



**T.C.**  
**RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN MODELİNDE L-KARNİTİN VE SPONGOSTANIN**  
**KIKIRDAK DEFEKTİ ÜZERİNDEKİ İYİLEŞTİRME ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

**Dr. Muhammet Uğur Ok**

I.Tez Danışmanı:

**Dr. Öğr. Üyesi Rifat Şahin**

II.Tez Danışmanı:

**Doç.Dr. Mehmet Sabri Balık**

**RİZE-2022**

**T.C.**  
**RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN MODELİNDE L-KARNİTİN VE SPONGOSTANIN**  
**KIKIRDAK DEFECTİ ÜZERİNDEKİ İYİLEŞTİRME ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

**Dr. Muhammet Uğur Ok**

I.Tez Danışmanı:

**Dr. Öğr. Üyesi Rifat Şahin**

II.Tez Danışmanı:

**Doç.Dr. Mehmet Sabri Balık**

**RİZE-2022**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan hocalarımdan, başta bölüm başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet Sabri BALIK ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Rıfat ŞAHİN ve diğer bölüm hocalarımız Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz Güvercin ve Dr. Öğr. Üyesi Cengiz KAZDAL Uzm. Dr. Ahmet Atilla Abdioğlu, Uzm. Dr. Altuğ Yücekul ve Uzm. Dr. Sadullah KARA' ya katkılarından ve varlıklarından dolayı teşekkür ederim.

İhtisas eğitimim boyunca beraber çalıştığımız asistan arkadaşlara; Dr. Nurettin MANTI, Dr. Sinan GÖRMEZ, Dr. İsmail Vehbi İMAMOĞLU, Dr. Can ASAR, Dr. Suat ŞAHİN, Dr. Ahmet Tunahan YILMAZ, Dr. Eyüp Furkan KARADAĞ, Dr. Emre PALTA ve Dr. Muhammet Emin KÜÇÜKAYDIN' a teşekkür ederim.

Tezin hazırlanmasında ve inceleme kısmında desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Gör. Sibel Mataracı KARAKAŞ ve Uzm. Dr. Oğuzhan OKCU' ya teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığımız servis ve poliklinik hemşire ve sekreterlerimize, ameliyat hemşire, personel ve anestezi ekibine teşekkür ederim.

Son olarak asistanlık eğitimim boyunca yanımda olan ve desteğini esirgemeyen annem Serap OK, babam Hüseyin OK ve kardeşim M. Onur OK' a teşekkür ederim.

Bu uzmanlık tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi tarafından TTU-2022/1395 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir.

## ÖZET

### **Sıçan Modelinde L-Karnitin ve Spongostanın Kıkırdak Defekti Üzerindeki İyileştirme Etkileri**

**Dr. Muhammet Uğur OK**

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi**

**Dr. Öğr. Üyesi Rıfat ŞAHİN**

**Doç. Dr. Mehmet Sabri BALIK**

**Amaç:** Kıkırdak hasarları ve nihayetinde meydana gelen osteoartrit özellikle ileri yaşlarda sıklıkla meydana gelmektedir. Çalışmamızda anti oksidan ve anti-inflamatuar etkinliği olan L-karnitin ve kollajen içeriği ile bilinen spongostanın, kıkırdak iyileşmesi üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladık. **Materyal ve Metod:** Çalışmamızda 32 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. 4 ayrı grup oluşturuldu. Bu gruplar şunlardan oluşmaktaydı: Sağlıklı kontrol grubu, kontrollü kıkırdak hasarı oluşturulup tedavi verilmeyen grup, kontrollü kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra hasar bölgesine spongostan uygulanan grup ve kontrollü kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra hasar bölgesine L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan grup. Sıçanlar 6. haftada sakrifiye edilerek değerlendirme aşamasına geçildi. Bu aşamada gruplar arasında biyokimyasal ve histolojik olarak fark olup olmadığı araştırıldı. **Bulgular:** Grupları biyokimyasal olarak karşılaştırdığımızda L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan grupta TBARS (Thiobarbituricacidreactivesubstances) seviyelerinin düştüğünü, antioksidan etki göstergesi olarak toplam tiyol miktarının ise arttığını gözlemledik. Grupları histopatolojik olarak karşılaştırdığımızda mankin skorlamasına göre L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan grupta hasar skorlarının belirgin olarak düştüğü gözlemlendi. **Sonuç:** Biyokimyasal analizlerde, L-karnitin ve spongostan kıkırdak iyileşmesine antioksidan etki göstermektedir. Ayrıca histopatolojik olarak kıkırdak iyileşme sürecinin tüm aşamalarına olumlu etki gösterdiği belirlendi.

**Anahtar kelimeler:** L-karnitin, spongostan, kıkırdak iyileşmesi, sıçan, kıkırdak

## ABSTRACT

### **The Healing Effects of L-Carnitine and Spongostane on Cartilage Defect in Rat Model**

**Dr. Muhammet Uğur OK**

**Department of Orthopedics and Traumatology Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Medicine Thesis of Specialization in Medicine**

**Asst. Prof. Dr. Rifat ŞAHİN**

**Assoc. Prof. Dr. Mehmet Sabri BALIK**

**Aim:** To speed up the healing of cartilage defect that may be stimulating to kondrogenesis anti-oxidant and anti-inflammatory activity that has L-carnitine and spongostane because it contains collagen. We aimed to determine the effects of cartilage healing. **Materials and Methods:** In our study, 32 Sprague-Dawley rats were used. 4 separate groups were created. The healthy control group was named as Group 1, controlled cartilage defect was named as Group 2, controlled cartilage defect + spongostane was named as Group 3, controlled cartilage defect + L-carnitine-impregnated spongostane was named as Group 4. Rats were sacrificed at 6. week and passed to the evaluation stages. In the evaluation phase, it was examined whether there was a biochemical and histological difference between these groups. **Result:** When we compared the groups biochemically, we observed that TBARS (Thiobarbituric acid reactive substances) levels decreased in the group treated with spongostane impregnated with L-carnitine, while the total amount of thiol, an indicator of antioxidant effect, increased. When we compared the groups histopathologically, it was observed that the damage scores decreased significantly in the group treated with spongostane impregnated with L-carnitine according to mankin's scoring. **Conclusion:** In biochemical analyzes, L-carnitine and spongostane has an antioxidant effect on cartilage healing. In addition, histopathologically, it was determined that it had a positive effect on all stages of the cartilage healing process.

**Keywords:** L-carnitine, spongostane, cartilage healing, rat, cartilage

## İÇİNDEKİLER

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| TEŞEKKÜR .....                                                      | III  |
| ÖZET .....                                                          | IV   |
| ABSTRACT .....                                                      | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                   | VI   |
| KISALTMALAR .....                                                   | VIII |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                                              | IX   |
| TABLO LİSTESİ .....                                                 | XI   |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ .....                                              | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                                             | 3    |
| 2.1. Hiyalin Kıkırdak .....                                         | 3    |
| 2.1.1. Hiyalin Kıkırdak Histolojisi .....                           | 3    |
| 2.2. Kondral İyileşme Süreçlerinin Araştırma Modelleri .....        | 6    |
| 2.3. Kıkırdak Yaralanması Tedavisi .....                            | 7    |
| 2.3.1. Cerrahi Yöntemler .....                                      | 7    |
| 2.3.1.1. Onarıcı Cerrahi Yöntemler .....                            | 7    |
| 2.3.1.2. Rejeneratif Cerrahi Yöntemler .....                        | 9    |
| 2.4. Spongostan .....                                               | 9    |
| 2.5. L-karnitin .....                                               | 10   |
| 3. MATERYAL METOD .....                                             | 10   |
| 3.1. Çalışma Grupları .....                                         | 13   |
| 3.2. Anestezi .....                                                 | 13   |
| 3.3. Deney Modelinin Oluşturulması .....                            | 14   |
| 3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi .....                             | 22   |
| 3.4.1. Biyokimyasal Değerlendirme .....                             | 22   |
| 3.4.1.1. TBARS (Thiobarbituricacidreactivesubstances) Tayini: ..... | 22   |
| 3.4.1.2. Toplam Tiyoil Grubu Tayini: .....                          | 22   |
| 3.4.2. Histopatolojik Değerlendirme .....                           | 24   |
| 3.4.2.1. Histopatolojik Doku Takip İşlemleri .....                  | 24   |
| 3.4.2.2. İstatistiksel Analiz .....                                 | 26   |
| 4. BULGULAR .....                                                   | 27   |
| 4.1. Biyokimyasal Bulgular .....                                    | 27   |
| 4.1.1. TBARS .....                                                  | 27   |

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.2. GSH (Toplam Tirol Grubu) .....                               | 28 |
| 4.2. Histopatolojik bulgular .....                                  | 29 |
| 4.3. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Analiz Sonuçları ..... | 41 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                   | 44 |



## KISALTMALAR

K: kontrol grubu

KD: kontrollü kırıkta defekt oluşturulan grup

KD+S: kontrollü kırıkta defekt + spongostan uygulanan grup

KD+LKS: kontrollü kırıkta defekt + L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan grup



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b> Anterolateral ve santral trokleada büyük bir kırıkda defekti gösteren sağ dizin intraoperatif görüntüsü. Medial ve lateral kondil kırıkdağı sağlam görünüyor (17-19). ....                                                                                                                                                                                                             | 2  |
| <b>Şekil 2.</b> Hiyalin kırıkda histopatolojik görüntüsü (52) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 3  |
| <b>Şekil 3.</b> Ekstrasellüler matriks ve proteoglikanların yapısı (45) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 5  |
| <b>Şekil 4.</b> Hiyalin kırıkda katmanları histolojisi. safranin-O ile boyandı. Matriks ve kondrositler her bölgede iyi düzenlenmiştir. Yüzeysel bölgede safranin-O boyaması yoktur. Safranin-O boyamasının görüldüğü orta bölgede, hücreler yuvarlak veya oval ve rastgele dağılıma sahip gibi görünmektedir; buna karşılık, derin bölgede hücreler kısa sütunlar halinde düzenlenmiştir (46,47)..... | 6  |
| <b>Şekil 5.</b> Gruplandırma ve etiketlendirme .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 12 |
| <b>Şekil 6.</b> Cerrahi hazırlık .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 15 |
| <b>Şekil 7.</b> Sıçan dizi görünecek şekilde steril olarak cerrahi alanın hazırlanması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 15 |
| <b>Şekil 8.</b> Parapatellar insizyon ile femur kondillerine ulaşım sonrası interkondiler bölgede 1 mm çapında oluşturulmuş kırıkda defektinin görüntüsü.....                                                                                                                                                                                                                                          | 16 |
| <b>Şekil 9.</b> İnterkondiler bölgede oluşturulan defekte aynı çap ve ölçüde spongostan materyalinin kishner teli yardımı ile yerleştirilmesi .....                                                                                                                                                                                                                                                    | 17 |
| <b>Şekil 10.</b> İnterkondiler bölgede oluşturulan kırıkda defektini dolduracak şekilde, L-karnitin emdirilmiş spongostan materyalinin yerleştirilmiş görüntüsü .....                                                                                                                                                                                                                                  | 18 |
| <b>Şekil 11.</b> Dizlerde kırıkda hasarı oluşturulduktan sonra yara yerlerine pansuman yapılmış olan sıçanların erken postoperatif dönemdeki görünümü .....                                                                                                                                                                                                                                            | 19 |
| <b>Şekil 12.</b> İntrakardiyak kan alınması .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 20 |
| <b>Şekil 13.</b> İntrakardiyak alınan kanların biyokimya tüplerine yerleştirilmesi .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 21 |
| <b>Şekil 14.</b> Total eksize edilmiş sıçan femurunun görünümü .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 21 |
| <b>Şekil 15.</b> Grup 1 deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 30 |
| <b>Şekil 16.</b> Grup 1 deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 31 |
| <b>Şekil 17.</b> Grup 1 deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toluidin blue stain) .....                                                                                                                                                                                                                                                   | 32 |
| <b>Şekil 18.</b> Grup 2 deki kontrollü kırıkda hasarı uygulanan sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....                                                                                                                                                                                                                                           | 33 |
| <b>Şekil 19.</b> Grup 2 deki kontrollü kırıkda hasarı uygulanan sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....                                                                                                                                                                                                                                           | 34 |
| <b>Şekil 20.</b> Grup 2 deki kontrollü kırıkda hasarı uygulanan sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toluidin blue stain).....                                                                                                                                                                                                                                  | 35 |
| <b>Şekil 21.</b> Grup 3 teki kontrollü kırıkda hasarı verilerek, defekte spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....                                                                                                                                                                                         | 36 |
| <b>Şekil 22.</b> Grup 3 teki kontrollü kırıkda hasarı verilerek defekte spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....                                                                                                                                                                                          | 37 |
| <b>Şekil 23.</b> Grup 3 teki kontrollü kırıkda hasarı verilerek defekte spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçan femoral kondilinin hyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toulidine blue stain).....                                                                                                                                                                                | 38 |

|                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 24.</b> Grup 4 teki kontrollü kırıkda hasarı verilerek defekte L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçanın femoral kondilinin hiyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....           | 39 |
| <b>Şekil 25.</b> Grup 4 teki kontrollü kırıkda hasarı verilerek defekte L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçanın femoral kondilinin hiyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain) .....           | 40 |
| <b>Şekil 26.</b> Grup 4 teki kontrollü kırıkda hasarı verilerek defekte L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçanın femoral kondilinin hiyalin kırıkda dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toulidine blue stain)..... | 41 |



## TABLO LİSTESİ

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Çalışma grupları.....                                             | 13 |
| <b>Tablo 2.</b> Biyokimyasal analizlerde kullanılan laboratuvar malzemeleri ..... | 23 |
| <b>Tablo 3.</b> Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar .....             | 23 |
| <b>Tablo 4.</b> Doku takip aşamaları.....                                         | 24 |
| <b>Tablo 5.</b> H&E boyama prosedürü aşamaları .....                              | 25 |
| <b>Tablo 6.</b> Toluidine blue boyama prosedürü hazırlama .....                   | 25 |
| <b>Tablo 7.</b> Mankin histolojik skora yöntemi .....                             | 26 |
| <b>Tablo 8.</b> Gruplar arası istatistiksel TBARS ölçüm değerleri.....            | 27 |
| <b>Tablo 9.</b> Gruplar arası istatistiksel TBARS ölçüm grafiği .....             | 28 |
| <b>Tablo 10.</b> Gruplarda ölçülen toplam tiyol grubu grafiği.....                | 29 |
| <b>Tablo 11.</b> Toplam tiyol grubu istatistik sonuçları .....                    | 29 |
| <b>Tablo 12.</b> Toplam skor istatistiksel sonuçlarının grafiği.....              | 42 |
| <b>Tablo 13.</b> Toplam skor istatistiksel sonuçları .....                        | 42 |
| <b>Tablo 14.</b> Mankin skor istatistiksel sonuçlarının grafiği .....             | 43 |
| <b>Tablo 15.</b> Mankin skor istatistiksel sonuçları .....                        | 44 |

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

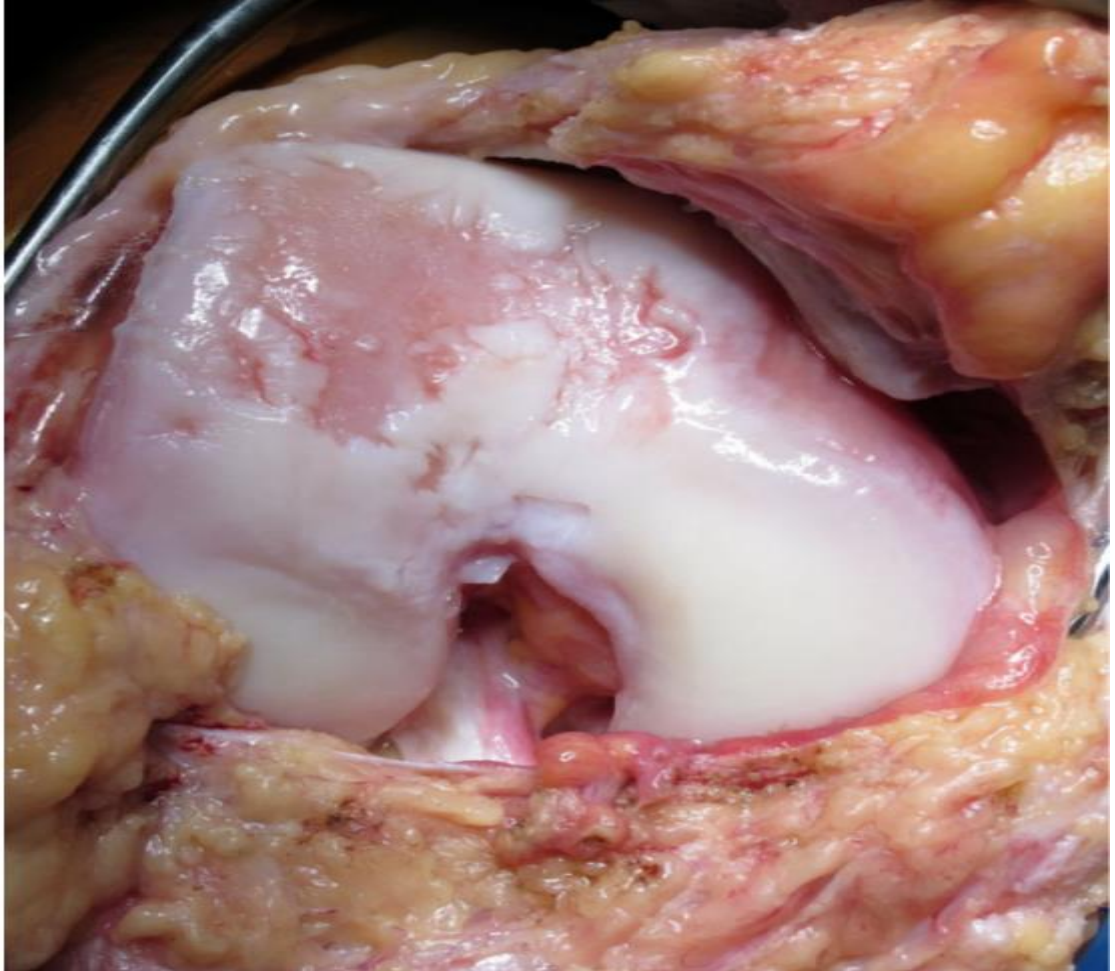
Eklem kıkırdağı, eklemleri oluşturan kemiklerin uçlarını örten ince tabakalı, düzgün, kaygan ve parlak yüzeyli benzersiz visko-elastik karaktere sahip özelleşmiş bir bağ dokudur. Sağlıklı eklem kıkırdağı önemsenmeyecek bir sürtünme ile kemiklerin birbiri üzerinde rahatça kaymasını ve yükün subkondral kemiklere aktarılmasını kolaylaştırarak hareket etmemizi sağlar (1,2). Eklem kıkırdağı, diz veya kalça eklemleri gibi diartrodiyal eklemlerde bulunan canlı, özel bir bağ dokusudur. Eklem kıkırdağı, kan damarları, lenfatik ve sinir dokuları olmayan bir diartrodial eklem bağ dokusu olarak çevre şartlarına adaptasyonda yüksek oranda özelleşmiştir (3). Kıkırdak dokusunun avasküler doğası ve kıkırdak hücrelerinin (kondrosit) düşük metabolik aktivitesi, travma, hastalık veya dejenerasyon nedenli hasarın intrinsik olarak kıkırdak iyileşmesini ve tamirini oldukça kısıtlamaktadır (4-7).

