



T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**EGF İLE BİYOSİNYALLENDİRİLMİŞ
JELATİN DOKU İSKELESİ ÜZERİNDE
KONTROLLÜ rhBMP 7 SALINIMI İLE
KIKIRDAK DOKU REJENERASYONU**

Dr. BİLGEHAN İLKER

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**EGF İLE BİYOSİNYALLENDİRİLMİŞ
JELATİN DOKU İSKELESİ ÜZERİNDE
KONTROLLÜ rh BMP 7 SALINIMI İLE
KIKIRDAK DOKU REJENERASYONU**

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: Prof. Dr. HALUK VAYVADA
Dr. BİLGEHAN İLKER

TIPTA UZMANLIK TEZİ
2015- İZMİR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasını yürütmemde yol gösteren danışman hocam Prof. Dr.Haluk VAYVADA'ya,

Asistanlığımın her aşamasında yoluma deneyimleri ve sevgisiyle ışık tutan saygıdeğer hocam Prof.Dr. Ali BARUTÇU'ya,

Tez projemin hayata geçirilmesinde büyük katkıları olan, her zaman destek, ilgi ve anlayışını gördüğüm, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Can KARACA'ya,

Cerrahi becerilerimin şekillenmesi için olağanüstü çaba harcayan ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a,

Yeteneklerine ve kişiliğine her zaman hayran olduğum, asistanı olmaktan gurur duyduğum "Cerrahi deha" ,sevgili hocam Prof.Dr. Adnan MENDERES'e,

Hastanemizdeki bilimsel araştırma ve çalışmalara sonsuz desteği ile dekanımız Sayın Prof. Dr.Tülay CANDA 'ya,

Çalışmanın histokimyasal çalışmalarındaki özverili katkıları ve hep yanımda hissettiğim manevi desteği için sevgili hocam Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR ve asistanı Eda KAHVECİ 'ye;

Çalışma kapsamında kullanılan doku iskelerinin, hem hazırlanma hem de mekanik özellik özelliklerinin test edilmesi aşamalarını başarıyla yürüten Yüks. Kimya Mühendisi Çiğdem YENGİN'e;

DeneySEL çalışmalar için gerekli ortamı sağlayan Prof. Dr. Osman YILMAZ ve Deney Hayvanları Laboratuvarı'nın değerli uzman ve çalışanlarına,

Dr. S. Ali KIZILKAYA, Dr. Özgür SUNAY, Dr.Koray URGU başta olmak üzere, asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma,

Sayırsız yardımlarını gördüğüm Sevgili Anabilim Dalı sekreterimiz Tülay Güler, sevgili servis sekreterimiz Gülay Turgut Elolen ve sevgili hemşirelerimiz Sevdije Ünlü, Ayça Keskinçiling ve Dyt. Hülya Çelik Taşdemir 'e, tüm servis ve poliklinik çalışanlarımıza,

Tez çalışmasının her aşamasında yanımda olan, tüm olumsuzlukları umutla aşmamı sağlayan Dr. Okan DERİN, Mol. Biy. Sezen KORKUT ve Dr.Saadet ALTIN'a,

Ve yaşamımın her alanında yanımda olan, yetişmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan çok sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	2
SİMGELER VE KISALTMALAR	7
ŞEKİLLER.....	9
TABLolar	12
1. ÖZET	13
2. ABSTRACT.....	15
3. GİRİŞ VE AMAÇLAR.....	17
4. GENEL BİLGİLER.....	22
4.1. KIKIRDAK DOKU HİSTOLOJİK YAPISI	22
4.1.1. Kıkırdak Hücreleri	22
4.1.1.1 Kondrojenik Hücreler	23
4.1.1.2. Kondroblastlar	23
4.1.1.3. Kondrositler.....	23
4.1.2. Ekstraselüler Matriks(ESM)	27
4.1.2.1. Glikozaminoglikanlar ve Proteoglikanlar	29
4.1.2.2. Fibröz Proteinler	31
4.1.2.2.1. Kollajen.....	31
4.1.2.2.2. Elastin.....	36
4.1.2.3. Adheziv Proteinler	37
4.1.2.3.1. Fibronektin.....	37
4.1.2.3.2. Kondronektin	37
4.1.2.3.3. Vitronektin.....	38
4.1.2.3.4. Laminin.....	38
4.1.3. Matriks Metalloproteinazları (MMP).....	40
4.1.4. Kıkırdak Doku Tipleri	41
4.1.4.1. Hyalin kıkırdak.....	42
4.1.4.2. Elastik kıkırdak	43
4.1.4.3. Fibröz kıkırdak.....	43
4.1.5.Kıkırdak doku rejenerasyonu ve gelişimi.....	44
4.2. KIKIRDAK REJENERASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	46

4.2.1.	Mekanik yöntemlerle kırıkta rejenerasyonunun artırılması	46
4.2.2.	Otojen kırıkta greftleri ile onarım	47
4.2.3.	Perikondrial ve Periosteal greftlerle onarım	48
4.2.4.	Allogreftler ve Xenogreftler	48
4.2.5.	Alloplastik biyomateryallerle onarım	49
4.2.6.	Gen Terapisi	49
4.3.	KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARı	50
4.3.1	Kırıkta doku mühendisliğinde hücre kaynağı	52
4.3.2.	Doku Kültürü Teknikleri	56
4.3.3.	De-differansiyasyon olgusu	58
4.4.	KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ	58
4.4.1.	Doğal Polimerlerden Olusan Doku İskeleleri:	61
4.4.2.	Protein bazlı doğal doku iskeleleri	62
4.4.3.	Karbohidrat Bazlı Polimerler	63
4.4.4.	Hidrojel yapısındaki doku iskeleleri	66
4.4.5.	Süngerler	68
4.4.6.	Meşler	68
4.5.	KIKIRDAK DOKU REJENERASYONUNDA BİYOSİNYAL MOLEKÜLLERİ	69
4.6.1.	Fibroblast Growth Faktör (Fibroblast growth factor, FGF)	71
4.6.2.	İnsülin benzeri büyüme faktörleri(IGF)	71
4.6.3.	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF β)	72
4.6.4.	Epidermal Growth Faktör(EGF)	72
4.6.5.	Kemik Morfojenik Proteinler	74
4.6.5.1.	Kemik morfojenik proteinlerin yapısal özellikleri	75
4.6.5.2.	Kemik Morfojenik Protein 7 (BMP7)	79
4.6.6.	Biyosinyal Taşınımında Kontrollü Salınım Sistemleri	80
4.6.6.1.	Kontrollü salınım sistemlerinden Mikrokürelerin özellikleri	81
4.6.7.1.1.	Mikroküre Hazırlama Yöntemleri	82
5.	GEREÇ VE YÖNTEM	83
5.1.	Çalışma Kapsamında Kullanılan Doku İskelelerinin hazırlanması:	83
5.1.1.	Kullanılan Malzemeler	83
5.1.2.	Jelatin Süngerlerin hazırlanması (GS)	84

5.1.3. Jelatin mikrokürelerin hazırlanması (GM)	84
5.1.4. EGF yüklü jelatin mikroküreler içeren Jelatin Süngerlerin Hazırlanması	85
5.1.5. Doku iskelesine rhBMP 7 immobilizasyonu:	85
5.2. DENEYSEL ÇALIŞMA	87
5.2.1. Deney Hayvanlarının Bakımı	87
5.2.2. Cerrahi Prosedür	89
5.3.2.1.Cerrahi Aletler.....	90
5.3.2.2. Anestezi.....	90
5.3.2.3. Kıkırdak Defekti Oluşturulması	91
5.3.2.4. Deney Grupları	94
5.3.2.5. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Histopatolojik doku örneklerinin alınması	95
6. DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ	96
6.1. Doku iskelelerinin morfolojik ve biyomekanik olarak değerlendirilmesi.....	96
6.1.1. Morfolojik Analiz	96
6.1.2. Porozite.....	97
6.1.3. Partikül Büyüklüğü Analizi	98
6.1.4. Mekanik Özelliklerin Analizi	99
6.1.5. Şişme özellikleri.....	103
6.2. Histokimyasal değerlendirme yöntemleri	104
6.2.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü	105
6.2.2. Masson Trikrom Boya Protokolü	106
6.2.3. Histolojik Değerlendirme Sonuçlarının Skorlanması	106
6.2.4. İmmünohistokimyasal değerlendirme	108
6.2.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Sonuçlarının Skorlanması	108
6.3. İstatiksel Değerlendirme	109
7. BULGULAR	110
7.1. Bulguların Makroskobik Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analizleri	110
7.2. Mikroskobik Değerlendirme Sonuçları.....	118
7.2.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirme Sonuçları.....	118
7.2.2. Masson Trikrom Boyama Histolojik Değerlendirme Sonuçları.....	130
7.2.3. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	139
8. TARTIŞMA	144

9. SONUÇ VE ÖNERİLER	182
10.KAYNAKLAR	185

SİMGELER VE KISALTMALAR

- BMP:** KEMİK MORFOGENETİK PROTEİN (BONE MORPHOGENIC PROTEİN)
- BSA :** SIĞIR SERUM ALBUMİNİ (BOVINE SERUM ALBUMIN)
- OP:** OSTEOJENİK PROTEİN
- CDGF:** KONDROBLAST KÖKENLİ BÜYÜME FAKTÖRÜ (CHONDROCYTE DERIVED GROWTH FACTOR)
- CMP:** KOLLAJEN MİMETİK PEPTİD
- COMP:** KIKIRDAK OLİGOMETRİK MATRİKS PROTEİNİ
- DIAS:** DERMİSTEN-İZOLE EDİLEN AGREKAN DUYARLI HÜCRELER (DERMIS-ISOLATED AGGREGAN-SENSİTİVE CELLS)
- DPBS:** DULBECCO FOSFAT TAMPON ÇÖZELTİSİ
- EGF:** EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)
- EGF:** EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (EPIDERMAL GROWTH FACTOR)
- EKH:** EMBRİYONİK KÖK HÜCRE
- ESM:** EKSTRASELLÜLER MATRİKS
- FGF:** FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FIBROBLAST GROWTH FACTOR)
- FBS:** FETAL BOVINE SERUM
- GAG:** GLUKOZAMİNOGLİKAN
- GER:** GRANÜLLÜ ENDOPLAZMİK RETİKULUM
- GS:** JELATİN SÜNGER (GELATINE SPONGE)
- GM-EGF:** EGF YÜKLÜ JELATİN MİKROKÜRELER (EGF LOADED MICROSPHERES)
- GS - MS – EGF:** EGF YÜKLÜ MİKROKÜRELER İÇEREN JELATİN SÜNGER
- GS-MS-EGF-BMP 7:** EGF VE BMP7 YÜKLÜ MİKROKÜRELER İÇEREN JELATİN SÜNGER
- HA:** HYALÜRONİK ASİT
- IGF:** İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR)
- Kİ:** KEMİK İLİĞİ
- MSC:** MEZENKİMAL STROMAL HÜCRE (MESENCHIMAL STROMAL CELL)
- MKH:** MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
- MMSC:** MULTİPOTENT MEZENKİMAL STROMAL HÜCRE (MULTIPOTENT MESENCHIMAL STROMAL CELL)

MMP: MATRİKS METALOPROTEİNAZLARI

NTPPHase: NÜKLEOTİD PİROFOSFOHİDROLAZ

PG: PROSTOGLANDİN

PDGF: PLATELET DERİVED GROWTH FACTOR (PLATELET KÖKENLİ BÜYÜME FAKTÖRÜ)

PGF: PLASENTAL BÜYÜME FAKTÖRÜ (PLASENTAL GROWTH FACTOR)

PEODA: POLİ (ETİLEN OKSİT) DİAKRİLAT

PEGDA: POLİ (ETİLEN GLİKOL) DİAKRİLAT

PEOT / PBT: POLİ (ETİLEN OKSİT) TEREFTALAT / POLİ (BÜTİLEN) TEREFTALAT

PPC: PERİKONDRIUM KAYNAKLI PROGENİTÖR HÜCRELER

(ePPC: Auriküler, tPPC: Trakeal)

rER: RİBOZOMAL ENDOPLAZMİK RETİKULUM

SEM: TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU

TGF β : ŞEKİLLENDİRİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ β (TRANSFORMING GROWTH FACTOR β)

TIMP: DOKU İNHİBİTÖR METALLOPROTEİNAZLARI

ŞEKİLLER

Şekil 1 : Kondrosit EM görüntüsü.....	24
Şekil 2. A. Mezenkimal hücreler, B. Mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kondroblastlar, C. Kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşıp olgunlaştıkları kondrositler , D. Kondrositlerden çoğalan izogen hücre grupları	25
Şekil 3. Kondrosit membranlarında iyon değişimi şematik gösterimi	26
Şekil 4:Kıkırdak dokusunun yapısı ve ESM bileşimi.....	28
Şekil 5: ESM Proteoglikan bileşenleri.....	30
Şekil 6. Kollajenin fibriler yapısı	31
Şekil 7. Kollajenin tekrarlayan peptid yapılarından oluşan helikal yapısı.....	33
Şekil 8 .Kollajen sentezi.....	35
Şekil 9. Kıkırdak matriksinde moleküler organizasyon	40
Şekil 10: Apozisyonel ve intersitisyel büyüme	45
Şekil 11.Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan yaklaşımların şematik gösterilmesi	51
Şekil 12. A) Doğal dokuda kıkırdak morfolojisi B) Kültür kabına ilk ekim C) Kültür kabında fibroblast benzeri çoğalma davranışı	58
Şekil 13.Çeşitli skafold yapıları: a) Hidrojeller, b)Süngerler, c)Meşler	66
Şekil 14. Çapraz bağlı hidrojelin yapısı.....	67
Şekil 15. EGF'nin yapısı (Das 1982) (gri hat: disülfid bağları)	73
Şekil 17 :Kemik morfojenik proteinlerin etki mekanizmaları	76
Şekil 16 BMP'lerin sinyalizasyon yolağı	76
Şekil 18. rhBMP7'e ait kromozom lokasyon haritası.....	79
Şekil 19.BMP7 Kristal yapı modeli (231)	79
Şekil 20: Çapraz bağlayıcı ajan olarak GA kullanılan Jelatin süngerlerin kimyasal kompozisyonu	84
Şekil 21 :NEODERM,ARS Arthro.....	86
Şekil 22 :rh BMP 7.....	86
Şekil 23: A)GS-MS-EGF.....	86
Şekil 24: Doku iskelerinin makroskobik görünümü.....	86
Şekil 25:3 'erli gruplar halinde barındırılan denekler.....	88
Şekil 26: A)Gruplandırmak için kullanılan renkli küpeler B) Pansumanların üzerine özel hazırlatılan şapka ateller C) Tieover pansuman.....	89
Şekil 27:Cerrahi Aletler	90
Şekil28:Anestezik Ajanlar	91
Şekil 30: A) 1,5x1,5 cm lik perikondrokutanöz flebin işaretlenmesi B)Perikondrakutanöz flep kaldırıldıktan sonra eksize edilecek 1x1 cmlik kıkırdak dokunun işaretlenmesi C) Perikondrium elevatörü ile kıkırdak dokunun elevasyonu	92
Şekil 29:Perikondrokutanöz flebin elevasyonu	92

Şekil 31: A) 1X1 cmlik kıkırdak doku eksizyonu B) Eksize edilen kıkırdak doku, düz ve rulo yapılarak yerleştirilen doku iskelesi C) Doku iskelesinin kondral defekte düz olarak yerleştirilmesi D) Doku iskelesinin kondral defekte rulo yapılarak yerleştirilmesi.....	93
Şekil 32: Oluşturulan kondral defekte düz ve rulo olarak doku yerleştirilmesinden sonra perikondrokutanöz fleplerin doku iskelelerinin üzerine sütüre edilmesi.....	93
Şekil 33 A) Perikondrokutanöz fleplerin sütürasyonu B)Denekler postoperatif ilk 10 gün günlük pansumanla izlendi. C)8. haftada sakrifikasyon öncesi insizyon hatlarının görünümü.....	95
Şekil 34: EGF yüklü jelatin mikroküreler ve EGF .BMP 7 yüklü jelatin mikrokürelerin SEM analizleri A)GM-EGF (x1600), B) GM-EGF-BMP 7 (x1600).....	97
Şekil 35.Doku iskeleleri kesitlerinin SEM görüntüleri . A)GM-EGF B) GM-EGF-BMP 7	97
Şekil 36.Gerilim -Gerinim Eğrisi	100
Şekil 37.GS-MS-EGF ve GS-MS-EGF-BMP7 doku iskelerinin elastik modül değerleri	102
Şekil 38:Doğal kıkırdak dokusunun Tip1 prokollajen antikoruna ile boyanması sonucu fibrillerin görüntüsü	109
Şekil 39: Tüm gruplarda Defekt Doluluğu oranlarının Pineda Skorumasına göre değerlendirme sonuçları	111
Şekil 40. Grup 1 (Kontrol grubu) ,denek 3 , makroskopik görünüm.	113
Şekil 41 :Grup 2, denek 2, makroskopik görünüm.	114
Şekil42. Grup3, Denek4, makroskopik görünüm	115
Şekil43.Grup4,Denek1	116
Şekil 44 Grup 4, Denek 6	116
Şekil 45: Grup 5, Denek 2, Makroskopik görünüm.....	117
Şekil 46: Grup 1'e ait HE boyalı kesit.	119
Şekil 47 Grup 1'e ait HE boyalı kesit.	119
Şekil 48 :Grup 2'e ait HE boyalı kesit.	120
Şekil 49: Grup 2'ye ait HE boyalı kesit.	121
Şekil 50: Grup 2'e ait HE boyalı kesit.	121
Şekil 51: Grup 3'e ait HE boyalı kesit.	122
Şekil 52: Grup 3'e ait HE boyalı kesit.	123
Şekil 53: Grup 4'e ait kesit.	124
Şekil 54 : Grup 4'e ait kesit.	124
Şekil 55 Grup 5'e ait kesit.	125
Şekil 56 :Grup 5'e ait kesit.	126
Şekil 57: Skorumasına göre Hücre Morfolojisi özelliklerinin Gruplararası karşılaştırılması	128
Şekil 58 :Grup 1 'e ait Masson Trikrom boyama kesiti.	131
Şekil 59 :Grup 1 e ait Masson Trikromla boyama kesiti	131
Şekil 60 :Grup 2 ye ait Masson Trikrom boyalı kesit,	132

Şekil 61: Grup 2 ye ait Masson Trikrom boyalı kesit, MT x20 büyütme. Bar 500µm	132
Şekil 62 :Grup 3'e ait Masson Trikrom boyalı kesit,.....	133
Şekil 63 :Grup 4'e ait Masson Trikrom boyalı kesiti,	134
Şekil 64:Grup 4 'e ait Masson Trikrom boyalı kesitler	135
Şekil 65: Grup 4 'e ait Masson Trikrom boyalı kesit.....	135
Şekil 66: Grup 5' e ait Masson Trikrom boyalı doku kesiti	136
Şekil 67: Grup 5' e ait Masson Trikrom boyalı doku kesiti	136
Şekil 68 :Grup 1'e ait immunhistokimyasal boyanma doku kesiti(zayıf-orta boyanma)	139
Şekil 69: Grup 2 ' ye ait immünhistokimyasal boyanma doku kesiti(orta-güçlü boyanma).....	140
Şekil 70: Grup 3 ' e ait immünhistokimyasal boyanma doku kesiti(orta-zayıf boyanma)	140
Şekil 71:Grup 4 ' e ait immünhistokimyasal boyanma doku kesiti ,en güçlü immün pozitif boyanma	141
Şekil 72 :Grup 5' e ait immünhistokimyasal boyanma doku kesiti	141

TABLolar

Tablo 1: GAG'ların kompozisyonu, dağılımı ve kollajen lifler ile olan ilişkisi.....	29
Tablo 2. Kollajen: içerdikleri alfa zincir tiplerine göre kollajen tiplerinin lokalizasyonu	34
Tablo 3. Kıkırdak matriksinin yapısal makromolekülleri (31, 32).....	39
Tablo 4. Kıkırdak Doku Tipleri	41
Tablo 5. Hücre Kaynağı	56
Tablo 6.Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri	65
Tablo 7.Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan Biyosinyal molekülleri.....	69
Tablo 8. Kemik morfojenik proteinler ve temel fizyolojik rolleri	78
Tablo 9: Mikroküre Hazırlama Yöntemleri	82
Tablo 10. Mikrokürelere biyomolekül salınım hızını değiştiren parametreler	82
Tablo 11. Deney Grupları	95
Tablo 12. Çalışmada kullanılan mikroküre boyutları ve partikül dağılım eğrileri	99
Tablo 13 :Hazırlanan doku iskelelerinin morfolojik özellikleri karşılaştırması.....	103
Tablo 14 :Doku takip protokolü.	104
Tablo 16 :Hematoksilen-Eozin boya protokolü.	105
Tablo 16.Kıkırdak Dokuda Rejenerasyonun Histolojik Skoruması (23).....	107
Tablo 17. Modifiye Pineda Skoruması Sistemi (222).....	107
Tablo 18. İmmünohistokimyasal Boyanma Özelliklerine göre Skoruması	109
Tablo 19 :Pineda Histolojik Skoruması Sistemine göre Defekt doluluğu oranlarının Tanımlayıcı İstatistiksel analizi	110
Tablo 20 : Defekt doluluğu oranlarına göre grupların Mann Whitney U testi ile istatistiksel karşılaştırılması	112
Tablo 21: Hücre Morfolojisi (ULUTAŞ) özelliklerinin Tanımlayıcı İstatistiksel analizi..	127
Tablo 22 : Hücre morfolojisi özellikleriyle grupların Mann Whitney U testi ile istatistiksel karşılaştırılması	128
Tablo 23 Ulutaş Histolojik Skoruması Sistemine göre Kıkırdak Geçiş Zonu özelliklerinin İstatistiksel analizi	129
Tablo 24:Kıkırdak geçiş zon özelliklerine göre grupların Mann Whitney U testi ile istatistiksel karşılaştırılması	130
Tablo 25 Matriks boyanma özelliklerine göre grupların skoruması (PİNEDA).....	137
Tablo 26:Matriks boyanma özelliklerine göre grupların Mann Whitney U testi ile istatistiksel karşılaştırılması	138
Tablo 27 : Grupların kıkırdak dokusunda Tip1 prokollagen dağılımı	142
Tablo 28: İmmünohistokimyasal sonuçlara göre grupların Mann WhitneyU testi ile istatistiksel karşılaştırılması	143

1. ÖZET

Başlık: EGF İLE BİYOSİNYALLENDİRİLMİŞ JELATİN DOKU İSKELESİ ÜZERİNDE KONTROLLÜ rhBMP 7 SALINIMI İLE KIKIRDAK DOKU REJENERASYONU

Araştırmacının Adı, Fakültesi ve Yazışma adresi: **BİLGEHAN İLKER**

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı İnciraltı-İzmir

Amaç ve Hipotez: Doğumsal veya edinsel nedenler (travma, tümör rezeksiyonu) ile oluşan kıkırdak defektleri fonksiyonel ve estetik sorunlara yol açmakta; kıkırdak doku rejenerasyonu ise avasküler yapısı gereği kısıtlı ve çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Farklı hücre kaynakları, doku iskeleleri ve çeşitli biyosinyal molekülleri kullanılarak yapılan kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları güncelliğini korumaktadır. Sıklıkla erişkin kondrositler ve kök hücre grupları ile yapılan hücre-polimer çalışmalarıyla invitro başarılı sonuçlar bildirilmesine rağmen, yeterli hücre elde etmedeki zorluklar ve yüksek maliyet problemleri nedeniyle klinik uygulamaya geçirilebilen ürün olmamıştır.

Bu çalışmada, deney hayvanları (tavşan) kulaklarında oluşturulacak kıkırdak defektlerinde yeni bir doku iskelesi üzerinde (EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin doku iskelesi) kontrollü rhBMP 7 salınımı gerçekleştirilerek, dual büyüme faktörlerinin perikondrial progenitör hücreler üzerine etkisiyle ek hücre kaynağına gerek kalmadan kıkırdak doku rejenerasyon kapasitesinin artırılması ve klinik pratikte kullanılabilir şekillendirilebilir, Hazır biyomalzeme oluşturulması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada yaşları,1-1,5 kiloları, 2,5-3,5 kilo arasında değişen 18 adet Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Denekler 5 gruba ayrıldı. Grup 1 'de tavşan kulağında kıkırdak yapıdan sadece 1x1 cmlik rezeksiyon yapılarak sütüre edildi. Grup 2' de oluşturulan aynı büyüklükteki defekt içine EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin doku iskelesi düz, Grup 3 'te ise rulo yapılarak yerleştirildi. Grup 4 ve Grup 5 için hazır doku iskelesine rhBMP 7 kontrollü salınımını sağlayacak mikroküreler yerleştirildi ve rhBMP 7 immobilize edildi. Hazırlanan BMP 7 kontrollü salınımına olanak sağlayacak

doku iskelesi Grup 4 te düz, Grup 5 'te rulo şeklinde defektlere yerleştirildi. Hazırlanan doku iskelelerinin morfolojik ve mekanik analizleri yapılarak çalışmaya uygunluğu doğrulandı. 8 haftalık bekleme süresi sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek histokimyasal ve immünohistokimyasal testler yapıldı. Bulgular Ulutaş ve modifiye Pineda Histolojik Skorlama sistemine göre derecelendirilerek istatistiksel analizlerle karşılaştırıldı.

Bulgular: Histomorfolojik ve immünohistokimya sonuçları karşılaştırıldığında, kontrol grubunda hipertrofi ve ossifikasyon yoğun gözlenirken; EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin doku iskelesi üzerinde rhBMP 7 kontrollü salınımı sağlanan Grup 4 başta olmak üzere tüm doku iskelesi kullanılan gruplarda oluşan onarım dokusunun kıkırdak doku özellikleri taşıdığı görüldü. Doku iskelesinin düz olarak yerleştirildiği Grup 2 ve Grup 4 gruplarda onarım dokusunun tüm defekt alanını kapladığı, doku iskelesinin defekt alanına rulo olarak yerleştirilmiş olduğu Grup 3 ve Grup 5 deneklerde, kondrogenezin iskele şekline göre şekil aldığı, defekt santralinde yeni onarım dokusu oluşmadığı gözlemlendi. EGF molekülünün tek olarak kullanıldığı iskele ile rhBMP 7 ile dual olarak kullanıldığı gruplar kıyaslandığında, defekt doluluğu oranı ve kıkırdak geçiş zon özellikleri arasında anlamlı farklar olsa da, hücre morfolojisi ve matriks boyanması arasında sinerjistik etkiye rastlanmadı.

Sonuç: EGF ile biyosinyallendirilmiş ve üzerinde rhBMP 7 kontrollü salınımı gerçekleştirilen Jelatin sünger yapılı doku iskelesinin, perikondrial progenitör hücrelerin etkisiyle kıkırdak rejenerasyon kapasitesini artırarak kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceği görüşüne varılmıştır. Böylece hücre-polimer sistemlerinin dezavantajlarından uzak, klinik uygulamaya geçirilebilecek kolay ulaşılabilir, düşük maliyetli bir implant üretilebilmesi için örnek bir çalışma olarak değerlendirilebilir. Kullanılan iskelenin şekillendirilebilir üç boyutlu yapısı her türlü kıkırdak doku defekti için kullanılabilirliği açısından avantaj olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Scaffold, perikondrium, kıkırdak, rejenerasyon, rhBMP 7,EGF, dual büyüme faktörü, kıkırdak doku mühendisliği

2. ABSTRACT

Title: The Cartilage Tissue Regeneration- Biosignalized Gelatin with EGF on Tissue Scaffold with Controlled Release of rhBMP7

Researcher Name, Faculty and Correspondence address: BILGEHAN ILKER
Dokuz Eylul University Faculty of Medicine, Plastic and Reconstructive Surgery
Department Inciraltı –İzmir

Aim and hypothesis: Cartilage defects can be caused congenital or acquired from trauma, tumor resection. Thus defects leads to functional and aesthetic problems; cartilage tissue because of its avascular structure has a very limited capacity for self repair. Cartilage tissue engineering studies are still under discussion by using different cell sources, tissue scaffolds and variety of biosignals molecules. Despite invitro with its cell-polymer studies reported successful results ofen with adult chondrocytes and stem-cells groups can not be applied in clinical practice because of its difficulties to obtain sufficient cells and high cost problems.

In this study as an animal experiment is used rabbit. In its ears will be created cartilage defects and try to perform (biosignalized with EGF gelatin tissue scaffold) release of rhBMP7 control on a new tissue scaffold. It is aimed to create ready biomaterials which can be used in clinical practice, increase the capacity of cartilage tissue regeneration by dual growth factors of perichondrial progenitor cells effects without the needs of additional cell source. It is aimed to create ready biomaterials which can be used in clinical practice, increase the capacity of cartilage tissue regeneration by dual growth factors of perichondrial progenitor cells effects without the nees of additional cell source

Materials and Methods: In this study 18 New Zeland Rabbits (age ranging 1-1,5 years; weight ranging 2,5-3,5 kg) were used. Subjects were divided into 5 groups. In the 1st Group; Only 1x1 cm resection was sutured on the rabbits ear cartillage structure. On the 2nd group its also created the same magnitude defect of cartilage structure and put into as a plain form the biosignalized with EGFR gelatin tissue scaffolds. In Group 3 it was placed in roll form. In 4th and 5th group it was placed microspheres in a prepared tissue scaffold which will control the release of rhBMP7 and rhBMP7 were immobilized. Prepared rhBMP7 which will controll the release was placed in defects on group 4 in plain form and group 5 in roll form. The suitability of the prepared tissue scaffold in case of the study was verified by making

morphological and mechanical analyses. At the end of the 8 weeks waiting period animals were sacrificed and histochemical and immunohistochemical tests were done. Results were graded according to Ulutas and Modified Pineda Histological Scoring System and compared with statistical analysis.

Results: When histomorphological and immunohistochemistry results were compared, it was intense observed hypertrophy and ossification in the control group, and it was seen a repair on the cartilage tissue scaffold characteristics especially in group 4 and all others where biosignaled with EGFR gelatin tissue scaffold provided release control of rhBMP7. Group 2 and group 4 which tissue scaffold layer were engrafting flatly, consisted tissue was lining all defect zone, group 3 and group 5 which tissue scaffold layer were engrafting rooled shape, chondrogenesis shapes similar scaffold conformation and observed that central of defect didn't demonstrated new repair tissue. Whether EGF molecule signly using scaffold compaire with rhBMP 7 dualling using groups deffect repletion ratio between cartilage transition zone properties significant difference, cell morphology between matrix coloration didn't encountered synergistic effect.

Conclusion: By biosignaled with EGFR and controlled release of rhBMP7 gelatin sponge structured tissue scaffold and effects of pericondrial progenitor cells the cartilage regeneration capacity increase and this study can be a lightway for being used in cartilage tissue engeneering. Thus it stands far from disadvantages of cell-polymer system and it is considered as an example study for producing a low cost implant in clinical application. The scaffold can be formed using three - dimensional structure will be used for all kinds of benefits for cartilage defects.

Keywords: scaffold, greater depth of penetration, cartilage regeneration, rhBMP 7, EGFR dual growth factor, cartilage tissue engineering

3. GİRİŞ VE AMAÇLAR

Kıkırdak doku; Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi alanında, başta septorinoplasti ve mikrotia onarımı olmak üzere kranioplasti, mentoplasti gibi birçok operasyonda destek materyali olarak kullanılmaktadır. Kıkırdak dokunun avasküler yapısı gereği, kendini yenileme kapasitesi sınırlı ve çoğu zaman yetersizdir (1-3). Bu nedenle konjenital veya edinsel (travma, neoplazi, cerrahi rezeksiyon vb.) olarak gelişebilen kıkırdak defektlerinin oluşturduğu fonksiyonel ve estetik bozukluklar ileri rekonstrüksiyon çözümleri gerektirmektedir(1, 2, 4).

Bu defektlerin onarımı için, otojen kıkırdak greftleri veya hasarlı bölgeye mekanik destek sağlamak amacıyla, çeşitli implantların yerleştirilmesi geleneksel tedavi yaklaşımlarından bazılarıdır(1, 2, 5, 6). Ancak yeterli miktarda uygun kıkırdak greftine ulaşmadaki zorluklar, donör alan problemleri, rezorbsiyon problemleri veya biyomateryaller için olası enfeksiyon riski ve uyum problemleri, klinik uygulamada pek çok soruna yol açmaktadır(1, 7).

Bilindiği üzere, avasküler özellikte olan kıkırdak doku rejenerasyonu temel olarak perikondrial öncü hücreler üzerinden gerçekleşmektedir.1959 yılında kıkırdaktan ayrılan perikondriumun, yeni kıkırdak dokusu oluşumuna neden olduğu Lester tarafından bildirilmiştir.(8), Takip eden çalışmalarla (9, 10), perikondrium greftleri ve perikondrial fleplerle onarım gündeme gelmiştir. (11, 12) ,(13, 14). Fakat perikondrium etkisiyle sadece milimetrik boyutlarda kıkırdak defektlerinin onarılabilirdiği, daha büyük kıkırdak defektlerinin onarımında perikondriumun rejenerasyon kapasitesinin yetersiz olduğu bir çok çalışmayla gösterilmiştir(15).

Kıkırdak doku onarımındaki bu geleneksel tedavi yöntemleriyle yaşanan sorunlar, araştırmacıları doku mühendisliği yaklaşımıyla yapay kıkırdak doku üretme çalışmalarına teşvik etmiştir. Bu amaçla, perikondrium rejenerasyon kapasitelerinin artırılması ve/veya hücre –polimer modelleri üzerinden kondroid doku üretme çalışmaları gündeme gelmiştir(16). Mühendislik ve yaşam bilimlerinin prensiplerini

birleştirek; doku fonksiyonlarını iyileştiren, koruyan veya onların yerini alan biyolojik yer tutucuların geliştirilmesine dayanan disiplinler arası yaklaşım olarak tanımlanan doku mühendisliği, son yıllarda Plastik, Estetik ve Rekonstrüktif Cerrahi alanında önemli bir uğraş konusu haline gelmiştir.

İlk kez 1977 'de Green tarafından tanımlanmış olan kıkırdak doku mühendisliği ve 1980'li yıllarda güncellenmiştir(17). Avasküler yapıya sahip olduğu bilinen kıkırdak doku için, doku mühendisliğinin temel sorunu olan vaskülarizasyon problemleri yaşanmamaktadır. Çeşitli büyüme faktörleri ile desteklenmiş yapay matriksler üzerinde, perikondrium metabolizmasına ek biyosinyal moleküllerinin salınımıyla doğal kıkırdak yapısına daha yakın, üç boyutlu kıkırdak dokusu eldesinin mümkün olabileceği savunulmuş ve konuyla ilgili bir çok çalışma yapılmıştır (7, 18-22).

Kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımlarında; ekstrasellüler matriksi taklit ederek, progenitör hücrelerin adezyon ve proliferasyonunu sağlayan , hücrelerin ve biyoaktif moleküllerin hasar bölgesine taşınımını sağlayan, üç boyutlu ortam oluşturan doku iskelesi temel öğelerden biridir. Zamansal ve mekansal olarak degradasyonun kontrol edilmesiyle, skafoldlar yeni doku büyümesini artırabilir ve/veya yönlendirebilir. Doku iskelesi olarak kullanılacak biyomateryal, doku ile uyumlu, uygun por yapısına, por boyutuna, uygun mekanik özelliklere ve biyoparçalanabilirliğe sahip olmalıdır (23). Bu amaçla en çok kullanılan sentetik polimerler polikaprolakton, poli laktik-ko-glikolik asit, poli etilen glikol, polivinil alkol, poliüretandır. Doğal polimerler olarak ise aljinat, jelatin ve kitosan kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında sık tercih edilen polimerlerdir.

Doku mühendisliği yaklaşımlarında en sık tercih edilen Kollajen molekülün izolasyonundaki zorluklar ve yüksek maliyeti, Jelatin doğal polimerinin gündeme gelmesine neden olmuştur. Jelatin yapısal direncin en önemli sağlayıcısı olan doku matriks elemanı kollajenin denatüre hali olarak bilinir. Jelatin yapıları yapay matrikslerin, kondrositlerin çoğalmasını, yuvarlak morfoloji almasını ve kıkırdak matriks moleküllerinin ekspresyonu ve tip II kollajen sürekli ekspresyonunu teşvik ettiği bilinmektedir. Çalışma kapsamında biyoyumluluk, biyobozunurluk, katyonik

karakterine bağılı olarak hücre yapıştırıcı ve üremeyi destekleyici özellikleri nedeniyle jelatin doğal polimerinden hazırlanarak, stabilizasyon için Gluteraldehitte çarpaz bağlanmış EGF ile biyosinyallendirilmiş makrogözenekli doku iskelesi (NEODERM, ARS Arthro Biyoteknoloji lab.) kullanılmıştır.

Kıkırdak doku mühendisliğı üçlemesinin, üçüncü önemli elemanı biyosinyal molekülleridir. Embriyonik gelişim sırasında, doku onarımında rol oynayan bu polipeptit yapısındaki kritik sinyal molekülleri; rejenerasyonu hızlandırmak veya indüklemek için kullanılabilir. Kondrojenik anabolik özellikli olarak bilinen, özellikle TGF β , BMP ailesi, IGF1, PDGF, FGF 2 biyomolekülleri kıkırdak doku mühendisliğinde biyosinyal molekülü olarak birçok çalışmada kullanılmıştır. Biyosinyaller hücre kültür ortamında destekleyici olarak kullanılabilceğı gibi çeşitli yöntemlerle doku iskelelerine immobilize edilebilir ve/veya yüklenebilirler.

Kondral lezyonların tedavisinde güncel yaklaşımlardan bir tanesi bu yerel düzenleyicilerin birlikte kullanılmasıdır. Sözü geçen büyüme faktörlerinin birlikte kullanıldığında, birbirlerinin gen ekspresyonlarını arttırdığı, in vitro protein üretiminin, kartilaj matriks sentezinin, ortaya çıkan sinerjistik etkiyle arttığı literatürde birçok çalışmada gösterilmiştir (24).

Kartilaj rejenerasyonunda en aktif düzenleyici olduğu bilinen BMP 7 nin diğer anabolik kondrojenik faktörlerden olan IGF 1 le beraber uygulandığında kartilaj matriks sentezini daha fazla arttırdığı Chubinskaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir (25). Yine Lim SM ve arkadaşları BMP-7 ve TGF-B2 biyomoleküllerini kondral defektlerin onarımı için dual büyüme faktörleri olarak kullanmış ve olumlu sonuçlar elde etmiştir (26). Farklı bir çalışma kapsamında IGF-I ve TGF-B1 kondrojenik büyüme faktörlerinin dual kullanıldığında ortaya çıkardığı kondrogenez üzerine olumlu sinerjistik etkiler Elisseeff J ve arkadaşları ile Holland TA (27) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda gösterilmiştir.

Ancak kullanılan bu protein yapıdaki biyosinyal faktörlerinin in vivo ortamda yarılanma ömürleri çok kısadır, degradasyonları görece hızlıdır. Böylece defekt alanında istenilen etkiyi gösterebilmeleri için bir taşıma sisteminin içinde bulunmaları, yavaş ve uzun süreli kontrollü salınım yapabilmeleri açısından gereklidir. Kontrollü salınım sistemlerinden son yılların gözdesi mikroküre formülasyonlarıdır. Mikroküreler ilk olarak 1960'larda Chang tarafından taşıyıcı sistem olarak hazırlanmıştır (28).

Mikroküreler; etkin maddeyi moleküler düzeyde partiküller halinde taşıyan, farklı fizikokimyasal özelliklere ve birkaç mikrondan mm boyutlarına kadar değişen çap dağılımına sahip, monolitik yapıdaki mikro taşıyıcılardır. Hücre kapsülasyonu dışında, hücre büyümesi ve farklılaşmasında büyük bir öneme sahip olan büyüme faktörlerinin etkinliğini artırmak amacıyla da çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. Son yıllarda etkin madde salımı ile ilgili yapılan pek çok çalışma, bozunur polimer mikroküreler üzerinde yoğunlaşmıştır.

Bu bilgiler ışığında, proje kapsamında, kontrollü salınım sistemleri ve doku mühendisliği temel ilkelerini birleştirerek, birden fazla biyoaktif molekülün aynı destek matriksinden salımını gerçekleştirebilecek doku iskeleleri hazırlandı. Biyosinyal molekülleri olarak, daha önce literatürde dual kullanımlarıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlamadığımız; kondrogeniz üzerinde en uyarıcı faktör olarak bilinen BMP 7 ve oluşacak neokartilaj dokusu içindeki matriks yapısının ana düzenleyicisi EGF biyomolekülleri kullanıldı. Sözü edilen büyüme faktörlerinin kıkırdak doku rejenerasyonu üzerine sinerjistik etki oluşturacakları düşünüldü. Bu amaçla Gluteraldehit ile çarpaz bağlanmış, biyouyumlu ve biyobozunur EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin Sünger Matriks üzerine, uygun dozda rhBMP 7 biyomolekülü yüklediğimiz, koaservasyon yöntemi ile hazırlanan Jelatin mikroküreler yerleştirildi. Hazırlanan doku iskelelerinin, porozite, partikül büyüklüğü, mekanik dayanıklılık, şişme testleri ve morfolojik analizleri yapılarak çalışma için uygunlukları doğrulandı. Deneysel cerrahi aşamasında, tavşan kulak kıkırdak defekti modelinde, perikondriumun tek başına onaramadığı literatürde gösterilmiş olan 1x1 cm'lik kritik kıkırdak defekti oluşturuldu. Kıkırdak gelişimi için öncü hücre grubu, defekt oluşturulurken korunacak olan perikondriumda yerleşmiş olan kondroprogenitör hücreler üzerinden sağlandı. Hazırlanan doku iskelelerinin yumuşak ve

şekillendirilebilir yapısının sağladığı avantajla, perikondriumla temas yüzeyi değiştirildiğinde kırıldak rejenerasyon kapasitesinin etkilenme oranlarının karşılaştırılabilmesi için, defekt alanlarına düz ve 3 mm kalınlığında rulolar halinde yerleştirildi. .8 haftalık bekleme süresi sonrasında defekt bölgesinden alınan kesitlerin makroskopik olarak gözlemleri sonrası histomorfolojik olarak değerlendirilmeleri yapıldı. Farklı histolojik skorlama sistemleri kullanılarak tüm denekler derecelendirildi. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak yorumlandı.

Özet olarak gerçekleştirdiğimiz projenin amaçları:

1- Kırıldak doku mühendisliğinde yeni bir doku iskelesinin kondrogeneze etkilerinin araştırılması ve standart bir model oluşturulması, (EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin doku iskelesi bu amaçla ilk defa bizim çalışmamızda kullanılmıştır).

2- Kontrollü salınım sistemleri ve doku mühendisliği temel ilkelerini birleştirerek, birden fazla biyoaktif molekülün aynı destek matriksinden salınımını gerçekleştirerek, ek hücre kaynaklarına gerek duymadan perikondrium rejenerasyon kapasitesinin artırılması; böylece klinikte kullanılabilecek çok fonksiyonlu yapılar elde edilmesi.

3- Kondrogeneze etkileri bilinen EGF ve BMP 7 nin ayrı ayrı kondroenez üzerine etkilerinin araştırılmasının yanı sıra kombine kullanımları ile olası sinerjistik etkilerinin araştırılması,

4- Literatürde, perikondrium etkisiyle kırıldak defektlerinin onarımı ile ilgili çalışmalar 3-4 mmlik küçük defektlerde yapılmıştır. Bu çalışmada 1 cm'lik defektlerin onarımı araştırılmıştır.

5- Erişkin sağlıklı hayvanlar kullanılarak standart bir klinik model oluşturulabilirliğinin araştırılması.

4. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, proje konusuyla ilgili literatür bilgileri üç temel başlık altında incelenmiştir. İlk olarak kıkırdak dokusunun histolojik yapısı ve özelliklerine yer verilmiştir. Ardından kıkırdak doku defektlerinin onarımında kullanılan yöntemlerden söz edilmiştir. Son bölümde ise kıkırdak doku mühendisliği ilkeleri ve önceki çalışmalar literatür eşliğinde anlatılmıştır.

4.1. KIKIRDAK DOKU HİSTOLOJİK YAPISI

Embriyonik dönemde insan iskeletinin tamamını oluşturan, organizmanın en önemli yapıtaşlarından olan kıkırdak doku, içerdiği elementler sayesinde eşi benzeri olmayan bir kompozisyon oluşturur. Bileşimindeki en önemli elementler; özel hücreleri, yumuşak fakat dayanıklı özel ekstrasellüler matriks yapısı ve beslenmesinin en önemli sağlayıcısı olan perikondrium olarak sıralanabilir.

Organizmanın dayanıklılık ve esneklik gerektiren bölgelerinde iskelet yapısını oluşturan bu avasküler özel bağ doku yapısı, mekanik yük altında anisotropik davranış sergileyen viskoelastik yapılar olarak tanımlanabilir.

Matriks içerisinde kollajen ve elastik liflerin bulunmasına bağlı olarak dokunun gerilme kuvveti veya elastikiyeti artırılmış olur ve dokunun vücudun farklı yerlerindeki mekanik ihtiyaçlara uyumu sağlanır. Liflerin cinsi, fazlalığı veya azlığı ile temel maddenin kimyasal özelliği kıkırdağın sınıflandırılmasında esas alınır.

4.1.1. Kıkırdak Hücreleri

Embriyonel hayatın altıncı haftasında, mezenkimal hücreler perikondrium kanallarının genişlemiş alanlarında, kıkırdak öncü hücreleri halinde görülmeye başlar. Bu öncü hücrelerden gelişen kondrositler mezenkimal hücre ailesindedir.

Kıkırdak doku ile ilgili 3 hücre tipi vardır:

4.1.1.1 Kondrojenik Hücreler

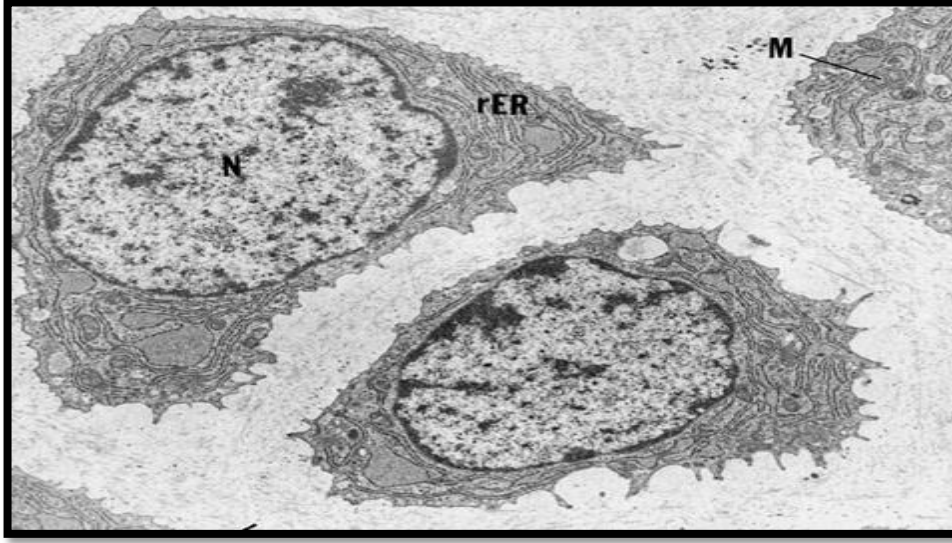
Mezenkimal hücrelerden köken alan iç şekilli hücrelerdir. Stoplazmaları dardır, bir- iki nukleoluslu, ovoid yapıda bir nukleusları bulunur. Elektron mikroskopik incelemelerinde küçük bir Golgi kompleksi, az sayıda mitokondri, az miktarda granüler endoplazmik retikulum ve bol serbest ribozom içerirler. Kondrojenik hücreler, hem kondroblast hem de osteoprojenitör hücrelere farklılaşabilen yapıdadırlar(29).

4.1.1.2. Kondroblastlar

Genç kıkırdak hücresi olarak tanımlabilen kondroblastlar, küçük, yassı, sitoplazmik uzantıları nedeniyle düzensiz sınırlı hücrelerdir. Perikondrium yerleşimli kondrojenik hücrelerden ve kondrifikasyon merkezindeki mezenkimal hücrelerden köken alırlar. Bazofilik boyanırlar. Protein sentezi için gerekli organellere sahiptir. Elektron mikroskopi ile yapılan incelemelerde, zengin granüler endoplazmik retikulum ağı, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri yapısı ve bol miktarda sekretuar vesiküller içerdiği görülür(30).

4.1.1.3.Kondrositler

Kondrositler, kıkırdak içinde bulunan ESM (Ekstrasellüler matriks) bileşenlerini üreten, devamlılığını sağlayan ve remodelize eden izole hücrelerdir. Kondrositler doku hacminin %1-2' ini oluşturur. Genellikle periferde ovoid veya derinlere gidildikçe sferikal yapıda bulunan kondrositler, kalın matriks yapısı ile çevrelenmiştir. Matriks yapısı içerisinde laküna adı verilen küçük kaviter yapılara gömülü olarak bulunurlar. Kondrositlerde protein sentezleyen hücrelerin genel özelliklerine sahiptir. Belirgin nukleoluslu, merkezi yerleşimli, iri sferikal nukleusları vardır. Nukleolus ise bir veya daha fazla olabilir. Sitoplazma sahip olduğu fazla miktarda serbest ribozomlardan ve nispeten iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulundan dolayı orta derece bazofilik boyanır. Görünümüne ince granüller hakimdir. Sitoplazmalarında, büyük hacimli mitokondriyal yapılar, lipid ve glikojen vakuelleri gözlenir.



Şekil 1 : Kondrosit EM görüntüsü

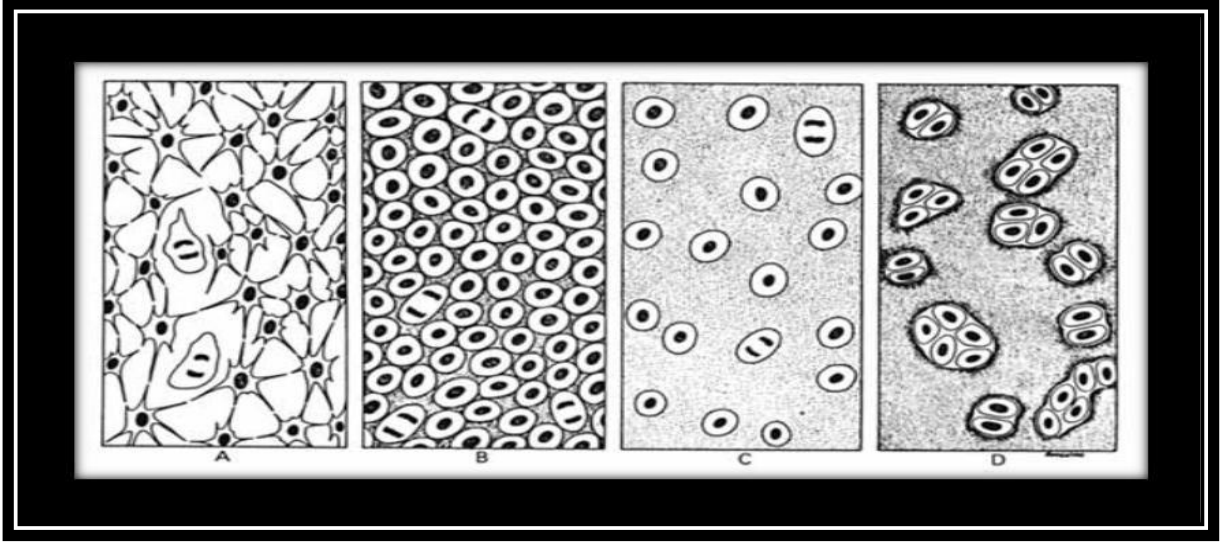
M:Mitokondri, rER: Ribozomal Endoplazmik Retikulum,N:Nükleus

Genç kondrositler açık boyanan sitoplazmaya, bol mitokondri, GER ve iyi gelişmiş Golgi kompleksine sahiptir ve bol glikojen içerir. Genç kondrositlerdeki açık ve bol mitokondrili sitoplazma yaşlanmaya bağlı olarak yağlanır ve protein sentez aktivitesi düşer(29, 30).

Kıkırdak dokunun avasküler yapısı nedeniyle kondrositler düşük parsiyel oksijen basıncı altında solunum yapar ve glikozu anaerobik olarak metabolize ederler. Besin ihtiyaçları matriksten difüzyon yolu ile sağlanır.

Canlı kıkırdak dokuda kondrositler lakünaları tamamen doldurur; fakat parafin kesitlerinde fiksasyon ve dehidratasyondan dolayı, lakünalarla hücre yapıları arasında boşluk görülür. Hücre yapıları büzüşmüştür, çok ender olarak lakünaların şeklini alabilir. Yetişkinde kıkırdak dokusu içinde hücreler gruplar halinde bulunabilir. Her bir grup tek bir ana kondrositin ürünüdür. Bir laküna içinde yerleşmiş bir ana hücreden köken almış olan bu hücreler grubuna izogen grup ya da hücreler yuvası denir. Kondrositlerin, izogen gruplar şeklinde bulunmaları yeni bölündüklerinin

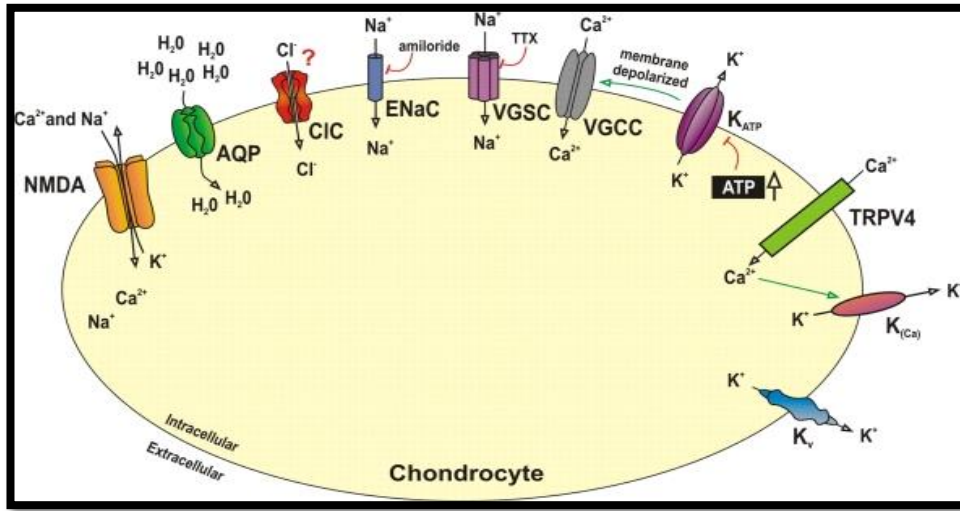
işaretidir. Yeni bölünmüş bu kondrositler etraflarındaki matriksi salgıladıklarında, birbirlerinden uzaklaşırlar. Bu hücreler ayrıca metalloproteinazları da salgılamaktadırlar. Bu enzim sayesinde kıkırdak matriksi parçalanır, hücreler genişler ve yeniden yerleşirler. Kıkırdak kümesinin periferine doğru hücreler eliptik şekil alır ve yüzeye paralel olarak düzleşir. Fetal kıkırdakta hücreler sıklıkla düzleşmiştir ve hücre yuvaları ender olarak görülür.



Şekil 2. A. Mezenkimal hücreler, B. Mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kondroblastlar, C. Kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşıp olgunlaştıkları kondrositler D.Kondrositlerden çoğalan izogen hücre grupları

Kondrosit membranı pek çok iyon kanalları içerir. Bunlardan potasyum kanalları ve kalsiyum kanalları elektrofizyolojik çalışmalarla tanımlanmıştır. Bu iyon kanalları sayesinde eklem kıkırdağında yer alan kondrositler, mekanik yüklenmelere iyon değişimi ile cevap verirler. İntegrinler, kondrosit hücre yüzey proteinlerini oluşturan büyük bir ailedir. Hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlar. " α ve β " subunitlerinden oluşur. Kondrositler çoğunlukla " $\alpha 3\beta 1$ " ve " $\alpha V\beta 3$ " kombinasyonlu integrinleri içerir. İntegrinler sinyal taşıma kapasitesi ve bağlanma seçiciliği gösterir. Dinlenmekte olan kondrositte integrin seviyesi çok düşüktür. Metabolik olarak aktif kondrositte ise integrin seviyeleri oldukça yüksektir ve yeni integrin subtipleri gelişir.

Kondrosit membranında ayrıca pek çok spesifik reseptörler yerleşmiştir. Bu reseptörler sayesinde çevredeki matrikse rağmen doku ve hormon sinyalleri kondrosit membranınca taranabilir. Hyaluronan reseptörleri, kondrosit matriksin hücre yüzeyine toplanmasında ve matriks metabolizmasında temel rolü oynar. Proteoglikanlar, hyaluronan reseptörleri ile kondrositlere bağlanırlar. Kondrositler pek çok doku hormonu ve büyüme faktörlerine spesifik reseptörleri aracılığı ile cevap verebilirler. Bu hormon reseptör ilişkisi kıkırdak gelişiminde ve erişkin kıkırdak metabolizmasının düzenlenmesinde önemlidir. Ayrıca bu ilişki makromoleküllerin sentezinde anabolik aktivite sağlamaktadır(31).



Şekil 3. Kondrosit membranlarında iyon değişimi şematik gösterimi

Yetişkin bir organizmada aktif halde olmayan kondrositin çok düşük bir metabolizma hızı vardır. Erişkin hayat boyunca hücre proliferasyonu göstermez. İmmatür dönemde ve gelişim sürecinde, iyileşme sürecinde, enzimatik olarak indirgenip doku kültürlerine konulduğunda, kondrosit metabolik olarak aktiftir. Aktif dönemde oldukça fazla miktarda ekstrasellüler matriks üretir. Ayrıca immatür kıkırdak, proteoglikan içeriği ve bağlayıcı protein içeriği bakımından zengindir. Sonuç olarak hem yetişkin bir organizmada, hem de hayatın daha erken evrelerinde kondrosit, enflamasyon ve travma gibi akut olaylara reaksiyon gösterebilir. Bu reaksiyonları da membrandaki spesifik reseptörler düzenler(32).

4.1.2. Ekstrasellüler Matriks(ESM)

Kıkırdak dokusunda bulunan ekstrasellüler matriks yapısı, diğer bağ doku yapılarından farklı olarak, ekstrasellüler alan içine gömülü makromoleküler matriks yapısı içermektedir. Oldukça sıkı bir kıvam gösteren ESM kıkırdak dokusuna, mekanik zorlamalar karşısında kalıcı şekil bozukluklarına yol açılmaması için gereken esnekliği kazandırmaktadır. Bu yapının sentezini sağlayan içinde barındırdığı özelleşmiş kıkırdak hücreleridir.

Ekstrasellüler matriksin bu özel yapısı kıkırdağın bükülgenliği ve şıkıştırılmaya karşı olan direnci, şok ve darbe emici olarak görev yapmasına olanak verir. Ayrıca çok düzgün yüzeyli olması nedeniyle eklemlerin sürtünmesiz olarak hareketine olanak sağlanması, yumuşak dokuların desteklenmesi aracılığı ile normal şeklin korunması ve uzun kemiklerin gelişimindeki eşsiz rolü özel matriks yapısının önemli görevleridir.

Kıkırdak matriksi diğer bağ doku matrikslerinden farklı olarak daha fazla sıvı içerir. Farklı kıkırdak tiplerinde, farklı konsantrasyonlarda ve organizasyonlarda makromoleküller içerir. İçerdiği sıvı miktarı kıkırdak ağırlığının %60-80'ini oluştururken yapısal makromoleküller kıkırdak kuru ağırlığının %20 -40'ını oluştururlar. Matriks makroskopik olarak homojen görünse de, moleküler yapısı üç sınıf yapısal makromolekülden oluşur. Bunlar aşağıda belirtildiği gibi kategorize edilebilir:

- Glikozaminoglikanlar (GAG) ve Proteoglikanlar.
- Kollajen ile elastin içeren fibröz proteinler.
- Adhezive proteinler.

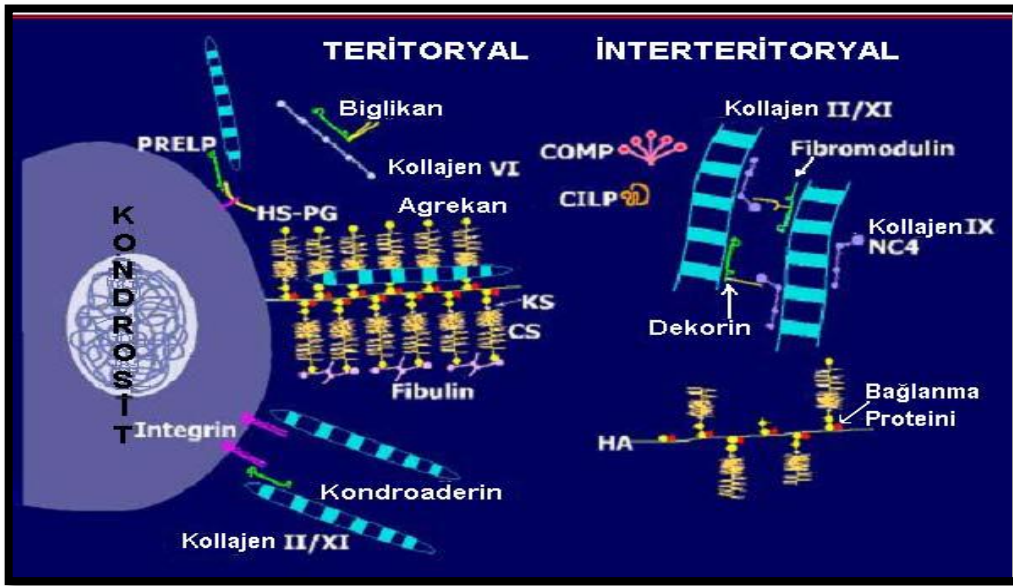
Yarı ışık geçirgen matriksin kuru ağırlığının % 40 'ı kollajendir. Kollajen lifler ile ara maddenin ışığı yansıtma indeksi yakın olduğundan, ışık mikroskobu ile kollajen seçilemez ve matriks amorf, homojen görünüme sahiptir.

Proteoglikanların yapısını büyük oranda karbonhidratlar oluştururken, diğer makromeküller protein yapıdadır.(63,64) Kollajen lifler arasında yalnızca hidrate proteoglikanlar değil, aynı zamanda bunların GAG yan zincirleri de kollajen lifler ile elektrostatik bağlantılar oluşturur. Böylece temel ara madde ile matriksin fibrilleri arasında çapraz bağlı bir moleküler iskelet oluşturulur ki bu gerilmelere karşı olan direncin temelini oluşturur.

Matrikste iki bölge gözlenir;

- Her bir laküna etrafındaki territorial matriks
- İnterterritoryal matriks

Territorial matriks, 50µm genişliğindeki bir bant şeklindedir ve PAS(+) boyanmaya sebep olan konroitin sülfat yapısınca zengindir. Bu bölge aynı zamanda yüksek bazofilik ve metakromatiktir. Bu matriksin dışı ise Tip II kollajence zengin proteoglikanlarca daha fakirdir. Matriksin çok küçük bir kısmı ise (1-3µm) lakünayı hemen çevreler ve perisellüler kapsül olarak bilinir. Burası bazal lamina benzeri bir materyale gömülü küçük kollajen lif ağından oluşur. Perisellüler kapsülün kondrositleri mekanik streslerden koruduğu ileri sürülmüştür(29).



Şekil 4:Kıkırdak dokusunun yapısı ve ESM bileşimi

4.1.2.1. Glikozaminoglikanlar ve Proteoglikanlar

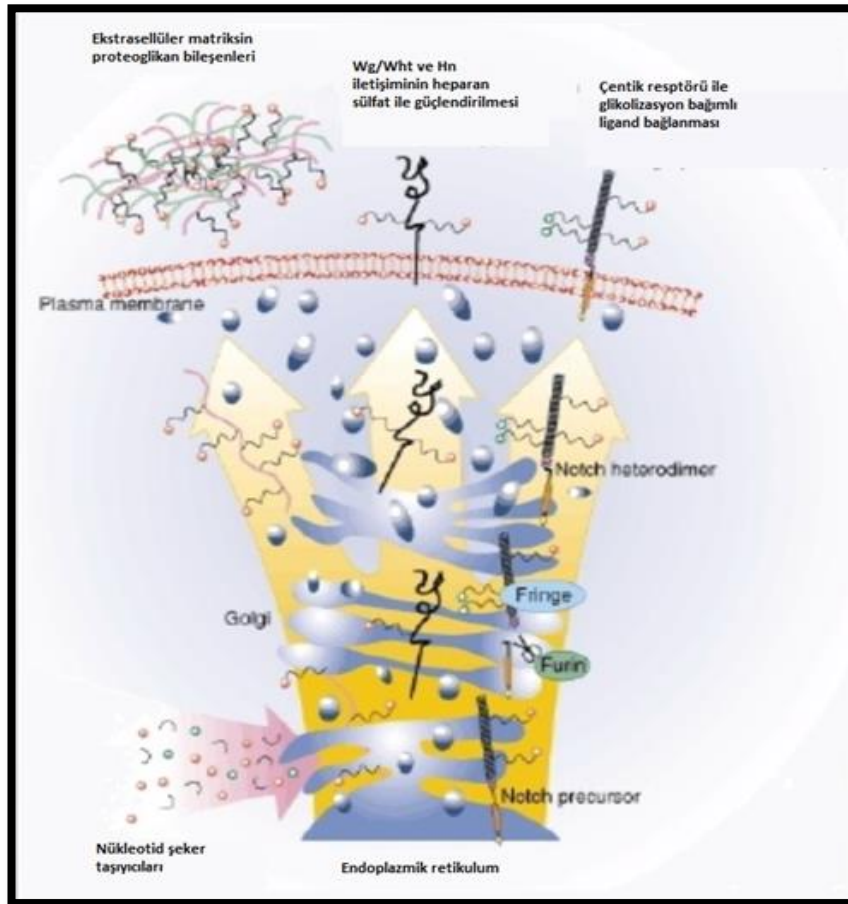
Glikozaminoglikanlar (GAG), genellikle bir üronik asit ve bir heksozamin tarafından oluşturulan, karakteristik tekrarlayan disakkarit birimlerinden meydana gelmiş olan doğrusal polisakkaritlerdir. Kıkırdakta bulunan glikozaminoglikanlar hiyaluronik asit, kondroitin sülfat, keratan sülfat ve dermatan sülfattır. GAG yapılarının kompozisyonu, bağ dokudaki dağılımları ve kollajen lifler ile ilişkileri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: GAG'ların kompozisyonu, dağılımı ve kollajen lifler ile olan ilişkisi

GAG	TEKRARLAYAN DİSSAKARİTLER	DAĞILIM	KOLLAJEN İLE ELEKTROSTATİK İLİŞKİ
Hiyalüronik asit	D-glukuronik asit / D-glukozamin	D- Sinovyal sıvı, kıkırdak	
Kondroitin-4-sülfat	D-glukuronik asit / D-galaktozamin	Kıkırdak, kemik, kornea	Esas olarak kollajen tip 2
Kondroitin-6-sülfat	D-glukuronik asit / D-galaktozamin	Kıkırdak, göbek bağı, deri	Yüksek oranda kollajen tip 2
Dermatan sülfat	D-glukuronik asit / L-iduronik asit / D-galaktozamin	Deri, tendon, aort	Yüksek oranda kollajen tip 1
Heparan sülfat	D-glukuronik asit / D-galaktozamin	Aort, akciğer, bazal lamina, karaciğer	Orta derecede Kol tip 3 ve 4
Keratan sülfat (kornea)	D-galaktoz / D-galaktozamin	Kornea	
Keratan sülfat (iskelet)	D-galaktoz / D-glukozamin	Kıkırdak	

Hiyaluronik asit dışındaki diğer GAG polimer zincirlerinin, bir kor proteinine bağlanmasıyla proteoglikan molekülü oluşmaktadır. Proteoglikan molekülü, telden yapı, sapı protein özünü, kolları ise GAG'ları andıran ve bir test tüpü fırçası olarak şematize edilebilen üç boyutlu bir yapıdır (Şekil 5).

Proteoglikanlarda karbonhidrat kısmı hakimdir ve molekül kütlesinin %80-90'ını oluşturmaktadır. Kıkırdak doku içinde, proteoglikan molekülleri daha büyük moleküller halinde proteoglikan agregatlarını meydana getiren bir hiyalüronik asit zincirine bağlı olarak gösterilmektedir. Proteoglikan agregatları, bir proteoglikan molekülü olan agregan bağlanma proteini ile bir hiyalüronik asit molekülüne bağlanması ve bu yapının da kollajen lifler ile etkileşime girmesi sonucu oluşmuştur. Proteoglikan moleküllerinin çoğunluğunun karbonhidrat kısmının içinde hidroksil, karboksil ve sülfat grupları yüksek oranda bulunduğundan dolayı yapı son derece hidrofildir ve polianyon davranışı gösterir. Bu özelliklerinden dolayı proteoglikanlar çok sayıda katyonla elektrostatik bağlar ile bağlanabilirler. Proteoglikan agregatları son derece sulu yapılar olup molekülün etrafını kalın bir çözelti suyu tabakası çevrelemektedir. Kuru hacimlerinin yaklaşık olarak 50 katı kadar suyu emerek yapı içinde tutabilirler. Bu şekilde dokuya son derece güvenli bir osmotik çevre sağlamaktadırlar(29).



