

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AŞIL TENDON TAMİRİ YAPILAN SIÇANLARDA
GEÇ DÖNEM SIÇAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
UYGULAMASININ TENDON RERÜPTÜRÜ ÜZERİNE ETKİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özgür SELEK

**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI**

KOCAELİ - 2009

**T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AŞİL TENDON TAMİRİ YAPILAN SIÇANLARDA
GEÇ DÖNEM SIÇAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
UYGULAMASININ TENDON RERÜPTÜRÜ ÜZERİNE ETKİSİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özgür SELEK

**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI**

Tez Danışmanı Öğretim Üyesi: Doç.Dr. Levent BULUÇ

Ana Bilim Dalı Başkanı: Prof.Dr. Ahmet Yılmaz ŞARLAK

KOCAELİ – 2009

Etik Kurul onayının tarih ve numarası:

Etik kurul Ön Onayı: 23.06.2009 - KOU HADYЕК 11/5-2009

Etik Kurul Son Onayı: 08.09.2009 – KOU HADYЕК 13/3-2009

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
SİMGE ve KISALTMALAR.....	iii
ŞEKİLLER	iv
TABLolar	v
1. AMAÇ ve KAPSAM.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. TENDONLAR.....	2
2.1.1. Tendonların histolojik yapısı	2
2.1.2. Tendonların Damar ve Sinir yapısı	5
2.1.3. Tendon İyileşmesinin Evreleri	6
2.1.3.1. İnflamasyon Evresi	7
2.1.3.2. Tamir Evresi	7
2.1.3.3. Remodeling Evresi	7
2.1.4. Tendon Biyomekaniği	7
2.2. KÖK HÜCRELER	9
2.2.1. Kök Hücre Tarihiçesi.....	9
2.2.2. Kök Hücre Nedir?	10
2.2.2.1. Embriyonal Kök Hücreler.....	13
2.2.2.2. Erişkin Kök Hücreler	14
2.2.2.3. Mezenkimal Öncüller İçin Çoğalım Hiyerarşisi.....	16
2.2.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünojenotiplendirilmesi	18
2.2.2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Bağışıklık Sistemini Baskılayıcı Özellikleri	18
2.2.2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulama Alanları	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerinin (sMKH) Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu	22
3.1.1. sMKH Elde Edilmesi	22
3.1.2. sMKH Karakterizasyonu	24

3.1.2.1. Akım Sitometri	24
3.1.2.2. İmmunohistokimya	24
3.2. Cerrahi Teknik	27
3.3. Transplantasyon İçin BrdU İşaretli Hücre Hazırlanması.....	29
3.4. Değerlendirme	30
3.4.1. Histolojik Değerlendirme	30
3.4.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme.....	30
3.4.3. Biyomekanik Değerlendirme	31
3.4.4. İstatistiksel Değerlendirme	33
4. BULGULAR	34
4.1. Kök Hücre Karakterizasyon Bulguları	34
4.1.1. Akım Sitometrisi: sKİ-MKH'lerin Belirlenmesi	34
4.1.2. İmmunohistokimya: sKİ-MKH'lerin Belirlenmesi	34
4.2. Cerrahi İşlem ve Kök Hücre Uygulaması Sonrası Bulguları	34
4.2.1. Makroskopik Bulgular	35
4.2.2. Histolojik Bulgular.....	35
4.2.3. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	38
4.2.4. Biyomekanik Bulgular	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	51
7. ÖZET	52
8. ABSTRACT.....	53
9. KAYNAKLAR	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

CFU-F: Koloni oluşturan birim-fibroblast (colony forming unit fibroblast)

KİSH: Kemik iliği stromal hücreleri

MKH: Mezenkimal kök hücre

MPH: Mezenkimal progenitör–öncül hücreler

MAPC: Multipotent erişkin progenitor hücresi,

MIAMI: Erişkin kemik iliği kaynaklı indüklenebilir multilinage hücre

İK-MKH: İnsan kemik iliği multipotent kök hücresi

DNA: Deoksirbonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

CD: Farklılaşma kümesi (cluster of differentiation)

SH: Src Homoloğu

MHC: Major histokompatibilite kompleksi

IL: İnterlökin

sMKH: Sıçan mezenkimal kök hücresi

MEM: Minimal essential medium

PBS: Phosphate-buffered saline

P: Pasaj (alt-kültür)

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

KÖGEM: Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi

sKİ-MKH: Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre

DMEM: Dulbeccos-minimum essential medium

FBS: Fetal bovine serum

FITC: Florasan izotiosiyanat

Ig: İmmunoglobulin

HCl: Hidroklorik asit

BrdU: Bromodeoksiüridin

N: Newton

ŞEKİLLER

Şekil 1: Tendonun yapısı (11)	4
Şekil 2: Tendonda iyileşme evreleri	6
Şekil 3: Tendonun gerim altında uzama eğrisi	8
Şekil 4: Totipotent hücrelerin yeni bireylere kaynaklık etme potansiyeli (27).....	11
Şekil 5: Kök hücre tipleri	12
Şekil 6: Erişkin kök hücre farklılaşması (27)	15
Şekil 7: Mezengenezis (27)	17
Şekil 8: Laboratuarda sıçanların bulunduğu ortam	21
Şekil 9: Sıçanlardan elde edilen femur ve tibia kemikleri	22
Şekil 10: Plastik doku kültür flaskı	23
Şekil 11: Cerrahiye hazırlanmış sıçan krurisi.....	27
Şekil 12: Çevre dokulardan sıyrılmış aşil tendon.....	27
Şekil 13: Transvers olarak kesilen aşil tendonunun Modifiye Kessler yöntemi ile tamiri.....	28
Şekil 14: Tendon tamiri sonrası	28
Şekil 15: Sıçanlara perkutan olarak MKH uygulaması	29
Şekil 16: Biomekanik çalışmanın yapıldığı germe düzeneği	31
Şekil 17: Distalde kalkaneus ile beraber çıkarılmış sıçan aşil tendonu	32
Şekil 18: Germe düzeneğinde ilk gerimin başlaması	32
Şekil 19: Germe düzeneğinde tendonun kopma anı	33
Şekil 20: Kontrol grubu BrdU ve desmin için immunboyanma.....	38
Şekil 21: Çalışma grubu immunofluoresans boyanması	39
Şekil 22: Tendoların BrdU için immunohistokimyasal boyama sonuçları	40
Şekil 23: Kontrol grubu Caspase 3 ve fibronectin için immunboyanma	41
Şekil 24: Çalışma ve kontrol grubu için TUNEL ile immunboyanma mikroskopik görüntüler	42

TABLolar

Tablo 1: sKI-MKH'lerin immünoSİtokİmyasal özellikleri	26
Tablo 2: Histolojik bulguların değeriendirilmesi	36
Tablo 3: Gruplara göre fibrozis şiddeti	37
Tablo 4: Gruplara göre damarlanma artışı miktarı	37
Tablo 5: Çalışma ve kontrol grubunda tendon kopma gücüne ve yerine göre dağılım	43
Tablo 6: Gruplar arası tendon kopma gücü farklılıkları	43

1. AMAÇ VE KAPSAM

Tendon yaralanmaları, sanayileşmenin artması ve insanların değişik spor dallarına ilgi duyması sonucu günümüzde giderek artmaktadır. Konservatif veya herhangi bir cerrahi teknikle tedavi edilen bu yaralanmalar iyileşmenin geç dönemlerinde rerüptürler ile karşımıza tekrar çıkabilmektedir.

Tendon tamirinde asıl hedef, uygun dikiş materyali ile iyi bir cerrahi teknik sonrası erken hareket başlayabilmektir. Erken hareket verilen tendonlarda iyileşme, biyomekanik açıdan, hareket verilmeyen tendonlardaki iyileşmeye oranla daha iyidir(1,2). Fakat aktif egzersizlerin verildiği dönemde tendon rerüptürleri, tedavinin önemli bir komplikasyonudur.

Kök hücreler, son yıllarda tüm tıp camiasının üzerinde durduğu, her yıl birçok yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Sunduğu veya sunacağı imkanlar düşünüldüğünde birçok hastalığa çare olması beklenmektedir. Kök hücrelerin klinik kullanımı üzerinde daha çok onkolog ve hematologlar çalışmaktadır, ancak en faydalı olacağı alanlardan biri de Ortopedi ve Travmatoloji olacaktır.

Mezenkimal kök hücrelerin (MKH), kas ve tendonlar gibi diğer konnektif doku elamanlarına farklılaşması ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Biyokimyasal ve histolojik analizlerin gelişmiş doku yapısını ortaya koymasına rağmen, tendonun tam iyileşmesini temin etmek, biyomekanik özellikleri ve hasarlanmış tendonun fonksiyonelliğini geliştirmek için daha başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmanın amacı, tendon tamiri yapılan alana iyileşmenin geç döneminde mezenkimal kök hücre uygulanmasının, tendon rerüptürleri üzerine etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TENDONLAR

Tendonlar, kası kemiğe bağlar, yükü kastan kemiğe iletir, sonuçta eklem hareketinde rol alır, kasın hareketini sağladığı eklemden belli bir mesafede kalmasını sağlar (1).

2.1.1. Tendonların Histolojik Yapısı

Tendonlar, paralel kollajen liflerden oluşan seyrek damarlanmış yapılardır. Az sayıda fibroblast (hacimlerinin yaklaşık %20'si) ve bol miktarda hücre dışı matriks içerirler. Hücre dışı matriks, yaklaşık %70 oranında su ve %%30 oranında kollajen, baz madde ve elastinden oluşur (1).

Tendon hücreleri hücre dışı matriksin tüm bileşiklerini sentezler. Matrikste tendona kendi gücünü kazandıran uzun iplikler halinde sıkı tip 1 kollajen demetleri vardır. Kollajen arasında küçük proteoglikan ve glikozaminoglikan zincirlerinden oluşan ara madde mevcuttur. Normal tendonda ışık mikroskopunda fark edilmeyen çok az ara madde vardır (3).

Fibroblastlar, fibrositlerin aktif şeklidir. Fibroblast bir kollajen öncüsü olan prokollajeni salgılar, prokollajen de hücre dışında tip I kollajen oluşumunda rol alır. Fibroblastlar bu özellikleri ile tamirci hücreler olarak görev yaparlar. Yara bölgesinde toplanarak intraselüler maddeler salgırlar ve skar dokusunu oluştururlar (3).

Kollajen lifleri ve fibrositler arasında kalan dar aralıklar yapışkan özelliği olan şekilsiz bir ara madde (amorf madde) ile doldurulmuştur. Tendonda kollajen yapım ve yıkım hızı (turnover) oldukça yavaştır. Kollajen molekülleri arasındaki çapraz bağlar, dokulara sahip oldukları direnci sağlar. Kollajen liflerinin dizilimi dokunun fonksiyonunu belirler. Tendondaki kollajen liflerinin paralel dizilimi dokuya tek yönlü yüksek gerilme kuvvetlerine dayanabilme yeteneği sağlar(1).

Tendonlar kas ile kemik arasında mekanik güç naklediciliğinin yanı sıra, kas kontraksiyonunu da düzenlemektedir. Elastik enerji deposudur, beklenmedik ani hareketlerde gücü absorbe ederek azaltırlar. Kasın devamlılığını sağlayan tendon, kemik veya kırıkta sonlanır (4). Güç dağılımı için tendonlar kemiğe, 4 farklı geçiş doku bağlantı tipini kullanarak yapışmaktadırlar (1, 2).

1- Tendon

2- Fibrokartilaj (kollajen lifler fibrokartilaj yapıya dönüşerek)

3- Kemik (mineralize kırıkta dokusu kortikal kemikle birleşerek)

4- Sharpey Lifleri

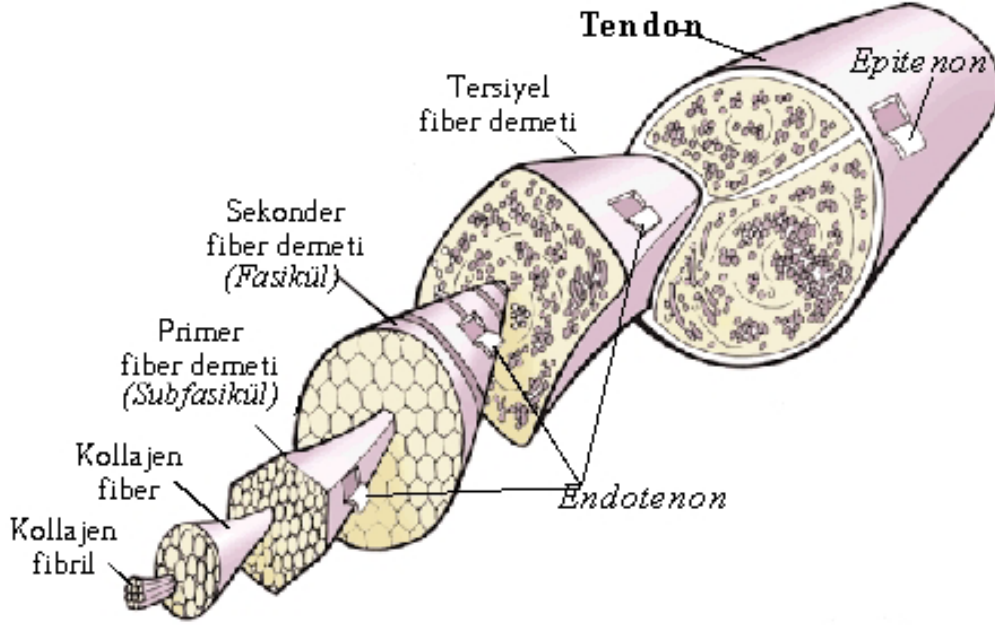
Kemiğe yapışma yerinde tendonun santral fibrilleri korteksi delerek kemik içinde kaybolurlar. Periferik fibriller ise, periost fibrilleri ile birbirine karışırlar. Kırıkta yapışma yerinde ise tendon fibrilleri perikondriuma girerek yaygın olarak dağılırlar (4).

İki tip tendon vardır (2);

- Paratenon ile çevrili olanlar,
- Kılıflı tendonlar.

Belirli sayıdaki kollajen lifi birleşerek primer demetleri oluştururlar ve çıplak gözle de görülebilen bu oluşumlar tendon lifi olarak adlandırılırlar (Şekil 1) (3). Primer demetlerdeki kollajen lifleri, seyirleri esnasında dallanarak anastomozlar yaparlar. Kollajen lif demetleri arasına paralel yerleşmiş az sayıdaki fibrositler, enine kesitlerde demetler arasına sokulan ışınal sitoplazmik uzantılara sahiptirler ve buldukları yerin şeklini alırlar (5). Tendon fibrositleri "tendon hücresi" veya sitoplazmik uzantılarının, lifler arasında kanat gibi uzanması nedeniyle "kanatlı tendon hücresi" olarak da adlandırılırlar. Endotenon ince gevşek bir bağ dokusudur. Primer lif demetlerinin etrafında kollajen demetlerine paralel olarak yer alır ve tendon fasiküllerini ayırarak sarar. Bu bağ dokusu ile birlikte damar sinir yapıları kollajen lifleri arasında seyreder (6).

Endotenon ile demetler birbirlerine bağlanırlar. Bu şekilde oluşan sekonder demetler epitenonla çevrelenmiştir. Epitenon iki tabaka halindedir. İçteki tabaka endotenon üzerinde seyrederek ve sinirler için koruyucu işlev görür. Dıştaki tabaka ise çevre bağ dokusu ile devam eder. Epitenon hücreleri, tendon onarımında çok önemli bir rol oynar (5).



Sekil 1: Tendonun yapısı (5).

Epitenonun sınırladığı sekonder demetlerin herbiri fasikül olarak adlandırılır. Bir tendon belli sayıda fasikülün paratenon denen oldukça kalın bir bağ dokusuyla sarılmasıyla meydana gelir. Paratenon epitenonun dış yüzeyini destekler. Epitenon ve paratenon içinde elastik lifler de bulunur ve kan damarlarından oldukça zengindirler. Oysa endotenonda çok az sayıda damarsal yapı mevcuttur. Primer demetler içinde ise hiç damar yoktur. Dolayısıyla metabolizma oldukça yavaştır (1,3). Paratenonun dış yüzeyi düzdür ve çevre dokusuyla çok sayıda bağlantı içermektedir. Böylece tendon hareketleri kısıtlanmamış olur. Sürtünmelere yol açabilecek kemik ve benzeri sert dokular üzerindeki tendonlar sinovya (vagina tendineum veya tendon kılıfı) adı verilen bir bağ dokusu kılıfı içinde uzanırlar. Bu kılıf mezenkimal kökenli yassı hücrelerden oluşan iki tabakadan meydana gelmiştir. İç tabaka paratenona sıkı

şekilde tutunurken dış tabaka çevre dokulara yapışiktır. İki tabaka arasında bir boşluk mevcuttur ve tabakaların boşluğa bakan yüzleri devamlılığı olmayan mezotel hücreleri ile döşenmiştir. Bu boşlukta sinovya benzeri protein, glikozaminoglikan, glikoprotein ve iyonlar içeren bir sıvı bulunur. Bu sayede tendon, en dış kılıf içinde kayarak hareket edebilme özelliğini kazanır. Aşil tendonun paratenonu el ve bilek tendonlarında olan sinovya tabakasına sahip değildir. Fakat bu tabaka aşil tendonunun posteriorunda mukopolisakkaritlerle kayganlaşmış birkaç ince kayan membrana dönüşür (7).

