

T.C. İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ADİPOZ DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE,
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İLE BİRLİKTE, DESELÜLERİZE
EDİLMİŞ İNSAN YAĞ DOKU EKSTRASELÜLER MATRİKSİNİN DOKU
İSKELESİ OLARAK KULLANILMASI**

DR. GAMZE BEKTAŞ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAKAN DARICI

KÖK HÜCRE VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2022

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Fevziye Figen KAYMAZ

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Abdullah OLGUN

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

Prof. Dr. Fevziye Figen KAYMAZ

İstinye Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi :Hakan DARICI

İstinye Üniversitesi

Doç. Dr.Emrah Şefik Abamor

Yıldız Teknik Üniversitesi

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “Adipoz doku mühendisliğinde, mezenkimal kök hücre ile birlikte, deselülerize edilmiş insan yağ doku ekstraselüler matriksinin doku iskelesi olarak kullanılması” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dr. Gamze BEKTAŞ

İTHAF

‘‘Benim manevi mirasım bilim ve akıldır’’ sözünün sahibi Cumhuriyetimiz’in kurucusu Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK’e ve tüm bilim kadınlarına ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman yüreklendiren, hiçbir zaman bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, her zaman desteğini üzerimde hissettiğim tez dönemim boyunca da üstümden ilgisini ve emeğini hiç eksik etmeyen, bilime her zaman teşvik eden, öğrencilere her zaman bilgilerini aktarmayı seven, inceliğini hiç bozmayan sevgili danışman hocam, Dr. Hakan Darıcı'ya

Bilimsel çalışmalarıyla kendisine hayran olduğum, kök hücre ve doku mühendisliği alanına ilgi duymamı sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e

Tez dönemim boyunca beni cesaretlendiren ve her yardıma ihtiyacım olduğunda bana destek olan arkadaşlarım Aslı Oyunlu, Ceren Özdemir, Anı Çinpolat, Zumreta Rizvanoviç'e

Yüksek lisans dönemim içerisinde bilgilerinden büyük yarar sağladığım hocalarım; Dr. Oktar GÜLOĞLU, Dr. Ayca Zeynep İLTER, Dr. Özgür TATAROĞLU, Dr. Cenk ANDAÇ ve Dr. Ayça BAL ÖZTÜRK 'e destek ve yardımları için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimin son döneminde tanışma fırsatı bulduğum değerli hocam Prof. Dr. Fevziye Figen KAYMAZ'a destek ve anlayışı için ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
ETİK BEYANI	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Yağ Dokusu Fizyolojisi	5
2.2. Adipoz Dokunun Kök Hücre İçeriği.....	7
2.3. Doku Mühendisliği	8
2.4. Adipoz Doku Mühendisliği	10
2.5. Adipoz Doku Mühendisliğinin Temel Gereksinimleri ve Değerlendirilmesi.....	12
2.6. Adipoz Doku Mühendisliği için Biyomalzemeler	14
2.6.1. Sentetik polimerler.....	14
2.6.2. Doğal polimerler.....	16
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Etik Onay	19
3.2. Kimyasal Malzemeler	19
3.3. Sarf Malzemeler	20
3.4. Hücre Hatları	20
3.5. Kullanılan Cihazlar	20
3.6. Primer Dizileri.....	21
3.7. ADKH'lerin In Vitro Çalışmalar için Hazırlanması	21
3.7.1. ADKH'ların stoktan çıkartılması.....	21
3.7.2. ADKH pasajlanması.....	22

3.7.3. Thoma lamı ile ADKH sayımı	22
3.7.4. Hidrojel hazırlama prosedürü	23
3.8. Deselülerize Matriks Hazırlanması	23
3.8.1. Adipoz doku alım prosedürü	23
3.8.2. Adipoz doku deselülerizasyonu.....	23
3.8.3. Hücre iskeletinin histolojik ve immünohistokimyasal karakterizasyonu	25
3.9. Adipoz Kaynaklı Kök Hücrelerin Doku İskelesi Üzerinde Kültüre Edilmesi.....	26
3.10. Adipojenik Fakılaşmanın İndüklenmesi.....	28
3.11. Oil-Red-O Boyama.....	28
3.12. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu) Analizi.....	29
3.12.1. RNA izolasyonu.....	30
3.12.2. cDNA.....	30
3.12.3. RT-PCR.....	31
4. BULGULAR.....	33
4.1. Deselülerizasyon süreci.....	33
4.2. Hücre ekim sonuçları.....	33
4.3. Oil-red-O boyama sonuçları	33
4.4. cDNA sonuçları	36
4.5. RT-PCR Sonuçları	37
5. TARTIŞMA.....	40
6. SONUÇ.....	46
KAYNAKÇA.....	47
EKLER.....	57
EK-1: İNTİHAL RAPORU.....	58
EK-2: ETİK KURUL ONAYI	59
EK-3: ÖZGEÇMİŞ.....	61

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1:Mühendislik ürünü oluşturulan yağ dokusunun biyokimyasal fonksiyonlarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yöntemler.....	13
Tablo 2.2: Adipoz doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan sentetik materyaller.....	15
Tablo 2.3: Adipoz doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan doğal malzemeler.....	17
Tablo 3.1: RT-PCR primer dizileri	21
Tablo 4.1: cDNA'lerin nanodrop cihazında ölçümü	36



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Beyaz adipoz doku (BAD) ve kahverengi adipoz doku (KAD) mikroskopik görünümü (Bargut ve ark., 2017)	7
Şekil 2.2: Doku mühendisliğinde ihtiyaç duyulan dokuların vücut dışında yani in vitro olarak uygun kök hücreler ile ve biyouyumlu iskele malzemeler ile inşa edilmesi (Sengupta ve ark., 2014)	9
Şekil 3.1: Doku süspansiyonunun kimyasallar ile yıkanması	25
Şekil 3.2: Liyofize edilen deselülerize ekstraselüler matriks (DAM).....	25
Şekil 3.3: Dat, dat ve hidrojel in hidrate edilerek küçük parçalara ayrılması ve 12 –kuyucuklu kültür kaplarına yerleştirilmesi	27
Şekil 3.4: Doku iskelelerinin üzerine ve boş olan kontrol grubuna her bir kuyucukta 3x10 ⁴ hücre olacak şekilde doku iskelelerinin üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.....	27
Şekil 3.5: Oil-Red-O Boyama sonrası floresans Mikroskopunda kırmızı lipid damlacıklarının görüntülenmesi.....	29
Şekil 3.6: RNA konsantrasyonlarını ölçmek için kullandığımız cDNA thermal cycler cihazı...	31
Şekil 3.7: Real time PCR için kullandığımız StepOne Plus qRT-PCR, Applied Biosystem cihazı	32
Şekil 4.1: Deney gruplarında oil-red-o boyama sonrası makroskopik görünüm	34
Şekil 4.2: Kontrol grubunda oil-red-o boyama sonrası mikroskopik görünüm.	34
Şekil 4.3: ECM grubunda oil-red-o boyama sonrası mikroskopik görünüm.	35
Şekil 4.4: ECM+jel grubunda oil-red-o boyama sonrası mikroskopik görünüm.....	35
Şekil 4.5: İki boyutlu kontrol grubu (farklılaşma medyumuna ilave edilen ADKH) 15. günde hücrelerde farklılaşma, yağ damlacıklarının birikimi ile net şekilde görünüyor	36
Şekil 4.6: RT-PCR amplifikasyon grafiği.....	37
Şekil 4.7: Deney gruplarında LPL gen ifadesinin grafiği	38
Şekil 4.8: Deney gruplarında PPAR γ gen ifadesinin grafiği.....	38
Şekil 4.9: Deney gruplarında ALP gen ifadesinin grafiği	38
Şekil 4.10: Deney gruplarında CD 90 gen ifadesinin grafiği	39
Şekil 4.11: Deney gruplarında COMP gen ifadesinin grafiği	39

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

2B	: İki boyutlu
3B	: Üç boyutlu
ADKH	: Adipoz kaynaklı kök hücreler
ADK-MKH	: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler
ALP	: Alkalen fosfataz
BAD	: Beyaz adipoz doku
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü 2
CAD	: Computer Aided Design; Bilgisayar Destekli Tasarım
CD	: Cluster of Differentiation
cDNA	: Komplementer DNA
COMP	: Cartilage Oligomeric Matrix Protein
DAM	: Deselülerize adipoz matriks
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sulfoksit
DOD	: Drop on Demand; Talep üzerine damla
GAPDH	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
ECM	: Ekstraselüler Matriks
NEAA	: Esansiyel olmayan amino asit
FDA	: ABD Gıda ve İlaç İdaresi
FBS	: Fetal Sığır Serum
KAD	: Kahverengi adipoz doku
KİK-MKH	: Kemik iliği kökenli- mezenkimal kök hücreler
LPL	: Lipoprotein lipaz
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltisi
PPARγ	: Peroksizom proliferator-activated receptor gamma
ECS	: Embriyonik Kök Hücre
PLA	: Polilaktik asit
PGA	: Poliglikolik asit
PLGA	: Polilaktik glikolik asit
PCL	: Poli kaprolakton

DNA	: Deoksiribon�kleikasit
RNA	: Ribon�kleikasit
RT-PCR	: Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris Asetat EDTA
THY1 (CD90)	: Thy-1 Cell Surface Antigen
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü



ÖZET

BEKTAS, G. (2022). Adipose doku mühendisliğinde, mezenkimal kök hücre ile birlikte, deselülerize edilmiş insan yağ doku ekstraselüler matriksinin doku iskelesi olarak kullanılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre ve Doku Mühendisliği ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.TÜRKİYE

Plastik cerrahi alanında; kanser, travma, yanık sonrası veya doğumsal deformiteler nedeniyle oluşan yumuşak doku defektlerinin rekonstrüksiyonu büyük önem arz etmektedir. Birçok sentetik ve doğal materyal ya da hastanın kendi dokuları ile rekonstrüksiyon yöntemi eksik olan dokuyu yerine koymak için geliştirilmiş, test edilmiş ve kullanılmıştır. Fakat sonuçlar tatmin edici değildir. Sentetik materyaller yabancı cisim reaksiyonuna yol açmakta, doğal materyaller çabuk rezorbe olmakta, kendi dokusu ile rekonstrüksiyon ise donör alan morbiditesine yol açmaktadır.

Hastaların kendi dokuları ile rekonstrüksiyon seçenekleri arasında olan otolog yağ transplantasyonu, deplase alanları doldurmak için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Fakat bu tedavide zamanla %10-90 arasındaki hacim kaybı görülmesi, kullanım alanlarını çok sınırlandırmakta ve zorlaştırmaktadır. Çözüm arayışında adipoz doku mühendisliği gündeme gelmektedir. Biz bu çalışmamızda, insan yağ dokusundan elde edilen deselülerize ekstraselüler matriks doku iskelesi üzerine mezenkimal kök hücre ekimi yaptığımız adipoz doku mühendisliği yönteminin etkinlik ve güvenilirliğini değerlendirmeyi amaçladık.

Estetik amaçlı operasyon sonrası normalde atılacak olan fazla dokuların toplanması ile elde edilen yağ dokusu, ekstraselüler matriks (ECM) yapımında kullanılmıştır. Hücreleştirme için yıkama, santrifügasyon, fiziksel ve kimyasal yöntemlerin kombinasyonu kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre (ADKH), çalışma grubu olarak ECM+ADKH ve ECM+hidrojel+ADKH grupları oluşturulmuştur. Gruplar farklılaşma medyumuna eklenerek kültüre edilmiş, 14. günlerde mikroskopta bakılarak fotoğraflanmış, 15. günde oil red o boyama yapılmış ve RNA izolasyonu ile adipojenik genlerin ekspresyon düzeyi incelenmiştir.

Sonuçlarda, ECM+ADKH ve ECM+hidrojel+ADKH gruplarında 14. günde adipojenik yönde bir farklılaşma olduğu, Oil Red O boyama sonuçlarında ise bu hücrelerde kapsamlı hücre içi lipid birikimi olduğu gözlemlendi ve yine bu gruplarda adipojenik genlerin ifade edildiği tespit edildi.

Yağ dokusu, doku mühendisliği uygulamaları için hem adipoz kaynaklı kök hücre hem de ECM içeren zengin ve harcanabilir bir kaynaktır. Özellikle sağlıklı hastalardan estetik amaçlı olarak alınan fazla yağ dokusunun, adipoz doku mühendisliğinde kullanılabilecek olması klinik uygulamalar için büyük umut vadetmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adipoz doku mühendisliği, Deselülerize adipoz matriks, Ekstraselüler matriks, Mezenkimal kök hücre.

ABSTRACT

BEKTAS, G. (2022). Use of decellularized human adipose extracellular matrix as scaffold in adipose tissue engineering, together with mesenchymal stem cells. Istinye University Institute of Health Sciences, Stem Cell and Tissue Engineering. Master Thesis. Istanbul. TURKEY

In the field of plastic surgery, reconstruction of soft tissue defects caused by cancer, trauma, post-burn or congenital deformities has a great importance. Many synthetic and natural materials or reconstruction methods with the patient's own tissues have been developed, tested, and used to replace the missing tissue. But the results are not satisfactory. Synthetic materials cause foreign body reaction, natural materials resorb quickly, and reconstruction with own tissue causes donor site morbidity.

Autologous fat transplantation is a frequently used treatment method to fill the displaced areas in these patients. However, the volume loss of 10-90% over time in this treatment limits and complicates the areas of use. In the search for solution, adipose tissue engineering comes to the fore. In our study, we aimed to evaluate the efficacy and safety of the adipose tissue engineering method, which we performed with mesenchymal stem cell transplantation on decellularized adipose extracellular matrix tissue scaffold.

The adipose tissue obtained by collecting the excess tissues that would normally be discarded after the operation for aesthetic purposes was used in the construction of the extracellular matrix (ECM). A combination of washing, centrifugation, physical and chemical methods was used for decellularization. Adipose-derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) group was formed as the control group, and ECM+ADMSC and ECM+hydrogel+AD-MSC groups were formed as the study group. The groups were cultured by adding differentiation medium, photographed under a microscope at 14th day, oil red-o staining was performed on the 15th day, and the expression level of adipogenic genes was examined by RNA isolation.

In the results, it was observed that there was an adipogenic differentiation on the 14th day in the ECM+ ADMSC and ECM+hydrogel+ADMSC groups, and extensive intracellular lipid accumulation was observed in these cells in the Oil Red O staining results, and it was determined that adipogenic genes were expressed in these groups.

Adipose tissue is a rich and expendable resource containing both adipose-derived stem cells and ECM for tissue engineering applications. The fact that excess adipose tissue taken from healthy patients for aesthetic purposes can be used in adipose tissue engineering shows great promise for clinical applications.

Keywords: Adipose tissue engineering, Decellularized adipose matrix, Extracellular matrix, Mesenchymal stem cell.

1.GİRİŞ

Yumuşak doku kayıpları; tümör rezeksiyonu sonrası, travma ve yanıklar sonrası veya konjenital anormalliklerin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Plastik cerrahi, kaybedilen dokunun yeniden ve 'benzeri gibi' inşa edilmesi hedefi temelinde bir uzmanlık alanı olarak gelişmiştir (Gillies ve Millard 1957). Yumuşak doku rekonstrüksiyonu her zaman plastik cerrahinin temelini oluşturacaktır. Doğal doku ile kozmetik, yapısal ve mekanik benzerlik gösteren bir rekonstrüksiyon sağlamak ana klinik amaçtır.

Plastik cerrahi ünitelerinde her yıl travma, doğumsal deformite ve tümör rezeksiyonu nedeniyle oluşan yumuşak doku defektlerinin rekonstrüksiyonu için çok sayıda işlem yapılmaktadır. Yumuşak doku rekonstrüksiyonuna yönelik standart yaklaşımlar; vaskülarize otolog doku flepleri, alloplastik implantlar ve otolog yağ transplantasyonudur (Mughal ve ark., 2021). Her yöntemin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Vaskülarize otolog flep tedavileri tipik olarak, pediküllü veya mikrocerrahi anastomozlu 'flep 'ismi verilen yumuşak doku transpozisyonu ile yapılır, yani kan dolaşım kaynağı ile beraber transfer edilen büyük bir yumuşak doku kitlesini ifade eder (Ashinoff, 2000). Bu flepler sadece yağ dokusu içerebileceği gibi, yağ ve deri, kas, kemik ya da fasya dokusunun beraberinde transferini de içerebilir.

Standart rekonstrüksiyon yöntemi olan bu flep transferleri, yumuşak doku örtüsünü veya meme rekonstrüksiyonu gibi alanlarda gerekli volümü sağlamada oldukça başarılıdır, ancak donör bölgelerde morbidite olmadan kullanılamazlar. Donör saha morbiditesi, donör sahada estetik ve fonksiyonel bozukluk en önemli dezavantajlarıdır. Ayrıca vasküler yetersizlik olması halinde kısmi veya total flep kaybı, yağ nekrozu, zaman içerisinde flepte hacim kaybı karşılaşılabilecek diğer sorunlardır.

Alloplastik implantlar ise yumuşak doku rekonstrüksiyonunda otolog dokuya alternatif olarak kullanılan ürünlerdir. Donör saha morbiditesinin olmaması, gerekli alana özel şekil ve büyüklükte imal edilebilir olması, ürün ve biyomateryal çeşitliliği önemli avantajlarıdır. Ancak enfeksiyon, hematoma gibi implantın geri çıkarılmasına sebep olacak akut komplikasyonlar ya da implant rüptürü, implant migrasyonu ve yabancı cisim

reaksiyonuna bağlı kapsüler kontraktür gibi uzun vadeli komplikasyonlar görülebilmektedir (Beahm ve Walton, 2009). Diğer bir yumuşak doku rekonstrüksiyon seçeneği olan otolog yağ transferi ise, son on yılda giderek artan bir şekilde kullanılmaya başlamıştır. Bu teknik hastanın fazla yağ dokusu içeren bölgelerinden alınan yağın onu besleyen bir damarsal yapı olmaksızın ihtiyaç olan bölgeye enjeksiyon yöntemi ile verilmesini tanımlar. Bir dizi plastik cerrahi operasyonunda, meme ve yüz estetik cerrahisinde, hacim eksikliği ve kontur düzeltilmede, rekonstrüktif cerrahide kendine geniş yer edinmiştir (Ashinoff, 2000; Gir ve ark., 2012).

Otolog yağ transferi ilk olarak Neuber tarafından 1893'te fasiyal defektler için kullanılmıştır; teknik daha sonra 1895 yılında Czerny tarafından meme rekonstrüksiyonu için popüler hale getirilmiştir (Chan ve ark., 2008). 1950'lerde, tekniğin zorluğu nedeni ile, yağ doku alınacak yerde insizyonlara ihtiyaç olması ve yağ bloklarının çıkarıldığı alanda estetik bozukluğa yol açması gibi sebeplerle kullanımı azalmıştır. Fakat hemen akabinde gelişen yeni liposuction teknikleri, otolog yağ grefti kullanımını yeniden artırmıştır. Liposuction yöntemi ile küçük bir insizyondan aspire edilen yağ dokusunun yağ grefti olarak kullanılması hem hastalar hem de cerrahlar için büyük bir çekiciliğe sahiptir, çünkü bu teknik minimal invaziv olup vücutta değişen derecelerde yumuşak doku kaybını geri kazanmanın bir yolu olarak umut vaat etmiştir. Fakat en önemli dezavantajı, yağ enjeksiyonu sonucunun değişkenlik göstermesidir; yağ enjeksiyonu sonrası, transfer edilen yağın hacim kaybının derecesi %10 ile %90 arasında değişmektedir (Choi ve ark., 2013; Chung ve ark., 2013).

