin, laminin, integrin, tenaskin
Glikozaminoglikanlar: Hyaluronik asit, Kondroitin sülfat, heparan sülfat, dermatan sülfattan oluşmaktadır.

Günümüzde yaygın bir şekilde dolgu materyali olarak kullanılan hyaluronik asit ECM'de en yüksek oranda bulunan sülfatlanmamış glikozaminoglikandır.



Resim 1. ECM bileşenlerinin şematik görünümü (Basic Histology Text and Atlas Mc Grow Hill 2013)

2.6. Deselülerizasyon

Deselülerizasyon temel olarak bir doku veya organda mevcut olan hücre ve nükleer bileşenlerin başarıyla çıkarılması ve doğal 3 boyutlu bir hücre iskelesi elde etme yöntemidir. ECM'nin biyomekanik özelliklerinin, kollajen yapısının ve ECM yapısında mevcut olan büyüme faktörlerinin (VEGF, FGF, TGF- β) olabildiğince en üst seviyede korunması gerekmektedir³. Bu yöntemin geliştirilmesinde, günümüzde kullanılan doğal olmayan, sentetik ürünlerin varlığı ve bu ürünlerin yetersizliği etkili

olmuştur. Doğal, sentetik olmayan doku uyumu yüksek ve biyoaktif mediatörler içeren bir iskele üretebilmek amacıyla doku mühendisleri bu alana yönelmiştir.

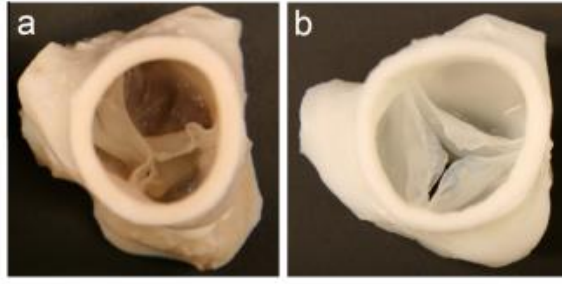
Deselülerizasyon sonrası elde edilen hücre iskelesinin; ECM içeriği olan kollajen tiplerini, glikozaminoglikanları, TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), VEGF(Vascular Endotelial Growth Factor), FGF(Fibroblast Growth Factor), PDGF(Platelet Derive Growth Factor) gibi birçok büyüme faktörünü koruyarak içerdiği tespit edilmiştir⁴⁷.

Gilbert ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada materyallerdeki tüm hücresel komponentlerin deselülerizasyon işlemleri ile tamamiyle ortadan kaldırılmadığı gözlenmiştir. Ölçülebilen miktarda DNA materyali ticari olarak ulaşılabilen ürünlerde histolojik olarak ve jel elektroforezi ile gösterilmiştir⁴⁸.

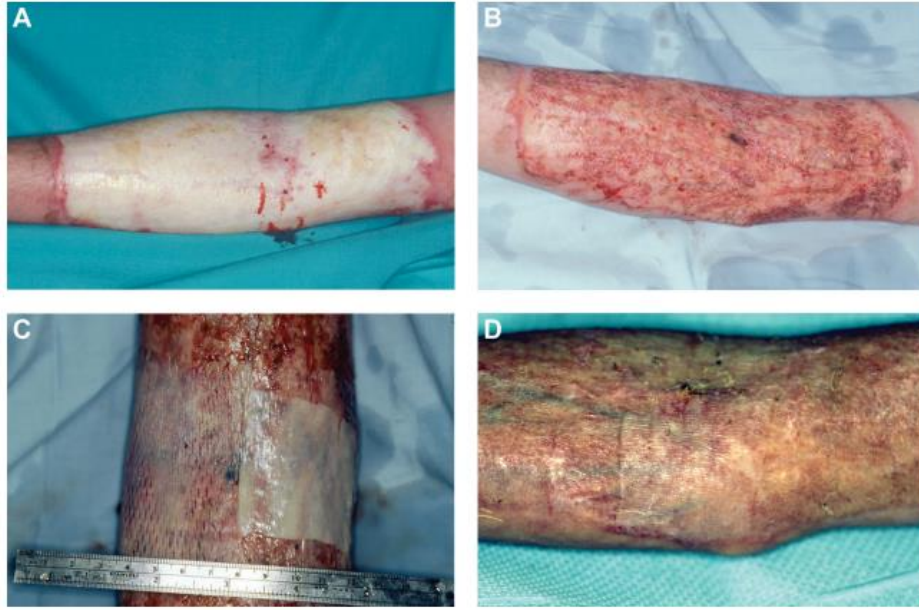
Günümüzde ince barsak submukozası, kalp kapağı, kıkırdak, deri, kemik, tendon, mesane duvarı, damar, kas, yağ gibi dokular başta olmak üzere birçok doku tipi klinik öncesi doku mühendisliği çalışmalarında başarı ile kullanılmıştır. Bu başarılı çalışmalar ışığında geliştirilen bazı ürünler klinik kullanımda yerini almıştır. Klinikte aktif olarak kullanılmakta olan bazı ECM-temelli ticari ürünler aşağıda listelenmiştir⁴.

Tablo 2. Klinikte aktif olarak kullanılmakta olan bazı ECM temelli ticari ürünler

Ürün	Doku Kaynağı	Uygulama Alanı
Alloderm	İnsan Derisi	Yumuşak Doku, Doku Örtüsü
Zimmer Collagen Repair Patch	Domuz Derisi	Yumuşak Doku
Tissue Mend	Sığır Derisi	Yumuşak Doku
Matristem	Domuz İdrar Kesesi	Yumuşak Doku
Oasis, Sugisis	Domuz İnce Bağırsak	Yumuşak Doku
IOPatch	İnsan Perikardı	Oftalmoloji
OrthAdapt, Unite	At Perikardı	Yumuşak Doku, Kronik Yaralar
CopiOs	Sığır Perikardı	Diş Hekimliği
Hancock, Mosaic	Domuz Kalp Kapakçığı	Kalp ve Damar Cerrahisi



Resim 2. (a) Doğal Domuz Aort Kapağı (B) Deselülerize Hali



Resim 3. Önkol 3.Derece yanığı sonrası Alloderm ile rekonstrüksiyon⁴⁹

2.7. Deselülerizasyon Yöntemleri

Doku deselülerizasyonu için kullanılan yöntemler; fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler olmak üzere üç ana başlık altında toparlanabilir. Bu üç yöntemin kombinasyonu ise deselülerizasyon yöntemlerinden en sık tercih edilenidir.

Fiziksel yöntemler; ajitasyon, sonikasyon, mekanik masaj, basınç, donma ve çözülme işlemlerini içermektedir. Bu yöntemler, ECM hücre içeriğinin sonradan durulama ve çıkarılmasını kolaylaştırmak için hücre zarını bozar. Bu fiziksel işlemler tam deselülerize elde etmek için genellikle yetersizdir ve bir kimyasal işlem ile kombine edilmelidir. Enzimatik yöntemler ise hücre membranının, hücreler arası ve hücre dışı bağlarını bozmaktadır³.

Tablo 3. Deselüerizasyon yöntemleri ve sınıflandırılması

KİMYASAL	FİZİKSEL	BİYOLOJİK
İyonik Deterjanlar	Dondurma-Çözdürme	Proteolitik Enzimler
Noniyonik Deterjanlar	Sonikasyon	Kalsiyum Şelatlayıcı Ajanlar
Şelatlayıcı Deterjanlar	Agitasyon	
Alkalın-Asit Uygulaması	Mekanik Kuvvet	
Tribütil Fosfat		
Hipotonik ve Hipertonik Uygulamaları		
Alkoller ve diğer Ajanlar		

2.7.1. Fiziksel Yöntemler

Deselüerizasyon işleminde fiziksel yöntemler arasında en sık tercih edilen dondurma ve çözdürmedir. Doğal dokuların hücresizleştirilmesi için ilk basamak olarak birçok çalışmada dondurma-çözdürme aşaması kullanılmaktadır^{50,51}. Dondurma derecesi -80C, çözdürme derecesi ise +37 C tercih edilmektedir. Bu şekilde hücre membranı lizisi ve hücre materyalin dış ortama çıkarılması sağlanmaya çalışılmaktadır. Bazı dokularda tek bir dondurma ve çözme sirkülasyonu yeterli gelmemekte çoklu tekrarlar ihtiyacı oluşmaktadır⁵².

Sonikasyon, ajitasyon ve hidrostatik basınç uygulama işlemleri; tek başlarına kullanılmaktansa enzimler, hipertonik solüsyonlar ve şelatlayıcı ajanlarla kombine edildiğinde daha etkin olmaktadır⁵³. Sonikasyon ses dalgası titreşimleri gönderme yoluyla hücre zarlarını parçalamayı sağlar.

Mekanik kuvvet uygulama yöntemi ise basınç uygulama yolu ile hücre lizisi sağlamaktadır. Akciğer ve karaciğer gibi yoğun ECM içeriği olmayan dokularda efektif olarak kullanılmaktadır. ECM yapısına minimal hasar veren bir yöntemdir³.

2.7.2. Kimyasal Yöntemler

2.7.2.1. İyonik Deterjanlar

İyonik deterjanlar, sitoplazmik ve nükleer hücre zarının çözünmesinde etkili bir yöntemdir, ancak protein-protein etkileşimini bozarak protein denatürasyonuna

neden olurlar. En yaygın kullanılan iyonik deterjanlar; sodyum dodesil sülfat (SDS) ve sodyum deoksikolat ile Triton X-200'dür.

SDS, dokudan hücresel içeriğin uzaklaştırılmasında çok efektif bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. SDS'yi diğer deterjanlardan ayıran özellik, sitoplazmik proteinlerden vimentin dahil tüm nükleer kalıntıların tamamen ortadan kaldırılmasını sağlamasıdır⁵⁴. SDS, ECM'nin doğal doku yapısını bozarak glikozaminoglikan konsantrasyonunda azalmaya ve kollajen birlikteliğinin bozulmasına neden olmaktadır. Fakat SDS ile dokudan kollajen uzaklaştırılması gerçekleşmemektedir⁵⁵.

2.7.2.2. Noniyonik Deterjanlar

İyonik olmayan deterjanlar deselüerizasyon protokollerinde sık olarak tercih edilen 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 bağlantılarını koruduğu bilinmektedir. Bu sebeple doku ya da organdaki proteinin fonksiyonel yapılarını bozmadığı bildirilmiştir⁵⁶.

Triton X-100 deselüerizasyon işlemlerinde sık olarak kullanılan iyonik deterjanlar arasındadır. Dokunun Triton X-100'e maruz bırakılma süresi birkaç saatten 14 güne kadar değişmektedir^{54,57}.

Triton X-100 ile deselüerizasyon çalışmalarında, glikozaminoglikan bileşimi arasında farklı sonuçlar bildirilmiştir. Kalp kapakçığında 24 saat muamele sonrasında glikozaminoglikanlar tamamen uzaklaştırılırken, ön çapraz bağlar üzerine dört günlük uygulama sonucunda sülfat glikozaminoglikanların içeriğinde herhangi bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Triton X-100 etkili bir deselüerizasyon yöntemi olmakla birlikte etkili olmasındaki en önemli nokta deselüerizasyon protokolündeki diğer yardımcı metotlarla desteklenmesidir⁵⁸.

2.7.2.3. Asit ve Alkalın Uygulamaları

Asetik asit, perasetik asit (PAA), hidroklorik asit, sülfürik asit ve amonyum hidroksit hücre zarını ve hücre içi organelleri etkili bir şekilde lizise uğratan alkalın ve asit örnekleridir⁵⁹. Asit ve alkalın uygulamaları deselüerizasyon protokollerinde

hücrenin sitoplazmik bileşenlerini çözmek ve eş zamanlı olarak RNA ve DNA gibi nükleik asitleri uzaklaştırmak için kullanılmaktadır⁵⁸.

Yapılan çalışmalarda, domuz ince bağırsak submukoza ve mesane tabakaları yaklaşık %0.10-0.15 konsantrasyondaki PAA ile deselülerize 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 bildirilmiştir⁶⁰. Farklı çalışmalarda ise PAA uygulaması sonrasında glikozaminoglikanlardan laminin ve fibronektinin ECM doku yapısında kaldığı gösterilmiştir⁶¹. 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 bildirilmiştir⁶². İnce bağırsak submukoza ve mesane tabakaları ile yapılan in vitro hücre kültürü çalışmaları da bu şekilde elde edilen materyallerin kullanım açısından mükemmel yakın bir yapı iskelesi olduklarını tekrarlı çalışmalar ile göstermiştir⁶⁰.

2.7.2.4. Hipotonik ve Hipertonik Solüsyonlar

Distile su ya da hipotonik ve hipertonik solüsyonlarla yapılan osmotik şok uygulaması organ ve dokularda hücre lizisine neden olmaktadır^{54,57}. 11 saatlik hipotonik solüsyon ve 11 saatlik hipertonik solüsyon döngüleri sonucunda hücre lizisinin gerçekleştiği ancak dokulardan ortaya çıkan hücre kalıntılarının tamamen uzaklaştırılmadığı bildirilmiştir⁵⁷. Aynı çalışmada hipotonik ve hipertonik solüsyon döngüsünün hücresel elemanların tamamen uzaklaştırılmasında yetersiz kaldığı için biyolojik ve kimyasal uygulamalar ile desteklenmesi gerekliliğine değinilmiştir.

2.7.2.5. Şelatlayıcı Deterjanlar

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve etilen glikol bistetraasetik asit (EGTA) gibi şelatlayıcı ajanlar halka şeklinde kompleks bir moleküler yapıya sahiptirler. Merkezi metal iyonlara kararlı bir şekilde bağlanarak bu iyonların izolasyonunu sağlamaktadırlar. Hücre-ECM adezyonunda görevli divalent katyonların bağlanmasıyla, bu ajanlar dokudan hücresel materyallerin uzaklaştırılmasını

sağlamaktadır⁵⁸. EDTA'nın sık olarak tripsin ile kombine edilerek kullanılması tercih edilmektedir⁶³.

2.7.2.6. 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 açmasıdır⁶⁴.

Aseton özellikle lipidlerin ECM yapısından uzaklaştırılmasında kullanılabilir ancak alkollere benzer şekilde dokunun protein yapısında bozulmaya sebep olabilir⁶⁵.

2.7.3. Enzimatik Yöntemler

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 lizisi sonrasında ortaya çıkan DNA ve RNA nükleik asitlerinin ve nükleotidlerinin parçalanmasını sağlar⁶⁶.

Deselülerizasyon protokollerinde proteolitik enzimlerden en çok kullanılan tripsindir. Tripsin, prolinin yan kalıntısı olduğu durumlarda arjinin ve lizinin karbon tarafından peptid bağlantılarını ikiye ayırma özelliği taşır. Serin proteaz olan Tripsin, enzimatik hücresizleştirmede sıkça kullanılan enzimatik ajandır. Tripsin ile yapılan hücresizleştirmede ECM yapısında bulunan GAG'ların korunmasına rağmen kollajen ve elastinin tripsine dirençlerinin az olması, tripsinin dikkatli kullanılmasını gerektirir⁶⁷. Diğer bir dezavantajı ise etki süresinin uzun olmasıdır. Özellikle kalın dokularda bu süre çok daha fazla artar³. Ancak bu şekilde kalın dokuların hücresizleştirilmesinde, diğer ajanların daha derine penetre olabilmeleri için tripsin kullanımını kaçınılmaz olmaktadır.

Biyolojik uygulamaların hücrel materyallerin uzaklaştırılması ve ayrılmasındaki etkinliği birçok farklı dokuda çalışılmıştır. Bazı çalışmalar domuz pulmoner kapakçıklarından 24 saatlik agitasyon yöntemi ile birlikte %0.05 tripsin ve %0.02 EDTA muamelesi sonrasında hücrel kalıntıların uzaklaştırılmasındaki başarısını gösterirken⁵³, bazı çalışmalar etkinlik derecesinin daha az olduğunu bildirmiştir⁶⁸. Bu çalışmalardan domuz aortik kapakçıklarında yapılan çalışmada, %0.5 tripsin, %0.05 EDTA, %0.02 mg/ml deoksiribonükleaz ve 20 µg/ml ribonükleaz ile yaklaşık 17 saat 37°C'de agitasyon yöntemi ile yapılan deselülerizasyon denemesi sonucunda hücrelerin tamamen ortamdaki uzaklaştırıldığı ancak hücrel kalıntıların dokudan uzaklaştırılmadığı bildirilmiştir⁶⁸.

Enzimatik yöntemler, doku ve organlardaki ECM bileşenlerine zarar veren bir etkiye sahiptir. Uzun süreli tripsin uygulamasının normal pulmoner kapakçıklardaki ECM yapısına zarar verdiği ancak dokudaki kollajen miktarında herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir⁵³. Aynı zamanda tripsin uygulamasından sonra ECM'deki laminin ve fibronektin bileşenlerinin büyük ölçüde azaldığı, elastin ve glikozaminoglikanlar üzerinde de zamana bağlı olarak önemli derecede bir azalma olduğu bildirilmiştir⁶⁸. Her iki çalışmada da enzimatik deselülerizasyon protokolleri sonrasında elde edilen ECM'in in vitro ortamda endotelial hücre büyümesini desteklediği tespit edilmiştir^{53,68}.

Sonuç olarak etkili bir deselülerizasyon yapabilmek için farklı yöntemlerin kombine edilmesi ortak bir düşünce olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kombinasyonu aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

1. Fiziksel yöntemlerden biri ile birlikte iyonik solüsyonlar kullanılarak hücre membranının lizisi gerçekleştirilir.
2. Ekstraselüler matriksden nükleer komponentlerin uzaklaştırılması için enzimatik yöntemler uygulanır.
3. Deterjanlar; sitoplazmik ve nükleer komponentlerin çözülmesi için kullanılır.
4. Hücrel artıklar dokudan tamamen arındırılır.

Bu dört basamağın kombinasyonu ile efektif ve ekstraselüler matriks elemanlarını koruyucu bir deselülerizasyon işlemi gerçekleştirmek mümkün olmaktadır.

2.8. Aseülere Dermal Matriks

Asellüler Dermal Matriks (ADM) 1990'ların başında ilk olarak geliştirildikten sonra farklı birçok alanda kullanılmış ve farklı birçok ürün geliştirilmiş bir biyomateryaldir. ADM'ler allojenik(kadavra kaynaklı) ve zenojenik (hayvan kaynaklı) formda üretilebilmektedir. Elde edilen allojenik veya zenojenik derinin hücre ilişkili rejeksiyonda antijenik hedef olan epidermal ve dermal hücreleri uzaklaştırılıp immunolojik açıdan etkisiz hale getirilerek dermal matriks yapısı tamamiyle korunmuş biyomateryallerdir. İçeriğinde esas olarak tip 1 kollajen, elastin, laminin, glikozaminoglikanlar ve farklı birçok çeşit büyüme faktörleri yer almaktadır⁶⁹.

Allogreft deriler kadavra derisinden elde edilir. American Assosiation of Tissue Banks kurallarına uygun olarak FDA tarafından onaylanarak doku bankalarından sağlanır. Medikal ve sosyal öyküleri incelenen donörlerin RPR, VDRL, HbsAg, Anti-HIV 2, Anti- HCV, Anti-HTLV 1 gibi serolojik tarama testleri yapılmaktadır. AlloDerm, BellaDerm, Cymetra, Zyplast ve Zyderm halen kullanımda olan bazı markalardır⁶⁹.

ADM'ler dermis yerine kullanılmaktadır ve epidermis fonksiyonu göstermezler. Açık yara ya da yanık rekonstrüksiyonunda kullanıldığında kısmi kalınlıkta deri grefti veya kültüre edilmiş keratinositlerle örtülmesi gereklidir. ADM, implantasyonundan sonra alıcının fibroblastları ve endotel hücreleri implant içine integre olur ve greftin revaskularizasyonu gerçekleşir⁷⁰.

Son 20 yıldır, meme kanseri cerrahisi sonrası meme rekonstrüksiyonu⁷¹, karın ön duvarı defektlerinin rekonstrüksiyonu⁷², yanık bölgelerinin tedavisi ve rekonstrüksiyonu, dudak augmentasyonu⁷³, nazolabial oluk derinliğinin azaltılması, deprese skar revizyonları, nazal septal perforasyon tedavisi ve rinoplasti sonrası burun dorsal bölge konturunun düzeltilmesi, yarık damak onarımları⁷⁴ gibi birçok plastik cerrahi alanında kullanılmıştır.

2.9. Deselüerize Adipoz Matriks

Adipoz doku günümüzde sıklıkla yağ enjeksiyonu ve kolay ulaşılabilir diferensiasyon yeteneği yüksek bir mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda içerdiği ekstraselüler matriksi nedeniyle birçok kompleks ve fonksiyonel protein, büyüme faktörü, kollajen gibi yapıtaşlarına sahiptir.

Deselüerizasyon işlemi ilk olarak yanık hastalarında bariyer olarak kullanılmak amaçlı 1973 yılında tanımlanmıştır⁷⁵. Deselüerize materyallerin hücre iskelesi olarak kullanımı ise ilk olarak 1989 yılında ince bağırsak submukozasının vasküler uygulamalarda kullanılması ile gerçekleşmiştir⁷⁶. Deselüerize adipoz matriks (DAM) ise ilk olarak 2009 yılında Choi vd. tarafından sadece fiziksel deselüerizasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir⁷⁷. Başarılı bir şekilde tüm hücre komponentleri kaldırılarak yapılan ilk deselüerizasyon ise 2010 yılında Flynn tarafından yapılmıştır⁷⁸.

Deselüerizasyon işlemi sonrasında elde edilen matriks içeriği bir çok farklı çalışma ile test edilmiş ve birçok farklı tipte kollajen (tip1, 2, 3, 4, 6, 7), proteoglikanlar (laminin ve fibronektin), Büyüme faktörleri (VEGF, FGF, PDGF, HGF, IGF, EGF) içerdiği tespit edilmiştir^{79,80}. Bahsedilen yapılardan zengin olan ECM içeriği hücrelerin büyümesi ve diferensiasyonu için çok uygun bir ortam oluşturmaktadır. Ayrıca içerdiği büyüme faktörleri anjiyogenez ve vaskülarizasyon aşamalarının gelişimine olanak sağlamaktadır. Hücre büyüme ve diferensiasyonundaki pozitif etkiler, anjiyogenez potansiyelleri göz önüne alındığında deselüerize adipoz matriks karışımına doku mühendisliğine çok uygun bir hücre iskelesi olarak çıkmaktadır. Bu sebeple birçok in vivo ve invitro deneyde kullanılmış aynı zamanda yara iyileşmesi, kırık ve kemik rejenerasyonu, sinir iyileşmesi gibi birçok alanda denemeler yapılmaktadır.

