

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MENİSKÜS DOKUSUNUN ALLOGREFT
DOĞAL YAPI İSKELESİ KULLANILARAK
BİYO-UYUMLULUĞUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

AYLİN KARA

BİYOMEKANİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR 2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc -2012970141

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MENİSKÜS DOKUSUNUN ALLOGREFT
DOĞAL YAPI İSKELESİ KULLANILARAK
BİYO-UYUMLULUĞUNUN GELİŞTİRİLMESİ**

BİYOMEKANİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYLİN KARA
Prof. Dr. Hasan Havıtcıoğlu

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc -2012970141

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomekanik
Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Aylin KARA “**MENİSKÜS
DOKUSUNUN ALLOGREFT DOĞAL YAPI İSKELESİ
KULLANILARAK BİYO-UYUMLULUĞUNUN GELİŞTİRİLMESİ**”

konulu Yüksek Lisans tezini 21.07.2017 tarihinde başarılı olarak
tamamlamıştır.


Prof. Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU
BAŞKAN


Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK
DEÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
ÜYE


Prof. Dr. Funda TIHMİNLİOĞLU
İYTE
Kimya Mühendisliği Bölümü
ÜYE

Prof. Dr. Hasan TATARİ
DEÜ
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
ÜYE (YEDEK)

Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY
EÜ
Biyomühendislik Bölümü
ÜYE (YEDEK)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER (LİTERATÜR BİLGİSİ)	4
2.1. Diz Eklemi	5
2.1.1. Ligamentler	5
2.1.2. Ön Çapraz bağ	6
2.1.3. Arka Çapraz Bag	6
2.1.4. İnseriyonel ligament	8
2.1.5. Meniskofemoral Ligamentler	9
2.2. Menisküs Dokusu	10
2.2.1. Menisküs Dokusunun Filogenetiği	10
2.2.2. Menisküs Dokusunun Anatomisi	12
2.2.3. Meniskus Dokusunun Organizasyonu	14
2.2.4. Kollajen Fibrillerin Dizilimi	17
2.2.5. Menisküs Dokusunun Damarlanması	19
2.2.6. Menisküs Dokusunun Hücresel Kompozisyonu	20
2.2.6.1. Fibrokondrositler	21
2.2.6.2. Eklem kondrositleri	22
2.2.6.3. Fibroblastlar	22
2.2.6.4. Mezenşimal kök hücreler	22
2.2.7. Menisküs Dokusunun Biyomekanik Özellikleri	23
2.2.8. Menisküs Hasarları ve Onarımı	24
2.3 Doku Mühendisliği	28
2.4. Asellülerizasyon.....	32
2.4.1.1. Fiziksel Ajanlar	33
2.4.1.2. Kimyasal Ajanlar	34
2.4.1.3. Biyolojik Ajanlar	35

3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Araştırmanın Tipi	36
3.2. Araştırma Yeri ve Zamanı	36
3.4. Çalışma Materyali	36
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	36
3.6. Veri Toplama Araçları	37
3.6.1. Yöntem	41
3.6.1.1. Menisküslerin elde edilmesi	41
3.6.1.2. Asellülerizasyon işlemi	41
3.6.1.3. Asellülerizasyon işleminin karakterizasyonu	43
3.6.1.3.1. Histolojik ve immunohistokimyasal araştırmalar	43
3.6.1.3.2. Biyokimyasal Araştırmalar	44
<i>Total kollajen Analizi</i>	44
<i>Total DNA Analizi</i>	45
<i>Total GAG Analizi</i>	45
3.6.1.3.3. Biyomekanik Testler	45
3.6.1.3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları	46
3.6.1.3.4.3. tMKH'lerin farklılaştırılması	47
<i>tMKH'lerinin Kondrojenik Farklılaştırılması</i>	47
<i>tMKH'lerinin Adipojenik Farklılaştırılması</i>	48
<i>tMKH'lerinin Osteojenik Farklılaştırılması</i>	48
<i>tMKH'lerin Fibroblastik farklılaştırılması</i>	49
3.6.1.3.4.4. Asellüler menisküs dokularının yeniden hücrelendirilmesi	49
3.6.1.3.4.5. Doku iskelelerine ekilen hücrelerin canlılık analizi	50
3.6.1.3.4.6. Yeniden hücrelendirilmiş menisküs dokularının histolojisi	50
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	52
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	52
3.10. Etik Kurul Onayı	52
4. BULGULAR	53
4.1. Asellülerizasyon İşleminin Histolojik ve İmmunohistokimyasal Bulguları	53
4.2. Asellülerizasyon İşleminin Biyokimyasal Bulguları	65
<i>Total Kollajen içeriğinin ölçülmesi</i>	65
<i>Total GAG içeriğinin ölçülmesi</i>	65
<i>Total DNA içeriğinin ölçülmesi</i>	66

4.3. Asellülerizasyon işleminin biyomekanik bulguları	66
4.4. Hücre kültürü çalışmaları.....	67
4.4.1. tMKH'lerin izolasyonu	67
4.4.2. tMKH'lerin karakterizasyonu	68
4.4.2.1. tMKH'lerin akım sitometri analizi.....	68
4.4.2.2. tMKH'lerin farklılaşma kapasiteleri	70
4.4.3. tMKH'ler ile menisküs dokusunun hücre popülasyonu oluşturulması	71
4.4.4. Asellüler dokuların yeniden hücrelendirilmesi.....	72
5. TARTIŞMA.....	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	86
7. KAYNAKLAR.....	87
8. EKLER	105

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Kadavra dizinden alınan menisküs dokusunun boyutları(mm)	13
Tablo 2. Menisküs grefti kullanılan çalışmalar.	27
Tablo 3. Doğal ve sentetik polimerler kullanılarak geliştirilen menisküs doku iskeleleri.	29
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.	37
Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları.	38
Tablo 6. Çalışmada kullanılan kitler ve kullanım amaçları.	40
Tablo 7. Asellülerizasyon yöntemi (1)	41
Tablo 8. Asellülerizasyon yöntemi (2)	42

SEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Diz ekleminin anterior görünümü	5
Şekil 2. ÖÇB femoral yapışma bölgesi	6
Şekil 3 Arka çapraz bağ femoral yapışma bölgesi, anteriolateral ve posteriomedial demetlerin görünümü.....	7
Şekil 4. İnversiyonel ligament	8
Şekil 5. Transvers genikulat ligament	8
Şekil 6. Meniskofemoral ligamentler.	9
Şekil 7. Yaşayan primatların üç farklı menisküs morfolojileri.	11
Şekil 8. Sağ tibianın yukarıdan görünümü ve sol diz ekleminin arkadan görünümü.....	12
Şekil 9. Menisküs boyutları.....	13
Şekil 10. Menisküs dokusunun biyokimyasal kompozisyonu.	14
Şekil 11. Agrekan agregatının yapısı	16
Şekil 12. Kollajen sarmal yapısı.....	17
Şekil 13. Menisküs dokusunda bulunan kollajen tipleri..	18
Şekil 14. Menisküs dokusunun kollajen fibril dizilimi.	18
Şekil 15. Menisküs dokusunun hücresel dağılımı.	21
Şekil 16. Menisküs dokusunun bifazik davranışı.....	24
Şekil 17. Menisküs dokularının indentasyon testinin şematik görünümü ve test düzeneği. ..	46
Şekil 18. Menisküs dokusunun bölgelerinin şematize görünümü.	53
Şekil 19. Doğal menisküs dokusunun HE boyaması görüntüleri.....	54
Şekil 20. % 1 SDS ile asellülerizasyon işlemi sonrası HE boyaması görüntüleri.....	54
Şekil 21. % 2 SDS ile asellülerizasyon işlemi sonrası HE boyaması görüntüleri.....	55
Şekil 22. % 5 SDS ile asellülerizasyon işlemi sonrası HE boyaması görüntüleri.....	55
Şekil 23. Doğal ve asellüler menisküs dokularının H&E boyaması görüntüleri.....	57
Şekil 24. Doğal ve asellüler menisküs dokularının Masson trikrom boyaması görüntüleri...59	
Şekil 25. Doğal ve asellüler menisküs dokularının Alcian blue boyaması görüntüleri	60
Şekil 26. Doğal ve asellüler menisküs dokularının tip I kollajen boyaması görüntüleri.....	61
Şekil 27. Doğal ve asellüler menisküs dokularının tip II kollajen boyaması görüntüleri..	62

Şekil 28. Doğal ve asellüler menisküs dokularının vimentin yapılarının immunohistokimya boyamaları.	63
Şekil 29. Doğal ve asellüler menisküs dokularının agrekan yapılarının immunohistokimya boyamaları.	64
Şekil 30. Doğal ve asellüler menisküs dokuların total kollajen ve GAG içerikleri.	65
Şekil 31. Doğal ve asellüler menisküs dokuların total DNA ölçümlerinin sonuçları.	66
Şekil 32. Doğal ve asellüler menisküs dokularının biyomekanik test sonuçları.	66
Şekil 33. Tavşan kemik iliklerinden ayrılan hücrelerin 2. 4. ve 7. günlerdeki görüntüleri....	67
Şekil 34. tMKH'lerinin mikroskop görüntüleri.....	68
Şekil 35. tMKH'lerin akım sitometrik analiz sonuçları.....	69
Şekil 36. tMKH'lerin kondrojenik, fibroblastik, osteojenik ve adiposit farklılaşması	70
Şekil 37. tMKH'lerin canlılık analizi sonuçları.....	71
Şekil 38. Hücre karışımının mikroskop görüntüleri.....	72
Şekil 39. Asellüler menisküs dokularına ekilen hücrelerin XTT ve LDH analizlerinin sonuçları.	72
Şekil 40. Fibroblast ile kültüre edilen asellüler menisküs dokularının H&E, Masson trikrom, Alcian blue boyamalarının mikroskop görüntüleri.....	74
Şekil 41. Kondrosit ile kültüre edilen asellüler menisküs dokularının H&E, Masson trikrom, Alcian blue boyamalarının mikroskop görüntüleri.....	75
Şekil 42. Karışım halindeki hücreler ile kültüre edilen asellüler menisküs dokularının H&E, Masson trikrom, Alcian blue boyamalarının mikroskop görüntüleri.	76
Şekil 43. Fibroblast ile yeniden hürelendirilen asellüler menisküs dokularının Tip I kollajen, Tip II kollajen, agrekan, vimentin boyamaları.	77
Şekil 44. Kondrosit ile yeniden hürelendirilen menisküs dokularının Tip I kollajen, Tip II kollajen, agrekan, vimentin boyamaları.	78
Şekil 45. Oluşturulan hücre karışımı ile yeniden hürelendirilen menisküs dokularının Tip I kollajen, Tip II kollajen, agrekan, vimentin boyamaları	79

KISALTMALAR

- (ÖÇB) Ön Çapraz Bağ
(AÇB) Arka Çapraz Bağ
(DYB) Dış Yan Bağ
(İYB) İç Yan Bağ
(AM) Anteromedial
(PL) Posterolateral
(AMFL) Anterior Meniskofemoral Ligament
(PMFL) Posterior Meniskofemoral Ligament
(MKH) Mezenşimal Kök Hücre
(ESM) Ekstrasellüler matriks
(SDS) Sodyum dodesil sülfat
(GAG) Glikozaminoglikan
(DNA) Deoksiribonükleik asit
(RNA) Ribonükleik asit
(TGF β)Dönüştürücü büyüme faktörü beta
(bFGF) Temel fibroblast büyüme faktörü
(PAA) Perasetik asit
(PDS) Polidioksanon
(PGA) Poliglolikolik asit
(PLA) Polilaktik asit
(PLGA) PoliL-glikolik asit
(PU) Poliüretan
(PCL) Polikaprolakton
(PBS) Fosfat tampon çözeltisi
(KMİ) Kollajen menisküs implant
(α DKA) α düz kas aktini
(EDTA) Etilen diamintetraasetik asit
(DMEM) Dulbecco'nun değiştirilmiş eagle ortamı

(MEM) Değiştirilmiş eagle ortamı

(FBS) Fetal sığır serumu

(IBMX) 3-Isobutil-1-metilksantin

(BSA) Sığır serum albümin

(DAPI) 4',6-diamidino-2-fenilindol

(DAB) 3,3'-diaminobenzidin

(H&E) Hematoksilen eosin

(MT) Masson trikrom

(DMMB) Dimetilen mavisi



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana daima yol gösteren, merhamet ve anlayışı ile her konuda desteğini hissettiğim, tez çalışmamın oluşturulması ve işleyişinde bilgi ve tecrübeleri ile hep yanımda olan değerli danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hasan HAVİTÇIOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca asellülerizasyon yönteminin oluşturulmasında, hücre kültürü çalışmalarımın yürütülmesinde destek veren ve etkin bilgisini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Semra KOÇTÜRK'e

Çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen bölüm arkadaşlarıma, ayrıca tez çalışmamın histolojik ve immunohistokimyasal araştırmalarda yardımlarından dolayı Uygur SAÇIK ve Gökçen BİLİCİ'ye, cerrahi işlemlerde yardımlarını esirgemeyen Ali İhsan Kılıç'a ve teknik çizimler konusunda Musa Güngörürler'e, biyomekanik testlerde yardımlarından dolayı Buğra Hüsemoglu'na,

Labotaruvar çalışmalarımda ihtiyaç duyduğum teknik donanım ve sarf malzemelerin kullanımını sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi'ne,

Eğitim hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan, daima destekleyen, ilgi ve sevgilerini benden esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma,

Teşekkürlerimi sunarım.

Aylin KARA
Temmuz-2017

MENİSKÜS DOKUSUNUN ALLOGREFT DOĞAL YAPI İSKELESİ KULLANILARAK BİYO-UYUMLULUĞUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Aylin KARA

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyomekanik Anabilim Dalı
İnciraltı, 35340, İzmir

aaylinkara@gmail.com

ÖZET

Menisküs dokusunun temel işlevi diz eklemine yük dağılımını sağlamak ve gerilmeyi azaltmaktır. Menisküs dokusu, insan vücudundaki bu önemli işlevinden dolayı deneysel ve klinik çalışmalara konu olmaktadır.

Total veya parsiyal menisektomi ile sonuçlanan menisküs yırtıkları artroskopik araştırmalar için sık görülen durumlardır. Allogreftler veya sentetik menisküs doku iskeleleri, menisküs yaralanmalarının erken dönemlerinde kullanılmaktadır. Fakat günümüzde uzun vadeli kararlılık sorunları ve immunolojik reaksiyonlar yaygın klinik kullanımı engellemektedir. Transplantasyon aşamasında, alıcıya başka bir donörün asellüler menisküs dokusunun implante edilmesi ve alıcının kök hücreleri ile hücrelendirilmesi dokunun kararlılığı ve immunolojik reaksiyonlarını aşmak açısından önemli bir yaklaşımdır. Tez çalışmasında geliştirilen bu yaklaşım ile menisküs transplantasyonunun önem kazanacağı ve menisküs onarımının sağlanacağı düşünülmektedir.

Tez çalışmasındaki amaç; tavşan menisküs dokusu kullanılarak asellüler menisküs allogrefti geliştirmektir. Bu amaç doğrultusunda, tavşanlardan menisküs dokuları çıkartılmış ve çok aşamalı yöntemler ile sodyum dodesil sülfat (SDS) kullanılarak asellüler hale getirilmiştir. Asellülerizasyon işlemi takiben, menisküslere tavşan kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücreler (MKH) ekilmiştir. Çalışmalar sonucunda elde edilen doğal menisküs doku iskeleleri histolojik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve biyomekanik olarak incelenmiştir.

Gerçekleştirilen işlemlerin sonucunda, mekanik gerilimi değişmeyen, ekstrasellüler matriksi korunan menisküs dokusunun hücresel bileşenleri dokudan uzaklaştırılmış ve MKH'ler korunan ekstrasellüler matrikse implante edilerek yeniden canlılık kazandırılmıştır. Böylelikle asellüler doğal biyo-uyumlu menisküs allogrefti geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Menisküs; Allogreft; Asellülerizasyon; Doku Mühendisliği; Mezenşimal Kök Hücreler

DEVELOPMENT OF MENISCUS TISSUE BIO-COMPATIBILITY USING ALLOGRAFT NATIVE SCAFFOLD

Aylin KARA

Dokuz Eylul University, Health Science Institute, Department of Biomechanics

İnciraltı, 35340, İzmir /TURKEY

aaylinkara@gmail.com

ABSTRACT

The main function of the meniscus tissue, which plays an important role in the biomechanics of the knee joint is load distribution and therefore stresses reduction in the knee joint. The meniscus leads to variety experimental and clinical research due to important function of the human body.

Meniscus tears are frequent indications for arthroscopic evaluation which can result in partial or total meniscectomy. Allografts and synthetic meniscus scaffolds have been used to treatment of early degenerative meniscus. Problems related to immunological reactions, as well as reduced initial and longterm stability restrain widespread clinical use so far. Therefore, implantation of acellular meniscus tissue to recipient from different donor and vitalization with recipient's stem cells for the treatment of meniscus tissue on transplantation process is significant approach. According to this thesis, it is believed that this approach will provide meniscus regeneration.

The aim of this thesis to develop a new construct by tissue engineering of the rabbit meniscus based on an acellular meniscus allograft. Thus rabbit meniscus collected and acellularized using sodium dodecyl sulfate (SDS) in the multiple process steps. Following of the acellularization process, the meniscus seeded with bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) obtained from rabbits. As a result of all these processes, native meniscus scaffolds examined in histologically, immunohistochemically, biochemically and biomechanically.

In conclusion all these treatments produced acellularized scaffold that was removed cellular components by preserving the extracellular matrix without any significant loss in mechanical properties. MSCs was seed on preserved extracellular matrix to revitalization. Thus allograft native biocompatible meniscus scaffold was produced.

Keywords: Meniscus; Allografts; Acellularization; Tissue Engineering; Mesenchymal Stem Cells

1. GİRİŞ VE AMAC

Menisküs dokusu yük dağılımı, yük iletimi ve eklem kararlılığını sağlayarak gerilmeyi azaltmasından dolayı diz eklemine önemli bir rol oynamaktadır. Menisküs yaralanmaları insan vücudunda en sık görülen yaralanmalardandır. Trafik kazaları, spor yaralanmaları gibi direk travmalarla menisküs hasarları görülebildiği gibi ilereyen yaşlarla birlikte menisküs dokusunun elastikiyet kayıpları ve dejenerasyonları sonrası yaralanmalar oluşabilmektedir.

Günümüzde iyileşmesi mümkün olmayan menisküs yaralanmalarında kullanılan en yaygın yöntem artroskopi uygulamalarıdır. İyileşme gerçekleşmediği durumlarda ise diz protezleri kullanılmaktadır. Çeşitli nedenlerle oluşan menisküs hasarları, kıkırdak yaralanmalarına ve daha ileri dönemlerde de atroza temel oluşturabilmektedir. Artroz oluşmuş durumlarda ise, diz protezine kadar varan tedavi yöntemleri nedeniyle iş gücü kaybı, hareket zorluğu, hasta memnuniyetsizliği ve ayrıca milli ekonomimize de yük oluşturabilmektedir. Dünyada ve ülkemizde her yıl binlerce hastaya endoprotez uygulanmakla birlikte, bütün bu sorunlar halen devam etmektedir.

Doku mühendisliği yöntemleri son zamanlarda oldukça ilerlemiş, doku onarımı ve yenilenmesi konusunda pek çok araştırmaya ışık tutmuştur. Halen gelişmeye devam eden bu yöntemler arasında asellülerizasyon işlemi ve mezenşimal kök hücreler (MKH) ile desteklenmiş doku iskeleleri yenilikçi tıpta araştırmaya oldukça açık yöntemlerdir.

Bu tez çalışmasında; menisküs yaralanmalarını onarmak üzere MKH'ler ile desteklenmiş doğal doku iskelesinin geliştirilmesi ve transplantasyon işlemi sonucundaki inflamatuvar yanıtın minimum düzeye indirgenmesi amaçlamaktadır. Bu amaç doğrultusundaki temel nokta, menisküs dokusunun asellüler hale getirilerek doğal yapısının korunmasıdır. Bir diğer önemli nokta ise, elde edilemiş asellüler menisküs dokusunun otolog MKH'ler ile yeniden hücrelendirilmesidir. Böylelikle menisküs dokusu doğal yapı özelliklerini ekstrasellüler matriks (ESM) ile birlikte koruyacak ve MKH'ler ile yeniden hücrelendirilmesiyle kendisine özgü hücresel ağı oluşturabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER (LİTERATÜR BİLGİSİ)

Menisküs dokusu yük dağılımını sağlayarak gerilmeyi azaltması sebebiyle diz ekleminde önemli bir role sahiptir. Femoral kondil ve tibial plato arasında bulunan menisküsler yarım ay şeklinde fibrokartilaginöz doku özelliği gösterirler (Arnoczky, 1999; Fithian ve ark., 1990; Rath & Richmond, 2000).

Menisküs dokusunun yaralanmalarında zorlu spor aktiviteleri veya yaş ile ilişkili doku hasarları sıklıkla karşılaşılan sorunlardır. İngiliz Ortopedik Spor Travma Artroskopi Derneği (BOSTAA) 100,000 kişiden 60-70'inin menisküs problemlerinden şikâyetçi olduğunu bildirmiştir. Ortaya çıkan semptomlar kayma, dizin kilitlenmesi ve aşırı ağrı hissi olarak karakterize edilmektedir (Neilson& Yde,1991). Menisküs dokusu kısmen damarlı bir yapıya sahip olması nedeniyle herhangi bir yaralanmada iyileşme kapasitesi oldukça zayıftır(Arnoczky, 1999; Arnoczky, 1983; Miller ve ark., 1994.). Bu nedenle menisküs dokusu kendiliğinden iyileşemez ve cerrahi bir müdahale gereklidir. Avrupa'da her yıl 400,000 'den fazla hastaya menisküs onarımı için cerrahi ameliyat uygulanmaktadır(van der Bracht ve ark., 2007). Amerika'da Amerikan Ortopedik Cerrahlar Akademisi'ne göre bu sayı her yılda 1 milyonun üzerine kadar çıkmaktadır.

Menisküs onarımının sağlanabilmesi için pek çok yöntem geliştirilmiştir. Menisküs dokusunun kısmi veya tamamen diz ekleminden kaldırılması olarak bilinen menisektomi yöntemi ağrıyı dindirmek amacı ile günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat sonucunda eklem kıkırdağında hasarlara ve osteoartrite yol açmaktadır (Roos ve ark., 1995). Daha büyük boyutlarda oluşan yaralanmalarda uygulanan menisküs transplantasyonunda ise doku reddi, hastalık bulaşma riski veya immünolojik pek çok olumsuz etken ile karşılaşılmaktadır (Kuhn & Wojtys, 1996).

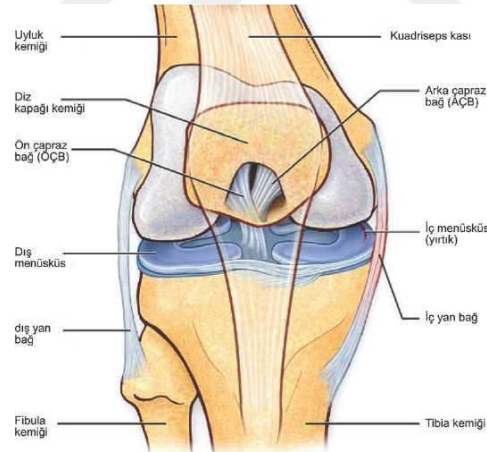
Sonuç olarak menisküs onarımının sağlanabilmesi için dikkate değer bir çözüm hala görülememektedir. Menisküs dokusunun yenilenmesini amaçlayan doku mühendisliği teknikleri umut verici bir çözüm sunmaktadır, ancak bu alanda diğer dokularla karşılaştırıldığında çok sınırlı bir anlayış bulunmaktadır.

2.1. Diz Eklemi

Diz eklemi insan vücudundaki en karmaşık ve en büyük eklem olarak bilinmektedir. Hem menteşe (ginglimu) hem de trokoid (pivot) eklem özelliklerini taşır. (Robert ve ark., 2012) Temel olarak fleksiyon (içe doğru bükülme) ve ekstansiyon (dışa doğru uzama) hareketine olanak sağlar. Bunun yanı sıra içe doğru bükülme hareketinde rotasyon (dönme), abdüksiyon (vücudun orta çizgisine uzaklaştırma) ve addüksiyon (vücudun orta çizgisine yakınlaştırma) hareketini yaparken, dışa doğru uzama hareketinde rotasyon yapamaz.

Diz ekleminin uygun fonksiyonu ile stabilitesi ligament bütünlüğü ile sağlanır ve vücutta sagittal planda hareket açıklığı en fazla olan eklemlerden biridir. Bu nedenle yaralanmalara oldukça açık bir eklemdir (DeLee, 2009).

Diz eklemi; sinoviyal sıvı ile beslenen, eklem kapsülü çevresindeki eklem yüzeyi ile karakterize edilen sinoviyal (hareketli) eklemdir. Eklem dayanaklılık ve yapısal destek veren üç kemikten oluşur. Femur (uyluk kemiği) ile tibia (kaval kemiği) ligamentler ile birbirine bağlanır. Patella ise diz ekleminin anterior yüzünde femur boyunca uzanan femoropatellar oluk içinde yer alır. Fibula diz eklemi içerisinde tam olarak yer almasa da eklem kapsülüne paralel olmasından dolayı diz eklemi içinde varsayılabilir.



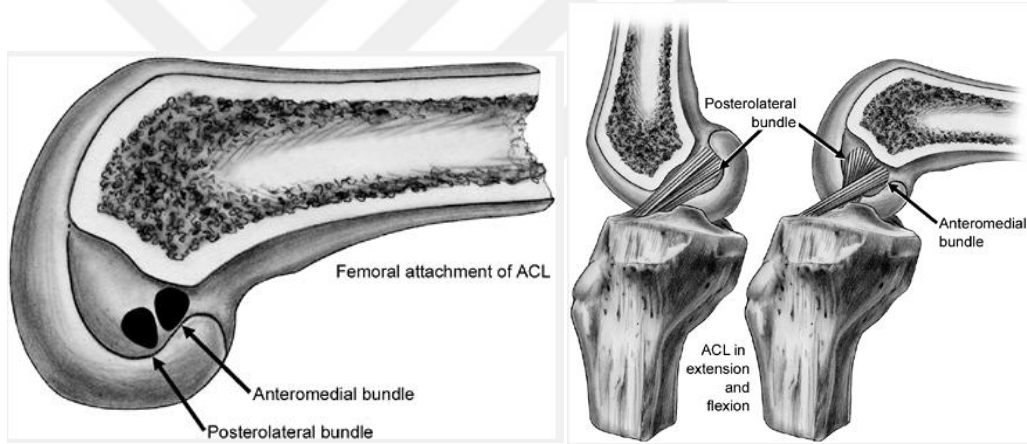
Şekil 1. Diz ekleminin anterior görünümü.

2.1.1. Ligamentler

Diz eklemi dört ana ligamentten oluşmaktadır. Bu ligamentler; ön çapraz bağ (ÖÇB), arka çapraz bağ (AÇB), dış yan bağ (DYB), iç yan bağ (İYB). Bu ligamentlerin yanı sıra; tibial insersiyonel ligamentler, intermeniskal ligamentler ve meniskofemoral ligamentler bulunmaktadır.

2.1.2. Ön Çapraz bağ

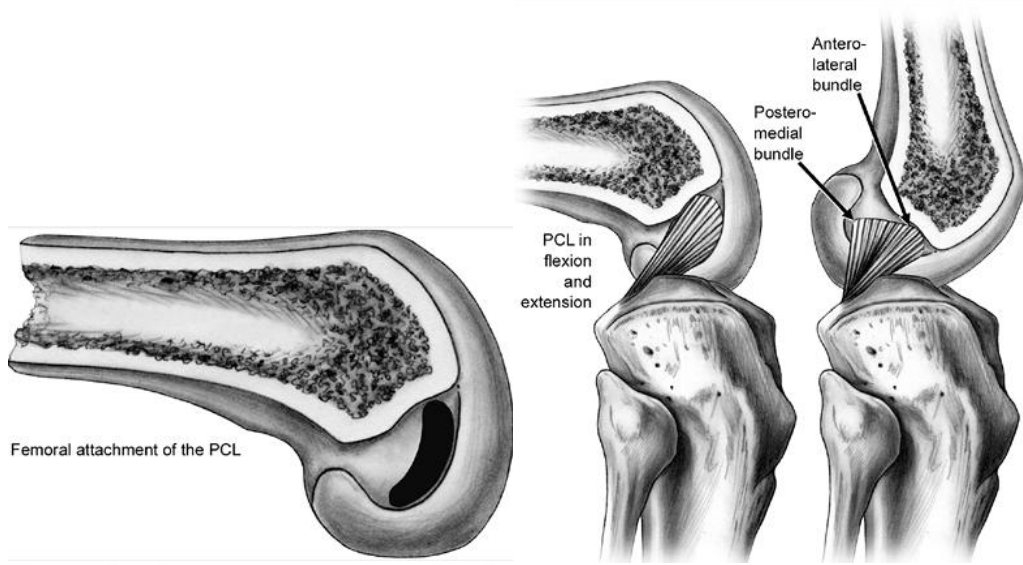
Ön çapraz bağın (ÖÇB), ortalama genişliği 10 mm (7-12mm) ve ortalama uzunluğu 38 mm (25-41mm)dir. ÖÇB lateral femoral kondilin medial yüzünün posteriomedial köşesine yapışır. Tibiada ise, tibia ön kenarının 15 mm arkasında, 30 mm uzunluğunda çukur bir bölgeye yapışır. Diz 90 derece fleksiyonda iken ÖÇB'nin yapışma alanının orta noktası, arka çapraz bağın yapışma alanının 7 mm. önündedir. Bazı lifler, transvers intermeniskal bağın altından geçerek lateral menisküsün ön boynuzuna kadar uzanır. ÖÇB tibial platoya yapışma alanına göre anteromedial (AM) ve posterolateral (PL) demetler olmak üzere iki adet fonksiyonel demetten oluşmaktadır (Şekil 2). PL demetler AM demetlere göre daha kuvvetli ve daha kalındır. Diz ekstansiyonu sırasında PL demetler gergin, AM demetler daha gevsektir. ÖÇB'nin femura yapışma bölgesi diz fleksiyondayken horizontal hale gelirken AM demet gerilir, PL demet gevşer. Kanlanması ise orta genikular arterin ligamentli dalları ve inferior genikuler arterin terminal dalları ile gerçekleşir (Insall & Scott, 1993).



Şekil 2. ÖÇB femoral yapışma bölgesi, anteriomedial ve posteriolateral demetlerin ekstansiyon ve fleksiyondaki görünümü. (Johnson, Donald H 2007)

2.1.3. Arka Çapraz Bag

AÇB femur medial kondilinin lateral yüzünden baslar, tibianın interkondiler aralığının posterioruna yapışır (Şekil 3). AÇB, ÖÇB'a göre daha kuvvetlidir. Anterolateral bant AÇB kütlelerinin %65'i, posteromedial bant ise %35'ini oluşturur. Anterolateral demet fleksiyonda, posteromedial bant ekstansiyonda gerilir. Tibianın posterior translasyonunu engelleyen en önemli yapıdır. AÇB kanlanması temel olarak orta genikuler arter ile gerçekleşir (Insall & Scott, 1993).



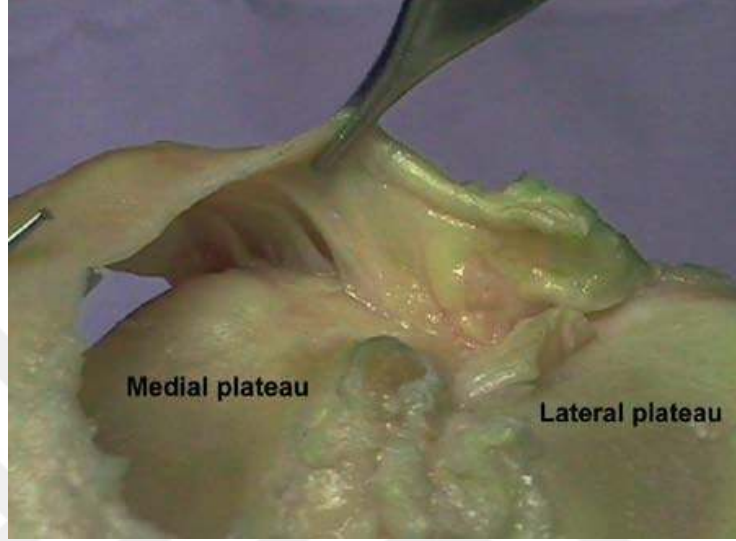
Şekil 3. Arka çapraz bağ femoral yapışma bölgesi, anteriolateral ve posteriomedial demetlerin görünümü.
(Johnson, Donald H 2007)

Dış yan bağ (DYB) lateral femoral kondilin dış yüzüne yapışır ve fibula başının yan tarafına doğru uzanır. DYB dize gelen varus yüklenmelerine karşı ilk tepki veren bağıdır. Medial menisküs ile bağlantısı olmasına karşılık lateral menisküs ile bir bağlantısı yoktur. İç yan bağ (İYB) ise femur medial kondiline doğru uzanır ve tibianın medial yüzündeki adduktor tuberkulun hemen aşağısındadır. Femur medial epikondilinin posterosüperior yüzüne ve tibianın medial yüzüne yapışır. Aşağıya ve öne doğru eğik olarak uzanır. Yüzeyel ve derin parçaları bulunur. Diz fleksiyonda iken öne, ekstansiyonda iken arkaya doğru hareket eder. Fleksiyon sırasında derin İYB gergin, yüzeyel İYB gevşektir.

Meniskofemoral ligamentler lateral menisküsün posterior boynuzundan medial femur kondilinin lateral yüzüne kadar uzanır. Humphrey ligamenti önde posterior kollateral ligamente uzanırken Wrisberg ligamenti ise posteriordan geçer. Gupta ve ark., bu bağların varlığını % 93 oranında, insidansının görülme oranını ise % 50, olarak kadavra çalışması ile ortaya koymuştur (Gupte ve ark., 2002).

2.1.4. İnsersiyonel ligament

Menisküs dokusundaki dairesel kollajen fibriller, tibia subkondral kemiğine bağlanan anterior ve posterior bölgelerde yerleşebilen ligamentler boyunca uzanır. Medial menisküsün ön boynuzunun insersiyonel ligamenti fan şeklindedir ve interkondiler fossa alanında, ön çapraz bağın yaklaşık 6 veya 7 mm önündeki tibia üzerine bağlanır (Şekil 4).



Şekil 4. İnsersiyonel ligament (McDermott ve ark. 2010).

Transvers genikulat ligament olarak bilinen anterior intermeniskal ligament, lateral ve medial menisküslerin anterior boynuzlarında birleşirler (Şekil 5).

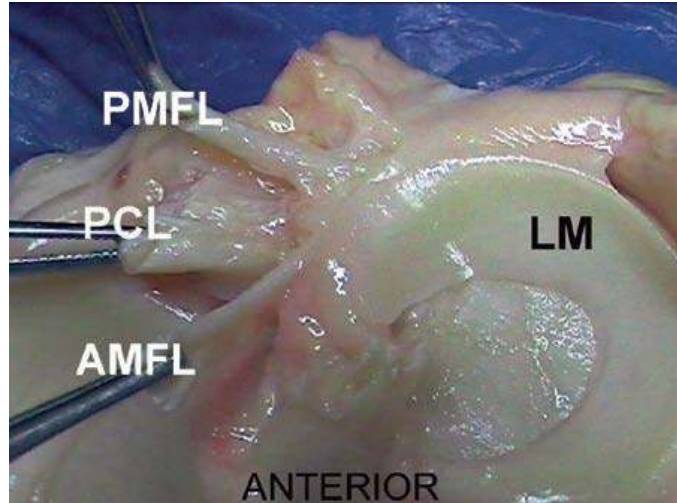


Şekil 5. Transvers genikulat ligament (forseps ile gösterilen) (McDermott ve ark. 2010).

2.1.5. Meniskofemoral Ligamentler

İnterkondiler çentikteki femur medial kondilinin lateraline, lateral menisküsün posterior boynuzunu birleştiren iki bağ da tespit edilmiştir. Bu bağlar meniskofemoral bağlardır. Anterior meniskofemoral ligament, AÇB'nin ön tarafına uzanarak Humphrey ligamenti olarak, posterior meniskofemoral ligament ise, AÇB'nin arkasına uzanarak Wrisberg ligamenti olarak adlandırılır (Şekil 6).

Kohn ve Moreno 92 kadavra dizinde %50 Humphrey ligamentinin, %76 Wrisberg ligamentinin olduğunu bildirmişlerdir (Kohn & Moreno, 1995). Bu bilgi Lee ve ark. gerçekleştirdiği bir çalışmada 138 hastanın %83'ünde meniskofemoral ligamentleri MR görüntüleri ile göstererek desteklemiştir (Lee ve ark. 2000). Heller and Langman 140 kadavra dizinin %71'inde meniskofemoral ligamentlerin bulunduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, Humphrey ligamentinin çapının AÇB'nin 1/3'ü kadar, Wrisberg ligamentinin ise AÇB'nin 1/2 büyüklüğüne kadar çıkabileceğini belirtmiştir (Heller & Langman 1964). Ayrıca meniskofemoral ligamentlerin çoğunlukla bir dizde bulunabileceği, diğer dizde olmadığı not edilmelidir (Wan & Felle 1995). Gupte ve ark. literatürde yer alan bir derlemesinde, dizlerin % 93'ünde en az bir meniskofemoral ligament bulunduğunu ve gençlerin yaşlılara göre daha yaygın prevalansa sahip olduğu ileri sürülmüştür (Gupte ve ark. (2002).



Şekil 6. Meniskofemoral ligamentler. LM lateral menisküs; PMFL posterior meniskofemoral ligament; AMFL anterior meniskofemoral ligamentleri; PCL arka çapraz bağ (McDermott ve ark. 2010).

2.2. Menisküs Dokusu

Sinoviyal eklem oluşumu iki aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak, gelişmekte olan mezenşimal blastoma, oluşacak uzun kemiğin kıkırdaksı modeline farklılaşır. Komşu iskelet elemanları, interzon olarak bilinen ince mezenşimal hücre bantları ile birbirinden ayrılır. İnterzon biyolojisi tam olarak anlaşılmamış olmasına rağmen, bu yapıların üç tabakaya ayrıldığı bilinmektedir; kıkırdaksı dokuyuörten iki dış kondrojenik tabaka ve ligamentler, menisküs ve sinoviyum gibi eklem içiyapıların oluşumuna katkıda bulunan bir ara tabaka. İnterzon oluşumunun ardından eklem boşluğu, komşu kıkırdaksı elemanların birbirinden ayrı iki mafsallı eklem yüzeyi oluşturacak şekilde ayrıştırılması ile oluşur. Bu gelişimsel süreçlerin her biri bozulmadan devam ederse sinovyal eklemlerin normal oluşumu gözlemlenecektir (Ito & Kida, 2000). Embriyogenez sırasında mekanik uyarı, menisküsün gelişimi için gereklidir. Fonksiyonel kas kasılmaları olmadığında, menisküs yoğunlaşmaları daha erken görülür ve hasar oluşur sonrasında da hızlıca kaybolur (Mikic B, 2000).

Fare menisküsündeki matriks gen ekspresyonunun gelişimsel ilerlemesinde, meniskal morfogenezinin dört farklı aşaması tanımlanmıştır:1. evre, femur ve tibia eklem yüzeyleri arasındaki mezenşimal hücre yoğunlaşması;2. evre, meniskal fibrokondroblastların gelişmekte olan menisküs içinde farklılaşması;3. evre, meniskal ekstrasellüler matriks (ESM) sentezi ve çökmesi ve 4. evre, meniskal ESM olgunlaşması (Pavlova ve ark. 2001). Bu sonuçlar, menisküsün farklı bir gelişim profili olan benzersiz bir bağ dokusu olduğunu düşündürmektedir.