Yağ enjeksiyonu sonrası, transfer edilen yağın büyük miktarda hacim kaybına uğraması ve tutarsız sonuçlar elde edilmesi yöntemin başarısını düşürmektedir. Bu tür tutarsız sonuçları açıkladığı öne sürülen faktörler, belirli donör alanlarının üstünlüğü, alıcı alan kalitesi, yağ toplama ve enjeksiyon tekniklerindeki farklılıklar, greft hazırlama sırasındaki travma ve hastanın yağ dokusundaki kök hücre miktarı ve kalitesindeki değişkenliktir (Shiffman ve Mirrafati, 2001). Yağ greftlerinin nasıl hayatta kaldığı ve çevredeki mikro çevre ile nasıl etkileşime girdiği konusunda ise belirsizlik devam etmektedir (Kaufman ve ark., 2007).

Yağ, ideal bir dolgu maddesidir ve kolayca ulaşılabilen bir kaynaktır. Fakat otolog doku/hücre transplantasyonunun tutarsız ve değişen başarıdaki sonuçları ve özellikle zayıf hastalarda donör alanda yetersizlik olması büyük bir sorundur ve bilim insanlarını

yağ dokusu oluşturmak için ikinci bir stratejiye yöneltmiştir. Bu yeni strateji adipoz dokusu mühendisliğidir. Doku mühendisliği teknikleri, yağ dokusunu hem yapı hem de işlev olarak yeniden oluşturabilen biyoaktif doku yapılarının geliştirilmesi yoluyla bu sorunlara yeni çözümler sunar. Doğal yağ doku ile kozmetik ve mekanik benzerlik taşıyan, mühendislik ürünü yağ dokusu elde etmek adipoz doku mühendisliği için ana hedeftir ve klinik uygulamalar için heyecan verici bir olasılıktır.

Bugüne kadar adipoz doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalar, kök hücre veya progenitör hücreler ile birlikte, üç boyutlu doku iskelelerinin kullanıldığı yaklaşımın potansiyelini vurgulamıştır (Beahm ve ark., 2003).

Yağ dokusu üretimi için sentetik ve doğal birçok doku iskelesi araştırılmış ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır (Flynn, 2010; Zhao ve ark., 2009). Doğal malzemelerin kullanılması doku mühendisliği uygulamalarında biyoyumluluk açısından avantajlıdır, mekanik ve biyolojik özellikleri transplante edilecek doku ile daha iyi eşleşme eğilimindedir (Uriel ve ark., 2008). Yağ dokusu mühendisliği için doğal ekstraselüler matriksten türetilen çok sayıda polimer vardır. Hücreleştirilmiş plasenta, kıkırdak ve kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmıştır (Flynn, 2010; Zhao ve ark., 2009). Daha yakın zamanlarda, yağ, adipoz doku rejenerasyon stratejileri için zengin bir insan ekstraselüler matriks (ECM) kaynağı, özellikle de bazal membran olarak tanımlanmıştır (Uriel ve ark., 2008). Yağ matrisi, I-VI tip kolajenlerin yanı sıra laminin ve fibronektin gibi diğer ECM bileşenlerini içerir (Nakajima ve ark., 1998). Plastik cerrahide abdominoplasti veya diğer estetik cerrahi işlemler sırasında alınan ve sonrasında atılan bol miktarda yağın ECM kaynağı olarak kullanılabilecek olması heyecan verici bir gelişmedir.

Adipoz doku mühendisliğinde; ideal hücre kaynağında aranan özellikler olan, yüksek proliferasyon özelliği, kolay elde edilebilme ve güvenli transplantasyon özelliklerini taşıyan ve sıklıkla tercih edilen hücre tipi adipoz kaynaklı kök hücreler (ADKH)'dir (Zuk ve ark 2002; Flynn, 2010). ADKH'nin olgun adipositlere farklılaşabilme özelliğinin yanı sıra, konakçı kök hücrelerin implantasyon bölgesine göçünü tetikleyerek rejenerasyona katkıda bulunan faktörleri in vivo olarak salgıladıkları ve aynı zamanda vaskülarizasyonu teşvik ettikleri gösterilmiştir. Bunlar da yağ stabilitesinin uzun süre sağlanmasına katkıda bulunan faktörlerdir (Caplan, 2005; Meyerrose ve ark., 2007).

Biz bu çalışmamızda, yumuşak doku replasmanı için, güvenilir ve stabil bir rekonstrüksiyon sağlama potansiyeli olan adipoz doku mühendisliği alanındaki gelişmeleri, mevcut biyomateryaller, hücre kaynakları ve doku kültürü stratejileri yönünden gözden geçirerek; adipoz doku mühendisliğinde, adipoz kaynaklı kök hücreler ve doku iskelesi olarak insan yağ dokusundan elde edilen ekstraselüler matriksin birlikte kullanımının etkinlik ve güvenilirliğini değerlendirmeyi amaçladık.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.Yağ Dokusu Fizyolojisi

Bir yağ doku mühendisliği stratejisi geliştirmek için yağ dokusunun karmaşık fizyolojisini anlamak önemlidir. Bu, yenilenen dokunun yapısal, mekanik ve işlevsel olarak implantasyon bölgesine uyum sağlamasına ve tasarlanmış bileşenlerin düzgün entegrasyonuna izin verecektir.

Adipoz doku yapısında olgun adiposit, öncül adiposit (preadiposit), fibroblast, endotel hücre, vasküler düz kas hücresi, monosit, makrofaj, lenfosit gibi farklı hücre tiplerini içerir. Doku yüksek oranda preadipositlerden ve olgunlaşmış lipid damlacıkları içeren adipositlerden oluşur. Adipositler dışında kalan hücre grubu vasküler stromal fraksiyon (SVF) olarak adlandırılır. Dokunun temel fonksiyonu metabolizma için gerekli enerjinin lipid formatında saklanması sağlamak ve vücut sıcaklığını dışarıdan izole etmektir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ayrıca pek çok farklı hormonun (leptin, estrogen, resistin, TNF α vb.) üretildiği bir endokrin organ olarak görev aldığı ortaya konmuştur (Flynn, 2010).

Vücut genelinde beyaz adipoz doku (BAD) ve kahverengi adipoz doku (KAD) olmak üzere iki tür adipoz doku mevcuttur (Şekil 2.1) :

- Kahverengi adipoz doku (KAD) ilk olarak İsviçreli doğa bilimci Conrad Gessner (1551) tarafından keşfedilmiş, Gessner yeni bulduğu bu hücreleri ne yağ ve ne de kas dokusu hücresi, ikisinin arasında bir yapı olarak tanımlamıştır. Bundan yaklaşık 450 yıl sonra, kahverengi ve beyaz olarak ayrılan iki farklı yağ hücresinin varlığına ve bunların farklı görevleri olduğuna dair ikna edici kanıtlar elde edilmiştir (Tseng ve ark., 2008; Cannon ve Nedergaard, 2004). KAD doğumdan hemen sonra yenidoğanlarda en belirgin hacminde bulunur. BAD'ya kıyasla daha küçük adipositlerden oluşur ve doku içi kanlanması daha fazladır. Doğumda meydana gelen sıcaklıktaki hızlı düşüşle ilişkili strese karşı hayatta kalmak için gereken ısı üretiminden sorumludur (Cannon ve Nedergaard, 2004). KAD, spesifik olarak titremesiz termojenez yeteneğine sahiptir. Bu terim trigliseritlerin ısı üretmek için parçalanması ve bu ısının vücudu ısıtmak için doku damar sistemi yoluyla aktarılmasını tanımlar. KAD ayrıca sempatik sinir sistemine sahiptir ve

termogenin adlı uncoupling protein aracılığı ile proton gradiyentini bozarak ısı üretilmesinde rolü vardır (Cannon ve Nedergaard, 2004). Doğumda, KAD tüm vücuda dağılmıştır ve hatta BAD içindeki küçük depolarda bile bulunabilir.

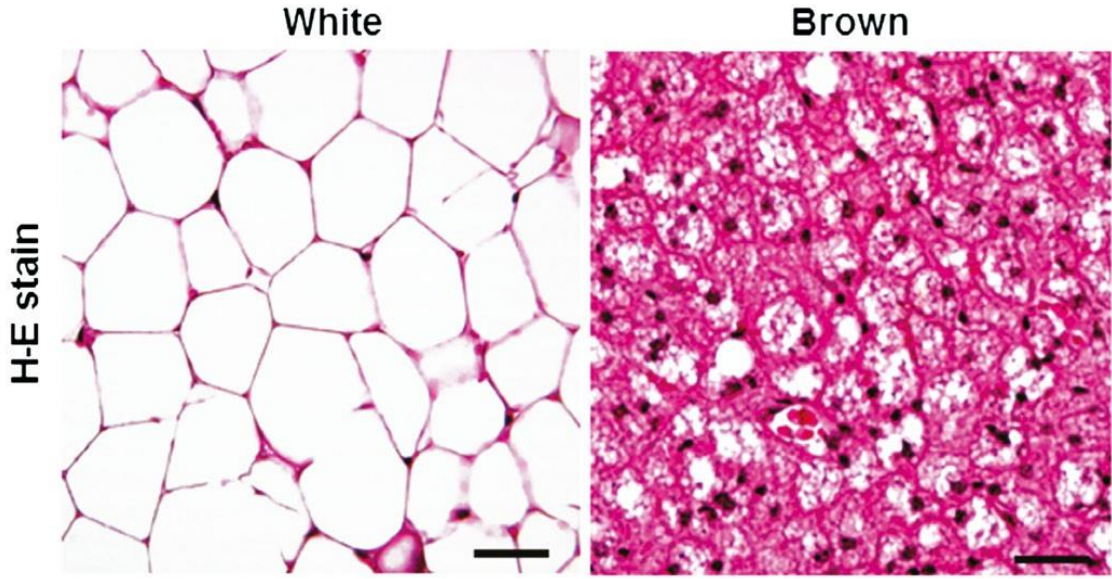
- Beyaz adipoz doku (BAD) beyaz ve sarı renkli, farklı büyüklükte 20-200 mikrometre ağısı bir yapıya sahiptir. Kanlanması kahverengi dokuya göre daha azdır. Özel boyalar yardımı ile bakıldığında adipoz dokunun fibroblast, immün hücreler, retiküler lifler ve miyelinsiz sinir lifleri içeren bir doku olduğu görülür. BAD sağlıklı erkeklerin vücut ağırlığının %15-20'sini, kadınlarda ise %20-25'ini oluşturur. BAD'ın %70-90'ı yağ, %10-30 su, geri kalanı proteindir.

Ancak vücut olgunlaştıkça KAD içeriği azalır ve BAD içeriği artar (Farmer, 2008). BAD sadece bir enerji depolama deposu olarak işlev görmez, aynı zamanda metabolik fonksiyon ve çeşitli patolojik durumlarla ilgili bir endokrin organ olarak kabul edilir (Tilg ve Moschen, 2006). Olgun memeli türlerinde BAD, toplam vücut ağırlığının yaklaşık %3'ünden %70'ine kadar değişen oranlarda bulunabilir. Sağlıklı yetişkin insanlarda bu oran genellikle %15-35 arasındadır (Hausman ve ark., 2001).

BAD, ağırlıklı olarak büyük lipid damlacıkları içeren olgun adipositlerden ve buna ek olarak stromal-vasküler hücrelerden (preadipositler, interstisyel hücreler, endotelial hücreler ve perisitler) oluşur. BAD yapısında, kan damarları, lenf düğümleri ve sinirlerden oluşan geniş bir sistem içerir ve kollajen tip I, III, IV, V ve VI ve diğer ECM proteinlerinden oluşan bir hücre dışı matris ile desteklenir (Flynn ve ark., 2006).

Yağ dokusunun metabolizması ve işlevinde KAD'ın varlığına ve rolüne artan bir ilgi olmasına rağmen, bu çalışma, yağ dokusunun baskın formu olduğu için ve hacim veren yapısı nedeniyle BAD replasmanının ihtiyaçlarını karşılamak için geliştirilmiş doku mühendisliği stratejilerine odaklanacaktır.

Adipoz doku ayrıca vücutta dağılım yerine göre de, deri altı yani subkutan (kol, abdominal ve gluteal dahil), intraabdominal (omental, retroperitoneal ve visseral) ve diğer bölgeler (meme, retroorbital, periartiküler bölgeler, kemik iliği, kas içi ve perikardiyal) olarak kategorize edilebilir (Gesta ve ark., 2007).



Şekil 2.1: Beyaz adipoz doku (BAT) ve kahverengi adipoz doku (KAD) mikroskopik görünümü (Bargut ve ark., 2017)

2.2.Adipoz Dokunun Kök Hücre İçeriği

1970’li yılların başında Dr. Alexander Friedenstein, kemik iliğinde yer alan, morfolojik olarak fibroblasta benzeyen bir grup hücrenin, kemik ve kırıkta hücrelerine dönüşebildiğini göstermiştir (Owen ve Friedenstein 1988). Bu hücrelerin kültür kaplarına ekimleri sonrası klonal bir hücre gelişimi gösterdikleri görülmüş ve mezoderm kaynaklı farklı hücre tiplerine dönüşebildikleri görülmüştür. Bu özelliklerine dayanarak ‘‘mezenkimal kök hücre (MKH) ’’olarak adlandırılmışlardır (Caplan,1991). Gerçekleştirilen çalışmalar MKH’ların insanda ve memelilerde kemik iliğinde bulunan kemik iliği kökenli- mezenkimal kök hücreler (KİK-MKH) dışında kordon kanı da dahil olmak üzere pek çok organ ve dokuda mevcut olduğunu göstermiştir (Crisan ve ark., 2008). 2001 yılında, Zuk ve ark. adipoz doku içinde MKH özelliği gösteren kök hücreler olduğunu ilk kez göstermiş ve bunlar ‘‘adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (ADK-MKH) ’’olarak isimlendirilmiştir (Zuk ve ark., 2001). 2001 yılında ilk tanımlandıkları günden günümüze kadar geçen süreçte ADK-MKH’ler bir çok deneysel ve klinik çalışmada kullanılmış ve KİK-MKH’ler ile aralarında büyüme kinetikleri, farklı hücre tiplerine dönüşme potansiyeli, hücre senesansı ve gen nakli uygulamalarında transdüksiyon potansiyelleri açısından anlamlı olarak farklılık olmadığı bildirilmiştir (De Ugarte ve ark., 2003). Ayrıca klinik uygulamada elde edildikleri liposuction materyalleri

incelendiğinde, lipoaspirat bölümünün %1'den az bir miktarını oluşturmalarına rağmen, bu hücrelerin adipoz doku içerisindeki yoğunluğunun kemik iliğindeki MKH yoğunluğuna kıyasla 100 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Zuk ve ark., 2001). Bu bulgular, ADK-MKH hücrelerinin yağ dokusunun liposuction yöntemi ile daha kolay elde edilebilir olması ve doku içerisindeki yoğunluklarının fazla olması avantajları ile KİK-MKH hücrelerine üstünlük sağladıklarını, gelişim ve farklılaşma potansiyelleri bakımından ise benzer olduklarını göstermektedir. Tüm bu bulgular değerlendirildiğinde, özellikle adipoz doku ve adipoz doku kaynaklı kök hücrelerin doku mühendisliği uygulamalarında gerek araştırma gerekse klinik amaçlı yüksek kullanım potansiyelleri açıkça görülmektedir.

2.3.Doku Mühendisliği

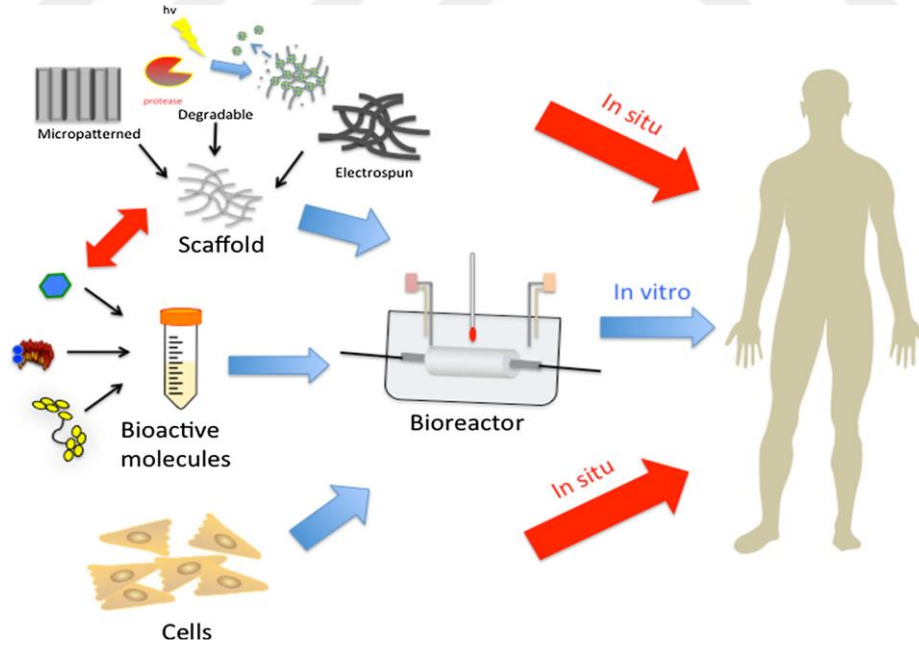
Doku mühendisliği, yapı iskelesi olarak kullanılan biyomalzemelerin, kök hücreler ve biyolojik olarak aktif moleküller ile birleştirilmesi yöntemiyle fonksiyonel dokular elde etmeyi ifade eder. Günümüzde doku mühendisliği, hasarlı dokuları veya işlevi bozulmuş dokuları restore eden, koruyan veya iyileştiren fonksiyonel yapıları ve bunun için gerekli doku iskelelerini üretmeye yönelik mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alandır (Rusk, 1950).

Doku mühendisliği, ihtiyaç duyulan dokuların vücut dışında yani *in vitro* olarak inşa edilmesini sağlar. Donör dokusundan izole edilmiş uygun kök hücreler ile ve biyouyumlu iskele malzemeleri hasar görmüş dokulara implant ederek hücre büyümesinin ve doku fonksiyonunun *in vivo* olarak değiştirilmesini hedefler (Risbud ve Sitter, 2002) (Şekil 2.2).