Şekil 5: ESM Proteoglikan bileşenleri

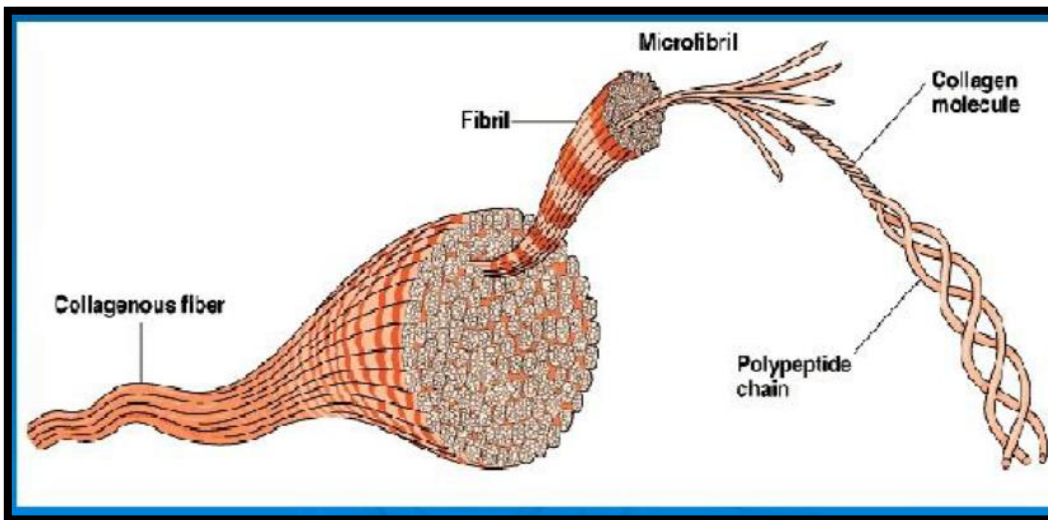
4.1.2.2. Fibröz Proteinler

Fibröz proteinler, dokularda yapısal fonksiyonları yerine getiren genişletilmiş moleküllerdir. Düzenli, sekonder yapısal elementler oluşturmak üzere birleşen spesifik aminoasitlerden oluşurlar.

4.1.2.2.1.Kollajen

ESM' in önemli bileşenidir ve insan vücudunda en bol bulunan proteindir, kuru ağırlığın yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır. Kollajen, kemik, tendon ve derideki başlıca protein türüdür. Kıkırdak doku kollajeni oldukça dayanıklı, hayat boyu değişmeden kalan ve yarılanma süresi 50-300 gün olan bir yapıya sahiptir.

Kollajen, kıkırdığın şeklini korumada ve tensil kuvvetini sağlamada görev alır. Ayrıca diğer yapısal makromoleküller olan proteoglikanlar ve glikoproteinler kollajen yapının üzerine tutunurlar. Böylece kollajen, eklem kıkırdığına kuvvet uygulandığında proteoglikan akışına karşı koyar. Kayma gücüne karşı direnç gösteren dayanıklı protein fiberleri meydana geldiğinden bulunduğu dokuya dayanıklılık sağlarken, gerilme direncini artırır (Şekil 6).



Şekil 6. Kollajenin fibriler yapısı

Kimyasal kompozisyonlarının farklılıkları, morfolojik özellikleri, dağılımları, fonksiyonları ve patolojileri ile fark edilen birkaç hücre tipi tarafından üretilirler.

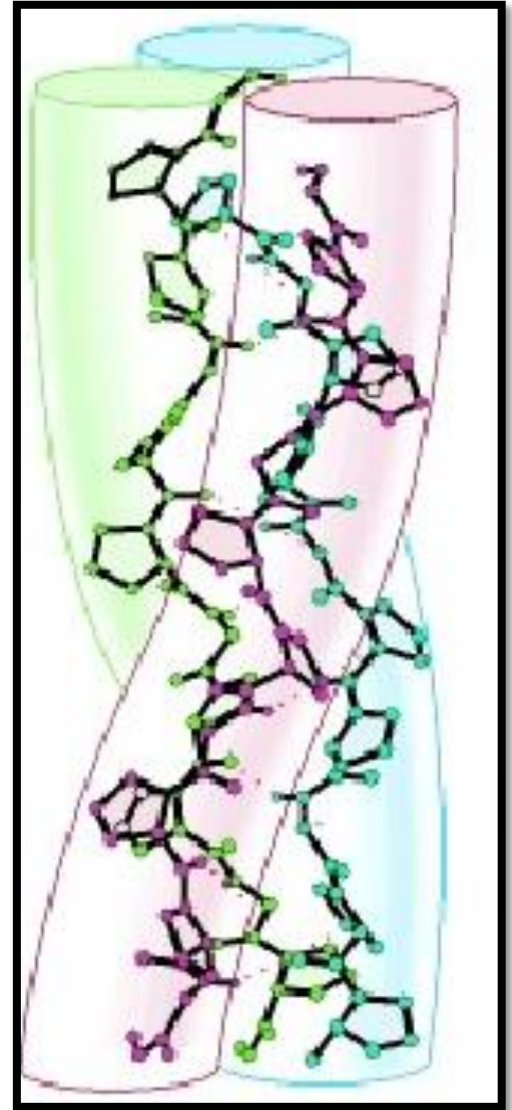
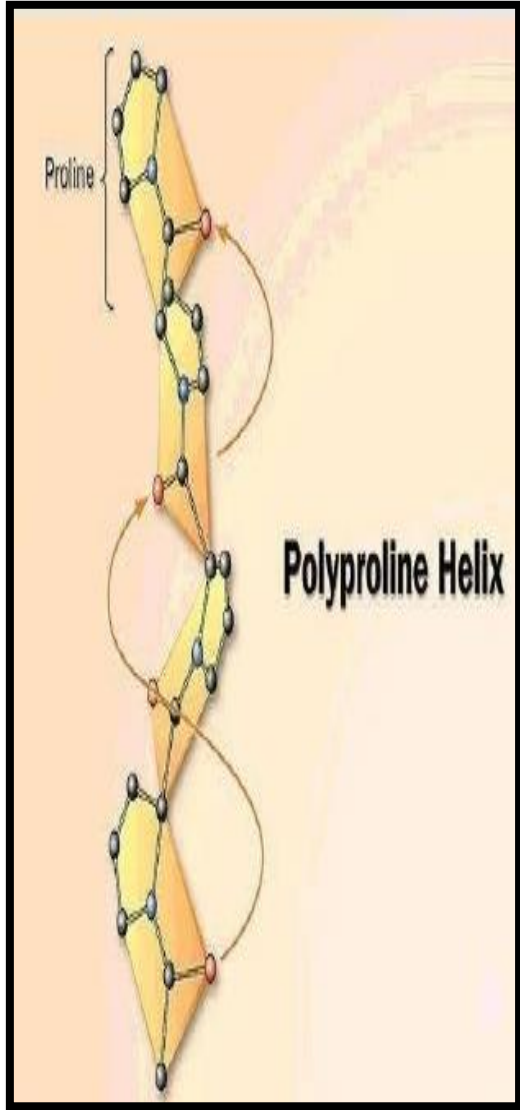
Kollajen Molekülü Yapısı

Kollajen liflerinin paketlenmiş yapısı açıldığında, en alt biriminin alfa zincir peptitleri olduğu görülmektedir. 3 polipeptid alt biriminden oluşan büklümlenmiş üçlü sarmal yapıya sahiptir. Polipeptid alt birimler olan alfa zincirler bir ortak eksen etrafında dönerek 3000 Å uzunluğunda ve 15 Å çapında katı bir çubuk benzeri molekül yapısı oluşturarak fibrilleri meydana getirir. Aminoasit dizileri tekrarlayan polipeptid yapıdadır. Kollajen proteininin ana yapısını glisin (%35,5), prolin (%12) ve hidroksiprolin (%10) amino asitleri oluşturmaktadır. Yapıda ayrıca daha az miktarda olmakla birlikte lizin ve hidroksilizin amino asitleri de dikkati çekmektedir. Hidroksiprolin ve hidroksilizin amino asitleri kollajene has bir şekilde bu yapıda bulunurlar. Bu amino asitler prolin ve lizin amino asitlerinin protein molekülü sentezlenirken peptidil prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz enzimlerinin etkisiyle hidroksillenmesi sonucu oluşurlar. Bir dokuda bulunan kollajen miktarı yapısındaki hidroksiprolin miktarının tespit edilmesiyle belirlenebilmektedir. Prolin ve hidroksiprolin, polipeptid omurganın rotasyonunu sınırlar ve böylelikle üçlü sarmalın stabilitesini arttırmaları (Şekil 7).

Kollajenin yapısında bulunan amino asitlerin farklı şekilde ve oranda dizilmesiyle farklı alfa-zincirleri; farklı alfa-zincirlerinin bir araya gelerek paketlenmesiyle de farklı kollajen lifleri oluşmaktadır (Tablo 2).

Kollajen tipleri, nihai kollajen fibrillerini oluşturan temel ve en küçük moleküller olan, " α_1 , α_2 , α_3 " adı verilen protokollajenlerin farklı şekil ve sayılarda birleşmesiyle oluşur. Kollajen liflerinin bilinen 28 farklı türü vardır. Fakat her nasılsa insan vücudundaki kollajenin %90'ından fazlası Tip I, II, III ve IV yapısındadır. Tip I, II ve III fibriller kollajenlerdir; fibrillerin lineer polimerleri, her bir kollajen molekülünün biraraya toplanmasını yansıtır. Tip IV (ve aynı zamanda Tip VII) iletişim ağı oluşturan

kollajenlerdir ki, bunlara uyan yapı belirgin fibril yapıları değil, üç boyutlu ağ yapılarıdır(29, 30). Fibrildeki kollajen tiplerinin çeşitliliği, kollajen fibrillerin büyüklüğünü ve şeklini belirler. Diğer minör kollajen tipleri bu majör fibril ağı arasında dağılmış halde bulunur. Bazı kollajen türlerinin ise tam yapısı ve görevi kesin olarak belirlenememiştir. Olayın fütal kıkırdak dokunun kalsifikasyonunda önemli olduğu sanılmaktadır (Tablo 2).



Şekil 7. Kollajenin tekrarlayan peptid yapılarından oluşan helikal yapısı

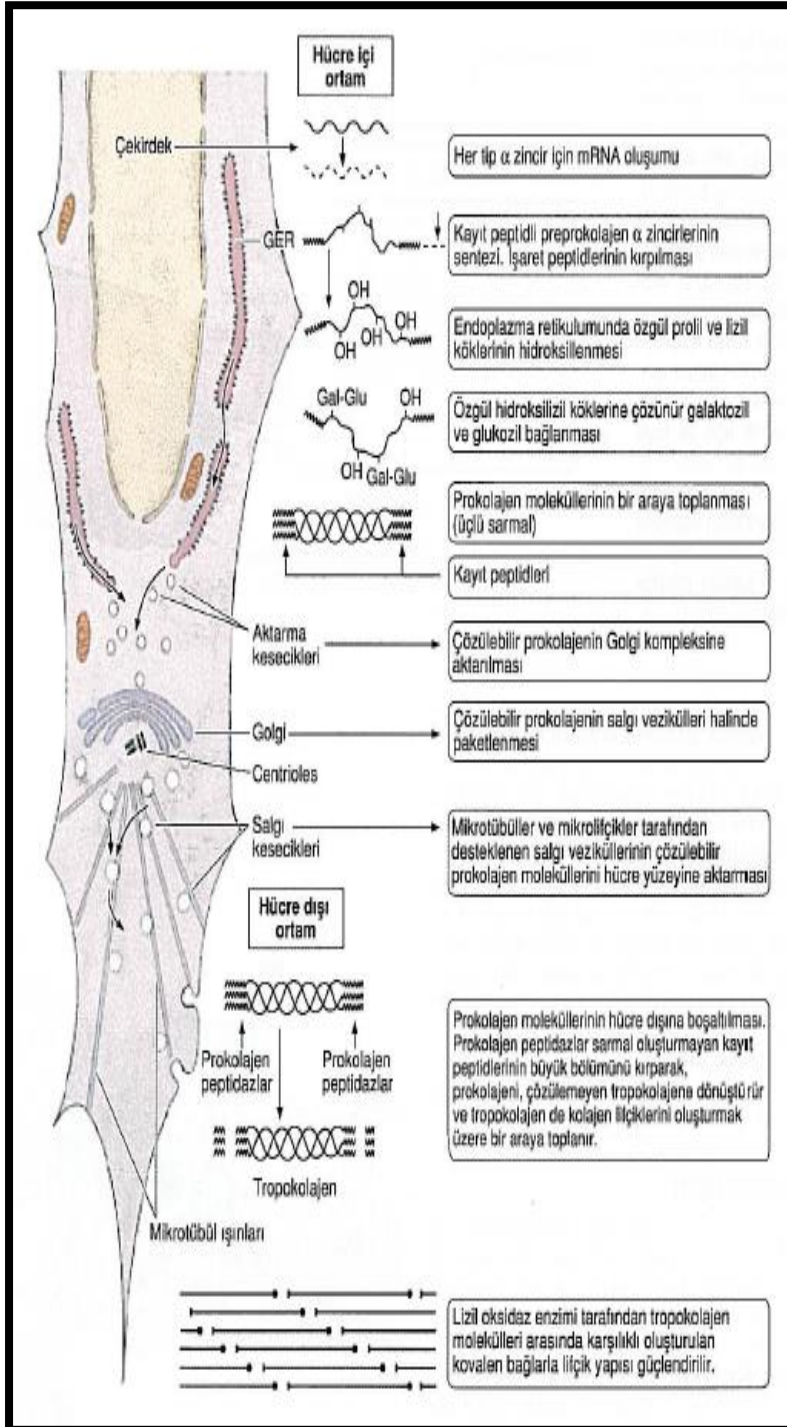
Tablo 2. Kollajen içerdikleri alfa zincir tiplerine göre kollajen tiplerinin lokalizasyonu

Kollajen Tipi	α -zincir düzeni	Yapısı	Lokalizasyonu
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha(I)]$	300nm,67nmsarıllı fibriller	Deri,tendon, kemik,kıkırdak, vb.
II	$[\alpha(II)]_3$	300nm,küçük,67nm fibriller	Kıkırdak
III	$[\alpha(III)]_3$	300nm,küçük,67nm fibriller	Deri ve kasta yoğun
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	390nm,C-term globüler bölge, non-fibriler	Tüm bazal lamina
V	$[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)] [\alpha 3(V)]$	390nm,N-term globüler bölge, küçük fiberler	Tip I kollajen ile ilişkili
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)] [\alpha 3(VI)]$	390nm,N-term globüler bölge, küçük fiberler	Tip I kollajen ile ilişkili
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	450nm, dimer	Epitel
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_3$	150nm,N-C term,globüler bölge	Bazı endotel hücreler
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)] [\alpha 3(IX)]$	200nm,N-term, globüler bölge	Kıkırdak, tip II kollajen ile ilişkili
X	$[\alpha 1(X)]_3$	150nm,C-term, globüler bölge	Hipertropik ve mineralize kıkırdak
XI	$[\alpha 1(XI)][\alpha 2(XI)] [\alpha 3(XI)]$	300nm, küçük fiberler	Kıkırdak

Kollajen Sentezi

Kollajen sentezinde ilk aşama bir kollajen prekürsörü olan prokollajenin sentez edilmesidir. Fibril yapıda bireysel kollajen polipeptid zincirlerinin membrana bağlı ribozomlar üzerinde translasyonlan ile prokollajen üretimi meydana gelir (Şekil 8). Daha sonra, belirli aminoasit kalıntılarının olağandışı modifikasyonları gerçekleşir. C Vitamini ne bağımlı bir reaksiyon ile seçilmiş prolin ve lizin aminoasit kalıntıları hidrosillenirler. Bu aşama, prokollajen moleküllerinin sonradan hücre dışında meydana gelecek agregasyonu ve fibrillerin oluşumu için gereklidir. Sonra bazı

hidroksilizin kalıntıları glukozillenirler. Golgi kompleksinde, üç adet pro α zinciri, kendi üzerlerine katlanarak sarmal hale gelirler. Daha sonra, Golgi kompleksinde gelişen bir salgı kesesi plazma membranı ile birleşir ve yeni sentezlenen üçlü Kollajen sarmallarını ekstraselüler boşluğa salar. Yeni sentezlenen zincirlerin her bir ucunun (C-terminal ve N-terminal) küçük bir bölümü, tropokollajen ürünü ortaya çıkarmak üzere proteazlar (prokollajen peptidaz gibi) tarafından bölünürler(29). Daha sonra tropokollajen molekülleri kendi aralarında toplanıp çapraz bağlar kurarak olgun



kollajen fibrillerini meydana getirirler. Fibriller içindeki kollajen moleküllerinin paketlenmesi, elektron mikroskobu ile gözlemlenebilecek şeritli bir modele sahip tekrarlayan karakteristik bir yapıya yol açar. Kollajenin fibriller dizilişi lizil oksidaz adlı enzim tarafından regüle edilir. Lizil oksidaz; olgun kollajen liflerinde görülen çapraz kovalent bağlar yapmalarını sağlarlar. Bu çapraz bağlar, bağ dokunun doğru fonksiyon göstermesi için gerekli gerilme direncini elde etmede gereklidir.

Şekil 8 .Kollajen sentezi

4.1.2.1.2. Elastin

Ekstraselüler matriks içindeki diğer önemli fibröz protein elastindir. Fibroblastlar tarafından sentezlenir. Akciğer, damar duvarları, cilt altı bağ dokusu ve elastik ligamentlerde bol bulunur; arterlerde en fazla bulunan ESM bileşenidir.

Elastin tarafından üretilen elastik fiberler, derinin, damarların ve akciğerlerin gerginliğe bağlı yırtılmadan, esneyebilmelerine olanak verir. Elastin; özellikle glisin, alanin, valin gibi küçük aminoasitlerden oluşur. Prolin ve lizin aminoasitlerince zengindir. Küçük miktarda hidroksiprolin içermesine rağmen, hidroksilizin içermez. Elastinin yapısında hiç karbonhidrat bulunmaz; bu sebeple elastin bir glikoprotein değildir(29). Kollajen bir çok genetik türe sahipken, Elastin tek genetik tiptedir.

Elastin, kollajen gibi üçlü heliks yapısına sahip değildir. Kendisini içeren dokuya esneklik veren birbirine bağlı karmaşık bir yumak benzeri iletişim ağı gibidir. Bu yapı, birbirlerine düğümlenmiş lastik şerit topluluklarına benzer; düğümler, dezmosin çapraz bağlarını simgelemektedir. Elastin monomerlerinin düzenli sekonder protein yapısından yoksun oldukları görülür; uzamaya izin veren dağınık helezon yapıları şeklindedir; çünkü elastin hem gevşek hem de gerginken farklı biçimler benimseyebilir(29).

Elastin sentezi, ekstraselüler boşluk içine elastin öncüsü olan tropoelastin salgılanmasıyla başlar. Tropoelastin, daha sonra fibrilin de içeren glikoprotein mikrofibrilleri ile etkileşime geçer. Fibrilin, tropoelastinin üzerine emanet edildiği bir iskele gibi görev yapar. Tropoelastin polipeptidleri içindeki bazı lizin aminoasit kalıntılarının yan zincirleri, lizin kalıntıları oluşturmak üzere modifiye olurlar. Ardından üç tane lizin kalıntısının yan zinciri ile aynı ya da komşu tropoelastin polipeptidlerinden gelen bir adet değişime uğramamış lizin kalıntısının yan zinciri, dezmozin çapraz bağları oluşturmak üzere kovalent olarak bağlanırlar Böylece dört adet bireysel polipeptid zinciri kovalent olarak birbirleriyle bağlanmış olurlar(30).

4.1.2.3. Adheziv Proteinler

Doku içerisindeki spesifik görevlerini yerine getirerek hücreler ile alt tabakalar ve diğer ESM molekülleri arasındaki bağlantıyı kurarak dokunun metabolik bütünlüğünü korurlar. Bunlardan fibronektin, vitronektin, laminin kondrositler ile ESM molekülleri arasındaki iletişimi sağlayan önemli glikoprotein yapılarıdır.

4.1.2.3.1. Fibronektin

Fibronektin, fibroblastlar ve bazı epitel hücreleri tarafından sentezlenen bir glikoproteindir. Molekül kütlesi 222.000-240.000 Da arasında olup hücreler ve bazı ESM molekülleri için bağlanma molekülleri içermektedir. Bu ilişkiler normal hücre göçü ve birleşmesine yardımcı olmaktadır.

Fibronektin yüksek oranda oligometrik çapraz bağ içeren dimerik bir moleküldür. Genel olarak iki ayrı formda üretilmektedir. Bunlar:

Çözünür fibronektin: Karaciğerden sentezlenerek kan akımına verilmektedir.

Çözünmez fibronektin: Hücre yüzeyinde toplanmakta ya da ESM içinde birikmektedir. Bazı hücre yüzeylerinde ise fibriler yapıda bulunmaktadır(29, 30).

4.1.2.3.2. Kondronektin

Kondronektin, fibronektine benzerdir ve tip 2 kollajen ile kondroidin-4,6 sülfat hiyaluronik asit ve kondrosit yüzeyindeki transmembran proteini olan integrin için bağlanma bölgeleri taşır. Böylece kondronektin kondrositler ile matriksin amorf ve fibriler elemanları arasında bağlantının devamlılığını sağlar(29, 30).

4.1.2.3.3. Vitronektin

Vitronektin multifonksiyonel bir glikoproteindir. Hücrelerin bağlanma ve yapışma fonksiyonlarına aracılık etmektedir. ESM içerisinde kollajen ve fibronektin kadar yaygın bir dağılım göstermemekle birlikte genellikle fibronektin ile kolonize olarak dermal elastik fiberlerinin çevresinde bulunur.

Vitronektin molekülünde de hücrelere bağlanmak için kullanılan RGD (arjinin-glisi nasparagin) hücre bağlanma dizisi bulunmaktadır. Bu RGD bağlanma dizisi ayrıca hücrelerin in vitro olarak seruma yapışmasını sağlamaktadır. Vitronektin aynı zamanda ürokinaz plazminojen reseptörü olarak iş görmektedir. Ürokinaz plazminojenin vitronektine bağlanmasıyla plazminojen plazmine dönüşmektedir. Plazmin ise ortamdaki fibrini degrade etmektedir. Degrade olan fibrin ise matriks metalloproteaz (MMP) öncülerini uyararak MMP'leri aktif hale getirir. MMP'ler ise matriks moleküllerini degrade ederek matriks yapısının ve stabilitesinin bozulmasına neden olarak kıkırdak dokusunda hasara yol açmaktadır.

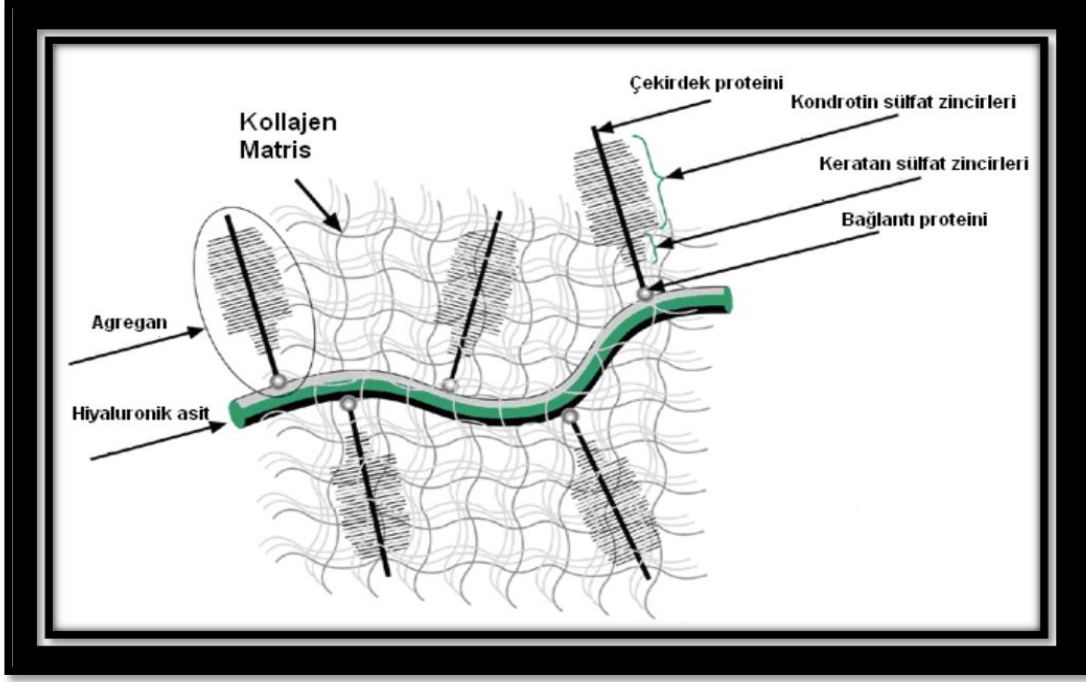
4.1.2.3.4. Laminin

Heterotrimerik bir glikoprotein olan Laminin, diğerlerine benzer şekilde hücrelerin bağlanma ve yapışma fonksiyonlarında görev almaktadır. Genel olarak bazal laminada bulunmaktadır. Tümör hücreleri metastaz süresince bazal laminadan geçmek için laminin reseptörlerini kullanmaktadır; metastazlar için fibronektin ile laminin işbirliği içinde olduğu kabul edilmektedir.

Laminin ekspresyonu gelişmenin düzenlenmesinde ortaya çıkar ve yaklaşık olarak kollajen tip 4 ile eşit miktarda üretilir. Laminin üzerinde heparin/heparin sülfat ve kollajen 4 için spesifik bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bazı *in vitro* hücre kültürlerinde laminin, polistiren kültür kaplarına kaplanarak hücresel bağlanma, çoğalma ve farklılaşma uyarılabilmektedir.

Tablo 3. Kıkırdak matrisinin yapısal makromolekülleri (31, 32)

MOLEKÜL	YERİ	FONKSİYON
KOLLAJENLER		
Tip II Kollajen	Makrofibrilin ana komponenti	Germe kuvveti sağlar
Tip VI kollajen	Perisellüler alandaki mikrofibrillerde	Germe kuvvetinin dağılımı
Tip IX kollajen	Makrofibril yüzeyine çapraz bağlanır	Fibril-interfibriler bağlantı
Tip X kollajen	Perisellüler kafes yapısında bulunur.	.Yapısal destek?
Tip XII-XIV kollajen	Olasılıkla makrofibrilin yapısında	Bilinmiyor
PROTEOGLİKANLAR		
Agregan	Major proteoglikandır. G1 bölgesiyle hyaluronan bağlar,	Kompresif dayanıklılık
Decorin	Eklem yüzeyi ve perisellüler alanda	Makrofibrilyapının düzeni
Biglikan	Agrekana benzer	Bilinmiyor
Fibromodulin	Dört keratan sülfat zinciri içerir	Decorin gibi
Lumican	İmmatürken keratan sülfat içerir	Decorin gibi
C	Hücre yüzeyinde bulunur	Hücre-matriks yapışmasında
Perlecan	Heparan sülfat içerir. .	Hücre matriks yapışmasında
SZP	Eklem yüzeyi ve sinovyal sıvıda Yüzeyel tabaka hücrelerinde sentezlenir.	Eklem kayganlığında görev alır
GLİKOPROTEİNLER		
COMP	Trombospondin ailesinden beş kollu	Tip II kollajen bağlar
Kondrokalsin	Eklem kıkırdağında bolca bulunur	Kalsiyum bağlar
Laminin	Perisellüler alanda bulunur	Bilinmiyor
Kondroadherin	Lökinden zengin bir proteindir	Hücre matriks yapısı
GAG		
Hyaluronan	Agrekanın G1 bölgesine ve	Agrekanın matrikste tutulması
Keratan sülfat	Agrekan ve fibromodulin yapısında	
Heparan sülfat	Perlecan ve syndecan yapısında	
Kondroitin sülfat	Agrekan ve Tip IX kollajen yapısında	



Şekil 9. Kıkırdak matriksinde moleküler organizasyon

4.1.3. Matriks Metalloproteinazları (MMP)

Matriks metalloproteinazları kıkırdak matriksinin intrinsik komponentleridir. Stromelizin, jelatinaz, kollajenaz ve membran birleşik metalloproteinaz şeklinde sınıflandırılır. Kollajenazlar endoproteinazdır, üçlü heliks kollajen yapıdadır. Jelatinazlar indirgenebilir. Hem kollajenazlar hem de jelatinazlar kollajen harici diğer matriks proteinlerini de indirger. Stromelizinler pek çok substratı indirgeyebilir. Bunların arasında proteoglikanlar da bulunur. Proteoglikanlar indirgenince hyaluronan gibi molekülleri bağlayamaz (32-34).

Metalloproteinazlar matriks moleküllerinin normal döngüsünü bozarak kollajen fibrillerin ve bileşiklerin makro yapılarını parçalar. Normal kıkırdakta ne kadar metalloproteinaz olduğu bilinmemektedir. Özellikle osteoartrit gelişmesinde ve ilerlemesinde rol aldıkları düşünülmektedir(32).

Metalloproteinaz inhibitörleri "Tissue-induced metalloproteinase inhibitors (TIMP)" olarak bilinir. TIMP I, II ve III ile "cartilage-derived inhibitor (CDI)" olmak üzere dört izoformu bilinmektedir. CDI kıkırdakta üretilmez. Lenfatik sistemde sentezlenip kıkırdakta depolanır. Bu inhibitörler kollajen gibi matriks proteinlerine bağlanarak kıkırdak matriksinin metalloproteinazlar tarafından indirgenmesini büyük oranda önler(31, 32).

4.1.4. Kıkırdak Doku Tipleri

İçerdikleri ekstrasellüler matriks fibriler yapısına bağlı olarak göre 3 tip kıkırdak bulunur. Her tip kıkırdağın kendine özgü fonksiyonu ve yapısı vardır(29). Bu özellikler Tablo 4 'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Kıkırdak Doku Tipleri

Kıkırdak doku tipleri	Fonksiyon	Yapı	Lokasyon	Hasara yanıt
Hyalin Kıkırdak	Yükü dağıtmak	Tip II KL	Eklemler Sternum Trakea	İyileşme kısıtlı, Rejenerasyon komşu kemikten hücre infiltrasyonu ile
Elastik Kıkırdak	Destek sağlar	Tip II KL+EL Bükülgenmatriks yapısı	Kulak Larinks	İyileşme kısıtlı. Çevre dokudan infiltrasyon sonucu skar dokusu
Fibröz Kıkırdak	Yük transferi	Kaba Tipi KL Çekme-germe güçlerine dirençli	IVD Menisküs	Skar oluşumu

4.1.4.1. Hyalin kıkırdak

Organizmada en yaygın bulunan kıkırdak doku yapısıdır. Hyalin kelimesi Yunanca cam anlamına gelen hyalos kelimesinden köken alır. Taze iken, hyalin kıkırdak şeffaf, mavimsi-beyaz yığınlar halindedir. Sert, basınca dayanıklı, homojen amorf matriksli dokudur.

Fetüste hemen bütün iskelet hyalin kıkırdak yapısındadır, birçok uzun kemiğin şablonunu oluşturur. Yetişkinde ise fazla hareketlilik gerektiren yerlerde görülür. Burunda nazal septumda, larinks, kostaların sternuma bağlandığı ventral yüz, trakeal ve bronşial halkalarda ve hareketli eklem yüzeylerinde bulunur. Epifizial plak hyalin kıkırdaktan oluşur. Hyalin kıkırdak matriks yapısı; tip II kollajen, proteoglikan, glikoprotein ve ekstrasellüler sıvıdan ibarettir. Matriksin kuru ağırlığının % 40 'ı kollajendir. Buna ilave olarak proteoglikan, glikoprotein ve ekstrasellüler sıvı bulunur. Hyalin kıkırdak matriksi temel olarak tip II kollajen içerir. Fakat Tip IX, X, XI ve diğer küçük kollajenler de az miktarda bulunur. Tip II kollajen büyük bantlar oluşturmaz, buna karşın liflerin kalınlığı lakünalardan uzaklaştıkça artar(30, 35).

Hyalin kıkırdağın kaygan düzgün yüzeyli olması, sıkıştırmaya karşı olan direnci onun eklem yüzeyinde fonksiyon görmesine izin verir. Kıkırdak avasküler bir doku olduğundan, besin maddeleri matriksteki hidrasyon sıvısı boyunca diffüzyonla kondrositlere ulaşır. Böyle bir yetersiz sistemde kıkırdağın genişliği sınırlı kalır. Yaşla birlikte PG miktarı değişkenlik gösterir. Hormonlar ve vitaminler de kıkırdağın büyüme, gelişimi ve fonksiyonu üzerine etkilidir. Kıkırdak yenilenmesi çocukluk dönemi hariç oldukça zayıftır. Rejenerasyon genellikle perikondriumdaki kondrojenik hücrelerin defekt bölgesine girerek yeni kıkırdağı oluşturması ile gerçekleşir. Kayıp (defekt) büyük ise bölgedeki fibroblastlar profere olarak sıkı bağ dokusu (skar doku) oluşturulur(29, 30, 35).

4.1.4.2. Elastik kıkırdak

Elastik kıkırdak matristeki elastin moleküllerce karakterize edilir. Hiyalin kıkırdak matrisinde bulunan elemanların dışında, elastin ve bağlayıcı ara tabakalardan oluşmaktadır. Bu fiberler ve lameller orsein gibi özel boyalarla görüntülenebilmektedir.

Bu tip kıkırdak destek ile birlikte elastikiyetin de (fleksibilite) gerektiği yerlerde; dış kulak, iştme boruları, epiglottis ve larinksin bazı bölümlerinde görülür. Taze iken, şeffaf değildir ve içerdği elastik liflerin ortama hakimiyetinden dolayı sarı renktedir. Hiyalin kıkırdağın bir modifikasyonudur, fakat daha opaktır. Hücreleri yağ ve glikojen yönünden hyalin kıkırdak hücrelerine oranla daha fakirdir. Matriksinde çok fazla elastik lif yanında kollajen lifler de bulunur. Kollajen lifler maskelenmiş durumdadır. Elastik liflerin kalınlığı ve miktarı farklıdır. Lifler kıkırdağın iç taraflarında daha geniştir ve daha yoğun paketlenmiştir. Elastik kıkırdakta dejenerasyon daha az görülür(30).