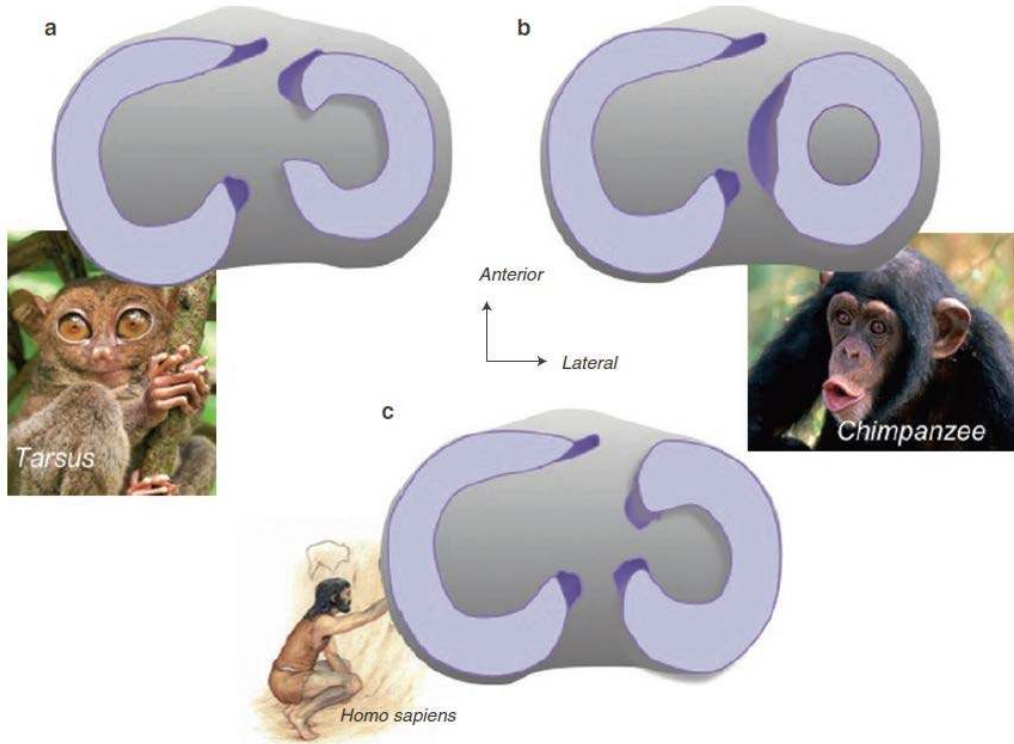
2.2.1. Menisküs Dokusunun Filogenetiği

İnsan dizinin karmaşık fonksiyonel morfolojik özelliklerinin pek çoğu sadece insanlara özgü değildir. Hominidae (insangiller) tüm yaşayan tetrapod akrabaları (amfibiler, reptiller, kuşlar ve memeliler) ile karmaşık morfolojideki dizin ortak evrimsel tarihini paylaşırlar (Good ve ark., 2007; Lebel ve ark., 2010).

Başlıca tetrapod sınıflarının diz anatomisi filogenetik olarak araştırılmıştır. Timsah menisküsünün femur ve tibia yüzeyleri arasında yer aldığı ve intermeniscal lgament ile anteriorden birleştiği gösterilmiştir. Kertenkele (*Varanus varius*) menisküsleri ise lateraal menisküs femuru tamamen tibiadan ayıran devamlı bir kütle halinde medial menisküs ise dairesel şekilli ve merkezinde delikli bir yapıya sahip olduğu belirtilmiştir. 215-70 milyon yıl öncesinde Mesozoik dönemde, dinazorların femuru bugünkü insanların femur yapısında olduğu

gibi iç rotasyon hareketini yapabiliyordu (Mossman ve ark. 1983). Senozoik dönemde fosil kertenkele, kuş ve memeliler incelendiğinde patella kemiğinin gelişmeye başladığı görülmüştür (Romer, 1962). Kara ayıların dizleri incelendiğinde klasik memeli dizi ile morfolojik açıdan oldukça benzediği görülmektedir (Parsons, 1900; Lebel ve ark. 2010).

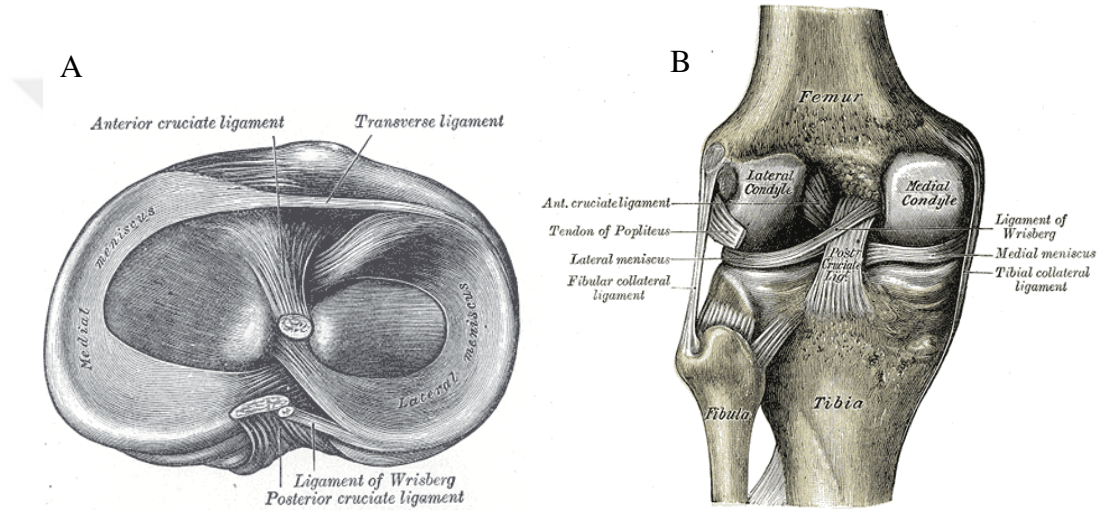
Farklı primatların menisküsleri incelendiğinde lateral menisküs yapılarının üç farklı morfolojisine rastlanır. Günümüzde yaşayan lemuriform, Tarsius, Pango ailelerinin dizlerinde, hilal şekilli lateral menisküs ile tibia tek noktada temas halindedir. Catarrhinhes olarak bilinen eski dünya maymunların tümünde halka şeklinde lateral menisküs görülmektedir. İki boynuzu birleşmiş lateral menisküs tibia platosunun lateraline anterior kısmından bağlanır. Hilal şekilli lateral menisküs sadece Homo sapiens türünde bir anterior bir de posterior olmak üzere tibia platosuna iki bağlantı noktası ile bağlanır. Fosil kayıtlar, insangillerde lateral menisküsün tibia ile bağlantısı tek bağlantıdan çift bağlantı noktasına geçişini kanıtlamıştır (Preuschoft & Tardieu, 1996).



Şekil 7. Yaşayan primatların üç farklı menisküs morfolojileri. (a) hilal şeklindeki tek bağlantıya sahip lateral menisküs, (b) halka şeklindeki lateral menisküs, (c) hilal şekilli iki bağlantı noktasına sahip lateral menisküs (Lebel ve ark. 2010).

2.2.2.Menisküs Dokusunun Anatomisi

Menisküsler femoral kondiller ve tibia platosu arasında yer alan bir çift yarım ay şeklinde fibrokartilaginöz yapılardır (McDermott ve ark. 2010; Arnoczky ve ark., 1992; Rath & Richmond, 2000). Distal yüzeyler hafif konveks ve tibial plato ile temas halindedir. Proksimal yüzeyler ise bunun tam aksine hafif konkav şeklinde olup femoral kondiller ile temas halindedir (McDevitt & Webber, 1990). Menisküsler şekil yapısı bakımından tibia platolarının düz yüzeyi ile femur kondillerinin konveks yüzeyi arasındaki uyumsuzluğu giderirler. Şekli ve pürüzsüz yapısı sayesinde menisküsler devamlı etkileşim halinde olduğu iki eklem yüzeyi ile uyum sağlayarak diz ekleminin hareketine yardımcı olmaktadır.



Şekil 8. (A) Sağ tibianın yukarıdan görünümü, (B) Sol diz ekleminin arkadan görünümü (Henry,1918).

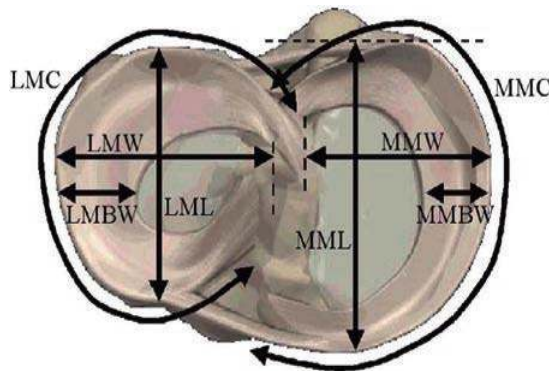
Menisküs dokusu arka boynuz, merkezi gövde ve ön boynuz olarak üç bölüme ayrılmaktadır. Her dizde lateral (dış) ve medial (iç) menisküs olmak üzere iki adet menisküs bulunmaktadır. İç menisküs hilal biçimli olup, ön ucu ön çapraz bağın ön tarafına tutunur, arka ucu posterior interkondiler aralığa (arka çapraz bağ ile lateral menisküsün arka ucu arasındaki sahaya) tutunur. Periferik kısım ise fibröz kapsüle tibial kollaeteral ligamana sıkıca tutunmuştur (Şekil 8). Bu nedenle iç menisküsler dış menisküslere oranla daha az hareketlidirler (Arıncı, Elhan,2006).

Dış menisküsler C harfi şeklinde olup dairesel yapıdadır ve tibiada iç menisküse oranla daha fazla yer kaplarlar. Ön boynuz ön çapraz bağın arka ve dış bölgesinde kalan tibia interkondiller alana yapışır. Arka boynuz ise iç menisküsün arka boynuzunun ön bölgesinde kalan tibia interkondiler alana yapışır (Arıncı&Elhan,2006).

Menisküsler medial ve lateral genikulat arterlerin süperior ve inferior dalları ile beslenirler. Bu damarlar dizin sinovial ve kapsüler yapıları içerisinde perimeniskal kapiller pleksusu oluştururlar. Bu pleksus iç menisküsün periferel %10-30'unu, dış menisküsün periferel %10-25'ini besler. Geri kalan menisküs ve dış menisküsün popliteal hiatus alanı avaskülerdir (Arnoczky & Warren,1982.)

Tablo 1. Kadavra dizinden alınan menisküs dokusunun boyutları (mm)

	Ortalama	Standart sapma	Oran
Medial menisküs çevresi	99.0	9.3	84-119
Medial menisküs gövde genişliği	9.3	1.3	6.7-12.4
Medial menisküs uzunluğu	45.7	5.0	30.1-56.1
Medial menisküs genişliği	27.4	2.5	23.3-32.7
Lateral menisküs çevresi	91.7	9.6	78-112
Lateral menisküs gövde genişliği	10.9	1.3	8.3-14.5
Lateral menisküs uzunluğu	35.7	3.7	29.5-51.2
Lateral menisküs genişliği	29.3	3.0	24.0-36.3

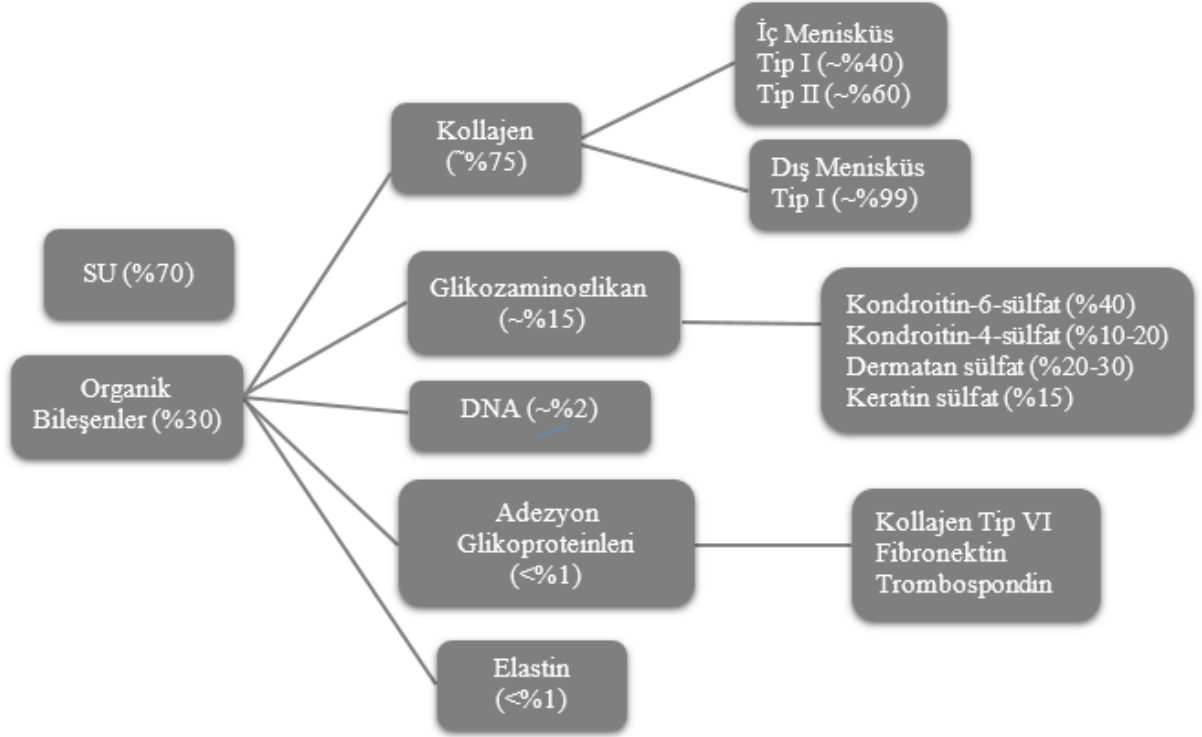


Şekil 9. Menisküs boyutları. LMC; Lateral menisküs çevresi, LMW; Lateral menisküs genişliği, LMBW; Lateral menisküs gövde genişliği, LML; Lateral menisküs uzunluğu, MMC; Medial menisküs çevresi, MMW; Medial menisküs genişliği, MMBW; Medial menisküs gövde genişliği, MML; Medial menisküs uzunluğu.

(McDermott ve ark., 2004).

2.2.3.Menisküs Dokusunun Organizasyonu

Menisküs dokusu yüksek oranda (%70) su içeriğine sahiptir. Geriye kalan organik bileşenler ise ekstrasellüler matriks ve hücrelerdir (Makris ve ark.,2011). ESM'deki organik bileşenlerin büyük çoğunluğunu (%75) kollajen yapıları oluşturmakla birlikte Glikozaminoglikan (GAG) (%17), DNA (%2), adezyon glikoproteinleri (<%1) ve elastin (<%1) onu takip eder (Makris ve ark., 2011;Herwig ve ark., 1984).

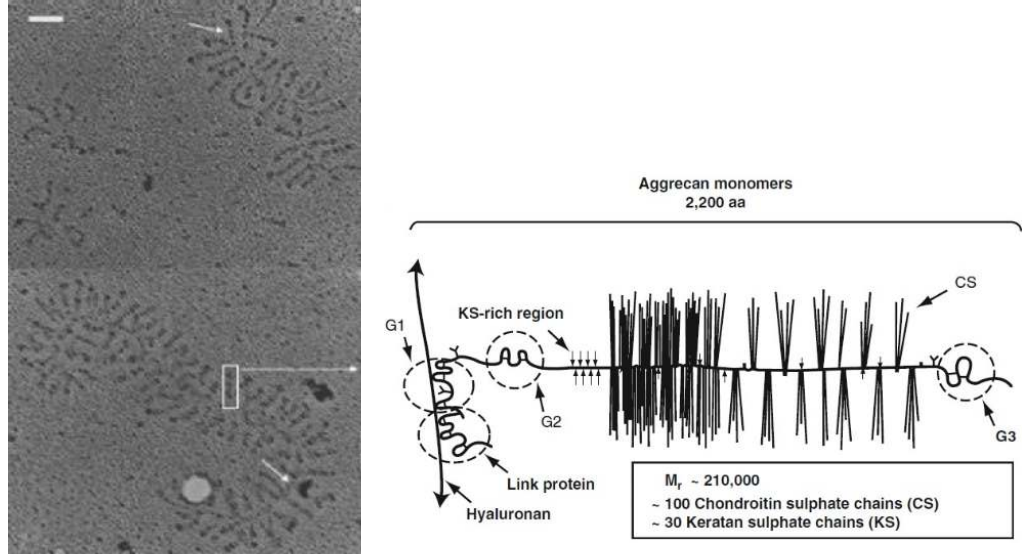


Şekil 10. Menisküs dokusunun biyokimyasal kompozisyonu.

Kollajen menisküs dokusunun başlıca fibriller bileşenidir. Dokunun her bölgesinde çeşitli miktarlarda farklı kollajen tipleri bulunmaktadır. Tip I kollajen dokunun kırmızı-kırmızı bölgesinde %90 oranında bulunmasıyla en baskın kollajen tipidir. Diğer kollajen tipleri ise; tip II, tip III, tip IV ve tip VI olmakla birlikte %1'den daha az miktarda bulunurlar. Dokunun iç kısımlarını oluşturan beyaz-beyaz bölgede kollajen tip II %60 oranında bulunurken kırmızı olarak adlandırılan vasküler bölgede bulunmamaktadır (Cheung, 1987).

Eyre ve Muir 1970 yılında yayınladığı bir çalışmada, eklem kıkırdağındaki esas fibriller kollajenin Tip II kollajen olmasına karşılık menisküs içeriğindeki ana fibriller kollajenin Tip I kollajen olduğu belirtilmiştir (Eyre&Muir 1975). Bu farklılık, fibroz kıkırdak (tip I kollajen) ile hiyalin kıkırdak (tip II kollajen) ve menisküs hücreleri ile kondrositler arasındaki ayırda moleküler bir kıstas olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, menisküs dokusunda az miktarlarda tip II kollajen vardır. Menisküs dokusundaki kollajenin büyük kısmının tip I kollajen olduğu ve daha az miktardaki tip II kollajen göz önüne alındığında yuvarlak/oval şekilli kondrosit benzeri menisküs hücrelerinin hiyalin kıkırdak dokusundaki kondrositler olmadığı söylenebilir. İlk olarak McDevitt ve ark. yuvarlak/oval şekilli menisküs hücrelerinin fibrokondrosit olduğunu bildirmişlerdir (McDevitt & Webber, 1990).

Proteoglikanlar ekstrasellüler matriksin başlıca bileşenleridir. Bu moleküller GAG'ı oluşturan ana proteinlerdir. Menisküs dokusunda bulunan GAG tipleri; kondroitin-6-sülfat (%40), dermatan sülfat (%20-30), kondroitin-4-sülfat (%10-20) ve keratin sülfat (%15) dır(Herwig ve ark., 1984; Verbruggen ve ark.,1996). Agrekan menisküs dokusunda bulunan başlıca proteoglikandır, daha az sayıda bulunan proteoglikanlar ise; decorin, biglikan ve fibromodüldür(Scott ve ark., 1997). İç ve orta bölgelerden alınan menisküs eksplantları kültür koşullarında ağırlıklı olarak agrekan proteoglikanları üretirler. Periferik bölgedeki eksplantlar hem daha az hem de daha küçük proteoglikanları üretirler (Collier & Ghosh 1995). Valiyaveettil ve ark. köpek menisküsünün dış bölgesinde agrekan üretilmediğini göstermişlerdir (Valiyaveettil ve ark., 2005). Genellikle, menisküs dokusunda üretilen agrekan konsantrasyonu eklem kıkırdağına oranla ortalama 1/8 ile 1/10 arasındadır. Biglikan ve fibromodulin miktarının domuz menisküsünün orta ve iç bölgelerinde periferik bölgeye göre daha yüksek miktarda olduğu bulunmuştur. Bir diğer yandan decorin, periferik bölgede daha yaygın bulunmaktadır(Scott ve ark., 1997). Agrekan, biglikan, fibromodulin gibi özel proteoglikanlar, menisküsün iç bölgesinde birikmektedir. Agrekan ile hyaluronan güçlü bağlarla bağlanarak proteoglikan agregatları oluştururlar (Şekil 11). Agregatlar dokuda suyun kalması ve emilmesi için gereklidirler. Decorin ve fibromodulin kollajen fibril oluşumunu etkiler, biglikan ise remodelling ve tamir süreçlerinde rol alır (Verdonk, 2010).



Şekil 11. Agrekan agregatının yapısı (Verdonk, 2010).

Agrekan monomeri (kare içerisinde), farklı boyutlarda agregat oluşturmak için hyoluronan omurgasına (ok ile gösterilen) bağlanır (Şekil 11). Agrekan monomerinde üç globular alan (G1, G2 ve G3) GAG, kondroitin sülfat ve keratan sülfatı taşıyan iki uzatılmış segmentile ayrılır. Bağlantı proteini, hyaluronan ve agrekan monomer arasındaki agregat yapısını dengeler. Bir hiyaluronana 200'e kadar agrekan monomeri bağlanılabilir(Verdonk, 2010).

GAG'ların temel görevleri menisküs dokusunun basınç altında su emilimini sağlayarak dokuyu mekanik olarak basınçlara karşı desteklemektir. Doku içerisinde bölgesel farklılık gösteren bu moleküller iç bölgelerde dış bölgelere göre daha yüksek oranda bulunduğu gözlenmektedir (Scott ve ark., 1997). Kollajen fibriller ve proteoglikanlar dizilimleri, yönelimleri ve miktarları sayesinde menisküs dokusunun karmaşık mimarisini oluşturarak dokuya özgü biyomekanik karakteristiği sağlarlar.

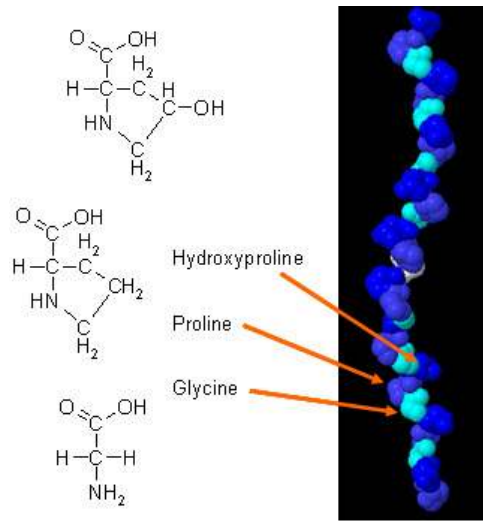
Adezyon glikoproteinleri menisküs matriksinde bulunan, ESM bileşenleri ile hücreler arasındaki bağlantıyı oluşturan diğer önemli bileşenlerdir. Başlıca adezyon glikoproteinleri fibronektin, trombospondin ve tip VI kollajendir (Miller & McDevitt 1991; Pereira ve ark., 2013].

2.2.4. Kollajen Fibrillerin Dizilimi

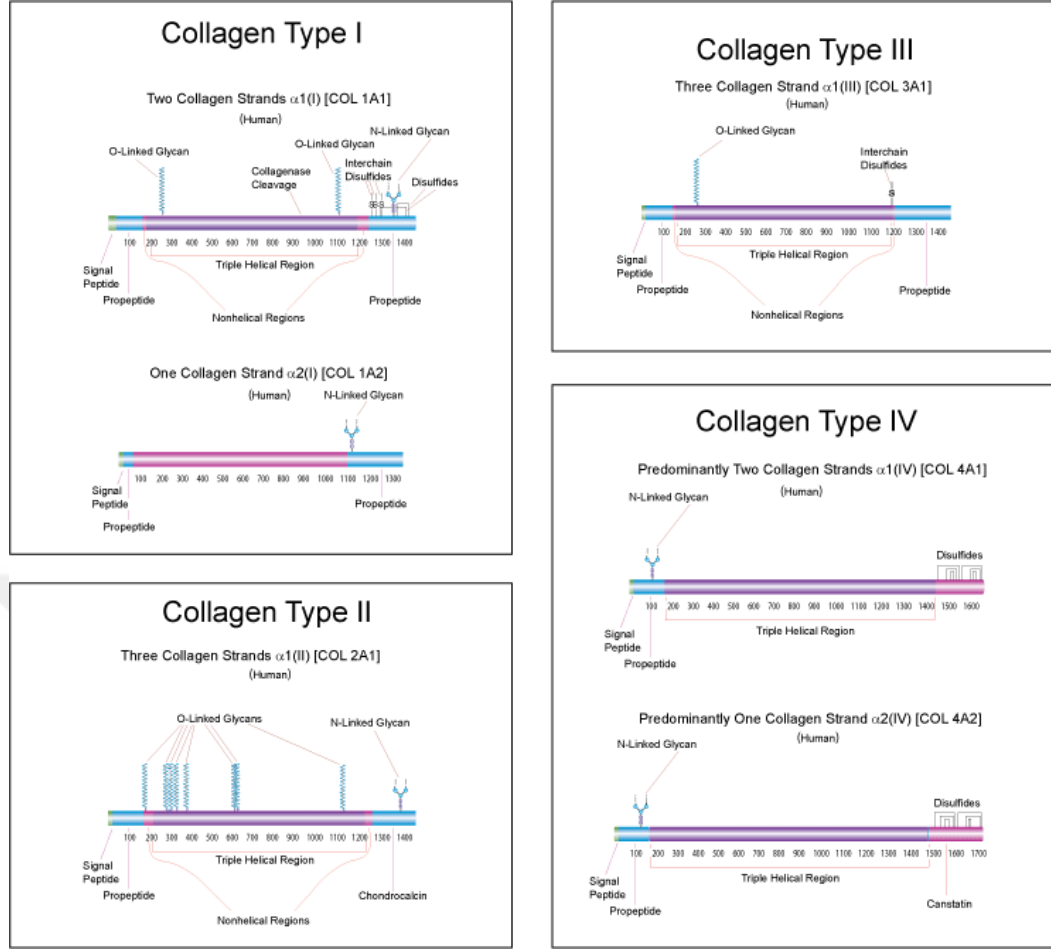
Kollajen tüm hayvanlarda bol miktarda bulunan bir proteindir. İnsanlarda kollajen toplam proteinin 1/3'ünü, cildin kuru ağırlığının 3/4'ünü oluşturur ve ekstremsellüler matrisin (ESM) en yaygın bileşenidir.

Omurgalılarda en az 46 farklı polipeptit zincirinden oluşan 28 farklı kolajen türü tanımlanmıştır ve diğer pek çok protein de kolajenöz alanlar içermektedir (Brinckmann, 2005; Veit ve ark., 2006). Dikkat çekici bir şekilde, bugüne kadar tespit edilen en eski protein olarak; 68 milyon yıllık *Tyrannosaurus rex* fosilinin fosilleşmiş kemiklerinin yumuşak dokusunda bozulmamış kollajen keşfedilmiştir (Schweitzer ve ark., 2007, Asara ve ark., 2007).

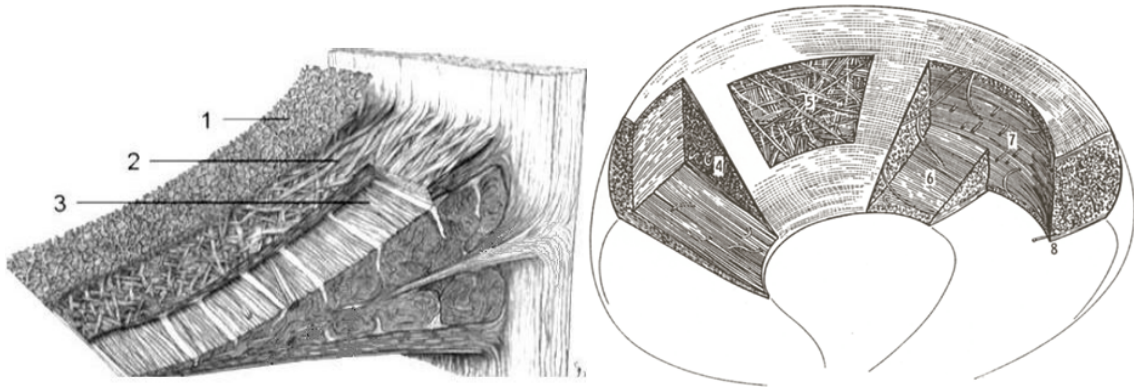
Kolajenin belirleyici özelliği, üç paralel polipeptit zinciri ve üçlü heliks oluşumu için poliprolin tip II (PPII) sarmal konformasyon halkası birbiriyle çakışmayan bir rezidü ile dizildiği zarif bir yapısal motiftir (Şekil 12). Üçlü heliks yapısı içerisindeki PPII sarmallarının sıkı paketlenmesi her üçüncü rezidünün Gly olmasını gerektirir ve herhangi bir Xaa ve Yaa amino asidi olabilen XaaYaaGly sekansının tekrarı ile sonuçlanır. Fibriler olmayan kolajenlerin üçlü heliks bölgesi içindeki belirli alanları bozulmasına rağmen bu tekrar tüm kollajen tiplerinde görülmektedir (Brazel ve ark., 1987). Kollajen dizilimindeki Xaa ve Yaa aminoasitleri sırasıyla (2S)-Prolin (Pro, 28%) ve (2S,4R)-4-hidroksiprolindir (Hyp, 38%). Kollajen dizilimdeki en temel üçlü sarmal 10.5% oranı ile ProHypGly'dır (Ramshaw ve ark., 1998). Hayvanlarda, tropokollagen (TC) olarak bilinen kollajen üçlü sarmalları, kompleks, hiyerarşik bir biçimde bir araya gelerek doku, kemik ve bazal membranlarda makroskopik fiber ağları olarak gözlenir (Şekil 13).



Şekil 12. Kollajen sarmal yapısı (Ramshaw ve ark., 1998).



Şekil 13. Menisküs dokusunda bulunan kollajen tipleri.



Şekil 14. Menisküs dokusunun kollajen fibril dizilimi. (sol) (1) Superfisiyel tabaka: rasgele dizilen kollajen fibriller, (2) lamellar tabaka: radyal diziliimli kalın kollajen demetleri ve (3) derin tabaka: dairesel diziliimli kollajen fibriller. Menisküs içerisindeki kollajen fibrillerin dağılımı (sağ) (Petersen & Tillmann, 1997; Bullough ve ark.,1970).

Menisküs içeriğindeki kollajen fibriller birbirinden farklı üç tabakadan oluşmaktadır (Şekil 14). Femoral ve tibial yüzeyler ile etkileşimde olan menisküsün superior ve inferiorde bulunan superfisiyal/yüzeyel fibril ağı (1) 10 µm kalınlığında düzgün bir dizilime sahip olmayan fiberlerden oluşmaktadır. Bu tabakanın hemen altında lamellar tabaka bulunmakta olup buraya yerleşmiş dairesel kollajen fibriller radial dizilimdedir (2). Menisküs merkezinde bulunan fibriler ağ menisküsün temel fibriler ağını oluşturur ve dairesel bir dizilime sahiptir (3).

Menisküs dokusu tabakalardan oluşan benzersiz fibriller ağ yapısının yanı sıra daha yaygın olarak bölgelere ayrılmaktadır. Bunlar; dizin ön bölümüne denk gelen anterior boynuz, arka bölümüne denk gelen posterior boynuz ve anterior ile posterior bölgeler arasındaki merkez bölgesidir.

2.2.5. Menisküs Dokusunun Damarlanması

Meniskus dokusunun büyük kısmında damar bulunmamasına rağmen aktif bir dokudur. Meniskusmerkezi doğrudan eklem sıvısından beslenir ve merkeze doğru gidildikçe damarlanmanın azaldığı gözlenir. Menisküs dokusunun kesit alanı incelendiğinde damarlanma bölgeleri görülmektedir. Eklem kapsülü ile bağlantılı menisküs periferi damarlanmanın yoğun olduğu kırmızı alan, damarlanma olmayan beyaz bölge ve bu iki bölge arasında kalan kırmızı-beyaz bölge olarak ayrılmaktadır.

Menisküs dokusunun iyileşme potansiyeli damarlanma ile doğrudan ilişkilidir. Periferik kısım daha iyi beslendiği için periferik yırtıkların tamiri merkeze yakın bölgedeki yırtıkların tamirinden daha iyi sonuç vermektedir. (Kang ve ark., 2006)

Menisküslerin periferal kısımlarının beslenmesi ağırlıklı olarak lateral ve medial geniküler arterlerin superior ve inferior dalından gerçekleşir. Bu damarlardan çıkan dallar diz ekleminin kapsüler ve sinoviyal dokuları etrafında perimeniskeal kapiller sinir ağı oluştururlar. Bu perimeniskal damarlar dairesel şekilde dizilerek eklemin merkezine doğru radial dallar oluştururlar. Erişkin menisküsünde damarlanma; medial meniskus periferinde %10-30, lateral meniskusde %10-25 civarındadır. Lateral ve medial menisküslerin her ikisinde femoral ve tibial yüzeylerin periferik kısımlarında vasküler sinoviyal katlantılar mevcuttur ve bu katlantılar kısa terminal damarlar içerir. Lateral meniskus posterolateralinde yer alan popliteal hiatus bölgesinde kanlanma görülmez. Meniskus kanlanmasına katkısı olmayan bu bölüm meniskuslerin hem superior ve hem de inferior yüzleri boyunca 1-3 mm. boyunca uzanır. Orta

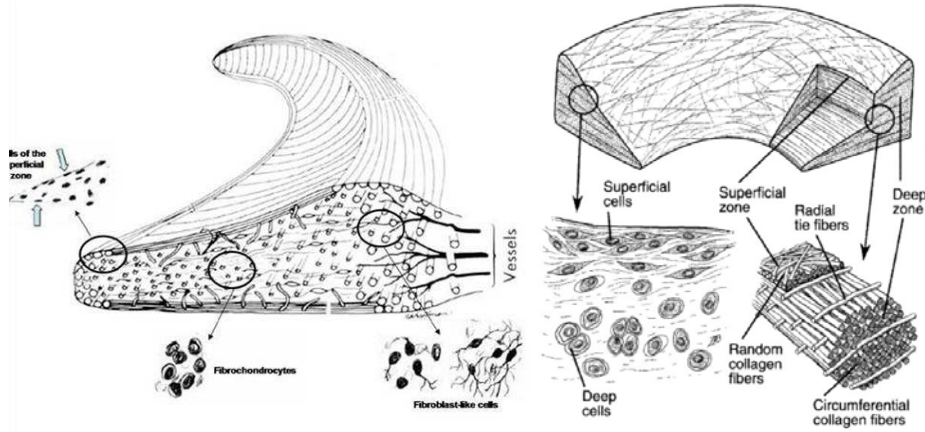
genikulat arter medial ve lateral genikulat arterlerin terminal dallarıyla birlikte ön ve arka boynuzun vasküler sinoviyal örtüsü aracılığıyla beslenmeye katkı sağlar. Bu sinoviyal damarlar boynuzların tibial platoya tutunmasını sağlayan insersiyonel ligamentlerin içinden dokuya girer ve boynuzları besleyen kısa, terminal endoligamentöz damarları oluşturur (Gardner ER, 1968). Menisküslerin diğer kısımlarının beslenmesi sinovyal sıvıdan difüzyon ya da mekanik pompalama yolu ile gerçekleşir. Menisküsün santral kısmına dek uzanan pek çok kanaldan oluşan bu sistemin varlığı 1988’de elektron mikroskobu ile gösterilmiştir. Bu sistemin menisküs periferindeki damarlarla ilişkide olduğu görülmüştür. Ayrıca menisküs dokusunun yüklenme sırasında sıvı akışının kolaylaştırılmasında, hidrostatik basıncının ayarlanmasında, sinovyal sıvı ve kan damarlarından yoksunavasküler bölgelere besin taşınmasında bu kanal sisteminin rolü olabileceği düşünülmektedir (Clark ve ark., 1983.).

Yenidoğan menisküslerinde periferik alanın %50 si kanlanırken 40 yaşında bu oranın % 20 nin altına düşmesi yaşla birlikte damarlanmanın azaldığını göstermektedir. Menisküslerin; bebeklikte anlamlı ölçüde yüklenmeye ve kas kuvvetine maruz kalmadıklarından beslenmesinin yalnızca kan damarları aracılığıyla olabileceği, difüzyon yoluyla beslenmenin olmayacağı ileri sürülmüştür. Bipedal yürüme ile beraber kas kuvvetleri menisküs dokusuüzerine yeterli basıncı oluşturmaya başladıktan sonra, tamamı kan damarları ile beslenen menisküs dokusunun yerini iç kısmı damarsız olan erişkin tipi doku almaya başlamaktadır.

2.2.6. Menisküs Dokusunun Hücresel Kompozisyonu

Menisküs dokusunda yuvarlak ve oval şekilli birçok hücre bulunmasından dolayı ve ESM’in fibroz görünümünden dolayı fibrokartilaginöz doku olarak tanımlanmaktadır (Ghadially ve ark., 1983).

Menisküs dokusunda morfolojik olarak çeşitli hücre tipleri gözlenmektedir (Şekil 15). Bunlardan birincisikırmızı vaskülarize bölgede yer alan uzun ve ince sitoplamik uzantılara sahip uydu hücreleridir. Kırmızı-beyaz bölgede, yer alan ve bası yüklerine en çok maruz kalan fibrokondrositler bulunmaktadır. Fibroblast benzeri hücreler, fusiform morfolojide, menisküsün fibriler dış kısmında süperfisiyal alanda yer alır ve sinoviyal sıvı ile etkileşim halindedir. Avasküler hiyalin benzeri beyaz bölgede ise yuvarlak şekilli kondrositler yer almaktadır (Hellio de Graverand ve ark., 2001).



Şekil 15. Menisküs dokusunun hücresel dağılımı (Kawamura S, 2003; van der Bracht 2007).

Menisküs dokusunun 2/3 kısmındaki yuvarlak morfolojideki hücreler yüksek oranlarda proteoglikanları sentezlediği gösterilmiştir (Tanaka ve ark. 1999). Proteoglikan sentezinin, doza bağımlı bir şekilde transforme edici büyüme faktörü beta'ya (TGF- β) duyarlı olduğu gösterilmiştir ve sentezleyen hücrelerin kondrojenik fenotipe sahip olduğu olduğunu düşündürmektedir (Tanaka ve ark., 1999). Oval ve yuvarlak morfolojideki hücreler tarafından eksprese edilen büyük boyutlu proteoglikan olan perlecanın menisküsün beyaz zonlarında bulunduğu ve güçlü hücre ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca perlecan oranının menisküs yaralanmalarında ve yaşa bağlı olarak düştüğü bildirilmiştir (Melrose ve ark., 2005). Menisküs dokusu içinde en fazla miktarda bulunan GAG olan kondroitin sülfat ve onu izleyen keratan sülfat da menisküs hücreleri tarafından sentezlenir (Gruber ve ark., 2008).

2.2.6.1. Fibrokondrositler

Menisküs dokusundaki tüm bölgelerde bulunan fibrokondrositler dokunun sağlıklı kalmasını ve fonksiyonlarını sürdürebilmesini devam ettiren ESM moleküllerini üretir. Ayrıca doku içeriğindeki tip I, II kollajen tiplerini ve daha az oranlarda tip III, IV, V ve VI kollajenleri üretir (Melrose ve ark., 2005; Stapleton ve ark., 2008). Otolog fibrokondrositler sağlam menisküs dokusunun contralateralinden biyopsi ile veya yırtılmış bölgeden toplanabilmekte ve izole edilmektedir. Van der Bracht bir çalışmada fibrokondrositleri akım sitometrik olarak araştırmıştır (van der Bracht ve ark., 2007). Fibrokondrositler aljinat iğnesinde kültüre edilerek tip I kollajen, agrekan ve daha az miktarda tip II kollajen ürettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca fibrokondrositler tek tabaka kültür sisteminde kültüre edildiğinde tip I ve II kollajen ürettiği fakat agrekan üretmediği bildirilmiştir (Verdonk ve ark., 2005).

2.2.6.2. Eklem kondrositleri

Menisküs dokusundaki kondrosit hücreleri hiyalin kıkırdak benzeri beyaz bölgede bulunmaktadır. Bu hücreler yüksek oranda tip II kollajen ve agrekan üretimi ile karakterize edilirler (Kambic & McDevitt, 2005; Verdonk ve ark., 2005a; Valiyaveetil ve ark., 2005).

Peretti domuz menisküsündeki kıkırdak hücrelerini araştırmıştır. Bu çalışmada otolog kondrositler allograft menisküs dokusu üzerinde kültüre edilmiş ve menisküsün avasküler bölgesine implante edilerek in vivo olarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda kondrositlerin menisküs dokusunu yenileyebileceğini tanımlamıştır (Peretti ve ark., 2004). Bu nedenle menisküs doku mühendisliğinde eklem kıkırdağı hücreleri kullanımının daha fazla araştırılmasının yararlı olduğu düşünülmektedir.