In vitro doku mühendisliği, rejeneratif tıp alanında birçok önemli ilerleme sağlamıştır. Bu yaklaşım, işlevsel olarak olgun doku yapılarını yeniden üretmeyi amaçlar ve *in vivo* ortam için modeller oluşturmamıza olanak tanır. Başarılı *in vitro* doku mühendisliğine klinik bir örnek olarak, hastalardan alınan mesane biyopsilerinin kültürde büyütüldüğü, bir kolajen- Polilaktit-ko-glikolid (PLGA) iskelesine ekilerek biyoreaktörde birleştirildiği yapay mesanenin geliştirilmesi verilebilir. 7 haftalık büyümeden sonra, bu yapılar hastalara implante edilerek, mesane fonksiyonunu geri kazanması sağlanabilir (Atala ve ark., 2006). Otolog doku kullanımı, bağışıklık reddi

sorununu ortadan kaldırır; bu tür otolog dokunun mevcut olduğu durumlarda, bu tür in vitro doku mühendisliği, rejeneratif tedavilerin geliştirilmesine yönelik uygulanabilir ve başarılı bir yaklaşım olmaya devam etmektedir (Sengupta ve a, 2014).

Doku mühendisliğinde doku iskelesi olarak kullanılan biyomateryaller, biyolojik ekstraselüler matriks gibi davranmalı, hücre yapışmasını, göçünü ve birikmesini teşvik edecek yapıya, gözenekliliğe ve biyolojik olarak parçalanabilirliğe sahip olmalıdır (Furth ve ark., 2014). Biyoyumlu ve fonksiyon gören yapay doku veya organlar elde etmek için; doku mühendisliğinin üç ayağı olan hücre, mühendislik ve malzeme bileşenlerinin uygun fiziksel ve biyokimyasal kombinasyonlarıyla kullanılması gereklidir (Zhang ve Kohn, 2012). Hücrelerle doku iskelelerinin birleşmesi ile oluşan yapılarda her ikisinin de seçimi çok önemlidir. Yapay doku ve organ geliştirirken, kök hücreler farklılaşma potansiyeli yüksek olduğundan tercih edilirken, doku iskelesinin biyoyumlu olması da başarı oranlarını artırmaktadır (Chan BP ve Leong, 2008). Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için doğru mikro ortamı sağlamak adına üç boyutlu doku iskeleleri ve uygun pH, sıcaklık ve gaz oranını sağlayan (biyoreaktör gibi bir) makro ortama ihtiyaç vardır (Tonelli ve ark., 2017).



Şekil 2.2: Doku mühendisliğinde ihtiyaç duyulan dokuların vücut dışında yani in vitro olarak uygun kök hücreler ile ve biyoyumlu iskele malzemeler ile inşa edilmesi (Sengupta ve ark., 2014)

Sonuç olarak günümüzdeki doku mühendisliği çalışmaları, hücre çoğalması, farklılaşması ve yeni doku oluşumu için 3B yapı işlevi gören, kolay uygulanabilir polimerik iskeleleri bulma konusunda yoğunlaşmıştır. Hücreleri güçlü şekilde destekleyecek özelliklere sahip yapı iskeleleri, hücreler için doğal bir matriks görevi görmektedir (Zhang PX ve ark., 2019). İskele malzemeleri hücre adezyonu, büyümesi, proliferasyonu ve dokunun rejenerasyonu ile birlikte vaskülarizasyonu sağlamak için gözenekli bir yapıda olmalıdır. Bu malzemeler biyolojik olarak uyumlu ve biyobozunur olmalıdır. Aynı zamanda parçalanma ürünleri toksik olmamalı metabolik yollarla kolayca uzaklaştırılmalıdır (Sultana ve Khan, 2012).

2.4.Adipoz Doku Mühendisliği

Yumuşak doku hasarı akut ve kronik yaralanmalar, tümör nedeni ile cerrahi olarak doku ve organ çıkarılması, radyoterapi sonrası yumuşak doku hasarı oluşması gibi nedenlerle günlük hayatta sıklıkla karşımıza çıkan bir durumdur. Hastalık, travma veya yaralanma vücudun çeşitli bölgelerindeki yağ dokusuna zarar verdiğinde genellikle yumuşak doku replasmanı gerekir. Bu klinik durumlarda yumuşak doku hacmini sağlayacak ve devam ettirebilecek bir yağ dokusunu (adipoz doku) doku mühendisliği yöntemi ile elde edebilmek plastik cerrahlar için büyük önem taşımaktadır (Katz ve ark., 1999; Patrick, 2000).

Yumuşak doku defektleri hastaları sadece kozmetik olarak etkilemekle kalmaz, aynı zamanda hastaların duygusal refahını da etkiler ve işlev bozukluğuna yol açabilir. Bu nedenle, kayıp yağ dokusunun yerine konulmasına güçlü bir klinik ihtiyaç vardır (Patrick, 2001). Bu amaca yönelik olarak son yıllarda adipoz doku mühendisliği alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, yumuşak doku rekonstrüksiyonu için kök hücre veya progenitör hücreler ile birlikte, üç boyutlu doku iskelelerinin kullanıldığı yaklaşımın potansiyelini vurgulamıştır (Beahm ve ark., 2003). Yağ dokusu üretimi için sentetik ve doğal birçok doku iskelesi araştırılmış ve bu konuda çalışmalar yapılmıştır. Kısaca bahsedecek olursak: Sentetik doku iskelesi örnekleri; polilaktik-ko-glikolik asit (Patrick, 2004; Neubauer ve ark., 2005), poliglikolik asit (Fischbach ve ark., 2004), polietilen glikol diakrilat (Alhadlaq ve ark., 2005) olarak sayılabilir. Doğal olarak türetilen doku iskelesi örnekleri ise ; kolajen (Gentleman ve

ark., 2006), fibrin (Cho ve ark., 2005), hyaluronan türevleri (Hemmerich ve ark., 2005), ipek proteini (Kang ve ark., 2009), ekstraselüler deselülarize matrikstir (Robb ve ark., 2021; Wang ve ark., 2013).

Bu iskele yapılarına, olgun adipositlere farklılaşma kapasitesine sahip hücreler ekilerek hücreyel yanıt in vitro ve in vivo olarak incelenmiştir. Başarılı bir doku mühendisliğinde en önemli unsur hücre kaynağıdır. Olgun adipositler son derece hassas ve kırılğan bir yapıda oldukları ve hücre proliferasyon özellikleri olmadığı için doku mühendisliğinde hücre kaynağı olarak tercih edilmezler (Brey ve Patrick 2000). Preadipositler bir dereceye kadar bu alanda kullanılabilir olsa da, ideal hücre kaynağında aranan özellikler, yüksek proliferasyon özelliğı, istenildiğinde bir işlem sonrası yüksek sayıda hücre elde edilebilmesi, elde edilebilmeleri için minimum derecede invaziv işlem gerektirmesi, tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir şekilde farklı hücre tiplerine dönüşebilir özelliklerinin olması, güvenle transplante edilebilir olmaları gerektiğı biçiminde tanımlanmıştır (Gimble ve ark. 2007). Bu tanımlara en çok uyan ve günümüzde de adipoz doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilen hücre tipi adipoz kaynaklı kök hücreler (ADKH)'dir (Zuk ve ark 2002; Flynn, 2010).

ADKH, adipoz doku mühendisliği de dahil olmak üzere bir dizi rejeneratif strateji için özellikle umut verici bir hücre kaynağıdır. Yağ doku, multilineage farklılaşma kapasitesine sahip kök hücreler için bol ve kolay erişilebilir bir hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir (Zuk ve ark., 2002). ADKH'nin olgun adipositlere farklılaşabilme özelliğinin yanı sıra, konakçı kök hücrelerin implantasyon bölgesine göçünü tetikleyerek rejenerasyona katkıda bulunan faktörleri in vivo olarak salgıladıkları ve aynı zamanda vaskülarizasyonu teşvik ettikleri gösterilmiştir. Bunlar da yağ stabilitesinin uzun süre sağlanmasına katkıda bulunan faktörlerdir (Caplan, 2005; Meyerrose ve ark., 2007). ADKH'nin ayrıca immün cevabı modüle ettiğı gösterilmiştir ve bu nedenle otolog veya allojenik hücre kaynağı olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Rodriguez ve ark., 2005; McIntosh ve ark., 2006).

2.5.Adipoz Doku Mühendisliğinin Temel Gereksinimleri ve Değerlendirilmesi

Adipoz doku mühendisliği yolu ile yumuşak doku rekonstrüksiyonunun sağlanabilecek olması oldukça heyecan verici bir gelişme olmuştur. Üç boyutlu (3D) in vitro insan dokusu dizayn edilmesi ve bu amaçla 3D iskele yapılarının kullanılması sadece arzu edilen şekilde doku elde edilmesini sağlamaz, aynı zamanda Boudreau ve Weaver'ın (2006) çalışmalarında gösterdiği 3D iskele yapısı hücre bağlanmasını ve göçünü teşvik eder ve hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini kolaylaştırır (Boudreau ve Weaver, 2006).

Mevcut klinik durumda doku mühendisliğinin kullanılabilmesi için temel gereksinimler şunlardır:

- Konakçı uyumluluğu: Konakçıdan hücrelere karşı minimum bağışıklık tepkisi ve iskele yapısının konakçı ile uyumlu biyobozunma özelliklerine sahip olması
- Biyoaktivite: Mühendislik yoluyla oluşturulan yağ dokusuna alıcı alanda yeterli kanlanmanın sağlanması, oluşan yağ dokusunun fonksiyonel olması ve rejenere olabilmesi
- Sürdürülebilirlik: Mühendislik dokusunun uzun vadeli canlılığı ve işlevi, minimum donör bölgesi morbiditesi

Mühendislik ürünü yağ dokusunun transplante olması kritiktir, çünkü dokunun uzun vadede fonksiyon kaybı olmaksızın tamamen yenilenmesi, doğal doku fonksiyonunun tam restorasyonunu sağlaması gerekir. Bu amaçla mühendislik ürünü oluşturulan yağ dokusunun biyokimyasal fonksiyonlarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yöntemler Tablo 2.1'de listelenmiştir (Choi ve ark., 2010).

Yağ dokusundaki baskın hücre tipi olan olgun adipositler, yağ dokusu oluşumunun ilk görünür belirtileri olan mikroskobik hücre içi lipid damlacıkları içerir. Sırasıyla hücre içi lipidi gözlemlemek ve ölçmek için Oil Red O boyama ve enzimatik testler yapılır (Kang ve ark., 2005; Lin ve ark., 2008).

Ek olarak, adipojenik farklılaşma ve lipojenik aktivite ile ilgili spesifik transkriptleri tespit etmek için gerçek zamanlı polimer zincir reaksiyonu (RT-PCR) uygulanır. Sıklıkla ölçülen anahtar transkriptler, transkripsiyon faktörü PPAR γ , glukoz taşıyıcı-4, yağ asidi

bağlayıcı protein-4 ve açıl-CoA sentazı içerir (Mauney ve ark., 2007; Shanti ve ark., 2008). Triaçilgliserol biyosentezinde anahtar bir enzim olan gliserol-3-fosfat dehidrojenaz, sıklıkla hem transkript hem de aktivite seviyelerinde saptanır (Flynn ve ark., 2007).

Tablo 2.1: Mühendislik ürünü oluşturulan yağ dokusunun biyokimyasal fonksiyonlarını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan yöntemler

Amaç	Yöntem
Adiposit morfolojini değerlendirmek için	Oil Red O boyama
	AdipoRed boyama
	Trigliserit miktar tayini
Adiposit gen ve enzim ekspresyonunu değerlendirmek için	RT-PCR (PPAR α , Glut4, FABP4, ACS)
	GPDH enzim aktivitesi
Adipokin sentezini (leptin ve adiponektin) değerlendirmek için	ELISA
Metabolik aktiviteyi değerlendirmek için	Lipoliz tahlili
	Glikoz alımı
Damarlanmanın değerlendirmesi için	Histoloji
	İmmünohistokimya (CD31 ve vWF)

Yağ dokusu hayati bir endokrin organ olarak kabul edildiğinden, tasarlanmış dokunun leptin ve adiponektin gibi uygun adipokinleri salgılama yeteneği de geniş çapta araştırılmıştır (Kang ve ark., 2005).

Yağ dokusunda sentezlenen peptit hormonları ve diğer endokrin faktörler şunlardır (Guzik ve ark., 2006):

- Adipokinler: Adiponectin, Leptin, Resistin, Visfatin, Retinol binding protein 4
- İnflamatuar sitokinler: Tumor-necrosis factor- α , Interleukin-6, Interleukin-1, CC-chemokine ligand 2
- Tromboz ilişkili sitokinler: Plasminogen-aktivator inhibitor type 1

Adipojenik uyarıcılar, büyüme faktörleri, adipokinler, inflamatuvar sitokinlerden oluşan yağ dokusu nişi, doğal yağ dokusunu uyaran ve koruyan karmaşık mikro ortamı oluşturur (Gomillion ve Burg, 2006).

Adipoz doku oluşumu için sıklıkla yararlanılan araçlar şunlardır: fosfodiesteraz inhibitörü 3-izobütil-1-metil-ksantin, glukokortikoid deksametazon; glukoz alımında ve trigliserit oluşumunda aktif olan insülin ve bir siklooksijenaz inhibitörü olan indometasin bulunur (Gomillion ve Burg, 2006). Doğal yağ dokusunda bulunan anahtar bir faktör olan temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), adipoz doku mühendisliği stratejilerinde de yaygın olarak kullanılmıştır. Mühendislik yapılarının tasarımı ve analizinin doğal doku ortamını yakından yansıtması önemlidir, uygun ECM ve destek hücreleri olmalıdır. Belirli pH ve oksijen seviyeleri olmalıdır.

2.6.Adipoz Doku Mühendisliği için Biyomalzemeler

Yağ dokusu mühendisliği için birçok biyomateriyal araştırılmıştır. Hem sentetik hem de doğal polimerler yaygın olarak kullanılmıştır. Burada, yağ doku mühendisliği için yaygın olarak kullanılan sentetik ve doğal polimerlerin en son uygulamalarına odaklanacağız.

2.6.1.Sentetik polimerler

Sentetik polimerler, yağ dokusu mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Önemli avantajları istenildiği gibi şekil verilebilmesi, mekanik ve kimyasal özelliklerinin, bozunma sürelerinin iyi biliniyor olmasıdır (Lavik ve Langer, 2004).

Yumuşak doku uygulamaları için, poli-laktik asit (PLA), poli-glikolik asit (PGA) ve kopolimer polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) gibi polimerler kullanılarak önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu polimerler hidroliz ile laktik asit ve glikolik asitlere bozunurlar. Bozunma süre ve hızları moleküler ağırlık, kristallik ve laktik asit alt birimlerinin, glikolik asit alt birimlerine oranı değiştirilerek kontrol edilebilir ve ayarlanabilir (Lavik ve Langer, 2004).

PLA ve PGA polimerleri yağ dokusu mühendisliğinde ağırlıklı olarak 3D meshler, iskeleler ve/veya greftler halinde kullanılır (Lee JA ve ark., 2003). Bunlar hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda kullanılmış ve rejenere olan yağ dokusunu destekleme potansiyeli gösterilmiştir. PGA meshlerinin in vivo olarak 12 hafta içinde bozulduğunu uzun süreli çalışmalar göstermiştir (Weiser ve ark., 2008). Yapılan hayvan çalışmalarında

PGA meshlerinin 12 hafta içinde çözünürken, rejenere olan yağ dokusunun 24 hafta sonra da belirgin olduğu yani adipogenezi 24 haftaya kadar desteklemeye devam ettiği görülmüştür (Weiser ve ark., 2008). Benzer şekilde PLA'nın da in vivo olarak hızla bozulurken, daha uzun sürelerde ADKH'lerin adipogenezini destekleme yeteneği gösterilmiştir (Shanti ve ark., 2008).

Kopolimer olan PLGA ise, doku mühendisliği çalışmaları için yaygın olarak kullanılmıştır. Çeşitli çalışmalarla bu kopolimerin adipogenezi hem in vitro hem de in vivo destekleme yeteneği gösterilmiş (Patrick ve ark., 2002; Dolderer ve ark., 2007), aynı zamanda bu çalışmalarda matriks, 3D matriks, mikro kürecikler gibi oldukça farklı formlarda ya da bFGF gibi vaskülarizasyonu indüklediği gösterilen ajanlarla birlikte kullanılmıştır (Patrick ve ark., 2002; Dolderer ve ark., 2007).

Tablo 2.2: Adipoz doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan sentetik materyaller

Sentetik Polimer	Özellik
Polilaktik asit	12 hafta sonra in vivo bozunma
Poliglikolik asit	4 hafta sonra in vivo bozunma
Polilaktik-ko-glikolik asit	Adipoz doku mühendisliği alanında in vivo uzun süreli çalışma sonuçları mevcut değil
Polietilen glikol	İn vivo bozunma hızı iyi karakterize edilmemiş İn vivo kültürden sonra şeklini korur
Polietilen tereftalat ve poliprolen	İn vivo bozunma göstermez, şeklini korur Hücre yapışması için yüzey elverişli değil
Silikon	İn vivo bozunma göstermez, şeklini korur

Yağ dokusu mühendisliği uygulamaları için başka sentetik malzemeler de araştırılmıştır ve bazıları potansiyel yumuşak doku replasmanı için umut vaat etmeye devam etmektedir. Bunlar, polietilen glikolün (PEG) hidrojeller formları, polietilen tereftalat ve polipropilen'in meshleri ve 3D iskelelerini ve silikondan yapılan çeşitli silikon boru/muhafaza yapılarını içerir (Choi ve ark., 2010). Adipoz doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan sentetik materyaller Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

2.6.2.Doğal polimerler

Doğal polimerler, biyolojik sistemler tarafından üretilen doğal ekstraselüler matriksin (ECM) bir parçası olarak bulunan malzemelerdir (Lavik ve Langer, 2004). Doğal malzemelerin kullanılması doku mühendisliği uygulamalarında biyouyumluluk açısından avantaj sağlar, mekanik ve biyolojik özellikleri transplante edilecek doku ile daha iyi eşleşme eğilimindedir. Yağ dokusu mühendisliği için doğal ekstraselüler matriksten türetilen çok sayıda polimer vardır. Tablo 2.3'te, yağ dokusu mühendisliği araştırmalarında sıklıkla kullanılan en yaygın doğal polimerler özetlenmiştir.

Sıklıkla kullanılan doğal polimerler, kolajen (Vashi ve ark., 2006), ipek fibroini (Lovett ve ark., 2007), fibrin, jelatin, hyaluronan, Matrigel, deselülarize insan plasentası, adipoz dokudan türetilen ECM'dir (Flynn ve ark., 2007).

Kolajen, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu ve zayıf antijenliği nedeniyle yumuşak doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılır (Vashi ve ark., 2006). Kolajen, 3D yapı iskeleleri, jeller, fiber lifler, süngerler veya mikro küreler dahil olmak üzere birçok biçimde kullanılmıştır. 3D kolajen süngerlerinin, yapı iskelesi olarak progenitör hücreleri desteklemesinin yanı sıra, 12 hafta sonra in vivo olarak yeni yağ dokusunun gelişimini teşvik etme yeteneğini gösteren çok sayıda çalışma vardır (von Heimburg ve ark., 2003; Gentlemen ve ark., 2006). FGF-2 içeren kolajen hidrojellerinin, hücre kaynağı eklenmeden bile in vivo vaskülarize yağ dokusunun gelişimini kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Vashi ve ark., 2006).

