

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKAL İNTERVERTEBRAL DİSK DEJENERASYONU OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA, MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN DİSK REJENERASYONU
ÜZERİNDE ETKİSİ VE BUNUN HİSTOPATOLOJİK OLARAK
İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Eyüp GENÇ**

SAMSUN 2012

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**SERVİKAL İNTERVERTEBRAL DİSK DEJENERASYONU OLUŞTURULMUŞ
RATLARDA, MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN DİSK REJENERASYONU
ÜZERİNDE ETKİSİ VE BUNUN HİSTOPATOLOJİK OLARAK
İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
DR. Eyüp GENÇ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Kerameddin AYDIN**

SAMSUN 2012

TEŞEKKÜR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakóltesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı'nda bulunduğum 2006-2012 yılları arasında uzmanlık eğitimime mesleki bilgi ve deneyimleriyle katkıları olan değerli hocalarıma;

Eğitim sürecinde birlikte çalıőtıđım tüm hemŐire ve personel arkadaşlara;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte hep yanımda ve yardımcı olan Dr. Ercan YARAR, Dr. Adnan ALTUN ve diğer asistan arkadaşlarıma;

PYO.TIP.1904.11.037 no'lu proje baŐvurumu onaylayarak projeme destekte bulunan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisine;

Ve hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda ve destek olan aileme sonsuz teŐekkürler ediyorum...

Dr. Eyüp GENÇ

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
TEŞEKKÜR	I
KISALTMALAR	IV
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Servikal disk	2
2.1.1. Servikal vertebra eklemlerinin anatomisi	2
2.1.1.1. İntervertebral diskler	3
2.1.1.1.1. Anulus fibrosus	3
2.1.1.1.2. Nükleus pulpozus	3
2.1.1.2. Bağları	4
2.1.1.3. Faset eklemleri	4
2.1.2. Histolojisi	6
2.1.2.1. Anulus fibrosus	6
2.1.2.2. Nükleus pulpozus	6
2.1.2.3. Fibröz kıkırdak	6
2.1.3. Embriyolojisi	7
2.1.4. Patolojisi	9
2.2. Mezenkimal kök hücre	11
2.2.1. Tanımlama	11
2.2.2. Kaynakları	11
2.2.3. İmmünofenotipik özellikler	12
2.2.4. Sekretuar özellikler ve immünmodülatuar etki	13
2.2.5. Farklılaşma potansiyeli	13
2.2.6. Hasarlı doku tamirine katkı	13
2.2.7. Klinikte kullanım açısından avantajları	14
2.2.8. Klinikte kullanım açısından dezavantajları veya kullanımında zorluklar	15
2.3. Deney hayvanı	16
2.3.1. Cerrahi araştırmalarda hayvan kullanımı	16
2.3.2. Deney hayvanı olarak sıçan kullanımı	16
2.3.3. Deney hayvanı sıçanlarda anatomi	17
3. GEREÇ YÖNTEM	19
3.1. Mezenkimal kök hücre	19
3.1.1. Mezenkimal kök hücre elde edilmesi	19
3.1.2. Akım sitometri ile mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması	20

3.2.	Deney hayvanlarının hazırlanması	21
3.3.	Deneyin uygulanması	21
3.3.1.	Cerrahi işlem öncesi hazırlık	21
3.3.2.	Cerrahi işlem	22
3.3.3.	Cerrahi işlem sonrası bakım ve gözlem	25
3.3.4.	Deneyin sonlandırılması	25
3.4.	Histopatolojik işlemler	26
4.	BULGULAR	29
5.	TARTIŞMA	31
6.	SONUÇ	35
7.	KAYNAKLAR	36

KISALTMALAR

i.m.	: İntramüsküler
i.p.	: İnteraperitoneal
Lig.	: Ligament
Ant.	: Anterior
Long.	: Longitudinal
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
a.	: Arteria
n.	: Nervus
m.	: Muskulus
DMEM-LG	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium-Low Glucose
FBS	: Fetal Bovine Serum
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
SDF-1	: Stromal Derived Factor-1
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 1 : Deney sonrasında ratlardan alınan spesmenlerin histopatolojik değerlendirme tablosu	27
Tablo 2 : Anterior longitudinal ligament de rejenerasyonun değerlendirmesi	29
Tablo 3 : Kartilaj son plakda rejenerasyonun değerlendirilmesi	29
Tablo 4 : Anulus fibrozus da rejenerasyonun değerlendirilmesi	30
Tablo 5 : Nükleus pulpozus da rejenerasyonun değerlendirilmesi	30

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1 : Servikal vertebra eklemleri	2
Şekil 2 : İntervertebral disk anatomisi	3
Şekil 3 : İntervertebral disk innervasyonu	5
Şekil 4 : Somit'in gelişimi	7
Şekil 5 : Gelişimin değişik evrelerinde vertebral kolonun şematik çizimi	8
Şekil 6 : Ratlarda boyun yüzeysel ve derin kasları	16
Şekil 7 : a. Yüzeysel yağlı dokular kaldırıldıktan sonraki görünüm b. Trakea önündeki yapılar uzaklaştırıldıktan sonraki görünüm c. Trakea ve özofagus uzaklaştırıldıktan sonraki görünüm	17
Şekil 8 : İlk üç omur kemiği	17
Şekil 9 : Cerrahi alan temizliği ve cerrahi alan antisepsisi	20
Şekil 10 : Cilt insizyonu ve cilt-cilt altı dokunun ekartasyonu	21
Şekil 11 : Yüzeysel yağlı dokunun uzaklaştırılması ve yüzeysel kas yapıları	21
Şekil 12 : Adele diseksiyonu sonrası derin kas yapıları	22
Şekil 13 : a. Servikal anterior intervertebral disk mesafesi b. Diskektomi uygulanması	22
Şekil 14 : Diskektomi yapılan sahaya spongostan konulması	23
Şekil 15 : 2/0 ipek suture ile cilt sutureasyonu	23
Şekil 16 : Dekalsifikasyon sonrasında longitudinal kesi ile elde edilen spesmen	25

Şekil 17	: Normal intervertebral diskin histolojik incelenmesi, x40 hematoksilen eozin	25
Şekil 18	: Normal intervertebral diskin histopatolojik incelenmesi, x40 hematoksilen eozin	28
Şekil 19	: Deney grubunda intervertebral diskin incelenmesi x40 hematoksilen eozin	28
Şekil 20	: Son plakda kartilajinöz ossifikasyon, anterior longitudinal ligaman düzensiz bağ doku olarak izlenmekte, x100 hematoksilen eozin	28
Şekil 21	: Son plakta osseöz ossifikasyon, nükleus pulpozusda kondrosit benzeri hücrelerde artma, anulus fibrozusda fibrotik değişiklikler ve anterior longitudinal ligamentde düzensiz bağ dokusu yapısı izlenmekte, x40 hematoksilen eozin	28
Şekil 22	: Son plakda hyalen kırkırdak yapısı korunmuş, nükleus pulpozusda kondrosit benzeri hücrelerde artma, anulus fibrozuda düzenli lameller yapının korunduğu izlenmekte, x40 hematoksilen eozin	28

ÖZET

SERVİKAL İNTERVERTEBRAL DİSK DEJENERASYONU OLUŞTURULMUŞ RATLARDA, MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN DİSK REJENERASYONU ÜZERİNDE ETKİSİ VE BUNUN HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

**Dr. Eyüp GENÇ, Beyin ve Sinir Cerrahisi Uzmanlık Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 2012**

Servikal dejeneratif disk hastalıkları günümüzde sık karşılaştığımız bir klinik tablo olup cerrahi tedavisinde enstrümanlı ya da enstrümansız füzyon teknikleri kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda dejenere olmaya başlamış disk tespit edildiğinde kök hücre uygulanmasıyla birlikte disk dejenerasyonun ne derecede önlenebileceği veya ne kadar geri döndürülebilir olduğunu, servikal disk dejenerasyon modelini kullanarak göstermeyi amaçladık.

Çalışmamızda 24 adet, dişi, Sprague Dawley ırkı rat iki eşit gruba ayrıldı. Birinci Grupta mikrocerrahi teknik ile servikal anterior intervertebral diskektomi uygulanarak disk dejenerasyonu oluşturuldu. İkinci Grupta ise servikal anterior intervertebral diskektomi ile disk dejenerasyonu oluşturulmasını takiben, disk mesafesine mezenkimal kök hücre uygulandı. Cerrahi işlemi izleyen sekizinci haftanın sonunda dekapitasyon ile ratların yaşamları sonlandırıldı. Servikal intervertebral disk mesafesi, komşu vertebra korpuslarıyla birlikte çıkarılarak histopatolojik olarak incelendi. Servikal intervertebral disk rejenerasyonu değerlendirmesinde elde edilen bulgular ki kare testi değerlendirilerek, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı araştırıldı.

Servikal intervertebral disk dejenerasyonu sonrasında kök hücre uygulanan ve uygulanmayan gruplar arasında disk rejenerasyonu değerlendirildi. Anulus fibrozus ve kartilaj son plak rejenerasyonunun; kök hücre uygulanan grupta, kök hücre uygulanmayan gruba göre istatistiksel ($p < 0,05$) olarak daha anlamlı olduğu gözlemlendi. Nükleus pulpozus ve anterior longitudinal ligament rejenerasyonunun değerlendirmesinde ise kök hücre uygulanan grup ile kök hücre uygulanmayan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p > 0,05$).

Servikal intervertebral disk dejenerasyonu oluşturulmuş ratlarda mezenkimal kök hücre uygulamasının, servikal intervertebral disk rejenerasyonuna olumlu etkide bulunduğu gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Mezenkimal kök hücre, servikal intervertebral disk, disk rejenerasyonu, disk dejenerasyonu.

ABSTRACT

Efficiency of mesenchymal stem cell on disc regeneration at rats with experimental servical intervertebral disc degeneration and histopathological evaluation of mesenchymal stem cell.

**Dr. Eyüp GENÇ, Thesis in Neurosurgery
Ondokuz Mayıs University, Samsun, 2012**

Cervical degenerative disc disease is a frequently observed clinical problem. For cervical degenerative disc diseases fusion with or without instrumentation techniques can be used. In our study our aim was to observe if servical degeneration can be reversible or can be prevented after stem cell application.

We used 24 female, Spraque Dawley rats. We seperated them to two equal groups. In First Group , we applied cervical anterior intervertebral discectomy by microsurgical techniques and we formed disc degeneration. In Second Group, we used cervical anterior intervertebral discectomy technique again and formed disc degeneration and then we applied mesenchymal stem cell to degenerated disc space. After eight weeks from surgical procedure, we decapitated all rats and rats' cervical intevertebral disc space and adjacent vertebral bodies excised for histopathological researches. Chi square test method was used for evaluating findings for cervical disc regeneration ratio.

We evaluated cervical disc regeneration quantities between groups; group with mesenchymal stem cell therapy and without mesenchymal stem cell therapy. Annulus fibrosis and cartilage end plate regeneration were compared between two groups. P value was $<0,05$ and regeneration was significantly higher in mesenchymal stem cell group. But there was not a significant difference between two groups for nucleus pulposus and anterior longitudinal ligament regeneration ($p>0,05$).

In conclusion; we observed that mesenchymal stem cell usage on rats with experimental cervical intervertebral disc degeneration has an increasing effect on cervical intervertebral disc regeneration.

Key words: Mesenchymal stem cell, cervical intervertebral disc, disc regeneration, disc degeneration.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Omurga; üzerine etki eden kuvvetlere karşı koymanın yanında, hareket fonksiyonunu da yürütmek zorundadır. Bu yüzden katı olmak ve hareketli olmak gibi çatışan iki özelliğe sahip olmalıdır. Bu ikili özellik omurganın bölümlü yapısı ve vertebralar arasındaki diskler tarafından sağlanır.

Diskler dikey yönde, yana eğilme ve dönme sırasında uygulanan kuvvetleri emerler. Zamanla diskler az ya da çok yıpranarak yük emme yetenekleri ve dayanıklılıkları azalır (1).

Disk dejenerasyonu sonrasında ortaya çıkan disk hernileri eski zamanlardan beri günlük yaşamı etkileyen ağrılı bir hastalık olarak medikal ve cerrahi birçok yöntemle tedavi edilmeye çalışılmıştır.

Son birkaç yılda intervertebral disk rejenerasyonunda kök hücre kullanımıyla ilgili önemli yol katedilmiştir. Otojenik mezenkimal kök hücreler hayvan modellerinde intervertebral disk dejenerasyonunu durdurabilir ya da kısmen rejenerasyonunu sağlayabilir. Bu rejenerasyon oranı dejenerasyonun derecesi ile ilişkilidir. Bu konudaki olumlu bulgular daha ileri ve kapsamlı çalışmalar yapılabilmesi için cesaret vermektedir. Mezenkimal kök hücrelerin kullanımının önemli bir avantajı da, immüsupresyona gerek kalmadan rahatlıkla kullanılabilmesidir (2). Çünkü mezenkimal kök hücreler allo-antijen olarak tanımlanmazlar ve mezenkimal kök hücreleri hedef dokularda hasarlanmış bölgeye giderek o dokunun destek stromasına dönüşür (3).

Rejeneratif tıpta mezenkimal kök hücre uygulamaları potansiyel terapötik opsiyon olarak karşımıza çıkmaktadır. Burada amaç diskte tam rejenerasyonu sağlamak değil, belli oranda iyileşme sağlamaktır.

Bu çalışmada, disk dejenerasyonu oluşturulmuş ratlarda mezenkimal kök hücre uygulamasını takiben disk rejenerasyonu histopatolojik olarak incelenerek mezenkimal kök hücre uygulanmayan ratlarda elde edilen histopatolojik bulgularla karşılaştırıldı.

