



T.C.

**AFYONKARAHİSAR SAĞLIK
BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DİZ OSTEOKONDRAL DEFEKTLERİNİN TEDAVİSİNDE
KULLANILACAK OLAN İKİ KATMANLI SENTETİK
SKAFOLDUN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

-DENEYSEL ÇALIŞMA-

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Bilge Kağan YILMAZ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mehmet Nuri KONYA

AFYONKARAHİSAR 2021

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

DİZ OSTEOKONDRAL DEFEKTLERİNİN
TEDAVİSİNDE KULLANILACAK OLAN İKİ
KATMANLI SENTETİK SKAFOLDUN
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
-DENEYSEL ÇALIŞMA-

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr.
Bilge Kağan YILMAZ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet Nuri KONYA

AFYONKARAHİSAR 2021

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

Tez Başlığı: Diz Osteokondral Defektlerinin Tedavisinde Kullanılacak Olan İki Katmanlı Sentetik Skafoldun Etkinliğinin Değerlendirilmesi -DeneySEL Çalışma-

Tezi Hazırlayan: Arş. Gör. Dr. Bilge Kağan YILMAZ

Tez Savunma Tarihi: 09.07.2021

Tez Kabul Tarihi: 09.07.2021

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mehmet Nuri KONYA

İş bu çalışma, jürimiz tarafından ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç. Dr. Mehmet Nuri KONYA

Üye

Doç. Dr. Bahattin Kerem AYDIN

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Murat YEŞİL

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Necip BECİT

TEŞEKKÜR

Ortopedi ve travmatoloji uzmanlık eğitimimde büyük emekleri olan, eğitim süresince bilgi ve deneyimlerini daima benimle paylaşan değerli hocalarım Prof.Dr. Özal ÖZCAN'a, Prof.Dr. Gökhan MARALCAN'a, Dr.Öğr.Üy. Murat YEŞİL'e, Doç.Dr. Ali Fuat KARATAŞ'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tezimin başından sonuna her aşamasında ilgi, alaka ve tecrübesini yakından hissettiğim, yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Doç.Dr. Mehmet Nuri KONYA'ya şükranlarımı sunarım.

Asistanlık eğitimime başladığım gün asistanlık dönemini bitirip uzman doktor olarak göreve başlayan, aynı yerde çalışmasak da sürekli bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli ağabeyim Op.Dr. Abdullah Recep ERTEN'e, asistanlık sürecimin ilk zamanlarından beri örnek aldığım ağabeyim Op.Dr. Sadık Emre ERGİNOĞLU'na, çalışma arkadaşından ziyade bana bir kardeş olarak yaklaşan, desteklerini her zaman hissettiğim değerli büyüklerim Op.Dr. Recep ALTIN, Op.Dr. Uğur YÜZÜGÜLDÜ, Op.Dr. Mohamed Salah Ahmed Ali, Dr. Mustafa Reha Dodurgalı'ya, klinik içerisinde onları çok yorsam da öğrendiğim ve öğrettiğim her andan büyük keyif aldığım değerli kardeşlerim Dr. Serhat AKÇALAN, Dr. Süleyman ÇAKIRTÜRK, Dr. Çağlar Tuna ISSI, Dr. Turan NAJAFOV, Dr. İbrahim Ethem BÜTÜNER, Dr. Erdal KESKİN, Dr. Mohamed Hamid SHIRZAD, Dr. Sakhı Ahmad FAZLİ, Dr. Osman Emre TOSUN, Dr. Serkan SAVAŞ, Dr. Halil Sami POSTALLI, Dr. Oğuz ŞİMŞEK, Dr. Mevlüt ÖZBAHÇE, Dr. Fatih AY'a teşekkürlerimi sunarım.

Aynı klinik çatısında çalışmasak da vaktimizin çoğunu beraber geçirdiğimiz arkadaştan öte kardeşlerim sayılan Uzm.Dr. Bilal Atilla BEZEN ve Op.Dr. Arif YILMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin planlanmasında ve işleyiş süresince en az benim kadar yorulan

Dr.Öğr.Üy. Sadık KAĞA, Dr.Öğr.Üy. Elif KAĞA'ya, elde edilen verilerin incelenmesi ve analizinde desteklerini esirgemeyip özveri ile çalışan Dr.Öğr.Üy. Hasan Hüseyin DEMİREL'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen sevgili annem Öğr.Gör. Durdane YILMAZ'a, değerli babam Prof.Dr. Hacı Murat YILMAZ'a, beraber büyüdüğüm ve en yakın arkadaşım olan kardeşim Arş.Gör. Halil Çağrı YILMAZ'a, evimizin haylazı küçük kardeşim Metehan YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çocukluğum, gençliğim ve yetişkinliğimin her anında yanımda olan, beraber büyüdüğüm, beraber güldüğüm, beraber ağladığım her şeyim canım eşim Arş.Gör.Dr. Ayşe YALÇINKAYA YILMAZ'a, varlığıyla hayatımıza ayrı bir anlam katan, sürekli özlediğim canım kızım Gökçe Nil YILMAZ'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bütün zorluklara sizin sayenizde katlandım. Her zaman benimle olan sevginiz ve desteğiniz olmasa bugünlere gelemezdim.

DR. BİLGE KAĞAN YILMAZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	III
TABLOLAR ÇİZELGESİ.....	VI
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ.....	VII
KISALTMALAR	XII
1.GİRİŞ	14
2.GENEL BİLGİLER	15
2.1 EKLEM KIKIRDAĞI GENEL ÖZELLİKLERİ	15
2.1.1.Hyalin Kıkırdak:	16
2.2 EKLEM KIKIRDAĞININ BİLEŞENLERİ.....	18
2.2.1. Kondrositler/Kondroblastlar	18
2.2.2. Ekstrasellüler Matriks	19
2.3 EKLEM KIKIRDAK HASARI.....	21
2.3.1. EKLEM KIKIRDAĞININ TRAVMA SONRASI YARALANMA ŞEKİLLERİ	22
2.3.2. KIKIRDAK YARALANMA SINIFLAMALARI.....	23
2.4. TEDAVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	24
2.5. KIKIRDAK HASARINDA TEDAVİ YÖNTEMLERİ.....	25
2.5.1. Eklem İçi Yıkama ve Traşlama	27
2.5.2. Subkondral Delme ve Mikrokırık	27
2.5.3. Osteokondral Ototograft ve Mozaikplasti.....	28
2.5.4. Osteokondral Allograftlar	29
2.5.5. Otolog Kondrosit İmplantasyonu.....	30
2.5.6. Kıkırdak Doku Mühendisliği	31

2.5.7. Gen Tedavisi	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Skafold Üretimi	35
3.1.1. PEGMEMA Sentezi.....	35
3.1.2. Kıkırdak Doku İskelesi Sentezi	36
3.1.3. Kemik Doku İskelesi Sentezi.....	37
3.1.4. İki Katmanlı Doku İskelesinin Üretimi	38
3.2. Anestezi ve Analjezi.....	39
3.3. Otojen Kıkırdak Doku Alınması	40
3.4. Hücre Kültür Aşaması	43
3.5. Skafold ve Otojen Kıkırdak Dokunun Entegrasyonu.....	44
3.6. Cerrahi Teknik.....	46
3.6.1. Kontrol Grubu (Osteokondral Defekt + Mikrokırık).....	50
3.6.2. Osteokondral Defekt + Mikrokırık + Çift Katmanlı Kondrosit İçeren Skafold Grubu.....	51
3.6.3. Osteokondral Defekt + Mikrokırık + Çift Katmanlı Kondrosit İçermeyen Skafold Grubu.....	54
3.6.4. Osteokondral Defekt + Mikrokırık + Tek Katmanlı Kondrosit İçeren Skafold Grubu.....	57
3.6.5. Osteokondral Defekt + Mikrokırık + Tek Katmanlı Kondrosit İçermeyen Skafold Grubu.....	60
3.7. Histopatolojik İnceleme	62
4. BULGULAR	76
5. TARTIŞMA	96
6. SONUÇ	106
7. ÖZET.....	110
8. ABSTRACT	113

9. KAYNAKLAR	116
10. EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



TABLÖLAR ÇİZELGESİ

Tablo 1. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği, Osteokondritis Dissekans Evrelemesi	23
Tablo 2. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Artiküler Kıkırdak Yaralanmaları Evreleme Sistemi	24
Tablo 3. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Kıkırdak Tamir Değerlendirmesi[1].	25
Tablo 4. Modified Mankin ve O'Driscoll Kriterleri	63
Tablo 5. Modified Mankin sınıflamasına göre parametrelerin grup ve haftalara göre karşılaştırılması	80
Tablo 6. O'Driscoll sınıflamasına göre parametrelerin grup ve haftalara göre karşılaştırılması	92

ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

Şekil 1. Kıkırdak doku anatomisi, Aytekin Karaman, uzmanlık tezi, 2006[21]	18
Şekil 2 a,b. Kıkırdak doku iskelesi	36
Şekil 3. Kemik doku iskelesi	37
Şekil 4. İki katmanlı doku iskelesi	38
Şekil 5. İki katmanlı skafolda ait ışık mikroskobu (solda) ve SEM (sağda) görüntüleri ..	38
Şekil 6. İki katmanlı (üstte) ve tek katmanlı (altta) skafolda ait makroskopik görüntüler	39
Şekil 7. Xylazin Bio %2 ksilazin etken madde, Alfamine %10 ketamin etken madde	40
Şekil 8. Otojen kıkırdak doku örneği alınmasında cerrahi temizlik ve örtünme sonrası görüntü	41
Şekil 9. Otojen kıkırdak doku örneği alınmasında uygun ekartasyon sonrası donör kıkırdak alanın gösterilmesi	41
Şekil 10. Uygun ebatlarda alınmış otojen kıkırdak doku örneğinin görüntüsü.....	42
Şekil 11. Otogreft alınması sonrası yara yerinin süturize edilmiş görüntüsü.....	42
Şekil 12.Otogreft taşınmasında kullanılan solüsyonun görüntüsü	43
Şekil 13. Rat kulak kıkırdağından izole edilmiş olan kondrosit hücreleri morfolojik görüntüsü	44
Şekil 14. Skafold üzerinde kültürlenmiş kondrosit hücrelerinin kontrol grubuna göre proliferasyon oranları.....	45
Şekil 15. Skafold üzerine ekilmiş primer kondrosit hücreleri. Yeşil renk canlı kondrosit hücrelerini göstermektedir. Kırmızı renk ölü kondrosit hücreleri göstermektedir. (BF;Bright Field)	46
Şekil 16. Batticon, Povidin-iyon %10.....	47
Şekil 17. Ortopedik cerrahi küçük set aletleri	47
Şekil 18. Ortopedik mikrocerrahi set aletleri	47
Şekil 19. Anestezik indüksiyon sonrası deney hayvanının görüntüsü(a), anestezik indüksiyon altında sağ diz cerrahi alanın tıraş ve temizlik sonrası görüntüsü(b)	48
Şekil 20. Steril örtü ile genel temizlik örtme işlemleri sonrası deney hayvanı görüntüsü	48
Şekil 21. Sağ dizin paramedian insizyon ile cilt ve cilt altı kesilmiş görüntüsü	49
Şekil 22. Patella laterale devrilmesi ve sonrasında femur distal kondillerin görüntüsü....	49
Şekil 23. Femur distal kondiller ve defektif alanın görüntüsü	50
Şekil 24. Sakrifiye edilmiş A grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda (a), 8. hafta sağda (b)	51

Şekil 25. Kondrosit hücresi içeren çift katmanlı skafoldların özel taşıma kabında görüntüsü	52
Şekil 26. Uygun ebatlara getirilen skafoldun görüntüsü.....	53
Şekil 27. Defektif alana yerleştirilmiş çift katmanlı kondrosit içeren skafoldun görüntüsü	53
Şekil 28. Patellar tendon onarım sonrası görüntü	53
Şekil 29 a,b. Sakrifiye edilmiş B grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda (a), 8. hafta sağda(b)	54
Şekil 30 a,b. Laboratuvar şartlarında üretilen çift katmanlı sentetik skafoldun görüntüsü	55
Şekil 31. Uygun boyutlara getirilmiş kondrosit içermeyen çift katmanlı skafoldun görüntüsü	56
Şekil 32. Defektif alana yerleştirilmiş çift katmanlı kondroist içermeyen skafoldun görüntüsü	56
Şekil 33 a,b. Sakrifiye edilmiş C grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda(a), 8. hafta sağda(b)	57
Şekil 34. Kondrosit hücresi içeren tek katmanlı skafoldların özel taşıma kabında görüntüsü	58
Şekil 35. Defektif alana yerleştirilmiş tek katmanlı kondrosit içeren skafoldun görüntüsü	59
Şekil 36 a,b. Sakrifiye edilmiş D grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda(a), 8. hafta sağda(b)	60
Şekil 37. Defektif alana yerleştirilmiş tek katmanlı kondrosit içermeyen skafoldun görüntüsü	61
Şekil 38 a,b. Sakrifiye edilmiş E grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda(a), 8. hafta sağda(b)	62
Şekil 39. A grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	65
Şekil 40. A grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	65
Şekil 41. B grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü.....	66
Şekil 42. B grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	67

Şekil 43. C grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	68
Şekil 44. C grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	68
Şekil 45. D grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	69
Şekil 46. D grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	69
Şekil 47. E grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	70
Şekil 48. E grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	70
Şekil 49. A grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	71
Şekil 50. A grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	71
Şekil 51. B grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	72
Şekil 52. B grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	72
Şekil 53. C grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	73
Şekil 54. C grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	73
Şekil 55. D grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	74
Şekil 56. D grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	74
Şekil 57. E grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	75
Şekil 58. E grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü	75
Şekil 59. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki morfolojik alanın gruplar arasında karşılaştırılması	78

Şekil 60. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki yüzey düzenliliğinin gruplar arasında karşılaştırılması	78
Şekil 61. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki komşu bağlanmanın gruplar arasında karşılaştırılması	79
Şekil 62. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki hücre popülasyonunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	79
Şekil 63. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kıkırdak tıkaç kalitesinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	80
Şekil 64. Modified Mankin sınıflamasına göre toplam puanların haftalara göre ortalamaları	82
Şekil 65. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki morfolojik alanın gruplar arasında karşılaştırılması.....	86
Şekil 66. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki matrixin gruplar arasında karşılaştırılması	87
Şekil 67. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki yüzey düzenliliğinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	87
Şekil 68. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki yapısal bütünlüğün gruplar arasında karşılaştırılması.....	88
Şekil 69. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kalınlık yara dolgusunun gruplar arasında karşılaştırılması	88
Şekil 70. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki osteokondral bağlanmanın gruplar arasında karşılaştırılması	89
Şekil 71. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki komşu bağlanmanın gruplar arasında karşılaştırılması.....	89
Şekil 72. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki hücre yoğunluğunun gruplar arasında karşılaştırılması.....	90
Şekil 73. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kümeleşme dağılımının gruplar arasında karşılaştırılması	90
Şekil 74. Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki subkondral kemiğin gruplar arasında karşılaştırılması.....	91
Şekil 75. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki hücre popülasyonunun gruplar arasında karşılaştırılması	91
Şekil 76. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kıkırdak tıkaç kalitesinin gruplar arasında karşılaştırılması	92

Şekil 77. O’Driscol sınıflamasına göre toplam puanların haftalara göre ortalamaları.....	95
Şekil 78. Kıkırdak Doku Mühendisliği	97



KISALTMALAR

KÇM: Küçük Çaplı Mikrokırık

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

TGF- β : Transforming Growth Factor- β ,

ICRS: International Cartilage Research Society,

cm: Santimetre

cm²: Santimetre Kare

mm: Milimetre

mm³: Milimetreküp

μ m: Mikrometre

nm: Nanometre

ml: Mililitre

mg: Miligram

μ L: Mikrolitre

$^{\circ}$ C: Santigrat Derece

OKİ: Otolog Kondrosit İmplantasyonu

FDA: U.S. Food and Drug Administration,

FGF: Fibroblast Growth Factor,

HADYEK: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

PEGMEMA: Poly Ethylene Glycol Methyl Ether Methacrylate

EGMEMA: Ethylene Glycol Methyl Ether Methacrylate

PLGA: Poly D,L-Lactide-co-Glycolide

HA: Hidroksi Apatit

RAFT: Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer

GPC: Gel Permeation Chromatography

PDI: PolyDispersity Index

PEG: Poli Ethylene Glycol

PBS: Phosphate Buffered Saline

SEM: Scanning Electron Microscopes

İM: İntramuskuler

H₂O: Dihidrojen Monooksit

CO₂: Karbon Dioksit

RPM: Revolutions Per Minute

UV: Ultraviyole

CCK-8: Cell Counting Kite,

BF: Bright Field

BAPK: Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon

AFSÜ: Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

1.GİRİŞ

Kıkırdak dokunun avasküler yapısı, lenfatik dolaşımının olmaması, sinir innervasyonunun olmaması ve hücrelerin düşük metabolik aktivitede olması nedeniyle minör yaralanmalar bile genellikle tamir edilemeyip ağrı, hareket kısıtlılığı ve sonunda osteoartrite neden olarak kişinin hayatını olumsuz yönde etkilemektedir [1]. Bu sebeple kıkırdak hasarlarının tedavisi, ortopedik cerrahiler içinde önemli bir yere sahiptir. Tedavide birçok yöntem kullanılmakla beraber her yöntemin kendi içinde kısıtlılıkları mevcuttur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda henüz hyalin kıkırdak dokusunun uygun fonksiyonel özellikler gösterdiğini, bütün özellikleriyle iyileşebildiğini gösteren bir yöntem geliştirilememiştir [2]. Kıkırdak dokunun vücuttaki temel işlevi genel anlamda etraf yumuşak dokuları desteklemektir. Kıkırdak dokunun yapısı esnek olup düzgün yüzeylidir. Bu sayede kıkırdak doku eklem yüzeylerinde yüklere karşı şok emici görev alır ve aynı zamanda eklem doğal bir kayganlık sağlar. Bu sayede eklemlerin hareket yeteneğini kolaylaştırır. Tam kat kıkırdak defektlerinin onarılmasının hastalarda ağrıyı, limitli eklem fonksiyonunu ve eklem katılığı semptomlarını azalttığı bilinmektedir. Kıkırdak onarımının etkili olabilmesi için kullanılan kıkırdak onarım prosedürlerinin hyalin kıkırdağa en yakın kıkırdak oluşturması tercih edilmektedir [3]. Mikrokırık küçük çaplı osteokondral lezyonların ($<2\text{ cm}^2$) tedavisinde ilk tedavi seçeneği olarak uzun zamandır kullanılan, kolay uygulanılan, ucuz, minimal invaziv bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Mikrokırık sonrası oluşan fibrokıkırdak yapının sert olması, esnekliğinin az olması sebeplerinden dolayı, hyalin kıkırdağa yakın bir formda kıkırdak rejenerasyonu sağlamak için farklı yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Son yıllarda, kondral defekt alanında yapılan küçük çaplı mikrokırık (KÇM) uygulamalarının, mikrokırık alanlarında görülen subkondral tabakadaki bozulmaları azaltarak deliklerden ortaya çıkan mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) sayısının arttırdığını ve oluşan kıkırdak benzeri dokunun kalitesinin mikrokırık sonrası oluşan dokuya üstün olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Fakat literatürde, KÇM zemininde karşılaştırmalı skafold örtü uygulamalarını araştıran yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

İskoçyalı anatomist ve bilim adamı William Hunter, 1743 yılında kaleme aldığı makalesinde; “Hipokrat zamanından günümüze kadarki cerrahların bilgilerini alacak olursak şu sonucu buluruz; ülsere olmuş bir kıkırdak, ileride mutlaka çok sorunlu bir hastalık oluşturacaktır. Hasar gördüğü zaman, hiçbir zaman iyileşemez” demiştir [4]. Fokal geniş kıkırdak lezyonların tedavisinde tanımlanan ve güncel olarak kullanılan birçok tedavi alternatifi olmasına karşın ideal tedavi tekniği, gelişen teknoloji ve bilgi birikimine rağmen halen tanımlanabilmiş değildir.

Genç hastalarda fokal, semptomatik kıkırdak lezyonlarının oldukça yaygın görüldüğü söylenebilir. Yapılan farklı diz artroskopisi çalışmalarında, hastalığın görülme sıklığı %60 civarlarında olduğu saptanmıştır [5].

2.1 EKLEM KIKIRDAĞI GENEL ÖZELLİKLERİ

Yetişkinlerde kıkırdak dokusu eklem yüzeyleri, trakea, bronş, burun, kulak, larinks ve intervertebral disklerde bulunur. Vücutta birçok bölgede bulunan eklem kıkırdağı düşük sürtünme katsayısına sahiptir. Eklem kıkırdağı aynı zamanda kaygan yüzeyi ile eklemde yer alan kemiklerin birbiri üzerinde düzgün bir şekilde hareketi ile kaymasını ve rotasyon yapmasını sağlar [6]. Kıkırdak doku, özelleşmiş bir bağ dokusu olup üç elemandan meydana gelmiştir; kondrositler, matriks sıvısı ve makromoleküler iskelet [7]. Oldukça kompleks olan bu dokuda hücrelerin hacimsel oranı %1.7 olup neredeyse aselüler kabul edilir [8]. Kan damarları, lenf damarları ve sinirleri yoktur. Kıkırdak dokunun beslenmesi çevre bağ dokulardaki kapillerlerden gerçekleşirken, eklem kıkırdaklarının beslenmesi ise sinoviyal sıvıdan difüzyonla gerçekleşmektedir [9]. Avasküler olarak nitelenen kondrositler düşük metabolik aktivite göstermektedir. Kondrositlerde kapiller dolaşımın olmayışı sebebiyle kondrositler düşük oksijen seviyelerinde solunum yaparak aktivitelerini devam ettirmek zorundadırlar. Dolayısıyla kıkırdak dokunun kendi kendini yenileme özelliği zayıftır ve kendini tamir etme yeteneği çok düşüktür [10]. Kıkırdak dokunun matriksi yüksek oranında su içermektedir. Matriksin organik içeriklerinin büyük çoğunluğu ise proteoglikanlardan ve

kollajenden oluşmaktadır [11]. Yapısında bulunan kollajenlerin tipi ve miktarına göre üç alt tip kıkırdak doku vardır ;

1-Hyalin Kıkırdak

2-Elastik Kıkırdak

3-Fibröz kıkırdak

2.1.1.Hyalin Kıkırdak:

En sık bulunun kıkırdak doku alt tipidir. Çoğunluğunu tip 2 kollajen oluşturur. İskelet sisteminde epifizyel plaklarda, solunum yollarında, kostaların sternumla bileşkesinde ve sinoviyal eklem yüzlerinde bulunmaktadır. En sık rastlanan bu hyalin kıkırdak dokusu saydam camsı, mavimsi beyaz ve sedef rengi görünümü olup sinovyal eklemlerin yüzeyini örter. Bu özel görünüm, yapısında bulunan kollajen liflerin, içine gömülü olduğu temel maddeyle yakın bir kırılma indeksine sahip olmasındandır. Hyalin kıkırdak matriksinin %70'ini su, %15'ini tip 2 kollajen, %10'unu proteoglikan ve kalan kısmını diğer kollajenler meydana getirir. Hyalin kıkırdağın matriks dışında kalan kısmının büyük kısmını da tip 2 kollajen oluşturur [10].

Eklem kıkırdağı 4 katmandan oluşur;

1-Süperfisyal Katman: Eklem ile temas halinde olan, kollajen oranı yüksek katmandır.

2-Transizyonel Katman: Hücrelerin seyrek olarak yerleştiği geçiş bölgesidir.

3-Radial Katman: Eklemdeki kıkırdağın %65'lik kısmını oluşturur. Yoğun hücre içerir.

4-İrregüler Katman: Kemik dokuya komşu katman olup hücresel dizilim ekleme dik olacak şekildedir. Subkondral bölge olarak da adlandırılır [12].

Elastik Kıkırdak:

Elastik kıkırdak yapısında bol miktarda elastin kollajeni ihtiva eder. Elastin kollajeninin fazla olması yapısını daha elastik hale getirir. Böylece elastik

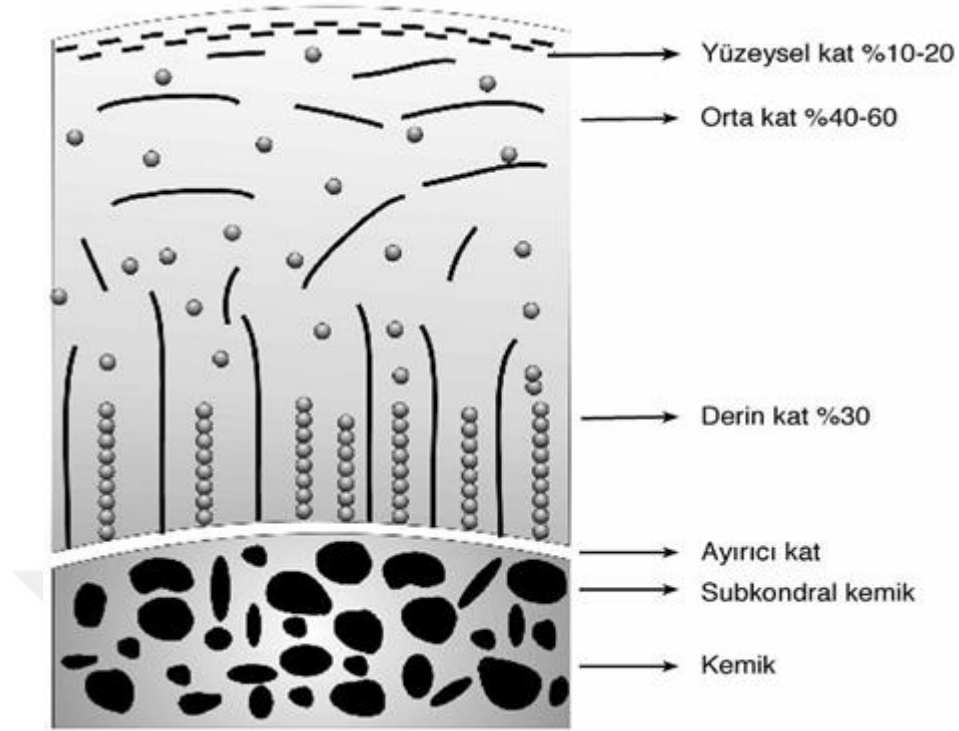
kıkırdak tipi gerilime dayanıklı hale gelmektedir. Elastik kıkırdak kulak kepçesi, östaki borusu ve epiglot gibi bölgelerde bol miktarda bulunur [13].

Fibröz Kıkırdak:

Fibröz kıkırdak bağ dokusundan zengin, fibröz kollajen ve proteoglikanlardan oluşan, daha katı ve elastik olmayan bir yapıya sahiptir. İntervertebral disklerde bol miktarda ve simfisis pubiste bulunur [14].

Kıkırdak dokusu, eklem yüzeyinden subkondral kemiğe ilerledikçe farklı tabakalardan oluşmaktadır. Yüzeyel, orta ve derin tabakalarındaki hücre ve ekstraselüler matriksi oluşturan yapıların; yoğunluk ve dağılımları farklılıklar gösterir [6]. Ekstraselüler matriksin kollajen yapısı gerilme kuvvetini sağlarken, proteoglikan yapısı ise sıkışmaya karşı direncini sağlar [15]. Eklem kıkırdağı ince bir tabaka halinde olup vücuttaki lokalizasyonuna göre kalınlığı değişebilir. İnsanlarda hangi eklemden yer aldığına göre kalınlıkları 1 mm'den 4 mm'ye kadar değişebilir [16]. Bununla birlikte kompresif yüklere tamamen adapte olmuştur. Bu doku, temas için toplam yüzey alanını artırarak deforme olabilir, böylece toplam stres azaltılır. Eklem kıkırdağının viskoelastik özelliğini gösteren stres gevşemesi, uygulanan yükler karşısında oluşan hasara karşı direnci gösteren benzersiz bir fonksiyondur [17]. Eklem kıkırdağının kompresif ve sürtünme kuvvetlerine olan direnç fonksiyonu, onun ekstraselüler matriks moleküllerinin spesifik düzenine bağlıdır. Özellikle kollajen liflerinin mimarisi, uygulanan strese bağlı olarak deformasyon miktarını ve yönünü büyük ölçüde belirlemektedir [18].

Eklem kıkırdağı 4 farklı zondan oluşur; yüzeyel, orta, derin ve kalsifiye zon (Şekil-1). Bu tabakaların hücre tipleri ve moleküler bileşimleri farklıdır. Bu tabakalar arasındaki morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel farklılıklar eklem yüzeyinden olan derinliğe bağlıdır [19]. Yüzeyel zonda kondrositler yassı, birbirlerine yakın ve kollajen lifler eklem yüzeyine paralel görülür. Orta zonda kondrositler oblik formda ve kollajen lifler rastgele farklı yönlerde organize olmuştur. Derin zonda kollajen fiberler eklem yüzeyine göre dikleşmeye başlar ve kondrositler tek sıra kolon şeklinde sferik boyut kazanır. Derin zondaki kollajen fiberler tidemarkı geçerek kalsifiye kıkırdağa ulaşır ve bu sayede subkondral kemik üzerinde yapısal stabiliteyi sağlar [20].



Şekil 1. Kıkırdak doku anatomisi, Aytekin Karaman, uzmanlık tezi, 2006 [21]

2.2 EKLEM KIKIRDAĞININ BİLEŞENLERİ

Kıkırdak doku, özelleşmiş bir bağ dokusu olup üç elemandan meydana gelmiştir. Bunlar; kondrosit hücreleri, matriks sıvısı ve makromoleküler iskelettir. Matriks yapımı ve yıkımı arasındaki denge, kondrositler tarafından sağlanmaktadır ve bu kıkırdak dokunun normal metabolizmasını oluşturur. Bu dengeyi etkileyen pek çok faktör vardır. Kompresif yükler, yaşlanma, travma, hormonlar ve sitokinler bu faktörler arasında sayılabilir.

2.2.1. Kondrositler/Kondroblastlar

Kıkırdak dokuda iki tip hücre bulunmaktadır; kondroblastlar ve kondrositler. Kondroblastlar, kıkırdak hücrelerinin öncülleri ve matriks sentezleyen hücrelerdir. Kondrositler ise olgun kıkırdak hücrelerini ifade eder. Aslında iki hücre gelişimsel süreçte farklılaşarak oluşan aynı kökene sahip hücrelerdir. Kıkırdak doku embriyonik dönemde mezenkimal yapıdan köken alarak gelişir. Embriyonik dönemde oksijen konsantrasyonu fazla olduğu zaman mezenkimden kemik doku gelişirken, oksijen konsantrasyonu az olduğu zaman kıkırdak doku gelişir. Kıkırdak doku fetüsün iskelet yapısını oluştururken, zamanla embriyogenez

basamakları sayesinde kemikleşerek olgun iskelet yapısını meydana getirir. Yoğun miktardaki hücre dışı matriks içine gömülü olan kıkırdak hücreleri tarafından kıkırdak oluşturulmuştur. Kıkırdak dokusunun oluşum aşamaları ve gelişim mekanizması kondroenez olarak adlandırılmaktadır [22].

Kondrositler, eklem kıkırdağının değişik katmanlarında değişik sayı ve morfolojik özellikte bulunabilen, tümü matriks sentezleyebilecek organellere sahip hücreler olup erişkin eklem kıkırdağının toplam hacminin yaklaşık %2'sini oluşturmaktadır. Kondrositler ve ekstraselüler matriks arasındaki bu ilişki kıkırdak dokunun yaşam bütünlüğünü korumasını sağlar. Matriks de uyarı iletkeni görevi görerek mekanik yüklenme ile oluşan sinyalleri kondrositlere ulaştırır. Embriyonal hayatın altıncı haftasında mezenkimal hücreler, perikondrium kanallarının genişlemiş alanlarında kıkırdak öncü hücreleri halinde görülmeye başlar. Bu öncü hücrelerden gelişen kondrositler mezenkimal hücre ailesindendir. Kondrositler, yuvarlak veya oval çekirdekli, çekirdeğe yakın hücre merkezinde bir çift sentriol ve iyi gelişmiş bir golgi aygıtı içeren hücrelerdir [23]. Artan yaşla birlikte hücre içeriğinde ve matris sentezinde progresif bir azalma vardır. Matriks sentezi 20 ile 30 yaş arasında en düşük noktaya ulaşmaktadır. Hücre yoğunluğu ise derin bölgede en düşük seviyededir [23].

2.2.2. Ekstrasellüler Matriks

Kıkırdak doku matriksi diğer doku matrikslerinden farklı özellik sergilemektedir. Daha fazla doku sıvısı içermesi nedeniyle eklem kıkırdağının yaklaşık %75'ini su oluşturur. Bu doku sıvısı da gazları, küçük proteinleri ve negatif yüklü proteoglikanları dengeleyen yüksek konsantrasyondaki katyonları içermektedir. Matriksin ana bileşenlerini de kollajen demetleri ve bunların arasında yer alan proteoglikan zincirleri oluşturmaktadır.

2.2.2.a. Kollajen

Kollajen, kıkırdağın şeklini korumada ve tensil kuvvetini sağlamada görev alır. Ayrıca diğer yapısal makromoleküller olan proteoglikanlar ve glikoproteinler, kollajen yapının üzerine tutunurlar. Böylece kollajen, eklem kıkırdağına kuvvet uygulandığında proteoglikan akışına karşı koyar [24].

Eklem kıkırdağı tip 2, 6, 9, 10 ve 11 olmak üzere en az beş tip kollajen içerir. Tüm bu kollajen tipleri, nihai kollajen fibrillerini oluşturan temel ve en küçük moleküller olan, “ α_1 , α_2 , α_3 ” adı verilen protokollajenlerin farklı şekil ve sayılarda birleşmesiyle oluşur. Eklem kıkırdak kollajenine esneklik veren ve onu deri, kemik ve fibröz doku kollajeninden ayıran yapı, üç adet α_1 protokollajen içeren tip 2 kollajendir.

Eklem kıkırdağında bulunan kollajenin %90-95'i tip 2 kollajendir. Bunun yanında az miktarda tip 6, 9, 11 kollajen bulunur. Tip 6 kollajen kondrositlerin çevresini saran matrikste yoğundur ve hücrelerin matrikse yapışmasını sağlar. Tip 9 ise proteoglikan parça içeren kısa bir kollajen lifidir. Tip 2 ile çapraz bağlar oluşturur ve hücre dışı matrikste proteoglikan parçalar ile etkileşir. Tip 11 kollajen ise, tip 2 kollajen lif çapının düzenleyicisi gibi görünmektedir ve tip 2 ile kopolimer oluşturur. Fizyolojik koşullarda kollajen liflerinin metabolizması yavaştır ve liflerin yarı ömrü yıllarla ölçülür.

Dejenere olmuş eklem kıkırdağı kendi halinde iyileşmeye bırakılırsa yeni oluşan tamir dokusunda tip 1 kollajen yoğunluğu artmış olarak gözlenir. Tip 2 kollajen ise düşük orandadır. Bu, fibröz kıkırdak veya fibrokartilaj şeklinde iyileşen kıkırdak doku defektinin tipik özelliğidir [19].

2.2.2.b. Proteoglikanlar

Proteoglikanlar polisakkarit zincirlerinden oluşan makromoleküllerin protein çekirdeklere kovalen bağ ile bağlanmasıyla oluşur. Bu moleküllerin temel yapısı karbonhidratlardır.

Eklem kıkırdağı, majör ve minör proteoglikanlar olmak üzere iki ana proteoglikan sınıfını içerir. Agregan, 100 kondroitin sülfat, 60 kadar keratin sülfat zinciri içerir ve hyalin kıkırdağı belirleyen majör proteoglikandır. Agregan molekülleri içeriğindeki sülfat grupları nedeniyle güçlü negatif yük taşırlar. Agreganın N-terminal protein yapısı, hem hyalüronik asit hem de bağlantı proteini için yüksek afinite gösteren globüler yapıda bir protein parçası içerir ve bir araya toplanmadan sorumludur [25]. Her bir hyalüronik asit zinciri büyük miktarlarda agregan molekülü bağlayabilir ve birkaç yüz milyon daltona varan yumaklar oluşturabilir.

Minör proteoglikanlar grubunda ise dekorin, biglikan ve fibromodulin yer almaktadır. Bu moleküller de diğer moleküllere bağlanarak matriksin sağlamlığına katkıda bulunurlar. Dekorin ve fibromodulin, tip 2 kollajene bağlanarak kollajen ağının organizasyonuna katılırken, biglikan ise perisellüler matrikste tip 6 kollajene bağlanır. Bu küçük agregat oluşturmeyen proteoglikanlar ayrıca matrikste dönüştürücü büyüme faktörü- β (transforming growth factor- β ; TGF- β) ile bağlanarak bu sitokinin kıkırdak dokudaki fonksiyonlarını da düzenler [26].

Bu büyük ve yüksek elektrik yüklü proteoglikan yumaklarının kollajen matriks içinde bulunması, dokuya biyomekanik özellikler kazandırır. Matriks içinde bulunan negatif yük, katyonları çeker ve dokunun osmolalitesinde bir artışa yol açar. Buna bağlı olarak çekilen su ise osmolaliteyi düşürür. Bu yüzden eklem kıkırdağının doku basıncı yüksektir ve yoğun bağlantılı tip 2 kollajen matriksin şişmesini engelleyerek doku bütünlüğünü korur. Eklem kıkırdağı yüksek hidrostatik basıncı sayesinde aksiyal yüklere karşı koyabilir. Yüklene sırasında kıkırdaktan su açığa çıkar ve ince bir sıvı tabaka oluşturarak sürtünmeyi azaltır. Yük ortadan kalktığında ortama salınan sıvı tekrar kıkırdak içine emilir. Böylece hem kıkırdağın viskoelastik özelliği sağlanmış hem de hücrelerin beslenmesi ve atıkların uzaklaşması için gerekli sinovyal sıvı döngüsü sağlanmış olur.