Kolajene benzer şekilde, jelatin kullanılarak gerçekleştirilen doku mühendisliği çalışmalarında da özellikle polimer içinde taşınıp salınım yapılabilen FGF-beta gibi büyüme faktörleri salınımı ile adipogenezin uyarıldığı gösterilmiştir (Hiraoka ve ark., 2006).

Hyaluronik asit tabanlı biyomateryaller doku mühendisliği alanında özellikle kemik, kıkırdak ve deri alanında popüler olsa da yapılan çalışmalar preadipositlerin de hyaluronik asit tabanlı doku iskelelerine tutunabildiğini ve bu yapıların timusu alınan farelere nakledildiğinde in vivo ortamda da başarılı bir şekilde adipoz dokuyu oluşturduğunu göstermiştir (Halbleib ve ark., 2003; Solchaga ve ark., 1999).

İpek; düşük immünojenite, yavaş bozunma, biyolojik yüklerin olmaması ve güçlü mekanik özellikler gibi doku mühendisliği uygulamaları için uygun özelliklere sahip olması nedeniyle, son dönemde çok dikkat çeken bir biyomateryal haline gelmiştir ve adipoz doku mühendisliği alanında da başarı ile kullanılabilir (Lovett ve ark., 2007; Wang ve ark., 2006).

Tablo 2.3: Adipoz doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan doğal malzemeler

Doğal malzeme	Özellik
Kolajen	Adipoz ECM'sinde yaygın; olumlu yağ sonuçlarını teşvik eder, iyi karakterize edilmiş
İpek fibroini	Adipogenezi destekler; uygun mekanik özellikler, yavaş bozulma oranı
Hyaluronan	Uygun mekanik özellikler; yağ dokusu oluşumunu destekler
Fibrin	Biyouyumlu malzeme; in vivo olarak adipogenezi destekler
Jelatin	İn vivo olarak adipogenezi destekler; kültürden sonra şeklini korur
Matrigel	Adipogenezi destekler
Plasental deselülerize matriks	Geniş adipoz doku oluşturmak için allojenik yaklaşım; yağ dokusu oluşumunu destekler
Adipoz kaynaklı ECM	Yerel ECM adipogenez için uygun mikro ortamı teşvik eder

Polimer olarak Matrijel'in kullanıldığı çalışmalarda in vitro şartlarda ümit verici sonuçlar alınmış olsa da polimerin fare sarkom hücreleri tarafından üretiliyor oluşu ile, yani hayvan kaynaklı ve tümör hücrelerinin ürettiği bir madde olması nedeni ile klinik olarak kullanımı sınırlıdır ve adipoz doku mühendisliğinde başarısı bilinmemektedir (Polykandriotis ve ark., 2008).

Son yıllarda Matrijel'e alternatif olarak sunulan kas doku kaynaklı miyojel ile yapılan çalışmalar, polimerin in vitro ve in vivo şartlarda preadiposit farklılaşmasını ve

vaskülarize adipoz doku oluşumunu arttırdığı göstermiş olmakla birlikte daha fazla sayıda deneysel ve preklinik çalışmaya ihtiyaç vardır (Abberton ve ark., 2008).

Deselülerize plasenta, kıkırdak ve kemik sırasıyla adipojenik, kondrojenik ve osteojenik uygulamalar için mezenkimal kök hücrelerle kombinasyon halinde araştırılmıştır (Flynn, 2010; Zhao ve ark., 2009). Daha yakın zamanlarda, yağ, adipoz doku rejenerasyon stratejileri için zengin bir insan ECM kaynağı, özellikle de bazal membran olarak tanımlanmıştır (Uriel ve ark., 2008). Yağ matrisi, I-VI tip kolajenlerin yanı sıra laminin ve fibronektin gibi diğer ECM bileşenlerini içerir (Nakajima ve ark., 1998). Sağlam bir bazal membran kaynağı, doku mühendisliğinde özellikle ilgi çekicidir, çünkü bu yapının hem organogenez hem de yara iyileşmesi sırasında hayati bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Streuli, 1999). Matrisin enjekte edilebilir bir hücre dağıtım aracı olarak veya daha büyük hacimli büyütme için 3-D gözenekli bir yapı iskelesi olarak kullanılması amacıyla yağdan kolajen çıkarmak için teknikler geliştirilmiştir (Choi JS ve ark., 2009). Bugüne kadar, büyük yağ dokusu bloklarından iyi korunmuş 3-D mimarisi ile bozulmamış ECM'nin toplanmasını kolaylaştıran hiçbir metodoloji tarif edilmemiştir. Matriks bileşimi, hücrel tepkiye aracılık etmede önemli bir faktör olsa da 3-D mikro-ortamın organizasyonu eşit derecede önemlidir (Cukierman ve ark., 2002).

Mevcut çalışmada, insan yağ dokusunun eksize edilmiş bloklarının deselülerizasyonu, büyük hacimli yağ dokusu rejenerasyonu için yapı iskelelerinin geliştirilmesi için bir yöntem olarak araştırıldı. Genel strateji, plastik ve rekonstrüktif cerrahi alanlarında geniş uygulanabilirliğe sahip biyomateryaller geliştirmek için abdominoplasti veya pannikülektomi sırasında alınan yağ gibi tipik olarak atılan bol miktarda insan kolajen kaynaklarından yararlanmaktır.

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Etik Onay

Bu araştırma, İstinye Üniversitesi Etik Kurulu 2/2021.K-69 nolu etik kurul onayı ile yapılmıştır. Doku örneği alınan bütün hastalardan, dokularının bilimsel araştırmalarda kullanımı için bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

3.2.Kimyasal Malzemeler

- Jelatin, Sigma, Almanya
- Alginat, Sigma, Almanya
- Fetal sığır serumu (FBS), PAA, USA
- Penisilin-Streptomisin Solüsyonu, Gibco, ABD
- Glutamax, Gibco, USA
- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco, ABD
- DMEM/F12, Sigma, Almanya
- DMEM/F12, Gibco, ABD
- MKH karakterizasyon kiti, BD, US
- %0,05 Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco, ABD
- TrypLE™ Express Enzyme (1X), no phenol red, Gibco, ABD
- Dimetilsülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya
- Sodyum hidroksit (NaOH), Sigma, Almanya
- Paraformaldehit (PFA), Sigma&Aldrich, Inc., Almanya
- Triton-X
- Sığır Serum Albumini (BSA)
- 4',6-Diamidino -2-fenilindol dihidroklorür (DAPI), Sigma
- Alkol, Tekkim Kimya
- Quick-RNATM MiniPrep, Zymo Research, ABD
- SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit, Bioline, ABD

- SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit, Bioline, ABD
- Primer dizileri
- Primer ve sekonder antikorlar

3.3.Sarf Malzemeler

- 25, 75, 175 cm² 'lik kültür kabı, Nest
- 6, 12, 24 ve 48 kuyulu kültür kapları, Nest
- 2, 5, 10 ve 25ml serolojik pipet, Nest 34
- 5 ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Set inject
- 10-100-1000 µl'lik pipet uçları, İsolab
- Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Corning
- Steril santrifüj tüpleri (15-50 ml), Nest
- Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham, PA, USA
- Mikroskop lamı, Nest
- Kriyoviyal, Corning
- Bistüri ucu, Beybi

3.4.Hücre Hatları

Tez kapsamında ATCC'den satın alınan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri (ADMKH) kullanıldı. Deneysel çalışmalarda kullanılan hücrelerin pasaj numaraları farklılaşma deneylerinde P2-P5 'tür.

3.5.Kullanılan Cihazlar

- Floresans Mikroskobu, Zeiss Axio.Observer.A2
- Zeiss Stemi 508 model stereo mikroskop
- pH Metre, Ohaus
- Hassas Terazı, SHIMADZU AUW220D
- Santrifüj, Hitachi, Japonya
- Etüv, Nüve FN055
- Hücre Kültürü İnkübatörü (CO₂inkübatörü), Panasonic

- Steril Kabin, Telstar
- Otoklav, Nüve, OT120M
- Inverted Mikroskop, Nikon, Japonya
- UV Light, Omnicure S2000, Excelitas Technologies, ABD
- Manyetik karıştırıcı, Jeiotech
- Buzdolabı, Panasonic
- Mikropipet, Rainin, Eppendorf, İsolab
- StepOne Plus qRT-PCR, Applied Biosystem
- Thermal Cyclers cihazı, BIO-RAD

3.6. Primer Dizileri

Tablo 3.1: RT-PCR primer dizileri

Gen	Tanım	Baz Dizilimi (5'-3')
PPARγ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	F: TGGTGACCAGAAGCCTGCAT R: CCCAAAGTTGGTGGGCCAGA
ALP	CCAAT-enhancer-binding protein alpha	F: GCTGATCATTCCCACGTTT R: CTGGGCCTGGTAGTTGTTGT
LPL	Lipoprotein lipase	F: AAGGCTCCTTCATGTGGCGT R: TGATTCGTGCCGCGGAAAAG
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	F: TTCTTTTTCGTCGCCAGCC R: CCGTTCTCAGCCTTGACGGT
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein	F: CCGGGCAACATAACTGCGTC R: CGGGAAGCCGTCTAGGTCAG
THY1 (CD90)	Thy-1 Cell Surface Antigen	F: ACAGTCTTGCAGGTCTCCCG R: TCCCGATGGGCAAGGATGAC

3.7. ADKH'lerin In Vitro Çalışmalar için Hazırlanması

3.7.1. ADKH'ların stoktan çıkartılması

Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler -80 C'den çıkarılarak sıcak su banyosunda çözündürüldü. Hücre süspansiyonu; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin

(10,000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin) içeren L-DMEM besiyeri içerisine alındı ve 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Takiben süpernatant kısım aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti üzerine 2 ml besiyeri ilave edilerek mikropipet ile pipetaj yapılarak hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlanmıştır. Akabinde 175 cm²’lik kültür kaplarının içerisine hücre süspansiyonu ve 18 ml besiyeri eklenmiştir. Hücre kültürü aşmalarında, DMEM besiyeri, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 non esansiyel amino asit ile kullanıldı. Kültür kabı üzerine hangi hücre hattı olduğu, pasaj sayısı, işlem tarihi ve işlemi gerçekleştiren kişi adı yazılarak 37°C’de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

3.7.2.ADKH pasajlanması

Deneylerde kullanılacak olan hücreler kültür kabında 3 günde bir kontrol edilerek besiyeri değişikliği yapıldı. %70-90 oranında konfluent olduklarında kültür kabı içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreler PBS ile yıkanarak fetal bovine serumundan arındırıldı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırılmıştır. Sonrasında tabandaki mezenkimal kök hücrelerin yüzeyden ayrılımları için kullanılan kültür kabının yüzey alanına uygun miktarda 6 ml %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu eklendi ve hücreler solüsyonun aktive olduğu 37°C’de %5 CO₂’li ortamda 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası inverted mikroskopla bakılarak hücrelerin yüzeyden kalkma durumu kontrol edildi. Trypsinin aktivitesini inhibe etmek ve böylece hücre membranına zarar vermesini engellemek için, trypsinin miktarında (6 ml) besiyeri ilave edildi. Kültür kabı içerisindeki hücre süspansiyonu, konik tüp içerisine alınarak 1500 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant kısım aspire edilerek uzaklaştırıldı ve hücreler elde edildi. Pasajlama işlemi, hücrelerin deneyler için kullanılacak yeterli sayıya ulaşması amacıyla yapıldı.

3.7.3.Thoma lamı ile ADKH sayımı

Hücre sayımı için, 10 µl %0,5 tripan mavisi (Biological Industries, İsrail), 10 µl süspanse haldeki hücre ile karıştırılarak mikropipet ile iyice homojen hale getirildi. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına dikkatlice koyuldu ve üzerine lamel kapatılarak mikroskopta lam üzerinde 16 karelik alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı, sulandırma katsayısı ile çarpılarak besiyeri içerisinde ne kadar hücre olduğu hesaplanmıştır.

Hücre sayımı formülü;

Hücre sayımı = Hücre sayısı x Dilüsyon Oranı x 10.000.

Hücre sayısına göre hangi kültür kabına ne kadar sayıda hücre ekileceğine karar verildi.

3.7.4. Hidrojel hazırlama prosedürü

%3 Aljinat, %5 Jelatin toz halinde alınıp tartıldı ve besi yeri ile karıştırılarak hidrojel elde edildi. Çalışmamız için gerekli olan 10 ml hidrojel hazırlamak için, 10 ml DMEM içerisine, %3 aljinat çözeltisi elde etmek için 300 mg aljinat, %5 Jelatin çözeltisi elde etmek için 500 mg jelatin tartılarak karıştırıldı. Sıcak su banyosunda 15 dk inkübe edildi. Daha sonra çalışmamızda ikinci grup olarak kullanılacak olan hidrojel+ECM hücre iskeleti grubunu oluşturmak için, bu oluşturduğumuz hidrojel içine 0,5 mg ECM eklendi ve birlikte 121 derecede katı programda otoklavlandı. Jel+ECM'ler ekim yapılacak 12 kuyucuklu kültür kaplarına alındı. Bir kuyuda maksimum 1 ml olacak şekilde serolojik pipet yardımı ile yerleştirildi ve kalsiyum klorür ile çapraz bağlandı.

3.8. Deselülarize Matriks Hazırlanması

3.8.1. Adipoz doku alım prosedürü

Çalışmayı yapan otör tarafından gerçekleştirilen elektif vücut kontur cerrahisi uygulanan hastalardan çıkarılan subkutan yağ dokusu parçaları toplandı. Adipoz doku örnekleri antibiyotikli salin içinde saklandı ve hasattan sonraki 4 saat içinde işlenmek üzere laboratuara teslim edildi.

3.8.2. Adipoz doku deselülerizasyonu

Deselülarize adipoz matriks (DAM) hazırlama protokünde amaç, ECM'nin biyolojik olarak aktif bileşenlerini (kollajenler, proteinler, büyüme faktörleri ve glikozaminoglikanlar dahil) korurken tüm immünojenik bileşenleri (nükleik asitler ve fragmanlar) çıkarmaktır. Transplantasyondan sonra konakçı kök hücre implantasyonunu ve farklılaşmasını sağlayan uygun mikro ortamı, 3B yapıyı ve mekanik özellikleri korumayı amaçlamaktadır.

Uyguladığımız hücresizleştirme protokolü, fiziksel ve kimyasal yöntemlerin bir kombinasyonunu içermektedir. Protokolümüzü başlıca iki adımda özetleyebiliriz:

- Birinci adım: Hücre zarı bileşenlerini fiziksel yollarla (homojenizasyon) yok etmeyi amaçlamaktadır. Bunun için, taze izole edilmiş yağ dokusu numuneleri, kütleleri

20 ila 25 g arasında değişen parçalar halinde kesildi. Daha sonra ince kesilmiş yağ dokusu, bir doku homojenleştirici (Hengfeng Instrument Manufacturing, Jiangsu, in) kullanılarak homojenleştirildi (12.000 rpm, 5 dakika) ve doku süspansiyonu haline getirildi.

- İkinci adım: Kimyasal yöntemlerin kullanımıdır, sitoplazmik ve nükleer bileşenleri çözmek için deterjanların veya deterjan olmayanların kullanımını içerir. Lipit kalıntılarını gidermek için ise alkoller (izopropanol gibi) kullanılır. Yukarıdaki adımlar, reaktiflerin etki süresini kısaltmak, verimliliği artırmak ve yapısal hasarı azaltmak için sürekli mekanik karıştırma ve çalkalama ile birleştirilir. Ayrıca kimyasal ve enzimatik maddelerin kalıntılarının neden olduğu bağışıklık tepkisini önlemek için her aşamada iyice yıkamak şarttır.

Kullanılan kimyasallar:

1. Sodyum dodesil sülfat (SDS) % 2'lik çözelti hazırlanır; iyonik deterjandır, hücrel membran bileşenlerini bozar.
2. Triton X-100 % 1'lik çözelti hazırlanır; iyonik olmayan deterjandır, lipit-lipit ve lipit-protein bağlarını bozar.
3. Parasetik asit distile su ile % 4 çözelti hazırlanır, kalıntı lipitleri uzaklaştırır.
4. Parasetik asit etanol ile % 4 çözelti hazırlanır, kalıntı lipitleri uzaklaştırır.

Kimyasal özme sırasında, ilk adımda oluşturduğumuz doku süspansiyonu sırasıyla önce SDS, Triton X-100 ve PBS ile 2 saat aralıklı yıkandı. Reaktiflerin etki süresini kısaltmak, verimliliği artırmak ve yapısal hasarı azaltmak için sürekli çalkalama ile birlikte uygulandı (şekil 3.1). Bu işleme 5 gün boyunca devam edildi. Bu şekilde hücrel membran bileşenleri bozulan doku süspansiyonunu, sırayla parasetik asit, etanollü parasetik asit ve PBS ile birer saat yıkandı. PBS ile iyice yıkandıktan sonra doku süspansiyonu santrifüjlenerek alttaki beyaz dokuyu toplandı. Oluşan DAM, -20'de donduruldu, sonra bir liyofilizatör (GAMMA2-16 LSC; Christ, Osterode am Harz, Almanya) ile dondurularak kurutuldu (şekil 3.2).