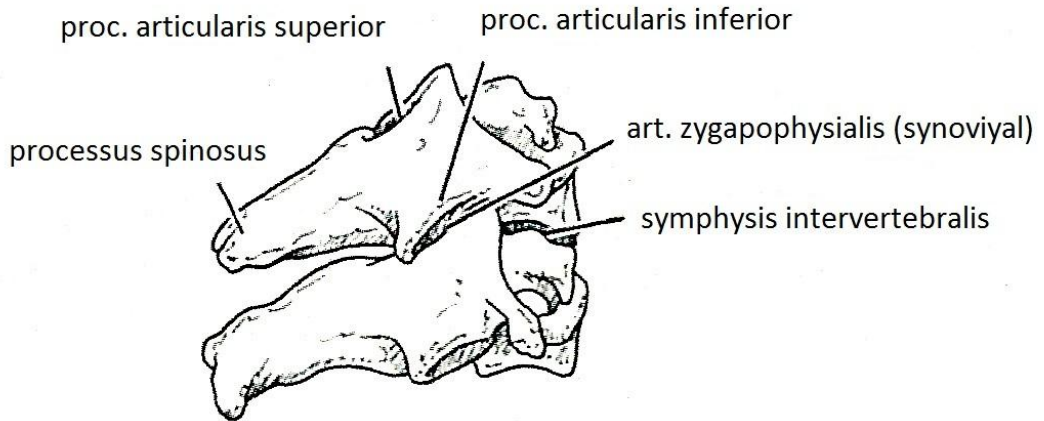
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Servikal disk

Servikal disk hastalığı; omurilik ve sinir köklerini etkileyen, en sık hayatın üçüncü ve dördüncü on yılında rastlanılan hastalık grubudur. Eski zamanlardan beri insanoğlunun günlük yaşamını etkileyen ağrılı bir hastalık olarak medikal ve cerrahi birçok yöntem ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Bu tedavi yöntemleri, her geçen gün kazanılan yeni bilgiler, edinilen tecrübeler ve ilerleyen teknolojik imkanlar ile gelişerek daha iyi sonuçlar elde edilmesi sağlanmıştır.

2.1.1. Servikal vertebra eklemlerinin anotomisi

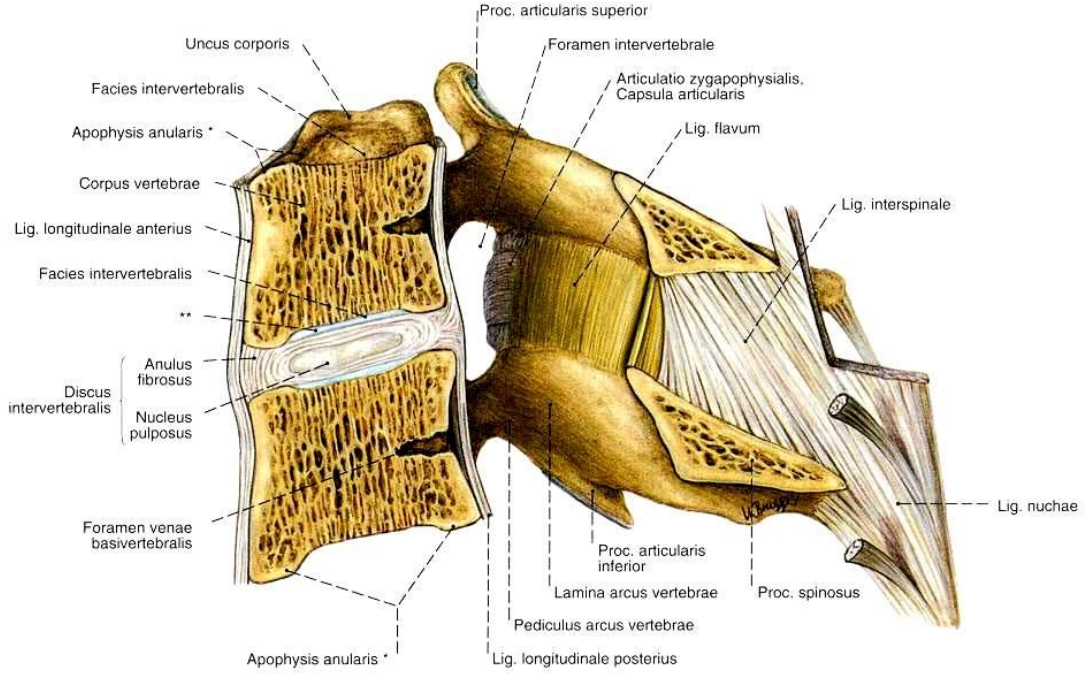
Omurga, dikey yönde etki yapan vücut ağırlığı ve dış kuvvetlere karşı koymanın yanında hareket fonksiyonunu da yürütmek durumundadır. Bu, sabit ve hareketli olma birlikteliği iki tür ekleme sahip olmasıyla mümkün olmaktadır; faset eklemler ve intervertebral diskler. Faset eklemler diartrodial eklemlerdir. Sinovyal membranla kaplı oldukları için minimal dirençle harekete izin verirler. Buna karşın intervertebral diskler ise amfiartrodial eklemlerdir ve sinovyal membranları yoktur. Yine sahip oldukları özel yapı sayesinde hem dikey duruştaki yükü taşırlarken, hem de vertebra korpusları arasındaki harekete izin verirler (4). Şekil 1’de servikal vertebra eklemleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1: Servikal vertebra eklemleri (Klinik Anatomi beşinci baskı s. 829’den alınmıştır.)

2.1.1.1. İntervertebral diskler

İntervertebral diskler vertebral kolonun daha hareketli olduğu servikal ve lumbal bölgelerde daha kalındırlar. Onlara komşu vertebraların sert gövdeleri arasında bulunan yarı elastik diskler olarak bakılabilir. Her bir diskin anulus fibrozus denilen periferik parçası ve nükleus pulpozus denilen santral parçası vardır (Şekil 2) (5).



Şekil 2: İntervertebral disk anatomisi (Sobotta İnsan Anatomisi Atlası II. cilt, s. 25'den alınmıştır.)

2.1.1.1.1. Anulus fibrosus

Anulus fibrozus, fibrokartilajinöz bir yapıya sahiptir. Anulus fibrozusun kollajen lifleri konsantrik lameller veya kılıf şeklinde dizilmişlerdir. Kollajen bantlar komşu vertebraların gövdeleri arasında oblik olarak uzanırlar. Komşu lamellerde liflerin eğimi birbirine zıttır. En dıştaki çoğu lifler columna vertebralis'in ön ve arka longitudinal bağlarına sıkıca tutunurlar (5).

2.1.1.1.2. Nükleus pulpozus

Adölesan ve çocukta büyük miktarda su, az sayıda kollajen lif, birkaç kıkırdak hücresi içeren ovoid jelatinöz bir kitledir. Normalde basınç altındadır ve diskin ön kenarından daha çok arka kenarına hafifçe yakın yerleşmiştir. Komşu vertebraların

korpuslarının disk ile temas eden üst ve alt yüzleri ince bir hyalin kıkırdak tabakası ile kaplıdır. Nükleus pulpozus'un yarı akıcı yapısı vertebral kolonun fleksiyon ve ekstansiyonunda vertebraların öne veya arkaya bükülebilmesine olanak tanır (5).

2.1.1.2. Bağları

Anterior ve Posterior Longitudinal Ligamentler kafatasından sakruma kadar vertebral kolonun ön ve arka yüzleri boyunca, devamlı bir bant şeklinde uzanırlar (Şekil 2). Ön ligament geniştir ve korpus vertebraların ön yüzüne ve yan kenarlarına sıkıca tutunurlar. Arka ligament zayıf ve dardır. Bu bağlar vertebraların sıkıca bir arada durmalarına yardım ederler ve onların aralarında oluşacak küçük hareketlere olanak tanırırlar (5).

2.1.1.3. Faset eklemleri

İki arkus vertebra'nın birleşmesi komşu vertebraların processus articularis superior ve inferiorları arasındaki eklemler aracılığıyla olur (Şekil 2). Eklem yüzeyleri hyalen kıkırdakla örtülüdür ve eklem kapsüleri bir ligament ile çevrilmiştir.

Bağları:

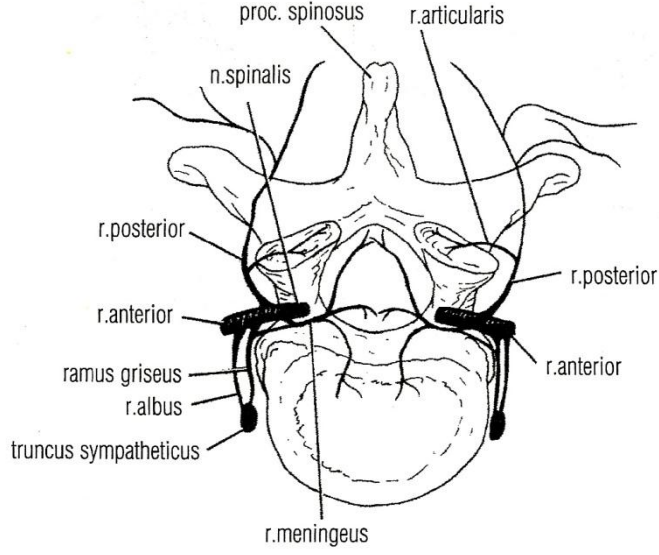
- **Ligamentum supraspinale** komşu spinöz çıkıntıların uçları arasında uzanır.
- **Ligamentum interspinale** komşu spinöz çıkıntıları birbirine bağlar
- **Ligamentum intertransversarium** komşu transvers çıkıntılar arasında uzanır.
- **Ligamentum flavum** komşu vertebraların laminalarını bağlar

Servikal bölgede ligamentum supraspinale ve ligamentum interspinale'ler oldukça kalınlaşarak **ligamentum nuchae**'yi oluştururlar. Ligamentum nuchae, kafatasındaki protuberentia occipitalis ekstena ile yedinci servikal vertebra processus spinosus'u arasında uzanır (Şekil 2) (5).

2.1.1.4. Vertebral eklemlerin innervasyonu

Vertebra korpusları arasındaki eklemler her bir spinal sinirin küçük meningeal dalları ile innerve edilirler (Şekil 3). Sinir foramen intervertebrale'den çıkan spinal

sinirlerden ayrılır; foramen intervertebrale'den tekrar vertebral kanal'a girer ve meninksleri, ligamentleri ve intervertebral diskleri innerve eder (5).



Şekil 3: İntervertebral disk innervesyonu (Klinik Anatomi s. 830'dan alınmıştır.)

2.1.2. Histolojisi

2.1.2.1. Anulus fibrosus

Bağ dokusundan yapılmış bir dış tabakaya sahiptir, ancak bu tabaka, fibröz kıkırdağın birbiri üzerine oturmuş katlanmalarından oluşmuştur. Birbiri ile komşu olan bu tabakalarda kollajen lif demetleri ortogonal düzenlenim gösterirler. Komşu tabakalar ile 90° açı yapan Tip I kollajen liflerden oluşan çok sayıdaki lamel; diske, vertebralar arasında meydana gelen basınca karşı koyabilmesi için, gereken esnekliği sağlar (6).

2.1.2.2. Nükleus pulposus

Anulus fibrosusun merkezinde yer alır. Kökenini notokorddan alır. Hyaluronik asid ve Tip II kollajen liflerden zengin, şekilsiz kıvamlı bir madde içine gömülmüş, birkaç yuvarlağımsı hücreden ibarettir. Çocuklarda nükleus pulposus büyüktür, ancak yaş ilerledikçe giderek küçülür ve kısmen yerini fibröz kıkırdağa bırakır (6).

2.1.2.3. Fibröz kıkırdak

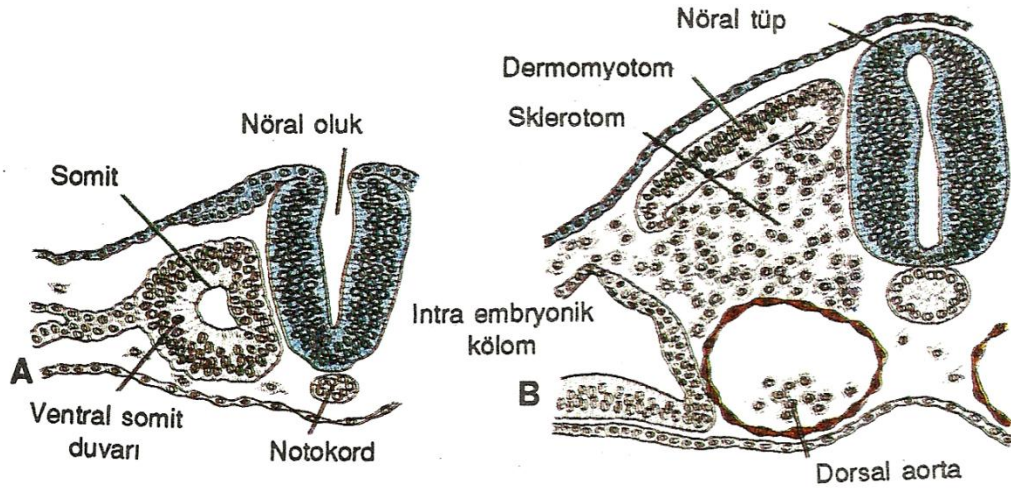
Yapısal olarak fibröz kıkırdak, yoğun bağ dokusu ile hyalin kıkırdak dokusu arasında bir yapıya sahiptir. Fibröz kıkırdak, intervertebral disklerde bazı ligamanların, kıkırdakla kaplı kemik yüzeylerine bağlandıkları yerlerde bulunur. Fibröz kıkırdak her zaman tıkkız bağ dokusu ile ilişkidir ve bu iki dokunun birbirlerine değişmesi nedeni ile aralarındaki sınır kesin değildir.

Fibröz kıkırdağın hücreleri; çoğunlukla uzun sıralar halinde, tek tek ya da izojen gruplar halinde olup hyalin kıkırdak hücrelerine benzerler. Fibröz kıkırdak asidofiliktir, çünkü matriksinde rahatlıkla görülebilen çok sayıda kalın Tip I kollajen lifleri içerir. Amorf matriks, bu tip kıkırdakta daha az miktardadır.