2.1.2. Tendonların Damar ve Sinir Yapısı:

Tendon beslenmesi iki ayrı kaynaktan olmaktadır;

- vasküler perfüzyon,
- sinovyal difüzyon.

Green'in çalışmasında, diffüzyonun perfüzyondan daha etkili olduğu sonucuna varılmış ve diffüzyonun vasküler yapıdan arındırılmış tendonun beslenmesi için yeterli olduğu belirtilmiştir (8).

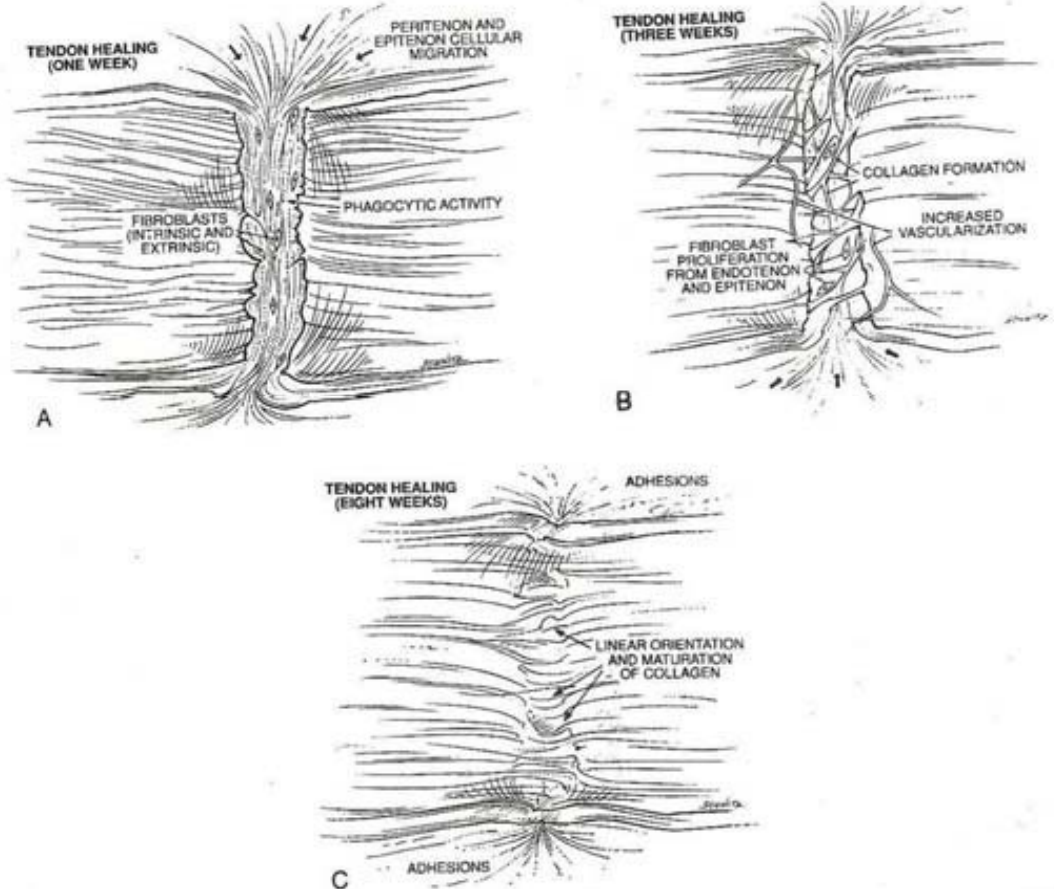
Rothman çalışmasında tendonların damarlanmasını incelenmiş olup bunların üç bölgeden kanlandığını göstermiştir. Bunlar:

- 1- Adeleye ait damarların dallarından,
- 2- Tendonun adale ve periosta insersiyoyerinden giren damarlardan,
- 3- Tendonu çevreleyen paratenon, mezotenon ve vinkula denen konnektif dokulardan giren damarlardan kanlanmaktadır (9).

Tendonlar afferent sinirlerden zengindirler. Sinir liflerinin bir kısmı, tendonların kasa yakın bölgelerinde, tendon mekiği adı verilen yapıları oluştururlar. Tendon mekiği, sinir liflerinin bağ dokusu tarafından sarmalanmış kollajen lifleri etrafında dolanmasıyla oluşur. Diğer bölgelerde serbest sonlanmalar da görülür. Afferent sinir lifleri, tendonları aşırı uzamalara karşı korurlar (5).

2.1.3. Tendon İyileşmesinin Evreleri:

Tendon yapısı herhangi bir sebeple bozulduğunda iyileşme ve skar oluşturma süreci başlar. Tendon iyileşme süreçleri genel olarak hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucu ortaya konmuştur. Tendon iyileşmesi iki teori üzerinden açıklanmaya çalışılır. İntrensek iyileşme modelinde epitenon ve endotenondaki fibroblastların çoğalması ve bu kılıfların sağladığı kanlanma görev alır. Ekstresek iyileşme modeli ise tendon iyileşmesi için çevre dokulardan gelen inflamatuvar hücrelerin, tenositlerin ve ekstrapendinöz kanlanmanın gerekli olduğunu savunur (5). Her iki durumda da iyileşme süreci temel olarak üç dönem içerir.



Şekil 2: Tendonda iyileşme evreleri

2.1.3.1. İnflamasyon Evresi: Tendon gücünün en az olduğu dönem olup onarımdan sonraki ilk 3-5 günde oluşur. Bu dönemde en belirgin olan özellik hücre migrasyonu ve fagosit aktivasyonudur. İnfiltrate olan iltihabi hücreler fibroblast olarak farklılaşırlar (Şekil 2-A) .

2.1.3.2. Fibroblast veya Tamir Evresi: Fibroblastik farklılaşma ve damarlanmada artma ile karakterize bir dönem olup bu dönemde kollajen sentezinde hızlı bir artış mevcuttur. Tendon tensil gücü ve düzeni tam olarak sağlanamamıştır. Onarımdan sonraki 5. gün ile 6. haftaya kadar olan dönemi kapsar. Kollajen sentezi sayesinde zamanla tendon gücünde artma izlenir (Şekil 2-B).

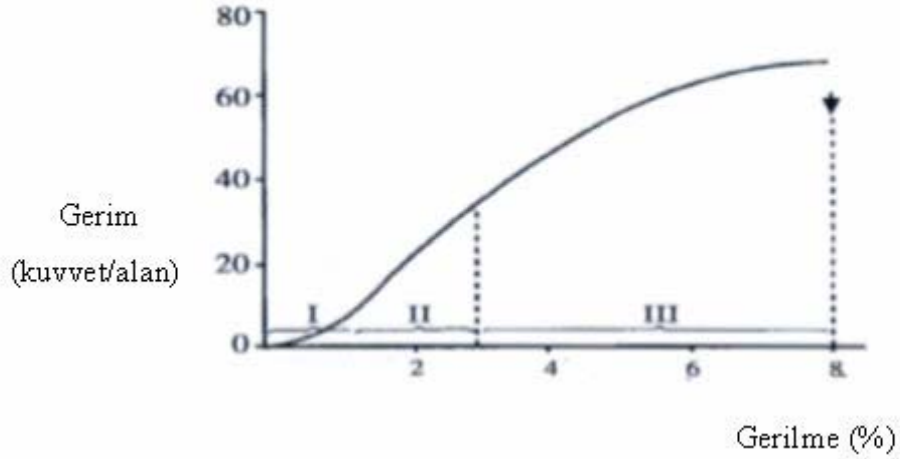
2.1.3.3. Remodeling veya Olgunlaşma Evresi: Tendon iyileşmesinde son aşamadır. Kollajenlerin olgunlaşması ve yapışıklıkların oluşması ile karakterize bir dönemdir. Tendon gücünde artma ile birlikte fibroblastik aktivite ile kollajenler uzunlamasına yerleşir. Bu son faz 6 ile 12 ay kadar devam eder (Şekil 2-C).

Tendon iyileşmesi, süre açısından, türlere göre farklılık gösterir. Yapılan deneysel bir çalışmada köpek, kedi, tavşan, rat ve Gine domuzlarında tendondaki iyileşmenin farklı sürelerde tamamlandığı gösterilmiştir. Ratlarda 60 gün, tavşanlarda 180 günde tam iyileşme görülmüş, köpeklerde ise 358 gün geçtiği halde tam iyileşme görülmemiştir (10).

2.1.4. Tendon Biyomekaniği

Tendonlar kuvveti kastan kemiğe aktarırlar. Kollajenin mekanik davranışı, moleküler yapısındaki bağların sayısı ve biçimiyle değişiklik gösterir. Gerilme eğrisi tendonun yük altındaki davranışını açıklamada yardımcı olur. İstirahat halinde kollajen fibrilleri kıvrımlı bir haldedir. Eğriliğin ilk kısmında görülen konkav bölge tendonun boyunun %2 si kadar gerildiği döneme aittir ve kıvrımlı kollajen yapısı bu dönemde düzleşir (Şekil 3). Bu noktanın ötesinde tendonlar kollajen üçlü helikslerinin molekülleri arasındaki bağların kırılmasına bağlı olarak çizgisel bir şekilde deforme olurlar ve kollajen fibrilleri paralel hale gelir. Gerilme %4'ün altında kalır ise tendon elastik özellik gösterir ve üzerindeki yük kaldırıldığında başlangıç

uzunluğuna döner. Gerilme %4'ün üstünde olursa kollajen yapısında mikroskopik düzeyde bozulma başlar. %8-10'un üzerinde ise gözle görülen bir deformasyon vardır (5).



Sekil 3: Tendonun gerim altında uzama eğrisi

Koşu sırasında aşıl tendonu üzerine binen yükün 9000 N'a kadar çıktığı belirlenmiştir (11). Bu kuvvetler bir tendonun karşılayabileceği kuvvetten yüksek olduğu için yükün uygulanma hızının da tendonun taşıyabileceği maksimum yük miktarı üzerinde etkili olabileceği bildirilmiştir (12). Tendona uygulanan gerim ne kadar hızlı ve oblik planda ise tendonun kopma riski o kadar yüksektir (13).

Bir kollajen fibrilinin mekanik gücü, üçlü heliks yapısında oluşturduğu molekül içi bağlarla birlikte çapıyla da ilişkidir. Öyle ki fibril çapı arttıkça biyomekanik dayanıklılık da artmaktadır (14). Dejenerasyona uğramış tendonlarda ve tendon iyileşmesi sürecinde, yoğunluğu artan tip III kollajen fibril çapının tip I 'e göre daha küçük ve gerilme kuvvetlerine karşı daha dayanıksız olduğu bilinmektedir (15).

Steiner çalışmasında sıçanlarda tendon iyileşmesi sırasında, 3. haftada tendon gücünün normalin %50'si, 4. haftada ise %25'i kadar olduğunu göstermiştir (16). Diğer bir çalışmada da sıçan patellar tendonlarında oluşturulan yaralanma modelinde 28. günde apoptozisin maksimum olduğu gösterilmiştir (17).

2.2. KÖK HÜCRELER

2.2.1. Kök Hücre Tarihçesi:

Mitolojide ateşi Olimpos Dağından, tanrılardan çalarak insanlığa hediye etmesi üzerine Zeus tarafından cezalandırılan Prometheus'un hikayesi kök hücre kavramına bir örnektir. Zeus tarafından Kafkas (Kaf) dağında bir kayaya bağlanarak karaciğerinin hergün bir kartal tarafından yenmesi şeklinde bir cezaya çarptırılan Prometheus'un karaciğeri hergün kendisini yenilemektedir. Bu, karaciğer hücrelerinin rejenerasyon yeteneği ve dolayısı ile kök hücre kavramını ortaya koyan ilk hikayedir. Yüzyıllar sonra bu transplantasyon hayali ve teknolojisi, bir profesyonelin eline geçerek klasik edebiyatın bir uç örneğini oluşturacak şekilde Mary Shelley'in Frankenstein romanına malzeme olmuştur (18).

Kök hücre konusunda ilk önemli öngörü Alman bilim adamı Carl Rudolph Virchow'un 1800'lü yılların başındaki "Omnis cellula e cellula = tüm hücreler başka hücrelerden gelişir" yaklaşımıdır (19).

1949 da Jacobsen ve ark., 1951 de Lorenz ve ark. ilk defa ölümcül dozda ışınlanmış hayvanları kurtarmak için kemik iliği infüzyonu ihtimalini ortaya atmışlardır(20).

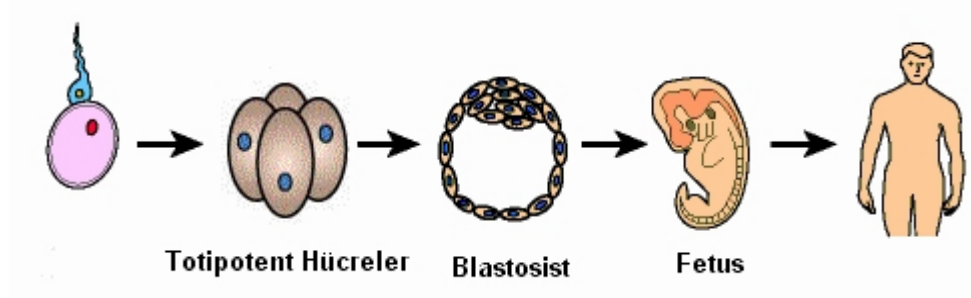
Bugünün kök hücre tedavisi üzerine dünyada belki de ilk çalışmaları yapan, insan ömrünü uzatmanın yolunun, doğum sonrası atılan plasentalarda, kordon hücrelerinde olduğunu söyleyen araştırmacı Prof.Dr.Süreyya Tahsin Aygün'dür. 1950-1960'lı yıllarda kendisi hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırmalar yapmış ve almanca tıp dergilerinde yayınlamıştır. Aygün 1971 yılında "örneğin kalp kültür hücresi enjekte edilen bir organizmada, kalbe yerleşiyor; hücreler 2-7 ay içinde gelişiyor, 35- 45 gün içinde de hasta organı yeniliyor" diyerek zamanının ötesinde bir yaklaşımla hücrenin gücünü vurgulamıştır (19).

Mezenkimal kök hücreler, ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin ortama yayılması sonrasında, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan ve

fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlandı. Sonraki in vivo ve in vitro çalışmalar, mezenkimal kök hücreleri her üç germ yaprağından köken alan hücre veya dokuları oluşturan bir multipotent kök hücre kaynağı olarak belirlemişlerdir. Bugüne kadar bu hücreleri temsilen birçok isimlendirme kullanılmıştır. Önceleri “koloni oluşturan birim-fibroblast (colony forming unit fibroblast; CFU-F)” ya da “kemik iliği stromal fibroblastları” adlandırmaları kullanılmış, fakat zamanla yerini kemik iliği stromal hücreleri (KİSH), mezenkimal kök hücreler (MKH) ya da mezenkimal progenitör-öncül hücreler (MPH) gibi adlandırmalara bırakmıştır. Son olarak, Minnesota Üniversitesi’nden Catherine Verfaillie bu hücreleri “multipotent erişkin progenitör hücreler” olarak tanımlamıştır (21).

2.2.2. Kök Hücre Nedir ?

Canlılarda kendilerini yenileme ve farklılaşma kabiliyeti bulunan hücrelere kök hücre denir. Organizmanın tüm yaşamı boyunca kendini yenileme özelliklerine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı in vitro kültürlerde kolaylıkla çoğalabilmektedirler. Belirli biyolojik sinyaller altında fenotiplerinden tamamen farklı bir hücre tipine dönüşebilme potansiyelleri vardır. Bunun en iyi örneği döllenmiş yumurtadır ki vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeli olan bu ilk embriyonel hücreye "totipotent" hücre denmektedir (Şekil 4). Fertilizasyonun yaklaşık beşinci gününde bu hücreler mezoderm, endoderm ve ektodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine dönüşebilme yeteneği olan "blastosist"e dönüşürler. Bu özelliğe sahip hücrelere de "pluripotent" hücreler denir. Hayatın ilerleyen dönemlerinde yerleştikleri dokunun hücre tipini üreten daha özelleşmiş erişkin tip kök hücreler ortaya çıkar. Kemik iliği kök hücreleri gibi olan bu hücrelere de "multipotent" hücreler denir(19).



Şekil 4: Totipotent hücrelerin yeni bireylere kaynaklık etme potansiyeli (21).

Kök hücreler buldukları yere göre sınıflandırılabilirler (Şekil 5).

1- Embriyonik kök hücreler (erken embriyo döneminde blastokistin iç tabakasında bulunur.)

