



## Mezenkimal kök hücrelerin anti-apoptotik etkileri ve tendon iyileşmesi (Hayvan çalışması)

Özgür SELEK<sup>1</sup>, Levent BULUÇ<sup>1</sup>, Bahar MUEZZİNOĞLU<sup>2</sup>,  
Rıza Emre ERGÜN<sup>3</sup>, Selda AYHAN<sup>4</sup>, Erdal KARAÖZ<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Kocaeli;

<sup>2</sup>Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kocaeli;

<sup>3</sup>Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Makine Eğitimi Bölümü, Kocaeli;

<sup>4</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Eskişehir;

<sup>5</sup>Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi, Kocaeli

**Amaç:** Bu çalışmada tendon onarımı sonrasında, mezenkimal kök hücre (MKH) uygulamasının tendon gücü ve iyileşmesi üzerine etkileri ve olası etki mekanizmaları araştırıldı.

**Çalışma planı:** Çalışmaya alınan 40 adet Wistar albino sıçanın 6'sının femur ve tibiaları mezenkimal kök hücre elde etmek için kullanıldı. Kalan 34 sıçanda açık olarak Aşil tendon kesilip onarıldı. Sıçanlar daha sonra 2 gruba ayrıldı. Dördüncü haftada çalışma grubuna (n=17) perkütan MKH uygulaması yapılırken, kontrol grubuna (n=17) sadece serum fizyolojik verildi. Sıçanlardan, 12. haftada eter anestezi altında servikal dislokasyonla sakrifiye edilerek alınan örnekler, histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Biyomekanik analizde 10 mm/dk ile traksiyon kuvveti uygulandı ve kopma gücü her tendon için Newton cinsinden kaydedildi.

**Bulgular:** Histolojik olarak gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı (p>0.05). Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda ise verilen MKH'lerin daha yoğun olarak onarım sahasına yerleştiği, kontrol grubunda belirgin olarak artmış apoptozun çalışma grubunda çok düşük olduğu görüldü. Tendon gücü açısından ise 12. haftada, mezenkimal kök hücre verilen çalışma grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha üstün olduğu bulundu (p<0.05).

**Çıkarımlar:** Nüks yırtıklarını azaltmak için başvurulan MKH uygulaması, muhtemel anti-apoptotik etkileri sayesinde tendonun gücünü arttırmaktadır. Mezenkimal kök hücre uygulamaları tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde perkütan olarak etkili bir şekilde kullanılabilir.

**Anahtar sözcükler:** Apoptoz; mezenkimal kök hücre; tendon iyileşmesi.

Tendon iyileşmesinde mezenkimal kök hücre (MKH) uygulamasını içeren çalışmalar tendon gücünde artışa işaret etmekteyse de, histopatolojik farklılıkları ve bu artışın mekanizmasını tam olarak ortaya koyamamıştır.<sup>[1]</sup>

Tendon iyileşmesi enflamasyon, onarım ve yeniden şekillendirme fazlarını içerir. Tendon iyileşmesinin ikinci fazında, matris depolamak ve yeni kolajen lifleri oluşturmak üzere hasar bölgesinde iyileştirici tendon fibroblastları artar. Özellikle normal tendon iyileşmesinin geç

**Yazışma adresi:** Dr. Özgür Selek, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Umuttepe, İzmit, Kocaeli.

Tel: +90 505 – 689 49 20 e-posta: ozgurselek@yahoo.com

**Başvuru tarihi:** 21.07.2012 **Kabul tarihi:** 09.10.2013

©2014 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu  
www.aott.org.tr adresinde  
doi: 10.3944/AOTT.2014.2985  
Karekod (Quick Response Code)



safhalarında, iyileşen kitlede artmış olan fibroblastlar normal hücre/matriks oranını yakalamak için azalmaya başlar. Bu süreç sayısı artan fibroblastların apoptoza uğraması sonucu meydana gelir.<sup>[2]</sup> Sıçan patellar tendon yaralanma modeli ile yapılan bir çalışmada iyileşmenin 28. gününde apoptozun maksimum düzeye ulaştığı gösterilmiştir.<sup>[2]</sup> Steiner de, tendon iyileşmesi ile ilgili çalışmasında tendon gücünün 3. haftada normalin %50'si, 4. haftada ise %25'i kadar olduğunu belirtmiştir.<sup>[3]</sup>

Bu çalışmanın amacı tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde uygulanan MKH'lerin histopatolojik ve biyomekanik açıdan etkilerini araştırmaktır. Biz MKH'lerin tendon iyileşmesi sırasında apoptozu azalttığını ve bunun MKH'lerin tendon iyileşmesine neden olan mekanizmalarından biri olduğunu düşünüyoruz.

### Gereç ve yöntem

Çalışmamızda ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen, dişi ve gebe olmayan 40 adet Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışmanın başında bu sıçanların 6'sı, femur ve tibialarından sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre (rKİ-MKH) elde etmek için sakrifiye edildi. Kalan sıçanlar rKİ-MKH verilen çalışma (n=17) ve serum fizyolojik verilen kontrol grubu (n=17) olmak üzere ikiye ayrıldı. On ikinci haftada tüm sıçanlar eter anestezisi altında servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edildi. Bu deneysel çalışma ve tüm prosedürleri Üniversitemiz Hayvan Çalışmaları Etik Kurulu'nun onayı ile yapıldı.

rKİ-MKH'lerin izolasyonu ve kültürü daha önce Karaöz ve ark. tarafından tariflenen yöntemler ile yapıldı.<sup>[4]</sup>

Kültürde üreyen rKİ-MKH'lerin kendi fenotipik özelliklerinin devam ettiğini doğrulamak için akım sitometri analizinde farklılaşmamış MKH'ler kullanıldı. Daha önce Karaöz ve ark. ile Kılıç ve ark. tarafından belirtilen Pasaj 3'teki rKİ-MKH'lere ait 3 yüzey belirteci değerlendirildi.<sup>[4,5]</sup>

rKİ-MKH'ler 75 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip kültür kaplarına 1x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde ekildi. Kültürün 2. gününde hücreler kültür kabının %50'ini doldurdularında, kültür besi yeri, 10 mM BrdU (Sigma, St. Louis, MO, ABD) içeren besi yeri ile değiştirildi. Hücreler 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'de 48 saat inkübe edildikten sonra tripsinizasyon işlemi ile kültür kabından kaldırıldı ve canlılık bakımından incelendi.<sup>[6]</sup>