Fibröz kıkırdakta bulunan çok sayıda kollajen liflerin düzenleniminin şekli, fibröz kıkırdağa etki eden kuvvetlerin yönüne bağlıdır. Çünkü kollajen demetleri, etki altında buldukları kuvvetin yönüne bağlı olarak yerleşirler. Fibröz kıkırdağın perikondriyumu yoktur (6).

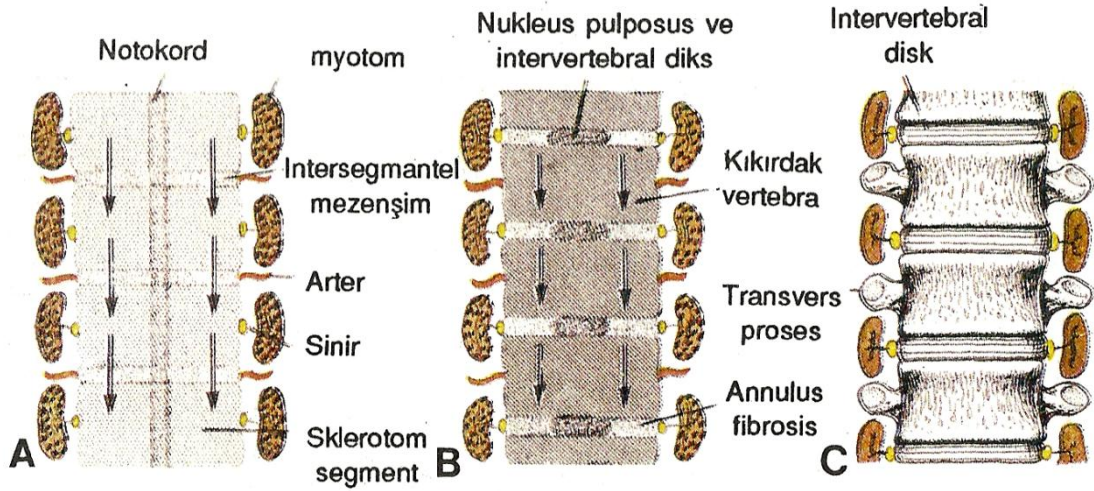
2.1.3. Embriyolojisi

Gelişimin dördüncü haftasında, sklerotom hücreleri spinal kord ve notokordu çevrelemek üzere pozisyon değiştirirler (Şekil 4). Bu pozisyon değişimi, sklerotom hücrelerinin aktif migrasyonu ile değil, çevre yapıların değişik yönlere büyümesiyle gerçekleşir. Vertebral kolon, kaynağını aldığı yapı gibi segmental özellikler gösterir ve bu sklerotomik bloklar, içlerinde intersegmental arterlerin yer aldığı, daha az yoğunluktaki bölgelerle birbirlerinden ayrılırlar (Şekil 5 A) (7).



Şekil 4: Somit'in gelişimi **A.** Paraksiyal mezoderm hücreleri küçük bir boşluk çevresinde sıralanmışlardır. **B.** Farklanmanın daha sonraki evrelerinde, ventromedial duvardaki hücreler epitelial düzenlerini kaybeder ve mezenkimal hale gelirler. Topluca sklerotom olarak değerlendirilirler. Somitin dorsolateral duvarındaki hücreler dermomyotomu oluşturur. (Medikal Embriyoloji s. 141'den alınmıştır.)

Gelişimin daha ileri evrelerinde, her bir sklerotom segmentinin kaudal bölgesi aşırı proliferasyon göstererek yoğunlaşır (Şekil 5 B). Bu proliferasyon komşu intersegmental dokuya dek uzanır ve her bir sklerotom segmentinin kaudal ucu, komşu sklerotomun sefalik yarısı ile birleşir (Şekil 5 A ve B). Daha sonra intersegmental dokunun prekartilajinöz vertebral cisim yapısına katılmasıyla, (Şekil 5 B) vertebranın cisimi orijinal şekildeki gibi intersegmental hale gelir (7).



Şekil 5: Gelişimin değişik evrelerinde vertebral kolonun şematik çizimi. **A.** 4. Haftada, sklerotomik segmentler yoğunluğu daha az olan bir intersegmental dokuyla ayrılmıştır. **B.** Bir sklerotomun kaudal yarısının, intersegmental mezenşim içine ve yanındaki sklerotomun kranial yarısına doğru yoğunlaşması ve çoğalması. **C.** Kıkırdak vertebral cisimcikler, birbirini takip eden iki sklerotomun üst ve alt yarılarından ve intersegmental doku tarafından oluşturulurlar. (Medikal Embriyoloji s. 154'den alınmıştır.)

Sklerotom segmentinin sefalik ve kaudal bölümleri arasında yer alan mezenkimal hücreler, prolifer olmayarak, iki prekartilajinöz vertebra cismi arasındaki boşluğu doldururlar. Böylelikle intervertebral disklerin yapısına katılmış olurlar (Şekil 5 B). Notokord, vertebral cisimlerin olduğu bölgede tam bir regresyona uğrasa da, intervertebral disk bölgesinde varlığını devam ettirir ve genişler. Bu bölgede mukoid dejenerasyona uğrayıp nükleus pulposus oluşturur ve daha sonra çevresi anulus fibrozusun sirküler lifleri ile sarmalanır. Her iki yapı bir arada intervertebral diskleri oluşturur (Şekil 5 C) (7).

Sklerotomların kalıcı vertebra halinde düzenlenmeleri, myotomların intervertebral diskler üzerinde köprü yapmalarına neden olur. Bu değişiklik, bunlara omurgayı hareket ettirme yeteneğini verir (Şekil 5 C). Aynı nedenle başlangıçta sklerotomlar arasında yerleşmiş olan intersegmental arterler, artık vertebral cisimlerin ortasından geçerler. Spinal sinirler ise intervertebral disklere doğru yaklaşarak vertebral kolonu intervertebral foramenler aracılığı ile terkeder (7).

2.1.4. Patolojisi

Eklemler yaşlanma ile birlikte yıpratıcı değişikliklere maruz kalırlar. Yıpratıcı olaylar çok yönlü işlemlerdir ve eklemlerle beraber hareket eden tüm bileşenleri ilgilendirir. Bu bileşenler disk mesafesini, faset eklemleri ve omurga içerisindeki ve çevresindeki dokuların yanısıra vertebra korpuslarını ve artiküler süreçleri içerir. Bu yıpranma sonucunda spondiloz, osteofit oluşumu ve disk sıkışması görülür (8).

Diskteki yıpratıcı işlemler erken çocukluk döneminde başlar. Bebeklerin disklerinde kan damarları vardır. Yaşamın ikinci yılından itibaren bu damarlar gerilemeye başlar. Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte bebeğin yürümeye başlama zamanına denk geldiği için dik duruşla alakalı olabileceği konusunda söylemler yapılmaktadır. Dik konuma geçilmesiyle disk üzerine yük binmeye başlaması, kan damarlarının gerilemesine neden olabilir. Dört yaşına gelindiğinde ise artık kondrositlerin tüm beslenmesi difüzyon yoluyla gelen maddeler sayesinde olmaktadır. Bunun yanısıra lamina kribrozadaki porların çapları da giderek küçülür. Küçülmüş por çapı ile yıpratıcı disk değişiklikleri arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Yetersiz beslenme üçüncü dekattan itibaren nükleus pulpozusun içeriğini değiştirir. Ortaya çıkan geçişimsel değişiklikler ve bunun sonucu diskin su kaybı, diskin hacmini ve yüksekliğini düşürür (4, 8).

Disk, ana maddesinin protein içeriğinde hem nitel hemde nicel değişiklikler olmaktadır. Glikoproteinlerin moleküler ağırlıkları düşer. Ek olarak kondrotin sülfata oranla keratin sülfat miktarında artış olur. Keratin sülfatın negatif yükü bir iken, kondrotin sülfatın negatif yükü ikidir. Bunun sonucunda da diskin ozmotik özelliklerinde değişiklikler ortaya çıkar. Daha az protein, daha az negatif yük sonucu disk içerisine sıvı akışında azalma ortaya çıkar. Diskin su içeriği %90'dan %70'e iner. Böylece disk yükseklik kaybına uğrar ve şişkinleşme yeteneğinin bir kısmını yitirir.

Yüksekliğin azalması, anulusun bombeleşmesine neden olur, bu da komşu vertebra periostunu kemikten ayırır. Kemikle periost arasında oluşmuş bu boşluk yeni kemik oluşumuyla dolar, böylelikle osteofitler meydana gelir. Kıkırdak son plaklar incelik ve çatlaklar oluşur. Yaşlanmakla ayrıca anulusun tabakalı yapısı da bozulur, özellikle arkada posterior longitudinal ligamanla olan bağlantılar gevşer. Bu da arka-yanda

anulusta zayıflamış bir alan ortaya çıkarır ki, burasıda disk fitıklaşmasının en çok görüldüğü yerdir. Böylece dış güçler ile yıpranmış bir disk fitıklaşır.

Spondiloz, yıpranmış disk hastalığına ikincil osteofitozis olarak tarif edilebilir. Spondilozda görülen osteofitler intervertebral diskin yıpranması ile birliktedir. Bu yüzden spondilozun varlığı, noninflamatuvar disk yıpranmasının varlığıyla tanımlanır (4, 9).

2.2. Mezenkimal kök hücre

Mezenkimal kök hücreler (MKH), erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MKH’lerin birçok alanda kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır.

2.2.1. Tanımlama

Mezenkimal kök hücreler, bağ (konnektif) dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilir. Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler. Bu hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır. Fridenstein FCS (fötal buzağı serumu) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Yıllar sonra yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan (non-hematopoetik) pluripotent kök hücreler olduğu, her üç germ yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur. Önceleri CFU-F (Colony forming unit fibroblast) ve “Kemik iliği stromal fibroblast”ları denilen bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/stromal hücre olarak tanımlanmışlardır (10).

MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışması (plastik adherans), stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir (10).

2.2.2. Kaynakları

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH’ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök/projenitör hücreler bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH olduğu gösterilmiştir (10).

Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Solid dokulardan hücre izolasyonunda enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kemik/periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasyal dokular, karaciğer, lipoaspirasyon

materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovyal sıvı, hatta periferik kandanda adezyon özellikleri nedeniyle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür. Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik doku kültür kaplarına yapışabilme, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır. Bu özellikler büyük ölçüde benzerlik gösterir. Ancak farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özelliklerinde, köken alınan doku tipine göre bazı değişiklikler olabildiği de gösterilmiştir (10).

Periferik kanda MKH varlığı ise tartışmalıdır. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan non-hematopoetik ve MKH karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir. Özellikle ağır hasar olan durumlarda, kemik kırığı, multiorgan yetmezliği hallerinde periferik kandan MKH izole edildiği gösterilmiştir (10).

2.2.3. İmmünofenotipik özellikler

Heterojen hücre topluluğu ile başlanılan kültürlerde MKH popülasyonunu diğer hücre popülasyonlarından ayırt etmek için hematopoetik kök hücreler veya hücrelerin izole edildiği dokuya özgü antijenlerin negatif olması gerekmektedir. Bu hücrelerin hematopoetik antijenleri (veya dokuya özgü antijenleri) taşımadıkları, buna karşın adezyon, hücre-hücre, hücre-hücre dışı matriks ilişkilerinde rol oynayan ve stromaya özgü antijenleri, yüksek oranda eksprese ettikleri bilinmektedir. Sadece MKH'leri tanımlayan spesifik bir antijen henüz tanımlanmamıştır (2).

Kemik iliğinden elde edilmiş ve kültürde çoğaltılmış MKH'lerin akım sitometri ile immünofenotipik özellikleri detaylı olarak incelenmiştir. Buna göre hücre popülasyonunda CD45, CD34, CD14 veya CD11b, HLA sınıf II CD79 α veya CD19 gibi hematopoetik antijenlerdeki pozitiflik oranının %2'yi geçmemesi gerekmektedir. Buna karşın MKH'ler stroma ile ilgili antijenlerden tipik kabul edilenlerden SH2 (CD10⁵), SH3-SH4 (CD73), CD90, CD29, CD44 pozitifdir (2).

2.2.4. Sekretuar özellikler ve immünmodülatuar etki

Çeşitli dokularda destek hücresi olarak bulunmakta olan MKH'ler, bu özellikleri ile ilişkili olarak çok sayıda biyoaktif molekül, sitokin, kemokin, enzim ve ekstraselüler matriks proteinleri sentezlenmektedir (2).

Mezenkimal hücrelerin in vivo uygulamalar için belki en avantajlı özelliklerinden birisi, bu hücrelerin immünojenitesinin düşük olması ve immün baskılayıcı (immünsüpresif) olmalarıdır. Bu immünmodülatuar özellik yanında antiinflamatuvar etki de gösterdikleri bildirilmiştir. Diğer birçok özellikleri gibi MKH'lerin bu etkilerinin de buldukları ortam ve mikroçerçeve ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (2).

Mezenkimal kök hücrelerin sekretuar fonksiyonunda immünmodülatuar etkili faktörler yanında antiapoptotik, anjiojenik, antifibrotik özellikleri de bulunmaktadır. Bu özellikler de bu hücrelerin hasar onarımında rollerini açıklamaktadır (2).

2.2.5. Farklılaşma potansiyeli

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikroçerçeve koşullarında başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Caplan ve arkadaşlarının ardından çeşitli araştırmacılar in vitro koşullarda uygun sitimulanlarla mezenkimal kök hücrelerin; osteojenik (kemik yapıcı), adipojenik (yağ yapıcı), kondrojenik (kıkırdak yapıcı), myojenik (kas yapıcı) farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir. İlerleyen zamanda MKH'lerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epitelooid hücrelere dönüşüm olduğu, yine uygun koşullar sağlandığında nöronal hücreler geliştiği de gösterilmiştir (2).

