

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**TAVŞAN OSTEOKONDRAL DEFEKT
MODELİNDE MİKROKIRIK
LOKALİZASYONUNUN HİSTOMORFOLOJİK
ARAŞTIRILMASI**

DR.ALİ İHSAN KILIÇ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2019

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**TAVŞAN OSTEOKONDRAL DEFEKT
MODELİNDE MİKROKIRIK
LOKALİZASYONUNUN HİSTOMORFOLOJİK
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR.ALİ İHSAN KILIÇ

**DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ:
PROF. DR. MUSTAFA CAN KOŞAY**

ÖNSÖZ

Ağustos 2014'den bugüne Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda devam eden uzmanlık eğitimimde katkılarından dolayı hocalarım Prof. Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU, Prof. Dr. Haluk BERK, Prof. Dr. Halit PINAR, Prof. Dr. İzge GÜNAL, Prof. Dr. Hasan TATARİ, Prof. Dr. Mustafa ÖZKAN, Prof. Dr. Ömer AKÇALI, Prof. Dr. Vasfi KARATOSUN, Prof. Dr. Kadir BACAKOĞLU, Doç. Doç. Dr. Onur HAPA, Dr. Mehmet ERDURAN, Doç. Dr. Ahmet KARAKAŞLI, Doç. Dr. Safa SATOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Onur BAŞÇI ve Uzm. Dr. Onur GÜRSAN'a;

Tezimin hazırlanmasında değerli bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Mustafa Can KOŞAY 'a çok teşekkür ederim.

Tezimin her noktasında desteklerini esirgemeyen, histolojik değerlendirmeleri gerçekleştiren Öğr. Gör. Pınar AKOKAY VE Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR'e, elektron mikroskobu ile analizleri için İYTE Malzeme Araştırma Merkezine, Aylin KARA'yave tezimin istatistik hesaplamalarını yürüten Doç. Dr. Ferhan ELMALI'ya teşekkür ederim.

Beş yıl boyunca birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum arkadaştan öte olan tüm asistan abilerim ve kardeşlerime, servis ve ameliyathanedeki hemşire, personel ve teknisyen arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen ve bu günlere gelmemde en büyük paya sahip olan sevgili annem ve babam Gülpaşa - Mahmut KILIÇ' a, kardeşim Abdulkadir KILIÇ'a ,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ali İhsan KILIÇ

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. EKLEM KIKIRDAĞININ YAPISI	7
2.1.1. Eklem Kıkırdığı	7
2.1.2. Eklem Kıkırdığının Histolojisi.....	7
2.1.2.1 Eklem Kıkırdak Tabakaları	8
2.1.2.2 Eklem Kıkırdak Matriksi Katmanları	10
2.1.2.3 Kondrositler	11
2.1.2.4 Ekstrasellüler Matriks	12
2.1.3. Eklem Kıkırdığının Biyomekaniği.....	15
2.2. EKLEM KIKIRDAK HASARI.....	17
2.2.1. Eklem Kıkırdığı Yaralanmaları ve Kıkırdak Onarımı	17
2.2.2. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Değerlendirilmesi ve Sınıflandırılmaları	19
2.2.2.1. Klinik (Artroskopik) Sınıflamalar	20
2.2.2.2. Histolojik Sınıflamalar	22
2.2.3 EKLEM KIKIRDAK HASARINDA TEDAVİ SEÇENEKLERİ	25
2.2.3.1. Artroskopik Debridman ve Lavaj	25
2.2.3.2. Kemik İliği Stimulasyon Teknikleri	26
2.2.3.5. Kıkırdak Doku Biyomühendisliği	31
3. GEREÇLER YÖNTEM	32

3.1. Deney Hayvanları Ve Gruplandırma	32
3.2. Anestezi Ve Cerrahi İşlem.....	33
3.4. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu.....	38
3.4. Makroskopik Değerlendirme	38
3.5. Mikroskopik Değerlendirme.....	39
3.6.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme	42
3.7. İstatistiksel Analiz Yöntemi	43
4. BULGULAR	44
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	67
7. KAYNAKÇA.....	68

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: ICRS Makroskopik Kıkırdak Tamir Değerlendirilmesi	22
Tablo 2: Modifiye O'Driscoll Histolojik Kıkırdak Tamir Skorlaması.....	23
Tablo 3: Deney Hayvanlarını Gruplandırma ve Uygulanan İşlemler	32
Tablo 4: Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı Ortalamasının gruplara göre dağılımı.....	44
Tablo 5: Gruplar arası Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı ortalamasının Tukey HSD testi ile karşılaştırılması.....	44
Tablo 6: ICRS skoru ortalamasının gruplara göre dağılımı	45
Tablo 7: Gruplar arası ICRS skoru ortancasının Tukey HSD testi ile karşılaştırılması.....	45
Tablo 8: İncelenen parametrelerin sağlıklı gruptaki değerleri	48
Tablo 9: Modifiye O'Driscoll skoru ortalamasının gruplara göre dağılımı	49
Tablo 10: Gruplar arası Modifiye ODriscoll skoru ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması	49
Tablo 11: Komşu Kıkırdağa Tutunma ortancası ve ortalamasının gruplara göre dağılımı.....	50
Tablo 12: Gruplar arası Komşu Kıkırdağa Tutunma ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması	50
Tablo 13: Komşu Kıkırdak ile Mesafe ortancası ve ortalamasının gruplara göre dağılımı	51
Tablo 14: Gruplar arası Komşu Kıkırdak ile Mesafe ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması	51
Tablo 15: Tip-I kollejen ortancasının gruplara göre dağılımı	54
Tablo 16: Gruplar arası Tip-I kollejen ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması	54
Tablo 17: Tip 2 kollejen ortancasının gruplara göre dağılımı.....	55
Tablo 18: Gruplar arası Tip 2 kollejen ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması.....	56
Tablo 19: Agregan ortancasının gruplara göre dağılımı	56
Tablo 20: Gruplar arası Agregan ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması	57
Tablo 21: Araştırma gruplarına göre incelenen parametrelerden ortalama/ ortancası istatistiksel olarak önemli bulunanların dağılımı	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Eklem kıkırdak dokusunun histolojik katmanlarının şematik gösterimi	10
Şekil 2: Eklem kıkırdak matriks katmanlarının şematik gösterimi	11
Şekil 3: Eklem kıkırdağının kompresif yükler altında, kıkırdağın laterale genişlemesi ve "tidemark"ta oluşan makaslama kuvvetleri	16
Şekil 4: Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Eklem Kıkırdak Yaralanmaları Evreleme Sistemi (https://cartilage.org)	21
Şekil 5: Eklem kıkırdak defektine bir subkondral kemik delicisi ile mikrokırık işlemi uygulanması	27
Şekil 6: Eklem kıkırdak defektinin osteokondral allogreftte uygun şekilde temizlenerek allogreftin yerleştirilmesi	28
Şekil 7: Eklem kıkırdak defektine mozaikplasti uygulaması	29
Şekil 8: Eklem kıkırdak defektine laboratuvar ortamında hazırlanmış kıkırdak hücre kültürü süspansiyonunun uygulanması	30
Şekil 9: Cerrahi işlem basamakları. Steril şartlar altında anterior longitudinal insizyonla cilt ve ciltaltının geçilerek, eklem kapsülüne ulaşılması ve eklem medial parapatellar yaklaşımla açılıp patellanın laterale deviye edilerek eklem ortaya çıkarılması (soldan sağa).	33
Şekil 10: Osteokondral defekt oluşturmak için kullanılan 5 mm çapındaki ucu düz matkap ucu ve mikrokırık işlemi için kullanılan 0,9 mm çapındaki alet(biz/awl) (solda). Mikrokırık için kullanılan aletin 3 mm derinliğinin cetvel yardımıyla işaretlenmesi (ortada). Oluşturulan defekt çapının cetvel yardımıyla kontrol edilmesi (sağda).	34
Şekil 11: Deney hayvanlarına uygulanan işlemlerin şematik gösterimi	35
Şekil 12: Deney hayvanlarına uygulanan işlemlerin şematik gösterimi (sagittal planda)	36
Şekil 13: Tavşan femur patellar oluşuna daha önceden hazırlanmış drill ile osteokondral defekt oluşturulması ve mikrokırık işlemi	36
Şekil 14: İşlem uygulanan grupların tavşan dizlerinde gösterimi (soldan sağa: sadece defektin gösterimi, santralden mikrokırık işlemi, saat 12 hizasında mikrokırık işlemi, saat 12 ve 6 hizasından mikrokırık işlemi).....	37
Şekil 15: İşlem sonrası eklem kapsülü ve fasya emilebilir sütürlerle (Vicryl 4/0), cilt ise primer olarak yine emilebilir sütürler (Vicryl 2/0) ile usulüne uygun kapatıldı.	37
Şekil 16: Tavşan dizlerindeki defekt sahasının ne kadarlık kısmının tamir dokusu ile dolduğunun dijital ortamda bilgisayar yazılımı (Image J version 1.46, National Institute of Health, Bethesda, MD) ile kantitatif hesaplanması.....	39

Şekil 17: Yeni oluşan kırık dokusunun komşu kırık ile arasındaki mesafenin ölçümü (Image Tool version 3.0, UTHSCSA).....	42
Şekil 18: Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi için hazırlanmış dokular	43
Şekil 19: Tavşan diz osteokondral defekt modelinde elde edilen kesitlerin histokimyasal boyalarına ait histolojik görüntüler.	47
Şekil 20: Tavşan diz osteokondral defekt modelinde elde edilen kesitlerin immünohistokimyasal boyalarına ait histolojik görüntüler.....	53
Şekil 21: Tamir dokusu ile sağlam kırık doku arasındaki bölgenin üstten görünümü.	58
Şekil 22: Cerrahi işlemden 8 hafta sonrasında tamir dokusunun iç yandan görünümü.	59



KISALTMALAR

ESM: Ekstraselüler matriks

PG: Proteoglikan

rER: Ribozomal endoplazmik retikulum

GAG: Glukozaminoglikan

TGF: Transforme edici büyüme faktörü

TNF: Tümör nekroz faktörü

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

DNA: Deoksiribonükleik asit

IL: İnterlökin

RA: Romatoid artrit

MRG: Manyetik rezonans görüntüleme

ICRS: Uluslararası Kıkırdak Tamir Cemiyeti

IU: Uluslararası ünite

kg: Kilogram

HE: Hematoksilen & Eosin

MT: Masson trikrom

Agr: Agregan

SFR: Safranin O

Tip I K: Tip 1 kollajen

Tip II K: Tip 2 kollajen

mm: Milimetre

µm: Mikrometre

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

ÖZET

Tavşan Osteokondral Defekt Modelinde Mikrokırık Lokalizasyonunun Histomorfolojik Araştırılması

Dr. Ali İhsan KILIÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Balçova –İZMİR

Giriş: Eklem kıkırdağı, kanlanması ve iyileşme potansiyeli iyi olmayan bir dokudur. Kıkırdak defektlerinde mikrokırık en sık kullanılan yöntemdir. Mikrokırık cerrahisinde, subkondral kemiğe rastgele delikler açılmaktadır. Bu deliklerin konumlarının defekt ile olan ilişkisinin, iyileşmeye etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmamızda tavşan diz osteokondral defekt modelinde farklı mikrokırık lokalizasyonlarının, iyileşme üzerine etkisini histomorfolojik açıdan araştırmayı amaçladık.

Gereç – Yöntem: Çalışmamızda 29 adet erişkin Yeni Zelanda tavşanı 5 gruba ayrıldı. 24 adet tavşanın sağ dizinin patellar oluğuna 5 mm çapında ve 3 mm derinliğinde kıkırdak defekti oluşturuldu. Grup 1'e (defekt kontrol) sadece defekt oluşturuldu (n=6). Grup 2'de (periferik tek) oluşturulan defektin saat 12 hizasından bir adet mikrokırık işlemi uygulandı (n=6). Grup 3'te (santral) aynı boyutlarda defekt oluşturularak defektin santralinden bir adet mikrokırık işlemi uygulandı (n=6). Grup 4'te (periferik çift) oluşturulan defektin saat 12 ve 6 hizasından birer adet mikrokırık işlemi uygulandı (n=6). Defekt oluşturulmayan ve cerrahi uygulanmayan beş adet tavşan Grup 5 (sağlıklı kontrol) grubuna ayrıldı (n=5). Deney hayvanları 8 hafta sonunda kurban edilerek; kıkırdak iyileşmesi, makroskopik, histolojik, immünohistokimyasal ve SEM analizi ile değerlendirildi.

Bulgular: Periferik çift (Grup 4) grubunda tüm parametrelerde (makroskopik, histolojik ve immünohistokimyasal parametreler) diğer gruplara kıyasla daha iyi kıkırdak iyileşmesi gözlemlendi ($P<0,05$). Periferik çift (Grup 4) mikrokırık uygulanan grupta ortalama defekt sahasının %79'unda, periferik tek (grup 2) grubunda defekt sahasının %73'ünde, santral (Grup 3) grubunda defekt sahasının %56'sında ve kontrol (Grup 1) grubunda defekt sahasının %45'inde tamir dokusu izlenmiştir. ICRS skoru (makroskopik iyileşme değerlendirmesi) periferik tek (Grup 2) grubunda, santral (Grup 3) ve kontrol (Grup 1) grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Tip II Kollajen ve Agregan immünreaktivitesi, santral grupta (Grup 3), periferik tek (grup 2) ve kontrol (Grup 1) grubuna göre anlamlı olarak daha güçlü bulundu ($P<0,05$).

Sonuç: Bu çalışmada, defektin periferik sınırından yapılan mikrokırık işleminin defekt bölgesini doldurmada daha iyi olduğunu tespit ettik. Bu çalışmamız, mikrokırık sahasından salınan pluripotent hücrelerin sağlam kıkırdak ile etkileşiminin, onarım dokusunun kalitesini önemli ölçüde arttırdığını gösterdi.

Anahtar Kelimeler:*Osteokondral Defekt, Mikrokırık, Kemik İliği Stimülasyonu, Kıkırdak Tamiri, Hayvan Modeli*



ABSTRACT

Histomorphological Investigation of Microfracture Localization in Rabbit Osteochondral Defect Model

Ali İhsan KILIÇ, MD,
Department of Orthopaedics,
Dokuz Eylul University Hospital 35340,
Balcova, Izmir, Turkey

Introduction: Joint cartilage, is a tissue with poor blood supply and healing potential. Microfracture is the most commonly applied method of treatment in cartilage defects of the knee. In microfracture surgery, the holes are randomly drilled into the subchondral bone. The location of the holes relative to the defect site and its effect on cartilage healing is still unknown. In this study, we aimed to investigate the effect of different fracture localizations on cartilage healing, in the rabbit knee osteochondral defect model from a histomorphological perspective

Methods: In this study, 29 adult New Zealand rabbits were divided into 5 groups. Cartilage defects with a diameter of 5 mm and a depth of 3 mm were created in the patellar groove of 24 rabbits. In Group 1 (defect control) only the defect was created (n = 6). In Group 2 (peripheral single), 1 microfracture was performed at 12 o'clock of the defect (n = 6). In Group 3 (central), a micro-fracture procedure was performed at the central of the defect (n = 6). In group 4 (peripheral double), one fracture was performed at 12 and 6 o'clock of the defect (n = 6). Five rabbits with no defects and no surgery were divided into Group 5 (healthy control) group (n = 5). The animals were sacrificed after 8 weeks; cartilage healing was evaluated by macroscopic, histological, immunohistochemical and SEM analysis.

Results: In the peripheral couple (Group 4) group, better cartilage healing was observed in all parameters (macroscopic, histological and immunohistochemical parameters) compared to the other groups ($P < 0.05$). While %79 of the defect area was filled with repair tissue in the peripheral double (group 4) group; 73% of the defect area in the peripheral single (Group 2) group, 56% of the defect area in the central (Group 3) group and 45% of the defect area of control (Group 1) group was filled with repair tissue, respectively. The ICRS score (macroscopic cartilage healing assessment) was significantly higher in the peripheral single (Group 2) group compared to the central (Group 3) and the control (Group 1) group. Type □ Collagen and Aggregate immunoreactivity were significantly stronger in the central group (Group 3) than the peripheral single (group 2) and control (Group 1) group ($P < 0.05$).

Conclusion: In this study, we found that the microfracture performed at the peripheral margin of the defect was better at filling the defect site. This study proved, that the interaction of the pluripotent cells, released from the microfracture site, with the intact cartilage significantly enhanced the quality of the repair tissue.

Keywords:*Osteochondral Defect, Microfracture, Bone marrow stimulation, Chondral Repair, Animal Model*



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağı, deforme edici kuvvetlere karşı direnç gösteren, eklemlerin kemik yüzeylerini kaplayan, pürüzsüz, kaygan ve dayanıklı bir dokudur(1) . Kompleks bir yapıda olan eklem kıkırdağında hücrelerin hacimsel oranı % 1-2 arasında olup, neredeyse asellüler kabul edilir ve kan, lenf damarları ve sinirleri yoktur.Kıkırdak dokusunun hasarında iyileşme, hyalen kıkırdak yerine fibröz kıkırdağa benzer şekilde olmakta ve bu tamir dokusu hyalen kıkırdağa göre biyomekanik olarak daha az dirençli ve çok kısa dayanıklılık göstermektedir.Bu biyolojik nedenlerden dolayı tedavi edilmeyenkıkırdak dokudaki minor yaralanmalar bile genellikle tamir edilemeyip ağrı, hareketkısıtlılığı ve sonunda osteoartrite neden olarak kişinin hayatını olumsuz yönde etkilemektedir(2-4).

Eklem kıkırdağının iyileşme kapasitesini1743 yılında Hunter(5) "Bir kere bozulunca bir daha onarılamadığını" belirtmiştir. Hunter'dan günümüze; eklem kıkırdağına bakış oldukça değişmiş ve eklem kıkırdağının biyoloji, patofizyoloji ve biyomekaniği konusundaki bilgilerimiz özellikle son çeyrek asırda oldukça artmıştır(6-8).

Kanlanma ve iyileşme potansiyeli iyi olmayan bu dokunun onarımına yardımcı yöntemler, klinik ve deneysel olarak birçok çalışmanın konusu olmuştur. Bunlardan; eklem debridmanı, otojen periost greftleri ile onarım, otolog kondrosit transplantasyonu, mikrokırık oluşturulması, sitokinlerin etkilerinin azaltılması, osteokondral otogreft-allogreftler, demineralize kemik matriksi ve büyüme faktörleri uygulamaları gibi yöntemler birçok çalışmada araştırılmıştır(6). Diğer tedavi yöntemleri ile karşılaştırıldığında tedavi maliyeti, düşük morbidite, kolay uygulanabilir olması ve minimal invaziv bir yöntem olması nedeniyle günümüzde klinik uygulamada en fazla kullanılan yöntem hala mikrokırık yöntemidir(9,10).

Mikrokırık endikasyonlarına baktığımızda 2 cm² den küçük, unikompartmantal, grade 3-4 kıkırdak defektlerine uygulanmaktadır. Kondral defekt sahasına 2-3 mm aralıklar ile subkondral kemiği delmek suretiyle uygulanır(11,12). Mikrokırık cerrahisinin amacı subkondral kemikte oluşturulan perforasyonlar ile kemik iliğindeki pluripotent hücrelerin defekt sahasına girmesi ve defekt bölgesinde ilerleyen süreçte fibrokartilaj bir iyileşme sağlamasıdır(12). Subkondral bölgenin perforasyon teknikleri üzerine literatürde;defekt sahasına açılan perforasyon sayısının, subkondral perforasyonda kullanılan aletlerin tipinin, perforasyonun derinliğinin, subkondral perforatör aletin genişliğinin kıkırdak iyileşmesi üzerine etkilerinin çalışmaları literatürde bulunmaktadır(13-16). Ancak mikrokırık cerrahisinde defekt sahasına uygulanan perforasyonların lokalizasyon farklılıklarının kıkırdak iyileşmesi üzerine etkisi hakkında çalışma bulunmamaktadır.

Mikrokırık cerrahisinde, subkondral kemiğe rastgele biçimde delikler açılmaktadır. Bu deliklerin konumlarının defekt ile olan ilişkisinin, iyileşmeye olan etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmamızda tavşan diz osteokondral defekt modelinde farklı mikrokırık lokalizasyonlarının, iyileşme üzerine etkisini histomorfolojik açıdan araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. EKLEM KIKIRDAĞININ YAPISI

2.1.1. Eklem Kıkırdağı

İnsan vücudunda üç tip kıkırdak vardır: Fibröz kıkırdak, elastik kıkırdak ve hiyalin kıkırdak. İnsan vücudunda, sinovyal eklemlerin (diartrozlar) yüzeylerini örten kıkırdak,Hiyalin Kıkırdak tipidir. Sinovyal olmayan (sinartrozlar) eklemlerde de eklem yüzeyini kıkırdak dokusu kaplayabilir. Sinovyal olmayan eklemler kendi aralarında fibröz ve kartilajenöz olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Kartilajenöz sinartrozlarda eklemleşen kemik yüzeyler eklem bulunduğu yere ve oluşum biçimine göre fibröz kıkırdak veya hiyalin kıkırdaklakaplı olabilir. Sinartrozlarda, sinovyal eklemlerdeki gibi çok yönlü eklem hareketkabiliyetine sahip değildir(17).

Eklem kıkırdağı 1-7 milimetre kalınlığında olmasına rağmen, kendine has yapısı sayesinde eklem yüzeylerinde kayganlaştırma, aşınmaya dayanıklılık ve şok emilimi gibi kıkırdak fonksiyonlarını yerine getirilebilir.Bu sayede kıkırdak dokusu, kişinin ömrü boyunca milyonlarca kez tekrar eden çok yönlüyüklenmelere maruz kalmasına rağmen bütünlüğünü koruyabilir.Kıkırdak dokusu, mekanik olarak zor durumlar altında ve metabolik aktivitesidüşük bir şekilde yaşamasına rağmen, bu şartlara dayanıklılık gösterme ve fonksiyonlarını yerine getirme kabiliyeti çok gelişmiştir. Kıkırdak dokunun tek bir hücre hücrel birleşeni olan kondrositin düşük metabolik aktivitesi temel olarak kıkırdak doku matriksin devamlılığının devam ettirmeyi amaçlarken, dokuda oluşan bir hasarın tamiri için genellikle yetersiz kalmaktadır. Kıkırdak yapının karmaşık organizasyonunda meydana gelen yaralanmalar genellikle tamir edilemeyip, kişide değişik seviyelerde kas iskelet morbiditelerine yol açabilmektedir(18).

2.1.2. Eklem Kıkırdağının Histolojisi

Sinovyal (diartroidal) eklemlerin kıkırdak dokusu özelleşmiş bir hiyalin kıkırdaktır. Eklem kıkırdağının kalınlığı 1 ile 7 mm arasında değişmektedir. Eklem kıkırdağı karakteristik olarak; konveks eklem yüzeylerinde yüzeyin orta bölgesinde, konkav yüzeylerde ise eklem yüzeyinin periferinde daha kalındır. Diğer kıkırdak dokulardan farklı olarak, eklem kıkırdağı fibröz yapıda bir perikondrium tabakası ile çevrelenmemiştir. Histolojik olarak bu yapıyı, ekstrasellüler matriks (ESM) ile kondrositler oluşturur. Eklem kıkırdağında damar yapısı, lenfatik sistem yapısı veya sinirler yoktur. ESM'i temel olarak su, proteoglikanlar (PG), kollajen (esas olarak tip 2) ve çok daha az miktarlarda diğer protein ve glikoproteinler

oluşturur. Kollajen lifleri, eklem kıkırdağında gerilme kuvvetlerine karşı dayanıklılığını sağlarken; PG molekülleri sıkışmaya karşı direncini sağlar (18–20).

Eklem kıkırdağının yapısı; yüzeyel tabaka (tanjansiyel), geçiş tabakası (transitional zone), derin tabaka (radial \ orta tabaka) ve kalsifiye tabaka olmak üzere dört ayrı tabaka şeklinde incelenir(18,19,21). Herbir tabakadaki ESM ise: perisellüler bölge, teritoryal bölge ve interteritoryal bölge şeklinde üç bölgeye ayrılır (18).Eklem kıkırdak tabakaları ve ESM'in bölgeleri yapısal ve fonksiyonel olarak birbirlerinden farklılıklar göstermelerine karşın; birbirleri arasındakısınırlar çok belirgin değildir (21). Yüzeyel tabakada kondrositler ve kollajen lifleri eklem yüzeyine paralel şekilde dizilmişlerken, derine doğru hem hücreler hem de kollajen lifleri eklem yüzeyine göre dikleşerek dizilim göstermeye başlarlar ve derin tabakada kondrositler yüzeye göre tam dik şekilde kolonlar oluşturarak organize olurlar(18,19). Yüzeyel tabakada kondrositler elipse benzer şekilde iken alt tabakalarda daha yuvarlak şekillidirler(18).