Sıçanların anestezisi için intraperitoneal yol ile 50 mg/kg ketamin HCl (Ketalar®; Pfizer) ve 5 mg/kg ksilazin HCl (Rompun®, Bayer) kombinasyonu kullanıldı. Tüm cerrahi işlemler steril şartlarda aynı cerrah tarafından yapıldı. Sağ kruris orta hatta yapılan 2 cm'lik longitudinal insizyonla Aşil ve plantaris tendonları ortaya konuldu. Aşil tendonuna kalkaneal insersiyosunun 0.5 cm

proksimalinden transvers, tam kat kesi yapıldı. Plantaris tendonu internal splint görevi görmesi amacı ile sağlam bırakıldı. Aşil tendonu modifiye Kessler dikiş tekniği ile 3/0 Ethibond dikiş kullanılarak, cilt ise 4/0 monofilaman naylon dikiş ile onarıldı.<sup>[7,8]</sup> Cerrahi sonrası sıçanlar plastik kafeslere yerleştirildi ve herhangi bir immobilizasyon kullanılmadan gözlem altına alındı.

Cerrahi işleminden 4 hafta sonra, eter anestezisi altında onarım sahasına perkütan peritendinöz olarak, çalışma grubunda rKİ-MKH (0.5 mL, 1.0x10<sup>6</sup> hücre), kontrol grubunda ise aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edildi.

Çalışmamıza alınan 34 sıçandan kontrol grubuna ait bir denek 3. haftada öldüğü, çalışma grubundan bir denek ise örnek alınması sırasında Aşil tendonu yanlış yerden kesildiği için çalışmadan çıkarıldı. Çalışma grubunda 7 ve kontrol grubunda 7 olmak üzere 14 sıçan biyomekanik testler için rastgele seçildi. Otuz iki sıçandan geriye kalan 18'i ise immünohistokimyasal değerlendirilmelerde kullanıldı (çalışma grubu n=9, kontrol grubu n=9). Tüm örnekler kör bir şekilde değerlendirildi. Hiçbir denekte enfeksiyon bulgusu saptanmadı.

Hem çalışma ve hem de kontrol grubu deneklerinin 9'ar tanesinden alınan doku örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için kullanıldı. Bu dokular 24 saat %10 formalinde fikse edildikten sonra parafine gömüldü.<sup>[6]</sup> Parafine gömülmüş tendon örneklerinden, her biri 5 µm kalınlığında 4 longitudinal kesit serisi alındı ve hematoksilin eozin (H&E) ve Alsiyan mavisi ile boyamaları yapıldı. Fibrozis şiddeti, tendondaki kapiller damar yoğunluğu, enflamatuvar hücre dağılımı ve kıkırdak metaplazisi değerlendirildi. Enflamasyon, fibrozis ve damarlanma 0 (yok), 1 (minimal), 2 (orta), 3 (şiddetli); kıkırdak metaplazisi ise 0 (yok) veya 1 (var) olmak üzere sınıflandırıldı.<sup>[7]</sup>

BrdU işaretli rKİ-MKH enjeksiyonu sonrası hücre takibi yapmak için Adas ve ark. tarafından tanımlanan immüno Floresan ikili boyama protokolü kullanıldı.<sup>[6]</sup>

Parafine gömülmüş tendon doku örneklerinden, her biri 5 µm kalınlığında 5 longitudinal kesit serisi alındı. TUNEL ve Caspase-3 immünohistokimyasal boyamaları apoptozu, anti-BrdU immünohistokimyasal boyaması ise BrdU-pozitif hücreleri göstermek amacıyla gerçekleştirildi. Fibronektin ve desmin monoklonal antikorları, BrdU ve Caspase-3 ile boyanan örnekler için ikincil immünboyanma amacıyla kullanıldı. Rastgele seçilen 3 kesitin her birinde 294 mm<sup>2</sup> alanda TUNEL-pozitif hücreler ışık mikroskobu (Leica DMI 4000B; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany) ile sayılarak toplam yüzey alanı ile oranlandı.

Aşil tendonları distalde kalkaneus, proksimalde ise

kas bileşkesi ile alındı ve %0.9 NaCl ile ıslatılmış gazlı bez içinde muhafaza edilerek 3 saat içinde gerçekleştirilen biyomekanik testler için hazırlandı. Tendon örnekleri 10 mm/dk traksiyon kuvveti uygulayan test cihazının özel olarak hazırlanmış dişli klempleri arasına yerleştirildi ve her örnek için yetmezliğin oluştuğu kuvvet Newton cinsinden kaydedildi.

Veriler "SPSS for Windows v13.0" (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı ile değerlendirildi. Histolojik değerlendirmede kullanılan 18 örnekten elde edilen verilerin istatistiksel analizinde ki-kare testi kullanıldı. Biyomekanik testlerde kullanılan 14 örneğin verilerinde ise non-parametrik Mann-Whitney U-testinden yararlanıldı. 0.05'ten düşük p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