2.2.6.3. Fibroblastlar

Fibroblastların asellüler doku iskeleleri veya dondurularak kurutulmuş allogreftler üzerinde hücre kültürü çalışmalar gerçekleştirilmiştir (TG ve ark., 2006). Bir diğer çalışmada, fibroblastların deney hayvanı modelinde başlangıçta fibrokartilaginöz dokuya dönüşebilen fibrovasküler doku ürettiği gözlemlenmiştir (Buma ve ark., 2004).

2.2.6.4. Mezenşimal kök hücreler

Kök hücreler farklı dokulara farklılaşma potansiyeline ve kendi kendini yenileme yeteneğine sahiptir (Arnoczky, 1999). Mezenşimal kök hücreler (MKH'ler), kemik, kıkırdak, tendon, yağ, nöronal doku, kas ve kemik iliği gibi farklı mezenşimal dokulara farklılaşabilirler (Koc & Lazarus, 2001; Minguell ve ark., 2001; Muraglia ve ark., 2000; Pittenger ve ark., 1999). Kemik iliği, doku mühendisliğinde kullanılan en yaygın MKH kaynaklarından biridir. Bunun yanında, kas, yağ ve sinovyal membran gibi diğer mezenşimal dokulardan da izole edilebilirler (Murphy ve ark., 2003). Kemik iliği kaynaklı MKH'ler, tek tabaka kültür sistemlerine yapışma potansiyelleri sebebiyle kolayca izole edilebilir. Bu durumda, bu hücreler, çeşitli dokularo oluşturabilme potansiyellerini korumaktadırlar (Pittenger ve ark., 1999). MKH'ler, kültür ortamı ve kültür koşullarına bağlı olarak, in vitro ortamda farklı dokulara farklılaşabilir. Bu kültür sistemleri, mikropellet adı verilen çok yoğun hücre kültürlerine dayanmaktadır. Hücreler, agregatlar/kümelenmeler oluşturarak hücre-hücre etkileşimlerini arttırabilirler. MKH'ler, deksametazon ve TGF- β ile desteklenmiş ortamda mikropellet olarak kültüre edilirse, (fibro)kondrojenik farklılaşma gerçekleşir (Johnstone & Yoo, 1999; Yoo ve ark., 1998).

Bir diğerk çalışmada, otolog MKH'ler hiyalüronan ile karıştırılmış ve menisektomi uygulanmış keçi dizine enjekte edilmiştir. Çalışma sonucunda bazı deney gruplarındaki menisküs dokularında yeni doku oluşumu gözlemlenmiştir (Murphy ve ark., 2003).Günümüzde, yeni doku oluşumunun bu hücrelerin dış kaynaklı beslenme etkisiyle uyarılan yapısal yenilenmenin olabileceği varsayılmaktadır.

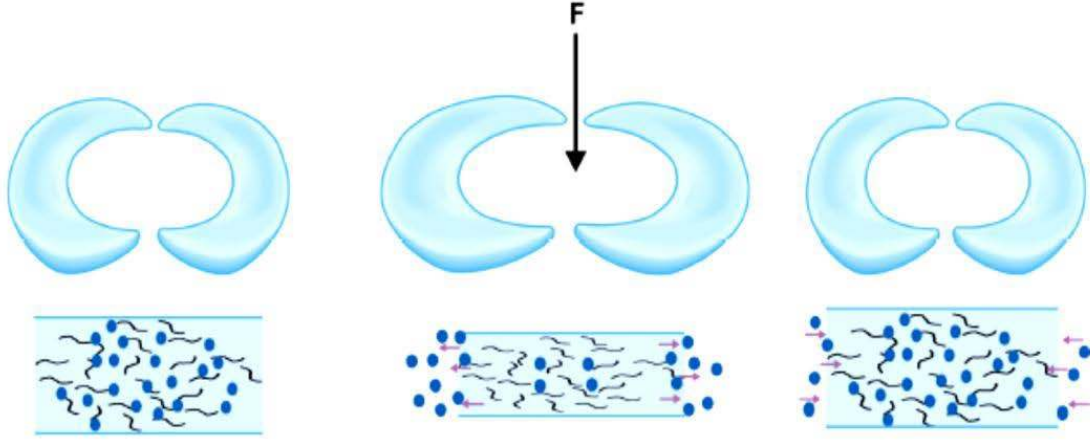
2.2.7. Menisküs Dokusunun Biyomekanik Özellikleri

Menisküs dokusu anatomik ve viskoelastik özellikleri sayesinde diz ekleminde pek çok önemli göreve sahiptir. Menisküs dokusunun başlıca görevi, diz eklemine gelen yükleri dağıtmaktır. Menisküsler bası, gerilme ve makaslama kuvvetlerine maruz kalırlar (Buma ve ark., 2004). Çevresel olarak yerleşmiş kollajen lifler ile ön ve arka boynuzun tibiaya tutunma özellikleri sayesinde vertikal bası yükleri horizontal hoop stresine çevrilir; böylelikle menisküsler eklem dışına çıkmaktan korunur (Aspden & Hukins, 1989). Menisküsler gerilme özellikleri sayesinde yük taşınması ve şok absorpsiyonu görevlerini yerine getirirler (Vedi ve ark., 1999; Boyd & Myers, 2003). Yüklenme sırasında lateral bölgedeki yükün %70'i, medial bölgedeki yükün ise %50'si menisküsler tarafından iletilir (Shrive ve ark., 1978). Diz ekstansiyondayken eklem gelen yüklerin %50'sini menisküsler taşır ve dizin 90° fleksiyonunda yük taşıma oranı %85'e kadar çıkabilmektedir (Walker & Erkiuan, 1975).

Menisküs dokusunun mekanik özellikleri iç ve dış bölgelere göre değişiklik göstermektedir. İç menisküs dış menisküse kıyasla daha yüksek basınç direncine sahiptir ve gerilme dayanımı radyal yöne göre dairesel doğrultuda daha yüksektir (Sweigart, 2004). menisküs dokusu diz mekaniği ve stabilitesinde önemli rol oynamaktadır fakat kolaylıkla hasar görebilmekte ve düşük vaskülaritesi nedeniyle iyileşme kapasitesi oldukça sınırlıdır.

Menisküsün yüklenmeye yanıtı diğerk biyolojik dokularda olduğu gibi iki fazlıdır: İlk aşamada yüklenmeye mekanik ya da elastik yanıt oluşur. Solid matriks ve doku içi sıvıların kompresyonuyla menisküsün hidrostatik basıncı artar. İkinci aşamada; sıvının dışarı çıkışı başlar. Bu aşamada, matriksin içindeki sıvı zamana bağımlı olarak dışarı çıkar. Biyomekanik anlamda "creep" olarak alandırılan yavaş bir şekil değişikliği görülür. Sıvının dışarı çıkışı menisküsün hidrostatik basıncını düşürür. Sıvı akımı, uygulanan basınç, matriksin hidrostatik basıncı ve kollajen liflerindeki gerilme kuvvetleri arasında bir denge kurulana kadar devam eder (Aagaard&Verdonk, 1999; Athanasiou&Sanchez-Adams, 2009). Bu yanıtlar sayesinde menisküs yük altında kaldığında bir miktar şekil değiştirir ve temas yüzeyini ve uyumunu

arttırarak üzerine gelen kuvveti dağıtır, yük ortadan kalktığında tekrar eski boyutlarına döner ve ortama saldığı sıvıyı geri emer (Şekil 16). Bu sıvı akımı hem fibrokondrositlerin hem de eklemin beslenmesine katkıda bulunur (Athanasίου & Sanchez-Adams, 2009).



Şekil 16. Menisküs dokusunun bifazik davranışı. (a)GAG'lar (.) doku içindeki su moleküllerine (~) bağlanır. (b) yüklenme anında su molekülleri dokudan atılır. (c) yük ortadan kalktığında GAG'lar su moleküllerini doku içine çeker(Athanasίου & Sanchez-Adams, 2009).

2.2.8. Menisküs Hasarları ve Onarımı

Menisküs Yaralanmaları

Normal menisküs dokusu yarım ay şekilli ve fibrokartilaginöz yapıdadır. Bu yapısından dolayı çeşitli durumlarda hastalıklar, hasarlar, travmatik yaralanmalar ve anormal gelişimler ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda menisküs kalsiyum pirofosfat kristal birikimi, hemokromatozis gibi kalsifikasyona ve dokunun renk değişimine neden olan metabolik hastalıklardan da etkilenebilmektedir (Bjelle, 1981). Bu durumlar menisküsün normal şekilde çalışmasını etkilemekte ve vücuttaki sistemik değişiklikler nedeniyle lokal tedavi uygulanamamaktadır. Dejenerasyon ve travma gibi diğer durumlar ise doğrudan menisküsü etkilediği için tedavi edilebilmektedir.

Menisküs dokusunun yaralanmaya yatkın bir doku olduğu bilinmektedir (Hough & Webber, 1990). Osteoartrit, hem menisküs hem de çevresindeki kıkırdaklarda dejeneratif değişikliklere neden olmaktadır ve menisküs yırtıkları ve ekstrüzyonlarının % 75'i osteoartrit ile ilişkilendirilmiştir (Berthiaume ve ark., 2005; Lange ve ark., 2007). Osteoartrit medial posterior ve lateral anterior boynuzların kalınlaşmasına neden olması nedeniyle menisküs geometrisini etkiler. Bu durum da yaralanan dokunun biyomekaniğini etkileyebilir (Bamac ve ark., 2006).

Menisküs yaralanmaları, spor yaralanmaları, spor dışı yaralanmalar ve tanımlanamayan yaralanmalar olarak üç tipe ayrılabilir. Menisküs hasarı oluşturma riski en fazla olan spor

futboldur, onu atletizm, Amerikan futbolu ve kayak izler ve spor yaralanmaları tüm meniskal yaralanmalarının % 32,4'ünü oluşturur. Spor dışı yaralanmalar günlük aktivitelerden kaynaklanır ve % 38,8 orana sahiptir (Drosos & Pozo, 2004). Menisküslerin travmatik lezyonları sık olarak, fleksiyon ve rotasyondaki dizin ekstansiyon pozisyonuna doğru hareket etmesi ile meydana gelir. Medial menisküs tibia üzerinde daha az hareketli olduğundan kondiller arasında sıkışıp yaralanabilir. En sık yaralanan bölge menisküsün arka boynuzu ve en sık görülen yaralanma tipi longitudinal yırtıktır. Yırtığın derinliği, uzunluğu ve pozisyonu yaralanma esnasındaki arka boynuzun femoral ve tibial kondillere göre pozisyonuna bağlıdır (Miller, 2003).

Tedavi yöntemleri

Meniskü yırtıklarının tedavisinde önceleri total menisektomi yaygın olarak kullanılan bir yöntemdi. Kısa süreli fonksiyonel iyileşme görülmesine rağmen uzun süreli takiplerde artan dejeneratif değişiklikler görülmüştür (Fairbank, 1948). En fazla dejeneratif değişiklikler total menisektomi sonrası ortaya çıkmaktadır. Menisküsün 1/3'ünün çıkarılmasının bile, eklem temas kuvvetlerini % 50 arttırdığı; total menisektominin ise uzun dönemde osteoartrit riskini 14 kat arttırdığı gösterilmiştir (Roos ve ark., 1998). Menisektomi eklem boşluğunda daralmaya neden olur, rejenerasyon oranını düşürür, çevredeki kıkırdak dokuda meydana gelen dejeneratif değişikliklerde artışa ve dolayısıyla osteoartrit insidansında artışa neden olur (Fairbank, 1948; Jackson, 1968; Cox ve ark., 1975; McGinity ve ark., 1977; Allen ve ark., 1984; Moon & Chung, 1988; Messner & Gao, 1998; Shelbourne & Dickens, 2007). Günümüzde menisküs yırtıklarının tedavisinde en sık uygulanan tedavi artroskopik kısmi menisektomidir (Brindle ve ark., 2001). Bu tedavi, yırtık menisküsten kaynaklanan mekanik bulguların ortadan kaldırılmasında etkindir. Sonuçlar total menisektomi ile karşılaştırıldığında daha iyi olmasına rağmen dejenerasyon halen devam etmektedir (Burks ve ark., 1997; Shelbourne & Dickens, 2007).

Menisküs iyileşmesine yardımcı olmak için, çeşitli dikiş yöntemleri, bozunabilir doku iskeleleri, hücrelerin ve kan akışını sağlayan kanallar gibi pek çok yöntem geliştirilmiştir (Ghadially ve ark., 1986; Zhang ve ark., 1988; Gershuni ve ark., 1989; Fox ve ark., 1993; Zhang ve ark., 1995; Zhang & Arnold, 1996). Dikiş teknikleri dokuyu yakınlaştırabilir ve iyileşen dokunun büyüme sürecinde vasküler geçit kanalları sağlayabilir. Erken dönem dikiş çalışmalarının çoğunda poliglikolik asit (PGA), poliglaktin veya polidioksanon (PDS) gibi

absorbe olabilen dikişlerin kullanılmıştır. Fakat eklem hareketinin mekanik etkilerine karşı, bozunabilen dikiş iplikleri ile istenen desteğin sağlanamadığı görülmüştür (Miller, 2003).

Menisküs değişimlerinde kullanılan ilk metot transplantasyondur. Otogreft dokular (hastadan alınan) ve allogreftler (insan kadavrasından alınan) transplantasyonda yaygın olarak kullanılmaktadır (Bursk ve ark., 1988; Arnoczky ve ark., 1992; Rath ve ark., 2001). Transplantasyonun başarısı dokunun saklanması, alıcının ve vericinin immünolojik uygunluğu, fiksasyon metodu, transplantın uzun süre biyolojik ve biyomekanik anlamda bütünlüğünü koruması gibi etkenlere bağlıdır (Jackson ve ark., 1992; Rodeo ve ark., 2000). Otogreft transplantasyonunun immün sistem tarafından reddedilmemesi ve enfeksiyon oluşturmaması gibi avantajları mevcuttur. Bunun yanı sıra doku boyutunda uyumsuzluk uzun süren cerrahi işlem dokunun alındığı bölgede oluşabilecek morbidite gibi dezavantajları nedeniyle sorun teşkil etmektedir. Fakat allogreft transplantasyonunda bu sorunlar ortadan kalkmaktadır. Otogreft transplantasyonu değerlendirmek ve allojenik transplantasyon avantajlarını göstermek için Stone ve ark. köpeklerde otojenik menisküs transplantasyonu gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada menisküs dokuları diz ekleminde çıkarılmış ve yeniden aynı bölgeye implante edilmiştir. Deney sonucunda köpeklerin %50'sinde iyileşme olmasına karşılık iyileşme bölgesinde kollajen anormallikleri tespit edilmiş ve deneklerin %79'unda topallama gözlemlenmiştir (Stone ve ark., 1995).

Allogreftler literatürde taze, kriyopreserve, taze donmuş veya liyofilize olarak tanımlanmıştır. Liyofilize allogreft transplantasyonlarında kıkırdak hasarları, sinovit gibi istenmeyen sonuçlarla karşılaşmış ve greftlerde küçülme saptanmıştır. Taze ve kriyopreserve allogreftler transplantasyon sırasında canlı hücre içermeleri sebebiyle ESM üretebileceği gibi immünolojik reaksiyon oluşturmaları çok yüksektir (Peters & Wirth, 2003). Donmuş greftler daha az maliyetli ve daha az enfeksiyon riski taşımasından dolayı kriyopreserve allogreftlere alternatif oluşturmaktadır (Fabbriciani ve ark., 1997). Ayrıca greftin donma-çözme sayısının, menisküsün kompresyona dayanma yeteneği üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Tek bir dondurma-çözme döngüsüne tabi tutulmuş menisküslerin, dört kez dondurma-çözme işlemine tabi tutulan menisküsten daha yüksek bir Young modülüne sahip oldukları gösterilmiştir (Lewis ve ark., 2008).

Verici hücreleri ile alıcı hücrelerinin yer değiştirilmesinden (Arnoczky ve ark., 1992; Jackson ve ark., 1993; Rodeo ve ark., 2000) bu yana fonksiyonel bir transplant için ESM'in korunması daha önemli hale gelmiştir.

Tablo 2.Menisküs grefti kullanılan çalışmalar.

Model	Menisküs	Kullanılan otogreft	Bulgular	Referans
Keçi	Medial	Menisküs	Periferdeyeniden vaskülarizasyon ile birlikte iyileşme. Su içeriği % 6 artışı ile proteoglikan içeriği artışı	Jackson ve ark.(1992)
Koyun	Medial	Patellar tendon	Dokunun yenilenmesi ve revaskülarizasyonu. Normal menisküs ile karşılaştırıldığında daha düşük gerilme modülü. Menisküsün büzülmesi ile bazı dejeneratif değişiklikler	Kohn ve ark.(1992)
Koyun İnsan	Medial	Infrapatellar fat pad Patellar tendon Quadrisepts tendonu	Normal dokuya göre düşük gerilme dayanımı Komplikasyon kıkırdak dejenerasyonu bulunmadı.	Kohn (1993)
Köpek	Medial	Otogreft menisküs	% 50' oranında iyileşme. Önemli ölçüde kolajen dejenerasyonları.	Stone ve ark.(1995)
İnsan	Lateral	Semitendinous tendon(4) Patellar tendon (1)	Bir hastada hafif iyileşme. Eklem yüzeyi korunmadı ve iyileşme gözlenmedi.	Johnson & Feagin (2000)
Koyun	Medial	Meniskus otogreft (8) Meniskus allogreft (8)	Tüm deneklerde periferal iyileşme Meniskektomiye kıyasla defekt boyutunda azalma. Hafif yüzey fibrilasyonu ve fibrinoid dejenerasyon.	Szomor ve ark.(2000)
Koyun	Medial	Perikondriyum	Normalden düşük gerilme dayanımı ve daha az yoğun revaskülarizasyon.	Bruns ve ark.(1998)

2.3 Doku Mühendisliği

Langer ve Vacanti doku mühendisliğini, doku veya organların işlevlerinin korunması, yeniden düzenlenmesi, iyileştirilmesi ya da yeniden biyolojik dokuların oluşturulması yönünde mühendislik ve temel bilimlerin ilkelerinin uygulanması olarak tanımlamıştır. (Langer ve Vacanti, 1993). MacArthur ise *Bringing the gap* adlı makalesinde “doku oluşum prensiplerini anlamak ve klinik uygulamalar için fonksiyonel doku üretiminde bu bilgileri uygulamak” olarak tanımlamaktadır (MacArthur ve Oreffo, 2005).

Menisküs doku mühendisliği, biyolojik ve biyomekanik özellikleri doğal menisküs dokusu ile uyumlu olan, eklem zarar vermeyen bir ürün geliştirmeyi amaçlamaktadır. Bu alanda pek çok çalışma yapılmış fakat sınırlı başarılarla ulaşılmıştır. Menisküsün kendine özgü fibriller dizilimi ve hücre popülasyonu nedeni ile taklit edilmesi zor bir dokudur. İdeal bir menisküs implantı, biyo-uyumlu, çevre dokularla etkileşimde, yeni damarlanmalara izin verebilecek, yeni doku oluşumu sürecinde eklem kıkırdığına zarar vermeyecek, biyomekanik olarak uyumlu ve doku beslenmesine izin verebilecek özelliklere sahip olmalıdır. Sonuç olarak menisküs doku mühendisliğinde, doku iskeleleri ile birlikte kullanılan hücre temelli yöntem ve dokudan endojen hücreleri ayırarak hücresiz doku iskeleleri kullanılan yöntem olmak üzere temelde iki yaklaşım vardır. Hücre kültürü temelli yöntemler ile kök hücreler veya meniskal hücre tiplerinin özel koşullarda kültüre edilmesiyle ESM oluşturmaya amaçlanmaktadır. Bu yöntemler ile hücreler arası etkileşime olanak veren, toksik etki oluşturmeyen doku iskeleleri kullanılmaktadır. Menisküs yenilenmesindeki ideal bir yaklaşım belirlenmemiş olup her yöntem daha ileri araştırmalar için değer sağlamaktadır.

Menisküs dokusunun yapısal ve anatomik özellikleri nedeniyle, fonksiyonel bir menisküs doku iskelesi elde edilmesi kadar iskelelerin hücreler ile kültüre edilmesi de önemlidir. Bu alanda farklı çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Mueller ve ark. bir çalışmada menisküs dokusunda elde edilen hücreleri KMI (Kollajen Menisküs İmplant) (CMI®, ReGen Biologics, Hackensack, NJ, USA) üzerinde in vitro ortamda çoğaltmış üç hafta sonrasında kollajen doku iskelesinin %50 oranında büzüştüğü/azaldığı görülmüştür (Mueller ve ark., 1999). İmmunohistokimya çalışmalarında ise beyaz bölgedeki hücreler, hücrelere kontraktif fenotip veren alfa düz kas aktin (α -DKA) proteini için pozitif boyanmış ve miyofibroblastlar olarak tanımlanmıştır. Mueller ve ark. α -DKA'nın normal meniskal dokusundaki hücrelerde % 10 oranında mevcut olduğunu göstererek bu hücrelerin tek katmanlı kültürü boyunca tüm hücrelerde α -DKA mevcut olduğunu belirtmiştir (Mueller ve ark., 1999).

Bir başka in vitro çalışmada ise insan kemik iliğinden elde edilen MKH'ler ile tip I kollajen doku iskelesi kullanılmıştır. Bu çalışmada MKH'ler kondrosit hücrelerine farklılaştırılarak tip I kollajen doku iskelesi içerisine enjekte edilmiştir. Hücrelerin doku iskelelerine enjekte edilmesi, yüzeysel ekim ile karşılaştırıldığında çoğalan hücrelerin sayıca daha çok olduğu bulunmuştur (Verdonk ve ark., 2006).

İdeal bir doku iskelesi temel olarak biyo-uyumlu ve yeni doku oluşumu ile eş zamanlı, kontrol edilebilir biyo-bozunur özelliklere sahip olmalıdır. Aynı zamanda hücrelerin tutunmasına, yeni doku gelişimine, besin maddelerinin ve atıkların akışına olanak sağlayan yeterince büyük ve birbiri ile etkileşim halinde olan gözenekli üç boyutlu yapıda olmalıdır. Bu özelliklerin yanında doğal doku ile uyumlu mekanik davranış göstermelidir (Hutmacher, 2000).

Doku iskelesi yapımında çoğunlukla polimerler kullanılırlar (Dabrowski ve ark., 2010; Isikli ve ark., 2011). Doku mühendisliğinde kollajen, polyester benzeri polihidroksilalkanoatlar gibi doğal polimerler ve polilaktik asit (PLA), poliglaktik asit (PLGA) ve poli ürean (PU) gibi sentetik polimerler sıklıkla kullanılmaktadır. Doğal malzemelerin potansiyel avantajının yanı sıra inflamatuvar ve antijenik dezavantaj oluşturmaktadır (Furthmayer, 1976). Bu malzemelerin uzun izolasyon ve saflaştırma işlemleri sınırlı fiziksel ve mekanik özellikler teşkil etmektedir. Tabloda 3'te görüldüğü gibi fibrin jeller, agaroz, selüloz, hiyaluronik asit, ipek ve kollajen menisküs doku iskelesi uygulamalarında kullanılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Doğal ve sentetik polimerler kullanılarak geliştirilen menisküs doku iskeleleri.

Malzeme	Hücreler	Sonuçlar	Referans
PGA-PLGA	Fibro kondrosit (koyun)	GAG, kollajen üretimi ve organizasyonu	Ibarra ve ark. 1997
PGA	Fibro kondrosit (tavşan)	Hücre proliferasyonu, GAG, kollajen üretimi fakat düşük mekanik dayanım	Aufderheide and Athanasiou, 2005
PGA-PLGA	Meniskal kondrositler (tavşan)	Mekanik dayanımı yüksek, menisküs benzeri doku oluşumu fakat düşük kollajen ve GAG üretimi	Kang ve ark. 2006

Tablo 3.Doğal ve sentetik polimerler kullanılarak geliştirilen menisküs doku iskeleleri (devam).

PLLA	Meniscus hücreleri ve eklem kıkırdağı kondrositleri	Artan eklem kıkırdağı kondrosit oranı ile kollajen tip II ve GAG üretimi	Gunja and Athanasiou, 2009
PCL	MKH	Hücre ekimi ile artan gerilme özellikleri, yüksek oranda kollajen fakat düşük oranda GAG üretimi	Baker ve ark 2011
Tip I kollajen Tip II kollajen	Fibro kondrosit (sığır)	Tip II kollajen temelli yapılar hücre sayısında azalma, çok sayıda kollajen ve GAG üretimi göstermiştir.	Mueller ve ark., 1999
Kollajen I- GAG (Regen Menaflex)	Fibro kondrosit (koyun)	ESM üretimi, hızlı yenilenme ve hücre ekim sonrasında vaskularizasyon oluşumu belirlenmiştir.	Martinek ve ark. 2006
Kollajen sünger (sığır derisinden)	Meniskal hücreler (insan), TGFbeta	Hücrelerin iyi yayılması ve ESM oluşumu	Gruber ve ark. (2008)
Kollajen tip I (KMI)	MKH (insan)	Perfüzyon işlemi ile hücre kültüründe proliferasyon artışı ve hücre farklılaşması ile mekanik uyarım	Petri ve ark. 2012
Kollajen I- GAG	Fibro kondrosit (insan)	Biyomekanik özellikler hücre ekimi ile geliştirilmiş, kollajen tip I, II ve GAG üretimi saptanmıştır.	Ndreu-Halili 2011

Tablo 3.Doğal ve sentetik polimerler kullanılarak geliştirilen menisküs doku iskeleleri (devam).

İpek fibroin	Orta: insan eklem kondrosit, Perifer: insan dermalfibroblast	Hücre ekimi sonrasında basıdayanımı geliştirilmiş ve düşük tip I, II kollajen ve GAG üretimi gözlenmiştir.	Mandal ve ark. 2011 a
	Mezenşimal kök hücreler	Mandal ve ark. 2011a ile karşılaştırıldığında daha da iyileştirilmiş bası dayanımı, yüksek kollajen, GAG ve agrakan üretimi gözlenmiştir.	Mandal ve ark. 2011b
Hyaluronan	Eklem kondrositler	Dinamik kültür ile doku iskelelerinin periferinde yüksek kollajen tip I ve versican üretimi ve orta kısımda kollajen tip I, II, agrekan üretimi belirlenmiştir.	Marsano ve ark. 2006 b

Günümüzde segmental menisküs defektlerinin tedavisinde kullanılabilen iki adet sentetik menisküs doku iskelesi mevcuttur. Menaflex (ReGen Biologics Inc., Hackensack, New Jersey, ABD), daha önceden sığır aşıl tendonundan elde edilmiş kollajen menisküs implant (KMİ) olarak bilinen doku iskelesinin, içine hücrelerin büyümesini kolaylaştırmak için kollajen lifleri GAG'larla zenginleştirilmiş, menisküsün anatomik ve biyomekanik özelliklerini taklit eden gözenekli sentetik doku iskelesidir (Stone K. Prosthetic knee joint meniscal cartilage. US Patent No. 4, 880). KMİ'nin erken dönem tahribatları sonrasında geliştirilen Menaflex köpekler üzerinde denenmiştir. Yürütülen çalışmalarda erken sonuçlar ümit vaat etse de bir yıl sonraki değerlendirmelerde total menisektomi grubuna göre anlamlı bir fark yaratamamıştır (Stone ve ark., 1995). Actifit (Orteq, Londra, İngiltere) ise, gözenekli, biyo-bozunur, poliüretan sentetik bir doku iskelesidir. Yaklaşık beş yıl içinde yavaş bozunabildiği ve parçalanınca toksik olmayan bileşenlerin güvenle vücut dışına atıldığı söylenmektedir. Menaflex'e göre Actifit ile ilgili çalışmalar daha az olmakla birlikte; doku iskelesinin içinde menisküs benzeri dokunun geliştiği,

gösterilmiştir. Actifit mensikal implantı ile temas alanının arttığı ve temas basınçlarının parsiyel menisektomili dizlere göre azaldığı gösterilmiştir (Brophy ve ark., 2010). Daha sonra yürütülen koyun menisküs defekti çalışmasında doku iskelesinin altında kalan eklem kıkırdığı üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı ve parsiyel menisektomi ile benzer sonuçlar verdiği saptanmıştır (Maher ve ark., 2010). Fakat aynı çalışmada eklem orta hattına yakın kıkırdak hasarı geliştiği gözlenmiş ve bu durumun yetersiz yük transferi veya aşırı yüklenmelerin eklem yüzeylerinde yoğunlaşması nedeni olabileceği düşünülmüştür (Rongen ve ark. 2014).

Poliüretan kullanılarak üretilen doku iskeleleri ile yürütülen ilk klinik çalışmaların sonuçları, implantın biyo-uyumluluk gösterdiği ve doku büyümesine olanak verdiğini ortaya koymaktadır (Verdonk ve ark., 2011). Verdonk ve ark. ICRS (International Cartilage Repair Society) evreleri ikinin altında olan 52 hastada yürüttükleri iki yıl takipli çalışmasında; altı ayın sonunda hastalarda anlamlı ve klinikle uyumlu fonksiyonel iyileşme olduğu ve bu değerlerin ikinci yıldaki son takibe kadar giderek daha da iyileştiğini bildirmişlerdir (Verdonk ve ark., 2012). Kıkırdak yıkımın azalması ve osteoartrit oluşumunun engellenmesi gibi etkiler uzun dönem süren çalışmalar sonucunda anlaşılabileceği öngörülmektedir (McDermott ve ark., 2010; Spencer ve ark., 2012).

Doku mühendisliği çalışmaları, yumuşak ve sert doku iskeleleri geliştirmek için birçok olasılık sunmaktadır. Özellikle asellülerizasyon yöntemi ve onu takiben dokunun MKH'ler ile canlılık kazanması, antijenite açısından, dokunun biyoaktif rol kazanmasında çok etkili bir yöntem olabilecektir.

2.4. Asellülerizasyon

Asellülerizasyon yöntemi, dokunun hücresel içeriğinden arındırılması ve hücresiz ESM'i korunmuş doku iskelesi elde edilmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Asellülerizasyon yönteminde çeşitli teknikler denenmiş olup en sık kimyasal yöntem kullanılmıştır. Kimyasal yolla hücresel yapıların uzaklaştırılması işlemi sonucunda üç boyutlu yapısı iyi korunmuş ESM elde etmek amaçlanmaktadır. Asellülerizasyon işlemi sonucunda elde edilen ESM fonksiyonel bir halde GAG, protein yapıları ve büyüme faktörlerini içerirse daha ideal taşıyıcı olarak doku mühendisliğinde kullanılabilir (Mokry ve ark., 2013). Sentetik doku iskeleleri, kolay işlenebilirliği, bileşenlerinin tam olarak bilinmesi ve pek çok üretim tekniğine sahip olmaları gibi avantajlarına karşılık hücrelerin tutunması ve proliferasyonu açısından doğal yapılar kadar uygun destek verememektedir. Canlı dokudan asellülerizasyon yöntemi ile elde edilen ESM'in

doğal doku özelliklerinin korunabilmesi ve canlı sistemde bulunan hücrelerin yerleşmesi ile çoğalması için destek sağlaması ilham verici bir yaklaşımdır. Böylelikle doku nakillerinde, vericiden alınan dokulardan asellülerizasyon yöntemi ile doğal bir doku iskelesi elde edilebilecek doku kaybı olan bölgeye implante edildiğinde alıcının hücreleri için uygun bir ortam oluşturulmuş olacaktır. Bu yöntem, hem doku nakilleri için kaynak oluşturabilecek hem de doğal doku iskeleleri ile tedavi yöntemi geliştirilmesine olanak sağlayabilecektir.

Dokulardan hücrelerin arındırılması için pek çok asellülerizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Asellülerizasyon sürecinde hücrelerin dokulardan arındırılması kullanılan dokunun, kökenine biyokimyasal yapısına ve asellülerizasyon için seçilmiş fiziksel, kimyasal ve enzimatik ajanlara bağlıdır. İşlemlerin her biri dokunun mikro yapısını ve biyokimyasal özelliklerini etkilemektedir. Asellülerizasyonun başarılı olabilmesi dokuların mikro yapılarının ve biyokimyasal özelliklerinin değiştirilmeden ya da değişimin en aza indirilmesi ile ESM bütünlüğünün korunmasına bağlıdır.

2.4.1. Asellülerizasyon Ajanları

Asellülerizasyon için kullanılan ajanlar fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak sınıflandırılmaktadır. Uygulanacak yöntem ve kullanılacak basamaklar dokunun hücresel yoğunluğuna, kalınlığına, biyokimyasal yapısındaki moleküllere bağlı olarak seçilmelidir.

2.4.1.1. Fiziksel Ajanlar

Fiziksel ajanların tek başına kullanıldığı yöntemler mevcut olsa da dokudan hücrelerin arındırılmasına yeterli olmadığı görülmektedir (Naal ve ark., 2008). Asellülerizasyon işlemine yardımcı olması için fiziksel uygulamalar yapılabilir. Dondurma-çözme, doğrudan basınç, ses dalgalarının kullanımı gibi yöntemler fiziksel asellülerizasyona örnek gösterilebilir (Gulati ve ark., 1988; Freytes ve ark., 2008; Funamoto ve ark., 2010). Bu yöntemler arasında etkili yöntem olarak dondurma-çözme yöntemi, hücre içinde oluşan buz kristalleri ile hücrelerin parçalanmasına ve dokuların açılması ile birlikte kimyasal ajanların doku içerisine girebilmesini sağlayarak asellülerizasyon işlemine yardımcı basamak oluşturmaktadır.

2.4.1.2. Kimyasal Ajanlar

Asitler ve Bazlar

Asit ve bazlar biyolojik moleküllerin hidrolitik yıkımını sağlayarak hücresel bileşenleri çözer. Fakat asit ve bazların kullanımı doku için önemli hasarlara neden olacağından dikkatlice seçilmelidir. Örneğin, asetik asit sülfatlanmış GAG'lara zarar vermezken, kollajen fibrillerde hasara neden olur (Dong ve ark., 2009). Perasetik asit (PAA) ise yaygın olarak dezenfeksiyon ve sterilizasyon amacıyla kullanılmaktadır. ESM üzerinde hasara neden olmadan nuklear kalıntıların uzaklaştırılmasından dolayı asellülerizasyon ajanı olarak kullanılabilir (Hodde ve ark., 2007). Bazlar deri asellülerizasyonunun erken basamaklarında kılların uzaklaştırılması için kullanılmış fakat büyüme faktörlerini dokudan uzaklaştırması ve kollajen fibrillere zarar vermesi nedeniyle mekanik özellikler olumsuz olarak etkilenmiştir. (Reing ve ark., 2010).

Hipotonik ve Hipertonik Çözeltiler

Hipertonik ve hipotonik çözeltiler dokular üzerinde osmotik şok etkisi göstererek hücrelerin parçalanmasına neden olur (Cox and Emili ve ark.,2006.) Maksimum osmotik etki için hipotonik ve hipertonik çözeltiler döngü halinde dokudan geçirilebilir. Bu çözeltiler ayrıca parçalanmış hücrelerin dokulardan uzaklaştırılmasına da yardımcı olurlar. Tek başına hipotonik ve hipertonik çözeltiler dokudan hücrelerin ayrılmasında etkili olmazlar ve deterjanlar ile birlikte kullanıldığında daha etkili sonuçlar verirler (Yang ve ark.,2009).

Deterjanlar

Dokuların asellülerizasyonunda iyonik, iyonik olmayan deterjanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Deterjanlar hücre zarını çözerek proteinleri denatüre etmesinden dolayı asellülerizasyon için önemli bir basamak oluşturur. Dokuların hücrelerden arındırılmasında deterjana maruz kalma süresi ESM'in zarar görmemesi için önemli bir faktördür. Ayrıca farklı deterjan kombinasyonlarının kullanılması, ESM'in hasar görmesi ile sonuçlanmaktadır (Rieder ve ark., 2004).

SDS hücre ve nukleus zarını parçalayarak ESM proteinlerini denature etmektedir. Asellülerizasyon yöntemi için oldukça uygun özelliklere sahip olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Reing ve ark., 2010; Lumpkins ve ark., 2008; Stapleton ve ark., 2008; Deeken ve ark., 2011). SDS'nin hücre ve nukleus içeriği etkili bir şekilde kaldırdığı gösterilmiştir ancak, aynı zamanda GAG, büyüme faktörleri ve kollajen fibrillere zarar verebilmektedir (Reing ve ark., 2010; Lumpkins ve ark., 2008; Stapleton ve ark., 2008; Deeken ve ark., 2011). Yüksek

konsantrasyonlarda kullanılan SDS sadece hücre içeriğini ortadan kaldırmakla kalmaz aynı zamanda ESM proteinlerine ve kollajen fibrillere zarar verebilir. Düşük konsantrasyonlar bu zararı en aza indirmek için tercih edilmelidir. SDS'nin yanı sıra Triton X-100 hücreleri parçalamak amacıyla sık kullanılan iyonik olmayan bir deterjandır (Reing ve ark., 2010; Yang ve ark., 2009;). Doku içerisindeki protein-protein etkileşimlerine zarar vermeden dokunun hücrel içeriğini kaldırabilir. Fakat bu etki ince dokuların asellülerizasyonu için önerilebilir, böbrek, karaciğer gibi daha yoğun dokuların asellülerizasyonu için yetersiz kalmaktadır.

2.4.1.3. Biyolojik Ajanlar

Enzimler

Asellülerizasyon işleminde sık kullanılan enzimler hücrel içeriklerin ve ESM bileşenlerinin uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Tripsin hücrel yapıların uzaklaştırılması amacı ile kullanılan proteolitik enzimdir. Fakat tripsinden kaynaklanan matriks hasarı dokunun hem mekanik hem de biyolojik özelliklerinde değişime neden olur (Yang ve ark., 2009). Nükleazlar DNA ve RNA'yı parçalayarak nükleer maddenin dokulardan çıkarılmasına yardımcı olmak için kullanılır. Enzimlerin nükleer maddeye erişebilmesi için hücrelerin parçalanması gerekir, dolayısıyla nükleaz basamakları bir protokolün sonuna doğru uygulanır. Daha verimli parçalanma ve dolayısıyla DNA'nın daha verimli çıkarılması için Benzonaz gibi kısıtlama içermeyen endonükleazlar kullanılabilir (Petersen et al., 2010). Ayrıca dokunun enzimler ile muamele edilme süresi de dikkate alınması gereken bir noktadır. Uzun inkübasyon donun ESM'ine zarar verirken kısa inkübasyon ise hücrel içeriğin dokudan tamamen uzaklaştırılmasını önler.

Enzimatik Olmayan Ajanlar

Etilendiamintetra asetik asit (EDTA) ve etilen glikol tetraasetik asit (EGTA) gibi şelatlayıcı ajanlar daha hassas bir asellülerizasyon için kullanılmaktadır. Bu maddeler Ca ve Mg gibi iyonları tutabilme özelliği sayesinde ESM proteinlerinden hücrelerin ayrılmasını kolaylaştırır (Klebe, 1974). Bu ajanlar diğer asellülerizasyon ajanlarının hücreleri parçalaması ile ortaya çıkan endojen proteinazlardan ESM'i korur (Booth et al., 2002).

Uygun bir asellülerizasyon işlemi için seçilen yöntemler ve bahsedilen tüm ajanlar asellüler hale getirilecek dokunun özellikleri doğrultusunda belirlenmelidir. Dokuların asellülerizasyonu her dokunun sahip olduğu ESM proteinleri, kollajen yapıları ve hücrel içeriğine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Araştırmanın tipi

Bu tez çalışması onarımı mümkün olmayan menisküs doku yaralanmalarının iyileştirilmesi üzerine planlanmış araştırmaya yönelik deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırma yeri ve zamanı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi'nde Biyomekanik Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ortaklığı ile 9.10.2014-10.6.2017 tarihleri arasında yürütülmüştür.