4.1.4.3. Fibröz kıkırdak

Kuvvetli mukavemet ve desteğin gerektiği yerlerde, intervertebral disklerde, pubis symphysislerde ve diğer bazı eklemlerin intraartiküler disklerinde bulunur. İlaveten bazı tendon ve ligamentlerin kemiğe bağlı olduğu yerlerdeki kıkırdak ile omuz, kalça eklemlerini sınırlayan kıkırdaklarda da görülürler. Fibröz kıkırdak hiçbir zaman tek başına bulunmaz. Ya aşamalı olarak komşu hyalin kıkırdak ile birleşir veya komşu sıkı fibröz doku ile kaynaşır. Elastik kıkırdağın aksine fibröz kıkırdak hyalin kıkırdağın modifiye olmuş şekli değildir. Dens (sıkı) kollajenöz bağ dokusundan meydana gelmiştir. Lif bandlarının arasında hyalin kıkırdak matriksi bulunur ve bu matriks içindeki hücreleri içeren lakünalar yer alır. Hücreler tek tek veya izogen gruplar halinde olabilir, fakat çoğunlukla kısa sıralar şeklindedir. Kondrositler, hyalin kıkırdaktakilere benzer fakat hücrelerarası madde daha azdır. Fibröz kıkırdak perikondriuma sahip değildir. Ligament ve eklem kapsüllerininin sıkı bağ dokuları ile yakın ilişkilidir, dolayısı ile kıkırdak

ile sıkı bağ dokusu arasında değişici bir yapı olarak düşünölebilir. Genel olarak normal bağ dokusuna benzer bir şekilde gelişir. Başlangıçta çok miktarda fibriller materyal ile birbirlerinden ayrılmış, fibroblastlar bulunur. Sonradan bu hücreler kondrositlere dönüşür ve bunlar da kartilajinöz matriksten oluşmuş ince bir tabaka ile sarılır.

Fibröz kıkırdak hücreleri, çok çeşitli hücrelerarası madde moleküllerini yalnızca gelişimi esnasında değil, aynı zamanda olgun safhada da sentezlemektedir. Bu durum, fibröz kıkırdağın, mekanik güç, beslenme değişiklikleri, hormonlardaki ve büyüme faktörlerindeki değişiklikler gibi çevresel faktör değişikliklerine cevap vermesini sağlamaktadır. Hücrelerarası madde, tip I ve tip II kollajen liflerinin ikisini de içermekte ve bu iki tip arasındaki oran, bölgelere göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğın; diz eklemi menisküs bölgesinde çok az tip II kollajen bulunmakta; intervertebral disklerde ise eşit miktarda bulunmaktadır. Bu oran, ayrıca, yaş ile birlikte de değişmektedir.

4.1.5.Kıkırdak doku rejenerasyonu ve gelişimi

Doğumdan itibaren kıkırdak dokusunun gelişimi *interstisyel* ve *apozisyonel* olmak üzere iki şekilde olmaktadır.(Şekil 10) Her iki durumda da yeni oluşan kondrositler, kollajen liflerin ve temel maddelerin sentezini gerçekleştirmektedir. Böylece büyüme, basit bir hücre artışından daha kompleks bir şekilde gerçekleşmektedir.

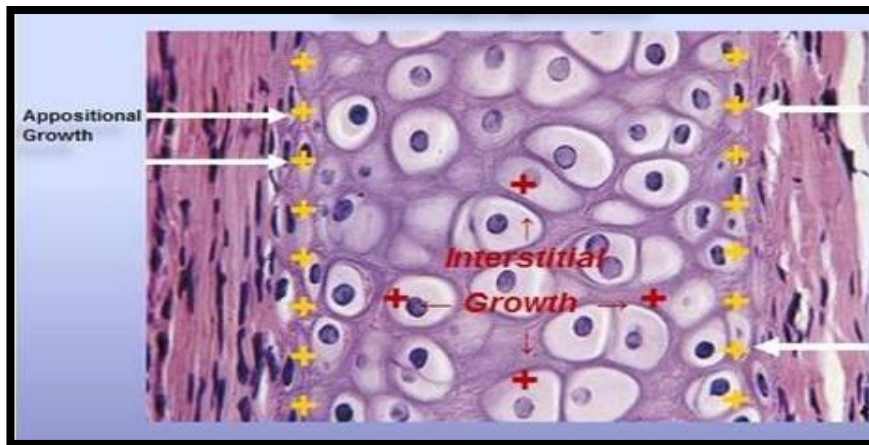
Diğer destek dokuları gibi kıkırdak dokusu da mezenkimal orjinlidir. Gelişim bölgelerinde mezenkimal hücreler, uzantılarını kaybeder, yuvarlaklaşarak yoğunlaşır. Böylece yoğun hücrelerden meydana gelen bir kondrifikasyon merkezi ortaya çıkar. Bu hücreler daha sonra kondroblastlara farklılaşırlar. Kondroblastlar hemen bir matriks sentezlerler. Bu süreç ilerlerken kondroblastlar kendine ait küçük kompartmanlar olan laküna içine hapsolürler, bundan sonra artık kondrosit olarak isimlendirilirler. Bu hücreler halen bölünme yeteneğini sürdürdüklerinden, bir laküna içinde 2-4 veya daha fazla hücre grubu oluştururlar. Bu grup izogen grup olarak tanımlanır ve bir tek ana hücrenin 1-2 veya daha fazla bölünmesi ile oluşmuştur.

İzogen gruplar matriks ürettikçe lakünalar da bir birlerinden uzaklaşır, kıkırdak içerden büyümeye başlar. Bu **içsel (İnterstisyel) tipte** büyümedir(29).

Gelişmekte olan kıkırdağın periferindeki mezenşimal hücreler ise ilk olarak fibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlar sıkı kollajenöz bir bağ dokusu olan perikondriumu şekillendirir. Perikondrium kıkırdağın varlığını ve büyümesini sürdürmesinde sorumludur. Perikondrium iç tabakasındaki kondrojenik hücreler bölünerek kondroblastlara farklılaşır. Bu hücreler matriks sentezleyerek kıkırdağın periferine ilaveler yaparlar. Bu büyüme tipi ise **apozisyonel büyüme** olarak tanımlanır(29).

Eklem kıkırdağında, apozisyonel hücre ekleyecek bir perikondrium olmadığı için eklem yüzeyindeki, zamanla yıpranan hücreler ve matriks, kıkırdağın iç kısımlarından takviye edilir. Vücudun diğer bölgelerinde bulunan kıkırdaklarda ise, matriks zamanla sertleşince interstisyel büyüme azalır ve kıkırdak bir bant halinde sadece apozisyonel olarak büyür.

İnterstisyel büyüme yalnızca hiyalin kıkırdağın oluşumu sırasında, perikondriumu olmayan eklem kıkırdağı ve epifizial plaklarda (kemik boyuna büyümesi) meydana gelir. Bunlar dışındaki vücut bölgelerinde büyüme çoğunlukla apozisyoneldir, kontrollü bir süreç olup kıkırdağın yaşamı boyunca devam eder.



Şekil 10: Apozisyonel ve intersitisyel büyüme

4.2. KIKIRDAK REJENERASYONUNDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Kıkırdak yapısının bir kere zarar gördükten sonra spontan olarak iyileşme gösterme kapasitesi, dokunun avasküler yapısı gereği çok azdır. Çeşitli yenileme teknikleri öngörülse de, zarar görmüş kıkırdak dokunun yerini tam olarak alabildiği bir teknik bulunamamıştır.

Son otuz yılda klinik ve deneysel çalışmalarla ön plana çıkan yapay matriksler, büyüme faktörleri, perikondrium, periosteum ve transplante edilen kondrositler ve kök hücre gruplarıyla osteokondral ve kondral kayıplarda kıkırdak yapımı uyarılmaya başlanmıştır.

4.2.1. Mekanik yöntemlerle kıkırdak rejenerasyonunun artırılması

Kıkırdak dokuda mekanik hasar oluşturarak rejenerasyonun tetiklenmesi esasına dayanır. Siklik yüklenme ve hareketlendirme kıkırdak onarımını uyarır. Kıkırdağın rejenerasyonunu arttırmak için subkondral kemiğe penetrasyon (mikrofraktürler), drille delme, osteotomiler, eklem distraksiyonu, abrazyonlar ve başka yöntemler denenmiş, fakat istenilen sonuçlar elde edilmemiştir. Bu mekanik uyaranlarla kıkırdak rejenerasyonunu arttırmaya yönelik yöntemlerin birbirlerine karşı kesin üstünlükleri de kanıtlanmış değildir.

Burkart ve Imhoff 'un 2001 yılında, Agneskirchner ve arkadaşlarının 2002 yılında, Steadman ve arkadaşlarının 2001 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalarda eklem yüzeylerinde osteokondral rejenerasyonu arttırmak için mikrofraktür yöntemini kullanılmış, fakat yeterli sonuç elde edilememiştir. Müller ve arkadaşları 1999 yılında kıkırdak rejenerasyonunu arttırmak için eklem yüzeylerinde drilleme yöntemini kullanmışlardır.

4.2.2. Otojen kıkırdak greftleri ile onarım

En ideal yöntem olarak bilinen otojen kıkırdak greftleri, immünolojik ve biyomekanik özellikleri ile çok iyi bir greft materyalidir (36-38).

Kıkırdak greftler çeşitli avantajlara sahiptirler; vasküler beslenmeye ihtiyaçları olmaz, kolay şekillendirilebilirler. Yeni yerlerine kolay adapte olmakta, doku rejeksiyonuna neden olmamaktadır.(36, 39-41). Ancak kıkırdak grefte uygun şekil vermek için kıkırdağı kesmek, ezmek ve kırmak gibi işlemler greftin ömrünü kısaltmaktadır(42). Kıkırdak greftlerin en önemli dezavantajlarından biri de rezorbsiyona uğramalarıdır. Ayrıca verici alan kısıtlaması, yeterli kıkırdak greft miktarına ulaşmadaki zorluk bu yöntemin diğer dezavantajları olarak sayılabilir(43). Donör sahalarına göre otojen kıkırdak greftler septal, auriküler ve kostal kıkırdaklar olarak üç grupta incelenirler:

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

Kulak kıkırdak greftleri: Kulak konkasının önemli bir kısmı konkal kıkırdak grefti ya da kompozit tam kat kama greft şeklinde donör saha deformitesi oluşturmadan belirli miktarlarda 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.

4.2.3. Perikondrial ve Periosteal greftlerle onarım

Perikondrium, kondroprogenitör hücrelerden zengin bir kaynak olup mekanik ve inflamatuvar mediatörlere yanıt olarak, yeni kıkırdak matriksi oluşturma potansiyeline sahiptir. 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 kıkırdak oluştuğunu göstermişlerdir. Klinikte, 1970'lerden sonra, kıkırdak doku kaynağı olarak perikondrium grefti kullanılmış, fakat teknik zorluklar ve oluşturacağı kıkırdak miktarının önceden tespit edilememesi gibi nedenlerle klinik olarak kullanım alanları daralmıştır. Bunun yanında, perikondrium greftinin örtü, kamuflaj veya dolgu amacıyla kullanımı halen söz konusudur.

4.2.4. Allogreftler ve Xenogreftler

Allojenik (veya homolog) ve xenojenik kıkırdak greftleriyle ilgili yapılan klinik ve deneysel çalışmalar değişik oranlarda başarıya sahiptirler. Otolog greftler, allogreftlere ve xenogreftlere oranla daha uzun bir sağkalıma sahiptir (76). Bu, oluşan immün reaksiyonun miktarı ile ters orantılıdır. Kıkırdak, immünitesi az bir doku olarak kabul edilmektedir. Teorik olarak, içeriğinde alıcı immün sistemini uyaracak ekspoz

kondrosit yoktur. Bu, kondrositlerin vasküler bir ağa sahip olmayan matriks tarafından kuşatılmış olmasındandır. Tiku ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tavşan kondrositlerinin HLA antijen (Class II) salınımı yaptıkları ve kondrositlerin antijen sunan hücre fonksiyonu gördüklerini göstermişlerdir(44). Sonuç olarak kondrositler güçlü immün cevap stimülasyonuna sahiptirler ancak rölatif olarak az sayıda olduklarından ve yoğun ekstraselüler matriksin varlığı büyük olasılıkla rejeksiyon sürecini yavaşlatmaktadır.

Allogreftlerin sınırsız kaynak teşkil etmesi, verici alan morbiditesi yaratmaması gibi avantajları vardır. Özellikle maksillafasyal defektler için tercih edildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur(43, 45, 46). Velidedeoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada solventte prezerve edilmiş kadavra homogreftlerin augmentasyon rinoplastide başarılı kullanımı bildirilmiştir(43). Tüm avantajlarına rağmen allogreftlerin kullanılması doku uyumsuzluğu, zamanla hacmini kaybetmesi, enfeksiyon taşıma riski, hazırlanmasının maliyetli olması, kadavradan doku alınarak canlı insana yerleştirilmesi gibi etik ve diğer sorunlar yaratmaktadır(43, 47).

4.2.5. Alloplastik biyomateryallerle onarım

Verici alan morbiditesi yaratmaması, sınırsız kaynak teşkil etmesi, istenilen formatta üretilebilmesi, kolay sterilizasyonu nedeniyle birçok çalışmada organik ve inorganik implantlar kullanılmıştır. Konulduğu yere kötü adaptasyonu, çevre dokulardan farklı mekanik özelliklere sahip olması, sık deformasyona, alerjik ve enflamatuar reaksiyonlara neden olması, vücuttan kolay dışarıya çıkması gibi son derece ciddi istenmeyen yan etkilere sahiptir(45, 47).

4.2.6. Gen Terapisi

Gen terapi tekniğinin en önemli avantajı kondrojenik bilgi taşıyan genlerin hücrelere transfekte edilerek genetik olarak hazırlanacak dokunun kontrolünü sağlayabilmesidir(48). Viral (retrovirüs ve adenovirüs) ve nonviral (polimerler ve

lipozomlar) ajanlar hücrelere transfekte edilerek uygulama gerçekleştirilmektedir. Viral vektörlerin transfeksiyon verimlilikleri yüksek olmasına karşın güvenilirlikleri düşüktür (49). Hücreler ve doku iskelelerinin limitsiz kombinasyonları düşünüldüğünde, kıkırdak doku rejenerasyonu için uygulanan gen terapi pek çok araştırmaya konu olmaya devam edecektir.

4.3. KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ ÇALIŞMALARI

Doku mühendisliği, son yıllarda Plastik, Estetik ve Rekonstrüktif Cerrahi alanında önemli bir uğraş konusu haline gelmiştir. Plastik cerrahide yeni bir aşama olarak kabul edilebilecek doku mühendisliği, dokuların hücresel ve moleküler düzeyde değiştirilmesini sağlar.

Doku mühendisliği, mühendislik ve yaşam bilimlerinin prensiplerini birleştirerek; doku fonksiyonlarını iyileştiren, koruyan veya onların yerini alan biyolojik yer tutucuların geliştirilmesine uygulayan disiplinler arası yaklaşım olarak tanımlanabilir. Daar ve Greenwood (2007) ise doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen rejeneratif tıbbi hücre, doku veya organların onarımı, replasmanı veya rejenerasyonu ile ilgilenen bilim dalı olarak tanımlamıştır (64).

Modern anlamda tarihsel gelişimine bakılacak olursa, 20. yüzyılın başlarında Lexer taze kadavradan aldığı allogreftleri eklem rekonstrüksiyonunda kullanarak "doku mühendisliği" kavramını ilk dile getiren araştırmacı olmuştur. Önceleri; yapay doku oluşturma çabası başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Sonraki yıllarda genel anlamda biyomalzeme teknolojisindeki gelişmelerle birlikte tıpta yeni sentetik malzemelerin geliştirilmesi doku mühendisliği uygulamalarına hız vermiştir.

Kıkırdak doku mühendisliği ilk kez 1977 yılında Green tarafından tanımlanmış ve 1980'li yıllarda güncellenmiştir. 1994'te Brittberg ve ark. ilk klinik uygulama sonuçlarını bildirmiştir(17).

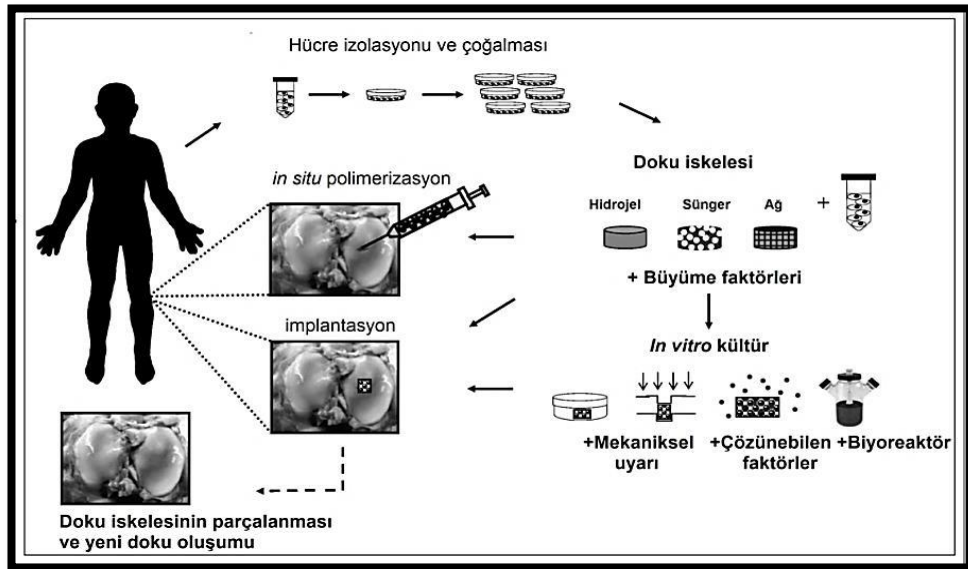
Doku mühendisliğinde temel yaklaşım (Şekil 11); hücreler, skafoldlar, sinyal faktörlerinin tek tek ya da kombine olarak kullanılmasıdır. (50). Kıkırdak dokusunun doku mühendisliği uygulamalarında bu yaklaşımlar kullanılabilir;

1) Yeni izole edilmiş ya da kültürü yapılmış hücrelerin implantasyonu; herhangi bir doku iskelesi kullanmadan hücre gruplarının doğrudan hasarın olduğu bölgeye enjekte edilmesi.

2) In vitro ortamda üretilmiş hücre ve doku iskelesinden oluşan biyohibrid malzemenin implantasyonu; Otolog hücreler ya da allojenik hücreler bir doku iskelesi aracılığıyla hasarlı bölgeye implante edilmesi.

3) Kontrollü ilaç salım sistemleri ile doku mühendisliği teknikleriyle geliştirilen doku iskelerinin birleştirilmesi ve perikondrium etkisiyle kıkırdak doku onarımına gidilmesi.

4) Doku iskelesi-biyosinyal molekülü (büyüme faktörü ve genler) modeli ile sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen doku mühendisliği yaklaşımıyla yeni kıkırdak doku oluşumunun sağlanması.



Şekil 11. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan yaklaşımların şematik gösterilmesi

4.3.1 Kıkırdak doku mühendisliğinde hücre kaynağı

Kıkırdak doku mühendisliği için esas kısıtlayıcı, uygun hücrelerin sağlanmasıdır.

Kondrositler; doğal kıkırdakta bulunduğu ve kıkırdak ESM'indeki rolleri geniş olarak çalışıldığı için en çok tercih edilen hücre kaynağıdır. Kondrositler, yuvarlak bir morfolojide olup tip II kollajen ve sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAGs) gibi ESM moleküllerinin senteziyle karakterizedirler. Matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve doku inhibitör metalloproteinazlarını (TIMPs) içeren anabolik ve katabolik süreçlerin dengesi sayesinde kıkırdak matriksini korur ve yeniden şekillendirir. Kıkırdak onarımında hücre kaynağı olarak kullanılması için bu özelliklerinin korunması önemlidir. Kıkırdak doku mühendisliği için büyük zorluklardan biri de defekt bölgesini doldurmak için yeterli sayıda hücre elde etmektir.

Birçok canlı türünde yapılan deneysel çalışmalarda ekstrasellüler matrikslerinden ayrılan kondrositlerin fenotipik olarak stabiliteilerinin yitirdikleri gözlenmiştir. Tek tabaka halinde inkübe edildiklerinde plak üzerinde düzleşip, yayılıp fibroblast haline geldikleri bilinmektedir. Benya ve ark nın da yaptıkları çalışmada kulak kartilajından elde edilen kondrositlerin tek tabaka halinde inkübe edildiklerinde Tip 2 kollajen sentezinin giderek azaldığını ve Tip 1 kollajen sentezinin arttığını (fibroblastlarda ve bazı andiferansiye mezenşimal hücrelerdeki gibi) gözlemişlerdir(51).

Kondrositleri, doğal ortamlarındaki gibi üç boyutlu yapıda tutmak, hücrelerin doğal özelliklerini korumalarına ve kendi uygun ekstrasellüler matriks içeriklerini sentezlemelerini sağlayabilir. Bonaventure ve ark. tek tabakalı kültürde "dediferansiye" olmuş insan kıkırdak hücrelerinin, tekrar kondrosit fenotipine dönüp tip 2 kollagen ve geniş agregasyonlu proteoglikan sentezleyebildiğini göstermiştir(52). Tek tabakalı kültürde birkaç hücre bölünmesinden sonra bile kondrositlerin, in vivo ortamda tekrar eski fenotiplerine dönebileceği bilinmektedir. Fonksiyonlarının geri dönüşümü yanı sıra biyolojik olarak yıkılabilen hidrojen polimerleri içinde sferik şekillerini geri kazanabilirler ve karakteristik matriks moleküllerini üretebilirler. Agaroz,

aljinat boncuk ve fibrin yapıştırıcı gibi üç boyutlu kültürler artmış aggrekan üretimi ve tip II kollajen salınımı sayesinde kondrosit fenotipini koruyabilirler(53-55).

Kondrositlerin en fazla tutunma oranı ilk 24 saatte gerçekleşmektedir. İmplant edilen hücrelerin dördüncü haftaya kadar ancak %14'ü yaşamakta, sonra sayıca artış göstermektedirler(42). Deneysel çalışmalar kemik morfojenik proteinlerin kondrosit çoğalması ve aramaddede sentezi üzerinde pozitif etkisi olduğunu göstermişse de bu proteinlerin tümör başlatma ve ilerletme potansiyelleri nedeniyle henüz klinik kullanımları mevcut değildir(12).

Kıkırdağın yeniden yapılması, yapılandırılması ve onarımı için hücre tabanlı tedavi yeni değildir. Otolog kondrosit transferi (ACT) klinik olarak hem kraniyofasiyal hem de eklem kıkırdak defektlerinde kullanılmıştır. 1987 den beri, ACT dünya çapında 12,000 den fazla hastada kullanılmıştır. (56). Bu yaklaşım, minimal invaziv bir tarzda hastanın kıkırdağından küçük biyopsiler almayı, alınan dokudan kondrositleri izole etmeyi ve hücreleri in vitro büyütmeyi kapsamaktadır. Bu hücreler daha sonra yeni kıkırdak dokusu üretmek için, periost veya membran altında kıkırdak defekt bölgesine yerleştirilir. Kıkırdak dokusunun düşük hücre yoğunluğundan dolayı ACT'de en önemli sorun; biyopsi sonucu elde edilen hücrelerin az sayıda olmasıdır. Kıkırdak doku mühendisliğinde araştırmalar sonucunda ilerlemeler, yeni teknikler, hücre kaynakları ve biyomateryaller bu sorunların üstesinden gelmek ve onarımın kalitesini artırmak için kullanılmaktadır.

Eklem kıkırdağı; hücresel morfoloji, biyomekanik bileşim ve yapısal özellikler bakımından birbirinden farklı olan tabakalardan oluşmaktadır. Yüzeysel, orta ve derin tabakalardan oluşan anizotropik bir dokudur(57). Her tabaka yapı ve işlevsel olarak çeşitlilik gösterir ve farklı uyarılara cevap vererek farklı proteinler sentezler. Her tabakadan izole edilen kondrositin farklı büyüme oranları, gen ekspresyonu ve biyosentez seviyeleri vardır. Tabakalar arasında derinlik arttıkça GAG ve kollajen salınımında artış gözlenir(58, 59). Bu da derin tabakayı yüzeysel tabakaya kıyasla mekanik özellik bakımından daha sağlam yapar. Tipik olarak, eklem kıkırdak

mühendislik çalışmalarında hayvanlardan homojen hücre karışımlarını kullanır. Bu kondrositler yüksek miktarda ESM sentezler ancak bölgesel organizasyondan eksiktirler. Bu nedenle günümüzde bölgesel organizasyonun sağlayabilmek için çok tabakalı hidrojel ve porlu gradyent skafoldları içeren metotlar araştırılmaktadır.

Aurikular kıkırdak; kulak ve epiglottiste bulunan elastik bir kıkırdaktır. Eklem kıkırdağına kıyasla aurikular kıkırdakta kondrositlerin ikiye katlanma zamanı ve hücre proliferasyonu 4 kat hızlı bulunmuştur(60, 61).

Nazoseptal kıkırdak, kraniyofasiyal ve plastik cerrahi uygulamalarında dikkat çeken hiyalin bir kıkırdaktır. Yetişkin nazal kondrositlerinde yüksek oranlı kollajen II/I ve GAG birikimi olan matriks mevcuttur. Ayrıca, nazal kondrositler tek tabakada eklem kondrositlerden 4 kat daha hızlı prolifer olurlar(62).

Kondrosit kaynaklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, inek nazal, eklem, kostal ve aurikular kondrositleri poli(L-lactide-ε-caprolactone) skafoldlarda 4 hafta büyütüldü. Büyüme oranları ve gen ekspresyonları hücre tipiyle farklılık gösterdiği tespit edildi. Tip II kollajen ve agrekan salınımının en fazla kostal kondrositlerde olduğu ve onu sırasıyla nazoseptal, eklem ve aurikular kondrositlerin takip ettiği görüldü. Aurikular kondrositler en geniş çapa sahipken kostal kondrositlerin en kalınları olduğu görüldü(63).

Kondrojenik potansiyeli olan hücreler de doğru polimer ve uygun koşullar içinde kıkırdak gelişimini sağlayabilir. Örneğin, Mizuno ve ark.(138) demineralize kemik matriksi içeren tip 1 kollajen süngerler üzerine insan dermal fibroblastlarını ekmişler ve tip 2 kollajen içeren kartilaj benzeri doku elde etmişlerdir.

Allojenik veya xenojenik kaynaklı kondrositler de kıkırdak mühendisliği için kullanılabilir. Allojenik veya xenojenik kıkırdakların bütün olarak kullanımı klinik olarak başarılı olmasa da bu kaynaklardan izole edilen kondrositlerden doku mühendisliğinde faydalanılabilir. Ancak bu hücrelerin ekstrasellüler matriksi

uzaklaştırıldığında major histokompatibilite antijenlerinin ekspozite olması ve bunların oluşturacağı immün yanıt araştırıcıların karşısındaki problemlerden biridir. Bunun için taşıyıcı iskeletin; hem kondrositlerin kendi ekstrasellüler matrikslerini oluşturmasını sağlayan hem de immün yanıtı koruyan yapıda olması beklenir.

Fibroblastlar: Cilt, doku mühendisliği için minimal invaziv, göreceli olarak bol fibroblast kaynağı sunar. Kıkırdak defektinde PLA ağ üzerine direkt fibroblast transferinin fibröz doku gelişimiyle sonuçlanmasına rağmen, uygun koşullar altında kültürlendikleri zaman fibroblastlar tekrar kondrositik fenotipe yönlendirilebilirler. Demineralize kemik varlığında ya da laktik asit varlığında cilt fibroblastları agregan ve tip II kollajen gibi kıkırdak özellikli matriks proteinleri üretirler(64).

Kök hücreler: Kök hücreler, pluripotent hücrelerdir, farklılaşma olmaksızın her dokuya dönüşebilmektedir. Değişik koşullarda değişik hücrelere dönüşebilme özelliğine sahiptirler. Bu nedenle klinik denemeleri de çekince oluşturmaktadır. 1998 yılında, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin TGF- β 1 varlığında kültüre edildiğinde kondrogenesis sağladığı bulunmuştur(65). Kondrosite dönüşme potansiyeli olan kök hücreler mezankimal kök hücrelerdir (MKH). MKH'ler kemik iliği, sinovyal membran, epidermis ve adipoz dokudan elde edilebilmektedir. (66-69). Kemik iliğindeki her 105 hücreden biri MKH'dir(70). Kök hücreleri için birinci rezervuar kemik iliği olsa da, periost, kas, fetal kemik iliği, karaciğer ve kan gibi dokularda da kök hücreleri olduğu, yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur.

İnsan, tavuk, tavşan ve köpek mezenşimal kök hücrelerinde (MKH) yapılan birçok çalışmada kontrol altındaki in vitro koşullarda kemik, yağ tendon, kas ve kıkırdak benzeri dokulara farklılaştıkları gözlenmiştir. MKH'ni TGF β , deksametazon, IGF, bFGF gibi kondrojenik bir ortamda kültüre ederek kondrogenesis gerçeleştirilmiştir. Kondrogenesisin delili de ortamda kıkırdak ekstrasellüler matriks elemanlarının ve kondrositlere özel gen ekspresyonlarının saptanmasıdır. Tüm bu bulgular, farklı kaynaklardan gelen hücrelerin kıkırdak mühendisliği için kullanılabileceği fikrinin doğmasına yol açmış ve birçok deneysel çalışmaya yön vermiştir.

Sonuç olarak, kıkırdak doku mühendisliği için uygun hücre kaynağı hala tam olarak tanımlanmamıştır. Kondrositler, fibroblastlar, kök hücreler ve genetik olarak modifiye edilmiş hücreler kıkırdak onarımı için uygulanabilirlik potansiyelleri bakımından halen incelenmektedir. (Tablo 5)

Tablo 5. Hücre Kaynağı

KONDROSİT KAYNAKLARI	KÖK HÜCRE KAYNAKLARI
Perikondrium	Kemik iliği kaynaklı
Artiküler	Adipoz doku kaynaklı
Aurikular	Kas kaynaklı
Kostal	Sinovya kaynaklı
Nasoseptal	Periost kaynaklı
	Embriyonik

4.3.2. Doku Kültürü Teknikleri

Hücre ekimi tekniğiyle yürütülen doku mühendisliği çalışmalarında, kültüre edilen hücrelerin ortamları ne kadar iyi olursa hücrelerin çoğalmaları ve fenotiplerinin süregenliği o kadar iyi korunmaktadır. İki tip kültür tekniği bulunmaktadır(71).

1-Statik (Petri kabında).

2-Dinamik (Biyoreaktörlerde).

Statik Teknik

Bu teknikte, kıkırdak doku alınıp kollajenaz kullanılarak enzimatik ayrıştırmadan sonra, içinde medium, fetal calf serumu, antibiyotik ve büyüme faktörü olan kültür plaklarına konur. Doku kültürü işlemi süresince plaklar vücut ısısındaki (37,2°C) inkübatörlerde bekletilir. Daha sonra hücrelerin ortamları iki veya üç günde bir

değiştirilerek, metabolik artıkların uzaklaştırılması ve besinlerin ortama eklenmesi sağlanır. Bu işlemde hücrelerin plak yüzeyinden ayrılması tripsin ile gerçekleştirilir. Yapılan pasajlarla yeterli hücre elde edilince doku iskelesi ile birleştirilir.

Dinamik Teknik

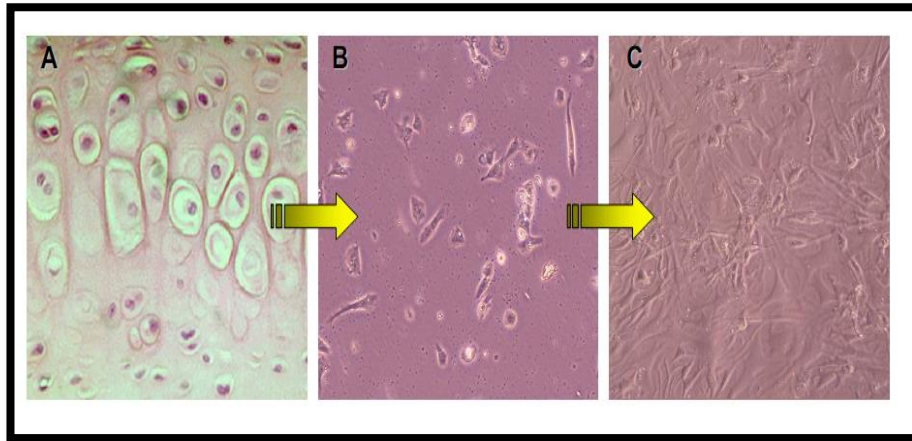
Doku kültürü fizyolojik şartların gerçekleştirildiği biyoreaktörlerde yapılır. Bu amaçla fizyolojik besinleri, sıvıları içeren bilgisayar kontrollü biyoreaktörler geliştirilmiştir. Biyoreaktörlerde mediyumun günde ortalama %50'si yenilenmektedir. Böylece metabolik artıklar daha hızlı uzaklaştırılmış ve yerine besinlerin geçişi hızlandırılmış olur. Biyoreaktörlerin de değişik türleri bulunmaktadır: Spinner flask, mikrotaşyıcılar, perfüzyon kültürleri, dönen duvar biyoreaktörleri(72-74).

Her iki teknikte de, düşük hücre yoğunluğunda hücrelerin büyüme hızı artmaktadır. Ortamda hücre başına düşen besin miktarı azaldıkça hücre daha çok farklılaşmaktadır. Doğal olarak bu sorun statik kültürlerde daha çok görülür. Buna karşın dinamik uygulamaların maliyeti yüksektir ve daha özel laboratuvar donanımı gerektirmektedir (72, 74).

Doku kültüründe elde edilecek hücre sayısı da önemlidir. Hücre ekim yoğunluğu ve tohum ekme metodu, yeterli hücre-hücre etkileşimleri sağlamak için gereken hücrelerin uygun sayısı, dikkatle üzerinde durulması gereken bir durumdur. Bir başka deyişle defekti onarmak için kullanılacak yapay dokuda hücre yoğunluğu ne olmalıdır? Genel olarak önerilen hücre/doku iskelesi oranı $4-10 \times 10^6 / \text{mm}^3$ dür(74). Birçok yaklaşımda agregatlar ya da yüksek yoğunluklarda ekilerek embriyonik kıkırdak gelişimi sırasında hücrelerinin doğal yoğunlaşması taklit edilmeye çalışılır. Daha yüksek başlangıç yoğunluklarında ekim, tahminen bu, hücre-hücre etkileşimleri için, daha fazla ESM sentezini ve çökmesini kolaylaştırma eğilimi yaratır. Sünger ve örgü skafoldlarda, dinamik tohumlama hücresel dağılımı artırabilir, hidrojeller ise eğer hücreler jelasyon sırasında yeterince süspansiyon edilebilirse tipik olarak tek tip hücre dağılımını destekler(75).