Eklem kıkırdak hasarı dizin sık görülen patolojilerinden biridir (8-10). Kıkırdak hasarının en sık klinik belirtisi spesifik olmayan diz ağrısıdır, ancak bu belirtiler asemptomatik hastalardan eklem şişliği, şiddetli eklem ağrısı ve hareket kaybı olan hastalara kadar değişebilmektedir (11). Eklem kıkırdağının defektleri çoğunlukla diz eklemine travmatik yaralanmalarından kaynaklanır ve menisküs yırtıkları, ön çapraz bağ yırtıkları ve patellofemoral dislokasyonlar en sık nedenlerdir (12). Eklem kıkırdak hasarı, diz protez cerrahi tedavi ihtiyacına yol açan osteoartrit gelişiminde önemli bir aşamadır (13-15). Bu nedenle, kondral ve osteokondral defektlerin oluşturduğu klinik tablo hafif olsa dahi olası cerrahi tedavi ihtiyacı açısından titiz bir klinik ve radyolojik değerlendirme gereklidir (16).

Tam kat kıkırdak defektlerine (şekil 1), kıkırdak onarım prosedürlerinden potansiyel olarak en çok fayda sağlayacağı düşünülen grup olan 40 yaş altı hastalarda yapılan diz artroskopilerinin %4-11'inde rastlanmaktadır (17-19).

Kıkırdak hasarları, akut travma veya daha sık olarak yıllarca kullanımdan kaynaklanan tekrarlayan mikrotravmalar sonucu oluşmaktadır. Kıkırdak, günlük yaşam aktiviteleri sırasında bile yüksek mekanik kuvvetlere maruz kalırken, bu durum vücuda binen yükün vücut ağırlığının 10-20 katına ulaştığı sportif faaliyetler sırasında önemli ölçüde artar (20). Akut travma osteokondral bir yaralanma ile sonuçlanırsa, kemik iliği hücreleri içeren bir kan pıhtısı oluşması nedeniyle onarıcı bir süreç ortaya çıkar. Bu hücreler, kemik iliğinin uyarımıyla ortaya çıkan onarım teknikleriyle benzer bir fibrokartilaginöz onarım

dokusu üretebilir. Bununla birlikte, tekrarlayan mikrotravma, kondropeni, proteoglikan üretiminin azalması ve kollajen ağının hasar görmesine neden olur. Kollajen ağ örgüsü proteoglikanları içerir ve su girişinden şişmeyi sınırlar; herhangi bir bozulma daha fazla şişmeye izin verir, doku sertliğini azaltır (21). Ek olarak, glikosilasyon son ürünleri ve pestisitler yaşla birlikte birikerek daha sert, daha kırılabilir bir kıkırdak oluşumu ile sonuçlanırken, kondrositlerin de metabolik aktivitesinde azalma görülür (22).



**Şekil 1.**Anterolateral ve santral trokleada büyük bir kıkırdak defekti gösteren sağ dizin intraoperatif görüntüsü. Medial ve lateral kondil kıkırdağı sağlam görünüyor (17).

Kıkırdak, temel madde (polisakkaritler), fibriller bileşen (fibröz proteinler) ve interstisyel sıvıdan (esas olarak su) oluşan ekstrasellüler matriks içine gömülü hücreli bir bileşen ile karakterize edilen mezodermal kökenli özel bir bağ dokusundan oluşur. Doğrudan kan, lenfatik ve sinir dokusu yoktur; beslenme, çevre dokulardan difüzyona dayanır.

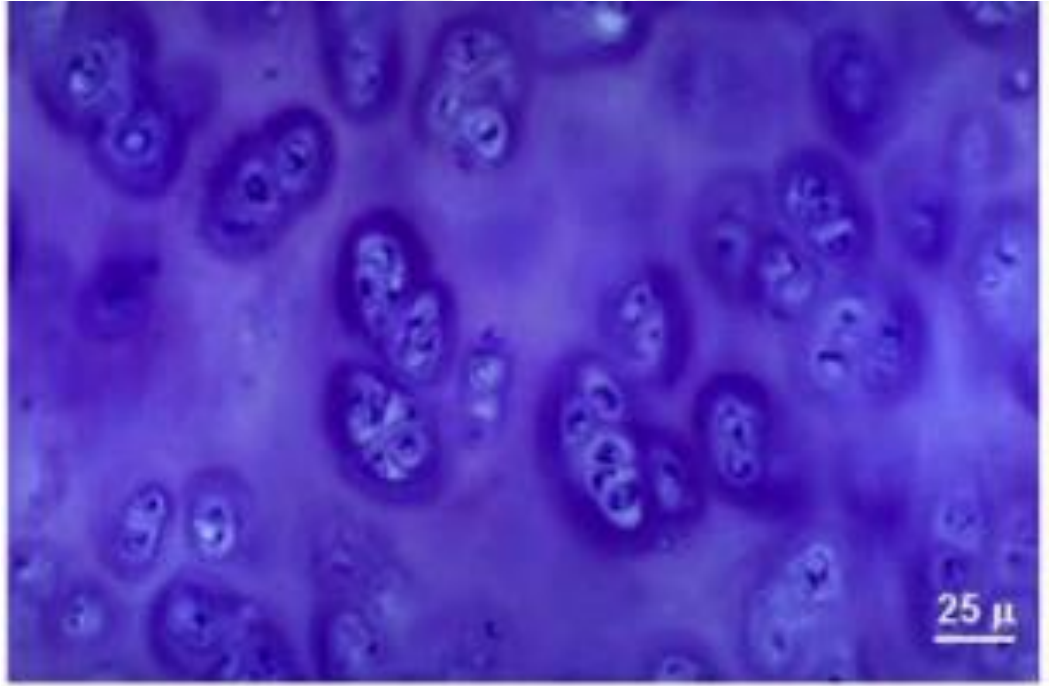
Kıkırdak hasarlarının tedavisi, kondrosit hücre proliferasyon ve rejenerasyon kapasitesindeki kısıtlılık sebebiyle oldukça sorunludur (23-25). Bu sebeple, eklem kıkırdak hasarlarının hiyalin kıkırdak oluşumunu sağlayarak iyileşmesini sağlamak için, kondrogenезisi uyarıcı olabilecek kollajen içeriği yüksek spongostan ve antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri olan L-karnitin' i, kontrollü oluşturulan sıçan diz eklem kıkırdak hasarı modelinde denemeyi amaçladık.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1.Hiyalin Kıkırdak**

#### **2.1.1. Hiyalin Kıkırdak Histolojisi**

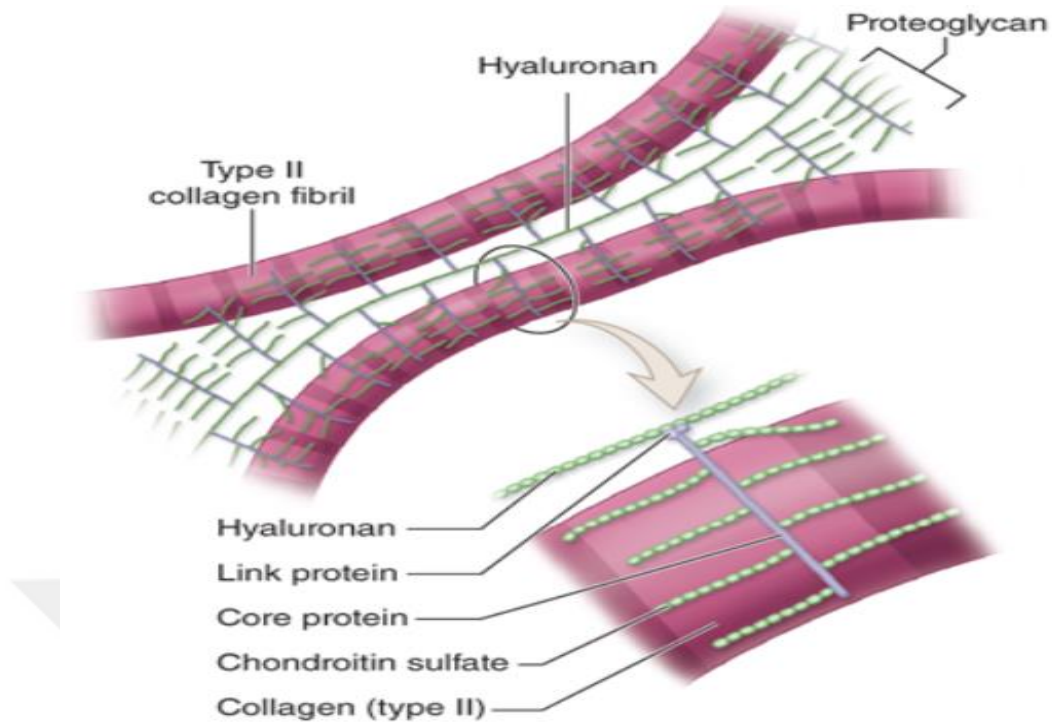
Hiyalin kıkırdak, embriyo gelişimi sırasında yavaş yavaş kemik dokusu ile yer değiştirene kadar geçici bir iskelet görevi gören, en yaygın kıkırdak türüdür (26) (Şekil 2). Hiyalin kıkırdak, kaburgalar ve sternum arasındaki bağlantıda, trakea ve dirsek ve diz gibi sinovyal eklemlerin eklem yüzeylerinde bulunur (27,28).



**Şekil 2.**Hiyalinkıkırdak histopatolojik görüntüsü (29)

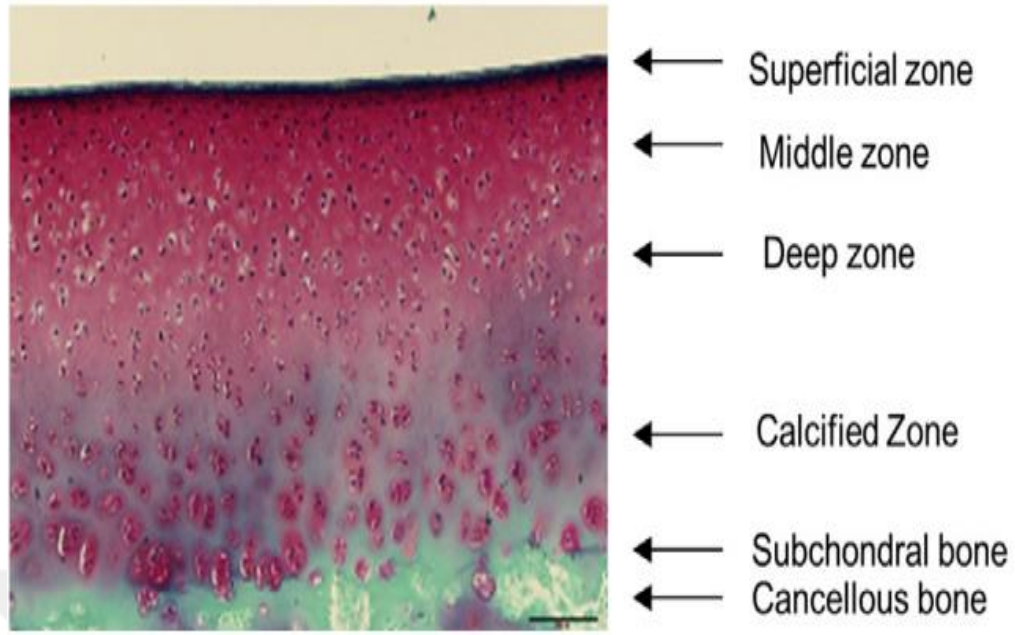
Kıkırdak dokular hareketi destekleyebilir ve makaslama stresi ve deformasyona karşı koyabilir. Bu dokuların uzun süreli sıkışmayı önlemek için enerji depolamaya ihtiyacı vardır

(30,31). Kıkırdak, sınırlı kendi kendini yenileyebilme özelliğine sahip vasküler olmayan ve innerve olmayan bir dokudur. Tek bir hücre tipinden, kondrositler ve yoğun bir hücre dışı matriksten oluşur. Kondrositler özelleşmiş mezenkimal hücrelerdir (32). Kondrositler, eklem kıkırdak dokusu hacminin sadece %10'unu oluşturmaktadırlar (33). Kondrositler yoğun bir matrikse yayılır ve hücreden hücreye teması yoktur. Ekstrasellüler matriks bileşeninin sentezinden ve yıkımından sorumludurlar. Dokunun homeostazını koruyarak; hücre farklılaşmasını, çoğalmasını, hayatta kalmasını ve matriksin yeniden şekillenmesini kontrol etmek için aracı olarak integrinleri salgırlar (34). Kondrositler özellikle proteoglikanları, kollajenleri ve diğer kollajen olmayan proteinleri sentezlerler (35). Kondrositler hipoksik nişlerde izole edilir, bu da hipoksi ile indüklenebilir faktör 1-alfa'yı farklılaşma ve homeostazın önemli bir düzenleyicisi haline getirir (36). Hiyalin ekstrasellüler matriks, su, proteoglikan ve kollajen (kuru ağırlığının %40'ını oluşturur) içerir. Daha az ölçüde, ekstrasellüler matrikste kollajen olmayan proteinler ve glikoproteinler bulunur (37). Su içeriğinin üçte birinden azı kollajen fibrillerle bağlantılıdır, geri kalanı ekstrasellüler matriksin boş alanlarında bulunur (38). Proteoglikanlar, bir çekirdek protein ve kondroitin sülfat veya keratan sülfat gibi glikozaminoglikan zincirlerinden oluşan yüksek oranda glikosile edilmiş proteinlerdir (39). Kıkırdakta en sık görülen proteoglikan, yük taşımada rol oynayan agrekandır. Proteoglikan, hyaluronanı bağlar ve ekstrasellüler matrikste yüksek miktarda su tutan bir kompleks oluşturur (40) (şekil 3).



**Şekil 3.**Ekstrasellüler matriks ve proteoglikanların yapısı (41)

Kollajen, fibriller bir proteindir; birincil rolü matriks yapısını destekleyen karmaşık ve organize bir ağ oluşturmaktır (42,43). Tip II kollajen, ekstrasellüler matriksin ana bileşenlerinden biridir. Hiyalin kıkırdığının yüzeysel bölgesinde daha yüksek bir yoğunluğa ve derin bölgedeki en düşük yoğunluğa sahip bir gradyanda dağılır. Tip II kollajen, yapısal amaçlar için IX, XI ve III gibi diğer kollajen tipleri ile etkileşime girer (44). Hiyalin kıkırdak, dört farklı katmanda benzersiz bir bölgesel organizasyona sahiptir (45) (Şekil 4). Yüzeysel bölge, eklem yüzeyine paralel yönlendirilmiş kollajen lifleri (esas olarak tip II ve IX) içeren en ince tabakadır. Bu katman eklem yüzeyinin direnç özelliklerinin çoğundan sorumludur. Geçiş bölgesinde, kollajen fibrilleri daha fazla proteoglikan ile daha kalın ve daha az organizedirler. Derin bölge, en yüksek proteoglikan yoğunluğu ve en düşük su içeriği ile karakterizedir ve kollajen yapıları olarak derin bölgeyi subkondral kemikten ayıran noktaya dik olarak konumlanmıştır (46). Kondrosit yoğunluğu, morfolojisi ve gen ekspresyonu da hiyalin kıkırdak içindeki derinliğe bağlı olarak değişir (47-49). Bu farklılıklar aynı zamanda farklı katmanlara uygulanan farklı biyomekanik streslerle de ilişkilidir (50). Bu özel bölgesel organizasyon ve hücresel dağılım kıkırdak doku onarımının çok önemli bir bileşenidir. Kıkırdak dokusunun iyi onarım, entegrasyon ve biyomekanik özelliklere sahip rekonstrüksiyonu, kıkırdak dokusu mühendisliğinin temel zorluğudur (51-53).



**Şekil 4.** Hiyalin kıkırdak katmanları histolojisi. safranin-O ile boyandı. Matriks ve kondrositler her bölgede iyi düzenlenmiştir. Yüzeysel bölgede safranin-O boyaması yoktur. Safranin-O boyamasının görüldüğü orta bölgede, hücreler yuvarlak veya oval ve rastgele dağılıma sahip gibi görünmektedir; buna karşılık, derin bölgede hücreler kısa sütunlar halinde düzenlenmiştir (54).