3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme

Bu tez çalışması insan üzerinde değil deney hayvanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. Çalışma materyali

Çalışmada deney hayvanları (tavşan) kullanılmıştır. 2,5-3 kg ağırlığındaki 30 adet Yeni Zellanda Beyaz Tavşanı Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Temel deney materyali olarak ise tavşan menisküsleri ve tavşan kemik iliğinden elde edilen hücreler kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Deney grupları şu şekilde sıralanmıştır;

Grup 1 (n=10): Bu çalışma grubu; kontrol grubu olarak tasarlanmıştır. 10 adet tavşanın sağ dizlerindeki medial menisküsler uygun cerrahi işlem ile çıkarılıp herhangi bir işleme tabitutulmadan incelemeye alınmıştır. Böylelikle diğer gruplardaki menisküs dokularının histolojik, biyokimyasal ve biyomekanik özellikleri doğal menisküs dokuları ile karşılaştırılmıştır.

Grup 2 (n=10): Bu grup; asellülerizasyon deney grubu olarak tasarlanmıştır. 10 adet tavşanın sağ dizlerindeki medial menisküsler uygun cerrahi işlem ile çıkarılıp %0.1 g/mL SDS (sodyumdodesilsulfat) ile asellüler hale getirilmiştir. Asellüler menisküs dokuları histolojik, biyokimyasal ve biyomekanik olarak araştırılmıştır.

Grup 3 (n=10) Bu grup; menisküsü alınan tavşanlara, laboratuvar koşullarında asellüler hale getirilmiş menisküs dokularının, tekrar MKH'ler ile canlılık kazandırılması amacı ile oluşturulmuştur. İlk olarak, tavşanların sağ dizindeki medial menisküsler çıkartılarak laboratuvar koşullarında asellüler hale getirilmiştir. Bu işleme paralel olarak aynı tavşanların kemik iliklerinden mezenşimal kök hücrelerin izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. MKH'lerin tanımlanması ve farklılaştırılmasının ardından asellüler haldeki menisküs dokularına ekimleri gerçekleştirilmiştir. Asellüler menisküs dokularının kök hücreler ile yeniden farklılaştırılması

sonucunda menisküs dokusunun hücresel, biyokimyasal ve biyomekanik özellikleri araştırılmıştır.

3.6. Veri toplama araçları

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, sarf malzemeler ve kitlerin listeleri ilgili tablolarda gösterilmiştir. (Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8)

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Adı, Modeli	Çalışmadaki Kullanım Amacı
Inkübatör/ Heraus, Heracell 150	Hücrelerin inkübasyonu
Santrifüj/ Hettich, Universal 32	Hücre süspansiyonlarının ayrıştırılması
Su banyosu/ Memmert, WB 7	Gerekli kimyasalların çözünmesi
Orbital çalkalayıcı/ BioSan PSU 20İ	Çözeltilerin uzun sürelerde çalkalanması
Çalkalayıcı inkübatör / Shellab SI6	Çözeltilerin istenen sıcaklıklarda uzun süre çalkalanarak inkübe edilmesi
Etüv / Memmert	Kimyasalların istenen sıcaklığa getirilmesi
Hassas terazi / Denver Ins. SI234	Kimyasalların tartımı
Manyetik karıştırıcı / Labart SH5	Kimyasalların karışımı
pH metre / Hanna	Çözeltilerin pH ayarlanması
Distile su cihazı / GFL 2004	Distile su eldesi
Derin dondurucu -20°C / GLE30	Kimyasalların saklanması
+4°C buzdolabı/ Indesit, T5	Kimyasallar ve hücre kültürü ortamlarının saklanması
-40 °C derin dondurucu / GLE30	Kimyasalların saklanması
Mikrodalga fırın / Galanz	İmmünohistokimya “antigen retrieval” işlemi
Otoklav / Nüve OT/O32	Hücre kültüründe gerekli malzemelerin sterilizasyonu
Azot tankı / Airliquid GT18	Hücrelerin ve dokuların uzun süre saklanması
Laminer flow/ Nüve, MN 120	Hücre kültüründe steril ortamın sağlanması

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları (devam).

Ters-faz mikroskop / Olympus CKX41SF, Japonya	Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin izlenmesi
Fluoresan Mikroskop	İmmünofluoresan görüntülemeler
Işık mikroskobu / Olympus BH50	Histolojik incelemeler
Mikrotom /RM 2255, Leica	Histolojik kesitleri alınması
Digital kamera / Olympus DP71	Histolojik görüntüleme
Akış sitometre / Facs Aria III / BD Bioscience	Hücre yüzey işaretleyicilerinin analizi
Plak okuyucu (BioTek ELX 800)	96 kuyulu plakların absorbanlarının okunması
Schimadzu AG-10	Biyomekanik analizler

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları.

Adı	Çalışmadaki Kullanım Amacı
Tris-HCl/Applichem	Hücreleştirme tampon bileşeni
Sodium dodesil sülfat (SDS)/Applichem	Hücreleştirme tampon bileşeni
Etanol/Sigma	Hücreleştirme tampon bileşeni
EDTA/Applichem	Hücreleştirme tampon bileşeni
DAB kromojeni/Roche	İmmünohistokimyasal araştırmalarda tampon bileşeni
Hidrojen peroksit/Bio Optica	İmmünohistokimyasal araştırmalarda tampon bileşeni
Sitrat tamponu	İmmünohistokimyasal araştırmalarda tampon bileşeni
Hematoksilen & eosin/Bio Optica	Histolojik çalışmalarda nükleus/stoplazma boyası
Etanol/Merck	Rutin doku takibinde dokuların yıkanması

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları (devam).

Aseton/Merck	Rutin doku takibinde dehidrasyon işlemi
Ksilol/Merck	Rutin doku takibinde şeffaflaştırma işlemi
Formaldehit	Rutin doku takibinde dokuların fiksasyonu
Parafin	Rutin doku takibinde dokuların gömülmesi
DMEM ortamı/Biochrome	MKH'lerin izolasyon aşamasındaki besi ortamı bileşeni
MEM ortamı/Biochrome	MKH'lerin fibroblast hücrelerine farklılaştırılmasında ortam bileşeni
Fetal Bovine Serum (FBS)/Biochrome	Hücrelerin büyüme ortamı bileşeni
PBS/Biochrome	Yıkama çözeltisi
L-Glutamine /Biochrome	Hücrelerin büyüme ortamı bileşeni
Penisilin-streptomisin-amfoterisin karışımı/Biochrome	Hücrelerin büyüme ortamı bileşeni
Trypsin/EDTA/Biochrome	Pasajlama işleminde hücrelerin kaldırılması
Biocoll-Ayırma çözeltisi/Biochrome	MKH'lerin izolasyonu
Deksametazon/Applichem	MKH'lerin adiposit ve kondrosit farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni
Askorbik asit/Applichem	MKH'lerin kondrosit farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni
İnsülin/Biochrome	MKH'lerin kondrosit farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni
basic-FGF/Cell Signaling	MKH'lerin fibroblast farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni
İndometasin/Cell Signaling	MKH'lerin adiposit farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni
IBMX (3-izobütil-1-metilksantin)/Cell Signaling	MKH'lerin adiposit farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları (devam).

İnsülin-Transferrin-Selenyum karışımı/Cell Signaling	MKH'lerin adiposit ve kondrosit farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni
TGF-beta1/Cell Signaling	MKH'lerin kondrosit farklılaştırılmasında besi ortamı bileşeni
DAPI boyası/Applichem	Dokuların nükleotit boyaması
Flow cytometry için yıkama solüsyonuBD	Akım sitometri analizinde yıkama solüsyonu
CD29, CD34, CD45, CD90, CD73, CD117, HLA-DR Antikorları/Abcam	Akış sitometrik analizlerdeki monoklonal antikorlar
Tip I-II kollajen antikor	İmmünohistokimyasal boyaması
Agrekan/ Vimentin antikor	İmmünohistokimyasal boyaması
25 ve 75cm ² Flask/Greiner	Hücre kültürü kapları
15 ve 50 mL tüpler/Greiner	Hücre kültürü çözeltilerinin hazırlanması
6-24-96 well plate/Greiner	Hücre kültürü ve hücre canlılık analizleri

Tablo 6. Çalışmada kullanılan kitler ve kullanım amaçları.

Adı	Çalışmadaki kullanım amacı
Massson trikrom kit/Bio-Optica	Kollajen boyaması
Alcian blue kit/Abcam	GAG boyaması
Oil Red O/Abcam	Yağ hücrelerinin boyanması
DNA izolasyon kiti/M&N NucleoSpin Tissue	Total DNA ölçümü
GAG ölçüm kiti/Amsbio	Total GAG ölçümü
Kollajen ölçüm kiti/QuickZyme	Total kolajen ölçümü
XTT hücre canlılık ölçüm kiti/Cell Signaling	Hücrelerin canlılığının ölçülmesi
LDH Sitotoksosite analiz kiti/Roche	Hücrelerin toksisite analizi

3.6.1. Yöntem

3.6.1.1. Menisküslerin elde edilmesi

Tavşanlar, cerrahi operasyon öncesi intramuskular yol ile 5 mg/kg ksilazin ve 35 mg/kg ketamin verilerek anestezi altına alınmıştır. Deri dezenfekte edilerek, kaslara zarar vermeden medial parapatellar artrotomi yöntemi ile diz açılmıştır (Rijk ve ark., 2008). Böylece menisküs dokuları elde edilmiştir.

3.6.1.2. Asellülerizasyon işlemi

Tavşan menisküs dokularının asellülerizasyon işlemi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk olarak tavşan menisküs dokuları sadece kimyasal asellülerizasyon yöntemi (Sandmann ve ark., 2008) ile içerisinde sodyum dodesil sulfat (SDS) deterjanı bulunan çözelti içinde 15 gün süre ile 37 °C’de bekletilmiştir. Ardından tabloda görüldüğü gibi distile su ile yıkama ve %70 etanol ile sterilizasyon aşamaları sonrasında incelenmiştir. Tüm basamaklar kimyasalların örneklere iyi bir şekilde nüfuz edebilmesi için çalkalayıcı inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 7. Asellülerizasyon yöntemi (1)

1. gün	distile su ile yıkama	37 °C’de, 24 saat	Yıkama
2-14. günler arası	%1, %2, %5 SDS	37 °C’de, 15 gün	Asellülerizasyon
15. gün	distile su ile yıkama	37 °C’de, 24 saat	Yıkama
16. gün	%70 etanol	oda sıcaklığında 24 saat	Sterilizasyon
17-18-19. günler	PBS	37 °C’de, 3 gün	Yıkama

Tez çalışmasında kullanılan diğer yöntem ise fiziksel, kimyasal, enzimatik yöntemlerin hepsini içeren çok aşamalı asellülerizasyondur. Yöntem, Stapleton’un yönteminde değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Menisküs dokuları tavşanlardan elde edildikten sonra, ilk olarak dondurma çözme işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem -20 °C’de dondurma ve oda sıcaklığında tamamen çözülene kadar çözme olacak şekilde 3döngü halinde gerçekleştirilmiştir. Bu aşama dokulara hipotonik tampon (10 mM tris HCl, 10 KIU/mL Aprotinin ve %0.1g/mL EDTA) eklenerek tekrarlanmıştır. Daha sonra, dokular hipotonik çözelti içerisinde 37°C’de 24 saat yıkanmıştır. Kimyasal basamakda dokular, hipotonik tampona %0.1 g/mL SDS eklenerek 45 °C’de 48 saat boyunca ve ardından PBS, 10 KIU Aprotinin ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca

yıkanmıştır. Bu basamağı enzimatik basamak izleyerek nukleaz tamponu 3 kez (50 mM tris HCl, 21 mM MgCl₂, 50 µg/mL BSA, 50 U/mL DNAaz, 1 U/mL RNAaz) kullanılarak dokular 37 °C’de 3 saat boyunca yıkanmıştır. Menisküs dokuları yıkama çözeltisi (PBS, 10KIU Aprotinin, %0.1 g/mL EDTA) ile oda sıcaklığında 24 saat boyunca yıkanmış ve hipertonic tampon (50 mM tris HCl, 1.5 M NaCl) içerisinde 37 °C’de 24 saat boyunca bekletilmiştir. Ardından dokular yıkama çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 24 saat boyunca yıkanmış ve %0.1 g/mL perasetikasit (PAA) içerisinde 3 saat boyunca yıkanarak dezenfekte edilmiştir. Bu aşama sonrasında sterilizasyona dikkat edilerek aseptik koşullar sağlanmıştır. Son olarak dokular yıkama çözeltisi ile 45 °C’de, 37 °C’de ve oda sıcaklığında yıkanarak kimyasallardan arındırılmıştır. Tüm basamaklar çalkalayıcı inkübatörde gerçekleştirilerek tüm çözeltilerin dokulara nüfuz etmesi sağlanmıştır.

Tablo 8. Asellülerizasyon yöntemi (2)

Dondurma-çözme	-20 °C- oda sıcaklığı	3kez
Hipotonik tampon ile dondurma-çözme	-20 °C- oda sıcaklığı	
Hipotonik tampon ile yıkama	+4 °C’de 24 saat	3kez
Hipotonik tampon ile yıkama	37°C’de 24 saat	
%0.1 SDS ile asellülerizasyon	45°C’de 48 saat	3kez
Yıkama	oda sıcaklığında 24 saat	
Nukleaz tamponu	37 °C’de 3 saat	
Hipertonik tampon	37 °C’de 24 saat	
Yıkama	37 °C’de 24 saat	
%0.1 PAA ile sterilizasyon	oda sıcaklığında 3 saat	
Yıkama	45 °C, 37 °C’de ve oda sıcaklığında 24 saat	

3.6.1.3. Asellülerizasyon işleminin karakterizasyonu

3.6.1.3.1. Histolojik ve immunohistokimyasal araştırmalar

Tavşan menisküs dokularının hücresel içerikleri, kollajen fibriller ve GAG yapıları asellülerizasyon işlemi sonrasında incelenmiştir. Dokular, rutin doku takibi için dokular formalin ile fiske edilmiştir. 1 gece akarsu altında yıkanarak fiksatif uzaklaştırılmıştır. Ardından %70'den %96'ya doğru artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidre edilmiştir. Bu işlemi takiben, 20'şer dakika 4 değişim aseton solüsyonundan geçirildikten sonra 2 kez xylolde 30'ar dakika bekletilenmiştir. Rutin doku takibindeki işlemler 60°C'de etüvde gerçekleştirilmiş ve son olarak dokular parafine gömülmüş ve dondurulduktan sonra 5 µm kesitleri alınarak boyamaya hazırlanmıştır.

Hematoxilen&eosin boyaması için, 5µm parafin kesitler alınmış ve deparafinizasyon işlemi için 60°C'de 1 gece etüvde bırakıldıktan sonra, 20 dakika üç değişim ksilol uygulanmıştır. Dehidratasyon işlemi için %95'den %70'e doğru azalan etil alkol serilerinden geçirilen kesitler 10 dakika akarsu altında yıkanmıştır. Hematoksilen ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin boyası ile boyanarak sırasıyla %80 ve %95 alkol serilerinden geçirilip kurutulan kesitler şeffaflaştırma işlemi sonrasında sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelenmiştir (Sun, ve ark., 2012).

Ayrıca Masson tricrome boyaması yapılarak kollajen yapılar gözlemlenmiştir. Bu işlem için doku takibi sonrası deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler biri etüvde olmak üzere üç farklı ksilolde 20'şer dakika tutulmuştur. Azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile suda çalkalandıktan sonra Masson Trikrom boyama seti boyanmıştır. Boyama için, dokular üzerine Weigert's iron hematoksilen A solüsyonu ile Weigert's iron hematoksilen B çözeltisi damlatılarak nükleusların boyanabilmesi için 10 dakika bekletilmiştir. Yıkama işlemi yapılmadan preparatlar kurutulduktan sonra Pikrik asit alkolik C çözeltisi damlatılarak 4 dakika bekletilmiş ve distile su ile hemen yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan Ponceau asit fuksin azofloksin D solüsyonu 4 dakika bekletilerek hücre sitoplazmalarının boyanması sağlanmıştır. Preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra Fosfomolibdik asit E çözeltisi damlatılarak 10 dakika bekletilmiş ve yıkama yapılmadan Masson anilin blue F solüsyonudamlatıp 5 dakika bekletilerek bağ dokusunun boyanması sağlanmıştır. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilmiş ve ksilol ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatılarak ve ışık mikroskobunda incelenmiştir.

GAG yapılarının gözlenmesi için dokular Alcian blue ile boyanmıştır. Bu işlem için doku takibi sonrası deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler biri etüvde olmak üzere üç farklı ksilolde 20'şer dakika tutulmuştur. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandıktan sonra 30 dk Alcian blue ile boyanmıştır. Akarsu altında 2 dk yıkanan kesitler distile su ile çalkandıktan sonra Nuklear fast red ile 5 dk boyunca yavaşça kaynayana kadar ısıtılıp soğutuldu ve akarsu altında 1 dk boyunca yıkanmıştır. Ardından artan alkol serilerinden geçirilmiştir. Ksilol ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatılmış ve ışık mikroskobunda incelenmiştir (Björnsson, ve ark. 1993).

İmmunohistokimyasal araştırmalar, kollajen Tip I, II, agrekan ve vimentin antikorları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, öncelikle 60 °C'lik etüvde 3 değişim 20'şer dakika deparafinize edilen doku kesitleri, azalan alkol serilerinde rehidrate edilmiştir. Distile su ile 10 dakika boyunca yıkanıp dokuya zarar vermeden çevresi dakopen ile sınırlandırılmıştır. Antikorlar için Tripsin solüsyonu içinde 37 °C etüvde 15 dakika bekletilen kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacı ile 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulanmıştır. Fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda sıcaklığında bloklama solüsyonu ile inkübe edilip yıkama yapılmadan kollajen tip I,II, agrekan ve vimentin antikorları ile 1 saat +40°C'de inkübe edilmiştir. Fosfat tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikorlar ile 30 dakika inkübe edilmiştir. Sonrasında enzim işaretli avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) 30 dakika boyunca uygulandıktan sonra reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diaminobenzidin (DAB) kullanılmış ve hematoksilin ile zemin boyaması yapıldıktan sonra ışık mikroskobu ile incelenmiştir (Sun, ve ark., 2012).

3.6.1.3.2. Biyokimyasal Araştırmalar

Total kollajen Analizi

Asellülerizasyon işlemi sonrasında dokuların içeriğindeki kollajen miktarları Total Kollajen Kiti (Quickzyme Biosciences, Leiden The Netherlands) ile hidroksiprolin-prolin miktarına bağlı olarak ölçülmüş ve doğal menisküs dokusu ile karşılaştırılmıştır. İlk olarak dokular tartılmış ve 6M HCl ile 95°C'de 20 saat boyunca hidroliz edilmiştir. Örnekler soğuduktan sonra 13000g'de 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Dokular seyreltilmiş ve uygun standartlar kit talimatlarına bağlı kalınarak hazırlanmıştır. Örnekler 60 °C'de 60 dk. Boyunca çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildikten sonra soğutulmuş ve 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (Hanemaaijer R., ve ark. 2011).

Total DNA Analizi

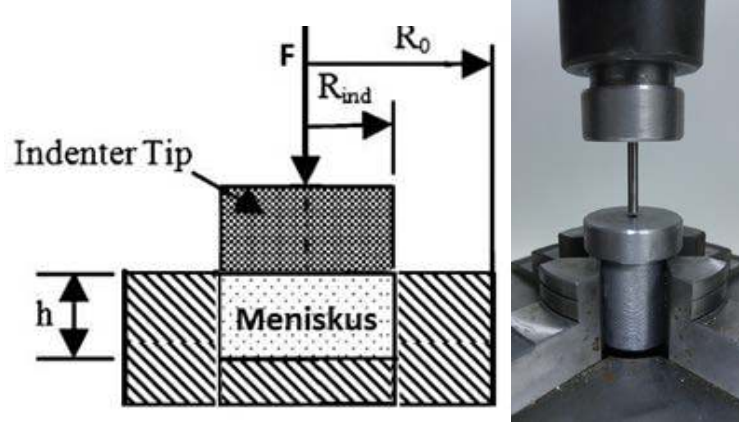
Asellülerizasyon işlemi sonrasında dokulardaki DNA içeriğinin değişip değişmediğini araştırılmıştır. Menisküs dokularından DNA, NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) ile ekstrakte edilip, 260 nm dalga boyunda UVnanodrop ile ölçülmüştür. İlk olarak dokular tartılıp küçük parçalara ayrılmış ve 25 uL Proteinaz K çözeltisi içinde gece boyunca 56 °C’de hidroliz edilmiştir. Santrifüj basamaklarından geçirilen örneklerden saf DNA elüsyonu elde edilmiş ve 260 nm dalga boyunda nanodrop ile DNA miktarları ölçülmüştür (Elder. ve ark. 2010).

Total GAG Analizi

Elde edilen asellüler menisküs dokusundaki glikozaminoglikan (GAG) miktarları metakromatik boya olan 1,9 dimetilmetilen mavisi (1,9 DMMB) ile incelenmiştir. Deney prensibi, GAG’ların boyaya bağlanması sırasında absorpsiyon spektrumunda bir kayma oluşturmaya ve kaymanın sülfatlanmış glikozaminoglikan miktarı ile doğru orantılı olmasına dayanır. Örnek değerleri, sülfatlanmış glikozaminoglikanların µg/ml, standart eğri ile tespit edilir. Deney kondroitin 4 ve 6 sülfat, heparin, keratin ve dermatan sülfatları tespit eder. Doku iskeleleri papain ile hidroliz edildikten sonra, 1,9 DMMB çözeltisi eklenerek 530 nm dalga boyunda spektrofotometre ile GAG miktarları ölçülmüştür (Mort & Roughley, 2007).

3.6.1.3.3. Biyomekanik Testler

Menisküs dokularının biyomekanik testler ile mekanik özellikleri incelenmiştir. Tez çalışmasının bu bölümünde; asellülerizasyon işleminin menisküs dokusunun biyomekanik özellikleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, menisküs dokularına, test cihazına yerleştirilecek olan doku boyutlarına uygun ekipmanlar ile basınç testleri uygulanmıştır. 2,5mm çapında biopsi kanülü ile dikkatli bir şekilde menisküs örnekleri kesilerek, indentasyon testi için silindirik numuneler elde edilmiştir. Elde edilen menisküs numunelerinin kalınlıkları ölçüldükten sonra, dokunun kaymaması ve gerçekleştirilecek test için elde edilen standart numunelere uyacak şekilde özel olarak tasarlanmış, 2,5mm çapında paslanmaz çelik bir pot içerisine yerleştirilmiştir. Standart menisküs numuneleri özel olarak tasarlanmış pot içerisine yerleştirildikten sonra, numunelere yine 2,5mm çapında düz uçlu indenter ile bası yükü uygulanmıştır. Bası deplasman parametresi 2mm ile sınırlandırılarak menisküsün malzeme karakteristiği indentasyon testi ile belirlenmiştir. Tüm testler aksiyel yük altında Elektromekanik Aküatör ile gerçekleştirilmiştir. (5 kN AG-X; Shimadzu, Japan) (Hayes ve ark., 1972).



Şekil 17. Menisküs dokularının indentasyon testinin şematik görünümü ve test düzeneği.

3.6.1.3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.6.1.3.4.1. Kemik iliği aspirasyonu

Kemik iliği aspirasyonu için; tavşanlar anestezi altına intramuskular yol ile 5 mg/kg ksilazin ve 35 mg/kg ketamin verilerek alınmıştır. Deri dezenfekte edilmiş ve ardından lumbur bölgesinin arkasından sırasıyla cilt, cilt altı, kemik zarı ve kemiğe girilerek, kemik iliği heparin içeren enjektör yardımı ile çekilmiş ve kemik iliği aspirasyonu elde edilmiştir (Boo ve ark., 2011)

3.6.1.3.4.2. tMKH'lerin izolasyonu ve karakterizasyonu

Tavşanlardan alınan kemik iliği PBS ile süspanse edilerek kemik iliği süspansiyonu Biocool Separation üzerinde tabakalandırılmıştır. Mononükleer tabaka toplanarak düşük glikoz içeren, antibiyotik/antimikotik ile desteklenmiş düşük glikoz içeren Dulbecco'nun değiştirilmiş eagle ortamı (DMEM-LG; 1000 mg L_1D-glukoz) kullanılarak yıkanmıştır. Hücreler %10 FBS (fetal sığır serumu), %1 antibiyotik/antimikotik ve 200 mM glutamin ile desteklenmiş büyüme ortamı (DMEM-LG) ile 1×10^6 hücre/cm² olarak flaskları kaplayacak şekilde kültüre edilmiştir (Tan S. L., ve ark.). İzole edilen ve flasklara yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri inverted mikroskopta çalışma süresince incelenmiştir. İmmünofenotipik özelliklerinin belirlenmesi için yüzey belirteçleri ile işaretlenerek akım sitometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için ise kondrojenik, adipojenik ve fibroblastik olarak hücreler farklılaştırılmıştır (Sik-Loo Tan ve ark., 2013).

tMKH'lerin akım sitometrik analizleri, 3. pasaj (P3) sonrasında, FACS AriaIII akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler Acutase Cell detachment Solution (StemCell, BD) kullanılarak tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılmış ve hücre sayısı belirlendikten sonra (yaklaşık olarak 5×10^6 hücre) PBS içinde homojenize edilmiştir. tMKH'leri, fluoresan izotiyosiyonat (FITC)-, fikoeritrin(PE)-, allophycocyanin (APC)-, fikoeritrin siyanin 5.5 (PECy^{5.5})- ile konjuge, CD 73 (APC – rabbit IgG_{1,κ}), CD 90 (FITC-rabbit IgG_{1, κ}) hücre yüzey işaretleyicilere pozitif ve CD 34 (PE – rabbit IgG₁), CD 45 (PE/Cy^{5.5} rabbit IgG_{1, κ}), tavşan hücre yüzey işaretleyicilerine özel monoklonal antikorlar ile negatif işaretlenmiştir. 15 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilen hücreler 1200 rpm'de 5 dk. sentrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 500 µl hücre yıkama çözeltisi eklenip resüspanse edilmiştir (Shaofeng, ve ark. 2009). Süspansiyon halindeki hücreler FACS Aria III akım sitometri-hücre ayırlama cihazında okutulurken önce tanımlanmış ardından hücre ayırlama işlemi yapılarak ayrılmıştır. Ardından FaxDiva Software programı ile veriler elde edilmiştir.

3.6.1.3.4.3. tMKH'lerin farklılaştırılması

tMKH'lerinin Kondrojenik Farklılaştırılması

tMKH'lerin kondrojenik farklılaşması tMKH'lerin izolasyonundan itibaren 3. pasaj sonrasında gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu kültür kabında 3000 hücre/cm² olacak yoğunlukta ekilen MKH'ler, içerisinde %10 FBS, %1 penisilin- streptomisin, 100 µM deksametazon, 10 ng/ml TGFβ (transforme edici büyüme faktörü-β1), 50 µg/ml askorbik asit ve 50 mg/ml ITS+Premiks bulunan DMEM-HG kıkırdaklaşma ortamına ekilmiştir. Hücrelerin içerisinde bulunduğu medyum haftada iki kez değiştirilerek 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda 2 hafta boyunca kültüre edilmiştir. Kültürün 2. haftası sonunda, kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların varlığının belirlenmesi için alcian mavisi ile boyanarak kondrojenik farklılaşma belirlenmiştir (Oliver ve ark. 2015).

Alcian blue boyaması için, kuyulardaki besiyerleri alındı ve 2 ml PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml paraformaldehit eklenerek ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırılarak distile su ile 2 kez yıkanmıştır. Kuyucuklara 3 ml alcian blue çözeltisi eklenerek 45 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Boya PBS ile yıkandıktan sonra alkol serileri (%25, %35, %50, %75, %90, %100) ile yıkanan kuyucuklar mikroskop altında görüntülenmiştir.

tMKH'lerinin Adipojenik Farklılaştırılması

tMKH'leri adipojenik farklılaşması, tMKH'lerin izolasyonundan itibaren 3. pasaj sonrasında gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu kültür kabında 3000 hücre/cm² olacak yoğunlukta ekilen tMKH'ler; içinde %10 FBS, 0.5mM isobutil-metilksantin, 10-6M deksametazon, 10 µg/ml insulin, 200 µM indometazin ve 1% penisilin- streptomisin eklenmiş MEM besi ortamına ekilerek besi ortamı haftada iki kez değiştirilmiş ve hücreler 4 hafta boyunca 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edilmiştir. Kültürün 4. haftası sonunda, intrasellüler yağ damlacıklarının varlığının belirlenmesi için adipojenik farklılaşmayı gösteren Oil red O ile boyanmıştır (Oliver ve ark. 2015).

Oil red o boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alınarak 2 ml PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml paraformaldehit eklenerek 45 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkanmıştır. Kuyucuklara 2ml oil red o çözeltisi eklenerek karanlıkta 45 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Boya distile su ile 2 kez yıkandıktan sonra hemotoksilen ile 1 dakika inkübe edildi ve kuyucuklar alkol serilerinden (%25, %35, %50, %75, %90, %100) geçirilerek fiksasyon sağlandı ve hücreler mikroskop altında görüntülendi.

tMKH'lerinin Osteojenik Farklılaştırılması

tMKH'leri osteojenik farklılaşması, tMKH'lerin izolasyonundan itibaren 3. pasaj sonrasında gerçekleştirilmiştir. 6 kuyucuklu kültür kabında 3000 hücre/cm² olacak yoğunlukta ekilen MKH'ler; 100 nM dexamethasone, 0.05 µM askorbik asit, 10 mMβ-gliserofosfat, %1 penisilin- streptomisin ve %10 FBS içeren MEM kültür medyumunda 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda kültüre edilmiştir. Kültür süresi boyunca hücrelerin medyumları 3-5 gün aralıklarla tazelenmiş ve kültürün 4. haftasında hücre dışı kalsifikasyon gösterilmesi amacıyla alizarin kırmızısı ile boyanarak osteojenik farklılaşma gösterilmiştir (Oliver ve ark. 2015).

Alizarin kırmızısı boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alınmış ve kuyulara 2 mlPBS eklenip 1 dakika kadar bekletildikten sonra PBS uzaklaştırılmıştır. Sonrasında kuyulara 2 ml formalin eklenerek 45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında bekletilmiştir. 45 dakika sonrasında formalin uzaklaştırıldı ve distile su ile 2 kez yıkandı. Distile sudan sonra 2 ml alizarin kırmızısı solüsyonu eklenerek 45 dakika boyunca oda ısısında bekletilmiştir. 45 dakika sonrasında boya alındı ve distile su ile iki kez yıkanarak mikroskopta incelenmiştir.

tMKH'lerin Fibroblastik farklılaştırılması

tMKH'lerin fibroblastik farklılaşması tMKH'lerin izolasyonundan itibaren 2. pasaj sonrasında gerçekleştirilmiştir. Kültür kabında 3000 hücre/cm² olacak yoğunlukta ekilen tMKH'ler; içinde %10 FBS, 1ng/ml bFGF ve %1 antibiyotik eklenmiş α -MEM besiyerinde kültüre edilmiştir. Kültürün 3. gününde besiyerine 5ng/ml oranında TGF- β eklenerek, kültür işlemi 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda 2 hafta boyunca devam ettirilmiştir. tMKH'lerin fibroblastik farklılaşma potansiyellerinin belirlenebilmesi için H&E ile boyanmıştır (Oliver ve ark. 2015).

H&E boyaması için kuyucuklardaki besiyeri alınıp 2 ml PBS ile yıkandıktan sonra 2 ml paraformaldehit eklenerek ve 45 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Formalin uzaklaştırılması için distile su ile 2 kez yıkanmıştır. Kuyucuklara 2ml H&E çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edilmiştir. Kuyucuklar tekrar distile su ile yıkanıp alkol serilerinden (%25, %35, %50, %75, %90, %100) geçirilerek mikroskop altında görüntülenmiştir.

3.6.1.3.4.4. Asellüler menisküs dokularının yeniden hücrelendirilmesi

Menisküs dokusunda kondrosit, fibroblast ve fibrokondrosit olmak üzere üç farklı hücre tipi görülmektedir. Menisküs dokusunun bu yapısından dolayı 1-6 pasajlar arasında olan farklılaştırılmış hücrelerden hücre kokteyli (MKH+fibroblast+kondrosit) oluşturulmuş ve her bir hücre tipi için 2x10⁶ hücre/cm² olacak şekilde, 3x3x2 mm³ boyutlarındaki menisküs doku iskelelerine hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Böylelikle dokunun doğal hücre içeriğini bozmadan biyo-aktifliğinin sağlanmış ve hücrelendirmenin gelişimi XTT Cell Viability Kit ile canlılıkları, LDH Cytotoxicity Detection Kit ile toksisite analizleri gerçekleştirilmiştir.

Grup 1: Elde edilen doku iskelelerinin hücrelendirilmesinde ilk olarak sadece fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Yukarıda anlatıldığı şekilde MKH'ler izole edildikten sonra fibroblast hücrelerine farklılaştırılmış ve ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler 1-6 pasajlar arasında, 2x10⁶ hücre/cm² olacak şekilde, 3x3x2 mm³ boyutlarındaki asellüler menisküs doku iskelelerine hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir.

Grup 2:Elde edilen doku iskelelerinin hücrelendirilmesinde ikinci grup olarak sadece kondrositler kullanılmıştır. MKH'ler izole edildikten sonra kondrosite farklılaştırılmış ve ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler 1-6 pasajlar arasında, 2×10^6 hücre/cm² olacak şekilde, $3 \times 3 \times 2$ mm³ boyutlarındaki menisküs doku iskelelerine hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir.

Grup 3: Bu grupta ise doku iskelelerine hücre ekiminde üç hücre tipi kullanılmıştır. 1-6 pasajlar arasında olan farklılaştırılmış hücrelerden (fibroblast+kondrosit) ve farklılaşmaya alınmayan MKH'lerden hücre kokteyli oluşturarak ve her bir hücre tipi için 2×10^6 hücre/cm² olacak şekilde, $3 \times 3 \times 2$ mm³ boyutlarındaki menisküs doku iskelelerine hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir.

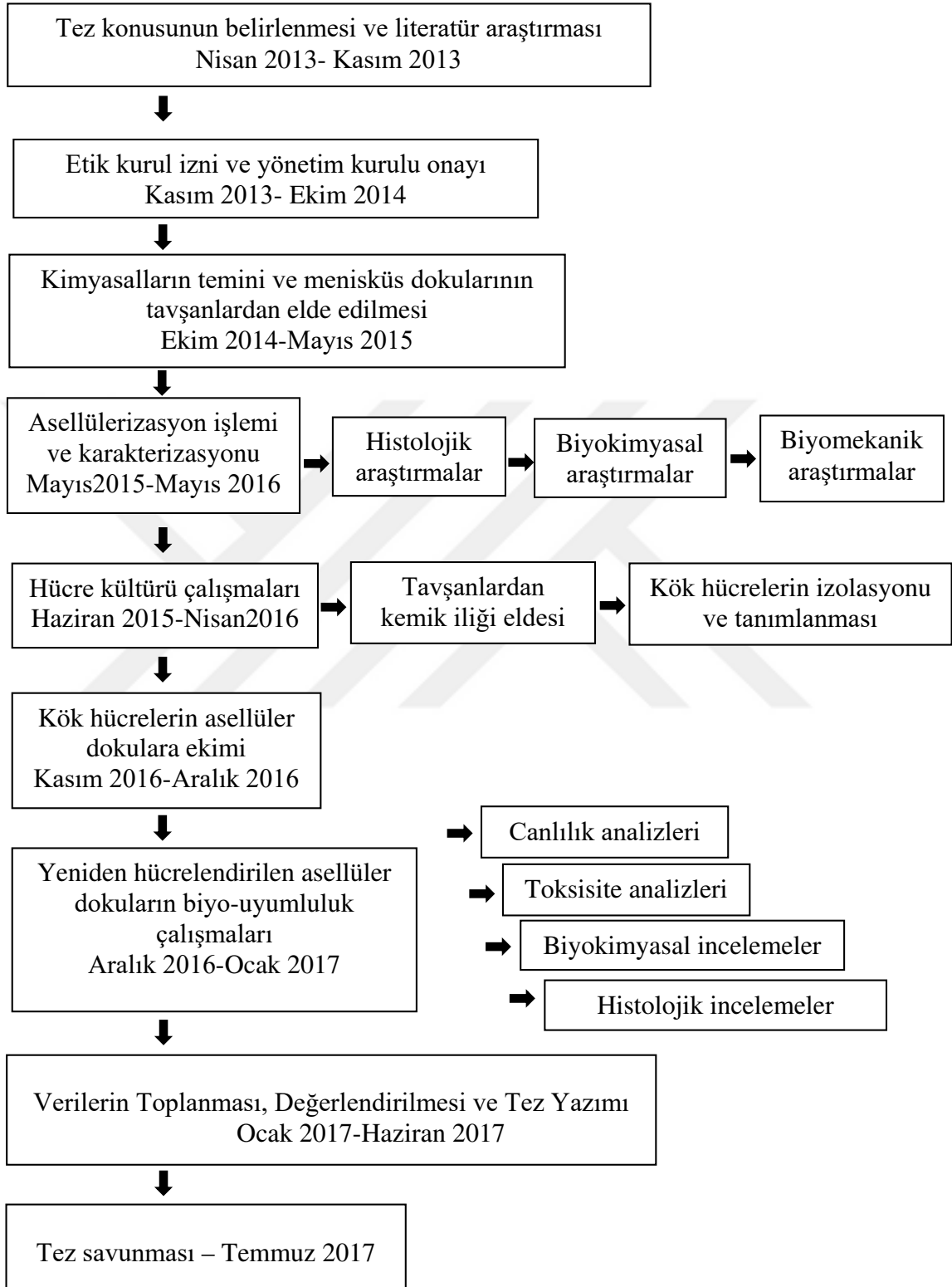
3.6.1.3.4.5. Doku iskelelerine ekilen hücrelerin canlılık analizi

Doku iskeleleri üzerinde hücre büyümesi hücre canlılık analizi ile izlenmiş olup 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-diphenyltetrazolium bromür formazan ile (XTT Viability Kit, Cell Signaling Technology) tayin edilerek spektrofotometrik olarak 450 nm dalga boyunda ve sitotoksosite analizi LDH Cytotoxicity Detection Kit (Roche) ile 490 nm dalga boyunda ölçülerek doku iskelelerine hücrelerin ekiminin ardından 3, 7, 14. günlerde gerçekleştirilmiştir.

3.6.1.3.4.6. Yeniden hücrelendirilmiş menisküs dokularının histolojisi

Asellülerizasyon işlemi sonrası yeniden hücrelendirilen menisküs doku iskeleleri histolojik ve immünolojik olarak 3.6.1.3.1. bölümde anlatıldığı şekilde incelenmiştir. H&E boyaması ile dokunun genel morfolojik yapısı, alcian blue boyaması ile GAG yapıları, masson trikrom boyaları ile kollajen fibriller, immunohistokimyasal yöntem ile doku içerisindeki tip II, II kollajen, agrekan ve vimentin yapıları incelenmiştir.

3.7.Araştırma Planı ve Takvimi:



3.8. Verilerin değerlendirilmesi

Her deney en az 3'er kez tekrarlanarak elde edilen tüm veriler SPSS 16,0 istatistik programı ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farkların analiz edilebilmesi amacı ile one-way ANOVA ve Mann Whitney U testleri kullanılmış, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alınarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Bu tez çalışmasında tavşan menisküs dokularının asellülerizasyonu in vitro olarak değerlendirilmiş ve sonuçları oldukça umut vericidir. Fakat ileri dönem çalışmalarda in vivo menisküs transplantasyonu yapılarak asellüler doku iskelelerinin canlı sistem içindeki davranışları da araştırılması gerekmektedir. Tavşan menisküs dokuları insan menisküs dokularına göre boyut olarak küçük kalmaktadır. İleri çalışmalarda insan menisküs dokularının da aynı yöntem ile asellüler hale getirilip in vitro koşullarda yeniden hücrelendirilmesi ile biyoyumluluk çalışmalarının gerçekleştirilmesi menisküs rejenerasyonu için düşünülebilir.

