



**T.C. MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE  
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**



# **SIÇAN KULAK PERİKONDRIUMUNUN KIKIRDAK APOPTOZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Volkan BEDEN  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Emrah ARSLAN**

**MERSİN - 2008**



**T.C. MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE  
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**



# **SIÇAN KULAK PERİKONDRIUMUNUN KIKIRDAK APOPTOZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Dr. Volkan BEDEN  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Emrah ARSLAN**

**Bu tez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Fonu tarafından  
BAP-TF CTB ( EA ) 2006-1 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MERSİN - 2008**

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında her basamakta yardımcı olan, tez danışmanım hocam Sayın Doç. Dr. Emrah ARSLAN'a, araştırma görevliliğim süresince tüm sorunlarımıza anlayışla yaklaşan, bilgi ve birikimlerini bizden esirgemeyen, meslek sırlarını bizlere öğreten değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Ferit DEMİRKAN'a, Sayın Doç Dr.Şakir ÜNAL'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Yavuz BAŐTERZİ'ye, Sayın Yrd. Doç. Dr. Alper SARI'ya, teşekkürü borç bilirim.

Tezimin hazırlanmasında emekleri geçen birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım Uzm. Dr. Onur Gürbüz, Uzm. Dr. Necmettin Tütüncü, Dr. Atilla Fesli, Dr. Tolga Yener. Dr. Mehmet Güşen'e teşekkür ederim.

Biyokimyasal incelemeleri ve değerlendirmeleri yapan Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Gürbüz POLAT ve asistan arkadaşım Dr. Özlem Görüroğlu'na,

Patolojik incelemeleri ve değerlendirmeleri yapan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç Dr.Ayşe POLAT'a

Elektron mikroskopik incelemeleri ve değerlendirmeleri yapan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embrioloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç Banu COŐKUN'a

İstatistiksel analizleri yürüten Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Arzu KANIK ve asistan arkadaşım Dr. Mehmet Ali'e,

Poliklinikte birlikte çalıştığım bölüm hemşirelerimizden Hemş. Yıldız Özfırat ve yarabakım polikliniğimizde birlikte çalıştığım Hemş. Serap Randa'ya desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışma azmini, disiplinini örnek aldığım sevgili kayınbabam Mehmet DUMLU ve ailesine teşekkürü borç bilirim.

Hekimle evli olmanın sorumluluklarını omzunda taşıyan, sevgisinden güç aldığım sevgili eşim Evin Serra BEDEN'e teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>5</b>
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b>	<b>6</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>7</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>9</b>
Kıkırdak anatomisi, fizyolojisi, fiziksel özellikleri	9
Kıkırdak grefti kaynakları	12
Kıkırdak hasarı ve iyileşmesi	13
“Apoptozis” Terminolojisi	14
Kaspaz Ailesi	17
Bcl-2 Ailesi	19
Ölüm Reseptörleri	20
Kıkırdak Apoptozisi (Kondropitoz) “Chondroptosis”	20
<b>GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>	<b>23</b>
Etik Kurul Onayı	23
Çalışmanın Materyal ve Metodu	23
Apoptozisin Tespiti	27
Işık Mikroskopundaki Değerlendirme	27
Biyokimyasal Değerlendirme	28
Elektron Mikroskopundaki Değerlendirme	29
İstatistiksel Değerlendirme	30
<b>BULGULAR</b>	<b>31</b>
Işık Mikroskopundaki Bulgular	31
Işık Mikroskopik Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi	36
Biyokimyasal Bulgular	38
Biyokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirmesi	39
Elektron Mikroskopundaki Bulgular	40
<b>TARTIŞMA</b>	<b>43</b>
<b>SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>46</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>49</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	<b>53</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b>	<b>54</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>55</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b>	<b>56</b>

## ÖZET

Kıkırdak greftleri rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kullanılan kıkırdak greftlerinin dayanıklılığı ve yaşayabilirliği, rekonstrüksiyon ameliyatlarının uzun dönemli sonuçlarını etkilemektedir. Kıkırdak dokunun besin ve oksijen kaynağı olan perikondrium, kıkırdak dokunun canlılığının devamında ve iyileşmesinde önemli görevlere sahiptir. Bu amaçla kıkırdağın birincil beslenmesini sağlayan doku olan perikondriumun, korunduğu ve korunmadığı durumlarda travmatik kıkırdağın hücre ölüm mekanizmalarından olan apoptozis profilini çalışmayı planladık. Çalışma sonucunda, kıkırdak greftleri arasında programlanmış hücre ölümü farkı saptanırsa bu cerraha kıkırdak greftlerinin uygulanma prensipleri konusunda yol gösteriyor olabilecektir.

Çalışmamızda Wistar tipi 99 adet erişkin sıçan deney hayvanı olarak kullanıldı. Perikondriumu vaskülerize, perikondrium ile birlikte ve perikondriumsuz kıkırdak greft grupları kendi içlerinde skoring yapılan ve yapılmayan gruplara bölündü. Gruplar 1 hafta, 4 hafta ve 12 hafta izlendi. Kıkırdak greftlerinden alınan örnekler, apoptozis ve rezorpsiyon açısından TUNEL metodu ile; apoptozun kalitatif değerlendirilmesi açısından da elektron mikroskobu değerlendirildi. Kan örneklerinde serum Nitrat (NO) ve Malonilaldehid (MDA) seviyeleri araştırıldı.

TUNEL tekniği sonucu, perikondriumsuz koyulan kıkırdak greftlerinde 1. hafta ve 4. hafta aralıklarında yüksek oranda apoptozis varlığı tespit edildi. Perikondriumlu travmatik olmayan kıkırdak greftlerinin 12. haftaya kadar apoptozis oranlarının düşük kaldığı, perikondriumlu travmatik kıkırdak greftlerinin 12. hafta apoptozis oranlarının arttığı tespit edildi. Serum MDA ve NO seviyelerinin perikondriumsuz greftlerde 4. haftada yükseldiği, diğer zaman aralıklarında ise farklı olmadığı görüldü. Elektron mikroskobunda apoptozisin aşamaları tespit edildi. Diğer gruplardan farklı olarak perikondriumsuz greftlerde nekroz ve matriks degradasyonu da izlendi.

Bu çalışma, sık kullanılan kıkırdak greft metodlarını, perikondriumun kıkırdak apoptozisi üzerine etkisini araştıran ilk örnek olması açısından önemlidir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz, Kıkırdak, Perikondrium, Rat, TUNEL

## **ABSTRACT**

### **The Effects of Rat Ear Perichondrium on Cartilage Apoptosis**

Cartilage grafts have been commonly used in reconstructive surgery. The resistance and viability may have an impact on their long term success. Perichondrium, which is the main source of nourishment and oxygen, has a major role in maintaining the viability and healing capacity of the cartilage tissue. Herein, we planned a study to demonstrate the apoptosis profile of traumatic cartilage in cases of perichondrium-preserved and non-preserved conditions. A detection of differences in programmed cell death may lead the surgeon to improve the principles of cartilage greft usage.

In our study, we used 99 Wistar rats. Grafts with vascularized perichondrium, with non-vaskularised perichondrium and without perichondrium groups were divided into scorred and nonscorred groups. They were observed one, four or twelwe weeks. Apoptosis and resorption were evaluated by TUNEL method and electron microscopy. Serum nitrate and malondialdehyde levels were detected in blood samples.

TUNEL tecnique results revealed that the grafts without perichondrium group had higher apoptosis rate in the first and fourth weeks. Nontraumatic cartilage grafts with perichondrium have had low apoptosis levels in the first and fourth weeks and this rised only in traumatic cartilage grafts with perichondrium in the twelfth weeks. Serum MDA and NO levels rised in grafts without perichondrium group in the fourth week, and no difference with other groups in the first and twelfth week was observed. Apoptosis stages were detected with electron microscopy. Necrosis and matrix degradation were seen only in the grafts without perichondrium group.

It is important that this is the first study detecting the effect of perichondrium on cartilage apoptosis.

Key words: Apoptosis, Cartilage, Perichondrium, Rat, TUNEL

## GİRİŞ VE AMAÇ

Modern plastik cerrahi uygulamalarında kıkırdak grefti kullanımı estetik ve rekonstrüktif uygulamalarında önemli bir yere sahiptir. Yapılmış olan birçok çalışma, kullanılan kıkırdak greftlerinin klinik olarak başarılı sonuçlar verdiğini göstermiştir.<sup>1</sup> Ancak kıkırdak dokusu, vücutta kısıtlı miktarda bulunur ve kıkırdak defekti veya deformitesi gibi onarılması gereken durumlarda, yine bir kıkırdak dokusunun kullanılması tercih edilir.<sup>2</sup>

Kıkırdak grefti kullanılarak yapılan onarımlarda ise, uygulanan kıkırdak greftinin zamanla deforme olabildiği veya rezorbe olarak hacminin azalabildiği klinik olarak bilinen bir durumdur.<sup>2,3</sup> Bu tip istenmeyen etkiler, kıkırdak grefti kullanılarak yapılan nazoplasti, yarık dudak burnu, doğumsal kulak yokluğu (mikrotia), gibi ameliyatların özellikle uzun dönemli sonuçlarını etkileyerek başarısını azaltabilmekte ve düzeltici ek işlemlere gerek duyulabilmektedir.<sup>2</sup>

Kıkırdak greftinin canlılığının ve dolayısıyla yapısal özelliklerinin mümkün olduğunca korunabilmesi cerrahinin başarısı ve uzun dönem sonuçlar üzerinde en etkili faktörlerdendir.<sup>4</sup> Kıkırdakta oluşabilecek yapısal sorunlara yol açabilen başlıca iki süreç vardır. Bunlardan ilki nekroz iken, ikincisi apoptozistir. Nekroz dokunun beslenme bozukluğu, apoptozis ise programlanmış hücre ölümüdür. Nekrotik değişikliklerden iyi bilinen cerrahi teknikler uygulanarak bir ölçüde kaçınmak mümkün olsa da, apoptozisin sebep olduğu kıkırdak hücre ölümlerinden nasıl korunabileceği henüz tam açıklanabilmiş değildir.

Travmanın septal ve artiküler kıkırdak üzerinde apoptotik etkilerinin olduğu klinik çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>1,5</sup> Travmanın neden olabileceği kıkırdak apoptozisinin azaltılması ile ilgili bir veriye ise literatürde rastlanmamıştır. Bizim çalışmamızın ana felsefesi, travmatik kıkırdağın apoptozisten korunma yöntemlerinin araştırılmasıdır. Bu konuda temel yaklaşımımız, çeşitli kıkırdak grefti kullanım tekniklerindeki farklılıkların, kıkırdak apoptozisi üzerine etkilerini değerlendirmektir.

Kıkırdak greftleri, ameliyatlarda üzerindeki perikondrium korunarak veya korunmaksızın kullanılabilir. Kıkırdak beslenmesi doğrudan kanlanma yoluyla değil, difüzyon yoluyla olmaktadır. Bu süreçte, iyi damarlanan bir yapı olan ve kıkırdağı dıştan saran perikondrium etkin bir öneme sahiptir. Bu gerçek,

kıkırdak grefti üzerindeki korunan perikondriumun apoptozisi azaltılabileceğini düşündürebilir. Bu düşüncüyü destekleyecek şekilde, kendi kanlanması olan dokularda, korunan veya arttırılan kanlanmanın apoptozisin azaltılması üzerine olumlu etkileri bildirilmiş dahi olsa<sup>6</sup>, kıkırdak greftinin iyi kanlanmaya nasıl cevap vereceği ile ilgili bir veri henüz literatürde yoktur. Bu amaçla kıkırdağın birincil beslenmesini sağlayan doku olan perikondriumun korunduğu, ve korunmadığı durumlarda travmatik kıkırdağın apoptozis profilini çalışmayı planladık.

Özellikle iç organlarda zaman faktörünün apoptozisi azaltıcı bir etkisi olduğu biliniyor iken, kıkırdak greftlerde zaman özellikle travmatik kaynaktan elde edilenlerde kısalma, şekil değiştirme, hacim kaybı gibi çeşitli yapısal farklılıklara neden olmaktadır.<sup>7</sup> Zaman faktörünün kıkırdak apoptozisi üzerine etkilerini gözlemleyebilmek için, çalışmamızda, 1, 4 ve 12 haftalık süreçlerde hayvanlar feda edildi. Böylece, değişik zaman aralıklarında travmatik kıkırdak dokusunun apoptozis profilinin çıkarılması ile klinik olarak gözlemlediğimiz değişikliklerin apoptozise mi, yoksa diğer olası neden olan nekroza mı bağlı olduğu konusunda fikir sahibi olabileceğiz.



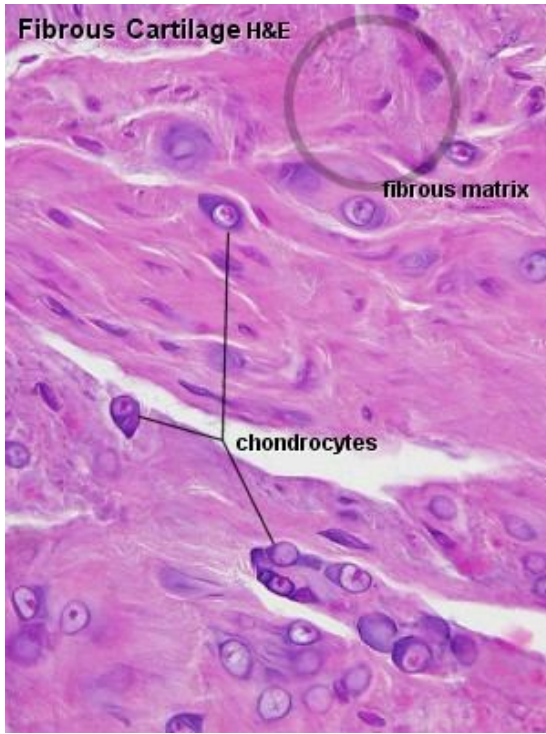
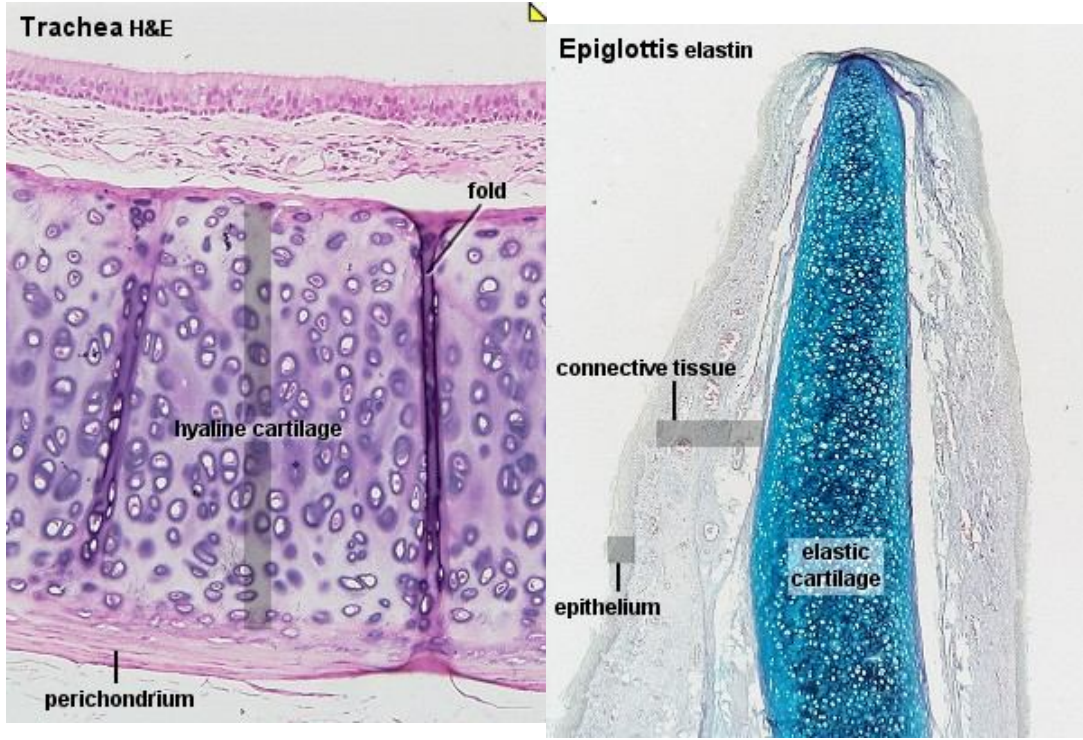
## GENEL BİLGİLER

### Kıkırdak Anatomisi, Fizyolojisi, Fiziksel Özellikleri

Kıkırdak, temelinde proteoglikan, kollajen ve sudan oluşan, ve ekstraselüler matriksi içinde kondrositlerin oluşturduğu basit ancak yüksek oranda özelleşmiş bir yapıya sahip bağ doku elemanıdır.<sup>7,8</sup> Kıkırdak yapısında vasküler ağ olmadığı için iyileşme ve rejenerasyon potansiyeli kısıtlı olmaktadır.<sup>8,9</sup> Bu nedenle kıkırdak hasarı fonksiyon ve içerik kaybına neden olan skar oluşumu ile sonuçlanmaktadır.<sup>7-10</sup> Yapısal olarak beslenmesi vasküler bir ağdan ziyade difüzyon ile olduğundan, şekil verilerek çeşitli kontur düzeltmelerinde ve rekonstrüksiyonlarda rahatlıkla kullanılabilir olmaktadır. Bunun yanında yapısının basit olması nedeniyle doku mühendisliğinde bununla ilgili çalışmalarda çok hızlı ilerlemeler kaydedilmektedir.<sup>11</sup>

Kıkırdak proteoglikan jeli içerisinde sık kollajen ağının olduğu solid matriks fazı ile interstisyel sıvı fazından oluşan bifazik yapıdadır. İnterstisyel sıvı kıkırdağın viskoelastik yapısını sağlamakla birlikte kondrositlerin ihtiyacı olan besinlerin difüzyon yolu ile taşınmasını sağlar.<sup>12</sup> Hücreler kıkırdağın %1-12 gibi çok küçük bir hacmini oluşturmaktadır. Vasküler yapıda olan organlardaki hücreler kadar metabolik ihtiyaçları fazla değildir. Ekstraselüler matriks içine yerleşmiş olan kondrositler kıkırdağın biyomekanik özelliğini veren kollajen, glikozaminoglikan ve elastin gibi makro molekülleri ekstraselüler ortama sağlar.<sup>13</sup>

Kıkırdak, gelişen embriyoda mezodermden köken alır. Genç hayvanlarda ya interstisyel alanda mitosis ile ya da perikondrium kaynaklı hücrelerin büyümesiyle meydana gelir. Kondrositler çoğaldıkça kondron denen alt ünitelere ayrılır ve etrafı multilamine matriks tarafından çevrelenmiştir. Olgun kıkırdak ise apposisyonel büyüme ile gelişir. Çevredeki perikondriumun alt zonunda bulunan hücreler kondroblastlara dönüşür. Kondronun içinde bulunduğu matriks proteoglikan ve hyaluronik asitten zengindir. Proteoglikanlar negatif yüklüdürler. Doku hidrasyonundan ve eklem yüzeye binen mekanik güçlere karşı dayanıklılıktan sorumludur.