2.2.6. Hasarlı doku tamirine katkı

Hasarın iyileştirilmesinde etkili mekanizmalar; MKH'lerin farklılaşarak olgun fonksiyonel hücrelere dönüşmesi, hasarlı hücre-MKH füzyonu sonucu hücre fonksiyonunun yeniden kazanılması, MKH'nin hasarlı dokuda hücre-hücre, hücre dışı matriks ilişkileri ve solubl faktörlerin (büyüme faktörü, sitokin, kemokin vs.) parakrin

faktörlerin, enzimlerin salınımı veya immünmodülatör, antiinflamatuvar, antiapoptotik, anjiojenik etki göstermek yoluyla hasarın giderilmesine katkıları olarak sayılabilir. Burada en önemli mekanizmanın solubl faktörler ve hücreler/matriks ile adeziv ilişkiler ile de olduğu düşünülmektedir (2).

Mezenkimal kök hücrelerin buldukları bölgelerdeki “niche” lerin (yuva), hasarlı dokuya doğru mobilizasyonu, migrasyonu gerekmektedir. Bunu sağlayan uyarının da hasarlı dokunun değişik mikro çevresinden geldiği gösterilmiştir. Hasarlı bölgede salınan solubl faktörlerden SDF (stromal derived factor-1), Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve kompleman C3 fraksiyonunun önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir. Burada yüksek konsantrasyon gelişmesi sonucu oluşan gradyan diğer bölgelerdeki kök hücrelerin hasarlı bölgeye mobilizasyonu için bir uyarı oluşturmaktadır. Ayrıca , hücrelerin hasarlı bölgeye hareketini sağlayan bu uyarıların büyük ölçüde MKH’ler tarafından sağlandığı da düşünülmektedir (2).

2.2.7. Klinikte kullanım açısından avantajları

- Konnektif doku kökenli olmaları nedeniyle stromal destek sağlayarak ilgili doku hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonuna katkı sağlamaları,
- Farklılaşma yeteneklerinin fazla olması;
 - Kendi köken aldığı konnektif doku hücreleri olan kas, yağ, kemik, kıkırdak, stromal hücreler, tendon, ligament gibi,
 - Diğer doku hücrelerine farklılaşma özelliği (transdiferansiyasyon): Nöron, hepatik, pankreatik hücre gibi,
- Hasarlı hücre ile füzyon yeteneği olması,
- Biyoaktif maddeler, çözümlü faktörler (büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler gibi) salgılayarak hücre/doku tamirine katkı sağlaması,
- Migrasyon özellikleri sayesinde hasarlı dokuya ulaşabilmeleri,
- İmmünsüpresif/non-immünojenik özellikte olmaları (çoğunlukla): bu özellikleri nedeniyle MKH klinik kullanımı için HLA doku uyumunun şart olmadığı, haplo-idantik, hatta tamamen HLA uyumsuz bireylerden bile MKH tedavilerinin mümkün olduğu,
- Anjiojenik, antiapoptotik, anti-enflamatuar özellikleri nedeniyle doku onarımına katkıları, gen transferi kolaylığı ve dayanıklı olmaları nedeniyle

gen tedavisi için uygun olmaları; bu nedenle kalıtsal hastalıklarda ve kanser tedavisinde kullanım potansiyeli bulunması, enzimler (örn. Lizozomal enzim) salgılayarak kalıtsal hastalıklardaki enzim defektlerinin yerine konulabilme potansiyeli bulunması, hücrel tedaviler içinde MKH'lerin öne çıkmasını sağlamaktadır (3).

2.2.8. Klinikte kullanım açısından dezavantajları veya kullanımında zorluklar

- En önemli dezavantajı, sayılarının çok az olması nedeniyle in vitro kültür ortamında haftalarca süren kültürlerde çoğaltılması gereğidir.
- Çoğaltılan bu hücrelerin, hastalarda kullanılabilmesi için ileri teknolojik yatırımlar gereklidir.
- Hücre hazırlığında gerekli tüm in vitro işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda GMP (Good Manufacturing Practice=İyi Üretim Uygulamaları) yapılması gerekmektedir.
- Hücrelerin kalite kontrolleri yapılmış olarak haftalar süren kültür ortamında çoğaltılabilmeleri için, en başta, dış ortamdan gelebilecek enfeksiyonların önlenmesi, ayrıca işlemlerden geçirilirken hücrelerde stres oluşmasına bağlı gelişebilecek istenmeyen etkilerin (örn. Kanser geliştirme potansiyeli, hedeflenenden başka hücre gelişmesi gibi) önlenmesi gerekmektedir (3).

2.3. Deney hayvanı

2.3.1. Cerrahi araştırmalarda hayvan kullanımı

Tıbbi araştırmaların kaçınılmaz bir basamağı hayvanların deneysel amaçlarla kullanımınıdır. Bu basamak, gönüllü bile olsalar insanlarda kullanılması mümkün olmayan kontrollü, ileriye dönük (prospektif) hastalık ya da ameliyat modelleri üzerinde araştırmalar yapmak, klinikteki sorunları deneysel ortamda hazırlanan senaryolar çerçevesinde ele alıp çözümler üretmeye çalışmak için gereklidir. Modern tıbbın birçok ilerlemeyi hayvanlar üzerinde yapılmış deneylere borçlu olduğu gerçeği inkar edilemez. Ancak hayvanlar üzerinde tıbbi amaçlı araştırma yapmak hayvanlara eziyet anlamına gelmez (11).

Russell ve Brunch 1959 yılında hayvanlar üzerinde yapılacak deneylerde gözetilmesi gereken etik ilkeleri basitçe “3R” ile formüle etmişlerdir. İlk “R” “*replacement*” ilkesini ifade eder. Bunun anlamı, mümkün olan her koşulda canlı hayvan yerine “cansız model” kullanarak çözüm aramaktır. Cansız modeller çoğu zaman cerrahi araştırmalarda gerekli olan karmaşık fizyolojik süreçleri araştırmak için yetersiz kalmalarına rağmen eğitim amaçlı bazı çalışmalarda mümkün olabilir. İkinci “R” “*reduction*” karşılığıdır. Reduction ya da “sayıca azaltma” araştırmacının tutarlı bir istatistiksel sonuç alabileceği ya da en fazla bilgiyi sağlayabileceği en az sayıda hayvan kullanması gereğine işaret eder. Üçüncü ve belkide en önemli “R” ise “*refinement*” ya da “nezaket” olarak belirlenir. Bu terim hayvana verilecek ağrı ve eziyeti en aza indirecek yöntemleri kullanmak gerektiğinin ifadesidir (11).

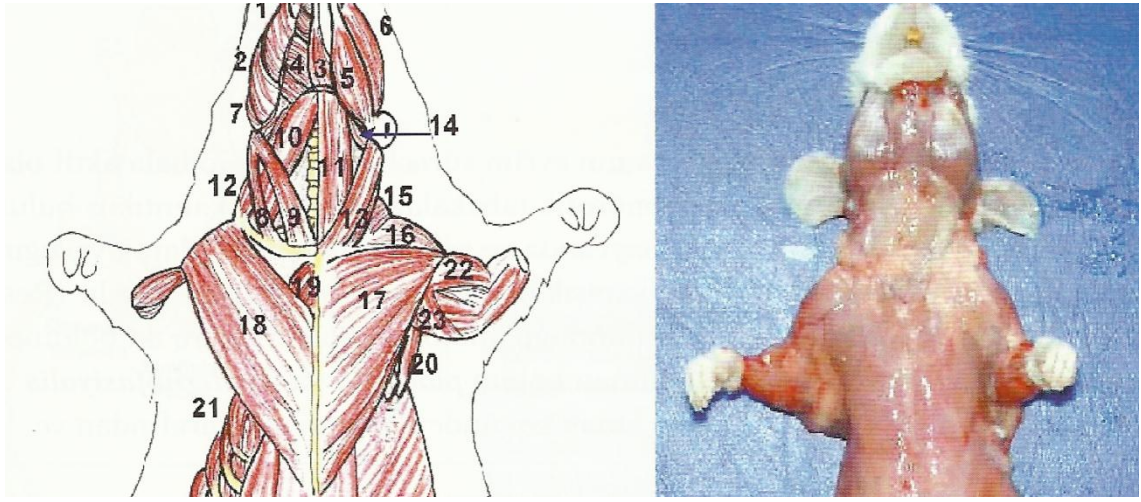
2.3.2. Deney hayvanı olarak sıçan kullanımı

Literatürde yapılacak üstünkörü bir tarama bile deneysel mikrocerrahide en sık kullanılan hayvanın sıçan olduğunu ortaya koyar. Bunda şaşırtıcı bir yan yoktur. Labaratuvar sıçanları kolay ve hızlı üreyebilen hayvanlar oldukları için deneysel amaçla edinilmeleri zor değildir. Sıçanlar küçük ve dayanıklı hayvanlardır ve bu sayede çok sayıda hayvana uygun bakım ve beslenme koşulları daha kolay ve düşük maliyetle hazırlanabilir. Ayrıca deneysel amaçlı kullanımlarının rahat olması ve cerrahi araştırmaların nispeten basit koşullarda yürütülebilmesi en önemli üstünlükleridir. Bakım kolaylıkları sayesinde temel şartlara sahip herhangi bir labaratuvarda, bu hayvanla çalışmak için uygun ortam kolayca bulunur. Bu nedenlerle sıçan, çok sayıda hayvan kullanılması gereken çalışmalarda hem en pratik hem de en ekonomik seçenektir (11).

2.3.3. Deney hayvanı sıçanlarda anatomi

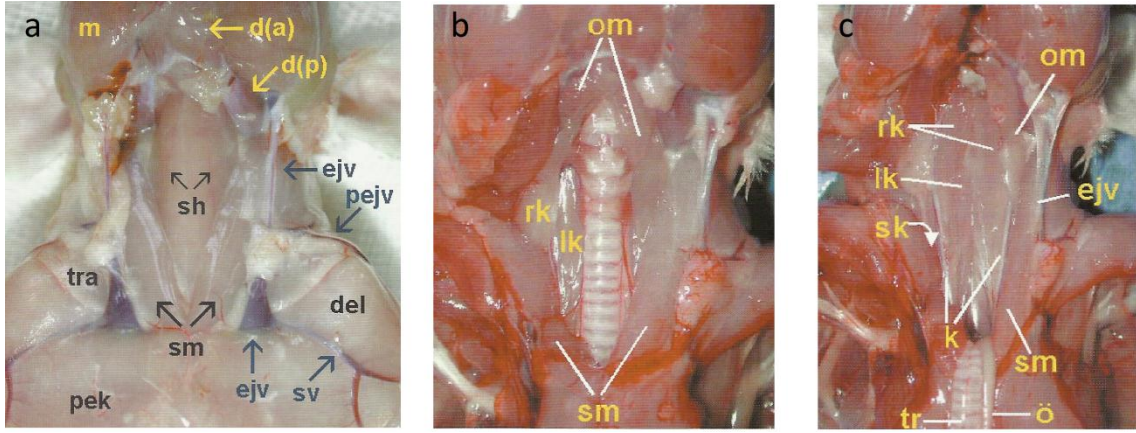
Deneyisel araştırmaya başlamadan önce elbette cerrahi saha hakkında detaylı anatomik bilgiye sahip olmak gereklidir. Bu cerrahi işlem esnasında dokuları tanıyarak en kısa sürede ve dokuya mümkünse hasar vermeden cerrahi işlemi tamamlayabilmemize olanak sağlar.

Aşağıdaki resimde şematik ve resim olarak ratlarda, boyun yüzeyel ve derin kasları görölmektedir (şekil 6).



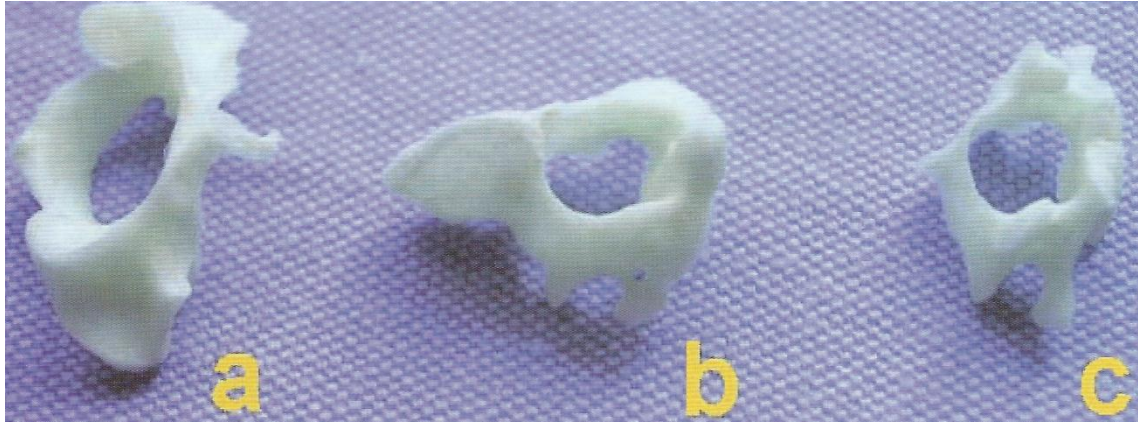
şekil 6: Ratlarda, boyun yüzeyel ve derin kasları **1.** M. Masseter derin bölüm kaudal parça, **2.** M. Masseter derin bölüm kraniyal parça, **3.** Digastrik kası ön karnı, **4.** Milohyoid kas, **5.** M. Masseter yüzeyel bölüm yüzeyel parça, **6.** M. Masseter yüzeyel bölüm derin parça, **7.** Temporal kas, **8.** Kleidomastoid kas, **9.** Sternomastoid kasın derin parçası, **10.** Omohyoid kas, **11.** Sternohyoid kas, **12.** M. Romboideus kapitis, **13.** M. Sternomastoideus, **14.** Digastrik kasın arkakarnı, **15.** Trapez kasın klaviküler parçası, **16.** Deltoid kasın klaviküler parçası, **17.** Yüzeyel pektoral kas, **18.** Derin pektoral kas, **19.** Rektus abdominuskasının kraniyalde, manubrium sterni seviyesinde yapışma noktası, **20.** Latissimus dorsi ve kutaneus trunki kaslarının muskulotendinöz güdükleri, **21.** m. Serratus anterior, **22.** Biceps brakii kasının uzun başı, **23.** M. Tensor fasya antebrakii (Deneyisel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri kitabı s. 128'den alınmıştır.)