## 2.2. Kondral İyileşme Süreçlerinin Araştırma Modelleri

Özellikle kıkırdak dokusunda iyileşme süreçlerine ayrılmış çalışmalarda tavşanlar en çok kullanılan hayvanlardır. Bu hayvanlardaki femoral kondil ve trokleanın büyüklüğü, çapı 3-4 mm olan yapay olarak oluşturulan osteokondral lezyonları kolayca barındıracak kadar büyüktür. Bununla birlikte, bu tür çalışmalardan elde edilen sonuçların insanlara uygulanmasındaki zorluk, miyeloid hücrelerin farklı potansiyelinden kaynaklanmaktadır. Tavşanlarda osteokondral lezyonların onarımı neredeyse sadece komşu sağlıklı kıkırdak hücrelerinin katılımı olmadan mezenkimal kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşması yoluyla gerçekleşir. Müdahale olmadan, insan kıkırdağı, kendiliğinden iyileşme için, hiç veya çok az kapasite gösterir. Ayrıca, tavşanlarda eklem kıkırdağı çok ince, yani yaklaşık olarak oluşturulan yaralanmanın yüzde sekseni aslında kıkırdağın kendisinden ziyade subkondral kemiği etkiler (55).

Klinik açıdan bakıldığında, kıkırdak hasarı tedavisinin üç temel amacı tanımlanabilir:

- eklem yüzeylerinin sürekliliğinin yeniden yapılandırılarak, eklem fonksiyonel kapasitesinin restorasyonu,

- ağrının azaltılması,
- osteoartrit başlangıcının gecikmesi veya önlenmesi (56,57).

Benzersiz yapısal özellikleri ve kırıkdağın travmaya karşı tam olarak anlaşılamamış cevabı hekimlerin bu tür yaralanmaları tedavi ederken benimsedikleri düzenli olmayan yaklaşımlara neden olmaktadır. Tedavi yöntemi, lezyonun büyüklüğüne, lokalizasyonuna ve derinliğine ve diğer eklem koşullarının bir arada bulunmasına bağlıdır (58). Tedavi metodları, genellikle konservatif ve cerrahi tedavi şeklinde ayrılabilir. Konservatif tedavi, farmakoterapi, çeşitli minimal invaziv cerrahi yöntemler, immobilizasyon, eklem ponksiyonu, fizyoterapi ve vücut kitle indeksinin azaltılmasını içerir (59). Cerrahi tedaviler ise rejeneratif ve onarıcı olarak iki başlıkta ele alınabilir.

### **2.3. Kırıkdağ Yaralanması Tedavisi**

Başlangıçta basit bir doku olarak görünse de hücrelerin azlığı, yüksek matriks-hücre oranı ve eklem kırıkdağında doğrudan kan beslemesinin olmaması nedeniyle kırıkdağ hücreleri iyileşme için zor bir ortamda bulunmaktadır. Bu durum, kemik iliği stimülasyon teknikleri kullanılarak defekt içine endojen hücre göçünü uyarak veya hücrelerin doğrudan implantasyonu ile lokal hücre sayısını arttırmayı amaçlayan onarım stratejilerine de yol açmıştır (60).

#### **2.3.1. Cerrahi Yöntemler**

Cerrahi tedavi yöntemleri şunları içerir: Onarıcı teknikler ve rejeneratif teknikler.

Hem onarıcı hem de rejeneratif yöntemlerde amaç öncelikle hasarlı eklem kırıkdağının yeniden yapılandırılmasıdır. Bu hasarın onarımı, sağlıklı kondral dokudan farklı histolojiye sahip bir doku ile de yapılabilmektedir. Pratik olarak, doku sürekliliğini, orijinal farklılaşmalarını ve tam fonksiyonel kapasitelerini geri getirmeden önce yeniden kırıkdağ veya kırıkdağ benzeri doku oluşumu indüklenmelidir (61).

##### **2.3.1.1. Onarıcı Cerrahi Yöntemler**

Onarıcı teknikler, kansellöz kemik damarlarının devamlılığına müdahale ederek mezenkimal kök hücrelerinin sayısının artmasını gerektirir (ilik stimülasyon teknikleri) (62). Organizmanın uyarılmış biyolojik tepkisi, fibrokartilaj dokusu olarak adlandırılan skar dokusu üretir. Bu tür tedaviler, hastanın aktivite düzenine ve beklentilerine bağlı olarak küçük (<2 cm<sup>2</sup>) ve orta büyüklükteki defektlerin (2.5 cm<sup>2</sup>'ye kadar) tedavisinde kullanılır

(63). Uygulanan bazı teknikler; subkondral kemiğin drillenmesi, mikrokırık oluşturma, abrazyon ve otolog matriks kaynaklı kondrojenektir.

Subkondral kemiğin drillenmesi ilk olarak 1959'da Pridi tarafından deneysel bir tavşan modelinde gerçekleştirildi. Drillenerek açılan delikler hematoma ile dolar ve sonra büyüme faktörleri ve multipotent hücrelerden zengin pıhtı, kemik iliğinden gönderilir. Orijinal iskelet yeniden yapılandırıldığında, fibrokartilaj dokusu oluşur. Drilleme ayrıca intraosseöz basıncı azaltarak ağrıyı hafifletir.

1970'lerde Ficat ve ark. spongilyolizasyon denen radikal bir teknik geliştirdi. Etkilenen tüm kırıkdağın bitişik subkondral kemikle birlikte çıkarılmasını içermektedir.

1980'lerde Johnson, vaskülarize tabakayı açığa çıkaran kondral defekt bölgesinde 1-3 mm subkondral kemiğin küretajını içeren abrazyon olarak adlandırılan tekniği tanıttı. Bununla birlikte, yöntemin geçerliliği, subkondral kemik plakasında meydana gelen önemli hasar nedeniyle tartışmalı olmaya devam etmektedir.

1984 yılında Steadman, günümüzde en çok tavsiye edilen onarıcı tekniklerden biri olan mikrokırık yöntemini uygulamaya koydu. 3-4 milimetrelık aralıklarla yerleştirilmiş, cerrahi aletler kullanılarak subkondral kemiğe mikro deliklerin açılmasını içerir. Tekniğin önemli bir unsuru, hasarlı alanın uygun şekilde önceden hazırlanmasıdır. Kalsifiye kırıkdağ tabakasının lezyonun altından çıkarılması ve kenarlarının eşitlenmesi gerekir. Doğru hazırlanmış alan, oluşan pıhtıyı barındırabilir ve koruyabilir (64). Prosedür aşırı ısı üretmez ve drilleme veya abrazyonda olduğu gibi subkondral kemik plakasına zarar vermez (65,66). Prosedür tek aşamalıdır ve teknik olarak nispeten basittir. Steadman, mikrokırık tedavisi gören 72 hastanın %80'inde preoperatif duruma göre anlamlı iyileşme bildirmiştir. Yukarıda belirtilen tekniğin uygulandığı hayvan modelleri üzerinde yapılan histolojik çalışmalar, defekt bölgesinde esas olarak tip I kollajen içeren fibröz dokunun oluştuğunu ortaya koymuştur. Ancak, 18 ay sonra, bu dokunun kalitesinin önemli ölçüde bozulduğu gözlenmiştir (67).

AMIC yöntemi (Otolog Matriks Kaynaklı Kondrojenektir), mikrokırık tekniği ile bir Chondro-Gide® kollajen membranının (Geistlich Biyomalzemeleri) kullanımının bir kombinasyonudur (68). İlk olarak 2003 yılında Behrens tarafından, daha geniş kırıkdağ defektlerine (6 cm<sup>2</sup>'ye kadar) uygulanabilirliğini sağlamak için mikrokırık tekniğinin etkinliğini arttırmanın bir yöntemi olarak sunulmuştur. Membran, oluşan pıhtıyı stabilize etmek ve korumak, tip II kollajen üretimini uyarmak ve eklem boşluğuna kanamayı azaltmak

için defekt bölgesini kaplar. Üç boyutlu yapısı, oluşan kollajen liflerinin düzgün bir şekilde yönlendirilmesini sağlar. Süturlarla yerinde tutulur. Steadman tarafından yapılan onarıcı tedavi gören hastaların uzun süreli araştırma ve gözlemleri sırasında, diğerlerinin yanı sıra, bu yaklaşımın klinik etkinliği genel olarak tatmin edici olarak değerlendirilmiştir (69). Yeniden yapılan dokunun yapısının analizi, öncelikle fibrokartilaginöz dokudan oluştuğunu ortaya koydu. Ne yazık ki, fibrokondral dokunun yapısal ve mekanik özelliklerinin yetersizliği nedeniyle, yukarıda belirtilen yöntemlerin uzun vadeli etkinliği biraz tartışmalıdır. Genel olarak, ilik stimülasyon tekniklerinin kullanılmasını gerektiren tedavinin kısa süreli semptomatik rahatlama sağlayabileceği kabul edilmektedir (70).

### **2.3.1.2. Rejeneratif Cerrahi Yöntemler**

Doku rejenerasyonu, dokunun mikro mimarisini ve biyomekanik fonksiyonlarını korurken hasarlı hücrelerin ve hücreler arası maddenin değiştirilmesini içerir. Rejeneratif yöntemler şunları içerir:

- periosteal ve perikondriyal greftler,
- otolog ve allojenik osteokondral greftler (mozaikplasti, OAT-Osteokondral Otolog Transplantasyon; Osteokondral Otogreft Transferi).
- Otolog Kondrosit İmplantasyonu (ACI)-(ACT : Otolog Kondrosit Nakli).
- Matriks Kaynaklı Otolog Kondrosit İmplantasyonu (MACI) (71).

### **2.4. Spongostan**

Kompozisyon ve yapı bakımından kesin olarak farklılık gösteren birçok kemik ikame maddesi geliştirilmiştir. Bu maddeler beş gruba ayrılabilir: Doğal kökenli maddeler, sentetik maddeler, kompozit maddeler, büyüme faktörleri ile birleştirilmiş maddeler ve canlı hücrelerle yüklü maddelerdir. Tüm bu materyaller klinik uygulamada farklı endikasyonlar ve değişken başarılarla kullanılmaktadır (72-74). Mevcut çok çeşitli ikamelere rağmen, mühendislik kemik ikamesi materyalleri karmaşık bir süreçtir, çünkü nano ve mikrotopografilerinin optimal vasküler büyümenin yanı sıra kök hücre ve osteojenik progenitör hücre göçü ve farklılaşmasına izin vermesi gerekir. Petersen ve arkadaşları,  $89 \pm 15 \mu\text{m}$  mikro gözeneklerden oluşan kanal benzeri gözenek mimarisine sahip, tasarlanmış bir domuz kollajen skafold için sıçan femurunda kritik boyutlu bir defekt modelinde

endokondral ossifikasyonda önemli ölçüde iyileşme olduğunu bildirmişlerdir (75). Çok çeşitli klinik ortamlarda yaygın olarak hemostatik kollajen sünger olarak kullanılan klinik onaylı kollajen sünger spongostan <sup>TM</sup> 'da  $60.66 \pm 24.48 \mu\text{m}$  çapında mikro gözenekler ve  $32.97 \pm 1.41 \text{ nm}$  boyutunda nanoporlar gözlemlenmiştir (76-78). Cerrahide jelatinimsi hemostatik bir sünger olan spongostan <sup>®</sup> kullanılır. Ayrıca, spongostan <sup>®</sup> defektlere implante edilen proteinler veya hücreler için bir skafold görevi görebilir (79,80). Hemostatik bir ajan olarak spongostanın kullanımı için spesifik endikasyon, von Willebrand hastalarındaki (vWd) kanamadır. Sık mukozal kanama nedeniyle, Vwd' li hastaların tedavisi zordur; ancak dış prosedürleri sıklıkla gereklidir ve spongostan kullanımı bu durumlarda endikedir. Bu hastaların tedavisi kanamayı ve komplikasyonlarını mümkün olduğunca önleyecek şekilde ayarlanmalıdır (replasman tedavisi ve hemostatik ajanlar) (81). Hemostatik bir ajan olarak kullanılmasının ötesinde, kök hücre veya büyüme faktörü taşıyıcısı olarak da kullanılabilir (82,83). Spongostan <sup>TM</sup> üzerindeki mikro ve nano topografik işaretlerin tek varlığının kritik boyutlu kalvaryal sıçan kemiği defektinin fonksiyonel rejenerasyonu için yeterli olduğu gösterilmiştir (84).

## **2.5. L-karnitin**

L-Karnitin, hücresel metabolizmada önemli bir rolü olan bir moleküldür. Dokular arasında yaygın olarak dağıtılır (85) ve beta oksidasyonu için, uzun zincirli açılCoA' nın iç mitokondriyal membrandan taşınması için bir kofaktördür (86). Önceki çalışmalar, L-karnitinin hem in vitro hem de in vivo osteoblastik metabolizmayı etkilediğini doğrulamıştır. Özellikle, in vitro çalışmalarda, L-karnitinin domuz primer osteoblastında protein sentezini, insan primer osteoblastının çoğalmasını ve farklılaşmasını uyardığı ve apoptoz murin osteoblastik hücrelerine karşı koruduğu gösterilmiştir (87-89).

## **3. MATERYAL METOD**

Spongostan ve L-karnitin'in kıkırdak iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmak için deneysel çalışma planlandıktan sonra Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 25/02/2022 tarih ve 2022/06 karar no ile hayvan deneyi etik kurul onayı alındı. Üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nden TTU-2022-1395 nolu proje ile çalışma desteği alındıktan sonra 01/02/2022 – 01/05/2022 tarihleri arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çalışma yürütüldü.

Çalışmada ortalama ağırlığı  $280-340 \pm 15$  gr olan 32 adet Sprague-Dawley cinsi dişi erişkin sıçanlar kullanıldı. Çalışma grupları rastgele oluşturuldu. Her grupta sekiz sıçan ve 4 grup olacak şekilde kafeslere ayrıldı (Tablo 1). Kafesleri üzerine grupları belirten etiketlendirme yapıldı (Şekil 5).

Hayvanlarda korku ve stres ortamı oluşturulmaması amacıyla tüm hayvanlara günlük alışma süreci sonunda işleme başlandı. Kıkırdak hasarı oluşturulmadan önce ve sonraki dönemde yem olarak pelet tam sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi / Erzurum) kullanıldı. Suları daima serbest bırakılmış (ad libitum) olarak verildi ve günlük olarak değiştirildi. Tüm hayvanlar steril, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık deney hayvanları ünitesi ortamında %55-60 nem oranı ve  $22 \pm 3$  °C oda sıcaklığında bakım ve beslenmeye tabi tutuldu.



Şekil 5. Gruplandırma ve etiketlendirme

### 3.1. Çalışma Grupları

**Tablo 1.** Çalışma grupları

| <b>Çalışma grupları</b>                                                          | <b>Çalışma haftaları</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Grup 1 (n=8)</b><br><b>Sağlıklı kontrol grubu</b>                             | 6. hafta sakrifiye       |
| <b>Grup 2 (n=8)</b><br><b>Kıkırdak defekt grubu</b>                              | 6. hafta sakrifiye       |
| <b>Grup 3 (n=8)</b><br><b>Kıkırdak defekt + spongostan grubu</b>                 | 6. hafta sakrifiye       |
| <b>Grup 4 (n=8)</b><br><b>Kıkırdak defekt + L-karnitin emdirilmiş spongostan</b> | 6. hafta sakrifiye       |

### 3.2. Anestezi

Cerrahi anestezik olarak, 50 mg/kg ketamin HCl (Ketasol%10, Richter Pharma AG, Wels-Austria), 5 mg/kg Xylazine HCl (Rompun %2, Bayer İlaç Sanayi, İstanbul) aynı enjektör içinde kombine olarak intraperitoneal yol ile uygulandı (1 cc ketamin-2 cc rompun).

Tüm denekler aynı cerrah tarafından opere edildi. Anestezi uygunluğu, sıçan derisine uygulanan sıkıştırmaya sıçanların verdiği yanıtı göre değerlendirildi.

### 3.3. Deney Modelinin Oluşturulması

Cerrahi hazırlık sonrası (şekil 6), sıçanların sağ alt ekstremitesi kasığa kadar traş edildi. Sterilizasyonu sağlamak amacıyla kıkırdak hasarı yapılacak sıçanların sağ alt ekstremiteleri tamamen%10povidoneiodine solüsyonu ile temizlenip, operasyon sahası açık kalacak şekilde steril örtüler ile örtüldü (şekil 7). Diz anteriordan vertikal yaklaşık 1,5 cm lik cilt insizyonu yapıldı. Cilt altı ve fasya geçildi. Retropatellar insizyon ile diz eklemine ulaşıldı (şekil 8). Patellar ve kuadriseps tendonları korundu. Mediale ve laterale ekartörler yerleştirilerek cerrahi çalışma sahası açıldı. Distal femur kondil troklearbölgeden termal hasar oluşturulmadan 1 mm çapında ve subkondral kemiğe ulaşan kıkırdak defekti oluşturuldu (şekil 8). İnsizyon sahası %0,09 NaCl ile yıkanıp katlar 4/0 prolene sütür materyali ile anatomik planlara uygun olarak kapatıldı ve pansuman yapıldı. 3. gruptaki sıçanlarda, oluşturulan 1 mm' lik kıkırdak defektine aynı çap ve ölçüde spongostan materyali yerleştirildi (şekil 9). İnsizyon sahası %0,09 NaCl ile yıkanıp katlar 4/0 prolene sütür materyali ile anatomik planlara uygun olarak kapatıldı ve pansuman yapıldı. 4. gruptaki sıçanlarda, oluşturulan 1 mm' lik kıkırdak defektine aynı çap, ölçüde ve hacim olarak tamamı olacak şekilde l-karnitin emdirilmiş spongostan materyali yerleştirildi (şekil 10). İnsizyon sahası %0,09 NaCl ile yıkanıp katlar 4/0 prolene sütür materyali ile anatomik planlara uygun olarak kapatıldı ve pansuman yapıldı. Operasyona son verildi. Yara yerleri pansuman sonrası açık bırakıldı (şekil 11). İnsizyon bölgesi günlük yara yeri pansumanı ile takip edildi.