4.3.3. De-differansiyasyon olgusu

Kıkırdak hücreleri ortam değişimlerine oldukça duyarlıdır. Özellikle mikroçevrelerinde anlık değişim gen ifadesi düzeyinde kendini gösterir. Vücut içerisinde üç boyutlu ortamda bulunan kıkırdak hücreleri kültür kaplarında çoğaltılmaya başlandığında, kıkırdak hücrelerinin ilk karşılaştığı etki 2 boyutluluktur. İlk andan itibaren yüzeye tutunmak için integrinler aracılığı ile gerekli fokal yapıları oluştururlar. Aynı anda iç sinyaller ile gen ifadenme düzeylerini değiştirerek dedifferansiyasyon döngüsüne girerler. Bu olgu temelde hücrelerin belirli gen ifadeleri kaybederek kıkırdak morfolojisinden fibroblast öncüllerine dönüşümü olarak açıklanabilir. Bu olgu hücrelerin tek tabakalı kültür kapları yerine doku iskelesi kullanılması ile aşılmaktadır. Şekil 12' de bir de-differansiyasyon olgusu verilmiştir.



Şekil 12. A) Doğal dokuda kıkırdak morfolojisi B) Kültür kabına ilk ekim C) Kültür kabında fibroblast benzeri çoğalma davranışı

4.4. KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ

Kıkırdak doku rejenerasyonunda oldukça gözenekli doku iskelelerinin doku mühendisliği yaklaşımıyla kullanılması, diğer tedavi yöntemlerine alternatif olarak söz konusu olmuştur(76). Çok sayıda skafold materyali kıkırdak yenilenmesinde hücre ve/veya biyosinyal, uyarıcı moleküler için taşıyıcı olarak kullanılmaktadır.

Dokunun yapısı ve fonksiyonunun devamlılığı için hücre dışı matriks, ekstrasellüler ağından öneminden bahsedilmiştir. Hücre dışı matriksi taklit ederek, hücrelere ve büyüme faktörlerine yapısal destek sağlayarak, hücrelerin yapışmasını ve üremesini sağlayacak doku iskelesi temel öğelerden biridir. Scaffold yapıları kıkırdak doku üretimi için cazip olan bir üç boyutlu bir ortam sağlar.

Bu da kullanılacak doku iskelesi tipini en az hücre tipi kadar önemli kılar. Buna dayanarak ideal ağı oluşturabilmek için üzerinde çalışılan malzemenin özellikleri Hunziker tarafından özetlenmiştir. Bu özelliklerin beş tanesini elde edebilen araştırmacılar tatmin edici sonuç elde etmiş demektir(71, 77) :

a) Uygun yüzey kimyası: Kondrositler, fonksiyonlarını yerine getirebilmek için bir zemine bağlanmaya gereksinim duyan hücrelerdir. İzolasyonun ardından hücreler polimerik yapıya ekildiklerinde yapıya bağlanmaları gerekmektedir. Bu nedenle polimerin, hücrelerin bağlanması ve aktivite göstermesi için uygun yapıya sahip olması ve bunun için gerekli olan fonksiyonel grupları taşıması gerekmektedir.

b) Porozite: Doku iskelesine ekilen hücrenin ve doku iskelesine yerleştirilen biyosinyal molekülünün yapışabilmesi, migrasyonu; ayrıca metabolik atıkların ve besinlerin taşınması için önemlidir. Porlar arasında bağlantılar olmalıdır. Polimerik iskelet ya da sünger yapısı hazırlanırken uygun teknikler kullanılarak gözenek miktarı ve boyutu ayarlanabilmektedir.

c) Taşıyıcılık: Büyüme faktörü destekli sistemlerde doku iskelesinin bu tip molekülleri kontrollü salabilme özelliğinin olması gerekir.

d) Adezyon: Hücrenin normal biyokimyasal ve salgı fonksiyonlarını oluşturabilmesi için doku iskelesi hücrelerin yapışmasını kolaylaştıracak özellikte olmalıdır.

e) Biyobozunurluk: Doku iskelesi yeniden şekillenme süreci için gerekli olan bozunma özelliğine sahip olmalıdır. Rezorbsiyon süresi kontrol edilebilmelidir. Bozunurken orijinal ağ oluşumuna izin vermelidir. Biyobozunur polimerler, suda çözünebilir formlara dönüşmeden önce vücutta kimyasal tepkime ile değişime uğramaktadır. Parçalanmaları, genellikle uzun bir zaman periyodunda oluşan hidroliz

gibi bir kimyasal tepkime içerdiğinden, daha uzun süreli (birkaç gün–birkaç yıl) etken madde salımı için kullanılmaktadır. Bir biyobozunur polimerlerin vücuttaki değişimleri temel olarak iki yolla olabilmektedir:

Bunlardan birincisi; polimer, -OH, -COOH veya diğer hidratize grupları oluşturmak üzere, vücutta hidrolize uğrayan bir yan zincir gruplarına sahip olmasından dolayı polimerin bozunarak suda çözünebilir hale geçmesidir. İkinci bozunma yolu; Suda çözünebilir bir polimerin, hidroliz olabilen bir çapraz bağlayıcı madde ile çapraz bağlanmasıyla polimer çözünmeyen forma dönüşür. Ancak vücutta bu çapraz bağların hidroliz olmasıyla veya parçalanmasıyla biyobozunma gerçekleşir.

Zamansal ve mekansal olarak degradasyonun kontrol edilmesiyle, skafoldlar yeni doku büyümesini artırabilir ve/veya yönlendirebilir. Ancak, bir denge bulunmalıdır; hızlı bozunma yapısal destek ve şekil korunmasından taviz verirken; yavaş bozunma, yeni kıkırdak ECM üretimini engelleyebilir. Örneğin, Solchaga ve arkadaşları, yaptıkları osteokondral lezyon modelinde daha düşük bozunma oranları olan skafoldlarla büyük kalınlıkta kıkırdak elde edildiğini göstermiş, fakat kırık ve fissürlerin yeni oluşan kıkırdak yüzeyinde belirgin olduğunu görmüşlerdir(78).

f) Hacim Stabilitesi: Kullanılan ağ zamanla şişme veya büzümme gibi hacim değişiklikleri göstermemelidir. Bu durumda yerleştirildiği defektli alanın düzlüğü ve pürüzsüzlüğü kaybolur.

g) Biyouyumluluk: Konak dokuya yerleştirildiği zaman çevre dokuyla bütünleşebilmelidir. Vücut içerisinde hiçbir şekilde reaksiyona girmemeli; dokular için tamamen inert olmalı ve immünolojik tepkiye yol açmamalıdır. Ayrıca parçalanma ürünleri de vücuda zarar vermemeli, toksik etki göstermemelidir. Bu da ancak biyouyumlu malzemelerle sağlanabilir. Greftle konak doku devamlılığı sağlanamazsa bütünleşme elde edilememiş demektir.

h) İnternal Yapışma: Yapay matriks yapısı boşluğa doldurulduğunda internal yapışma özelliği olmazsa boşluktan tekrar dışarı çıkar.

İ) Elastiklik: Doku iskelesinin doğal sertliği de bu açıdan önemlidir. Özellikle eklem yüzüne yerleştirilecekse bir takım kuvvetlere direnebilmesi gerekir. Ek olarak mekanik özellikler açısından konak dokuya benzemelidir.

İ)Cerrahi Tekniğe Uygunluk: Klinik uygulamalarda kullanılacak cerrahi tekniğe uygun olarak sıvı veya katı formda olması istenebilir.

Sayılan bu özellikleri elde edebilme çabası araştırmacıları doğal yada sentetik çok farklı malzemeler üzerinde çalışmaya itmiştir(49).

Kıyırdak mühendisliği için biyoaktif skafoldlar olarak araştırılmış doğal polimerler şunlardır: Aljinat, Agaroş, Fibrin, HA, Kollajen, Jelatin, Kitosan, Kondroitin Sülfat ve Selüloz'dur. **Doğal polimerler**, genellikle, hücre yüzey reseptörleri ile etkileşim yoluyla hücre fonksiyonu düzenler veya yönlendirir. Ancak bu etkileşimle aynı zamanda immün sistem yanıtını stimüle edebilir, böylelikle antijenite ya da materyalle beraber hastalık taşınması şüphesine yol açabilir. Buna ek olarak, doğal polimerler mekanik olarak daha kalitesizdir ve değişken biçimde konak enzimatik yıkımına uğrayabilir(79).

Sentetik polimerler, daha fazla kontrollü ve belirlenebilir özelliktedir; polimerin kimyasal ve fiziksel özellikleri modifiye edilerek mekanik ve degradasyon karakteristikleri değiştirilebilir. Kıyırdak rejenerasyonu için araştırılmış sentetik polimerler: poli (α -hidroksi esterleri), PEG, poli (Hidrofilik), poli (propilen fumaratlar) ve poliüretanlardır. Bununla birlikte, sentetik polimerlerde özellikli olarak birleştirilmedikçe yapışma, hücre sinyali, yönlendirilmiş degradasyon ve matriks remodelingi gibi direk hücre skafold etkileşimlerinin yararı yoktur. Buna ek olarak, yapının degradasyonu ile toksik veya iltihabik bir cevap ortaya çıkarabilirler.

4.4.1.Doğal Polimerlerden Olusan Doku İskeleleri:

Kabaca protein bazlılar ve karbohidrat bazlılar olarak ikiye ayrılabilirler:

4.4.2. Protein bazlı doğal doku iskeleleri

Kollajen ve fibrin yapıları bu amaçla kullanılabilir. Bu tür doku iskeleleri doğal kaynaklı olduğundan hücre yüzey reseptörlerini tanıyan ligandlar taşıyabilirler. Bu durum biyoyumluluk açısından bir avantaj sağlar. Ancak kaynakların sınırlı olması, fabrikasyondaki zorluklar, immun cevap, allogreftten taşınabilecek hastalıklar ve bozunma hızının değişiklik göstermesi karşılaşılan sorunların başında gelir.

Kollajen: Bu alanda kullanılan malzemelerin başında kollajen gelir. Kollajen, en eski olmanın yanında üzerinde en çok çalışılan protein yapısındaki polimerlerdendir.

Wakitani ve arkadaşları kollajen jeller içerisine kondrosit ekimi yapmışlar ve 6 hafta sonunda farklılaşmış fenotipin devam ettiğini ve GAG sentezini gözlemlemişlerdir(80). Kollajen matriksler tavşanlarda hasarlı bölgeye implante edildiğinde yeterli hiyalin kıkırdak doku oluşturduğu saptanmış, ancak yeterli mekanik dayanım sağlanamamıştır. Nehrer ve ark. yapmış oldukları in vitro çalışmada, Tip 1 kollajen ağı ile Tip 2 kollajen ağı karşılaştırmışlardır. Her iki ağa da kondrositleri ekmişlerdir. İki haftalık süre sonunda Tip 2 kollajenden yapılan ağda kondrosit morfolojisi korunmuş, DNA içeriği artmış, glikozaminoglikan yapımı da daha fazla olmuştur(81).

Jelatin: Basitçe denatüre kollajen diyebileceğimiz jelatin çeşitli doku mühendisliği çalışmalarında denenen bir başka proteindir. Jelatin, kondrositleri bir arada tutan ve yapısal direncinin en önemli sağlayıcısı olan doku matriks elemanı olan kollajenin denatüre halidir. Biyoyumlu olduğu bilinen Jelatin, bazı potansiyel difüzyon sınırlamaları mevcut olsa bile kondrositleri desteklemesi ve görünür ışıkta çapraz bağlanması için modifiye edilebilir. Ayrıca jelatin yapılı yapay matriksler, kondrositlerin çoğalmasını, yuvarlak morfoloji almasını ve kıkırdak matriks moleküllerinin ekspresyonu ile proteoglikanların artmış uzaysal birikimini ve tip II kollajen sürekli ekspresyonunu teşvik eder(82).

Fibrin: Fibrinojen ve tromboninin polimerizasyonu sonucu oluşan doğal bir polimerdir ve bir yara yapıştırıcı kadar iyi biyoyumluluk gösterir. Fibrin mekanik olarak kuvvetli olmamasına rağmen ekstra-vasküler kompartmanda yara iyileşmesi temel yardımcılarından. Bu temel bilgilere dayanarak birçok araştırmacı fibrini boş olarak, hücre ile yada büyüme faktörü ile birlikte değişik doku mühendisliği uygulamalarında kullanmışlar ve kırık doku mühendisliği için de uygun olabileceğini ifade etmişlerdir(83, 84). Bağlayıcı integrin yoluyla hücre-matriks etkileşimlerini kolaylaştırabilir(85). Fibrin yapıştırıcı da poliüretan gibi diğer polimerler ile bir araya getirilerek hücre ekim viyabilitesi ve dağıtımını geliştirilmiş, agregan ve tip II kollajen ekspresyonunu arttırılmıştır(86). Atlarla yapılan çalışmalarda, hasarlı bölgede yüksek oranda kollajen II ve GAG içeren hiyalin doku oluşumu gözlenmiştir(76). Ancak fibrin bozunma ürünlerinin, fizyolojik yapılar olmalarına rağmen immün cevaba neden olduğuna dair çalışmalar mevcuttur(87). Ayrıca bu malzemenin yapısal kararlılığı da yoktur.

4.4.3. Karbohidrat Bazlı Polimerler

Agaroz: Temelde galaktoz içeren ve Asya deniz yosunlarından elde edilen lineer polisakkarit yapısında bir polimerdir. İnert oluşu ve mekanik olarak in vitro iyi sonuçlar alınmasıyla kabul gören bir polimerdir. Kompresyon sırasında, mekanik kuvvetlerin iletilmesi ile oluşan deformasyonel yüklenme sonucu kondrosit cevabıyla ilgili yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılır(88). Ancak memelilerde bu polimeri yıkacak sistemlerin yetersiz oluşu degradasyon sorununu birlikte getirmiştir(89).

Aljinat: Aljinat, kahverengi alglerde bulunan polianyonik bir polimerdir ve iyonik olarak kararlı çapraz bağlanmış jeller oluşturmak için iki değerli katyonlar ile çapraz bağlanabilir. Yapılan in vitro çalışmalarda aljinat jelin kırık doku mühendisliğine uygun bir polimer olduğu bildirilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin bu polimere ekildiğinde kondrosite farklılaştığı gözlenmiştir(90). Buna karşın yapılan in vivo çalışmalarda, yabancı cisim dev hücrelerle karakterize immün reaksiyon oluşturduğu bildirilmiştir(91).

Aljinat boncuklar ve hidrojeller, kondrositleri arttırmak ve kök hücre diferansiyasyonunu indüklemek için kullanılmıştır. Yakın geçmişte, araştırmacılar hibrid skafoldlar yapmak için sentetik adezyon peptidlerini aljinat jellerle ya da başka malzemeler ile aljinatı bir araya getirerek modifiye etmişlerdir(92, 93).

Hyaluronik Asit: Kıkırdak doku rejenerasyonu için kullanılan bir başka polimer olan Hyaluronik Asit (HA) eklem kartilaj ağının karbohidrat yapısındaki lineer yapıda doğal bir bileşenidir. HA hücre proliferasyonu, morfolojileri, enflamasyon ve yara tamiri gibi hücresel süreçlerde önemli bir rol oynar. Hücre ile skafold etkileşimlerinde Hyaluronik asit (CD44, CD54 ve CD168 molekülleri ile) hücre yüzeyi reseptörü görevi yaparak biyoaktif bir skafold gibi işlev görebilir. Kıkırdak dokuda agregan oluşumu sırasında, Keratin Sülfat ve Kondroitin Sülfatın bağlandığı kor molekül olarak işlev görür ve öncelikle vücutta bulunan Hyaluronidaz molekülleriyle yıkılarak atılırlar. Orijinal haliyle implante edilebildiğinde oldukça biyouyumlu bir moleküldür. Hyaluronik asitin farklı kimyasal yapıda daha stabil formlarının geliştirilmesine ihtiyaç vardır(94). Stabil bir ağ olabilmesi için fotopolimerizasyonda HA, metakrilat grupları ile modifiye edilebilir, böylece moleküler ağırlığı ve konsantrasyonunun değiştirilmesi ile geniş bir özellik yelpazesi elde eder. Artmış makromer konsantrasyonları sayesinde, şişme oranları ve hücre viabilitesi düşerken, ağ yapısının kompresif modülü ve molekülün yıkım süresi belirgin olarak artar(91). Skafold özelliklerindeki bu varyasyonlar auriküler kondrositlerin *in vivo* neokartilaj oluşturmada etkili olmuştur(95). Liu ve ark yeni bir *in vivo* tavşan defekti modelinde, MKH ekilmiş HA-jelatin hidrojeller kullanarak onarım kalitesini araştırmışlardır. Yalnız MKH 'lerin kullanıldığı defektlerde periferik kartilaj defekt alanında hiyalin benzeri kıkırdak ve ortada fibröz onarım görülürken; skafold ve MSC ile onarım uygulanan defektlerde, çevre kıkırdak doku ile iyi bütünleşmiş, zonal mimariye uygun ve elastik, saydam ve sağlam bir kıkırdak doku oluşumu izlenmiştir(96).

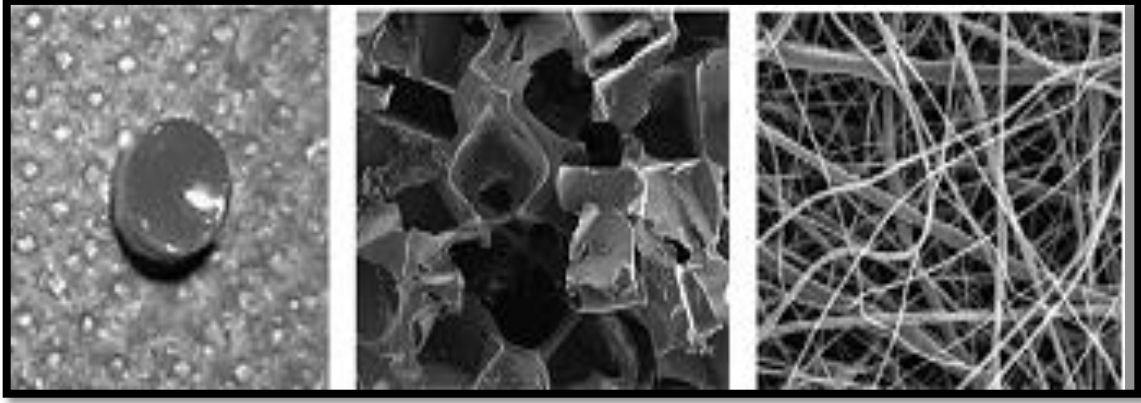
Kitosan: Kabuklu deniz hayvanları, artropodların dış yüzeyinde bulunan kitinden elde edilen doku mühendisliğinin değişik alanlarında denenmekte olan bir biyosentetik polisakarit türevi polimerdir. Moleküler yapısı hyaluronik asit ve glukozaminoglikana benzer. Fizyolojik sıcaklıklarda jel ve oda sıcaklığında sıvı halde olan, bu yarı kristalin polimer, iyi biyouyumluluk, düşük toksisite ve biyobozunurluk

gibi olumlu özellikleri nedeniyle son yıllarda biyomedikal ve ilaç alanında kitosan kullanımını artırmıştır. Kitosan lizozomlar tarafından *in vivo* bozunabilir, GF (Büyüme faktörleri) ve adezyon proteinleri ile etkileşime girebilir. Buna ek olarak mekanik özelliklerini artırmak için, kitosan veya kitosan türevlerini iyonik veya kovalent olarak çapraz bağlamak için bir dizi yöntem kullanılmıştır. Kitosan hibrid hidrojel iki boyutlu ve üç boyutlu kültürlerinde normal kondrosit fenotipini destekler(97). Su çekim özelliği olan bu polimerin yapılan *in vitro* çalışmalarda kondrositlerin yapışması için çok uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 6. Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanılan Doku İskeleleri

DOĞAL POLİMERLER	PROTEİN BAZLI POLİMERLER
Agaroz	Fibrin
Aljinat	Kollajen
Selüloz	Jelatin
Kollajen	Laminin
Kitosan	KARBONHİDRAT BAZLI POLİMERLER
Kondroitin Sülfat	Polilaktik Asit
Fibrin Glue	Poliglikolik Asit
Jelatin	Hyaluronik Asit
Hyaluronik Asit	Agaroz
İpek Fibroin	Aljinat
SENTETİK POLİMERLER	Kitosan
Poli(α hidroksi ester)	ENJEKTABL POLİMERLER
Poli(etilen glikol)	Aljinat
Poli(NiPAAm)	Kollajen
Polipropilen fumarat	Fibrin
Poliüretan	Hyaluronik Asit
Polivinil alkol	Poli(etilen glikol)

Skafoldlar, kıkırdak doku mühendisliği için hidrojel, sünger ve fibröz mesh yapısında kullanılabilir(98).(Şekil 13)



Şekil 13.Çeşitli skafold yapıları: a) Hidrojeller, b)Süngerler, c)Meşler

4.4.4. Hidrojel yapısındaki doku iskeleleri

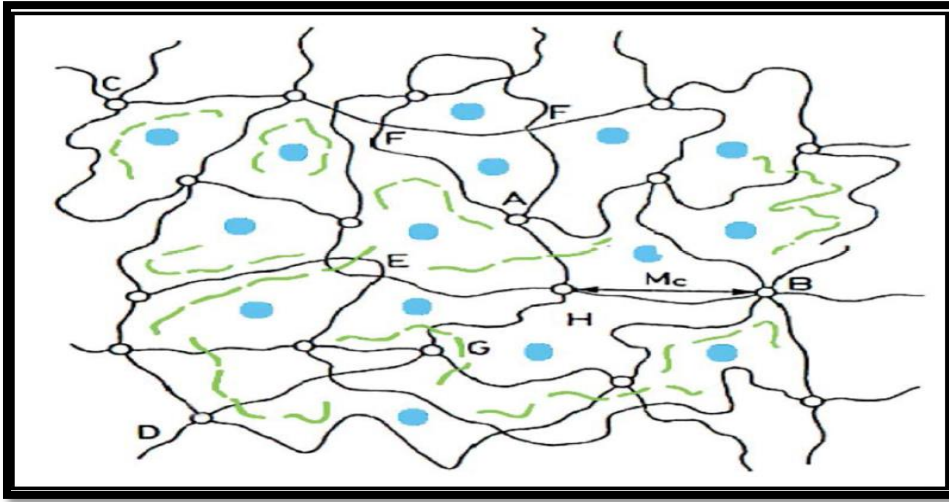
Su içerisinde çözünmeden şişebilme özelliğine sahip, çapraz bağlı, üç boyutlu ağ yapılı polimerler olan hidrojeller kontrollü salınım sistemi olarak da, doku iskelesi olarak da kullanılabilirler (99). Su içeriği kendi kütlesinin %100'ünden fazla olan hidrojellere de süper absorbant; su dışında çözücülerde en az %20 veya daha fazla şişebilen jeller ise kserojel olarak adlandırılır.

Yapılarında çok fazla miktarda su bulundurma, yumuşak ve esnek olma gibi birçok fiziksel özelliklerden dolayı hidrojeller, canlı dokularla büyük bir benzerlik gösterirler ve doku iskelesi olarak sıklıkla kullanılırlar. Hidrojeller, kolayca herhangi bir boyut ve şekildeki defektleri dolduran enjektabl skafoldlar olarak kullanılabilir ve minimal invaziv bir prosedürle implante edilebilir niteliktedir. Yuvarlak morfolojiyi koruyarak tipik kondrositik fenotipi indükleyebilirler. Hücrelere mekanik yükleri ileterek kontrollü kuvvet uygulama yeteneğine sahiptirler(99).

Üç boyutta çapraz bağlanmalarla oluşan ağ yapısındaki bağlar kovalent ya da iyoniktir. Bir polimerin hidrojel özelliği gösterebilmesi için ana zincirinde ya da yan dallarında hidroksil, karboksil, karbonil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğine sahip grupların bulunması gerekir. Bu gruplardan dolayı bağlı duruma

geçen su nedeniyle çapraz bağlı polimer hacim ve kütle artışıyla şişmeye başlar(100, 101). Kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla hidrojellerin üç boyutlu yapısı gerçekleşir. Fiziksel çapraz bağlı jellerin dış çevre değişimine fazlaca duyarlı oldukları bilinmektedir (102). Fotopolimerizasyon, ultraviyole veya görünür ışık kullanılarak hidrojellerde kullanılan kimyasal çapraz bağ yöntemidir ve polimerizasyon üzerine mekânsal ve zamansal kontrolle homojen bir hücre ekimi sağlar(103). Fotobaşlatıcı koşulların dikkatli görüntülenmesi bu çapraz bağlanmış ağlar içinde hücre canlılığını optimize etmeyi sağlar.

Bir hidrojinin çapraz bağlı yapısı Şekil 14'de verilmiştir(100, 101)



Şekil 14. Çapraz bağlı hidrojinin yapısı.

A: Dört fonksiyonlu çapraz bağlar, B: Çok fonksiyonlu çapraz bağlar, C-D: Zincir uçları, E: Dolaşmış ve birbirine karışmış polimer zincirler, F: İki zincir takılması, G: Çapraz bağlanmamış küçük zincirler, Mc: İki çapraz

Hidrojeller son zamanlarda doku mühendisliğinde, özellikle enjekte edilebilir formlarda kullanılan malzemelerdir. Kıkırdak doku çalışmalarında en çok kullanılanlarının başında Pluronics® (blok kopolimer; polietilenglikopolipropilen), kollajen, fibrin glue ve Matrigel™ gelir. Bu malzemeler toksisite sorunu nedeniyle kimyasal yerine fiziksel olarak çapraz bağlanmaktadır. Ancak bu yöntemler malzemenin mekanik dayanımını azaltmakta ve kullanım alanlarını kısıtlamaktadır.

Hidrojeller çok iyi su tutabilme ve sulu ortamda şişebilme yeteneklerinden dolayı biyoteknoloji, biyomühendislik, biyomedikal, eczacılık, tarım, veterinerlik, yiyecek endüstrisi gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyomateryal özelliğe sahip hidrojeller, tıp, eczacılık, veterinerlik gibi alanlarda; kontrollü salınım sistemleri, yapay organ yapımı, kontakt lens yapımı, enzim immobilizasyon sistemleri, ilaç taşıyıcı sistemler, kemik hastalıkları tedavisi için materyal, sentetik kıkırdak, yara örtüleri, ameliyat ipliği ve buna benzer pek çok uygulamada etkin olarak kullanılırlar.

4.4.5. Süngerler

Poröz skafoldlar yapılardır. Por boyutu ve bağlantıları hücre infiltrasyonu ve göçü, matriks birikimi, dağılımı ve besin, atık alışverişinde etkilidir. Porozite kavramı ise, hücre yapışması için yüzey alanını belirler. Bugüne kadar, porojen süzdürme, dondurarak kurutma, gaz ile köpüklenme gibi çeşitli yöntemler de dahil olmak üzere, süngerleri üretmek için kullanılmıştır. Bu üretim yöntemleri doku formasyonunu etkileyerek skafoldun mimarisini değiştirir ve GF 'lerin enkapsülasyonu için kullanılabilir.

Poli (α -hidroksi esterler), poliglaktin/poly-dioksanon, kitosan, ipek fibroin, HA, kollajen ve jelatin dahil olmak üzere çok sayıda malzeme sünger skafoldlar imal etmek için kullanılmıştır.

4.4.6. Meşler

Meşler; boşluk hacmi, lif çapı ve yönelmesinde farklılıklar ile hücre davranışını belirleyen dokunmuş veya dokunmamış liflerden oluşan ağlardır. Dokunmamış meşler; geniş boş hacmi ve yüzey alanı sayesinde hücre rejenerasyonunu daha rahat sağlarken, dokunmuş meşler daha sağlamdır. Genel olarak, bu prefabrik formlar mekanik olarak stabil bir skafold oluşturmak için hücreler ile in vitro kültürlenebilir ve daha sonra tam bir onarım için in vivo implante edilir. Prefabrik skafoldların dezavantajı düzensiz şekilli-kusurlarını doldurmadaki zorluktur ve çevreleyen kıkırdak

ile eksik iletişim tam entegrasyonu engelleyebilmektedir(104). Üç boyutlu fiber birikimi, düzenlenmiş desenler ile skafoldları oluşturmak için kullanılan bir tekniktir.

En sık kullanılan meşler poli(α -hidroksi ester)'leridir. Bu meşler 1990'lardan beri kullanılmaktadır. Bunların içinde en iyi bilinenleri PLA, PGA ve kopolimer olan PLGA'dır. PGA bu grubun en hidrofilik olanı olup, tamamen doğal yollardan metabolize olabilmektedir. Diğer taraftan PLA ise yapında metil grubu olduğundan hidrofobiktir ve geç metabolize olur. PGA ve PLA'nın kopolimeri olan PLGA ise mekanik ve metabolize olma bakımından en iyisidir. Shin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kopolimer içine PGA ve PLA %50'li %50 katıldığında yıkımın daha hızlı olduğunu ama PGA'nın %75 ve PLA'nın %25 katıldığında ise yıkımın yavaşladığını göstermişlerdir(105).

4.5. KIKIRDAK DOKU REJENERASYONUNDA BİYOSİNYAL MOLEKÜLLERİ

Tablo 7.Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan Biyosinyal molekülleri

BüyümeFaktörü/Sitokin	Düzenleyici Etki
TGF- β 1, BMP 7	Progenitör hücrelerin kondrojenik farklılaşması
TGF- β 1, IGF-1, FGF, BMP 4,7, EGF	Kondrosit proliferasyonu
TGF- β 1, BMP-2, 4, 6, 7, IGF-1,EGF	Matriks sentezi
TGF- β 1, IGF-1, BMP 7, IL-4, 6	Matriks metalloproteinaz (MMP) inhibisyonu
TGF- β 1, FGF	İnflamatuar hücrelerin hareketi
TGF- β 1, BMP-2, FGF, PDGF, EGF	Osteokondral organizasyon
FGF, PDGF, IL-1 β , 17, 18, TNF- α	MMP aktivasyonu
BMP-2, FGF, PDGF, EGF, IL-1 β , TNF- α	Matriks degradasyonu

Embriyonik gelişim sırasında, doku onarımında rol oynayan bu polipeptit yapısındaki kritik sinyal molekülleri; hücre bölünmesini teşvik eden mitojenler, proliferasyonu uyaran ve farklı fonksiyonları da olan büyüme faktörleri ve doku tiplerinin oluşumunu sağlayan morfojenler; olarak sınıflandırılabilir.

Kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında biyosinyal molekülü olarak kullanılan sitokinler ve büyüme faktörleri, önemli düzenleyici etkileri ile Tablo 7' de özetlenmiştir.

Büyüme faktörleri, molekül ağırlıkları 4000-60000 Da arasında değişen, çok az miktarları bile hücresel aktiviteleri etkileyebilen biyolojik olarak aktif doğal polipeptid hormonlardır (106). Stanley Cohen, 1974 yılında "büyüme faktörü" terimini, ilk defa, çözülebilir olan, T lenfositler ve makrofajlar tarafından üretilen bir madde için kullanmıştır(107). Bunlar, hücre proliferasyonunu, kemotaksisini ve matriks sentezi gibi anahtar hücresel olayları, özgün reseptörlerine bağlanarak düzenlerler (108).

Doku iskeleleri gibi, perikondrial hücrelerin yuvalanabileceği destek biyomateryalleri ile hücre büyümesinin lokal etkili büyüme hormonları ile sinyallenmesine olanak tanıyan kontrollü salım teknolojileri kıkırdak doku mühendisliğinin çarpıcı gelişmelerindedir. Büyüme faktörleri ve diğer katkı maddeleri, hücre differansiyasyonu ve doku oluşumu kontrol için in vitro kültür ortamına ya da in vivo verilebilmesi için yapılara dahil edilerek eklendiği bir çok çalışmanın olumlu sonuçları literatürde göze çarpmaktadır. Düzgün gelişen bir kondrogenез süreci için bu biyoaktif moleküllerin sekans şeklinde ortamda bulunmalarına ihtiyaç vardır. Bir çok biyoaktif molekülün birarada kullanımı ile ortaya çıkan sinerjistik etkiyle, kondrogenезin aktif şekilde uyarıldığına dair çalışmaların olumlu sonuçları mevcuttur (109).

Kıkırdak rejenerasyonu üzerinde etkili olduğu bilinen biyoaktif moleküller TGF- β , FGF, EGF, BMP ailesi ve IGF gibi bir dizi büyüme faktörü; bağımsız veya sinerjistik olarak, hücre tipi ve kültür koşullarına bağlı olarak araştırılmıştır (118).

Bu bölümde kıkırdak rejenerasyonunda etkili olan büyüme faktörleri ile ilgili genel bilgi verilecek, ardından çalışmamızda kullandığımız rhBMP 7 ve EGF moleküllerinin kondrogeneze etkileri literatür eşliğinde anlatılacaktır.

4.6.1. Fibroblast Growth Faktör (Fibroblast growth factor, FGF)

Fibroblast büyüme faktörleri, osteokondral gelişme sürecinde önemli düzenleyici rollere sahip, 35 kDa ağırlığında proteinlerdir. Hem asidik (FGF1) hem de bazik (FGF2) olmak üzere iki tip FGF tanımlanmıştır. FGF2 1974 yılında karakterize edilmiştir (110).

İnvitro çalışmalarda, özellikle FGF 2' nin, osteoblast ve kondroblast hücreleri üzerinde mitojenik etkilerinin olduğu dikkati çekmektedir. Ayrıca, kondrosit farklılaşmasının çeşitli aşamalarında da etki gösterirler. Kondrogenez sırasında kondrositlerin tek tabaka haline genişlemesini ve çoğalmasını arttırır, bu sayede ESM birikimi artarken ve iyileşme de hızlanmış olur. Hücrelerin hipertropik fenotipe farklılaşmasında kuvvetli bir baskılayıcı faktör olduğu da unutulmamalıdır(153,154).

Isogai ve ark. doku iskelesi üzerine implante edilmiş kondrositlerde FGF 2 nin, yavaş salınımının kulak kartilajı gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmış ve olumlu sonuçları bildirilmiştir. (111) .

4.6.2. İnsülin benzeri büyüme faktörleri(IGF)

İzole edilmiş büyüme hormonuna (GH) bağımlı büyüme faktörü, kıkırdakta sülfat bileşimini artırmasından dolayı ilk kez 1957'de Salmon ve Daughaday

tarafından sülfasyon faktörü olarak tanımlanmıştır (112). 1978'de insülin benzeri yapısal özellikleri nedeniyle bu peptidler Insulin-Like Growth Factors (IGF)-İnsülin benzeri büyüme faktörleri olarak adlandırılmıştır (113).IGF 1 molekülünün kıkırdak dokuda proteoglikanların üretimi ve Tip 2 kollajene dönüşümündeki anabolik metabolizmada görev almakta olduğu bildirilmiştir.

4.6.3. Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta (TGF β)

Araştırmalar sonucunda, TGF β ailesi üyelerinin kıkırdak doku gelişiminde majör rol oynadığı gösterilmiştir. Kollajen sentezinin en güçlü uyarıcısı olarak kabul edilen TGF β molekülünün, in vitro ve in vivo ortamlarda kondrojenik farklılaşmayı indüklediği bilinmekte ve sıklıkla çalışmalarda kullanılmaktadır.

