

2020

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emin Yusuf AYDIN



T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON İLE KEMİK İLİĞİ
KONSANTRESİNİN BİRLİKTE KULLANIMLARININ TEK
TEK KULLANILMALARINA GÖRE AŞIL TENDONU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emin Yusuf AYDIN

KAS-İSKELET SİSTEMİ VE REJENERATİF TIP PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON İLE KEMİK
İLİĞİ KONSANTRESİNİN BİRLİKTE
KULLANIMLARININ TEK TEK
KULLANILMALARINA GÖRE AŞIL TENDONU
ÜZERİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emin Yusuf AYDIN

KAS-İSKELET SİSTEMİ VE REJENERATİF TIP PROGRAMI

**Bu araştırma; Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
(TÜBİTAK) 1002-Hızlı Destek Programı tarafından 119S901 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Stromal Vasküler Fraksiyon ile Kemik İliği Konsantresinin Birlikte Kullanımının
Tek Tek Kullanımlarına Göre Aşil Tendonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Emin Yusuf AYDIN

Yüksek Lisans Tezi

08.06.2020

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Murat BOZKURT

Dr. Öğr. Üy. Mehmet Doğan AŞIK

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Prof. Dr. Murat BOZKURT

Doç. Dr. Nurdan ÇAY

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

Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN

Enstitü Müdürü

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

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. 08.06.2020

Emin Yusuf AYDIN



Aileme ve sevdiğime ithafen.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin başlangıcından, tezimin tamamlanma aşamasına kadar bilgi ve deneyimleri ile yoluma ışık tutmuş olan, daima yardımını ve desteğini hissettiğim, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Murat BOZKURT'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda, konunun belirlenmesinden, deneylerimin tamamlanmasına kadar tüm aşamalarda derin bilgi ve deneyimlerini paylaşan, gerekli tüm olanakları sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen, eş danışman hocam, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK'a çok teşekkür ederim.

Hayvan deneylerinde bana yardım eden, tüm sorularıma sabırla cevap veren değerli hocalarım Doç. Dr. Nurdan ÇAY'a, Doç. Dr. Berrak GÜMÜŐKAYA ÖCAL'a ve Doç. Dr. Safa GÜRSOY'a teşekkür ederim.

Arkadaşım, Dr. Ali TORABI'ye yardım ve dostluğu için çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu uzun süreçte her zaman yanımda olduklarını bildiğim, aileme ve Uzm.Fzt. Rabia Gülçin SEYHAN'a sabırları ve destekleri için, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırma, TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından desteklenmiştir. Proje No: 119S901

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Tendon.....	5
2.2.Aşil Tendonu	8
2.3.Tendon Yaralanmaları.....	9
2.3.1.Tendon Ruptürü.....	9
2.3.2.Tendinopati.....	10
2.3.3.Tendon İyileşmesi	11
2.3.4.Tendon İyileşmesinde Kullanılan Yöntemler.....	13
2.4.Stromal Vasküler Fraksiyon.....	16
2.4.1.SVF İzolasyon Yöntemleri	17
2.4.2.SVF'nin Kullanım Alanları	19
2.5.Kemik İliği Konsantresi	21
2.5.1.KİK İzolasyon Yöntemleri	21
2.5.2.KİK Kullanım Alanları.....	22
3.MATERYAL VE YÖNTEM	25
3.1.Hayvanlar	25
3.2.Hayvan Deneyinin Tasarımı.....	25
3.3.Cerrahi Prosedür.....	26
3.4.Stromal Vasküler Fraksiyonun Elde Edilmesi	27

3.5.Kemik İliği Konsantresinin Elde Edilmesi.....	28
3.6.Hücre Sayımı.....	28
3.7.Histolojik Değerlendirme	29
3.8.Elastosonografik Değerlendirme	31
3.9.İstatistik	32
4.BULGULAR.....	33
4.1.Hücre Sayımı.....	33
4.2.Elastosonografik Bulgular.....	34
4.3.Histolojik Bulgular	38
5.TARTIŞMA	43
5.1.Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Karışımı	43
5.2.Elastosonografik Bulgular.....	44
5.3.Histolojik Bulgular	45
5.4.Öneriler.....	47
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
7.KAYNAKLAR	49
8.EKLER.....	66
EK-1.Etik Kurul İzni	66
EK-2.Özgeçmiş	67

ÖZET

Stromal Vasküler Fraksiyon ile Kemik İliği Konsantresinin Birlikte Kullanımlarının Tek Tek Kullanımlarına Göre Aşil Tendonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

Tendonlar, kendilerine özgü fibroblastlara (tenositler) sahiptir ve bu tenositler yoğun bir hücre dışı matriks oluştururlar. İnsan vücudunda en güçlü tendon olmasına rağmen, aşil tendonu vücutta en sık yaralanan tendondur. Tendon iyileşmesine yönelik, ilaç tedavisi, cerrahi tedavi ve fizik tedavi uygulamalarını da içeren birçok geleneksel tedavi kullanılmaktadır. Ancak, bu tedavi yöntemleri ile istenilen sonuçlar elde edilememektedir. Bu tedavilerin dışında, rejeneratif tıbbın gelişmesiyle farklı tedavi yöntemleri bulunmuştur. Bunlar ikisi stromal vasküler fraksiyon (SVF) ve kemik iliği konsantresi (KİK)'dir. Bu tezin amacı, SVF ile KİK' in birlikte kullanımlarının aşil tendon yaralanmalarının tedavisi üzerine etkisini değerlendirmesidir. Araştırmada oluşturulan hayvan deneyinde kontrol grubu ve her bir deney grubu için beşer hayvan kullanıldı. Bu çalışmada histolojik bir derecelendirme sistemi ile tendon iyileşmesi sınıflandırıldı. Elastosonografi ile elde edilen doku rengi ve sayısal veriler ise iyileşen dokunun biyomekanik karakterizasyonunda kullanıldı. Çalışmanın sonucunda elastosonografi çekilmiş 12 tavşanın gerilme değerleri 1. Ay sırasıyla ortalama sağlam grubu 0.30, kontrol grubu 1.77, %100 SVF grubu 0.51, %100 KİK grubu 0.50, %50 SVF- %50 KİK grubu 0.69, %75 SVF- %25 KİK grubu 0.62 ve %25 SVF- %75 KİK grubu 0.79 olarak bulundu. 2.Ay ise ortalama sağlam grubu 0.23, kontrol grubu 1.30, %100 SVF grubu 0.35, %100 KİK grubu 0.38, %50 SVF- %50 KİK grubu 0.33, %75 SVF- %25 KİK grubu 0.29 ve %25 SVF- %75 KİK grubu 0.32 olarak bulundu. Histolojik değerlendirme sonucunda tendon dokularının iyileşme puanları ortalama puanları sırasıyla sağlam grubun 0, kontrol grubunun 6.6, %100 SVF grubunun 9.33, %100 KİK grubunun 4.5, %50 SVF- %50 KİK grubunun 4.6, %75 SVF-%25 KİK grubunun 5.5 ve %75KİK- %25 SVF grubunun ise 7 olduğu tespit edildi.Sonuç olarak elde edilen veriler KİK ve SVF'nin birlikte kullanımlarının tek tek kullanımlarına göre aşil tendonunu daha etkin bir şekilde iyileştirdiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Aşil tendonu, kemik iliği konsantresi, stromal vasküler fraksiyon, tendinopati.

ABSTRACT

Comparison of Co-Use Stromal Vascular Fraction and Bone Marrow Concentrate According to Their Single Use the Effects of on Achilles Tendon

Tendons have their own fibroblasts (tenocytes) and these tenocytes form a dense extracellular matrix. Although it is the strongest tendon in the human body, the Achilles tendon is the most frequently injured tendon in the body. Many traditional treatments are used for tendon healing, including drug therapy, surgical treatment, and physical therapy applications. However, the desired results cannot be obtained with these treatment methods. Apart from these treatments, different treatment methods have been found with the development of regenerative medicine. These are two stromal vascular fractions (SVF) and bone marrow concentrate (BMC). The aim of this thesis is to evaluate the effect of using SVF and KIK on the treatment of Achilles tendon injuries. In the animal experiment created in the study, five animals were used for the control group and each experiment group. In this study, tendon healing was classified with a histological grading system. The tissue color and numerical data obtained by elastosonography were used in the biomechanical characterization of the healing tissue. As a result of the study stress ratios of 12 rabbits that received elastosonography were healthy group 0.30, control group 1.77, 100% SVF group 0.51, 100% BMC group 0.50, 50% SVF- 50% BMC group 0.69, 75% SVF- 25% BMC group was 0.62 and 25% SVF- 75% BMC group was 0.79 in first month. In the second month, healthy group is 0.23, the control group is 1.30, 100% SVF group is 0.35, 100% BMC group is 0.38, 50% SVF-50% BMC group is 0.33, 75%SVF-25% BMC group is 0.29 and 25% is SVF-% 75 BMC group is found to be 0.32. Histological evaluation was performed on 30 rabbit achilles tendons and mean scores were healthy group is 0, control group is 6.6, 100% SVF group is 9.33, 100% BMC group is 4.5, 50% SVF- 50% group is 5.5, 75% SVF-25% BMC group is 5.5 and 75% BMC -25% SVF group was found to be 7. With these results, it has been proven that the use of mixtures together improves the Achilles tendon more effectively than the individual uses.

Keywords: Achilles tendon, bone marrow concentrate, stromal vascular fraction, tendinopathy.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BMAC : Bone Marrow Aspiration Concentrate (Kemik İliği Aspirasyon Konsantresi)

BMC : Bone Marrow Concentrate (Kemik İliği Konsantresi)

ESWT : Ekstrakorporeal Şok Dalgası Tedavisi

HA : Hyalüronik Asit

KİK : Kemik İliği Konsantresi

MRG : Magnetik Rezonans Görüntüleme

OA : Osteoartrit

PRP : Platelet Rich Plasma (Trombosit Açısından Zenginleştirilmiş Plazma)

SVF : Stromal Vasküler Fraksiyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tendonun yapısı	6
Şekil 2.2. Endotenon ve paratenon yapısı	7
Şekil 2.3. Aşıl tendonu anatomisi.	8
Şekil 2.4. Aşıl tendinopatisi çeşitleri	10
Şekil 2.5. Tendon iyileşme aşamaları	12
Şekil 2.6. SVF enzimatik izolasyon	18
Şekil 3.1. Hayvan deneyi grupları.	26
Şekil 3.2. Tendon üzerine açılan yara.	26
Şekil 3.3. Stromal vasküler fraksiyon.	27
Şekil 3.4. Kemik iliği konsantresi.	28
Şekil 3.5. Histolojik bulguların şematik görüntüsü a) 0 puanlı tendon b)18 puanlı tendon	31
Şekil 4.1. Thoma lamı görüntüsü.	33
Şekil 4.2. %75 SVF- %25 KİK karışımı uygulanmış aşıl tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.	34
Şekil 4.3. %100 Kemik iliği konsantresi uygulanmış aşıl tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.	35
Şekil 4.4. %25 SVF- %75 KİK karışımı uygulanmış aşıl tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.	35
Şekil 4.5. %100 Stromal vasküler fraksiyon uygulanmış aşıl tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.	36
Şekil 4.6. Kontrol grubunun aşıl tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.	36
Şekil 4.7. %50 SVF- %50 KİK karışımı uygulanmış aşıl tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.	37
Şekil 4.8. Sağlam taraf aşıl tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.	37
Şekil 4.9. Histolojik bulguların 40x mikroskop görüntüsü.	39

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Histolojik derecelendirme sistemi	30
Tablo 3.2. Elastikiyet tipleri ve elastosonografideki görünümleri	32
Tablo 4.1. Thoma lamında bulunan hücrelerin sayısı ve yaşayan hücre oranı.....	33
Tablo 4.2. Grupların ortalama gerilme değerleri.....	38
Tablo 4.3. Seçilen altı tavşanın ve sağlam tarafın elastikiyet tipleri ve elastosonografideki görünümleri.....	38
Tablo 4.4. Histolojik değerlendirme skorlarına göre grupların ortalamaları.....	40
Tablo 4.5. Histolojik değerlendirme alt parametreleri ile gruplar arasındaki ilişki. .	41
Tablo 4.6. Histolojik değerlendirme skalası çalışma grupları ile kontrol grubu arasındaki ilişki.	42

1. GİRİŞ

Tendonlar kasları kemiğe bağlamaktadır. Bu sayede esnek bir şekilde eklem hareketini oluştururlar. Tendonlar, kendilerine özgü fibroblastlardan (tenositlerden) ve yoğun bir hücre dışı matriksinden meydana gelmiştir. Matrikste ortalama %95 oranında tip-I kolajen lifleri bulunmaktadır. İnsan hareketlerinde önemli bir yeri bulunan tendonlarda, kan damarlarının azlığı nedeniyle iyileşme süreci çok yavaş ve yetersizdir. Tenositlerin çoğalma kabiliyetinin sınırlı olması ve yüksek derecede farklılaşmış olması bunun bir sebebi olarak gösterilmektedir.(1).

İnsan vücudunda en güçlü tendon aşil tendondur. Buna rağmen vücutta en sık yaralanan tendondur (2). Literatürde aşil tendonu ile ilişkili intratendinöz olan iki patoloji bulunmaktadır: Aşil tam rüptürü ve Aşil tendinopatisi. En sık görülen yaralanma ise, orta-kısım aşil tendinopatisi (3). Tendinopati, genellikle aşırı yüklenmeden, dejenerasyondan, ilaçtan veya sistemik bir hastalıktan kaynaklanmaktadır (4). Spor (özellikle koşma ve zıplama içeren) yapan insanlarda sıklıkla görülmesinin yanı sıra sedanter (az fiziksel aktivite yapan) insanlarda da görülmektedir. Eğer yeterli ve gerekli tedavi uygulanmazsa, kısmi tendon yırtığı dejeneratif değişikliğe uğrayarak günlük yaşam aktiviteleri etkileyecek kadar kötüleşebilir ve hatta tam rüptüre kadar gidebilir (2). Aşil tendon yırtıklarının histolojisine bakıldığında ise genellikle altında yatan başka bir patolojinin olduğu görülmüştür (5). En sık görülen patoloji ise kısmi tendon yırtıklarıdır (6). Bu yırtıklar, tendon fiberlerinde düzensizlik, fokal hipoeokhoik bölgeler ve şişlik ile kendini göstermektedir. Genellikle kalkeneus kemiğinin üst ucunun 3-4 cm yukarısında ve arka-orta kısmına denk gelen yeni damar oluşum bölgelerinde meydana gelmektedir (7, 8).

Tendon iyileşmesi incelendiğinde 3 fazlı fizyolojik aşamaların olduğu görülmektedir: Enflamasyon, Proliferasyon (fibroblastların kolajen üretimi) ve Kolajenlerin yeniden modellenmesi. İlk faz olan enflamasyon, yaralanma ile başlar ve hasarlanmış dokuda akut enflamasyon cevaplar görülür. Fibroblastların kolajen

üretimi aşamasında, öncelikle yaralanan bölgeye gelen fibroblastlar ile çevre dokularda bulunan tenositler lifleri kolajen tip-III ile oluştururlar. Kolajen tip-III oluşurken dağınık ve lifler üst üste oluşturulur. Oluşan dağınık kolajen yapısı skar doku meydana getirdikten sonra iyileşmenin son aşamasına geçilir. Bu son fazda ise kolajen tip-III' lerin yeniden modellenmesiyle kolajen tip-I' e dönüşüm hızlanır. Lifler skar dokuda olduğunun aksine paralel bir şekilde dizilmeye başlar. Paralel dizilimlerin tamamlanması ile iyileşmenin gerçekleşmesi yaklaşık 2 ila 6 ayı bulabilmektedir. Paralel dizilimler arttıkça tendonun taşıma kuvveti ve esnekliği de gittikçe artmaktadır. Bu iyileşme fazlarını geçen bir tendon incelendiğinde, yaralanma öncesi tendona göre daha güçsüz ve esnekliği daha azdır (9). Bu problemin temelinde kolajen liflerin tamamının birbirine paralel şekilde dizilememesi ve skar dokunun da tam olarak uzaklaşmaması gösterilebilir (1, 9, 10).

Tendon iyileşmesinde tıbbi tedavilerin en büyük amacı; tendon iyileşmesini daha etkin bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak, tekrar yaralanmaları azaltmak ve tendonun hem biyomekanik hem de hücrel açıdan sağlıklı haline daha çok yaklaştırmaktır.

İlaç tedavisi, cerrahi tedavi ve fizik tedavi uygulamalarını da içeren birçok tedavi bu amaç için kullanılmaktadır. İlaç tedavisinde genellikle anti-enflamatuar ilaçlar kullanılır. Cerrahi tedavi de ise genellikle otogreft, allogreft ve ksenogreft işlemleri uygulanır. Allogreft ve ksenogreftlerin immünolojik cevap ve alerjik reaksiyon oluşturma ihtimali de tedavinin tam anlamda gerçekleşmemesine neden olmaktadır. Fizik tedavi de ise; dinlenme, etkilenen bölgeye belirli sürede immobilizasyon ve ağrıyan bölgeye buz gibi yöntemler uygulanır. Fizik tedavi yöntemleri genellikle semptomları geçirmeye yönelik olarak kullanılır. Ancak, literatüre bakıldığında istenilen sonuçlar elde edilemediği görülmektedir.

Bahsedilen tedavilerin dışında, rejeneratif tıbbın gelişmesiyle farklı tedavi yöntemleri de bulunmuştur. Bunlardan biri olan stromal vasküler fraksiyon (SVF) 2001 yılında adipoz dokudan kök ve stromal hücrelerin elde edilmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu yıldan itibaren adipoz dokudan elde edilen SVF ve kök hücreler rejeneratif tıpta ve tendon yaralanmalarında kullanılmaya başlamıştır (11). SVF' deki mezenkimal kök/ progenitor hücrelerin başarılı bir şekilde kültüre edilebildiği ve uygun koşullar altında adiposit, perisit, kondrosit, osteoblast ve miyoblastlara ve bu

hücrelerin bulunduğu kemik, eklem kıkırdağı, tendon, iskelet kası ve yağ dokularına dönüşebildiği gösterilmiştir. Bu nedenle mezenkimal kök hücreleri barındıran SVF, doku mühendisliği yaklaşımları ile birçok kalıtsal ya da kazanılmış, travmatik ya da dejeneratif kemik, eklem ve yumuşak doku hasarlarının tedavisinde halen kullanılmaktadır (12).

Başka bir tedavi yöntemi olan kemik iliği konsantrasyonu (KİK) ise; hematopoietik ve mezenkimal kök hücreler, monositler, endotel hücreleri, TNF α , kemik morfogenetik proteini (BMP) -2 ve -7, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve trombositler vb. içeren heterojen bir yapıdadır (13). Buradan elde edilen mezenkimal kök hücreler ve stromal hücreler doku mühendisliğinde ve rejeneratif tıp da yaygın bir şekilde kullanılır. Bu yöntemin tendon yaralanmalarına uygulanmasının yararı birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışmada görülmüştür (14-17).

Literatüre bakıldığında hemen hemen tüm çalışmaların tek tip hücre ya da maddenin tendon iyileşmesi üzerine etkisinin araştırıldığı görülmektedir. Ancak insan vücudunun herhangi bir yerinde oluşan bir yaranın iyileşmesine bakıldığında, yaranın etrafındaki hücrelerin hatta vücudun başka noktalarındaki hücrelerin bu yaranın iyileşmesi için çalıştığı görülmektedir (18). Bu yüzden çalışmada; vücudumuzun bir yaraya karşı ortak tepkisini simüle etmek için, içlerinde farklı hücreler bulunan bu ikili karışımın kullanılması hedeflenmiştir.

