TENDON HÜCRELERİ KULLANILARAK HAZIRLANAN ALLOGRAFTLARIN SIÇAN AŞİL TENDONU REJENERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ALLOGRAFTS CONSTRUCTED WITH TENDON CELLS ON RAT ACHILLES TENDON REGENERATION

CANSIN GÜNGÖRMÜŞ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. DÜRDANE KOLANKAYA

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

CANSIN GÜNGÖRMÜŞ'ün hazırladığı **"Tendon Hücreleri Kullanılarak Hazırlanan Allograftların Sıçan Aşil Tendonu Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması"** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Unvanı, Adı ve Soyadı) _____

Danışman

(Unvanı, Adı ve Soyadı) _____

Üye

(Unvanı, Adı ve Soyadı) _____

Üye

(Unvanı, Adı ve Soyadı) _____

Üye

(Unvanı, Adı ve Soyadı) _____

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İTHAF

Biricik eşim Savaş'a…

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında:

- tez içindeki bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

07 / 01 / 2013

Cansın Güngörmüş

ÖZET

TENDON HÜCRELERİ KULLANILARAK HAZIRLANAN ALLOGRAFTLARIN SIÇAN AŞİL TENDONU REJENERASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

CANSIN GÜNGÖRMÜŞ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. DÜRDANE KOLANKAYA

Ocak 2013, 116 sayfa

Tendon, kaslar tarafından üretilen gerim kuvvetini iskelet sistemi üzerine aktarır. Tendon sakatlanmaları sıklıkla rastlanan bir durumdur. Tendon ve ligamentlerin rejenerasyon kapasiteleri vücuttaki diğer dokulara oranla daha az olduğu için; sakatlanmalar sonrasındaki doğal iyileşme mekanizmaları dokunun tümüyle onarılması için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi olan hücresiz veya yüzeyine hücre implantasyonu yapılmış graftların (yama) kullanılması yaygındır.

Mevcut uygulamalar kapsamında karşılaşılan en büyük sorun, kullanılan graftın biyolojik ve materyal özelliklerinin asıl doku ile karşılaştırıldığında daha zayıf olmasıdır. Biyolojik ihtiyaçları karşılayabilmek amacı ile biyomateryallerin geliştirilmesi yönünde pek çok araştırma yürütülmektedir. Bu araştırmalar arasında en ilgi çekici olan, hücreden arındırılmış allojenik dokuların, yüzeyine otolog hücre implantasyonu yapıldıktan sonra yama (graft) amaçlı kullanımıdır.

Bu çalışmada, tenositlerin hücresiz tendon matrikslerine gömülmesi ile elde edilen allograftların sıçan Aşil tendonu rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin histolojik, moleküler ve biyomekanik testler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, sıçan Aşil tendonu tenositleri izole edilerek primer ve sekonder kültürleri yapılmıştır. Bu kültürlerden elde edilen tenositler, hücreden arındırılmış tendon matrikslerine (DCM) gömülerek elde edilen kompozitler Aşil tendonu defektli sıçanlara transplante edilmiştir. Kullanılan hücrelerin transplantasyon öncesi fenotipik karakterizasyonu, immünositokimyasal boyama teknikleri ve eşzamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmıştır. Transplante edilen allograftların (kompozitlerin) iyileşme üzerindeki etkinliği histopatolojik incelemeler yapılarak ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada, tendon rejenerasyonu ve doku mühendisliği alanında mevcut olan ve ortaya çıkabilecek yeni problemlerin çözümüne yönelik yeni katkılar sağlamak amaçlanmıştır. Çalışmamızda ilk defa DCM+Tenosit kompozitlerinin Aşil tendonu rejenerasyonu üzerindeki etkinliği ortaya koyulmuştur. Bulgularımız, DCM+Tenosit kompozitlerinin tendon defektlerinde uygulanabilirliği konusundaki bilgi eksikliğini gidererek; rejenerasyonu hızlandırdığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Aşil tendonu, RT-PCR, histoloji, biyomekanik test, deselülerize matriks, doku mühendisliği.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ALLOGRAFTS CONSTRUCTED WITH TENDON CELLS ON RAT ACHILLES TENDON REGENERATION

CANSIN GÜNGÖRMÜŞ

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. DÜRDANE KOLANKAYA

January 2013, 116 pages

Tendon transmits the tensile force produced by muscles to skeletal system. Recently, tendon tissue injuries are frequently encountered situations. Because the regeneration capacities of tendons and ligaments are lower when compared to other tissues in the body; the natural regeneration mechanisms are insufficient for the tissue to heal completely after injury. According to this reason, the application of either decellularized or cell seeded grafts' is inevitable.

The main problem that encounters within these applications is the impotency of the grafts' biological and material specifications when compared to the native tissue. In order to provide the biological needs, there are several researches going on in advancing biomaterials. One of the most impressive researches is the application of decellularized allogenic tissues as grafts after autologous cell implantation.

The goal of this study was to determine the effects of tenocyte seeded decellularized tendon matrix allografts on the regeneration of rat Achilles tendon by histologic, molecular and biomechanic tests. With this purpose, tenocytes from rat Achilles tendon were isolated and primer/seconder cultures were done. Tenocytes obtained from cell culture were seeded on decellularized tendon matrixes (DCM) and these composites were transplanted to rats with Achilles tendon defect. The phenotypic characterization of the cells were done by immunocytochemical staining techniques and realtime-polimerase chain reaction. The regenerative effects of transplanted allografts (composites) were determined by histopathological investigation. With this study, we aimed to make contributions to solve present and future encountering problems in tendon regeneration and tissue engineering fields. The effect of DCM+tenocyte composites on Achilles tendon regeneration was demonstrated for the first time. Our results improved the knowledge about the application of DCM+tenocyte composites for tendon defects by accelerating the regeneration process.

Keywords: Achilles tendon, RT-PCR, histology, biomechanical test, decellularized matrix, tissue engineering.

TEŞEKKÜR

Çalışmam boyunca değerli bilgi ve yardımlarıyla desteğini esirgemeyen ve bana her konuda yardımcı olan danışman hocam Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın planlanması ve tamamlanması sürecindeki bilimsel katkıları ve sağladıkları olanaklar için Tez İzleme Komitesi hocalarım Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ ve Doç. Dr. Ö. Aylin GÜRPINAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamın projelendirilmesi ve deneysel aşaması için sağladığı proje desteğinden ötürü Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), Temel Bilimler Araştırma Grubu'na teşekkür ederim. Tez çalışmamın hücre kültürü aşaması için her türlü imkân ve olanaklarını bana açan Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı'na ve ihtiyacım olan her an yanımda olarak beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın biyomekanik gerim deneyleri için imkan sağlayan Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na , Prof. Dr. Necati ÖZKAN'a ve değerli zamanını bana ayıran Uzm. Ali GÜZEL'e; ayrıca veri değerlendirmesi için büyük emeği olan Yrd. Doç. Dr. Erkin AYDIN'a teşekkürü borç bilirim. Çalışmamın deney hayvanları ve cerrahi uygulama aşaması için Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi ve Cerrahi Araştırma Ünitesi'ne; cerrahi operasyonlarda pratik becerimi kazanmamda çok büyük emeği olan sevgili arkadaşım Dr. Alper ÇETİNKAYA'ya teşekkür ederim. Tezimin pek çok aşamasında desteğini gördüğüm değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Aysun (Kılıç) SÜLOĞLU ve Araş. Gör. Senem FIRAT'a yardımlarından dolayı teşekkürü borç bilirim. Histopatolojik değerlendirmelerin yapılmasında bana yol gösteren arkadaşım Doç. Dr. Aslı KORKMAZ'a; tezimin baskı aşaması için düzenlenmesi ve tez sunumumun hazırlanmasında bana sabırla yardımcı olan arkadaşım Dr. Ahmet KOLUMAN'a teşekkür ederim.

Doktora çalışması ve deneylerim boyunca daima yanımda olarak beni gece gündüz demeden destekleyen sevgili eşim Savaş GÜNGÖRMÜŞ'e; öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bana inanan canım anne ve babama sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI .....
İTHAF .....
ETİK .....
ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER VE KISALMALAR vi
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİ 3
2.1. Tendon Biyolojisi 3
2.2. Tendonun Yapısal Özellikleri 5
2.3. Hücresiz Matrikslerin Graft Materyali Olarak Kullanılması 6
2.3.1. Fiziksel Yöntemler 8
2.3.2. Kimyasal Yöntemler 9
2.3.2.1. Alkalin ve Asit Uygulaması 9
2.3.2.2. İyonik Olmayan Deterjanlar 9
2.3.2.3. İyonik Deterjanlar 10
2.3.2.4. Şelatlaştırıcı Ajanlar 10
2.3.3. Enzimatik Yöntemler 11
2.4. Hücre Üreme Eğrisi 11
2.5. β-Galaktozidaz Aktivitesi 13
2.6. Tendonun İyileşme Evreleri 14
2.7. Tendon Biyomekaniği 15
3. MATERYAL VE YÖNTEM 17
3.1. Materyal 17
3.1.1. Deney Hayvanları 17
3.1.2. Cerrahi Operasyon İçin Kullanılan Madde ve Malzemeler 18
3.2. Yöntem 18
3.2.1. Tenosit İzolasyonu ve Kültürü 18
3.2.2. Hücre Üreme Eğrisi Çıkartılması 21
3.2.3. β-Galaktozidaz Aktivitesi ile Hücresel Yaşlanmanın Gösterilmesi 22
3.2.4. İkili-İmmünofloresan Boyama Protokolü 23
3.2.5. Eşzamanlı - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) 24
3.2.6. Tendon Matrikslerinin İzolasyonu 27

3.2.7. Tendon Matrikslerinin Hücreden Arındırılması (Deselülerizasyonu) 28
3.2.8. Deselülerize Matrikslere Tenositlerin Gömülmesi (Reselülarizasyonu) 29
3.2.9. Kontrol Grubu (n=30) Cerrahi Protokolü 31
3.2.10. DCM Kontrol Grubu (n=30) Cerrahi Protokolü 33
3.2.11. DCM+Tenosit Grubu (n=30) Cerrahi Protokolü 35
3.2.12. Postoperatif Uygulama 36
3.2.13. Histopatolojik İncelemeler 37
3.2.14. Biyomekanik Ölçümler 38
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 40
4.1. Sonuçlar 40
4.1.1. Tenosit Kültürü 40
4.1.2. Hücre Üreme Eğrileri 41
4.1.3. β-Galaktozidaz Aktivitesi 42
4.1.4. İkili-İmmünofloresan Boyama 43
4.1.5. RNA İzolasyonu ve Nanodrop Ölçüm Sonuçları 47
4.1.6. RT-PCR 47
4.1.7. Deselülerize Tendon Matrikslerinin Kontrolü 52
4.1.8. Histopatolojik İnceleme Sonuçları 53
4.1.9. Biyomekanik Ölçüm Sonuçları 77
4.2. Tartışma 93
KAYNAKLAR 102
ÖZGEÇMİŞ 111

SİMGELER VE KISALMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
%	Yüzde değeri
µg	Mikrogram
µmol	Mikromol
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare
CO_2	Karbondioksit
HCl	Hidroklorik asit
IU	Ünite
pH	Hidrojenin gücü
mJ	Milijul
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ml	Mililitre
MPa	Megapaskal
N	Newton
p	Anlamlılık seviyesi
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

ANOVA	Varyans analizi
cDNA	Komplementer DNA
Col	Kollajen geni
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCM	Hücreden arındırılmış tendon matriksi

DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM/F12	F12 karışımlı Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Hücrelerarası alan
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	Etilenglikoltetraasetik asit
FBS	Fötal sığır serumu
FITC	Floresan izotiyosiyanat
GAG	Glikozaminoglikan
Gapdh	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz geni
GC%	Guanin sitozin yüzdesi
GP	Glikoprotein
H&E	Hematoksilen ve Eozin boyası
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
PG	Proteoglikan
PLGA	DL-laktid-ko-glikolid
RNA	Reoksiribonükleik asit
RT-PCR	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
Scx	Scleraxis geni
SDS	Sodyum dodesil sülfat
Tm°C	Erime derecesi
Tnmd	Tenomodulin geni
Tnsc	Tenascin-C geni
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu

1. GİRİŞ

Tendon, kaslar tarafından üretilen gücü kemiklere ileterek, fazla gerim nedeniyle oluşabilecek kas hasarını engeller [1]. Yüksek mekanik gerime sahip bu doku, esneklik ve yoğun aktivite sırasında gereken miktarda elastikiyet gösterebilme özelliğine sahiptir [2]. Tendonun gerim kuvvetine karşı dayanıklılığı, dokunun kalınlığı ve içerdiği kollajen molekülü tiplerine bağlı olarak değişiklik gösterir. Bu sağlam yapı sayesinde $1cm^{2}$'lik bir tendon 500-1,000kg yüke dayanabilir [3]. Yüksek fiziksel aktivite sırasında tendon üzerine çok yüksek miktarda yük binmesi kaçınılmazdır. Bu nedenle, sporcuların özellikle de atletlerin Aşil tendonları ani ve aşırı miktarda yırtılma ve kopma gibi sakatlanmalar için uygun hedefler haline gelmektedir.

Normal fizyolojik koşullar altında ergin bir bireye ait tendon yapısında diğer dokulara oranla daha az miktarda hücre ve damarlanma görülür. Doku içerisinde yer alan tenositlerin mitotik aktivitesi son derece düşüktür [4]. Bazı araştırmacılara göre tendon sakatlanmaları sonrasında iyileşme süresinin diğer dokulara oranla daha geç gerçekleşmesinin nedeni düşük mitotik aktivitedir [5,6]. Çeşitli doku mühendisleri tarafından bu duruma çözüm üretebilmek amacı ile *in vitro* koşullarda biyopolimer yüzeyine gömülen tenositler ya da *in vitro* koşullarda farklılaştırılmış kemik iliği ve otolog mezenşimal hücreler kullanılmaya başlanmıştır [7,8,9,10]. Yakın zamanda bu tip yöntemlerin deri ve kalp dokusu rejenerasyonlarında son derece olumlu sonuçlar verdiği rapor edilmiş ve her iki dokunun da hücreden arındırıldıktan sonra yüzeyine otolog hücre implantasyonu yapılarak sağlam graft materyalleri olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır. Bu araştırmalarda kullanılan yöntemlerin tendon dokusu için de uygun olduğu Kryger ve arkadaşları [11] tarafından gösterilmiştir.

Çalışmamızda, tenositlerin hücresiz tendon matrikslerine gömülmesi ile elde edilen allograftların tendon rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin histolojik, moleküler ve biyomekanik testler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, tenositler izole edilerek primer ve sekonder kültürlerinin yapılması çalışmanın ilk basamağını oluşturmuştur. Tüm *in vitro* ortamlar, araştırmacının daha önce aynı hücrelerin uzun süreli *in vitro* kültürdeki

davranışlarını gözlemlemek amacıyla yapmış olduğu çalışma şartlarına göre hazırlanmıştır [12].

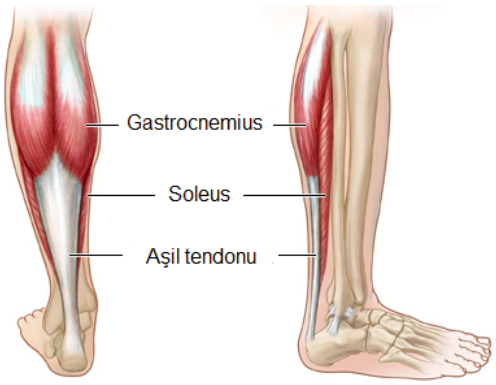
İkinci basamak, kullanılan hücrelerin transplantasyon öncesi genotipik ve fenotipik karakterizasyonun, immünositokimyasal boyama teknikleri ve eşzamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu ile yapılmasıdır. İndüktör olarak, tip 1 kollajen – *Col1*, tip 3 kollajen – *Col3*, tip 5 kollajen – *Col5*; tendon-spesifik marker tenomodulin - *Tnmd* ve tenaskin-C - *Tnsc* olarak bilinen tendon matriks proteininin ve genlerinin üretimi incelenmiştir. Tip 2 kollajen – *Col2* ise özellikle kıkırdak dokusuna ait bir protein ve gen olması nedeniyle her iki teknikte de negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Böylece hücrelerin transplantasyon öncesinde *in vitro* koşullarda geçirdikleri süre boyunca genotipik ve fenotipik ifadelerine dair veriler elde edilerek; hangi özellikleri taşıyan hücrelerin iyileşme üzerinde ne tip bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Mevcut kaynaklarda yer alan çalışmalarda böyle bir teknik uygulanmadığı için, transplantasyonda kullanılan hücrelerin hangi özelliğinin iyileşmeyi arttırıcı etkisi olduğuna dair veriler bulunmamaktadır. Bu çalışma ile elde edilen veriler bu konu hakkında doku mühendisliği bilimine katkıda bulunmuştur.

Üçüncü basamak, bu kültürlerden elde edilen tenositlerin, hücreden arındırılmış tendon matrikslerine (DCM) gömülerek, elde edilen graftların Aşil tendonu defektli sıçanlara transplante edilmesidir. Mevcut kaynaklara göre tendon rejenerasyonu yaklaşık 6 ay boyunca devam eden inflamasyon, tekrar şekillenme ve olgunlaşma aşamalarından oluşan uzun bir süreçtir [13,14]. Çalışmamızın üçüncü aşamasında bu kaynak verilerine dayanarak 6 aylık bir süre boyunca sıçanlardaki rejenerasyonun gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda uygulama 2, 4, 6, 8, 12 ve 24. haftalarda sonlandırılmış; gruplardan elde edilen dokuların yarısı histopatolojik inceleme için, diğer yarısı ise mekanik gerim testlerinde kullanılmıştır. İmplantasyonu takip eden bu dönemlerin her birisi iyileşmenin farklı aşamalarını gözlemlemek için büyük önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİ

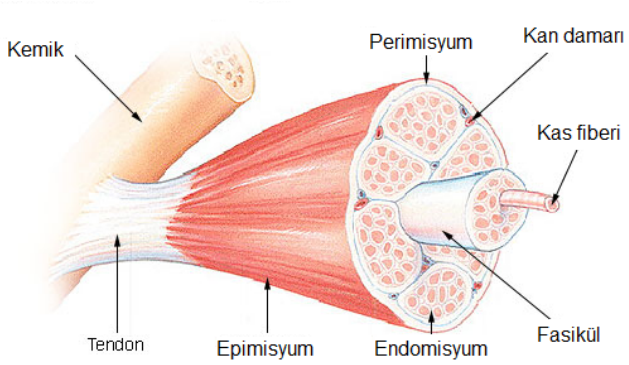
2.1. Tendon Biyolojisi

Tendon, kaslar tarafından üretilen gerim kuvvetini iskelet sistemi üzerine aktaran dokudur (Şekil 2.1). Tendonun biyomekanik özellikleri, yüksek oranda özelleşmiş hücrelerarası alan (ECM) ve bunu çevreleyen tendon kılıfı ile sağlanır [15]. ECM, temel olarak proteoglikan yapı içerisinde uzunlamasına (longitudinal) düzenlenme gösteren tip 1 kollajen moleküllerine ait demetlerden ve farklı hücrelerden meydana gelir. Tendonun diğer yapısal bileşenleri, tip 3 ve tip 5 kollajen molekülleri ile ECM içerisinde yer alan hücrelerdir [16]. Tendonun hücresel bileşeninin %90-95'ini tenoblast ve tenositler; %10'unu ise tendonun kemiğe bağlantı noktasındaki kondrositler, tendon kılıfındaki fibroblastlar, arteriyollerin duvarını oluşturan endotel ve düz kas hücreleri meydana getirirler [17].



Şekil 2.1. İnsan Aşil tendonunun anatomik yapısı [18]

Kollajen molekülleri ve tenositleri çevreleyen ECM: proteoglikanlar (PG), glikozaminoglikanlar (GAG), glikoproteinler (GP) ve diğer küçük moleküllerden meydana gelir [19]. Proteoglikanların yüksek oranda hidrofilik yapısı, suda çözünebilir moleküllerin doku içerisinde hızlıca yayılmasına ve hücrelerin göçüne olanak sağlar. Tendon matriksi içerisinde bulunan hücrelerin yüzeyindeki transmembran proteinler ve adhezif glikoproteinler, tendon onarım ve rejenerasyonunda görev alır [20].



Şekil 2.2. Kas-kemik bağlantısı ve tendon kılıfının yapısal bütünlüğü [21]

Tendon dokusunun bu yapısal bütünlüğü, sinoviyal hücreler tarafından sentezlenen tendon kılıfları ile çevrelenir (Şekil 2.2). Bu kılıf özellikle el ve ayak gibi ekstremitelere ait tendonlarda bulunarak, yüksek oranda mekanik strese maruz kalan dokularda kayganlaştırıcı yüzey olarak görev yapmaktadır [16]. Tendon dokusunun damarlanması da sinoviyal kılıf içerisinde yer alan kan damarları ile sağlanmaktadır. Damarlanma açısından büyük öneme sahip olması nedeni ile, olası dejenerasyon ve rejenerasyon mekanizmaları sırasında büyüme faktörü ve diğer sitokinlerin kan yoluyla yangı bölgesine taşınmasında bu kılıfın rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Tendon sakatlanmaları günümüzde sıklıkla rastlanan bir durumdur. Her yıl, 800.000'in üzerinde vakada tendon, ligament ve eklem kapsülü rahatsızlıklarından şikayetçi olunmaktadır [22]. Tendon ve ligamentlerdeki kopma ve diğer sakatlanmalar şiddetli ağrı ve eklem bölgesinin fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Tendon ve ligamentlerin rejenerasyon kapasiteleri vücuttaki diğer dokulara oranla daha az olduğu için [22,23]; sakatlanmalar sonrasındaki doğal iyileşme mekanizmaları dokunun tümüyle onarılması için yetersiz kalmaktadır. Bazı tendon ve ligamentlerde, kopma ya da yırtılma sonrasında cerrahi yöntemler kullanılarak hasarlı bölgenin iki ucu birbirine dikilse bile; uygulama yapılan çoğu hastada hasarlı bölgenin iyileşmesi için bu teknik yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi olan çıplak veya yüzeyine hücre transplantasyonu yapılmış yamaların kullanılması kaçınılmazdır [25]. Yakın zamanda, deri ve kalp kapağı dokularınının hücreden arındırıldıktan sonra otolog hücre implantasyonu yapılarak sağlam graft (yama) materyalleri olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır [26,27]. Bu araştırmalarda

kullanılan yöntemlerin tendon dokusu için de uygun olduğu daha önceki bir çalışmada [11] da gösterilmiştir.

2.2. Tendonun Yapısal Özellikleri

Yapısal olarak tendon, uzunlamasına dizilmiş farklı kollajen moleküllerinin arasında yer alan tenoblast ve tenosit hücrelerinden oluşur. Tenoblastlar, tendon hücrelerinin genç ve olgunlaşmamış formlarıdır. Yaşlanma ile birlikte, metabolizmaları yavaşlayarak tenositlere dönüşürler [28]. Tenositler başta tip 1, tip 3, tip 5 kollajen molekülleri olmak üzere çeşitli proteoglikanlar, fibronektin ve elastik fibrillerin sentezinden sorumludur [12,29]. Tendon dokusunda en fazla miktarda tip 1 ve tip 3 kollajen proteinleri bulunur. Bu proteinlerin doku içerisindeki dağılımları tendon dokusuna gerime karşı direnç özelliği kazandırır. Kollajen moleküllerinin bir diğer özelliği ise kendi aralarında çapraz bağlar kurarak gerim karşısındaki direnci arttırmaktır [30].

Yapılan çalışmalarda, tenosit markerı olarak tanımlanan az sayıda gen bulunmaktadır. Bunlardan birisi olan scleraxis (*Scx*), tenositler de dahil olmak üzere tüm bağ doku hücrelerde üretilen bir transkripsiyon faktörüdür [31]. Scleraxis, hem hücresel farklılaşmayı hem de hücrelerarası alanın organizasyonunu etkilemektedir. Önceki araştırmalarda, scleraxis gen ifadesindeki bozukluğun tendon matriksinde ciddi organizasyon sorunlarına neden olduğu gösterilmiştir [32]. Tenomodulin *(Tnmd)*, tendon gelişiminde önemi olan bir diğer farklılaşma markerıdır [33]. Schulze-Tanzil ve arkadaşlarının sonuçlarına göre *Tnmd* gen ifadesi *Scx* bağımlıdır. Tendon gelişimi sırasında *Scx* ifadesindeki artış, *Tnmd* ifadesini tetiklemekte ve tenositlerin ileri düzeyde farklılaşmasını sağlamaktadır. Bu bulgular, *Tnmd*'nin tendon morfogenezinde önemli bir marker olduğunu göstermektedir. Tenascin-C *(Tnsc)*, tendon dokusunda bol miktarda bulunan ve elastik protein görevinde olan diğer bir önemli markerdır [34]. Tendinopati durumunda gen ifadesi artan *Tnsc*, kollajen fibrillerin dizilimi ve düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir [35,36].

Sürekli ve tekrarlı hareket nedeni ile, tendon hem akut hem de kronik travmaların sıklıkla görüldüğü bir dokudur [37]. Doku mühendisliği alanındaki araştırmacılar bu soruna çözüm getirebilmek için tenositler ve mezenşimal kök hücreler ile farklı çalışmalar yapmışlardır [7,9,11]. Bu araştırmalarda karşılaşılan en büyük sorun, tek tabakalı kültürde düşük yoğunluk ile üretilen tenositlerin pasajlama

ile *in vitro* koşullarda geçirdikleri süre içerisinde fenotipik bir kayma (bozulma) göstermeleridir. Hücrelerde, çeşitli kollajen molekülleri ve bilinen tenosit markerlarının gen ifadesi zaman içerisinde azalmakta ve hücreler tenosit özelliklerini kaybetmektedir [12,33].

2.3. Hücresiz Matrikslerin Graft Materyali Olarak Kullanılması

Her yıl, 800.000'in üzerinde kişi tendon, ligament ve eklem kapsülü rahatsızlıklarından şikayetçi olmaktadır [22]. Tendon ve ligamentlerdeki kopma ve diğer sakatlanmalar şiddetli ağrı ve eklem bölgesinin fonksiyon kaybına neden olmaktadır. Tendon ve ligamentlerin rejenerasyon kapasiteleri vücuttaki diğer dokulara oranla daha az olduğu için [23,24]; sakatlanmalar sonrasındaki doğal iyileşme mekanizmaları dokunun tümüyle onarılması için yetersiz kalmaktadır. Bazı tendon ve ligamentlerde, cerrahi yöntemler kullanılarak hasarlı bölgenin iki ucu birbirine dikilebilir ancak; uygulama yapılan çoğu hastada hasarlı bölgenin iyileşmesi için bu teknik yeterli olmamaktadır. Bu nedenle, iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi olan hücresiz veya yüzeyine hücre transplantasyonu yapılmış graftların kullanılması kaçınılmazdır [38]. Ancak, uygun graft materyalinin bulunması problem yaratabilir. Hastanın kendisinden elde edilecek otograftlar donor rahatsızlığına neden olabilirken, başka bireylerden elde edilecek allograftlar bağışıklık sistemi üzerinde uyarıcı etkiye neden olabilir [39]. Bu dezavantajların yanı sıra, her iki durumda da elde edilen graft, hasarsız dokudan elde edilen dayanıklılığı ve mekanik özellikleri sağlamayabilir.

Tendon ve ligamentlerin onarımında meydana gelebilecek bu olumsuzluklar doku mühendisliği uygulamaları ile ortadan kaldırılabilir. Doku mühendisliği stratejileri, taşıyıcı biyomateryaller, biyolojik olarak yıkılabilir faktörler ve farklı hücre tipleri kullanılarak dokunun vücut içerisinde doğal yollardan iyileşmesini hızlandırmayı amaçlar [40]. Bu amaç doğrultusunda günümüzde, hasarlı bölgeye platelet [40], fibrin pıhtısı [41], hücre-kollajen jel bileşeni [7] enjeksiyonu yapılması, DL-laktid-ko-glikolid (PLGA) yapısında graftların uygulanması [42], mezenşimal [43] ve kemik iliği kök hücrelerinin transplantasyonu gibi çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Bu uygulamalar kapsamında karşılaşılan en büyük sorun, kullanılan graftın biyolojik ve materyal özelliklerinin hasarsız doku ile karşılaştırıldığında daha zayıf olmasıdır [44]. Biyolojik özellikleri bakımından hasarsız dokuya en çok benzerlik

gösteren biyomateryallerin geliştirilmesi yönünde pek çok araştırma yürütülmektedir. Bu araştırmalar arasında en ilgi çekici olan, çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilen hücreden arındırılmış allojenik dokuların, yüzeyine otolog hücre implantasyonu yapıldıktan sonra yama (graft) amaçlı kullanımıdır. Yakın zamanda, deri ve kalp kapağı dokularınının hücreden arındırıldıktan sonra otolog hücre implantasyonu yapılarak sağlam graft materyalleri olarak kullanılabileceği kanıtlanmıştır [26,27]. Bu araştırmalarda kullanılan yöntemlerin tendon dokusu için de uygun olabileceği Kryger ve arkadaşları [11] tarafından belirtilmiştir.

Doku ve organların hücreden arındırılması pek çok doku mühendisliği/rejeneratif tıp alanında başarı ile kullanılan bir tekniktir. Bu teknik ile elde edilen matriksler, hem pre-klinik hayvan çalışmalarında hem de klinik insan uygulamalarında kullanılmaktadır [46-53]. Hücreden arındırma yöntemleri, doku ve organa göre çeşitlilik göstermektedir. Bir doku yüzeyindeki hücrelerin arındırılma başarısı dokunun kökenine göre de değişiklik gösterebilir. Bu yöntem için spesifik fizyolojik, kimyasal ve enzimatik teknikler kullanılabilir. Bu tekniklerin her birisi hiç kuşkusuz elde edilen matriksin biyokimyasal kompozisyonunu, doku yapısını ve mekanik özelliklerini etkiler. Bu özelliklerin bozulması konukçu (host) canlının nakil sonrası kullanılan matrikse verdiği cevap üzerinde de oldukça etkilidir.

Hücrelerin bir yüzeyden arındırılması sonunda yalnızca yapısal ve fonksiyonel proteinlerden oluşan bir hücrelerarası alan (ECM) elde edilir. Dokuların yüzeyinde bulunan ksenojenik ve allojenik hücresel antijenler, konukçu canlı tarafından yabancı olarak algılanarak, bağışıklık sistemini uyaran ve dokunun reddedilmesine neden olan moleküllerdir. Ancak, ECM yapısında bulunan pek çok bileşen evrimsel olarak çoğu canlı organizmada korunduğu için, nakiller sonrasında ksenojenik alıcılar tarafından kolaylıkla kabul edilir. Hücreden arındırma ve ECM eldesi günümüzde pek çok doku mühendisliği ve rejeneratif tıp araştırmasında kalp kapakçığı [54], kan damarı [55], deri [56], sinir [57], iskelet kası [58], tendon [59], ligament [60], ince bağırsak mukozası [61] ve karaciğer [62] gibi çeşitli dokularda araştırılmıştır. Hücreden arındırma protokolünün hedefi dokunun kompozisyonunu, biyolojik aktivitesini ve mekanik bütünlüğünü koruyarak, tüm hücresel ve nükleer materyalin yüzeyinden temizlenmesidir.

Hücreden arındırma protokolleri sırasında kullanılan tüm teknikler ECM'in doğal üç-boyutlu yapısını değiştirecektir. Günümüzde hücreden arındırma için fiziksel

ve kimyasal uygulamalar bir arada kullanılmaktadır. Fiziksel uygulamalar sonikasyon, mekanik travma, basınç maruziyeti ya da dondurma gibi pek çok yöntemi içerir. Bu yöntemler hücre zarını parçalayarak, hücresel bileşenlerin yıkanmasını sağlar; böylece hücresiz bir ECM elde edilir. Pek çok araştırmada fiziksel uygulamaların hücreden arındırma için yetersiz olduğunu; bu tekniğin kimyasal uygulamalar ile birlikte kullanılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Tripsin gibi çeşitli enzimler, iyonik solüsyonlar ya da deterjan kullanılması, hücre zarlarını, hücre-hücre ve hücre-ECM bağlantıları parçalamakta kullanılan uygulamalardır. Çoğu dokuda yapısal olarak hücreler yalnızca yüzeyde değil, aynı zamanda ECM içerisine gömülü olarak bulundukları için, hücreden arındırma sırasında ECM arasındaki bağlantılar da yeterli ölçüde kırılmalıdır. Ancak, verimli bir arındırma uygulamasında doğal mekanik ve biyolojik özelliklerin korunabilmesi için oluşabilecek hasarın minimum ölçüde tutulması amaçlanmaktadır.

2.3.1. Fiziksel Yöntemler

Günümüzde hücreden arındırma için kullanılan fiziksel yöntemler arasında en yaygın olanları dondurma, basınç uygulaması, sonikasyon ve ajitasyondur. Tendon ve ligamentlerin hücreden arındırılmasında özellikle dondurma yöntemi kullanılmaktadır [63,64]. Doku hızla dondurulduğunda oluşan buz kristalleri hücre zarlarını bozarak lizize neden olmaktadır. Ancak bu tip uygulamalarda, ECM bütünlüğünün de zarar görmemesi için, sıcaklık değişimi kontrollü olarak yapılmalıdır. Dondurma tekniği hücresel lizizi sağlamasına rağmen, hücrelerin doku yüzeyinden arındırılması için başka bir teknik daha kullanılmalıdır.

Yapısında sıkı bağ dokusu bulundurmadığı bilinen akciğer ve karaciğer gibi dokularda basınç uygulanması da bir diğer hücreden arındırma tekniğidir. Bu yöntemin dondurma ile kıyaslandığı zaman, ECM'in üç-boyutlu dokusuna daha az zarar verdiği bilinmektedir.

Mekanik ajitasyon ve sonikasyon, hücrelerin doku yüzeyinden tamamen temizlenmesi için hücre lizizini takip eden kimyasal yıkama basamaklarını da içermelidir. Her iki teknikte de çeşitli dokular için olumlu sonuçlar alınmasına rağmen; günümüzde optimum hücre zarı parçalayıcı değerler belirlenemediği için, bu tekniklerin kullanılması yaygın değildir. Bu tekniklerin tümünde uygulanan prosedürdeki kimyasalların hacimleri, mekanik ajitasyon ya da sonikasyon gibi

tekniklerin uygulanma süreleri gibi değerlerin tümü dokunun hacmine, kompozisyonuna ve yoğunluğuna göre değişiklik göstermektedir.

2.3.2. Kimyasal Yöntemler

2.3.2.1. Alkalin ve Asit Uygulaması

Hücreden arındırma protokolleri içerisinde yer alan alkalin ve asit uygulaması sitoplazmik bileşenlerin ve RNA-DNA gibi nükleik asitlerin ortamdan uzaklaştırılması için tercih edilir. Örneğin, asetik asit, hidroklorik asit, sülfirik asit ve amonyum hidroksit hücre zarı ve intraselüler organellerin parçalanmasında oldukça etkili kimyasallardır [65-69]. Ancak bu kimyasallar kollajen içerikli matrikslerden glikozaminoglikanlar (GAG) gibi önemli moleküllere de zarar verebilmektedir.

2.3.2.2. İyonik Olmayan Deterjanlar

Hücreden arındırma protokollerinde hassas etkili olması nedeniyle iyonik olmayan deterjanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Bu kimyasallar lipit-lipit ve lipit-protein etkileşimlerini bozarken; protein-protein etkileşimlerine zarar vermez. Bu sayede, elde edilmeye çalışılan ECM'in protein yapısı bozulmadığı için, fonksiyonel düzenlenmesi de sağlam kalır [70].

Triton X-100, hücreden arındırma protokollerinde en çok kullanılan iyonik olmayan deterjandır. ECM eldesi için bir dokunun Triton X-100'e maruziyeti doku çeşitine göre birkaç saatten 14 güne kadar sürebilir [47,59,60,62,65,71]. Dokuların Triton X-100 ile hücreden arındırılması farklı sonuçlar vermiştir. Grauss ve arkadaşları [72], kalp kapakçığını hücreden arındırmak için Triton X-100 kullanmışlar; uygulama sonucunda nükleer materyalin doku yüzeyinden tamamen temizlendiğini rapor etmişlerdir. Ancak aynı araştırmacıların bulgularına göre, Triton X-100 ECM bileşenlerinden GAG'lara da bir miktar zarar vermektedir. Triton X-100 uygulaması yapılan farklı araştırmalarda kan damarı, tendon ve ligament gibi dokularda bu kimyasalın tek başına hücreden arındırma için yeterli olmadığı belirtilmektedir [59,60,71]. Dokuların tamamında Triton X-100 uygulamasını takiben immünohistokimyasal olarak hücre iskeleti proteini olan vimentinin varlığı tespit edilmiştir. Tüm bu çalışmaların ışığında, Triton X-100 hücreden arındırma protokolünde kullanılmak üzere kuvvetli bir kimyasal ajan olsa da; verimliliği dokunun

tipine ve Triton X-100 ile kombine olarak kullanılacak diğer tekniklere göre değişiklik göstermektedir.

2.3.2.3. İyonik Deterjanlar

İyonik deterjanlar hem sitoplazmik hem de nükleer hücre zarlarının parçalanmasında başarılı ajanlar olmalarına karşın; protein-protein etkileşimlerine zarar verdikleri için hücreden arındırma protokollerinde sıklıkla tercih edilmezler [70]. En sık kullanılan iyonik deterjanlar sodyum dodesil sülfat (SDS) ve sodyum deoksikolat'tır [56,57,60,62,73].

SDS, doku yüzeyindeki hücresel bileşenleri temizlemekte oldukça başarılıdır. Diğer deterjanlarla karşılaştırıldığı zaman, SDS'in yapmış olduğu hücreden arındırma ve vimentin gibi yapısal proteinlerin uzaklaştırılması daha başarılıdır [60]. Ancak SDS'in uygulama sırasında, GAG konsantrasyonunda azalmaya neden olduğu ve dokudaki kollajen proteinlerine de büyük ölçüde zarar verdiği bilinmektedir.

Sodyum deoksikolat, SDS ile karşılaştırıldığı zaman etkisi daha şiddetli bir deterjandır. Bu nedenle doğal doku organizasyonuna daha fazla miktarda zarar vermektedir. Günümüzde yalnızca sodyum deoksikolat kullanarak yapılmış herhangi bir hücreden arındırma çalışması henüz bulunmamaktadır. Bu ajanın zwitter iyonik ajanlar ya da Triton X-100 ile bir arada kullanıldığında sinir doku ECM'i elde etmek için başarılı olduğu rapor edilmiştir [57].

2.3.2.4. Şelatlaştırıcı Ajanlar

EDTA ve EGTA olarak bilinen şelatlaştırıcı ajanların en önemli özelliği bulundukları ortam içerisindeki metal atomlarının çevresini sararak halka şeklinde moleküler bir kompleks oluşturmasıdır. Yapılan araştırmalarda, Ca^{+2} ve Mg^{+2} gibi divalent katyonların hücrelerin kollajen ve fibronektin yüzeyine bağlanmasında önemli olduğu gösterilmiştir [74,75]. Bu ajanlar ortamda bulunan divalent katyonları bağlayarak, hücre-ECM bağlantısını engellemekte ve hücreden arındırma protokollerinin daha verimli olmasını sağlamaktadırlar. EDTA, genellikle tripsin enzimi ile birlikte kullanılır.

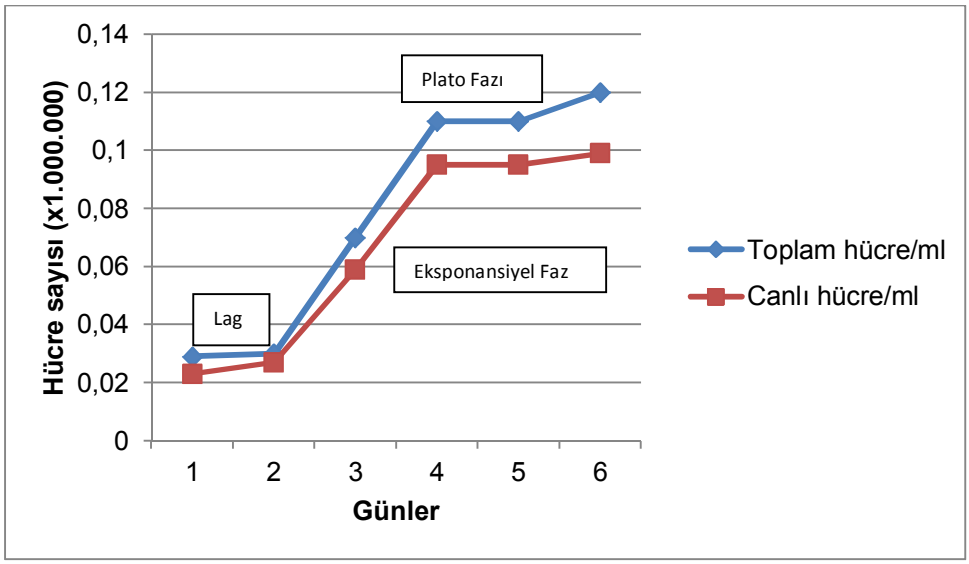
2.3.3. Enzimatik Yöntemler

Hücreden arındırmada kullanılan enzimler arasında proteazlar ve nükleazlar yer almaktadır [26,76,77]. Tripsin, hücreden arındırma protokollerinde en yaygın kullanılan proteolitik bir enzimdir. Maksimum enzimatik aktivitesini 37°C ve pH 8'de gerçekleştiren tripsin; arjinin ve lizin amino asitlerinin karbon uçlarındaki peptit bağlarını kıran spesifik bir enzimdir.

ECM eldesi için çok farklı dokularda enzimatik uygulamalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların bazılarında enzimin aktivitesini arttırmak ve hücreden arındırmayı kolaylaştırmak için tripsin-EDTA karışımları da kullanılmaktadır. Uzun süreli enzim uygulaması da diğer teknikler gibi ECM yapısına zarar verirken; enzimin EDTA ile birlikte kullanılması bu hasarı hafifletmektedir [78]. Tripsinin aynı zamanda fazladan maruz bırakıldığı dokularda GAG ve spesifik olarak elastin proteinine de zarar verdiği; bu nedenle kullanıldığı dokuda gerime karşı dirençte azalmaya neden olabileceği rapor edilmiştir. Sonuç olarak, protokol içerisinde tripsin-EDTA kullanılacak ise, ECM kompozisyonu ve yapısına zarar vermemesi için maruziyetin mümkün olabildiğince kısa tutulması tercih edilmektedir.