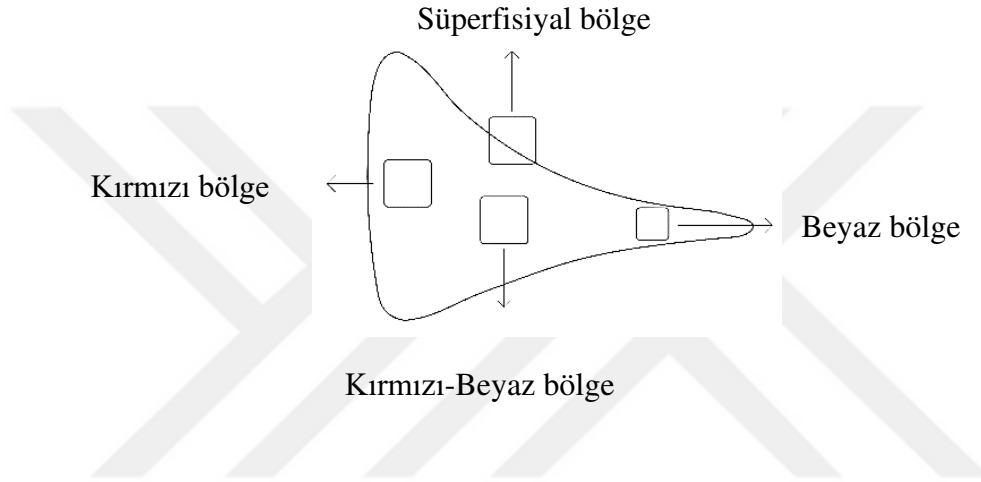
3.10. Etik Kurul Onayı

Bu tez alışması, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 20 Kasım 2013 tarihinde 4/22/2013 numaralı toplantıda 95/2013 protokol numarası ile onaylanmıştır.

Etik kurul onay formu EK-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

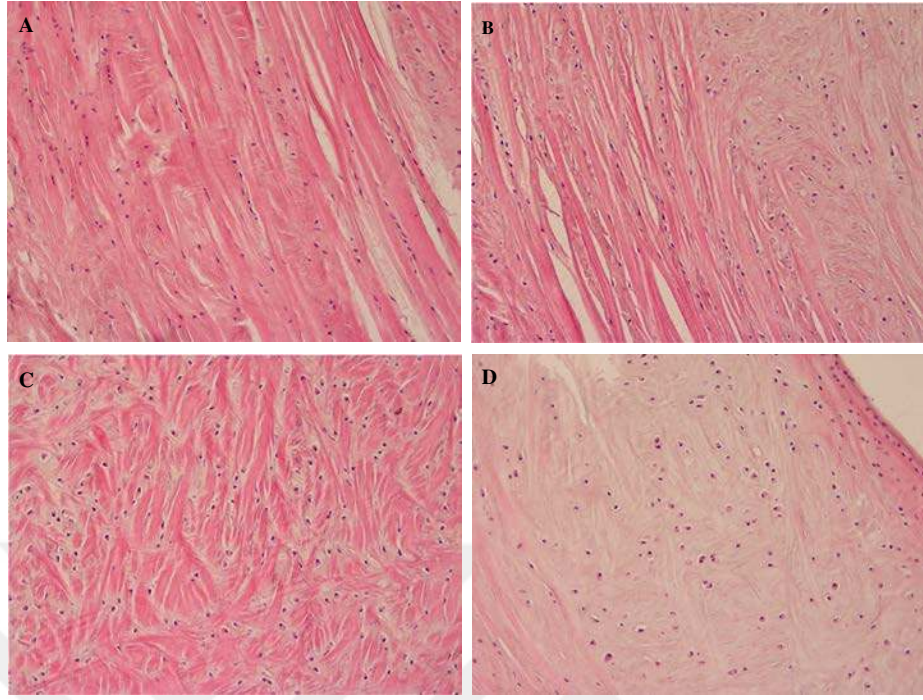
Doğal menisküs dokusu hem fibriller dizilim hem de hücrel kompozisyon olarak heterojen özellikler göstermektedir. Doku içeriğindeki hücrel bileşenlerin dağılımı ile kollajen fibriller oluşur ve yönelimleri belirlenir. Bu nedenle menisküs dokusu bölgelere ayrılmış ve kendi içerisinde gruplandırılmaktadır. Tez çalışmasında histolojik boyamalar ile elde edilen sonuçlar, aşağıda şematize edildiği gibi, menisküs dokusunun kırmızı, kırmızı-beyaz, beyaz ve süperfisiyel bölgeleri olarak değerlendirilmiştir (Şekil 18).



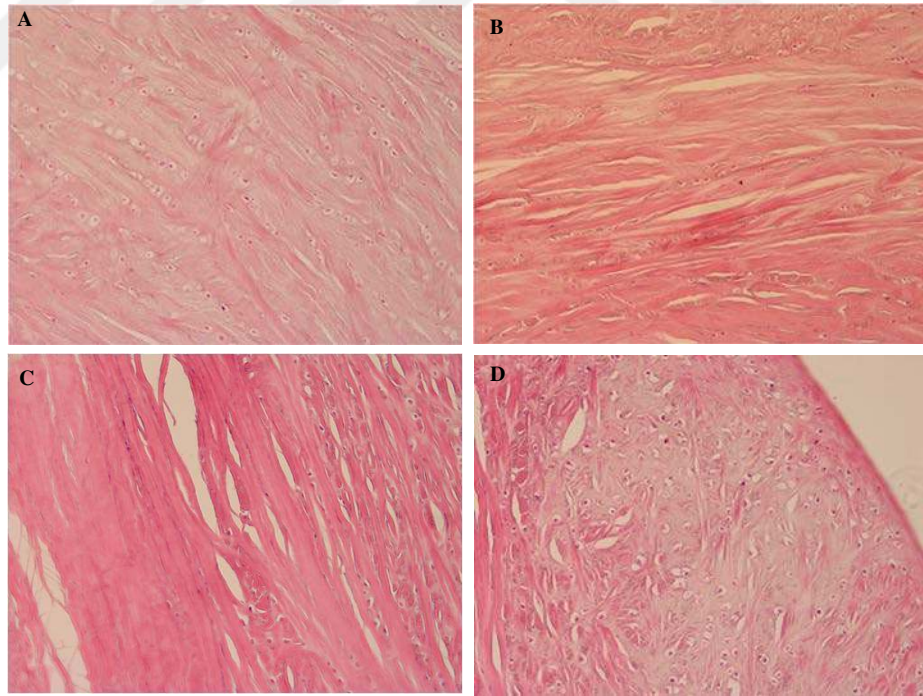
Şekil 18. Menisküs dokusunun bölgelerinin şematize görünümü.

4.1. Asellülerizasyon İşleminin Histolojik ve İmmunohistokimyasal Bulguları **Yöntem 1**

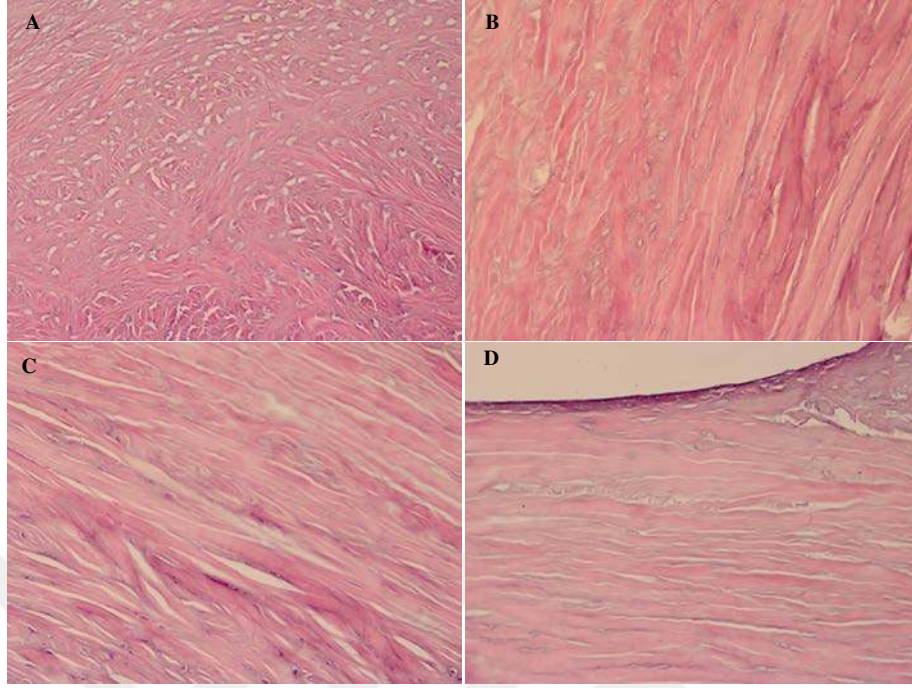
Menisküs dokularının asellülerizasyon işlemi için SDS deterjanı kullanılarak sadece kimyasal asellülerizasyon yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntem ile menisküs dokuları 19 gün süren kimyasal asellülerizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Dokular distile su ile yıkanarak %1, %2 ve %5 konsantrasyonlarında SDS ile muamele edilmiştir. Ardından yıkama işlemleri ile kimyasallardan arındırılarak HE boyamaları ile tüm bölgeler incelenmiştir.



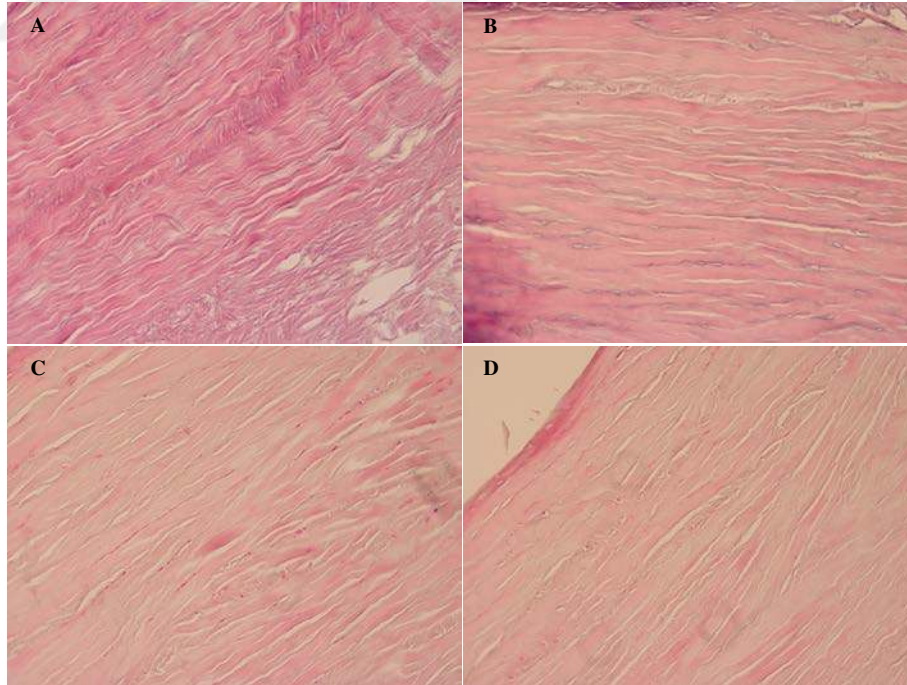
Şekil 19. Doğal menisküs dokusunun HE boyaması görüntüleri. (A) beyaz, (B) kırmızı-beyaz, (C) kırmızı ve (D) süperfisiyal bölgeler (Büyütme: 20x).



Şekil 20. % 1 SDS ile asellülerizasyon işlemi sonrası HE boyaması görüntüleri. (A) beyaz, (B) kırmızı-beyaz, (C) kırmızı ve (D) süperfisiyal bölgeler (Büyütme 20x).



Şekil 21. % 2 SDS ile asellülerizasyon işlemi sonrası HE boyaması (A) beyaz, (B) kırmızı-beyaz, (C) kırmızı ve (D) süperfisiyal bölgeler (Büyütme 20x).

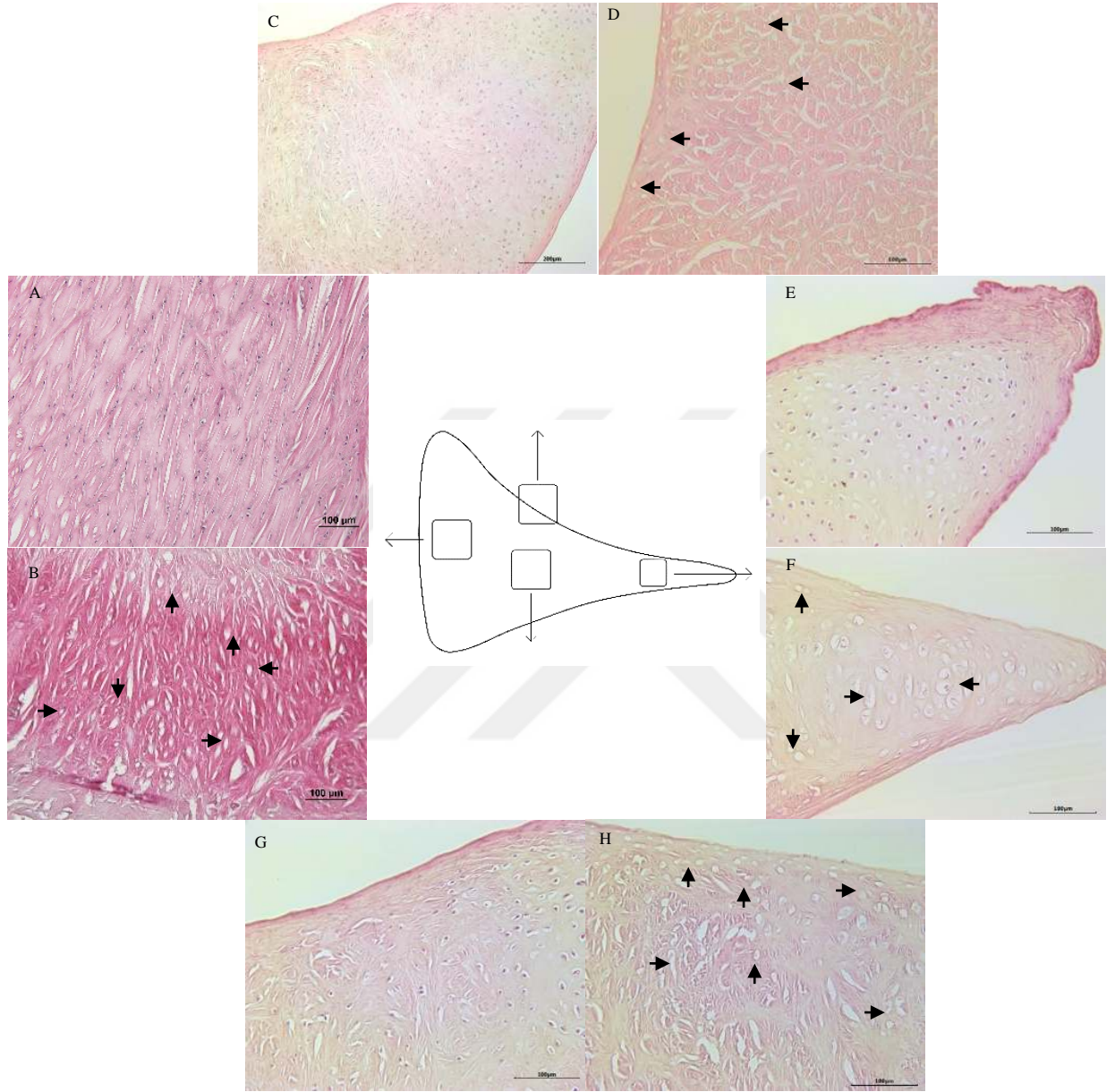


Şekil 22. % 5 SDS ile asellülerizasyon işlemi sonrası HE boyaması (A) beyaz, (B) kırmızı-beyaz, (C) kırmızı ve (D) süperfisiyal bölgeler (Büyütme 20x).

Doğal menisküs dokusunun kırmızı, kırmızı-beyaz, beyaz, süperfisiyal bölgelerinin yoğun hücresel içeriği Şekil 19’da görülmektedir. HE boyama sonuçlarında %1 SDS kullanılan deney grubunda hücrelerin büyük çoğunluğunun doku içerisinde kaldığı ve asellülerizasyon yönteminin başarılı olmadığı görülmüştür (Şekil 20). %5 SDS grubunda hücrelerin ortadan kaldırıldığı fakat yüksek miktarda deterjan kullanımının kollajen fibrillere ve dokunun histomorfolojik yapısına zarar verdiği belirlenmiş olup Şekil 21’de gösterilmiştir. %2 SDS kullanımı ise kimyasal yöntem ile asellülerizasyon için en uygun oran olduğu, hem dokuya zarar vermediği hem de büyük ölçüde hücrelerin ortadan kaldırıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 22). Fakat dokunun tüm hücresel içeriğinin kaldırılması için yeterli olmadığı, kullanılan kimyasal yönteme ek olarak farklı tamponların da eklendiği yeni bir yöntem geliştirilebileceği düşünülmüştür. Bu nedenle fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin bir arada kullanıldığı farklı bir asellülerizasyon yöntemi denenmiştir.

Yöntem 2

Geliştirilen ikinci asellülerizasyon yöntemi menisküs dokularının fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamalarla muamele edildiği yöntemdir. Fiziksel işlemlerle menisküs dokuları dondurularak çözülmüştür. Menisküs dokusunun sıkı paketlenmiş fibriller yapısı bu işlem ile nispeten açılmış, dokuların gevşemesini ve sonraki basamaklarda kullanılan kimyasalların doku içerisine daha iyi nüfuz etmesini sağlamaktadır. Kimyasal basamakta kullanılan SDS anyonik deterjanı menisküs dokusu içindeki hücreleri parçalamak amacı ile kullanılmıştır. Hipotonik tamponlar kullanılan çözeltilerin pH değerinin sabit tutulmasını sağlamıştır. Ayrıca tampon içindeki proteaz inhibitörü olan EDTA ve aprotinin endojen proteinlerin ESM’e zarar vermesini önlemiştir. Hipertonik tampon ise dokunun osmotik basınca maruz kalmasını sağlayarak hücrelerin parçalanmasını sağlayarak nüklear içeriği uzaklaştırmıştır. Kullanılan enzimler (DNaz ve RNaz) kalan nüklear içeriği parçalamıştır. Dokunun sterilizasyon aşamasında PAA kullanılmış ve dokular dezenfekte edilmiştir. Son basamakta birkaç kez yıkama işlemi ile kimyasallar dokulardan arındırılmıştır. Böylelikle %0.1 SDS kullanımı ile fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemlerle asellüler hale getirilmiş doku iskelesi elde edilmiştir.



Şekil 23. Doğal ve asellüler menisküs dokularının H&E boyaması görüntüleri. Doğal (A) ve asellüler (B) menisküs dokularının kırmızı bölgeleri, doğal (C) ve asellüler (D) menisküs dokularının kırmızı-beyaz bölgeleri, doğal (E) ve asellüler (F) menisküs dokularının beyaz bölgeleri, doğal (G) ve asellüler (H) menisküs dokularının süperfisiyal bölgeleri. Boş lakünalar oklar ile gösterilmektedir.

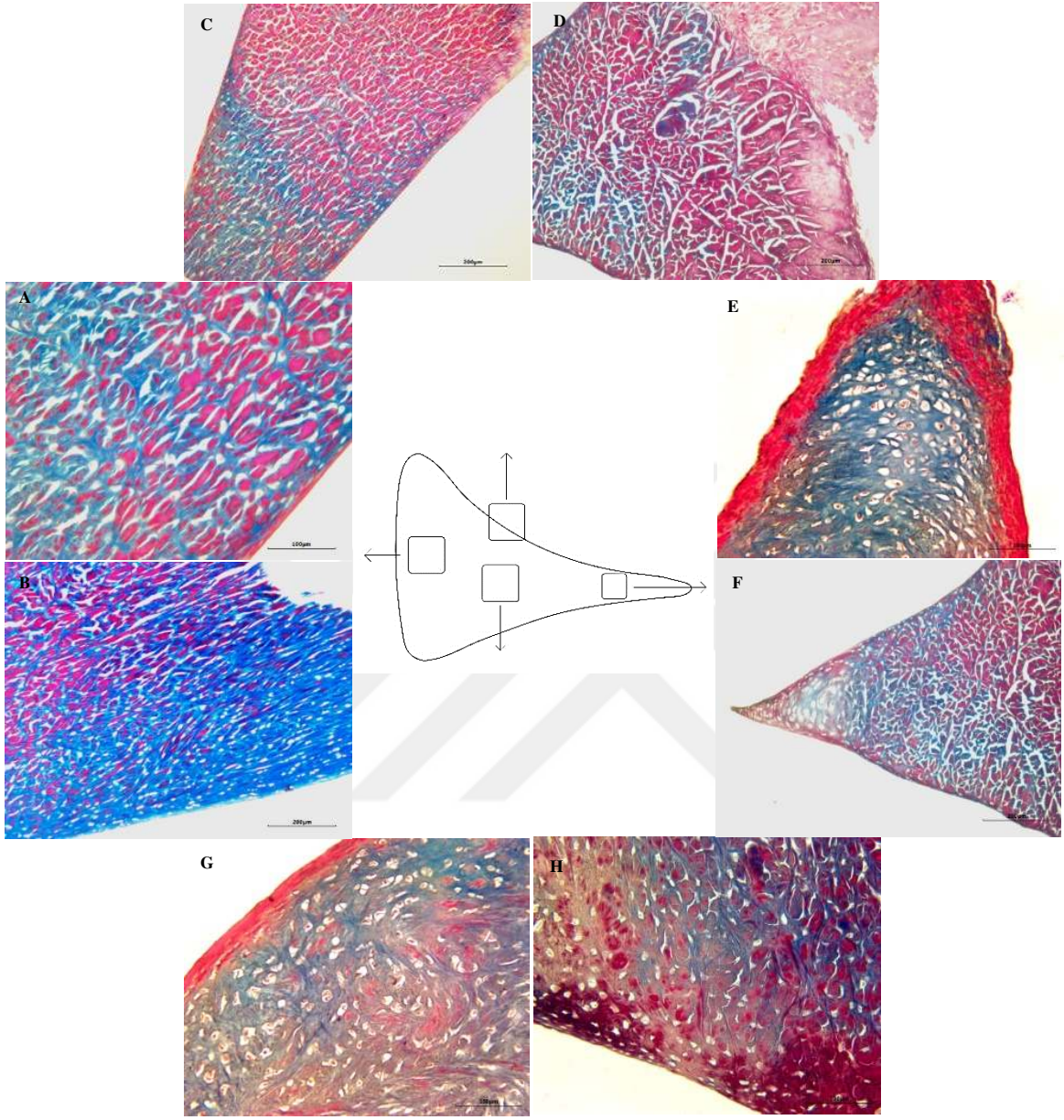
Fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin bir arada uygulandığı asellülerizasyon işleminde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında menisküs dokularının hücresel içeriğinin kaldırıldığı ve lakünalar içerisindeki hücrelerin arındırıldığı gözlemlenmiştir. H&E boyamaları sonuçlarında asellülerizasyon işleminin başarılı olduğu görülmüştür (Şekil23).

HE boyamalarına ek olarak kollajen, GAG yapıları da histolojik olarak incelenmiştir. Masson trikrom ve Toluidin blue boyamalarında sırasıyla kollajen ve GAG yapılarının korunduğu gözlenmiştir.

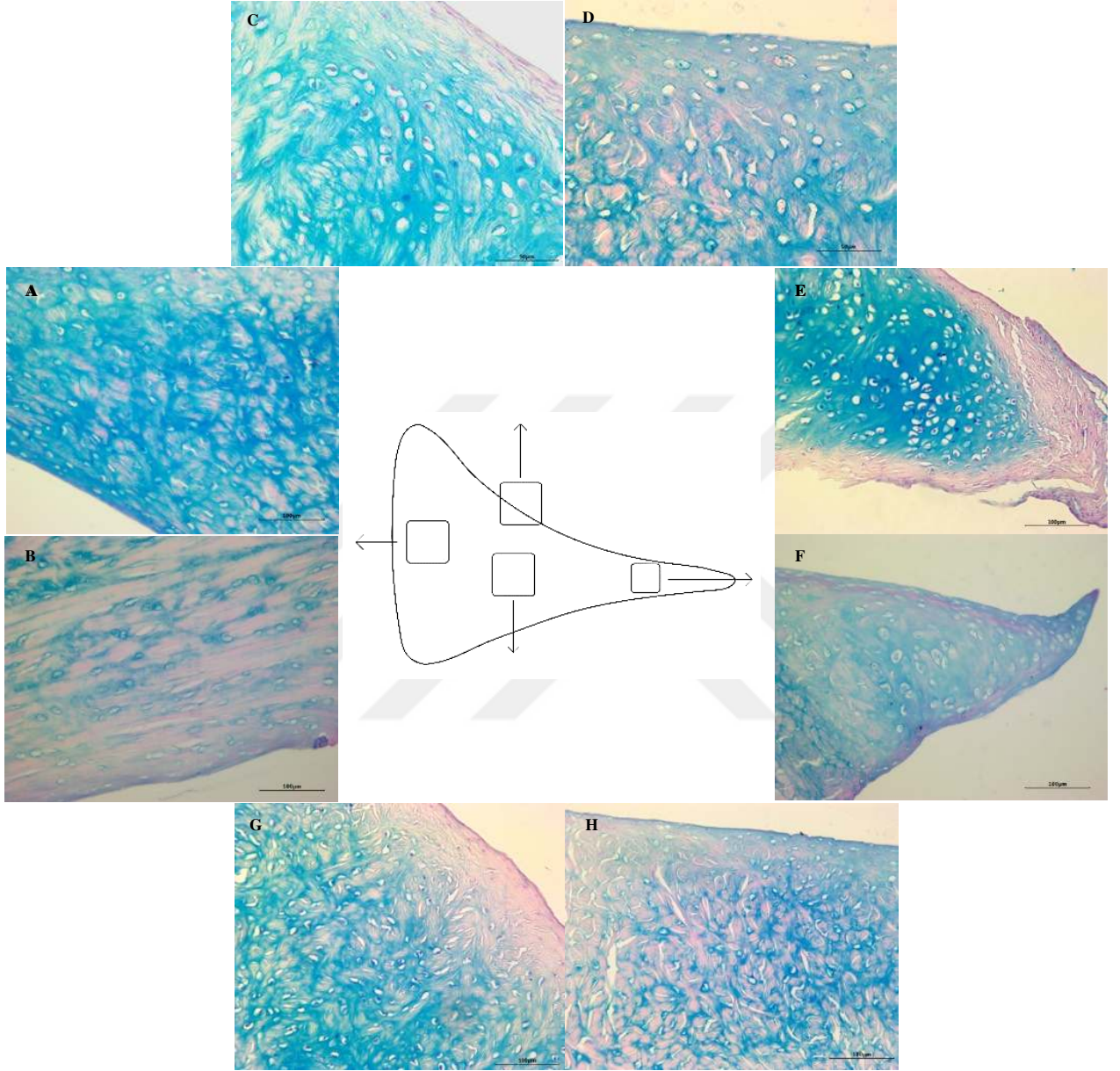
Masson trikrom boyamasında menisküs dokusu içindeki kollajen demetlerin varlığı görülmektedir (Şekil 23). Masson trikrom boyamasında kollajen fibriller mavi, sitoplazma kırmızı/pembe nükleuslar ise siyah/koyu mavi renkte boyanmaktadır. Şekil 24 de A,C,E ve G görüntülerinde işlem görmemiş menisküs dokusunun boyamaları B,D,F ve H görüntüleri ise asellülerizasyon işlemi sonrası boyamalardır. Doğal menisküs dokuları ile karşılaştırıldığında asellülerizasyon işlemi sonrasında doku içeriğindeki kollajen fibrillerin varlığı tespit edilmiştir. Kollajen fibrillerin en yoğun olduğu kırmızı alanlar asellülerizasyon işlemi sonrasında da mavi renge boyanmış ve fibrillerin zarar görmediği gösterilmiştir.

Alcian blue boyamasında doku içeriğindeki proteoglikanlar mavi renge, hyalin kıkırdak bölgeleri ise pembe renge boyanmaktadır. GAG yapılarının menisküs dokusunun tüm bölgeleri incelendiğinde doku içerisindeki dağılımının önemli ölçüde değişmediği asellülerizasyon işlemi sonrasında mevcut olduğu gösterilmiştir (Şekil 25). Doğal dokunun tüm bölgelerinde daha parlak boyanan GAG yapıları asellülerizasyon işlemi sonrasında biraz daha soluk olarak boyanmıştır. Asellülerizasyon işleminin hücresel içeriği dokudan uzaklaştırması nedeniyle hücrelerin etrafındaki GAG'ların nispeten azaldığını söylenebilir, fakat genele bakıldığında menisküs dokusu içeriğinde hala GAG'ların bulunduğu sonucuna varılmaktadır.

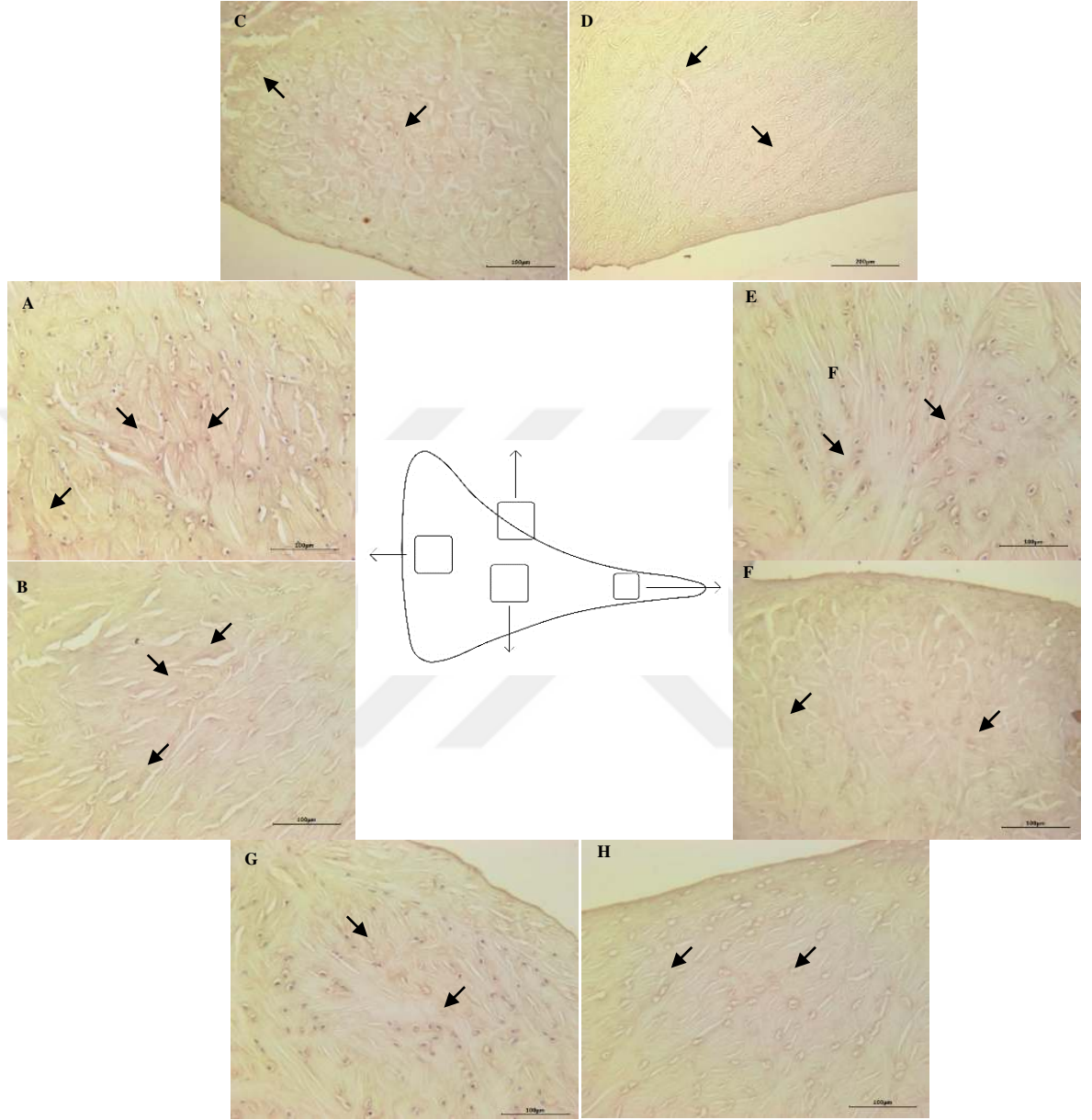
İmmunohistolojik araştırmalarda menisküs dokusundaki kollajen tip I, tip II, agrekan ve vimentin yapıları incelenmiştir. Doku genelinde koyu kahverengi olarak boyanan bu yapılar hem işlem görmemiş menisküs dokusunda hem de asellüler menisküs dokusunda gözlenmiştir (Şekil 26,27,28,29).



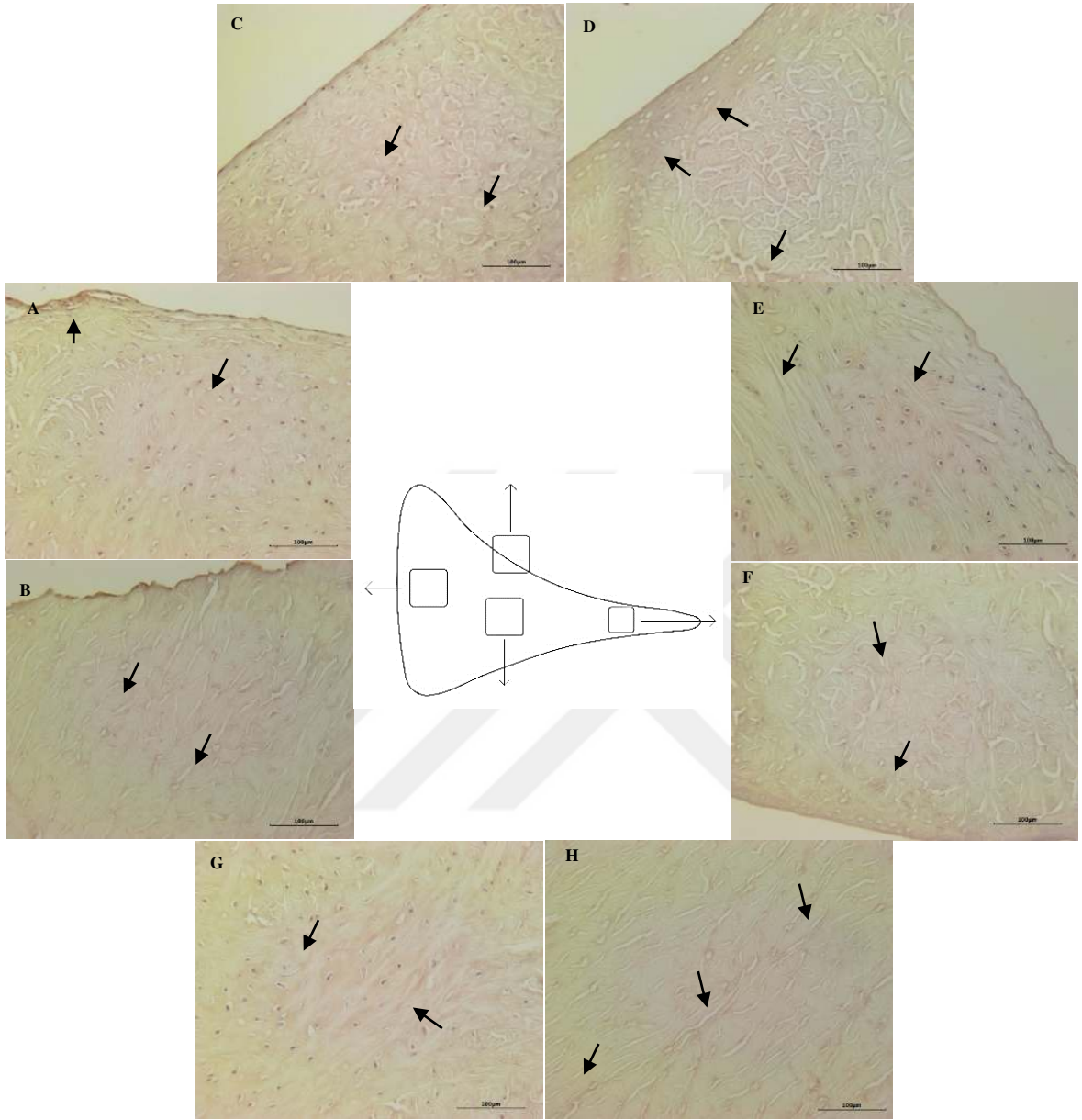
Şekil 24. Doğal ve asellüler menisküs dokularının Masson trikrom boyamalarının görüntüleri. Doğal (A) ve asellüler (B) menisküs dokularının kırmızı bölgeleri, doğal (C) ve asellüler (D) menisküs dokularının kırmızı-beyaz bölgeleri, doğal (E) ve asellüler (F) menisküs dokularının beyaz bölgeleri, doğal (G) ve asellüler (H) menisküs dokularının süperfisiyal bölgeleri.



Şekil 25. Doğal ve asellüler menisküs dokularının Alcian blue boyamalarının görüntüleri. Doğal (A) ve asellüler (B) menisküs dokularının kırmızı bölgeleri, doğal (C) ve asellüler (D) menisküs dokularının kırmızı-beyaz bölgeleri, doğal (E) ve asellüler (F) menisküs dokularının beyaz bölgeleri, doğal (G) ve asellüler (H) menisküs dokularının süperfisiyal bölgeleri.

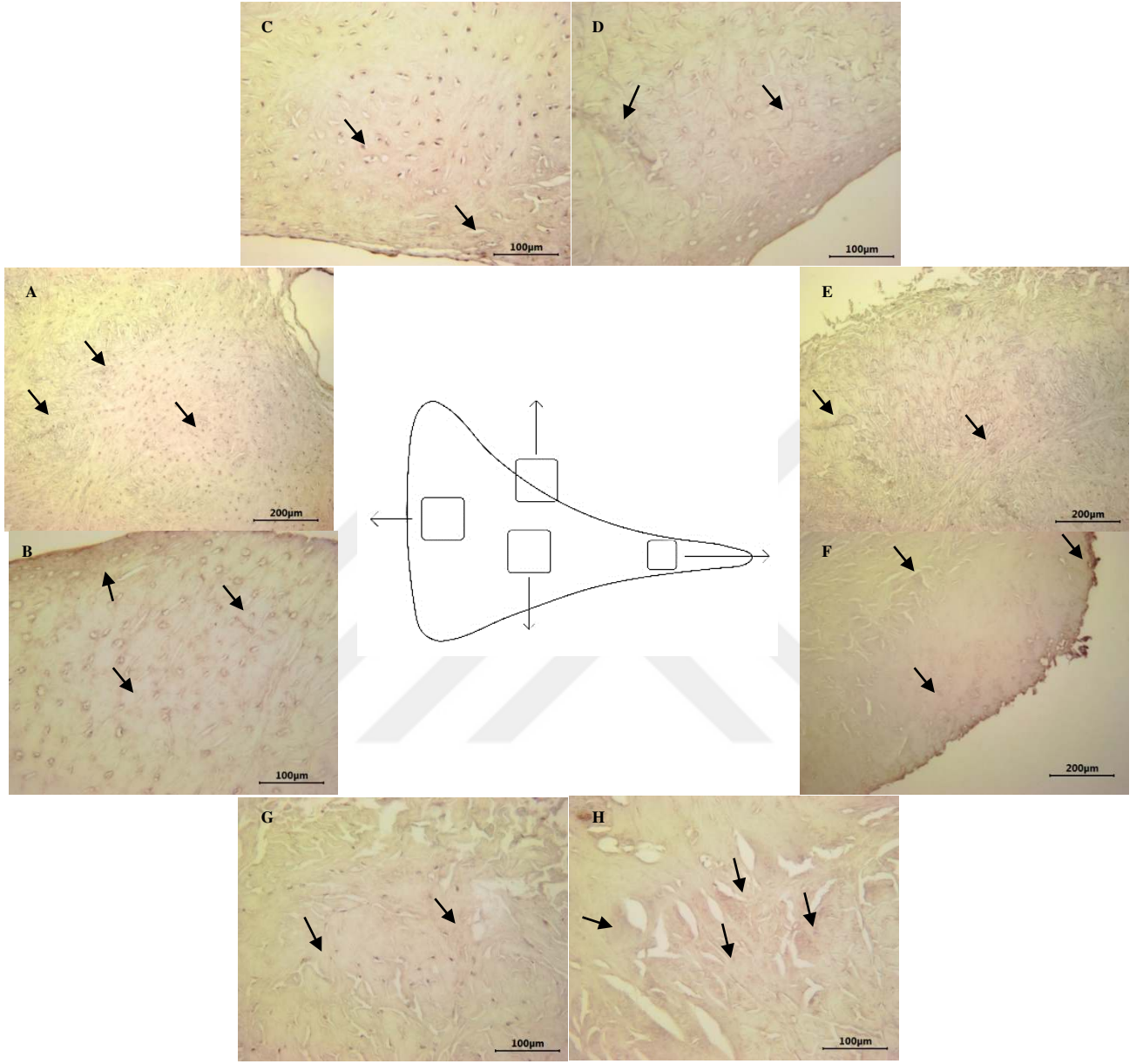


Şekil 26. Doğal ve asellüler menisküs dokularının tip I kollajen boyaması görüntüleri. Doğal (A) ve asellüler (B) menisküs dokularının kırmızı bölgeleri, doğal (C) ve asellüler (D) menisküs dokularının kırmızı-beyaz bölgeleri, doğal (E) ve asellüler (F) menisküs dokularının beyaz bölgeleri, doğal (G) ve asellüler (H) menisküs dokularının süperfisiyal bölgeleri. Oklar tip I kollajen yapılarını işaret etmektedir.