Resim 1: Üç tip kıkırdak dokusu olan hyalin(üst sağ), elastik(üst sağ) ve fibröz (alt) kıkırdakların, hematoksilin eosin boyama ile ışık mikroskobisi altında görüntüsü.

Dipnot: Resim 1, <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Cartilage> The University of Western Australia Erişim tarihi: 16.08.2008 tarihinde erişilmiştir.

Kıkırdak vücutta hyalin kıkırdak, elastik kıkırdak ve fibröz kıkırdak olmak üzere 3 tipte bulunur. Hyalin ve elastik kıkırdakta predominant kollajen tip 2'dir. Daha az olarak tip 6, 9 ve 11 de bulunmaktadır. Fibröz kıkırdakta ise en yoğun kollajen tip 1 vardır (%90). Daha az sıklıkla tip 2, tip 3 ve tip 5 kollajen vardır. Elastin gibi nonkollajenöz proteinler elastik kıkırdak içinde bol miktarda bulunur ve distraksiyon kuvvetlerine dayanıklı olmayı sağlar.

**Tablo 1:** Kıkırdak tipleri ve yapısal özellikleri

Tip	Fonksiyon	Lokasyon	Hasara cevap
Hyaline	Yükü dağıtmak	Eklemler göğüs kafesi ve trakea	İyileşme kısıtlı, rejenerasyon komşu kemikten kanama ve hücre infiltrasyonu ile
Elastik	Destek sağlar	Kulak ve larenks	İyileşme kısıtlı. Çevre dokudan infiltrasyon sonucu skar dokusu
Fibröz	Yük transferi	İntervertebral disk, menüsküs	Skar oluşumu

Ekstraselüler matriks yaş, hasar ve metabolik hastalıklarla değişme eğilimindedir. Örneğin matriksteki kollajen miktarı yaşla birlikte artarken proteoglikan içeriğinde azalma oluşur. Bu nedenle matriks katılaşıp hatta kalsifiye olabilir. Yaş ilerledikçe mineralizasyonu artan kostal kıkırdağın greft olarak kullanılması teknik güçlükler gösterebilir.

Dışta fibröz zon ve içeride selüler zon adı verilen iki zondan oluşan perikondrium, kıkırdağı çepeçevre sarar ve bunun mekanik özelliklerine katkıda bulunur. Dıştaki zon yoğun kollajen ve elastik fibriller içerir ve çevre doku ile iç içe geçmiştir. İçerideki zon ise subperikondreal kıkırdak ile iç içe geçmiş, ve greft olarak kullanıldığında ve gençlerde progenitör hücre sağlamakla görevlidir. Hayatın ilk yıllarında iç zon kalındır ancak zamanla neredeyse yok olur<sup>14</sup>. Bununla birlikte bu özelleşmiş konnektif doku kan dolaşımının olmasından dolayı kıkırdak için gerekli besinlerin sağlanmasından, proliferasyon ve

differentiasyon bölgesinin düzenlenmesinden, kıkırdak onarım ve rejenerasyonundan sorumludur<sup>15</sup>.

### **Kıkırdak Grefti Kaynakları**

**Kostal kıkırdak greftleri:** Vücuttaki en büyük kıkırdak grefti kaynağıdır. Kolaylıkla şekil verilebilir olduğundan çok yönlü kullanım alanına sahiptir. En önemli dezavantajı diğer yöntemlere göre daha invazif olmaları ve yaşlı hastalarda kalsifikasyona uğramalarıdır. Bununla birlikte kostal kıkırdaklar semer burun deformitesinde, malar ve mandibular kontur deformitesinde, dış kulak gibi karmaşık yapıların onarımında kullanılır.

**Kulak kıkırdak greftleri:** Kulak konkasının önemli bir kısmı konkal kıkırdak grefti ya da kompozit tam kat kama greft şeklinde donör saha deformitesi oluşturmadan kullanılabilir. Kulak kıkırdak grefti nasal rekonstrüksiyon, birincil ve ikincil rinoplastiler ve inverted nipple rekonstrüksiyonları gibi farklı alanlarda ve işlemlerde kullanılabilir.

**Septum kıkırdak greftleri:** Septum, iki taraflı submukozal disseksiyon sonrası sadece kıkırdak olarak veya tek taraflı submukozal disseksiyon sonrası kondromukozal kompozit greft şeklinde hazırlanabilir. Septal kıkırdak greftleri birincil ve ikincil rinoplastilerde kullanılabilir. Kompozit kondromukozal greft olarak ise, göz kapağı rekonstrüksiyonlarında destek ve konjunktival hattın sağlanması gibi amaçlarla kullanılabilir.

**Perikondrium greftleri:** Perikondrium, kondroprogenitör hücrelerden zengin bir kaynak olup mekanik ve inflamatuvar mediatörlere yanıt olarak yeni kıkırdak matriksi oluşturma potansiyeline sahiptir.<sup>16</sup> Buna örnek olarak güvercin göğsü deformitesi (pektus ekskavatum) olan hastaların cerrahisinde subperikondreal kıkırdağın alınmasından sonra yeniden kıkırdak formasyonunun oluşması söylenebilir. Perikondrium greftleri genellikle kostal kıkırdak veya kulak posteromedial taraftan alınmaktadır. Genç hastalarda her iki kaynak yeni kıkırdak oluşumu için etkin bölgeler iken, yaşlı hastalarda perikondrium kemik doku oluşturmaya meyillidir. Lester 1959'da, perikondriumun yeni kıkırdak oluşumuna neden olduğunu bildirmiştir. Daha sonra 1972 yılında, Ohlsen ve arkadaşları, güreşçi kulağının etiyojisi araştırılırken, perikondriumun kıkırdak oluşturma kapasitesinin olduğunu göstermiştir. Ohlsen, Skoog ve Sohn, bunu, perikondriumun altındaki kıkırdaktan ayrılmasıyla, kontakt inhibisyonu ortadan kalktığını ve bu nedenle

yeni kırıkta oluştuğunu göstermişlerdir. Klinikte, 1970'lerde kırıkta kaynağı olarak perikondrium grefti kullanılmış ancak alınmasındaki ve yerleştirilmesindeki teknik zorluklar, oluşturacağı kırıkta miktarının önceden tespit edilememesi gibi nedenlerle klinik olarak kullanım alanları daralmıştır. Bunun yanında, perikondrium greftinin örtü, kamufraj, veya dolgu amacıyla kullanımını halen söz konusudur.

**Allogreftler ve Xenogreftler:** Allojenik (veya homolog) ve xenojenik kırıkta greftleriyle ilgili yapılan klinik ve deneysel çalışmalar değişik oranlarda başarıya sahiptirler. Otolog greftler, allogreftlere ve xenogreftlere oranla daha uzun bir sağkalıma sahiptir.<sup>17</sup> Bu, oluşan immün reaksiyonun miktarı ile ters orantılıdır. Kırıkta, immünitesi az bir doku olarak kabul edilmektedir. Teorik olarak, içeriğinde alıcı immün sistemini uyaracak ekspozite kondrosit yoktur. Bu, kondrositlerin vasküler bir ağa sahip olmayan matriks tarafından kuşatılmış olmasındandır. Tiku ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tavşan kondrositlerinin HLA antijen (klas 2) salınımı yaptıkları ve kondrositlerin antijen sunan hücre fonksiyonu gördüğü gösterilmiştir.<sup>18</sup> Sonuç olarak kondrositler güçlü immün cevap stimülasyonuna sahiptirler ancak rölatif olarak az sayıda olduklarından ve yoğun ekstraselüler matriksin varlığı büyük olasılıkla rejeksiyon sürecini yavaşlatmaktadır.

### **Kırıkta Hasarı ve İyileşmesi**

Kırıkta hücresi etrafındaki vaskülaritesi olmayan yüksek dansiteli ekstraselüler matriks iyileşme üzerinde doğrudan etkilidir.<sup>19,20</sup> Perikondrium travma sonrasında stimüle olur ve eşlik eden kanama skar oluşumunu hızlandırır.

Özellikle eklem yerlerindeki kırıkta dokuların iyileşmesi, bunların uzun dönemli işlevlerinin devamı için kritik öneme sahiptir. Kemik dokuya kadar ulaşan lezyonlar, muhtemelen kanla taşınan progenitör hücreler aracılığı ile fibröz kırıkta tabakası oluşturarak iyileşme eğilimindedir.<sup>21</sup> Kısmi lezyonlar ise hücre invazyon yapacak kaynağın ve kan dolaşımının olmamasından dolayı sınırlı bir şekilde kalmaktadırlar. Reindel ve arkadaşlarının son zamanlarda yaptığı invitro bir çalışmada, kondrositlerin kesik olan yüzlerde tomurcuklandığı ve iki yüzeyi birleştirmek amacıyla çoğaldığı tespit edilmiştir.<sup>22</sup> Şu anda eklem yüzeylerinde oluşan lezyonlar için kullanılan klinik uygulamalar mikrofraktür oluşturma, delinerek subkondral kemikten kan ve hücre invazyonunun

sağlanması, mozaikplasti adı verilen etkilenmemiş bölgeden alınan tıkaç şeklinde kıkırdak nakli, ve doku kültürü ile olmaktadır.<sup>21</sup> Tedavi klinik olarak düzelme sağlar ancak oluşan dokunun hyalin kıkırdağa benzerliği çok az olmaktadır.

Peretti ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kıkırdak matriks parçaları üzerine kondrosit ekimi yapmışlar ve kondrositlerin yeni matriks oluşturarak parçaların bir arada kalmasını sağladığını tespit etmişler.<sup>23</sup>

### **“Apoptozis” Terminolojisi**

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü) fizyolojik bir süreç olup gelişme ve homeostasis için kritik bir öneme sahiptir. İlk olarak İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972’de dile getirilmeye başlanmıştır. Bu sözcük, Yunan kökenli olup ‘yıkılarak veya azalarak kaybolma’ anlamındadır.<sup>24</sup>

Apoptozis hasarlanmış ve organizma için tehlike yaratacak şekilde değişime uğramış hücrelerin organizmadan uzaklaştırılması için fizyolojik bir mekanizmadır. Bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürler (“programmed cell death”), ve fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır. Çeşitli nedenlerle (viral ya da çevresel etkenler) organizmaya zarar verecek şekilde değişikliğe uğramış hücreler kendilerini yok ederler (cell suicide). Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin “turnover”ında olduğu gibi) hücreler ortamdaki ölümlerle kaybolur (“cell deletion”). İşte, tüm bu kavramlar apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilir.

Apoptozis aynı zamanda dokularda yapım ve yıkım arasındaki denge ve doku homeostazisi için gereklidir. Örneğin, barsak kriptalarının tabanındaki hücreler 3-4 günde bir yüzeye doğru göç ederek ölür ve barsak boşluğuna dökülür; derideki keratinositler bazal tabakada oluştuktan sonra stratum korneum doğru göç ederler ve en sonunda deriyi dış etkenlerden koruyan korneum tabakasını oluşturmak üzere ölürler; timusta T lenfositlerin etkisiz olanları ve kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanlar kan dolaşımına girmeden önce timusta apoptozisle ölürler. Sistemik şekilde olan bu hücre yıkımı doku gelişimi ve embriogenez için önemli yere sahiptir.<sup>2-6</sup> Apoptozisin organizmada doğru bir şekilde işlemesi gerekir. Beklenmeyen, hızlanmış ya da yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Alzheimer gibi bazı dejeneratif hastalıklarda, kalp yetmezliğinde ve yaşlanmada apoptozis

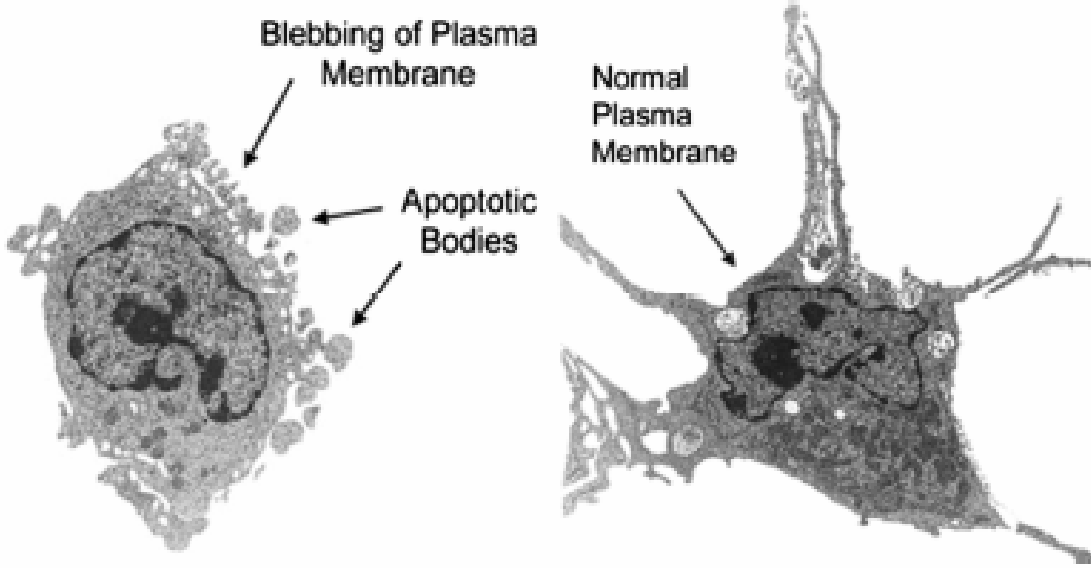
artışının etkili olduğu, bunun aksine kanser, otoimmün hastalıklar ve gelişimsel hastalıkların bazılarında apoptozisin baskılandığı görülmektedir.<sup>24</sup>

Bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın kaderinin üç adet gene bağlı olduğunu tespit edilmiştir. Bunlara “*C. Elegans death*” genleri (CED) adı verilmiştir. CED-3, CED-4 ve CED-9 genlerinin bu prosesi düzenlediği tespit edilmiştir. CED-3 ve CED-4'ün apoptozisi indüklediği CED-9'un ise bu genleri inhibe ettiği tespit edilmiştir. Böylelikle başlangıçta 1090 olan hücre sayısı 131 hücre azalarak hermafrodit formdan yetişkin forma dönüşür.<sup>24,25</sup>

Bu üç genin homolog genleri memelilerde de araştırılmıştır. CED-3 ile homolog olan genin bir sistein proteaz olan “interleukin-1 beta-converting” enzimi'ni (ICE) kodladığı 1993'te bildirilmiştir. Bu enzim bir proteaz olup kaspaz ailesi içerisine dahildir. ICE ilk tanımlanan kaspaz ailesi enzimi olup prokaspaz 1 olarak bilinir. Bu enzim İnterlökin-1 $\beta$  prekürsörünü proinflamatuvar sitokine çevirir. İleriki yıllarda memelilerde diğer sistein proteazlarda keşfedilmiştir. Bu proteazlar zincirleme etkiyle alt ürünlerini parçalayarak aspartik asit kalıntıları elde ederler. Bunlardan 14 tanesi kaspazlar (caspase= cysteinyl aspartate-specific protease) olarak adlandırılırlar.<sup>24,25</sup> CED-3'ün memelideki homoloğu kaspaz ailesi, CED-4'ün homoloğu Apaf-1, CED-9'un homoloğu ise Bcl-2 ailesi olarak tanımlanabilir.