2- Non-embriyonik kök hücreler

a- Erişkin kök hücreler (somatik kök hücreler)

—Hematopoetik kök hücre

· Kemik iliği kaynaklı kök hücreler

· Periferik kan kaynaklı kök hücreler

— Stromal kök hücreler

· MKH: Mezenkimal kök hücre

· MAPC: Multipotent erişkin progenitor hücresi,

· MIAMI: Erişkin kemik iliği kaynaklı indüklenebilir multilinage hücre

· İK-MKH: İnsan kemik iliği multipotent kök hücresi

—Organ spesifik kök hücreler

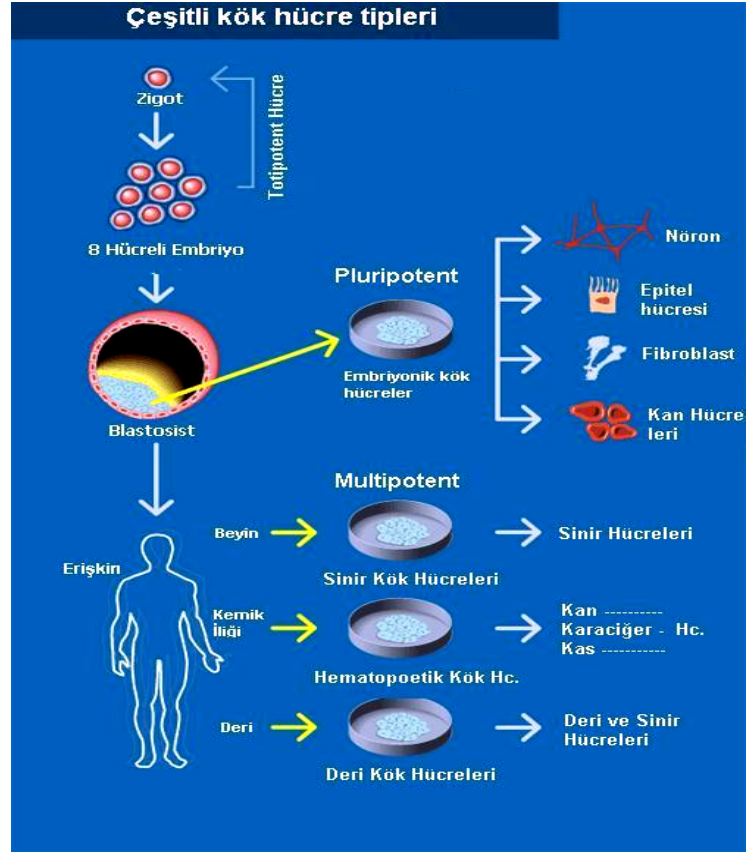
b- Fetüs kök hücreleri

c- Kadavradan elde edilen kök hücreler

d- Göbek kordonu veya plasental kök hücreler

e- Partoneod hücreler

f- Dedifferansiyasyon ile herhangi bir hücre kök hücre haline gelen hücreler



Şekil 5: Kök hücre tipleri (21)

Bugün reperatif ve rejeneratif tıp olarak tanımlanan bir alanda embriyonel, fetal, kadavra hücrelerinin allojenik oluşları, özellikle embriyonel hücrelerde gösterilen teratom oluşturma riskleri ve bazı etik sorunları beraberlerinde taşımaları nedeniyle klinik uygulamalarda son derece kısıtlı kullanılırken; dedifferansiyasyon ile elde edilen kök hücreler ile parteneot hücreler sadece hayvan modellerinde çalışılmaktadır. Otolog organ spesifik kök hücrelerin üretim zorluğu ve amaçlanan hedefler için yeterli sayılarda elde edilememesi nedeniyle kliniğe yansısı çok azdır. MAPC, MİAMİ ve İK-MKH ise üretimleri zor, zaman alıcı ve çok fazla manuplasyon gerektirdikleri için henüz klinikte yeterli uygulama alanı bulamamışlardır. Bu alanda kliniğe en çok yansıyan hücreler otolog hematopoetik ve klasik mezenkimal kök hücrelerdir (21).

2.2.2.1. Embriyonal kök hücreler

Blastosit adı verilen hücre kümesinden alınan hücrelerin her birine "embriyonel kök hücre" denir. Daha sonra bu hücreler kültürlerde çoğaltılarak bilimsel araştırmalarda kullanılabilir. Embriyonel kök hücreleri genellikle tüp bebek ünitelerinden elde edilir. Erişkin kök hücrelerden farklı olarak embriyonel kök hücreler çok daha hızlı çoğalma gücüne sahiptir. Çoğalma çeşitliliği olarak da embriyonel kök hücreler, daha geniş bir yelpazeye sahiptirler. Farklılaşma potansiyeli erişkin kök hücrelere göre daha fazladır (22). Hücrelerin bölünme kapasitesini, belirleyen faktörlerden biri doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve " telomer " denilen DNA zincirleridir. Telomerik DNA, her bir çoğalma döngüsü esnasında ve oksidatif DNA hasarlanması gibi diğer nedenlerden dolayı kaybolur. Her replikasyon sonrası kromozom kısalır. Bu kaybı karşılama, telomerler bünyesinde tersine transkriptaz telomeraz proteinini (hTERT) ve telomeraz RNA (hTR) taslağını taşıyan bir ribonükleoprotein olan telomeraz tarafından uzatılarak sağlanır. Enzim, her replikasyon sonrası telomerin kısalmasını önlemek için sayısız telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna takarak kromozomun kısalmasını engeller (21).

Sonuç olarak, normal bir hücrenin her bölünüşünde, telomer boyu yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır. Telomer kısalması hücre bölünmesini sayan bir saat gibidir ve telomerler normal insan somatik hücrelerinin bölünme sayılarını düzenleyen önemli unsurlar olarak ortaya çıkmışlardır. Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz aslında etkin değildir ve bundan dolayı, her hücre bölünmesi sonucu kromozomların telomerleri kısalır. Birçok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar olur ve hücre daha fazla bölünme kapasitesini yitirir. Diğer yandan, insan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği bulunmuştur ve bu hücre tiplerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, telomeraz etkinliği kök hücrelerinin bir belirtecidir (21).

2.2.2.2. Erişkin kök hücreler

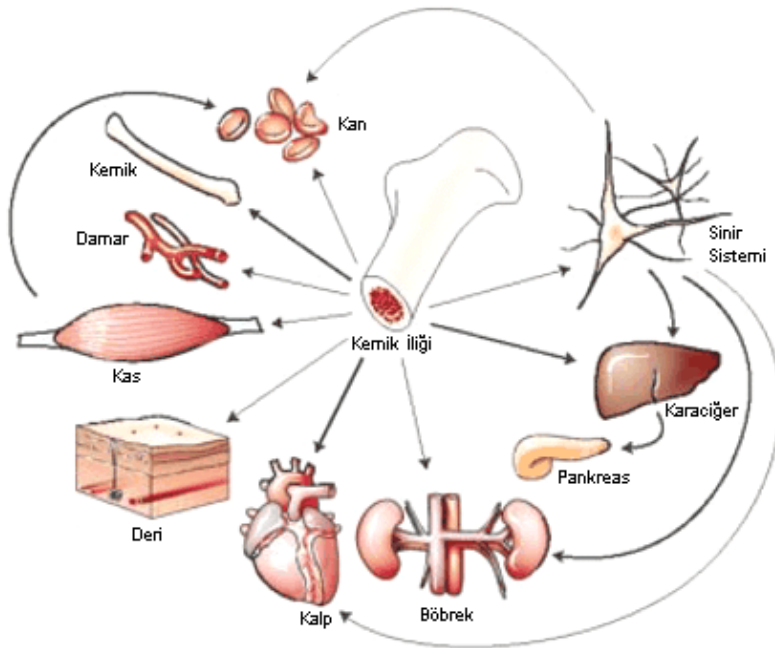
Erişkin kök hücreler, farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Her yaştaki insanda bulunan bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve ihtiyaç duyulduğunda buldukları dokudaki değişik hücre türlerine dönüşebilirler. Erişkin kök hücreler, organizma yaşadığı süre boyunca kendilerinin kopyalarını üreterek çoğalabilirler. Erişkin kök hücreler kemik iliği, kas, göz, sinir, karaciğer ve deri gibi dokularda bulunurlar. İnsan vücudunda en fazla erişkin kök hücrelerinin bulunduğu yer ise yağ dokusu (1/100) ve kemik iliğidir (1/10000). Vücuttaki tüm hücreler erişkin kök hücrelerinden elde edilemez. Embriyonel kök hücrelerinden ise tüm hücre türleri elde edilebilir (22).

Kliniğe en çok yansıyan, bir erişkin kök hücre tipi olan mezenkimal kök hücreler osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik ve fibroblastik stromal hücreler yönünde farklılaşırlar (23,24,25). Bu kök hücrelerin bir ön hücre tipi olan ve kültür kaplarına yapışan ‘multipotent erişkin progenitör hücre’ tipi tespit edilmiştir. Multipotent erişkin progenitör hücreler, endotelial, epitelyal ve hatta hematopoetik hücrelere farklılaşabilmektedir (26). Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği aspirasyonundaki çekirdekli hücre popülasyonunun % 0,001’inden daha azını oluştururlar (27). Primer kültürleri 12-16 günde elde edilirken daha sonraki kültürlerde sayıları çoğaltılır. Mezenkimal kök hücreler morfolojik olarak yapışan fibroblastlara benzerler. Mezenkimal kök hücreler mezenkimal stromal hücreler, kemik iliği stromal hücreleri, mezenkimal progenitör hücreler olarak da adlandırılmışlardır. İsimlendirme konusundaki tartışma devam etmektedir. Genç hayvanların periosteum ve kemik iliğinde bol bulunmasına rağmen yaşın ilerlemesi ile sayıları azalır (25). Mezenkimal kök hücrelerin sayısı ve aktivitesi metafiz bölgeleri ve kalın vasküler periostta daha çoktur ve bu nedenle bu bölgelerde olan hasarların iyileşmesi daha iyidir (23). Son zamanlarda MKH’in kemik iliğinden başka eklem kıkırdakları, sinovya ve periosteum gibi yapılarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda ise diz eklem yağ yastıkçıkları da dahil olmak üzere yağ dokuları ve hatta arter duvarı da MKH izolasyonunda kullanılmıştır (28,29,30). Bu gözlemler Virchow’un 1863 yılında damar duvarlarındaki ektopik kıkırdak ve kemik

oluşumunu açıklayabilir (31). Ayrıca MKH göbek bağı ve fetal dolaşım gibi iskelet dışı yapılardan da daha az oranda izole edilebilmiştir (32,33)

Mezenkimal kök hücreler belirli doku hücre karakteri taşımayan ancak belirli sinyaller altında belirli doku hücreleri (yağ, kas, kıkırdak, sinir, kalp kası, endotel vb.) yönünde farklılaşabilen hücrelerdir (Şekil 6). Bu sinyaller travma, kırık, inflamasyon, nekroz veya bir tümöral dokudan kaynaklanabilir (34). Bu hücrelerin hareketlenmesi ve farklılaşması kemotaksis ve integrin gibi transmembran proteinlerin ekstrasellüler matriks ile etkileşmesi ile gerçekleşir (35).

Fakat, MKH üretimi ve çoğaltılması kültürde yapıldığından in vivo sinyallerle çoğalan MKH'lerin tüm özelliklerini tam olarak yansıtmamaktadırlar, dolayısıyla in vivo farklılaşmada rol oynayan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Song ve Tuan'ın yaptıkları çalışmada, belirli alkalen fosfataz aktivitesine sahip osteoblastların fonksiyonel yağ yapan yağ hücrelere veya kondrositlere dönüşmesi genetik yeniden programlama ve yeniden farklılaşma kavramlarını ortaya çıkarmıştır. Bu olaylar farklılaşmış bir hücrenin başka bir farklı hücre tipine farklılaşması olarak tanımlanır (36).



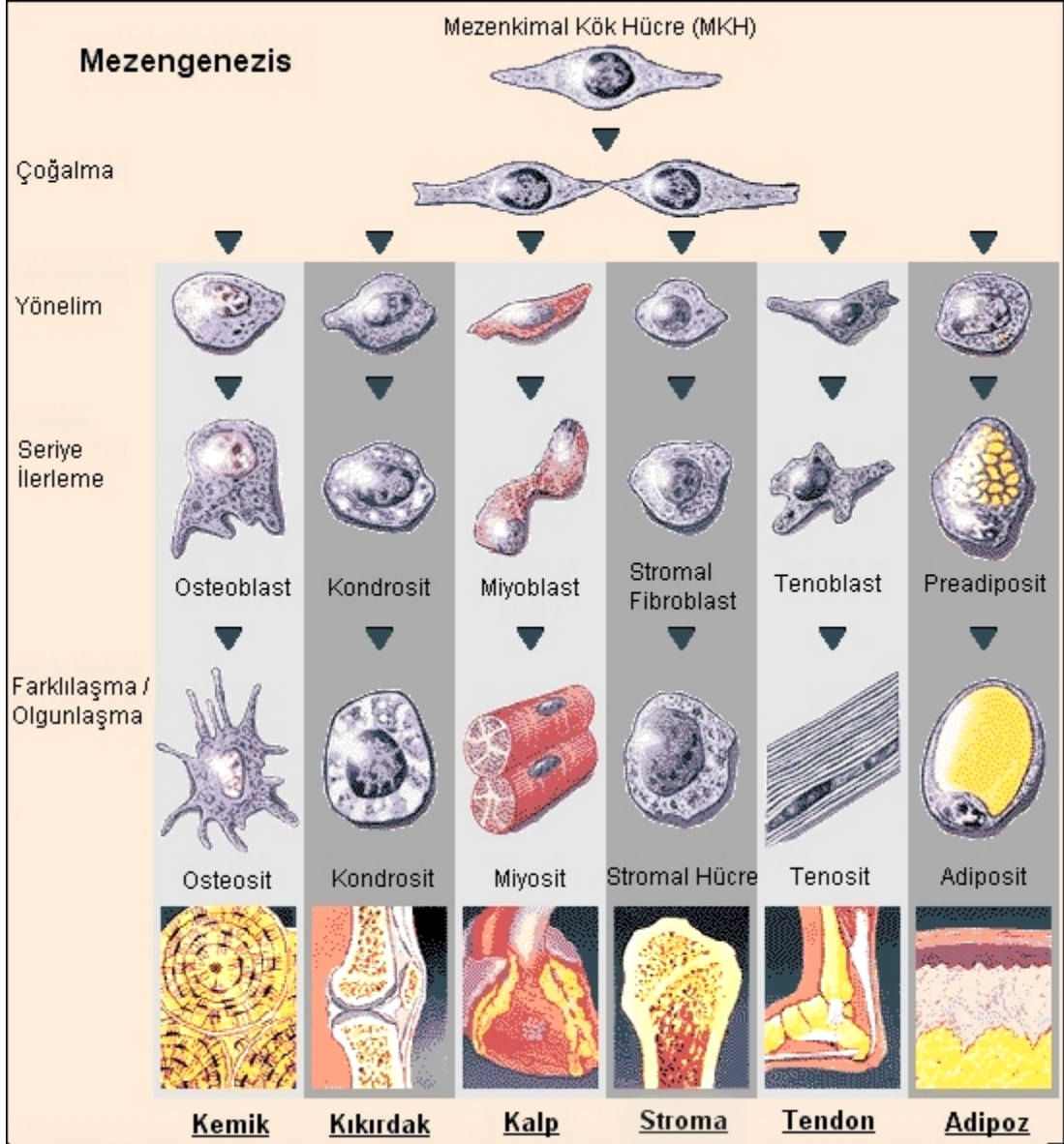
Şekil 6: Erişkin kök hücre farklılaşması (21)

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyon teknikleri daha çok onların yapışma özelliği kullanılarak geliştirilmiştir (27). Yoğunluk farkına göre santifrüjü takiben yapılan kültürlerde, kültür kaplarının yüzeylerine yapışan fibroblast-benzeri koloniler yaparlar. Yapışmayan hücreler her kültür değişiminde alınarak daha saf MKH'ler elde edilir. Bu hücrelerde kontakt inhibisyon özelliği olmadığı için tekrarlayan pasajlarla çoğaltılarak saf bir MKH kültürü elde edilir (27)

2.2.2.3. Mezenkimal Öncüller İçin Çoğalm Hiyerarşisi

Kemik iliği, bir organizmanın bütün hayat süresi boyunca hem normal ve hem de değişik şartlar altında mezenkimal hücreler tarafından sağlanan desteğin daimi olarak yenilenmesini, kendilerine ait yenilenme ve çoğul farklılaşma potansiyellerine bağlı olarak sağlayan serbest mezenkimal kök hücrelerin in vivo ortamdaki barınma yeri olarak düşünülmüştür. Çoğalm hiyerarşisi fikri, bir dokudaki kök, bağlı ve olgun hücreleri içine alan yapısal hücre topluluklarını ifade etmek için geliştirilmiştir. Kemik iliği kökenli mezenkimal öncüllerin geniş repertuarına uygulanabilen bu görüş çoğalmanın, farklılaşmanın ve olgunlaşmanın ilkesel olarak bağımsız olduğu, diğer bir deyişle kök hücreler olgunlaşmadan bölünürken, işlevsel yeterliliğe yakın hücrelerin olgun oldukları, ancak bölünmedikleri varsayımına dayanmaktadır. Fakat bağımlı hücre toplulukları bölünebilirler, olgundurlar ve kök hücrelerle, işlev gören olgun hücreler arasında özellikler sergiler. Dolayısıyla halihazırda tartışılmış olan mezenkimal öncüllerin köklük kavramı, özgün bir hücre tipine ait bir özellik olmayıp, bir topluluk içindeki hücre tiplerinin kabiliyetlerinin yelpazesidir. Mezenkimal öncüllerdeki çoğalm hiyerarşisine ilişkin bir şema oluşturma gayretleri, 1994 senesinde Caplan'ın son derece kapsamlı bir yayında “**mezenjenik işlem hipotezi**”nin deneysel ve mantıki temellerini tartışmasıyla başlamıştır. Bunu, büyük ekseriyeti kemik hücrelerinin gelişiminde görevli kemik öncül hücreleri için bir hiyerarşi belirlemeyi hedeflemiş olan bazı modeller takip etmiştir. Serbest ve çeşitli bağlı öncüllerin mevcudiyetine ilişkin tartışılan verilere dayanılarak, bu hücrelerin çoğalm hiyerarşisi için bir diyagram önerilmiştir (Şekil 7). Halihazırda güvenilir kök hücre belirteçleri mevcut olmadığından, serbest mezenkimal kök hücreler çoğunlukla işlevsel kabiliyetlerine göre tanımlanmıştır.