2.1.2.1 Eklem Kıkırdak Tabakaları

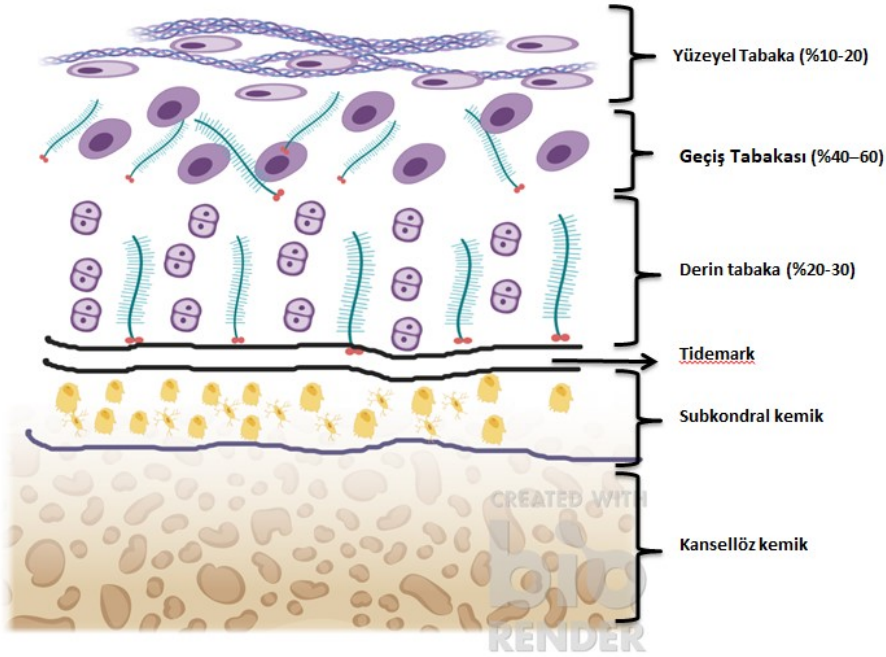
Yüzeyel Tabaka (Tanjansiyel) : Eklem yüzeyini oluşturan kıkırdağın üst tabakasıdır. Yaklaşık 0,2- 0,5 mm kalınlığındır ve tüm eklem kıkırdak kalınlığının %10-20'sini oluşturur. Yüzeyel tabaka iki ayrı tabakadan meydana gelir. En üstte, eklem kaygan yüzü üzerinde yer alan lamina splendens, fibriller ve çok az miktarda PG içeren ancak hücre barındırmayan bir katmandır. Bu katmanın altında ise kollajen lifleri ve oval şekilli kondrositler yüzeye paralel dizilmişlerdir (18,19,21). Bu tabaka PG konsantrasyonu en az, PG agregatları en küçük, su miktarı ve fibronektin konsantrasyonu ise en fazla olan kıkırdak tabakasıdır. Bu tabakadaki kondrositler; PG'ları daha hızlı bir şekilde yıkarken, kollajen ve PG'ları daha az sentezlediği ortaya koyulmuştur. Yüzeyel tabaka kollajen liflerinin yüzeye paralel bir diziliş yapısı sergilemesi, bu takaya germe ve makaslama kuvvetlerine karşı dayanıklılığıs sağlar. Ayrıca alttaki tabakaların sıkıştırıcı güçlere karşı olan dayanıklılıklarına da katkı sağlar. Bu tabakanın kıkırdak dokudan uzaklaştırılması dokunun geçirgenliğini arttırarak dokunun kompresyon kuvvetlerine karşı dayanıklılığını azaltır. Yüzeyel tabaka aynı zamanda sinovyal sıvı ile matriksin derinlikleri arasında bir bariyer görevi de yaparak, kıkırdak dokusunun bağışıklık sisteminden izole edilmesini ve eklem içindeki zararlı maddelerden korunmasını sağlar(21).

Geçiş Tabakası (Transizyonel) : Bu tabaka eklem kıkırdak kalınlığının %40–60'ını oluşturur ve tabakadaki kollajen lifleri, daha az organize şekilde olup düzensiz bir biçimde dizilmişlerdir. Geçiş tabakasındaki kondrositler, yüzeyel tabakadakilere göre biraz daha

büyük ve yuvarlak görünümündedir. Bu tabakada kondrositler tek başlarına bulunabilecekleri gibi hücre grupları olarak da bulunabilirler(18,19). Mikroskopik incelemede, bu tabakadaki kondrositler daha fazla endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı içerdikleri için metabolik olarak daha aktif hücrelerdir. ESM’te ise yüzeyel tabakaseviyesine göre daha çok PG varken, su içeriği azalmıştır (21).

Derin tabaka (radial /orta tabaka) : PG yoğunluğu en fazla olan ve su içeriği en az olan kıkırdak tabakası derin tabakadır. Kıkırdak kalınlığının yaklaşık %30’unu meydana getirir. Eklem yüzeyine dik olacak şekilde organize olmuş kalın kollajen lifleri içerir. Kondrositler ise yuvarlak şekilli olup eklem yüzeyine dik kolonlar şeklinde dizilmişlerdir (1,17,22).

En alt tabaka (kalsifiye): Eklem kıkırdak dokusundaki en alt tabakadır. Bu tabakayı derin tabakadan ayıran içeriği tam olarak aydınlatılamamış tidemark denilen bir yapı bulunmaktadır. Derin tabakadaki kollajen lifler, tidemarkın içine doğru uzanır. Yaşın ilerlemesi ile birlikte kıkırdak kalınlığı azalarak tidemarkın yüzeye yaklaşmasına neden olur, böylece derindeki kalsifiye kıkırdak doku kemik dokusuyla yer değiştirir. Kalsifiye tabaka, üstündeki hiyalin kıkırdağı altındaki subkondral kemik dokusuna bağlayarak kıkırdak ile kemik arasında bir geçiş noktası oluşturur. Bu tabaka, besin maddelerinin subkondral kemikten kıkırdağa geçişine engel olarak kıkırdağın yalnızca sinovyal sıvıdan beslenmesini sağlar. En alt tabakadaki kıkırdak hücreleri, üst tabakalardaki hücrelere göre boyutları çok daha küçüktür ve çok az miktarda endoplazmik retikulum ve golgi aygıtı içerir. Bu hücreler bazı bölgelerde tamamen kalsifiye matriks ile çevrelenmiş olup, metabolizmaları da çok yavaştır(18,21) (Şekil 1).



Şekil 1: Eklem kıkırdak dokusunun histolojik katmanlarının şematik gösterimi

2.1.2.2 Eklem Kıkırdak Matriksi Katmanları

Eklem kıkırdak, aynı eklem içinde ve eklemler arasında içerik bakımından farklılık göstermekle birlikte aynı temel bileşenlerden meydana gelir. Yetişkin eklem kıkırdakının matriksi, kıkırdakta gerilim mukaveti veren ve kollagen fibrillerden meydana gelen yoğun bir ağdan, suyu emme ve bırakma yeteneği ile kıkırdakta basınç direnci sağlayan PG kafesinden ve bu iki yapının arasında yer alan diğer proteinlerden meydana gelen özel bir yapıdır. Matriksin tabakalara göre değişen yapısı, doku sıvısı ile etkileşimini belirleyerek kıkırdakın mekanik özelliklerini ortaya çıkarır (23,24).

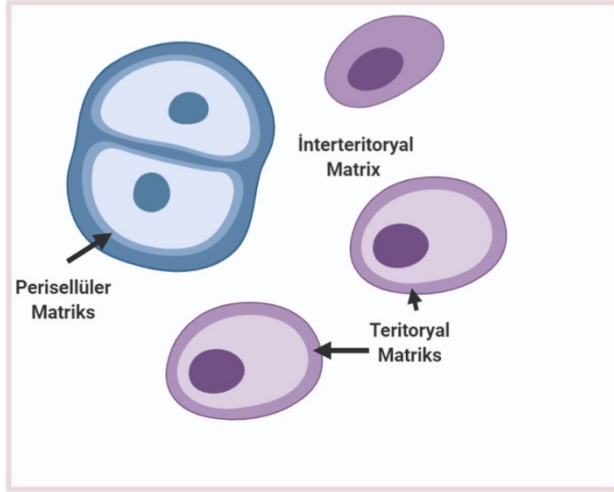
Matriksin düzeni ve içeriği, kondrositlerden uzaklığına göre değişkenlik gösterir. Perisellüler matriks, teritoryal matriks ve interteritoryal matriks olmak üzere ESM 3 bölgeye ayrılır (Şekil 2).

Perisellüler matriks: Kondrositin çevresini sararak ince bir tabaka oluşturan bölgedir ve hücrenin çevresi ile sinyal iletimini düzenleyen bölgedir. Bu bölgede PG'lar, ankorin CII gibi kollajen dışı proteinler ve tip VI kollajen varken ilginç bir şekilde bu bölgede fibriller halinde kollajen yok denecek kadar azdır. Kondrositlerin sitoplazmik uzantıları perisellüler matriks boyunca uzanarak teritoryal matrikse ulaşır (25,26).

Teritoryal matriks: Perisellüler matriksi çevreleyen, kollajen lifler içeren ve yük altında kondrosite mekanik destek veren bölgedir. Kondrosit (veya kondrositler) ile çevresindeki perisellüler matriks ve teritoryal matrikse kondron adı verilir. Teritoryal matriks, bazı tabakalarda birden çok kondrosit ve perisellüler matriksi çevrelerken, derin

tabakalara doğru kondrositlerin oluşturduğu kolonları çevreler. Teritoryal matriksin hücreye yakın yerlerinde kollajen lifleri perisellüler matrikse tutunurken, daha uzak bölgelerde fibriller birbirleri ile çaprazlaşarak hücreyi dışarıdan çevreleyerek koruyan bir nevi örgüden bir sepet oluştururlar. Bu bölgedeki kollajen fibrillerinin kalınlığı çevresinde arttığında ve birbirlerine daha paralel bir dizilim göstermeye başladıklarında interteritoryal matrikse geçiş başlar; ancak bu geçiş çok keskin bir sınırla kendisini belli etmez(20,27,28).

İnterteritoryal matriks: ESM'in en büyük bölgesidir ve ESM'e mekanik özellikler kazandırır. PG'ların ve kalın kollajen liflerin çoğunluğu bu bölgede yer alır. Kıkırdak tabakalarında daha önce belirtilen, kollajen liflerinin değişik doğrultuda dizilmesi bu tabakada olmaktadır. Böylece interteritoryal matriks, değişik kıkırdak tabakalarında değişik organizasyon gösterir ve bu da her bir kıkırdak tabakasının farklı biyomekanik özellikte olmasına yol açar(18)(21)(28).



Şekil 2: Eklem kıkırdak matriks katmanlarının şematik gösterimi

2.1.2.3 Kondrositler

Kondrositler, erişkin eklem kıkırdağının toplam hacminin %1-2'sini oluşturmaktadır(29). Kondrositler eklem kıkırdağının değişik katmanlarında değişik sayı ve morfolojik özellikte bulunabilen, tümü matriks sentezleyebilecek organellere sahip hücrelerdir. Kondrositler ve ekstraselüler matriks arasındaki bu dayanışma dokunun yaşam bütünlüğünü korumasını sağlar. Ayrıca bu matriks uyarı iletkeni görevi görür ve bu sayede mekanik yüklenme ile oluşan sinyalleri kondrositlere ulaştırır. Embriyonal hayatın altıncı haftasında mezenkimal hücreler, perikondrium kanallarının genişlemiş alanlarında kıkırdak öncü hücreleri halinde görülmeye başlar. Bu öncü hücrelerden gelişen kondrositler mezenkimal hücre ailesindendir. Kondrositler, yuvarlak veya oval çekirdekli, çekirdeğe yakın hücre merkezinde bir çiftsentrül ve iyi gelişmiş bir golgi aygıtı içeren hücrelerdir.

Kondrositlerin hacimleri de süperfisiyal tabakadan derine gidildikçe artar (30–32).

Kondrositlerin temel fonksiyonları, kıkırdak dokuya biyomekanik özelliklerini veren ESM'in devamlılığının sağlanmasıdır. Bu hücreler mekanik yüklenmeye, büyüme faktörleri ve interlökinler gibi moleküllere ve bazı farmakolojik ajanlara karşı duyarlıdırlar. Kondrositler, tüm bu özellikleri de göz önünde bulundurulunca, aslında metabolik olarak diğer herhangi bir iyi kanlanan organın hücresi kadar metabolik aktivite gösterir; ancak düşük hücre yoğunluğu nedeniyle bir bütün halinde kıkırdak dokusunun metabolik aktivitesi oldukça düşüktür(19).

Eklem kıkırdağındaki matriks sentezi ve hücre yoğunluğu, 20 ile 30 yaş arasında kadar korunmaktadır. Artan yaşla birlikte, hücre içeriğinde ve matris sentezinde progresif bir azalma vardır. Hücre yoğunluğu derin bölgede en düşük seviyededir(33).

2.1.2.4 Ekstrasellüler Matriks

Eklem kıkırdak dokusu ağırlığının %65-80'ini su oluşturmaktadır. Kıkırdak dokuda ESM'in su dışındaki içeriği esas olarak kollajen ve PG'lar tarafından oluşturulsa da lipitler, fosfolipitler, kollajen dışı proteinler ve glikoproteinler de matriks içerisinde bulunmaktadır(34).

Eklem kıkırdak matriksinin su içeriği, yüzeyel tabakada ağırlığının %80'i iken, derin tabakada bu oran %65'edüşmektedir. ESM içerisindeki moleküler boşluklar sayesinde; suyun, matriks içerisindeki akışkanlığı ve dengesi sağlanır. ESM içeriğinde çözünmüş halde sodyum, kalsiyum, klor ve potasyum mineralleri de bulunmaktadır. Kıkırdağın sıvı içeriğinin, kıkırdak içerisindeki moleküller arasındaki boşluklarda eklem yüzeyi boyunca hareketi, kıkırdağınbiyomekanik özelliklerine katkıda bulunmakla birlikte çözünmüş haldeki besinlerin matriks içerisinde taşınmasında da önemli rol oynar. Kıkırdak dokunun su içeriği, hem kendi başına hem de PG molekülleri ile kurduğu ilişki sayesinde, eklem kıkırdağının kompresyon kuvvetlerine karşı direnç göstermesini sağlar. ESM içerisindeki küçük boyuttaki moleküler boşlukların oluşturduğu sıvı akımına karşı gelişen sürtünme kuvveti, matriks içindeki hidrostatik basınç ile birleşince, eklem kıkırdağının çok büyük miktardaki ezici yüklere dayanmasını sağlar(34).

Eklem kıkırdağı kuru ağırlığının yaklaşık %60'ı kollajen lifleri tarafından meydana gelir. Kollajen yoğunluğunun, tüm kıkırdak dokusunda hemen hemen aynı olmasına rağmen kollajen liflerinin organizasyonu tabakalara göre değişiklik göstermektedir. Kollajen liflerinin karakteristik özelliği, kıkırdak dokusuna gerilme direncini kazandırır. Eklem kıkırdağındaki kollajenlerin % 90-95'i tip II kollajen tipindedir ve çapraz bağlı liflerin temel yapısını

oluşturur. Kalan miktarı ise tip VI, IX, X ve XI kollajenler oluşturur. Tip IX kollajen, tip II kollajen molekülleri yüzeyi boyunca çapraz bağlar oluşturur ve Tip 2 kollajen lifleri ile PG kümeleri arasında ara bağlantı olarak görev görür. Bu sayede fibril ağının mekanik stabilitesini artırır bu ağ tarafından tutulmakta olan PG'ların şişme basıncına direncini artırır(23). Tip XI kollajen molekülleri ise tip II kollajen moleküllerine bağlanarak çapraz bağlı lif yapısına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Tip IX ve XI kollajenleri, kollajen fibrillerin oluşmasında ve stabil tutulmasında yardımcı olurlar. Tip VI kollajen, perisellüler matrikste bulunarak kondrositlerin matrikse tutunmasına yardım eder. Tip X kollajen ise sadece kalsifiye kıkırdakta hücrelerin çevresinde bulunur ve kıkırdığın mineralizasyonunda rol aldığı düşünülmektedir(21)(23)(35).

Tip II prokollajen zincirleri, ribozomal endoplazmik retikulum içinde sentezlenir. Sentezlenen zincir burada üçlü sarmal formasyonunu kazanır ve karbonhidratlar da yapıya dahil edilir. Oluşan bu molekül Golgi aygıtına taşındıktan sonra burada glikozilasyona girer ve oluşan son prokollajen yapısı matrikse atılır. ESM'te prokollajen yapısındaki terminal peptitler, enzimatik olarak molekülden kopartılarak tropokollajen yapısı oluşur ve bunlar da bir araya gelerek kollajen liflerini oluşturur(27).

Kollajenin tipik makromoleküler yapısı üçlü sarmal şeklinde birbiri üzerine dolanmış 3 adet alfa polipeptit (tropokollajen) zinciridir(18). Polipeptit yapısını oluşturan ana aminoasitler, glisin ve prolindir. Bunlarla beraber bulunan hidroksiprolin, oluşturduğu hidrojen bağları ile moleküle dayanıklılık kazandırır. Başka bir aminoasit olan hidroksilisine ise kovalent çapraz bağlar meydana getirerek üç boyutlu kollajen yapısının dayanıklılığına katkıda bulunur. Çapraz bağlı lifler, kıkırdak dokusuna gerilme direnci ve kuvveti verir. Bu liflerden oluşan ağ ayrıca içerisinde PG'ları tutarak, agregatların içlerine su çekilmesini sağlar ve dokunun şişmesiyle kompresif kuvvetlere dayanıklılığına da katkıda bulunur(18)(36).

Proteoglikanlar, kıkırdak dokusunun toplam ağırlığının %10-15'ini, kuru ağırlığının ise %25-30'unu oluşturur. Kollajenler gibi PG'lar da kondrositler tarafından üretilir ve ESM'e salınır. PG temel olarak, bir çekirdek protein molekülüne kovalent olarak bağlanmış glikozaminoglikan(GAG) moleküllerinden oluşur. Bu temel yapı taşına agregan molekülü denir. Çok sayıda agregan molekülü, bağlayıcı proteinler sayesinde bir adet hyaluronan molekülüne kovalent olmayan bağlarla bağlanarak PG agregatlarını oluşturur. PG agregatlarının oluşturulması, PG'ların matriks içinde sabit tutulmasına ve kollajen ağı ile PG arasındaki devamlılığının sağlanmasına yardımcı olur. Agreganlar kollajen lifleri arasına

girererek agregatlar halinde matriks PG miktarının %90'ını oluştururlar. Agregat oluşturmamış büyük PG'lar ise matriks miktarının %10'unu meydana getirirler(21)(24)(37).

GAG molekülü, dallanması olmayan, tekrar eden disakkarit ünitelerden oluşan tek bir zincirdir. Disakkarit zincirini oluşturan moleküllerden en sık görülenleri; kondroitin sülfat molekülünün 4- ve 6- sülfat izomerleri olan keratan sülfat ve dermatan sülfat molekülüdür(18). Bu disakkarit kümeleri içerdikleri sülfat ve karboksil grupları sayesinde negatif yüklüdürler ve bu nedenle birbirlerini iterken, daha sonra oluşturacakları PG agregatları içine su ve katyonları (kalsiyum, sodyum) çekerler. Hyaluronat da bir GAG'dır ancak diğer GAG'lar gibi sülfat grubu içermez ve kendisi bir çekirdek protein molekülüne bağlanmaz. Hyaluronat ile oluşturulan PG agregatının içerisindeki bağlayıcı proteinlerde kayıp veya yapı bozulması gibi durumlarda (artrit, yaşlanma gibi) PG agregatının molekül büyüklüğü azalır ve bu da ESM'in yapısını zayıflatarak kıkırdağın biyomekanik özelliklerini bozar(18,23)

Eklem kıkırdağı matriksinde, agregat oluşturmayan biglikan, decorin ve fibromodulin isminde üç tip PG daha vardır. Decorin bir dermatan sülfat zinciri içerirken, biglikan iki dermatan sülfat zinciri içerir. Fibromodulin ise birden fazla keratan sülfat zinciri içerir. Matriksteki tüm PG miktarının %3'ünü oluşturan bu PG'lar çok daha küçüktürler ve kollajen lifleri ile bir arada bulunurlar. Agregat oluşturmayan bu PG'lar daha küçük çekirdek proteinleri içerirler. Bunların temel fonksiyonu matriksteki diğer moleküllere bağlanarak hücre fonksiyonlarının düzenlenmesine katkıda bulunmaktır. Decorin ve fibromodulin tip II kollajene bağlanarak kollajen ağının organizasyonuna katılırken biglikan perisellüler matrikste tip VI kollajene bağlanır. Bu küçük agregat oluşturmayan PG'lar ayrıca matrikste dönüştürücü büyüme faktörü-P(transforming growth factor-P TGF-P) ile bağlanarak bu sitokinin kıkırdak dokudaki fonksiyonlarını da düzenler (38,39).

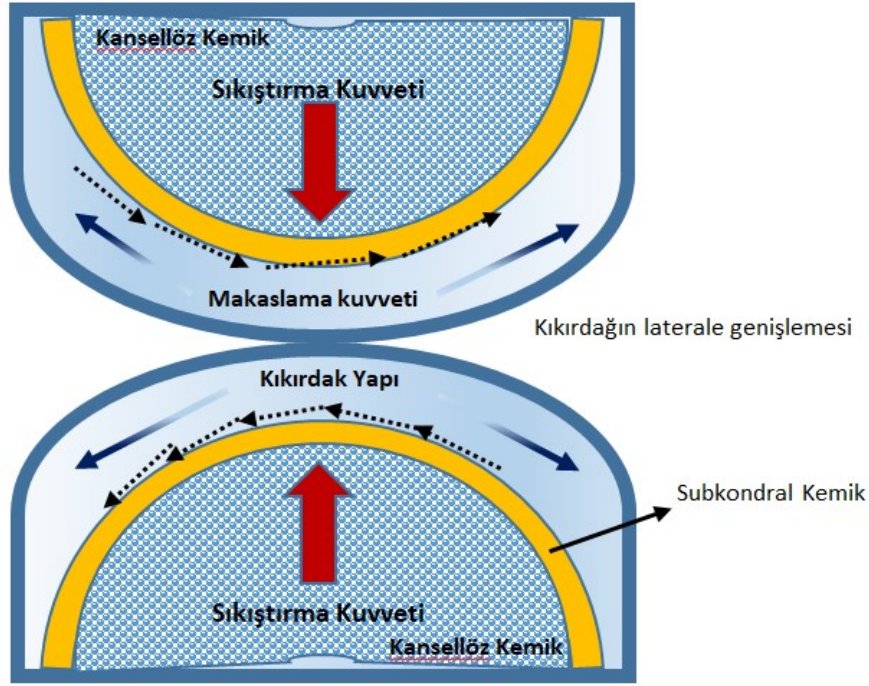
ESM'te üzerinde kollajen dışı proteinler ve glikoproteinler de bulunmaktadır. Bunlar, kıkırdak dokusu kuru ağırlığının yaklaşık %15-20'sini oluşturur. Bu moleküller bazen monosakkaritlere veya oligosakkaritlere bağlı olarak bulunurlar ve temel işlevlerinin ESM yapısının devamlılığının korunması olduğu düşünülmektedir. Bu moleküllere örnek olarak ankorin CII, fibronektin, tenaskin ve kıkırdak oligomerik proteini verilebilir. Ankorin CII, kollajen liflerine bağlanan bir kondrosit yüzey molekülüdür ve kondrositlerin matrikse tutunmasını sağlar. Fibronektin ve tenaskinin kıkırdak dokusundaki fonksiyonları tam olarak bilinmemekle birlikte hücre ile matriks arasındaki ilişkide ve dokunun osteoartrit veya enflamatuar hastalıklara yanıtında rol oynadıkları düşünülmektedir. Kıkırdak oligomerik

proteini kıkırdak dokusunun teritoryal bölgesinde bulunur ve kondrositlere bağlanır. Bu proteinin önemi sinovyal sıvıdaki miktarının kıkırdak yapım yıkım döngüsü hakkında bilgivermesi veya erken dönem osteoartrit tanısında kullanılabilmesidir(39).

2.1.3. Eklem Kıkırdağının Biyomekaniği

Eklem kıkırdak yüzeyleri eklem tüm aktiviteleri boyunca yükün eklem üzerinden iletilmesinde bir ara yüz olarak işlev görür. Bu işlevi sırasında incelenen eklem göre değişik oranlarda yüke maruz kalır. Örneğin, diz eklemi tüm aktiviteleri sırasında ortalama olarak vücut ağırlığının 3 misli bir kuvvete dayanmak zorunda kalırken, bu yüklenme ko u sırasında vücut ağırlığının 10 misli, zıplama ile ise 20 misli olabilmektedir. Eklem kıkırdağının doğal yapısı bu yüklerin yarattığı enerjinin saklanması ve eklem boyunca iletilmesini sağlar. Kıkırdak dokunun mekanik enerjiyi kendi bünyesinde saklayıp y k kaldırıldığında bu enerjiyi kullanması sayesinde kıkırdak doku, deforme edici veya kırıcı g  ler sonrasında bütünlüğünü korur ve formunu geri kazanabilir(40).

Eklem kıkırdağı gerilme ve kompresyon kuvvetlerine ileri derecede dirençlidir. Kıkırdak dokunun tümü bir arada çalışan bir yapı olsada kollajen lifleri arasındaki çapraz bağlanmalar özellikle gerilme direncini oluştururken, ezilme kuvvetlerine karşı çok az bir direnç gösterirler. Kompresyon kuvvetlerine karşı direnç, özellikle proteoglikanlar ve bunların kollajen lifleri arasında kalan su tarafından sağlanır. Kıkırdak yük altında kaldığında kıkırdak dokusu içerisindeki sıvı yer değiştirir. Uygulanan kompresyon kuvveti, negatif yüklü olan GAG'ları birbiri üzerine sıkıştırmaya çalışır. Bu sırada PG agregatı dokudan dışarıya doğru çıkmaya zorlanır ve sıvı da matriksin daha az kuvvete maruz kalan bölümlerine doğru taşınır. Kompresyon ortadan kaldırıldığında sıvı, yükten kurtulan yere geri döner. Sağlam bir kollajen ağı, aralarındaki PG moleküllerinin tutacağı su miktarını belirler. Bu ağın mekanik yetmezlik ile veya dejeneratif eklem hastalıklarında bozulması durumunda PG makromoleküllerinin tuttuğu su ve geni leyebilme yetenekleri artar; bu da molekül içindeki su miktarını arttırarak dokunun daha geçirgen ve daha yumuşak olmasına yol açarak dayanıklılığını önemli ölçüde azaltır(41) ( ekil 3).



Şekil 3: Eklem kıkırdağının kompresif yükler altında, kıkırdağın laterale genişlemesi ve "tidemark"ta oluşan makaslama kuvvetleri

Eklem kıkırdak yapısının bifazik özelliği onu tekrarlayan yüklere karşı dayanıklı kılar. PG'lar, kollajen ve diğer makromoleküller kıkırdak dokusunun katı bölümünü oluştururken, su sıvı kısmını oluşturur. Eklem kıkırdağının biyomekanik özelliklerinin tümü bu iki fazın birbiri ile etkileşimi sayesinde oluşur. Matriksin katı kısmının mikroskobik düzeydeki poroz özelliği sayesinde; eklem yüzü yüke maruz kaldığında, matriksin su içeriği bu boşluklar aracılığı ile kıkırdak içerisinde yer değiştirir ve kıkırdak dokusunun katı bölümü kuvvetin çok az bir kısmı ile karşılaşır. Sıvı kısmın, yüklerin büyük kısmını karşılamasına karşın; katı kısmın, bu yüklerden korunmuş olmasına katı fazın gerilim kalkanı(stress shielding) denir. Normal bir kıkırdakta, normal aktiviteler esnasında eklem kıkırdağına uygulanan yükün %95'ini interstisyel sıvı karşılar(42). Eklem kıkırdağı; sabit bir yük (stress) altında, zamanla artan miktarda deformasyon (strain) göstermesi, kıkırdak dokusunun viskoelastik özellikte olduğunu gösterir. Kıkırdağın viskoelastik özelliği, akıma bağlı ve akımdan bağımsız olmak üzere iki özelliği ile oluşur. Kıkırdağın viskoelastikliğinin, akımdan bağımsız özelliğinin kaynağı, matriksteki PG moleküler arasındaki sürtünmedir. Akıma bağlı mekanizmanın temelinde ise matriksin su içeriğinin akımı ve buna karşı oluşan sürtünmedir. İnterstisyel sıvının matriks içinde hareketi kıkırdak dokunun viskoelastikliğinin esas kaynağıdır. Dokunun geçirgenliği arttıkça (yani por genişliği arttıkça) yarattığı sürtünme azalır ve bunun sonucunda da yük altında iken ESM'i koruyacak gerilim kalkanı etkisini

gösteremez. Dejeneratif eklem hastalıklarındaki durum da buna (43,44).