Şekil 3.1: Doku süspansiyonunun kimyasallar ile yıkanması



Şekil 3.2: Liyofize edilen deselülerize ekstraselüler matriks (DAM)

3.8.3. Hücre iskeletinin histolojik ve immünohistokimyasal karakterizasyonu

DAM'dan alınan temsili örnekler (en merkezi bölgeler ve dış yüzeyler dahil olmak üzere işlenmiş matrisin çeşitli bölgelerinden alınmıştır) 24 saat boyunca %10 nötr tamponlu formalin içinde sabitlendi ve durulandı. Histolojik ve immünohistokimyasal boyama yapıldı. Boyama, hücresel ekstraksiyon işleminin etkinliğini doğrulamak ve ayrıca bazal membran bileşenleri, kolajen tip IV (CIV) ve laminin (LN) dağılımını karakterize etmek için yapıldı. Tüm numuneler parafine gömüldü ve kesitler alındı (6 mm

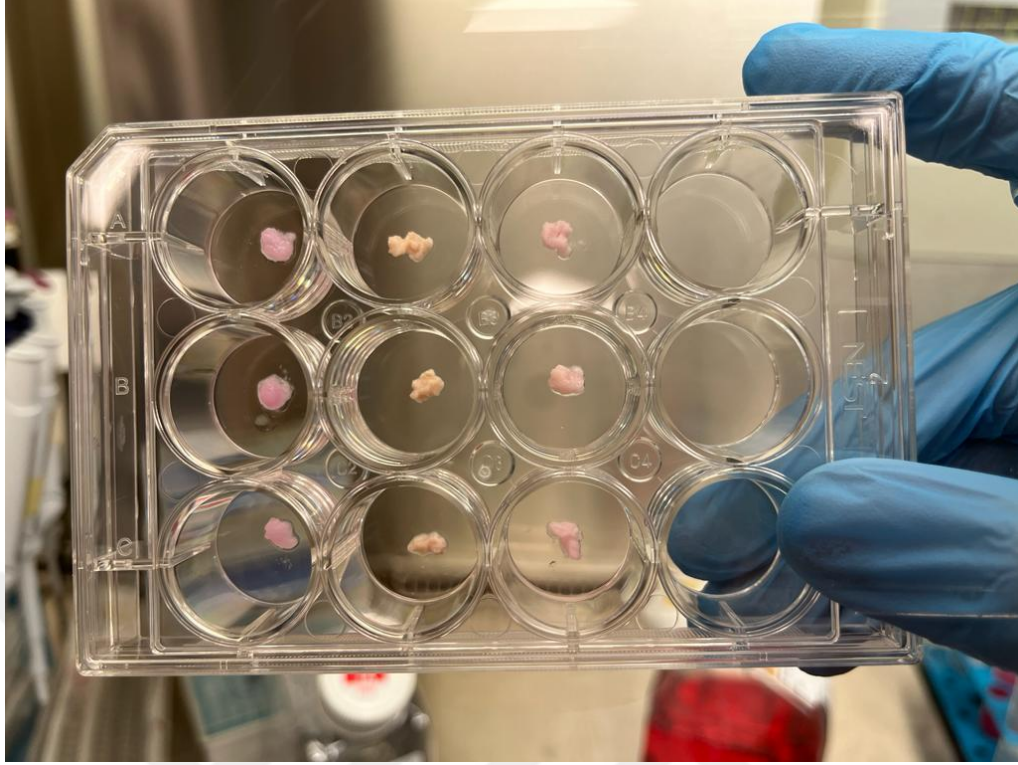
kesitler). Hematoksilen ve eozin (H&E) boyaması ve Masson's Trichrome boyaması, canlı hücre kalıntısı veya hücre parçalarının varlığını saptamak ve DAM'in kolajen yapısını karakterize etmek için kullanıldı.

3.9. Adipoz Kaynaklı Kök Hücrelerin Doku İskelesi Üzerinde Kültüre Edilmesi

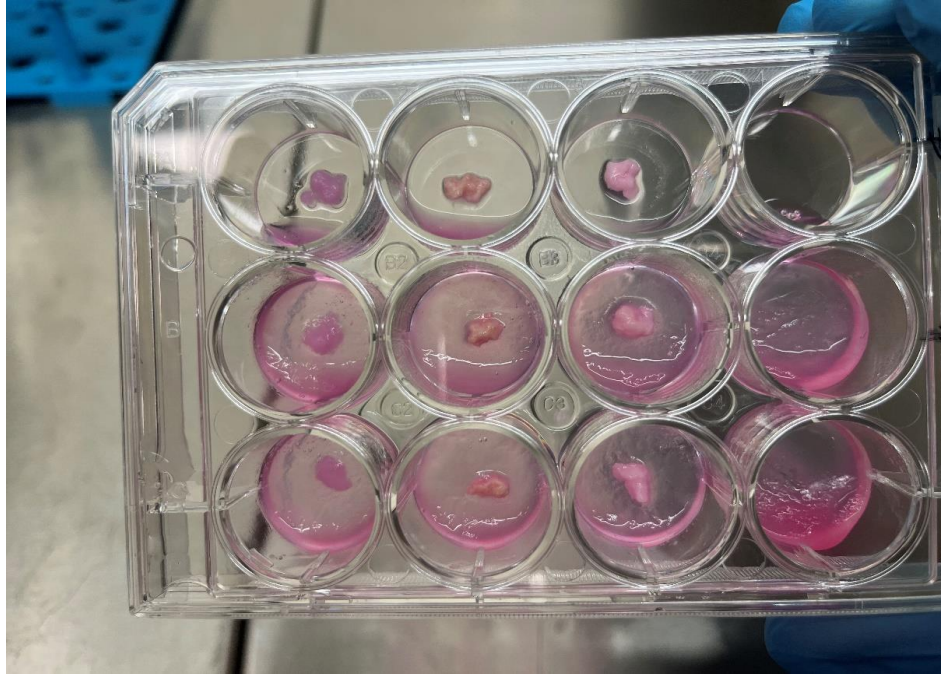
Gruplar ve çalışma planı:

- Kontrol Grubu (sadece ADKH),
- Deselülerize Ekstraselüler Matriks+ADKH ,
- Deselülerize Ekstraselüler Matriks+Hidrojel+ADKH grupları üzerinde çalışmalar yapıldı.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak deselülerize ekstraselüler matrikslerin sterilizasyon işlemi otoklav ile gerçekleştirildi. UV ile 30 dakika steril edildikten sonra hidrate edilerek küçük parçalara ayrıldı ve 12 –kuyucuklu kültür kaplarına yalnız ve hidrojel ile birlikte olacak şekilde yerleştirildi (Şekil 3.3). Hazırlanan doku iskelelerinin üzerine ADKH'ler ekilmiştir. Hücre adezyon testi 12-kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirildi. Doku iskeleleri steril şartlarda 12-kuyucuklu kültür kaplarında hazırlandı. Her bir kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde doku iskelelerinin üzerine hücre ekimi gerçekleştirildi (Şekil 3.4). Belirli sürelerde yapılacak analizler için 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.3: DAM, DAM+hidrojelin hidrate edilerek küçük parçalara ayrılması ve 12 kuyucuklu kültür kaplarına yerleştirilmesi



Şekil 3.4: Doku iskelelerinin üzerine ve boş olan kontrol grubuna her bir kuyucukta 3×10^4 hücre olacak şekilde doku iskelelerinin üzerine hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.

3.10. Adipojenik Farklılaşmanın İndüklenmesi

Adipojenik farklılaşmayı indüklemek için hücreler, High Glucose DMEM (+ %10 FBS, %1 Pen-Strep), 1µm Dexamethasone, 1µm Indomethacin, 500 µm IBMX, 10 µg/ml human recombinant insulin tartılarak besi yerinin içine eklendi, fresh olarak hazırlandı.

Adipoz Hücre Farklılaştırma Protokolü: Deney dizayn edildikten bir gün sonra adipoz farklılaşma besi yeri eklendi ve 2 günde bir besi yeri değiştirildi. Bununla birlikte kontrol grubu olarak adipoz kaynaklı kök hücreler normal besi yerinde ve farklılaşma besiyerinde ekilerek gözlemlendi.

Deney süresi boyunca mikroskopta hücre farklılaşmaları kontrol edildi ve 14. Günde fotoğraflandı. Daha sonrasında bir kısım hücre RT-PCR için toplandı, bir deney grubunda ise boyama yapıldı.

3.11. Oil-Red-O Boyama

Oil-Red-O Boyama, adipojenik indüksiyondan 15 gün sonra hücrelerde, hücre içi lipitleri boyamak için yapıldı. Hücreler PBS'le üç kez 5 dakika yıkandı. Hücrelere paraformaldehit (PFA) (% 4) eklendi ve 30- 45 dakika inkübe edildi. Hücreler tekrar PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. Hücrelere % 60 izopropanol eklendi ve 5 dakika inkübe edildi. Hücreler PBS ile 5 dk yıkandı. Oil Red O stok çözeltisi, 3 g/L'lik bir konsantrasyonda %99.9 izopropanol içinde hazırlandı. Hücreler Oil-Red-O Çalışma Çözeltisi ile 30-45 dakika inkübe edildi. Hücreleri 2-5 kez PBS ile yıkandı. Mikroskop altında lipit damlacıkları kırmızı görüntüsünü gözlemlemek için görüntülendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Oil-Red-O Boyama sonrası floresans Mikroskobunda kırmızı lipid damlacıklarının görüntülenmesi

3.12.Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu) Analizi

Adipojenik belirteçlerin ekspresyonunu değerlendirmek için RT-PCR kullanıldı. Farklılaşma indüksiyonu yapıldıktan 15 gün sonra adipojenik markerlar, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR), Lipoprotein lipaz (LPL), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) değerlendirilmek üzere RT-PCR analizi yapıldı. Çalışmada Bioline'nın SensiFAST SYBR Hi-ROX Kiti kullanıldı. RT-PCR işlemi için mix hazırlama aşaması; önce su, sonra master mix ardından cDNA'lar eklendi. Her örnek için hesaplama yapılarak Kit içindeki protokol uygun olarak kuyucuk başına toplam 20 µl olacak şekilde belirtilen oranlarda örnekler koyuldu.

3.12.1.RNA izolasyonu

Hücrelere 25 mg/ml olacak şekilde trizol eklendi. Trizolle çözünen hücreler 2ml santrifüj tüpüne aktarıldı. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 2:1 oranında kloroform eklendi. +4 derecede 15 dk bekletildi. 12.000 rpm’de 10 dk santrifuj edildi. Üst faz dikkatlice başka bir tüpe aktarıldı. 1:1 oranında isoproponal eklendi. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. 12.000 rpm’de 10 dk santrifuj yapıldı. 1ml %70 ethanol eklendi. 7500 rpm’de 5k dk santrifuj edildi ve yıkama yapıldı. DNA/RNA free water ekleyerek dolaba kaldırıldı.

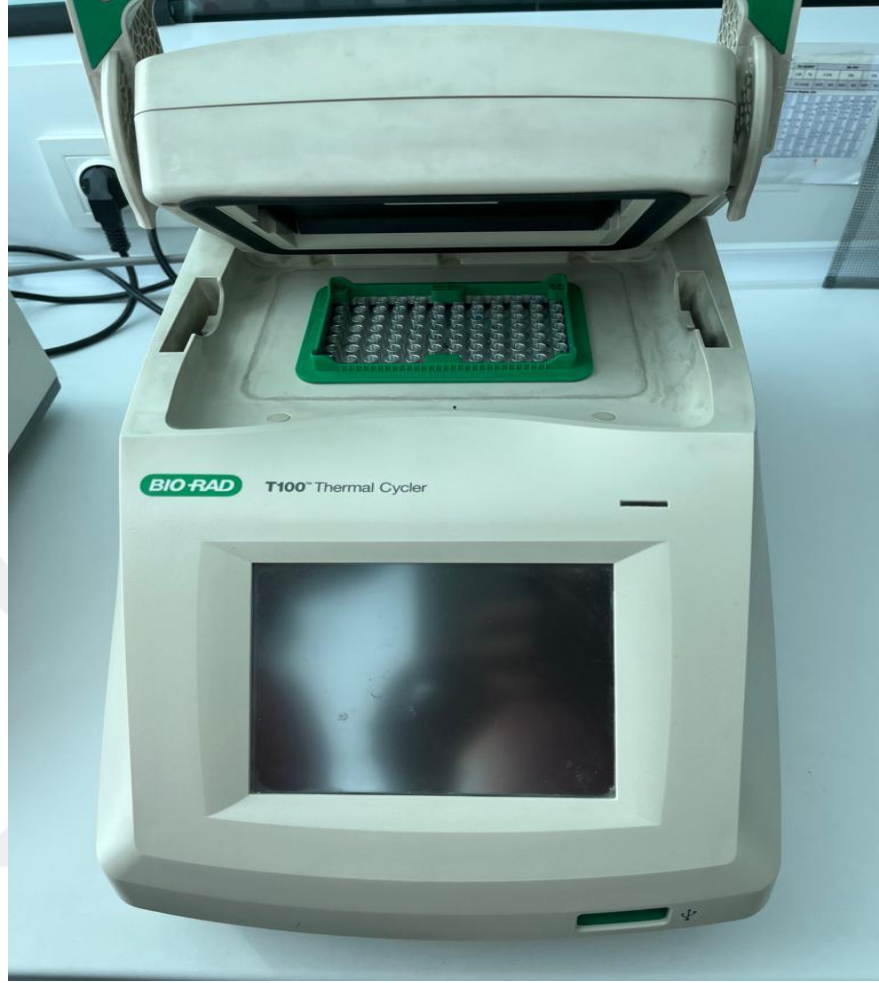
3.12.2.cDNA

RNA konsantrasyonu ve saflığı, bir NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü (kaç ml koyacağımızı hesaplamak için). İzole edilen RNA’nın cDNA’ya çevrilmesi için Bioline marka SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Yapılan tüm işlemler firmanın önerdiği protokole göre yapıldı. Deneyin tüm aşamaları buz üzerinde gerçekleştirildi.

Total RNA (n)ul, 5xTBuffer 4ul, Revers Transkriptase 1ul, DNAase RNAase free water totalde 20 ul olacak şekilde hesaplanarak mikrosantrifüj tüplerine konuldu. cDNA thermal cycler cihazındaki hazır program kullanılarak elde edildi ve -20 derecede bekletildi (Şekil 3.6).

cDNA Program Protokolü;

25°C	10 dk	Primer Yapışması
42°C	15 dk	Ters Transkriptasyon
48°C	15 dk	Yüksek Yapılandırılmış RNA
85°C	5 dk	İnaktivasyon
4°C	5 dk	Bekletme veya buzda soğutma



Şekil 3.6: RNA konsantrasyonlarını ölçmek için kullandığımız cDNA thermal cycler cihazı

3.12.3.RT-PCR

2x SensiFAST SYBR Hi-ROX Mix	10 µl
10 µl forward	0,8 µl
10 µl reverse primer	0,8 µl
cDNA	8,4 µl 'ye kadar
H ₂ O	20 µl 'ye tamamlayacak miktarda
Toplam	20 µl



Şekil 3.7: Real time PCR için kullandığımız StepOne Plus qRT-PCR, Applied Biosystem cihazı

4.BULGULAR

4.1. Deselülerizasyon süreci

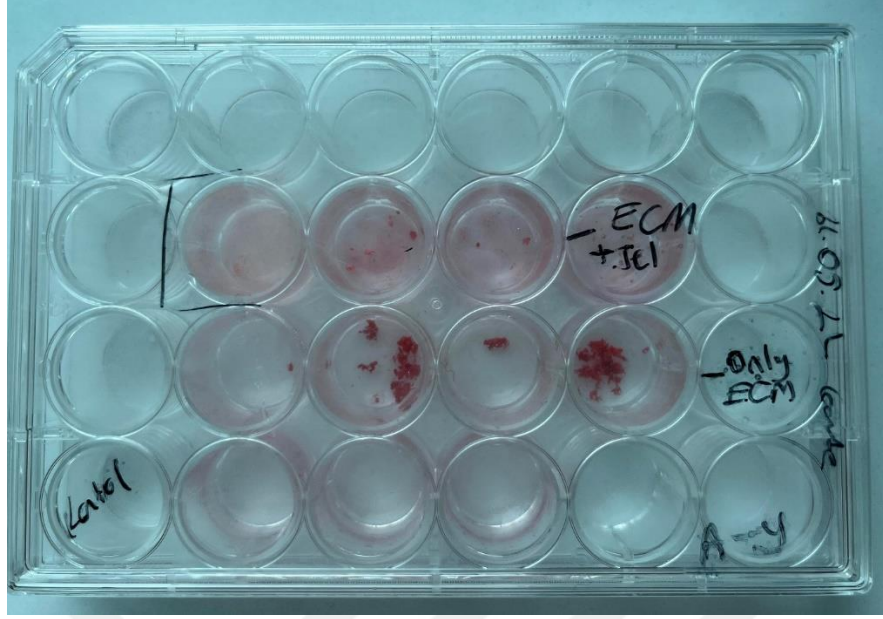
Makroskopik olarak, matrisin mimarisi, işlemenin ardından iyi korunmuş olarak görünüyordu. Masson'un Trichrome boyaması hücresizleştirme işleminin etkinliğini doğruladı, bu da işlemenin sonunda matriksin herhangi bir bölümünde hiçbir kalıntı hücre veya hücresel kalıntı birikimi olmadığını gösterdi. Malzemenin yığınının makroskopik olarak katkıda bulunan ve tüm yapı iskelesine potansiyel olarak mekanik bütünlük kazandıran demetler oluşturacak şekilde düzenlenmiş, yoğun şekilde paketlenmiş kolajen lifleri görüldü.

4.2.Hücre ekim sonuçları

Yapı iskeleleri üzerine ve kontrol gruplarına ekim yapılarak, farklılaştırma medyumu eklenmesinin ardından 14. günde yapılan histolojik incelemede, ADKH'nin iskelelere yapıştığını ve yayıldığını gösterdi. DAM ve DAM+ jel yapı iskelesinin gevşek yapısı, yapıların üst, orta ve alt bölümlerinde hücresel infiltrasyonu kolaylaştırdığı gözlemlendi. Farklılaşma medyumu ilavesi ile yapılan ve proliferasyon medyumu ile yapılan kontrol gruplarında da yer yer yağ dokuya farklılaşma izlendi.

4.3.Oil-red-O boyama sonuçları

15. günde yapılan oil-red-o boyamalara ait makroskobik görünüm Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Makroskobik olarak bakıldığında indüklenmiş DAM mikro taşıyıcıları üzerinde kültürlen ADKH'lerde, farklılaşmanın indüklenmesinden 15 gün sonra Oil Red O boyamasıyla kapsamlı lipit yüklemesi tespit edildi. DAM+jel grubuna bakıldığında da bir miktar lipit yüklemesini işaret eden renk değişikliği görülmektedir. Kontrol grubunda anlamlı bir renk değişikliği gözlenmiyordu.