Dolayısıyla, bir “mezenkimal kök hücrenin” gerçekten de öyle olup olmadığı halen bilinmemektedir (21).



Şekil 7: Mezengenezis (21).

2.2.2.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotiplendirilmesi

Mezenkimal kök hücrelerin henüz spesifik bir immünofenotip belirteçleri yoktur. Hematopoetik öncül hücreler gibi CD31, CD34, CD45, CD117 veya CD133 hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (37). Değişik hücre tiplerinde eksprese edilen değişik tipte antijen yapıları vardır. Bundan dolayı belirlenmeleri adhezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve büyüme faktörü reseptörleri gibi farklılaşma ve belirli hücre tipini gösteren geniş bir monoklonal antikor çeşidi ile yapılabilir (38,39). Bugün için en çok kabul edilen immünofenotip profili CD44, CD29, CD166, CD146, CD90, CD105 (SH2) ve CD73 (SH3 ve SH4) ekspresyonudur (21,25).

2.2.2.5. Mezenkimal Kök Hücrelerin Bağışıklık Sistemini Baskılayıcı Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin alıcının immün cevabından kaçtığına dair güçlü bulgular vardır. Bunun mekanizmaları olarak MKH'lerden sınırlı sayıda eksprese olan alloantijenlerin varlığı ve hücre temas mekanizmalarının bloke edilmesi olarak düşünülmektedir. MKH'ler MHC sınıf I antijenler içermelerine rağmen MHC sınıf II antijenlerini ve CD40, CD70 ve CD86 gibi aktive edici moleküller içermezler. Bunun sonucu olarak MKH'ler MHC sınıf I antijenler ile T-hücrelerini aktive etseler bile diğer aktive edici molekülleri içermediğinden bu cevap yarım kalır. Mezenkimal kök hücreler T-hücre cevabını hücre çoğalması seviyesinde de bloke ederler. Mezenkimal kök hücreler T-hücre döngüsünü 'cyclin D2 downregulasyonu' yaparak G1 fazında durdurur. Yapılan çalışmalarda, T-hücreler MKH ko-kültüründen alındıktan sonra İnterferon-C üretseler dahi çoğalamamaktadırlar (40). MKH'lerin neden olduğu T-hücre çoğalmasının baskılanması kalıcı olmaktadır (41).

Mezenkimal kök hücrelerce hücre-hücre reaksiyonunda, baskılayıcı faktörler salınabilir veya etkileri arttırılabilir. 'İndoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)' enzimi bu mekanizmada rol oynar. Bu enzim 'kynurenine' adlı bağışıklık baskılayıcı bir maddenin tiriptofandan oluşumunu katalize eder. Bu madde otoantijen ve fetal allojenlerin T-hücre cevabını güçlü şekilde baskılar. T-hücre aktivasyonuna bağlı inflamatuvar sitokinlerin stimule ettiği MKH'lerin 'İndoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)' oluşturduğu tespit edilmiştir (42). MKH'ler, immün yanıtta rol oynayan B-hücre ve dendritik hücreleri de etkiler (40,43). Mezenkimal kök hücreler dentritik

hücrelerin monositlerden farklılaşmasını engellemenin yanında IL-10 üreterek daha toleransı güçlü bir fenotip oluştururlar (43). Bağışıklık sistemini baskılama özelliklerinden dolayı tedavi edici olarak kullanılacakları düşünülmüştür. İlk gözlemlerde MKH'lerin maymunlarda in vivo olarak 'MHC-mismatched' deri greftlerinin yaşayabilirliğini arttırdığı görülmüştür (44). Klinik olarak allojen kemik iliği transplantasyonu yapılan bir hastada gelişen 'graft-versus-host' hastalığı allojenik MKH infüzyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir (45).

2.2.2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulama Alanları

Mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamalarda gelecekte önemli bir yeri olacağı düşünülmektedir. Bu bakımdan değişik klinik dallardaki uzmanların ve bilim adamlarının ilgisini çekmektedir. Bu hücreler serebral hasar, miyokard iskemi/enfarktüs, diyabet, Parkinson, karaciğer yetmezliği, müsküler distrofi ve kemik, kıkırdak ve tendon defektleri gibi birçok hasar modellerinde denenmiştir ve klinik denemeleri başlamıştır (46).

Friedenstein, Piatetzky-Shapiro ve Petrakova'nın MKH'lerin yeni kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini hızlandığını belirten yayınlarından sonra, MKH'lerin yeni kemik oluşumu ve kemik iyileşmesindeki yeri birçok araştırmacı tarafından irdelenmiştir (47). Bir çok çalışmada, MKH'lerin deneysel olarak oluşturulan büyük kemik defektlerinin onarımındaki etkinliği gösterilmiştir. Horwitz ve ark. 'osteogenesis imperfecta'lı 3 çocuğa verilen MKH'lerin tedavi edici etkisini rapor etmişlerdir (48). Son zamanlarda, açık cerrahi gerektirmeyen, enjekte edilebilen taşıyıcılar içine konan MKH'lerin etkinliği araştırılmıştır. Goel ve ark. tibial kaynamaması olan hastaların perkutan kemik iliği greftlemesi ile kemik iyileşmelerini sağlamıştır. Tekniklerinin basit, az girişimsel ve düşük komplikasyon oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir (49). Siwach ve ark., gecikmiş, kaynamamış kırık veya bacak uzatma yapılan ancak hatalı kaynaması olan 72 hastanın 69'unda perkutan otojen kemik iliği greftlemesi ile iyileşme göstermişlerdir (50). Geniş kemik defektlerinde MKH emdirilmiş taşıyıcılar ile tedaviler araştırılmıştır. Bu teknikte, geniş kemik defektlerinin iyileşmesi sağlanmakla beraber birtakım büyüme faktörleri eklenmesi ile etkinin arttığı tespit edilmiştir (51,52).

MKH'lerin tendonlar gibi diğer konnektif doku elemanlarına diferensiasyonu ile ilgili çalışmalar da mevcuttur. Tendon içi enjeksiyonlar bir çok hayvan çalışmasında denenmiş, olumlu sonuçlar bildirilmiştir. Tip I kollajen içinde verilen otolog MKH'ler ile tendon tamiri yapılmış, ancak vakaların yaklaşık %30'unda ektojik kemik oluşumu gözlenmiştir (53). Hücre-kollajen oranınının 20 kat kadar azaltılması (0.8'den 0.004 M hücre/mg kollajen) ile kültür ortamında hücre canlılığının düzeldiği, tamir yöresinde ektojik kemik oluşumunun ortadan kalktığı ve tedavi sonrası 12. haftada histolojik görünümün düzeldiği gösterilmiştir (54). Chong ve ark. tavşan aşil tendonlarını tam kat keserek oluşturdukları lezyonların tamirinde intralezyonel MKH kullanmışlardır. Tendonların iyileşmesinde MKH verilen grubun kontrol grubuna göre erken dönem daha hızlı iyileştiğini göstermişlerdir (55). Dresler ve ark. yapmış oldukları çalışmada, genç (1 yaşında) ve yaşlı (4 yaşında) tavşanlarının aşil tendonlarında defekt oluşturulup MKH enjeksiyonu yapılarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, enjeksiyondan 12 hafta sonra hayvanların yaş farkından bağımsız olarak her iki grupta da tendon iyileşmesinin sağlandığı, tendon güçleri arasında fark olmadığı ve tendon çevresinde oluşan ossifikasyonun hareketlere mani olmadığı gösterilmiştir(56). Tüm benzer olumlu sonuçlara rağmen bu gün tendon dokusunun tamir kabiliyetinin sınırlı olması ve tendonlarda kemik dokulardaki gibi doku spesifik diferansiasyon faktörlerinin ortaya konulamamış olması çalışmaların önünde aşılması gereken zorluklardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı tarafından Kocaeli Üniversitesi Etik Komitesinin izniyle gerçekleştirildi (KOÜ. HADYEK 11/5-2009).

Çalışmamızda ağırlıkları 200–300 gr. arasında olan 40 adet dişi Winstar–Albino türü sıçan kullanıldı. Tüm sıçanlar, standart laboratuvar koşulları altında üretim yapan Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı'ndan temin edildi. Sıçanlara özel bir besleme uygulanmadı ve ilaç tatbiki yapılmadı. 50x50x15 cm boyutlarında, havalandırma delikleri bulunan kafeslerde, standart kemirgen yemi ile beslendi (Şekil 8). İçme suyu olarak musluk suyu verildi. Çalışmanın ilk adımında 6 adet sıçanın yaşamlarına son verilerek, sMKH elde etmek için tibia ve femurları çıkarıldı. Kalan sıçanlar; çalışma grubu (sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre verilen) (n=17) ve kontrol grubu (n=17) olmak üzere ikiye ayrıldı. Deney sonunda (12. hafta sonunda) tüm sıçanların yaşamları eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapılarak sonlandırıldı.

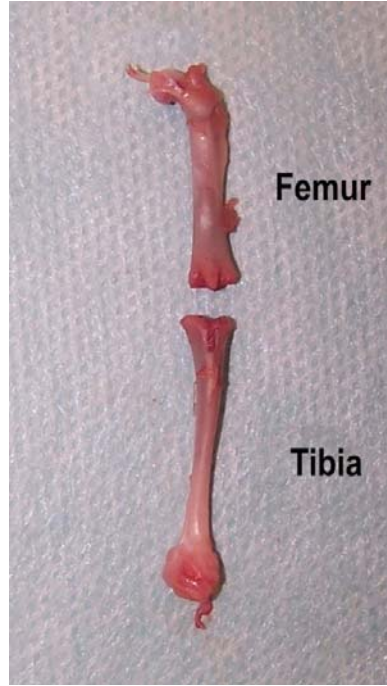


Şekil 8: Laboratuvarda sıçanların bulunduğu ortam

3.1. Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerinin (sMKH) Elde Edilmesi ve Karakterizasyonu

3.1.1. sMKH Elde Edilmesi

sMKH kültürü elde etmek için 6 adet sıçan eter anestezi altında servikal dislokasyon uygulanarak öldürüldü. Steril şartlar altında femur ve tibiaları çıkarıldı. Kaslar ve tüm yumuşak dokular ayrıştırıldı (Şekil 9).



Şekil 9: Sıçanlardan elde edilen femur ve tibia kemikleri.

Kemikler metafizer bölgelerinden kesildi. %15 fetal bovine serum (FBS; Invitrogen/GIBCO, Grand Island, NY, USA), 100 IU/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin (Invitrogen/GIBCO) içeren MEM-Earle medium (Biochrom, Berlin, Germany) çekilmiş insülin enjektörü ile medulla yıkanarak kemik iliği aspiratları 15 ml'lik Falcon tüplerde toplandı. Kemik iliği aspiratı 70 µm mesh naylon filtre (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) ile filtre edildi ve 200 devir/dk hızında 10 dakika sentrifüj edildi. Trombosit ve eritrosit içeren üstte kalan kısım (supernatant) uzaklaştırıldı ve hücre peleti besiyeri (vasat, medyum) ile pipetlenerek süspansiyon haline getirildi. Her sıçandan alınan hücreler, 25 cm² plastik doku kültür flasklarında

(BD Biosciences) (Şekil 10) 37 °C ısıda ve % 5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda (inkübatörde) 3 gün süreyle inkübe edildi.



Şekil 10: Plastik doku kültür flaskı

MKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edildi. Üçüncü günde, eritrositler ve kültür kabına yapışmayan diğer hücreler uzaklaştırıldı ve MKH'lerin gelişimini sağlamak amacı ile taze medium eklendi. %70 konflüente (kültür kabının yüzeyinin % 70 oranında hücrelerce doldurulması) ulaşan yapışan hücreler pasaj sıfır (P₀) olarak tanımlandı. P₀ MKH'ler, Ca²⁺-Mg²⁺ içermeyen phosphate-buffered saline (PBS) (Invitrogen/GIBCO) ile yıkandı ve %0.25 trypsin-EDTA solüsyonu (Invitrogen/GIBCO) ile 5-10 dakika süre ile 37 °C ısıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kültür tabağının tabanında ayrılan (yüzen) hücreler inverted (zıt/faz) mikroskobunda gözlenerek onaylandıktan sonra tripsini inaktive etmek için serum içeren besiyeri eklendi. Birkaç kez pipetleme işlemi yapıldıktan sonra hücreler 200 devir/dk hızında 10 dakika sentrifüj edildi ve 1 ml normal besiyeri ile tekrar yıkandı. Son yıkama işleminden sonra oluşan hücre peleti 1 ml besiyeri ile pipetlendi, 100µl'lik örnekte hücre sayım işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla Thoma lamı kullanıldı ve hücre sayımı manuel olarak gerçekleştirildi. 75 cm² flasklara (BD Biosciences) 1x10⁶ hücre/flask yoğunluğunda olacak şekilde hücreler ekildi ve P₁ olarak kabul edildi. 10-14 gün boyunca her üç günde bir normal besiyeri değiştirildi. Sonraki dönemlerde, hücreler % 70 oranında konflüente ulaştığında benzer yöntemlerle alt-kültürleme (pasaj) işlemi gerçekleştirildi.

3.1.2. sMKH karakterizasyonu

MKH'ler ile ilgili karakterizasyon çalışmaları Kocaeli Üniversitesi KÖGEM'de gerçekleştirildi.

3.1.2.1. Akım Sitometri

Kültürde üreyen sKİ-MKH'lerin kendi fenotipik özelliklerinin devam ettiğini doğrulamak için akım sitometri analizinde farklılaşmamış MKH'ler kullanıldı. Pasaj 3'teki sKİ-MKH'lerin 3 çeşit yüzey belirteci (CD29, CD45 ve CD90) araştırıldı. Bu amaçla, MKH'ler her pasajdan sonra toplandı ve 1×10^6 hücre/ml konsantrasyonunda kendi kültür ortamlarına konuldu. Kısa süreli bir santrifüj işlemi sonrası hücreler yıkanmış tampona (BD Bioscience) tekrar konuldu ve 300µl hücre süspansiyonu, oda ısında 45 dakika süre ile fluorasan izotiosiyanat (FITC) konjuge antikorlar ile inkübe edildi. Akım sitometri FACSCalibur (BD Bioscience, San Diego, USA) ile yapıldı. Veriler Cell Quest Software (BD Bioscience) ile analiz edildi.

sKİ-MKH'lerin immünofenotipleme için seçilen antijenleri CD29 (İntegrin b1 zinciri; Ha2/5; FITC), CD45, and CD90'a (Thy-1/Thy-1.1-FITC) karşı antikorlar ve onların izotip kontrolleri (IgG2aj; FITC) ile yapılmıştır.

3.1.2.2. İmmunohistokimya

MKH'lerin immunohistokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmalarını yapabilmek için her altkültür işleminden sonra poli-l-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA) 2×10^5 hücre (her kuyucuk için) ekildi. Bir gün sonra immunboyama işlemine geçildi. Hücreler immunohistokimyasal çalışmalar için % 0.1 H₂O₂ içeren metanolde endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için oda ısısında (nemli ortamda) 30 dak. süreyle inkübe edildiler. PBS ile yıkandıktan sonra, hücreler % 1.5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dak. inkübe edildi ve Tablo 1'de verilen uygun dilüsyon oranlarında primer antikor eklendi, +4 °C 1 gece ve oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildiler. PBS ile 3 kez yıkama işleminden geçirildikten sonra immunohistokimyasal çalışmalar için uygun biyotinli sekonder antikorla (rabbit ABC staining system;sc-

2018, Goat ABC staining system;sc-2023 veya mouse ABC staining system;sc-2017, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA) ve immunfluoresans çalışmalar için uygun fluoresans (FITC) işaretli sekonder antikorla (donkey anti-goat IgG;sc-2024, goat anti-rabbit IgG;sc-2012 veya goat anti-mouse IgG;sc-2010, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA) oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildiler. Son aşamada, çekirdek zıt boyaması için %0.1 Mayer's Hematoksilen (immunohistokimyasal) ve DAB (immunfluoresans) kullanıldı ve lam üzerine kapatıldı. Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulandı fakat primer antikor yerine PBS kullanıldı. Mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelendi ve fotoğraflandı.