Apoptozisi daha iyi anlamak için nekrozisle karıştırılmaması ve farklarının bilinmesi gereklidir. Nekrozis patolojik bir durumda meydana gelmesine rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Nekrozisde hücre içine fazla miktarda sıvı girmesi sonucu hücre şişer (cell swelling), oysa apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage). Nekrozisde kromatin yapısını koruyarak hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ancak apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde birikir (chromatin aggregation) ve yoğunlaşma oluşur (chromatin condensation). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içi materyallerin hücre dışına çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepçikler (membrane blebs) oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotic bodies) parçalanır. Membranla kaplı apoptotik cisimcikler değişen miktarlarda nükleus ve diğer hücre içi yapıları içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama

saliverilmesi sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptoziste apoptotik hücre veya cisimcikler, plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz.<sup>24,26</sup>



**Resim 2:** Apoptotik bir dendritik hücrenin(sol) yapısal görünüşünün sağlam dendritik hücre(sağ) ile elektron mikroskobu altında karşılaştırılması.<sup>24</sup>

Apoptozisin en önemli belirteci DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti ve bunun katları boyutunda parçalar oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu parçalanma agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü (ladder pattern) imajının ortaya çıkmasına neden olur. Ama bu durum hücre tipine bağlı olarak değişebilir. DNA'yı parçalayan Ca/Mg-bağımlı bir endonükleazdır. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.<sup>24,26</sup>

Apoptoziste birçok mediatör rol oynar. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (c-myc), proteinler (p53) ve organeller (mitokondri) bulunmaktadır.<sup>1</sup> Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur.



Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alırlar.

Apoptoziste, MDA(malondialdehid) gibi lipid peroksidasyonu son ürünlerinin ve L-arjinin'den NO(nitrat) sentaz ile oluşan NO gibi serbest oksijen radikallerinin de çeşitli etkileri olduğu bilinir. Bunlar oksidatif stresin önemli göstergelerindedir. Hashimoto ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada kondrosit apoptozisinde ve matriks kaybında NO ve diğer reaktif oksijen radikallerinin mediatör olarak rol oynadığı gösterilmiştir<sup>27</sup>.

Serbest radikaller kolesterole, araşidonik asit ve deoksihegzanata bağlanır ve lipid peroksidasyonunu başlatır. Bu sürecin başladığının en iyi göstergelerinden biri MDA dır. Nonenzimatik ve anti-oksidatif sistemde yetersizlik olması, bunun sonucu olarak da sülfhidril grubunun azalması hücre harabiyetine neden olmaktadır. Antioksidan enzim sistemindeki yetersizliğe bağlı olarak serbest oksijen radikallerinin (MDA) yüksek olması belirgin oksidatif strese maruz kalındığını gösterir.<sup>28</sup>

### **Kaspaz Ailesi**

İlk olarak 1993'te tanımlanmıştır. Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağına kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirerek bir hiyerarşi içerisinde çalışırlar.<sup>24,25</sup> Kaspazlar iki grupta incelenir. Başlatıcı kaspazlar olan 2, 8, 9, 10 ve muhtemelen 11'dir. Diğer grup ise efektör kaspazlar olan 3,6 ve 7'dir. Kaspaz sisteminin hangi yolda ilerleyeceği apoptozisin başlangıcına bağlıdır. Effektör kaspazlar kaskatın alt basamaklarında yer alır ve nükleus, sitoplazma ve hücre iskeletinde yer alan yapısal ve düzenleyici çok sayıda substrat üzerinde direkt olarak etkilidir. Bazı durumlarda başlatıcı kaspazlar efektör kaspazlar şeklinde fonksiyon görerek zayıf şekilde başlayan apoptozisin artmasını sağlayabilir. Bununla birlikte efektör kaspazlar sadece başlatıcı kaspazların aktivasyonu ile aktive olmakla kalmaz, diğer proteazlar olan katepsinler, kalpainler ve granzimler ile de aktifleşebilirler.<sup>25</sup> Kaspazlar dış ve iç hücre ölüm sinyallerine göre farklı şekilde uyarılırlar. Ekstresek uyarı ile kaspaz 8, intrensek mitokondrial uyarı ile kaspaz 9 aktifleşir. Her iki yol da sonuçta efektör kaspaz olan prokaspaz 3'ü kaspaz 3'e dönüştürür. Aktif kaspaz 3 kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü "ICAD (inhibitor of

caspase-activated deoxyribonuclease)” inaktifleştirir ve böylece ICAD’ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz “CAD (caspase-activated deoxyribonuclease)” serbestleşir. Oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna ve apoptozis ile ölüme neden olur. Kaspazlar diğer proteinleri parçalayarak apoptozise özgü değişikliklerin oluşumuna; plazma membranında ceçiklerin oluşumuna, apoptotik cisimlerin oluşumuna, hücresel paketlenme (cellular packaging) oluşumuna, makro molekül sentezinin durması ve hücre yaşam sinyallerinin bitmesine yol açarlar.<sup>24,25</sup>

Kaspaz yolunun kontrolü hücrede endojen kaspaz inhibitörleri tarafından sıkıca kontrol altında tutulmaktadır. Bu inhibitörler 7 üyesi olan IAP (inhibitors of apoptosis) familyası, c-FLIP (FADD-like ICE-inhibitory protein), BAR (bifunctional apoptosis regulator) ve ARC (apoptosis repressor with CARD) olarak sayılabilir. Hemen tüm kaspaz inhibitörleri dokuya özeldir. Örnek olarak c-FLIP kas, lenfoid doku ve testiste kaspaz 8 ve 10’a spesifiktir, BAR beyinde kaspaz 8 ve ARC kalp ve iskelet kasında kaspaz 2 ve 8’e spesifiktir. Ve hemen tüm kaspaz inhibitörleri kaspaz 3 ve 7’nin aktif formuna bağlanma eğilimindedir. Aynı zamanda c-FLIP, BAR ve ARC ölüm reseptörlerinden kaspaz 8’e giden sinyallerin engellenmesinden sorumludur.<sup>25</sup>

Son zamanlarda eksojen kaspaz inhibitörleri (terapötik ajanlar) apoptozisin baskılanması gereken birtakım hastalıkların tedavisi amacıyla geliştirilmeye başlanmıştır. Örnek olarak yeni çıkan eksojen kaspaz inhibitörlerinden IDN-1965® (Idun Pharmaceuticals Inc.) kalp ve akciğer hasarlarında lezyonları küçültmüştür.<sup>27</sup>

Kalp hastalıkları, felçler, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılması planlanan apoptozis inhibitörlerinin kanser ve otoimmün hastalık geliştirme potansiyelleri unutulmamalıdır. Bu terapötiklerin ortak özellikleri kaspazların aktif enzimatik merkezindeki sisteine kendi keton gruplarıyla kovalent olarak irreversibl bağlanması sonucu etkilidirler. Bir kısmı aldehit grubu içerir, aldehitler reversibl olarak bağlanırlar.<sup>25</sup>

Farmakolojik olarak kaspaz aktivatörleri kanser hücrelerinin yok edilmesinde ve kemoterapötiklere karşı oluşan rezistansın azaltılması amacıyla çalışmalar yürütülmektedir. Bu terapötiklerin bir kısmı kaspaz 3’ü aktifleştirirken bir kısmı bir kısmı adenoviral vektörlerle yapılan gen tedavilerini içerir. Bu gen tedavileri ile kaspaz 3, 6, 8 ve 9’un isteğe bağlı olarak aktifleştirilmesi hedef

alınır. Buna örnek ise dirençli gliomada gen tedavisi ile kanser hücrelerinde apoptozise gidiş tespit edilmiştir.<sup>26</sup>

Kaspaz bağımlı hücre ölümünün son yıllarda daha iyi anlaşılması sonucu kanser tedavisinde yeni umutları da beraberinde getirmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki birçoğu doku selektif değildir ve uzayan hücre yaşamıyla birlikte maligniteye dönüşme potansiyeli de artmaktadır.<sup>25</sup>

### **Bcl-2 Ailesi**

Bcl-2 ilk olarak insan B hücreli folliküler lenfomada t(14;18) translokasyonundan sorumlu protoonkogen olarak tanımlanmış, ve sonra apoptozis ile ilişkisi araştırılmaya başlamıştır. Bcl-2'nin CED-9 ile homolog olduğunun tanımlanması önemli bir gelişme olmuştur. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-X<sub>s</sub>), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X<sub>l</sub>) geniş bir ailedir. Bcl-2 özellikle mitokondri dışı membranında bulunmakta ve iyon taşınmasını düzenlemektedir. "Bax" sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanarak, burada küçük delikçiklerin oluşumunu indükler. Böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur ve sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF' ün mitokondriden sitozole çıkması sağlanır.<sup>24,28</sup> Bir hücrenin surveyi, bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin göreceli oranına bağlıdır. Pro-apoptotik olan "Bid", "Bak" ve "Bax", normalde hücrelerde sessiz halde bulunurlar. Ekstresek yoldan ölüm reseptörlerine gelen uyarılar kaspaz-8'i aktive eder. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom C'nin sitoplazmaya salıverilmesini sağlarlar. Aktif kaspaz-8, "Bid"i kırar. Oluşan parçacık diğer proapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerle etkileşime girerek onların normalde buldukları sitoplazmadan mitokondriye göç etmelerine neden olur. Bu aktivasyon sonucu, sitokrom-c salıverilir. Sitokrom-c mitokondri iç membranında bulunan bir elektron transport zincir proteindir. Sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınımı apoptozis sürecine girmiş hücrede geri dönüşsüz döneme girildiğinin göstergesi olarak kabul edilir. Sitokrom-c sitoplazmik bir protein olan "apoptotic protease activating factor-1"e (Apaf-1) bağlanır ve onu aktive eder. Apaf-1 CED-4'ün memelideki homologudur. ATP'nin de katılımı ile apoptozom (apoptosome) adı verilen bir yapı oluşur. Bu yapı inaktif prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüştürerek kaspaz bağımlı apoptozisi başlatır.<sup>1</sup> Tümöral

dokularda DNA'nın metilasyonu sonucu Apaf-1 yapımı azalır ve apoptozis gerçekleşmez. DNA'nın metilasyonunun engellenmesi ile tümör hücrelerinin kemoterapötiklere daha hassas olmasını sağlar.<sup>24</sup>

### **Ölüm Reseptörleri**

Tümör nekroz faktör 1984 yılında keşfedilmiştir. Fas (diğer adı Apo-1, CD95), tümör nekroz faktör- reseptörü1 (TNF-R1), DR-3 (death receptor-3, Apo-3, WSL-1, TRAMP), DR-4, DR-5, DR-6, EDA-R "ectodermal dysplasia receptor", NGF-R, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinirler.<sup>24,39</sup> Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları (FasL ve TNF) ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve "natural killer" hücrelerde bulunur. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD ("TNFR-1 associated death domain") ve FADD ("Fas associated death domain") ile etkileşime girerler. Bu etkileşim sonucu kaspaz-8 ve 10 aktifleşerek proteaz aktivasyon kaskadını başlatır. Bu kaskad, ekstrensek hücre ölümünün protipini oluşturur.<sup>24</sup>

### **Kıkırdak Apoptozisi (Kondropitoz) "Chondroptosis"**

Çeyrek yüzyıl önce, Farnum ve Wilsman kıkırdak büyüme plağının vasküler yüzünde normal kondrositlerden farklı olan ve koyu kondrositler ismini verdikleri yoğunlaşmış hücreler saptamışlardır. Aynı şekilde, kondrositlerin vasküler invazyon öncesinde programlanmış şekilde öldüğünü gözlemişlerdir.<sup>30</sup> Sonraki yıllarda, kıkırdağın apoptozise gidişinde, Nitrik oksit ve Fas sinyali gibi farklı uyarıların rolü gözlenmiştir. Ayrıca proinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- $\alpha$  ve IL-1 ile kıkırdakta yıpranma olduğu saptanmıştır. Bunlardan özellikle TNF- $\alpha$ 'nın kondrositlerin apoptozise gidişini hızlandırdığı not edilmiştir.<sup>31</sup>

Normal eklem kıkırdağında golgi ve endoplazmik retinakulum sınırlı sayıdadır ve gelişmemiştir. Klasik apoptoziste de bu organeller pek değişmez. Ancak kondroptosis kaskadının erken safhalarında golgi ve rER'da artış gözlenir. Birincil lizozomların golgiden tomurcuklanarak geliştiği düşünülürse, golgi aktivitesindeki artışın birincil lizozom miktarında bir artış doğuracağı ve terminal hipertrofik kondrositlerde asit fosfataz aktivitesinde artış yaratacağı fikrini desteklemektedir. Endoplazmik retinakulum membranı hücre içindeki

organellerin etrafını kuşatarak sindirilmekten korumaktadır. Bu şekilde hücre materyal belki golginin artışıyla artan lizozomlarca hücre içerisinde sindirilir.

Kondroptoziste otofajik vakuollerde artış olduğu açıkça görülmektedir. İnsan yaşamında otofajik tipte hücre ölümü uzun zamandır bilinmektedir. Otofajik hücre ölümü tip 2 ölüm olarak sınıflanır ve böcek metamorfozunda ve over atrofisinde gözümüze çarpar. Çevresel etkiler olduğunda otofajik hücre ölümü apoptozise alternatif olabilir. Otofaji, lizozomal proteinazlar, özellikle katepsin B ve D yardımıyla olur, fakat kaspaz içermezler.<sup>30</sup>

Özellikle büyüme plağındaki ve osteoartritteki kıkırdak dokuda kondroptotik hücrede yaygın cepçik oluşumu veya hücre materyalin lakunaya çıkması açıkça görülmektedir. Bu cepçikler apoptotik cisimlerin tomurcuklanmasına değil, daha çok nekrotik hücrelerdekine benzerler.

ER kompartmanları ve otofajik vakuolizasyon ile hücre içinde sindirim ve hücre atıklarının ekstraselüler boşluğa salınımı ile kondroptotik süreç sonlanır. Bu apoptotik cisimler matriks vezikülleri olarak kıkırdağın derinlerinde saklanır.<sup>30</sup> Kondrositin kendini öldürmesi ile kıkırdak dokuda yeri boş bir laküna görünümü olur. Osteoartritte bu boşlukların yan taraftaki osteoartritik değişikliğe uğramış kıkırdak ve fibrosis tarafından dolduğu bilinmektedir.<sup>26,30</sup>

Klasik apoptozisten farklı bir apoptozise sahip tek hücre kondrositler değildir. Nöral hücrelerde nükleer fragmentasyon olmadan sitoplazmik vakuolizasyonla birlikte giden 'paraptosis' adı verilen apoptotik hücre ölümü gerçekleşir. Yine yağ hücrelerinde yaşlanma ve obezite ile birlikte görülen ve klasik apoptozisten farklı olarak 'lipoapoptozis' ile hücre ölümü gerçekleşir.<sup>32</sup>

Muhtemelen kondroptozisin en önemli farkı hücre artıklarının mükemmel bir biçimde elimine edilmesidir. Bu olaylar fagositozis olmadan sonuçlanmaktadır. Klasik apoptozis bu durumda ikincil nekroz ile sonuçlanır ki, bu da lizozomal enzimlerin kontrol dışı salınımı ile sonuçlanır. Bu nedendir ki hücreler farklı farklı hücre yıkım mekanizması geliştirmektedirler.

**Tablo 2:** Apoptozis, kondropitoz ve nekroz arasındaki farklılıklar.<sup>30</sup>

	<b>Klasik apoptozis</b>	<b>Kondropitozis</b>	<b>Nekroz</b>
<b>Nükleus</b>	Kromatinler çevrede yoğunlaşır	Yaygın yama şeklinde yoğunlaşır	Nükleer yoğunlaşma vardır (Pyknosis)
<b>Golgi</b>	Artmaz	Erken basamakta artar	Artmaz
<b>ER</b>	Değişmez	Artar ve lümeni genişler	Değişmez
<b>Otofajik vakuol</b>	Gözlenmez	Sık görülür	Değişmez
<b>Apoptotik blebler</b>	Apoptotik cisimler tomurcuklanır	Stoplazmik materyal ve veziküller cepçikler oluşturur	Yaygın cepçikler oluşur
<b>Son eliminasyon</b>	Apoptotik cisimlerin heterofagositozu	Hücre içeriğinin kendini sindirmesi, son olarak veziküllerin fagositozu	Yaygın parçalanma
<b>Lizozomal enzim salınımı</b>	Yok, lizozomal membranların sağlam olduğu apoptotik cisimler	Yok, sitoplazmik adalar veya otofajik vakuollar mevcut	KontROLSÜZ lizozomal enzim salınımı mevcut
<b>Fonksiyon</b>	İnflamasyonsuz hücre eliminasyonu	Fagositlerin yokluğunda oto-eliminasyon	Kaçınılmaz hücre ölümü ve inflamasyon

## GEREÇ ve YÖNTEMLER

### Etik Kurul Onayı

Çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alındıktan sonra (27.03.2006 tarih, 03/18 sayılı onay belgesi) MEÜ T.F. Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yapılmıştır.