Kliniğe bakıldığında SVF ve KİK 'in ayrı ayrı olarak tendon rahatsızlıkları için kullanıldığı görülmektedir. Ancak tam bir iyileşmenin sağlanamaması nedeniyle hala araştırmalar sürmektedir (19, 20). Yapılacak karışımın tek tek uygulamaya göre üstün olması durumunda birçok hastanın gelecekte daha etkin bir şekilde tedavi olması sağlanacaktır.

Çalışma; 'Aşıl tendonu yaralanmalarında SVF ile KİK'in birlikte uygulanması, tek tek uygulamalarına göre daha etkin bir iyileşme sağlar.' hipotezini test etmek amacı ile tasarlanmıştır.

Çalışmada; SVF' in ile KİK'in aşıl tendonunun hem hücresel açıdan hem de biyomekanik açıdan sağlıklı haline göre kıyaslanması amaçlanmıştır. Bu karşılaştırma da histolojik değerlendirmede uluslararası birçok makalede kullanılan değerlendirme çizelgesi ile verdiğimiz karışımın daha iyi tendon iyileşmesi

sağladığını göstermek ve elastosonografi değerlendirmede ise dokunun rengi ve sayısal verileri sayesinde tendon dokusuna özel sert ancak esnek yapıyı ortaya çıkarmak hipotezin geçerliliğini göstermektedir.



2. GENEL BİLGİLER

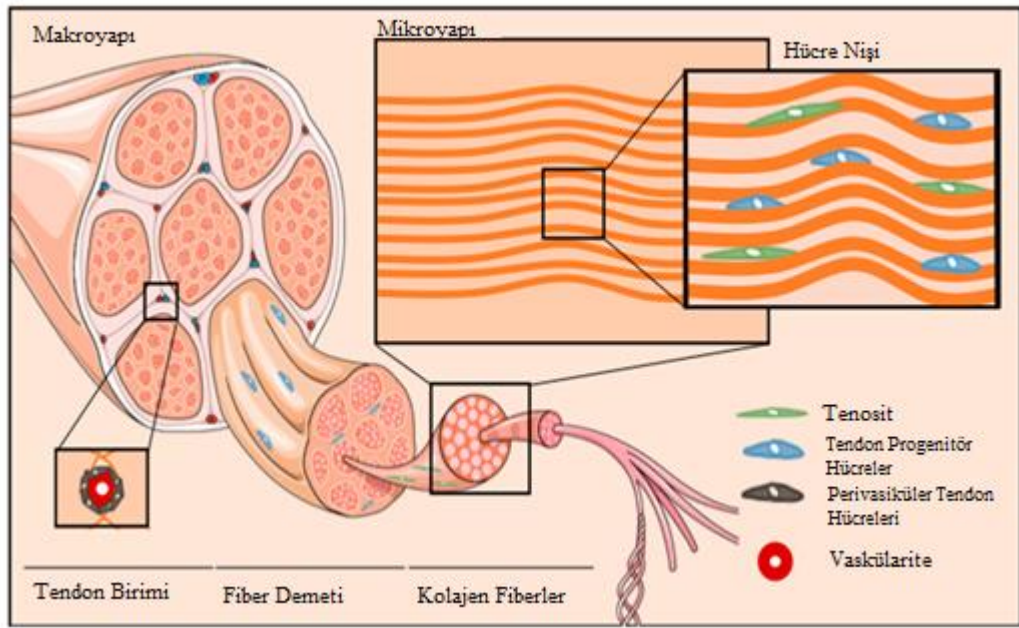
2.1.Tendon

Tendon, kas-tendon biriminin ayrılmaz bir parçasını oluşturur. En önemli işlevi, kaslardan eklem hareketini ortaya çıkaran kemiklere kuvvetleri iletmektir. Tendonlar kaslardan daha güçlüdür. Gerilme kuvvetlerine ve yüksek sıkıştırıcı kuvvetlere maruz kalmaktadır. Tendonlar şok absorpsiyonu ve propriyoseptif özellikleri sayesinde duruş oluşması alanlarında da görev almaktadır. Sağlıklı tendonlar beyaz renklidir ve fibroelastik bir yapıya sahiptir. Hücre dışı matriks ağı içinde, tenoblastlar ve tenositler, tendonların hücresel elemanlarının yaklaşık %90 ila %95'ini oluştururlar. Tenoblastlar olgunlaşmamış tendon hücreleridir. Aks şeklinedirler ve yüksek metabolik aktivitelerini yansıtan çok sayıda sitoplazmik organel içerirler. Olgunlaştıkça, tenoblastlar uzar ve tenositlere dönüşürler. Tenositler, metabolik aktivitenin azalmasıyla tenoblastlardan daha düşük bir çekirdek-sitoplazma oranına sahiptir. Geriye kalan %5 ila %10'luk kısım ise, kemik tutunma ve yerleşme yerleri, tendon kılıfının sinovyal hücreleri ve kılcal endotel hücreleri ile düz damar hücrelerinin de dahil olduğu vasküler hücrelerden oluşur. Tenositler, aerobik Krebs döngüsü ve anaerobik glikoliz yoluyla enerji üretiminde aktiftirler ve kolajen ve hücre dışı matriks ağının tüm bileşenlerini sentezlerler. Artan yaşla birlikte, metabolik yollar aerobikten daha fazla anaerobik enerji üretimine geçer (21, 22).

Tendonların ve ligamanların oksijen tüketimi iskelet kaslarınınkinden 7,5 kat daha düşüktür. Düşük metabolik hız ve iyi gelişmiş anaerobik enerji üretim kapasitesi, uzun süre boyunca yük taşımak ve gerginliği sürdürmek, iskemi riskini ve sonrasında nekroz riskini azaltmak için gereklidir. Bununla birlikte, düşük bir metabolik hız, yaralanma sonrası yavaş iyileşme ile sonuçlanır (22-24).

İnsan tendonlarının kuru kütlesi, toplam tendon kütlesinin yaklaşık %30'udur, geriye kalan %70'lik kısmı ise su oluşturur. Kuru kütlenin, %65 ila %80'ini kolajen tip I ve elastin ise yaklaşık %2'sini oluşturur. Tenositler ve tenoblastlar, tendonun uzun eksen boyunda kolajen lifleri arasında uzanır (22-24).

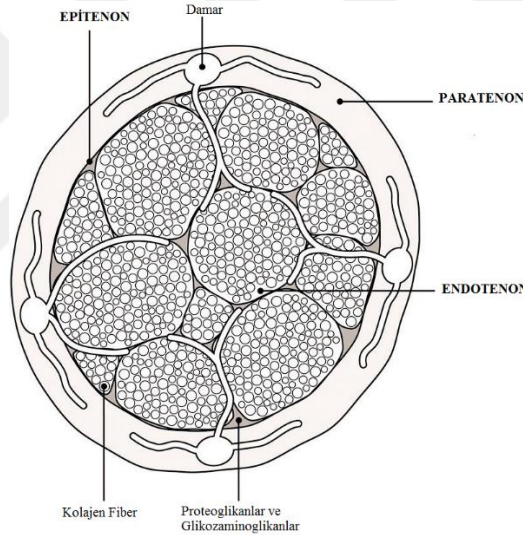
Kolajen; lifler (birincil demetler); fasiküller (ikincil demetler); üçüncül demetler ve tendonun kendisi olmak üzere gittikçe artan seviyeleri oluşturur (Şekil 2.1). Çözünebilir tropokolajen molekülüleri, kolajen fibrilleri oluşturmak üzere çapraz bağlantılar yaparlar. Bir kolajen lifi, mekanik olarak test edilebilecek ve ışık mikroskobu altında görülebilecek en küçük tendon birimidir. Kolajen lifleri esas olarak uzunlamasına yönlendirilmiş olsalar da lifler enine ve yatay olarak da hareket ederek spiralleri ve bezleri oluştururlar (22, 24, 25).



Şekil 2.1. Tendonun yapısı (26).

Kolajen ve tenositleri çevreleyen hücre dışı matriks ağının temel maddesi proteoglikanlar, glikozaminoglikanlar, glikoproteinler ve diğer birkaç küçük molekülden oluşur. Proteoglikanlar hidrofildir ve bu sayede suda çözünür molekülün hızlı bir şekilde yayılmasını ve hücrelerin göçünü sağlarlar. Fibronektin ve trombospondin gibi yapışkan glikoproteinler, tendonda onarım ve rejenerasyon işlemlerine katılır. Tendon ekstraselüler matriks ağının bir diğer önemli bileşeni olan Tenascin-C, tendon gövdesinde ve osteotendinous ve myotendinous kavşaklarda bol miktarda bulunur. Tenascin-C birkaç tekrarlayan fibronektin tip-III alan içerir ve bu alanların strese bağlı uzamasını sağlayan elastik bir protein olarak da işlev görür. Tenascin-C ekspresyonu mekanik zorlanma ile düzenlenir (22, 24, 25).

Tendonun vasküler, lenfatik ve sinir beslemesini içeren ince, gevşek bir bağ dokusu kılıfı olan epitenon, tüm tendonu kaplar ve endotenon olarak tersiyer demetler arasında derinlere uzanır. Endotenon, her tendon liflerini saran ince bir retiküler bağ dokusu ağıdır (Şekil 2.2). Yüzeysel olarak, epitenon; paratenon, tip-I ve tip-III kolajen fibrilleri, bazı elastik fibrilleri ve sinovyal hücrelerin iç astarını kapsayan gevşek bir areolar bağ dokusu ile çevrilidir. Sinovyal tendon kılıfları, verimli yağlamanın gerekli olduğu el ve ayak tendonları gibi mekanik strese maruz kalan bölgelerde bulunur. Sinovyal kılıflar, dış fibrotik kılıf ve ince visceral ve pariyetal tabakaları içeren iç sinovyal kılıftan oluşur. İç sinoviyal kılıf tendon gövdesini sarar ve sinovyal sıvı üretmek için bir ultrafiltrasyon membranı olarak işlev görür. Elyafli kılıf, tendon fonksiyonuna yardımcı olmak için dayanak görevi gören kasnakları oluşturur (22-25).

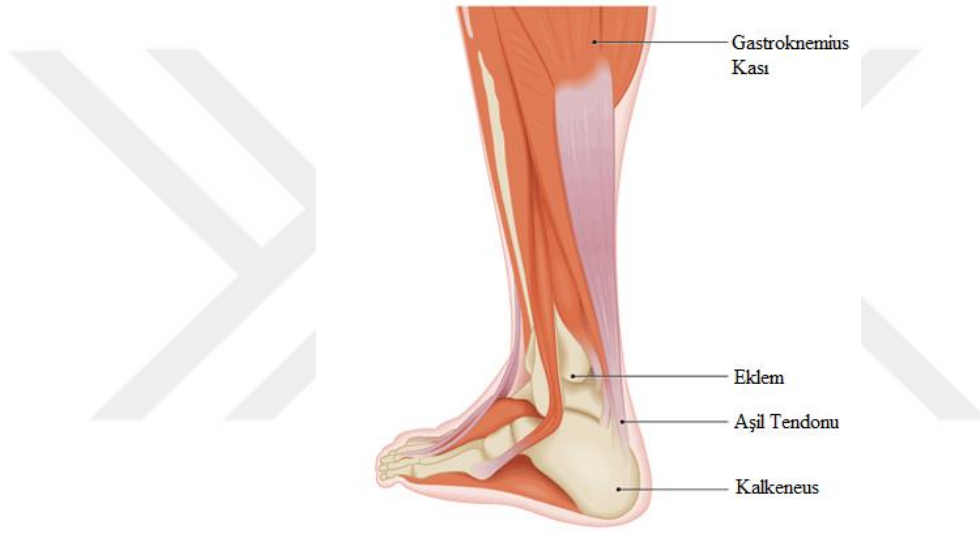


Şekil 2.2. Endotenon ve paratenon yapısı (27).

Myotendinöz kavşakta, hassas kolajen fibrilleri, kas liflerinin hücre içi kasılma proteinleri tarafından üretilen gerginliğin kolajen fibrillerine iletilmesini sağlayan, miyosit işlemlerinin oluşturduğu derin girintilere sokulur. Bu karmaşık mimari yapı, kas kasılması sırasında tendon üzerine uygulanan gerilme stresini azaltır. Bununla birlikte, myotendinöz kavşak hala kas-tendon ünitesinin en zayıf noktası olmaya devam etmektedir. Osteotendinöz kavşak ise dört bölgeden oluşur: yoğun bir tendon bölgesi, fibrocartilaj, mineralize fibrocartilaj ve kemik. Osteotendinöz kavşağın özel yapısı kolajen veya lifin bükülmesini, yıpranmasını, yırtılmasını ve bozulmasını önler (Şekil 2.3) (22, 24, 25).

2.2.Aşil Tendonu

Aşil tendonu (AT), gastrocnemius ve soleus kasının iki başının yapışık tendonudur (Şekil 2.3). Beraber bu yapılar genellikle “gastros-soleus kompleksi” olarak adlandırılır. İnsan vücudundaki en büyük ve en güçlü tendondur ve sprint sırasında vücut ağırlığının 12.5 katına kadar (9 kiloton [kN]), atlama veya bisiklete binme gibi atletik aktivite sırasında vücut ağırlığının 6 ila 8 katı gerilme kuvvetini karşılar. Arka kompartımanın sinir ve damarları olan tibial sinir, arka tibial arter ve peroneal arter ya doğrudan ya da kollarından, aşil tendonunun ve kasların sinir iletimlerinden ve beslenmelerinden sorumludurlar (28, 29).



Şekil 2.3. Aşil tendonu anatomisi (30).

Büyüklüğü ve fonksiyonel talepleri nedeniyle, aşil tendonu hem akut hem de kronik yaralanmalara karşı hassastır ve doğrudan ya da dolaylı olarak ayak ve ayak bileğinin patolojik durumlarında yer almaktadır. Bu bozuklukları teşhis etmek ve tedavi etmek için, aşil tendonu ve çevresindeki yapıların anatomisi hakkında ayrıntılı bilgi önemlidir (28, 29).

Kaslar;

Gastrocnemius; Alt bacağın arkasındaki ana kütleyi oluşturur ve çok güçlü bir kastır. İki eklem veya biartiküler kastır ve iki başı vardır ve diz arkasından topuğa doğru uzanır. Buzacağının kesin şekli, alt bacağın arka, üst yarısında yer alan gastrocnemiusun medial ve lateral kafalarının bir sonucudur. Soleus ve plantaris ile,

triceps surae adı verilen kompozit bir kas yapısı oluştururlar. Kasın iki başı, popliteal fossa'nın alt sınırlarını oluşturur (31).

Soleus; gastroknemiusun derinliklerine uzanır ve geniş, pennate kastır. Oblik çizgiden ve tibia medial sınırının orta üçte birinden, fibula ve tibia arasındaki fibröz arktan ve fibula başının arka yüzeyinden orijin alır. Sadece ayak bileği eklemi üzerinde etkilidir ve ayak bileğine fleksiyon yaptırıldığında gastroknemiusun her iki yanında palpe edilebilir. Gastroknemius ile, üç başlı triceps surae oluşturur. Triceps surae, aşıl tendonu ile plantarfleksiyon hareketinde etkilidir (29).

2.3.Tendon Yaralanmaları

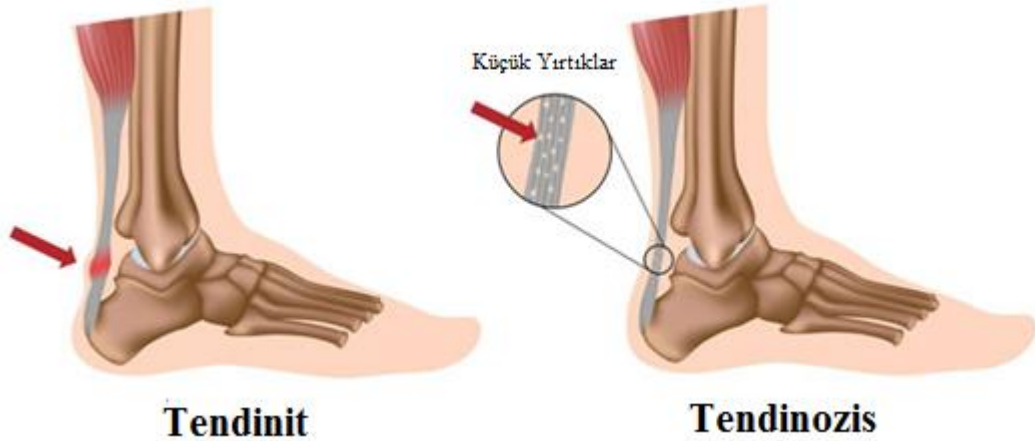
Aşıl tendonu bozuklukları evrenseldir ve geniş bir yaş grubundaki insanları etkiler. Aşıl tendonu vücuttaki en güçlü kas-tendon yapılarından biri olduğundan, aşıl tendonunda oluşan bir hasar tüm vücut bölgelerinde etkisini hissettirir. Tendon yaralanmaları akut veya kronik olabilir ve tek başlarına veya kombinasyon halinde, iç veya dış etkenlerden kaynaklanabilir. Akut travmada dış etkenler daha baskındır. Büyüyen popülasyonumuz yaşlanmakta ancak fiziksel olarak daha uzun süre aktif kaldığından, bu hastalıkların görülme sıklığı artmaya devam etmektedir (32).

2.3.1.Tendon Rüptürü

Aşıl tendon rüptürü çoğunlukla (%44-%83) sportif aktiviteler sırasında meydana gelir ve erkeklerde, kadınlara oranla daha sık görülür (1.7:1-12:1). Tendon rüptürünün etiolojisi hala belirsizliğini korumaktadır. Dejeneratif tendinopati, spontan tendon rüptürlerinde en sık görülen histolojik bulgudur. Arner ve ark. yaptıkları çalışmada aşıl tendon rüptürü olan yetmiş dört hastanın hepsinde dejeneratif değişiklikler olduğunu bildirmişlerdir ve bu değişikliklerin rüptürden önce mevcut olan içsel anormallikler nedeniyle olduğunu varsaymışlardır (33). Kannus ve Jozsa, kendiliğinden parçalanmış 891 tendonun 865'inde (%97) dejeneratif değişiklikler tespit ederken, 445 kontrol tendonunun sadece 149'unda (%33) dejeneratif değişiklikler görülmüştür. Tendon dejenerasyonu, gerilme direncinin azalmasına ve yırtılmaya yatkınlığa neden olabilir (5).

2.3.2. Tendinopati

Aşil tendinopatisi terimi, yaygın olarak tendinit (tendonun akut inflamasyonu), tendinozis (tendonun mikro yırtıklarını içeren kronik bir durum), ve paratenonitis (tendonu çevreleyen bağ doku inflamasyonu) tanımlamak için kullanılır (34). Bahsedilen yaralanmalar genellikle aşırı kullanıma bağlı çok faktörlü bir kökene sahiptir. İntrinsik ve ekstrinsik arasındaki etkileşim kronik tendon bozukluklarında yaygındır. Hizalama ve biyomekanik yapılar gibi intrinsik faktörlerin, aşil tendonu bozukluklarının üçte ikisinde etkili bir rol oynamaktadır. Tendonlar, kılıflarının iltihaplanması veya vücutlarının dejenerasyonu veya her ikisi ile tekrarlanan aşırı yüklenmeye fizyolojik eşiğin ötesinde tepki verir. Farklı stresler farklı tepkilere neden olur (Şekil 2.4). Oluşan hasar onarılmadıkça, tendonlar zayıflar ve sonunda yırtılırlar. Onarım mekanizmasına, hücre dışı matriks ağ üretimi ve yıkımı arasında iyi bir denge sağlayan yerleşik tenositler aracılık eder. Tendon hasarı, fizyolojik sınırlar içindeki gerilmelerden bile meydana gelebilir, çünkü sık sık gerçekleşen kümülatif mikrotravmalar onarım için yeterli zaman vermeyebilir. Mikrotravma ayrıca tendonların içindeki tek tip olmayan stresten kaynaklanabilir, fibriller arasında anormal yük konsantrasyonları ve sürtünme kuvvetleri oluşturabilir ve lokalize lif hasarına neden olabilir (35-37).