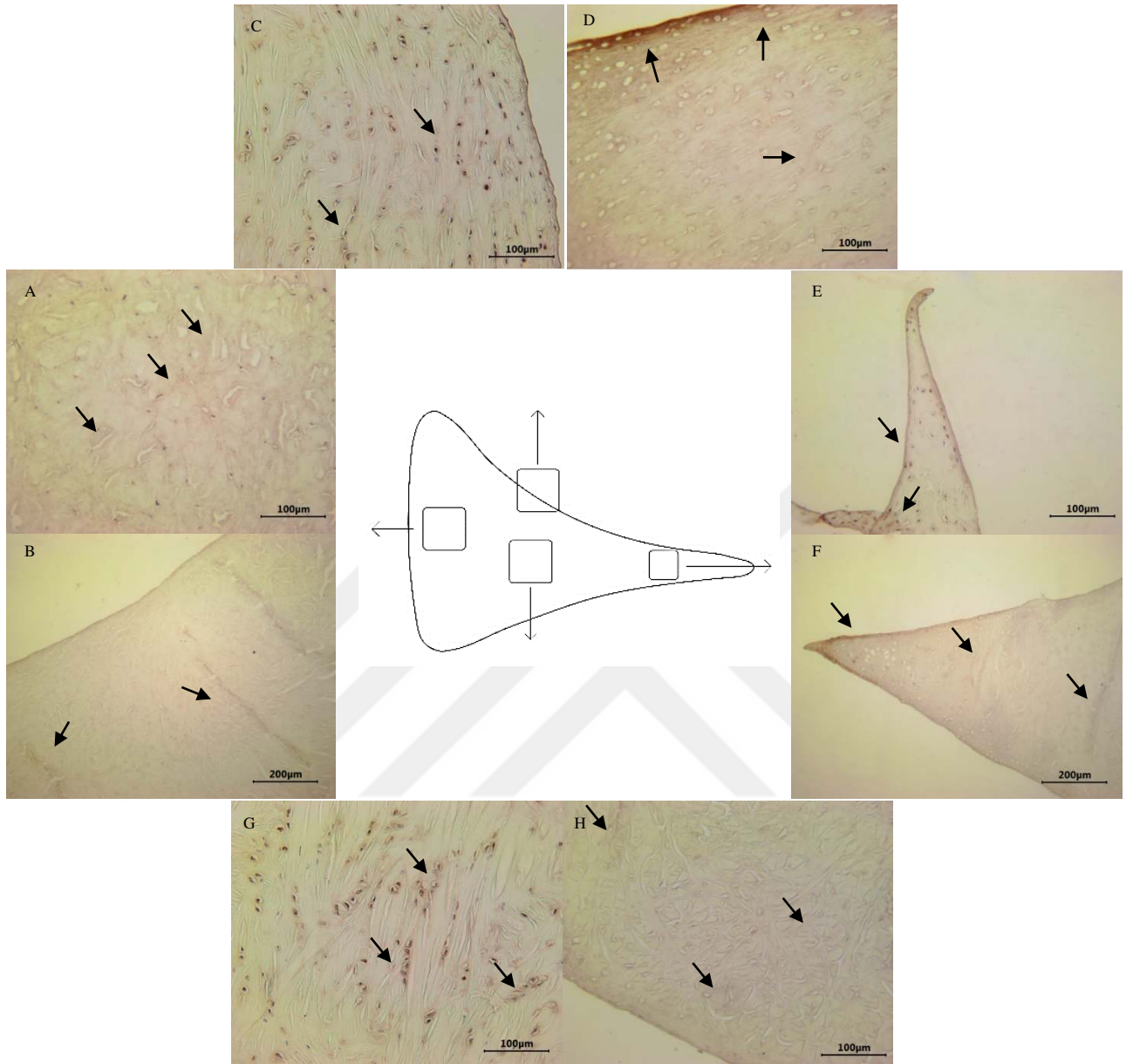


Şekil 27. Doğal ve asellüler menisküs dokularının tip II kollajen boyaması görüntüleri. Doğal (A) ve asellüler (B) menisküs dokularının kırmızı bölgeleri, doğal (C) ve asellüler (D) menisküs dokularının kırmızı-beyaz bölgeleri, doğal (E) ve asellüler (F) menisküs dokuların beyaz bölgeleri, doğal (G) ve asellüler (H) menisküs dokularının süperfisiyal bölgeleri. Oklar tip II kollajen yapılarını işaret etmektedir.

Şekil 27 ve 28'de oklar ile gösterilen tip I ve tip II yapılarının asellülerizasyon işleminden etkilenmediği, işlem görmemiş doku ile karşılaştırıldığında asellüler doku ile benzer oranlarda boyandığı belirtilmektedir.



Şekil 28. Doğal ve asellüler menisküs dokularının vimentin yapılarının immunohistokimya boyamaları. Doğal (A) ve asellüler (B) menisküs dokularının kırmızı bölgeleri, doğal (C) ve asellüler (D) menisküs dokularının kırmızı-beyaz bölgeleri, doğal (E) ve asellüler (F) menisküs dokularının beyaz bölgeleri, doğal (G) ve asellüler (H) menisküs dokularının süperfisiyal bölgeleri. Oklar vimentin yapılarını işaret etmektedir.



Şekil 29. Doğal ve asellüler menisküs dokularının agrekan yapılarının immunohistokimya boyamaları. Doğal (A) ve asellüler (B) menisküs dokularının kırmızı bölgeleri, doğal (C) ve asellüler (D) menisküs dokularının kırmızı-beyaz bölgeleri, doğal (E) ve asellüler (F) menisküs dokularının beyaz bölgeleri, doğal (G) ve asellüler (H) menisküs dokularının süperfisiyal bölgeleri. Oklar agrekan yapılarını işaret etmektedir.

Doku içerisindeki agrekan ve vimentin yapıları Şekil 28 ve 29'da oklar ile gösterilmiştir. İmmunohistokimyasal boyamalar ile incelenen agrekan ve vimentin yapılarının, doğal ve asellüler doku karşılaştırıldığında tüm bölgelerde benzer olarak boyandığı ve zarar görmediği sonucuna varılmıştır.

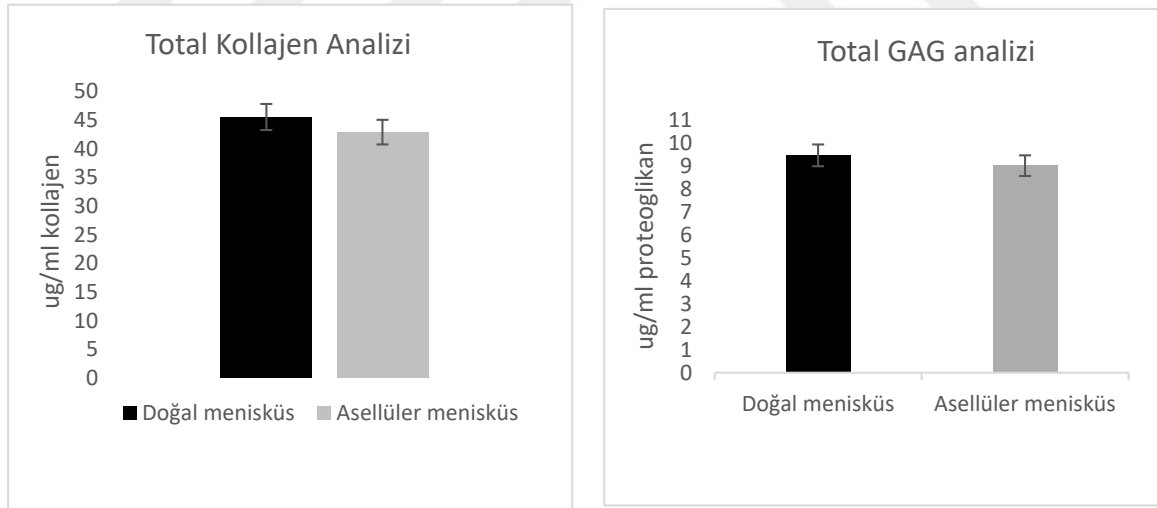
4.2. Asellülerizasyon İşleminin Biyokimyasal Bulguları

Total Kollajen içeriğinin ölçülmesi

Asellüler ve doğal menisküs dokularının kollajen içerikleri hidroksiprolin-prolin miktarına bağlı olarak ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Histolojik boyamalarda da alınan sonuçlara eş değer olarak menisküs dokusundaki total kollajen içeriğinin doğal menisküs dokusunda 45.53 ± 0.41 ug/ml, asellüler dokuda ise 42.90 ± 0.30 ug/ml olarak bulunmuştur (Şekil 30). Verilerin istatistiksel anlamlılığı Man Whitney U Testi ile $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Total GAG içeriğinin ölçülmesi

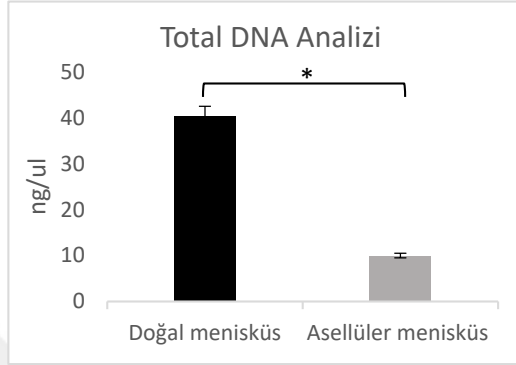
Doğal ve asellüler menisküs dokularının total GAG içerikleri 1,9 DMMB testi ile ölçülmüştür. Şekil 30' da görüldüğü gibi GAG içeklerinin değişmediği gösterilmiştir. Doğal menisküs dokusunda 9.45 ± 0.60 ug/ml oranın $GAG \pm 0.43$ içerirken asellülerizasyon işlemi sonrasında 9 ug/ml oranında GAG içerdiği gösterilmiştir. Verilerin istatistiksel anlamlılığı Man Whitney U Testi ile $p > 0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Şekil 30. Doğal ve asellüler menisküs dokuların total kollajen ve GAG içerikleri.
(Ort±SD, her koşul 6 kez tekrarlanmıştır.)

Total DNA içeriğinin ölçülmesi

Histolojik boyamalara ek olarak menisküs dokularının asellülerizasyon işlemi öncesinde ve sonrasında total DNA içerikleri nanodrop ile ölçülmüştür. Şekil 28’de görüldüğü gibi doğal menisküs dokularının total DNA içeriği 40.5 ng/ml olarak ölçülürken asellülerizasyon işlemi sonrasında 10.02 ng/ml oranında ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Man Whitney U Testi ile $p<0,05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı azalış saptanmıştır.



Şekil 31. Doğal ve asellüler menisküs dokuların total DNA ölçümlerinin sonuçları.

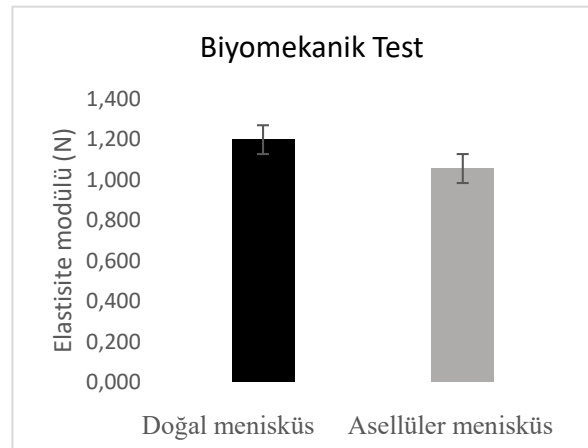
(* $p<0.05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalış saptanmıştır.)

4.3.Asellülerizasyon İşleminin Biyomekanik Bulguları

Biyomekanik testler Biyomekanik Anabilim Dalı’nda geliştirdiğimiz doku boyutuna uygun ekipmanlar ile gerçekleştirilmiştir. Hayes ve ark. geliştirdiği aşağıda belirtilen denklem sistemine dayalı olarak indentasyon testleri gerçekleştirilmiştir.

$$E = P(1 - \nu^2)/2awk$$

p	Yük
a	Indenter Çapı
v	Possion Oranı Yumuşak doku için 0,45
w	Indentasyon miktarı
h	doku kalınlığı
k	a/h



Şekil 32. Doğal ve asellüler menisküs dokularının biyomekanik test sonuçları.

(Ort±SD, her koşul 6 kez tekrarlanmıştır.)

Biyomekanik testler ile işlem görmemiş ve asellüler hale getirilmiş menisküs dokularının mekanik dayanımı ölçülerek sırasıyla 1.199 N ve 1.056 N olarak bulunmuştur. Biyomekanik test sonuçları istatistiksel olarak Man Whitney U Testi ile değerlendirilmiş ve $p>0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Böylelikle asellülerizasyon işleminde dokunun mekanik dayanımının değişmediği gösterilmiştir (Şekil 32).

4.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Asellüler menisküs dokularının yeniden hücrelendirilmesi ve biyo-uyumluluk özelliklerinin araştırılabilmesi için hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları için rejenerasyon kapasitesi yüksek olan MKH'ler kullanılmıştır. MKH'ler Yeni Zellanda Beyaz tavşanlarının kemik iliklerinden elde edilerek aseptik koşullarda çoğaltılmış ve farklılaşma kapasiteleri incelenmiştir.

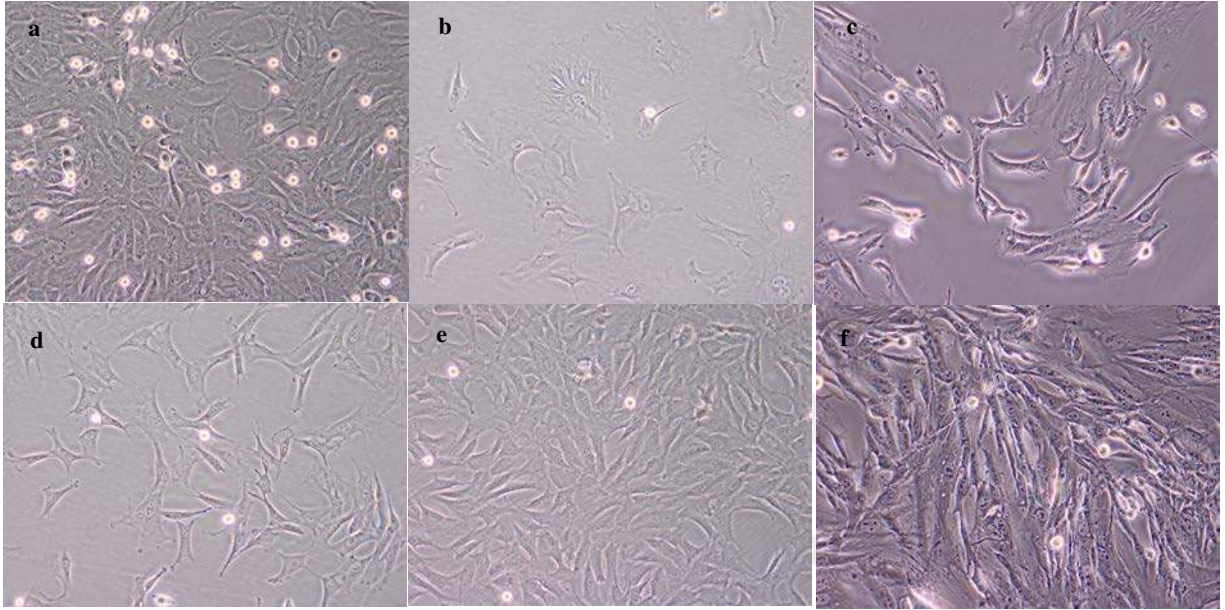
4.4.1. tMKH'lerin İzolasyonu

Kemik iliklerinden kök hücreler izole edildikten sonra T-25 cm²' lik flasklara ekilip 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edilmiştir. Hücrelerin besi ortamları 3-5 gün arasında tazelenmiştir. Şekil 33'de gösterildiği gibi hücreler fibroblast benzeri iğsi yapıya sahiptir.



Şekil 33. Tavşanların kemik iliklerinden ayrılan hücrelerin 2. 4. ve 7. günlerdeki görüntüleri. (a) 2. gün, (b) 4. gün, (c) 7. gün. Büyütme 20X.

Hücrelerin çoğalması ve morfolojik özellikleri inverted mikroskop ile takip edilmiştir. Şekil 34’de kültür kabının yüzeyine yapışmış olan hücrelerin ikinci günde tek tek sonraki günlerde koloni oluşturup çoğaldıkları görülmüştür. 7. günde hücreler kültür kabı yüzeyinde yaklaşık % 70 yoğunluk gösterdiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Birinci kültür sıfırncı pasaj (P0) olarak kabul edilerek üç kez pasajlama (P1,P2,P3) işlemi yapılarak alt kültürler elde edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. tMKH’lerinin mikroskop görünimleri. P1 (a ve d), P2 (b ve e), P3 (c ve f), a-b-c 4. gün, d-e-f 7. gün mikroskop görüntüleri. (Büyütme: 20X).

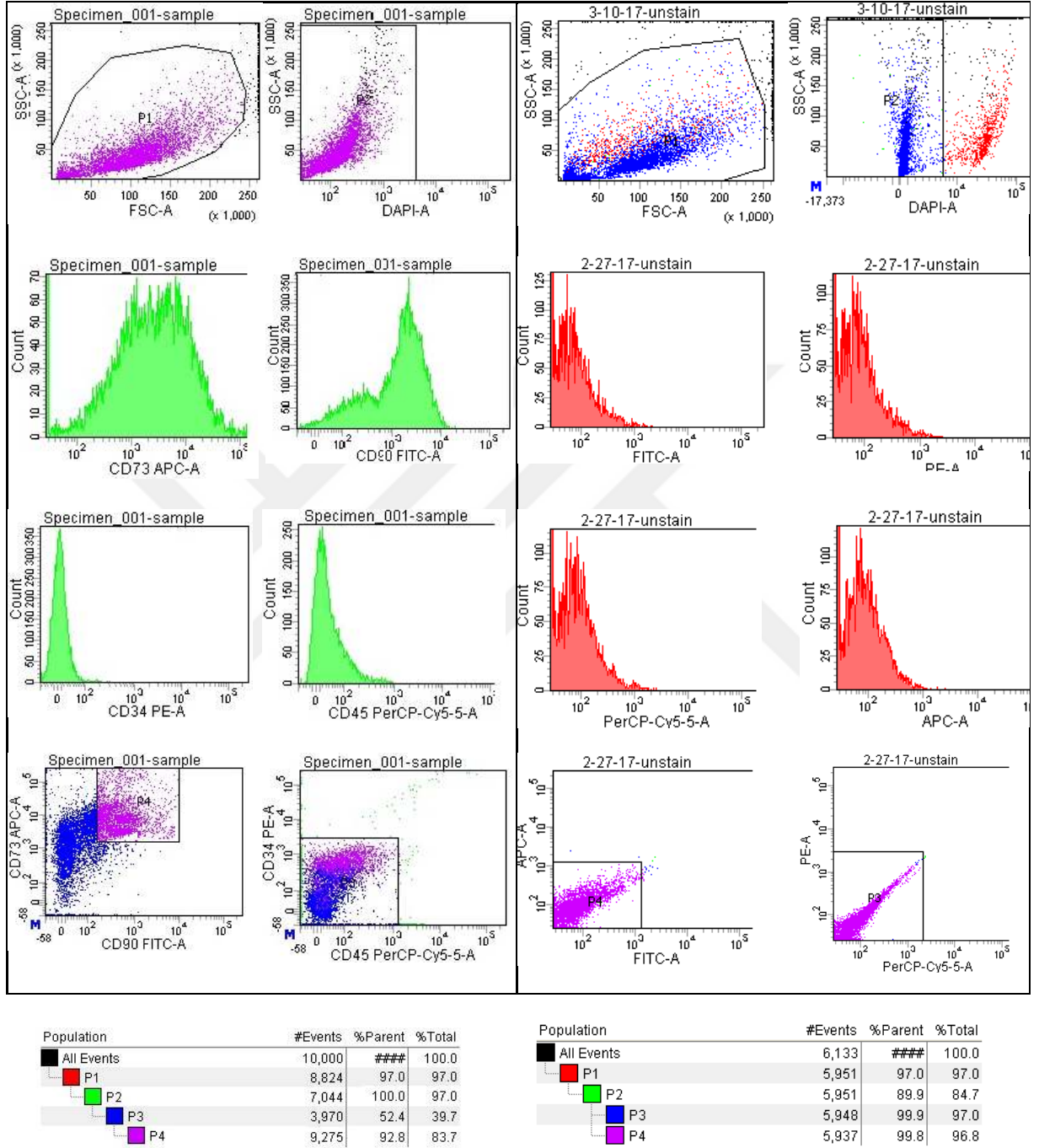
4.4.2. tMKH’lerin karakterizasyonu

4.4.2.1. tMKH’lerin akım sitometri analizi

tMKH’leri P3’e alındıktan yaklaşık 10 gün sonra %70 yoğunlaştığı (konfluent) ve kültür kaplarının yüzeyini kapladığı gözlenmiştir. Hücrelerin, kök hücre olarak tanımlanabilmesi için karakterizasyon çalışmaları akım sitometrik analizler ile gerçekleştirilmiştir. Hücreler hematopoetik kök hücre belirteci olan CD 45 ve CD 34 işaretlerini yüzeylerinde göstermedikleri, aynı zamanda bu hücrelerin mezenşimal kök hücre belirteci olan CD 90 ve CD 73 antijenlerini yüzeylerinde gösterdikleri görülmüştür. tMKH’leri tanımlandıktan sonra mezenşimal kök hücreler ayırlama yapılarak farklı bir tüpe toplanmıştır. Analiz edilen toplam hücre süspansiyonundan pozitif özellik gösteren % 92.8 oranında hücre olduğu belirlendi ve bu hücreler kültüre devam edilmesi amacı ile ayırlama yapılarak toplanmıştır.

A örnek grubu

B kontrol grubu



Şekil 35. tMKH'lerin akım sitometrik analiz sonuçları.

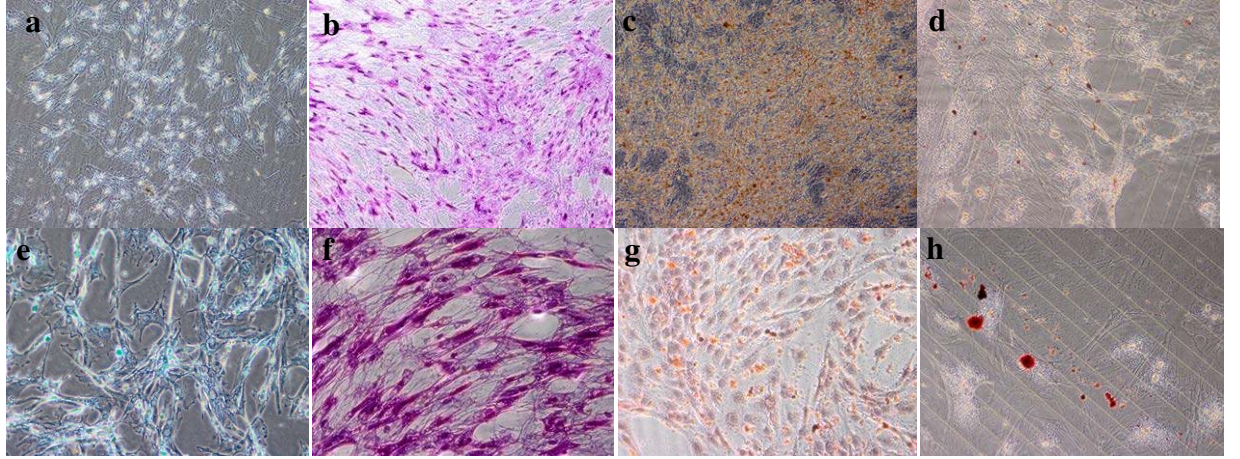
4.4.2.2. tMKH'lerin farklılaşma kapasiteleri

Kondrojenik farklılaştırma için tMKH'leri iki hafta kondrojenik besiyeri ile kültürleri yapıldı ve hücrelerin kondrosit benzeri hücelere farklılaştıkları görüldü. Kültürün ikinci haftasında alcian blue ile boyanan hücrelerde kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların mavi renkte boyandığı görüldü (Şekil 36a).

Fibroblastik farklılaşma için tMKH'ler fibroblastik besiyerinde iki hafta süre ile kültürleri edildi ve hücrelerin fibroblast benzeri hücelere farklılaştıkları gösterildi. Kültürün ikinci haftasında hematoxilen & eosin ile yapılan boyama sonrasında iğsi yapıdaki hücreler görüldü (Şekil 36b).

Osteojenik farklılaştırma için uyarılan tMKH'lerinin osteoblast benzeri hücelere farklılaştıkları gözlenmiştir. Osteojenik farklılaştırma besiyerine alınan tMKH'leri kültürün 4. haftasında alizarin kırmızısı ile boyandı ve mineralize kemik nodülleri görülmüştür (Şekil 36c).

Adipojenik olarak farklılaştırmak için tMKH'ler adipojenik besiyerinde iki hafta süre ile kültürleri sürdürüldü ve hücrelerin adiposit benzeri hücelere farklılaştıkları gösterildi. Kültürün ikinci haftasında Oil red O ile yapılan boyama sonrasında kırmızı renkte yağ damlacıkları görüldü (Şekil 36d).



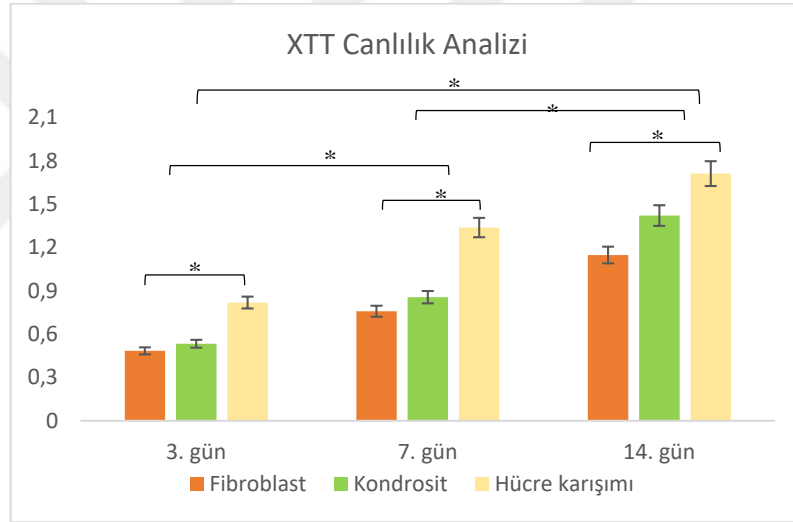
Şekil 36. tMKH'lerin kondrojenik (a-e), fibroblastik (b-f), osteojenik (c-g) ve adiposit (d-h) farklılaşması.

Büyütme; a-b-c-d 10X, e-f-g-h 20X.

4.4.3. tMKH'ler ile menisküs dokusunun hücre popülasyonu oluşturulması

tMKH'leri tanımlanıp farklılaşma kapasiteleri gösterildikten sonra menisküs dokusunun kendine özgü hücre popülasyonu elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, farklılaşan kondrosit, fibroblast hücreleri ve farklılaşmayan MKH'ler aynı kuyucuklar içerisine ekilmiş ve 14 gün süre ile kültür edilmiştir. Böylelikle menisküs dokusuna özgü hücre içeriği oluşturulmuştur.

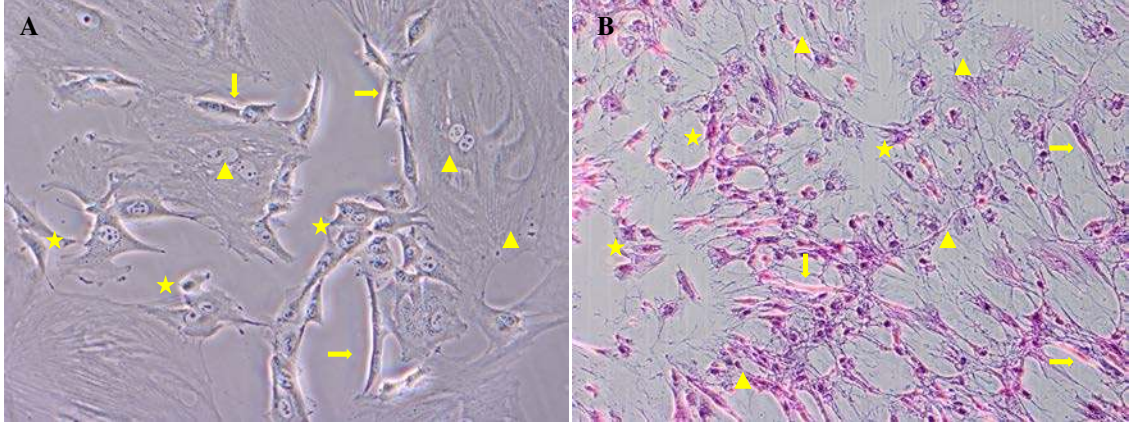
Hücre kültürünün 3, 7, 14. günlerde canlılık analizleri yapılarak hücre canlılığı ölçülmüştür. 14 günlük kültür boyunca tMKH'lerin canlılıklarının giderek arttığı gözlemlenmiştir. Her bir hücre grubunun canlılık oranları one way ANOVA analizi ile $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiştir. Şekil 37'de gösterildiği gibi 3, 7 ve 14. günlerde fibroblast ve kondrosit gruplarına göre hücre karışımı olarak hazırlanan hücrelerin canlılık oranlarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır.



Şekil 37. tMKH'lerin canlılık analizi sonuçları.

(Ort±SD, * $p < 0.05$ düzeyinde istatistiksel anlamlı artış, deneyler 4 kez tekrarlanmıştır).

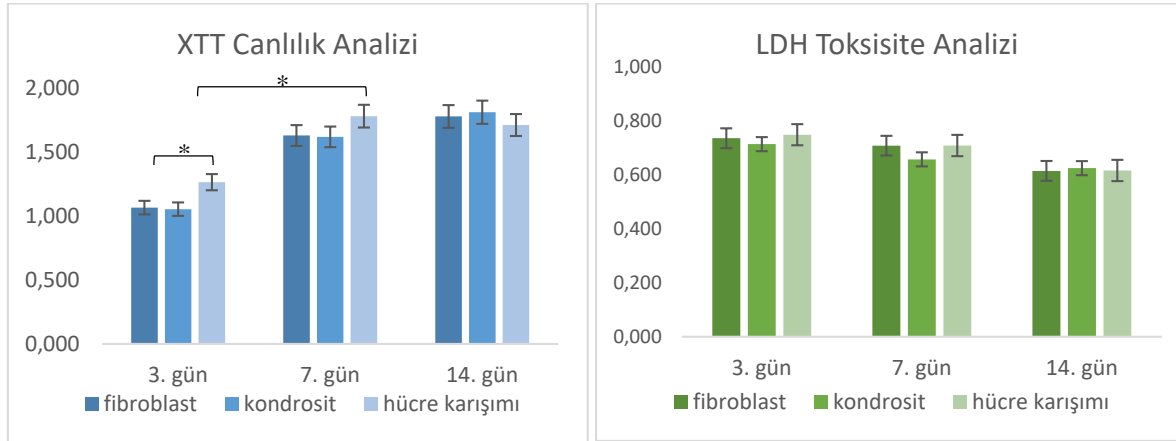
Fibroblast, kondrosit ve karışım olarak hazırlanan hücreler, kültür süresi boyunca inverted mikroskop ile incelenmiştir. 14. gün sonunda tek bir kuyucuk içerisinde bulunan farklı hücre popülasyonu oluşturduğu gözlenmiştir. Şekil 38'de görüldüğü gibi iğsi yapıdaki fibroblastlar, fibroblastlardan daha yuvarlak bir şekle sahip kondrosit hücreleri ve menisküs dokusu içeriğinde bulunan fibrokondrosit benzeri hücreler aynı kuyucuk içerisinde çoğalmaya devam etmiştir. Menisküs dokusunun kendine özgü hücresel içeriğini oluşturabilmek amacıyla hazırlanan hücre karışımının içerisinde farklılaşmamış MKH'lerin yine karışım olarak hazırlanan besi ortamında fibrokondrositlere dönüştüğü düşünülmektedir.



Şekil 38. Hücre karışımının A; kültür kabındaki, B; HE boyaması sonrası mikroskop görüntüleri. Fibroblast (ok), kondrosit (üçgen), fibrokondrosit (yıldız). Büyütme 20X.

4.4.4. Asellüler dokuların yeniden hücrelendirilmesi

Asellüler menisküs dokularını yeniden hücrelendirmek amacı ile dokulara fibroblast, kondrosit, fibroblast-kondrosit ve fibroblast-kondrosit-MKH hücre karışımı olacak şekilde 4 grup haline ekim yapılmıştır. Hücre kültür 14 gün boyunca izlenerek XTT canlılık ve LDH toksisite analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca histolojik olarak HE, masson trikrom ve alcian blue boyamaları ile araştırılmıştır.

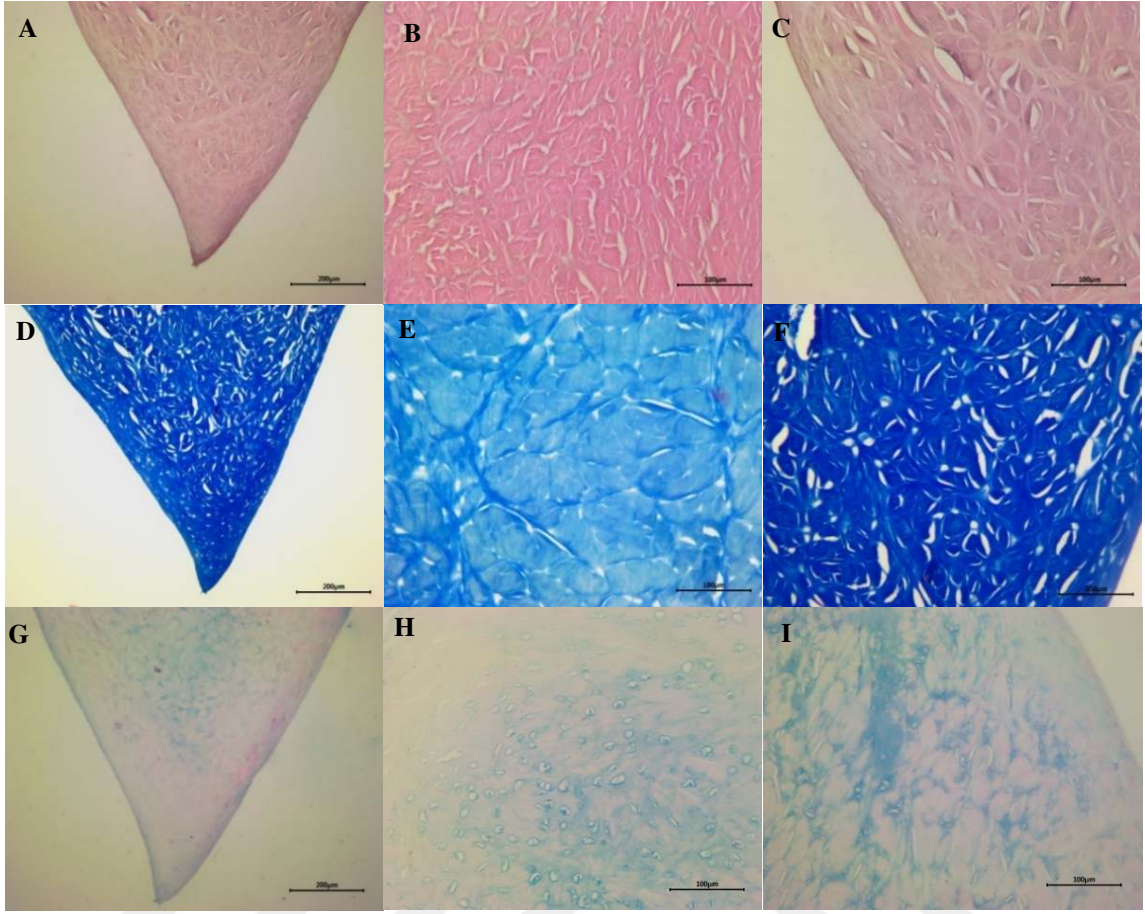


Şekil 39. Asellüler menisküs dokularına ekilen hücrelerin XTT ve LDH analizlerinin sonuçları. (*p<0.05 düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. (Ort±SD, deneyler 4 kez tekrarlanmıştır.)

Menisküs dokularının yeniden hücrelendirilmesi çalışmalarında kontrol grubunda asellüler menisküs dokuları üzerine hücre ekimi yapılmadan, diğer gruplarda ise asellüler dokular üzerine sırasıyla fibroblast, kondrosit ve hücre karışımı (fibroblast, kondrosit, MKH'ler) ekilerek 14 gün boyunca kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

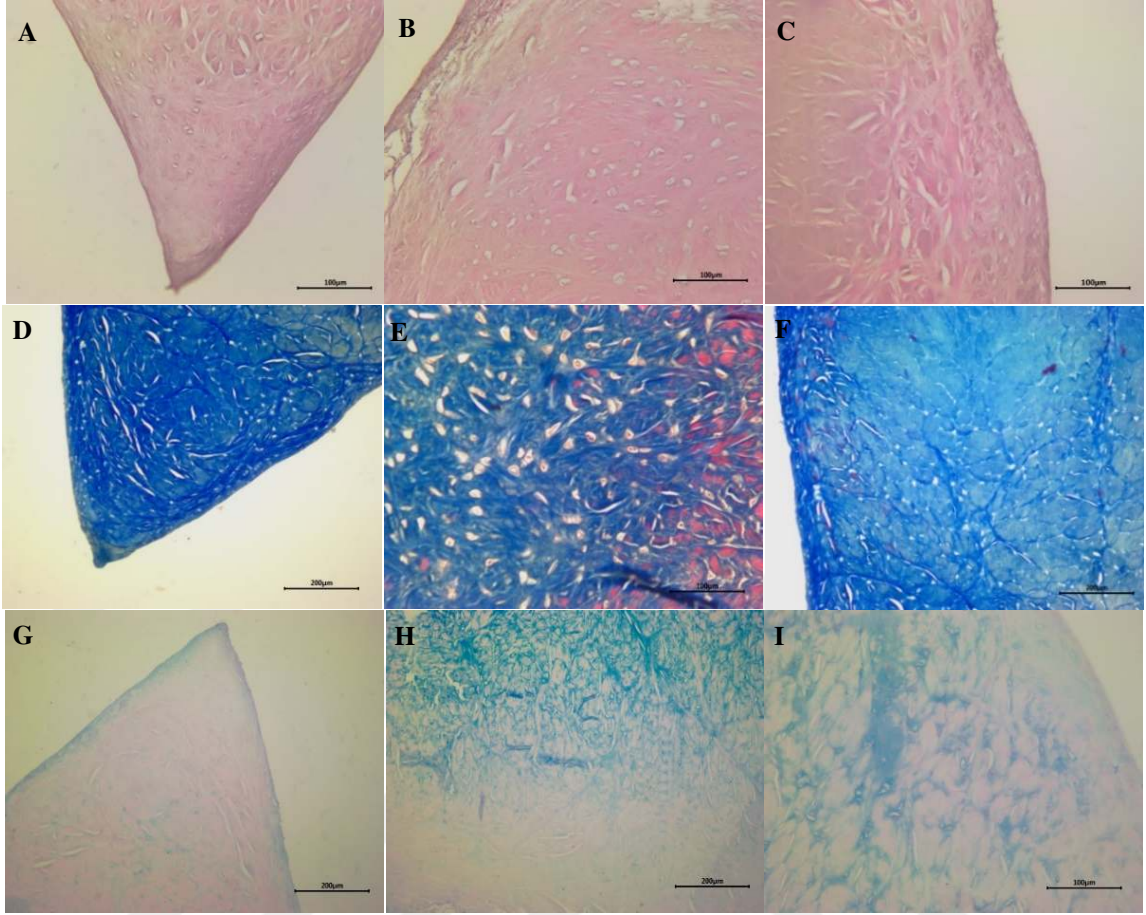
14 günlük kültürde XTT canlılık analizleri ile gün geçtikçe hücrelerin menisküs dokuları içinde çoğalmaya devam ettiği ve canlılıklarını sürdürdüğünü gözlenmiştir. Hücre karışımı grubu, fibroblast ve kondrosit hücrelerinin ekildiği gruplar ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının daha hızlı bir artış gösterdiği saptanmıştır. Gruplar arasında ve günlere göre değişen canlılık oranları one way ANOVA analizi ile değerlendirilmiştir. Şekil 39'da 3. günde hücre karışımı grubunun canlılık oranı diğer gruplara göre $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde daha yüksek olduğu ve 7. Günde 3. güne göre hücre karışımı grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca 14 günlük kültür sürecinde LDH toksisite analizleri de gerçekleştirilerek toksik bir etki gözlenmediği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar one way ANOVA analizi ile $p > 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirilmiş ve Şekil 39'da görüldüğü gibi grupların ortalamaları standart sapmalara göre belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Asellüler menisküs dokuları elde edilen hücreler ile yeniden canlandırılmış ve histolojik olarak incelenmiştir. Doku genelindeki hücre dağılımı hematoksilin&eosin boyaması, kondrojenik hücreler ve GAG'lar alcian blue boyaması ile kollajen demetler ise masson trikrom boyaması yapılarak incelenmiştir. Asellülerizasyon işlemi ile hücrelerden arındırılan lakünalar içerisine yeniden hücrelerin yerleştiği görülmektedir. Ayrıca dokunun genel yapısının da değişmediği görülmektedir.