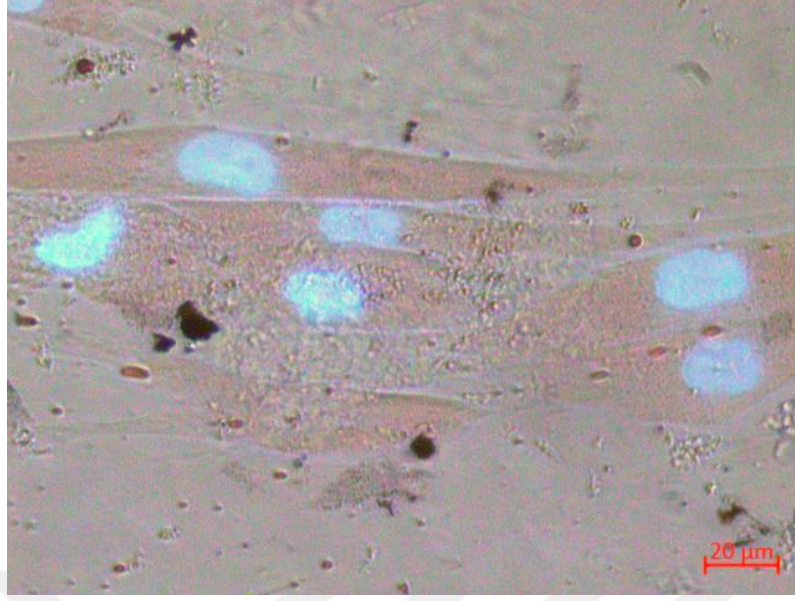


Şekil 4.1: Deney gruplarında oil-red-o boyama sonrası makroskopik görünüm

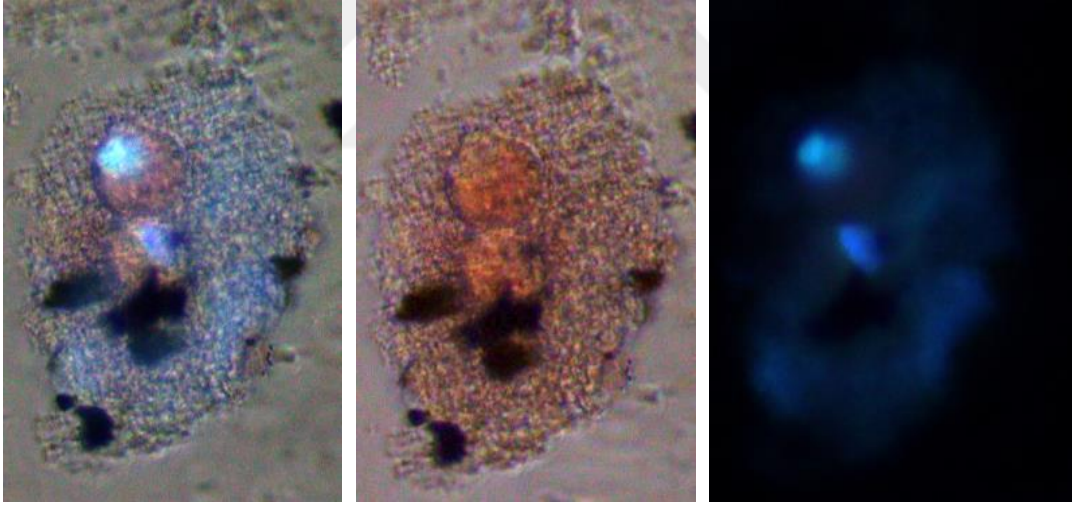
15. günde yapılan oil-red-o boyamalara ait mikroskopik görünümünde ise kontrol gruplarında sitoplazma içinde lipit birikimi gözlenmezken, yalnız ECM olan grupta sitoplazma içinde multiokuler lipit birikimi, ECM+jel olan grupta ise sitoplazma içinde unilocular lipit birikimi gözlemlendi (Şekil 4.2, 4.3, 4.4).



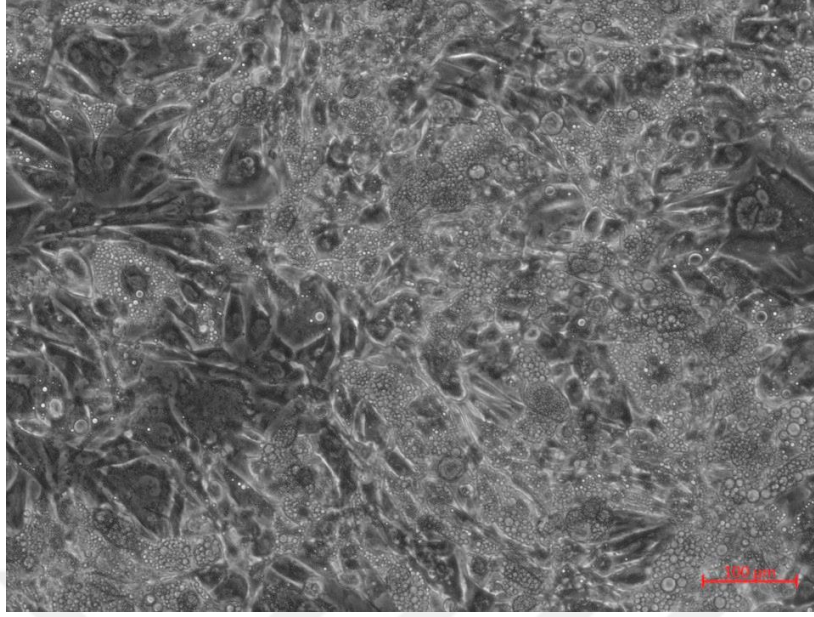
Şekil 4.2: Kontrol grubunda oil-red-o boyama sonrası mikroskopik görünüm



Şekil 4.3: ECM grubunda oil-red-o boyama sonrası mikroskopik görünüm



Şekil 4.4: ECM+jel grubunda oil-red-o boyama sonrası mikroskopik görünüm



Şekil 4.5: İki boyutlu kontrol grubu (farklılaşma medyumunu ilave edilen ADKH) 15. günde hücrelerde farklılaşma, yağ damlacıklarının birikimi ile net şekilde görünüyor

4.4.cDNA sonuçları

Tablo 4.1: cDNA'lerin nanodrop cihazında ölçümü

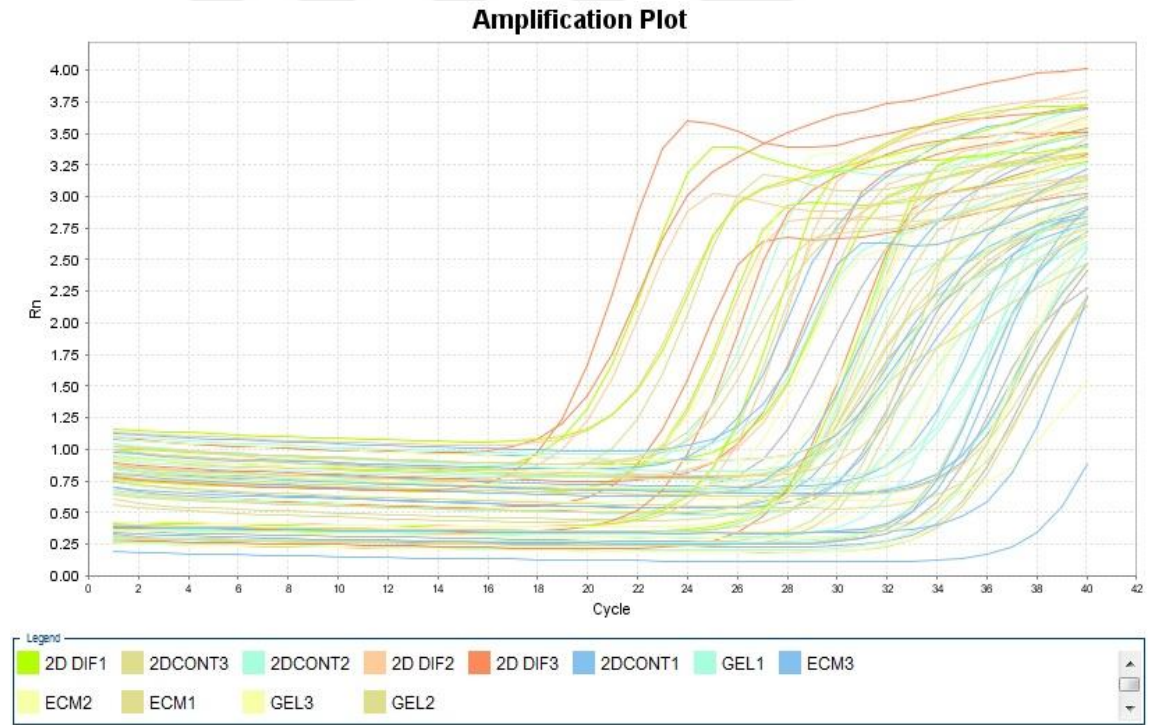
	ng/ μ L	A260/280	A260/230
ECM	70,7	1,35	0,21
ECM+jel	105,3	1,56	0,45
Kontrol	156,8	1,53	0,24
ECM	70,5	1,41	0,19
ECM+jel	106	1,52	0,27
Kontrol	144,9	1,40	0,21

4.5.RT-PCR Sonuçları

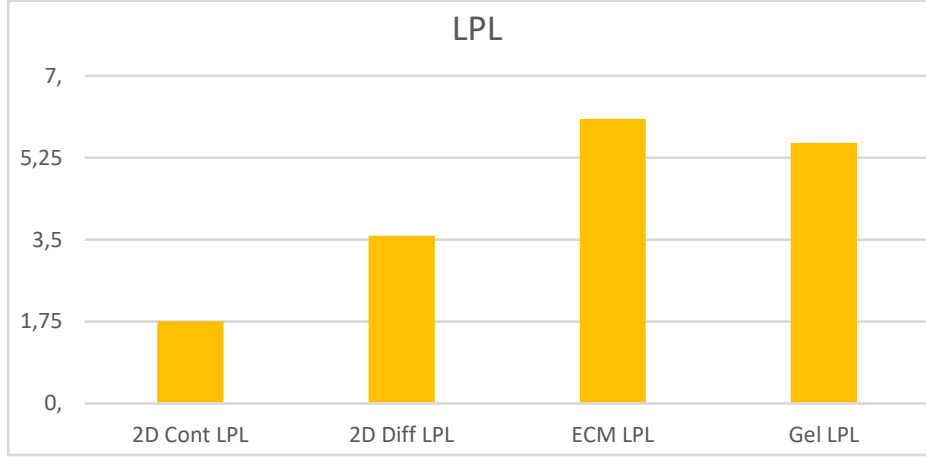
RT-PCR, ana adipojenik düzenleyiciler PPAR γ ve ayrıca erken adipojenik marker LPL'nin ekspresyonunu kalitatif olarak analiz etmek için gerçekleştirildi. Housekeeping gen olarak GAPDH ve kontrol amaçlı olarak osteojenik marker olan ALP, kondrojenik marker olan Kıkırdak Oligomerik Matriks Proteini (COMP) ve mezenkimal hücre belirteci olan CD90 bakıldı.

Adipojenik genlerin tümü, indüklenmiş DAM numunelerinde ve indüklenmiş DAM+jel numunelerinde 15 günde ifade edildi. Buna karşılık, indüklenmiş kontrol numunelerinde de daha az olmak üzere adipojenik gen ekspresyonu gözlemlendi.

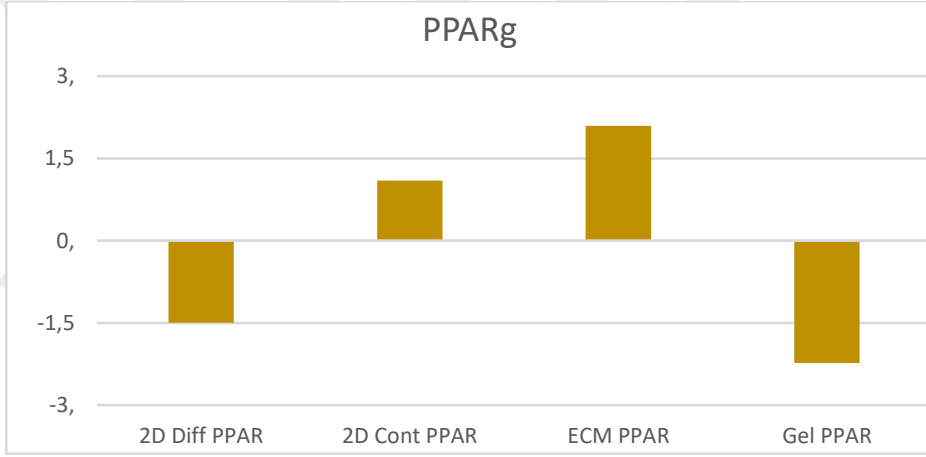
Kıyaslamalı olarak DAM+jel ve kontrol gruplarına göre sadece DAM taşıyıcıları üzerinde kültürlen hücrelerde adipojenik markerlar daha yoğun eksprese ediliyordu.



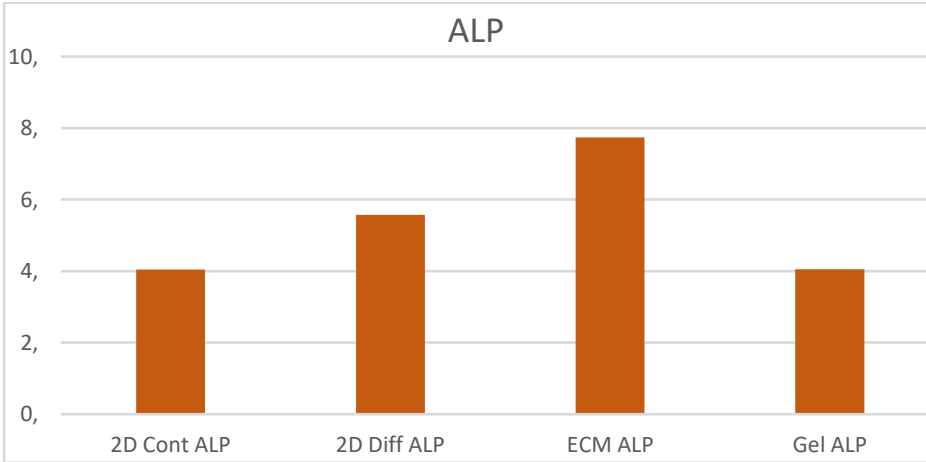
Şekil 4.6: RT-PCR amplifikasyon grafiği



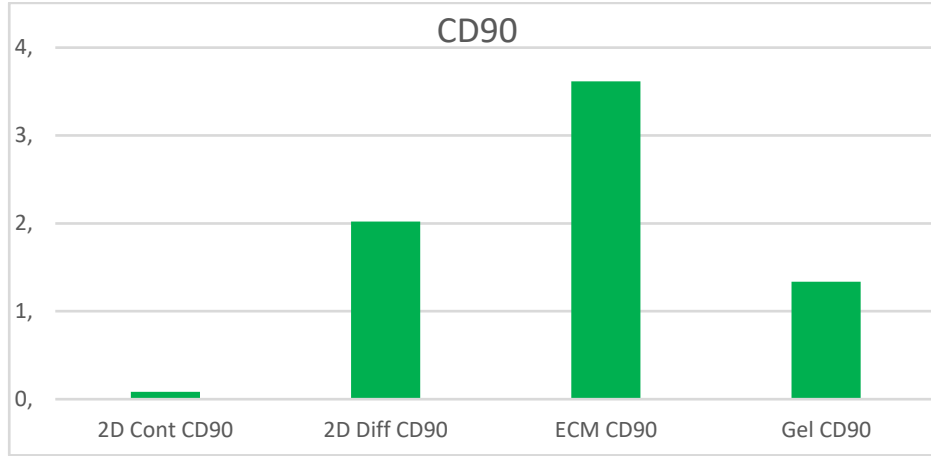
Şekil 4.7: Deney gruplarında LPL gen ifadesinin grafiği



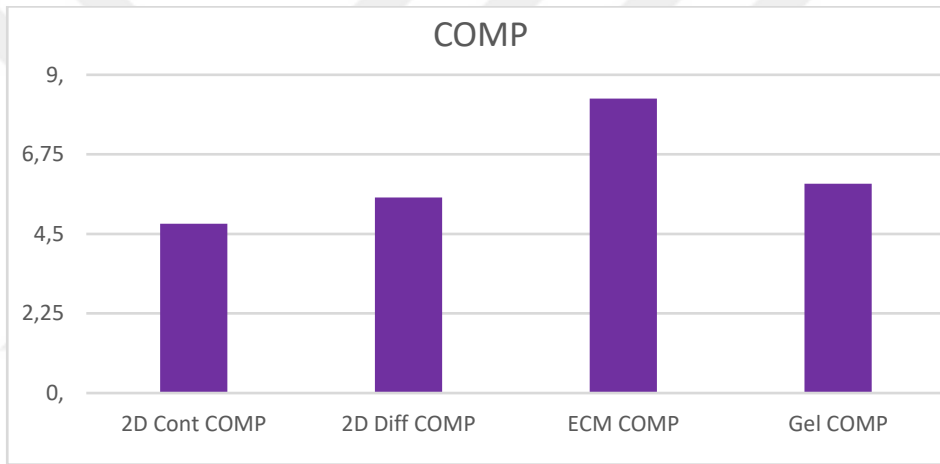
Şekil 4.8: Deney gruplarında PPARg gen ifadesinin grafiği



Şekil 4.9: Deney gruplarında ALP gen ifadesinin grafiği



Şekil 4.10: Deney gruplarında CD 90 gen ifadesinin grafiği



Şekil 4.11: Deney gruplarında COMP gen ifadesinin grafiği

5.TARTIŞMA

Yağ dokusu mühendisliği araştırmalarının mevcut gövdesi, birçok farklı türde doku iskelesinin hücresel bağlanmayı ve adipojenik farklılaşmayı destekleyebildiğini göstermektedir (Flynn, 2010). Deney tasarımıındaki ve uygulanan hücre kaynaklarıındaki farklılıklar nedeniyle, bu çalışmaların sonuçlarını doğrudan karşılaştırmak ve adipogenez için "ideal" tasarlanmış bir mikro-ortam tanımlamak zordur.

Bununla birlikte, literatürü gözden geçirirken, bu özel uygulama için gerekli olan doku iskelesi malzeme özellikleri hakkında bazı genel sonuçlar çıkarmak mümkündür.

Mekanik özellikler özellikle önemlidir ve ideal olarak iskele, dahil edileceği doğal dokuları taklit eder (Greenwald ve ark., 2000). Makroskopik düzeyde bu, implantın doğal bir his vermesini sağlamak, inflamasyonu ve skar dokusu oluşumunu en aza indirmek için önemlidir. Bununla birlikte, son araştırmalar, substrat sertliğinin, iskeleye ekilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma tepkisini de çarpıcı biçimde etkilediğini, yani hücresel düzeyde de mekanik özelliklerin önemli olduğunu vurgulamıştır (Engler ve ark., 2006). Normal yağ dokusunun 3-4 kPa aralığında Young modülüne sahip olduğu düşünüldüğünde, genel olarak adipoz doku mühendisliği uygulamaları için; yumuşak, esnek ve elastik bir yapı iskelesi en uygun olacaktır (Samani ve ark., 2003).

Bununla birlikte, yapıların implantasyon sonrası dokulara uygulanan kuvvetlere dayanacak yeterli mekanik bütünlüğe sahip olması zorunludur. Uzun süreli çalışmalarda iskelesinin yapısal çöküşünün adipoz doku rejenerasyonu açısından yıkıcı olduğu bildirilmiştir (Vonheimburg ve ark., 1994; Patrick ve ark., 2002). İdeal olarak, yapı iskelesi malzemesi, iskeleye ekilen mezenkimal kök hücrelerden yeni olgun yağ dokusu gelişimini destekleyecek bir hızda bozunmalıdır (Flynn, 2010).

Doğal olarak türetilen biyomalzemeler, bir dizi doku mühendisliği uygulaması için büyük umut vaat etmektedir. İmmünojenik reaksiyon potansiyelini en aza indirerek, uzun vadeli stabiliteyi sağlamaktadırlar. Dokulardan türetilen bu materyalleri elde etmek için genellikle bir dizi işlem ön gerekmektedir. (Badylak, 2002). Doku hücresizleştirme (deselülerizasyon) bu yöntemlerden birisidir ve üç boyutlu yapı iskelelerinin üretimi için özellikle etkili olan bir stratejidir. Tipik olarak işlem, hücresel materyalin çıkarılmasına ve hücre dışı matrisin (ECM) toplanmasına katkıda bulunan fiziksel, kimyasal ve biyolojik arıtma aşamalarının bir kombinasyonunu içerir (Gilbert ve ark., 2006).