Yüzeyel yağlı doku uzaklaştırıldıktan sonra boyun yüzeyel ve derin kas yapılarının, trakea ve damar yapılarının görünüşü (Şekil 7).



Şekil 7: **a.** Yüzeyel yağlı dokular kaldırıldıktan sonraki görünüm, **b.** Trakea önündeki yapılar uzaklaştırıldıktan sonraki görünüm, **c.** Trakea ve özofagus uzaklaştırıldıktan sonraki görünüm. **d (a):** diğastrik kas (ön karın), **d (p):** diğastrik kas (arka karın), **del:** deltoid kas, **ejv:** eksternal juguler ven, **m:** masseter kas, **pejv:** eksternal juguler venin posterior dalı, **pek:** pektoralis majör kası, **sh:** sternohyoid kas, **sm:** sternomastoid kas, **sv:** sefalik ven, **tra:** trapez kas, **om:** omohyoid kas, **rk:** rektus kapitis kası, **lk:** longus kapitis kası, **sk:** m. Skalenyus, **k:** A. Karotis kommunis ve n. vagus, **tr:** trakea, **ö:** özofagus. (Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri kitabı s. 134-135'den alınmıştır.)

Ratlarda servikal vertebraların görünüşü (Şekil 8).



Şekil 8: İlk üç omur kemiği **a.** Atlas, **b.** Epistrofeus, **c.** 3. Servikal vertebra (Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri kitabı s. 124'den alınmıştır.)

3. GEREÇ YÖNTEM

Bu araştırmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi etik kurulu onayı alınarak başlanmıştır. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisinin, Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) kapsamında çalışmada kullanılan denekler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilmiştir. Cerrahi işlemler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde Kök Hücre elde edilmesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji laboratuvarlarında, Histopatolojik işlemler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapılmıştır.

3.1. Mezenkimal kök hücre

Çalışmamızda, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji laboratuvarlarında elde edilen Mezenkimal kök hücreler kullanıldı.

3.1.1. Mezenkimal kök hücre elde edilmesi

Mezenkimal kök hücre elde etmek amacıyla kemik iliğı vericisi olarak 5 adet erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Bu sıçanlardan eter inhalasyonu ile anestezi altında her birinden 8-10 ml olmak üzere eksternal intrakardiyak yol ile kan alındı. Alınan kanlar 4000 devir/dakika (rpm)'da 10 dakika santrifüj edilerek otolog serum elde edildi. Eter inhalasyonuna devam edilerek öldürülen deney hayvanlarının femur, tibia ve humeruslarının medüller kavitelerinden yıkama yöntemi kullanılarak kemik iliğı alındı. Bu işlem sırasında önceden heparinle yıkanmış dulbecco's modified eagle's medium-low glucose (DMEM-LG) çekilmiş insülin enjektörleri kullanıldı. Her kemik için 1cc toplamda ise hayvan başına 8-12cc DMEM-LG kullanıldı. Hücreler eşit hacimdeki Ficoll solüsyonu (1.077 g/mL) üzerine tüp içerisinde yayıldı. Elde edilen solüsyondan mononükleer hücreleri ayırmak amacıyla dansite gradiyent yöntemi kullanılarak 900 devirde 30 dakika süre ile santrifüj edildi. İnterfazdan toplanan mononükleer

hücrelerden 3ml'si akım sitometri çalışması için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına götürüldü. Geride kalan kısım 3ml'lik daha önceden 200 mL/L fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penisilin, 100 U/mL streptomisin ve 20 mL/L L-glutamin eklenerek hazırlanmış olan DMEM-LG besiyeri içinde 25 cm²lik (T25) hücre kültür kaplarına 10⁶/mL konsantrasyonunda yayılarak ekildi. Hücreler 37 °C ve 50 mL/L CO₂ içeren % 95 nem oranına sahip CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Besiyerleri, ilk üç gün hergün, sonrasında ise miktarı 5 ml'ye çıkarılarak 3 günde bir değiştirildi. İvert mikroskopta hücrelerin kültür kabının %75'ini kapladığının görüldüğü 14. günde hücreler pasajlandı. Pasaj işlemi için kültür kaplarına içerisindeki besiyerini aldıktan sonra 1,5 ml Tripsin-EDTA-C konuldu. 2-3 dakikalık elle perküsyon sonrasında 37 °C'lik inkübatörde 3-5 dakika arası tutuldu ve tekrar elle 2 dakika kadar perküte edilen hücrelerin mikroskopta yapıştıkları plastik yüzeyden kalktıkları görüldü. Hücreler bu şekilde toplam 5 kez pasajlandı. Pasajlanan 12 kültür kabından tripsin-EDTA-C ile kaldırılan hücreler süspansiyon haline getirilip akım sitometri çalışması için Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematoloji Laboratuvarına götürüldü.

Pasajlanarak çoğaltılan diğer hücre kültürleri yine aynı yöntem kullanılarak tripsin-EDTA-C ile kaldırıldı. % 10 Dimetil sulfoksit (DMSO) ve % 20 FBS içeren DMEM-LG'den 1,5ml eklenerek 2ml'lik kriyotüplerde daha sonra deneyde kullanılmak üzere -80°C' ye kaldırıldı.

3.1.2. Akım sitometri ile mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması

İnterfazda toplanan mononükleer hücrelerden oluşan ekim yapılmadan önce alınmış 3 ml'lik örneğin kullanımında her hücre dizini için 6 tüp kullanıldı. Tüplerin üzerleri sırasıyla yüzey belirteçlerinin adları ve kontrol grubu olarak yazıldı. Sonra her tüpe hücre konsantrasyonu 1x10⁶ olacak şekilde getirilen hücre süspansiyonundan 100'er µl konuldu. Birden beşe kadar olan tüplere yüzey belirteçleri sırası ile 10'ar µl eklendi. Altıncı tüpe belirteç konulmadı. Tüpler vortekslendi. 4 °C'de karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildikten sonra üzerine daha önceden hazırlanmış olan yıkama solüsyonundan 1 ml eklendi ve 1400 devir/dakikada 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra kalan hücre çökeltisine tekrar 0,5 ml yıkama solüsyonu eklenerek akım sitometri cihazında tanımlandı. Bu işlemde Hematopoetik Kök Hücre

(HKH) ve MKH hücre belirteçleri (CD11b/c, CD44, CD45, CD90, CD106)'nin kullanımı sonucunda CD11b/c [%97 (+)], CD44 [%1 (-)], CD45 [%99 (+)], CD90 [%34 (+)] ve CD106 [%11 (-)] olduğu gösterildi.

Aynı işlemler, pasajlanan kültür kabından tripsin-EDTA-C ile kaldırılarak toplanan hücrelerden oluşan örneklerle de tekrarlandı. Aynı belirteçlerin kullanımı sonucunda CD11b/c [%5 (-)], CD44 [%97 (+)], CD45 [%1 (-)], CD90 [%97 (+)] ve CD106 [%30 (+)] olarak tanımlandı.

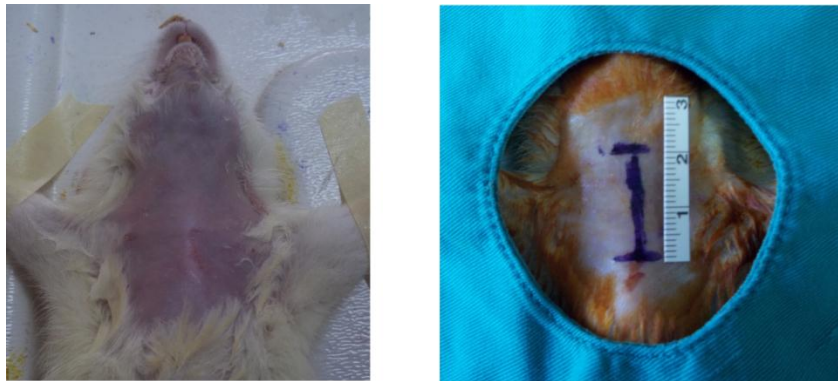
3.2. Deney hayvanlarının hazırlanması

Bu çalışmada araştırma için kullanılacak olan Spraque-dawley ırkı, yaklaşık 300-350 gr ağırlığında dişi ratlar Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma laboratuvarı'ndan temin edildi. Yine aynı laboratuvarında cerrahi işlem uygulanması ve cerrahi işlem sonrası rat bakımı yapıldı.

3.3. Deneyin uygulanması

3.3.1. Cerrahi işlem öncesi hazırlık

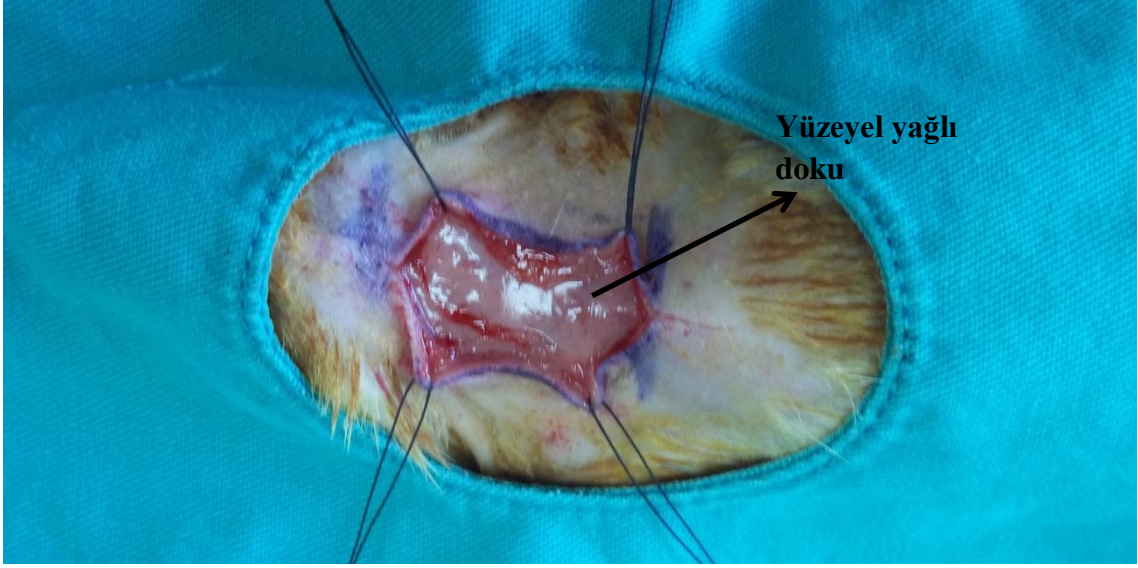
Deney hayvanları 12 kontrol ve 12 deney gurubu olarak ayrıldı. Yapılacak olan cerrahi işlem öncesi antibiyotik profilaksisi amacıyla ratlara 10 mg/kg sefazolin sodyum intramüsküler (i.m.) olarak uygulandı. Preoperatif anestezi amacıyla ratlara 50-150 mg/kg dozunda ketamin ve 5-10 mg/kg dozunda xylozine intraperitoneal (i.p.) uygulandı (12). Preoperatif anesteziyi takiben ratlar cerrahi masada supine pozisyon verilerek her bir ekstremitesi ve üst çene yapışkan bantlar kullanılarak uygun şekilde tespit edildi. Cerrahi alan temizliğini takiben povidin iyot (%10) solüsyonu kullanılarak cilt antisepsisi sağlandı (Şekil 9).



Şekil 9: Cerrahi alan da cilt temizliği ve cerrahi alan antisepsisi

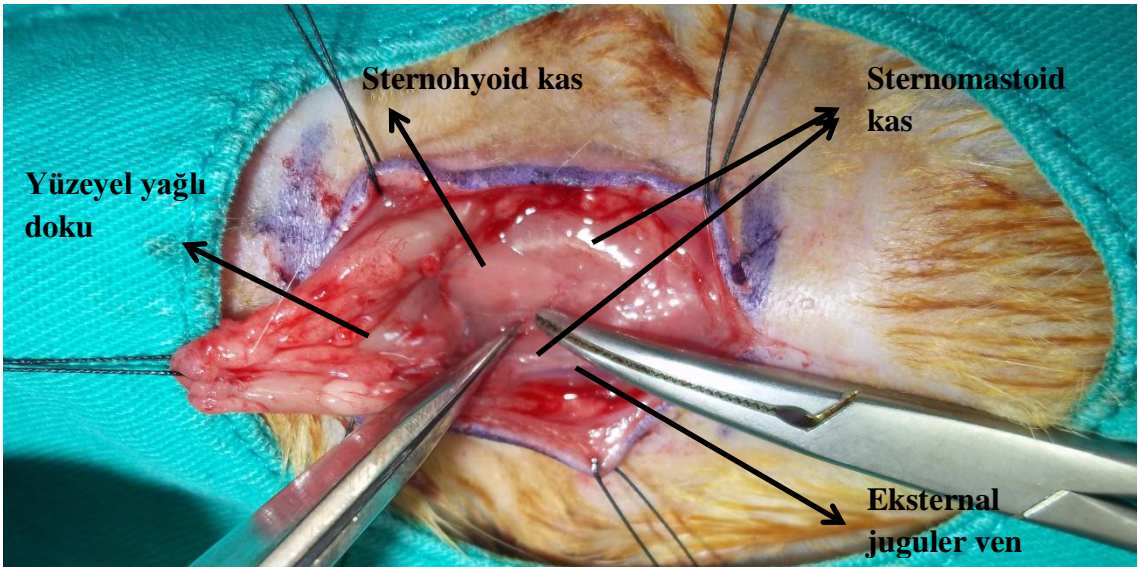
3.3.2. Cerrahi işlem

Cerrahi masada tespit edilen ratlarda cilt antisepsisini takiben alt çeneden manubrium'a uzanan orta hat insizyonu 15 no'lu bisturi yardımıyla cilt-cilt altı geçilerek yapıldı. Cilt ve cilt altı doku 3/0 ipek sütürler kullanılarak asıldı ve cerrahi alan ortaya kondu (Şekil 10).