Şekil 6.Cerrahi hazırlık



Şekil 7.Sıçan dizi görünecek şekilde steril olarak cerrahi alanın hazırlanması



**Şekil 8.**Parapatellar insizyon ile femur kondillerine ulaşım sonrası interkondiler bölgede 1 mm çapında oluşturulmuş kıkırdak defektinin görüntüsü



**Şekil 9.**İnterkondiler bölgede oluşturulan defekte aynı çap ve ölçüde spongostan materyalinin kishner teli yardımı ile yerleştirilmesi



**Şekil 10.**İnterkondiler bölgede oluşturulan kıkırdak defektini dolduracak şekilde, L-karnitin emdirilmiş spongostan materyalinin yerleştirilmiş görüntüsü



**Şekil 11.** Dizlerde kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra yara yerlerine pansuman yapılmış olan sıçanların erken postoperatif dönemdeki görünümü

Cerrahi sonunda tek doz intraperitoneal 40 mg/kg sefazolin sodyum uygulandı. Anajezik olarak metamizol sodyum (Novalgine 1g/2ml IM/IV ampul) intramüsküler olarak uygulandı. Postoperatif dönemde sıçanlara immobilizasyon yöntemi uygulanmadı. Denekler cerrahi işlem sonrası sakrifikasyon sürecine kadar kafes içinde aktif mobilizasyona izin verilerek takip edildi. Gruplar sakrifiye edilmeden önce intrakardiyak girişim ile biyokimya tüplerine 5 cc kan alındı (Şekil 12) (Şekil 13). Her grup takip süresi sonunda (6. haftada) anestezi altında dekapitasyonla sakrifiye edilerek femur kondilleri bacak ile total olarak çıkartıldı (Şekil 14). Femoral kondiller diseke edildi. %10 formol solüsyonuna alındı. Histopatolojik ve biyokimyasal inceleme sürecine geçildi.



Şekil 12.İntrakardiyak kan alınması



**Şekil 13.** İntrakardiyak alınan kanların biyokimya tüplerine yerleştirilmesi



**Şekil 14.**Total eksize edilmiş sıçan femurunun görünümü

### **3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi**

#### **3.4.1. Biyokimyasal Değerlendirme**

Antikoagölansız tüplere alınan kan örnekleri fibrin oluşumunun gerçekleşmesi için yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 2-8 3000×g 15 dk. santrifüj edildi. Elde edilen °C kan serumları (süpernatantlar) ependorf tüplere koyularak Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda -80°C'de dondurucuda numunelerin çalışıldığı güne kadar muhafaza edildi. Numunelerin çalışılacağı günden 24 saat önce ependorflar -80 °C derin dondurucudan çıkartıldı ve kademeli olarak sırasıyla -20ve ardından +4°C'de çözünmeye bırakıldı, serumlar çalışılacağı gün oda sıcaklığına çıkarılarak vortekslendi ve homojen hale gelmeleri sağlandı.

##### **3.4.1.1.TBARS (Thiobarbituricacidreactivesubstances) Tayini:**

Draper ve Hadley (Draper, H. and Hadley, M. (1990) Malondialdehyde Determination as Index of Lipid Peroxidation. Methods in Enzymology, 186, 421-431.) yöntemi modifiye edilerek yapıldı. 200 µL serum üzerine 1 ml %10'luk Triklorasetik asit (TCA) eklenip vortekslendi, 15 dk çalkalamalı su banyosunda kaynar suda bekletildi ardından soğutuldu ve 3000 g' de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlardan 750 µL alınarak üzerine 375 µL % 0.67' lik tiyobarbitürikasit (TBA) eklendi, vortekslendi ardından 15 dk kaynar suda bekletildi, süre dolunca soğutuldu. Mikroplaka üzerinde numune, standart ve kör için belirlenen kuyucuklara 250 µL pipetleme yapıldı ve oluşan pembe renk 532 nm de spektrofotometrede okutuldu. Sonuçlar hazırlanan standart grafiği ile belirlendi ve µmol/L olarak hesaplandı.

##### **3.4.1.2. Toplam Tiyol Grubu Tayini:**

Ellman ayıracı kullanılarak -SH grupları tayin edildi. Mikroplaka üzerinde numune, standart ve kör için belirlenen kuyucuklara 25 µL pipetleme yapıldı ardından 100 µL 3M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 25 µL DTNB konuldu (4mg DTNB %1'lik 10 mL sodyum sitrat çözeltisinde hazırlandı.) ve hafif bir çalkalama sonrasında oluşan sarı renk 412 nm'de spektrofotometrede okutuldu. Sonuçlar hazırlanan 1000 µM- 62,5 µM'lık redükte glutatyon standart grafiği ile belirlendi ve µmol/ml olarak hesaplandı.

**Tablo 2.**Biyokimyasal analizlerde kullanılan laboratuvar malzemeleri

**ANALİZLERDE KULLANILAN LABORATUVAR MALZEMELERİ**

| Cihaz Adı                                     | Markası                |
|-----------------------------------------------|------------------------|
| Soğutmalı santrifüj                           | Heraus 3SR+ Multifuge  |
| Otomatik pipetler                             | Eppendorf, Socorex     |
| Vorteks                                       | Velp Scientifica       |
| Distile su cihazı                             | Sartorius Arnum 61316  |
| Manyetik karıştırıcı                          | Wisestir Msh           |
| Elisa okuyucu                                 | Thermo Multiscan Go    |
| Elisa yıkayıcı                                | Biotek EL X 50         |
| -80 Derin dondurucu                           | Newbrunswick Scientfic |
| Çalkalamalı su banyosu                        | Memmert WNB 14         |
| Buzdolabı                                     | Beko BK 7121 T         |
| Balon joje, beher gibi çeşitli cam malzemeler | Iso Lab                |
| Hassas Terazı                                 | Precisa XB 220A        |
| Ependorf                                      | Iso Lab                |
| Çeşitli hacimlerde pipet uçları               | Labosel                |

**Tablo 3.**Biyokimyasal analizlerde kullanılan kimyasallar

**ANALİZLERDE KULLANILAN KİMYASALLAR**

| Kimyasalın Adı                                                    | Markası       |
|-------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1,1,3,3 Tetrametoksipropan (TEP)                                  | Fluka         |
| Etanol                                                            | Iso Lab       |
| Triklorasetik asit (TCA)                                          | MERCK         |
| Tiyobarbitürik asit (TBA)                                         | MERCK         |
| Ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB)                              | Sigma-Aldrich |
| Tri sodyum sitrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) | MERCK         |
| Redükte glutatyon (GSH)                                           | Sigma-Aldrich |
| Di sodyum hidrojen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )           | HIMEDIA       |

### 3.4.2. Histopatolojik Değerlendirme

#### 3.4.2.1. Histopatolojik Doku Takip İşlemleri

Patoloji laboratuvarına 4 farklı gruba ait (grup isimleri bildirilmedi) ve numara ile kodlanarak gönderilen sıçanlardan çıkarılan diz eklemlerine materyaller öncelikle fiksasyon amacıyla 24 saat %10'luk nötral formaldehitte bekletildi. Fiksasyon işlemini takiben %8'lik formik asitte bekletilerek günlük kontrol edilerek dekalsifikasyon sağladı. Dekalsifikasyon işlemleri sonrası her bir sıçana ait eklem örneği 3 farklı doku takip kasetinde örneklendi. Materyaller otomatik doku takip cihazında (Leica ASP300 S) takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklama cihazı (Leica EG1160) ile parafin bloklar oluşturuldu. Parafin bloklardan mikrotom makinası (Thermo Shandon Scientific Finesse ME) ile 4 mikronluk kesitler alındı. Otomatik boyama cihazı (Thermo Shandon Scientific Varistain Gemini Otomatik Boyama Cihazı) ile Hematoksilen Eozin ve manuel olarak Toluidine blue ile boyandı. Tüm kesitler manuel olarak lamel ile kapatıldı.

**Tablo 4.**Doku takip aşamaları

LEİCA MARKA ASP300 S MODEL DOKU TAKİP CİHAZI doku takip aşamaları

|                            |                  |
|----------------------------|------------------|
| %10 luk nötral Formaldehit | 1 saat           |
| Alkol %70                  | 45 dakika        |
| Alkol %80                  | 45 dakika        |
| Alkol %90                  | 45 dakika        |
| Alkol %96                  | 2 saat           |
| Alkol %99,9                | 90 dakika        |
| Ksilen                     | 1 saat           |
| Ksilen                     | 1 saat           |
| Ksilen                     | 1 saat           |
| Parafin                    | 1 saat           |
| Parafin                    | 1 saat           |
| Parafin                    | 1 ssat 45 dakika |

**Tablo 5.H&E boyama prosedürü aşamaları**

Thermo Shandon Scientific Varistain Gemini Otomatik Boyama Cihazı)  
**HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA PROSEDÜRÜ AŞAMALARI**

| Aşama no | HEMATOKSİLEN EOZİN BOYAMA PROSEDÜRÜ AŞAMALARI | SÜRE         |
|----------|-----------------------------------------------|--------------|
| 1        | KSİLEN                                        | 3 DAKİKA     |
| 2        | KSİLEN                                        | 3 DAKİKA     |
| 3        | ISITMA İSTASYONU (SICAK KURU HAVA)            | 1 DAKİKA     |
| 4        | ALKOL                                         | 3 DAKİKA     |
| 5        | ALKOL                                         | 3 DAKİKA     |
| 6        | AKAN SUDA YIKA                                | 1 DAKİKA     |
| 7        | HEMATOKSİLEN                                  | 4 DAKİKA     |
| 8        | AKAN SUDA YIKA                                | 3 DAKİKA     |
| 9        | ASİT ALKOL                                    | 3 SANİYE     |
| 10       | AKAN SUDA YIKA                                | 5 DAKİKA     |
| 11       | EOZİN                                         | 10/15 SANİYE |
| 12       | ALKOL                                         | 10 SANİYE    |
| 13       | ALKOL                                         | 15 SANİYE    |
| 14       | ISITMA İSTASYONU (SICAK KURU HAVA)            | 1 DAKİKA     |
| 15       | KSİLEN                                        | 3 DAKİKA     |
| 16       | KSİLEN                                        | 3 DAKİKA     |
| 17       | ISITMA İSTASYONU (SICAK KURU HAVA)            | 1 DAKİKA     |

**Tablo 6.Toluidineblue boyama prosedürü hazırlama**

**Toludine blue (Bio optica) Boyamam Prosedürü Hazırlama**

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| Ksilen                 | 1 dakika  |
| Alkol                  | 1 dakika  |
| Distile suda yıkama    | 1 dakika  |
| Toludine blue solüyonu | 45 dakika |
| Distile suda yıkama    | 1 dakika  |
| Alkol                  | 1 dakika  |
| Ksilen                 | 1 dakika  |
| Kapama                 |           |

Sıçanlara ait eklemlerde eklem kıkırdağında hasar ve iyileşmesi değerlendirmek üzere hazırlanan Hematoksilen Eozin ve Toluidine Blue boyaları ile boyalı kesitler Olympus BX51 mikroskopunda, çalışma grupları bilgisinden kör olarak patoloji uzmanı tarafından incelendi. Histopatolojik sınıflama için Mankin' in histolojik skora yöntemi kullanıldı (Tablo 7).

**Tablo 7.**Mankin histolojik skora yöntemi

| <b>Yapı</b>                        | <b>Skor</b> |
|------------------------------------|-------------|
| Normal                             | 0           |
| Yüzey düzensizlikleri              | 1           |
| Pannus                             | 2           |
| Tranzisyonel zona yarık            | 3           |
| Radyal zona yarık                  | 4           |
| Kalsifiye zona yarık               | 5           |
| Tümenden disorganizasyon           | 6           |
| <b>Tidemark/ sınır integritesi</b> |             |
| Intakt                             | 0           |
| Kan damarları tarafından geçilmiş  | 1           |
| <b>Proteoglikan boyanması</b>      |             |
| Normal                             | 0           |
| Hafif azalma                       | 1           |
| Orta derecede azalma               | 2           |
| Ciddi azalma                       | 3           |
| Hiç boyanmama                      | 4           |
| <b>Hücresellik</b>                 |             |
| Normal                             | 0           |
| Diffüz hiperselülarite             | 1           |
| Cloning                            | 2           |
| Hiposelülarite                     | 3           |

#### 3.4.2.2. İstatistiksel Analiz

Analizler sonucu elde edilen tüm veriler SPSS 18.0 (IBM, Armonk, NJ, USA) istatistik programı kullanılarak hesaplandı. Çalışma gruplarının TBARS ve Toplam Tiyo1 Grubu değerlerinin dağılımını belirlemek için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan ikiden fazla bağımsız grupların değerlendirilmesinde One Way ANOVA testi ve ardından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu belirlemek için post hoc

test olarak Bonferroni testi yapıldı. Elde edilen değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma ( $\bar{x} \pm S.D$ ) olarak ifade edildi. Test sonucu normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal-Wallis testi ve bunu takiben hangi gruplar arasında farklılık olduğunu belirlemek için post hoc test olarak Mann Whitney U testi yapıldı. Elde edilen değerler median (çeyrekler arası aralık) olarak ifade edildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda p değeri  $<0.05$  anlamlı olarak seçildi.

#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Biyokimyasal Bulgular

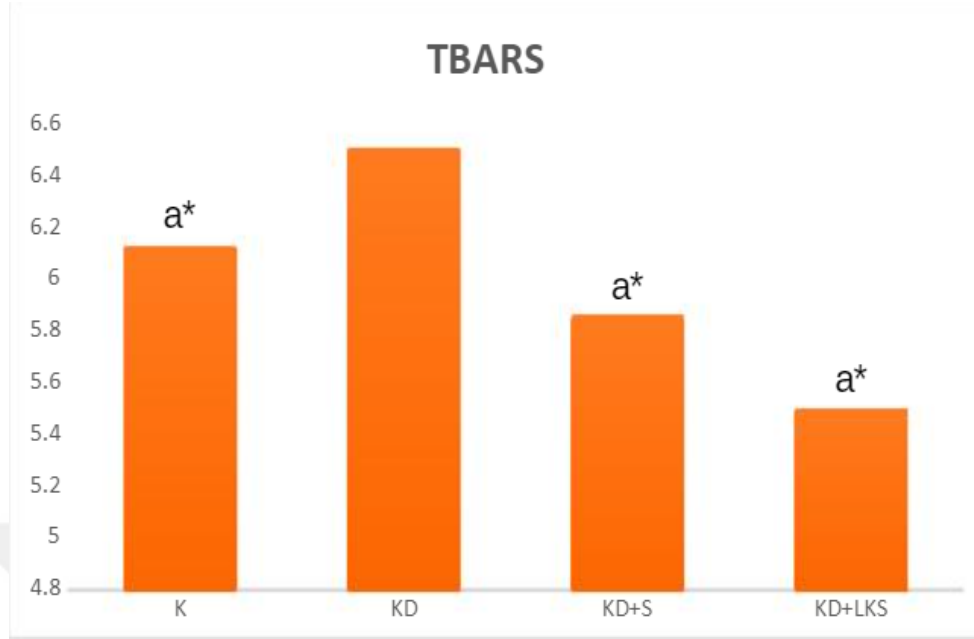
###### 4.1.1. TBARS

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda verilerin normal dağılıma uymadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). Kontrol, KD, KD+S ve KD+LKS gruplarının sonuçları Kruskal wallis testine göre değerlendirildi,  $p<0.05$  ( $p=0.012$ ) olduğundan gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi. Ardından yapılan Mann-Whitney U testi sonucuna göre KD ile K ( $p=0.025$ ), KD ile KD+S ( $p=0.016$ ), KD ile KD+LKS ( $p=0.006$ ) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi.

**Tablo 8.** Gruplar arası istatistiksel TBARS ölçüm değerleri

|                                                                                                                 | TBARS ( $\mu\text{mol/L}$ ) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| KONTROL (K)                                                                                                     | 6,13 (1,45) <sup>a*</sup>   |
| KIKIRDAK DEFEKTİ (KD)                                                                                           | 6,51 (1,07)                 |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+SPONGOSTAN (KD+S)                                                                              | 5,86 (0,97) <sup>a*</sup>   |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+L-KARNİTİN EMDİRİLMİŞ SPONGOSTAN (KD+LKS)                                                      | 5,50 (1,42) <sup>a*</sup>   |
| *: $p<0,05$<br>a: Kıkırdak Defekti oluşturulan grup ile kıyaslandığında<br>Kruskal Wallis, Mann Whitney U testi |                             |

**Tablo 9.**Gruplar arası istatiksel TBARS ölçüm grafiği



#### 4.1.2. GSH (Toplam Tiylol Grubu)

Yapılan istatiksel analiz sonucunda verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendi ( $p>0.05$ ). Kontrol, KD, KD+S ve KD+LKS gruplarının sonuçları ANOVA testine göre değerlendirildi,  $p<0.05$  ( $p=0.000$ ) olduğundan gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi. Ardından yapılan Bonferroni testi sonucuna göre KD ile K ( $p=0.015$ ), KD ile KD+S ( $p=0.045$ ) ve KD ile KD+LKS ( $p=0.000$ ) arasında anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi.