Şekil 2.4. Aşil tendinopatisi çeşitleri (38).

Etiyolojisi

Tendinopati etiyolojisi belirsizliğini korumaktadır. Bir teoride tendon gevşerken, oksijen serbest radikalleri üreten reperfüzyon meydana gelir; bu da

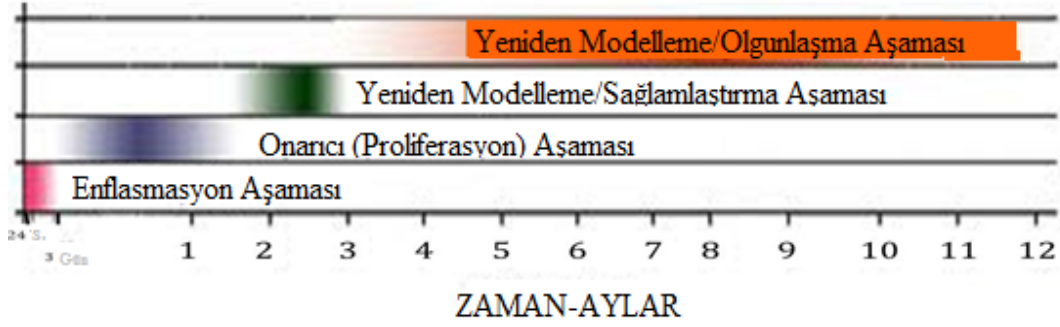
tendon hasarına neden olabilir ve tendinopati ile sonuçlanabilir (39). Peroksiredoksin 5, hücreleri bu tür reaktif oksijen türlerinden zarar görmeye karşı koruyan bir antioksidan enzimdir. Peroksiredoksin 5 insan tenositlerinde bulunur. Oksidatif stresin rol oynayabileceği görüşünü destekleyen bir bulgu olan tendinopatide ekspresyonu artmıştır. Ayrıca tek başına hipoksi de hücre sel adenzin trifosfat seviyelerini korumak için oksidatif enerji metabolizmasına bağlı olduğu için, dejenerasyona neden olabilir. Kuvvetli egzersiz sırasında, tenosit ölümü ile tendonlarda lokalize hipoksi ortaya çıkabilir. Hareket sırasında tendonlar, ısıya dönüşen enerjinin %5 ila %10'unu depolarlar. Tekrarlanan hipertermik hakaretler ve uzun süreli hipertermide, hücre canlılığını tehlikeye atabilir ve tendon dejenerasyonuna neden olabilir. Son olarak aşırı tenosit apoptozisi, sıklıkla rotator manşet tendinopatisinde gösterilmiştir. Tüm tenositlere uygulanması, apoptozu tetikleyen stresle aktive olan protein kinazları üretir. Oksidatif stres, apoptozun indüklenmesinde rol oynayabilir, ancak kesin detaylar açıklanmaya devam etmektedir. Tendinopatik kuadriseps femoris tendonları, normal tendonlara göre 1,6 kat daha fazla olan spontan apoptoz oranını göstermiştir (35-37).

2.3.3. Tendon İyileşmesi

Tendon iyileşmesi çalışmaları genellikle kesilen hayvan tendonları veya yırtılmış insan tendonları üzerinde gerçekleştirilmiştir ve bunların tendinopatik insan tendonlarının iyileşmesi ile ilişkisi belirsizliğini korumaktadır (40).

Tendon iyileşmesi artarda gelen üç aşamadan oluşur (Şekil 2.5). Başlangıçta, enflamatuar fazda eritrositler ve enflamatuar hücreler, özellikle nötrofiller, yaralanma bölgesine girer. İlk yirmi dört saat içinde monositler ve makrofajlar baskındır ve nekrotik malzemelerin fagositozu oluşur (24, 40, 41).

TENDON İYİLEŞMESİ



Şekil 2.5. Tendon iyileşme aşamaları (42).

Birkaç gün sonra çoğalma aşaması başlar. Tip-III kolajen sentezi bu aşamada zirve yapar ve birkaç hafta sürer. Bu aşamada su içeriği ve glikozaminoglikan konsantrasyonları yüksek kalır (24, 40, 41).

Yaklaşık altı hafta sonra, yeniden evreleme fazı, hücreliliğin azalması ve kolajen ve glikozaminoglikan sentezinin azalması ile başlar. Yeniden düzenleme aşaması bir konsolidasyon aşamasına ve bir olgunlaşma aşamasına bölünebilir. Konsolidasyon aşaması yaklaşık altı haftada başlar ve on haftaya kadar devam eder. Bu dönemde, onarım dokusu hücrelerden lifli hale gelir. Bu dönemde tenosit metabolizması yüksek kalır ve tenositler ve kolajen lifleri stres yönünde hizalanır. Bu aşamada daha yüksek oranda tip-I kolajen sentezlenir. On hafta sonra, olgunlaşma aşaması, bir yıl boyunca lifli dokunun skar benzeri tendon dokusundan kademeli olarak değişmesiyle meydana gelir. Bu aşamanın ikinci yarısında tenosit metabolizması ve tendon vaskülaritesi azalır (24, 40, 41).

Tendon iyileşmesi özünde, epitenon ve endotenon tenositlerin çoğalmasıyla veya dışsal olarak hücrelerin çevredeki kılıf ve sinovyumdan istilası ile ortaya çıkabilir. Epitenon tenoblastları, çoğalma ve göç yoluyla onarım sürecini başlatır (24, 40, 41).

İyileşmedeki Limitasyonlar: İntrasinoviyal tendon hasarı sonrası adezyon oluşumu önemli bir klinik problem oluşturmaktadır. Yaralanma veya ameliyat sırasında sinovyal kılıfın bozulması, granülasyon dokusunun ve çevre dokudan monositlerin onarım bölgesini istila etmesine izin verir. Ekzojen hücreler, endojen

tenositler üzerinde baskın olarak, çevre dokunun onarım bölgesine yapışmasına izin verir ve yapışma oluşumuna neden olur (43).

Yeniden yapılanmaya rağmen, iyileşmiş tendon dokusunun biyokimyasal ve mekanik özellikleri hiçbir zaman sağlam tendonunkilerle uyuşmaz. Kendiliğinden iyileşen kesilmiş koyun Aşil tendonları üzerinde yapılan bir çalışmada, yırtılma gücü on iki ayda normalin sadece %56,7'si olmuştur (43).

2.3.4.Tendon İyileşmesinde Kullanılan Yöntemler

Fiziksel Yöntemler

Tendon bozukluklarının tedavisinde birçok fiziksel yöntem kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler rutin klinik kullanımda olmasına rağmen, sadece birkaç kontrollü klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. Kanıtların çoğu hala klinik öncesi ve zaman zaman tartışmalıdır (44).

Tavşan aşil tendonlarına yirmi dakika içinde 14 kV'luk 500 impuls oranında uygulanan ekstrakorporeal şok dalgası tedavisi (ESWT) neovaskülarizasyon, nitrikoksit sentaz ve VEGF gibi anjiyogenezle ilişkili belirteçlerde bir artışla sonuçlanmıştır. ESWT, sıçanlarda deneysel aşil tendinopatisinin iyileşmesini hızlandırmıştır. Yazarlar, iyileşmenin büyüme faktörü düzeylerindeki bir artış nedeniyle iyileştiğini, çünkü erken dönemde büyüme faktörü- β 1'in (TGF- β 1) ve IGF-1 seviyelerinin sürekli olarak yükseldiğini belirtmişlerdir (45).

Başka bir çalışmada, kronik kalsifik olmayan rotator manşet tendinopatisi olan yetmiş dört hasta, aktif ESWR (1500 puls 0.12 mJ / mm²) veya aylık üç ay boyunca sahte tedavi almak için randomize edilmiştir. Tüm hastalar görsel bir analog skorla ölçülen gece ağrısı dahil olmak üzere omuzda ağrı açısından değerlendirilmiş ve her tedaviden önce ve tedavinin tamamlanmasından bir ve üç ay sonra bir sakatlık indeksi ile hesaplanmıştır. Tedaviden önce iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her iki grup da iki aydan itibaren belirgin ve sürekli iyileşmeler göstermiştir, ancak orta doz ESWT sahte tedaviye kıyasla ek bir fayda sağlamamıştır (46).

Gen Terapi: Gen tedavisi, viral veya viral olmayan vektörler veya doğrudan gen transferi yoluyla hücresel fonksiyonun değiştirilmesine izin vererek hücrelere genetik materyal (DNA-RNA) vermektir. Gen terapisi, bireysel proteinlerin spesifik dokulara ve hücrelere verilmesini sağlar. Tendonlara gen transferinin fizibilitesini araştırmak için çeşitli hayvan çalışmaları yapılmıştır. Örneğin, sıçan patellar tendonlarına p-galaktosidaz vermek için Japonya (HVJ)-lipozom yapılarının hemaglutinasyon virüsü kullanılmıştır (47).

Gen tedavisi ayrıca tendon onarımının hayvan modellerinde tendonların iyileşme ortamını değiştirebilir. Fokal yapışma kinazının kısmen yırtılmış tavuk fleksör tendonlarına adenoviral transdüksiyonu, kontrol gruplarındaki sonuçlara kıyaslanmıştır. Sonucunda adezyon oluşumunda beklenen bir artış meydana gelmiştir. Bu çalışmada tendon iyileşmesi düzelmese de, sonuçlar iyileşme ortamının ve koşullarının manipüle edilebileceğini göstermiştir (48).

Genlerin tendonlara transferi de mümkündür ve iyileşme ortamı sekiz ila on haftaya kadar manipüle edilebildiğinden, bu klinik olarak anlamlı olacak kadar uzun süreli olabilir. Yukarıdaki çalışmalar tendon transeksiyon modellerinde yapılırken, trombosit türevi büyüme faktörü-B (PDGF-B), BMP-12 ve decorin gibi maddelerin verilmesi tendinopatinin iyileşmesini iyileştirebilir ancak bu alanda ek araştırmalar yapılması gerekmektedir (49).

Doku Mühendisliği ile Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücreler, kemik, tendon, kıkırdak, kas, ligament, yağ ve kemik iliği stroma dahil olmak üzere çeşitli özel mezenkimal dokulara farklılaşma gösterebilir. Yetişkinlerde, mezenkimal kök hücreler kemik iliğinde yaygındır, ancak aynı zamanda kas, yağ, ciltte ve kan damarlarının çevresinde bulunur. Mezenkimal kök hücrelerin belirli bir fenotipik yol boyunca farklılaşması, kaslara özgü genlerin ekspresyonunu indükleyebilen bir kas transkripsiyon faktörü olan MyoD'un keşfinden sonra kontrol edilmektedir (50).

Bununla birlikte, miyojenik farklılaşmadan sorumlu tek transkripsiyon faktörü MyoD olmayabilir; Myf5, miyogenin ve MRF4 de rol oynayabilir. Adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı düzenleyen transkripsiyon faktörleri de

tanımlanmıştır, ancak tenosit farklılaşmasını düzenleyen transkripsiyon faktörleri henüz tanımlanmamıştır (51).

Mezenkimal kök hücreler doğrudan yaralanma bölgesine uygulanabilir veya doku onarımı yapılırken bir iskele görevi gören uygun bir scaffold üzerine verilebilir. Doku mühendisliği, tendon kaybı alanlarını arasında köprü görevi görmek veya ciddi şekilde dejenere olmuş bölgeleri değiştirmek için kullanılabilir (52).

Günümüzde doku mühendisliği gelişmekte olan bir alandır ve ideal scaffold malzemeleri, optimal hücre yoğunluğu ve optimal kültür koşulları gibi birçok sorunun çözülmesi ile tendon yaralanmalarında iyileşme için bir seçenek haline gelebilir.

Mobilizasyon ve Mekanik Yüklenme

Hayvan deneylerinde, mekanik yüklenme sağlayan eğitimin; tendonların gerilme mukavemetini, elastik sertliğini, ağırlığını ve kesit alanını geliştirdiği görülmüştür. Bu etkiler, tenositler tarafından kolajen ve hücre dışı matriks ağ sentezindeki bir artışla açıklanabilir (53). Egzersizin insan tendonları üzerindeki etkisi hakkında çok az veri vardır, ancak yoğun şekilde eğitilmiş sporcuların kontrol deneklerinden daha kalın aşil tendonlarına sahip oldukları bildirilmektedir (54). Mevcut bilginin çoğu bu nedenle hayvan çalışmalarının sonuçlarına dayanmaktadır. Bununla birlikte, eğitimsiz hayvanlarda elde edilen sonuçlar, eğitilmiş hayvanlardakilerle doğrudan karşılaştırılmadığından, hayvan çalışmaları yorumlanırken dikkatli olunmalıdır (55).

Kas-iskelet sistemi hasarını takiben uzun süre hareketsiz kalmanın zararlı etkileri olabilir. Stres-korumalı tavşan patellar tendonlarından gelen kolajen fasiküller, kontrol örneklerine göre daha düşük gerilme mukavemeti göstermiştir. İmmobilizasyon tendonların su ve proteoglikan içeriğini azaltır ve indirgenebilir kolajen çapraz bağlarının sayısını artırır (56).

Klinik çalışmalar, tendon onarımını takiben erken mobilizasyonun yararını göstermiştir ve postoperatif birkaç mobilizasyon protokolü savunulmuştur. Hücrelerin yüke tepki verdikleri kesin mekanizma yoktur. Ancak, hücrelerin mekanik ve kimyasal sinyallere koordineli bir şekilde yanıt vermeleri

beklenmektedir. Örneğin, *ex vivo* modellerde mitojenik ve matrijenik tepkileri monte etmek için boşluk bağlantıları vasıtasıyla hücreler arası iletişim gereklidir (57).

2.4.Stromal Vasküler Fraksiyon

Yağdan türetilen kök / stromal hücreler ilk olarak 2001 yılında karakterize edilmiştir ve o zamandan beri geniş bir şekilde incelenmiştir. Mezenkimal kök / stromal hücrelerinkine benzer özelliklere sahip, rejeneratif potansiyeli olan büyük bir hücre kaynağı olarak kullanılmıştır (58). SVF'ler lipoaspiratın enzimatik sindiriminden elde edilen sulu fraksiyonun bir parçası olarak izole edilir. Kök hücrenin yanı sıra endotelial öncü hücreler, endotelial hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri, lenfositler, perisitler ve pre-adipositlerin bir kombinasyonu olan bu sulu fraksiyon, stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak bilinir (59).

Doku rejenerasyonu alanındaki son ilerlemeler SVF'yi, mezenkimal kök hücrelere eşit ve hatta bazen üzerine koymuştur (60, 61). Örneğin, sinir hasarı yapılmış bir sıçan modelinde erektil fonksiyon üzerinde yapılan bir çalışmada, SVF tedavisi sadece kök hücre tedavisine kıyasla, özellikle düz kas / kolajen oranında ve endotelial hücre içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar göstermiştir (60). SVF'nin kök hücrelere göre avantajının iki temel alanda olduğuna inanılmaktadır.

İlk olarak, immünomodülasyon, antienflamatuvar, anjiyogenez ve benzerleri gibi özelliklerde benzer olmasına rağmen, SVF'nin ayırt edici, heterojen hücresel bileşimi karşılaştırmalı hayvan çalışmalarında gözlemlenen daha iyi terapötik sonuçtan sorumlu olabilir (62).

İkincisi, ADSC'lerin aksine, SVF, herhangi bir hücre ayırma veya kültürleme şartına ihtiyaç duymadan çok daha kolay elde edilir. Böylece, terapötik hücresel ürün anında elde edilir ve reaktiflerle minimum teması vardır, bu da onu nispeten daha güvenli hale gelir ve daha az düzenleyici kriterlerin yerine getirilmesi beklenmektedir (62).

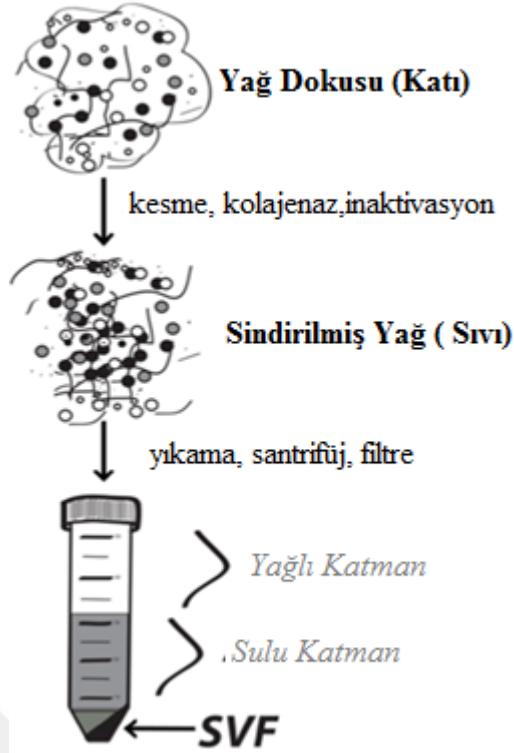
Rejeneratif tıpta SVF potansiyeline rağmen, üstesinden gelinmesi gereken zorluklar da vardır. Birincisi, temiz oda tesisi, ekipman, reaktifler ve teknik eleman gibi özel bir altyapıya ihtiyaç duyulan SVF'nin izolasyonudur. İkinci olarak, SVF'yi izole etme yöntemi, terapötik uygulamalar için onaylanmış bir yöntemin olması

gereklidir. Yağın sindirimi kolajenaz ile gerçekleştirilir ve enjekte edilebilir üründe kolajenaz varlığı, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) gibi düzenleyici otoriteler tarafından çok iyi karşılanmamaktadır (63). Sonuç olarak, bazı cesaret verici sonuçlar ile alternatif yöntemler araştırılmaktadır (64).

2.4.1. SVF İzolasyon Yöntemleri

Enzimatik

SVF'nin lipoaspirattan izolasyonu (Şekil 2.6) için en yaygın olarak kullanılan teknik, lipoaspiratın yağ kısmının, kolajenaz ile sindirilmesidir. Bu durum içeriği iki ayrı faza ayırır: yüzen olgun adiposit fraksiyonu ve düşük sulu fraksiyonda ilgilenilen hücresel bileşenler (12, 65). Bu ayırma işlemi, santrifüjleme ile arttırılabilir; bununla birlikte, yerçekimine dayalı faz ayırma ve filtrasyon ile karşılaştırılabilir ayırma elde edilebilir (66). Santrifüjleme daha verimli olmasına rağmen, mevcut tüm hücreleri de peletleyecek, filtrasyon ise sadece büyüklüğe dayanan önemli hücre tiplerini yakalamak için tasarlanabilmekte, böylece spesifik hücresel kokteyli zenginleştirmektedir. Sulu fraksiyonun santrifüjlenmesi, SVF hücreleri içeren kırmızımsı bir pelet verir. SVF pelletinde bulunan majör bir kirlenici olan eritrositler, *in vitro* genişleme için istenirse daha saf bir SVF hücre popülasyonunu izole etmek için lize edilebilir (67).



Şekil 2.6. SVF enzimatik izolasyonu (68).