Kochhar vd. DAM'in viskoelastik ve reolojik özelliklerini lipoaspirat materyali, çapraz bağlı hyaluronik asit dolgu ve kalsiyum hidroksiapatit ile karşılaştırmış. Sonuçta lipoaspirata en yakın viskoelastik özelliklere DAM'in sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum DAM'in yumuşak doku rekonstrüksiyonunda uygun bir dolgu materyali olduğunu ve yağ enjeksiyonuna alternatif olabileceğini göstermektedir⁸¹.

2.10. Deselüerize Kartilaj Doku

Kıkırdak doku sferik ve oval yapıda kondrositler ve bunları çevreleyen dens yapıda ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Eklem kıkırdaklarının %80'i su geri kalan matriks kısmı ise kollajen, proteoglikan ve glikoproteinlerden zengin bir yapı içermektedir. Kompleks iskeletsel yapılardan oluşan bu iyi organize olmuş doku, içerisinde kan damarları, sinirler ve lenfatik dokular içermemektedir. Avasküler bir yapıda olması sebebiyle kıkırdak doku rejeneratif potansiyeli çok düşük bir doku olarak bilinmektedir⁸². Bu problemleri ortadan kaldırmak amaçlı otologreftler ve allogreftler kullanılmıştır. Ototgreftler donör saha morbiditeleri allogreftlerde gelişen immün cevap ve integrasyon problemleri nedeniyle dezavantajlı görünmektedir. Kıkırdak doku mühendisliği ise kıkırdak onarımında umut veren bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır. İmmünojenik olmayan, donör saha morbiditesi yaratmayan ve yüksek miktarlarda ulaşılabilir bir materyal olması nedeniyle iyi bir alternatif sunmaktadır. Bu alanda ise sıklıkla deselüerize hücre iskeleleri kullanılmaktadır. Bu işlem genellikle 3 aşamada gerçekleşmektedir. Donör dokunun deselüerizasyonu, reselüerizasyon ve hasarlı dokuda kullanımı olarak özetlenebilir.

İçermiş olduğu bioaktif faktörler sebebiyle deselüerize ECM hücre adezyonu ve migrasyonunu regüle ederek kondrositler için uygun bir mikroçevre oluşturmakta ve yeni matriks üretimi ile remodelling sağlanmaktadır.

2.11. Deselüerize Materyallerin Hücresel Tedaviler ile Kombine Edilmesi

Deselüerizasyon işlemi ilk olarak yanık hastalarında bariyer olarak kullanılmak amaçlı 1973 yılında tanımlandı⁷⁵. Deselüerize materyallerin hücre iskelesi olarak kullanımı ise ilk olarak 1989 yılında ince bağırsak submukozasının vasküler uygulamalarda kullanılması ile gerçekleşti⁷⁶. Deselüerize adipoz matriks ise ilk olarak 2009 yılında Choi vd. tarafından sadece fiziksel deselüerizasyon yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir⁷⁷. Başarılı bir şekilde tüm hücre komponentleri kaldırılarak yapılan ilk deselüerizasyon ise 2010 yılında Flynn tarafından yapılmıştır⁷⁸.

Deselüerize adipoz matrikslerle ilgili ilk in vitro çalışma Flynn tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada deselüerize adipoz matriks hücre iskelesi üzerine

ADSC ekimi yapılmış ve herhangi bir diferensiasyon faktörü kullanılmadan peroxisome proliferative activated receptor gamma (PPAR gama), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) aktivitelerinde ve adipojenik gen ekspresyonlarında artış tespit edilmiştir⁸³. Farklı in vitro çalışmalarla da ADSC'lerin deselülerize adipoz matriks içinde büyüüp geliştiği ve diferansiye olabildiği gösterilmiştir^{50,84}.

Hayvan deneylerinde ise DAM hayvanların subkutan dokularına kök hücre^{50,84,85}, FGF⁸⁶ ve SVF⁸⁷ ile zenginleştirilerek enjekte edilmiş ya da yerleştirilmiştir. Araştırmacılar DAM hücre iskelelerinin volümlerini koruyabildiğini, anjiogenez ve neovaskülarizasyonu güçlü bir şekilde desteklediğini ve biyouyumlu bir materyal olup minimal inflamatuvar reaksiyonlara yol açtığını tespit etmişlerdir⁸⁸.

Kim vd. yapmış olduğu bir çalışmada deselülerize adipoz matriks ve metil selüloz karışımı hidrojel forma dönüştürülmüş. Bu hidrojel karışımı herhangi bir hücre ekilmeden in vivo olarak incelenmiş. Konak ADSC ve adipoz doku makrofaj hücrelerinin hidrojel iskeleye göçü izlenmiş. Hidrojel iskelenin dışardan herhangi bir hücre yada bioaktif molekül uygulamadan konak kaynaklı adipogenez ve anjiyogenezi anlamlı şekilde stimüle ettiği izlenmiştir⁸⁰.

Aselüler dermal matriksler kullanım sonrası belli oranda rezorbsiyona uğramaktadırlar. Rezorbsiyon oranını azaltmak ve daha biyoaktif bir materyal elde etmek amaçlı çeşitli kök hücrelerle zenginleştirilerek kullanılmış ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmalara örnek vermek gerekirse ilk olarak Altman vd. aselüler dermal matriksleri yara iyileşmesinde ADSC ile kombine ederek kullanmıştır⁸⁹. Orbay vd. ise aselüler dermal matriksleri subkutan implant olarak ADSC ile zenginleştirerek uygulamış. 8 hafta sonra ADSC ile zenginleştirilmiş grup sadece dermal matriks verilen gruba göre implant kalınlığı, vasküler dansitesi ve kollajen formu oluşumu açısından üstün bulunmuştur⁹⁰.

Mezenkimal kök hücreler bilindiği üzere kıkırdak, kemik ve adipoz doku gibi birçok farklı konektif dokuya diferansiye olabilme potansiyeline sahiptir. Fickert vd. 2004 yılında ilk olarak osteoartritik bir kıkırdak dokusundan progenitör kıkırdak hücreleri izole etmişlerdir. Ardından bu progenitör kıkırdak hücrelerin osteojenik,

kondrojenik ve adipojenik hücelere dönüşme potansiyellerini değerlendirmiş ve her doku için sağlanan uygun kültür ortamı ile bu diferensiyasyonu sağlamışlardır⁹¹.

Şuan ticari kullanımında Chondrofix® (Zimmer Biomet, Warsaw, IN) tam kat kırık ve kemik defektlerinde deselülerize osteokondral allogreft olarak kullanılmaktadır. Ayrıca BioCartilage (Arthrex Inc., Naples, FL) ticari olarak ulaşılabilir bir başka üründür. Bu ise deselülerize mikronize allojenik kartilajdır. Liyofilize ve toz formdadır. Sulandırılarak kullanılmaktadır. PRP ile sulandırılıp beş adet atın diz kırık tam defektinde kullanılmıştır. Mikrofraktür ile karşılaştırılmış ve 13 ay sonunda International Cartilage Repair Society (ICRS) skoruna göre daha başarılı olarak görülmüştür⁹².

Yağ, kırık ve dermis dokularında elde edilen ECM'ler bir çok çalışmada hücre kültürü sonucu elde edilen kök hücreler ile kombine edilmiş ve viabilitelerinde, diferensiyasyonlarında, sağ kalımlarında başarılı sonuçlar alınmıştır. Literatürde detaylı araştırma yapıldığında mevcut deselülerize matrikslerin yukarıda bahsetmiş olduğumuz kolay, hızlı ve ekonomik bir kök hücre elde etme yöntemi olan SVF ile uygulaması sadece tek bir makalede incelenmiştir⁸⁷. Bu çalışmada domuz yağ dokusundan elde edilen ECM tozu SVF ile zenginleştirilip farelerin sırt bölgesine enjekte edilmiş ve 6 hafta takip edilmiş. ECM+SVF verilen grup ECM+DMEM verilen grup ile karşılaştırılmış. SVF ile zenginleştirilmiş grubun kollajen dağılımının daha organize olduğu, remodeling mekanizmalarının daha iyi gerçekleştiği izlenmiş. CD 31 ile yapılan immün boyamalarda her iki grupta neovaskülarizasyon izlenmiş ancak SVF verilen grupta daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda yapılan PCR ile PPAR γ , aP2, adipo-nectin ve leptin ekspresyonları incelenmiş gene SVF grubunun anlamlı düzeyde daha biyoaktif olduğu anlaşılmıştır.

Yaptığımız literatür taramasına göre deselülerize dermis ve kırık matrikslerinin liyofilize toz formlarının ekonomik ve hızlı bir kök hücre elde etme metodu olan SVF ile zenginleştirilerek yumuşak doku dolgu materyali olarak kullanımlarını kıyaslayan bir çalışmaya rastlayamadık.

Burdan yola çıkarak çalışmamızda deri, yağ ve kırık dokularından elde ettiğimiz deselülerize ECM tozlarının in vivo koşulda davranışlarını, dolgu malzemesi olarak kullanılma potansiyellerini makroskopik ve patolojik olarak inceledik. Bu

inceleme yapılırken uygulanan immünbaskılama ile pahalı ve özel bakım gerektiren atimik hayvan kullanımına alternatif bir yöntem oluşturuldu. Aynı zamanda klinik pratikte çok rahat uygulanan bir kök hücre yöntemi olan SVF ile zenginleştirilerek; kompleks pahalı, laboratuvar koşulları gerektiren kök hücre izolasyon yöntemlerine alternatif sunmayı planlıyoruz.



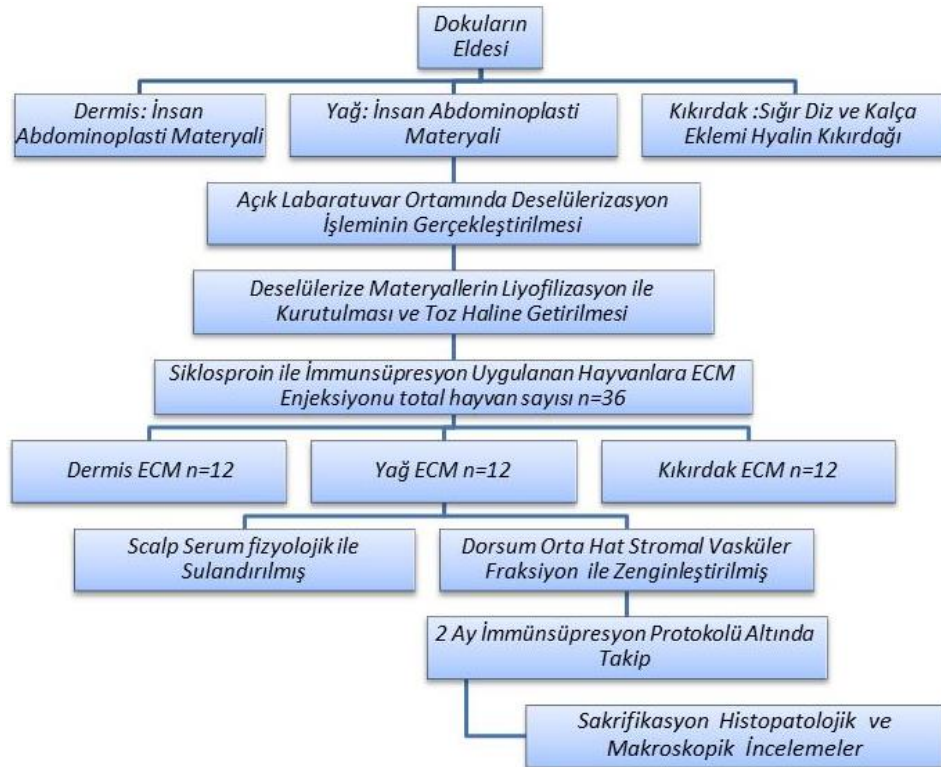
3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 08.07.2021 tarih ve 06/03 karar sayılı onayı ile Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları ve Tıp Araştırmaları Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Deney Düzeni

Deney için 3 farklı doku (yağ, kıkırdak, dermis) kullanıldı. Her doku ayrı ayrı deselülerize edildi. Ardından liyofilizasyon uygulanarak enjekte edilebilir toz forma dönüştürülüp muhafaza edildi. Her materyal için farklı 2 grup oluşturuldu. Gruplardan birinde ECM'ler serum fizyolojik ile sulandırılırken diğer grupta ise stromal vasküler fraksiyon ile sulandırıldı. Hayvanların scalp bölgesine SF ile sulandırılmış, dorsal orta hatta ise SVF ile sulandırılmış ECM enjeksiyonu gerçekleştirildi. Hayvanlara 2 ay boyunca belirlenen dozda siklosporin ile immünsüpresyon uygulandı. Postoperatif 2. ayda hayvanlar sakrifiye edilerek örnekler toplandı.

Tablo 4. Deney düzeninin şematize edilmiş hali



3.1. Deselüerizasyon İşlemi

Deselüerizasyon işleminin amacı hücre membranını lizise uğratıp tüm hücresel yapı ve nükleer materyalin ortadan kaldırılmasıdır. Bu antijenik yapılar ortadan kaldırılırken en önemli unsur ECM'nin minimal zarar göreceği şekilde korunmasıdır.

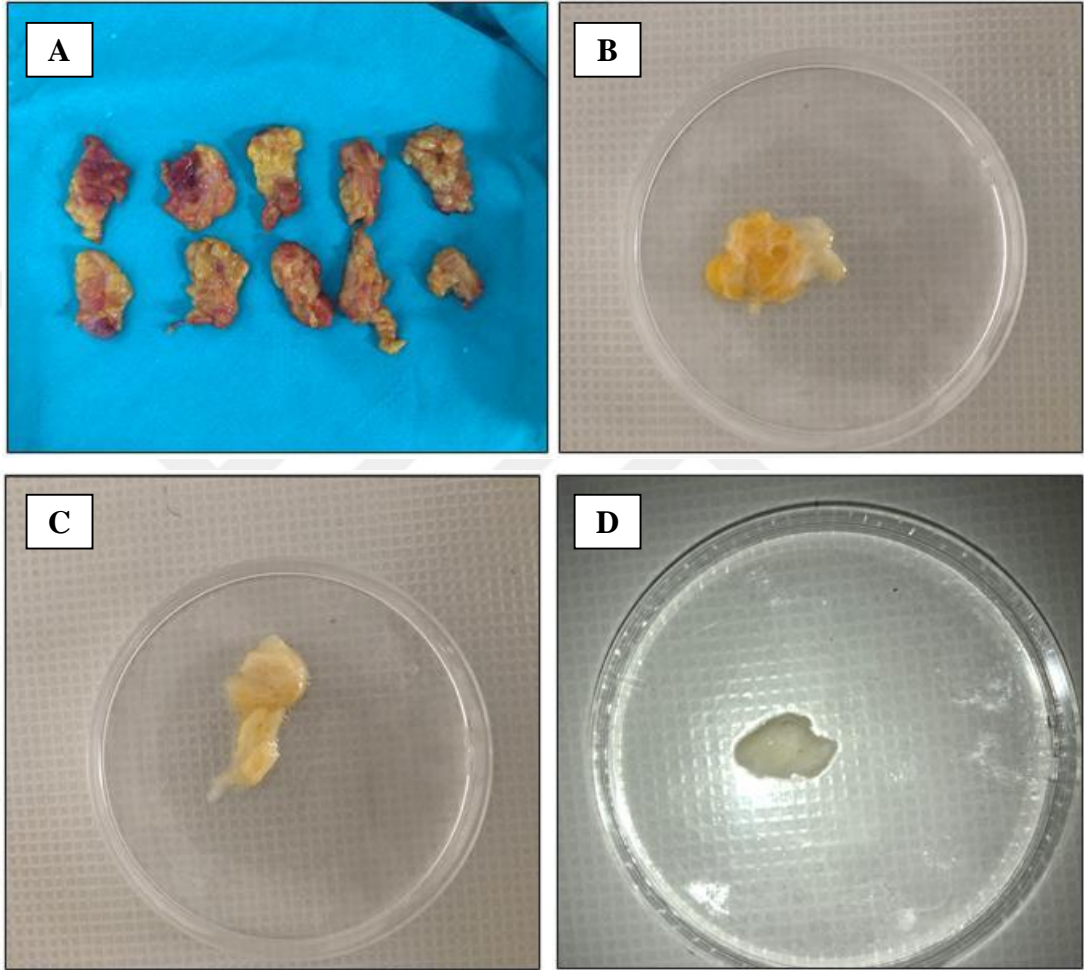
Adipoz ECM üretimi için çalışmamızda Wang vd. adipoz doku deselüerizasyon yöntemi⁹³, dermis ECM üretimi için Ventura vd. deselüerizasyon yöntemi⁹⁴, kıkırdak ECM üretimi için ise Pati vd. deselüerizasyon yöntemi⁹⁵ kullanıldı. Deselüerizasyon çalışmalarının tamamı açık laboratuvar ortamında gerçekleştirildi.

3.2. Adipoz Doku Deselüerizasyonu

Üniversite hastanemizde abdominoplasti operasyonu gerçekleştirilen bir hastadan alınan atık yağ doku materyali hasta onamı alınarak kullanıldı. Abdominal bölgeden alınan subkutan yağ dokusuna sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Yağ doku materyali öncelikle -80°C 'ye donduruldu. Ardından $4 \times 2 \times 1$ cm boyutlarında parçalara kesildi.
2. Örnekler 3 kez -80°C 'den 37°C 'ye donma ve çözülme tepkimesi uygulandı.
3. Örnekler saf su içine yerleştirilerek 2 gün boyunca 120 rpm 'de çalkalayıcı kullanılarak oda sıcaklığında takip edildi. Saf su günlük olarak değiştirildi.
4. Örnekler $0,5 \text{ M NaCl}$ solüsyonunun içerisinde 4 saat, 1 M NaCl solüsyonunun içerisinde 4 saat boyunca 120 rpm çalkalayıcı içerisinde takip edildi. Sonrasında saf su ile gece boyunca yıkama işlemi uygulandı. Bu tuzlu su ve saf su ile yıkama prosedürü toplamda 2 defa gerçekleştirildi.
5. Ardından 37°C 'de 2 saat $0,25$ tripsin/EDTA içerisinde inkübe edildi.
6. Saf su ile 1 saat yıkanan örnekler 1 gece izopropanol içerisinde bekletildi.
7. Saf su ile yıkanan örnekler $\%1$ triton X-100 kimyasalı içerisinde 3 gün bekletildi. Kimyasal günlük olarak değiştirildi.
8. Triton X-100 kalıntılarını uzaklaştırmak için örnekler 2 gün boyunca saf su ile yıkandı. Saf su günde 3 kez değiştirildi.

9. Ardından örnekler 1 gün PBS solüsyonu içerisinde bekletildi.
10. Son aşamada örnekler %1'lik penisilin-streptomisin içeren PBS solüsyonunda 4 °C'de muhafaza edildi.
11. Ardından liyofilizasyon ile kurutulan materyaller doku parçalayıcı ile enjektabil toz forma dönüştürülüp -20°C'de muhafaza edildi.



- Resim 4. A.** Hastadan alınan taze yağ dokusu 4x2x1cm boyutlarında
- B.** NaCl uygulaması sonrası yağ dokuların görünümü
- C.** Tripsin ile enzimatik inkübasyon sonrası görünüm
- D.** Deselülarizasyon işlemi tamamlanmış yağ doku ECM görünümü



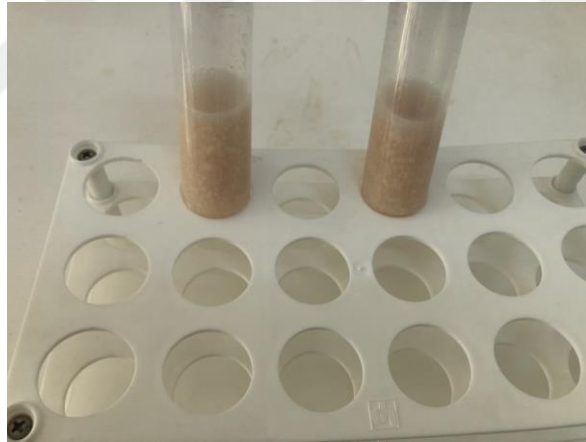
Resim 5. Deselülerizasyonun farklı aşamalarındaki yağ dokuların görünümü

3.3. Kıkırdak Doku Deselülerizasyonu

Kıkırdak ECM üretimi için ise Pati vd. deselülerizasyon yöntemi kullanıldı. Bunun için kasaplardan temin edilen sığır femur eklem yüzeylerinde bulunan hyalin kıkırdaklar toplandı.

1. Toplanan kıkırdaklar öncelikle doku parçalayıcı ile parçalanarak püre haline getirildi.
2. Sonrasında parçalanmış kıkırdaklar hipotonik 10mM Tris-HCl (ph:8.0) solüsyonu ile karıştırıldı.
3. Kıkırdak Tris-HCl karışımına 6 kez -80°C'den 37°C'ye donma ve çözülme işlemi uygulandı.

4. Saf su ile yıkama ve santrifüj ile sıvı kısmı uzaklaştırılan kıkırdaklar %0,25 tripsin PBS solüsyonu ile karıştırıldı ve 24 saat 37°C’de çalkalandı. Tripsin solüsyonu her 4 saatte bir değiştirildi.
5. Ardından Tripsinli kıkırdak solüsyonu hipertonic Tris-HCl Solüsyonu (50mM Tris-HCl içerisinde 1.5 M NaCl Ph:7,6) ile yıkandı.
6. Sonrasında 10mM Tris-HCl solüsyonu içerisinde 50 U ML DNase ve 1U ml RNase A nükleazları ile 37°C’de 4 saat inkübe edildi.
7. Tüm enzimleri kaldırmak için hipotonik Tris-HCl solüsyonu ile 20 saat yıkanma uygulandı.
8. Ardından yıkanan örnekler %1 triton X-100 kimyasalı içerisinde 1 gün bekletildi.
9. Triton X-100 kalıntılarını uzaklaştırmak için örnekler 3 gün boyunca saf su ile yıkandı. Saf su günde 3 kez değiştirildi.
10. Ardından liyofilizasyon ile kurutulan materyaller doku parçalayıcı ile enjektabil toz forma dönüştürülüp -20°C de muhafaza edildi.