Eklem kıkırdığının diğer iki biyomekanik özelliği ise sünme ve gerilim boşalmasıdır. Her iki özellik de yine matriks içinde suyun yük altında yer değiştirmesi sonucunda oluşmaktadır. Sünme, bir viskoelastik cismin sabit bir yük altında başlangıçta hızlı bir şekilde deforme olması daha sonra da yavaş yavaş deformasyonun belli bir seviyeye kadar devam etmesi durumunu tanımlar. Gerilim boşalması ise bir cismi belli bir deformasyon düzeyinde tutmak için gerekli olan başlangıçtaki stresin zamanla azalmasını tanımlar (41).

Kuvvetler genellikle kompresif ve bazen çekme kuvvetleri olarak incelense de makaslama kuvvetleri de kıkırdak dokunun sıkça maruz kaldığı bir etkidir. Makaslama kuvvetleri altında kıkırdak davranış şekli biraz değişiklik gösterir. Makaslama kuvvetleri altında kıkırdak dokusunun daha önce bahsedilen sünme ve gerilim boşalması özellikleri sıvı akımından bağımsız olarak PG ve kollajen matriks içindeki moleküller arasındaki sürtünmeye bağlıdır. Makaslama kuvvetleri altındaki dayanıklılığına en çok katkıyı kıkırdak tabakasının orta tabakasındaki düzensiz organize olmuş kollajen lifleri sağlar. Bu liflerin kuvvetin yönüne göre yeniden organizasyonu ile kıkırdağa gittikçe artan bir dayanıklılık sağlanmış olur(18,28,40)

2.2. EKLEM KIKIRDAK HASARI

2.2.1. Eklem Kıkırdağı Yaralanmaları ve Kıkırdak Onarımı

Artiküler kıkırdaktaki hastalıklı ve travmatik doku bozuklukları tedavi edilerek yapısal ve fonksiyonel olarak doğal kıkırdak dokusunun özelliğinin devam ettirilmesi için çok sayıda deneysel ve klinik deneme gerçekleştirilmiştir. Süreç hücre dışı matrikste proteoglikanların kaybı ve kollajenöz fibriller ağı yapısında bozulmalar meydana gelmesi ile başlar. Bunu ise hücre metaplası ve kaybı takip eder (45).

Eklem kıkırdak hasarı ve buna bağlı yıkım metabolik, genetik, mekanik, travma gibi pek çok sebep görülebilir. 3 tip kıkırdak hasarı vardır.

- a. Yüzeyel matriks yıkımı ve matrikste ayrılma olmaksızın, kondrosit ve matrikste oluşan künt travmaya bağlı mikro hasar
- b. Parsiyel kıkırdak defekti; subkondral kemiğe uzanmayankalsifiye kıkırdak hattına kadar olan kıkırdak hasarı.
- c. Tam kat kıkırdak defekti; subkondral kemiği de içine alan kıkırdak hasarı.

Bu yaralanmalar, kemik iliği hücrelerine de ulaştığından ötürü bir onarım tepkisi ortaya çıkarabilir. Bu tepki sonucunda, genel olarak fibrokartilaj ile dolu tamir dokusu oluşturur. Bu tip tamir dokusu, hyalin kıkırdağa göre basınça dayanımı ve dayanıklılığı daha zayıftır ve uzun dönemde yavaş yavaş dejenerasyona yol açar. Tüm bu yaralanma tiplerinin iyileşme süreleri de farklıdır. Lezyon lokalizasyonu da prognozda etkilidir. Bununla beraber hasta yaşı, cinsiyeti, aktivite düzeyi, obezite ve yapmakta olduğu meslek de iyileşme sürecini etkiler(46).

Eklem kıkırdağı iyileşme yanıtında, sürecin nasıl ilerleyeceğini belirleyeniki önemli faktör olduğu düşünülmektedir; bunlar bölgesel kan dolaşımı desteğinyeterli olmaması ve tamirde görev alan farklılaşmamış hücrelerin eksikliğidir. Kondrositler tamir görevini ancak bazı gerekliliklerin varlığı halinde yerine getirebilir. Kondrositlerin düzgün bir şekilde çalışabilmesi için matriksteki glikoprotein kaybının hücrelerin hızlı çalışmasını engellemeyecek düzeyde olması ve fibriller kollajenlerin sağlam olması gerekmektedir. Ayrıca matriks hasarına cevap verebilecek yeterli sayıda kondrosit de ortamda mevcut olmalıdır(47).

Kıkırdak hasarı sonrası, kondrositler farklılaşır ve sentezleri artar. Bu hücrelerle matriks, bazen doku defektini yeterince dolduramamaktadır. Tamir sürecindeki buyetersizliğin sebebi, matriks üretiminde ve hücre proliferasyonunda ani durma olmasıdır (28). Travmaya bağlı hasar sonrasında onarım sürecinde kollajen tip 2 düzeyi artmaktadır. Subkondral kemik hasarı kritik düzeydir. Özellikle yüzeysel defektler, subkondral kemik alanını genişletir, sonucunda kanama oluşur. Kanama sonucu oluşan hematomiçindeki mediatörler inflamatuvar süreci başlatır(47,48)

Osteokondral yaralanmayı takip eden iki hafta içerisinde, osteokondral bölgedefektlerinde, kondral alandaki iyileşme dokusunda; tip 1 kollajen ve nonkollajenproteinler ile kondrosit benzeri hücreler, matriks bileşiminde tip 2 kollajen ve proteoglikanların bulunduğu gözlenmiştir. Altı-sekiz hafta sonra defektin kondralkısımındaki doku göreceli olarak yüksek oranda kondrosit benzeri hücreler, tip I kollajen ve proteoglikanlardan zengin bir matriks içerirken, yüksek miktarlarda tip I kollajen de bulundurulur(45,48). Doku iyileşmesi sürecinin sonucunda; hyalin kıkırdak ve fibrokıkırdak formasyonları arasında tipik bir doku oluşumu belirir. Bu yeni oluşum, normal eklem kıkırdağı dokusundan, yapı ve biyomekanik fonksiyon açısından, farklılıklar göstermektedir(6,41,48).

2.2.2. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Değerlendirilmesi ve Sınıflandırılmaları

Kıkırdak yaralanması aksiyel yüklenmeye eşlik eden burkulma veya makaslama kuvvetleri ile meydana gelir. Spesifik bir semptomu ve özel bir muayene yöntemi olmadığından dizde tanı konulması en güç lezyondur. Hastalarda en sık semptom ağrı olmakla birlikte, tekrarlayan efüzyonlar ve mekanik şikayetlere de sebep olabilmektedir. Ağrı yaralanma yerine göre iç veya dış femoral kondilde, patellofemoral eklemden olabilir ve ekleme yükün artmasıyla şikayetler artar. Patellofemoral eklemden lezyonu olan hastalarda çökme-kalkma sırasında, yokuş çıkarken ve uzun oturma sonrası ağrıya sebep olabilir. Eklem hattı boyunca palpasyonla ağrı tespit edilebilir. Meniskopati ve bağ yaralanmaları eşlik edebilir.

Tanı için, her iki diz tam ekstansiyonda basarak anteroposterior (AP) grafi, yük vermeden 30 derece fleksiyonda lateral diz grafisi ve patellofemoral eklem aksiyel grafisi (Merchant) ilk başvurulacak yöntemlerdir. AP grafi ile tanı koymak oldukça güçtür ve ancak ileri vakalarda eklem aralığında daralma ve subkondral skleroz uyarıcı olabilir. Eklem aralığını daha iyi değerlendirebilmek açısından 45 derece fleksiyonda yük vererek çekilecek posterioranterior (PA) grafi (Rosenberg grafisi) oldukça faydalıdır. Dizilim bozukluklarını değerlendirmek açısından alt ekstremiteler ortoröntgenogram da çekilmelidir (49).

Ancak tanı koymada en duyarlı non-invazif yöntem manyetik rezonans görüntülemesidir (MRG). MRG ile kıkırdak dokunun değerlendirilebilmesi yanı sıra eklem kıkırdağının kalınlığı da değerlendirilebilir (50). Ayrıca MRG ile eşlik eden intraartiküler lezyonlar da değerlendirilebilir. En iyi kıkırdak değerlendirmesi proton dansiteli fast spin eko (FSE-PD) ve T1 ağırlıklı, yağ baskılı, 3D gradient echo (3D-FS T1W GRE) kesitleri ile yapılır. Yağ baskılama sayesinde subkondral kemikten yağ dokusundan gelen parlak sinyallerin önüne geçilir. 3D ise ince kesit, çok yönlü görüntü elde edilmesini sağlarken gradient echo ile kıkırdak dokudan alınan sinyallerin daha net hale gelmesi ve çevre dokular ile sinovyal sıvıya göre daha karşıt bir görüntü oluşturması sağlanır (51).

Kıkırdak patolojilerini değerlendirmede artroskopik girişim altın standarttır ancak ortopedistin tecrübesi önemlidir. Artroskopi ile tanı koyulabilmesinin yanı sıra kıkırdak lezyonun boyu, derinliği değerlendirilebilir ve aynı seansta tedavisi yapılabilir (52)(53).

Kıkırdak lezyonları klinik ve histolojik olarak çok farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Lezyonun derinliği hemen hemen tüm sınıflandırmaların

temelini oluşturmaktadır. Yüzeyel kıkırdak hasarları subkondral kemiğe ulaşmazken, subkondral kemiğe ulaşan ve/veya geçen lezyonlara tam kat kıkırdak yaralanması denir(54)..

2.2.2.1. Klinik (Artroskopik) Sınıflamalar

Fokal kıkırdak lezyonları, diz artroskopisi sırasında oldukça sık karşılaşılan lezyonlardır. Curl ve ark. , inceledikleri 31 bin 516 diz artroskopisinden 19 bin 827 tanesinde kıkırdak patolojisi olduğu görülmüştür(55). Dizde tam kat kıkırdak lezyonlarının gerçek sıklığının %5-10 arasında olduğu düşünülmektedir. Kıkırdak hasarlarında; Outerbridge, Bauer Ve Jackson Sınıflaması ve Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Artiküler Kıkırdak Yaralanmaları Evreleme Sistemi (International Cartilage Repair Society; ICRS)gibi artroskopik değerlendirmeye dayanan evreleme sistemleri kullanılmaktadır (56)(57)(58).

Outerbridge Sınıflaması

İlk olarak 1960 yılında menisektomi için yapılan artrotomi sırasında patellada karşılaşılan kıkırdak hasarını tanımlamada kullanılan Outerbridge sınıflaması, daha sonar kıkırdak lezyonlarının artroskopik sınıflamasında da kullanılmıştır (56). Outerbridge sınıflaması en sık kullanılan sınıflandırmalardan biridir. Kıkırdak hasarının derinliğini temel alır. Outerbridge sınıflamasının dezavantajı lezyonun derinliğini ve boyutlarını tanımlamamasıdır (resim). Outerbridge sisteminin geçerliği üzerine yapılan bir çalışmada; cerrahlar arasında %68'lik bir uyum olduğunu, dolayısıyla da bu sistemin orta derecede güvenilir olduğunu bildirmişlerdir (59).

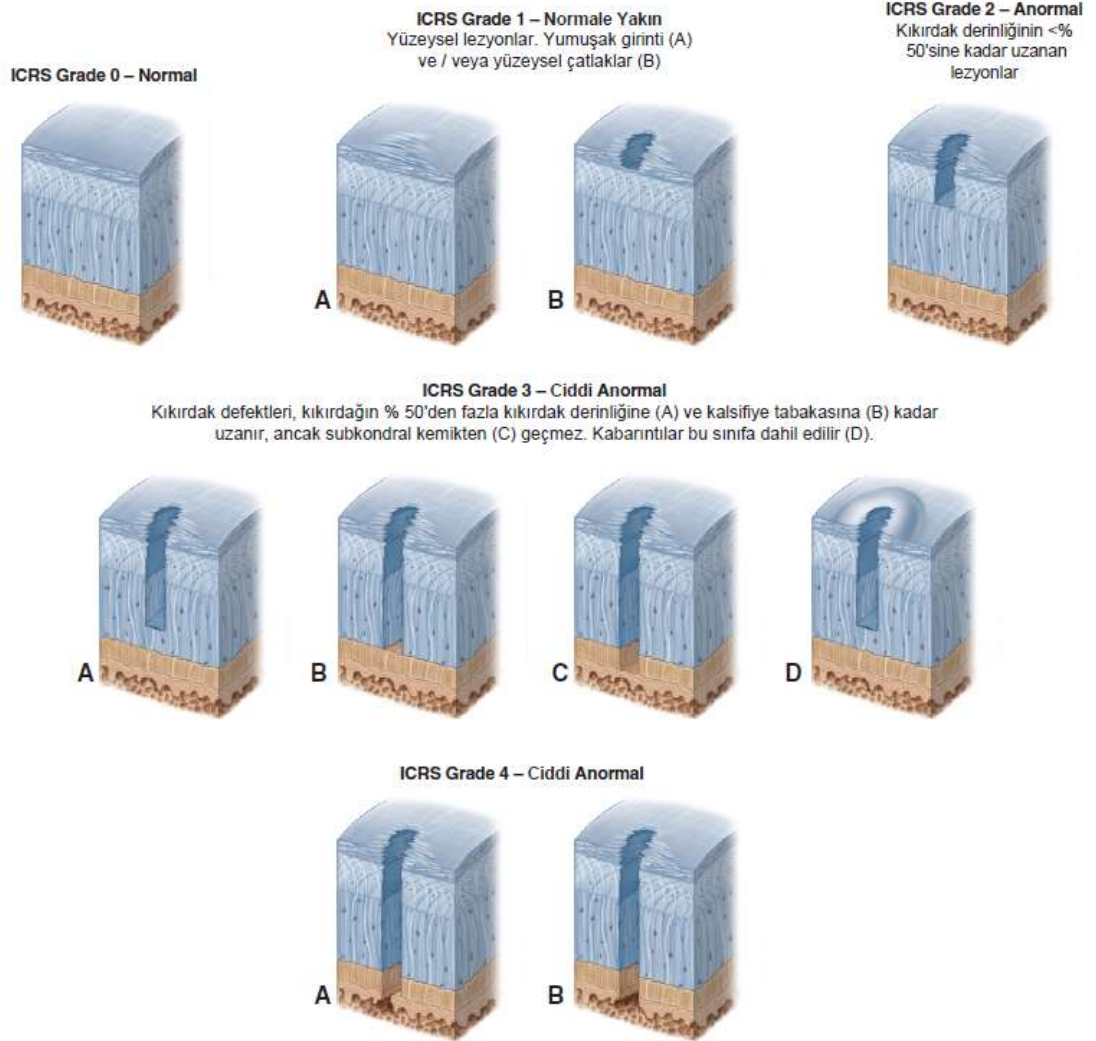
Bauer ve Jackson Sınıflaması

Bauer ve Jackson; artroskopi sırasında femoral kondilde karşılaştıkları 167 kıkırdak hasarını, 6 kategoriye ayırarak tanımlamışlardır. Kıkırdak lezyonunun şekline göre;Tip I izole çizgisel fissur, tip II yıldız şeklinde, tip III flep şeklinde, tip IV subkondral kemiğin görüldüğü krater şeklinde, tip V ciddi kıkırdak ayrışması olmaksızın liflenme ve tip VI dejeneratif görünümlü kıkırdak değişikliklerinden ayrılması güç olan degrade görünümlü kıkırdak olarak tariflenmiştir(57).

ICRS Sınıflaması (Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Eklem Kıkırdak Yaralanmaları Evreleme Sistemi)

Eklem kıkırdak lezyonlarının artroskopik olarak evrelendirilmesinde evrensel bir dil oluşturmak üzere 1997 yılında International Cartilage Repair Society (ICRS) tarafından standart bir evreleme sistemi geliştirilmiştir. Bu sınıflamada kıkırdak defektleri lezyonun derinliğini dikkate alarak 4 evre de sınıflandırılır (Şekil 4). ICRS sınıflama sistemi kıkırdak lezyonun derinliğini, lokalizasyonunu ve yüzeyin durumunu tanımlamasının yanı sıra

subkondral kemik tutulumunun önemini de vurgular (58). Kıkırdak lezyonlarına yapılan işlemler sonrasında, kıkırdak dokudaki iyileşmeyi değerlendirmek içinde makroskopik skorlama sistemi mevcuttur (tablo 1). En kapsamlı olan ve günümüzde en yaygın kullanılan sınıflamadır.



Şekil 4: Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği Eklem Kıkırdak Yaralanmaları Evreleme Sistemi (<https://cartilage.org>)

Tablo 1: ICRS Makroskopik Kıkırdak Tamir Değerlendirilmesi

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

2.2.2.2. Histolojik Sınıflamalar

İlk olarak Mankin sınıflaması ile osteoartritte artiküler dejenerasyon miktarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır(60). Kıkırdak tedavisini değerlendirmeye yönelik O'Driscoll skoru bunu takip etmiştir. Günümüzde kıkırdağın histolojik değerlendirmesi için birçok sınıflama tanımlanmıştır. Pineda ve Wakitani gibi basit sınıflamalar ve OsScore, Sellers,

Fortier, O'Driscoll, International Cartilage Repair Society (ICRS) I and II skorları gibi kompleks sınıflamalar en çok kullanılan evleme sistemleridir (61–65).

Mankin sınıflaması oluşan kıkırdığın yapısını, hücreleri, boyanmayı ve tidemark entegrasyonunu değerlendiren ve diğer sınıflamaların öncülü kabul edilen skrolama sistemidir(60).

Wakitani skrolaması, hücre morfolojisi, matriks boyanması, yüzey düzenliliği, kıkırdak kalınlığı ve defektin sınırlarının çevre kıkırdağa entegrasyonunu değerlendiren 5 kriter ile toplam 14 puanla değerlendirilir ve Pineda sınıflamasının modifikasyonudur (63).

ICRS sınıflaması, yüzeyin düzenliliğini, matriks morfolojisini, hücre dağılımını, hücrelerin canlılığını, subkondral kemiği ve kıkırdak mineralizasyonunu değerlendirir. ICRS II ise 14 kriteri değerlendiren kollajen tip 2 immunhistokimyasal boyama gerektiren kapsamlı bir sınıflamadır(64,65).

O'Driscoll sınıflaması kıkırdak morfolojisini, yüzey düzenliliğini, yapının entegrasyonunu, çevre doku ile ilişkisini ve yeni oluşan kıkırdığın çevre sağlam kıkırdak dokusuna göre yüksekliğini değerlendiren skrolama sistemidir (Tablo 2)(66). Pineda'nın basit değerlendirme sistemi ile O'Driscoll sınıflaması karşılaştırıldığında her iki sistemde güvenilir olduğu bulunmuş olup, O'Driscoll sınıflaması daha kıkırdak tamir dokusu hakkında daha fazla bilgi vermektedir (67).

Tablo 2: Modifiye O'Driscoll Histolojik Kıkırdak Tamir Skrolaması

Modifiye O'Driscoll Histolojik Skrolaması		Skor
I. % Hyalin kıkırdak	80-100	8
	60-80	6
	40-60	4
	20-40	2
	0-20	0
II. Yapısal özellikler		
A. Yüzey düzensizliği	Prüzsüz ve intakt	2
	Çatlaklar	1
	Ciddi bozulma, fibrilasyon	0
B. Yapısal bütünlük	Normal	2
	Hafif bozulma , kist içirme	1
	Ciddi bütünlük kaybı	0
C. Kalınlık	100% of normal bitişik kıkırdak	2
	50% to 100% veya normaldan kalın	1
	0-50%	0
D. Komşu kıkırdağa tutunma	Her iki uçtatutunma	2

	Tek uçtan yada kısmen çift ucuna tutunmuş	1
	Tutunma yok	0
III. Kondrosit kümeleşmesi		
	Normal hücresellik, kümeleşme yok	2
	Hafif hiposelülerite, <25% kondrosit kümeleşme	1
	Hafif hiposelülerite, >25% kümeleşme	0
IV. Komşu kırıldaktaki dejenerasyon		
	Normal hücresellik , kümeleşme yok, normal boyanma	3
	Normal hücresellik, hafif kümeleşme, orta boyanma	2
	Hafif hiposelülerite, hafif boyanma	1
	Ciddi hiposelülerite, hafif boyanma	0
V. Subkondral kemiğin yeniden oluşturulması		
	Tamamen oluşma	2
	%50 den fazla	1
	50% den az	0
VI. Tamir dokusunun subkondral kemiğe tutunması		
	Tamamen, bölünmemiş	2
	<100% >50%	1
	<50%	0
VII. Safrinin-O boyama		
	>80% homojen pozitif boyanma	2
	40%-80%	1
	<40%	0
	Toplam skor	27 max

2.2.3 EKLEM KIKIRDAK HASARINDA TEDAVİ SEÇENEKLERİ

Kıkırdak hasarı olan hastalara uygulanan konservatif tedavi yöntemleri (fizyoterapi, oral veya intraartiküler farmakolojik ajanlar) sadece şişlik ve ağrı gibi semptomların kısa süreli geriletilmesini sağlarlar; ancak kıkırdak dokunun dejenerasyon hızını yavaşlatsalar da oluşmuş kıkırdak yaralanmalarının iyileşmesini sağlayamazlar (47). Genç ve orta yaşlı bireylerde; kıkırdak lezyonlarının, ilerleyen dönemde osteoartrite ilerlememesi ve erken dönemde tedavi edilebilmesi için çeşitli tedavi yöntemleri üzerinde araştırmalar sürmektedir. Genç hastalarda kıkırdak yaralanmalarına yönelik uygulanan veya araştırılan yeni cerrahi tedavi yöntemlerinin hepsinin ortak amacı, kıkırdaktaki defektlerin yapısal ve fonksiyonel olarak normal kıkırdağa yakın bir yapı ile doldurulması ve bu yapının uzun süre dayanıklı olmasıdır; yani kıkırdak yüzeyin restorasyonudur(45,47).

Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan pek çok cerrahi teknik, tam kat gelişen lezyonlar sonrasında eklem kıkırdağının kendiliğinden iyileşme mekanizması üzerinden hareket eder(45). Hangi tedavinin uygulanacağına; lezyonun büyüklüğü, yeri, alt ekstremitenin dizilimi, kişinin yaşı, cinsiyet, vücut kitle indeksi ve hastanın fiziksel kapasitesi göz önüne alınarak tedavi yöntemi seçilir. Kıkırdakdefektlerinin tedavisi için kullanılan güncel tedavi yöntemleri arasında: artroskopiktraşlama, abrazyon artroplastisi, subkondral kemiğe penetrasyon, mikrokırık, küçükçaplı mikrokırık, osteokondral otogreft transferi, osteotomi, yumuşak doku greftleri, hücre transplantasyonu, büyüme faktörleri ve yapay matrikskullanımı gibi birçok teknik tanımlanmıştır. Gelişen doku mühendisliği ve teknoloji ile yeni kıkırdak oluşturma yeteneğine sahip dokular veya hücreler ile de eklem kıkırdak yüzeyinin rejenerasyonunu sağlanmaya çalışılmaktadır(6,8,27).

2.2.3.1. Artroskopik Debridman ve Lavaj

Debridman ve lavaj, semptomları az olan, 2 cm² den küçük kıkırdak lezyonu olan düşük aktiviteli, hastalarda uygulanan palyatif bir yöntemdir. Dejeneratif eklem kıkırdak defektlerinde, semptoma yönelik ve geçici etkili bir yöntemdir. Kollajen ve proteoglikan gibi bozulmuş olan kıkırdak komponentleri, inflamasyanona sebep olarak, kronik sinovit tablosuna neden olur. Bunların eklemden uzaklaştırılması geçici bir süre ağrının gerilemesini sağlar. Eklemin bol miktarda sıvıyla yıkanması, defekt bölgesinde yer alan gevşek süperfisyal kıkırdak dokunun alınması prensibine dayanır (68). Ancak günümüzde osteoartriti mevcut olan hastaya önerilmemektedir (69).

2.2.3.2. Kemik İliği Stimulasyon Teknikleri

Pridie tarafından ilk olarak 1959 yılında tanımlanan bu teknik zamanla gelişerek günümüze kadar gelmiştir(70). Subkondral kemikaçığa çıkarılarak, kemik iliğinden pluripotent kök hücre migrasyonunu sağlar; fibrokartilaj kıkırdak doku oluşturulması amaçlanır (45). 3 çeşit kemik iliği stimulasyon tekniği tanımlanmıştır: Abrazyon Artroplastisi, Subkondral Drilleme ve Mikrokırık.

Abrazyon Artroplastisi

Abrazyon Artroplastisi, defektin debridmanı sonrasında subkondral kemiğin küret ya da motorize burr yardımıyla subkondral kemikten 1-3 mm tıraşlanarak uygulanır. Artroskopik tekniklerdeki gelişme ve tecrübeye paralel olarak, subkondral kemiğe daha az zarar veren subkondral drilleme ve mikrokırık uygulamasından sonra artık güncel kullanımı olmayan bir tekniktir(71,72). Buna rağmen 2015 yılında yayınlanan bir çalışmada; en az 20 yıllık takibi olan hastaların %67,9'unda yeni bir cerrahi işlem gerektirmediğini belirtmişlerdir(73).