Enzimatik Olmayan

Enzimatik izolasyonla ilgili düzenleyici sorular ışığında SVF'yi izole etmek için alternatif yöntemlere bakmak ve bunları geleneksel yöntemlerle karşılaştırmak önemlidir (64, 69). Bu tekniklerin çoğu, yağ dokusunu parçalayan ve stromal hücreleri serbest bırakan mekanik yöntemleri içermektedir. Beklendiği gibi, mekanik prosedürlerden elde edilen hücresel verim, kollajen tarafından sıkıca bağlanan yağ dokusunun hücreleri tek başına mekanik etki ile kolayca salınmayacağından enzimatik yöntemlere kıyasla çok daha düşüktür. Yeni bir mekanik ajitasyon yöntemi Tonnard ve ark. . "Nanofat" olarak adlandırılan enjekte edilebilir ürün, lipoaspiratın emülsifikasyonu ve filtrasyonu ile elde edildi (70). Nanofatın etkinliği ve özellikleri, cilt gençleştirme, skar iyileşmesi, yara yönetimi için cilt greftleme ve vulvar liken sklerozusun (VLS) ve ayrıca standart ADSC ile ilgili birçok vaka çalışmasında gösterilmiştir. (70-72). Tekniğin sadeliği nedeniyle, sadece istenen hacimdeki şırınga kullanılarak ve/veya gerektiği gibi birden fazla şırınga kullanılarak ölçeklendirilebilir. Emülsifikasyon işleminin, normalde enzimatik olarak işlenmiş SVF'de bulunan diğer ilgili hücreler üzerindeki etkisi görülmeye devam etmektedir.

Bu tekniklerin santrifüjleme veya filtrasyon ile birleştirilmesi, ADSC'lerle yüksek oranda konsantre edilmiş ürünler verebilir. Böylece enzimatik sindirimi ortadan kaldırarak işlem süresini, maliyeti ve ilgili düzenleyici kısıtlamaları azaltır.

2.4.2. SVF'nin Kullanım Alanları

Osteoartrit

2011 yılında, Pak ilk kez dizlerin OA'sı olan hastaları otolog yağ SVF'si ile tedavi eden ve kıkırdak benzeri dokuyu yenileyen bir vaka serisi bildirdi (73). Pak ve ark.'ları , yaklaşık 100 gram adipoz dokuyu kollajenaz ile sindirerek ve süpernatantı santrifüjdan geçirerek otolog adipoz SVF elde etmiştir (12, 74). Trombosit açısından zengin plazma ve HA içeren bu otolog yağ SVF'si daha sonra iki hastanın diz eklemlerine perkütan yolla enjekte edilmiştir. 3 ay sonra hastaların ağrı, fonksiyonel derecelendirme indeksi, hareket açıklığı ve görsel analog skor değerlendirilmiştir ve kıkırdak rejenerasyonunun MRG kanıtı ile birlikte iyileştiği gösterilmiştir (73).

Bu tür bir çalışmaya;

Dahil etme kriterleri: (i) önemli fonksiyonel yetersizlik ve / veya ağrıya neden olan kronik veya dejeneratif eklem hastalığı; (ii) konservatif tedavilerin başarısızlığı; ve (iii) cerrahi müdahaleye devam etmek istememesi.

Dışlama kriterleri: (i) ağrı durumunu etkilediği düşünülen aktif enflamatuvar veya bağ dokusu hastalığı (yani, lupus, romatoid artrit ve fibromiyalji); (ii) ağrı durumunu (hipotiroidizm ve diyabet) etkileyebilecek düzeltilmemiş aktif endokrin bozukluğu; (iii) ağrı durumunu etkileyebilecek aktif nörolojik bozukluk (yani periferik nöropati ve multipl skleroz); (iv) ilaç kullanımı ile kontrolsüz akciğer ve kalp hastalığı; (v) son 5 yıl içinde aktif neoplazm öyküsü; (vi) şiddetli anemi, trombositopeni, lökositoz ve / veya lökopeni dahil olmak üzere 3 ay içinde anormal tam kan sayımı (CBC) ile belgelenen kan bozuklukları; ve (vii) enjeksiyon prosedürlerinden önceki tıbbi durumlar.

Gösterilebilmektedir.

Kondromalazi Patella (CMP)

2013 yılında Pak ve ark. dizlerinde CMP'si olan üç hastayı içeren bir vaka serisi bildirdiler. Pak ve ark. bu hastaları, hastaların karnından elde edilen 100 gram adipoz doku kullanılarak otolog adipoz SVF ile tedavi etti. Yağ SVF'ye perkütan olarak PRP ve HA enjekte edildi. 3 aylık tedaviden sonra hastaların semptomları VAS ağrı skalası, FRI ve ROM açısından düzeldi. Çalışma aynı zamanda tedavi öncesi ve sonrası MRG'ler arasında her üç hastanın da patellofemoral eklemlerinde hiyalin kırıkdağının pozitif olarak yeniden üretildiği gösterilmiştir (73).

Aşil tendinopatisi

2016 yılında da Girolamo ve ark. aşil tendinopatili 56 hastayı içeren randomize prospektif klinik çalışma da 56 hastanın randomize 28 hastaya tek bir otolog PRP enjeksiyonu ve diğer 28 hastaya sise tek bir otolog SVF enjeksiyonu uygulanmıştır. Tüm hastalar klinik olarak görsel analog skalaları, aşil tendinopatisi Victoria Spor Değerlendirme Enstitüsü (VISA-A), Amerikan Ortopedik Ayak ve Ayak Bileği Derneği (AOFAS) ve Kısa Form-36 (SF-36) formları kullanılarak klinik olarak değerlendirilmiştir. Tedaviden önce, tüm hastalara ultrason görüntüleme çalışmaları ve MRI yapılmıştır. Daha sonra 4. ve 6. ay takiplerinde de aynı testler tekrarlanmıştır. Son takipte her iki hasta grubunda da başlangıç skoruna göre tüm skorlarda anlamlı oranda düzelme görülmüştür ($p < 0.05$). Yağ SVF enjeksiyon hastalarında, bu gelişmeler daha hızlı ve daha belirgin olmuştur. Her iki grupta da yan etki gözlenmedi. Çalışma sonucunda hem PRP hem de SVF'nin aşil tendinopatisi için güvenli ve etkili tedaviler olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak SVF PRP'den daha hızlı ve daha iyi klinik sonuçlar ortaya çıkarmaktadır (75).

Lateral epikondiloz

Lee ve ark. 2015 yılında allojenik adipoz türevi mezenkimal kök hücrelerle tedavi edilen 12 lateral epikondiloz hastasını içeren bir çalışma yapmışlardır. Çalışma, lateral epikondilozlu hastaların tedavisinde kültüre edilmiş ASC'ler, kronik lateral epikondilozun hipoekoik tendon lezyonlarına, ultrason rehberliğinde, enjekte edilmiştir. Daha sonra hastaların görsel ağrı skalası, modifiye mayo klinik performans indeksi ile tendon defekt alanlarının boyuna ve enine ultrason görüntüleri 6, 12, 26 ve 52 haftalarda değerlendirilmiştir. 52 haftalık takip sonucunda VAS

skorları giderek azaldı ve dirsek performans skorları düzelmiştir. Ultrason görüntüleri ile değerlendirilen tendon defektleri de takip süresi boyunca önemli ölçüde azalmıştır. Önemli bir yan etki gözlenmemiştir (76).

2.5.Kemik İliği Konsantresi

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin veya KİK'lerin, travma, yaşlanma ve dejeneratif hastalık nedeniyle hasar gören dokuların onarımını arttırdığı düşünülmektedir. KİK'lerin kesin etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak çeşitli araçlar önerilmiştir. Parakrin aktivitesi ile KİK'ler, anti-enflamatuvar, immünomodülatör, pro-anjiyojenik, anti-apoptotik, antifibrotik ve yara iyileştirici özelliklere sahip salgılayıcı veya trofik bir fonksiyon sergilemektedir (77).

KİK'ler çoğunlukla kemik iliğinden toplanmaktadır. Çünkü bir kaynak olarak nispeten yüksek sayıda kök hücre sağlamaktadır ve toplaması kolaydır. Kemik iliği hücrelerinin, çeşitli işlevleri yerine getirmek için çok sayıda büyüme faktörü (GF), sitokin ve kemokin salgıladıkları bilinmektedir (78). Özellikle KİK içinde eritroblastlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, monoid hücreler (mezenkimal kök hücre ve makrofaj içeren monositler), lenfositler ve plazma hücreleri bulunmaktadır (79).

2.5.1.KİK İzolasyon Yöntemleri

Manuel İzolasyon

Kemik iliği uygulamaları için erken girişimler manuel teknikler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle sedimentasyon ile kırmızı kan hücrelerini kemik iliğinden ayırmak için basit bir teknik kullanılmıştır. Etkili olmasına rağmen, bu yöntem, aşırı kullanımdan ve çevreye maruz kalınması sebebiyle kemik iliğinin bakteriyel kontaminasyonuna neden olma olasılığı yüksektir. Daha sonrasında günümüzde de sık kullanılan yoğunluk gradyan ayırımı yöntemi ortaya çıkmıştır. Bu yöntemde Ficoll-Paque gibi maddelerle kırmızı kan hücrelerinden monoküler hücreleri gradyan farkıyla ayırım sağlanmaktadır. Bu maddeler ve alınan kemik iliği karıştırılıp santrifüjlenir ve işlem sonucunda kırmızı kan hücreleri dibe çöker. Üste ise plazma ortaya çıkar. Ayırıcı maddenin üstünde ise KİK bulunur (80, 81).

Otomatik İzolasyon

Sedimentasyon teknikleri kırmızı kan hücrelerini uzaklaştırmak için yüksek verimli yöntemler olmasına rağmen, daha yeni otomatik teknikler, daha saf KİK karışımlarının hazırlanması açısından belirgin avantajlara sahiptir. Otomatik yoğunluksuz gradyan ayırma teknikleri günümüzde kullanılmaktadır ve yüksek bir yüzdede kök hücreleri korurken minimum kırmızı kan hücreleri ve plazma kontaminasyonu ile KİK üretir. Örneğin COBE 2991, Fenwal CS3000, Fresenius AS104, Terumo SteriCell, Du Pont Stericell, Dideco T90 ve COBE Spectra gibi diğer cihazlar kullanılarak KİK üretimi yapılmaya devam etmektedir (80).

2.5.2.KİK Kullanım Alanları

Rotator Cuff Yaralanmaları

Tendon patolojilerinde en sık etkilenen rotator cuff, aşil ve ortak ekstansör kökenli tendinopatiden tam yırtılmaya kadar değişebilir.

Cerrahi bilgi ve teknolojideki gelişmelere rağmen, tam kalınlıkta tendon yırtılmalarının onarımı %25-57 tekrar yırtılma oranları ile ilişkili bulunmuştur (82, 83). Günümüzde, rotator cuff tendonlarının iyileşmesi sadece mekanik yönleri değil, aynı zamanda iyileşmenin biyolojik yönünü de ele alan bir cevap arayışına rehberlik etmiştir. Böyle bir çözüm, tendonların daha iyi iyileşmesine ve daha hızlı bir rejenerasyonuna yol açabilir. Gomes ve ark. yaptıkları çalışmada tam kalınlıkta rotator cuff yırtığı olan 14 hasta (dokuz kadın, beş erkek), mini-açık bir teknik kullanılarak BMAC ile güçlendirilmiş transseksüel dikişlerle tedavi edilmiştir. Tüm hastalar en az bir yıl takip edilmiş ve tendon bütünlüğünü değerlendirmek için MRI taramaları yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda BMAC'nin rotator cuff tendonunun onarımlarında güvenli bir şekilde implante edilebileceği sonucuna varılmıştır (84).

Hernigou ve ark. yaptıkları çalışmada 45 hastada artroskopik tek sıra rotator cuff kaslarının onarımını arttırmada BMAC'nin etkinliğini değerlendirmiştir. Birincil hedefleri, BMAC grubundaki tendon iyileşmesini, BMAC eklenmemiş 45 hastadan oluşan kontrol grubuyla karşılaştırmaktır. BMAC ile tedavi edilen hastaların, ultrason ve MRG ile gösterildiği gibi tendon iyileşme oranı ve onarılmış tendonun kalitesi açısından üstün sonuçlar gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca, en son 10 yıllık

takipte, kontrol grubundaki sadece 20 (%44) omuza kıyasla, BMAC grubundaki 39 (%87) omuzda onarımın bütünlüğü korunmuştur (85).

Alt ekstremite tendon yaralanması

Son zamanlarda, Stein ve ark. ortalama 38.3 yaşında, kombine açık tendon onarımı ve BMAC enjeksiyonu ile tedavi edilen aşıl tendon rüptürü olan 27 hastayı (28 tendon) incelemiştir. Çalışmanın sonucunda komplikasyonlara, kuvvet restorasyonuna, hareket açıklığına, rüptüre, buzağı çevresine ve aşıl tendonu toplam kopma skoruna bakılmıştır. Nihai takipte ortalama 30 ayda herhangi bir rüptür rapor edilmemiştir. Hastaların %92'sinin altı ayda spor aktivitelerine devam ettiğini görülmüştür (86).

Campbell ve ark., profesyonel bir sporcuda heterotopik ossifikasyonun çıkarılmasından sonra kalça kapsülünün ve gluteus minimus tendonunun semptomatik eksikliğinde BMAC'in başarılı bir şekilde kullanıldığını bildirmişlerdir. 16 hafta boyunca toplam üç PRP ve iki BMAC enjeksiyonu uygulanmıştır. Tekrarlanan BMAC enjeksiyonları, MRG'deki kalça kapsülünün ve gluteus minimus tendonunun bütünlüğünün yanı sıra ağrısını dindirdiği ve gücünü de arttırdığı görülmüştür. Hareket analizi sonuçları, tedavi süresi boyunca subjektif ağrı skorunun istikrarlı bir şekilde azaldığını ve tekme performansında artış olduğunu ortaya koymuştur (87).

Epikondilit

Geleneksel olarak, lateral epikondilitteki baş lezyonun, yaygın ekstansör orijininin hassas kısmında enflamatuar granülasyon dokusu olduğu düşünülektedir. Bu lezyonda tendon dejenerasyonu olduğu göz önüne alındığında, ekspresyon, epikondiloz veya tendinosis, epikondilitten daha uygun bir terim olarak savunulmuştur. Tendon rüptürleri kemiğe benzemez, çünkü tendon iyileşmesi tam iyileşme ve zarar görmemiş duruma geri dönüş ile sonuçlanmaz. Tersine, doğal tendondan mekanik olarak daha zayıf bir tendona yol açan bir fibrovasküler doku üretilir (88).

Moon ve ark., cerrahi olmayan tedavilere karşı başarısız olan 26 dirsekte (24 hasta) medial veya lateral epikondiliti tedavi etmek için BMAC ile cerrahi

müdahaleyi birleştirmiştir. Dirsek tendinitinde artroskopik debride edildikten sonra BMAC enjeksiyonunun, daha hızlı iyileşmeyi sağladığı sonucuna varılmıştır. Altı aylık sonra ise görsel analog ağrı skorlarında ve Mayo dirsek performans skorlarında iyileşme görülmüştür. Son post-operatif takipte tedavi edilen dirseğin ultrason muayenesi sonucunda tendonun sağlıklı yapıya yönelim ortaya koymuştur. Sitokin analizinde, önemli ölçüde yüksek Interleukin-12, Interferon gama ile indüklenen Protein 10 ve Normal T Hücresi Ekspres Edilmiş ve Salgılanmış (RANTES) seviyeleri belirlenmiştir (89).

Pascual-Garrido ve ark., tedaviye yanıt vermeyen patella tendiniti için, ultrason rehberliğinde, BMAC enjeksiyonunun sonucunda bir vaka serisinin klinik sonuçlarını bildirmişlerdir. Raporları 14-35 yaşları arasında sekiz hastayı (dört erkek ve dört kadın) içermektedir. Çalışma, 8 hastanın 7'sinde günlük yaşam skorları, dizle ilişkili yaşam kalitesi ve fonksiyonel diz skorları (Uluslararası Diz Dokümantasyon Komitesi (IKDC) ve Diz Yaralanması ve Osteoartrit Sonuç Skoru (KOOS), ağrı ve aktivitesinde önemli bir iyileşme olduğunu bildirmiştir (90).

Potansiyel risk

Kemik iliği aspirasyonunun nispeten güvenli bir prosedür olduğu düşünülmektedir. Tüm invaziv prosedürlerde olduğu gibi, hastalar olası tüm riskler konusunda rıza göstermiş olmalıdır [51-54]. Bu riskler, KİK'in elde edilmesi veya uygulanması ile ilişkili olabilir. En büyük risk, kemik iliğinin alındığı bölgeye yakın nörovasküler yapılarda yaralanma riskidir. Bu yapıların yaralanması hemorajiye veya kronik ağrı ile ilgili sorunlara neden olabilir. Ayrıca, özellikle osteomalazi gibi altta yatan bir metabolik problem veya osteoporoz gibi bir patolojinin varlığında buna bağlı kırıklar potansiyel risk kaynağıdır (91, 92).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırma hayvan modelleri ile gerçekleştirildi. Bu deney için Saki Yenilli Deneysel Hayvanlar Üretim ve Uygulama Laboratuvarı yerel hayvan etik kurul izni alınmıştır (Bkz. EK-1). Hayvanların beslenmesi ve bakımı Saki Yenilli Deneysel Hayvanlar Üretim ve Uygulama Laboratuvarı'nda uygun kafeste ve sıcaklıkta yapılmıştır. Hayvanların cerrahi girişimlerin ve prosedür uygulanmalarının da bu laboratuvarda yapılmıştır. Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Kıkırdak Doku Laboratuvarı'nda elde edilen tendonların histolojik değerlendirme yapılmıştır. Tendonların elastosonografi testi ise Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Bölümü'nde yapılmıştır.

3.1. Hayvanlar

Araştırmamızda Yeni Zelanda Beyaz türü, ağırlıkları ortalaması 2,68 kg olan 6-8 haftalık tavşanlar kullanılmıştır. Araştırmamızda tavşan kullanmamızın sebebi ise yapılan araştırmalarda tendon patolojileri için tavşan gibi büyük hayvanların kullanılmasının daha iyi sonuçları verdiği ve insan dokusuna daha yakın olduğunun gösterilmesidir (93). Kontrol grubu için beş (5) hayvan ve her bir deney grubu için beş (5) hayvan kullanılmıştır. Toplamda 30 tavşan kullanılmıştır.

3.2. Hayvan Deneyinin Tasarımı

Deneylerde, elde edilen SVF ve KİK karışımları kullanılmıştır. 1. Deney grubu kontrol grubu oldu ve herhangi bir karışım eklenmemiştir. 2. Deney grubuna sadece SVF solüsyonu enjekte edilmiştir. 3. Deney grubuna sadece KİK solüsyonu enjekte edilmiştir. 4. Deney grubunda her iki solüsyondan da eşit miktarda (%50-%50) alınıp karıştırılarak enjekte edilmiştir. 5. Deney grubunda SVF'den toplam miktarın %75'ini karşılayacak kadar, KİK'ten ise %25'i kadar alınıp karıştırılarak enjekte edilmiştir. 6. Deney grubunda SVF'den %25, KİK'ten ise %75 alınıp karıştırılarak enjekte edilmiştir (Şekil 3.1). Tüm bu karışımlar yaralı aşil tendonuna enjekte edilmiştir. Her hayvanın kendi dokusundan üretilen solüsyon yine kendisine verilmiştir. Uygulanan solüsyon miktarı ise 1 mililitredir.

1.Deney Grubu- Kontrol Grubu 5 tavşan	2.Deney Grubu- %100 SVF 5 tavşan	3.Deney Grubu- %100 KİK 5 tavşan
4.Deney Grubu %50 SVF-%50 KİK 5 tavşan	5.Deney Grubu- %75 SVF-%25 KİK 5 tavşan	6.Deney Grubu- %25 SVF-%75 KİK 5 tavşan

Şekil 3.1. Hayvan deneyi grupları.