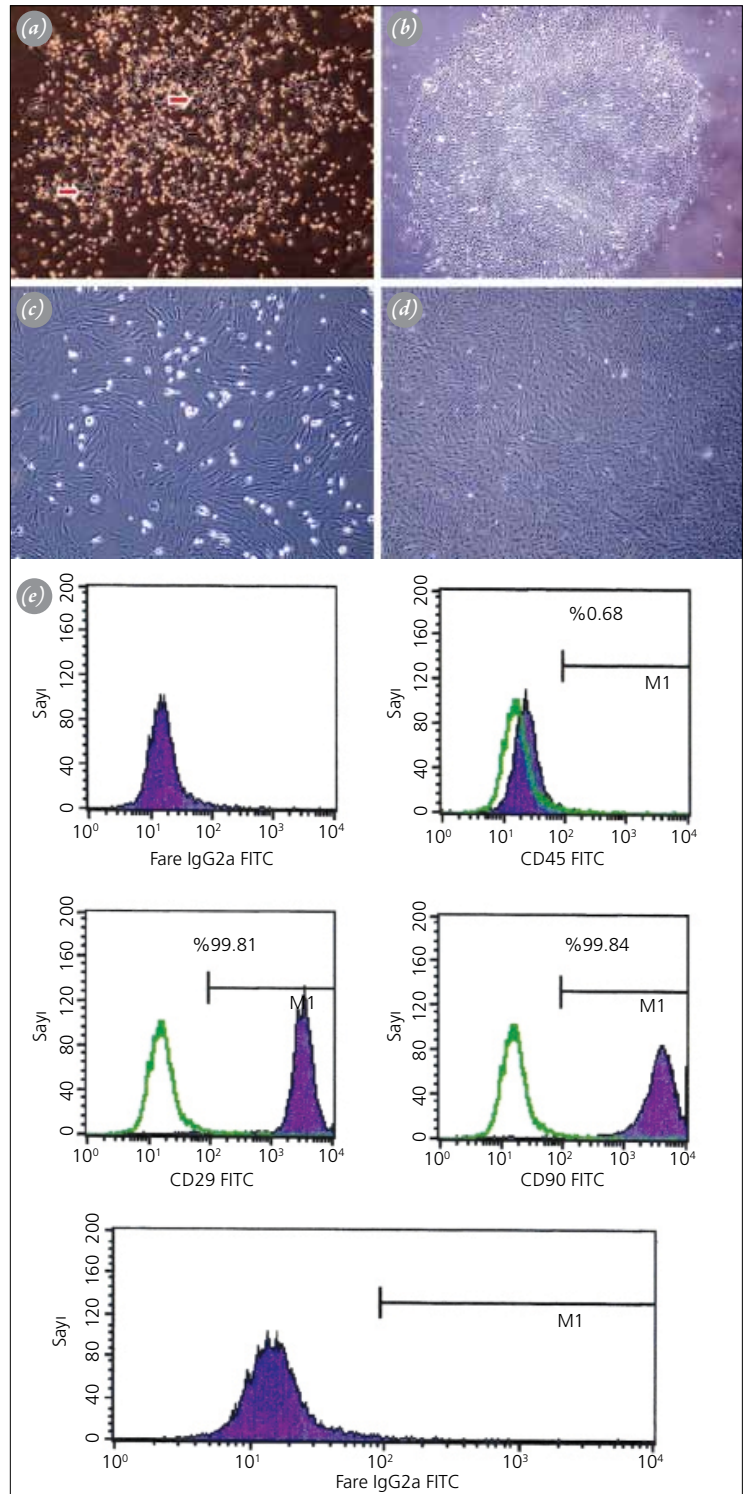
İnkübasyonun ilk günleri boyunca rKİ-MKH'leri hücre kültür flasklarına yapışarak fibroblast benzeri iğsi morfoloji gösterdi. Kültürün 3. veya 4. gününden sonra hücreler küçük koloniler halinde proliferasyon olarak büyümeye başladılar ve 6 ile 8. günler arasında bu koloniler değişik boyutlara ulaşarak sayıları arttı (Şekil 1a ve b). Büyümeyle beraber yan yana olan koloniler birbirleri ile birleşerek 12. ve 15. günler arasında tek tabaka olarak kültür flaskının tabanını doldurdular ve hücre canlılık oranları %95 olarak saptandı.<sup>[6]</sup>

rKİ-MKH'ler CD29 ve CD90 antikorları için pozitif olarak ekspresyon gösterirken, CD45 antikorunu eksprese etmedikleri belirlendi ve tüm pasajlar boyunca bu fenotiplerini korudular (Şekil 1e).

Fibrozis ve damarlanma artışı kontrol grubunda daha çok görülse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ( $p > 0.05$ ). Enflamatuvar hücreler ve kıkırdak metaplazisi açısından gruplar arasında fark görülmedi ( $p > 0.05$ ).

Kolajen lifleri düzenli yapılarını kaybetmişti. Özellikle onarım sahası çevresinde yeni oluşan bağ dokusu düzensiz, miksoid ve hücreden zengindi. Yapılan histolojik değerlendirmelerde immün yanıt ve rejeksiyonu gösteren herhangi bir bulguya rastlanmadı.

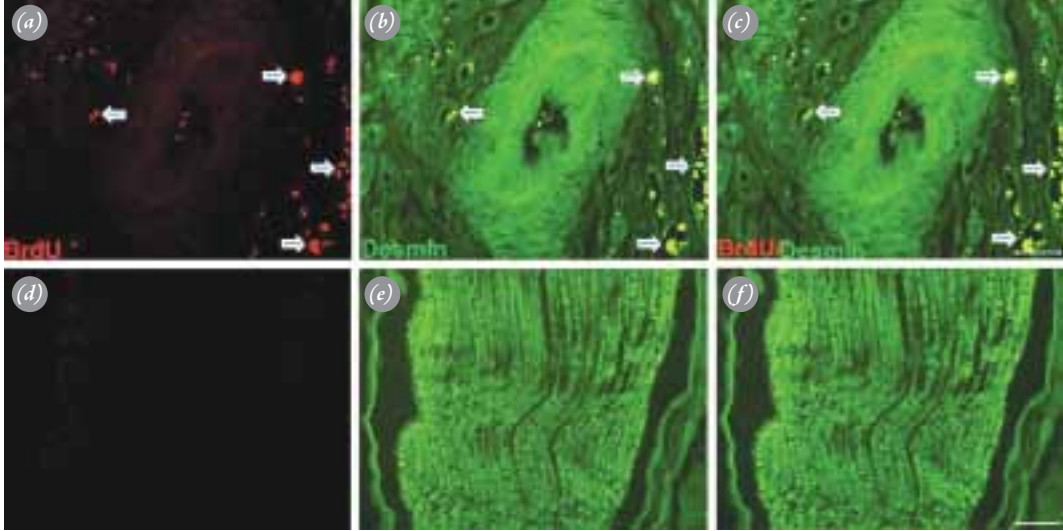
Kontrol grubunda anti-BrdU antikorları immünboyanması sonucunda, immünofloresan mikroskop altında damar içi otofloresan