Subkondral Drilleme

Defektin debridmanı sonrası, bölgedeki kanama ve mezenkimal kök hücre gelişimini kolaylaştırmak amacıyla subkondral kemiğe drilleme yapılması işlemidir. İşlem sırasında ısı hasarı ve termal nekroz oluşturması tekniğin dezavantajı iken talus gibi ulaşımın güç olduğu bölgelerde oldukça etkili olmaktadır(74,75).

Mikrokırık

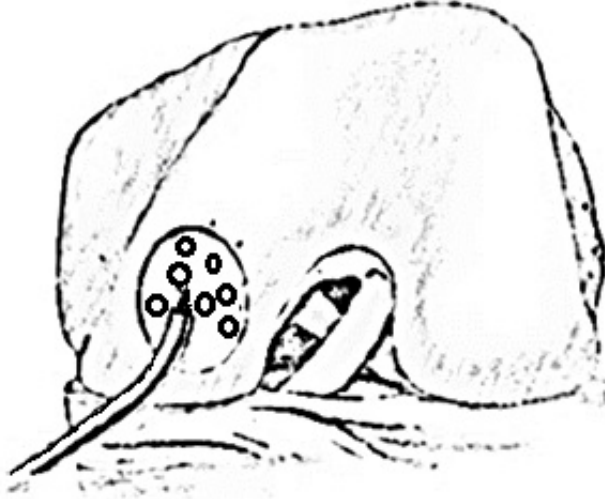
Mikrokırık, 1994'de Steadman tarafından tarif edilen bir tekniktir ve yine Steadman'ın klinik çalışmaları ile popüler hale gelmiştir(4). Halen klinik uygulamada kemik iliği stimulasyon tekniklerinden en popüler olanı ve en sık kullanılanıdır. Subkondral kemiğin daha az zarar görmesi ve drilleme sırasında oluşabilecek termal nekroz riskinin olmaması mikrokırık tedavisini yıllar içerisinde diğer kemik iliği stimulasyon tekniklerine göre ön plana çıkarmıştır (12,74,76).

Diğer kıkırdak tamir yöntemelerine göre daha minimal invaziv ve ucuz olması, tam artroskopik uygulamanın kolaylığı, kolay ulaşılabilir bir tedavi olması ve başarısızlık durumunda diğer alternatif tamir metodlarının uygulanabilir olması mikrokırık tekniğinin avantajları olarak sıralanabilir(77).

Mikrokırık tekniğinde; diagnostik artroskopik girişim sonrasında, defekt sahasındaki serbest kıkırdak fragmanlar shaver ve küret yardımıyla subkondral kemiğe kadar temizlenir. Defekt sahasının hazırlanması sonrasında mikrokırık işlemine geçilir. Defekt sahasına göre değişik açılarda hazırlanmış artroskopik bizler kullanılarak, defekt yüzeyine 90 derece açıyla

subkondral tabakaya uzanan 3-4 mm aralık ve derinlikte delikler açılır. Açılan deliklerden yağ damlacıkları ve kanamanın geldiği görülünceye kadar biz derinleştirilebilir.

Mikrokırık tedavisi; lezyon boyutu 4 cm² 'ye kadar olan genç – orta yaşlı hastalarda, semptomatik fokal kıkırdak lezyonlarının tedavisinde uygulanabilir. Lezyonun boyutu hakkında literatürde çelişkili yayınlar olsa da tedavinin başarılı olduğu hasta grubu, lezyon boyutunun 2 cm² 'in altında olan 45 yaş altı hastalar olduğu görülmektedir(77,78).



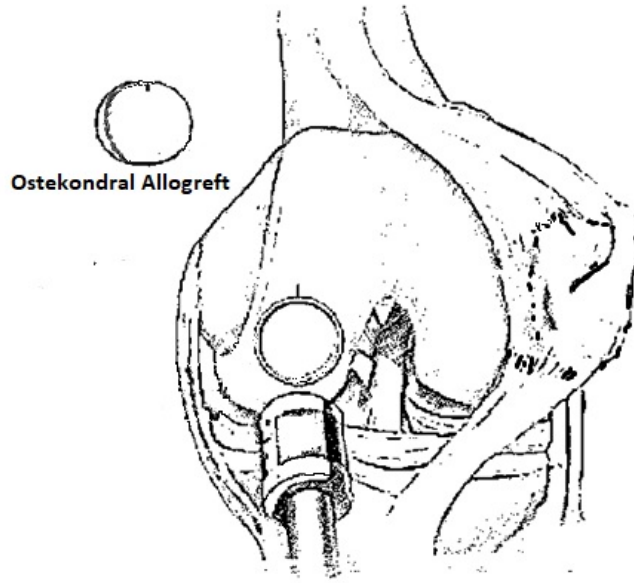
Şekil 5:Eklem kıkırdak defektine bir subkondral kemik delicisi ile mikrokırık işlemi uygulanması

2.2.3.3. Osteokondral Transplantasyon

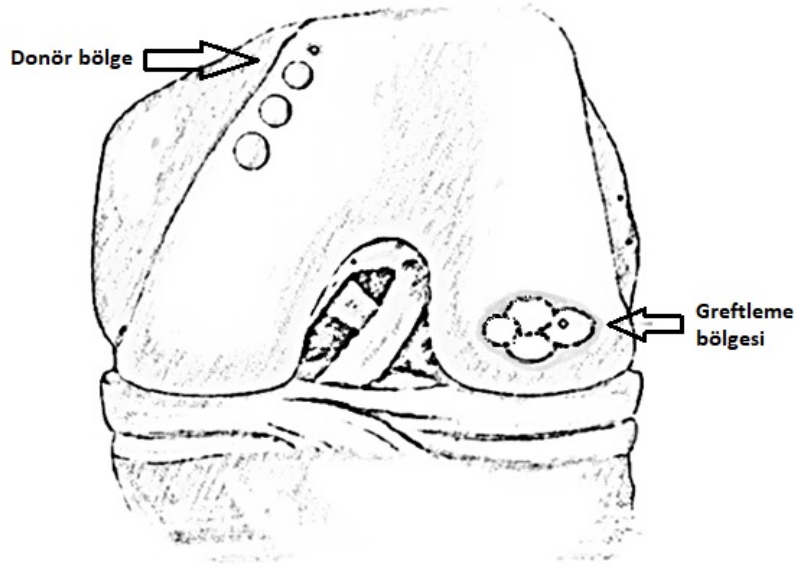
Kıkırdak defekti olan alanın, başka bir insandan veya aynı hastanın eklemine yük taşımayan bölgesinden alınan osteokondral greftlerle doldurulması yöntemidir. Diz eklemine yük binen bölgelerinin fokal kondral ve osteokondral defektlerinde kullanılır. Otolog osteokondral transfer ilk olarak 1993 yılında Bobic ve Matsusue tarafından, mozaikplasti ise 1996 yılında Bobic ve Hangody tarafından tanımlanmıştır(79,80) Mini artrotomi ya da artroskopik olarak yapılabilir. Osteokondral greftler; femur kondillerinin posteriorları, medial femoral kondilin anteromediali, lateral femoral kondilin anterolaterali, troklea medial ya da laterali, interkondiler çentiğin anterolaterali, patella ya da fibula başından alınabilmektedir. Greft almak için standardize cerrahi ekipman kullanılır. Standardize boyutlarda ve silindirik şekilde alınan greftler, defekt alanına pres-fit yerleştirilerek, intakt kıkırdak yüzeyi oluşması amaçlanır(81). Otogreftler 1-4 cm² büyüklüğünde defektlerde uygun tedavi yöntemidir. 4-8 cm² arası lezyonlarda palyatif olarak kullanılabilir ancak 4 cm² üzeri lezyonlarda donör alanın morbiditesi artar(82).

Allogreftler ise 3 cm² üzeri lezyonlarda endikedir. Allogreft kullanılmasının immunolojik reaksiyonu (doku reddi) ve bulaşıcı hastalık riskleri vardır (Şekil 6)(83).

Greft alıcı aleti kıkırdak doku yüzeyine dik olarak yerleştirmek ve alınan iki greft arası en az 3mm intakt doku bırakmak donör saha için önemlidir. Alınan greftler, defekt bölgesine dik olarak yerleştirilerek pres-fit sıkıştırılır ve doldurulur (Şekil 7). Bu tekniğin avantajı, tamir dokusunda hyalin kıkırdak oluşmasıdır. Defekt alanın ancak %70'inin doldurulabilmesi, donör alanın morbiditesi, santral greftlerin nekroz potansiyeli ve düzensiz kıkırdak yüzey oluşumu gibi dezavantajları vardır(47,82).



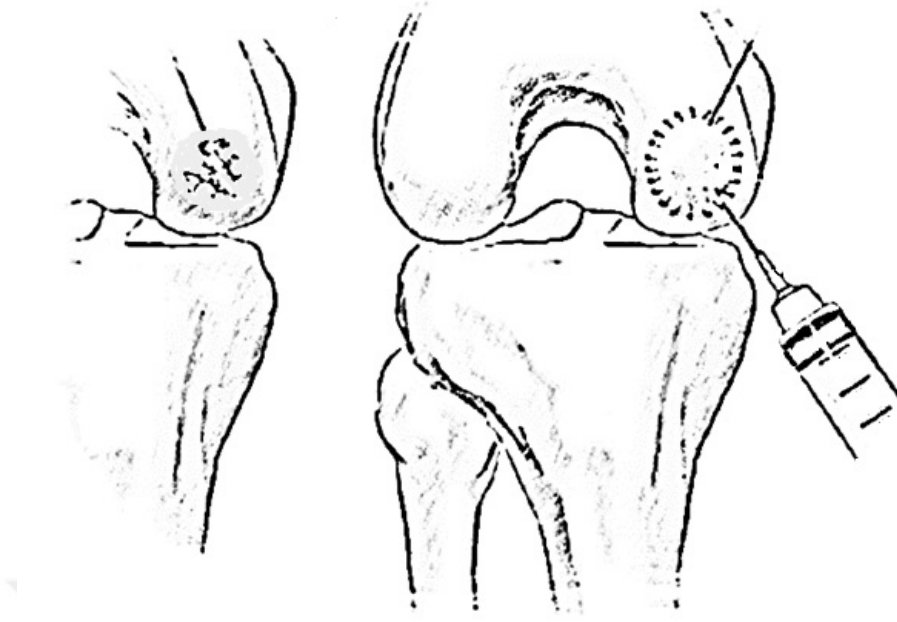
Şekil 6: Eklem kıkırdak defektinin osteokondral allogreftte uygun şekilde temizlenerek allogreftin yerleştirilmesi



Şekil 7: Eklem kıkırdak defektine mozaikplasti uygulaması

2.2.3.4. Otolog Kondrosit Transplantasyonu

Otolog hücreler ile kıkırdak defektlerin tamiri ilk olarak 1984-87 de Peterson tarafından tanımlanmıştır(84). Son yirmi yılda popüler olan bir diğer yöntemdir. Kıkırdak defekti 2cm²'den büyük ve aktivite düzeyi yüksek olan hastalarda tercih edilen bir yöntemdir. Otolog kondrosit transplantasyonu iki aşamalı bir işlemdir. Cerrahi teknikte ilk olarak artroskopi yapılır ve kıkırdak doku, femoral kondil proksimallerinden yani trokleanın medial ya da lateral kenarından ya da interkondiler çentik çevresinden alınabilir. İlk aşamada artroskopi ile alınan 200-300 mg kıkırdak hücrelerinin laboratuvar ortamında ekstrasellüler matriksinin uzaklaştırılarak kültüre edilmesi sağlanır. İkinci aşamada defektli alanın tibia medialinden alınan periostal yama ile kapatılması ve içerisine yaklaşık 0.5 ml kondrosit süspansiyonu enjekte edilmesi takip eder (Şekil 8). Periost, 5-0 veya 6-0 emilebilir dikişlerle dikilebilir veya fibrin yapıştırıcı kullanılarak yapıştırılır. Burada periost kullanılmasının amacı, pluripotent mezenkimal kök hücreler içermesi, kolay elde edilebilir ve transfer edilebilir, kondrojenik büyüme faktörleri içeriyor olması ve yapısal bir katman oluşturmasıdır(85,86).



Şekil 8: Eklem kıkırdak defektine laboratuvar ortamında hazırlanmış kıkırdak hücre kültürü süspansiyonunun uygulanması

Matriks Destekli Otolog Kondrosit Implantasyonunu

Otolog kondrosit transplantasyonu yapılan hastalarda iyi sonuçlar alınmasına rağmen, periost hipertrofisi ve bölgesel kemikleşme; periostun, sağlam kıkırdağa tespit edilirken sağlam kıkırdak üzerinde yarattığı travma etkisi, yetersiz mekanik stabilite, yeni kıkırdak dokusu içerisinde kondrositlerin heterojen dağılımı komplikasyonları olabilmesi matriks destekli otolog kondrosit implantasyonunu doğurmuştur (87). Bu yöntemde, yapay üç boyutlu yapılar (doku iskeleleri) kondrositleri taşır ve periost örtüsüne gerek kalmaz. Doku iskelesinden yapılan matriks zamanla biodegradasyona uğrayarak yeni kıkırdak doku oluşur. Matriks olarak; hayvan kaynaklı kollajenler (sıklıkla kollajen tip 1 ve 3), hyaluronan ve polimerler (PLA: polilaktik asit ve PLGA: polilaktik-ko-glikolik asit) kullanılmaktadır. Bu matriksler transosseöz olarak, fibrin yapıştırıcı kullanarak, sütür veya ankor ile fikse edilebilmektedir(88).

2.2.3.5. Kıkırdak Doku Biyomühendisliği

Biyomühendislik, hastalık veya travma sonucu oluşan doku veya organ kaybının rejenerasyonu ve normal işlev görebilmesi için hücre, iyileştirici molekül ve yapısal doku iskelelerini mühendislik ve biyoloji bilimini kullanarak gerçekleştiren çok disiplinli araştırma alanıdır (89).

Kondral ve osteokondral kayıp ve hasarlarda dokunun kendi kendini onarma yeteneğinin kısıtlı olması, çalışmalarda hücrelerin hasarlı veya kayıp bölgelere uygulanma ve barındırılma yollarının incelenmesi konusuna yoğunluk verilmesine sebep olmuştur. Kıkırdak doku mühendisliği bu sorunu çözmek için ortaya atılmış biyoteknolojik bir alandır. İlk kez 1977 yılında Green tarafından tanımlanmış ve 1980'li yıllarda güncellenmiştir (90). 1994'te Brittberg ve ark. İlk klinik uygulama sonuçlarını bildirmiştir(91). Kısaca "Kıkırdak Doku Mühendisliği" hastalık veya travma sonucu oluşan doku veya organ kaybının onarımının veya yeniden yapılmasını sağlaması için güncel bir seçenek olarak giderek gelişmektedir(6,89).

Metabolik etkinlik açısından uygun özelliklere sahip hücre eldesi, hücreler arası işlevsel ağı oluşturmak için oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda kullanılmak üzere tedavi edebilecek kıkırdak tipine ve bulunduğu bölgeye göre çok farklı hücre seçenekleri: eklem kıkırdağı kondrositi, periostium ve perikondriumun kambiyum tabasından elde edilen hücreler, mezenkimal kök hücreler, synovial hücreler, fetal ve embriyonik öncül hücreleri gibi hücreler üzerinde durulmuştur.

Kıkırdak mühendisliği yaklaşımlarından en sık başvurulardan biri doğal ve sentetik polimerik hücre ve iskelelerinin kullanımıdır. Hücre iskeleleri biyouyumlu, hücre yapışması, büyümesi ve farklılaşmasına izin veren, üç boyutlu yapısını yeterli süre koruyan, biyolojik olarak çözülebilen, toksik ve immün riski olmayan, üretim süreci belirlenmiş, tekrarlanabilir, ucuz ve kolay üretilen, cerrahi sırasında boyutu ve şekli kolay uyarlanabilir olmalıdır. Doğal polimer olarak kitosan, jelatin, fibrin, hiyaluronan ve aljinat kullanılır iken; sentetik polimer olarak poli-kaprolakton (PCL), poli-hidrosibutirik asit-ko-hidroksivalerik asit (PHBV), hidrojel, desellülerize doku iskeleleri gibi yapı iskeleleri kullanılmaktadır. Deneysel araştırmalar; kıkırdak doku mühendisliğinde, önümüzdeki yıllarda çok daha umut veren gelişmeler olacağını göstermektedir(92).

3. GEREÇLER YÖNTEM

“Tavşan Osteokondral Defekt Modelinde Mikrokırık Lokalizasyonunun Histomorfolojik Araştırılması” başlıklı deneysel çalışmamız, 03.04.2018 tarihinde Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 17/2018 Protokol Numaralı onayı alınarak, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanları Ve Gruplandırma

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deney Hayvanları Laboratuvarı’ndan temin edilen, 3100-4300 gram ağırlığında, beyaz Yeni Zelanda türü 29 adet tavşan kullanıldı. Hayvanlar çalışmaya başlamadan önce standart laboratuvar koşullarında (12 saat gündüz-12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma altında, %50-60 nem ve 20-22⁰C oda sıcaklığında) bekletildi, hayvanların laboratuvar ortamına alışmaları sağlandı. Serbest (ad libitum) yem ve su verilen 29 adet tavşan, randomize seçilerek sağ dizine işlem uygulanacak şekilde 4 gruba ve cerrahi işlem uygulanmayacak şekilde (kontrol) toplam 5 gruba ayrıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Deney Hayvanlarını Gruplandırma ve Uygulanan İşlemler

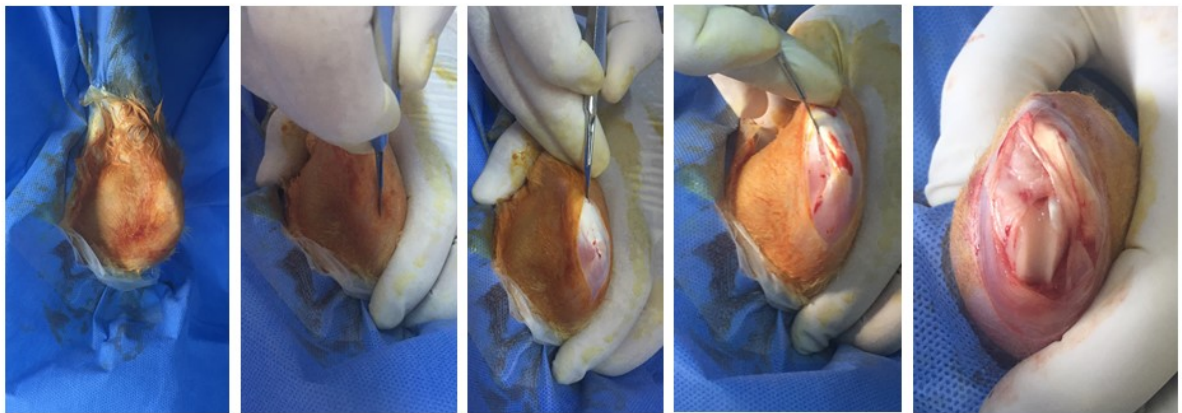
n	Grup	Gruplar
6	1 (Defekt Kontrol)	Osteokondral Defekt (Hasar Kontrol Grubu)
6	2	Osteokondral Defekt + Periferik Mikrokırık Uygulaması (Saat 12 Hizasından)
6	3	Osteokondral Defekt + Santral Mikrokırık Uygulaması
6	4	Osteokondral Defekt + Periferik Mikrokırık Uygulaması (Saat 12 Ve 6 Hizasından)
5	Sağlıklı kontrol	Diz eklemine herhangi bir işlem uygulanmadı.
Toplam=29 diz		Toplam 29 Adet Tavşan

3.2. Anestezi Ve Cerrahi İşlem

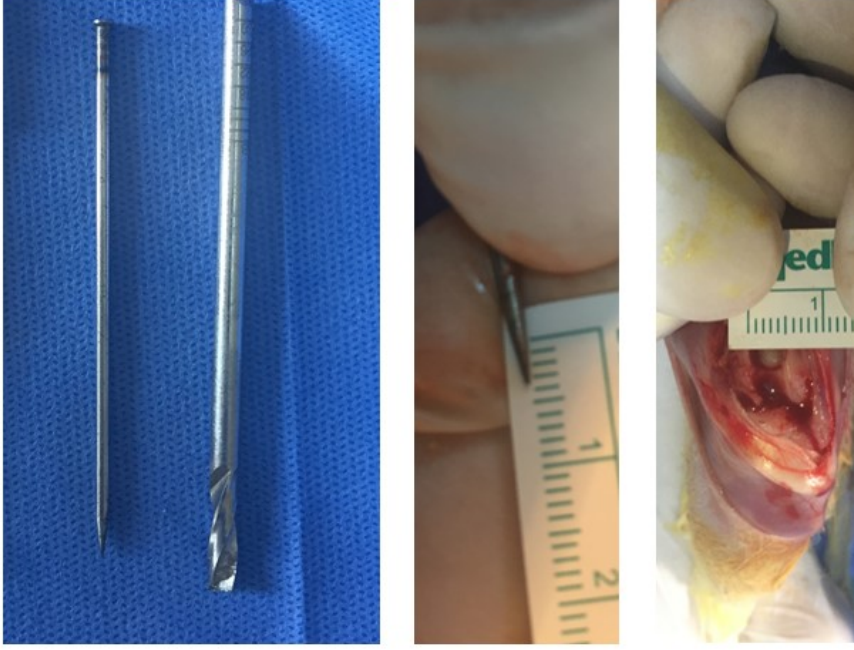
Tüm hayvanlara cerrahi işlem öncesi 5 mg/kg Xylazin (Alfazyne, Ege vet Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti. Bornova / İZMİR) ve 35 mg/kg Ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı İlaç San. ve Tic. A.Ş. Lüleburgaz / KIRKLARELİ) intramusküler yolla verilerek genel anestezi uygulandı. Preoperatif cerrahi enfeksiyon profilaksisi amacıyla hayvanlara birinci kuşak sefalosporin (sefazolin sodyum, Sefazol, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş. Yenibosna-İSTANBUL) 50mg/kg dozda verildi.

Genel anestezinin yeterliliği kontrol edildikten sonra tavşanların sağ diz bölgesi traş makinesi ile traşlanarak temizlendi. Cerrahi bölge polyvidon iyot (Batticon, Adeka İlaç San. ve Tic. A.Ş. Maslak / İSTANBUL) kullanılarak lokal antisepsi sağlanmasının ardından steril olarak örtüldü. Kullanılan cerrahi aletler, Avrupa Sterilizasyon Enstitüsü kriterlerine uygun olarak 135⁰C ve 2 atm basınç altında buhar ile otoklavda sterilize edildi.

Literatürde tarif edildiği gibi yaklaşık 5 cm lik longitudinal cilt insizyonu sonrası subkutan yumuşak dokular diseke edilip medial parapatellar yaklaşımla eklem kapsülüne ulaşıldı. Patella laterale devrildikten sonra eklem kapsülü açılarak diz fleksiyona alınarak femoral kondiller ve femur patellar oluşu açığa çıkarıldı (Şekil 9). Femur patellar oluşunda, ucu düz hale getirilmiş 5 mm çapında matkap ucu ve delici motor yardımıyla 3 mm derinliğinde osteokondral defekt oluşturuldu. Derinliği standart boyutlarda yapılabilmesi için matkap ucundan cetvel yardımıyla vertikal yönde 3 mm ölçülerek işaretlendi. Mikrokırık işlemi, 0,9 mm çapında ve 3 mm derinlik oluşturacak şekilde daha önceden hazırlanmış biz (awl) ile uygulandı (Şekil 10)(93)(94)(95). İşlem uygulanan 24 hayvan 4 gruba ve işlem uygunlanmayan 5 hayvan sağlıklı kontrol grubu olacak şekilde, hayvanlar randomize seçilerek toplam 5 gruba ayrıldı (Şekil 10)(Şekil 11).



Şekil 9: Cerrahi işlem basamakları. Steril şartlar altında anterior longitudinal insizyonla cilt ve ciltaltının geçilerek, eklem kapsülüne ulaşılması ve eklem medial parapatellar yaklaşımla açılıp patellanın laterale devriledikçe eklem ortaya çıkarılması (soldan sağa).

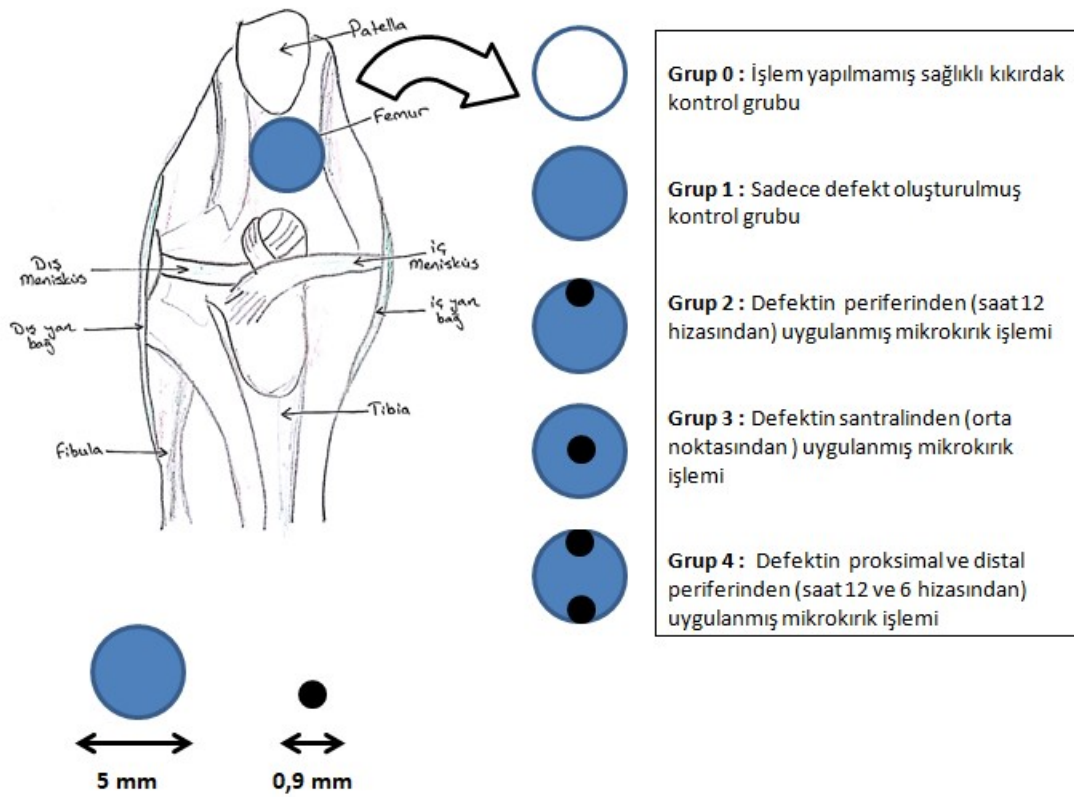


Şekil 10: Osteokondral defekt oluşturmak için kullanılan 5 mm çapındaki ucu düz matkap ucu ve mikrokırık işlemi için kullanılan 0,9 mm çapındaki alet(biz/awl) (solda). Mikrokırık için kullanılan aletin 3 mm derinliğinin cetvel yardımıyla işaretlenmesi (ortada). Oluşturulan defekt çapının cetvel yardımıyla kontrol edilmesi (sağda).