Resim 6. Kıkırdak deselülerizasyon işleminin çeşitli aşamalarda görünümü

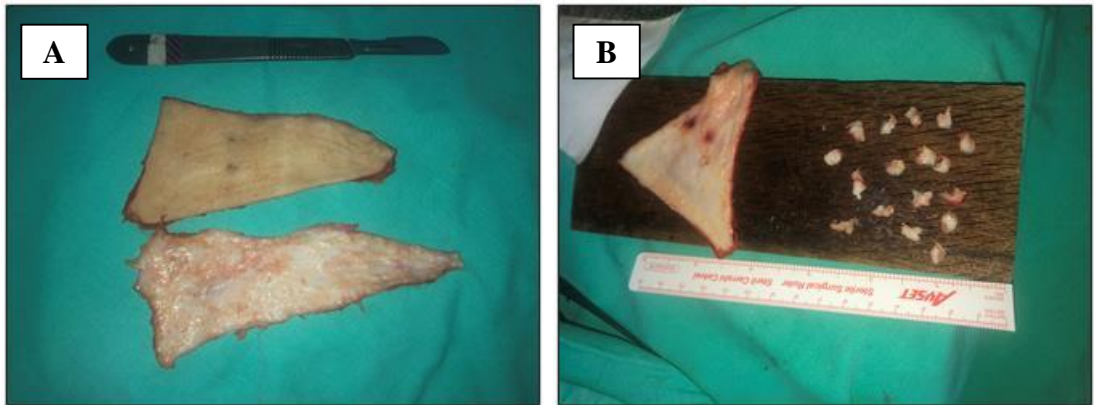
3.4. Dermis Deselülerizasyonu

Dermis ECM üretimi için Ventura vd. deselülerizasyon yöntemi baz alındı. Üniversite hastanemizde abdominoplasti operasyonu gerçekleştirilen bir hastadan alınan atık karın derisi hasta onamı alınarak kullanıldı. Uygulanan işlemler aşağıdaki gibidir;

1. Alınan deri ilk olarak batikon ve serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra epidermis tabakası bistüri ile cerrahi olarak elemine edildi. Ardından 5mm

boyutunda parçalara kesildi. Kesilen parçalar doku parçalayıcı ile muamele edilip daha homojenize hale getirildi.

2. Ardından distile su ile yıkanıp 3000 rpm 5 dakika santrifüj edilerek atık kısımlar ve kalan yağ dokudan temizlendi.
3. Materyal %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu ile karıştırıldı ve 6 saat boyunca 37°C'de muamele edildi. Ardından distile su ile yıkandı.
4. Ardından %0.1 SDS, %70'lik izopropanol çözeltisi içerisinde çözülerek elde edilen solüsyonda 6 saat boyunca 37°C'de bekletildi. Ardından distile su ile yıkandı.
5. %1 Triton-x 100, %70'lik izopropanol çözeltisi içerisinde çözülerek elde edilen solüsyonda 12 saat boyunca 37°C'de bekletildi. Deterjan etkisini ortadan kaldırmak için distile su ile 5 defa yıkandı.
6. Ardından %100 izopropanol içerisinde 12 saat 37°C'de bekletildi. İzopropanol 4 saatte bir değiştirildi.
7. Distile su ile örnekler 6 kere yıkanarak tüm enzim ve kimyasallardan arındırıldı.
8. Ardından 3 gün boyunca liyofilize edilen materyaller doku parçalayıcı ile enjektabil toz forma dönüştürülüp -20°C de muhafaza edildi.

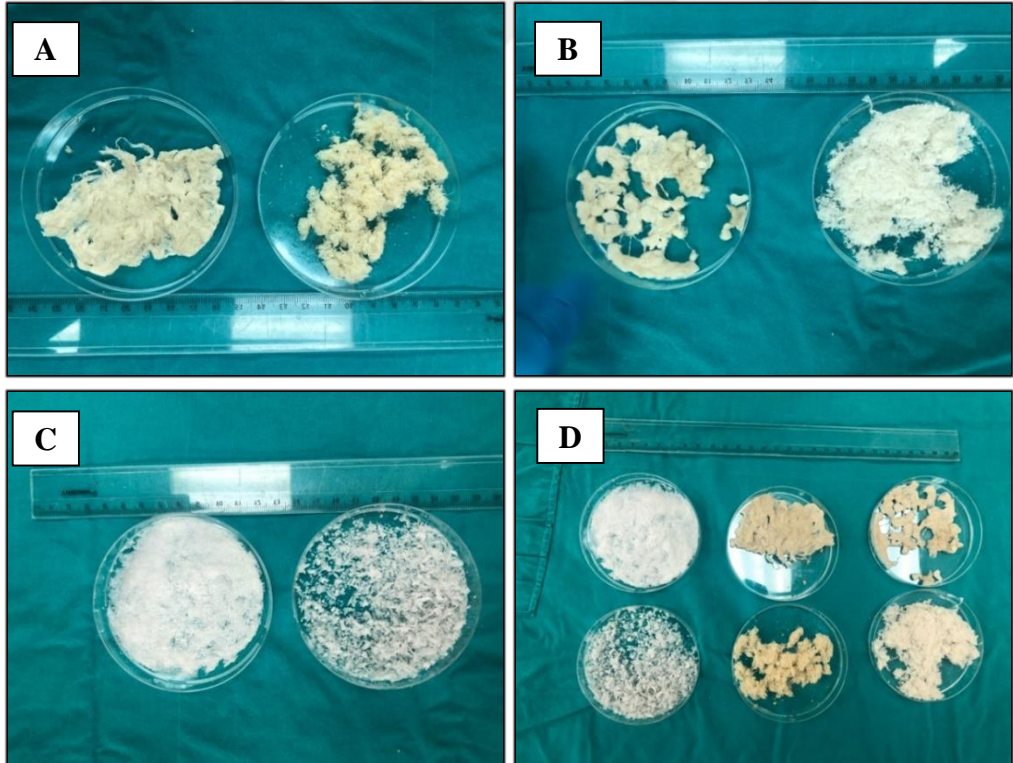


Resim 7. A. Abdominoplasti operasyonu sonrası üstte hastadan alınan taze tam kat deri görünümü, alta ise dezepitelize hali görünümünde

B. 5mm boyutlarında kesilmiş dermis görünümü



Resim 8. Dermis deselülerizasyon çalışmalarının çeşitli aşamalarındaki görünümü



Resim 9. A. Deselülerize yağ ECM nin liyofilizasyon sonrası görünümü ve toz formu
B. Deselülerize dermis ECM nin liyofilizasyon sonrası görünümü ve toz formu
C. Deselülerize kıkırdak ECM nin liyofilizasyon sonrası görünümü ve toz formu
D. Her 3 materyalin liyofilize formlarının toplu görünümü

Stromal Vasküler Fraksiyon Eldesi

Kliniğimizde elektif liposuction operasyonu planlanan hastalardan genel anestezi altında aynı cerrah tarafından yağ greftleri elde edildi. Klasik manuel liposuction yöntemi kullanılacak, infiltrasyon solüsyonu künt uçlu kanül ile cilt altına ciltte portakal kabuğu manzarası görünene kadar infiltre edildi. İnfiltrasyon solüsyonu 1000 ml serum fizyolojik %0,9, 1:1000 epinefrin 1 ml, %8.4 sodyum bikarbonat 12.5 ml ihtiva etmektedir. Daha sonra 3 mm çapında künt kanüller 0.75 atmosfer basıncında 50 ml kilitli enjektörlere bağlanarak manuel olarak yağ dokusu aspire edildi. Elde edilen yağ greftleri ringer laktat solusyonu ile yıkanarak süzüldü.

Klinik pratiğimize uygun olarak liposuction ile elde edilen yıkanmış yağ greftleri 10 ml kilitli enjektörlere yerleştirildi. Ağız kapatılan enjektörler santrifuj cihazında 3 dakika 1200 g'de santrifuj edilip üstte kalan oil ve altta biriken infiltrasyon sıvısı atıldı. Kalan yağ dokusuna Coleman yağı denilmektedir. SVF eldesi için Coleman yağları filtreden geçirilerek 10 ml'lik 2 enjektör arasında mekanik olarak 10 ml/ saniye hızla transfer edilerek emulsifiye edildi. Süt kıvamına gelen yağ greftleri 2000 G'de 3 dakika daha santrifuj yapıp enjektör altında kalan yapışkan tabaka SVF olarak kabul edildi.



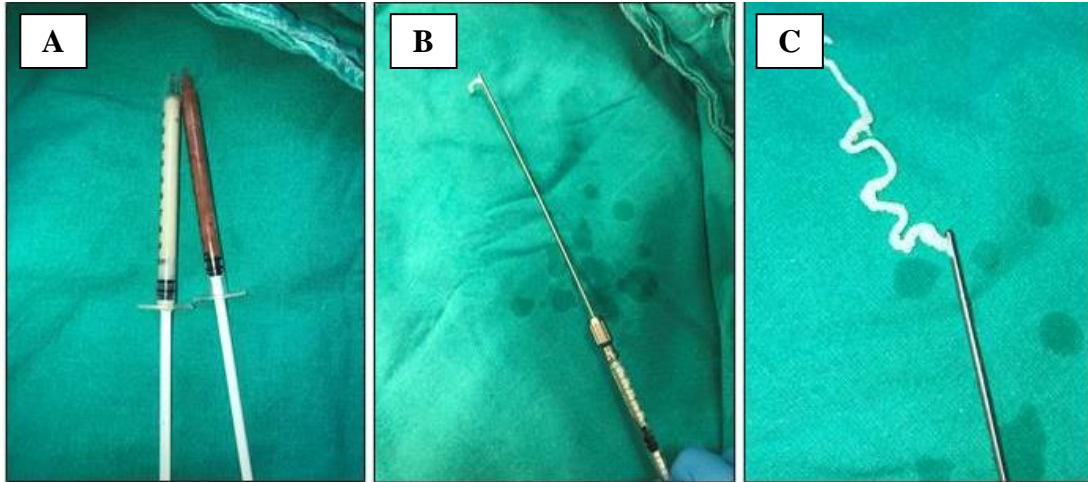
Resim 10. SVF'nin 10 ve 20 cc enjektörlerde elde edilmiş görünümü. Mavi ok oil tabaka, kırmızı ok stromal vasküler fraksiyon.

Hayvanlar

Çalışmamızda ortalama 300(±45) gram ağırlığında ve ortalama 16 haftalık dişi Wistar sıçan (n=36) kullanıldı. Cerrahi sonrası anestezi tesiri sona eren sıçanların her biri tekli Tip 2 kafeslere alındı ve sakrifikasyon günlerine dek tekli kafeslerde tutuldular. Hayvanlar deney süresince 21±1 C sıcaklıkta, %55 bağıl nem oranı; 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ışık döngüsü standartlarının sağlandığı odalarda gözlemlendi ve standart pelet formundaki sıçan yemi (Korkutelim Yem® S-2, Korkuteli/Antalya, Türkiye) ve musluk suyuna ad libitum olarak ulaşmalarına olanak sağlandı. Kafes temizlikleri haftada iki gün rutin olarak, buna ek olarak ise lüzum görüldüğü zamanlarda yapıldı.

Sıçan Modeline Enjekte Edilecek Deselülerize Ekstraselüler Matrisler

Elde edilen toz haldeki yağ, kıkırdak ve dermis ekstraselüler matrisleri kuru hali 0,15 gr olacak şekilde ayrıldı. Ardından mevcut materyal bir grupta 0,5 cc serum fizyolojik ile diğer grupta ise 0,5cc stromal vasküler fraksiyon ile sulandırılıp enjektabil forma dönüştürüldü. Sulandırma sonrası elde edilen her enjeksiyon materyali 0,5 cc olacak şekilde ölçüldü. Enjeksiyonlar yayma tekniği ile (fan-like pattern) tarzda gerçekleştirildi.



Resim 11. A. Serum Fizyolojik ve stromal vasküler fraksiyon ile zenginleştirilmiş ECM'lerin insülin enjektöründe enjeksiyon öncesi görünümüleri

B. ve C. ECM'nin kanülden geçiş görünümü

Sıçan Modeline Anestezi

Tüm sıçanlar 0. günde cerrahi işlemler öncesinde ve sakrifiye edilecekleri ilgili günlerde işlemler öncesinde intraperitoneal ketamin&ksilazin anestezisi (35-50&5-10 mg/kg) ile sorunsuz anestezi sağlandı. Anestezi derinliği korneal refleks ile monitörize edildi. Cerrahi işlemler sonrasında 37°C ayarlanmış battaniyeler üzerinde uyanma gerçekleştikten sonra hayvanlar kafeslerine aktarıldı.

Cerrahi İşlemler

Cerrahi işlemleri tüm hayvanlara 0.günde aynı şekilde gerçekleştirildi. Hayvanlara cerrahi öncesi 30mg/kg dozunda sefazolin sodyum antibiyotik profilaksisi intramusküler olarak uyguladı.

Her hayvanın dorsumunda ense bölgesine serum fizyolojikle sulandırılmış ekstraselüler matris, dorsum orta hatta ise stromal vasküler fraksiyon ile zenginleştirilmiş 0,5 cc ECM enjeksiyonu gerçekleştirildi.

Dorsum bölgesinin enjeksiyon alanı olarak seçilmesinin nedeni olarak; bu bölgelerde alıcı hayvana ait yağ dokusunun bulunmaması, deri örtüsünün gevşek olması, altta kapillerlerden zengin bir fasiyal yatak olması gösterilebilir. Enjekte edilen greft miktarları büyük oranda hacimsel olarak belirlenmekte ve yine ilgili literatürlerde 0,2-2 cc arasında değişmektedir. Dorsum orta hatta bir noktasal insizyonu takiben, 2,2 mm kalınlığında kanülün ilerletilmesi ile deri ve derin fasya arasında oluşturulacak tünellere yayma tarzında 0,5 cc'lik enjeksiyonlar gerçekleştirildi. 1 cc'lik enjektörlerdeki greftler tartılarak boş enjektörün ağırlığının darası alınmak suretiyle enjekte edilecek greftlerin net ağırlıkları kaydedildi.

Sıçan modeline Siklosporin Enjeksiyonu ile İmmünsüpresyon Oluşturma

Siklosporin A güçlü bir immünsupresan ajan olup solid organların ve kompozit dokuların klinik ve deneysel transplantasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yöntemimizde kliniğimizde daha önceden uzmanlık tezi olarak yapılan insan deri ve yağ zenogreftlerinin, sıçanlara transferleri sonrası alıcı immun yanıtından korunabildiği düşük doz siklosporin tedavi protokolü tercih edildi⁹⁶. Düşük doz

siklosporin tedavisinde Towpik vd. sıçan allo deri greftlerinin 6 aydan fazla sağ kalımını gerçekleştiren doz esas alındı⁹⁷.

0. gündeki cerrahi işlemleri takiben 16mg/kg/gün siklosporin 3 gün boyunca intramusküler olarak uygulandı. 3. günden sonra gün aşırı olmak üzere 16mg/kg idame dozuna geçilerek devam edildi.

Sıçan Modelinde Deney Süresi

Deselülerize ekstraselüler matrikslerin enjeksiyonu ve remodelling sürecinin incelendiği bir çok çalışmada örneklemeler 1-3.ay arasında yapılmıştır^{84,85}. Bu referanslar doğrultusunda çalışmamızın enjeksiyonları takiben nihai süresi 60 gün olarak belirlendi.

Verilerin Toplanması ve Gros Değerlendirmeler

Uyutulan sıçanlar traş edilip, antisepsinin sağlanılmasının ardından ekstraselüler matrikslerin olası lokalizasyonları elle belirlenmeye çalışılıp işaretlendi ve ardından bu bölgelerden uzak kalınarak geniş bir cilt ve panniculus carnosus insizyonu yapılarak fasiyal düzlemler arasından ince diseksiyonlarla işaretli bölgelere ulaşıldı ve fasiyal dokular arasından diseke edilerek çıkarıldı. Toplanan ekstraselüler matrikslerin hassas mikrotartı (AND GR-200) ile ağırlık ölçümleri yapıldı. Ayrıca elde edilen greftlerin gros görünümünde dikkat çeken özellikleri kaydedildi ve gerekli görülen bütün basamaklarda fotoğraflamalar yapıldı. Ardından yüksek doz anestezi ile sakrifikasyon gerçekleştirildi.

Sakrifiye edilen hayvanlardan toplanan örnekler; literatürde ağırlık ve/veya hacim ölçümleri yapılarak karşılaştırılmaktadır. Enjekte edilecek materyalin kuru materyal olması ve enjeksiyon için sulandırılacak olması hacim ölçümü ile değerlendirmeyi anlamsız kılmaktadır. Dolayısıyla greftlerin son ağırlıklarının ölçülerek başlangıç ağırlıkları ile karşılaştırılmasının daha yerinde olacağı öngörüldü. Bunun yanında materyalleri nihai halinin son halleri fotoğraflanarak kayıt altına alındı.

3.5. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik analizler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Histopatolojik

değerlendirmelerde ilk olarak deselülerize edilen yağ, kıkırdak ve dermis ECM'leri Hematoksilen & Eozin (H & E) ve Masson Trikrom (MTK) ile boyandı. Matrikslerdeki kalıntı hücreler, kollajen lif görünüşleri, hücre çekirdekleri incelenerek deselülerizasyon işleminin etkinliği ortaya kondu. Ardından sıçanlardan elde edilen materyaller aynı şekilde H & E ve Masson Trikrom ile boyandı.

Nekropsi sırasında alınan ve %10'luk formaldehit solüsyonunda 48 saat fikse (tespit) edildi. İki gün süre ile formaldehit solüsyonunda tutulan dokuların bir kez solüsyonları değiştirildi ve bu süre sonunda trimlemeler yapılarak doku takip kasetlerine yerleştirildi. Örneklerin karılmasını önlemek için her bir doku örneği takip kasetinin üzerine ait olduğu gruplar ve hayvan numaraları yazılarak tekrar formaldehit içerisine alındı. Ertesi gün akşam tüm kasetler rutin histopatolojik doku takibi amacıyla tam otomatik doku takip cihazının (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) sepetlerine dizilerek cihaza takıldı. Günlük vakumlu doku takip programına ayarlanarak solüsyonların dokular içine daha penetre olması sağlandı. Doku takibi sırasında kasetler gece boyunca düşük alkollerden yüksek alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek dokular içinde bulunan suyun çekilmesi, ardından iki seri ksilolden geçirilerek doku yağının alınması ve sıcak parafinden geçirilerek su ve yağdan boşalan alanlara parafinin geçmesi sağlandı. Ertesi sabah takip işlemi bitirilen doku örnekleri sıcak parafine gömülerek blokaj işlemleri gerçekleştirildi. Bu işlem için takibi tamamlanmış doku örnekleri doku takip cihazından çıkarılarak blokaj işlemi için doku gömme cihazının sıcak haznesine alındı ve sıcak tabla üzerinde sıcak parafin çeşmesi altında (Leica Histocore Arcadia H) parafine blokajları yapıldı. Ardından bloklar aynı cihazın soğuk tabla bölümüne alınarak yaklaşık bir saat burada bekletilerek parafinin donması sağlandı. Bu işlemler ardından parafin bloklar 4-5 saat kadar buzdolabında soğutuldu. Ardından tam otomatik Leica 2155 rotary mikrotomda (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı ve kesitlerin kuruması amacıyla 1 gece boyunca oda ısısında bekletildi.

Ertesi gün kesitler H&E boyama için özel boyama kabı köprülerine dizilerek boyama prosedürüne alındı. Bu işlem için öncelikle parafinin eritilmesi ve kesitlerin lam üzerine daha iyi yapışması için 60°C'de 2 saat süreyle etüvde bekletildi. Ardından kesitler üzerinde kalan parafin artıklarının uzaklaştırılması amacıyla 45'er dakika süre ile 3 ayrı seri ksilolde bekletildi. Bu işlemden sonra sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70'lik

alkollerden geçirilerek bu sefer kesitlere su verilmesi işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra hematoksilenle 10 dakika boyandı, distile su ile yıkandı ve ardından eozinle 3 dakika süre ile boyamaları gerçekleştirildi. Boyama işleminden sonra kesitler sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilerek kesitlerdeki suyun alınması sağlandı. Ardından ksilolde şeffaflaştırılan (parlatılan) kesitlerin üstüne özel yapıştırma materyali (entellan) konularak lamel yapıştırıldı. Bu işlemin ardından bir gün süre ile entellanın kurumması için oda sıcaklığında tutuldu ve kesitler ışık mikroskopunda incelenip değerlendirmeye hazır hale getirildi. Zeiss-Axioscope 5 model ışık mikroskopunda incelenen preparatlar Zeiss Axiocam 208 model kamera ile mikroskopik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Ayrıca fibrozis gibi bağ doku bileşenlerini ve kollajen lifleri ilgilendiren değişiklikleri daha spesifik inceleme amaçlı bütün parafin kesitlere Masson's Trichrome (MTK) boyama yapıldı. MTK boyama için ksilen ile deparafinize edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler Boin's solüsyonu (#BNF 125, ScyTek, Utah, USA) ile muamele edildi ve ardından Trichrome Stain Kit'indeki (ScyTek, Utah, USA) yönergeler takip edilerek boyamalar gerçekleştirildi.

Deselülerize Ekstraselüler Matrikslerin Canlılıklarının Histopatolojik Değerlendirilmesi

Yağ ECM'lerinin H&E ve MTK değerlendirmesi bir çok yağ grefti çalışması tarafından da referans gösterilen Yi vd. çalışmasındaki⁹⁸ puanlama skalası baz alınarak yapıldı.

Buna göre aşağıdaki 4 parametre belirtilen kriterlerin varlığına göre 0-5 arasında semikantitatif olarak puanlandı (0=yok, 1=minimal derecede var, 2=minimal-orta derecede var, 3=orta derecede var, 4=orta-yoğun derecede var, 5=yoğun derecede var).