### Çalışmanın Materyal ve Metodu

Çalışmada Wistar tipi 99 adet erişkin sıçan altı deney (her grup kendi arasında üçer alt gruba ayrılarak) ve bir kontrol grubuna rasgele paylaştırıldı. Tüm sıçanlar tartılarak uygun dozda ketamin (50-100 mg/kg) ve xylazine (5mg/kg) anestezisi altında cerrahi işlemlere tabi tutuldu

Anestezi indüksiyonunu takiben sıçanların kulakları %10'luk povidon iyodin ile temizlendikten sonra, kulak posteriorundan yapılan kesi ile işlemler gerçekleştirildi.

**Grup 1:** (n:15) Anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondrium da flepte kalacak şekilde kaldırıldı. Kıkırdak doku 1x1 cm boyutunda perikondriumsuz olarak çıkarıldı ve sonra tekrar yerine yerleştirilerek kesi suture edildi. Sol kulakta işlem yapılmadı. Ratlardan 5'i bir hafta, 5'i 4 hafta ve 5'i de 12 hafta takip edildi.

**Grup 2:** (n:15) Anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondriumu içermeyecek şekilde kaldırıldı, kıkırdak doku 1x1 cm olarak perikondriumu ile birlikte çıkarıldı ve sonra tekrar yerine yerleştirilerek kesi suture edildi. Sol kulakta işlem yapılmadı. Ratlardan 5'i bir hafta, 5'i 4 hafta ve 5'i de 12 hafta takip edildi.

**Grup 3:** (n:15) Anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondrium da içerecek şekilde kaldırıldı, kıkırdak doku 1x1 cm olarak perikondriumsuz olarak çıkarıldı. Bu kıkırdak parçasının her iki yüzeyi 15 no'lu bistürinin kendi ağırlığı ile 45 derecelik açı altında çizildi (scoring) Bu sayede bir miktar incelen kıkırdak dokusu yerine iade edilerek kesi kapatıldı. İşlemin her kıkırdakta eşit olarak gerçekleştirilebilmesi amacıyla, her uygulamada yeni bir bisturi ucu kullanıldı ve bunun kendi ağırlığı ile dokuyu çizmesine izin verildi. Sol kulakta işlem yapılmadı. Ratlardan 5'i bir hafta, 5'i 4 hafta ve 5'i de 12 hafta takip edildi.

**Grup 4:** (n:15) Anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondriumu içermeyecek şekilde kaldırıldı, kıkırdak doku 1x1 cm olarak perikondriumu ile

birlikte çıkarıldı. Bu kıkırdak parçasının her iki yüzeyi 15 no'lu bistürinin kendi ağırlığı ile 45 derecelik açı altında çizildi (scoring). Bu sayede bir miktar incelen kıkırdak dokusu yerine iade edilerek kesi kapatıldı. İşlemin her kıkırdakta eşit olarak gerçekleştirilebilmesi amacıyla, her uygulamada yeni bir bisturi ucu kullanıldı ve bunun kendi ağırlığı ile dokuyu çizmesine izin verildi. Sol kulakta işlem yapılmadı. Ratlardan 5'i bir hafta, 5'i 4 hafta ve 5'i de 12 hafta takip edildi.

**Grup 5:** (n:15) Anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondrium da içerecek şekilde kaldırıldı, kıkırdak doku 1x1 cm olarak perikondriumsuz olarak çıkarıldı. Sol kulakta işlem yapılmadı. İnsizyonun inferiorundan sırt bölgesine doğru tünel açıldı ve bu bölgede sırt kasları fasyası üzerinde oluşturulan poşa, kıkırdak greftin koyulmasının ardından cilt kapatıldı. Ratlardan 5'i bir hafta, 5'i 4 hafta ve 5'i de 12 hafta takip edildi.

**Grup 6:** (n:15) Anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondrium da içerecek şekilde kaldırıldı ve kıkırdak doku 1x1 cm olarak perikondriumsuz olarak çıkarıldı. Bu kıkırdak parçasının her iki yüzeyi 15 no'lu bistürinin kendi ağırlığı ile 45 derecelik açı altında çizildi (scoring). İşlemin her kıkırdakta eşit olarak gerçekleştirilebilmesi amacıyla, her uygulamada yeni bir bisturi ucu kullanıldı ve bunun kendi ağırlığı ile dokuyu çizmesine izin verildi. Sol kulakta işlem yapılmadı. İnsizyonun inferiorundan sırt bölgesine doğru tünel açıldı ve bu bölgede sırt kasları fasyası üzerinde oluşturulan poşa, kıkırdak greftin koyulmasının ardından cilt kapatıldı. Ratlardan 5'i bir hafta, 5'i 4 hafta ve 5'i de 12 hafta takip edildi.

**Kontrol Grubu:** (n:9) Anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondrium da içerecek şekilde kaldırıldı, kıkırdak doku 1x1 cm olarak perikondriumsuz olarak çıkarıldı. İki parçaya bölünerek Histoloji ve Patoloji Anabilim Dallarına teslim edildi.

Hayvanlar ilgili süre sonunda (1; 4; 12 hafta) kan ve her iki kulaktan doku örnekleri alındıktan sonra yüksek doz ketamin anestezisi ile feda edildi.

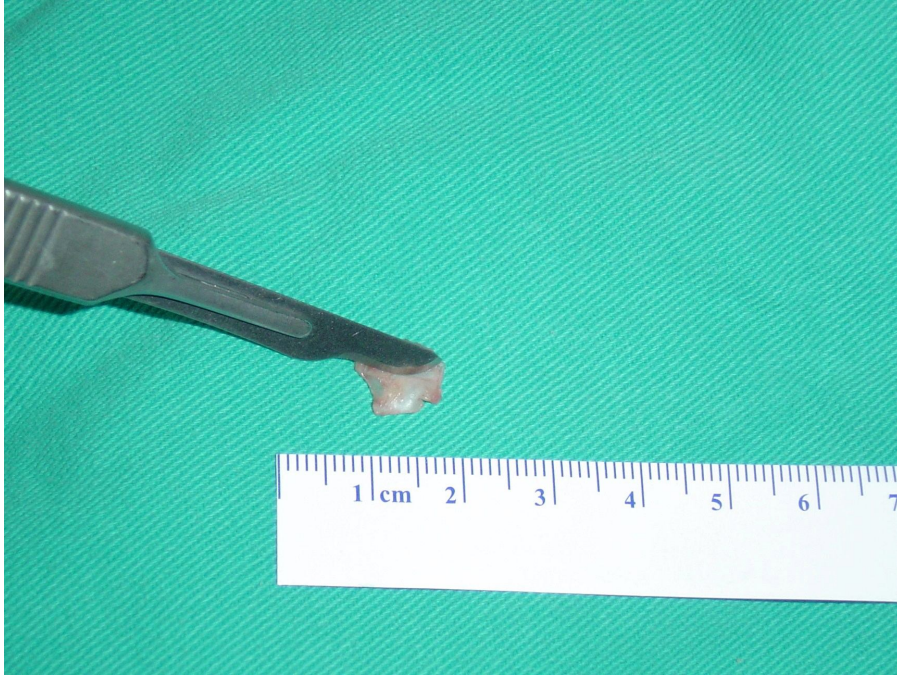




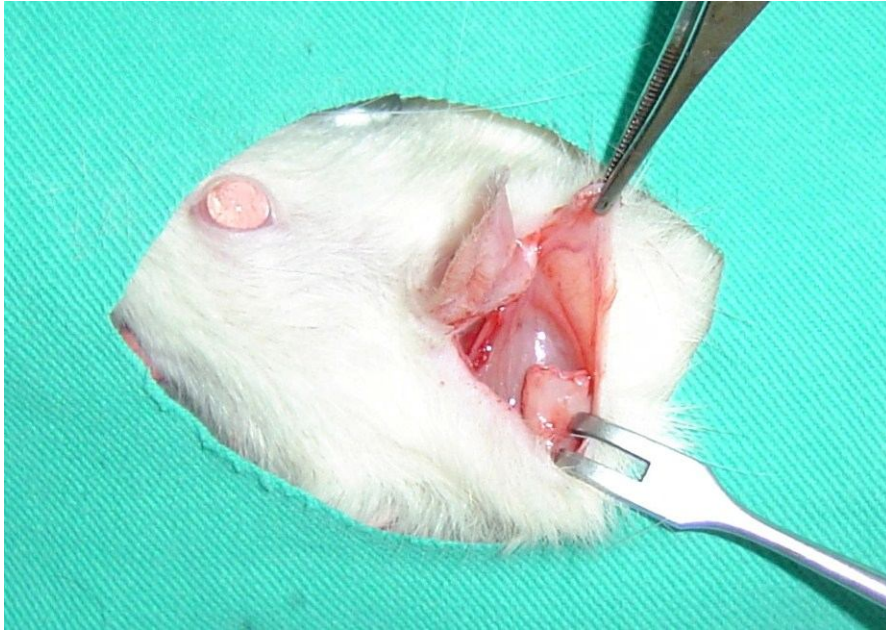
**Resim 3** : 1., 3., 5. ve 6. gruplarda anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondrium da içerecek Şekilde kaldırıldı



**Resim 4**: 2. ve 4. gruplarda anesteziyi takiben sağ kulak derisi perikondriumu içermeyecek Şekilde kaldırıldı



**Resim 5 :** 3., 4. ve 6. gruplardan alınan kıkırdak parçası bistürinin kendi ağırlığı ile 15 no'lu bisturi ucu 45 derecelik açı ile "scoring" tarzında çizildi.



**Resim 6:** 5. ve 6. gruplarda insizyonun inferiorundan yapılan undermining ile subkutan bölgede sırt kasları fasyası üzerinde oluşturulan poşa, kıkırdak grefti yerleştirildi.

Elde edilen örneklerde şu araştırmalar yapıldı:

**1. Kan Örneği:**

a) NO seviyeleri: Kan örnekleri santrifüj edildikten sonra tüplere yerleştirildi ve derin dondurucuda Biyokimya Anabilim Dalı tarafından işlem yapılacak güne kadar saklandı.

b) MDA seviyeleri: Kan örnekleri santrifüj edildikten sonra tüplere yerleştirildi ve derin dondurucuda Biyokimya Anabilim Dalı tarafından işlem yapılacak güne kadar saklandı.

**2. Kıkırdak Örneği:**

a) Elektron Mikroskopi: Alınan örnekler ikiye bölünecek ve bir parçası elektron mikroskobik inceleme için %2.5'lik soğuk glüteraldehit içerisine konuldu, 1 gecelik fiksasyondan sonra elektron mikroskobu ile Histoloji Anabilim Dalı tarafından incelendi..

b) Histopatolojik inceleme: İkinci parça kondrositlerdeki DNA fragmentasyonunu göstermek için Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu ("in situ apoptosis detection kit" ,Biogen®, katalog no S7101) ile apoptozis tespiti için Patoloji Anabilim Dalına iletildi.

**Apoptozisin Tespiti**

Kıkırdak greftlerindeki apoptozisin tespiti Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı ve Histoloji Anabilim Dalı tarafınca yapılmıştır. Elde edilen kan örneklerindeki MDA ve NO düzeylerinin incelenmesi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafınca yapılmıştır.

**Işık Mikroskobundaki Değerlendirme**

Çıkarılan kıkırdak örnekleri %10'luk nötral formaldehit içeren kaplar içerisine konuldu. Bir gecelik formaldehit tespit işlemi ardından örnekler rutin takip işlemine sokuldu. Rutin takip işleminde kıkırdak dokuları sırasıyla alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletildiler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler rutin hematoksilin eosin histokimyasal boyası ile boyandı. Preparatlar işık mikroskobik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelendi. Fotoğraflama işlemi Nikon dijital kamera, DS-L1) ile yapıldı.

Kondrositlerdeki DNA fragmentasyonunu göstermek için Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL)

metodu ("in situ apoptosis detection kit" ,Biogen®, katalog no S7101) seçildi. Bu işlemde, elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kıkırdak kesitleri, deparafinizasyon ve alkol takip işlemleri ardından proteinaz K ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (10µl/2.5 ml, fosfat buffer solüsyonu). Fosfat buffer solüsyonunda yıkandıktan sonra kesitler, buharlı kabin içerisine yerleştirildi ve üzerlerine terminal deoksi transferaz (tdt) reaksiyon karışımı damlatılarak 37 C<sup>0</sup>'de etüv içerisinde 1 saat inkübe edildi. Kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), zemin boyaması için metil green kullanıldı. Kesitler kapama maddesi ile kapatıldı. Pozitif kontrol olarak germinal merkezleri belirgin tonsil kesitleri kullanıldı.

Kesitler değerlendirildi. Her bir örnekteki kondrosit sayısı ve TUNEL ile immünreaktivite gösteren kondrositler sayıldı. Sayım için kesitler ışık mikroskopik düzeyde önce küçük büyütmede ve X40 büyütme alanında taranarak ardından X200 büyütmede sayım yapıldı

### **Biyokimyasal Değerlendirme**

**Nitrit- nitrat çalışması:** Bu çalışmada nitrit ve nitrat ölçümleri nitrit-nitrat kolorimetrik assay kiti (Nitrite / Nitrate colorimetric method, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, 1 746 081) kullanılarak yapıldı. Nitrojen monoksit biyolojik sıvılarda nitrit olarak tespit edilmektedir. Örnekte mevcut olan nitrat ise NADPH varlığında nitrat redüktaz (NR) enzimiyle nitrite redüklenir.



Oluşan nitrit ise sülfanilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girerek kırmızı viole diazo boyası meydana getirir. Oluşan bu rengin şiddeti ise spektrofotometrik olarak, 540 nm dalga boyunda ölçülür.

Total nitrit absorbans değerlerinden nitrit absorbansları çıkartılarak örneklerdeki nitrat absorbans değerleri elde edilmiş oldu. Absorbansların tespitinin ardından nitrit ve nitrat için ayrı ayrı hazırlanmış olan standart eğriler yardımıyla örnek konsantrasyonları hesaplandı. Nitrit ve nitrat konsantrasyonları toplanarak sonuçlar total nitrit+nitrat konsantrasyonu olarak µM cinsinden verildi.

**Malondialdehit (MDA) çalışması:** Bu çalışmada MDA ölçümü Ohkawa tarafından önerilen yöntemle göre yapıldı. Aerobik koşullarda PH 3,5'de thiobarbitürik asit (TBA) ile serumun 95<sup>0</sup>'de inkubasyonu sonucu eğer lipid peroksidasyonu varsa , lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olan MDA

oluşmaktadır. Oluşan MDA ise TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Oluşan pembe rengin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü ile lipid peroksidasyonu saptanmaktadır. Tüm örnekler ve standartlar aynı yöntemle çalışıldı. Steril deney tüplerine kör için 50 µl distile su, örnek için 50 µl serum ve standart için 50 µl 1/10 dilue standart konuldu. Her tüpün üzerine sırasıyla 100 µl %8,1'lik SDS, 750 µl % 20'lik asetik asit, , 750 µl % 0,8'lik TBA çözeltisi eklendi. Sonra tüm tüplere 350 µl distile su eklenerek tüplerin ağızları kapatıldı ve önceden 95<sup>0</sup>'ye gelmiş olan sıcak su banyosunda (Memmert thermostating fluid waterbath) 30 dakika süre ile inkubasyona bırakıldı. Sıcak su banyosundan alınan tüpler musluk suyunda soğutuldu. Üzerlerine 0,5 ml distile su ve 2,5 ml çalışmadan hemen önce hazırlanmış olan n-butanol-pyridin (15/1) çözeltisi eklendi. Tüplerin kapakları tekrar kapatılarak vortekslendi (Velp scientifica 2x<sup>3</sup>). Daha sonra tüm tüpler 4000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj (Nüve NF 800) edildi. Bu işlemin ardından üstte kalan organik kısmın absorbans değerleri quartz küvetlere otomatik pipet ile alınarak 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik (Varian cary 50 Bio UV visible spectrophotometer) olarak okundu. Önceden hazırlanan standart eğri üzerinden örnek konsantrasyonları nmol/ml cinsinden hesaplandı.