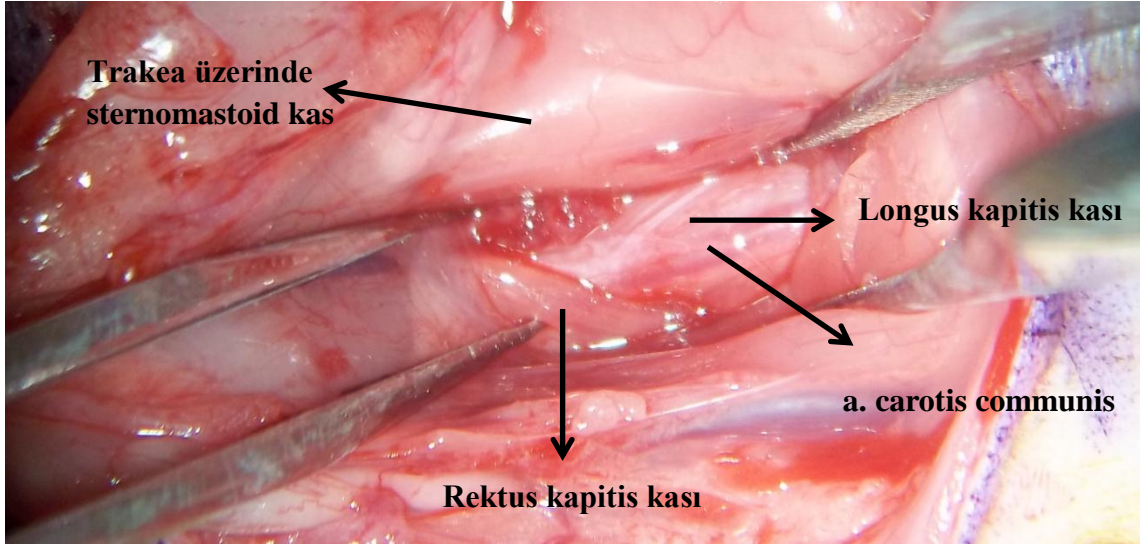
Şekil 10: Cilt insizyonu ve cilt-cilt altı dokunun ekartasyonu

Hemostaz sağlandıktan sonra yüzeyel yağlı doku uzaklaştırıldı. Her iki diğastrik kas arasından künt diseksiyonla ilerlendi (Şekil 11).



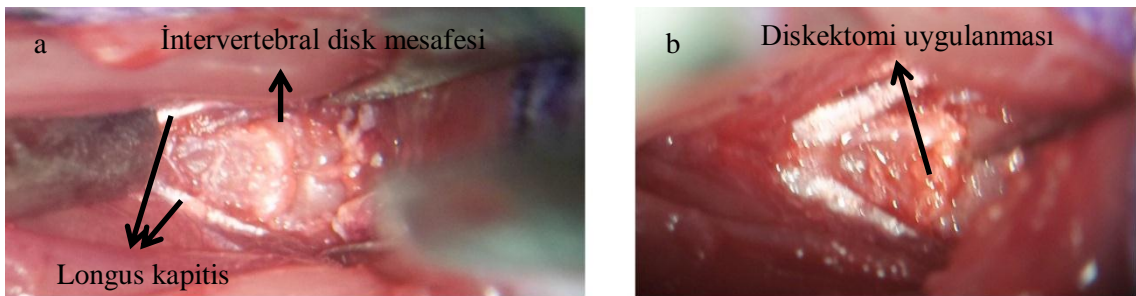
Şekil 11: Yüzeyel yağlı dokunun uzaklaştırılması ve yüzeyel kas yapıları

Sternomastoid kas ve sternohyoid kas arasından künt diseksiyonla ilerlenerek trakea ortaya kondu. Trakea ve özofagus medialde, arteria (a.) karotis kommunis ve nervus (n.) vagus lateralde kalacak şekilde ekarte edilerek musculus (m.) longus capitis'ler ortaya kondu (Şekil 12).



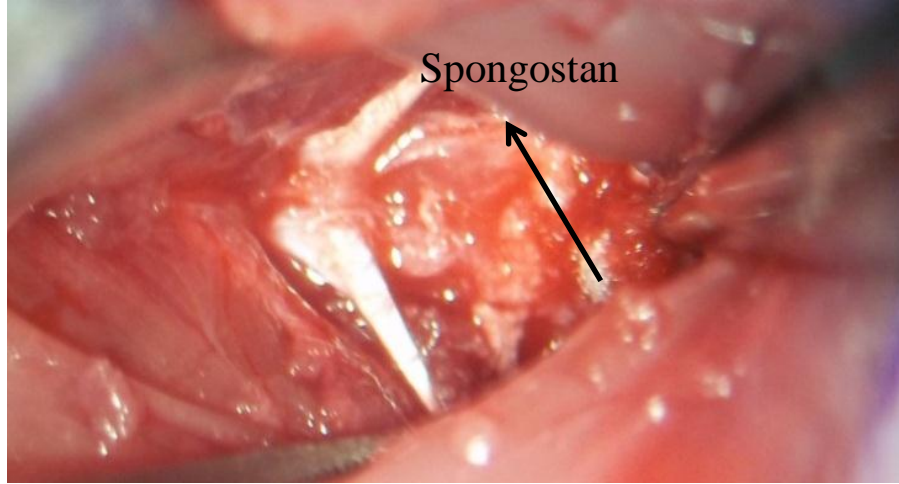
Şekil 12: Adele diseksiyonu sonrası derin kas yapıları

Her iki m. Longus capitis'ler arasından servikal vertebra korpus anterior'una ulaşıldı (Şekil 13 a). Disk mesafesi tespit edildikten sonra bir üst vertebra korpus anterior inferioruna yapışan ligamentler ve anterior longitudinal ligament mikromakas yardımıyla kesildi. 26 G iğne keskin ucu yardımıyla mikroskop eşliğinde diskektomi uygulanarak servikal anterior diskektomi yapıldı (Şekil 13 b).



Şekil 13: a. Servikal anterior intervertebral disk mesafesi, b. Diskektomi uygulanması

Kontrol grubunda intervertebral disk mesafesine spongostan bırakıldı (Şekil 14). Cerrahi alan hemostazı sağlandıktan sonra cilt 2/0 ipek suture ile suture edildi (Şekil 15). İşlem sonrasında cerrahi alana neo caf antibakteriyel topikal sprey uygulandı.



Şekil 14: Diskektomi yapılan sahaya spongostan konulması

Deney grubunda ise intervertebral disk mesafesine spongostan'a emdirilmiş 3×10^6 adet MKH bırakılıp üzeri bone-wax ile kapatıldı. Cerrahi alan hemostazı sağlandıktan sonra cilt 2/0 ipek suture ile suture edildi (Şekil 15). İşlem sonrasında cerrahi alana neo caf antibakteriyel topikal sprey uygulandı. Ratlar anesteziden çıkana kadar ayrı kafeslerde takip edildi. Hareketleri normale dönen ratlar 4'erli gruplar halinde kafeslerde takibe alındı.



Şekil 15: 2/0 ipek suture ile cilt sutureasyonu

3.3.3. Cerrahi işlem sonrası bakım ve gözlem

Cerrahi işlem sonrasında ratlar, kontrol ve deney grupları farklı kafeslerde olacak şekilde dört'lü gruplar halinde takip edildi. Cerrahi işlem sonrasında post-operatif analjezi amacıyla ratlara üç gün boyunca içme suyunun her ml'sinde 2 mg parasetamol olacak şekilde analjezi uygulandı.

Ratlar cerrahi işlem sonrası erken dönemde kanama, aspirasyon sonrası solunum yetmezliği, paralizisi açısından takip edildi. Cerrahi işlem sonrasında cerrahi alanda kanama olmadı. Kontrol grubunda iki, deney grubunda bir ratda aspirasyon sonrası solunum sıkıntısı gelişti. Derin trakeal aspirasyon sonrası ratların solunumunun düzenli olduğu görüldü.

İşlem sonrası ratlar günde bir defa davranış, aktivite ve postür kontrolü, günlük gıda ve su tüketimi ve cerrahi işlem yapılan bölgede akıntı, kızarıklık ve şişme gibi enfeksiyon veya enflamasyon belirtileri izlendi. Yapılan izlemde ratlarda davranış değişikliği, aktivitede azalma, postür değişikliği saptanmadı. Yara yeri enfeksiyonu gelişmedi.

3.3.4. Deneyin sonlandırılması

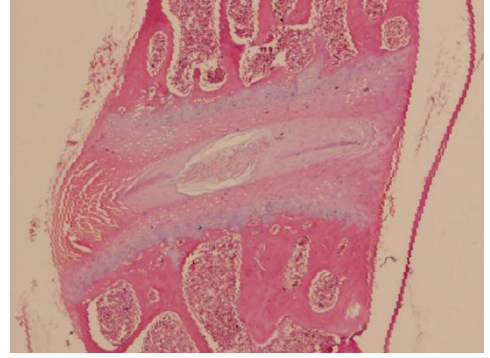
Cerrahi işlem sonrası sekiz hafta takip edilen 24 adet rat, eter ile derin anesteziyi takiben dekapite edildi. Dekapite edilen ratların servikal vertebraları C2-T1 seviyesini içerecek şekilde, mikrodiseksiyonla çevre yumuşak dokulardan arındırılarak histopatolojik inceleme için %10'luk formolin solüsyonuna konuldu.

3.4. Histopatolojik işlemler

Histopatolojik inceleme için patoloji bölümüne götürülen servikal vertebralar kemik yapıyı dekalsifiye etmek amacıyla %10'luk nitrik asit içinde 21 gün bekletildi. Dekalsifiye olan servikal vertebralar sagittal planda ve orta hattan geçecek şekilde longitudinal kesi ile iki eş parçaya ayrıldı (Şekil 16). Kesitler histopatolojik inceleme için parafin bloklandı. Beş mikron aralıkla alınan kesitler hematoxilen eozin ile boyanarak incelendi (Şekil 17).



Şekil 16: Dekalsifikasyon sonrasında longitudinal kesi ile elde edilen spesmen. Siyah ok diskektomi yapılan disk mesafesini gösteriyor.



Şekil 17: Normal intervertebral diskin histolojik incelenmesi, (x40 hematoxilen eozin).

Spesmenlerin histopatolojik incelemesinde kifoz, angulasyon ve füzyon izlenmedi. İntervertebral disk kesitleri hematoxilen eozin ile boyandıktan sonra sagittal planda intervertebral diski oluşturan nükleus pulpozus ve anulus fibrozus, kartilaj son plak ve anterior longitudinal ligamenti içeren kesitler mikroskopla x40 ve x100 büyütmelemlerde incelendi (Şekil 18-22).

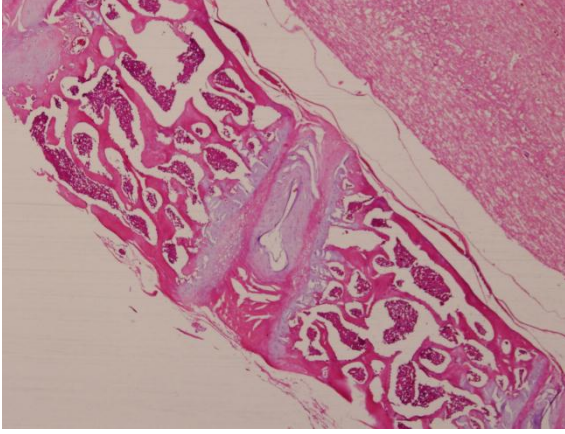
Histopatolojik inceleme tamamladıktan sonra elde kalan spesmenlerden kök hücre uygulanan Gruba ait dokuz adet spesmen genetik araştırma için ayrıldı.

Histopatolojik incelemede aşağıdaki değerlendirme skalası kullanıldı.

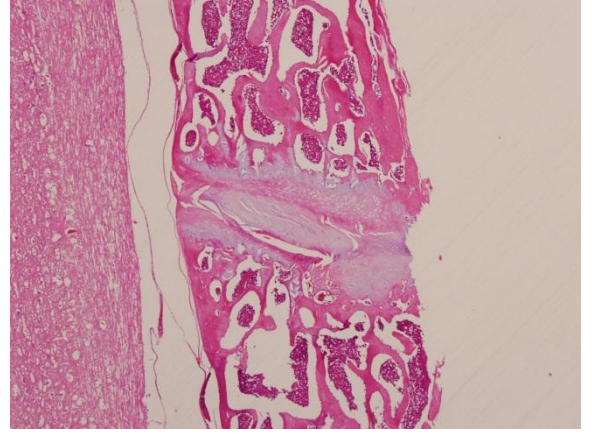
- Mezenkimal kık hücre uygulandı mı?
 0. Uygulanmadı
 1. Uygulandı
- Anterior longitudinal ligamentde rejenerasyonun değerlendirilmesi
 0. Teknik nedenlerle değerlendirilemedi
 1. Fibrotik bağ doku
 2. Düzensiz bağ doku
 3. Düzenli bağ doku
- Anulus fibrozusda rejenerasyonun değerlendirilmesi
 0. Teknik nedenlerle değerlendirilemedi
 1. Düzensiz fibrokartilaj yapı nedeniyle kollaps gelişmiş
 2. Fibrokartilaj lamel yapısı kısmen bozulmuş
 3. Fibrokartilaj lamel yapısını korumuş
- Nükleus pulpozusda rejenerasyonun değerlendirilmesi
 0. Teknik nedenlerle değerlendirilemedi
 1. Hiposelüler fibrokartilajınöz yapı
 2. Vakuolüze hücrelerde azalma, kondrosit benzeri hücrelerde artma
 3. Vakuolüze hücrelerde artma, kondrosit benzeri hücrelerde azalma
- Kartilaj son plakda rejenerasyonun değerlendirilmesi
 0. Teknik nedenlerle değerlendirilemedi
 1. Enkondral ossifikasyon
 2. Kartilajınöz osteofit
 3. Hyalen kıkırdak yapısı korunmuş.