- A) İntakt ve çekirdekli yağ hücrelerinin varlığı (integrite)
- B) Kist ve vakuol varlığı
- C) Kollajen Remodeling/Fibrozis (elastik fibril ve kollojen gibi) varlığı
- D) Lenfosit ve makrofaj yoğunluğunun işaret ettiği inflamasyon

Kıkırdak ECM'lerin H&E ve MTK değerlendirilmesinde referans gösterilen herhangi bir skala olmaması üzerine Rutgers vd.⁹⁹ ve Yin vd.¹⁰⁰ çalışmaları incelendi. Belirlenen 4 parametre, belirtilen kriterlerin varlığına göre 0-5 arasında semikantitatif olarak puanlandı (0=yok, 1=minimal derecede var, 2=minimal-orta derecede var, 3=orta derecede var, 4=orta-yoğun derecede var, 5=yoğun derecede var).

A) Çekirdek Oluşumu

B) Kollajen Remodeling/Fibrozis

C) Neovaskülarizasyon

D) Lenfosit ve makrofaj yoğunluğunun işaret ettiği inflamasyon,

Dermis ECM'lerin H&E ve MTK değerlendirilmesinde referans gösterilen herhangi bir skala olmaması üzerine Sclafani vd. çalışmalarında^{101,102} incelenen kriterler ve toplamda belirtilen 3 parametre varlığına göre 0-5 arasında semikantitatif olarak puanlandı. (0=yok, 1=minimal derecede var, 2=minimal-orta derecede var, 3=orta derecede var, 4=orta-yoğun derecede var, 5=yoğun derecede var).

A) Fibroblast İnfiltrasyonu

B) Kollajen Remodeling/Fibrozis

C) Lenfosit ve makrofaj yoğunluğunun işaret ettiği inflamasyon,

İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

Anti-CD34 monoklonal antikor dokulardaki neovaskülarizasyonu mikrovasküler düzeyde ölçmede yaygınca kullanılan bir antikor olup, çalışmamızda sıçanlardan postoperatif elde edilen matrikslerin kapiller yoğunluğu ölçmede kullanılmıştır. Bu immün antikor canlılık göstermede önemli bir ölçüttür.

Neovaskülarizasyon Olympus Bx53 mikroskopta damarların yoğun olduğu 5 büyük büyütme(400X) alanı seçilerek sayıldı ve ortalamaları alınarak;

0= Hiç damar görülmedi

1=20 veya daha az damar sayıldı

2=21-50 damar sayıldı.

3=50'den fazla damar sayıldı

ölçeklendirmesine göre semikantitatif olarak puanlandı.

Anti-CD34 immün boyamaları şu şekilde gerçekleştirilmişti. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınmış olan kesitler pozitif şarjlı lamalar üzerine yerleştirildi ve bir gece 37°C'lik etüvde bekletildi. Ksilenle deparafinize edilen kesitler 20 dakika saf alkolde bekletilip, distile sudan geçirilmelerinin ardından antijen retrieval işlemi için Biocare Medical Decloaking Chamber cihazında sitrat tampon içerisinde 110°C'de 15 dakika ısıtıldı. İşlem sonrası 20 dakika oda ısısında sitrat tampon içerisinde soğutulan kesitler tekrar distile sudan geçirilip H₂O₂ (hidrojen peroksit) damlatılarak 20 dakika inkübe edildi. pH: 7,6 olan PBS (Phosphat Buffered Saline) solüsyonuyla yıkamanın ardından Ultra V bloklama yapılan kesitler 5 dakika daha inkübe edildikten sonra RabMab anti-CD34 (klon:EO373Y; Kat.No:ab81289 Abcam-Cambridge-MA-USA) için 1/100 dilüsyonda 60 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı. Sekonder antikör olarak Biotinyloted Goat Anti-Polyvalent (TP-125-BN Labvision Freemont, CA-USA) damlatılmasının ardından 20 dakika daha inkübasyona devam edildi ve ardından PBS yıkama yapıldı. Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR Labvision Freemont, CA-USA) ile 20 dakika daha inkübe edilen kesitlere DAB Substrat Kit (kat.no:ab64238; Abcam-Cambridge-MA-USA) ile kromojen eklendi ve uygun inkübasyonun ardından tekrar distile su ile yıkanıp, alkolden geçirilerek havada kurutulan kesitler entelen ile kapatılarak değerlendirmeye hazır hale getirildi.

Bütün histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler iki farklı grupta kör uzman patolog tarafından gerçekleştirildi.

İstatistik analiz

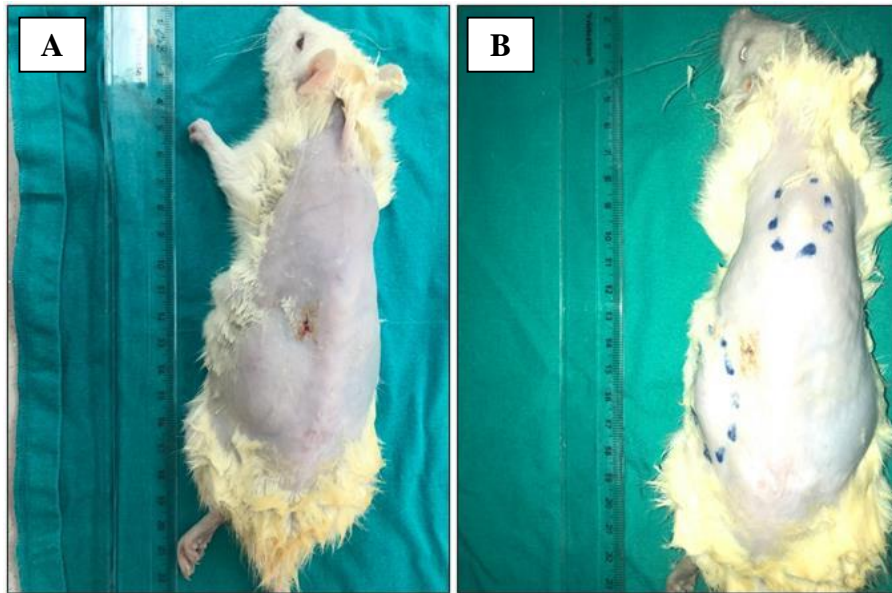
Histopatolojik ve immunhistokimyasal skorların istatistik analizi için SPSS-22.00 paket program kullanıldı. Gruplar arası farklar Student t testi ile belirlendi. P<0.05 olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya katılan 36 sıçandan 2 tanesi öldü. Ölüm gerçekleşen hayvanların ishal tablosunu takiben hızlı kilo verdiği izlendi. İzole edilen hayvanlar sıvı desteği tedavisine rağmen kaybedildi. Bir grup hayvanda ise post operatif 1. Ayda verilen örneklerin kist formasyonu oluşumu sonrası cilde fistülize olarak abseleştiği izlendi. Abseleşme gerçekleşen örneklerin daha çok siklosporin enjeksiyonu yapılan bölgeye yakın örneklerde olduğu dikkat çekti. Bu şekilde kaybedilen örneklerden sonra incelemeye alınan örneklerin tablosu aşağıdaki gibidir.



Resim 12. Kırmızı ok abseleşen örneğin dışardan görünümü, mavi ok yabancı cisim reaksiyonu göstermemiş örneğin 2 ay sonraki görünümü



Resim 13. A. Enjeksiyondan hemen sonraki görünüm
B. Postoperatif 2. Ay sonrası örnekler alınmadan önceki görünüm

Tablo 5. Postoperatif 2. ayda herbir gruptan elde edilen örnek sayılarının dağılımı

Gruplar	Çalışma Sonunda Alınan Örnek Sayısı	Total Hayvan Sayısı
Yağ SF	10	12
Yağ SVF	10	
Kıkırdak SF	10	12
Kıkırdak SVF	10	
Dermis SF	10	12
Dermis SVF	10	

Tablo 6. Deselülerize yağ ECM SF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri

	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Kist/vaküol	Kollajen Remodeling/Fibrosis	integrite	inflamasyon	CD34
Yağ SF							
1	0,151	0,280	2	2	2	4	2
2	0,162	0,180	3	2	2	4	2
3	0,149	0,450	2	2	2	3	2
4	0,142	0,103	2	1	3	3	1
5	0,154	0,172	2	1	3	4	1
6	0,165	0,430	1	1	2	3	1
7	0,150	0,860	1	2	3	3	2
8	0,159	0,203	1	1	1	4	2
9	0,143	0,600	2	2	1	3	2
10	0,144	0,300	2	1	1	4	1

Tablo 7. Deselülerize yağ ECM SVF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri

	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Kist/vaküol	Kollejen Remodeling/Fibrosis	integrite	inflamasyon	CD34
Yağ SVF							
1	0,144	0,202	2	1	3	3	3
2	0,152	0,206	2	3	3	3	3
3	0,156	0,110	2	3	4	3	3
4	0,140	0,137	3	3	4	2	4
5	0,169	0,261	1	4	3	2	4
6	0,146	0,442	1	4	4	2	4
7	0,142	0,320	2	5	4	2	2
8	0,150	0,160	1	5	4	3	2
9	0,149	0,241	1	4	3	2	2
10	0,152	0,760	3	4	3	2	3

Tablo 8. Deselülerize kıkırdak ECM SF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri

	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Çekirdek Oluşumu	Kollajen remodeling/Fibrozis	Neo vaskülarizasyon	İnflamasyon	CD34
Kıkırdak SF							
1	0,167	0,130	2	2	2	2	2
2	0,157	1,5	1	2	2	2	2
3	0,154	1,2	2	3	2	2	2
4	0,165	3,1	2	2	3	3	3
5	0,150	0,608	2	2	3	3	3
6	0,159	0,720	1	1	3	3	3
7	0,143	0,600	1	1	2	2	2
8	0,144	0,120	2	1	2	2	2
9	0,144	0,200	2	1	2	3	3
10	0,142	0,300	1	1	3	3	2

Tablo 9. Deselülerize kıkırdak ECM SVF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri

	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Çekirdek Oluşumu	Kollajen remodeling/Fibrozis	Neo vaskülarizasyon	İnflamasyon	CD34
Kıkırdak SVF							
1	0,154	0,750	3	3	4	3	4
2	0,165	0,450	3	3	4	2	4
3	0,150	1,300	3	3	4	2	4
4	0,159	0,800	4	4	4	2	3
5	0,143	0,721	4	4	5	3	4
6	0,144	0,320	2	3	5	3	4
7	0,166	1,200	5	3	3	3	3
8	0,143	0,721	2	4	5	2	3
9	0,150	0,800	2	5	5	2	4
10	0,151	2,300	2	5	4	2	4

Tablo 10. Deselülerize dermis ECM SF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri

	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Fibroblast İnfiltrasyonu	Kollajen Remodeling/Fibrosis	İnflamasyon	CD34
Dermis SF						
1	0,144	0,112	1	2	3	2
2	0,152	0,160	2	2	3	2
3	0,144	0,400	1	2	4	1
4	0,152	0,221	1	3	2	1
5	0,156	0,113	2	1	2	2
6	0,140	0,621	2	1	3	1
7	0,169	1,100	3	3	4	2
8	0,156	0,200	3	3	4	1
9	0,140	0,720	3	1	4	2
10	0,169	0,262	2	2	5	2

Tablo 11. Deselülerize dermis ECM SVF grubunun ağırlık ve histopatolojik verileri

	İlk Ağırlık	Son Ağırlık	Fibroblast İnfiltrasyonu	Kollajen Remodeling/Fibrosis	İnflamasyon	CD34
Dermis SVF						
1	0,144	0,300	4	4	2	3
2	0,152	0,401	3	4	2	3
3	0,156	1,200	4	4	2	3
4	0,140	0,600	3	4	4	4
5	0,169	0,201	2	3	3	4
6	0,154	0,101	3	3	3	4
7	0,165	0,203	3	3	4	3
8	0,150	0,316	3	5	2	3
9	0,159	0,202	2	3	5	2
10	0,143	0,800	2	4	5	2

Gross Değerlendirmeler

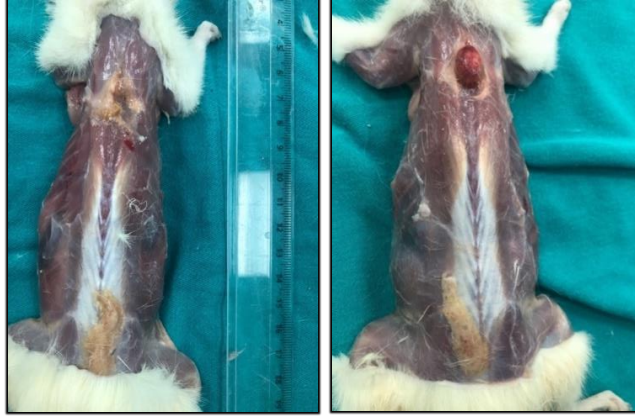
Postoperatif 2. Ayda materyaller uygun insizyon yapılarak fasiyal düzlemler arasından ince diseksiyonlarla işaretli bölgelerden çıkarıldı.



Resim 14. Pre-operatif örneklerin işaretlenmesi ve görünümü

Yağ ECM

Toplanan örnekler yağ SVF ve yağ SF gruplarının her ikisi içinde çevre dokulardan rahatlıkla ayrılabilir özellikteydi. Yağ SF grubunda örneklerin daha kapsüler yapıda olduğu yağ SVF grubunda ise daha homojen bir dağılım göstermiş olduğu ve doku uyumunun daha üstün olduğu dikkat çekti. Yağ SVF grubuna ait örneklerin morfolojik olarak insan adipoz dokusuna benzerliği dikkat çekti. SF grubunda ise deselülerize materyalin daha şeffaf ve beyazımsı rengini muhafaza ettiği, daha çok fibrotik ve yara iyileşmesi benzeri bir görünümde olduğu izlendi. Hacimsel olarak SF grubunun bazı örneklerinde litik bir görünüm saptanırken SVF grubunda ise örneklerin hacimlerini daha iyi muhafaza ettikleri gözlemlenmekteydi.



Resim 15. A. Resim üst bölgesinde izlenen SF grubu materyali daha litik olarak gözlenmekte **B.** Resim alt tarafında görünen SVF grubu materyalinin daha homojen SF grubu ise kapsüler yapıda izlenmekte



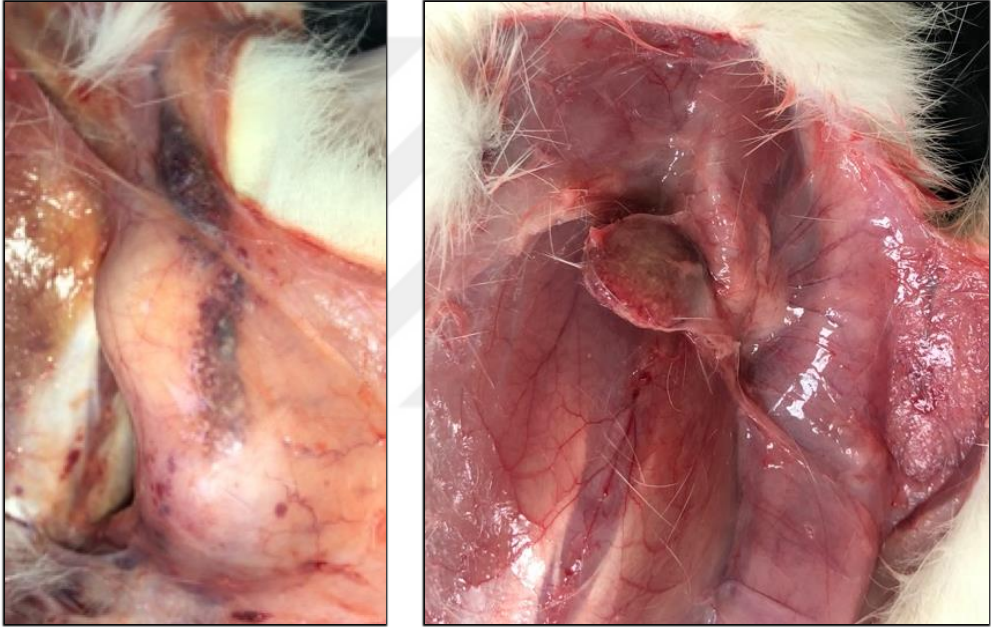
Resim 16. Dorsum posteriora enjekte edilen SVF grubunun morfolojik olarak insan adipoz dokusuna benzerliği

Kıkırdak ECM

Toplanan örnekler kıkırdak SVF ve kıkırdak SF gruplarının her ikisi içinde çevre dokulardan rahatlıkla ayrılabilir özellikteydi. Kıkırdak grubu örneklerinin en dikkat çeken özelliği yağ ve dermis grubuna göre çok daha kapsüler bir yapıda izlenmesiydi. Yağ ve dermis gruplarına göre doku ile aralarında belirgin kapsüler bariyer dikkat çekmekteydi. Kıkırdak SVF ve kıkırdak SF grupları arasında morfolojik olarak bir fark izlenmemekteydi.



Resim 17. Kıkırdak Matrikslerde kapsüler görünüm



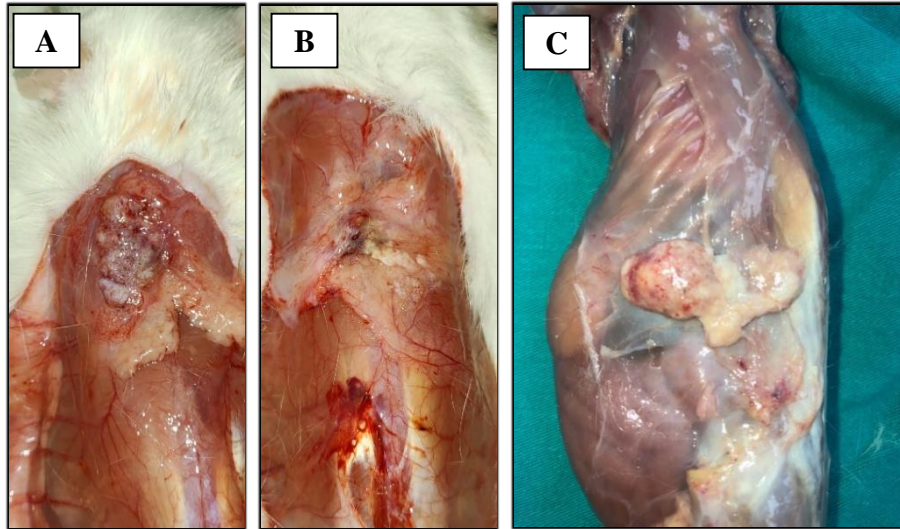
Resim 18. Kıkırdak Matrikslerde homojen ve viabilitesi yüksek örneklerden görünüm



Resim 19. Kıkırdak Matrikslerin daha kapsüler olan görünümüleri

Dermis ECM

Toplanan örnekler dermis SF ve dermis SVF gruplarının her ikisi içinde çevre dokulardan rahatlıkla ayrılabilir özellikteydi. Kıkırdak grubundaki kadar yüksek oranda olmasa bile dermis gruplarında da kapsüler oluşumlar dikkat çekti. SF grubunda örneklerin daha kapsüler yapıda olduğu SVF grubunda ise daha homojen bir dağılım göstermiş olduğu ve doku uyumunun daha üstün olduğu dikkat çekti. SVF grubuna ait örneklerin kısmi nekrozlar içersede, nekroze alanların SF grubuna göre daha az olduğu izlendi. SVF grubunda örneklerin daha şeffaf ve beyazımsı rengini muhafaza ettiği, SF grubunda ise daha nekrotik ve şeffaf görünümü kayıp ettiği izlendi.



Resim 20. A ve B. SF grubundan örneklerin daha litik ve nekrotik görünüm C. SVF grubu örneğinin yakından görünümü

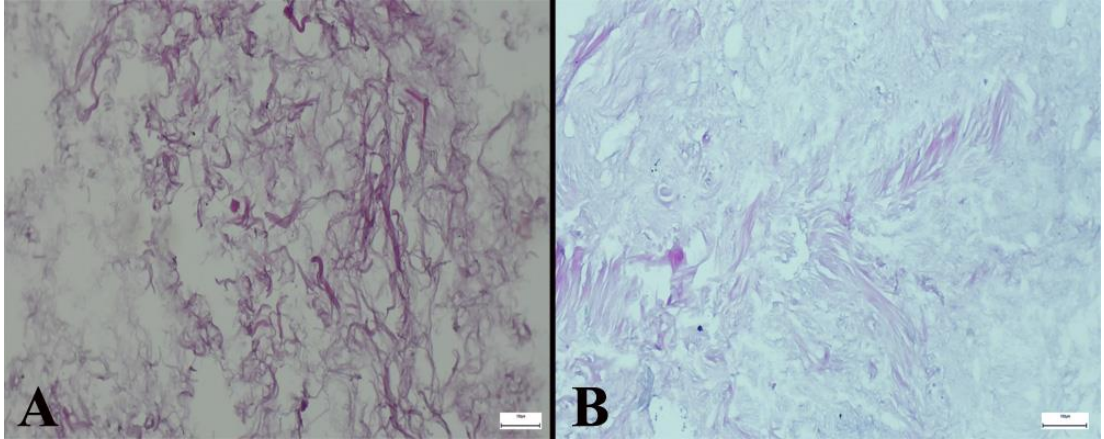


Resim 21. Dermis örneklerinin Görünümü

Histopatolojik Bulgular

Yağ Doku Deselülerizasyon Bulguları

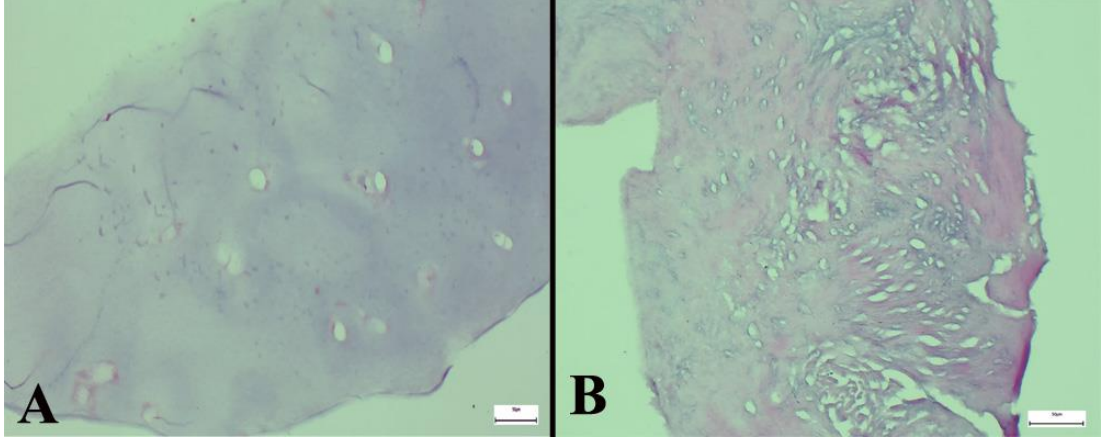
Yapılan deselülarizasyon işleminden sonra örnekler rutin patoloji doku takibinden geçirilerek parafine gömülerek kesit alındı. Daha sonra kesitler H&E ve MTK ile boyanarak hücre çekirdeklerinin varlığı incelendi. Yağ ECM'nin mikroskopik incelemesinde yaygın kollajen lifler izlendi. Hiçbir alanda nükleer materyal izlenmedi. (Resim 22).