### **Elektron Mikroskopindeki Değerlendirme**

Elde edilen dokular, %2.5'luk gluteraldehitte 4-6 saat bekletildi. Osmium tetroksitle postfiksasyonu gerçekleştirilen dokular, yükselen derecelerde alkollerde tutularak dehidrate edildiler. Propilen oksitle şeffaflandırma ve plastiğe alıştırma işlemlerinden sonra, dokular epoksi resine gömüldüler. 70°C'de 24 saat polimerizasyondan sonra dokulardan ultramikrotomla 70 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat kullanılarak kontrastlandı. Bu işlemden sonra kontrastlı kesitler JEOL JEM 1011 transmisyon elektron mikroskopunda incelendi ve mikroskoba eklenmiş bir dijital kamera ile fotoğraflandı.

### **İstatistiksel Değerlendirme**

Rezorpsiyon varlığı bakımından gruplar arasındaki farklılığı incelemek amacıyla 1 hafta, 4. hafta ve 12. hafta sonunda elde edilen değerler her bir zaman diliminde ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Perikondriumun var olup olmamasının, varken canlı olup olmamasının ve kırıkdağın travmalı olup

olmasının etkilerinin ayrı ayrı incelenebilmesi amacıyla karşılaştırmalar dört ayrı aşamada gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak müdahale gruplarında normale göre bir farklılık olup olmadığının incelenmesi amacıyla 1.grup, 2. grup, 3. grup, 4. grup, 5. grup ve 6. grup her bir zaman diliminde ayrı ayrı kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Daha sonra travmanın etkisini incelemek 1. grup ile 3. grup, 2. grup ile 4. grup ve 5. grup ile 6. grup birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Üçüncü bir karşılaştırma olarak vaskülarize perikondriumla devaskülarize perikondriumlu kıkırdak grefti grupları arasındaki farkın incelenmesi amacıyla 1. grup ile 2. grup ve 3. grup ile 4. grup birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Son olarak perikondriumun var olup olmasının etkisinin incelenmesi amacıyla ise 2. grup ile 5. grup ve 4. grup ile 6. grup birbirleriyle karşılaştırılmıştır.

Işık mikroskopisindeki apoptozis oranları bakımından gruplar arasındaki farklılığı incelemek amacıyla ise yine 1 hafta, 4 ve 12 hafta sonunda elde edilen değerler her bir zaman diliminde ayrı ayrı karşılaştırılmıştır.

Rezorpsiyon varlığı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar incelenirken Fisher's Exact test; ışık mikroskopisindeki apoptozis oranları bakımından gruplar arasındaki farklılıklar incelenirken ise Kruskal-Wallis testinden yararlanılmıştır. İstatistik analizler SPSS 11.5 paket programında yapılmıştır. Analiz sonucunda  $P < 0,05$  ise sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. Biyokimya kan değerleri bakımından grupların karşılaştırılması amacıyla One-Way ANOVA testi kullanılmıştır. Testler 1. hafta, 4. hafta, ve 12. hafta değerleri için yapılmıştır.

## BULGULAR

### Işık Mikroskopundaki Bulgular

Çalışma gruplarında 90, kontrol grubunda 9 olmak üzere, toplam 99 örnek, TUNEL testi ile incelendi. Işık mikroskopisinde apoptotik hücre ve total çekirdekli hücre sayımı yapıldı ve dokudaki rezorpsiyon varlığı araştırıldı. Apoptotik hücre sayısı/total hücre sayısı oranı istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmede apoptotik hücre sayısı/total çekirdekli hücre sayısı oranları kullanıldı.

**Tablo 3:** TUNEL tekniği sonucu 1. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.

1.Grup 1. hafta			1.Grup 4. hafta			1.Grup 12. hafta		
Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.
1	YOK	0,06	1	YOK	0,093	1	YOK	0,103
2	VAR	0,078	2	VAR	0,06	2	YOK	0,16
3	VAR	0,035	3	VAR	0,264	3	YOK	0,09
4	VAR	0,013	4	VAR	0,283	4	YOK	0,288
5	x	X	5	VAR	0,196	5	x	x

x: TUNEL tekniğinde sonuç alınamayan ratlar  
A.H./Ç.H.: Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı

**Tablo 4:** TUNEL tekniği sonucu 2. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.

2.Grup 1. hafta			2.Grup 4. hafta			2.Grup 12. hafta		
Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.
1	YOK	0,029	1	VAR	0,190	1	YOK	0,026
2	YOK	0	2	VAR	0,05	2	VAR	0,219
3	VAR	0,045	3	VAR	0,058	3	VAR	0,075
4	VAR	0,038	4	YOK	0,076	4	x	x
5	x	x	5	VAR	0,34	5	x	x

x: TUNEL tekniğinde sonuç alınamayan ratlar  
A.H./Ç.H.: Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı

**Tablo 5:** TUNEL tekniği sonucu 3. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.

3.Grup 1. hafta			3.Grup 4. hafta			3.Grup 12. hafta		
Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.
1	YOK	0	1	VAR	0,071	1	YOK	0,086
2	VAR	0,058	2	VAR	0,025	2	YOK	0,061
3	YOK	0,055	3	VAR	0,033	3	YOK	0,122
4	VAR	0,047	4	VAR	0,186	4	VAR	0,183
5	x	X	5	VAR	0,28	5	x	x

x: TUNEL tekniğinde sonuç alınamayan ratlar  
A.H./Ç.H.: Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı

**Tablo 6:** TUNEL tekniği sonucu 4. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.

4.Grup 1. hafta			4.Grup 4. hafta			4.Grup 12. hafta		
Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.
1	VAR	0,066	1	YOK	0,153	1	YOK	0,224
2	VAR	0,037	2	YOK	0,28	2	VAR	0,106
3	VAR	0,015	3	VAR	0,2	3	VAR	0,238
4	VAR	0,052	4	VAR	0,065	4	VAR	0,2
5	VAR	0,04	5	VAR	0,066	5	VAR	0,3

x: TUNEL tekniğinde sonuç alınamayan ratlar  
A.H./Ç.H.: Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı

**Tablo 7:** TUNEL tekniği sonucu 5. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.

5.Grup 1. hafta			5.Grup 4. hafta			5.Grup 12. Hafta		
Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.
1	VAR	0,24	1	VAR	0,25	1	VAR	0,115
2	VAR	0,192	2	VAR	0,28	2	VAR	0,133
3	VAR	0,145	3	YOK	0,375	3	VAR	0,178
4	YOK	0,111	4	YOK	0,458	4	VAR	0,163
5	x	X	5	VAR	0,4	5	X	x

x: TUNEL tekniğinde sonuç alınamayan ratlar  
A.H./Ç.H.: Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı



**Tablo 8:** TUNEL tekniği sonucu 6. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.

6.Grup 1. hafta			6.Grup 4. hafta			6.Grup 12. Hafta		
Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.	Rat	Rezorpsiyon	A.H./Ç.H.
1	VAR	0,153	1	YOK	0,29	1	VAR	0,76
2	VAR	0,083	2	VAR	0,25	2	VAR	0,125
3	VAR	0,137	3	VAR	0,203	3	VAR	0,105
4	VAR	0,153	4	VAR	0,428	4	VAR	0,057
5	x	x	5	x	x	5	YOK	0,052

x: TUNEL tekniğinde sonuç alınamayan ratlar

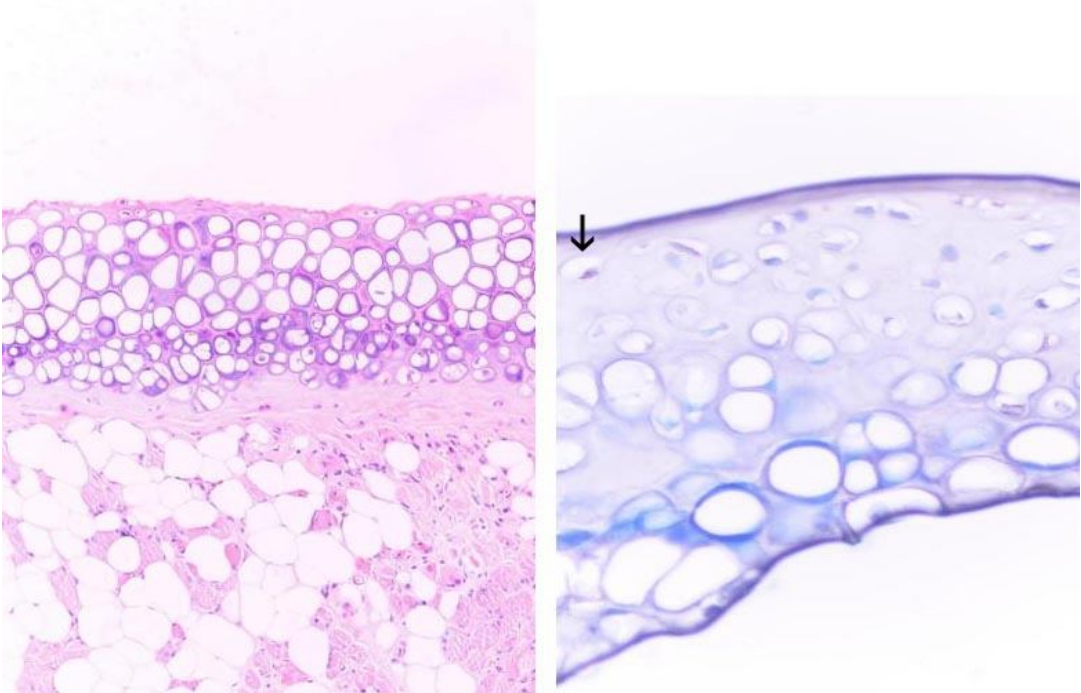
A.H./Ç.H.: Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı

**Tablo 9:** TUNEL tekniği ile kontrol grubu 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.

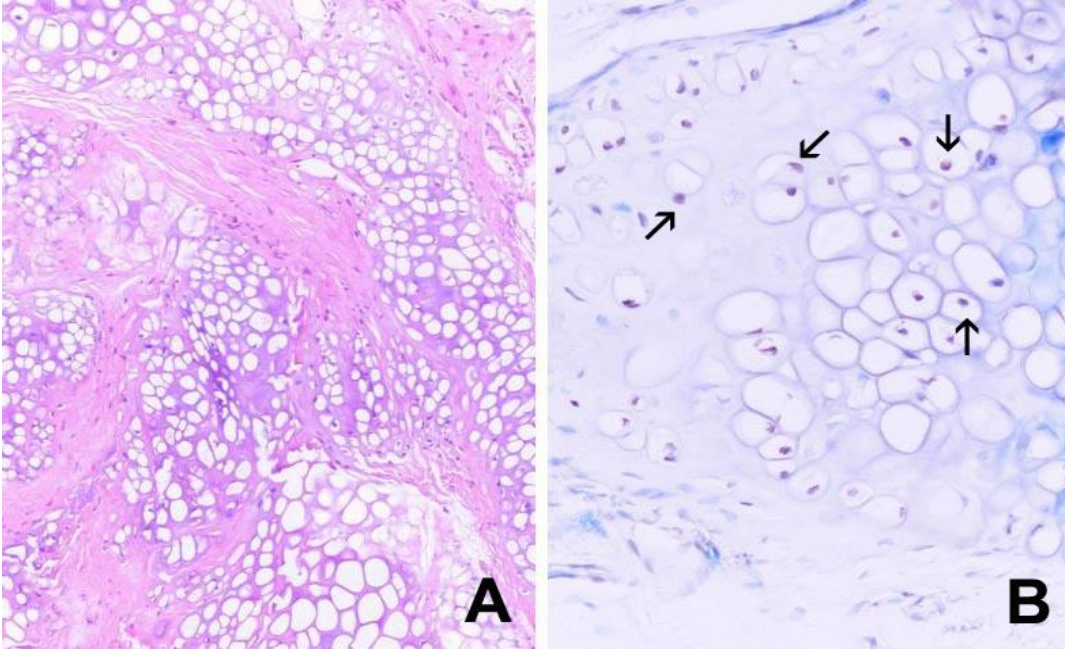
GRUP	REZORPSİYON	A. H./ Ç.H.
Kontrol 1	YOK	0
Kontrol 2	YOK	0
Kontrol 3	YOK	0.038
Kontrol 4	YOK	0.043
Kontrol 5	YOK	0
Kontrol 6	YOK	0,035
Kontrol 7	YOK	0,095
Kontrol 8	YOK	0,012
Kontrol 9	YOK	0

x: TUNEL tekniğinde sonuç alınamayan ratlar

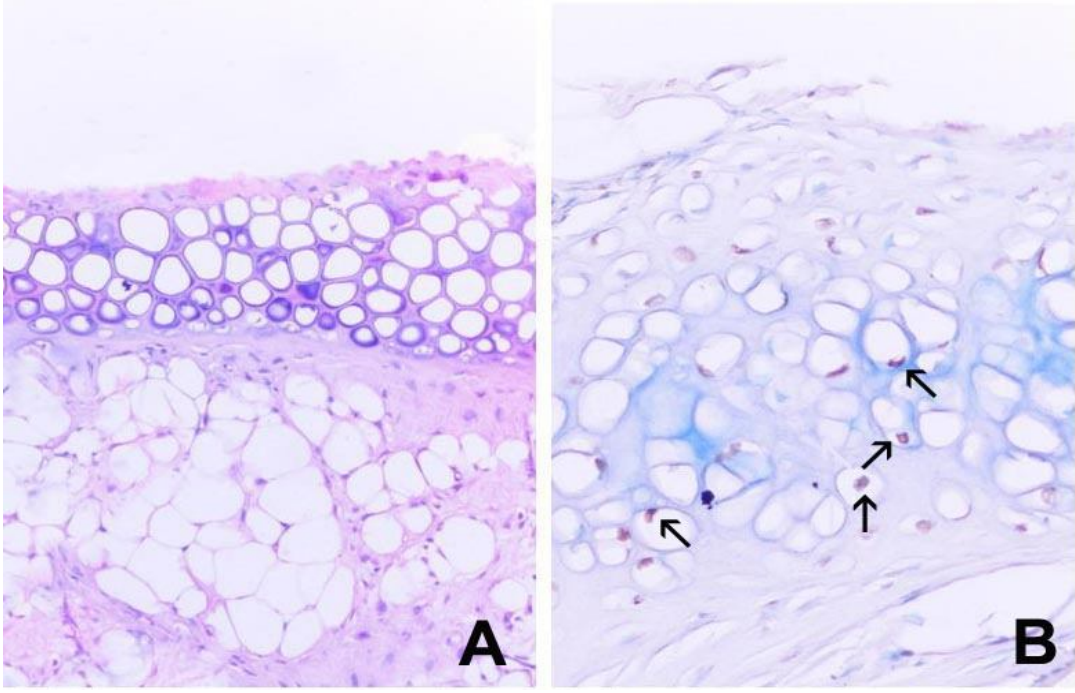
A.H./Ç.H.: Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı



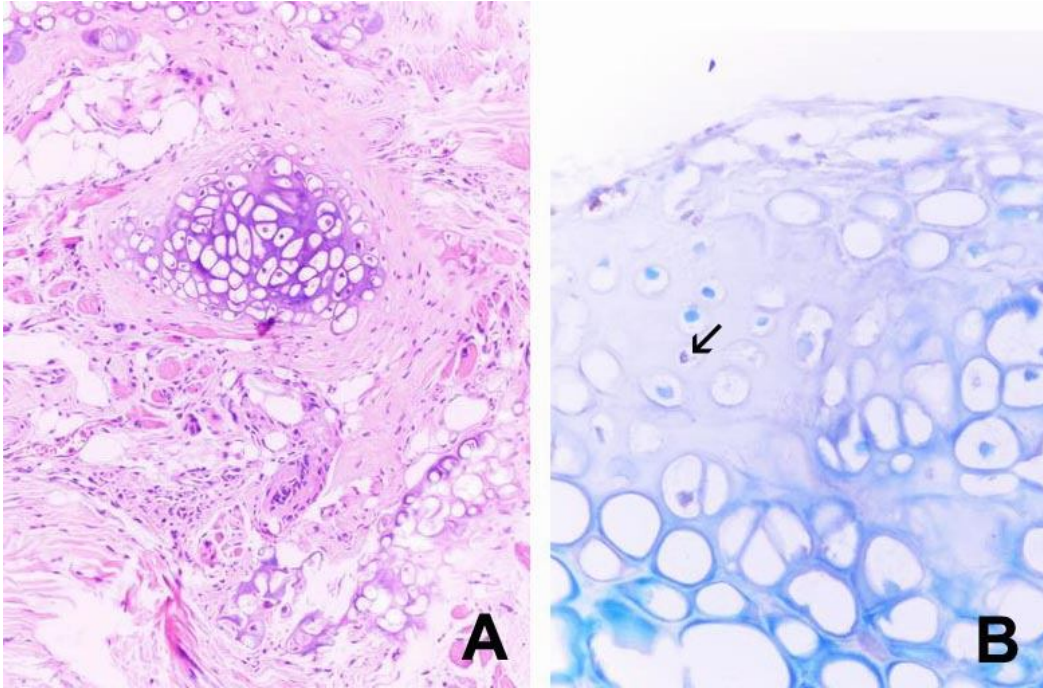
**Resim 7:** Solda; kontrol grubunun H&E boyamada (x200) ve sağda; TUNEL reaksiyonu sonucu ışık mikroskobisi altında görünümü (x400). TUNEL ile pozitif reaksiyon veren kondrosit ok işareti ile gösterilmiştir.