2.3 EKLEM KIKIRDAK HASARI

Günümüze kadar, kıkırdak dokudaki hasarlanmalar ve doku bozuklukları çeşitli yöntemlerle tedavi edilerek yapısal ve fonksiyonel olarak doğal kıkırdak dokusu özelliğinin devam ettirilip yeniden kazanılması amaçlanmış ve bu konuda çeşitli deneysel ve klinik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kıkırdak dokudaki hasarlanma süreci hücre dışı matrikste proteoglikanların kaybı ve kollajenöz fibriler ağın yapısında bozulmalar meydana gelmesi ile başlar. Bunu hücre metaplazisi ve hücre kaybı takip eder [8].

Eklem kıkırdak hasarı ve buna bağlı yıkım; metabolik, genetik, mekanik, travma gibi pek çok sebeple oluşabilir. 3 tip kıkırdak hasarı vardır:

- a. Yüzeyel matriks yıkımı; ayrılma olmaksızın kondrosit ve matriksde oluşan künt travmaya bağlı mikro hasar,

- b. Parsiyel kıkırdak defekti; kalsifiye kıkırdak hattına kadar olur, subkondral kemiğe uzanmaz.
- c. Tam kat kıkırdak defekti; subkondral kemiği içine alır.

Bu kusurlar, kemik iliği hücrelerine erişimden ötürü bir onarım tepkisi ortaya çıkarabilir. Bununla birlikte, bunlar tipik olarak fibrokartilaj ile doludur. Bu tip tamir dokusu, hyalin kıkırdağa göre çok daha zayıftır ve zayıf basınç dayanımı ve dayanıklılığından ötürü uzun dönemde zayıf performans gösterir ve yavaş yavaş dejenerasyona yol açar.

Tüm bu yaralanma tiplerinin iyileşme süreleri de farklıdır. Lezyon lokalizasyonu prognozda etkilidir. Bununla beraber hasta yaşı, cinsiyeti, aktivite düzeyi, obezite ve meslek de iyileşme sürecini etkiler.

2.3.1. EKLEM KIKIRDAĞININ TRAVMA SONRASI YARALANMA ŞEKİLLERİ

Eklem kıkırdağında alınan mikrohasar sonucu stres oluşur. Oluşan bu stres subkondral kemiği ve kalsifiye olmuş kıkırdağı etkileyerek zamanla eklem kıkırdağında incelmeye neden olur. Deneysel olarak kıkırdak hasarı oluşturulan tavşan deneyi modelinde, hasar olan bölgedeki kondrosit hücrelerinin çoğunda apoptozis olduğu görülmüştür.

Eklem kıkırdağında iyileşme yanıtında sürecin nasıl ilerleyeceğini belirleyen iki önemli faktör olduğu düşünülmektedir. Bunlar bölgesel kan dolaşımı desteğinin yeterli olmaması ve tamirde görev alan farklılaşmamış hücrelerin eksikliğidir. Kondrositler tamir görevini ancak bazı gerekliliklerin varlığı halinde yerine getirebilir. Kondrositlerin düzgün bir şekilde çalışabilmesi için matriks glikoprotein kaybının hücrelerin hızlı çalışmasını engellemeyecek düzeyde olması ve fibriller kollajenlerin sağlam olması gerekmektedir ayrıca matriks hasarına cevap verebilecek yeterli sayıda kondrosit de ortamda mevcut olmalıdır.

Kıkırdak hasarı sonrası kondrositler farklılaşır ve sentezleri artar. Bu hücreler ve matriks bazen doku defektini yeterince dolduramamaktadır. Tamir sürecindeki bu yetersizliğin sebebi matriks üretiminde ve hücre proliferasyonunda ani durma olmasıdır [27]. Travma sonrası onarım sürecinde kollajen tip 2 düzeyi

artmaktadır. Subkondral kemik hasarı kritik düzeydir. Özellikle yüzeyel defektler, subkondral kemik alanını genişletir, sonucunda kanama oluşur. Kanama sonucu oluşan hematoma içindeki mediatörler inflamatuvar süreci başlatır. Osteokondral yaralanmayı takip eden iki hafta içerisinde, osteokondral bölge defektlerinde, kondral alandaki iyileşme dokusunda tip 1 kollajen ve nonkollajen proteinler ile kondrosit benzeri hücreler, matriks bileşiminde ise tip 2 kollajen ve proteoglikanların bulunduğu gözlenmiştir. Altı-sekiz hafta sonra defektin kondral kısmındaki doku göreceli olarak yüksek oranda kondrosit benzeri hücreler, tip 2 kollajen ve proteoglikanlardan zengin bir matriks içerirken, yüksek miktarlarda tip 1 kollajen de bulundurulur [28], [29], [30]. Doku iyileşme sürecinin sonucunda hyalin kıkırdak ve fibrokıkırdak formasyonları arasında tipik bir doku oluşumu belirir. Bu yeni oluşum, normal eklem kıkırdağı dokusundan, yapı ve biyomekanik fonksiyon açısından farklılıklar göstermektedir [28], [29].

2.3.2. KIKIRDAK YARALANMA SINIFLAMALARI

Kıkırdak yaralanmalarının sınıflaması için en sık kullanılan sınıflama sistemi Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği (International Cartilage Research Society; ICRS) tarafından önerilen sistemdir (Tablo1,2).

Tablo 1. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği, Osteokondritis Dissekans Evrelemesi

Evre I	Stabil, devamlı: Sağlam kıkırdakla kaplı yumuşamış alan
Evre II	Kısmi bütünlük bozulması, prob ile muayenede stabil
Evre III	Tam bütünlük bozulması, “yerinde ölmüş”, yerinden oynamamış
Evre IV	Yerinden oynamış fragman, yatağında gevşek ya da boş defect
Evre IVA	Lezyon derinliği 10 mm den az
Evre IVB	Lezyon derinliği 10 mm den fazla

Tablo 2. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Artiküler Kıkırdak Yaralanmaları Evreleme Sistemi

Evre 0	Normal	
Evre I	Normale yakın	
	IA	Yüzeyel lezyon
	IB	Yüzeyel çatlaklar, yarıklar
Evre II	Anormal: %50'den az derinlikte olan lezyonlar	
Evre III	Şiddetli anormal: %50'den daha fazla derinliğe inen lezyonlar	
	IIIA	Kalsifiye kıkırdağa kadar
	IIIB	Subkondral kemiğe kadar
Evre IV	Şiddetli anormal: Subkondral kemik açıkta	

2.4. TEDAVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Uygulanan tedavinin değerlendirilmesi ICRS'in tanımladığı kriterlere göre yapılır (Tablo 3). Bu değerlendirmede defekt onarımının derecesi puanlanır. Alınan toplam puanlara göre dört evre olarak sınıflanır [1].

Tablo 3. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Kıkırdak Tamir Değerlendirmesi[1].

	Puan	
1. Protokol A*		
Çevre kıkırdak ile aynı seviyede	4	
Defekt derinliğinin %75'i tamir dokusu	3	
Defekt derinliğinin %50'si tamir dokusu	2	
Defekt derinliğinin %25'i tamir dokusu	1	
Defekt derinliğinin %0'ı tamir dokusu	0	
1. Protokol B*		
Greftlenen yüzeyin %100'ü canlı	4	
Greftlenen yüzeyin %75'i canlı	3	
Greftlenen yüzeyin %50'si canlı	2	
Greftlenen yüzeyin %25'i canlı	1	
Greftlenen yüzeyin %0'ı canlı, silindirler kırık yada kayıp	0	
2. Sınır bölgesine entegrasyon		
Çevre kıkırdak ile tam entegrasyon	4	
Çevreyi belirleyen doku < 1mm	3	
Greftin 3/4'ü entegre, 1/4'ü 1mm'den geniş belirgin sınır ile ayrı	2	
Greftin yarısı entegre, yarısı 1mm'den geniş sınır ile ayrı	1	
Her taraf ayrı yada 1/4'e kadar ayrı	0	
3. Makroskopik görünüm		
Sağlam düzgün yüzey	4	
Liflenmiş yüzey	3	
Küçük, dağınık çatlaklar, yarıklar	2	
Bir miktar, küçük ya da az ama büyük çatlaklar	1	
Greftli alanın toptan dejenerasyonu	0	
Toplam puan		
Evre 1	12	Normal
Evre 2	11-8	Normale yakın
Evre 3	7-4	Anormal
Evre 4	3-1	Şiddetli anormal
* Protokol A: ACI, periost ya da perikondrium <u>transplantasyonu</u> , <u>delme</u> , <u>mikrokırık</u> , <u>diğerleri</u>		
* Protokol B: Mozaikplasti, OATs ve diğerleri		

2.5. KIKIRDAK HASARINDA TEDAVİ

YÖNTEMLERİ

Eklem kıkırdağının avasküler doğası nedeniyle, kıkırdak dokusunun hasarı, rejenerasyon için sınırlı bir potansiyel gösterir [28]. Dizdeki kıkırdak kusurları ağrıya, şişmeye ve osteoartrit erken gelişimine neden olabilir. Kıkırdak yaralanmaları ve osteoartritte kıkırdağa yönelik uygulanan veya araştırılan yeni tedavi yöntemlerinin hepsinin ortak amacı kıkırdaktaki defektlerin yapısal ve fonksiyonel olarak normal kıkırdağa yakın bir yapı ile doldurulması ve bu yapının uzun süre dayanıklı olmasıdır. Yani kıkırdak yüzeyin restorasyonudur. Sonuç

olarak amaç hastaların ağrı, fonksiyon kısıtlılığı gibi şikayetlerinin azaltılması ve dejenerasyonun önüne geçilmesidir.

1 cm'den daha küçük lezyonların etrafındaki sağlam kıkırdak dokuda yük artışına rastlanmazken, 1 cm'den büyük çaptaki lezyonlarda çevre sağlam kıkırdak yüzeye binen yükün %65 oranında arttığı görülmüştür [31]. Benzer bir çalışmada 1 cm ve daha fazla defekt olan hastaların takiplerinde eklem aralığının %50'den fazla azaldığı saptanmıştır [32].

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, bizim çalışmamızda da olduğu gibi, kıkırdak dokunun bir miktar kendiliğinden iyileştiği saptanmıştır. Herhangi bir tedavi uygulanmadan iyileşemeyen kıkırdak defekt büyüklüğünü ifade etmek için 'kritik boyut' terimi kullanılmıştır. Bu her canlı için değişen bir büyüklüktür; insanda 2 cm olduğu öne sürülmüş olup 2 cm olan defektlerin iyileşebildiğini gösteren çalışmalar da mevcuttur [33]. Kıkırdak lezyonlarını sadece büyüklük çapına göre değerlendirmek yetersiz olacaktır; burada lezyonun derinliği de önem taşımaktadır. Özellikle tidemarkı geçen, subkondral kemik bölgesine uzanan defektler iyileşme potansiyelleri açısından farklılık göstermektedir. Tidemarkı geçip kemik iliğine ulaşan lezyonlarda mezenkimal kök hücrelerin iyileşmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir. Ancak meydana gelen iyileşme dokusunun rejenerasyon özelliği kısıtlı olduğundan dolayı primer kıkırdak doku kadar fonksiyonel olmamaktadır [34].

Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan pek çok cerrahi teknik tam kat lezyonlar sonrasında kıkırdağın kendiliğinden iyileşme mekanizmasını kullanır. Daha yeni teknikler ise yeni kıkırdak oluşturma yeteneğine sahip dokular veya hücreler ile eklem kıkırdak yüzeyinin rejenerasyonunu sağlamaya yöneliktir [8]. Kıkırdak defektlerinin tedavisi için günümüzde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında: artroskopik tıraşlama (debridman), yüzey abrazyon artroplastisi, subkondral alana penetrasyon sağlayan girişimler, mikrokırık uygulaması, küçük çaplı mikrokırık uygulaması, defektif alana osteokondral otograft veya allograft transferi, düzeltici osteotomiler, eklem distraksiyonu, yumuşak doku greftleri uygulaması, otolog kondrosit implantasyonu, büyüme faktörleri uygulaması ve son dönemlerde popüler olan doku mühendisliği ile üretilen yapay matriks

kullanımı gibi birçok teknik tanımlanmıştır [35], [36]. İyileşmede hyalin kıkırdak oluşturma amacına en yakın sonuçlar, osteokondral otogreft transferi, otolog kondrosit implantasyonu, doku mühendisliği ile üretilen skafold materyallerinin hücreli ya da hücresiz kullanımı ile elde edilmiş olmasına rağmen, hala yeterli hyalin benzeri kıkırdak özelliği taşıyan kıkırdak üretimi sağlanamamıştır [37]. Güncel kıkırdak onarımı yöntemleri kabaca; fibröz kıkırdak oluşturma yöntemleri ve hyalin benzeri kıkırdak oluşturma yöntemleri olarak iki ana grupta incelenebilir. Fibröz kıkırdak oluşturma yöntemleri arasında; subkondral penetrasyon, mikrokırık, abrazyon artroplastisi yer almakta iken hyalin benzeri kıkırdak oluşturma yöntemleri arasında otolog osteokondral transfer, otolog kondrosit transplantasyonu, matriks temelli kondrosit transplantasyonu yer almaktadır.

2.5.1. Eklem İçi Yıkama ve Traşlama

Kıkırdak doku hasarının erken dönemlerinde yakalanan yüzeysel lezyonlarda uygulanmalıdır. Yaklaşık 3 cm'e kadar olan defektlerde, genellikle genç-orta yaş grubunda uygun endikasyonludur. Kartilajın shaverlanması ile eklem yüzey kıkırdağında rejenerasyon süreci uyarılamaz [38]. Yapılacak bu tedavi tekniği için en uygun hastalar radyografi bulguları çok kötü olmayan, hareketlere bağlı şikayetleri olan, dizilim problemi olmayan, akut dönem şikayetleri olan hastalardır. Nihayetinde artroskopik olarak yapılan işlem hasarlı kıkırdakların temizlenmesi, menisküs ve çevre dokularının temizlenmesi, varsa osteofit eksizyonu içerir. Ancak bu yöntem ileri derece hasarlı kıkırdaklar için yetersiz kalacaktır.

2.5.2. Subkondral Delme ve Mikrokırık

1997 yılında Steadman ve ark. mikrokırık tekniğini öne sürmüşlerdir [39]. Tanımlanan Steadman tekniğinde artroskopik olarak üç portal açılıyordu. Portallerin yerleri ise lezyona göre değişiklik gösteriyordu. Mikrokırık uygulanmadan önce instabil olan kıkırdak bölgeleri temizlenir, kalsifiye kıkırdak katmanına kadar debridman uygulanır. Arkasından mikrokırık işlemi yapılarak oluşacak yeni kıkırdağın subkondral katmana tutunması sağlanır. Ancak tutunma

sağlanmak istenen subkondral tabaka korunarak yapılan çalışmalarda da hyalin kıkırdığa yakın iyileşme görüldüğü tespit edilmiştir [40].

Debridman yapılan hasarlı bölgenin çevresinden başlanarak mikrokirik telleri yardımı ile drilleme yapılır. Kullanılan tellerin uç kısımlarının prizmatik olması nedeniyle derinlik kontrolü daha kolay sağlanabilmektedir. Delikler hasarlı bölgeye dik olacak şekilde planlanmalıdır. Bu amaçla yapılan mikrokirik setlerinde 30°, 45° ve 90° eğimli guide telleri mevcuttur. Açılacak delikler mümkün olduğunda birbirine yakın olur, aralıkları 3-4 mm olmasına özen gösterilir [41]. Subkondral bölgede damarsal yapılara ulaşma hedeflenir [42]. Deliklerden eklem boşluğuna süzülen yağ damlacıklarının görülmesi subkondral bölgeye ulaşıldığı anlamına gelir. Kanama sağlanarak oluşan fibrin pıhtısı ve hematoma sayesinde tamir sürecinin başlaması hedeflenir. Hematom sonrasında fibrovasküler tamir mekanizmasının başlangıcı olan granülasyon dokusu oluşur [43]. Mezenkimal kaynaklı kök hücreler proliferasyon olup olgunlaşırlar, dönüşüm göstererek kondroblastlara ardından da kondrositlere dönüşürler. Erken dönemlerde hyalin kıkırdak benzeri doku oluşumları meydana gelir, ancak yapılan incelemeler sonucunda sekizinci haftadan sonra fibrokartilaj dokunun baskın olduğu görülmüştür [44], [45]. Ek olarak mikrokirik gibi subkondral penetrasyon teknikleri sonrasında elde edilen fibrin pıhtısının, hasarlı bölgeye gelen kuvvetlere karşı yeterli mekanik stabiliteye sahip olmadığı görülmüştür [46]. En uygun endikasyonları aktif hastada semptomatik, belirli bir odağı olan lezyon, kondral travması olan veya insidental olarak yakalanmış hasta grubu olarak sayılabilir [47]. Tekniğin başarılı olabilmesi için lezyonun yaygın olmaması gerektiği bilinmelidir. Kullanılabilecek en üst sınır 2x2 cm olarak ön görülmüştür [48]. Kolay uygulanabilmesi, maliyetinin az olması, ek bir hazırlık gerektirmemesi, tek basamaklı işlem olması, yapılacak ileri düzey girişimlere engel olmaması mikrokirik tekniğinin önemli avantajları olarak öne çıkmaktadır [48].

2.5.3. Osteokondral Otograft ve Mozaikplasti

Bilinen otolog greft transferi ilk olarak 1993 yılında Bobic ve ark. tarafından uygulanmıştır [49]. Dört yıllık çalışmalar ve deneyler sonucunda 1997 yılında klinik çalışmalarını yayınlamışlardır.

Kemik defektinin de eşlik ettiği 1 cm'den derin kıkırdak lezyonlarında, otogreft uygulanması öncelikle tercih edilmesi gereken bir tekniktir. Bu yöntemin 2 cm çapından büyük ve yaklaşık 6 cm'ye kadar olan lezyonlarda kullanımı uygundur. Alt sınır çapı olarak da 1 cm düşünülmelidir, ancak pratikte 2 cm'den küçük alanlara uygulamak pek mümkün değildir [41].

Teknik açık, mini artrotomi ya da artroskopik olarak uygulanabilir. Beşten fazla greft kullanılmayacaksa, lezyon çapı 2x3 cm ve daha altında ise artroskopik olarak gerçekleştirilebilir [50]. 6 cm²'den büyük kıkırdak lezyonlarında artrotomi uygulamak gerekebilir. İlk defa Hangody ve Karpati tarafından mozaikplasti tekniği tarif edilmiştir [35].

Büyük defektlerde, 6 cm² ve üstü, mozaikplasti tekniğinin başarısızlık oranı çok yüksektir. Başarısızlık nedenlerinden en önemlisi de bu defekti kapatabilecek otogreftin bulunamamasıdır. Osteokondral greftler trefinler ya da osteotomlar yardımı ile alınabilir. Uygulanacak alana dik olarak yerleştirilmesi çok önemlidir [51]. Ayrıca greft alınan bölgeye de dikkat edilmelidir, çünkü uygun teknikle alınmazsa iyileşme dokusu hipertrofik fibröz şekilde iyileşip eklem seviyesinin üstüne çıkarak ciddi semptomlara, hatta dejeneratif artrite sebep olabilir [52]. Kıkırdak doku hasarlarının tedavilerinde osteokondral otogreft kullanılması etkili olduğu kadar güvenilir yöntemdir. Otogreft uygulamalarında doku uyumsuzluğu beklenen bir durum değildir. Büyük ve geniş kıkırdak defektlerinde rekonstrüksiyon için gerekli miktarda otogreft alabilmek mümkün değildir. Greft yetersizliği dezavantajı nedeniyle, eklem kıkırdak lezyonlarında yük taşımayan yüzeylerden alınan birden fazla küçük greft yük taşıyan yüzeydeki lezyonlara uygulanarak göreceli olarak tedavi protokolü oluşturulmak istenmektedir. İnterkondiler notch ve çevresi, femur kondillerinin periferleri bu teknik için uygun görülen bölgelerdir [35]. Transfer edilen hyalin kıkırdağın devamlılık göstermesinde en önemli faktörlerden biri fonksiyonel bir tidemark olması ve subkondral bölge ile beraber greftleme yapılmış olmasıdır [53].

2.5.4. Osteokondral Allogreftler

Kıkırdak defektlerinde kullanılan osteokondral allogreftler, abrazyon artoplastisi, subkondral drilleme ve konservatif tedavilerin yetersiz kaldığı durumlarda

uygulanmalıdır [38]. Kıkırdak yüzeydeki büyük defektlerin (15 mm'den büyük) tedavisinde kullanılabilir. Osteokondral allogreftler immünolojik açıdan çok ciddi problemler meydana getirmez. Yeni hazırlanmış allogreftlerin genel olarak daha etkili olduğu kabul görmektedir [36]. Dondurulmuş greft uygulanan hastalarda da başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

2.5.5. Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Chesterman ve Smith 1968 yılında kondrositleri ilk defa izole ederek kültürde sayılarını arttırıp üretim yapmışlardır [54]. 1971 yılında Bentley ve Greer kondrositleri izole ederek kıkırdak doku hasarlarında tedavi amaçlı kullanmışlardır [55]. Otolog kondrosit implantasyonu (OKİ) 1997 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Kurumu (U.S. Food and Drug Administration, FDA) onayı almıştır. Bu tarihten başlayarak on bir yıllık sonuçlarını yayınlayan Petersen sayesinde teknik ön plana çıkarılmış ve yaygınlaşmıştır [56]. OKİ'nun avantajları; allojenik greft kullanılmaması, ölü boşlukların kalmaması, greft alınan saha hasarı olmamasıdır. Dezavantajları ise iki ayrı cerrahi uygulama gerektirmesi, yüksek maliyetli olması, kondrosit çoğaltılması ve kıkırdak doku oluşmasının süre alması ve transport işlemleri gerektirmesidir [57].

OKİ femoral kondiller, patella, troklea ICRS göre evre 3 ve 4 kıkırdak yaralanmalarının tedavinde kullanılmalıdır. Hastaların yaş aralığı 20-50 arasındadır. Özellikle 40 yaşın üzerindeki hastalarda mikrokırık ve benzeri tekniklere göre daha iyi iyileşme yanıtları gözlenmiştir [58]. Küçük defektlerin tedavisinde, 2 cm², ilk tercih mikrokırık ya da osteokondral otolog transfer iken, multiple 2 cm² defekt varsa OKİ kullanılabilir. 2.5-3 cm² lezyonlarda OKİ kullanılması endikedir [59]. Pediatrik hastalarda en sık tercih edilen yöntemdir.

OKİ uygulamasının ilk adımı artroskopik olarak eklem muayenesi, kondrosit üretimi için kartilaj doku alınması, laboratuvara transport edilmesidir [60]. Alınacak dokular için femur troklea çevresi uygundur. Alınan materyal %0,9'luk NaCl solüsyonunda transport edilir. Genellikle kültür için otolog serum gerekmektedir. Serum elde etmek için ise hastadan alınan kanın pıhtılaşması beklenir, ardından santrifüj işlemi uygulanır. Filtre kullanılarak serum ayrıştırılır.

-4 °C’de saklanarak kültür ekimi için kullanılır. Serumun otolog olarak kullanılması bovine göre çok daha hızlı üretim sağlamaktadır [61]. Yaklaşık 10 cm defekt için gerekli implantasyon materyali sekiz haftada sağlanabilmektedir. Cerrahi işlemler defektin büyüklüğüne göre mini artrotomi yapılarak altıncı haftadan itibaren uygulanabilmektedir [62].

Komplikasyonlara bakacak olursak; %3,8 insidansı vardır, en sık görülen komplikasyon ise yeni kırıldak dokuda hipertrofi meydana gelmesidir [63]. Bunun dışında implante kırıkdağın çevre doku ile uyumsuzluğu, yetersiz yeni doku oluşumu, subkondral kemik ile greftin ayrılmasıdır [64]. OKİ uygulanan hastaların sekonder cerrahi geçirme oranları yüksektir. Ancak bu oranın yaş ile veya defektin büyüklüğü ile ilgisi yoktur. En sık neden hipertrofik greft olmuştur [65]. Greft altındaki periostun sürtünme ile uyarılması hipertrofiye neden olmaktadır. Patelladaki vertikal kuvvetlerin augmentasyon üzerinde etkili olduğu düşünülür ki en az yetmezliğe gidiş bu bölgede görülmektedir.

2.5.6. Kırıldak Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği travma ve hastalık nedenleri ile doku veya organ kayıplarının yeniden yapılması ve onarımı için son dönemlerde geliştirilmiş bir tekniktir. Temel yaklaşım skafoldların, sitokinlerin ve kondrositlerin bir arada kullanılmasıdır. Kırıldak dokudaki düşük hücre yoğunluğu nedeniyle biyopsi sonucu elde edilen materyalin az olması doku mühendisliğindeki en önemli sorunlardan biridir. Yeni hücre kaynakları ve yeni biyomateryaller bu sorunu çözebilmek için geliştirilmeye devam edilmektedir [66]. Doku mühendisliği kırıldak doku için en uygun hücre kaynağını hala bulunamamıştır. Genetik olarak modifiye edilmiş hücreler, kök hücreler, kondrositler ve fibroblastlar kırıldak onarımı için potansiyelleri ve uygunlukları açısından incelenmektedir.

Uygun Hücre Kaynakları:

-kosta	-kemik iliği
-auriküler	-periost
-artiküler	-embriyonik
-nasoseptal	-sinovia
-adipoz doku	-kondrosit hücreleri

Kondrositler, doğal kıkırdak dokuda bulunduğu ve matriksteki fonksiyonları fazla olduğu için kıkırdak doku mühendisliğinde en çok ilgi gören hücre tipidir. Fakat kondrositlerin hücre miktar yoğunluğunun az olması doku mühendisliği için ciddi zorlayıcı bir sebeptir. Eklem kıkırdak yüzeyinin sadece %2'lik kısmı kondrositleri ihtiva eder [67]. Çoğaltılması gereken kondrositlerin kültür ortamlarında rejenerasyon yeteneklerini kaybettikleri bilinmektedir. Fibrin yapıştırıcı, agaroz ve aljinat kondrosit fenotipini korumada yardımcı olabilir [68]. Eklem kıkırdak katmanlarında kondrositlerin fonksiyonel ve işlevsel özellikleri farklılık gösterir. Yüzeyel, orta ve derin katmanlardaki kondrositlerin metabolizmaları birbirinden farklıdır [69]. Örnek olarak süperfisyal tabaka kondrositleri yüzeyel bölge proteini sentezlerken, orta katman kondrositleri ağırlıklı olarak tip 2 kollajen sentezlerler. Subkondral bölgeye doğru artan kollajen sentezi sayesinde derin tabaka daha dayanıklıdır. Bu farklılıklar nedeniyle kıkırdak doku mühendisliği tekniğinde katmanlara hücresel homojen dağılım sağlanması gerekmektedir. Tabakalar arası başarısızlık bu nedenden dolayı oluşmaktadır [70].

Kök hücreler, pluripotent özelliğe sahip hücrelerdir. Bunun anlamı değişik koşullar altında çok farklı hücrelere dönüşebilmesidir. Son yıllarda gözde konulardan biri olan kök hücrelerin kemik iliğinden izole edilip TGF- β sitokini ile uyarıldığında kondroblastlara dönüştüğü gösterilmiştir [71]. Kondrositlere dönüşebilen mezenkimal kök hücreler; adipoz dokuda, sinoviyal membranda, kemik iliğinde bulunur. Yağ doku kaynaklı kök hücreler istikrarlı büyüme kapasitesi, yaşlanma gecikme özelliği ile kültür için uygun hücre tipidir [72]. Bu hücreler de TGF- β sitokiniyle uyarıldığı zaman kondroblastlara dönüşebilmektedir. Yapılan çalışmalarda FGF-2'nin hücre proliferasyonunu arttırırken, tip 2 kollajen sentez metabolizmasını arttırdığı gösterilmiştir [73]. Kondroblastlara dönüşebildiği ispatlanmış olmasına rağmen hasarlı doku tamiri için de gerekli olan kondrojenik özellik adipoz doku kök hücrelerinde kemik iliği kaynaklı olanlara göre çok daha düşüktür [74]. Blastokist safhasında olan hücre kaskadından embriyonik kök hücre izole edilebilmiştir. Pluripotent özelliğe sahip olan bu hücreleri klinik olarak saflaştırmak çok zordur. Erişkin kök hücrelere göre çok daha az immunojenik olduğu için odak kaynağıdır. Aynı zamanda çok hızlı

hücresel büyüme yeteneğine sahiptirler. Embriyonik hücrelerin erişkin kondrogenesize uğrayabildikleri gösterilmiştir [75].

Skafoldların kıkırdak doku rejenerasyonunda hücre iletimi maksadıyla kullanımı ön plana çıkmıştır. Kıkırdak doku üretimi için optimum şart üç boyutlu ortamı sağlamaktadır. İyi bir skafold bozunmayı önleyebilmeli, hücre ölümünü kontrol altında tutabilmeli, besin geçişine ve artık biyomaddelerin difüzyonuna izin vermeli, kıkırdak dokunun sağladığı doğal yapışma desteklerini sağlamalı, matriks oluşumunu destekleyebilmeli ve tabi ki hücre proliferasyonuna izin verebilmelidir [76]. Günümüzde skafold amaçlı olarak aljinat, fibrin, agaroz, hyaluran, kollajen, jelatin, kitosan, sellüloz, sülfat ve kondroidin kullanılmaktadır.

2.5.7. Gen Tedavisi

Vektörler aracılığı ile in-vivo veya ex-vivo olarak özel genlerin eklem içerisine yerleştirilmesidir [77]. Vektör doğrudan ekleme bırakılıyorsa in-vivo, genetik yapısı dışarda değiştirilmiş hücrelerin yeniden ekleme transferi gerçekleşiyorsa ex-vivo olarak adlandırılmaktadır. İşlem hem viral konak ile hem de direkt vektör ile yapılabilir. Yapılan çalışmalarda sadece altı haftalık bir süreçte lezyonların tamir edilebildiği görülmüştür [78]. Gen tedavisi kıkırdak doku hasar tamirlerinde daha emekleme aşamasında olmasına rağmen büyük bir potansiyele sahiptir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışmada ratların sağ dizlerinde osteokondral defekt oluşturup, bu defekti laboratuvar ortamında ürettiğimiz iki katmanlı ve tek katmanlı hücreli ve hücresiz skafoldlar ile onararak kırık doku iyileşmesindeki etkilerini gözlemlemeyi amaçladık. Amacımız iki katmanlı sentetik skafold ile kırık doku onarımı yapabilmek olup subkondral dokunun kırık doku iyileşmesinde mutlak gerekli olup olmadığının cevabını bulabilmektir.

Yaptığımız tez çalışmasının etik uygunluğu Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından AKÜHADYEK-166-20-Referans nolu araştırma, 49533702/211 sayı numaralı sayfa ile onaylanmış ve çalışma, proje no: 20.TUS.005 ile AFSÜ BAPK tarafından desteklenmiştir. Çalışmamız Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık ve Araştırma Deney Hayvanları Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan bütün denekler Kocatepe Deney Hayvanları Merkezi'nden temin edilmiştir. Çalışmamızda toplam 70 adet Wester Albino türü erkek rat kullanıldı. Deney hayvanları;

A Grubu : Kontrol Grubu (Osteokondral defekt + Mikrokırık) 14 adet rat

B Grubu : Osteokondral defekt + mikrokırık + çift katmanlı kondrosit içeren skafold grubu 14 adet rat

C Grubu : Osteokondral defekt + mikrokırık + çift katmanlı kondrosit içermeyen skafold grubu 14 adet rat

D Grubu : Osteokondral defekt + mikrokırık + tek katmanlı kondrosit içeren skafold grubu 14 adet rat

E Grubu : Osteokondral defekt + mikrokırık + tek katmanlı kondrosit içermeyen skafold grubu 14 adet rat olacak şekilde 5 farklı gruba ayrıldı.

Ortalama yaşları 3 ay olarak hesaplanan deney hayvanları aynı merkezde polietilen karışımlarından yapılmış olan kafeslerde, gruplarına göre isimlendirilerek her kafeste üç adet kobay olacak şekilde bakımları sağlandı. Hayvanlara günlük rutin yem ve su verildi. Cerrahi uygulandıktan sonra hayvanların sularına Sulphamezathine (sulfadimidin sodyum, CEVA-DİF)

%16'lık solüsyon verilerek antibiyotik profilaksisi sağlandı. Hayvanların rutin günlük temizlikleri ve pansumanları yapıldı. Deneklerin sayısı önceden yapılan çalışmalar ve istatistiksel anlamlarına göre grup başı en az 6 olarak hesaplandı ve güç analizi %95 olarak belirlendi. Her gruptaki denekler için 4. hafta ve 8. hafta sakrifiye edilip histopatolojik inceleme planlanması nedeniyle her gruba iki adet deney hayvanı güvenlik amacıyla eklendi ve toplamda her gruba 6+1 ve 6+1 olacak şekilde 14 adet deney hayvanı alınmış oldu. Kullanılan Wester Albino türü denek hayvanlarının DNA benzerliği %99 olması çalışmamızın güç analizini kuvvetlendirmiştir.

3.1. Skafold Üretimi

Skafold (doku iskelesi); doku defektleri, doku travmaları ve çeşitli hastalıklar sonucu oluşan doku kayıplarının onarılması için kullanılan malzemelerdir. Doku iskelelerinin kullanımında genel yaklaşım dokuyu rejenere edebilmektir [79]. Bu amaçla dokuyu ilgili bölgede yeniden oluşturmak için doku iskelesi içerisindeki gözenekli alanda ilgili hücrelerin büyütülmesi ve doku iskelesinin zamanla degrade olmasıyla yerini tamamen temel dokuya bırakması en çok kullanılan stratejidir [80], [81]. Tez kapsamında üretilen doku iskelesi de bu strateji temellidir. Kemik ve kıkırdak doku katmanlarının birleşmesini sağlamak amacıyla iki katmanlı bir doku iskelesi tasarlanmıştır. Bu iki doku için farklı özelliklere sahip doku iskeleleri üretilmiştir. Kıkırdak doku iskelesinin üretimi için bileşiminde kullanılan poly ethylene glycol methyl ether methacrylate (PEGMEMA) polimeri sentez edilmiş. Diğer kimyasallar olan PLGA (poly D,L-lactide-co-glycolide) ve hidroksi apapit (HA) ticari olarak temin edilmiştir.

3.1.1. PEGMEMA Sentezi

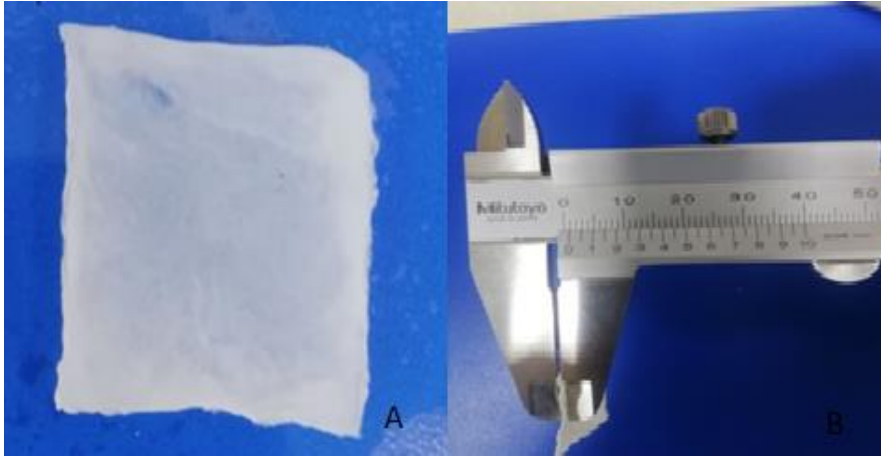
Bu polimerin sentezinde reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polimerizasyonu kullanılmıştır [82], [83]. Bu amaçla 1000 mg ethylene glycol methyl ether methacrylate (EGMEMA, average Mn 300 g/mol) ve 21.039 mg 2-cyano-2-propyl benzodithioate 3 ml metanolde çözüldü. Ardından 2.23 mg 2,2'-azobis(isobutyronitrile) 1 ml'de çözülüp monomer çözeltisine eklendi. Bu karışım çözeltisi oksijenden arındırılmak için ağzı septumla kapatılarak yüksek saflıkta azot gazı ile temizlendi. Daha sonra polimerizasyon 70 °C'de 16 saat devam

ettirildi. Reaksiyon balonunun ağzı açılarak ve soğutulularak polimerizasyon durduruldu. Reaksiyon çözelti hacmi %50 azaltılana kadar metanol evaporasyonla uçuruldu. Geriye kalan çözelti 250 mL soğuk dietil etere damlatılarak çöktürüldü. Bu çöktürme işlemi 3 kez tekrar edildi. Böylelikle polimerizasyona katılmayan monomer ve diğer kimyasallar uzaklaştırılarak polimer saflaştırıldı. Son olarak elde edilen polimer yüksek vakumda bekletilerek uçucu tüm bileşiklerden arındırılarak saflaştırıldı [84]. Elde edilen POEGMEMA polimeri Gel Permeation Chromatography (GPC) ile karakterize edildi. GPC cihazında yapılan analiz sonucu elde edilen polimerin 8000 kDa moleküler ağırlığına ve 1.2 polydispersity index(PDI) değerine sahip olduğu belirlendi.

3.1.2. Kıkırdak Doku İskelesi Sentezi

Biyobozunur, hidrofobik yapıda ve FDA onaylı bir polimer olan PLGA polimeri ile hidrofilik yapıda FDA onaylı PEG (polyethylene glycol) yan dallarına sahip bir polimer olan PEGMEMA polimerinin moleküler düğümlenmesi ile bir doku iskelesi elde edilmiştir. Bu amaçla çözücü dökme yöntemi kullanılmıştır. Çözücünün (aseton) uçurulması sonrasında PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanmış ve kullanılana kadar PBS içinde 4°C da bekletilmiştir.