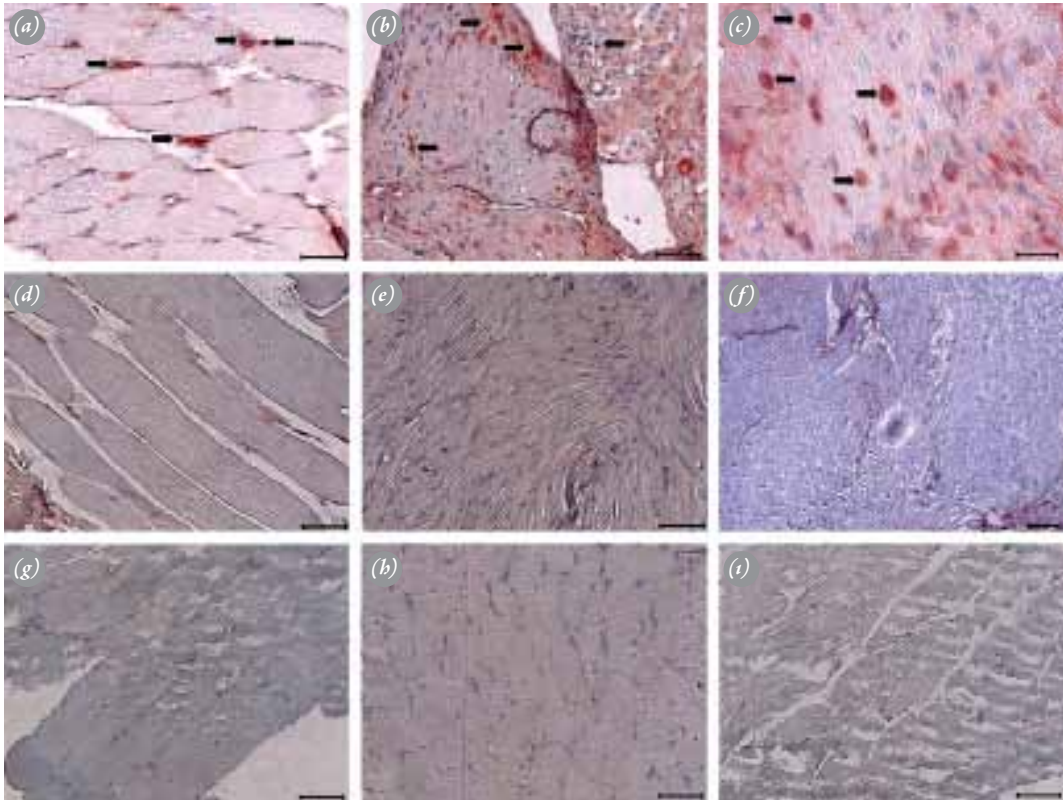
**Şekil 1.** (a, b) rKİ-MKH'lerin primer kültür morfolojisi ve (c, d) farklı pasajlarını gösteren alan görüntüleri. (a) Kültürün başlangıcında (P0-7. gün), sıçan kemik iliğinden izole edilen hücrelerin tek hücre kaynaklı kolonileri (oklar). (b) P0-9. günde, tek hücre kaynaklı koloninin daha büyük görüntüsü. Sonraki pasajlarda, (c) P1-5. Gün, (d) P4-9. gün) büyük, düz ve fibroblast benzeri morfoloji gösteren kök hücreler görülmekte (orijinal büyütme: (a-c): x40, d: x100). (e) Pasaj 3'teki MKH yüzey belirteçlerinin akım sitometri analizleri. [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

veren eritrositler dışında pozitif boyanma saptanmadı (Şekil 2). BrdU immünboyanma sonuçlarını değerlendirmek için normal tendon örnekleri de incelendi (Şekil

3g-1). Mikroskopik inceleme (floresan ve ışık mikroskopisi) sonucunda kontrol grubu tendon örneklerinde BrdU-pozitif hücre görülmedi.



**Şekil 2.** (a-f) Kontrol grubu tendonlarına ait kesitlerin BrdU ve desmin için immünboyanma sonrası görünüşleri. Otofloresan damar içi eritrositler (oklar) dışında BrdU için pozitif boyanma görülmemektedir (Bar çubukları: 50 µm). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]



**Şekil 3.** Tendoların BrdU için immünohistokimyasal boyama sonuçları. (a-c) Çalışma grubu tendoları, (d-f) kontrol grubu tendonları ve (g-i) sağlam tendonlar. Kök hücre uygulanan grupta BrdU-pozitif hücreler (oklar) izlenirken, diğer gruplarda görülmemektedir (Bar çubukları: A-C,D,E,G-I: 50 µm, F: 70 µm). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

Dördüncü haftada rKİ-MKH uygulanan Aşıl tendon doku örneklerinde 12. haftada özellikle onarım sahasında yoğunlaşan BrdU-pozitif hücreler saptandı. Tendonun farklı bölgelerinden alınan kesitlerde de BrdU-pozitif hücrelerin olması verilen rKİ-MKH'lerin sadece yaralanma sahasında bulunmadığını gösterdi (Şekil 3a-c ve Şekil 4).