**Tablo 10.**Gruplarda ölçülen toplam tiyol grubu grafiği

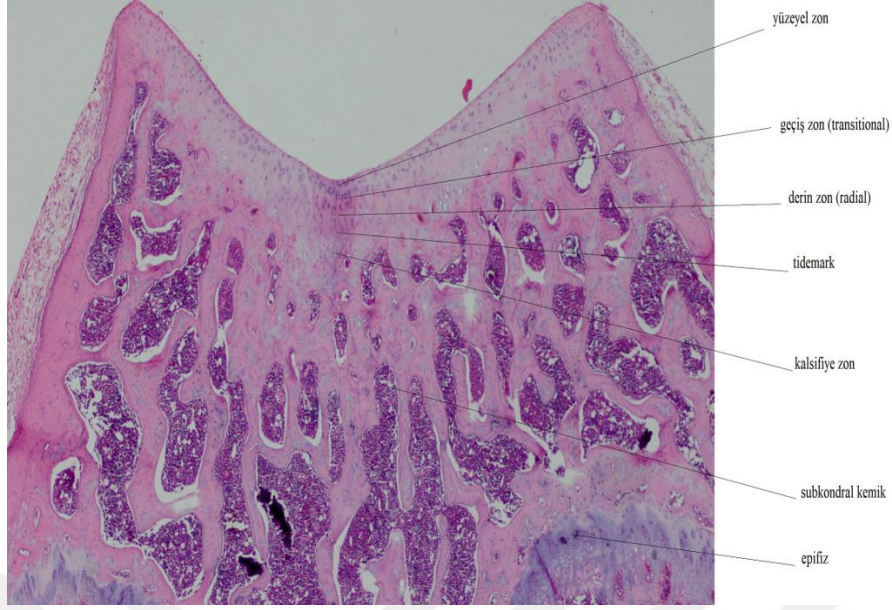


**Tablo 11.**Toplam tiyol grubu istatistik sonuçları

|                                                                                                 | TOPLAM TİYOL GRUBU (μmol/ml) |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| KONTROL (K)                                                                                     | 432±79 <sup>a*</sup>         |
| KIKIRDAK DEFEKTİ (KD)                                                                           | 294±68                       |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+SPONGOSTAN (KD+S)                                                              | 413±37 <sup>a*</sup>         |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+L-KARNİTİN EMDİRİLMİŞ SPONGOSTAN (KD+LKS)                                      | 495±81 <sup>a*</sup>         |
| *: p<0,05<br>a: Kıkırdak Defekti oluşturulan grup ile kıyaslandığında<br>ANOVA, Bonferroni test |                              |

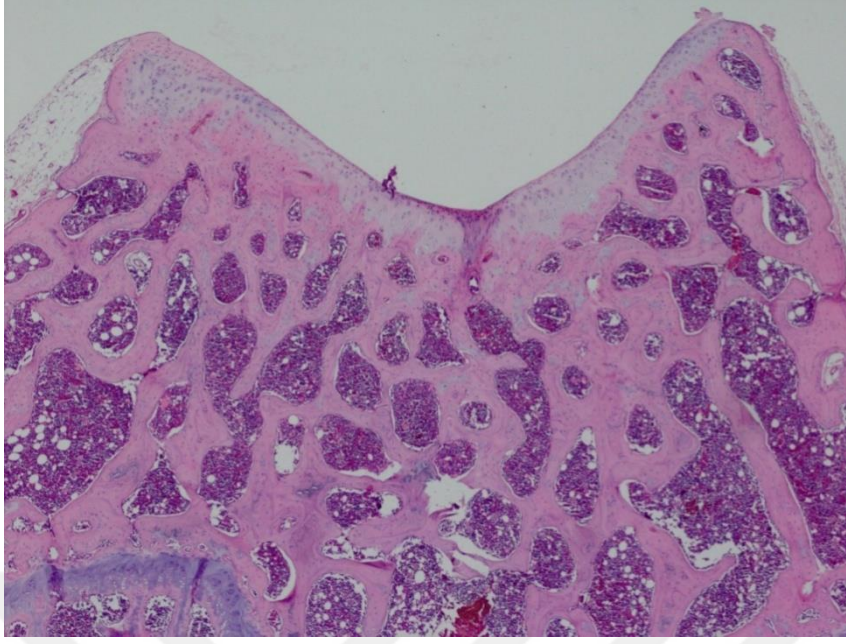
#### 4.2. Histopatolojik bulgular

Diz eklemi kıkırdak dokusuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde kontrol grubundaki normal yapıda olan hiyalin kıkırdak dokusu görülmektedir.

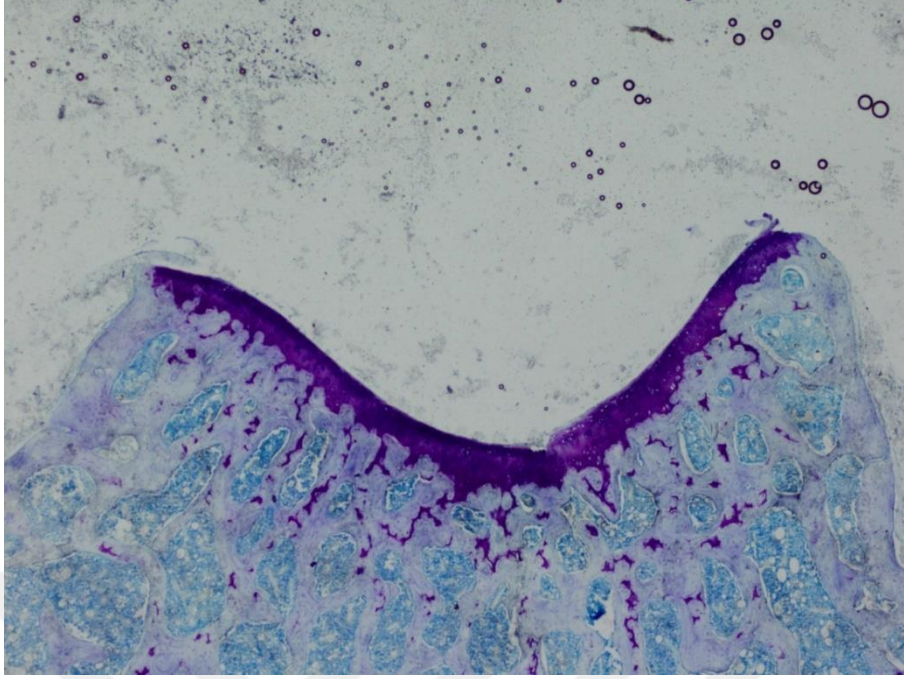


**Şekil 15.**Grup 1 deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&Estain)

Normal yapıdaki hyalin kıkırdak dokusunun yüzeysel bölgesinde disk şeklinde, geçiş bölgesinde yuvarlak şekilli ve derin bölgesinde ise dikey şekilli kondrositler görülmektedir, derin ve kalsifiye bölgesinin sınırı ise tidemark olarak gösterilmiştir (Şekil 15).

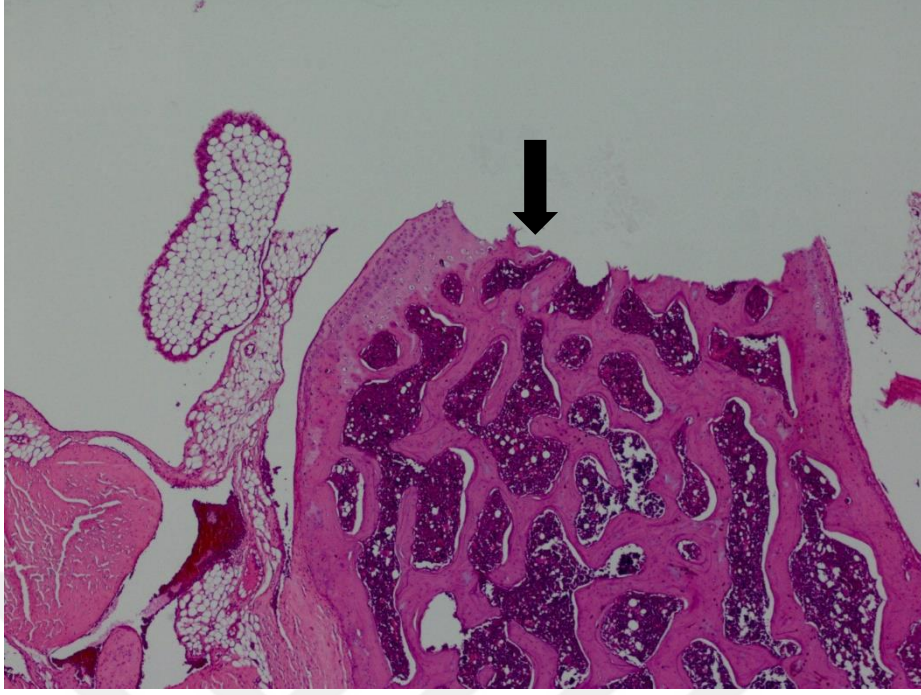


**Şekil 16.**Grup 1 deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&Estain)

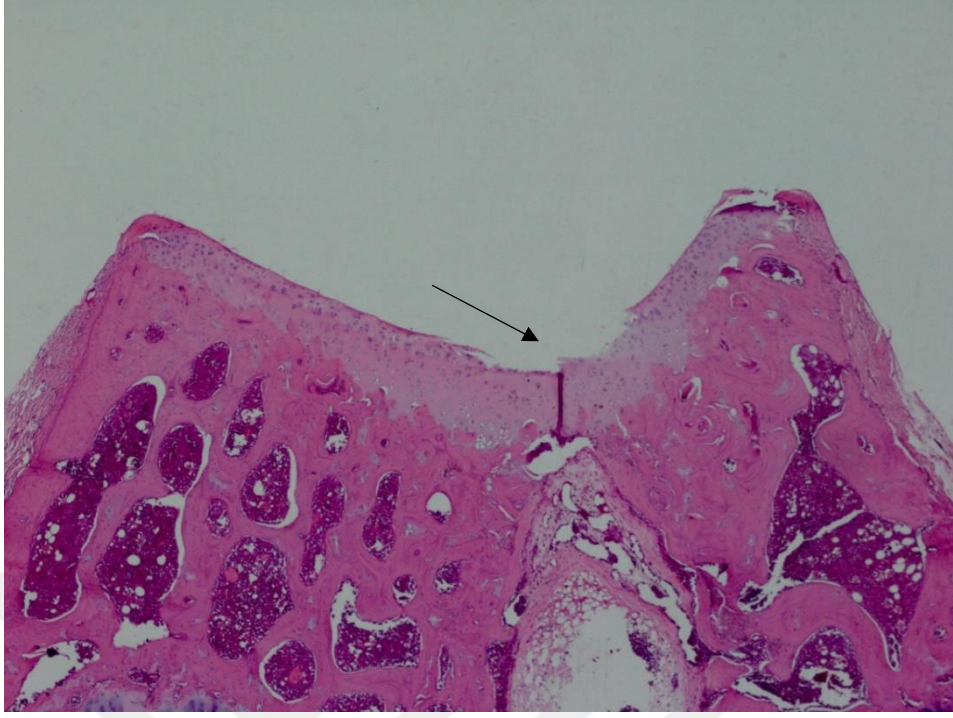


**Şekil 17.**Grup 1 deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toluidin blue stain)

Hasar verilen deneklerde kıkırdak yapısının, tümten disorganize, proteoglikan boyanmasının neredeyse hiç olmadığını ve hücresellüğün subkondral kemiğe kadar ortadan kalktığı görülmektedir (Şekil 18).

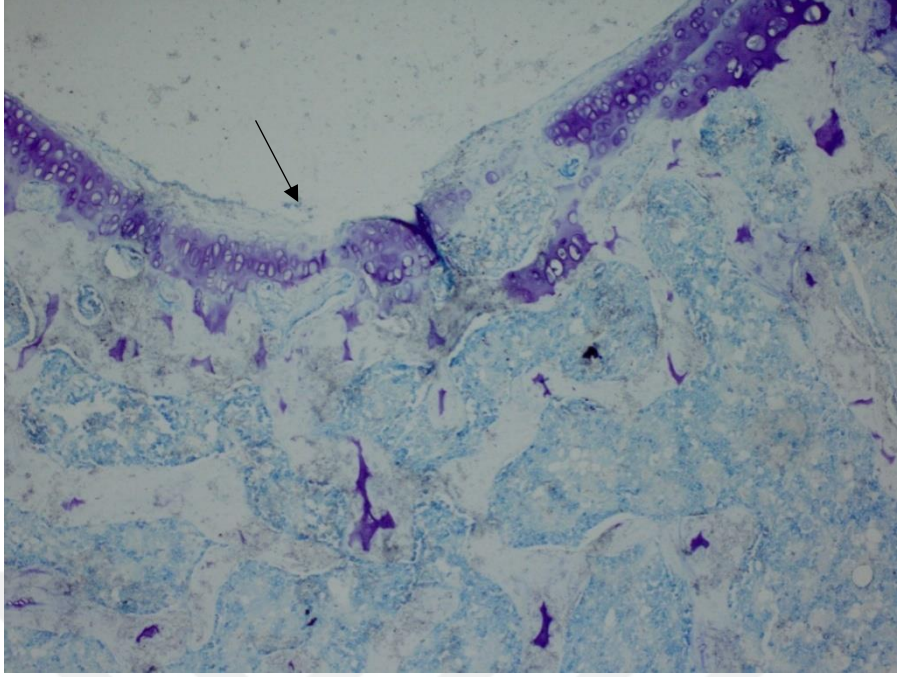


**Şekil 18.**Grup 2 deki kontrollü kırıldak hasarı uygulanan sıçan femoral kondilinin hiyalin kırıldak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&Estain)



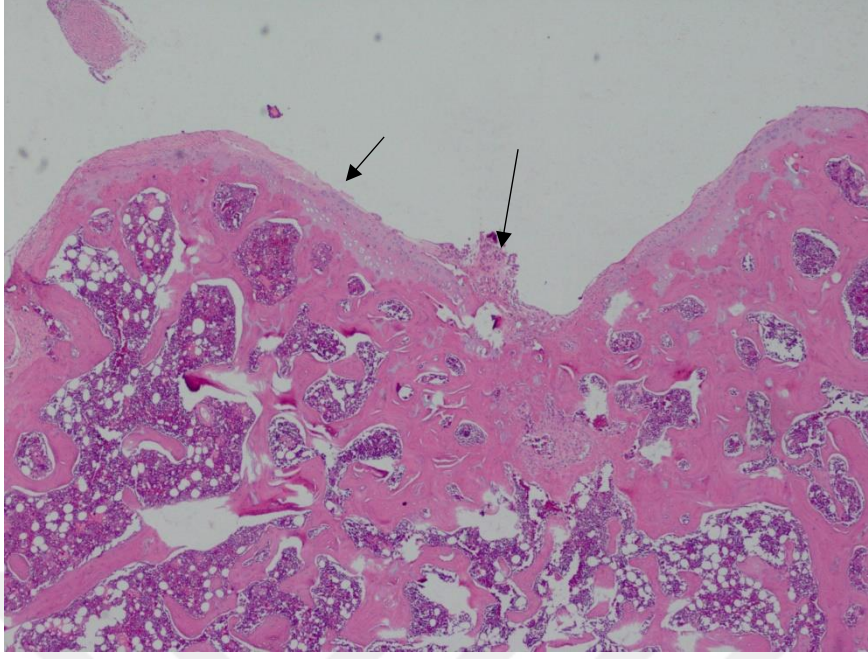
**Şekil 19.**Grup 2 deki kontrollü kırıldak hasarı uygulanan sıçan femoral kondilinin hiyalin kırıldak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain)

Azalmış hücresellik, derin zona ulaşmış yarık, orta derecede azalmış proteoglikan boyanması görülmektedir (Şekil 19).