Resim 22. Yağ greftinin deselülerize olmuş mikroskopik görünümü, (A) H&E ve (B) MTK, Barlar= 100 μ m.

Kıkırdak Doku Deselülerizasyon Bulguları

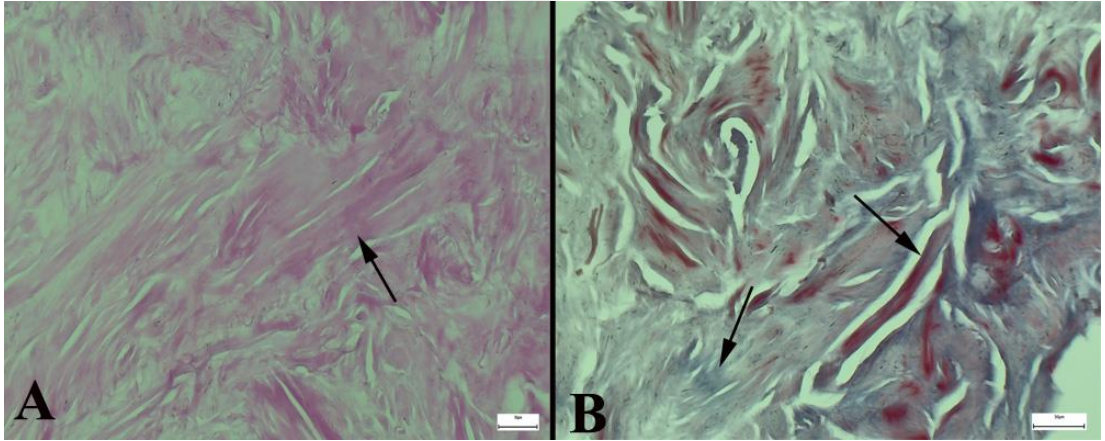
Deselülerize edilen kıkırdak dokuda kıkırdak lakünlerinin boşalmış olduğu ve yaygın kollajen lifler gözlemlendi (Resim23).



Resim 23. Kıkırdak ECM'nin deselülerize olmuş mikroskopik görünümü, (A) H&E ve (B) MTK, Barlar= 50 μ m.

Dermis Deselülarizasyon Bulguları

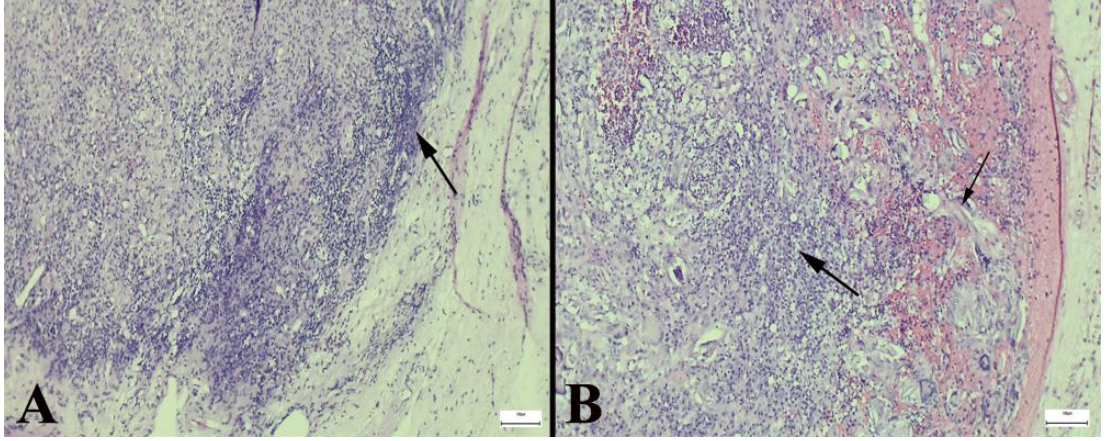
Dermiste deselülarizasyon işleminden sonra hücrelerde çekirdek bulunmadığı sadece kollajen liflerin bulunduğu saptandı (Resim24).



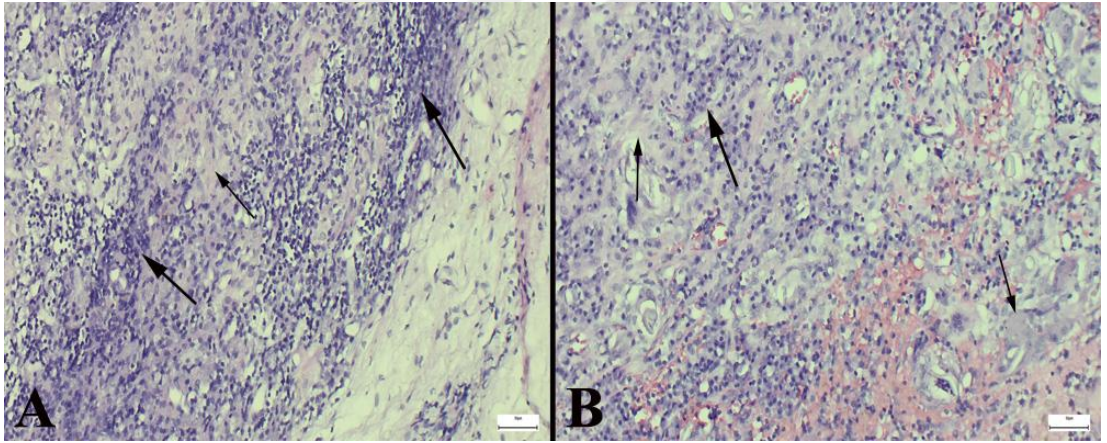
Resim 24. Deselülerize olmuş dermis kesitlerinde kollajen liflerin (oklar) mikroskopik görünümü, (A) H&E ve (B) MTK, Barlar= 50 μ m.

Yağ ECM H&E Bulguları

Gruplara göre yağ ECM reaksiyonları incelendiğinde SF grubunda belirgin bir yangısal reaksiyon gözlemlendi. Kollajen gelişimi bu grupta yok denecek kadar azdı. SVF grubunda yangısal reaksiyon az, kollajen gelişimi ise daha belirgin olarak görüldü (Resim25-26).



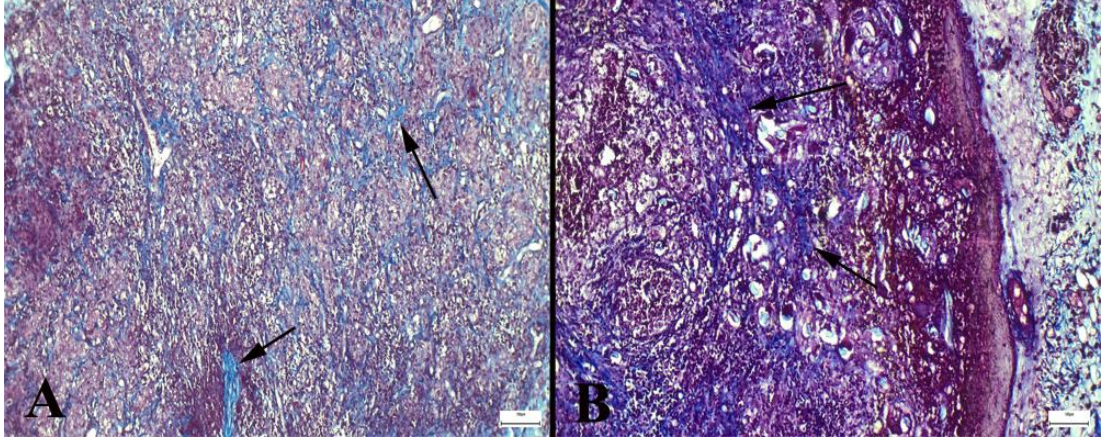
Resim 25. Yağ ECM'nin mikroskopik görünümü. (A) SF grubunda belirgin yangısal reaksiyon (kalın ok), (B) SVF grubunda daha hafif yangısal reaksiyon (kalın ok), artmış kollajen reaksiyonu (ince ok), HE, Bar=100µm.



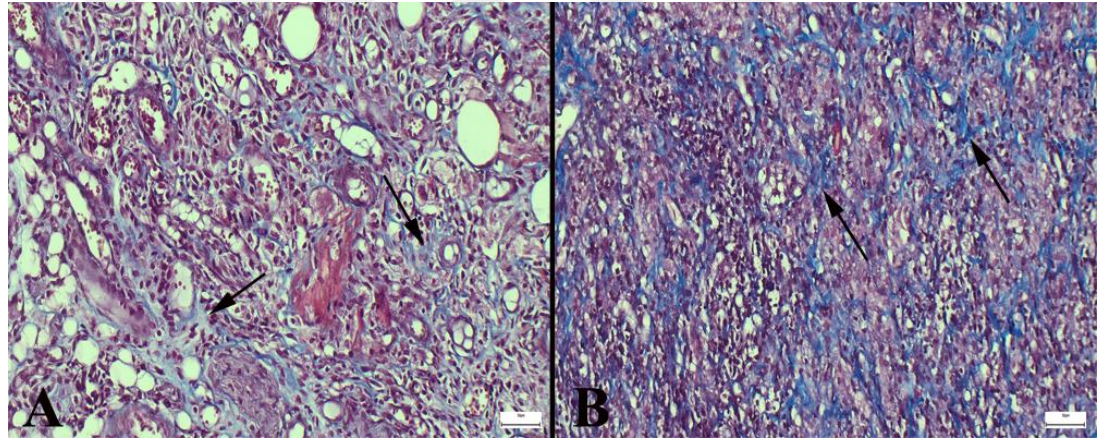
Resim 26. Yağ ECM'nin mikroskopik görünümünün büyük büyütmedeki görünümü. (A) SF grubunda belirgin yangısal reaksiyon (kalın ok) ve hafif kollajen gelişimi (ince ok), (B) SVF grubunda daha hafif yangısal reaksiyon (kalın ok), artmış kollajen gelişimi (ince ok), HE, Bar=100µm.

Yağ ECM Massons Trikrom Boyaması Bulguları

Gruplarda şekillenen kollajen miktarı için yapılan boyamada SF grubunda hafif, SVF grubunda ise belirgin kollajen gelişimi dikkati çekti (Resim27-28).



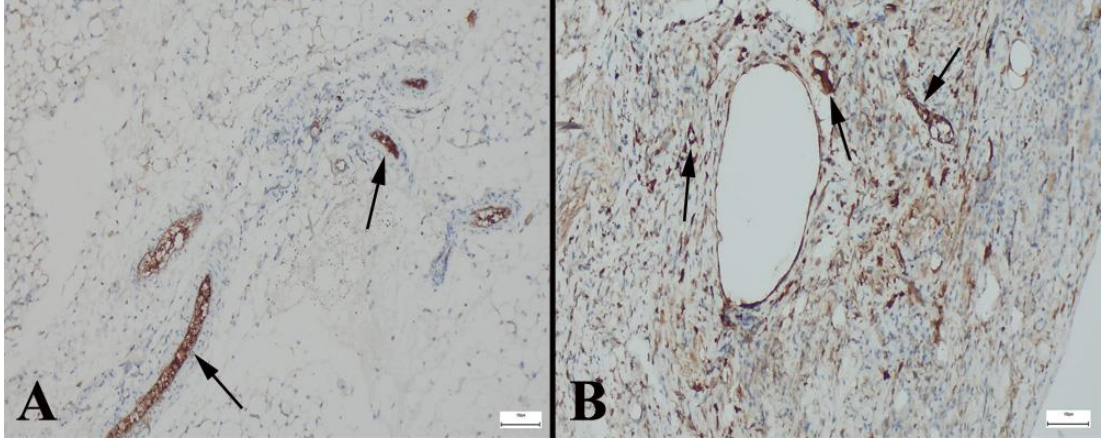
Resim 27. Gruplara göre yağ ECM'nin kollajen miktarlarının görünümü. (A) SF grubunda az miktarda olgunlaşmış mavi kolajen (oklar) boyaması, (B) SVF grubunda belirgin şekilde artmış kollajenin (oklar) görünümü, MTK Boyaması, Barlar= 100 µm.



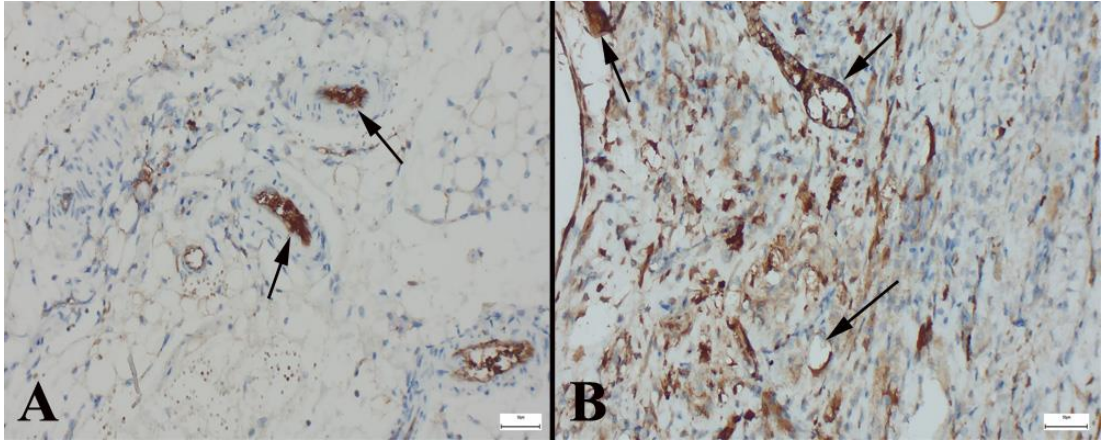
Resim 28. Gruplara göre yağ ECM'nin kollajen miktarlarının yakından görünümü (A) SF grubunda az miktarda olgunlaşmış mavi kolajen (oklar) boyaması, (B) SVF grubunda belirgin şekilde artmış kollajenin (oklar) görünümü, MTK Boyaması, Barlar= 100 µm.

Yağ ECM CD34 Immunohistokimya bulguları

Gruplara göre yağ dokularının CD34 immunohistokimyasal bulguları incelendiğinde SF grubunda damarlaşmanın daha az SVF grubunda ise belirgin damarlaşma dikkati çekti (Resim29-30).



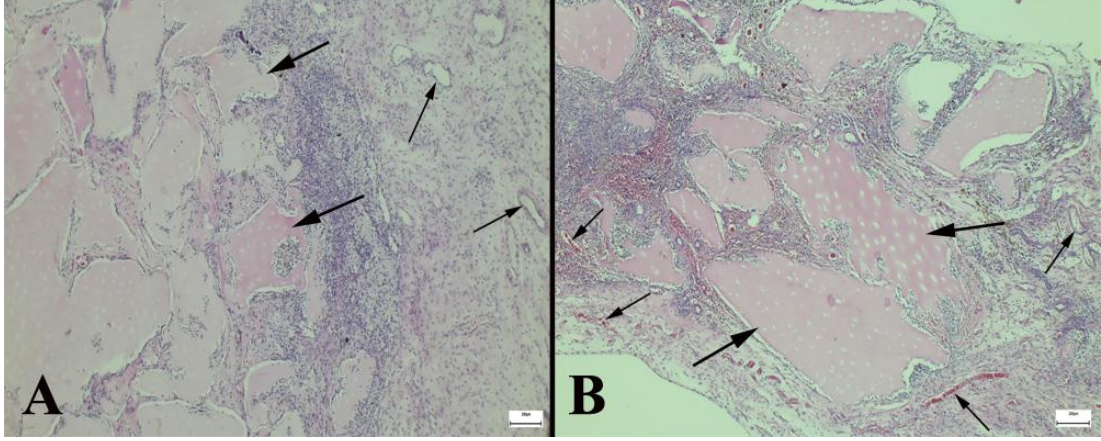
Resim 29. Gruplara göre yağ dokusunun CD34 immuno reaksiyonları. (A) SF grubunda az sayıda yeni damar gelişimi (oklar), (B) SVF grubunda çok sayıda CD34 pozitif immunoekspresyonları (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 100µm.



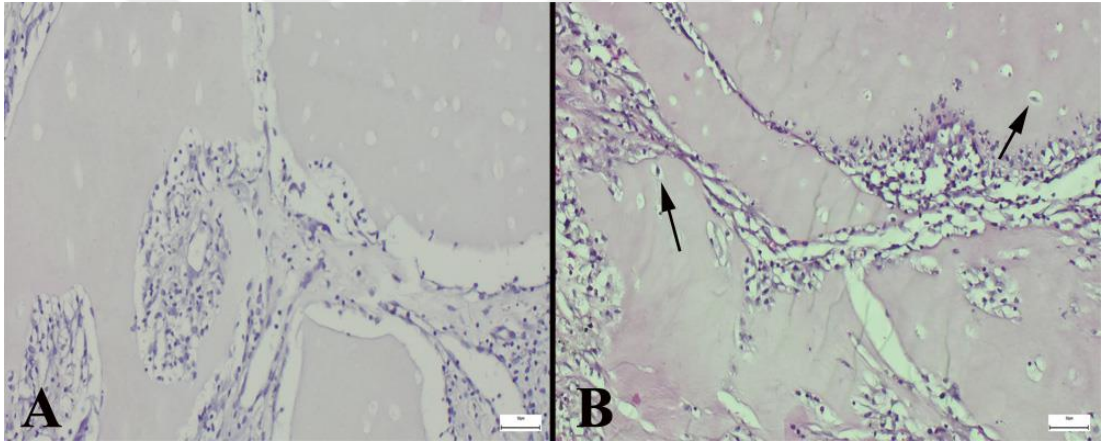
Resim 30. Gruplara göre yağ dokusunun CD34 immunoekspresyonlarının büyütülmüş görünümü. (A) SF grubunda az sayıda yeni damar gelişimi (oklar), (B) SVF grubunda damarlaşma ve damarlarda belirgin CD34 pozitif immunoekspresyonları (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 100µm.

Kıkırdak ECM H&E Bulguları

Kıkırdak ECM'de gruplar karşılaştırıldığında her iki grupta da kıkırdak dokusunun canlılığını devam ettirdiği ve yangısal reaksiyonun bulunduğu gözlemlendi. SF grubuna göre SVF grubunda damarlaşmanın daha belirgin olarak şekillendiği saptandı. Ayrıca SVF grubunda kıkırdak lakünleri içinde yeniden çekirdek oluşumları gözlemlendi (Resim31-32).



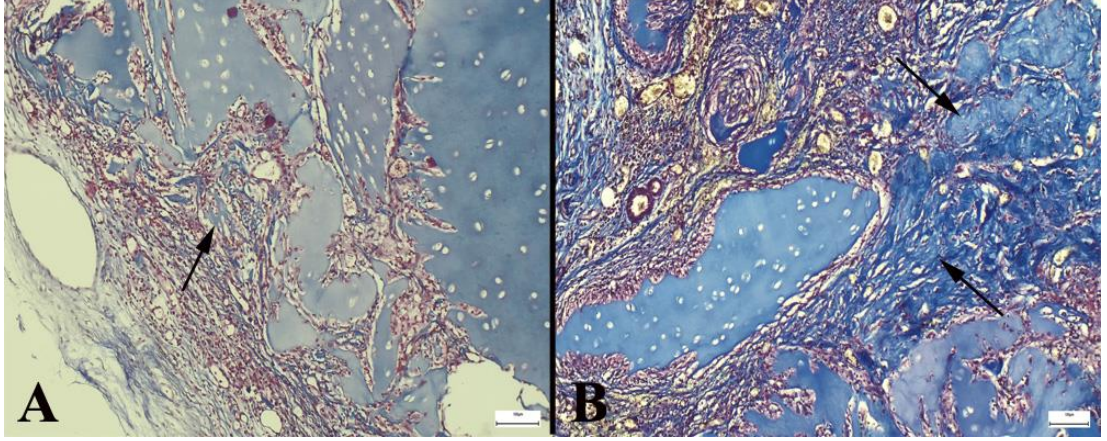
Resim 31. Gruplara göre kıkırdak ECM görünümü. (A) SF grubunda kıkırdak grefti (kalın oklar) ve orta düzeyde damarlaşma (ince oklar). (B) SVF grubunda büyük ve canlı kıkırdak greft materyali (kalın oklar) ve belirgin şekilde artmış damarlaşma (ince oklar), H&E, Barlar =100 μ m.



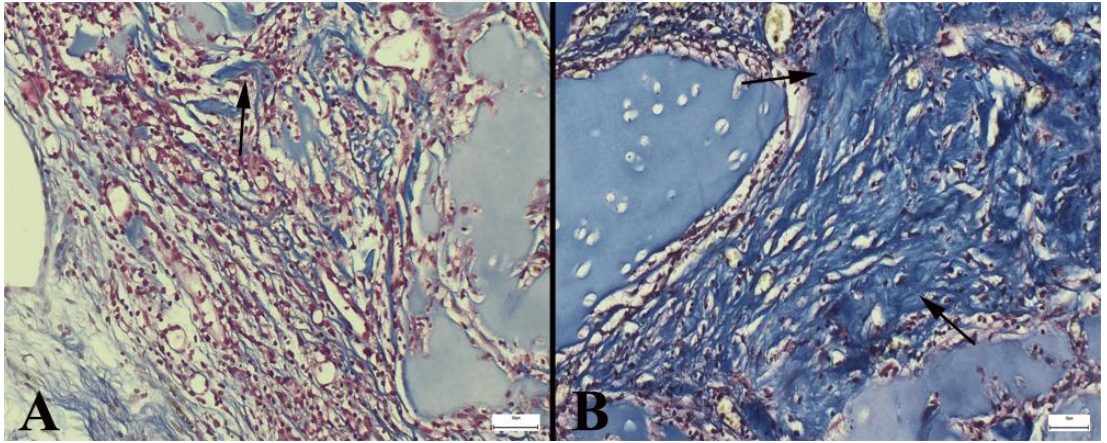
Resim 32. Gruplara göre kıkırdak ECM yakından görünümü. (A) SF grubunda kıkırdak lakünlerinin boş görünümü. (B) SVF grubunda büyük ve canlı kıkırdak greft materyalinin lakünlerinde çekirdek oluşumları (oklar), H&E, Barlar =100 μ m.