Tablo 1: Deney sonrasında ratlardan alınan spesmenlerin histopatolojik değerlendirme tablosu

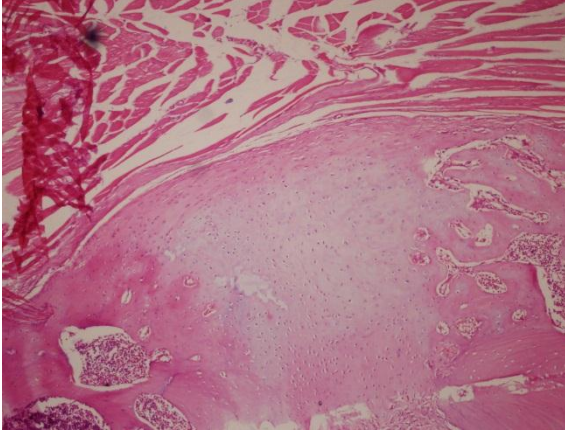
Rat no	Meznkimal Kök Hücre uygulandı mı?	Anterior longitudinal ligamentde rejenerasyonun değerlendirilmesi	Anulus fibrozus rejenerasyonun değerlendirilmesi	Nükleus pulposusda rejenerasyonun değerlendirilmesi	Kartilaj son plak rejenerasyonun değerlendirilmesi
1	0	0	1	2	2
2	0	1	1	2	2
3	0	0	1	2	2
4	0	0	1	2	2
5	0	2	2	2	2
6	0	1	1	2	2
7	0	1	1	2	2
8	0	3	2	2	2
9	0	0	1	2	2
10	0	2	1	2	2
11	0	0	0	0	2
12	0	1	1	2	2
13	1	1	1	2	3
14	1	1	1	2	2
15	1	3	2	2	2
16	1	2	1	2	1
17	1	2	0	2	0
18	1	2	3	2	2
19	1	2	1	2	2
20	1	3	3	2	3
21	1	2	3	2	2
22	1	1	3	2	3
23	1	0	3	2	3
24	1	2	3	2	3



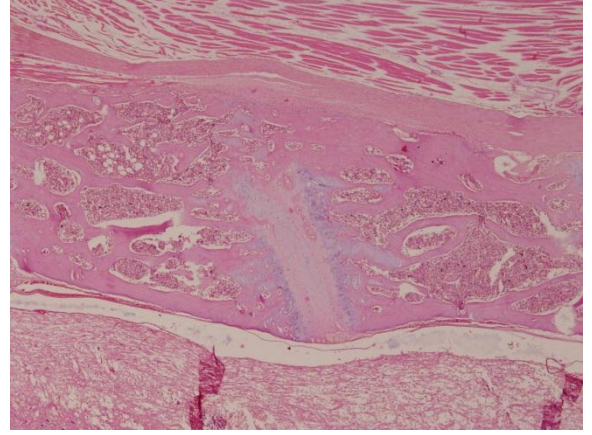
Şekil 18: Normal intervertebral diskin histopatolojik incelenmesi, (x40 hematoksilen eozin).



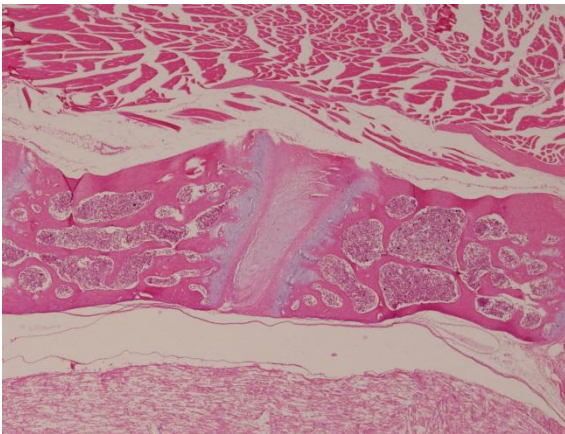
Şekil 19: Deney grubunda intervertebral diskin incelenmesi; nükleus pulposus da kondrosit benzeri hücrelerde artma, son plakda kartilajinöz ossifikasyon izlenmekte, (x40 hematoksilen eozin).



Şekil 20: Son plakda kartilajinöz ossifikasyon, anterior longitudinal ligaman düzensiz bağ doku olarak izlenmekte, (x100 hematoksilen eozin).



Şekil 21: Son plakta osseöz ossifikasyon, nükleus pulposusda kondrosit benzeri hücrelerde artma, anulus fibrozusda fibrotik değişiklikler ve anterior longitudinal ligamentde düzensiz bağ dokusu yapısı izlenmekte, (x40 hematoksilen eozin).



Şekil 22: Son plakda hyalen kıkıdak yapısı korunmuş, nükleus pulposusda kondrosit benzeri hücrelerde artma, anulus fibrozuda düzenli lameller yapının korunduğu izlenmekte, (x40 hematoksilen eozin).

4. BULGULAR

Araştırmadan elde edilen veriler (Tablo 1) SPSS 16.0 paket program kullanılarak, bilgisayarda analiz edilmiştir. Kök hücre uygulanan ve kök hücre uygulanmayan gruplarda anterior longitudinal ligament, anulus fibrozus, nükleus pulpozus ve kartilaj son plak rejenerasyonu ki kare testi ile değerlendirildi. Kullanılan ki kare testi için anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

Anterior longitudinal ligament rejenerasyonunun, kök hücre uygulanan grup ile kök hücre uygulanmayan grup arasında ki kare testi değerlendirmesinde $p>0,05$ hesaplandığından, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 2).

Tablo 2: Anterior longitudinal ligament de rejenerasyonun değerlendirilmesi*

	Teknik nedenlerle değerlendirilemedi	Fibrotik bağ doku	Düzensiz bağ doku	Düzenli bağ doku
Kök hücre uygulanmayan	5	4	2	1
Kök hücre uygulanan	1	3	6	2

* Tablo 2 için $\chi^2=5.14$, $sd=3$, $p=0.162$ olarak hesaplanmıştır.

Kartilaj son plakın değerlendirilmesinde kök hücre uygulanan ratların 5'inde hyalen kıkırdak yapısı korunmuşken, kök hücre uygulanmayan grupta hyalen kıkırdak yapısı korunmamıştır. İki grup arasında hyalan kıkırdak yapısının korunması, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 3).

Tablo 3: Kartilaj son plak rejenerasyonun değerlendirilmesi*

	Teknik nedenlerle değerlendirilemedi	Enkondral ossifikasyon	Kartilajinöz osteofitler	Hyalen kıkırdak korunmuş
Kök hücre uygulanmayan	0	0	12	0
Kök hücre uygulanan	1	1	5	5

* Tablo 3 için $\chi^2=9.882$, $sd=3$, $p=0.020$ olarak hesaplanmıştır.

Anulus fibrozus rejenerasyonunun değerlendirmesinde; kök hücre uygulanan ratların 6'sında fibrokartilaj lamel yapının korunması, $p<0,05$ olduğundan kök hücre uygulanmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Fibrokartilaj lamel yapının bozulması ve fibrokartilaj lamel yapısının kısmen bozulması değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. (Tablo 4).

Tablo 4: Anulus fibrozus da rejenerasyonun değerlendirilmesi*

	Teknik nedenlerle değerlendirilemedi	Fibrokartilaj lamel yapısı bozulmuştur	Fibrokartilaj lamel yapısı kısmen bozulmuştur	Fibrokartilaj lamel yapısı korunmuştur
Kök hücre uygulanmayan	1	9	2	0
Kök hücre uygulanan	1	4	1	6

*Tablo 4 için $\chi^2=8.26$, $sd=3$, $p=0.041$ olarak hesaplanmıştır.

Nükleus pulpozus rejenerasyonunun, kök hücre uygulanan grup ile kök hücre uygulanmayan grup arasındaki ki kare testi değerlendirmesinde $p>0,05$ hesaplandığından, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 5).

Tablo 5: Nükleus pulpozus da rejenerasyonun değerlendirilmesi*

	Teknik nedenlerle değerlendirilemedi	Hiposelüler fibrokartilajınz yapı	Vakuolüze hücrelerde azalma, kondrositlerde artma	Vakuolüze hücrelerde artma, kondrositlerde azalma
Kök hücre uygulanmayan	1	0	11	0
Kök hücre uygulanan	0	0	12	0

*Tablo 5 için $\chi^2=1.04$, $sd=1$, $p=0.307$ olarak hesaplanmıştır.

5. TARTIŞMA

Dejeneratif spinal hastalıklar sadece ağrı nedeni olmayıp aynı zamanda üretkenliği ve buna bağlı olarak ekonomiyi etkileyen mesleki hastalıklardır (13, 14). İntervertebral disk hastalıkları dejeneratif spinal hastalıkların majör nedeni olarak görülse de yaş, travma, genetik yatkınlık ve yaşam tarzı (obezite, sigara, iş) gibi faktörler de dejenerasyonda etkilidir (15-17).

İntervertebral disk dejenerasyonu'nun geri dönüşümsüz ve progresif bir hastalık olduğu düşünülse de çeşitli güncel tedavilerle dejenere disklerin onarımı ve rejenerasyonu sağlanmaya çalışılmaktadır. Deneysel intervertebral disk dejenerasyonu modellerinde çalışılan rejeneratif tıp teknikleri arasında sitokin ve büyüme faktörlerinin disk içine enjeksiyonu (18-22), intervertebral disk hücrelerine gen transferi (23-25), yapay intervertebral disk üretimini içeren doku mühendisliği yöntemleri (26) ve hücre transplantasyonu (27-30) bulunmaktadır.

Son dönemlerde moleküler biyoloji ve rejeneratif tıptaki gelişmeler mezenkimal kök hücrelere dikkati çekmiştir. Çünkü bu immatür hücreler pluripotenttir; kemiğe, kıkırdağa veya kullanım amacına göre yağ hücrelerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptirler. Farklılaşmamış mezenkimal kök hücreler immün sistem tarafından tanınmadığından immün yanıtı neden olmazlar. Bu nedenle otolog mezenkimal kök hücre transplantasyonları çeşitli hastalıklarda önemli tedavi yöntemlerinden biri haline gelmiştir (31, 32).

Mezenkimal kök hücreler, kolay elde edilebilmesi, ekstrakorporal izolasyonunun olması ve kolay kültüre edilebilmeleri nedeniyle klinik uygulamalarda tercih edilmektedir. İntervertebral disk mesafesine mezenkimal kök hücre transplantasyonunu gösteren çok sayıda çalışma vardır. Bunlardan bir tanesi de Sakai ve arkadaşlarının tavşan intervertebral disk modelinde otolog mezenkimal kök hücre transplantasyonu yaptıkları çalışmadır (27). Bu çalışmada radyolojik, histopatolojik ve biyokimyasal parametreler kullanılarak, mezenkimal kök hücrenin intervertebral disk dejenerasyonunu suprese ettiği gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada mezenkimal kök hücrelerin, nükleus pulpozus hücrelerine farklılaştığı gösterilmiştir.

Yapılan hayvan çalışmalarında disk dejenerasyon derecesi, diskin restorasyonu histolojik/immünkimyasal olarak sıklıkla araştırılmıştır. Bazı çalışmalarda intervertebral disk mesafelerine mezenkimal kök hücre uygulanmasının ekstraselüler anulus fibrozus matriks sentezini artırdığı ve disk yüksekliğini artırdığı saptanmıştır (29,33). Li ve arkadaşları da mezenkimal kök hücrelerin vücuttaki kök hücreleri stimüle ederek hedef dokuya dönüşümlerini sağladığını gözlemlemiştir (34).

Literatüre bakıldığında disk dejenerasyonu ile ilgili olarak anulus fibrozus'un yapısı, nükleus pulpozus'un yapısı son plak dejenerasyonu gibi parametrelere bakılmıştır (35,36).

Masuda ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ratlarda lomber intervertebral disklerde, 16, 18 ve 21 Gauge (G) iğne ile disk hasarı oluşturulmuş. 16 G iğne ile disk hasarı oluşturulan grupta disk dejenerasyonunun daha ağır olduğu gözlenmiş. Bu çalışmada oluşturulan disk hasarı ile disk dejenerasyonu arasında korelasyon olduğu saptanmış (35). Bu nedenle çalışmamızda disk dejenerasyon modeli olarak daha fazla disk hasarı oluşturabilmek amacıyla mikroskop eşliğinde 26 G iğne kullanılarak anterior diskektomi yapılarak intervertebral disk dejenerasyonu oluşturmayı tercih ettik.

Çalışmamızda disk dejenerasyon modellemeleri ve kök hücre uygulamaları ile ilgili bahsedilen çalışmalar baz alınarak ratlarda servikal disk dejenerasyon modeli oluşturuldu. Tüm deneklerde 26 G iğne yardımıyla anterior servikal diskektomi uygulandı. Denekler iki gruba ayrıldı; birinci grup kontrol grubu olarak takip edildi. İkinci grupta disk mesafesine mezenkimal kök hücre uygulandı. Deneyden sekiz hafta sonra tüm deneklerden alınan servikal vertebral histopatolojik olarak incelendi. Servikal vertebralarda kifoz, angulasyon ve füzyon oluşmadığından değerlendirme yapılmadı. Nükleus pulpozus, anulus fibrozus, kartilaj son plak ve anterior longitudinal ligamentte rejenerasyon değerlendirildi.