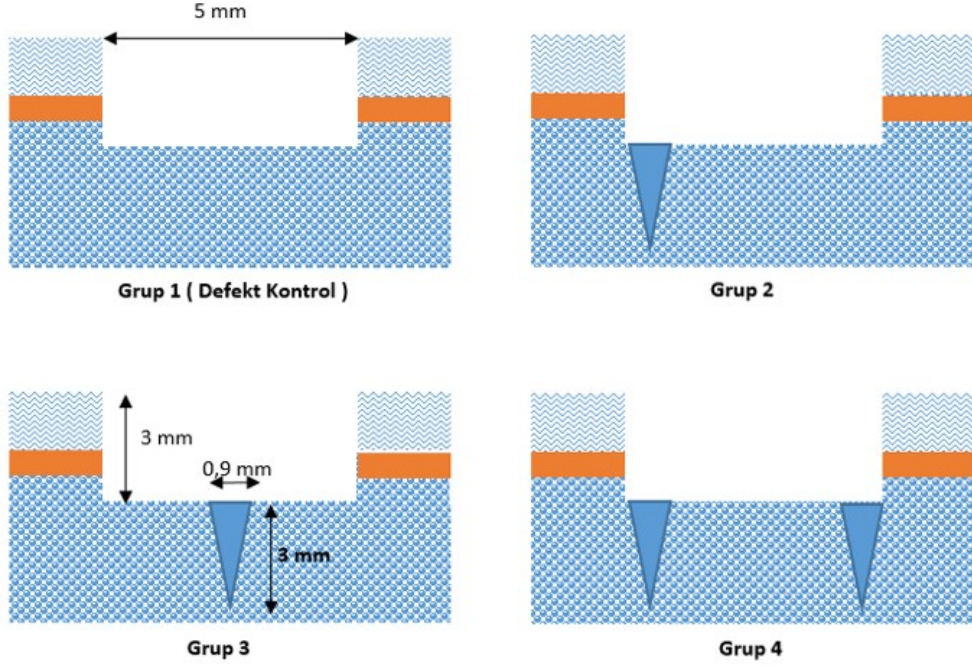
- **Grup 0 (Sağlıklı kıkırdak kontrol grubu) :** Herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadı.(n = 5)
- **Grup 1 (Hasar Kontrol Grubu) :**Tavşanların sağ dizinde femur patellar oluğuna 5 mm çapında 3 mm derinliğinde sadece osteokondral defekt oluşturuldu (Şekil 13). (n = 6)
- **Grup 2 (Periferik Tek Mikrokırık Uygulaması - Saat 12 hizası) :**Tavşanların sağ dizine aynı büyüklükte osteokondral defekt oluşturulduktan sonra, defektin saat 12 hizası periferinden künt şekilde 0,9 mm kalınlığındaki awl ile 3 mm derinliğinde **1 adet subkondral kemikte perforasyon** oluşturularak mikrokırık uygulaması gerçekleştirildi (Şekil 14). (n = 6)
- **Grup 3 (Santral Mikrokırık Uygulaması) :**Tavşanların dizine subkondral defekt oluşturulduktan sonra defektin santralinden aynı awl ile aynı derinlikte **subkondral kemiğe 1 adet perforasyon yapılarak** mikrokırık uygulaması gerçekleştirildi (Şekil 14). (n = 6)

- **Grup 4 (Periferik Çift Mikrokırık Uygulaması – Saat 12 ve 6 hizası) :** Tavşanların dizine subkondral defekt oluşturulduktan sonra defektin saat 12 ve 6 hizasından awl ile subkondral kemiğe 2 adet perforasyon yapılarak mikrokırık uygulaması gerçekleştirildi (Şekil 14). (n = 6)

İşlem sonrası tüm cerrahi bölge steril serum fizyolojik ile yıkandı. Eklem kapsülü ve fasya emilebilir suturelerle (Vicryl 4/0), cilt ise primer olarak yine emilebilir sutureler (Vicryl 2/0) ile usulüne uygun kapatıldı. Cilt kapandıktan sonra pansuman yapıp cerrahi alana postop Opsite sprey (Smith&Nephew) uygulandı ve hayvanlar operasyon sonrası takibe alındı (Şekil 15).



Şekil 11: Deney hayvanlarına uygulanan işlemlerin şematik gösterimi



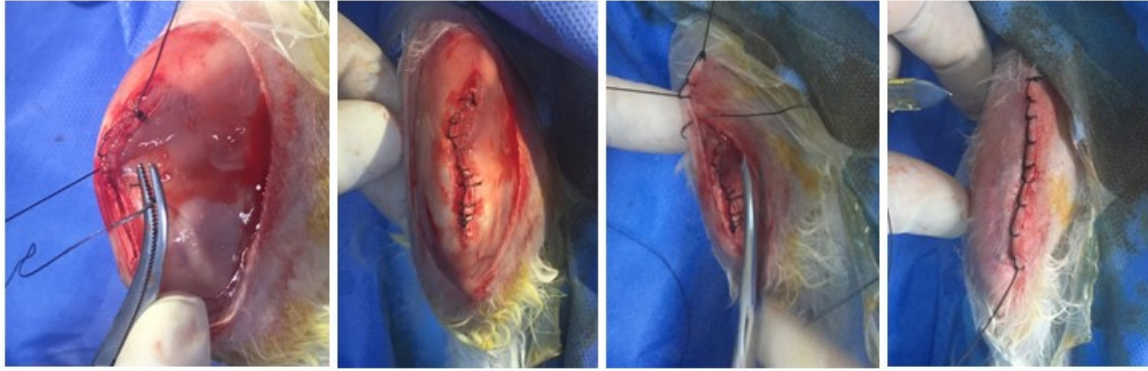
Şekil 12: Deney hayvanlarına uygulanan işlemlerin şematik gösterimi (sagittal planda)



Şekil 13: Tavşan femur patellar oluğuna daha önceden hazırlanmış drill ile osteokondral defekt oluşturulması ve mikrokırık işlemi



Şekil 14: İşlem uygulanan grupların tavşan dizlerinde gösterimi (soldan sağa: sadece defektin gösterimi, santralden mikrokırık işlemi, saat 12 hizasında mikrokırık işlemi, saat 12 ve 6 hizasından mikrokırık işlemi)



Şekil 15: İşlem sonrası eklem kapsülü ve fasya emilebilir sütürlerle (Vicryl 4/0), cilt ise primer olarak yine emilebilir sütürler (Vicryl 2/0) ile usulüne uygun kapatıldı.

Çalışmamızdaki tavşanların cerrahi işlem sonrasındastandart yem ve su ile serbest (ad libitum) beslenmesi sağlanarak, günlük yara yeri bakımı ve takibi yapıldı. Tüm tavşanların kafes içerisinde serbest yürümelerine izin verilerek, herhangi bir hareket kısıtlılığı uygulanmadı. Postoperatif antibiyotik ve analjezi uygulanmadı. Cerrahi bölge enfeksiyonu veya tavşanda gelişebilecek sistemik enfeksiyon bulguları bakımından gözlem altında tutuldu. Tavşanlar, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuarında iki hayvan barındıran kafeslerde 8 hafta takip edildi. Çalışma süresince deney hayvanlarında lokal veya sistemik bir enfeksiyon yaşanmadı.

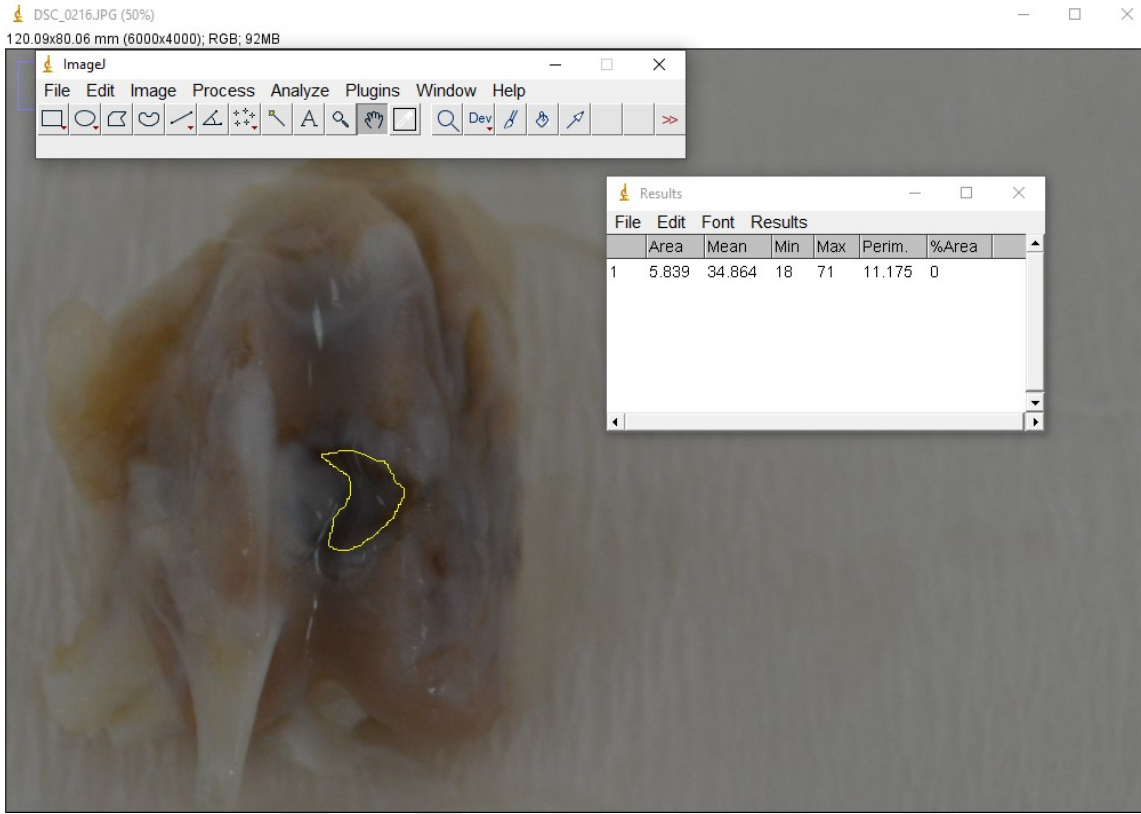
3.4. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu

Planlanan sekiz haftalık takip süresinin sonunda, tüm hayvanlar yüksek doz thiopental sodium (**Pental**, *İbrahim Etem Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. Topkapı – İSTANBUL*) uygulanarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrasında, deney hayvanlarının sağ diz eklemleri tekrar açılarak, diz eklemi etrafındaki tüm yumuşak dokular temizledi. Femur distali net olarak ortaya konduktan sonra tam kat kırıkta hasarı oluşturulmuş sağ femur distali kondiler bölgedeki sağlam ve hasar oluşturulmuş tüm eklem kırıktağını içerecek şekilde eklem hizasının 1 cm proksimalinden aksiyel planda testere yardımı ile kesildi ve femoral kondiller deney hayvanının vücudundan uzaklaştırıldı. Hayvanlardan alınan distal femur materyallerinin, makroskopik incelemede kullanılmak üzere dijital kamera ile yanlarına ölçek (cetvel) yerleştirilerek fotoğrafları çekildi. Cerrahi işlem uygulanmış her gruptan randomize seçilmiş 2 adet distal femur parçası (4 Grup : 8 adet distal femur) defekt sahasının orta noktasından hassas doku testeresi yardımıyla sagittal planda ikiye ayrıldı. Parçanın bir yarısı Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme inceleme yapılmak üzere İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezine ulaştırıldı. Parçaların diğer yarısı ve deneklerden alınan örnekler formaldehid ile 48 saat fiks edildikten sonra histolojik inceleme amacıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına ulaştırıldı.

3.4. Makroskopik Değerlendirme

Sakrifikasyon öncesinde tüm tavşanların dizleri lokal ısı artışı, renk değişikliği, fistül gibi morfolojik enfeksiyon bulguları yönünden incelendi. Sakrifiye edilen tüm tavşanların diz eklemleri açılarak, enfeksiyon bulguları açısından değerlendirildi. Tavşanların her bir dizini öncelikle makroskopik olarak değerlendirilmeye alındı. Makroskopik puanlama için ICRS skorlama sistemi kullanıldı (Tablo 1). Dokular bir ortopedist ve iki histolog tarafından ayrı ayrı değerlendirildi. Ayrı ayrı değerlendirmeler sonucu elde edilen ICRS skorlarının ortalamaları alındı.

Eksize edilen tüm distal femurların, yanlarına bir ölçek (cetvel) yerleştirilerek dijital fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekildi. Tavşan dizlerindeki defekt sahasının ne kadarlık kısmının tamir dokusu ile dolduğu dijital ortamda bilgisayar yazılımı (Image J version 1.46, National Institute of Health, Bethesda, MD) ile kantitatif hesaplandı (Şekil 16).



Şekil 16: Tavşan dizlerindeki defekt sahasının ne kadarlık kısmının tamir dokusu ile dolduğunun dijital ortamda bilgisayar yazılımı (Image J version 1.46, National Institute of Health, Bethesda, MD) ile kantitatif hesaplanması.

3.5. Mikroskopik Değerlendirme

Işık Mikroskopi Doku Takibi Prosedürü:

Dokular histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24-48 saat bekletilerek fiske edildi. Ardından kemik dokunun dekalsifikasyonu için dokular, EDTA solüsyonunda 3 hafta bekletildi. Daha sonra EDTA'nın uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'er dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'er dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'er dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı.

Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'er dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile

çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirdi. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinden dokular üzerine 4 damla weigert hematoksin boyası ile 4 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi 4 dakika sonra uzaklaştırıldı. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı 4 dakika bekletilen kesitler distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 10 dakika muamele edildikten sonra uzaklaştırıldı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal Boya Prosedürü:

Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika üç değişim ksilele tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Ardından dokular 15 dakika 37°C de Tripsin ile muamele edildi. 3 kez fosfat tamponlu saline (PBS) ile yıkanan kesitler 10 dk Hidrojen Peroksit ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile bekletildi. Primer antikor rat spesifik anti- tip 1 kollajen, anti- tip 2 kollajen ve anti-agrecan antikorları ile + 4 °C' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikor (85-9043 Zymed Histostain Kit, San Francisco, USA) ile 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminabenzidinamine (DAB) (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's

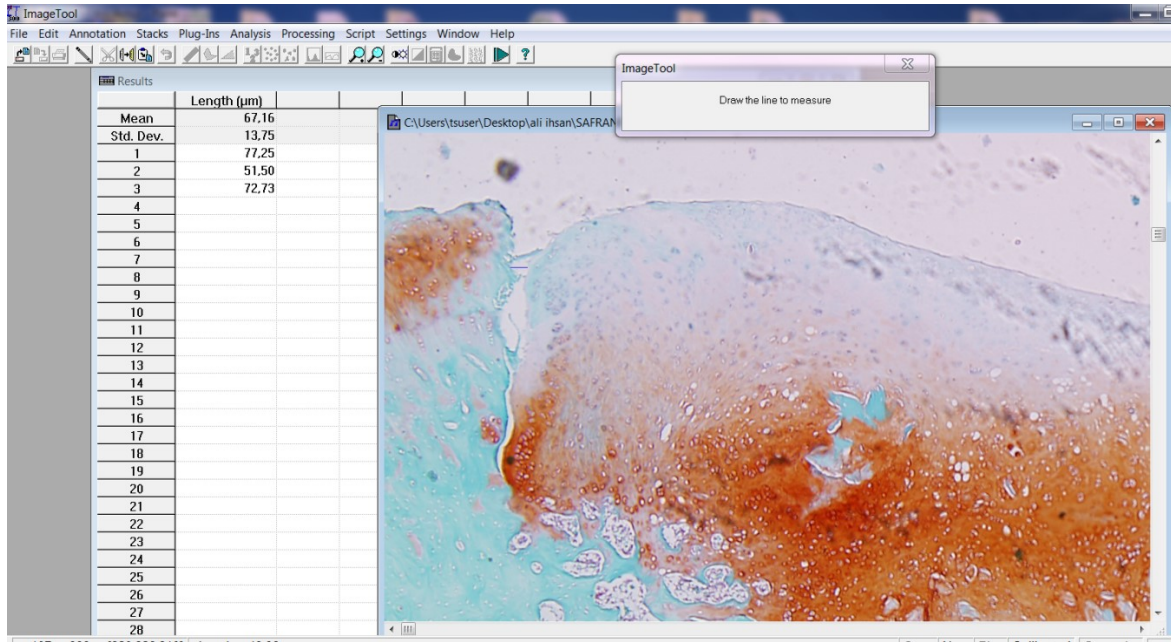
hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Safranin O Boya Prosedürü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geiridi. Distile suda çalkalandıktan sonra safranin O boyama seti (Sciencell Cat.8348) içerisinden dokular üzerine %0.1 Fast Green damlatılıp 10 dakika bekletildi. Ardından preparatlar %1 asetik asit içerisinde 15 saniye çalkalandı. Daha sonra preparatlar %0.1 Safranin O ile 30 dakika muamele edildi. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Histolojik Değerlendirme

Histolojik olarak kıkırdak dokusunun iyileşmesini, tamir doku miktarı ve hücre kalitesi açısından değerlendirmek için Modifiye O'Driscoll Skorlama sistemi kullanıldı (Tablo 2)(66). Her bir örnekte kıkırdak morfolojisi, yüzey düzenliliği, rejenere yapının entegrasyonunu, çevre doku ile ilişkisi ve yeni oluşan kıkırdağın çevre sağlam kıkırdak dokusuna göre yüksekliği gibi kriterler ile değerlendirilerek 0 ile 27 puan arasında değerlendirildi. Yeni oluşan kıkırdak dokusunun, çevre (sağlam) kıkırdak dokusu ile arasındaki mesafesi, her iki lateral kenarlardandigital ortamda bilgisayar yazılımı (Image Tool version 3.0, UTHSCSA) ile 5'er farklı yerden ölçüm (qm: mikrometre cinsinden) alınarak ortalama değerlerin toplamı hesaplandı (Şekil 17). Yeni oluşan kıkırdak dokusunun komşu kıkırdağa tutunma durumu 0 ile 2 puan arasında Modifiye O'Driscoll Skorlamasındaki alt grubuna göre ayrıca değerlendirilmeye alındı (Tablo 2).Anti-tip 1 kollajen, anti-tip 2 kollojen ve Anti-agreganantikorları ile boyanan kesitlerde, kıkırdaktaki iyileşme dokusuOlympus BX51 floresan mikroskop (Almanya) ile incelenip, rejenere olan bölgeki kollajen I ve II'nin ve agreganınimmünreaktivitesi 0 ile 3 (0: immune tutulum yok 3: çok güçlü immune tutulum var) arasındaskorlandı. Analizleruygun istatistiksel yöntemlerle anlamlılık açısından değerlendirildi.



Şekil 17: Yeni oluşan kıkırdak dokusunun komşu kıkırdak ile arasındaki mesafenin ölçümü (Image Tool version 3.0, UTHSCSA)

3.6.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme

Dokular %2.5 gluteraldehit ile fikse edildikten sonra fosfat tamponu ile yıkandı. Osmium tetroksit ile sekonder fiksasyon işlemi sonrası fosfat tamponla yıkanarak alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. Örnekler oda sıcaklığında 30 dk kurutulmuş ve analiz gününe kadar desikatör içerisinde saklanmıştır. Analiz öncesinde örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilerek sputter-coater ile yaklaşık 200 Å kalınlığında altın ile kaplanmıştır. Altın kaplama işlemleri sonrası dokular, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'nde Quanta 205FEG (FEI, Thermo Fisher Scientific) Taramalı Elektron Mikroskobundaincelendi.

Dokuların kesit yüzünden (iç yan) ve ön yüzünden, yeni oluşan kıkırdak ile çevre kıkırdak arasındaki tutunma yapıları görüntülendi.



Şekil 18: Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi için hazırlanmış dokular

3.7. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Veriler IBM SPSS Statistics Standard Concurrent User V 25 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) istatistik paket programında değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama±standart sapma ($\bar{x} \pm ss$), ortanca (M), 25.yüzdelik (Ç1) ve 75.yüzdelik(Ç3) değerleri olarak verildi. Sayısal değişkenlere ait verilerin normal dağılımı Shapiro Wilk normallik testi ve Q-Q grafikleri ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar normal dağılım gösteren değişkenlerde tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Tek yönlü varyans analizi sonucu fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırma testi olarak Tukey HSD testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis analizi sonucu fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırmalar Dunn-Bonferroni testi ile yapıldı. . $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Makroskopik değerlendirme

4.1.1. Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı

Cerrahi işlem uygulanmış gruplar makroskopik olarak; Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı ve Makroskopik ICRS Skoru açısından değerlendirilmiştir. Periferik çift (saat 6 ve 12 hizası) mikrokirik uygulanan grupta ortalama defekt sahasının %79'u tamir dokusu ile dolduğu izlenirken, periferik tek (saat 12 hizası) grubunda %73, santral grubunda %56 ve kontrol grubunda %45 tamir dokusu ile dolduğu gözlemlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 4: Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı Ortalamasının gruplara göre dağılımı

Gruplar	N	X	Sd	Minimum	Maksimum
Kontrol	6	0,45	0,14	0,28	0,62
Periferik tek	6	0,73	0,09	0,58	0,81
Santral	6	0,56	0,19	0,23	0,78
Periferik çift	6	0,79	0,05	0,71	0,84

Levene homojenlik testi: $p=0,585$ ANOVA $F=8,14$ $p<0,001$

Tablo 5: Gruplar arası Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı ortalamasının Tukey HSD testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar	X farkı	P
Periferik Çift vs. Kontrol	0,33	0,002
Periferik Çift vs. Santral	0,23	0,034
Periferik Çift vs. Periferik Tek	0,06	0,862
Periferik Tek vs. Kontrol	0,27	0,009
Periferik Tek vs. Santral	0,17	0,156
Santral vs. Kontrol	0,11	0,506

Tukey HSD post hoc testi

Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı ortalaması istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, periferik çift ve periferik tek grubu kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir. Ayrıca Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı ortalaması, periferik çift grubunda; santral gruba göre anlamlı olarak daha yüksektir. Periferik çift ile periferik tek, periferik tek ile santral, santral ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 5-6).

4.1.2. ICRS Makroskopik Kıkırdak Tamir Değerlendirilmesi

Makroskopik ICRS skoru; defekt derinliğinin tamir dokusuna oranı, çevre kıkırdak bölgesine entegrasyon ve kıkırdak tamir dokusu yüzeyinin görünümü açısından toplam 0 ile 12 puan arasında değerlendirilmiştir. Ortalama ICRS skorları periferik çift grubunda 7,67, periferik tek grubunda 6,83, santral grupta 4,50 ve kontrol grubunda 4 puan olarak hesaplanmıştır (Tablo 7).

Tablo 6: ICRS skoru ortalamasının gruplara göre dağılımı

Gruplar	N	X	Sd	Minimum	Maksimum
Kontrol	6	4,00	1,26	2,00	6,00
Periferik tek	6	6,83	0,75	6,00	8,00
Santral	6	4,50	2,22	4,00	7,00
Periferik çift	6	7,67	0,82	7,00	9,00

Levene homojenlik testi: $p=0,927$ ANOVA $F= 17,49$ $df:3$ $p<0,001$

ICRS: International Cartilage Repair Society skoru

Tablo 7: Gruplar arası ICRS skoru ortancasının Tukey HSD testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar	X farkı	p
Periferik Çift vs Kontrol	3,67	<0,001
Periferik Çift vs Santral	3,17	<0,001
Periferik Çift vs Periferik Tek	0,83	0,522
Periferik Tek vs Kontrol	2,83	0,001
Periferik Tek vs Santral	2,33	0,005
Santral vs Kontrol	0,50	0,839

Tukey HSD post hoc testi

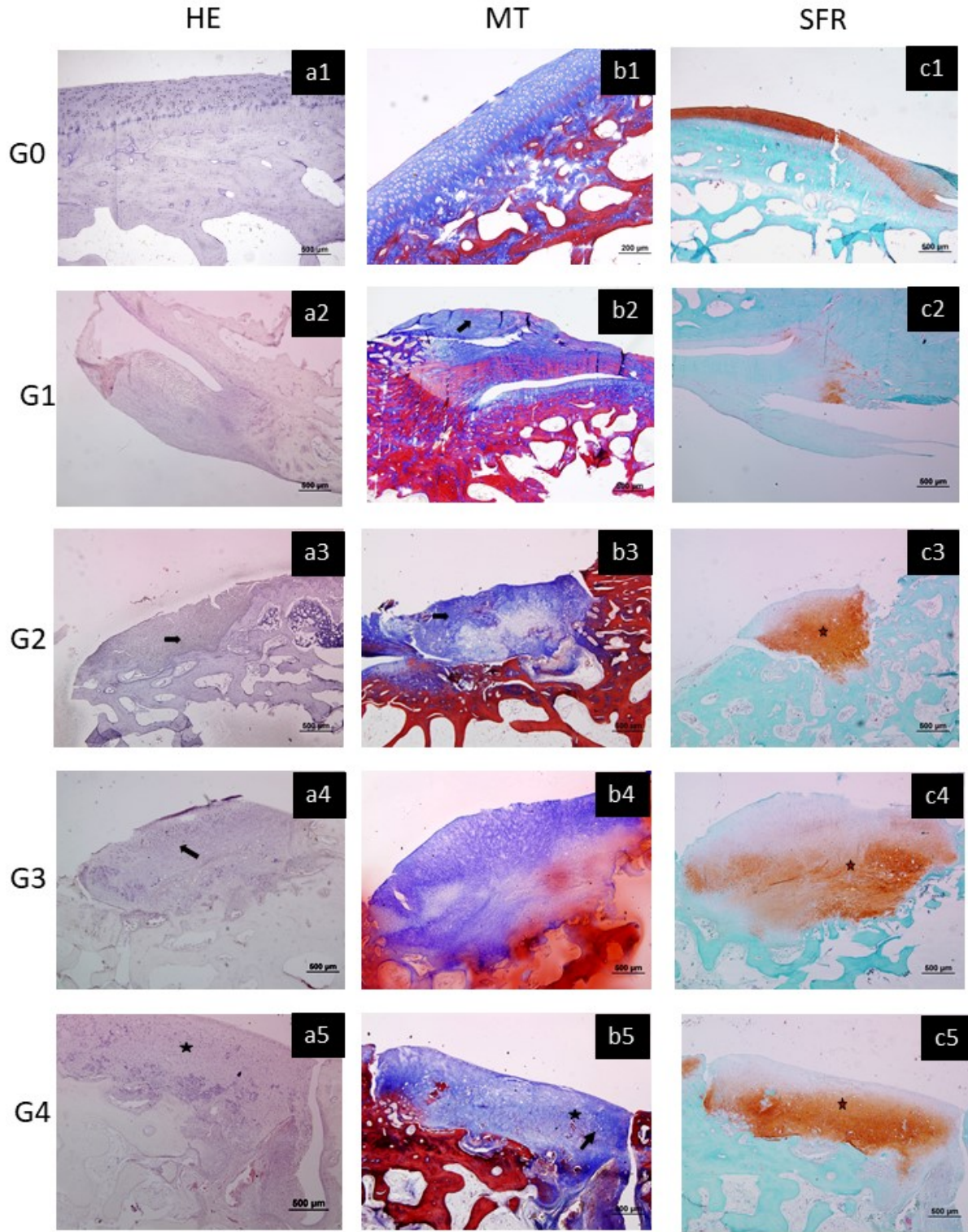
ICRS skoru ortalaması gruplararası istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, periferik çift ve periferik tek grubunda kontrol ve santral grubuna göre ortalama çok yüksek ve anlamlı bulunmuştur. Ayrıca periferik çift ile periferik tek grubu, kontrol ile santral grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 7-8).