3.3.Cerrahi Prosedür

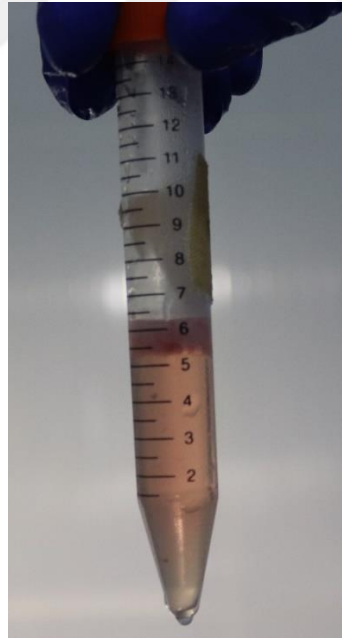
Tüm cerrahi prosedürler, Saki Yenilli Deney Hayvanları Üretim ve Uygulama Laboratuvarı ünitesinin içinde tam donanımlı bir ameliyathanede gerçekleştirilmiştir. İntramüsküler şekilde 35/5 mg/kg Ketamin /Ksilazin maddesi uygulanarak tavşanlar anestezi edilmiştir. Hayvanlar yüzüstü bırakılmıştır ve sol bacaklarının arka kısımları, karın için bölgesi ve sol trokanter bölgesi tıraş edilmiştir. Cerrahi alan batikon ile yıkanmıştır ve daha sonra steril örtü ile kaplanmıştır. Aşil tendonu üzerine kısmi olarak açılması, sol taraftaki kalkaneusun yaklaşık 1 cm yukarısına 0,3 cm'lik biyopsi punch yardımı ile sağlanmıştır (Şekil 3.2). Solüsyonlar da hayvanlar anestezi iken hazırlanmıştır. Solüsyonlar aynı gün enjekte edildikten sonra 8 hafta boyunca beklenmiştir. 2 ay sonunda hayvanlar öldürülerek tendonları testler için toplanmıştır.



Şekil 3.2. Tendon üzerine açılan yara.

3.4. Stromal Vasküler Fraksiyonun Elde Edilmesi

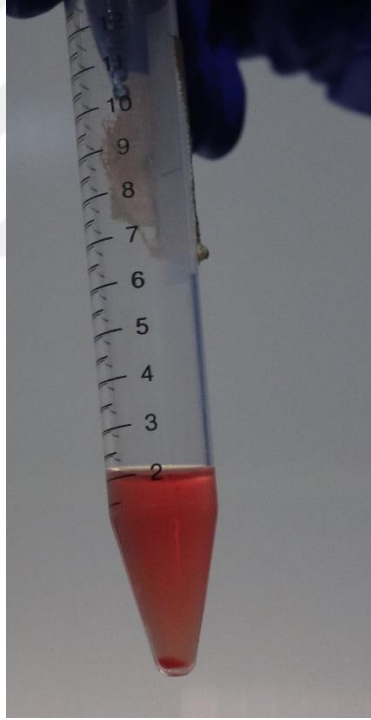
Aseptik koşullar altında, bilateral inguinal yağ yastığına erişmek için bir orta hat suprapubik deri insizyon yapılmıştır. Yaklaşık 6 ila 8 gram deri altı yağ dokusu alınmıştır. Alınan yağ dokusu ilk olarak, Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), with Ca & Mg, w/o Phenol Red (Capricorn Scientific HBBS 1-A) ile yıkayıp eritrositleri ve hücre kalıntıları uzaklaştırmak için 2 dakika boyunca 1200 G'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra büyük hücrelerden arındırılmış numuneler HBBS içinde 60 dakika boyunca 37°C'de %0,1 kolajenaz tip II (Gibco 17101-015) ile su banyosuna koyulmuştur. Sonraki aşama da kolajenazı nötrlemek için HBBS ile aynı miktarda DMEM (Capricorn Scientific DMEM-HA) eklenmiştir. Yağ dokunun hücre kalıntılardan ve sindirilmemiş dokulardan uzaklaştırılabilmesi için 1200 G'de 10 dakika boyunca tekrar santrifüjlenmiştir. Ortaya çıkan solüsyonun daha az kan hücresi ve daha fazla kök hücre içerebilmesi için santrifüjden sonra elde edilen süpernatanın 100 mikrometrelik naylon hücre süzgecinden geçirilip tekrar aynı süre ve kuvvette santrifüjlenmiştir. Tüm bu işlemlerden elde edilen solüsyonlar gerekli olan hayvanlara uygulanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Stromal vasküler fraksiyon.

3.5. Kemik İliği Konsantresinin Elde Edilmesi

Hayvan anestezi altında iken sol trokanter bölgesinden kemik iliği aspirasyonu 18 Gauge'luk iğne ile gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 2 ml kemik iliği aspire edilmiştir. Daha sonra bu kemik iliği konsantrasyonuna Ficoll/Paque (Capricorn Scientific LSM-B) eklenerek, 10 dakika boyunca 20°C'de 400G'de santrifüj edilmiştir. Ficoll/Paque maddesi santrifüj sonunda üç ayrı faz görülmüştür. Bu fazlardan üst tabaka kan plazması, ara tabakada Ficoll/Paque maddesinin üstünde hematopoetik öncü kök hücrelerin, kemik iliği stromal hücrelerin ve mezenkimal kök hücrenin bulunabildiği yerler ve alt tabaka da ise kan hücrelerinin bulunması beklenmiştir. Ara tabaka pipet yardımı ile alınmıştır. Daha sonra önce 300 G'de daha sonra da 200G'de 10 dakika boyunca PBS ile yıkanmıştır. Elde edilen son solüsyon yaralı bölgeye uygulanmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Kemik iliği konsantresi.

3.6. Hücre Sayımı

Yapılan her solüsyondan 10µl alınmıştır ve bunlar hücre sayımı için kullanılmıştır. Hücre sayımında 10µl Trypan-blue boyası ile ayrılan süspansiyonlar karıştırılarak boyanmıştır. Hücrelerin Thoma lamında sayma işlemi ışık mikroskobu

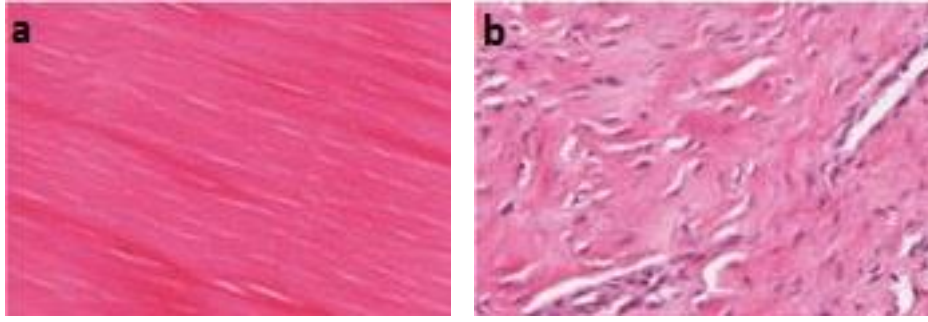
yardımıyla 10x boyutlarında yapılmıştır. Yaşayan hücreler beyaz, ölü hücreler ise mavi görünmüştür. Yaşayan/ ölü hücre oranına bakıldı. %95 ve üstü yoğunluğa ulaşan hücreler yaralı bölgeye uygulanmıştır.

3.7.Histolojik Değerlendirme

Tavşan aşil tendonlarında yer alan tenositlerin ve hücre dışı matriksin iyileşmesinin görülmesi için histolojik test yapılmıştır. Tendonlar, 48 saat %10 formalin içeren PBS ile fikse edilecek ardından, artan alkol serilerinde dehidrasyon yapılmıştır ve ksilolden geçirilerek saydamlaştırılmıştır. Dokular parafine gömüldükten sonra, mikrotom yardımıyla 5 µm kesitler alındı ve PBS ile yıkanmıştır. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinin ardından kesitlerin antijen görünürlüğünü arttırmak için mikrodalga fırında antijen retrieval solüsyonunda kaynatılmıştır. %3 hidrojen peroksidad ile 5 dakika endojen peroksidad inaktivasyonu yapılmıştır. Bloklama işleminden sonra kesitler (4 mm uzunluğunda 2 mm eninde) hematoksilin-eozin (BES-LAB, BS-001) ile boyanıp, ışık mikroskobu altında 40x büyütme ile incelenmiş ve skorlanmıştır (94, 95). Kullanılan derecelendirme sisteminde mükemmel bir normal tendon skoru 0 ve maksimum anormal tendon skoru 18'dir (Tablo 3.1)(Şekil 3.5). İncelemede tenosit morfolojisine (çekirdeğin yapısı), enflamasyona, vaskülarizasyona, kolajen yapısına (fibrillerin devamlılığına ve doğrusallığına) ve hücre yoğunluğuna bakılmıştır (96, 97).

Tablo 3.1. Histolojik derecelendirme sistemi (94).

Tendon İyileşmesi Histolojik Değerlendirme Skorları				
	Derece 0	Derece 1	Derece 2	Derece 3
Fiberlerin Yapısı	Devamlı, Uzun	Biraz parçalanmış	Orta Derecede Parçalanmış	Yüksek Derecede Parçalanmış
Fiberlerin Düzeni	Sıkışık ve Paralel	Biraz gevşek ve Dalgalı	Orta derecede gevşek, Dalgalı ve Birbirlerine Çaprazlı	Tanımlanabilir herhangi bir model yok
Çekirdeğin Yapısı	Uzun iç-şekli	Az derecede yuvarlak	Orta derecede yuvarlak	Yüksek derecede yuvarlak
Enflamasyon (Enflamasyonlu Bölgelerin Yoğunluğu)	<%10	%10- %20	%20- %30	>%30
Vaskülarizasyon(Neo-vasküler Bölge Yoğunluğu)	< %10	%10- %20	%20- %30	>%30
Hücre Yoğunluğu	Normal	Biraz artmış	Orta şiddette artmış	Yüksek şiddette artmış



Şekil 3.5. Histolojik bulguların şematik görüntüsü a) 0 puanlı tendon b)18 puanlı tendon (98).

3.8.Elastosonografik Değerlendirme

Elastosonografi tabanlı görüntüleme teknikleri, son yıllarda doku mekanik özelliklerinin non-invazif olarak değerlendirilmesinde büyük ilgi görmüştür. Bu teknikler, çeşitli patolojilerde değişen yumuşak doku elastikiyetinden yararlanarak, teşhis amaçlı kullanılabilen niteliksel ve niceliksel bilgi üretmektedir. Ölçümler, uygulanan mekanik kuvvete sıkıştırma (compression veya shear wave) yanıt olarak doku sertliğini tespit edebilen özel görüntüleme modlarında elde edilir (99). Çalışmamızda tendonun sertliğine ve iyileşmesine bu yöntem ile de bakılmıştır. Her bir deney grubundan 2 tavşanın operasyondan sonraki 4.hafta ve 8.hafta olmak üzere iki kere Ankara Şehir Hastanesi Radyoloji Bölümü'nde 5-13 Mhz probe ile elastosonografileri çekilmiştir (HITACHI-Preirus). Elastosonografilerin değerlendirilmesi hem sayısal değerler üzerinden hem de renk değişimlerine göre yapılmıştır.

Sayısal değer olarak gerilme değerleri belirlenmiştir. Sağlam tek bir bölge ve hasarlı bölgeler seçilerek gerilme miktarı bulunup oranları alınmıştır. Renk değişimleri Tan ve ark. çalışması esas alınarak yapılmıştır (100) (Tablo3.2).

Tablo 3.2. Elastikiyet tipleri ve elastosonografideki görünümleri (101).

Tipler	Tendon Paternleri
Tip 1(en sert doku)	Mavi
Tip 2 (sert doku)	Yeşil/Mavi
Tip 3 (orta sertlikte doku)	Yeşil
Alt-tip A	Homojen Yapı
Alt-tip B	Göreceli Homojen Yapı
Alt-tip C	Heterojen Yapı

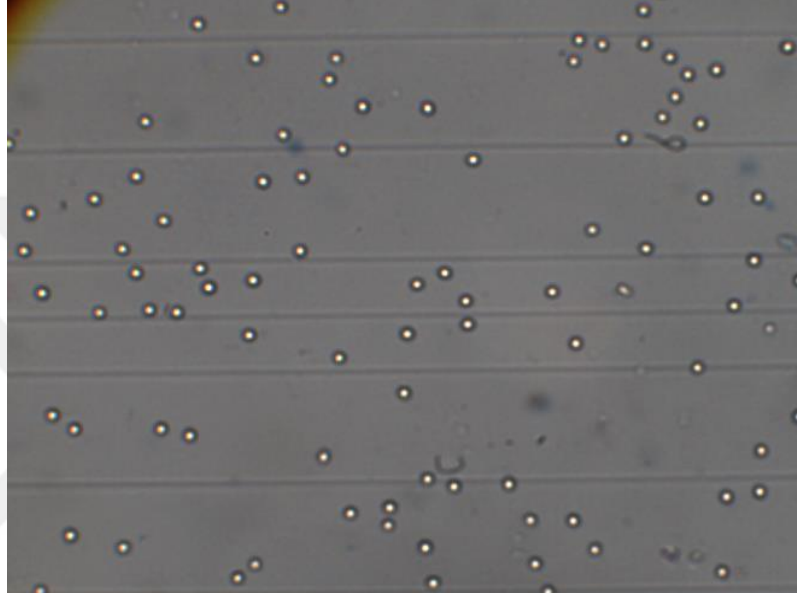
3.9.İstatistik

Uygulanan testlerden elde edilen ve hesaplanan verilerin, yüzde değerlerin normal dağılıma uygunluğu, grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler ortalama±standart sapma ile verildi. Gruplardaki zamana göre değişimleri karşılaştırabilmek için varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Fark bulunduğunda; farkın kaynağını belirleyebilmek amacı ile bağımsız t teste başvurulmuştur. İstatistiksel kararlarda; $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel farklılığın göstergesi olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hücre Sayımı

KİK ve SVF hazırlandıktan sonra karışımlar hayvanlara verilmeden önce hücre sayımı yapılmıştır (Şekil 4.1). Ayrıca her karışımda da toplam hücrelerin %95'nin yaşadığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.1).



Şekil 4.1. Thoma lamı görüntüsü.

Tablo 4.1. Thoma lamında bulunan hücrelerin sayısı ve yaşayan hücre oranı.

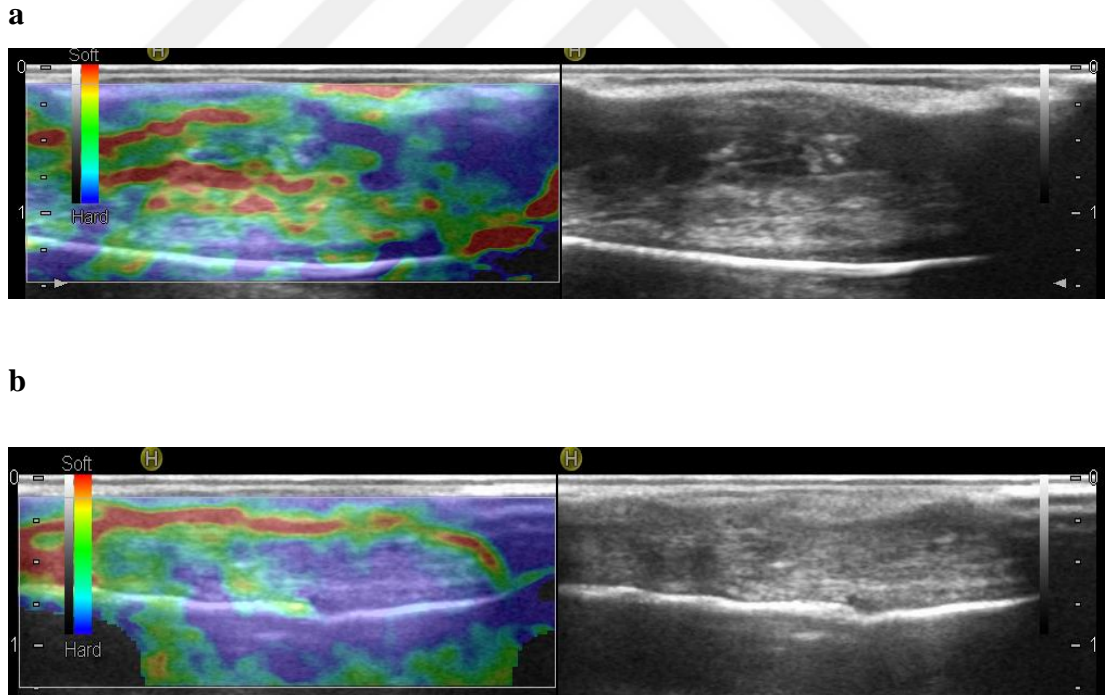
	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup	6.Grup
Tahmini Hücre Sayısı	102	96	110	105	112	116
Yaşayan Hücre Oranı	%97	%95	%97	%96	%96	%96

4.2.Elastosonografik Bulgular

On iki tavşanın cerrahi operasyonlarından bir ay ve iki ay sonra aşil tendonlarının elastosonografileri çekilmiştir. Sonuç olarak 5. Deney grubunun en iyi iyileşmeyi gösterdiği, karışımların tek tek kullanımlara göre daha hızlı iyileştiği görülmüştür (Şekil 4.2, 4.3,4.4,4.5,4.6,4.7,4.8).

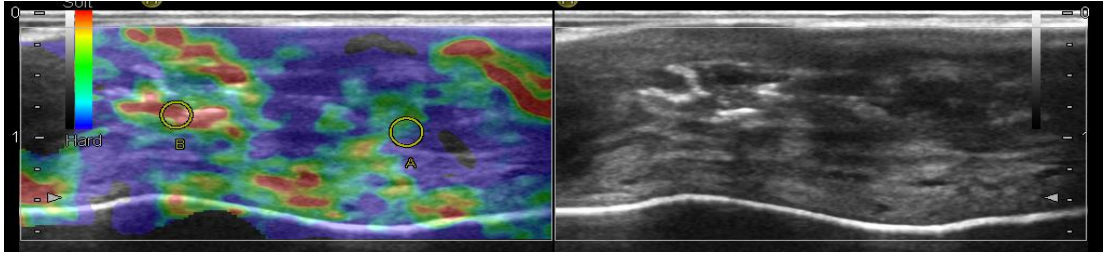
1.Ay gerilme değerlerine bakıldığında ortalama sağlam grubu 0.30, kontrol grubu 1.77, %100 SVF grubu 0.51, %100 KİK grubu 0.50, %50 SVF- %50 KİK grubu 0.69, %75 SVF- %25 KİK grubu 0.62 ve %25 SVF- %75 KİK grubu 0.79 olarak bulunmuştur.

2.Ay gerilme değerlerine bakıldığında ortalama sağlam grubu 0.23, kontrol grubu 1.30, %100 SVF grubu 0.35, %100 KİK grubu 0.38, %50 SVF- %50 KİK grubu 0.33, %75 SVF- %25 KİK grubu 0.29 ve %25 SVF- %75 KİK grubu 0.32 olarak bulunmuştur.