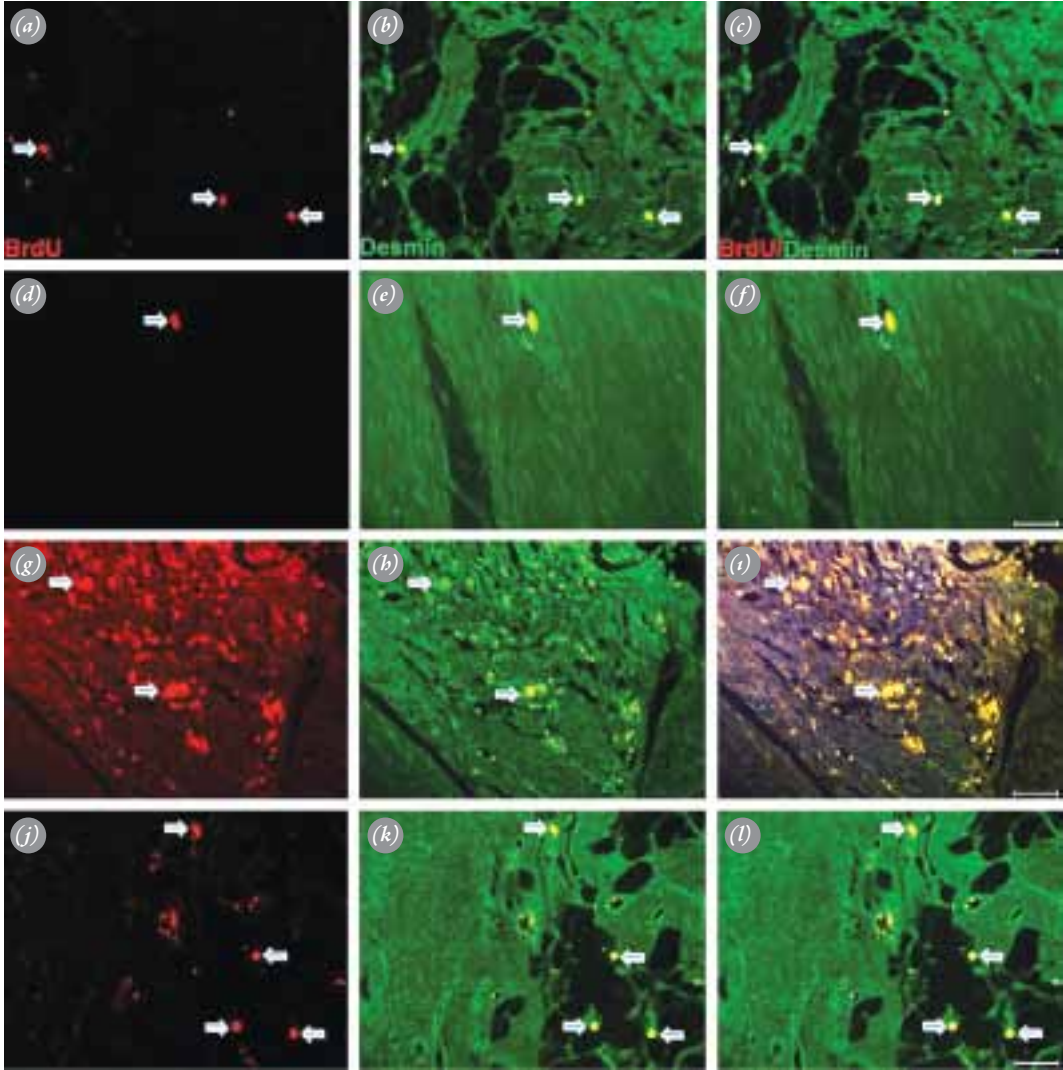
On ikinci haftada yapılan TUNEL ve Caspase-3 immünboyanmaları sonucu kontrol grubunda tüm örneklerde yoğun apoptoz görülürken (ortalama hücre sayısı oranı:  $28 \pm 3.75$ ), bu sayı çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha azdı (ortalama hücre sayısı oranı:  $12 \pm 4.30$ ) ( $p < 0.05$ ) (Şekil 5 ve 6).

Tendonlardaki ortalama yetmezlik yükü çalışma gru-

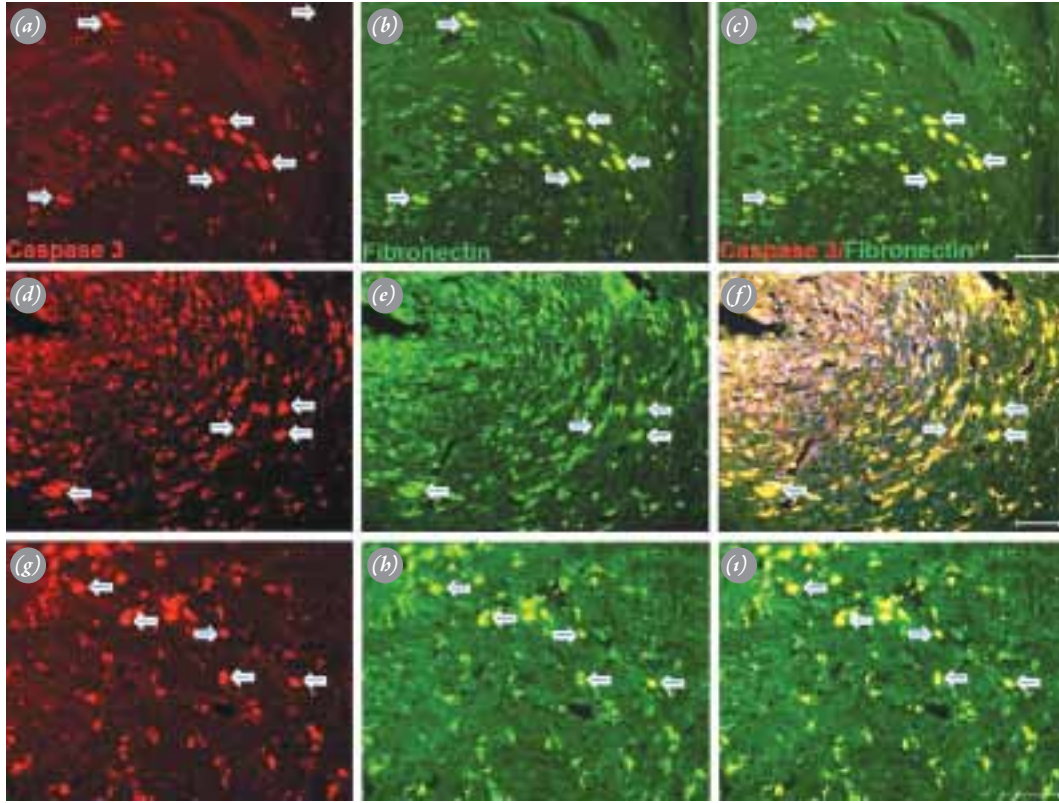
bu ( $n=7$ ) için 38.3 N ve kontrol grubu ( $n=7$ ) için 23.7 N olarak bulundu (Tablo 1). Gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p < 0.05$ ). Yetmezlik örneklerin 10'unda kalkaneal insersiyoda, 2'sinde onarım sahasının proksimalinde ve kalan 2'sinde ise onarım sahasında gelişti. Çalışma grubunda onarım sahasında yetmezlik görülmezken, kontrol grubunda 2 örnekte yetmezlik gelişti ( $p > 0.05$ ).