4.2. Histolojik Değerlendirme

Histolojik parametreleri değerlendirmek için kesit alınan dokular hematoxilen eozin, masson trikrom ve safranin O ile histokimyasal boyamalar yapıldı.

Deneklerden elde edilen diz osteokondural defekt modeline ait kesitler değerlendirildiğinde sağlıklı kontrol grubuna (Grup 0) ait kıkırdak dokusunun normal yapıda olduğu, eklem yüzeyinin normal olduğu ve hyalin kıkırdağa ait kondrositlerin normal yapıda bulundukları gözlemlendi. Grup 1'deki (defekt kontrol) kesitler değerlendirildiğinde hyalin kıkırdak defektinde oluşmaya başlayan matriksin düzenli olmadığı, dokuda yer alan kondrosit ve fibrillerin organize dağılım göstermediği ve ayrıca kıkırdak yüzeyinin düzgün olmadığı görüldü. Grup 3 (santral) ve 4'te (periferik çift) kondrositlerin iyi organize olduğu ve adacıklar oluşturduğu gözlemlendi. Grup 3 (santral) ve 4'te (periferik çift) diğer gruplara göre hyalin kıkırdak defekt bölgesinde oluşan temel madde miktarında artış ve daha fazla kollajen oluşumu dikkati çekti. Eklem yüzeyinin daha regüler olduğu dikkati çekti. Safranin O boyanması GAG'ların, rejenerasyon gösteren kıkırdakdaki gelişimini göstermektedir. GAG yapısı arttıkça kahverengi renk daha koyulaşmaktadır. Bu çalışmada santral ve periferik olarak yapılan defektlere bakıldığında GAG oluşumunun ve kollajen fibril oluşumunun histokimyasal boyalarla artmış olduğu gözlemlendi.





Şekil 19: Tavşan diz osteokondral defekt modelinde elde edilen kesitlerin histokimyasal boyalarına ait histolojik görüntüler.

Kıkırdak tamir dokusunda hematoksil-eo-zin (a1-a5), masson trikrom (b1-b5) ve safranin O (c1-c5) ile boyanmış kesitler. a1, b1 ve c1 de normal kıkırdak dokusu gözlenmektedir. a1-5 resimlerinde Gruplarda hiyalin kıkırdak dokusu yerine, gelişen fibrokartilajenöz doku siyah ok (➔) ile işaretlenmiştir. b1-5 kesit resimlerinde masson trikrom 3'lü bağ dokusu boyamasında temel madde ve kollajen oluşumu (➔) siyah ok ile işaretlenmiştir. c1-5 Safranin O kesit resimlerinde kıkırdak matriksi siyah yıldız (★) ile işaretlenmiştir.

4.2.1 Sağlıklı Kontrol Grubunun Değerlendirilmesi

Sağlıklı kontrol grubu, kıyas amaçlı morfolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Herhangi bir defekt veya cerrahi işlem uygulanmadığı için ICRS, Modifiye O'Driscoll Skorlaması, Tamir Dokusunun Defekt Sahasına Oranı, Komşu Kıkırdağa Tutunma Skoru, Komşu Kıkırdak ile Mesafe ölçümü değerlendirilememiştir. Sağlam kıkırdak boyanma miktarları histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 8: İncelenen parametrelerin sağlıklı gruptaki değerleri

Parametreler	N	X	Sd	Minimum	Maksimum
Safranin O	5	2,00	0,00	2,00	2,00
Tip 1 Kollagen	5	2,83	0,41	2,00	3,00
Tip 2 Kollagen	5	2,83	0,41	2,00	3,00
Agregan	5	2,83	0,41	2,00	3,00

4.2.2. Modifiye O'Driscoll Histolojik Kıkırdak Tamir Skorlaması

.Modifiye O'Driscoll Histolojik Kıkırdak Tamir Skorlaması, yeni oluşan kıkırdak dokunun miktarı ve tamir dokusunun kalitesi (hücre miktarı, hyaline kıkırdağa benzeme oranı, dejenerasyon, vs) açısından genel bir değerlendirme skorlamasıdır. Modifiye O'Driscoll Histolojik Kıkırdak Tamir Skorlamasıyla 0 ile 27 puan arasında değerlendirme yapılmıştır (Tablo 2). Defektin periferinden çift (saat 12 ve 6 hizası) mikrokirik uygulaması yapılan grupta ortalama Modifiye O'Driscoll skoru 20,8 ile en yüksek puanı alırken diğer gruplarda sırasıyla; santral 15,8 , periferik tek 13,0 ve kontrol grubu 4,2 puan almıştır (Tablo 9).

Tablo 9: Modifiye O'Driscoll skoru ortalamasının gruplara göre dağılımı

Group	N	Ortanca	X (Sd)	%25	%75
Kontrol	6	4,50	4,2 (2,3)	2,00	6,00
Periferik Tek	6	13,50	13,0 (2,2)	11,00	14,00
Santral	6	16,00	15,8 (2,6)	13,00	18,00
Periferik Çift	6	21,00	20,8 (0,4)	21,00	21,00

Kruskal-WallisH = 20,33 3 df. P = <0,001

Tablo 10: Gruplar arası Modifiye ODriscoll skoru ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar ^a	Fark Sıralaması	q	p
Periferik Çift vs Kontrol	108,00	6,23	<0,05
Periferik Çift vs Periferik Tek	64,00	4,89	<0,05
Periferik Çift vs Santral	44,00	4,98	<0,05
Santral vs Kontrol	64,00	4,89	<0,05
Santral vs Periferik Tek	20,00	2,26	>0,05
Periferik Tek vs Kontrol	44,00	4,98	<0,05

^aS-N-K: Student-Newman-Keuls post hoc testi

Gruplar arası Modifiye O'Driscoll skoru ortancası istatistiksel değerlendirildiğinde, periferik çift, periferik tek ve santral grubunda kontrol grubuna göre 3 kat daha yüksektir. Yine periferik çift grubu Modifiye ODriscoll skoru, periferik tek, kontrol ve santral grubundan daha yüksektir. Santral ve periferik tek grubu ortanca değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 9-10).

4.2.3. Kıkırdak Tamir Dokusunun Sağlam Kıkırdağa Tutunma Skorlaması

Mikrokırık cerrahisi sonrası oluşan yeni dokunun komşu kıkırdağa tutunma durumu Modifiye O'Driscoll Skorlamasının alt grubuna göre lateral kenarla tutunmanın hiç olmaması "0", tek kenardan tutunması "1", her iki kenara tutunması "2" puan şeklinde puanlanarak değerlendirildi. Grupların ortalama skorları sırasıyla; periferik çift (saat 6 ve 12 hizası) grubu 1,5 , periferik tek grubu 1,5 , santral grubu 1,17 ve kontrol grubu 0,33 olarak değerlendirilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11: Komşu Kıkırdağa Tutunma ortancası ve ortalamasının gruplara göre dağılımı

Gruplar	N	Ortanca	X (Sd)	%25	%75
Kontrol	6	0,000	0,33 (0,52)	0,000	1,000
Periferik tek	6	1,500	1,50 (0,55)	1,000	2,000
Santral	6	1,000	1,17 (0,75)	1,000	2,000
Periferik çift	6	2,000	1,50 (0,84)	1,000	2,000

Kruskal-Wallis - H= 8,43 df:3 p=0,038

Tablo 12: Gruplar arası Komşu Kıkırdağa Tutunma ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar ^a	Fark sıralaması	q	P
Periferik Çift vs. Kontrol	58,50	3,38	<0,05
Periferik Çift vs. Santral	18,00	1,38	>0,05
Periferik Çift vs. Periferik Tek	1,50	0,17	>0,05
Periferik Tek vs. Kontrol	57,00	4,36	<0,05
Periferik Tek vs. Santral	16,50	1,87	>0,05
Santral vs. Kontrol	40,50	4,59	<0,05

^aS-N-K: Student-Newman-Keuls post hoc testi

Karşılaştırılan gruplar arası Komşu Kıkırdağa Tutunma ortancası istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; periferik çift, periferik tek ve santral grubu, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir. Diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 11-12).

4.2.4. Kıkırdak Tamir Dokusunun Komşu Kıkırdak İle Mesafesi (qm)

Kıkırdak defekti cerrahi uygulamasında, yeni oluşan kıkırdak tamir dokusunun komşu kıkırdağa tutunma miktarı, kıkırdak iyileşmesinin değerlendirilmesi açısından önemli bir parametredir. İşlem uygulanmış tüm gruplarda yeni oluşan kıkırdak dokusunun, çevre (sağlam) kıkırdak dokusu ile arasındaki mesafesi, her iki lateral kenarlardandigital ortamda bilgisayar yazılımı (Image Tool version 3.0, UTHSCSA) ile 5'er farklı yerden yapılan ölçüm (qm: mikrometre cinsinden) alınarak ortalama değerlerin toplamı hesaplandı (Şekil 16).Yapılan ölçümler sonrasında periferik çift grubunun ortalama her iki lateral sağlam kenara

toplam mesafesi 19,83 μm ile en az olarak ölçüldü. Diğer gruplarda ortalama mesafe sırasıyla; santral grupta 40,12 μm , periferik tek grubunda 43,18 μm ve kontrol grubunda ise 106,08 μm olarak ölçüldü (Tablo 13).

Tablo 13: Komşu Kıkırdak ile Mesafe ortancası ve ortalamasının gruplara göre dağılımı

Gruplar	N	Ortanca	X (Sd)	%25	%75
Kontrol	6	218,65	106,08(219,36)	133,19	302,18
Periferik tek	6	152,46	43,18(158,06)	122,67	190,99
Santral	6	97,23	40,12(95,35)	60,88	107,76
Periferik çift	6	13,56	19,83(17,35)	0,00	23,56

Kruskal-Wallis - H = 15,99 df: 3 P = 0,001

Tablo 14: Gruplar arası Komşu Kıkırdak ile Mesafe ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar	Fark sıralaması	q	P
Kontrol vs. Periferik Çift	89,0	5,14	<0,05
Kontrol vs. Santral	44,0	3,36	<0,05
Kontrol vs. Periferik Tek	11,0	1,25	>0,05
Periferik Tek vs. Periferik Çift	78,0	5,96	<0,05
Periferik Tek vs. Santral	33,0	3,74	<0,05
Santral vs. Periferik Çift	45,0	5,09	<0,05

S-N-K: Student-Newman-Keuls post hoc testi

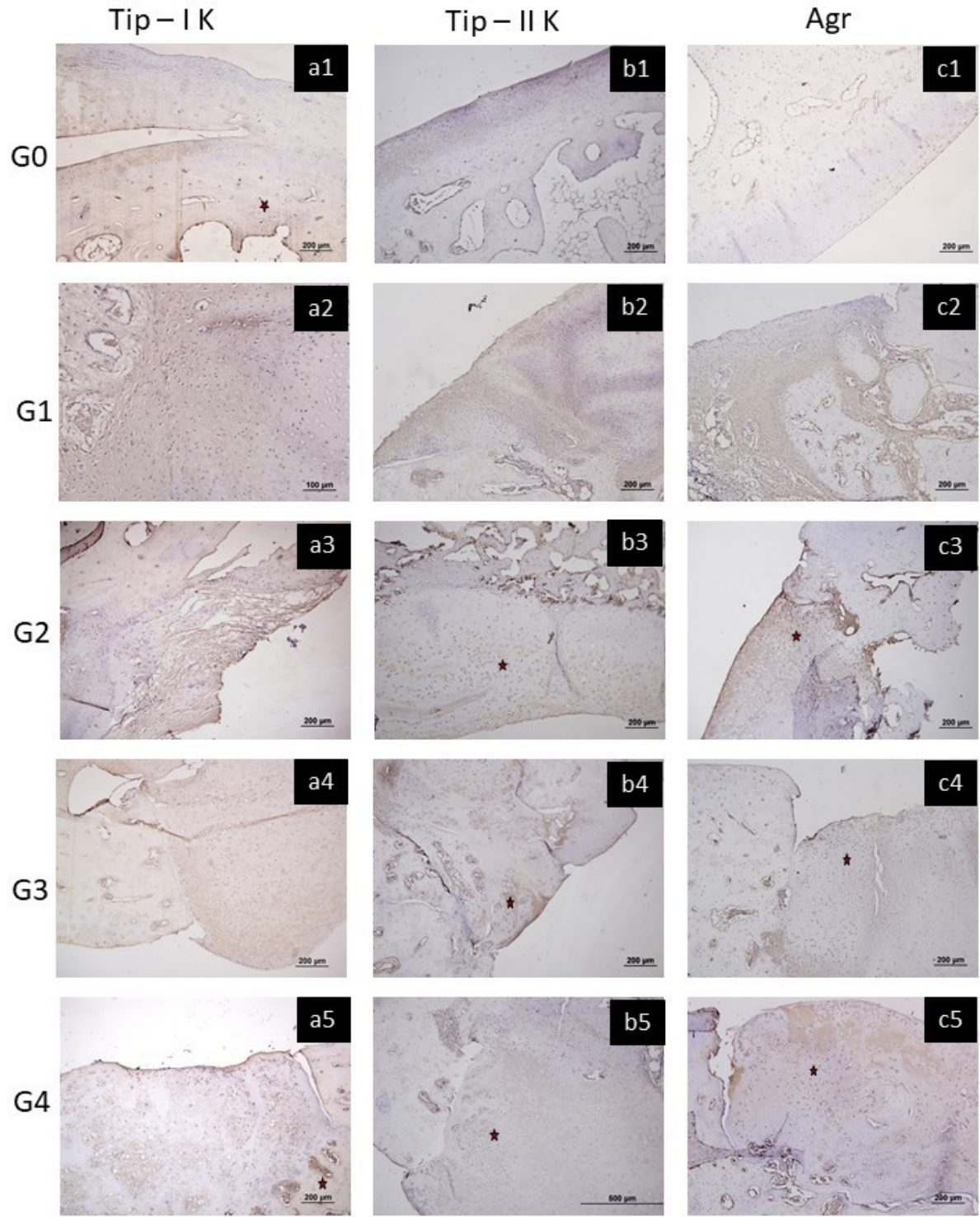
Gruplar arasında kıkırdak tamir dokusunun, komşu kıkırdak dokusu ile arasındaki mesafesi istatistiksel değerlendirilmesinde; kontrol grubunda periferik çift ve santral grubuna göre, periferik tek grubunda santral ve periferik çift grubuna göre, santral grubunda periferik çift grubuna göre anlamlı olarak çok yüksektir. Kontrol ile periferik tek grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 13-14).

4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Yeni oluşan dokunun hyalin kıkırdığa benzeme durumunu ve matriks proteoglikan yapısını değerlendirmek için de immünohistokimyasal boyalarla histolojik değerlendirme yapıldı.

İmmünohistokimyasal incelemelerde kıkırdak tamir dokusunda tip 1 kolajen, tip 2 kolajen ve agreganın immün aktiviteleri değerlendirildiğinde; immünopozitif hücre dağılımının grup 3 ve 4'te daha yoğun olduğu dikkati çekti.





Şekil 20: Tavşan diz osteokondral defekt modelinde elde edilen kesitlerin immünohistokimyasal boyalarına ait histolojik görüntüler.

Kıkırdak tamir dokusundan elde edilen kesitlere ait resimlerde; tip 1 kollajen (a1-a5), tip 2 kollajen (b1-b5) ve agregan (c1-c5) antikorlarının immunreaktiviteleri gözlenmektedir. Antikorlarının immunreaktiviteleri siyah yıldız (★) ile işaretlenmiştir.

4.3.1. Tip 1 Kollajen

Tip 1 Kollajen, insan vücudundan en fazla bulunan kollajendir. Kıkırdak iyileşme dokusunda tip 1 kollajen artışı izlenir(6). Çalışmamızdaki gruplardan alınan dokuların Tip 1 kollajen immünreaktivitesi 0 ile 3 puan arasında (0: reaksiyon yok, 3: Çok güçlü reaksiyon var) değerlendirilmiştir. Grupların ortalama Tip 1 Kollajen immünreaktivitesi en güçlüden en aza sırasıyla; periferik çift grubu (ort: 2,83), santral grup (ort: 1,50), periferik tek grubu (ort: 1,17) ve kontrol grubu (ort: 1,00) şeklindedir.

Tablo 15: Tip-I kollejen ortancasının gruplara göre dağılımı

Gruplar	N	Ortanca	X (Sd)	%25	%75
Kontrol	6	1,00	1,00 (0,00)	1,0	1,0
Periferik tek	6	1,00	1,17 (0,41)	1,0	1,0
Santral	6	1,50	1,50 (0,55)	1,0	2,0
Periferik çift	6	2,00	2,33 (0,52)	2,0	3,0

Kruskal-Wallis - H=14,75 df: 3 P = 0,002

Tablo 16: Gruplar arası Tip-I kollejen ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar	Fark sıralaması	q	P
Periferik Çift vs. Kontrol	76,00	4,39	<0,05
Periferik Çift vs. Periferik Tek	65,00	4,97	<0,05
Periferik Çift vs. Santral	43,00	4,87	<0,05
Santral vs. Kontrol	33,00	2,52	>0,05
Santral vs. Periferik Tek	22,00	2,49	>0,05
Periferik Tek vs. Kontrol	11,00	1,25	>0,05

S-N-K: Student-Newman-Keuls post hoc testi

Tip 1 kollajen ortancası gruplar arası istatistiksel karşılaştırıldığında; periferik çift grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 15-16).

4.3.2. Tip 2 Kollajen

Eklem kıkırdağı kuru ağırlığının yaklaşık %60'ı kollajen lifleri tarafından meydana gelir. Kollajen lifleri, kıkırdak dokusuna gerilme direncini kazandırır. Eklem kıkırdağındaki kollajenlerin % 90-95'i Tip 2 kollajen tipindedir. Gruplardan alınan dokuların Tip 2 kollajen immünreaktivitesi 0 ile 3 puan arasında (0: reaksiyon yok, 3: Çok güçlü reaksiyon var) değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonrasında periferik çift grubu ortalama 2,83 puan alarak en fazla immünreaktivite gösterir iken kontrol grubu ortalama 1,00 puan alarak en az immünreaktivite gösteren grup olmuştur. Santral grup ortalama puanı (ort: 2,17), periferik tek gruptan (ort: 1,33) daha yüksek bulunmuştur.

Tablo 17: Tip 2 kollajen ortancasının gruplara göre dağılımı

Gruplar	N	Ortanca	X (Sd)	%25	%75
Kontrol	6	1,00	1,00 (0,00)	1,0	1,0
Periferik tek	6	1,00	1,33 (0,52)	1,0	2,0
Santral	6	2,00	2,17 (0,41)	2,0	2,0
Periferik çift	6	3,00	2,83 (0,41)	3,0	3,0

Kruskal-Wallis - H=15,67 df: 3 P <0,001

Tablo 18: Gruplar arası Tip 2 kollejen ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar	Fark sıralaması	q	P
Periferik Çift vs. Kontrol	89,00	5,14	<0,05
Periferik Çift vs. Periferik Tek	71,00	5,43	<0,05
Periferik Çift vs. Santral	28,00	3,17	<0,05
Santral vs. Kontrol	61,00	4,66	<0,05
Santral vs. Periferik Tek	43,00	4,87	<0,05
Periferik Tek vs. Kontrol	18,00	2,04	>0,05

S-N-K: Student-Newman-Keuls post hoc testi

Gruplar arası Tip 2 kollejen ortancası istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, periferik çift ve santral grubunda diğer gruplara yüksek olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, periferik tek ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 17-18).

4.3.3. Agregan

Proteoglikanlar, kıkırdak dokusunun toplam ağırlığının %10-15'ini, kuru ağırlığının ise %25-30'unu oluşturur. Kollajenler gibi PG'lar da kondrositler tarafından üretilir ve ESM'e salınır. PG temel olarak, bir çekirdek protein molekülüne kovalent olarak bağlanmış glikozaminoglikan (GAG) moleküllerinden oluşur. Bu temel yapının en önemlisi agregan molekülüdür. Tüm gruplardan alınan dokuların immünreaktivitesi 0 ile 3 puan arasında (0: reaksiyon yok, 3: Çok güçlü reaksiyon var) değerlendirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonrasında periferik çift grubu ortalama 2,67 puan alarak en fazla immünreaktivite gösteren grup olmuştur. Diğer gruplar sırasıyla; santral grup (ort: 2,33) , periferik tek grubu (ort: 1,33) ve kontrol grubu (ort: 1,0) şeklindedir.

Tablo 19: Agregan ortancasının gruplara göre dağılımı

Gruplar	N	Ortanca	X (Sd)	%25	%75
Kontrol	6	1,00	1,00 (0,00)	1,0	1,0
Periferik tek	6	1,00	1,33 (0,52)	1,0	2,0
Santral	6	2,00	2,33 (0,52)	2,0	3,0
Periferik çift	6	3,00	2,67 (0,52)	2,0	3,0

Kruskal-Wallis - H=17,55 df: 3 P <0,001

Tablo 20: Gruplar arası Agregan ortancasının S-N-K testi ile karşılaştırılması

Karşılaştırılan gruplar	Fark sıralaması	q	P
Periferik Çift vs. Kontrol	82,00	4,73	<0,05
Periferik Çift vs. Periferik Tek	64,00	4,89	<0,05
Periferik Çift vs. Santral	14,00	1,58	>0,05
Santral vs. Kontrol	68,00	5,20	<0,05
Santral vs. Periferik Tek	50,00	5,66	<0,05
Periferik Tek vs. Kontrol	18,00	2,04	>0,05

S-N-K: Student-Newman-Keuls post hoc testi

Cerrahi işlem uygulanmış tüm gruplarda Agregan ortancası istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; periferik çift ve santral grubunda kontrol ile periferik tek grubuna göre yüksektir ($p<0,05$). Periferik çift ile santral grubu, periferik tek ile kontrol grubu arasındaki agregan ortancası farkı istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Tablo 19-20).

4.4. Araştırma gruplarının tüm parametrelerde değerlendirilmesi

Tüm parametreler değerlendirildiğinde periferik çift grubu diğer gruplardan üstün olarak değerlendirilmiştir. Santral grubu hücresel kalite açısından periferik tek ve kontrol grubuna göre daha iyi sonuç vermiştir. Grupların tek bir tablo içerisinde istatistiksel açıdan değerlendirilmesi aşağıda belirtilmiştir (Tablo 15).