Histopatolojik olarak değerlendirdiğimiz ilk iki parametre anulus fibrozus ve nükleus pulpozus idi. Histolojik gradeleme yapılırken Masuda ve arkadaşlarının literatürdeki disk dejenerasyon çalışmalarını baz alarak oluşturduğu gradeleme skalası kullanıldı (35). Anulus fibrozus yapısı 3 grupta değerlendirildi. Anulus fibrozus; fibrokartilaj lamel yapısını korumuş, fibrokartilaj lamel yapısı kısmen bozulmuş ve

düzensiz fibrokartilaj yapı nedeniyle kollaps gelişmiş olmak üzere üç histopatolojik tipte incelendi. Buna göre bizim çalışmamızda kök hücre uygulanan grupta deneklerin %50'sinde (6 adet rat) anulus fibrozusun düzenli fibrokartilaj yapısının korunduğu, kök hücre uygulanmayan grupta ise bu etkinin gözlemlenmediği görüldü. Bu değerler ki kare testi ile değerlendirildiğinde $p < 0.05$ olarak hesaplandığından anulus fibrozus rejenerasyonunda mezenkimal kök hücrenin olumlu katkı yaptığı gözlemlendi.

Nükleus pulpozus dejenerasyonunun değerlendirilmesinde Sobajima ve arkadaşlarının literatürdeki disk dejenerasyon çalışmalarını baz alarak oluşturduğu gradeleme skalası kullanıldı (37), Nükleus pulpozus; büyük vakuolüze hücreler ve küçük kondrosit benzeri hücrelerin varlığı, vakuolüze hücrelerde azalma ve kondrosit benzeri hücrelerde artma ve hiposelüler fibrokartilajinöz yapı olmak üzere üç histopatolojik tipte incelendi. Buna göre bizim çalışmamızda kök hücre uygulanan grupta deneklerin %100'ünde (12 adet rat), kök hücre uygulanmayan grupta deneklerin %91,7'sinde (11 adet rat) nükleus pulpozusun değerlendirilmesinde vakuolüze hücrelerde azalma, kondrosit benzeri hücrelerde artma izlendi. Bu değerler ki kare testi ile değerlendirildiğinde $p > 0,05$ olarak hesaplandığından mezenkimal kök hücre uygulanmasının nükleus pulpozus rejenerasyonunda anlamlı katkısı olmadığı gözlemlendi.

Kartilaj son plağın histopatolojik değerlendirilmesinde Sobajima ve arkadaşlarının literatürdeki disk dejenerasyon çalışmalarını baz alarak oluşturduğu gradeleme skalası kullanıldı (37), kartilaj son plak; hyalen kırıkdağ, kartilajinöz osteofit oluşumu ve enkondral ossifikasyon oluşumu olmak üzere üç histopatolojik tipte değerlendirildi. Buna göre bizim çalışmamızda kök hücre uygulanan grupta deneklerin %41,7'sinde kartilaj son plakta hyalen kırıkdağın korunmuş olduğu, kök hücre uygulanmayan grupta ise kartilaj son plakta hyalen kırıkdağın korunmadığı, kök hücre uygulanmayan grupta deneklerin %100'ünde kartilajinöz osteofit oluşumu izlenmiştir. Bu değerler ki kare testi ile değerlendirildiğinde $p < 0,05$ olarak hesaplandığından mezenkimal kök hücre uygulanmasının kartilaj son plak rejenerasyonda anlamlı katkısının olduğu gözlemlendi.

Anterior longitudinal ligamentin değerlendirilmesi; düzenli bağ doku, düzensiz bağ doku ve fibrotik bağ doku olmak üzere üç histopatolojik tipte değerlendirildi. Her üç parametrenin değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Kök hücre uygulanan Grupta deneklerin %50'sinde anterior longitudinal ligament düzensiz bağ

doku şeklinde izlenirken kök hücre uygulanmayan Grupta deneklerin %41,7'sinde teknik nedenlerden dolayı anterior longitudinal ligamentin değerlendirilemediği görüldü. Elde edilen veriler ki kare testi ile değerlendirildiğinde $p>0,05$ olarak hesaplandığından mezenkimal kök hücre uygulanmasının anterior longitudinal ligament rejenerasyonunda anlamlı etkisinin olmadığı gözlemlendi.

Kök hücrelerin terapötik etkinlikleri çeşitli in vivo çalışmalarda araştırılmıştır. Muhtemelen mezenkimal kök hücrelerin rejeneratif potansiyelleri mezenkimal kök hücre ile nükleus pulpozus hücrelerinin etkileşimi nedeniyle artan ekstraselüler matriks protein sentezine bağlıdır. Sobajima ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarında da (38) mezenkimal kök hücre ve nükleus pulpozus hücrelerinin birlikte kullanımında da sinerjistik etkiden dolayı proteoglikan sentezinde ve glukozaminoglikan içeriğinde artış olduğu saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da servikal disk dejenerasyon modelinde disk içine uygulanan mezenkimal kök hücrenin anulus fibrozus ve kartilaj son plakın rejenerasyonuna anlamlı katkı yapmış olduğunun saptanması, kök hücrenin terapötik etkilerinin klinik kullanımına öncülük etmesi açısından cesaret verici olacaktır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde disk rejenerasyonunun değerlendirilmesi ve disk dejenerasyon modelleri arasında oluşturulmuş bir standart yöntem bulunmamaktadır. Disk dejenerasyon modellerinde çoğunlukla lomber intervertebral disk dejenerasyonu kullanılmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada ratlarda servikal intervertebral disk dejenerasyonu, anterior servikal diskektomi yapılarak oluşturulmuş olup bu konuda literatürde yeterince veri bulunmamaktadır. Sonuçlar incelendiğinde mezenkimal kök hücre kullanımının servikal intervertebral disk rejenerasyonunda da önemli katkılarının olabileceği görülmektedir. Ancak bu konuda daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için yöntem standardizasyonu ile birlikte çok sayıda deneysel çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

- ✓ Anterior servikal intervertebral diskektomi ile disk dejenerasyon modelinde mezenkimal kök hücre uygulanmasının anulus fibrozus ve kartilaj son plak rejenerasyonunda anlamlı olarak daha iyi olduğu görülmüştür.
- ✓ Kesin sonuçlar elde edebilmek için daha fazla deneysel çalışmaya ihtiyaç vardır.
- ✓ Ratlarda servikal intervertebral disk dejenerasyon modeli olarak literatürde yeterli çalışma olmadığından servikal intervertebral disk dejenerasyon modelinin geliştirilmesi gerekmektedir.
- ✓ Servikal intervertebral disk dejenerasyonunun değerlendirilmesinde Histopatolojik değerlendirme ile birlikte radyolojik yöntemlerden de faydalanılması ve izlem süresinin daha uzun tutulması ile birlikte daha kesin sonuçlar elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Aydın, Y, Çavuşoğlu H. Sevikal Disk Hernisi (içinde) TND Temel Nöroşirürji Kitabı Cilt II (Editörler E. Korfalı, M. Zileli), ISBN:978-605-4149-04-9.2010, Buluş Tasarım ve Matbaacılık Hizmetleri, Ankara, S: 1461.
2. Çetinkaya DU. Mezenkimal Kök Hücreler (içinde) Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, ISBN: 978-9944-252-29-4, 2009, Yalçın Matbaacılık, Ankara, S: 53-62.
3. Çetinkaya DU. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı (içinde) Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, ISBN: 978-9944-252-29-4, 2009, Yalçın Matbaacılık, Ankara, S: 99-103.
4. Kuhlendahl H, Richter H. Morphologie und Funktionelle Pathologie der Lendenbandscheiben. Langenbecks Arch. Klin. Chir. 272 (579), 1952.
5. Snell RS. Sırt (içinde) Klinik Anatomi (Editör M. Yıldırım), ISBN: 975-411-120-0, 1998, Nobel & Yüce, İstanbul, S: 828-830.
6. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Kıkırdak (içinde) Temel Histoloji (Editör Y. Aytekin), ISBN: 975-95331-2-X, 1998, Barış Kitapçılık, İstanbul, S: 130-131.
7. Sadler TW, İskelet Sistemi (Kafatası, Ekstremiteler, Vertebral kolon, Göğüs kafesi) (içinde) Langman's Medikal Embriyoloji (Editör A. C. Başkalar), ISBN: 975-7477-28-1, 1996, Özkan Matbaacılık San. Tic. Ltd Şti. Ankara, S: 153-154.
8. Schmorl G, Junghans H. Die gesunde und die kranke Wirbelsäule in Röntgenbild und Klinik, 5. Aufl. Thieme, Stuttgart 1968.
9. Robertson JT. Anterior removal of cervical disc without fusion. Clin Neurosurg 20: 259-261, 1973.

10. Can A. Kök hücre tanımları (içinde) Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, ISBN: 978-9944-252-29-4, 2009, Yalçın Matbaacılık, Ankara, S: 15-22.
11. Bayramiçli M. Biyolojik Özellikler ve Bakım Koşulları (içinde) Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri ISBN: 975-596-021-X, 2005, A4 Ofset Matbaacılık, İstanbul, S: 101-102.
12. Eroğlu F, Eroğlu HE. Ratlarda Analjezi ve Anestezi (içinde) Küçük Deney Hayvanlarından Rat (Editör O. Yücel, O. Genç).
13. Andersson GB, Lucente T, Davis AM, et al. A comparison of osteopathic spinal manipulation with standard care for patients with low back pain. *N Engl J Med* 341: 1426–1431, 1999.
14. Borenstein D. Epidemiology, etiology, diagnostic evaluation, and treatment of low back pain. *Curr Opin Rheumatol* 4: 226–232, 1992.
15. Gruber HE, Hanley EN Jr. Ultrastructure of the human intervertebral disc during aging and degeneration: comparison of surgical and control specimens. *Spine* 27: 798–805, 2002.
16. Luoma K, Riihimaki H, Luukkonen R, et al. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine* 25: 487–492, 2000.
17. Luoma K, Vehmas T, Raininko R, et al. Lumbosacral transitional vertebra: relation to disc degeneration and low back pain. *Spine* 29: 200–205, 2004.
18. Masuda K, An HS. Growth factors and the intervertebral disc. *Spine J* 6: 330–340, 2004.
19. Masuda K, An HS. Prevention of disc degeneration with growth factors. *Eur Spine J* 3: 422–432, 2006.

20. Masuda K, Imai Y, Okuma M, et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model. *Spine* 31: 742–754, 2006.
21. Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* 16: 253–260, 1991.
22. Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of egenerated intervertebral disc. *Spine* 29: 156–163, 2004.
23. Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease. *Spine* 28: 755–763, 2003.
24. Nishida K, Kang JD, Suh JK, et al. Adenovirus mediated gene transfer to nukleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine*, 23: 2437–2442, 1998.
25. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine*, 24: 2419–2425, 1999.
26. Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissueengineering method. *Spine* 28: 548–553, 2003.
27. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 24: 3531–3541, 2003.
28. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 30: 2379–2387, 2005.

29. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 27: 335–345, 2005.
30. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res* 26: 589–600, 2008.
31. Okano H. Stem cell biology of the central nervous system. *J Neurosci Res* 15: 698–707, 2002.
32. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641–650, 1991.
33. Le Visage C, Kim SW, Tateno K, Et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis. *Spine (Phila Pa 1976)* 31: 2036–2042, 2006.
34. Li Y, Chen J, Chen XG, Et al. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* 59: 514–523, 2002.
35. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an annulus needle puncture: correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration, *Spine* 1: 5-14, 2004.
36. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, et al. Classification of Age-Related changes in lumbar intervertebral discs, *Spine* 23: 2631-2644, 2002.
37. Sobajima S, Kompel JF, Kim JS, et al. A slowly progressive and reproducible animal model of intervertebral disc degeneration characterized by MRI, X-Ray and Histology. *Spine* 1: 15-24, 2004.
38. Sabojima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *The Spine Journal* 6: 888-896, 2008.

39. Le Maitre CL, Baird P, Freemont AJ, Hoyland JA. An in vitro study investigating the survival and phenotype of mesenchymal stem cells following injection into nükleus pulposus tissue. *Arthritis Research & Therapy* 1: 1-10, 2009.
40. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model. *Spine* 21: 2379-2387, 2005.
41. Vadala G, Denaro V, Kang JD. Stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine*, www.touchbriefings.com/pdf/3340/kang.pdf, 27.03.2011.
42. Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, Meisel HJ. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. *Eur Spine J* 4: 492-503, 2008.
43. Koç K. Servikal Dejeneratif Disk Hastalığı ve st Ekstremitte Tuzak Nropatileri. 1 baskı. Ankara. Buluş Tasarım ve Matbaacılık Hizmetleri San. Tic. 2009.
44. Taşkın Y. Servikal Disk Hastalığı.: Aksoy k. Temel Nöroşirürji, 1. Baskı. Ankara, Papyrus Tasarım Dizgi ve Bilgisayar Hizmetleri, 2005: 1044-1047.
45. Barry FP. Biology and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells. *Birth Defects Research* 69: 250-256, 2003.
46. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med.* 6: 507-520, 2001.
47. Leung VYL, Chan D, Cheung KMC. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. *Eur Spine J* 3: 406-413, 2006.
48. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 27: 335-345, 2006.

49. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* 24: 3531-3541, 2003.
50. Korecki CL, Taboas JM, Tuan RS, Iatridis JC. Notochordal cell conditioned medium stimulates mesenchymal stem cell differentiation toward a young nucleus pulposus phenotype. *Stem Cell Research & Therapy* 1;18, 2010 (<http://stemcellres.com/content/1/2/18>)
51. Serigano K, Sakai D, Hiyama A, et al. Effect of Cell Number on Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Canine Disc Degeneration Model. *J Orthop Res* 28: 1267-1275, 2010.