Antikor/Belirteç	Dilüsyon	Kaynak	<i>sKİ-MKH</i> (Pasaj 3)
			Sonuç
CD 31/ PECAM-1 (M-20)	1:100	Santa Cruz Biotechnology	∅
CD 34 (C-18)	1 : 150	Santa Cruz Biotechnology	∅
CD 45 (H-230)	1 : 150	Santa Cruz Biotechnology	∅
CD 71 (K-20)	1 : 150	Santa Cruz Biotechnology	∅
CD105/Endoglin (M-20)	1:100	Santa Cruz Biotechnology	+
c-Fos (4)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
Kollajen II Ab-2 (2B1.5)	Predilüye	Thermo Scientific	+
Kollajen I a1 (D-13)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
β- Tubulin (KMX-1) β -Tubulin	1 : 50 Predilüye	Chemicon International Thermo Scientific	+
Nestin (Rat-401)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
Vimentin (C-20)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology	+
Desmin (H-76) Desmin Ab1 (D33)	1 : 50 Predilüye	Santa Cruz Biotechnology Thermo Scientific	+ ¹
Fibronektin (EP5)	1 : 100	Santa Cruz Biotechnology	+
α-Düz kas Aktin Ab-1	1 : 800	Thermo Scientific	+
Aktin (C-2)	1 : 50	Santa Cruz Biotechnology	+
CD146	1:300	Abcam	+ ¹
Ki67	1:200	Abcam	+
BrdU	1:500	Thermo Scientific	+

Tablo 1: sKİ-MKH'lerin immünohistokimyasal özellikleri

+ belirteç ekspresyonu olması

∅ belirteç ekspresyonu olmaması

-/+ belirteç ekspresyonunun zayıf olması

¹ Hücrelerin % 10-20'sinde immünreaktivitenin olması

3.2. Cerrahi Teknik

Cerrahi anestezi olarak, 50mg/kg ketamin HCl (Ketalar® Pfizer) ve 5 mg/kg Xylazine HCl (Rompun® Bayer) aynı enjektör içinde kombine olarak intraperitoneal yol ile uygulandı. Tüm denekler aynı cerrah tarafından opere edildi.

Sıçanların sağ kruris posteriorundaki tüyleri tıraş edildi. Aseptik cerrahi koşullar sağlanıp sağ alt ekstremité betadine solüsyonu ile boyandı (Şekil 11). Posteriordan longitudinal standart 2 cm'lik insizyon ile girilerek cilt, cilt altı geçildi. Aşil tendonuna ulaşarak paratenon açıldı ve tendon açığa çıkarıldı. Aşil tendonu ve plantaris tendonları çevre yumuşak dokulardan sıyrıldı (Şekil 12).



Şekil 11: Cerrahiye hazırlanmış sıçan krurisi



Şekil 12: Çevre dokulardan sıyrılmış aşil tendonu

Tüm gruplarda aşil tendonuna, kalkaneus yapışma yerinin 0.5 cm proksimalinden tam kat transvers kesi oluşturuldu. Plantaris tendonu sağlam bırakılarak “internal splint” etkisi oluşturması sağlandı (57). Kesik olan tendon uçları 3/0 Ethibond sutür kullanılarak Modifiye Kessler yöntemi ile uç uca tamir edildi. Talokrural eklem hareketini kontrol altına alabilmek için tibiofibular çentikten geçirilen dikiş kalkaneus medialinde plantar aponözdan çıkarılarak eklem ekin postüründe iken kendi üzerine düğümlendi (58). Cilt 4/0 Prolen ile suture edildi(Şekil 13,14).



Şekil 13: Transvers olarak kesilen aşil tendonunun Modifiye Kessler yöntemi ile tamiri



Şekil 14: Tendon tamiri sonrası

Cerrahi sonunda tek doz intraperitoneal 40mg/kg sefazolin sodyum (İespor® Mustafa Nevzat) uygulandı. Postoperatif dönemde sıçanlara immobilizasyon yöntemi uygulanmadı.

Postoperatif dönemde sıçanlar metal kafesler içinde sabit oda sıcaklığı (23° C) ve floresan ışığı altında takip edilerek, su ve standart sıçan yemi ile beslendiler. Cerrahi sonrası tüm deneklerin kafes içinde serbest hareket edebilmelerine olanak sağlandı.

Üçüncü hafta sonunda kontrol grubunda bir hayvanın öldüğü görülerek çalışmadan çıkarıldı.

3.3. Transplantasyon İçin BrdU İşaretli Hücre Hazırlanması

Sıçanlara verilecek kök hücreler, Kocaeli Üniversitesi KGEM’de çalışmanın 4. haftasında, transplantasyondan 48 saat önce, 10 $\mu\text{mol/ml}$ BrdU olacak şekilde kültür yapıldı. Kültürü yapılan hücreler % 0,25 trypsin ile kaldırıldı. Kültür besiyeriyle nötralize edildi. 2000 devir/dk. de oda sıcaklığında 10 dk sentrifüj edildi. Hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Transplantasyon için son konsantrasyon $1 \times 10^6/\text{ml}$ olacak şekilde PBS’de süspanse edildi. Transplantasyon yapılacağı gün her sıçan için 0,2 ml MEM içinde 1×10^6 mezenkimal kök hücre bulunan insülin enjektörleri şeklinde hazırlandı. Eter anestezisi altında çalışma grubu sıçanlarına (n=17) eski insizyon skarı üzerinden tendon tamiri yapılan bölgeye perkutan olarak 1×10^6 MKH uygulandı (şekil 15). Kontrol grubuna (n=16) ise sadece 0,2 ml MEM verildi.



şekil 15: Sıçanlara perkutan olarak MKH uygulaması

3.4. Değerlendirme

3.4.1. Histolojik Değerlendirme

12 haftalık takip süresi sonunda sıçanlar eter anestezisi altında servikal dislokasyon metodu ile sakrifiye edildi. Çalışma grubu (n=9) ve kontrol grubu (n=9) aşıl tendonları, proksimalde muskületendinöz bileşkeden, distalde kalkaneus yapışma yerinden kesilerek % 10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonu içinde Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na teslim edildi. Histolojik inceleme burada gruplar hakkında önceden bilgilendirme yapılmamış tek patolog tarafından yapıldı.

Makroskopik olarak, üzerinde sütürleri bulunan tendon yapıları uzunlamasına ortadan ikiye bölünerek her iki parçası da görülebilecek şekilde tümüyle incelendi. Formalin tespiti sonrası parafine gömülen dokular 5 µm kalınlığında seri kesitler haline getirildi. Bu kesitler Hematoksilen Eozin ile Alcian Blue ile boyandı. Tendon yapısının düzeni ve morfolojisini değerlendirmek amacıyla fibrozis varlığı ve şiddeti, tendon dokusunun içinde kapiller damar varlığı ve yaygınlığı, yangısal hücrelerin dağılımı ve kıkırdak metaplazisi temel kriterler alınarak değerlendirildi. Bu değerlendirme sırasında semi kantitatif bir derecelendirme yöntemi kullanıldı. Bu derecelendirmede 0 (yok), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (şiddetli) olarak belirlendi. Kıkırdak metaplasizi ise 0 (yok) ve 1 (var) olarak iki aşamada derecelendirildi. Her örnek için en az 4 kesit değerlendirildi ve tüm kesitlerin ortalama değerleri alındı.

3.4.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

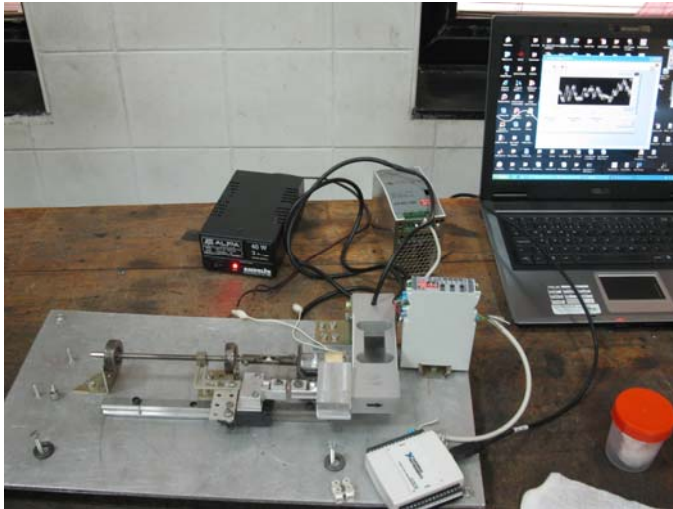
Deney sonunda elde edilen doku kesitlerindeki immunohistokimyasal çalışmalar Kocaeli Üniversitesi KÖGEM'de gerçekleştirildi.

Formalin ile tespit sonrası parafine gömülen dokular 5 µm kalınlığında seri kesitler haline getirildi. Her örnek için en az 5 kesit değerlendirildi. Elde edilen örneklere apoptozis için TUNEL ve Caspase 3 immunboyaması, BrdU pozitif hücrelerin seçilebilmesi ve izlenebilmesi için anti-BrdU immunboyamaları gerçekleştirildi. TUNEL boyaması için ticari olarak elde edilen kitteki prosedür

uygulandı, Caspase 3 immun boyaması için ise MKH'lerin karakterizasyonunda belirtilen immunohistokimyasal yöntemler uygulandı. Bununla birlikte, hem BrdU hem de Caspase 3 için gerçekleştirilen immunboyamalarda ikincil boyama için fibronektin ve desmin monoklonal antikorları kullanıldı.

3.4.3. Biyomekanik Değerlendirme

Deney gruplarındaki tendonların kopma kuvvetleri arasında biyomekanik açıdan fark olup olmadığı, Kocaeli Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Makine Eğitimi Anabilim Dalı laboratuvarlarında aynı araştırmacı tarafından araştırıldı. Germe testi için biri sabit, diğeri elektrik motoruna bağlı bir mil tarafından 10mm/dakika hızında hareketli iki klemp ile önceden hazırlanmış özel düzeneğe kullanıldı (Şekil 16). Veriler bilgisayara load cell, transmitter ve data kart bağlantıları ile aktarıldı. Data karttan elde edilen veriler Labview yazılım dili ile hazırlanmış olan özel program sayesinde yorumlandı.



Şekil 16: Biyomekanik çalışmanın yapıldığı germe düzeneği

Onikinci haftanın sonunda aşil tendonları, sıçanlar eter anestezisi altında servikal dislokasyon metodu ile sakrifiye edilip, distalde kalkaneus ile birlikte çıkarıldı (Şekil 17). Bu işlem sırasında çalışma grubunda bir tendon yanlış yerden kesildiği için çalışma dışı bırakıldı.



Şekil 17: Distalde kalkaneus ile beraber çıkarılmış sıçan aşil tendonu

Çalışma grubu (n=7) ve kontrol grubu (n=7) aşil tendonları taze olarak laboratuvara getirildi ve her iki ucundan test makinesinin klemplerine yerleştirildi (Şekil 18). Tendonlara 10mm/dak hızında gerim uygulandı (Şekil 19). Tendonların koptukları kuvvetler Newton cinsinden kaydedildi.



Şekil 18: Germe düzeneğinde ilk gerimin başlaması



Şekil 19: Germe düzeneğinde tendonun kopma anı

3.4.4. İstatistiksel Değerlendirme

Toplam 18 adet örnek histolojik olarak değerlendirilip istatistiki çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan her bir örnekten elde edilen histolojik sonuçlar kategorik veri olduğu için istatistiksel olarak Ki-kare testi kullanılarak analiz edildi.

Toplam 14 adet örnek biyomekanik özellikleri açısından değerlendirip istatistiki çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan her bir örnekten elde edilen biyomekanik sonuçlar numerik veri olduğu için istatistiksel olarak Mann-Whitney U testi kullanılarak analiz edildi.

Elde edilen sonuçların değerlendirmesi bilgisayarda “SPSS® 13.0 for Windows” (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) istatistik programı yardımıyla yapıldı. p değeri 0.05 veya daha küçük olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kök Hücre Karakterizasyon Bulguları

4.1.1. Akım Sitometri: sKİ-MKH'lerin Belirlenmesi

sKİ-MKH'ler CD29 ve CD90 eksprese ederken, CD45'i etmediler ve fenotipik özelliklerini tüm pasajlar boyunca korudular. Bu nedenle, bu çalışmada kullanılan hücrelerin literatürde tanımlanan immunofenotipik özelliklere sahip olduğuna ve MKH'ler olarak değerlendirilebileceğine karar verildi.

4.1.2. İmmünohistokimya: sKİ-MKH'lerin Belirlenmesi

İmmünohistokimyasal çalışmalar, değişik fenotiplerle ilişkili olduğu bilinen antijenlere özgün geniş antikor paneli kullanılarak sKİ-MKH'lerin nesillerini kategorize etmek için yapıldı. sKİ-MKH'lerin immünreaktivite profili Tablo 1'de gösterildi. MKH'lerin antijenik fenotipi tek çeşit değildi ve MKH'lere özgün tek bir belirteç bulunamamakla birlikte CD31 (endotelyal), CD34, CD45, ve CD71 gibi hematopoyetik kök hücre belirteçlerini eksprese etmemeleri, CD105, CD146, fibronektin ve vimentini eksprese etmeleri bu çalışmada kullanılan hücrelerin MKH'ler olarak değerlendirilmesini sağlamıştır.

Ek olarak, sKİ-MKH'lerde farklılaşma uyarısı olmadan, demsin ve α -Düz kas Aktin Ab-1 gibi bazı myojenik belirteçler ve tip II kollajen gibi kondrojenik belirteçler ekspresyonu görüldü.

4.2. Cerrahi işlem ve kök hücre uygulaması sonrası bulguları

Cerrahi uygulanan 34 adet denekte, 12 haftalık takip süresince 3. haftada kontrol grubunda ölen bir sıçan ve çalışma grubundan biomekanik testler için örnek alınırken aşıl tendonu yanlış yerden kesilen bir sıçan çalışma dışı bırakıldı. Deneklerde enfeksiyon bulgusuna rastlanmadı. Cerrahi sonrası tüm deneklerin 1. günden itibaren kafes içinde serbest hareket edebildikleri gözlemlendi.

4.2.1. Makroskopik Bulgular

Hayvanlara kafes içinde immobilizasyon uygulanmadı. Deney sonunda, sıçanlar sakrifiye edildikten sonra çıkarılan, çalışma ve kontrol grubu aşıl tendonlarının hiçbirinde rerüptür görülmedi. Aşıl tendonunun, tendon tamiri yapılan tarafta, karşı taraf ile karşılaştırıldığında daha kısa olduğu görüldü. Her iki grupta da tamir sahaları hipertrofik görünümdeydi. Kontrol grubunda, tamir sahalarındaki translüsensi, çalışma grubuna göre daha fazla idi.

4.2.2. Histolojik Bulgular

Histolojik olarak normal tendonda, doğal yapı tamamen korunmuş olup düzenli, sıkı bir demet şeklinde izlenen kollajen yapısı içinde birbirleri ile paralel yapıda ve içsi yapıda sitoplazma sınırları seçilemeyen tenositler görüldü. Kapiller damarlar kasla ve kemikle bütünleştiği alanlarda çok az sayıda izlenebilmekte, kompakt alanlarda ise son derece belirsizdi. Yangı hücreleri ise normal tendon yapısı içinde izlenmedi.

Sütür bölgesinde ise, gruplardan bağımsız olarak örneklerin pek çoğunda, tenositlerin dağılımı düzensiz, çekirdek şekilleri yuvarlakmış, hafifçe büyümüş ve yer yer kıkırdak metaplazisi sonucu lakünler içinde yer almaktaydı.

Bağ dokusu açısından kollajen düzenli yapısını genelde kaybetmişti. Halen izlenen sütür materyalinin etrafında daha yoğun olmak üzere, genç bağ dokusunun düzensiz, miksoid yapı özelliğine sahip, düzgün demet yapısının ancak küçük odaklarda var olduğu, genel olarak karmaşık ve hücreden zengin bir halde olduğu görülmekteydi. Özellikle kondroid metaplazi alanlarının etrafında Alcian Blue ile boyanan musinöz yapıda bağ dokusu gelişimi görüldü.

Damarlanma açısından iki farklı dağılım dikkati çekti. İlkinde, tendon içinde kollajen demetler arasında küçük damar yumakları şeklinde damarlanma artışı görüldü. Diğerinde ise, bağ dokusu düzeninin kaybolduğu ve yangısal infiltrasyonun belirgin olduğu alanlarda, yaygın olarak izlenen kapiller çapta damar artışı dikkati

çekti. Her iki tip damarlanma artışı aynı örnekte olduğu gibi biri diğerinden daha baskın olarak da görüldü.

Yangı hücreleri ağırlıklı olarak sutür materyalinin çevresinde izlendi. Yangı içinde esas olarak kronik yangısal infiltrasyon hücreleri (lenfosit, histiyosit) görüldü. Ancak, tendon yapısı içinde de tek tek veya küçük gruplar halinde lenfosit varlığı da saptandı. Nötrofil lökositler bu yangısal infiltrasyon içinde hiçbir örnekte saptanmadı.

Histolojik değerlendirme sırasında her iki grup içinde immun yanıt düşündürecek doku değişikliği veya rejeksiyon bulgusu gösterilemedi.

Tablo 2: Histolojik bulguların değerlendirilmesi

Grup	Denek numarası	Fibrozis	Damarlanma	Yangı	Kıkırdak Metaplazisi
ÇALIŞMA GRUBU	1	2	2	2	1
	2	2	2	2	1
	3	2	2	1	1
	4	2	2	1	1
	5	3	3	2	1
	6	1	1	1	0
	7	1	2	1	1
	8	1	1	1	1
	9	1	1	1	0
KONTROL GRUBU	10	3	3	3	1
	11	3	3	2	1
	12	2	2	0	0
	13	2	2	0	0
	14	1	1	1	0
	15	2	1	0	1
	16	2	3	1	1
	17	3	3	2	1
	18	1	1	1	0

Histolojik olarak değerlendirilen kesitlerde kontrol grubunda fibrozis ve damarlanma artışı daha fazla bulundu. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$), (Tablo 3,4).