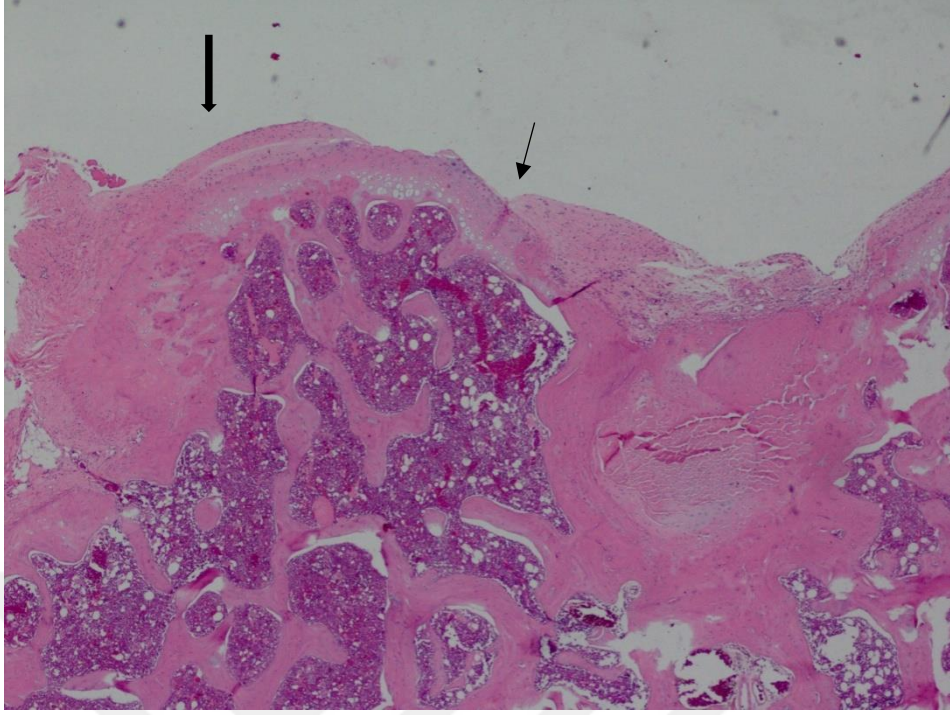


**Şekil 20.**Grup 2 deki kontrollü kıkırdak hasarı uygulanan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toluidin blue stain)

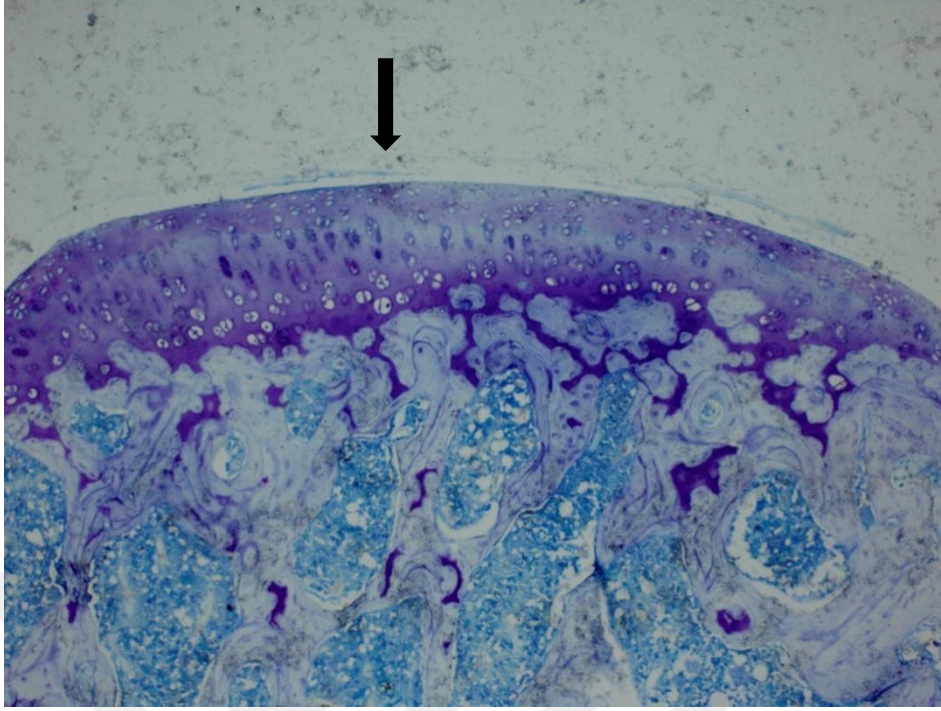
Kıkırdak hasarı verip iyileşme için spongostan kullandığımız gruptaki sıçanların femur troklea kıkırdak dokusunun histopatolojik incelenmesinde; orta derecede yapısal iyileşmenin olduğu, sınır integritesinin yer yer intakt olduğunu, proteoglikan boyanmasının hafif-orta derecede azaldığını ve çoğunlukla diffüz hiperselülaritede hücresellik olduğunu görmekteyiz (Şekil 21).



**Şekil 21.**Grup 3 teki kontrollü kırıldak hasarı verilerek, defekte spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçan femoral kondilinin hiyalin kırıldak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain)



**Şekil 22.**Grup 3 teki kontrollü kırıldak hasarı verilerek defekte spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçan femoral kondilinin hiyalin kırıldak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain)

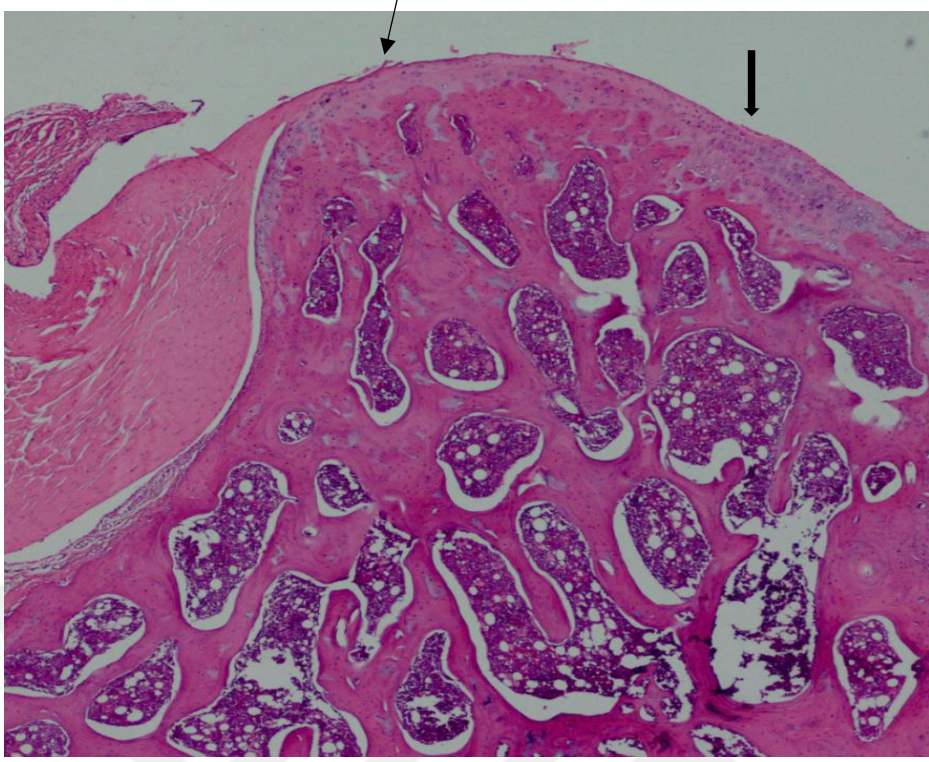


**Şekil 23.**Grup 3 teki kontrollü kıkırdak hasarı verilerek defekte spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toulidine blue stain)

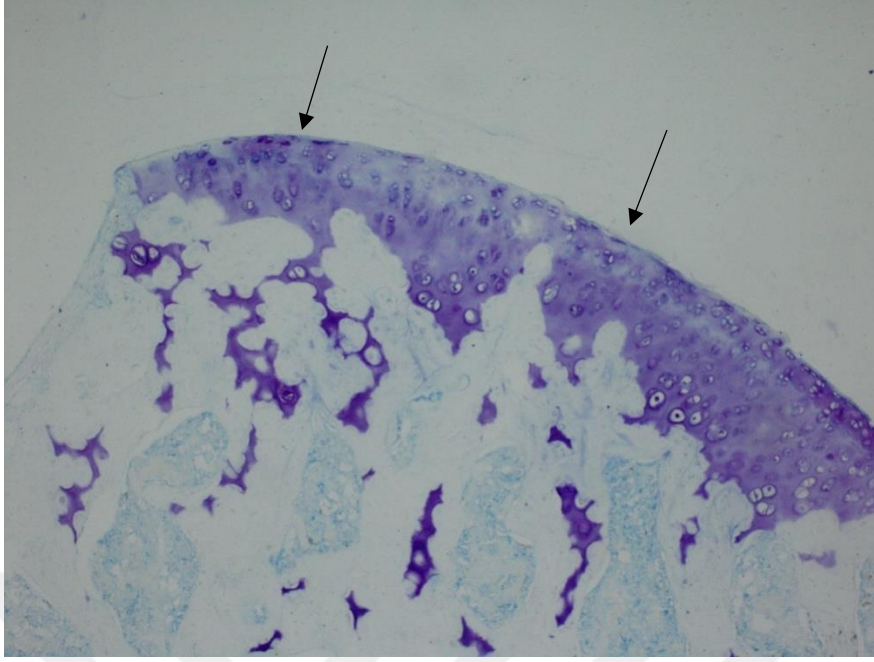
Kıkırdak hasarı meydana getirip L-karnitin emdirilmiş spongostan uyguladığımız gruptaki kesitlerde; kıkırdak yapısının normale yakın iyileştiğini, sınır integritesinin tamamen intakt olduğunu, proteoglikan boyanmasının hafif azaldığını ve hücresellik ise normal veya hiperselülaritede olduğunu görmekteyiz (Şekil 24-25).



**Şekil 24.**Grup 4 teki kontrollü kıkırdak hasarı verilerek defekte L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçanın femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain)



**Şekil 25.** Grup 4 teki kontrollü kıkırdak hasarı verilerek defekte L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçanın femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain)

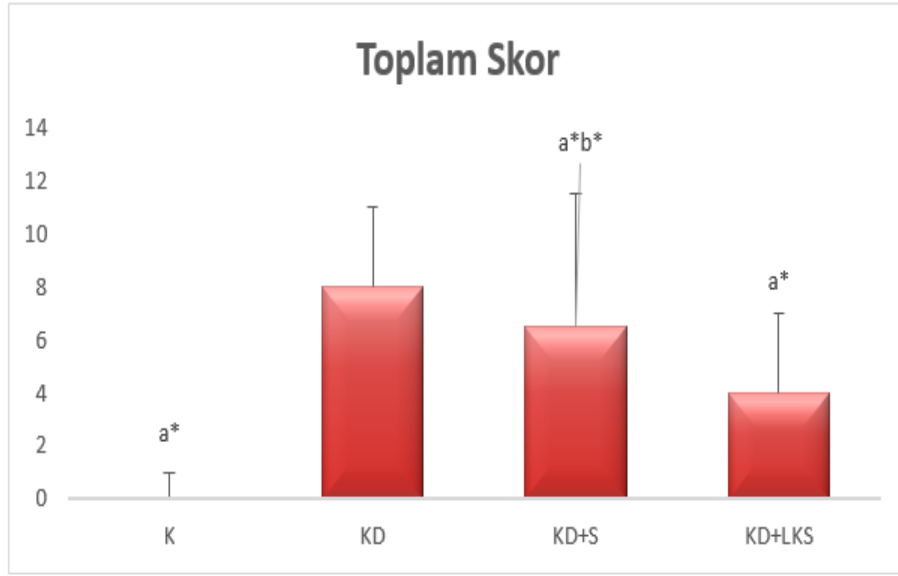


**Şekil 26.** Grup 4 teki kontrollü kırıkta hasarı verilerek defekte L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulandıktan 6 hafta sonraki sıçanın femoral kondilinin hiyalin kırıkta dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toulidine blue stain)

#### **4.3. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Analiz Sonuçları**

**Toplam Skor için;** yapılan istatistiksel analiz sonucunda verilerin normal dağılıma uymadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ). K, KD, KD+S ve KD+LKS gruplarının sonuçları Kruskal wallis testine göre değerlendirildi,  $p < 0,05$  ( $p = 0,000$ ) olduğundan gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi. Ardından yapılan Mann-Whitney U testi sonucuna göre KD ile KD+S ( $p = 0,043$ ), KD+LKS ( $p = 0,003$ ) ve K ( $p = 0,001$ ) arasında, K ile KD+S ( $p = 0,00$ ) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi.

**Tablo 12.**Toplam skor istatistiksel sonuçlarının grafiği



**Tablo 13.**Toplam skor istatistiksel sonuçları

|                                                            | TOPLAM SKOR             |
|------------------------------------------------------------|-------------------------|
| KONTROL (K)                                                | 0 (1) <sup>a*</sup>     |
| KIKIRDAK DEFEKTİ (KD)                                      | 8 (3)                   |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+SPONGOSTAN (KD+S)                         | 6,5 (5) <sup>a*b*</sup> |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+L-KARNİTİN EMDİRİLMİŞ SPONGOSTAN (KD+LKS) | 4 (3) <sup>a*</sup>     |

\*: p<0,05

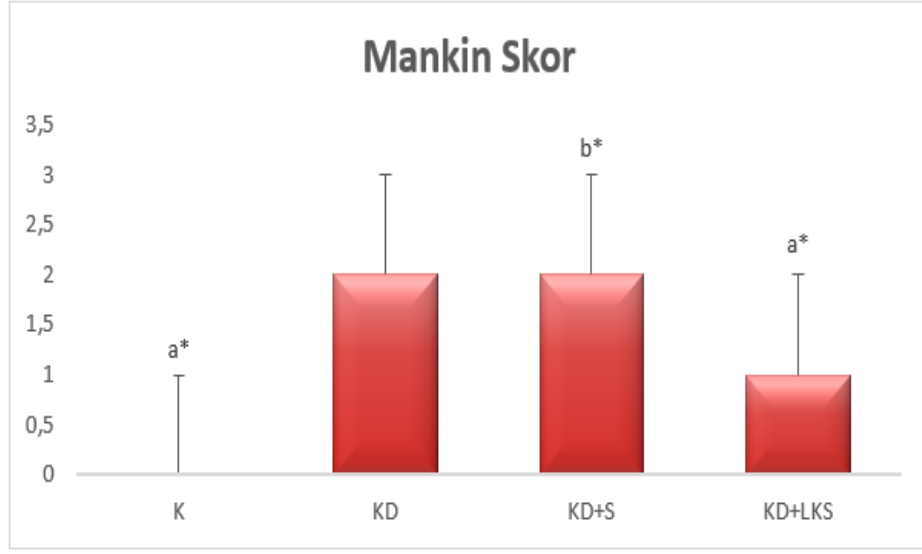
a: Kıkırdak Defekti oluşturulan grup ile kıyaslandığında

b: Kontrol grubu ile kıyaslandığında

Kruskal Wallis, Mann Whitney U testi

**Mankin Skor için;** yapılan istatistiksel analiz sonucunda verilerin normal dağılıma uymadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). K, KD, KD+S ve KD+LKS gruplarının sonuçları Kruskal wallis testine göre değerlendirildi,  $p<0,05$  ( $p=0,000$ ) olduğundan gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi. Ardından yapılan Mann-Whitney U testi sonucuna göre KD ile KD+LKS ( $p=0,005$ ) ve K ( $p=0,000$ ) arasında, K ile KD+S ( $p=0,001$ ) arasında anlamlı bir fark olduğu belirlendi.

**Tablo 14.**Mankin skor istatistiksel sonuçlarının grafiğı



**Tablo 15.**Mankin skor istatistiksel sonuçları

|                                                            | TOPLAM SKOR         |
|------------------------------------------------------------|---------------------|
| KONTROL (K)                                                | 0 (1) <sup>a*</sup> |
| KIKIRDAK DEFEKTİ (KD)                                      | 2 (1)               |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+SPONGOSTAN (KD+S)                         | 2 (1) <sup>b*</sup> |
| KIKIRDAK DEFEKTİ+L-KARNİTİN EMDİRİLMİŞ SPONGOSTAN (KD+LKS) | 1 (1) <sup>a*</sup> |
| *: p<0,05                                                  |                     |
| a: Kıkırdak Defekti oluşturulan grup ile kıyaslandığında   |                     |
| b: Kontrol grubu ile kıyaslandığında                       |                     |
| <u>Kruskal Wallis, Mann Whitney U testi</u>                |                     |

Yapılan Mann-Whitney U testi sonucuna göre KD+S ile KD+LKS (p=0.153) (p>0.05) arasında toplam skor için yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

Yapılan Mann-Whitney U testi sonucuna göre KD+S ile KD+LKS (p=0.263) (p>0.05) arasında mankin skor için yapılan istatistiksel analizde anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.

## 5. TARTIŞMA

Eklem kıkırdığının iyileşme potansiyeli zayıftır. Kıkırdaktaki travmatik veya dejeneratif kaynaklı bu hasarlar onarılamadığında kaçınılmaz bir son olarak osteoartrit tablosu ile karşılaşmaktayız. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde osteoartrit tedavisinin maliyeti 2001 yılında 60 milyar doların üzerinde olduğu tahmin ediliyor (90). Osteoartritin yüksek klinik ve finansal yükü, bilim insanlarını ve klinisyenleri eklem kıkırdığının onarımını ve yenilenmesini iyileştirmek için yeni stratejiler araştırmaya yönlendirmektedir. Kıkırdak yaralanması ve dejenerasyonuna ek olarak, ileri yaş, kadın cinsiyeti, obezite daha yüksek osteoartrit insidansı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (91). Travmanın, osteoartritin yaklaşık % 12'sini oluşturduğu ve erken hastalığın önemli bir nedeni olduğu bildirilmektedir (92). Kondral defektler semptomatik dizde sık görülür ve zamanla osteoartrite ilerler (93). Fokal kıkırdak yaralanmalarının tedavisinde klinik ilgi yenilenmiştir. Son 20 yılda, fokal kondral defektleri iyileştirmek için yöntemler geliştirmeye odaklanan yeni kıkırdak dokusu mühendisliği alanını içerecek şekilde kıkırdak onarımı ve rejenerasyonu ile ilgili

çalışmalarda hızlı ve büyük bir artış da ortaya çıkmıştır. Bu tür tedavileri klinik uygulamaya sokarken, in vitro deneyler ve insan klinik çalışmaları arasındaki boşluğu kapatmak için in vivo hayvan çalışmaları esastır (94). Fokal defekt oluşumu, eklem destabilizasyonu veya kondrotoksik ajanların enjeksiyonu dahil olmak üzere eklem kıkırdağının doğrudan yaralanması, hayvan modellerinde kıkırdak kaybını ve osteoartriti indüklemek için yaygın bir yöntemdir (95-98).

Kıkırdak hasarlarının kalıcı tedavisinin belirlenmesi klinisyenler ve hastalar açısından çok önemlidir. Bu nedenle, çalışmamızda anti oksidan ve anti-inflamatuar etkinliği olan L-karnitin ve kıkırdağın yapısında yüksek oranda kollajen bulunduğundan iyileşme döneminde içeriğindeki kollajenden faydalanmak için spongostan kullandık. Bu maddelerin kıkırdak iyileşmesi üzerine biyokimyasal ve histopatolojik etkilerini araştırdık. Literatür incelememizde benzer çalışma ile karşılaşmadık. Çalışmamız alanında öncüdür.