Elde edilen kıkırdak doku iskelesi 3 mm kalınlığında olup makro görüntüsü yer almaktadır (Şekil-2 a,b).



Şekil 2 a,b. Kıkırdak doku iskelesi

3.1.3. Kemik Doku İskelesi Sentezi

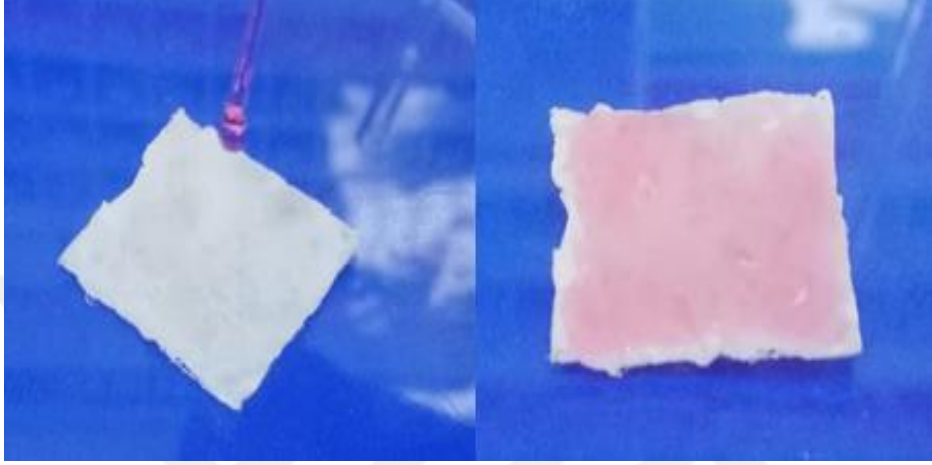
Kemik doku iskelesinin üretimi için PLGA polimeri ile HA karışımı kullanılmıştır. Bu amaçla %50 PLGA ve %50 HA içerecek şekilde hazırlanan karışım cam yüzeye dökülmüş ve çözücü (aseton) uçurulması sonrasında PBS ile yıkanmış ve kullanılabilecek kadar PBS içinde 4°C da bekletilmiştir. Elde edilen kıkırdak doku iskelesi 0.9 mm kalınlığında olup makro görüntüsü yer almaktadır (Şekil-3).



Şekil 3. Kemik doku iskelesi

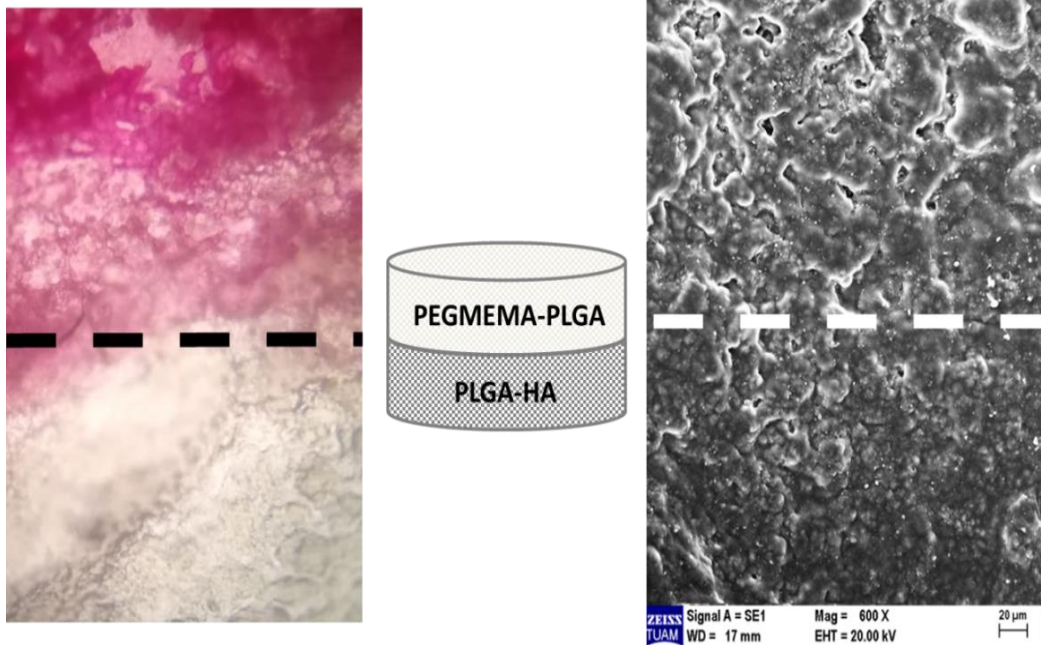
3.1.4. İki Katmanlı Doku İskelesinin Üretimi

İki katmanlı doku iskelesinin üretimi için önceden hazırlanan kemik doku iskelesi üzerine kıkırdak doku iskelesi için hazırlanan karışım çözücü dökme yöntemi ile uygulanmıştır (Şekil-4). Çözücünün (aseton) uçurulması sonrasında PBS ile yıkanmış ve kullanılabilecek kadar PBS içinde 4°C da bekletilmiştir.



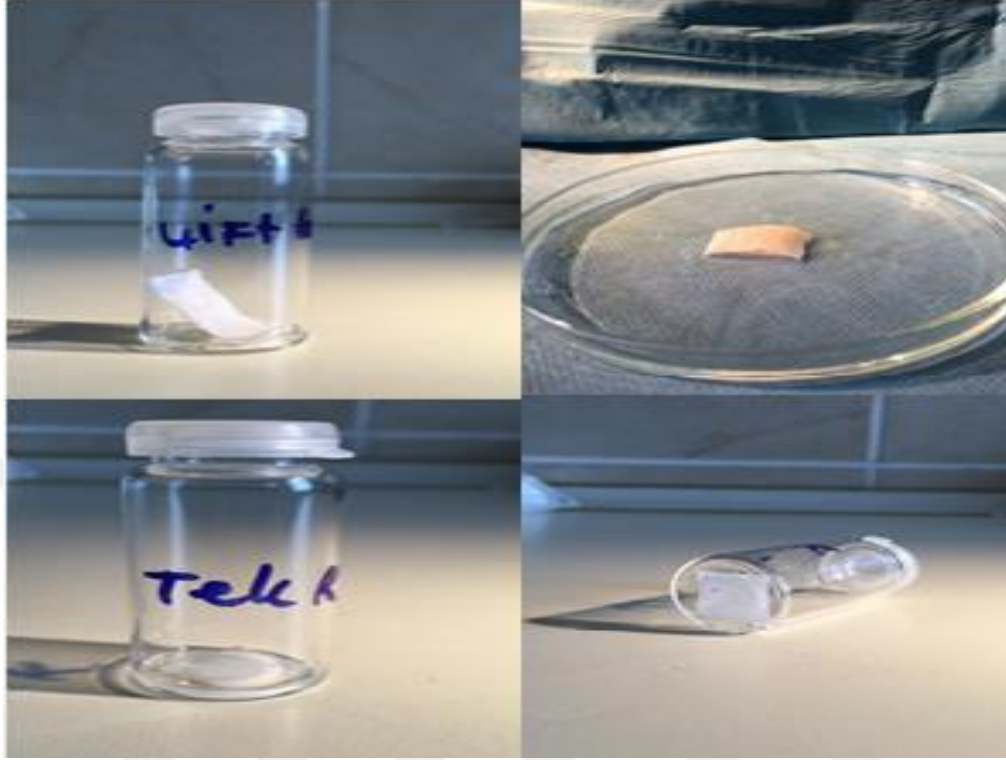
Şekil 4. İki katmanlı doku iskelesi

Elde edilen iki katmanlı skafolda ait ışık mikroskobu ve SEM görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil-5).



Şekil 5. İki katmanlı skafolda ait ışık mikroskobu (solda) ve SEM (sağda) görüntüleri

Elde edilen iki katmanlı ve tek katmanlı skafolda ait makroskopik görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil-6).



Şekil 6. İki katmanlı (üstte) ve tek katmanlı (altta) skafolda ait makroskopik görüntüler

3.2. Anestezi ve Analjezi

Çalışmada 5 adet grup oluşturulmuş ve A,B,C,D,E olarak isimlendirilmiştir. Bu gruplardan B ve D grubundaki deney hayvanlarına gruplarındaki deneysel özellikten dolayı birinci basamakta ilk cerrahi işlem uygulandı. B grubuna iki katmanlı hücreli sentetik skafold, D grubuna da tek katmanlı hücreli sentetik skafold uygulanacağından dolayı bu iki gruptaki hayvanlar diz cerrahi işleminden bir hafta önce ilk cerrahi prosedüre maruz kalmıştır. Bu prosedüre göre hayvanlara verilmek üzere Xylazinbio (ksilazin etken madde, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) 50ml %2'lik çözeltiden 400 grama 0,1 ml olacak şekilde, Alfamine (Ketamin etken madde, Atafen, İzmir) 50 ml %10'luk çözeltiden 400 grama 0,3ml olacak şekilde insülin enjektörüne toplam 0,4 ml anestezi karışımı hazırlandı (Şekil-7). Hayvanların kuadriseps kası içine im uygulanarak anestezi indüksiyonu sağlandı. Cerrahi süresi boyunca ihtiyaç duyulması halinde 0,1 ml ek doz uygulandı. Anestezi hazırlıkları ardından otogreft transplantasyonu için standardizasyon

amaçlı her ratın sağ kulağı kullanıldı. Sağ kulak posteriorundan 3x3 mm'lik otojen kıkırdak doku grefti alındı. Alınan bu otojen kıkırdak doku greftleri uygun koşullarda temizlenip her deney hayvanının ismine özel solüsyon ve kaplarda saklanarak hücre kültür laboratuvarına taşındı. Cerrahi işlemi tamamlanan deney hayvanında yara yeri temizliği sonrasında uygun suturezasyon uygulandı. Postoperatif dönemde hayvanların rahat olabilmeleri için ılık ortamda bakımları sağlandı, bir gün boyunca pansumanlarının korunmasına dikkat edildi. Otojen kıkırdak doku grefti alınmasını takiben alınan materyaller hücre kültür laboratuvarında üretildi. Üreme safhası yaklaşık bir hafta sürdü. Bu aşamadan sonra beş gruptaki deney hayvanlarına da aynı cerrahi öncesi prosedür uygulandı.



Şekil 7. Xylazin Bio %2 ksilazin etken madde, Alfamine %10 ketamin etken madde

3.3. Otojen Kıkırdak Doku Alınması

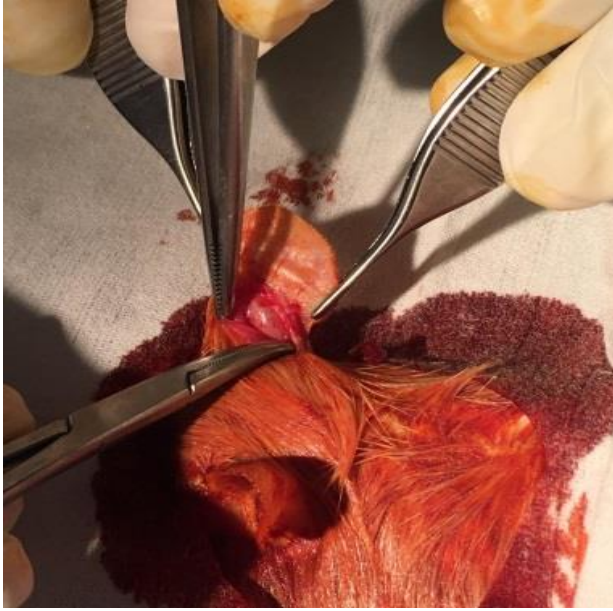
Kondrosit hücresi içeren skafold kullanılacak olan B ve D gruplarındaki deney hayvanları diz cerrahi prosedürleri başlamadan yedi gün önce otojen kıkırdak doku örneği almak amacıyla opere edilmiştir.

Preoperatif antibiyotik profilaksisi uygulanan deney hayvanları Xylazin bio (ksilazin etken madde, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) 50 ml %2'lik çözeltiden 300 grama 0,1 ml olacak şekilde, Alfamine (Ketamin etken madde, Atafen, İzmir) 50 ml %10'luk çözeltiden 300 grama 0,3 ml olacak şekilde insülin enjektörüne toplam 0,4 ml anestezi karışımı hazırlandı ve hayvanların kuadriseps kası içine uygulanarak anestezi indüksiyonu sağlandı. Yapılan anestezi sonrası ratlar cerrahi boyama ve örtünmeye tabi tutuldu (Şekil-8).



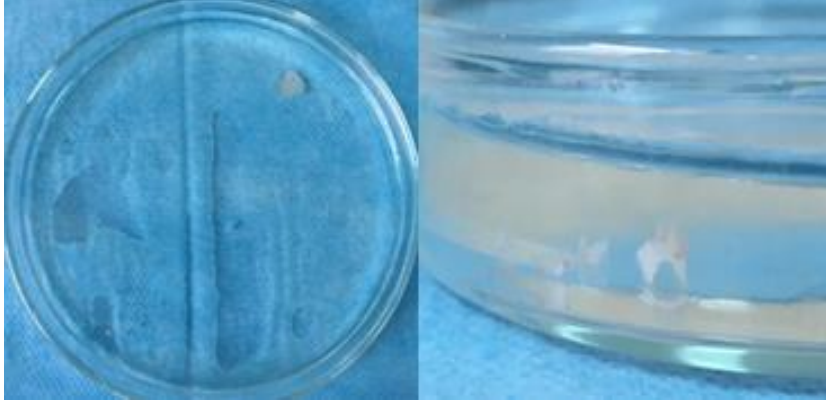
Şekil 8. Otojen kıkırdak doku örneği alınmasında cerrahi temizlik ve örtünme sonrası görüntü

Operasyonda standardizasyon amacıyla her rata sağ kulak posteriordan 1 cm longitudinal insizyon yapıldı, cilt geçildikten sonra uygun ekartasyon ile kıkırdak dokuya ulaşıldı (Şekil-9).



Şekil 9. Otojen kıkırdak doku örneği alınmasında uygun ekartasyon sonrası donör kıkırdak alanının gösterilmesi

Perikondriyum tabakası zedelenmeden ayrıldı ve ulaşılan kıkırdaktan 3x3 mm olacak şekilde otojen kıkırdak doku örneği alındı (Şekil-10 a,b).



Şekil 10. Uygun ebatlarda alınmış otojen kıkırdak doku örneğinin görüntüsü

Otojen kıkırdak doku örneği alındıktan sonra genel yıkama temizlik yapıldı ve katlar usulüne uygun suture edilerek pansumanı yapıldı (Şekil-11).



Şekil 11. Otogreft alınması sonrası yara yerinin suture edilmiş görüntüsü

Alınan otojen kıkırdak doku örnekleri her deney hayvanına özel olarak ayrılmış olan kaplara konulmak üzere uygun şekilde temizlendi ve bu kaplarda özel solüsyona (Şekil-12) alınarak hızlıca hücre kültür laboratuvarına transfer edildi. Cerrahi işlem sonrası deney hayvanlarının anesteziyenin uyanmaları beklendi.



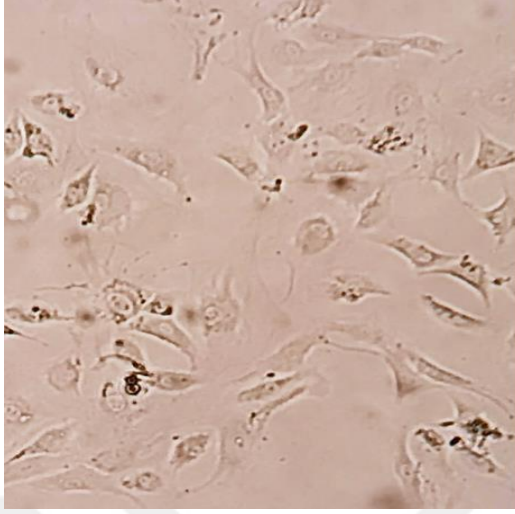
Şekil 12.Otogreft taşınmasında kullanılan solüsyonun görüntüsü

Çalışmada in vitro deneyler için rat sağ kulak kıkırdağından izole edilmiş olan kondrosit hücreleri kullanılmıştır. B ve D grubundaki her bir rata kendi kondrosit hücresi, sırasıyla çift katman ve tek katman skafold içerisine ekilmiş olarak uygulanmıştır. Hücre hattı % 10 FBS, 100 U/mL penisilin-streptomisin takviyeli media (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ortamında kültürlenmiştir. Hücreler 37 °C'de %5 CO₂'de inkübe edilmiştir.

3.4. Hücre Kültür Aşaması

Primer dokudan hücre izolasyonu için, elde edilen rat sağ kulak kıkırdağı örnekleri, antibiyotikli besiyerine [(DMEM/F12, Gentamisin (25 µg/ml), Penisilin (10,000 units/mL), Streptomisin (10,000 µg/mL), Amfoterin B (% 0.1), FBS (% 5)] alınmıştır. Işık mikroskobu altında kemik ve bağ dokusuna ait yapılar uzaklaştırılmıştır. Steril bistüri yardımıyla kıkırdak parçaları yaklaşık 1 mm³'lük küçük kesitlere ayrılmıştır. Dokuları parçalama işleminin ardından kollojenaz tip 2 (1 mg/ml) içeren besiyerinde hücre kültürü şartlarına, 37 °C'de %5 CO₂'de gece boyu bekletilmiştir. Ertesi gün kollajenaz tip 2 enzimi ve kondrosit tipi hücreleri içeren örnekler 100 µm'lik hidrofilik süzgeç filtresinden geçirildi. Hücre süspansiyonu 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra tüplere uygun besi yeri eklenmiştir. Hücreler solüsyonda homojen hale getirilip tripan mavisi ile boyanarak thoma lamı ile sayılmıştır. Hücreler 20000 hücre/cm² olacak şekilde kondrosit kültür medyumuna içeren flakslara ekilerek, 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Her üç günde bir medyum

değiştirilmiştir [85]. Hücreler %80 doluluk oranında pasajlanmıştır (Şekil-13).



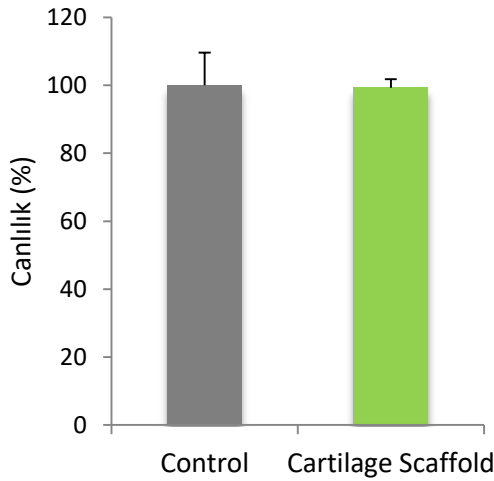
Şekil 13. Rat kulak kıkırdağından izole edilmiş olan kondrosit hücreleri morfolojik görüntüsü

3.5. Skafold ve Otojen Kıkırdak Dokunun Entegrasyonu

Tek katman ve çift katman olarak tasarlanmış olan PLGA bazlı skafoldlar kondrosit hücreleri uygulanmadan önce sterilizasyon amaçlı, etanolde 10 dakika bekletilmiştir. Etanol sterilizasyonu sonrası 5 dakika UV ışını altında bekletilmiştir. Sterilizasyon basamakları sonrası uygulama yapılacak olan deney hayvanı sayısı kadar tek katman ve çift katman skafoldlar flasklara yerleştirilmiştir. Üzerine 20000 hücre/cm² olacak şekilde uygun besiyeri ile her bir sıçana ait kondrosit hücreleri ekilmiştir. 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.

Sitotoksikite testi, PLGA bazlı skafoldun hücre proliferasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacı ile yapılmıştır. Kıkırdak skafold üzerinde kültürlen primer doku kültüründen izole edilmiş olan kondrosit hücrelerinin, kontrol grubuna göre proliferasyon oranları değerlendirilmiştir. In vitro hücre sitotoksikite testi, CCK-8 (hücre proliferasyon analiz kiti) ile belirlenmiştir. Kondrosit hücreleri uygun kültür besiyeri ve tek katman ve çift katman olarak tasarlanmış olan skafold olacak şekilde dört tekrarlı bir şekilde 96 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak skafold içermeyen sadece kondrosit hücresi içeren kuyucuk kullanılmıştır. Yapışması için 37 °C'de %5 CO₂ ortamında 24 saat

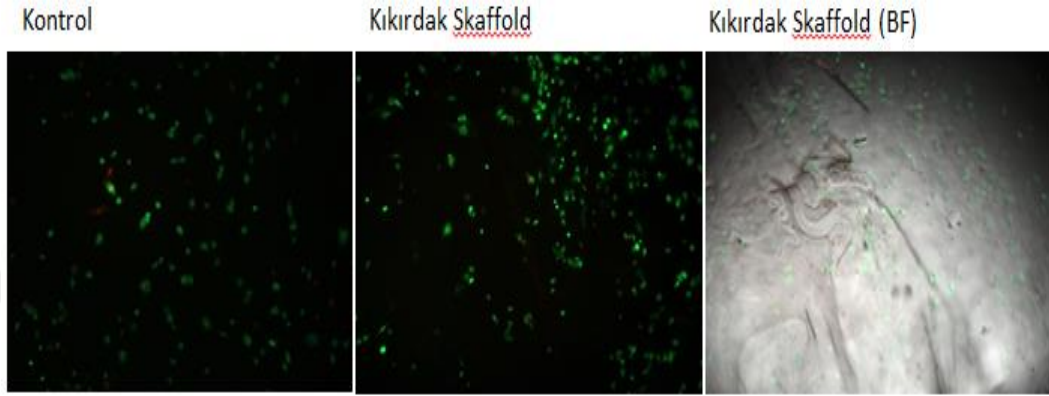
inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan besiyeri alınıp ve iki kere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sonrası hücrenin canlılığını belirlemek için %10 CCK-8 çözeltisi içeren 200 uL besiyeri her kuyuya ilave edilmiştir. Dört saatlik inkübasyon sonunda plaka okuyucu kullanılarak 450 nm’de absorbans değerleri belirlendi. Hüce kültüründe skafold yapının hücre proliferasyonuna etkisi yüzde olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonuçlarına göre kontrol grubu içeren kuyucukların canlılık oranı %100 olarak değerlendirilmiştir. Bu veriye göre skaffold üzerinde kültürlenenden kondrosit hücreleri canlılık oranı % 99,2 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, çalışmada kullanılan PLGA bazlı skafoldun proliferasyonu üzerine toksik etki yaratmadığını göstermektedir. Hesaplamalarda, işlenmiş hücrelerin canlılığı, kontrol hücrelerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir (Şekil-14).



Şekil 14. Skafold üzerinde kültürlenenden kondrosit hücrelerinin kontrol grubuna göre proliferasyon oranları

Skafold üzerine yapışan hücrelerin canlılık testi ise “Live/Dead assay, invitrogen” kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek katman ve çift katman olarak tasarlanmış olan skafold yapılar üzerine kondrosit hücreleri (2×10^5), uygun kültür besiyeri ile dört tekrarlı bir şekilde 24 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Yapışması için 37 °C’de % 5 CO₂ ortamında 48 saat inkübe edilmiştir. Canlılık testi, kit içeriğinde bulunan metoda göre gerçekleştirilmiştir. Hücreler kalsein AM (20 M) (yeşil) ve etidyum homodimer-1 (4 M) (kırmızı) ile boyama işlemi için 30 dakikalık bir inkübasyon süresinin ardından, floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Skafoldların yüzeyine bağlanan hücreler için yeşil renkte ışıma

yapan hücreler canlı ve kırmızı renkte ışıma yapan hücreler ölü hücre olarak değerlendirilmiştir. Plaka yüzeyine bağlanan hücreler kontrol olarak kullanmıştır (Şekil-15). Skafold materyali bulunmayan (kontrol) hücre grubu ve skafold içine ekilmiş hücre grubu karşılaştırıldığında hücre canlılık oranlarında kontrole göre fark gözlemlenmemiştir(yeşil renk).



Şekil 15. Skafold üzerine ekilmiş primer kondrosit hücreleri. Yeşil renk canlı kondrosit hücrelerini göstermektedir. Kırmızı renk ölü kondrosit hücreleri göstermektedir. (BF;Bright Field)

3.6. Cerrahi Teknik

Klasik anestezi prosedürü uygulanarak denek hayvanlarının indüksiyonu sağlandıktan sonra standardizasyon amacıyla bütün ratların sağ dizlerine cerrahi operasyon planlandı. Antiseptik olarak %10'luk povidon-iyot içeren Batticon (Adeka, İstanbul) solüsyonu kullanıldı (Şekil-16). Batticon ile hayvanların dizleri steril edildi. Cerrahi steril örtü kullanılarak örtme işlemi sağlandı. Ortopedik cerrahide kullanılan küçük kemik ve küçük yumuşak doku setleri (Şekil-17) ile mikrocerrahi setleri (Şekil-18) steril olarak temin edildi.



Şekil 16. Batticon, Povidin-iyon %10

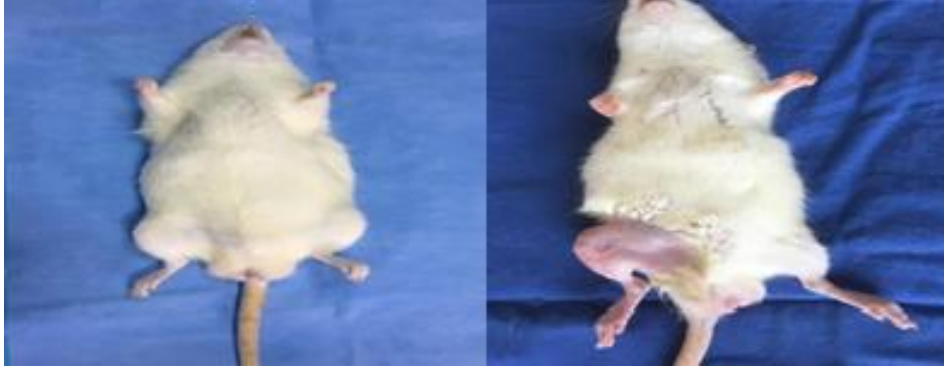


Şekil 17. Ortopedik cerrahi küçük set aletleri



Şekil 18. Ortopedik mikrocerrahi set aletleri

Belirlenen prosedüre göre hayvanlara verilmek üzere Xylazinbio (ksilazin etken madde, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) 50 ml %2'lik çözeltiden 300 grama 0,1 ml olacak şekilde, Alfamine (Ketamin etken madde, Atafen, İzmir) 50 ml %10'luk çözeltiden 300 grama 0,3 ml olacak şekilde insülin enjektörüne toplam 0,4 ml anestezi karışım hazırlandı. Hayvanların kuadriseps kası içine im uygulanarak anestezi indüksiyonu sağlandı. Deney hayvanları indüksiyonu sağlandıktan sonra sağ dizleri tıraş edilerek yıkandı ve temizlendi (Şekil-19 a,b).



Şekil 19. Anestezik indüksiyon sonrası deney hayvanının görüntüsü(a), anestezik indüksiyon altında sağ diz cerrahi alanın tıraş ve temizlik sonrası görüntüsü(b)

Dizleri tıraş edildikten sonra cerrahi bölgesi yıkanıp temizlenen deney hayvanlarına antiseptik olarak %10'luk povidon-iyot içeren Batticon (Adeka, İstanbul) solüsyonu kullanılarak dizleri steril edildi. Cerrahi steril örtü kullanılarak genel temizlik örtme işlemi sağlandı (Şekil-20).



Şekil 20. Steril örtü ile genel temizlik örtme işlemleri sonrası deney hayvanı görüntüsü

Deney hayvanlarının sağ dizi paramedian insizyon ile açıldı. Cilt cilt altı yumuşak doku bağlantıları ve kanlanması korunarak tek kesi ile geçildi (Şekil-21). Patellar tendona ulaşıldı. Patalla laterala deviye edilecek şekilde S insizyon ile patellar tendon kesildi. Patella laterala devrildi. Femur troklear bölgesi uygun ekartörler aracılığı ile ortaya konuldu (Şekil-22). Ardından 2 mm kalınlığında drill ucu kullanılarak total eklem yüzey alanının %10-20'sini içerecek şekilde bir adet kırık defekti oluşturuldu. Oluşturulan bu defekte de bir adet 0.8 mm Kirschner

teli ile lezyonun subkondral kemiği de içerek şekilde ilerlemesi sağlandı. Ardından uygun ekartörler ile femur distal kondil ve defektif alan ortaya konuldu (Şekil-23).



Şekil 21. Sağ dizin paramedian insizyon ile cilt ve cilt altı kesilmiş görüntüsü



Şekil 22. Patella laterale devrilmesi ve sonrasında femur distal kondillerin görüntüsü



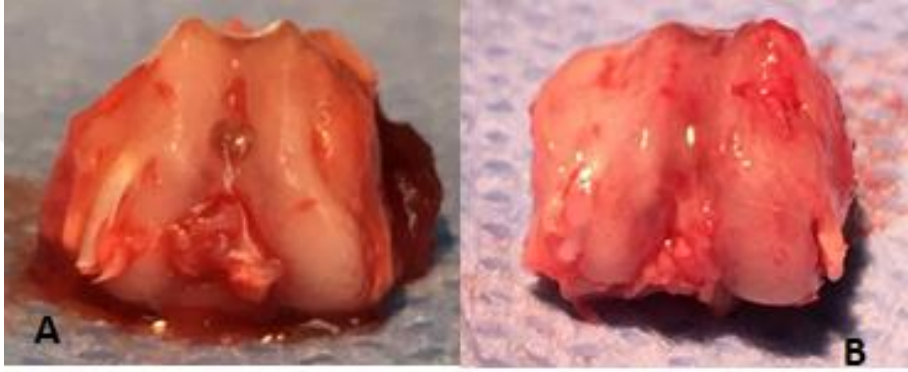
Şekil 23. Femur distal kondiller ve defektif alanın görüntüsü

Bu aşamaya kadar tüm deney hayvanlarına aynı cerrahi prosedür uygulanmış olup bu aşamadan sonra beş farklı grup için farklı metodlar uygulanmıştır. Aşağıda gruplar tek tek ele alınmıştır.

3.6.1. Kontrol Grubu (Osteokondral Defekt + Mikrokırık)

14 adet ratın dahil olduğu A grubunda osteokondral defekt + mikrokırık cerrahi prosedürü uygulandı. Deney hayvanlarının sağ dizi paramedian insizyon ile açıldı. Cilt cilt altı yumuşak doku bağlantıları ve kanlanması korunarak tek kesi ile geçildi. Patellar tendona ulaşıldı. Patalla laterala deviye edilecek şekilde S insizyon ile patellar tendon kesildi. Patella laterala devrildi. Femur troklear bölgesi uygun ekartörler aracılığı ile ortaya konuldu. Ardından 2 mm kalınlığında drill ucu kullanılarak total eklem yüzey alanının %10-20'sini içerecek şekilde bir adet kırık defekti oluşturuldu. Oluşturulan bu defekte de bir adet 0.8 mm Kirschner teli ile lezyonun subkondral kemiği de içerek şekilde ilerlemesi sağlandı. Mikrokırık yapıldıktan sonra kanama kontrolü yapıp patellar tendon onarıldı. Cilt altı ve cilt onarımı 5/0 vicryl süturlar ile yapıldı. Ardından pansuman yapıldı. Hayvanların sularına profilaktik olarak 100 ml suya 0,1 ml sulfametazin eklendi. Planlanan çalışma takvimine uyularak 4. hafta sonunda birinci gruptaki 6 denek hayvanına aynı cerrahi anestezi prosedürü uygulanarak indüksiyon sağlandı. İndüksiyon sonrasında eski insizyon kullanılarak diz eklemine ulaşıldı.

Femur distal eklemi yüzeyine azami dikkat gösterilerek femur kondilleri total olarak eksize edildi ve histopatolojik olarak hazırlanmak üzere yumuşak dokularından ayrıldı. Cerrahi işlem sonrası deney hayvanı HADYЕК ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi. Geriye kalan 8 deney hayvanından 2 tanesinin ölmesi üzerine kalan 6 adet deney hayvanı da aynı işlem sırası uygulanarak 8. haftanın sonunda doku örnekleri histopatolojik inceleme için ayrıldı (Şekil-24 a,b). Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYЕК ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi.

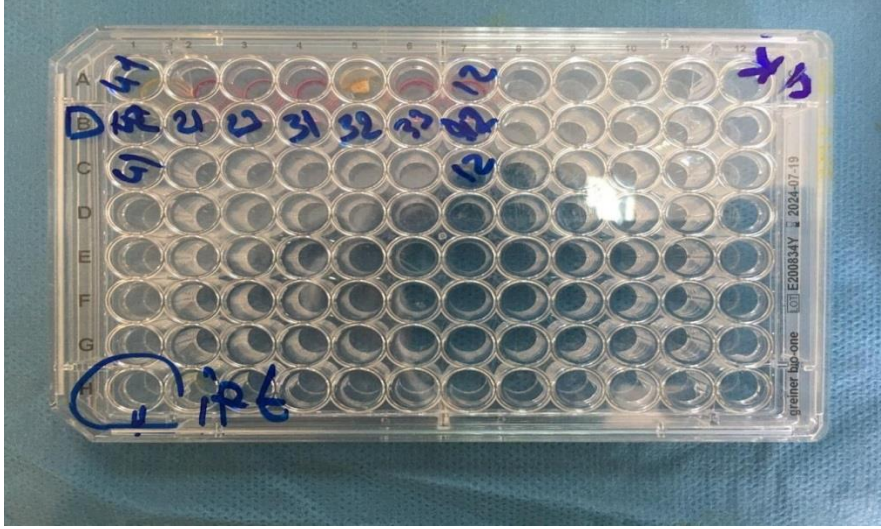


Şekil 24. Sakrifiye edilmiş A grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda (a), 8. hafta sağda (b)

3.6.2. Osteokondral Defekt + Mikrokırık + Çift Katmanlı Kondrosit

İçeren Skafold Grubu

14 adet ratın dahil olduğu B grubu daha önce belirtildiği üzere 7 gün öncesinden otojen kıkırdak doku örneği alımı için ilk aşama cerrahi işleme maruz kalmıştı. Bu grupta osteokondral defekt + mikrokırık + çift katmanlı kondrosit içeren skafold transplantasyon cerrahi prosedürü uygulandı. Diz için uygulanacak cerrahi işlem 24 saat öncesinde de deney hayvanına özel olarak alınıp uygun laboratuvar kültür şartlarında çoğaltılması sağlanan kondrosit hücreleri çift katmanlı skafolda yerleştirildi. Hücrelerin bu skafoldda canlılığına devam ettiği gözlemlendi. Cerrahi işlem günü bu kondrosit hücresi içeren çift katmanlı skafoldlar taşıma için hazır hale getirilerek özel solüsyon ve taşıma kabına alındı (Şekil-25).



Şekil 25. Kondrosit hücresi içeren çift katmanlı skafoldların özel taşıma kabında görüntüsü

Deney hayvanındaki diz cerrahi işlemi başlarken hayvana özel olan bu skafoldlar steril bir şekilde cerrahi alana dahil edildi. Deney hayvanlarının sağ dizi paramedian insizyon ile açıldı. Cilt cilt altı yumuşak doku bağlantıları ve kanlanması korunarak tek kesi ile geçildi. Patellar tendona ulaşıldı. Patalla laterala deviye edilecek şekilde S insizyon ile patellar tendon kesildi. Patella laterala devrildi. Femur troklear bölgesi uygun ekartörler aracılığı ile ortaya konuldu. Ardından 2 mm kalınlığında drill ucu kullanılarak total eklem yüzey alanının %10-20'sini içerecek şekilde bir adet kırkırdak defekti oluşturuldu. Oluşturulan bu defektte de bir adet 0.8 mm Kirschner teli ile lezyonun subkondral kemiği de içerek şekilde ilerlemesi sağlandı. Ardından defektif femur distal eklem yüzeyi uygun ekartörler ile ortaya konuldu. Kanama kontrolü sonrası cerrahi alana uygun boyutlardaki skafold (Şekil-26) mikrocerrahi setlerle troklear bölgedeki defektif alana kemik doku iskelesi defektif alana, kırkırdak doku iskelesi eklem boşluğuna bakacak şekilde yerleştirildi (Şekil-27).



Şekil 26. Uygun ebatlara getirilen skafoldun görüntüsü



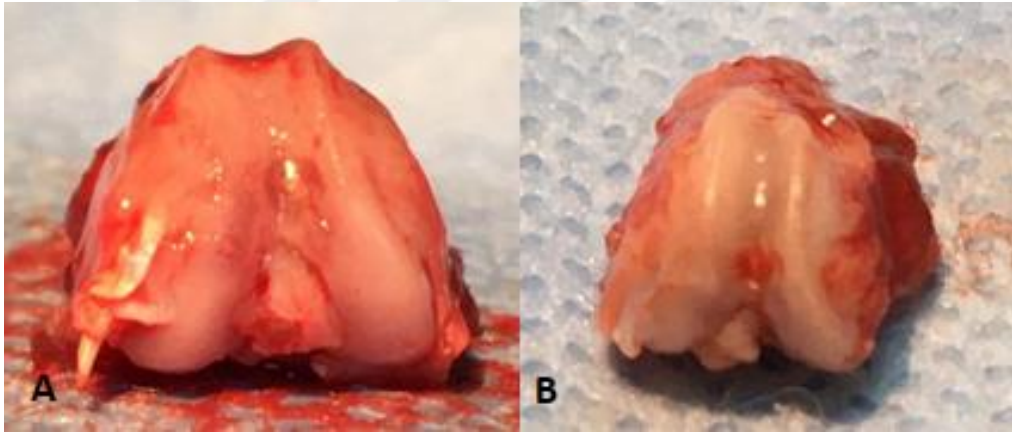
Şekil 27. Defektif alana yerleştirilmiş çift katmanlı kondrosit içeren skafoldun görüntüsü

Defektif alana skafold yerleştirildikten sonra tekrar kanama kontrolü yapıp patellar tendon onarıldı (Şekil-28).



