



ACIBADEM
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TENDON KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İLE YAĞ
DOKU KÖKENLİ KÖK HÜCRENİN, HÜCRELERİNDEN
ARINDIRILMIŞ AMNİYOTİK MEMBRAN İLE
KULLANILMASININ TENDON İYİLEŞMESİ VE
PERİTENDİNÖZ ADEZYONA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hacı Ömer Sağır
TIPTA UZMANLIK TEZİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Halil İbrahim Canter

İSTANBUL, 2015

TEŞEKKÜR

Beş yıllık eğitim maratonumda, eğitimime katkıda bulunarak beni meslek yaşantıma hazırlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ferit DEMİRKAN, Prof. Dr. Şükrü YAZAR, Prof. Dr. Halil İbrahim CANTER, Prof. Dr. Aydın SARAY, Prof. Dr. Cengiz AÇIKEL, Doç. Dr. Mehmet Veli KARAALTIN, Doç. Dr. Çiğdem Ünal, Yrd. Doç. Dr. Berkhan YILMAZ, ve Uzm. Dr. Umut Sinan ERSOY'a, kök hücrelerin hazırlanmasında ve kök hücreler hakkındaki tecrübesini benimle paylaşan Prof. Dr. Ercüment OVALI 'ya,

Tezimin hazırlanmasının her aşamasında desteğini ve bilgisini esirgemeyen Prof. Dr. Halil İbrahim CANTER'e,

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde rotasyonlarım boyunca yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Ethem GÜNEREN, Prof. Dr. Selma Sönmez ERGÜN, ve Yrd. Doç. Dr. Kemalettin Yıldız ve çok değerli asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmasının histolojik değerlendirmelerini yapan Yrd. Doç. Beste KINIKOĞLU ve Öğr. Gör. Gülsün EKİCİOĞLU'a, biyomekanik çalışmaları yapan İTÜ Makina Fakültesi Öğretim Üyesi Dr. Sürreyya ERGÜN BOZDAĞ'a, deney hayvanları laboratuvarında yardımlarını eksik etmeyen Vet. Hekim Mert ÇELİKTEN ve Vet. Teknikeri Nurhayat DÖNEK'e, ve tezimin biyoistatistik analizlerinde bilgisini ve desteğini esirgemeyen Yard. Doç. Dr Erdal COŞGUN'a,

Tezimin yapılması için maddi destek sağlayan Acıbadem Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destek Birimi'ne,

Tezim için bana maddi ve manevi destek veren Sn. Seher AYDINLAR'a

Bugünlere gelmemde yıllardır sarfettikleri emekle benden hiçbir desteği esirgemeyen, her zaman önce iyi bir insan sonra iyi bir doktor olmam gerektiğini bana öğreten değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Hacı Ömer Sağır

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ŞEKİLLER LİSTESİ	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	viii
ÖZET	1
SUMMARY	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Tendon onarımının tarihçesi	7
2.2. İnsanda fleksör tendonların anatomisi ve histolojisi	9
2.3. Parmaklardaki makara (pulley) sistemleri	13
2.4. İnsanda ekstansör tendonların anatomisi	15
2.5. Tendonların kan dolaşımı ve beslenmesi	20
2.6. Tendonların histolojik yapı ve metabolizması	25
2.7. Tendon fizyopatolojisi ve tendonlarda iyileşme sürecinin özellikleri	27
3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HAKKINDA GENEL BİLGİLER ve TIBBİ KULLANIMI	31
3.1. Tanımı	31
3.2. Kök hücre uygulamalarının tarihçesi	33
3.3. Kök hücrelerin özellikleri	35
3.4. Kök hücre kaynakları	37
3.5. Kök hücrelerin kullanım alanları	38
4. TENDON KÖKENLİ KÖK HÜCRE HAKKINDA GENEL BİLGİLER ve TIBBİ KULLANIMI	39
4.1. Tendon kökenli kök hücre (TKKH) izolasyonu ve kültürü	39
4.2. TKKH'nin imminofenotipik profili.....	40
4.3. TKKH'nin niş ortamı	41
4.4. TKKH'nin tenojenik differansiyasyonu	42

5. HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMIŞ AMNİYOTİK

MEMBRAN (HAAM)	43
5.1. HAAM anatomik ve histolojik yapısı	43
5.2. HAAM özellikleri	44
5.2.1. Anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal özellikleri	45
5.2.2. Düşük immünojenite ve mekanik özellikleri	45
5.3. HAAM kullanım alanları	47
6. GEREÇ ve YÖNTEM	48
6.1. Deney grupları	50
6.2. Cerrahi işlemler	50
6.3. Amniyotik membran greftlerinin hücrelerinden ayrılması işlemi	53
6.4. Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (YDKKH) elde edilmesi	54
6.4.1. Donör hayvandan yağ doku alınması	54
6.4.2. Yağ dokudan YDKKH elde etme işlemi ve hücrelerin izolasyonu ..	55
6.5. Tendon dokudan TKKH elde edilmesi	56
6.5.1. Donör hayvandan tendon doku alınması	56
6.5.2. Tendon dokudan TKKH elde etme işlemi ve hücrelerin izolasyonu	57
6.6. Hücrelerin işaretlenmesi	57
6.7. Histolojik değerlendirme	58
6.8. Biyomekanik değerlendirme	59
6.9. İstatistiksel değerlendirme	60
7. BULGULAR	61
7.1. Biyomekanik çalışma bulguları	61
7.2. Histolojik çalışma bulguları	64
8. TARTIŞMA	74
9. SONUÇ	79
11. KAYNAKLAR	80
12. EK 1: ETİK KURUL KARARI	89
13. ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İnsan elinin tendon anatomisi

Şekil 2: Kamper çaprazı (Kiazması)

Şekil 3: Elin intrinsek ve ekstrinsek tendonlarının parmak seviyesinde birbirleriyle ilişkisi

Şekil 4: Başparmak ve diğer parmaklarda fleksör tendon yaralanma bölgeleri

Şekil 5: Parmaklardaki makara (pulley) sistemi

Şekil 6: El bileğinde ekstansör kompartmanlar

Şekil 7: Parmağın ekstansör tendon anatomisi

Şekil 8: Ekstansör tendonların yaralanma bölgeleri

Şekil 9: Fleksör tendonların beslenmesinden sorumlu vinculumlar

Şekil 10: Tendon dikişlerinde olası uygun kavrama noktaları

Şekil 11: Fleksör tendonun beslenmesi

Şekil 12: Tendonun uzunlamasına kesitinde kollajen ve fibroblast dizilimi

Şekil 13: İndüklenmiş pluripotent kök hücrenin farklılaştığı hücreler

Şekil 14: Farklı türlerden ve dokulardan alınmış TKKH'nin farklı morfolojilere sahip olduğunun görüntüsü

Şekil 15: TKKH ile ilgili potansiyel niş faktörleri

Şekil 16: Term zamanında fetal membranın katmanlarının şematik görünümü

Şekil 17: Farklı dokularda amniyotik membranın kullanıldığı insan ve hayvan çalışmaları

Şekil 18: Deney hayvanlarının barınma koşulları ve çalışmanın gerçekleştirildiği Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Denepleri Laboratuvarı

Şekil 19: Ratlarda sağ alt ekstremitenin uygun traş sonrası steril şartlara uygun olarak boyanıp örtülmesi (1. Resim), sağ alt ekstremitte Aşil tendonu 0,5 cm insersiyon proksimalinden transvers tenotomi görüntüsü (2. Resim), kesilen tendon kısmı 5.0 yuvarlak prolen ile Modifiye Kessler tekniği ile onarımı (3. Resim), onarımı sonrası dörtgen flep eski yerine suture edildikten sonraki görünümü (4. Resim)

Şekil 20: 1x1 cm² boyutlarında hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran görünümü (Resim 1), onarılan tendon kısmı 1x1 cm² boyutlarında hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılmış haldeki görünümü (Resim 2), onarılan

tendon kısmın yağ kaynaklı mezenkimal kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılmış haldeki görünümü (Resim 3), cilt sutürasyonu sonrası pansuman yapılmış ve bacağına atele alınmış görünümü (Resim 4)

Şekil 21: Ratlardan yağ doku elde etmek için kasık bölgesinin traş edildikten sonraki görünümü (Resim 1) ve bu bölgeden yapılan insizyon sonrası elde edilen yağ greftinin görünümü (Resim 2). Soldaki resim yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürünün 2. günü, sağdaki resim yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 15. günde flask tabanını kaplaması (Resim 3)

Şekil 22: Ratlarda tendon kaynaklı kök hücre elde edilmesi için sağ Aşil tendonu eksizyon materyalleri

Şekil 23: Trapezium-2 programında elde edilen yük (Force-Newton cinsinden)-yer değiştirme (Stroke, mm cinsinden) eğrisi

Şekil 24: Aşil tendonu mekanik gerim cihazı olan MTS 858 Mini Bionix 2® 'nin 10kN' nin mangelere her iki uçtan tutturularak 1kg/N (1000N) yük hücresi kullanılarak 20mm/dakikalık sabit gerim hızında kopuncaya kadar test edilirkenki görünümü

Şekil 25: Ratlarda Aşil tendonu histolojik kesitlerinde "Qtracker Cell Labeling Kits" ile işaretli kök hücrelerin immünofloresan mikroskopta görünümü. Kök hücrelerin yoğun miktarda olduğu alanlar yeşil renkte görünmekte

Şekil 26: Ratlarda Aşil tendonu histolojik kesitlerinde Hematoksilen Eozin ile boyama sonrası mikroskopta görünümü. 4. ve 5. grupta kollajen sentezi ve fibroblast infiltrasyonu yoğunluğu, tendon onarım sahası kapanma mesafesinin kapandığı dikkati çekmektedir.

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Kullanılan alet ve malzemeler listesi

Tablo 2: Çalışma gurupları

Tablo 3: Aşil tendonu biyomekanik germe testi sonrası elde edilen maksimum kuvvet değerleri

Tablo 4: Aşil tendonu biyomekanik germe testi ile elde edilen maksimum yük değerlerinin istatistiksel analizi

Tablo 5: Aşil tendonu biyomekanik germe testi değerlerinin guruplar arasında farklılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılması

Tablo 6: Aşil tendonu biyomekanik germe testi ile guruplar arasında farklılık olup olmadığının Dunn's ikili karşılaştırma testi ile karşılaştırılması

Tablo 7: Aşil tendonu guruplar arasında histolojik olarak onarılan tendon arası kapanma mesafesi ölçümü (Gap) ve ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanlamaları

Tablo 8: Kruskal Wallis testi ile Aşil tendonunda guruplar arasındaki histolojik açıdan onarılan tendon arası kapanma mesafesi ölçümü (Gap) ve ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanlamaları arasında farklılık olup olmadığının incelenmesi

Tablo 9: Kruskal Wallis testi sonuçlarına göre Aşil tendonlarında guruplar arasındaki histolojik açıdan kapanan mesafe (Gap) ve ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanlamaları arasında biyoistatistik açıdan farklılık olduğunun saptanması

Tablo 10: Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşil tendonunda guruplar arasındaki histolojik açıdan kapanan mesafesinde (Gap) farklılık olup olmadığının incelenmesi

Tablo 11: Kruskal Wallis testi ile Aşil tendonunda, guruplar arasındaki histolojik açıdan kapanma mesafesinin (Gap) C gurubundaki yüksek değer inceleme dışına çıkarılması sonrası istatistiksel olarak farklılık olup olmadığının incelenmesi

Tablo 12: Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşil tendonlarında guruplar arasındaki histolojik açıdan kapanma mesafesinin (Gap) C gurubu yüksek değer inceleme dışına çıkarılması sonrası istatistiksel olarak farklılık olmadığının saptanması

Tablo 13: Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşil tendonunda guruplar arasındaki

histolojik açıdan kollajen yoğunluğu puanları arasında farklılık olup olmadığının incelenmesi

Tablo 14: Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşil tendonunda guruplar arasındaki histolojik açıdan fibroblast infiltrasyonu puanları arasında farklılık olup olmadığının incelenmesi



KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklamalar
EM	Ekstrasellüler Matriks
EmKH	Embriyonik kök hücre
EKH	Erişkin kök hücreler
FDS	Fleksör dijitorum süperfisyalis
FDP	Fleksör dijitorum profundus
HAAM	Hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran
KH	Kök Hücre
MKH	Mezenkimal kök hücre
MMP	Metalloproteyinazlar
TGF- β	Transforme eden büyüme faktörü beta
TKKH	Tendon kökenli kök hücre
YDKMKH	Yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
TGF- β	Transforme eden büyüme faktörü beta
MMP	Metalloproteinazlar

ÖZET

Günümüzde tendon yaralanmaları ile oldukça sık karşılaşılmaktadır. Yaralanan tendon onarımı doğru şekilde yapılırsa dahi karşılaşılan önemli problemler peritendinöz yapışıklık (tendon etrafında yapışıklık) gelişmesi ve tendon iyileşmesindeki gecikmedir. Bu sorunlar çoğu zaman hayat kalitesini etkileyebilecek düzeyde sakatlıklar oluşturabilmektedirler. Son zamanlarda kök hücre tedavisindeki gelişmeler tendon yapışıklıklarını önleyici ve/veya iyileşmesini hızlandırılabilceğini düşündürmüştür. Bu nedenle tendon kökenli mezenkimal kök hücre ile yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrenin, hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile beraber kullanılmasının tendon iyileşmesine ve peritendinöz adezyona etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Her grupta 14 denek olacak şekilde toplam 5 grupta 70 adet dişi Wistar-Albino sıçan kullanıldı. Sıçanların sağ bacaklarındaki aşil tendonu kesilip onarıldıktan sonra 1. grupta tendon onarımı sonrası ek hiçbir işlem uygulanmadı. 2. grupta tendon onarım sahası hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran (HAAM) ile sarıldı. 3. grupta tendon onarım sahası yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (YKMKH) ekilmiş HAAM ile sarıldı. 4. grupta tendon onarım sahası tendon kökenli kök hücre (TKKH) ekilmiş HAAM ile sarıldı. 5. grupta tendon onarım sahası YKMKH ve TKKH ekilmiş HAAM ile sarılarak bütün sıçanlarda cilt primer onarıldı. 1. ayda sıçanlar sakrifiye edilip aşil tendonunun onarım yapılan kısmı biyomekanik ve histopatolojik inceleme için eksize edildi.

Çalışma sonucunda ortaya çıkan biyomekanik ve histolojik veriler birbirleri ile paralellik göstererek en iyi sonuçların tendon kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı grupta olduğunu, bunu sırası ile hibrit kök hücrelerin kullanıldığı grubun ve yağ kökenli mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı grubun takip ettiği gösterildi.

Bu bulgular kök hücrelerin uygulanacakları dokudan elde edilmesinin daha yararlı olacağı tezini desteklemektedir. Hibrit kullanılan grubun sonuçlarının farklı kaynaklardan gelen kök hücrelerin sonuçlarının arasında bir değer vermesi azalan tendon kaynaklı kök hücrelerin sayısı ile açıklanabilmektedir. Hibrit kullanımının etkisinin daha net aydınlatılabilmesi için tendon kaynaklı kök hücre sayısı azaltılmadan konulacak yağ kaynaklı kök hücrelerin oluşturduğu bir çalışmanın daha yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler : Tendon onarımı, tendon iyileşmesi, peritendinöz yapışıklık formasyonu, yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre, tendon kaynaklı mezenkimal kök hücre, hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran, hibrit kök hücreler



SUMMARY

Effects of decellularised amniotic membrane impregnated with adipose derived mesenchymal stem cell and/or tendon derived mesenchymal stem cell in tendon healing

Even after all precautions in occupational health, tendon injuries are still quite often. Even if a tendon repair is conducted in a correct way, there will still be some crucial problems such as peritendinous adhesion formation and delayed tendon healing. These problems can usually cause disabilities that can affect the overall quality of a patient's life.

Recent advances in stem cell therapy have hinted at the accelerated healing of a tendon and the prevention of peritendinous adhesion formation. Because of that, it has been aimed to analyze the best stem cell source for tendon repair and the effect of coexistence of adipose derived mesenchymal stem cell and tendon derived mesenchymal stem cell. Effects of each individual stem cells and effect of their coexistence on peritendinous adhesion and tendon healing were investigated.

70 female Wistar rats divided into five groups, with each group comprising 14 test subjects. After right leg achilles tendon of each rat had been cut and repaired, no further operations were performed in the first group. In the second group, the repaired tendon area was wrapped with decellularised amniotic membrane (DAM). In the third group, the repaired area was wrapped with DAM that was seeded with adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC). In the fourth group, the repaired tendon area was wrapped with DAM that was seeded with tendon derived stem cell (TDSC). In the fifth group, the repaired tendon area was wrapped with DAM that was seeded with ADMSC and TDSC. All primary repairs on rats were concluded. After a postoperative follow up that lasted for a month, rats were sacrificed, and the repaired achilles tendons were excised. The specimens obtained were examined for biomechanical (tensile strength test) and morphological analyses.

Both the biomechanical and the histological data demonstrated the same findings. Although results of the stem cells groups were better than that of control

groups, the results obtained from the groups with tendon derived stem cells were better than that of ADMSC group. As the number of tendons derived stem cells in the groups decreases the healing parameters changes accordingly. Therefore, these findings support the thesis that the more the stem cells are obtained from similar tissues to be operated, the better results will be in terms of tissue regeneration and healing. In order to clarify the whole picture about hybrid use of stem cells, two groups with the same number of tendon derived stem cells should be compared while one group has additional fat derived stem cells.

Keywords: Tendon, peritendinous adhesion formation, adipose-derived mesenchymal stem cells, tendon derived stem cell, decellularised amniotic membrane, hybrid stem cells

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sanayileşme süreci arttıkça toplumlarda el ayarlanmalarının görölme sıklığında da artış olmaktadır. Acil servise başvuran el yaralanmalarının da yaklaşık %20'sini tendon kesileri oluşturur (1,2).

Gelişmiş ülkelerde tendon yaralanmaları daha sıklıkta iş kazası nedeniyle oluşmakta iken gelişmekte olan ülkelerde kesici alet yaralanmaları ilk sırada yer alır(3). Ülkemizde de yapılan çalışmalar tendon yaralanmalarının temel olarak cam kesileriyle yaralanma sonucu meydana geldiğini ortaya çıkarmıştır (4,5). Elde, ekstansör tendon yaralanmaları en sık 3. zonda iken, fleksör tendon yaralanmaları 2. Zondadır (5). Tüm el yaralanmaları içinde tendon kesileri 20-44 yaş arasında saptanmakta ve bunların çoğuna diğer yumuşak doku yaralanmaları da eşlik edebilmektedir (6).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada çocuk hasta grubunda tüm el yaralanmalarında ise tendon kesileri %80 ile en sık hasarlanan yapı olarak bildirilmiştir (7). Tendon yaralanmalarında cerrahi tedavinin başarısında, kullanılan onarım tekniğinin özelliklerinin yanı sıra yaralanma özellikleri ve yaralanan bölge ve onarım sonrası uygulanan rehabilitasyon programı da önemli paya sahiptir. Kirli-kontamine yaralanmalarda, özellikle tendon çevresi yumuşak dokuların da kaybedildiği olgularda, rehabilitasyona rağmen iyileşme tam olmamakta ve bunlara kemik kırıkları da eklendiğinde ameliyat sonrası immobilizasyonun süresi uzadığından hareket kısıtlılıkları ortaya çıkmaktadır (8, 9, 10).

Fleksör tendonlar parmak hareketleri anında palmar bölgede dar tüneller şeklindeki makara sistemleri içerisinde (pulley) kayarak hareket ederler. Fleksör tendonlar onarım sonrası çoğu zaman bu makara sistemi içerisinde etraf dokulara yapışarak iyileşirler ve sıkışıp kalabilirler. Bu sorunlar kısmen erken pasif hareketlendirme ile aşılabilirken, bir kısım hastada tendon protezi uygulamasını takiben tendon grefti ile onarım gibi ikincil ameliyatlara gerekmektedir.

Bu durumda tendon iyileşmesini ve işlevini en iyi etkileyecek onarım yöntemi seçilmelidir. Onarım tekniği ile ilgili olarak tendon iyileşmesini etkileyen temel unsurlardan biri olan dikiş özelliklerini etkileyen faktörler aşağıdaki gibidir;

- 1) Onarım hattında oluşturduğu yabancı cisim reaksiyonunun yoğunluğu,

- 2) Tendon yatağı boyunca oluşturduğu hacim,
- 3) Tendon kesi hattında yüksek gerilme-kopma direnci sergilemesi,
- 4) Onarım sonrası sutürde ayrışma veya tendondan sıyrılma olup olmaması,
- 5) Erken aktif mobilizasyona olanak sağlaması ve onarım sırasında tendon kılıfının tamiri sayılabilir (11).

Onarımın başarısında postoperatif dönemde rehabilitasyonun erken başlatılması büyük önem taşır. Bu amaçla uygulanan egzersiz programları temel olarak ameliyat edilen ekstremitenin elevasyonu ile başlayıp, dirsek ve omuz eklemleri için eklem hareket açıklığı (EHA) egzersizleri, erken dönem aktif ekstansiyon-pasif fleksiyon hareketlerinden oluşan Kleinert ateli uygulaması ve pasif ekstansiyon hareketlerinden oluşan Duran-Houser egzersizlerini içerir (8).

Aktif interfalengeal eklem fleksiyonuna genelde 3'üncü hafta sonunda başlanmakta ise de dirençli egzersizlere ancak 8'inci haftadan sonra geçilmektedir. Elin normal yükte kullanımı için 12'inci haftaya kadar dirençli egzersizlerin sürdürülmesi önerilmektedir (7,8). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda farklı dokularda kök hücrelerin etkinliği incelenmiştir. Farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin sinerjistik veya additif etkilerinin araştırılması literatürde ilktir. Bu çalışmada tendon onarımları sonrası gelişen tendon yapışıklıklarının engellenmesi, tendon iyileşmesini hızlandırmak, iyileşen tendonun dayanıklılığını arttırmak, kök hücre tedavisinin tendon iyileşmesi üzerine etkisini araştırmak için; tendon kökenli kök hücre ile yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrenin hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile beraber kullanılmasının tendon iyileşmesine ve peritendinöz adezyona etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tendon Onarımının Tarihçesi

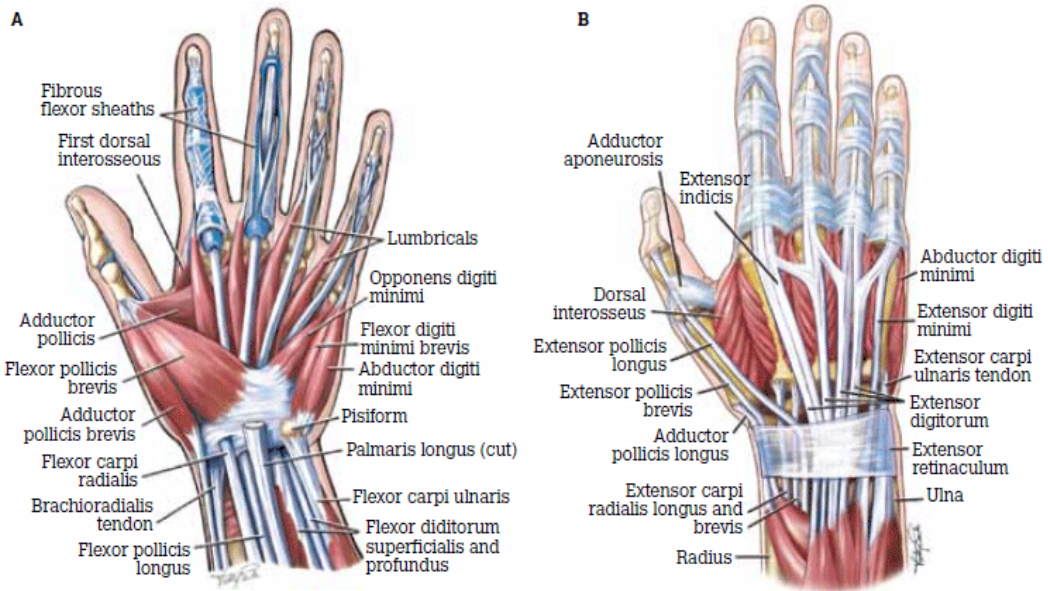
Tendon onarımlarının tarihsel gelişimine bakıldığında “tendon” terimi ile ilgili ilk kayıtlar II. yüzyılda "Ars Parva " adlı eserinde ligament ve sinirlerin bir birleşimi olarak bahseden Galen'e aittir. Galen bu yapıların onarıldığı zaman ağrılara ve kasılmalara yol açacağını belirterek böyle bir işlemde kaçınılması gerektiğini savunmuştur (9). Bu düşünce biçimi Avrupa'da XVII. ve XVIII. yüzyıllara kadar kabul görmüştür. Tendonların onarılması gerektiğinden bahseden ilk yazılı belgeler X. yüzyılda Buhara'da yaşamış olan ünlü Türk hekimi İbn-i Sina'ya aittir. Ancak bu düşünce uzun bir süre daha Avrupa'da kabul görmemiştir. Ambroise Pare (1510-1590) yazılarında, Galen'in etkisinin XVI. yüzyıla kadar sürdüğünü anlatmaktadır. Ancak Fransa'da Guy de Chauliac, İtalya'da Parmalı Roger, XIII. yüzyılda tendon tamiri ameliyatları yapmışlardır (10,11). Meekren, tendon hassasiyetini kontrol ederek yaralanmış tendonun devamlı ağrılara yol açacağı inancını ortadan kaldırmış ve rönesans izleyen yıllarda bir çok cerrah yaralanmış tendonları onarmaya başlamıştır (9). Ambrose Parè ve Andre Della Groce XVII. ve XVIII. yüzyıllarda kesilmiş tendonların primer onarımını önermişlerdir. Vesalingius 1740'da Achilles ve patella tendonları üzerinde yaptığı başarılı ameliyatları bildirmiş, 1752'de Albrecht von Haller'in tendonların sinirler gibi ağrıya hassas olmadığını kanıtlaması ile Galen'in öğretisi tamamen yıkılmıştır. Hunter 1769'da deneysel çalışmaları sonucu, tendon iyileşmesinin, kemik iyileşmesi gibi kal teşekkülü ile meydana geldiğini bildirmiştir (9,10). İlk tendon transferi muhtemelen Nisson'un 1770 yılında bildirdiği, orta parmak ekstansörünün tenorafiye uygun olmayan kesisinde, tendonun distal güdüğünü 5. parmağın ekstansörüne, proksimal güdüğünü de işaret parmağının ekstansörüne diktiği olgudur. Yine Velpeau yaralanmış tendonların komşu tendonlara dikilebileceğini bildirmiştir (12). 1882'de Heuck, ekstansör pollicis longus (EPL) tendon onarımlarında ilk olarak serbest tendon grefti uygulamış ve 1888 yılında da Robson fleksör tendon onarımında serbest tendon grefti kullanmıştır. 1889'da Bolognalı Codivilla tendon dikiş ve transferlerinde yapışıklık ve önleme yöntemleri tarif etmiştir (9). Bir ekstremitede ki çalışan kasların tendonlarını uygun

yerlere naklederek diğ er felçli kasların işlevini yerine getirecek şekilde deformite düzeltimi için, ilk defa Nicoladoni denemelerde bulunmuştur. XIX. Yüzyılın ikinci yarısında Avrupa'da Nicoladoni, Velpeau, Duplay, Tillaux, Franke, Amerika'da ise Milliken, Parrish ve Goldvvaith'in çalışmalarıyla tendon cerrahisi bir hayli yol katetmiştir. Lange (1909), Kirschner (1909), Rehn (1910) ve Biesalski (1909-1910) tendon dikiş ve greftleri üzerine çalışmalar yapmış, 1912'de Erich Lexer serbest tendon grefti vakalarını bildirmiş, bunu Leo Mayer'in günümüz tendon cerrahisinin temeli sayılan çalışmaları izlemiştir (16,19). Mayer 1916'da tendonların kan damarları ve kılıfları hakkında ayrıntılı anatomik incelemelerini, eklem sertlikleri ve tendon yapışıklıklarını önleme ile ilgili çalışmalarının sonuçlarını bildirmiştir (9). Amerika'da Bunnell 1918'de tendonların primer ve sekonder onarımları için başarılı sütür teknikleri geliştirmiştir. Bunnell, tendon uçlarının karşı karşıya dikilmesinde çok dikkatli davranılmasını ve serbest demet ucu bırakılmamasını, çevre dokulara yapışıklığın önlenmesi açısından önemle tavsiyelerde bulunmuştur (16). İkinci dünya savaşındaki ustaca uygulamaları ile Bunnell, elde dokulara karşı nazik davranılması, ince aletler kullanılması temel ilkesi ile birlikte atravmatik dikişler, tendon transferleri, sinir dikişleri ve greftleri, damar onarımları, kemik, eklem ve yumuşak dokularda sayısız görüş ve uygulamaları ile 1957'deki ölümüne kadar el cerrahisinin unutulmaz öncülerinden olmuştur. Bunu izleyen yıllarda Littler (1947), Boyes (1950), Flyn (1953), Carroll (1955) ve Avrupa'da değişik görüşlerle Iselin (1954), Pulvertaft (1957), Verdan (1960) tendon greftleri ve primer tendon onarımı konusunda büyük seriler yayınlamışlardır (9,10). Mason (1932) ve Kessler (1961), Bunnell'ın çapraz tendon sütürlerine karşı birbirine paralel atılan sütürleri tercih etmişlerdir (17,18). Özellikle yapışıklıkların en fazla problem olduğu parmak fleksör tendon onarımlarında 1959 yılına kadar tedavide ortak bir karara varılamamıştır. El cerrahisinin ilk öğreticisi Bunnell ve önde gelen el cerrahları dijital kılıf içerisinde tendon kesilerinin onarımında kesin tedavinin serbest tendon grefti olduğunu kabul ettirmişlerdir (19,20). Fakat 1960'lardan sonra çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalar tendon cerrahisine ait problemlerin yeniden gözden geçirilmesine neden olmuş, Lindsay, Lundborg, Manske ve diğ er yazarlar tendon iyileşmesinde yeni görüşler getirmişler, Kleinert ve Verdan gibi cerrahların da öncülüğü ile de primer tendon tamirinin sekonder grefte olan üstünlüğü önde gelen cerrahlar tarafından kabul

edilmiştir (21-26). Tsuge, iki iğne ile atılan kement tarzı dikiş tekniği ile daha kısa sürede daha az travmatik ve daha kolay bir şekilde fleksör tendon onarımı yapılabileceğini ortaya koymuştur (29).

