

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

PROF. DR. NEDİM SAVACI
ANABİLİM DALI BAŞKANI

KÜLTÜRE EDİLMİŞ FLEKSÖR TENDON FİBROBLASTLARINA
5-FLOUROURASİL UYGULAMASININ
TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR BETA-1 GEN EKSPRESYONU
ÜZERİNE OLAN ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
DR. ZEYNEP KARAÇOR

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. MUSTAFA KESKİN

KONYA-2007

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2. 1 Fleksör tendonların yapısı ve histolojisi	5
2. 2 Fleksör tendonların beslenmesi	6
2. 3 Tendon iyileşmesinin fazları	7
2. 4 Tendon iyileşmesinin mekanizması ve iyileşmeye cevabın modülasyonu	9
2. 5 Tendon iyileşmesi ve Transforming Growth Faktör – Beta	11
2. 6 Polimeraz zincir reaksiyonu	12
3. MATERYAL VE METOD	14
3. 1 Gruplar	14
3. 2 Köpek fleksör tendonundan hücre kültürü hazırlanması ve 5-Flourourasil uygulanması	14
3. 3 Polimeraz zincir reaksiyonu ile transforming growth faktör beta -1 gen ekspresyonunun ölçülmesi	16
3. 3. 1 5-Flourourasil uygulanmış hücre kültürlerinden RNA izolasyonu ve saflaştırılması	16
3. 3. 2 “Complementary DNA” Sentezi	17
3. 3. 3 Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu	17
3. 3. 4 İstatiksel analiz	21
4. BULGULAR	22
4. 1 Üçüncü gün TGF-β1 gen ekspresyon düzeyleri	22
4. 2 Yedinci gün TGF-β1 gen ekspresyon düzeyleri	23
4. 3 Ekspresyonda 3. günden 7. güne olan değişim	24
5. TARTIŞMA	25
6. ÖZET	33
7. SUMMARY	34

8. KAYNAKLAR	35
---------------------------	-----------

KISALTMALAR

TGF- β : Transforming Growth Factor- Beta

5-FU: 5- Flourourasil

DNA: Deoksiribonükleic Acid

RNA: Ribonucleic Acid

MEM: Minimum Essential Medium

rpm: rotor per minute

RT- PCR: Real Time Reverse Transcription –Polimerase Chain Reaction

EDTA: Ethylendiaminetetraacetic Acid

dNTP: Deoxynucleotide Triphosphate

HA: Hyaluronan

MMPs: Matrix Metalloproteinases

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fleksör tendon yaralanmalarında postoperatif dönemde görülen yapışıklıklar halen önemli bir sorundur.

Fleksör tendon yaralanması kompleks bir hücrel ve kemotaktik cevabı başlatır. Yapışıklık bölgesi incelendiğinde subsinovyal dokuda ve tendon fibroblastlarında yoğun bir inflamatuvar reaksiyon görülmektedir. Transforming Growth Faktör - Beta tendon iyileşmesinde ve yapışıklık oluşumunda etkili olduğu bilinen önemli bir büyüme faktörüdür. Özellikle de profibrotik faktör olarak bilinen Transforming Growth Faktör Beta-1 skar oluşumunda etkilidir.

Tendon onarımları sonrası yapışıklık oluşumunu önlemek için birçok kimyasal ajan denenmiştir. Son zamanlarda deneysel çalışmalarda kullanılan 5-Flourourasil'in yapışıklığı azalttığı bulunmuştur fakat bu olumlu etkisini nasıl gösterdiği tam olarak bilinmemektedir.

Planlanan bu deneysel çalışmada, kültüre tendon fibroblastlarına 5-FU uygulanarak Transforming Growth Faktör Beta-1 geninin ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. FLEKSÖR TENDONLARIN YAPISI VE HİSTOLOJİSİ

El hareketlerinin önemli bir bölümü uzun ekstrinsik fleksör tendonlar yoluyla gerçekleştirilmektedir. Bu ekstrinsik tendonlar proksimalde elin ekstrinsik bir kasından orijin alarak distalde proksimal veya distal falanks yapışırılar.

Fleksör tendon dokusunun ana komponenti ekstrasellüler matrikstir (1,2,3). Bu ekstrasellüler matriksin major bileşeni olan Tip 1 kollajen ise tendon kuru ağırlığının yaklaşık % 70'ini oluşturmaktadır. Tendonun geri kalan kısmını fibroblastlar, kan damarları, sinirler ve lenfatikler oluşturur. Tendon yüzeyindeki fibroblastlara epitenon , içinde yerleşenlere ise endotenon denilmektedir. Bunlar kollajen üretiminden sorumlu primer hücrelerdir. Henderson ve arkadaşları tendon yüzeyindeki hücrelerin Tip 1 ve Tip 3 kollajen üretirken, içindeki hücrelerin sadece Tip 1 kollajen ürettiğini göstermiştir (4). Kollajen sentezi, messenger-RNA oluşturmak için DNA transkripsiyonu ile başlar. Daha sonra granüllü endoplazmik retikulum ribozomlarında polipeptid zincirlere translasyon gerçekleşir. Prolin ve lizin hidrosilasyonundan sonra helikal prokollajen ekstrasellüler ortama taşınarak amino ve karboksil uçları fibril oluşumu için temizlenir. Oluşan tendon fibrilleri çapraz bağlanarak tendon fiberlerini meydana getirirler. Bu fiberler gruplaşarak fasikülleri, fasiküllerde tendon paketlerini oluştururlar (5).

Ekstrasellüler matrikste Tip 1 kollajen dışında glikozaminoglikanlar (hyaluronik asit, kondroidin-4 sülfat, dermatan sülfat ve heparan sülfat), glikoproteinler ve nonkollajenöz proteinler bulunmaktadır. Bunlar güç uygulaması esnasında kayganlık sağlar ve tendonun deforme olmasını önler (5).

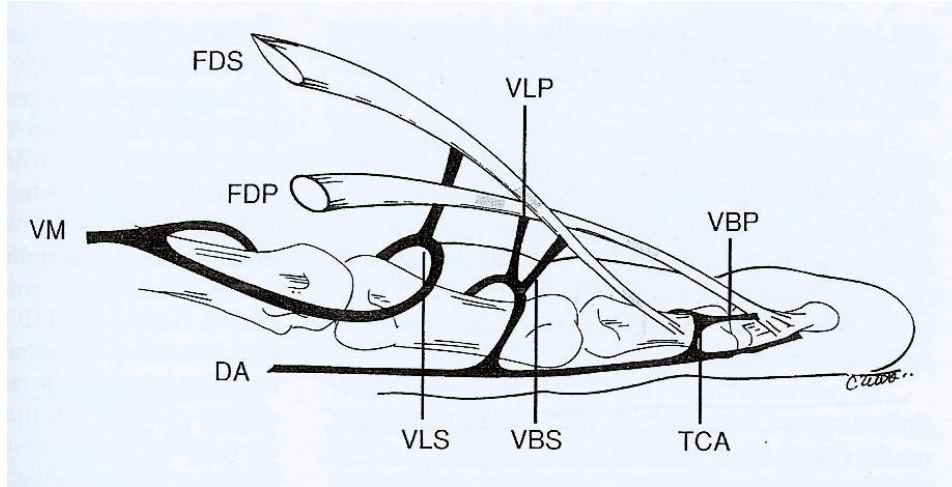
Ekstraselüler matriks glikoproteini olan fibronektinin, hücre-hücre, hücre-matriks

adhezyonu, hücre morfolijisinin düzenlenmesi ve hücre göçü gibi birçok fonksiyonu olduğu bilinmektedir (6,7). Epitenon hücrelerinde endotenon hücrelerine göre 3.8 kat daha fazla fibronektin düzeyi olduğu gösterilmiştir (8). Yara iyileşmesi esnasında epitenon hücrelerinde fibronektin miktarı artmaktadır (9).

Alfa düz-kas aktin de ekstrasellüler matriks komponentlerinden birisidir. Tendon hücrelerinin, uzunlamasına organize aktin fibrilleri ile yan yana dizildikleri gösterilmiştir (10).

2. 2. FLEKSÖR TENDONLARIN BESLENMESİ

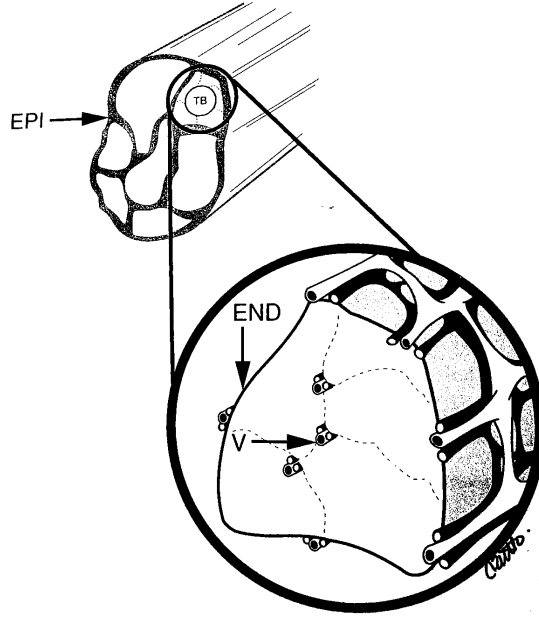
Fleksör tendon perfüzyonu dijital arterlerden çıkan vasküler ağla (vincula) sağlanmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1 : Fleksör tendon perfüzyonu VM:Volar metakarpal arter, DA:Dijital arter, VLS: Vinculum longum süperficialis, VLP:Vinculum longum profundus, VBP:Vinculum breve profundus VBS:Vinculum breve süperficialis (Williamson DG, Richards R. *Flexor tendon injuries and reconstruction. Plastic Surgery Volume VII 2nd ed. Mathes S.J.Saunders Philadelphia. S:357.2006*)

Bu vasküler ağ, intratendinöz vasküler ağla birleşmektedir ve bu intrinsik beslenme

endotenon içinde kollajen fibrillerine paralel olarak seyretmektedir (Şekil 2).