Kıkırdak Massons Trikrom Boyaması Bulguları

Gruplarda kıkırdak ECM MTK boyaması incelendiğinde SF grubunda hafif, SVF grubunda ise belirgin kollajen gelişimi dikkati çekti (Resim33-34).



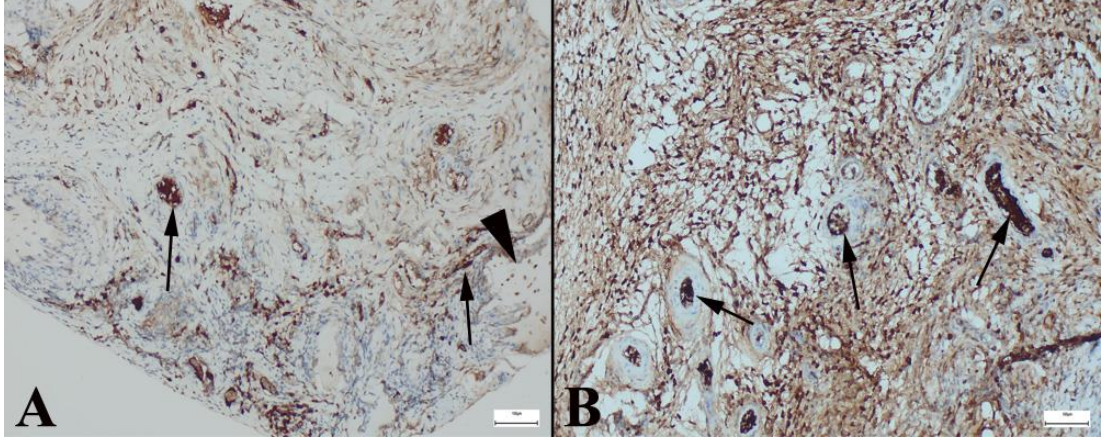
Resim 33. Kıkırdak ECM gruplarına göre görünümü. (A) SF grubunda az sayıda olgunlaşmış kollajen (ok). (B) SVF grubunda belirgin şekilde artmış olgun kollajenin görünümü (oklar), MTC, Barlar =100µm.



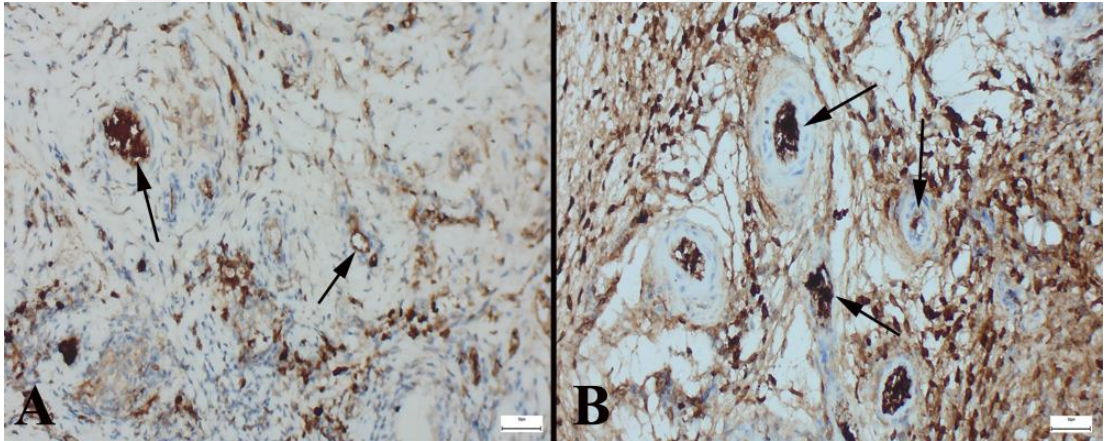
Resim 34. Kıkırdak ECM büyütülmüş görünümü. (A) SF grubunda az sayıda olgunlaşmış açık mavi kollajen (ok). (B) SVF grubunda belirgin şekilde artmış olgun koyu mavi kollajenin görünümü (oklar), MTC, Barlar= 50µm.

Kıkırdak ECM CD34 Immunohistokimya bulguları

Kıkırdak ECM CD34 immunohistokimyasal bulguları incelendiğinde SF grubunda damarlaşmanın daha az SVF grubunda ise belirgin damarlaşma dikkati çakti (Resim35-36).



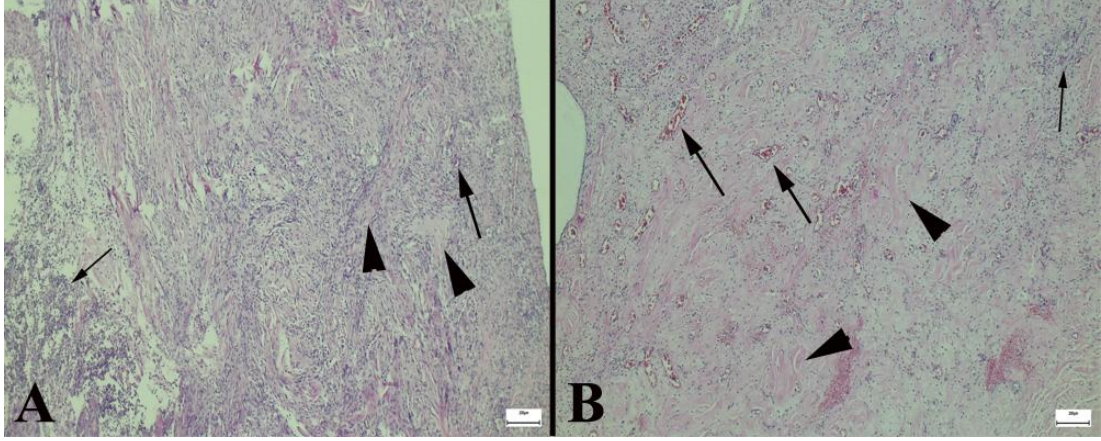
Resim 35. Gruplara göre kıkırdak ECM CD34 immunoreaksiyonu. (A) SF grubunda kıkırdak greftinde (ok başı) orta şiddette ekspresyon (oklar). (B) SVF grubunda kıkırdak greftinde belirgin ekspresyon (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 100µm.



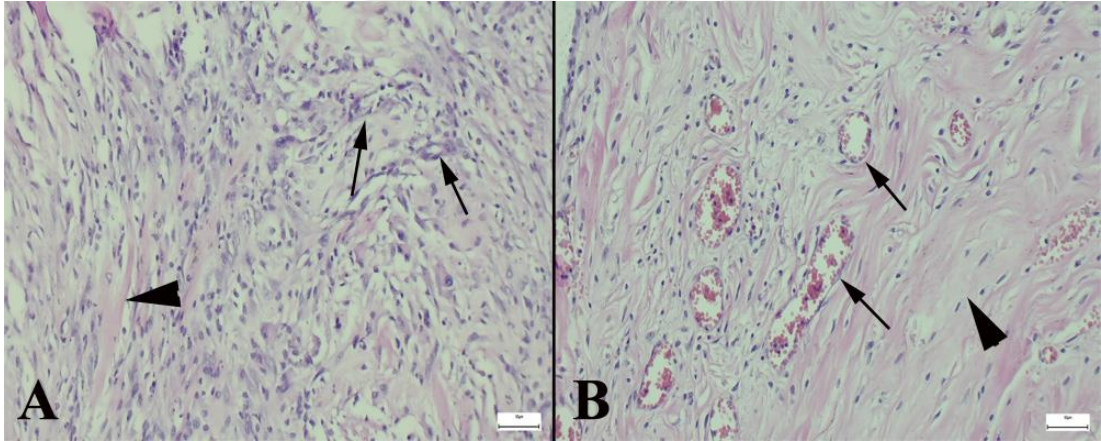
Resim 36. Gruplara göre kıkırdak greftinde CD34 immunoreaksiyonunun büyütülmüş görüntüsü. (A) SF grubunda orta şiddette ekspresyon (oklar). (B) SVF grubunda belirgin ekspresyon (oklar), Streptavidin Biotin Peroksidaz Metodu, Barlar= 50µm.

Dermis ECM H&E Bulguları

Gruplara göre histopatolojik görünümler incelendiğinde, SF grubu ile kıyaslandığında SVF grubunda damarlaşmanın ve kollajen miktarının daha belirgin şekilde arttığı dikkati çekti (Resim 37-38).



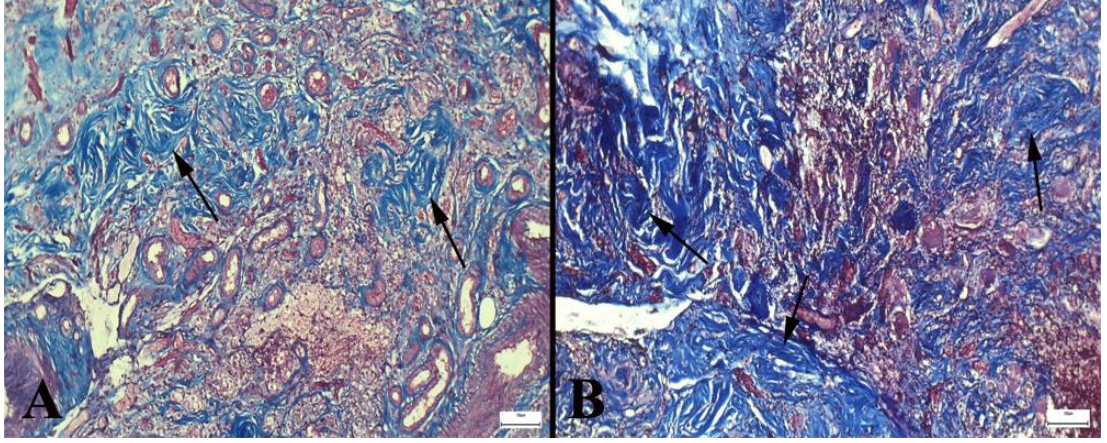
Resim 37. Grupların histopatolojik görünümüleri (A) SF grubunda az sayıda damarlaşma (kalın ok), belirgin inflammatuar reaksiyon (ince ok) ve az miktarda kollajen oluşumu (ok başı), (B) SVF grubunda belirgin damarlaşma (kalın oklar), hafif şiddette inflammatuar reaksiyon (ince ok) ve belirgin kollajen oluşumu (ince oklar), HE, Barlar=200µm.



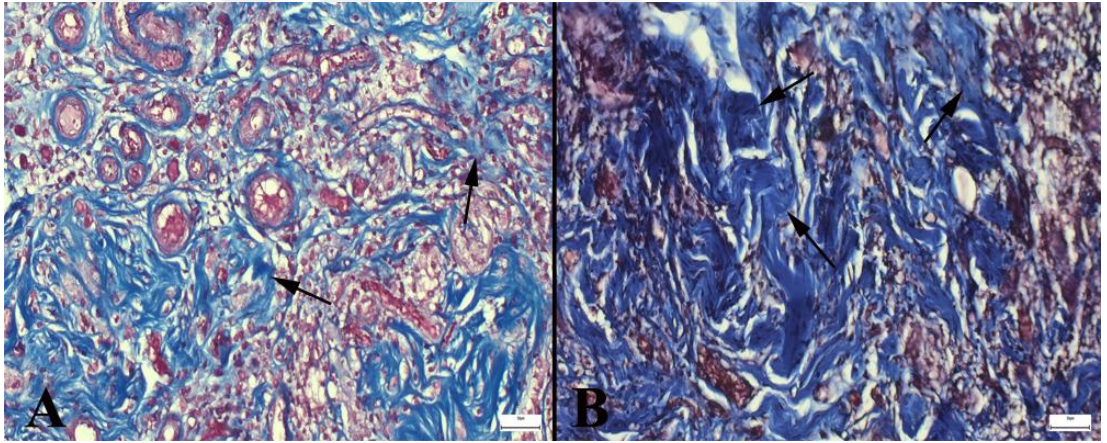
Resim 38. Grupların histopatolojik görünümüleri büyütülmüş görüntüleri (A) SF grubunda az sayıda damarlaşma (kalın ok) az miktarda fibroblast infiltrasyonu ve kollajen oluşumu (ok başı), (B) SVF grubunda belirgin damarlaşma (kalın oklar) belirgin kollajen oluşumu ve fibroblast infiltrasyonu (ince oklar), HE, Barlar=50µm.

Dermis ECM Massons Trikrom Boyaması Bulguları

Gruplara göre MTK bulguları karşılaştırıldığında SF grubunda şekillenen kollajenin olgunlaşmış mavi kollajen miktarının SVF grubuna göre belirgin şekilde az miktarda şekillendiği gözlemlendi. SVF grubunda olgunlaşmış mavi kollajen miktarının belirgin şekilde arttığı dikkati çekti (Resim39-40).



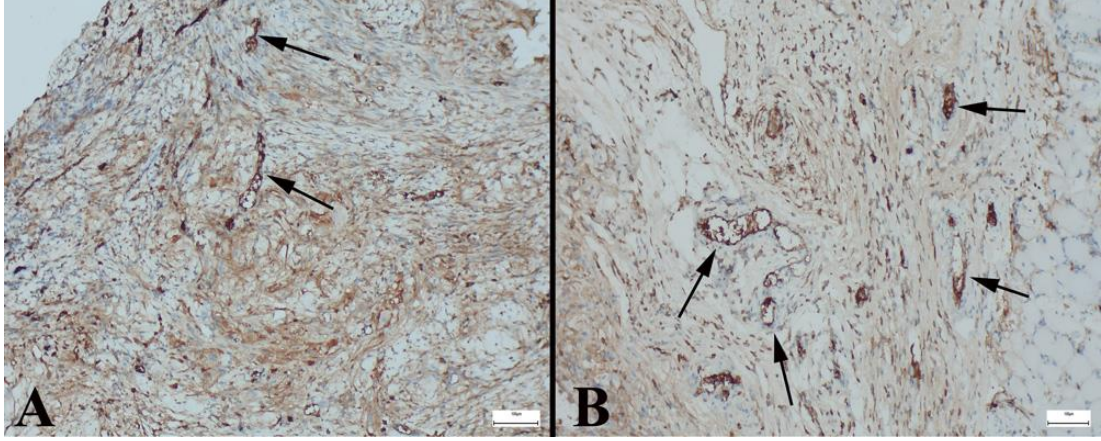
Resim 39. Gruplara göre kollajen miktarlarının görünümü. (A) SF grubunda az miktarda olgunlaşmış mavi kolajen (oklar) boyaması, (B) SVF grubunda belirgin şekilde artmış kollajenin (oklar) görünümü, MTK Boyaması, Barlar= 100 µm.



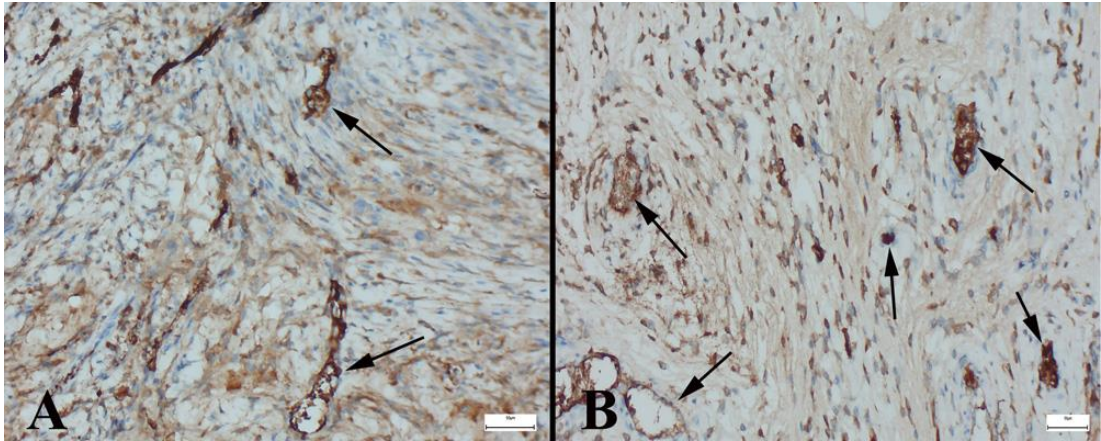
Resim 40. Gruplara göre kollajen miktarlarının büyütülmüş görünümü. (A) SF grubunda az miktarda olgunlaşmış mavi kolajen (oklar) boyaması, (B) SVF grubunda belirgin şekilde artmış kollajenin (oklar) görünümü, MTK Boyaması, Barlar= 100 µm.

Dermis ECM CD34 Immunohistokimya bulguları

Dermis greftinde SF ve SVF grupları karşılaştırıldığında damarlaşmanın her iki grupta da şekillendiği ancak SVF grubunda damarlaşmanın daha belirgin olduğu ve CD34 ekspresyonlarının daha şiddetli olduğu dikkati çekti (Resim41-42).



Resim 41. Gruplarının CD34 immunohistokimya bulguları.(A) SF grubunda yeni şekillenen damarlarda pozitif immunoreaksiyon (oklar), (B) SVF grubunda yeni şekillenen damarlarda artmış pozitif immunoekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar= 100µm.



Resim 42. CD34 immunohistokimya bulguların büyük büyütmedeki görünümü (A) SF grubunda yeni şekillenen damarlarda orta şiddette immunopozitif reaksiyon (oklar), (B) SVF grubunda yeni şekillenen damarlarda şiddetli immunoekspresyonlar (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar= 50µm.

İstatistik Analiz

Yağ ECM

Yağ ECM örnekleri istatistiksel olarak incelendiğinde SVF grubunun integrite ve kollajen remodeling sonuçlarında SF grubuna göre anlamlı düzeyde üstün olduğu izlendi. İnflamasyon bulgularında ise SVF grubu anlamlı olarak daha az inflame olarak saptandı. Her iki grup arasında vakuol/kist oluşumu bulguları arasında anlamlı fark

bulunmadı. İmmunohistokimyasal olarak ise SVF grubu neovaskularizasyon açısından anlamlı düzeyde SF grubuna göre üstün izlendi.

Tablo 12. Yağ ECM'nin gruplara göre histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçlarının istatistik analizi. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

	SF	SVF	P değeri
Integrite	2.00±0.81	3.50±0.52	<0.001
Vakuol/Kist oluşumu	1.80±0.63	1.80±0.78	>0.05
Kollajen Remodeling/Fibrozis	1.50±0.52	3.60±1.17	<0.001
İnflamasyon	3.50±0.52	2.40±0.51	<0.001
CD34	1.60±0.51	3.00±0.81	<0.001

Kıkırdak ECM

Kıkırdak ECM örnekleri istatistiksel olarak incelendiğinde SVF grubunun yeniden çekirdek oluşumu, kollajen remodeling ve neovaskularizasyon sonuçlarında SF grubuna göre anlamlı düzeyde üstün olduğu izlendi. İnflamasyon bulgularında ise her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı. İmmunohistokimyasal olarak ise SVF grubu neovaskularizasyon açısından anlamlı düzeyde SF grubuna göre üstün izlendi.

Tablo 13. Kıkırdak ECM'nin gruplara göre histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçların istatistik analizi. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

	SF	SVF	P değeri
Çekirdek Oluşumu	1.60±0.51	3.00±1.05	<0.001
Kollajen Remodeling/Fibrozis	1.60±0.69	3.70±0.82	<0.001
Neovaskularizasyon	2.40±0.51	4.30±0.67	<0.001
İnflamasyon	2.50±0.52	2.40±0.51	>0.05
CD34	2.40±0.51	3.70±0.48	<0.001

Dermis ECM

Dermis ECM örnekleri istatistiksel olarak incelendiğinde SVF grubunun fibroblast infiltrasyonu ve kollajen remodeling sonuçlarında SF grubuna göre anlamlı

düzeyde üstün olduğu izlendi. İnflamasyon bulgularında ise her iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı. İmmunohistokimyasal olarak ise SVF grubu neovaskülarizasyon açısından anlamlı düzeyde SF grubuna göre üstün izlendi.

Tablo 14. Dermis ECM'nin gruplara göre histopatolojik ve immunohistokimyasal sonuçların istatistik analizi. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

	SF	SVF	P değeri
Fibroblast İnfiltrasyonu	2.00±0.81	2.90±0.73	<0.05
Kollajen Remodeling/Fibrosis	2.00±0.81	3.70±0.67	<0.001
İnflamasyon	3.40±0.96	3.20±1.22	>0.05
CD34	1.60±0.51	3.10±0.73	<0.001

Tablo 15. ECM ağırlıklarının istatistik analizleri. Student t testi, veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

	SF	SVF	P değeri
Dermis	0.38±0.32	0.43±0.34	>0.05
Yağ	0.35±0.23	0.28±0.19	>0.05
Kıkırdak	0.84±0.91	0.93±0.56	>0.05

Yağ, dermis ve kıkırdak her üç ECM materyalinde SF ve SVF grupları arasında istatistiksel olarak postoperatif 2. ayda anlamlı fark bulunmamıştır. Fakat materyallerin ilk enjeksiyon volümü olan 0,15 gr'a göre her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede ağırlık kazanmıştır.

5. TARTIŞMA

Günümüzde estetik cerrahide FDA tarafından onaylanmış yumuşak dolgu materyali olarak kullanılan hyaluronik asit, kollajen, kalsiyum hidroksiapatit ve poly-L-laktik asit içeren birçok ürün bulunmaktadır. Bu dolgu materyallerinin; inflamasyon ve yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaları, kısa sürede rezorbe olmaları, sık enjeksiyon tekrarı gerektirmeleri, biyolojik doku özelliği göstermemeleri, pahalı olmaları gibi birçok dezavantajları vardır². Bu dezavantajların önüne geçmek amacı ile ideal bir dolgu materyali arayış çalışmaları hızla devam etmektedir. Bu alanda doku mühendisliği ve deselülerize matriks ürün çalışmaları dikkat çekmektedir.