Tablo 21: Araştırma gruplarına göre incelenen parametrelerden ortalama/ ortancası istatistiksel olarak önemli bulunanların dağılımı

Gruplar	Kontrol	Periferik tek	Santral
Kontrol	-	MOD,	
Periferik Tek	ICRS, TDO, KKT		ICRS
Santral	MOD, KKT, KKM, TIP-II, A	KKM, TIP-II, A	-
Periferik Çift	ICRS, MOD, TDO, KKT, KKM, HK, TIP-I, TIP-II, A,	MOD, KKM, TIP-I, TIP-II, A,	ICRS, MOD, TDO, KKM, TIP-I, TIP-II,

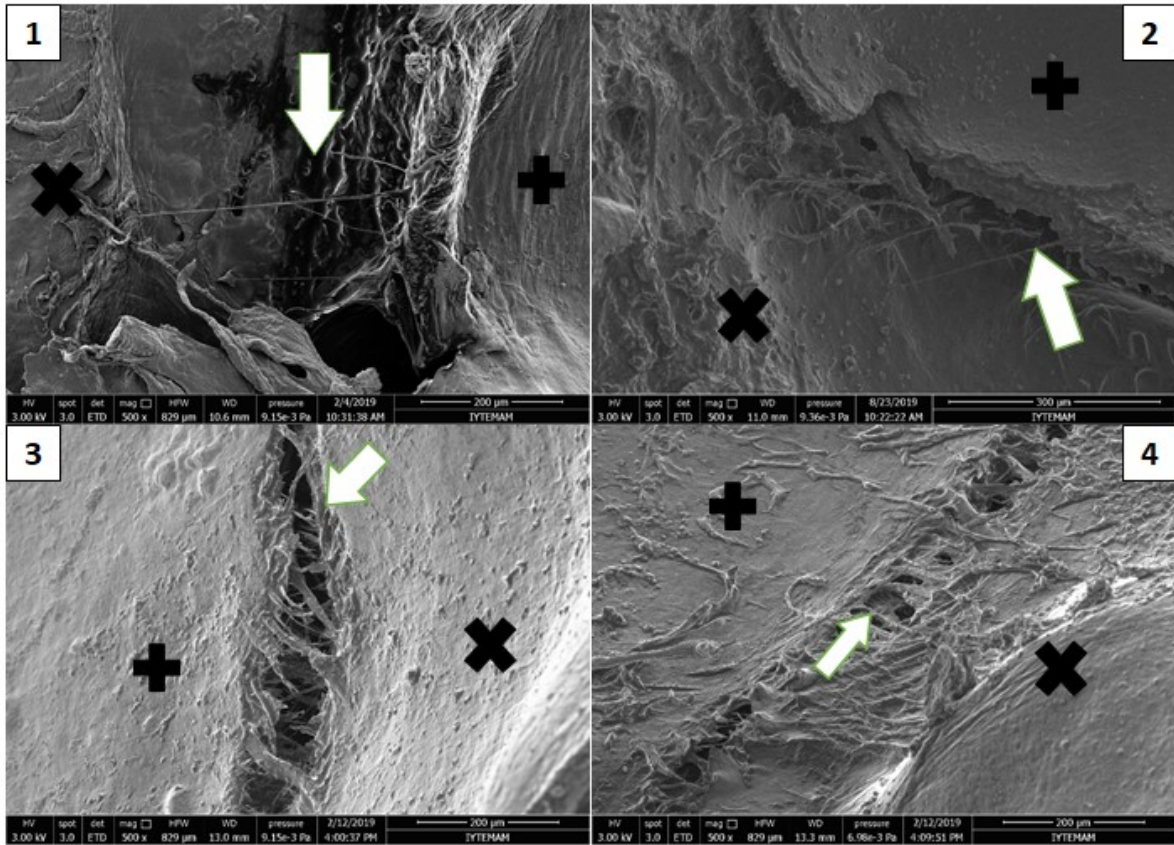
TDO: Tamir Dokusu Oranı,ICRS: International Cartilage Repair Society skoruMOD: Modifiye ODriscoll skoru,KKT: Komsu Kıkırdağa Tutunma,KKM: Komsu Kıkırdak ile MesafeTIP-I : Tip-I kollejen, TIP-II : Tip-II kollejen A: Agregan

4.6. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi

Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Analizi için her cerrahi işlem uygulanmış gruptan 2 tane doku randomize olarak sakrifikasyondan hemen sonra seçildi. Seçilen dokular hassas doku testeresi ile sagittal planda tam orta hattan ikiye ayrıldı. İkiye ayrılan dokunun bir yanı histolojik değerlendirmeye gönderilirken diğer yanı SEM analizine dahil edildi.

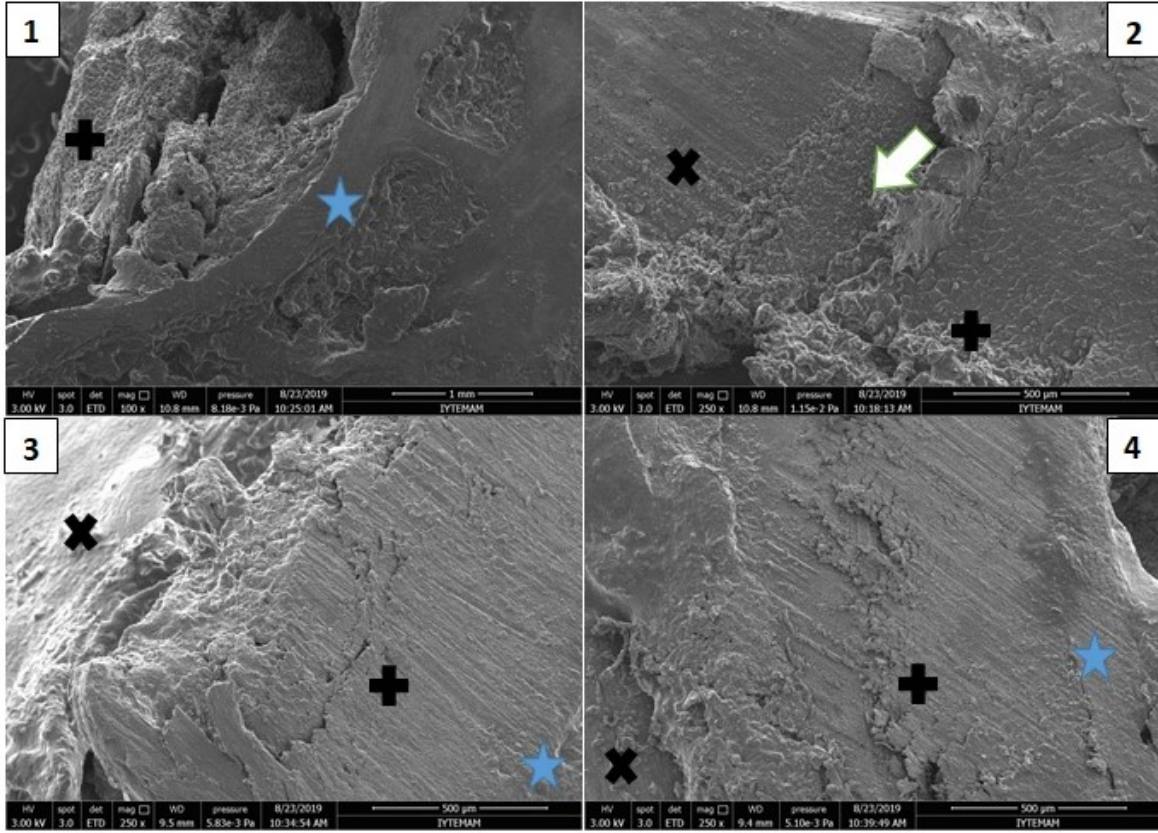
Dokuların iç yandan ve ön yüzden çoklu büyütmelemlerde görüntüleri alındı. Yeni oluşan kıkırdak dokunun komşu kıkırdak ile olan ilişkisi ve yeni oluşan dokunun organizasyonu 8. hafta sonunda göreceli olarak değerlendirildi.

Periferik çift (saat 6 ve 12 hizası) grubunda ön yüzden yapılan görüntülerde yeni oluşan kıkırdak dokudan fibriler yapının komşu kıkırdağa uzandığı ve neredeyse kapandığı izlendi. Periferik tek ve santral grupta tamir dokusunun komşu kıkırdağa doğru fibriler yapı oluşturduğu ancak periferik çift grubuna göre daha az kaynaşma gösterdiği izlenmiştir.



Şekil 21: Tamir dokusu ile sağlam kıkırdak doku arasındaki bölgenin üstten görünümü. 1. grupta defektin kapanmadığı oluşan fibrillerin dokuya yeterince tutunamadığı gözlenmiştir. 2. ve 3. gruplarda defekt bölgesinde kaynaşma olduğu fakat düzgün bir iyileşme olmadığı gösterilmiştir. 4. Grupta iyileşmenin daha fazla olduğu ve tamir dokusu ile sağlam kıkırdak arasındaki mesafenin kapandığı görülmektedir. Ok ile gösterilen bölgede yeni fibrillerin oluştuğu ve dokunun tamir edildiği görülmektedir.

+: Tamir dokusu, x: sağlam kıkırdak doku **ok**: tamir dokusu ile sağlam kıkırdak doku arasındaki sınır **1**: Grup 1 (defekt kontrol), **2**: Grup 2 (periferik tek), **3**: Grup 3 (santral), **4**: Grup 4 (periferik çift)



Şekil 22:Cerrahi işlemden 8 hafta sonrasında tamir dokusunun iç yandan görünümü. Cerrahi işlem uygulanmış tüm gruplarda defekt bölgesindeki tamir dokusu ve yeni oluşan kıkırdak doku gösterilmiştir. 4. grup ve 3. grupta diğer gruplara göre tamir dokusu daha homojen fibril organizasyonu göstermektedir. 1. grupta ise tamamen dağınık bir tamir dokusu izlenmektedir.

+: Tamir dokusu, x: sağlam kıkırdak doku **Ok**: tamir dokusu ile sağlam kıkırdak doku arasındaki sınır, **Yıldız**: subkondral kemik **1**: Grup 1 (defekt kontrol), **2**: Grup 2 (periferik tek), **3**: Grup 3(santral), **4**: Grup 4 (periferik çift)

5. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada osteokondral defektin periferinden yapılan mikrokırık işlemi (subkondral perforasyon) ile santralden yapılan mikrokırık işlemi makroskopik, histolojik ve immünohistokimyasal olarak karşılaştırıldı. Her grupta makroskopik ICRS skoru, histolojik Modifiye O'Driscoll skoru, kırıkta defektindeki oluşan tamir dokusunun defekt sahasına oranı, oluşan yeni kırıktağın komşu kırıktağa olan mesafesi, tip 2 kollajen, tip 1 kollajen ve agregan miktarı değerlendirildi.

Eklem kırıktağı damar, lenf ve sinir yapısı içermeyen bir dokudur. Bu nedenle eklem kırıktağı hasarı sonrasında kondrositler, sınırlı mitoz ve yeni kırıktağı oluşturma kapasitesine sahiptir. Kırıktağı hasarının tedavisindeki amaç, sağlam doku ile tamamen uyum sağlamış, mekanik olarak yeterli güce sahip ve hasarlı bölgeyi tamamen doldurmuş bir hiyalin kırıktağı oluşumudur (2-4). Bu konuda birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, eklem kırıktağı onarımı için mevcut deneysel ve klinik çalışmalarda henüz doğal eklem kırıktağının yapısı ve fonksiyonu elde edilememiştir (6,96). Diğer tedavi yöntemleri ile karşılaştırıldığında tedavi maliyeti, düşük morbidite, kolay uygulanabilir olması ve minimal invaziv bir yöntem olması nedeniyle günümüzde klinik uygulamada en fazla kullanılan yöntem hala mikrokırık yöntemidir (9,10). Pridie tarafından ilk olarak 1959 yılında tanımlanan bu teknik, zamanla gelişmeye devam etmiş ve Steadman tarafından klinik çalışmalar ile popüler hale gelmiştir (4,12,70,74,76). Mikrokırık bir kemik iliği stimülasyon yöntemi olup, Steadman tarafından 2 cm² den küçük, unikompartmantal, evre 3-4 kırıktağı defektlerine, eklem kırıktağı defekt sahasına 2-3 mm aralıklar ile subkondral kemiğin delinmesi şeklinde tarif edilmiştir (12).

Mikrokırık yönteminde subkondral kemik delinerek, kemik iliğinden gelen pluripotent hücrelerin defektin kırıktağı tamir dokusu oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir (97)(98). Yaptığımız deneysel çalışmada gruplar değerlendirildiğinde; diğer mikrokırık yapılan gruplar, defekt kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Modifiye O'Driscoll histolojik skorlaması istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha iyi çıkmıştır ($P < 0,05$) (Tablo 9-10). Bu sonuç, mikrokırık yönteminin literatürde genel kabul görmüş kısa dönem olumlu etkilerini desteklemektedir. Çalışmamızın, literatürdeki sonuçları desteklemesi uygulamış olduğumuz hasar oluşturma ve mikrokırık ile tedavi yöntemlerimizin uygun olduğunu destekler niteliktedir.

Tavşan dizlerindeki defekt sahasındaki tamir dokusunun defekt sahasına oranı (ne kadarlık kısmının tamir dokusu olduğu) değerlendirildiğinde en fazla periferik çift (ort: 0,79) grubunda sonra sırasıyla periferik tek (ort: 0,73), santal (ort: 0,56) ve kontrol (ort: 0,45)

grubunda defektin kıkırdak tamir dokusu ile dolduğu izlenmiştir (Tablo 5). İstatistiksel olarak tamir dokusu doluluğu değerlendirildiğinde; periferik çift ve periferik tek grubunda kontrol grubuna, yine periferik çift grubunda santral grubuna göre daha yüksektir (Tablo 6). Periferik çift ile periferik tek, periferik tek ile santral, santral ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$) (Tablo 6). Shapiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışma; kıkırdak defektinin mikrokırık işlemi sonrası oluşan tamir dokusunun özelliklerini göstermiştir. Çalışmaya 122 tavşan dâhil edilmiş ve operasyon sonrası ilk günden 48. haftaya kadar gruplar oluşturularak sonuçlar karşılaştırılmıştır. Üçüncü günden itibaren kemik iliğinden gelen kök hücrelerin, defektin periferine tutunduğu gözlenmiştir (97). Bizim çalışmamızda da periferik çift ve periferik tek grubunun diğer gruplara göre kıkırdak defektini daha fazla doldurması; periferden mikrokırık yapıldığında pluripotent hücrelerin sağlam kıkırdağa, santrale göre daha yakından tutunma göstererek proliferasyon gösterdiği için defekti daha fazla tamir dokusu ile doldurması yukarıdaki çalışma ile doğrulanmaktadır. Periferik çift ile periferik tek, periferik tek ile santral, santral ile kontrol grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması gruplardaki hayvan sayılarının yetersizliğine yorumlanmıştır.

Periferik tek yapılan grupta hücreler, defektin saat 12 hizasından agreve olarak defekti doldurmaya çalışmaktadır. Defekt sahasını göz önünü aldığımızda mikrokırık deliğinden gelen pluripotent hücreler, bir kenardan sağlam kıkırdak hücrelerine tutunarak geriye kalan alanı doldurmaya çalışmaktadır. Santralden yapılan işlemde ise defektin tam orta noktasından gelen pluripotent hücreler çok yönlü çevre kıkırdağa doğru yol almaktadır. Periferik tek yapılan grup ile santral grup karşılaştırıldığında; periferik tek yapılan grupta hücrelerin karşı sağlam kıkırdağa ulaşma mesafesi, santral tek yapılan gruptan daha fazladır (Şekil 11-12). Santralden yapılan işlem sonucunda defektin merkezinden çıkan hücreler sağlam kenara yarısı kadar mesafede ve daha fazla (çok yönlü) sağlam kıkırdak ile etkileşimi olduğu düşünülmektedir. Santralden yapılan işlemde, hücreler periferiye ulaşarak defekti doldurmaya çalışırken defektin merkezi boş kalmaktadır. Bu durum, mikrokırık uygulanmış grupların makroskobik ICRS skoru karşılaştırıldığında periferik çift ve periferik tek grubu kontrol ve santral grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermesiyle desteklenmiştir (Tablo 7-8). Santral işlem grubunun makroskobik ICRS skorunda periferik çift ve periferik tek grubuna göre düşük puan alması, santral grubunun defekti doldurmaya çalışırken defektin merkezi boş kalmasına ve dolayısıyla defekti doldurma miktarının az olmasına yorumlanmaktadır.

Kıkırdak defektlerinin iyileşmesinde, kıkırdak tamir dokusunun çevre kıkırdağa tutunması, tamir dokusunun değerlendirilmesinde önemli bir parametredir

(62,65).Çalışmamızda cerrahi işlem uygulanmış gruplar Modifiye O'Driscoll Skoru alt grubuna göre; lateral kenarın her ikisine tutunması 2 puan, tek kenardan tutunması 1 puan ve tutunmanın olmaması 0 puan şeklinde puanlanmış ve tamir dokusunun her iki lateral kenara olan uzaklığının toplamı bilgisayar yazılımı ile mikrometre (µm) cinsinden kantitatif ölçülerek değerlendirilmiştir (Tablo 2)(Şekil 16). Ayrıca cerrahi işlem uygulanmış her gruptan randomize seçilmiş ikişer tavşan dizininTaramalı Elektron Mikroskop (SEM) analizi ile göreceli değerlendirilmesi yapılmıştır (Şekil 19-20). Komşu Kıkırdağa Tutunma puanıperiferik çift, periferik tek ve santral grubunda kontrol grubuna göre daha yüksektir ($P<0,05$)(Tablo 12). Diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Oluşan yeni kıkırdağın sağlam kıkırdak kenarına olan mesafesi (µm) değerlendirildiğinde; kontrol grubunda periferik çift ve santral grubuna göre, periferik tek grubunda santral ve periferik çift grubuna göre, santral grubunda periferik çift grubuna göre istatistiksel anlamlı yüksektir ($P<0,05$)(Tablo 14). Kontrol ile periferik tek grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Periferik tek grubu ile santral grup tutunma oranı açısından karşılaştırıldığında periferik grup ortalama 1,5 puan iken santral 1,17 puan almıştır (Tablo 11). Periferik tek grubu ile santral grubun komşu kıkırdağa mesafesi karşılaştırıldığında ise periferik tek 43,18 µm iken santral 40,12 µm şeklinde hesaplanmıştır (Tablo 13). SEM analizi ile yapılan göreceli değerlendirmede de benzer sonuçlar görülmüştür (Şekil 19-20). Bu iki değerlendirmede periferik tek grup ile santral grubunda farklı sonuç çıkmasının sebebiniKomşu Kıkırdağa Tutunma skorunun bir puanlama sistemi olması ve semi-kantitatif bir sonuç olmasına yorumluyoruz. Periferik tek grubu kendi içinde değerlendirildiğinde; oluşan tamir dokusu hepsinde bir kenara tutunmuş ve minimum 1 puan almıştır. Kantitaif “Komşu Kıkırdak ile Mesafesi” ölçümünde yeni oluşan kıkırdağın her iki kenarına olan mesafesinin toplamı değerlendirilmeye alınmıştır. Bu sebep ile santral grubun toplam mesafesi periferik tek grubuna göre daha az iken Komşu Kıkırdağa Tutunma skorunda daha az puan aldığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda cerrahi işlem uygulanan gruplar histolojik olarak değerlendirildiğinde;histolojik Modifiye O'Driscoll skoru periferik çift, periferik tek ve santral grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak 3 kat daha yüksektir. Yine periferik çift grubu genel histolojik Modifiye O'Driscoll skoru, diğer işlem uygulanan gruplardan istatistiksel anlamlı olarak daha yüksektir (Tablo 10). Santral işlemin ortalama Modifiye O'Driscoll Skoru (15,8), periferik tek grubundan (13,0) daha yüksektir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0,05$). Tip 2 kollajen immünreaktivitesi gruplar arasında karşılaştırıldığında periferik çift (ort: 2,83) ve santral grubunda (ort: 2,17) diğer

gruplara göre yüksek olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, periferik tek (ort: 1,33) ile kontrol grubu (ort: 1,0) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 18). Santral grupta mikrokırık işlemi sonrasında periferik tek gruba göre sağlam kıkırdak ile daha fazla ilişkide olması santral grubundaki pluripotent hücrelerin orijinal kıkırdağa benzeme oranını arttırdığı düşünülmektedir (Şekil 11-12). Kıkırdak yapısının temel proteoglikanı olan Agregan'ın immünreaktivitesi gruplar arasında karşılaştırıldığında periferik çift (ort: 2,67) ve santral grubunda (ort: 2,33) kontrol (ort: 1,0) ile periferik tek grubuna (ort: 1,33) göre yüksektir ($p < 0,05$) (Tablo 19-20). Periferik çift ile santral grubu, periferik tek ile kontrol grubu arasındaki agregan ortancası farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Agregan ile Tip 2 kollajen immünreaktivitesi karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonucu, yukarıda ifade ettiğimiz sağlam kıkırdak kenara tutunma miktarı ilişkisi desteklemektedir. Shapiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mikrokırık işlemi sonrası oluşan pluripotent hücrelerin sağlam kıkırdak dokuya tutunduktan sonra hücre farklılaşmasının gerçekleştiği ifade edilmiştir (97). Bu durum da bizim sonucumuzu destekler niteliktedir.

Çalışmamızdaki gruplar arası Tip 1 kollajen immünreaktivitesi değerlendirildiğinde periferik çift grubunda, santral, periferik tek ve kontrol grubuna göre (sırasıyla ort: 2,33, 1,50, 1,17, 1,00) yüksek olup aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P < 0,05$) (Tablo 15-16). Diğer gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tavşanların kıkırdak kalınlıkları 0.25 mm ile 0.75 mm arasında iken, insan kıkırdak kalınlığı yaklaşık 2.2 mm-4.3 mm arasında değişmektedir. Tavşan kıkırdağının ince olması sebebiyle oluşturduğumuz kıkırdak defekti modelinde, 3 mm defekt derinliği alanında kemik dokusunda defekt alanında bulunduğunu açıklamaktadır (99). Deney hayvanı osteokondral defekt modelimizde de defekt tabanında kemik doku bulunmakta ve mikrokırık sonrası oluşan pluripotent hücreler kemik dokuyula ilişki göstermesinden dolayı Tip 1 kollajen immünreaktivitesinin bu şekilde sonuçlandığını düşünüyoruz. Ayrıca tavşan kıkırdağının hasar görmesi sonrası, spontan rejenerasyonun tamamlaması 24. haftayı bulmaktadır (97). Çalışmamızdaki deney hayvanları ise 8. haftada kurban edilmiştir. Kıkırdak tamir dokusunun rejenerasyon evresinde erken faza denk gelmektedir. Hayashi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; ratlara tam kat kıkırdak defekti ve mikrokırık uygulaması yapılarak, ilk günden 56. güne kadar kıkırdak iyileşmesinin karakteristik özellikleri gösterilmiştir ve cerrahi işlem sonrası 8. haftanın kıkırdak iyileşmesi için erken faz olarak değerlendirilmiştir. Ratlarda yapılan çalışma ile de bu sonuç desteklenmektedir (100). Erken fazda kemik iliğinden gelen hücrelerin farklılaşmasının daha az olması sebebiyle, Tip 1

Kollajen immünreaktivitesi Tip 2 kollajen ve Agregan immünreaktivitesi ile karşılaştırıldığında, periferik çift grubu santral gruptan, santral grup periferik tek grubundan ve periferik tek grubunda kontrol grubundan benzer şekilde yüksek çıkmıştır (Tablo 21).

Mikrokırık yönteminin etkinliği üzerine literatürde birçok çalışma mevcut olmasına rağmen, uygulama tekniği üzerine literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Başlıca defekt sahasına açılan perforasyon sayısının, subkondral perforasyonda kullanılan aletlerin tipinin, perforasyonun derinliğinin, subkondral perforatör aletin genişliğinin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin çalışmaları literatürde bulunmaktadır(13–16).

Subkondral kemik perforasyonunda kullanılan perforatör çapı ile ilgili literatürde ulaşılabilen sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Eldracher ve arkadaşları, koyunların diz troklear bölgesine dikdörtgen şeklinde 4x8 mm boyutlarında bir tam kat kırık defekt oluşturarak, defekt bölgesine 1.0 mm ile 1.8 mm'lik farklı kalınlıktaki matkap ucu kullanılarak yapılan subkondral perforasyon işleminin kırık iyileşmesi üzerine etkisi incelemiştir. Sonuçlar işlemiden 6 ay sonra makroskopik skorlama, histolojik skorlama, immünohistokimya (tip I ve tip II kollajen) ve mikro-BT ile değerlendirilmiştir. 1.0 mm'lik matkap ucu 1.8 mm'lik ile karşılaştırıldığında; 1.0 mm'lik matkap ucu subkondral kemiği delmenin daha iyi ortalama toplam histolojik skora, tip II kollajen için daha yüksek immünoreaktiviteye yol açtığı görülmüştür(13). Orth ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada, koyunlarda tam kat kırık defektine 1.0 mm ile 1.2 mm farklı kalınlıktaki matkap (awl) kullanılarak mikrokırık uygulanmıştır. İşlemden 6 ay sonra yapılan değerlendirmede, 1.0 mm'lik matkap (awl) 1.2 mm'liğe göre histolojik olarak daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir(101). Ancak tavşanlarda Min ve ark. yaptığı çalışmada defekt alanına farklı çap ve farklı sayıda mikrokırık işlemi uygulamışlardır. Sonuç olarak defekt sahasına farklı çaplarda ve farklı sayıda mikrokırık yapmanın defekt sahasını dolduran pluripotent hücrelerin sayısının istatistiksel anlamlı olmadığını ifade etmişlerdir. Ancak defekt sahasına daha fazla mikrokırık yapılmasının göreceli olarak daha fazla hücrenin defekt sahasını doldurduğunu göstermişlerdir (102). Marchand ve arkadaşları ise 0.5 mm ile 0.9 mm'lik farklı çap deliklerle tavşan trokleasındaki tam kat kırık defektlerine yapılan mikrokırık işlemi ile 6 aylık süre sonunda çap farklılığının tedavi üzerine etkili bir fark oluşturmadığını bildirmişlerdir(103).

Kırık defektlerinde kullanılan kemik iliği stimülasyonu tekniğinde; subkondral kemik perforasyonunda, perforasyon derinliğinin matkap (awl) veya matkap ucu ile kemik iliği yağ damlacıklarının ve kanamanın görüleceği derinliğe kadar yapılması önerilmektedir(4,12). Literatürde mikrokırık yaparken ne kadar derinlikte yapılması gerektiğine dair bir dizi çalışmaya ulaşılmıştır. Chen ve ark.'larının tavşan dizlerinde yaptığı çalışmada; tam kat

kıkırdak defektlerinde subkondral perforasyon derinliğini, 2 mm ile 6 mm derinlikte yapmanın farkını ortaya çıkarmıştır. 6 mm derinlikte yapılan subkondral perforasyonda 2 mm'ye göre anlamlı bir şekilde tamir doku miktarının arttığını ve tamir dokusu kalitesini iyileştirdiğini göstermiştir(14–16).