TGF β matriks moleküllerinin ekspresyonunu düzenler. Fibroblastlarca fibronektin ve proteoglikan, kollajen ve tenaskin sentezini; keratinositlerce de fibronektin sentezini uyarır. Önemli bir etkisi de matriks moleküllerini degrade eden proteazlara karşı bunların inhibitörlerinin üretimini uyarmasıdır. Matriksi organize edebilme özelliği nedeni ile remodelling olayında görev yapar. Böylece proteazların matriks moleküllerini degrade ederek yapının stabilitesini ve bütünlüğünü bozmasına karşı dokuyu korumaktadır (114)

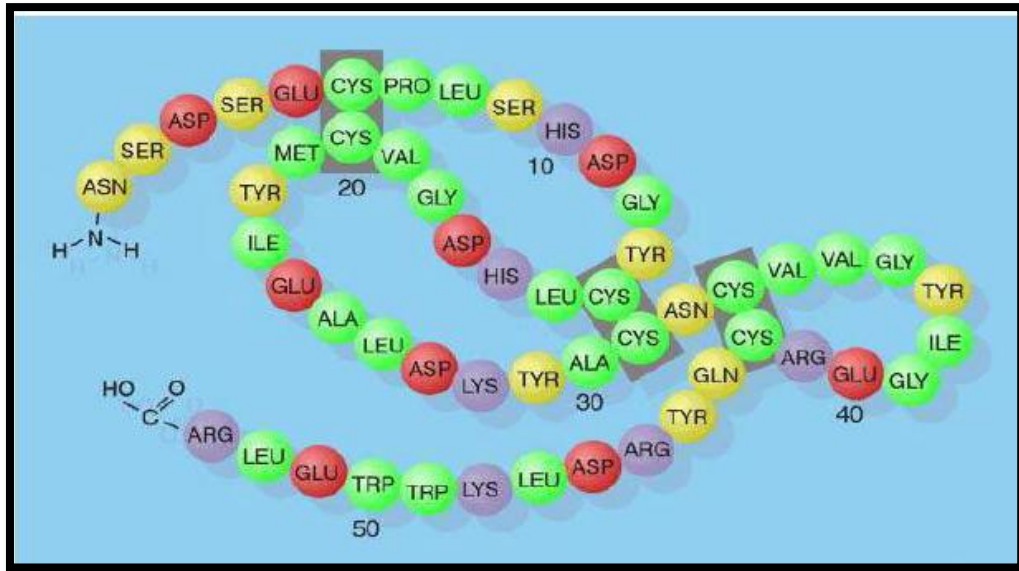
TGF β süper ailesi çok sayıda büyüme faktörü içermektedir. Bunların içinden TGF β 1 ve TGF β 2 kondrositlerin olgunlaşmasını ve çoğalmasını uyarmaktadır. Ayrıca vasküler invazyonu ve tümör oluşumunu önleyerek dokuyu korumaktadır(152).

4.6.4. Epidermal Growth Faktör(EGF)

Epidermal Growth Faktör (EGF) ilk olarak 1962 yılında Cohen tarafından bulunmuş, ürogastron ile idantik bir polipeptittir. Cohen, erkek farelerin submandibular tükürük bezlerinde Sinir Büyüme Faktörünü (NGF) izole etmeye

çalışırken bu bezlerden elde ettiği salgının yeni doğan farelere enjekte edildiğinde, erken diş sürmesi ve erken gözkapığı açılışına neden olduğunu gözleyerek etken maddeyi izole etmiş ve bu maddeye epidermin gelişimini hızlandırıcı etkisinden dolayı Epidermal Growth Factor (EGF) adını vermiştir(115).

Epidermal büyüme faktörü, 53 aminoasitten oluşmuş 6000 Da moleküler ağırlığında tek zincirli bir polipeptittir (116). Molekülün bir ucu $-NH_2$ grubu, diğer ucu ise $-COOH$ grubu ile sonlanmaktadır. Polipeptit, 6 sistein köküne sahiptir ve 3 tane disülfid bağı içerir. Bu disülfid bağları sayesinde intramoleküler yapı belirlenir ve biyolojik etkinlik sağlanabilir.(Şekil 15)



Şekil 15. EGF'nin yapısı (Das 1982) (gri hat: disülfid bağları)

EGF'ün ilk saptanan etkileri epitelizasyona ve keratinizasyona yol açmasıdır. Daha sonra yapılan detaylı araştırmalarda EGF'ün etki mekanizmaları daha da detaylı anlaşılmıştır. EGF, epidermal ve mezodermal hücre proliferasyonunu stimüle etmektedir ve bunu da hücre içi basamaklarda membran kaynaklı reseptörler ve ligandlar üzerinden gerçekleştirmektedir. Epidermal growth faktörün reseptörüne bağlanması tirozin kinazı aktive eder; fibronektin, hyalüronik asit gibi ekstrasellüler matriks moleküllerinin salgılanmasına ve kontakt inhibisyonun olmadığı hücrelerin çoğalmasına neden olan DNA sentezini uyarır. Epidermal büyüme faktörü, başlıca fibroblastlar ve epitelial hücreler olmak üzere birçok hücre tipinde mitojenik etki ile

proliferasyonu uyarıcı role sahiptir. Etkili olduğu hücrelerde iyon alınımını, glikolizisi, DNA ve RNA ile protein yapımını arttırıcı özellik gösterir. Ekstrasellüler matrikste yer alan fibronektin, kollajenler, laminin ve glikozaminoglikanlar gibi proteinlerin sentez ve dönüşümünü etkiler.

Kondrosit proliferasyonunu arttırarak, kondrogenezi tetikler. Kartilaj matriks sentezini uyarırken, katabolik degradasyonu inhibe eder. Ayrıca kondrositlerin fizyolojik koşullarda dizilimi ve ESM kompozisyonunun en önemli düzenleyicilerindendir.

4.6.5. Kemik Morfojenik Proteinler

Kemik morfojenik proteinler (BMP), Transforming büyüme faktörü (TGF) büyük ailesinin bir üyesi olarak organizmada bir çok gelişimsel ve organogenetik süreç içinde yer almaktadır ve bu biyomoleküllerin kırık doku gelişiminde anahtar rol oynadıkları belirlenmiştir (117).

Kemik Morfojenik Protein kavramı ilk kez 1965'de Urist tarafından ortaya atılmıştır. Urist ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemik doku yenilenmesinden aktif bir protein-matriks topluluğunun sorumlu olduğunu ortaya koymuştur (118). Diğer adı osteojenik protein olan bu biyomoleküllerin daha sonra 80'li ve 90'lı yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkması ve gelişmesi ile rekombinant olarak üretilmeleri sağlanmıştır(119). 2002 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan iki farklı BMP ürünü medikal marketlerde yerini almıştır. Bu ürünler rekombinant insan kemik morfojenik proteini-2 (rhBMP2) ve rekombinant insan kemik morfojenik proteini-7 (rhBMP7)'dir (120). Rekombinant BMP'ler ile literatürde çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. Özellikle bu çalışmalar osteokondral defektler, omurga cerrahisi ve kırık iyileşmesi konularında toplanmıştır (120).

4.6.5.1. Kemik morfojenik proteinlerin yapısal özellikleri

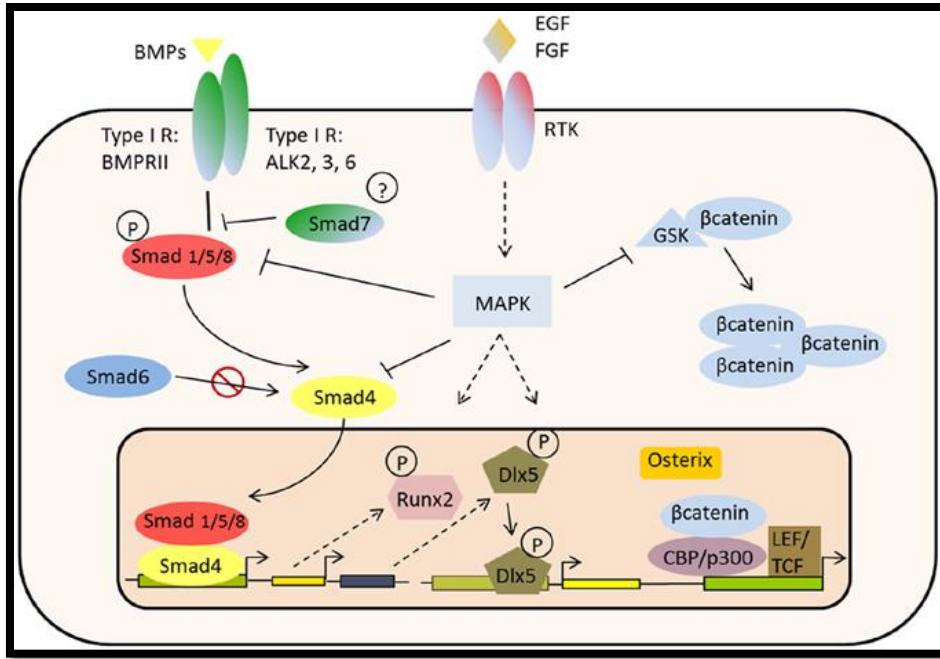
BMP 1 hariç tüm kemik morfojenik proteinler TGF β süper ailesinin bir üyesidir ve aralarında birçok yapısal türdeşlik bulunur. Aminoasit dizilimleri korunaklıdır ve tüm aile üyeleri gibi öncü molekülden sentezlenir.

Yapıları homo ve heterodimer yapılarının disulfid bağları ile birbirine bağlanmasından oluşmuştur. Bu homodimer ve heterodimer yapıları biyolojik olarak aktif konformasyonda bulunurlar. Kemik morfojenik proteinlerdeki aktif dimer formasyonu moleküller arası bir bağ ve 6 adet molekül içi disulfid bağları ile bir araya gelen yedi sistein molekülü ile oluşur (120) .

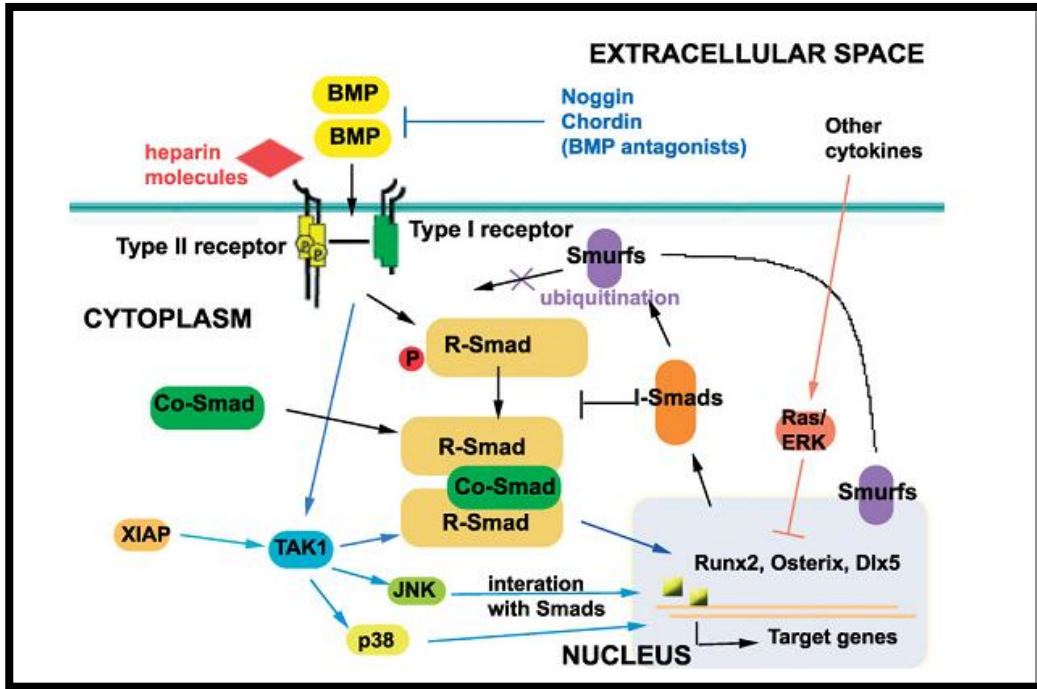
Tüm aile üyeleri gibi, hücre yüzeyindeki serin-treonin kinaz reseptörlerine bağlanarak; hücre içi metabolik aktivitelerin ve çok çeşitli metabolik yolların aktive olması sağlanır. Böylece hücre çoğalması ve farklılaşması tetiklenmiş olur. BMP'lerin sinyalizasyon yolağı Şekil 16'da verilmiştir.

Hücre yüzeyinde TGF β süper ailesi için Tip I, Tip II ,Tip III olmak üzere 3 çeşit reseptör bulunmaktadır. Bunlardan sadece Tip I ve Tip II, kemik morfojenik proteinlerin bağlanmasında ve aktivasyonunda ve sinyalizasyonda etkilidir (121) ,(122)

Bir sinyal, hücrede sitosol içerisinde dönüştürüldüğü anda, doğrudan nukleus içerisine aktarılır. Smad ailesinin üyeleri doğrudan tip I reseptörüne bağlanır ve onu fosforile eder. Aktif haldeki bir Smad üyesi reseptör kompleksinden ayrılarak diğer Smad üyeleri ile oligomerize olur ve nukleus içlerine göç eder. Smad ailesi bu göçten sonra genomdaki özel bölgelere bağlanarak gen aktivitesini düzenler. BMP reseptörleri Smad1, Smad5 veya Smad8'i fosforile ederler (Şekil 17). BMP sinyal aktarımı düzenlenmesinde sadece Smad ailesi sorumlu değildir. Hay ve ark. yaptıkları çalışmalarda protein kinaz C'nin BMP 2'nin indüklediği osteoblastlardaki apoptoz olayında temel rol oynadığını bulmuşlardır(123).



Şekil 16 BMP'lerin sinyalizasyon yolağı



Şekil 17 :Kemik morfojenik proteinlerin etki mekanizmaları

Kemik morfojenik protein kodlanmasından ve sinyalizasyonundan bu güne kadar 20 kadar genin sorumlu olduğu ortaya çıkarılmıştır (124).

Kemik morfojenik proteinler alt ailesi 10 'dan fazla protein grubu içerir. BMP'ler ve bunların reseptörleri, karmaşık ve birbiriyle çakışan bir şekilde eksprese edildiğinden her bir genin özgül islevi maskelenir(124). Tablo 8 'de insanda tanımlanan kemik morfojenik proteinler ve belirlenen temel fizyolojik rolleri verilmiştir. Genel olarak kemik ve kıkırdak gelişiminde rol oynasalar da, tablodan da görülebildiği gibi, çok çeşitli fizyolojik olaylarda rol oynadıkları ortaya konulmuştur (167-175)

BMP' lerin embriyonik ve doğum sonrası dönemde birçok dokuda var oldukları belirlenmiştir. Embriyolojik yaşam sürecinde hedef organları farklılaşmamış perivasküler bağ dokusu hücreleriyken, erişkin dönemde hedef farklılaşmış hücrelerdir. Hem kemik, hem kıkırdak gelişimi üzerinde önemli düzenleyici etkilere sahip olan bu moleküllerin, bu etkileri özellikle kök hücrelerde, progenitör perikondrial hücrelerde ve hücrelerin çoğalmasını indükleyen biyolojik reaksiyonların aktivasyonunda görülmektedir (124) .

BMP islevinin hücre ve organ kültürlerinde araştırılması, BMP sinyallerinin, kondrosit çoğalmasını düzenlemede indüktif bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, kondrositlerin hipertrofik farklılaşmasında bu proteinlerin rolüne ilişkin çeliskili sonuçlar elde edilmiştir (139).

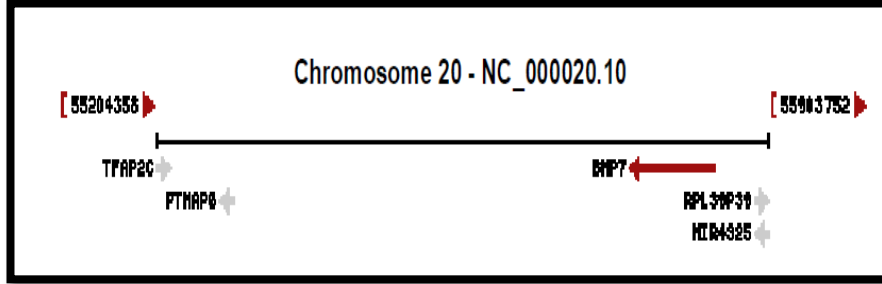
BMP moleküllerinin, diğer biyosinyal molekülleri gibi, yeterli indüksiyon yapabilmesi için yavaş olarak salınım yapabilme özelliğine sahip taşıyıcıyla birlikte kullanılması gerekmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde BMP lerin in vitro etkilerinin 50-200 ng / ml çok düşük dozlarda ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bununla birlikte, ticari olarak mevcut rhBMP7 nin yoğun proteolitik tüketimi olan bazı çalışmalarda, yüksek dozlarda (400ng/ml kadar) kullanıldığı bilinmektedir (125). Kullanılan rhBMP' nin dozajı tutunabileceği uygun doku iskelesi kullanımıyla ya da kontrollü salınımını sağlayan mikroküre sistemleriyle azaltılabilir. (168)

Tablo 8. Kemik morfojenik proteinler ve temel fizyolojik rolleri

BMP	ADLANDIRMA	Temel Fizyolojik Rolü
BMP-2	BMP-2a	Kemik ve kıkırdak morfogenezini ve kalp oluşumu
BMP-3	Osteogenin	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol
BMP-3b	GDF-10	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol
BMP-4	Bmp-2b	Kemik ve kıkırdak morfogenezini ve böbrek oluşumu
BMP-5		Kemik morfogenezini ve ekstremiteleri geliştirmesi
BMP-6	Vrg1, Dvr6	Kemik ve kıkırdak morfogenezinde hipertrofi
BMP-7	OP-1	Kıkırdak ve kemik morfogenezini, böbrek formasyonu
BMP-8	OP-2	Kemik morfogenezini/spermatogenez
BMP-8b	OP-3	Spermatogenez
BMP-9	GDF-2	Kemik morfogenezini ve kolinerjik nöronların oluşumu
BMP-10		Kalp morfogenezini
BMP-11	GDF-11	Aksiyal iskelet, Göz , Böbrek ve pankreas gelişimi
BMP-12	CDMP-3 , GDF-7	Tendon, Ligament ve duyu nöronlarının gelişimi
BMP-13	CDMP-2 , GDF-6	Kıkırdak gelişimi ve hipertrofi
BMP-14	CDMP-1 , GDF-5	Kondrogenez ve anjiyogenez
BMP-15	GDF-9b	Yumurta fizyolojisi
BMP-16		Embriyonik gelişim
BMP-17		Embriyonik gelişim
BMP-18		Embriyonik gelişim

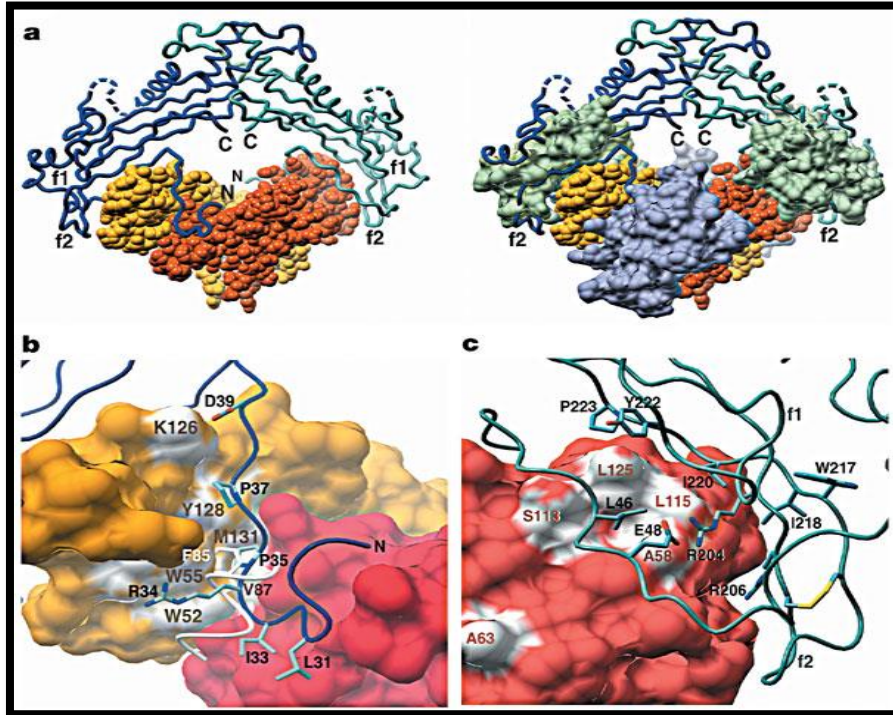
4.6.5.2. Kemik Morfojenik Protein 7 (BMP7)

BMP 7 (osteojenik protein / OP-1) 49kD'luk bir propeptit yapısıdır. İlgili sentez geni insanda 20.kromozom üzerinde bulunur. (Şekil 18)



Şekil 18. rhBMP7'e ait kromozom lokasyon haritası

BMP 7, N terminalindeki farklılık ile diğer TGF β ailesi üyelerinden ayrılır. BMP 7 diğer BMP'lerde olduğu gibi Smad1, Smad5 veya Smad8 sinyal yolağı üzerinden düzenlenir (126). Ana yapıda 7 sistein bulunur ki, bu yapılardan BMP 7lerin disülfid bağları yaparak dimer formasyonu alması sağlanır. BMP 7'ye ait kristal yapı modeli Şekil 19' da verilmiştir:



Şekil 19. BMP7 Kristal yapı modeli (231)

BMP 7, fetal gelişimde sentezlenmeye başlar ve erişkin dönemde de devam eder. Yaşla ve kartilaj doku dejenerasyonu gelişen durumlarda, kondrositlerden salgılanan BMP 7 gen ve protein ekspresyonu azalır; fakat henüz tanımlamayan bir mekanizma ile BMP 7 nin hücre içi etkileri değişmez; farklı bir anlatımla, hasarlı kıkırdak dokusunun BMP 7 nin anabolik etkilerine verdiği cevapta azalma olmaz (127, 128). Bu özelliği ile diğer kondrojenik büyüme faktörlerinden ayrılır.

BMP 7 gelişim sırasında iskelet kaslarında, sinirler, kan damarları, kıkırdak ve perikondriumda, onların çalışması sırasında bolca eksprese edilir ve yapılarının düzenlenmesinde önemli roller üstlenir. Yapılan çalışmalar BMP 7'nin böbrek ve göz gibi bazı organların gelişiminde olan etkileri de ortaya konmuştur(129).

Son yıllardaki çalışmalarla BMP 7'nin en büyük rolünün kıkırdak ve perikondrium oluşumunda, olduğuna dair çalışmalar mevcuttur(130). Kondrosit diferansiyasyon evrelerinin ve ESM kompozisyonunun en önemli düzenleyicisi olduğu, kartilaj doku gelişimi ve defektlerinde gelişimi tetikleyen "gold standart" büyüme faktörü olarak belirlenmiştir (131). IL 1, IL 6,IL 8, BMP 1 ve BMP 7 gibi sayısız katabolik sitokininin etkisini azaltarak kartilaj degradasyonunu önleyici etkileri bilinmektedir(170, 132).

4.6.6. Biyosinyal Taşınımında Kontrollü Salınım Sistemleri

Kıkırdak dokusu sınırlı bir yenilenme yeteneğine sahip olduğu için uygun hücrelerin, biyomateryallerin ve biyosinyal faktörlerinin hasarlı bölgeye etkin şekilde aktaracak yaklaşımların geliştirilmesi gerekmektedir.

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan protein yapıdaki biyosinyal moleküllerinin invivo yarılanma ömürleri çok kısadır. Bozunma ve parçalanmaları görece hızlı moleküller oldukları için etkileri oldukça kısa sürmektedir. Böylece defekt olan bölgede etkili olabilmeleri için çok yüksek dozlarda kullanılmaları gerekir. Bu denli yüksek dozda kullanılmaları, hem hedeflenmeyen dokularda toksik etkilere neden olabilir, hem de tedavi maliyetini büyük oranda arttırır. Bu nedenle, bir taşıma

sisteminin içinde bulunmaları bölgede yavaş ve uzun süreli kontrollü salınım yapabilmeleri açısından gereklidir.

Kontrollü salım sistemleri, *“Organizma için gerekli olan etkin maddenin salım hızını kontrol ederek hedef hücreye, dokuya veya organa ulaştırılan sistemler”* olarak tanımlanmaktadır (133).

Bu amaçla çeşitli biyosinyal moleküllerinin, kontrollü salınım sistemleriyle desteklenmiş matrisler yardımıyla defekt bölgesinde lokalizasyonunu amaçlayan çeşitli çalışmalar sürdürülmüştür (134, 135)

Doku mühendisliği yaklaşımlarında, kontrollü salınım ve taşıyıcı sistem olarak en çok kullanılan yapılar hidrojel, mikroküre, nanokapsül ve lipozom sistemleridir. (136).Diğer taşıyıcı sistemlerin düşük mekanik özelliklerinden kaynaklanan kısıtlamalar nedeniyle, biyosinyal moleküllerinin hedef bölgeye ulaştırılmasında, son yılların gözdesi mikroküre formülasyonlarıdır.

Çalışmamızda da kondrogeniz üzerindeki olumlu etkilerini araştırdığımız EGF ve BMP 7 büyüme faktörlerinin doku üzerine kontrollü salınımı, hazırlanan Jelatin yapılı mikroküre formülasyonları ile sağlandığından bu bölümde mikroküreler hakkında ayrıntılı bilgi verilecektir:

4.6.6.1. Kontrollü salınım sistemlerinden Mikrokürelerin özellikleri

Mikroküreler, çapları birkaç mikrondan mm boyutlarına kadar değişen, etkin molekülleri belirlenen hedef bölgelere taşıyabilme özelliğine sahip, katı, küresel mikrot taşıyıcı sistemlerdir. Hücre kapsülasyonu dışında, hücre büyümesi ve farklılaşmasında büyük bir öneme sahip olan büyüme faktörlerinin etkinliğini artırmak amacıyla da çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır.

4.6.7.1.1.Mikroküre Hazırlama Yöntemleri

Mikrokürelerin hazırlanmasında pek çok farklı maddenin kullanıldığı çeşitli teknikler Tablo 9 'da özetlenmiştir:

Tablo 9: Mikroküre Hazırlama Yöntemleri

HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ	ÇEŞİTLERİ
Polimerleşme	Emülsiyon Polimerleşme
	Süspansiyon polimerleşmesi
Emülsiyon oluşturma	Yağ/su emülsiyonu
Çözücü buharlaştırma	Su/yağ emülsiyonu
	Su/yağ/su emülsiyonu
Koaservasyon(Faz ayrımı)	Basit ve kompleks koaservasyon
Polikondenzasyon	Süspansiyon ve emülsiyon polikondenzasyon
Püskürterek kurutma	
Püskürterek dondurma	
Dispers fazda jelleşme ve çarpaz bağlanma	

Hazırlanan mikroküre formülasyonlarından etkin madde salınımını etkileyen faktörler Tablo 10 'da özetlenmiştir:

Tablo 10. Mikrokürelere biyomolekül salınım hızını değiştiren parametreler

Etkin madde özellikleri	Polimer özellikleri	Çözünme ortamı özellikleri	Mikroküre özellikleri
Molekül kütlesi	Molekül ağırlığı	Ph	Hazırlama yöntemi
Polimerle etkileşimi	Biyobozunurluğu	Sıcaklık	Partikül büyüklüğü
Partikül büyüklüğü	Kristal yapısı	Karıştırma hızı	Etkin madde miktarı
Mikroküre içindeki yerleşimi		Polarite	Çarpaz bağlayıcı ajanın cinsi ve derişimi

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Çalışma Kapsamında Kullanılan Doku İskelelerinin hazırlanması:

Çalışmada EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin Sünger doku iskelesi olarak, ARS Arthro Biyoteknoloji Laboratuvarında hazırlanan, ticari ismiyle NEODERM olarak bilinen hazır doku iskelesinden yararlanılmıştır. Hazır doku iskelesine koaservasyon yöntemi ile hazırlanan rhBMP 7 yüklü Jelatin mikrokürelerin yüklenmesi ve Jelatin Sünger matriks yapısı üzerine embedding yöntemi ile immobilizasyonu Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyoteknoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

5.1.1. Kullanılan Malzemeler

Çalışmamızda, matriks tasarımında öncül malzeme olarak Jelatin polimeri kullanılmıştır. Difco (USA) den satın alınan Bacto Jelatin, koaservasyon tekniği ile çeşitli aşamalardan geçirilerek, birbiriyle bağlantılı çok sayıda pordan oluşan bir yapıya sahip, polimetrik özellikte, jelatin mikrokürelerden oluşan matriks elde edildi. Elde edilen sentetik matriksin doku içinde şişebilme ve yıkılabilme özelliklerinin kontrol altına alınması için polimer fazında, BDH (İngiltere) den ticari olarak elde edilen Gluteraldehit (50%) kullanılarak çapraz bağlanması sağlandı. Sigma(A.B.D) aracılığıyla elde edilen EGF (human recombinant) , jelatin mikrokürelere yüklendi. Grup 4 ve Grup 5'te kullanılan rh BMP7, ProSpec (A.B.D.) firmasından elde edildi. Çalışmada kullanılan büyüme faktörlerinin stabilitelerini korumak için, çalışmanın her aşamasında soğuk zincir kurallarına dikkat edildi.

Diğer reaktif maddeler tüm kimyasal ürünler, analitik seviyede ve herhangi bir saflaştırmaya tabi tutulmadan satın alındığı gibi kullanıldı.

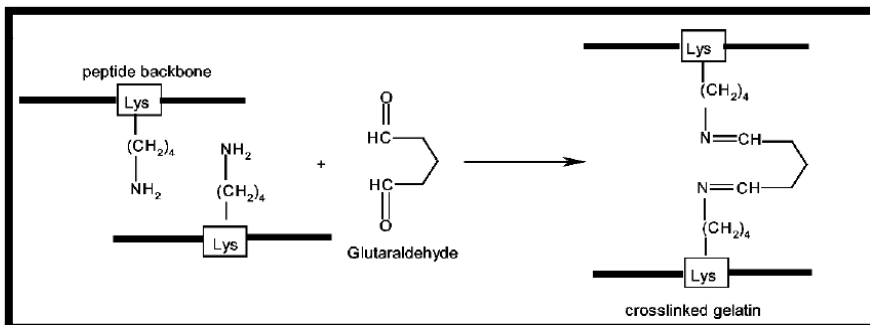
5.1.2. Jelatin Süngerlerin hazırlanması (GS)

Yaklaşık 30 dakika, 2000 rpm'de santrifüj edilen aköz jelatin çözeltileri oda sıcaklığına soğutulmaya bırakıldı. Daha sonra çözelti 4°C'deki buz-su banyosuna (Su banyosu; BÜCHI B-480, İsviçre) konarak 10 dakika daha karıştırıldı. Diğer taraftan 2.0 mL, 5% GA çözeltisi deiyonize suda hazırlandı ve çözelti içine eklenerek 30 dakika 4°C'de karıştırıldı. Hazırlanan çözelti sıvı nitrojen içinde dondurularak kalıplar içine döküldü. Ardından 24 gözlü petri kaplarına aktararak 24 saat dondurularak kurutularak sünger yapısında iskeleler hazırlandı. Elde edilen süngerler 1 saat boyunca UV ışınları ile sterilize edildi ve GS (Jelatin sünger) olarak isimlendirildi.

5.1.3. Jelatin mikrokürelerin hazırlanması (GM)

Jelatin mikroküreler Nastruzzi' nin (137) tariflediği koaservasyon tekniğiyle hazırlandı. Kısaca, aköz jelatin çözeltisi (%15), parafin içeren yağlı çözeltiliye damla damla eklendi ve 1000 rpm de santrifüje edilerek yağ-su karışımından oluşan emülsiyon hazırlandı. Hazırlanan emülsiyon buzlu su çözeltisine daldırılarak hızlı bir şekilde soğutuldu ve filtre edildi. Emülsiyon içinde geriye kalan yağın giderilebilmesi için jelatin mikrokürelerden oluşan çözelti üzerine 100 mL aseton eklenerek 30 dakika karıştırıldı, filtre edildi ve vakum fırınında (Vakum kurutucu; Nüve EV-018, Türkiye) kurutulduktan sonra 4°C saklandı. EGF içeren mikroküreler hazırlamak amacıyla çözdürülmüş EGF (Sigma, USA) ile EGF (1 ml fosfat tampon çözelti içinde 50 - 750 ngr EGF, pH"7.4) ve heparin (50 µl) (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi AŞ, Türkiye) ,aköz jelatin çözeltisine eklendi. Oluşan Jelatin mikroküreler GM-EGF (EGF yüklü jelatin mikroküreler) olarak isimlendirildi.

Şekil 20: Çarpraz bağlayıcı ajan olarak GA kullanılan Jelatin süngerlerin kimyasal kompozisyonu



5.1.4. EGF yüklü jelatin mikroküreler içeren Jelatin Süngerlerin Hazırlanması

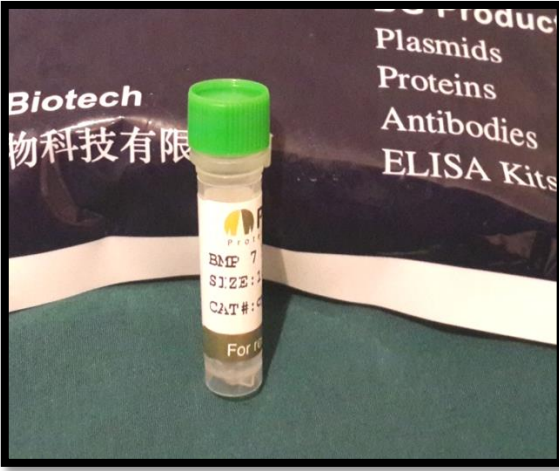
EGF içeren mikroküreler, köpükler halinde jelatin çözeltiye ilave edilerek jellerle karıştırıldı. Petri kaplarına dökülerek -20°C'de bir gün süreyle liyofilize edilerek kompozit sünger formülasyonları elde edildi. Jelatin mikrokürelerle hazırlanan jelatin süngerlere EGF dozu 15 µgr/ cm² olacak şekilde aktarım yapıldı. On milimetre kalınlığında hazırlanan iskeleler 1 saat süre ile UV altında tutularak sterilize edildi. Elde edilen süngerler GS - MS - EGF (EGF yüklü mikroküreler içeren jelatin sünger) olarak isimlendirildi. Çalışma kapsamında kullanılan EGF yüklü mikrokürelerden oluşan Jelatin doku iskelesi, ARS Arthro Biyoteknoloji Laboratuarlarında üretilerek, NEODERM Yara ve Yanık Örtüsü ismiyle hazır ticari ürün olarak bulunmaktadır. (Şekil 21).