Çalışma planı yapılırken deselülerize matriks ürünlerinin bir çok hücresel zenginleştirme yöntemleri (ADSC, SVF, PRP, MSC vb.) ile kombine edildiğini gözlemlendi. Fakat deselülerize dermis ve kıkırdak matrikslerinin liyofilize toz formlarının SVF ile zenginleştirilerek yumuşak doku dolgu materyali olarak kullanımlarını kıyaslayan bir çalışmaya rastlayamadık.

Burdan yola çıkarak çalışmamızda deri, yağ ve kıkırdak dokularından elde ettiğimiz deselülerize ECM tozlarının in vivo koşulda davranışlarını, dolgu malzemesi olarak kullanılma potansiyellerini makroskopik ve patolojik olarak inceledik. Bu inceleme yapılırken klinik pratikte çok rahat uygulanan bir kök hücre yöntemi olan SVF ile zenginleştirilerek; kompleks pahalı, laboratuvar koşulları gerektiren kök hücre izolasyon yöntemlerine alternatif sunmayı planladık. Aynı zamanda uygulanan immünbaskılama ile pahalı ve özel bakım gerektiren atimik hayvan kullanımına alternatif oluşturmayı düşündük.

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta hücre dışı matriks, deselülerizasyon işleminden türetilmiş bir biyolojik iskele olarak doku ve organlarda kullanılabilir. Deselülerizasyonun asıl amacı, ECM'nin yapısal ve fonksiyonel proteinler, glikozaminoglikanlar, büyüme faktörleri vb. yer alan üç boyutlu yapısının korunmasıdır. Deselülerizasyon sürecinin etkinliği, doku yoğunluğu ve organizasyonu, hücre giderme yöntemi, biyolojik bileşenler ve hedef klinik uygulamalar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Deselülerizasyon yöntemlerinde sadece tek tip yöntem kullanmak uygun olmayıp; fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin

kombinasyonu ile daha iyi bir sonuç sağlamaktadır. Optimal deselüerizasyon yönteminin geliştirilmesi büyük çabalar gerektirir ve hala doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta çalışmalar devam etmektedir. Çalışmamızda deselüerizasyon yöntemi olarak fiziksel, enzimatik ve kimyasal yöntemlerin kombinasyonu uygulandı. Deselüerizasyon histopatolojik olarak kanıtlandı. Hücre çekirdeklerinden arınmış kollajen liflerce zengin ECM yapısı elde edildi. Elde edilen materyalde GAG, VEGF, kollajen lif vb. biyoaktif maddelerin kantitatif olarak tespit edilmemesi bir eleştiri olarak değerlendirilebilir.

Elde edilen ECM'lerin alıcıda başarılı bir şekilde tutulumunu etkileyen faktörler uygun vaskülerize bir alana verilmesi ve verilen materyalin vaskülerize yatakla maksimum etkileşimde olmasıdır. Bu noktada temas yüzeyini arttırmak ve enjekte edilebilir form amacıyla materyali toz hale getirdik. Literatürdeki eksikliklerden biri olarakta uygulanan ECM miktarının standardize olmaması gösterilebilir. Birçok çalışmada sadece hacim olarak bilgi verilmiş fakat içerdiği ECM miktarı belirtilmemiştir. Bu noktada yapılacak ileri çalışmalar ile enjeksiyon miktarının standardize olması fayda sağlayacaktır.

Toz formdaki ECM'ye alternatif olarak pepsin ve hidroklorik asit uygulamaları sonrası deselüerize matriksler hidrojel formuna getirilmektedir¹⁰³. Bu çözelti formu hem enjeksiyonu kolaylaştırma hem de 3 boyutlu yazıcı teknolojisinde biomürekkep olarak kullanımda kolaylık sağlamaktadır. Son dönemde yapılan bazı çalışmalar ile biomürekkep formdaki deselüerize matrikslere 3 boyutlu şekillendirme sağlanmıştır.

Pati vd. deselüerize yağ ve kıkırdak dokudan elde edilen biomürekkep ile oluşturdukları 3 boyutlu materyali ADSC ve mezenkimal kök hücreler hücre kültürü ortamında in vitro olarak izlemişler. Üretilen 3 boyutlu materyaller adipojenik ve kıkırdak doku benzeri diferensiasyon gösterdiği ve hücreler için uygun bir platform olduğu tespit edilmiştir⁹⁵. Aynı çalışmanın benzeri deselüerize dermis dokusunda Won vd. tarafından uygulanmış. Elde edilen biomürekkep ile 3 boyutlu yazıcıda üretilen deselüerize matriks platformunun dermal fibroblast hücrelerinin üremesi için uygun bir iklim oluşturduğu saptanmıştır¹⁰⁴. Üzerinde çok fazla çalışılması gerekmesine ve aşılacak çok fazla problem olmasına rağmen doku mühendisliğinin

multidisipliner yaklaşımla gelecekte birçok tedavi alanında gelişmelere sebep olacağını öngörmekteyiz.

Bilindiği üzere ADSC ler VEGF, PDGF, IGF, TGF beta gibi birçok parakrin faktörler sekrete etmektedirler. İlk olarak Altman vd. aselüler dermal matriksleri yara iyileşmesinde ADSC ile kombine ederek kullanmıştır⁸⁹. Kim vd. yapmış oldukları iki çalışmada ADSC'lerin sekrete ettikleri parakrin faktörler ve fibroblastlar üzerinden kollajen sekresyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Bu şekilde yara iyileşmesini hızlandırdığı, kollajen sentezi ve remodelingde artış yaparak kırışıklıklarda azalma sağladığı tespit edilmiştir^{105,106}.

Orbay ve arkadaşları ise aselüler dermal matriksleri subkutan implant olarak ADSC ile zenginleştirerek uygulamış. 8 hafta sonra ADSC ile zenginleştirilmiş grup sadece dermal matriks verilen gruba göre implant kalınlığı, vasküler dansitesi ve kollajen formu oluşumu açısından üstün bulunmuştur⁹⁰.

Çalışmamızda SVF ile zenginleştirilen dermis ECM'lerin SF grubuna göre; kollajen remodeling, neovaskülarizasyon ve fibroblast infiltrasyonu bakımından istatistiksel açıdan üstün bulunmuştur. Bu bulgular literatürle uyumludur.

Aselüler dermal matrikslerle SVF kombinasyonunun potansiyel olarak kullanılabilceği bir diğer alanda postmastektomi silikon implantlarla gerçekleştirilmiş meme rekonstrüksiyonlarıdır. Bu hasta grubunda ince yumuşak doku zarfı nedeniyle implantlar ekspoz olabilmekte ve estetik olarak yetersiz sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Dermal matriksler bu komplikasyonların önüne geçmek amacıyla sıkça kullanılmaktadır. Matrikslerin SVF ile kombinasyonu içerdikleri ve sekrete ettikleri parakrin faktörler nedeniyle matriks remodeling ve integrasyonuna yardım edebileceği görüşündeyiz. Aynı zamanda aselüler matriksin yeniden göç eden hücrelerle remodeling sonucunda lizis oranlarını azaltabileceği görüşündeyiz.

Fiziksel, enzimatik ve kimyasal üç yönteminde beraber kullanılarak gerçekleştirilen ilk deselülerize adipoz matriks üretimi 2010 yılında Flynn tarafından gerçekleştirilmiştir⁸³. Deselülerize adipoz matrikslerle ilgili ilk in vitro çalışma Flynn tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada deselülerize adipoz matriks hücre iskelesi üzerine ADSC ekimi yapılmış ve herhangi bir diferensiyasyon faktörü kullanılmadan peroxisome proliferative activated receptor gamma (PPAR gama), glycerol-3-

phosphate dehydrogenase (GPDH) aktivitelerinde ve adipojenik gen ekspresyonlarında artış tespit edilmiştir⁸³. Farklı in vitro çalışmalarla da ADSC'lerin deselülerize adipoz matriks içinde büyüyüp geliştiği ve diferansiye olabildiği gösterilmiştir^{50,84}.

Aynı zamanda deselülerize adipoz matriksler ADSC^{50,84,85,107}, FGF⁸⁶ ve SVF⁸⁷ ile zenginleştirilerek enjekte edilmiş ya da yerleştirilmiştir. Araştırmacılar DAM hücre iskelelerinin volümlerini koruyabildiğini, anjiogenez ve neovaskülarizasyonu güçlü bir şekilde desteklediğini ve biyouyumlu bir materyal olup minimal inflamatuvar reaksiyonlara yol açtığını tespit etmişlerdir^{88,107}.

Literatürde detaylı araştırma yapıldığında mevcut deselülerize matrikslerin yukarıda bahsetmiş olduğumuz kolay, hızlı ve ekonomik bir kök hücre elde etme yöntemi olan SVF ile uygulaması sadece tek bir makalede incelenmiştir⁸⁷. Bu çalışmada domuz yağ dokusundan elde edilen ECM tozu, SVF ile zenginleştirilip farelerin sırt bölgesine enjekte edilmiş ve 6 hafta takip edilmiş. ECM+SVF verilen grup ECM+DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media) verilen grup ile karşılaştırılmış. SVF ile zenginleştirilmiş grubun kollajen dağılımının daha organize olduğu, remodeling mekanizmalarının daha iyi gerçekleştiği izlenmiş. CD 31 ile yapılan immün boyamalarda her iki grupta da neovaskülarizasyon izlenmiş ancak SVF verilen grupta daha belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda yapılan PCR ile PPAR γ , α 2, adipo-nectin ve leptin ekspresyonları incelenmiş gene SVF grubunun anlamlı düzeyde daha biyoaktif olduğu anlaşılmıştır.

Kokai vd. yapmış oldukları bir çalışmada kadavra kaynaklı yağ dokusu deselülerize matriks olarak insan deneklerde el dorseline enjekte edilip 4 ay boyunca takip edilmiş¹⁰⁸. Deneklere ortalama 2,5cc-5,5cc aralığında deselülerize adipoz matriks serum fizyolojik ile sulandırılarak enjekte edilmiş. Matriksin subkutanöz enjeksiyondan sonra herhangi bir yabancı cisim reaksiyonuna, enfeksiyona, alerjik reaksiyona yol açmadığı ve biyolojik olarak uyumlu bir materyal olduğu izlenmiş. Enjeksiyon yapılan el dorsalinde cilt kalınlığında ve kalitesinde artış olduğu tespit edilmiş. Aynı zamanda 4. Ay sonunda deneklerden birinden alınan biyopsi materyalinin Perilipin A ile pozitif boyandığı ve kümeler şeklinde adipoz doku depozitleri izlenmiş. Sonuç olarak insan deneklerde yapılan bu ön çalışma ile allogreft

deselüleri adipoz matriksin içerdği adipojenik ve anjiyogenik özellikler ile yumuşak doku rejenerasyonu sağladığı kanıtlanmıştır.

SVF ile zenginleştirilmiş deselüleri adipoz matriks grubunun histopatolojik olarak integrite, kollajen remodeling ve neovaskülarizasyon bakımından SF grubuna göre anlamlı düzeyde üstün bulduk. Bulgular literatürle uyumlu gözükmektedir. Kist ve vakuol oluşumu bulgularında ise iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Buna sebep olarak verilen matriksin hücresiz, avasküler ve cansız bir bileşen olması düşünülmüştür. Her iki grupta kist ve vakuol görünümü dikkat çekmiştir. Çalışma süresinin 60 gün ile sınırlı olması sebebiyle lipogenez süreci ve akabinde oluşabilecek kist/vakuol bulguları daha uzun süreli çalışmalar ile araştırılabilir.

Deselüleri kırık matriksler rejenerasyon potansiyellerini arttırmak amaçlı farklı hücre tipleri ile zenginleştirilmiştir. Bu zenginleştirme işlemleri in vitro kondrojenizasyonu indüklemekte in vivo olarak iyileşme sürecini desteklemektedir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri¹⁰⁹⁻¹¹¹, sinovium kökenli mezenkimal kök hücreler¹¹², infrapatellar yağ yastıkçığı kök hücreleri¹¹³, kondrositler ve ADSC^{114,115} ler kırık matriks rejenerasyonunda kullanılan hücrelere örnek gösterilebilir. Bu hücrelerden literatürde en sık kullanılmış olan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerdir. Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ile zenginleştirme sonrasında glikozaminoglikan, tip 2 kollajen ve kondrojenizasyonda artış dikkati çekmiştir¹¹¹.

Yin vd. ürettikleri deselüleri kırık matriksleri in vitro olarak artiküler kondrositler ve ADSC hücreleri ile kombine etmiş. Ardından in vivo olarak kırık defekt modeline implante edip 3 ve 6. aylarda sonuçları incelemiştir. İn vitro olarak kondrositlerin ve ADSC hücrelerinin ECM yüzeyine hızlıca tutundukları uygun şekilde çoğalabildikleri ve yüksek viabilite gösterdikleri tespit edilmiştir. Aynı zamanda mikrogravite uygulanan kültür ortamında dışardan büyüme faktörü uygulanmadan ADSC hücrelerinin kondrojenik fenotip gelişimi gösterdiği izlenmiştir. Ardından in vivo olarak tavşan eklemine oluşturulan osteokondral defekte hücre kültürleri ile zenginleştirilmiş deselüleri matriksler implante edilmiş. Artiküler kondrosit grubu ve ADSC grubunda 6 ay sonunda eşit düzeyde kırık onarımı bulguları izlenmiştir. Her iki grupta deselüleri matriksin tek başına verildiği kontrol

grubuna göre anlamlı olarak daha üstün kıkırdak iyileşmesi göstermiştir. Bu bulgular ile ADSC hücrelerinin kondrositler ile eşit düzeyde iyileşme göstermeleri ve ek olarak büyüme faktörü kullanılmadan kondrojenik diferensiasyon göstermesi kıkırdak doku mühendisliğinde ümit vaad etmektedir. ADSC lerin liposuction gibi kolay bir uygulama ile elde edilmesi, minimal donör saha morbiditesi oluşturması dikkat çeken avantajlarıdır.

SVF ile zenginleştirilmiş kıkırdak ECM grubunun histopatolojik olarak, kollajen remodeling, neovaskülarizasyon ve nükleer materyal oluşumu bakımından SF grubuna göre anlamlı düzeyde üstün bulduk. Bulgular literatürle uyumlu gözükmektedir. Kıkırdak doku difüzyonla beslenen kapiller ağ desteği olmayan ve rejenerasyon kabiliyeti çok düşük bir dokudur. Histopatolojide deselülerize olan boş kıkırdak lakünalarının 2 ay sonunda nükleer materyal içermesi umut vericidir. Bu durumu yağ ve kıkırdak dokunun ortak mezenkimal kökenden gelmesine bağlamaktayız. Bu durum SVF'in içerdiği ADSC 'lerin kondrojenik değişim geçirebildiğini ortaya koymaktadır.

Deselülerize kıkırdak matriksler incelendiğinde literatürdeki birçok çalışmanın osteoartrit modellerinde ve ortopedik cerrahi alanında olduğu dikkat çekmektedir. Kıkırdak matriksin dolgu materyali olarak denendiği bir çalışma ile karşılaşmadık. Bu noktada deselülerize kıkırdak matriksin dolgu materyali olarak rinoplasti sonrası oluşan saddle nose deformitesi gibi durumlarda ya da 3 boyutlu olarak şekillendirilip revizyon rinoplasti operasyonlarında kullanım sahası oluşturabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda reolojik özellikleri ve sağ kalım süresi ile ilgili yapılacak ileri çalışmalardan sonra kalsiyum hidroksiapatit bazlı dolguların kullanım alanlarında deneme potansiyeli olduğunu düşünüyoruz.

Her üç dokunun inflamasyon sonuçları incelendiğinde sadece yağ ECM grubunda SVF içeren örneklerin SF grubuna göre daha az oranda inflame olduğu izlendi. Kıkırdak ve dermis materyallerinde gruplar arasında inflamasyon bakımından anlamlı fark yoktu. Materyaller makroskopik olarak değerlendirildiğinde ise kıkırdak grubunda kistik, inlame ve kapsüller oluşumlar çok daha fazla dikkat çekmekteydi. Bu durum kıkırdak dokunun daha dens ve yoğun bir doku olmasına ve deselülerizasyon

işlemi başarısının en düşük olan dokulardan biri olmasına bağlanabilir. Aynı zamanda daha dens olması yumuşak doku ile adaptasyonda zorlandığını düşündürmektedir.

İnsan kaynaklı SVF kullanımı zenogreft uygulaması olduğu için deney planında ratlara siklosporin ile immünbaskılama uygulandı. Kliniğimizde daha önceden uzmanlık tezi olarak yapılan insan deri ve yağ zenogreftlerinin, sıçanlara transferleri sonrası alıcı immün yanıtından korunduğu düşük doz siklosporin tedavi protokolü tercih edildi⁹⁶. Düşük doz siklosporin tedavisinde Towpik vd. sıçan allo deri greftlerinin 6 aydan fazla sağ kalımını gerçekleştiren doz esas alındı⁹⁷.

.Hayvanlarda ECM reddi oluşmaması verilen örneklerde kısmi kist bulguları gelişse bile totalde verilen 36 örnekten 30'unun deney sonunda patolojik inceleme aşamasına ulaşması anlamlı gözükmektedir. Dezavantaj olarak hayvanlardan iki tanesinin ilk bir ay içerisinde kilo kaybı sonrası gerçekleşen ölümleri siklosporin tedavisi ile ilişkili olabilir. Bu durumun önüne geçmek amaçlı aralıklı kan siklosporin düzeylerinin ölçümü ileri çalışmalarda gözönünde bulundurulabilir.

Bilindiği gibi atimik ve immünsüprese hayvanlarda T hücre aracılı yanıt engellenmekte yara iyileşme mekanizmaları bozulmaktadır. Bu sebeple elde ettiğimiz deselülerize matrikslerin native davranışlarını incelemek amaçlı normal immün cevabı olan deneysel modellerde de deneme gereksinimi olduğunu düşünüyoruz. Kadavra kaynaklı materyallere erişim oranı kısıtlı olduğu için zenojenik ürünlerin dolgu materyali potansiyellerini test etmek amaçlı normal immün cevabı olan hayvanlarla gerçekleştirilen in vivo çalışmaların literatüre kazandırılması gerektiğini düşünüyoruz.

Atimik hayvanlar pahalı, özel bakım koşulları gerektiren ve ülkemizde temini zor olan canlılardır. Uyguladığımız düşük doz immünbaskılama (16mg/kg) ile alternatif ve ekonomik bir çözüm yöntemi ortaya konulmuştur.

SONUÇ

Güncel pratikte hyaluronik asitler, yağ enjeksiyonu, sığır ve insan kollajenleri yumuşak doku dolgu materyali olarak sık kullanılan ürünlerdir. Bu ürünlerin tümünde yüksek rezorbsiyon oranları ve uzun dönem sonuçlarda instabilite en sık karşılaşılan problemlerdendir^{7,116}.

Herhangi bir avasküler organik materyal otolog olsa dahi beslenme yetersizliği sebebiyle yüksek oranda rezorbe olmakta ve viabilitesi azalmaktadır. Erken revaskülarizasyon ve erken kapiller ağ desteği ile bu avasküler dolgu materyallerinde rezorbsiyon oranını azaltmak mümkün olmaktadır. Bizim çalışmamızda da SVF grubunda daha iyi kollajen remodelingi olması ve absorpsiyon oranlarının daha düşük olmasını ADSC lerin sekrete etmiş olduğu anjiogenik faktörlere bağlamaktayız¹¹⁷. Erken vaskülarizasyon, beslenmenin erken başlaması implante edilen materyalde rezorbsiyon oranlarını azaltmaktadır. Bu sebeple içerisinde ADSC ler ve parakrin faktörler içeren SVF kolay elde edilebilme özelliği ile deselülerize ekstraselüler matrikslerle eş zamanlı uygulanarak rejeneratif potansiyele pozitif katkı sağlayabilen bir kombinasyon olarak karşımıza çıkmıştır.

SVF ile kombine edilen ekstraselüler matriks uygulamalarının içermiş oldukları ADSC'ler ve parakrin faktörler nedeniyle izole matriks uygulamalarına üstün olduğu sonucuna varmış bulunuyoruz. Hücre iskelelerinin SVF ile zenginleştirilerek verilmesi yanık rekonstrüksiyonu⁴⁹, dudak agumentasyonu, postmastektomi meme rekonstrüksiyonu⁷¹, yara iyileşmesi¹¹⁸, dolgu materyali olarak kullanım gibi bir çok alanda klinik sonuçları pozitif yönde etkileyeceğini düşünmekteyiz.

Deselülerize ekstraselüler matriks uygulamalarını içeren birçok deneysel çalışma modelinde atimik hayvan kullanımı dikkati çekmiştir. Uygulamış olduğumuz immünbaskılama protokolü ile bakımı özel koşullar isteyen ve pahalı olan atimik hayvan kullanımına alternatif ekonomik bir çözüm oluşturulmuştur.

Allojenik ya da zenojenik adipoz doku ekstraselüler matriks ürünlerini alıcıda dokuda sağladığı rejenerasyon ve hücre göçü ile yumuşak doku defektlerinde ümit vaad eden bir materyal olarak karşımıza çıkmaktadır. İleri çalışmalar ile üretilebilecek

ticari ürünler maksillofasial operasyonlar, rekonstrüktif işlemler, kontür düzeltme işlemleri gibi birçok alanda kullanım potansiyeli içermektedir. Bu şekilde otolog doku transfreri operasyonlarının birçok komplikasyonun önüne geçilebilir. Yumuşak doku rekonstrüksiyon işlemlerine ideal bir alternatif yöntem olarak değerlendirilebilir.