**Resim 8:** 6. grup 4. hafta sonunda alınan örneğin ışık mikroskobisi altında görüntüleri. (A) H&E x200, (B) TUNEL x400. Sağ resimde TUNEL aktivitesinde artış izlenmektedir. Bunun yanında rezorpsiyonun başladığı tespit edilmektedir.



**Resim 9:** 4. grup 12. hafta sonunda alınan örneğin ışık mikroskopisi altında görünümleri. (A) H&E x200, (B) TUNEL x400. Sağ resimde TUNEL aktivitesinde artış izlenmektedir. Minimal rezorpsiyon gözlenmektedir.



**Resim 10:** 6. grup 12. hafta sonunda alınan örneğin ışık mikroskopisi altında görünümleri. (A) H&E x200, (B) TUNEL x400. Sağ resimde TUNEL aktivitesinin kontrol grubu ile benzer olduğu ancak çekirdekli hücre sayısında azalma olduğu izlenmektedir. Rezorpsiyonun çok artmış olduğu gözlenmektedir.

### Işık Mikroskobu Bulgularının İstatistiksel Değerlendirmesi

İlk hafta örneklerinde, apoptozis oranlarının belirlenmesi amacıyla Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Test sonucunda gruplardan en az birinin diğerlerinden farklı olduğu görülmüştür (P=0,004). Çoklu karşılaştırma testi sonucunda kontrol grubu ile grup 5 (P=0,014) ve kontrol grubu ile grup 6 (P=0,039) arasında anlamlı bir farklılık olduğu, diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. (tablo 10)

**Tablo 10:** 1. hafta sonucunda gruplar arasında TUNEL test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

1. HAFTA, P=0,004							
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Kontrol
grup 1		1,000	1,000	1,000	0,731	1,000	1,000
grup 2	1,000		1,000	1,000	0,093	0,206	1,000
grup 3	1,000	1,000		1,000	0,605	1,000	1,000
grup 4	1,000	1,000	1,000		0,494	0,987	1,000
grup 5	0,731	0,093	0,605	0,494		1,000	<b>0,014*</b>
grup 6	1,000	0,206	1,000	0,987	1,000		<b>0,039*</b>
Kontrol	1,000	1,000	1,000	1,000	<b>0,014*</b>	<b>0,039*</b>	

\*: p<0.05

Dördüncü hafta örneklerinde, apoptozis oranlarının belirlenmesi amacıyla Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Test sonucunda gruplardan en az birinin diğerlerinden farklı olduğu görülmüştür (P=0,001). Çoklu karşılaştırma testi sonucunda kontrol grubu ile grup 5 (P=0,001) ve kontrol grubu ile grup 6 (P=0,010) arasında anlamlı bir farklılık olduğu, diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

**Tablo 11:** 4. hafta sonucunda gruplar arasında TUNEL test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

4. HAFTA, P=0,001							
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Kontrol
grup 1		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,327
grup 2	1,000		1,000	1,000	0,183	0,500	1,000
grup 3	1,000	1,000		1,000	0,160	0,479	1,000
grup 4	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,468
grup 5	1,000	0,183	0,160	1,000		1,000	<b>0,001*</b>
grup 6	1,000	0,500	0,479	1,000	1,000		<b>0,010*</b>
Kontrol	0,327	1,000	1,000	0,468	<b>0,001*</b>	<b>0,010*</b>	

\*: p<0.05

Onikinci hafta örneklerinde, apoptozis oranlarının belirlenmesi Kruskal-Wallis testi amacıyla kullanılmıştır. Test sonucunda gruplardan en az birinin diğerlerinden farklı olduğu görülmüştür (P=0,002). Çoklu karşılaştırma testi sonucunda kontrol grubu ile grup 4 arasında anlamlı bir farklılık olduğu (P=0,001), diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.(Tablo 12)

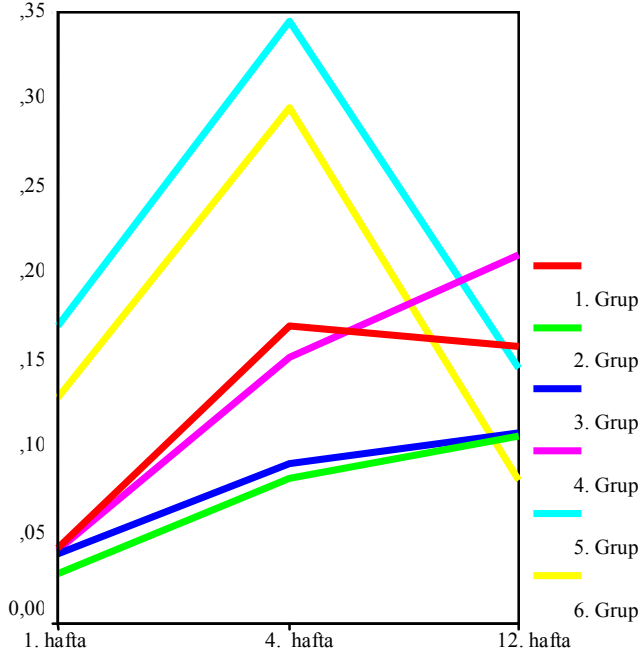
**Tablo 12:** 12. hafta sonucunda gruplar arasında TUNEL test sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

12. hafta, P=0,002							
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Kontrol
grup 1		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,105
grup 2	1,000		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
grup 3	1,000	1,000		1,000	1,000	1,000	0,642
grup 4	1,000	1,000	1,000		1,000	0,389	<b>0,001*</b>
grup 5	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	0,058
grup 6	1,000	1,000	1,000	0,389	1,000		1,000
Kontrol	0,105	1,000	0,642	<b>0,001*</b>	0,058	1,000	

\*: p<0.05

Bu sonuçlar doğrultusunda 1. hafta ve 4. hafta sonunda perikondriumsuz olarak alınıp çevresinde perikondrium olmayan başka bir bölgeye yerleştirilen kıkırdak greftlerinin kontrol grubuna ve diğer gruplara oranla apoptozis oranının daha fazla olduğu ancak 12 hafta sonucunda bu farkın kaybolduğu tespit edildi. Bu farkın kaybolmasındaki sebebin sadece apoptozisin azalması değil, buna ek olarak canlı çekirdekli hücre sayısının da azalması ve dolayısıyla apoptozisin tespit edilememesi olduğu düşünüldü. Öte yandan, 12. hafta sonunda diğer gruplardan daha fazla apoptozis görülen grubun perikondriumla birlikte kaldırılan ancak travmatize edilen kıkırdak greft grubunda olduğu tespit edildi. Bu durum, perikondriumun travmanın apoptotik etkisini geciktirdiğinin bir göstergesi olabilir.

Perikondriumsuz koyulan greftlerde ise travmatik olsun ya da olmasın 1. haftadan itibaren apoptozis görüldüğü, 4. haftada ise apoptozisin maksimuma çıktığı tespit edildi. Onikinci hafta sonunda ise, canlı kondrosit sayısında ve dolayısıyla apoptozis oranında genel bir azalma olduğu görüldü.



**Grafik 1:** Grupların apoptozis oranlarının zamana bağlı grafiksel dökümü görülmektedir.

İlk hafta sonunda, rezorpsiyonun 4., 5. ve 6. gruplarda diğerlerine nazaran daha yüksek (sırayla  $P=0,000$ ,  $P=0,027$ ,  $P=0,000$ ); dördüncü hafta sonunda tüm gruplarda rezorpsiyonun kontrol grubuna oranla daha yüksek, ve onikinci hafta sonunda, rezorpsiyonun 4., 5. ve 6. gruplarda diğerlerine nazaran daha yüksek (sırayla  $P=0,005$ ,  $P=0,001$ ,  $P=0,005$ ) olduğu tespit edildi. Bu durum, perikondriumun rezorpsiyonu azaltıcı bir etkisi olduğunu gösterebilir.

### Biyokimyasal Bulgular

**Tablo 13:** 1. hafta sonunda grupların MDA değerleri ve NITRAT değerleri

1. HAFTA	MDA			NITRAT	
	N	O	S.D.	O	S.D.
1. Grup	4	0,2275	0,0780	0,6174	0,3608
2. Grup	5	0,2600	0,0704	0,5469	0,1615
3. Grup	5	0,2740	0,0789	0,4186	0,2890
4. Grup	5	0,2060	0,0799	0,5391	0,3279
5. Grup	5	0,2040	0,0747	0,4358	0,2209
6. Grup	5	0,2180	0,0526	0,4758	0,1830
Kontrol grubu	9	0,2025	0,0330	0,8174	0,1030

O: ortalama; S.D.: Standart sapma

**Tablo 14:** 4. hafta sonunda grupların MDA değerleri ve NİTRAT değerleri

4. HAFTA	MDA			NİTRAT	
	N	O	S.D.	O	S.D.
1. Grup	4	0,1260	0,0451	0,3466	0,2669
2. Grup	5	0,1220	0,0466	0,5360	0,2045
3. Grup	5	0,3140	0,0594	0,7128	0,3145
4. Grup	5	0,1940	0,0451	0,5782	0,0976
5. Grup	5	0,2325	0,0350	0,5078	0,1968
6. Grup	5	0,2575	0,0299	0,5578	0,1434
Kontrol grubu	9	0,2025	0,0330	0,8174	0,1030

O: ortalama; S.D.: Standart sapma

**Tablo 15:** 12. hafta sonunda grupların MDA değerleri ve NİTRAT değerleri

12. HAFTA	MDA			NİTRAT	
	N	O	S.D.	O	S.D.
1. Grup	5	0,2420	0,0795	0,6549	0,3253
2. Grup	4	0,2850	0,0480	0,6154	0,2808
3. Grup	5	0,1820	0,0311	0,6552	0,3066
4. Grup	5	0,2480	0,0626	0,5313	0,1680
5. Grup	2	0,2800	0,0141	0,7660	0,4869
6. Grup	2	0,3300	0,0849	0,9160	0,2748
Kontrol grubu	9	0,2025	0,0330	0,8174	0,1030

O: ortalama; S.D.: Standart sapma

### **Biyokimyasal Bulguların İstatistiksel Değerlendirilmesi**

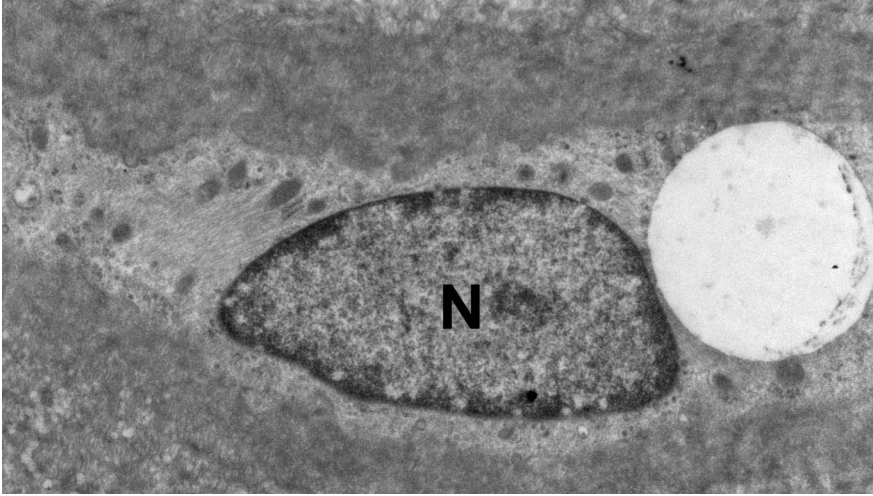
MDA değerleri ( $P=0,555$ ) ve NİTRAT değerleri ( $P=0,299$ ) 1. hafta sonunda gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi.

Çoklu karşılaştırma testi sonucunda ise 4. hafta MDA değerleri bakımından 1. grup ile 3. grup arasında ( $P=0,000$ ), 1. grup ile 5. grup arasında ( $P=0,022$ ), 1. grup ile 6. grup arasında ( $P=0,003$ ), 2. grup ile 3. grup arasında ( $P=0,000$ ), 2. grup ile 5. grup arasında ( $P=0,016$ ), 2. grup ile 6. grup arasında ( $P=0,002$ ) ve 3. grup ile 4. grup arasında ( $P=0,005$ ) anlamlı bir farklılık olduğu, diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

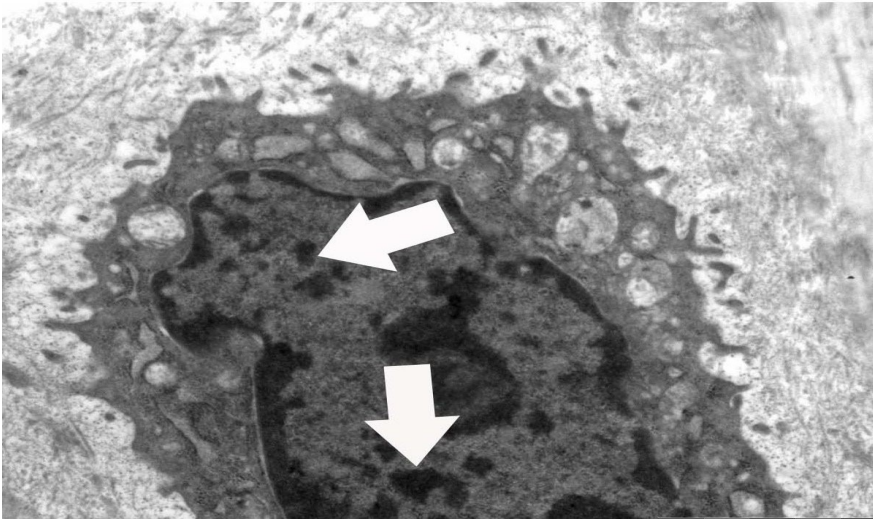
MDA değerleri ( $P=0,074$ ) ve Nitrat değerleri ( $P=0,724$ ), 12. hafta sonunda gruplar arasında anlamlı bir fark göstermedi.

### Elektron mikroskopik bulgular

Elektron mikroskop çalışmalarında, vezikül oluşumu ve nükleus yamalaşması görülmesi erken dönem apoptozis lehine bulgular iken, ekstraselüler matriks dejenerasyonu ve otofajik vakuol (asteriks) oluşumlarının görülmesi geç dönem apoptozis bulguları olarak kabul edilir. Buna göre, çalışmamızda elde ettiğimiz elektron mikroskopik bulgular kalitatif olarak değerlendirildi.

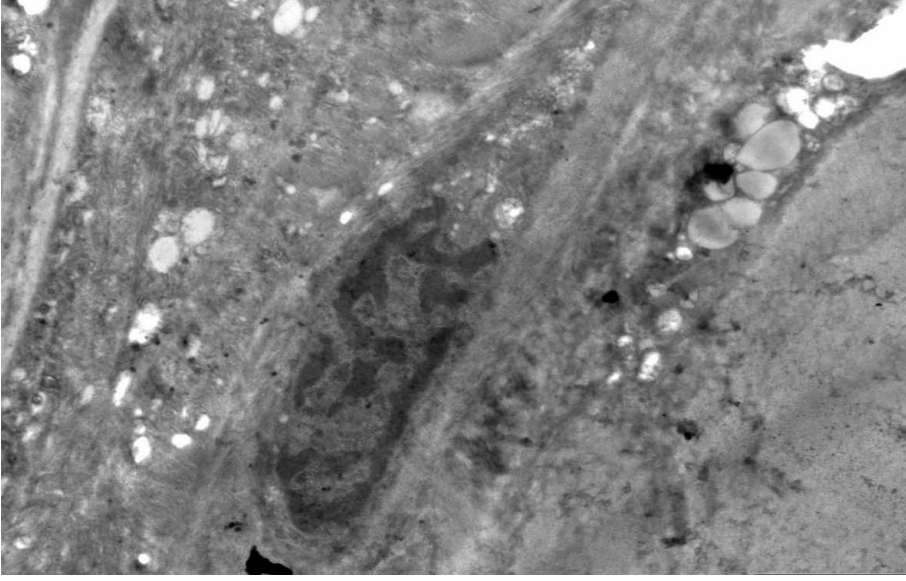


**Resim 11:** 1. hafta, 2. gruba ait normal kondrosit rneği. Kondrosit nükleusu (N).

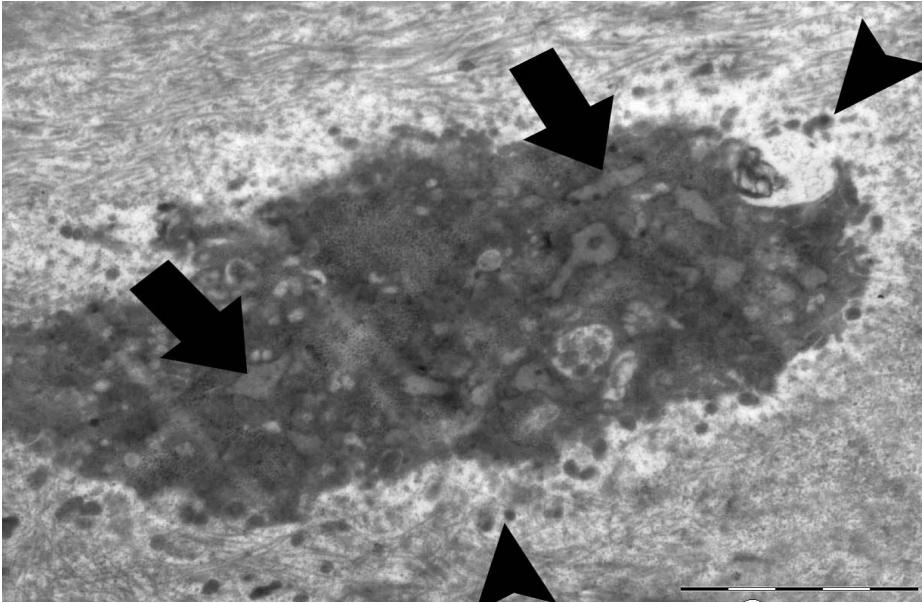


**Resim 12:** 1. hafta, 5. gruba ait kondrosit rneği. Erken kondroptozis döneminde bir kondrosit izleniyor. Nkleusunda yama tarzında heterokromatin yoğunlaşmaları (beyaz ok) dikkati çekiyor.