2.2. İnsanda fleksör tendonların anatomi ve histolojisi

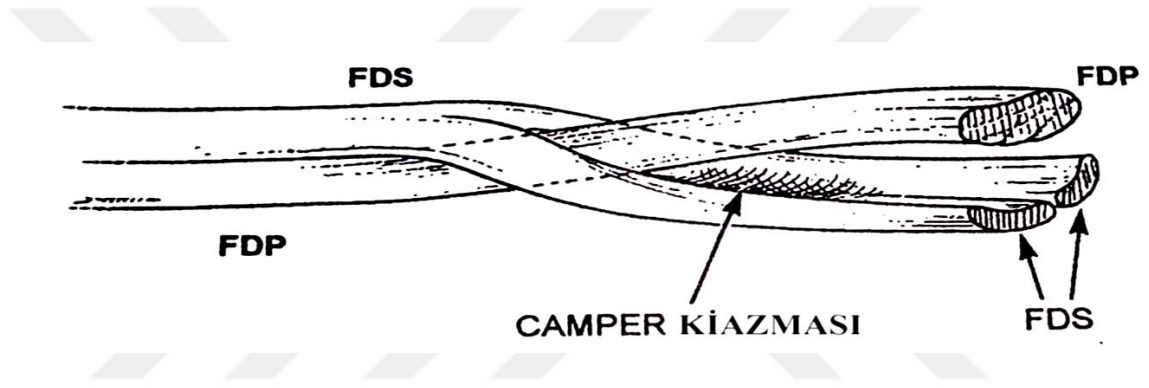
İnsanda fleksör tendonlar medial epikondil, ulna ön yüzü, radius ön yüzü, koronoid çıkıntı ve interossöz membrandan kaynaklanan kasların devamı olarak ilerler. Önkol 1/3 distal kısmında muskültendinöz bileşkeden itibaren kaslar tendon olarak devam eder. Ön kol boyunca üstte yüzeysel, altta derin parmak fleksörleri olarak iki tabaka halinde ilerler. El bileğine giden ulnar ve radial yerleşimli iki tendon haricinde yüzeysel (Fleksör digitorum superficialis - FDS) ve derin (Fleksör digitorum profundus - FDP) parmak fleksörleri ile başparmak uzun fleksör tendonu (Flexör pollicis longus - FPL) transvers karpal ligamanın altından geçerek avuç içine girer. Burada tendon kılıfının kalınlaşmasıyla oluşan makara (pulley) sistemlerinin altında oluşmuş dar tünellerin içinden geçerek parmaklara ulaşırlar (Şekil-1).



Şekil 1: İnsan Elinin Tendon Anatomisi a) Fleksör Tendonlar b) Ekstansör Tendonlar
[Kaynak :Von de Graaf, Human Anatomy, 6th Edition, The McGraw-Hill Companies, Companies, 2001, sf 270]

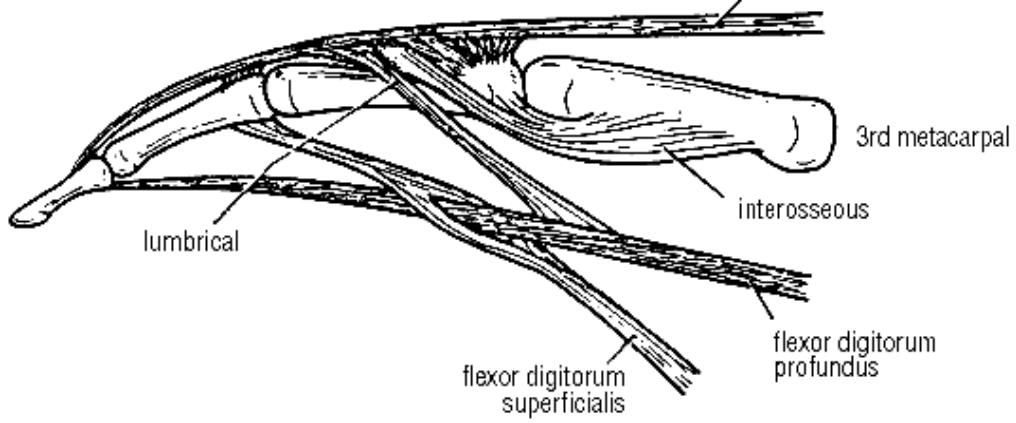
FDS tendonu parmakta proksimal falanks orta bölümüne isabet eden kısımda

ikiye ayrılır ve arasından FDP tendonunun geçmesine izin verir. Bu ikiye ayrılan kısımlarda tekrar ikiye ayrılarak, dörtte bir FDS tendon uzantısı FDP tendon dorsalini çevreleyerek çaprazlaşır. Bu çaprazlaşma noktası "Kamper'in kiazması" olarak adlandırılır (Şekil-2). Diğer uzanan tendon kısımları orta falanks proksimalinde lateral kısımlara iki bölüm halinde yapışır. Böylece FDP tendonu FDS tendonunu delerek veya çatal gibi ayrılan kısmın arasından geçerek distal falanks yapışır. Bu anatomik yapı ile, FDP tendonuna bağımsız hareketlerini sağlayan çok etkili bir askı veya makara (pulley) oluşmuş olur. Parmaklarda FDS tendonları proksimal interfalangeal eklemden, FDP tendonları ise distal interfalangeal eklemden fleksiyondan sorumludur.



Şekil 2: Kamper Çaprazı (Kiazması) [Idler RS. "Anatomy and biomechanics of the digital flexor tendons" isimli yazıdan değiştirilerek alınmıştır. Hand Clin 1:4,1985.]

FPL, pronator quadratus yapışma bölgesi ile FDS'nin radial başı arasında, ön kol 1/3 orta seviyede interosseöz membran ve radiusun palmar yüzünden köken alır. FPL tendonu, karpal tünelin lateralindeki en önemli yapıdır. Tenar kaslar içinde seyrederek ve Fleksör Pollicis Brevis (FPB)'in derin ve yüzeysel başları arasından açığa çıkar. Distal falanksın basisi ve proksimal 1/3'üne yapışır. Başparmağa interfalangeal (IP) eklemden fleksiyon yaptırır.

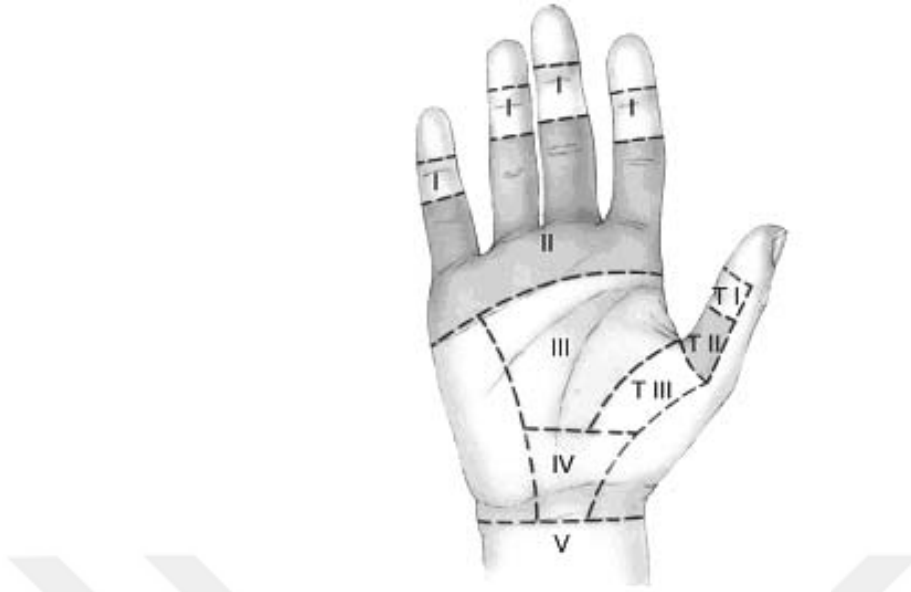


Şekil 3: Elin intrinsek ve ekstrinsek tendonlarının parmak seviyesinde birbirleriyle ilişkisi [Kaynak: Clinical Anatomy by Systems, R. Snell, 2002]

Kleinert ve Verdan'a göre, fleksör tendonlar elin değişik anatomik bölgelerinde değişik yapıda bulunmaları nedeniyle cerrahileri de farklılıklar göstermektedir. Bu nedenle eli zon'lara ayırarak incelemek gerekir.

I. Zon: Sadece FDP tendonunun yer aldığı bu zon, midfalanksta FDS tendon insersiyosunun distalinde yer alan bölgedir.

II. Zon: Distal palmar kıvrım seviyesinde yer alan fibroosseöz fleksör tendon kılıfının orijininden başlar ve distalde FDS tendonunun insersiyosuna kadar uzanır. Onarımlar sonrası iyileşmesi en sorunlu olan bölge olduğu için Bunnell tarafından "tarafsız bölge" (No Man's Land) olarak adlandırılmıştır (21,22). Özellikle erken hareketlendirmenin en çok gerekli olduğu bölgedir. Yapılan onarımlarda özellikle bu bölgede tendon kılıfının da onarıma dahil edilmesinin ve gerekirse rekonstrüksiyonunun yapılmasının fibrozis ve yapışıklık oranını azaltacağına dair görüşler mevcuttur.



Şekil 4: Başparmak (T) ve diğer parmaklarda fleksör tendon zonları. Zon ayrımı, onarımların bölgeden bölgeye değişmesiyle de ilgilidir.

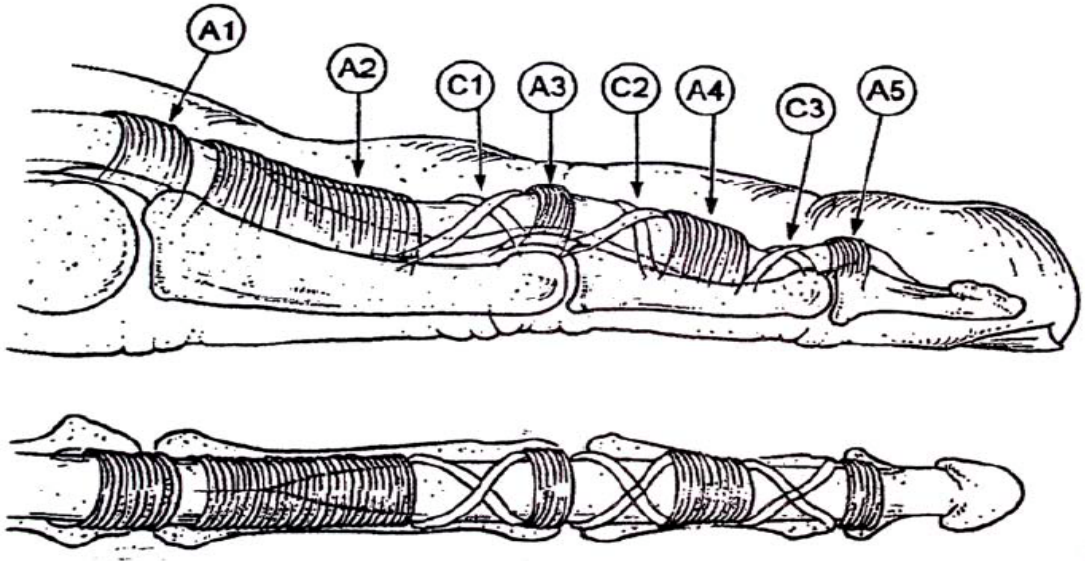
III. Zon: Transvers karpal ligamanın distal kenarından başlayıp aşağıda palmar bölgenin digital fibroosseöz kılıfının olduğu yer olan distal palmar kriz hizasına uzanan bölgedir.

IV. Zon: Transvers karpal ligamanın derininde yer alan bölge olup “karpal tünel” bu bölgedeki temel oluşumdur. Karpal tünel seviyesinde 3. ve 4. parmakların tendonları yüzeysel, 2. ve 5. parmakların tendonları ise derin planda seyreder.

V. Zon: Muskülotendinöz birleşim yerinden karpal ligamanın üst kenarına kadar olan bölgedir. Önkoldaki sinir hasarları sıklıkla tendon yaralanmalarına eşlik eder. Başparmakta ise interfalangeal eklem birinci, proksimal falanks ikinci, metakarpofalangeal eklem üçüncü, metakarp dördüncü ve karpometakarpal eklem beşinci bölgeyi oluşturur.

2.3. Parmaklardaki makara (pulley) sistemleri

Fleksör tendonların parmaklarda kemikten uzaklaşmasını önleyen "makara" (pulley) denilen fibröz köprü yapılar vardır. Bu makaralar halkasal (anüler, A) ve çapraz (crusiform, C) olarak iki tiptir. Anüler makaralar, daha kalın, sağlam ve geniş fibröz yapılardır. Her parmakta 4 yada 5 farklı anüler ve 3 adette çapraz (crusiat) makara vardır. Daha geniş olan anüler pulleyler, parmağın fleksiyonu sırasında tendonun bollaşmasını önlerken, yeterli tendon kayması için optimal eklem fonksiyonu da sağlarlar. Daha ince yapıdaki krusiyat pulleyler ise, fleksör kılıfın fleksibilitesini ve fleksiyon hareketinin daha rahat olmasını sağlarlar. A2 ve A4 pulleyleri sırası ile proksimal ve orta falankslar üzerine lokalizedirler. En proksimal makara (A1) , palmar fasyanın bittiği yerde MP ekleminin 0,5 cm proksimalinden başlar. Palmar fasyanın transvers liflerinin devamıdır.



Şekil 5: Parmaklardaki makara (pulley) sistemi. 5 adet halkasal(anüler,A) ve 3 adet çapraz(cruciate,C) makara bulunur. [Idler RS. "Anatomy and biomechanics of the digital flexor tendons" isimli yazıdan değiştirilerek alınmıştır.Hand Clin 1:6,1985.]

Makaralar, tabanda falanksların periostlarına veya volar plakalara yapışırlar. Tendonlar bu fibröz kanalda periost ve volar plaka üzerinden kayarlar. A-2 ve A-4 makaralar en önemlileridir. Optimal parmak işlevi elde edilmesi için mutlaka korunmalı, eğer yaralanmış ya da açılmışsa onarılmalıdır (24,28,29). Baş parmak makaraları diğer parmakların makara sisteminden farklıdır. Baş parmakta FPL'ye ait

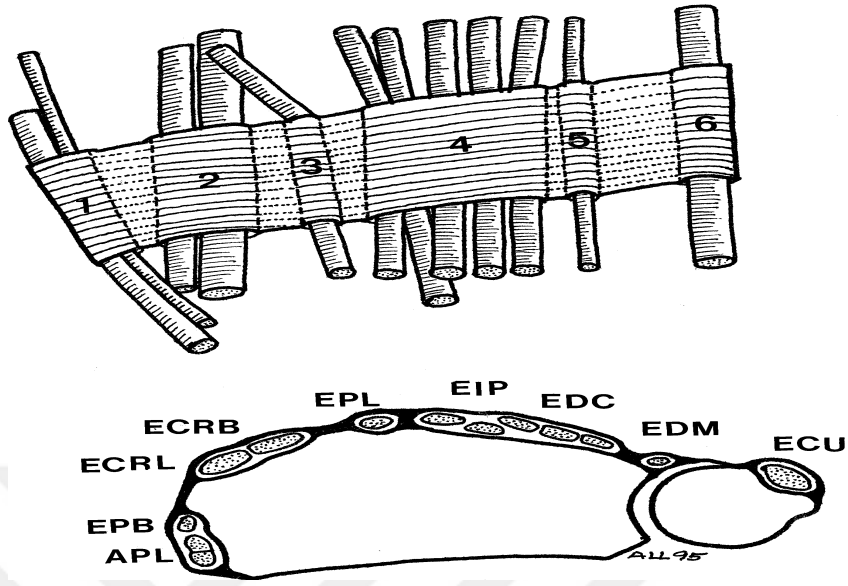
üç adet makara vardır. Proksimalde proksimal falanks tabanında volar plakaya ulaşan IP eklem seviyesinde ilk anüler makara vardır. Distal anüler makara IP eklem hizasında yine volar plaka üzerindedir, iki anüler makaranın arasında tek bir çapraz (oblik) makara vardır. Proksimal falanksın proksimal 1/3 ulnar taraftan, radial 1/3 orta kısmına uzanır. Baş parmakta en önemli makaralar A1 ve oblik makaralardır (25). Makaralar stratejik yerleşimleri nedeni ile, fleksör tendonlarla sıkı ilişkidir. (Şekil-5)

Tendonların her parmakta, parmak eksenini boyunca, düzgün olarak uzamasını sağlamak makaraların temel görevleridir. Eğer makaralar arasında geniş aralıklar bulunursa, fleksiyon ekstansiyon hareketi sırasında tendonlarda kıvrılma ve yaylanma (bowstring) gelişimi, sonuçta da yeterli fleksiyon yapamama ve güçsüzlüğe neden olur (27). Tendon onarımlarında makara sistemi eğer hasar görmüşse mutlaka onarılmalıdır. Makara sistemindeki defektler de tendon ya da fasya greftleri ile esas makaranın gerginliği ile uyumlu olarak mutlaka onarılmalıdır.

2.4. İnsanda ekstansör tendonların anatomisi

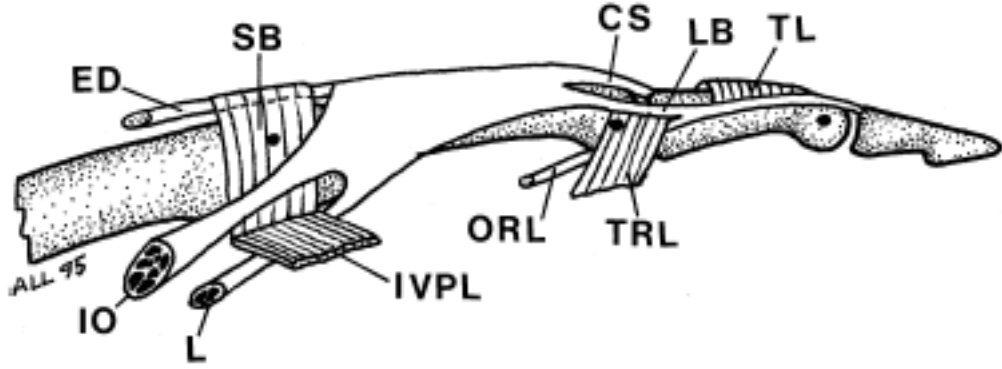
İnsanda ekstansör tendonlar lateral epikondil, ulna arka yüzü, radius arka yüzünde bulunan kasların devamı olarak ilerler. El bileği başparmak ve parmakların ekstansör tendonları radial sinir tarafından innerve olur. Brakioradialis, ekstansör karpi radialis longus ve brevis kası radial sinirden direk innerve olurken geriye kalan ekstansör kaslar posterior interosseöz sinir tarafından innerve olur. Ekstansör tendonlar elbileği seviyesi proksimalinde nutirsyonunu sağlayan ince bir tendon kılıfı olan paratenon tarafından sarılır. El bileği seviyesinde ise vertikal ve horizontal seyirli kollajen fibrillerden oluşan ve ekstansör tendonları 6 kompartmana ayıran ekstansör retinakulum tarafından beslenir (Şekil 6).

Bu seviyede radiusun dorsal çıkıntısı olan Lister Tuberkülü palpe edilebilir. Lister Tuberkülü 3. kompartmanda ekstansör pollisis longus tendonun radiale dönerek 1. parmağa doğru ilerlediği kavşak noktasıdır. Ekstansör retinakulum distalinde 2., 3., 4. ve 5. parmağa uzanan ekstansör tendonlar metakarp seviyesinde juncturae tendineae adı verilen tendonlar ile birbirlerine bağlanırlar. 4. parmak ile 3. ve 5. parmak arasında sık olarak bulunmakla birlikte 3. ve 2. parmak arasında nadiren bulunur. Extansör digitorum comunis tendonu dışında 2. ve 5. parmağa giden ayrı birer tendon bulunmaktadır ve bu tendon ulnar tarafta olup, tendon transferi için kullanılabilir. Metakarpal seviyede ekstansör digitorum comunis tendonunun luksasyonunu önleyen sagital bantlar bulunmaktadır. Bu seviye distalinde, proksimal falanks hizasında, ekstansör tendon oblik ve transvers fiberler ile geniş ve yassı bir yapıya dönüşür.



Şekil 6: Elbileğinde ekstansör kompartmanlar [Kaynak : Steven J. Bates And Jmaes Chan, Grabb and Smith's Plastic Surgery, Sixth Edition by Charles H. Thorne. 2007, Sf 811]

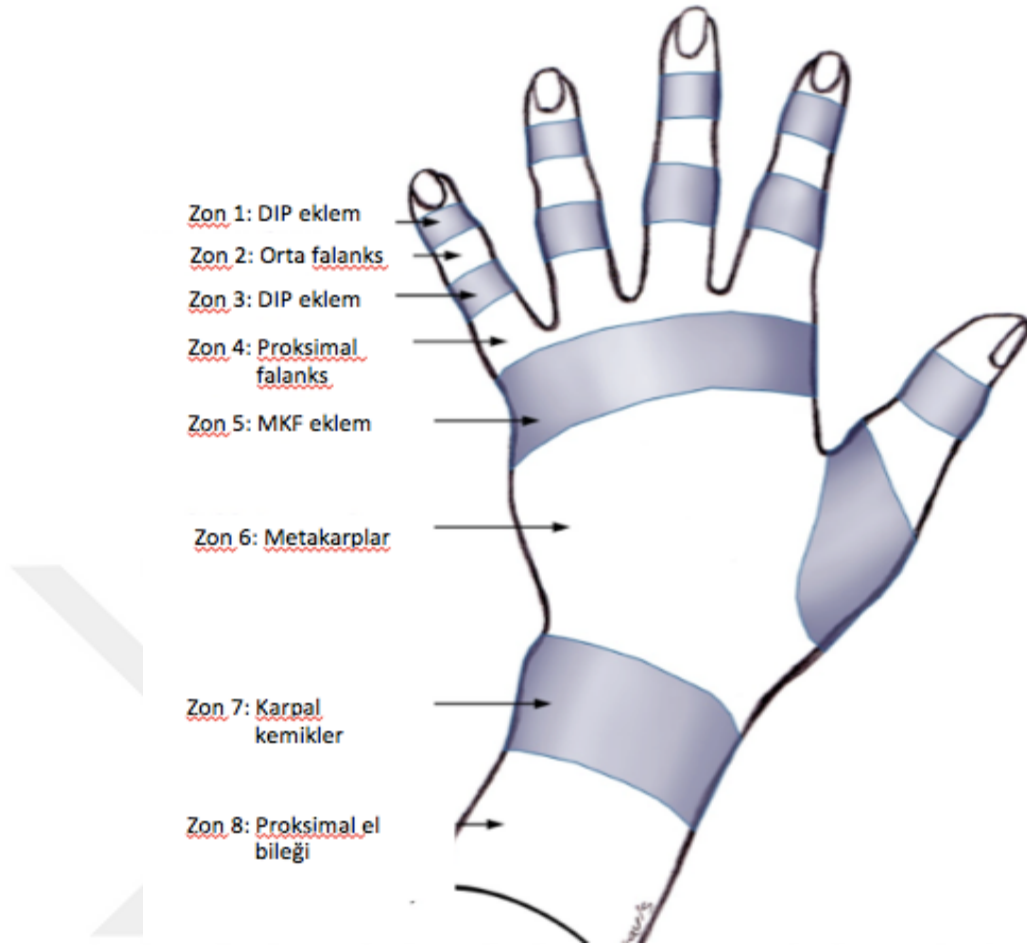
Bu seviyede ekstansör tendonlara lateral bantlar ile beraber elin intrinsik kaslarının tendonları ile bağlantı kurar. Lumbrikal kaslar metakarpofarengyal (MKP) eklem volarinden ve proksimal interfarengyal (PIP) eklem dorsalinden geçerek, parmak MKP eklemine fleksiyon yaptırırken PIP eklem ekstansiyon yaptırır. PIP eklem seviyesinde ekstansör tendon santral silip adını alır ve lateral bantların oblik fiberleri boyunca orta falanksın dorsaline yapışır. PIP eklem ekstansiyon hareketini yaptırır.



Şekil 7: Parmağın ekstansör tendon anatomisi [Kaynak : Steven J. Bates And Jmaes Chan, Grabb and Smith's Plastic Surgery, Sixth Edition by Charles H. Thorne. 2007, Sf 811]

Distalde lateral bantlar falanks bazisine yapışarak distal interfaringeal (DIP) eklemine ekstansiyon yaptırır. Orta falanks dorsalinde triangüler ligament lateral bantları stabil hale getirerek volar subluksasyonu ve butoniyer deformitesi oluşumunu önler. Aynı seviyede transvers retinaküler ligament terminal lateral bantları volarde stabilize ederek dorsal subluksasyonu ve kuğu boynu deformitesini önler (Şekil 7).

Ekstansör tendonların el dorsalinde yüzeysel seyretmesi ve kemiklerle yakın komşuluğu nedeniyle yaralanmalarında komplikasyonlar sık görülmektedir (30). Uluslararası El Cerrahisi Federasyonu tarafınca ekstansör tendonlar başparmak için beş, diğer parmaklar için sekiz bölgeye ayrılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8: Ekstansör tendonların yaralanma bölgeleri

Zon I: Tendon distal falanksın tabanına yapışır. Retinaküler oblik ligaman, distal falanks dorsaline yapışarak, ekstansör tendonun ucuyla birleşerek DIP eklemin fleksiyonda stabilizasyonunu sağlar. Terminal tendon koparsa ekstansiyon santral tendon üzerinden PIP eklem üzerinde toplanır, derin fleksör tendonun DIP eklemi çekmesiyle "çekiç parmak" deformitesi meydana gelir. PIP ekleminde ekstansiyon artarsa deformite belirginleşerek "kuğu boynu" deformitesi meydana gelir (32). Terminal ekstansör tendon bütünlüğünün bozulduğu yaralanmalarda cerrahi gerektiren büyük bir yaralanma olmadığı müddetçe tedavi konservatiftir. 6-8 hafta süreyle DIP eklemin fleksiyonuna izin vermeyen ekstansiyon splinti uygulanır (32).

Zon II: Orta falanks ve lateral bantların olduğu bölümdür.

Zon III: PIP eklemin ekstansörü olan santral bant PIP eklemine geçerek orta falanks proksimaline yapışır. Santral bantın koptuğu durumlarda lateral bantların palmar yöne yer değiştirmesi PIP eklemine fleksiyon, DIP eklemine ekstansiyon kuvveti uygulayarak "düğme iliği" deformitesine yol açabilir (33). Bu zondaki yaralanmalarda DIP eklem serbest kalacak şekilde PIP eklemin 6 hafta süreyle tam ekstansiyonda tespit edilmesi önerilir (33).

Zon IV: Proksimal falanksların hizasıdır.

Zon V: Ekstansör tendonların MKF eklem başları arasındaki sagittal bantları geçtiği bölümdür. Bu bantların kopması halinde, fleksiyon sırasında tendon intermetakarpal alana düşer. MKF eklem hizasında yapışıklık varsa, MKF eklemin fleksiyonu PIP eklemin ekstansiyonuna, PIP eklemin fleksiyonu ise MKF eklemin ekstansiyona gelmesine neden olur. Bu durum " ekstansör plus fenomeni" olarak adlandırılır (31).

Zon VI: Extensör digitorum comunis tendonları el sırtında parmaklara yayılır.

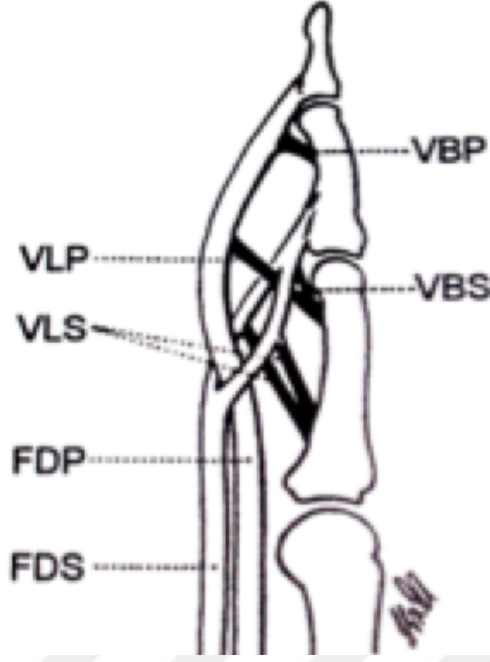
Zon VII: Bilek hizasında, ekstansör retinakulum bulunur. Ekstansör retinakulum bölgesi haricinde ekstansör tendonların sinovyal kılıfları yoktur. Bu nedenle onarımı fleksör tendonlara göre daha kolaydır. Bu bölgedeki yapışıklıklarda el bileği fleksiyonda iken parmaklar tenodez etkisiyle ekstansiyona gelir. Aynı zamanda ekstansör retinakulum pulley fonksiyonu görür, lezyonunda ekstansiyonda bowstringing görülebilir.