### Tartışma

Tendon iyileşmesinin erken safhaları enflamasyon, hücre göçü ve olgunlaşmasını içerir. Yara yerinde, fibroblast sayısı matris birikimi ve bu matrisin yeniden şekillendirilebilmesi için hızla artmaktadır. Enflamasyon



**Şekil 4.** (a-l) Çalışma grubuna rKİ-MKH verilen grup) ait farklı hayvanlardan elde edilmiş kesitlerin immünofluoresan boyanması sonrasındaki mikroskopik görünüşleri. BrdU işaretli kök hücrelerin çekirdekleri kırmızı olarak izlenmekte (oklar). Desmin ile pozitif reaksiyon veren (yeşil) hücresel komponentler tenosit ya da fibroblastları temsil etmektedir (Bar çubukları: 50  $\mu$ m). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]



**Sekil 5. (a-i)** Kontrol grubuna ait kesitlerin Caspase-3 (TR-kırmızı) ve fibronektin (FITC-yeşil) için immünboyanma sonrası görüntüleri. Farklı sıçanlardan elde edilen görüntülerde, Caspase-3 için pozitif reaksiyon (nükleer) veren apoptotik hücreler bol miktarda izlenmekte (oklar) (Bar çubukları: 50 µm). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

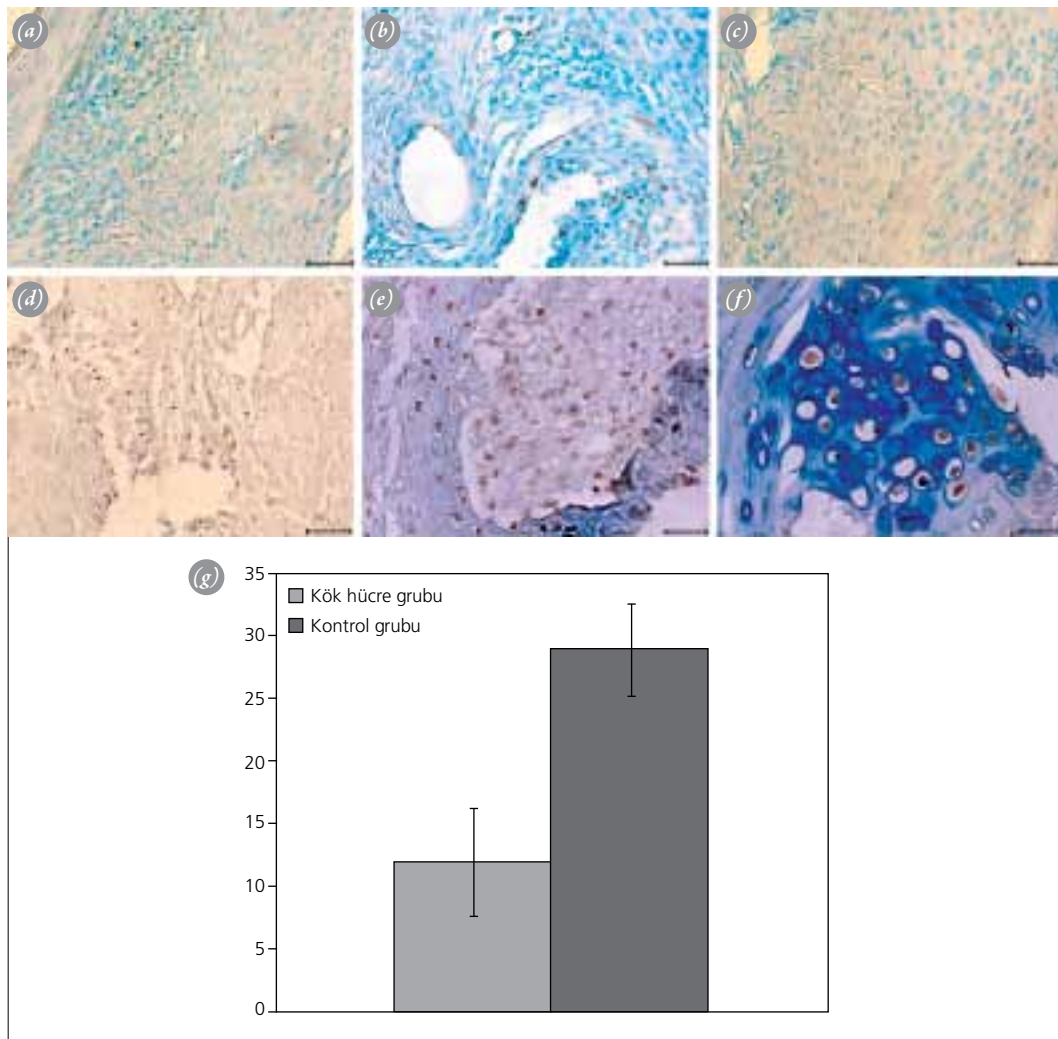
sırasında, büyüme faktörleri ve sitokinler, fibroblastları olgunlaşmak ve hücre dışı matris üretmek için uyarırlar. Böylece yeni kolajen lifleri oluşarak hücre/matris oranı düzenlenmeye çalışılır. Tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde ise hücre/matris oranı hücre sayısı azaltılarak sağlanır. Bu olayın kesin mekanizması bilinmemekle beraber, Lui ve ark.<sup>[2]</sup> nedenin apoptoz olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada fibroblast benzeri hücrelerin 4. günde arttığı, daha sonra ise sayılarının azalarak apoptozun 28. günde en üst seviyede olduğu gösterilmiştir. Tendon iyileşmesinin geç dönemlerinde artan nüks yırtığı oranının nedeni hücre/matris oranını düzeltmeye çalışan artmış apoptoz olabilir.

Mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkileri sadece yaralı doku içine doğrudan farklılaşması ile değil,

aynı zamanda parakrin ve otokrin faktörlerin üretimi ile de olur. Mezenkimal kök hücreler yaralanma bölgesinde parakrin ve otokrin etkileri olan çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımını da düzenler.<sup>[9,10]</sup> Bu konuda yapılmış birçok çalışma vardır. Enfarkta uğrayan kardiyak dokuya yerleştirilen MKH'lerin etki mekanizmasına bakıldığında, birçok araştırmacı MKH'lerin hipoksik ortamlarda kalp koruyucu büyüme faktörlerini in vitro normoksik koşullara göre daha çok salgıladığını göstermiştir.<sup>[11]</sup> Bir diğer çalışmada ise MKH'ler streptozotosin (STZ) ile yaralanmış pankreas adacık hücreleri üzerine hücre koruyucu, anti-enflamatuvar ve anti-apoptotik etkileri gibi parakrin fonksiyonları ile etki etmişlerdir.<sup>[12]</sup> Mezenkimal kök hücrelerden salınan IL6, TGF-β1, osteopontin ve fibronektin gibi parakrin me-

**Tablo 1.** Grupların tendon kopma gücü değerleri.

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



**Şekil 6.** (a-c) rKI-MKH uygulanmış çalışma grubu ve (d-f) uygulanmamış kontrol gruplarına ait parafine gömülü kesitlerin TUNEL ile immün boyaması sonrasında elde edilen mikroskopik görüntüler. Çalışma grubunda çekirdekleri kahverengi olarak izlenen apoptotik hücrelerin kontrol grubuna oranla belirgin şekilde az olduğu görülmektedir. (e, f) Özellikle kontrol grubundaki fibrokartilagenöz doku hücrelerindeki apoptoz belirgin şekilde dikkati çekmektedir. (g) Kök hücre verilen grupta TUNEL-pozitif hücrelerin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha azdır ( $p < 0.05$ ) (Bar çubukları: 50  $\mu\text{m}$ ). [Bu şekil, derginin [www.aott.org.tr](http://www.aott.org.tr) adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir.]

diatörlerin pankreas adacığının canlılığını düzenleyen mekanizmalar olabileceği gösterilmiştir.

Mae ve ark.'nın sıçan patellar tendon allogreftleri üzerine yaptığı çalışmada, allogreftin 4. haftada en zayıf (gerçek gücünün %20'si) seviyesinde olduğu aktarılmıştır.<sup>[13]</sup> Steiner<sup>[3]</sup> ise, sıçan Aşil tendonları üzerine yaptığı biyomekanik çalışmada, tendon gücünün 3. haftada %50 ve 4. haftada %25 düzeyinde olduğunu göstermiştir. Yazar, 3. haftadaki bu değişikliği erken fibrodizplaziye, 4. haftadaki zayıflamayı ise fibrodizplazinin yerini alan büyük lifler ve onların arasındaki longitudinal düzene bağlamıştır. Steiner, Mae ve ark., Lui ve ark.'nın çalışmaları ile diğer geç dönem nüks yırtığını bildiren çalışmalar ışığında, MKH'ler, bizim çalışmamızda, tendonun en zayıf

olduğu zamanda, yani tendon onarımı sonrası 4. haftada uygulanmıştır.<sup>[14-18]</sup>

Birçok çalışmada, biyomekanik özellikleri açısından MHK ve kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmasına rağmen bu çalışmaların çoğunda histolojik incelemelerde istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Awad ve ark., MKH ve tavşan patellar tendonları ile yaptığı çalışmada histolojik fark saptamadıklarını bildirmişlerdir.<sup>[19]</sup> Chong ve ark. ise, MKH uyguladıkları grupta sadece erken dönemde (3. hafta) hücre çekirdeği boy oranı ve çekirdek oryantasyon açısı arasında fark gösterebilmiştir.<sup>[20]</sup> Young ve ark.,<sup>[21]</sup> MKH verdikleri çalışma grubunun kontrol grubuna göre daha büyük bir enine kesit alanına ve daha iyi organize olmuş kolajen

liferine sahip olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, özellikle çalışmanın erken dönemlerinde tüm gruplarda sütür materyali çevresinde yoğun fibrozis ve enflamatuvar hücreler saptamıştır. Bizim çalışmamızda, MKH verdiğimiz grupta daha az fibrozis ve damarlanma görülmeye rağmen istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştı. Her iki grupta da sütür materyali çevresinde enflamatuvar hücreler yoğundu. Tendon hücrelerinin belirgin sitoplazma içinde çekirdeklerinin büyüyüp yuvarlaklaşması kıkırdak metaplazisi olarak yorumlanmakta olup, bunun oluş mekanizması ise tam olarak açıklanamamıştır.<sup>[22]</sup> Biz de gruplardan bağımsız olarak bazı kesitlerde kıkırdak metaplazisi gördük, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık.

İşaretlenmiş MKH'lerin oluşturulmuş tendon defektleri modelinde aynı anda verildiğinde, defekt sahasına yerleştiği ve burada canlı olarak kalabildiği gösterilmiştir.<sup>[20]</sup> Bununla birlikte, daha önceden oluşturulmuş bir tendon defektine geç dönemde MKH uygulaması ile ilgili çalışma yoktur. Çalışmamızda tendon onarımı sonrası iyileşmenin ikinci evresi olan fibroblast (onarım) evresinde BrdU ile işaretlenmiş MKH perkütanöz olarak uygulandı. Transplante edilen MKH'lerin 12. haftada, farklılaşmış ve farklılaşmamış hallerde, iyileşme bölgesinde var olduğu saptandı. İyileşmenin ilk evresinde (enflamasyon evresi) MKH'lerin iyileşme bölgesine göçünü sağlayan kemotaktik faktörler enflamatuvar hücrelerce salgılanır. Çalışmamızda geç dönemde perkütan verildiğinde dahi MKH'lerin bu bölgeye yerleşmesi, kemotaktik faktörlerin enflamatuvar hücrelerce salgılanmasının iyileşmenin ilerleyen dönemlerinde de devam ettiğini göstermektedir.