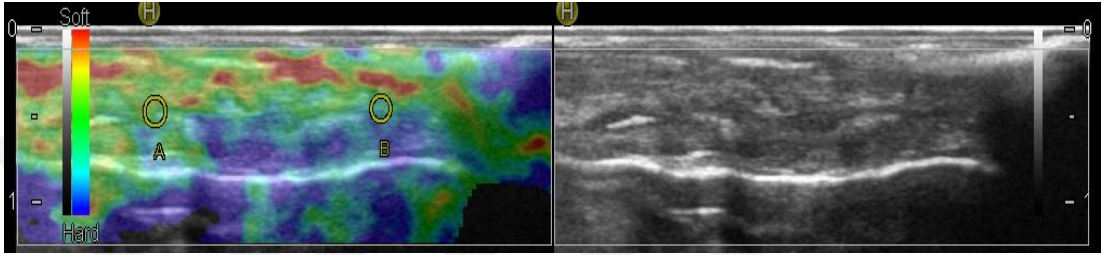


Şekil 4.2. %75 SVF- %25 KİK karışımı uygulanmış aşil tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.

a

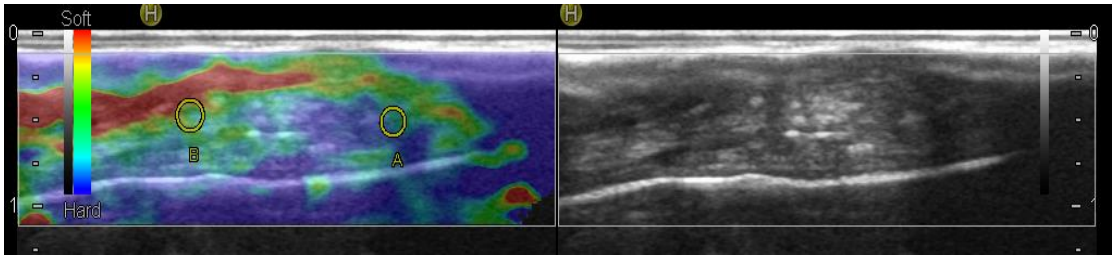


b

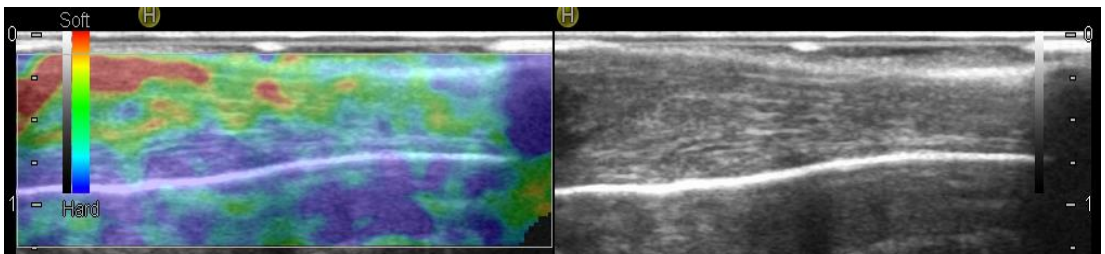


Şekil 4.3. %100 Kemik iliği konsantresi uygulanmış aşil tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.

a

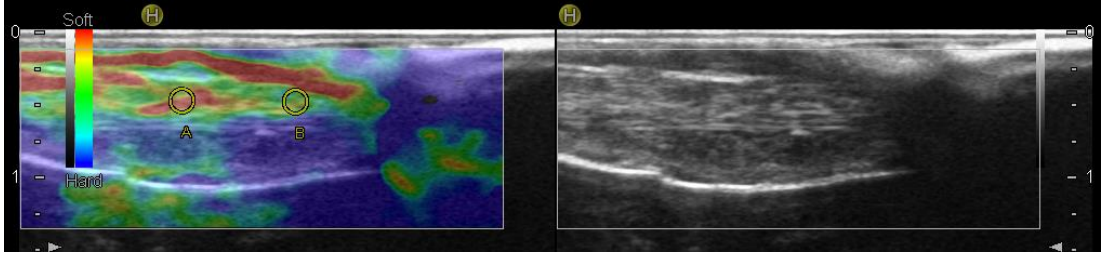


b

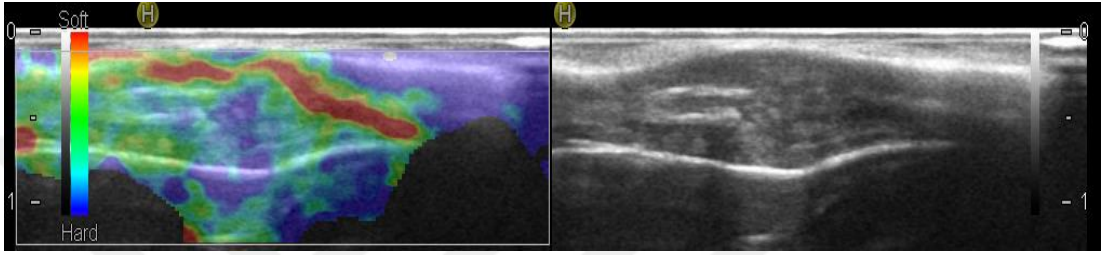


Şekil 4.4. %25 SVF- %75 KİK karışımı uygulanmış aşil tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.

a

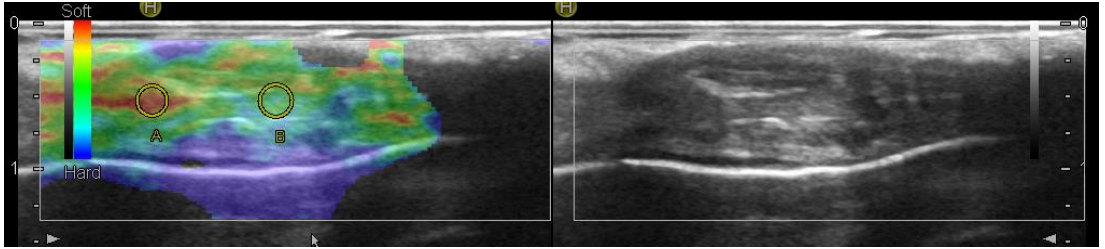


b

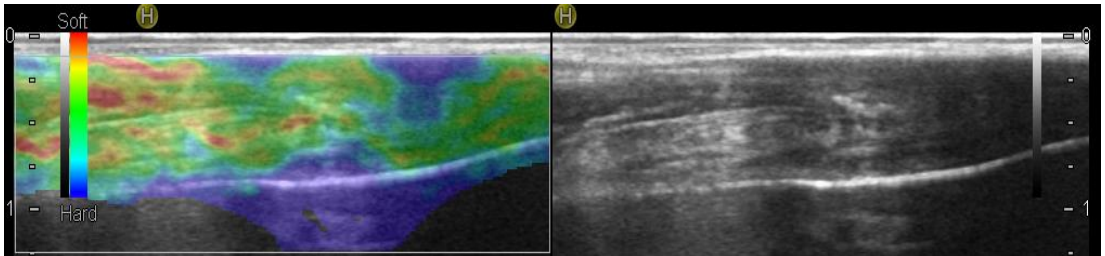


Şekil 4.5. %100 Stromal vasküler fraksiyon uygulanmış aşil tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.

a

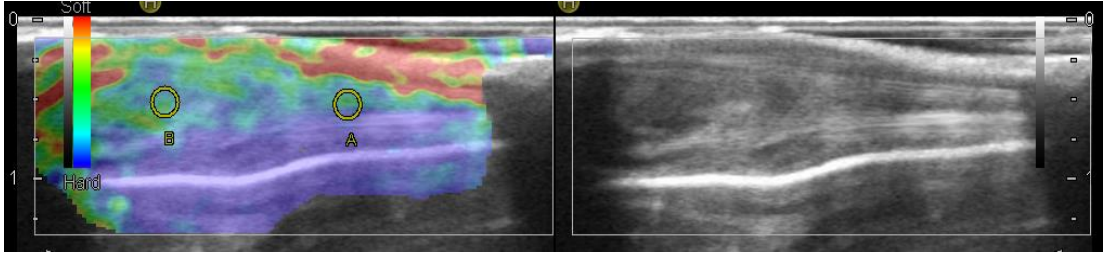


b

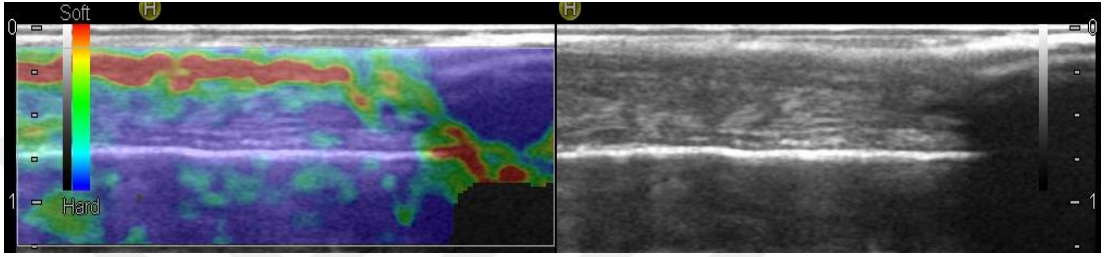


Şekil 4.6. Kontrol grubunun aşil tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.

a

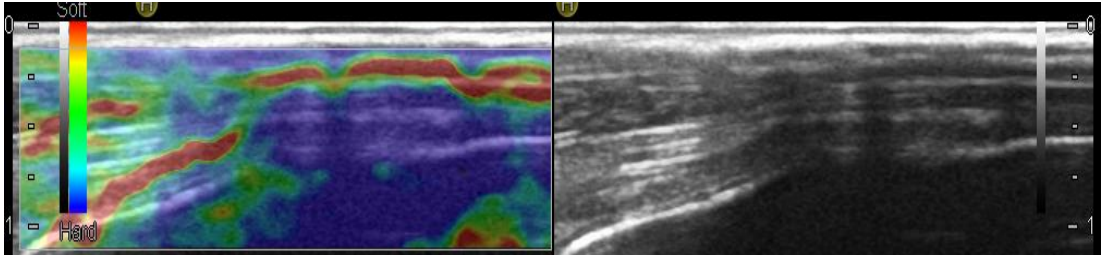


b

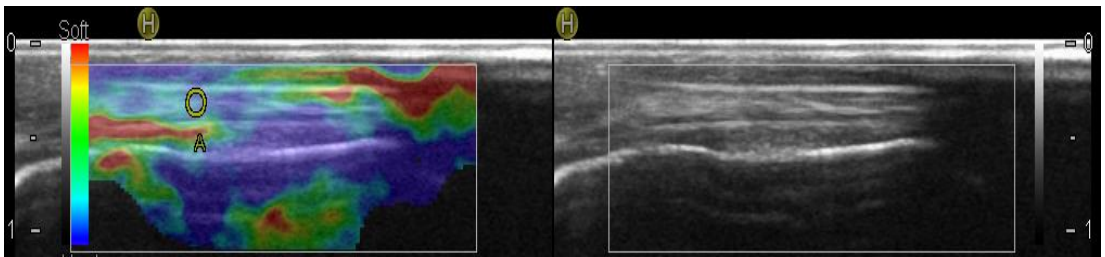


Şekil 4.7. %50 SVF- %50 KİK karışımı uygulanmış aşil tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.

a



b



Şekil 4.8. Sağlam taraf aşil tendonu a) 1.Ay ve b) 2.Ay elastosonografik görüntüsü.

Tablo 4.2. Grupların ortalama gerilme değerleri.

ORT±SS	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup	6.Grup	Sağlıklı
1.Ay	1,77±0,45	0,51±0,46	0,50±0,15	0,69±0,014	0,62±0,56	0,79±0,32	0,30±0,08
2.Ay	1,30±0,08	0,35±0,21	0,38±0,28	0,33±0,15	0,29±0,028	0,34±0,028	0,23±0,028

ORT= Ortalama, SS= Standart Sapma, 1.Grup= Kontrol, 2.Grup= %100SVF, 3.Grup= %100KİK, 4.Grup= %50KİK-%50SVF, 5.Grup= %75SVF-%25KİK, 6.Grup= %75KİK-%25SVF, 7.Grup= sağlam

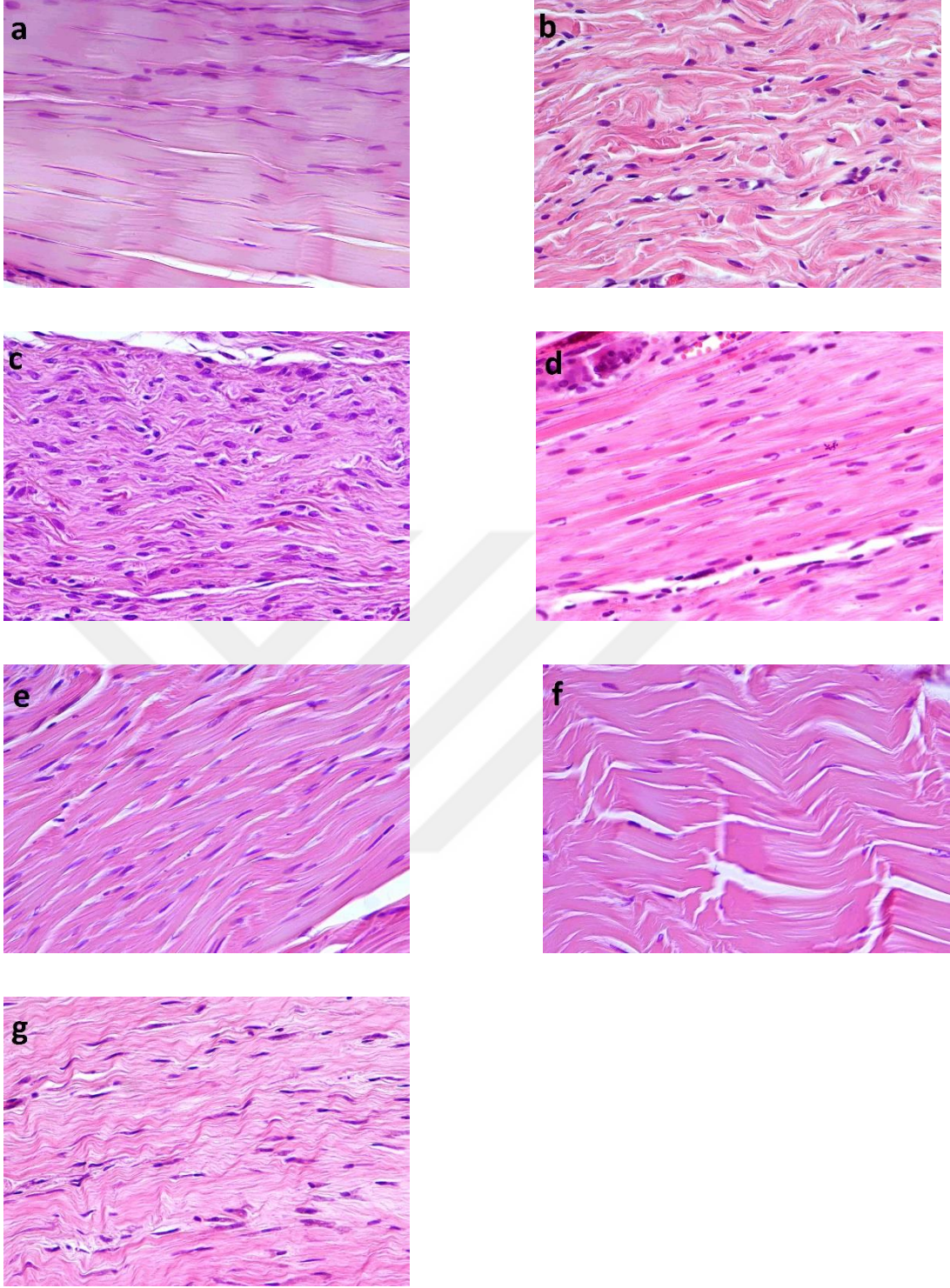
Tablo 4.3. Seçilen altı tavşanın ve sağlam tarafın elastikiyet tipleri ve elastosonografideki görünümleri.

1.Grup		2.Grup		3.Grup		4.Grup		5.Grup		6.Grup		Sağlıklı	
1.ay	2.ay	1.ay	2.ay	1.ay	2.ay	1.ay	2.ay	1.ay	2.ay	1.ay	2.ay	1.ay	2.ay
3C	3B	2A	2A	2C	2B	1C	2C	3B	2A	1B	2A	2A	2A

1.Grup= Kontrol, 2.Grup= %100SVF, 3.Grup= %100KİK, 4.Grup= %50KİK-%50SVF, 5.Grup= %75SVF-%25KİK, 6.Grup= %75KİK-%25SVF,7.Grup=Sağlam

4.3.Histolojik Bulgular

Çalışmanın sonucunda 30 tavşan aşıl tendonuna değerlendirme yapılmıştır. Grupların ortalama puanlarının sırasıyla sağlam grubun 0, kontrol grubunun 6.6, %100 SVF grubunun 9.33, %100 KİK grubunun 4.5, %50 SVF- %50 KİK grubunun 4.6, %75 SVF-%25 KİK grubunun 5.5 ve %75KİK- %25 SVF grubunun ise 7 olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.9) (Tablo 4.4, 4.5.,4.6).



a) Sağlıklı b) Kontrol c) %100SVF d) %100KİK e) %50KİK-%50SVF f) %75SVF-%25KİK
g) %25SVF-%75KİK

Şekil 4.9. Histolojik bulguların 40x mikroskop görüntüsü.

Tablo 4.4. Histolojik değerlendirme skorlarına göre grupların ortalamaları.

	Sağlıklı	6.grup	5.grup	4.grup	3.grup	2.grup	1.grup/ Kontrol	ORT±SS
FIBERLERİN YAPISI	0±0	1,5±1,29	1,25±0,50	0,80±0,44	0,5±0,57	1,66±0,57	1,4±0,54	1,4±0,54
FIBERLERİN DÜZENİ	0±0	1,5±0,57	1±0	1,4±0,89	1,25±0,05	1,66±0,57	1,8±0,44	1,8±0,44
ÇEKİRDEĞİN YAPISI	0±0	1,25±0,95	1,25±0,50	0,8±0,83	0,5±0,57	1,66±0,57	1,4±0,54	1,4±0,54
ENFLAMASYON	0±0	1±1,41	0,25±0,50	0,6±0,54	0,5±0,57	1±0	0,4±0,54	0,4±0,54
VASKÜLARİZASYON	0±0	0,25±0,50	0,25±0,50	0,2±0,44	0,25±0,5	1,33±0,57	0,2±0,44	0,2±0,44
HÜCRE YOĞUNLUĞU	0±0	1,5±1,29	1,5±0,57	0,8±0,44	1,5±0,57	2±1	1,4±0,54	1,4±0,54
TOPLAM	0±0	7±5,16	5,5±1,73	4,6±3,04	4,5±2,38	9,33±2,08	6,6±2,30	6,6±2,30

ORT= Ortalama, SS= Standart Sapma, 1.Grup= Kontrol, 2.Grup= %100SVF, 3.Grup= %100KİK, 4.Grup= %50KİK-%50SVF, 5.Grup= %75SVF-%25KİK, 6.Grup= %75KİK-%25SVF,7.Grup= Sağlam

Tablo 4.5. Histolojik değerlendirme alt parametreleri ile gruplar arasındaki ilişki.

ANOVA						
		Karelerin Toplamı	df	Ortalama Kare	F	Anlamlılık
fiberlerinyapısı	Gruplar Arasında	11,021	6	1,837	5,462	,001
	Gruplar İçinde	9,417	28	,336		
	Toplam	20,437	34			
fiberlerindüzeni	Gruplar Arasında	10,915	6	1,819	7,938	,000
	Gruplar İçinde	6,417	28	,229		
	Toplam	17,332	34			
çekirdeğinyapısı	Gruplar Arasında	10,080	6	1,680	5,132	,001
	Gruplar İçinde	9,167	28	,327		
	Toplam	19,247	34			
enflamasyon	Gruplar Arasında	4,118	6	,686	1,893	,117
	Gruplar İçinde	10,150	28	,363		
	Toplam	14,268	34			
vaskülarizasyon	Gruplar Arasında	5,828	6	,971	6,021	,000
	Gruplar İçinde	4,517	28	,161		
	Toplam	10,345	34			
hücreyoğunluğu	Gruplar Arasında	12,686	6	2,114	5,382	,001
	Gruplar İçinde	11,000	28	,393		
	Toplam	23,686	34			
toplam	Gruplar Arasında	250,352	6	41,725	6,751	,000
	Gruplar İçinde	173,067	28	6,181		
	Toplam	423,419	34			

Tablo 4.6. Histolojik değerlendirme skalası çalışma grupları ile kontrol grubu arasındaki ilişki.