Zon VIII: Ön kol düzeyinde, supinatör kası hizasındadır.

2.5. Tendonların kan dolaşımı ve beslenmesi

Tendon onarım yöntemi geliştirilirken tekniğin tendon kan dolaşımı ve beslenmesini olumsuz yönde etkilememesine özen gösterilmelidir. Tendonlar tamamen inaktif yapılar olmayıp kan damarlarına ihtiyaç duyarlar (45). Tendonların uzun yıllar boyunca kan dolaşımı olmadığına inanılmıştır. 1872' de Ludwig ve Schweiger tendon içi damarların varlığından bahsetmişlerdir. 1946'da Edwards bunlara yeni bilgiler eklemiştir. Brockis 1953'te elli insan parmağında arterlere belli basınçta gümüş iyodür vererek disseksiyon yapmış ve tendonların damar ağını tespit etmiştir (45). Tendonun damarlanması birçok yazara göre pozisyon ve yerlerine göre farklılıklar gösterir.

Tendonlar iki kaynaktan beslenirler (Şekil 9). Bunlar vasküler beslenme ve sinoviyal beslenmedir. Vasküler beslenme; kasta tendona uzanan yada kas ile tendon birleşme noktasından giren damarın kasa ve tendona dal vermesi şeklinde, paratenonlar aracılığıyla, kılıfı olan tendonlarda mezotenon aracılığı ile meydana gelir. Tendonun kemikle birleştiği yerden kanlanması tartışmalıdır. Tendonlar kemiğe yapıştıkları bölgedeki periost aracılığı ile besleyici kan damarlarını almaktadır. Ancak Nichols bunu kabul etmemektedir (47). Brockis ve Braithwaite araştırmalarında greft ameliyatından 18 hafta sonra ampute edilmiş parmakta kolloidal gümüş iyodür enjeksiyonu ile damar ağını göstermişler ve bu damar ağının en fazla greftin kemiğe yapıştığı yerden girdiklerini, diğer bölümlerden girenlerin az olduğunu ve damarların tendonun aksına paralel seyrettiğini tespit etmişlerdir (49). Bu bulgu tendon onarımı ve greft ameliyatlarında önemlidir.



Şekil 9: Fleksör tendonların beslenmesinden sorumlu vinculum'lar. VLS, vinculum longum superficialis, VLP, Vinculum longum rofundus, VBS, vinculum breve superficialis, VBP, vinculum breve profundus (Kleinert psurgery" isimli makaleden alınmıştır)

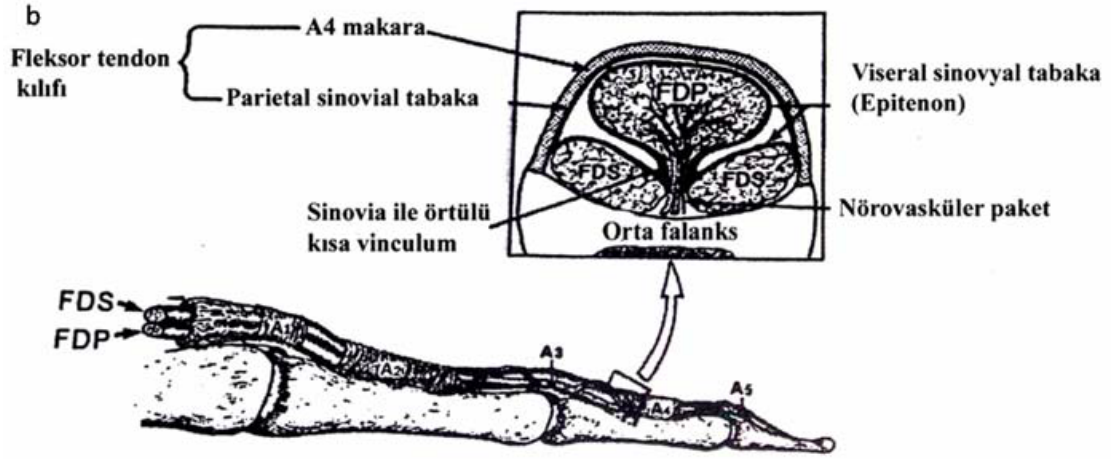
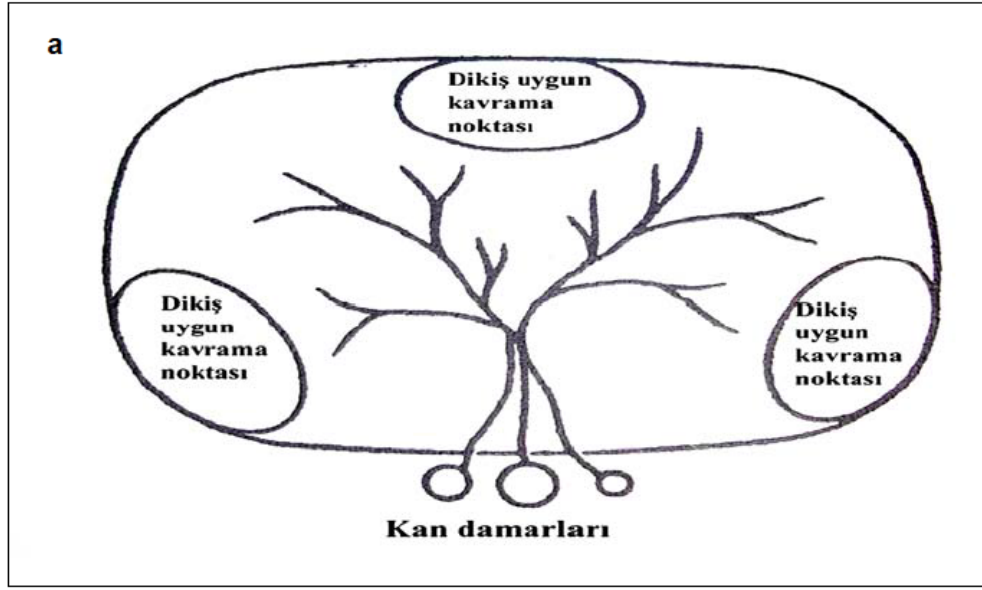
Tendonun paratenon aracılığı ile damarlanmasında, damarlar paratenonun muhtelif yerlerinden geçerler ve paratenonun fibrillerine uyarak kıvrıntılar yaparlar. Bu sayede tendon gerilmesinden etkilenmezler. Paratenondan giren damar grupları çoğu zaman bir arter iki venden oluşurlar. Peacock'a göre tendonların her iki ucundan damar ağları tendonun ancak 1/3 proksimal ve 1/3 distal parçasını beslemeye yeterlidir. Bu durumda 1/3 orta kısım diğer damarlardan beslenmelidir (50). Tendonun kılıfı aracılığı ile damarlanmasında damarlar mezotenon aracılığı ile konveks kısımdan girerler (22, 28, 36). Mezotenonu olmayan kılıflarda ise damarlar ya kılıfın her iki ucundaki vinkulum triangulare'ler ile ya da vinkula filiformisler ile girerler. Parmakların fleksör tendonlarında mezotenon, vinkula longa ve brevis ile yer değiştirmiştir (46). Vinkulumlar, tendonların dorsallerinde yer alırlar. İçlerinde bir arter, iki ven ve dört lenfatik damar vardır. Dijital arterlerin transvers kominikan dalları makaralar hizasında dijital kanala girerek vinkulum sistemini beslerler (51-55). Vinkulumlar, derin ve yüzeysel fleksör tendonların orta ve proksimal falanks bölgesindeki paratenonlarından, mezotenon şeklinde farklılaşmış fibröz yapılardır. Tendonlara kan taşımak ve eklemlerin aşırı ekstansiyonlarını önlemek görevlerini

üstlenmişlerdir. Birçok varyasyonları vardır ancak en sık bilinen normal biçimde FDP ve FDS'nin her ikisinde bir uzun, birde kısa olmak üzere ikişer tane vinkulumları vardır. Uzun olanlarına vinkula longum, kısa olanlarına da vinkula breve denir.

FDS nin kısa vinkulası (VBS), proksimal falanksın distal ucundan PIP eklemının proksimalinden tendonun yapışma yerinin hemen proksimalinden tendona ulaşır. FDS'nin uzun vinkulası ise (VLS), proksimal falanksın proksimalinden distale doğru uzanarak FDS tendonuna ulaşır, FDP nin kısa vinkulası (VBP), midfalanksın distal 1/2 sinden geniş bir şekilde başlayarak FDP tendonunun distal yapışma yerinin hemen proksimalinden tendona girer. FDP'nin uzun vinkulası (VLP) ise VBS'in FDS tendonuna girdiği yerin üzerinden Camper kiazması hizasında çıkar. PIP eklem seviyesinde FDP tendonuna girer. Baş parmakta da bunlara benzerlik gösteren iki adet vinkula vardır (30-33).

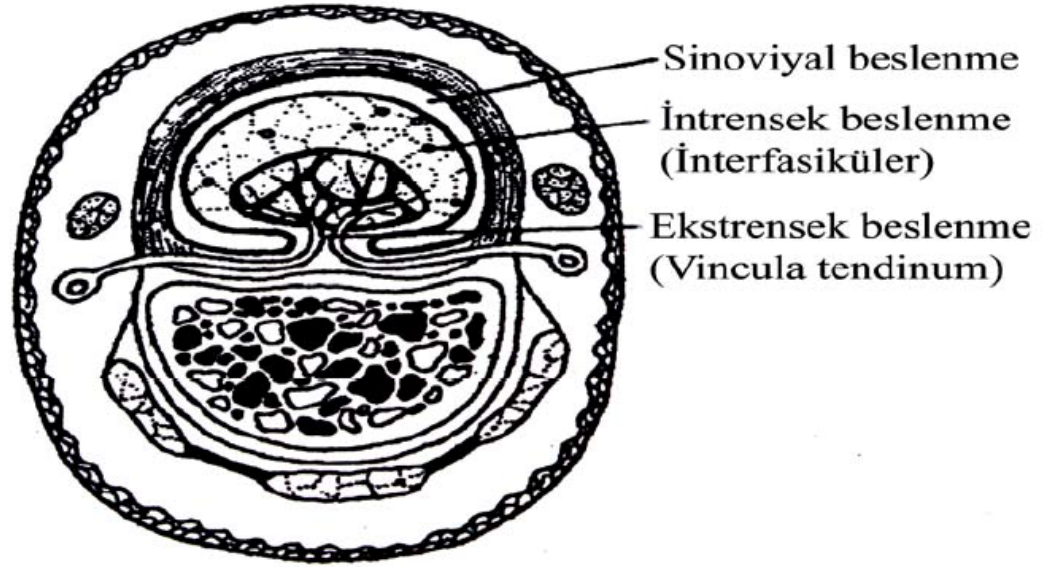
Tendon damarlanmasına , tendon enine kesitinden bakıldığında tendona giriş noktasının dorsal (derin) yüzde ve orta 1/3 kısımda yoğunlaştığı görülür. Uygulanacak tendon onarımlarında kullanılan tekniğin bu damarlanmayı bozmayacak konumda yerleşmesi önerilmektedir (34) (Şekil 10). Dolayısıyla yeni bir tendon dikişi geliştirilirken özellikle dikkat edilen lokalizasyonlar dikiş uygun kavrama noktaları olan tendonun volar yüzü ile dorsal yüzde 1/4 lateral ve medial kısımlardır (34).

Parmak fleksör tendonlarında damarlanma, aynı zamanda palmar bölgeden longitudinal şekilde gelerek intertendinöz kanallardan ilerleyip, yine palmar bölgede proksimal sinoviyal kıvrımdan giren damarlar aracılığı ile olur.



Şekil 10: a) Tendon dikişlerinde olası uygun kavrama noktaları b) İnsan derin fleksor tendonu beslemesinin A4 makara düzeyinde ki enine kesitte gösterimi. Vinculum iki FDS şeridinin arasından geçerek FDP'ye ulaşır.

Ayrıca tendonların kemiğe yapışma noktalarından giren damarlar da mevcuttur. Tendonların vasküler kaynağı dorsaldendir. Derin ve yüzeysel her iki fleksör tendon proksimal falanks seviyesi diğer bölgelere göre avaskülerdir. Derin fleksör tendonun orta falanks üzerinde, diğer bölgelere nispeten avasküler olduğu kısa bir bölgesi vardır. Ayrıca tendonların makaraların altında kalan kısımları göreceli olarak daha az kanlanırlar.



Şekil 11: Fleksör tendonun beslenmesi [Messina A, J Hand Surg 17A:140,1992, "The double armed suture :Tendon repair with immediate mobilization of the fingers" isimli makaleden değiştirilerek alınmıştır]

Tendon greftlerinin dolaşımından ayrılmasına rağmen beslenebilmeleri araştırmacılar tendonların dolaşım harici faktörlerle beslenebildiği fikrini uyandırmıştır. Ayrıca, tendonun avasküler bölümü olan volar bölümün beslenmesinin sinovyal sıvıdan olduğunu ileri sürmüştür (56). Tendonların volar avasküler yüzlerinde kondroitin sülfat oranı yüksektir. Bu nedenle kollajen lifleri birbirinden dağınık ve ayrıdır. Bu özellik nedeniyle diffüzyonel beslenme kalın liflerin hakim olduğu tendon bölümlerine göre daha iyidir (57) (Resim-10).

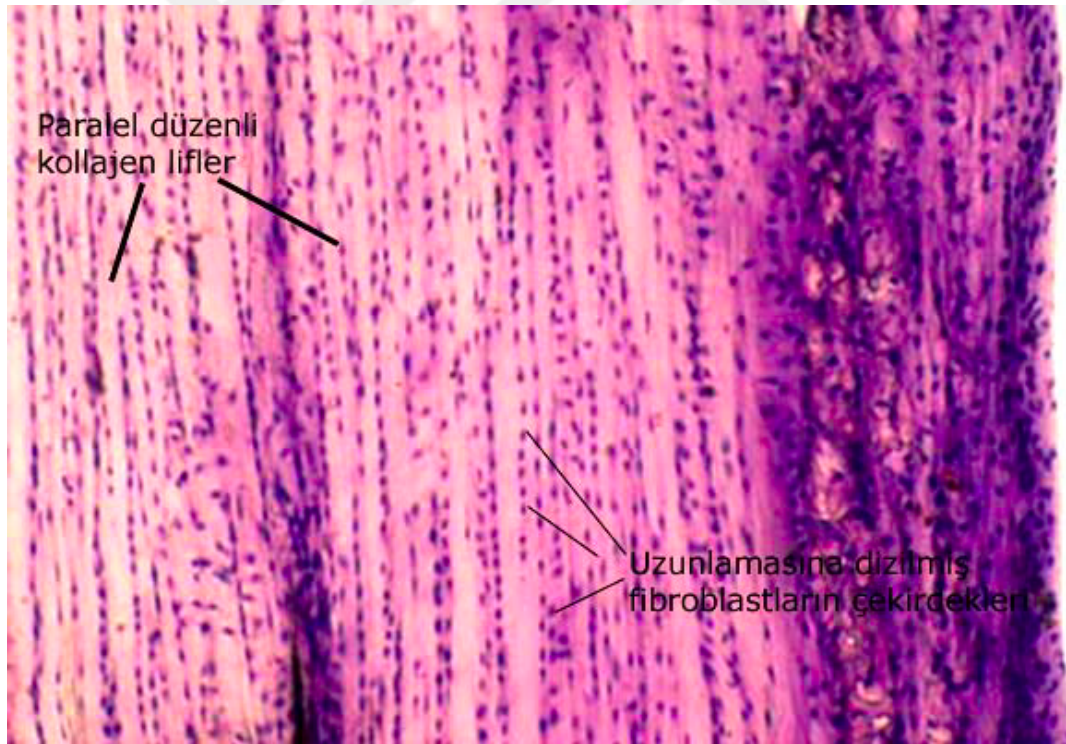
Sinoviyal sıvı diffüzyonu; fleksör tendonlar için etkili bir besleyici ortam oluşturur. Tendonu besleyici faktörler, imbibisyon olarak bilinen pompa mekanizması ile, her fleksiyon ve ekstansiyon hareketi esnasında küçük köprü kanalcıklar vasıtasıyla tendona ulaşırlar. Travma sonucu ya da hasarlı tendonun tamirinden sonra, hem vasküler yapılar hem de bu sıvı nutrisyonel sistem bozulmaktadır (58). Sinoviyal sıvı, fibröz fleksör kılıfın sinoviyal yüzeyinden salgılanır. Sıvının karakteri eklem sıvısına benzemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre tendon beslenmesinde esas önemli kaynak sinoviyal sıvıdan olan diffüzyondur (30-34).

Tendona giren damarlar, kollajen demetler içine girmeden, bunları saran

endotenon arasında ve demetlere paralel seyrederek. Tüm damarlar, aralarında transversal anastomozlar yaparlar. Bir başka deyişle terminal sonlanmaları yoktur (33,45,46). Peer'e göre tendon boyunca her seviyeden girmeyip belli bölgelerden giren ve tendon içinde fibrillere paralel olarak seyreden kan damarları ağı, tendonlara geniş hareket alanı sağlamaktadır (63).

2.6. Tendonlarda histolojik yapı ve metabolizma

Tendon cerrahisinde onarımın etkinliğini belirleyen önemli bir faktör de yaralanmalarda tendonun histolojik yapısının ne kadar korunduğudur. Özellikle kirli ve avulsiyon tarzı yaralanmalarda bu histolojik yapı büyük ölçüde hasar görür ve iyileşme fibrozis ve yapışıklıklarla sonlanarak tendon yatağı oluşturulmasını hedefleyen ikincil ameliyatları gerektirir.



Şekil 12 : Tendonun uzunlamasına kesitinde kollajen ve fibroblast dizilimi

Tendon, kaslar ile kuvvetin iletileceği iskelet parçası arasında yer alan, büyük bir kısmını birbirine paralel kollajen liflerin oluşturduğu, hücreden fakir bir tıkHz bağ

dokusu örneğidir (38). Mezoderm kökenli olup elastikiyeti yoktur ve dayanıklılığı aynı çapta bükülmüş ipten fazladır. Lifler ve bunların oluşturduğu demetler birbirlerine paraleldir, aralarında birleşmezler (38). Kollajen demetlerin arasında ince elastik lifler tarif edilmiştir (34). Bir çok yazara göre ise elastik lifler yalnızca paratenon içinde yer alır (34-37).

Tendon parankim hücreleri (tenositler) demetler arasındaki mesafelerde birbirleri üzerinde uzun sütunlar şeklinde dizilirler (Şekil 12). Bu hücreler fibroblast türevidirler. Yerleşmiş inaktif fibroblastlar olan “fibrositler“ kimi kaynaklara göre tenositlerle aynı hücrelerdir (35-38). Tenositler, bazofilik sitoplazmalı bol miktarda endoplazmik retikulum içeren ve gelişmiş bir Golgi aygıtına sahip tek çekirdekli hücrelerdir. Bu protein yapım-yıkım yani yeniden modellenmenin ne kadar sık olduğunun göstergesidir. Yassı olan hücreler kollajen demetlerin yüzeylerindeki girintilere yerleşir. Uzunlamasına kesitlerde birbiri üzerine binmiş çubuklar gibi, enine kesitlerde ise kollajen demetler çevresinde yıldız şeklinde basık ve dallanmış olarak görülürler (34-37). Tendonun üzerini ince bir bağ dokusu sarar ve demetler arasına uzantılar verir. Bu kılıfa periteneum eksternum ya da epitenon, demetleri birbirinden ayıran uzantılara ise periteneum internum ya da endotenon denir (36-38). Tendonlar kollajen, elastin, tenosit, ara madde, kan damarları, sinir ve lenfatiklerden oluşmuş yapılardır. Tendonlarda vücuttaki tüm dokulardan daha yoğun kollajen bulunmaktadır. Yaklaşık kuru ağırlığının %70'i kollajendir (39). Kollajen, fibriller ile kompleks protein yapılardan oluşmuştur. Fibriller tropokollajen ve makromoleküller yapıdadır ve özellikle Tip 1 kollajen yapısında üçlü sarmal oluşturmuşlardır. Sarmal , ikisi benzer biri farklı üç adet polipeptit zincirlerden oluşur. Her biri yaklaşık 1000 amino asit içerir. Polipeptit zincirlerde en yaygın bulunan amino asit glisin (%30), daha sonra hidroksiprolin ve prolin (%28)'dir (40,41).

Zincirler arasında çapraz bağ olması gerginliğe dayanıklılığı artırır. Kollajen fibrilleri paralel uzanarak fiberleri oluşturur ve bunların çapı yaklaşık 300 mikrometredir (42). Tendon fiberleri gruplar yaparak fasikülleri, fasiküller de birbirine yapışıp tendon demetlerini meydana getirir. Kasta oluşan kasılma myofibrillerden tendon fibrillerine gerginliği iletir. Tendon demetleri kemikteki yapışma yeri olan fibrokartilaja, o da kemiğe iletir (43). Zemin maddesi az miktarda

glikozaminoglikanlar, glikoproteinler ve non kollajenöz proteinlerden oluşmuştur (44).

Metabolizması bakımından, kollajenin iki ana fraksiyonunu sitrik asitte eriyen ile asit ve alkalide erimeyen kısımlar oluşturur. Bu iki ana unsurun izotop deneylerinde son derece düşük metabolizma göstermeleri kollajen liflerin metabolik açıdan inaktif oldukları görüşünü doğurmuştur. Kollajenin alkali veya nötr tuzda eriyen küçük bölümü ise, yüksek metabolik faaliyet gösterir. Yukarıda belirtildiği gibi tendon hücreden fakir bir dokudur ve bu az sayıdaki hücre normal şartlarda yalnızca kollajen demetlerin bakımını temin ederler. Bu sebepten hücrelerin metabolizmaları da düşüktür (19).

2.7. Tendon fizyopatolojisi ve tendonlarda iyileşme sürecinin özellikleri

Tendonlar, kas gücünü kemiklerdeki yapışma yerlerine taşır ve oradaki eklemlerin hareketini sağlar. Aynı zamanda hareketin yapılabilmesi için nispeten kısa kas huzmesinin yeterli olduğu durumlarda özel yapılı, kasıldığında kitle oluşturan ve yüksek metabolizmalı kas dokusunun lüzumsuz uzunlukta olmasının önüne geçer.

Tendonlar bazı bölgelerde fibröz veya fibroosseöz halka veya kanallardan geçerek yön değiştirirler. Böylece kasın kasılma yönünden farklı yönde hareket sağlarlar. Kasın yapıştığı bölge ile tendonun yapışma noktasının maruz kaldığı kuvvet eşittir, ancak tendon kasa oranla daha dar bir bölgeye bu kuvveti iletir (22,35). Tendon, en önemli görevi olan kas kuvvetini yapışma yerine nakletmeyi tam olarak sağlayabilmek için sahip olması gereken özellikler;

- 1) Kasılma kuvvetine dayanacak kadar güçlü olması,
- 2) Boyu uygulanan güç nedeniyle değişmemesi, yani uzayıp kısalması,
- 3) Uzunluğu boyunca kendini çevreleyen komşu dokulara yapışık olmaması, ileri geri kolayca kayabilmesi,
- 4) Kas gücünün nakli sırasında güç kaybını önleyebilmek için komşu dokular ile arasında sürtünme en az olmasıdır.

Normal bir tendon bütün bu özelliklere sahiptir. Sağlamdır. Gerildiğinde uzayıp kısalmaz. Tendonun ileri geri hareketine izin veren, sürtünmeyi azaltan mükemmel

bir kayma mekanizmasına sahiptir (35).

Vücuttaki herhangi bir yarada dokular, doku boşluklarını dolduran koagulum, granülasyon dokusu ve sonunda fibrotik proses ile iyileşirler. Bu, kozmetik sorunlar dışında önemli problem yaratmaz. Tendon iyileşmesinde ise etraf dokulara yapışma neticesinde önemli fonksiyonel problemler ortaya çıkar. Bugüne kadar yapılan hayvan deneyleri tendon iyileşmesinin, ekstrensek (yapışıklık oluşumu ve sinoviyal membrandan tendon uçlarına doğru fibroblastik aktivite) ve intrinsik (tenositlerin ve endotenon hücrelerinin sağladığı iyileşme) mekanizmalarla olduğunu göstermiştir. Bu iki iyileşme tipini birbirinden ayırmak güçtür. Tenorafi bölgesindeki fibroblastların kaynağı hakkında araştırmacılar birçok farklı görüş ortaya koymuştur. Ancak fibroblastlar hem sinoviyal kılıf veya paratenon, hem de endotenon kaynaklı olduğu bugün bilinmektedir (23, 30, 64). Tendon iyileşmesinin ilk 3-5 gününde sinoviyal fibroblastik aktivite baskındır. Yapışıklık oluşumunda sinoviyal fibroblastik aktivite çok önemlidir (63, 64).

Tendon iyileşmesi birbirini takip eden, aynı zamanda iç içe üç fazda gerçekleşir:

1. Enflamasyon: İlk 24-48 saatte lokal enflamatuar ödem ve lökositlerin fagositozunu içeren bu dönemi, fibrinojenin organize olup fibrin pıhtı oluşturması izler. Tendon yarası gerilme gücü olmayan granülasyon dokusu ile dolar. Tendon uçları ödemlidir ve devamlılık sadece dikişler ile sağlanır. Her iğne deliği enflamatuar ödem ile çevrilidir.

2. Fibroplazi: Bu proliferatif fazda fibroblastlar ortaya çıkar ve eski kollajenin yıkılımı ile yeni kollajen sentezi başlar. Yaralanmadan 3-4 gün sonra başlayan fibroblastik aktivite 3-6 haftaya kadar sürer. Fibroblast proliferasyonu 10 gün sürer. 3-6 hafta arasında fibroblast ve yara dokusundaki kan damarı sayısı giderek azalır. Skar dokusunun dayanıklılığında sorumlu olan kollajen lifleri artar. Fibroblastların azalması bu dönemin sonlanışını belirler. 7. günde tendonun içinde ve çevresinde granülasyon dokusunun organizasyonu başlamış, tendon hücreleri çoğalmakta fakat tendon uçları arasındaki iyileşmeye katkıda bulunmamaktadır. İyileşme primer olarak komşu dokulardaki hücrelerin göçüne ve yerleşmesine dayanmaktadır. 14. günde tendon yarası fibroblast ve kollajen köprüsü ile dolmuştur. Ancak gerilme kuvveti hala çok sınırlıdır. Tendon içinde ve çevresinde oluşan büyük proliferatif hücre reaksiyonu çevredeki dokular ile iştirak içindedir.

3. Yara kontraktürü ve matürasyon: 3. haftadan sonra zaman alıcı bir işlem olan skarın yeniden şekillenmesi ve olgunlaşması başlar. 2-3 hafta içerisinde yara orijinal büyüklüğünün %20' sini kaybeder. Kontraksiyon kuvvetleri, çevre dokuların karşı yöndeki kuvvetleri tarafından dengeleninceye kadar yarayı kapatmaya devam ederler. Kollajen sentezi sürer. Tendon birleşimindeki kollajen ve fibroblastlardan oluşan lifler longitudinal olarak dizilmeye başlarlar ve gerim kuvveti artar. Yapışıklıklar harekete izin verecek şekilde gevşeyebilir. Maksimal şekillenme 6 aydan daha fazla süre gerektirir. Moleküler yapının fonksiyona adapte olması ile tendonlar eskisi kadar güçlü olurlar (9,12).

Tendon greftlerinde iyileşmede rol alan fibroblastların kaynağı bakımından üç ayrı görüş mevcuttur (60).

I. Onarım ve rejenerasyon sadece komşu dokulardan kaynaklanan fibroblastlar tarafından yapılır. Bunlar greft ile ana tendonun birleşme sahasında toplanarak tendon demetlerini olduğu gibi, endotenon, paratenon ve peritenonu tamir ederler.

II. Onarım ve rejenerasyon paratenon ve kılıf hücreleri tarafından yapılır. Ancak bunlar olmadığı takdirde, civar dokulardan gelen fibroblastların iyileşme olayında rol aldığı söylenir.

III. Onarım ve rejenerasyonun ilk evresinde paratenon ve endotenon hücrelerinin aktivitesi ile erken bir yapışma sağlanır. Bunu takiben greft ve ana tendonun hücreleri çoğalarak tamir olayına katılır.

Tendon iyileşmesiyle ilgili temel çalışmalardan birisi olarak Mason ve Shearon bir grup köpekte sadece tenotomi yapıp, kesik tendonu hemen dikerek, diğer grup köpeklerde tendondan bir parçayı çıkarıp tekrar aynı yere tendon grefti gibi dikerek, üçüncü grupta ise bir bacadan çıkarılan tendon segmenti yerine diğer bacadaki tendondan alınan segmenti koyarak tendon iyileşmesi olayını incelemişlerdir (56). Bunların bir kısmında tendon kılıfı onarılmış diğer kısımda onarılmamıştır. İyileşme olayının ilk fazında, kesik tendon uçlarının paratenon hücrelerinin proliferasyonu yardımıyla yapıştıklarını ve 5. günden itibaren tenoblastların çoğalarak tendon uçları arasındaki mesafeyi kapatmaya çalıştıklarını gözlemlemişlerdir. Paratenon faaliyeti ise ortalama 2. hafta sonunda hemen tamamen durmuş, buna karşın tenoblastlar ise en faal duruma geçmiştir (64).