	Fibrozis			Toplam
	Hafif	Orta	Şiddetli	
Çalışma grubu	4 (%44.4)	4 (%44.4)	1 (%11.1)	9 (%100)
Kontrol grubu	2 (%22.2)	4 (%44.4)	3 (%33.3)	9 (%100)

Tablo 3: Gruplara göre fibrozis şiddeti

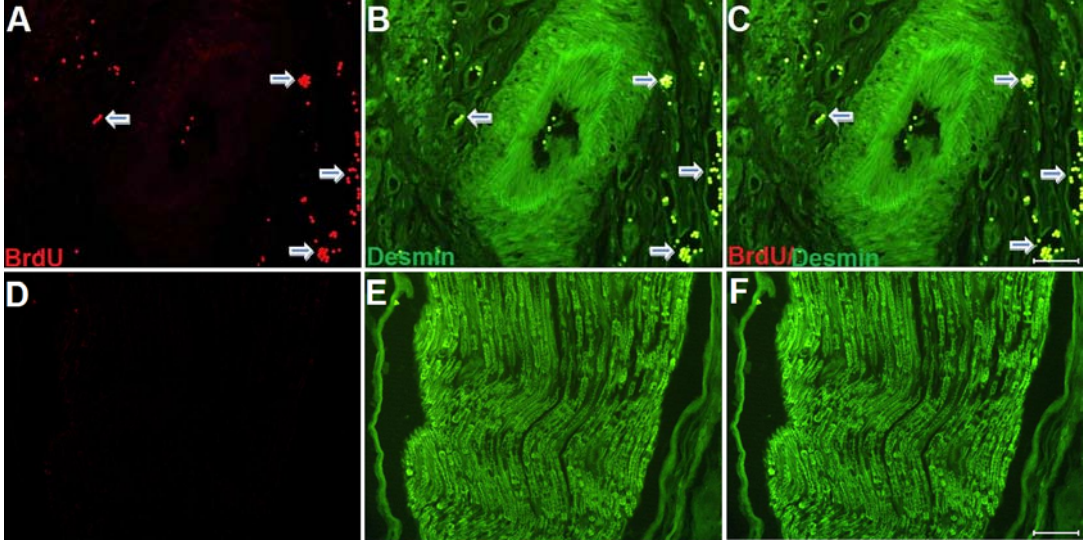
	Damarlanma artışı			Toplam
	Hafif	Orta	Şiddetli	
Çalışma grubu	3 (%33.3)	5 (%55.5)	1 (%11.1)	9 (%100)
Kontrol grubu	3 (%33.3)	2 (%22.2)	4 (%44.4)	9 (%100)

Tablo 4: Gruplara göre damarlanma artışı miktarı

Histolojik olarak değerlendirilen diğer kriterler yangı hücreleri ve kıkırdak metaplazisi olup gruplar arasında belirgin fark saptanmadı ve istatistiksel olarakda anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

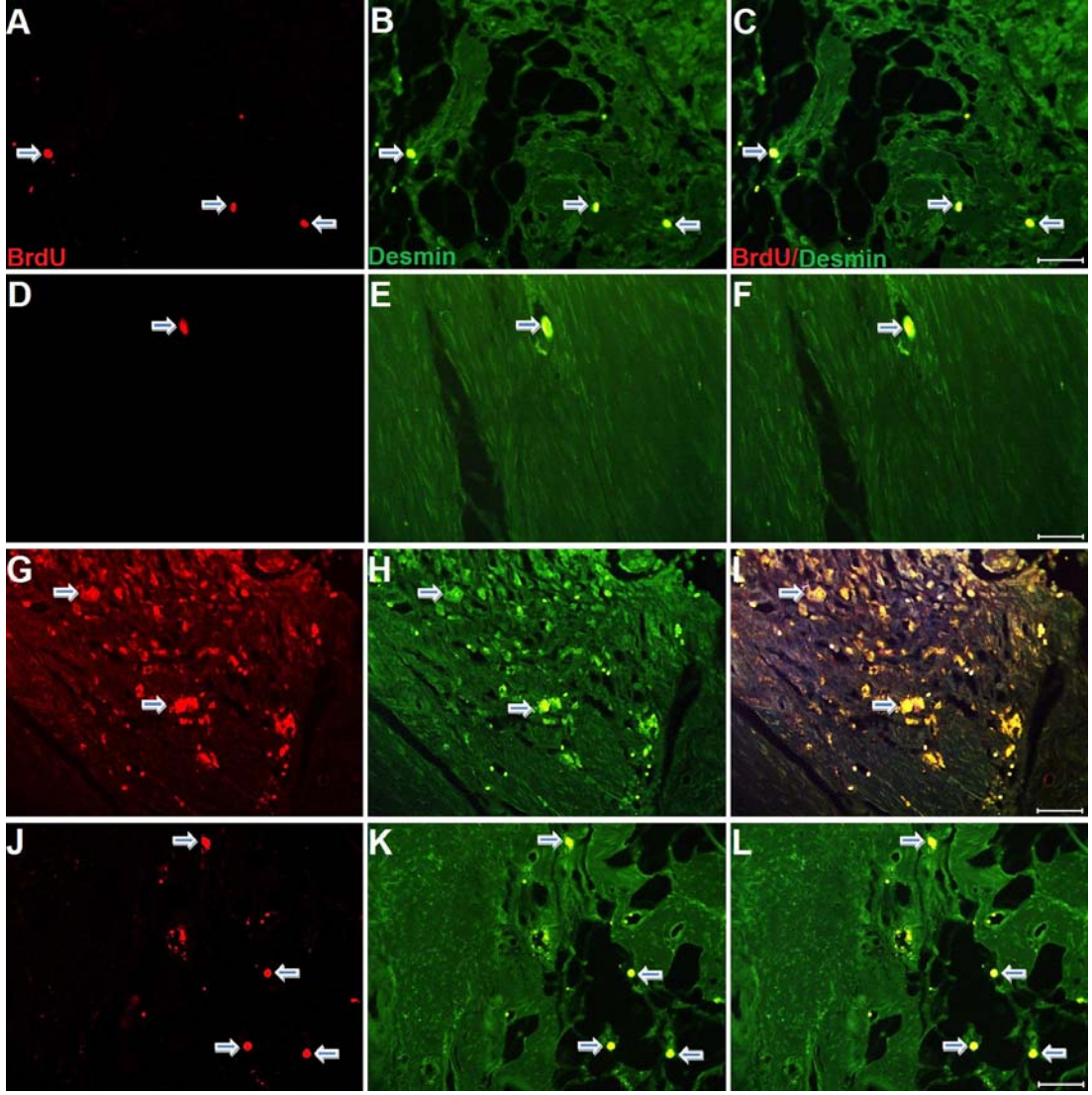
4.2.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubunda anti-BrdU antikoru ile yapılan immunboyanmada otofluoresans veren damar-içi eritrositler dışında BrdU için pozitif boyanma görülmemektedir (Şekil 20).



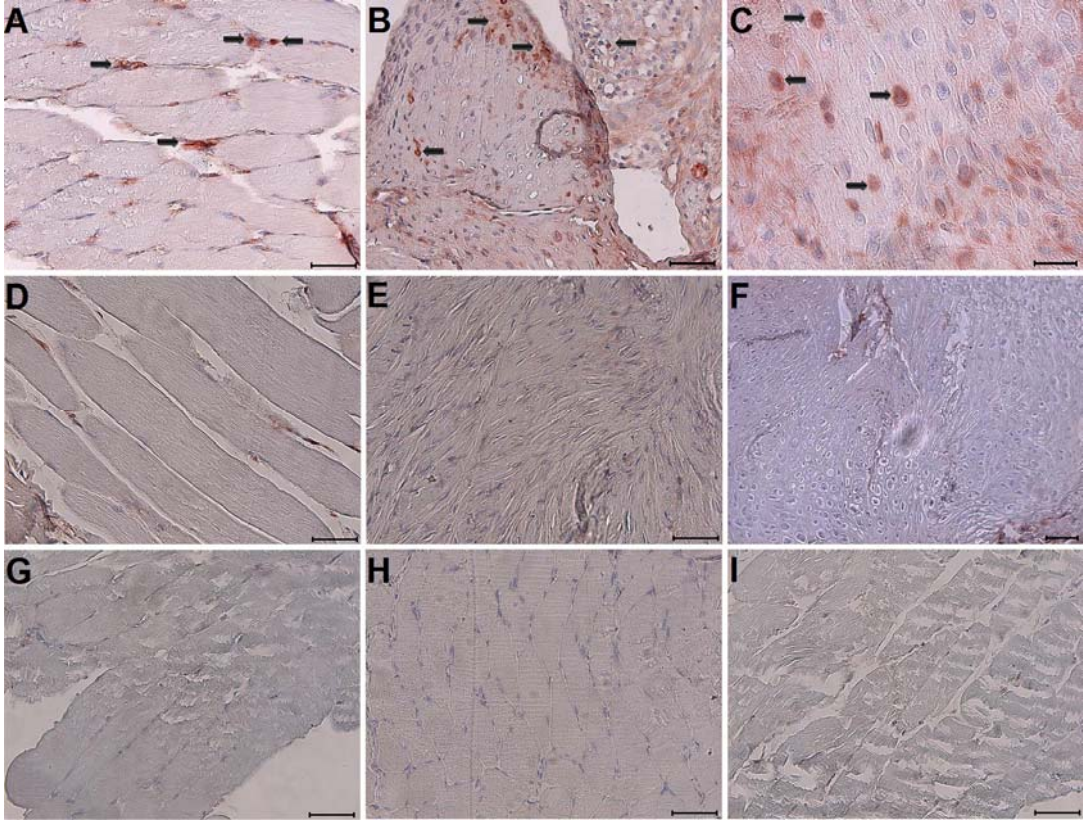
Şekil 20: Kontrol grubu tendonlarına ait kesitlerin BrdU ve desmin için immunboyanma sonrası görünüşleri. Otofluoresans veren damar-içi eritrositler (oklar) dışında (A) BrdU için pozitif boyanma görülmemektedir. (Bar çubukları. 50 µm).

4. haftada MKH verdiğimiz çalışma grubunda 12. haftada alınan örneklerin kesitlerinde özellikle tamir sahasında daha yaygın olmak üzere verdiğimiz BrdU pozitif hücreler tespit edildi. Farklı tendon bölgelerinden elde edilen kesitlerin tümünde benzer BrdU pozitif hücrelerin izlenmesi, naklettiğimiz hücrelerin hasar bölgesinde yerleştiğini göstermektedir (Şekil 21).



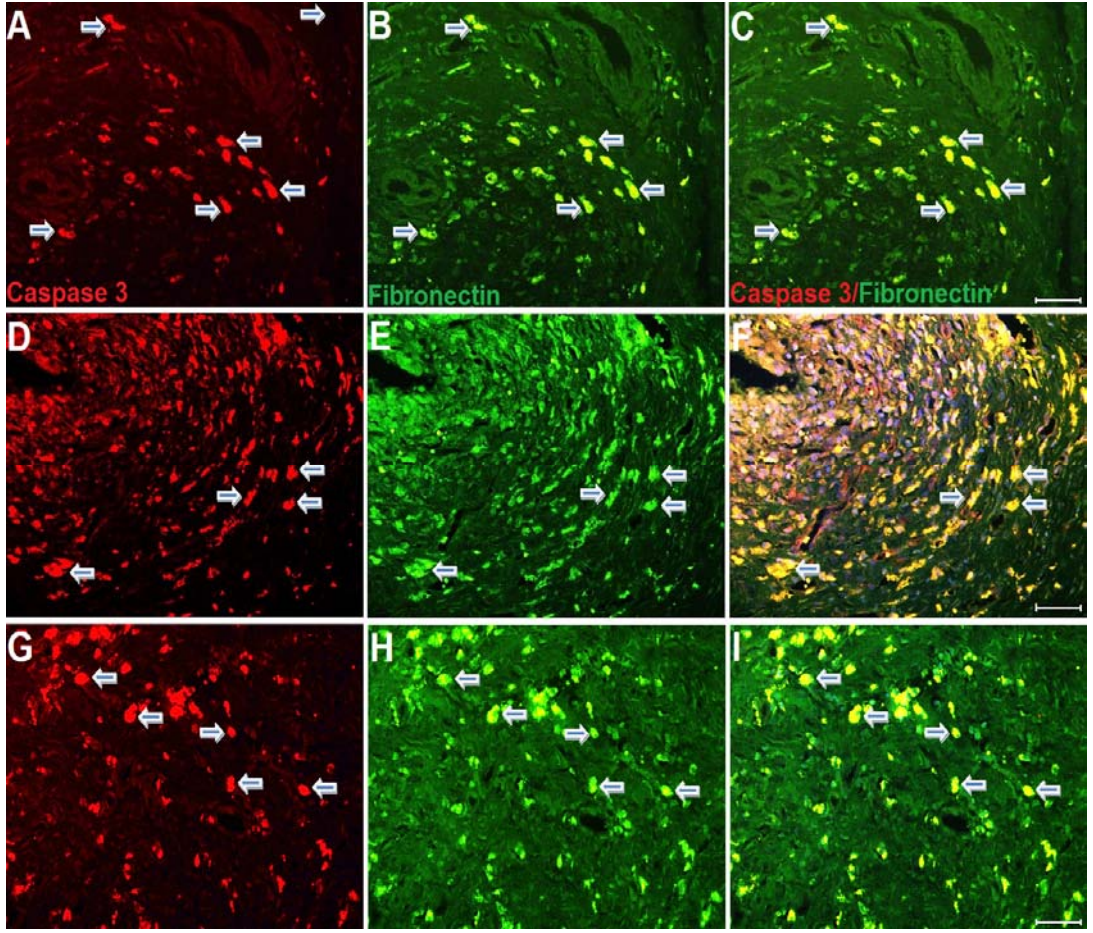
Şekil 21: Çalışma grubuna (MKH verilen grup) ait farklı hayvanlardan elde edilmiş kesitlerin immunofluoresans boyanması sonrasındaki mikroskopik görünümleri. BrdU işaretli kök hücrelerin çekirdekleri anti-BrdU boyanması sonrası Texas Red (TR) ile konjuge sekonder antikorlar ile kırmızı olarak izlenmekte (oklar). Desmin ile pozitif reaksiyon veren (yeşil) hücresel komponentler tenosit ya da fibroblastları temsil etmektedir.(Bar çubukları. 50 μ m).

BrdU için immunohistokimyasal boyama sonuçlarını değerlendirmek için normal tendon kesitleri de alındı (Şekil 22).

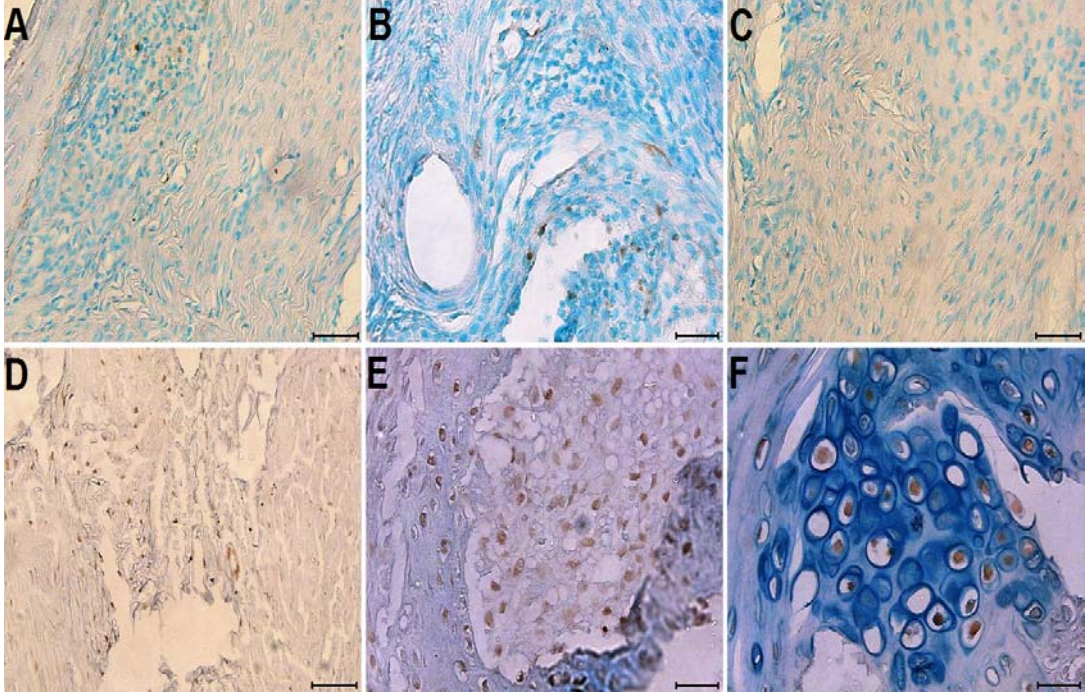


Şekil 22: Tendoların BrdU için immunohistokimyasal boyama sonuçları.Çalışma grubu tendoları (A,B,C), kontrol grubu tendonları (D,E,F) ve sağlam tendonlar (G,H,I). Kök hücre uygulanan grupta (A,B,C) BrdU pozitif hücreler (oklar) izlenirken diğer gruplarda görülmemektedir. (Bar çubukları: A-C,D,E,G-I; 50 µm, F:70 µm).

Yapılan TUNEL ve Caspase 3 immunoboyaması sonucu kontrol grubunda 12. haftada tendonlardan alınan her kesitte yaygın apoptozis varken, MKH verilmiş olan çalışma grubunda apoptoz belirgin olarak az izlendi (Şekil 23,24).