2.4. Hücre Üreme Eğrisi

Kültürde üretilen hücreler pasajlanmaya başlandığında, her bir hücre tipi kendisine özgü karakteristik bir üreme paterni göstermeye başlar. Bu üreme paterni "hücre üreme eğrisi" olarak adlandırılır. Üreme eğrisi: lag fazı, eksponensiyel faz ve bekleme/plato fazı olmak üzere üç temel evreden meydana gelmektedir (Şekil 2.3). Hücre hatları ile çalışırken lag ve plato fazları hücrelerin canlılığı ile verilerin elde edilmesinde kullanılır. Eksponansiyel faz evresinde hücrelerin bölünme hızlarına ait bilgi edinilebilir. Bölünme hızı, bazı spesifik inhibitör ya da stimülatör maddelerin *in vitro* koşullarda tutulan hücrelerin proliferasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde son derece önemlidir. Aynı zamanda pasajlama sırasında hücrelerin dilüsyon oranlarının belirlenmesinde de kullanılır. Belirtilen bu üç temel evre, primer kültürden elde edilen hücreler için farklılık gösterebilir. Hızlı üreyen hücreler için başlangıç konsantrasyonu olarak yaklaşık $2x10^4$ hücre/ml önerilirken; yavaş üreyen hücreler için $1x10^5$ hücre/ml önerilir.



Şekil 2.3. Hücre üreme eğrisi.

Lag Fazı

Pasajlamadan sonraki ilk evredir. Bu fazda hücre sayısının artmaması beklenmektedir. Tripsinizasyon ile konfluent flask yüzeyinden kaldırılan hücreler bu evrede kaybettikleri hücre yüzeyi moleküllerini ve hücrelerarası alan bileşenlerini tekrar sentezledikleri için bu evre "adaptasyon fazı" olarak kabul edilir. Sentez aşamasından sonra hücreler substrat yüzeyine tutunarak, zemin üzerinde yayılmaya başlarlar. DNA ve yapısal proteinlerin sentezlenmesi nedeni ile DNA polimeraz aktivitesinde artış gözlenir.

Eksponansiyel Faz

Lag fazını takip eden bu evrede hücre sayılarında eksponansiyel bir artış gözlenir. Bu evre, bölünme hızının %90-100 oranında verimlilikle devam ettiği ve hücrelerin en bölünebilir yetenekte olduğu dönemdir.

Plato Fazı

Eksponansiyel fazın sonlarına doğru hücreler substrat yüzeyini tamamen kaplayarak *konfluent* hale gelmeye başlar. Konfluensiye ulaşıldıktan sonra, kültürün üreme hızı azalır ve hatta duraklar. Bu evrede hücre sayısında artış gözlemlenmediği için, hücre üreme eğrisinde plato şeklinde bir düzlük oluşur. Bölünme hızı yaklaşık

%0-10 oranındadır. Konfluensiye ulaşılmasının ardından hücre üremesinin yavaşlamasının nedeni “kontak inhibisyon” olarak bilinmektedir [79]. Malign bazı kültürler kontakt inhibisyon ile plato fazına girmezler.

2.5. β-Galaktozidaz Aktivitesi

Doku yenilenmesi, memeliler gibi kompleks organizmalarda canlılığın devamı için son derece büyük önem taşımaktadır. Ancak, doku yenilenmesi sırasında hücrelerin yüksek oranda bölünmeye başlamaları tümörogenezi tetiklediğinden, yenilenen dokular kanser gelişme riski olan potansiyel hedeflerdir [80]. Bunun nedeni, kanser gelişiminin proliferatif özellikteki somatik hücrelerde mutasyonların birikimi ile olması ve hücre bölünmesi sırasında mutasyonların birikebilmesidir [81]. Bu nedenle, kanserin bölünemeyen hücrelere oranla bölünebilir hücrelerde daha sıklıkla görülmesi kaçınılmazdır. Yenilenebilir dokulardaki proliferatif hücrelerin kansere yol açmaması için günümüzde tanımlanmış çeşitli tümör süpressör mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan bir tanesi hücresel yaşlanma olarak tanımlanmıştır [82,83,84].

Normal koşullar altında somatik hücreler bağımsız olarak bölünmezler. Hücrelerin sınırlı sayıda bölünebilmesi anlamına gelen bu durum, hücre bölünmesinin replikatif ya da hücresel yaşlanması olarak adlandırılır. Hücresel çalışmalarda yaşlanmış hücreler spesifik moleküllerin üretimini yeterli miktarda gerçekleştiremediğinden ve hücresel fonksiyonlarının bazılarını tam olarak yerine getiremediğinden, yapılan deneylerde bu hücrelerin tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır. Tüm iç ve dış koşullar kontrol altında tutulabildiğinden *in vitro* sistemler hücresel yaşlanmanın en iyi çalışıldığı ortamlardır [85,86].

Yaşlanan hücreler, hücre bölünmesinin G_1 fazında kalarak, fizyolojik mitojenler ortamda bulunsa bile S fazına girmezler. Bu durum, hücrelerin aktif olarak bölünürken, yaşlanma ile bölünmeyen bir forma dönüşmeleri ile açıklanabilir. Hücre bölünmesindeki azalma geri dönüşümsüzdür. Hücreler bölünme yeteneklerini kaybederken; hücre morfolojisi, hücreye spesifik şekil, hücrelerin fiziksel görünümleri ve gen ifadesi paternlerinde de değişiklikler meydana gelir. Bu hücreler metabolik olarak aktif kalırken, uzun süre apopitotik yolla ölüme karşı direnç gösterirler; ancak yaşlanma sürecinin sonucu mutlak hücre ölümüdür. Bu özelliklerine ek olarak, histolojik incelemeler sırasında yaşlanan hücreler çok az morfolojik değişiklik

gösterdiğinden, doku içerisinde diğer hücrelerden ayırt edilemeleri oldukça zordur. Yaşlanan hücreler, genç hücrelere göre daha yaygın bir sitoplazmaya ve daha fazla sayıda hücresel uzantıya sahiptir.

Önceki araştırmacılar tarafından tespit edilen interlökin 6 ve metalloproteinazlar (MMP) gibi bazı yaşlanma markerları bulunmaktadır [85,87,88]. İnterlökin 6, yaşlanmaya başlayan hücrelerde sentezlenen inflamatuvar bir regülatördür. MMP7 ve MMP10 ise yaşlanma eğiliminde olan bazı hücrelerde üretim miktarı artan enzimlerdir. Ancak, bu markerların hücre-spesifik olmaması ve yaşlanmakta olan hücreler tarafından salgılanıp, komşu hücreler üzerinde de parakrin etki yaparak bu hücrelerin de yaşlanma mekanizmalarını tetiklemeleri nedeni ile günümüzde çok fazla tercih edilmemektedirler.

Dimri ve arkadaşları [89], bu durumu açıklığa kavuşturmak ve yaşlanan hücreleri *in vitro* koşullarda tespit edebilmek için bazı araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmacıların sonuçlarına göre, lizozomal hidrolaz enzimi β-galaktozidaz'ın gen ifadesi, normal hücrelerde pH 4'te, yaşlanmış hücrelerde ise pH 6'da artmaktadır. Bu enzimin üretimi yalnızca yaşlanmış hücrelerde olurken, yeni yaşlanan hücrelerde ve genetik olarak manipüle edilmiş ölümsüz kanser hücrelerinde olmamaktadır. Bu nedenle, β-galaktozidaz'ın hücre içerisindeki miktarının tespiti, *in vitro* koşullardaki hücre popülasyonlarında bulunan gerçek yaşlanmış hücre sayısının belirlenmesinde büyük önem taşımaktadır.

2.6. Tendonun İyileşme Evreleri

Tendon iyileşmesi 3 ardışık evre ile meydana gelir. Temel olarak nötrofillerin, eritrositlerin ve inflamatuvar hücrelerin yara bölgesine göçü ile ilkin inflamatuvar evre başlar. İlk 24 saat içerisinde oluşan nekrotik parçaların fagositozu için monositler ve makrofajların sayısı artar. Kan damarları ve hücreleri etkileyecek kemotaksik faktörler salgılanır; böylece kan damarlarının geçirgenliği artar, hipervaskülarizasyon başlar ve daha fazla inflamatuvar hücre yangı bölgesine göç eder [90,91]. Tenositler yangı bölgesine nüfuz eder ve tip 3 kollajen sentezi başlar [92].

Birkaç gün sonra rejeneratif evre başlar. Bu evrede tip 3 kollajen sentezi maksimum noktaya ulaşır ve miktarı birkaç hafta boyunca korunur. Bu evre boyunca dokunun su içeriği ve glikozaminoglikan (GAG) konsantrasyonu yüksek miktarda seyreder [92].

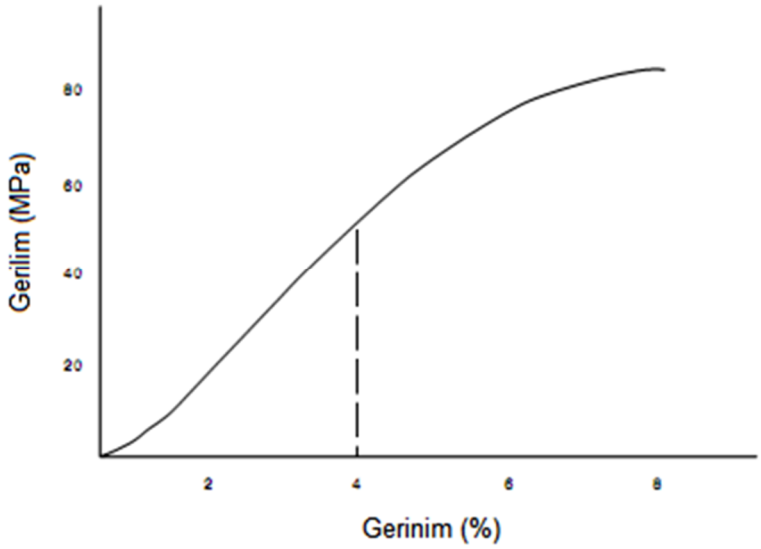
Tam olarak 6 hafta sonra, hücrelerarası alanın tekrar şekillenmesi başlar. Hücre miktarı ve kollajen/GAG sentezi azalır. Tekrar şekillenme evresi dokunun sıkılaşma ve olgunlaşma basamaklarından oluşur [93]. Sıkılaşma basamağı 6. haftada başlar ve yaklaşık 10. haftaya kadar devam eder. Bu süre zarfında doku fibröz bir görünüm kazanır. Tenosit metabolizması hala yüksek seyrederken; kollajen fibriller ve tenositler mekanik gerim yönünde dizilmeye başlar [94]. Bu evrede tip 1 kollajen sentezinde oransal olarak bir artış gözlemlenir [95]. Onuncu (10.) haftadan sonra olgunlaşma basamağı başlar [94]. Olgunlaşma evresi insanlarda yaklaşık bir yıl devam eder. Bu süre boyunca tenosit metabolizması yavaşlar ve tendon damarlanması azalır [96].

Mevcut literatür kaynaklarına göre tendon iyileşmesi intrinsik ve ekstrinsik mekanizmalar ile sürdürülür. İntrinsik mekanizmada tendon içerisinde yer alan tenosit/tenoblastlar rejenerasyonu sağlarken; ekstrinsik mekanizmada tendon kılıflarında bulunan fibroblastlar ve çevre dokulardaki inflamatuvar hücreler hasar bölgesine göç ederek rejenerasyonu sağlar. Fujita ve arkadaşları [97], tendon içerisinde yer alan tenositlerin kılıftaki tenositlere oranla daha fazla miktarlarda kollajen proteini sentezleyebildiğini; bu nedenle, tendon içerisinde yer alan tenositlerin iyileşmede daha etkin hücreler olduğunu bildirmişlerdir.

2.7. Tendon Biyomekaniği

Tendon, yalnızca kaslar tarafından üretilen gerim gücünü kemiklere aktarmakla kalmaz; aynı zamanda kas hasarını engellemek için tampon görevi de görür [98]. Tendonun diğer dokulardan farklı olan bu özelliğini koruyabilmesi için iyi bir mekanik gerim gücü, yeterli miktarda esneklik ve optimum düzeyde elastikiyete sahip olması gerekmektedir [99,100].

Tendon mekaniğini anlamak için *gerilim – gerinim grafiği* kullanılır (Şekil 2.4). Dinlenme halindeyken, kollajen fiberleri dalgalı bir kompozisyon gösterir [2]. Eğer gerinme değeri %4'ün altında kalırsa, tendon elastik bir ip gibi gerilip gevşeyebilir [101]. Gerinme %4'ün üzerine çıktığı zaman mikroskobik hasar oluşmaya başlar ve %8-10 civarında makroskobik hasar meydana gelir [102,103,126]. Bu noktadan sonra dokuda kopma meydana gelir ve kopan uçlar düzensiz ip yumağı şeklinde kendi üzerine büzüşür [98].



Şekil 2.4. Tendonun gerilim – gerinim grafiği [16]

Yukarıda görülen gerilim-gerinim grafiği tendona ait pek çok biyomekanik özelliğin hesaplanması için kullanılmaktadır:

Maksimum Yük: Tendonun kopmadan önce dayanabildiği maksimum gerim gücüdür. Birimi "newton"dur (N).

Uzama: Tendonun gerim testi sırasında boyunda meydana gelen değişikliktir. Birimi "milimetre"dir (mm).

Enerji Alımı: Mekanik gerim testi sırasında tendonun kopması için gereken enerji miktarıdır. Maksimum yük ve uzama verileri çarpılarak hesaplanır. Birimi "miliJul"dur (mJ).

Rijitlik: Tendonun maksimum yük karşısında stabil kalabilme yeteneğidir. Maksimum yük, uzama verisine bölünerek hesaplanır. Birimi "N/mm" olarak ifade edilir.

Gerilme: Tendon üzerinde düşen maksimum yükün tendon kesitinin alanına bölünmesi ile hesaplanır. Birimi "megapaskal"dır (MPa).

Gerinme: Uzama miktarının örneğin başlangıç uzunluğuna bölünmesi ile hesaplanır. "%" olarak ifade edilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Çalışma kapsamında uygulanan tüm cerrahi işlemler, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan (Onay No: 2009/8) alınan izin ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın hücre kültürü, deselülerize matriks izolasyonu ve cerrahi uygulamaları için toplam 140 adet erkek *Rattus norvegicus* türüne ait *Wistar albino* ırkı sıçan kullanılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılacak sıçan gruplarında örneklem sayıları ve yapılan uygulamalar

Sıçan Grubu	Uygulama
Grup A (n=20)	Tenosit izolasyonlarının yapılacağı grup
Grup B (n=30)	Hücresiz tendon matrikslerinin elde edileceği grup
Kontrol Grubu (n=30)	Boş kontrol grubu (tendon hasarı oluşturulacak ve hasarlı bölge dikilecek)
DCM Grubu (n=30)	Kontrol grubu (tendon hasarı oluşturulacak ve hasarlı bölgeye DCM transplante edilecek)
DCM+Tenosit Grubu (n=30)	Uygulama grubu (tendon hasarı oluşturulacak ve hasarlı bölgeye DCM+tenosit kompoziti transplante edilecek)

Kullanılan sıçanların ortalama yaşı 9 hafta, ortalama ağırlığı ise 250 ± 50g'dır. Sıçanlar uygulama gruplarına göre rastgele dağıtılmıştır. Cerrahi uygulama tüm hayvanların hem sağ hem de sol bacaklarındaki Aşil tendonu bölgesine yapılmıştır. Tüm sıçanlara günlük olarak musluk suyu ve sıkıştırılmış pelet yem verilmiştir. Özel diyet uygulanmamıştır. Deney boyunca sıçanlar paslanmaz çelik kapaklı ve polikarbonat otoklavlanabilir kafesler içerisinde; özel havalandırmalı odalarda 20±2°C'de ve %45 nem bulunan ortamda, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık koşullarında barındırılmıştır.

3.1.2. Cerrahi Operasyon İçin Kullanılan Madde ve Malzemeler

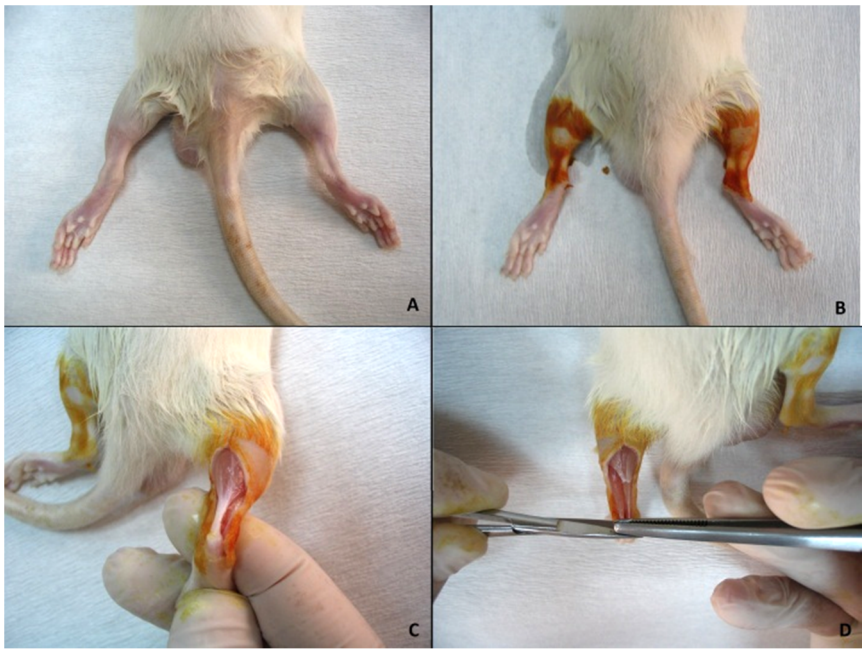
Çalışmanın cerrahi operasyonları için anestezik solüsyon olarak xylazine HCl (Alfasan) ve ketamine HCl (Richter Pharma), 8-0 absorbe edilebilir ip (SMI), 4-0 absorbe edilmeyen ip (Ethicon), 6-0 absorbe edilmeyen ip (SMI), derinin tıraş edilmesi için, 1ml'lik enjektör, %10 poviodine solüsyonu (Diagnokim), mikrocerrahi pensi, penseti ve makası, bistüri ucu, cerrahi iplikler, steril serum fizyolojik, gazlı bez, eldiven ve maske kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

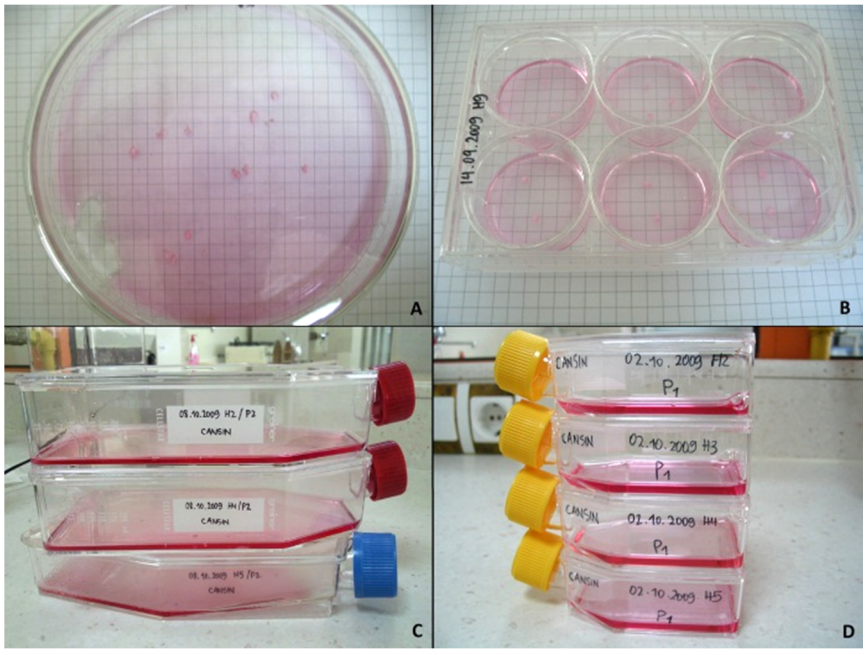
3.2.1. Tenosit İzolasyonu ve Kültürü

Hücre izolasyonu için gereken Aşil tendonları, 10 haftalık sıçanlara eter inhalasyonu altında servikal dislokasyon uygulandıktan sonra elde edilmiştir. Aşil tendonu bölgesinde insizyonun yapılacağı tibia-fibula arasındaki gastrocnemius kası (baldır kası) ve bilekteki kıllar temizlendikten sonra (Şekil 3.1.A) cerrahi bölgesi povidine-iodine solüsyonu ile dezenfekte edilmiştir (Şekil 3.1.B). Kas tabakasına ve aşil tendonuna ulaşabilmek için deri bistüri yardımı ile 1,5-2cm uzunluğunda longitudinal olarak insize edilip (Şekil 3.1.C), altta bulunan bağ dokudan hemostat yardımı ile ayrılmıştır. Aydınlatmalı büyüteç altında Aşil tendonuna ait sinoviyal kılıflar kesilerek uzaklaştırılmış ve Aşil tendonları iki uçtan kesilerek çıkartılmıştır (Şekil 3.1.D). Örnekler 100 IU/ml penisilin ve 100µg/ml streptomisin içeren transport DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içerisine alınmıştır.

Hücre izolasyonu için Aşil tendonu örnekleri hücre kültürü ortamına taşınmıştır. Steril cam petriler içerisinde her bir hayvandan izole edilen dokular ayrı ayrı bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrılmıştır (Şekil 3.2.A). Daha sonra doku parçaları her bir hayvan için hazırlanan 6-kuyulu plağa yerleştirilmiştir (Şekil 3.2.B). Rutin besiyeri olarak %10 Fötal Sığır Serumu (FBS) ve %2 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM kullanılmıştır. Plaklar %5 CO_2 içeren inkübatörde 37^{o}C sıcaklıkta inkübe edilerek; besiyerleri her 3 günde bir yenilenmiştir. Plak yüzeyleri gün aşırı kontrol edilerek, plak yüzeyine göç ederek tendon dokularından ayrılan tenositler konfluent duruma geldiklerinde pasajlama aşamasına geçilmiştir. 6-kuyulu plaklar öncelikle 25cm^{2}'lik (Şekil 3.2.D), daha sonra 175cm^{2}'lik (Şekil 3.2.C) flasklara pasajlanmıştır.



Şekil 3.1. A. Tibia-fibula arasındaki bölgenin kılları temizlenmiştir **B.** Deri povidine-iodine solüsyonu ile dezenfekte edilmiştir **C.** Deride 1,5-2cm uzunluğunda uzunlamasına (longitudinal) insizyon (kesi) oluşturulmuştur **D.** Aşil tendonu iki uçtan kesilerek çıkartılmıştır



Şekil 3.2. A. Hayvanlardan izole edilerek ayrılan ve küçük parçalara bölünmüş tendonlar **B.** 6-kuyulu plaklara yerleştirilmiş tendon parçaları **C.** Üreyen hücreler 175cm^2'lik ve **D.** 25cm^2'lik flasklara pasajlanmıştır

Hücre Pasajlama Protokolü

- Flask yüzeyindeki eski besiyeri uzaklaştırılmıştır.
- Flask yüzeyi 1ml Tripsin-EDTA ile yıkanır. Tripsin-EDTA uzaklaştırılmıştır.
- Her bir flask içerisine 0.5ml Tripsin-EDTA eklenip, flasklar 37^{o}C etüvde 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Her bir kuyunun üzerine 5ml %10FBS (Fötal Sığır Serumu)+DMEM eklenir ve karışım kapaklı santrifüj tüpüne toplanır. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işleminden sonra besiyeri uzaklaştırılır. Pelet tüpe hafifçe vurularak kaldırılmıştır.
- Tüpün üzerine %10 FBS+DMEM eklenir ve hücreler süspanse edilir, yeni flasklara bölünmüştür.
- Hücreler mikroskopta kontrol edildikten sonra 37^{o}C etüve kaldırılmıştır.

Hücre Dondurma Protokolü

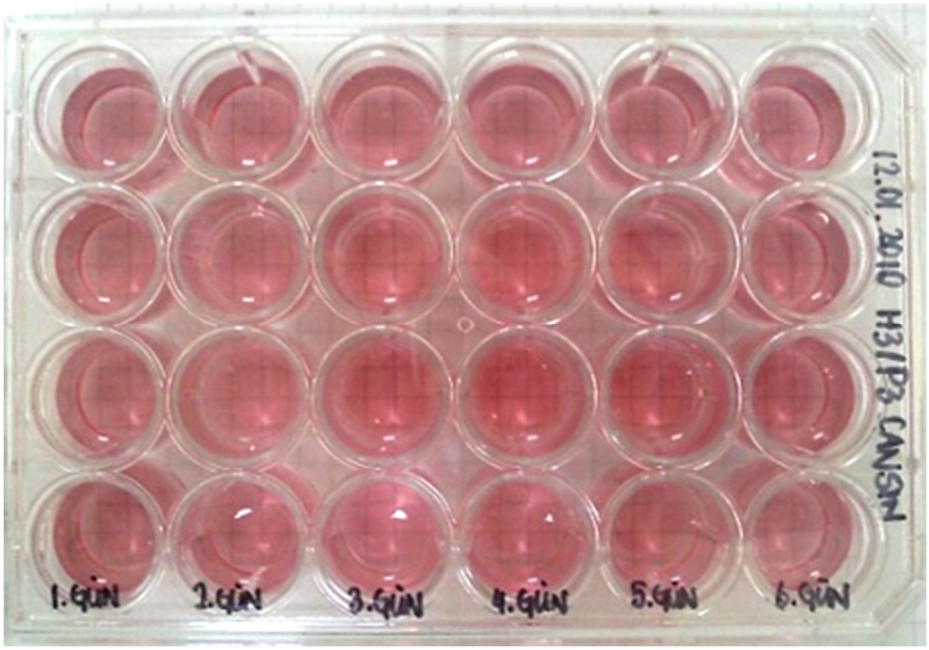
- Hücrelerin üzerindeki besiyeri toplanmıştır.
- Flask yüzeyine 1ml Tripsin-EDTA eklenerek yıkama yapılır. Tripsin-EDTA uzaklaştırılmıştır.
- Flask yüzeyine 0,5ml Tripsin-EDTA eklenir ve 37^{o}C etüvde 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Hücrelerin yüzeyine 5ml %10FBS+DMEM eklenip kapaklı santrifüj tüplerine toplanır. 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Dondurma tüplerine %90 FBS + %10 DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren karışım hazırlanıp eklenmiştir.
- Santrifüj sonrası süpernatan atılmıştır.
- Dondurma tüpü için hazırlanan solüsyondan 1,8ml çekilip hücreler pipetlenmiştir.
- Tüpler önce -80^{o}C'de, sonra sıvı azotta kademeli olarak dondurularak saklanmıştır.

3.2.2. Hücre Üreme Eğrisi Çıkartılması

Hücre üreme eğrisini çıkartmak için 1., 2. ve 3. Pasaj (P1, P2 ve P3) tenositleri 25cm^2'lik flaskların (Orange Scientific, Cat# 5520100) yüzeyinde üretilmiştir. Her bir flask, günlük sayımların yapılacağı 24-kuyulu plak yüzeyine alınmadan önce otomatik hücre sayım cihazı (Beckmann, Vicell) ile sayılarak, başlangıçtaki hücre sayıları elde edilmiştir.

- Her bir flask yüzeyi 1ml Tripsin-EDTA ile yıkanarak, flask yüzeylerine 500µl Tripsin-EDTA eklenip 37°C'de 3 dakika inkübe edilmiştir.
- Tripsinizasyon tamamlandıktan sonra flask yüzeylerine 5ml DMEM/F12 eklenip, tüm flask içeriği kapaklı santrifüj tüplerine toplanarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra tüpün üzerindeki süpernatan uzaklaştırılıp, pelet tüp ucuna hafifçe vurularak yüzeyden kaldırılmıştır.
- Pelet 5ml DMEM/F12 ile süspanse edilerek, her bir süspansiyonun 1ml'si hücre sayım cihazına yüklenip, total ve canlı hücre sayıları elde edilmiştir.
- Hücre sayısını bildiğimiz hücre süspansiyonları 24-kuyulu plaklara (Orange Scientific, Cat# 5530300), 2x10^4 hücre/ml/kuyu olacak şekilde uygun miktarlarda sulandırılıp, paylaştırılmıştır.

24-kuyulu plak yüzeyleri Şekil 3.3'te görüldüğü gibi 6 parçaya bölünerek, her gün yukarıda belirtilen protokol uygulanarak hücre sayımları yapılmıştır. Sayımlardan elde edilen total ve canlı hücre sayıları Microsoft Excel programı ile grafiklenmiştir.



Şekil 3.3. Hücre sayımında kullanılan 24-kuyulu plak dizaynı

3.2.3. β-Galaktozidaz Aktivitesi ile Hücresel Yaşlanmanın Gösterilmesi

Yaşlanma tayini, β-galaktozidaz aktivitesi ölçümü ile *Senescence Cell Histochemical Staining Kit* (Sigma) kullanılarak yapılmıştır. Hücrelerde yaşlanma tayininin yapılması için 1., 2. ve 3. Pasaj (P1, P2 ve P3) tenositleri 25cm^{2}'lik flaskların (Orange Scientific, Cat# 5520100) yüzeyinde üretilmiştir. İmmünositokimyasal boyama aynı flaskların yüzeyinde yapılmış ve hücreler inverted mikroskop ile görüntülenmiştir (IX70 Olympus).

β-galaktozidaz aktivitesinin gösterilme protokolü

- Flask yüzeyindeki besiyeri aspire edilmiştir.
- Hücreler 2 kere 1ml 1xPBS ile yıkanmıştır. PBS aspire edilmiştir.
- Her bir flaskın yüzeyine 1,5ml formaldehit eklenerek flasklar 6-7 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- Boyama solüsyonu üretici firmanın kit protokolüne uygun olarak hazırlanmıştır (Sigma, Cat# CS0030).
- Flask yüzeyi 3 kere 1ml 1xPBS ile yıkanmıştır.

- Her bir flaskın yüzeyine 1ml boyama solüsyonu eklendikten sonra flasklar CO_2'siz etüvde 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonrasında hücrelerin boyanma durumları mikroskop altında gözlemlenerek *β-galaktozidaz* genini ifade eden ve mavi boyanmış hücreler fotoğraflanmıştır.

3.2.4. İkili-İmmünofloresan Boyama Protokolü

İkili-immünofloresan boyama için Vector Labs'dan temin edilen Vectastain ABC Kit (Goat IgG – Alkaline Phosphatase – AK5005) kullanılmıştır.

- IFB için kullanılacak P1, P2 ve P3 hücreleri önce besiyerinin fazlasının uzaklaştırılması için PBS ile yıkanmıştır.
- Hücreler %2.5 gluteraldehit ile 20 dakika fikse (tespit) edilmiştir.
- Örnekler PBS (fosfat tamponlu tuzlu su) ile yıkanmıştır.
- Hücre zarını bir miktar parçalamak ve antijenleri açığa çıkartmak için örnekler Triton X-100 ile 5 dakika inkübe edilmiştir.
- Örnekler PBS ile yıkanmıştır.
- Fiksasyon ve antijen açığa çıkartma basamakları sonrasında örnekler oda ısısında kurutulmuştur.
- İkili antijen boyaması yapılacak olan tip 1/tip 2 kollajen (Santa Cruz – sc25974 – sc7764), tip 3/tip 5 kollajen (Santa Cruz – sc8781 – sc9856) ve tenomodulin/tenaskin-C (Santa Cruz – sc49325 – sc9871) proteinleri için örnekler önce avidin/biyotin ile (Vector Labs – Avidin Biotin Blocking Kit – SP2001) işaretlenmiştir.
- Daha sonra 15 dakika protein blokajı yapılmıştır.
- Her blokaj sonrasında örnekler PBS ile yıkanmıştır.
- Non-spesifik bağlanmaları engellemek için örnekler protein solüsyonu ile 5 dakika inkübe edilmiştir.

- Primer antikorlar SantaCruz firmasının önerileri doğrultusunda 1:100 sulandırılmıştır.
- Örnekler primer antikorlar ile 30 dakika inkübe edilerek, PBS ile birkaç kez yıkanmıştır.
- Biyotinli sekonder antikorlar VectorLabs'dan temin edilerek kit içerisinden çıkan solüsyon ile 1:300 sulandırıldıktan sonra örneklerle 10 dakika inkübe edilmiştir (Vector Labs – Goat IgG – I5000).
- Antikorların fazlasının kuyuların yüzeyinden temizlemek için PBS ile birkaç sefer yıkama yapılmıştır.
- Son aşama olarak florokrom moleküller FITC (Vector Labs – Fluorescein Avidin D – A2001) ve Rhodamine (Vector Labs – Rhodamine Avidin D – A2002) 1:300 PBS içerisinde sulandırılarak hücre yüzeylerine bağlanıp 5-10 dakika inkübasyon için beklenmiş, florokrom atıklarının temizlenmesi için kuyular birkaç kez PBS ile yıkanmıştır.
- Boyanması tamamlanan kuyuların yüzeyi kapatma materyali ile kapatıldıktan sonra fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5. Eşzamanlı - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Moleküler karakterizasyon için tenosit örneklerinden izole edilen RNA'lar, cDNA'ya (komplementer DNA) çevrilerek, ilgilenilen gen bölgelerinin transkripsiyon düzeyleri RT-PCR tekniği kullanılarak incelenmiştir. Tip 2 kollajen proteinini kodlaran *Col2* ise özellikle kıkırdak dokusuna ait bir protein olması nedeniyle her iki teknikte de negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

RNA izolasyonu Tri Reagent (Sigma, İngiltere) ile üretici firmanın talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. Spektrofotometrik olarak analiz edilen RNA kaliteleri A260/A280 oranına göre (1.8-2.0) belirlenmiş, örneklerin bütünlükleri RNAaz'dan uzak şartlarda denatüre edici agoroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir.

İzole edilen total RNA miktarları Nanodrop cihazı (NanoDrop 1000 Spectrophotometer) ile ölçülmüştür. RNA'ların 1µg'ı kalıp olarak kullanılarak Roche Transcriptor First Strand cDNA sentez kiti (Roche, Applied Science, Germany) aracılığıyla üretici protokolüne göre cDNA sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA

örneklerinde *Tnmd*, *Tnsc*, *Col1*, *Col2*, *Col3* ve *Col5* transkriptlerine özgü farklı ekzonlardan hareketle (intron sekanslarını içine alacak şekilde, DNA kontaminasyonunu bertaraf etmek üzere) primerler tasarlanmıştır. Roche 480 Sybr Green I Master kiti ile Light Cycler 480 (Roche, Applied Science, Germany) RT-PCR cihazında gen ifade paternleri çıkarılmıştır. İç kontrol gen *Gapdh*, relatif ekspresyon analizi için internal kontrol olarak kullanılmış olup RT- PCR reaksiyonları 10µl toplam hacimde ve her bir örnek için üçlü (triplicate) olarak çalışılmıştır. Böylece her bir gen bölgesi için toplam 110 reaksiyon; 6 gen bölgesi için toplam 660 reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlemler sırasında 6 gen için yapılan optimizasyonlar göz önüne alındığında her gen bölgesi 3 kez çalışılmış ve tüm gen bölgeleri için toplam 2640 reaksiyon verisi elde edilmiştir.

Gen ifadelerinin görüldüğü PCR döngülerine ait değerler arasındaki fark tek yönlü ANOVA testi kullanılarak Statistica 8.0 programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Veri dağılımlarının normalitesi, Shapiro-Wilk testi kullanılarak belirlenmiştir. ANOVA testi sonucunda, arasında fark olan grupları belirlemek için *post* hoc Bonferroni testi yapılmıştır. Böylece tenositlerin kültürde geçirdikleri süre boyunca genotipik ve fenotipik karakterizasyonu belirleyen bu gen bölgelerinin zaman içerisinde kayma gösterip göstermedikleri belirlenmiştir.

cDNA sentez protokolü

- İlk-zincir komplementer DNA'lar (cDNA) izole edilen RNA'ların 1µg'ını kalıp olarak kullanarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda rastgele hekzamerler ile cDNA kiti (Roche, Applied Science, Germany) kullanılarak sentezlenmiştir.
- Örnekler tekrar süspanse edilmiş ve reverse transkripsiyon 8µl solüsyon içerisinde yapılmıştır. Solüsyon bileşenleri aşağıdaki gibidir:
    1. 4µl trankriptor reverse trankriptaz reaksiyon tamponu (5X),
    2. 0,5µl RNazein,
    3. 10mM dNTP karışımı,
    4. 0,5µl reverse trankriptaz
    5. 7µl reaksiyon karışımı.

- Thermal cycler programı belirtilen şekildedir: 25°C - 10 dakika, 55°C - 30 dakika ve 85°C - 5 dakika.
- Örnekler derhal buz üzerine alınarak 80µl RNAaz içermeyen su eklenerek 100µl'ye süspanse edilmiştir.

Primer tasarımı:

Primerler, Perl-Primer programı kullanılarak tasarlanmıştır. *Col1*, *Col2*, *Col3*, *Col5*, *Tnmd*, *Tnsc* ve *Gapdh* gen bölgelerine ait primer dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir. Tüm primerler Metabion International (Martinsried, Deutschland)'dan temin edilmiştir. Optimizasyon için nükleotid primerler farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Tüm primerlerin spesifiklik durumu erime eğrisinde tek bir amplifikasyon ürünü oluşturması ile kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.1. Hedef genler, primer dizileri, guanin - sitozin oranları (GC%) ve erime sıcaklıkları (TM)

Hedef Gen	Primer	Primer Dizileri	GC%	Tm°C
Col1	Forward	5'-AGT CGA TTC ACC TAC AGC AC-3'	50	58
	Reverse	5'- GCC AAT GTC CAT TCC GAA -3'	50	54
Col2	Forward	5'-CAGCAGGTTCACGTACACT-3'	52	64
	Reverse	5'-GAGGTCTTCTGTGATCGGT-3'	52	64
Col3	Forward	5'- CAA ATT CAC TTA CAC AGT TCT A -3'	31,80	55
	Reverse	5'- ATG TCA TAG GGT GCG ATA -3'	44,4	52
Col5	Forward	5'- AGT ATC CAC TCT TCC CTG -3'	50	54
	Reverse	5'- GAG GAT CAA GGT GAC ATT -3'	44,4	50
Tnsc	Forward	5'- GTG GCT GCA TTG ATG GTT G-3'	60	63
	Reverse	5'- TCT CAG CAT GGT CAC CTC C-3'	50	58
Tnmd	Forward	5'- CAA AGA ATC CTC CAG AGA A -3'	42,1	53
	Reverse	5'- CAG GAC AAT TAG AGT TAA GG -3'	40	54
Gapdh	Forward	5'-TAT GAC TCT ACC CAC GGC AA -3'	50	58
	Reverse	5'- GAC TCC ACG ACA TAC TCA GCA -3'	52,4	61

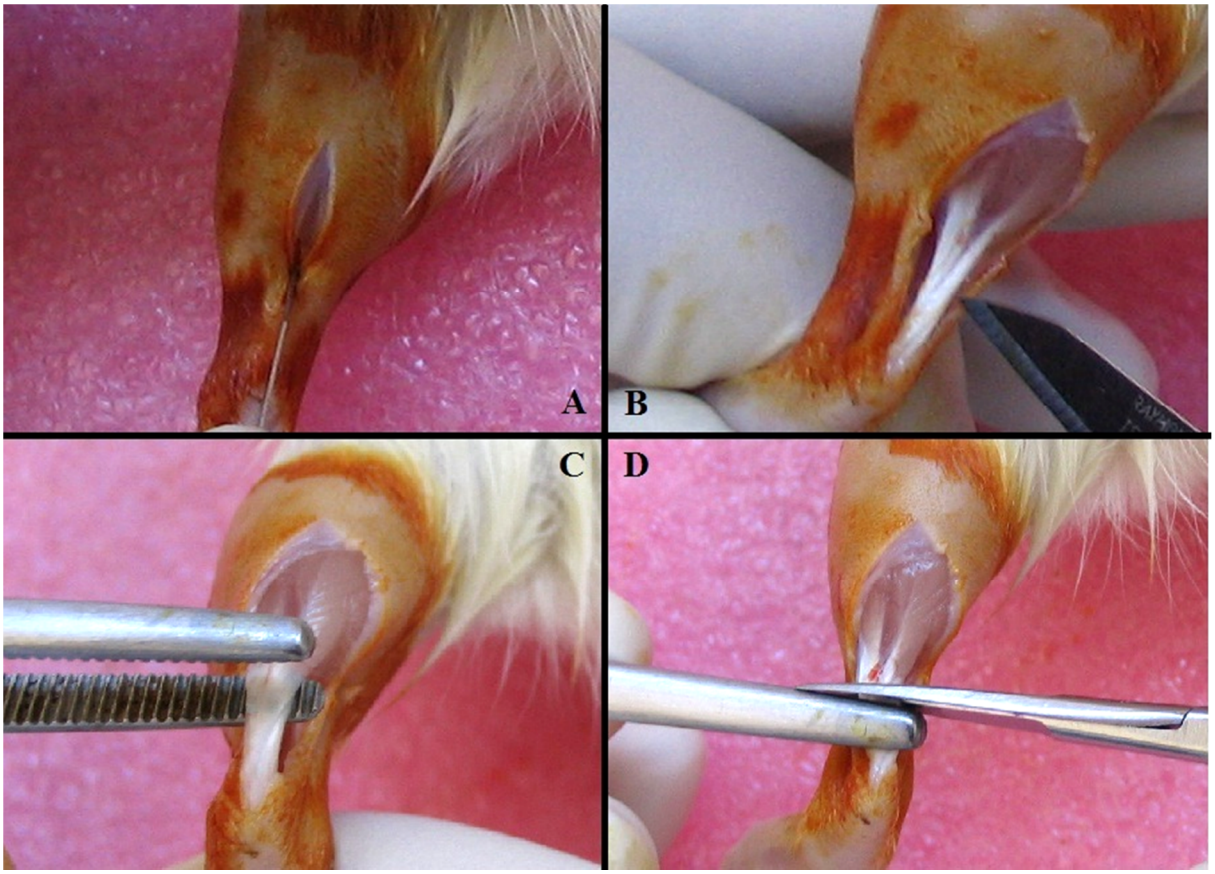
RT-PCR ile gen ifadesi analizi

- Gen ifade paternleri Roche 480 Sybr Green I Master Kit ve Light Cycler 480 (Roche, Applied Science, Germany) kullanılarak elde edilmiştir.
- Reaksiyon karışımının bileşenleri aşağıdaki şekildedir:
    1. 2µl cDNA,
    2. 0,5µmol/l primer,
    3. 200µmol/l dNTP,
    4. 1,5-2mmol/l $mgCl_2$,
    5. 2,5µl 10X reaksiyon tamponu,
    6. 0,05IU/µl *Tag* polimeraz
    7. 17,3µl su.
- Ek olarak çift zincirli DNA boyası olarak SYBR Green kullanılmıştır.
- Isıl döngüleyici programı belirtilen şekildedir:
    1. cDNA 95°C - 1 dakika ısıtılarak denatüre edilmiştir.
    2. Örnekler 95°C - 30 saniye koşulunda 40 döngü denatüre edilmiştir.
    3. Primerlerin bağlanması 60-65°C - 1 dakika koşulunda,
    4. Bağlanma sonrası uzama 72°C - 30 saniye koşunda yapılmıştır.
    5. PCR ürünleri erime eğrileri çıkartılarak tanımlanmıştır.
    6. Erime protokolü örneklerin 95°C - 10 dakika ısıtılmasının ardından 65°C - 1 dakika soğutulması ve SYBR Green floresan ışıması görülene kadar yavaşça 95°C'ye ısıtılması ile tamamlanmıştır.

3.2.6. Tendon Matrikslerinin İzolasyonu

Hücreden arındırma (deselülerizasyon) için kullanılacak tendon parçaları steril koşullar altında 60 adet, 8-10 haftalık erkek Wistar albino sıçanın çift bacağından izole edilmiştir. Sıçanlara anestezi uygulandıktan sonra dekapitasyon gerçekleştirilmiştir. Uygulanan cerrahi protokol Şekil 3.4'te görülmektedir.

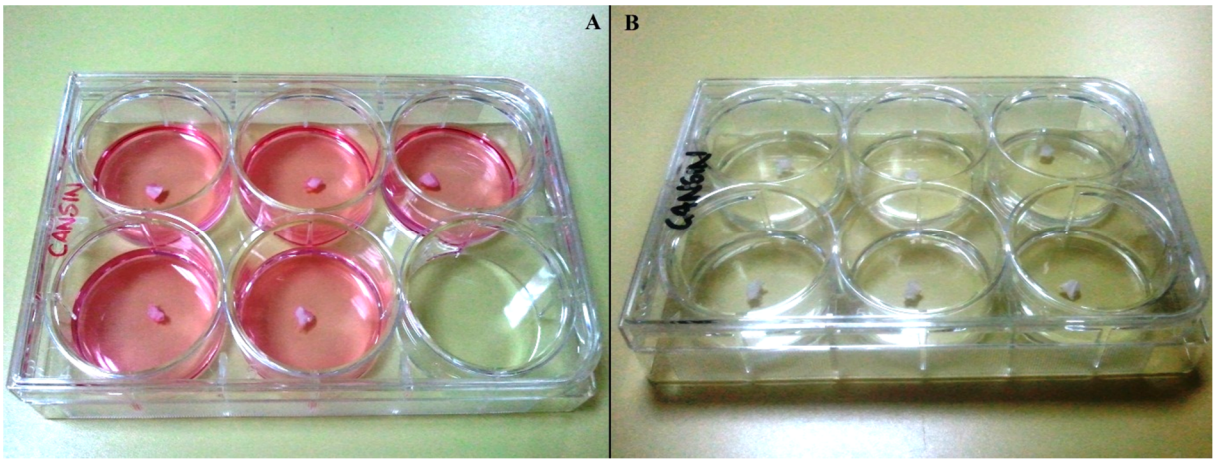
Çalışma bölgesindeki kıllar temizlendikten sonra, batikon solüsyonu ile silinmiştir. Aşil tendonu üzerine denk gelen deri uzunlamasına olarak (1.5-2cm) kesilmiştir (Şekil 3.4.A). Aşil tendonunun orta 1/3'lük kısmı kesilerek çıkartılmıştır (Şekil 3.4.C). Aşil tendonuna ait dokular antibiyotikli PBS içerisinde yıkanıp -80°C'de dondurularak kullanım zamanına kadar saklanmıştır.



Şekil 3.4. Tendon matrikslerinin hücreden arındırılması için izolasyonu: **A.** Uzunlamasına kesi **B.** Matriksin izole edildiği Aşil tendonu bölgesi **C.** Aşil tendonunun orta 1/3'lük kısmı **D.** Matriks kesilerek izole edilmiştir

3.2.7. Tendon Matrikslerinin Hücreden Arındırılması (Deselülerizasyonu)

Deselülerize matriks hazırlama aşamaları Şekil 3.5'te görülmektedir. Dondurulmuş tendonlar kullanılacağı zaman oda sıcaklığına alınarak, 6 kuyulu plaklarda %0.05 Tripsin-EDTA ile 37°C ve %5 CO^{2}'li inkübatör ile 24 saat (Şekil 3.5.A); daha sonra %0.5 Triton X-100 ile 24 saat (Şekil 3.5.B) oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.



Şekil 3.5. Tendon matrikslerinin hücreden arındırılması: **A.** 6-kuyulu plaklarda %0.05 Tripsin-EDTA ile inkübe edilen örnekler **B.** %0.5 Triton X-100 ile oda ısısında inkübe edilen örnekler

3.2.8. Deselülerize Matrikslere Tenositlerin Gömülmesi (Reselülarizasyonu)

Deselülerize matriksler (DCM) tripsin-EDTA ve Triton X-100 uygulamasının ardından bir kaç kez penisilin/streptomisin içeren PBS ve DMEM/F12 ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir DCM, 96 gözlü plağın bir kuyusu içerisine yerleştirilmiştir. 1-4. pasajlara ait tenosit kültürleri Beckmann Vi-Cell™ Cell Viability Analyzer ile sayılmıştır.

$1x10^6$ hc/ml tenosit içerdiği tespit edilen hücre süspansiyonundan 200µl/kuyu olmak üzere DCM'lerin üzerine eklenmiştir. Hücre süspansiyonları %1 penisilin/streptomisin içeren serumsuz DMEM/F12 ile hazırlanmıştır. Hücre ve DCM'ler, 37°C ve %5 CO_2 içeren ortamda 48 saat inkübe edilerek hücrelerin matrikslerin yüzeyine tutunması (reselülerize olması) sağlanmıştır.

İnkübasyon sürecinde matrikslerin kurumasını engellemek için 96 gözlü plaklar, bakır sülfatlı ultra-saf ile ayrı bir steril kap içerisine koyularak etüve kaldırılmıştır (Şekil 3.6). Deselülerize matriks+tenosit kompozitleri, olası bir kontaminasyon ihtimaline karşı gün aşırı olarak mikroskopta kontrol edilmiştir.



Şekil 3.6. Deselülerize matriks ve tenositlerin 96 gözlü plak ile inkübasyon düzeneği

3.2.9. Kontrol Grubu (n=30) Cerrahi Protokolü

Çalışma planında Kontrol grubu oluşturulmasının nedeni tendon “otograft” uygulamasının inflamatuvar cevabını gözlemlemektir. Otograft uygulaması, bir bireyin vücudunun bir kısmından alınan parçanın “aynı” bireyin vücudunun aynı ya da farklı kısmına *implante* edilmesidir. Bu sıçanların tendonlarından orta 1/3’lük kısım kesilerek çıkartılmış ve aynı parça geri dikilmiştir.

Sıçanlar operasyon gününde tartılarak intraperitonal 2mg/kg xylazine HCl ve 15mg/kg ketamine HCl enjeksiyonu ile anesteziye alınmıştır. Her iki bacaktaki kıllar jilet ve sabunlu su kullanarak temizlenmiştir (Şekil 3.6.a). Cerrahi bölgeleri %10’luk poviodine solüsyonu ile silinerek dezenfekte edilmiştir (Şekil 3.6.b).

Steril koşullar altında, yüzeydeki derinin baldır kasının distal ucundan kalkaneus (topuk) kemiğine kadar olan kısmı kesilmiştir (Şekil 3.6.c). Aşil tendonu yüzeyindeki bağ doku kısımları temizlenmiş ve orta 1/3’lük kısmı (3mm uzunluğunda) bistüri yardımı ile kesilmiştir (Şekil 3.6.d,e). Kesilen kısım 8-0 abzorbe edilebilir ip ile proksimal ve distal kısımlarından tekrar dikilmiştir (Şekil 3.6.f). Cerrahi bölgesine fazladan yük binmesini engellemek ve dikişlerin ayrılmasını önlemek için Aşil tendonu çevresine 4-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kısmi immobilizasyon uygulanmıştır (Şekil 3.6.g). İğne kesilen 1/3’lük Aşil tendonu bölgesinin proksimal ve distalini kapsayacak şekilde baldır kasının ve topuk kemiğinin arasından geçirilmiş; kemiğe yakın bölgeye düğüm atılmıştır. Deri, sürekli-kilitli dikiş ile 6-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kapatılmıştır (Şekil 3.6.h).



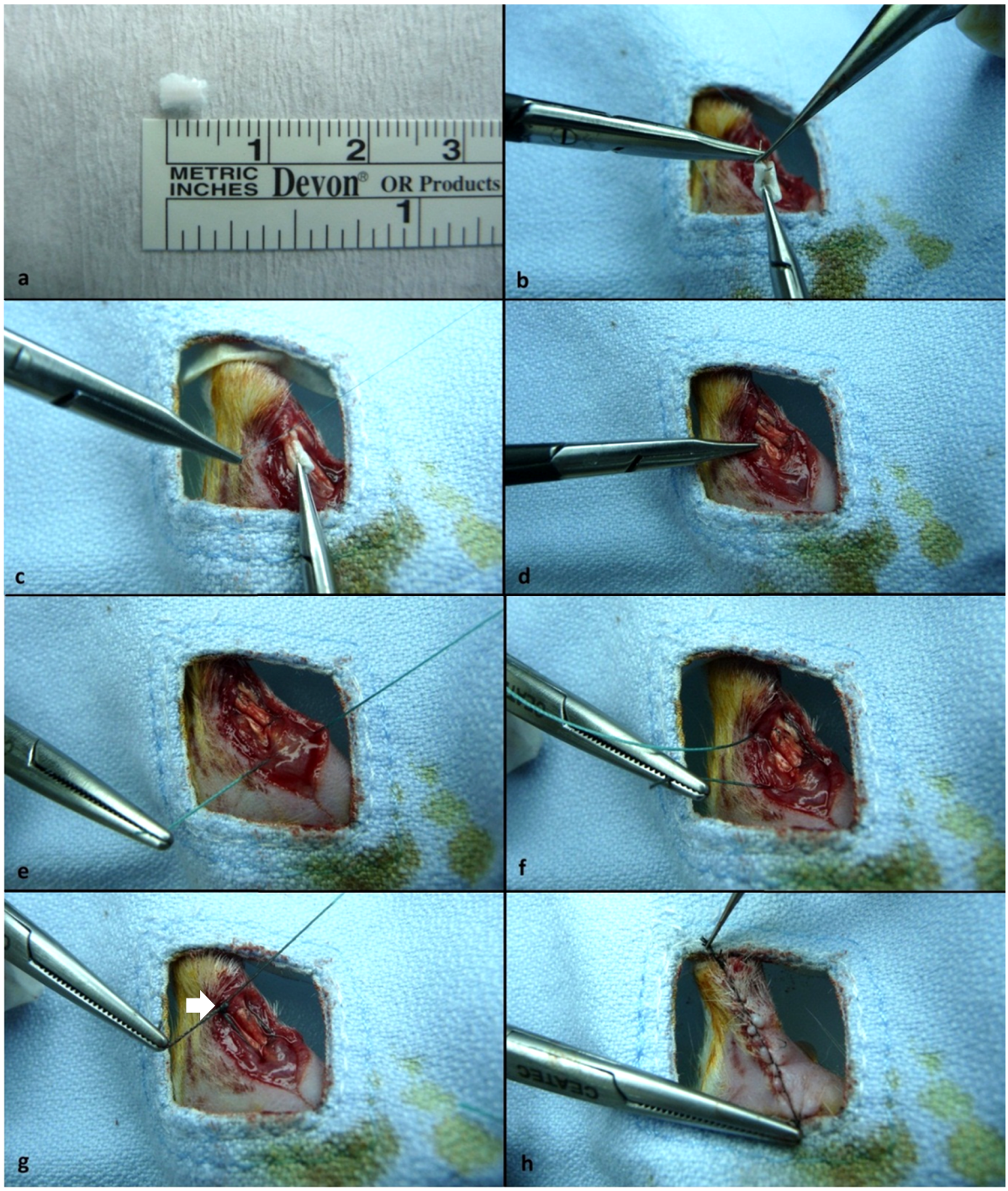
Şekil 3.6. a. Her iki bacaktaki kılların temizlenmesi **b.** Cerrahi bölgelerinin %10'luk poviodine solüsyonu ile dezenfekte edilmesi **c.** Kesi yapılması **d-e.** Orta 1/3'lük kısmı kesilmiş Aşil tendonu **f.** 8-0 abzorbe edilebilir ip ile proksimal ve distal uçların dikilmesi (→) **g.** Aşil tendonu çevresine 4-0 abzorbe edilmeyen ip ile kısmi immobilizasyon uygulanması **h.** 6-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak sürekli-kilitli dikiş ile kapatılan deri

3.2.10. DCM Kontrol Grubu (n=30) Cerrahi Protokolü

Çalışma planında DCM Kontrol grubu oluşturulmasının nedeni tendon "allograft" uygulamasının inflamatuvar cevabını gözlemlemektir. Allograft uygulaması, bir bireyin vücudunun bir kısmından alınan parçanın genetik olarak aynı olan "başka" bir bireyin vücudunun aynı ya da farklı kısmına *transplante* edilmesidir. Bu sıçanlarda Aşil tendonun orta 1/3'lük kısmı kesilerek uzaklaştırıldıktan sonra izole edilip, antibiyotikli PBS içerisinde yıkanarak -80ºC'de saklanmış olan desellülerize matriksler (DCM) transfer edilmiştir. Uygulanan cerrahi prosedür Kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir.

Sıçanlar operasyon günlerinde tartılarak intraperitonal 2mg/kg xylazine HCl ve 15mg/kg ketamine HCl enjeksiyonu ile anesteziye alınmıştır. Her iki bacaktaki kıllar jilet ve sabunlu su kullanarak temizlenmiştir (Şekil 3.6.a). Cerrahi bölgeleri %10'luk poviodine solüsyonu ile silinerek dezenfekte edilmiştir (Şekil 3.6.b).

Steril koşullar altında, yüzeydeki derinin baldır kasının distal ucundan topuk kemiğine kadar olan kısmı insize edilmiştir. Aşil tendonu yüzeyindeki bağ doku kısımları temizlenmiş ve orta 1/3'lük kısmı (3mm uzunluğunda) bistüri yardımı ile kesilmiştir (Şekil 3.6.c). Kesilen kısım uzaklaştırıldıktan sonra önceki dönemde başka sıçanlardan izole edilerek antibiyotikli PBS içerisinde yıkanıp, -80ºC'de saklanmış ve yüzeyinde hücre olmadığı tespit edilen DCM'ler (Şekil 3.7.a) hemen 8-0 abzorbe edilebilir ip ile distal (Şekil 3.7.b,c) ve proksimal kısımlarından dikilmiştir (Şekil 3.7.d). Cerrahi bölgesine fazladan yük binmesini engellemek ve dikişlerin ayrılmasını önlemek için Aşil tendonu çevresine 4-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kısmi immobilizasyon uygulanmıştır. İğne kesilen 1/3'lük Aşil tendonu bölgesinin proksimal ve distalini kapsayacak şekilde baldır kasının ve topuk kemiğinin arasından geçirilmiş; kemiğe yakın bölgeye düğüm atılmıştır (Şekil 3.7.e,f,g). Deri, sürekli-kilitli dikiş ile 6-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kapatılmıştır.



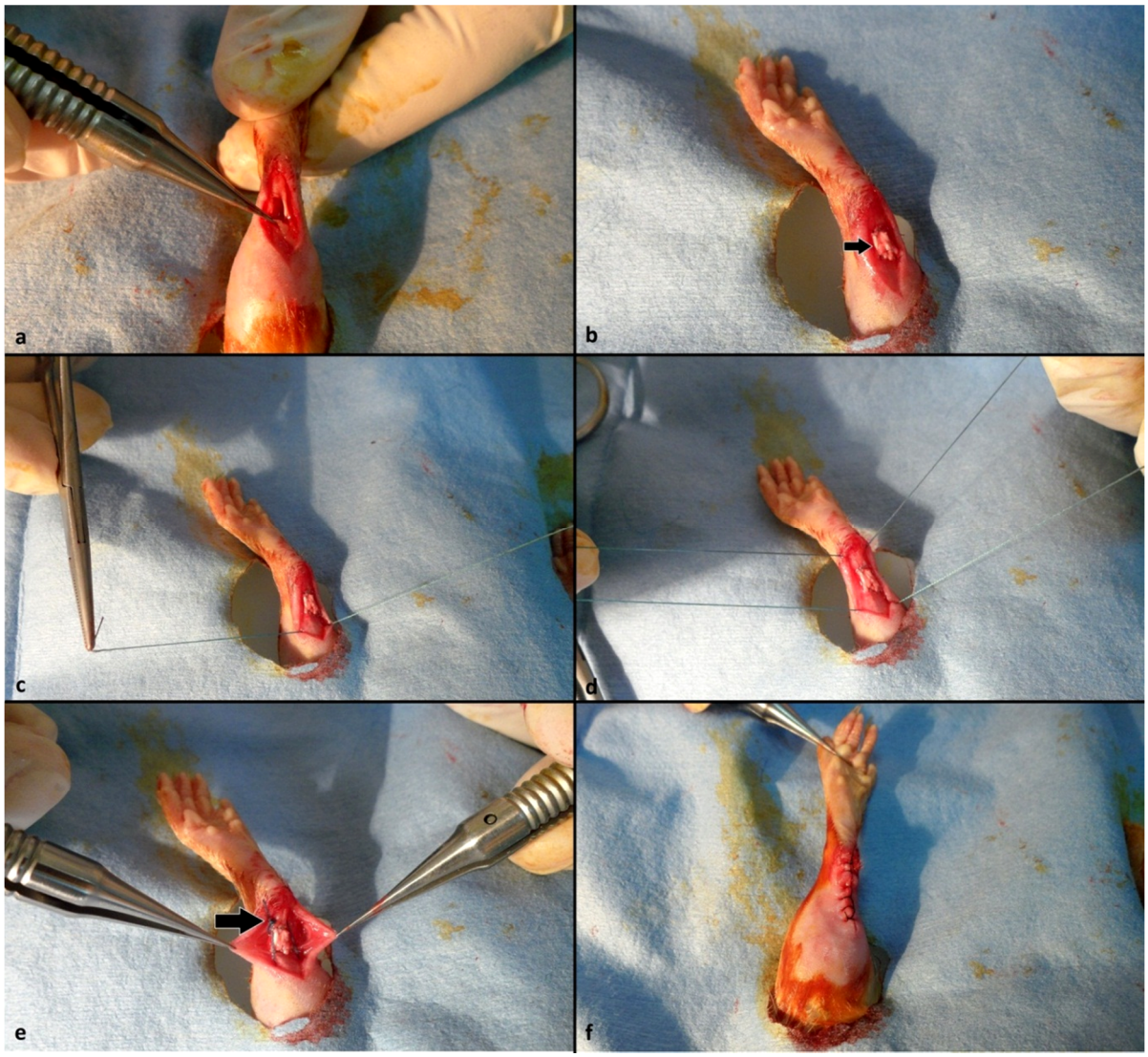
Şekil 3.7. a. Desellülerize matriksin makroskobik görünümü (DCM) **b.** DCM'in 8-0 abzorbe edilebilir ip ile distal ve **c-d.** proksimal kısımlarından dikildiği örnekler e. Kısmi immobilizasyon uygulaması için Aşil tendonu bölgesinin distal kısmı ve **f.** proksimal kısmından 4-0 abzorbe edilmeyen ipin geçirilişi **g.** Topuk kemiğine yakın bölgesine atılan düğüm (beyaz →) **h.** Sürekli-kilitli dikiş ile 6-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kapatılan deri görüntüsü

3.2.11. DCM+Tenosit Grubu (n=30) Cerrahi Protokolü

Çalışma planında DCM+Tenosit grubu (DCM+H) oluşturulmasının nedeni, DCM Kontrol grubu ile DCM+H grubu arasında inflamatuvar yanıt ve iyileşme gelişimi açısından farklılık olup olmadığını ortaya koymaktır. DCM+H grubu için hazırlanan DCM'lerin yüzeyine tenositler gömülmüş ve DCM – hücre kompozitleri elde edilmiştir. DCM+H grubu'nda yer alan sıçanlarda Aşil tendonunun orta 1/3'lük kesimi kesilerek uzaklaştırılmış; yerine hazırlanan DCM – tenosit kompozitleri transfer edilmiştir. DCM+H grubu'na uygulanan cerrahi işlem diğer gruplara benzerlik göstermektedir.

Sıçanlar operasyon günlerinde tartılarak intraperitonal 2mg/kg xylazine HCl ve 15mg/kg ketamine HCl enjeksiyonu ile anesteziye alınmıştır. Her iki bacaktaki kıllar jilet ve sabunlu su kullanarak temizlenmiştir. Cerrahi bölgeleri %10'luk poviodine solüsyonu ile silinerek dezenfekte edilmiştir. Cerrahi sırasında sıçanların üzerine steril örtü serilmiştir.

Steril koşullar altında, deri baldır kasının distal ucundan topuk kemiğine kadar olan kısmı insize edilmiştir. Aşil tendonu yüzeyindeki bağ doku kısımları temizlenmiş ve orta 1/3'lük kısmı (3mm uzunluğunda) bistüri yardımı ile kesilmiştir (Şekil 3.8.a). Kesilen kısım uzaklaştırıldıktan sonra önceki dönemde başka sıçanlardan izole edilerek antibiyotikli PBS içerisinde yıkanıp, -80ºC'de saklanmış ve yüzeyine tenosit gömülmüş olan DCM'ler 8-0 abzorbe edilebilir ip ile proksimal ve distal kısımlarından dikilmiştir (Şekil 3.8.b). Cerrahi bölgesine fazladan yük binmesini engellemek ve dikişlerin ayrılmasını önlemek için Aşil tendonu çevresine 4-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kısmi immobilizasyon uygulanmıştır. İğne kesilen 1/3'lük Aşil tendonu bölgesinin distal (Şekil 3.8.c) ve proksimalini (Şekil 3.8.d) kapsayacak şekilde baldır kasının ve topuk kemiğinin arasından geçirilmiş; kemiğe yakın bölgeye düğüm atılmıştır (Şekil 3.8.e). Deri sürekli-kilitli dikiş ile 6-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kapatılmıştır (Şekil 3.8.f).



Şekil 3.8. a. Orta 1/3'lük kısmı kesilerek uzaklaştırılmış olan Aşil tendonun boşluğu (penset ucu), **b.** proksimal ve distal kısımlarından dikilmiş DCM – hücre kompoziti (→), **c.** Kısmi immobilizasyon uygulaması için distal ve **d.** proksimal kısmından 4-0 abzorbe edilmeyen ip geçirilmiş Aşil tendonu bölgesi, **e.** Topuk kemiğine yakın bölgeye atılan düğüm (→) **f.** Sürekli-kilitli dikiş ile 6-0 abzorbe edilmeyen ip kullanılarak kapatılan deri görüntüsü

3.2.12. Postoperatif Uygulama

Tüm cerrahi uygulamaların sonrasında cerrahi bölgeleri dezenfeksiyon için %10'luk poviodine solüsyonu ile temizlenmiştir. Cerrahi bölgesinin temizliği için %10 poviodine uygulamasına post-operatif 3. güne kadar devam edilmiştir. Anestezi sırasında meydana gelebilecek hipotermi durumunu engellemek için tüm sıçanlar anesteziden çıkana kadar sıcak su sirküle eden sıcak ped (WBC3044-PR,

COMMAT™, Ankara, Türkiye) üzerinde tutulmuştur. Post-operatif olarak herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamıştır.

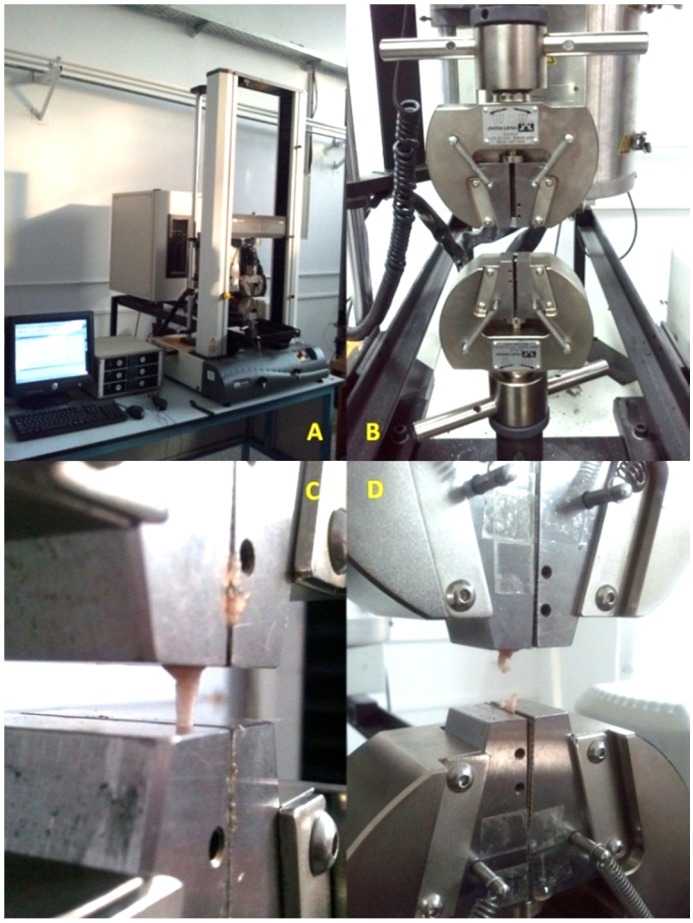
3.2.13. Histopatolojik İncelemeler

Sıçan tendonunda oluşturulan defekt sonrasında, hasarlı bölgeye implante/transplante edilen graftların rejenerasyon üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmada, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24. haftaların sonunda tüm gruplarda yer alan 90 adet sıçana eter inhalasyonu altında dekapitasyon ile ötanazi uygulandıktan sonra histopatolojik incelemeler için sağ bacaklardaki tendon dokusu alınmıştır. Kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanların tendon doku örnekleri vakit kaybedilmeden %10'luk formol solüsyonuna koyularak 24 saat boyunca tespit edilmiştir. Daha sonra dokular sırasıyla %70' lik, %80' lik, %95' lik, %99,9'luk alkol ve ksilen serilerinden geçirilip ve parafin ile bloklanmıştır. Bloklar mikrotomda (LEICA RM2125RT) 5µm kalınlığında kesilmiştir. Deney kapsamında yer alan 90 hayvanın her birisinden izole edilen tendon dokusu için üç preparat hazırlanmış ve hazırlanan preparatlar rutin Hematoksilen – Eozin (H&E) boyası ile boyanmıştır. Çalışmanın tüm deneysel gruplarına ait 270 adet tendon preparatı, yapılan uygulamalarla ilgili bilgisi olmayan tarafsız bir uzman ile ışık mikroskopta (LEICA DM3000) incelenerek histopatolojik bulgular fotoğraflanmış (LEICA DFC 420 / Leica Application Suite V3.0) ve değerlendirme histopatolojik puanlama metoduyla yapılmıştır. Elde edilen veriler Statistica 8.0 programı ile istatistiksel olarak test edilmiştir. Gruplar arasında haftalara bağlı olarak meydana gelmesi beklenen değişikliklere ait puanlar ANOVA ve *post-hoc* Bonferroni testleri ile sınanmıştır.

Çalışma kapsamında fazla sayıda deney hayvanı kullanılması ve her bir hayvandan 3 adet histolojik preperat olmak üzere, toplam 270 adet preperat incelendiğinden; karışıklık oluşmasını engellemek için her bir sıçana ayrı kod numarası verilmiştir. Bu kodlarda görülen ilk büyük harf sıçanın bulunduğu grubu (K:Kontrol, D:DCM Kontrol, H:DCM+Tenosit), sonraki rakam sıçanın çalışma kapsamındaki numarasını, ardından gelen küçük harf farklı bir histolojik preperatı (a:1., b:2., c:3. preperat) ve W(hafta) önündeki rakam ise preperatın ait olduğu uygulama sonlandırma haftasını göstermektedir. Örn; K1a2W.

3.2.14. Biyomekanik Ölçümler

Biyomekanik gerim testleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkezi Laboratuvar, AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Graftların implantasyon/transplantasyonunu takip eden 4, 8, 12 ve 24. haftaların her birisinde kontrol ve uygulama gruplarına ait sıçanlara (n=120) ötanazi uygulanarak, cerrahi bölgeleri tekrar açılıp her bir sıçanın sol bacağına ait baldır kası ve topuk kemiği ile birlikte tendon dokuları çıkartılmıştır.



Şekil 3.9. A. Biyomekanik gerim cihazı **B.** Klamp düzeneği **C.** Klampler arasına yerleştirilmiş tendon örneği **D.** Gerim sonrası kopmuş tendon örneği

Biyomekanik testler, materyal test cihazı (Instron, Model No:3367, Şekil 3.9.A,B) kullanılarak Arsenberg ve Virchenko [104]'nun metodolojisine göre 4, 8, 12 ve 24. haftalara ait örnekler üzerinde yapılmıştır. Tendon dokusu vücuttan uzaklaştırıldıktan sonra test zamanına kadar serum fizyolojik ile nemlendirilmiş gazlı bez arasında tutulmuştur. Tendon örnekleri iki metal kıskaç arasına sabitlenmiştir (Şekil 3.9.C). Sabitleme sonrasında örnekler 1mm/saniye'lik çekme gücü ile kopana kadar test edilmiştir (Şekil 3.9.D). Uygulanan testler sonucunda örneklere ait maksimum yük (N), alan (mm^2), rijitlik (N/mm), gerilme (Mpa), uzama (mm), Young Modülü (Mpa), gerinme (%) ve enerji alımı (mJ) verileri elde edilmiştir. Bu veriler ANOVA ve *post-hoc* Bonferroni testi ile istatistiksel olarak yorumlanmış ve stres-gerim grafikleri çizilmiştir. Örneklerin kesit alanları ImageJ programı kullanılarak hesaplanmıştır.

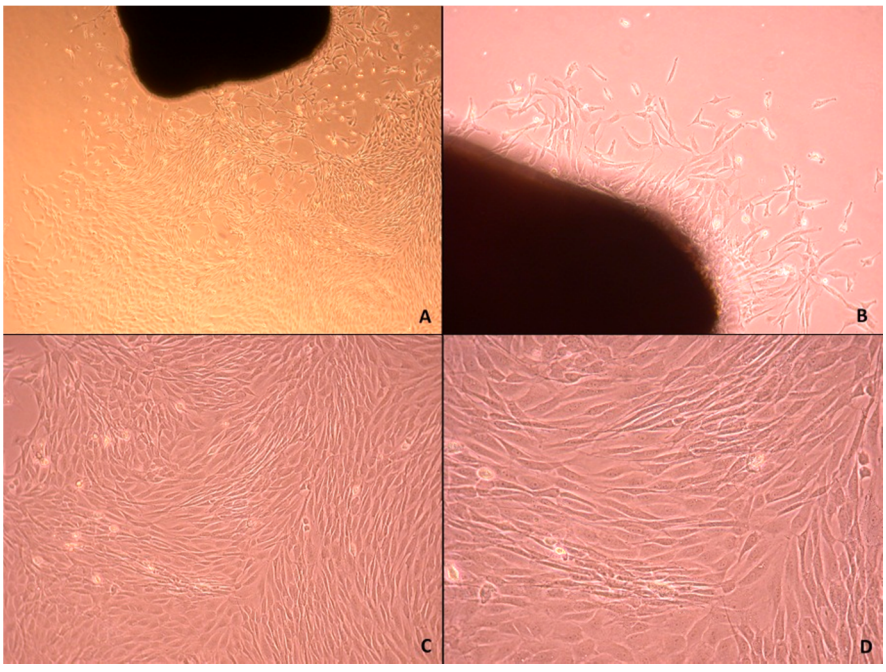
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Sonuçlar

4.1.1. Tenosit Kültürü

Elde edilen bulgulara göre, tenositlerin primer hücre kültürlerinde dokudan substrat yüzeyine göç etme süreleri ortalama 10 gündür. Konfluensiye ulaşan plakların 25cm^2'lik ve 175cm^2'lik flasklara pasajlanmasının ardından, hücrelerin bu substrat yüzeylerini kaplamaları ortalama 3-5 gün arasında değişiklik göstermiştir.

Belirli günlerde dokudan ayrılarak plak yüzeyini kaplayan hücrelerin ve konfluent substrat yüzeylerinin fotoğrafı çekilmiştir (Şekil 4.1.A-D). Tüm gözlemlerde hücrelerin son derece sağlıklı olduğuna karar verilmiştir. Transplantasyon sürecinde genotipik değişime uğramamış (bazı spesifik tenosit genlerinin ifadesinin devam ettiği) tenositler kullanılmak istenildiğinden; hücreler 3. kuşağa (P3) kadar pasajlanmıştır. P1, P2 ve P3 hücreleri daha sonraki aşamada kullanılmak üzere dondurularak saklanmıştır.

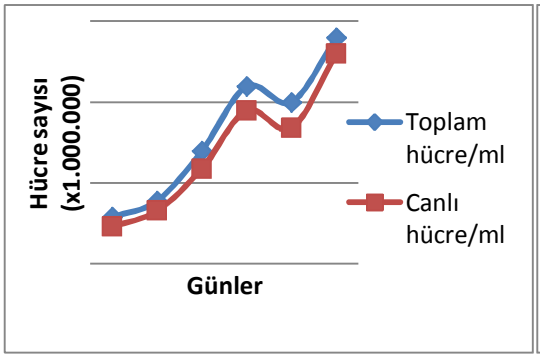


Şekil 4.1. Dokudan substrat yüzeyine göç eden tenositlerin **A.** (X40) **B.** (X100) görüntüsü, Konfluent substrat yüzeyinin **C.** (X100) **D.** (X200) görüntüsü

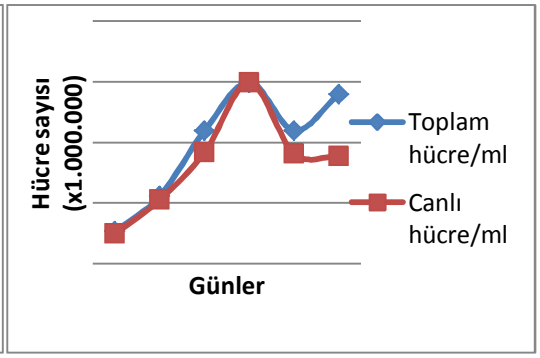
4.1.2. Hücre Üreme Eğrileri

Şekil 4.2.A-C'de sırasıyla P1, P2 ve P3 tenositlerine ait hücre sayımlarından elde edilen verilerle çizilmiş hücre üreme eğrileri görülmektedir. Grafikler üzerinde hem toplam hücre/ml sayımları, hem de canlı hücre/mL sayımlarına ait sonuçlar gösterilmiştir. Başlangıçtaki canlı hücre sayısı $2x10^4$ - $3x10^4$ hücre/ml aralığında ayarlanmıştır.

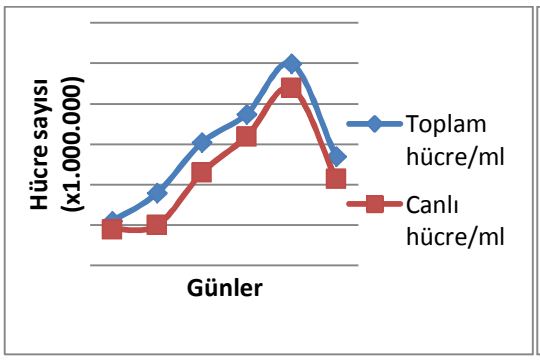
Grafikler incelendiğinde, elde edilen eğrilerin standart hücre üreme eğrilerinden bir takım farklılıklar içerdiği gözlenmektedir. Bu eğrilerde tenositlerin *lag fazına* girmeden, doğrudan *eksponansiyel faza* girdikleri ve bu fazda 4-5 gün boyunca üremeye devam ettikleri görülmektedir. Ortalama 5. günden itibaren plaklardaki canlı hücre sayılarında azalma olduğu saptanmıştır.



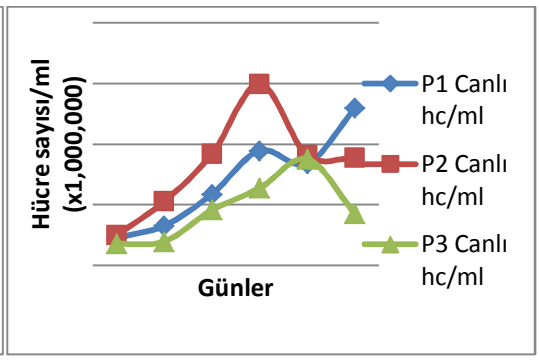
Şekil 4.2.A. P1 hücre üreme eğrisi



Şekil 4.2.B. P2 hücre üreme eğrisi



Şekil 4.2.C. P3 hücre üreme eğrisi



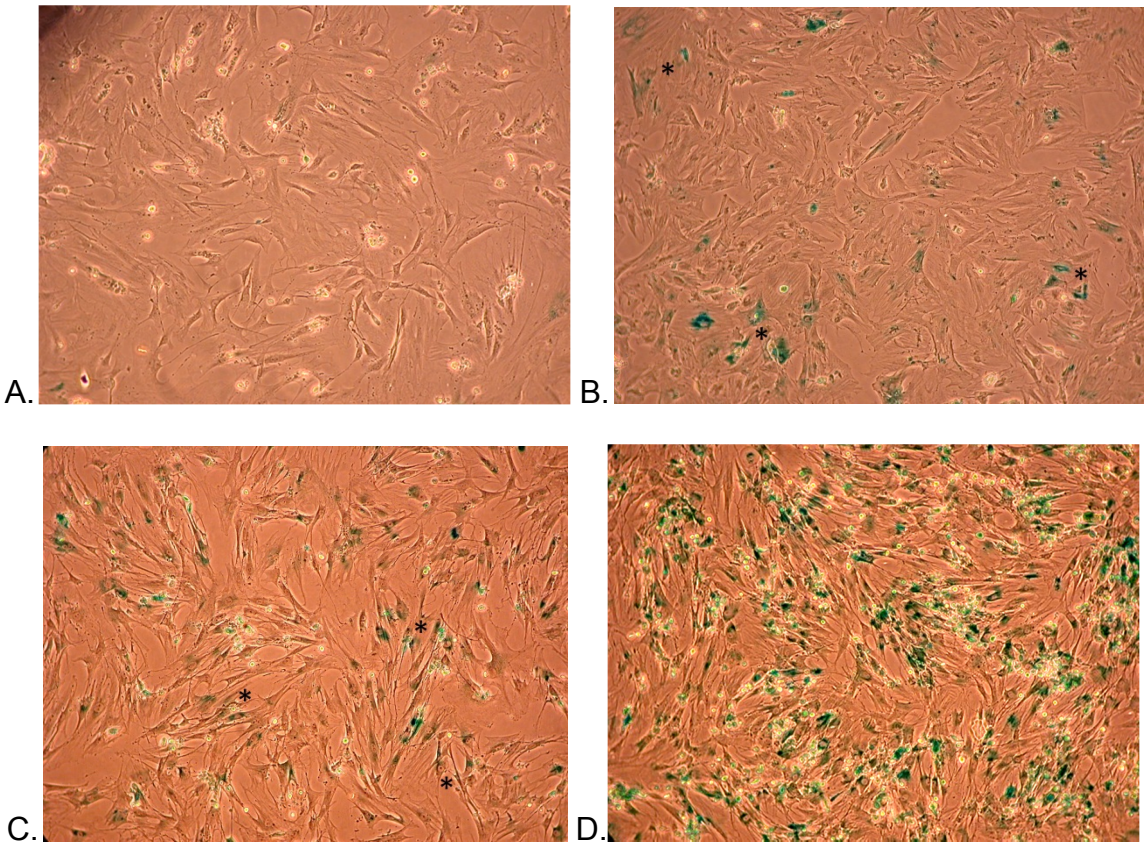
Şekil 4.2.D. P1, P2, P3 hücre üreme eğrileri

Şekil 4.2.D'de P1, P2 ve P3 tenositlerinin sayımlardan elde edilen canlı hücre sayılarına ait eğriler bir arada görülmektedir. Bu grafik incelendiğinde

eksponansiyel fazda görülen hücre üremesi etkinliğinin sırasıyla en yüksek P2'de, daha sonra P1 ve en az P3'te olduğu ortaya çıkmaktadır.

4.1.3. β-Galaktozidaz Aktivitesi

Şekil 4.3'te β-galaktozidaz aktivitesinin immünositokimyasal boyama sonuçları görülmektedir. P0 hücreleri dokudan henüz ayrılan en genç hücreler oldukları için kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.3.A). Bu hücrelerde yaşlanma olmadığından β-galaktozidaz negatif (-) boyanma tespit edilmiştir. P1, P2 ve P3 hücrelerinde ise hücre yaşlanması saptanmış olup, hücrelerin bazıları β-galaktozidaz pozitif (+) boyanmıştır (Şekil 4.3.B-D). Boyanan hücre yoğunluğu göz önüne alındığında, β-galaktozidaz aktivitesinin P0'dan P3'e doğru artış gösterdiği görülmektedir.

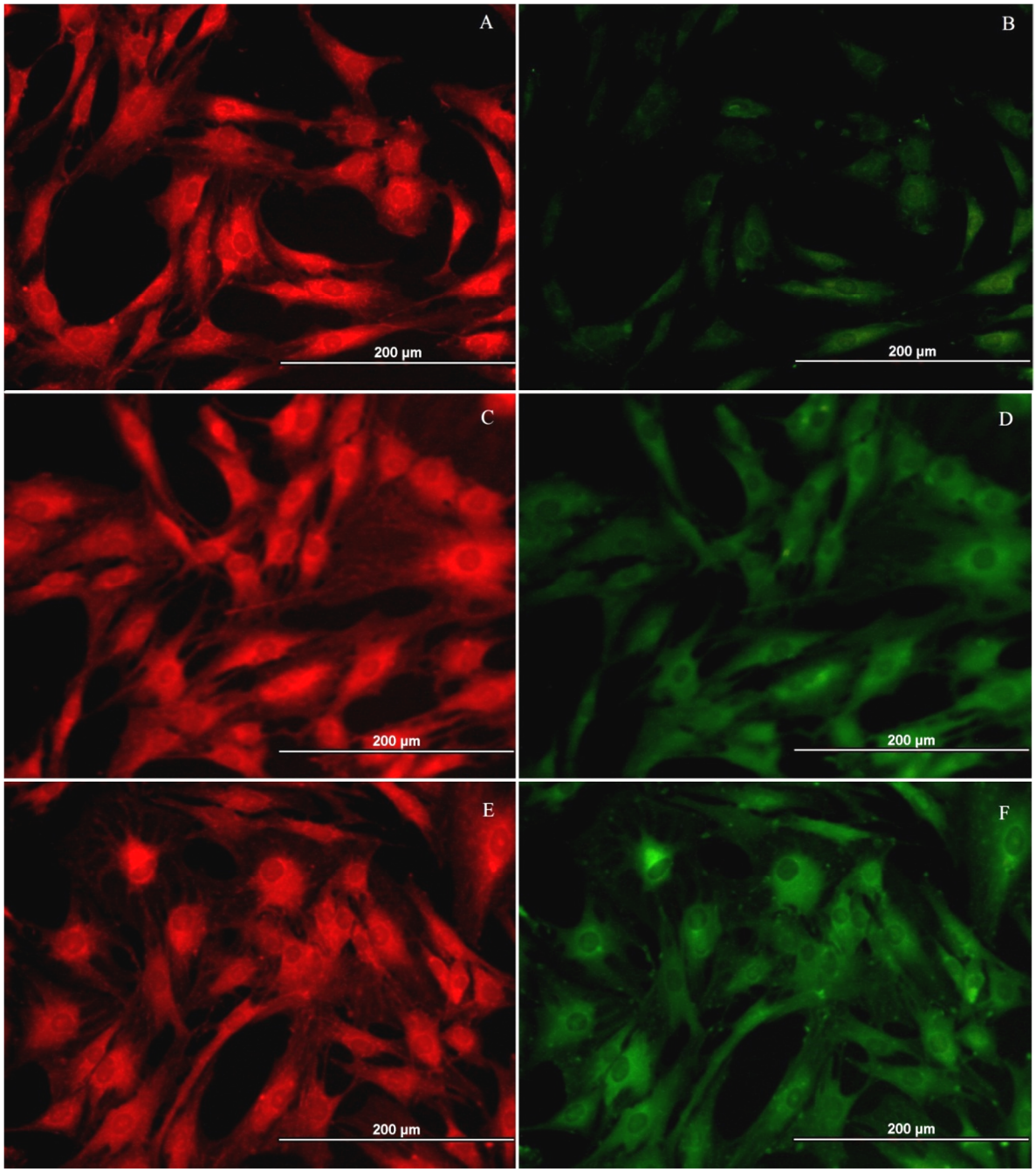


Şekil 4.3. A. Kontrol (P0), **B.** P1, **C.** P2, **D.** P3 tenositlerinde β-galaktozidaz aktivitesi pozitif hücreler (*) (X100).

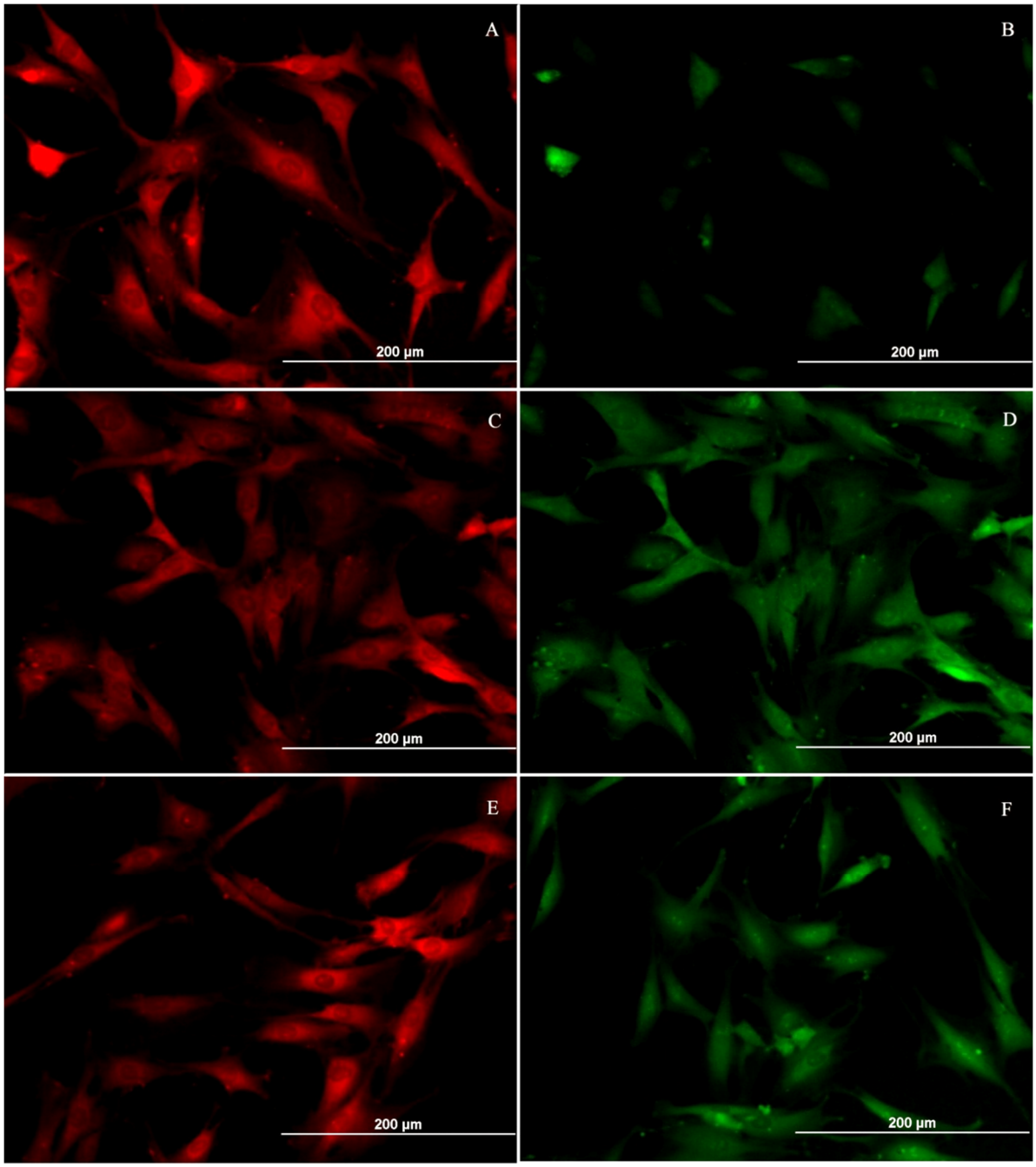
4.1.4. İkili-İmmünofloresan Boyama

Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da sırasıyla 1. Pasaj (P1), 2. Pasaj (P2) ve 3. Pasaj (P3) tenositlerine ait örneklerde uygulanan ikili-immünofloresan boyama sonuçları görülmektedir. Tüm örneklerde tip 1 kollajen/tip 2 kollajen, tip 3 kollajen/tip 5 kollajen, tenomodulin/tenascin-C antijenleri ikili olarak boyanmıştır. Her üç boyamada da ilk antijenler Rhodamine florokromu (kırmızı) ile, ikinci antijenler ise Fluorescein florokromu (yeşil) ile işaretlenmiştir.

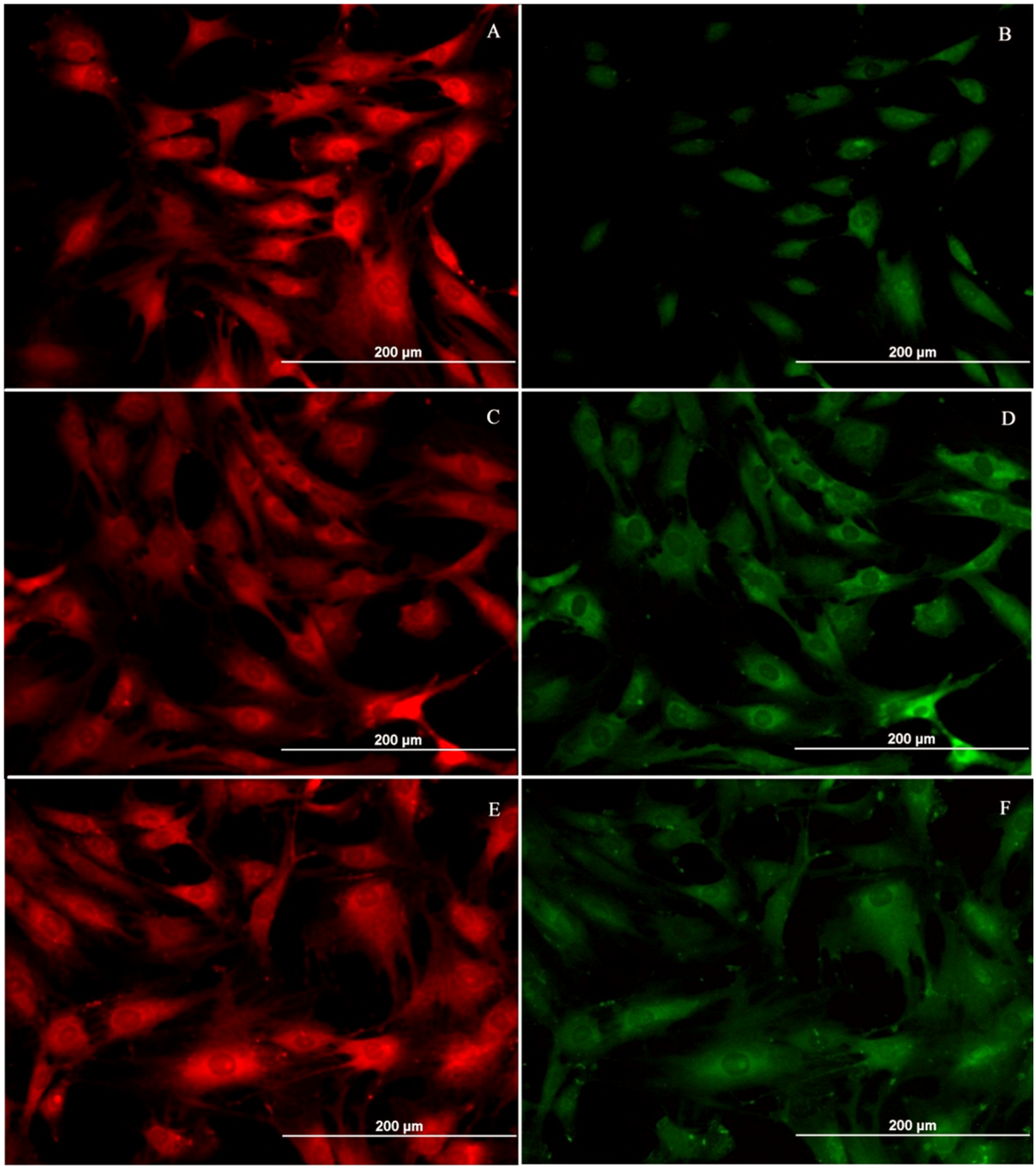
Yapılan incelemede, tüm pasajlara ait örneklerde tip 2 kollajen hariç, diğer antijenler için yüksek oranda pozitif boyanma gözlenmiştir. Tip 2 kollajen molekülü yaygın olarak "kıkırdak dokusu" kökenli hücrelere ait bir marker molekül olduğundan, boyamalarda negatif kontrol antijeni olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, diğer antijenlerde gözlenen boyanma yoğunluğu ile karşılaştırıldığı zaman işaretlemenin daha az olması beklenen bir bulgudur. Burada tip 2 kollajen, sentezi az olması ya da hiç olmaması beklenen bir moleküldür.



Şekil 4.4. P1 tenositlerinde **A.** tip 1 kollajen **B.** tip 2 kollajen **C.** tip 3 kollajen **D.** tip 5 kollajen **E.** tenomodulin **F.** tenascin-C antikorları ile ikili-immünofloresan boyama sonuçları görülmektedir



Şekil 4.5. P2 tenositlerinde **A.** tip 1 kollajen **B.** tip 2 kollajen **C.** tip 3 kollajen **D.** tip 5 kollajen **E.** tenomodulin **F.** tenascin-C antikorları ile ikili-immünofloresan boyama sonuçları görülmektedir



Şekil 4.6. P3 tenositlerinde **A.** tip 1 kollajen **B.** tip 2 kollajen **C.** tip 3 kollajen **D.** tip 5 kollajen **E.** tenomodulin **F.** tenascin-C antikorları ile ikili-immünofloresan boyama sonuçları görülmektedir

4.1.5. RNA İzolasyonu ve Nanodrop Ölçüm Sonuçları

Tek tabakalı kültürlerden elde edilen Total RNA miktarlarının Nanodrop ölçüm sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir:

Çizelge 4.1. P1, P2 ve P3 örneklerinden elde edilen tenositlerdeki total RNA miktarlarının A260/A280 ve A260/A230 absorbans değerlerine göre Nanodrop ile ölçüm sonuçları

Örnek	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
P1 tenosit	451,8	11,295	5,425	2,08	0,72
P2 tenosit	486,92	12,173	6,641	1,83	0,57
P3 tenosit	641,12	16,028	7,85	2,04	1,55

4.1.6. RT-PCR

RT-PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen veriler Pfaffle Formülasyonu [105] kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu formülasyonda iç kontrol gen olarak sonuçların normalizasyonu için *Gapdh* kullanılmış ve diğer genlerin relatif ifade profilleri incelenmiştir. Hesaplamalardan elde edilen sonuçlar P1-P2, P2-P3 ve P1-P3 olarak karşılaştırılmıştır.

Hesaplama sonuçlarına ait grafikler Şekil 4.7-4.12'de görülmektedir. Tüm grafiklerin dikey ekseninde *Gapdh*'e göre relatif gen ifadelerinin başladığı ilk PCR döngülerinin sayıları P1, P2 ve P3 örnekleri için ayrı ayrı verilmiştir. Yatay eksende ise P1, P2 ve P3 olarak tenosit örneklerinin adları yer almaktadır. Dikey eksende yer alan PCR döngü sayıları mevcut örnekteki genin ifade miktarı ile ters orantılıdır. Yani mevcut örnekteki bir gen bölgesinin analiz sırasındaki ifadesi ne kadar fazla ise, PCR reaksiyonları sırasında bir o kadar erken sayıdaki döngüde ifadesi tespit edilmeye başlanmıştır.

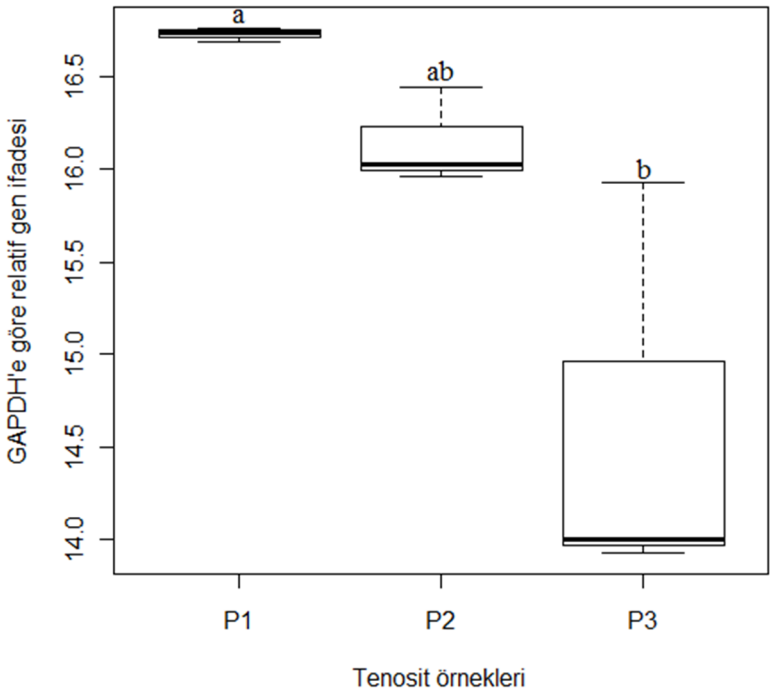
Genlerin ifade grafikleri incelendiğinde; *Tnsc* hariç diğer tüm genlerin ifadesinin P1'le kıyaslandığı zaman P2 ve P3'te sırasıyla artış gösterdiği

görülmektedir. Bu durum, *Tnsc* gen bölgesinin ifade profilinde tam tersi şekilde ortaya çıktığı görülmektedir.

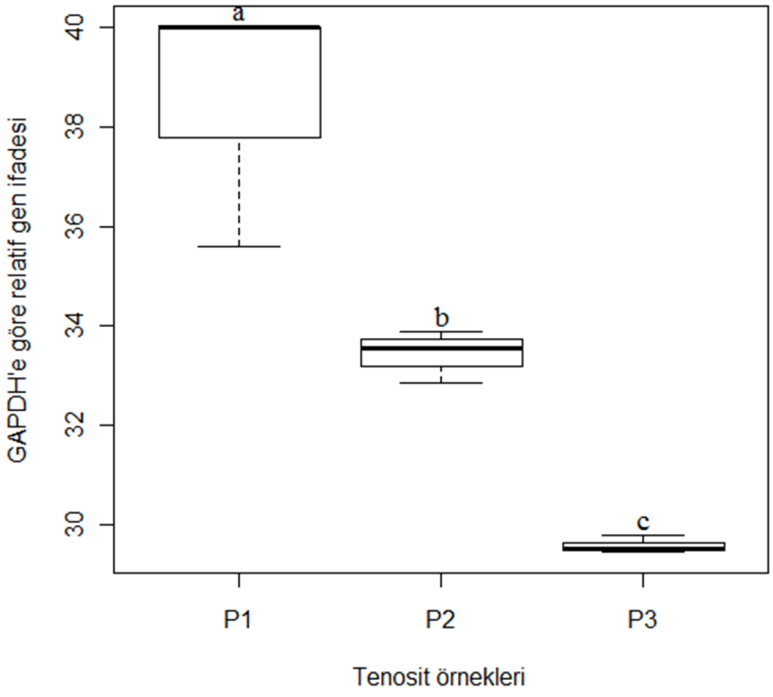
Col1, *Col3*, *Col5* ve *Tnmd* hücre içerisinde birbiri ile ilişkili olarak sentezlenen tenosit markerları olduğundan; elde edilen bulgular çalışmanın hipotezini desteklemektedir. Bu durum, çalışma için kullanılan tenositlerde herhangi bir fenotipik ya da genotipik kayma olmadığını ortaya koymaktadır. Hücreler, tenositik karakterlerinin kanıtı olan genleri pasajlar arası artan miktarlarda ifade etmeye devam etmekte olduklarından transplantasyon için uygun bulunmuşlardır. Tüm genlerin ifade profilleri P1'e kıyasla P2 örneklerinde az miktarda artış gösterirken, P1'e göre P3 örneklerinde çok daha yoğun bir artış sergilemektedir.

Diğer genler ile karşılaştırıldığı zaman, negatif kontrol için kullanılan *Col2*'nin gen ifadesinin, oldukça geç PCR döngülerinde başladığı dikkati çekmektedir (≈40. Döngü). Tip 2 kollajen, önceden elde edilen kaynak bilgilerine göre, varlığı yüksek oranda kıkırdak hücrelerinde tespit edilen bir proteindir. *Col2*'nin mevcut çalışmada kullanılan tenositlerde diğer gen bölgelerine kıyasla çok sonraki PCR döngülerinde ortaya çıkması ve dolaylı olarak sentezinin diğer gen bölgeleri ile kıyaslandığı zaman çok daha az miktarlarda olması çalışmamız için beklenen bir sonuçtur. *Col2*'de bu durumun gözlenmesi hücrelerin tenositik karakterlerini muhafaza ettiklerinin bir diğer kanıtıdır.

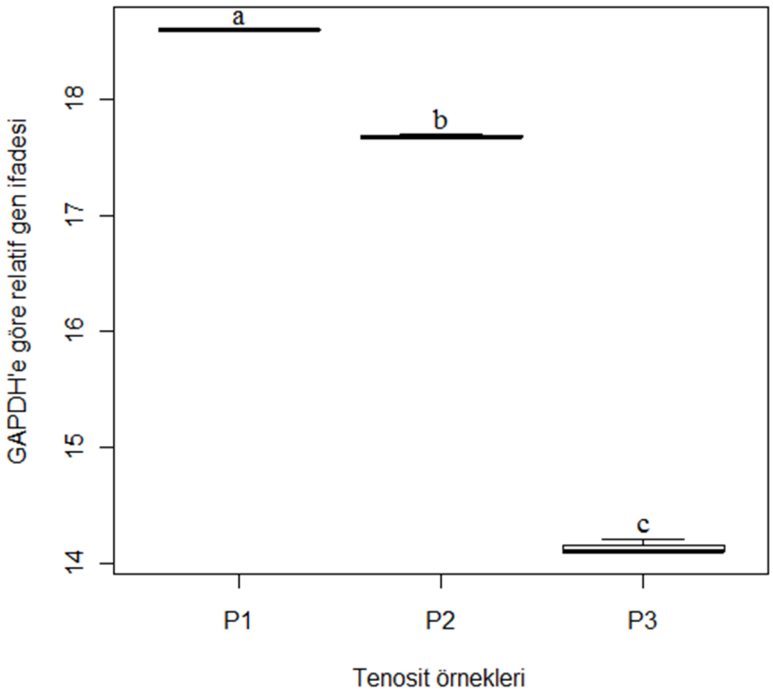
Tnsc proteini ise tendon yaralanmaları ve rejenerasyonu sırasında ifadesinin arttığı bir molekül olarak bilindiğinden; bu proteinin ifadesinin ilerleyen pasajlarda (P1'e oranla P2 ve P3'te) azalan bir profil izlemiş olması hücrelerin takip ettiğimiz *in vitro* koşullarda kendilerini travmatik ortamda hissetmediklerini ve pasajlanma ile ortama uyum sağladıklarını göstermektedir.



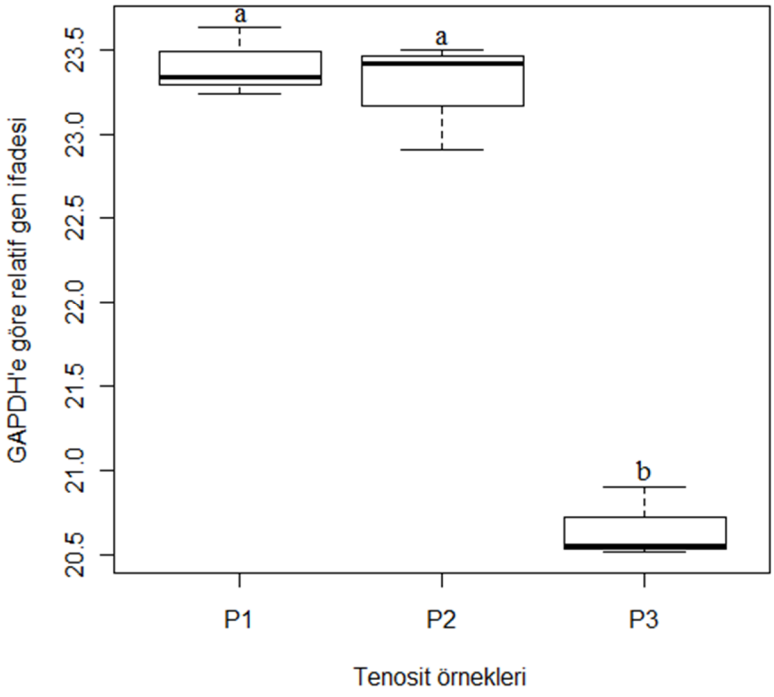
Şekil 4.7. P1, P2 ve P3 örneklerinde *Gapdh*'e göre relatif C*ol1* ifadesi. Kutular üzerinde yer alan farklı üst-semboller, gruplar arasında yer alan istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade ederken (p≤0,05); aynı üst-semboller gruplar arasında farklılık olmadığını göstermektedir.



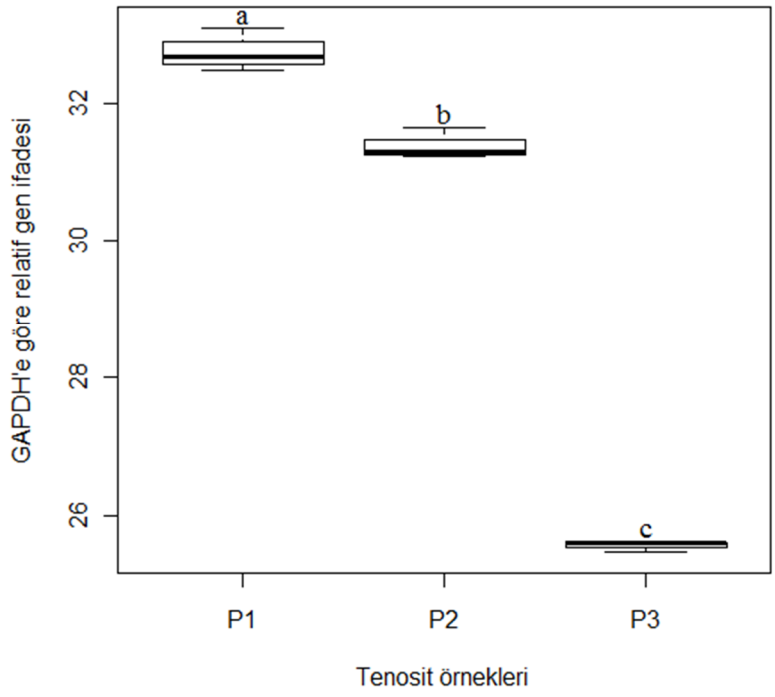
Şekil 4.8. P1, P2 ve P3 örneklerinde *Gapdh*'e göre relatif *Col2* ifadesi. Kutular üzerinde yer alan farklı üst-semboller gruplar arasında yer alan istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder (p≤0,05).



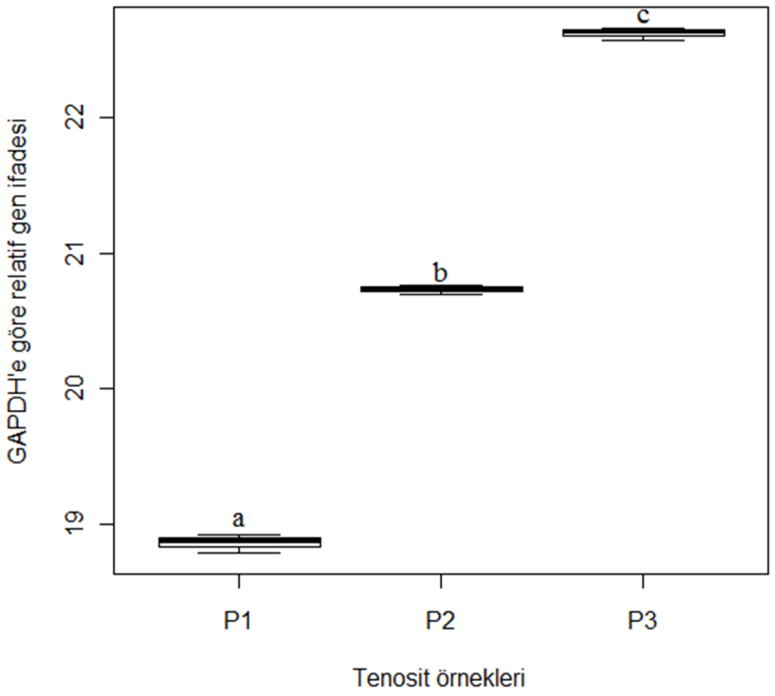
Şekil 4.9. P1, P2 ve P3 örneklerinde *Gapdh*'e göre relatif *Col3* ifadesi. Kutular üzerinde yer alan farklı üst-semboller gruplar arasında yer alan istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder (p≤0,05).



Şekil 4.10. P1, P2 ve P3 örneklerinde *Gapdh*'e göre relatif *Col5* ifadesi. Kutular üzerinde yer alan farklı üst-semboller, gruplar arasında yer alan istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade ederken (p≤0,05); aynı üst-semboller gruplar arasında farklılık olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.11. P1, P2 ve P3 örneklerinde *Gapdh*'e göre relatif *Tnmd* ifadesi. Kutular üzerinde yer alan farklı üst-semboller gruplar arasında yer alan istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder (p≤0,05).



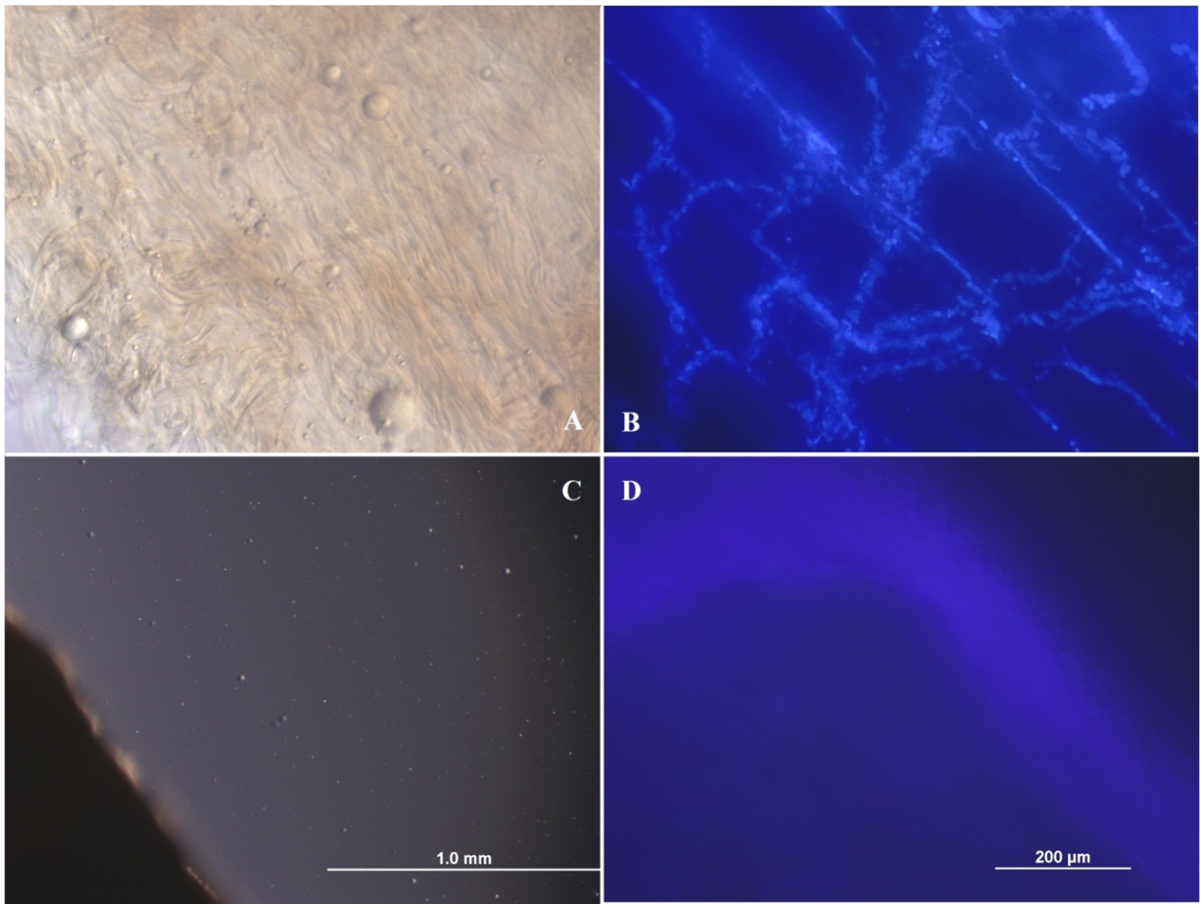
Şekil 4.12. P1, P2 ve P3 örneklerinde *Gapdh*'e göre relatif *Tnsc* ifadesi. Kutular üzerinde yer alan farklı üst-semboller gruplar arasında yer alan istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları ifade eder (p≤0,05).

4.1.7. Deselülerize Tendon Matrikslerinin Kontrolü

Uygulama öncesinde ve sonrasında tendon dokuları 24 saat 37°C %5 CO_2'li inkübatörde bekletilerek DAPI ile boyandıktan sonra floresan mikroskop ile incelenerek matrikslerinin tamamen hücresiz kaldığı doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.13'te görülmektedir.

DCM hazırlık aşamasında, izole edilen tendon matriksleri öncelikle inverted mikroskop altında plak üzerine yerleştirilerek incelenmiştir (Şekil 4.13.A). Yapılan incelemede, hafif dalgalanmalar gösteren kollajen fibril demetleri ve demetlerin çevresinde az miktarda yağ hücrelerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu matriksler 24 saat DAPI solüsyonu ile 37°C %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiş ve doku yüzeyindeki hücrelerin diziler şeklinde kollajen fibril demetlerinin arasında yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.13.B).

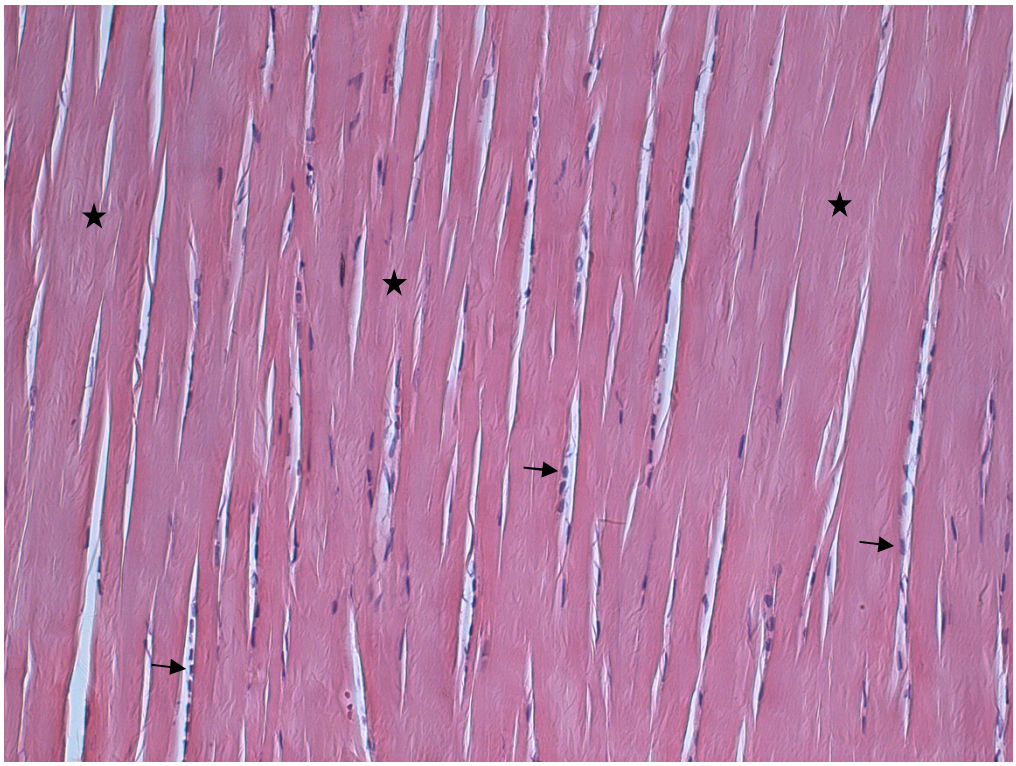
Matriksler, %0,05 Tripsin-EDTA ile 24 saat 37^{o}C %5 CO_2'li inkübatörde, daha sonra %0,5 Triton X-100 ile 24 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar mikroskobik olarak incelenmiştir. Yapılan değerlendirmede tenositlerin her iki uygulama sonrasında da matriks yüzeyinden ayrılarak substrat içerisinde yüzdükleri belirlenmiştir (Şekil 4.13.C). Bu matriksler deselülerizasyon sonrası 24 saat DAPI solüsyonu ile 37°C %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edildikten sonra görüntülenmiş ve matriks yüzeyinin tamamen hücreden arındırıldığı doğrulanmıştır (Şekil 4.13.D). Elde edilen tüm görüntüler, uygulanan tekniğin tendon matriksinin deselülerize edilmesinde başarılı olduğunu ortaya koymaktadır.



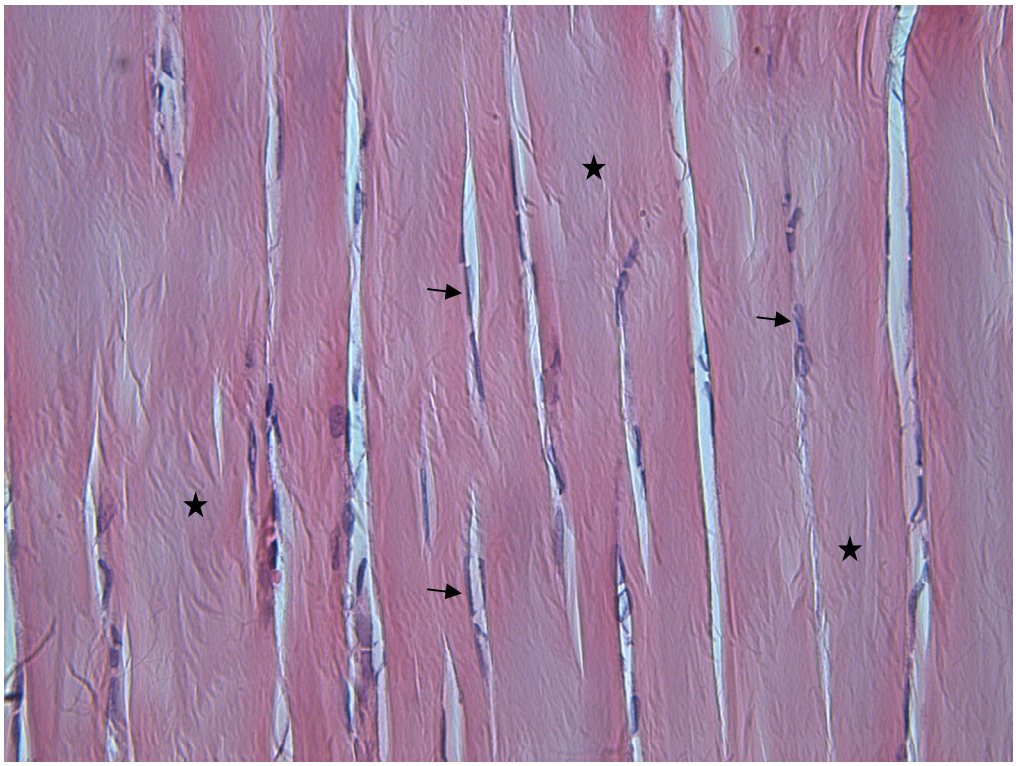
Şekil 4.13 DCM preparasyon aşamaları **A.** Henüz deselülerize edilmemiş tendon matriksinin mikroskobik görüntüsü **B.** Deselülerize edilmemiş tendon matriksinin 24 saat DAPI ile inkübasyonu sonrasında doku yüzeyinde boyanmış hücreler **C.** Tripsin ve Triton-X uygulaması sonrası deselülerize edilmiş tendon matriksinin çevresinde yüzen tenositler **D.** Deselülerize tendon matriksinin 24 saat DAPI ile inkübasyonu sonrasındaki görüntüsü

4.1.8. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

Kontrol ve uygulama gruplarındaki sıçanların tendon doku preparatları Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelenmiştir. Normal (sağlıklı) tendon grubuna ait tendon doku kesitlerinde kollajen fibril dağılımı, hücrelerarası alan ve hücre dağılımlarında herhangi bir histopatolojik bulgu saptanmamıştır (Şekil 4.14,15).



Şekil 4.14. Sağlıklı bireye ait normal tendon kesitinde paralel düzenlenmiş kollajen fibrillerin (*) ve tenositlerin (→) histolojik görüntüsü. Boya: H&E, Büyütme: X100



Şekil 4.15. Sağlıklı bireye ait normal tendon kesitinde paralel düzenlenmiş kollajen fibrillerin (*) ve tenositlerin (→) histolojik görüntüsü. Boya: H&E, Büyütme: X200

Uygulama gruplarında yer alan 90 adet sıçana ait 270 tendon preparatı için histolojik puanlama yapılmıştır. Puanlama için yedi adet kriter belirlenmiştir. Bunlar: hücrelerarası alan organizasyonu, hücre/matriks oranı, hücre dağılımı, iyileşme bölgesinin görünümü, dejeneratif değişiklikler/doku metaplazisi, damarlanma ve inflamasyondur. Cerrahi işlem uygulanmamış sağlıklı tendon dokusu “normal tendon” olarak kabul edilmiş ve 12 tam puan verilmiştir. Histolojik puanlama kriterleri ve her bir hayvana ait preparata verilen puan Çizelge 4.2-10’da verilmiştir.

Çizelge 4.2. 2 ve 4 haftalık Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	K1a2W	K1b2W	K1c2W	K2a2W	K2b2W	K2c2W	K3a2W	K3b2W	K3c2W	K4a2W	K4b2W	K4c2W	K5a2W	K5b2W	K4c2W	K6a4W	K6b4W	K6c4W	K7a4W	K7b4W	K7c4W	K8a4W	K8b4W	K8c4W	K9a4W	K9b4W	K9c4W	K10a4W	K10b4W	K10c4W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**		2																												
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**			1	1			1			1	1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**	0				0	0		0	0				0	0	0															
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**		2																												
Hücre sayısında lokal artış	**1**			1				1			1	1	1				1	1				1	1		1			1			
Hücre sayısında genel artış	**0**	0			0	0	0		0	0				0	0	0			0	0	0			0		0	0		0	0	0
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**	1	1		1	1	1		1	1				1	1	1			1	1	1	1		1	1	1	1		1	1	1
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**			0				0			0	0	0				0	0					0					0			
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**		2																												
Lokal heterojen doku görünümü	**1**			1				1			1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**	0			0	0	0		0	0					0	0										1	1				
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**	3	3	3	3	3	3	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		3			3	3	3	3	3	3	
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**									0											0		0	0							0
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**		1																			1			1						
Hiper damarlanma	**0**	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0	0
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**	1	1			1					1	1	1			1	1	1			1	1			1	1		1		1	1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**			0	0		0	0	0	0				0	0				0	0			0	0			0		0		

Çizelge 4.3. 6 ve 8 haftalık Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	K11a6W	K11b6W	K11c6W	K12a6W	K12b6W	K12c6W	K13a6W	K13b6W	K13c6W	K14a6W	K14b6W	K14c6W	K15a6W	k15b6W	K15c6W	K16a8W	K16b8W	K16c8W	K17a8W	K17b8W	K17c8W	K18a8W	K18b8W	K18c8W	K19a8W	K19b8W	K19c8W	K20a8W	K20b8W	K20c8W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**							2		2	2		2	2			2	2	2			2				2	2	2		2	
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**	1	1	1	1	1	1		1			1			1	1				1	1		1	1	1				1		1
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**																														
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**										2		2	2			2	2				2									
Hücre sayısında lokal artış	**1**	1	1	1	1	1		1	1	1					1	1			1								1	1			1
Hücre sayısında genel artış	**0**						0					0								0	0		0	0	0	0			0	0	
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**				1	1	1	1			1	1	1				1		1	1	1	1				1	1	1			
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**	0	0	0					0	0				0	0	0		0					0	0	0				0	0	0
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**							2			2		2				2					2				2	2				
Lokal heterojen doku görünümü	**1**	1	1	1	1	1	1		1	1		1		1	1	1		1	1									1	1	1	1
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**																			0	0		0	0	0						
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**	3	3	3			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			3				3	3				3
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**				0	0														0	0		0	0	0			0	0	0	
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**							1			1	1	1				1	1				1									
Hiper damarlanma	**0**	0	0	0	0	0	0		0	0				0	0	0			0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**	1		1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1					1		1	1	1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**		0				0												0				0	0	0	0		0			

Çizelge 4.4. 12 ve 24 haftalık Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	K21a12W	K21b12W	K21c12W	K22a12W	K22b12W	K22c12W	K23a12W	K23b12W	K23c12W	K24a12W	K24b12W	K24c12W	K25a12W	K25b12W	K25c12W	K26a24W	K26b24W	K26c24W	K27a24W	K27b24W	K27c24W	K28a24W	K28b24W	K28c24W	K29a24W	K29b24W	K29c24W	K30a24W	K30b24W	K30c24W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**	2	2	2	2	2	2				2	2	2	2	2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		2	2
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**							1	1	1								1											1		
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**																0														
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**	2	2	2				2	2	2	2	2	2		2	2				2	2	2	2	2	2	2	2	2		2	2
Hücre sayısında lokal artış	**1**				1	1	1							1				1	1										1		
Hücre sayısında genel artış	**0**																0														
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**	1	1	1				1	1	1	1	1	1		1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**				0	0	0							0			0	0	0										0		
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**	2				2		2	2	2	2	2	2		2	2				2	2	2	2	2	2		2	2		2	2
Lokal heterojen doku görünümü	**1**		1	1	1		1							1				1	1							1			1		
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**																0														
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**	3	3	3	3	3		3	3	3	3	3	3		3	3					3		3	3	3						
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**						0							0			0	0	0	0		0				0	0	0	0	0	0
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**										1	1	1			1				1	1		1	1	1					1	1
Hiper damarlanma	**0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0				0	0		0	0	0			0				0	0	0	0		
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**	1	1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1					1	1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**				0	0	0										0	0								0	0	0	0		

Çizelge 4.5. 2 ve 4 haftalık DCM Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	D1a2W	D1b2W	D1c2W	D2a2W	D2b2W	D2c2W	D3a2W	D3b2W	D3c2W	D4a2W	D4b2W	D4c2W	D5a2W	D5b2W	D5c2W	D6a4W	D6b4W	D6c4W	D7a4W	D7b4W	D7c4W	D8a4W	D8b4W	D8c4W	D9a4W	D9b4W	D9c4W	D10a4W	D10b4W	D10c4W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**																		2										2	2	
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**	1	1	1										1	1	1	1	1		1	1	1		1		1	1	1	1		
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**				0	0	0	0	0	0	0	0	0										0		0						
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**																												2	2	2
Hücre sayısında lokal artış	**1**			1											1	1		1		1	1	1		1	1						
Hücre sayısında genel artış	**0**	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0		0				0			0	0	0			
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**		1		1	1	1		1		1	1	1	1					1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**	0		0				0		0					0	0	0	0						0	0						
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**																		2	2	2	2				2	2	2	2	2	2
Lokal heterojen doku görünümü	**1**	1	1	1	1	1	1							1	1	1	1	1						1	1						
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**							0	0	0	0	0	0										0								
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**	3	3	3	3	3	3		3					3		3		3	3				3	3	3	3	3	3	3	3	3
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**							0		0	0	0	0		0		0			0	0	0									
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**		1												1	1				1	1	1							1	1	1
Hiper damarlanma	**0**	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0	0				0	0	0	0	0	0			
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**	1	1	1					1						1	1			1	1	1	1				1	1	1	1	1	1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**				0	0	0	0		0	0	0	0	0			0	0					0	0	0						

Çizelge 4.6. 6 ve 8 haftalık DCM Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	D11a6W	D11b6W	D11c6W	D12a6W	D12b6W	D12c6W	D13a6W	D13b6W	D13c6W	D14a6W	D14b6W	D14c6W	D15a6W	D15b6W	D15c6W	D16a8W	D16b8W	D16c8W	D17a8W	D17b8W	D17c8W	D18a8W	D18b8W	D18c8W	D19a8W	D19b8W	D19c8W	D20a8W	D20b8W	D20c8W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**	2	2			2	2	2									2	2	2					2	2	2	2	2	2		
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**			1	1				1	1	1	1	1	1	1	1				1									1	1
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**																				0	0	0								
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**	2				2	2	2								2	2	2	2	2				2	2	2	2	2	2		
Hücre sayısında lokal artış	**1**								1	1	1	1	1	1	1														1	1
Hücre sayısında genel artış	**0**		0	0	0																0	0	0								
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**	1	1	1	1	1	1	1				1			1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	1		
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**								0	0	0		0	0							0	0	0							0	0
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**	2	2		2	2	2	2									2	2	2					2	2	2	2	2	2		
Lokal heterojen doku görünümü	**1**			1					1	1	1	1	1	1	1	1				1									1	1
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**																				0	0	0								
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**	3	3	3	3	3	3	3				3	3		3	3	3	3	3	3	3			3		3	3	3	3		
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**								0	0	0			0								0	0		0				0	0
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**	1				1	1	1								1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	1		
Hiper damarlanma	**0**		0	0	0				0	0	0	0	0	0	0						0	0	0							0	0
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**	1	1	1		1	1	1				1	1	1		1	1	1	1	1				1	1	1	1	1			
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**				0				0	0	0				0						0	0	0						0	0	0

Çizelge 4.7. 12 ve 24 haftalık DCM Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	D21a12W	D21b12W	D21c12W	D22a12W	D22b12W	D22c12W	D23a12W	D23b12W	D23c12W	D24a12W	D24b12W	D24c12W	D25a12W	D25b12W	D25c12W	D26a24W	D26b24W	D26c24W	D27a24W	D27b24W	D27c24W	D28a24W	D28b24W	D28c24W	D29a24W	D29b24W	D29c24W	D30a24W	D30b24W	D30c24W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**					2	2	2							2	2	2	2			2	2	2	2	2	2	2	2		2	2
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**	1	1	1	1							1	1	1						1									1		
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**								0	0	0								0												
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**					2	2	2							2	2	2				2	2	2	2	2	2	2	2			
Hücre sayısında lokal artış	**1**	1	1	1	1							1	1	1				1		1									1	1	1
Hücre sayısında genel artış	**0**								0	0	0								0												
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**					1	1	1				1	1	1	1	1	1		1		1	1	1	1	1	1	1	1			1
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**	0	0	0	0				0	0	0							0		0									0	0	
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**					2	2	2													2	2	2	2	2	2	2	2			2
Lokal heterojen doku görünümü	**1**	1	1	1	1							1	1	1	1	1	1	1		1									1	1	
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**								0	0	0								0												
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**											3	3	3	3		3				3	3			3	3		3	3		
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0					0		0	0	0			0	0			0			0	0
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**							1				1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	1	1	1			1
Hiper damarlanma	**0**	0	0	0	0	0	0		0	0	0							0	0	0									0	0	
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**					1	1	1				1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	1					1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**	0	0	0	0				0	0	0							0	0	0							0	0	0	0	

Çizelge 4.8. 2 ve 4 haftalık DCM+Tenosit Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	H1a2W	H1b2W	H1c2W	H2a2W	H2b2W	H2C2w	H3a2W	H3b2W	H3c2W	H4a2W	H4b2W	H4c2W	H5a2W	H5b2W	H5c2W	H6a4W	H6b4W	H6c4W	H7a4W	H7b4W	H7c4W	H8a4W	H8b4W	H8c4W	H9a4W	H9b4W	H9c4W	H10a4W	H10b4W	H10c4W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**														2	2	2		2												
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1				1		1		1	1		1	1	1	1	1	1	1
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**						0														0			0							
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**	2														2															
Hücre sayısında lokal artış	**1**														1		1		1											1	1
Hücre sayısında genel artış	**0**		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**	1		1	1	1		1	1	1	1	1	1	1				1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**		0				0								0	0	0		0												0
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**	2																													
Lokal heterojen doku görünümü	**1**		1	1											1	1	1		1	1		1	1		1	1				1	1
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				0			0			0			0	0	0		
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**			3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		3				3	3
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**		1																										1		
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**	0																							0		0	0			
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**	1																													
Hiper damarlanma	**0**		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1		1					1	1	1	1	1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**						0										0				0		0	0	0	0					

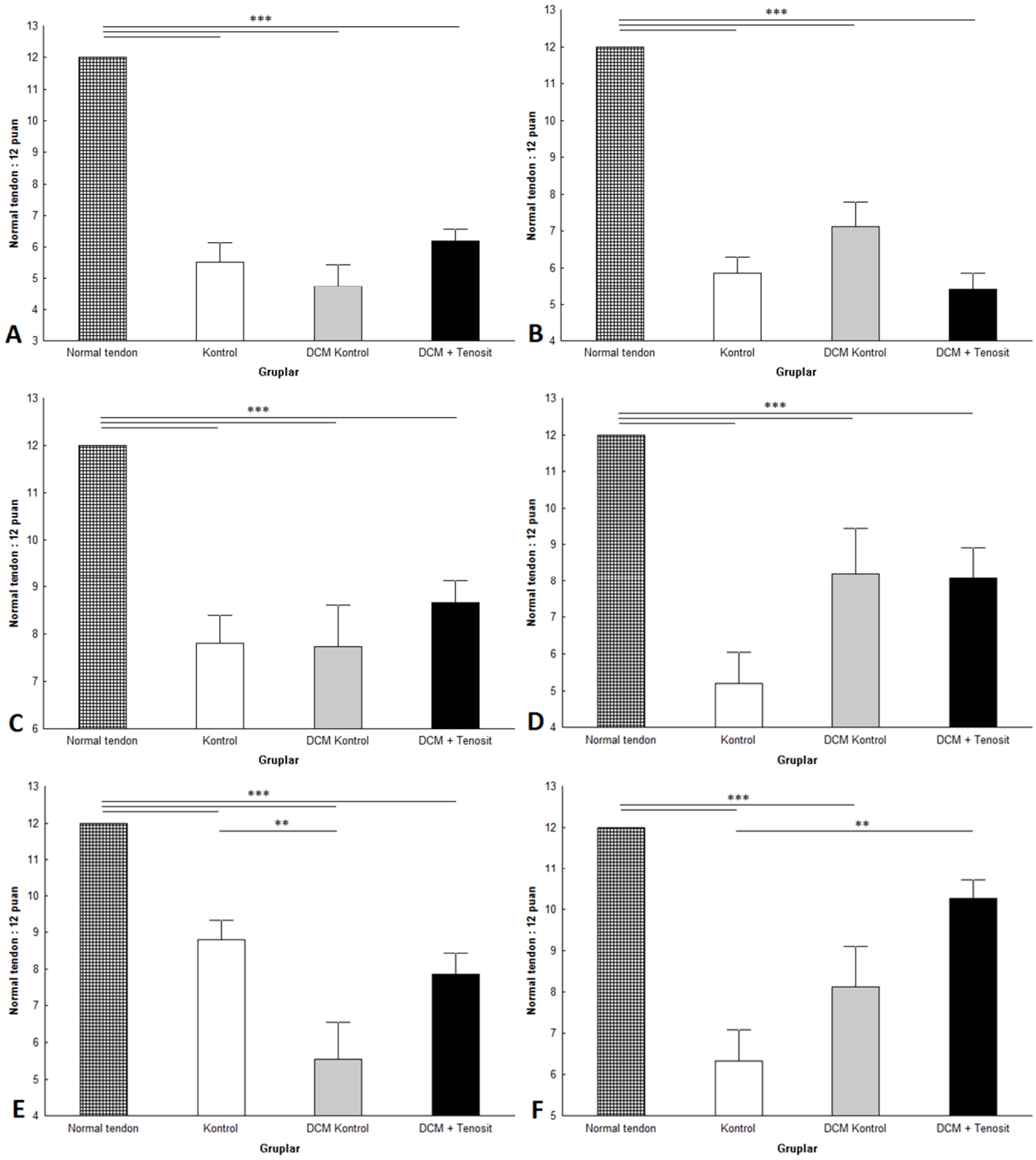
Çizelge 4.9. 6 ve 8 haftalık DCM+Tenosit Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	H11a6W	H11b6W	H11c6W	H12a6W	H12b6W	H12c6W	H13a6W	H13b6W	H13c6W	H14a6W	H14b6W	H14c6W	H15a6W	H15b6W	H15c6W	H16a8W	H16b8W	H16c8W	H17a8W	H17b8W	H17c8W	H18a8W	H18b8W	H18c8W	H19a8W	H19b8W	H19c8W	H20a8W	H20b8W	H20c8W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**		2	2							2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2						
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**				1	1	1	1		1																1	1	1	1	1	1
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**	0							0																						
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**		2	2		2	2	2									2	2	2				2	2	2						
Hücre sayısında lokal artış	**1**	1										1	1							1	1	1				1	1	1	1	1	1
Hücre sayısında genel artış	**0**				0				0	0	0			0	0	0															
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1					1	1
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**	0																			0	0				0	0	0	0		
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**		2	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		2					2	2
Lokal heterojen doku görünümü	**1**	1			1																			1		1	1	1	1		
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**																														
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**	3	3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3			3					3	
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**			0																			0	0		0	0	0	0		0
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**		1	1													1	1	1	1	1	1			1						
Hiper damarlanma	**0**	0			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0							0	0		0	0	0	0	0	0
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**		1	1	1	1	1	1			1			1	1	1	1	1	1				1	1	1		1	1	1	1	1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**	0							0	0		0	0							0	0	0				0					

Çizelge 4.10. 12 ve 24 haftalık DCM+Tenosit Kontrol gruplarına ait histolojik puanlama ham verileri

	PUAN	H21a12W	H21b12W	H21c12W	H22a12W	H22b12W	H22c12W	H23a12W	H23b12W	H23c12W	H24a12W	H24b12W	H24c12W	H25a12W	H25b12W	H25c12W	H26a24W	H26b24W	H26c24W	H27a24W	H27b24W	H27c24W	H28a24W	H28b24W	H28c24W	H29a24W	H29b24W	H29c24W	H30a24W	H30b24W	H30c24W
Hücrelerarası Alan Organizasyonu																															
Dalgalı, kompakt, paralel dizilmiş kollajen fibriller	**2**	2	2	2	2	2	2	2	2				2	2	2	2						2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Kısmen paralel, kısmen düzensiz	**1**									1	1	1					1	1	1	1	1										
Tamamen düzensiz ya da "granülasyon dokusu" oluşumu	**0**																														
Hücre/Matriks Oranı																															
Fizyolojik	**2**	2		2	2	2				2				2	2	2				2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Hücre sayısında lokal artış	**1**		1				1		1		1	1	1				1	1	1												
Hücre sayısında genel artış	**0**							0																							
Hücre Dağılımı																															
Homojen ve fizyolojik	**1**	1		1	1	1	1	1		1				1	1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fokal olarak artmış hücre sayısı (hücre kümelenmesi)	**0**		0						0		0	0	0				0	0	0												
İyileşme Bölgesinin Yapısı																															
Homojen (tüm doku aynı görünümde)	**2**	2	2	2	2		2			2				2	2	2				2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Lokal heterojen doku görünümü	**1**					1		1	1		1	1	1				1	1	1												
Tüm doku görünümü değişmiş	**0**																														
Dejeneratif Değişiklikler / Doku Metaplazisi																															
Yok	**3**				3		3		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3				3	3	3	3	3	
Hafif ödem var	**2**																														
Artmış ödem ve kısmi boşluklar var	**1**																														
Kıkırdak ya da kemik oluşumu var	**0**	0	0	0		0		0															0	0	0						0
Damarlanma																															
Normal damarlanma (küçük kılcallar)	**1**				1	1	1							1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hiper damarlanma	**0**	0	0	0				0	0	0	0	0	0																		
İnflamasyon																															
İnflamatuvar hücre yok	**1**	1		1	1	1	1		1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
İnflamatuvar hücre var (nötrofil, makrofaj, dev hücre)	**0**		0					0			0	0	0																		

Histolojik puanlama verilerine ait ANOVA ve *post-hoc* Bonferroni sonuçları Şekil 4.16'daki grafiklerde görülmektedir.



Şekil 4.16. Haftalara göre post-hoc Bonferroni test sonuçlarına ait histopatolojik değerlendirme histogramları **A.** 2 hafta **B.** 4 hafta **C.** 6 hafta **D.** 8 hafta **E.** 12 hafta **F.** 24 hafta (***p<0,001 ve **p<0,05)

ANOVA sonuçlarına göre, tüm haftalarda histolojik parametrelere ait puanlar karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır (p<0,001). 2, 4, 6 ve 8. haftalarda normal tendon ile tüm uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılık

görülmektedir ($p<0,001$). 12 haftalık grupta Kontrol ve DCM Kontrol grubu arasındaki farklılık anlamlı düzeydedir ($p<0,05$). 24 haftalık grupta ise Kontrol ve DCM+Tenosit grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,05$). Sonuç olarak, 24 haftalık iyileşme süreci göz önünde bulundurulduğu zaman, normal tendon yapısına en yakın düzenlenişi gösterenin DCM+Tenosit grubu olduğu saptanmıştır. Bu farklılık istatistiksel olarak da desteklenmiştir.

Kontrol grubuna ait tendon kesitlerindeki hücrelerarası alan organizasyonunda dalgalı – paralel dizilim gösteren kollajen fibriller (Şekil 4.23), kısmen paralel – kısmen düzensiz dizilim gösteren kollajen fibriller (Şekil 4.20) ve az miktarda granülasyon dokusu izlenmiştir (Şekil 4.17). Grubun bazı preparatlarında kollajen fibrillerde lokal erime alanları (Şekil 4.35) ya da hipertrofik (şişkin) görünüm tespit edilmiştir (Şekil 4.36). Bu gruba ait incelenen doku kesitlerinin bir kısmında hücre/matriks oranı normal tendon yapısıyla uyumlu bulunurken (fizyolojik), bir kısmında ise lokal ya da genel hücre artışı (Şekil 4.26) gözlenmiştir. Hücre dağılımı yaygın olarak normal tendonda oluğu gibi homojen ve fizyolojik olarak belirlenirken, bazı preparatlarda fokal olarak artmış hücre sayısı saptanmıştır. Kontrol grubunun iyileşme bölgesinin yapısı çoğunlukla lokal heterojen bir yapı gösterirken (Şekil 4.20), az sayıda preparatta homojen yapılanma ve tüm doku organizasyonunda değişim görülmüştür. İncelenen preparatların büyük bir kısmında normal tendon dokusu ile uyumlu olarak ödem ya da kıkırdak/kemik metaplazisine rastlanmazken; az sayıda preparatta kondroid metaplazi (kıkırdaklaşma) gelişimi gözlenmiştir (Şekil 4.38). Kontrol grubuna ait tendon kesitlerinde yaygın olarak vaskülarizasyonda (damarlanma) artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29). Gruba ait çoğu preparatta inflamasyona (yangı) rastlanmazken, bazı preparatlarda nötrofil infiltrasyonu ve dev hücreler saptanmıştır (Şekil 4.32).

Histolojik parametreler bakımından incelenen 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 haftalık Kontrol grubu örneklerinin genelinde, 8. haftadan itibaren tendon organizasyonun iyileşme gösterdiği ve normal dokuya yakınlaştığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Hücreler arası alanda kollajen fibrillerin paralel düzenleniş göstermesi özellikle 12 ve 24. haftalarda tespit edilmiştir. Dokudaki hücre sayısı ve dağılımları genellikle 8. haftadan sonra normal tendon yapısına yakınlık göstermektedir. Vaskülarizasyonda ise 12. haftadan itibaren azalma olduğu görülmektedir (Çizelge 4.4).

DCM Kontrol grubunun tendon kesitlerinde organizasyonun Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha hızlı düzenlendiği tespit edilmiştir. Bu gruba ait tendon

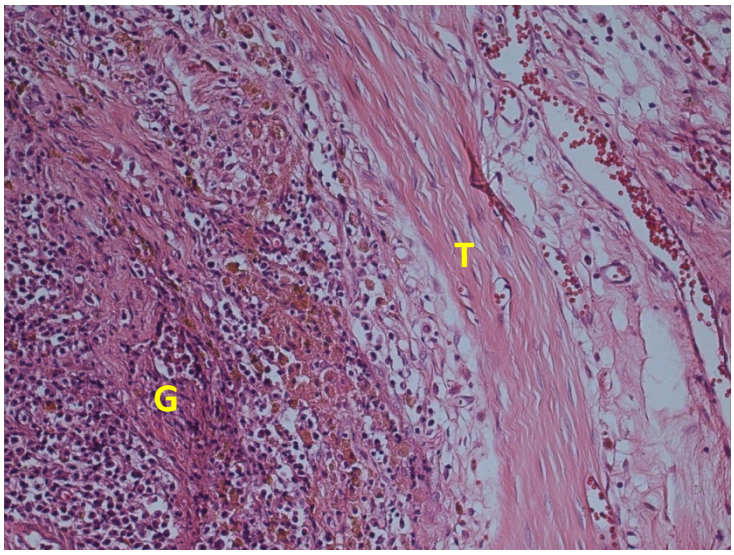
kesitlerinde genellikle dalgalı – paralel dizilmiş (Şekil 4.24) ve kısmen paralel-kısmen düzensiz dizilim gösteren kollajen fibril (Şekil 4.21) yapılanması saptanmıştır. Ancak, özellikle iyileşmenin erken evrelerinde yoğun granülasyon dokusu varlığı tespit edilmiştir (Şekil 4.18). DCM Kontrol grubunun bazı preparatlarında kollajen fibrillerde hipertrofi (Şekil 4.37) ve diğer gruplardan farklı olarak fibriller arası yağ doku birikimi de gözlenmiştir. Bu gruba ait kesitlerde hücre/matriks oranı genellikle normal tendon yapısıyla uyumlu (fizyolojik) bulunurken, az miktarda kesitte genel olarak hücre artışı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.27). Hücrelerin doku içerisindeki dağılımı yaygın olarak fizyolojik ölçüde ve normal tendon dokusu ile uyumludur. DCM Kontrol grubunun iyileşme bölgesinin yapısı genel olarak homojen ya da lokal heterojen olarak saptanırken, az sayıda preparatta tüm doku yapısında değişiklik olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman daha fazla sayıda kesitte kondroid metaplazi olduğu saptanmıştır (Şekil 4.39). Ancak, DCM Kontrol grubuna ait kesitlerin büyük bir kısmı normal tendon dokusu ile uyumlu bir yapılanma göstermektedir. Kesitlerde yaygın olarak vaskülarizasyonda artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.30). DCM Kontrol grubunda çoğunlukla inflamasyona rastlanmazken, bazı preparatlarda nötrofil infiltrasyonu ve dev hücreler olduğu saptanmıştır (Şekil 4.33).

Histolojik parametreler bakımından incelenen 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 haftalık DCM Kontrol grubu örneklerinin genelinde, 4. haftadan itibaren tendon organizasyonun iyileşme gösterdiği ve normal dokuya yakınlaştığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman örneklerin daha erken bir evrede (4. hafta) dalgalı – paralel dizilim gösteren kollajen fibriller bulundurduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, iyileşme bölgesi 4. haftada homojen bir dağılım göstermektedir. Hiper vaskülarizasyon genel olarak 8. haftadan sonra belirgin ölçüde azalmıştır.

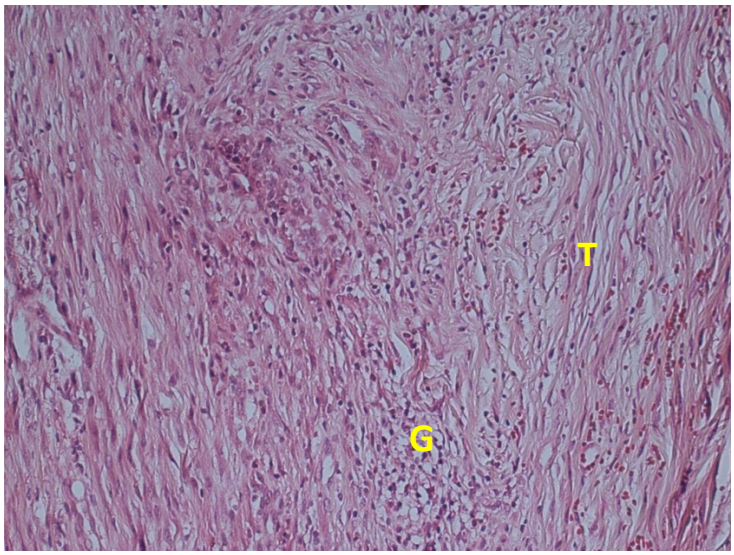
DCM+Tenosit grubuna ait tendon kesitlerinde hücrelerarası alan organizasyonun Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında daha önce başladığı saptanmıştır. Bu gruba ait tendon kesitlerinde çoğunlukla dalgalı – paralel (Şekil 4.25) ve kısmen paralel – kısmen düzensiz dizilim gösteren kollajen fibril (Şekil 4.22) yapılanması saptanmıştır. Bu bulguların yanı sıra, DCM+Tenosit grubunda granülasyon dokusu yalnızca sınırlı sayıda kesitte gözlenmiştir (Şekil 4.19). Bu gruba ait kesitlerin çoğunluğunda hücre/matriks oranı normal tendon yapısıyla uyumlu ya da genel artış şekilde belirlenmiştir (Şekil 4.28). İlerleyen haftalarda tendonun iyileşme bölgesinin homojen karakterde ve normal tendon görünümüne benzer olduğu belirlenmiştir. DCM+Tenosit grubu, Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile

karşılaştırıldığı zaman kondroid metaplazi oldukça az sayıda preparatta gözlenmiştir (Şekil 4.40). Bazı örneklerde vaskülarizasyonda artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31).DCM+Tenosit grubu, Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında inflamasyonun büyük ölçüde gerileme gösterdiği belirlenmiş; ancak bazı prepratlarda diğer gruplara benzer olarak nötrofil infiltrasyonu ve dev hücreler tespit edilmiştir (Şekil 4.34).

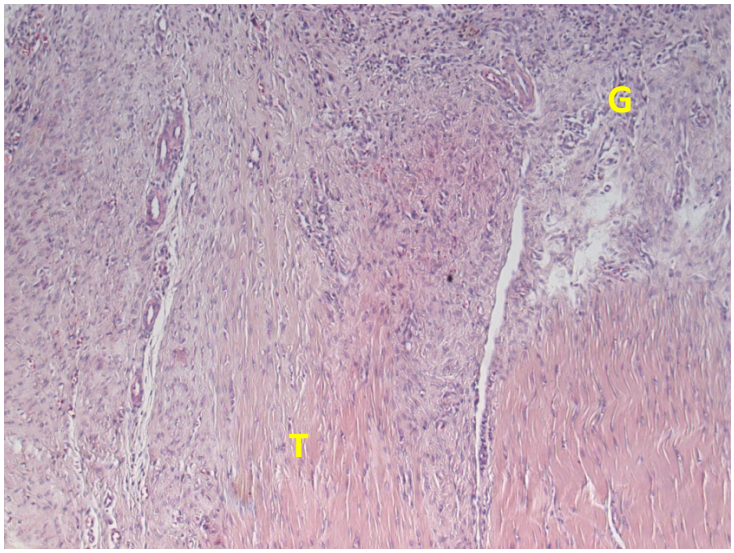
Histolojik parametreler bakımından incelenen 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 haftalık DCM+Tenosit grubu örneklerinin genelinde, 6. haftadan itibaren tendon organizasyonun iyileşme gösterdiği ve dokunun normal histolojik yapısına yaklaştığı belirlenmiştir (Çizelge 4.9). DCM+ tenosit grubu, fibriller organizasyon, hücre sayısı ve dağılımı, iyileşme bölgesinin yapılanması gibi özellikler bakımından Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, iyileşmenin 12 ve 24. haftalarda büyük ölçüde tamamlandığı ve dokunun normal tendon histolojisine sahip olduğu görülmüştür.



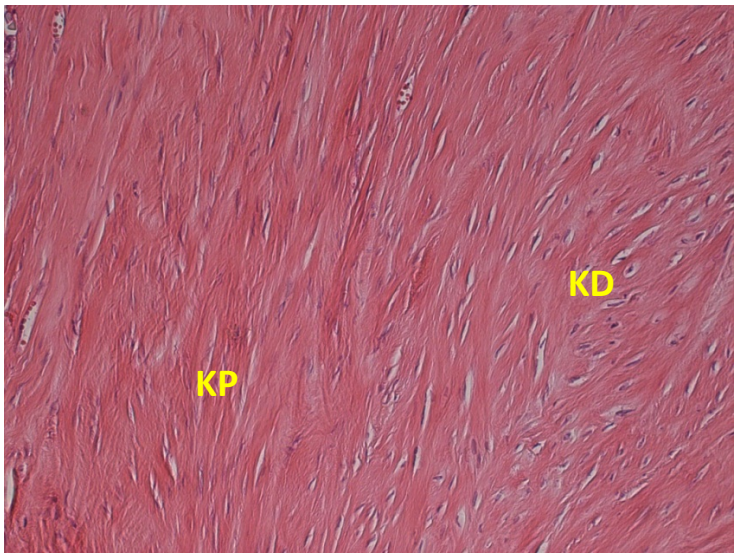
Şekil 4.17. Kontrol grubu sıçanın 2. haftaya ait tendon (T) kesitinde granülasyon dokusu (G). Boya: H&E, Büyütme: X100



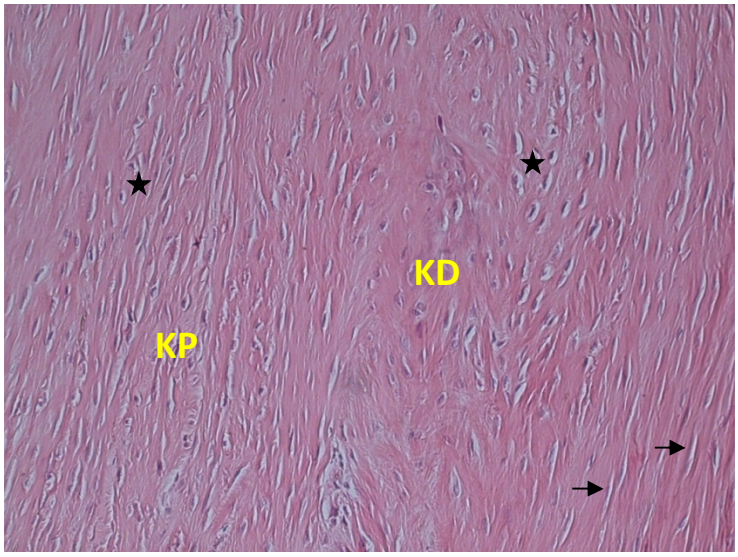
Şekil 4.18. DCM Kontrol grubu sıçanın 2. haftaya ait tendon kesitinde (T) yoğun granülasyon dokusu (G). Boya: H&E, Büyütme: X100



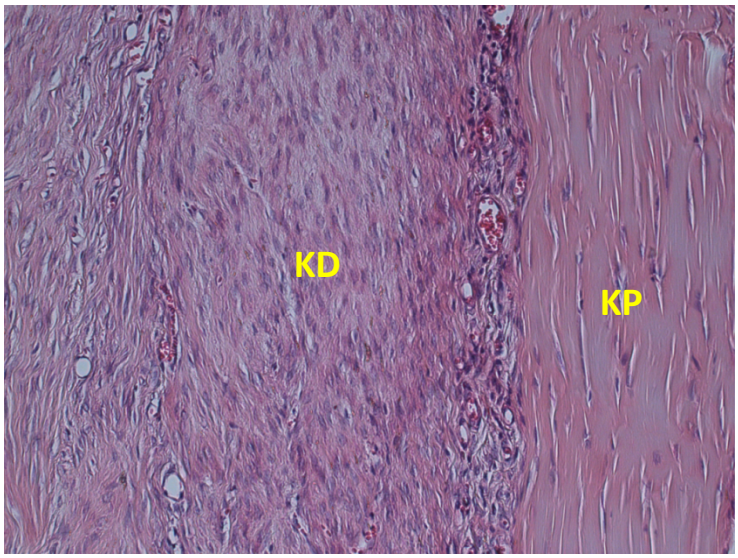
Şekil 4.19. DCM+Tenosit grubu sıçanın 2. haftaya ait tendon (T) kesitinde granülasyon dokusu (G). Boya: H&E, Büyütme: X50



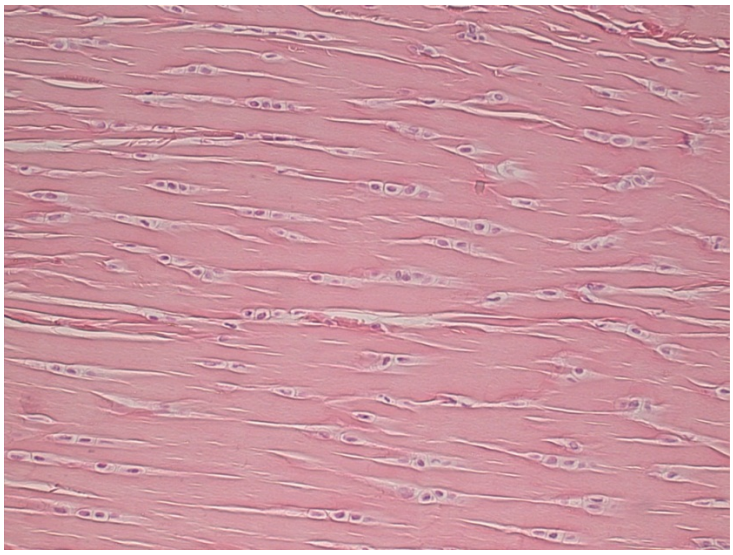
Şekil 4.20. Kontrol grubu sıçanın 4. haftaya ait tendon kesitinde hücrelerarası alan organizasyonunda kısmen paralel (KP) – kısmen düzensiz (KD) dizilim gösteren kollajen fibriller ve tenositler. Boya: H&E, Büyütme: X100



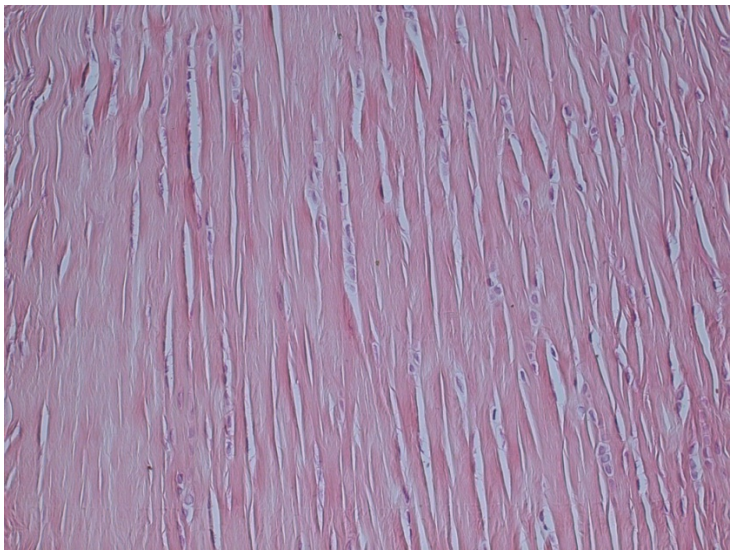
Şekil 4.21. DCM Kontrol grubu sıçanın 4. haftaya ait tendon kesitinde kısmen paralel-kısmen düzensiz dizilim gösteren kollajen fibriller ve tenoblast (*) / tenositler (→). Boya: H&E, Büyütme: X100



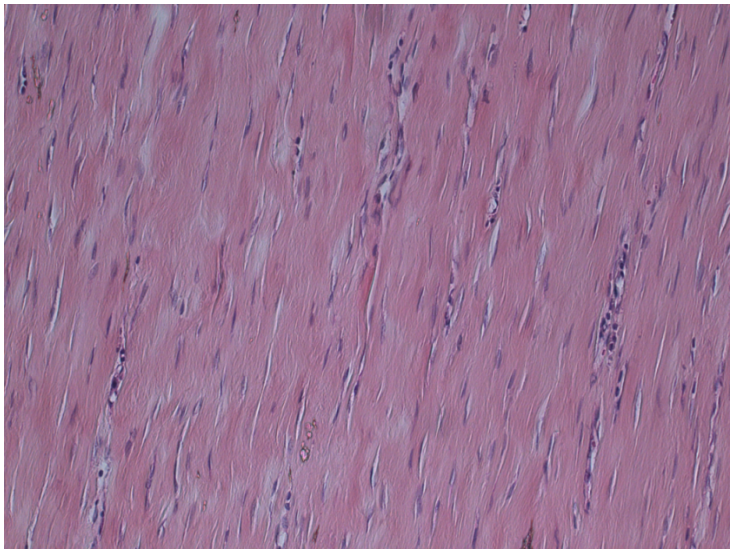
Şekil 4.22. DCM+Tenosit grubu sıçanın 4. haftaya ait tendon kesitinde kısmen paralel (KP) – kısmen düzensiz (KD) kollajen fibriler. Boya: H&E, Büyütme: X100



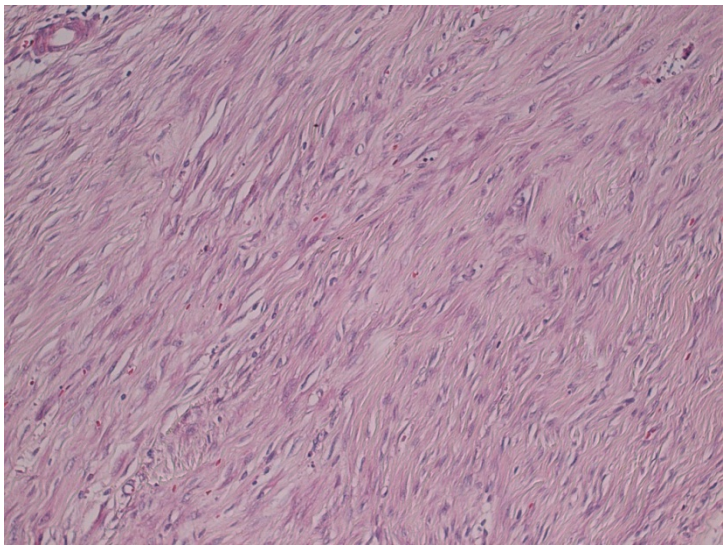
Şekil 4.23. Kontrol grubu sıçanın 24. haftaya ait tendon kesitinde dalgalı – paralel dizilmiş kollajen fibriller ve tenoblastlar. Boya: H&E, Büyütme: X100



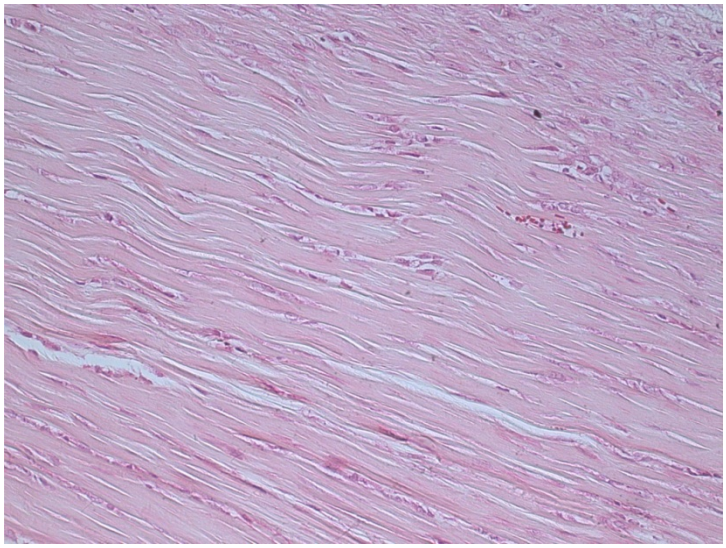
Şekil 4.24. DCM Kontrol grubu sıçanın 24. haftaya ait tendon kesitinde dalgalı – paralel dizilmiş kollajen fibriller ve tenoblastlar. Boya: H&E, Büyütme: X100



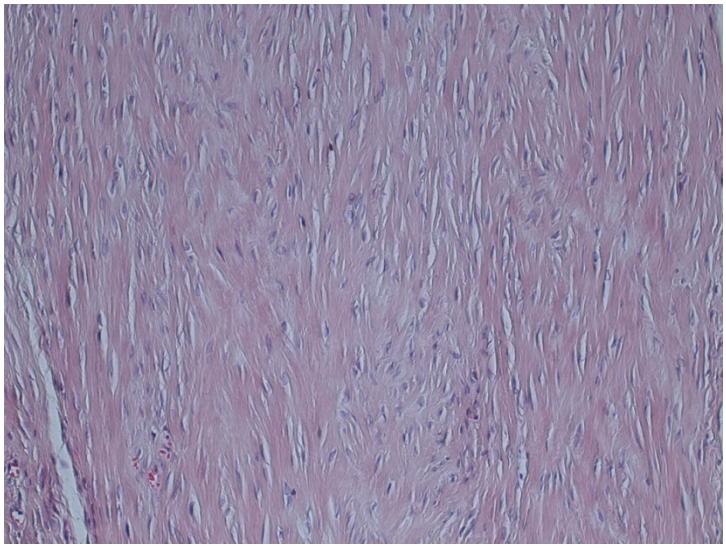
Şekil 4.25. DCM+Tenosit grubu sıçanın 24. haftaya ait tendon kesitinde dalgalı – paralel kollajen fibriller ve tenositler. Boya: H&E, Büyütme: X100



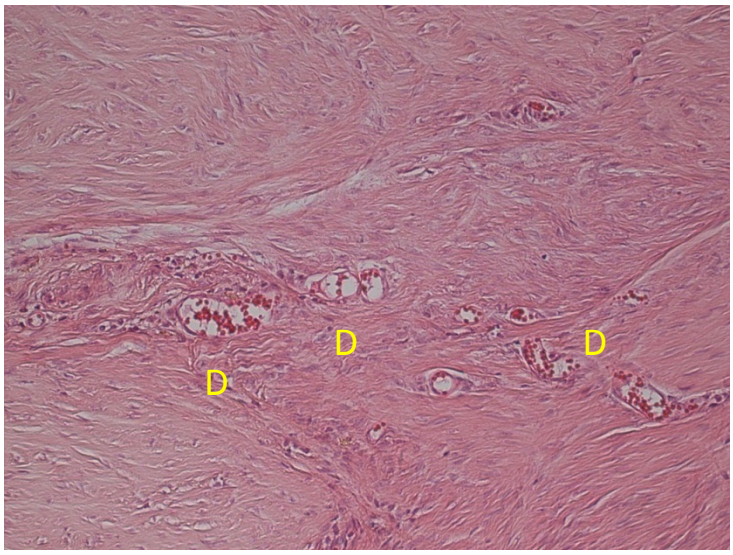
Şekil 4.26. Kontrol grubu sıçanın 2. haftaya ait tendon kesitinde genel hücre sayısı artışı. Boya: H&E, Büyütme: X100



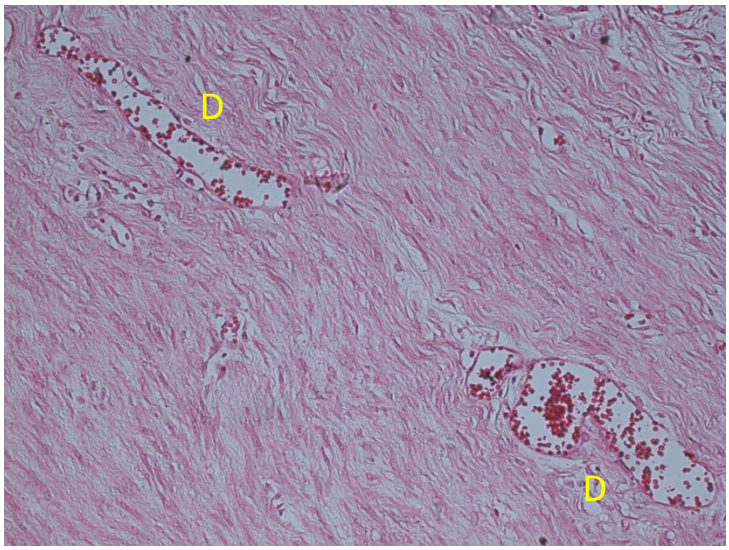
Şekil 4.27. DCM Kontrol grubu sıçanın 2. haftaya ait tendon kesitinde genel hücre artışı. Boya: H&E, Büyütme: X100



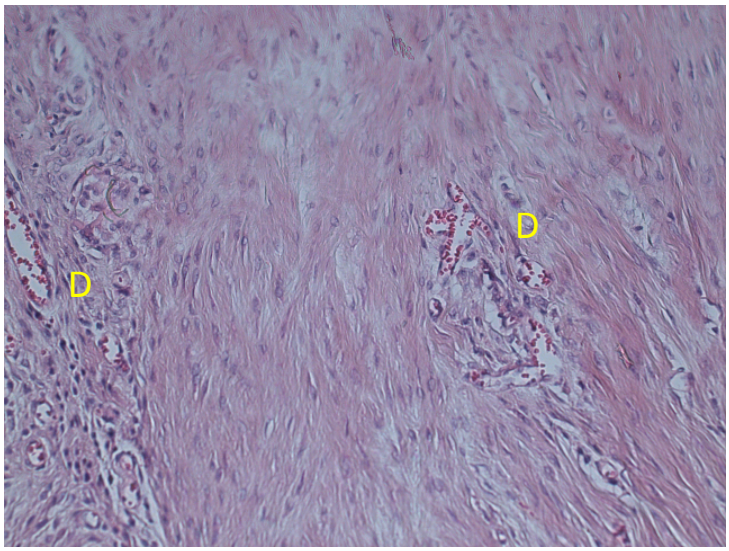
Şekil 4.28. DCM+Tenosit grubu sıçanın 2. haftaya ait tendon kesitinde hücre sayısında genel artış. Boya: H&E, Büyütme: X100



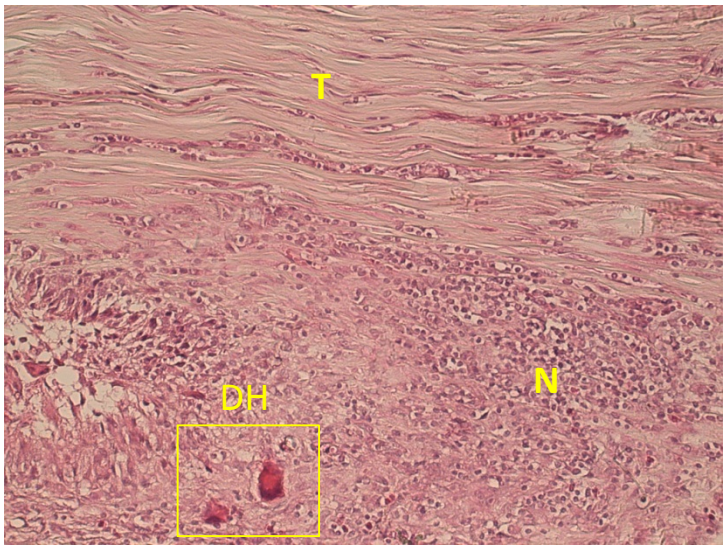
Şekil 4.29. Kontrol grubu sıçanın 12. haftaya ait tendon kesitinde vaskülarizasyonda (damarlanma) (D) artış. Boya: H&E, Büyütme: X100



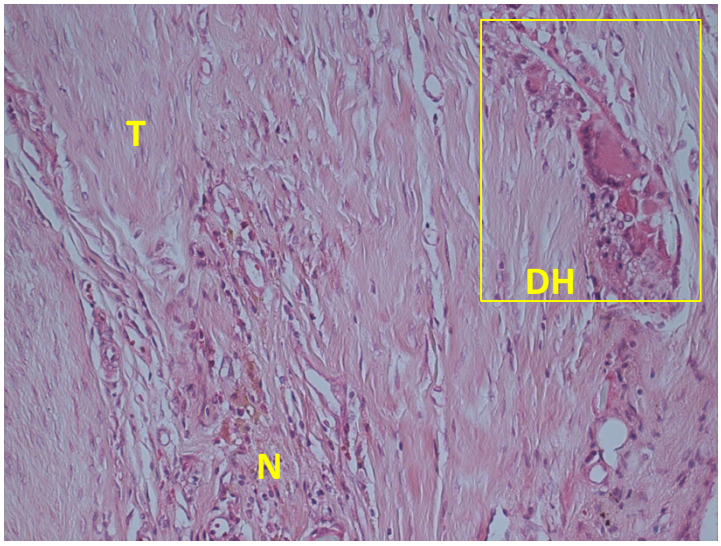
Şekil 4.30. DCM Kontrol grubu sıçanın 12. haftaya ait tendon kesitinde vaskülarizasyonda (damarlanma) (D) artış. Boya: H&E, Büyütme: X100



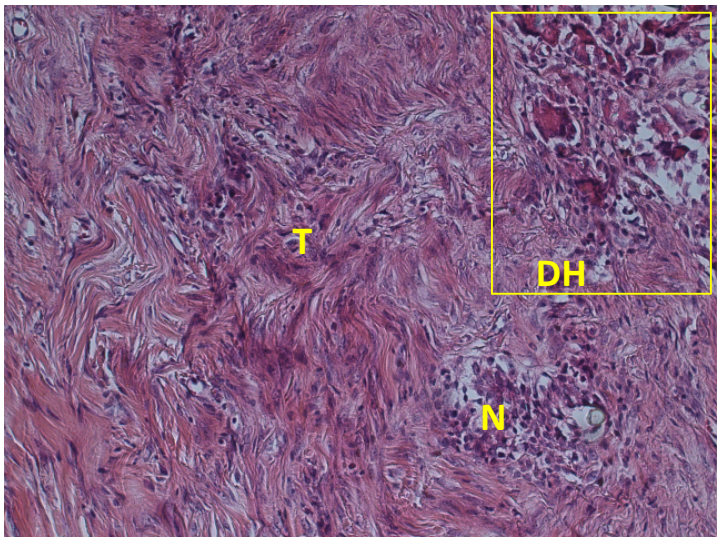
Şekil 4.31. DCM+Tenosit grubu sıçanın 12. haftaya ait tendon kesitinde vaskülarizasyonda (damarlanma) (D) artış. Boya: H&E, Büyütme: X100



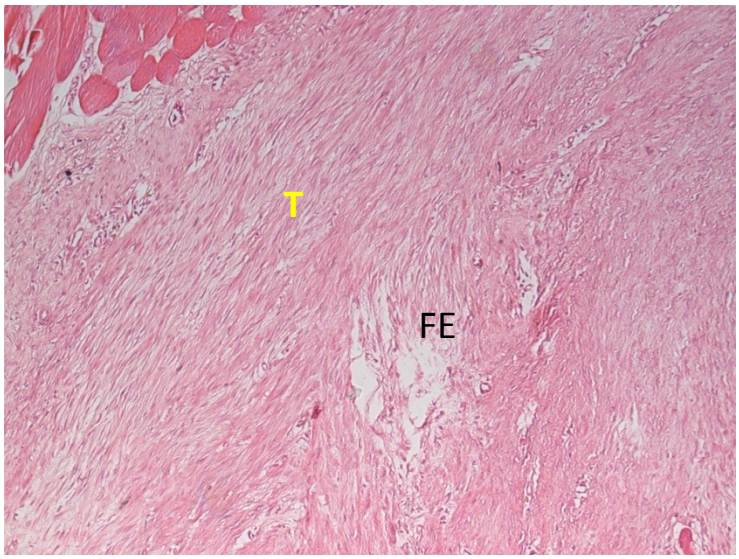
Şekil 4.32. Kontrol grubu sıçanın 8. haftaya ait tendon (T) kesitinde nötrofil infiltrasyonu (N) ve dev hücreler (DH). Boya: H&E, Büyütme: X100



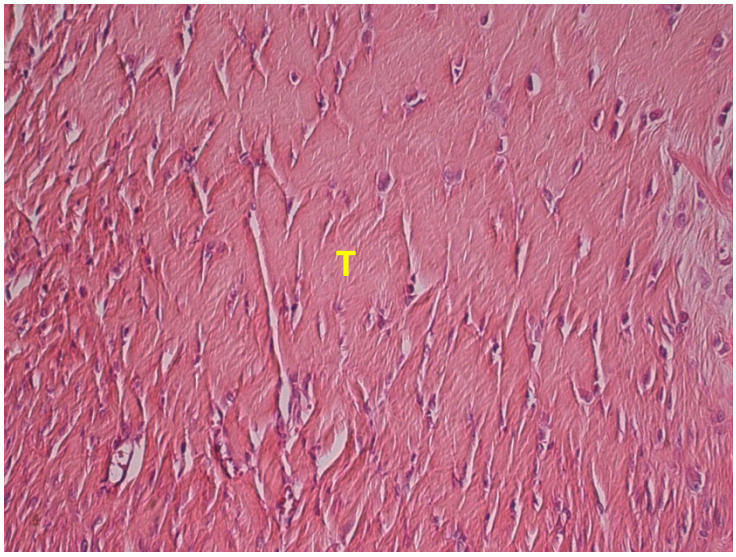
Şekil 4.33. DCM Kontrol grubu sıçanın 8. haftaya ait tendon (T) kesitinde hafif nötrofil infiltrasyonu (N) ve dev hücreler (DH). Boya: H&E, Büyütme: X100



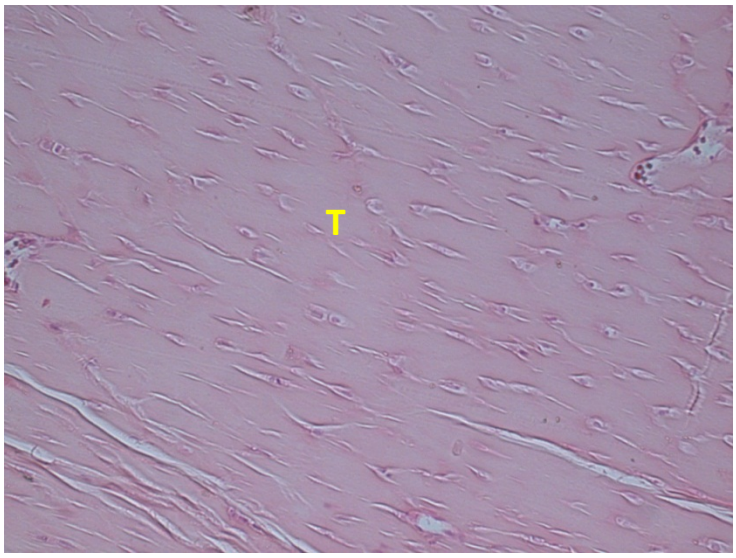
Şekil 4.34. DCM+Tenosit grubu sıçanın 8. haftaya ait tendon (T) kesitinde hafif nötrofil infiltrasyonu (N) ve dev hücreler (DH). Boya: H&E, Büyütme: X100



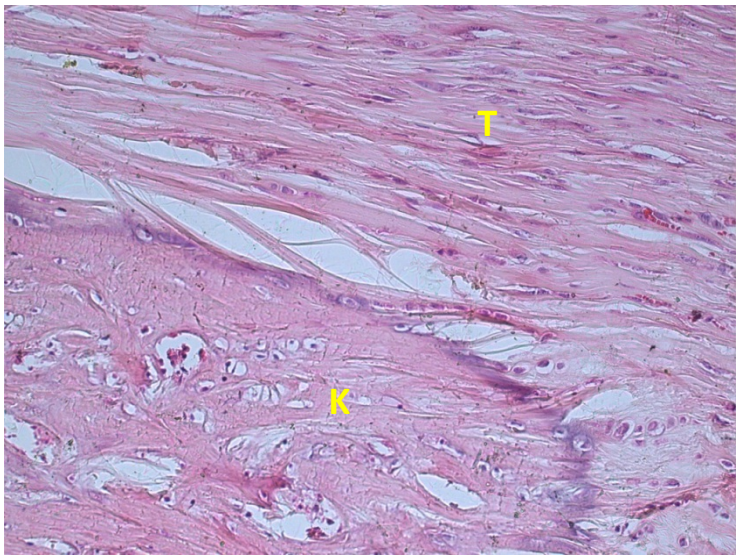
Şekil 4.35. Kontrol grubu sıçanın 2. haftaya ait tendon (T) kesitinde kollajen fibrillerde lokal erime alanları (FE) ve kas dokusu (K). Boya: H&E, Büyütme: X50



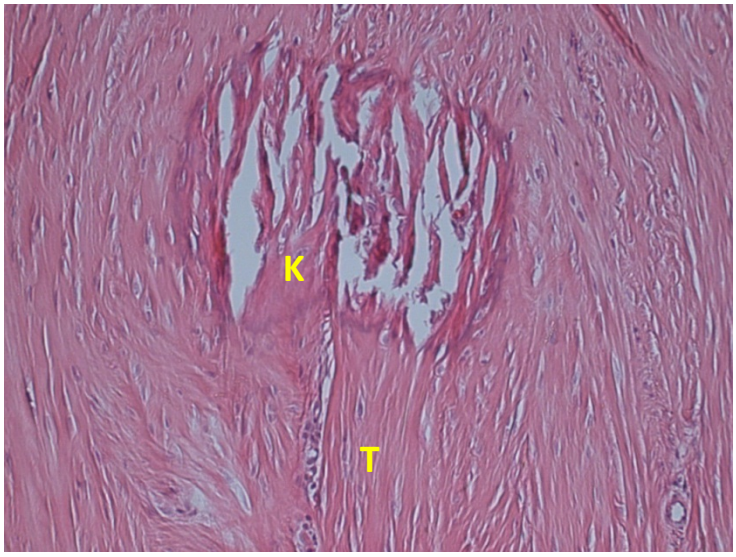
Şekil 4.36. Kontrol grubu sıçanın 6. haftaya ait tendon (T) kesitinde hipertrofiye kollajen fibriller. Boya: H&E, Büyütme: X100



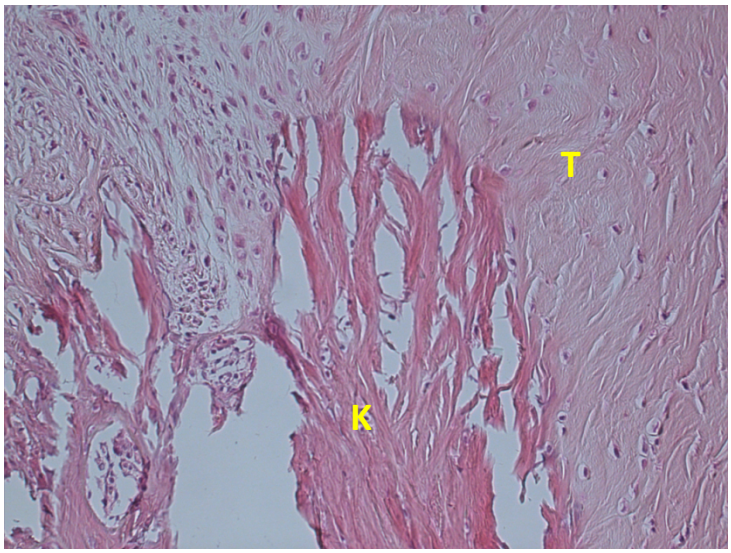
Şekil 4.37. DCM Kontrol grubu sıçanın 6. haftaya ait tendon (T) kesitinde kollajen fibrillerde hipertrofi. Boya: H&E, Büyütme: X100



Şekil 4.38. Kontrol grubu sıçanın 12. haftaya ait tendon (T) kesitinde kondroid metaplazi (K) gelişimi. Boya: H&E, Büyütme: X100



Şekil 4.39. DCM Kontrol grubu sıçanın 12. haftaya ait tendon (T) kesitinde kondroid metaplazi (K). Boya: H&E, Büyütme: X100



Şekil 4.40. DCM+Tenosit grubu sıçanın 12. haftaya ait tendon (T) kesitinde kondroid metaplazi (K). Boya: H&E, Büyütme: X100

4.1.9. Biyomekanik Ölçüm Sonuçları

Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarının 4, 8, 12 ve 24. haftalarına ait tendon kesitlerinin alan, maksimum yük, rijitlik, Young Modülü, gerinme, uzama ve enerji alımı ölçüm ve hesaplamalarına ait ham veriler Çizelge 4.11-13'te; *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri ise Şekil 4.44-51'de görülmektedir.

Gerinme verileri dışında elde edilen tüm biyomekanik özelliklere ait değerlerde haftalara bağlı, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı değişimler tespit edilmiştir. İyileşme sürecindeki tendonların *alanları* ilk haftalarda artmış; ancak sonraki haftalarda tekrar düşüş göstermiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.44).

Biyomekanik ölçümlerden elde edilen *maksimum yük* değerleri göz önünde bulundurulduğunda, 4 haftalık DCM+Tenosit grubuna ait örneklerden elde edilen veriler, DCM Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksektir ($p<0,001$) (Şekil 4.45). 8, 12 ve 24 haftalık örneklerde ise maksimum yük ölçümleri Kontrol ve DCM Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,001$). Bu sonuçlar, DCM+Tenosit grubuna ait tendonların biyomekanik gerim testi sırasında kopmadan önce daha fazla yüke dayanabildiğini ortaya koymuştur.

Dokulardan elde edilen *rijitlik* verileri karşılaştırıldığı zaman, DCM+Tenosit grubunun verileri 4 hafta sonunda Kontrol ve DCM Kontrol verilerine göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermiştir ($p<0,05$) (Şekil 4.46). Ayrıca 8 haftalık örneklerdeki rijitlik verileri de DCM Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Elastikiyeti gösteren *Young Modülü* değerleri karşılaştırıldığı zaman, 4 haftalık örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Şekil 4.47). 8 haftalık DCM Kontrol örneklerinde yapılan hesaplamalarda Young Modülü değerleri Kontrol Grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte ($p<0,05$), DCM Kontrol ve DCM+Tenosit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. 12 ve 24 haftalık DCM+Tenosit örneklerinde ise Young Modülü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermiştir ($p<0,05$). Young Modülü elastikiyeti gösteren bir değer olduğu için, maksimum yüke karşı olan direnç artarken; Young modülü değerinin azalması beklenir. 12 ve 24 haftalık örneklerde maksimum yük istatistiksel olarak anlamlı derecede artarken ($p<0,001$), Young Modül değerinin de anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$).

Gerinme, her bir örneğin uzama miktarının başlangıç uzunluğuna bölünmesi ile hesaplanmıştır (Şekil 4.48). Uzama ise kopma anında örnek boyunda meydana gelen maksimum uzunluk değişimidir (Şekil 4.49). Gerinmeye ait veriler karşılaştırıldığı zaman Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı belirlenmiştir. Uzama verilerinde ise yalnızca 4 haftalık DCM Kontrol grubu ölçümleri Kontrol ve DCM+tenosit grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken ($p<0,05$); 8, 12 ve 24 haftalık ölçümlerdeki farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Kopma için gereken *enerji alımı* DCM+Tenosit grubunda Kontrol ve DCM Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermektedir ($p<0,05$) (Şekil 4.50). Özellikle 8 ve 24 haftalık DCM+Tenosit grubuna ait örneklerde enerji alımı verileri istatistiksel olarak anlamlı derecede Kontrol ve DCM Kontrol grubu verilerinden daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Gerilme verilerinde de, DCM+Tenosit grubuna ait stres verileri 4 ($p<0,05$), 12 ($p<0,001$) ve 24 haftalık ($p<0,001$) örneklerde Kontrol ve DCM Kontrol verilerinden anlamlı düzeyde daha yüksektir (Şekil 4.51).

Ek olarak, 4, 8, 12 ve 24. haftalardaki verilere ait *gerilme – gerinme grafikleri* çizilmiş, bu grafikler Şekil 4.52-55'te verilmiştir. Grafikler incelendiği zaman iyileşmenin 4. haftasında Kontrol grubunun gerilme özelliğinin DCM Kontrol ve DCM+Tenosit grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.52). Aynı hafta verilerine göre DCM+Tenosit grubu, DCM Kontrol grubundan daha yüksek gerilme kapasitesine sahiptir.

8. haftaya ait grafik incelendiği zaman, DCM+Tenosit grubunun gerilme özelliğinin Kontrol ve DCM Kontrol gruplarından daha yüksek seyrettiği belirlenmiş; aynı haftada DCM Kontrol grubu, Kontrol grubuna benzer bir gerilme özelliği gösterdiği izlenmiştir (Şekil 4.53). DCM Kontrol grubuna ait hayvanların bazılarında, 8. hafta sonlarına doğru Kontrol grubuna göre daha iyi gerilme profili göstermeye başladığı tespit edilmiştir.

İyileşmenin 12 ve 24. haftalarında gerilme – gerinme grafikleri aynı paterni izlemiştir (Şekil 4.54 ve Şekil 4.55). Her iki haftaya ait veriler incelendiğinde, DCM+Tenosit grubunun, Kontrol ve DCM Kontrol gruplarına göre daha yüksek gerilme kapasitesinin olduğu; bu kapasitenin özellikle 24. haftada belirginleştiği tespit

edilmiştir. Her iki haftaya ait grafiklerde DCM Kontrol grubu, Kontrol grubuna göre daha yüksek gerilme profili göstermiştir.

Çizelge 4.11. Kontrol grubu 4, 8, 12 ve 24. haftalara ait tendon kesitlerinin maksimum yük, alan, gerilim, uzama, rijitlik, enerji alımı, gerinme ve Young Modülü ölçüm ve hesaplamalarına ait ham veriler

4 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(N/mm)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(MPa)	Young Modülü(MPa)
	Kontrol 1	53,2	19,838	2,681721948	12,9819462	4,097998804	690,6395378	155,6694	0,017227033
	Kontrol 2	29,4	17,9744	1,635659605	9,660797	3,043227179	284,0274318	98,6281	0,016584114
	Kontrol 3	43,092	20,391	2,113285273	9,58935	4,493735238	413,2242702	14,38819	0,146876381
	Kontrol 4	31	18,489	1,676672616	5,592104	5,543530664	173,355224	53,00475	0,031632497
	Kontrol 5	38,36	20,006	1,917424773	6,26196	6,125877521	240,2087856	57,81543	0,033164586

8 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(N/mm)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(MPa)	Young Modülü(MPa)
	Kontrol 1	54,2	18,977	2,85608895	9,605993	5,642311003	520,6448206	78,87978	0,036208125
	Kontrol 2	54,174	17,9	3,026480447	7,014156	7,723523686	379,9848871	62,95519	0,048073565
	Kontrol 3	56,9	20,591	2,763343208	8,52242	6,676507377	484,925698	95,59865	0,028905672
	Kontrol 4	43	22,354	1,923593093	5,527979	7,778611315	237,703097	52,53185	0,036617654
	Kontrol 5	50,36	17,2062	2,926851949	7,65412	6,579463087	385,4614832	67,12926	0,043600242

12 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(N/mm)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(MPa)	Young Modülü(MPa)
	Kontrol 1	78,3	27,4	2,857664234	8,871959	8,825559271	694,6743897	74,62115	0,038295634
	Kontrol 2	74,94	26,502	2,827711116	8,761976	8,552865244	656,6224814	73,96714	0,038229288
	Kontrol 3	90,2	24,648	3,659526128	10,35638	8,709607025	934,145476	103,2561	0,035441258
	Kontrol 4	83,3	22,846	3,646152499	10,24799	8,128423232	853,657567	82,46136	0,044216497
	Kontrol 5	77,728	27,97	2,778977476	9,434029	8,239109717	733,2882061	77,89825	0,035674453

24 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(N/mm)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(MPa)	Young Modülü(MPa)
	Kontrol 1	75	23,2316	3,22836137	10,7161	6,998814867	803,7075	84,99426	0,037983287
	Kontrol 2	78	16,052	4,859207575	11,35789	6,867472744	885,91542	88,36583	0,054989667
	Kontrol 3	67,1	15,603	4,300455041	8,075995	8,308573742	541,8992645	69,78856	0,061621203
	Kontrol 4	91,4	22,312	4,096450341	7,436085	12,2914141	679,658169	65,72664	0,062325571
	Kontrol 5	82,84	21,18	3,911237016	7,841941	10,5637112	649,6263924	68,32194	0,05724716

Çizelge 4.12. DCM Kontrol grubu 4, 8, 12 ve 24. haftalara ait tendon kesitlerinin maksimum yük, alan, gerilim, uzama, rijitlik, enerji alımı, gerinme ve Young Modülü ölçüm ve hesaplamalarına ait ham veriler

4 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM Kontrol 1	62,9	18,422	3,414395831	17,77799	3,5380828	1118,235571	117,0079	0,0291809
	DCM Kontrol 2	70,4	18,3258	3,84157854	14,07599	5,0014244	990,949696	101,5049	0,037846237
	DCM Kontrol 3	52,7	17,264	3,052594995	13,597	3,875855	716,5619	83,82246	0,036417387
	DCM Kontrol 4	58,56	14,459	4,050072619	14,404008	4,0655351	843,4987085	119,5285	0,03388374
	DCM Kontrol 5	68,3	15,476	4,413285087	11,23199	6,0808459	767,144917	87,71337	0,05031485

8 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM Kontrol 1	44,1	12,173	3,622771708	7,325888	6,019748	323,0716608	65,01019	0,055726213
	DCM Kontrol 2	43,9	14,2204	3,087114287	8,637905	5,0822508	379,2040295	73,2242	0,042159754
	DCM Kontrol 3	58,2	14,618	3,981392803	8,731976	6,665158	508,2010032	73,78801	0,053957178
	DCM Kontrol 4	51,44	12,35	4,165182186	6,997871	7,3508071	359,9704842	62,84667	0,066275304
	DCM Kontrol 5	48	12,334	3,891681531	8,623977	5,5658776	413,950896	73,14045	0,053208335

12 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM Kontrol 1	62,1	22,667	2,739665593	6,076067	10,220427	377,3237607	56,50345	0,048486696
	DCM Kontrol 2	66,2	23,682	2,795372012	6,170085	10,729188	408,459627	57,16915	0,048896512
	DCM Kontrol 3	59,52	20,8812	2,850410896	6,68587	8,9023568	397,9429824	60,74443	0,046924646
	DCM Kontrol 4	54,9	18,785	2,922544583	9,919975	5,5342881	544,6066275	80,64745	0,036238524
	DCM Kontrol 5	66,8	22,33	2,991491267	6,310121	10,586168	421,5160828	58,15255	0,051442134

24 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM Kontrol 1	88,4	16,737	5,281711179	11,40203	7,7530054	1007,939452	88,59361	0,059617293
	DCM Kontrol 2	94,4	17,7666	5,313340763	11,0101	8,5739457	1039,35344	86,55289	0,061388369
	DCM Kontrol 3	87,52	17,589	4,975837171	9,811976	8,919712	858,7441395	80,04295	0,06216459
	DCM Kontrol 4	99	19,557	5,062126093	7,68396	12,883982	760,71204	67,3197	0,075195316
	DCM Kontrol 5	84,262	21,427	3,932515051	10,60794	7,9432953	893,8462403	84,41468	0,046585677

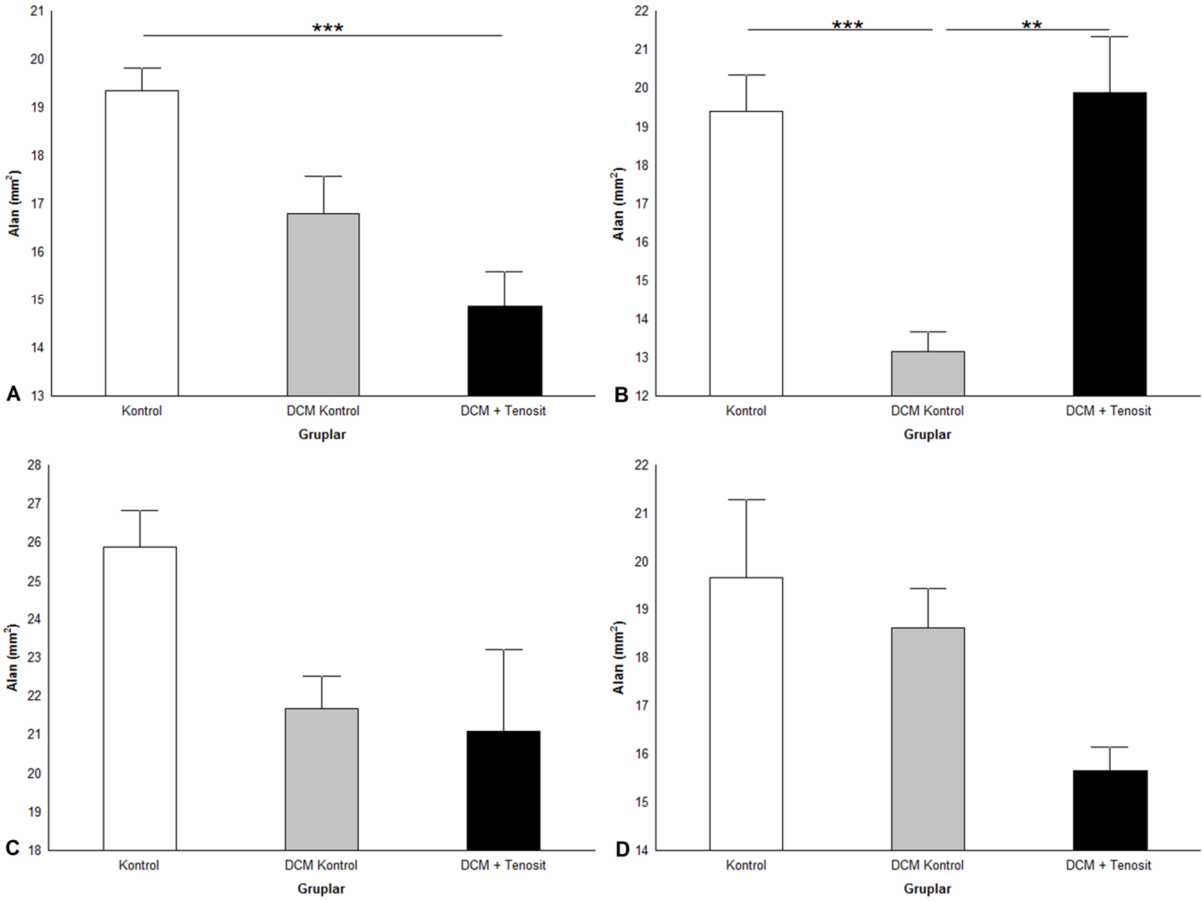
Çizelge 4.13. DCM Tenosit grubu 4, 8, 12 ve 24. haftalara ait tendon kesitlerinin maksimum yük, alan, gerilim, uzama, rijitlik, enerji alımı, gerinme ve Young Modülü ölçüm ve hesaplamalarına ait ham veriler

4 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM+Tenosit 1	55,5	13,476	4,118432769	8,96603	6,19003059	497,614665	75,17716	0,054783032
	DCM+Tenosit 2	61,8	13,572	4,553492485	10,37405	5,95717198	641,11629	83,14976	0,054762545
	DCM+Tenosit 3	58,44	17,1858	3,400481793	9,952119	5,87211628	581,6018344	80,82666	0,042071289
	DCM+Tenosit 4	66,2	15,916	4,159336517	7,154031	9,25352434	473,5968522	63,8825	0,065109169
	DCM+Tenosit 5	60,7	14,187	4,278564883	7,090013	8,56133832	430,3637891	63,45916	0,067422337

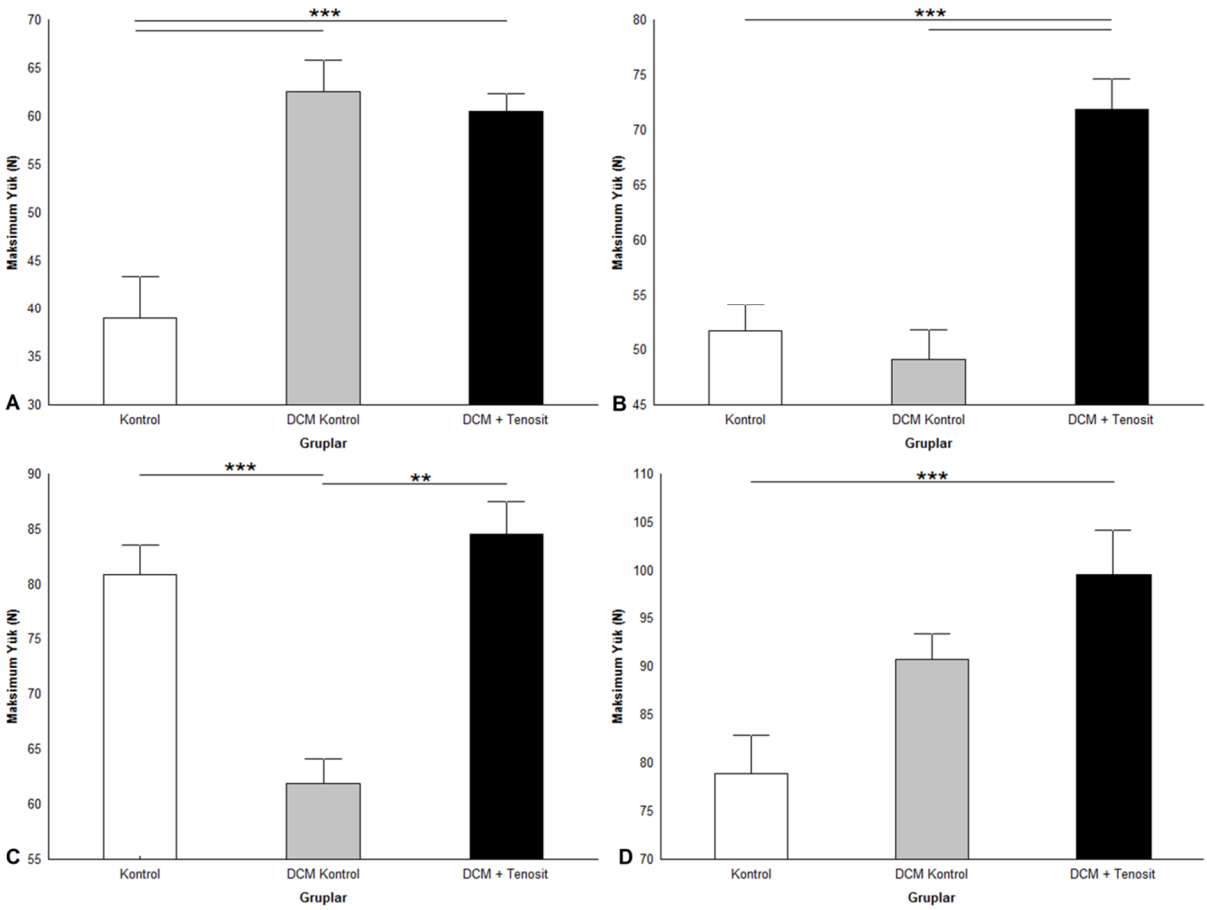
8 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM+Tenosit 1	66	17,737	3,721035124	8,185976	8,06256945	540,274416	70,47037	0,052802832
	DCM+Tenosit 2	68,1	21,524	3,163910054	9,855957	6,9095269	671,1906717	80,28957	0,03940624
	DCM+Tenosit 3	81,4	24,659	3,301025995	10,09007	8,06733749	821,331698	81,59214	0,040457647
	DCM+Tenosit 4	74,88	18,8842	3,965219602	9,94398	7,53018409	744,6052224	100,2188	0,039565626
	DCM+Tenosit 5	69,056	16,645	4,148753379	7,794049	8,86009313	538,2258477	68,01917	0,060993884

12 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM+Tenosit 1	77,9	22,544	3,455464869	7,248049	10,7477198	564,6230171	64,501	0,053572268
	DCM+Tenosit 2	78,1	14,154	5,517874806	8,810083	8,8648427	688,0674823	74,25374	0,074311069
	DCM+Tenosit 3	93	22,0248	4,222512804	6,888049	13,5016461	640,588557	62,11173	0,067982534
	DCM+Tenosit 4	86,44	27,136	3,185436321	11,78003	7,33784209	1018,265793	90,52312	0,035189202
	DCM+Tenosit 5	87,5	19,6139	4,461121959	10,13806	8,63084259	887,08025	81,85712	0,054498887

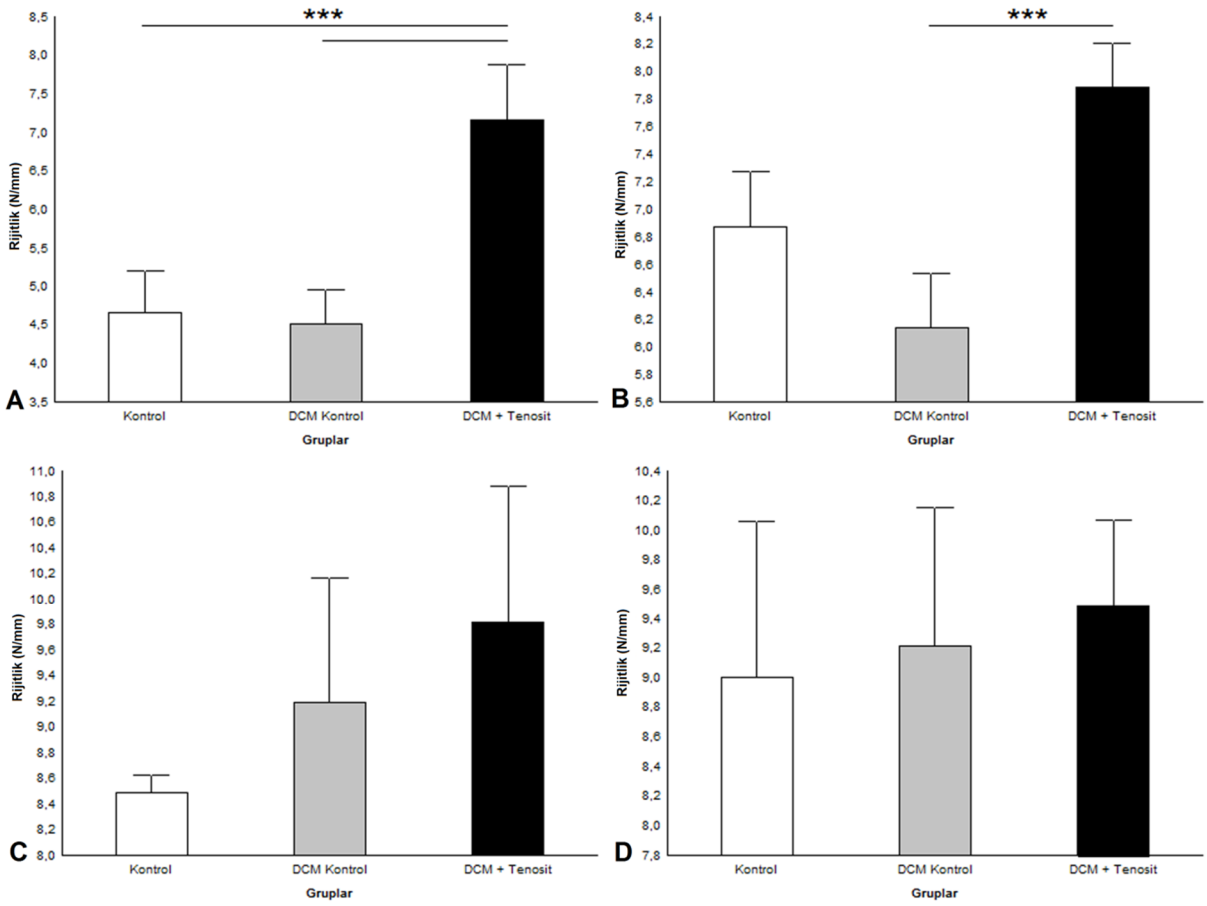
24 hafta	Örnek	Maksimum Yük(N)	Alan(mm^2)	Gerilim(MPa)	Uzama(mm)	Rijitlik(%)	Enerji Alımı(mJ)	Gerinme(%)	Young Modülü(MPa)
	DCM+Tenosit 1	103,4	14,296	7,232792389	11,44997	9,03059135	1183,926898	88,84042	0,081413307
	DCM+Tenosit 2	104,7	15,257	6,862423805	11,40322	9,18161712	1193,917134	108,3415	0,063340676
	DCM+Tenosit 3	96,26	16,327	5,895755497	10,73003	8,97108396	1032,872688	85,06865	0,069305855
	DCM+Tenosit 4	83,6	15,33	5,453359426	9,84203	8,4941826	822,793708	80,21153	0,067987226
	DCM+Tenosit 5	110	17,0798	6,440356444	9,356083	11,7570569	1029,16913	77,45015	0,083154861



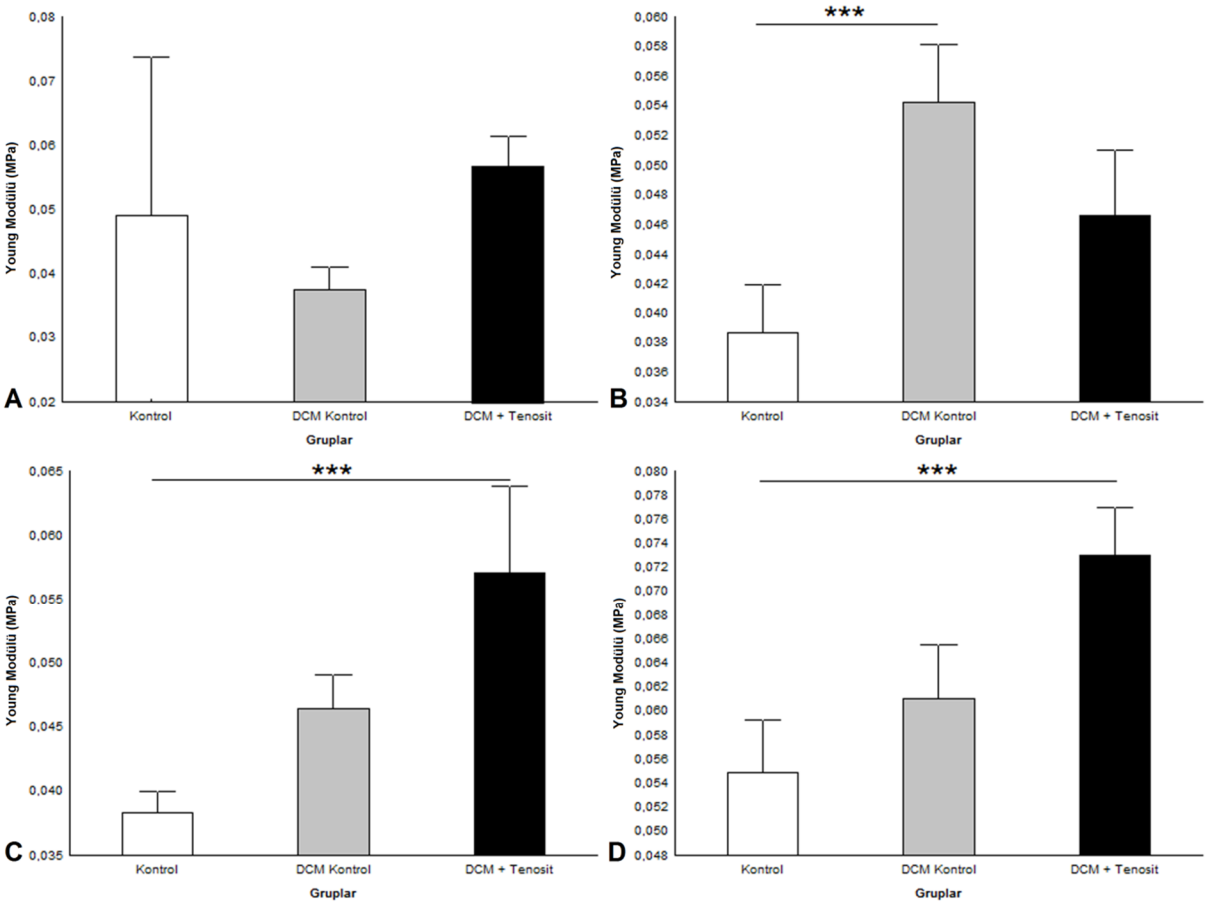
Şekil 4.44. Kontrol, DCM Kontrol, DCM+Tenosit gruplarına ait kesitlerin alan ölçümlerinin *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri
A. 4 hafta (***p<0,001) **B.** 8 hafta (***p<0,001 ve **p<0,05) **C.** 12 hafta **D.** 24 hafta



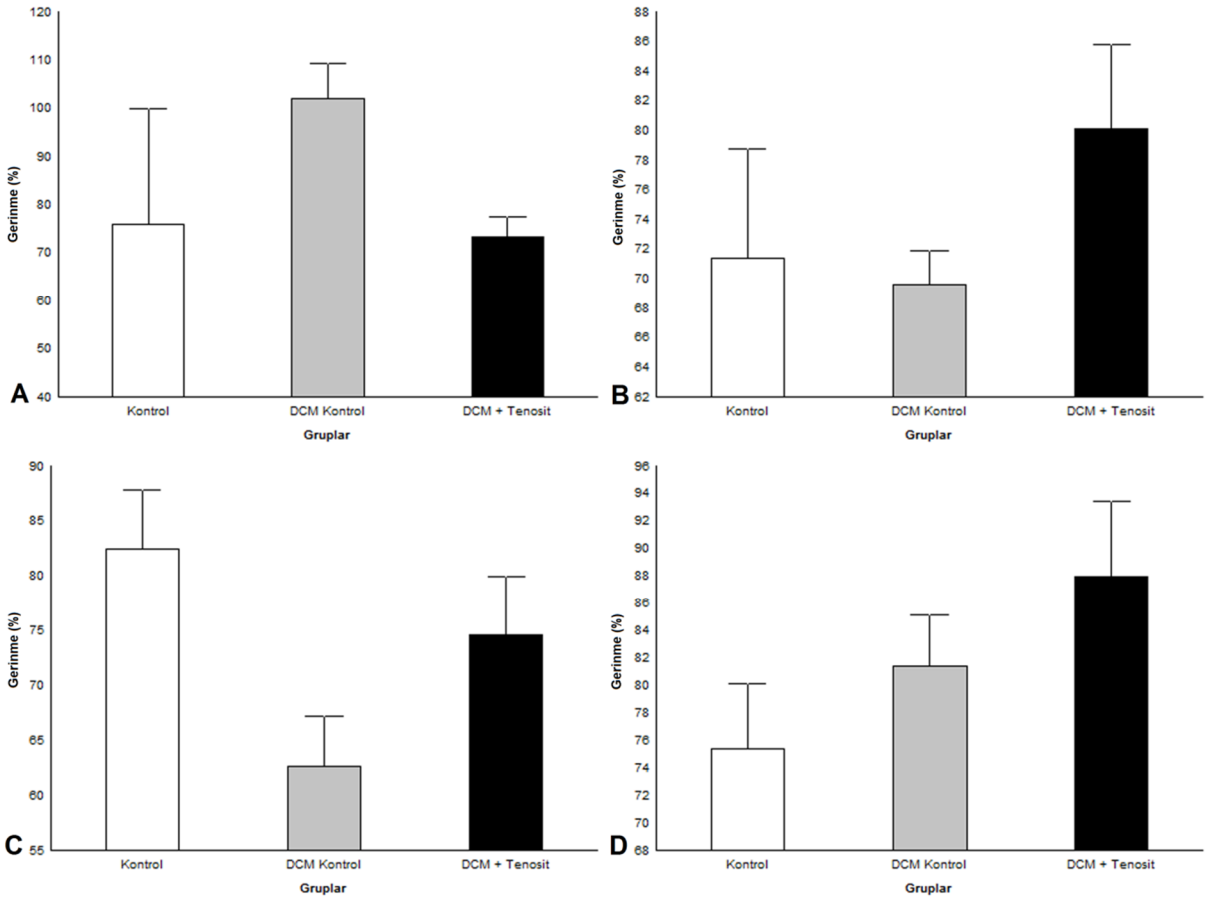
Şekil 4.45. Kontrol, DCM Kontrol, DCM+Tenosit gruplarına ait örneklerin maksimum yük ölçümlerinin *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri **A.** 4 hafta (***p<0,001) **B.** 8 hafta (***p<0,001) **C.** 12 hafta (***p<0,001 ve **p<0,001) **D.** 24 hafta (***p<0,001)



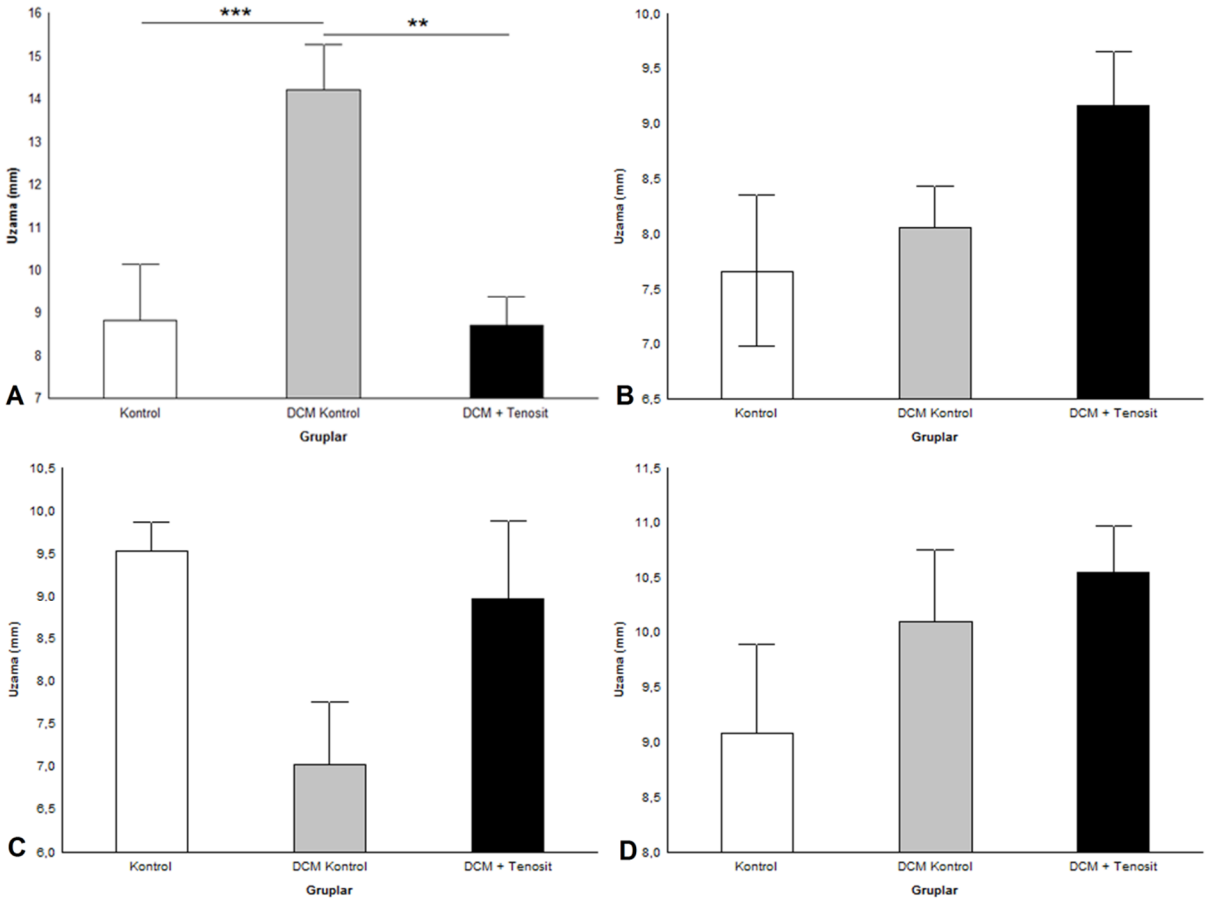
Şekil 4.46. Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına ait örneklerin ait rijitlik hesaplamalarının *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri **A.** 4 hafta (***p<0,05) **B.** 8 hafta (***p<0,05) **C.** 12 hafta **D.** 24 hafta



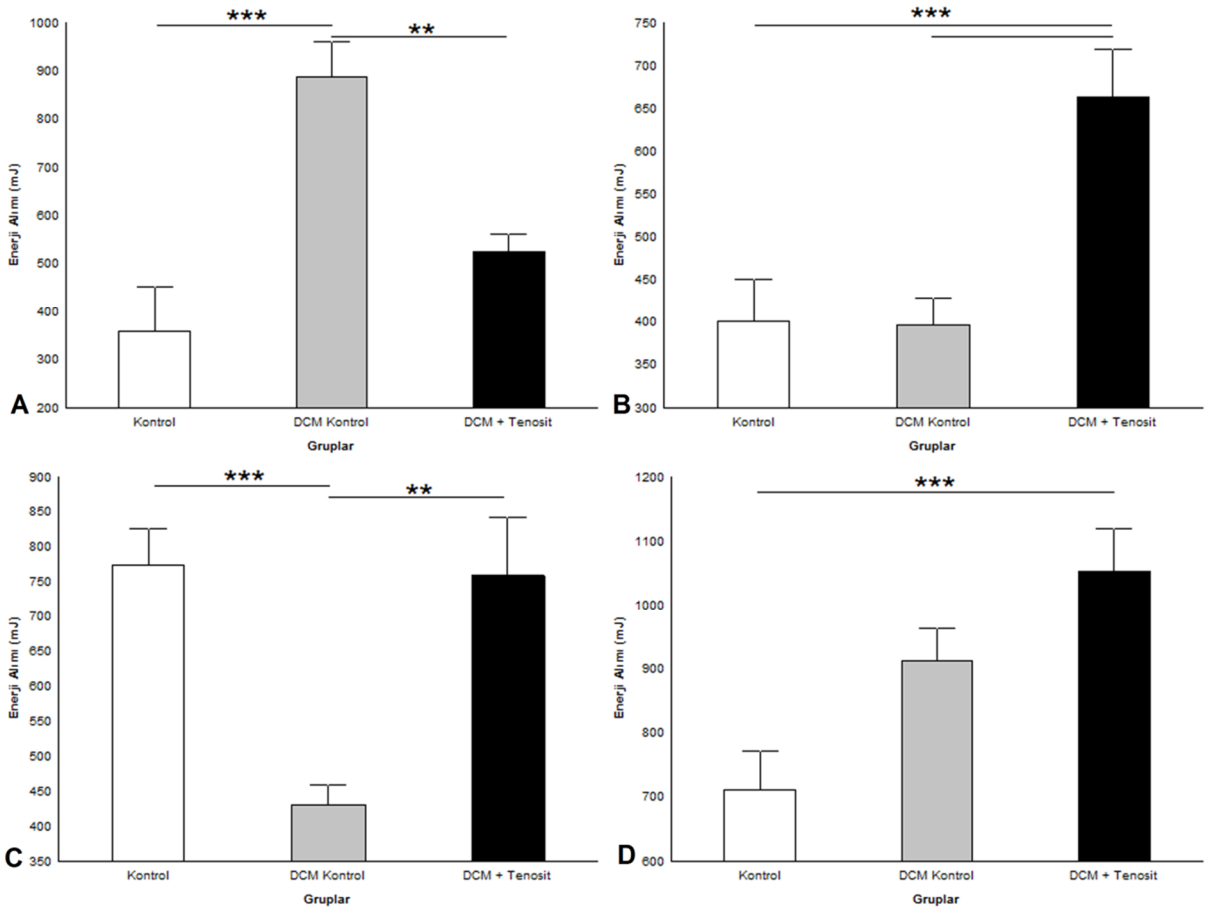
Şekil 4.47. Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına ait örneklerde Young Modülü hesaplamalarının *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri **A.** 4 hafta **B.** 8 hafta (***p<0,05) **C.** 12 hafta (***p<0,05) **D.** 24 hafta (***p<0,05)



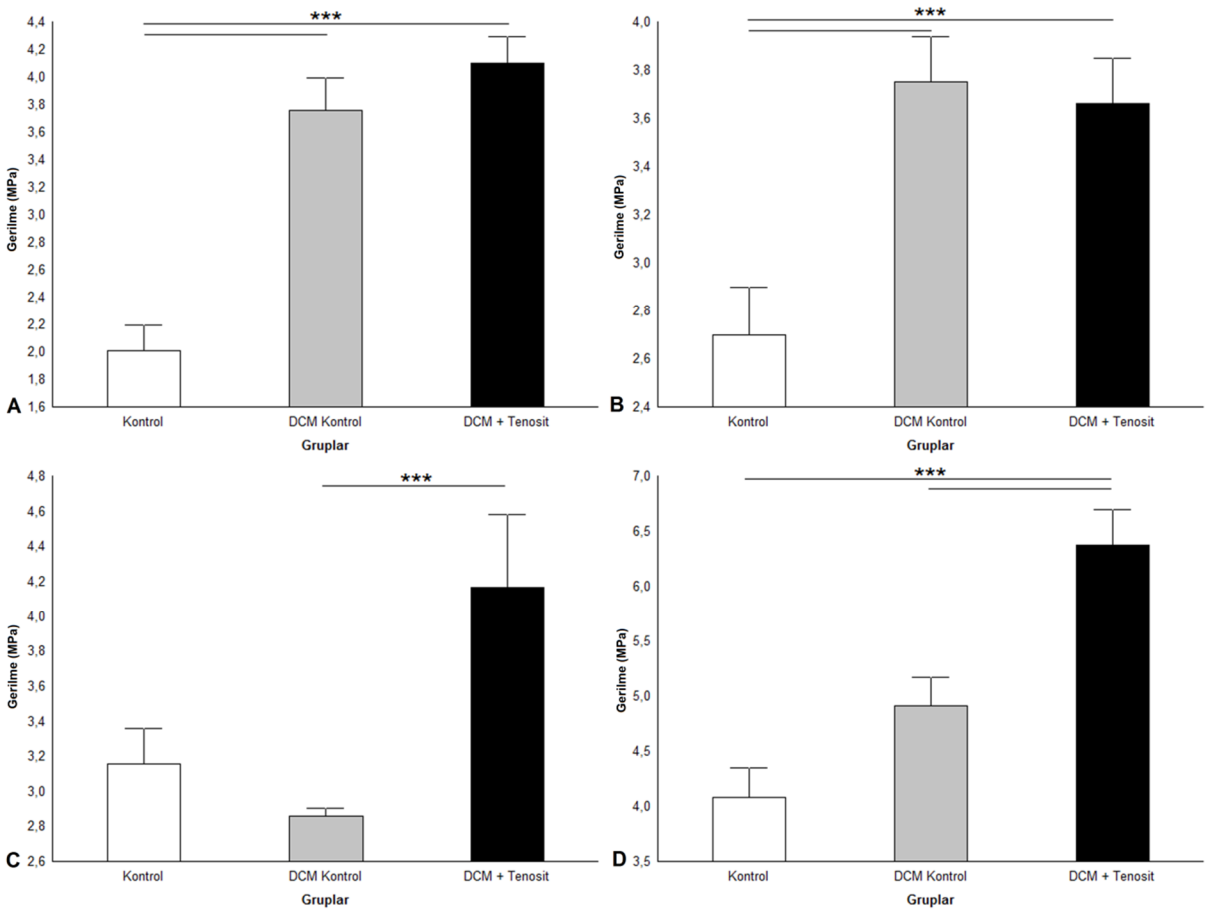
Şekil 4.48. Kontrol, DCM Kontrol ve DCM +Tenosit gruplarının örneklerine ait gerinme hesaplamalarının *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri **A.** 4 hafta **B.** 8 hafta **C.** 12 hafta **D.** 24 hafta



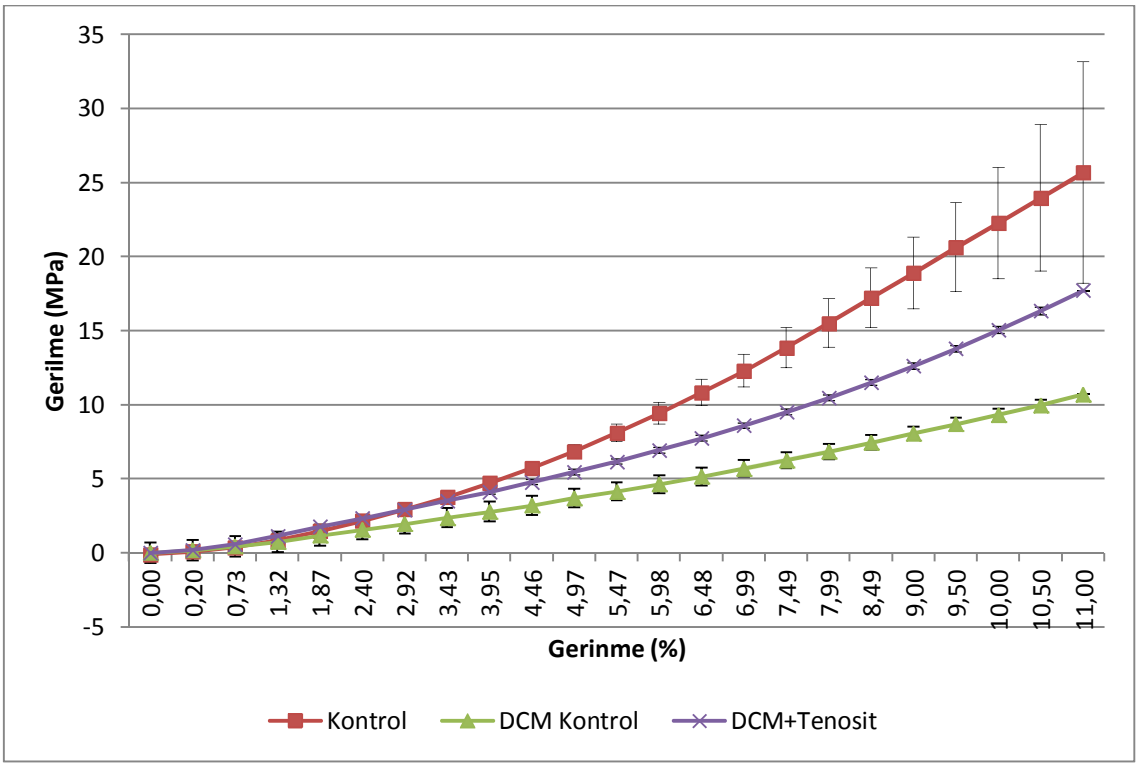
Şekil 4.49. Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarının örneklerine ait uzama ölçümlerinin *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri **A.** 4 hafta (***p<0,05 ve **p<0,05) **B.** 8 hafta **C.** 12 hafta **D.** 24 hafta



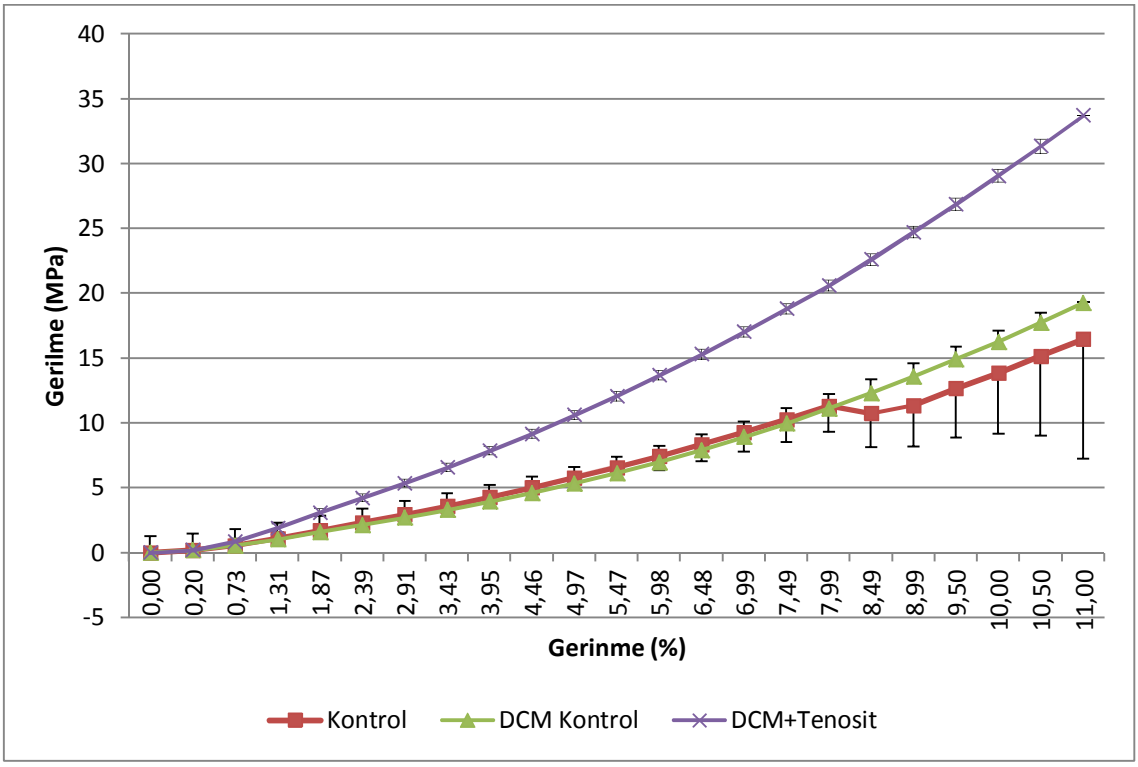
Şekil 4.50. Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarının örneklerine ait enerji alımı hesaplamalarının *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri **A.** 4 hafta (***p<0,001 ve **p<0,05) **B.** 8 hafta (***p<0,05) **C.** 12 hafta (***p<0,05 ve **p<0,05) **D.** 24 hafta (***p<0,05)



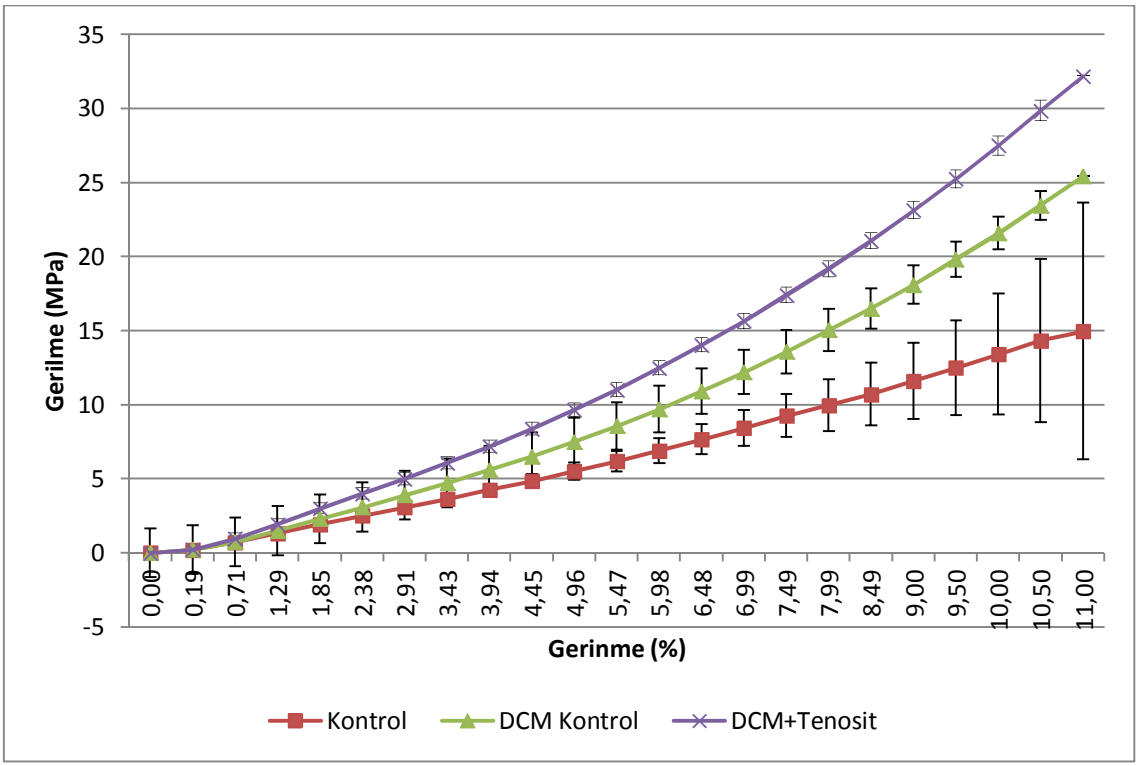
Şekil 4.51. Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarının örneklerine ait gerilme hesaplamalarının *post-hoc* Bonferroni test sonuçlarına göre çizilmiş grafikleri **A.** 4 hafta (***p<0,001) **B.** 8 hafta (***p<0,05) **C.** 12 hafta (***p<0,05) **D.** 24 hafta (***p<0,05)



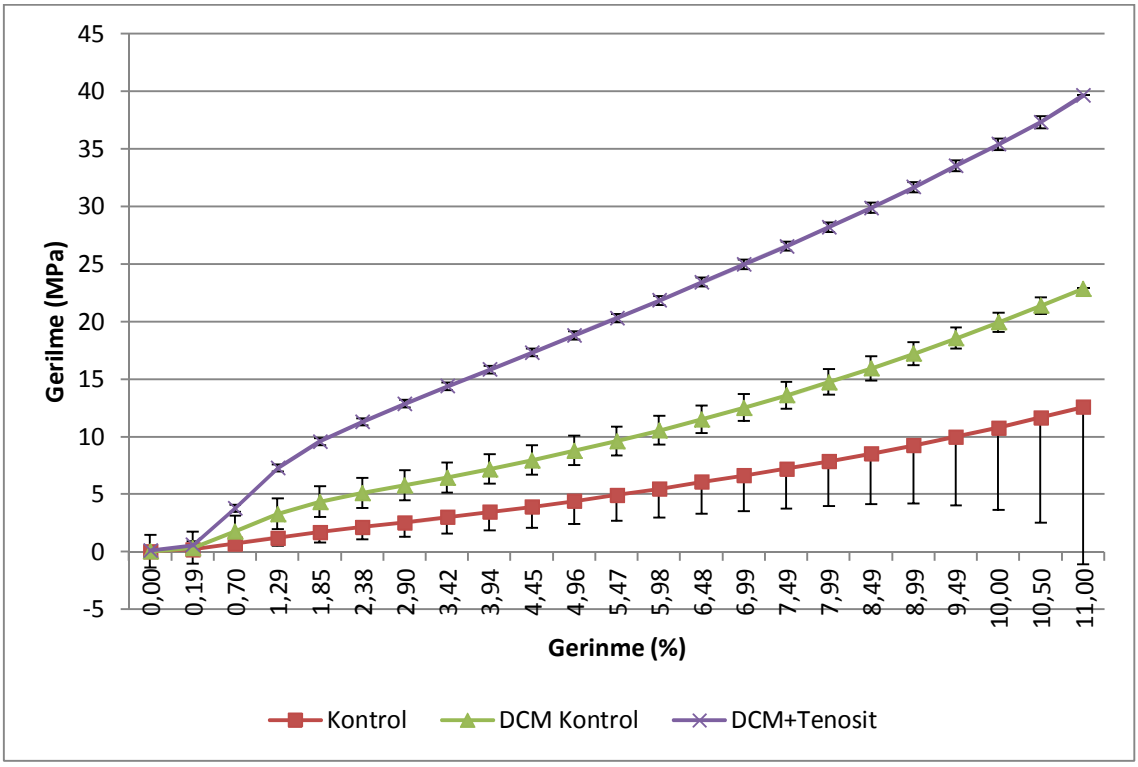
Şekil 4.52. İyileşmenin 4. haftasında Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına ait gerilme-gerinme eğrisi



Şekil 4.53. İyileşmenin 8. haftasında Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına ait gerilme-gerinme eğrisi



Şekil 4.54. İyileşmenin 12. haftasında Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına ait gerilme-gerinme eğrisi



Şekil 4.55. İyileşmenin 24. haftasında Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına ait gerilme-gerinme eğrisi

4.2. Tartışma

Tendon, asıl görevi kaslar tarafından üretilen gerilim gücünü kemikler üzerine aktararak hareket etmeyi sağlayan özelleşmiş bağ dokudur. Vücuttaki diğer dokular ile kıyaslandığı zaman tendonlar, zayıf rejenerasyon kapasitesi, düşük oksijen ve hücre yoğunluğuna sahiptir [106]. Tendonun biyomekanik özellikleri, temel olarak tip 1 kollajen proteininden oluşan yüksek organizasyonlu bir hücrelerarası alan tarafından sağlanır.

Tendon yaralanmaları, gerekli tedavi uygulansa bile hastanın hayat standartının bozulmasına ve uzun süre hareketinin kısıtlanmasına (morbiditeye) neden olur. Günümüzde tendonun temel hücre biyolojisi tam olarak anlaşılmadığı için, tendon sakatlanmalarına karşı geliştirilen tedavi yaklaşımları yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, tendonun rejeneratif kapasitesi diğer dokulara oranla zayıf olduğu için, sakatlanma sonrasında iyileşen doku yapısal, organizasyonel ve mekanik özellikler açısından sağlıklı tendona göre işlevsel açıdan yetersiz kalmaktadır [25,107]. Kim ve Pedowitz [39]'in çalışma sonuçlarına göre, genellikle dokuda kopmanın meydana geldiği bölgenin dikilmesi yeterli olurken; bazı durumlarda çeşitli graft materyallerinin hasarlı bölgeye uygulanması da gerekli olmaktadır. Ancak, biyolojik graftların pek çok dezavantajı olması nedeniyle uygun graft materyalinin seçilmesi oldukça zordur. Goulet ve arkadaşları [108], kadavralardan elde edilen allograftların immün sistem yanıtına yol açabildiğini; hastanın kendisinden elde edilen otograftların ise sınırlı miktarda olduğunu ve hareketin kısıtlanmasına (morbiditeye) yol açtığını bildirmişlerdir. Bu nedenle, doku mühendisliği uygulamaları ile tendon benzeri dokuların üretilmesi klinik bir ihtiyaç haline gelmiştir.

Doku mühendisliğinin amacı, organ transplantasyonları ve biyomateryal implantasyonları ile geleneksel uygulamaların karşılaştığı zorlukları aşmaktır. Bu amaç doğrultusunda doku mühendisliği uygulamaları hücre, biyomateryal ve büyüme faktörlerinin bir ya da birkaçını içeren mikro-çevresel bileşenlerden meydana gelir. Tendon doku mühendisliği uygulamaları, tenosit fenotipi ve genotipinin *in vitro* koşullarda korunmasının zorluğu nedeniyle fazla gelişmemiştir.

Doku mühendisliğinde kullanılacak tendon graftleri, hücresel iyileşmeyi ve doku onarımı sağlamalıdır. Liu ve arkadaşları [109]'nın sonuçlarına göre, graft materyali iyileşme süreci boyunca mekanik ve yapısal özelliklerini koruyarak yüzeyine

yerleştirilen hücrelerin yangı (inflamatuvar) reaksiyonlardan korunmasını sağlamalıdır. Ayrıca graft, zaman içerisinde yerleştirildiği doku içerisinde rezorbe edilmelidir. Bilimsel kaynaklarda tendon rejenerasyonu için uygulanmış pek çok malzeme yer almaktadır: domuz ince barsak submukozası [110,111], ipek fiber [112-114], semitendinöz tendon [115], fibronektin/fibrinojen fiberleri [116], vb. Ancak, bu malzemelerin pek çoğu mekanik güç bakımından yetersiz kaldığı için klinik uygulamalarda kullanılamamakta; uygulanmaları yalnızca in vivo hayvan deneyleri ile sınırlı kalmaktadır.

Gilbert [117]'in yaptığı araştırma sonuçlarına göre mevcut graft materyallerine karşın deselülerize graftların tendon doku mühendisliği çalışmalarında kullanılması pek çok yönden daha avantajlıdır: Deselülerize graftların transplantasyonunda otograft/allograft uygulamalarında gözlenen hücre nekrozu meydana gelmemekte, böylece transplantasyonu takip eden günlerde dokunun mekanik gücü artmaktadır. Deselülerize graftlar doğal dokular oldukları için, hücre tutunması ve mekanik özelliklerin korunması açısından gerekli hücrelerarası alan proteinlerini içerirler. Ayrıca, deselülerizasyon sonrasında kalan hücrelerarası alan proteinleri farklı türler arasında bile benzerlik gösterdiğinden uygulanabilirlik açısından büyük kolaylık sağlamaktadır.

Deselülerize graftların canlı doku gibi davranabilmesi ve rejenerasyona katkıda bulunabilmesi için transplantasyon öncesinde yüzeyine hücrelerin gömülmesi kaçınılmazdır. Doroski ve arkadaşları [118], tendon deselülerize graftlarında en sık kullanılan hücrelerin fibroblastlar, tenositler ve mezenşimal/kemik iliği kök hücreleri olduğunu bildirmişlerdir. Tenositler *in vitro* koşullarda üreyebilen ve tendonun temel bileşeni olan tip 1 kollajeni sentezleyen hücrelerdir [119]. Önceki araştırma sonuçlarına göre, tenositler tek tabakalı kültürde birkaç kere pasajlandıktan sonra fenotip/genotiplerini kaybetmektedirler [120]. Bu nedenle, izole edildikten sonra *in vitro* koşullarda bulundukları sürenin kısa tutulması ve yüksek yoğunlukta (10^6 hücre/ml) kullanılmaları gerekmektedir [120-122]. Çalışma kapsamında da Aşil tendonundan izole edilen tenositlerin kullanılması tercih edilmiş; hücrelerin deselülerize matrikslerin yüzeyine gömülmesinden önce proliferasyon karakterizasyonu için üreme eğrileri çıkartılmış ve hücre yaşlanması β-galaktozidaz aktivitesi ölçümü ile tayin edilmiştir. Üçüncü pasaja (P3) ait tenositler önceki pasajlara göre daha düşük bir proliferasyon çizgisi gösterirken; β-galaktozidaz aktivitesinin

P0'dan P3'e doğru artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu durum pasajlama ile yaşlanan tenositlerde beklenen bir bulgudur ve mevcut kaynak verileri ile uyumludur. Ayrıca tenositlerin ikili – immünofloresan boyama ve RT-PCR ile fenotipik ve genotipik karakterizasyonları yapılmış; tip 1 kollajen – *Col1*, tip 2 kollajen – *Col2*, tip 3 kollajen – *Col3*, tip 5 kollajen – *Col5*, tenomodulin - *Tnmd* ve tenascin-C - *Tnsc* proteinlerinin gen ifadeleri farklı pasajlara ait tenositlerde karşılaştırılmıştır. Bu moleküller, tip 2 kollajen hariç tendon spesifik proteinler olarak tanımlanmışlardır [123,124]. Tip II kollajen esas olarak kıkırdak doku markerı olmasına rağmen, tendon dokusu içerisinde de diğer proteinlere kıyasla çok az miktarda üretildiği bilinmektedir [125,126]. Tenascin-C ise tendon yaralanmaları ve rejenerasyonu sırasında ifadesi artan bir proteindir [127]. Genlerin ifade grafiklerini incelendiği zaman; *Tnsc* hariç diğer tüm genlerin ifadesinin P1'le kıyaslandığında P2 ve P3'te sırasıyla artış gösterdiği tespit edilmiş; *Tnsc* gen bölgesinin ifade profili ise tam tersi şekilde gözlenmiştir. *Col2* ifadesi tüm örneklerde ifadesi en az olan gendir. Elde edilen bulgular, Lou ve arkadaşları [124]'nın verileri ile örtüşmektedir. Bu araştırmacılar, *Col1* ve *Col3*'ün bir arada artan gen ifadelerinin tenojenik farklılaşmanın sembolü olduğunu rapor etmişlerdir. *Tnsc* ifadesinin ilerleyen pasajlarda (P1'e oranla P2 ve P3'te) azalan bir profil izlemiş olması, hücrelerin çalıştığımız *in vitro* koşullarda kendilerini travmatik ortamda hissetmediklerini ve pasajlanma ile ortama uyum sağladıklarını göstermektedir. *Tnsc* bulguları, Pauly ve arkadaşları [127]'nın sonuçları ile uyumludur. Sonuç olarak, çalışma için kullanılan tenositlerde herhangi bir fenotipik ya da genotipik kayma olmadığı saptanmıştır. Hücreler, tenositik karakterlerinin kanıtı olan genleri pasajlar arası beklenen ölçüde artan ya da azalan miktarlarda ifade etmeye devam ettiklerinden, bu çalışmada implantasyon için uygun bulunmuşlardır.

Deselülerize matriks (DCM) hazırlama protokolü için incelenen kaynaklarda yer alan pek çok farklı kimyasal ajan uygulaması bulunmaktadır. Her bir ajanın avantaj/dezavantajları Woods ve Gratzer [60] tarafından tartışılmış; hücreden arındırmada en başarılı protokolün Triton X-100 ve SDS ile elde edildiği rapor edilmiştir. Çalışmamız kapsamında transplantasyonu yapılan DCM'ler aynı protokol ile hazırlanmış ve hücreden arındırmada elde edilen başarı Woods ve Gratzer [60]'in sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Hazırlanan DCM'lerin tenositlerin bağlanması için iyi bir yüzey oluşturduğu belirlenmiştir.

Genel olarak, tendon sakatlanmasından sonra ilk 24 saat içerisinde yırtılma bölgesinde pıhtı oluşması ve inflamatuvar hücrelerin bölgeye göçü gerçekleşir [128,129]. İkinci aşamada tenositlerin proliferasyonu ile granülasyon dokusu oluşur. İyileşme süreci sakatlanmayı takip eden 6. haftadan sonra ise yeni sentezlenen hücrelerarası alanın olgunlaşması ve tekrar şekillenmesi ile tamamlanır [17,128]. Kaynaklarda yer alan bu bilgiler doğrultusunda, iyileşme sürecini yakından takip edebilmek için, çalışmamızda cerrahi operasyonları takip eden 2, 4, 6, 8, 12 ve 24. haftalarda uygulama sonlandırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda tendon iyileşmesini değerlendirmek için çok sayıda histolojik puanlama yöntemi kullanılmıştır [130-132]. Hücrelerarası alanın organizasyonu, hücre/matriks oranı, hücre dağılımı, iyileşme bölgesinin yapısı, doku metaplazisi, damarlanma yapısı ve inflamasyon histolojik puanlamada kullanılan kriterlerden bazılarıdır. Ancak bu kriterlerin sayısı, araştırmacıların beklentilerine göre arttırılabilir [133]. Bu çalışmada belirlenen 7 adet kriterden elde edilen histolojik puanlama verileri değerlendirildiğinde, 24. hafta DCM+Tenosit grubuna ait histolojik puanlama verileri Kontrol ve DCM Kontrol gruplarına ait verilere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara benzer şekilde, Stoll ve arkadaşları [133], tavşanların kısmi defekt yaratılan tendonlarında tenosit/biyomateryal implantasyonunun ardından histolojik puanlama değerlerinin arttığını belirtmektedir.

24. haftaya kadar incelenen çoğu preparatta özellikle ilk 6 haftada gevşek hücrelerarası alan yapılanması, hücre sayısında artış ve aşırı damarlanma olduğu tespit edilmiştir. Bu preparatlarda görülen hücre sayısındaki artışla paralel olarak beslenme ihtiyacının da artması ve bu durumun hipervaskülarizasyona neden olması beklenen bir bulgudur. Kryger ve arkadaşları [11], tendon iyileşme sürecini takip etmek için en uygun zaman aralıklarının 6 ve 12. haftaların olduğunu belirtmektedir.

Buna karşın, DCM+Tenosit kompozitlerinin Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile karşılaştırıldığı zaman makrofajlar, dev hücreler ve bol miktarda nötrofil hücresinden oluşan daha yoğun inflamatuvar cevap gelişimine neden olduğu belirlenmiştir. Ancak diğer taraftan DCM+Tenosit grubu 6. haftadan sonra Kontrol ve DCM Kontrol gruplarına göre daha iyi hücrelerarası alan organizasyonu göstermiştir. Benzer sonuçlar Young ve arkadaşları [134]'nın kollajen jel kullanarak yaptıkları çalışmada da saptanmıştır. Xia ve Trifitt [135], inflamasyonun sitokin ve büyüme faktörü salınım

mekanizmalarını uyararak fibroblastların sayıca artışına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmamızdaki preparatlarda 6 haftadan sonra bile lokal ya da yaygın nötrofil dağılımı ve özellikle emilmeyen dikiş iplerinin çevresinde toplanan dev hücrelerin tespit edilmesi, tendon metabolizmasının vücuttaki diğer dokulara kıyasla daha yavaş seyretmesinden ve rejenerasyon sürecinin uzun olmasından kaynaklanmış olabilir.

Buck ve arkadaşları [136], kondroid metaplaziyi normal şartlarda tendonun kemiğe bağlandığı noktada yer alan fibröz kıkırdaktan farklı olarak gelişen kıkırdak dokusu olarak tanımlamıştır ve kondroid metaplazinin özellikle tendonun distal (kemiğe yakın) kısmında yer aldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, metaplazi bölgeleri çoğunlukla damarlanmanın ve tenositlerin sayıca az bulunduğu bölgeler olarak dikkat çekmektedir [137]. Bu çalışmada incelenen histolojik kesitlerin büyük bir kısmında normal tendon dokusu ile uyumlu olarak ödem ya da kıkırdak/kemik metaplazisine rastlanmazken; az sayıda preparatta kondroid metaplazi (kıkırdaklaşma) gelişimi gözlenmiştir. Cırcı ve arkadaşları [138], 36 adet Sprague-Dawley sıçana ait Aşil tendonu hasarı ile çalışmış, sonuçlarımıza benzer şekilde sham grubunda 12/15 örnekte (%80) kondroid metaplazi geliştiğini bildirmişlerdir. Mosier ve arkadaşları [5], normal (n=15) ve cerrahi işlem görmüş (n=15) kadavra tendonlarını histolojik olarak incelemiş; normal gruptaki 12/15 tendonda, cerrahi işlem görmüş 15/15 tendonda kondroid metaplazi bulunduğunu bildirmişler ve bu bulguyu normal tendonun yapısal özelliği olarak sınıflandırmıştır. Önceki kaynaklarda yer alan bu oransal verilerle kıyaslandığı zaman, bu çalışma sonucunda tespit edilen kondroid metaplazi oluşumlarının tendon iyileşmesi sırasında sıklıkla gözlenen bir patolojik bulgu olduğuna karar verilmiştir. Çalışmamızda kondroid metaplazi görülme sıklığının Kontrol (28/90), DCM Kontrol (38/90) ve DCM+Tenosit (21/90) grupları kıyaslandığı zaman, DCM+Tenosit grubunda diğer gruplara oranla daha az görülmesi çalışmanın amacına yönelik sonuç verdiğini gösteren bir bulgudur. Ayrıca, diğer araştırmacılar doğal biyomekanik ortamlarından izole edilen tenositlerin *in vitro* koşullarda kendiliğinden fibröz kıkırdağa dönüşebildiğini bildirmişlerdir [33,139,140]. Histopatolojik bulgu olarak kondroid metaplaziye neden olan tenositlerin DCM yüzeyine gömülen allojenik hücreler mi, yoksa bölgeye göç eden otojenik hücreler mi olduğu belirlenememiştir. Bu durumun tespiti için X/Y floresan *in situ* hibridizasyon teknikleri kullanılarak saptanması uygun olabilir. Ek olarak, Pauly ve arkadaşları

[127]'na göre çalışılan hücrelerde *Tnsc*'nin gen ifadesinin artışı, kondrosit ve osteosit farklılaşmasının markerıdır. Çalışmamızdan elde ettiğimiz RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde, *Tnsc*'nin ifadesinin hücreler pasajlandıkça istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olması, DCM yüzeyinde gömmek üzere kullandığımız allojenik tenositlerin kıkırdak-kemik farklılaşması göstermediğinin kanıtıdır. Tespit edilen kondroid metaplazi gelişiminin otojenik tenositlerin tendon hasarına karşı gösterdiği bir tepki olarak geliştiği düşünülebilir. Çalışmamızda tespit edilen bu durum, Gigante ve arkadaşları [125]'nın tendon içerisinde meydana gelen herhangi bir hasara karşı tenositlerde kondroid metaplazi gelişebileceği yönünde açıklaması ile tamamen uyum içerisindedir.

On ikinci (12.) haftadan sonra, hücrelerarası alan organizasyonu yönünden Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına ait histolojik incelemeler benzer bulgular olduğunu ortaya koymuştur. Çoğu preparatta kollajen fibriller paralel düzenleniş gösterirken, hücre/matriks oranının hemen hemen normal tendon ile uyumlu fizyolojik düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Ancak, tüm bu düzenlenişlerin, Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile karşılaştırıldığı zaman DCM+Tenosit grubunda daha başarılı olduğu belirlenmiştir. On ikinci (12.) haftadan sonra az sayıda da olsa bazı preparatlarda görülen inflamasyonun normal olduğu düşünülmektedir. Stoll ve arkadaşları [133], 12. Haftadan sonra tespit edilen inflamatuvar hücrelerin –özellikle lökositlerin- sitokinler salgılayarak fibril düzenlenişine etkisi olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bulgular, çalışmamıza ait bulgulara açıklık getirmektedir.

Yapılan bir çok çalışma biyolojik ya da sentetik olarak hazırlanan graft materyallerinin iyileşme sürecinde tendonun mekanik özelliklerinde zayıflama meydana getirebildiğini, doku yapısını zayıflattığını, doku bütünlüğünü bozduğunu ve çevre dokularda aşınmalara neden olabildiğini göstermiştir [141-144]. Bu nedenlerden ötürü, deneysel uygulamalar (manipülasyon) sonrasında, elde edilen örneklerde yalnızca histopatolojik incelemeler değil; biyomekanik ölçümler de yapılmaktadır. Carpenter ve Hankenson [145]'a göre, tendonun asıl görevi gerim gücünü kas ve iskelet sistemi arasında iletmek olduğu için; yapılan doku mühendisliği uygulamasının etkinliğini sınamada en önemli kriterlerden birisi biyomekanik ölçümlerdir. Bu amaç doğrultusunda, Kontrol, DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarına 4, 8, 12 ve 24. haftalara ait tendon kesitlerinin alan, maksimum yük, rijitlik, Young Modülü, gerinme, uzama ve enerji alımı verilerine ait ölçüm ve hesaplamalar

yapılmış; elde edilen verilere istatistiksel testler uygulanmış ve DCM içeren DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarında maksimum yüke dayanıklılığın daha yüksek olduğu ve haftalar ilerledikçe istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Palmes ve arkadaşları [146], biyomekanik ölçümler arasında en önemli verinin maksimum yük değeri olduğunu ve iyileşmenin olduğunu kanıtlayabilmek için erken evrelerde matriks organizasyonu nedeni ile maksimum yükün zayıf; ilerleyen evrelerde ise bu dayanıklılığın istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış göstermesi gerektiğini belirtmektedirler. Aspenberg ve Virchenko [104]'nun sıçan Aşil tendonu ile yaptıkları çalışma sonucunda maksimum yük verileri haftalara bağımlı olarak artış gösterdiğinden bu sonuçla örtüşmektedir. Çalışmamızda yapılan ölçümlerde 24. haftanın sonunda, DCM içeren DCM Kontrol (90,7N) ve DCM+Tenosit (99,6N) gruplarında maksimum yüke dayanıklılığın Kontrol grubuna (78,9N) göre daha yüksek olması ve haftalar ilerledikçe istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış göstermesi önceki çalışma ile uyumlu bir sonuç olarak kabul edilmektedir. DCM+Tenosit grubundan, Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile kıyaslandığı zaman daha yüksek ölçüm verileri elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ve gerilim-gerinim grafiklerindeki haftalara bağlı bulgular, çalışmamızın temel hipotezini doğrulamakta ve DCM+Tenosit grubunun tendon rejenerasyonu üzerindeki etkinliğini ortaya koymaktadır. Tenositlerin DCM yüzeyine gömülmesi dokunun dayandığı maksimum yükü arttırmaktadır.

Alan hesaplamalarından elde ettiğimiz veriler doku kalınlığının uzun süre korunduğunu göstermektedir. Kontrol grubunda bu şişkinlik genel olarak 4 ve 8. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı bir alan artışına neden olmuştur. Benzer durum, Aspenberg ve Virchenko [104]'nun Sprague Dawley sıçanlar ile yaptıkları Aşil tendonu rejenerasyonu çalışma sonuçlarında ilk 2 haftada alan artışı olarak rapor edilmiştir. DCM Kontrol ve DCM+Tenosit gruplarında ise alanın haftalar ilerledikçe azalma göstermesi, hasarlı dokunun iyileştiğini ve hücrelerarası alan organizasyonunun yavaş yavaş tamamlanarak paralel düzenlenişin tekrar oluştuğunu ortaya koymaktadır. DCM+Tenosit grubunda 8. haftada alan muhtemel hücre infiltrasyonu nedeni ile artış göstermiş; ancak 12 ve 24. haftalarda Kontrol ve DCM Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında azalışa geçmiştir. Nagasawa ve arkadaşları [29]'nın tavşan Aşil tendonu ile yaptıkları 12 haftalık rejenerasyon çalışmasının

sonuçlarına göre iyileşme ilerledikçe doku alanı da azalmaktadır. Benzer sonuçlar Perry ve arkadaşları [147]'nın Spraque-Dawley sıçanlarda ince barsak submokozası graftı ile yaptıkları 16 haftalık rejenerasyon çalışmasında da görülmüştür. Bu çalışmalara ait sonuçlar verilerimiz ile uyum içerisinde olup, iyileşme mekanizmalarının iyi bir eğilimde olduğunu kanıtlamaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, maksimum yük verilerini de desteklemekte ve dokuya ait alan azaldıkça maksimum yük değerleri artmaktadır. Bulgularımız, sıçan tendonu ile yapılan önceki çalışmalar [41] ile uyumludur.

Aspenberg ve Virchenko [104]'nun sıçan Aşil tendonu rejenerasyonu konusunda yaptığı çalışma, oluşan hasar sonrasında iyileşme süreci ilerleyip, doku gerime karşı dayanıklılık kazandıkça enerji alımının arttığını göstermiştir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre dokunun kopması için gerekli olan enerji alımı verileri Kontrol ve DCM Kontrol gruplarıyla kıyaslandığı zaman DCM+Tenosit grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazladır. Enerji alımı, kopma anındaki doku uzaması ile orantılı olduğundan; DCM+Tenosit grubuna ait verilere göre, bu gruptan alınan örneklerin kopmaya dayanarak oldukça yüksek bir uzama özelliği gösterdikleri tespit edilmiştir.

Perry ve arkadaşları [147], rijitlik değerinin ilerleyen haftalarda yüksek olmasının rejenerasyon üzerindeki pozitif etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Aspenberg ve Virchenko [40] da, sıçan Aşil tendonu ile yaptıkları rejenerasyon çalışmasında rijitlik değerinin hafta artışıyla birlikte doğru orantılı olarak yükselme eğiliminde olduğunu rapor etmişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızdan elde edilen rijitlik değerleri oldukça anlamlı ve mevcut çalışmaların verileri ile örtüşmektedir. Çalışmamızda DCM+Tenosit verileri özellikle 4 ve 8. haftalarda Kontrol ve DCM Kontrol verilerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksektir ve ilerleyen haftalarda tüm örneklere ait değerlerde artış vardır. Gerilme verileri de bu sonuçlar ile uyumlu olup, DCM+Tenosit grubunda sürekli artış göstermiştir. Gerilme verilerinin ilerleyen haftalar ile artış göstermesi Thomopoulos ve arkadaşları [41]'nın tendon defektinin rejenerasyonu üzerinde kan pıhtısının etkilerini araştırdıkları çalışmanın bulguları ile de örtüşmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen tüm veriler bir arada değerlendirildiği zaman, uygulamasını yaptığımız DCM'in hasarlı doku ile biyolojik bir uyum gösterebildiği hem histopatolojik incelemeler, hem de biyomekanik ölçümler ile kanıtlanmıştır. DCM

yüzeyine tenositlerin gömülmesi ise, histopatolojik ve biyomekanik sonuçlara göre DCM'nin etkinliğini arttırmıştır. Bu anlamda, 24 haftalık bir süre zarfında, iyileşmekte olan dokunun normal tendon dokusuna benzerliği diğer gruplar ile kıyaslandığı zaman daha hızlı ortaya çıkmıştır. Ayrıca biyomekanik ölçüm ve hesaplama sonuçlarına göre DCM+Tenosit kompozitleri iyileşmekte olan dokunun mekanik özellikleri üzerinde son derece olumlu etkiler oluşturmuştur. Bu noktada DCM yüzeyine gömmek için kullanılan tenositlerin kültür sürecinde karakterizasyonlarının yapılmış olması en önemli noktayı teşkil etmektedir. Üreme eğilimi, rejenerasyon için gerekli olan proteinlerin hücredeki üretimi ve aynı proteinlerin gen ifadesi düzeyindeki artış/azalışlarının tespit edilmesi hiç kuşkusuz DCM+Tenosit kompozitlerinin etkin kullanılabilirliğini arttırmıştır.

Doku mühendisliği uygulamaları tendon graftlarının geliştirilmesini ve sakatlanma sonrası rejenerasyon sürecinin kısalmasını sağlamalıdır. Özellikle, deselülerizasyon ile elde edilen matriksler ve bu matrikslerin yüzeyine hücre gömülmesi ile elde edilen kompozitler hastada immün yanıt gelişmeden doku rejenerasyonunu hızlandırmaktadır. Mevcut çalışmada, sıçan Aşil tendonu rejenerasyonu için hazırladığımız deselülerize matriks - hücre kompozitlerinin hem histopatolojik incelemeleri, hem de biyomekanik analizleri bu kompozitlerin doku rejenerasyonunu arttırdığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızdan elde edilen veriler ortopedik cerrahi alanındaki önemli bir sorunu doğrudan ilgilendirmekte ve tendon rejenerasyonu uygulamaları için geleceğe yönelik umut verici sonuçlar taşımaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışmada ilk defa DCM+Tenosit kompozitlerinin sıçan Aşil tendonu rejenerasyonu üzerindeki etkinliği ortaya koyulmuştur. Çalışmadan elde edilen bulguların, deselülerize matrikslerin tenositler ile birarada kullanılarak tendon defektlerinde uygulanabilirliği konusundaki bilgi ve deneyim eksikliğini giderecek yönde olduğu ve DCM+Tenosit kompozitlerinin uygulanması sonucunda Aşil tendonu iyileşmesinin hızlandığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Fyfe, I., Stanish, W.D., The use of eccentric training and streching in the treatment and prevention of tendon injuries, *Clinical Sports Medicine,* 11, 601-24, **1992**

[2] Diamant, J., Keller, A., Baer, E., Litt, M., Arridge, R.G., Collagen; ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of agening, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 180, 293-315, **1972**

[3] Shadwick, R.E., Elastic energy storage in tendons: mechanical differences related to function and age, *Journal of Applied Physiology*, 68, 1033-40, **1990**

[4] Ahmed, I.M., Lagopoulos, M., McConnell, P., Soames, R.W., Sefton, G.K., Blood supply of the Achilles tendon, *Journal of Orthopaedic Research*, 16, 591-6, **1998**

[5] Möller, H.D., Evans, C.H., Maffuli, N., Current aspects of tendon healing, *Orthopade*, 29, 182-7, **2000**

[6] Woo, S.L., Hildebrand, K., Watanabe, N., Fenwick, J.A., Papageorgion, C.D., Wang, J.H., Tissue engineering of ligament and tendon healing, *Clinical and Orthopaedics Related Research*, 367, 312-23, **1999**

[7] Awad, H.A., Butler, D.L., Boivin, G.P., Smith, F.N., Malaviya, P., Huibregtse, B., Caplan, A.I., Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon, *Tissue Engineering*, 5, 267-77, **1995**

[8] Cao, Y., Vacanti, J.P., Ma, X., Paige, K.T., Upton, J., Chowanski, Z., Schloo, B., Langer, R., Vacanti, C.A., Generation of neo-tendon using synthetic polymers seeded with tenocytes, *Transplantation Proceedings*, 26, 3390-402, **1994**

[9] Koob, T.J., Willis, T.A., Qiu, Y.S., Hernandez, D.J., Biocompatibility of NDGA-polymerized collagen fibers. II. Attachment, proliferation, and migration of tendon fibroblasts in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research*, 56, 40-8, **2001**

[10] Torres, D.S., Freyman, T.M., Yannas, I.V., Spector, M., Tendon cell contraction of collagen-GAG matrices in vitro: effect of cross-linking, *Biomaterials*, 21, 1607-19, **2000**

[11] Kryger, G.S., Chong, A.K.S., Costa, M., Pham, H., Bates, S.J., Chang, J., A comparision of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering, *The Journal of Hand Surgery,* 32A, 597-605, **2007**

[12] Güngörmüş, C., Kolankaya, D., Characterization of type I, III and V collagens in high-density cultured tenocytes by triple-immunofluorescence technique, *Cytotechnology,* 58, 145–52, **2008**

[13] Gelberman, R.H., Manske, P.R., Van de Berg, J.S., Lesker, P.A., Akeson WH., Flexor tendon repair in-vitro: a comperative histologic study of the rabbit, chicken, dog and monkey, *Journal of Orthopaedic Research,* 2, 39-48, **1984**

[14] Manske, P.R., Lesker, P.A., Biochemical evidence of flexor tendon participation in the repair process – an in vitro study, *Journal of Hand Surgery*, 9B, 117-20, **1984**

[15] Franco, B., Vincenzo, V., Alessandro, D.V., Tonello, C., Abatangelo, G., Mazzoleni, F., Tissue engineering approaches for the construction of a completely autologous tendon substitute, *Indian Journal of Plastic Surgery,* 41, 38-46, **2008**

[16] Sharma, P., Maffuli, N., Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling, *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 6, 181-90, **2006**
[17] Sharma, P., Maffuli, N., Basic biology of tendon injury and healing, *Surgeon*, 3, 309-16, **2005**
[18] The Health, The Anatomic Structure of Achilles Tendon, http://www.thehealth.com, (Haziran, **2012**).
[19] Jozsa, L., Kannus, P., Human Tendon: Anatomy, Physiology and Pathology, Human Kinetics Campaign, USA, **1997**
[20] Aström, M., Laser Doppler flowmetry in the assessment of tendon blood flow, *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 10, 365-7, **2000**
[21] Target plantar fasciitis, The Structure of Tendon, http://www.targetplantarfasciitis.com, (Haziran, **2012**).
[22] Butler, D.L., Dressler, M., Awad, H., Functional tissue engineering: assesment of function in tendon and ligament repair, Functional tissue engineering, New York: Springer. pp. 213-26, **2003**
[23] Homsi, C., Bardalo-Rodrigues, M., daSilva, J., Stump, X., Ultrasound in adhesive capsulitis of the shoulder: is assessment of the coracohumeral ligament a valuable diagnostic tool?, *Skeletal Radiology*, 35, 673-88, **2006**
[24] Louie, L., Yannas, I., Spector, M., Tissue engineered tendon., Frontiers in tissue engineering., New York: Elsevier Science Ltd. pp. 413-42, **1998**
[25] Woo, S.L., Abromowitch, S.D., Kilger, R., Liang, R., Biomechanics of knee ligaments: injury, healing and repair. *Journal of Biomechanics*, 39, 1-20, **2006**
[26] Bader, A., Schilling, T., Teebken, O.E., Brandes, G., Herden, T., Steinhoff, G., Haverich, A., Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves, *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 14, 279-84, **1998**
[27] Livesey, S.A., Herndon, D.N., Hollyoak, M.A., Atkinson, Y.H., Nag, A., Transplanted acellular allograft dermal matrix. Potential as a template for the reconstruction of viable dermis, *Transplantation,* 60, 1-9, **1995**
[28] Kannus, P., Josza, L., Jarvinnen, M., Basic science of tendons. Principles and Practice of Orthopaedic Sports Medicine, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. pp. 21-37, **2000**
[29] Nakagawa, Y., Majima, T., Nagashima, K., Effect of ageing on ultrastructure of slow and fast skeletal muscle tendon in rabbit Achilles tendons, *Acta Physiologica Scandinavica*, 152, 307-13, **1994**
[30] Kuhn, K., The classical collagens: types I, II and III, Structure and function of collagen types, Ornaldo, Academic Press, **1987**
[31] Schweitzer, R., Chyung, J.H., Murtaugh, L.C., Brent, A.E., Rosen, V., Olson, E.N., Lassar, A., Tabin, C.J., Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligament, *Development* 128, 3855-66, **2001**
[32] Murchison, N.D., Price, B.A., Conner, D.A., Keene, D.R., Olson, E.N., Tabin, C.J., Schweitzer, R., Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons, *Development*, 134, 2697-708, **2007**
[33] Schulze-tanzil, G., Mobasheri, A., Clegg, P.D., Sendzik, J., John, T., Shakibaei, M., Cultivation of human tenocytes in high-density culture, *Histochemistry and Cell Biology*, 122, 219-28, **2004**

[34] Kannus, P., Jozsa, L., Järvinen, T.A., Järvinen, T.L., Kvist, M., Natri, A., Järvinen, M., Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat, *Histochemistry,* 30, 799-810, **1998**

[35] Mackie, E., Ramsey, S., Expression of tenascin in joint-associated tissues during development and postnatal growth, Journal of Anatomy, 188, 157-65, 1996

[36] Mehr, D., Pardubsky, P.D., Martin, J.A., Buckwalter, J.A., Tenascin-C in tendon regions subjected to compression, Journal of Orthopaedic Research, 18, 537-45, 2000

[37] Lin, Y.L., Moolenaar, H., van Weeren, P.R., van de Lest, C.H., Influence of electrode placement on effective field strength in the superficial digital flexor tendon of horses, *American Journal of Veterinary Research,* 67, 845-9, **2006**

[38] Woo, S.L., Wu, C., Dede, O., Vercillo, F., Noorani, S., Biomechanics and anterior cruciate ligament reconstruction, *Journal of Orthopaedic Surgery Research*, 25, 1-2, **2006**

[39] Kim, C.W., Pedowitz, R.A., Principles of Surgery: Graft Choices and the Biology of Graft Healing in Knee Ligaments: Structure, Function, Injury, and Repair. Ed. Lippincott Williams & Wilkins ISBN-139780781718172, pp 435-55, **2003**

[40] Goulet, F., Rancourt, D., Cloutier, R., Germain, L., Poole, A.R., Auger, F.A., Tendons and ligaments. Principles of tissue engineering. 2nd ed. San Diego Academic Press Ltd., ISBN 13: 978-0-12-370615-7, pp 711-22, **2000**

[41] Thomopoulos, S., Soslowsky, L.J., Flanagan, C.L., Tun, S., Keefer, C.C., Mastaw, J., Carpenter, J.E., The effects of fibrin clot on healing rat supraspinatus tendon defects, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 11, 239-47, **2002**

[42] Qin, T.W., Yang, Z.M., Wu, Z.Z., Xie, H.Q., Qin, J., Cai, S.X., Adhesion strenght of human tenocytes to extracellular matrix component-modified poly (DL-lactide-co-glycolide) substrates, *Biomaterials*, 26, 6635-42, **2005**

[43] Hoffmann, A., Gross, G., Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches, *International Orthopaedics*, 31, 791-7, **2007**

[44] Chong, A., Chang, J., Tissue engineering for the hand surgeon: a clinical perspective, *Journal of Hand Surgery*, 31, 349-58, **2006**

[45] Richardson, L.E., Dudhia, J., Clegg, P.D., Smith, R., Stem cells in veterinary medicine-attempts at regenerationg equine tendon after injury, *Trends in Biotechnology*, 25, 409-16, **2007**

[46] Badylak, S.F., Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, *Transplant Immunology*, 12, 367-77, **2004**

[47] Chen, F., Yoo, J.J., Atala, A., Acellular collagen matrix as a possible “off the shelf” biomaterial for urethral repair, *Urology*, 54, 407-10, **1999**

[48] Dellgren, G., Eriksson, M., Brodin, L.A., Radegran, K., The extended Biocor stentless aortic bioprosthesis, Early clinical experience, *Scandinavican Cardiovascular Journal*, 33, 259-64, **1999**

[49] Harper, C., Permacol: clinical experience with a new biomaterial, *Hospital Medicine,* 62, 90-5, **2001**

[50] Kolker, A.R., Brown, D.J., Redstone, J.S., Scarpinato, V.M., Walllack, M.K., Multilayer reconstruction of abdominal Wall defects with Acellular dermal allograft (AlloDerm) and component deperation, *Annals of Plastic Surgery,* 55, 36-41, **2005**

[51] Lee, M.S., GraftJacket augmentation of chronic Achilles tendon ruptures, *Orthopedics,* 27, 151-3, **2004**
[52] Metcalf, M.H., Savoie, F.H., Kellum, B., Surgical technique for xenograft (SIS) augmentation of rotator-cuff repairs, *Operative Techniques in Orthopaedics,* 12, 204-8, **2002**
[53] Wainwright, D.J., Use of an Acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns, *Burns*, 21, 243-8, **1995**
[54] Booth, C., Korossis, S.A., Wilcox, H.E., Watterson, K.G., Kearney, J.N., Fisher, J., Ingham, E., Tissue engineering of cardiac valve prosthesis I: development and histological characterization of an Acellular porcine scaffold, *The Journal of Heart Valve Disease*, 11, 457-62, **2002**
[55] Conklin, B.S., Richter, E.R., Kreutziger, K.L., Zhong, D.S., Chen, C., Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft, *Medical Engineering and Physics*, 24, 173-83, **2002**
[56] Chen, R.N., Ho, H.O., Tsai, Y.T., Sheu, M.T., Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications, *Biomaterials*, 25, 2679-86, **2004**
[57] Hudson, T.W., Liu, S.Y., Schmit, C.E., Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing, *Tissue Engineering,* 10, 1346-58, **2004**
[58] Borschel, G.H., Dennis, R.G., Kuzon Jr, W.M., Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an Acellular scaffold. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 113, 595-602, **2004**
[59] Cartmell, J.S., Dunn, M.G., Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research*, 49, 134-40, **2000**
[60] Woods, T., Gratzer, P.F., Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft, *Biomaterials*, 26, 7339-49, **2005**
[61] Badylak, S.F., Tullius, R., Kokini, K., Shelbourne, K.D., Klootwyk, T., Voytik, S.L., Kraine, M.R., Simmons, C., The use of xenogeneic small intestinal submucosa as a biomaterial for Achilles tendon repair in a dog model, *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 977-85, **1995**
[62] Lin, P., Chan, W.C., Badylak, S.F., Bhatia, S.N., Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering, *Tissue Engineering,* 10, 1046-53, **2004**
[63] Jackson, D.W., Windler, G.E., Simon, T.M., Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patella tendon-bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament, *The American Journal of Sports Medicine*, 18, 1-10, **1990**
[64] Roberts, T.S., Drez, Jr.D., McCarthy, W., Paine, R., Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patellar tendon-bone allografts, Two year results in thirty-siz patients, *The American Journal of Sports Medicine*, 19, 35-41, **1991**
[65] De filippo, R.E., Yoo, J.J., Atala, A., Urethral replacement using cell seeded tubularized collagen matrices, *Journal of Urology*, 168, 1789-92, **2002**
[66] Falke, G., Yoo, J.J., Kwon, T.G., Moreland, R., Atala, A., Formation of corporal tissue architecture in vivo using human cavernosal muscle and endothelial cells seeded on collagen matrices, *Tissue Engineering*, 9, 871-9, **2003**

[67] Freytes, D.O., Badylak, S.F., Webster, T.J., Geddes, L.A., Rundell, A.E., Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds, *Biomaterials,* 25, 2353-61, **2004**

[68] Probst, M., Dahiya, R., Carrier, S., Tanagho, E.A., Reproduction of functional smooth muscle tissue and partial bladder replacement. *British Journal of Urology*, 79, 505-15, **1997**

[69] Yoo, J.J., Meng, J., Oberpenning, F., Atala, A., Bladder augmentation using allogenic bladder submucosa seeded with cells, *Urology*, 51, 221-5, **1998**

[70] Seddon, A.M., Curnow, P., Booth, P.J., Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666, 105-17, **2004**

[71] Dahl, S.L., Koh, J., Prabhakar, V., Niklason, L.E., Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation, *Cell Transplantation*, 12, 659-66, **2003**

[72] Grauss, R.W.I., Hazekamp, M.G., Oppenhuizen, F., van Munsteren, C.J., Gittenberger-de Groot, A.C., DeRuiter, M.C., Histological evaluation of decellurarized porcine aortic valves: matrix changes due to different decellularization methods, *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 27, 255-71, **2005**

[73] Rieder, E., Kasimir, M.T., Silberhumer, G., Seebacher, G., Wolner, E., Simon, P., Guenter, W., Decellurization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells, *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127, 399-405, **2004**

[74] Gailit, J., Ruoslahti, E., Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cation-dependent manner, *The American Journal of Physiology,* 266, 1099-1107, **1988**

[75] Klebe, R.J., Cell attachment to collagen: the requirement for energy, *Journal of Cell Physiology,* 86, 231-36, **1975**

[76] Gamba, P.G., Conconi, M.T., Lo Piccolo, R., Zara, G., Spinazzi, R., Parnigotto, P.P., Experimental abdominal wall defect repaired with Acellular matrix, *Pediatric Surgery International*, 18, 327-31, **2002**

[77] Mcfetridge, P.S., Daniel, J.W., Bodamyali, T., Horrocks, M., Chaudhuri, J.B., Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* 70, 224-34, **2004**

[78] Schenke-layland, K., Vasilevski, O., Opitz, F., Konig, K., Riemann, I., Halbhuber, K.J., Wahlers, T., Stock, U.A., Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves, *Journal of Structural Biology*, 143, 201-8, **2003**

[79] Abercrombie, M., Heaysman, J.E., Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts, *Experimental Cell Research*, 6, 293-306, **1954**

[80] Hanahan, D., Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer, *The Cell,* 100, 57-70, **2000**

[81] Busuttil, R.A., Rubio, M., Dollé, M.E., Campisi, J., Vijg, J., Mutant frequencies and spectra depend on growth state and passage number in cells cultured from transgenic lacZ-plasmid reporter mice, *DNA Repair*, 5, 52-60, **2006**

[82] Braig, M., Schmitt, C.A., Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development, *Cancer Research*, 66, 2881-84, **2006**

[83] Campisi, J., Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism, *Trends Cell Biology*, 11, 27-31, **2001**
[84] Sager, R., Senescence as a mode of tumor suppression, *Environmental Health Perspective*, 93, 59-62, **1991**
[85] Goldstein, S., Replicative senescence: the human fibroblast comes of age, *Science,* 249, 1129-33, **1990**
[86] Hayflick, L., The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains, *Experimental Cell Research,* 37, 614-36, **1965**
[87] Campisi, J., Dimri, G.P., Hara, E., Handbook of the Biology of Ageing. Schneider, E., Rowe, J., eds. Academic Press, New York, **1995**
[88] Stanulis-praeger, B.M., Cellular senescence revisited: a review, *Mechanical Ageing and Development*, 38, 1-48, **1987**
[89] Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9363-7, **1995**
[90] Murphy, P.G.L.B., Frank, C.B., Hart, D.A., Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments, *Biochemistry and Cell Biology,* 72, 403-9, **1994**
[91] Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Lingelbach, J., Masakowski, V.R., Griffin, G.L., Senior, R.M., Deuel, T.F., Platelet derived growth factor and transforming growth factor-b enhance tissue repair activities by unique mechanisms, *Journal of Cell Biology*, 109, 429-40, **1989**
[92] Oakes, B.W., Tissue healing and repair: tendons and ligaments. In: Frontera W.R. Editor. Rehabilitation of sports injuries: scientific basis. Oxford:Blackwell Science. Pp 56-98, **2003**
[93] Tillman, L.J., Chasan, N.P., Properties of dense connective tissue and wound healing. In: Hertling D., Kessler R.M. Editors. Management of common musculoskeletal disorders. Philedelphia: Lippincott, **1996**
[94] Hooley, C.F., Cohen, R.E., A model for the creep behaviour of tendon, *International Journal of Biological Macromolecules*, 1, 123-32, **1979**
[95] Abrahamsson, S.O., Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon, *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery Hand Surgery Supplement*, 23, 1-51, **1991**
[96] Amiel, D., Akeson, W., Harwood, F.L., Frank, C.B., Stress deprivation effect on metabolic turnover of medical colateral ligament collagen, *Clinical Orthopaedics*, 172, 551-58, **1987**
[97] Fujita, M., Hukuda, S., Doida, Y., Experimental study of intrinsic healing of the flexor tendon: collagen synthesis of the cultured flexor tendon cells of the canine, *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*, 66, 326-33, **1992**
[98] Best, T.M., Garrett, W.E., Basic science of soft tissue: muscle and tendon. In: DeLee JC DD, Editors. Orthopaedic sports medicine, Philedelphia: WB Saunders, **1994**
[99] O'brien, M., Functional anatomy and physiology of tendons, *Clinical Sports Medicine*, 11, 505-20, **1992**
[100] Oxlund, H., Relationships between the biomechanical properties, composition and molecular structure of connective tissues, *Connective Tissue Research,* 15, 65-72, **1986**

[101] Curvin, S.L., Stanish, W.D., Tendinitis: its etiology and treatment Lexington: Collamore press, **1984**
[102] Butler, D.L., Grood, E.S., Noyes, F.R., Zernicke, R.F., Biomechanics of ligaments and tendons, *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 6, 125-181, **1978**
[103] Kastelic, J., Baer, E., Deformation in tendon collagen, Symposia for the Society of Experimental Biology, 34,397-435, **1980**
[104] Arsenberg, P., Virchenko, O., Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 75, 93-9, **2004**
[105] Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Research*, 29, e45, **2001**
[106] Chuen, F.S., Chuk, C.Y., Ping, W.Y., Nar, W.W., Kim, H.L., Ming, C.K., Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52, 1151-57, **2004**
[107] Wong, J.K., Lui, Y.H., Kapacee, Z., Kadler, K.E., Ferguson, M.W., McGrouther, D.A., The cellular biology of flexor tendon adhesion formation: an old problem in a new paradigm, *American Journal of Pathology*. 175, 1938–51, **2009**
[108] Goulet, F., Rancourt, D., Cloutier, R.,Tendons and ligaments, Principles of tissue engineering, San Diego, Academic Press, **2000**
[109] Liu, Y., Ramanath, H.S., Wang, D.A., Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies, *Trends in Biotechnology,* 26, 201-9, **2008**
[110] Musahl, V., Abramowitch, S., Gilbert, T., Tsuda, E., Wang, J., Badylak, S., Woo, S.L., The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament a functional tissue engineering study in rabbits, *Journal of Orthopaedic Research,* 22, 214-20, **2004**
[111] Rodeo, S.A., Maher, S.A., Hidaka, C., What's new in orthopaedic research. *Journal of Bone and Journal of Surgery of America*, 86, 2085-95, **2004**
[112] Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 24, 401-16, **2003**
[113] Altman, G.H., Horan, R.L., Lu, H.H., Moreau, J., Martin, I., Richmond, J.C., Kaplan, D.L., Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments, *Biomaterials*, 23, 4131-41, **2002**
[114] Chen, J., Altman, G.H., Karageorgiou, V., Horan, R., Collette, A., Volloch, V., Colabro, T., Kaplan, D.L., Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 559-70, **2003**
[115] Martinek, V., Latterman, C., Usas, A., Abramowitch, S., Woo, S.L., Fu, F.H., Huard, J., Enhancement of tendon-bone integration of anterior cruciate ligament grafts with bone morphogenetic protein-2 gene transfer: A histological and biomechanical study, *Journal of Bone and Joint Surgery of America,* 84, 1123-31, **2002**
[116] Ahmed, Z., Underwood, S., Brown, R.A., Low concentrations of fibrinogen increase cell migration speed on fibronectin/fibrinogen composite cables, *Cell Motility and Cytoskeleton*, 46, 6-16, **2000**
[117] Gilbert, T.W., Sellaro, T.L., Badylak, S.F., Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27, 3675-83, **2006**

[118] Doroski D.M., Brink, K.S., Johnna, S., Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament, *Biomaterials*, 28, 187-202, **2007**
[119] Li, F., Li, B., Wang, Q.M., Wang, J.H., Cell shape regulates collagen type I expression in human tendon fibroblasts, Cell Motility and Cytoskeleton, 31, 1-10, 2008
[120] Yao, L., Bestwick, C.S., Bestwick, L.A., Maffulli, N., Aspden, R.M., Phenotipic drift in human tenocyte culture, *Tissue Engineering*, 12, 1843-49, **2006**
[121] Bagnaninchi P.O., Yang, Y., El Hai, A.J., Maffulli, N., Tissue engineering for tendon repair. *British Journal of Sports and Medicine*, 41, 1-10, **2007**
[122] Cao, D., Liu, W., Wei, X., Xu, F., Cui, L., Cao, Y., In vitro tendon engineering with avian tenocytes and poliglicolic acids: A preliminary report, *Tissue Engineering*, 12, 1369-77, **2006**
[123] Docheva, D., Hunziker, E.B., Fassler, R., Brandau, O., Tenomodulin is necessary for tenocytes proliferation and tendon maturation, *Moleculer Cell Biology*, 25, 699-705, **2005**
[124] Lou, Q., Song, G., Song, Y., Xu, B., Qin, J., Shi, Y., Indirect co-culture with tenocytes promotes proliferation and mRNA expression of tendon/ligament related genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells, *Cytotechnology*, 61, 1-10, **2009**
[125] Gigante, A., Marinelli, M., Chillemi, C., Greco, F., Fibrous cartilage in the rotator cuff: A pathogenetic mechanism of tendon tear?, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 13, 328-32, **2004**
[126] Martin, J.A., Mehr, D., Pardubsky, P.D., Buckwalter, J.A., The role of tenascin-C in adaptation of tendons to compressive loading, *Biorheology*, 40, 312-29, **2003**
[127] Pauly, S., Klatte, F., Strobel, C., Schmidmaier, G., Greiner, S., Scheibel, M., Wildemann, B., Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff, *European Cells and Materials*, 20, 84-97, **2010**
[128] Aspenberg, P., Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini-review, *International Orthopaedics*, 31, 783-9, **2007**
[129] Schulze-tanzil, G., Al-Sadi, O, Wiegand, E., Ertel, W., Busch, C., Kohl, B., Pufe, T., The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights, Epub ahead of print, *Scandinavian Journal of Medicine Science & Sports*, 21, 337-51, **2011**
[130] Shalabi, A., Kristoffersen-Wiberg, M., Papadogiannakis, N., Aspelin, P., Movin, T., Dynamic contrast-enhanced mr imaging and histopathology in chronic achilles tendinosis. A longitudinal MR study of 15 patients, *Acta Radiologica*, 43, 198-206, **2002**
[131] Suckow, M.A., Hodde, J.P., Wolter, W.R., Hiles, M.C., Repair of experimental Achilles tenotomy with porcine renal capsule material in a rat model, *Journal of Materials Science, Materials in Medicine*, 18, 1105-10, **2007**
[132] Wang, B., Liu, W., Zhang, Y., Jiang, Y., Zhang, W.J., Zhou, G., Cui, L., Cao, Y., Engineering of extensor tendon complex by an ex vivo approach, *Biomaterials*, 29, 2954-61, **2008**
[133] Stoll, C., John, T., Conrad, C., Lohan, A., Hondke, S., Ertel, W., Kaps, C., Endres, M., Sittinger, M., Ringe, J., Schulze-Tanzil, G., Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation, *Biomaterials*, 32, 4806-15, **2011**

[134] Young, R.G., Butler, D.L., Weber, W., Caplan, A.I., Gordon, S.L., Fink, D.J., Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair, *Journal of Orthopaedic Research*, 16, 406-13, **1998**
[135] Xia, Z., Trifitt, J.T., A review on macrophage responses to biomaterials, *Biomedical Materials*, 1, 1-9, **2006**
[136] Buck, F.M., Grahn, H., Hilbe, M., Pfirrmann, C.W.A., Manzaneli, S., Hodler, J., Magnetic resonance histologic correlation in rotator cuff tendons, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 32, 165-172, **2010**
[137] Fukuda, H., Hamada, K., Yamanaka, K., Pathology and pathogenesis of bursal-side rotator cuff tears viewed from en block histologic sections, *Clinical Orthopaedics,* 254, 75-80, **1990**
[138] Cırcı, E., Akpınar, S., Balçık, C., Bacanlı, D., Güven, G., Akgün, R.C., Tuncay, I.C., Biomechanical and histological comparision of the influence of oestrogen deficient state on tendon healing potential in rats, *International Orthopaedics*, 33, 1461-66, **2009**
[139] Ehlers, T.W., Vogel, K.G.., Proteoglycan synthesis by fibroblasts from different regions of bovine tendon cultured in alginate beads. *Comperative Biochemistry and Physiology Part A, Moleculer and Integrative Physiology*, 121, 355-63, **1998**
[140] Jelinsky, S.A., Archambault, J., Li, L., Seeherman, H., Tendon-selective genes identified from rat and human musculoskeletal tissues, *Journal of Orthopaedic Research*, 28, 289-97, **2010**
[141] Beredjiklian, P.K., Biologic aspects of flexor tendon laceration and reprair. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 85, 539-50, **2002**
[142] Butler, D.L., Juncosa, N., Dressler, M.R., Functional efficacy of tendon repair processes, *Annual Reviews of Biomedical Engineering*, 6, 303-29, **2004b**
[143] Butler, D.L., Shearn, J.T., Juncosa, N., Dressler, M.R., Hunter, S.A., Functional tissue engineering parameters toward designing repair and replacement strategies, *Clinical Orthopaedics*, 427, 190-99, **2004a**
[144] Koob, T.J., Biomimetic approaches totendon repair. *Comperative Biochemistry and Physiology Part A, Moleculer and Integrative Physiology,* 133, 1171-92, **2002**
[145] Carpenter, J.E., Hankenson, K.D., Animal models of tendon and ligament injuries for tissue engineering applications, *Biomaterials*, 25, 1715-22, **2004**
[146] Palmes, D., Spiegel, H.U., Schneider, T.O., Langer, M., Stratmann, U., Budny, T., Probst, A., Achilles tendon healing: Long-term biomechanical effects of postoperative mobilization and immobilization in a new mouse model, *Journal of Orthopaedic Research*, 20, 939-46, **2002**
[147] Perry, S.M., Gupta, R.R., Van Kleunen, J., Ramsey, M.L., Soslowsky, L.J., Glase, D.L., Use of small intestine submucosa in a rat model of acute and chronic rotator cuff tear, *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, 16, 179-83. **2007**

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Cansın Güngörmüş

Doğum Yeri : Ankara

Medeni Hali : Evli

E-posta : cansiny@gmail.com

Adresi : Dildevrimi cad. Metrokent Sitesi A1-8 Blok No:19 Eryamanevleri/ANKARA

Eğitim

Lise (1993 – 2000): Özel Bilkent Lisesi

Lisans (2000 – 2004): H.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans (2004 – 2007): H.Ü. Biyoloji Bölümü, Zooloji A.B.D.

Doktora (2007 - 2013): H.Ü. Biyoloji Bölümü, Zooloji A.B.D.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce KPDS 2012 Bahar Dönemi Puanı 80/100

İş Deneyimi

2005 – 2012 : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Araştırma Görevlisi.

2012 – devam ediyor : T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Ulusal Gıda Referans Laboratuvarı, Katkı, Tağşiş ve Orijin Belirleme Bölümü, Histoloji Birimi, Biyolog.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

(2010 – 2012): Tenositler Kullanılarak Hazırlanan Allograftların Sıçan Aşil Tendonu Rejenerasyonu Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. TÜBİTAK (TBAG). Proje No: 109T977. Proje Bütçesi: 114.446,00TL. Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Dürdane Kolankaya, Bursiyer: Araş. Gör. Cansın Güngörmüş.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Güngörmüş C., Kolankaya D. (2012) Gene Expression of Tendon Collagens and Tenocyte Markers in Long-Term Monolayer and High-Density Cultures of Rat Tenocytes. (Connective Tissue Research, 2012, 53(6): 485–491)

SCI Kapsamında Uluslararası Dergilerde Yayınlanan Kongre Özetleri:

Güngörmüş C., Kolankaya D. (2011) Viability, cellular senescence and extracellular matrix production of tenocytes in monolayer culture. (The FEBS Journal, Volume 278, Supplement 1, June 2011, ISSN 1742-464X)

İde S., Şen E.H., Güngörmüş C., Kolankaya D., Orujalipoor I. (2011) Examination of structural changes in the tendons during healing process. (Acta Cryst, 2011, A67, C237)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Güngörmüş C., Çetinkaya A. (2011) A new model for partial immobilization of the rat hind limb after tendon surgery. 3rd ICLAS Symposium & XV. ICLAS General Assembly, Harbiye Military Museum, İstanbul, 13-15 Haziran 2011.

Güngörmüş C., Kolankaya D. (2011) Viability, cellular senescence and extracellular matrix production of tenocytes in monolayer culture. 36th FEBS Congress, Torino, İtalya, 25-30 Haziran 2011.

İde S., Şen E.H., Güngörmüş C., Kolankaya D., Orujalipoor I. (2011) Examination of structural changes in the tendons during healing process. XXII Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, Madrid, İspanya, 22-30 Ağustos 2011.