Subkondral plakadaki yüzeysel defektler fibrokartilaj ile sınırlı derecede iyileşse de kıkırdak kendi kendini onarma için çok az kapasiteye sahiptir (99). Subkondral fibrokartilajın mekanik özellikleri normal eklem hiyalin kıkırdağından daha düşüktür ve yaralı eklemler sürekli artritik dejenerasyona yatkındır (100). Mevcut kıkırdak rejenerasyon tedavileri, otolog kondrosit transplantasyonu (101-105) ve subkondral drilllemenin (106-108) yanı sıra karbon plakların (109), periosteumun (110) ve perikondriumun (111) yerleştirilmesini içerir. Bununla birlikte, başarı oranları büyük ölçüde değişmektedir ve çoğu yöntemin sınırlı klinik kullanımı vardır. Rejenere kıkırdağın yapısal, kimyasal ve mekanik özellikleri normal kıkırdak ile aynı değildir (112) ve birden fazla denemeden sonra bile rejenere doku komşu dokuya bağlanmaz (113). Yeni kıkırdak, tedavi edilmemiş defektlerdeki iyileşme dokusuna benzer şekilde 1 yıl sonra dejeneratif değişikliklere uğrar (114). Bu nedenle, çoğu onarım yöntemi kıkırdağı tedavi edilmemiş osteokondral defektlerin doğal onarımı ile elde edilenden daha fazla iyileştiremez.

Eklem kıkırdağının yaralanması sonrası dönemde iyileşme sürecinin desteklenmesi çok önemlidir. Bunun yanında iyileşme sürecini olumsuz etkileyen faktörlerin belirlenmesi de ayrı bir önem arz etmektedir.

Hayvan modelleri, fokal eklem kıkırdak defektlerinin yeni deneysel stratejilerini ve rekonstrüktif cerrahi tedavilerini test etmede önemli bir rol oynamaktadır (115). Fareler, sıçanlar, tavşanlar, keçiler, koyunlar, mini domuzlar ve atlar eklem kıkırdağı defektleri ve iyileşmesi açısından iyi modellerdir (116-118). Bu hayvan modelleri, in vitro çalışmalar ile

insandaki klinik deneyler arasındaki boşluğu kapatmaktadır. Çalışmanın kapsamına bağlı olarak, belirli araştırma soruları için farklı hayvan modelleri daha uygundur (119,120). Ayrıca, seçtiğimiz hayvanın doku özelliklerinin insan dokusuyla benzerlik taşıması gerekir. Sıçan ve insan genleri karşılaştırıldığında yüksek oranda aynı olduğu görülmüştür (121). Dış ortama çabuk uyum gösterebilmesi, kolay elde edilmesi, kıkırdak hasarı oluşturulmasının ve değişik tedavi yöntemlerinin belli koşullarda uygulanmasının nispeten kolay olması da seçimimizde etkili olmuştur. Genel olarak, maliyet hayvan büyüklüğü ile orantılı olarak artar. Bu nedenle, çoğu araştırmacı, kavram kanıtını göstermek için kemirgenler ve tavşanlar gibi daha küçük modeller üzerinde ilk deneyler yapar (122). Çalışmamızda da bu sebeplerden dolayı sıçanlar tercih edildi. İyileşme potansiyelleri yaşla birlikte giderek azalacağı için genç sıçanlar tercih edilmiştir. Ameliyat sonrası tüm sıçanlara kısıtlama uygulanmadan serbest harekete izin verdik.

Aynı yaş ve ağırlıkta rat seçimine ve aynı şartlar altında bakım ve beslenmelerine dikkat edilerek iyileşme potansiyeli tüm kıkırdaklar için aynı seviyeye getirildi.

Sıçanların altı haftalık takibi süresince yapılan gözlemlerde yeme ve suya ulaşımında herhangi bir sorun yaşanmadı. Tüm sıçanlar her iki ayak üzerine kalkarak yeme ulaşabildi. Cerrahi olarak kapatılan cilt insizyonlarında da rüptür izlenmedi.

Çalışma planlanırken hayvan uygulamalarında eklem kıkırdak dejenerasyonu ve hasarı oluşturmanın birden fazla yönteminin olduğu görülmüştür. Bu yöntemleri kimyasal ve mekanik olarak ikiye ayırabiliriz. Biz kıkırdakta kimyasal yol ile hasar oluşturmanın uyguladığımız spongostan ve L-karnitin ile etkileşime girebileceğini düşündük. Bu yüzden mekanik hasar mekanizmasını tercih ettik.

L-karnitin ve spongostanın ayrı ayrı veya birlikte eklem kıkırdağı hasarı tedavisinde, fokal olarak kullanımındaki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde karşılaşılmamıştır. Bu nedenle çalışmamız özgündür.

Çalışmanın tüm aşamalarında tüm sıçanlara standart uygulama yaparak elde ettiğimiz sonuçların objektifliğine katkı sağladık.

Sıçanlardan alınan kan örneklerinin biyokimyasal değerlendirmesinde TBARS ve tiyol gruplarının ölçümü yapılarak oksidatif stres seviyeleri ölçümü yapılmıştır. TBARS, lipid peroksidasyonu yan ürünü olup oksidatif hasarın ölçümünde kullanılmaktadır (123).

Tiyol grupları ise yüksek oranda antioksidan etkinliğe sahip moleküllerdir. Tiyollerin en bilinen örneği ise glutatyondur (124).

L-karnitinin anti-inflamatuar ve anti-oksidan etkinliğinin olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (125). Deney gruplarımızda yapılan TBARS ölçümünde en düşük oran L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan grupta ortaya çıkmıştır. En yüksek oran beklenildiği gibi sadece kıkırdak defekti yapılan grupta ortaya çıkmıştır. Bu sonuç L-karnitinin antioksidan mekanizma ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Diğer ölçülen biyokimyasal parametremiz olan toplam tiyol grubu ölçümümüzde ise en yüksek oran L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan grupta tespit edilmiştir. Bu oran kontrol grubundakine göre daha yüksek ölçülmüştür. Bu sonuçlar, L-karnitinin antioksidan etkinliğine uygun olarak bulunmuştur (125).

Sıçanların sakrifikasyonu sonrası elde edilen kıkırdakların histopatolojik değerlendirmesinde Mankin sınıflaması kullanılmıştır (126). Bu sınıflamada hasar skorlamasında yapı, tidemark/sınır integritesi, proteoglikan boyanması ve hücresellik kriterleri değerlendirilmiştir.

Grupları kıkırdağın histopatolojik yapısı açısından karşılaştırdığımızda en az skorun cerrahi geçirmeyen grupta olduğu görülmektedir. En yüksek skor ise sadece kıkırdak defekti yapılan grupta görülmektedir. Sadece spongostan uygulanan grupta L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan gruba göre yapı skoru daha yüksektir. Kıkırdak dokusunun histopatolojik yapısındaki katmanlarda sadece spongostan ve L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan gruplarda tama yakın iyileşme meydana geldiğini görmekteyiz.

Gruplar arasında karşılaştırılan diğer parametre ise sınır integritesi (bütünlüğü) dir. Bu skor sıfır ve bir puan olmak üzere iki adet kriterden oluşmaktadır. Cerrahi geçirmeyen gruptaki sıçanların tümünde bu skor sıfır olarak gösterilmiştir. Sadece kıkırdak hasarı oluşturulan gruptaki sıçanların neredeyse tamamında bu skor bir puan olarak gösterilmiştir. Sadece spongostan uygulanan grupta, L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan gruba göre bu skor daha yüksektir.

Gruplar arasında karşılaştırılan diğer parametre ise proteoglikan boyanmasıdır. Proteoglikan boyanması skoru en düşük cerrahi geçirmeyen grupta görülürken en yüksek skor ise sadece kıkırdak defekti oluşturulan grupta görülmüştür. L-karnitin emdirilmiş

spongostan uygulanan grupta ise, sadece spongostan uygulanan gruba göre daha düşük skor gösterilmiştir.

Gruplarda son olarak kıyaslanan parametre hücreselliktir. Hücresellik skorunun en yüksek olduğu grup sadece kırıkta hasarı oluşturulan grup olarak gösterilmiştir. En düşük skor ise cerrahi uygulanmayan grupta gösterilmiştir. L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan gruptaki hücresellik skoru sadece spongostan uygulanan gruptakinden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu skora bize spongostanın ve L-karnitininkondrojenезisi indüklediğini göstermektedir.

Bu sonuçlara bakarak spongostan ve L-karnitin kırıkta iyileşmesinde olumlu katkı yaptığı görülmektedir. Histopatolojik mankin skorlamasına göre kontrollü kırıkta defekti oluşturarak sadece spongostan ve L-karnitin emdirilmiş spongostan uyguladığımız gruplarda sadece kırıkta hasarı oluşturduğumuz gruba göre anlamlı bir iyileşme görülmektedir. Yine mankin skorlamasına göre, kırıkta iyileşmesindeki en büyük etkiyi L-karnitin emdirilmiş spongostan uygulanan grupta görmekteyiz.

Yapılan bir çalışmada yeni kemik oluşumunda ve kemik mineral yoğunluğundaki en yüksek artış klinik olarak kanıtlanmış sentetik kemik materyalleri olan Nanobone ve Actifuse'akıyasla kollajen yapıda bir hemostatik ajan olmasına rağmen spongostan uygulamasında gösterilmiştir (127). Bu çalışmanın sonucuna benzer şekilde kırıkta iyileşmesi sürecine olumlu etkilerini gözlemledik.

Spongostan ve L-karnitin mekanik sonuca etkisinin belirlenmesi için bu alanda biyomekanik değerlendirme konulu çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızda kırıkta iyileşmesi çalışmalarına uygun olarak 6. hafta göz önünde bulundurulmuştur. L-karnitin ve spongostanın kırıkta dokusundaki iyileştirici etkisini göz önüne aldığımızda çalışmamızın kırıkta hasarını takiben 6 haftadan daha uzun sürecek çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Çünkü kırıkta iyileşmesi yaklaşık 6 hafta sonra fibrokırıkta ile olurken daha uzun dönemde oluşan bu iyileştirme dokusunun da başarısız olduğu gösterilmiştir (128,129).

Sonuç olarak, histopatolojik mankin skorlamasına göre spongostan ve L-karnitin kırıkta iyileşmesinde olumlu etkilerinin olduğunu ve beraber kullanıldıklarında bu etkilerinin arttığını gözlemledik. İnsan çalışmalarıyla bu olumlu etkilerin desteklenmesine ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

Kıkırdak hasarının tedavisinin günümüzde ortopedik cerrahlar için en zor klinik problemlerden biri olduğu göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızın sonuçlarının klinisyene karar vermede yardımcı olabileceğı kanaatindeyiz.



## KAYNAKLAR

1. Nakagawa Y, Muneta T, Otabe K, et al. Cartilage derived from bone marrow mesenchymal stem cells expresses lubricin in vitro and in vivo. PLoS One 2016;11(2):e0148777.
2. Ateshian GA, Warden WH, Kim JJ, et al. Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments. J Biomech 1997;30:1157–64.
3. A.J. Sophia Fox, A. Bedi, S.A. Rodeo, The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function, Sport Health 1 (2009) 461–468, <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>.
4. Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, Arnold LM, Choi H, Deyo RA, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. Arthritis Rheum 2008; 58: 26–35.
5. D.J. Huey, J.C. Hu, K.A. Athanasiou, Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive, Science 338 (80-) (2012) 917–921, <https://doi.org/10.1126/science.1222454>.
6. Alparslan L, Winalski CS, Boutin RD, Minas T. Postoperative magnetic resonance imaging of articular cartilage repair. Semin Musculoskelet Radiol 2001;5(04):345–363
7. Rehnitz C, Kupfer J, Streich NA, et al. Comparison of biochemical cartilage imaging techniques at 3 T MRI. Osteoarthritis Cartilage 2014;22(10):1732–1742
8. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. Arthroscopy 2002;18(07):730–734
9. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. Knee 2007;14(03): 177–182
10. Arøen A, Løken S, Heir S, et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. Am J Sports Med 2004;32(01): 211–215
11. Rath B, Eschweiler J, Betsch M, Gruber G. Cartilage repair of the knee joint [in German]. Orthopade 2017;46(11):919–927
12. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. Knee 2007;14(03): 177–182
13. Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. Int Orthop 2010;34(05): 621–630

14. Salzmänn GM, Niemeyer P, Hochrein A, Stoddart MJ, Angele P. Articular cartilage repair of the knee in children and adolescents. *Orthop J Sports Med* 2018;6(03):2325967118760190
15. Gersing AS, Schwaiger BJ, Wörtler K, Jungmann PM. Advanced cartilage imaging for detection of cartilage injuries and osteochondral lesions [in German]. *Radiologe* 2018;58(05):422–432
16. Weber M-A, Wünnemann F, Jungmann PM, Kuni B, Rehnitz C. Modern cartilage imaging of the ankle. *RoFo Fortschr Geb Röntgenstr Nuklearmed* 2017;189(10):945–956
17. Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekland A, Granlund OG, et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 2004; 32: 211–15.
18. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31 516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997; 13: 456–60.
19. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 2002; 18: 730–4.
20. Maquet PG, Van de Berg AJ, Simonet JC. Femorotibial weightbearing areas. Experimental determination. *J Bone Joint Surg Am* 1975; 57: 766–71.
21. Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984; 17: 377–94.
22. Verbruggen G, Cornelissen M, Almqvist KF, Wang L, Elewaut D, Broddez C, et al. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 170–9.
23. Nelson AE (2018) Osteoarthritis year in review 2017: clinical. *Osteoarthritis Cartilage* 26(3):319–325
24. Karmarkar TD, Maurer A, Parks ML et al (2017) A fresh perspective on a familiar problem: examining disparities in knee osteoarthritis using a Markov model. *Med Care* 55:993–1000
25. Schrock JB, Kraeutler MJ, Houck DA, McQueen MB, McCarty EC (2017) A cost-effectiveness analysis of surgical treatment modalities for chondral lesions of the knee: microfracture, osteochondral autograft transplantation, and autologous chondrocyte implantation. *Orthop J Sports Med* 5:2325967117704634
26. P.J. Roughley, E.R. Lee, Cartilage proteoglycans: structure and potential functions, *Microsc. Res. Tech.* 28 (1994) 385–397.

27. A.K. Williamson, A.C. Chen, K. Masuda, E.J. Thonar, R.L. Sah, Tensile mechanical properties of bovine articular cartilage: variations with growth and relationships to collagen network components, *J. Orthop. Res.* 21 (2003) 872–880.
28. R.K. Korhonen, J.S. Jurvelin, Compressive and tensile properties of articular cartilage in axial loading are modulated differently by osmotic environment, *Med. Eng. Phys.* 32 (2010) 155–160.
29. O. Bogin, M. Kvansakul, E. Rom, J. Singer, A. Yayon, E. Hohenester, Insight into Schmid metaphyseal chondrodysplasia from the crystal structure of the collagen X NC1 domain trimer, *Structure* 10 (2002) 165–173.
30. Flik, K.R.; Verma, N.; Cole, B.J.; Bach, B.R. Articular Cartilage. In *Cartilage Repair Strategies*; Williams, R.J., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2007; pp. 1–12. ISBN 978-1-59745-343-1.
31. Silver, F.H.; Bradica, G. Mechanobiology of cartilage: How do internal and external stresses affect mechanochemical transduction and elastic energy storage? *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2002, 1, 219–238.
32. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, et al. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003;11(6):421–30.
33. Cohen, N.P.; Foster, R.J.; Mow, V.C. Composition and dynamics of articular cartilage: Structure, function, and maintaining healthy state. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.* 1998, 28, 203–215.
34. Loeser, R.F. Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol.* 2014, 39, 11–16.
35. Roughley, P.J. Articular cartilage and changes in arthritis: Noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res.* 2001, 3, 342–347.
36. Duval, E.; Baugé, C.; Andriamanalijaona, R.; Bénateau, H.; Leclercq, S.; Dutoit, S.; Poulain, L.; Galéra, P.; Boumédiene, K. Molecular mechanism of hypoxia-induced chondrogenesis and its application in in vivo cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2012, 33, 6042–6051.
37. Fox, A.J.S.; Bedi, A.; Rodeo, S.A. *The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function.* Sports Health 2009.

38. Maroudas, A.; Wachtel, E.; Grushko, G.; Katz, E.P.; Weinberg, P. The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage. *Biochim. Biophys. Acta* 1991, 1073, 285–294.
39. Yanagishita, M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol. Jpn.* 1993, 43, 283–293.
40. Roughley, P.J.; Mort, J.S. The role of aggrecan in normal and osteoarthritic cartilage. *J. Exp. Orthop.* 2014, 1.
41. Anthony L. Meschner: Junqueira's Basic Histology, 14th Edition.
42. Wong, M.; Carter, D.R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: A research perspective. *Bone* 2003, 33, 1–13.
43. Quiroga, J.M.P.; Wilson, W.; Ito, K.; van Donkelaar, C.C. Relative contribution of articular cartilage's constitutive components to load support depending on strain rate. *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2017, 16, 151–158.
44. Eyre, D.R.; Weis, M.A.; Wu, J.-J. Articular cartilage collagen: An irreplaceable framework? *Eur. Cell Mater.* 2006, 12, 57–63.
45. Bhosale, A.M.; Richardson, J.B. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br. Med. Bull.* 2008, 87, 77–95.
46. Mansfield, J.C.; Peter Winlove, C. A multi-modal multiphoton investigation of microstructure in the deep zone and calcified cartilage. *J. Anat.* 2012, 220, 405–416.
47. Grogan, S.P.; Duffy, S.F.; Pauli, C.; Koziol, J.A.; Su, A.I.; D'Lima, D.D.; Lotz, M.K. Zone-specific Gene Expression Patterns in Articular Cartilage. *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 418–428. [CrossRef] [PubMed]
48. Schuurman, W.; Gawlitta, D.; Klein, T.J.; ten Hoope, W.; van Rijen, M.H.P.; Dhert, W.J.A.; van Weeren, P.R.; Malda, J. Zonal Chondrocyte Subpopulations Reacquire Zone-Specific Characteristics during in Vitro Redifferentiation. *Am. J. Sports Med.* 2009. [CrossRef] [PubMed]
49. Amanatullah, D.F.; Yamane, S.; Reddi, A.H. Distinct patterns of gene expression in the superficial, middle and deep zones of bovine articular cartilage. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2014, 8, 505–514.
50. Quinn, T.; Häuselmann, H.; Shintani, N.; Hunziker, E. Cell and Matrix Morphology in Articular Cartilage from Adult Human Knee and Ankle Joints Suggests Depth-Associated Adaptations to Biomechanical and Anatomical Roles.