Son 10 yıl içinde deselülerizasyon yöntemi ile elde edilen ECM temelli iskele üretim tekniği ile, biyolojik kaynaklı ECM'nin doku mühendisliği ve klinik uygulamalarda bir biyomalzeme olarak kullanımını olanaklı kılacak yeni bir süreç başlamıştır. Hücresizleştirme tekniğinin temel prensibi, çeşitli kaynaklardan elde edilen doku veya organların uygun yöntemler ile hücrelerinden arındırılmasına ve bu yolla biyouyumlu doğal üç-boyutlu yapıya sahip biyoiskelelerin elde edilmesine dayanmaktadır (Cornwell 2009). Yöntemin uygulanmasındaki temel başarı kriteri, hücresizleştirme aşamasında hücresel bileşenler tamamen uzaklaştırılırken, mevcut dokudaki hücreler tarafından salgılanan/sentezlenen aktif ECM bileşiminin büyük oranlarda korunmasıdır.

Yapılan hücresizleştirme çalışmalarında, ECM temelli biyomalzemelerin hücresel davranışlarını koordine ederek optimal doku işleyişini sağlamada etkin roller üstlenen kollajen tiplerini, glikozaminoglikanlar ile dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin doğal yapılarında aktif durumda korunabildiği gösterilmiştir (McDevitt ve ark., 2003; Hodde ve ark., 2005).

Dokulardan elde edilecek ECM'nin doğal üç-boyutlu yapısı ve çok yönlü aktif bileşiminin önemli ölçüde korunabilmesi sayesinde, hücresizleştirilmiş doku ve organ kaynaklı ECM'ler, günümüzde rejeneratif tıp ve doku mühendisliği çalışmalarında biyoiskele olarak ele alınabilmektedir. Bugüne kadar, ince barsak submukozası, kalp kapağı, deri, tendon, mesane duvarı, damar, kas gibi dokular başta olmak üzere çeşitli doku tipleri klinik öncesi doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmış ve elde edilen başarılı sonuçlar ışığında bu ürünler kliniğe aktarılabilmiştir (Hoshiba ve ark., 2010).

Hücresizleştirilmiş plasenta, kıkırdak ve kemik, sırasıyla adipojenik, kondrojenik ve osteojenik uygulamalar için mezenkimal kök hücrelerle kombinasyon halinde araştırılmıştır (Flynn LE ve ark., 2008; Zhao YN ve ark., 2009). Daha yakın zamanlarda, yağ, adipoz doku rejenerasyon stratejileri için zengin bir insan ECM kaynağı olarak tanımlanmıştır (Uriel ve ark., 2008). Yağ matrisi, tip I-VI kolajenlerin yanı sıra laminin ve fibronektin gibi diğer ECM bileşenlerini içerir (Streuli, 1999). Sağlam bir bazal membran kaynağı, doku mühendisliğinde özellikle ilgi çekicidir, çünkü bu yapının hem organogenez hem de yara iyileşmesi sırasında hayati bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Streuli, 1999). Bugüne kadar, büyük yağ dokusu bloklarından iyi korunmuş 3-D

mimarisi ile bozulmamış ECM'nin toplanmasını kolaylaştıran hiçbir metodoloji tarif edilmemiştir. Matriks bileşimi, hücrel tepkiye aracılık etmede önemli bir faktör olsa da, 3 boyutlu mikro ortamın organizasyonu eşit derecede önemlidir (Cukierman ve ark., 2002).

Mevcut çalışmamızda, insan yağ dokusundan eksize edilmiş blokların hücreleştirilmesi ve bunlardan yağ dokusu rejenerasyonu için yapı iskelelerinin geliştirilmesi için uyguladığımız yöntem araştırıldı. Genel strateji, plastik ve rekonstrüktif cerrahi alanlarında geniş uygulanabilirliğe sahip biyomateryaller geliştirmek için, abdominoplasti veya diğer estetik cerrahi eksizyonel işlemler sırasında alınan ve tipik olarak atılan bol miktarda insan ekstraselüler matris kaynaklarından yararlanmaktır.

Adipoz doku mühendisliğinde, yapı iskelesi olarak hücreleştirilmiş yağ dokusunun (DAM) potansiyelini ve 3-D mikro ortamın hücrel davranış üzerindeki etkisini anlayabilmek için insan ADKH'nin in vitro adipojenik tepkisi kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Elde ettiğimiz sonuçlar ECM'nin adipojenik doku mühendisliğinde ADKH üzerinde adipojenik tepkiye yol açtığını ve üç boyutlu mikro ortam sağlayarak unilocular sitoplazmik yağ birikimini desteklediği yönündeydi. Bu görünüme farklılaşma medyumunu uygulanan iki boyutlu kontrol gruplarında rastlanmadı. İki boyutlu kültür ve farklılaşma medyumunu uygulanan kontrol gruplarında dahi yağ hücrelerinde sitoplazmada multilocular yağ birikimi izlenmekteydi. Bu da bize üç boyutlu hücre kültürünün oluşturduğu mikroortamın, beyaz yağ dokusu elde etmek için oldukça avantajlı olduğunu düşündürdü.

Dokulardan veya organlardan elde edilen ECM'lerin, hedeflenen dokunun iskele yapısı ve içeriğini karşılamsı açısından önemli avantajları vardır. Ancak sağladıkları avantajlara ve erken klinik çalışmalarda elde edilen başarılı sonuçlara rağmen, bulundurdıkları bazı dezavantajlar klinik uygulamalarda yaygınlaşmalarını engellemektedir. Doku veya organ temelli ECM üretiminde otolog doku/organ teminindeki sınırlamalar, bugüne kadar ECM kaynaklı malzeme üretimini de sınırlayan başlıca faktör olmuştur. Alternatif sayılabilecek allojenik veya zenojenik dokuların kullanımında "etkin olmayan deselülerizasyon işlemlerinden" kaynaklanabilen yangısal (inflamatuvar) yanıtın gözlenmesi veya patojen transferi gibi büyük riskler her zaman mevcuttur (Erdag ve Morgan, 2004). İstenmeyen bağışıklık (immünojenik) yanıtının en

aza indirilmesi için, deselülerizasyon prosesinin iyi bir şekilde optimize edilmesi ve antijenik epitopların uzaklaştırılması şarttır. Ancak, dokuların ve organların üç-boyutlu kompleks yapıları düşünüldüğünde bu işlemin kontrol edilebilmesi oldukça zordur (Badylak ve ark., 2009).

Dokular ve/veya organlardan doğal ECM'nin elde edilmesine alternatif bir yaklaşım olarak, in vitro şartlarda sürdürülen hücre kültürlerinden ECM elde edilmesi ve doku mühendisliği biyoiskelesi üretiminde hammadde olarak kullanılması dikkat çekmeğe başlayan bir diğer yeni yaklaşımdır (Wolchok ve Tresco, 2010; Wolchok ve Tresco, 2012). Bu yaklaşım, temelde in vitro şartlarda kültürü yapılan hücreler tarafından sentezlenen doğal hücre dışı matriksin toplanması esasına dayanmaktadır. Kültür yüzeyinde belirli bir yoğunluğa ulaşan hücreler standart deselülerizasyon protokolleri ile ortamdan uzaklaştırılırken, hücrelerin salgıladıkları doğal biyoaktif molekülleri ve proteinleri içeren hücre dışı matriks ortamı toplanarak, çok amaçlı biyomalzeme olarak veya hücre kültür yüzeyi olarak kullanılabilir (Gilbert ve ark., 2006). Hücre kültürü ECM'si elde edilme yaklaşımı ile doku/organ kaynaklı ECM'lerde karşılaşılan bazı dezavantajların üstesinden gelme ve ideal hücre dışı ortamı in vitro şartlarda taklit etme imkanı ortaya çıkmaktadır. Bu bakımdan, hücre kültürü ECM'sinin doku mühendisliği ve hücre tedavisi uygulamalarında etkin kullanım potansiyelinin olduğunu belirtmek mümkündür. Ancak yeterli ECM dokusu elde edilemediği için bulunan bu alternatif yöntemler daha riskli ve maliyetlidir. Oysa son yıllarda oldukça popüler hale gelen estetik uygulamalar sayesinde birçok kaynak olabilecek doku tıbbi atıklara girmektedir. Bu yöntem ile doku mühendisliği uygulamaları için bulunmaz bir atıkların geri dönüşümü fırsatı yaratmaktadır ve doğal malzemelerde en büyük sorun olan kaynak azlığı sorununu ortadan kaldırmaktadır.

Yağ dokusu, doku mühendisliği uygulamaları için hem insan kök hücrelerin hem de ECM içeren zengin ve harcanabilir bir kaynaktır. Bu çalışmada kullanılan hücresizleştirme protokolü, büyük hacimli sağlam ECM bileşenlerinin toplanmasını kolaylaştırır. Dokunun insan kaynaklı olması, tipik olarak sığır veya domuz kollajeni gibi hayvansal ürünlerin kullanımıyla ilişkili olan ksenojenik hastalık bulaşmasının yanı sıra immün reaksiyon/duyarlılık ile ilişkili endişeleri azaltır. Protokol, enzimatik sindirim ve solvent ekstraksiyonunun ek aşamalarını dahil ederek daha büyük doku bloklarını laboratuvarında işlemeyi kolaylaştırmıştır.

Bugüne kadar yumuşak ve sert doku rekonstrüksiyonunda alloplastik malzemeler sıklıkla kullanılmıştır. DAM, hem otolog hem allojenik olarak kullanılma potansiyeli olan bir malzemedir. Kurutulma işlemlerinden geçtiği için depolamaya ve doku bankasında uzun süre saklanmaya müsait gözükmektedir. Bu da allojenik olarak kullanımı kolaylaştırabilecek bir avantajdır. Her gün çeşitli estetik operasyonlarla önemli miktarlarda insan yağ dokusu çıkartılıp tıbbi atık olarak atılmaktadır. Yağ dokusunun hastanelerden serum fizyolojik içerisinde merkezi bir tesise gönderilip orada işlem için göreceği bir sistem kurulabileceği gibi hastadan alındıktan sonra dondurulup belirli zamanlarda merkezi tesislere transferi sağlanabilir. Donma çözünme döngüsü de deselülerizasyon işleminin bir parçası olarak kullanılabilir. Böylelikle ihtiyaç halinde kullanılmak üzere dev hacimli ve düşük maliyetli allojenik doku iskeleleri elde etmek mümkün olacaktır. Aynı şekilde daha küçük hacimli uygulamalar için, liposuction yoluyla alınan yağ toplanarak, işlenebilir ve büyütme için otolog bir materyal olarak kullanılabilir.

Alternatif hücresizleştirme yaklaşımları deselülerizasyon stratejilerini optimize etmek için araştırılmıştır. Özellikle, iyonik olmayan deterjan, Triton-X 100; ve anyonik deterjanlar lauroyl sarkosinat, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve sodyum deoksikolatı içeren protokoller üzerinde çalışılmıştır. Bu deterjanların tümü, diğer doku türlerinin hücresizleştirilmesinde değişen derecelerde başarı elde etmiştir (Flynn, 2010). Deterjan kullanımı, işlenmiş matriste kalıntı sitotoksik kimyasalların mevcudiyeti potansiyeli nedeniyle güvenlikle ilgili endişeleri artırmaktadır. Bu nedenle ilerleyen aşamalarda insan çalışmalarında kullanılacağımız zaman protokolümüzden deterjan kullanımı çıkarılarak alternatif protokollerin kullanımına ihtiyaç duyulabilecektir. Şu anda kullandığımız protokol, en kısa işlem süresi çerçevesinde ECM'deki makroskopik değişiklikleri en aza indirirken, hücresel bileşenleri dokulardan çıkarmada oldukça etkili olması sebebiyle araştırıldı. Bu çalışmada işlem sürelerini ve yaklaşımın maliyetlerini azaltmak ve DAM'ın doku iskelesi olarak yararlılığını değerlendirmek açısından oldukça önemliydi.

Bu çalışma, hücresel yanıtı yönlendirmede üç boyutlu doku mimarisinin önemini desteklemektedir. Hücresel fraksiyonun dokudan uzaklaştırılması doku mimarisini bir şekilde değiştirmekte fakat yüksek derecede doğal matris ortamını korumaktadır. Histolojik boyama sonuçları, vasküler yapının en azından bir bölümünün korunduğunu

gösterir, bu da yapıyı vaskülarize etmek için sızan endotelial hücrelerin organizasyonunu teşvik etme açısından nihai olarak faydalı olabilir. Gen ekspresyonu sonuçları, hücreleştirilmiş yağ dokusunun, insan ADKH'nin adipojenik farklılaşması için izin veren bir mikro-ortam sağladığını açıkça göstermektedir.

Adipoz doku mühendisliği, plastik cerrahi için oldukça ihtiyaç duyulan ve büyük açık olan bir alandır. Gerek rekonstrüktif cerrahi uygulamalarda, travma ve tümör cerrahisi sonrası oluşan doku defektlerinin giderilmesinde, deforme dokuların düzeltilmesinde, gerek estetik amaçlı olarak dokulara hacim ve şekil verilmesinde büyük fayda sağlayacak bir işlemdir. Deselülerize adipoz matriks, allojenik doku iskelesi olarak büyük bir potansiyele sahiptir, kullanıma hazır allojenik bir biyomateryal olarak doku bankasında saklanması üzerine ise ileri klinik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle sağlıklı hastalardan estetik amaçlı olarak alınan fazla yağ dokusunun, işlemlerden geçirilerek yağ doku iskelesi olarak saklanabilecek olması ve ihtiyaç duyan hastanın kendi hücreleri ile ekim yapılarak kullanılabilmesi klinik uygulamalarda büyük bir çığır açacak ve plastik cerrahi uygulamalarını kolaylaştıracak, birçok hasta için umut olacak bir gelişmedir.

6.SONUÇ

Yağ dokusu, içerisinde hem adipoz kaynaklı kök hücre, hem de ECM bulundurması ile doku mühendisliği çalışmaları için eşsiz zengin ve harcanabilir bir kaynak oluşturmaktadır. Estetik amaçlı olarak hastalardan elde edilen fazla atık yağ dokusunun ekstraselüler matrikse çevrilerek adipoz doku mühendisliğinde kullanılabileceğini öngörülmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların, adipoz doku mühendisliğinde, deselülerize ekstraselüler matriks ve adipoz kaynaklı kök hücrenin birlikte kullanımının oldukça etkili bir yağ doku kaynağı oluşturduğunu ve ileri çalışmalar ile klinikte yumuşak doku rekonstrüksiyonuna ihtiyacı olan hastalara umut vadettiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

Abberton KM, Bortolotto SK, Woods AA, Findlay M, Morrison WA, Thompson EW ve ark.(2008). Myogel, a novel, basement membrane-rich, extracellular matrix derived from skeletal muscle, is highly adipogenic in vivo and in vitro. *Cells Tissues Organs*;188(4):347-58. doi: 10.1159/000121575. Epub 2008 Mar 20.

Alhadlaq A, Tang M, Mao JJ.(2005) Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: implications in soft tissue augmentation and reconstruction. *Tissue Eng*;11(3-4):556-66.

Ashinoff R. (2000). Overview: soft tissue augmentation. *Clin Plast Surg* ; 27: 479–487.)

Atala, A., S. B. Bauer, S. Soker, J. J. Yoo, and A. B. Retik. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 367:1241–1246, 2006.

Badylak SF. (2002). The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol* ;13(5):377-83.

Badylak, S.F., Freytes, D.O. and Gilbert, T.W. 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 5(1);1-13.

Bargut TCL, Souza-Mello V, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. (2017) Browning of white adipose tissue: lessons from experimental models. *Horm Mol Biol Clin Investig*. Jan 18;31(1). doi: 10.1515/hmbci-2016-0051.

Beahm, E.K., and Walton, R.L. (2009). Issues, considerations, and trends in bilateral breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 124, 1064.

Beahm EK, Walton RL, Patrick Jr CW.(2003) Progress in adipose tissue construct development. *Clin Plast Surg*;30(4):547-58.

Boudreau, N., and Weaver, V. (2006). Forcing the third dimension. *Cell* 125, 429.

Brey E.M., Patrick C.W. Jr. (2000). "Tissue engineering applied to reconstructive surgery", *IEEE Eng Med Biol Mag*, 19: 122–125.

Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84,277.

Caplan AI.(2005) Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* ;11(7-8):1198-211.

Caplan, A.I., (1991). "Mesenchymal stem cells", *J Orthop Res*, 9: 641-650.

Chan, B. P., ve Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(SUPPL. 4). <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>.

Chan CW, McCulley SJ, Macmillan RD.2008 Autologous fat transfer: a review of the literature with a focus on breast cancer surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* ; 61: 1438–1448.

Cho SW, Kim SS, Rhie JW, Cho HM, Choi CY, Kim BS.(2005). Engineering of volume stable adipose tissues. *Biomaterials*;26(17):3577-85.

Choi JH, Gimble JM, Lee K, Marra KG, Rubin JP, Yoo JJ, et al. (2010) Kaplan Adipose Tissue Engineering for Soft Tissue Regeneration *Tissue Eng Part B Rev*. Aug; 16(4): 413–26.

Choi M, Small K, Levovitz C, Lee C, Fadl A, Karp NS. (2013). The volumetric analysis of fat graft survival in breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*;131:185-91.

Choi JS, Yang HJ, Kim BS, Kim JD, Kim JY, Yoo B, ve ark.(2009). Human extracellular matrix (ECM) powders for injectable cell delivery and adipose tissue engineering. *J Control Release*;138(1):2-7.

Chung MT, Hyun JS, Lo DD, Montoro DT, Hasegawa M, Levi B, et al. (2013). Micro-computed tomography evaluation of human fat grafts in nude mice. *Tissue Eng Part C Methods*;19:227-32.

Cornwell, K.G., Landsman, A. and James K.S. 2009. Extracellular matrix biomaterials for soft tissue repair. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, 26(4); 507-23.

Crisan M., Yap S., Casteilla L., Chen C.W., Corselli M., Park T.S, et al. (2008). "A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs", *Cell Stem Cell*, 3:301-313.

Cukierman E, Pankov R, Yamada KM.(2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol*;14(5):633-9.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*.174(3):101-9. doi: 10.1159/000071150.

Dolderer, J.H., Abberton, K.M., Thompson, E.W., Slavin, J.L., Stevens, G.W., Penington, A.J., ve ark. (2007). Spontaneous large volume adipose tissue generation from a vascularized pedicled fat flap inside a chamber space. *Tissue Eng* 13, 673.u

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* ;126(4):677-89.

Erdag, G. and Morgan, J. 2004. Allogeneic vs xenogeneic immune reaction to bioengineered skin grafts. *Cell Transplantation*, 13, 701-712.

Farmer, S.R. (2008) Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev* 22, 1269.

Fischbach C, Spruss T, Weiser B, Neubauer M, Becker C, Hacker M, et al.(2004) Generation of mature fat pads in vitro and in vivo utilizing 3-D long-term culture of 3T3-L1 preadipocytes. *Exp Cell Res*;300(1):54-64.