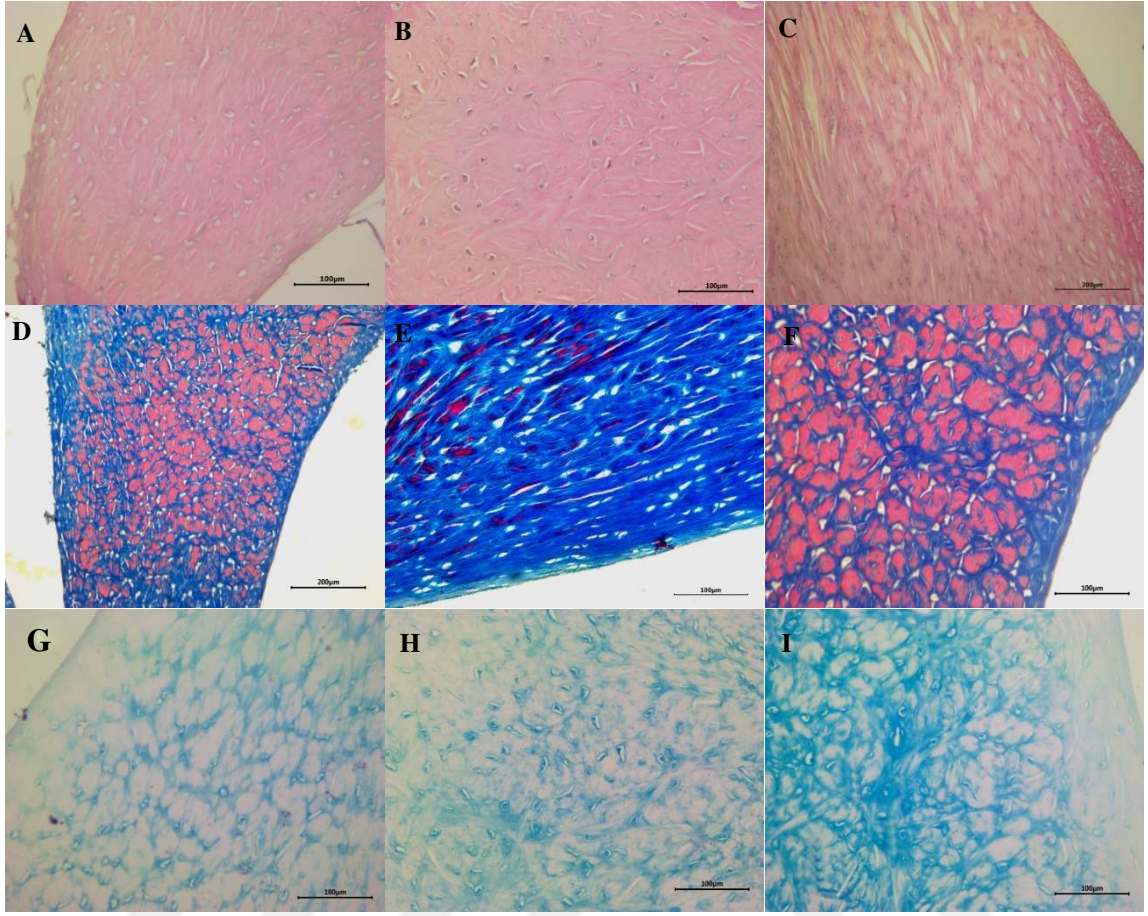
Şekil 40. Fibroblast ile kültüre edilen asellüler menisküs dokularının H&E (A,B ve C), Masson trikrom (D,E ve F), Alcian blue (G, H ve I) boyamalarının mikroskop görüntüleri.

Hücre kültürü çalışmaları ile elde edilen fibroblastlar kültür çalışmalarının 14. gününde asellüler menisküs dokularına ekilmiştir. 14. gün sonunda menisküs dokularının uç, orta, dış alanları histolojik boyamalar yapılarak incelenmiştir (Şekil 40). H&E boyamasında menisküs dokusunun en fazla uç (A) ve dış (C) alanlara hücrelerin yerleştiği görülmektedir. Orta (B) bölgede ise hücre sayısının daha az olduğu tespit edilmiştir. masson trikrom boyaması ile kollajen fibrillerin hasar görmediği ve doku içerisinde varlığını koruduğu uç (D), orta (E) ve dış (F) alanlarda gösterilmiştir. GAG yapıları yeniden hücrelendirilen menisküs dokusunun uç (G), orta (H) ve dış (I) alanlarında bulundukları alcian blue boyaması ile belirtilmiştir (Şekil 42).



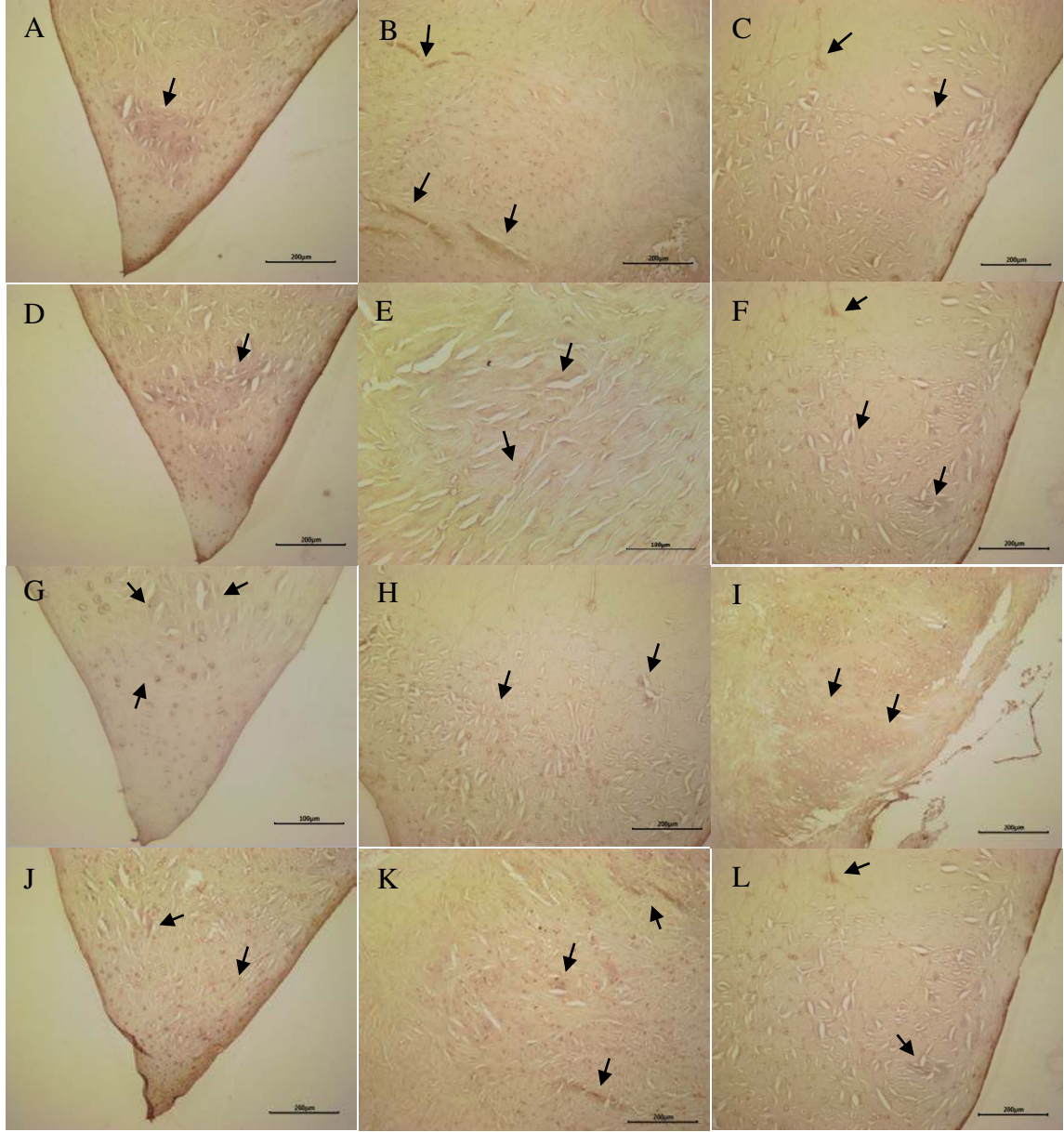
Şekil 41. Kondrosit ile kültüre edilen asellüler menisküs dokularının H&E (A,B ve C), Masson trikrom (D,E ve F), Alcian blue (G, H ve I) boyamalarının mikroskop görüntüleri

Mezenşimal kök hücrelerden farklılaştırılmış kondrositlerin asellüler dokular üzerine ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. 14. gün sonunda HE boyaması ile histolojik olarak incelenen dokuların uç (A), orta (B) ve dış (C) bölgelerinde fibroblast kültür sonuçlarına göre daha fazla sayıda hücre olduğu saptanmıştır. Masson trikrom boyamasında da görülen hücreler menisküs dokusunun uç (D), orta (E) ve dış (F) bölgelerinde kollajen demetlerinin aralarında yer aldığı gözlenmiştir. Alcian blue boyamasında ise dokuların uç (G), orta (H) ve dış (I) bölgelerinde proteoglikanlar mavi renkte boyanmıştır (Şekil 41).



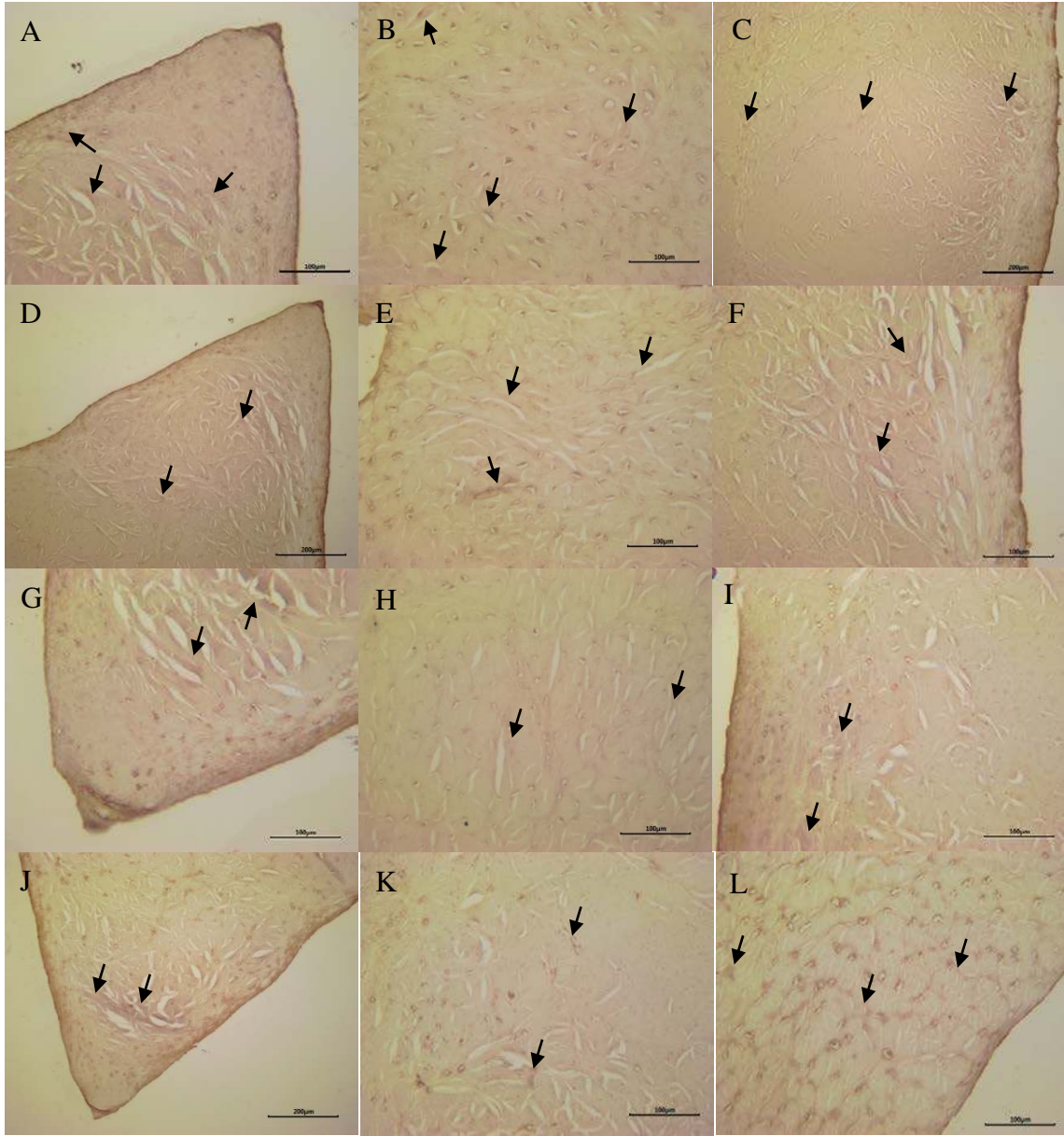
Şekil 42. Karışım halindeki hücreler ile kültüre edilen asellüler menisküs dokularının H&E (A,B ve C), Masson trikrom (D,E ve F), Alcian blue (G, H ve I) boyamalarının mikroskop görüntüleri.

Hücre kültürü çalışmaları ile elde edilen fibroblast, kondrosit ve MKH'ler ile oluşturulan hücre karışımı kültürün 14. gününde asellüler menisküs dokularına ekilmiştir. Yeniden hücrelendirilen dokular 14 gün boyunca hazırlanan karışım olarak hazırlanan besi yeri içerisinde bekletilmiş ve 3-5 gün arasında besi yeri tazelenmiştir. 14. gün sonunda dokular uç, orta, dış alanları histolojik boyamalar yapılarak incelenmiştir (Şekil 42). H&E boyamasında menisküs dokusunun uç (A), orta (B) ve dış (C) alanlarında hücrelerin yerleşimi görülmektedir. Ekimi gerçekleştirilen hücrelerin dış bölgelere yerleşmelerinin yanı sıra dokunun iç alanlarına doğru ilerlediği tespit edilmiştir. Masson trikrom boyaması ile kollajen fibrillerin hasar görmediği ve doku içerisinde varlığını koruduğu uç (D), orta (E) ve dış (F) alanlarda gösterilmiştir. GAG yapıları yeniden hücrelendirilen menisküs dokusunun uç (G), orta (H) ve dış (I) alanlarında hücreler arasında bulundukları Alcian blue boyaması ile belirtilmiştir.



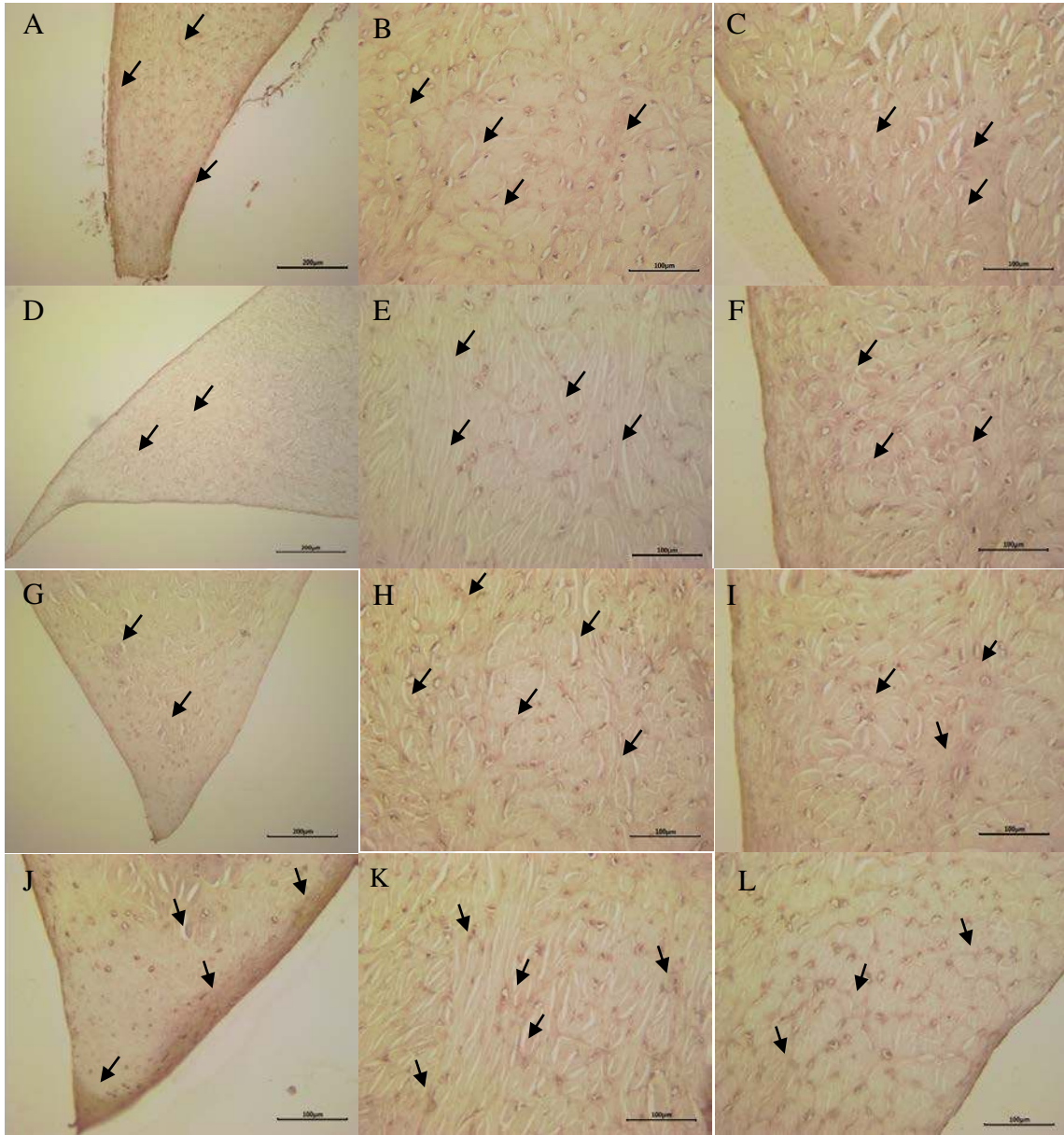
Şekil 43. Fibroblast ile yeniden hücrelendirilen asellüler menisküs dokularının Tip I kollajen (A,B,C), Tip II kollajen (D,E,F), Agrekan (G,H,I), Vimentin (J,K,L) boyamaları.

Fibroblastlar ile yeniden hücrelendirilen asellüler menisküs dokularının immunohistolojik boyamaları Şekil 43’de gösterilmiştir. Tip I kollajen oklar ile gösterilen dokunun uç (A), orta (B) ve dış (C) alanlarında gözlenmektedir ve orta alanda büyük kollajen demetleri (B) daha belirgin şekilde gözlenmektedir. Tip II kollajen de aynı şekilde dokunun uç (D), orta (E) ve dış (F) alanlarında gösterilmektedir. Agrekan yapıları hücrelendirilmiş dokuların uç (G), orta (H) ve dış (I) alanlarında koyu kahverengi bölgeler olarak görülmektedir. Vimentin boyamaları ise uç (J), orta (K) ve dış (L) alanlarında oklar ile belirtilmiş ve dokunun orta bölgesinde diğer bölgelere göre daha yoğun olarak bulunduğu gözlenmiştir.



Şekil 44. Kondrosit ile yeniden hücelendirilen menisküs dokularının Tip I (A,B,C), Tip II (D,E,F), Agrekan (G,H,I), Vimentin (J,K,L) boyamaları.

Şekil 44’de kondrosit ile kültüre edilen asellüler dokuların immünolojik boyamaları görülmektedir. Tip I ve tip II kollajen boyamalarında sırasıyla dokuların uç (A,D), orta (B,E) ve dış (C,F) alanlarında oklar ile kollajen demetleri gösterilmiştir. Agrekan yapıları ise dokunun orta (H) bölgesine göre uç (G) ve dış (I) bölgelerde daha yoğun olarak gözlenmiştir. Vimentin yapıları ise dokunun uç (J), orta (K) ve dış (L) bölgelerinde oklar ile belirtilmiştir.



Şekil 45. Oluşturulan hücre karışımı ile yeniden hücrelendirilen menisküs dokularının Tip I (A,B,C), Tip II (D,E,F), Agrekan (G,H,I), Vimentin (J,K,L) boyamaları.

Oluşturulan hücre karışımı ile yeniden hücrelendirilen asellüler dokular içerisinde tip I ve II kollajen, agrekan, vimentin yapıları daha yoğun olarak gözlenmiştir. Şekil 45’de dokunun uç (A), orta (B) ve dış (C) olarak tüm alanlarda tip I kollajen bulunmakta olup uç bölgesinde hiyalin kıkırdak benzeri alanlarda daha yoğun boyandığı gözlenmiştir. Tip II kollajen ise dokunun uç (D), orta (E) ve dış (F) alanlarında belirtilmiş ve orta bölgede fibriller arasında hücrelerin yerleştiği gözlenmektedir. Agrekan yapıları koyu kahverengi boyanmış olarak dokunun uç (G), orta (H) ve dış (I) alanlarında hücrelerin arasında bulunmaktadır. Vimentin boyamaları ise uç (J), orta (K) ve dış (L) alanlarında oklar ile belirtilmiş ve dokunun uç bölgesinde daha yoğun olarak gözlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Geleneksel tıp uygulamalarındaki zorlu cerrahi yöntemler hem hasta memnuniyeti hem de uygulanabilirlik açısından güç olmakla birlikte yeni yöntemlerin geliştirilmesinde de ilham verici güç olmuştur. Tıp uygulamalarında sentetik ürünlerin kullanılması yerine doğal ürünler ve bu ürünlerin uygulanması araştırılmaktadır.

Biyo-aktif doğal doku iskelelerinin implantasyonu canlı sistemi ile uyum sağlayacak ve uzun süre kararlılığını koruması bakımından avantaj sağlamaktadır. Doğal ürünler ile hem biyolojik olarak uyumlu malzemeler kullanılmış olur hem de ikinci cerrahi işleme gerek duyulmaz. Literatür bilgisine bakıldığında araştırmalarda sentetik malzemelerin kullanımının başarılı sonuçlar getirdiği görülmektedir, fakat klinik uygulamalarda aynı başarı uzun dönem takiplerde gözlenmemektedir. Klinik uygulamalarda sentetik malzemelerin kullanımı kolaydır fakat geçici çözüm sunmakla beraber doğal bir uygulama olmadığı için iyileşme düzeyini azaltmaktadır. Bu nedenle doğal yöntemler ile elde edilmiş doku veya malzemelerin tercihi kullanılabilirliği ve iyileştirme kapasitesini arttırmaktadır.

Doku mühendisliğindeki yeni metotlar, örneğin; dokunun asellülerizasyonu ve otolog hücrelerin ekimi, transplantasyon problemlerinin çözümü için büyük bir potansiyele sahiptir (Tischer ve ark., 2007). Günümüzde birçok organ ve doku (tendon, kalp kapakları, sinirler, özofagus vb.) farklı metotlar kullanılarak asellülerize edilmektedir (Lichtenberg ve ark., 2006). Allograft asellülerizasyonu için farklı yöntemler kullanılmıştır. Tekrarlayan donma/çözdürme (Tischer ve ark., 2007) ve yüksek basınç (Diehl ve ark., 2006; Naal ve ark., 2008) işlemleri gibi çeşitli kimyasal olmayan metotlar asellülerizasyon için kullanılmaktadır. Naal ve ark., 10 dakika boyunca 600 MPa basınçta yüksek basınç uygulaması ile meniskal kıkırdak iyileştirmesinin biyomekanik özelliklerde negatif bir etki oluşturmadığını göstermiştir. Ayrıca, kollajen yapılarının (kollajen I, II, III) veya peptidoglikan kompozisyonlarının (versikan, agrekan, bağlantı proteini), kontrol grubuna göre immunohistokimyasal boyamalarında farklılık saptanmamıştır (Naal ve ark., 2008). Fakat yine de, tekrarlayan donma/çözdürme ve yüksek basınç uygulamaları hücre kalıntıları bıraktığı için potansiyel immunojenik reaksiyonlar oluşturabilmektedir. İmmunojenik reaksiyonların üstesinden gelmek için çeşitli kimyasal metotlar geliştirilmiştir. Örneğin, tripsin kolajen bağları parçalamadığı için koyun kalp kapakçığının asellülerizasyonunda başarılı olarak kullanılmıştır. Fakat menisküs dokusu, sıkıca paketlenmiş ESM ile fibrokartilaj ve kollajenden oluştuğu için asellülerizasyon işleminde tripsin tek başına yetersiz kalmaktadır. İlk kez koyun menisküs dokusu, çok aşamalı enzimatik

işlem ile tripsin, kollajenaz ve proteaz kullanılarak asellüler hale getirilmiştir (Maier ve ark., 2007) Fakat bu yöntemde de; kullanılan enzimler nedeniyle ekstrasellüler matrisin bir bölümü parçalanmıştır. Menisküsün su içeriğinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan glikozaminoglikanlar (GAG) ise kısmen ortadan kaldırılmıştır ve biyomekanik özellikler negatif olarak etkilenmiştir.

Başarılı bir asellülerizasyon yöntemi ile ekstrasellüler matriks bileşenleri korunarak doğal dokunun yapısal özelliklerinin bozulmaması amaçlanır. SDS gibi iyonik deterjanlar hücre ve nükleus zarını parçalayarak proteinleri denature etmektedir. Aynı zamanda GAG'ları, büyüme faktörlerini ortadan kaldırıp kollajen yapılara zarar verdiği gösterilmiştir (Lumpkins ve ark., 2008). Bu nedenle farklı deterjanlar veya çözücü tabanlı solüsyonlar menisküs asellülerizasyonunda kullanılmıştır. SDS, Triton-X ya da Tri-(n-butyl) fosfat benzeri ajanlar bütün hücreleri ve hücre kalıntıları ortadan kaldırır (Gilbert ve ark., 2006) ve ön çapraz bağ, sinir greftleri ve kalp kapakçıkları için kullanışlıdır fakat menisküs dokusu için henüz geçerliliği bulunmamaktadır (Hudson ve ark., 2004; Lichtenberg ve ark., 2006, Stone ve ark., 2006). Patella tendonunun asellülerizasyon çalışmasına göre SDS, Triton-X veya Tri-(n-bütill) fosfattan daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca Triton-X, tri-(n-bütill) fosfat ve SDS karşılaştırıldığında ise SDS'nin hücre ekstraksiyonu için daha etkili olduğu belirtilmektedir (Cartmell ve ark., 2000).

Gerçekleştirilen tez çalışmasında tavşan menisküs dokusu, asellülerizasyon yöntemi ile ESM korunarak allogreft doğal doku iskelesi geliştirilmiş ve tavşanlardan elde edilen MKH'ler ile menisküs dokusunun hücre popülasyonu oluşturularak asellüler doku iskelelerinin yeniden hücrelendirilmesi sağlanmıştır. Uygulanan birinci yöntem, insan menisküs dokusunun asellülerizasyonunda kullanılan bir yöntemdir. Sadece kimyasal basamak içeren yöntemde %2 SDS kullanılarak asellülerizasyon işlemi uygulanmış, histolojik ve biyomekanik araştırmalar ile incelenmiştir. Çalışmada insan menisküs dokusunun kollajen fibrillerine zarar verilmeden ve biyomekanik gerilimi değiştirilmeden başarılı bir şekilde asellüler hale getirilmiştir (Sandman ve ark., 2008). Aynı yöntem %1, %2, %5 SDS konsantrasyonları kullanılarak, tavşan menisküs dokularının asellüler hale getirilmesi amacı ile uygulanmıştır (Yöntem 1). HE boyamalarına bakıldığında %1 SDS kullanımının hücresel içeriği değiştirmediği (Şekil 20), %2 SDS kullanımının hücresel içeriğin kaldırılmasında daha fazla etkili olduğu (Şekil 21), %5 SDS kullanımının ise dokunun histopatolojik yapısındaki en önemli bileşen olan kollajen fibrillere zarar verdiği görülmüştür (Şekil 22). Referans çalışmasından (Sandman ve ark., 2008) farklı

sonuçlar elde edilmesinin nedeni; tavşan menisküs dokusunun insana göre daha çok sayıda hücre içermesinden kaynaklandığı düşünölmektedir. Chevrier ve ark. alışmasında tavşan, koyun ve insan menisküs dokuları karşılaştırılarak, dokuların benzer hücre morfolojisine sahip olduğu fakat en fazla hücrenin tavşan menisküs dokusunda bulunduğu bildirilmiştir (Chevrier ve ark., 2009). Tavşan menisküs dokusunun tüm bölgelerinde görölen yoğun hücresel içeriği nedeniyle tek başına kimyasal asellölerizasyon yöntemi hücrelerin arındırılmasında yeterli olmamıştır.

İkinci yöntemde fiziksel, kimyasal ve enzimatik olmak üzere üç farklı yöntem birleştirilerek kullanılmıştır. Menisküs dokusunun sıkı paketlenmiş kollajen fibrilleri ve bu fibrillerin kendilerine özgü dizilimleri nedeniyle kullanılan kimyasalların doku içerisine nüfuz edebilmesi oldukça güç olmaktadır. Bu nedenle, fiziksel basamakta dondurma-çözme işlemleri uygulanarak sıkı fibril demetlerinin açılması sağlanmış ve kimyasalların dokunun i bölgelerine girebilmesi kolaylaştırılmıştır. Kimyasal yöntem ile SDS deterjanı kullanılarak hücrelerin parçalanması sağlanmıştir. Bunun yanı sıra tampon çözeltilere eklenen proteinaz inhibitörleri (aprotinin ve EDTA), endojen proteinleri inhibe ederek kullanılan SDS'ın ESM'e zarar vermesini önlenmiştir. Hipotonik özelti sonrası hipertonic tampon kullanılması ise osmotik şok oluşturarak hücrelerin parçalanmasını sağlamış ve DNA proteinlerden uzaklaştırılmıştır. Enzimatik yöntem ile DNA ve RNA parçalanarak nüklear maddenin dokulardan çıkarılması sağlanmıştir. Böylelikle % 0.1 SDS kullanılarak tavşan menisküs dokuları ESM'e zarar vermeden asellöler hale getirilmiş ve histolojik, biyokimyasal ve biyomekanik araştırmalar ile karakterize edilmiştir.

Histolojik araştırmalarda menisküs dokularının kırmızı, kırmızı-beyaz, beyaz ve süperfisiyal bölgeleri ayrı ayrı araştırılarak tüm doku incelenmiştir. HE boyamalarında, doğal menisküs dokusunun asellölerizasyon işlemi sonrasında yoğun hücresel içeriğinin tamamen ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (şekil 23). Menisküs dokusunun kırmızı bölgesinde diğer bölgelere göre daha yoğun hücresel yerleşim olduğu bilinmektedir. Bu bölgedeki hücrelerin dokudan kaldırıldığı tüm boyamalarda gösterilmiştir. Dokunun uç bölgesi olan beyaz bölge damarsız bölge olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla daha az hücre içermesi beklenir fakat tavşan menisküs dokusunun beyaz bölgesinde de hücrelerin sayıca fazla olduğu görölmektedir (şekil 23 E). Beyaz, kırmızı-beyaz ve süperfisiyal bölgelerde bulunan lakönalara yerleşmiş hücrelerin dokudan uzaklaştırıldığı gösterilmiştir (şekil 23 F,D,H). Masson trikrom boyaması ile menisküs dokularında bulunan kollajen fibriller incelenmiştir. Asellölerizasyon işlemi

sonrasında, kollajen fibrillerin dokunun tüm bölgelerinde varlığını koruduğu Şekil 24’de gösterilmiştir. Kimyasal basamakta tampona eklenen proteaz inhibitörleri ile fibriler ağı zarar görmemesini sağlanmıştır. GAG yapıları ise asellülerizasyon işlemi sonrasında alcian blue boyaması ile incelenmiş ve doku içerisinde bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 25).

İmmunohistokimyasal incelemelerde menisküs dokusundaki tip I, tip II kollajen, vimentin ve agrekan yapıları araştırılmıştır. Menisküs dokusunun ESM yapısı temel olarak tip I kollajen fibrillerden oluşmaktadır. Kırmızı bölgede yaklaşık %80 oranında tip I kollajen bulunduğu, beyaz bölgede tip II kollajen %60 oranında, tip I kollajen %40 oranında bulunduğu gösterilmiştir (Cheung, 1987). Şekil 26’da tip I kollajen fibriller hem doğal dokuda hem de asellülerizasyon sonrasında doku genelinde gözlenmektedir. Şekil 27’de tip II kollajen fibriller dokunun beyaz (F) ve kırmızı (B) bölgelerinde yoğun olarak boyandığı görülmektedir. Agrekan ise menisküs dokusunun su absorpsiyonunu sağlayan en büyük proteoglikanıdır ve dokunun geneline yayılmış olarak gözlenir (Scott ve ark., 1997). İmmunohistolojik incelemelerde hem tip I, II kollajenin hem de ESM proteinleri olan agrekan ve vimentin yapılarının asellülerizasyon işlemleri sonrasında da doku içeriğinde bulunduğu gözlenmiştir.

Histolojik incelemelere ek olarak doğal doku ile asellüler menisküs dokusunun total DNA, kollajen ve GAG içeriği biyokimyasal olarak analiz edilmiştir. Asellülerizasyon işlemi sonrasında menisküs dokularından DNA izolasyonu yapılarak total içerik ölçülmüştür. İşlem görmemiş menisküs dokularında 40,5 ng/ml olan DNA, asellülerizasyon işlemi sonrasında 10,02 ng/ml bulunmuştur. İstatistiksel olarak analiz edilen sonuçların $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olduğu saptanmıştır (Şekil 31). Dokunun total kollajen içeriği hidroksiprolin-prolin miktarına bağlı olarak ölçülmüş ve doğal dokuda 45,53 ug/ml, asellülerizasyon sonrası ise 42,90 ug/ml olarak bulunmuştur (Şekil 30). GAG miktarları 1,9 DMMB testi ile ölçülerek doğal ve asellüler doku içerikleri karşılaştırılmıştır. Analiz sonucunda doğal dokuda 9,45 ug/ml, asellüler dokuda ise 9,00 ug/ml olarak ölçülmüştür (Şekil 30). Biyokimyasal incelemeler ile elde edilen total kollajen ve GAG miktarları istatistiksel olarak test edilmiş ve $p > 0.05$ düzeyinde anlamlı ölçüde değişmediği belirlenmiştir. Elder ve ark., eklem kıkırdığını %2 SDS kullanarak asellüler hale getirmiştir. Asellülerizasyon işlemi sonrasında total DNA, kollajen ve GAG analizleri ile dokuları incelemiştir. Kollajen miktarlarının değişmediği, DNA ve GAG oranlarının istatistiksel olarak anlamlı azaldığı gösterilmiştir (Elder ve ark. 2010). Tez çalışmasında uygulanan fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler ile hücresel içerik arındırılırken dokunun en az düzeyde hasar görmesi amaçlanmıştır. Kimyasal yöntem basamağında kullanılan % 0,1

SDS Elder ve ark. kullandığı konsantrasyondan oldukça düşüktür. Bu nedenle dokunun ESM'i zarar görmemiş ve biyokimyasal analizler ile doğrulanmıştır.

Asellülerizasyon işleminin dokuya zarar vermemesi biyomekanik dayanım açısından oldukça önemlidir. Asellüler dokuların greft olarak kullanılabilmesinin temelde iki koşulu vardır; birincisi dokunun tamamen hücresiz olması ile immünolojik yanıtı en aza indirmek; ikincisi biyomekanik özelliklerini koruyarak dayanıklı olması ve transplantasyon sonrasında işlevsel kayıp oluşturmamasıdır. Asellülerizasyon işleminin dokunun biyomekanik dayanımına etkisini araştırmak için biyomekanik testler gerçekleştirilmiştir. Biyomekanik gerilmeler dokunun ESM'i ile doğrudan ilişkilidir. Histolojik ve immunohistokimyasal olarak ESM'in zarar görmediği saptanmış ve biyomekanik testler ile desteklenmiştir. Laboratuvarımızda geliştirdiğimiz tavşan menisküs dokusunun boyutlarına uygun ekipmanlar ile basma testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler sonucunda oluşturulan denklem sistemine bağlı olarak dokuların elastisite modülleri hesaplanmıştır. Literatür incelemelerinde menisküs dokularının biyomekanik test sonuçları, kullanılan test metoduna bağlı olarak farklılık göstermektedir (Abdelgaied ve ark., 2015). Gerçekleştirilen tez çalışmasında kullanılan yöntemde standart örnek boyutları elde edilmiş ve tüm dokuların kalınlıkları ölçülerek elastisite modülü doğal dokuda 1,199 N, asellüler dokuda 1,056 N olarak bulunmuştur (Hayes ve ark., 1972). İstatistiksel olarak değerlendirilen test sonuçlarında $p>0,05$ düzeyinde anlamlı bir fark saptanmamıştır (Şekil 32).