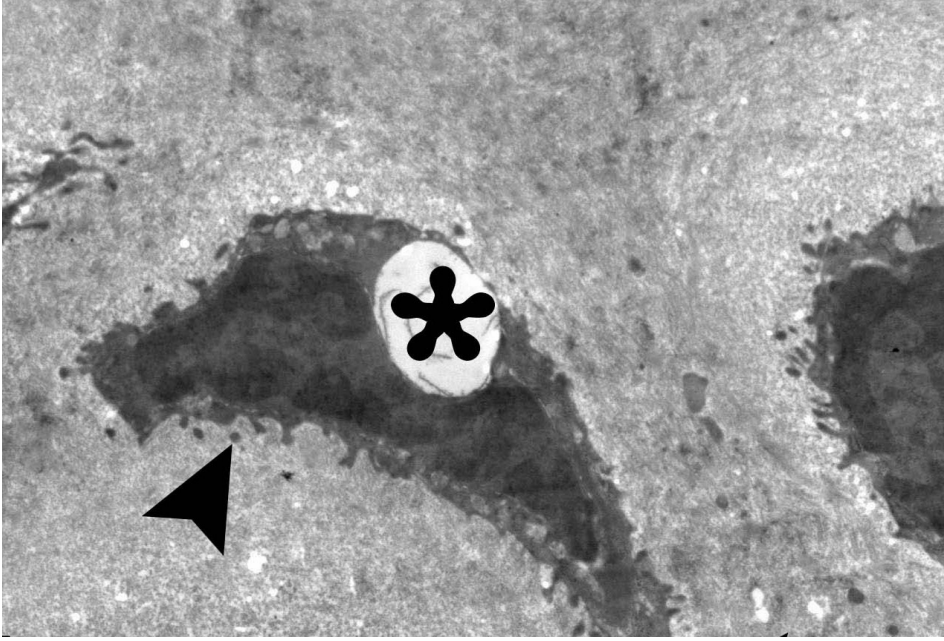




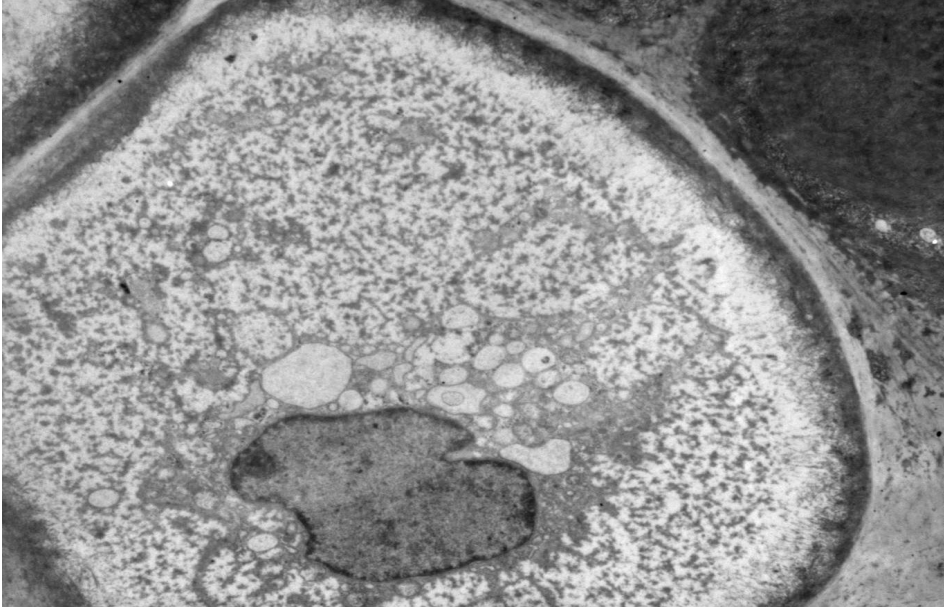
**Resim 13:** 4. hafta, 5. gruba ait kondroptotik kondrosit örneği. Ekstraselüler matriks dejenere bir görünüm sergiliyor.



**Resim 14:** 12. hafta, 6. gruba ait geç dönemde kondroptotik kondrosit örneği. Sitoplazmada GER genişlemeleri (ok) dikkati çekiyor. Belirgin matriks vezikülleri (ok başı) görülüyor.



**Resim 15:** Geç dönem kondroptotik kondrosit örneği. Ortadaki kondrositte kondroptozisin geç dönem özelliği olarak otofajik vakuol (asteriks) de izleniyor. Ayrıca yine matriks vezikülleri (ok başı) dikkati çekiyor.



**Resim 16:** 5. grupta nekrotik hücre görünümü. Nükleus sağlam kromatin yoğunlaşması yok sitoplazması parçalanmış görünüm izlenmektedir.

## TARTIŞMA

Kıkırdak mezenşimden köken alan kondrosit, kondroblast ve su yüklü matriksten oluşan özelleşmiş konnektif yapıya sahip bir dokudur. Vücutta yumuşak dokuya destek veren, eklem yüzeyinin sürtünmesini azaltan ve mekanik darbelerin emilimi gibi görevlere sahiptir. Bu derece önemli görevleri olan kıkırdak dokunun hasarlarında veya eksikliğinde oluşabilecek deformite ve fonksiyon kaybı, ağır patolojileri de beraberinde getirebilmektedir.

Kıkırdak greftleri rekonstrüktif cerrahide yaygın olarak kullanılır. Bunlar çoğu kez perikondriumsuz olsa, da zaman zaman perikondriumlu olarak da elde edilir. Bundan başka, özellikle septumdan alınan greftlerin çoğunlukla önceden geçirilmiş travma durumu göz ardı edilir. Ayrıca, düzeltici amaçlı olarak, kıkırdağın ezilmesi veya çizilmesi gibi işlemler de klinikte yaygın olarak yapılır. Ayrıca, kıkırdak greftleri alındıkları yerden başka bölgelerin rekonstrüksiyonlarında da kullanılabilir. Bizim çalışmamızda, tüm bu klinik uygulama şekillerini taklit edecek çalışma alt grupları oluşturuldu.

Travmatize olan ve olmayan kıkırdak greftlerinin, kendi yerlerinde veya farklı bir bölgeye taşındıktan sonra çeşitli zaman aralıklarında karşılaştıkları olası değişikliklerde perikondriumun rolü apoptozis açısından araştırıldı.

Kondrositler için nutrient ve oksijen kaynağı olan perikondriumun, kıkırdak greftine dâhil edilmediği durumda TUNEL tekniğine göre, kondrosit apoptozisinin ilk 4 haftada artarak devam ettiği, ancak 12. hafta sonunda apoptozis oranının azaldığı görüldü. Geç dönemdeki bu gelişmenin nedeninin, canlı hücre sayısındaki azalma ve dolayısıyla apoptozisin tespit edilememesi olduğu düşünüldü.

Travmatik kıkırdakta ise, TUNEL tekniğine göre, perikondriumun apoptozis açısından doğrudan bir etkisi olduğu saptanamadı.

Ancak ilk 12 hafta içinde travmatize edilmeyen perikondriumlu kıkırdak greftlerinin apoptozis oranlarının normal kıkırdak dokusundan farklı olmadığı söylenebilir. Bununla birlikte travmatize edilen perikondriumu intakt kıkırdak greftlerinin 4 haftaya kadar apoptozisin normal kıkırdak dokusundan farklı olmadığı ancak 12. haftada apoptozis oranının normal kıkırdaktan fazla olduğu ifade edilebilir. Işık mikroskobu ve elektron mikroskobu bulguları, perikondriumsuz kıkırdak greftlerinde yoğun fibrozis artışı olduğunu gösterdi. Dikkat çeken diğer bir bulgu ise perikondriumu intakt gruplarda apoptotik

hücrelerin kıkırdağın kondrojenik hücrelerin yoğun olduğu perikondreal yüze yakın bölgelerde oluştuğu ancak perikondriumu olmayan kıkırdak greftlerinde ise kıkırdağın her tarafına homojen olarak dağıldığı tespit edildi.

Kıkırdak greftinin ilk klinik kullanımının 1896 yılında Konig tarafından yapıldığı bilinir. Daha sonraki yıllarda, kostal ve septal kıkırdak greftlerinin canlılığı üzerine de çalışmalar yapılmıştır.<sup>33</sup> Guyuron ve arkadaşları 1994 yılında, deneysel olarak otojen kıkırdak greftlerinde canlılık oranlarının %70 ile %90 arasında değiştiğini, ve aynı yıl yayınlanan klinik araştırmalarında ise, canlılığın %87,5 gibi yüksek oranlarda olduğunu bildirdiler.<sup>34</sup> Verwoerd ve arkadaşları ise 1991'de ezilmiş kıkırdak greftlerinde yüksek oranda nekroz oluştuğunu tespit etmiştir. Yine Bujia ve arkadaşları ezilmiş kıkırdak greftlerinde canlı kondrositlerin %10 ile %30 arasında kaldığını tespit etmişlerdir.<sup>35</sup> Bu çalışmalardan, kıkırdak greftlerin yüksek canlılık oranlarına sahip olduğu, ancak, travma gibi faktörlerin bunu olumsuz etkilediği sonucuna varılabilir.

Duncan ve arkadaşları 1984'te yaptığı bir çalışmada, perikondriumlu ve perikondriumsuz greftleri karşılaştırmışlar ve perikondriumlu greftlerin iyileşme hızlarının daha yüksek olduğunu ve parçalanmaya karşı da perikondriumsuz olan greftlere nazaran daha dayanıklı bulunduğunu göstermişlerdir.<sup>15</sup>

Kıkırdak greftlerinin zamanla ossifikasyona uğrayabildikleri de bilinir. Can ve arkadaşlarının 2008 de yaptığı deneysel çalışmada travmatize ettikleri ve tekrar yerine koydukları perikondriumlu ve perikondriumsuz kıkırdak greft gruplarının ikisinde de osteojenik hücre aktivitesi sonucu ossifikasyona yönelik değişikliklerin olduğunu tespit etmişler.<sup>36</sup> Bunu nedeni, perikondriumun sahip olduğu osteojenik aktivite olabilir. Bunun tersi olarak da, periostun olmadığı durumlarda, kemik üzerine yerleştirilen kıkırdak dokunun iyileşmesinin azaldığı da gösterilmiştir.<sup>37</sup> Bu, periostun da kıkırdak iyileşmesi üzerine bir etkisinin olduğunu dolaylı bir göstergesidir. Klinik olarak, kemik üzerine uygulanacak kıkırdak greftlerinin canlı periost olan bölgelerde ve özellikle de periost altında olduğunda daha başarılı sonuçlar verebileceğini düşündürür.

Kolesteatom cerrahisinde açık kavitenin doldurulması için sık kullanılan kıkırdak greft metodu üzerine Tu ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları bir çalışmada perikondriumunu koruyarak kullanılan kıkırdak greftlerinde canlı kondrosit sayısının, kodrogenesisin ve revaskülarizasyonun, perikondriumsuz kullanılan kıkırdak greftlerine oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca,

kıkırdak greftlerinin doğranarak 'diced cartilage graft' kullanılmasının, perikondrium korunan gruba nazaran, canlı hücre oranı açısından daha olumsuz olduğunu göstermişlerdir (canlı hücre oranları sırayla %49, %35). Bunun nedenini ise perikondriumdan beslenen kıkırdak dokusunun perikondrium olmadığı zaman nutrientler ve oksijenizasyonunun olmaması, revaskülarizasyonun olmamasına bağlanmaktadır. Ancak boşalan lakünaların hangi hücre ölümü ile gerçekleştiğine bu çalışmada değinilmemiştir.<sup>38</sup>

Yakın zamana kadar kondrosit ölümünün sadece nekroz ile gerçekleştiği bilinirken, son zamanlarda yapılan çalışmalar göstermektedir ki; travmanın bir sonucu olarak kondrosit apoptozisi indüklenmektedir.<sup>39</sup> Travmanın kıkırdak üzerindeki etkileri üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu konu ile ilgili Görür ve arkadaşlarının yaptığı travmatik ve travmatik olmayan septum kıkırdaklarında apoptozis tespiti ile ilgili çalışma konuya ışık tutması açısından önemlidir. Septal deviasyonu olan travmatik ve travmatik olmayan hastaların, eğri olan kısımları ve eğri olmayan kısımlarının karşılaştırıldığı çalışmada travmatik septum örneklerinde apoptozis oranı %56 iken, travmatik olmayan örneklerde %7,7 olarak saptanmış ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Travma sonucu kıkırdak ile perikondrium arasında oluşan hematoma ve kıkırdağın direkt etkiyle fraktürü gibi nedenlerle kıkırdakta difüzyon bozulmaktadır. Oluşan iskemi sonucu hem nekroz görülmekte, hem de apoptozis (kondropitoz) tetiklenmektedir. Sonuç olarak matriks yıkımı ve kondrosit kaybı ile apoptozise bağlı kıkırdakta zayıflama gözlenmektedir. Öylece, travmatik septumdan alınacak kıkırdak greftinin rezorbe olma olasılığının yüksek ve bunun bir nedeninin de apoptozis olabileceği savunulmuştur.<sup>8</sup>

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen bulgular doğrultusunda TUNEL ve elektron mikroskopisi sonucunda travmatize edilmeden blok şekilde koyulan kıkırdak greftleri, vaskülerize perikondrium olan bir alana yerleştirildiğinde 1. hafta, 4. hafta ve 12. hafta sonunda apoptozis oranının canlı ve travmatize edilmemiş kıkırdaktaki kadar az olduğu tespit edildi. Serum nitrat sonuçlarına göre tüm zaman aralıklarında diğer gruplar ile benzer sonuçlar verdiği, serum MDA ise 1. hafta ve 12. haftada diğer gruplar ile benzer sonuçlar alınmasına rağmen 4. haftada travmatize edilen ve vaskülerize perikondrium aralığına koyulan kıkırdak greftleri, travmatik veya değil perikondriumsuz olarak başka bölgelere konulan kıkırdak greftlerine oranla daha düşük seviyede kaldığı tespit edildi. Bu durum klinik olarak, perikondrium disseksiyonu sonrası septuma hiçbir işlem yapılmadığında apoptozis tespit edilmiyor olarak değerlendirilebilir.

Travmatize edilmeden perikondriumu korunarak blok şekilde konulan greftler ise TUNEL tekniği ve elektron mikroskopisi sonucunda, 1. hafta, 4. hafta ve 12. hafta sonunda apoptozis oranının canlı ve travmatize edilmemiş kıkırdaktaki kadar az olduğu tespit edildi. Serum nitrat sonuçlarına göre tüm zaman aralıklarında diğer gruplar ile benzer sonuçlar verdiği, serum MDA ise 1. hafta ve 12. haftada diğer gruplar ile benzer sonuçlar alınmasına rağmen 4 haftasında travmatize edilen ve vaskülerize perikondrium aralığına koyulan kıkırdak greftleri, travmatik veya değil perikondriumsuz olarak başka bölgelere konulan kıkırdak greftlerine oranla daha düşük seviyede kaldığı tespit edildi. Bu durum klinik olarak perikondriumlu onlay kıkırdak greftlerinde oksidatif stresin olmadığı ve apoptotik hücre sayısının normal kıkırdak sınırlarında olduğunu gösterir.