Şekil 2: Tendon anatomisi TB: Tendon bundles EPI : Epitenon END: Endotenon V: İntrinsik vaskularite (Williamson DG, Richards R. *Flexor tendon injuries and reconstruction. Plastic Surgery Volume VII 2nd ed. Mathes S.J.Saunders Philadelphia. S:354.2006*)

Fleksör tendon beslenmesinde diğer önemli bir mekanizma da sinovyal diffüzyondur. Kapiller imbibisyon ve dijital hareketin pompa etkisi ile sinovyal sıvı tendon yüzeyindeki küçük açıklıklardan içeri girer (11).

2.3 TENDON İYİLEŞMESİNİN FAZLARI

Tendon iyileşmesi 3 faza bölünmüştür.

1. İnflamasyon fazı
2. Fibroblastik proliferasyon fazı
3. Remodeling fazı

İyileşme süreci kategorik olarak bölünmesine rağmen aslında iç içe girmiş fazların zamanla diğerine baskın hale gelerek devam etmesidir.

Fleksör tendon yaralanması kompleks bir kemotaktik ve hücrel cevabı başlatır. Kan pıhtısı oluşumu, endotelin açığa çıkması ve trombosit aktivasyonu sonrasında inflamatuvar mediatörler, sitokinler ve büyüme faktörleri iyileşme sürecini başlatır (12,13,14). Sonuç olarak vasküler geçirgenlik artar ve inflamatuvar hücreler fagositoz için aktive olur. Neovaskülarizasyon ile kollajen üretimi için hücrel farklılaşma stimüle edilir. İntrinsik ve ekstrinsik fibroblastlar kollajen sentezi için yaralanma sahasına göç eder. Makrofajlar ve polimorfonükleer hücreler yara debrisini temizler. Bu işlem ilk 3-5 gün içinde maksimumdur. Bu süre esnasında tendondaki iyileşme gerilimi suture gerilimine bağlıdır.

Yaklaşık 3. günden 21. güne kadar fibroblastik proliferasyon fazı dominanttır. Üçüncü günde kollajen depozisyonu tespit edilir. Kollajen başlangıçta random olarak depolanır. Tip 3 kollajenin Tip 1'e oranı artar. Fibroblastlar prolifer olmaya devam eder ve aynı anda anjiogenezis gerçekleşir. Üçüncü haftada fibroblastlar tendon yüzeyinde longitudinal olarak oryante olmaya başlarlar . Metalloproteinazların kollajen üretimini düzenledikleri düşünülmektedir ve 4. günden 9. güne kadar yarada bulunmaktadır (15). Fibronektin fibroblastlar için kemotaktiktir ve hücrel göç için zemin oluşturur. Fibronektin; kılıf, epitenon ve endotenonda azalan miktarlarda mevcuttur ve tendon iyileşmesi esnasında 7. ve 17. günler arasında düzeyi artmaktadır (13,16).

Kollajen üretimi yıkımına eşitlendiğinde remodeling fazı başlar. Bu genellikle 4. haftada başlar ve 6. aya kadar devam edebilir. Tendon gerilimi 21. günden sonra hızla artar. Tendon stresi ve hareket kollajen fibrillerinin reorganizasyonunu artırır. Kollajen fibrilleri tendon uzun aksı boyunca organize olur ve iyileşme gerilimi büyük miktarda artar. Ek olarak bu periodda skar dokusundaki miktar azalır. 20. hafta ile birlikte skar dokusu tamamen remodelize olur ve normal tendondan minimal histolojik farklılıklar

gösterir (17).

2. 4 TENDON İYİLEŞMESİNİN MEKANİZMASI ve İYİLEŞMEYE CEVABIN MODÜLASYONU

Deneysel araştırmalar fleksör tendonların intrinsik ve/veya ekstrinsik yolla iyileşme kapasiteleri olduğunu göstermiştir (18,19,20,21,22). Ekstrinsik ve intrinsik iyileşme aynı anda meydana gelir ve rölatif etkileşimleri yaralanmanın tipine, cerrahi tekniğe ve postoperatif rehabilitasyona bağlıdır.

İntrinsik iyileşme basit olarak tendonun kendi içindeki elemanlarıyla iyileşmesini tanımlar. İntratendinöz kan dolaşımı ve sinovyal diffüzyon yoluyla beslenen epitenon ve endotenon tenositleri intrinsik iyileşmeyi sağlar (23,24,25). Tendon iyileşmesinde intrinsik yolun rolünü araştırmanın en ideal yöntemi kan elemanları da dahil tüm ekstra tendinöz hücrelerden arındırılmış hücre kültür ortamlarıdır (26,27).

Ekstrinsik iyileşme tendon dışında yerleşen fibroblastlar yoluyla olur. Yapışıklıkların oluşmasından sorumlu tutulmaktadır. Oluşan yapışıklıklar erken dönemde besleyici damar desteği sağlamaktadır fakat daha sonra fonksiyon kaybına neden olmaktadır.

İntrinsik iyileşmenin baskın olduğu durumlarda tendonlar minimal yapışıklıkla iyileşmektedir. Tersine ekstrinsik iyileşme dominant olursa tendon ve onu çevreleyen tendon kılıfı arasında, belirgin derecede tendon hareketini sınırlandıran kalın yapışıklıklar gözlenir. Eğer ekstrinsik ve intrinsik iyileşme arasındaki hassas denge değiştirilebilirse yapışıklık oluşumu en aza indirilebilir.

Yapılan çalışmalarda ekstrinsik iyileşmeyi modüle ederek yapışıklık oluşumunu en aza indirmek amacıyla çok farklı kimyasal ajanlar kullanılmıştır. Steroidler,

antihistaminikler ve beta – aminopropionitrilin ile klinik olarak skar oluşununun azaltıldığı gösterilememiştir (28,29). İbuprofen ve indometazinin çok az etkili olduğu bulunmuştur (30,31).

Yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkrit olan hyaluronanın tendon iyileşmesi ve yapışıklıklar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı *invivo*, *invitro* kombine bir çalışmada HA'nın iyileşmeyi belirgin etkilemediği saptanmıştır. Solüsyon şeklinde tek doz uygulanan HA'nın yedi gün içinde tamamen ortamdan kaldırıldığı ve etkisiz hale geldiği bulunmuştur (32).

Kömürcü ve arkadaşları tavşan fleksör tendonlarına lokal aprotinin uygulayarak yapışıklık oluşumu üzerine etkisini araştırmışlardır. Primer kılıf tamiri ile birlikte 15000 IU/kg lokal aprotinin uyguladıkları grupta postoperatif en iyi sonuçların elde edildiğini bildirmişlerdir (33).

Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan 5- Fluorourasil' in lokal ve tek doz olarak uygulanmasının tendon yapışıklığını azalttığı gösterilmiştir (34,35). 5-FU kanser kemoterapisinde kullanılan bir antimetabolittir. Oftalmik cerrahlar ise zedelenmiş gözde skar oluşumunu kontrol altına almak için klinik olarak kullanmaktadırlar (36). 5-FU'in hücre kültürlerinde fibroblast proliferasyonunu inhibe ettiği ve bu supresyonun hücre ölüm bulguları olmadan 36. güne kadar devam ettiği gösterilmiştir (37). Bu etkiler uygulama alanı ve süresi ile sınırlıdır (38,39,40).

Occleston ve arkadaşları oküler fibroblastların 5-FU ile muamele edilmesinin matriks molekülleri ve büyüme faktörlerinin salınımında azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Düşük doz 5-FU uygulanan hücreler migrasyon ve sekresyon gibi belli fonksiyonlarını kaybetmemektedirler (41). Bu araştırmalar, 5-FU'in özellikle sinovyal

kılıf içindeki fleksör tendon cerrahisi sonrasında görülen yapışıklıklarda da etkili olabileceğini gündeme getirmiştir ve ilacın etkinliği fleksör tendonlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (34,35).

2. 5. TENDON İYİLEŞMESİ VE TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR - BETA

Büyüme faktörleri iyileşme sürecinde tendon fibroblastlarının göçünü ve proliferasyonunu düzenleyen kimyasal sinyallerdir.

TGF- β çok sayıda biyolojik aktivitesi tanımlanmış olan önemli bir büyüme faktörüdür. Fibroblast ve makrofaj stimülasyonu, kollajen üretimi ve metalloproteinaz inhibitör düzeylerini arttırma gibi etkileri vardır. TGF- β 1, β 2 ve β 3 olmak üzere üç izoformu bulunmaktadır. Bu izoformların % 60-80'i homologdur ve 12-kDa polipeptid dimerleridir. TGF- β 1 ve β 2 profibrotik olarak bilinmektedir ve skar oluşumunda etkilidir. β 3' ün bazı modellerde antiskar etkisi olduğu gösterilmiştir. TGF- β peptidleri R1, R2, R3 olarak tanımlanan üç membran reseptörüne bağlanır. R1 ve R2 transmembran serin/treonin kinaz reseptörleridir ve TGF- β sinyal iletimi için gereklidir. R3 membran bağımlı bir proteoglikandır. R3 başlıca R2' ye ligandları sunar. Bütün TGF- β peptid ve reseptör izoformları, yara iyileşmesinde aktif olan hücrelerin çoğu tarafından üretilmektedir ve yara iyileşme sürecinin temel düzenleyicileridir (42).

TGF- β 'nın tendon iyileşmesinde de önemli etkileri olduğu gösterilmiştir. Anjiogenezis, kayma yüzeyi restorasyonu ve yapışıklık oluşumunda etkili olduğu bilinmektedir (43). Yaralanmış tendonlarda yükselmiş TGF- β düzeyi tespit edilmiş ve bu yükselmiş TGF- β düzeyinin 8. haftaya kadar devam ettiği gösterilmiştir (44). TGF- β 1'in fibroblastlar ile ekstraselüler matriks proteinleri arasındaki etkileşimi düzenlediği

bilinmektedir (45). Tendon onarımı sonrasında üç TGF- β reseptör düzeyinde de artış olduğu gösterilmiştir ve eksojen TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 uygulamasının tüm tendon hücre tiplerinde kollajen Tip 1 ve Tip 3 üretimini arttırdığı bulunmuştur (42).