Yine Skoog ve Perssen tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada endotenon, peritenon ve paratenonun rolünü araştırarak tenotomi yapılmış tendonlarda erken fazda tendon ve endotenon hücrelerinin faaliyet göstermediğini, peritenonun tek başına iyileşmeyi sağlayamadığını ve tendon uçlarını birleştiren nedbe dokusunun başlıca komşu dokulardan kaynaklandığını bulmuşlardır (59). Histolojik olarak, normal intrasinovyal tendonlar ile ekstasinovyal tendonlar arasındaki tek fark, intrasinovyal tendonların tek tabaka epitenon hücreleri ile çevrili olmalarıdır (11). Seiler ve arkadaşları köpeklerde yaptıkları çalışmada intrasinovyal bölgede tendon grefti ile onarım uyguladıklarında intrasinovyal tendonların daha iyi bir kaynama ve iyileşme mekanizmasına sahip olduğunu bulmuşlar ve bunun sonucu olarak daha az yapışıklık ve fonksiyon kaybıyla bir iyileşme meydana geleceğini bildirmişlerdir (60).

3. MEZENKİMAL KÖK HÜCRE HAKKINDA GENEL BİLGİLER ve TIBBİ KULLANIMI

3.1. Tanım

Kök hücreler (KH) canlılarda kendilerini yenileyebilme, sürekli bölünebilme ve farklılaşabilme özelliklerine sahip olan hücreler olarak tanımlanırlar. Kök hücreler kaynaklandıkları serilerden farklı olarak diğer özelleşmiş hücrelere de farklılaşabilirler (65).

Bir hücrenin kök hücre olarak tanımlanması için bazı özellikleri sağlaması gereklidir. Kök hücreler uzun süre bölünerek kendilerini yenileyebilme ve bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Hücrelerin bölünme yeteneklerini kromozom uçlarındaki telomerler belirler. Telomerler, kromozom uçlarının parçalanmasını ve diğer kromozomlarla birleşmesini engelleyerek yapısal bütünlük sağlayan ve tekrar eden DNA dizilerinden oluşan yapılardır (66). Bölünmeler sonrasında oksidatif hasarlanma nedeniyle kromozomlar yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalmaktadır. Bu kısalmayı telomeraz enzimi engeller. Özelleşmiş hücrelerde belli bir bölünme sayısından sonra ciddi aşınma meydana gelmekte ve hücre bölünme yeteneğini kaybetmektedir. Zıt olarak bazı tümörlerde ve kök hücrelerdeki telomeraz aktivitesinin sınırsız bölünmeyi sağladığı düşünülmektedir. Mezenkimal kök hücrelerde telomeraz aktivitesi telomerleri belli uzunlukta tutacak niteliktedir (67). Kök hücreler pluripotent özelliktedir yani birçok hücre tipine farklılaşma özelliğindedir ve bu özelliğini kaybetmeden sınırsız şekilde çoğalabilmektedirler. Ayrıca çevre koşullarına göre bölgesel dokuyu oluşturan fonksiyonel hücrelere dönüşebilmektedirler (68-70,72,89). Buldukları çevrenin ekstraselüler matriksinin uyarıcı etkisiyle çoğalarak ve farklılaşırlar.

Kök hücrelerin farklılaşması dış ortamdan gelen sinyaller vasıtasıyla ve genetik olarak düzenlenmektedir. Hücrelerin düzenlenmesi ve işlevlerinin kontrol edilmesi için gerekli hücresel ve moleküler yapıları içeren bu mikroçevreye "niş" adı verilmektedir. Kemik dokusu gibi bazı dokularda bu mikroçevre hem kök hücreleri hem de öncüllerini düzenleyici etki gösterir. Kök hücre nişleri, hücrelere yaşam için

uygun ortam sağlamakta, çoğalmalarını düzenlemekte, farklılaşmalarına yön vermektedir. Kök hücreler genellikle asimetrik olarak bölünür fakat mikroçevredeki kök hücre sayısını düzenlemek için simetrik bölünme de görülebilir (75,87).

KH'ler vücudumuzdaki tüm dokularda bulunabilmektedir. Bu hücreler buldukları dokulardaki hücresel kayıpları (doğal ya da patolojik) yerine koymaya programlı rezerv hücreler olarak işlev görmektedirler (68,69). Hücrelerin kaybı kontrol mekanizmalarını tetiklemekte ve birçok yolla bu hücreler stimüle edilerek kayıplar yerine konulmaktadır. Bu hücreler buldukları ortamın bölgesel özelliklerine bağlı olarak ve çevre hücrelerle etkileşerek ihtiyaç olan hücelere dönüşebilmektedir (68,70,71).

KH'ler embriyonik (EmKH- Embriyonik Kök Hücre) ve erişkin (Erişkin Kök Hücre- EKH) olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (68,72). EmKH hücreleri totipotenttir ve tüm hücre serilerine dönüşebilmektedir. Fakat EKH multipotenttir ve bu hücrelerin transforme olabildiği hücre spektrumu daha dardır. EmKH birkaç günlük embriyodan elde edilebilmektedir (68). İlk tanımlandığı 1981 yılından sonra bu hücreler üzerinde birçok çalışma yapılmış ve günümüze dek 200'ün üzerinde EmKH hattı tanımlanmıştır (73). Uygun kültür ortamı var olduğu sürece bu hücreler ölümsüz sayılmaktadır ve bu özelliği nedeniyle tedavi uygulamalarında bu hücrelerin kullanımı sınırlıdır. Çoğalmasını kontrol etmek zordur ve genelde implante edildiği dokuda teratomla sonuçlanan bir büyüme eğilimi gösterirler (74). Elde edilmesi ve kullanılması konusunda hücresel sorunlar olmakla birlikte etik sorunlar da çözülememiş olan bu hücreler pek çok araştırmacı tarafından deneysel yollarla incelenmektedir, fakat klinik kullanımı yaygın değildir.

KH'ler dönüşüm özelliklerine göre temel olarak üç gruba ayrılabilir; totipotent, pluripotent ve multipotent KH'ler. Totipotent hücreler; totus (tam) ve potentia (güç) kelimelerinden türetilen isimleri her yöne farklılaşma kabiliyeti olan hücreleri tanımlamaktadır. Örneğin zigot totipotent bir hücredir ve vücutta bulunan tüm hücelere dönüşebilmektedir. Pluripotent kavramı plurimus (çok, birçok) ve potentia (güç) kelimelerinden türetilmiştir. Bu isimle anılan hücreler tıpkı totipotent hücreler gibi vücuttaki tüm hücelere kaynaklık edebilmekle birlikte totipotentten farklı olarak yeni birey oluşturma özelliğini kaybetmiş hücrelerdir. Örneğin zigot ilk 5 günde

totipotent hücrelerden oluşur ve zigotu oluşturan tüm hücreler bu süreçte farklı bireyler oluşturabilir ama sonrasında bu özelliği yitirir. Multipotent hücreler fetal dönemin hücreleridir ve daha özelleşmiş EKH'lerdir. Bunlar buldukları dokunun hücrelerine kaynaklık ederler. Multipotent hücreler daha sınırlı bir farklılaşma yelpazesine sahiptir (76). En iyi bilinen multipotent hücreler hematopoetik KH'lerdir. Bu hücreler uygun ortam ve sinyallerin varlığında in vivo ve invitro koşullarda farklı dokuların hücrelerine dönüşebilmektedir.

3.2 Kök hücre uygulamalarının tarihçesi

Hücrel tedavi düşüncesinin ortaya çıkışı binlerce yıl önceye dayanmaktadır. M.Ö. 1600 yıllarında yazıldığı düşünülen Eber Tıp Papirusları'nda insan canlılığını artırmak için hayvan organlarından hazırlanan yapıların enjeksiyonundan bahsedilmektedir. İlk doku nakillerinin 2000 yıl önce yapıldığı bilinmektedir (88).

1889 yılında, Parisli Dr. C.E. Brown-Sequard hayvan gonadlarından hazırladığı sıvıyı kendine enjekte ederek hücrel tedavi çalışmasını gerçekleştirmiştir. 1930' da Prof. Paul Niehans ilk modern hücrel çalışmayı yapmış ve 1950' li yıllarda hücrel tedaviler bilim adamlarınca kabul gören bir uygulama şekli haline gelmiştir (88,90).

Ülkemizde kök hücre tedavilerini gerçekleştiren ilk bilim adamı Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün' dür. Aygün hayvanlarda bazı hastalıkların kordon kanı ve fetal greftlerle iyileştirilebileceğini düşünerek bu konuda çalışmalarını yürütmüştür. Yaptığı klinik çalışmalarda insandan elde ettiği hücreleri intravenöz, intramüsküler enjekte ederek uygulamıştır. Bu uygulamalar sonunda hücrelerin ilgili dokulara yerleşerek çoğaldıkları ve işlevleri düzelttiklerini öne sürmüştür (91,92).

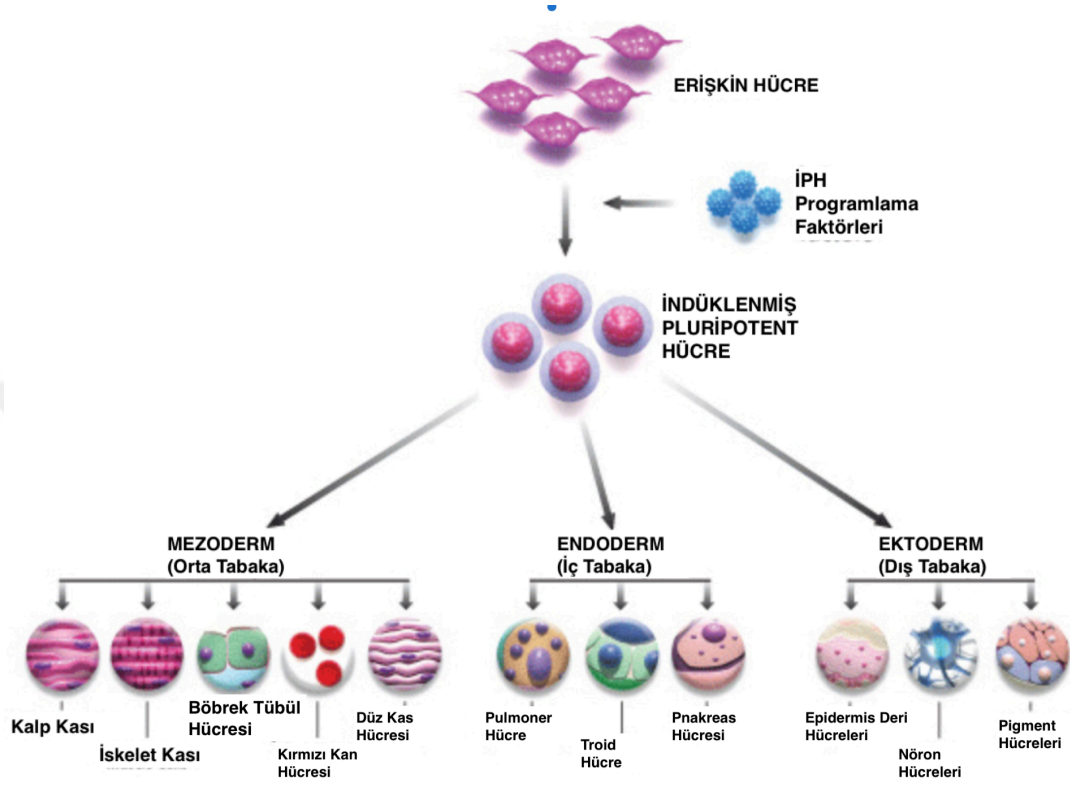
1949 yılında Jacobson aşırı radyasyona maruz kalmış deney hayvanlarında intravenöz kemik iliği uygulamasını gündeme taşımıştır (66). Becker ve ark. tarafından yapılan çalışmada aşırı radyasyona maruz kalan sıçanlara kemik iliğinden elde ettikleri hücreleri enjekte etmişler ve bu hayvanların otopsislerinde dalaklarında birçok nodül oluştuğunu gözlemlemişlerdir (77). Bu deney sonrasında KH'lerin kendini yenileyebilme özelliği dikkatleri üzerine çekmiştir. 1968 yılında Friedenstein

ve ark. tarafından yapılan çalışmada kemik iliğinden izole edilen bazı hücrelerin birçok hücre serisine kaynaklık edebilecek mezenkim kökenli prekürsör hücreler olduğu görülmüştür (78). 1981 yılında Evans ve Kaufman fare EmKH'lerini inceleme şansını bulmuştur (79). Fankoni anemisi olan bir hastaya kordon kanı nakli 1988 yılında gerçekleşmiştir. Maymun EmKH'lerinin elde edilmesi 1996 yılında gerçekleşmiştir (80). Nihayet ilk insan EmKH'si 1998 yılında yine Thomson ve ark. tarafından elde edilmiştir (70). Elde edilen insan EmKH'sinin pluripotent olduğu 2000 yılında tariflenmiştir (81).

Kemik iliği aspirasyonunun zorlukları ve elde edilen KH sayısının azlığı araştırmacıları yeni kaynaklar aramaya itmiştir. Bunlar arasında çalışmamızda da kullandığımız yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (YDKMKH) de vardır. Adipoz dokuda KH'ler olduğu ve bunların izolasyonu ilk defa Zuk ve ark. tarafından 2001 yılında rapor edilmiştir (82). Bu çalışmayı birçok çalışma takip etmiştir. Bu çalışmada lipoaspirasyon yöntemi ile elde edilen yağ dokusundan YDKMKH izole edilmiş ve takiben bu hücreler kültüre edilerek erişkin metabolizmadan izole edilebilen diğer fibroblast, kas, kemik iliği kaynaklı MKH ile karşılaştırılmıştır (82). In vitro ortamda osteojenik farklılaşmanın yanı sıra kondrojenik, miyojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyelleri kanıtlanmıştır. Bu çalışmayı YDKMKH'nin potansiyellerini inceleyen birçok çalışma takip etmiştir.

2001 yılında Halvorsen ve ark. YDKMKH osteojenik farklılaşma, 2002 yılında Safford ve ark. sinir dokusuna farklılaşma, yine 2002 yılında Ericsson ve ark. kıkırdak dokuya farklılaşma, 2005 yılında Seo ve ark. hepatojenik farklılaşma potansiyelini deneysel çalışmalarla ispatlamışlardır (83, 84-86). Toma ve ark. 2001 yılında sıçan dermisinden KH elde etmeyi başarmışlardır (114). Bu hücrelerin nöron, glia, düz kas ve yağ hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin osteogeneze de katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (115). 2007 yılında Sir Martin Evans, Mario Capecchi, Oliver Smithies embriyonik kök hücreler üzerinde yaptıkları çalışmalarla Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir. Bundan 5 yıl sonra Jhon B. Gurdon ve Shinya Yamanaka özelleşmiş hücrelerden uyarılabilir pluripotent kök hücrelerin (IPS) oluşturulabileceğini göstererek Nobel ödülü almışlardır (Şekil 13). Bu araştırma hücrelerin yeniden programlanabileceğini

göstermiştir. Bu gelişme hastalığa özgü IPS lerin üretilmesine imkan vermiştir. Günümüzde elliden fazla hastalığa özgü iPS üretilmiş olmasına karşın henüz klinik uygulamaya geçmiş değildir.



Şekil 13 : İndüklenmiş pluripotent kök hücrenin farklılaştığı hücreler

3.3 Kök hücrelerin özellikleri

KH olarak tanımlanan yapı üç ana özelliğe sahiptir (93,94). “Self renewal”, yani kendini yenileyebilme kabiliyeti ve ilk hücrenin özelliklerini aynen taşıyan en az bir hücre oluşturabilme özelliği. “Multi-lineage differentiation”, tek bir hücre iken birden fazla hücre serisine farklılaşabilme özelliği. Bir dokunun fonksiyonel ve yapısal onarımında görev alabilme özelliği. İnsan EKH’leri bu özelliklerin tamamına sahiptir (95, 96).

Belli bir dokudan alınan KH’lerin farklı dokulara ait hücrelere farklılaşabilmelerine kök hücre plastisitesi denmektedir. Bu özellikleriyle KH’ler uygun koşullarda belli bir sinyal yol izini takip ederek, köken aldıkları dokunun

hücrelerinden farklı özelliklere sahip başka hücelere dönüşebilmektedir (100). Doku mühendisliği kavramı bu işlemi in vivo koşullarda sağlayan ve kontrollü hücre farklılaşmasını temin ederek organ fonksiyonlarını sağlamaya çalışan bilim dalının adıdır (99). Bu yolla dışarı alınarak belli bir seriye yönlendirilen hücreler tekrar insan organizmasına transfer edilerek defektif olan dokunun tamiri sağlanmaya çalışılmaktadır.

Yağ dokudan izole edilen YDKMKH hücreleri kemik iliği kaynaklı kök hücrelerine göre üreme kapasitesi daha yüksek olan hücrelerdir (102). Kök hücrelerin uygulandığı mikroçevrenin topografik yapısı da önemlidir. Hücrenin göç edebilmesi, tutunması, çoğalması ve nihayet farklılaşması yüzey özelliklerinden de etkilenmektedir (103). Bu hücreler sistemik ya da bölgesel olarak uygulandığında hasarlı bölgeye göç etmekte ve doku yapı ve fonksiyonuna destek verecek şekilde organize olabilmektedir (104-106).

Farklı bir denekten elde edilen YDKMKH'leri enjekte edilen her hayvan için allogreft konumundayken herhangi bir immün reaksiyon gözlenmemektedir. Bu durum laboratuvar hayvanlarının genetik olarak ileri derece benzerliği yanı sıra KH'lerin düşük immünojenik özellikte oluşlarına da bağlanmaktadır (107).

Kök hücrelerin üzerinde sınıf 1 antijen olan HLA-G (insan lökosit antijen) antijeni bulunmaktadır. HLA-G özellikle İmmün reaktivitenin durdurulmasında ve T hücre anerjisinin oluşturulmasında rol alan bir HLA molekülüdür. Bu molekül embriyonik kök hücre dışında umbilikal kord, wharton jeli, amniyotik membran ve mezenkimal kök hücrelerinden (fetal kök hücrelerde) eksprese edilir. Erişkin hücrelerde bulunmaz (145). Ayrıca doğal öldürücüler (Naturel Killer-NK cells) üzerinde HLA-G'nin bağlandığı doğal öldürücü inhibitör reseptörü olan KIR2DL4 reseptörü mevcuttur. Bu reseptör sayesinde trofoblastlardan sentezlenen HLA-G, doğal öldürücü hücelere bağlı rejeksiyonu engellemeye çalışır (146).

KH'lerin kullanımını sınırlayan bazı dezavantajlar da mevcuttur. Yüksek maliyetli bir teknik oluşu en önde gelen dezavantajdır (68). Ayrıca canlı dokudan elde edilebilen KH sayısının yetersizliği, implante edilen hücrelerin apoptozise uğraması, bölgesel dokuya bağlı kanlanma benzeri sorunlar, skaffold ile uygulama

zorlukları ve nihayetinde etik sorunlar bu hücrelerin kullanımını sınırlamaktadır (68, 108,109). Doku mühendisliği ile yapılan hücresel tedavilerde immün reaksiyonlar, tümoral doku oluşumunun tetiklenmesi, donör uyumsuzluğu, nakli yapılan dokunun damarlanmasının yetersiz olması gibi problemler vardır (99).

3.4 Kök hücre kaynakları

Erişkin kök hücreler (EKH) insan vücudundaki birçok dokuda mevcuttur. Deneysel çalışmalarla periost, kemik iliği, dalak, timus, deri, kan, kornea, karaciğer, iskelet kası, sinovyum, diş pulpası, pankreas yağ, retina, amniotik kord, umbilikal kord, sinir sistemi hücreleri vs dokulardan elde edilebilmişlerdir (85,110,111).

Kemik iliği en iyi tanınan ve klinik uygulamada en sık kullanılan KH kaynağıdır (68). Esas olarak hematopoetik hücre desteği sağlayan bu KH'ler mezenkimal dokulara da dönüşebilme kabiliyetine sahiptir (112). Kemik iliğindeki bu MKH'ler ilk olarak 1960'larda bulunmuş ve zaman içinde özellikleri daha iyi şekilde öğrenilebilmiştir (78). Deneysel uygulamalarda bu hücrelerin kemik, kırık, bağ doku, yağ ve kas dokularına dönüşebildiği gösterilmiştir. Kemik iliği transplantasyonu olarak adlandırılan işlemde de alınan KH'ler hiçbir işleme tabi tutulmaksızın hastaya verilir. Kemik iliği stromasında MKH'ler bulunmaktadır. Bu hücrelerin elde edilmesinde en sık kullanılan kaynak iliak kanatlardır (113).

Bu hücreler in vivo kültür ortamlarında birçok farklı hücre serisine dönüşebilmektedir. Periferik kandaki CD34 pozitif hematopoetik hücreler de diğer bir KH kaynağıdır. Kemik iliğine göre elde edilmesi daha kolay olan bu yolla elde edilen hücre sayısı daha az olduğu için alınan hücreler in vitro kültüre edilerek hastaya verilebilmektedir.

Kordon kanı bir diğer KH kaynağı olarak tanımlanmıştır ve erişkin periferik kanına göre daha fazla progenitör hücre içermektedir (116). Kordon kanı kaynaklı hücreler kemik iliğine göre iyi bir alternatif olarak, özellikle pediatrik malign hastalıklarda kullanılmaktadır. Düşük immüniteye sahip bu hücreler anne ve bebek için kullanılabilir. Bu özelliği doğumdaki immünolojik fonksiyonları az oluşuna bağlanmaktadır. Umbilikal kord yapısındaki Wartin jölesi de diğer bir MKH

kaynağıdır (67). Bu hücreler düşük immüniteye sahiptir ve hem anne hem de bebek için kullanılabilir.

Gebeliğin 2. ayından 7. ayına kadar fetal karaciğer hematopoetik sistemin majör parçası olarak görev yapmaktadır ve dolayısıyla KH bakımından çok zengindir. Klinik uygulamalarda alternatif bir kaynak olarak yerini almıştır (118). Yağ dokudan elde edilen EKH'ler mezenkimal kaynaklı olup kemik, kıkırdak, kas ve sinir doku hücreleri için progenitör hücre olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir. Bu YDKMKH'lerinin özellikleri son on yıldır ayrıntılı olarak incelenmiştir. Multipotent olan bu hücrelerin özellikle osteojenik ve kondrojenik farklılaşma kabiliyeti in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Kemik doku kaynaklı MKH'e kıyasla daha az donör saha morbiditesi oluşturan bu hücrelerin kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır (74,101).

3.5 Kök hücrelerin kullanım alanları

Nöroloji, kardiyoloji gibi bazı alanlarda olumlu sonuçlar bildirilmekte, hatta ileri dönem lenfoma ve lösemi hastalarında eldeki tek çare olarak kabul edilmektedir (119). Etik ve uygulama zorlukları göz önüne alındığında da erişkin dokulardan elde edilen KH'ler EmKH'lere göre daha avantajlı görünmektedir. Hücre serileri olarak EKH'ler daha dar bir spektruma sahip olmakla birlikte daha sık kullanılmaktadır. EKH'ler ise kemik, deri, yağ doku gibi ulaşılması daha kolay ve etik olarak daha tartışmasız kaynaklardan elde edilebilmektedir. Çalışmalar ışığında KH uygulamaları bazı lenfoma ve lösemilerde, Akdeniz anemisinde başarılı şekilde uygulanmaktadır (119).

Yara iyileşmesine katkı sağlamak amacıyla endotelial progenitör hücre tedavisi son yıllarda uygulama alanı bulmuştur ve tamir dokusunda yeni damar oluşumu için KH nakli uygulanmaktadır (104). Sistemik uygulanan KH'ler selektif olarak iskemik bölgelere yerleşir ve tedaviye katkı sağlar, yara iyileşmesini hızlandırır. Yanıklarda, kronik yaralarda, diyabetik yaralarda bu yöntem günümüzde uygulanmaktadır.

Travmalar, enfeksiyon ya da tümör rezeksiyonu sonucu gelişen segmental kemik defektlerinin onarımında osteokondüktif bir scaffold (iskele) ile uygulanan KH'lerin

tedaviye katkı sağladığı bildirilmektedir. Sentetik greftler ve allogreftlere göre daha biyolojik olan bu yöntemle başarılı hayvan uygulamaları gerçekleştirilmiştir (97). İnsan üzerinde ciddi kemik kaybı olan vakalar için bu yöntemin uygulanabilirliği halen deneme aşamasındadır (97,98).

4. TENDON KÖKENLİ KÖK HÜCRE HAKKINDA GENEL BİLGİLER ve TIBBİ KULLANIMI

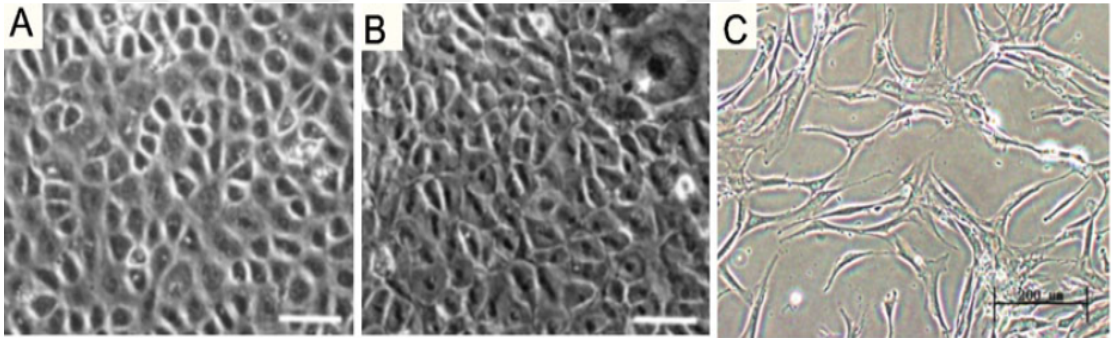
Tendonları oluşturan hücrelerin genel olarak bakım, onarım ve yenilenme için sadece tenositlerden oluştuğu düşünülmüştür. Bilimsel araştırmalarda tendonlar içinde kendi kendine çoğalabilen ve farklı hücre tiplerine farklılaşabilen özel hücre tipleri görülmüştür (120-124). 2007 yılında Bi ve arkadaşları tendonlarda kök hücrelerin varlığını direkt olarak göstermişlerdir (125). Bi ve arkadaşları insan ve fare tendonları içinde genel olarak klonlanabilen, kendi kendine çoğalabilen ve başka hücrelere farklılaşabilen özelliği gibi kök hücre karakterini taşıyan küçük bir hücre popülasyonu olduğunu göstermişlerdir (125). Bu gelişmelerden sonra tendon fiziolojisine, patolojisine ve tendon doku mühendisliğinde ilgi artmıştır. Tendon kökenli kök hücreler (TKKH) diğer kök hücrelere benzer bir şekilde onların lokal mikroçevresi (niş) içerisinde doku rejenerasyonu, devamlılığı ve onarımında rol oynar. TKKH'in in vivo niş ortamı şuan hala anlaşılammıştır. Bu hücreleri tanımlamak için genel olarak TKKH kullanılsa da literatürde birçok isim kullanılmaktadır.

4.1. TKKH İzolasyonu ve Kültürü

TKKH'leri, erişkin insan, fare, tavşan, rat, fetus tendonundan elde edilebilmiş ve kültüre edilebilmiştir (125,126,127). TKKH elde edebilmek için tip 1 kollajenaza maruz bırakılmaktadır. TKKH kümeler oluşturmadan önce plakalara yapışır ve günlerce sessiz kalırlar (128). Günümüzde kök hücre kültür metodları alt kültürlerle ayrışırken çoğaltma ve seçme mantığına dayanmaktadır. Zhang ve Wang arkadaşlarıyla beraber lokal tripsin uygulaması ile TKKH kümelerini tenositlerden ayırmışlardır (126,129,130). Başarılı TKKH kültürü için bir optimal ekim yoğunlu belirlemek en önemli kriterdir. TKKH diğer kök hücreler gibi çok düşük ekim

yoğunluğunda hızlı büyürler (127,132). Kök hücre kültürü için tür spesifik ve doku spesifik optimal başlangıç ekim yoğunluğu gibi farklılıkları mevcuttur.

TKKH kolonileri genişlik ve yoğunluğu koloniler arasında büyük varyasyonlar göstermektedir (126,127). TKKH'nin kıkırdak, kemik ve yağ dokuya farklı differensiyasyon potansiyelleri mevcuttur (125). Zhou ve arkadaşları insandan veya hayvandan elde edilen TKKH'nin yaşlı tendon dokularında sayıca daha az olduğunu yaptığı araştırmalarla ortaya koymuştur (135). Bu yüzden TKKH izolasyonu için daha genç insan veya hayvan tendonları önerilmektedir. İnsan hamstring tendonu ve fare patellar tendonu 3–4 % TKKH'si içermektedir. (125) Rat fleksör tendonu 1–2% TKKH'si içermektedir (127). 5–6% TKKH'si bulduran insan aşil tendonu 2 pasaj sonrasında ancak koloniler oluşturabilmiştir. TKKH arasındaki morfolojik benzerlikler tür, doku ve hücre pasajı ve yoğunluğuna göre değişmektedir (Şekil 14).