SVF ile zenginleştirme; kolay bir şekilde elde edilmesi, birçok farklı operasyon ile kombine edilebilmesi, zaman ve ekonomik tasarruf sağlaması, operasyon süresini uzatmaması gibi kök hücre izolasyon yöntemlerine göre bir çok avantaj içermektedir. Bu noktada yapılacak ileri çalışmalarla SVF ve ADSC tedavileri arasında anlamlı fark olup olmayacağının araştırılması gerektiğini düşünüyoruz. Kök hücrelerin sinyal molekülleri ile özelleştirme çalışmalarının klinik kullanıma girmesi için bilimsel dünya hızla gelişmektedir. Bu süreç içerisinde daha ilkel olmasına karşın pozitif etkilerinden ve pratik yönlerinden dolayı SVF tedavilerinin kullanılması mantıklı görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. American Society of Plastic Surgeons. 2016 Cosmetic Plastic Surgery Statistics. No Title.
2. Christensen L, Breiting V, Janssen M, Vuust J, Hogdall E. Adverse reactions to injectable soft tissue permanent fillers. *Aesthetic Plast Surg.* 2005;29(1):34-48. doi:10.1007/s00266-004-0113-6
3. Üçgül, İ , Aras S. Deselülerizasyon Yöntemleri ve Dokularda Kullanımı. *ANKA e- Dergi.* 2017;2(2):19-34.
4. Hoshiba T, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(12):1717-1728. doi:10.1517/14712598.2010.534079
5. Langer R and V. Tissue Engineering. *Science (80-).* 1993;260:920-926.
6. Banyard DA, Borad V, Amezcua E, Wirth GA, Evans GRD, Widgerow AD. Preparation, characterization, and clinical implications of human decellularized adipose tissue extracellular matrix (hDAM): A comprehensive review. *Aesthetic Surg J.* 2016;36(3):349-357. doi:10.1093/asj/sjv170
7. Buck DW, Alam M, Kim JYS. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg.* 2009;62(1):11-18. doi:10.1016/j.bjps.2008.06.036
8. Yaar M, Gilchrest BA. Skin aging: Postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. *Clin Geriatr Med.* 2001;17(4):617-630. doi:10.1016/S0749-0690(05)70089-6
9. Rohrich RJ, Rios JL, Fagien S. Role of new fillers in facial rejuvenation: A cautious outlook. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(7):1899-1902. doi:10.1097/01.PRS.0000097307.62862.27
10. Neuber F. Fetttransplantation. *Chir Kongr Verhandl Dtsch Gesellch Chir.* 1893;22:66.
11. Narins RS, Beer K. Liquid injectable silicone: A review of its history, immunology, technical considerations, complications, and potential. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3 SUPPL.):77-84. doi:10.1097/01.prs.0000234919.25096.67
12. Inamed Corporation. Product Information Sheet on Cosmo- Derm and CosmoPlast. Santa Barbara Calif.: Inamed Corp, 2003.
13. Miller PJ, Levine J, Ahn MS, Maas CS CM. Softform for facial rejuvenation: historical review, operative techniques, and recent advances. *Facial Plast Surg.* 2000;16(1):23-28.
14. Balazs, E.A., and Denlinger J. Clinical uses of hyaluronan. *Ciba Found Symp.* 1989;143(265).

15. Narins, R.S., Brandt, F., Leyden, J., Lorenc, Z.P., Rubin, M., and Smith S. A randomized, evaluator-blind, multicenter comparison of the efficacy and tolerability of Perlane versus Zyplast in the correction of nasolabial folds. *Dermatol Surg.* 2003;29(588). doi:10.1097/01.PRS.0000146704.02347.36
16. Eppley BL, Dadvand B. Injectable soft-tissue fillers: Clinical overview. *Plast Reconstr Surg.* 2006;118(4):98-106. doi:10.1097/01.prs.0000232436.91409.30
17. Van Nieuwenhove I, Tytgat L, Ryx M, et al. Soft tissue fillers for adipose tissue regeneration: From hydrogel development toward clinical applications. *Acta Biomater.* 2017;63:37-49. doi:10.1016/j.actbio.2017.09.026
18. Chajchir A BI. Fat grafting injection for soft tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84:921-934.
19. SR C. Facial recontouring with lipostructure. *Clin Plast Surg.* 1997;24:347-367.
20. Woodward J, Khan T, Martin J. Facial Filler Complications. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2015;23(4):447-458. doi:10.1016/j.fsc.2015.07.006
21. Coleman SR, Saboeiro AP. Fat grafting to the breast revisited: Safety and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 2007;119(3):775-785. doi:10.1097/01.prs.0000252001.59162.c9
22. Smith P, Adams WP, Lipschitz AH, et al. Autologous human fat grafting: Effect of harvesting and preparation techniques on adipocyte graft survival. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(6):1836-1844. doi:10.1097/01.prs.0000218825.77014.78
23. Abram Nguyen, Krystyna A. Pasyk, Theresa N. Bouvier, Cheryl A. Hassett LC, Argenta. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg.* 1990;85(3):378–386.
24. Theodore C. Kononas, Louis P. Bucky, Christine Hurley JWMJ. The fate of suctioned and surgically removed fat after reimplantation for soft-tissue augmentation: a volumetric and histologic study in the rabbit. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91(5):763–768.
25. H.W. Hörl, A.-M. Feller EB. Technique for Liposuction Fat Reimplantation and Long-Term Volume Evaluation by Magnetic Resonance Imaging. *Ann Plast Surg.* 1994;94(3):496–508.
26. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228. doi:10.1089/107632701300062859
27. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105
28. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294-1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342

29. Riordan NH, Ichim TE, Min WP, et al. Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J Transl Med.* 2009;7:1-9. doi:10.1186/1479-5876-7-29
30. Chang H, Do BR, Che JH, et al. Safety of adipose-derived stem cells and collagenase in fat tissue preparation. *Aesthetic Plast Surg.* 2013;37(4):802-808. doi:10.1007/s00266-013-0156-7
31. Baptista LS, Do Amaral RJFC, Carias RBV, Aniceto M, Claudio-Da-Silva C, Borojevic R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy.* 2009;11(6):706-715. doi:10.3109/14653240902981144
32. Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, et al. Isolation of adipose-derived stem cells: A comparison among different methods. *Biotechnol Lett.* 2014;36(4):693-702. doi:10.1007/s10529-013-1425-x
33. Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy.* 2013;15(8):979-985. doi:10.1016/j.jcyt.2013.04.001
34. Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, et al. Adipose tissue derived stem cells: In vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):1-15. doi:10.1186/scrt536
35. Premaratne GU, Ma LP, Fujita M, Lin X, Bollano E, Fu M. Stromal Vascular Fraction Transplantation as an Alternative Therapy for Ischemic Heart Failure: Anti-inflammatory Role. *J Cardiothorac Surg.* 2011;6(1):1-10. doi:10.1186/1749-8090-6-43
36. Atalay S, Coruh A, Deniz K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. *Burns.* 2014;40(7):1375-1383. doi:10.1016/j.burns.2014.01.023
37. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, et al. Cell-assisted lipotransfer: Supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3375-3382. doi:10.1089/ten.2006.12.3375
38. Kølle SFT, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, et al. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2013;382(9898):1113-1120. doi:10.1016/S0140-6736(13)61410-5
39. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: Supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32(1):48-55. doi:10.1007/s00266-007-9019-4
40. Paik KJ, Zielins ER, Atashroo DA, et al. Studies in Fat Grafting: Part V. Cell-Assisted Lipotransfer to Enhance Fat Graft Retention Is Dose Dependent. *Plast Reconstr Surg.* 2015;136(1):67-75. doi:10.1097/PRS.0000000000001367

41. Charles-De-Sá L, Gontijo-De-Amorim NF, Maeda Takiya C, et al. Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(4):999-1009. doi:10.1097/PRS.0000000000001123
42. Khademhosseini A, Langer R. Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials*. 2007;28(34):5087-5092. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.021
43. Ji C, Khademhosseini A, Dehghani F. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2011;32(36):9719-9729. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.003
44. Joshua R. Mauney, Carl Kirker-Head, Lauren Abrahamson GG, Vladimir Volloch DLK. Matrix-mediated retention of in vitro osteogenic differentiation potential and in vivo bone-forming capacity by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *J Biomed Mater Res Part A*. 2006;79(4):963-973. doi:10.1002/jbm.a
45. E. V. Wong. *Cells: Molecules and Mechanisms*. Axolotl Acad Publ Company, Louisville, KY. Published online 2009.
46. Watt FM, Driskell RR. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2010;365(1537):155-163. doi:10.1098/rstb.2009.0149
47. M P 2018. Hücre Kültürü Temelli Ekstraselüler Matriksin Doğal Niş ve Doku Mühendisliği İskelesinde Biyomimetik Bileşen Olarak Etkinliğinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Doktora Tezi.
48. Gilbert TW, Freund JM, Badylak SF. Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials. *J Surg Res*. 2009;152(1):135-139. doi:10.1016/j.jss.2008.02.013
49. Wainwright DJ, Bury SB. Acellular dermal matrix in the management of the burn patient. *Aesthet Surg J*. 2011;31(7 Suppl). doi:10.1177/1090820x11418202
50. Wang L, Johnson JA, Zhang Q, Beahm EK. Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomater*. 2013;9(11):8921-8931. doi:10.1016/j.actbio.2013.06.035
51. Fernández-Pérez J, Ahearne M. The impact of decellularization methods on extracellular matrix derived hydrogels. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-12. doi:10.1038/s41598-019-49575-2
52. Gulati AK. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg*. 1988;68(1):117-123. doi:10.3171/jns.1988.68.1.0117
53. Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F, et al. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*. 2003;143(3):201-208. doi:10.1016/j.jsb.2003.08.002

54. Woods T, Gratzner PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials*. 2005;26(35):7339-7349. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.066
55. Faulk DM, Carruthers CA, Warner HJ, et al. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater*. 2014;10(1):183-193. doi:10.1016/j.actbio.2013.09.006
56. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2004;1666(1-2):105-117. doi:10.1016/j.bbamem.2004.04.011
57. Dahl SLM, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*. 2003;12(6):659-666. doi:10.3727/000000003108747136
58. Akbay E. Decellularization Methods of Organ and Tissue for Regenerative Medicine Rejeneratif Tıpta Kullanılan Organ ve Doku Deselülerizasyon Yöntemleri. 2017;(December 2016).
59. Falke G, Yoo JJ, Kwon TG, Moreland R, Atala A. Formation of Corporal Tissue Architecture in Vivo Using Human Caverosal Muscle and Endothelial Cells Seeded on Collagen Matrices. *Tissue Eng*. 2003;9(5):871-879. doi:10.1089/107632703322495529
60. Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: Evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnol Bioeng*. 2002;79(2):211-216. doi:10.1002/bit.10281
61. Brown B, Lindberg K, Reing J, Stolz DB, Badylak SF. The basement membrane component of biologic scaffolds derived from extracellular matrix. *Tissue Eng*. 2006;12(3):519-526. doi:10.1089/ten.2006.12.519
62. Hodde JP, Record RD, Liang HA, Badylak SF. Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix. *Endothel J Endothel Cell Res*. 2001;8(1):11-24. doi:10.3109/10623320109063154
63. Khorramirouz R, Sabetkish S, Akbarzadeh A, Muhammadnejad A, Heidari R, Kajbafzadeh AM. Effect of three decellularisation protocols on the mechanical behaviour and structural properties of sheep aortic valve conduits. *Adv Med Sci*. 2014;59(2):299-307. doi:10.1016/j.advms.2014.08.004
64. 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. *Am J Sports Med*. 2005;33(8):1202-1209. doi:10.1177/0363546504271510
65. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675-3683. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014
66. Elder BD, Vigneswaran K, Athanasiou KA, Kim DH. Biomechanical, Biochemical, and Histological Characterization of Canine Lumbar Facet Joint Cartilage NIH Public Access. *Neurosurgery*. 2010;66(4):722-727. doi:10.1227/01.NEU.0000367616.49291.9F.Biomechanical

67. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011;32(12):3233-3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
68. Grauss RW, Hazekamp MG, Oppenhuizen F, Van Munsteren CJ, Gittenberger-De Groot AC, DeRuiter MC. Histological evaluation of decellularised porcine aortic valves: Matrix changes due to different decellularisation methods. *Eur J Cardio-thoracic Surg*. 2005;27(4):566-571. doi:10.1016/j.ejcts.2004.12.052
69. Tork S, Jefferson RC, Janis JE. Acellular Dermal Matrices: Applications in Plastic Surgery. *Semin Plast Surg*. 2019;33(3):173-184. doi:10.1055/s-0039-1693019
70. Sevin F 2014. Farklı İmplant Materyellerinin Aselüler Dermal Matriks Vaskülarizasyonuna Etkileri Uzmanlık Tezi Kırıkale.
71. Namnoum JD. Expander/implant reconstruction with AlloDerm: Recent experience. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(2):387-394. doi:10.1097/PRS.0b013e3181aee95b
72. Altman AM, Khalek FJA, Alt EU, Butler CE. Adipose tissue-derived stem cells enhance bioprosthetic mesh repair of ventral hernias. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(3):845-854. doi:10.1097/PRS.0b013e3181e6044f
73. Lang MS, Waite PD, Holmes JD, Nichols MR. A Clinical Study of AlloDerm in Lip Augmentation. *Am J Cosmet Surg*. 2000;17(4):233-242. doi:10.1177/074880680001700407
74. Kirschner RE, Cabiling DS, Slemple AE, Siddiqi F, Larossa DD, Losee JE. Repair of oronasal fistulae with acellular dermal matrices. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118(6):1431-1440. doi:10.1097/01.prs.0000239612.35581.c3
75. Elliott R HJ. Use of commercial porcine skin for wound dressings. *Plast Reconstr Surg*. 1973;52:401-405.
76. Badylak S, Lantz G, Coffey A GL. Small intestinal submucosa as a large diameter vascular graft in the dog. *J Surg Res*. 1989;47:74-80.
77. Choi JS, Yang HJ, Kim BS, et al. Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering. *J Control Release*. 2009;139(1):2-7. doi:10.1016/j.jconrel.2009.05.034
78. 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(17):4715-4724. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.046
79. Kim EJ, Choi JS, Kim JS, Choi YC, Cho YW. Injectable and Thermosensitive Soluble Extracellular Matrix and Methylcellulose Hydrogels for Stem Cell Delivery in Skin Wounds. *Biomacromolecules*. 2016;17(1):4-11. doi:10.1021/acs.biomac.5b01566
80. Kim JS, Choi JS, Cho YW. Cell-Free Hydrogel System Based on a Tissue-Specific Extracellular Matrix for In Situ Adipose Tissue Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(10):8581-8588. doi:10.1021/acsami.6b16783

81. Kochhar A, Wu I, Mohan R, et al. A comparison of the rheologic properties of an adipose-derived extracellular matrix biomaterial, lipoaspirate, calcium hydroxylapatite, and cross-linked hyaluronic acid. *JAMA Facial Plast Surg.* 2014;16(6):405-409. doi:10.1001/jamafacial.2014.480
82. Xia C, Mei S, Gu C, et al. Decellularized cartilage as a prospective scaffold for cartilage repair. *Mater Sci Eng C.* 2019;101(November 2018):588-595. doi:10.1016/j.msec.2019.04.002
83. 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(17):4715-4724. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.046
84. Poon CJ, Maria M V., Sinha S, et al. Preparation of an adipogenic hydrogel from subcutaneous adipose tissue. *Acta Biomater.* 2013;9(3):5609-5620. doi:10.1016/j.actbio.2012.11.003
85. Han TTY, Toutounji S, Amsden BG, Flynn LE. Adipose-derived stromal cells mediate in vivo adipogenesis, angiogenesis and inflammation in decellularized adipose tissue bioscaffolds. *Biomaterials.* 2015;72:125-137. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.08.053
86. Zhang S, Lu Q, Cao T, Toh WS. Adipose tissue and extracellular matrix development by injectable decellularized adipose matrix loaded with basic fibroblast growth factor. *Plast Reconstr Surg.* 2016;137(4):1171-1180. doi:10.1097/PRS.0000000000002019
87. Lu Y, Jia C, Bi B, et al. Injectable SVF-loaded porcine extracellular matrix powders for adipose tissue engineering. *RSC Adv.* 2016;6(58):53034-53042. doi:10.1039/c6ra09543g
88. Dong J, Yu M, Zhang Y, Yin Y, Tian W. Recent developments and clinical potential on decellularized adipose tissue. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2018;106(9):2563-2574. doi:10.1002/jbm.a.36435
89. Altman AM, Matthias N, Yan Y, et al. Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials.* 2008;29(10):1431-1442. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.11.026
90. Orbay H, Takami Y, Hyakusoku H, Mizuno H. Acellular dermal matrix seeded with adipose-derived stem cells as a subcutaneous implant. *Aesthetic Plast Surg.* 2011;35(5):756-763. doi:10.1007/s00266-011-9683-2
91. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(5):422-432. doi:10.1186/ar1210
92. Fortier LA, Chapman HS, Pownder SL, et al. BioCartilage improves cartilage repair compared with microfracture alone in an equine model of full-thickness cartilage loss. *Am J Sports Med.* 2016;44(9):2366-2374. doi:10.1177/0363546516648644

93. Wang JQ, Fan J, Gao JH, Zhang C, Bai SL. Comparison of in vivo adipogenic capabilities of two different extracellular matrix microparticle scaffolds. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131(2):174-187. doi:10.1097/PRS.0b013e3182789bb2
94. Ventura RD, Padalhin AR, Park CM, Lee BT. Enhanced decellularization technique of porcine dermal ECM for tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C*. 2019;104(June). doi:10.1016/j.msec.2019.109841
95. Pati F, Jang J, Ha DH, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun*. 2014;5. doi:10.1038/ncomms4935
96. Dilek O F 2019. Siklosporinle İmmunsupresyon Sağlanan Sıçanlarda İnsan Yağ Greftlerinin Sağkalımı ve Histopatolojisinin Araştırılması :Tıpta Uzmanlık Tezi Isparta.
97. Towpik Edward TNL. The Potential Use of Cyclosporine in Reconstructive Surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1985;76(2):312-322.
98. Yi CG, Xia W, Zhang LX, et al. VEGF gene therapy for the survival of transplanted fat tissue in nude mice. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2007;60(3):272-278. doi:10.1016/j.bjps.2006.01.052
99. Rutgers M, van Pelt MJP, Dhert WJA, Creemers LB, Saris DBF. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthr Cartil*. 2010;18(1):12-23. doi:10.1016/j.joca.2009.08.009
100. Yin H, Wang Y, Sun X, et al. Functional tissue-engineered microtissue derived from cartilage extracellular matrix for articular cartilage regeneration. *Acta Biomater*. 2018;77:127-141. doi:10.1016/j.actbio.2018.07.031
101. Sclafani AP, Romo T, Jacono AA, McCormick S, Cocker R, Parker A. Evaluation of acellular dermal graft in sheet (AlloDerm) and injectable (micronized AlloDerm) forms for soft tissue augmentation. *Clinical observations and histological analysis. Arch facial Plast Surg Off Publ Am Acad Facial Plast Reconstr Surgery, Inc Int Fed Facial Plast Surg Soc*. 2000;2(2):130-136. doi:10.1001/archfaci.2.2.130
102. Sclafani AP, Romo T, Jacono AA, McCormick SA, Cocker R, Parker A. Evaluation of Acellular Dermal Graft (AlloDerm) Sheet for Soft Tissue Augmentation. *Arch Facial Plast Surg*. 2001;3(2):101-103. doi:10.1001/archfaci.3.2.101
103. Young DA, Ibrahim DO, Hu D, Christman KL. Injectable hydrogel scaffold from decellularized human lipoaspirate. *Acta Biomater*. 2011;7(3):1040-1049. doi:10.1016/j.actbio.2010.09.035
104. Won JY, Lee MH, Kim MJ, et al. A potential dermal substitute using decellularized dermis extracellular matrix derived bio-ink. *Artif Cells, Nanomedicine Biotechnol*. 2019;47(1):644-649. doi:10.1080/21691401.2019.1575842
105. Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: Activation of dermal fibroblast by secretory factors. *J Dermatol Sci*. 2009;53(2):96-102. doi:10.1016/j.jdermsci.2008.08.007

106. Kim WS, Park BS, Sung JH, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48(1):15-24. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.05.018
107. Wu I, Nahas Z, Kimmerling KA, Rosson GD, Elisseff JH. An injectable adipose matrix for soft-tissue reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(6):1247-1257. doi:10.1097/PRS.0b013e31824ec3dc
108. Kokai LE, Schilling BK, Chnari E, et al. Injectable Allograft Adipose Matrix Supports Adipogenic Tissue Remodeling in the Nude Mouse and Human. *Plast Reconstr Surg.* 2019;143(2):299e-309e. doi:10.1097/PRS.0000000000005269
109. Benders KEM, Boot W, Cokelaere SM, et al. Multipotent Stromal Cells Outperform Chondrocytes on Cartilage-Derived Matrix Scaffolds. *Cartilage.* 2014;5(4):221-230. doi:10.1177/1947603514535245
110. Sutherland AJ, Detamore MS. Bioactive Microsphere-Based Scaffolds Containing Decellularized Cartilage. *Macromol Biosci.* 2015;15(7):979-989. doi:10.1002/mabi.201400472
111. Yang Z, Shi Y, Wei X, et al. Fabrication and repair of cartilage defects with a novel acellular cartilage matrix scaffold. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2010;16(5):865-876. doi:10.1089/ten.tec.2009.0444
112. Bautista CA, Park HJ, Mazur CM, Aaron RK, Bilgen B. Effects of chondroitinase ABC-Mediated proteoglycan digestion on decellularization and recellularization of articular cartilage. *PLoS One.* 2016;11(7):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0158976
113. Luo L, Eswaramoorthy R, Mulhall KJ, Kelly DJ. Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2016;55:21-31. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.10.002
114. Yin H, Wang Y, Sun X, et al. Functional tissue-engineered microtissue derived from cartilage extracellular matrix for articular cartilage regeneration. *Acta Biomater.* 2018;77:127-141. doi:10.1016/j.actbio.2018.07.031
115. Schneider C, Lehmann J, Van Osch GJVM, et al. Systematic comparison of protocols for the preparation of human articular cartilage for use as scaffold material in cartilage tissue engineering. *Tissue Eng - Part C Methods.* 2016;22(12):1095-1107. doi:10.1089/ten.tec.2016.0380
116. Rohrich RJ, Monheit G, Nguyen AT, Brown SA, Fagien S. Soft-tissue filler complications: The important role of biofilms. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(4):1250-1256. doi:10.1097/PRS.0b013e3181cb4620
117. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation.* 2004;109(10):1292-1298. doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1
118. Liu S, Zhang H, Zhang X, et al. Synergistic angiogenesis promoting effects of extracellular matrix scaffolds and adipose-derived stem cells during wound repair. *Tissue Eng - Part A.* 2011;17(5-6):725-739. doi:10.1089/ten.tea.2010.0331