Zon 2 fleksör tendon iyileşmesinin araştırıldığı deneysel bir çalışmada TGF- β 1 gen ekspresyonu, in situ hibridizasyon ve immunohistokimyasal yöntemlerle 1,3,7,14,28 ve 56. günlerde ölçülmüştür. Yaralanma öncesi tenosit ve epitenositlerde az miktarda TGF- β 1 mRNA saptanırken, yaralanma sonrasında TGF- β 1 mRNA ekspresyonu yapan hücre sayısının çok büyük oranda artmış olduğu saptanmıştır. Tenosit, epitenosit ve bölgeye göç eden inflamatuvar hücrelerin tümü büyük miktarlarda TGF- β 1 sentezlemeye başlamışlardır. TGF- β 1 aktif olan hücrelerden latent propeptid şeklinde salındıktan sonra yaralanma ile oluşan asidik ortamda proteolitik yıkımla aktif molekül haline dönüşmektedir. Yaralanma ile artmaya başlayan bu sentezin ikinci aya kadar yüksek düzeylerde kaldığı gözlenmiştir. Çalışmada, TGF- β 1'in tendon iyileşmenin tüm fazlarında etkili olduğu ve iyileşme sonunda sentez miktarının azalmasının da bir otokontrol mekanizmasına bağlı olduğu vurgulanmıştır (12).

2. 6 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Tüm dünyada canlıları oluşturan genetik yapının çözümlenmesi, ortaya çıkarılan bu yapıdaki genlerin yerlerinin saptanması, işlevlerinin anlaşılması, ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalar hızla devam etmektedir. Bu amaç doğrultusunda, belirlenen hedefe ulaşmayı kolaylaştıracak, hızlandıracak yöntemlerin geliştirilmesi zorunlu hale gelmiştir. Geliştirilen bu yöntemlerin en önemlilerinden birisi Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("Polymerase Chain Reaction")'dur.

1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen metod nükleik asitlerin canlı organizma içinde bulunmadan, uygun koşullar altında çoğaltılmasına dayanır (46).

PCR da 30 veya 40 kez tekrarlanan 3 temel basamak vardır. Bu basamaklar reaksiyon karışımını içeren tüpleri çok kısa zaman içinde ısıtıp soğutabilen özel bir cihaz tarafından gerçekleştirilmektedir.

1. Deoksiribonükleik asidin (DNA) iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması ("Denaturation")
2. Sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması ("Annealing")
3. Zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması ("Extension")
aşamalarından meydana gelir

Bir PCR döngüsü için gerekli olan beş ana madde vardır: DNA örneği; çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen bir çift sentetik primer; deoksi-nükleotit-trifosfatlar; yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi; uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı.

3. MATERYAL – METOD

Mayo Klinik Biyomekanik Laboratuvarı 90603004 no'lu etik kurul izni ile 15-03-2005 tarihinde çalışma planlandı. Çalışma için bir yaşında, ağırlığı 15 kg olan Mongrel cinsi köpekten arka ayak ikinci fleksör digitorum profundus tendonu alınarak hücre kültürü hazırlandı.

3.1 Gruplar

Hücre kültürleri kontrol (n=10) ve 5-FU (n=30) grubu olmak üzere iki ana gruba ayrıldı. 5-FU grubu ilaç dozuna göre kendi içinde üç alt gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu

Kontrol: 0 mgr/ml 5-FU (n=10)

5-FU Grubu

Grup 1: 5 mgr/ml 5-FU (n=10)

Grup 2: 15 mgr/ml 5-FU (n=10)

Grup 3: 25 mgr/ml 5-FU (n=10)

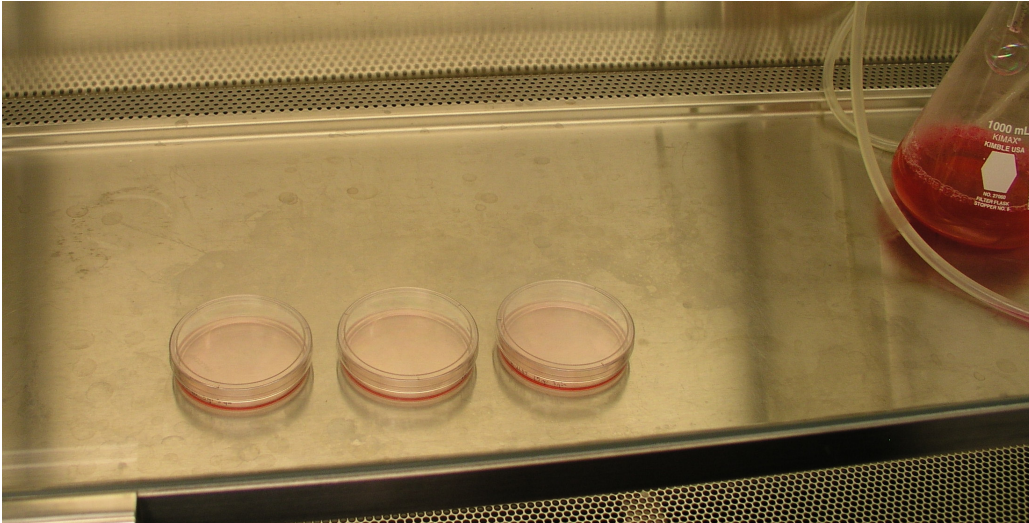
5-FU gruplarına ilaç Minimum Essential Media (MEM) (MEM w/L-glut and Earle's salts 500ml, Fisher, USA) besleme solüsyonu ile dilüe edilerek uygulanırken kontrol gruplarına sadece MEM solüsyonu uygulandı.

3.2 Köpek fleksör tendonundan hücre kültürü hazırlanması ve 5-FU uygulanması

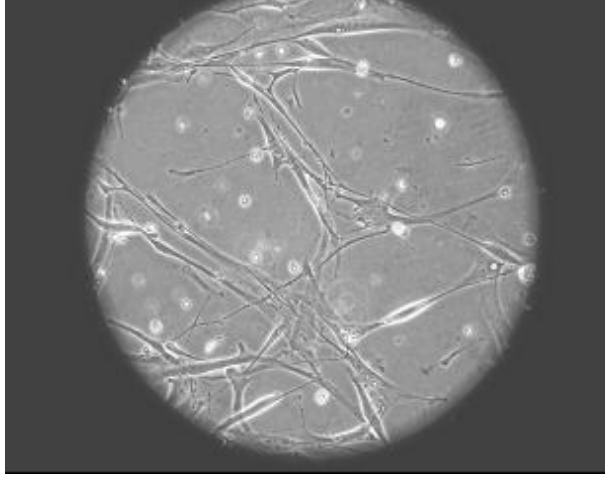
Köpek fleksör digitorum profundus tendonu alınarak epitenon hücreleri elde edildi. Epitenon hücresi elde etmek için daha önce Banes ve arkadaşları tarafından tanımlanmış tekniğin modifikasyonu kullanıldı (47). Tendon lup şeklinde bağlandıktan sonra, 20 mM'lik HEPES solüsyonu (HEPES 1M Solution 238.3 mgr/ml, 100 ml, Fisher, USA) ile hazırlanan % 0.25'lik tripsin (Trypsin 1X in HBSS, 100 ml, Fisher, USA) içinde 37°C ve % 5 CO₂ ortamı bulunan inkübatörde 20 dakika bekletildi. Süpernatant kısmı toplandıktan sonra 1132 rpm'de tripsin solüsyonunu uzaklaştırmak için 5 dakika

santrifüj edildi. Elde edilen epitenon hücreleri 100 mm'lik kültür tabaklarına (Falcon 100x20 mm, CN: 353003, USA) ekildi. Üzerine 10 ml'lik %10'luk Fetal Bovine Serum (Fetal Bovine Serum 500ml, Fisher, USA) ve % 0.5'lik penisilin/ streptomisin (Pen Strep 5000 IU, Fisher, USA) içeren MEM besleme solüsyonu ilave edildi. 37°C'de inkübatöre konuldu. İki günde bir besleme solüsyonu değiştirilerek hücrelerin çoğalması için beklenildi (Resim 1,2).

3-5 pasaj sonrasında çoğalan tendon fibroblastları toplanarak hemositometre (Neubauer, Germany) ile hücre sayısı belirlendi. Kültür tabaklarına yarım milyon tendon hücresi konularak MEM solüsyonu ile dilüe edilmiş 0, 5, 15, 25 mg/ml dozlarında 5-FU (5-Flourouracil 50mgr/ml flacon, Ebewe Pharma, Austria) 1 dakika süre ile uygulandı. Bir dakika sonunda uygulanan 5-FU aspire edilerek MEM solüsyonu ile toplam 15 dakikada üç kez yıkama yapıldı.



Resim 1: Kültür tabaklarına ekilmiş tendon fibroblastları



Resim 2: Tendon fibroblastlarının mikroskopik görünümü (40x büyütme)

3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile TGF- β 1 gen ekspresyonunun ölçülmesi

5-FU uygulamasından sonraki 3. ve 7. günlerde hücreler toplanarak RNA'ları izole edildi ve TGF- β 1 gen ekspresyonu Real Time Reverse Transkripsiyon - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile test edildi

3.3.1 5-FU uygulanmış hücre kültürlerinden RNA izolasyonu ve saflaştırılması

5-FU ile tedavi edilmiş ve kontrol grubundaki hücrelerin RNA'ları trizol solüsyonu ile elde edildi. Kısaca, $5-10 \times 10^6$ hücre üzerine 1 ml trizol (Trizol Reagent CN: 15596-026, Invitrogen, USA) solüsyonu konularak 15-30°C de 5 dakika inkübe edildi. Her 1 ml trizol solüsyonu üzerine 0.2 ml kloroform eklendi. Örnekler 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda RNA'nın bulunduğu renksiz üst berrak kısım yeni bir tüpe transfer edildi. RNA'yı çöktürmek amacıyla 0.5 ml izopropil alkol ilave edildi. 15-30°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst kısmı uzaklaştırılarak elde edilen RNA 1 ml % 75'lik etanol

solüsyonu ile yıkandı.