	%25KİK- %75SVF	%75KİK- %25SVF	%50SVF- %50KİK	%100 KİK	%100 SVF	
	0,862	0,644	0,094	0,027	0,409	Fiberlerin Yapısı
	0,347	0,004	0,397	0,084	0,634	Fiberlerin Düzeni
	0,744	0,644	0,217	0,027	0,409	Çekirdeğin Yapısı
	0,347	0,644	0,580	0,771	0,040	Enflamasyon
	0,862	0,862	1	0,862	0,003	Vaskülarizasyon
	0,862	0,711	0,094	0,771	0,172	Hücre Yoğunluğu
	0,863	0,397	0,276	0,167	0,056	Toplam

T testi, $p < 0,05$

5. TARTIŞMA

5.1. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Karışımı

Literatüre bakıldığında adipoz dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyonun tendon iyileşmesini arttığı görülmektedir (102). Ayrıca kemik iliği konsantrinin de biyomekanik, morfolojik ve yapısal parametrelerde tendonun normalleştirilmesini arttırdığı görülmüştür (103). Bu iki farklı konsantrenin içinde de mezenkimal kök hücre bulunmaktadır ve iyileşmeyi sağlayan ana etken budur. İki farklı kaynaktan elde edilen bu karışımlar birçok biyolojik özelliği paylaşır. Ancak bunların immünofenotipi, farklılaşma potansiyeli, transkriptom, proteom ve immünomodülatör aktiviteleri arasında bazı farklılıklar vardır (104, 105).

Bu farklılıklara baktığımızda öncelikle kök hücre karakterizasyonunda kullanılan belirteçlerde küçük farklılıklar görülmektedir. Kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin CD34 negatif ekspresyonu yağdan üretilenlere göre daha fazla olduğu, CD49d ise yağdan üretilen kök hücrelerin ekspresyonunun daha fazla olduğu bulunmuştur (104). Ayrıca bu karışımların barındıkları kök hücre bakımından SVF, KİK'ten 500 kat daha fazla kök hücreye sahiptir (105).

Diğer farklılık ise; 21 gün boyunca yağdan üretilen kök hücreler proliferasyona devam ederken kemik iliğinden üretilenlerin bu kadar süre proliferasyon yapamadığı görülmüştür. Ancak osteogenik aktiviteyi gösteren ALP aktivitesinde ise kemik iliğinden üretilen kök hücrelerin daha erken bu aktiviteye başladığı görülmüştür (104).Tendonda ve birçok dokuda iyileşmeyi gösteren ve sağlayan kolajen tip-I üretiminde ise ikisi arasında bir fark bulunmamıştır. Bu da her ikisinin iyileşmeye katkısını göstermektedir (104).

Gen ekspresyonlarına bakıldığında 384 gen üzerine yapılan bir çalışmada %3,4'ünün sadece bir kaynaktan elde edilen karışımlar tarafından spesifik olarak eksprese edildiği bulunmuştur. Bu genlere bakıldığında sadece kemik iliğinden üretilenlerim eksprese ettiği genler WNT sinyalizasyon ve farklılaşma yollarında (WNT11, WNT7B ve SOX6), yağdan elde edilenlerde benzersiz olarak eksprese edilen genler hücre sel iletişiminde (CCL3, FGF9, IL1R2 ve KDR) ve transkripsiyon kontrolünde (PAX3, SPI1 ve ZNF45) görev almaktadır. Ayrıca bu iki farklı

kaynakların proteomik analizinde (tüm hücre ekstresinin 2D elektroforezi), proteinlerin%23'ünün spesifik olarak bir kaynaktan eksprese edildiğini gösterilmiştir. Ek olarak toplam proteinlerin %18'inin bu iki farklı kaynak arasında farklı şekilde eksprese edildiği bulunmuştur (106). Diğer bir araştırma da ise kemik iliğinden üretilen kök hücrelerin 14. günde tavan yaptığını ancak 21. güne yaklaşırken her iki kaynağında aynı ekspresyon seviyelerine ulaştığı görülmüştür (104).

Son farklılık olarak immünomodülatör aktivitelere bakarsak yağ kaynağının Ig üretimini kemik iliği kaynağından çok daha fazla bastırdığı ve immünosüpresif sitokin IL-10 salgılanmasını arttırdığı görülmüştür (107, 108).

Literatüre baktığımızda bu farklılıkların sebebinin farklı izolasyon ve kültür protokolleri ile ilgili olabileceği söylenmiştir (105). Ancak farklılıkların sebebi hala tam olarak bilinmemektedir.

Çalışmamızda iyileşmeye daha hızlı ve normale daha yakın hale getirmek için bazı farklılıklara sahip bu iki karışımı birlikte uygulanmasının tek tek kullanımlarına göre daha iyi sonuç vereceği hipotezini çalıştık ve bu hipotezin doğru olduğunu da yapılan değerlendirmeler ile de ortaya çıkardık.

5.2. Elastosonografik Bulgular

Elastosonografi nispeten büyük olması ve kolay ulaşılabilmesi nedeniyle birçok aşıl tendonu çalışmasında kullanılmaktadır (109-111). En büyük avantajı non-invazif yöntem ile tendonun sertliğini, gerilme değerlerine ya da kalınlığı gibi biyomekanik değerlendirmelerinin yapılabilmesidir. Bu sayede çalışma devam ederken tendonun durumu hakkında bilgi sahibi olunabilir ve gerekli görülmesi halinde tendona müdahaleler yapılabilir.

Elastosonografi daha çok gerilim ve esneklik parametreleri için kullanılmaktadır. Daha elastik bir doku daha fazla gerilme gösterirken, daha az elastik bir doku daha az gerilme göstermektedir. Ultrason görüntüsü üzerine bindirilmiş renk kodlu haritalama ile gerçek zamanlı olarak doku esnekliği hakkında anında ve kapsamlı bilgi sağlanmaktadır (112). Literatürde hayvan çalışmalarında histolojik çalışmayla birlikte tendinopatinin (geleneksel ultrasona göre) değerlendirilmesine farklı bir yaklaşım sağlayan bir araç olarak görülmektedir (113).

Klinik çalışmalar elastografik bulguların semptomlar, ultrason ve manyetik rezonans görüntüleme ile iyi ilişkili olduğunu ortaya koymuştur(109, 112, 114). Çalışmamızda da yöntemin avantajı kullanılarak tendonların iyileşme aşamasında da gerilimleri ve esneklikleri değerlendirilmiştir.

Çalışmada elastosonografideki görünümlere bakarak bir değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirme de en dikkat çekici nokta ilk ay ile ikinci ay arasında hem homojenizasyon hem de esneklik bakımından iyileşme yönünde birçok farklılığın bulunmasıdır. Özellikle karışım gruplarının sağlam taraf tendonlarına çok benzediği görülmüştür. Çalışmada yer alan elastosonografi görüntüleri ile literatürde yer alan diğer araştırmaların görüntüleri ile de benzerdir (115, 116).

İlk ay oluşan sertliklerin iyileşme sırasında oluşan skar dokunun olabileceği düşünülmektedir. Zaten sertlik ile görülen heterojen yapı da orada bir iyileşme sürecinin olduğunu göstermektedir. İkinci ayda ise tendon dokusuna özgü sert ancak esnek yapı meydana gelmiştir. İyileşme aşamalarından da bilindiği gibi yeniden modelleme aşaması yılları bulmaktadır. Ancak görüntülere bakıldığında karışım uygulanan grupların iki ay içerisinde yaralanma öncesi döneme geldiği görülmüştür. Bu da karışımın tek tek uygulamaya göre daha etkin iyileşmenin sağladığını göstermektedir.

5.3. Histolojik Bulgular

Histolojik bulgular, çalışan dokuda yer alan hücrelerin ve hücre dışı matrikslerin durumu hakkında bilgi almak için birçok çalışma da kullanılmaktadır. Hematoksilin-eozin boyama yaygın olarak mevcuttur, düşük maliyetlidir ve çok az teknik beceri gerektirir. Ayrıca, çoğu patolog, hematoksilin-eozin boyamasına aşinadır ve bu şekilde boyanmış çeşitli örnekleri yorumlamaktadır (117). Bu çalışmada da histolojik değerlendirme hematoksilin-eozin boyanmış slaytlar üzerinden yapılmıştır.

Çalışmada tendon iyileşmesi için önemli olan altı faktör incelenmiştir (98, 118-120). İlk parametre olan fiberlerin yapısında fiberlerin oluşturduğu makro yapılar bakılmıştır. Çalışmamızda %50 SVF-%50 KİK grubu ile %75 SVF-%25 KİK grupları kontrol grubu ve tek tek kullanımlara göre fiber yapıları sağlam

tendona daha benzer çıkmıştır. Bu sonuç karışım grubu ile tedavi edilen tendonun, daha az parçalı bir yapıya sahip olduğunu ve bu sayede de daha fazla kuvvete karşı dayanıklılık kazandığını göstermektedir.

İkinci parametre olan fiberlerin diziliminden de kolajen fiberlerinin paralellikleri ve birbirleri ile olan ilişkileri gözlemlenmiştir. Çalışmamızın sonucunda da tüm karışım gruplarının kontrol gruplarına ve tek tek kullanımlara göre daha paralel ve sıkışık yapıda olduğu görülmüştür. Karışım gruplarını ile tedavi edilen tendonların daha esnek yapıya sahip olduğu söylenebilir.

Üçüncü parametremiz olan çekirdeğin yapısında ise, yeni tenositlerin oluşumu ve fiberlerin üzerine yerleşimlerine bakılmıştır. Sonucunda %50 KİK- %50 SVF grubunda tenositlerin oluştuğu ve düzgünce yerleştiği, diğer karışım gruplarının ise kontrol ve tek tek kullanım gruplarına göre daha düzgün yapıda tenositlere sahip olduğu görülmüştür. İyileşmeye büyük katkısı olan tenositlerin karışım gruplarında daha hızlı oluşması, iyileşmenin de bu grup da daha hızlı olabileceğini göstermektedir.

Dördüncü parametremiz olan enflamasyonda ise tendonda enflamasyonun belirtilerine bakılmıştır. Sonucunda en az enflamasyonun %25 KİK- %75 SVF grubunda olduğu görülmüştür. Karışım grubunda enflamasyonun azlığı hedeflerimizden biri olan ortam değişikliğinin başarılı bir şekilde yapıldığı göstermektedir.

Beşinci parametremiz vaskülarizasyonda damarlanma yapısı incelenmiş ancak çalışmamızda gruplar arasında bir farklılık bulunamamıştır. Bunun nedeni olarak ise zaten normal dokuda da az kanlanan bölge, yara oluşturulup o bölgenin iyileşmesi incelendiği için damarlanmasının erken dönemde kendini iyileştirdiği düşünülmektedir.

Son parametremiz hücre yoğunluğunda ise tenositlerin miktarına ve dağılımlarına bakılmıştır. %50 KİK- %50 SVF grubunun diğer tüm gruplara göre daha fazla hücre yoğunluğuna sahip olduğu görülmüştür. Karışımlarda hücre yoğunluğunun fazla olması iyileşmenin de daha hızlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın sonucunda da karışım verilen grupların kontrol grubuna ve tek tek kullanım gruplarına göre daha etkin iyileştiği görülmüştür.

5.4. Öneriler

Çalışma da bazı limitasyonlar ortaya çıkmıştır. Bunlardan birisi, karışımlarının daha konsantre olması gerekmektedir. Özellikle literatüre uygun olarak yaptığımız SVF izolasyonunda hücre sayısı az kalmıştır. Diğer limitasyonumuz ise, küçük hayvanların bu tür cerrahi operasyonları kaldıramamasıdır. Yine literatüre uygun kilo da ve yaşta tavşan seçilmesine rağmen ölümler meydana gelmiştir. Bir dahaki çalışmalarda bunları dikkat edilmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma, KİK ve SVF karışımlarının birlikte kullanımlarının tek tek kullanımlarına göre aşil tendonu üzerine etkilerini görmek amacıyla yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda elastosonografik ve histolojik değerlendirmeler yapılmıştır.

Değerlendirme sonuçlarına göre;

1. Elastosonografik değerlendirme de ilk ay ile ikinci ay arasında hem homojenizasyon hem de esneklik bakımından iyileşme yönünde birçok farklılık bulunmuştur. Özellikle karışım gruplarının sağlam taraf tendonlarına çok benzediği görülmüştür.
2. Histolojik değerlendirme de karışım verilen grupların kontrol grubuna göre, özellikle de fiberlerin yapısı ve düzeni faktörlerinde, daha etkin iyileştiği görülmüştür.

Yukarıda madde madde verilen sonuçlara göre çalışmanın hipotezi “aşil tendonu yaralanmalarında SVF ile KİK’in birlikte uygulanması, tek tek uygulamalarına göre daha etkin bir iyileşme sağlar.” kanıtlanmıştır.

Bu sonuçlar ışığında klinikte hastaların daha hızlı ve daha etkin bir şekilde iyileşmeleri için tek tek kullanılan SVF ve KİK’in birlikte kullanılmaları ümit vaat etmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Veronesi F, Torricelli P, Della Bella E, Pagani S, Fini M. In vitro mutual interaction between tenocytes and adipose-derived mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy*, 2015, 17(2):215-223.
2. Pierre-Jerome C, Moncayo V, Terk MR. MRI of the Achilles tendon: a comprehensive review of the anatomy, biomechanics, and imaging of overuse tendinopathies, *Acta Radiol*, 2010, 51(4):438-454.
3. Asplund CA, Best TM. Achilles tendon disorders, *BMJ*, 2013, 346(f1262).
4. Jarvinen TA, Kannus P, Maffulli N, Khan KM. Achilles tendon disorders: etiology and epidemiology, *Foot Ankle Clin*, 2005, 10(2):255-66.
5. Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients, *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 1991, 73(10):1507-1525.
6. Hartgerink P, Fessell DP, Jacobson JA, van Holsbeeck MT. Full-versus partial-thickness Achilles tendon tears: sonographic accuracy and characterization in 26 cases with surgical correlation, *Radiology*, 2001, 220(2):406-412.
7. Kålebo P, Goksör L-Å, Swärd L, Peterson L. Soft-tissue radiography, computed tomography, and ultrasonography of partial Achilles tendon ruptures, *Acta Radiologica*, 1990, 31(6):565-570.
8. Szaro P, Witkowski G, Śmigielski R, Krajewski P, Cizek B. Fascicles of the adult human Achilles tendon—an anatomical study, *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 2009, 191(6):586-593.

9. Behfar M, Sarrafzadeh-Rezaei F, Hobbenaghi R, Delirez N, Dalir-Naghadeh B. Enhanced mechanical properties of rabbit flexor tendons in response to intratendinous injection of adipose derived stromal vascular fraction, *Current stem cell research & therapy*, 2012, 7(3):173-178.
10. Pagorek S, Noehren B, Malone T. Principles of Rehabilitation for Muscle and Tendon Injuries, *Physical Rehabilitation of the Injured Athlete E-Book: Expert Consult-Online and Print*, 2011:89.
11. Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation, *Stem cell research & therapy*, 2017, 8(1):145.
12. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue engineering*, 2001, 7(2):211-228.
13. Desando G, Giavaresi G, Cavallo C, Bartolotti I, Sartoni F, Nicoli Aldini N, Martini L, Parrilli A, Mariani E, Fini M. Autologous bone marrow concentrate in a sheep model of osteoarthritis: new perspectives for cartilage and meniscus repair, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2016, 22(6):608-619.
14. Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. Viability of allogeneic bone marrow stromal cells following local delivery into patella tendon in rabbit model, *Cell transplantation*, 2004, 13(6):649-658.
15. Ouyang HW, Goh JC, Thambyah A, Teoh SH, Lee EH. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and

regeneration of rabbit Achilles tendon, *Tissue engineering*, 2003, 9(3):431-439.

16. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses, *Tissue engineering*, 2007, 13(12):2949-2955.
17. Sassoon AA, Ozasa Y, Chikenji T, Sun YL, Larson DR, Maas ML, Zhao C, Jen J, Amadio PC. Skeletal muscle and bone marrow derived stromal cells: a comparison of tenocyte differentiation capabilities, *Journal of Orthopaedic Research*, 2012, 30(11):1710-1718.
18. Martin P, Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing, *British Journal of Dermatology*, 2015, 173(2):370-378.
19. Pak J, Lee JH, Park KS, Park M, Kang L-W, Lee SH. Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications, *Journal of biomedical science*, 2017, 24(1):9.
20. Sampson S, Bemden AB-v, Aufiero D. Autologous bone marrow concentrate: review and application of a novel intra-articular orthobiologic for cartilage disease, *The Physician and sportsmedicine*, 2013, 41(3):7-18.
21. Benjamin M. Functional and developmental anatomy of tendons and ligaments, *Repetitive Morton. Disorders of the Upper Extremity*, 1995:185-203.
22. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair, *Journal of Orthopaedics for Physician Assistants* 2005, 87(1):187-202.

23. O'Brien M, *Anatomy of tendons*, in *Tendon Injuries*. 2005, Springer. p. 3-13.
24. Nourissat G, Berenbaum F, Duprez D. Tendon injury: from biology to tendon repair, *Nature Reviews Rheumatology*, 2015, 11(4):223.
25. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue, *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 2000, 10(6):312-320.
26. Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes ME. Mesenchymal Stem Cells Empowering Tendon Regenerative Therapies, *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12)
27. Chbinou N, Frenette J. Insulin-dependent diabetes impairs the inflammatory response and delays angiogenesis following Achilles tendon injury, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, 286(5):R952-7.
28. Benjamin M, Theobald P, Suzuki D, Toumi H. The anatomy of the Achilles tendon, *The Achilles Tendon*, 2007, 3(5-16).
29. Doral MN, Alam M, Bozkurt M, Turhan E, Atay OA, Dönmez G, Maffulli N. Functional anatomy of the Achilles tendon, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2010, 18(5):638-643.
30. Creaney L. Achilles tendon rupture. <https://www.bupa.co.uk/health-information/muscles-bones-joints/achilles-tendon-rupture>. 12 Ocak 2020
31. Palastanga N, Field D, Soames R, *Anatomy and human movement: structure and function*. Vol. 20056. 2006: Elsevier Health Sciences.

32. Bjur D. The human Achilles tendon Innervation and intratendinous production of nerve signal substances - of importance in understanding the processes of Achilles tendinosis, Faculty of Medicine, Surgical and Perioperative Sciences, Sports Medicine, Doktora Tezi, Umeå: Umeå University, 2010.
33. Arner O. Subcutaneous rupture of the Achilles tendon. A study of 92 cases, *Acta. Chir. Scandinavica Supplementum.*, 1959, 116(239):1-51.
34. Yıldızgören MT, Osmanoğlu K, Üstün N, Güler H, Turhanoglu AD. Aşil tendinozisinin konservatif tedavisi ve takipte ultrasonografinin yeri: olgu sunumu, *Türk Osteoporoz Dergisi*, 2015, 21(1):37-39.
35. Kvist M, *Achilles tendon overuse injuries: a clinical and pathophysiological study in athletes with special reference to Achilles paratenonitis*. 1991: Turun yliopisto.
36. Kvist M. Achilles tendon injuries in athletes, *Sports Medicine*, 1994, 18(3):173-201.
37. Selvanetti A, Cipolla M, Puddu G. Overuse tendon injuries: basic science and classification, *Operative Techniques in Sports Medicine*, 1997, 5(3):110-117.
38. Tan J, Nobles T. Achilles Tendinosis.
<https://www.bayridgephysio.com/single-post/2017/12/13/Achilles-Tendinosis>. 05 Ocak 2020
39. Wang M-X, Wei A, Yuan J, Clippe A, Bernard A, Knoop B, Murrell GA. Antioxidant enzyme peroxiredoxin 5 is upregulated in degenerative human tendon, *Biochemical and biophysical research communications*, 2001, 284(3):667-673.