Şekil 14 : Bu fotoğraf farklı türlerden ve dokulardan alınmış TKKH' nin farklı morfolojilere sahip olduğunu göstermektedir. A) Tavşan patellar tendonundan elde edilen TKKH' ni göstermektedir. B) Tavşan aşil tendonundan elde edilen TKKH'ni göstermektedir. C) İnsan fetus hamstring tendonundan elde edilen TKKH'ni göstermektedir. [Kaynak: Pauline Po Yee Lui & Kai Ming Chan, Tendon-Derived Stem Cells (TDSCs): From Basic Science to Potential Roles in Tendon Pathology and Tissue Engineering Applications, Stem Cell Rev and Rep (2011) 7:883–897]

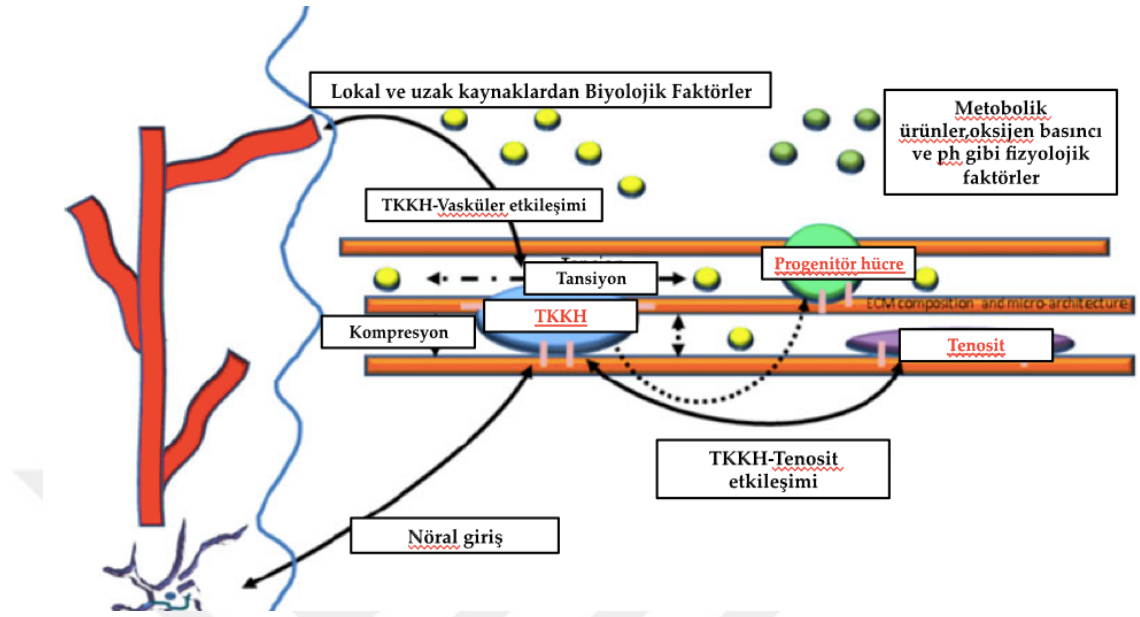
4.2. T.K.K.H'nin İmmünofenotipik profili

TKKH fenotipik olarak diğer MKH'ne benzer yüzey belirteçleri buldurmaktadırlar. TKKH Sca-1, CD44, CD90, CD90.1, CD90.2, CD105, Stro-1, CD146, nükleostemin, Oct-4 ve SSEA-4 yüzey belirteçi buldurmakla birlikte CD31, CD34, CD18, CD117, CD45, Flk-1, CD144 ve CD106 yüzey belirteçi buldurmamaktadır (168-173,178). Genç ve yaşlı rat tendonları TKKH'de farklı

yüzey belirteçleri bulunabilmektedir (178). Oysa hemen hemen bütün genç ve yaşlı rat tendonunda bulunan TKKH, nucleostemin, Oct-4 and SSEA-4 bulundurmakla beraber yaşlılar TKKH' daha az CD90.1 , daha fazla miktarda CD44 bulundururlar. Zhang ve Wang yaptığı araştırmada TKKH'de Oct-4, SSEA-4 ve nucleostemin bulundurduğunu fakat tenositlerin bulundurmadığını gözlemlemiştir (126,129).

4.3. TKKH'nin niş ortamı

Uygun niş ortamı olmadığında erişkin kök hücre fonksiyonları sınırlıdır. Kök hücre ve niş arasındaki etkileşim dokuların sürdürülmesi için gerekli bir dinamik sistem oluşturur. Ancak niş ortamı aberrant yollar oluşturarak patolojik durumlara da yol açabilmektedir. Kök hücre niş ortamı modifikasyonu veya in vitro kök hücre kültürü esnasında in vivo kök hücre niş replikasyonu yaparak, hastalıklar için yeni kök hücre tedavi protokolleri belirlenebilir. Bu yüzden kök hücre niş ortamını anlamak kök hücre biyolojisi, doku sağlığı ve hastalıklar için çok önemlidir. YDKKH'de olduğu gibi yaralanmış tendonda da TKKH'nin doku hemostazı ve onarımı yapabileceği düşünülmektedir. Niş sinyalleri ve organizasyonu henüz tam anlaşılamamıştır. Mekanik faktörler, ekstrasellüler matriksin nano-mikro yapılanması, biyolojik faktörler, tenositler, nöral ileti, vasküler ileti, doku aktivitesi sonucu oluşan oksijen açığı ve metabolik ürünler niş ortamını etkileyen ve TKKH'nin kaderini belirleyen önemli faktörlerdir (Şekil-15).



Şekil 15: TKKH ile ilgili potansiyel niş faktörleri şemada gösterilmektedir. [Kaynak: Pauline Po Yee Lui & Kai Ming Chan, Tendon-Derived Stem Cells (TDSCs): From Basic Science to Potential Roles in Tendon Pathology and Tissue Engineering Applications, Stem Cell Rev and Rep (2011) 7:883–897]

TKKH'nin yenilenmesinde nişin etkilerini gösteren çalışmalar, proliferasyon ve differansiyasyon tendon fizyolojisi ve patolojisi hakkında önemli bilgiler göstermekte ve doku mühendisliği için in vitro TKKH'nin üretilebileceğini göstermektedir. Tendon için önemli olan mekanik faktörlere TKKH'nin duyarlı olduğu yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (133, 136, 137).

4.4. TKKH'nin Tenojenik differansiyasyonu

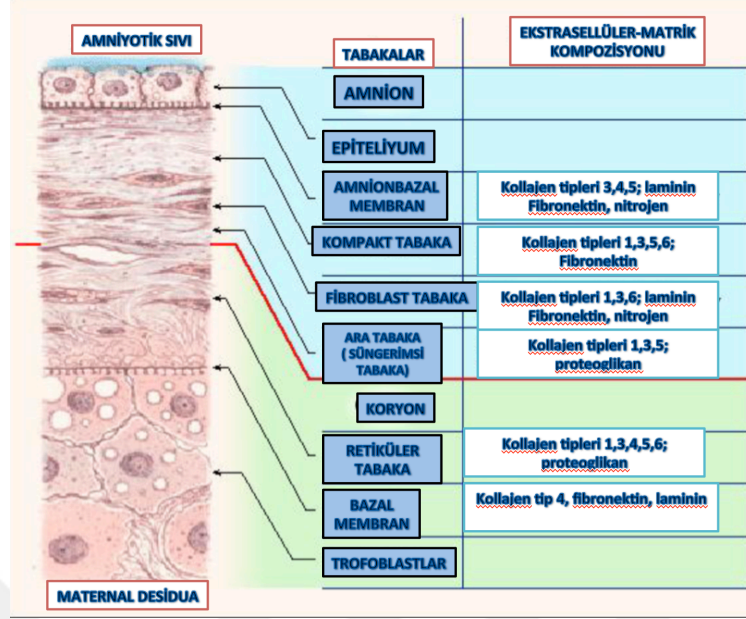
Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler ektopik tümör ve kemik formasyonu yapması nedeniyle, kök hücrelerin in vitro tenojenik differansiyasyonu ektopik tümör ve kemik formasyonu gibi istenmeyen olayların önüne geçmek için bir avantaj oluşturmaktadır (138,139,140). Mezenkimal kök hücrelerin tenojenik differansiyasyonunu sağlayarak ektopik tümör ve kemik formasyonu oluşumunu önlemek büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsan fetus TKKH'nin osteojenik differansiyasyonu süprese edildiğinde integrin ve miyozin bağlantılı mekanotransdüksiyon yolu ile nano-fibröz iskele içinde tenojenik odaklar

oluşturmaktadır (128). Fakat henüz TKKH'nin tenojenik differansiyasyonu tam olarak açıklanamamıştır.

5. HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMIŞ AMNİYOTİK MEMBRAN (HAAM)

5.1. Anatomik ve histolojik yapısı

Amniyotik membran (AM), fetal (koryonik plak) ve meternal (desidual plak) komponenti olan ekstra-embryonik dokudur. Bu iki kısım koryonik villuslar tarafından birbirine bağlanarak, koryon kesesinin sitotrofoblastik zarını desidua bazalis tabakasına bağlar. AM tek sıralı epitel katmanından, kalın bazal membrandan ve avasküler stromadan oluşmaktadır. AM sinir ve damar içermediği için amniotik sıvıdan veya aşağı kısımdaki desidua tabakasından diffüzyonla beslenir. Bu diffüzyonda önemli paya sahip olan bazal membran (BM) insan vücudundaki en kalın BM'dir. BM yanındaki stromal matriks doku AM'a ana destek yapıyı sağlar. Bu bölgedeki kollajenler fibroblast tabakadaki mezankimal hücreler tarafından sentezlenir. İntertisyel kollajen olan tip 1 ve 3 AM'ın mekanik sağlamlığından sorumlu iken tip 5 ve 6 kollajenler ise, intertisyel kollajen olan tip 1 ve 3'ün bazal membran ile ilişkisini sağlar. Proteoglikan ve glikozaminoglikandan zengin ara tabaka ise tip 3 kollajenden zengindir ve koryonik membranla komşudur. Bu gevşek bağ doku, koryonik tabaka ile aralarındaki bağların zayıf olması nedeniyle kolayca koryonik membrandan sıyrılır.



Şekil 16: Term zamanında fetal membranların katmanlarının şematik görünümü

5.2. HAAM Özellikleri

Doku mühendisliğinde, hücrelerin üzerinde tutunduğu ve büyüdüğü iskele (scaffold) önemli bir yere sahiptir. İskelenin konak dokuya kolayca entegre olması ve hücrelerin büyümesi için uygun ortam sağlaması gerekmektedir. Bu yüzden doku mühendisliğinde iskele oluşturmak için biyomateryal seçimi ve dizaynı önemlidir. Doku mühendisliğinde iskele üzerine hücre ekimi 3 boyutlu bir kültür oluşturmak için en önemli ilk adımdır. İskele üzerine başarılı hücre ekiminde yaşayan hücreler kadar, iskelenin ekstrasellüler matriks komponentleride önemlidir. Özellikle AM'ın skar oluşumunu azaltması, antienflamatuvar ve antimikrobiyal özelliği sayesinde hücre differansiyonu ve proliferasyonunu sağlamaktadır. Bunlara ek olarak AM ekstrasellüler matriksinde büyüme faktörlerinin bulundurması AM'ın doku mühendisliği için etkin bir iskele adayı olduğunu göstermektedir. Ayrıca AM, kolay elde edilebilir, işlenebilir ve transfer edilebilir bir biyomateryaldir. AM'ın biyouyumlu olmasındaki en önemli etken toksik etki yapmaması, kanserojen olmaması ve bulunduğu dokuda immunojenik reaksiyon oluşturmaması. Ayrıca mekanik özellikleri permeabil, stabil, elastik, fleksibl ve doku replasmanı ile uyumlu olması gerekmektedir. Hücre adezyonuna izin vermeli ve büyüme faktörü, genetik materyallerin geçişi gibi biyomodulatör maddelerin geçişine izin vermeli.

Çoğu skafold, memeli dokularından elde edilmektedir. Bu nedenle AM önemli

bir skafol materyalidir (145). AM plasentanın en iç katmanını oluşturmaktadır. Bu özel yapısı ve biyolojik yaşayabilirliği nedeniyle doku mühendisliğinde skafold olarak uygun bir materyaldir. Ekstrasellüler matriks elemanı olan bazal membran kök hücreler için uygun ekim alanı oluşturmaktadır. Bazal membran yanındaki stromal membran AM'nin fibröz iskeletini oluşturur. Burada bulunan mezenkimal hücreler ve kollajen kompakt tabakayı oluşturur. İntertisyel kollajenler (tip1 ve tip3) predominanttır ve AM'nin mekanik integrasyonunu sağlar.

5.2.1. Anti-inflamatuvar ve anti-mikrobiyal özellikleri

Doku mühendisliğinde yabancı cisim reaksiyonu meydana gelerek inflamatuvar bir süreç başlayabilmektedir. İmplant edilen materyal konak hücreler tarafından parçalanabilir veya parçalanamaz. İnflamasyon bazen iyileşmeyi tetikleyici bir tetik olsada, implant başarısızlığına neden olabilir. Yabancı cisim reaksiyonu büyük hücreler ve makrofajların stokin üretmesi ile fibroblastları aktive eder ve fibrozis ile sonuçlanır. Bu fibroblastlar Transforme eden büyüme faktörü beta (TGF-b) tarafından aktive edilir. (Khouw ve Ark., 1999) AM, TGF-b salınımını ve reseptör sayısını azaltarak fibrozis oluşumunu azaltır. Böylece doku rekonstrüksiyonundan daha çok, skar oluşumunu önlemede daha fazla role sahiptir. (Tseng ve Ark., 1999; Lee ve Ark., 2000). AM ayrıca proinflamatuvar stokinler olan IL-1 alfa ve IL-1 beta salınımını da azaltarak skar oluşumunu azaltır. (Solomon ve Ark., 2001). Matriks Metalloproteinazlar (MMP) polimorfonükleer hücreler ve makrofajlardan sentezlenir. MMP doğal inhibitörleri AM'da bulunmaktadır. (Hao ve Ark., 2000; Kım ve Ark., 2000) Yüksek molekül ağırlığına sahip Hiyalorinik asit, AM'da yüksek oranda bulunmaktadır (145). Hiyalorinik asit CD 44 için bir ligand görevi görerek lenfosit gibi inflamatuvar hücrelerin adezyonunu sağlar. Ayrıca Beta 3-Defensin epitelyal hücre mukoza yüzeyinden sentezlenen major anti-mikrobiyal peptittir. (Krisanaprakornkit ve Ark.,1998; Harder ve Ark., 2000)

5.2.2. Düşük immünojenite ve mekanik özellikleri

Doku Mühendisliği için biyoyumlu iskele elde edebilmek için en önemli komponent düşük immünojenitedir. Ekstrasellüler matriks (EM) için en sık kullanılan ajanlar ksenojenik (örneğin domuz aşıl tendonundan elde edilen tip 1

kollajen) olduğu için düşük immünojenite önemli bir yere sahiptir. Biyomateryallerin doğal yapısı değiştiği zaman da inflamatuvar reaksiyon daha fazla gözlenmektedir. Örneğin EM'in dayanıklılığını arttırmak için yapılan çapraz bağlanma oranını artırılması inflamatuvar reaksiyonu daha fazla arttırmaktadır. Diğer düşük immünojen özellik ise trofoblastlardan sentezlenen sınıf 1 antijen olan HLA-G'dir. T hücrelerine antijen sunan peptidler olan HLA-A ve HLA-B sınıf 1 antijenlerinden farklı olarak HLA-G, doğal öldürücüler ve makrofajların ligand reseptör sentezini azaltarak konak dokunun immün yanıtını baskılar (146). Hücre differansiyasyonu için mekanik sinyaller de önemlidir. İskele elde edilmesinde için vizikoelastitise gereklidir. Mesela sert bir iskele, damarların az vizikoelastitiseye sahip olması ve böylece damarlarda intimal hiperplazi ve oklüzyon meydana gelmesine sebep olmaktadır (Sarkar ve Ark., 2007).

5.3. Kullanım alanları ve kaynakları

Scaffold için kullanılmış en eski biyomateryal fetal membranlardır. Fetal membran ilk defa 1910 yılında deri transplantasyonu için kullanılmıştır. Daha sonra, fetal membranların yanıkların tedavisinde yararlı olduğu tespit edilmiştir. Cerrahi örtüler oluşturulması; oral kavite rekonstrüksiyonu, mesane, vajina, timpanoplasti, artroplastik ve benzeri dokuların rekonstrüksiyonunda kullanılmıştır (145).

Referans	AM komponenti	Kaynak	hedef hücre/ doku
Azuara-Blanco ve Ark, 1999	Kriyoprezerve AM	İnsan	Göz
Chen ve Ark., 2000	Kriyoprezerve AM	İnsan	Göz
Davis, 1910	İntakt AM	İnsan	Deri
Ishino ve Ark., 2004	Soyulmuş AM	Tavşan	Göz
Jin ve Ark, 2007	İntakt ve Soyulmuş AM	Tavşan	Kartilaj
Kosuga ve Ark., 2000	Aminyotik Epitel Hücreleri	Fare	Bete-glukoronidaz sekresyonu yapan hücreler
Mligiliche ve Ark., 2002	Soyulmuş AM	Rat	Periferel Sinir
Mohammad ve Ark., 2000	Soyulmuş AM	Rat	Periferel Sinir
Takashima ve Ark., 2000	Aminyotik Epitel Hücreleri	Fare	Hepatosit
Tsai ve Ark., 2007	Kriyoprezerve AM	-	Endotelial Hücreler
Tseng ve Ark., 1998	Kriyoprezerve AM	İnsan	Göz
Ucakhan ve Ark., 2002	Non- Prezerve	İnsan	Göz
Yang <i>et al.</i> , 2006	Soyulmuş AM	Fare	Deri

Şekil 17: Farklı dokularda amniyotik membranın kullanıldığı insan ve hayvan çalışmaları

6. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Hannover Wistar cinsi, beyaz, dişi, ortalama 320 gram ağırlığında, 10 aylık, erişkin, standart laboratuvar koşullarında yetişmiş, aynı soydan, 70 adet rat kullanıldı. Cerrahi prosedürlerin tamamı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı ameliyathanesinde, steril aletler kullanılarak steril şartlarda yapıldı. Hayvanların ameliyat sonrası bakımları yine aynı merkezde yapıldı. Öncesinde Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı ameliyathanesinde ratların kasık bölgesinden alınan yağ dokularından YDKKH ve aynı ratların aşil tendonundan TKKH elde etme amaçlı olarak Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı'na gönderildi ve hücre kültür işlemleri de burada yapıldı.

Canlı Hayvan Modelinde Kullanılan Ratların Bakımı:



Şekil 18 :Deney hayvanlarının barınma koşulları ve çalışmanın gerçekleştirildiği Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarı

70 adet Wistar cinsi, beyaz, dişi erişkin rat Bezmialem Vakıf Üniversitesi Geliştirme ve Araştırma Merkezi Hayvan Barınağı'na getirilerek saat 8.00 ile 20.00 arasında aydınlıkta, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sabit sıcaklıkta, havalandırılmalı bir odada, taze çeşme suyu ve günlük standart yemleri verilerek, $0,25\text{ m}^2$ 'lik 9 bölmeli kafeste, günlük düzenli kafes bakımları yapılarak barındırıldı. Kafes bölmelerinde birbiriyle geçinebilen en fazla 4 hayvan bulunduruldu (Şekil-18).

Tablo 1: Kullanılan Alet ve Malzemeler

Ketamin HCL (Ketalar ® 50mg/ml),Pirilokain HCl(Citanest ® 250mg/ml)
Enjektör 5ml,1ml(insulin),
Çizim kalemi
Cetvel
Povidon-iodin standart solusyon,
Klorheksidinli sıvı sabun 15 numara bistüri
2 adet Adson penset
Steven's doku makası
1 adet Portegü
Tendon onarımı için: 5-0 (Propilene;Doğsan ® ,Türkiye) yuvarlak iğneli dikiş materyali
Cilt onarımı için : 5-0 (Propilene;Doğsan ® ,Türkiye)keskin iğneli dikiş materyali
Steril gaz bezi,steril atılabilir örtüm seti,
Steril cerrahi eldiven(No:8 Beybi)
Sanitaplast ® Hipoallerjenik beyaz tıbbi flaster Tartı aleti
HP Photosmart R817 Fotoğraf makinesi

6.1. Deney Grupları

Her grupta 14 adet denek olacak şekilde (7 adet histopatolojik test için, 7 adet biyomekanik test için) toplam 5 grupta 70 adet dişi wistar sıçan kullanıldı. Her rat ayrı ayrı sağ bacak posteromedialinde cilt insizyonu sonrası Aşil tendonu eksplore edildi ve insersiyon 0,5 cm proksimalinden transvers tenotomi yapıldı. Daha sonra gruplar yapılan işlemlere göre aşağıdaki gibi adlandırıldı

Tablo 2 : Çalışma grupları

1.Grup : Tendon çevresine hiçbir ek materyal kullanılmadan sadece standart tendon onarımı yapılan grup.

2.Grup : Standart tendon onarımı sonrası koaptasyon bölgesi çevresi sadece hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılan grup

3.Grup : Standart tendon onarımı sonrası koaptasyon bölgesi çevresi yağ kaynaklı mezenkimal kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılan grup

4.Grup : Standart tendon onarımı sonrası koaptasyon bölgesi çevresi tendon kaynaklı kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılan grup

5.Grup : Standart tendon onarımı sonrası koaptasyon bölgesi çevresi yağ kaynaklı mezenkimal kök hücre ve tendon kaynaklı kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılan grup

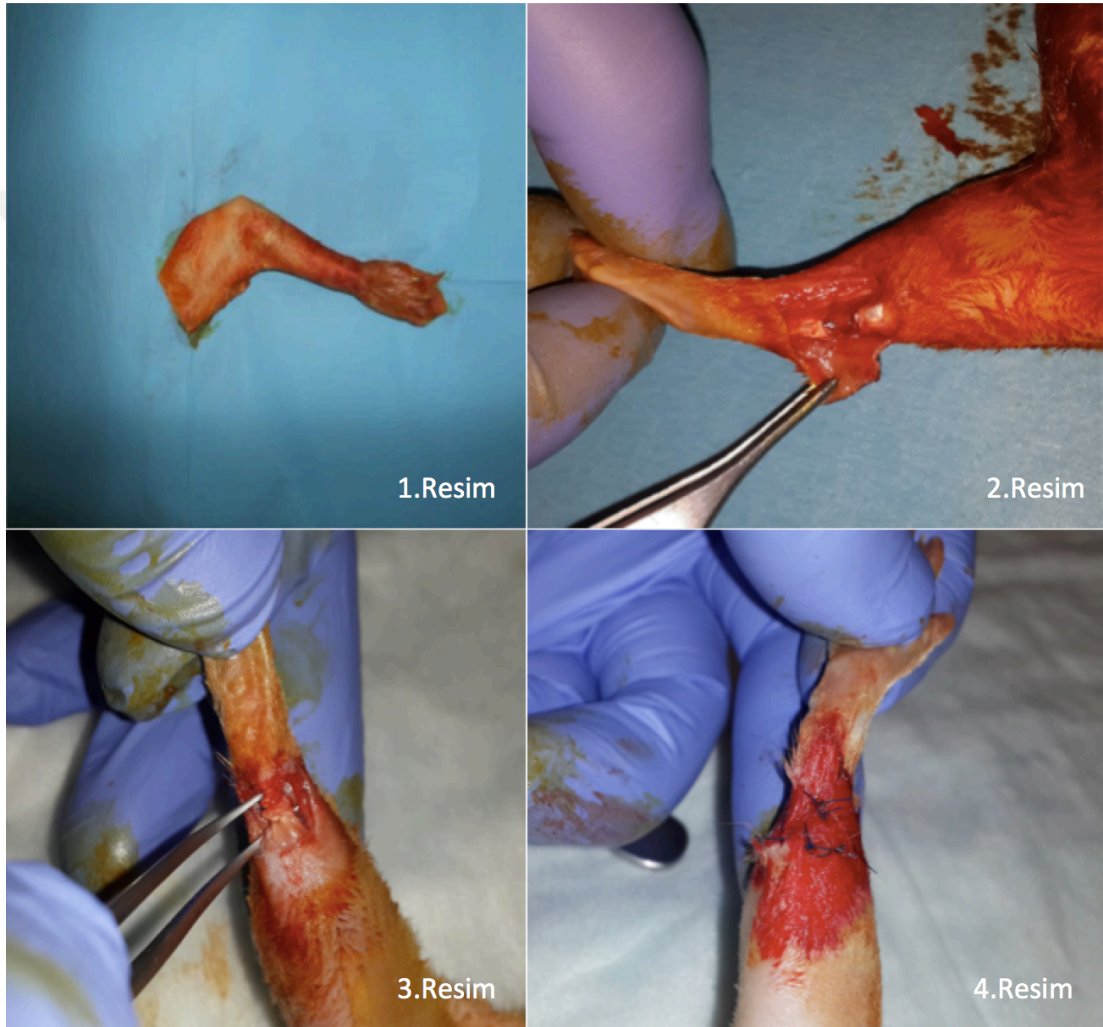
6.2. Cerrahi işlemler

Aseptik koşullar altında gerçekleştirilen işlemlerde, anestezi ajanı olarak Ketamin hidroklorür (35mg/kg İM) ve xylazine hidroklorür (5mg/kg İM) kullanıldı. Anestezi sonrası Ratlara profilaktik antibiyotik tedavisi uygulanmadı.

Ratlar supin pozisyonda tespit edilerek sağ alt ekstremitesi, sağ kasığına kadar traş edildi (Şekil 19). Polivinilpirolidon iyot (Polividon-iyot) 10 % (Batticon®, Adeka İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.) solüsyonu ile temizlik sonrasında steril olarak örtüldü. Sağ uyluk posteromedialinden yaklaşık dikey uzunluğu 2 cm yatay uzunluğu

1 cm olan pedikülü anteriyora uzanan dörtgen flepler eleve edildikten sonra aşil tendonu eksplere edildi. Aşil tendonu 0,5 cm insersiyo proksimalinden transvers tenotomi yapıldı.

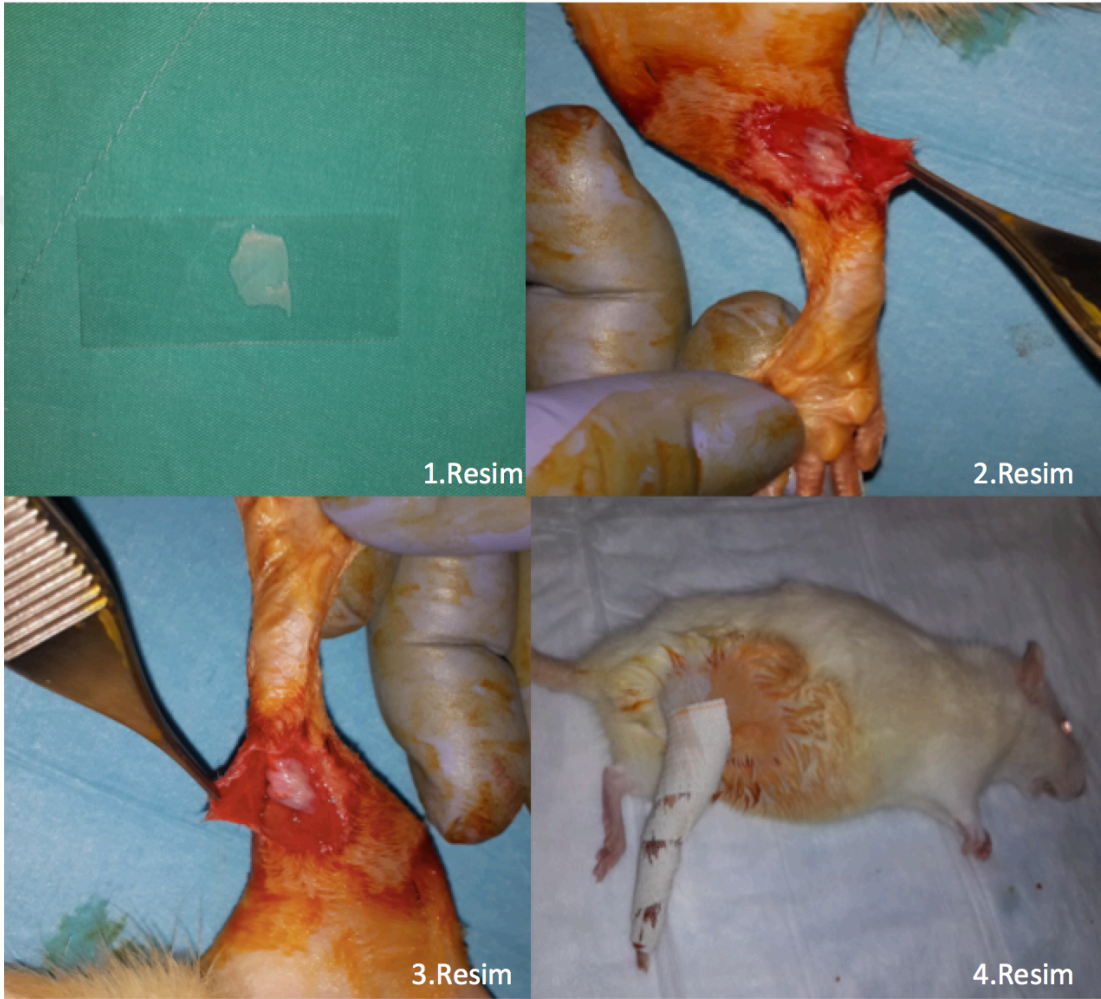
Uzunluğu 1 cm olan pedikülü posteriyora uzanan dörtgen flepler eleve edildikten sonra aşil tendonu eksplere edildi. Aşil tendonu 0,5 cm insersiyo proksimalinden transvers tenotomi yapıldı (Şekil 19).



Şekil 19 : Ratlarda sağ alt ekstremitte uygun traş sonrası steril şartlara uygun uygun olarak boyanıp örtülmesi (1. Resim), sağ alt ekstremitte Aşil tendonu 0,5 cm insersiyo proksimalinden transvers tenotomi görüntüsü (2. Resim), kesilen tendon kısmı 5.0 yuvarlak prolen ile Modifiye Kessler tekniği ile onarımı (3. Resim), onarımı sonrası dörtgen flep eski yerine suture edildikten sonraki görünümü (4. Resim)

1. grupta tenotomi yapıldıktan sonra kesilen tendon kısmı 5.0 yuvarlak prolen ile Modifiye Kesler tekniği ile onarıldı. Cilt sutüre edildi (Şekil 19).