Travmatize edilen ve vaskülerize perikondriumu olan bir bölgeye koyulan kıkırdak greftlerinde TUNEL tekniği sonucu 1. hafta, 4. hafta ve 12. hafta sonunda apoptozis oranının canlı ve travmatize edilmemiş kıkırdaktaki kadar az olduğu tespit edildi. Elektron mikroskopisinde ise kalitatif olarak 4. hafta ve 12. haftada bir miktar apoptotik hücreler izlenmiştir. Serum nitrat sonuçlarına göre tüm zaman aralıklarında diğer gruplar ile benzer sonuçlar verdiği, serum MDA ise 1. hafta ve 12. haftada diğer gruplar ile benzer sonuçlar alınmasına rağmen 4. haftada travmatik ve perikondriumu korunan kıkırdak greftinden, travmatik olmayan perikondriumu korunan kıkırdak greftinden ve vaskülerize

perikondrium altına koyulan kıkırdak greftinden daha fazla olduğu dikkati çekmiştir. Bu durum klinik olarak perikondrium disseksiyonu sonrası septuma yapılan skoring sonrasında apoptozisin önemli ölçüde olmayacağı olarak değerlendirilebilir.

Travmatize edilen perikondriumu korunan kıkırdak greftlerinde TUNEL tekniği sonucu doğrultusunda 1. hafta ve 4. hafta sonunda apoptozis oranının canlı ve travmatize edilmemiş kıkırdaktaki kadar az olduğu tespit edildi. Ancak 12. hafta sonunda apoptozis oranlarının kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi. Elektron mikroskopisinde apoptozis tespit edildi.

Serum nitrat sonuçlarına göre tüm zaman aralıklarında diğer gruplar ile benzer sonuçlar verdiği, serum MDA ise 1. hafta ve 12. haftada diğer gruplar ile benzer sonuçlar alınmakla birlikte 4. haftada travmatize edilen canlı perikondrium arasına koyulan kıkırdak greftlerinden düşük seviyelere sahip olduğu tespit edildi. Bu durum klinikte, perikondriumlu ama doğranmış kıkırdakta apoptozisin zamanla arttığı, ancak bunun perikondriumsuz kıkırdaktaki seviyeye ulaşmadığı ve daha düşük kaldığı şeklinde yorumlanabilir.

Perikondriumsuz ve travmatize edilmeden farklı bir bölgeye koyulmuş kıkırdak greftlerinde TUNEL tekniği sonucu 1. hafta ve 4. hafta sonunda apoptozis oranının kontrol grubuna oranla yüksek olduğu ancak 12. haftada kontrol grubu ile aynı seviyelerde olduğu tespit edildi. Bununla birlikte 12. haftada ışık mikroskopik bulgularda perikondriumsuz travmatik olmayan kıkırdak greftlerinde fibrosisin yoğun biçimde arttığı tespit edildi. Elektron mikroskopisinde tüm zaman dilimlerinde kondroptotik hücrelere rastlanmaktadır. 4. haftada nekrotik hücreler ve ekstraselüler dejenerasyon görülmektedir. Serum nitrat sonuçlarına göre tüm zaman aralıklarında diğer gruplar ile benzer sonuçlar verdiği, serum MDA ise 1. hafta ve 12. haftada diğer gruplar ile benzer sonuçlar alınmakla birlikte 4. haftada canlı perikondrium arasına koyulan travmatik olmayan ile perikondriumu intakt travmatize edilmemiş kıkırdak greftlerinden yüksek oranda olduğu tespit edildi. Bu durum klinikte, perikondriumsuz kullanılan greftlerin bir süre apoptozis etkisinde olacağı, devamında da canlı hücre sayısı azalmasına bağlı olarak rezorpsiyon sürecine gireceği ve dolayısıyla greftte bir yapısal bozukluk olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Perikondriumu alınmış ve travmatize edilmesinden sonra farklı bir bölgeye koyulmuş kıkırdak greftlerinde TUNEL tekniği sonucu 1. hafta ve 4. hafta sonunda apoptozis oranının kontrol grubuna nazaran yüksek olduğu ancak 12. haftada kontrol grubu ile aynı seviyelerde olduğu tespit edildi. Bununla birlikte 12. haftada ışık mikroskopik bulgularda perikondriumsuz travmatik kıkırdak greftlerinde fibrozisin yoğun biçimde arttığı tespit edildi. Elektron mikroskopisinde tüm zaman dilimlerinde kondroptotik hücrelere rastlanmaktadır. 4. haftada nekrotik hücreler ve ekstraselüler dejenerasyon görülmektedir. Serum nitrat sonuçlarına göre tüm zaman aralıklarında diğer gruplar ile benzer sonuçlar verdiği, serum MDA ise 1. hafta ve 12. haftada diğer gruplar ile benzer sonuçlar alınmakla birlikte 4. haftada canlı perikondrium arasına koyulan travmatik olmayan ile perikondriumu intakt travmatize edilmemiş kıkırdak greftlerinden yüksek oranda olduğu tespit edildi. Bu durum klinik olarak, “doğranmış perikondriumsuz kıkırdakta öncelikle apoptotik sürecin işlediği, sonrasında da buna bağlı olarak canlı hücre sayısının azaldığı, nekroz ve rezorpsiyon sürecinin de görülebileceği” olarak yorumlanabilir.

Sonuç olarak, bu deneysel çalışma, perikondriumun kıkırdak apoptozisi üzerine etkisini araştıran ilk örnek olması açısından önemlidir, ancak konunun daha iyi anlaşılması için daha ileri deneysel ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

1. Tjelmeland K, Stal S. Cartilage Graft Resorption: An animal model. *Aesth Surg Journal* 2000;20:471-476
2. Acarturk S, Arslan E, Demirkan F, Unal S. An algorithm for deciding alternative grafting materials used in secondary rhinoplasty. *Br J Plast Surg*. 2005 Dec 10; [Epub ahead of print].
3. Arslan E, Unal S, Demirkan F, Gurbuz O, Beden V. Augmentation rhinoplasty with a combination of triple cartilage grafts for secondary rhinoplasty in a middle-aged population. *Aesthetic Plast Surg*. 2005;29(4):240-5.
4. Araco A, Gravante G, F. Araco F. Autologous Cartilage Graft Rhinoplasties *Aesth. Plast. Surg*. 2006;30:169-174,
5. Loening AM, James IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, Nuttall ME, Hung HK, Blake SM, Grodzinsky AJ, Lark MW. Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis. *Arch. Biochem.Biophys*. 2000;381:205–212.
6. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J Pathol* 1995;146:3-1415.
7. Görür K, Polat G, Özcan C, Arslan A, Vayisoğlu Y, Öztürk Ö.G, Bağdatoğlu Ö. The Role of Apoptosis in Traumatic versus Nontraumatic Nasal Septal Cartilage. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2007; 119(6):1773-1776
8. Randolph MA, Yaremchuk MJ. Repair, grafting and engineering of cartilage In: Mathes S(ed), Mathes, *Plastic Surgery*, 2nd Ed. Philadelphia : Saunders Elsevier, 2006(1): 621-638
9. Hunziker EB: Articular Cartilage Repair: Problems And Perspectives. *Biorheology* 2000;37:163-164
10. Hunziker EB: growth factor induced healin of partial thickness defects in adult articular cartilage . *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:22-32
11. Vacanti CA, Upton j: tissue engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polimer matrices. *Clin plast surg* 1994;21:445-462
12. Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech* 1984;17:377-394

13. Mow VC, Mac AF, Lai WM. Viscoelastic properties of proteoglycan subunits and aggregates in varying solution concentrations. *J Biomech* 1984;17:325-338
14. Chang X, Wang Y, Wu H. Intrachondral microvasculature in the human fetal talus. *Foot Ankle Int* 1997;18:335-338
15. Duncan MJ, Thompson HG, Mancner JF: Free cartilage grafts, The role of the perichondrium. *Plast. Reconstr. Surg.* 1984;73:916
16. Skoog T, Ohlsén L, Sohn SA. Perichondreal potential for cartilaginous regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg*:1972;6:123
17. Upton J, Sohn SA, Glowacki J. Neocartilage derived from transplanted perichondrium: What is it? *Plast Reconstr Surg* 1981;68:166
18. Elves MW. A study of transplantation antigens on chondrocytes from articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 1974;56:178-185.
19. Peretty GM, Randolph MA, Caruso EM, et al: Bonding of cartilage matrices with culture chondrocytes: an experimental model. *J Orthop Res* 1998; 6:89-95
20. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing: an overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995; 28:847-864
21. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: Surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* 2001;391(suppl):362-369
22. Reindel ES, Aryoso AM, Chen AC, et al. Integrative repair of articular cartilage in vitro: Adhesive strength of the interface region *J Orthop Res* 1995;13:751-760
23. Peretti GM, Randolph MA, Caruso EM, et al: Bonding of cartilage matrices with cultured chondrocytes: an experimental model. *J Orthop Res* 1998;6:89-95.
24. Gastman BR, Futrell W, Manders EK. Apoptosis and Plastic Surgery. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 2003; 111(4):1481-1496
25. Philchenkov A. Caspases: Potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* 2004; 8(4):432-444
26. Castillo ECG, Kouri JB. A new role for Chondrocytes as Non-Professional Phagocytes. *An In Vitro Study. Microscopy research and technique.* 2004; 64:269-278

27. Kreuter M, Langer C, Kerkhoff C, Reddanna P, Kania AL, Maddika S, Chlichlia K, Bui TN, Los M. Stroke, myocardial infarction, acute and chronic inflammatory diseases: caspases and other apoptotic molecules as targets for drug development, *Arch. Immunol. TherExp.*, 2004; 52:141-155,
28. Feng L, Richard B. Bcl-2 Regulates Chondrocyte Morphology and Aggrecan Gene Expression Independent of Caspase Activation and Full Apoptosis *Journal of Cellular Biochemistry* 1999; 74:576–586
29. Lee SW, Lee HJ. TRAIL Induces Apoptosis of Chondrocytes and Influences the Pathogenesis of Experimentally Induced Rat Osteoarthritis Arthritis & Rheumatism 2004; 50(2):534–542
30. Roach HI, Aigner T, Kouri JB. Chondroptosis: A variant of apoptotic cell death in chondrocytes? *Apoptosis* 2004; 9(3):265-277
31. Yoshimura F, Kano H, Uzuki M, Tajima K, Shimamura T, Sawai T. Downregulation of inhibitor of apoptosis proteins in apoptotic human chondrocytes treated with tumor necrosis factor-alpha and actinomycin D. *OsteoArthritis Research Society International*. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. 2005 ;11(3):1-7
32. Unger RH, Orci L. Lipoapoptosis: Its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1585: 202–212.
33. Yılmaz S, Erçöçen AR, Can Z. Viability of Diced, Crushed Cartilage Grafts and the Effects of Surgicel (Oxidized Regenerated Cellulose) on Cartilage Grafts *Plastic And Reconstructive Surgery*, 2001; 15:1054-1060
34. Rudderman RH, Guyuron B and Mendelsohn G. The fate of fresh and preserved, noncrushed and crushed autogenous cartilage in the rabbit model. *Ann. Plast. Surg.* 1994; 32: 250,
35. Bujia J. Determination of the viability of crushed cartilage grafts: Clinical implications for wound healing in nasal surgery. *Ann. Plast. Surg.* 1994;32: 261.
36. Can İH, Atilla PA, Çakar N, Önerci M. An animal study on cartilage healing using auricular cartilage as a model *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265:307–311
37. Brittberg M, Sjögren-Jansson E, Thornemo M. Clonal growth of human articular cartilage and the functional role of the periosteum in chondrogenesis *Osteoarthritis and Cartilage*, 2005:13: 146-153.

- 38.** Tu TY, Yang AH, Fan CC. Short-Term Effects of Perichondrium Preservation on Chondrocyte Survival and Chondrogenesis of Auricular Cartilage Grafted in Rabbit Tympanic Bullae *Audiol Neurotol* 2008;13:239–246
- 39.** Borrelli J, and William M. Acute Effects of Cartilage Impact *Clinical Orthopaedics And Related Research* Number 2002; 423:33–39

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AIF CAD:</b>	Caspase-activated deoxyribonuclease
<b>BAR:</b>	Bifunctional apoptosis regulator
<b>CED:</b>	Caenorhabditis elegans death genes (CED-3,CED-4,CED-9)
<b>HLA:</b>	Human leukocyte antigen
<b>ICE:</b>	Interleukin-1beta-converting enzyme
<b>MDA:</b>	Malondialdehyd
<b>NO:</b>	Nitrat
<b>ICAD:</b>	Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
<b>IAP:</b>	Inhibitors of apoptosis
<b>FLIP:</b>	FADD-like ICE-inhibitory protein
<b>ARC:</b>	Apoptosis repressor with CARD
<b>DNA:</b>	Deoxyribonucleicacid
<b>EDA-R:</b>	Ectodermal dyslasia receptor
<b>FADD:</b>	Fas associated death domain
<b>FLICE:</b>	Caspase 8
<b>Apaf1:</b>	Apoptotic protease activating factor-1
<b>TNF-R1:</b>	Tumor necrosis factor- receptor1
<b>TRADD:</b>	TNFR-1 associated death domain
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>IL-1:</b>	İnterleukin-1
<b>TUNEL:</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling
<b>DAB:</b>	Diaminobenzidine tetrahydrochloride
<b>A.H./Ç.H:</b>	Apoptotik hücre sayısı/Çekirdekli hücre sayısı
<b>S.D.:</b>	Standart deviasyon
<b>M:</b>	Ortalama

## RESİMLER DİZİNİ

Resimler		Sayfa
<b>Resim 1</b>	(Üç tip kıkırdak dokusu)	10
<b>Resim 2</b>	(Apoptotik ve sağlam dendritik hücre elektron mikroskobu altında karşılaştırılması)	16
<b>Resim 3</b>	(1., 3., 5., 6. gruplarda kulak derisi perikondrium kaldırıldı)	25
<b>Resim 4</b>	(2. ve 4. gruplarda derisi perikondriumusuz kaldırıldı)	25
<b>Resim 5</b>	(3., 4. ve 6. gruplardan alınan kıkırdak parçası)	26
<b>Resim 6</b>	(5. ve 6. gruplarda kıkırdak grefti yerleştirilmesi.)	26
<b>Resim 7</b>	(Solda; kontrol grubunun H&E sağda; TUNEL reaksiyonu)	34
<b>Resim 8</b>	(6. grup 4. hafta ışık mikroskobisi altında görünümüleri)	34
<b>Resim 9</b>	(4. grup 12. hafta ışık mikroskobisi altında görünümüleri).	35
<b>Resim 10</b>	(6. grup 12. hafta ışık mikroskobisi altında görünümüleri.)	35
<b>Resim 11</b>	(1. hafta, 2. gruba ait normal kondrosit örneği.)	40
<b>Resim 12</b>	(1. hafta, 5. gruba ait kondrosit örneği.)	40
<b>Resim 13</b>	(4. hafta, 5. gruba ait kondroptotik kondrosit örneği.)	41
<b>Resim 14</b>	(12. hafta, 6. gruba ait geç dönemde kondroptoz)	41
<b>Resim 15</b>	(Geç dönem kondroptotik kondrosit örneği)	42
<b>Resim 16</b>	(5. grupta nekrotik hücre görünümü.)	42

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablolar</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1</b>	Kıkırdak tipleri ve yapısal özellikleri	11
<b>Tablo 2</b>	Apoptozis, kondropitoz ve nekroz arasındaki farklılıklar	22
<b>Tablo 3</b>	TUNEL tekniği 1. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.	31
<b>Tablo 4</b>	TUNEL tekniği 2. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.	31
<b>Tablo 5</b>	TUNEL tekniği 3. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.	32
<b>Tablo 6</b>	TUNEL tekniği 4. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.	32
<b>Tablo 7</b>	TUNEL tekniği 5. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.	32
<b>Tablo 8</b>	TUNEL tekniği 6. Grup: 1, 4 ve 12. hafta apoptotik hücre oranları.	33
<b>Tablo 9</b>	TUNEL tekniği ile kontrol grubu apoptotik hücre oranları.	33
<b>Tablo 10</b>	1. hafta sonucunda gruplar arasında TUNEL test sonuçlarının istatistiksel değeriendirilmesi	36
<b>Tablo 11</b>	4. hafta sonucunda gruplar arasında TUNEL test sonuçlarının istatistiksel değeriendirilmesi.	36
<b>Tablo 12</b>	12. hafta sonucunda gruplar arasında TUNEL test sonuçlarının istatistiksel değeriendirilmesi.	37
<b>Tablo 13</b>	1. hafta sonunda grupların MDA değeri ve NITRAT değeri	38
<b>Tablo 14</b>	4. hafta sonunda grupların MDA değeri ve NITRAT değeri	39
<b>Tablo 15</b>	12. hafta sonunda grupların MDA değeri ve NITRAT değeri	39

## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafikler</b>		<b>Sayfa</b>
<b>Grafik 1</b>	Grupların apoptozis oranlarının zamana bağılı grafiğı.	38