Elde edilen RNA'nın saflaştırılması için DNA kontaminasyonunu uzaklaştırmak amacıyla DNase I, RNase-free (Roche CN: 776 785, Germany) ve Protector RNase Inhibitor (Roche CN: 3 335 399, Germany) kullanıldı. Kısaca elde edilen total RNA, 50mM Tris-EDTA, 10mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 7mM β -merkaptotanol, RNase inhibitörü ve RNase-free DNase karışımından hazırlanan solüsyon içinde 37°C'de 1 saat bekletildi. RNA saflaştırılması sonrasında elde edilen RNA miktarı Ribogreen RNA Quantification Kit (Invitrogen CN: R11490, USA) kullanılarak tespit edildi.

3.3.2. “Complementary DNA” Sentezi

Elde edilen RNA saflaştırıldıktan sonra 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche CN: 1 483 188, Germany) kullanılarak complementary DNA'ya reverse transkripte edildi. İçinde 3.2 mikrogram random primer, 1 mM deoksinükleotid mix, 5 mM magnezyum klorür, 50 ünite RNase inhibitörü ve Reverse Transkriptaz olacak şekilde 20 mikrolitre reaksiyon solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan solüsyon önce 25°C'de 10 dakika ardından 42°C'de 1 saat inkübe edilerek complementary DNA'ya reverse transkripte edildi. Reaksiyon sonunda elde edilen DNA miktarı PicoGreen dsDNA Quantification Kit (Invitrogen CN: P7589, USA) kullanılarak tespit edildi.

3.3.3 Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Elde edilen DNA'lar RT-PCR ile amplifiye edilerek TGF- β 1 gen ekspresyonları test edildi.

RT-PCR reaksiyonu için gerekli olan forward ve reverse TGF- β 1 primerleri

LightCycler Probe Design Software 2.0 programında dizayn edildi (Tablo 1).

TGF- β 1	<i>LightCycler Probe Design Software</i>
<i>Forward</i>	ACCATTCATGGCATGAACC
<i>Reverse</i>	CAGATCCTTGCGGAAGTC

Tablo 1 : TGF- β 1'in primer gen dizilimleri

RT-PCR LightCycler DNA Master SYBR Green I Kit (Roche CN: 2 015 099, Germany) kullanılarak kapiller cam tüpler içinde LightCycler cihazında (Rapid thermal cycling instrument of Roche-Roche Diagnostics GmbH, Germany) yapıldı.

RT-PCR aşağıda tanımlanan standart protokol kulladığımız primerlere göre düzenlenerek yapılmıştır (Tablo 2).

1. Aşağıdaki komponentleri içeren karışım hazırlanarak steril mikrotüplere konuldu.

Komponent	Hacim	Son konsantrasyon
H ₂ O, steril	11.6 mikrolitre	
MgCl ₂ stok solüsyonu	2.4 mikrolitre	4 mM
Primer karışımı	2 mikrolitre	0.5 mikro M
LightCycler DNA Master SYBR Green I	2 mikrolitre	1 X
Total	18 mikrolitre	

Tablo 2: RT-PCR için tanımlanan standart protokol

2. Hazırlanan karışım kibarca sallanıp LightCycler kapiller tüplere konuldu (Resim 4).

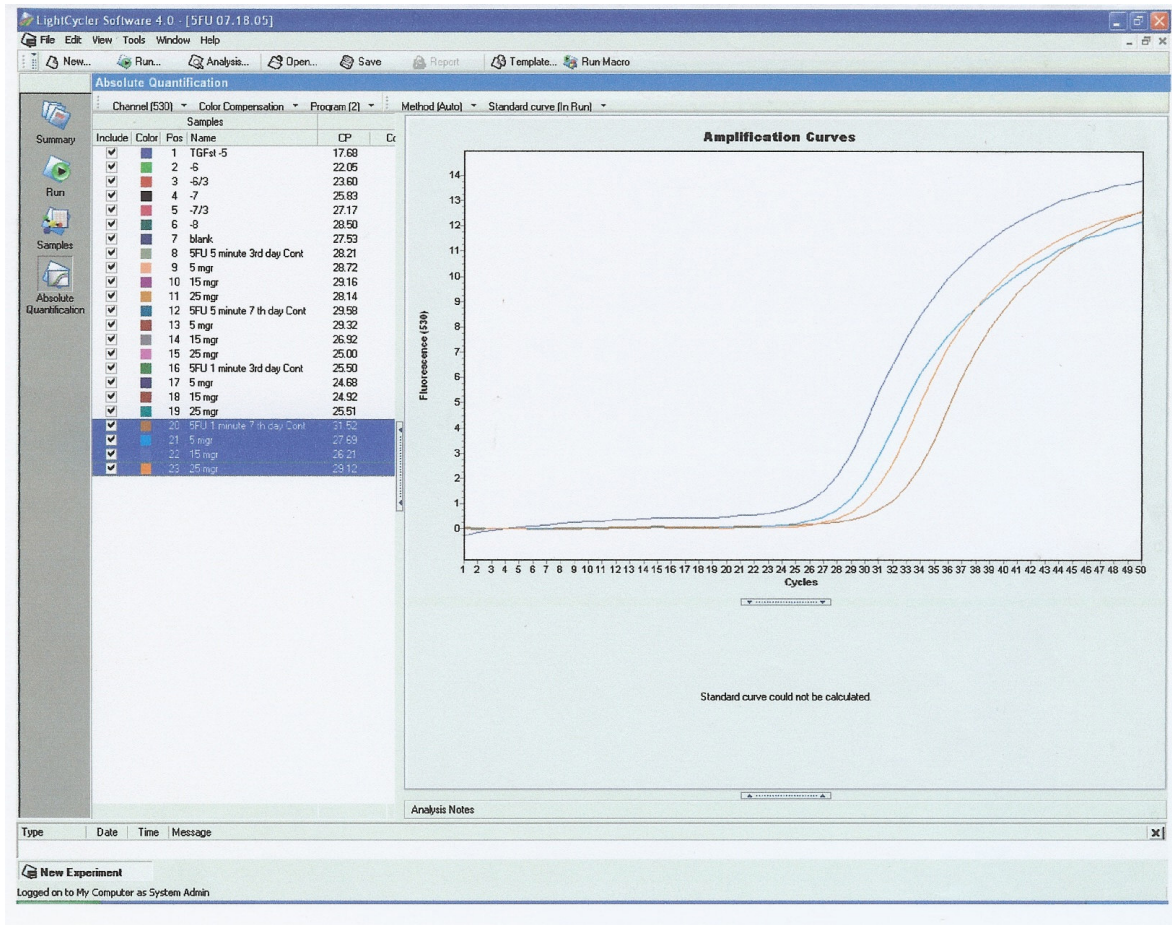
3. Üzerine 2 mikrolitre DNA eklenerek 700xg'da 5 saniye santrifüj edildi
4. Kapiller tüpler yuvarlak taşıyıcılara konularak Light-Cycler enstrümanına yerleştirildi ve reaksiyon başlatıldı (Resim 5).
5. Reaksiyon sonunda hedef DNA kuantifiye edildi (Resim 6).



Resim 4: Hazırlanan karışımın konulduğu cam tüpler ve bu tüplerin yerleştirildiği yuvarlak taşıyıcılar



Resim 5: Light-Cycler cihazı



Resim 6 : LightCycler sistemde DNA kuantifikasyon sonucu

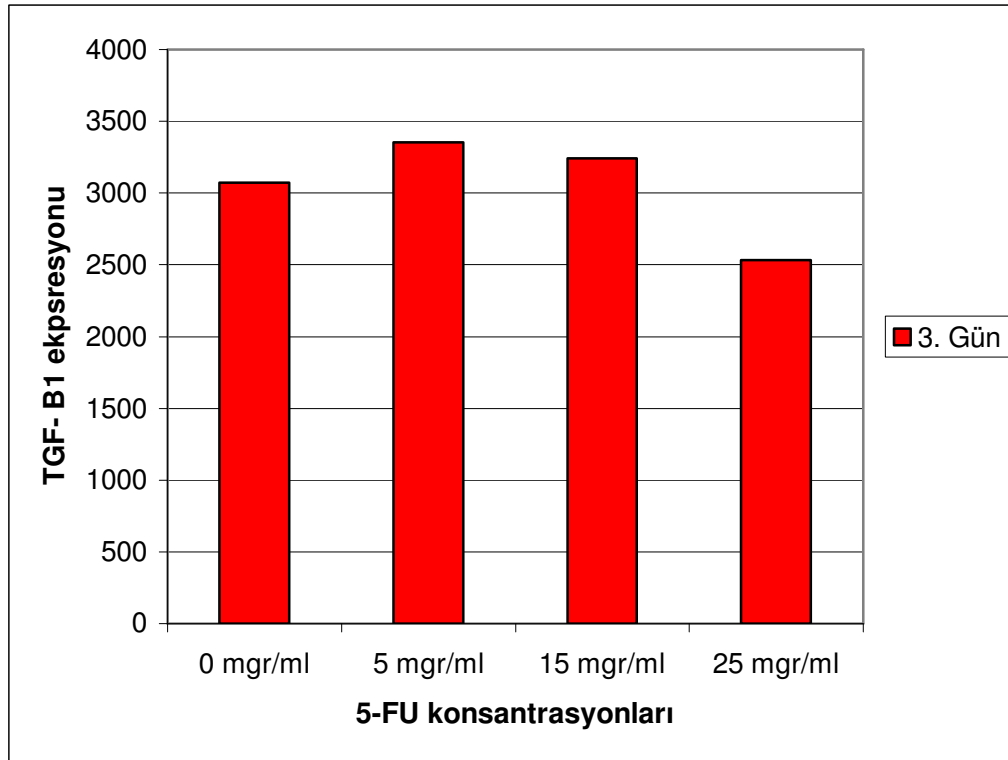
3.3.4 İSTATİKSEL ANALİZ

Veriler bilgisayar ortamına aktarılarak hata kontrolleri yapıldı. Verilerin istatistik çözümlemesi SPSS programı ile yapıldı. Veriler median, minimum ve maksimum şeklinde özetlendi. Gruplar arası karşılaştırma Kruskal-Wallis varyans analizi ile yapıldı. İkincil test olarak gruplar arası ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1 Üçüncü gün TGF- β 1 gen ekspresyon düzeyleri

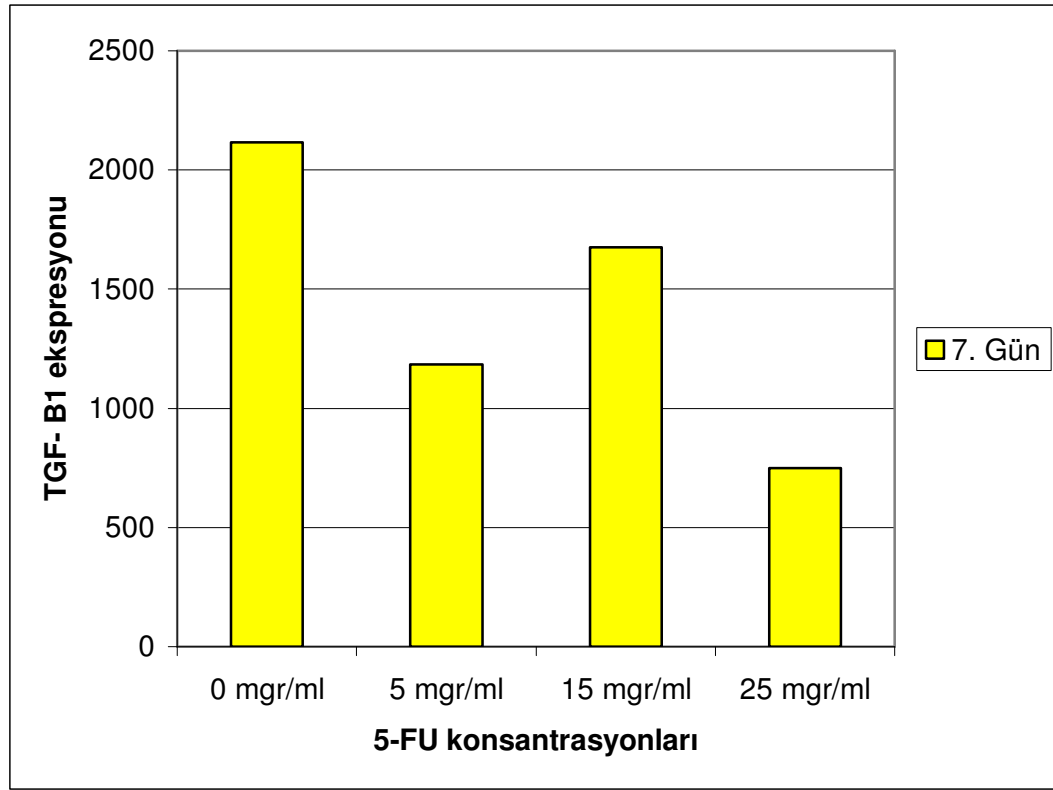
Kültüre edilen tendon fibroblastlarının 1 dakika 5-FU ile tedavisi sonrası 3. günde ölçülen TGF- β 1 gen ekspresyon düzeyleri hem kontrol grubu hemde kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,05$) (Grafik 1).



Grafik 1: Tendon fibroblastlarının 3. gün TGF- β 1 ekspresyonu

4.2 Yedinci gün TGF- β 1 gen ekspresyon düzeyleri

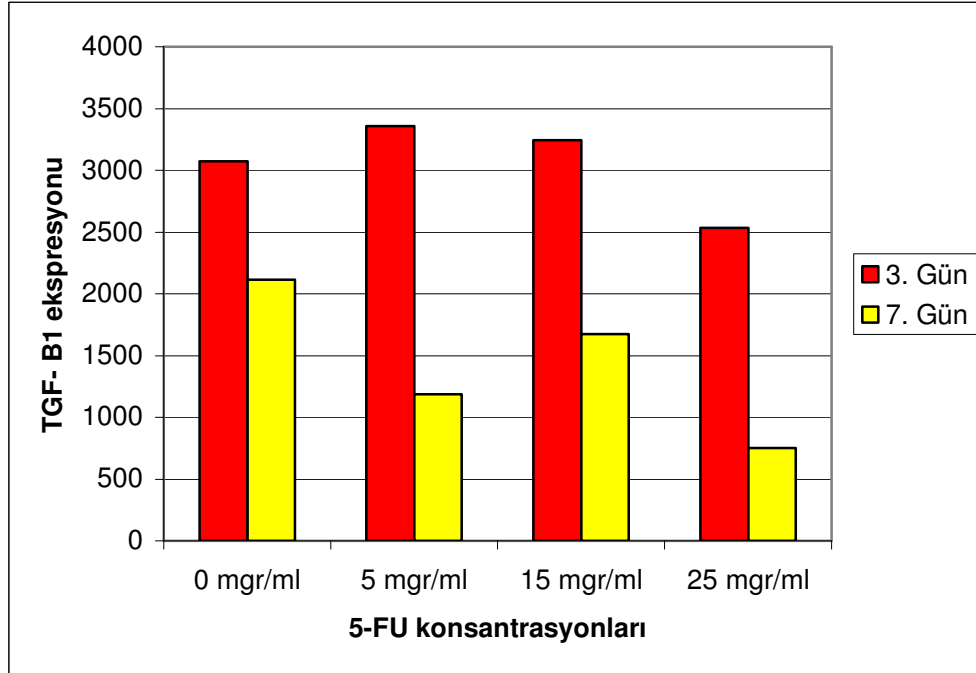
7. günde ölçülen TGF- β 1 gen ekspresyonları 5-FU tedavisi uygulanan bütün gruplarda kontrol grubuna göre daha düşük bulundu fakat bu azalma tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Grafik 2).



Grafik 2: Tendon fibroblastlarının 7. gün TGF- β 1 ekspresyonu

4.3 Ekspresyonda 3. günden 7. güne olan değişim

Tendon fibroblastlarının 3. günden 7. güne kadar olan TGF- β 1 ekspresyonundaki değişim yüzdeleri karşılaştırıldığında ilacın verilmediği kontrol grubu ile diğer tüm gruplar (5, 15, 25 mgr/ml) arasında istatiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0.05$). Bu fark en fazla $\% 89 \pm 12$ ($p < 0.05$) ile 25 mg/ml 5-FU uygulanan grupta görüldü. 5 mgr/ml ve 15 mgr/ml 5-FU uygulanan gruplar arasında ise sırayla $\% 63 \pm 14$ ve $\% 60 \pm 4$ oranında bir azalma ile belirgin farklılık tespit edilmedi (Grafik 3).



Grafik 3: TGF- β 1 ekspresyonunda 3. günden 7. güne kadar olan değişim

5.TARTIŞMA

El cerrahisinde fleksör tendon yaralanmalarında görülen en önemli problemlerden biri tendon ve çevre dokular arasında nedbe ve yapışıklık oluşmasıdır. Bu yapışıklıklar tendonun kayma özelliğini kaybetmesine neden olur. En sık özellikle derin ve yüzeysel fleksör tendonların birlikte seyrettiği Zon 2 bölgesinde en sık oluşmaktadır (48, 49, 50).

Günümüzde fleksör tendon onarımlarında iyileşmeyi hızlandırıp yapışıklık oluşumunu en aza indirmek için; cerrahi teknik, postoperatif rehabilitasyon programları ve iyileşmeye cevabın farmakolojik modülasyonu üçlüsü halen tartışılan ve araştırılan konulardır.

Cerrahide eskiden bazı çelişkiler olmasına rağmen şimdi yüzeysel ve derin tendonların her ikisinde tamiri yaygın olarak kabul görmüştür. Yüzeysel tendonun tamiri derin tendona yumuşak bir yatak sağlar ve vinkulum longum profundusun bütünlüğü korunmuş olur. Parmağın daha güçlü bir fleksiyonu sağlanır (51, 52).

Bazı yazarlar Zon 2 kılıfının kapatılmasını tavsiye etmektedirler. Kılıfın kapatılması sinovyal sıvı üretilmesi ile tendonun beslenmesini artırır. Ek olarak kayma mekanizmasının bir komponentini de tamir edilmiş olur ve böylece onarılan tendonla çevre dokular arasında bir bariyer oluşturularak yapışıklık oluşumu azaltılabilir (53).

Bir kısım araştırmacı ise kılıf onarımının tersine kılıf eksizyonunu önermektedir. Bunlara göre tendon onarımıyla beraber kılıf onarımı yapıldığında, tendon ve kılıf arasındaki potansiyel boşluk, gerek ilk travma ve cerrahi işlem sırasında gelişen ödem gerekse kullanılan dikiş materyali nedeni ile azalmaktadır. Bu durum tendon ile kılıf arasında baskı oluşmasına neden olur. Bunu takibende iskemi, beslenme yetersizliği ve sonuçta tamir edilen kılıfta destrüksiyon ve fibrozis gelişmektedir (53, 54).

Tendon cerrahisi sonrasında maksimum fonksiyonel sonuca ulaşmak için cerrahi teknik dışında çeşitli postoperatif rehabilitasyon protokolleri de önerilmektedir. Kontrollü erken hareket streslerinin tendon geriliminin dönüşünü hızlandırdığı ve yapışıklık oluşumunu azalttığı bilinmektedir (17, 55, 56).

Kleinert ve Duran-Houser günümüzde en sık kullanılan rehabilitasyon protokolleridir (23). Modifiye Kleinert protokolünde aktif ekstansiyon pasif fleksiyon metodu kullanılmaktadır. Tırnaklardan önkola uzanan lastik bandlarla birlikte dorsal ekstansiyonu engelleyen bir splint kullanılmaktadır. Dorsal koruyucu splint genellikle el bileği 30-40 derece fleksiyonda , MCP 60-70 derece fleksiyonda, PIP ve DIP eklemleri düz olacak şekilde hazırlanır. Lastik bantlar parmakların rezistansa karşı fleksiyonunu engeller. Aktif ekstansiyon sırasında ekstrinsik fleksörlerin resiprokal relaksasyonu tendon üzerindeki gerilimi azaltır. 3-4 hafta sonra dorsal splint çıkarılır (57).

Duran – Houser protokolünde onarılmış tendon, lastik bantlar kullanılmadan PIP ve DIP eklemlerine izole pasif ekstansiyon hareketi yaptırılarak mobilize edilir (58).

Erken pasif mobilizasyon protokollerinde aktif harekete genellikle 3-6 hafta arasında başlanır. Aktif hareketlere geçiş genellikle hastanın durumuna ve skar oluşumunun derecesine göre belirlenir.

Bazı otörler tendon onarımlarından sonra erken kontrollü aktif fleksiyon protokollerinin kullanılmasını savunmaktadır (59, 60). Bu protokollerde onarılmış tendon yine bir splintle korunmakta ve pasif mobilizasyon hareketleride programa dahil edilmektedir. Programın aktif kısmı genellikle “place-and-hold” şeklinde uygulanmaktadır. Erken aktif mobilizasyon, tendon onarımı yeterince kuvvetli yapılan uyumlu hastalarda ve tecrübeli terapistler tarafından yapılmalıdır (61).

Tendon yaralanması sonrasında gelişen kompleks moleküler olaylar zincirinin giderek daha iyi anlaşılması, onarım sonrası yapışıklığın önlenmesinde; cerrahi teknik ve rehabilitasyon dışında ayrıca efektif bir klinik modülasyona da gerek olduğunu göstermektedir.

Skar oluşumunun kontrolü düşünüldüğünde hem hücre proliferasyonu hem de ekstraselüler matriks reorganizasyonu dikkate alınmalıdır (62). Deneysel olarak sistemik steroidler, nonsteroidal antienflamatuar ajanlar , β -aminopropionitril ve lokal hyaluronik asit uygulaması gibi çok farklı farmakolojik ajanlar denenmiştir fakat günümüzde halen klinik olarak etkisi üzerinde görüş birliği olan bir ajan bulunamamıştır (28, 29, 30, 31, 32). Yapılan bazı deneysel araştırmalarda peroperatif kullanılan 5-FU' in tendon yapışıklığının önlenmesinde umut vaad edici olduğu görülmüştür. Bu nedenle bizde çalışmamızda kimyasal ajan olarak 5-FU' i tercih ettik.

Akali ve arkadaşları tavşan fleksör tendonlarının parsiyel insizyonu sonrasında lokal 50 mg/ml dozunda 5-FU uygulamışlardır. Yapılan histolojik kesitlerde tedavi edilmeyen kontrol grubunda, kılıf hücre yoğunluğunda artışla beraber sinovyal boşlukta azalma olduğu görülürken tersine tedavi edilen grupta iyi korunmuş bir sinovyal boşluk ve daha az hücre tespit etmişlerdir. Aynı zamanda 5-FU grubunda sinovyal kalınlaşmada belirgin bir azalma olduğu izlenmiştir (35).

Yapılan diğer bir çalışmada fleksör tendon onarımından hemen sonra 5, 25 ve 50 mg/ml dozlarında lokal 5 dakika 5-FU uygulanmıştır. 3 hafta sonra tendonların morfolojik ve histolojik incelemeleri yapılmıştır. Histolojik incelemelerde yapışıklığa en etkili dozun 25 mg/ ml olduğu tespit edilmiştir (34).

5-FU' in tendon yapışıklığını hangi etki mekanizması veya mekanizmaları ile azalttığı

tam olarak bilinmemektedir ve bu konu ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

Khan ve arkadaşları sinovyal kılıf ve endotenondan elde ettikleri fibroblastları kollajen ortamı içine yerleştirerek farklı dozlarda 5-FU uygulamışlardır. Tedavi edilmeyen kontrol grubu hücreleri kendi içlerinde karşılaştırıldığında sinovyal fibroblastların endotenon fibroblastlarından daha fazla kontraktıl olduğu tespit edilmiş. 5-FU tedavisi uygulanan gruplarda ise, her iki hücre grubunda da (endotenon - sinovyal fibroblast) kollajen kontraksiyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. Bu azalma endotenon fibroblastlarında doz bağımlı bulunurken sinovyal fibroblastlarda etkinin dozdan bağımsız olduğu görülmüştür. Ayrıca 5-FU'in hücre iskeleti üzerine etkisini araştırmak amacıyla hücrelerin aktin organizasyonu flörosan mikroskopi ile incelenmiştir. Her iki hücre grubunda da (sinovyal-endotenon) 5-FU'in aktin organizasyonunu etkilemediği bulunmuştur (62).

Daha sonra yapılan bir çalışmada endotenon ve sinovyal fibroblastların tek doz 5-FU ile muamelesinin matriks metalloproteinazlarının üretimini azalttığı gösterilmiştir. (63). Matriks metalloproteinazları özellikle MMP-2 ve 9 hücre göçü için gerekli olan ekstraselüler matriks yıkımında görevli enzimlerdir (64, 65). MMPs üretiminin fibroblast aracılı kollajen kontraksiyonunun bir parçası olduğu gösterilmiştir. MMPs aynı zamanda büyüme faktorlerinin ve diğeri önemli sitokinlerin salgılanmasında etkilidir (66). Çalışmada özellikle MMP-2 ve 9 olmak üzere toplam MMPs üretiminin her iki hücre kültüründe de azalmış olduğu bulunmuştur. 5-FU'in hücre protein sentezinde global bir azalma yapabileceği ve bunun MMPs'de non-spesifik bir azalmaya yol açabileceği belirtilmiştir. Neticede fibroblastların göç etme kapasitelerini sınırlayarak yapışıklığı önleyebileceği vurgulanmıştır.

TGF- β 'lar yara iyileşmesinin her aşamasında etkili oldukları bilinen moleküllerdir. Birçok hücre TGF- β sentezleme kapasitesine sahiptir. Trombositler, makrofajlar, lenfositler, fibroblastlar, kemik hücreleri ve keratinositler TGF- β sentezleyebilen hücrelerden bazılarıdır. Hemen hemen tüm hücrelerde TGF- β reseptörü bulunmaktadır ve bu nedenle bilinen en geniş etkili büyüme faktörüdür. Tüm dokuların iyileşmesinde etkili olmasının belli başlı iki nedeni kemotaksisi ve ekstraselüler matriks sentezini arttırmalarıdır (67). Enflamasyonun neden olduğu lokal hipoksi TGF- β sentezini stimüle eder. Daha sonra TGF- β hem kendi sentezini hem de mezenkim epitel ilişkilerini kontrol eden olayları yönlendirir. Yara iyileşme problemi olan deney hayvanlarına lokal ve sistemik TGF- β uygulandığında yara iyileşmesinin normale döndüğü saptanmıştır. Ancak sürekli devam eden TGF- β sentezi kontrol dışı fibrozise neden olmaktadır (68).

Tendon yapışıklığının patofizyolojisinde subsinovyal doku ve tendon yüzeyindeki epitenon hücrelerinde yoğun bir inflamatuvar reaksiyon görülmektedir. Zedelenmiş tendon çevresinde ve sinovyumda yüksek konsantrasyonda inflamatuvar hücre birikimi görülmektedir. Bu inflamatuvar hücreler büyük oranlarda TGF- β dahil olmak üzere sitokinler ve büyüme faktörleri salgılamaktadırlar. TGF- β hücre proliferasyonunu, göçünü, ekstraselüler matriks üretimini ve yapışıklık oluşumunu stimüle eder. Tendon, sinovyum ve periton gibi mezotelial dokularda TGF- β 'nın yapışıklık oluşumunda etken ajanlardan biri olduğu gösterilmiştir (69). Bu nedenle çalışmamızda, 5-FU'in özellikle profibrotik faktör olarak bilinen TGF- β 1'in gen ekspresyonu üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, parsiyel tendon laserasyonu sonrasında lokal 50 mgr/ml dozunda 5 dakika uygulanan 5-FU'in TGF- β 1 sekresyonunun etkisi

araştırılmıştır. Postoperatif 7. günde immünohistokimyasal yöntemlerle ölçülen TGF- β 1 sekresyonunda belirgin azalma olduğu gösterilmiştir (70).

Bulstrode ve arkadaşları ise bunun tam tersi 5-FU'in tendon fibroblastlarında hem TGF- β 1 sekresyonunu hemde gen düzeyindeki ekspresyonunu etkilemediğini bulmuşlardır (71). Yazarlar tendon fibroblast kültürlerine, 0.25, 2.5, 25, 50 mgr/ml dozlarında 5 dakika 5-FU tedavisi uygulamışlardır. 24. saatte “sandwich enzyme linked immunosorbent assay” yöntemi ile TGF- β 1 sekresyonunu ölçmüşlerdir. 25 mg/ml 5-FU verdikleri hücrelerde ise TGF- β 1 sekresyonuna ek olarak 0, 6 ve 24. saatlerde total RNA izolasyonu yaparak RT-PZR ile TGF- β 1 gen ekspresyonuna da bakmışlardır. Yazarlar TGF- β 1 sekresyonunda azalma değil tersine hafif bir artış olduğunu fakat bunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ifade etmişlerdir. Aynı şekilde gen ekspresyonunda da 24 saat içinde bir artış olduğu fakat 24 saat sonundaki düzeyin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olmadığını bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda Bulstrode'nin çalışmasından farklı olarak, gen ekspresyonu kontrol grubu dışında 5, 15, 25 mgr/ml olmak üzere 3 farklı doz için değerlendirilmiş ve 3. ve 7. günler olmak üzere nispeten geç dönemlerde RNA izolasyonu yapılmıştır.

Çalışmamızda 3. ve 7. günlerde tüm gruplarda TGF- β 1 gen ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu bulgular Bulstrode'nin çalışması ile uyumludur ve 5-FU'in nispeten geç dönemde TGF- β 1 ekspresyonunu etkilemediğini düşündürmektedir. Ancak 3. güne kadar olan bekleme döneminde kontrol grubundaki hücrelerin hızla proliferasyon olarak çoğaldığı buna karşın 5-FU verilen diğer gruplarda hücre çoğalmasının baskılandığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda çoğalmaya devam etmek isteyen fibroblastlar için ekilen kültür tabağı alanı bir süre sonra yetersiz

kaldığından, TGF- β 1 ekspresyonunu sınırlayıcı bir faktör haline gelmiş olabilir. Bu nedenle daha az hücre sayısı ve/veya daha geniş bir kültür tabağı kullanılması durumunda TGF- β 1 ekspresyonunda kontrol grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunabileceğini düşünmekteyiz.

Bununla birlikte tendon fibroblastlarının 3. günden 7. güne kadar olan TGF- β 1 ekspresyonundaki yüzde değişimlerine bakıldığında, kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.05$). TGF- β 1 ekspresyonunu en fazla 89 ± 12 ($p < 0.05$)'lik bir değişim ile 25 mgr/ml'lik doz azaltmıştır. Bu verilere dayanarak belkide deney sayısının arttırılması sonuçları etkileyecek ve 5-FU'in TGF- β 1 gen ekspresyonu üzerindeki etkisini daha doğru anlamamızı sağlayacaktır.

Ayrıca tendon yapışıklığına etkisi konusunda yapılan diğer tüm *invivo* ve *invitro* çalışmalarda 5-FU 5 dakika uygulanmış olup bizim çalışmamızda 1 dakika uygulanmıştır. 5 dakika bekleme süresi bazen cerrahi sırasında oldukça uzun bir bekleme süresi olabilir. Özellikle 1 dakika 25 mgr/ml 5-FU'in 3. günden 7. güne TGF- β 1 gen ekspresyonunda gösterdiği anlamlı azalma ($p < 0.05$) dikkate alınırsa, *invivo* çalışmalarda önerilen 50 mgr/ml 5-FU'in lokal 1 dakika uygulanması da yapışıklığı önlemede yeterli olacaktır kanaatindeyiz.

Sonuç olarak, tendon yapışıklığını azalttığı gösterilen 5-FU, klinik uygulamalar içinde uygun bir ajan gibi görünmektedir. Etki mekanizmasının yapılacak ileri araştırmalarla daha iyi anlaşılması klinik uygulamalarda da yer bulmasını sağlayacaktır.

6. ÖZET

Fleksör tendon onarımları sonrasında postoperatif dönemde görülen yapışıklıklar önemli bir problemdir. Yapışıklık oluşumunu azaltmak için çok farklı farmakolojik ajanlar denenmiştir fakat halen klinik olarak rutin kullanılan bir ilaç bulunmamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda tendon onarımı sonrasında, tek doz lokal 5-Fluorourasil uygulamasının yapışıklığı azalttığı gösterilmiştir fakat etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. TGF- β 1 ise tendon iyileşmesini düzenleyen ve yapışıklık oluşumunda etkili bir büyüme faktörüdür. 5-FU'in TGF- β 1 gen ekspresyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla planlanan bu çalışmada köpekten elde edilen tendon fibroblastları kültüre edildi. Hazırlanan hücre kültürlerine 0 mgr/ml (kontrol) ve 5,15,25 mgr/ml dozlarında 5-FU bir dakika süre ile uygulandı. Tedaviden sonraki 3. ve 7. günlerde RNA izolasyonları yapılarak TGF- β 1 gen ekspresyon düzeyleri reverse transkripsiyon ve polimeraz zincir reaksiyonu ile kuantifiye edildi. 3. ve 7. günlerde ölçülen TGF- β 1 gen ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, hem kontrol grubu hemde farklı dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Ekspresyondaki 3. günden 7. güne kadar olan değişim yüzdeleri incelendiğinde ise, kontrol grubu ile diğer tüm dozlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). Bu fark en fazla % 89 ± 12 'lik bir azalma ile 25mgr/ml 5-FU uygulanan hücrelerde görüldü. 5-FU'in tendon hücrelerinden TGF- β 1 ekspresyonunu azaltarak postoperatif tendon iyileşmesini olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir.

7. SUMMARY

Postoperative adhesion formation is a challenging problem after flexor tendon repair. Various pharmacologic agents have been used to reduce adhesion formation but none of them is used clinically. In recent studies, it has been shown that a single topical 5-FU application after flexor tendon repair reduces postoperative adhesions but the effects of 5-FU are not clearly known. TGF- β 1 is a growth factor which regulates tendon healing and causes adhesion formation. In this study the tendon fibroblasts harvested from dog tendons were cultured to investigate the effect of 5-FU on the gene expression of TGF- β 1. Cell cultures were treated with 0 mgr/ml (control) and 5,15,25 mgr/ml 5-FU for one minute. Total cellular RNA were extracted at the 3rd and the 7th day after the treatment and the expression levels of TGF- β 1 were quantified with reverse transcription and polymerase chain reaction. There was not significant difference between control and other groups when the expression levels of TGF- β 1 were compared at the posttreatment 3rd and the 7th day ($p>0.05$). When the percent of the variation from 3rd to 7th day was observed there was a significant difference between control and other groups ($p<0.05$). This difference was the most in 25 mgr/ml 5-FU group with % 89 ± 12 reduction. It has been thought that 5-FU effects postoperative tendon healing by reducing the expression of TGF- β 1.

KAYNAKLAR

1. Beredjiklian PK. Biologic aspects of flexor tendon laceration and repair. *J Bone & Joint Surg* 2003; 85 (3):539-550.
2. Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B and Dent CM. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *J Biochemical* 2000; 350:181-188.
3. Vogel KG, Keller EJ, Lenhoff RJ, Campbell K and Koob TJ. Proteoglycan synthesis by fibroblast cultures initiated from regions of adult bovine tendon subjected to different mechanical forces. *European Journal of Cell Biology* 1986; 41:102-112.
4. Riederer-Henderson MA, Gauger A, Olson L, Robertson C, Greenlee TK Jr. Attachment and extracellular matrix differences between tendon and synovial fibroblastic cells. *Invitro* 1983; 19:127-33.
5. Williamson DG, Richards R. Flexor tendon injuries and reconstruction. *Plastic Surgery* 2nd ed. Mathes SJ(ed) Saunders Philadelphia. 2006 Volume VII. 351-399.
6. Ali IU, Mautnre V, Lanza R, Hynes RO. Restoration of normal morphology, adhesion and cytoskeleton in transformed cells by addition of a transformation- sensitive surface protein. *Cell* 1977; 11(1): 115-26.
7. Greenberg JH, Seppa S, Seppa H, Tyl Hewitt A. Role of collagen and fibronectin in neural crest cell adhesion and migration. *Dev Biol.* 1981; 30;87(2):259-66.
8. Brigman BE, Hu P, Yin H, Tsuzaki M, Lawrence WT, Banes AJ. Fibronectin in the tendon-synovial complex: quantitation in vivo and in vitro by ELISA and relative mRNA levels by polymerase chain reaction and northern blot. *J Orthop Res.* 1994; 12(2):253.
9. Gelberman RH, Steinberg D, Amiel D, Akeson W. Fibroblast chemotaxis after tendon repair. *J Hand Surg [Am].* 1991;16(4):686-93.
10. Ralphs JR, Waggett AD, Benjamin M. Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro. *Matrix Biol.* 2002; 21(1):67-74.
11. Manske PR. The flexor tendon (review). *Orthopedics* 1987; 10:1733-1741.
12. Chang J, Most D, Stelnicki E, Siebert JW, Longaker MT, Hui K, Lineaweaver WC. Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. *Plast Reconstr Surg.* 1997 ;100(4):937-44.