2. grupta tenotomi yapıldıktan sonra kesilen tendon kısmı 5.0 yuvarlak prolen ile Modifiye Kesler tekniği ile onarıldı. Onarılan tandon kısmı 1x1 cm² boyutlarında hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran (Şekil 20) ile sarıldı. Cilt sutüre edildi. Pansuman yapıldı.



Şekil 20: 1x1 cm² boyutlarında hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran görünümü (Resim 1), onarılan tendon kısmı 1x1 cm² boyutlarında hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılmış haldeki görünümü (Resim 2), onarılan tendon kısmın yağ kayanklı mezenkimal kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarılmış haldeki görünümü (Resim 3), cilt sutürasyonu sonrası pansuman yapılmış ve bacağın atele alınmış görünümü (Resim 4)

3. grupta tenotomi yapıldıktan sonra kesilen tendon kısmı 5.0 yuvarlak prolen ile Modifiye Kessler tekniği ile onarıldı. Onarılan tendon kısmı 1x1 cm² boyutlarında yağ kaynaklı mezenkimal kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarıldı (Şekil 20). Cilt sutüre edildi. Pansuman yapıldı.

4. grupta tenotomi yapıldıktan sonra kesilen tendon kısmı 5.0 yuvarlak prolen ile Modifiye Kessler tekniği ile onarıldı. Onarılan tendon kısmı 1x1 cm² boyutlarında tendon kaynaklı kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarıldı. Cilt sutüre edildi. Pansuman yapıldı.

5. grupta tenotomi yapıldıktan sonra kesilen tendon kısmı 5.0 yuvarlak prolen ile modifiye kesler tekniği ile onarıldı. Onarılan tendon kısmı 1x1 cm² boyutlarında tendon kaynaklı kök hücre ve yağ kaynaklı mezenkimal kök hücre ekilmiş hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile sarıldı, cilt sutüre edildi. Pansuman yapıldı.

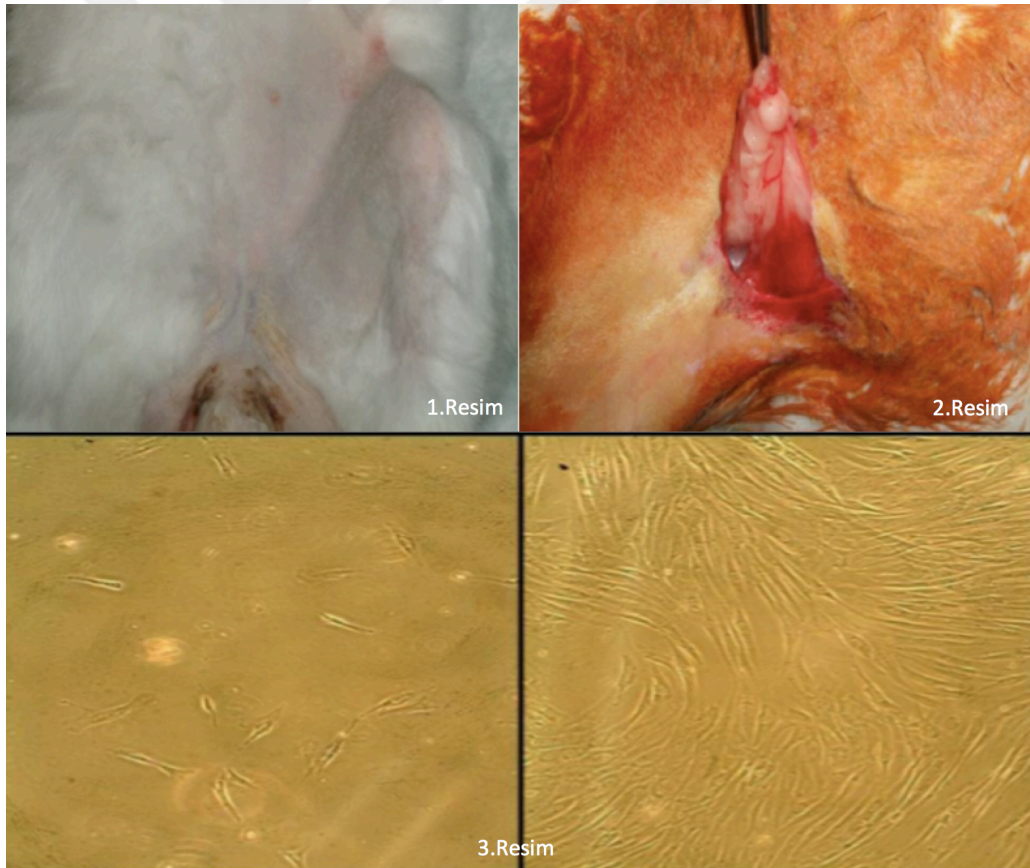
6.3. Amniyotik membran greftlerinin hücrelerinden ayrılması işlemi

Cerrahi işlem ile alınmış ve 2-8°C derecede muhafaza edilmiş amniyotik membran %1 batikon içeren Fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde yıkandı. Doku batikondan arındırmak için PBS ile iki kez yıkandı. Yıkaması yapılan doku deoksikolik asit içeren korunmuş matriks deselülarizasyon solusyonu ile muamele edilerek deselülarize hale getirildi. Deselülarize hale gelen doku antibiyotik içeren yıkama solusyonu ile yıkanarak deoksikolik asitten arındırıldı. Deselülarize doku testler için bir kısmı ayrıldıktan sonra hücre yüklemesi yapılana kadar %1 antibiyotik içeren saklama sıvısı içerisinde 2-8°C'de muhafaza edildi.

6.4. Yağ dokudan YDKMKH elde edilmesi

6.4.1. Donör hayvandan yağ doku alınması

Çalışmada kullanılacak YKKH için 10 adet rat çalışmadan 1 ay önce hazırlandı. Ratlara sedasyon ve analjezi amaçlı anestezi ajan olarak Ketamin hidroklorür (35mg/kg İM) ve xylazine hidroklorür (5mg/kg İM) uygulandı. Hayvan operasyon masasına sırtüstü yatırılarak kolları ve bacakları çok sıkı olmayacak şekilde bağlandı. Kasık bölgeleri tıraş edildi (Şekil 21). Kasık bölgeleri, uyluk ve karın bölgesi povidin iodine 3 defa boyandı ve kuruması beklendi. Kasık bölgesinden yapılan 2 cm'lik düz insizyonla girildi ve fındık büyüklüğünde cilt altı yağ dokusu alındı (Şekil 21). Karşı kasıktan da aynı teknikle aynı miktarda yağ doku alındı. Alınan doku steril şekilde 10 ml transfer medyumunu içeren tüplere konuldu. Hayvanın kasık bölgesi yıkanarak 4.0 örgülü emilebilir dikiş ile tek kat olarak dikildi.



Şekil 21: Ratlardan yağ doku elde etmek için kasık bölgesinin tıraş edildikten sonraki görünümü (Resim 1) ve bu bölgeden yapılan insizyon sonrası elde edilen yağ greftinin görünümü (Resim 2). Soldaki resim yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kültürünün 2. günü, sağdaki resim yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 15. günde flask tabanını kaplaması (Resim 3)

6.4.2. Yağ Dokudan YDKMH elde etme işlemi ve hücrelerin izolasyonu

Hücre izolasyonu: 100 mg sıçan kaynaklı yağ dokusu tripsin-kollejenaz vasıtası ile enzimatik disseksiyona alındıktan sonra 800 g'de santrifügasyon ile yağ hücrelerinden ayrıldı.

Primer kültür: Elde edilen hücreler T-150 flaskta %1 antibiyotik, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) bulunan ortamda DMEM-LG ile kültüre edilir. 3 günde bir besiyeri değiştirilen flasktaki hücreler %70 konfluense ulaşması beklenir.

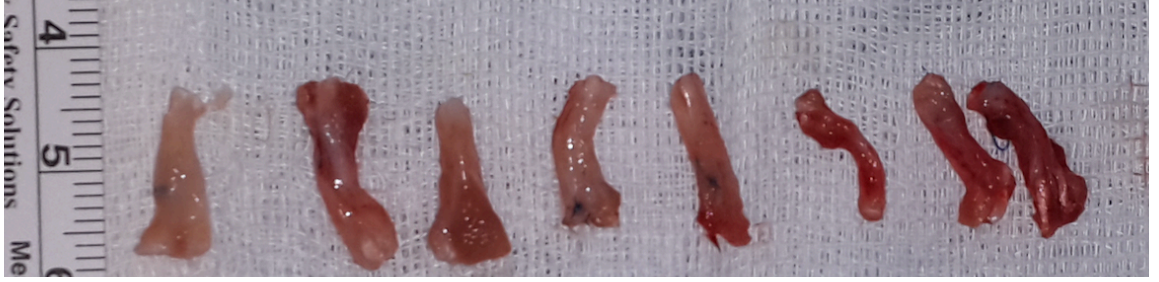
1.Pasaj: Primer kültür süreci tamamlanan hücreler tripsinle kaldırılarak aynı besiyeri ortamında tekrar üremeye alındı.

2.Pasaj: 1. Pasaj sürecinde flasktaki hücrelerin ≥ 70 konfluense ulaştıktan sonra tripsin ile kaldırılarak PBS ile yıkaması yapıldıktan sonra %1 penisilin ve %10 FBS içeren DMEM-LG ile resüspande edildi. Hücre süspansiyonundan kalite kontrol testleri için örnek alındı. Kalan hücreler işaretlendi. İşaretleme kontrolü yapılmak üzere akım sitometri için örnek alındıktan sonra uygulama için kullanıldı.

6.5. Tendon dokudan T.K.K.H. elde edilmesi

6.5.1. Donör hayvandan tendon doku alınması

Çalışmada kullanılacak T.K.K.H. için 10 adet rat çalışmadan 1 ay önce hazırlandı. Ratlara sedasyon ve analjezi amaçlı anestezi ajan olarak Ketamin hidroklorür (35mg/kg İM) ve xylazine hidroklorür (5mg/kg İM) uygulandı. Hayvan operasyon masasına sırtüstü yatırıldı. Sağ alt ekstremité traş edildi ve povidin iodinle 3 defa boyandı ve kuruması beklendi. Sağ uyluk posteromedialinden yaklaşık dikey uzunluğu 2 cm yatay uzunluğu 1 cm olan pedikülü anteriyora uzanan dörtgen flepler eleve edildikten sonra aşil tendonu eksplere edildi ve Aşil tendonu origo ve insersiyó sınırından eksize edildi (Şekil 22). Alınan doku steril şekilde 10 ml transfer medyumu içeren tüplere konuldu. Hayvanlar daha sonra sakrifiye edildi.



Şekil 22: Ratlarda tendon kaynaklı kök hücre elde edilmesi için sağ Aşil tendonu eksizyon materyalleri

6.5.2. Tendon dokudan TKKH elde etme işlemi ve hücrelerin izolasyonu

Hücre izolasyonu: Sıçan kaynaklı tendon dokusu tripsin-kollejenaz vasıtası ile enzimatik disseksiyona alındıktan sonra 800 g'de santrifügasyon ile hücrelerinden ayrıldı.

Primer kültür: Elde edilen hücreler T-150 flaskta %1 antibiyotik, %10 Fetal Bovine Serum (FBS) bulunan ortamda DMEM-LG ile kültüre edilir. 3 günde bir besiyeri değiştirilen flasktaki hücreler %70 konfluense ulaşması beklenir.

1.Pasaj: Primer kültür süreci tamamlanan hücreler tripsinle kaldırılarak aynı besiyeri ortamında tekrar üremeye alındı.

2.Pasaj: 1. Pasaj sürecinde flasktaki hücrelerin \geq %70 konfluense ulaştıktan sonra tripsin ile kaldırılarak PBS ile yıkaması yapıldıktan sonra %1 penisilin ve %10 FBS içeren DMEM-LG ile resüspande edildi. Hücre süspansiyonundan kalite kontrol testleri için örnek alınır. Kalan hücreler işaretlendi. İşaretleme kontrolü yapılmak üzere akım sitometri için örnek alındıktan sonra uygulama için kullanıldı.

6.6. Hücrelerin İşaretlenmesi

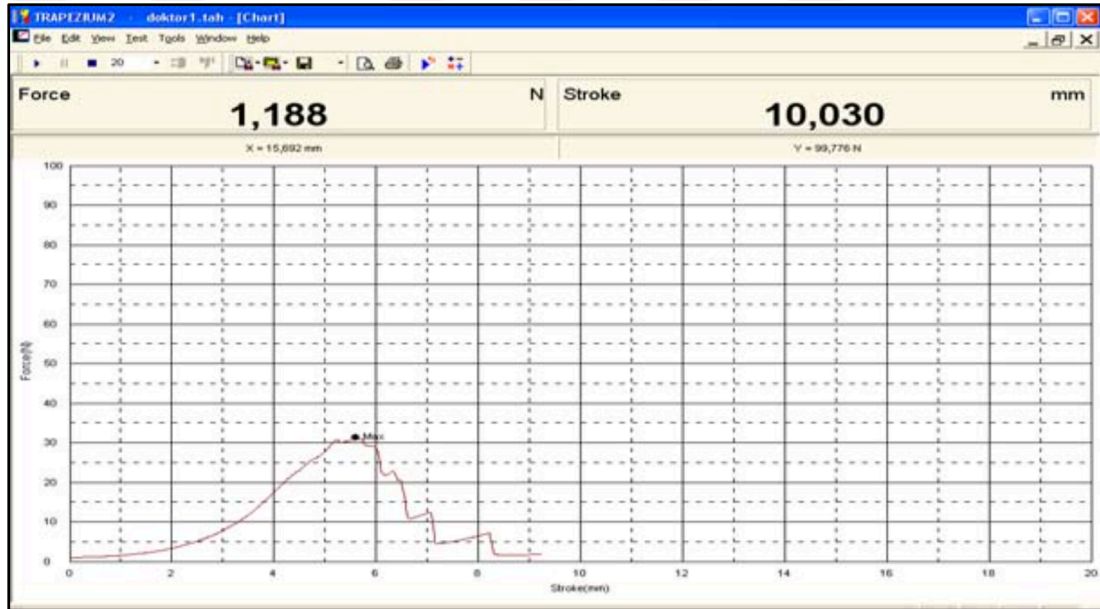
Elde edilen hücreler "Qtracker Cell Labeling Kits" kullanılarak işaretlendi. Kit içerisinde bulunan A ve B komponentleri hücre miktarına uygun oranlarda bir tüp içerisinde karıştırılır ve oda ısısında 5 dk inkube edildi. %10 FBS içeren taze besiyeri ve hücreler tüp içerisine eklendikten sonra 37 derecede 60 dk inkube edildi. İnkubasyon sonrasında yıkama yapılır hücrelerin bir kısmı akım sitometrik analiz için ayrıldı.

6.7. Histolojik Değerlendirme

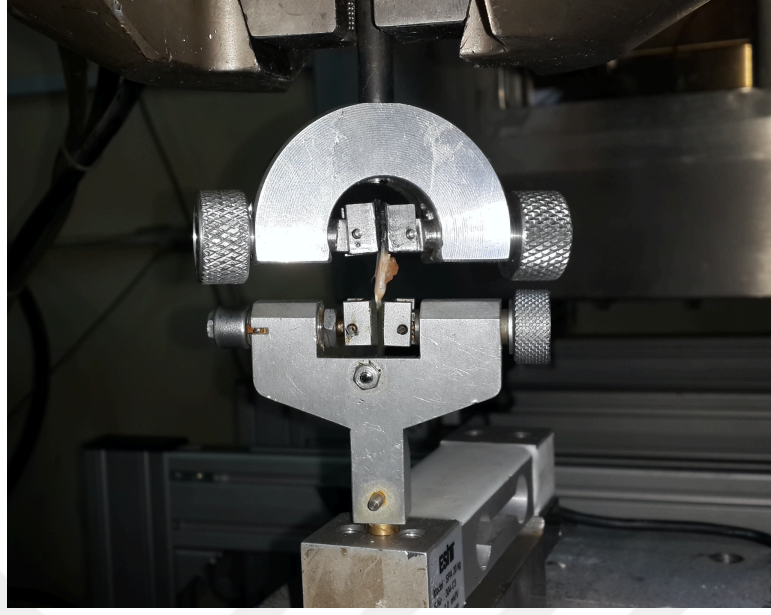
Sağ bacak Aşıl tendonları Acıbadem Üniversitesi Kerem Aydınlar Patoloji Klinięi'ne %10 Formol çözeltisi içinde getirilerek gruplar hakkında bilgisi olmayan bir patolog tarafından uzunlamasına ve enine kesitlerde değerlendirildi. Kesitlere genel morfolojik değerlendirme için Hematoksilen/Eozin ve bağ doku boyası olan Masson-Trikrom boyama uygulandı. Boyalı kesitler Olympus BX51 foto mikroskopunda (Tokyo, Japonya) incelenerek, Olympus DP72 kamera ile fotoğraflandı. Histopatolojik skora için her kesitte birbirinin benzeri en az 3 alanda, x 400 büyütmede tendon dokuları incelendi. Aşıl tendonu gruplar arasında histolojik olarak tendon onarım sahası kapanan mesafe ölçümü (Gap) ve ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanlamaları yapıldı ve bu sonuçların istatistiksel analizi uygulandı. Histopatolojik skora deneyimli 2 histolog tarafından körlemesine yapıldı. Histolojik değerlendirmede uzunlamasına kesitlerde Kollajen 1-3, dekorin, tenomodulin ve tenascin gibi antikorlara bakılarak skora yapıldı ve bu sonuçların istatistiksel analizi uygulandı.

6.8. Biyomekanik değerlendirme

Onarım yöntemlerinin biyomekanik özelliklerinin karşılaştırılması amacıyla deneyden 1 ay sonra, onarılan tendon kısımları her iki uçtan alüminyum folyo ile sarılarak izotonik serum emdirilmiş pedler içerisinde incelenmek üzere İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Mukavemet Laboratuvarı'na getirildi. Tendonlar mekanik gerim cihazı olan MTS 858 Mini Bionix 2® 'nin 10kN' nin mngenelerine her iki uçtan tutturularak 1kg/N (1000N) yük hücresi kullanılarak 20mm/dakikalık sabit gerim hızında kopuncaya kadar test edildi. Elde edilen veriler Trapezium 2.0 (Version 2.23 Shimadzu Corp.) programına aktarılarak yük–yer değiştirme grafikleri elde edildi (Şekil 23).



Şekil 23: Trapezium-2 programında elde edilen yük (Force-Newton cinsinden)-yer değiştirme (Stroke, mm cinsinden) eğrisi. *Max*, kopma noktasını gösterir. Başlangıçtan max noktasına kadar olan eğrinin eğim açısı kopmanın dayanıklılığı ile orantılıdır. Eğrinin iniş kısmındaki dalgalanma dikişin değişik bileşenlerinin tendondan ayrıştığı anları göstermektedir.



Şekil 24: Aşıl tendonu mekanik gerim cihazı olan MTS 858 Mini Bionix 2® 'nin 10kN' nin mngenerlerine her iki uçtan tutturularak 1kg/N (1000N) yük hücresi kullanılarak 20mm/dakikalık sabit gerim hızında kopuncaya kadar test edilirkenki görünümü

6.9. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel analizlerde tanımlayıcı istatistik olarak ortalama, ortanca, standart sapma, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır. Verilerin görselleştirilmesi için “Kutu Çizgi Grafiği” ve “Bar Grafik” kullanılmıştır. Ölçümlerin normal dağılım gösterip göstermediğine “Kolmogorov Smirnov Testi” ile bakılmıştır. Ölçümlerin dağılımı normal dağılıma uygun olmadığı için grupların karşılaştırmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Bu karşılaştırma sonrası 2’li grup karşılaştırmalar Dunn’s testi ile yapılmıştır. Grafiklerde parametrik olmayan yöntem kullanıldığı ve örneklem genişliği küçük olduğu için tanımlayıcı ölçü olarak ortanca kullanılmıştır. Analizlerin tamamı %5, 1.tip hata (alpha) ile yapılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılığı ifade etmiştir. Elde edilen biyomekanik ve histolojik çalışma verilerinin analizleri SPSS 22.00 (IBM Company, USA) ile gerçekleştirilmiştir.

7. BULGULAR

7.1. Biyomekanik çalışma bulguları

Biyomekanik çalışmada bütün gruplarda 1 ay sonra sakrifiye edilen ratlardan elde edilen sağ Aşil tendonu onarım sahasının biyomekanik germe testi verileri sırasıyla Tablo-3 'de verilmiştir.

Tablo 3: Aşil tendonu biyomekanik germe testi sonrası elde edilen maksimum kuvvet değerleri

	NUMUNE KODU	MAX KUVVET (N)	
KONTROL GRUBU	Numune 1	23,912446	
	Numune 2	21.271504	
	Numune 3	17.01451	
	Numune 4	14.561327	
	Numune 5	27.528649	
	Numune 6	12.796219	
	Numune 7	15.215238	ORT : 18,9
2. GRUP	Numune 1	26,301845	
	Numune 2	22.289129	
	Numune 3	16.32872	
	Numune 4	18.207623	
	Numune 5	13.621723	
	Numune 6	12.763803	
	Numune 7	17.622372	ORT : 18,2:
3. GRUP	Numune 1	19,206689	
	Numune 2	21.433797	
	Numune 3	27.378314	
	Numune 4	26.285902	
	Numune 5	21.970753	
	Numune 6	27.030097	
	Numune 7	18,510775	ORT : 23,1
4. GRUP	Numune 1	42,279428	
	Numune 2	29.422945	
	Numune 3	32.968337	
	Numune 4	30.569096	
	Numune 5	29.06025	
	Numune 6	25.842675	
	Numune 7	32,432699	ORT : 31,8
5. GRUP	Numune 1	23,462987	
	Numune 2	35.162072	
	Numune 3	23.467369	
	Numune 4	24.742446	
	Numune 5	29.002737	
	Numune 6	17.81302	
	Numune 7	30,584745	ORT : 26,3

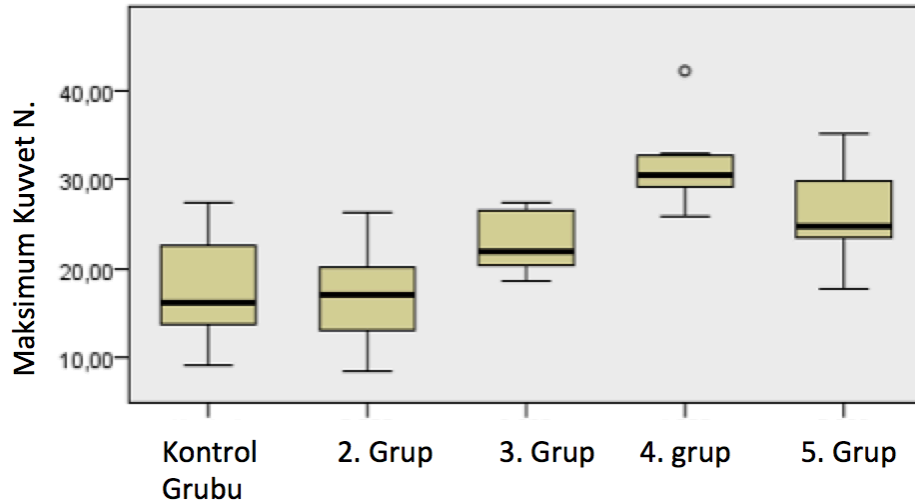
Elde edilen veriler doğrultusunda öncelikle grupların ve genel olarak tüm örnekler için tanımlayıcı istatistiksel değerler hesaplanmıştır. (Tablo 4)

Tablo 4: Aşıl tendonu biyomekanik germe testi ile elde edilen maksimum yük değerlerinin istatistiksel analizi

	MAX KUVVET					
	Kontrol	2	3	4	5	Total
Mean	17,686172	16,937141	23,116618	31,796490	26,319339	22,854423
Standard Deviation	6,105292	5,615521	3,745396	5,192063	5,696853	7,565168
Median	16,114874	16,975546	21,970753	30,569096	24,742446	23,462987
Maximum	27,528649	26,301845	27,378314	42,279428	35,162072	42,279428
Minimum	9,189481	8,361915	18,510775	25,842675	17,813020	8,361915

Maksimum kuvvet bakımından gruplar arasında farklılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı. (Tablo 5)

Tablo 5: Aşıl tendonu biyomekanik germe testi gruplar arasında farklılık olup olmadığı Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldı.



Tablo 6 : Aşıl tendonu biyomekanik germe testi gruplar arasında farklılık olup olmadığı Dunn's ikili karşılaştırma testi ile karşılaştırıldı. (Sarı fon ile işaretli değerlerden istatistiksel anlam gözlenmiştir.)

Gruplar	Test İstatistiği	Standart Hata	Standart Test İstatistiği	Ortalama Değer	P değeri
1. ve 2. Grup	1,25	5,41	0,231	0,817	1,000
2. ve 3. Grup	-9,321	5,602	-1,664	0,096	0,961
2. ve 5. Grup	-14,036	5,602	-2,505	0,012	0,112
2. ve 4. Grup	-21,464	5,602	-3,831	0,000	0,001
1. ve 3. Grup	-8,071	5,062	-1,441	0,150	1,000
1. ve 5. Grup	-12,786	5,062	-2,282	0,022	0,225
1. ve 4. Grup	-20,214	5,602	-3,608	0,000	0,003
3. ve 5. Grup	-4,714	5,786	-0,815	0,415	1,000
3. ve 4. Grup	-12,143	5,786	-2,099	0,036	0,358
4. ve 5. Grup	7,429	5,786	1,284	0,199	1,000

Bu grupların maksimum yük (N) değerlerinin istatistiksel analizine bakıldığında T.K.K.H. ekilmiş H.A.A.M. ile sarılı tendon gurubu ile sadece tendon onarımı yapılan ve tendon onarımı sonrası H.A.A.M. ile sarılı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

7.2. Histolojik Çalışma Bulguları

Sağ ayak Aşil tendonlarında 30. gün (4. hafta) sonunda ortaya çıkan tek kör histolojik çalışma verileri puanlandırıldı. Tendon onarımı sonrası kapanan mesafe (Gap) ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanlandırılarak Tablo- 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Aşil tendonu gruplar arasında histolojik olarak kapanma mesafesi ölçümü (Gap) ve ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanlamaları

Grup	Gap (mikrometre)	Kollajen yoğunluğu	Fibroblast İnfiltrasyon	Damarlanma Artışı	Yabancı cisim reak.
A1	10,68	2	2	5	3
A2	20,3	1	2	1	2
A3	19,48	4	4	3	4
A4	22,08	7	8	6	2
A5	46,74	4	3	5	2
A6	26,63	5	7	4	2
A7	0	10	10	10	10
B1	17	6	5	2	2
B2	11,12	8	8	1	2
B3	19,87	8	8	8	4
B4	12,21	9	9	9	2
B5	5,46	9	10	10	3
B6	6,46	9	10	10	3
B7	9,74	4	4	9	10
C1	29,6	6	3	3	8
C2	6,79	9	5	2	6
C4	3,5	10	10	2	1
C5	0	10	10	2	2
C6	0	10	10	5	2
C7	0	10	10	10	10
D1	6,79	10	10	1	1
D2	0	10	10	6	9
D3	0	10	10	6	2
D4	0	10	10	10	10
D5	0	10	9	10	9
D6	0	10	10	4	3
D7	0	10	10	2	2
E1	0	10	10	7	10
E2	0	10	10	7	2
E3	0	10	10	8	1
E4	0	10	10	9	2
E5	0	10	10	10	10
E6	0	10	10	2	1
E7	0	10	10	4	1

Tablo 8: Kruskal Wallis testi ile Aşıl tendonlarında gruplar arasındaki histolojik açıdan kapanan mesafesi ölçümü (Gap) ve ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanları farklılık olup olmadığının incelenmesi

		Grup2				
		Ortalama değer	Maximum	Median	Minimum	Standard Deviyasyon
Tendon onarımı kapanma mesafesi (Gap)	A	20,84	46,74	20,30	,00	14,41
	B	11,69	19,87	11,12	5,46	5,25
	C	6,65	29,60	1,75	,00	11,57
	D	,97	6,79	,00	,00	2,57
	E	,00	,00	,00	,00	,00
Kollajen yoğunluğu	A	4,7	10,0	4,0	1,0	3,0
	B	7,6	9,0	8,0	4,0	1,9
	C	9,2	10,0	10,0	6,0	1,6
	D	10,0	10,0	10,0	10,0	,0
	E	10,0	10,0	10,0	10,0	,0
Fibroblast İnfiltrasyon	A	5,1	10,0	4,0	2,0	3,2
	B	7,7	10,0	8,0	4,0	2,4
	C	8,0	10,0	10,0	3,0	3,2
	D	9,9	10,0	10,0	9,0	,4
	E	10,0	10,0	10,0	10,0	,0
Damarlanma Artışı	A	4,9	10,0	5,0	1,0	2,8
	B	7,0	10,0	9,0	1,0	3,8
	C	4,0	10,0	2,5	2,0	3,2
	D	5,6	10,0	6,0	1,0	3,6
	E	6,7	10,0	7,0	2,0	2,8
Yabancı cisim reaksiyonu	A	3,6	10,0	2,0	2,0	2,9
	B	3,7	10,0	3,0	2,0	2,9
	C	4,8	10,0	4,0	1,0	3,7
	D	5,1	10,0	3,0	1,0	4,0
	E	3,9	10,0	2,0	1,0	4,2

Tablo 9: Kruskal Wallis testi sonuçlarına göre Aşıl tendonlarında gruplar arasındaki histolojik açıdan kapanan mesafe (Gap) ve ayrıca kollajen yoğunluğu, fibroblast infiltrasyonu, damarlanma artışı ve yabancı cisim reaksiyonu puanları arasında sarı renkli gruplarda farklılık olduğu saptanmıştır

Gruplar	Null Hipotezi	Test	P değeri	Sonuç
1	Onarım Mesafesi (Gap)	Kruskal-Wallis testi	0,000	Null hipotezi red edildi
2	Kollajen Yoğunluğu	Kruskal-Wallis testi	0,000	Null hipotezi red edildi
3	Fibroblast infiltrasyonu	Kruskal-Wallis testi	0,003	Null hipotezi red edildi
4	Damarlanma artışı	Kruskal-Wallis testi	0,542	Null hipotezi kabul edildi
5	Yabancı cisim reaksiyonu	Kruskal-Wallis testi	0,833	Null hipotezi kabul edildi

Puanlar SPSS programında non-parametrik olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında Aşıl tendon onarım mesafesinde (Gap), kollajen yoğunluğu ve Fibroblast Infiltrasyonu bakımından istatistiksel açıdan farklılık bulunmaktadır ($p < 0.05$).