Tendon onarımı sonrası geç dönemde MKH verdiğimiz çalışma grubunda 12. haftada çok az miktarda apoptoz gördük. Bununla birlikte, MKH verilmeyen kontrol grubunda yaygın apoptoz mevcuttu. İyileşmenin geç dönemi olmasına karşın verilen MKH'lerin onarım sahasına daha belirgin olarak yerleşmesinin bir nedeni de bu bölgedeki artmış apoptotik aktivite olabilir. Biz MKH'lerin, muhtemel olarak, eksprese ettikleri anti-apoptotik genler sayesinde apoptozu azalttığını ve tendon gücünde artışa neden olduğunu varsayıyoruz. Mezenkimal kök hücrelerin etki mekanizmaları için farklı teoriler öne sürülmüştür. Bunlardan biri, MKH'lerin farklılaşarak tenosit haline dönüşmesi, iyileşme sahasında ve yeniden şekillendirme aşamasında görev alması; bir diğeri ise MKH'lerin terminal farklılaşmadan ziyade 'büyüme faktörü pompası' (growth factor pump) olarak rol oynamasıdır.<sup>[23]</sup> Biz ise, hasar bölgesine nakledilen MKH'lerin, parakrin etki mekanizmasıyla anti-apoptotik işlevi olduğunu öngörmekteyiz.

Sıçanlar kolay üretilebilmeleri, bakım kolaylığı, filogenetik skalada diğer türlere göre daha alt sıralarda olmaları, düşük enfeksiyon riski ve kök hücre çalışmalarında daha çok verileri olduğu için tarafımızdan tercih edilmiştir. Ancak, Aşil tendonlarının kısa olması biyomekanik çalışma yapılması açısından bir dezavantajdır. Dördüncü haftada perkütan olarak MKH enjeksiyonu yapacağımız zaman, tendon onarımın yapıldığı bölgedeki sütür renginin cilt altında görülmesi bize kolaylık sağladı. Bununla birlikte, histolojik sonuçlara bakıldığında, bu sütür materyali çevresinde enflamatuvar hücreler ve fibrozis daha yoğun olarak görüldü. Bu nedenle, histolojik inceleme için tendon onarımından daha çok tendonda defekt oluşturan modeller daha uygundur. Çalışmamızda MKH'ler cerrahi sonrası 4. haftada uygulandı ve sonuçlar 12. haftada değerlendirildiyse de, tendon onarımının üzerinden 12 hafta geçmesine rağmen tüm deneklerde histolojik olarak iyileşmenin tamamlanmadığı görüldü. Bu nedenle, gelecekte yapılacak MKH uygulaması çalışmalarında daha uzun takip süreleri daha iyi histolojik sonuçlar almak açısından faydalı olacaktır.

Sonuç olarak, MKH'lerin, deneysel veya klinik olsun, yapılan birçok uygulamada iyi sonuçlar verdiği görülmüş ve gelecekte birçok hastalığın çözümü olacağı düşünülmektedir. Yine de, bu iyi sonuçlara rağmen, etki mekanizmaları halen kesin olarak anlaşılamamıştır. Geç dönemde nüks yırtığı insidansını azaltmak açısından MKH uygulamasının, bu hücrelerin muhtemel anti-apoptotik etkileri sayesinde tendonun kopma gücü eşğini arttırdığını düşünmekteyiz.

**Çıkar örtüşmesi:** Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

## Kaynaklar

1. Hoffmann A, Gross G. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *Int Orthop* 2007;31:791-7.
2. Lui PP, Cheuk YC, Hung LK, Fu SC, Chan KM. Increased apoptosis at the late stage of tendon healing. *Wound Repair Regen* 2007;15:702-7.
3. Steiner M. Biomechanics of tendon healing. *J Biomech* 1982;15:951-8.
4. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sarıboyacı AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 2009;132:533-46.
5. Kiliç E, Ceyhan T, Cetinkaya DU. Evaluation of differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to cartilage and bone cells. [Article in Turkish] *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:295-301.
6. Adas G, Arikian S, Karatepe O, Kemik O, Ayhan S,



- Karaoz E, et al. Mesenchymal stem cells improve the healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Langenbecks Arch Surg* 2011;396:115-26.
7. Saygi B, Yildirim Y, Cabukoğlu C, Kara H, Ramadan SS, Esemeli T. The effect of dehydration and irrigation on the healing of Achilles tendon: an experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2008;14:103-9.
  8. Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells enhance primary tendon repair: biomechanical and immunohistochemical evaluation. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012;65:1712-9.
  9. Xu YX, Chen L, Wang R, Hou WK, Lin P, Sun L, et al. Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms. *Med Hypotheses* 2008;71:390-3.
  10. Ichim TE, Alexandrescu DT, Solano F, Lara F, Campion Rde N, Paris E, et al. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cell Immunol* 2010;260:75-82.
  11. Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morrello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006;20:661-9.
  12. Karaoz E, Genç ZS, Demircan PÇ, Aksoy A, Duruksu G. Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis* 2010;1:e36.
  13. Mae T, Shino K, Maeda A, Toritsuka Y, Horibe S, Ochi T. Effect of gamma irradiation on remodeling process of tendon allograft. *Clin Orthop Relat Res* 2003;414:305-14.
  14. Aoki M, Ogiwara N, Ohta T, Nabeta Y. Early active motion and weightbearing after cross-stitch achilles tendon repair. *Am J Sports Med* 1998;26:794-800.
  15. Cretnik A, Kosanović M, Smrkolj V. Percutaneous suturing of the ruptured Achilles tendon under local anesthesia. *J Foot Ankle Surg* 2004;43:72-81.
  16. Gelberman RH, Nunley JA 2nd, Osterman AL, Breen TF, Dimick MP, Woo SL. Influences of the protected passive mobilization interval on flexor tendon healing. A prospective randomized clinical study. *Clin Orthop Relat Res* 1991;264:189-96.
  17. Cetti R, Henriksen LO, Jacobsen KS. A new treatment of ruptured Achilles tendons. A prospective randomized study. *Clin Orthop Relat Res* 1994;308:155-65.
  18. Möller M, Movin T, Granhed H, Lind K, Faxén E, Karlsson J. Acute rupture of tendon Achillis. A prospective randomised study of comparison between surgical and non-surgical treatment. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83:843-8.
  19. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 2003;21:420-31.
  20. Chong AK, Ang AD, Goh JC, Hui JH, Lim AY, Lee EH, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:74-81.
  21. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16:406-13.
  22. Hapa O, Cakici H, Gideroğlu K, Ozturan K, Kükner A, Buğdayci G. The effect of ethanol intake on tendon healing: a histological and biomechanical study in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129:1721-6.
  23. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005;11:1198-211.