13. Gelberman RH, Vandeberg JS, Manske PR, Akeson WH. The early stages of flexor tendon healing: a morphologic study of the first fourteen days. *J Hand Surg [Am]* 1985 ;10:776-84.
14. Khan U, Edwards JC, McGrouther DA. Patterns of cellular activation after tendon injury *J Hand Surg [Br]*. 1996; 21(6):813-20.
15. Trumble TE: Experimental studies of the structure and function of flexor tendons . In Light TR, Scholl WM, eds: *Hand Surgery Update 2*. American Society for Surgery of the Hand.
16. Gelberman RH, Steinberg D, Amiel D, Akeson W. Fibroblast chemotaxis after tendon repair. *J Hand Surg [Am]* 1991;16(4):686-93.
17. Strickland JW. Development of flexor tendon surgery. Twenty five years of progress. *J Hand Surg Am* 2000; 25:214-235.
18. Lundborg G. Experimental flexor tendon healing without adhesion formation-a new concept of tendon nutrition and intrinsic healing mechanisms. A preliminary report. *Hand*. 1976; 8(3):235-8.
19. Gelberman RH, Chu CR, Williams CS, Seiler JG 3rd, Amiel D. Angiogenesis in healing autogenous flexor-tendon grafts. *J Bone Joint Surg Am*. 1992; 74(8):1207-16
20. Manske PR, Gelberman RH, Vande Berg JS, Lesker PA. Angiogenesis in healing autogenous flexor-tendon grafts. *J Bone Joint Surg Am*. 1992; 74(8):1207-16.
21. Mass DP, Tuel R. Human flexor tendon participation in the in vitro repair process. *J Hand Surg [Am]*. 1989;14(1):64-71.
22. Potenza AD. Critical evaluation of flexor tendon healing and adhesion formation within artificial digital sheaths. *J Bone Joint Surg Am*. 1963 ;45:1217-33.
23. Ingari JW, Pederson WC. Update on tendon repair. *Clin Plast Surg* 1997; 24:161-173.
24. Matthews P, Richards H. The repair reaction of flexor tendon within the digital sheath. *Hand* 1975; 7:27-29.
25. Wang ED. Tendon repair (review) *J Hand Ther* 1998; 11:105-110.
26. Manske PR. Intrinsic flexor tendon repair. *J Bone Joint Surg*. 1984; 66A: 385
27. Manske PR. Histologic evidence of intrinsic flexor tendon healing in various experimental animals- an in vitro study. *Clin Orthop Rel Res* 1984;182: 297.
28. Herzog M, Lindsay WK, McCain WG. Effects of beta- aminopropionitrile on

adhesions following digital flexor tendon repair in chickens. Surg Forum 1970; 21:509-511.

29. Kapetanos G. The effect of local corticosteroids on the healing and biomechanical properties of the partially injured tendon. Clin Ortop 1982;163:170-179.

30. Kulick MI, Smith S, Hasdler K. Oral ibuprofen: evaluation of its effect on peritendinous adhesions and breaking strength of a tenorrhaphy. J. Hand Surg 1986; 11A: 110-120.

31. Szabo RM, Younger E. Effects of indomethacin on adhesion formation after repair of zone II tendon lacerations in the rabbit. J Hand Surg 1990; 15A:480-483.

32. Wiig M, Abrahamsson SO, Lundborg G. Tendon repair –cellular activities in rabbit deep flexor tendons and surrounding synovial sheaths and the effects of hyaluronan: an experimental study in vitro and in vivo. J Hand Surg (Am). 1997; 22(5):818.

33. Komurcu M, Akkus O, Basbozkurt M, Gur E, Akkas N. Reduction of restrictive adhesions by local aprotinin application and primary sheath repair in surgically traumatized flexor tendons of the rabbit. J Hand Surg (Am) 1997; 22(5):826-32.

34. Moran SL, Ryan CK, Orlando GS, Pratt CE, Michalko KB Effects of 5-fluorouracil on flexor tendon repair. J Hand Surg [Am]. 2000; 25(2):242-51.

35. Akali A, Khan U, Khaw PT, McGrouther AD Decrease in adhesion formation by a single application of 5-fluorouracil after flexor tendon injury. Plast Reconstr Surg. 1999; 103(1):151-8.

36. Blumenkranz M, Hernandez E, Ophir A, Norton EW. 5-fluorouracil: new applications in complicated retinal detachment for an established antimetabolite. Ophthalmology. 1984; 91(2):122-30.

37. Blumenkranz MS, Claflin A, Hajek AS. Selection of therapeutic agents for intraocular proliferative disease. Cell culture evaluation. Arch Ophthalmol. 1984; 102(4):598-604.

38. Khaw PT, Occleston NL, Schultz G, Grierson I, Sherwood MB, Larkin G. Activation and suppression of fibroblast function. Eye 1994; 8:188-195.

39. Khaw PT, Sherwood MB, MacKay SLD, Rossi MJ, Schultz G. Five-minute treatment with fluorouracil, floxuridine and mitomycin have long term effects on human Tenon's capsule fibroblasts. Arch Ophthalmol 1992; 110:1150-1154.

40. Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Smith MF, McGorray S. Effects of intraoperative 5-fluorouracil or mytomycin C on glaucoma filtration surgery in rabbits. *Ophthalmology* 1993; 100:367-372.
41. Occleston NL, Daniels JT, Tarnuzzer RW, Sethi KK, Alexander RA, Bhattacharya SS, Schultz GS, Khaw PT. Single exposures to antiproliferatives: long-term effects on ocular fibroblast wound-healing behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997 ;38(10):1998-2007.
42. Yalamanchi N, Klein MB, Pham HM, Longaker MT, Chang J. Flexor tendon wound healing in vitro: lactate up-regulation of TGF-beta expression and functional activity. *Plast. Reconstr Surg.* 2004, 113:625-32.
43. Jin Bo Tang MD, Yan Xu MD, Fei Ding MD and Xiao Tian Wang MD. Expression of genes for collagen production and NF-kappaB gene activation of in vivo healing flexor tendons. *J Hand Surg [Am].* 2004; 29(4):564-70.
44. Natsu-ume T, Nakamura N, Shino K, Toritsuka Y, Horibe S and Ochi T: Temporal and spatial expression of transforming growth factor beta in the healing patellar ligament of the rat. *J Orthop Res* 1997; 15.
45. Ignatz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 1986; 25;261(9):4337-45.
46. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985 ;230(4732):1350-4.
47. Banes, A. J.; Donlon, K.; Link, G. W.; Gillespie, Y.; Bevin, A. G.; Peterson, H. D.; Bynum, D.; Watts, S.; and Dahners, L.: Cell populations of tendon: a simplified method for isolation of synovial cells and internal fibroblasts: confirmation of origin and biologic properties. *J Orthop Res.* 1988; 6(1):83-94.
48. Leddy JP. Flexor tendons-acute injuries. In : Green DP.(ed) *Operative Hand Surgery.* Churchill Livingstone Inc 1993(Third ed) pp 1882-1851.
49. Tang JB. Flexor tendon repair in zone 2C. *J Hand Surg* 1994; 19B : 72-75.
50. Baktir A, Turk CY, Kabak S, Kardas Y. Flexor tendon repair in zone 2 followed by early active mobilization . *J Hand Surg* 1996; 21B:624-628.

51. Manske PR. Flexor tendon healing. *J Hand Surg* 1988;13:237-245.
52. Steinberg DR. Acute flexor tendon injuries. *Orthopedic Clinics of North America* 1992; 23:125-140.
53. Gelberman HR, Khabie V, Cahill JC. The revascularization of healing flexor tendons in digital sheath. *J Bone Joint Surg* 1991; 73A:868-881.
54. Şener M, Erçin C, Aydın H, Atal S, Yıldız M. Fleksör tendon tamirinde yapışıklıkların önlenmesinde kılıf tamiri ve fibrinin etkisi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 1997; 31:160-162.
54. Coert JH, Uchiyama S, Amadio PC. Flexor tendon-pulley interaction after tendon repair. A biomechanical study. *J Hand Surg* 1995;20:573-577.
56. Gelberman RH, Botte MJ, Spiegelman JJ, Akeson WH. The excursion and deformation of repaired flexor tendons treated with protected early motion. *J Hand Surg Am* 1986;11:106-110.
57. Kleinert HE, Cash SL. Management of acute flexor tendon injuries in the hand. *Instr Course Lect* 1985;34:361-372.
58. Duran J, Hauser R: Controlled passive motion following flexor tendon repair in zones 2 and 3. *AAOS Symposium on Tendon Surgery in the Hand*. St Louis, Mosby, 1975:105-114.
59. Becker H, Orak F, Duponselle E: Early active motion following a beveled technique of flexor tendon repair : a report on fifty cases. *J Hand Surg Am* 1979; 4:454-460.
60. Bainbridge LC, Robertson C, Gillies D, Elliot D: A comparison of postoperative mobilization of flexor tendon repairs with “passive flexion active extension” and “controlled active motion techniques. *J Hand Surg Am* 1994;19:517-521.
61. Gratton P: Early active mobilization after flexor tendon repairs. *J Hand Ther* 1993; 6:285-289.
62. Khan U, Occleston NL, Khaw PT, McGrouther DA. Single exposures to 5-fluorouracil: a possible mode of targeted therapy to reduce contractile scarring in the injured tendon. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 99(2):465-71.
63. Ragoowansi R, Khan U, Brown RA, McGrouther DA Reduction in matrix metalloproteinase production by tendon and synovial fibroblasts after a single exposure to 5-fluorouracil. *Br J Plast Surg*. 2001; 54(4):283-7.

64. Hunt TK, Conolly WB, Aranson SB, Goldstein P. Anaerobic metabolism and wound healing: An hypothesis for the initiation and cessation of collagen synthesis in wounds. *Am J Surg* 1978; 135: 328.
65. Nicoll SB, Wedrychowska A, Smith NR, Bhatnagar RS. Modulation of proteoglycan and collagen profiles in human dermal fibroblasts by high density micromass cultures and treatment with lactic acid suggests change to a chondrogenic phenotype. *Connect Tissue Res* 2001; 42:59.
66. Ngo MB, Pham HB, Longaker MT, Chang J. Differential expression of transforming growth factor β receptors in a rabbit zone II flexor tendon wound healing model. *Plast Reconstr Surg* 2001;108:1260.
67. Bennet NT. Growth factors and wound healing. Biochemical properties of growth factors and their receptors *Am J Surg* 1993;165:728
68. Sporn MB. Transforming Growth Factor β : Recent progress and new challenges *J Cell Biol* 1992 ; 119(5) :1017.
69. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Eng J Med* 1994; 331(19):1286-92.
70. Khan U, Kakar S, Akali A, Bentley G, McGrouther DA. Modulation of the formation of adhesions during the healing of injured tendons *J Bone Joint Surg* 2000;82B:1054-1058.
71. Bulstrode NW, Mudera V, McGrouther DA, Grobbelaar A, Cambrey A. 5-Fluorouracil selectively inhibits collagen synthesis *Plast Reconstr Surg* 2005;116:209-221.