Ancak hangi grup sonuçları birbirinden farklı olduğunu anlamak için yapılan Dunn's 2'li karşılaştırma testleri sonrasında sarı renkli ölçümler arasında istatistiksel açıdan farklılıklar saptanmıştır.

Tablo 10 : Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşıl tendonunda gruplar arasındaki histolojik açıdan kapanan mesafesinde (Gap) farklılık olup olmadığının incelenmesi

Gruplar	Test İstatistik	Standart Hata	Standart test istatistiği	Ortalama değer	P değeri
E-D	1,786	4,980	,359	,720	1,000
E-C	7,583	5,183	1,463	,143	1,000
E-B	15,143	4,980	3,041	,002	,024
E-A	17,857	4,980	3,586	,000	,003
D-C	5,798	5,183	1,119	,263	1,000
D-B	13,357	4,980	2,682	,007	,073
D-A	16,071	4,980	3,227	,001	,012
C-B	7,560	5,183	1,459	,145	1,000
C-A	10,274	5,183	1,982	,047	,475
B-A	2,714	4,980	,545	,586	1,000

Not: C gurubu Gap mesafesindeki maksimum değer 29,60 olması dikkat çekmektedir. Bu değer denekten kaynaklanan hataya bağlı ekstreme değer olarak kabul edilerek deneyden çıkartıldığında istatistiksel inceleme sonucunun değişip değişmeyeceği araştırıldı. Öncelikle denek sayısının sınırlı olmasından dolayı ortalama değer yerine ortanca değerleri kullanıldığı için bu veri istatistiksel incelemeyi etkilememektedir.

Tablo 11: Kruskal Wallis testi ile Aşil tendonunda, gruplar arasındaki histolojik açıdan tendon onarımı kapanma mesafesinin (Gap) C gurubundeki yüksek değerin inceleme dışına çıkarılması sonrası istatistiksel olarak farklılık olup olmadığının incelenmesi

		Grup2				
		Ortalama Değer	Maximum	Median	Minimum	Standard Deviyasyon
Tendon onarımı kapanma mesafesi (Gap)	A	20,84	46,74	20,30	,00	14,41
	B	11,69	19,87	11,12	5,46	5,25
	C	2,06	6,79	0	,00	3,05
	D	,97	6,79	,00	,00	2,57
	E	,00	,00	,00	,00	,00
Kollajen yoğunluğu	A	4,7	10,0	4,0	1,0	3,0
	B	7,6	9,0	8,0	4,0	1,9
	C	9,2	10,0	10,0	6,0	1,6
	D	10,0	10,0	10,0	10,0	,0
	E	10,0	10,0	10,0	10,0	,0
Fibroblast İnfiltrasyon	A	5,1	10,0	4,0	2,0	3,2
	B	7,7	10,0	8,0	4,0	2,4
	C	8,0	10,0	10,0	3,0	3,2
	D	9,9	10,0	10,0	9,0	,4
	E	10,0	10,0	10,0	10,0	,0
Damarlanma Artışı	A	4,9	10,0	5,0	1,0	2,8
	B	7,0	10,0	9,0	1,0	3,8
	C	4,0	10,0	2,5	2,0	3,2
	D	5,6	10,0	6,0	1,0	3,6
	E	6,7	10,0	7,0	2,0	2,8
Yabancı Cisim reaksiyonu	A	3,6	10,0	2,0	2,0	2,9
	B	3,7	10,0	3,0	2,0	2,9
	C	4,8	10,0	4,0	1,0	3,7
	D	5,1	10,0	3,0	1,0	4,0
	E	3,9	10,0	2,0	1,0	4,2

Tablo 12: Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşil tendonlarında gruplar arasındaki histolojik açıdan tendon onarımı kapanma mesafesinin (Gap) C gurubu yüksek değer in inceleme dışına çıkarılması sonrası istatistiksel olarak farklılık olmadığını saptanması

Gruplar	Test İstatistik	Standart Hata	Standart test istatistiği	Ortalama değer	P değeri
E-D	1,786	4,803	,372	,710	1,000
E-C	4,300	5,261	,817	,414	1,000
E-B	15,143	4,803	3,153	,002	,016
E-A	17,714	4,803	3,688	,000	,002
D-C	2,514	5,261	,478	,633	1,000
D-B	13,357	4,803	2,781	,005	,054
D-A	15,929	4,803	3,317	,001	,009
C-B	10,843	5,261	2,061	,039	,393
C-A	13,414	5,261	2,550	,011	,108
B-A	2,571	4,803	,535	,592	1,000

Not: C gurubu Aşil tendonunda gruplar arasındaki histolojik açıdan kapanma mesafesinin (Gap) yüksek değer in inceleme dışına bırakılması sonrası Mann- Dunn's ikili karşılaştırma testi sonuçlarına göre istatistiksel olarak bir anlamlılık taşımadığı tespit edilmiştir.

Tablo 13: Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşıl tendonunda gruplar arasındaki histolojik açıdan kollajen yoğunluğu puanları arasında farklılık olup olmadığının incelenmesi

Gruplar	Test İstatistik	Standart Hata	Standart test istatistiği	Ortalama değer	P değeri
A-B	-3,143	4,830	-,651	,515	1,000
A-C	-12,881	5,027	-2,562	,010	,104
A-D	-17,714	4,830	-3,668	,000	,002
A-E	-17,714	4,830	-3,668	,000	,002
B-C	-9,738	5,027	-1,937	,053	,527
B-D	-14,571	4,830	-3,017	,003	,026
B-E	-14,571	4,830	-3,017	,003	,026
C-D	-4,833	5,027	-,961	,336	1,000
C-E	-4,833	5,027	-,961	,336	1,000
D-E	,000	4,830	,000	1,000	1,000

Tablo 14: Dunn's ikili karşılaştırma testi ile Aşıl tendonunda gruplar arasındaki histolojik açıdan fibroblast infiltrasyonu puanları arasında farklılık olup olmadığının incelenmesi

Gruplar	Test İstatistik	Standart Hata	Standart test istatistiği	Ortalama değer	P değeri
A-B	-5,857	4,747	-1,234	,217	1,000
A-C	-10,095	4,941	-2,043	,041	,410
A-D	-14,857	4,747	-3,130	,002	,018
A-E	-16,429	4,747	-3,461	,001	,005
B-C	-4,238	4,941	-,858	,391	1,000
B-D	-9,000	4,747	-1,896	,058	,580
B-E	-10,571	4,747	-2,227	,026	,260
C-D	-4,762	4,941	-,964	,335	1,000
C-E	-6,333	4,941	-1,282	,200	1,000
D-E	-1,571	4,747	-,331	,741	1,000

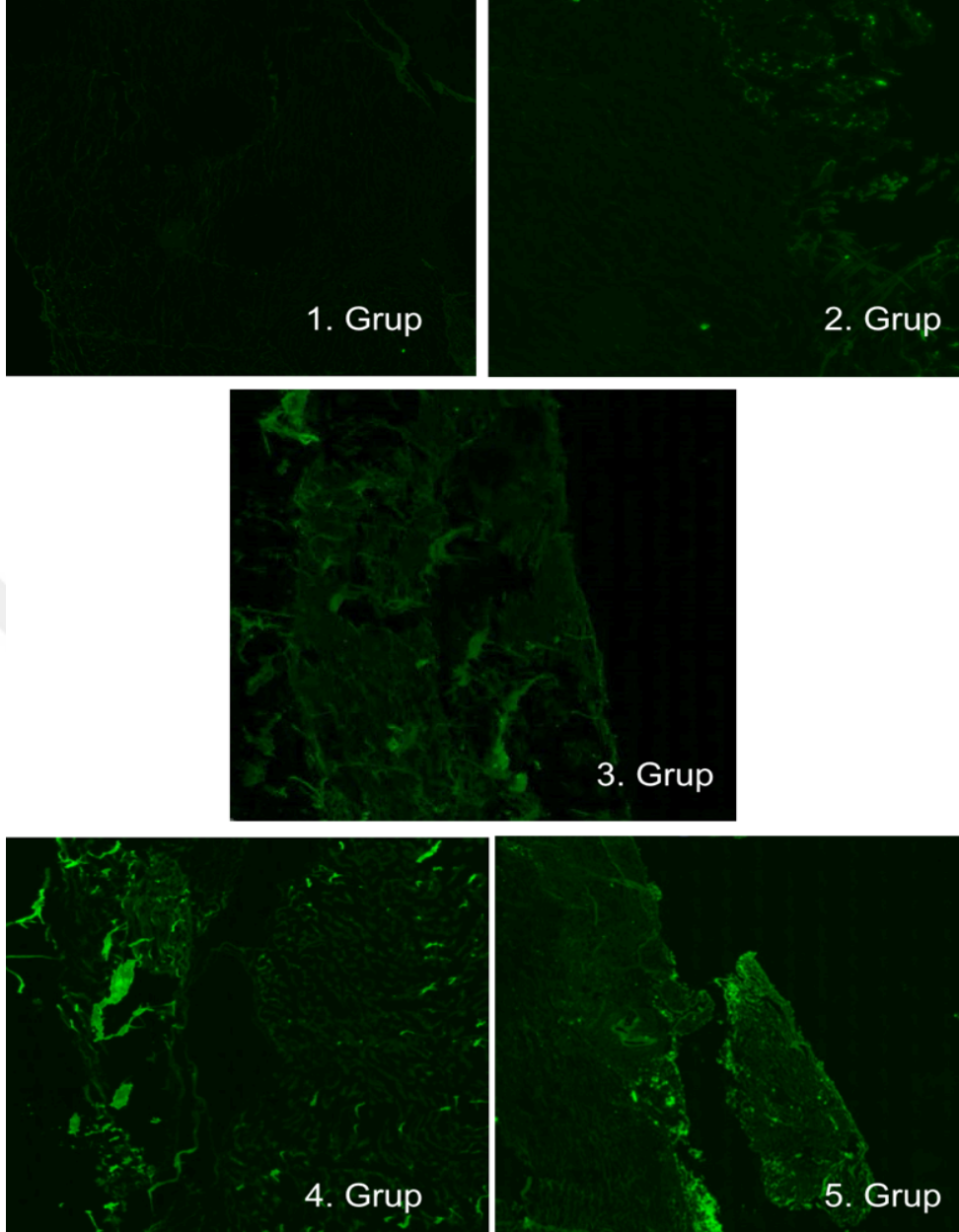
Kruskal Wallis testi ile anlamlı çıkan gruplarda Dunn's ikili karşılaştırma testi sonuçlarına göre;

Aşil tendon onarım mesafesinde (Gap), 5. grup ile 1. ve 2. grup arasında ayrıca 4. grup ve 1. grup arasında istatistiksel açıdan fark saptanmıştır.

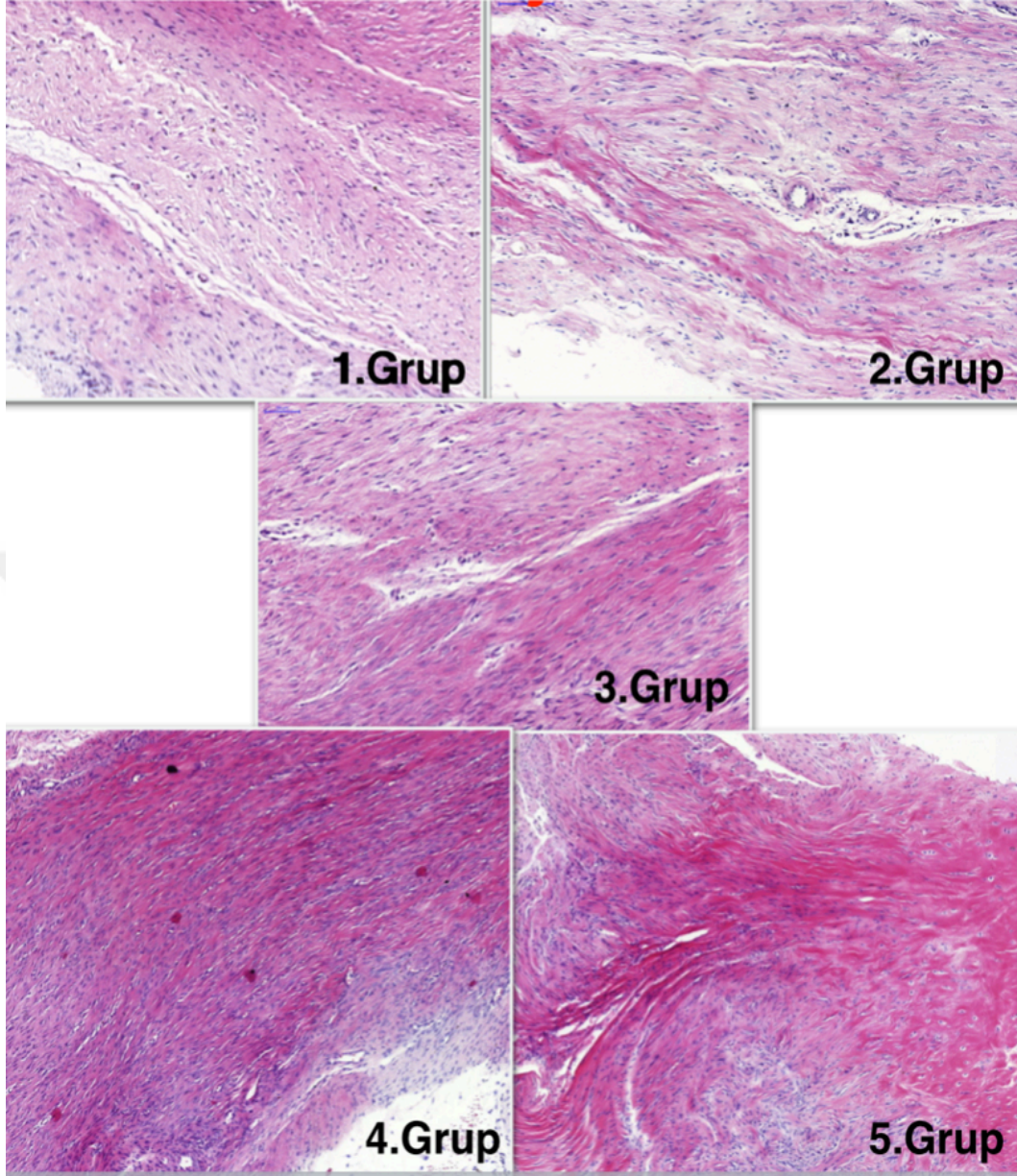
Aşil tendon onarım sahasındaki kollajen yoğunluğu, 5. grup ile 1. ve 2. grup arasında ayrıca 4. grup ile 1. ve 2. grup arasında istatistiksel açıdan fark saptanmıştır.

Aşil tendon onarım sahasındaki fibroblast infiltrasyonu 5. grup ile 1. grup arasında ayrıca 4. grup ile 1. grup arasında istatistiksel açıdan fark saptanmıştır.





Şekil 25: Ratlarda Aşil tendonu histolojik kesitlerinde “Qtracker Cell Labeling Kits”ile işaretli kök hücrelerin immüno Floresan mikroskofta görünümü. Kök hücrelerin yoğun miktarda olduğu alanlar yeşil renkte görünmekte



Şekil 26: Ratlarda Aşil tendonu histolojik kesitlerinde Hematoksilen Eozin ile boyama sonrası mikroskopta görünümü. 4. ve 5. grupta kollajen sentezi ve fibroblast infiltrasyonu yoğunluğu, tendon onarım sahası kapanma mesafesinin kapandığı dikkati çekmektedir.

8. TARTIŞMA

Tendon yaralanmaları el cerrahisi pratiğinde en sık karşılaşılan problemlerdendir. Tendon yaralanmalarının tedavisi cerrahi gerektirir. Özellikle eşlik eden kemik kırığı ve/veya arter-sinir yaralanması olan hastalarda erken mobilizasyon mümkün olamduğundan peritendinöz adezyon ve tendon hareketlerinde kısıtlılık sık gözlemlenmektedir. Peritendinöz adezyon, şiddetli ağrılara ve kalıcı sakatlıklara yol açabilmektedir. (83)

Tendon iyileşmesi esnasında ekstrinsik (tendon - çevre doku adezyonu) ve intirisik (tendon – tendon adezyonu) iyileşme aynı anda gerçekleşir (81,83). Bu iki mekanizma aynı iyileşme yollarını kullandığından çevre yapışıklığını engellemek için uygulanacak non selektif farmakolojik ajanlar tendon bütünlüğünü sağlayacak mekanizmaları da etkileyeceğinden çok tercih edilememektedir. Bu sebeple selektif mekanik yöntemler (fizyoterapi modaliteleri) kullanılmaktadır. Ancak kesin immobilizasyon gereken kemik kırığı ve/veya arter-sinir yaralanması olan hastalarda fizyoterapi modaliteleri de kontraendike olduklarından bu hastalarda ekstrinsik sistemi baskılayıp intrinsik sistemi etkilemeyen (yada etkisini arttıran) tedavi modalitelerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Literatürde tendon çevresine sarılan biyometaryeller ile peritendinöz yapışıklıkların gelişmesi engellenmeye ve tendonun iyileştiği çevre içinde kaymasının arttırılmasına çalışılmıştır (91). Bu yönde olumlu çalışmalar yapılmışsa da etkin bir tedavi henüz bulunamamıştır.

Doku mühendisliğindeki gelişmelerle birlikte tendon onarımı çalışmaları da dikkat çekmeye başlamıştır. He Q ve ark., tendon defektlerini onarmak amacıyla insan amnion ekstraselüler matriksini (İAEM) aşıl tendon defektlerinde doku iskelesi olarak kullanmış ve fibroblastların göçü ve yerleşmesinde mükemmel bir taşıyıcı olduğunu bildirmişlerdir (97). İAEM ile onarım sonrası ölçülen maksimum yük normal tendonun %81,8'i olarak saptanmıştır. Tendon histolojisine dönüşmenin diğer tendon iskelelerine göre daha hızlı olduğunu ve ameliyat sonrası üçüncü ayda işlevsel açıdan yeterli iyileşmenin sağlandığını ortaya koymuşlardır.

Tendon çevresine sarılan biyometaryeller peritendinöz adezyonların engellenmesi için mekanik bariyer veya izalatör görevi görmesi dışında büyüme faktörlerinin kontrollü salımını sağlamak için de taşıyıcı görevi görebileceği de

düşünölmektedir. Ancak uygulanan her skafoldun in vivo sistemlerde teorik olarak yabancı cisim reaksiyonunu tetikleyip inflamasyonu arttırarak peritendinöz adezyonu arttırması ve/veya tendon çevresindeki diffzyonunun azaltarak doku perfüzyonunun ve beslenmesinin bozulmasına yol açması ihtimali de vardır. Bu sebeple tendon çevresine sarılan biyometaryellerin taşıyıcı skafold olarak kullanılacağı her çalışmada bu materyelin tek başına kullanıldığı bir grubun olması ve etkisinin araştırılması gerekmektedir. Histolojik olarak deselülerize amniyotik membranın kullanıldığı deney grupları ile kullanılmayan birinci grup arasında yabancı cisim reaksiyonu açısından fark görölmemesi uygulananan deselülerize amniyotik membranın yabancı cisim reaksiyonuna yol açmadığını göstermektedir. Bu anlamda kök hücre ile yüklenmiş olsun yada olmasın deselülerize amniyotik membranın iyileşmeye olumsuz yönde etkisinin olmadığı çalışmada gösterilmiştir.

İncelenen tendon örneklerinde deney grupları arasında damarlanmada fark gözükmemesi kök hücrelerin kullanıldığı bir çalışmada ilk bakışta beklenmeyen bir bulgu olsa da tendon anatomik yapısı gereği avasküler bir dokudur. Bu bakımdan intrinsik tendon iyileşmemesinde damarlanmada artış olmaması iyileşmenin doğası gereğince anormal bir bulgu olarak değerlendirilmemiştir.

İntrinsik iyileşme parametreleri arasında değerlendirilen fibroblast yoğunluğu, kollajen yoğunluğu ve tendon onarım sahasındaki kapanan mesafe tendon kaynaklı kök hücre eklenen gruplarda anlamlı olarak fark saptanmıştır. Her üç bulgu da ufak tefek farklılıklar olsa da birbirleri ile paralellik göstererek tutarlılık sergilemektedirler. Ayrıca histolojik değerlendirmeler ile mekanik değerlendirmelerin paralellik sergilemesi de deneydeki bulguların tutarlılığını göstererek bulgular hakkında daha kesin hükümlere varılmasına olanak sağlamaktadır. Histolojik incelemede skorlama yapılan fibroblast yoğunluğu, tendon onarım sahasındaki kapanan mesafe ve kollajen yoğunluğu, tendon kaynaklı kök hücre eklenen gruplarda anlamlı fark saptanmıştır. Buna karşılık yabancı cisim reaksiyonu ve damarlanma artışında gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Histolojik değerlendirmelerde fibroblast yoğunluğu, kollajen yoğunluğu ve tendon onarım sahasındaki kapanan mesafe kriterleri göz önüne alınarak yağ doku kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı üçüncü grup ile hiç bir kök hücrenin

kullanılmadığı ikinci ve birinci gruplar arasında istatistiksel anlam yaratacak fark bulunamamıştır. Ancak üçüncü gruptaki sonuçlar tendon kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı dördüncü ve beşinci gruplar ile karşılaştırıldığında da istatistiksel fark gözlemlenmemiştir. Sonuçta subjektif değerlendirmemizde gözlemlediğimiz yağ doku kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı üçüncü gruptaki farkların objektif istatistiksel değerlendirmelerde ortaya konulamaması denek sayısındaki (ölçüm sayısındaki) yetersizlik ile izah edilebilir.

Son zamanlarda tendon onarımları ile ilgili yayınlarda tendon iyileşmesinde ekstrinsik faktörlere yani dış faktörlere katkıda bulunması konusunda çalışmalar giderek artmaktadır. Bu problem için Luo ve ark., insan asellüler amnion zarının tendon etrafına sararak yaptıkları deneysel çalışmada tendon çevresindeki yapışıklıkların belirgin olarak azaldığını ancak tendon biyomekanik ya da histolojik özelliklerini iyileştirmede ek bir katkısının olmadığını saptamışlardır (95). Buna karşılık Özgenel ve ark., sadece insan aselüler amniyotik sıvısının onarım bölgesine enjekte edildiği tendonlarda sadece tendon kılıfı onarımı yapılan tendonlara göre gerek yapışıklık oluşumunun anlamlı oranda azaldığını gerekse de maksimum gerim gücün anlamlı oranda arttığını saptamışlardır (96). Çalışmamızda yapışıklık oluşumunu engellemek amacıyla sadece HAAM kullanılmıştır. Çalışmadaki değişken sayısının artırılmaması ve böylece kök hücre uygulamalarının etkilerinin daha net ortaya konulabilmesi için literatürde başarısı gösterilen peritendinöz yapışıklığı azaltan diğer uygulamalar deneyde kullanılmamıştır.

Tendon onarım sahası iyileşmesine katkıda bulunmak için 57 tavşanda Aşil tendonlarında yapılan in vivo çalışmada modifiye Kessler tekniği ile onarılan tendon kesilerinde kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin intratendinöz uygulamasıyla üçüncü haftadaki sonuçlarda biyomekanik gerim testinde ve histolojik incelemelerde kontrol grubuna göre anlamlı bir düzelme saptanmıştır. Ancak 6. ve 12. haftalarda yapılan ölçümlerde farkın kalmadığı gözlenmiştir (93). Bu çalışma kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin intrinsik iyileşmeyi kısa vadede hızlandırdığını göstermektedir. Kısa sürede ulaşılan mekanik dayanıklılık daha erken dönemde el rehabilitasyonuna olanak sağlaması açısından klinik fark yaratacağından bilimsel olarak anlamlıdır.

Yağ ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesini

olumlu yönde etkilediği deneysel ve klinik çalımlar ile gösterilmiştir(145). Bu bağlamda kemik kırıklarının eşlik ettiği tendon yaralanmalarında kullanılacak yağ veya kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kemik kırığın iyileşme sürecini kısaltarak kısa zamanda tendon rehabilitasyonuna olanak sağlayacağından, tendon onarımına indirek fayda da sağlayacaktır. Çalışmamızda tendon kaynaklı kök hücrelerin (TKKH) tendon iyileşmesine en yüksek faydayı sağladığı tespit edilmişse de bu çalışma TKKH'lerin kemik iyileşmesine yönelik bilgi sağlamamaktadır. Ancak Rui YF ve arkadaşlarının 2012'de yayınladıkları makalelerinde TKKH'ler ile kemik iliği kaynaklı kök hücreler tendon-kemik bileşkesi üzerinde test edilerek üzerlerindeki BMP (kemik morfojenik protein) reseptör düzeyleri ve kemik oluşumuna etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada TKKH'ler ile daha iyi sonuçlar elde edilmiştir(146). Literatürdeki bu bilgilerin ışığında tendon kesilerinde kullanılacak TKKH'lerin tendon onarımına intrinsik tendon iyileşmesini olumlu yönde etkileyerek fayda sağlamasının yanı sıra aynı zamanda var ise eşlik eden kemik kırığının kaynama süresini de kısaltarak en kısa zamanda tendon rehalitasyonuna olanak sağlayarak da olumlu etki göstereceğini düşünebiliriz.

Literatürde iki farklı kaynaktan elde edilen kök hücrelerin bir arada (hibrit) kullanımına yönelik bir çalışma yoktur. Bu nedenle çalışmamızda literatürde ilk olarak farklı kaynaktan elde edilen kök hücrelerin aditif ve/veya sinerjistik etki gösterip göstermediği de araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar neticesinde en iyi sonuç sayısal olarak en yüksek miktarda TKKH uygulanan grupta gözlenmiştir. YDKMKH'in uygulandığı grupta (üçüncü grupta) ise kontrol gruplarından (1. ve 2. gruplardan) daha iyi sonuçlar elde edilmişse de sayısal olarak en yüksek miktarda TKKH uygulanan grubun (dördüncü grubun) gerisinde kalmıştır. Hibrit kök hücrelerin uygulandığı grubun (beşinci grubun) sonuçları azalan TKKH sayısına paralellik göstererek en yüksek miktarda TKKH uygulanan grubun (dördüncü grubun) gerisinde kalmış ancak YDKMKH'in uygulandığı gruptan (üçüncü gruptan) da daha iyi olmuştur. Hibrit kullanımdaki etkilerin daha net ortaya konabilmesi için tendon kaynaklı kök hücre sayısında azaltmaya gidilmeden ortama eklenecek yağ TKKH'in de olduğu bir grubun daha incelenmesinde bilimsel olarak fayda vardır. Kök hücrelerin bir arada kullanıldıklarında aditif veya sinerjistik etkilerinin olup olmadığının aydınlatılmasına katkı sağlayacak böyle bir çalışmanın bir başka

araştırmaya konu olması gerekmektedir.

Çalışmada inbred hayvanlarda kullanılan TKKH ve YDKMKH'ler allojenik olsa da, HAAM bu hayvanlar için zenojenik özelliktedir. HAAM, yüzeyinde bulunan, özellikleri daha önce izah edilen HLA-G sınıf 1 antijeni sayesinde zenojenik olarak uygulandıkları deneklerde dahi antijenik özellik göstermemiştir.

Kök hücreler üzerindeki HLA-G sınıf 1 antijenleri sayesinde insanda allojenik kök hücre tedavisi için HLA tiplendirmesi ve uyumu olmaksızın, alıcı ve vericinin kan gruplarının aynı olduğu durumlarda kök hücre transferinin yapılabilmesine olanak sağlamaktadır.

İnsanda kullanılmak üzere HAAM ve TKKH'lerinin dondurularak sağlanabiliyor olması ve ihtiyaç halinde 24 saat içerisinde yeniden kullanıma hazır hale getirilebiliyor olması, HAAM ve kök hücrelerin her hasta için yeniden üretilmesini gereksiz kılmaktadır. Daha önceden HAAM ve kök hücrelerin hazırlanıp dondurularak muhafaza edildiği doku bankaları sağlanabilir ise çalışmamız sonucunda başarısı kanıtlanan teknik, raf ömrü olan ve ihtiyaç halinde kişiye özel hazırlanabilen ticari bir ürün haline dönüşecektir.

Özellikle silikon spaserların çıkartılarak sekonder tendon greftlemesinin yapılacağı komplike olgularda veya kemik kırıklarının ve/veya damar-sinir hasarlanması eşlik ettiği, uzun süre immobilizasyon gerektiren tendon onarımları sonrası gelişmesi muhtemel peritendinöz adezyonun engellenmesi veya azaltılmasında tariflediğimiz tekniğin faydalı olacağını ve deneysel bir çalışma olarak kalmayıp klinik uygulama alanı bulabileceğini düşünüyoruz.