Şekil 28. Patellar tendon onarım sonrası görüntü

Cilt altı ve cilt onarımı 5/0 vicryl süturlar ile yapıldı. Ardından pansuman yapıldı. Hayvanların sularına profilaktik olarak 100 ml suya 0,1 ml sulfametazin eklendi. Deney hayvanlarının postoperatif takibi yapılırken 3. günde bir deney hayvanı, 7. günde bir deney hayvanı öldü. Planlanan  alışma takvimine uyularak 4. hafta sonunda 6 adet denek hayvanına aynı cerrahi anestezi prosedürü uygulanarak indüksiyon sağlandı. İndüksiyon sonrasında eski insizyon kullanılarak diz eklemine ulaşıldı. Femur distal eklemi yüzeyine azami dikkat gösterilerek femur kondilleri total olarak eksize edildi ve histopatolojik olarak hazırlanmak üzere yumuşak dokularından ayrıldı. Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYЕК ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi. Geriye kalan 6 adet deney hayvanı da aynı işlem sırası uygulanarak 8. Haftanın doku örnekleri histopatolojik inceleme için ayrıldı (şekil-29 a,b). Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYЕК ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi.



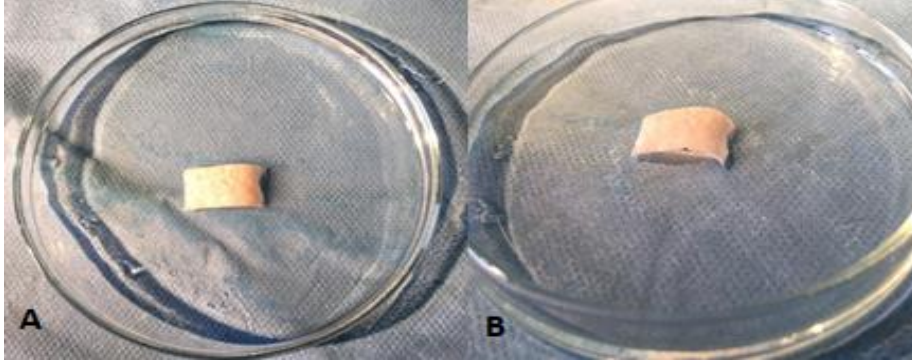
şekil 29 a,b. Sakrifiye edilmiş B grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda (a), 8. hafta sağda(b)

3.6.3. Osteokondral Defekt + Mikrokırık +  ift Katmanlı Kondrosit

 ermeyen Skaffold Grubu

14 adet ratın dahil olduğu C grubunda osteokondral defekt + mikrokırık + çift katmanlı kondrosit  ermeyen skafold transplantasyon cerrahi prosedürü uygulandı. Planan takvime göre deney hayvanları cerrahi prosedürü başlamadan önce çift katmanlı skafold üretilmişti. Deney hayvanındaki diz cerrahi işlemi

başlarken üretilen bu çift katmanlı kondrosit içermeyen skafoldlar steril bir şekilde cerrahi alana dahil edildi (Şekil-30 a,b).



Şekil 30 a,b. Laboratuvar şartlarında üretilen çift katmanlı sentetik skafoldun görüntüsü

Deney hayvanlarının sağ dizi paramedian insizyon ile açıldı. Cilt cilt altı yumuşak doku bağlantıları ve kanlanması korunarak tek kesi ile geçildi. Patellar tendona ulaşıldı. Patalla laterala deviye edilecek şekilde S insizyon ile patellar tendon kesildi. Patella laterala devrildi. Femur troklear bölgesi uygun ekartörler aracılığı ile ortaya konuldu. Ardından 2 mm kalınlığında drill ucu kullanılarak total eklem yüzey alanının %10-20'sini içerecek şekilde bir adet kırık defekti oluşturuldu. Oluşturulan bu defekte de bir adet 0.8 mm Kirschner teli ile lezyonun subkondral kemiği de içerek şekilde ilerlemesi sağlandı. Ardından defektif femur distal kondilleri uygun ekartörler ile ortaya konuldu. Cerrahi alan kanama kontrolü sonrası skafold uygun boyutlara getirilerek (Şekil-31) mikrocerrahi setlerle troklear bölgedeki defektif alana kemik doku iskelesi defektif alana, kırık doku iskelesi eklem boşluğuna bakacak şekilde yerleştirildi (Şekil-32).



Şekil 31. Uygun boyutlara getirilmiş kondrosit içermeyen çift katmanlı skafoldun görüntüsü



Şekil 32. Defektif alana yerleştirilmiş çift katmanlı kondroist içermeyen skafoldun görüntüsü

Defektif alana skafold yerleştirildikten sonra tekrar kanama kontrolü yapıp patellar tendon onarıldı. Cilt altı ve cilt onarımı 5/0 vicryl süturlar ile yapıldı. Ardından pansuman yapıldı. Hayvanların sularına profilaktik olarak 100 ml suya 0,1 ml sulfametazin eklendi. Planlanan çalışma takvimine uyularak 4. hafta sonunda 6 adet denek hayvanına aynı cerrahi anestezi prosedürü uygulanarak indüksiyon sağlandı. İndüksiyon sonrasında eski insizyon kullanılıp femur distal eklemi yüzeyine azami dikkat gösterilerek femur kondilleri total olarak eksize edildi ve histopatolojik olarak hazırlanmak üzere yumuşak dokularından ayrıldı. Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYЕК ilkelerine uygun şekilde

sakrifiye edildi. Geriye kalan 8 deney hayvanından 2 tanesinin ölmesi üzerine kalan 6 adet deney hayvanı da aynı işlem sırası uygulanarak 8. haftanın sonunda doku örnekleri histopatolojik inceleme için ayrıldı (Şekil-33 a,b). Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYЕК ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi.

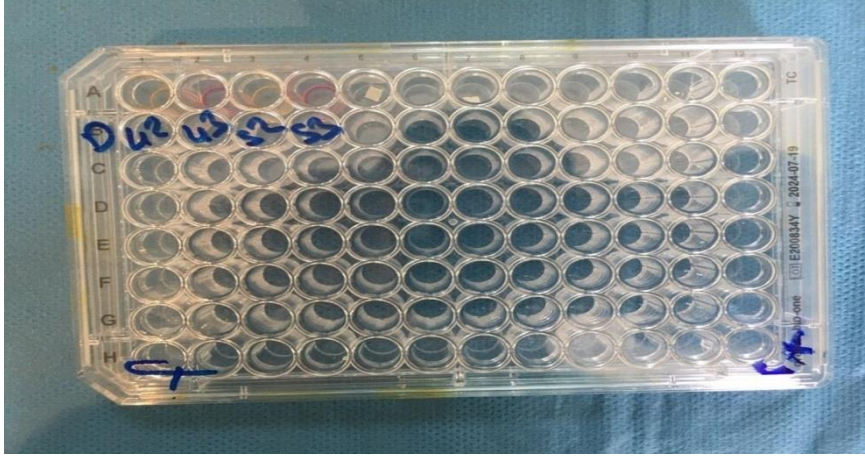


Şekil 33 a,b. Sakrifiye edilmiş C grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda(a), 8. hafta sağda(b)

3.6.4. Osteokondral Defekt + Mikrokırık + Tek Katmanlı Kondrosit

İçeren Skafold Grubu

14 adet ratın dahil olduğu D grubu daha önce belirtildiği üzere 7 gün öncesinden otojen kıkırdak doku örneği alımı için ilk aşama cerrahi işleme maruz kalmıştı. İlk cerrahi uygulama sonrası 1 adet deney hayvanı öldü. Bu grupta osteokondral defekt + mikrokırık + tek katmanlı kondrosit içeren skafold transplantasyon cerrahi prosedürü uygulandı. Diz için uygulanacak cerrahi işlemden 24 saat öncesinde de deney hayvanına özel olarak alınıp uygun laboratuvar kültür şartlarında çoğaltılması sağlanan kondrosit hücreleri tek katmanlı skafolda yerleştirildi. Hücrelerin bu skafoldda canlılığına devam ettiği gözlemlendi. Cerrahi işlem günü bu kondrosit hücresi içeren tek katmanlı skafoldlar taşıma için hazır hale getirilerek özel solüsyon ve taşıma kabına alındı (Şekil-34).



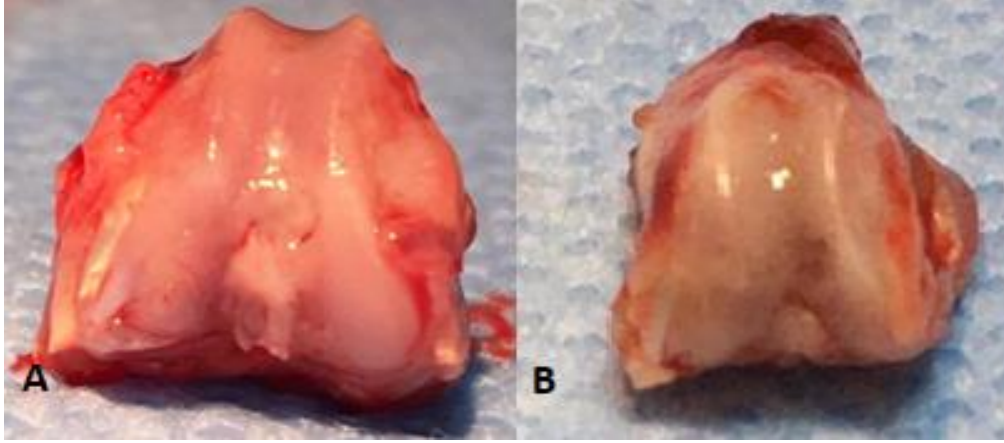
Şekil 34. Kondrosit hücresi içeren tek katmanlı skafoldların özel taşıma kabında görüntüsü

Deney hayvanındaki diz cerrahi işlemi başlarken hayvana özel olan bu skafoldlar steril bir şekilde cerrahi alana dahil edildi. Deney hayvanlarının sağ dizi paramedian insizyon ile açıldı. Cilt cilt altı yumuşak doku bağlantıları ve kanlanması korunarak tek kesi ile geçildi. Patellar tendona ulaşıldı. Patalla laterala deviye edilecek şekilde S insizyon ile patellar tendon kesildi. Patella laterala devrildi. Femur troklear bölgesi uygun ekartörler aracılığı ile ortaya konuldu. Ardından 2 mm kalınlığında drill ucu kullanılarak total eklem yüzey alanının %10-20'sini içerecek şekilde bir adet kırık defekti oluşturuldu. Oluşturulan bu defektte de bir adet 0.8 mm Kirschner teli ile lezyonun subkondral kemiği de içerek şekilde ilerlemesi sağlandı. Ardından defektif femur distal kondilleri uygun ekartörler ile ortaya konuldu. Cerrahi alan kanama kontrolü sonrası skafold uygun boyutlara getirilerek mikrocerrahi setlerle troklear bölgedeki defektif alana yerleştirildi (Şekil-35).



Şekil 35. Defektif alana yerleştirilmiş tek katmanlı kondrosit içeren skafoldun görüntüsü

Defektif alana skafold yerleştirildikten sonra tekrar kanama kontrolü yapıp patellar tendon onarıldı. Cilt altı ve cilt onarımı 5/0 vicryl süturlar ile yapıldı. Ardından pansuman yapıldı. Hayvanların sularına profilaktik olarak 100 ml suya 0,1 ml sulfametazin eklendi. Planlanan çalışma takvimine uyularak 4. hafta sonunda birinci gruptaki 6 adet deney hayvanına aynı cerrahi anestezi prosedürü uygulanarak indüksiyon sağlandı. Eski insizyon kullanılarak femur distal eklem yüzeyine ulaşıldı. Femur distal eklem yüzeyine azami dikkat gösterilerek femur kondilleri total olarak eksize edildi ve histopatolojik olarak hazırlanmak üzere yumuşak dokularından ayrıldı. Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYEK ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi. Geriye kalan 8 deney hayvanından 2 tanesinin ölmesi üzerine kalan 6 adet deney hayvanı da aynı işlem sırası uygulanarak 8. haftanın sonunda doku örnekleri histopatolojik inceleme için ayrıldı (Şekil-36 a,b). Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYEK ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi.



Şekil 36 a,b. Sakrifiye edilmiş D grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda(a), 8. hafta sağda(b)

3.6.5. Osteokondral Defekt + Mikrokırık + Tek Katmanlı Kondrosit

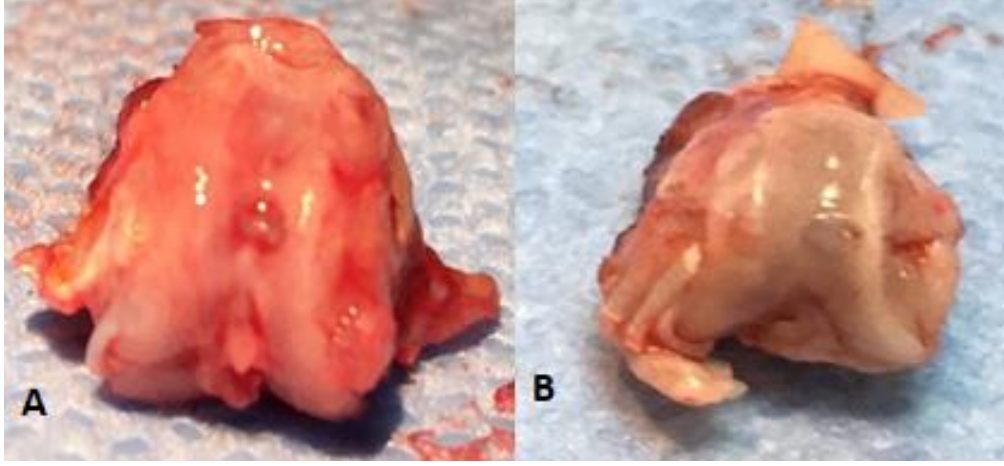
İçermeyen Skafold Grubu

14 adet ratın dahil olduğu E grubu osteokondral defekt + mikrokırık + tek katmanlı kondrosit içermeyen skafold transplantasyon cerrahi prosedürü uygulandı. Planan takvime göre deney hayvanları cerrahi prosedürü başlamadan önce tek katmanlı skafold üretilmişti. Deney hayvanındaki diz cerrahi işlemi başlarken üretilen bu tek katmanlı kondrosit içermeyen skafoldlar steril bir şekilde cerrahi alana dahil edildi. Deney hayvanlarının sağ dizi paramedian insizyon ile açıldı. Cilt cilt altı yumuşak doku bağlantıları ve kanlanması korunarak tek kesi ile geçildi. Patellar tendona ulaşıldı. Patalla laterala deviye edilecek şekilde S insizyon ile patellar tendon kesildi. Patella laterala devrildi. Femur troklear bölgesi uygun ekartörler aracılığı ile ortaya konuldu. Ardından 2 mm kalınlığında drill ucu kullanılarak total eklem yüzey alanının %10-20'sini içerecek şekilde bir adet kırık defekti oluşturuldu. Oluşturulan bu defekte de bir adet 0.8 mm Kirschner teli ile lezyonun subkondral kemiği de içerek şekilde ilerlemesi sağlandı. Ardından defektif femur distal kondilleri uygun ekartörler ile ortaya konuldu. Cerrahi alan kanama kontrolü sonrası skafold uygun boyutlara getirilerek mikrocerrahi setlerle troklear bölgedeki defektif alana yerleştirildi (Şekil-37).



Şekil 37. Defektif alana yerleştirilmiş tek katmanlı kondrosit içermeyen skafoldun görüntüsü

Defektif alana skafold yerleştirildikten sonra tekrar kanama kontrolü yapıp patellar tendon onarıldı. Cilt altı ve cilt onarımı 5/0 vicryl süturlar ile yapıldı. Ardından pansuman yapıldı. Hayvanların sularına profilaktik olarak 100 ml suya 0,1 ml sulfametazin eklendi. Deney hayvanlarından iki tanesi cerrahinin ertesi gün öldü. Planlanan çalışma takvimine uyularak 4. hafta sonunda 6 denek hayvanına aynı cerrahi anestezi prosedürü uygulanarak indüksiyon sağlandı. İndüksiyon sonrasında eski insizyon kullanılarak femur distal eklem yüzeyine ulaşıldı. Femur distal eklem yüzeyine azami dikkat gösterilerek femur kondilleri total olarak eksize edildi ve histopatolojik olarak hazırlanmak üzere yumuşak dokularından ayrıldı. Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYEK ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi. Geriye kalan 6 adet deney hayvanı da aynı işlem sırası uygulanarak 8. haftanın sonunda doku örnekleri histopatolojik inceleme için ayrıldı (Şekil-38 a,b). Cerrahi işlemler sonrası deney hayvanı HADYEK ilkelerine uygun şekilde sakrifiye edildi.



Şekil 38 a,b. Sakrifiye edilmiş E grubu deney hayvanının femur kondil eksizyon materyali, 4. hafta solda(a), 8. hafta sağda(b)

3.7. Histopatolojik İnceleme

Gruplar sakrifikasyon zamanlarına göre, yüksek doz anestezi madde enjeksiyonu ile sakrifiye edildi. Deney hayvanlarının femurlarına ulaşmak amacıyla longitudinal kesi ve cilt diseksiyonu yapıldı. Ratların sağ femur distalleri çıkartıldıktan sonra materyaller %10'luk tamponlanmış formaldehit solüsyonuna yerleştirildi. Histopatolojik değerlendirmeler için materyaller Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat Meslek Yüksekokulu Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü laboratuvarına gönderildi. Çalışmamızdaki materyallerin kemik dokusunun histolojik değerlendirilmesi için %10'luk tamponlanmış formaldehitte tespit edilen parçaların fazla kısımları temizlendi. Gönderilen materyal %10'luk tamponlanmış formalinde 1 hafta süre ile fiks edildi. Fiksasyondan sonra tüm materyal %50'lik formik asit ve %20'lik sodyum sitrat çözeltilerinden birer ölçek alınarak hazırlanan solüsyonda dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon süreci tamamlanan kemik doku örnekleri akan çeşme suyunda yıkama işlemini takiben, artan derecelerdeki etanol serilerinden (%50-%99) ve ksilen serilerinden geçirildikten sonra 62 °C'de erimiş parafin infiltrasyonunu takiben parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245) ile 5-7 µm kalınlığındaki kesitler lamalar üzerine alındı. Bu kesitler Hematoksilen-Eozin ve Masson's Tricrom boyama yöntemiyle boyanıp Modified Mankin ve O'Driscoll skalasına göre değerlendirmeleri yapıldı. Boyanmış olan kesitler, Nikon Ci-S ışık

mikroskop, Nikon DS-Fi3 kamera ve NIS-Elements D görüntü analiz sisteminde (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğrafları çekildi.

Değerlendirme sürecinde defektif kırık baskı bölgesinde kırık oluşumu ve tamir kalitesi klasik kırık baskı doku tamiri kriterleri olan O'Driscoll ve Modified Mankin sınıflamaları ile değerlendirilmiş olup değerlendirme sürecinde aşağıda yazılı kriterler kullanılmıştır.

Tablo 4. Modified Mankin ve O'Driscoll Kriterleri

<u>Modified Mankin Kriterleri</u>
Morfoloji
Yüzey Düzenliliği
Komşu Bağlanma
Hücre Popülasyonu
Kırık baskı Tıkaç Kalitesi
<u>O'Driscoll Kriterleri</u>
Morfolojik Alan
Matrix
Yüzey Düzenliliği
Yapısal Bütünlük
Kalınlık/Yara Dolma
Osteokondral Bağlanma
Komsu Bağlanma
Hücre Yoğunluğu
Kümeleşme Dağılımı
Subkondral Kemik
Hücre Popülasyonu
Kırık baskı Tıkaç Kalitesi

Bu kriterlerin değerlendirilmesinde kriterlerin tümünde aynı skorlama uygulandı;

-Eğer kritere ait hiçbir değişim yoksa '0' (sıfır)

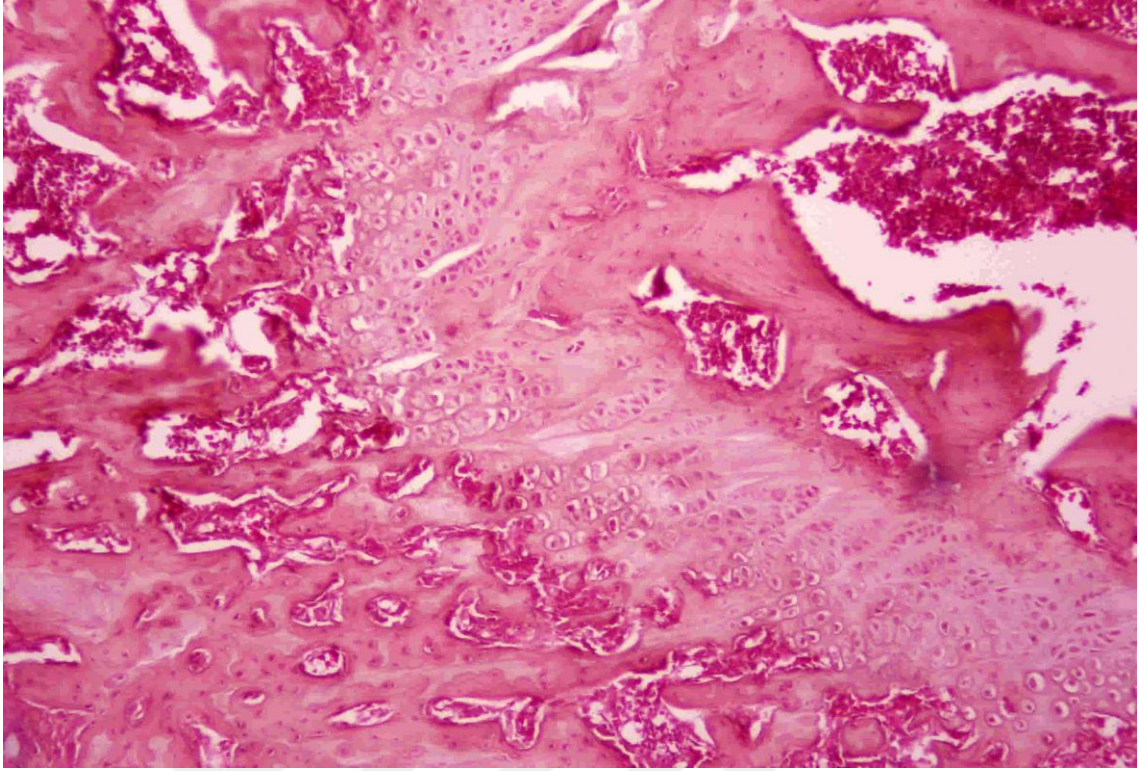
-Eğer kritere ait hafif olumlu yönde değişim varsa '1' (bir)

-Eğer kritere ait olumlu yönde değişim varsa '2' (iki)

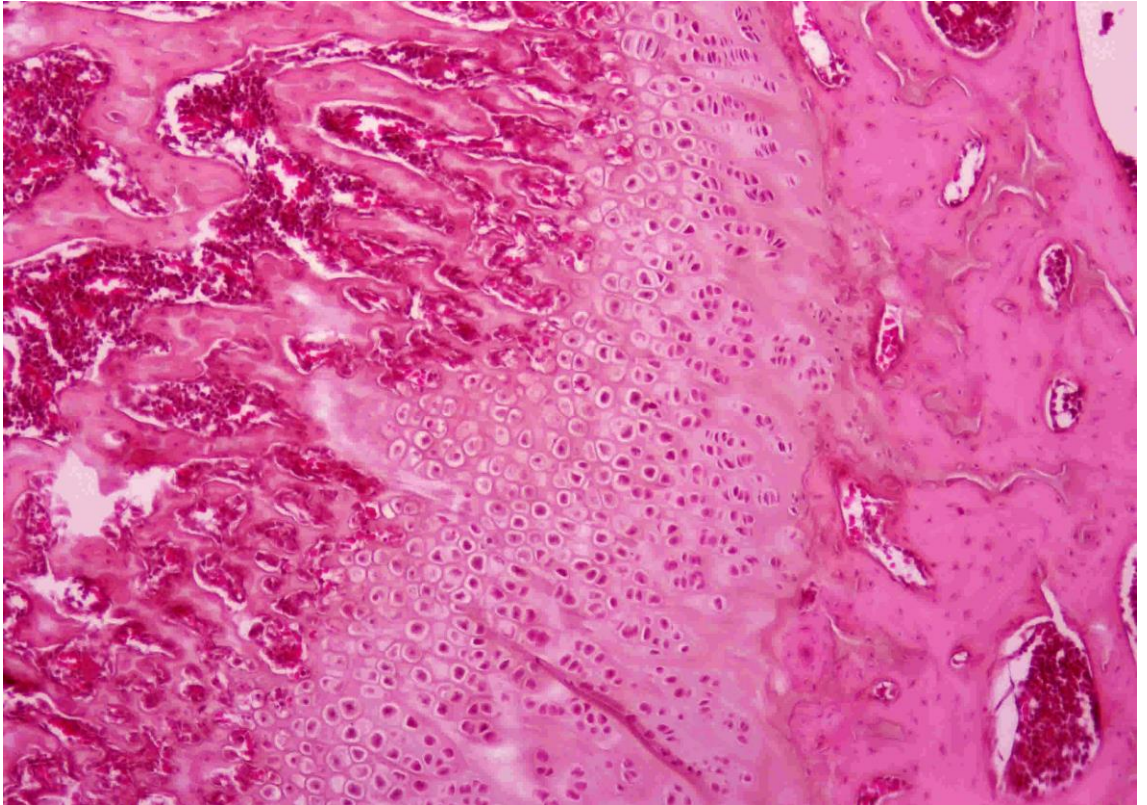
-Eğer kritere ait belirgin derecede olumlu yönde değişim varsa '3' (üç)

-Eğer kritere ait çok belirgin derecede olumlu yönde değişim varsa '4' (dört).

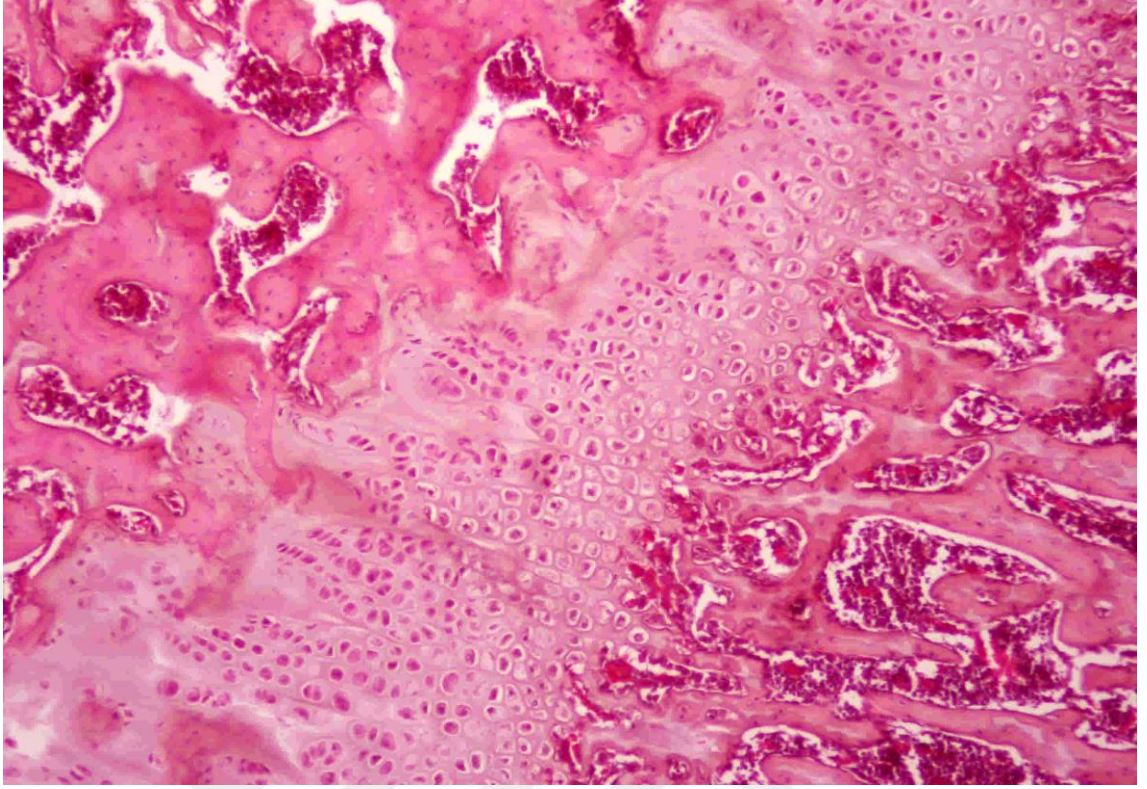
Her gruba ait kesitlerin tamamı ayrı ayrı ışık mikroskop altında değerlendirilerek skorlandı. Skorlama için kesitlerin farklı bölgelerinden 10 alanda x10 objektif büyütme altında her bir kriter ayrı ayrı hesaplama yapıldı. Skorlama sonunda her parametre için sayılan değerlerin ortalamaları her grup için ayrı ayrı olacak şekilde alındı. O'Driscoll sınıflaması için kullanılan 12 parametreye ve Modified Mankin sınıflaması için kullanılan 5 parametreye ait değerlerin ortalamaları gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Sürekli değişkenlerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerler verilmiştir. Değişkenlerin normallik varsayımları çarpıklık ve basıklık (Skewness ve Kurtosis) katsayıları, Kolmogorov Smirnov testi ve Histogram ile incelenmiş ve normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin üç ve üzeri gruplar arasında karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi sonucunda anlamlı bir farklılığın elde edilmesi durumunda farkın hangi gruplar arasından kaynaklandığını belirlemek amacıyla ise Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi yapılmıştır. Bütün analizlerde IBM SPSS.23 programı kullanılmış ve anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edilmiştir.



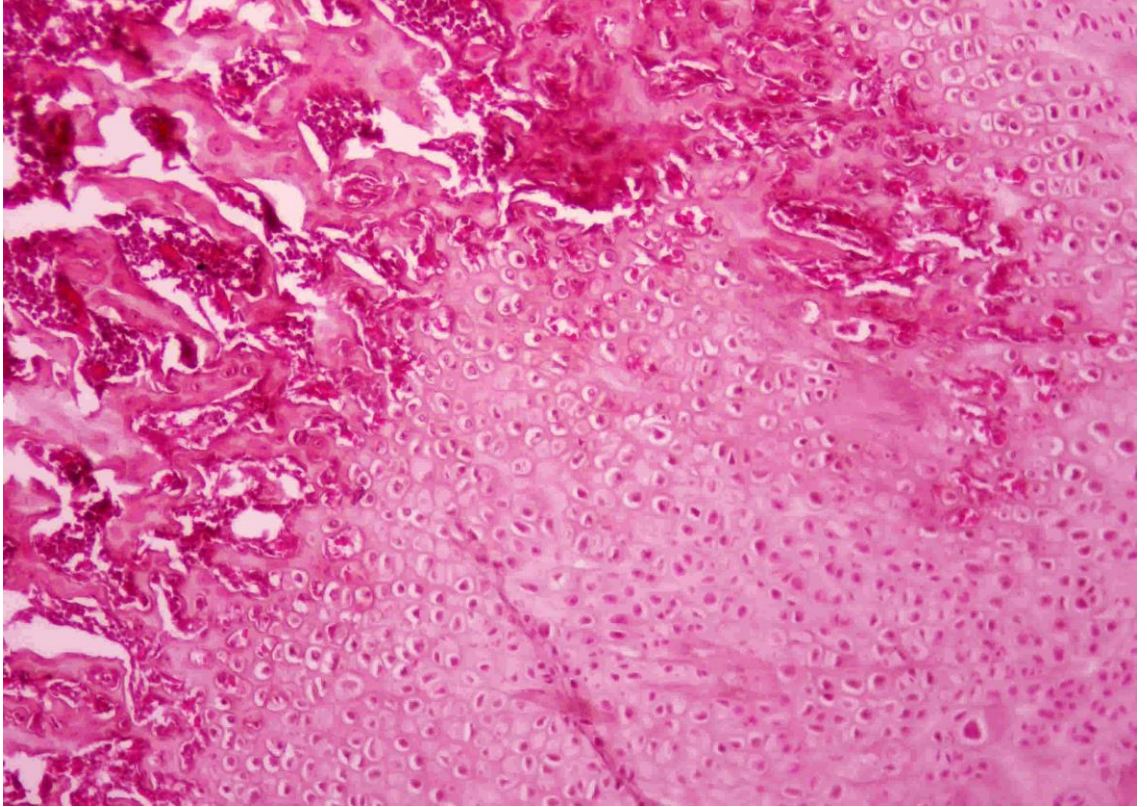
Şekil 39. A grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



Şekil 40. A grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü

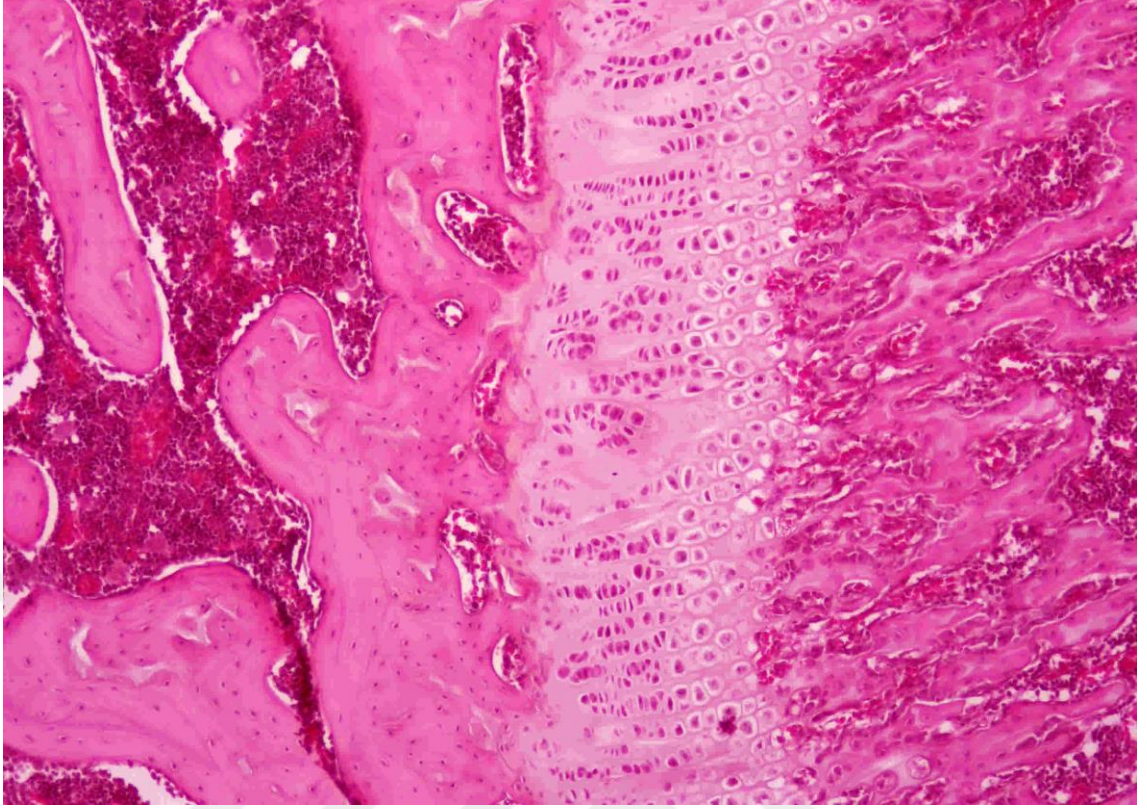


Şekil 41. B grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü

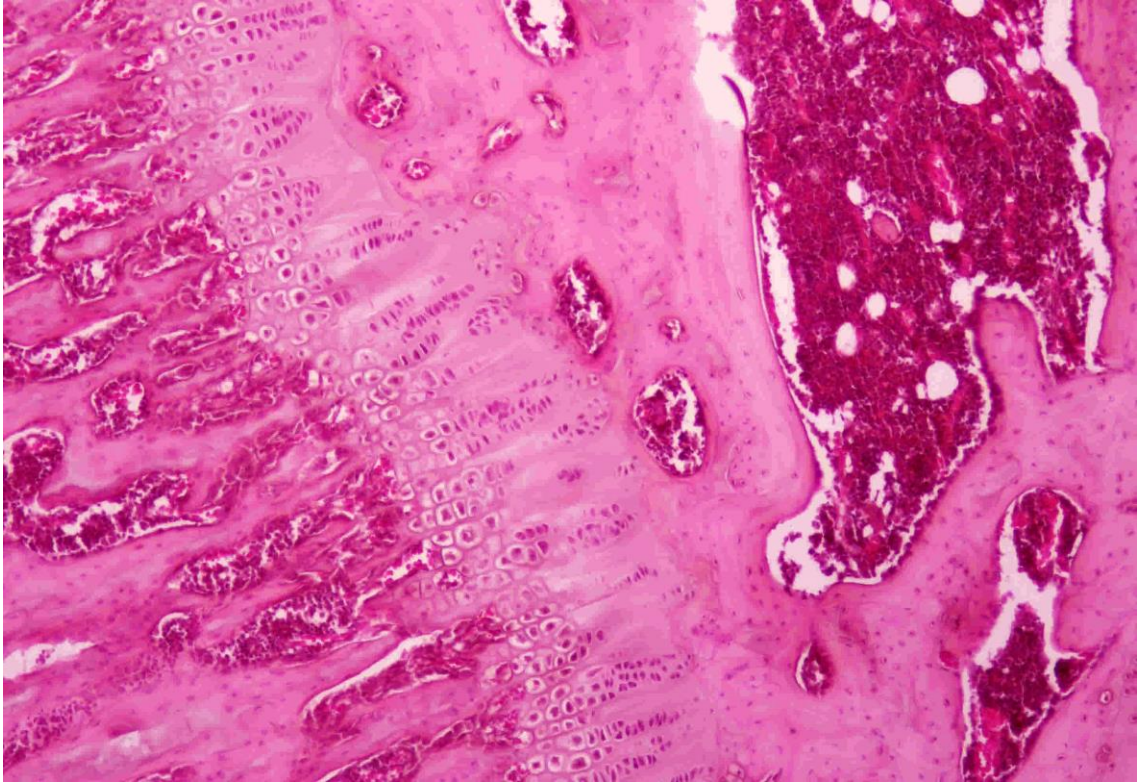


Şekil 42. B grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü

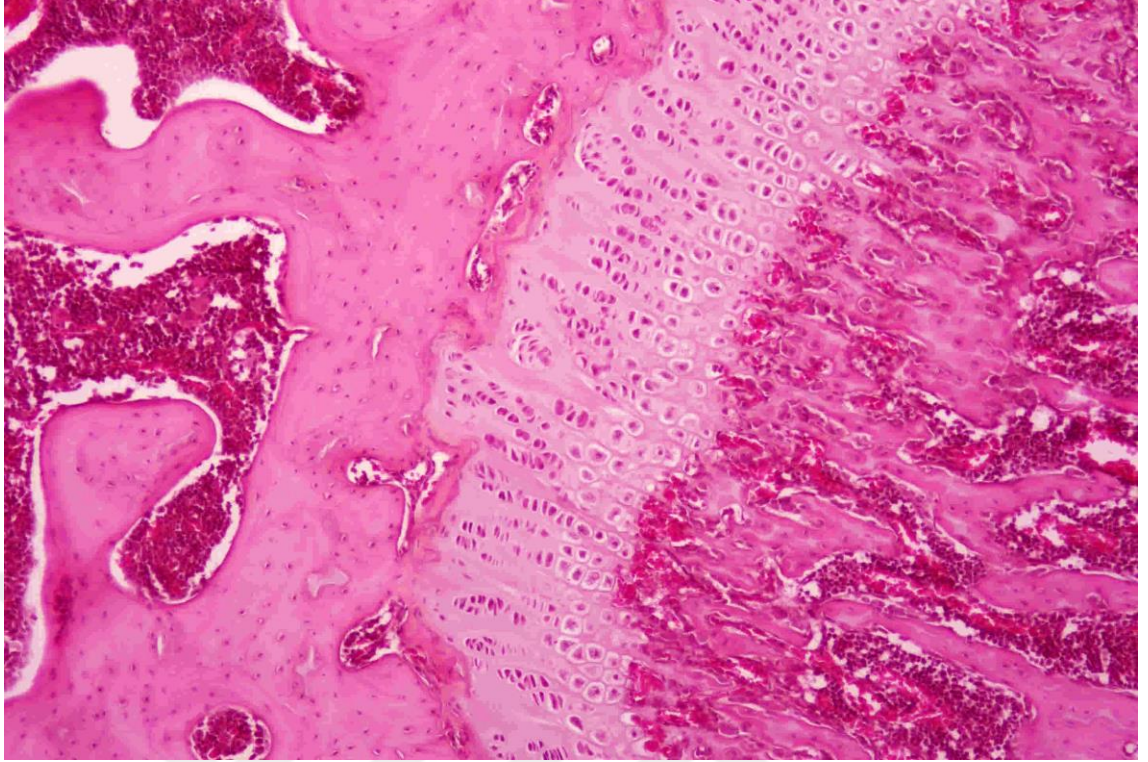




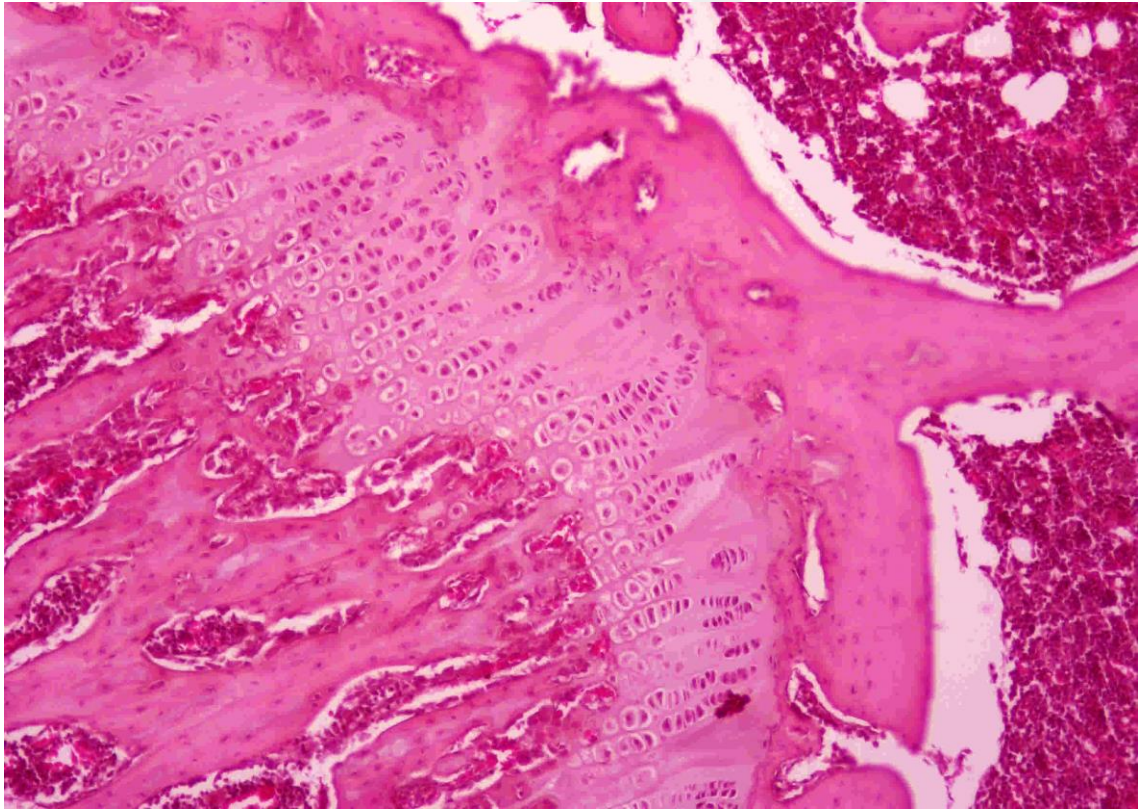
Şekil 43. C grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



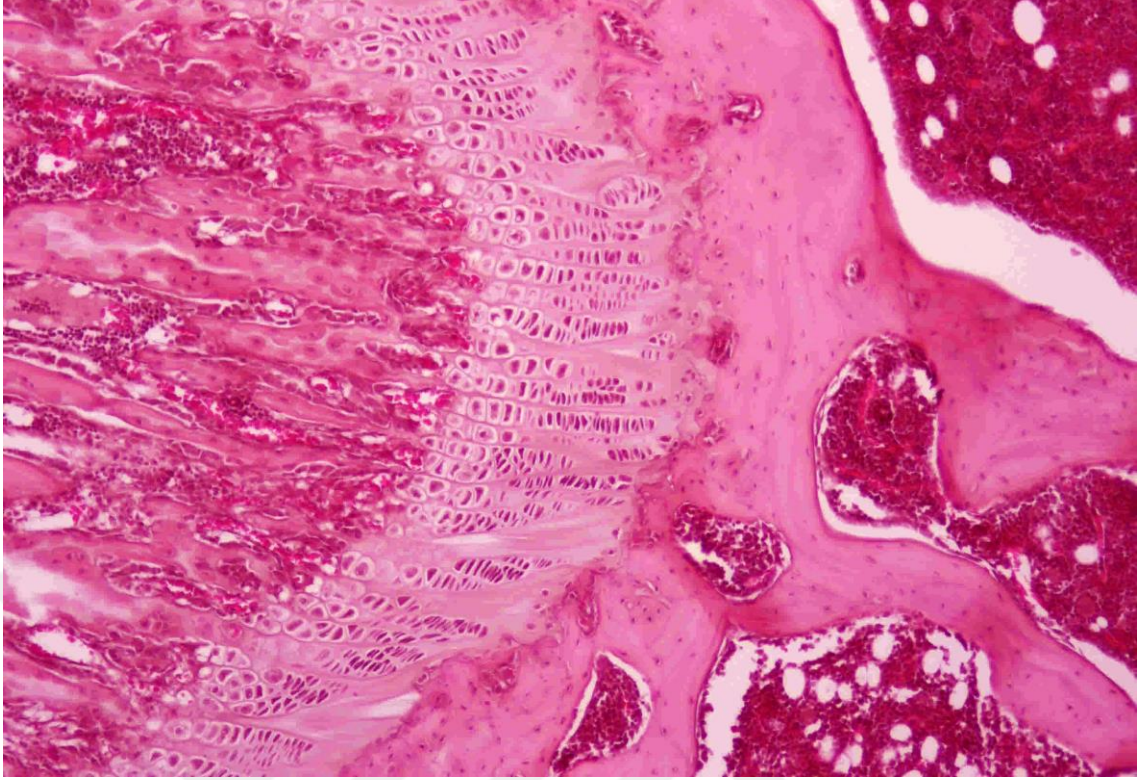
Şekil 44. C grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



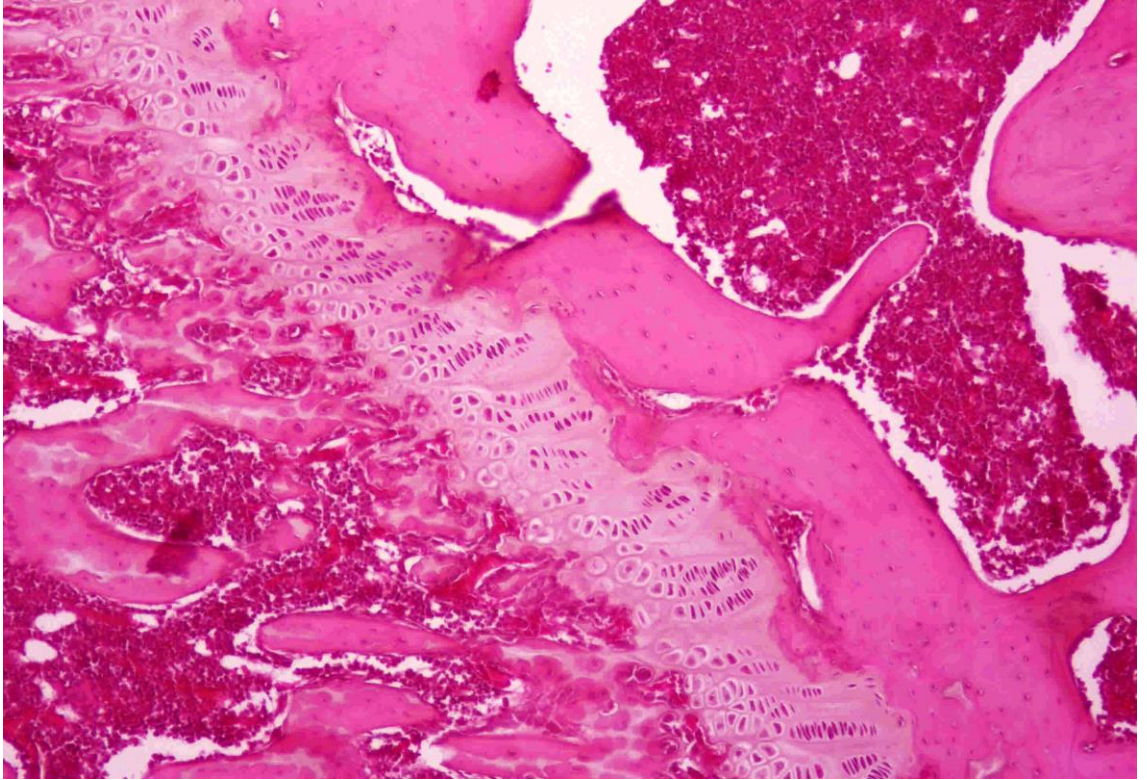
Şekil 45. D grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



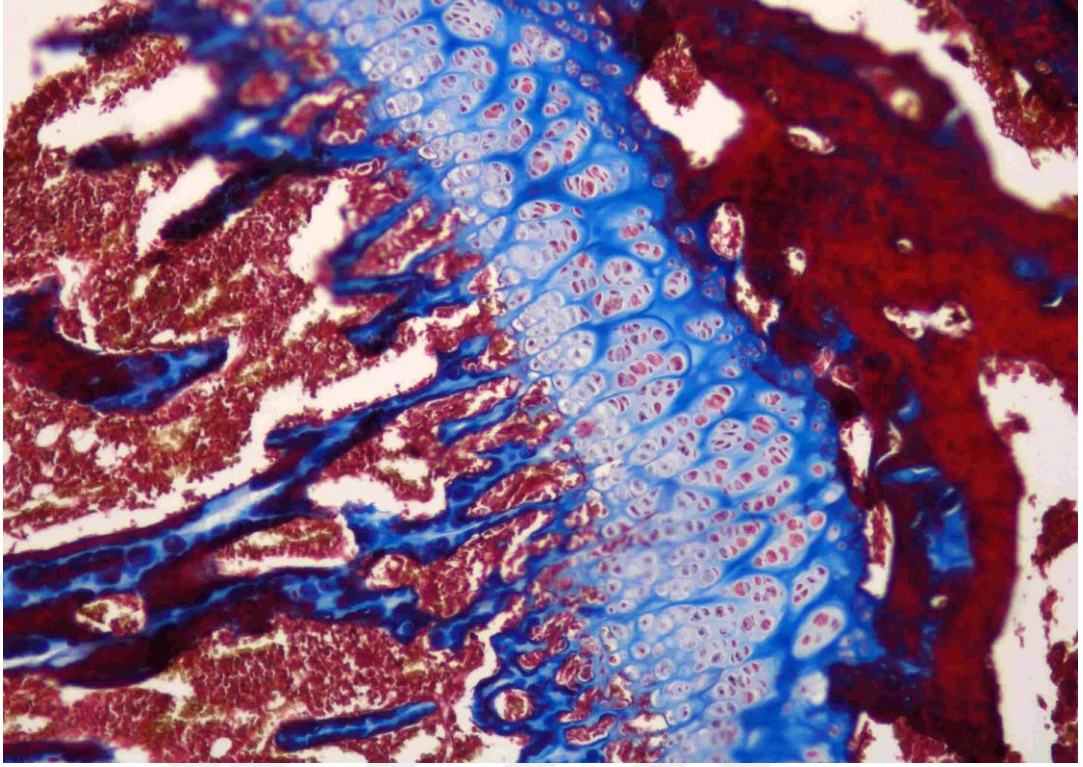
Şekil 46. D grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



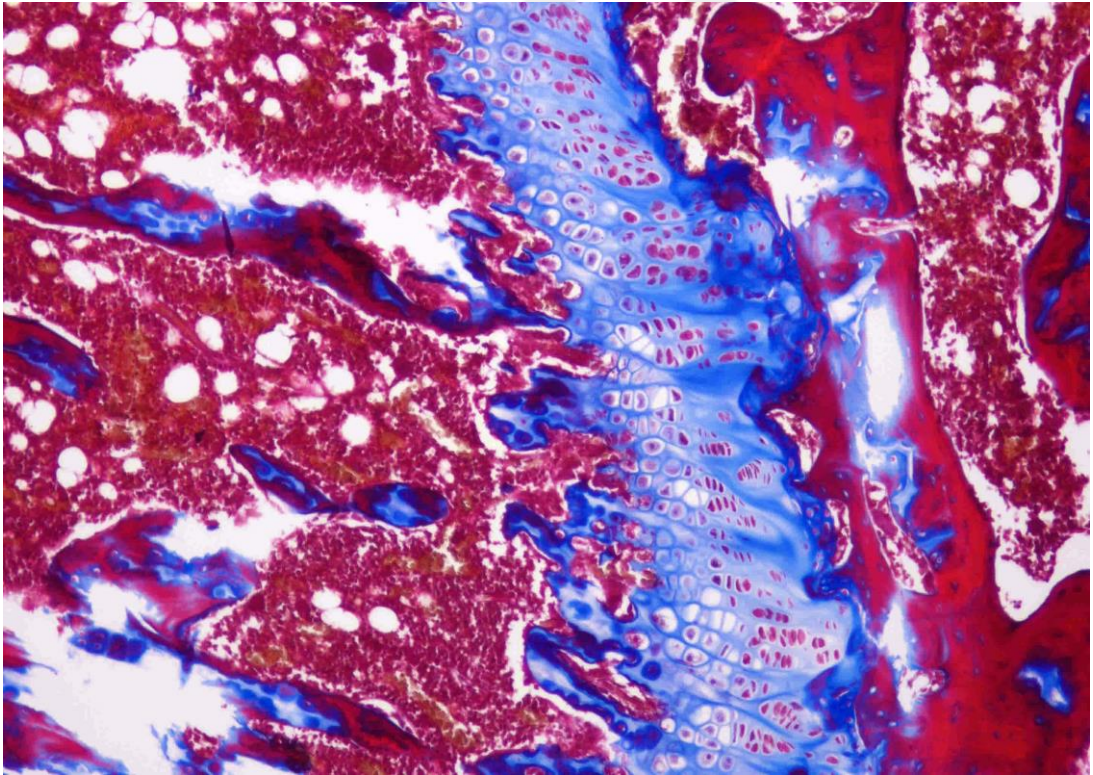
Şekil 47. E grubu 4. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



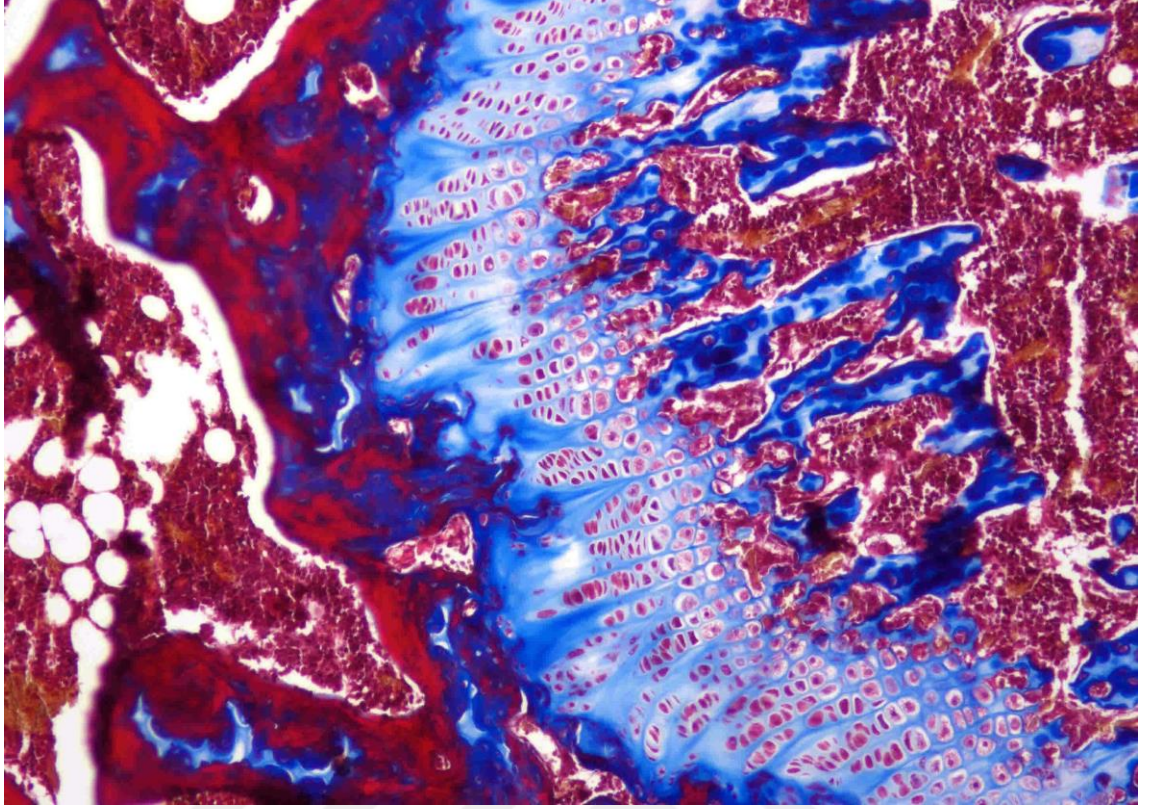
Şekil 48. E grubu 8. hafta materyalinin Hematoksilen-Eozin boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



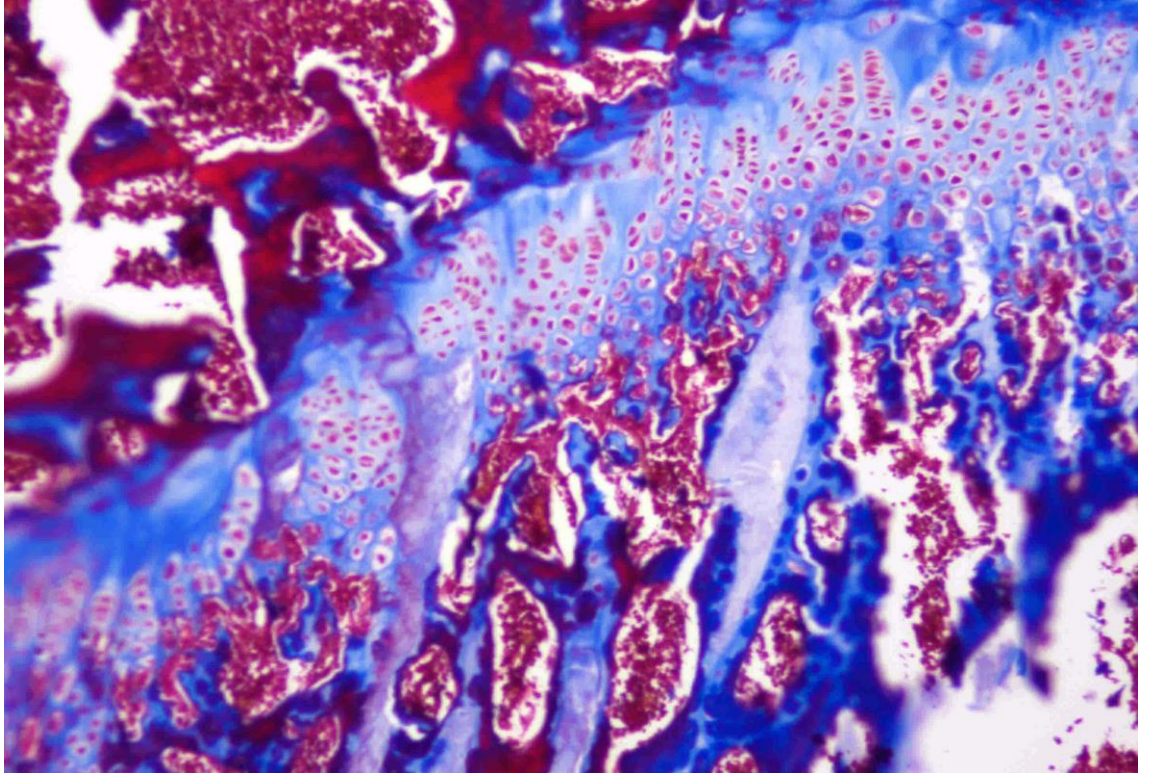
Şekil 49. A grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



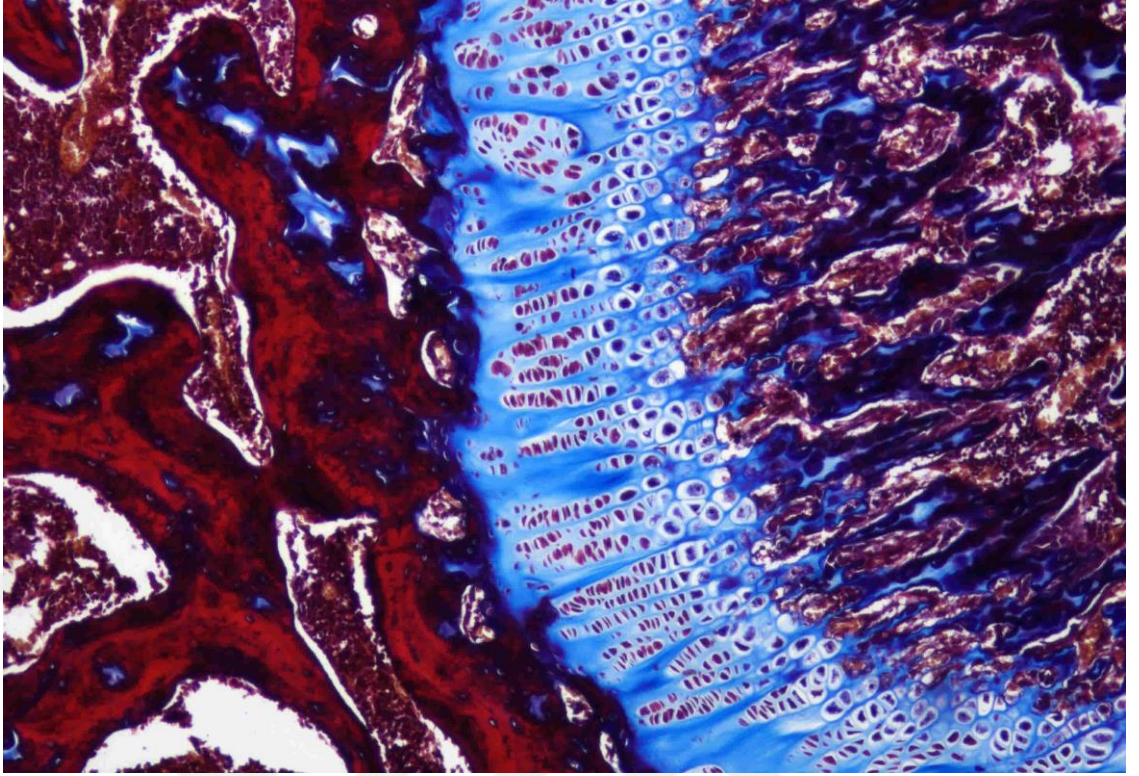
Şekil 50. A grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



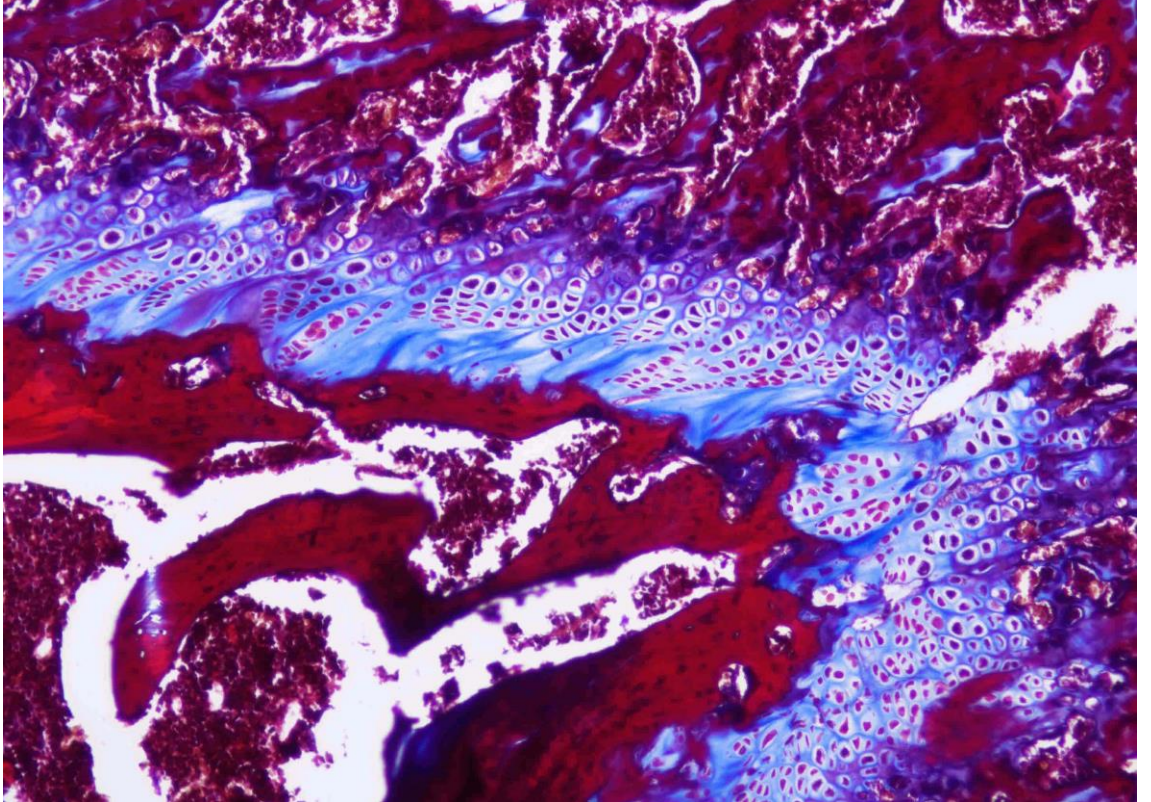
Şekil 51. B grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



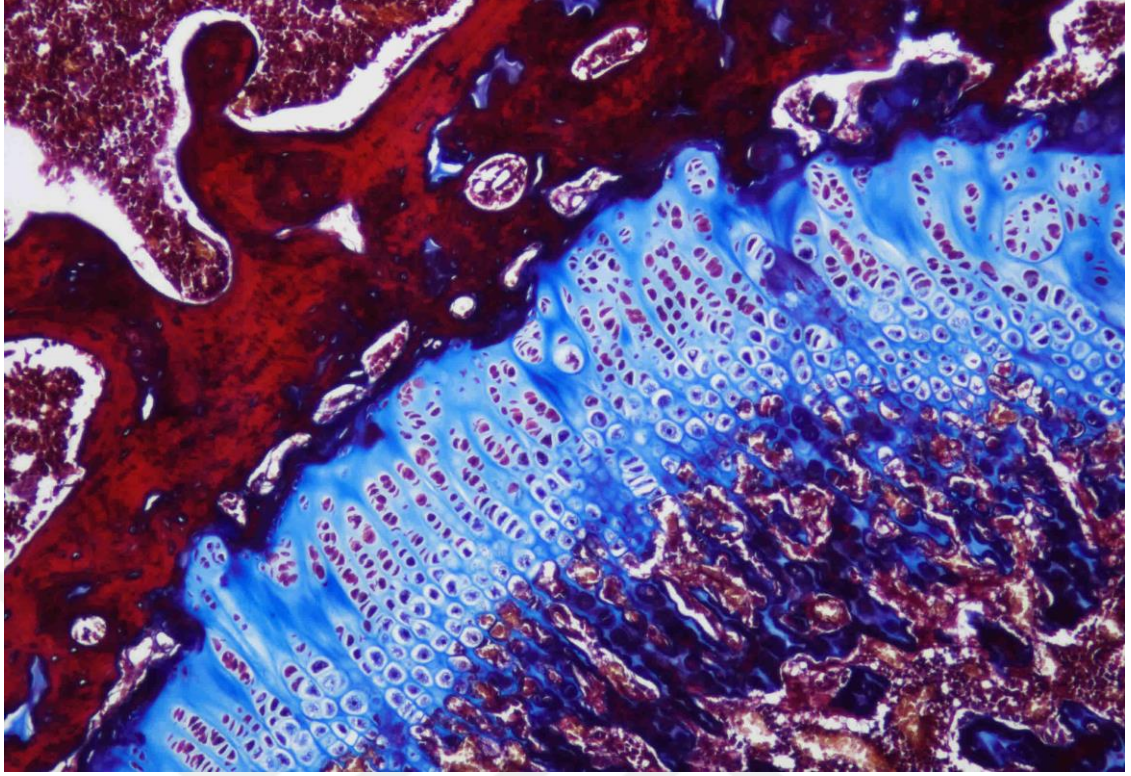
Şekil 52. B grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



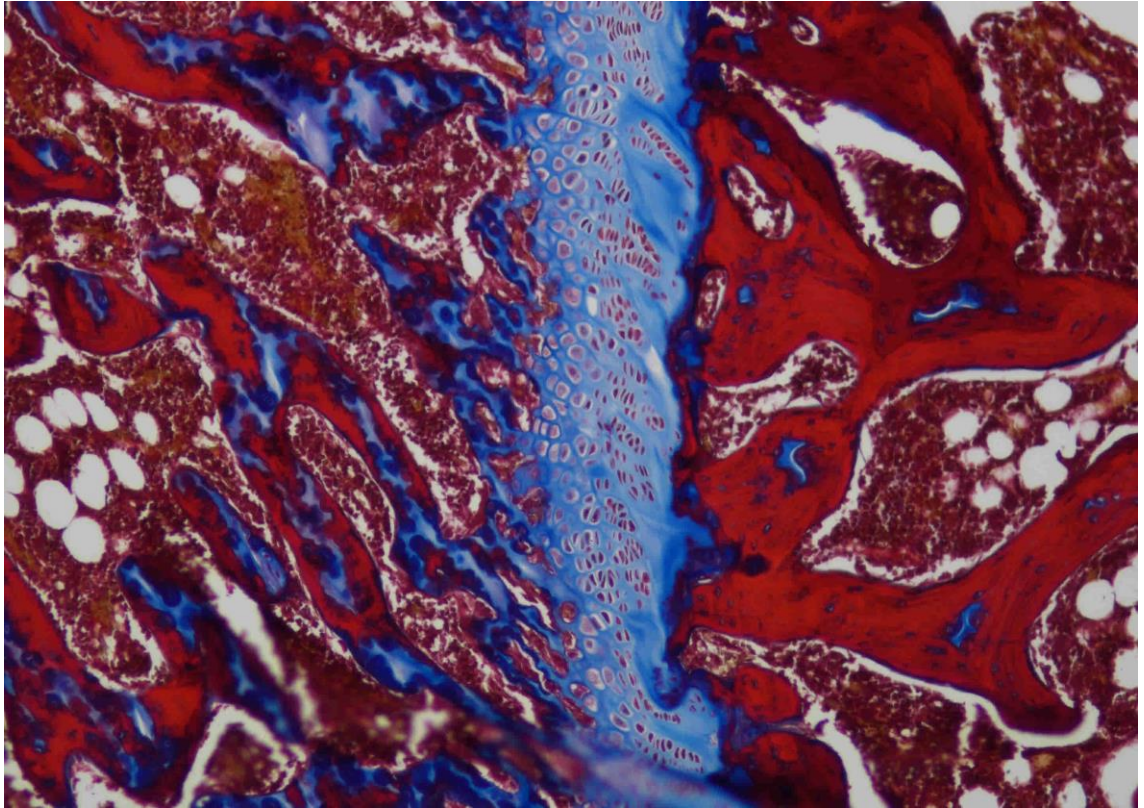
Şekil 53. C grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



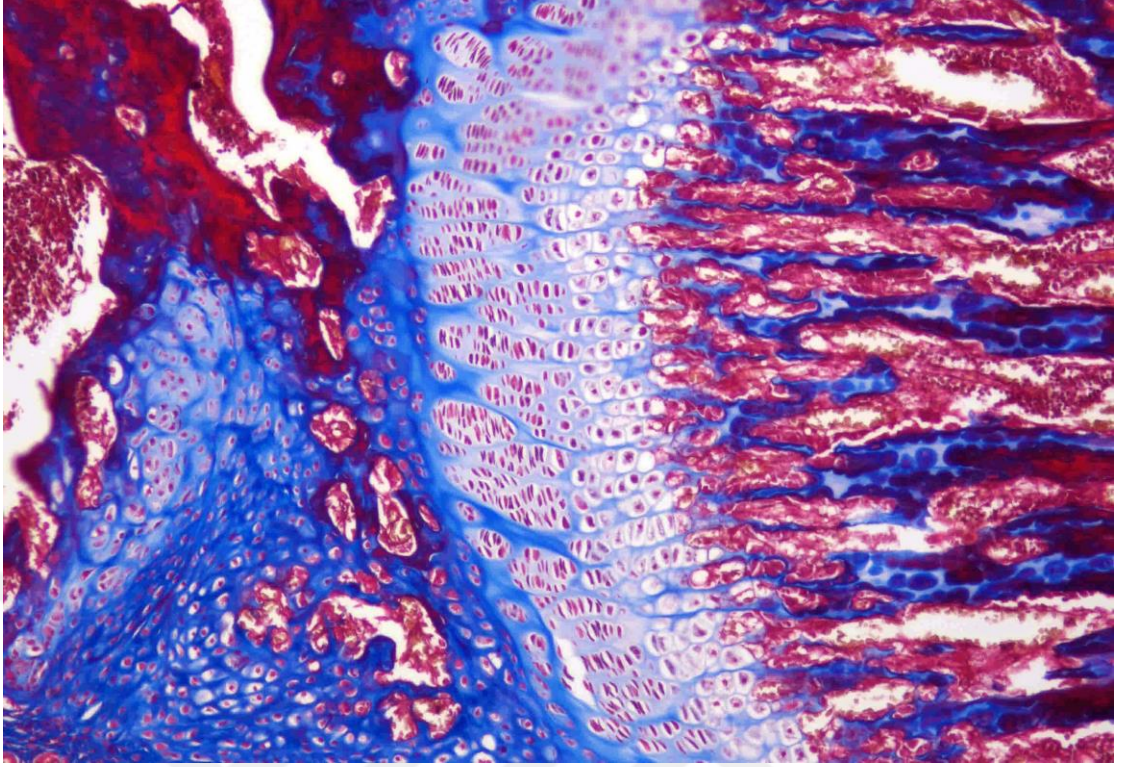
Şekil 54. C grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



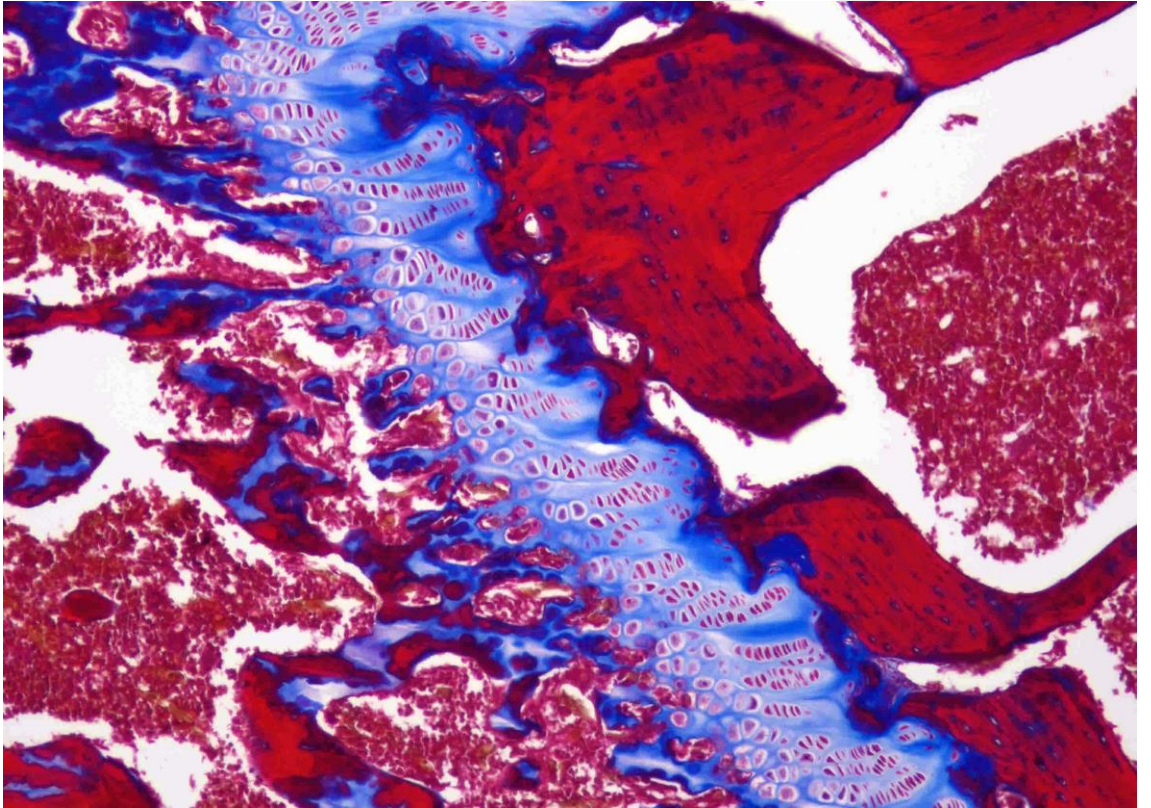
Şekil 55. D grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



Şekil 56. D grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



Şekil 57. E grubu 4. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü



Şekil 58. E grubu 8. hafta materyalinin Masson-Tricrom boyamaya ait mikroskopik görüntüsü

4. BULGULAR

Modifiye Mankin skorlama sistemine göre incelediğimizde;

4. haftada mankin morfolojik alan parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin morfolojik alan parametre puanı A grubunda, B, C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü. D grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5).

4. haftada mankin yüzey düzenliliği puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin yüzey derinliği parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti. D grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5).

4. haftada mankin komşu bağlanma parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin komşu bağlanma parametre puanı A grubunda, B, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve D grubuna göre daha düşüktü. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5).

4. haftada mankin hücre popülasyonu parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin hücre popülasyonu parametre puanı A grubunda, B, C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve E grubuna göre daha düşüktü. C grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. D grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 5).

4. haftada mankin kıkırdak tıkaç kalitesi parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin kıkırdak tıkaç kalitesi parametre puanı A grubunda B, C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C grubuna göre daha düşüktü. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5).

8. haftada mankin morfolojik alan parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin morfolojik alan parametre puanı A grubunda B, C, D ve E grubuna

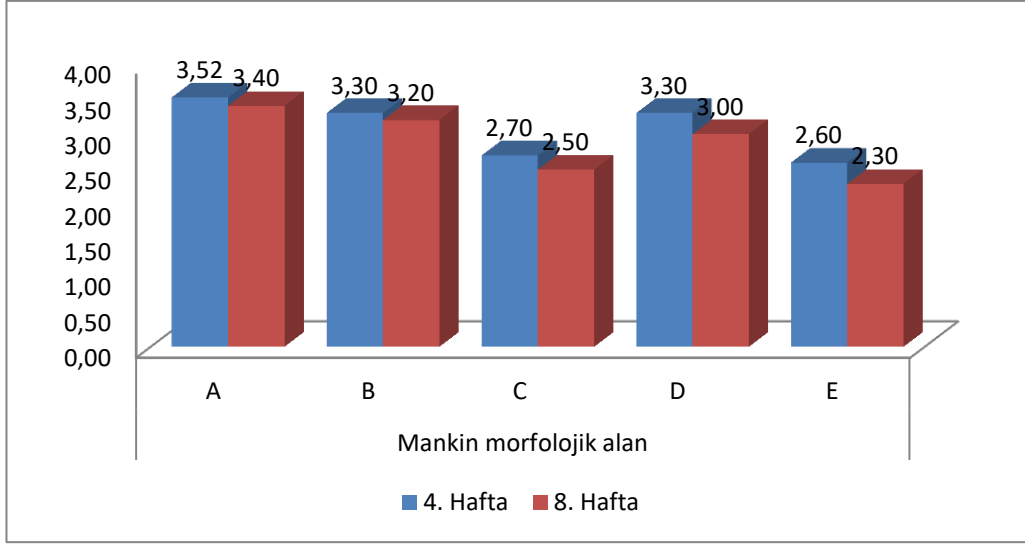
göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü. D grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5).

8. haftada mankin yüzey düzenliliği puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin yüzey derinliği parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti (Tablo 5).

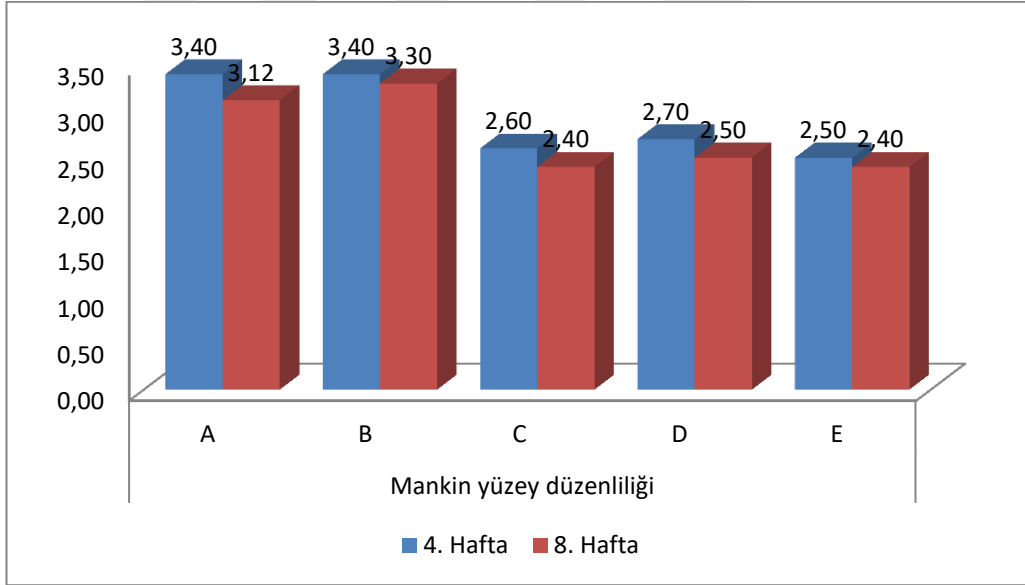
8. haftada mankin komşu bağlanma parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin komşu bağlanma parametre puanı A grubunda B ve D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve D grubuna göre daha düşüktü. C grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5).

8. haftada mankin hücre popülasyonu parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin hücre popülasyonu parametre puanı A grubunda B, C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve E grubuna göre daha düşüktü. D grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 5).

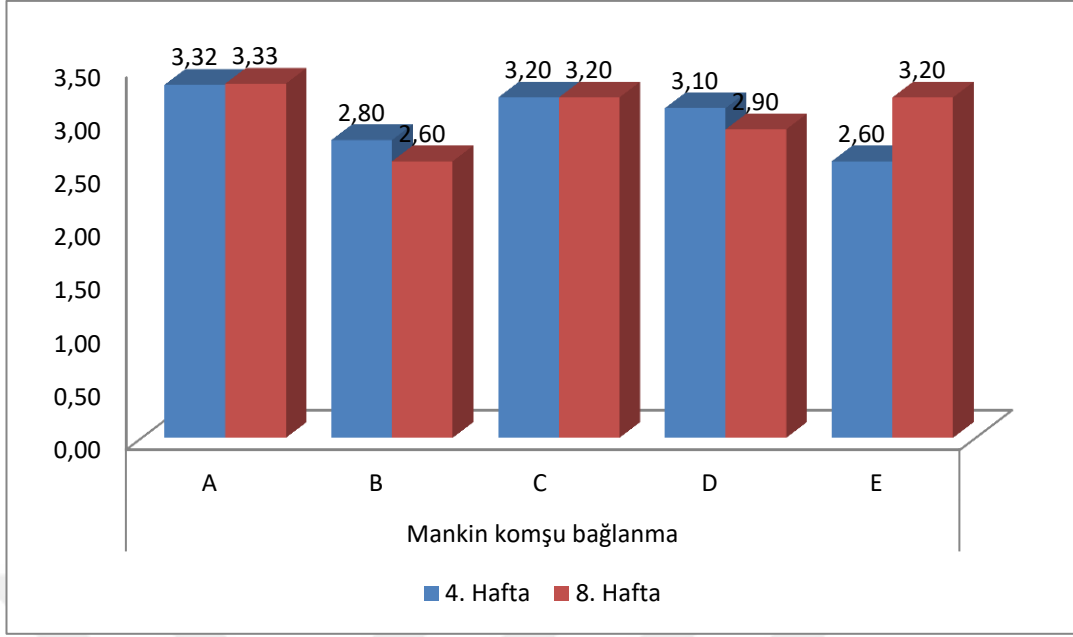
8. haftada mankin kıkırdak tıkaç kalitesi parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre mankin kıkırdak tıkaç kalitesi parametre puanı A grubunda B, C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C grubuna göre daha düşüktü. C grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 5).



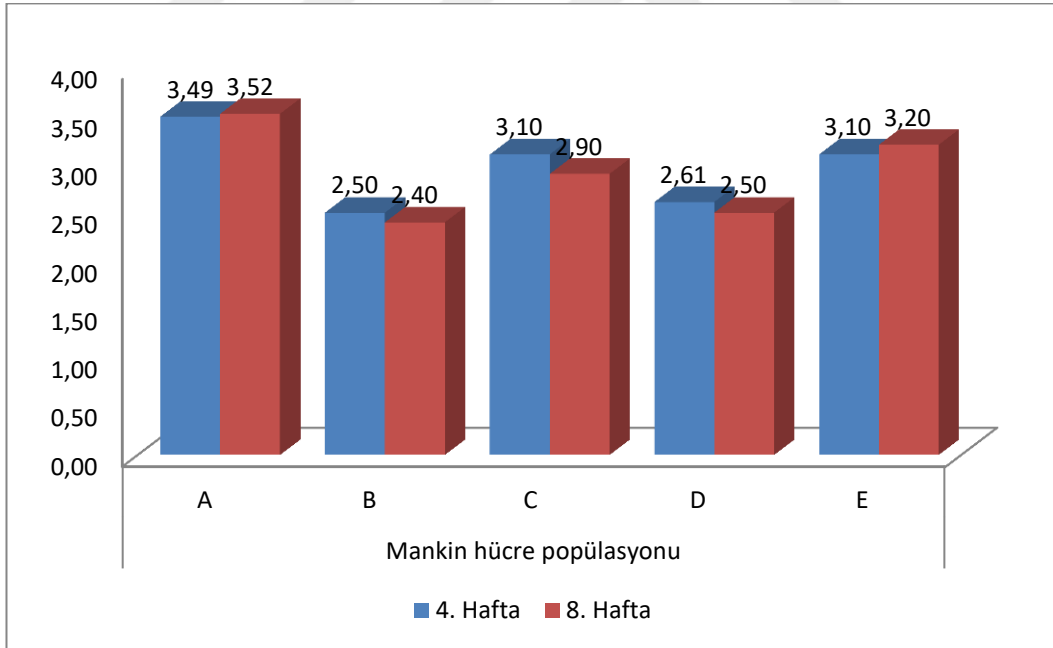
Şekil 59. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki morfolojik alanın gruplar arasında karşılaştırılması



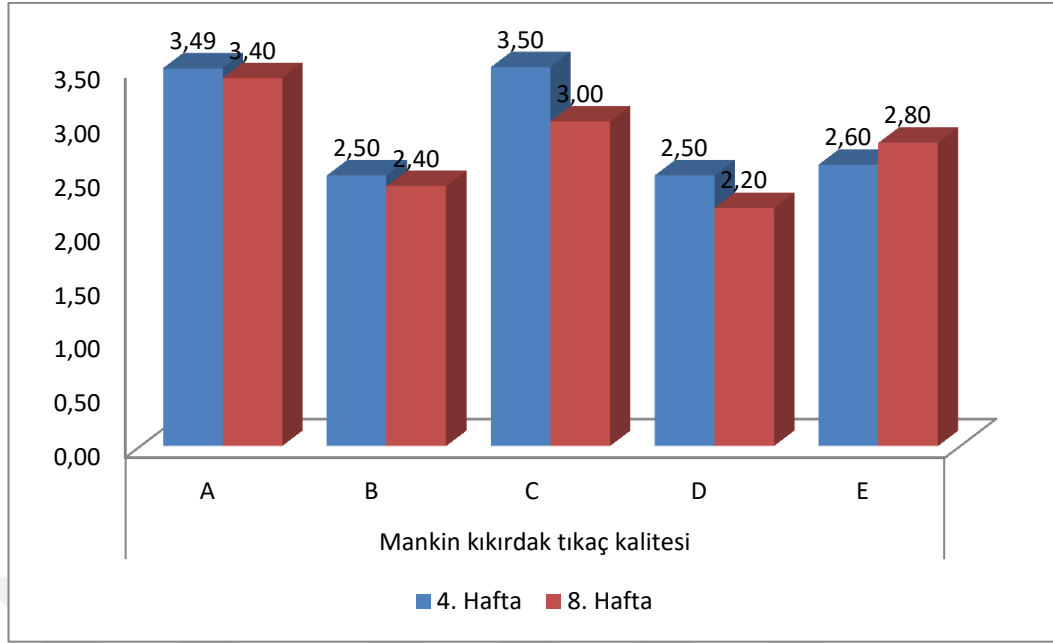
Şekil 60. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki yüzey düzenliliğinin gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 61. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki komşu bağlanmanın gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 62. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki hücre popülasyonunun gruplar arasında karşılaştırılması

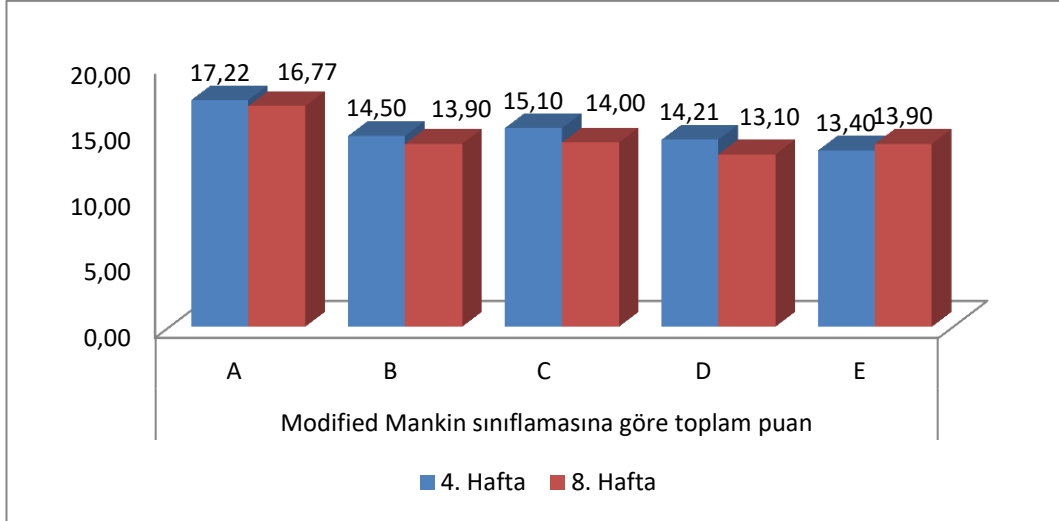


Şekil 63. Modifiye Mankin sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kırık tıkaç kalitesinin gruplar arasında karşılaştırılması

Tablo 5. Modified Mankin sınıflamasına göre parametrelerin grup ve haftalara göre karşılaştırılması

	4. hafta		8. hafta	
	Ort.±SS.	Medyan (Min.-Mak.)	Ort.±SS.	Medyan (Min.-Mak.)
Mankin morfolojik alan				
A (Mikrokırık)	3.52 ± .02	3.52 (3.51 -3.55)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 -3.40)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 -3.30)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 -3.20)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	2.70 ± .00	2.70 (2.70 -2.70)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 -2.50)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 -3.30)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 -3.00)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 -2.60)	2.30 ± .00	2.30 (2.30 -2.30)
	p<.001		p<.001	
Mankin yüzey düzenliliği				
A (Mikrokırık)	3.40 ± .01	3.40 (3.39 -3.41)	3.12 ± .01	3.11 (3.11 -3.13)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 -3.40)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 -3.30)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 -2.60)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 -2.40)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.70 ± .00	2.70 (2.70 -2.70)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 -2.50)

hücreliskafold)				
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 -2.50)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 -2.40)
	p<.001		p<.001	
Mankin komşu bağlanma				
A (Mikrokırık)	3.32 ± .01	3.33 (3.30 -3.33)	3.33 ± .00	3.33 (3.33 -3.33)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	2.80 ± .00	2.80 (2.80 -2.80)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 -2.60)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 -3.20)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 -3.20)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 -3.10)	2.90 ± .00	2.90 (2.90 -2.90)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 -2.60)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 -3.20)
	p<.001		p<.001	
Mankin hücre popülasyonu				
A (Mikrokırık)	3.49 ± .02	3.49 (3.48 -3.52)	3.52 ± .00	3.52 (3.52 -3.52)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 -2.50)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 -2.40)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 -3.10)	2.90 ± .00	2.90 (2.90 -2.90)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.61 ± .02	2.60 (2.60 -2.65)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 -2.50)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 -3.10)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 -3.20)
	p<.001		p<.001	
Mankin kıkırdak tıkaç kalitesi				
A (Mikrokırık)	3.49 ± .02	3.48 (3.47 -3.53)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 -3.40)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 -2.50)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 -2.40)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	3.50 ± .00	3.50 (3.50 -3.50)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 -3.00)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 -2.50)	2.20 ± .00	2.20 (2.20 -2.20)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 -2.60)	2.80 ± .00	2.20 (2.20 -2.20)
	p<.001		p<.001	



Şekil 64. Modified Mankin sınıflamasına göre toplam puanların haftalara göre ortalamaları

O'Driscol skorlama sistemine göre incelediğimizde;

4. haftada O'Driscol morfolojik alan parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p < .001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol morfolojik alan parametre puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol matrix parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p < .001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol matrix parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol yüzey düzenliliği parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p < .001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol yüzey derinliği parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol yapısal bütünlük parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p < .001$). Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol yapısal bütünlük parametre puanı A grubunda C, D ve E

grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol kalınlık yara dolgusu parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol kalınlık yara dolgusu parametre puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol osteokondral bağlanma parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol osteokondral bağlanma parametre puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol komşu bağlanma parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol komşu bağlanma puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol hücre yoğunluğu parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p=.003$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol hücre yoğunluğu puanı A grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol kümeleşme dağılım parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol kümeleşme dağılım puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol subkondral kemik parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi

sonucuna göre driscol subkondral kemik puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol hücre popülasyonu parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol hücre popülasyonu puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. D grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 6).

4. haftada O'Driscol kırıldak tıkaç kalitesi parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol kırıldak tıkaç kalitesi puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol morfolojik alan parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol morfolojik alan parametre puanı A grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol matrix parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol matrix parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol yüzey düzenliliği parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol yüzey derinliği parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol yapısal bütünlük parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi

sonucuna göre driscol yapısal bütünlük parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol kalınlık yara dolgusu parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol kalınlık yara dolgusu parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve D grubuna göre daha yüksekti. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol osteokondral bağlanma parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol osteokondral bağlanma parametre puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol komşu bağlanma parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol komşu bağlanma puanı A grubunda C, D ve E grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C, D ve E grubuna göre daha yüksekti (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol hücre yoğunluğu parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p=.003$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol hücre yoğunluğu puanı A grubunda D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve D grubuna göre daha yüksekti. D grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 6).

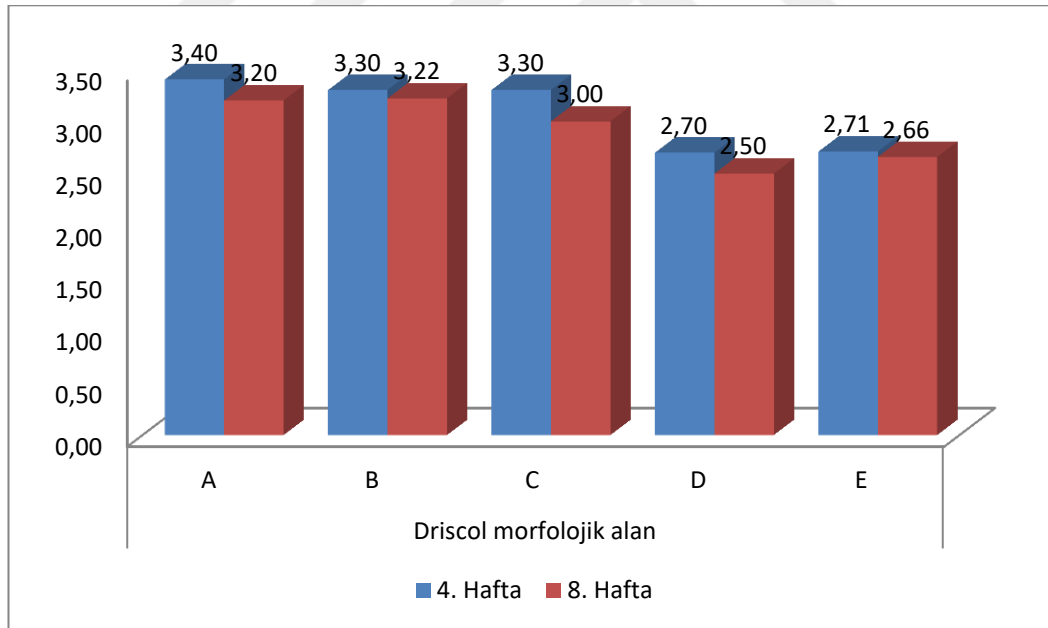
8. haftada O'Driscol kümeleşme dağılım parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol kümeleşme dağılım puanı A grubunda C ve D grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti. B grubunda C ve D grubuna göre daha yüksekti. C grubunda E grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol subkondral kemik parametre puanı gruplara göre anlamlı olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi sonucuna göre driscol subkondral kemik puanı A grubunda D ve E grubuna göre

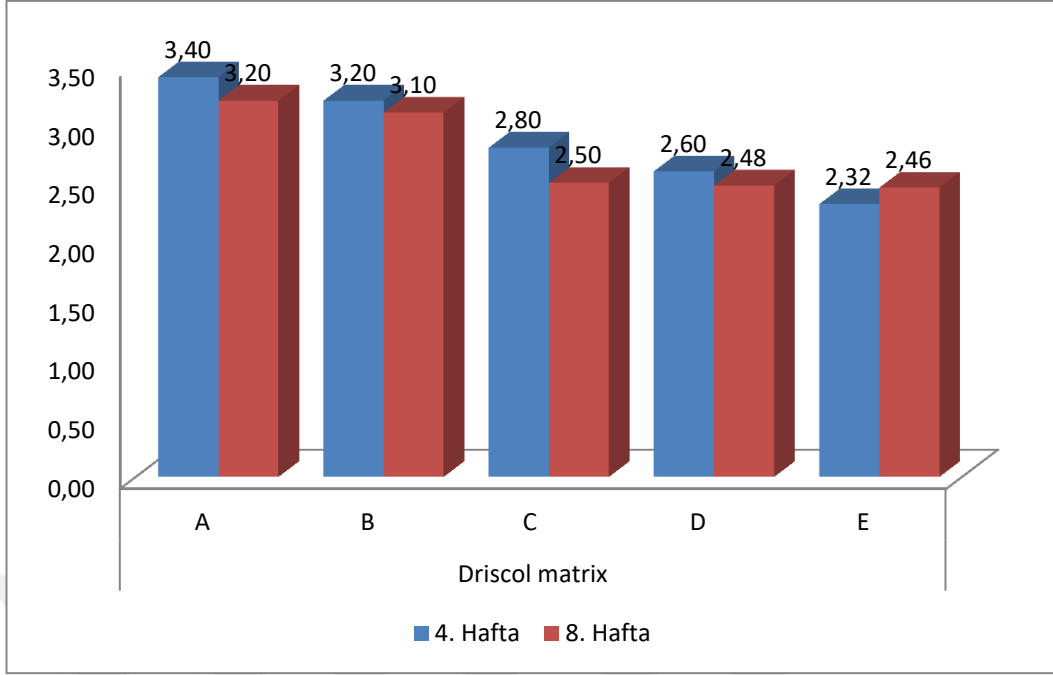
anlamli olarak daha yuksekti. B grubunda D ve E grubuna gore daha yuksekti. C grubunda E grubuna gore anlamli olarak daha dusuktu (Tablo 6).

8. haftada O'Driscol hucre populasyonu parametre puanı gruplara gore anlamli olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni duzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna gore driscol hucre populasyonu puanı A grubunda C, D ve E grubuna gore anlamli olarak daha yuksekti. B grubunda C ve D grubuna gore daha yuksekti. C grubunda D grubuna gore daha yuksek, E grubuna gore anlamli olarak daha dusuktu. D grubunda E grubuna gore anlamli olarak daha dusuktu (Tablo 6).

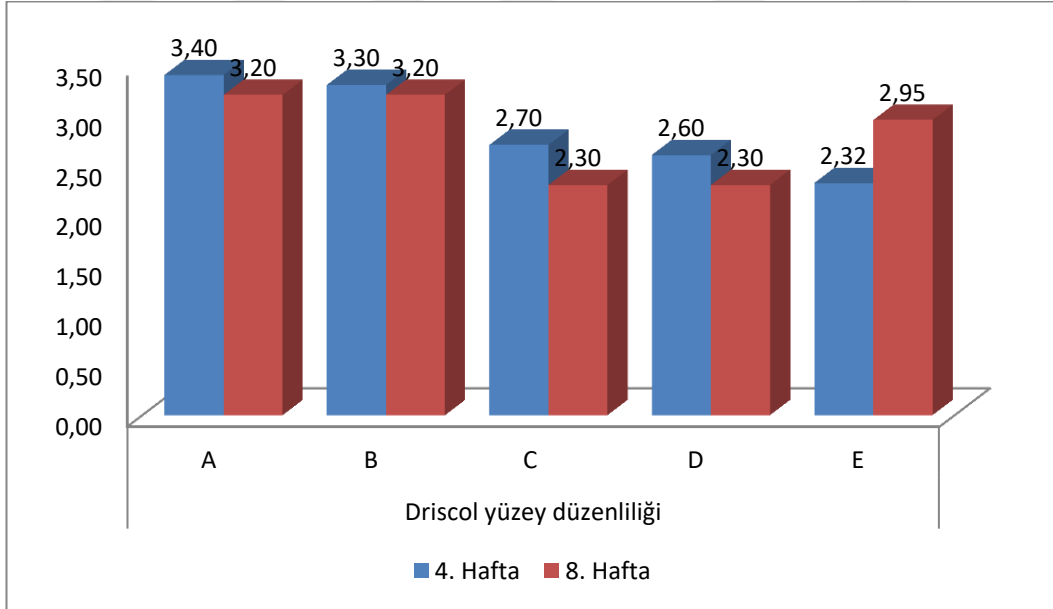
8. haftada O'Driscol kıkırdak tıkaç kalitesi parametre puanı gruplara gore anlamli olarak farklılaşmaktadır ($p<.001$). Bonferroni duzeltmeli Mann-Whitney testi sonucuna gore driscol driscol kıkırdak tıkaç kalitesi puanı A grubunda C, D ve E grubuna gore anlamli olarak daha yuksekti. B grubunda C, D ve E grubuna gore daha yuksekti. D grubunda E grubuna gore anlamli olarak daha dusuktu (Tablo 6).



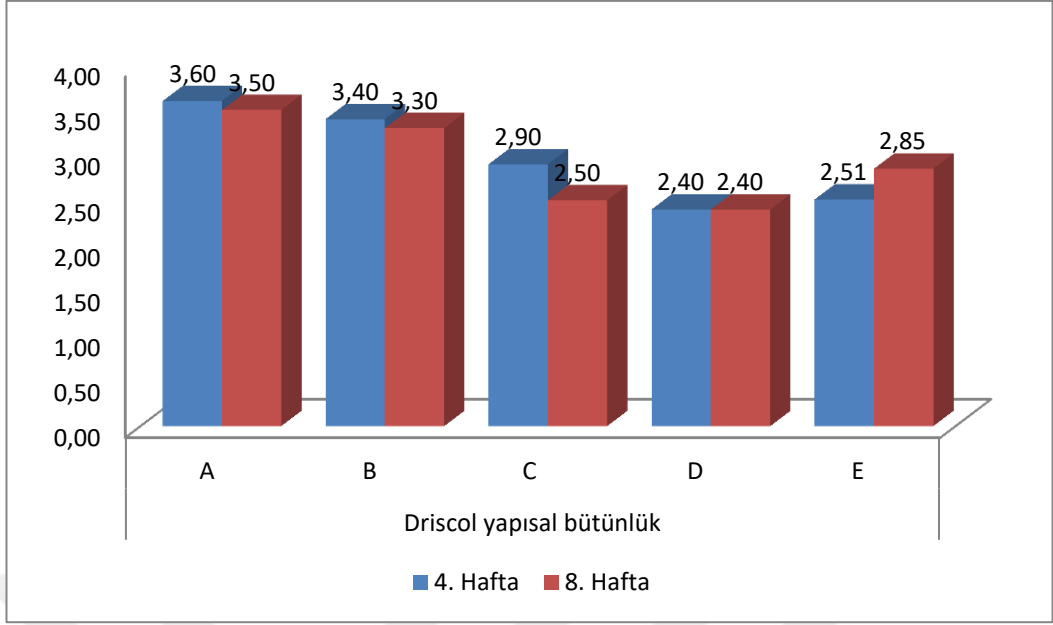
Şekil 65. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki morfolojik alanın gruplar arasında karşılaştırılması



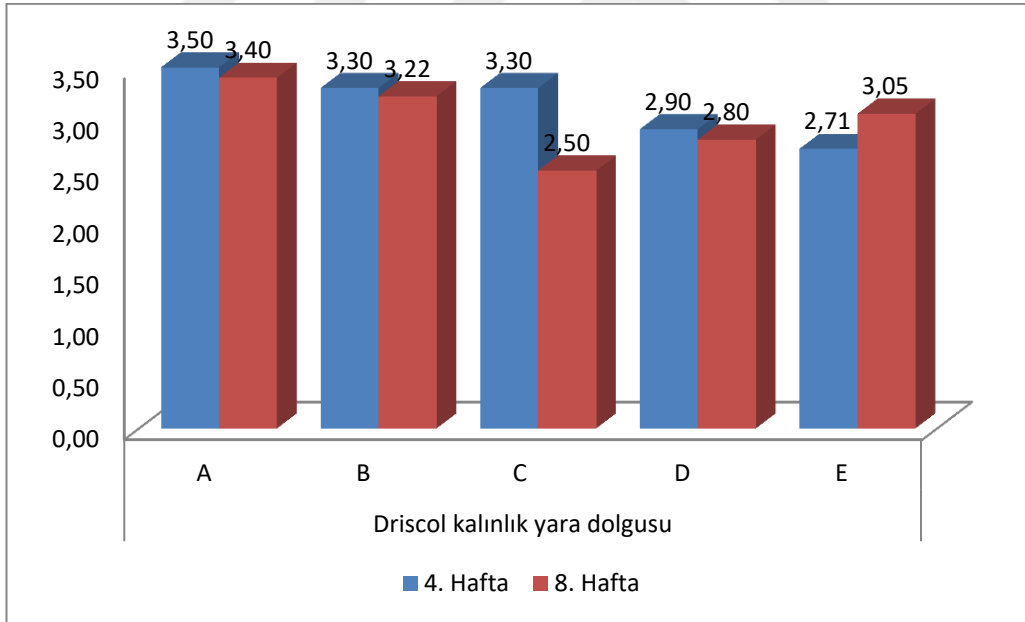
Şekil 66. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki matrixin gruplar arasında karşılaştırılması



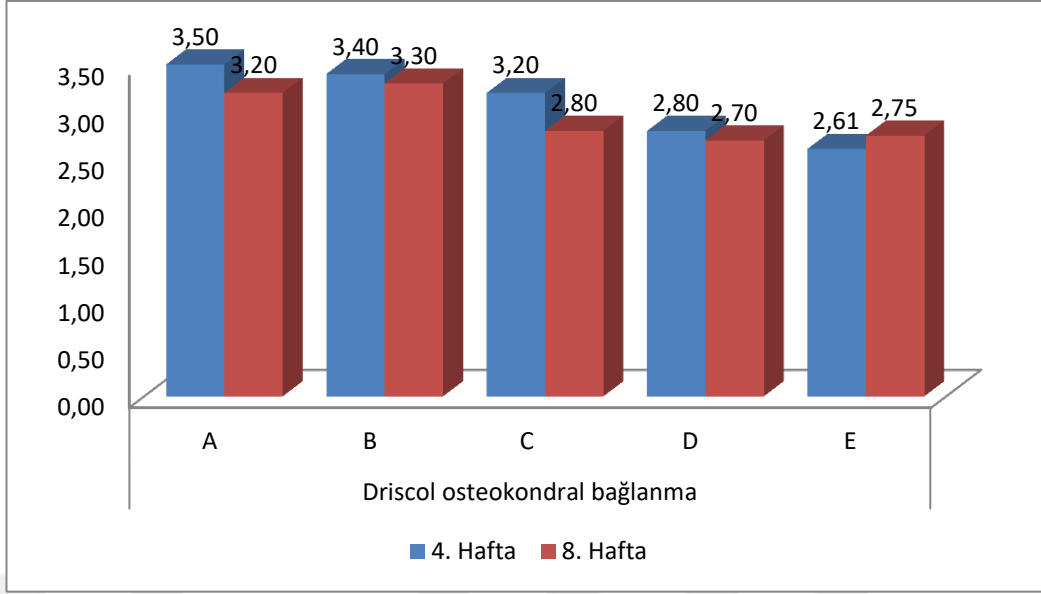
Şekil 67. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki yüzey düzenliliğinin gruplar arasında karşılaştırılması



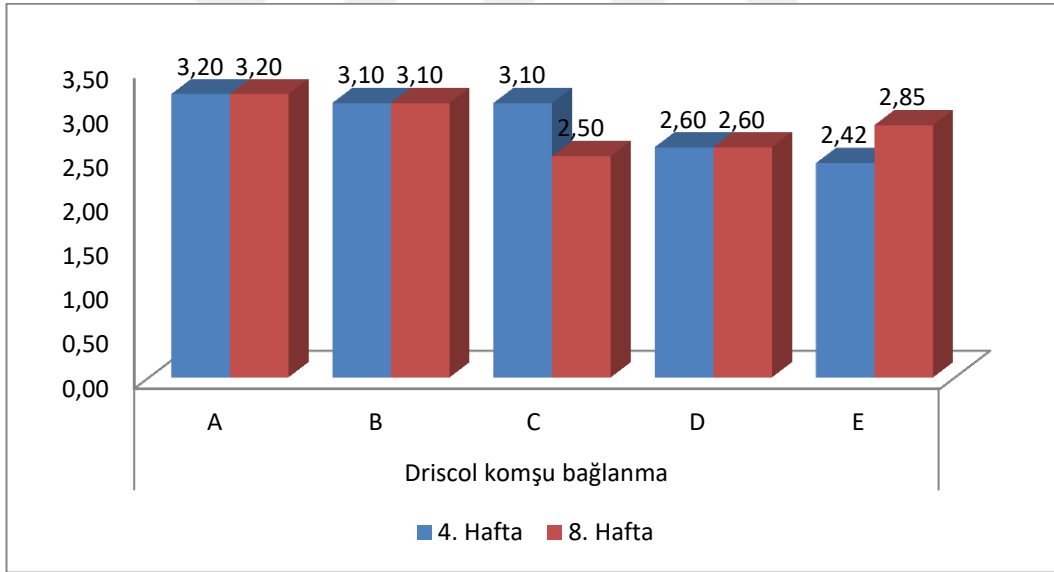
Şekil 68. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki yapısal bütünlüğün gruplar arasında karşılaştırılması



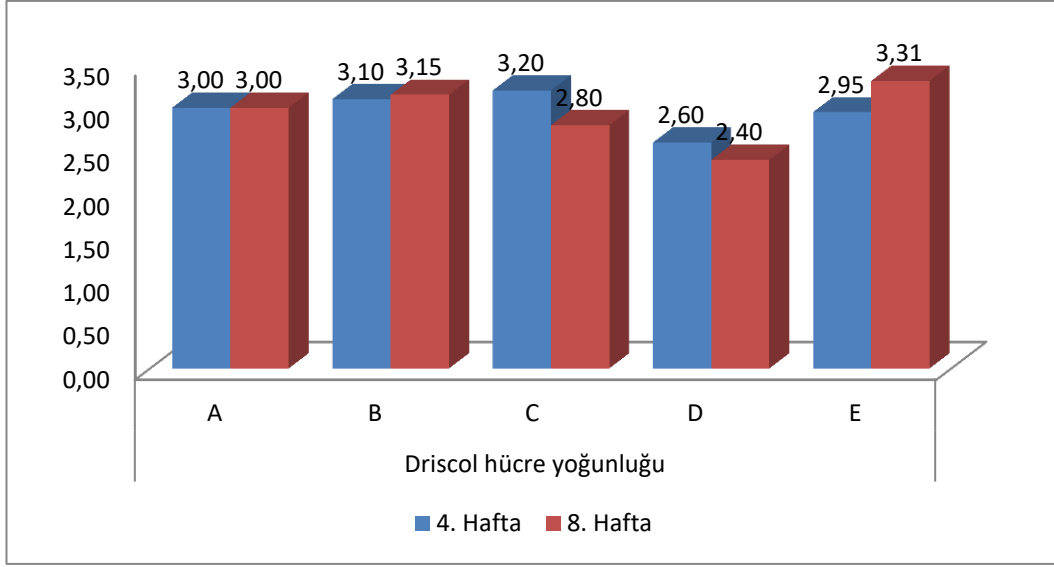
Şekil 69. O'Driscol sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kalınlık yara dolgusunun gruplar arasında karşılaştırılması



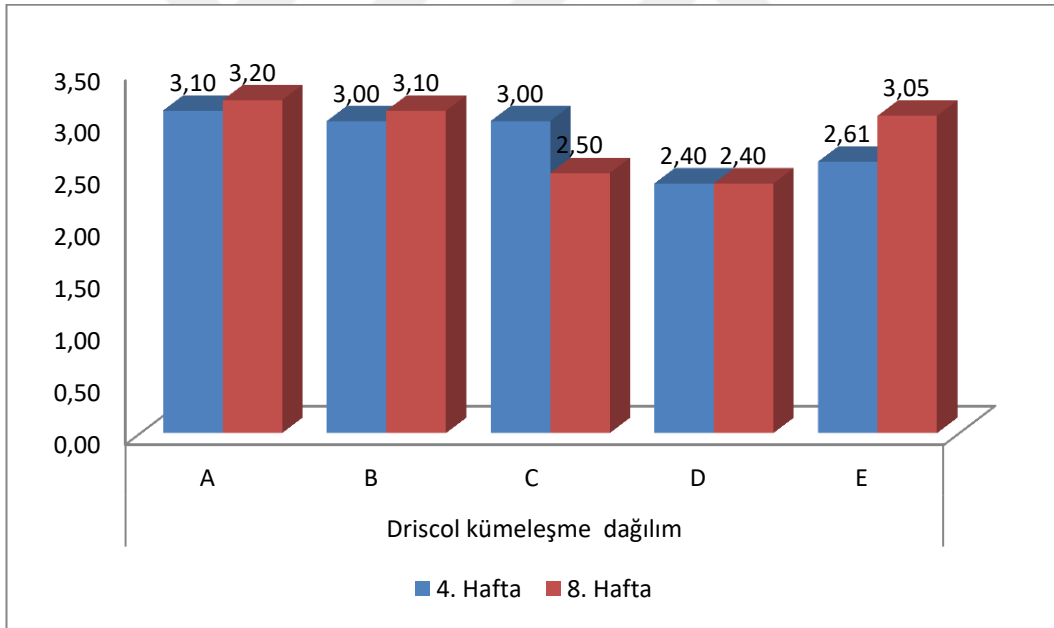
Şekil 70. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki osteokondral bağlanmanın gruplar arasında karşılaştırılması



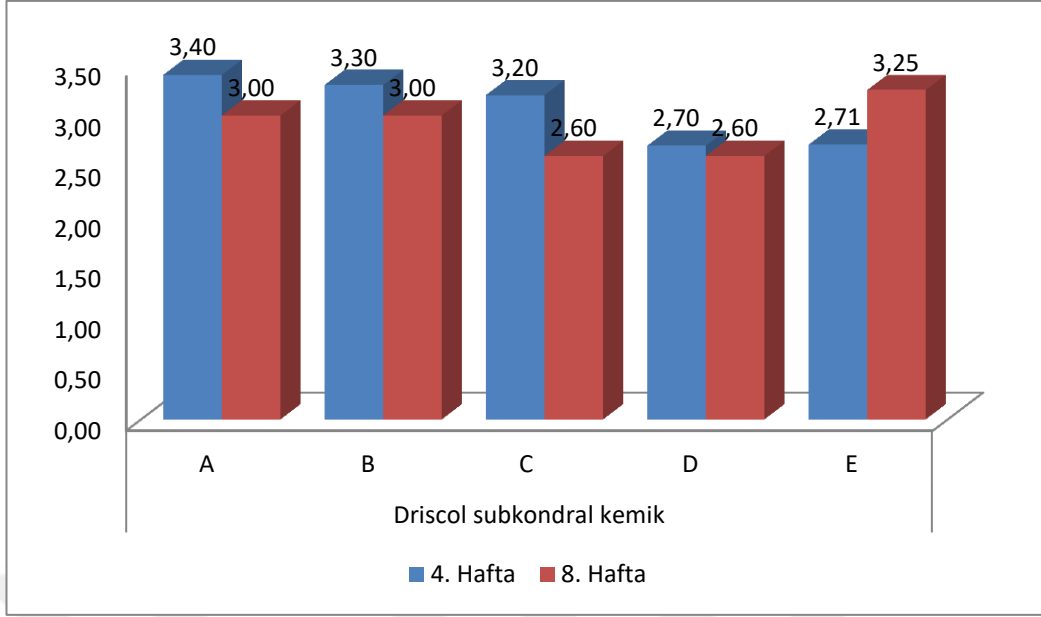
Şekil 71. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki komşu bağlanmanın gruplar arasında karşılaştırılması



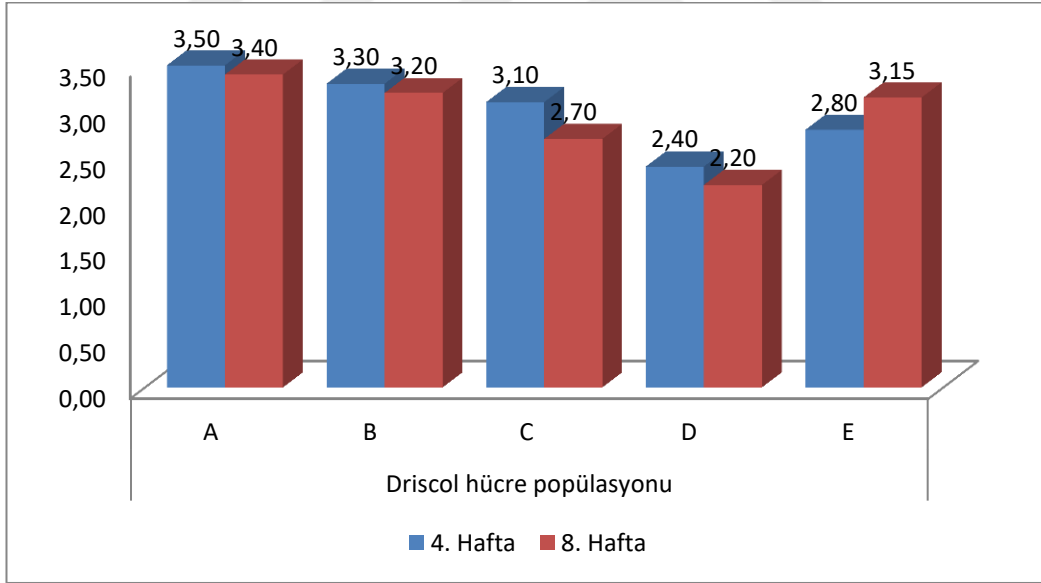
Şekil 72. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki hücre yoğunluğunun gruplar arasında karşılaştırılması



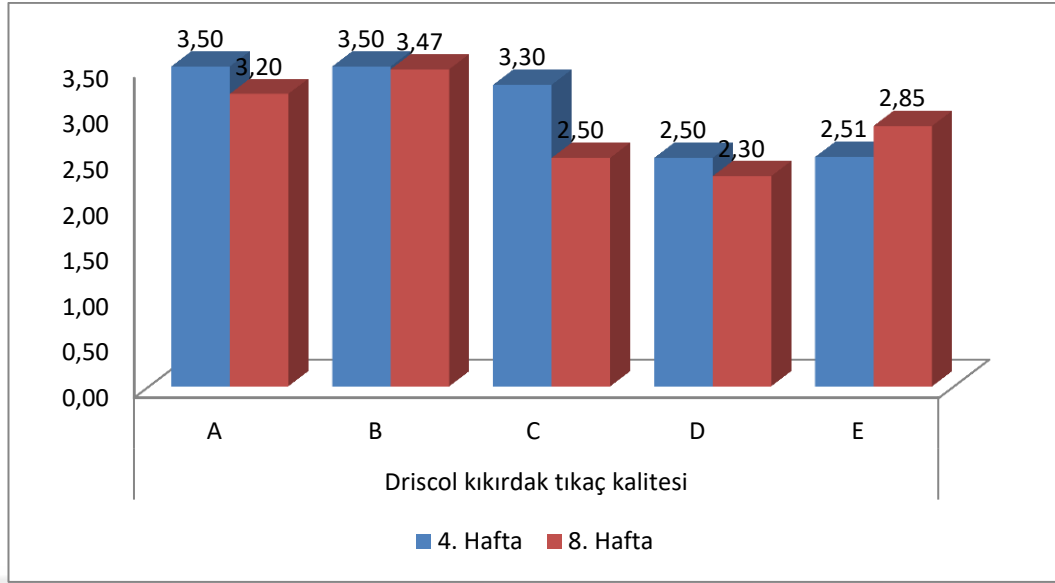
Şekil 73. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kümeleşme dağılımının gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 74. Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki subkondral kemiğin gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 75. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki hücre popülasyonunun gruplar arasında karşılaştırılması



Şekil 76. O'Driscoll sınıflandırmasına göre 4. ve 8. haftadaki kırık tıkaç kalitesinin gruplar arasında karşılaştırılması

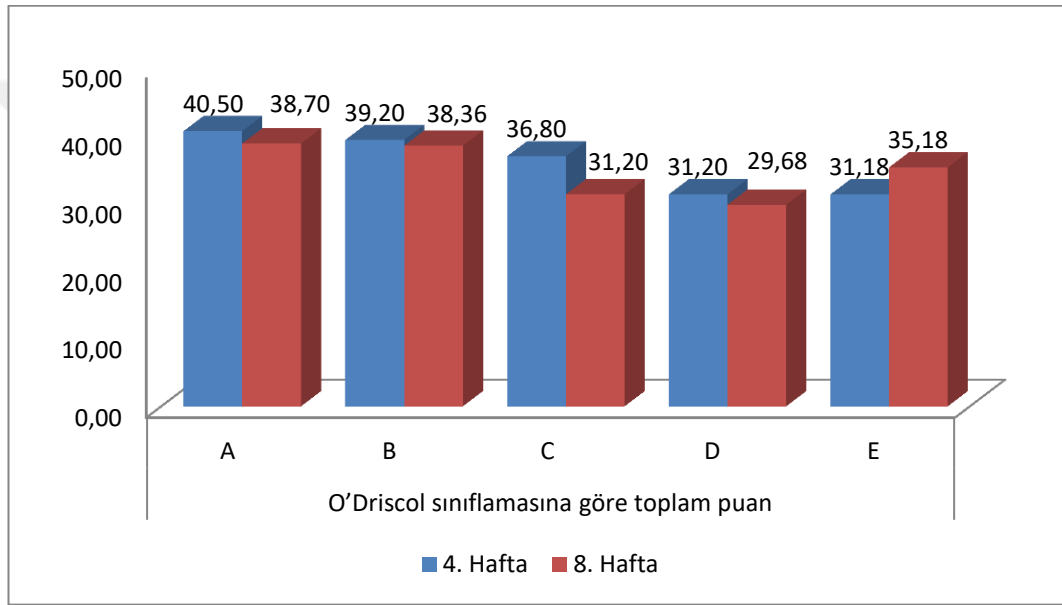
Tablo 6. O'Driscoll sınıflamasına göre parametrelerin grup ve haftalara göre karşılaştırılması

	4. hafta		8. hafta	
	Ort.±SS.	Medyan (Min. - Mak.)	Ort.±SS.	Medyan (Min. – Mak.)
O’Driscol morfolojik alan				
A (Mikrokırık)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	3.22 ± .04	3.20 (3.20 - 3.30)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 - 3.00)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.70 ± .00	2.70 (2.70 - 2.70)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.71 ± .14	2.80 (2.52 - 2.80)	2.66 ± .11	2.70 (2.43 - 2.70)
	p<.001		p<.001	
O’Driscol matrix				
A (Mikrokırık)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	2.80 ± .00	2.80 (2.80 - 2.80)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 - 2.60)	2.48 ± .04	2.50 (2.40 - 2.50)

E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.32 ± .12	2.40 (2.16 - 2.40)	2.46 ± .10	2.50 (2.25 - 2.50)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol yüzey düzenliliği				
A (Mikrokırık)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	2.70 ± .00	2.70 (2.70 - 2.70)	2.30 ± .00	2.30 (2.30 - 2.30)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 - 2.60)	2.30 ± .00	2.30 (2.30 - 2.30)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.32 ± .12	2.40 (2.16 - 2.40)	2.95 ± .12	3.00 (2.70 - 3.00)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol yapısal bütünlük				
A (Mikrokırık)	3.60 ± .00	3.60 (3.60 - 3.60)	3.50 ± .00	3.50 (3.50 - 3.50)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	2.90 ± .00	2.90 (2.90 - 2.90)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 - 2.40)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 - 2.40)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.51 ± .13	2.60 (2.34 - 2.60)	2.85 ± .12	2.90 (2.61 - 2.90)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol kalınlık/yara dolgusu				
A (Mikrokırık)	3.50 ± .00	3.50 (3.50 - 3.50)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	3.22 ± .04	3.20 (3.20 - 3.30)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.90 ± .00	2.90 (2.90 - 2.90)	2.80 ± .00	2.80 (2.80 - 2.80)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.71 ± .14	2.80 (2.52 - 2.80)	3.05 ± .13	3.10 (2.79 - 3.10)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol osteokondral bağlanma				
A (Mikrokırık)	3.50 ± .00	3.50 (3.50 - 3.50)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)	2.80 ± .00	2.80 (2.80 - 2.80)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.80 ± .00	2.80 (2.80 - 2.80)	2.70 ± .00	2.70 (2.70 - 2.70)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.61 ± .14	2.70 (2.43 - 2.70)	2.75 ± .11	2.80 (2.52 - 2.80)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol komşu bağlanma				
A (Mikrokırık)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
B (Mikrokırık+2katmanlı)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)

hüceliskafold)				
C (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)
D (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 - 2.60)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 - 2.60)
E (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.42 ± .13	2.50 (2.25 - 2.50)	2.85 ± .12	2.90 (2.61 - 2.90)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol hücre yoğunluğu				
A (Mikrokırık)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 - 3.00)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 - 3.00)
B (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)	3.15 ± .05	3.15 (3.10 - 3.20)
C (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)	2.80 ± .00	2.80 (2.80 - 2.80)
D (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 - 2.60)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 - 2.40)
E (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.95 ± .69	3.40 (2.06 - 3.40)	3.31 ± .13	3.34 (3.06 - 3.40)
	p=.003		p<.001	
O'Driscol kümeleşme dağılım				
A (Mikrokırık)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
B (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 - 3.00)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)
C (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 - 3.00)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)
D (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 - 2.40)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 - 2.40)
E (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.61 ± .14	2.70 (2.43 - 2.70)	3.05 ± .13	3.10 (2.79 - 3.10)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol subkondral kemik				
A (Mikrokırık)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 - 3.00)
B (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	3.00 ± .00	3.00 (3.00 - 3.00)
C (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 - 2.60)
D (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.70 ± .00	2.70 (2.70 - 2.70)	2.60 ± .00	2.60 (2.60 - 2.60)
E (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.71 ± .14	2.80 (2.52 - 2.80)	3.25 ± .13	3.30 (2.97 - 3.30)
	p<.001		p<.001	
O'Driscol hücre popülasyonu				
A (Mikrokırık)	3.50 ± .00	3.50 (3.50 - 3.50)	3.40 ± .00	3.40 (3.40 - 3.40)
B (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
C (Mikrokırık+2katmanlı hüceliskafold)	3.10 ± .00	3.10 (3.10 - 3.10)	2.70 ± .00	2.70 (2.70 - 2.70)
D (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.40 ± .00	2.40 (2.40 - 2.40)	2.20 ± .00	2.20 (2.20 - 2.20)
E (Mikrokırık+1katmanlı hüceliskafold)	2.80 ± .15	2.90 (2.61 - 2.90)	3.15 ± .13	3.20 (2.88 - 3.20)

	p<.001		p<.001	
O'Driscol kırıldak tıkaç kalitesi				
A (Mikrokırık)	3.50 ± .00	3.50 (3.50 - 3.50)	3.20 ± .00	3.20 (3.20 - 3.20)
B (Mikrokırık+2katmanlı hücreliskafold)	3.50 ± .00	3.50 (3.50 - 3.50)	3.47 ± .05	3.50 (3.40 - 3.50)
C (Mikrokırık+2katmanlı hücresizskafold)	3.30 ± .00	3.30 (3.30 - 3.30)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)
D (Mikrokırık+1katmanlı hücreliskafold)	2.50 ± .00	2.50 (2.50 - 2.50)	2.30 ± .00	2.30 (2.30 - 2.30)
E (Mikrokırık+1katmanlı hücresizskafold)	2.51 ± .13	2.60 (2.34 - 2.60)	2.85 ± .12	2.90 (2.61 - 2.90)
	p<.001		p<.001	

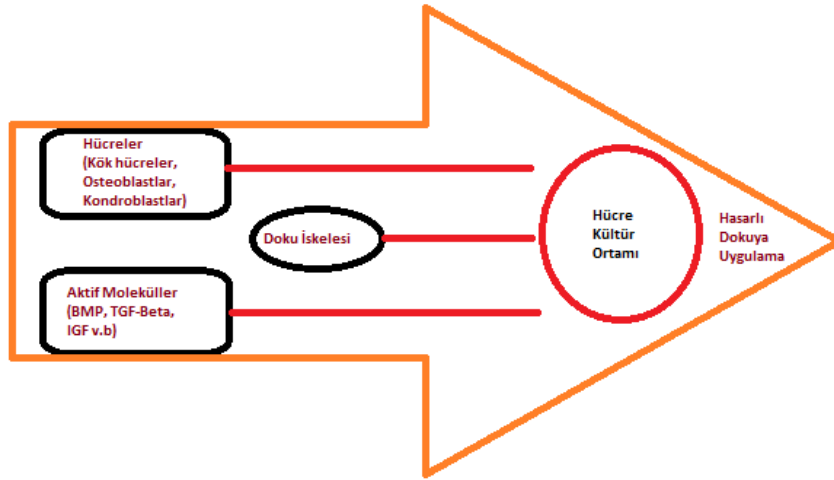


Şekil 77. O'Driscol sınıflamasına göre toplam puanların haftalara göre ortalamaları

5. TARTIŞMA

Eklem kıkırdığı kan damarları, lenf damarları ve sinirleri olmayan bir dokudur. Bu nedenle kondrositler mitotik girmek veya bozulmaya karşılık olarak kıkırdığı yeniden oluşturmak için sınırlı kapasiteye sahiptir. Kıkırdak dokunun avasküler, anöral ve hücresel yoğunluğu düşük bir doku olmasının da etkisiyle lezyonlara verdiği cevap oldukça zayıftır. Kondrosit olarak cevap oluşturabilmesine rağmen lezyonun ilerlemesine engel olunamaz. Primer iyileşme sağlanamaz, travmaların hasara dönüşmesi tam olarak engellenemez [29]. Etiyolojisi farketmeksizin meydana gelen kıkırdak defekti ya hiç iyileşmez ya da fibrotik doku ile iyileşerek defektif alan kapatılır. Fibrokartilaj ile mekanik olarak iyileşme sağlanmış olsa da fonksiyonel kayıp oluşur [86]. Fonksiyonel kaybın nedeni, iyileşme dokusunda meydana gelen fibrokartilajın tip 1 kollajen içermesidir. Hyalin kıkırdak asıl olarak tip 2 kollajen ihtiva eder. Tip 1 kollajen eklem kayganlık, esneklik ve elastikiyet özelliğini kazandıramaz; bu nedenle mekanik aşınma kaçınılmaz sonuç olarak karşımıza çıkar [87]. Kıkırdak dokunun bu kısıtlı kapasitesi hücrelerin hasara yanıt cevabının incelenmesi konusunda son yıllarda birçok merkezde araştırma konusu olmaktadır.

Biyomühendislik, hastalık ve travma sonucu oluşabilen doku veya organ kaybının rejenerasyonu ve normal işlev görebilmesi için hücre, iyileştirici molekül ve yapısal doku iskelelerini mühendislik ilkelerini kullanarak gerçekleştiren bir multidisiplindir [88]. İlk kez 1977 yılında Green tarafından tanımlanmış ve 1980'li yıllarda güncellenmiştir. 1994'te Brittberg ve ark. ilk klinik uygulama sonuçlarını bildirmişlerdir [89]. Kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında, polimerik hücre iskeleleri, hücre kültür teknolojileri, kondrositler ve sinyal molekülleri tek başlarına ya da birlikte kullanılabilir (Şekil-78).



Şekil 78. Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında metabolik etkinlik açısından uygun özelliklere sahip hücrelerin eldesi, hücreler arası işlevsel ağı oluşturmak için önemli ve gereklidir. Chen ve ark. yaptıkları in vitro çalışmada ekimi gerçekleştirilen hücre sayısının üretilen ağ miktarına etkisi olduğunu belirtmişlerdir [90]. Bizde yaptığımız çalışmada ekimi gerçekleştirilen hücre sayısını azami sayıda tutmaya çalıştık. Hücreler 20000 hücre/mm³ olacak şekilde kondrosit kültür medyumunu içeren flasklara ekilerek, 37 °C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edildi. Her üç günde bir medyum değiştirildi [85]. Hücreler % 80 doluluk oranında pasajlandı.

Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılacak hücreler için akla ilk olarak kondrositler ve kondroblastlar gelmektedir. Bu hücrelerin kök hücrelere nazaran kolay elde edilebilmesi nedeniyle araştırmacılar arasında popüler olmuştur. Biz de çalışmamızda; önceden belirlediğimiz gruplarda yer alan deney hayvanlarına ek cerrahi girişim uygulayarak auriküler kondrosit otogrefti elde ederek bu hücreleri izole etmeyi başardık. Elde edilen hücreler birçok çalışmada farklı polimer ağlarla birlikte kullanılmıştır [91]. Kawamura ve ark. yaptıkları çalışmada, elde edilen hücrelerin erken dönemde kıkırdak yüzeyinde yeterli onarımı sağladıklarını gözlemlenmiştir. Ancak uzun dönem takiplerde aynı olumlu sonuç elde edilemediğini vurgulayarak; bu hücrelerin farklılaşmış dokudan üretilmelerinden dolayı yeterli sayıda çoğalamadığını ve yeniden farklılaşmayı sağlamada da beklenen başarıyı elde edemediklerini belirtmişlerdir [92]. Biz de yaptığımız

çalışmada, skafoldlara yerleştirdiğimiz kondrosit hücreleri ile 4. haftadaki akut dönem sonuçlarında anlamlı iyileşme saptarken, 8. hafta orta dönem sonuçlarında bu iyileşmenin aynı olumlu sonuçta olmadığını saptadık.

Bu çalışmada yeni oluşturulan çift katmanlı ve tek katmanlı skafoldun deneysel mikrokırık zemininde oluşturulan osteokondral defekt alanına hücreli ve hücresiz uygulanması sonrası oluşabilecek olan eklem kıkırdığı rejenerasyon yeteneğini araştırdık. Çalışmamızda; hem çift katmanlı skafold ile tek katmanlı skafoldun etkinliğini hem de nakledilen kondrositlerin kıkırdak iyileşmesinde aktif rol alıp alamayacağını kıyaslama imkanı elde ettik. Amacımız iki katmanlı sentetik skafold ile kıkırdak onarımı yapabilmek olup subkondral dokunun kıkırdak iyileşmesinde mutlak gerekli olup olmadığınıun cevabını bulabilmektir.

Son dönemde yapılan çalışmalarda, bir kıkırdak stimülasyon yöntemi olan mikrokırık uygulamaları yerini daha KÇM uygulamalara bırakmıştır[93]. Mikrokırık uygulanması sırasında, büyük genişlikteki delik sahalarının çevresindeki spongioz kemik dokusunun kontrolsüz kompresyonunun subkondral kemik mimarisini değiştirdiği, bu sebeple defekt alanına ulaşan mezenkimal kök hücre miktarının azalmasına bağlı olarak kıkırdak onarım sahasındaki hyalin benzeri kıkırdak oluşumunun etkilendiği görülmüştür [47]. Bazı deneysel çalışmalar standart genişlikteki mikrokırık uygulamalara kıyasla, daha derin ve küçük çaplı deliklerle yapılan mikrokırık uygulamalarının, kıkırdak defekt alanında, daha etkili olarak kıkırdak onarımını sağladığını, bunun yanında defekt bölgesinde tip 1'e göre daha yoğun oranda tip 2 kollajen bulunduğunu göstermişlerdir [93].

Son yıllarda kıkırdak iyileşmesine yönelik yapılan çalışmalarda özellikle kıkırdak rejenerasyon işlemlerinde önemli gelişmeler mevcuttur. Mikrokırık gibi subkondral penetrasyon teknikleri sonrasında elde edilen fibrin pıhtının, hasarlı bölgeye gelen kuvvetlere karşı yeterli mekanik stabiliteye sahip olmaması nedeniyle dışardan uygulanan matriksler, endojen hücrelerin sabitlenmesi ve mekanik dayanıklılığının artırılması amacıyla kullanılmaya başlanmıştır [94]. Ana mantık ile bu matriksler; kıkırdak rejenerasyonu oluşana kadar hücrelerin ya da büyüme faktörlerinin hasar içerisinde tutulmasını sağlayan destek yapılarıdır.

Kıkırdak yapısına ve özelliklerine bakıldığında, kıkırdak defekt alanında kullanılacak olan ve kıkırdak görevi görebilecek yapay malzemelerin, iyi biyomekanik özellik ve aşınma direnci göstermesi, kondrosit büyümesini indükleyici yeteneği, kemik tabanı ile sıkı bağlantı sağlayabilmesi ve biyouyumluluk göstermesi gerekmektedir. 3 boyutlu skafold materyallerinin kullanımı, kolay kullanım sağlamasının yanında, kondrositlerin farklılaşmış tiplerinin korunması için ortam sağlamaktadır. Kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımlarından en sık başvurulanlardan biri doğal ve sentetik polimerik skafold kullanımıdır. Hücre iskeleleri biyouyumlu, hücre yapışması, büyümesi ve farklılaşmasına izin veren, üç boyutlu yapısını yeterli süre koruyan, biyolojik olarak çözünebilen, toksik ve immün riski olmayan, üretim süreci belirlenmiş, tekrarlanabilir, ucuz ve kolay üretilen, cerrahi sırasında boyutu ve şekli kolay uyarlanabilen materyaller olmalıdır.

Mevcut prosedürleri daha da geliştirmek için 2 ana strateji üzerinde durulmaktadır. Bunlardan biri cerrahi uygulamaları basitleştirmek, ikincisi doku rejenerasyonunu uyarmak için daha güçlü ajanların kullanılmasıdır. Bu sebeple tek basamaklı hücresiz prosedürler geliştirilmiştir. Tek adımda hücresiz prosedürler kondrosit kültürü ile ilgili problemlerden ve skafoldların genişlemesinden kaçınmak, maliyetleri ve cerrahi zamanı azaltmak için geliştirilmiştir. Bu nedenle hücre içermeyen iskelelerin kullanımı önerilmiş ve popülerlik kazanmıştır. Bu yeni tedavi seçenekleri arasında, osteokondral iskeleler subkondral tabakanın patolojik süreçte dahil olduğu lezyonları tedavi etmek için önerilmiştir [95]. Son dönemde yapılan çalışmaların çoğu, doku mühendisliği teknolojisi ile üretilen polimerlerin yapısal özelliklerinin kendi aralarında kıyaslanması, ya da hücreli ve hücresiz formlarının kıyaslanmasına yoğunlaşmıştır. Polimerler çok değişik özellikte üretilen, biyolojik stratejilere göre kolay modifiye edilebilen, hala üzerinde çalışmaların devam ettiği bileşenlerdir. Pek çoğu kıkırdak rejenerasyonunda kullanılmak için araştırma aşamasındadır [96].

Biz de yaptığımız çalışmada; kıkırdak doku iskelesi üretimi için biyobozunur, hidrofobik yapıda ve FDA onaylı bir polimer olan PLGA polimeri ile PEG yan

dallarına sahip olup hidrofilik yapıda olan FDA onaylı PEGMEMA polimerlerinin moleküler düğümlemesi ile yeni bir doku iskelesi elde ettik. Kemik doku iskelesi üretimi için %50 PLGA polimeri ile %50 HA'den oluşan karışımı kullandık. Son olarak çift katmanlı doku iskelesi üretimi için ise önceden elde edilen kemik doku iskelesi üzerine kıkırdak doku iskelesi için hazırlanan karışımı çözücü dökme yöntemi ile uyguladık.

Elizaveta Kon ve ark. [97], koyun dizinde oluşturdıkları deneysel osteokondral defekt modelinde hücreli ve hücresiz skafold uygulamışlar. Bu uygulamaların aynı ölçüde kıkırdak yüzey rekonstrüksiyonu ve subkondral kemik iyileşmesi sağladığını bulmuşlar. Skafoldların kemik ve hiyalin benzeri kıkırdak rejenerasyon sürecini yönlendirmek ve koordine etmek için kolay uygulanabilen ve güvenli bir matris olabileceğini öne sürmüşlerdir. Biz de yaptığımız çalışmada çift katmanlı hücreli skafold uygulamasının yüzey düzenliliği, osteokondral bağlanma, komşu bağlanma, kıkırdak tıkaç kalitesi gibi değerlendirme parametrelerinde anlamlı histolojik iyileşme sonuçları verdiğini saptadık. Modifiye Mankin skorlama sistemine göre toplam skora bakıldığında kontrol grubuna en çok yaklaşan değerlerin çift katmanlı hücresiz skafold uygulanan C grubuna ait olduğunu belirledik. Bu değerler iyileşme süresi uzadıkça azalmakla beraber hem 4. hafta hem 8. hafta sonuçlarında da geçerlidir. İyileşme dönemi ilerledikçe histolojik kıkırdak iyileşmesindeki azalma tek katmanlı hücresiz skafold uygulanan E grubu hariç diğer dört grupta da saptandı. İlginç olarak E grubunda orta dönem 8. hafta sonuçlarında histolojik olarak anlamlı bir iyileşme saptandı. O'Driscoll skorlama sistemine göre toplam skora bakıldığında kontrol grubuna en çok yaklaşan değerlerin çift katmanlı hücreli skafold uygulanan B grubuna ait olduğunu belirledik. Bu değerler iyileşme süresi uzadıkça azalmakla beraber hem 4. hafta hem 8. hafta sonuçlarında da geçerlidir. İyileşme dönemi ilerledikçe histolojik kıkırdak iyileşmesindeki azalma tek katmanlı hücresiz skafold uygulanan E grubu hariç diğer dört grupta da saptandı. İlginç olarak E grubunda orta dönem 8. hafta sonuçlarında histolojik olarak anlamlı bir iyileşme saptandı.

Kıkırdak doku lezyonunun tedavi seçeneklerinden otolog OKİ allojenik doku kullanılmaması, donör alanda morbid bir lezyon bırakmaması gibi avantajlar

mevcutken; pahalı olması, iki ayrı cerrahi işlem gerektirmesi, laboratuvar transport işlemi, kıkırdak doku oluşumunun uzun süre alması gibi dezavantajları vardır [57], [98]. OKI uygulamasında tek tabakadan oluşan kültürde kondrositler fenotip olarak değişim gösterirler. Homojen dağılım sağlayan hücre süspansiyonunun enjeksiyonu; periost greftinden dışarı çıkarak implantasyon kaybına neden olmaktadır [99]. İkinci nesil OKI üç boyutlu biyolojik matrikslerin kullanıldığı bir yöntem olup implantasyon problemlerinin üstesinden gelmek amacıyla geliştirilmiştir ve klinik kullanımı mevcuttur [100]. Yaptığımız çalışmada, B ve D grubunda yer alan deney hayvanları kondrosit elde etme amacıyla ek olarak bir cerrahi prosedüre maruz bırakılmıştır. Elde edilen kondrositler çoğaltılarak iki katmanlı ve tek katmanlı oluşturulan 3 boyutlu skafoldlara transfer edilerek tekrar deney hayvanındaki osteokondral defekte implante edilmiştir.

Modifiye Mankin sınıflamasına göre morfolojik alanın 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; kontrol grubu olan A grubuna en yakın değerlerin B ve D grubunda olduğu saptandı. 8. hafta yani orta dönem sonuçları değerlendirildiğinde de minimal azalma ile birlikte aynı sonuçların olduğu görüldü. Bu durum, hücreli skafold kullanımının morfolojik alan değişimlerinde olumlu sonuç etkisini göstermektedir. Skafold katmanlarının sonuca etkisi değerlendirildiğinde ise çift katmanlı skafold uygulamanın hem hücreli hem hücresiz kullanımda tek katmanlı skafolda göre morfolojik alan skorunda minimal artış etkisi görülmektedir. Bu etki akut dönemde orta döneme nazaran biraz daha yüksek saptanmıştır.

Modifiye Mankin sınıflamasına göre yüzey düzenliliğinin 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; B grubunun kontrol grubu olan A grubu değerleri ile eşit değerde olduğu ve diğer üç gruba göre anlamlı derecede yüksek değerde olduğu görüldü. 8. hafta yani orta dönem sonuçlarına bakıldığında ise B grubu sonuçlarının kontrol grubuna göre daha da yüksek değerlerde olduğu görülmüştür. Yüzey düzenliliğinin çift katmanlı hücreli skafold ile daha yüksek değerlerde olması sinerjik etki ile yüzey iyileşmesinin arttığını düşündürmektedir.

Modifiye Mankin sınıflamasına göre komşu bağlanmanın 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; kontrol grubuna en yakın değerler C grubunda saptanmış olup akut dönemde komşu bağlanmanın çift katmanlı hücresiz skafold ile en güçlü olduğu söylenebilir. Bunun aksine komşu bağlanma en az E grubunda tespit edilmiş olup tek katmanlı skafoldun komşu bağlanmaya etkisinin zayıf olduğu söylenebilir. 8. hafta yani orta dönem sonuçlara baktığımızda ise E grubu değerlerinin anlamlı derecede yükselerek kontrol grubu ile aynı seviyelere çıktığı görülmektedir.

Modifiye Mankin sınıflamasına göre hücre popülasyonunun 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; kontrol grubuna göre B ve D grubunda beklenenin aksine çok düşük değerler saptanmıştır. Bu düşük değerler orta dönem sonuçlarında da azalarak devam etmiştir. B ve D grubundaki bu düşük değerlerin nedeni, skafold içerisinde canlılığı görülen kondrosit hücrelerinin nakil sonrası canlı doku ile reaksiyona girerek ölümü olarak değerlendirilmiştir. Hücre popülasyonu değerlendirmesinde akut ve orta dönem en iyi sonuçlar kontrol grubunda görülmektedir.

Modifiye Mankin sınıflamasına göre kırıldak tıkaç kalitesinin 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; C grubu değerlerinin kontrol grubunu da geçerek en yüksek seviyede olduğu görülmüştür. Ancak orta dönem sonuçlarında C grubu bu yüksek değerleri koruyamamış ve kontrol grubunun gerisine düşmüştür. Genel olarak sonuçlara baktığımızda ise yine iyileşmede en yüksek değerler kontrol grubu olan A grubunda saptanmıştır. Bunun nedeni olarak da iyileşme dönemi ilerledikçe kondrosit hücrelerinin canlılığını koruyamaması olarak değerlendirilebilir.

O'Driscoll sınıflamasına göre morfolojik alanın 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; B ve C grubun kontrol grubuna göre minimal düşük puan aldığı görülmüş ve çift katmanlı skafoldun etkinliği tek katmanlı skafolda göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 8. hafta orta dönem sonuçları değerlendirildiğinde en yüksek skorun C grubunda olduğu görülmüştür. Tüm iyileşme dönemi değerlendirildiğinde en yüksek skorun yine kontrol grubu olan A grubunda olduğu

görülmüş ve ek olarak da en düşük değerlerin tek katmanlı skafold uygulanmasında olduğu belirlenmiştir.

O'Driscol sınıflamasına göre matriksin 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B grubunda, en uzak değerler ise E grubunda saptanmıştır. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde ise yine en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B grubunda, en uzak değerler ise akut döneme göre hafif artış olmasına rağmen E grubunda saptanmıştır.