Menisküs dokusunda üç farklı hücre tipi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi doku yüzeyinin hemen altında bulunan kondrositler, ikincisi fibröz kısımda bulunan fibroblastlar ve üçüncüsü ise dokunun iç ve orta kısmında bulunan fibrokondrositlerdir. Tez çalışmasında hücre kültürü araştırmaları ile menisküs dokusuna özgü olan hücre popülasyonu elde edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla; tavşanlardan kök hücreler izole edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları ile mezenşimal kök hücre oldukları gösterilmiştir (Şekil 35). Uygun besi ortamları içerisinde farklılaştırılan hücreler ile menisküs dokusunun sahip olduğu hücresel içerik fibroblast, kondrosit ve fibrokondrosit olacak şekilde elde edilmiştir (Şekil 38). Elde edilen her bir hücre tipi eşit oranlarda kullanılarak bir karışım oluşturulmuş ve asellüler hale getirilmiş dokulara ekilmiştir. Menisküs dokularının yeniden hücrelendirilmesi ile XTT canlılık analizleri ve LDH toksisite analizleri gerçekleştirilerek hücre canlılığının gün geçtikçe arttığı ve aynı zamanda toksik herhangi bir etki oluşmadığı gösterilmiştir (Şekil 39). Canlılık analizlerinde fibroblast, kondrosit ve MKH olarak oluşturulan hücre karışımı grubu diğer gruplara göre en yüksek

seviyede canlılık göstermiştir. Elde edilen bu sonucun hücreler arası sitokin alışverişinin en yüksek seviyede olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Asellüler menisküs dokularının yeniden hücrelendirilmesi çalışmalarında sadece fibroblast ekimi yapılan grupta hücreler dokunun daha çok dış bölgelerine yerleşmiş ve çoğalmıştır. Doğal menisküs dokusunda da fibroblast hücrelerinin dış bölgelerde fazla sayıda bulunması bu sonuç ile ilişkilendirilebilir. Sadece kondrosit ekimi yapılan grupta ise dokunun uç ve orta bölgelerine daha fazla hücrenin girdiği gözlenmiştir. Bu sonuç menisküs dokusunun uç bölgesinin hiyalin kıkırdağa benzer yapıda olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Hem fibroblast, hem kondrosit hem de farklılaşan fibrokondrositlerin ekildiği grupta ise en fazla hücre yoğunluğu elde edilmiştir. Hücreler menisküs dokusunun geneline yayılarak uç, orta ve dış bölgelerin tümünde gözlenmiştir. Hücre karışımı olan grubun diğer gruplar ile karşılaştırılmasında en iyi sonuç verdiği görülmektedir.

Hücre kültürü çalışmaları menisküs dokusunun hücresel içeriğinin doğala en yakın olacak şekilde elde edilmesi amacı ile planlanmış olup özgün bir yöntemdir. Bu yöntem ile menisküs dokusunun rejeneratif kapasitesinin daha da artacağı düşünülmektedir. Böylece asellüler menisküs doku iskelesi ileri transplantasyon çalışmalarında hem immun yanıtı ortadan kaldıracak hem de yeniden hücrelendirilmesi ile doku hasarlarının tedavisinde etkin rol oynayabilecektir.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre tavşan menisküs dokusunun biyomekanik gerilimi değiştirilmeden, ekstrasellüler matriks korunarak hücresel içeriğinin dokudan uzaklaştırıldığı görülmüştür. Elde edilen asellüler allogreft doku iskelesinin, menisküs tedavisindeki zorlu cerrahi uygulamalara, alternatif bir yöntem olabileceği düşünülmektedir. Bu yöntemin yaygın kullanımı ile geri dönüşümü olmayan ve ikinci bir ameliyat gerektiren protez cerrahisinin azalabileceği ve onun yerine biyoaktif olarak güçlendirilmiş asellüler menisküs doku iskelelerinin etkin olarak kullanılabileceği öngörülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen tez çalışmasında hem kimyasal asellülerizasyon hem de fiziksel, kimyasal, enzimatik yöntemlerin bir arada uygulandığı iki farklı asellülerizasyon yöntemi kullanılmıştır. Kimyasal asellülerizasyon yönteminde (Yöntem 1) farklı konsantrasyonlarda (%1, %2, %5) SDS deterjanı uygulanmış fakat %1 ve %2 SDS denemesinde tam olarak hücresel içerik uzaklaştırılmadığı gibi %5 SDS denemesinde dokunun histopatolojisine zarar verilmiştir. Fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kullanıldığı çok basamaklı asellülerizasyon yönteminde (Yöntem 2) istenilen sonuç alınmış ve dokunun histopatolojisine zarar verilmeden hücresel içeriği uzaklaştırılmıştır. Asellülerizasyon işlemi sonrasında dokuların doğal yapıya oldukça yakın bir içeriğe sahip olduğu histolojik ve immünolojik araştırmalarla ortaya koyulmuş, biyokimyasal analizler ile desteklenmiştir.

Asellülerizasyon işlemi sonrasında hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilerek tavşan kemik iliğinden MKH'ler izole edilip meniskal hücre popülasyonu oluşturulmuştur. Asellüler menisküs dokularına tMKH'leri ekilerek canlılıkları ile toksisiteleri analiz edilmiştir. Hücre karışımı olarak hazırlanan hücrelerin asellüler menisküs dokularındaki lakünelara yerleştiği ve canlılıklarını sürdürdüğü saptanmıştır.

Gerçekleştirilen in vitro çalışmalar ile asellüler tavşan menisküs dokusunun biyolojik olarak uygunluğu belirlenmiş, ileri çalışmalarda in vivo araştırmaların yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

- Aagaard H, Verdonk R. Function of the normal meniscus and consequences of meniscal resection. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 1999; 9(3):134-40.
- Allen PR., Denham RA, Swan AV. Late degenerative changes after meniscectomy factors affecting the knee after operation. *Journal of Bone and Joint Surgery-British*, 1984; 66: 666-671.
- Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nelrich M, Goldberg V, Yoo J. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res*, 2008; 85:445-55.
- Arıncı K, Elhan A. *Anatomi 1. Cilt*. Ankara, Güneş Kitapevi; 2006; 102.
- Arnoczky SP, Warren RF. Microvasculature of the human meniscus. *Am J Sports Med*, 1982; 10: 90–95.
- Arnoczky SP, Warren RF. The microvasculature of the meniscus and its response to injury. An experimental study in the dog. *Am J Sports Med*, 1983; 11: 131-41.
- Arnoczky SP, Dicarlo EF, Obrien SJ, Warren RF. Cellular repopulation of deep-frozen meniscal allografts - an experimental study in the dog. *Arthroscopy*, 1992; 8: 428-436.
- Arnoczky SP. Meniscus. *Clin Orthop* 1999; 367: 293-5.
- Arnoczky SP. Building a meniscus. *Clin Orthop* 1999; 367: 244-53.
- Asara JM, Schweitzer MH, Freimark LM, Phillips M, Cantley LC. Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science*, 2007;316:280–28.
- Aspden RM, Hukins DWL. Structure, function and mechanical failure of the meniscus. In: A. L. Yettram, ed. *Material Properties and Stress Analysis in Biomechanics*, Manchester, Manchester University Press. 1989; p109-122
- Athanasiou KA, Sanchez-Adams J. Engineering the knee meniscus. Lecture 1: Synthesis lectures on tissue engineering. Morgan-Claypool Publishers. 2009.

Bamac B, Ozdemir S, Sarisoy HT, Colak T, ve ark. Evaluation of medial and lateral meniscus thicknesses in early osteoarthritis of the knee with magnetic resonance imaging. *Saudi Medical Journal*, 2006; 27: 854-857.

Berthiaume MJ, Raynauld JP, Martel-Pelletier J, Labonte F, ve ark. Meniscal tear and extrusion are strongly associated with progression of symptomatic knee osteoarthritis as assessed by quantitative magnetic resonance imaging. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2005; 64: 556-563.

Bjelle A. Cartilage matrix in hereditary pyrophosphate arthropathy. *Journal of Rheumatology*, 1981; 8: 959-964.

Björnsson, S., Simultaneous preparation and quantitation of proteoglycans by precipitation with Alcian Blue, *Anal. Biochem*, 1993; 210, 282–291

Bodin A, Concaro S, Brittberg M, Gratenholm P. Bacterial cellulose as a potential meniscus implant. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007; 1:406-8.

Boo L., Selvaratnam L., Tai C. C., Ahmad T. S., Kamarul T., Expansion and preservation of multipotentiality of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture, *J Mater Sci: Mater Med*, , 2011;22: 1343–1356.

Booth, C., Korossis, S. A., Wilcox, H. E., Watterson, K. G., Kearney, J. N., Fisher, J. & Ingham, E. Tissue engineering of cardiac valve prostheses i: Development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *Journal of Heart Valve Disease*, 2002;11:457-462.

Boyd KT, Myers PT. Meniscus preservation; rationale, repair techniques and results. *The Knee*. 2003 Mar 31;10(1):1-1.

Brazel D, Oberbäumer I, Dieringer H, Babel W, ve ark. Completion of the amino acid sequence of the $\alpha 1$ chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 nontriplet interruptions located within the collagenous domain. *Eur. J. Biochem*, 1987; 168: 529–536.

Brinckmann J. Collagens at a glance. *Top. Curr. Chem* 2005; 247: 1–6.

Brindle T, Nyland J, Johnson D. The meniscus: Review of basic principles with application to surgery and rehabilitation. *The Journal of Athletic Training*, 2001; 36: 160-169.

Brophy RH, Cottrell J, Rodeo SA, Wright TM, Warren RF, Maher SA. Implantation of a synthetic meniscal scaffold improves joint contact mechanics in a partial meniscectomy cadaver model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2010 Mar 1;92(3):1154. -6: s.n.

Buckley M, Walker A, Ho SYW, Yang Y, ve ark. Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science*, 2008; 319: 333.

Bullough PG, Munuera L, Murphy J, ve ark. The strength of the menisci of the knee as it relates to their fine structure. *J Bone Joint Surg*, 1970; 52B: 564–567.

Buma P, Ramrattan NN, van Tienen TG, Veth RPH. Tissue engineering of the meniscus. *Biomaterials*, 2004; 25: 1523-32.

Burks RT, Metcalf MH, Metcalf RW. Fifteen-year follow-up of arthroscopic partial meniscectomy. *Arthroscopy-the Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, 1997;13: 673-679.

Cartmell JS, Dunn M. Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties. *J Biomed Mater Res*, 2000;49: 134–140.

Chengzhong X., Jingyi H., Mark OM., Jing H. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into cornea lepidithelial cells in vivo and exvivo. *Molecular Vision* 2009; 15:99-107.

Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res*, 1987; 16: 343–356.

Chevrier A, Nelea M, Hurtig MB, Hoemann CD, Buschmann MD. Meniscus structure in human, sheep, and rabbit for animal models of meniscus repair. *Journal Of Orthopaedic Research* September, 2009; 27:1197-1203.

- Clark CR, Ogden JA. Development of the menisci of the human knee joint. Morphological changes and their potential role in childhood meniscal injury. *J Bone Joint Surg Am*. 1983; 65(4): 538-47.
- Collier S, Ghosh P. Effect of transforming growth factor beta on proteoglycan synthesis by cell and explant cultures derived from the knee joint meniscus. *Osteoarthritis Cartilage*, 1995; 3: 127–138.
- Cox, B. & Emili, A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nature Protocols*, 2006;1:1872-1878.
- Cox JS, Nye CE, Schaefer WW, Woodstein IJ. Degenerative effects of partial and total resection of medial meniscus in dogs. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1975; 178-183.
- Dabrowski B, Swieszkowski W, Godlinski D, Kurzydowski KJ. Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 95:53-61.
- Deeken, C. R., White, A. K., Bachman, S. L., Ramshaw, B. J., Cleveland, D. S., Loy, T. S. & Grant, S. A. Method of preparing a decellularised porcine tendon using tributyl phosphate. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2011;96B:199-206.
- DeHaven KE, Arnoczky SP. Meniscal repair. *J Bone Joint Surg Am*, 1994;76(1): 140-52.
- DeLee. Knee. In: Bruce D. Beynnon, Robert J. Johnson, Lauren Brown editors. *DeLee and Drez's Orthopaedic Sports Medicine*, 2nd ed. Elsevier 2009. p.1548-1579.
- Diehl P., Steinhauser E., Gollwitzer H., Heister C., Schauwecker J., Milz S., Mittelmeier W., Schmitt M., Biomechanical and immunohistochemical analysis of high hydrostatic pressure-treated Achilles tendons, *J Orthop Sci*, 2006; 11: 380–385.
- Dong, X., Wei, X., Yi, W., Gu, C., Kang, X., Liu, Y., Li, Q. & Yi, D. Rgd-modified acellular bovine pericardium as a bioprosthetic scaffold for tissue engineering. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2009;20:2327-2336.
- Drosos GI, Pozo JL. The causes and mechanisms of meniscal injuries in the sporting and non-sporting environment in an unselected population. *The knee*. 2004;11(2):143-9.

Elder BD., Daniel HK., Athanasiou KA. Developing an articular cartilage decellularization process toward facet joint cartilage replacement. *Toward Facet Joint Cartilage Replacement*, 2010; 66, 722-727.

Eyre DR, Muir H. The distribution of different molecular species of collagen in fibrous, elastic and hyaline cartilages of the pig. *Biochem J*, 1975; 151: 595–602.

Fabbriciani C, Lucania L, Milano G, Schiavone PA, et al. Meniscal allografts: Cryopreservation vs deep-frozen technique. An experimental study in goats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1997; 5: 124-34.

Fairbank TJ. Knee joint changes after meniscectomy. *Journal of Bone and Joint Surgery-British Volume*, 1948; 30: 664-670.

Fithian, DC, Kelly M, Mow VC. Material properties and structure-function relationships in the menisci. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 1990; 252: 19-31.

Fox JM, Rintz KG, Ferkel RD. Trephination of incomplete meniscal tears. *Arthroscopy*, 1993; 9: 451-455.

Freytes, D. O., Stoner, R. M. & Badylak, S. F. Uniaxial and biaxial properties of terminally sterilized porcine urinary bladder matrix scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2008;84:408-414.

Funamoto, S., Nam, K., Kimura, T., Murakoshi, A., Hashimoto, Y., Niwaya, K., Kitamura, S., Fujisato, T. & Kishida, A. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularise blood vessels. *Biomaterials*, 2010;31:3590-3595.

Gardner ER, O'Rahilly RO. The early development of the knee joint in staged human embryos. *Journal of anatomy*, 1968; 102(Pt 2): 289.

Gershuni DH, Skyhar MJ, Danzig LA, Camp J. Experimental models to promote healing of tears in the avascular segment of canine knee menisci. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 1989; 71A: 1363-1370.

Ghadially F, Lalonde J, Wedge J. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat*, 1983; 136: 773–791.

Ghadially FN, Lalonde JMA, Wedge JH. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *Journal of Anatomy*, 1983; 136: 773-791.

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak S. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 2006; 27: 3675–3683.

Good CR, Green DW, Griffith MH, Valen AW ve ark. Arthroscopic treatment of symptomatic discoid meniscus in children: classification, technique, and results. *Arthroscopy*, 2007; 23: 157–163.

Greis PE, Bardana DD, Holmstrom MC, Burks RT. Meniscal injury: I. Basic science and evaluation. *J Am Acad Orthop Surg*, 2002; 10: 168-76.

Gruber HE, Mauerhan D, Chow Y, Ingram JA. Three-dimensional culture of human meniscal cells: Extracellular matrix and proteoglycan production. *Bmc Biotechnology*, 2008; 8.

Gulati, A. K. Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *Journal of Neurosurgery*, 1988;68:117-123.

Gunja NJ, Uthamanthil RK, Athanasiou KA. Effects of TGF-beta1 and hydrostatic pressure on meniscus cell-seeded scaffolds. *Biomaterials*, 2009; 30:565-73.

Gupte CM, Smith A, McDermott ID. Meniscomfemoral ligaments revisited. Anatomical study, age correlation and clinical implications. *J Bone Joint Surg*, 2002; 84-B: 846–851.

Hanemaaijer R., Lent N., Snabel J., Wit E. Easy measurement of collagen in tissues, 2011 (www.quickzyme.com)

Hayes WC, Keer LM, Herrmann G, Mockros LF. A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage.” *J Biomech*, 1972; 5: 541–51.

Heller L, Langman J. The menisco-femoral ligaments of the human knee. *J Bone Joint Surg*, 1964; 46: 307–313.

Hellio Le Graverand MP, Ou Y, Schield-Yee T, Barclay L, Hart D, Natsume T, Rattner JB. The cells of the rabbit meniscus: Their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat*, 2001; 198: 525-35.

Henry Gray *Anatomy of the Human Body*. 1918; 1821–1865.

Herwig J, Egner E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis*, 1984; 43: 635–640.

Hodde, J., Janis, A., Ernst, D., Zopf, D., Sherman, D. & Johnson, C. Effects of sterilization on an extracellular matrix scaffold: Part i. Composition and matrix architecture. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2007;18:537-543.

Hough AJ, Webber RJ. Pathology of the meniscus. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1990; 32-40.

Hudson TW, Zawko S, Deister C, Lundy S. Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration, *Tissue Eng*, 2004;10: 1641–1651.

Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21:2529-43.

Insall & Scott. *Anatomy*. In: Henry D. Clarke, W. Norman Scott, John N. Insall, Henrik B. Pedersen, Kevin R. Math, Vincent J. Vigorita, Fred D. Cushner editors. *Surgery of the Knee*. 4ed, Churchill Livingstone, 1993; p.4-76.

Isikli C, Hasirci V, Hasirci N, Development of porous chitosan-gelatin/hydroxyapatite composite scaffolds for hard tissue engineering applications. *J Tissue Eng Regen Med* 2011. DOI: 10.1002/term.46.

Ito MM, Kida MY. Morphological and biochemical re-evaluation of the process of cavitation in the rat knee joint: cellular and cell strata alterations in the interzone. *J Anat*, 2000; 197:659–679.

Jackson DW, Mcdevitt CA, Simon TM, Arnoczky SP ve ark. Meniscal transplantation using fresh and cryopreserved allografts an experimental study in goats. American Journal of Sports Medicine, 1992; 20: 644-656.

Jackson DW, Whelan J, Simon TM. Cell survival after transplantation of fresh meniscal allografts - DNA probe analysis in a goat model. American Journal of Sports Medicine, 1993; 21: 540-550.

Jackson JP. Degenerative changes in knee after meniscectomy. British Medical Journal, 1968; 2: 525.

Johnson, Donald H. Practical Orthopaedic Sports Medicine & Arthroscopy In: Pedowitz, Robert A. 1st Edition 2007 Lippincott Williams & Wilkins. p565.

Johnstone B, Yoo JU. Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. Clin Orthop, 1999; 367:156-62.

Kambic HE, Futani H, Mcdevitt CA. Cell, matrix changes and alpha-smooth muscle actin expression in repair of the canine meniscus. Wound Repair Regen 2000; 8(6):554-61.

Kambic HE, Mcdevitt CA. Spatial organization of types I and II collagen in the canine meniscus. Journal of Orthopaedic Research, 2005; 23: 142-149.

Kang SW, Sun-Mi S, Jae-Sun L, Eung-Seok L ve ark. Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006;77(4):659-71.

Kawamura S, Lotito K, Rodeo S. Biomechanics and healing response of the meniscus. Op Tech Sports Med 2003; 11: 68-76.

Klebe, R. J. 1974. Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. Nature, 250, 248-251.

Koc ON, Lazarus HM. Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. Bone Marrow Transplant 2001; 27: 235-9.

- Kohn D, Moreno B. Meniscus insertion anatomy as a basis for meniscus replacement: a morphological cadaveric study. *Arthroscopy*, 1995; 11: 96–103.
- Kuhn JE, Wojtys EM. Allograft meniscus transplantation. *Clin Sports Med*, 1996; 15: 537-46.
- Lange AK, Singh MF, Smith RM, Foroughi N ve ark. Degenerative meniscus tears and mobility impairment in women with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2007; 15: 701-708.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 199;260(5110):920-6.
- Lebel B, Tardieu C, Locker B, Hulet C, Ontogeny-Phylogeny, In: Philippe Beaufils René Verdonk, editors. *The Meniscus* 1st ed Berlin Heidelberg Springer-Verlag; 2010. p.6
- Lee BY, Jee WH, Kim JM. Incidence and significance of demonstrating the meniscomfemoral ligament on MRI. *Br J Radiol*, 2000; 73: 271–274.
- Lewis PB, Williams JM, Hallab N, Viridi A. Multiple freeze-thaw cycled meniscal allograft tissue: A biomechanical, biochemical, and histologic analysis. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008; 26: 49-55.
- Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions, *Circulation*, , 2006; 114: 559–565.
- Lumpkins SB, Pierre N, Mcfetridge, PS. A mechanical evaluation of three decellularisation methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc. *Acta Biomaterialia*, 2008; 4: 808-816.
- MacArthur BD, Oreffo RO. Bridging the gap. *Nature*. 2005; 6:433(7021):19.
- Maher SA, Rodeo SA, Doty SB, Brophy R. Evaluation of a porous polyurethane scaffold in a partial meniscal defect ovine model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related . Surgery*. 2010 Nov 30;26(11):1510-9.
- Maier D, Braeun K, Steinhäuser E, Ueblacker P. In vitro analysis of an allogenic scaffold for tissue-engineered meniscus replacement, *J Orthop Res*, 2007; 25: 1598–1608.

- Makris EA, Hadidi P, Athanasiou KA. The knee meniscus: structure-function, pathophysiology, current repair techniques, and prospects for regeneration. *Biomaterials*, 2011; 32: 7411–7431.
- Mandal BB, Park SH, Gil ES, Kaplan DL. Multilayered silk scaffolds for meniscus tissue engineering. *Biomaterials*, 2011a; 32:639-51.
- Mandal BB, Park SH, Gil ES, Kaplan DL. Stem cell-based meniscus tissue engineering. *Tissue Eng* 2011b. DOI: 10.1089/ten.tea.2011.0031.
- Marsano A, Vunjak-Novakovic G, Martin I. Towards tissue engineering of meniscus substitutes: selection of cell source and culture environment. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2006a. 1:3656-8.
- Marsano A, Wendt D, Raiteri R, Gottardi R, Stolz M, Wirz D, Daniels AU, Salter D, Jakob M, Quinn TM, Martin I. Use of hydrodynamic forces to engineer cartilaginous tissues resembling the non-uniform structure and function of meniscus. *Biomaterials*, 2006b; 27:5927-34.
- Martinek V, Ueblacker P, Braun K, Nitschke S, Mannhardt R, Specht K, Gansbacher B, Imhoff AB. Second generation of meniscus transplantation: in-vivo study with tissue engineered meniscus replacement. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2006; 126:228-34.
- McDermott ID, Masouros SD, Bull AMJ, Amis AA. Anatomy, In: : Philippe Beaufils René Verdonk, editors. *The Meniscus* 1st ed Berlin Heidelberg Springer-Verlag; 2010. P.111-15.
- McDermott ID, Sharifi F, Bull AMJ. An anatomical study of meniscal allograft sizing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2004; 12: 130–135.
- McDevitt C, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop Relat Res*, 1990; 252: 8–18.
- McDevitt CA, Mukherjee S, Kambic HE, Parker R. 2002. Emerging concepts of the cell biology of the meniscus. *Curr Opin Orthop* 13(5):345–350.).
- Mcginity JB, Geuss LF, Marvin RA. Partial or total meniscectomy - comparative analysis. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 1977; 59: 763-766.

- Melrose J, Smith S, Cake M, Read R ve ark. Comparative spatial and temporal localisation of perlecan, aggrecan and type I, II and IV collagen in the ovine meniscus: An ageing study. *Histochemistry and Cell Biology*, 2005; 124: 225-235.
- Messner K, Gao JZ. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics, and a rationale for clinical treatment. *Journal of Anatomy*, 1998; 193: 161-178.
- Mikic B, Johnson TL, Chhabra AB, Schalet BJ, Wong M, Hunziker EB. Differential effects of embryonic immobilization on the development of fibrocartilaginous skeletal elements. *J Rehabil Res Dev*, 2000; 37:127–133.
- Miller MD, Warner JJ P, Harner CD. In: Fu FH, Harner CD, Vince KG editors. *Knee Surgery*. Williams and Wilkins, 1994.
- Miller RH: Knee Injuries, In: *Anatomy Campbell's Operative Orthopaedics*. St. Louis Mosby-Year Book, 10th edition, 2003 ; 2165–2337.
- Miller RR, McDevitt CA. Thrombospondin in ligament, meniscus and intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta*, 1991; 1115: 85–88.
- Minguell JJ, Erices A, Congei P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*. 2001; 226(6):507-20.
- Moon MS, Chung IS. Degenerative changes after meniscectomy and meniscal regeneration. *International Orthopaedics*, 1988; 12: 17-19.
- Mort JS, Roughley PJ. Measurement of glycosaminoglycan release from cartilage explants. *Methods Mol Med*. 2007;135:201-9.
- Mossman DJ, Sargeant W. The footprints of extinct animals. *Sci Am*, 1983; 250: 78–79.
- Mueller SM, Schneider TO, Shortkroff S, Breinan HA ve ark. Alpha-Smooth muscle actin and contractile behaviour of bovine meniscus cells seede in type I and type II collagen-GAG matrices. *J Biomed Mater Res* 1999 Jun 5; 43(3):157-66.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Science*, 2000; 113:1161.

Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(12):3464-74.

Naal FD., Schauwecker J., Steinhäuser E., Milz S., ve ark. Biomechanical and immunohistochemical properties of meniscal cartilage after high hydrostatic pressure treatment, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008; 87: 19–25.

Ndreu-Halili A. Collagen-based meniscus tissue engineering: design and application. PhD thesis. Middle East Technical University. Turkey. 2011.

Neilson AB, Yde J. Epidemiology of acute knee injuries: a prospective hospital investigation. *J Trauma*, 1991; 31: 1644-1648.

Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI: Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem*, 2002; 50(8):1049–1058.

Oliver FW., Gardner MA, and Martin JS. Methods In Molecular Biology, In: Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow ed. Pauline M. Doran, Springer New York Heidelberg Dordrecht London © Springer Science+Business Media New York 2015 41-52.

Parsons FG. The joints of mammals compared with those of man. *J Anat Physiol*, 1900; 34: 301.

Pavlova A, Gamer L, Cox K, Celeste A ve ark. Developmental expression of BMPs and matrix proteins during meniscal morphogenesis. *Transactions*, 2001; vol.26, San Francisco, California.

Pereira H, Silva-Correia J, Oliveira JM, Reis RL. The Meniscus: Basic Science, R. In: Meniscal Transplantation Verdonk, R., Espregueira Mendes, editors 2013.

Peretti GM, Gill TJ, XU JW, Randolph MA ve ark. Cell-based therapy for meniscal repair: a large animal study. *Am J Sports Med*, 2004; 32: 146-58.

Peters G, Wirth CJ. The current state of meniscal allograft transplantation and replacement. *Knee*, 2003; 10: 19-31.

Petersen W, Tillmann B. Collagenous fibril texture of the human knee joint menisci. *Anal Embryol*, 1998; 197: 317-24.

Petersen, T. H., Calle, E. A., Zhao, L., Lee, E. J., Gui, L., Raredon, M. B., Gavrilov, K., Yi, T., Zhuang, Z. W., Breuer, C., Herzog, E. & Niklason, L. E. Tissue-engineered lungs for in vivo implantation. *Science*, 2010;329:538-541.

Pevzner PA, Kim S, Ng J. Protein sequences from mastodon and *Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science*, 2008;321:1040.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK ve ark. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284:143-7.

Preuschoft H, Tardieu C. Biomechanical reasons for the divergent morphology of the knee joint and the distal epiphyseal suture in hominoids. *Folia Primatol*, 1996; 66: 82–92.

Pufe T, Petersen WJ, Miosge N, Goldring MB ve ark. Endostatin/collagen XVIII an inhibitor of angiogenesis is expressed in cartilage and fibrocartilage. *Matrix Biology*, 2004; 23: 267-276.

Ramshaw JAM, Shah NK, Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: a context for hostguest triple-helical peptides. *J. Struct. Biol*, 1998; 122: 86–91.

Rath E, Richmond JC. The menisci: Basic science and advances in treatment. *British Journal of Sports Medicine*, 2000; 34: 252-257.

Rath E, Richmond JC, Yassir W, Albright JD ve ark. Meniscal allograft transplantation - two-to eight-year results. *American Journal of Sports Medicine*, 2001; 29: 410-414.

Reing, J. E., Brown, B. N., Daly, K. A., Freund, J. M., Gilbert, T. W., Hsiong, S. X., Huber, A., Kullas, K. E., Tottey, S., Wolf, M. T. & Badylak, S. F. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*, 2010;31:8626-8633.

Rieder, E., Kasimir, M. T., Silberhumer, G., Seebacher, G., Wolner, E., Simon, P. & Weigel, G. 2004. Decellularisation protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of

cell removal and susceptibility of the matrix to recellularisation with human vascular cells. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 127, 399-405.

Rijk PC, Tigchelear-Gutter W, Bernoski FP, Noorden CFJ. Histological Changes of Articular Cartilage after Medial Meniscus Replacement in Rabbits, *Arthroscopy*, Proefchrift Amsterdam-Nederlands, 2008;p.68-77.

Rodeo SA, Seneviratne A, Suzuki K, Felker K, ve ark. Histological analysis of human meniscal allografts - a preliminary report. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 2000; 82A: 1071-1082.

Rodkey WG, DeHaven KE, Montgomery WH 3rd, Baker CL Jr, Beck CL Jr, Hormel SE, Steadman JR, Cole BJ, Briggs KK. Comparison of the collagen meniscus implant to partial meniscectomy: a prospective randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*, 2008; 90:1413-26.

Romer AS. *The vertebrate body*, 3rd edition. Philadelphia, WBSaunders, 1962.

Rongen JJ, van Tienen TG, van Bochove B, Grijpma DW, Buma P. Biomaterials in search of a meniscus substitute. *Biomaterials*, 2014;35(11):3527-40.

Roos H, Adalberth T, Dahlberg L, Lohmander LS. Osteoarthritis of the knee after injury to the anterior cruciate ligament or meniscus: the influence of time and age. *Osteoarthritis Cartilage*, 1995; 3: 261-7.

Roos H, Laurén M, Adalberth T, Roos EM ve ark. Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls. *Arthritis & Rheumatism*, 1998; 41(4): 687-93.

Robert H, Miller III, Frederick M, Knee injuries, In: Canale ST, Beaty J, editors. *Campbell's Operative Orthopaedics*, 11th ed Elsevier, 2012; p. 2789–2800.

Sandmann GH, Eichhorn S, Vogt S, Adamczyk S, ve ark. Generation and characterization of a human acellular meniscus scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2008.

Schweitzer MH, Suo Z, Avci R, Asara JM ve ark. Analyses of soft tissue from *Tyrannosaurus rex* suggest the presence of protein. *Science*, 2007; 316: 277–280.

Scott PG, Nakano T, Dodd CM. Isolation and characterization of small proteoglycans from different zones of the porcine knee meniscus. *Biochim Biophys Acta*, 1997; 1336: 254–262.

Setton LA, Guilak F, Hsu EW, Vail TP. Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. *Clin Orthop Relat Res*, 1999; 367: 254-72.

Shelbourne KD, Dickens JF. Digital radiographic evaluation of medial joint space narrowing after partial meniscectomy of bucket-handle medial meniscus tears in anterior cruciate ligament-intact knees. *The American Journal of Sports Medicine*, 2006; 34: 1648-1655.

Shrive NG, O'connor JJ, Goodfellow JW. Load-bearing in the knee joint. *Clinical orthopaedics and related research*, 1978; 131: 279-87.

Sik-LT., Tunku SA., Lakshmi S., Tunku K. Isolation, characterization and the multilineage differentiation potential of rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells *J. Anat.*, 2013; 222, pp437-450

Spencer SJ, Saithna A, Carmont MR, Dhillon MS, Thompson P, Spalding T. Meniscal scaffolds: early experience and review of the literature. *The Knee*, 2012 Dec 31;19(6):760-5.

Stone K. Prosthetic knee joint meniscal cartilage. US Patent No. 4, 880,.

Stapleton TW, Ingram J, Katta J, Knight R ve ark. Development and characterization of an acellular porcine medial meniscus for use in tissue engineering. *Tissue Engineering Part A*, 2008; 14: 505-518.

Stone K. Prosthetic knee joint meniscal cartilage. US Patent No. 4, 880.

Stone KR, Rodkey WG, McKinney LA, Steadman JR. Autogenous replacement of the meniscus cartilage - analysis of results and mechanisms of failure. *Arthroscopy*, 1995; 11: 395-400.

Stone KR, Walgenbach AM, Turek TJ, Freyer A. Meniscus allograft survival in patients with moderate to severe unicompartmental arthritis: A 2- to 7- year follow-up, *J Arthrosc Relat Surg*, 2006; 22: 469–478.

Sun Y., Mauerhan DR., Kneisl JS., Norton H J. Histological examination of collagen and proteoglycan changes in osteoarthritic menisci. *The Open Rheumatology Journal*, 2012; 6, 24-32.

Sweigart MA, Athanasiou KA. Tensile and compressive properties of the medial rabbit meniscus. *Proc Inst Mech Eng*, 2005; 219(5): 337–347.

Sweigart MA. Characterization of the meniscus for future tissue engineering efforts [Ph.D.]. Houston: Rice University, 2004; 45-48.

Tanaka T, Fujii K, Kumagai Y. Comparison of biochemical characteristics of cultured fibrochondrocytes isolated from the inner and outer regions of human meniscus. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, 1999; 7: 75-80.

Tischer T, Vogt S, Aryee S, Steinhäuser E, Milz S, Martinek V, Imhoff AB. Tissue engineering of the anterior cruciate ligament: A new method using acellularized tendon allografts and autologous fibroblasts, *Arch Orthop Trauma Surg*, 2007;127: 735–741.

Tienen TG, Heijkants RGJC, de Groot J, Pennings AJ ve ark. Replacement of the knee Meniscus by a porous polymer implant: a study in dogs. *Am J Sports Med*, 2006; 34:64-71.

Valiyaveetil M, Mort JS, McDevitt CA. The concentration, gene expression, and spatial distribution of aggrecan in canine articular cartilage, meniscus, and anterior and posterior cruciate ligaments: a new molecular distinction between hyaline cartilage and fibrocartilage in the knee joint. *Connect Tissue Res*, 2005; 46: 83–91.

van der Bracht H, Verdonk R, Verbruggen G, Elewaut D, Verdonk P. Cell-based meniscus tissue engineering. In: Ashammakhi N, Reis R, Chiellini E, eds. *Topics in tissue engineering*. 2007.

Vedi V, Spouse E, Williams A, Tennant SJ ve ark. Meniscal movement An in-vivo study using dynamic MRI. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 1999; 81(1): 37-41.

Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M ve ark. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J. Biol. Chem*, 2006; 281: 3494–3504.

Verbruggen G, Verdonk R, Veys EM, Van Daele P, ve ark. Human meniscal proteoglycan metabolism in long-term tissue culture. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1996; 4:57–63.

Verdonk P, Histology-Ultrastructure-Biology, In: Philippe Beaufils René Verdonk, editors. *The Meniscus* 1st ed Berlin Heidelberg Springer-Verlag; 2010. p 19-21.

Verdonk PC, Forsyth RG, Wang J, Almqvist KF ve ark. Characterisation of human knee meniscus cell phenotype. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005; 13(7): 548-60.

Verdonk PCM, Forsyth R, Van der Bracht H, Verdonk R ve ark. The normal and pathological human meniscus: biological considerations. *Proceedings on the Annual Termis-EU meeting*, 204, October 8-11, 2006, Rotterdam, Netherlands.

Verdonk PCM, Verdonk R, Almqvist KF, Veys EM. Fibrochondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in Combination with a Collagen Scaffold. Submitted for publication.

Verdonk R, Verdonk P, Huysse W, Forsyth R, Heinrichs EL. Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions. *The American journal of sports medicine*, 2011;39(4):774-82.

Verdonk P, Beaufils P, Bellemans J, Djian P, Heinrichs EL, Huysse W, Laprell H, Siebold R, Verdonk R, Colombet P, Cugat R. Successful treatment of painful irreparable partial meniscal defects with a polyurethane scaffold two-year safety and clinical . outcomes. *The American journal of sports medicine*, 2012;40(4):844-53.

Walker PS, Erkiuan MJ. The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clinical orthopaedics and related research*. 1975; 109: 184-92.

Wan AC, Felle P. The menisco-femoral ligaments. *Clin Anat*, 1995; 8: 323–326.

Weinand C, Peretti GM, Adams SB Jr, Bonassar LJ, ve ark. An allogenic cellbased implant for meniscal lesions. *Am J Sports Med*, 2006; 34(11): 1779-89.

Yang, M., Chen, C.-Z., Wang, X.-N., Zhu, Y.-B. & Gu, Y. J. Favourable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularised bovine pericardium scaffold for

tissue engineered heart valves. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2009;91B:354-361.

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L ve ark. The chondrogenic potential of human bonemarrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 1998; 80A(12): 1745-56.

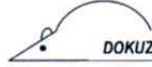
Zhang ZN, Arnold JA. Trephination and suturing of avascular meniscal tears: A clinical study of the trephination procedure. *Arthroscopy*, 1996; 12: 726-731.

Zhang ZN, Arnold JA, Williams T, Mccann B. Repairs by trephination and suturing of longitudinal injuries in the avascular area of the meniscus in goats. *American Journal of Sports Medicine*, 1995; 23: 35-41.

Zhang Z, Tu K, Xu Y, Zhang W ve ark. Treatment of longitudinal injuries in avascular area of meniscus in dogs by trephination. *Arthroscopy*, 1988; 4, 151-159.

8. EKLER

EK 1- ETİK KURUL ONAY BELGESİ



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 412234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 12/15/2014

Toplantı Tarihi : 19 Ağustos 2014

Sayın, Prof.Dr.Mehmet Hasan TATARİ
Biyomekanik Bilim Dalı

95/2013 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz **“Meniskus dokusunun allogreft doğal yapı iskelesi kullanılarak biyo uyumluluğunun geliştirilmesi”** isimli projede proje yürütücüsünün Prof.Dr.Hasan HAVİTÇIOĞLU olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr. Hüseyin BASKIN
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Alper SÖYÜLÜ
Üye

Prof.Dr.Hüsnü Alper BACRIYANIK
Üye

Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.M.Emrî GÜNELİ
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye

Doç.Dr.Meral KARAMAN
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI
Üye (Topl.Katılmadı)

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Aduan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.



Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/22/2013
Toplantı Tarihi : 20 Kasım 2013

Biyomekanik Bilim Dalı Başkanlığı'na

95/2013 Protokol No'lu; Biyomekanik Bilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Mehmet Hasan TATARİ'nin yürütücüsü olduğu "**Meniskus dokusunun allogreft doğal yapı iskelesi kullanılarak biyo uyumluluğunun geliştirilmesi**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

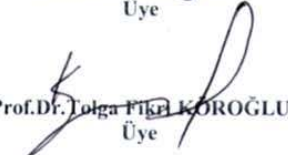
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı
(Topl.Katılamadı)

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye (Topl.Katılamadı)

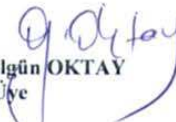

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye


Prof.Dr.Şermin GENC
Üye


Prof.Dr.Tolga Fikri KOROĞLU
Üye

Prof.Dr.Turna İLKUNUR
Üye (Topl.Katılamadı)


Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye


Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye(Topl.Katılamadı)

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye (Topl.Katılamadı)


Vet.Hekim Aydın SERPEN
Üye


Doç.Dr.Furkan ERTAY
Üye


Zehra KINAM
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır

EK 2 - ÖZGEÇMİŞ
AYLİN KARA

TC Kimlik No / Pasaport No:	72445056980
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomekanik Anabilim Dalı İnciraltı / İZMİR
Telefon:	0555 701 80 25
Faks:	
e-posta:	aaylinkara@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Biyomekanik	Yüksek Lisans	2017
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2012

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Pendik Devlet Hastanesi	TC	İstanbul	Patoloji Bölümü	Stajyer	Kasım 2012
Medicaperk Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi	TC	İstanbul	Ar-Ge	Stajyer	Ekim2012
Adli Tıp Kurumu	TC	İzmir	Biyoloji	Stajyer	Ağustos2011
İstanbul Medicine Hastanesi	TC	İstanbul	Mikrobiyoloji, Hematoloji, Biyokimya	Stajyer	Ağustos2010

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Aylin Kara, Semra Koçturk, Berivan Cecen, Guven Erbil, Uygur Sacik, Hasan Havitcioglu. "Meniscus acellularization using allograft native scaffold", 20th National Biomedical Engineering Meeting, IEEE, 2016; p 1-4.

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Aylin Kara, Semra Koçtürk, Aylin Albayrak, Oylum Çolpankan, Hasan Havitçioğlu. 'Kemik dokusunun yenilenmesinde kullanılacak balık pulu temelli biyo-bozunur doku iskelesi.' 20. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Sözlü Bildiri, 2016; 1:9-13.
Aylin Kara, Semra Koçtürk, Berivan Çeçen, Güven Erbil, Uygur Saçık, Hasan Havitçioğlu. "Menisküs dokusunun allogreft doğal yapı iskelesi kullanılarak asellülerizasyonu." 20. Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı, Poster Bildiri, 2016; 11:395-399.