9. SONUÇ

Bu çalışmada tendon onarımı sonrası karşılaşılan en sık komplikasyon olan peritendinöz adezyonu önlemek ve tendon iyileşmesini hızlandırmak için, farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin ayrı ayrı ve hibrit uygulanmalarının tendon iyileşmesine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda tendon kaynaklı kök hücrelerin (TKKH) tendon iyileşmesine en yüksek faydayı ve tendon onarımına intrinsik tendon iyileşmesini olumlu yönde etkileyerek fayda sağlamasının yanı sıra aynı zamanda var ise eşlik eden kemik kırığının kaynama süresini de kısaltarak en kısa zamanda tendon rehalitasyonuna olanak sağlayarak da olumlu etki sağladığı tespit edilmiştir,

YDKMKH'in uygulandığı grupta (üçüncü grupta) ise kontrol gruplarından (1. ve 2. gruplardan) daha iyi sonuçlar elde edilmişse de sayısal olarak en yüksek miktarda TKKH uygulanan grubun (dördüncü grubun) gerisinde kalmıştır. Hibrit kök hücrelerin uygulandığı grubun (beşinci grubun) sonuçları azalan TKKH sayısına paralellik göstererek en yüksek miktarda TKKH uygulanan grubun (dördüncü grubun) gerisinde kalmış ancak YDKMKH'in uygulandığı gruptan (üçüncü gruptan) da daha iyi olmuştur, yalnız hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran (HAAM) kullanılan 2. grup ile HAAM kullanılmayan 1. grupta yabancı cisim reaksiyonu açısından istatistiksel bir fark oluşmaması HAAM'ın uygun bir skafold olabileceğini bir kez daha düşündürmüştür.

Çalışma sonucunda ortaya çıkan biyomekanik ve histolojik veriler birbirleri ile paralellik göstererek en iyi sonuçların tendon kaynaklı kök hücrelerin kullanıldığı grupta olduğunu, bunu sırası ile hibrit kök hücrelerin kullanıldığı grubun ve yağ kökenli mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı grubun takip ettiği gösterilmiştir.

Bu bulgular kök hücrelerin uygulanacakları dokudan elde edilmesinin daha yararlı olacağı tezini desteklemektedir. Hibrit kullanılan grubun sonuçlarının farklı kaynaklardan gelen kök hücrelerin sonuçlarının arasında bir değer vermesi azalan tendon kaynaklı kök hücrelerin sayısı ile açıklanabilmektedir. Hibrit kullanımının etkisinin daha net aydınlatılabilmesi için tendon kaynaklı kök hücre sayısı azaltılmadan kullanılacak yağ kaynaklı kök hücrelerin oluşturduğu bir çalışmanın daha yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

10. KAYNAKLAR

1. Jarvik JG, Dalinka MK, Kneeland JB. Hand injuries in adults. *Semin Roentgenol.* 1991 Oct;26(4):282-99.
2. Smith ME, Auchincloss JM, Ali MS. Causes and consequences of hand injury. *J Hand Surg [Br].* 1985 Oct;10(3):288-92.
3. Sorock GS, Lombardi DA, Hauser RB, Eisen EA. Acute traumatic occupational hand injuries: Type, location, and, severity. *J Occup Environ Med* 2002;44:345-51.
4. Dinçer F, Çetin A, Çeliker R, Çetin M. Causes and consequences of hand injuries requiring hand rehabilitation. *Eur J Phys Med Rehabil* 1998;8:113
5. Ergüner H, İnanır M, Dursun N, Dursun E. Travmatik el yaralanmalı hastalarımızın klinik özellikleri. *Romatol Tıp Rehab.* 2002;13:243-51.
6. Jackson LL. Non fatal occupational injuries and illnesses treated in hospital emergency department in the United States. *Inj Prev* 2001;7(suppl):121-6.
7. Azimet Özdemir, Mehmet Veli Karaltın, Fatma Nilay Yoğun, Ali Murat Akkuş, Ali Cem Akpınar, Kemalettin Yıldız, Selma S. Ergün, Çetin Duygu, Ethem Güneren, Analysis of Hand Injuries in Children Between 0-6 Years of Age, *Türkiye Klinikleri Pediatri Dergisi*, doi: 10.5336/pediatr.2014-42094
8. Pettengill K M, van Strein G. Postoperative management of flexor tendon injuries. In: Hunter M, *Rehabilitation of the hand and upper extremity* 5th ed St Louis, Missouri, Mosby 2002;431-56.
9. Lister G.D. Flexor tendon. In JG. Me Carthy ed. *Plastic Surgery.* Vol: 7, pp: 4516-64. Philadelphia , W.B. Saunders,1990.
10. Wren T.A.L, Yerby .S.A, Beaupre G.S, Carter D.R. Mechanical properties of human Achilles tendon. *Clin. Biomech.* 16: 245-51; 2001.
11. Zhang A.Y, Chang J. Tissue engineering of flexor tendons. *Clin. Plastic. Surg.* 30:565-72; 2003.
12. Bredjiklian P.K. Biologic aspects of flexor tendon laceration and repair. *J. Bone Joint Surg.* 85A : 539-49; 2003.
13. Gerwin M. Cerebral palsy. In D.P. Green, R.N. Hotchkiss, W.C. Pederson (eds), third ed. *Green's Operative Hand Surgery.* Vol:1, pp: 259-86, 1999.
14. Vulpius O., Strofel A. In Enke Ferdinand ed. *Orthopadische Operatonslehre .* pp 29-30. Stuttgart, 1911.
15. Baker L.D. Triceps surae syndrome in cerebral palsy: an operation to aid its relief. *Arch Surg.* 68: 216-21, 1954.
16. Bunnell. S. Repair of tendons in the fingers and two new instruments. *Surg. Gynecol. Obstet.* 10: 103-10, 1918.
17. Kessler, I. Primary repair without immobilization of flexor tendon division within the digital sheet. *Acta, Orth. Scan.* 40: 587-601, 1961.
18. Mason, M.L., Shearon, C.G. The process of tendon repair. An experimental study of tendon suture

- and tendon graft. Arch. Surg. 25:615-92,1932.
19. Harrison, P.W., Chandy, J. A subclavian aneurism cured by cellophane fibrosis. Ann. Surg. 118: 478-81, 1943.
 20. Peacock, E.E., Van, W. Repair of tendons and restoration of gliding function. In E. Peacock (ed.), 2nd ed. Wound Repair, p: 367-463, 1976.
 21. Green,W.L and Niebauer, J.J. Primary and secondary flexor tendon repairs in "No Man's Land". J. Bone Joint Surg. 56A:1216-22; 1974.
 22. Kleinert, H.E., Kutz, J.E., Atasoy, E. Primary repair of flexor tendons. Orth. Clin, of North Amer. 4: 865-76; 1973.
 23. Lindsay, W.K., McDougal, E.P. Direct digital flexor tendon repair. Plast. Reconst. Surg. 26: 613-621; 1960.
 24. Lindsay, W.K., Thompson, H.G. Digital flexor tendons an experimental study. Br J Plast Surg. 12: 289-319; 1960.
 25. Lundborg, G.: Experimental flexor tendon healing without adhesion formation. A new concept of tendon nutrition an intrinsic healing mechanism. The Hand. 8: 235-8; 1976.
 26. Verdan, C.E. Primary repair of flexor tendons. J. Bone Joint Surg.42A: 647-57; 1960.
 27. Kleinert HE, Verdan C: Report of the Committee on Tendon Injuries. J. Hand Surg, 8: 794- 798, 1983
 28. Boyes, J.H. Histology of tendon repairs. 4 th ed. Bunnell's Surgery of the Hand, pp: 422-5, Philadelphia, J.B. Lippincott.1964.
 29. Christofer, F. A textbook of surgery by American authors. 4 th ed. p: 225, Philadelphia and London, W.B. Saunders, 1945.
 30. Lundborg G. Superficial repair of severed flexor tendon in synovial environment. J. Hand Surg. 5:451, 1980.
 31. Lundborg G. The nutrition of flexor tendons. In R Tubiana ed. The Hand. Vol: 3, pp 20-32, W.B. Saunders Comp, 1988.
 32. Manske P.R., LeskerP.A. Flexor tendon nutrition. Hand Clin. 1:13, 1985.
 33. Chaplin D.M. The vascular anatomy within normal tendons, divided tendons, free tendon grafts in rabbit. J. Bone Joint Surg. 55B: 269, 1973
 34. Cohen MJ,Kaplan L . Histology and ultrastructure of the human flexor tendon sheath.J Hand Surg 12A:25 ,1987
 35. Bloom, W., Favvcett, D.W. A Textbook of Histology. 9th ed. pp. 112-25, Philadelphia, Saunders Comp, 1968.
 36. Mayer L. Anatomy and phisiology of tendons. In The Cyclopedia of Medicine, Surgery, Specialities. L. MAYER (ed). Vol:13: pp:713-26, 1961.
 37. Stbhr P., Mollendorff W., Goertler K. Zehrbuch der histologie und der mikroskopischen anatomie des menschen. WEB. Gustav Fischer Verlag, Jena, 1939.
 38. Halit Kayalı ,Genel Histoloji, Sayfa 201-202,1992
 39. Leslie, B.A. Developmental Anatomy. 4 th ed. pp: 360-61, 1942.

40. Bishop AT., Cooney W.P., Wood M.B. Treatment of partial flexor tendon lacerations; The effect of tenoraphy and early protected mobilization. *J. Trauma* 26: 301-12, 1986.
41. Klein L, Lewis J. Simultaneous quantification of H3-Collagen loss and Hi-Collagen replacement during healing of rat tendon grafts. *J. Bone Joint Surg.* 54A: 137, 1972.
42. Elliot D.H. The structure and function of mammalian tendon. *Biol. Rev.* 40: 392, 1965.
43. Cooper R.R., Misol.S. Tendon and ligament insertion light and electron microscopic study. *J. Bone Joint Surg.* 52A: 1, 1970.
44. Jackson D.S., Bentley J.P. Collagen glycosaminoglycan interactions, in Ramchandran, G.S.(Ed): *Treatise on collagen. Vol:2A.* Newyork, Academic press, 1968.
45. Gambier R., Asvazadurian A., Venturini G. Rescherches sur la vascularisation des tendons. *Rev. Chis. Orthop.*, 48/3: 225, Mai-juin, 1962
46. Brockis J.G. The blood supply of the flexor and extensor tendons of the fingers in man. *J. Bone Joint Surg.*, 35-B, 131-8, Febr. 1953.
47. Nichols H.M., Lehman W.L, Meek E.C. Alteration of the blood supply of flexor tendons following injury, *Am. J. Surg.* Vol: 187:379-83, March, 1959.
48. Rank B.K., Wakefield A.R. *Surgery of repair as applied to hand injuries.* E. and S. Livingstone ltd. Edinburg and London, 1960.
49. Braithvaite F., Brockis. J.G. The vascularization of a tendon graft. *Brit. J. Plast. Surg.* 4: 130, 1951.
50. Peacock E., Hill C Some problems in flexor tendon healing. *Surgery*, vol: 45: 415-23, March, 1959.
51. Lundborg G. The vascularization of human flexor pollycis longus tendon. *The Hand.*11:28-31,1979.
52. Ochiai N., Matsui T., Myaji N. Vascular anatomy of flexor tendons. Vincular system and blood supply of the profundus tendon in the digital sheat. *J. Hand Surg.* 4:321-30, 1979.
53. Schatzker J., Branemark, P.I. intravital observation on the microvascular anatomy and microcirculation of the tendon. *Agta Orthop. Scand. Suppl.* 126:1, 1969.
54. Smith, J.W. The blood supply of tendons. *Am.J. Surg.* 109: 272, 1965.
55. Manske PR., Whiteside L.A, Lesker P.A. Nutrient pathway to flexor tendons using hydrogen Washout technique. *J. Hand Surg.* 3: 32-6, 1978.
56. Arai H. Die Blutgefasse der Sehnen. *Anat. Hefte*, 34: 363, 1907
57. Weber E.R, Hardin G., Haynes D. Synovial fluid nutrition of flexor tendon. In Hunter, J.M., Schneider, L.H. and Mackin, E. Ed: *Tendon Surgery in the Hand.* Pp:113-21. St louis, The Cv Mosby Co., 1987.
58. Strickland J.W. Flexor tendon acute injuries. Green, P.D., Hotckiss, R.N., Pederson, W.C (eds), third ed. *Green's Operative Hand Surgery.* Churchill Livingstone Comp. New York, pp1851-5,1999.
59. Skoog, T., Perssen, B.T. An experimental study of the early healing of tendons. *Plast. Reconst. Surg.* 13: 384, 1954.

60. Seiler J.G., Gelbermen R.H., Williams C.S . et al. Autogenous flexor tendon grafts. *J. Bone Joint. Surg.* 75A: 1004-14; 1993.
61. Thermann H., Zwip H., Tscherne H. The use of ultrasonography in foot and ankle pathology. *Foot and Ankle.* 12:321-8,1992.
62. Carls J., Wirth C.J. Die Sehnennaht-Operative Techniken. *Orthopade.* 29:188-95,2000.
63. Peer, L.A. Transplantation of tissues. L. Peer ed. p: 395-39. Baltimore: Williams and Wilkins , 1955
64. Tubiana, R. Historical survey of the treatment of tendon lesions in the hand. R. Tubiana ed. *The Hand*, p: 5-7, Philadelphia: WB Saunders ,1988.
65. Labana N, Messer T, Lautenschlager E, Nagda S, Nagle D.A biomechanical analysis of the modified Tsuge suture technique for repair of flexor tendon lacerations. *J Hand Surg [Br].* 2001 Aug;26(4):297-300.
66. Viinikainen A, Göransson H, Huovinen K, Kellomäki M, Törmälä P, Rokkanen P. The strength of the 6-strand modified Kessler repair performed with triplestranded or triple-stranded bound suture in a porcine extensor tendon model: an ex vivo study. *J Hand Surg [Am].* 2007 Apr;32(4):510-7.
67. Savage R. In vitro studies of a new method of flexor tendon repair. *J Hand Surg* 1985;10B: 135–141.
68. McLarney E, Hoffman H, Wolfe SW. Biomechanical analysis of the cruciate four-strand flexor tendon repair. *J Hand Surg* 1999;24A:295–301.
69. Winters SC, Gelberman RH, Woo SL, Chan SS, Grewal R, Seiler JG 3rd. The effects of multiple-strand suture methods on the strength and excursion of repaired intrasynovial flexor tendons: a biomechanical study in dogs. *J Hand Surg* 1998;23A:97–104.
70. Thurman RT, Trumble TE, Hanel DP, Tencer AF, Kiser PK. Two-, four-, and six-strand zone II flexor tendon repairs: an in situ biomechanical comparison using a cadaver model. *J Hand Surg* 1998;23A:261–265.
71. Xie RG ,Tang JB, Investigation of locking configurations for tendon repair, *J Hand Surg*; May 2005; 30A,pp-461-65
72. Hatanaka H, Zhang J, Manske PR. An in vivo study of locking and grasping techniques using a passive mobilization protocol in experimental animals. *J Hand Surg* 2000;25A:260–269.
73. Wada A, Kubota H, Hatanaka H, Hotokezaka S, Miura H, Iwamoto Y. The mechanical properties of locking and grasping suture loop configurations in four-strand core suture techniques. *J Hand Surg* 2000;25B:548 –551.
74. Tang JB, Tan J, Xu Y. Lengthening and locking: 2 ways to improve repair strength of obliquely lacerated tendons. *J Hand Surg* 2003;28A:832–837.
75. Tanaka T, Amadio PC, Zhao C, Zobitz ME, Yang C, An KN. Gliding characteristics and gap formation for locking and grasping tendon repairs: a biomechanical study in a human cadaver model. *J Hand Surg* 2004;29A:6 –14.
76. Uysal A.,Sungur M.,Ulusoy M.G.,Koçer U.,Çöloğlu H.,Karalezli K.: Tavuk ayağı uzun

- parmağının fleksor tendon sisteminin detaylı anatomik incelemesi, Türk Plas Rekonstr Est Cer Derg (2005) Cilt:13 Sayı:2
77. Işık S, Oztürk S, Gürses S, Yetmez M, Güler MM, Selmanpakoğlu N, Günhan O. Prevention of restrictive adhesions in primary tendon repair by HA membrane: experimental research in chickens.Br J Plast Surg. 1999 Jul;52(5):373-9.
78. McDowell CL, Marqueen TJ, Yager D, Owen J, Wayne JS (2002).Characterization of the tensile properties and histologic/biochemical changes in normal chicken tendon at the site of suture insertion. Journal of Hand Surgery, 27A: 605–614
79. Wong JK, Cerovac S, Ferguson MW, McGrouther DA.Cellular effect of a single interrupted suture on tendon, J hand surg [br]. 2006 aug;31(4):358-67. Epub 2006 may 11.
80. Bishop AT, Cooney III WP, Wood MB (1986). Treatment of partial flexor tendon lacerations : the effect of tenorrhaphy and early protected mobilization. Journal of Trauma, 26: 301–312
81. Kleinert, H.E., Schepel, S., Gill, T., 1981. Flexor tendon injuries. Surg.Clin. North Am. 61, 267–286.
82. Kleinert, H.E., Spokevicius, S., Papas, N.H., 1995. History of flexor tendon repair. J. Hand Surg. [Am.] 20, S46–S52.
83. Komanduri, M., Phillips, C.S., Mass, D.P., 1996. Tensile strength of flexor tendon repairs in a dynamic cadaver model. J. Hand Surg.[Am.] 21, 605–611
84. Peck FH, Bucher CA, Watson JS, Roe A: A comparative study of two methods of controlled mobilization of flexor tendon repairs in zone 2. J Hand Surg [Br] 23:41-45, 1998.
- gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. Tissue Eng 2001(7(6)): 729–741
85. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. Biochem Biophys Res Commun 2002(294(2)): 371– 379.
86. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. Biochem Biophys Res Commun 2005(328(1)): 258–264
87. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. Nature 2006 441(7097):1075e9.
88. Feng G, Wan Y, Balian G, Laurencin GT, et al. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells. Growth Factors, 2008 (26(3)) : 132–142
89. Molnar, E.M., Forever young; The practical handbook of youth extension, Witkower Press, Connecticut,1985 USA, 79-91
90. Şahin, F., Saydam, G., Omay, S.B., Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi 2005 (15):48-56. 4
91. Dincer, F., Ord. Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün'un Hayatı ve Bilimsel Çalışmaları, A.U. Vet. Fak. Derg. 1982 29(1-2):256-276.
92. Weissman IL. Translating Stem And Progenitor Cell Biology To The Clinic: Barriers And Opportunities. Science 2000; 287: 1442- 1446
93. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK,

- Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.
94. Edwards BE, Gearhart JD, Wallach EE. The human pluripotent stem cell: impact on medicine and society. *Fertil Steril*. 2000 Jul;74(1):1-7. Review.
95. Sandmaier BM, Storb R, Kinley J. Evidence Of Allogeneic Stromal Engraftment in The Bone Marrow Using Canine Mesenchymal Stem Cells. *Blood* 1998; 116: 85
96. Grzesik WJ, Cheng H, Oh JS, Kuznetsov SA, Mankani MH, Uzawo K. Cementum- Forming Cells Are Phenotypically Distinct From Bone-Forming Cells. *J. Bone Miner. Res.* 2000;15: 52–61
97. Kraus KH, Kirker Head C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Vet. Surg.* 2006 35(3): 232. 43
98. Nerem R, Sage H, Kelley CA, McNicol LA. Symposium Summary. *Ann NY Acad Sci* 2002;961:386-91.
99. Nerem RM. Cell-based therapies: From basic biology to replacement, repair, and regeneration. *Biomaterials* 2007; 28: 5074-7.
100. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, et all. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005(87):125–128.
101. Karaöz, E., Ayça, A., Ayhan, S., Eker-Sarıboyacı, A., Kaymaz, F. ve Kasap, M., 2009, Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers, *Histochem Cell Biol.*, 1-14ss.
102. Yim, Evelyn K. F., Pang, Stella W. and Leong Kam W., 2001, Synthetic nanostructures inducing differentiation of human mesenchymal stem cells into neuronal lineage, *Experimental Cell Research*, 313(9), 1820-1829pp.
103. Cario MS, Wagner JE. Placental And/ Or Umbilical Cord Blood: An Alternative Source Of Hematopoietic Stem Cells For Transplantation. *Blood* 1997; (90) 4665: 55
104. Kokai LE, Rubin JP, Marra KG. The Potential Of Adipose Derived Adult Stem Cells As A Source Of Neuronal Progenitor Cells. *Plast. Rec. Surg.* 2005;116: 1453
105. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem Cells For Myocardial Regeneration. *Circ Res.* 2002; 91: 1092-1102
106. Toghraie FS, Chenari N, Gholipour MA, Faghieh Z, Torabinejad S, Dehghani S, Ghaderi A. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *Knee.* 2011 Mar;18(2):71-5. doi: 10.1016/j.knee.2010.03.001. Epub 2010 Jun 29.
107. Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng* 2006(12(5)): 1137–1142.
108. Griffith CK, Miller C, Sainson RC, et al. Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng* 2005(11(1–2)): 257–266.
109. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. and Black, I.B., 2000, Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons, *Journal of Neuroscience Research*, 61, 364-370pp.
110. Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K, Ichinose S, Hata Y, Muneta T. In vitro cartilage formation

- of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res* 2005; 322: 289-98.
111. Tavassoli M, Friedenstein A. Hemopoietic stromal microenvironment. *Am J Hematol* 1983(15(2)): 195–203.
 112. Pfendler KC, Kawase E. The Potential of Stem Cells. *Obstet. Gynecol Surg.* 2003;58,3: 197.
 113. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005(23(6)):727–737
 114. Buranasinsup S, Sila-Asna M, Bunyaratvej N, et al. In vitro osteogenesis from human skin derived precursor cells. *Dev Growth Differ* 2006(48(4)): 263–269
 115. Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach AD. Human umbilical cord blood: A Clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int. J. Cell Cloning* 1980; 8: 76–88
 116. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004(200(2)): 123-135.
 117. Khan AA, Shaik MV, Parveen N, Rajendraprasad A, Aleem MA, Habeeb MA, Srinivas G, Raj TA, Tiwari SK, Kumaresan K, Venkateswarlu J, Pande G, Habibullah CM. Human fetal liver-derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of endstage decompensated liver cirrhosis. *Cell Transplant.* 2010;19(4):409-18. doi: 10.3727/096368910X498241.
 118. Kök Hücrelerin Kullanım Alanları, Kök hücre araştırmalarında güncel kavramlar. *Türkiye Bilimler Akademisi Raporları* 2006; Sayı: 7 s:14–21
 119. Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M.(2003) Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental Cell Research*, 287, 289–300.
 120. Scutt N, Rolf CG, Scutt A. Glucocorticoids inhibit tenocyte proliferation and Tendon progenitor cell recruitment. *Journal of Orthopaedic Research*, 24(2),173–182.
 121. Strassburg, S., Smith, R., Goodship, A., Hardingham, T., & Clegg, P. (2006). Adult and late fetal equine tendons contain cell 66. populations with weak progenitor properties in comparison to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Transection of Orthopaedic Research Society Annual Meeting*, 31, 1113.
 123. de Mos, M., Koevoet, W. J., Jahr, H., et al. (2007). Intrinsic differentiation potential of adolescent human tendon tissue: an in- vitro cell differentiation study. *BMC Musculoskeletal Disorder*, 8, 16. 167. Hashimoto, Y., Yoshida, G., Toyoda, H., & Takaoka, K. (2007). Generation of tendon-to-bone interface ‘enthesis’ with the use of recombinant BMP-2 in a rabbit model. *Journal of Orthopaedic Research*, 25, 1415–1424.
 124. Bi, Y., Ehrichiou, D., Kilts, T. M., et al. (2007). Identification of tendon stem / progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine*, 13(10), 1219–1227.
 125. Zhang, J., & Wang, J. H. C. (2010). Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. *BMC Musculoskeletal Disorder*, 11, 10.

126. Rui, Y. F., Lui, P. P. Y., Li, G., Fu, S. C., Lee, Y. W., & Chan, K. M. (2010). Isolation and characterization of multi-potent rat tendon-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 16(5), 1549–1558.
127. Yin, Z., Chen, X., Chen, J. L., et al. (2010). The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*, 31(8), 2163–2175.
128. Zhang, J., Pan, T., Liu, Y., & Wang, J. H. (2010). Mouse treadmill running enhances tendons by expanding the pool of tendon stem cells (TSCs) and TSC-related cellular production of collagen. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(9), 1178–1183.
129. Zhang, J., & Wang, J. H. (2010). Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *American Journal of Sports Medicine*, 38(12), 2477–2486.
130. Colter, D. C., Clas, R., DiGirolamo, C. M., & Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3213–3218.
131. Rui, Y. F., Lui, P. P. Y., Ni, M., Chan, L. S., Lee, Y. W., & Chan, K. M. (2011). Mechanical loading increased BMP-2 expression which promoted osteogenic differentiation of tendon-derived stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 29(3), 390–396.
132. Rui, Y. F., Lui, P. P. Y., Ni, M., et al. (2010). Higher expression of BMP receptors and BMP-2-induced osteogenesis in tendon-derived stem cells compared to bone marrow-derived stem cells. 7th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies. 16th–20th Oct, 2010, Kyoto International Conference Centre, Kyoto, Japan.
133. Zhou, Z., Akinbiyi, T., Xu, L., et al. (2010). Tendon-derived stem / progenitor cell aging: defective self-renewal and altered fate. *Aging Cell*, 9(5), 911–915.
134. Zhang, J., & Wang, J. H. C. (2010). Mechanical response of tendon stem cell: implications of tendon hemostasis and pathogenesis of tendinopathy. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(5), 639–643.
135. Wang, J. C., & Thampatty, B. P. (2010). Mechanobiology of adult stem cells. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 271, 297–342.
136. Awad, H. A., Butler, D. L., Dressler, M. R., Smith, F., Boivin, G. P., & Young, R. G. (2003). Repair of patellar tendon injuries using mesenchymal stem cells and collagen scaffolds. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(3), 420–431.
137. Harris, M. T., Butler, D. L., Boivin, G. P., Florer, J. B., Schantz, E. J., & Wenstrup, R. J. (2004). Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. *Journal of Orthopaedic Research*, 22(5), 998–1003.
138. Tasso, R., Augell, A., Carida, M., et al. (2009). Development of sarcomas in mice implanted with mesenchymal stem cells seeded onto bioscaffolds. *Carcinogenesis*, 30(1), 150–157.
139. Merle M. Skin cover for the extensor apparatus and indications for its use. In: Tubiana R, editor. *The Hand*. Philadelphia: WB Saunders, 1998:75- 81.
140. Rosenthal EA. The extensor tendons. In: Hunter JM, Schneider LH, Mackin EJ, Callahan AD, editors. *Rehabilitation of the Hand*. St Louis: CV Mosby, 1990:696-704.

141. Graham T, Mullen DJ. Athletic Injuries of the Adult Hand. In: DeeLee J, Drez D, Miller (eds). Orthopaedic Sports Medicine Principles and Practices. Philadelphia: Saunders, 2003:1381-431.
142. Evans RB. Therapeutic management of extensor tendon injuries. In: Hunter JM, Schneider LH, Mackin EJ, Callahan AD, editors. Rehabilitation of the Hand. St Louis: CV Mosby, 1990:492-511.
143. Hassan N, Habibollah P, Masoumeh J, Abolhassan A. Properties of amniotic membrane for potential use in tissue engineering. European Cells and Materials Vol.15 2008 (pages 88-99)
144. Arnaiz-Villena A, Martinez-Laso J, Alvarez M, Castro MJ. Primate mhc-E and -G alleles. Immunogenetics. 1998;47(3):281.
145. Zaidi N1, Nixon AJ. Stem cell therapy in bone repair and regeneration. Annals of the New York Academy of Sciences, pages 62–72, November 2007
146. Yun Feng Rui & Pauline Po Yee Lui & Yuk Wai Lee & Kai Ming Chan. Higher BMP receptor expression and BMP-2-induced osteogenic differentiation in tendon-derived stem cells compared with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. International Orthopaedics (SICOT) (2012) 36:1099–1107

11. ETİK KURUL KARARI



T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2014/114
KONU: Sn. Öğr. Gör. Halil İbrahim CANTER

29.04.2014

Sayın Öğr. Gör. Halil İbrahim CANTER,

Başlığı "Tendon kökenli mezenkimal kök hücre ile yağ doku kökenli mezenkimal kök hücrenin, hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ile kullanılmasının tendon iyileşmesi ve peritendinöz adezyonuna etkisinin araştırılması" olan projeniz 29.04.2014 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Ülkan KILIÇ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Prof. Dr. Serdar ÜŞÜMEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Mahmut GÜRGAN
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

Nasuhi GÜNAY
Üye

Veli ÖZTÜRK
Üye

12. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hacı Ömer	Soyadı	Sağır
Doğum Yeri	Adana - Seyhan	Doğum Tarihi	06.10.1983
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	17605177464
E-mail	Dromer.sagir@gmail.com	Tel	05324063580

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp Bölümü	2010
Lise	Adana Özel Çukurova Bilfen Koleji	1

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Araştırma Görevlisi Dr.	Acıbadem Üniversitesi	2010-2015
2. Pratisyen Doktor	Kilis Toplum Sağlığı Merkezi	6 ay
3.		-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	iyi	iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu •

KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

• Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

• KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-

Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English

as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced

English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Mac OS Yosemite	iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin