



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**AŞIL TENDON RÜPTÜRÜ İYİLEŞMESİNDE UMBİLİKAL
KORD STROMAL-KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN
ETKİSİNİN TEK BAŞINA VE KURKUMİN
BİRLİKTELİĞİNDE İNCELENMESİ - SİNERJİSTİK
ETKİLERİ OLABİLİR Mİ?**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğçe Merve ÖZYAZGAN

KAYSERİ - 2020



**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**AŞIL TENDON RÜPTÜRÜ İYİLEŞMESİNDE UMBİLİKAL
KORD STROMAL-KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN
ETKİSİNİN TEK BAŞINA VE KURKUMİN
BİRLİKTELİĞİNDE İNCELENMESİ - SİNERJİSTİK
ETKİLERİ OLABİLİR Mİ?**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğçe Merve ÖZYAZGAN

**Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN**

**Bu çalışma TTU-2020-9689 nolu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.**

KAYSERİ - 2020

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	iii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. TENDONLARIN YAPISI	3
2. 1. 1. Tenoblastlar ve tenositler	7
2. 1. 2. Tendon iyileşmesi	9
2. 1. 3. Aşil tendonu	13
2. 1. 4. Aşil tendonu anatomisi	13
2. 1. 5. Aşil tendonunun biyomekanigi	14
2. 1. 6. Aşil tendon rüptürü	16
2. 2. KÖK HÜCRE	17
2. 2. 1. Mezenkimal kök hücreler	18
2. 2. 2. Tendon tamirinde kök hücre-temelli yaklaşımlar	19
2. 2. 3. Umbilikal kord stromal-kaynaklı mezenkimal kök hücreler	21
2. 3. KURKUMİN	22
2. 3. 1. Kurkuminin antiinflamatuvar etki mekanizmaları	23
2. 3. 2. Kurkuminin antioksidan etki mekanizmaları:	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3. 1. UMBİLİKAL KORD STROMAL-KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN HAZIRLANMASI	24
3. 2. DENEY PROSEDÜRÜ	25
3. 2. 1. Cerrahi yöntem	26
3. 2. 2. Histolojik değerlendirme	27
3. 2. 3. Biyomekanik değerlendirme	33
3. 2. 4. İstatistiksel değerlendirme	34
4. BULGULAR	35
4. 1. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI	38

4. 2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME BULGULARI	45
4. 2. 1. Tip I kollajen boyanma yoğunluğu	45
4. 2. 2. Tip III kollajen boyanma yoğunluğu	47
4. 2. 3. Tenomodülin boyanma yoğunluğu	49
4. 3. BİYOMEKANİK ANALİZ BULGULARI.....	54
4. 4. KORELASYON ANALİZLERİ	56
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	69
7. KAYNAKLAR	71



KISALTMALAR

AK-MKH	: Adipoz-kaynaklı mezenkimal kök hücre
cm	: Santimetre
COMP	: Kartilaj oligomerik matriks proteini
dzm	: Dizyem (0,1cc)
EKH	: Embriyonik kök hücre
ESM	: Ekstraselüler matriks
GAG	: Glikozaminoglikan
IL	: İnterlökin
IVF	: İn-vitro fertilizasyon
İFM	: İnterfasiküler matriks
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
iPKH	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
Kİ-MKH	: Kemik iliği-kaynaklı mezenkimal kök hücre
KN	: Kilonewton
MHC	: Major histocompatibility complex
MKH	: Mezenkimal kök hücre
mm	: Milimetre
MPa	: Megapaskal
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
Oct-4	: Octamer-binding transcription factor 4
PAS	: Periyodik asit-Schiff
PDGF	: Platelet-derived growth factor
PGs	: Proteoglikanlar
PPAR-γ	: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
ROS	: Reactive oxygen species
rpm	: Revolutions per Minute
SCID	: Severe combined immunodeficiency
SDFT	: Süperfisyal dijital fleksör tendonu
SLRPs	: Lösin-zengin proteoglikanlardır
SOD	: Süperoksit dismutaz

SSEA-4	: Stage-specific embryonic antigen 4
TCs	: Tenositler
TGF- β	: Transforming growth factor-beta
TKPH	: Tendon kök/projenitör hücre
TLR4-MD2	: Toll-like receptor 4-myeloid differentiation factor-2
TN-C	: Tenascin-C
TNF- α	: Tümör nekroz faktör-alfa
tnmd	: Tenomodülin
UK-MKH	: Umbilikal kord stromal-kaynaklı mezenkimal kök hücre
VEGF	: Vascular endothelial growth factor
β -FGF	: Beta-fibroblast growth factor

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Doku hazırlama metodu.....	28
Tablo 2. Modifiye Bonar skorlaması	29
Tablo 3. Masson trikrom boyama tekniği	30
Tablo 4. Alsiyan mavisi - PAS boyama tekniği.....	31
Tablo 5. İmmünohistokimya boyama tekniği	32
Tablo 6. Gruplarda 2. hafta ortalama değerleri (\pm SD).....	36
Tablo 7. Gruplarda 4. hafta ortalama değerleri (\pm SD).....	36
Tablo 8. Gruplarda 2. ve 4. hafta ortalama değerleri (\pm SD) ve, 2. ve 4. hafta değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması (Student t testi).....	37
Tablo 9. Değişkenlerin Pearson korelasyon analizi	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kollajen fibrili iç yapısı	5
Şekil 2. Yüzeysel dijital fleksör tendonun kesiti. Her bir fasikülün interfasiküler matriks ile çevrelenmesi ile açıkça görülen bal peteği şeklindeki fasiküler düzenlenme (2)	9
Şekil 3. Tendonda gerilim-sünme grafiği.....	15
Şekil 4. Mezenkimal kök hücrelerin tenositlere diferansiyasyon yolağı	19
Şekil 5. Altıncı pasajda invert mikroskopta kök hücrelerin görünümü (10x).....	25
Şekil 6. Rat bacağına Aşil tendonunun eksplorasyonu, punch ile pencere defekt oluşturulması ve özel olarak yapılmış punch'ın yakından görünümü	27
Şekil 7. Biyomekanik testlerin yapıldığı tensometre cihazının görünümü, cihaza tespit edilen tendon ve kopmak üzere olan tendonun yakından görünümü	34
Şekil 8. Gruplarda 2. hafta Bonar skorları	38
Şekil 9. Gruplarda 4. hafta Bonar skorları	39
Şekil 10. Gruplarda 2. ve 4 hafta Bonar skorları.....	39
Şekil 11. Kontrol-2. hafta grubunun 4. hayvanında kollajen lif demetlerinde sınırı kaybı ve liflerin ayrılması, vaskülaritede artış	40
Şekil 12. Kontrol-2. hafta grubunun 8. hayvanına ait kesitte kollajen liflerde ayrılma..	41
Şekil 13. Susam yağı-2. hafta grubunun 2. hayvanına ait kesitte sayıca artmış kapillerlerin oluşturduğu kümeler	41
Şekil 14. Susam yağı-2. hafta grubunun 2. hayvanına ait kesitte kollajen dizilimindeki bozulma ve vaskülaritede artış	42
Şekil 15. Susam yağı-2. hafta grubunun 1. hayvanına ait kesitte intratendinöz adipositler ve vaskülaritede artış	42
Şekil 16. Susam yağı-2. hafta grubunda 3. hayvana ait kesitte hücre çekirdeklerinde yuvarlaklaşma.....	43
Şekil 17. Kurkumin-2. hafta grubunun 4. hayvanına ait kesitte kollajen lif diziliminde bozulma ve hiperselülarite.....	43
Şekil 18. Kurkumin-4. hafta grubunun 1. hayvanına ait kesitte dizilimi kuvvete paralel olmaya başlayan kollajen lifler. MT boyama	44
Şekil 19. Kurkumin+mezenkimal kök hücre-2. hafta grubunun 2. hayvanına ait kesitte abondan müsün varlığı	44

Şekil 20. Gruplarda 2. hafta tip I kollajen boyanma yoğunlukları.....	45
Şekil 21. Gruplarda 4. hafta tip I kollajen boyanma yoğunlukları.....	46
Şekil 22. Gruplarda 2. ve 4.hafta tip I kollajen boyanma yoğunlukları.....	46
Şekil 23. Gruplarda 2. hafta tip III kollajen boyanma yoğunlukları	47
Şekil 24. Gruplarda 4. hafta tip III kollajen boyanma yoğunlukları	48
Şekil 25. Gruplarda 2. ve 4. hafta tip III kollajen boyanma yoğunlukları	49
Şekil 26. Gruplarda 2. hafta tenomodülin boyanma yoğunlukları.....	50
Şekil 27. Gruplarda 4. hafta tenomodülin boyanma yoğunlukları.....	50
Şekil 28. Gruplarda 2. ve 4.hafta tenomodülin boyanma yoğunlukları	51
Şekil 29. Kurkumin-2h grubunda 3. hayvana ait kesitte tenomodülinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.	52
Şekil 30. Kontrol-2h grubunun 8. hayvanına ait kesitte tip I kollajenin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi	52
Şekil 31. Susam yağı-4h grubunun 8. Hayvanına ait kesitte tip III kollajenin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. 40x	53
Şekil 32. Gruplarda 2. hafta gerilme gücü	54
Şekil 33. Gruplarda 4. hafta gerilme gücü	55
Şekil 34. Gruplarda 2. hafta ve 4. hafta gerilme gücü.....	55
Şekil 35. Bonar skoru ve tip I kollajen boyanma yoğunluğu arasındaki ilişki	57
Şekil 36. Bonar skoru ile gerilme gücü arasındaki ilişki	57
Şekil 37. Tip I kollajen ve tip III kollajen boyanma yoğunlukları arasındaki ilişki	58
Şekil 38. Gerilme gücü ile tip I kollajen boyanma yoğunluğu arasındaki ilişki	59
Şekil 39. Gerilme gücü ile tip III kollajen boyanma yoğunluğu arasındaki ilişki	59

**AŞIL TENDON RÜPTÜRÜ İYİLEŞMESİNDE UMBİLİKAL KORD
STROMAL–KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN ETKİSİNİN TEK BAŞINA VE
KURKUMİN BİRLİKTELİĞİNDE İNCELENMESİ - SİNERJİSTİK ETKİLERİ
OLABİLİR Mİ?**

ÖZET

Amaç: Tendon rüptür iyileşmesi üzerine mezenkimal kök hücrelerin (MKH) bölgesel olarak uygulanmasının ve sistemik kurkumin verilmesinin tek başlarına faydalı olduğu daha önceki deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmada diğerlerinden farklı olarak bölgesel olarak birlikte verilecek olan umbilikal kord stromal-kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (UK-MKH) ve kurkuminin, punch ile oluşturulan tendon hasar modelinde etkisinin histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyomekanik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Birlikte uygulamanın, faydalı etkileri potansiyelize edeceği beklenmektedir.

Gereç ve Yöntem: Umbilikal korddan elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterizasyonu yapılarak mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese ettikleri gösterildi. Ağırlıkları 300-350 g arasında olan toplam 80 adet Wistar albino türü erişkin diő sıçan rastgele 5 gruba ayrıldı. Gruplar; sadece tendon hasarının oluşturulduğu kontrol grubu, gruptaki her bir hayvanın her iki Aşil tendonu bölgesinde 0,5 dzm susam yağı içerisinde çözülmüş 0,22 mg/kg dozunda kurkuminin peritendinöz boşluğa enjekte

edildiği kurkumin grubu, tendon başına 0,5 dzm susam yağının her iki Aşil tendonu bölgesinde peritendinöz boşluğa enjekte edildiği susam yağı grubu, tendon başına $6,8 \times 10^5$ adet mezenkimal kök hücrenin direkt olarak tendona enjekte edildiği mezenkimal kök hücre grubu ve kurkumin ve mezenkimal kök hücrenin diğer gruplarda bahsedildiği şekilde ve birlikte uygulandığı kurkumin+mezenkimal kök hücre grubu. Gruplardaki hayvanların yarısı 2. haftada, diğer yarısı ise 4. haftada sakrifiye edilip her iki bacaktaki Aşil tendonları çıkarıldı. Sol Aşil tendonları Masson trikrom ve alsiyen mavisi- periyodik asit-Schiff (PAS) boyama ile Bonar skorlaması yapılarak histopatolojik olarak değerlendirildi. Aşil tendonlarında tenomodülin, tip I ve III kollajen immünoaktivitesi ise immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Sağ Aşil tendonları biyomekanik teste tabi tutularak biyomekanik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Tendonlar Bonar skorlaması ile histopatolojik olarak değerlendirildiğinde 2. haftada Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre Bonar skoru istatistiksel şekilde anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$). Dördüncü haftada ise Bonar skorları açısından gruplar arasında fark görülmemiştir. Grupların 2. ve 4. hafta Bonar skorları birbirleriyle kıyaslandığında Kontrol, Susam Yağı ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0,05$). İmmünohistokimyasal değerlendirmede, tip I kollajen boyanma yoğunluğu açısından 2. haftada gruplar arasında anlamlı farklılık görülmemekle birlikte 4. haftada hem Kurkumin hem de Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldı ($p < 0,05$). 2. ve 4. hafta değerleri birbirleriyle kıyaslandığında Susam Yağı, Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre gruplarında 4. haftada anlamlı şekilde azalma mevcuttu ($p < 0,05$). Tip III kollajen boyanma yoğunluğuna bakıldığında, 2. haftada Kurkumin grubunda Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır ($p < 0,05$). Dördüncü haftada da tip III kollajen boyanma yoğunluğunun yine Kurkumin grubunda Kontrol grubuna göre artmış olduğu görülmüştür ($p < 0,05$). 2. ve 4. haftalar tip III kollajen boyanma yoğunluğu açısından kendi içlerinde karşılaştırıldığında Susam Yağı, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında 4. haftada anlamlı şekilde artış görülmüştür ($p < 0,05$). Tenomodülin boyanma yoğunluğu değerlendirildiğinde 2. haftada Susam Yağı grubunda Kontrol grubuna kıyasla azalma görülürken, 4. haftada Kurkumin ve Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı

şekilde arttı ($p<0,05$). Tenomodülün boyanma yoğunluğunun 2. ve 4. haftalardaki grup içi karşılaştırılmasında Kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görülürken Mezenkimal Kök Hücre grubunda ise artış izlendi ($p<0,05$). Biyomekanik analiz sonucunda tendonların gerilme güçleri 2. haftada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Gerilme gücü 4. hafta değerleri Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken ($p<0,05$) bu iki deney grubu arasında fark yoktu. Gerilme gücü açısından grupların 2. ve 4. hafta değerleri karşılaştırıldığında Susam Yağı dışındaki tüm gruplarda 4. hafta değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p<0,05$).

Sonuç: Bu çalışmada literatürde tendon iyileşmesi üzerine olumlu etkileri gösterilmiş olan kurkumin ve umbilikal kord stromal-kaynaklı kök hücrelerin, ratlarda Aşil tendonunda punch ile oluşturulan pencere defekti sonrası iyileşme üzerine de olumlu etkileri gösterilmekle beraber, birlikte uygulandıklarında iyileşme üzerine sinerjistik etkileri gözlenmedi.

Anahtar kelimeler: Aşil Tendon Rüptürü, Kurkumin, Mezenkimal kök hücre, Umbilikal kord

**INVESTIGATION THE EFFECT OF UMBILICAL CORD-DERIVED STEM
CELLS ONLY AND TOGETHER WITH CURCUMIN ON ACHILLES
TENDON HEALING - CAN THEY ACT SYNERGISTICALLY?**

ABSTRACT

Objectives: It has been shown in previous experimental studies that local application of mesenchymal stem cells and systemic application of curcumin both positively effective on healing of tendon rupture. In this study, unlike the others, we aimed to show the effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells and curcumin on tendon punch injury model histopathologically, immunohistochemically and biomechanically when they are delivered together and locally. We expect that the co-administration will potentialize effects of each other.

Material and Methods: The characterization of the cells obtained from the umbilical cord were performed and determined that they were expressed mesenchymal stem cell markers. 80 adult female Wistar albino rats weighing between 300-350 g were randomly divided into 5 groups. Groups; only tendon injury group without any treatment, injury+curcumin group where curcumin is administered to peritendinous area by injection to both tendons of each animal at 0.22 mg/kg dose, mesenchymal stem cell group where mesenchymal stem cells (6.8×10^5 per tendon) is injected directly to tendon defect, injury +curcumin+mesenchymal stem cell group where tendon injury treated with both curcumin and mesenchymal stem cell. Half of the animals in the groups were sacrificed at 2nd week and the other half at 4th week, and Achilles tendons were harvested at both time points. Left Achilles tendon evaluated histopathologically by alcian blue-PAS and Masson trichrome staining according to Bonar scale and immunohistochemically by

analyzing type I, type III and tenomodulin immunoreactivity. Right Achilles tendon used for biomechanical testing.

Results: When tendons evaluated histopathologically by Bonar scoring, there was a statistically significant difference in Curcumin, Mesenchymal Stem Cell and Curcumin+Mesenchymal Stem Cell groups in comparison with Control group, at 2nd week ($p=0.05$). There was no statistically significant difference among experimental groups in Bonar score at 4th week. When the groups' Bonar scores in the 2nd and 4th weeks are compared with each other, Control, Sesame Oil and Curcumin+Mesenchymal Stem Cell group showed better results which were statistically significant ($p<0.05$). In immunohistochemical analyze, regarding type I collagen staining intensity, there was no statistically significant difference among groups at 2nd week. At 4th week, there were lower results in Curcumin and Curcumin+Mesenchymal Stem Cell group according to Control group which were statistically significant ($p<0.05$). Comparing type I collagen staining intensity for the 2nd and 4th weeks, there were lower results in sesame Oil, Curcumin and mesenchymal Stem Cell groups which were statistically significant ($p<0.05$). When type III collagen staining intensity result compared, according to Control group, there were statistically significant and higher results in only Curcumin group at 2nd week ($p<0.05$). There were also statistically significant and higher results in Curcumin in comparison to Control group at 4th week ($p<0.05$). When it comes to comparison of week 2nd and 4th regarding type III staining intensity, there were higher results in Sesame Oil, Mesenchymal Stem Cell and Curcumin+Mesenchymal Stem Cell groups according to Control group, which were statistically significant, at 4th week ($p<0.05$). When the staining intensity of tenomodulin is evaluated, there were statistically significant lower results in Sesame oil group at 2nd week ($p<0.05$) and Curcumin and Mesenchymal Stem Cell groups show statistically significant higher results at 4th week, according to Control group ($p<0.05$). In the comparison of tenomodulin staining intensity within groups at 2nd and 4th weeks, there lower results in Control group and higher results in Mesenchymal Stem Cell group which both were statistically significant ($p<0.05$). As a result of biomechanical analyze, although there was no difference among groups according to Control group at 2nd week, there were statistically significant higher results in Mesenchymal Stem Cell and Curcumin+Mesenchymal Stem Cell groups in comparison with Control group at 4th week, while there were no statistically significant

difference in these two group when compared with each other ($p < 0.05$). When the 2nd and 4th weeks values of the groups were compared in terms of tensile strength, 4th week results were statistically significant higher in all groups, except Sesame oil group ($p < 0.05$).

Conclusion: Although curcumin and umbilical cord stromal-derived stem cells, which have been shown to have positive effects on tendon healing in the literature, have also been shown to have positive effects on the healing after window defect made by punch in the Achilles tendon in rats, synergistic effects on healing were not observed when applied together.

Keywords: Achilles tendon rupture, Curcumin, Mesenchymal stem cell, Umbilical cord

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tendonlar, kas kontraksiyonunu kemiklere iletip iskelet kas-sisteminin dinamik ve statik bölümleri arasında fonksiyonel bağlantıyı sağlayarak hareket oluşumunda görev alan, fibröz yapıya sahip bağ dokularıdır. Bileşenleri ve bunların kendine özgü yapılanmaları sayesinde hareketin oluşumunu mümkün kılan güçlü gerici kuvvetlere karşı koyabilirler (1).

Bir erişkin tendonunda, diğer dokulara kıyasla daha az damarlanma ve hücre mevcuttur. Bu hücreler düşük mitotik aktiviteye sahiptir. Bunun yanı sıra, yaşla birlikte tendondaki metabolik aktivite, aerobik-baskın taraftan anaerobik-baskın tarafa kayar. Bu değişim, uzun süreli stres esnasında düşük oksijen seviyelerini tolere ederek iskemi ve nekroz oluşum riskinin azalmasını sağlarken tendonun iyileşme kapasitesini de düşürür. Bu da kötü iyileşme ile sonuçlanmaktadır (1).

Yukarıda sayılan nedenler ve yaşlanan popülasyonun ve sportif aktivitelere katılımın artması sebebiyle tendon rüptür riski ve sıklığı devamlı olarak artmaktadır (1).

Gastroknemius ve soleus kaslarının liflerinin birleşiminden oluşan Aşil tendonu, diz ve ayak bilek eklemine sabitlenir. Bu iki önemli bağlantısı ve vücut ağırlığının 10 katı kadarlık bir kuvvete maruz kalması sebebiyle Aşil tendonu rüptüre olma riskine

sahiptir (2). Diğer tendon rüptürlerinde olduğu gibi konservatif veya cerrahi olarak tedavi edilebilir (3). Ancak hasarlı tendonlar tek başına konservatif tedavi ile yarananma öncesi sağlıklı haline dönememektedir (4). Cerrahi yöntem ise rüptür gibi ciddi akut yarananmalarda tercih edilmektedir (5). Bununla birlikte yapılan randomize kontrollü çalışmalarda bu iki yöntemin birbirlerine belirgin üstünlüklerinin olmadığı gösterilmiştir (3) ve mevcut olan bu yöntemler tendonun doğal kompozisyonuna, yapısına ve mekanik özelliklerine kavuşmasını sağlayamamaktadır. Bu yüzden de yeni etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, hasar sonrası tendon iyileşmesi üzerine kurkumin ve umbilikal kord stromal-kaynaklı kök hücrelerin iyileştirici etkilerinin ve birlikte uygulandıklarında olası sinerjistik etkilerinin histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyomekanik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. TENDONLARIN YAPISI

Tendonlar kasları kemiklere bağlayan yoğun bağ dokusu niteliğinde yapılardır. Primer fonksiyonları kas ile kemik arasındaki güç aktarımını sağlamaktır. Atlarda süperfisyal dijital fleksör tendonu (SDFT) ve insan Aşil tendonu enerji depolamayı sağlayan ek fonksiyonel özelleşmelere de sahiptir (6). Tendonlar lokomotor etkinliği artırabilmek için gerilebilen ve enerji depolayabilen elastik yaylar gibi davranırlar (7).

Tendonlar fibroelastik bir dokuya sahip olup parlak ve beyaz renktedirler. Temel olarak, organize bir ekstraselüler matriks (ESM) ağı içerisine gömülmüş ve mekanik aksa paralel yönde longitudinal olarak dizilmiş kollajen lifler ile tendon hücreleri olan tenositlerden oluşmuşlardır. Mekanik yüklenmeye maruz kalan diğer dokular gibi baskın olan bileşeni ekstraselüler matrikstir ve bu matriks büyük ölçüde yoğun fibröz bağ dokusundan meydana gelir (8).

Tendonların esas bileşeni, yaş ağırlığının %55-70'ini oluşturan sudur. Ekstraselüler matriksin esas bileşeni ise kollajendir ve tendon kuru ağırlığının %60-85'ini oluşturur. Tendon içerisinde kollajen, mekanik aksa paralel ve longitudinal olarak dizilmiş oldukça hizalı kollajen fiberler şeklinde hiyerarşik bir organizasyona sahiptir. Böylelikle yüksek gerim gücüne sahip bir yapı oluşur. Kollajenden zengin hiyerarşik

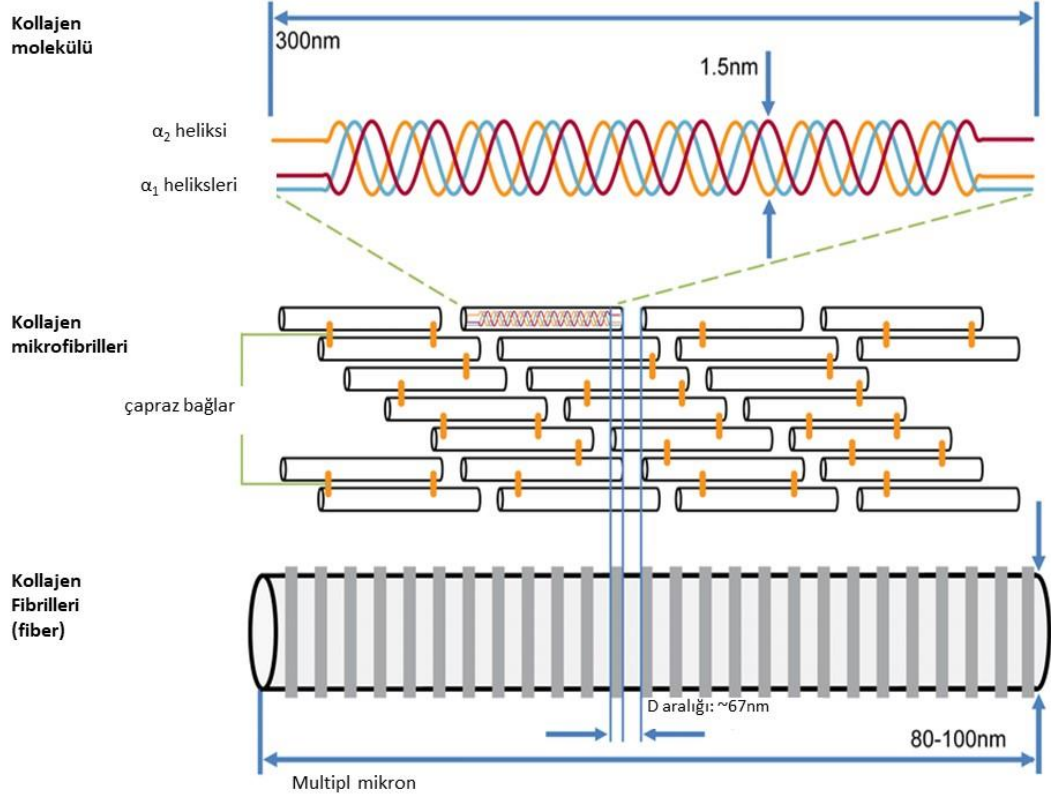
yapının arasına, her bir düzeyde değişen miktarlarda non-kollajenöz ekstraselüler matriks girer (9).

Kollajenin tendon içerisinde son derece hizalı dizilimi, gerim esnasında direkt yüklenmeyi ve tendonun yeterli gerim gücüne ulaşabilmesini sağlar. Non-kollajenöz matriks ise daha visköz, zaman-bağımlı bir element olarak tendon yapısına katkıda bulunur.

Kollajen dışında ekstraselüler matriks içerisinde elastik lifler, temel madde ve inorganik elemanlar bulunmaktadır. Kollajen kitlesinin %95'i tip I kollajen olmakla birlikte tip III, V, VI, XI, XII, XIV kollajen de tendon yapısında bulunmaktadır. Tip III kollajen sağlıklı tendonlarda sadece tendon kılıflarında bulunur (10). Ayrıca tendon yapısında %1-2 oranında elastin bulunmaktadır (1).

Tendon matriksinde bulunan kollajen ağ, "kıvrımlar" olarak tanımlanan düzenli sinüzoidal paterne sahiptir. Bu patern, tendonun tampon veya şok emici olarak görev yapabilmesine ve birbirinden bağımsız liflerin dokuya kalıcı zarar vermeksizin küçük longitudinal uzamalarına izin verir (11). Bu kıvrımların tendonun %1-3 oranında uzayabilmesini sağladığı düşünülür. Bu nedenle tendonun bağlı bulunduğu iskelet kasının kontraksiyonu veya uzaması nedeniyle oluşan ani ve tehlikeli olabilecek germe kuvvetine karşı dirençte güçlü ve etkili bir hareket aralığı sağlarlar (11).

Kollajenin alt birimlerinden biri olan, hidrofilik yapıya sahip tropokollajen moleküllerinden üç tanesi, kovalent çapraz bağlar kurarak hidrofobik, çözünmez kollajen moleküllerini ve bu moleküllerin 5 tanesi moleküller-arası çapraz-bağlarla birleşip grup yaparak "pentafibril" olarak da adlandırılan mikrofibrilleri oluştururlar. (7). Kollajen molekülleri, bitişik moleküle göre çeyrek-aşamalı düzenlenim ile longitudinal olarak hizalanmışlardır. Her bir molekül arası yaklaşık olarak 40 nm boşluk bulunmaktadır. Bu düzenlenim, her 67 nm'de bir tekrarlayan ve "D" periyodu olarak bilinen periodisite veya kollajen fibrillerin bantlı görünümü ile sonuçlanır. Üst üste gelen bölgeler 0,4 D'yi, boşluk bölgeleri ise 0,6 D'yi temsil eder.



Şekil 1. Kollajen fibrili iç yapısı

Mikrofibriller bir araya gelerek, 10-500 nm arasında değişebilen çapa sahip, elektron mikroskopi düzeyinde seçilebilen birimler olan fibrilleri, fibriller ise tendon içerisinde bir uçtan bir uca hizalanarak fiberleri meydana getirirler. Bir fiber içerisindeki fibriller sadece longitudinal değil, aynı zamanda transvers ve horizontal olarak da seyredir. Longitudinal fiberler paralel seyrin yanı sıra, birbirini çaprazlayıp spiraller oluşturacak şekilde de seyir gösterirler. Kollajen fibrilleri, moleküller arası olan ve bitişik mikrofibrilleri birbirine bağlayan spesifik çapraz bağlantılar ile stabilize edilir (12). Fiberler, tendonun temel ünitesidir ve yan yana gelerek primer fiber demetleri (subfasikül) denilen grupları oluşturur. Bazı fiberler ve fibril grupları spiral yapıda kıvrımlar oluşturur. Hem fiberler hem de oluşturdukları bu gruplar endotenon olarak isimlendirilen gevşek bağ dokusu niteliğindeki kılıf ile sarılırlar ve birleşerek sekonder fiber demetlerini (fasikül) oluştururlar. Fasiküller tendon kesitine makroskopik olarak bakıldığında göz ile seçilebilecek ilk alt ünedir, 150-500 μ m arasında değişen çapa sahiptirler. Fasiküller de “endotenon” ile sarılarak yan yana gelerek birleşirler ve tersiyer fiber demetlerini oluştururlar. Fasikülleri saran

endotenon “interfasiküler matriks (İFM)” olarak da adlandırılır. Tersiyer fiber demetlerinin birleşmesi ile de tendon meydana gelir. Endotenon, lif gruplarının birbiri üzerinde kaymasını sağlar ve içinde tendonun daha derin kısımlarına ait kan damarlarını, sinirleri ve lenfatikleri taşır (8).

Tendonlar, en dışarıdan “epitenon” olarak isimlendirilen görece yoğun kollajen fibriller ağından oluşan ince bağ dokusu niteliğinde bir kılıf ile çevrilidir. Epitenon 8-10 nm kalınlığındadır ve kollajen ağı longitudinal, oblik ve transvers seyirli fibriller içermektedir. Epitenonun iç yüzeyi endotenon ile bitişiktir. Dış yüzeyi ise, eklem dışındaki bölgelerde “paratenon” olarak isimlendirilen gevşek bağ dokusu niteliğindeki kılıf ile bitişiktir (13). Paratenon, tendonun çevre dokulara karşı serbest hareketini sağlar. Paratenonun temel bileşenleri tip I ve tip III kollajen fibriller ve elastik fibrillerdir (14). Paratenon iç yüzeyi sinovyal hücreler ile döşelidir (15). Tendonların eklemi geçtikleri yerlerde, tendon hareketini kayganlaştırıp kolaylaştırmak için sinovyal kılıfları da bulunur.

Kollajen kıvrımlar ile birlikte, elastin ve tenascin-C’den (Tn-C) oluşan elastik lifler, tendonun uzayıp esneyebilmesini ve kuvvet uygulanması sonrası enerji harcamadan eski konumuna dönebilmesini sağlar (16).

Tendonların temel maddesi dekorin, biglikan, fibromodülin ve lumikan gibi proteoglikanlar (PGs), glikoproteinler, elastin ve inorganik moleküllerden (bakır, manganez, kalsiyum) meydana gelir (17). Hidrofilik, jel-benzeri yapıdaki temel maddenin ağırlığının %60-80’i sudur. Temel maddenin su bağlama yeteneği tendonun elastisitesine katkıda bulunur, yırtılma ve kompresif güçlere karşı direnç ve kollajen liflere desteklik sağlar (18).

Tendon yapısında monosakkaritten polisakkaritlere kadar çeşitlilik gösterebilen karbonhidrat birimlerine bağlı proteinler içeren moleküller olan glikoproteinler de bulunur (19). Kartilaj oligomerik matriks proteini (COMP), Tn-C ve tenomodülin tendon yapısında bulunan glikoproteinlerden bazılarıdır. Tendonda en çok bulunan glikoprotein, merkezi bir silindir etrafında “kollar” halinde dizilmiş beş altbirim içeren büyük bir pentamerik protein olan COMP’dır (20). Tn-C de ekstraselüler matriks glikoproteinidir. Tn-C iskelet-kas sistemi dokularında düşük düzeyde bulunur ama immatür dokularda ve patolojik durumlarda fazla eksprese edilir (21). Tendon kuvvetli

mekanik güçlere maruz kaldığında da yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu gözlenmiştir (16). Tendon yapısındaki bir diğer glikoprotein de tenomodüldür ve hem gelişmekte olan hem de matür tendonlarda fazla eksprese edilen bir tip II transmembran glikoproteinidir; hücreler ve bunları çevreleyen matriks arasında bağlantı sağladığı düşünülmektedir (22) ve sentezinde rol oynayan genler tenositler için belirleyici gen olmaya adaydır (23).

Proteoglikanlar (PGs), amino şeker içeren bir veya birden fazla polisakkarit zincirinin bir merkez proteine bağlanması ile oluşan glikoprotein sınıfıdır. Bu zincirlere genellikle “glikozaminoglikan (GAG) yan zincirleri” denir (24). Tendonun gerilme bölgelerinde, PG’lerin çoğu küçük lösin-zengin proteoglikanlardır (SLRPs) ve bu grup içerisinde dekorin, biglikan, fibromodülin ve lumikan gibi PGs bulunmaktadır (19, 25). PGs tendon içerisinde geniş agregatlar olarak da bulunabilir; örneğin, agrekan tendonun fibrokondrojenik fenotip baskın bölgesi olan basınç bölgelerinde daha fazla eksprese olur (25).

Tendonun kendi içinde bölgeler arası farklılıklar görülebilir ve tendon yapısı ve bileşimi, tendon içinde longitudinal olarak değişiklik gösterebilir. Örneğin, çekme yüküne maruz kalan tendon bölgelerinde iyi hizalanmış kollajen ve düşük düzeylerde PGs bulunurken, eklem çevresi tendon bölgeleri gibi basınç yüküne maruz kalan tendon bölgeleri görece fazla miktarda PGs ve daha kıkırdak-benzer diğer proteinleri içerir. Fazla miktarda PGs varlığı dokunun su içeriğini artırarak, artmış sertlik ve basınca direnç sağlar (19).

2. 1. 1. Tenoblastlar ve tenositler

Genel olarak tendon hücre fenotipi az anlaşılmış ve tanımlanmıştır. Bununla birlikte güncel bilgiler şu şekildedir:

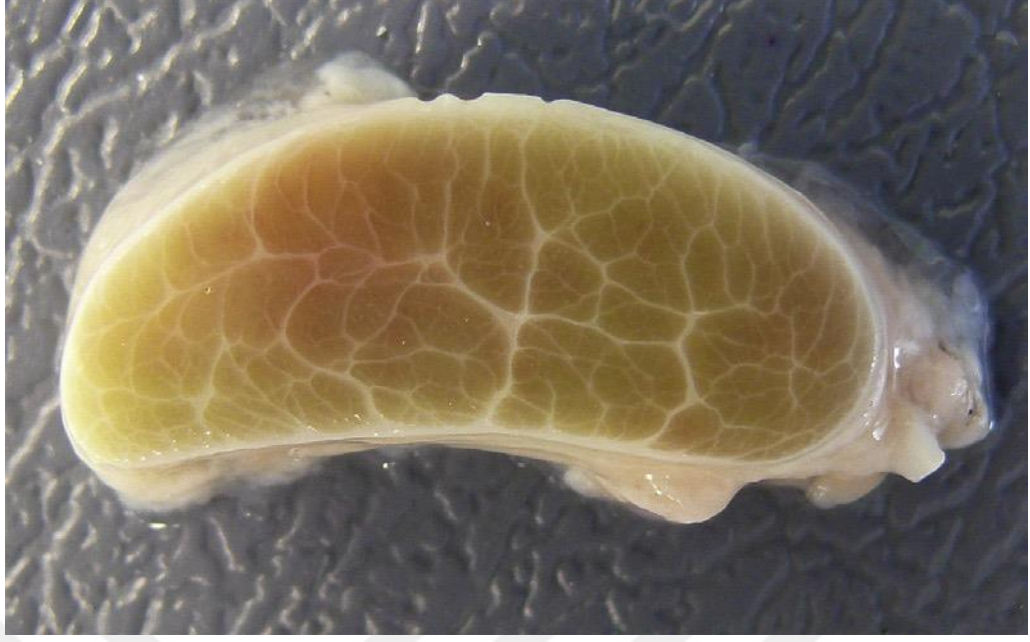
Tenositler ve tenoblastlar tendon hücrelerinin yaklaşık %90-95’ini oluşturur. Bu hücreler tendonun longitudinal eksenini boyunca kollajen lifleri arasında bulunur (1). Tenositler (TCs), farklılaşmanın son basamağına gelmişlerdir ve kollajen liflere tutunan ince sitoplazmik protrüzyonları bulunan, elonge nükleusa sahip, iğ şekilli hücrelerdir. Tenoblastlar ise daha yuvarlak şekillidir ve geniş, ovoid nükleusları vardır (26). Tenositler ve tenoblastların ayrımı hücrelerin şekil farklılıklarına göre yapılırken moleküler olarak kesin ayrımı sağlayacak belirteç gen ekspresyonu henüz tespit

edilememiştir. Bu nedenle, tendon hücre farklılaşma süreci hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

TCs, kollajen, elastin, glikoprotein ve proteoglikan gibi ekstraselüler matriks bileşenlerini üretmek üzere kollajen demetleri arasında sıralanmışlardır. (31). Tenositler, fasiküller içerisinde kollajen lifleri arasında (intrafasiküler TCs) veya kollajenöz fasiküller arasında İFM içerisinde gruplar halinde (interfasiküler TCs) bulunurlar. İntrafasiküler TCs, genişlemiş nükleus ve matrikse kadar uzanıp bitişik hücrelerle gap junctionlar ile bağlanan kompleks sitoplazmik çıkıntı ağına sahip elonge şekilli hücrelerdir (28). İnterfasiküler TCs ise daha dolgun ve yuvarlak bir görünüme sahiptir. Tenoblastlar ‘özelleşmiş fibroblastlar’ olarak tanımlanan ve devamlı bir şekilde proliferasyon olarak yeni kollajen sentezini sağlayan hücrelerdir (29). TCs morfolojik olarak farklı gözükabilen hücrelerdir ve farklı görünüme sahip TCs arası fenotipik ayırım henüz netleşmemiştir.

Tendonun hücresel kısmının geri kalan %5-10'u ise kondrositler, tendon kılıfının sinoviyal hücreleri, kapiller endotel hücreler ve arteriyollerin düz kas hücrelerinden oluşmaktadır.

Yaşla birlikte, aerobik enerji üretimi ve ekstraselüler matriks komponentlerinin sentezi azalır. Enerji üretiminde anaerobik tarafa kayış, tendonun düşük oksijen seviyelerini tolere edebilmesini sağlayıp uzun süreli stres esnasında meydana gelen iskemi ve nekroz riskini azaltır, fakat aynı zamanda kötü ve yavaş iyileşme kapasitesi ile sonuçlanır (18).



Şekil 2. Yüzeysel dijital fleksör tendonun kesiti. Her bir fasikülün interfasiküler matriks ile çevrenmesi ile açıkça görülen bal peteği şeklindeki fasiküler düzenlenme (2)

2. 1. 2. Tendon iyileşmesi

Tendon yaralandığında, iyileşme ve nihayetinde skar oluşumunun görüldüğü bir tendon iyileşme süreci başlar. Tendon iyileşmesi, hücresel ve biyokimyasal olaylara dayandırılarak çeşitli fazlara ayrılabilir.

Tendon iyileşmesi genel olarak üç temel fazdan oluşur. Başlangıç fazı olan hemostaz/inflamasyon fazında, travma sonrası hasarın meydana geldiği bölgede kan damarlarının rüptüre olması sonucu kan birikir ve hematoma meydana gelir. Yara bölgesinde biriken plateletler yırtık tendon kenarlarını stabilize etmek için, içerisinde hücreler ve plateletlerin bulunduğu bir fibrin pıhtı oluştururlar (30). Oluşan pıhtı ve hemostaz yoluyla vazodilatör kaskad, plateletler ve mast hücrelerinden pro-inflamatuar mediyatörlerin salınımı aktive olur. Daha sonra, aktive olmuş plateletlerden kemoatraktan salınımı olur ve bu salınım ile nötrofil ve monosit gibi inflammatuar hücrelerin dolaşımdan hasar bölgesine göç etmesi sağlanır. Nötrofiller bölgeye gelen ilk inflammatuar hücrelerdir. Nötrofillerden sonra bölgeye gelen monositler makrofajlara farklılaşırlar ve bu makrofajlar nötrofiller ile birlikte nekrotik materyal ve ESM parçalarının fagositozunda ve pıhtının parçalanmasında görev alırlar. Antimikrobiyal rolleri de olan makrofajlar (31) tenositlerin iyileşme sürecine

dahil edilmesini ve yara bölgesindeki kapiller ağın oluşumunu sağlayacak anjiyogenez uyarıcı faktörlerin salınımını da sağlarlar (32). Bölgede oluşan kapiller ağ, yara bölgesinde yeni oluşan fibröz dokunun sağkalımı için gereklidir (33). Makrofajlar sentezledikleri büyüme faktörleri ve sitokinler yoluyla lenfositler gibi birtakım hücrelerin görevlendirilmesinde rol oynamalarının yanısıra tenosit proliferasyonunu ve kollajen sentezini sağlayarak ESM'nin yeniden yapılandırılmasında da görev alır (34). Makrofajlar, debridman sürecinde ve yeni dokunun şekillenmesinde üstlendiği yönetici rol ile iyileşme sürecinin en önemli hücresi olarak görülmektedirler. T lenfositler de yara iyileşmesi üzerinde önemli role sahiptirler. Bu rolleri, T hücre ve alt tiplerinin eksikliğinde yaranın mekanik gücünün ve kollajen içeriğinin etkilendiğinin gösterilmesiyle kanıtlanmıştır (35). Tendon iyileşmesinin bu ilk fazı esnasında DNA, fibronektin, GAG, su ve tip III kollajen içeriğinde artış görülmektedir. Bu bileşenlerin toplu olarak artışı ile yeni oluşmuş ESM'nin stabilizasyonu sağlanır (36).

İnflamatuar faz 3-5 gün sürer ve bu süreçte tendona dışardan gelen nötrofil ve makrofaj gibi hücreler ile birlikte tendon içinde yerleşmiş olan endotenon ve epitenon hücreleri gibi hücreler ikinci bir sitokin havuzunun oluşumunu sağlayarak tendon iyileşmesinin ikinci fazı olan proliferasyon/fibroplazi/tamir fazını başlatırlar (37). Üç-altı hafta süren bu faz esnasında makrofajlar büyüme faktörleri salgılayarak hücrelerin aktif hale gelip tendon tamirinde görev almalarını sağlar ve tamir bölgesinde, disorganize kollajen birikimi, granülasyon dokusu, neovaskülarizasyon, ekstrinsik fibroblast göçü ve intrinsik fibroblastların proliferasyonu görülür. Dört günden sonra fibroblastlar yara bölgesini infiltre eder ve proliferolurlar (37).

Bu aşamada histolojik olarak baskın olan hücreler fibroblastlardır, daha az sayıda da makrofajlar ve mast hücreleri görülmektedir. Fibroblastlar bol miktarda tip III kollajen ve GAG içeren ESM sentezlerler (37).

Bu faz esnasında, tip III kollajen ve DNA konsantrasyonlarının tamir süreci boyunca en pik değerlerine ulaştıkları gözlemlenmiştir. Bu olayların kollajen sentezinin optimizasyonu ve tip III - tip I kollajen dönüşümüne yardımcı olduğu düşünülmektedir (38).

Artmış selülarite ve büyük miktarlarda su absorpsiyonu da yine bu fazın belirgin özelliklerindedir.

Tendon iyileşmesinin üçüncü ve son fazı olan yeniden şekillenme (remodeling) fazı, hasarlı dokunun organize bir ESM'ye dönüştürüldüğü fazdır. Bu fazda tamir dokusunda hücrel ve vasküler içerikte azalma görülürken tip I kollajen içeriği ve dansitesinde artış gözlemlenmektedir. Tip I kollajenin esas olarak bu fazda üretilir. Kollajen artık daha organize, oryante durumdadır ve hasar bölgesinin hemen yakınındaki sağlıklı matriks ile çapraz-bağlar kurmuştur. Matriks metalloproteinaz tip III kollajenin tip I kollajen ile yer değiştirmesini sağlayarak kollajen matriksi yıkar. Yeniden şekillenme fazı, konsolidasyon ve matürasyon olmak üzere iki alt faza bölünebilir. Konsolidasyon fazı selülaritede azalma ve matriks yapımı ile karakterizedir. Aynı zamanda tip III - tip I kollajen dönüşümü ile doku daha fibröz hale gelir. Konsolidasyon fazının sonunda, yani yaklaşık 10-12. haftalarda ve matürasyon fazının başlamasıyla birlikte fibröz doku daha güçlü olan skar dokusuna dönüşür. Yaklaşık 4. ayda kollajen lifler kas yüklenmesi yönünde olacak şekilde longitudinal olarak yeniden dizilirler. Sonraki 3 ay boyunca birbirinden ayrı şekilde duran kollajen lifler, sağlıklı tendonda olduğu gibi demetler oluşturur. İyileşme süreci tamamlandıktan sonra, selülarite, vaskülarite ve kollajen organizasyonu normal tendonda olana yaklaşırsa da çaplar ve kollajenin çapraz-bağları iyileşme sonrasında bile sağlıklı tendonunki gibi olamaz. Bu faz aylar veya yıllar sürer, genellikle de bu süre 6 hafta ile 9 ay arasında değişir. Yine de doku şekillenmesi yaklaşık 1 yıl sürer. İyileşmiş tendonun yapısal özellikleri, yaralanmadan yıllar sonra bile sağlıklı halinin ancak 2/3'üne kadar ulaşabilir (37).

Tendon iyileşme süreci, sekrete edilen birçok molekül tarafından yönetilir. Başlangıçta IL-6 ve IL-1 β gibi bazı inflamatuvar sitokinler yara bölgesini işgal eden inflamatuvar hücreler tarafından üretilir. Daha sonra yara bölgesinde lokalize olan hücrelerden salınan birtakım büyüme faktörleri ile doku tamiri hızlandırılır. β -FGF, kemik morfogenetik proteini-12, -13, -14 ve PDGF (platelet-derived growth factor) ve VEGF (vascular endothelial growth factor) iyileşme sürecinin farklı fazlarında görev alırlar ve farklı işlevlere sahiptirler. Tamir sürecinde, tendon hücreleri aktive edilmiştir ve ESM bileşenlerini hem sentezlerler hem de yıkarlar. Dolayısıyla tendonun yeniden şekillenmesinin yavaş ve devamlı bir süreç olmasına katkıda bulunurlar (27, 39).

Tendon iyileşmesinin ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki hücresel mekanizmasının olduğu öne sürülmektedir (32). Literatürde her iki iyileşme mekanizmasının üzerine çok fazla tartışma ve deneysel kanıt mevcuttur. Ekstrinsik iyileşme modelinde tendonun içsel olarak iyileşme kabiliyetinin olmadığı düşünülür, bu nedenle tendonun düzgün iyileşebilmesi için bu süreç dahilinde adezyon gelişimi, inflamatuvar hücrelerin ve fibroblastların infiltrasyonu ve ekstraselüler kan desteğine ihtiyaç vardır (40). İntrinsik iyileşme modelinde ise tendon, epitenon ve endotenon hücrelerinin proliferasyonu ve intratendinöz kan desteği ile iyileşir; bu iyileşme modelinde adezyon formasyonu görülmez (41).

Bu iki mekanizmanın normal olarak iş birliği içerisinde ilerledikleri, yani tendon iyileşmesinin her iki iyileşme modelinin de kombinasyonu şeklinde olan bir süreç olduğu düşünülmektedir. İyileşme sürecine dair hipotez, önce fibroblastların ve inflamatuvar hücrelerin tendon periferinden, kan damarlarından ve dolaşımdan gelip hücre infiltrasyonu ve adezyon gelişimine katkıda bulunarak hasarlı bölgeye tutundukları yönündedir. Sonra, endotenondan gelen intrinsik hücreler aktive olarak yara bölgesine göç ederler ve proliferer olurlar. Prolifere oldukları bölgede ESM'yi yeniden organize ederler ve internal vasküler ağ gelişimini desteklerler (17, 42). Tamir eden hücrelerin kaynağı hala tartışmalıdır ve bu kaynağı belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. 2007'de Kajikawa ve arkadaşları, biri yeşil floresan proteini dolaşımlarında, diğeri ise patellar tendonlarında bulunduran iki şimerik rat grubunda bir tendon yaralanma modeli kullanarak bu tartışmaya ışık tutan bir çalışma yapmışlardır. Sonuçta tendon iyileşmesinin bifazik paternli olduğu, hem dolaşımdaki hem de tendondaki hücrelerin iyileşme sürecinin farklı periyotlarında iyileşmeye katkıda buldukları gösterilmiştir (41).

Çoğu hastada, özellikle de yaşlı olanlarda iyileşmiş tendon, yaralanma öncesi mekanik özelliklerini yeniden kazanamaz. Tamir edilmiş dokunun bu azalmış gücü, kollajen liflerinin bütünleşmesinde yetersizlik ve tip III/tip I kollajen oranındaki artış nedeniyledir. Sonuç olarak tendon kalınlaşıp sertleşir; bu da azalmış birim mekanik gücü ile sonuçlanır. Bu yüzden tendon kalitesi ve fonksiyonel aktivitesi sağlıklı tendona göre daha azalmış durumdadır.

Tendon iyileşmesinin aynı zamanda tendonun bulunduğu bölgeye, travma şiddetine, tendonun sinoviyal sıvı ve kan dolaşımına ulaşılabilirliğine ve tendon mobilizasyon derecesine bağlı olarak değişiklik gösterebilen bir süreç olduğu da bilinmektedir

2. 1. 3. Aşil tendonu

Aşil tendonu (tendo calcaneus) vücuttaki en güçlü ve kalın tendondur. Birlikte “triseps surae” olarak isimlendirilen soleus ve gastroknemius kaslarının tendonlarının birleşiminden oluşur ve bu kas grubunu kalkaneusa bağlar. Bazen yapısına plantaris kası tendonu da katılabilir. İnsan anatomisi için oldukça karakteristiktir ve insan evriminin şekillenmesine yardımcı olduğu düşünülür. Kaslar ve Aşil tendonu baldırın posteriorunda ve süperfisiyal kompartmanda bulunur (43).

Aşil tendonu koşma, zıplama, sekme ve atlama esnasında vücut ağırlığının yaklaşık 10 katına kadar gerim kuvveti ile vücuttaki en büyük yüke maruz kalır (43).

2. 1. 4. Aşil tendonu anatomisi

Aşil tendonu yaklaşık olarak 15 cm uzunluğundadır ve baldırın orta kısmında, gastroknemius ve soleus kaslarının muskülotendinöz bileşkesinden başlar. Gastroknemiusun medial ve lateral başlarının başlangıç noktaları femoral kondillerdir ve Aşil tendonuna katkıları, bu kas gövdelerinin alt uçlarında geniş bir aponevroz olarak başlar. İnsanların %2,9-5,5’inde gastroknemiusun bir üçüncü başı da mevcuttur ve çoğunlukla medial baş ile ilişkilidir. Nadiren plantaris de üçüncü başı oluşturabilir (örneğin, gastroknemiusa lateral ve medial başlarının birleştiği yerde katıldığında) (44). Aşil tendonu başlangıç kısmında yassı şekillidir ve kalkaneus üzerindeki insersiyon noktasına 4 cm kala yuvarlak hale gelir. İnsersiyon düzeyinde tekrar yassılaştır, kalkaneusun arka yüzeyinin alt bölümünün orta kısımlarında pürüzlü bir alana yapışmak için kartilajinöz hale gelir ve delta şeklini alarak kalkaneusta sonlanır. Ön yüzeyinde ise, neredeyse soleusun insersiyosu olacak şekilde musküler fiberler bulunmaktadır (45).

Kas kitlesinin tibial taraftan gelen gastroknemius kaynaklı tendinöz lifleri, derinden süperfisyale ve oblik olarak seyredecek şekilde, tendonun süperfisyal yüzeyi boyunca gelerek kalkaneus üzerinde posterolateralde sonlanırlar. Fibular taraftan gelen soleusa ait tendinöz lifler ise tendonun derin kısmından geçerek kalkaneus üzerinde

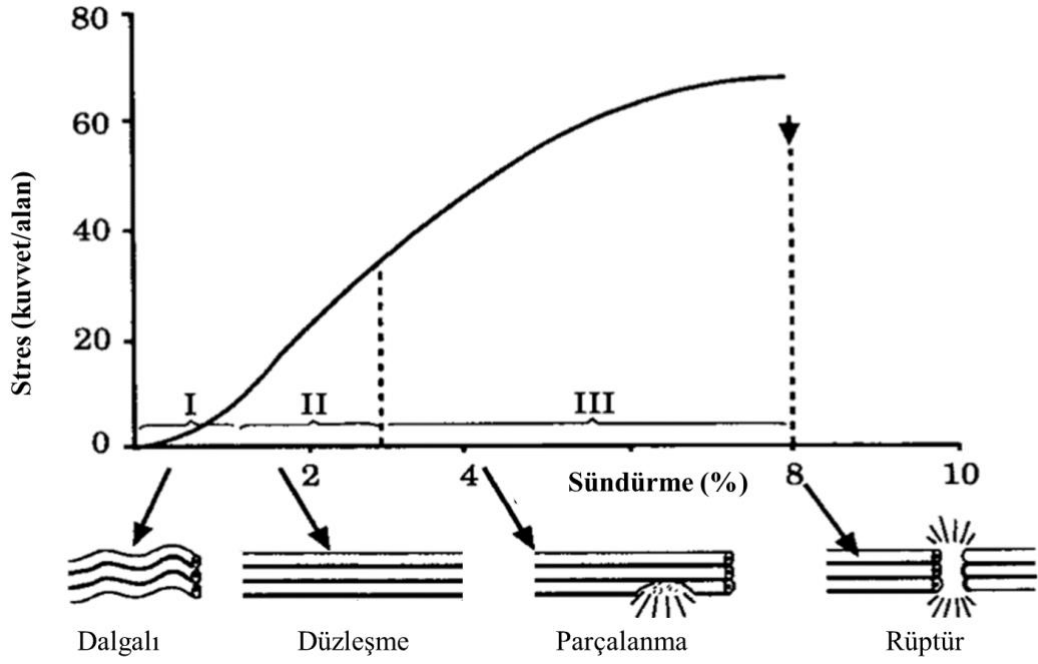
posteromedialde sonlanırlar (46). Bu kıvrılma, vasküler ağın konstriksiyonuna neden olabilsede tendon gevşek durumda olduğunda daha az lif burkulmasını ve gerim altında her bir ayrı lifin daha az hasar almasını sağlar. Dolayısıyla fiber distorsiyonu ve lifler-arası sürtünmenin azalması, güçte artış ile sonuçlanır (47). Bu bükülme, tendonda zayıf damarlanmaya sahip, tendinopati ve rüptürün sık görüldüğü bir stres alanı oluşturur ve bu stres kalkaneal insersiyon noktasının 2-5 cm yukarısında en belirgin olarak gözlenir (48).

Aşil tendonunun etrafında gerçek bir sinoviyal kılıf bulunmamaktadır. Aslında, paratenon tendonun hareket esnasında kayganlık gösterebilmesine izin veren elastik bir kılıf meydana getirir. Bu kılıf, tendonu bacağın derin fasyasından ayıran yoğun bağ dokusu tabakalarından meydana gelir. Tendon yapısında çok sayıda kan damarı ve sinir bulunur. Hatta tendonun en vasküler bölümüdür ve inflamasyon meydana geldiğinde kalınlaşabilmektedir. Peritendinöz yapılar ve kılıf, yapısındaki bol miktarda mukopolisakkarit sayesinde tendonun bitişik dokular boyunca kaymasına izin verir. Paratenon proksimalde kas fasyası ile devamlılık gösterirken distalde kalkaneusun periostu ile birleşir (49).

2. 1. 5. Aşil tendonunun biyomekaniği

Tendonlar iskelet hareketini sağlayan kontraktıl gücün taşıyıcılarıdır. Bu işlevi yerine getirirken, kaslar ve kemikler arasında rijit bağlantı bölgeleri olarak değil, aksine viskoelastik özellik gösteren yapılar olarak karşımıza çıkarlar. Hasar oluşmaksızın %4 oranında uzayabilecek kadar yüksek gerim gücüne sahiptirler (43). Tenositler içerisinde aktin ve miyozin bulunması tendonun, aktif kasılma-gevşeme mekanizması yoluyla güç taşınımını düzenleyen doğal bir mekanizmaya sahip olmasını sağlar (50).

Dinlenme esnasında tendon, kollajen fibrillerin kıvrımlı yapısından kaynaklanan dalgalı bir biçime sahiptir. Tendonun boyunun %2'den fazla sündürülmesi esnasında bu dalgalı biçim kaybolur. Sündürmenin artmasıyla birlikte kollajen fiberler doğrusal hale gelirler ve deforme olmaya başlarlar (50). %4-8 arası sündürme düzeyinde kollajen fiberler, moleküller arası çapraz bağlar koptuğu için birbirlerinin üstüne binmeye başlar. %8'in üzerindeki sündürme düzeylerinde ise tendonun direnci aşılmış olur ve makroskopik rüptür meydana gelir (51) (Şekil 3).



Şekil 3. Tendonda gerilim-sünme grafiği

Egzersiz sırasında Aşil tendonu üzerindeki yük vücut ağırlığının 12 katına kadar ulaşabilir; bu da Aşil tendonunu tekrarlayan stres yaralanmalarına yatkın hale getirir (52).

Aşil tendonun boyutları ve eşsiz yapısı kuvvetli yüklenmeler altında dahi işlev görebilmesini sağlar. Aşil tendonunun gerilme ve sünmeye direnç özellikleri diğer tendonlara benzerdir. Örneğin; fizyolojik kollajen lif gerilmesi %2-4 gerilme uzunluğu aralığında ortaya çıkarken, mikroskobik lif yetmezliği %6-8 gerilmede ve makroskobik yetmezlik %8 gerilmenin sonrasında ortaya çıkar. Gerilme-gerinim eğrisinin yetmezlik noktalarının altında tendon lifleri, işlevde önemli rolü olan geri tepme ve enerji salınımına olanak sağlayan elastisiteye sahiptir (53). Birçok anomali, deformite ve aktivite tendon üzerinde geri tepme kapasitesini açacak şekilde yüklenmeye neden olabilir ve bu durum tendon içerisindeki liflerde hasar ve dejenerasyon ile sonuçlanabilir. Hasarın aksine, tendona uygulanan subrüptür kuvvet, normal tendon sağlığı ve tendon iyileşmesinde önemli rolü olan kollajen sentezini sağlayan fibroblastların biyomekanik sinyalizasyonu için gereklidir (54). Bu mekanik stres hasarı önlemek ve hasar iyileşmesi için gerekli bir faktördür ve iyileşmiş tendon gücünü artırdığı gösterilmiştir. Bu esaslar, ideal iyileşmeyi sağlayabilmek için tendon

hareketi ve kontrollü stresin gerekli olduğunu göstererek iyileşme sırasında devam eden aktivitenin önemini vurgulamıştır.

2. 1. 6. Aşil tendon rüptürü

2. 1. 6. 1. Etiyoloji ve popülasyon

Aşil tendonu, insan vücudunda en sık rüptüre olan tendondur (55). Eğlence ve rekabete dayalı sporların popülaritesinin artmasının da etkisiyle (56) rüptür insidansı 1980’li yıllardan beri artış göstermektedir. En hızlı artış 30-39 yaş aralığındaki erkek grubunda görülmüştür (55). Aşil tendon rüptür riski açısından en riskli spor erkelerde %83 görülme sıklığıyla badmintondur. Ortalama hasta yaşı 35 ve erkek/kadın görülme sıklığı oranı 20/1’dir (57). En sık rastlanılan hasta profili 40’lı yaşlarda alışılmışın dışında spor dallarıyla ilgilenen erkektir.

Patlayıcı pilometrik kasılmaları içeren koşu ve zıplama gibi aktiviteler sıklıkla rüptüre neden olan aktivitelerdendir (58).

Klinik pratikte sıklıkla kullanılan steroidlerin hem oral hem de intratendinöz steroid enjeksiyonunun spontan tendon rüptürüne neden olabildiği gösterilmiştir (59).

Bireyin yaşam süresindeki doğal yaşlanma sürecinde, tendonun kronik dejenerasyonu ve normal inhibitör mekanizmaların bozulması görülebilir. Yaşla birlikte kan akımı ve kollajenin gerim kuvveti azalır. Dokunun katılığı ise yaşla birlikte artar, bu durum tekrarlayan streslere karşı koyma yetisinde azalmaya neden olur. Nihayetinde de tendon kuvvetli ve ani kontraksiyonlar ile yırtılmaya meyilli hale gelir (60).

2. 1. 6. 2. Aşil tendon rüptürü tedavisi

Tendon yaralanmaları her yıl 30 milyon insanı etkilemektedir (61). Bu yaralanmalar travma, aşırı kullanım ve yaşlanma ile birlikte görülebilir ve ağrı, inflamasyon ve disfonksiyon ile karakterizedir. Tendon yaralanmaları konservatif ve cerrahi olmak üzere iki şekilde tedavi edilebilir (3). Konservatif tedavilere örnek olarak kortikosteroid enjeksiyonu, non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar, fizik tedavi ve ekstrakorporeal şok dalgası tedavisi verilebilir (62). Bununla birlikte, sadece konservatif tedavi verilmesi tendona yaralanma öncesi sağlıklı halini kazandırmada yetersiz kalmaktadır (3). Rüptür gibi akut yaralanmalar için tedavide genellikle cerrahi yöntemler tercih edilir (5). Greft ile cerrahi tamir, tendon rüptürleri için standart

tedavidir. Bu yaklaşımla ilgili sebat eden ağrı ve re-rüptür riski (3), tendon adezyonları, skar dokusu gelişimi, osteotendinöz bileşkede fibrokartilaj rejenerasyon eksikliği gibi kısıtlamalar mevcuttur (4). Dahası, bu konservatif ve cerrahi tedavi yaklaşımları tendonun sağlıklı halindeki bileşimini, yapısını ve mekanik özelliklerini geri kazandıramamaktadır. Bu yüzden de daha etkin tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2. 2. KÖK HÜCRE

Canlı vücudunda, vücudun ihtiyaçları doğrultusunda farklı tipte hücelere dönüşebilen ve mitotik bölünme ile kendini yenileme yeteneğine sahip olan hücreler “kök hücreler” olarak adlandırılır. Genler aracılığıyla aldığı sinyallerle birçok dokunun temel yapısını oluşturabilseler de belirli bir fonksiyon için özelleşmiş olan sinir hücresi, kas hücresi, salgı epitel hücresi gibi hücrelerin işlevini yerine getiremezler.

Hücrelerde DNA sarmalının uç bölgesinde hücrenin bölünme yeteneğini kontrol eden telomer zinciri, kök hücrelerde oldukça uzundur. Bu uzunluk sayesinde kök hücreler, yüksek telomeraz enzim aktivitesi ile birlikte kendilerini replike etmelerini sağlayan sınırsız bölünme yeteneğine sahiptir (63). Yapılan bir çalışmada embriyonik kök hücre hatlarının 300-400 döngü boyunca proliferasyon olabildikleri gösterilmiştir (64).

Hücrelerin bir araya gelerek çok hücreli organizmaları meydana getirmek amacıyla, özgün işlevleri yerine getirebilecek özelleşmiş yapı kazanmaları “diferansiyasyon” olarak tanımlanır. Kök hücreleri diğer hücre tiplerinden ayıran bir başka özellik yüksek diferansiyasyon kapasitesine sahip olmalarıdır. Bu sayede organizmadaki yapım ve onarım olaylarında kritik rol üstlenirler (65).

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre temel olarak totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 gruba ayrılırlar.

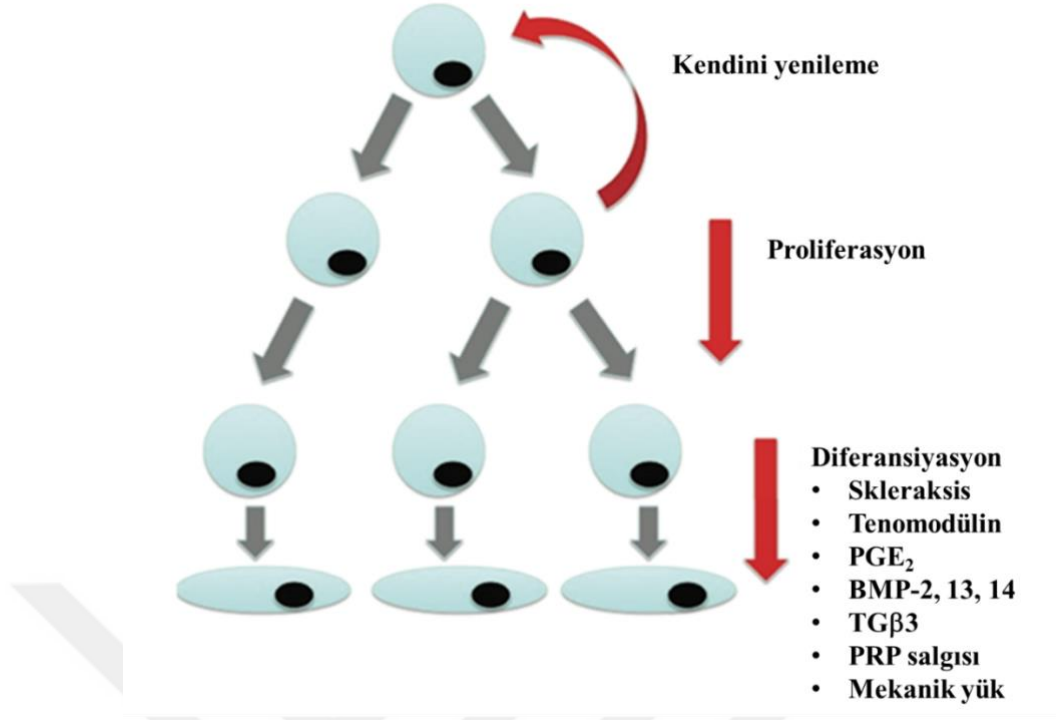
Zigot ve bölünmesiyle oluşan blastomerler totipotent özellik taşımaktadır. Bu hücreler plasental yapılarla birlikte tüm dokuları oluşturabilme yeteneğine, dolayısıyla canlıyı oluşturabilme sahiptirler. Pluripotent kök hücreler, totipotent kök hücreler benzer şekilde canlıdaki tüm dokuları oluşturabilmelerine rağmen plasental yapıları oluşturamazlar ve bu nedenle yeni bir canlı meydana getiremezler. Blastokist evresinde iç hücre kitlesi hücreleri pluripotense sahiptirler (66). Multipotent kök

hücreler ise tüm kan hücreleriyle birlikte birçok organa özgü farklı hücre tiplerine farklılaşabilen kök hücre grubudur. Kaynaklandıkları dokuya ait hücelere farklılaşabilirler. Mezenkimal kök hücre ve hematopoietik kök hücre bu gruba örnek olarak gösterilebilir. Bu üç gruba ek olarak daha sınırlı diferansiyasyon kapasitesine sahip oligopotent ve unipotent kök hücreler de mevcuttur (67).

Kök hücreler elde edildikleri doku ve organlara göre embriyonik (EKH), perinatal (umbilikal kord veya amniyotik dokudan elde edilen), somatik erişkin veya indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH'ler) olmak üzere gruplara ayrılırlar. Erişkin kök hücrelerin en sık kullanılan tipleri mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) ve hematopoietik kök hücrelerdir. Her iki kök hücre grubu da spesifik yüzey belirteçleri ile tanımlanmıştır (68). iPKH'ler erişkin kök hücreler değildir; erişkin hücelere, hücreyi pluripotent kök hücreye dönüştürmeye yarayacak transkripsiyon faktörlerini kodlayan dört spesifik genin konulması ile oluşan pluripotent kök hücrelerdir (69). Uygulanan bu teknik oldukça gelecek vaat etmektedir, ancak ortopedik tedavilerde kullanımına dair mevcut bilgiler oldukça kısıtlıdır. Embriyonik veya perinatal kök hücreler ile ilişkili etik kaygılar ve düzenlemelere dair mevcut sorunlar göz önüne alındığında, ortopedi alanında kullanılabilecek kök hücrelerle ilgili araştırmalar ağırlıklı olarak MKH'lere odaklanmıştır (70).

2. 2. 1. Mezenkimal kök hücreler

MKH'ler (aynı zamanda mezenkimal stromal hücreler de denir) kendilerini yenileyebilmeleri ve multipotense sahip olmaları ile tanımlanır (71). MKH'ler üç özelliğe sahiptir: (i) plastiğe tutunabilme, (ii) spesifik antijenlere sahip olma ve (iii) iskelet-kas tıbbında önemli yere sahip olan osteosit, kondrosit ve adipositler gibi bir dizi hücre hattına farklılaşabilen multipotent mezenkimal hücre oluşturma potansiyeline sahip olma (72). MKH'lerin tenositler gibi spesifik hücre hatlarına indüksiyonu kültür ortamı, büyüme ve medya koşulları ile sağlanmıştır (Şekil 4).



Şekil 4. Mezenkimal kök hücrelerin tenositlere diferansiyasyon yolağı

MKH'ler farklı doku kaynaklarından izole edilebilirler. İskelet-kas uygulamaları için en sık kullanılan MKH kaynakları kemik iliğı ve adipoz dokudur, çünkü bu dokulardan çok sayıda canlı hücre elde edilebilir. Kemik iliğı-kaynaklı MKH'ler adipoz-kaynaklı olanlara kıyasla kondrositlere ve osteositlere daha iyi farklılaşabilmektedir (73). Bununla birlikte adipoz-kaynaklı MKH'lerin kaynağına daha kolay ulaşılabilir ve donör bölge morbiditesi daha azdır. İnsan kemik iliğı ise toplamda %0,001-0,01'lik bir çekirdekli hücre yüzdesi ile düşük MKH verimine sahiptir (74). MKH'lerin daha az sıklıkta kullanılan kaynakları tendon, kas, sinovyum, kıkırdak, deri, periferal kan, periodontal doku, kıl folikülleri ve skalp dokusudur (75). MKH'lerin nispeten kolay elde edilebilmelerine rağmen, tendona etkin şekilde farklılaşıp farklılaşamayacakları tartışma konusudur. Bununla birlikte MKH'lerin tendon tamirini olumlu yönde etkilediklerini gösteren çok sayıda hayvan çalışması mevcuttur (33).

2. 2. 2. Tendon tamirinde kök hücre-temelli yaklaşımlar

Hücre-temelli doku mühendisliğı, iskelet-kas rejenerasyonu ile ilgili yaklaşımlar içerisinde en çok rağbet gören ve çokça araştırılan alanlardan birisidir. Bu strateji,

tamir edici özelliğe sahip hücrelerin dokunun hasarlı bölgesine tek başına ya da biyoyumlu skafold ile birlikte verilmesini temel alır. Bu tip uygulamalarda amaca en uygun hücre tipini belirlemek, değerlendirmeye alınması gereken en önemli faktörlerdendir (33).

Doku mühendisliğinde birçok hücre tipi, EKH, iPKH, tendon kök progenitör hücre (TKPH)'ler ve farklı kaynaklardan (kemik iliği, adipoz doku) elde edilen mezenkimal kök hücreler de dahil olmak üzere, uygun araçlar olarak görülmektedir (76).

EKH'ler hasar veya hastalık durumunda kayba uğrayan herhangi bir hücre tipini yerine koymak için tek başına yeterli olabilecek bir hücre kaynağıdır. Bu yüzden tendon tamiri ve rejenerasyonu da dahil olmak üzere, rejeneratif tıpta kendisine genişçe yer bulmuştur (77). Umut vaat eden bu sonuçlara rağmen, bu terapötik stratejinin tendinopati gibi kronik tendon yaralanmalarında kullanılabilirliğine dair daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH), erişkin hücrelere, hücreyi pluripotent kök hücreye dönüştürmeye yarayacak transkripsiyon faktörlerini kodlayan dört spesifik genin konulması ile oluşan pluripotent kök hücrelerdir (69). iPKH'lerden farklılaşan hücrelerin implantasyonu ihmal edilebilir düzeyde immünojeniteye sahiptir (78), bu sebeple de iPKH'ler doku tamiri için cazip bir hücre kaynağı haline gelmiştir. iPKH'lerin tendon tamirinde kök hücre-temelli tedaviler için potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülmesine rağmen uzun dönemli sonuçların değerlendirilmesi ve düzenleyici mekanizmanın ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

MKH'ler tenositler dahil bağ doku hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Kemik iliği, tendon, adipoz doku gibi kaynaklardan elde edilebilirler. Çok sayıda hayvan çalışması ile MKH'lerin kullanıldığı hücre-temelli yaklaşımların tendon tamirini iyileştirebildiği gösterilmiştir (70). Tendon tamiri için gündeme yeni gelmeye başlayan hücre kaynakları periferik kan MKH, umbilikal kord kanı MKH ve periodontal ligament hücreleridir. Allojenik UK-MKH'lerin kendiliğinden oluşmuş süperfisiyal dijital fleksör tendinitinde enjeksiyonun daha yüksek performans, güç ve daha iyi iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir. UK-MKH'lerin kemik tüneli ile tendon grefti arayüzüne verilmesinin kemik-tendon arayüzünde daha iyi histolojik görünüm sağladığı gösterilmiştir (79). Hayvan modellerinde birçok kök hücre tipi etkinliğe

sahip olduğu için, tedavi sonuçlarını değerlendirip karşılaştırmak ve tendon tamiri için en umut vaat eden kök hücre seçeneğini belirlemek için standart tedavi protokolüne ihtiyaç duyulmaktadır.

Birçok kök hücre tipinin tendon iyileşmesini olumlu yönde etkilediğinin gösterilmiş olmasına rağmen güvenlik sorunları ve yan etkiler de bildirilmiştir. KK-MKH'ler ve AK-MKH'lerde gösterildiği gibi, bazı özel durumlarda ektopik kemik oluşumu ve tümör gelişimi görülebilir. Hem EKH'ler hem de iPKH'lerde transplantasyon sonrası teratom gelişmesi riski mevcuttur (80). Dahası, TKPH'ler gibi kök hücrelerin elde edilmesi esnasında, donör bölge morbiditesi söz konusu olabilir. Bu yüzden, TKPH'ler gibi kök hücrelerin klinik uygulama için yeterli sayıda elde edilmesi hususunda zorluklar yaşanmaktadır.

2. 2. 3. Umbilikal kord stromal-kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Umbilikal kordon, yolk sak ve allantoisten gelişen ve gelişmekte olan embriyo/fetüs ile plasenta arasında kanal rolü oynayan bir yapıdır. Bu yapı 50-60 cm uzunluğunda, 1-2 cm kalınlığında, yaklaşık 40 g ağırlığındadır ve içinden iki arter ve bir ven geçer. Aynı zamanda oldukça esnek fakat sağlam bir yapıya ve yarı-şeffaf görünüme sahiptir. Dışı amniyon zarıyla örtülü olan umbilikal kordonun stromasını Wharton peltesi (jölesi) adı verilen, embriyoya özgü bir müköz bağ dokusu oluşturur. İçinden geçen damarlar stroma içine gömülüdür ve kendilerine ait belirgin bir adventisya tabakaları yoktur. Histolojik olarak homojen görünüme sahip olan stromada, farklı bölgelerden elde edilen hücrelerin, çoğalma ve farklılaşma yönünden de farklı karakteristiklere sahip olduklarının anlaşılması üzerine stroma temel olarak üç bölümde incelenmeye başlanmıştır. İlk olarak, subamniyotik stroma, amniyon zarının altında kalan bölgedir ve bol interselüler sıvı ile birlikte az sayıda stroma hücresi, dağınık ve ince kollajen lif demetleri (tip I, tip III ve tip VI kollajen) içerir. Bu alandaki hücreler sınırlı diferansiyasyon ve yüksek proliferasyon kapasitesine sahiptir. İkinci stroma bölgesi intervasküler stromadır ve en geniş stromal bölgedir. Wharton jölesini içeren bu bölgenin hücreleri, uzantılara sahip miyofibroblast benzeri hücrelerdir. Hücreler arasında tip I ve tip III kollajenin oluşturduğu kalın demetleri ve yoğun miktarda GAG'yi içeren interselüler madde mevcuttur. GAG'nin %70'inin hiyalüronik asit olması sebebiyle göbek kordonu fetüste en fazla hiyalüronik asit içeren dokudur. Üçüncü stromal tabaka, damarların etrafında bulunan ve bu bölgedeki hücrelerle

birlikte hücreler arası maddeyi içeren perivasküler stromadır. Buradaki stromal hücreler daha dar ve küçük sitoplazmalarıyla daha sınırlı bir alanda yerleşim gösterirler. Aynı zamanda buradaki stromal hücreler diğer tabakadakilere göre daha yüksek kemik hücrelerine dönüşme kapasitesine sahiptirler.

UK-MKH diğer MKH'lere kıyasla MKH'nin birçok ve hatta daha da ötesinde özelliklere sahip multipotent hücrelerdir. UK-MKH her üç germ yaprağının türevlerine *in vitro* farklılaşabilme yeteneğine ve Kİ-MKH'ye benzer ve hatta ondan daha farklı hücre belirteçlerine sahiptirler (örn, CD117). UK-MKH tip I MHC (temel doku uyumluluğu kompleksi, major histocompatibility complex) molekülleri olan HLA-A, -B ve -C bulundurlarken tip II MHC molekülü olan HLA-DR'yi bulundurmamaları ve dolayısıyla otolog ve allojenik hücre nakillerinde hipoimmünojenik karakter sergilemeleri sebebiyle Kİ-MKH'ye benzer immünfenotip özelliklere sahiptir. UK-MKH EKH'lerin aksine, SCID (severe combined immune deficiency) farelere verildiklerinde teratom oluşumu, sıçan beynine verildiklerinde tümör oluşumu gözlenmez ve karyotiplerini en az 50 pasaj boyunca korurlar. UK-MKH salgıladıkları bazı sitokin ve kemokinler sayesinde antiapoptotik özellik sergilerler; *in vitro* koşullarda tümör hücrelerinin yaşamını durdururlar ve bazı tümör kitlelerini küçültürler (81).

2. 3. KURKUMİN

Kurkumin (diferuloilmetan), yemeklerde kullanılan bir köri baharatı olan turmerik (*Curcuma longa* Linn)'in aktif bileşenlerinden biridir ve ilk defa 1910'da kimyasal olarak karakterize edilmiştir (82). Çin'de ve Güneydoğu Asya'da inflamatuvar durumların tedavisinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (83). Kurkumin sayısız moleküler hedef ile etkileşime girebilen oldukça pleiotropik bir moleküldür (84). Günümüzde kurkuminin antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen özellikleri dahil birçok biyolojik etkisini araştıran çok sayıda çalışma yapılmaktadır (85). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar ve özellikle klinik deneyler kurkuminin, inflamatuvar bağırsak hastalığı, artrit, pankreatit, kronik anterior üveit ve kanserler gibi birçok kronik hastalıkta kullanılabilecek potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini göstermiştir (84). Bazı bildirilerde kurkuminin oksidatif hasarı azaltıp yaşlanmaya bağlı bilişsel fonksiyonlardaki bozulmayı iyileştirdiği bildirilmiştir. Dahası, kurkumin Alzheimer'ın hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar ve beyin iskemisinin

tedavisinde de kullanılabildiği gösterilmiştir (86). Ek olarak, kurkuminin kök hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve yaşlanması üzerine koruyucu etkileri bildirilmiştir (87). Bunun yanısıra, spinal kord yaralanması sonrası iyileşme üzerine kurkumin ve kök hücre tedavisinin sinerjistik etkisini bildiren raporlar mevcuttur (88).

2. 3. 1. Kurkuminin antiinflamatuvar etki mekanizmaları

Kurkumin farmakolojik etkilerini hedefinde olan molekülleri modifiye ederek göstermektedir (84). İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), nükleer faktör kappa B (NF-κB) (89), IL-6, TNF-α ve IL-1β gibi proinflamatuvar, IL-10 ve TGF-β gibi antiinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin regülasyonu yoluyla antiinflamatuvar etki gösterir (90). NF-κB, PPAR-γ ve TLR4-MD2 sinyal yolları gibi inflamasyon-ilişkili sinyal yolları ile etkileşime girmesinin de antiinflamatuvar etki göstermesinde rolü vardır (91, 92).

2. 3. 2. Kurkuminin antioksidan etki mekanizmaları:

Kurkuminin antioksidan etki oluşturan en önemli fonksiyonlarından biri serbest radikalleri yakalayabilmesidir ve bu sayede ROS üretimini engeller (93). Bunun yanı sıra, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, katalaz gibi antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını ve aktivitelerini (94), glutatyon gibi antioksidan bileşenlerin düzeyini artırmak (95) gibi mekanizmalar da antioksidan işlevine katkıda bulunmaktadır.

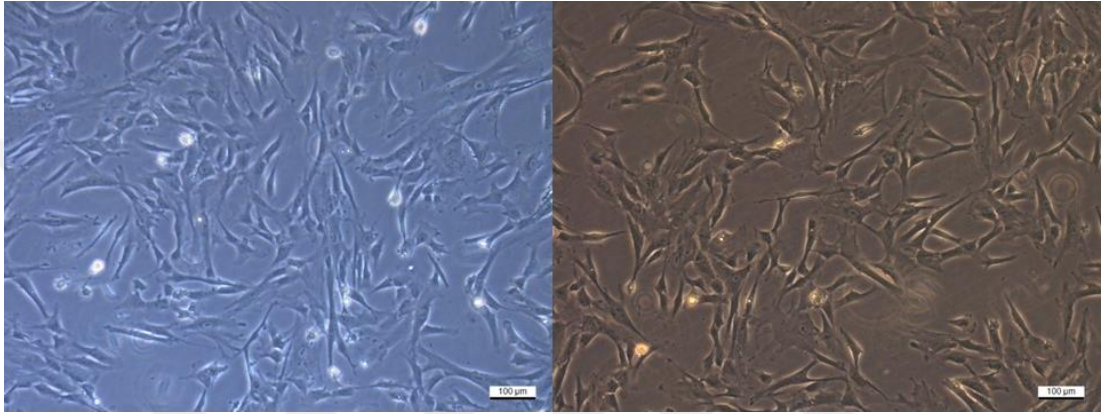
3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın 15/05/2019 tarih ve 19/114 no'lu kararı ile onaylanmış, TTU-2020-9689 no'lu proje kodu ile Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Çalışmanın deneysel aşamaları Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK), Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3. 1. UMBİLİKAL KORD STROMAL-KAYNAKLI KÖK HÜCRELERİN HAZIRLANMASI

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.04.2018 tarih ve 2018/182 numaralı onayı ile kullanılan umbilikal korddan izole edilmiş, immünofloresan boyama ve akım sitometrisi ile karakterizasyonları yapılmış mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Akım sitometride MKH'lerde bulunması gereken pozitif belirteçleri oldukça yüksek oranda ifade ettikleri, negatif belirteçleri ise ifade etmedikleri, immünofloresan boyama ile de adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları gösterilen UK-MKH'ler 2. pasajında, bu çalışmada kullanılmak üzere -196 °C azot tankına konularak muhafaza edilmiştir. Sonrasında bu hücreler kültüre

edilmeye hazır hale getirilerek flasklar içerisinde 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem ihtiva eden karbondioksit inkübatöründe (Sanyo, Gunma, Japonya) inkübe edilmiştir. Kültür ortamına alınan hücrelerin besiyeri 2-3 günde bir değiştirilerek çoğalmaları sağlanmıştır. Çoğalan hücreler %0,05'lik Tripsin-EDTA ile flasktan kaldırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar flasklara ekilerek pasajlama işlemine devam edilmiştir. Hücreler 6. pasaja geldiklerinde yeterli sayı elde edilip kullanılmıştır. Çoğaltılan hücrelerin invert mikroskop altında mezenkimal kök hücre görünüşüne sahip oldukları doğrulanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Altıncı pasajda invert mikroskopta kök hücrelerin görünümü (10x)

3. 2. DENEY PROSEDÜRÜ

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen ağırlıkları 300-350 g arasında olan toplam 80 adet Wistar albino türü erişkin dişi sıçan kullanıldı. Tüm denekler, deney süresince uygun laboratuvar koşulları (22±2 °C, 12 saat aydınlık/karanlık) altında, günlük içme suyu ve pelet yemlerle serbestçe beslenmiştir. Rastgele seçilen hayvanlar 5 gruba ayrıldı;

1. Kontrol grubu (n=16): Her iki bacakta da cilt açılıp Aşil tendonuna ulaşıldı, punch ile pencere şeklinde tendon hasarı oluşturulduktan sonra cilt sütüre edilerek kapatıldı. Grubun yarısı 2. haftada, diğer yarısı ise 4. haftada sakrifiye edildi.

2. Susam yağı grubu (n=16): Her iki bacakta da cilt açılıp Aşil tendonuna ulaşıldı, punch ile pencere şeklinde tendon hasarı oluşturulduktan sonra hasar hattı boyunca tendon içerisine enjeksiyon şeklinde 0,5 dzm susam yağı verildi. Sonrasında cilt sütüre edilerek kapatıldı. Grubun yarısı 2. haftada, diğer yarısı ise 4. haftada sakrifiye edildi.

3. Kurkumin grubu (n=16): Her iki bacakta da cilt açılıp Aşil tendonuna ulaşılarak, punch ile pencere şeklinde tendon hasarı oluşturulduktan sonra hasar hattı boyunca tendon içerisine enjeksiyon şeklinde 0,22 mg/kg dozda olacak şekilde 0,5 dzm susam yağı içinde çözülmüş kurkumin verildi. Sonrasında cilt suture edilerek kapatıldı. Grubun yarısı 2. haftada, diğer yarısı ise 4. haftada sakrifiye edildi.

4. Mezenkimal kök hücre grubu (n=16): Her iki bacakta da cilt açılıp Aşil tendonuna ulaşıldı, punch ile pencere şeklinde tendon hasarı oluşturulduktan sonra tendon içerisine hasar hattı boyunca enjeksiyon şeklinde $6,8 \times 10^5$ /0,1 ml UK-MKH verildi. Sonrasında cilt suture edilerek kapatıldı. Grubun yarısı 2. haftada, diğer yarısı ise 4. haftada sakrifiye edildi.

5. Kurkumin+ mezenkimal kök hücre grubu (n=16): Her iki bacakta da cilt açılıp Aşil tendonuna ulaşıldı, punch ile pencere şeklinde tendon hasarı oluşturulduktan sonra hasar hattı boyunca tendon içerisine enjeksiyon şeklinde $6,8 \times 10^5$ /0,1 ml UK-MKH ve 0,22 mg/kg dozda olacak şekilde 0,5 dzm susam yağı içinde çözülmüş kurkumin verildi. Sonrasında cilt suture edilerek kapatıldı. Grubun yarısı 2. haftada, diğer yarısı ise 4. haftada sakrifiye edildi.

Çalışmada kurkumin olarak “Curcumin for synthesis, Merck-Millipore, M820354.0010” kullanıldı. Susam yağı olarak “Karden-Susam yağı” kullanıldı.

Tüm gruplarda sakrifikasyon sonrası Aşil tendonları çıkarıldı. Sol Aşil tendonları histopatolojik ve immünokimyasal değerlendirme için kullanılırken sağ Aşil tendonları biyomekanik analiz için kullanıldı.

3. 2. 1. Cerrahi yöntem

Cerrahi işlemler için sıçanlar ketamin (50 mg/kg) ve ksilazinin (5 mg/kg) intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi altına alındı. Tüm denekler aynı cerrah tarafından opere edildi. Sıçanların sağ kruris posteriorundaki tüyleri tıraş edildi. Alt ekstremiteler betadine solüsyonu ile silinerek aseptik cerrahi koşullar sağlandı. Bacak posteriorundan longitudinal standart 2 cm’lik insizyon ile girilerek cilt ve cilt altı geçildi. Aşil tendonuna ulaşılarak paratenon açıldı ve tendon açığa çıkarıldı. Aşil tendonu ve plantaris tendonları çevre yumuşak dokulardan sıyrıldı. Aşil tendonunun altına silastik bir tabaka yerleştirilerek tendonda 1mm genişlikte pencere açacak

şekilde bu çalışma için özel olarak imal edilmiş olan “punch” ile dairesel defektler oluşturuldu (Şekil 6). Gruplara göre tendon hasarı bölgesindeki işlemler tamamlandıktan sonra tek kat olarak 5/0 sentetik, emilmeyen, monoflaman sütüleri kullanılarak ve devamlı dikiş tekniğiyle deri dikişleri konularak yara kapatıldı. Postoperatif dönemde sıçanlara immobilizasyon yöntemi uygulanmadı.



Şekil 6. Sıçan bacağında Aşil tendonunun eksplorasyonu, punch ile pencere defekt oluşturulması ve özel olarak yapılmış punch'ın yakından görünümü

3. 2. 2. Histolojik değerlendirme

3. 2. 2. 1. Doku takibi

Deney hayvanlarında çıkarılan Aşil tendonları çevre dokulardan temizlenecek şekilde düzgün bir biçimde trimlenerek %4'lük formaldehit solüsyonunda 15 gün süre ile

tespit edildi. %4'lük formaldehit ile tespit edilen doku örnekler akan suyun altında 1-2 saat süre ile yıkandı. Rutin histolojik doku takibi için uygulanan aşamalar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Doku hazırlama metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%4 Formaldehit	72 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	1 gece	9	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	13	Eriyik parafin (60°C)	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

Buzlukta yeterince sertleşen parafin bloklardan Leica® (RM 2125 RT, Nussloch, Almanya) marka mikrotom cihazı ve Leica® (RM 2125 RT, Nussloch, Almanya) marka mikrotom bıçakları kullanılarak 4-5 µm kalınlığında parafin kesitler alındı. Alınan kesitlerde histopatolojik değerlendirme için Masson trikrom ve alsiyan mavisi-PAS boyama metodları uygulandı.

3. 2. 2. 2. Histopatolojik değerlendirme

Masson trikrom ve alsiyan mavisi-PAS boyamaları ile boyanan kesitlerde histopatolojik değerlendirme için hücre morfolojisi, selülarite, kollajen lif dizilimi, vaskülarite ve ara madde varlığının skorlandığı Bonar skorlaması kullanıldı (96). Değerlendirilen parametrelere 0-3 arasında puan verildi.

Tablo 2. Modifiye Bonar skorlaması				
	0	1	2	3
Hücre morfolojisi	Işık mikroskopide belirgin olmayan elonge, iğsi şekilli nükleus ile birlikte belirgin olmayan sitoplazma	Artmış dairesellik; nükleuslar daha oval-yuvarlak şekilli, bariz sitoplazma	Artmış dairesellik ve boyutlar; nükleus yuvarlak, hafifçe büyük, az miktarda sitoplazma görülebilir	Büyük ve yuvarlak nükleus ile birlikte bol miktarda sitoplazma ve laküna formasyonu (kondroid değişiklik)
Kollajen dizilimi	Sıkıca yapışmış ve iyi sınırlanmış lif demetleri halinde organize olmuş kollajen	Birbirinden ayrılmış bağımsız lif demetleri ile birlikte genel anlamda bozulmamış demet yapısı	Lif demetlerinde değişiklikler; lif demetlerinin ayrılması ve sınırlarının kaybolması	Lif demetlerinin belirgin olarak ayrılması ve bütünüyle bozulmuş yapı
Selülarite	Birbirinden ayrı duran hücreler	Hiperselüler ^a , artmakta olan ve/veya artmış hücre sayısı	Hiposelüler ^a alanlarla birlikte hiperselüler alanlar	Değerlendirilen alan çoğunlukla aselüler
Vaskülarite	Demetler arasında belli belirsiz kan damarları	10 yüksek güç alanında 1 damar kümesi	10 yüksek güç alanında 2-3 damar kümesi	10 yüksek güç alanında 4 veya daha fazla damar kümesi ve/veya patolojik avasküler alanlar
Ara madde	Boyanabilir ara madde yok	Demetler arasında boyanabilir müsin mevcut ama hala birbirlerinden ayrı	Boyanabilir müsin ile birlikte sınırları ortadan kalkmış demetler	Bol miktarda müsin ile birlikte net seçilemeyen kollajen boyanması
^a Hiperselüler: alan başına <20 nükleus; hiperselüler: alan başına >30 nükleus. Kalsifikasyon veya intratendinöz adipositlerin varlığında +2,5 puan eklenir. En çok patoloji sergileyen tendon toplamda 20, görülebilir patoloji sergilemeyen tendon toplamda 0 olarak puanlanır.				

3. 2. 2. 3. Masson trikrom boyama (MT)

Beş µm kalınlığında alınan parafin kesitler kasetlerde deparafinizasyon işlemi için 67°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra ertesi gün direkt olarak ksilene alındı ve Masson trikrom boyama yöntemi uygulandı (Tablo 3). Masson trikrom boyama metodu uygulanan tüm preparatlar DP70 dijital kameralı Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus Corp. Tokyo, Japonya) altında incelendi ve histopatolojik değişiklikler ve Bonar skorlama kriterlerinden olan hücre morfolojisi, selülarite, kollajen lif dizilimi ve vaskülariteyi değerlendirmek için mikroskobik fotoğraflar alındı.

Tablo 3. Masson trikrom boyama tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (67 °C)	1 saat	16	Distile Su	5 dakika
2	Ksilen I	10 dakika	17	Fosfomolibdik asit	5 dakika
3	Ksilen II	10 dakika	18	Anilin blue	2-5 dakika
4	Ksilen III	10 dakika	19	Distile Su	5 dakika
5	Absolü Alkol I	5 dakika	20	%1'lik asetik asit	2 dakika
6	Absolü Alkol II	5 dakika	21	Distile Su	5 dakika
7	%96 Alkol	5 dakika	22	%50 Alkol	2 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika	23	%70 Alkol	2 dakika
9	%50 Alkol	5 dakika	24	%96 Alkol	2 dakika
10	Akarsu	2 dakika	25	Absolü Alkol I	10 dakika
11	Hematoksilen	5-8 dakika	26	Absolü Alkol II	10 dakika
12	Akarsu	5 dakika	27	Ksilen I	20 dakika
13	Asit alkol	30 saniye	28	Ksilen II	20 dakika
14	Akarsu	5 dakika	29	Ksilen III	20 dakika
15	Asit fuksin	1-2 dakika	30	Kapatma	

3. 2. 2. 4. Alsiyan mavisi - PAS boyama

Beş µm kalınlığında alınan parafin kesitler kasetlerde deparafinizasyon işlemi için 67°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra ertesi gün direkt olarak ksilene alındı ve alsiyan mavisi-PAS boyama yöntemi uygulandı (Tablo 4). Alsiyan mavisi-PAS boyama metodu uygulanan tüm preparatlar DP70 dijital kameralı Olympus BX51 ışık mikroskobu (Olympus Corp. Tokyo, Japonya) altında incelendi ve histopatolojik değişiklikleri ve Bonar skorlama kriterlerinden olan ara madde varlığını değerlendirmek için mikroskopik fotoğraflar alındı.

Tablo 4. Alsiyan mavisi - PAS boyama tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (67 °C)	1 saat	16	Distile su ile yıkama	
2	Ksilen I	10 dakika	17	Schiff's reagent	15 dakika
3	Ksilen II	10 dakika	18	Akarsu	2-5 dakika
4	Ksilen III	10 dakika	19	Distile su ile yıkama	5 dakika
5	Absolü Alkol I	5 dakika	20	Hematoksilen	5-8 dakika
6	Absolü Alkol II	5 dakika	21	Akarsu	5 dakika
7	%96 Alkol	5 dakika	22	%50 Alkol	2 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika	23	%70 Alkol	2 dakika
9	%50 Alkol	5 dakika	24	%96 Alkol	2 dakika
10	Akarsu	2 dakika	25	Absolü Alkol I	10 dakika
11	Alsiyan mavisi	45 dakika	26	Absolü Alkol II	10 dakika
12	Akarsu	5 dakika	27	Ksilen I	20 dakika
13	Distile su ile yıkama		28	Ksilen II	20 dakika
14	Periyodik asit	5 dakika	29	Ksilen III	20 dakika
15	Akarsu	5 dakika	30	Kapatma	

3. 2. 2. 5. İmmünohistokimyasal analizler

Deneydeki tüm sıçanlara ait tendon dokularında tendonun sağlıklı haline ne kadar dönebildiğini göstermek için tenomodülün (tnmd), kollajen içeriğindeki değişimi göstermek için ise tip I ve tip III kollajen molekülleri kullanıldı. Tenomodülün

“Tenomodulin Polyclonal Antibody, Bioss, bs-7525R”, tip I kollajen “Anti-Collagen I/COL1A1 Antibody, BosterBio, PA2140-2”, tip III kollajen ise “Anti-Collagen III antibody, Abcam, ab7778” poliklonal antikorlarının kullanıldığı avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal olarak gösterildi. İmalatçı firmaların talimatlarına uyularak kesitlerin dilüsyon oranları belirlendi ve aşağıdaki protokol uygulandı (Tablo 5).

Işık mikroskobu için parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler polilizinli lamlara alındı ve 3-4 saat boyunca 67⁰C’lik etüvde bekletildi. Lamlar deparafinizasyon işlemini tamamlamak için etüvden direkt olarak ksilen dolu şalelere alındı.

Tablo 5. İmmünohistokimya boyama tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	18	PBS	3x5 dakika
2	Ksilen I	5 dakika	19	Streptavidin Peroksidaz	15 dakika
3	Ksilen II	5 dakika	20	PBS	3x5 dakika
4	Ksilen III	5 dakika	21	DAB kromojen	1-10 dakika
5	Absolü Alkol	5 dakika	22	Distile su	Yıkama
6	%96 Alkol	5 dakika	23	Hematoksilen	1-5 dakika
7	%80 Alkol	5 dakika	24	Musluk suyu	5 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika	25	Distile su	Yıkama
9	Distile Su	3 kez yıka	26	%70 Alkol	5 dakika
10	%3 Sitrat Buffer	5 dakika	27	%80 Alkol	5 dakika
11	PBS	2x5 dakika	28	%96 Alkol	5 dakika
12	%3 H ₂ O ₂	10 dakika	29	Absolü Alkol	5 dakika
13	PBS	3x5 dakika	30	Ksilen I	5 dakika
14	Normal Serum	5-10 dakika	31	Ksilen II	5 dakika
15	Primer Antikor	2 saat Etüv(67°C)	32	Ksilen III	5 dakika
16	PBS	3x5 dakika	33	Kapatma	
17	Sekonder	15 dakika			

Bütün immünohistokimyasal boyama protokolleri aynı yöntemle yapılmış olup primer antikor dilüsyon oranları tenomodülün için 1:300, tip I kollajen için 0,5:1000, tip III kollajen için 1:100 olarak uygulandı. Sekonder antikor olarak kiti olarak “Lab Vision™ UltraVision™ Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use), Thermo, TL-125-HL” imalatçı firmaların talimatlarına uygun şekilde kullanıldı. DAB kromojen olarak “Ultravision Detection System, Large Volume DAB substrate system (RTU), Thermo, TA-125-HD” kullanıldı.

İmmünohistokimyasal boyama metodu uygulanan tüm preparatlar ışık mikroskobu altında incelendi. Her üç molekül için Image J programı kullanılarak elde edilen mikroskobik fotoğraflardan immünoreaktivite yoğunluğu hesaplandı. İmmünohistokimyasal analizler sonucunda kaydedilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3. 2. 3. Biyomekanik değerlendirme

Biyomekanik değerlendirme sıçanların sakrifikasyonu ile aynı gün içerisinde yapıldı. Sakrifikasyon sonrasında sağ Aşil tendon bölgesi bacak arka yüzünde yaklaşık 3 cm boyunda deri insizyonları yapılarak tendon, gastroknemius ve soleus kaslarının distalleri ve kalkaneus kemiğindeki tendon insersiyosu ile birlikte çıkarıldı. Tendonlar, nemli kalmalarını sağlayacak kadar serum fizyolojik içerisinde muhafaza edildi. Aşil tendonlarının çapları tendon onarım dijital kumpas (Mitotuyo®, Japonya) ile ölçüldü ve tendon kesitinin kabaca daire olduğu kabul edilerek (97) tendon kesit alanı mm^2 cinsinden hesaplandı. Tendonların biyomekanik testleri Instron® marka tensometre cihazı kullanılarak elde edildi. Tendonların proksimal devamlılığındaki kaslar iki zımpara yaprağı arasına yerleştirilip, distaldeki kalkaneal kemik parçası ile devamlılığı korunan distal ucu ise bir akciğer klempisi ile tutulduktan sonra tensometrenin alt ve üst çenelerine tespit edilerek çekme testine tabi tutuldu (Şekil 7). Çeneler 10 mm/dk sabit hızla ve 1 N/kg yük ile birbirinden uzaklaştırılarak ölçümler gerçekleştirildi; “Instron Series IX Automated Material Testing System Version 5.33” programı kullanılarak tendonların kopmadan önce gösterdikleri maksimum direnç Newton olarak kaydedildi.



Şekil 7. Biyomekanik testlerin yapıldığı tensometre cihazının görünümü, cihaza tespit edilen tendon ve kopmak üzere olan tendonun yakından görünümü

3. 2. 4. İstatistiksel değerlendirme

İstatistik değerlendirmeleri bilgisayar ortamında TURCOSA istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Gruplara ait değişkenlerin dağılımının öncelikle ‘normal’ olup olmadıkları test edildi; normal dağılımlar doğrulandıktan sonra gruplar arası karşılaştırmalar ANOVA testi ile yapıldı. ANOVA testi ile gruplar arası farklılık tespit edildiğinde hangi gruplar arasında fark olduğunun anlaşılması için Tukey testi yapıldı. Her bir grubun kendi içinde 2. ve 4. hafta değerlerinin karşılaştırılmasında Student t testi kullanıldı. Ayrıca değişkenlerin birbiri ile ilişkisinin olup olmadığını görmek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. ‘p’ değerinin 0,05 veya küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma süresince Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre Grubundan bir hayvan ölmüştür. Bu hayvanın eksikliği değişkenlerin gruplar arası istatistiksel analizini etkilemeyeceğinden ölen hayvan yerine konulmamıştır. Deney sırasında hayvanların cerrahi işlem bölgelerinde enfeksiyon veya yara açılması gözlenmedi. Hayvanlarda beslenme güçlüğü veya kilo kaybına rastlanmadı.

Bütün gruplara ait değişkenlerin 2. hafta ve 4. hafta ortalama değerleri ile bu değerlerin gruplar arasında ve 2. hafta ve 4. hafta ortalama değerlerinin grup içinde istatistiksel karşılaştırma sonuçları Tablo 6-8' de topluca gösterilmiştir.

İstatistiksel analize göre 2. hafta değişkenlerinden tip III kollajen boyanma yoğunluğu, tenomodülün boyanma yoğunluğu ve Bonar skoru açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0,05$) (Tablo 6).

Dördüncü hafta değişkenlerine göre tip I kollajen boyanma yoğunluğu, tip III kollajen boyanma yoğunluğu, tenomodülün boyanma yoğunluğu ve gerilme gücü bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir ($p<0,05$) (Tablo 7).

Tablo 6. Gruplarda 2. Hafta Ortalama değerleri (± SD)						
	Kontrol	Susam Yağı	Kurkumin	Mezenkimal Kök Hücre	Kurkumin + Mezenkimal Kök Hücre	p ANOVA
Bonar Skoru	11,50 ± 1,51	11,00 ± 1,16	9,75 * ± 0,46	9,75 * ± 1,38	8,42 *# ± 1,13	<0,001
Tip I Kollajen Boyanma Yoğunluğu	185,33 ± 15,32	182,90 ± 7,25	177,02 ± 8,94	174,15 ± 15,88	169,87 ± 6,65	0,086
Tip III Kollajen Boyanma Yoğunluğu	139,55 ± 9,93	149,92 ± 12,21	166,96 * ± 12,14	156,25 ± 13,08	147,50 \$ ± 14,19	0,006
Tenomodülin Boyanma Yoğunluğu	171,73 ± 19,18	147,63 * ± 12,45	176,84 # ± 8,19	150,41 \$ ± 22,36	164,67 ± 8,29	0,002
Gerilme Gücü (N/mm ²)	27,68 ± 15,45	41,37 ± 10,24	28,96 ± 16,01	38,66 ± 11,54	51,40 ± 24,28	0,057
P<0,05 (Post Hoc Tukey Testi) * Kontrol grubuna göre # Susam Yağı grubuna göre \$ Kurkumin grubuna göre						

Tablo 7. Gruplarda 4. Hafta Ortalama değerleri (± SD)						
	Kontrol	Susam Yağı	Kurkumin	Mezenkimal Kök Hücre	Kurkumin + Mezenkimal Kök Hücre	p ANOVA
Bonar Skoru	6,53 ± 3,02	8,50 ± 0,92	8,43 ± 1,80	8,18 ± 2,35	6,37 ± 1,59	0,102
Tip I Kollajen Boyanma Yoğunluğu	174,04 ± 4,79	165,02 ± 12,11	156,50 * ± 10,79	158,50 ± 8,71	157,20 * ± 15,83	0,019
Tip III Kollajen Boyanma Yoğunluğu	152,20 ± 14,56	163,28 ± 8,94	177,54 * ± 23,13	170,66 ± 8,18	164,95 ± 10,32	0,021
Tenomodülin Boyanma Yoğunluğu	146,88 ± 15,54	146,36 ± 146,36	171,04 *# ± 7,28	170,30 *# ± 12,47	163,60 ± 12,77	<0,001
Gerilme Gücü (N/mm ²)	55,36 ± 19,02	58,17 ± 21,59	70,10 ± 19,77	103,70 *# ± 43,33	104,17 *# ± 17,77	<0,001
P<0,05 (Post Hoc Tukey Testi) * Kontrol grubuna göre # Susam Yağı grubuna göre						

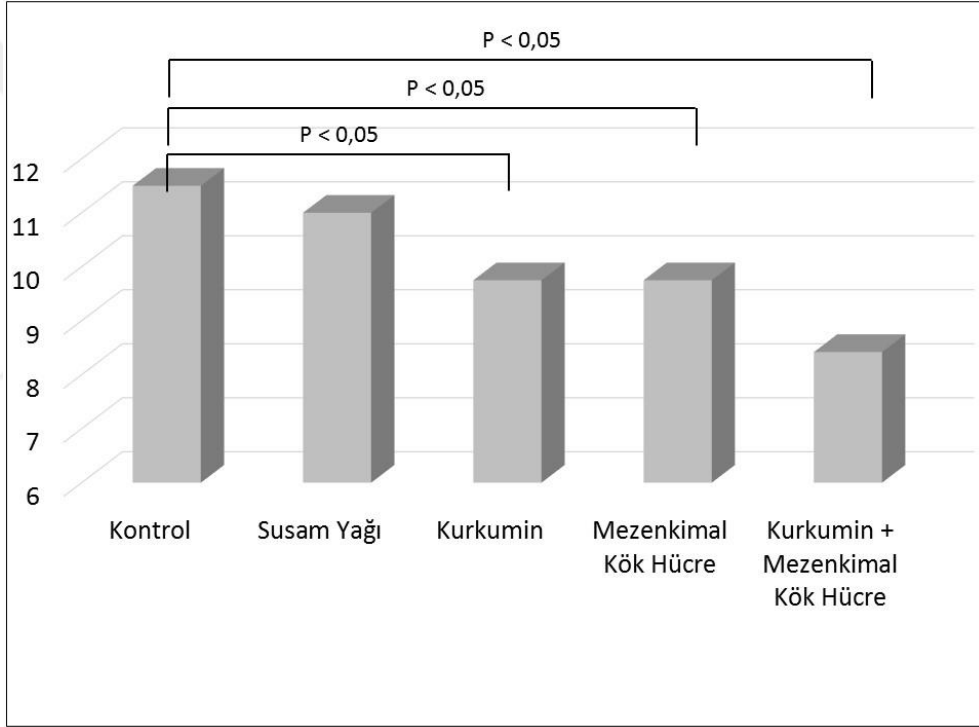
Değişkenlerin, grup içindeki 2. hafta ve 4. hafta değerleri karşılaştırıldığında Bonar skoru için Kontrol, Susam Yağı, ve Kurkumin +Mezenkimal Kök Hücre gruplarında; tip I kollajen boyanma yoğunluğu için Susam Yağı, Kurkumin, Mezenkimal Kök

Hücre gruplarında; tip III kollajen boyanma yoğunluğu için Susam Yağı, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında ve gerilme gücü için Kontrol, Kurkumin, Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 8).

Tablo 8. Gruplarda 2. ve 4. hafta ortalama değerleri (\pm SD) ve, 2. ve 4. hafta değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması (Student t testi)						
		Kontrol	Susam Yağı	Kurkumin	Mezenkimal Kök Hücre	Kurkumin + Mezenkimal Kök Hücre
Bonar Skoru	2. Hafta	11,50 \pm 1,51	11,00 \pm 1,16	9,75 \pm 0,46	9,75 \pm 1,38	8,42 \pm 1,13
	4. Hafta	6,53 \pm 3,02	8,50 \pm 0,92	8,43 \pm 1,80	8,18 \pm 2,35	6,37 \pm 1,59
	p	<0,001	<0,001	0,066	0,129	0,014
Tip I Kollajen Boyanma Yoğunluğu	2. Hafta	185,33 \pm 15,32	182,90 \pm 7,25	177,02 \pm 8,94	174,15 \pm 15,88	169,87 \pm 6,65
	4. Hafta	174,04 \pm 4,79	165,02 \pm 12,11	156,50 \pm 10,79	158,50 \pm 8,71	157,20 \pm 15,83
	p	0,067	0,003	0,002	0,028	0,071
Tip III Kollajen Boyanma Yoğunluğu	2. Hafta	139,55 \pm 9,93	149,92 \pm 12,21	166,96 \pm 12,14	156,25 \pm 13,08	147,50 \pm 14,19
	4. Hafta	152,20 \pm 14,56	163,28 \pm 8,94	177,54 \pm 23,13	170,66 \pm 8,18	164,95 \pm 10,32
	p	0,075	0,026	0,337	0,026	0,019
Tenomodülin Boyanma Yoğunluğu	2. Hafta	171,73 \pm 19,18	147,63 \pm 12,45	176,84 \pm 8,19	150,41 \pm 22,36	164,67 \pm 8,29
	4. Hafta	146,88 \pm 15,54	146,36 \pm 146,36	171,04 \pm 7,28	170,30 \pm 12,47	163,60 \pm 12,77
	p	0,013	0,845	0,174	0,045	0,862
Gerilme Gücü (N/mm ²)	2. Hafta	27,68 \pm 15,45	41,37 \pm 10,24	28,96 \pm 16,01	38,66 \pm 11,54	51,40 \pm 24,28
	4. Hafta	55,36 \pm 19,02	58,17 \pm 21,59	70,10 \pm 19,77	103,70 \pm 43,33	104,17 \pm 17,77
	p	0,011	0,083	<0,001	0,002	<0,001

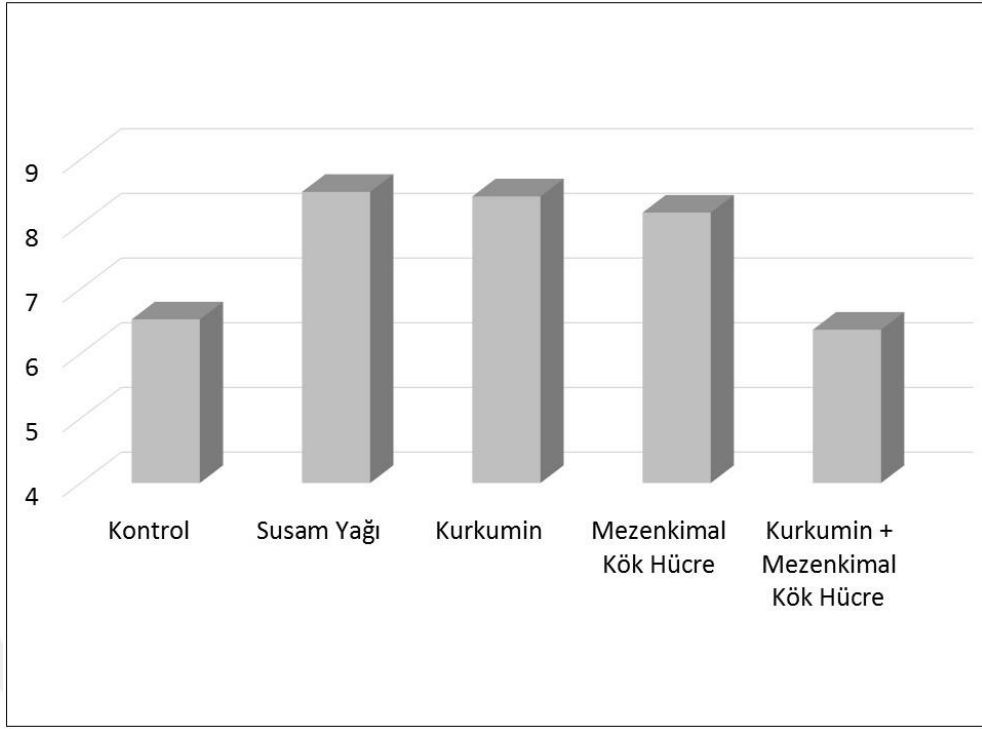
4. 1. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Işık mikroskobu ile değerlendirilen Masson trikrom ve alsiyan mavisi-PAS boyalı tendon kesitlerinin Bonar skoru 2. haftada Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel şekilde anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$). Susam yağı grubunun Bonar skoru Kontrol grubundan farksız iken Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre grubunda Susam Yağı grubuna göre de azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 8).



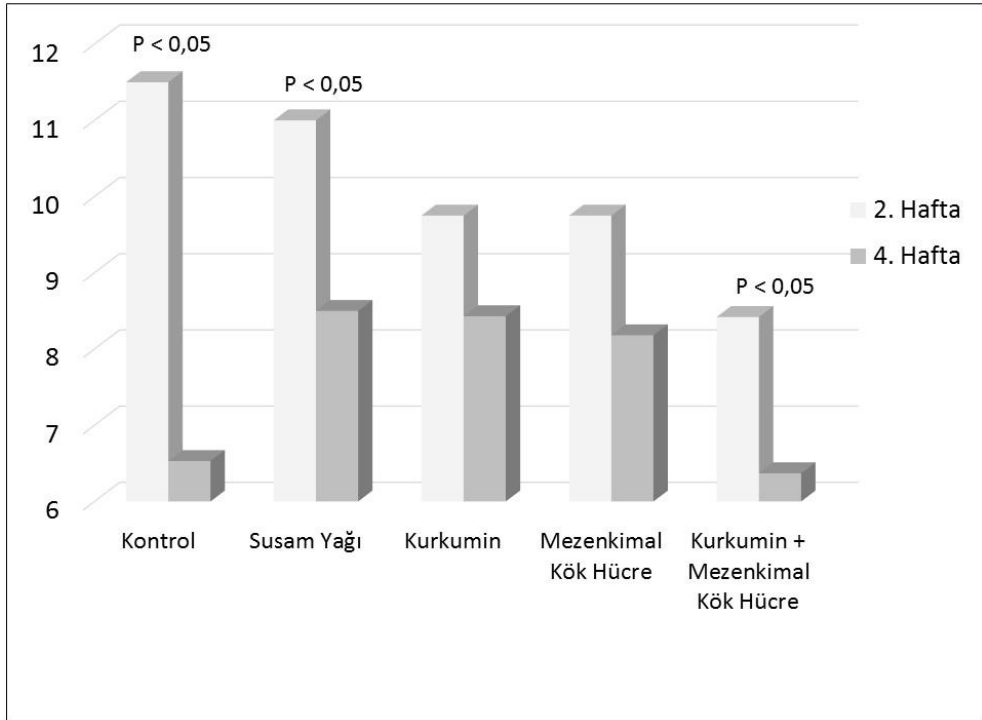
Şekil 8. Gruplarda 2. hafta Bonar skorları

Dördüncü haftada ise Bonar skorları açısından gruplar arasında fark belirlenememiştir. (Şekil 9).



Şekil 9. Gruplarda 4. hafta Bonar skorları

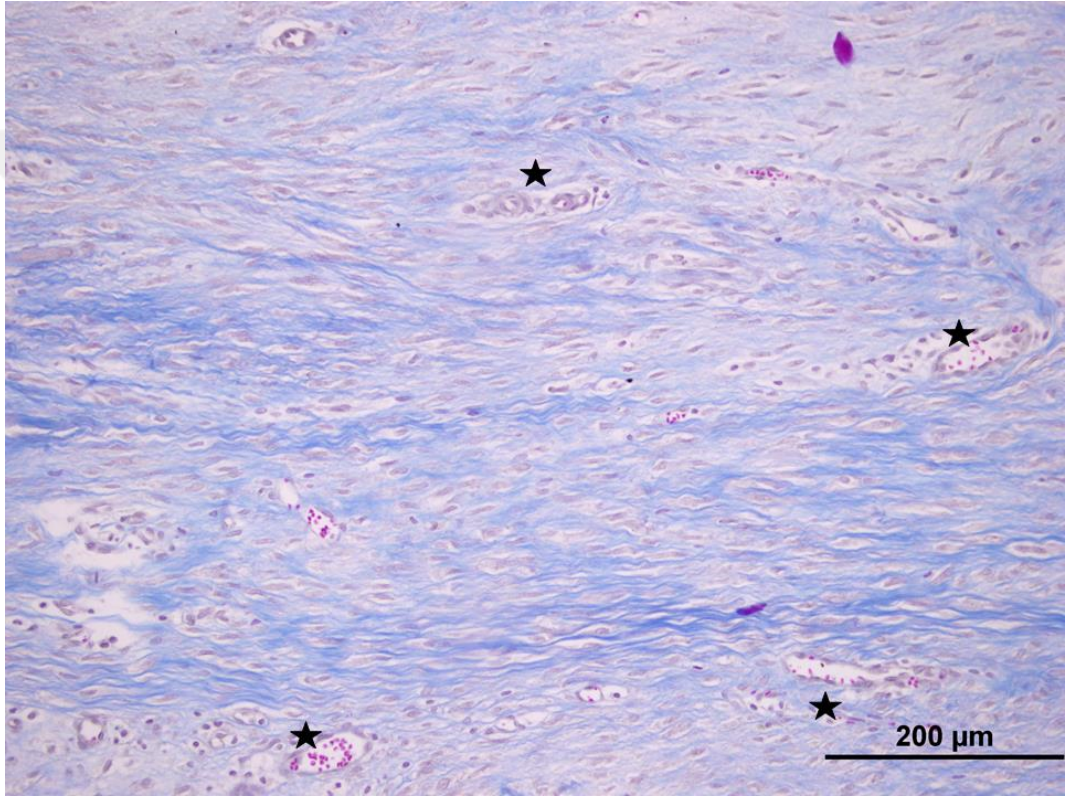
Grupların 2. ve 4. hafta Bonar skorları grupların kendi içinde karşılaştırıldığında Kontrol, Susam Yağı ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 10).



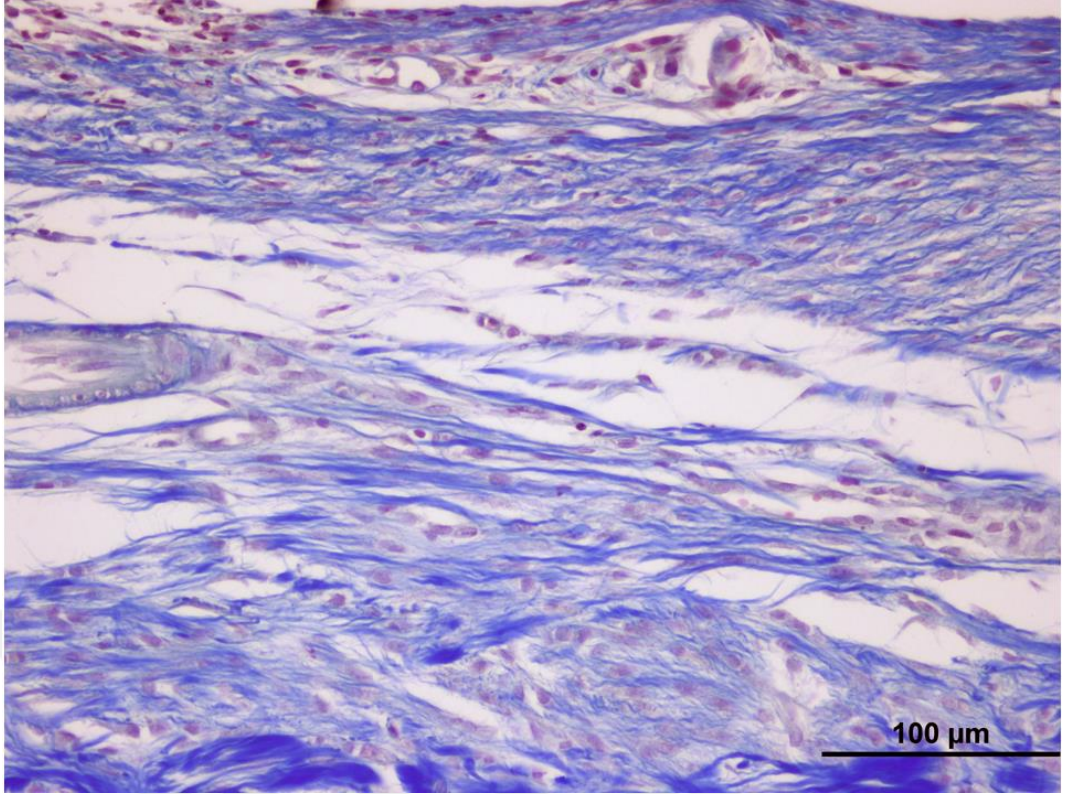
Şekil 10. Gruplarda 2. ve 4 hafta Bonar skorları

Tüm gruplar göz önünde bulundurulduğunda, kötü iyileşmeye işaret eden ve ek skorlama gerektiren kalsifikasyon ve intratendinöz adipozitlerin varlığına en sık Kontrol ve Susam Yağı gruplarında rastlanmıştır.

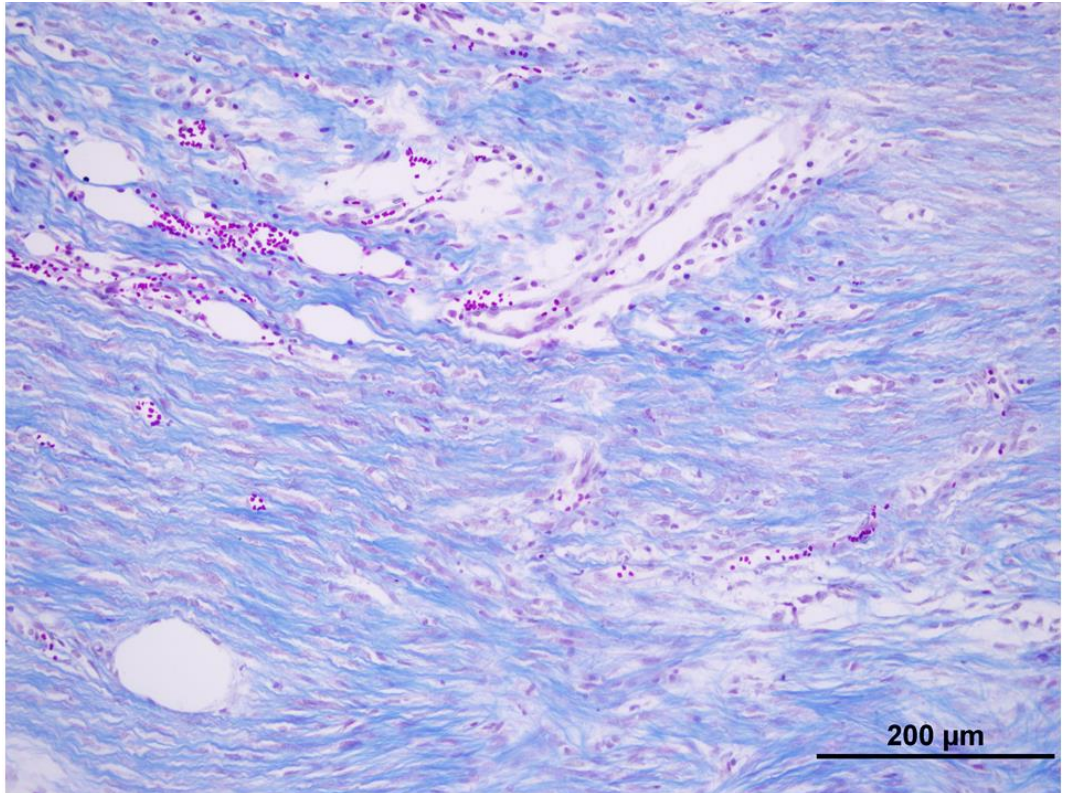
Histopatolojik değerlendirmelerin gerçekleştirildiği mikroskop görüntü örnekleri Şekil 11-19 arasında verilmiştir.



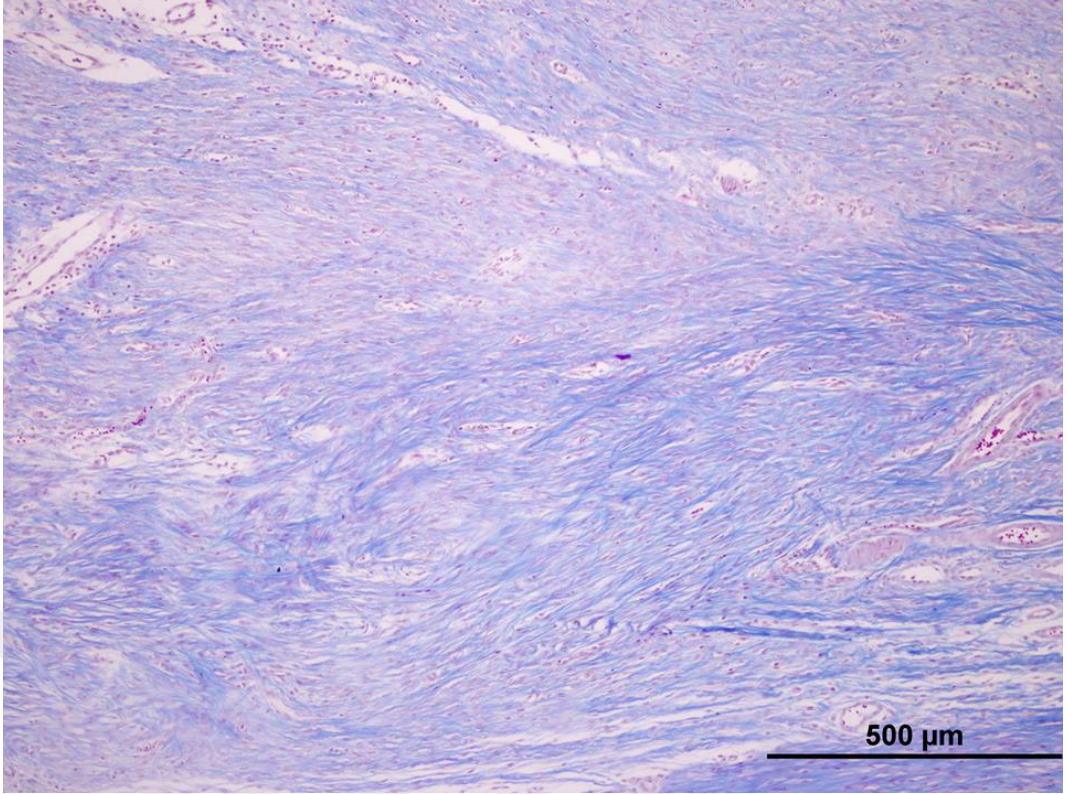
Şekil 11. Kontrol-2. hafta grubunun 4. hayvanında kollajen lif demetlerinde sınırı kaybı ve liflerin ayrışması, vaskülaritede artış (★ = damarlar). MT boyama, 20x



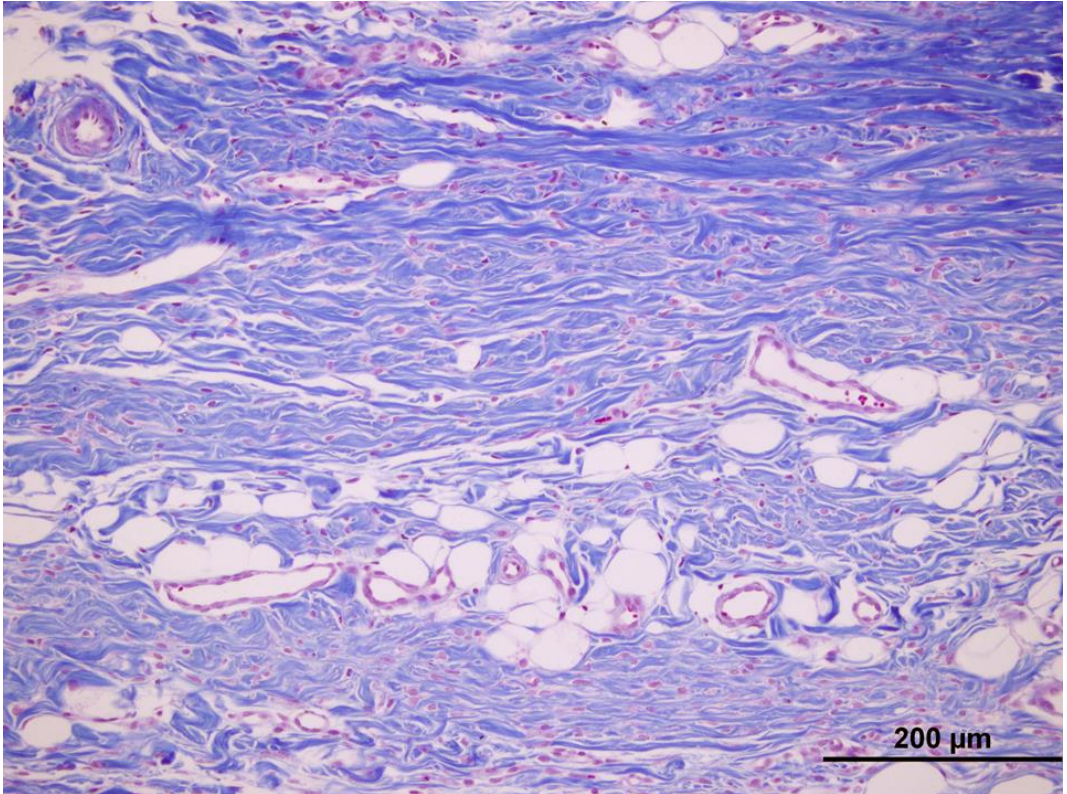
Şekil 12. Kontrol-2. hafta grubunun 8. hayvanına ait kesitte kollajen liflerde ayrılma.
MT boyama 40x



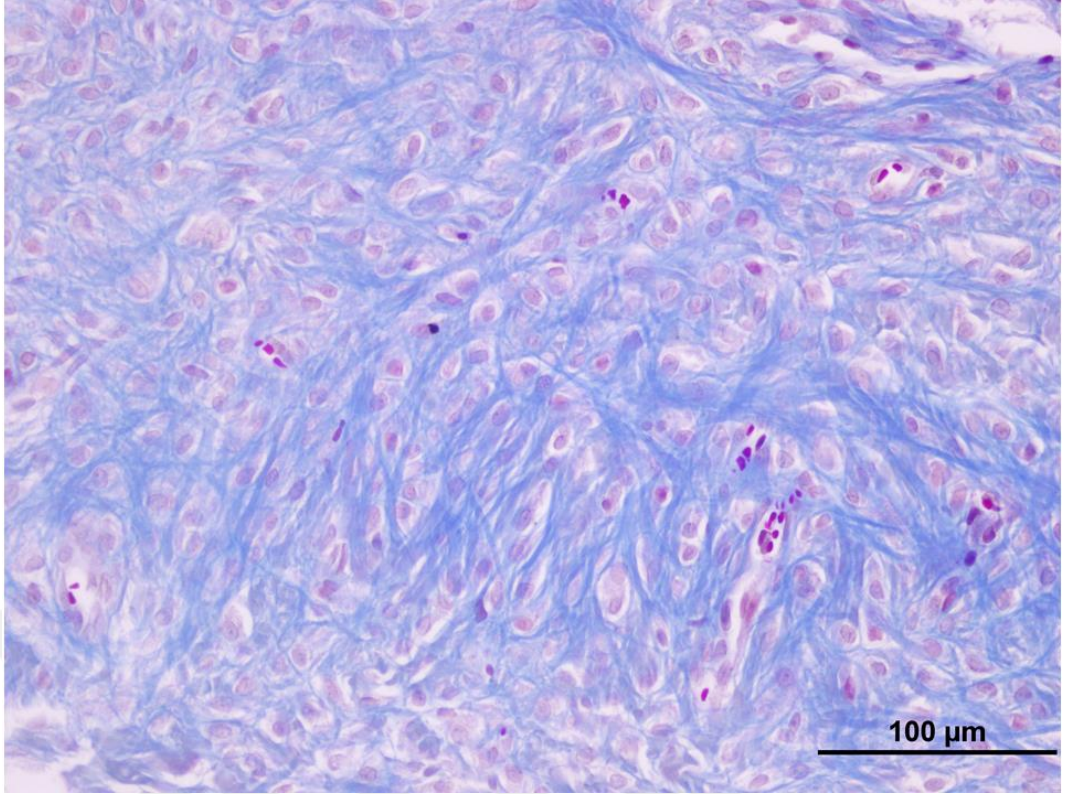
Şekil 13. Susam yağı-2. hafta grubunun 2. hayvanına ait kesitte sayıca artmış
kapillerlerin oluşturduğu kümeler. MT boyama, 20x



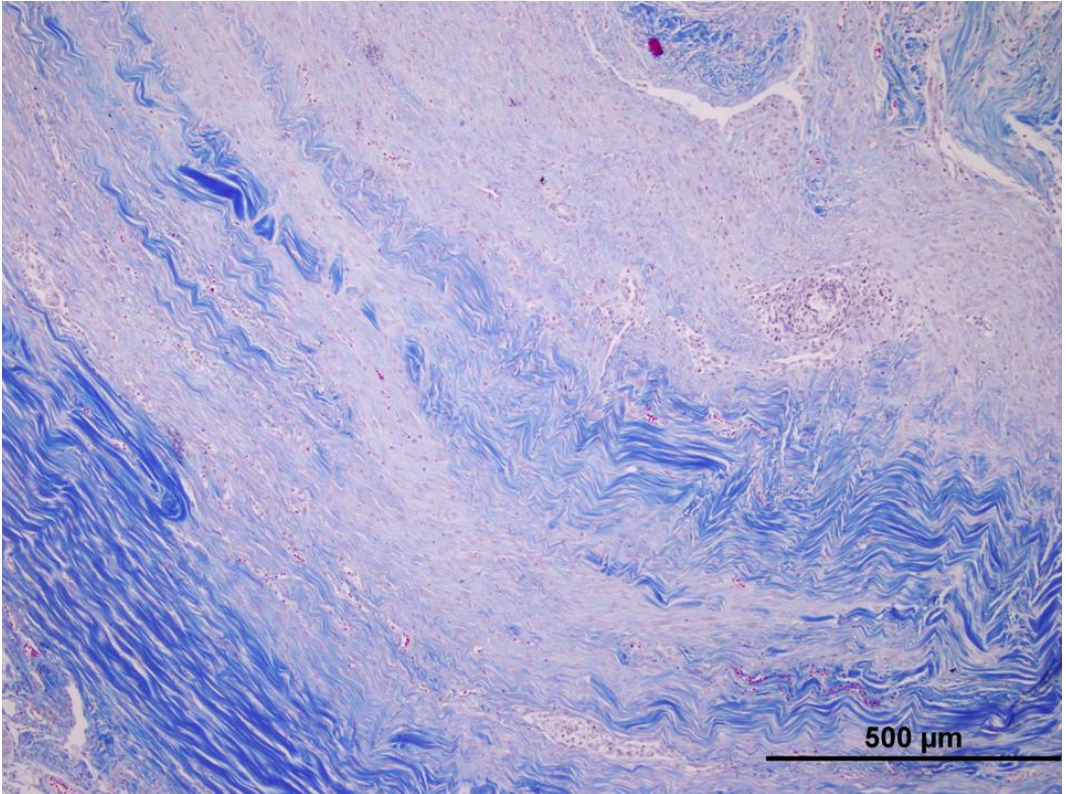
Şekil 14. Susam yağı-2. hafta grubunun 2. hayvanına ait kesitte kollajen dizilimindeki bozulma ve vaskülaritede artış. MT boyama, 10x



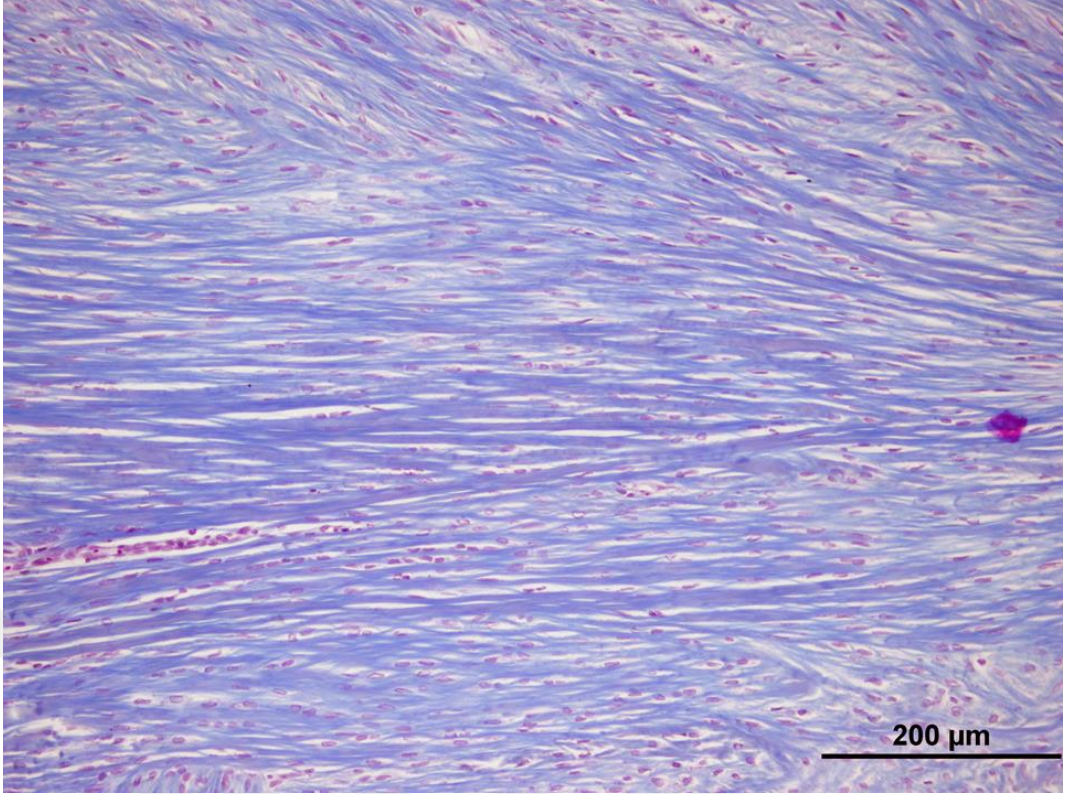
Şekil 15. Susam yağı-2. hafta grubunun 1. hayvanına ait kesitte intratendinöz adipositler ve vaskülaritede artış



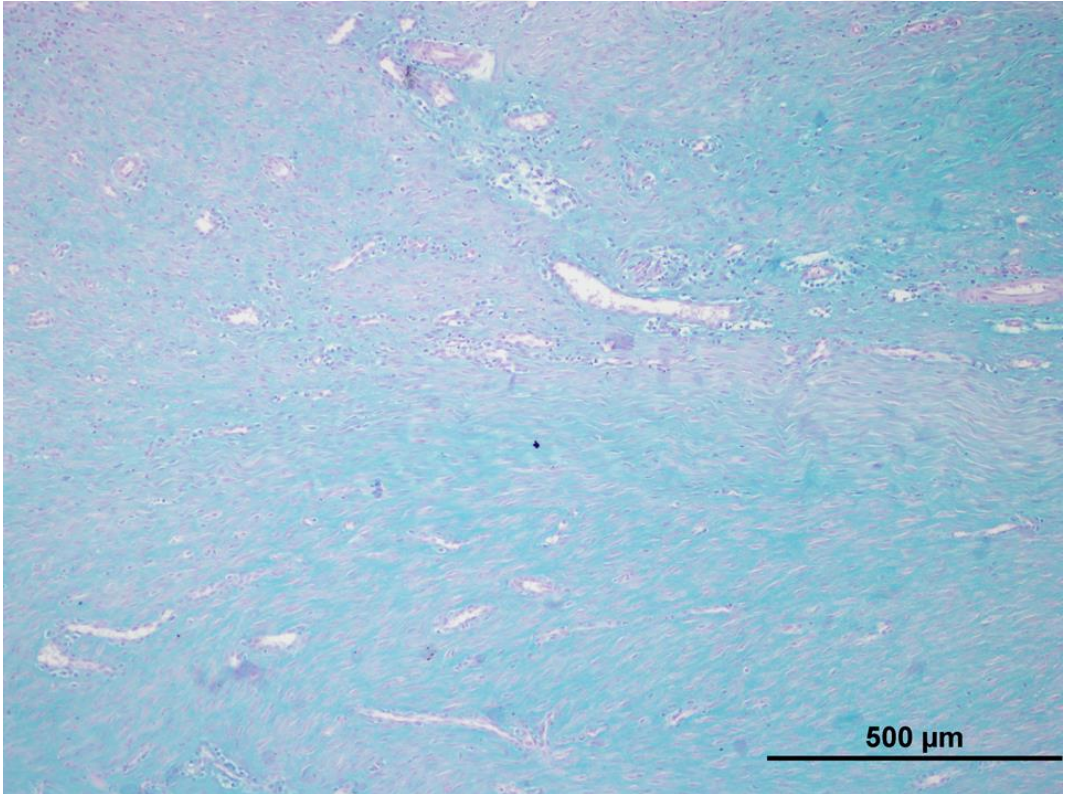
Şekil 16. Susam yağı-2. hafta grubunda 3. hayvana ait kesitte hücre çekirdeklerinde yuvarlaklaşma. MT boyama, 40x



Şekil 17. Kurkumin-2. hafta grubunun 4. hayvanına ait kesitte kollajen lif diziliminde bozulma ve hiperselülarite. MT boyama, 10x



Şekil 18. Kurkumin-4. hafta grubunun 1. hayvanına ait kesitte dizilimi kuvvete paralel olmaya başlayan kollajen lifler. MT boyama, 20x

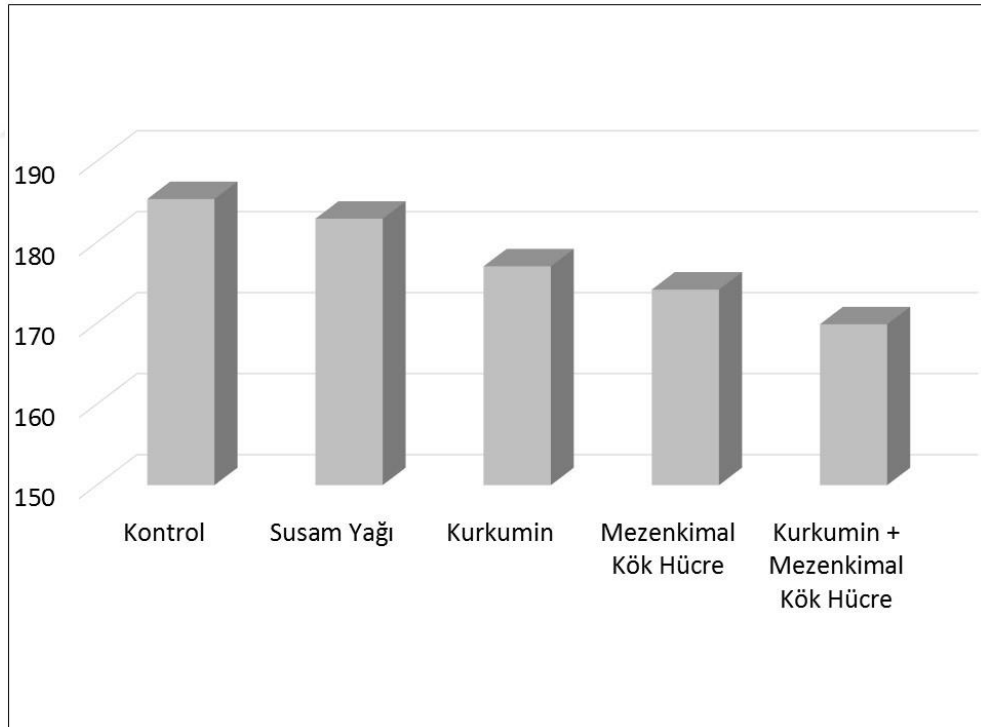


Şekil 19. Kurkumin+mezenkimal kök hücre-2. hafta grubunun 2. hayvanına ait kesitte abondan mûsin varlığı. Alsiyan mavisi-PAS boyama, 10x

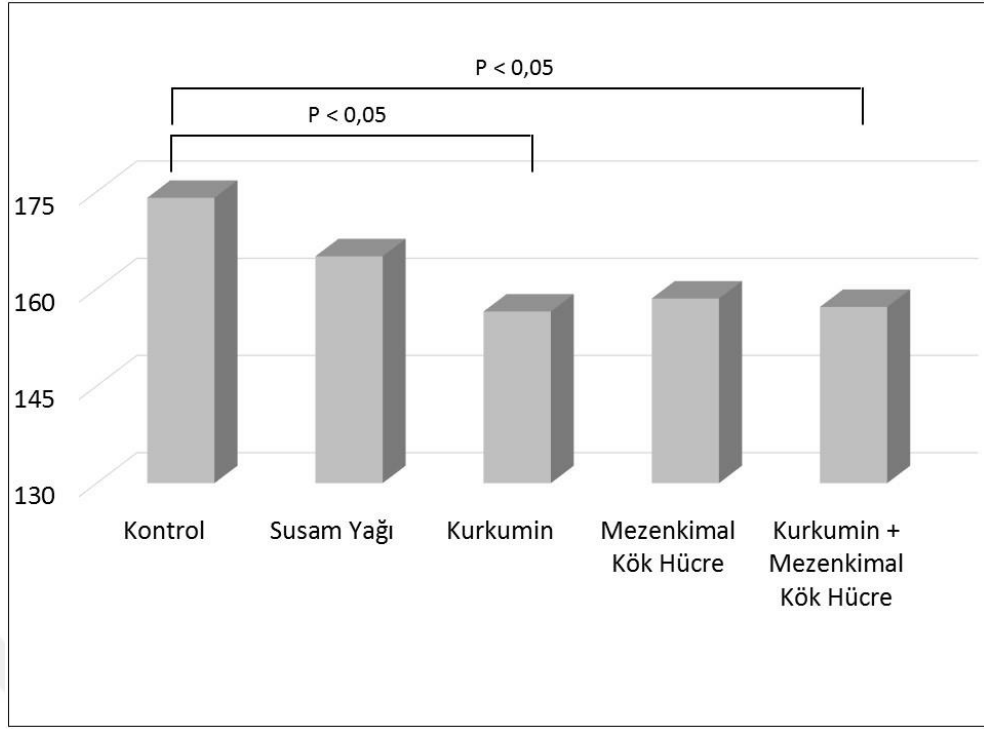
4. 2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLENDİRME BULGULARI

4. 2. 1. Tip I kollajen boyanma yoğunluğu

Tip I kollajen boyanma yoğunluğunun 2. hafta değerleri Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre azalmış olmakla birlikte bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,057$) (Şekil 20). Dördüncü hafta değerleri hem Kurkumin hem de Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0,05$) (Şekil 21); Mezenkimal Kök Hücre grubunda da Kontrol grubuna göre azalma var iken p değeri 0,06 olarak hesaplanmıştır.

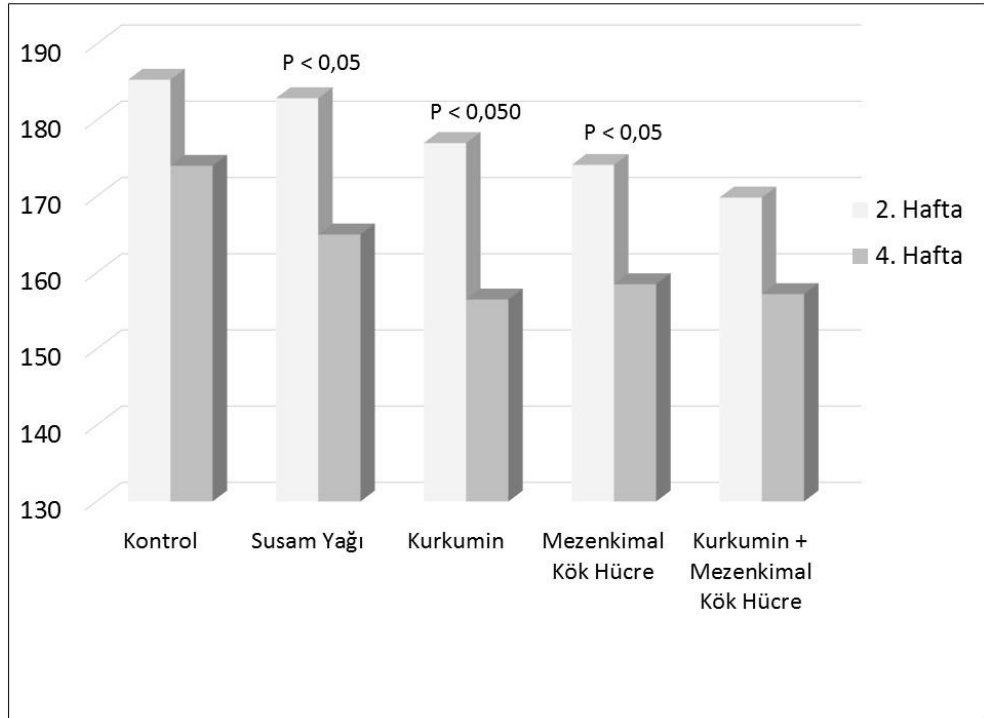


Şekil 20. Gruplarda 2. hafta tip I kollajen boyanma yoğunlukları



Şekil 21. Gruplarda 4. hafta tip I kollajen boyanma yoğunlukları

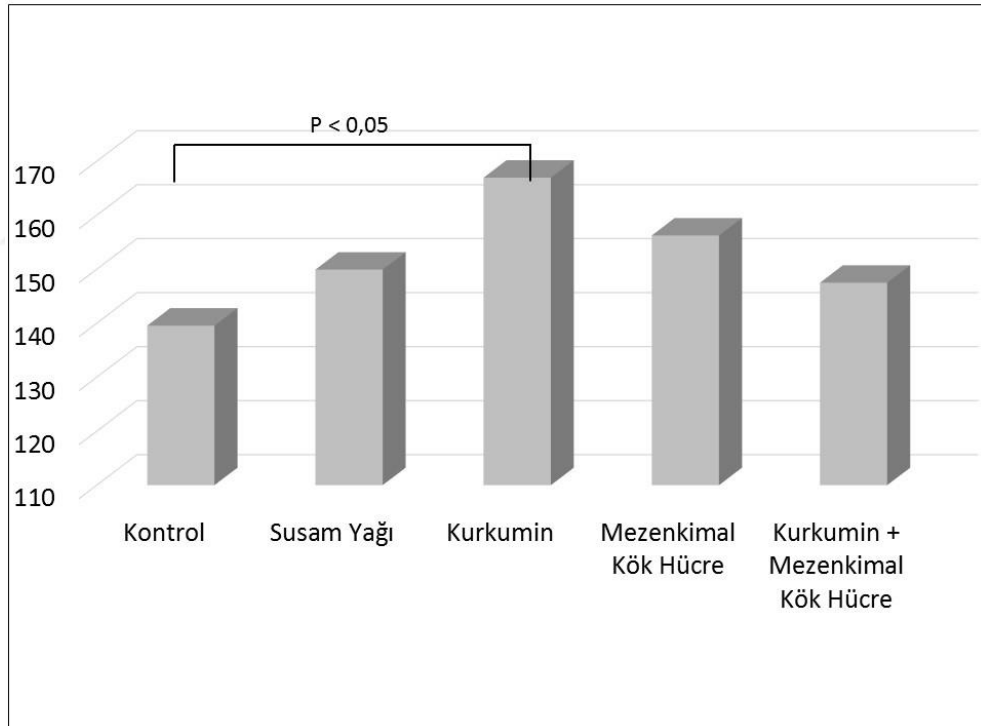
Tip I kollajen boyanma yoğunluğunun 4. hafta değerleri Susam Yağı, Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre gruplarında 2. hafta değerlerine göre anlamlı şekilde azalmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 22).



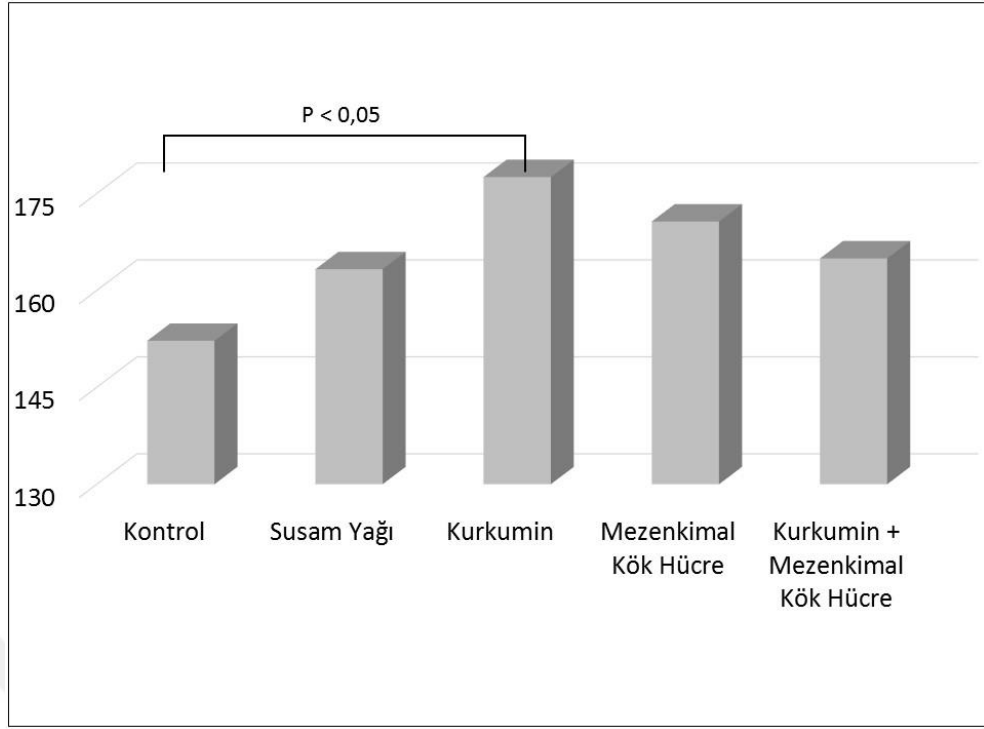
Şekil 22. Gruplarda 2. ve 4. hafta tip I kollajen boyanma yoğunlukları

4. 2. 2. Tip III kollajen boyanma yoğunluğu

Tip III kollajen boyanma yoğunluğunun 2. hafta değerleri Kurkumin grubunda Kontrol grubuna gore istatistiksel olarak artmıştır ($p < 0,05$) (şekil 23). Diğer deney gruplarında Kontrol grubuna gore farklılık bulunmamıştır. Dorduncu hafta değerleri incelendiğinde tip III kollajen boyanma yoğunluğunun yine Kurkumin grubunda Kontrol grubuna gore artmış olduğu gorulmuştur ($p < 0,05$) (şekil 24).

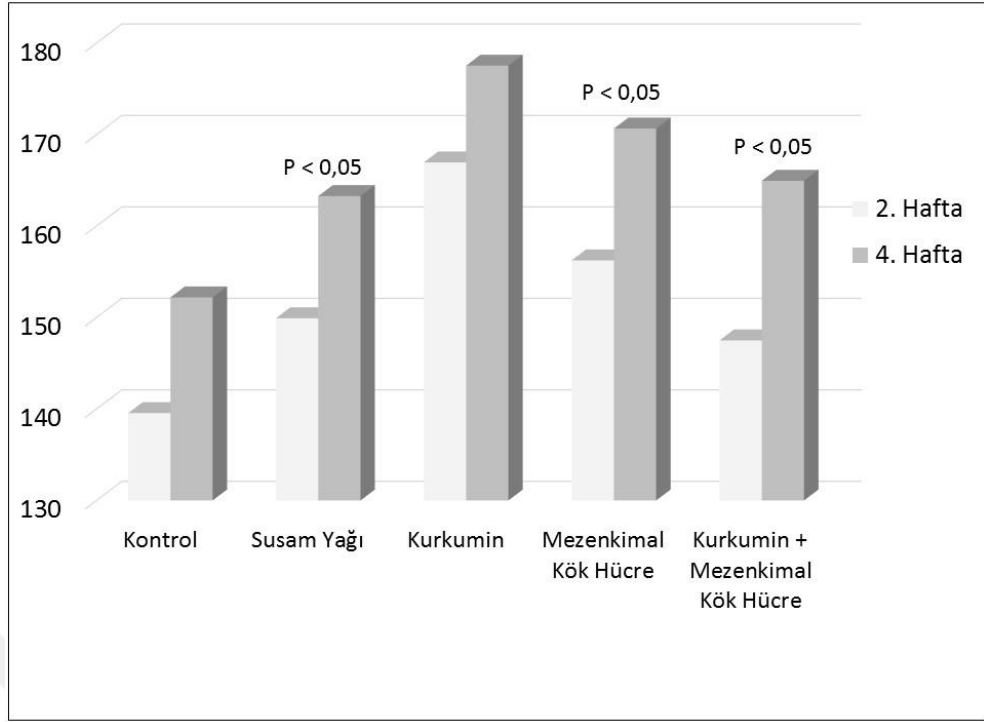


şekil 23. Gruplarda 2. hafta tip III kollajen boyanma yoğunlukları



Şekil 24. Gruplarda 4. hafta tip III kollajen boyanma yoğunlukları

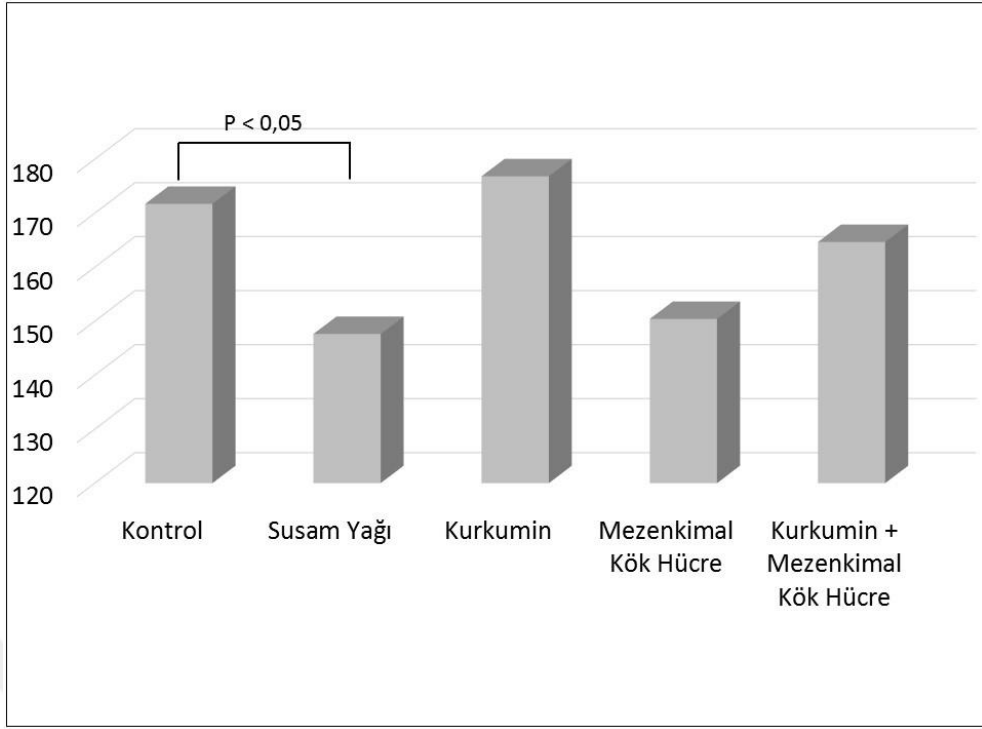
Tip III kollajen boyanma yoğunluğunun 4. hafta değerleri Susam Yağı, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında 2. hafta değerlerine göre anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0,05$) (Şekil 25).



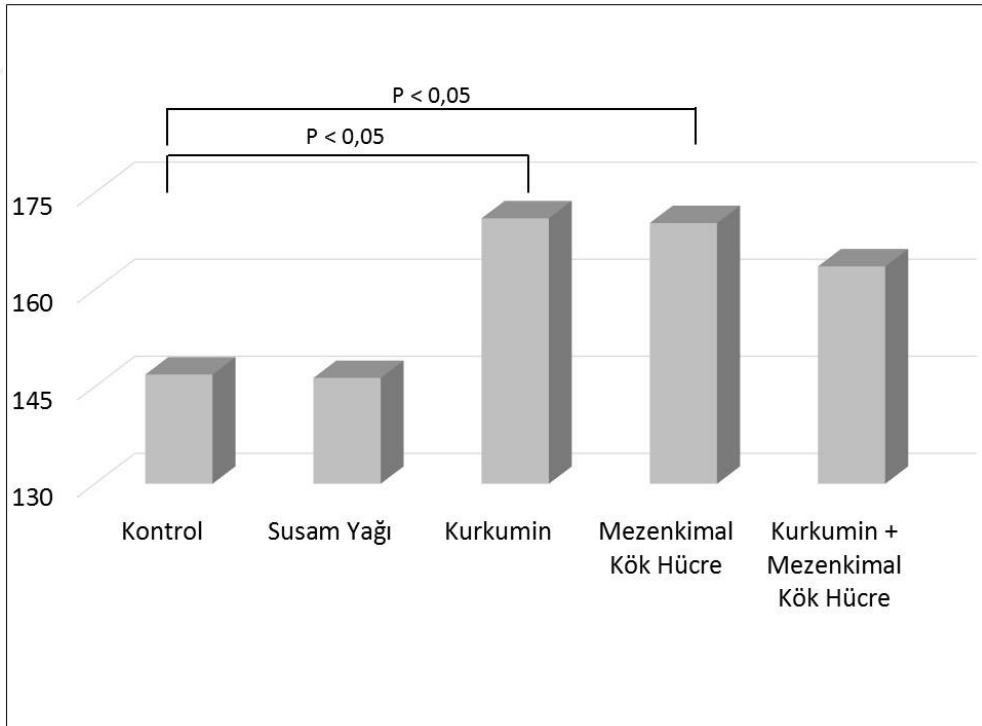
Şekil 25. Gruplarda 2. ve 4. hafta tip III kollajen boyanma yoğunlukları

4. 2. 3. Tenomodülün Boyanma Yoğunluğu

Tenomodülün boyanma yoğunluğu 2 haftada Susam Yağı grubunda Kontrol grubuna kıyasla azalırken ($p < 0,05$) diğer gruplarda Kontrol grubuna göre bir değişiklik olmadı (Şekil 26). Dördüncü haftada ise Kurkumin ve Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ($p < 0,05$) (Şekil 27).

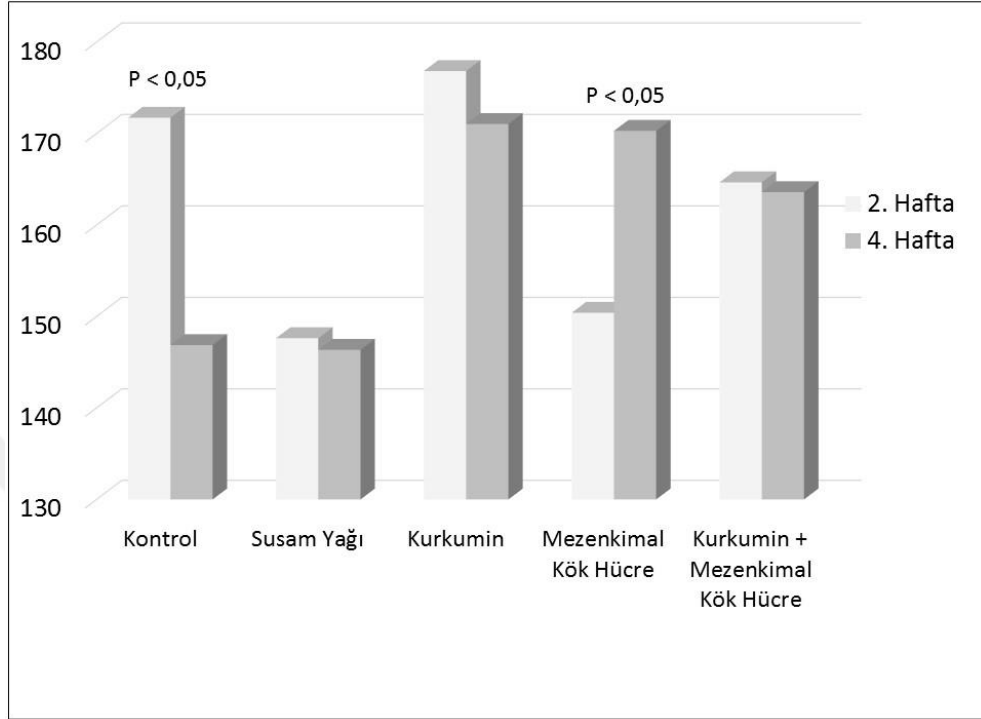


Şekil 26. Gruplarda 2. hafta tenomodülin boyanma yoğunlukları



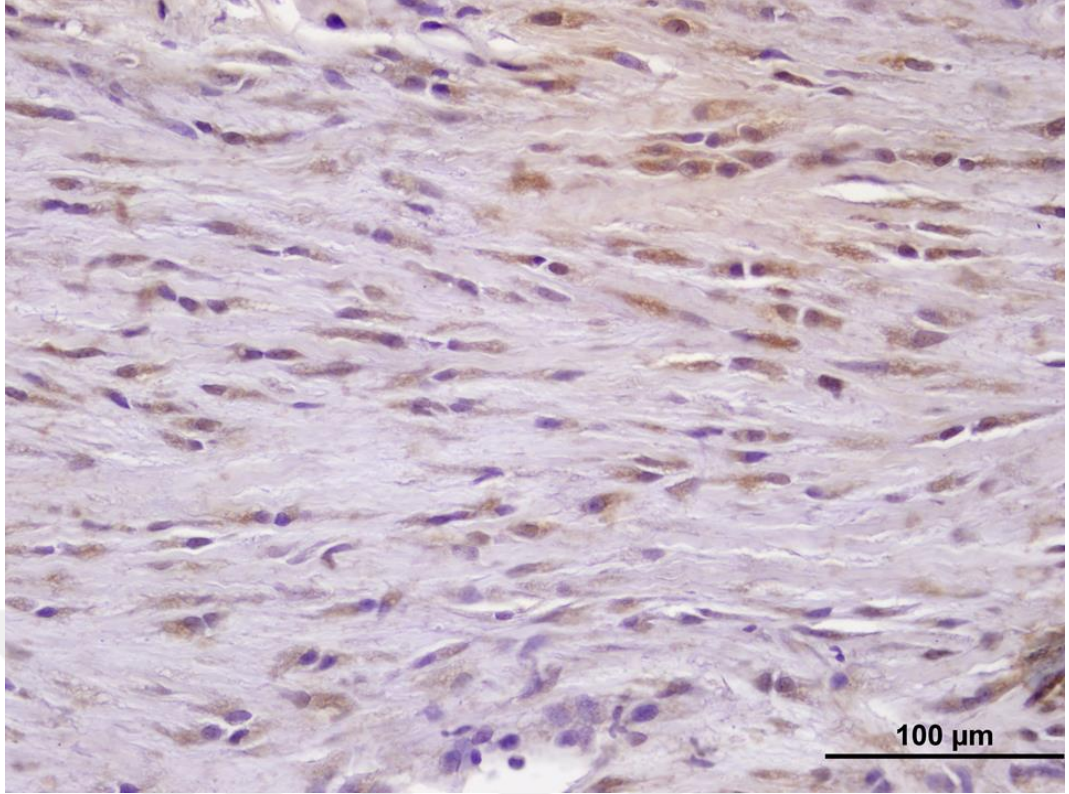
Şekil 27. Gruplarda 4. hafta tenomodülin boyanma yoğunlukları

Tenomodülün boyanma yoğunluğunun 2. ve 4. haftalardaki grup içi karşılaştırılmasında Kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalırken Mezenkimal Kök Hücre grubunda ise arttığı görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 28).

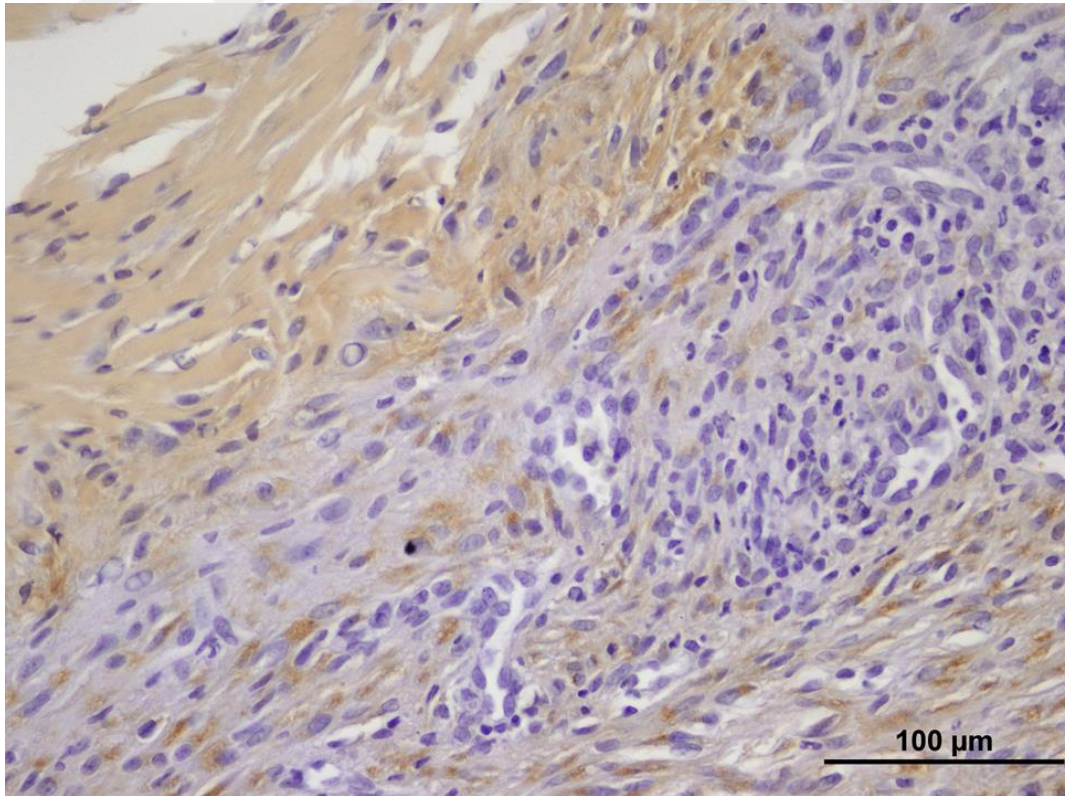


Şekil 28. Gruplarda 2. ve 4.hafta tenomodülün boyanma yoğunlukları

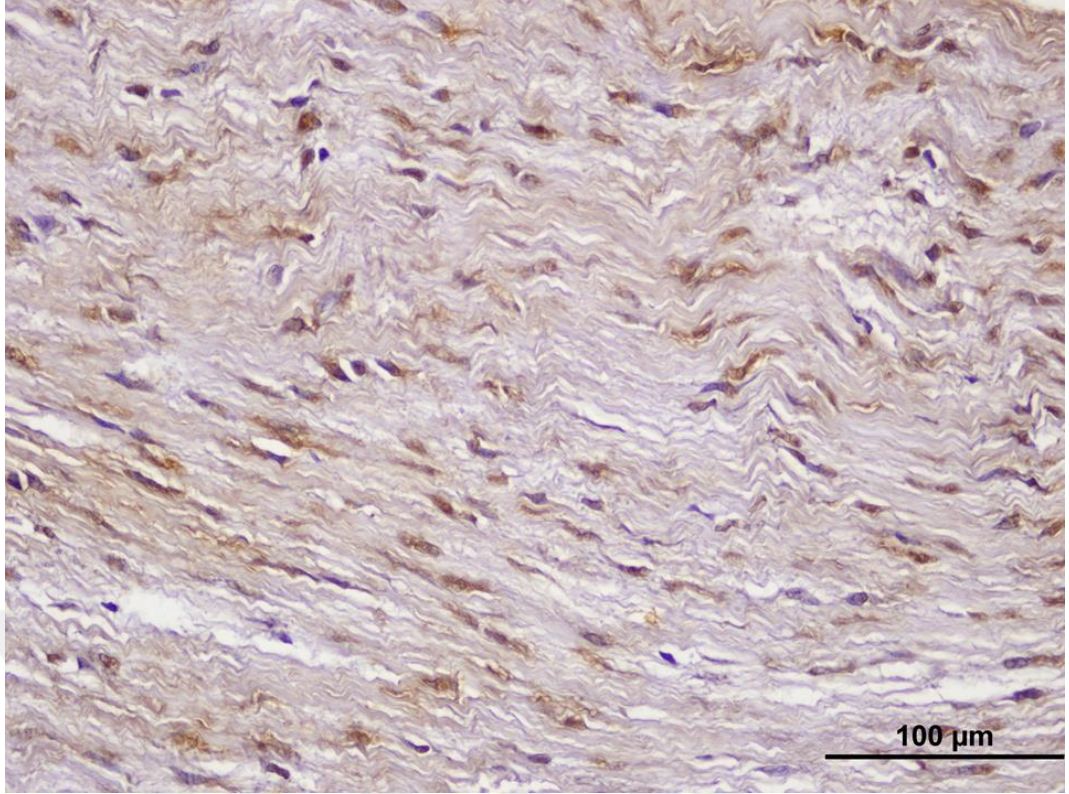
Tip I kollajen, tip III kollajen ve tenomodülün immünohistokimyasal boyama örnekleri Şekil 29-31 arasında gösterilmiştir.



Şekil 29. Kurkumin-2. hafta grubunda 3. hayvana ait kesitte tenomodülinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. 40x



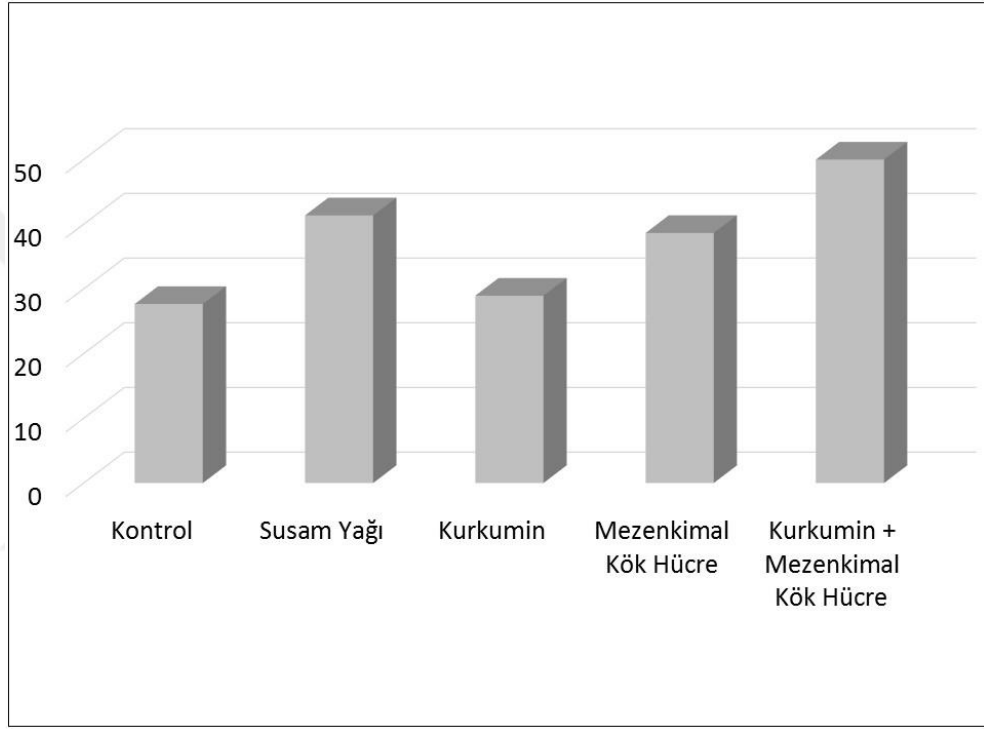
Şekil 30. Kontrol-2. hafta grubunun 8. hayvanına ait kesitte tip I kollajenin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. 40x



Şekil 31. Susam yağı-4. hafta grubunun 8. Hayvanına ait kesitte tip III kollajenin immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. 40x

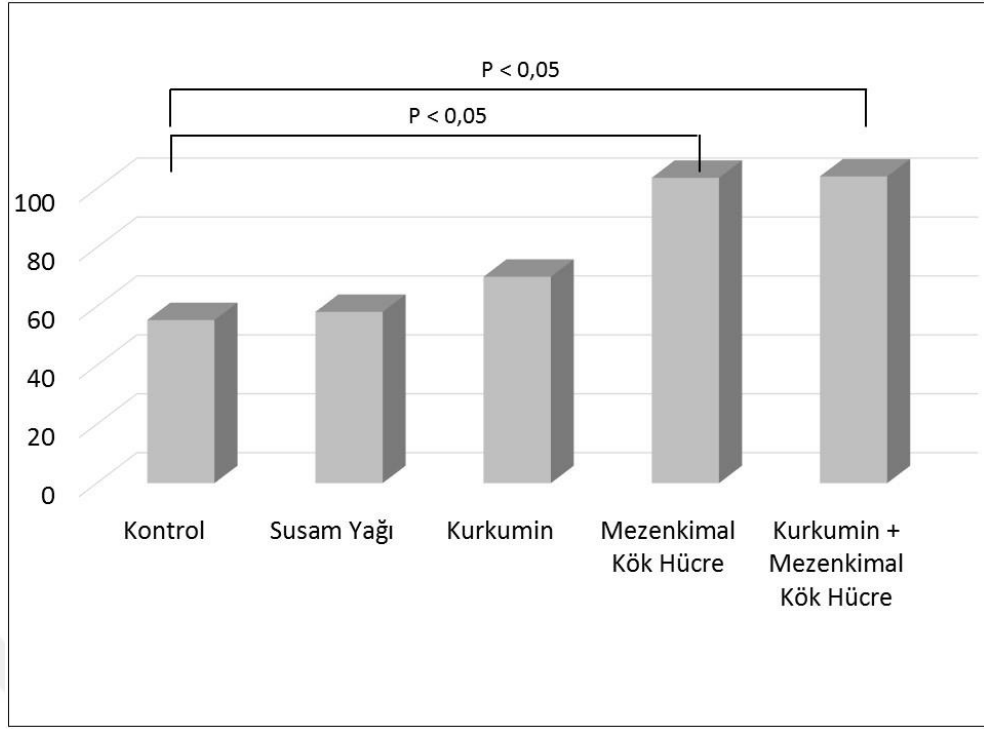
4. 3. BİYOMEKANİK ANALİZ BULGULARI

Tendonların gerilme güçleri 2. haftada gruplar arasında 0,05 p değerine göre anlamlı bir fark göstermedi. Bununla birlikte hesaplanan p değeri 0,057 gibi anlamlılık değerine çok yakındır ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre grubunda Kontrol grubuna göre artış eğiliminde olduğu söylenebilir (Şekil 32).



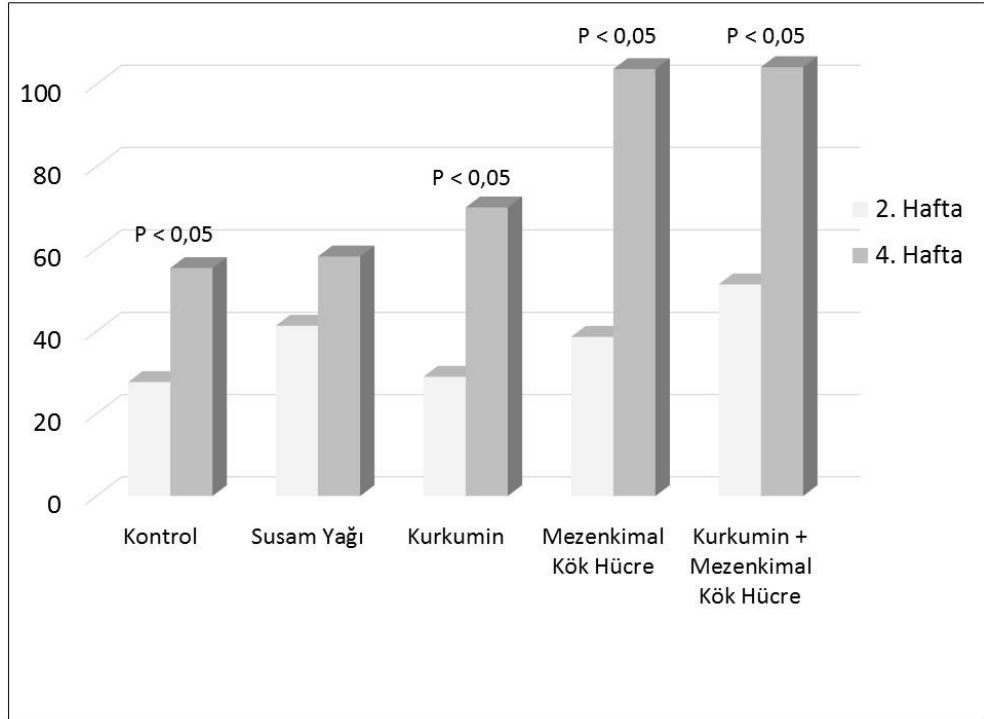
Şekil 32. Gruplarda 2. hafta gerilme gücü

Gerilme gücü 4. hafta değerleri Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken ($p < 0,05$) bu iki deney grubu arasında ise fark yoktu (Şekil 33).



Şekil 33. Gruplarda 4. hafta gerilme gücü

Gerilme gücü açısından grupların 2. ve 4. hafta değerleri karşılaştırıldığında Susam Yağı dışındaki tüm gruplarda 4. hafta değerlerinin artmış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 34).



Şekil 34. Gruplarda 2. hafta ve 4. hafta gerilme gücü

4. 4. KORELASYON ANALİZLERİ

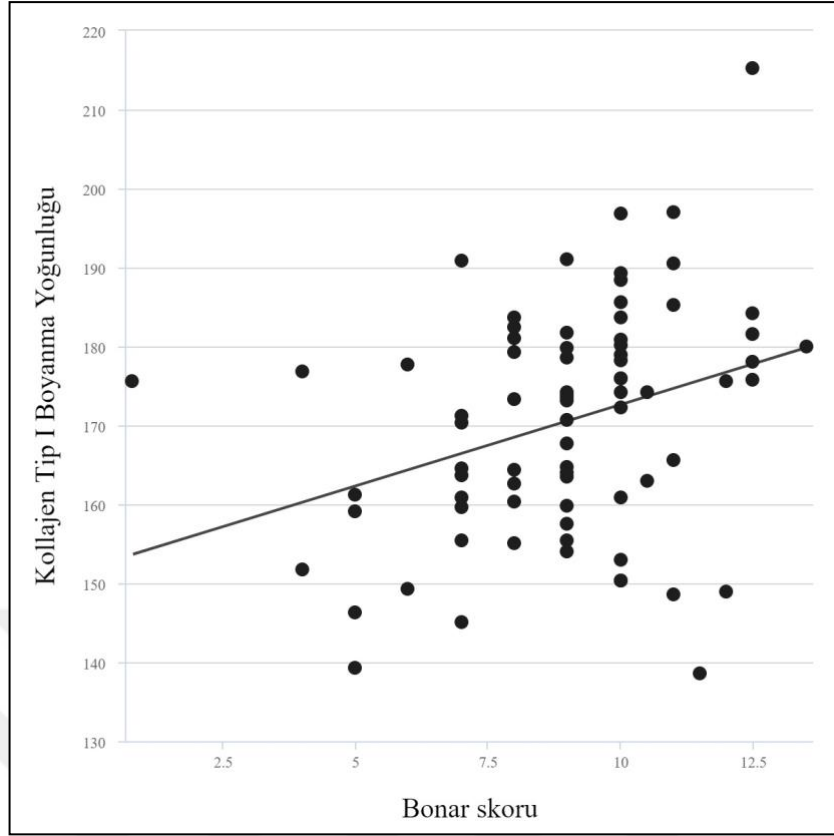
Tüm gruptaki değişkenler arasında bir ilişkinin varlığının araştırıldığı Pearson korelasyon analizleri Tablo 9’da toplu olarak verilmiştir.

	Bonar skoru	Tip I kollajen boyanma yoğunluğu	Tip III kollajen boyanma yoğunluğu	Tenomodülün	Gerilme gücü
Bonar skoru	1	0,3204	- 0,1921	0,0636	- 0,382
Tip I kollajen boyanma yoğunluğu	0,004	1	- 0,3865	0,0175	- 0,4465
Tip III kollajen boyanma yoğunluğu	0,104	<0,001	1	0,1096	0,3538
Tenomodülün	0,585	0,882	0,363	1	- 0,0203
Gerilme gücü	<0,001	<0,001	0,003	0,866	1

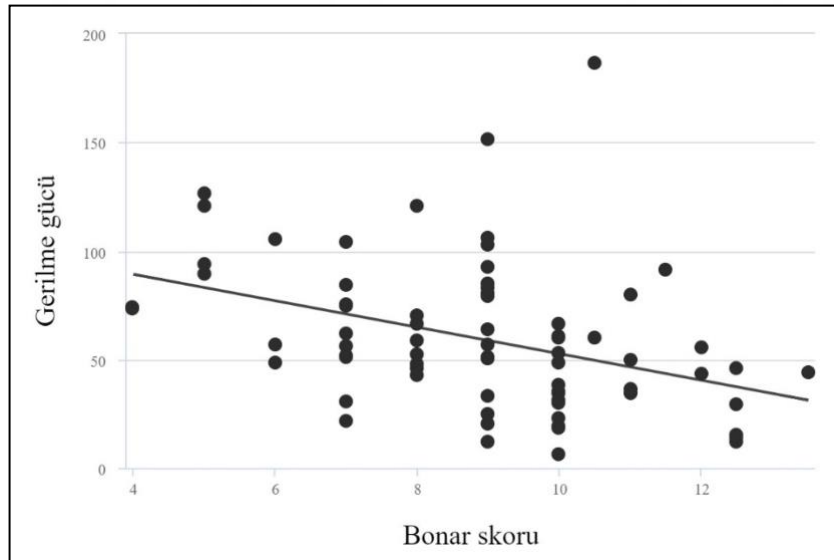
Analiz sonuçlarına göre tenomodülün boyanma yoğunluğu ile diğer değişkenler arasında istatistiksel anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir.

Diğer değişkenlerin birbiri ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlarına gelince;

Bonar skoru ile tip I kollajen boyanma yoğunluğu arasında pozitif yönlü, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ($r = 0,3204$, $p = 0,004$) (Şekil 35) ve gerilme gücü arasında negatif yönlü, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ($r = - 0,382$, $p < 0,001$) (Şekil 36) bulunmaktadır.

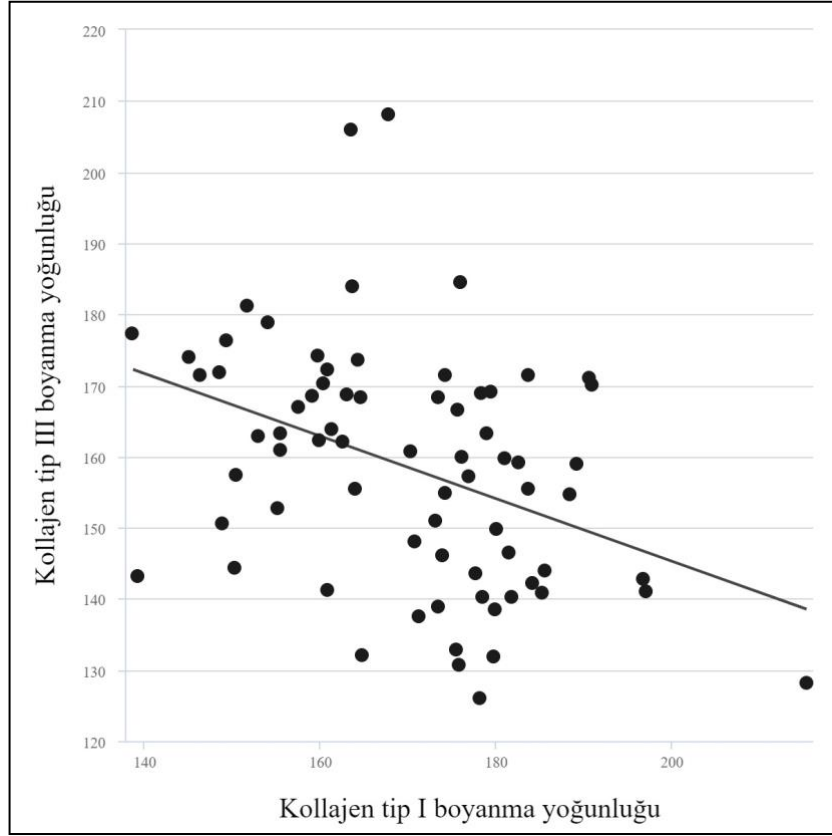


Şekil 35. Bonar skoru ve tip I kollajen boyanma yoğunluğu arasındaki ilişki



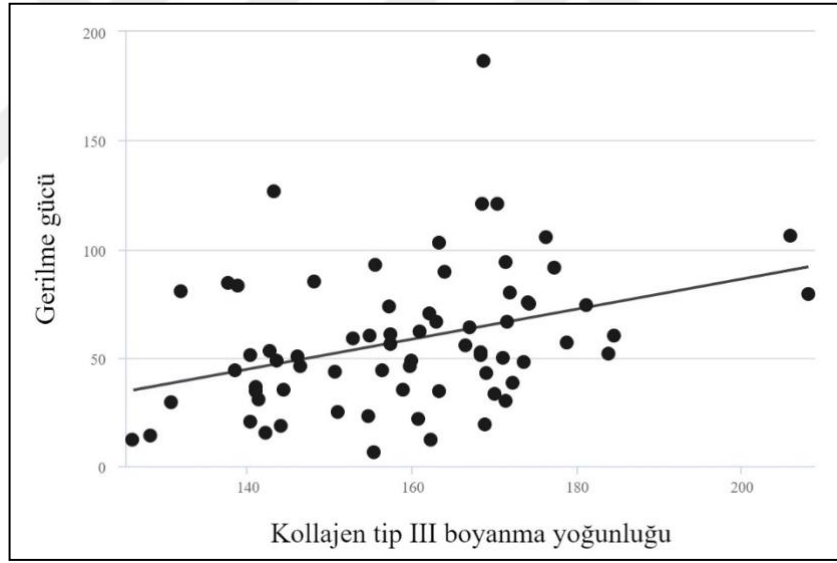
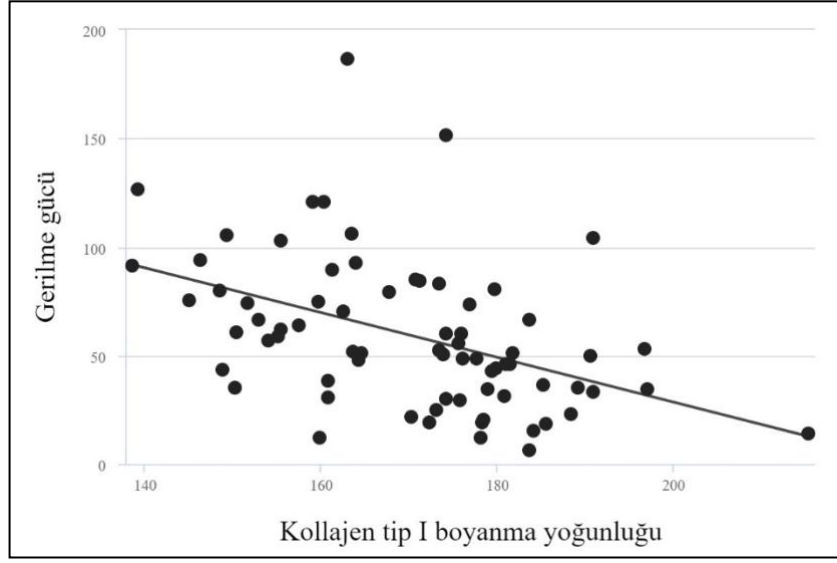
Şekil 36. Bonar skoru ile gerilme gücü arasındaki ilişki

Tip I kollajen boyanma yoğunluğu ve tip III kollajen boyanma yoğunluğu arasında negatif yönlü, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir ($r = -0,3865$, $p < 0,001$) (Şekil 37).



Şekil 37. Tip I kollajen ve tip III kollajen boyanma yoğunlukları arasındaki ilişki

Gerilme gücü ile tip I kollajen boyanma yoğunluğu arasında negatif yönlü, orta dereceli ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ($r = -0,4465$, $p < 0,001$) (Şekil 38) ve tip III kollajen boyanma yoğunluğu arasında pozitif yönlü, zayıf ve istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ($r = 0,3538$, $p = 0,003$) (Şekil 39) tespit edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Tendon yaralanmaları, travma cerrahisinde ve ortopedik cerrahide sık karşılaşılan bir klinik problemdir ve yaralanma sonucu fonksiyon ve hareket bozulmaktadır. Hipovasküler ve hiposelüler bir yapı ve düşük metabolizma hızına sahip olan sağlıklı tendonun iyileşme kabiliyeti sınırlıdır. Dolayısıyla, yaralanma sonrası iyileşme sürecini tamamlamış tendon dahi sağlıklı haline göre daha zayıf biyomekanik özellikler sergiler.

Klinikte en sık karşılaşılan tendon yaralanması olan Aşil tendon rüptüründe uygulanabilecek en uygun tedavi yönteminin ne olduğuna dair henüz bir fikir birliğine varılamamıştır (2). Hem cerrahi hem de konservatif tedavi ile tendonun sağlıklı haline dönememesi günümüzde hala karşı karşıya olduğumuz problemlerden birisidir (1). Tendon yaralanmasının tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalarda, cerrahi ve konservatif tedavilerin birbirlerine üstünlükleri ile ilgili herhangi bir veri elde edilememiştir (2). Geleneksel cerrahi yöntemlerin kısıtlamaları ve komplikasyonları sebebiyle son yıllarda konservatif tedaviler daha popüler hale gelmiştir.

Bir doku veya organın işlevselliğini yaralanma öncesi haline getirmek için uygun terapötik stratejilerin oluşturulmasını amaçlayan ve doku mühendisliğini de kapsayan rejeneratif tıbbın pratiğinde, hücreler rejeneratif cevabı yöneten anahtar oyuncular

niteliğindedir. Bu sebeple kök hücreler, doku rejenerasyonunun sağlanmaya çalışıldığı her türlü stratejinin ana hedefi konumundadır (98).

Tendonlar ESM'nin düzensiz olarak birikmesi sonucu fibrotik iyileşmeye meyilli dokulardır. Hücrelerin de ESM dinamiklerinin ve normal fonksiyonlarının sürdürülmesinde çok önemli rolleri vardır. Bu nedenle, hücre-temelli stratejiler günümüzde daha dikkat çeken bir duruma gelmişlerdir (98). Özellikle MKH'ler tendon uygulamalarını da içeren iskelet-kas dokusu mühendisliği ve rejenerasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (76).

MKH'ler birçok in vitro ve prelinik/hayvan çalışmasının odağı haline gelmiştir. MKH'lerin tenojenik hat da dahil olmak üzere birçok farklı hücre hattına farklılaşabilmeleri (1), vücuttaki birçok dokudan elde edilebilmeleri ve potansiyel rejeneratif etkileri (98) tendon iyileşmesinde kullanılmak için güçlü bir aday olmalarını sağlamaktadır (1). Transplante edilen MKH'ler sadece hedef doku hücrelerine diferansiye olma yoluyla değil, aynı zamanda büyüme faktörleri ve sitokinler gibi parakrin faktörleri salgılama yoluyla da etki göstermektedirler (1).

İskelet-kas sistemi uygulamalarında kullanılacak MKH'ler için en sık kullanılan doku kaynakları, ulaşılabilirlik ve fazla miktarda hücre elde edilebilirliği sebebiyle kemik iliği ve yağ dokudur (73). Kİ-MKH, AD-MKH'ye kıyasla kondrosit ve osteositlere daha iyi farklılaşabilme yeteneğine sahiptir (73). Buna rağmen insan kemik iliğinden elde edilen MKH verimi oldukça düşüktür (74). MKH'ler için daha az sıklıkla kullanılan kaynaklar tendon, kas, sinovyum, kıkırdak, deri, periferik kan, periodontal doku, kıl folikülleri ve skalp dokusudur (75).

Kİ-MKH ve EKH'ler ile kıyaslandığında UK-MKH'ler EKH'lere daha benzer bir gen ekspresyon profili ve Kİ-MKH'lere kıyasla daha hızlı kendini yenileme özelliği sergilerler. Aynı zamanda yeterli miktarda UK-MKH kolayca elde edilebilir ve ex vivo ekspansiyonları kolay sağlanır. En göze çarpan avantajları ise elde edilmiş yönteminin non-invaziv olması ve etik açıdan problem oluşturmamasıdır (88). Literatürde UK-MKH'lerin tendon iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin histolojik olarak kanıtlandığı çalışmalar mevcuttur (99, 100).

Çin'de ve Güneydoğu Asya'da inflamatuvar durumların tedavisinde uzun yıllardır kullanılan, köri baharatı ve şifalı bir bitki olan Curcuma longa (turmeric)'nin

bileşenlerinden birisi olan kurkuminin doku hasarını azaltma ve doku tamirini hızlandırmaya katkı sağlayan çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (96). Doku hasarı sonrası optimum düzeyde iyileşmenin sağlanabilmesi için, uygulanan tedavinin yara dokusunu bakteriyel enfeksiyonlardan koruması, inflamasyonu kontrol etmesi ve hücre proliferasyonunu azaltması gerekmektedir. (101). Uygulanan tedavi aynı zamanda, iyileşme sırasında görülen inflamasyonun esas sorumlusu olarak görülen serbest radikallere karşı da antioksidan olarak işlev görmelidir (102). Kurkuminin yara iyileştirici potansiyeli, antiinflamatuvar (84), antienfeksiyöz (103) ve antioksidan (84) aktivitesi gibi biyokimyasal etkilerine bağlanmaktadır. Çeşitli çalışmalarda kurkumin uygulamasının epitelyal rejenerasyonu hızlandırdığı, fibroblast proliferasyonu ve vasküler dansiteyi artırdığı gösterilmiştir (104). Sıçan tendon hasarı üzerine kurgulanmış bir başka çalışmada kurkumin, hasarlı tendonun iyileşmesini ve fonksiyonunu önemli ölçüde iyileştirmiştir. Tendon iyileşmesi ve fonksiyonundaki gelişme kurkuminin, rejenere tendon dokusunda iyi organize olmuş kollajen lifler ve yoğun kollajen birikimini sağlayan antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri sayesinde olmuştur (105). Güleç ve ark. (96) uzun dönem oral kurkumin verilmesi sonucu Aşil tendonu iyileşmesinin daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Kök hücre tedavisinin amacı hasarlı dokunun tamir edilip yenilenmesini ve hücre tedavisinin yeni teknik ve temin edilebilir ajanlar ile kombine edilmesini sağlamaktır. Bu nedenle MKH'ler, etki mekanizmaları ve kök hücrelerin diferansiyasyon ve büyümesi üzerine spesifik etkilerini araştırmak için geleneksel bitkisel ürünlerle birlikte kullanılmaktadır (106). Bitkisel ilaçların proliferasyon ve diferansiyasyon ajanı olarak kullanılması, kök hücre-aracılı tedavinin terapötik amaçları içerisinde non-toksik ve uygun maliyetli bir seçenek olabilir. Bu nedenle, doku rejenerasyon oranlarını iyileştiren yararlı ajanların tanımlanması hücre tedavisinin yanı sıra doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta da kullanılabilir. Bu alanda, kurkuminin klinik uygulamaları aktif olarak ilerlemektedir (107). Kurkuminin kök hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve yaşlanması üzerine koruyucu etki gösterdiği de bildirilmiştir (87). Dahası, kurkumin ve MKH'nin doku hasarı iyileşmesi üzerine sinerjistik etki gösterdiği bilgisi literatürde mevcuttur (108). Yukarıda anlatılan nedenlerle, bu çalışmada sıçan Aşil tendon yaralanmasında da kurkumin ve MKH'lerin kombine uygulamasının sinerjistik etki yapacağı hipotezi ile Kontrol, Kurkumin, Mezenkimal

Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre deney grupları oluşturulmuştur. Son yıllarda kurkuminin, özellikle oral olarak kullanıldığında, potansiyel tıbbi değeri üzerine kapsamlı çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, oral kurkuminin etkinliği zayıf biyoyararlanımı nedeniyle engellenmektedir, çünkü hidrofobik olan ve konjuge olmayan kurkumin molekülü, gastrointestinal sistem tarafından istenilen düzeyde emilmemektedir. Kurkumin alımı sonrası kanda ve dokularda çok düşük kurkumin seviyeleri saptanır (109). Kurkuminin sahip olduğu bu farmakokinetik ve farmakodinamik özellikler sebebiyle bu çalışmada kurkumin, Bahadır ve ark. yaptığı çalışmada kullandıklarına benzer şekilde susam yağı içerisinde çözdürülmüş olarak kullanılmıştır (110) ve lokal olarak verilmiştir. Susam yağı içerisinde çözdürülecek kurkumin miktarının doz ayarlaması Zhang ve ark. yapmış olduğu tendon iyileşmesi ile ilgili çalışmadaki (111) kurkumin dozu baz alınarak yapılmıştır. Kurkumin için çözücü olarak kullanılan susam yağının olası etkilerini test etmek için çalışma grubu olarak bir de Susam Yağı grubu oluşturulmuştur.

Biyomedikal çalışmalara konu olan tendon iyileşmesinde sıçan Aşil tendonu sıklıkla kullanılmıştır (112). Bunun yanı sıra, üremesi ve temin edilmesinin kolay ve ekonomik, çalışmanın gerçekleştirildiği laboratuvarında yetiştirilme ve barınma koşullarının elverişli ve yeterli düzeyde olması nedeniyle de bu çalışmada deney hayvanı olarak kullanılmak üzere yine sıçanlar tercih edilmiştir.

Tranekte edilen tendonların kullanıldığı ve tendon tamirinin doğrudan dikişlerle gerçekleştirildiği tendon iyileşmesi çalışmalarında iyileşmenin daha hızlı gerçekleşmesi ve bunun sonucunda tamir dokusunda incelenecek faktörlerin analizinin zorlaşabileceği ihtimali göz önüne alınarak, bu çalışmada tendon yaralanması punch ile pencere defekti oluşturarak gerçekleştirilmiştir (113).

Literatürde Aşil tendon yaralanması sonrası optimal iyileşmenin sağlanması için mekanik gerilmeyi sağlayan harekete ihtiyaç duyulduğu gösterilmiştir (114). Bununla birlikte Aşil tendonu yaralanması veya rüptür tamirinden sonra bacağın immobilize edildiği çalışmalar da bulunmaktadır (115). Ancak bu durumun, ek prosedürler nedeniyle süreci komplike edebilme ve sıçanların kendilerini beslemelerinde zorluk çıkarma ihtimali gibi dezavantajları bulunmaktadır. Tendonlarda pencere defekti oluşturulduğunda, bu defektin her iki tarafında intakt bırakılan tendon kısımları Aşil

tendonun fonksiyonlarını, yani sıçanın hareketlerini devam ettirmesini sağlayarak yukarıda bahsedilen olumsuz ihtimallerin bertaraf edilmesini sağlamıştır.

Tendonda yaralanma sonrası iyileşme ve skar şekillenmesi, birbiri ardınca meydana gelen ve iç içe geçen 3 faz halinde gerçekleşir: inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenme. İnflamatuvar fazda eritrositler ve inflamatuvar hücreler, özellikle nötrofiller yara bölgesine gelirler. Tendon hücreleri yara bölgesine göç edip tip III kollajen sentezini başlatırlar. Birkaç gün sonra proliferatif faz başlar ve bu faz esnasında tip III kollajen sentezi pik noktasına ulaşır. Bu fazın en önemli özelliklerinden birisi yüksek selülarite gözlenmesidir. Birkaç hafta sonra yeniden şekillenme (remodelling) fazına girilir ve tip I kollajen bu fazda en fazla oranda bu fazda sentezlenir (1).

Tendon iyileşmesinin histopatolojik olarak değerlendirilmesinde Bonar skorlaması sık kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada 2. hafta Bonar skorlarında Kontrol grubuna göre Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında (Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre grubunda daha belirgin olmak üzere) istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Bu azalma, iyileşmekte olan tendon bölgesinde hücre morfolojisinin tenosite daha yakın hale gelmesi, damarlanmanın ve hücreliliğin azalması, daha düzenli kollajen lif dizilimi ve daha az ara madde varlığı gibi tendon iyileşmesinin olumlu yönde ilerlediğini gösteren mikroskopik değişiklikleri kapsamaktadır. Dördüncü haftada ise Kontrol grubuna göre diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. 2. ve 4. hafta sonuçları birbirleri ile kıyaslandığında Kontrol, Susam yağı ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü. Bu sonuçlarla, deney gruplarında kurkumin ve MKH'nin literatürdeki bilgilere göre tendon iyileşmesi üzerindeki beklenen olumlu etkileri doğrulanmıştır.

Tip I kollajen tendon yapısında en fazla miktarda bulunan kollajendir. Tip III kollajen ise yaralanma sonrası erken evrede, yani proliferasyon fazında bol miktarda bulunur ve tamir bölgesinin mevcut halindeki stabilizasyonu sağlar (116). Tendonun doğal iyileşme sürecinde tip III kollajenin tip I kollajen ile yer değiştirmesi kritik öneme sahiptir (27) ve asıl olarak yeniden şekillenme fazında gerçekleşir. Bu tez çalışmasında tip I kollajen boyanma yoğunluğu gruplar arasında incelendiğinde 2. haftada gruplar arasında farklılık yokken 4. haftada Kontrol grubuna kıyasla Kurkumin ve

Kurkumin+Mezenkimal Kök hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), Mezenkimal Kök Hücre grubunda ise anlamlı değere yakın ($p=0,06$) azalma görüldü. Literatürde tip I kollajenin gen ekspresyonunun tendon iyileşmesinin başlangıcında ve devamındaki proliferasyon evresi süresince tedricen azaldığı gösterilmiştir (117). Bu bağlamda 4. haftada Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında proliferasyon fazının devam etmekte olduğu, Kontrol grubunda ise tendon iyileşmesinin daha ileri safhasına geçilmiş olduğu yorumu yapılabilir. Bununla birlikte Kurkumin ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarının birbirlerine üstünlükleri yoktu. Gruplarda 2. ve 4. haftalar arasında tip I kollajen boyanma yoğunluğu incelendiğinde Kontrol grubunda iki değer arasında fark yokken, Susam yağı, Kurkumin ve Mezenkimal Kök Hücre gruplarındaki istatistiksel olarak anlamlı azalma, adı geçen deney gruplarında iyileşmenin proliferasyon evresinin 4. haftada da devam ettiği görüşünü doğrulamaktadır.

Tendon iyileşmesi sırasında tip III kollajen en fazla proliferatif faz esnasında sentezlenir (1). Bu çalışmada tip III kollajen boyanma yoğunluğu gruplar arasında incelendiğinde hem 2. hem de 4. haftada, Kontrol grubuna kıyasla diğer tüm gruplarda artış görülmekle birlikte bu artış sadece Kurkumin grubunda istatistiksel olarak anlamlıydı. Hasarlı tendon iyileşmesinde kurkuminin tendon iyileşmesine olumlu etkileri bilinmektedir (105, 96). Bu çalışmada incelenen ve iyileşmenin proliferatif evresinde olduğu düşünülen tendonlarda tip III kollajenin boyanma yoğunluğu ile ilgili elde edilen veriler, MKH'lerin ve kurkuminin tendon iyileşmesi üzerine yukarıda bahsedilen olumlu etkilerini desteklemektedir. 2. ve 4. hafta sonuçları birbirleri ile kıyaslandığında Susam yağı, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. Haftalar arasındaki bu anlamlı artış da tendonların iyileşmenin proliferatif evresinde olduğu yorumuyla uyumludur.

Çalışmada tip I ile tip III kollajen boyanma yoğunlukları arasında negatif yönde korelasyon tespit edilmiştir. Değişkenlere ait ölçümlerin tendon yaralanmasının 2. ve 4. haftasında elde edildiği göz önüne alındığında, tendon iyileşmesinin proliferatif fazını yansıtan bu dönemdeki sonuçlar yukarıda daha önce bahsedilen ve bu dönemde tip I kollajenin azalıp tip III kollajenin arttığı genel bilgileriyle uyumlu ve birbiri ile de tutarlıdır.

Tenomodülün olgun tenositler için kullanışlı bir fenotipik belirteçtir. Bu tez çalışmasında tenomodülün boyanma yoğunluğu gruplar arasında incelendiğinde, 2. haftada Kontrol grubuna kıyasla Susam Yağı grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü. Bu bulguyu izah edecek veya destekleyecek literatür bilgisine rastlanmadı. Dördüncü haftada ise Susam Yağı grubu dışında tüm gruplarda Kontrol grubuna göre artış görülmüş olmakla birlikte, bu artış Kurkumin ve Mezenkimal Kök Hücre gruplarında çok anlamlı ($p<0,02$), Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre grubunda anlamlılık derecesine yakın olarak bulundu ($p=0,07$). Bu sonuçlar, hem kurkuminin hem de MKH'nin 4. haftada iyileşme bölgesinde -proliferatif evreyle uyumlu şekilde- tenositlerin yoğun olarak bulunmalarına neden olduklarını düşündürmektedir. Bu yorum, yukarda tip I ve III kollajen boyanma yoğunlukları üzerinden yapılmış olan, “çalışılan tendonların proliferatif evrede oldukları” yorumunu da desteklemektedir. İkinci ve 4. hafta sonuçları birbirleriyle kıyaslandığında Kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma olması Kontrol grubunda iyileşme bölgesindeki tenositlerin, literatürdeki “tenomodülünün tendon yaralanması sonrası 1 ve 2 hafta sonra upregüle olduğu ve sonraki yeniden şekillenme evresi süresince seviyesinin azaldığı” (118, 119) bilgisiyle uyumludur. Deney gruplarında ise tenomodülün seviyesinin artmış olması, bu gruplarda proliferatif fazın devam ettiğini göstermesinin yanında tip I ve tip III kollajen değerleri ile de uyumludur.

Biyomekanik değerlendirme verilerine göre gerilme gücün 2. haftada gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermedi. Bununla birlikte Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre grubunda Kontrol grubuna göre $p=0,072$ olan bir artış belirlendi. Literatür bilgisine (120) göre tendon iyileşmesinin ilk 2 haftasında gerilme gücü ile ilgili bir artış beklenmediğinden sonuçlar literatürle uyumludur. Dördüncü haftada ise Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre gerilme gücünün artmış olduğu belirlendi. Kurkuminin ve MKH'nin tendon iyileşmesi üzerine tartışma bölümünün başlangıç paragraflarında aktarılan olumlu etkileri göz önüne alındığında bu artış beklenen bir sonuçtur. İkinci ve 4. haftalar birbirleri ile kıyaslandığında, Susam Yağı dışındaki tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. Bu artış deney gruplarında kontrol grubuna göre çok daha belirgindi ve gerilme gücünün tendon iyileşmesi ile ilişkisinin ele alındığı kaynaklarla (120) paralellik göstermekteydi. Bu sonuçlara göre hem

kurkumin hem de MKH'nin iyileşmekte olan tendon yaralanmasında gerilme gücü geri kazanılmasında belirgin etkisinin olduğu görülmektedir.

İkinci ve 4. haftaların tüm değişkenler açısından karşılaştırılmasında; hücresel veriler açısından daha doğrudan bilgiler veren Bonar skoru ve tenomodülünün (tenosit belirteci) Kontrol grubunda belirgin olarak azalmış olması, Kontrol grubunda tendon iyileşme safhalarının tamamlanmış veya tamamlanmaya yakın olduğu şeklinde yorumlanabilir. Kontrol grubunda tip I ve III kollajenin boyanma yoğunluklarında anlamlı bir değişiklik olmaması yine iyileşme döneminde durağan bir safhada olduğu şeklinde yorumlanabilecek ek bulgulardır. Diğer deney gruplarında farklı değişkenlerde farklı olmakla birlikte genel olarak iyileşme bölgesindeki proliferatif fazın devam etmekte olduğunu destekleyen veriler elde edildi.

Bu çalışmada Bonar skoru ile tip I kollajen boyanma yoğunluğu arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönde bir ilişki olduğu da görülmüştür. Bonar skorunun azalması şeklinde kendini gösteren daha iyi durumdaki iyileşme, tip I kollajenin de azalmasıyla paralellik göstermektedir. Bu ilişkiyi doğrudan açıklayacak bir literatür bilgisine erişilememiştir. Bonar skoru ile gerilme gücü arasında ise negatif korelasyon tespit edilmiştir. Bu ilişki, düşük Bonar skoru ile ifade edilmiş olan daha iyi iyileşmenin daha yüksek gerilme gücüne sahip olması anlamına gelmektedir ki bu da genel literatür bilgisiyle uyumlu ve beklenen bir durumdur.

Deney gruplarında tip I kollajen ve tip III kollajen boyanma yoğunlukları arasındaki negatif korelasyon literatür bilgisiyle uyumludur. Tendon iyileşmesinin ilk 4 haftasını temsil eden ve dolayısı ile proliferasyon fazında olan örneklerde tip I kollajen azalırken tip III kollajenin artması beklenen bir bulgudur (117). Tip I ve III kollajen arasındaki negatif ilişki, bu kollajen tiplerinin gerilme gücü ile olan ilişkisinde de kendini göstermiştir. Tip III kollajen boyanma yoğunluğu ile gerilme gücü arasında pozitif yönde korelasyon tespit edilmiştir; tip III kollajen boyanma yoğunluğu arttıkça gerilme gücü de artmıştır. Tip I kollajen seviyesi ile gerilme gücü ilişkisi arasında ise negatif yönde bir korelasyon tespit edilmiştir. Bu son ilişki çelişkili gibi görünse de şu şekilde yorumlanmıştır: Örnekler tendon iyileşmesinin proliferasyon dönemine aittir. Bu dönemde tip I kollajen düzeyinde yenilenme veya artış henüz beklenmediği gibi, tendon bölgesinde pencere defekti oluşturulması sırasında defekt bölgesindeki tendon parçasının ortadan kalkmasıyla birlikte ortamda azalmıştır; çünkü tendonun en önemli

yapısal komponentidir. Bu nedenlerle gerilme gücünün bu dönemde temel olarak yeni oluşturulmakta olan ve ortama yeni eklenen tip III kollajenden kaynaklanacağı söylenebilir. Tendon iyileşmesinin erken döneminde tip III ve tip I arasında negatif bir ilişki olduğu bilindiğinden, korelasyon analizimizdeki gibi tip III kollajen boyanma yoğunluğu ve gerilme gücü artarken tip I kollajen boyanma yoğunluğunun azalması makul görünmektedir.

Çalışmanın bütün bulguları değerlendirildiğinde kurkumin ve MKH'nin birlikte kullanılmasının, bu etkenlerin tek başına kullanılmalarından daha farklı pozitif bir etkisi ortaya konulamamıştır.



6. SONUÇLAR

İkinci haftada Bonar skorları Kurkumin, Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre azalmıştır.

Tip I kollajen boyanma yoğunluğu 4. haftada Kurkumin ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre azalmıştır.

Tip III kollajen boyanma yoğunluğu Kurkumin grubunda hem 2. hem de 4. haftalarda Kontrol grubuna kıyasla artış göstermiştir.

Tenomodülin boyanma yoğunluğu 4. Haftada Kurkumin ve Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre artmıştır.

Gerilme gücü 4. Hafta Mezenkimal Kök Hücre ve Kurkumin+Mezenkimal Kök Hücre gruplarında Kontrol grubuna göre artış göstermiştir.

Kurkumin ve MKH'nin birlikte verildiği gruplardan elde ettiğimiz histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyomekanik bulgular ışığında bu etken maddelerin sinerjistik etkisi gözlenmemiştir.

Dördüncü haftada değerlendirilen parametrelerden elde edilen verilere dayanılarak çalışmadaki tendonların hala proliferatif evrede oldukları düşünölmüştür. Tendon iyileşmesinin yavaş gelişen bir süreç olduğu göz önünde bulundurularak proliferatif evre sonrası yeniden şekillenme evresini de kapsayacak çalışma takviminin kurgulandığı bir deney modelinin daha ideal olacağı fikrine varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

1. Schneider M, Angele P, Järvinen TAH, Docheva D. Rescue plan for Achilles: Therapeutics steering the fate and functions of stem cells in tendon wound healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;129:352-375.
2. Clain MR, Baxter DE. Achilles tendinitis. *Foot Ankle.* 1992;13(8):482-487.
3. Gulati V, Jaggard M, Al-Nammari SS, et al. Management of achilles tendon injury: A current concepts systematic review. *World J Orthop.* 2015;6(4):380-386. Published 2015 May 18
4. Lui PP. Stem cell technology for tendon regeneration: current status, challenges, and future research directions. *Stem Cells Cloning.* 2015;8:163-174. Published 2015 Dec 11.
5. Burrus MT, Chhabra AB. Distal biceps reconstruction 13 years post-injury. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2015;7(2):56-59.
6. Cappozzo A, Leo T, Pedotti A. A general computing method for the analysis of human locomotion. *J Biomech.* 1975;8(5):307-320.
7. Gomes M., Reis R, Rodrigues M., Tendon Regeneration- Understanding Tissue Physiology and Development to Engineer Functional Substitute., 1st edition, Academic Press, 2015.
8. Benjamin M, Kaiser E, Milz S. Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat.* 2008;212(3):211-228
9. Thorpe CT, Birch HL, Clegg PD, Screen HR. The role of the non-collagenous matrix in tendon function. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(4):248-259.
10. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(2):131-142.
11. Järvinen TA, Järvinen TL, Kannus P, Józsa L, Järvinen M. Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *J Orthop Res.* 2004;22(6):1303-1309.

12. Hess GP, Cappiello WL, Poole RM, Hunter SC. Prevention and treatment of overuse tendon injuries. *Sports Med.* 1989;8(6):371-384.
13. Elliott Dh. Structure And Function Of Mammalian Tendon. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1965;40:392-421.
14. Kvist M, Józsa L, Järvinen M, Kvist H. Fine structural alterations in chronic Achilles paratenonitis in athletes. *Pathol Res Pract.* 1985 Oct;180(4):416-23.
15. Jozsa, L., and Balint, B.J. The architecture of human tendons. II. The peritenonium and so-called surface phenomenon. *Traumatologia.* 1978; 21, 293-297
16. Järvinen TA, Jozsa L, Kannus P, et al. Mechanical loading regulates tenascin-C expression in the osteotendinous junction. *J Cell Sci.* 1999;112 Pt 18:3157-3166.
17. Lin TW, Cardenas L, Soslowky LJ. Biomechanics of tendon injury and repair. *J Biomech.* 2004;37(6):865-877.
18. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10(6):312-320.
19. Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005;5(1):22-34
20. Smith RK, Zunino L, Webbon PM, Heinegård D. The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load. *Matrix Biol.* 1997;16(5):255-271.
21. Riley GP, Harrall RL, Cawston TE, Hazleman BL, Mackie EJ. Tenascin-C and human tendon degeneration. *Am J Pathol.* 1996;149(3):933-943.
22. Docheva D, Hunziker EB, Fässler R, Brandau O. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Mol Cell Biol.* 2005;25(2):699-705.
23. Qi J, Dmochowski JM, Banes AN, et al. Differential expression and cellular localization of novel isoforms of the tendon biomarker tenomodulin. *J Appl Physiol (1985).* 2012;113(6):861-871.
24. Sharon N. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycoproteins, glycopeptides and peptidoglycans. Recommendations 1985. *Eur J Biochem.* 1986;159(1):1-6.

25. Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem J.* 2000;350 Pt 1(Pt 1):181-188.
26. Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, Ming CK. Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(9):1151-1157.
27. Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(1):187-202.
28. McNeilly CM, Banes AJ, Benjamin M, Ralphs JR. Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions [published correction appears in *J Anat* 1997 Apr;190(Pt 3):477-8]. *J Anat.* 1996;189 (Pt 3)(Pt 3):593-600.
29. O'Brien M. Structure and metabolism of tendons. *Scand J Med Sci Sports.* 1997;7(2):55-61
30. Robi K., Jakob N., Matevz K., Matjaz V. The Physiology of Sports Injuries and Repair Processes. In: *Current Issues in Sports and Exercise Medicine.* 2013, pp.43-86
31. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg.* 2004;187(5A):11S-16S
32. Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res.* 2002;4(4):252-260.
33. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;84:222-239
34. de la Durantaye M, Piette AB, van Rooijen N, Frenette J. Macrophage depletion reduces cell proliferation and extracellular matrix accumulation but increases the ultimate tensile strength of injured Achilles tendons. *J Orthop Res.* 2014;32(2):279-285.
35. Peterson JM, Barbul A, Breslin RJ, Wasserkrug HL, Efron G. Significance of T-lymphocytes in wound healing. *Surgery.* 1987;102(2):300-305.
36. Gomez, M. The physiology and biochemistry of soft tissue healing. In: Griffin, L. (Ed.), *Rehabilitation of the Injured Knee*, (2nd ed) Mosby Company, St. Louis, MO 1995, pp. 34-44.

37. Killian ML, Cavinatto L, Galatz LM, Thomopoulos S. The role of mechanobiology in tendon healing. *J Shoulder Elbow Surg.* 2012;21(2):228-237.
38. Woo SL, Buckwalter JA. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18-20, 1987. *J Orthop Res.* 1988;6(6):907-931
39. Sharma P, Maffulli N. Basic biology of tendon injury and healing. *Surgeon.* 2005;3(5):309-316.
40. Potenza, A. Mechanisms of healing of digital flexor tendons. 1969., *Hand* 1, 40–41
41. Lundborg G, Rank F, Heinau B. Intrinsic tendon healing. A new experimental model. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1985;19(2):113-117
42. James R, Kesturu G, Balian G, Chhabra AB. Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am.* 2008;33(1):102-112.
43. O'Brien M. The anatomy of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin.* 2005;10(2):225-238.
44. Bergmann RA, Afifi AK, Miyauchi R. *Illustrated Encyclopedia of Human Anatomic Variation.* <http://www.uh.org/Providers/Texbooks/AnatomicVariants/AnatomyHP.html> 2002
45. O'Brien M. Functional anatomy and physiology of tendons. *Clin Sports Med.* 1992;11(3):505-520.
46. Wood Jones F. *Structure and function as seen in the foot.* Baillere, Tindall and Cox; 1944
47. Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, Expert Consult (40th ed)* Elsevier, Churchill Livingstone 2008.
48. Barfred T. Experimental rupture of the Achilles tendon. Comparison of various types of experimental rupture in rats. *Acta Orthop Scand.* 1971;42(6):528-543.
49. Dayton P. Anatomic, Vascular, and Mechanical Overview of the Achilles Tendon. *Clin Podiatr Med Surg.* 2017;34(2):107-113.
50. Maffulli N. Rupture of the Achilles tendon. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81(7):1019-1036.

51. Maganaris CN, Narici MV, Maffulli N. Biomechanics of the Achilles tendon. *Disabil Rehabil.* 2008;30(20-22):1542-1547.
52. Benjamin M, Toumi H, Ralphs JR, Bydder G, Best TM, Milz S. Where tendons and ligaments meet bone: attachment sites ('entheses') in relation to exercise and/or mechanical load. *J Anat.* 2006;208(4):471-490.
53. Wang JH. Mechanobiology of tendon. *J Biomech.* 2006;39(9):1563-1582.
54. Eliasson P, Andersson T, Hammerman M, Aspenberg P. Primary gene response to mechanical loading in healing rat Achilles tendons. *J Appl Physiol* (1985). 2013;114(11):1519-1526.
55. Maffulli N, Waterston SW, Squair J, Reaper J, Douglas AS. Changing incidence of Achilles tendon rupture in Scotland: a 15-year study. *Clin J Sport Med.* 1999;9(3):157-160.
56. Suchak AA, Bostick G, Reid D, Blitz S, Jomha N. The incidence of Achilles tendon ruptures in Edmonton, Canada. *Foot Ankle Int.* 2005;26(11):932-936.
57. Leppilahti J, Puranen J, Orava S. Incidence of Achilles tendon rupture. *Acta Orthop Scand.* 1996;67(3):277-279.
58. Chiodo CP, Wilson MG. Current concepts review: acute ruptures of the achilles tendon. *Foot Ankle Int.* 2006;27(4):305-313.
59. Newnham DM, Douglas JG, Legge JS, Friend JA. Achilles tendon rupture: an underrated complication of corticosteroid treatment. *Thorax.* 1991;46(11):853-854.
60. Starkey C, Ryan JL. *Evaluation of Orthopedic and Athletic Injuries* (2nd ed) Philadelphia: Davis 2002
61. Maffulli N, Wong J, Almekinders LC. Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med.* 2003;22(4):675-692.
62. Andres, BM, & Murrell GA. Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clinical orthopaedics and related research.* 2008;466(7):539-1554.
63. Aragona M, Maisano R, Panetta S, et al. Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *Int J Oncol.* 2000;17(5):981-989.
64. Okarma T. Human primordial stem cells. *Hastings Cent Rep.* 1998;104, 30

65. Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant*. 2013;22(4):701-709.
66. Morgani SM, Canham MA, Nichols J, et al. Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell Rep*. 2013;3(6):1945-1957.
67. Can A. Kök hücrelerin genel özellikleri, embriyonik ve yetişkin kök hücrelere genel bakış. *Hematolog* 2014;4:238-254.
68. Ogawa M, Larue AC, Watson PM, Watson DK. Hematopoietic stem cell origin of mesenchymal cells: opportunity for novel therapeutic approaches. *Int J Hematol*. 2010;91(3):353-359.
69. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-1920.
70. Gulotta LV, Chaudhury S, Wiznia D. Stem cells for augmenting tendon repair. *Stem Cells Int*. 2012;2012:291431.
71. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1076-1084.
72. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells* 2007;25(11), 2739-2749.
73. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, et al. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng*. 2007;13(12):2949-2955
74. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
75. Awad HA, Butler DL, Boivin GP, et al. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*. 1999;5(3):267-277.
76. Liu L, Hindieh J, Leong DJ, Sun HB. Advances of stem cell based-therapeutic approaches for tendon repair. *J Orthop Translat*. 2017;9:69-75. Published 2017 Apr 13.
77. Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, et al. In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20641-20646.

78. Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100-104.
79. Jang KM, Lim HC, Jung WY, Moon SW, Wang JH. Efficacy and Safety of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction of a Rabbit Model: New Strategy to Enhance Tendon Graft Healing. *Arthroscopy*. 2015;31(8):1530-1539.
80. Nelakanti RV, Kooreman NG, Wu JC. Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2015;32:4A.8.1-4A.8.17. Published 2015 Feb 2.
81. Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Kitabevi, 2018-02
82. Milobedzka, J., Kostanecki, V., Lampe, V. Structure of curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 1910; 43:2163-2170
83. Lestari ML, Indrayanto G. Curcumin. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2014;39:113-204.
84. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked?. *Molecules*. 2015;20(5):9183-9213. Published 2015 May 20.
85. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(4):787-809.
86. Ray B, Bisht S, Maitra A, Maitra A, Lahiri DK. Neuroprotective and neurorescue effects of a novel polymeric nanoparticle formulation of curcumin (NanoCurc™) in the neuronal cell culture and animal model: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2011;23(1):61-77.
87. Wang T, Yan R, Xu X, et al. Curcumin represses adipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells via inhibiting kruppel-like factor 15 expression. *Acta Histochem*. 2019;121(2):253-259.
88. Ormond DR, Shannon C, Oppenheim J, et al. Stem cell therapy and curcumin synergistically enhance recovery from spinal cord injury. *PLoS One*. 2014;9(2):e88916. Published 2014 Feb 18.
89. Bengmark S. Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase

- inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30(1):45-51.
90. Xu XY, Meng X, Li S, Gan RY, Li Y, Li HB. Bioactivity, Health Benefits, and Related Molecular Mechanisms of Curcumin: Current Progress, Challenges, and Perspectives. *Nutrients.* 2018;10(10):1553. Published 2018 Oct 19.
 91. Li HY, Yang M, Li Z, Meng Z. Curcumin inhibits angiotensin II-induced inflammation and proliferation of rat vascular smooth muscle cells by elevating PPAR- γ activity and reducing oxidative stress. *Int J Mol Med.* 2017;39(5):1307-1316.
 92. Zhang Y, Liu Z, Wu J, et al. New MD2 inhibitors derived from curcumin with improved anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem.* 2018;148:291-305.
 93. Dikmen, M., Kaya-Tilki, E., Engur, S., & Ozturk, Y. Neuritogenic activity of epigallocatechin gallate and curcumin combination on rat adrenal pheochromocytoma cells. *Fresenius Environ Bull.* 2017;26(7):4726-4733
 94. El-Bahr SM. Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1. *Phytother Res.* 2015;29(1):134-140.
 95. Dai C, Tang S, Li D, Zhao K, Xiao X. Curcumin attenuates quinocetone-induced oxidative stress and genotoxicity in human hepatocyte L02 cells. *Toxicol Mech Methods.* 2015;25(4):340-346.
 96. Costa-Almeida R, Calejo I, Gomes ME. Mesenchymal Stem Cells Empowering Tendon Regenerative Therapies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):3002. Published 2019 Jun 19.
 97. Benevides G, Pimentel E, Toyama M, Novello JC, Marangoni S, Gomes L. Biochemical and biomechanical analysis of tendons of caged and penned chickens. *Connect Tissue Res.* 2004;45(4-5):206-15.
 98. Kwon DR, Park GY, Moon YS, Lee SC. Therapeutic Effects of Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Combined with Polydeoxyribonucleotides on Full-Thickness Rotator Cuff Tendon Tear in a Rabbit Model. *Cell Transplant.* 2018;27(11):1613-1622.
 99. Park GY, Kwon DR, Lee SC. Regeneration of Full-Thickness Rotator Cuff Tendon Tear After Ultrasound-Guided Injection With Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Model. *Stem Cells Transl Med.* 2015;4(11):1344-1351.

100. Güleç A, Türk Y, Aydın BK, Erkoçak ÖF, Safalı S, Ugurluoğlu C. Effect of curcumin on tendon healing: an experimental study in a rat model of Achilles tendon injury. *Int Orthop*. 2018;42(8):1905-1910
101. Kulac M, Aktas C, Tulubas F, et al. The effects of topical treatment with curcumin on burn wound healing in rats. *J Mol Histol*. 2013;44(1):83-90.
102. Mohanty C, Das M, Sahoo SK. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. *Mol Pharm*. 2012;9(10):2801-2811.
103. Mun SH, Joung DK, Kim YS, et al. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*. 2013;20(8-9):714-718.
104. Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, et al. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen*. 1998;6(2):167-177.
105. Jiang D, Gao P, Lin H, Geng H. Curcumin improves tendon healing in rats: a histological, biochemical, and functional evaluation. *Connect Tissue Res*. 2016;57(1):20-27.
106. Udalamaththa VL, Jayasinghe CD, Udagama PV. Potential role of herbal remedies in stem cell therapy: proliferation and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):110. Published 2016 Aug 11.
107. Sharifi S, Zununi Vahed S, Ahmadian E, et al. Stem Cell Therapy: Curcumin Does the Trick. *Phytother Res*. 2019;33(11):2927-2937.
108. Attari F, Zahmatkesh M, Aligholi H, et al. Curcumin as a double-edged sword for stem cells: dose, time and cell type-specific responses to curcumin. *Daru*. 2015;23(1):33. Published 2015 Jun 12.
109. Bahadır A, Ceyhan A, Öz Gergin Ö, et al. Protective effects of curcumin and beta-carotene on cisplatin-induced cardiotoxicity: An experimental rat model. *Anatol J Cardiol*. 2018;19(3):213-221.
110. Siviero, A., Gallo, E., Maggini, V., Gori, L., Mugelli, A., Firenzuoli, F., & Vannacci, A. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. *Journal of Herbal Medicine*. 2015; 5(2): 57-70.
111. Zhang W, Li X, Comes Franchini M, et al. Controlled release of curcumin from curcumin-loaded nanomicelles to prevent peritendinous adhesion during

- Achilles tendon healing in rats. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:2873-2881. Published 2016 Jun 22.
112. Black DA, Lindley S, Tucci M, Lawyer T, Benghuzzi H. A new model for repair of the Achilles tendon in the rat. *J Invest Surg*. 2011;24(5):217-221.
 113. Kraus TM, Imhoff FB, Wexel G, et al. Stem cells and basic fibroblast growth factor failed to improve tendon healing: an in vivo study using lentiviral gene transfer in a rat model. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(9):761-769.
 114. Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P. Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(2):399-407.
 115. Bring D, Reno C, Renstrom P, Salo P, Hart D, Ackermann P. Prolonged immobilization compromises up-regulation of repair genes after tendon rupture in a rat model. *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20(3):411-417.
 116. Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, Risteli J. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. *J Orthop Res*. 2002;20(6):1352-1357.
 117. Hope M, Saxby TS. Tendon healing. *Foot Ankle Clin*. 2007;12(4):553-v.
 118. Omachi T, Sakai T, Hiraiwa H, et al. Expression of tenocyte lineage-related factors in regenerated tissue at sites of tendon defect. *J Orthop Sci*. 2015;20(2):380-389.
 119. Dex S, Lin D, Shukunami C, Docheva D. Tenogenic modulating insider factor: Systematic assessment on the functions of tenomodulin gene. *Gene*. 2016;587(1):1-17.
 120. Themes UFO. Gene Therapy for Tendon Healing. *Plastic Surgery Key*. Published March 5, 2016. Accessed November 14, 2020. <https://plasticsurgerykey.com/gene-therapy-for-tendon-healing/>