O'Driscol sınıflamasına göre yüzey düzensizliğinin 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B grubunda, en uzak değerler ise E grubunda saptanmıştır. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde ise en yüksek skor A ve B gruplarında saptanmış, E grubu skorları da anlamlı bir artış ile A ve B grubu değerlerine yakın skorlara gelmiştir.

O'Driscol sınıflamasına göre yapısal bütünlüğün 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B grubunda, en uzak değerler ise E grubunda saptanmıştır. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B grubunda saptanmış, E grubu skorları da anlamlı bir artış ile B grubu değerlerine yakın skorlara gelmiştir.

O'Driscol sınıflamasına göre kalınlık/yara dolgusunun 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B ve C grubunda, en uzak değerler ise E grubunda saptanmıştır. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B grubunda saptanmış, E grubu skorları da anlamlı bir artış ile B grubu değerlerine yakın skorlara gelmiştir.

O'Driscol sınıflamasına göre osteokondral bağlanmanın 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skorların sırasıyla A, B ve C gruplarında olduğu, en düşük skorun ise E grubunda olduğu saptanmıştır. 8. hafta orta dönem

sonuçları incelendiğinde en yüksek skor B saptanmış ve bu durum çift katmanlı skafoldun osteokondral bağlanmada etkili olabileceğini düşündürmektedir.

O'Driscol sınıflamasına göre komşu bağlanmanın 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B ve C grubunda, en uzak değerler ise E grubunda saptanmıştır. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde en yüksek skor kontrol grubunda saptanmış ve bu değerlere en yakın değerler B grubunda saptanmış, E grubu skorları da anlamlı bir artış ile B grubu değerlerine yakın skorlara gelmiştir. Komşu bağlanmada çift katmanlı skafoldun akut dönemde etkinliği saptanmış olup hücre takviyesi ile bu etkinliği orta dönemde de sürdürdüğü görülmüştür. Skafold içerisine yerleştirilen kondrosit hücrelerinin etkinliğinin devam etmesiyle akut ve orta dönem sonuçlarında değişiklik olmaması üzerine bu kanıya varılmıştır.

O'Driscol sınıflamasına göre hücre yoğunluğunun 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skorların sırasıyla C, B ve A gruplarında olduğu, en düşük skorun ise D grubunda olduğu saptanmıştır. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde en yüksek skorların sırasıyla E, B ve A gruplarında olduğu, en düşük skorun ise D grubunda olduğu saptanmıştır. Çift katmanlı skafoldun hücre yoğunluğu üzerine etkisinin tek katmanlı skafolda göre daha fazla olduğu sonucu çıkarılmıştır.

O'Driscol sınıflamasına göre kümeleşme dağılımının 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skorun kontrol grubunda olduğu sonrasında ise az bir farkla B ve C grubunda olduğu görülmüştür. En düşük skorun ise D grubunda olduğu belirlenmiştir. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde en yüksek skorun kontrol grubunda olduğu sonrasında ise az bir farkla B grubunda olduğu görülmüş ancak E grubu skorunun ani bir artışla B grubu değerlerine çok yaklaştığı belirlenmiştir. Genel kanı olarak iyileşme süresi uzadıkça kümeleşme dağılım skorlarının arttığı saptanmıştır.

O'Driscol sınıflamasına göre subkondral kemiğin 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skorun kontrol grubunda olduğu sonrasında

ise az bir farkla B ve C grubunda olduğu görölmüştür. En düşük skorun ise D grubunda olduğu belirlenmiştir. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde E grubu skorunun ani bir artışla en yüksek değere ulaştığı görölmüştür. Genel kanı olarak iyileşme süresi uzadıkça E grubu hariç subkondral kemik skorlarının azaldığı ancak E grubunda ani bir artışla en yüksek değerlerin bulunduğu görölmüştür.

O'Driscoll sınıflamasına göre hücre popölasyonunun 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skorun kontrol grubunda olduğu sonrasında ise az bir farkla B ve C grubunda olduğu görölmüştür. En düşük skorun ise D grubunda olduğu belirlenmiştir. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde en yüksek skorun kontrol grubunda olduğu sonrasında ise az bir farkla B ve ani bir artışla E grubunda olduğu görölmüştür. En düşük skor ise yine D grubunda saptanmıştır.

O'Driscoll sınıflamasına göre kırıkta tıkaç kalitesinin 4. hafta yani akut dönem sonuçları incelendiğinde; en yüksek skorun kontrol grubu ve B grubunda olduğu, sonrasında az bir farkla C grubunda olduğu görölmüştür. En düşük skorun ise D grubunda olduğu belirlenmiştir. 8. hafta orta dönem sonuçları incelendiğinde en yüksek skorun B grubunda olduğu saptanmıştır. Genel kanı olarak iyileşme süresi uzadıkça E grubu hariç kırıkta tıkaç kalitesi skorlarının azaldığı ancak E grubunda ani bir artışla yükseldiğı görölmüştür.

Yapılan deneysel çalışma sonunda elde ettiğimiz en önemli bulgu, kırıkta defekt sahasında kullanılan çift katmanlı skafoldun akut ve orta dönemde sağlam kırıkta olan doku bütünlüğüne ve oluşan tamir dokusunun yüzey düzenliliğı, osteokondral ve komşu bağlanmasına bakıldığında tek katmanlı skafold uygulamalarından daha iyi histolojik sonuçlar göstermesidir. Ek olarak nakledilen kondrosit hücrelerinin çift katmanlı skafold zemininde uygulanmasının tek katmanlı skafold zemininde uygulanmasına göre daha iyi histolojik sonuçlar gösterdiğidir.

6. SONUÇ

Son yıllarda kıkırdak doku ile ilgilenen bilim adamları, sinoviyal eklemlerde hasar sonrası onarımın, rejenerasyon yeteneği sınırlı olan kıkırdak dokuda kıkırdak kaybının ve kıkırdak dokudaki ilerleyici dejenerasyonunun tedavisinde yeni yaklaşım yolları üzerinde çalışmaktadır. Ortopedik kıkırdak lezyonları özellikle genç popülasyonda yaygınlaşmakta ve tedavileri de son dönemde ilgi çekici hale gelmektedir. Cerrahi öncesi tedaviler, cerrahi girişimler ve doku mühendisliği yoğun olarak kullanılmaktadır. Ancak tedavi seçeneklerinden hiçbirisi yüzde yüz sonuç elde edememiştir.

Yaptığımız bu çalışmada laboratuvar ortamında üretilen çift katmanlı ve tek katmanlı skafoldları hücreli ve hücresiz olarak mikrokırık zemininde oluşturulan osteokondral defektlere uygulayarak kıkırdak doku iyileşmesini elde etmeyi ve iyileşen dokuları histolojik olarak karşılaştırmayı amaçladık. Deneysel çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar şöyledir:

1. Skafoldların hücreli kullanımının morfolojik alan değişimlerinde olumlu sonuç etkisini gösterildi. Skafold katmanları karşılaştırıldığında ise çift katmanlı skafold uygulamanın hem hücreli hem hücresiz kullanımda tek katmanlı skafolda göre morfolojik alan skorunda minimal artış etkisi görülmektedir. Bu etki akut dönemde orta döneme nazaran biraz daha yüksek saptanmıştır.
2. Yüzey düzenliliğinde çift katmanlı hücreli skafold grubunda kontrol grubundan da daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuç, skafold ve hücrelerin sinerjik etkisi ile yüzey iyileşmesinin arttığını düşündürmektedir.
3. Komşu bağlanmanın akut iyileşme döneminde çift katmanlı hücresiz skafold ile en yüksek skorlar elde edilmişken, orta dönem iyileşmesinde ise tek katmanlı hücresiz skafold ile en yüksek skorların elde edilmesi dikkat çekici olmuştur.
4. Hücre popülasyonunun akut dönem sonuçları incelendiğinde; kontrol grubuna göre hücreli çift ve tek katmanlı skafold grubunda beklenenin aksine çok düşük değerler saptanmıştır. Bu düşük değerler orta dönem sonuçlarında da azalarak devam etmiş olup nedeni, skafold içerisinde

canlılığı görülen kondrosit hücrelerinin nakil sonrası canlı doku ile reaksiyona girerek ölümü veya skafold içerisinde canlılığını devam ettiremediği olarak değerlendirilmiştir. Hücre popülasyonu değerlendirmesinde akut ve orta dönem en iyi sonuçlar kontrol grubunda görülmüştür.

5. Kıkırdak tıkaç kalitesinin akut dönem sonuçları incelendiğinde çift katmanlı hücresiz skafold etkinliği anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak bu etkinlik orta dönem sonuçlarına yansıyamamıştır. İyileşmede en yüksek değerler kontrol grubu olan A grubunda saptanmıştır. Bunun nedeni olarak da iyileşme dönemi ilerledikçe kondrosit hücrelerinin canlılığını koruyamaması olarak değerlendirilebilir.
6. İyileşmede matriksin durumu incelendiğinde; tüm iyileşme döneminde kontrol grubuna en yakın skor çift katmanlı hücreli skafold grubunda saptanmış olup çift katmanlı skafoldun tek katmanlı skafolda göre daha iyi matriks oluşturduğu görülmektedir.
7. Yapısal bütünlüğün tüm dönem sonuçlarında çift katmanlı hücreli skafoldun iyileşmiş kıkırdak dokusunda yapısal bütünlüğünün daha iyi olduğu görüldü. İlginç olarak tek katmanlı hücresiz skafoldun orta dönem sonuçlarında anlamlı bir artış saptandı. Uzun dönem sonuçlarının da değerlendirilmesi ile tek katmanlı hücresiz skafoldun yapısal bütünlük skorunda daha yüksek skorlar alabileceği düşünülebilir.
8. Çift katmanlı skafoldun yara dolgusunda daha etkili bir tedavi yöntemi olduğu görülmüştür. Kemik ara yüzeyinin akut dönemde osteokondral defekt iyileşmesinde yara dolgusuna etkisi olduğu düşünülmüştür. Orta dönem sonuçlarında ise tek katmanlı hücresiz skafold etkinliği belirgin şekilde artmıştır.
9. Osteokondral bağlanmada çift katmanlı skafoldun etkinliği belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Bu durum, bizlere kemik ara yüzeyinin osteokondral iyileşme için gerekli olduğu sonucunu göstermiştir.
10. Komşu bağlanmada çift katmanlı skafoldun akut dönemde etkinliği saptanmış olup hücre takviyesi ile bu etkinliği orta dönemde de sürdürdüğü görülmüştür. Skafold içerisine yerleştirilen kondrosit

hücrelerinin etkinliğinin devam etmesiyle akut ve orta dönem sonuçlarında değişiklik olmaması üzerine bu kanıya varılmıştır.

11. Akut dönemde en yüksek hücre yoğunluğu çift katmanlı hücresiz skafold grubunda saptanırken, orta dönemde ise tek katmanlı hücresiz skafold grubunda saptanmıştır. Bu durum beklenenin aksine nakledilen hücrelerin dezavantaj oluşturarak iyileşme dokusunda canlılıklarını koruyamadıklarını göstermektedir. Ek olarak çift katmanlı skafoldun hücre canlılığını devam ettirmesi üzerine etkisinin tek katmanlı skafolda göre daha fazla olduğu sonucu çıkarılmıştır.
12. Kümeleşme dağılım incelendiğinde, akut dönem sonuçlarında çift katmanlı skafold etkinliği iyi iken, orta dönemde tek katmanlı skafold etkinliği belirgin şekilde artmıştır. Genel kanı olarak iyileşme süresi uzadıkça kümeleşme dağılım skorlarının arttığı saptanmıştır.
13. Subkondral kemik iyileşmesi incelendiğinde, akut dönem sonuçlarında çift katmanlı skafold etkinliği iyi iken orta dönemde tek katmanlı skafold etkinliği belirgin şekilde artmıştır. Genel kanı olarak iyileşme süresi uzadıkça subkondral kemik skorlarının azaldığı görülmüş ancak tek katmanlı hücresiz skafold grubunda ani bir artışla en yüksek değerlerin bulunduğu görülmüştür. Buradan yola çıkarak uzun dönem tedavide tek katmanlı skafoldların daha etkili olabileceği kanısına varılabilir.
14. Mankin skorlaması toplam skoruna bakıldığında; akut dönem iyileşmede çift katmanlı skafoldun daha etkin olduğu bulunmuş iken orta dönem sonuçlarında gruplar arası anlamlı bir fark elde edilememiştir. Uzun dönem sonuçlarında en etkin tedavinin mikrokirik uygulanan kontrol grubu olduğu düşünülebilir.
15. O'Driscoll skorlaması toplam skoruna bakıldığında; akut dönem iyileşmede çift katmanlı skafoldun daha etkin olduğu bulunmuş iken bu skafoldun hücreli uygulanması ile çok daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar orta dönem sonuçlarına da yansımıştır.
16. Son olarak kontrol grubu olan mikrokirik grubunda histolojik olarak en yüksek iyileşme skorları elde edilmiştir. Kıkırdak hasarı sonrası erken

dönem tedavide mikrokırık yöntemi eklenmesi tedavi sonuçlarında yüz güldürücü etki yapabilmektedir. Mikrokırık yöntemine en yakın iyileşme parametreleri ise çift katmanlı hücreli skafold grubunda elde edilmiştir. Buradan yola çıkarak subkondral dokunun kırıldak doku iyileşmesinde gerekli bir yapı olduğu kanısına varılmıştır.



7. ÖZET

Amaç: Laboratuvar ortamında üretilen çift katmanlı ve tek katmanlı skafoldları hücreli ve hücresiz olarak mikrokirik zemininde oluşturulan osteokondral defektlere uygulayarak kırıldak doku iyileşmesini elde etmeyi ve iyileşen dokuları histolojik olarak karşılaştırmaktır.

Materyal Metod: Çalışmada ortalama yaşları 3 ay olan toplam 70 adet Wester Albino türü erkek rat kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 14 adet rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Her grupta sağ femur trohlear bölgesiye 2 mm çapında 1 mm derinliğinde osteokondral defekt oluşturulduktan sonra 0.8 mm kirschner teli ile mikrokirik işlemi uygulandı. Daha sonra kontrol grubu hariç her gruba belirlenen özel skafold uygulaması yapıldı. Cerrahi sonrası 4. hafta erken dönem iyileşmeyi, 8. hafta orta dönem iyileşmeyi değerlendirmek amacıyla her gruptan 4. hafta 6 rat, 8. hafta 6 rat kurban edildi. En az 6 denek kullanarak yapılan çalışmada güç analizi sonucu %95 olarak hesaplandı. Kullanılan Wester Albino türü denek hayvanlarının DNA benzerliği %99 olması çalışmamızın güç analizini kuvvetlendirmiştir.

Gruplar, kurban zamanlarına göre yüksek doz anestezi madde enjeksiyonu ile kurban edildi. Ratların sağ femur distalleri çıkartıldıktan sonra elde edilen materyaller %10'luk tamponlanmış formalinde 1 hafta süre ile fiks edildi. Fiksasyondan sonra materyaller %50'lik formik asit ve %20'lik sodyum sitrat çözeltilerinden hazırlanan solüsyonda dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrası kemik doku örnekleri parafin bloklara gömülerek mikrotom ile 5-7 µm kalınlığındaki kesitler lamalar üzerine alındı. Bu kesitler Hematoksilen-Eozin ve Masson's Tricrom boyama yöntemiyle boyanıp, Modified Mankin ve O'Driscoll skalasına göre değerlendirmeleri yapıldı.

Değişkenler; Kolmogorov Smirnov testi ve Histogram ile incelenmiş ve normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin üç ve üzeri gruplar arasında karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi sonucunda anlamlı bir farklılığın elde edilmesi durumunda farkın hangi gruplar arasından kaynaklandığını belirlemek amacıyla ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi yapılmıştır. Bütün analizlerde IBM SPSS.23 programı kullanılmış

ve anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ değeri kabul edilmiştir.

Bulgular: Skafoldların hücreli kullanımının morfolojik alan değişimlerinde olumlu sonuç etkisini gösterildi. Skafold katmanları karşılaştırıldığında ise çift katmanlı skafold uygulamanın hem hücreli hem hücresiz kullanımda tek katmanlı skafolda göre morfolojik alan skorunda minimal artış etkisi görülmektedir. Yüzey düzenliliğinde çift katmanlı hücreli skafold grubunda kontrol grubundan da daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Komşu bağlanmanın akut iyileşme döneminde çift katmanlı hücresiz skafold ile en yüksek skorlar elde edilmiştir. Hücre popülasyonunun akut dönem sonuçları incelendiğinde; kontrol grubuna göre hücreli çift ve tek katmanlı skafold grubunda beklenenin aksine çok düşük değerler saptanmıştır. Hücre popülasyonu değerlendirmesinde akut ve orta dönem en iyi sonuçlar kontrol grubunda görülmüştür. Kıkırdak tıkaç kalitesinin akut dönem sonuçları incelendiğinde çift katmanlı hücresiz skafold etkinliği anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ancak bu etkinlik orta dönem sonuçlarına yansıyamamıştır. İyileşmede matriksin durumu incelendiğinde; tüm iyileşme döneminde kontrol grubuna en yakın skor çift katmanlı hücreli skafold grubunda saptanmış olup çift katmanlı skafoldun tek katmanlı skafolda göre daha iyi matriks oluşturduğu görülmektedir. Yapısal bütünlüğün tüm dönem sonuçlarında çift katmanlı hücreli skafoldun iyileşmiş kıkırdak dokusunda yapısal bütünlüğünün daha iyi olduğu görüldü. Çift katmanlı skafoldun yara dolgusunda daha etkili bir tedavi yöntemi olduğu görülmüştür.

Osteokondral bağlanmada çift katmanlı skafoldun etkinliği belirgin şekilde yüksek bulunmuştur. Komşu bağlanmada çift katmanlı skafoldun akut dönemde etkinliği saptanmış olup hücre takviyesi ile bu etkinliği orta dönemde de sürdürdüğü görülmüştür. Kümeleşme dağılımı incelendiğinde, akut dönem sonuçlarında çift katmanlı skafold etkinliği iyi iken, orta dönemde tek katmanlı skafold etkinliği belirgin şekilde artmıştır. Subkondral kemik iyileşmesi incelendiğinde, akut dönem sonuçlarında çift katmanlı skafold etkinliği iyi iken orta dönemde tek katmanlı skafold etkinliği belirgin şekilde artmıştır.

Sonuç: Mankin skorlaması toplam skoruna bakıldığında; akut dönem iyileşmede çift katmanlı skafoldun daha etkin olduğu bulunmuş iken orta dönem sonuçlarında gruplar arası anlamlı bir fark elde edilememiştir. Uzun dönem sonuçlarında en

etkin tedavinin mikrokırık uygulanan kontrol grubu olduğu görölmüştür.

O'Driscoll skorlaması toplam skoruna bakıldığında; akut dönem iyileşmede çift katmanlı skafoldun daha etkin olduğu bulunmuş iken bu skafoldun hücreli uygulanması ile çok daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar orta dönem sonuçlarına da yansımıştır. Çift katmanlı skafold, mikrokırık uygulanan tedaviye alternatif olarak değerlendirilebilir.

Genel olarak kontrol grubu olan mikrokırık grubuna en yakın iyileşme parametreleri hücreli çift katmanlı skafold grubunda elde edilmiştir. Osteokondral kırıldak defektlerinde mikrokırık yöntemi ile iyileşme hala güncelliğini korumaktadır. Kırıldak doku mühendisliği ile üretilen çeşitli skafoldlar ile histolojik olarak daha iyi sonuçlar alınabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Osteokondral defekt, Kırıldak, Skafold, Hayvan deneyi

8. ABSTRACT

Objective: To compare double-layer and single-layer scaffolds produced in a laboratory environment with tissues with cartilage tissue healing by applying it to osteochondral defects created by the microfracture methods, with and without cells.

Material and Method: A total of 70 Wester Albino male rats with an average age of 3 months were used in the study. Experimental animals were divided into 5 groups with 14 rats in each group. After creating an osteochondral defect with a diameter of 2 mm and a depth of 1 mm in the right femoral trochlear region in each group, microfracture was performed with a 0.8 mm Kirschner wire. After that, a special scaffold was applied to each group, except the control group. 6 rats from each group were sacrificed in the 4th week to evaluate the early recovery, and in the 8th week to evaluate the mid-term recovery after surgery. By using at least 6 subjects in the study, the power analysis result was 95%. The DNA similarity of the Wester Albino type experimental animals used shown as 99% strengthened the power analysis of our study.

The groups were sacrificed by injection of high-dose anesthetic according to the time of sacrifice. Materials obtained after removal of the right distal femur bones of the rats were fixed in 10% buffered formalin for 1 week. After fixation, the materials were decalcified in a solution prepared from 50% formic acid and 20% sodium citrate solutions. After decalcification, bone tissue samples were embedded in paraffin blocks and 5-7 μ m thick sections cut with a microtome were taken on slides. These sections were stained with Hematoxylin-Eosin and Masson's Tricrom staining method and evaluated according to Modified Mankin and O'Driscoll scales.

Variables were examined with the Kolmogorov Smirnov test and Histogram, and the Kruskal-Wallis test was used to compare the continuous variables that did not show normal distribution in 3 or more groups. When a significant difference is obtained as a result of the Kruskal-Wallis test, the Mann-Whitney test with Bonferroni correction was used to determine the groups causing the difference.

IBM SPSS.23 program was used in all analyzes and $p < 0.05$ value was accepted as the level of significance.

Results: The cellular use of scaffolds showed a positive effect on morphological field changes. When the scaffold layers were compared, a minimal increase in the morphological area score of the double-layered scaffold application was observed compared to the single-layered scaffold, both with and without cells. In the surface regularity, better results were obtained in the double-layered cellular scaffold group compared to the control group. The highest scores of adjacent attachment were obtained with the double-layered cell-free scaffold during the acute recovery period. When the acute period results of the cell population are examined; Contrary to expectations, very low values were found in the cellular double and single layered scaffold groups compared to the control group. In cell population assessment, the best results in the acute and mid-term were found in the control group. When the acute period results of cartilage plug quality were examined, the efficiency of the double-layered cell-free scaffold was found to be significantly higher. However, this efficiency was not reflected in the mid-term results. When the state of the matrix is examined in recovery; During the whole recovery period, the closest score to the control group was found in the double-layered cellular scaffold group, and it was found that the double-layered scaffold forms a better matrix than the single-layered scaffold. In all-term results of structural integrity, it was observed that the structural integrity of the double-layered cellular scaffold was better in the healed cartilage tissue. It has been observed that the double-layered scaffold is a more effective treatment method in wound filling.

The efficiency of the double-layered scaffold in osteochondral attachment was found to be significantly higher. The efficiency of the double-layered scaffold in adjacent attachment was detected in the acute period, and it was observed that this efficiency continued in the mid-term with cell reinforcement. When the cluster distribution is examined, while the double-layer scaffold had a good efficacy in the acute phase results, the effectiveness of medium-term single-layered scaffold has increased significantly. When subchondral bone healing is examined, while

double-layered scaffold activity was good in the acute period, single-layered scaffold activity increased significantly in the mid-term.

Conclusion: Considering the total score of Mankin scoring; While the double-layered scaffold was found to be more effective in acute recovery, no significant difference was found between the groups in the mid-term results. In the long-term results, the most effective treatment was the microfracture-performed control group. Considering the total score of O'Driscoll scoring; While the double-layered scaffold was found to be more effective in acute healing, much better results were obtained with the cellular application of this scaffold. These results were also found in the mid-term results. Double-layered scaffold can be considered as an alternative to microfracture treatment. Generally, the closest healing parameters to the microfracture group, which is the control group, were obtained in the cellular double-layered scaffold group. Recovering with the microfracture method in osteochondral cartilage defects is still up to date. Better results can be obtained histologically with various scaffolds produced by cartilage tissue engineering.

9. KAYNAKLAR

- [1] Xu X et al. Full-thickness cartilage defects are repaired via a microfracture technique and intraarticular injection of the small-molecule compound kartogenin. *Arthritis Res. Ther.* 2015; 17:20.
- [2] Tiwary R, Amarpal H, Aithal P, Kinjavdekar P, Pawde AM, Singh R. Effect of IGF-1 and Uncultured Autologous Bone-Marrow-Derived Mononuclear Cells on Repair of Osteochondral Defect in Rabbits. *Cartilage* 2014; 5(1): 43-54.
- [3] Gugjoo MB et al. Mesenchymal stem cells with IGF-1 and TGF- β 1 in laminin gel for osteochondral defects in rabbits. *Biomed Pharmacother* 2017; 93: 1165-1174.
- [4] H. W. Of the structure and diseases of articular cartilages. *Clinical Orthop. Relat. Res* 1995: 317; 3-6.
- [5] Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997; 13: 456-460.
- [6] Sophia F, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* 2009; 1(6); 461-468.
- [7] Freemont AJ. Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage. *Eur. J. Radiol* 2006; 57: 32-36.
- [8] Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr. Cartil* 2002; 10(6) 432-463.
- [9] Kocaoglu B, Martin J, Wolf B, Karahan M, Amendola A. The effect of irrigation solution at different temperatures on articular cartilage metabolism. *Arthroscopy* 2011; 27: 526-31.
- [10] Graf J, Neusel E, Schneider E, Niethard FU. Intra-articular treatment with hyaluronic acid in osteoarthritis of the knee joint: a controlled clinical trial versus mucopolysaccharide polysulfuric acid ester. *Clin. Exp. Rheumatol*

1993; 11(4): 367-72.

- [11] Simon DW, Jackson TM. Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. *Sport. Med. Arthrosc* 2018; 26(1): 31-39.
- [12] Pitsillides AA, Will RK, Bayliss MT, Edwards JC. Circulating and synovial fluid hyaluronan levels. Effects of intraarticular corticosteroid on the concentration and the rate of turnover. *Arthritis Rheum* 1994; 37(7): 1030-8.
- [13] M. Decker, R. S., Koyama, E. & Pacifici, “Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions.,” *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 13, pp. 407–414, 2015.
- [14] Decker RS, Koyama E, Pacifici M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. *Current Osteoporosis Reports* 2015; 13(6): 407-14.
- [15] Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: A template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2001; 39: 26-33.
- [16] Adam C, Eckstein F, Milz S, Schulte E, Becker C, Putz R. The distribution of cartilage thickness in the knee-joints of old-aged individuals measurement by A-mode ultrasound. *Clin. Biomech* 1998; 13: 1-10.
- [17] Kovach IS. A molecular theory of cartilage viscoelasticity. *Biophys Chem* 1996; 59(1-2): 61-73.
- [18] Eyre D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Research* 2002; 4(1): 30-35.
- [19] Gartner LP. Color atlas and text of histology. Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
- [20] Newman AP. Articular cartilage repair. *American Journal of Sports Medicine* 1998; 26(2): 309-324.

- [21] Aytekin K. Tavşanlarda oluşturulan eklem kıkırdak defektlerinin tedavisinde pedüküllü sinovya grefti ile periost greft naklinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Başkent Üniversitesi, Ankara, 2006.
- [22] Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. J. Bone Jt. Surg. Am 1971; 53: 523-37.
- [23] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis and Rheumatism 1998; 41(8): 1331-1342.
- [24] Skinner H. Current Diagnosis & Treatment in Orthopedics. California: Lange Medical Books, 2006.
- [25] Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. Cell Research 2002; 12(1): 19-32.
- [26] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr. Course Lect 1998; 47: 477-486.
- [27] Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. Instructional Course Lectures-American Academy of Orthopaedic Surgeons 2005; 54: 465-80.
- [28] Mankin HJ, Mow VC. Articular cartilage repair and osteoarthritis. Orthop. basic Sci 2000; 2: 472-488.
- [29] Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. J Bone Jt. Surg 1982; 64(3): 460-6.
- [30] Buckwalter JA, Mow VC, Mankin HJ. Articular Cartilage. Structure, function, metabolism, injury, pathogenesis. The Adult Knee 2003; 1: 225-236.
- [31] Kock NB, Smolders JMH, Van Susante JLC, Buma P, Van Kampen A, Verdonschot N. A cadaveric analysis of contact stress restoration after

- osteochondral transplantation of a cylindrical cartilage defect. *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc* 2008; 16(5): 461-68.
- [32] Coons DA, Barber FA. Arthroscopic osteochondral autografting. *Orthopedic Clinics of North America* 2005; 36(4): 447-58.
- [33] Nehrer S, Chiari C, Domayer S, Barkay H, Yayon A. Results of chondrocyte implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: A preliminary study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2008; 466(8): 1849-55.
- [34] Bobic V, Noble J. Articular cartilage--to repair or not to repair. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 2000; 82(2): 165-6.
- [35] Hangody L, Kish G, Karpati Z, Udvarhelyi I, Szigeti I, Bely M. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics* 1998; 21(7): 751-6.
- [36] Garrett JC. Osteochondral allografts for reconstruction of articular defects of the knee. *Instr. Course Lect* 1998; 47: 517-22.
- [37] Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artif. Organs* 2001; 25(3): 172-9.
- [38] Rodrigo JJ. New techniques of cartilage healing cartilage grafting. *Sport. Med. Arthroscopy Rev* 1998; 6(2): 131.
- [39] Steadman JR, Rodkey WG, Singelton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results. *Operative techniques in orthopaedics* 1997; 7(4): 300-4.
- [40] Bae DK, Yoon KH, Song SJ. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy* 2006; 22: 367-74.vol.
- [41] Cole BJ, Lee SJ. Complex knee reconstruction: articular cartilage treatment options. *Arthroscopy* 2003; 19(1): 1-10.
- [42] Guzmán-Morales J et al. Subchondral chitosan/blood implant-guided bone

plate resorption and woven bone repair is coupled to hyaline cartilage regeneration from microdrill holes in aged rabbit knees. *Osteoarthr. Cart* 2014; 22: 323-33.

- [43] Mainil-Varlet P et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J. Bone Jt. Surg. Am* 2003; 85-A: 45-57.
- [44] Jakobsen RB, Engebretsen L, Slauterbeck JR. An analysis of the quality of cartilage repair studies. *J. Bone Jt. Surg. Am* 2005; 87: 2232-9.
- [45] Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J. Bone Jt. Surg. Am* 1976; 58: 230-3.
- [46] Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials* 2005; 26: 3617-29.
- [47] Mithoefer K, Williams RJ, Warren RF, Potter HG, Spock CR, Jones EC. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. *Surgical technique. J. Bone Jt. Surg. Am* 2006; 88(1): 294-304.
- [48] Van Bergen CJ, Leeuw PA, Van Dijk CN. Treatment of osteochondral defects of the talus. *Rev. Chir. Orthop. Reparatrice Appar. Mot* 2008; 94: 398-408.
- [49] Bobić V. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee Surg. Sport. Traumatol. Arthrosc* 1996; 3: 262-4.
- [50] Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg. Sport. Traumatol. Arthrosc* 1997; 5: 262-7.

- [51] Terukina M et al. Analysis of the thickness and curvature of articular cartilage of the femoral condyle. *Arthroscopy* 2003; 19: 969-73.
- [52] Ahmad CS, Guiney WB, Drinkwater JC. Evaluation of donor site intrinsic healing response in autologous osteochondral grafting of the knee. *Arthroscopy* 2002; 18: 95-8.
- [53] Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993; 9: 318-21.
- [54] Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J. Bone Jt. Surg. Br* 1968; 50: 184-97.
- [55] Bentley G, Greer RB. Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature* 1971; 230: 385-8.
- [56] Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J. Bone Jt. Surg. Am* 2003; 85-A: 17-24.
- [57] Dozin B et al. Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. *Clin. J. Sport Med* 2005; 15: 220-6.
- [58] Minas T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin. Orthop. Relat. Res* 2001: 349–61.
- [59] Gillogly SD, Voight M, Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J. Orthop. Sport. Phys. Ther* 1998; 28: 241-51.
- [60] Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in

cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J. Bone Jt. Surg. Am* 2003; 85-A: 185-92.

- [61] Tallheden T et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis Res. Ther* 2005; 7: 560-8.
- [62] Bentley G et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J. Bone Jt. Surg. Br* 2003; 85: 223-30.
- [63] Wood JJ et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J. Bone Jt. Surg. Am* 2006; 88: 503-7.
- [64] Zaslav K et al. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am. J. Sport. Med* 2009; 37: 42-55.
- [65] Niemeyer P et al. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *J. Sport. Med* 2008; 36: 2091-9.
- [66] Goessler UR et al. Expression of collagen and fiber-associated proteins in human septal cartilage during in vitro dedifferentiation. *Int. J. Mol. Med* 2004; 14: 1015-22.
- [67] Goessler UR et al. In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture. *Int. J. Mol. Med* 2006; 17: 301-7.
- [68] Homicz MR et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *Laryngoscope* 2003;113: 25-32.
- [69] Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged

- articular chondrocyte subpopulations. *J. Orthop. Res* 2005; 23: 425-32.
- [70] Hidaka C, Cheng C, Alexandre D, Bhargava M, Torzilli P. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes. *Cell Tissue Res* 2006; 323: 127-35.
- [71] Tay AG et al. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue Eng* 2004; 10(5-6): 762-70.
- [72] Zuk PA et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 2002; 13: 4279-95.
- [73] Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2006; 343: 644-52.
- [74] Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1222-32.
- [75] Toh WS et al. Effects of culture conditions and bone morphogenetic protein 2 on extent of chondrogenesis from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 950-60.
- [76] Bryant SJ, Anseth KS. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. *J. Biomed. Mater. Res* 2003; 64-A: 70-9.
- [77] Gouze JN, Evans CH, Ghivizzani SC, Gouze E. Gene therapy for osteoarticular disorders. *Med. Sci.* 2007; 23: 303-9.
- [78] Grande DA, Mason J, Light E, Dines D. Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair. *J. Bone Jt. Surg. Am* 2003; 85-A: 111-6.
- [79] Chen L, Liu J, Guan M, Zhou T, Duan X, Xiang Z. Growth Factor and Its

Polymer Scaffold-Based Delivery System for Cartilage Tissue Engineering. *Int. J. Nanomedicine* 2020; 15: 6097-6111.

- [80] Wang J, Cheng N, Yang Q, Zhang Z, Zhang Q. Double-Layered Collagen/Silk Fibroin Composite Scaffold That Incorporates TGF- β 1 Nanoparticles for Cartilage Tissue Engineering. *J. Biomater. Tissue Eng* 2015; 5(5): 357-363.
- [81] Galperin A, Oldinski RA, Florczyk SJ, Bryers JD, Zhang M, Ratner BD. Integrated bi-layered scaffold for osteochondral tissue engineering. *Advanced Heal. Matter* 2016; 2(6): 872-83.
- [82] Chiefari JYK et al. Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition – Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process. *Macromolecules* 1998; 31: 5559-5562.
- [83] Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Living Radical Polymerization by The RAFT Process. *Aust. J. Chem* 2005; 58: 379-410.
- [84] Kaga S, Truong NP, Esser L, Senyschyn D, Sanyal A, Sanyal R, Quinn JF, Davis TP, Kaminskas LM. Influence of Size and Shape on the Biodistribution of Nanoparticles Prepared by Polymerization-Induced Self-Assembly. *Biomacromolecules* 2017; 18: 3963-3970.
- [85] Lin TH, Wang HC, Cheng WH, Hsu HC, Yeh ML. Osteochondral tissue regeneration using a tyramine-modified bilayered plga scaffold combined with articular chondrocytes in a porcine model. *Int. J. Mol. Sci* 2019; 20(2): 326.
- [86] Campbell CJ. The healing of cartilage defects. *Clin. Orthop. Relat. Res* 1969; 64: 45-63.
- [87] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplatation. *Osteoarthr. Diagnosis Med. Surg. Manag.* 1998; 47: 487-504.
- [88] Langer R, Vacanti JP. Tissue Engineering. *Science* 1993; 260(5110):920-6.

- [89] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med* 1994; 333(14): 889-95.
- [90] Chen AC, Nagrampa JP, Schinagl RM, Lottman LM, Robert LS. Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro. *J Orthop Res* 1997; 15(6): 791-802.
- [91] Pomerantseva I, Bichara DA, Tseng A, Cronic MJ, Cervantes TM et al. Ear-Shaped Stable Auricular Cartilage Engineered from Extensively Expanded Chondrocytes in an Immunocompetent Experimental Animal Model. *Tissue Eng Part A* 2016; 22(3-4): 197-207.
- [92] Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan AI et al. Articular cartilage repair: Rabbit experiments with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop. Scand* 1998; 69(1): 56-62.
- [93] Orth P, Duffner J, Zurakowski D, Cucchiari M et al. Small-diameter awls improve articular cartilage repair after microfracture treatment in a translational animal model. *Am. J. Sports Med* 2016; 44(1): 209-219.
- [94] Filardo G, Kon E, Roffi A, Di Martino A, Marcacci M. Scaffold based repair for cartilage healing: a systematic review and technical note. *Arthroscopy* 2013; 29(1): 174-86.
- [95] Kon E, Filardo G, Roffi A, Andriolo L, Marcacci M. New trends for knee cartilage regeneration: from cell-free scaffolds to mesenchymal stem cells. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med* 2012; 5(3): 236-243.
- [96] Sancho-Tello M, Forriol F, De Llano JM, Antolinos-Turpin C, Gomez-Tejedor JA, Ribelles JLG. Biostable scaffolds of polyacrylate polymers implanted in the articular cartilage induce hyaline-like cartilage regeneration in rabbits. *Int. J. Artif. Organs* 2017; 40(7): 350-7.
- [97] Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Fini M, Giavaresi G et al. Orderly osteochondral regeneration in a sheep model using a novel nano- composite

multilayered biomaterial. J. Orthop. Res 2010; 28(1): 116-124.

- [98] Baums MH et al. Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus. J. Bone Jt. Surg. Am 2006; 88: 303-8.
- [99] Browne JE et al. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. Clin. Orthop. Relat. Res 2005; 436: 237-45.
- [100] Filardo G et al. Arthroscopic second generation autologous chondrocytes implantation associated with bone grafting for the treatment of knee osteochondritis dissecans: Results at 6 years. The Knee 2012; 19(5): 658-63.