Flynn, L., Prestwich, G.D., Semple, J.L., and Woodhouse, K.A. (2007).Adipose tissue engineering with naturally derived scaffolds and adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 28, 3834.

Flynn, L., Semple, J.L., and Woodhouse, K.A.(2006). Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 79, 359.

Flynn LE.(2010). The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. Jun;31(17):4715-24. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.046.

Flynn LE, Prestwich GD, Semple JL, Woodhouse KA.(2008). Proliferation and differentiation of adipose-derived stem cells on naturally derived scaffolds. *Biomaterials*;29(12):1862-71.

Furth, M. E., Atala, A., Innovations, W. F., ve Carolina, N. (2014). Tissue Engineering : Future Perspectives. In Principles of Tissue Engineering (Fourth Edi). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00006-9>.

Gentleman E, Nauman EA, Livesay GA, Dee KC. (2006) Collagen composite biomaterials resist contraction while allowing development of adipocytic soft tissue in vitro. *Tissue Eng*;12(6):1639-49.

Gessner, K. (1551) *Conradi Gesneri medici Tigurine Historiae Animalium Lib. I de Quadripedibus uiuiparis* 842 .

Gomillion, C.T., and Burg, K.J.(2006). Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 27, 6052.

Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242.

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF.(2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* ;27(19):3675-83.

Gillies H, Millard DR. (1957). *The Principles and Art of Plastic Surgery*. London: Butterworth

Gimble J.M., Katz A.J., Bunnell, B.A., (2007). "Adipose-derived Stem cells for regenerative medicine", *Circ Res*,100:1249-1260.

Gir P, Brown SA, Oni G, Kashefi N, Mojallal A, Rohrich RJ. (2012) Fat grafting: evidence-based review on autologous fat harvesting, processing, reinjection, and storage. *Plast Reconstr Surg* ; 130: 249–258.

Greenwald SE, Berry CL.(2000) Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties. *J Pathol* ;190(3):292-9.

Guzik, T.J., Mangalat, D., and Korbout, R. (2006). Adipocytokines: novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 57, 505.

Halbleib M, Skurk T, de Luca C, von Heimburg D, Hauner H. (2003). Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials*. Aug;24(18):3125-32. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00156-x.

Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., and Martin, R.J. (2001) The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2, 239.

Hemmrich K, von Heimburg D, Rendchen R, Di Bartolo C, Milella E, Pallua N.(2005). Implantation of preadipocyte-loaded hyaluronic acid-based scaffolds into nude mice to evaluate potential for soft tissue engineering. *Biomaterials*. Dec;26(34):7025-37. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.065.

Hiraoka Y, Yamashiro H, Yasuda K, Kimura Y, Inamoto T, Tabata Y.(2006). In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng*. Jun;12(6):1475-87. doi: 10.1089/ten.2006.12.1475.

Hodde, J., Ernst, D.M. and Hiles, M.C. 2005. An investigation of the long-term bioactivity of endogenous growth factor in OASIS Wound Matrix. *Journal of Wound Care*, 14, 23-25.

Hoshiba, T., Lu, H., Kawazoe, N. and Chen, G. 2010. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opinions in Biological Therapy*, 10, 1717-1728.

Kang JH, Gimble JM, Kaplan DL.(2009). In vitro 3D model for human vascularized adipose tissue. *Tissue Eng Part A*;15(8):2227-36.

Kang, X., Xie, Y., and Kniss, D.A.(2005). Adipose tissue model using three-dimensional cultivation of preadipocytes seeded onto fibrous polymer scaffolds. *Tissue Eng* 11, 458.

Katz AJ, Llull R, Hedrick MH, Futrell JW. (1999) Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg* ;26(4):587-603.

Kaufman MR, Bradley JP, Dickinson B, Heller JB, Wasson K, O'Hara C, et al. (2007.) Autologous fat transfer national consensus survey: Trends in techniques for harvest, preparation, and application, and perception of short- and long-term results. *Plast Reconstr Surg*;119:323-31.

Lavik, E., and Langer, R. (2004). Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 1.

Lee, J.A., Parrett, B.M., Conejero, J.A., Laser, J., Chen, J., Kogon, A.J., ve ark. (2003). Biological alchemy: engineering bone and fat from fat derived stem cells. *Ann Plast Surg* 50, 610.

Lin, S.D., Wang, K.H., and Kao, A.P. (2008). Engineered adipose tissue of predefined shape and dimensions from human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 14, 571.

Lovett, M., Cannizzaro, C., Daheron, L., Messmer, B., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D.L. (2007). Silk fibroin microtubes for blood vessel engineering. *Biomaterials* 28, 5271.

Mauney, J.R., Nguyen, T., Gillen, K., Kirker-Head, C., Gimble, J.M., and Kaplan, D.L. (2007). Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials* 28, 5280.

McDevitt, C., Wildey, G.M. and Cutrone, R.M. 2003. Transforming growth factor beta1 in a sterilized tissue derived from the pig small intestine submucosa. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 637–640.

McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, et al. (2006) The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*; 24(5):1246-53.

Meyerrose TE, De Ugarte DA, Hofling AA, Herrbrich PE, Cordonnier TD, Shultz LD, et al. (2007) In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. *Stem Cells* ;25(1):220-7.

Mughal M, Sindali K, Man J, Roblin P. (2021). 'Fat chance': a review of adipose tissue engineering and its role in plastic and reconstructive surgery. *Ann R Coll Surg Engl. Apr*;103(4):245-249.

Nakajima I, Yamaguchi T, Ozutsumi K, Aso H. (1998). Adipose tissue extracellular matrix: newly organized by adipocytes during differentiation. *Differentiation* ;63(4):193-200.

Neubauer M, Hacker M, Bauer-Kreisel P, Weiser B, Fischbach C, Schulz MB, et al. (2005) Adipose tissue engineering based on mesenchymal stem cells and basic fibroblast growth factor in vitro. *Tissue Eng*;11(11-12):1840-51.

Owen, M. ve Friedenstein, A.J., (1988). "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors", *Ciba Found Symp*, 136: 42-60.

Patrick, C.W., Jr., Zheng, B., Johnston, C., and Reece, G.P.(2002). Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds. *Tissue Eng* 8(2), 283-93.

Patrick CW. Breast tissue engineering.(2004) *Annu Rev Biomed Eng* ;6:109-30.

Patrick Jr CW. (2000) Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection.*Semin Surg Oncol*;19(3):302-11.

Patrick, Jr C.W.(2001). Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *Anat Rec* 263- 361.

Polykandriotis E, Arkudas A, Horch RE, Kneser U. (2008). To matrigel or not to matrigel *Am J Pathol.* May;172(5):1441; author reply 1441-2. doi:10.2353/ajpath.2008.071215.

Risbud, M. V., ve Sittering, M. (2002). Tissue engineering: Advances in in vitro cartilage generation. *Trends in Biotechnology*, 20(8), 351–356.

Robb KP, Juignet L, Morissette Martin P, Walker JT, Brooks CR, Barreira C, Dekaban GA, Flynn LE .(2021). Adipose Stromal Cells Enhance Decellularized Adipose Tissue Remodeling Through Multimodal Mechanisms.*Tissue Eng Part A*. 2021 May;27(9-10):618-630. doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0180. Epub 2020 Oct 2.

Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, et al.(2005) Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *Exp Med*;201(9):1397-405.

Rusk, R. D. (1950). *Tissue Engineering*. Educational Forum, 15(1), 119–120.

Samani A, Bishop J, Luginbuhl C, Plewes DB. (2003). Measuring the elastic modulus of ex vivo small tissue samples. *Phys Med Biol* ;48(14):2183-98.

Sengupta D, Waldman SD, Li S.(2014) From in vitro to in situ tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* Jul;42(7):1537-45. doi: 10.1007/s10439-014-1022-8. Epub 2014 May 9.

Shanti, R.M., Janjanin, S., Li, W.J., Nesti, L.J., Mueller, M.B., Tzeng, M.B., ve ark.(2008). In vitro adipose tissue engineering using an electrospun nanofibrous scaffold. *Ann Plast Surg* 61, 566.

Shiffman MA, Mirrafati S. (2001.) Fat transfer techniques: The effect of harvest and transfer methods on adipocyte viability and review of the literature. *Dermatol Surg* ;27:819-26.

Solchaga LA, Dennis JE, Goldberg VM, Caplan AI. (1999). Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res.* Mar;17(2):205-13. doi: 10.1002/jor.1100170209.

Streuli C.(1999). Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* ;11(5):634-40.

Sultana, N., ve Khan, T. H. (2012). In vitro degradation of PHBV scaffolds and nHA/PHBV composite scaffolds containing hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering. *Journal of Nanomaterials*. <https://doi.org/10.1155/2012/190950>.

Tilg, H., and Moschen, A.R.(2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6, 772.

Tonelli, F. M. P., de Cássia Oliveira Paiva, N., de Medeiros, R. V. B., Pinto, M. C. X., Tonelli, F. C. P., ve Resende, R. R. (2017). Tissue Engineering: The Use of Stem Cells in Regenerative Medicine. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00012-7>.

Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, et al. (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure *Nature*. Aug 21;454(7207):1000-4. doi: 10.1038/nature07221.

Turner AE, Yu C, Bianco J, Watkins JF, Flynn LE.(2012). The performance of decellularized adipose tissue microcarriers as an inductive substrate for human adipose-

derived stem cells. *Biomaterials*. Jun;33(18):4490-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.026. Epub 2012 Mar 26.

Streuli C. (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* ;11(5):634-40.

Uriel S, Huang J, Moya ML, Francis ME, Wang R, Change S, ve ark. (2008) The role of adipose protein derived hydrogels in adipogenesis. *Biomaterials*;29:3712-9.

Vashi, A.V., Abberton, K.M., Thomas, G.P., Morrison, W.A., O'Connor, A.J., Cooper-White, J.J., ve ark. (2006). Adipose tissue engineering based on the controlled release of fibroblast growth factor-2 in a collagen matrix. *Tissue Eng* 12, 3035.

Von Heimburg, D., Kuberka, M., Rendchen, R., Hemmrich, K., Rau, G., and Pallua, N. (2003). Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs* 26, 1064.

Von Heimburg D, Lemperle G, Dippe B, Kruger S.(1994). Free transplantation of fat autografts expanded by tissue expanders in rats. *Br J Plast Surg*;47 (7):470-6.

Wang L., Johnson J.A., Zhang, Q., Beahm, E.E.(2013) Combining decellularized human adipose tissue extracellular matrix and adipose-derived stem cells for adipose tissue engineering. *Acta Biomater*. 2013 Nov; 9(11): 8921–31. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.06.035

Wang, Y., Blasioli, D.J., Kim, H.J., Kim, H.S., and Kaplan, D.L. (2006). Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 27, 4434.

Weiser, B., Prantl, L., Schubert, T.E., Zellner, J., Fischbach, Teschl, C., ve ark.(2008). In vivo development and long-term survival of engineered adipose tissue depend on in vitro precultivation strategy. *Tissue Eng Part A* 14, 275.

Wolchok, J.C. and Tresco, P.A. 2010. The isolation of cell derived extracellular matrix constructs using sacrificial open-cell foams. *Biomaterials*, 31, 9595-9603.

Wolchok, J.C. and Tresco, P.A. 2012. Using growth factor conditioning to modify the properties of human cell derived extracellular matrix. *Biotechnology Progress*, 28, 1581-1587.

Zhang N, Kohn DH.(2016) Using polymeric materials to control stem cell behavior for tissue regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2012 Mar;96(1):63-81. doi: 10.1002/bdrc.21003.

Zhang, P. X., Han, N., Kou, Y. H., Zhu, Q. T., Liu, X. L., Quan, D. P., ... Jiang, B. G. (2019). Tissue engineering for the repair of peripheral nerve injury. *Neural Regeneration Research*, 14(1), 51–58. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.243701>.

Zhao YN, Lin H, Zhang J, Chen B, Sun WJ, Wang X, ve ark. (2009). Crosslinked threedimensional demineralized bone matrix for the adipose-derived stromal cell proliferation and differentiation. *Tissue Eng Part A* ;15(1):13-21.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al.(2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* ;13 (12):4279-95.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28. doi:10.1089/107632701300062859.

EKLER

EK-1: İntihal Raporu

EK-2: Etik Kurul Onayı

EK-3: Özgeçmiş



EK-1: İNTİHAL RAPORU

Gamze Tez 1

ORIGINALITY REPORT

14%

SIMILARITY INDEX

PRIMARY SOURCES

1	acikerisim.istinye.edu.tr Internet	1010 words — 9%
2	9lib.net Internet	124 words — 1%
3	www.tip.ibu.edu.tr Internet	72 words — 1%
4	www.biyologlar.com Internet	35 words — < 1%
5	acikbilim.yok.gov.tr Internet	25 words — < 1%
6	repository.bilkent.edu.tr Internet	23 words — < 1%
7	Turner, A.E.B.. "The performance of decellularized adipose tissue microcarriers as an inductive substrate for human adipose-derived stem cells", Biomaterials, 201206 Crossref	19 words — < 1%
8	Coskun, Melis Debreli. "NF-κB ve oksidatif stresin inhibisyonu ile peripheral noropatinin iyileştirilmesi ve kanser kemoterapi sonuçlarının geliştirilmesi", Bursa Uludag University (Turkey), 2021	16 words — < 1%

EK-2: ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
(2017-KAEK-120)



Sayı : (2017-KAEK-120) / 2/2021.G-139
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

Tarih : 16.09.2021

Sayın Doç. Dr. Gamze BEKTAŞ
İstinye Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Yüksek Lisans Bölümü

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz “**Adipose Doku Mühendisliğinde, Mezenkimal Kök Hücre İle Birlikte, Deselülerize Edilmiş İnsan Yağ Doku Ekstraselüler Matriksinin Doku İskelesi Olarak Kullanılması**” başlıklı araştırma başvurunuz araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak 06.09.2014 tarihli ve 29111 sayılı Resmî Gazete 'de yayımlanan Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği gereğince incelenmiş olup, Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'nun 15.09.2021 tarihli toplantısında incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda, çalışmanın yapılması etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuş ve onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.

Araştırmanın Adı	Adipose Doku Mühendisliğinde, Mezenkimal Kök Hücre İle Birlikte, Deselülerize Edilmiş İnsan Yağ Doku Ekstraselüler Matriksinin Doku İskelesi Olarak Kullanılması
Sorumlu Araştırmacı	Doç. Dr. Gamze BEKTAŞ
Proje Danışmanı	Dr. Öğr. Üyesi Hakan DARICI
Etik Kurul Karar No	2/2021.K-69

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

YUSUF SARIOĞLU Dijital olarak imzalayan YUSUF SARIOĞLU
Tarih: 2021.09.16 14:42:36 +0300
Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU
İstinye Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

Bu kapsamda yukarıda ayrıntıları verilen çalışma ile ilgili olarak;

- Gönüllülerden alınan ve ülke dışına çıkarılacak olan numuneler için biyolojik materyal transfer formunda belirtilen şartların yerine getirilmesi,
- Araştırmanın başlamaması, iptali veya sonlandırılması halinde tarafımıza bilgi verilmesi,
- Araştırma süresince ortaya çıkan advers olayların/etkilerin tarafımıza bildirilmesi,
- Araştırmanın Helsinki Bildirgesi'nin son metni, İyi Klinik Uygulamalar İlkeleri ve ilgili mevzuata uygun olarak yürütülmesi,
- Araştırmada kullanılan her türlü araştırma ürününün ve ürünlerin kullanılmasına mahsus her türlü malzeme ile muayene, tetkik, tahlil ve tedavilerin bedeli için gönüllüden herhangi bir ücret talep edilmemesi,
- Araştırmaya ait yıllık bildirim formunun düzenli olarak Etik Kurulumuza gönderilmesi,
- Destekleyicinin yasal temsilcisi olarak yazımızın bir örneğinin destekleyiciye, koordinatör merkez ve ilgili etik kurula iletilmesi hususlarında bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

YUSUF SARIOĞLU Dijital olarak imzalayan YUSUF SARIOĞLU
Tarih: 2021.09.16 14:42:40 +0300

Prof. Dr. Yusuf SARIOĞLU
İstinye Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul
Başkanı

EK-3: ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ FORMU				
Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
██████████	01.12.2019		00	1/2

7.A. KİŞİSEL BİLGİLER

Bu bölümde belirtilen tüm iletişim bilgilerinin güncel ve ulaşılabilir olması gerekmektedir.

Adı Soyadı	Gamze Bektaş
Akademik unvan/pozisyon	Doçent Doktor
Görev yeri	Yeni Yüzyıl Üniversitesi, Muayenehane
Telefon numarası	██████████
E-posta adresi	██████████

8.B. EĞİTİM BİLGİLERİ

Bu bölümde mezun olunan üniversite ve sonrasındaki eğitim bilgilerinizi yazınız. Derece bölümü Uzmanlık, Doktora, Yüksek Lisans vb. şekilde belirtilmelidir.

Yıl	Bölüm	Kurum	Derece
1998---2004	Tıp Fakültesi	Osmangazi Üniv. Tıp Fakültesi	Doktor
2004---2011	Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği	Akdeniz Üniv. Tıp Fakültesi	Araştırma Görevlisi
2019---Halen	Yüksek Lisans	İstinye Üniv. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği	Yüksek Lisans

9.C. İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

Bugüne kadar çalıştığınız kurum/kuruluşları tarih sırasına göre yazınız.

Tarih Aralığı	Kurum	Görev
2011---2013	Tatvan Devlet Hastanesi	Op. Doktor
2013---2015	Antalya Muayenehane	Op. Doktor
2016---Halen	İstanbul Muayenehane	Doç. Doktor
2022---Halen	Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	Doç. Doktor

10.D. KLİNİK ARAŞTIRMALARLA İLGİLİ GENEL BİLGİLER

Bu bölümdeki bilgileri tarih sırasına göre yazınız.

1. İyi Klinik Uygulamaları (İKU) ve klinik araştırma konularında alınan eğitim/sertifika bilgileri:

Aldığınız eğitime dair bir sertifika varsa lütfen bir kopyasını ekleyiniz.

Eğitim/sertifika adı ve eğitim yeri	Tarih

2. Görev alınan klinik araştırma bilgileri:

Görev olarak Sorumlu Araştırmacı, Yardımcı Araştırmacı, Koordinatör, Saha Görevlisi, İzleyici(Monitör), Eczacı vb. olarak belirtilmelidir.

Bu bölümdeki bilgileri tarih sırasına göre yazınız.

Klinik araştırma	Tarih Aralığı	Görev

ÖZGEÇMİŞ FORMU				
Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-FR-17	01.12.2019	06.08.2022	00	2/2

11.E. ÖZGEÇMİŞ SAHİBİNİN İMZASI

Yukarıda beyan ettiğim bilgilerin doğru ve güncel olduğunu ve klinik araştırmaların yürütülmesine ilişkin ilgili mevzuat hükümlerine ve iyi klinik uygulamalarına uyacağımı kabul ve beyan ederim.

Ad Soyadı	Gamze Bektaş
Tarih (gün/ay/yıl olarak)	06.08.2022
İmza	