51. Kuo, C.K.; Li, W.-J.; Mauck, R.L.; Tuan, R.S. Cartilage tissue engineering: Its potential and uses. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2006, 18, 64–73.
52. Huang, B.J.; Hu, J.C.; Athanasiou, K.A. Cell-based tissue engineering strategies used in the clinical repair of articular cartilage. *Biomaterials* 2016, 98, 1–22.
53. Lalan, S.; Pomerantseva, I.; Vacanti, J.P. Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J. Surg.* 2001, 25, 1458–1466.
54. Johnstone B, Alini M, Cucchiari M, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair—the state of the art. *Eur Cell Mater* 2013;25:248–67.
55. Chu CR, Szczodry M and Bruno S: Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. *Tissue Eng Part B Rev* 16: 105-115, 2010.
56. Archer C and Ralphs J: Regenerative medicine and biomaterials for the repair of connective tissues. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2010.
57. Reinholz GG, Lu L, Saris DBF, Yaszemski MJ and O’Driscoll SW: Animal models for cartilage reconstruction. *Biomaterials* 25: 1511-1521, 2004.
58. Widuchowski W, Tomaszewski W, Widuchowski J and Czamara A: Contemporary possibilities of treatment of cartilage lesions with special regard to the knee joint. *Ortop Traumatol Rehab* 13: 327-341, 2011.
59. Fox SM: Multimodal management of canine osteoarthritis. CRC Press, Taylor&Francis Group, 2nd edition, Boca Raton, 23-150, 2017.
60. S. Shortkroff, L. Barone, H.P. Hsu, C. Wrenn, T. Gagne, T. Chi, H. Breinan, T. Minas, C.B. Sledge, R. Tubo, M. Spector, Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage, *Biomaterials* 17 (1996) 147–154.
61. Pochwalski M, Urbanowska E and Wojtowicz A: Tissue engineering. Application in dentistry. Platelet rich plasma. Part I. *Nowa Stomatologia* 1-2: 17-22, 2000
62. Steinwachs MR, Guggi TH and Kreuz PC: Marrow stimulation techniques. *Injury Suppl* 1, 1: 26-31, 2008.
63. Bhosale AM and Richardson JR: Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 87: 77-95, 2008.
64. Farr J, Cole B, Dhawan A, Kercher J and Sherman S: Clinical Cartilage Restoration. Evolution and Overview. *Clin Orthop Relat Res* 469: 2696-2705, 2011.
65. Shah MR, Kaplan KM, Meislin RJ and Bosco JA: Articular Cartilage Restoration of the Knee. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65: 51-60, 2007.

66. Schepesis AA and Busconi BD: Sports Medicine; Articular cartilage injuries (chapter 30) Pylawka TK, Kang RW, Cole BJ. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 9780781756532, 418-429, 2006.
67. Shah RN, Shah NA, Del Rosario MM, Hsieh C, Nuber G and Stupp SI: Supramolecular design of self-assembling nanofibers for cartilage regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 3293- 3298, 2010.
68. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, Grontvedt T, Ludvigsen TC, Loken S, Solheim E, Strand T and Johansen O: A randomized multicenter trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture: Long-term follow-up at 14 to 15 years. *J Bone Joint Surg Am* 98: 1332-1339, 2016.
69. Kamarul T, Ab-Rahim S, Tumin M, Selvaratnam L and Ahmad TS: Preliminary study of the effects of glucosamine sulphate and Chondroitin sulphate on surgically treated and untreated focal cartilage damage. *Eur Cell Mater* 21: 259-271, 2011.
70. Tyyni A and Karlsson J: Biological treatment of joint cartilage damage. Review article. *Scand J Med Sci in Sports* 10: 249-265, 2000.
71. Chiang H and Jiang CC: Repair of articular cartilage defects: Review and perspectives. *J Formos Med Assoc* 108: 87-99, 2009.
72. Osorio, C.C.; Escobar, L.M.; Gonzalez, M.C.; Gamboa, L.F.; Chambrone, L. Evaluation of density, volume, height and rate of bone resorption of substitutes of autologous bone grafts for the repair of alveolar clefts in humans: A systematic review. *Heliyon* 2020, 6, e04646.
73. Velasco-Ortega, E.; Valente, N.A.; Iezzi, G.; Petrini, M.; Derchi, G.; Barone, A. Maxillary sinus augmentation with three different biomaterials: Histological, histomorphometric, clinical, and patient-reported outcomes from a randomized controlled trial. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2021, 23, 86–95.
74. Stumbras, A.; Januzis, G.; Gervickas, A.; Kubilius, R.; Juodzbalsys, G. Randomized and controlled clinical trial of bone healing after alveolar ridge preservation using xenografts and allografts versus plasma rich in growth factors. *J. Oral Implantol.* 2020, 46, 515–525.
75. Petersen, A.; Princ, A.; Korus, G.; Ellinghaus, A.; Leemhuis, H.; Herrera, A.; Klaumunzer, A.; Schreivogel, S.; Woloszyk, A.; Schmidt-Bleek, K.; et al. A biomaterial with a channel-like pore architecture induces endochondral healing of bone defects. *Nat. Commun.* 2018, 9, 4430.

76. Cho, K.S.; Park, C.H.; Hong, S.L.; Kim, M.J.; Kim, J.Y.; Kim, Y.W.; Koo, S.K.; Roh, H.J. Comparative analysis of Cutanplast and Spongostan nasal packing after endoscopic sinus surgery: A prospective, randomized, multicenter study. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2015, 272, 1699–1705.
77. Cegielski, M.; Izykowska, I.; Podhorska-Okolow, M.; Zabel, M.; Dziegiel, P. Development of foreign body giant cells in response to implantation of Spongostan as a scaffold for cartilage tissue engineering. *In Vivo* 2008, 22, 203–206.
78. De Concilio, B.; Vedovo, F.; Mir, M.C.; Silvestri, T.; Casarin, A.; Celia, A. Gelatin sponge (Spongostan(R)) and N-butyl-2- cyanoacrylate: Utility on percutaneous treatment of persistent urinary leakage after partial nephrectomy. Case report and review of the literature. *Arch. Ital. Urol. Androl.* 2020, 92.
79. Kos M, Staniszewska-Kus J, Matusiewicz M, Luczak K, Klempous R and Pielka S: Tissue reaction after implantation of Spongostan, as the carrier of xenogenic bone morphogenetic protein. *Experimental Study. Polim Med* 33(1-2): 25-33, 2003.
80. Paganelli C, Fontana P, Porta F, Majorana A, Pazzaglia UE and Sapelli PL: Indication of suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate. *J Oral Rehabil* 33: 625- 629, 2006.
81. Simurda, T.; Dobrotova, M.; Skornova, I.; Sokol, J.; Kubisz, P.; Stasko, J. Successful use of a highly purified plasma von Willebrand factor concentrate containing little FVIII for the long-term prophylaxis of severe (Type 3) von Willebrand's disease. *Semin. Thromb. Hemost.* 2017, 43, 639–641.
82. Arias-Gallo, J.; Chamorro-Pons, M.; Avendano, C.; Gimenez-Gallego, G. Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using spongostan and Bio-Oss as protein carriers. *J. Craniofac. Surg.* 2013, 24, 1507–1514.
83. Lin, C.Y.; Chang, Y.H.; Li, K.C.; Lu, C.H.; Sung, L.Y.; Yeh, C.L.; Lin, K.J.; Huang, S.F.; Yen, T.C.; Hu, Y.C. The use of ASCs engineered to express BMP2 or TGF-beta3 within scaffold constructs to promote calvarial bone repair. *Biomaterials* 2013, 34, 9401–9412.
84. Vordemvenne, T.; Wahnert, D.; Koettnitz, J.; Merten, M.; Fokin, N.; Becker, A.; Buker, B.; Vogel, A.; Kronenberg, D.; Stange, R.; et al. Bone regeneration: A novel osteoinductive function of Spongostan by the interplay between its nano- and microtopography. *Cells* 2020, 9, 654.

85. Rebouche CJ (2004) Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann NY Acad Sci* 1033:30–41
86. Chapela SP, Kriguer N, Ferná'ndez EH, Stella CA (2009) Involvement of L-carnitine in cellular metabolism: beyond AcylCoA transport. *Mini Rev Med Chem* 9:1518–1526
87. Chiu KM, Keller ET, Crenshaw TD, Gravenstein S (1999) Carnitine and dehydroepiandrosterone sulfate induce protein synthesis in porcine primary osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int* 6:527–533
88. Colucci S, Mori G, Vaira S, Brunetti G, Greco G, Mancini L, Simone GM, Sardelli F, Koverech A, Zallone A, Grano M (2005) L-Carnitine and isovaleryl L-carnitine fumarate positively affect human osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int* 76:458–465
89. Xie H, Tang SY, Li H, Luo XH, Yuan LQ, Wang D, Liao EY (2008) L-Carnitine protects against apoptosis of murine MC3T3- E1 osteoblastic cells. *Amino Acids* 35:419–423
90. Jackson, D.W., Simon, T.M., and Aberman, H.M. Symptomatic articular cartilage degeneration: the impact in the new millennium. *Clin Orthop Relat Res* 391 Suppl, S14, 2001.
91. John D. O'Neill, Rachel Anfang, Annabelle Anandappa, Joseph Costa, Jeffrey Javidfar, Holly M. Wobma, Gopal Singh, Donald O. Freytes, Matthew D. Bacchetta, Joshua R. Sonett, Gordana Vunjak-Novakovic. 2013. Decellularization of Human and Porcine Lung Tissues for Pulmonary Tissue Engineering. *The Annals of Thoracic Surgery* 96:3, 1046-1056.
92. Brown, T.D., Johnston, R.C., Saltzman, C.L., Marsh, J.L., and Buckwalter, J.A. Posttraumatic osteoarthritis: a first estimate of incidence, prevalence, and burden of disease. *J Orthop Trauma* 20, 739, 2006.
93. Messner, K., and Maletius, W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: a 14- year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand* 67, 165, 1996.
94. Gotterbarm, T., Breusch, S.J., Schneider, U., and Jung, M. The minipig model for experimental chondral and osteochondral defect repair in tissue engineering: retrospective analysis of 180 defects. *Lab Anim* 42, 71, 2008.

95. Niall A. Smyth, Christopher D. Murawski, Lisa A. Fortier, Brian J. Cole, John G. Kennedy. 2013. Platelet-Rich Plasma in the Pathologic Processes of Cartilage: Review of Basic Science Evidence. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 29:8, 1399-1409.
96. Jason C. Tank, Dennis S. Weiner, Robin Jacquet, Dylan Childs, Todd F. Ritzman, Walter I. Horne, Richard Steiner, Melanie A. Morscher, William J. Landis. 2013. The effects of hypothyroidism on the proximal femoral physis in miniature swine. *Journal of Orthopaedic Research* n/a-n/a.
97. Tun Yuan, Li Zhang, Kuifeng Li, Hongsong Fan, Yujiang Fan, Jie Liang, Xingdong Zhang. 2013. Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* n/a-n/a.
98. Aimee Claire Kok, Gabrielle J. M. Tuijthof, Steven Dunnen, Jasper Tiel, Michiel Siebelt, Vincent Everts, C. Niek Dijk, Gino M. M. J. Kerkhoffs. 2013. No Effect of Hole Geometry in Microfracture for Talar Osteochondral Defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*® .
99. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;(402):21–37. PMID:
100. Seol D, McCabe DJ, Choe H, Zheng H, Yu Y, Jang K, et al. Chondrogenic progenitor cells respond to cartilage injury. *Arthritis Rheum.* 2012; 64(11):3626–37. <https://doi.org/10.1002/art.34613> PMID: 22777600; PubMed Central PMCID: PMC4950521.
101. Gillogly SD, Voight M, Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998; 28(4):241–51. <https://doi.org/10.2519/jospt.1998.28.4.241> PMID: 9785259.
102. Hong HJ, Lee JS, Choi JW, Min BH, Lee HB, Kim CH. Transplantation of autologous chondrocytes seeded on a fibrin/hyaluronan composite gel into tracheal cartilage defects in rabbits: preliminary results. *Artif Organs.* 2012; 36(11):998–1006. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2012.01486.x> PMID: 22845808.
103. Kon E, Filardo G, Di Matteo B, Perdida F, Marcacci M. Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment: A systematic review. *Bone Joint Res.* 2013; 2(2):18–25. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.22.2000092> PMID: 23610698; PubMed Central PMCID: PMC3626217.

104. Peterson L. Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee. *Acta Orthop Belg.* 1996; 62 Suppl 1:196–200. PMID: 9084569.
105. Schinhan M, Gruber M, Dorotka R, Pilz M, Stelzeneder D, Chiari C, et al. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation in a compartmentalized early stage of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(1):217–25. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2012.10.006> PMID: 23085709.
106. Bouwmeester PS, Kuijer R, Homminga GN, Bulstra SK, Geesink RG. A retrospective analysis of two independent prospective cartilage repair studies: autogenous perichondrial grafting versus subchondral drilling 10 years post-surgery. *J Orthop Res.* 2002; 20(2):267–73. [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(01\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(01)00099-7) PMID: 11924645.
107. Hunt SA, Jazrawi LM, Sherman OH. Arthroscopic management of osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg.* 2002; 10(5):356–63. PMID: 12374486.
108. Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics.* 1997; 20(6):525–38. PMID: 9195635.
109. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994; 331(14):889–95. <https://doi.org/10.1056/NEJM199410063311401> PMID: 8078550.
110. Hoikka VE, Jaroma HJ, Ritsila VA. Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4- year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scand.* 1990; 61(1):36–9. PMID: 2336949.
111. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res.* 1984;(186):231–9. PMID: 6723151
112. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76(4):579–92. PMID: 8150826.
113. Komura M, Komura H, Otani Y, Kanamori Y, Iwanaka T, Hoshi K, et al. The junction between hyaline cartilage and engineered cartilage in rabbits. *Laryngoscope.* 2013; 123(6):1547–51. <https://doi.org/10.1002/lary.23269> PMID: 23553122.

114. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1993; 75(4):532–53. PMID: 8478382.
115. Hunziker EB (2009) The elusive path to cartilage regeneration. *Adv Mater* 21(32-33):3419–3424. doi:10.1002/adma.200801957
116. Hunziker EB (1999a) Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage* 7(1):15–28
117. Hunziker EB (1999b) Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop* (367 Suppl):S135–S146
118. Hunziker EB (2000) Articular cartilage repair: problems and perspectives. *Biorheology* 37(1-2):163–164
119. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP (2009) Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 17(6):705–713. doi:10.1016/j.joca.2008.11.00
120. Osterhoff G, Loffler S, Steinke H, Feja C, Josten C, Hepp P (2011) Comparative anatomical measurements of osseous structures in the ovine and human knee. *Knee* 18(2):98–103. doi:10.1016/j.knee.2010.02.001
121. Barré-Sinoussi, F. and X. Montagutelli, Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *FutureSci OA*, 2015. 1(4): p. Fso63
122. Frisbie, D.D., Cross, M.W., and McIlwraith, C.W. A comparative study of articular cartilage thickness in the stifle of animal species used in human pre-clinical studies compared to articular cartilage thickness in the human knee. *Vet Comp Orthop Traumatol* 19, 142, 2006.
123. Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM, Armstrong D. Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol*. 2001 Aug 15;154(4):348-56. doi: 10.1093/aje/154.4.348. PMID: 11495858.
124. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;66(8):1499-503. doi: 10.1016/s0006-2952(03)00504-5. PMID: 14555227.
125. Wang S, Xu J, Zheng J, Zhang X, Shao J, Zhao L, Hao J. [Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Acetyl-L-Carnitine on Atherosclerotic Rats](#). *Med Sci Monit*. 2020 Jan 16;26:e920250. doi: 10.12659/MSM.920250.PMID: 31945029

126. Isaac Oluwaseun Afara, Ph.D., Indira Prasadam, Ph.D., Hayley Moody, Ph.D., Ross Crawford, M.D., Ph.D., Yin Xiao, M.D., Ph.D., and Adekunle Oloyede, Ph.D., D.I.C. Near Infrared Spectroscopy for Rapid Determination of Mankin Score Components: A Potential Tool for Quantitative Characterization of Articular Cartilage at Surgery Arthroscopy. 2014 Sep;30(9):1146-55. doi: 10.1016/j.arthro.2014.04.097. Epub 2014 Jun 17.PMID: 24951136
127. Wähnert D, Koettnitz J, Merten M, Kronenberg D, Stange R, Greiner JFW, Kaltschmidt C, Vordemvenne T, Kaltschmidt B. Spongostan™ Leads to Increased Regeneration of a Rat Calvarial Critical Size Defect Compared to NanoBone® and Actifuse Materials (Basel). 2021 Apr 14;14(8):1961. doi: 10.3390/ma14081961.PMID: 33919825
128. Bae, D. K., Yoon, K. H. & Song, S. J. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. Arthroscopy 22, 367–374 (2006).
129. Kreuz, P. C. et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. Osteoarthritis Cartilage 14, 1119–1125 (2006).