Şekil 23: Kontrol grubuna ait kesitlerin Caspase 3 (TR-kırmızı) ve fibronectin (FITC-yeşil) için immunoboyanma sonrası görünüşleri. Farklı hayvanlardan elde edilen görüntülerde, Caspase 3 için pozitif reaksiyon (nuklear) veren apoptatik hücreler bol miktarda izlenmekte (oklar). (Bar çubukları. 50 μ m)



Şekil 24: MKH uygulanmış çalışma grubu (A,B,C) ve uygulanmamış kontrol gruplarına (D,E,F) ait parafin kesitlerin TUNEL ile immunboyanması sonrasında elde edilen mikroskopik görüntüler. Çalışma grubunda çekirdekleri kahverengi olarak izlenen apoptatik hücrelerin kontrol grubuna oranla belirgin şekilde az olduğu görülmektedir. Özellikle kontrol grubundaki fibrokartilagenöz doku hücrelerindeki apoptoz (E ve F) belirgin şekilde dikkati çekmektedir. (Bar çubukları. 50 µm).

4.2.4. Biyomekanik Bulgular

Biyomekanik testler sonucu tendonun kopma gücü değerleri Newton olarak, kopma yeri ise tamir sahası, tamir sahasının distali ve proksimali olarak kaydedildi. Çalışma grubunda (n=7) hiçbir tendonun tamir sahasından kopmadığı, bir tanesi hariç diğerlerinin tamir sahası distalinden koptuğu görüldü. Bu gruptaki tendon kopma gücü ortalaması 38,3 N idi. Kontrol grubunda (n=7) ise iki tendonun tamir sahasından koptuğu, tendon kopma gücü ortalamasının da 23,7 N olduğu görüldü (Tablo 5)

Grup	Denek Numarası	Kopma Gücü (N)	Kopma yeri (tamir sahasına göre)
ÇALIŞMA GRUBU	1	36,3	Distal
	2	22,1	Distal
	3	25,3	Distal
	4	67,1	Proksimal
	5	39,7	Distal
	6	34,1	Distal
	7	43,4	Distal
KONTROL GRUBU	8	28,9	Proksimal
	9	27,2	Distal
	10	40,5	Distal
	11	16,9	Distal
	12	19,5	Tamir sahası
	13	17,5	Distal
	14	15,3	Tamir sahası

Tablo 5: Çalışma ve kontrol grubunda tendon kopma gücüne ve yerine göre dağılım

Çalışma ve kontrol grupları arasında tendon kopma gücü açısından anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). Çalışma grubundaki sıçanlarda tendon iyileşmesi anlamlı derecede ve makroskopik görünümü ile de uyumlu olarak daha iyi idi (Tablo 6). Tendon kopma yeri açısından bakıldığında ise gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p > 0,05$).

	Kopma Gücü (N)				Standart sapma
	Denek Sayısı	Minimum	Maksimum	Ortalama	
Çalışma grubu	7	22.1	67.1	38.28	14.777
Kontrol grubu	7	15.3	40.5	23.68	9.07

Tablo 6: Gruplar arası tendon kopma gücü farklılıkları

5. TARTIŞMA

Tendon yaralanmaları gerek spor gerekse travmatik nedenler sonucu olsun günlük hayatta sık karşılaşılan bir durumdur. Konservatif veya herhangi bir cerrahi teknik ile tedavi edilen bu yaralanmalar, iyileşmenin geç dönemlerinde rerüptürler ile tekrar karşımıza çıkabilmektedir. Tendon tamirleri üzerine yapılan çalışmalarda, -özellikle de aşıl tendon ile olanlarda- rerüptürler insanlarda en çok 4 – 12. haftalar arasında görülmektedir (59,60,61,62,63). Birçok tendon çalışması, tendon onarımından sonra kontrollü erken hareketin tendon yapışıklıklarını azalttığını, gerilme gücünün oluşumunu hızlandırdığını, fakat rerüptür insidansını da arttırdığını göstermektedir (64,65,66,67).

Tüm yara iyileşmelerinde -tendon da dahil olmak üzere- ortak bir iyileşme mekanizması vardır. Yaralanma bölgesinde öncelikle fibrin pıhtı oluşumu meydana gelmekte, bu pıhtı içerisinde kan hücreleri, fibronektin ve trombositler hapsedilip yıkıma uğramaktadırlar. Yıkılan hücrelerden salınan kemotaktik faktörler ve ortama gelen lokal büyüme faktörlerinin etkisi ile iyileşme süreci başlamaktadır (68).

Tendon iyileşmesi erken safhalarında inflamasyon, hücre göçü ve hücre olgunlaşmasını içerir. Matriks depolamak ve bu matriksi yeniden yapılandırmak için yara yerinde fibroblast sayısı hızla artar. İnflamasyon sırasında büyüme faktörleri ve sitokinler, fibroblastları olgunlaşmaya ve ekstrasellüler matriks salgılamaya uyarır. Yeni kollajen fiberleri oluşur ve hücre/matriks oranı yeniden sağlanır. Tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde ise hücre/matriks oranını sağlamak için hücre sayısı azalır. Bunun mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, Lui (2007) çalışmasında bunun nedeninin apoptozis olduğunu göstermiştir (17). Bu çalışmasında, tendon tamirinde önemli rol oynayan fibroblast benzeri hücrelerin sayısının 4. günde arttığı, ilerleyen günlerde ise azaldığı ve apoptozun 28. günde en yüksek değere ulaştığını bildirmiştir. Tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde artmış olan rerüptür insidansına bu dönemlerde hücre/matriks oranını sağlamak için artmış olan apoptozis neden olabilir.

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik olarak istenmeyen, hasar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin, uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın temelinde genetik kontrol mevcuttur. Hücrelerde nekroza yol açabilen birçok etken (ısı, radyasyon, travma, kemoteröpatik ilaçlar ve hipoksi gibi) aynı zamanda apoptoza da neden olmaktadır. Apoptozun geç dönemlerinde bu hücrelerden salgılanan antiinflamatuvar sitokinler (insülin benzeri büyüme faktörü β gibi) inflamatuvar reaksiyonu engellemektedir (69,70). Tendon fibroblast kültürlerinde, tekrarlayan gerilmelerin uygulandığı hayvan modellerinde ve kronik tendinopati biopsi materyallerinde apoptozis görüldüğü bilinmektedir (71,72).

Mae (2003) sıçan patellar tendon allogreftleri ile yaptığı çalışmada allogreftin 4. haftada en zayıf olduğunu (normal gücünün %20'si kadar) göstermiştir (73). Steiner (1982) sıçan aşil tendonları ile yaptığı biyomekanik çalışmasında 3. haftada tendon gücünün %50, 4. haftada ise %25 olduğunu göstermiştir. Üçüncü haftadaki bu değişikliğin erken fibrodisplaziden, dördüncü haftadaki zayıflamanın ise fibrodisplazinin yerini daha büyük fiberlerin alması ve fiberler arasında longitudinal düzenin kurulmaya çalışılmasından olduğu belirtilmiştir (16). Steiner, Mae, Lui'nin apoptozis ile ilgili çalışması ve geç dönem rerüptürlerin varlığını gösteren diğer çalışmalardan yola çıkarak, çalışmamızda MKH uygulaması, tendon tamiri sonrası tendonun en zayıf olduğu varsayılan 4. haftada yapıldı.

Allojenik hücreler, daha önce doku mühendisliği uygulamalarında başarı ile kullanılmıştır (74,75). İn vivo ve in vitro çalışmalar MKH'lerin hipoiimmüjenite ve normal T hücre yanıtını önlemeleri sayesinde immun yanıtı kaçırdığını göstermektedir (76,77). Çalışmamızda bu nedenlerle allojenik MKH kullanımını tercih ettik. Histopatolojik inceleme sonucu immun yanıt lehine herhangi bir bulgu saptanmadı.

Awad (2003) çalışmasında tavşan patellar tendon defektlerine farklı sayılarda MKH (1×10^6 , 4×10^6 , 8×10^6) vermiş; 12 ve 26. haftalarda bakılan sonuçlarda histolojik açıdan fark saptamamıştır. Tendon gücü açısından, MKH verilenlerin kontrol grubuna göre daha iyi olduğu ancak farklı sayılarda MKH verilen gruplar

arasında fark olmadığı görülmüştür. Verilen işaretlenmiş MKH'lerin özellikle tamir sahasına yerleştiği ve çevreye göç etmediği saptanmıştır. Verilen MKH sayısından bağımsız olarak cerrahiden 6 hafta sonra tamir sahasındaki işaretli MKH oranı % 20-28 olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonunda 26. haftada bile tamir sahasında yerleşik MKH'ler saptanmıştır (53). Çalışmamızda verilecek MKH sayısı tendon çalışmalarında en çok kullanılan miktar olan 1×10^6 olarak belirlendi.

Dressler (2005) çalışmasında 1 ve 4 yaşındaki tavşanlardan alınan MKH'leri yine tavşanlarda oluşturulan patellar tendon defektlerine kollajen içerisinde uygulamış; 12. haftada biyomekanik özellikleri açısından gruplar arasında fark olmadığını göstermiştir. Bu nedenle farklı donörlerden alınan MKH'ler allojenik MKH olarak uygulandığında donörün yaşının önemi yoktur (56).

Tendon tamiri ve defektleri için yapılan MKH ile ilgili çalışmalarda çeşitli hücre taşıyıcılar kullanılmıştır. Bazı çalışmalarda fibrinin iyileşme sırasında rezorbe olarak yok olduğu ve sonuçları etkilemediği için iyi bir hücre taşıyıcı olduğu belirtilmiştir (55). Tip I kollajen içinde verilen otolog MKH'lerde tendon tamiri çalışmalarında kullanılmış, ancak vakaların yaklaşık %30'unda ektojik kemik oluşumu gözlenmiştir (53). Juncosa-Melvin (2005) çalışmasında, hücre-kollajen oranının 20 kat kadar azaltılması (0.8'den 0.004M hücre/mg kollajen) ile kültür ortamında hücre canlılığının düzeldiği, tamir sahasında ektojik kemik oluşumunun ortadan kalktığı ve tedavi sonrası 12. haftada histolojik görünümün düzeldiğini göstermiştir (54). Hücre taşıyıcılar çalışmalarının sonuçlarını etkileyebildiği için çalışmamızda herhangi bir hücre taşıyıcı kullanılmadı ve MKH'leri steril MEM içinde sıçanlara uygulandı.

MKH ile yapılan çalışmalarda bu hücreleri işaretleme çalışma sonunda MKH kökenli farklılaşmış veya farklılaşmamış hücreleri saptamak için kullanılmaktadır. İşaretleme için çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Çalışmamızda MKH'ler BrdU (bromodeoksiüridin) ile işaretlendi. BrdU bir timidin analogudur ve çekirdek içinde hücre DNA'sına bağlanır. Hücre döngüsünün S fazındaki hücreler, verilen BrdU spesifik antikolar ile immunohistokimyasal yöntemle tespit edilebilir (78). BrdU ile

işaretleme [3H]- timidin işaretleme yöntemine göre daha az zaman gerektirmesi ve daha yüksek çözünürlükte görüntü vermesi yönünden daha avantajlıdır (79,80).

Chong (2007) çalışmasını tavşanların aşil tendonları üzerinde yapmış ve tamir hattı çevresindeki hücre sayısı, 3. haftada en yüksek iken bu sayının 12. haftada azaldığını göstermiştir. 3. haftada yapılan biyomekanik testlerde gruplar arasında anlamlı fark çıkarken, 6 ve 12. haftalarda yapılan aynı testlerde anlamlı bir fark ortaya konulamamıştır. Makroskopik olarak gruplar (MKH verilen ve verilmeyen grup) arasında fark görülmemiştir. 3. haftada tamir sahasında her iki grupta da hipertrofi ve translüsensi görülmüştür. Tamir sahasında kesit alanına bakıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanamamıştır (55). Çalışmamızda da 12. haftada makroskopik olarak her iki grupta tamir sahasında hipertrofi görülürken, kontrol grubunda daha belirgin translüsensi görüldü.

Birçok çalışmada MKH verilen gruplar ile kontrol grupları arasında biyomekanik özellikler açısından anlamlı sonuçlar alınmışken bu çalışmaların çoğunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı histolojik fark elde edilememiştir. Awad (2003) MKH ve tavşan patellar tendonları ile yaptığı çalışmasında hiçbir grubunda kontrol grubuna göre histolojik olarak fark görememiş (53); Chong ise tavşan aşil tendonları ile ilgili çalışmasında MKH verilen grupta sadece erken dönemde (3. hafta), histolojik kriterlerden, çekirdek şekli (nuclear aspect ratio) ve çekirdeğin oryantasyonunda (nuclear orientation angle) fark olduğunu göstermiştir. Geç dönemlerde ve diğer histolojik kriterlerde ise fark ortaya koyamamıştır (55). Young ise kollajen jel içinde MKH verdiği grupta kontrol grubuna göre daha büyük kesitsel alan ve daha iyi organize olmuş kollajen fiberlerin olduğunu belirtmiştir. İncelemenin özellikle erken dönemlerinde her grupta belirgin fibrozis ve sutür etrafında yaygın inflamatuvar hücreler saptanmıştır (81). Çalışmamızda MKH verilen grupta daha az fibrozis ve damarlanma olmasına karşın istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Özellikle sutür materyali çevresinde yaygın inflamatuvar hücre her iki grupta da mevcuttu. Tendon hücrelerinin belirgin sitoplazma içinde çekirdeklerinin büyüyüp yuvarlaklaşması kıkırdak metaplazi olarak yorumlanmakta olup, bunun oluş mekanizması tam olarak açıklanamamıştır

(82). Biz de gruplardan bağımsız olarak bazı kesitlerde kıkırdak metaplazisi gördük ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık.

Chong, tavşan aşil tendonları ile yaptığı MKH çalışmasında biyomekanik özellikler açısından sadece erken dönemde (3.hafta) anlamlı fark olduğunu geç dönemde (6. ve 12. hafta) ise gruplar arasındaki bu farkın ortadan kalktığını söylemiştir. Çalışmasında, MKH'lerin iyileşen tendonun ulaştığı son gücü arttırmadığı sadece iyileşme hızını arttırdığı sonucuna varmıştır (55). Awad, Young gibi diğer birçok araştırmacı, tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde (12 ve 26. hafta) bile MKH verilen gruplarda biyomekanik özellikler açısından daha iyi sonuçlar aldıklarını bildirmişler (53), Çalışmamızda ise, biyomekanik özellikler açısından, MKH verilen grubun, MKH verilmeyen gruptan tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde bile istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük gösterdiği görüldü.

İşaretlenmiş MKH'lerin oluşturulmuş tendon defektleri modelinde aynı anda verildiğinde, defekt sahasına yerleştiği ve burada canlı olarak kalabildiği gösterilmiştir (55). Ancak daha önceden oluşturulmuş bir tendon defektine geç dönemde MKH uygulaması ile ilgili çalışma yoktur. Çalışmamızda tendon tamiri sonrası iyileşmenin ikinci evresi olan fibroblast (tamir) evresinde BrdU ile işaretlenmiş MKH uygulandı. Transplante edilen MKH'lerin farklılaşmış ve farklılaşmamış hallerde iyileşme bölgesinde bulunduğu saptandı. İyileşmenin ilk evresinde (inflamasyon evresi) MKH'lerin iyileşme bölgesine göçünü sağlayan kemotaktik faktörler inflamatuvar hücrelerce salgılanır. Çalışmamızda geç dönemde verildiğinde dahi MKH'lerin bu bölgeye yerleşmesi, inflamatuvar hücrelerce kemotaktik faktörlerin salınımının iyileşmenin ilerleyen dönemlerinde de devam ettiğini gösterir.

Tendon tamiri sonrası geç dönemde MKH verdiğimiz çalışma grubunda 12. haftada çok az miktarda apoptozis gördük. Ancak MKH verilmeyen kontrol grubunda yaygın apoptozis mevcuttu. İyileşmenin geç dönemi olmasına karşın verilen MKH'lerin tamir sahasına daha belirgin olarak yerleşmesinin bir nedeni de bu bölgedeki artmış apoptatik aktivite olabilir. MKH'ler muhtemel olarak, eksprese ettikleri anti-apoptatik genler sayesinde apoptozu azaltır ve tendon gücünde artmaya

neden olur. MKH'lerin etki yolu için farklı düşünceler vardır. Bunlardan biri MKH'lerin farklılaşarak tenosit haline dönüşmesi, iyileşme sahasında ve remodeling aşamasında görev alması; bir diğeri ise MKH'lerin terminal farklılaşmadan ziyade "büyüme faktörü pompası (growth factor pumps)" olarak rol oynamasıdır (83). Bizse, hasar bölgesine nakledilen MKH'lerin, parakrin etki mekanizmasıyla anti-apoptatik işlevi olduğunu öngörmekteyiz.

Hayvan çalışmalarının avantajları yanında dezavantajları da vardır. İlk olarak, bu çalışmalarda, genel olarak gruptaki denek sayıları 10'un altındadır ve yapılan histolojik değerlendirme derecelendirme (kategorik veri) esasına dayandığı için sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlılık elde etmek zordur. İstatistiksel olarak anlamlılık elde etmek için gruptaki denek sayılarını daha yüksek tutmak gerekmekte, ancak bu konuda da karşımıza etik sorunlar çıkmaktadır. İkinci olarak tendon tamiri ve aşırı kullanımı ile ilgili yapılan hayvan çalışmaları genelde sıçan, tavşan ve tavukla yapılmaktadır. Sıçanlar kolay üretilibilmeleri, bakım kolaylığı, filogenetik skalada diğer türlere göre daha alt sıralarda olması, düşük enfeksiyon riski ve kök hücre çalışmalarında daha çok verileri olduğu için tarafımızdan tercih edildi. Ancak tendon tamiri sonrası, zaten kısa olan aşil tendonlarının daha da kısalması biyomekanik çalışma yapılması açısından sıçanların dezavantajıdır.