40. Oakes BW. Tissue healing and repair: tendons and ligaments, *Rehabilitation of sports injuries: scientific basis*, 2003:28-98.
41. Tillan L. Properties of dense connective tissue and wound healing, *Management of common musculoskeletal disorders*, 1996:8-21.
42. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair, *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 84(222-39).
43. Bruns J, Kampen J, Kahrs J, Plitz W. Achilles tendon rupture: experimental results on spontaneous repair in a sheep-model, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2000, 8(6):364-369.
44. Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Kuo YR, Huang HC, Huang YT, Sun YC, Wang FS. Extracorporeal shock waves promote healing of collagenase-induced Achilles tendinitis and increase TGF- β 1 and IGF-I expression, *Journal of Orthopaedic Research*, 2004, 22(4):854-861.
45. Speed C, Richards C, Nichols D, Burnet S, Wies J, Humphreys H, Hazleman B. Extracorporeal shock-wave therapy for tendonitis of the rotator cuff: a double-blind, randomised, controlled trial, *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 2002, 84(4):509-512.
46. Gerdesmeyer L, Wagenpfeil S, Haake M, Maier M, Loew M, Wörtler K, Lampe R, Seil R, Handle G, Gassel S. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of chronic calcifying tendonitis of the rotator cuff: a randomized controlled trial, *Jama*, 2003, 290(19):2573-2580.

47. Nakamura N, Horibe S, Matsumoto N, Tomita T, Natsuume T, Kaneda Y, Shino K, Ochi T. Transient introduction of a foreign gene into healing rat patellar ligament, *The Journal of clinical investigation*, 1996, 97(1):226-231.
48. Lou J, Kubota H, Hotokezaka S, Ludwig FJ, Manske PR. In vivo gene transfer and overexpression of focal adhesion kinase (pp125 FAK) mediated by recombinant adenovirus-induced tendon adhesion formation and epitenon cell change, *Journal of orthopaedic research*, 1997, 15(6):911-918.
49. Özkan N, Altan L, Bingöl Ü, Akln S, Yurtkuran M. Investigation of the supplementary effect of GaAs laser therapy on the rehabilitation of human digital flexor tendons, *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 2004, 22(2):105-110.
50. Buckingham ME. Muscle: the regulation of myogenesis, *Current opinion in genetics & development*, 1994, 4(5):745-751.
51. Satomura K, Krebsbach P, Bianco P, Gehron Robey P. Osteogenic imprinting upstream of marrow stromal cell differentiation, *Journal of Cellular Biochemistry*, 2000, 78(3):391-403.
52. Cao Y, Liu Y, Liu W, Shan Q, Buonocore SD, Cui L. Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model, *Plastic and reconstructive surgery*, 2002, 110(5):1280-1289.
53. Kannus P, Jozsa L, Natri A, Järvinen M. Effects of training, immobilization and remobilization on tendons, *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, 1997, 7(2):67-71.
54. Maffulli N, King JB. Effects of physical activity on some components of the skeletal system, *Sports Medicine*, 1992, 13(6):393-407.

55. David L, Grood ES, Noyes FR, Zernicke RE. Biomechanics of ligaments and tendons, *Exercise and sport sciences reviews*, 1978, 6(1):125-182.
56. Akeson W, Amiel D, Mechanic G, Woo SL, Harwood F, Hamer M. Collagen cross-linking alterations in joint contractures: changes in the reducible cross-links in periarticular connective tissue collagen after nine weeks of immobilization, *Connective tissue research*, 1977, 5(1):15-19.
57. Banes AJ, Horesovsky G, Larson C, Tsuzaki M, Judex S, Archambault J, Zernicke R, Herzog W, Kelley S, Miller L. Mechanical load stimulates expression of novel genes in vivo and in vitro in avian flexor tendon cells, *Osteoarthritis and Cartilage*, 1999, 7(1):141-153.
58. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT), *Cytotherapy*, 2013, 15(6):641-648.
59. Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update, *World journal of stem cells*, 2011, 3(4):25.
60. You D, Jang MJ, Kim BH, Song G, Lee C, Suh N, Jeong IG, Ahn TY, Kim C-S. Comparative study of autologous stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells for erectile function recovery in a rat model of cavernous nerve injury, *Stem cells translational medicine*, 2015, 4(4):351-358.

61. Semon JA, Zhang X, Pandey AC, Alandete SM, Maness C, Zhang S, Scruggs BA, Strong AL, Sharkey SA, Beuttler MM. Administration of murine stromal vascular fraction ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis, *Stem cells translational medicine*, 2013, 2(10):789-796.

62. Charles-de-Sa L, Gontijo-de-Amorim NF, Maeda Takiya C, Borojevic R, Benati D, Bernardi P, Sbarbati A, Rigotti G. Antiaging treatment of the facial skin by fat graft and adipose-derived stem cells, *Plast Reconstr Surg*, 2015, 135(4):999-1009.

63. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, Paydar KZ, Evans GR, Widgerow AD. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature, *Journal Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2016, 69(2):170-9.

64. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue, *SpringerPlus*, 2015, 4(713-713).

65. Matsumoto D, Sato K, Gonda K, Takaki Y, Shigeura T, Sato T, Aiba-Kojima E, Iizuka F, Inoue K, Suga H. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection, *Tissue engineering*, 2006, 12(12):3375-3382.

66. SundarRaj S, Deshmukh A, Priya N, Krishnan VS, Cherat M, Majumdar AS. Development of a system and method for automated isolation of stromal vascular fraction from adipose tissue lipoaspirate, *Stem cells international*, 2015, 2015(

67. Riis S, Zachar V, Boucher S, Vemuri M, Pennisi C, Fink T. Critical steps in the isolation and expansion of adipose-derived stem cells for translational therapy, *Expert reviews in molecular medicine*, 2015, 17(
68. Knoepfler P. What exactly is stromal vascular fraction (SVF)? <https://ipsell.com/2019/07/what-exactly-is-stromal-vascular-fraction-svf/>. 05 Ocak 2020
69. Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells, *Cytotherapy*, 2013, 15(8):979-985.
70. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications, *Plastic and reconstructive surgery*, 2013, 132(4):1017-1026.
71. Tamburino S, Lombardo GA, Tarico MS, Perrotta RE. The role of nanofat grafting in vulvar lichen sclerosus: a preliminary report, *Archives of plastic surgery*, 2016, 43(1):93.
72. Kemaloğlu CA. Nanofat grafting under a split-thickness skin graft for problematic wound management, *Springerplus*, 2016, 5(1):1-4.
73. Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series, *Journal of medical case reports*, 2011, 5(1):296.
74. 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, *Molecular biology of the cell*, 2002, 13(12):4279-4295.

75. de Girolamo L, Grassi M, Viganò M, Orfei CP, Montrasio UA, Uselli F. Treatment of achilles tendinopathy with autologous adipose-derived stromal vascular fraction: results of a randomized prospective clinical trial, *Orthopaedic journal of sports medicine*, 2016, 4(7_suppl4):2325967116S00128.
76. Lee SY, Kim W, Lim C, Chung SG. Treatment of lateral epicondylitis by using allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells: A pilot study, *Stem Cells*, 2015, 33(10):2995-3005.
77. Steinert AF, Rackwitz L, Gilbert F, Nöth U, Tuan RS. Concise review: the clinical application of mesenchymal stem cells for musculoskeletal regeneration: current status and perspectives, *Stem cells translational medicine*, 2012, 1(3):237-247.
78. Gupta PK, Das AK, Chullikana A, Majumdar AS. Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis, *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3(4):25.
79. Lewandowski K, Complak A, Hellmann A. Microscopic examination of bone marrow aspirates in malignant disorders of haematopoiesis--a comparison of two slide preparation techniques, *Ann Hematol*, 2012, 91(4):497-505.
80. Namiri M, Baharvand H, Aghdami N. Methods for isolation of bone marrow stem cells: comparative analysis, *CELL JOURNAL (YAKHTEH)* 2011, 12(4):439-446.
81. Yeo C, Saunders N, Locca D, Flett A, Preston M, Brookman P, Davy B, Mathur A, Agrawal S. Ficoll-Paque™ versus Lymphoprep™: a comparative study of two density gradient media for therapeutic bone marrow mononuclear cell preparations, *Regenerative medicine*, 2009, 4(5):689-696.

82. Neyton L, Godenèche A, Nové-Josserand L, Carrillon Y, Cléchet J, Hardy MB. Arthroscopic suture-bridge repair for small to medium size supraspinatus tear: healing rate and retear pattern, *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 2013, 29(1):10-17.
83. Imam MA, Abdelkafy A. Outcomes following arthroscopic transosseous equivalent suture bridge double row rotator cuff repair: a prospective study and short-term results, *SICOT-J*, 2016, 2(
84. Gomes JLE, Da Silva RC, Silla LM, Abreu MR, Pellanda R. Conventional rotator cuff repair complemented by the aid of mononuclear autologous stem cells, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2012, 20(2):373-377.
85. Hernigou P, Lachaniette CHF, Delambre J, Zilber S, Duffiet P, Chevallier N, Rouard H. Biologic augmentation of rotator cuff repair with mesenchymal stem cells during arthroscopy improves healing and prevents further tears: a case-controlled study, *International orthopaedics*, 2014, 38(9):1811-1818.
86. Stein BE, Stroh DA, Schon LC. Outcomes of acute Achilles tendon rupture repair with bone marrow aspirate concentrate augmentation, *International orthopaedics*, 2015, 39(5):901-905.
87. Campbell KJ, Boykin RE, Wijdicks CA, Giphart JE, LaPrade RF, Philippon MJ. Treatment of a hip capsular injury in a professional soccer player with platelet-rich plasma and bone marrow aspirate concentrate therapy, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2013, 21(7):1684-1688.

88. Gott M, Ast M, Lane LB, Schwartz JA, Catanzano A, Razzano P, Grande DA. Tendon phenotype should dictate tissue engineering modality in tendon repair: a review, *Discovery medicine*, 2011, 12(62):75-84.
89. Moon YL, Jo S-H, Song CH, Park G, Lee HJ, Jang SJ. Autologous bone marrow plasma injection after arthroscopic debridement for elbow tendinosis, *Annals Academy of Medicine Singapore*, 2008, 37(7):559.
90. Pascual-Garrido C, Rolón A, Makino A. Treatment of chronic patellar tendinopathy with autologous bone marrow stem cells: a 5-year-followup, *Stem cells international*, 2012, 2012(
91. Bain B. Bone marrow biopsy morbidity: review of 2003, *Journal of clinical pathology*, 2005, 58(4):406-408.
92. Burkle CM, Harrison BA, Koenig LF, Decker PA, Warner DO, Gastineau DA. Morbidity and mortality of deep sedation in outpatient bone marrow biopsy, *American journal of hematology*, 2004, 77(3):250-256.
93. Bürgisser GM, Calcagni M, Bachmann E, Fessel G, Snedeker JG, Giovanoli P, Buschmann J. Rabbit Achilles tendon full transection model—wound healing, adhesion formation and biomechanics at 3, 6 and 12 weeks post-surgery, *Biology open*, 2016, 5(9):1324-1333.
94. Chen L, Liu J-P, Tang K-L, Wang Q, Wang G-D, Cai X-H, Liu X-M. Tendon derived stem cells promote platelet-rich plasma healing in collagenase-induced rat achilles tendinopathy, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2014, 34(6):2153-2168.
95. Yılmaz G, Doral MN, Turhan E, Dönmez G, Atay AÖ, Kaya D. Surgical treatment of achilles tendon ruptures: the comparison of open and

percutaneous methods in a rabbit model, *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2014, 20(5):311-318.

96. Stoll C, John T, Conrad C, Lohan A, Hondke S, Ertel W, Kaps C, Endres M, Sittinger M, Ringe J. Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation, *Biomaterials*, 2011, 32(21):4806-4815.
97. Romero A, Barrachina L, Ranera B, Remacha A, Moreno B, de Blas I, Sanz A, Vázquez F, Vitoria A, Junquera C. Comparison of autologous bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells, and platelet rich plasma, for treating surgically induced lesions of the equine superficial digital flexor tendon, *The Veterinary Journal*, 2017, 224(76-84).
98. Chen J, Yu Q, Wu B, Lin Z, Pavlos N, Xu J, Ouyang H, Wang A, Zheng M-H. Autologous Tenocyte Therapy for Experimental Achilles Tendinopathy in a Rabbit Model, *Tissue engineering. Part A*, 2011, 17(2037-48).
99. Sigrist RM, Liao J, El Kaffas A, Chammas MC, Willmann JK. Ultrasound elastography: review of techniques and clinical applications, *Theranostics*, 2017, 7(5):1303.
100. Tan S, Kudas S, Ozcan AS, Ipek A, Karaoglanoglu M, Arslan H, Bozkurt M. Real-time sonoelastography of the Achilles tendon: pattern description in healthy subjects and patients with surgically repaired complete ruptures, *Skeletal Radiol*, 2012, 41(9):1067-72.
101. Tan S, Kudaş S, Özcan AS, İpek A, Karaoğlanoğlu M, Arslan H, Bozkurt M. Real-time sonoelastography of the Achilles tendon: pattern description in healthy subjects and patients with surgically repaired complete ruptures, *Skeletal Radiol*, 2012, 41(9):1067-72.

102. Behfar M, Sarrafzadeh-Rezaei F, Hobbenaghi R, Delirezh N, Dalir-Naghadeh B. Adipose-derived stromal vascular fraction improves tendon healing in rabbits, *Chin J Traumatol*, 2011, 14(6):329-35.
103. Smith RKW, Werling NJ, Dakin SG, Alam R, Goodship AE, Dudhia J. Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy, *PloS one*, 2013, 8(9)
104. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, Idris SB. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison, *Stem cell research & therapy*, 2018, 9(1):168.
105. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells, *Stem cells and development*, 2012, 21(14):2724-2752.
106. Noël D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, Cousin B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal–stromal cells despite similar differentiation potentials, *Experimental cell research*, 2008, 314(7):1575-1584.
107. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Immunology letters*, 2009, 126(1-2):37-42.
108. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P, Kyurkchiev S. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or

adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro, *Cell biology international*, 2008, 32(4):384-393.

109. De Zordo T, Chhem R, Smekal V, Feuchtner G, Reindl M, Fink C, Faschingbauer R, Jaschke W, Klauser A. Real-time sonoelastography: findings in patients with symptomatic achilles tendons and comparison to healthy volunteers, *Ultraschall in der Medizin-European Journal of Ultrasound*, 2010, 31(04):394-400.
110. Drakonaki E, Allen G, Wilson D. Real-time ultrasound elastography of the normal Achilles tendon: reproducibility and pattern description, *Clinical radiology*, 2009, 64(12):1196-1202.
111. Klauser AS, Miyamoto H, Tamegger M, Faschingbauer R, Moriggl B, Klima G, Feuchtner GM, Kastlunger M, Jaschke WR. Achilles tendon assessed with sonoelastography: histologic agreement, *Radiology*, 2013, 267(3):837-842.
112. Ooi C-C, Malliaras P, Schneider M, Connell DA. "Soft, hard, or just right?" Applications and limitations of axial-strain sonoelastography and shear-wave elastography in the assessment of tendon injuries, *Skeletal radiology*, 2014, 43(1):1-12.
113. Kuo P-L, Li P-C, Shun C-T, Lai J-S. Strain measurements of rabbit Achilles tendons by ultrasound, *Ultrasound in medicine & biology*, 1999, 25(8):1241-1250.
114. Sconfienza LM, Silvestri E, Cimmino MA. Sonoelastography in the evaluation of painful Achilles tendon in amateur athletes, *Clin Exp Rheumatol*, 2010, 28(3):373-378.

115. Yamamoto Y, Yamaguchi S, Sasho T, Fukawa T, Akatsu Y, Akagi R, Yamaguchi T, Takahashi K, Nagashima K, Takahashi K. Quantitative US elastography can be used to quantify mechanical and histologic tendon healing in a rabbit model of Achilles tendon transection, *Radiology*, 2017, 283(2):408-417.
116. Ahn KS, Lee NJ, Kang CH, Lee YH, Jeon HJ. Serial Changes of Tendon Histomorphology and Strain Elastography After Induced Achilles Tendinopathy in Rabbits: An In Vivo Study, *Journal of Ultrasound in Medicine*, 2017, 36(4):767-774.
117. Maffulli N, Longo UG, Franceschi F, Rabitti C, Denaro V. Movin and Bonar scores assess the same characteristics of tendon histology, *Clinical orthopaedics and related research*, 2008, 466(7):1605-1611.
118. Yılmaz G, Doral M, Turhan E, Donmez G, Atay A, Kaya D. Surgical treatment of Achilles tendon ruptures: the comparison of open and percutaneous methods in a rabbit model, *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery: TJTES*, 2014, 20(311-318).
119. Chen J, Willers C, Xu J, Wang A, Zheng M-H. Autologous Tenocyte Therapy Using Porcine-Derived Bioscaffolds for Massive Rotator Cuff Defect in Rabbits, *Tissue engineering*, 2007, 13(1479-91).
120. Meier Bürgisser G, Calcagni M, Bachmann E, Fessel G, Snedeker JG, Giovanoli P, Buschmann J. Rabbit Achilles tendon full transection model - wound healing, adhesion formation and biomechanics at 3, 6 and 12 weeks post-surgery, *Biol Open*, 2016, 5(9):1324-33.

8. EKLER

EK-1.Etik Kurul İzni

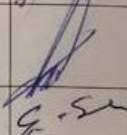
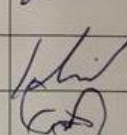

SAKİ YENİLLİ DENEY HAYVANLARI ÜRETİM VE UYGULAMALABORATUVARI TİC. LMT. ŞTİ.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 12/11/2019
TOPLANTI NO : 03
DOSYA NO : 02
KARAR NO : 08

Yürütücülüğünü Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji ABD dan Prof. Dr. Murat BOZKURT, Yıldırım Beyazıt Ün. Tıbbi Biyoloji ABD dan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK, Yıldırım Beyazıt Ün. Ortopedi ve Travmatoloji ABD dan Dr. Öğr. Üyesi Safa GÜRSOY, Ve Kas İskelet Sistemi ve Rejeneratif Tıp ABD dan Yüksek Lisans Öğrencisi Emin Yusuf AYDIN ın katıldığı

Stromal Vasküler Fraksiyon İle Kemik İliği Konsantrisinin Birlikte Kullanımlarının Tek Tek Kullanımlarına Göre Aşil Tendonu Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması adlı çalışmanın Saki Yenilli Deneysel Hayvanları Üretim Ve Uygulama Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

HAYVAN TÜRÜ : Yenezelanda Tavşanı
HAYVAN SAYISI : 30
GEÇERLİLİK SÜRESİ : 12/11/2019 – 12/11/2020

ETİK KURUL ÜYELERİ			
ADI SOYADI	ÜNVANI	GÖREVİ	İMZASI
MUSTAFA GÜRGEN	VET.HEKİM	ETİK KURUL BAŞKANI	
SAKİ YENİLLİ	PROTEZ-ORTEZ TEKNİKERİ	BAŞKAN VEK.	
HÜSEYİN HAYRİ KERTMAN	BEYİN CERRAHI	İNVİVO ÇALIŞACAK ÜYE	
ERCAN ŞAHİN	BİYOLOG	SİVİL TOPLUM KURULUŞUNA KAYITLI ÜYE	
SELİM KOCA	TEKNİKER	SEKRETER	
EMRAH SATILMIŞ	EDITÖR	SİVİL ÜYE	
BORA GÜRER	BEYİN CERRAHI	İNVİVO ÇALIŞACAK ÜYE	

EK-2.Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Emin Yusuf AYDIN
Doğum tarihi	: 16.04.1990
Doğum yeri	: Ankara
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: Türkiye Cumhuriyeti
Adres	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kas İskelet Sistemi ve Rejeneratif Tıp Anabilim Dalı, Ankara
Tel	: 05442876360
Faks	: -
E-mail	: eminyusufaydin@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Kalaba Anadolu Lisesi
Lisans	: Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 72,5 YÖKDİL