Kıkırdak iyileşmesi araştırmalarında kullanılan deney hayvanları modellerinde, kıkırdak defekti genellikle hayvanların femur medial kondil, troklea ya da tibia plato kıkırdağında tam kat (1 mm ile 5 mm çapında olacak şekilde) kıkırdak defektioleştirmek şeklindedir. Tavşanlarda oluşturulan bu hasar boyutlarında bile spontan iyileşme görüldüğü rapor edilmiş olup, tavşanlarda oluşturulan kritik kıkırdak defekt çapının 4 mm – 5 mm olması gerektiği belirtilmiştir(99,104,105) Çalışmamızdaki tavşan osteokondral defekt modelinde de 5 mm çapında defekt oluşturulmuştur. Bu modellerin en büyük sıkıntısı defektin derinliğini ayarlamak için standart cihazlar kullanılamamasıdır. Çünkü kıkırdak iyileşmesini etkileyen faktörler hem defektin büyüklüğü, hem de derinliğidir(105). Bunun yanında insan kıkırdak kalınlığı, tavşanların kıkırdak kalınlıkları ile karşılaştırıldığında; insan femur kondilinde ortalama kıkırdak kalınlığı yaklaşık 2.2 mm - 4.3 mm iken, tavşanlarda ise 0.25 mm - 0.75 mm arasında değişmektedir. Bundan dolayı tavşanlarda oluşturulan kıkırdak defektleri subkondral kemiğide içermekte ve oluşturulan defektler tam kat kıkırdak defektinden daha çok osteokondral defekt modeli olmaktadır(106). Oluşturduğumuz kıkırdak defekti modelinde, standart uygulama için 5 mm çapındaki düz matkap ucundan itibaren vertikal yönlü 3 mm'lik uzaklık cetvel yardımıyla belirlendi. Böylece her tavşan dizinde aynı derinlikte standart osteokondral kıkırdak defekti oluşturuldu. Ayrıca hayvanların diz biyomekaniği insan dizinden çok farklıdır. Fakat yine de bu deneylerden elde edilen sonuçlar insan eklem kıkırdağı tamiri için yol gösterici olmuştur.

Cerrahi işlem uygulanmış tüm gruplar değerlendirildiğinde,defektin periferik sınırından yapılan mikrokirik işleminde yeni oluşan kıkırdak dokusunun miktarı artar iken defektin periferik sınırı ile olan etkileşiminin artması ise yeni oluşan kıkırdak dokunun kalitesini (hyalin kıkırdağa benzemesi) artırmaktadır (Tablo 21). Santralden yapılan mikrokirikta, oluşan dokunun kalitesi artmakta iken; defekti doldurma miktarı ve makroskobik ICRS skoru, periferik tek yapılan mikrokirik işlemine göre azalmaktadır. Bu durum, mikrokirik işlemi ile subkondral kemikten oluşan pluripotent hücrelerin sağlam kıkırdağa olan mesafesi ve sağlam kıkırdak ile olan etkileşimiile açıklanmaktadır. Santralden yapılan işlemde oluşan pluripotent hücrelerin, defektin tüm kenarlarına ulaşması için kalan mesafe daha kısa ve her yönde (360 derece) sağlam kıkırdağa tutunur iken; periferden tek (saat 12 hizası) yapılan işlemde hücrelerin, defektin karşı tarafına ulaşması gereken mesafe daha fazla ve bir yönde tutunarak

ilerlemektedir. Periferik tek yapılan işlemde pluripotent hücreler tek bir yönden sağlam kıkırdak ile etkileşimi mevcut olduğu için, pluripotent hücrelerin sağlam kıkırdak ile etkileşiminin daha az olmasından dolayı immünohistokimyasal immünreaktivite sonuçları santrale göre daha düşüktür. Santralde yapılan işlemde ise oluşan pluripotent hücrelerin sağlam kıkırdak kenarı ile her yönde tutunması için daha kısa mesafesi olduğu için immünohistokimyasal immünreaktivite oranı yüksek çıkmaktadır (Tablo 16,18,20). Ancak santralden yapılan işlemde, delikten gelen pluripotent hücreler periferinden tutunarak defekti doldurduğu için defektin santrali boş kalmaktadır. Bu durum santralden yapılan işlemde tamir dokusu miktarı ve ICRS makroskobik skoru periferik tek yapılan işleme göre daha düşük sonuçlanması ile doğrulanmaktadır. Periferik çift (saat 12 ve 6 hizası) yapılan işlemde ise her iki delikten gelen pluripotent hücrelerin sağlam kıkırdak ile etkileşimi her iki yönden ve daha fazladır. Bu sonuç; periferik çift (saat 12 ve 6 hizası) grubu diğer gruplar ile ICRS makroskobik skoru, Modifiye O'Driscoll skoru, göreceli SEM analizi, kıkırdak tamir dokusu miktarı ve immünohistokimyasal boyanma skorları ile karşılaştırıldığında daha yüksek çıkması ile doğrulanmaktadır (Tablo 21).

Çalışmamızın kısıtlılıkları arasında en başta tavşan dizlerindeki osteokondral defekt alanının kronik değil de akut olarak oluşturulması sayılabilir. Bu durum hayvanlarda oluşturulan kıkırdak defekt modelini, insanda gelişen eklem kıkırdak hasarına göre daha az benzer yapmaktadır. Tavşanların kıkırdak kalınlığı insanların kıkırdak kalınlığına göre çok daha incedir. Bu çalışmanın sınırlayıcı etmenleri; takip süresinin kısalığı, denek hayvan sayısının azlığı ve farklı zamanlarda kurban edilmiş hayvan gruplarının eksikliği olarak sıralanabilir. Diğer kısıtlılıklar; oluşan kıkırdak dokunun biyomekanik değerlendirmesinin yapılamaması, gross makroskobik değerlendirmede mikro-bilgisayarlı tomografi incelemesi yapılamaması, defekt bölgesine daha farklı konfigürasyonda mikrokirik uygulanmış grupların olmamasıdır. Gelecekte belirtilen kısıtlılıklar göz önünde bulundurularak daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Periferden yapılan mikrokırık işlemlerinde (periferik çift ve periferik tek), kemik iliğinden gelen pluripotent hücreler defektin periferik sınırına (sağlam kıkırdak kenarı) tutunduğu için defekt doldurma miktarı, diğer işlem yapılan gruplara göre daha fazla olmaktadır.
2. Defektin santralinden mikrokırık işlemi yapılan grupta, defektin santralinden gelen pluripotent hücreler çevre kıkırdağa çok yönlü yayıldığı için diğer gruplara göre defekt doldurma miktarı daha az olmaktadır. Ancak sağlam kıkırdak ile çok yönlü etkileştiği için periferik tek grubuna göre tamir dokusu hücre kalitesi daha iyi olmaktadır.
3. Mikrokırık işleminde subkondral kemiğe açılan deliğin defektin periferik sınırına (sağlam kıkırdağa) olan mesafesinin önemli olduğunu düşünüyoruz. Subkondral kemikten gelen hücrelerin defektin periferik sınırla (sağlam kıkırdak) olan etkileşim miktarının artması hücre kalitesini artırırken; subkondral kemiğe açılan deliğin defektin periferik sınırına olan mesafesinin azalması kıkırdak tamir dokusu miktarını arttırdığı yaptığımız çalışma sonucunda görülmüştür.
4. Tüm parametreler değerlendirildiğinde, periferik çift grubu diğer gruplardan gerek defekt doldurma miktarı, gerekse tamir dokusu hücre kalitesi olarak daha iyi sonuçlanmıştır.
5. Bu deneysel çalışma sonucunda, küçük kıkırdak defektlerine mikrokırık cerrahi yöntemi uygulanırken periferden başlayarak mikrokırık uygulanmasının, defekt tamir dokusu miktarı ve kalitesini arttırmada önemli olduğunu düşünmekteyiz. Mikrokırık cerrahisinde klinik uygulamada defekt sahasına açılacak deliklerin konumlarının defekt ile olan ilişkisi, defektin hangi tarafına delik açılacağı ve bunların iyileşmeye olan etkisini açıklamak için daha çok deneysel ve klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.
6. Çalışmadaki tavşanlar, farklı zamanlarda sakrifiye edilecek yeni gruplar eklenerek daha fazla tavşan kullanılarak, zamana bağlı kıkırdak değişikliklerinin gözlemlenmesi ve klinik sonuçlara daha çok yol gösterebilmesi için koyun, keçi, at gibi diz eklemleri daha büyük hayvan modelleriyle deneylerin yürütülmesi çalışmamızın sonuçlarını daha açık şekilde ortaya koymak için gereklidir.
7. Çalışmamızdaki sonuçlar, kıkırdak defekt tamiri için kullanılan doku mühendisliği, kıkırdak allogrefti, kök hücre uygulamalarına ve klinikte kullanılan cerrahi yöntemlere yol gösterici olabilir.

KAYNAKÇA

1. Whitesides TE. Orthopaedic Basic Science. Biology and Biomechanics of the Musculoskeletal System. 2nd ed. J Bone Jt Surgery-American Vol. 2001;83(3):482.
2. Gilbert JE. Current treatment options for the restoration of articular cartilage. Am J Knee Surg [Internet]. 1998;11(1):42–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9533054>
3. Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Repair of articular cartilage defects: part II. Treatment options. Am J Orthop (Belle Mead NJ). 1999;28(2):88–96.
4. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. Oper Tech Orthop. 1997;7(4):300–4.
5. Hunter W. VI. Of the structure and diseases of articulating cartilages. Philos Trans R Soc London. 1743;42(470):514–21.
6. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. Vol. 11, Nature Reviews Rheumatology. 2015. p. 21–34.
7. Redondo ML, Naveen NB, Liu JN, Tauro TM, Southworth TM, Cole BJ. Preservation of Knee Articular Cartilage. Sports Med Arthrosc. 2018;26(4):E23–30.
8. Nukavarapu SP, Dorcenus DL. Osteochondral tissue engineering: Current strategies and challenges. Vol. 31, Biotechnology Advances. 2013. p. 706–21.
9. Knutsen G, Isaksen V, Johansen O, Engebretsen L, Ludvigsen TC, Drogset JO, et al. Autologous Chondrocyte Implantation Compared with Microfracture in the Knee: A Randomized Trial. J Bone Jt Surg - Ser A. 2004;86(3):455–64.
10. Kraeutler MJ, Belk JW, Purcell JM, McCarty EC. Microfracture Versus Autologous Chondrocyte Implantation for Articular Cartilage Lesions in the Knee: A Systematic Review of 5-Year Outcomes. Am J Sports Med. 2018;46(4):995–9.
11. Lewis PB, McCarty LP, Kang RW, Cole BJ. Basic Science and Treatment Options for Articular Cartilage Injuries. J Orthop Sport Phys Ther. 2006;36(10):717–27.
12. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: Surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. In: Clinical Orthopaedics and Related Research. 2001. p. S362–9.

13. Eldracher M, Orth P, Cucchiarini M, Pape D, Madry H. Small subchondral drill holes improve marrow stimulation of articular cartilage defects. *Am J Sports Med.* 2014;42(11):2741–50.
14. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Ouyang W, Buschmann MD. Characterization of subchondral bone repair for marrow-stimulated chondral defects and its relationship to articular cartilage resurfacing. *Am J Sports Med.* 2011;39(8):1731–40.
15. Chen H, Hoemann CD, Sun J, Chevrier A, McKee MD, Shive MS, et al. Depth of subchondral perforation influences the outcome of bone marrow stimulation cartilage repair. *J Orthop Res.* 2011;29(8):1178–84.
16. Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, et al. Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J Orthop Res.* 2009;27(11):1432–8.
17. Winalski CS, Alparslan L. Imaging of articular cartilage injuries of the lower extremity. Vol. 12, *Seminars in Musculoskeletal Radiology*. 2008. p. 283–301.
18. Sdfs Flik KR, Verma N, Cole BJ BB. Articular Cartilage. In: Williams RJ (ed) *Cartilage Repair Strategies* First edition USA, New Jersey: Humana Press Inc. 2007. p. 1–12.
19. Stranding S, Wigley C. Introduction and systemic overview: Functional anatomy of the musculoskeletal system. In: Stranding S, Ellis H, Healy JC, Johnson D, Williams A (eds) *Gray's Anatomy, 39th Edition: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 2005. p. 83-134.
20. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;(391 Suppl):S26-33.
21. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* [Internet]. 1998;47:477–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571449>
22. Outerbridge RE. Further studies on the etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br.* 1964;46:179–90.
23. Henry S, Deasy B, Chu C. Articular Cartilage. In: *Insall & Scott Surgery of the Knee, Fifth Edition* ed. 2012. p. 146–52.
24. Goldring SR, Goldring MB. Biology of the Normal Joint. In: *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 2013. p. 1-19.e6.

25. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW. Chondrons in cartilage: Ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res.* 1987;5(4):509–22.
26. Vanden Berg-Foels WS, Scipioni L, Huynh C, Wen X. Helium ion microscopy for high-resolution visualization of the articular cartilage collagen network. *J Microsc.* 2012;246(2):168–76.
27. Goldring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2012;4(4):269–85.
28. Mow VC, Guo XE. Mechano-Electrochemical Properties Of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4(1):175–209.
29. Archer C, Ralphs J. Regenerative medicine and biomaterials for the repair of connective tissues. *Regenerative Medicine and Biomaterials for the Repair of Connective Tissues.* 2010. 1–485 p.
30. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. In: *Arthritis and Rheumatism.* 1998. p. 1331–42.
31. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules.* Vol. 17, *BioEssays.* 1995. p. 1039–48.
32. Bush PG, Hall AC. The volume and morphology of chondrocytes within non-degenerate and degenerate human articular cartilage. *Osteoarthr Cartil.* 2003;11(4):242–51.
33. Stockwell RA. Chondrocytes. *J Clin Pathol.* 1978;(12):7.
34. Michael Ulrich-Vinther, MD, Michael D. Maloney, MD, Edward M. Schwarz, PhD, Randy Rosier, MD, PhD, and Regis J. O’Keefe, MD P. *Articular Cartilage Biology.* *J Am Acad Orthop Surg.* 2003;
35. Bruckner P. Supramolecular Structure of Cartilage Matrix. In: *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism.* 2006. p. 407–20.
36. Redondo ML, Naveen NB, Liu JN, Tauro TM, Southworth TM, Cole BJ. Preservation of Knee Articular Cartilage. Vol. 26, *Sports Medicine and Arthroscopy Review.* 2018. p. E23–30.
37. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2005.
38. Perrimon N, Bernfield M. Cellular functions of proteoglycans - An overview. *Semin*

- Cell Dev Biol. 2001;12(2):65–7.
39. Asperger A. Cartilage proteoglycans. In: *Cartilage: Volume 1: Physiology and Development*. 2016. p. 1–22.
 40. Mow VC, Ateshian GA, Spilker RL. Biomechanics of Diarthrodial Joints: A Review of Twenty Years of Progress. *J Biomech Eng*. 2008;115(4B):460.
 41. Lu XL, Mow VC. Biomechanics of articular cartilage and determination of material properties. Vol. 40, *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2008. p. 193–9.
 42. Soltz MA, Ateshian GA. Experimental verification and theoretical prediction of cartilage interstitial fluid pressurization at an impermeable contact interface in confined compression. In: *Journal of Biomechanics*. 1998. p. 927–34.
 43. Kempson GE. Relationship between the tensile properties of articular cartilage from the human knee and age. *Ann Rheum Dis*. 1982;41(5):508–11.
 44. Eberhardt AW, Lewis JL, Keer LM. Normal Contact of Elastic Spheres With Two Elastic Layers as a Model of Joint Articulation. *J Biomech Eng*. 2008;113(4):410.
 45. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr Cartil*. 2002;10(6):432–63.
 46. Hunter DJ, Felson DT. Osteoarthritis. *BMJ*. 2006;332(7542):639–42.
 47. Rodriguez-Merchan EC. Regeneration of articular cartilage of the knee. *Rheumatol Int*. 2013;33(4):837–45.
 48. Charalambous CP. The response of articular cartilage to mechanical injury. In: *Classic Papers in Orthopaedics*. 2014. p. 381–3.
 49. Samuel D, Madoff, Jarett S, Burak, Kevin R, Math DMW. Knee Imaging Techniques and Normal Anatomy. In: *Insall & Scott Surgery of the Knee*. 2012. p. 86–297.
 50. Potter HG, Chong LR. Magnetic resonance imaging assessment of chondral lesions and repair. In: *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. 2009. p. 126–31.
 51. Ronga M, Angeretti G, Ferraro S, De Falco G, Genovese EA, Cherubino P. Imaging of articular cartilage: Current concepts. Vol. 2, *Joints*. 2014. p. 137–40.
 52. DeHaven KE, Collins HR. Diagnosis of internal derangements of the knee. The role of arthroscopy. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 1975;57(6):802–10.
 53. Spahn G, Klinger HM, Hofmann GO. How valid is the arthroscopic diagnosis of cartilage lesions? Results of an opinion survey among highly experienced arthroscopic surgeons. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009;129(8):1117–21.
 54. Farr J, Cole B, Dhawan A, Kercher J, Sherman S. Clinical cartilage restoration: Evolution and overview. In: *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2011. p.

- 2696–705.
55. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 1997;13(4):456–60.
 56. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*. 1961;43-B:752–7.
 57. Bauer M, Jackson RW. Chondral lesions of the femoral condyles: A system of arthroscopic classification. *Arthroscopy*. 1988;4(2):97–102.
 58. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injuries and repair. In: *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. 2003. p. 58–69.
 59. Cameron ML, Briggs KK, Steadman JR. Reproducibility and reliability of the outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically. *Am J Sports Med*. 2003;31(1):83–6.
 60. Mankin HJ, Lippiello L. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. *J Bone Joint Surg Am*. 1970;52(3):424–34.
 61. Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Cells Tissues Organs*. 1992;143(4):335–40.
 62. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Jt Surg*. 1988;70(4):595–606.
 63. 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 Mesenchymal Defects Repair of Articular of Large , Cartilage. *Surger*. 1994;76(4):579–92.
 64. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of cartilage repair: A report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). In: *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. 2003. p. 45–57.
 65. Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nesic D, Knutsen G, Kandel R, Roberts S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *Am J Sports Med*. 2010;38(5):880–90.
 66. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint

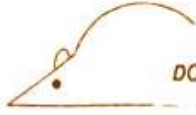
- surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Jt Surg*. 1986;68(7):1017–35.
67. Moojen DJF, Saris DBF, Auw Yang KG, Dhert WJA, Verbout AJ. The Correlation and Reproducibility of Histological Scoring Systems in Cartilage Repair. *Tissue Eng*. 2002;8(4):627–34.
 68. Ike R, Arnold W. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *J Bone Jt Surg - Ser B*. 1992;74(5):788–9.
 69. Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. Vol. 34, *International Orthopaedics*. 2010. p. 621–30.
 70. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Jt Surg*. 1959;41:618–9.
 71. Gomoll AH, Farr J, Gillogly SD, Kercher JS, Minas T. Surgical management of articular cartilage defects of the knee. *Instr Course Lect* [Internet]. 2011;60:461–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21553792>
 72. Insall J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1974;(101):61–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4837919>
 73. Sansone V, De Girolamo L, Pascale W, Melato M, Pascale V. Long-term results of abrasion arthroplasty for full-thickness cartilage lesions of the medial femoral condyle. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2015;31(3):396–403.
 74. Simon TM, Jackson DW. Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. Vol. 26, *Sports Medicine and Arthroscopy Review*. 2018. p. 146–54.
 75. Murawski CD, Kennedy JG. Operative treatment of osteochondral lesions of the talus. Vol. 95, *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*. 2013. p. 1045–54.
 76. Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, Krause SJ, Lahm A, Niemeyer P, et al. Is Microfracture of Chondral Defects in the Knee Associated With Different Results in Patients Aged 40 Years or Younger? *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2006;22(11):1180–6.
 77. Goyal D, Keyhani S, Lee EH, Hui JHP. Evidence-based status of microfracture technique: A systematic review of Level I and II studies. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2013;29(9):1579–88.
 78. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: Average 11-year follow-up. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2003;19(5):477–84.

79. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects: A preliminary report. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 1997;5(4):262–7.
80. Bobić V. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: A preliminary clinical study. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 1996;3(4):262–4.
81. Ahmad CS, Guiney WB, Drinkwater CJ. Evaluation of donor site intrinsic healing response in autologous osteochondral grafting of the knee. *Arthroscopy.* 2002;
82. Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: Ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Jt Surg - Ser A.* 2003;85(SUPPL. 1):25–32.
83. Chu CR, Convery FR, Akeson WH, Meyers M, Amiel D. Articular cartilage transplantation. Clinical results in the knee. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;(360):159–68.
84. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res.* 1989;7(2):208–18.
85. Gillogly SD, Voight M, Blackburn T. Treatment of Articular Cartilage Defects of the Knee With Autologous Chondrocyte Implantation. *J Orthop Sport Phys Ther.* 2013;28(4):241–51.
86. Dozin B, Malpeli M, Cancedda R, Bruzzi P, Calcagno S, Molfetta L, et al. Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. *Clin J Sport Med.* 2005;15(4):220–6.
87. Enea D, Cecconi S, Busilacchi A, Manzotti S, Gesuita R, Gigante A. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2012;20(5):862–9.
88. Basad E, Wissing FR, Fehrenbach P, Rickert M, Steinmeyer J, Ishaque B. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee: clinical outcomes and challenges. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc.* 2015;23(12):3729–35.
89. Khademhosseini A, Langer R. A decade of progress in tissue engineering. *Nat Protoc.* 2016;11(10):1775–81.
90. Green WT. Articular cartilage repair. Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop Relat Res [Internet].* 1977;(124):237–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/598084>
91. 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.
92. Akter F. Principles of Tissue Engineering. In: *Tissue Engineering Made Easy*. 2016. p. 3–16.
 93. Xu X, Shi D, Shen Y, Xu Z, Dai J, Chen D, et al. Full-thickness cartilage defects are repaired via a microfracture technique and intraarticular injection of the small-molecule compound kartogenin. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1).
 94. Xing L, Jiang Y, Gui J, Lu Y, Gao F, Xu Y, et al. Microfracture combined with osteochondral paste implantation was more effective than microfracture alone for full-thickness cartilage repair. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. 2013;21(8):1770–6.
 95. Hoemann CD, Sun J, McKee MD, Chevrier A, Rossomacha E, Rivard GE, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartil*. 2007;15(1):78–89.
 96. Walter SG, Ossendorff R, Schildberg FA. Articular cartilage regeneration and tissue engineering models: a systematic review. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2019;139(3):305–16.
 97. Shapiro FSKMJG. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(4):532–53.
 98. Kreuz PC, Steinwachs MR, Erggelet C, Krause SJ, Konrad G, Uhl M, et al. Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartil*. 2006;14(11):1119–25.
 99. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng - Part B Rev*. 2010;16(1):105–15.
 100. Hayashi S, Nakasa T, Ishikawa M, Nakamae A, Miyaki S, Adachi N. Histological Evaluation of Early-Phase Changes in the Osteochondral Unit After Microfracture in a Full-Thickness Cartilage Defect Rat Model. *Am J Sports Med*. 2018;46(12):3032–9.
 101. Orth P, Duffner J, Zurakowski D, Cucchiaroni M, Madry H. Small-Diameter Awns Improve Articular Cartilage Repair after Microfracture Treatment in a Translational Animal Model. *Am J Sports Med*. 2016;44(1):209–19.
 102. Min BH, Choi WH, Lee YS, Park SR, Choi BH, Kim YJ, et al. Effect of different bone marrow stimulation techniques (BSTs) on MSCs mobilization. *J Orthop Res*. 2013;31(11):1814–9.

103. Marchand C, Chen G, Tran-Khanh N, Sun J, Chen H, Buschmann MD, et al. Microdrilled cartilage defects treated with thrombin-solidified chitosan/blood implant regenerate a more hyaline, stable, and structurally integrated osteochondral unit compared to drilled controls. *Tissue Eng - Part A*. 2012;18(5–6):508–19.
104. Cook JL, Hung CT, Kuroki K, Stoker AM, Cook CR, Pfeiffer FM, et al. Animal models of cartilage repair. *Bone Jt Res*. 2014;3(4):89–94.
105. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthr Cartil*. 2009;17(6):705–13.
106. Räsänen T, Messner K. Regional variations of indentation stiffness and thickness of normal rabbit knee articular cartilage. *J Biomed Mater Res*. 1996;31(4):519–24.





Gündem No/Toplantı No/Yıl : 01/07/2018
Toplantı Tarihi : 03 Nisan 2018

Sayın, Prof.Dr.Mustafa Can KOŞAY
DEÜ Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

17/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Tavşan Osteokondral Defekt Modelinde Mikrokırık Lokalizasyonunun Histomorfolojik Araştırılması" isimli; Ali İhsan Kılıç, Bekir Uğur Ergur, H.Alper Bağrıyanık, Onur Hapa, Pınar Akokay'ın araştırmacı olduğu; 23 adet dışı tavşan talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


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

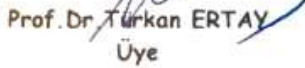

Prof. Dr. Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili


Prof. Dr. Safiye AKTAŞ
Üye

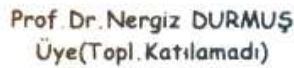

Prof. Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye

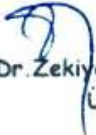

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
Üye


Prof. Dr. Günay KIRKIM
Üye


Prof. Dr. Türkan ERTAY
Üye

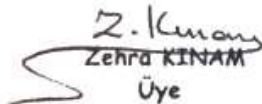

Prof. Dr. Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman


Prof. Dr. Nergiz DURMUŞ
Üye(Topl. Katılamadı)


Prof. Dr. Zekiye Sultan ALTUN
Üye


Doç. Dr. Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye


Doç. Dr. Orhan KALEMCI
Üye (Topl. Katılamadı)


Z. Kınan Zehra KINAM
Üye


Vet. Hekim Adnan SERDEN
Üye

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



Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/13/2019
Toplantı Tarihi : 10 Temmuz 2019

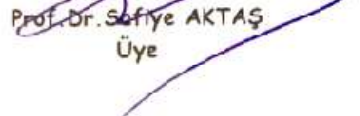
Sayın, Prof.Dr.Mustafa Can KOŞAY
DEÜ Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

17/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Tavşan Osteokondral Defekt Modelinde Mikrokirik Lokalizasyonunun Histomorfolojik Araştırılması" isimli; Ali İhsan Kılıç, Bekir Uğur Ergür, H.Alper Bağrıyanık, Onur Hapa, Pınar Akokay'ın araştırmacı olduğu; 23 adet dışı tavşan talep edilen projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilen projede, gönderilen belgeler incelenerek, ek olarak 6 adet dışı tavşan verilmesi uygun bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

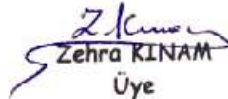

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye (Topl.Katılmadı)

Prof.Dr.Nergiz DORMUŞ


Prof.Dr.Gamze ÇAPA KAYA
Üye (Topl.Katılmadı)


Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN
Üye


Zehra KINAM
Üye

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili


Prof.Dr.Hatice Nur OLGUN
Üye


Prof.Dr.Gökay KIRKIM
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman


Prof.Dr.Semra KOÇTÜRK
Üye

Doç.Dr.Sefa KURT
Üye(Topl.Katılmadı)

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye(Topl.Katılmadı)

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