Tendon iyileşmesi ile ilgili olan çalışmaların bazılarında tendonda sadece defekt oluşturulmuş, bazılarında ise tendon transvers olarak kesilip uygun teknik ve sutür ile tamir edilmiştir. Çalışmamızın başında aşil tendonuna açık olarak total tenotomi uyguladık ve 3/0 Ethibond sutür kullanılarak Modifiye Kessler yöntemi ile uç uca primer tamir ettik. Bu yöntem 4. haftada perkutan olarak MKH enjeksiyonu yapacağımız zaman, tendon tamiri yapılan bölgedeki sutür renginin cilt altında görülmesi nedeni ile bize kolaylık sağladı. Ancak histolojik sonuçlara bakıldığında bu sutür materyali çevresinde yangı hücreleri ve fibrozis daha yoğun olarak görüldü. Bu nedenle histolojik inceleme için tendonda defekt oluşturan modeller daha uygundur.

MKH'ler deneysel veya klinik olsun yapılan birçok uygulamada iyi sonuçlar vermekte ve gelecekte birçok hastalığın çözümü olacağı düşünülmektedir. Ancak

MKH'lerin bu uygulamalarda iyi sonuçlar verdiği bilinmesine rağmen etki mekanizması halen kesin olarak anlaşılamamıştır. Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular ışığında, geç dönem rerüptür insidansını azaltmak açısından MKH uygulamasının, bu hücrelerin muhtemel anti-apoptatik etkileri sayesinde, tendonun kopma gücü eşığini arttırdığını düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

- Tendon tamiri sonrası geç dönem de bile MKH uygulaması sonrası MKH'ler tamir sahasına yerleşerek tendon yapısına katıldı.
- Tendon tamiri sonrası, iyileşmenin geç dönemlerinde tamir sahasına MKH uygulaması tendonun rerüptürü için kopma gücü eşliğini arttırdı.
- MKH uygulaması anti-apotatik etkisi sayesinde geç dönem tendon iyileşmesi sırasında artmış olan apoptozisi azalttı.
- Allojenik MKH kullanımı herhangi bir immun yanıtı yol açmadı.
- MKH uygulaması tendon tamiri yapılan alanda makroskopik olarak daha iyi bir görünüm sağladı.
- MKH uygulamasının histolojik kriterler açısından tendon iyileşmesi üzerine etkisi olmadı.
- Sıçan tendon iyileşmesinin 12. haftada halen tamamlanmamış olduğu görüldü.
- Özellikle histolojik veriler gibi kategorik verilerin istatistiksel değerlendirilmesi için çalışmadaki denek sayısını yüksek tutmak gerekir.
- Tendon iyileşmesi ile ilgili çalışma modellerinde defekt oluşturan modeller, sutür ile tamir edilenlere göre histolojik açıdan daha net sonuçlar verebilir.
- Tendon ile ilgili hayvan çalışmalarında sıçanlar kolay bakım şartları, düşük enfeksiyon riskleri, hızlı iyileşme kapasiteleri sayesinde tercih edilebilir. Tendon çalışmasında, eğer sıçan ile çalışılıyorsa büyük boy sıçan veya tavşan, tavuk gibi daha büyük boyuttaki hayvanlar tercih edilmelidir.

7. ÖZET

Çalışma Biçimi: Deneysel çalışma

Amaç: Tendon tamirleri sonrası oluşabilecek en önemli komplikasyonlardan biri rerüptürlerdir. Bu çalışmada tendon tamiri sonrasında, iyileşmenin geç döneminde (4.hafta) mezenkimal kök hücre uygulamasının tendon rerüptürleri üzerine etkisi araştırıldı

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızdaki 40 adet Wistar-Albino sıçanın 6'sının femur ve tibiaları MKH elde etmek için kullanıldı. Kalan 34 sıçanda açık olarak aşıl tendon kesilip tamir edildi. 4. haftada çalışma grubuna (n=17) perkutan MKH uygulaması yapıldı ve kontrol grubuna (n=17) sadece medyum verildi. Sıçanlardan, 12. haftada eter anestezisi altında servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek alınan örnekler, histolojik, immunohistokimyasal ve biyomekanik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Histolojik olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda ise verilen MKH'lerin daha yoğun olarak tamir sahasına yerleştiği ve kontrol grubunda belirgin olarak artmış apoptozisin çalışma grubunda çok düşük olduğu görüldü. Tendon gücü açısından ise 12. haftada, MKH verilen çalışma grubunun, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı daha üstün olduğu bulundu ($p<0,05$).

Çıkarımlar: Geç dönem rerüptürleri azaltmak açısından MKH uygulamasının, bu hücrelerin muhtemel anti-apoptatik etkileri sayesinde, tendonun kopma gücü eşiğini arttırdığı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kök hücre, tendon rerüptürü, apoptozis

8. ABSTRACT

Study Design: Experimental study

Objectives: Rerupture is one of the most common complications seen after tendon repair. In this study; the effect of MSC application on tendon rerupture at late stage of healing (fourth week), after tendon repair, was studied.

Methods: Femurs and tibias of 6 rats, out of 40 Wistar-Albino rats in the study, were used to get MSCs. Achilles tendons of the remaining 34 rats were cut and repaired with open surgical procedures. At the fourth week, percutaneous MSCs were applied to the study group (n=17) and only, medium was applied to the control group (n=17). The materials, which were taken from rats that were sacrificed by cervical dislocation method under ether anesthesia at the twelfth week of study, were analyzed by histological, immunohistochemical and biomechanical methods.

Results: Histologically there was no significant difference between groups ($p>0,05$). In immunohistochemical studies it was seen that MSCs were found more intensively at the repair zone and apoptosis, which was clearly increased in the control group, was minimally present in the study group. At the twelfth week, the increase in tendon strength in the study group was significantly higher than the control group.

Conclusion: Application of MSCs for decreasing reruptures increases the tendon strength, probably due to their anti-apoptotic effects.

Keyword: Stem cells, tendon rerupture, apoptosis

9. KAYNAKLAR

- 1- Skinner H.B. *Current Diagnosis & Treatment in Orthopaedics third edition*. Ankara: Güneş Kitabevi. 2005.
- 2- Miller M.D. *Review of Orthopaedics fourth edition Türkçe Çeviri*. Ankara: Akademi Doktorlar Yayınevi. 2006.
- 3- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology, seventh edition*, Appleton & Lange Türkçe çeviri, Barış Kitabevi; 1992
- 4- Ege R. *El Cerrahisi* ISBN 975-7508-01-2. Ankara: Türk Hava Kurumu Basımevi 1991; 109-116.
- 5- Sharma P, Maffulli N.: Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg* 2005; **87-A**: 187-202.
- 6- Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res* 2002; **4**: 252-260.
- 7- Cook JL, Khan KM, Purdam WC. Achilles tendinopathy. *Man Ther* 2002; **7**: 121–130.
- 8- Green PD, Hotchkiss NR, Pederson WC. *Operative Hand Surgery*. Churchill Livingstone 1999; 1851-1949.
- 9- Rothman RH, Slogoff S. The effect of immobilization on the vascular bed of tendon. *Surg Gynec & Obst* 1967; 1064-1066.
- 10- Mason ML, Allen HS. The Rate of Healing of Tendons. *Annals of Surgery* 1941 Mar; **113(3)**:424-59.

- 11- Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Oct;**(367 Suppl)**:312-23.
- 12- Komi PV, Fukashiro S, Jarvinen M. Biomechanical loading of Achilles tendon during normal locomotion. *Clin Sports Med.* 1992 Jul;**11(3)**:521-31.
- 13- Fyfe I, Stanish WD. The use of eccentric training and stretching in the treatment and prevention of tendon injuries. *Clin Sports Med.* 1992 Jul;**11(3)**:601-24.
- 14- Jarvinen TA, Jarvinen TL, Kannus P, Jozsa L, Jarvinen M. Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *J Orthop Res.* 2004 Nov;**22(6)**:1303-9.
- 15- Maffulli N, Ewen SW, Waterston SW, Reaper J, Barrass V. Tenocytes from ruptured and tendinopathic achilles tendons produce greater quantities of type III collagen than tenocytes from normal achilles tendons. An in vitro model of human tendon healing. *Am J Sports Med.* 2000 Jul-Aug;**28(4)**:499-505.
- 16- Steiner M. Biomechanics of tendon healing. *J Biomech.* 1982;**15(12)**:951-8.
- 17- Lui PP, Cheuk YC, Hung LK, Fu SC, Chan KM. Increased apoptosis at the late stage of tendon healings. *Wound Repair Regen.* 2007 Sep-Oct;**15(5)**:702-7.
- 18- Şahin F, Saydam G, Omay S.B. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi.* 2005;**1(15)**: 48-56.
- 19- Kömürcü M, Özkan H. Mezenkimal kök hücre ve ortopedide kullanımı. *TOTBİD dergisi.* 2006; **5**:130-9.
- 20- Özmen S, Fındıkçioğlu F, Siemionow M. Kök hücreler. *Türk Plast Rekonstr Est Cer Derg.* 2006; **14(3)**:187-96

- 21- Karaöz E, Ovalı E. *Kök Hücreler*, Trabzon: Derya Kitabevi, 2004.
- 22- Şenel F. Kök hücreler. *Bilim Teknik*. 2002; **Şubat**: 2-6.
- 23- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*, 1997; **64(2)**:278-94.
- 24- Devine SM. Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? *J Cell Biochem Suppl*, 2002; **38**:73-9.
- 25- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; **284(5411)**:143-7.
- 26- Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, Chuah MK. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2002; **2(2)**:195-209.
- 27- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; **9(5)**:641-50.
- 28- Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res*. 2004; **95(7)**:671-6.
- 29- Fickert S, Fiedler J, Brenner RE. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. *Arthritis Res Ther*. 2004; **6(5)**:R422-32.
- 30- Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 2003; **412**:196-212.
- 31- Virchow R. *Cellular pathology*. London: John Churchill, 1863.

- 32- Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; **98**:2396-402.
- 33- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000; **109**(1):235-42.
- 34- Metheny-Barlow LJ, Tian S, Hayes AJ, Li LY. Direct chemotactic action of angiopoietin- 1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. *Microvasc Res*. 2004; **68**(3):221-30.
- 35- Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif*. 2004; **37**(1):97-110.
- 36- Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J*. 2004; **18**(9):980-2.
- 37- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol*. 1998; **176**(1):57-66.
- 38- Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991; **78**(1):55-62.
- 39- Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM. Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1992; **80**(2):388-95.
- 40- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005; **105**(7):2821-27.

- 41- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003; **102(10)**:3837-44.
- 42- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004; **103(12)**:4619-21.
- 43- Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005; **105(10)**:4120-6.
- 44- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002; **30(1)**:42-8.
- 45- Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; **363(9419)**:1439-41.
- 46- Attar E. Kök hücreler ve kordon kanı toplanmasında güncel durum. *TJD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi*. 2004; **6**: 58-64.
- 47- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; **16(3)**:381-90.
- 48- Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999; **5(3)**:309-13.

- 49- Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury*. 2005; **36(1)**:203-6.
- 50- Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A. Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J Med Sci*. 2001; **55(6)**:326-36.
- 51- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998; **80(7)**:985-96.
- 52- Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in criticalsize defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. 2000; **49(3)**:328-37
- 53- Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res*. 2003; **21**:420-31.
- 54- Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Sklenka AM, Butler DL. Effects of cell-to-collagen ratio in mesenchymal stem cell-seeded implants on tendon repair biomechanics and histology. *Tissue Eng*. 2005; **11**:448-457.
- 55- Chong AK, Ang AD, Goh JC, Hui JH, Lim AY, Lee EH, Lim BH. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am*. 2007 Jan; **89(1)**:74-81.
- 56- Dressler MR, Butler DL, Boivin GP. Effects of age on the repair ability of mesenchymal stem cells in rabbit tendon. *J Orthop Res*. 2005 Mar; **23(2)**:287-93.

- 57- Saygı B, Yıldırım Y, Çabukoğlu C, Kara H, Ramadan SS, Esemeli T. The effect of dehydration and irrigation on the healing of Achilles tendon: an experimental study *Ulusal Travma ve Acil Cerrahi Dergisi*. 2008 Apr;**14(2)**:103-9.
- 58- Bring DK, Kreichbergs A, Renstrom PA, Ackermann PW. Physical Activity Modulates Nerve Plasticity and Stimulates Repair after Achilles Tendon Rupture. *J Orthop Res*. 2007 Feb;**25(2)**:164-72.
- 59- Aoki M, Ogiwara N, Ohta T, Nabeta Y. Early active motion and weightbearing after cross-stitch achilles tendon repair. *Am J Sports Med*. 1998 Nov-Dec;**26(6)**:794-800.
- 60- Cretnik A, Kosanovic M, Smrkolj V. Percutaneous Suturing of the Ruptured Achilles Tendon Under Local Anesthesia. *J Foot Ankle Surg*. 2004; **43(2)**: 72-81.
- 61- Gelbermann R.H, Nunley J.A, Ostermann A.L, Breenm T.S, Woo S.Y. Influences of the Protected Passive Mobilization Interval on Flexor Tendon Healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1991; **264**: 189-96.
- 62- Cetti R, Henriksen L.O, Jacobsen K.S. A New Treatment of Ruptured Achilles Tendons. *Clin Orthop Relat Res*. 1994; **308**: 155-65.
- 63- Möller M, Movin T, Granhed H, Lind K, Faxen E, Karlsson J. Acute rupture of tendo achillis *J Bone Joint Surg Br*. 2001; **83-B**:843-8
- 64- Boyer M.I, Strickland J.W, Engles D, Sachar K, Leversedge F.J. Flexor tendon repair and rehabilitation: state of the art in 2002. *Instr Course Lect*. 2003; **52**:137-61.
- 65- Boyer MI. Flexor tendon biology. *Hand Clin*. 2005; **21**:159-66.

- 66- Aoki M, Kubota H, Pruitt D.L, Manske P.R. Biomechanical and histologic characteristics of canine flexor tendon repair using early postoperative mobilization. *J Hand Surg [Am]*. 1997; **22**:107-14.
- 67- Gelbertman R, Vadge Berg J.S, Lundborg G.N, Akeson W.H. Flexor tendon healing and restoration of the gliding surface. *J Bone Joint Surg*. 1983; **65**:70–80.
- 68- Esen E, Cila E, Özoğul C. Taşçı A.G, Sipahioğlu S, Gemalmaz H.C, Öztürk A.M, Doğramacı Y. The effect of low-molecular-weight heparin on rat tendon healing. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2009;**43(1)**:54-61.
- 69- Kaufmann S.H, Hengartner M.O. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol*. 2001; **11**:526–34.
- 70- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; **407**: 770–6.
- 71- Barkhausen T, van Griensven M, Zeichen J, Bosch U. Modulation of cell functions of human tendon fibroblasts by different repetitive cyclic mechanical stress patterns. *Exp Toxicol Pathol* 2003; **55**: 153–8.
- 72- Yuan J, Murrell G.A, Wei A.Q, Wang M.X. Apoptosis in rotator cuff tendinopathy. *J Orthop Res* 2002; **20**: 1372–9.
- 73- Mae T, Shino K, Maeda A, Toritsuka Y, Horibe S, Ochi T. Effect of Gamma Irradiation on Remodeling Process of Tendon Allograft. *Clin Orthop Relat Res*. 2003; **414**: 305-14.
- 74- Ouyang H.W, Goh J.C, Mo X.M, Teoh S.H, Lee E.H. The efficacy of bone marrow stromal cell-seeded knitted PLGA fiber scaffold for Achilles tendon repair. *Ann N Y Acad Sci*. 2002; **961**:126-9.

- 75- Ouyang H.W, Goh J.C, Thambyah A, Teoh S.H, Lee E.H. Knitted polylactide-coglycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. *Tissue Eng.* 2003; **9**:431-9.
- 76- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003; **101**:3722-9.
- 77- Tse W.T, Pendleton J.D, Beyer W.M, Egalka M.C, Guinan E.C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003; **75**:389-97.
- 78- Gratzner H.G. Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science.* 1982; **218**:474-5.
- 79- Raza A, Ucar K, Bhayana R, Kempski M, and Preisler H.L. Utility and sensitivity of anti-BrdU antibodies in assessing S-phase cells compared to autoradiography. *Cell Biochem funct* 1985; **3(2)**:149-53.
- 80- Hume W. J. A reproducible technique combining tritiated thymidine autoradiography with immunodetection of bromodeoxyuridine for double labeling studies of cell proliferation in paraffin sections of tissues. *Cell Tissue Kinet* 1990; **23(3)**:161-8.
- 81- Young R.G, Butler L.B, Weber W, Caplan A.I, Gordon S.L, Fink D.J. Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon Repair. *J Orthop Res.* 1998; **16**: 406-13.
- 82- Hapa O, Çakıcı H, Gideroğlu K, Özturan K, Kükner A, Buğdaycı G. The effect of ethanol intake on tendon healing: a histological and biomechanical study in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009; **Apr 21** (Basım aşamasında).

83-Caplan A.I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005; **11**:1198-211.