5.1.5. Doku iskelesine rhBMP 7 immobilizasyonu:

Bu çalışmada kullanılan rhBMP 7 biyomolekülünün (Şekil 22) EGF ile koimmobilizasyonu, Grup 4 ve Grup 5'te cerrahi girişim öncesi , 1cmx 1cmx 3mm boyutunda hazırlanan iskelenin içine embedding yöntemi ile immobilize edilmiştir . Doku iskelelerine rhBMP7 immobilizasyonu için, doku iskeleleri %70 (v/v) etanol çözeltisi ve Dulbecco fosfat tampon çözeltisinde (DPBS, pH=7.4) 5 kez yıkanmıştır, ardından 5 µg/mL rhBMP7 (ProsPEC, A.B.D.) çözeltisi (DPBS içinde hazırlanarak) emdirilerek,12 saat boyunca 4°C'de çalkalanmıştır. rh BMP7 immobilize edilen doku iskeleleri DPBS ile yıkanmış ve daha sonra dondurarak kurutma (freeze-drying) yöntemi ile -80°C'de 1 gün boyunca liyofilize edilmiştir. Elde edilen doku iskelesi GS-MS-EGF-BMP7 olarak isimlendirilmiştir. rh BMP-7 miktarları yükleme çözeltisindeki konsantrasyona bağlı olarak, kuru doku iskelesi başına 10 ng olarak hesaplanmıştır.



Şekil 21 :NEODERM,ARS Arthro

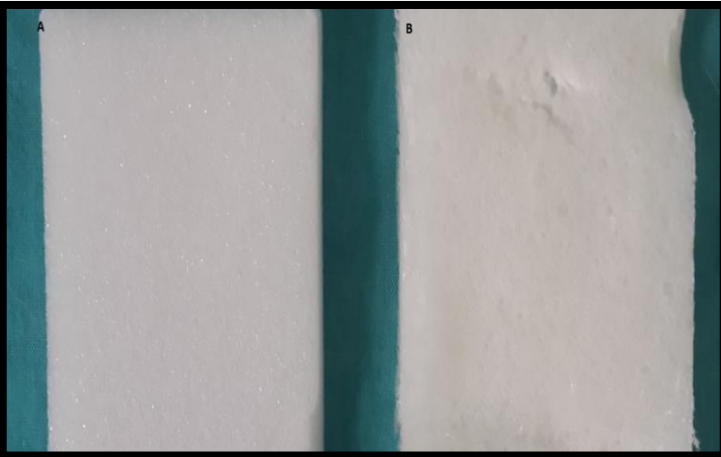


Şekil 22 :rh BMP 7



Şekil 23: A)GS-MS-EGF

B) rh BMP 7 immobilize edilmiş GS-MS-EGF



Şekil 24: Doku iskelerinin makroskobik görünümü

5.2. DENEYSEL ÇALIŞMA

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alınarak yapılan bu çalışmanın deneysel cerrahi uygulamaları Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yürütüldü.

Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından önerilen laboratuvar hayvanı kullanım kılavuzunda belirtilen şartlarda bakımı yapılan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Laboratuvarından temin edilen 18 adet, 1-1,5 yaş aralığında, 2,5-3,5 kg ağırlığında, erkek Yeni Zellanda tavşanı kullanıldı.

5.2.1. Deney Hayvanlarının Bakımı

Deney hayvanlarının bakımı, çalışma süresince 'Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları' doğrultusunda D. E. Ü. Deney Hayvanları Laboratuvarı' nda yapıldı. Denekler üçerli gruplar halinde, standart kafeslerde, standart nem ve ortam sıcaklığında barındırıldı. (Şekil 30) Deneklerin standart tavşan yemi ve suyun yanında haftanın üç günü, havuç ve taze marul ile beslenmelerine özen gösterildi. Cerrahi sonrasında deneklerin yem ve suya ulaşmalarında bir sıkıntı olmadığı görüldü. Çalışma süresince, hiçbir denekte anlamlı kilo kaybı olmadı. Operasyon sırasında ve sonrasında ayılma sırasında oda sıcaklığı 30 derecede tutularak hipotermiden kaçınıldı. Postoperatif dönemde, ilk 10 gün insizyon hatları günlük steril pansumanlarla izlendi. İnsizyon hatları; Octenisept solüsyonlu temizlik sonrasında, hem gerekli nemi sağlamak, hem de antibakteriyel koruma amacıyla %2 Mupirosin içerikli pomad (BACTROBAN %2 pomad) ile kapatıldı. Pansumanların üzerine selfmutilasyonu engellemek amacıyla, tavşan kulak boyutuna uygun diktirilen şapka ateller uygulandı.(Şekil 31) 10 gün sonra açık bırakılan insizyon hatlarının zarar görmemesi açısından, takip eden 10 gün üzerlerine tie-over pansumanlar gevşek şekilde suture edildi. Kullanılan dikiş materyallerinin erime süresini takiben, tieover

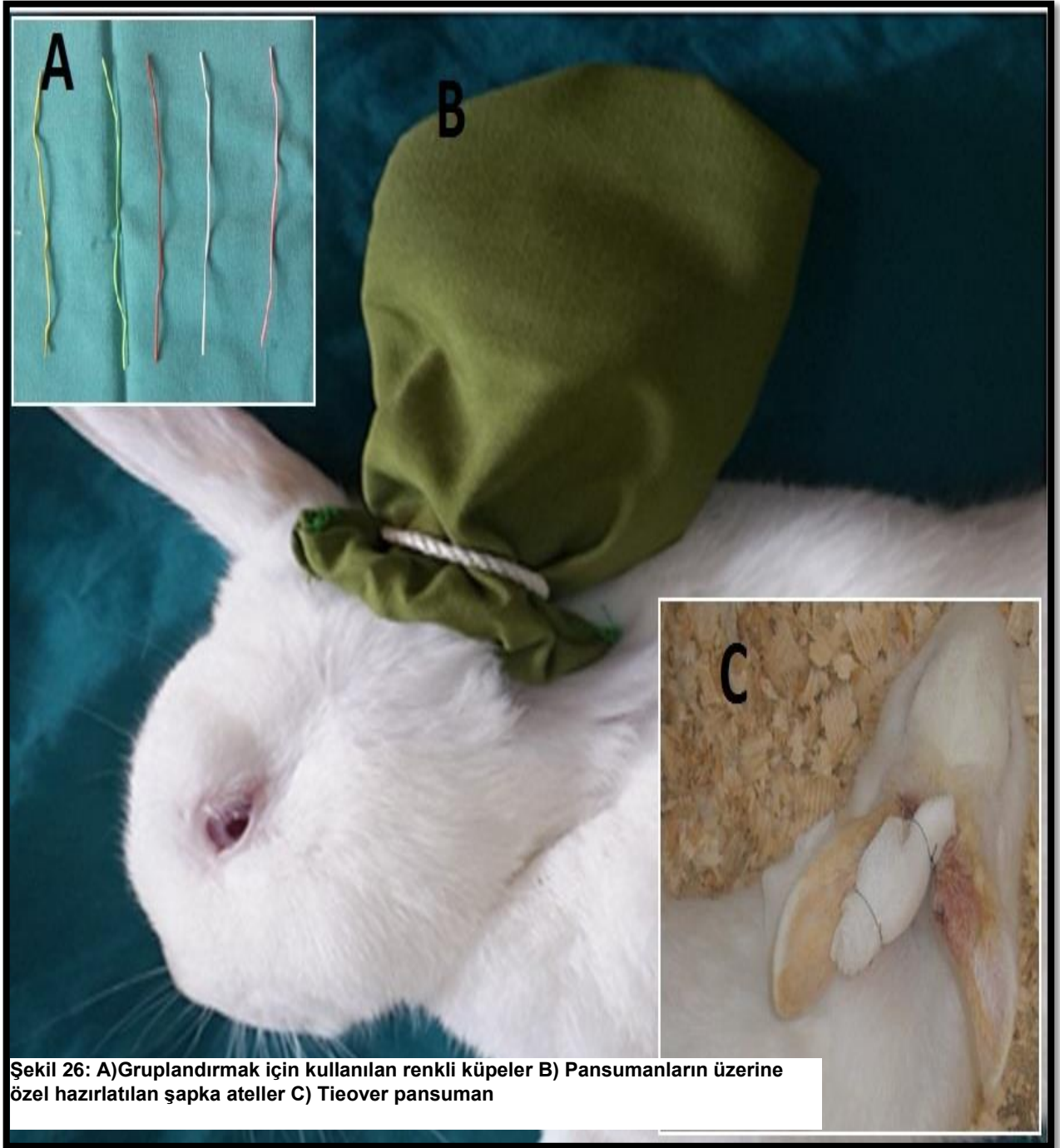
pansumanlar alındı. İnsizyon hatları, cerrahi ve pansuman materyali kalıntılarını temizlemek amacıyla bol SF ile yıkandı. Tüm kontrol ve deney grupları bu işlemten sonra 8 hafta süre ile takip edildi. Tavşanlarda 8 haftalık takip süresi sonunda flep nekrozu görülmedi.



Şekil 25:3 'erli gruplar halinde barındırılan denekler

Denekler renkli küpeler ve cerrahi uygulanan kulaklar renkli kalemlerle numaralandırılarak gruplara ayrıldı. Renkli küpeler, denek kulaklarına genel anestezi altında, her grup farklı renk olacak şekilde yerleştirildi.(Şekil 25)

Tavşanların her iki kulakları da deneyde işleme tabi tutularak, aynı tavşanın her bir kulağı ayrı bir grup olarak kullanılabilirdi. Böylelikle 18 hayvan, 35 kulak olarak ayrı ayrı değerlendirildi.

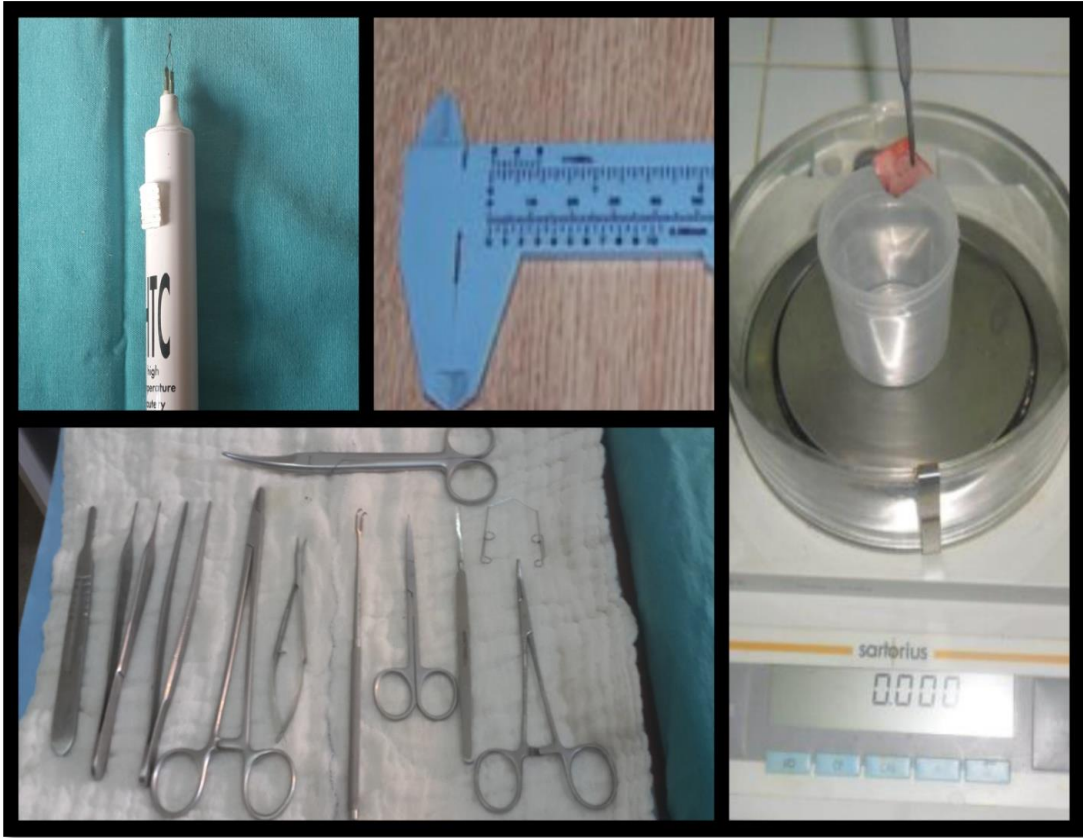


5.2.2. Cerrahi Prosedür

Tavşanlar üzerindeki tüm cerrahi prosedürler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında, Tavşan Ameliyathanesinde steril koşullarda uygulandı.

5.3.2.1.Cerrahi Aletler

1. Kuyumcu penseti
2. Bistüri sapı, Bistüri (no: 15)
3. İnce disseksiyon makası
4. Mikromakas
- 5.İnce uçlu otomatik ekartör
- 6.Perikondrium elevatörü
7. İnce uçlu portegü (10cm)
8. Sütür makası
9. Koter
- 10.Kumpas
- 11.Hassas terazi (Şekil 27)



Şekil 27:Cerrahi Aletler

5.3.2.2. Anestezi

Deneklerin anestezi Ketamin (Ketalar 500 mg) 35 mg/kg ve Ksilazin klorür (Basilazin % 2) 5mg/kg intramusküler uygulama ile sağlandı. Analjezik etki için Prilokain (Citanest) 1 mg/kg, cerrahi öncesi rejyonel olarak kulak kök sinirlerine uygulandı. Bu uygulama ile yaklaşık 30 dakika süre ile anestezi sağlandığı görüldü.

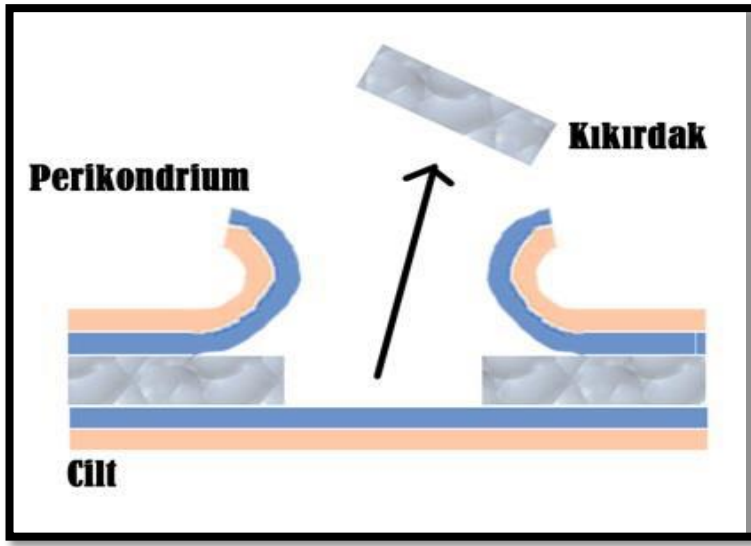


Cerrahi işlemin 30 dakikayı aştığı durumlarda ketamin enjeksiyonu 5 mg/kg intramüsküler olarak tekrarlandı.(Şekil 28)

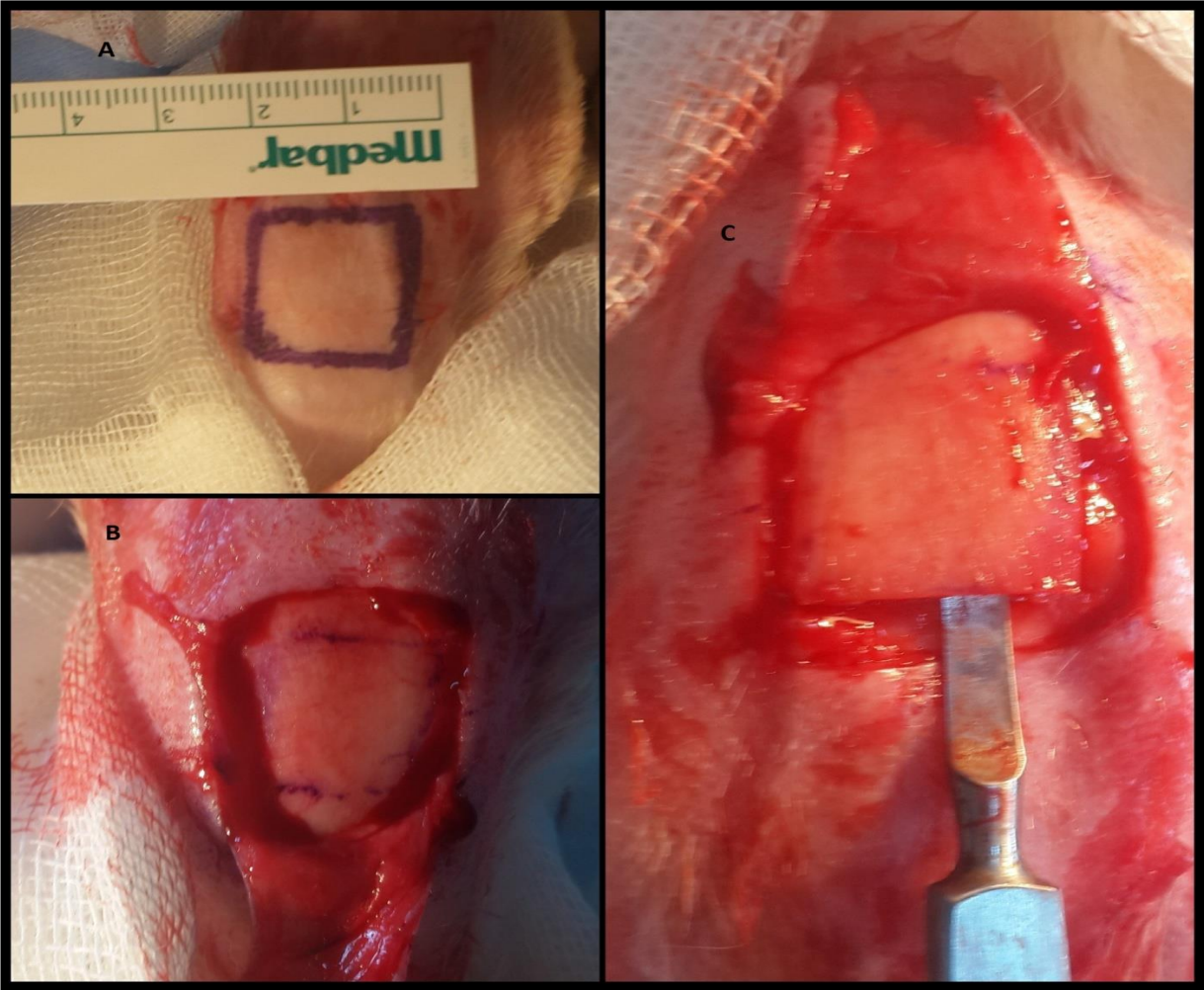
Şekil28:Anestezi Ajanları

5.3.2.3 Kıkırdak Defekti Oluşturulması

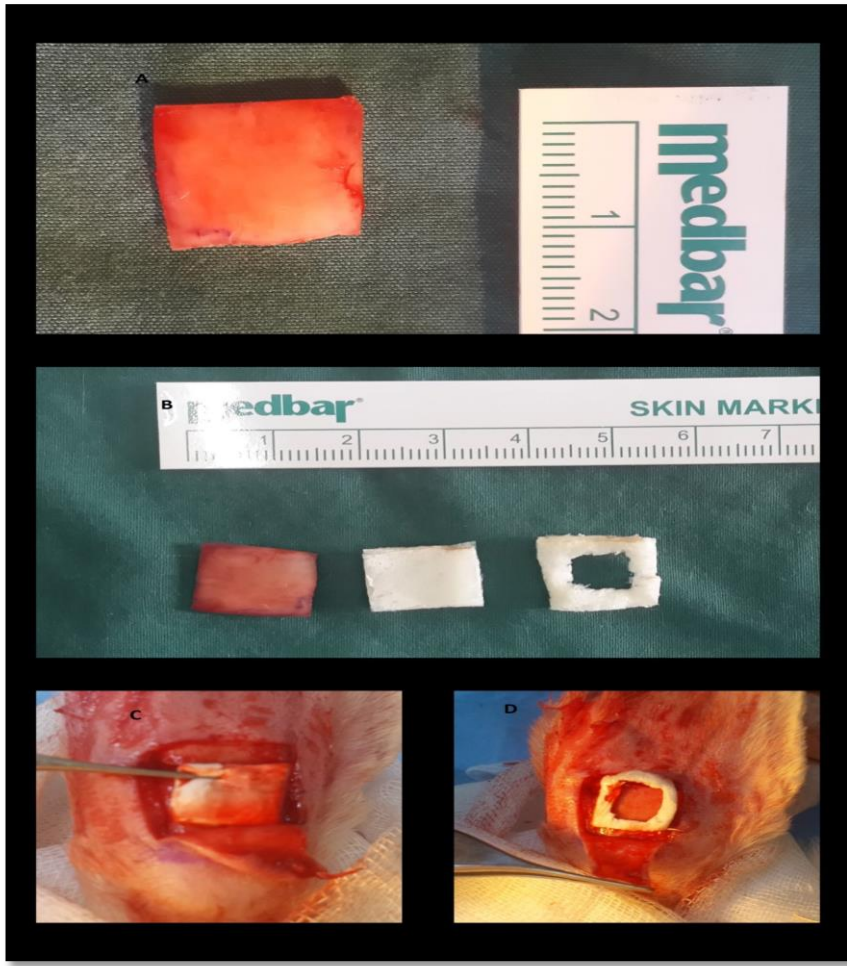
1. Tavşanlara 35 mg/kg Ketamin + 5 mg/kg Ksilazin ile anestezi yapılarak sırt üstü yatırıldı.
2. Bilateral kulaklar traş edilerek povidon iyodin solüsyonla temizlendi, ardından kulak kök sinirinden Prilokain ile rejyonel anestezi sağlandı.
3. Kulak posteriorundan yapılan insizyonun ardından, preoperatif ölçümlerle belirlenen 1,5cm x 1,5 cm perikondrokutanöz flep (cilt perikondriumdan ayrılmadan) perikondrium elevatörü ve mikromakas yardımıyla eleve edildi.(Şekil30 A-B-C)
4. Her iki yüzeydeki perikondriuma zarar vermeden, zeminde 1x1 cmlik kondral defekt oluşturuldu. Elde edilen tüm kıkırdak greftlerin ağırlıkları hassas terazi ile ölçülerek, defekt boyutunun aynı olduğu doğrulandı.
5. Kontrol grubundaki deneklerde, defekte herhangi bir müdahale yapılmadan, perikondrokutanöz flepler 4,0 PGA sütürler ile iade edildi. Grup 2 ve Grup 4 deney gruplarında kullanılacak doku iskelesi defekt üzerini tamamen örterek, defekte paralel olacak düz şekilde, perikondrokutanöz flepler arasına yerleştirildi. Grup 3 ve Grup 4 deney gruplarında kullanılacak doku iskelesi, defekt kenarlarının perikondriumla temas etmesi engellenecek şekilde 3 mm kalınlığında rulolar yapılarak yerleştirildi. Tüm gruplarda 4.0 PGA sütürler aracılığıyla perikondrokutanöz flepler yerlerine suture edildi.



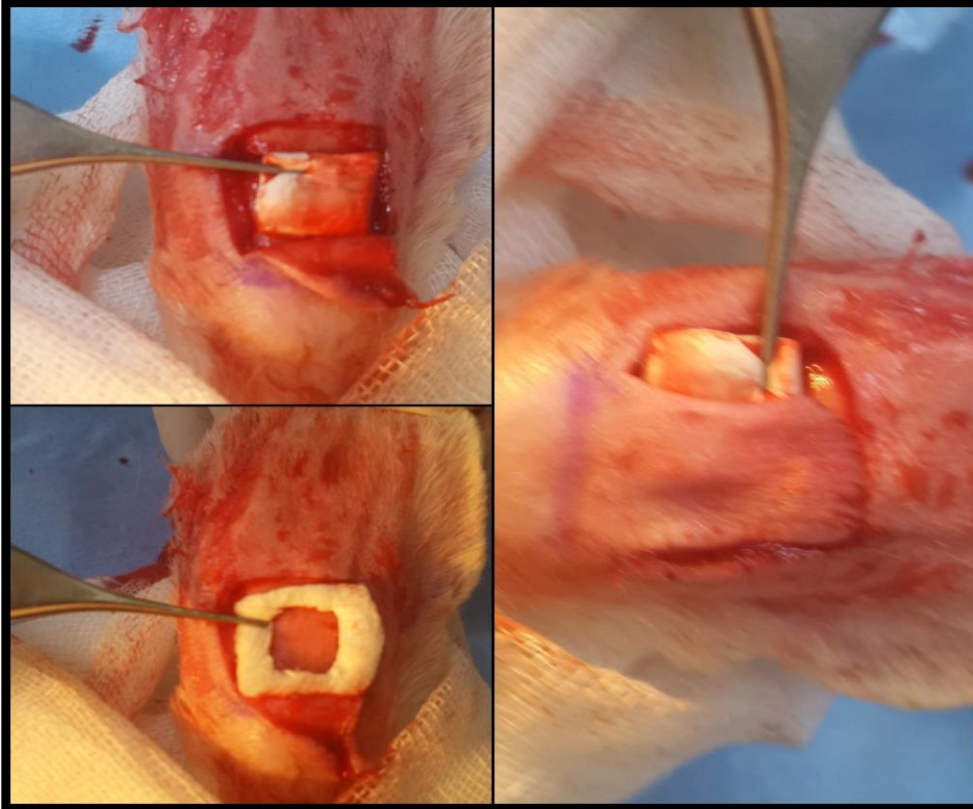
Şekil 29: Perikondrocutanöz flebin elevasyonu
(şematik çizim)



Şekil 30: A) 1,5x1,5 cm lik perikondrocutanöz flebin işaretlenmesi B) Perikondrocutanöz flep kaldırıldıktan sonra eksize edilecek 1x1 cm'lik kıkırdak dokunun işaretlenmesi C) Perikondrium elevatörü ile kıkırdak dokunun elevasyonu



Şekil 31: A) 1X1 cmlik kırıldak doku eksizyonu B) Eksize edilen kırıldak doku, düz ve rulo yapılarak yerleştirilen doku iskelesi C) Doku iskelesinin kondral defekte düz olarak yerleştirilmesi D) Doku iskelesinin kondral defekte rulo yapılarak yerleştirilmesi



Şekil 32: Oluşturulan kondral defekte düz ve rulo olarak doku yerleştirilmesinden sonra perikondrokutanöz fleplerin doku iskelelerinin üzerine sütüre edilmesi.

5.3.2.4. Deney Grupları

Çalışmada kullanılan doku iskelelerinden EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin doku iskelesi (NEODERM) ARS Arthro Biyoteknoloji ve Kırıkkale Üniversitesi AR-GE laboratuvarlarında hazırlanmıştır. Hazır doku iskelesinde rhBMP 7 yüklü mikrokürelerin yerleştirilerek kontrollü salınım sağlanması Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyoteknoloji laboratuvarında yapıldı. Hazırlanan doku iskelelerinin morfolojik ve mekanik özelliklerinin analizi Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyoteknoloji laboratuvarında yapıldı. Hazırlanma ve analiz aşamaları çalışmamızın 5.1. bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Hazırlanan doku iskeleleri istenilen boyuta getirildikten sonra uygun koşullarda sterilize edildi. Aşağıda belirtilen deney gruplarında, tarif edildiği üzere defekt üzerine yerleştirilmiştir.(Tablo 11) Tavşanların her iki kulakları da deneyde işleme tabi tutularak, aynı tavşanın her bir kulağı ayrı bir grup olarak kullanılabilir. Böylelikle 18 hayvan, 35 kulak olarak ayrı ayrı değerlendirildi. Her grupta 7 adet defekt oluşturulmuş tavşan kulağından oluşuyordu.

Grup 1: Tavşan kulağında sadece kırıldak defekti oluşturulan grup (KONTROL).

Grup 2: Oluşturulan defekte EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin dokuiiskelesi(GS-MS-EGF) defektin tamamını dolduracak şekilde düz olarak yerleştirildi.

Grup 3: Oluşturulan defekte EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin doku iskelesi (GS-MS-EGF)kenarların perikondriumla temas yüzeyini azaltacak şekilde rulo haline getirilerek yerleştirildi.

Grup 4: Oluşturulan defekte rhBMP 7 immobilizasyonu yapılmış EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin doku iskelesi (GS-MS-EGF-BMP7) defektin tamamını örtecek şekilde perikondrium altına düz olarak yerleştirildi.

Grup 5: Oluşturulan defekte rhBMP 7 immobilizasyonu yapılmış EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin doku iskelesi (GS-MS-EGF-BMP7)kenarların perikondriumla temas yüzeyini azaltacak şekilde rulo haline getirilerek yerleştirildi.

Tablo 11. Deneş Grupları

DENEY GRUPLARI	CERRAHİ PROSEDÜR
GRUP1 (Kontrol)	Sadece kondral defekt oluşturulan grup
GRUP 2	Kondral defekt + GS-MS-EGF Jelatin iskele ,DÜZ şekilde
GRUP 3	Kondral defekt +GS-MS-EGF Jelatin iskele, RULO şekilde
GRUP 4	Kondral defekt + GS-MS-EGF-BMP7 Jelatin iskele ,DÜZ şekilde
GRUP 5	Kondral defekt + GS-MS-EGF-BMP7 Jelatin iskele ,RULO şekilde

5.3.2.5. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Histopatolojik doku örneklerinin alınması

Tüm kontrol ve deneş grupları 8 hafta süre ile takip edildi.8. hafta sonunda genel anestezi altında, yüksek doz Ketamin (70 mg/kg ve Ksilazin klorür 10mg/kg ile intrakardiyak enjeksiyon ile sağlanan sakrifikasyonun ardından oluşan yeni kırıldak doku 5-6 mm sağlam doku bırakılacak şekilde eksize edildi.



Şekil 33 A) Perikondrokutanöz fleplerin sütünasyonu B)Denekler postoperatif ilk 10 gün günlük pansumanla izlendi. C)8. haftada sakrifikasyon öncesi insizyon hatlarının görünümü

6. DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

6.1. Doku iskelelerinin morfolojik ve biyomekanik olarak değerlendirilmesi

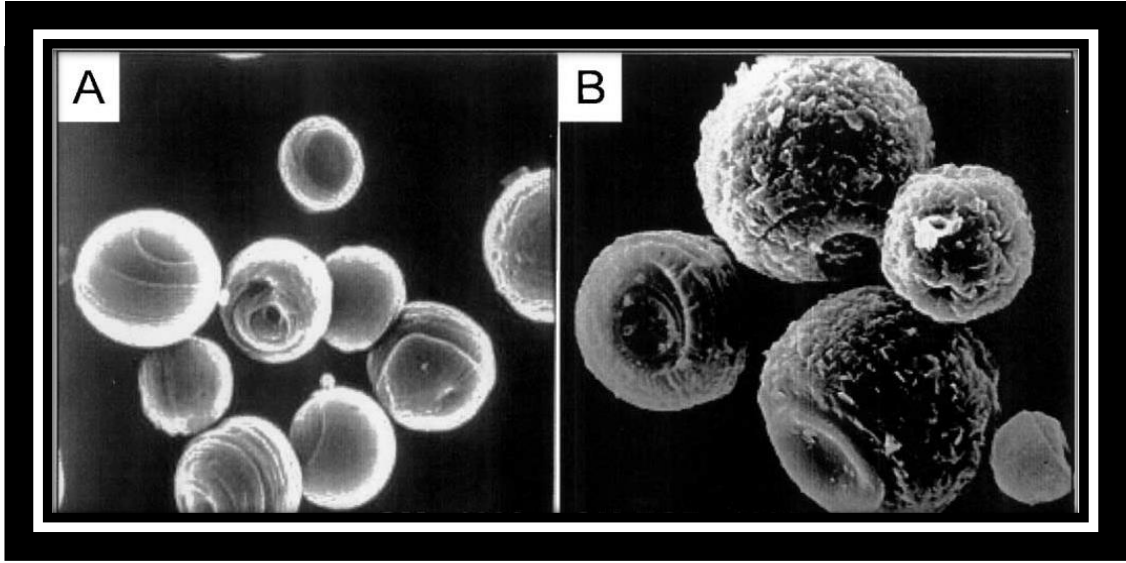
Çalışma kapsamında hazırlanan doku iskelerinin morfolojik ve biyomekanik değerlendirmeleri Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

6.1.1. Morfolojik Analiz

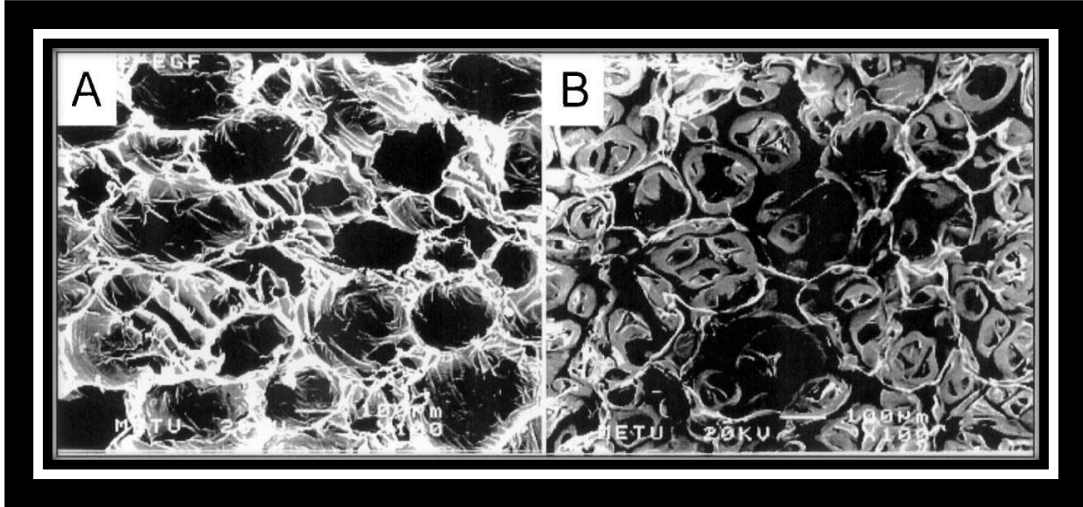
Bir doku iskelesinin hücre ve doku etkileşimlerinde kullanılabilmesi için gerekli temel parametreler içerisinde, biyoyumlu olmasının yanında, hücrelerin gelişimine ve biyosinyal moleküllerinin taşınmasına izin verecek şekilde uygun gözenek yapı ve boyutuna sahip olması beklenir. Tez kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin hücre gelişimini destekleyecek gözenek yapı özellikleri ve mikroküre yapıları, vakum altında ince altın- paladyum tabakası kaplandıktan sonra tarama elektron mikroskopi (SEM) (Jeol Model 6400) ile incelenmiştir. Elde edilen SEM mikrografları Şekil 34ve 35’de verilmiştir.

Şekilde verilen taramalı elektron mikrografları incelenecek olursa kullanılan biyomalzemenin oldukça gözenekli olduğu, gözeneklerin birbiri ile iç içe yapıda bulunduğu ve kıkırdak gelişimi için uygun gözenek büyüklüklerine sahip olduğu görülebilmektedir.(Şekil 39)

Hazırlanan doku iskelerinin SEM analizleri sonucunda, mikroküre yapılarının her iki doku iskelesi üzerinde homojen dağılım gösterdikleri, kümelenme oluşturmadıkları, küreselliklerini korudukları gösterildi. Yerleştirildikleri defekt alanının tüm yüzeyine eşit miktarda biyosinyal molekülünü taşıyabilirlikleri test edildi. Analizler sonucunda, GS-MS-EGF-BMP7 olarak isimlendirilen doku iskelesinin yüzey yapısının, GM-EGF mikrokürelere göre daha pürüzlü olduğu ama küreselliğini yitirmediği gözlemlendi.(Şekil39) Taşıdığı dual biyosinyal molekülü ve rhBMP7 molekülünün embedding yöntemi ile iskeleye immobilize edilmiş olması nedeniyle daha pürüzlü bir yapıya sahip olduğu gösterildi.(Şekil34,35)



Şekil 34: EGF yüklü jelatin mikroküreler ve EGF .BMP 7 yüklü jelatin mikrokürelerin SEM analizleri A)GM-EGF (x1600), B) GM-EGF-BMP 7 (x1600).



Şekil 35.Doku iskeleleri kesitlerinin SEM görüntüleri . A)GM-EGF B) GM-EGF-BMP 7

6.1.2. Porozite

Hazırlanan Jelatin sünger formülasyonlarının porozite değerleri literatürde yaygın kullanımı olan sıvı yer değiştirme metodu ile ölçüldü (138). Bu yöntemde 10 mL'lik beher içerisine bilinen hacme sahip bir sıvı (etil alkol) konularak, içine atılan formülasyon 5 ile 7 dakika (süngerdeki baloncuk çıkışı bitene kadar) süresince sıvı

içerisinde bekletildi. Bu süre içinde sahip olduğu hacim kadar sıvının yer değiştirmesi söz konusudur. Bu çalışmada yer değiştirici olarak etil alkol kullanıldı. Bu yöntemle göre aşağıdaki eşitlikler kullanılarak süngerlerin % porozite değerleri hesaplandı. (Tablo 12 'de doku iskelelerinin porozite ve partikül büyüklüğü analiz değerleri verilmiştir).

$$\% \text{ Porozite} = [1 - (\text{özgül yoğunluk} / \text{gerçek yoğunluk})] \times 100 \text{ (Eşitlik 1)}$$

$$\text{Özgül yoğunluk} = W / (V2 - V3) \text{ (Eşitlik 2)}$$

W: süngerin ağırlığı

V2: etanol ve etanol içerisinde bekletilmiş süngerin toplam hacmi

V3: sünger sıvıdan çıkarıldıktan sonra kalan etanolün hacmi

$$\text{Gerçek yoğunluk} = W / V0 \text{ (Eşitlik 3)}$$

V0: süngerin kuru hacmi

$$\text{Toplam hacim: } V = (V2 - V1) + (V1 - V3) = V2 - V3$$

V1: sıvı yer değiştiricisi olarak kullanılan etanolün hacmi

6.1.3. Partikül Büyüklüğü Analizi

Doku iskelesindeki sünger yapılarının ve /veya mikroküre hazırlanma aşamasında; çözeltideki jelatin konsantrasyonunun, santrifüj hızının değiştirilmesi ya da yüzey aktif maddelerin eklenmesi gibi deneysel koşulların değiştirilmesiyle farklı büyüklükte mikroküreler elde etmek mümkündür (139). Sürfaktan maddelerin eklenmesi hem oluşturduğu reaksiyonlarla *in vivo* yan etkilere yol açabileceğinden hem de biyouyumluluğu etkileyebileceğinden bu çalışmada kullanılmamıştır.

Çalışmada kullanılan iskelelerin ortalama partikül boyutları ve mikrokürelerin boyut dağılım eğrileri "Partikül boyutu analiz cihazı" Mastersizer (S Sürüm, Malvern Instruments Ltd, İngiltere) ile belirlendi. Çözücü olarak Aseton kullanıldı.

Hazırlanan mikrokürelerin ortalama çapları **42.80-58.60** µm arasında değişmekteydi.

Partikül boyut dağılım eğrileri ise:

%10' u 16.50 μm (GM-EGF) ve 21.17 (GM-EGF-BMP7) μm altında

%50'si 38.11 μm (GM-EGF) ve 47.97 (GM-EGF-BMP7) μm altında

%90'ı 76.16 μm (GM-EGF) ve 92.29 (GM-EGF-BMP7) μm altında

Tablo 12. Çalışmada kullanılan mikroküre boyutları ve partikül dağılım eğrileri

SKAFOLD	D (v,0.1)(μm)	D (v,0.5)(μm)	D (v,0.9)(μm)	VMD(μm)	SMD(μm)
GM-EGF	16.50	38.11	76.16	42.80	17.85
GM-EGF-BMP7	21.17	47.97	92.29	58.60	21.63

D (v,0.5): Partiküllerin %50 'sinin boyutu verilen değer altında, %50 si verilen değer üstündedir

.Median değer olarak da adlandırılır.

D (v,0.1):Partiküllerin %10 'unun boyutu verilen değer altındadır.

D (v,0.9):Partiküllerin %90' ının boyutu verilen değer üstündedir.

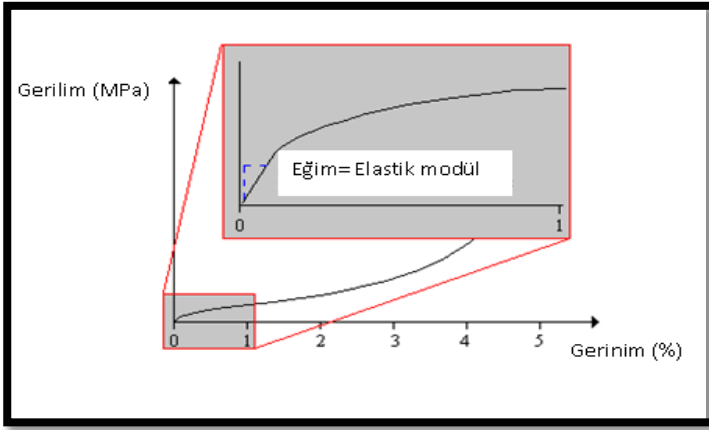
VMD: Ortalama mikroküre hacim değeri

SMD: Ortalama mikroküre yüzey alan çapı

6.1.4. Mekanik Özelliklerin Analizi

Termal ve mekanik özellikler, biyomalzemelerin kullanım performansını doğrudan etkileyen özelliklerdir. *In vitro* ve *in vivo* doku mühendisliği çalışmalarında implant olarak kullanılan doku iskeleleri uygulama sırasında yenilenecek dokunun özelliğine göre belli bir gerilime maruz kalır. Dolayısıyla uygulamalarda kullanılacak olan iskelelerin mekanik dayanımlarının belirlenmesi gereklidir. Elastikiyet, belli ölçüde sıkıştırma ve basınca dayanıklılık gibi biyomekanik özellikler doku iskelesinin kolay implante edilebilmesi ve uzun dönem uygulamalarda başarı sağlanabilmesi için taşıması gereken kritik özelliklerdir.

Jelatin sünger formülasyonlarının mekanik dayanıklılıkları Texture Analyser (TA-XTPlus, Stable Microsystems, UK) cihazında incelendi (Şekil 36). 15 mm çapa ve 2 mm yüksekliğe sahip süngerlerin üzerine, 500 N'luk bir yüke sahip ve 1 mm/dk'lık sabit hızla kuvvet uygulanmış olup, süngerlerin gerilim-gerinim (stress/strain) eğrileri elde edildi. (Şekil 36) Eğrilerdeki doğrusal bölgenin eğiminden süngerlerin elastik modül değerleri hesaplandı.



Şekil 36. Gerilim - Gerinim Eğrisi

Gerilim, kuvvetin orijinal kesit alanına bölünmesi ile ifade edilmektedir (Eşitlik 4).

Gerinim ise, kuvvet uygulaması sırasında oluşan boy değişiminin, kuvvet uygulamadan önceki ilk boyuna bölünmesi ile elde edilmektedir. (Eşitlik 5)

$$\text{Gerilim (MPa)} = \text{Kuvvet (F)} / \text{Alan (A)} \quad (\text{Eşitlik 4})$$

F: Kuvvet

A: Birim alan

$$\text{Gerinim (\%)} = dL/L \quad (\text{Eşitlik 5})$$

dL: Kuvvet uygulaması sırasında oluşan boy değişimi

L: Kuvvet uygulanmadan önceki boy değişimi

$$\text{Elastik modül (N/mm}^2\text{)} = \text{Gerilim/Gerinim} = F/A \ / \ dL/L = F \times L \ / \ A \times dL$$

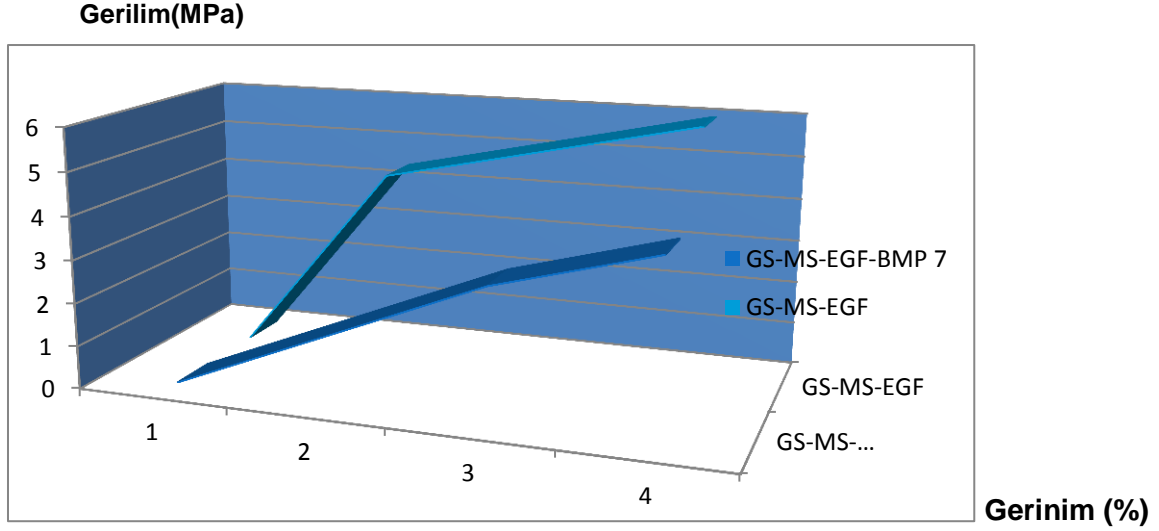
Malzemenin dayanımının yani mukavemetinin ölçüsü olarak tanımlanan literatürde “Young modülü” olarak da geçen “elastik modül”, elastik deformasyondaki (çekme deformasyonu, çekme gerinimi) birim uzama ile normal gerilme (çekme ya da

basma gerilmesi) arasındaki doğrusal ilişkinin bir sonucu olup “birim uzama başına gerilme” olarak tanımlanır.

Genel olarak elastik polimerler gerilim-gerinim eğrilerinde iki karakteristik deformasyon bölgesine sahiptir. Düşük gerinimlerde, artan gerinime bağımlı olarak gerilim hızlı bir şekilde artmaktadır. Elastik bölgede gözlenen keskin eğimler kantitatif olarak materyalin yüksek elastik modülüne sahip olduğunu göstermektedir. Yüksek gerinimlerde gerilim, artan gerinime bağımlı olarak sadece küçük bir artış gösterir ve kopma noktasında sona erer. Kopma noktası materyalin kırılma özelliğinin bir göstergesidir (140).

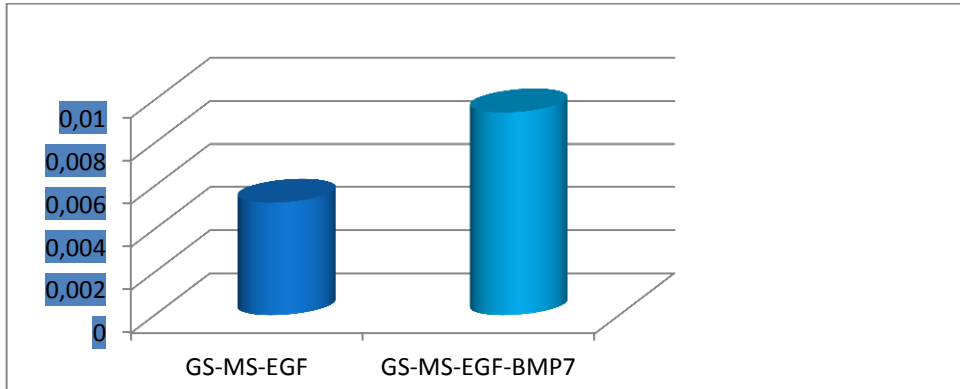
Tamamen şişirilmiş jelatin iskeleler yumuşak, süngerimsi ve esnektir. Aşağıdaki grafikten her bir iskele için elde edilen ‘gerilim-gerinim’ eğrilerini göstermektedir. Şekilden anlaşılacağı gibi, sadece EGF ile biyosinyallenmiş iskeleler düşük gerinim değerlerinde gerilimde hızlı artış göstermektedirler. Dolayısıyla EGF ve rhBMP 7 koimmobilizasyonu yapılmış iskelelerin bağıl olarak daha sert bir yapıya sahip oldukları söylenebilir.

Fakat hazırlanan doku iskelelerinin çok gözenekli poröz yapısı dolayısıyla, elastik modül değerlerinin tam olarak belirlenmesi, karmaşaya yer verilmemesi için farklı bir mekanik test cihazıyla doğrulanması gerekliliği düşünüldü. Bu amaçla hazırlanan doku iskelelerinin gerim dirençleri Lloyd Mechanical Testing Machine (Lloyd Instruments, LRX 5K) cihazında da ölçüldü. Dört ayrı numune şeklinde, 2cm x 5cm x 0,8 cm boyutlarında rektangüler sünger yapıları, özel klempler aracılığıyla, cihazın fiske ve hareketli ünitelerine yerleştirildi. Test hızı 2 mm/dk olarak ayarlandı. Numunelerin gerim dirençleri ve elastik modül ortalama değerleri cihaza bağlı bir bilgisayar üzerinde elde edilerek, diğer cihazla yapılan ölçümler doğrulandı.



GS-MS ve GS-MS-EGF doku iskelerinin Gerilim-Gerinim eğrileri

GS-MS-EGF ve GS-MS-EGF-BMP7 doku iskelelerinin mekanik özelliklerinde anlamlı farklılık gözlenmedi. Her iki doku iskelesinde de elastik modül değerleri yüksek bulundu. Bu özellik, deneysel çalışmamızda oluşturacağımız defekte yerleştirilen doku iskelesinin kolay şekillendirilebilir olması açısından önemliydi. GS-MS-EGF doku iskelelerinde elastik modül değerleri biraz daha düşük bulundu. Elde edilen değerlerle GS-MS-EGF doku iskelelerinin, GS-MS-EGF-BMP7 süngerlere göre daha yumuşak ve kırılğan olduğu, fakat çalışmamızda kullanılış şekilleriyle bu farkın sonuçları etkilemeyeceği sonucuna varıldı.



Şekil 37.GS-MS-EGF ve GS-MS-EGF-BMP7 doku iskelerinin elastik modül değerleri

6.1.5. Şişme özellikleri

Jelatin sünger yapısındaki doku iskeleleri için şişme çalışmaları örneklerin 37°C'de Dulbecco fosfat tampon çözeltisinde (DPBS, pH=7.4) rehidrasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler tampon çözeltisi içerisinden çıkartılmış, üzerindeki fazla çözelti filtre kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Şişme oranları gravimetrik olarak aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 6) kullanılarak kuru temelde belirlenmiştir:

$$\text{Şişme oranı} = (W - W_0) / W_0 \quad (\text{Eşitlik 6})$$

W_0 jelatin iskelenin kuru ağırlığını, W ise yaş ağırlığını göstermektedir.

Şişme testlerinin sonucunda elde edilen şişme oranları 27-40 arasında değişmektedir. Tablo 13 'te de görüldüğü gibi sadece GS-MS-EGF iskelerinin şişme oranları daha düşüktür. EGF ve rhBMP 7 koimmobilizasyonu ile hazırlanan Jelatin sünger (GS-GM-EGF-BMP 7) gözenek boyutlarının ve içsel bağlantılarının bağıl olarak daha büyük olmasından dolayı şişme oranları daha yüksektir. Şişme prosesinin 3 dakika içerisinde hızlı bir şekilde tamamlandığı belirlenmiştir.

Tablo 13 :Hazırlanan doku iskelelerinin morfolojik özellikleri karşılaştırması.

Doku İskelesi	GS-MS-EGF	GS-MS-EGF-BMP 7
Gözenek Boyut Aralığı (μm)	16.50-76.16	21.17-92.29
Ortalama gözenek çapı (μm)	142.80	158.60
Denge şişme oranı(%)	27.0 \pm 1.4	40.6 \pm 0.7
Elastik modül değeri (N/mm ²)	0,00523 \pm 0,0001	0,00942 \pm 0,0001

6.2. Histokimyasal değerlendirme yöntemleri

Sakrifikasyon sonrası alınan doku kesitleri ışık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildikten sonra, parafine gömüldü ve 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Rutin takip aşamalarından sonra, genel morfolojiyi gözlemek için Hematoksilen–Eosin, kollajen içeriğini değerlendirmek için Masson Trikrom ile boyanarak ışık mikroskop ile histolojik inceleme yapıldı.

Kıvırdak dokusu histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 14).

Tablo 14 :Doku takip protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

6.2.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 16).

Tablo 15 :Hematoksilen-Eozin boya protokolü.

Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

6.2.2. Masson Trikrom Boya Protokolü

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

6.2.3. Histolojik Değerlendirme Sonuçlarının Skorlanması

Hematoksilin-Eosin (HE) ile boyanarak kıkırdak hücre morfolojisi ve dağılımı değerlendirilip, Masson Trikrom boyama ile kollajen fibrillerinin ve kıkırdak yapının varlığı ile matriks boyanması gösterildikten sonra, bu iki boyamada kıkırdak geçiş zonu değerlendirilerek morfoloji ve dokunun sağlam doku ile ilişkisi skorlandı. Kesitlere kıkırdak defektlerinde kullanılan histolojik derecelendirme yöntemi uygulanarak, oluşmuş dokunun kalitesi karşılaştırmalı olarak belirlendi. Hücre morfolojileri ve çevre kıkırdak doku ile bağlantı noktalarındaki rejenerasyon için Ulutaş ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş ve 2005 yılında yayınlanmış olan histolojik derecelendirme yöntemi kullanıldı (13). (Tablo 16) Defekt alanındaki doluluk oranı ve matriks boyanması için ise sonuçlar neokartilaj dokusunun değerlendirilmesi için modifiye edilen Pineda skorlama sistemi kullanılarak değerlendirildi(22). (Tablo17) Böylece tüm gruplardaki bulgularla ortaya koyulan kıkırdak rejenerasyonunun istatistiksel olarak karşılaştırılmasına olanak sağlandı.

Tablo 16. Kıkırdak Dokuda Rejenerasyonun Histolojik Skorlaması (23)

Hücre Morfolojisi	SKOR
Fibröz doku + Mezenkimal doku (Az)	1
Fibröz doku + Mezenkimal doku (Çok)	2
Mezenkimal doku + Kıkırdak doku (Az)	3
Mezenkimal doku + Kıkırdak doku (Çok)	4
Kıkırdak doku (%100)	5

Çevre Kıkırdak Dokuyla Bağlantı	
Çevreyle bağlantı yok	0
Tek tarafta bağlantı mevcut	1
Tüm taraflarda bağlantı mevcut	2

Tablo 17. Modifiye Pineda Skorlama Sistemi (222).

PINEDA HISTOLOJİK SKORLAMA SİSTEMİ	Puanlama
Defekt alanı dolu	
% 125	1
% 100	0
% 75	1
% 50	2
% 25	3
% 0	4
Matriks boyanması	
Normal boyanma	0
Az boyanma	1
Belirgin olarak az boyanma	2
Silik boyanma	3
Boyanma yok	4

6.2.4. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Tip-1 prokollajen Boyama Protokolü

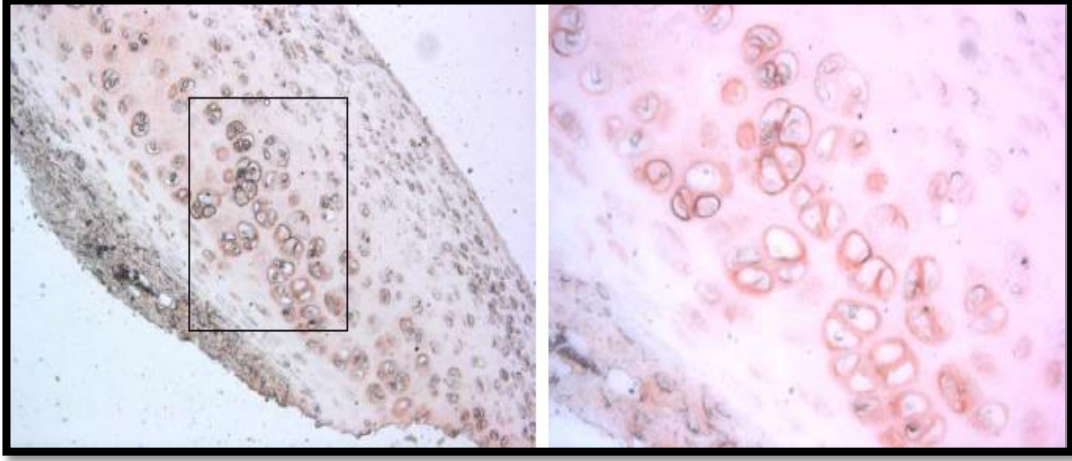
Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi, daha sonra şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika üç değişim Ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı Pappen ile çizildi. Ardından dokular 15 dakika 37°C de Tripsin ile muamele edildi. 3 kez fosfat tamponlu saline (PBS) ile yıkanan kesitler 10 dk Hidrojen Peroksit ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile bekletildi. Primer antikör rat spesifik anti-tip-1 prokollajen antikoru (1:100; Bios, 1932R, Rb aVit) ile + 4 °C' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain Kit, San Francisco, USA) ile 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla Diaminabenzidina (DAB) (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer's Hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra Entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

6.2.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçlarının Skorlanması

İmmünohistokimya, ECM'de bulunan yapısal proteinlerden kollajen tip-1 için yapılmıştır. Hücrelerdeki Tip-1 prokollajen moleküllerinin dağılımını belirlemek için Tip-1 prokollajen antikör boyaması yapıldı. Gruplar arası Tip-1 prokollajen moleküllerinin dağılımını belirlemek için, kıkırdak dokusunun dört farklı bölgesinde en az 10 ayrı alandan semikantitatif ölçümler yapıldı. Boya tutulumuna göre örnekler skorlandı. Semikantitatif skorlama aşağıdaki gibi tanımlandı (Tablo 18).

Tablo 18. İmmünohistokimyasal Boyanma Özelliklerine göre Skorlama

İMMUNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA	SKOR
Pozitif boyanma yok	0 (-)
Zayıf Boyanma	1 (+)
Orta Boyanma ,1-3 arası pozitif boyanma	2(++)
Güçlü Boyanma	3(+++)



Şekil 38:Doğal kıkırdak dokusunun Tip1 prokollajen antikoruna ile boyanması sonucu fibrillerin görüntüsü

6.3. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm grupların makroskopik inceleme skorları, histomorfometrik skorları ve immünohistokimyasal sonuçları Windows için SPSS 16,0 istatistik programında ANOVA ve Mann Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. Veriler p değeri olarak ifade edildi. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

7. BULGULAR

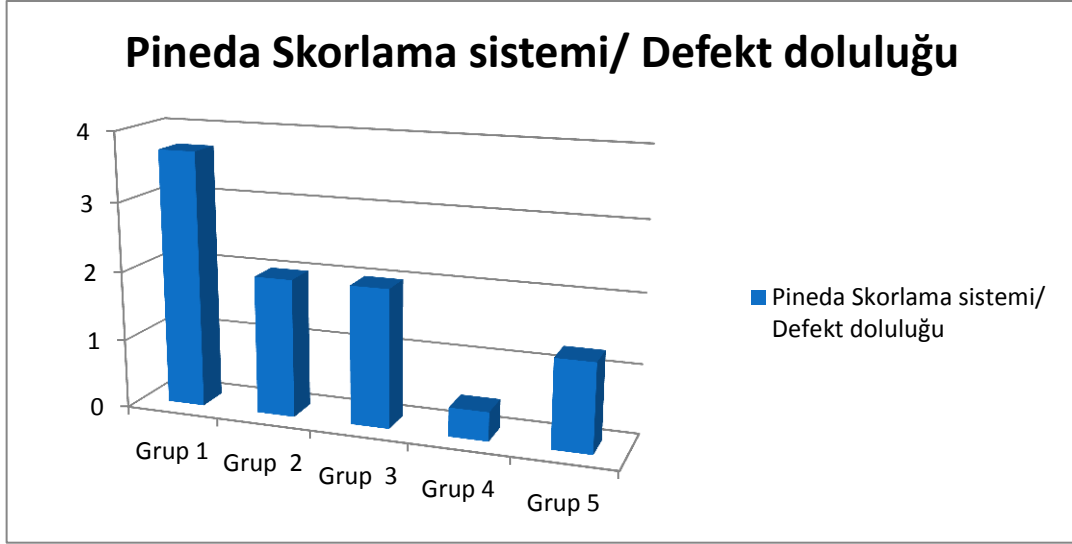
Çalışma her kulak bir grup ve yedişer adet olacak şekilde 18 denek ile yürütüldü. Çalışma sırasında denek kaybı veya çalışma dışı bırakılacak herhangi bir komplikasyon gelişmedi.

7.1. Bulguların Makroskobik Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analizleri

Dokular histolojik inceleme için fikse edilmeden önce her defekt gross olarak incelendi ve defektin son hali fotoğraflandı. Tüm gruptaki denekler öncelikle oluşturulan 1x1 cm lik kıkırdak defektinin doluluk oranına göre makroskobik olarak değerlendirildi. Tüm kontrol ve denek gruplarının defekt doluluk oranları Pineda Histolojik Skorum Sistemi kullanılarak skorlandı. Onarım dokusunun bitişiğindeki sağlam kıkırdakla farkını belirleyen kıkırdak geçiş zonu özellikleri değerlendirildi. Defekt alanında oluşan onarım dokusunun renk, sağlamlık, yüzey özellikleri değerlendirildi. Sonuçlar Windows için SPSS 16,0 istatistik programında ANOVA ve Mann Whitney U testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

Tablo 19 :Pineda Histolojik Skorum Sistemi'ne göre Defekt doluluk oranlarının Tanımlayıcı İstatiksel analizi

Defekt Doluluk Oranı	Defekt Doluluk Skoru	Ortalama ve Standart sapma değerleri
	(Tüm deneklerde sırasıyla)	
Grup 1	3,4,4,4,3,4,4	3,71±0,48
Grup 2	3,2,3,1,2,2,1	2,00±0,81
Grup 3	2,2,2,2,1,2,3	2,00±0,57
Grup 4	0,1,0,0,1,0,1	0,42±0,53
Grup 5	1,2,1,1,2,1,1	1,28±0,48



Şekil 39: Tüm gruplarda Defekt Doluluğu oranlarının Pineda Skorlama sistemine göre değerlendirme sonuçları

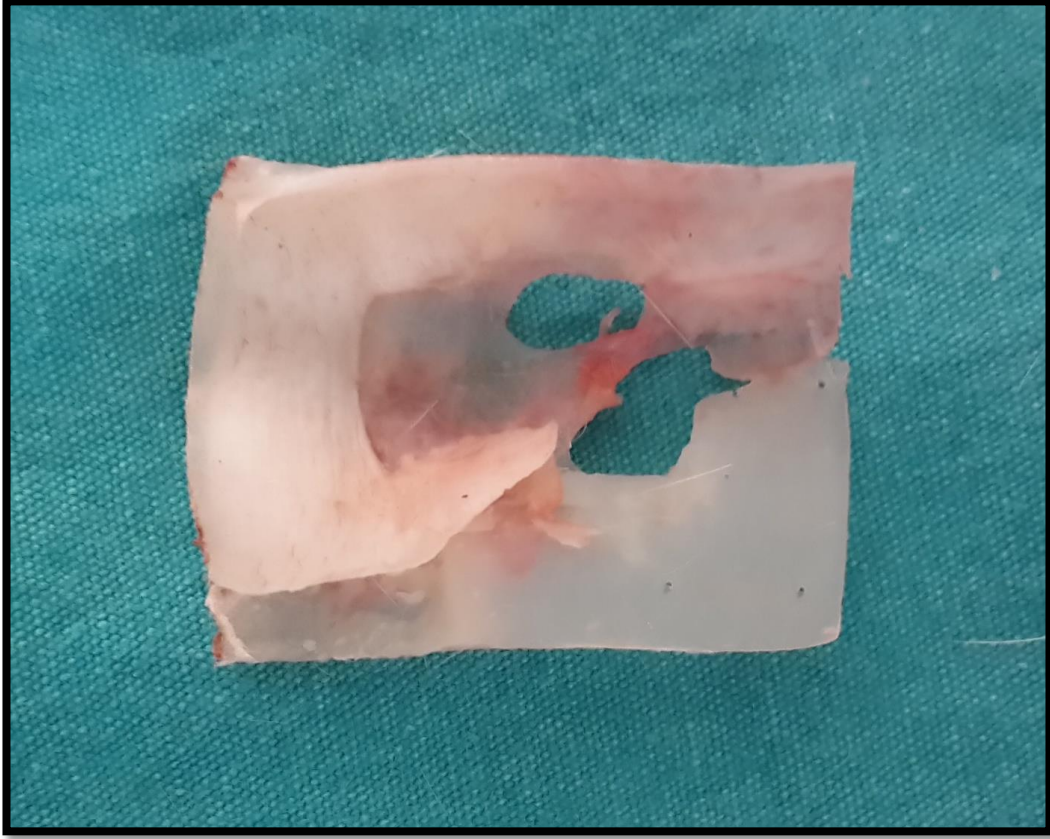
Histomorfometrik incelemede Pineda Skorlama sistemine göre kontrol grubu (Grup1) ve tüm deney grupları arasında onarım dokusu defekt doluluğu ve çevre kıkırdak bağlantıları açısından oldukça anlamlı fark vardı. (Hepsinde p değeri $\leq 0,05$) (Tablo 19) Kontrol grubu kabul edilen Grup 1'teki deneklerde oluşturulan defektin yalnızca perikondrium etkisiyle, ancak ortalama % 25 oranında kapandığı (ortalama olarak $3,71\pm 0,48$) ve doku iskelesi kullanılan tüm deney gruplarında ise perikondrium rejenerasyon kapasitesinin anlamlı orandığı artarak defekti kapattığı gözlemlendi. En iyi onarım dokusu Grup 4 'teki deneklerde gözlemlendi; ortalama $0,42\pm 0,53$ değeri ile neredeyse tüm deneklerdeki defektlerin tamamına yakın kapanmış olduğu gözlemlendi. rhBMP 7 nin kontrollü salınımının gerçekleştirildiği EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin doku iskelesi kullanılan Grup 4 ve Grup 5 'te, yalnızca EGF kullanılan doku iskelesi gruplarına göre anlamlı oranda defekt doluluğu oranının arttığı gözlemlendi. Dual büyüme faktörü kullanılarak hazırlanan doku iskelesinin rulo yapılarak perikondrium etkisinden uzaklaştırıldığı Grup 5 teki deneklerde ise defekt doluluğu oranı Grup 4 'e göre anlamlı olarak azdı. (p: 0,015) (Tablo 20)

Tablo 20 : Defekt doluluğu oranlarına göre grupların Mann Whitney U testi ile istatistiksel karşılaştırılması

DEFEKT DOLULUK ORANLARI	"P" değeri
	(Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmalı olarak elde edilmiştir. "P" değeri $\leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.)
Grup 1 -2	0,003
Grup 1-3	0,002
Grup 1-4	0,001
Grup 1-5	0,001
Grup 2-3	1,000
Grup 2-4	0,004
Grup 2-5	0,080
Grup 3-4	0,002
Grup 3-5	0,003
Grup 4-5	0,015

7.1.1. Grup 1, Makroskopik Değerlendirme

Kontrol grubunda perikondrium diseke edildiğinde, defektin minimal kontrakte olarak küçüldüğü görüldü. (Şekil 40) Grup içerisinde tüm deneklerde, defektin küçük bir kısmında onarım dokusu görülürken, özellikle defekt kenarlarında, komşu kıkırdakla bağlantı bölgelerinde yaygın fibrozis ve yer yer ossifiye doku dikkati çekti. Tüm defekt alanlarında yüzey düzensizliği mevcuttu. Doku katlandığında defekt kenarlarının dahilinde minimal eğilme görüldü. Kontrol grubunda defektin santral alanlarında yeni doku oluşumu olmadığı veya minimal doku rejenerasyonu olduğu izlendi. Oysa tüm denek gruplarında santralde bazı alanlarda yeni doku oluşumu gözlemlendi ve defektin onarım miktarı kontrol grubundan daha fazla olarak izlendi. (Şekil 45) Grup 1.kontrol grubu için Pineda histolojik skorlama sonuçlarının tanımlayıcı istatistiksel analizlerine göre defekt doluluğu değeri ortalama $3,71 \pm 0,48$ olarak derecelendirilerek, tüm deney gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu. ($p \leq 0,05$) (Tablo20)



Şekil 40. Grup 1 (Kontrol grubu) ,denek 3, makroskopik görünüm.

7.1.2. Grup 2, Makroskopik Değerlendirme

EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin Sünger Matriksin (GS-MS-EGF) defekt alanına düz olarak yerleştirildiği Grup 2’de, perikondrium diseke edildiğinde kontrol grubuna göre defektin daha az kontrakte olduğu, defekt santralinde daha fazla onarım dokusu olduğu görüldü. Defektin santralindeki yeni dokunun kıkırdak benzeri saydam gümüşü renkte olduğu ve çevre kıkırdakla kıyaslandığında daha ince olduğu saptandı. Ancak dokunun Grup 4 ve Grup 5 deneklere göre daha yumuşak ve daha kırılğan olduğu düşünüldü. Doku katlandığında oluşan dokuda minimal eğilme saptandı.(Şekil 41) Tüm deneklerde, sağlam kıkırdak dokuyla en az 2 bölgeden bağlantı bölgesi içerdiği görüldü.(Şekil 46,47)



Şekil 41 :Grup 2, denek 2, makroskopik görünüm.

Grup 2 denek grubu için Pineda histolojik skorlama sonuçlarının tanımlayıcı istatistiksel analizlerine göre defekt doluluğu değerleri ortalama $2,00 \pm 0,81$ olarak derecelendirildi.

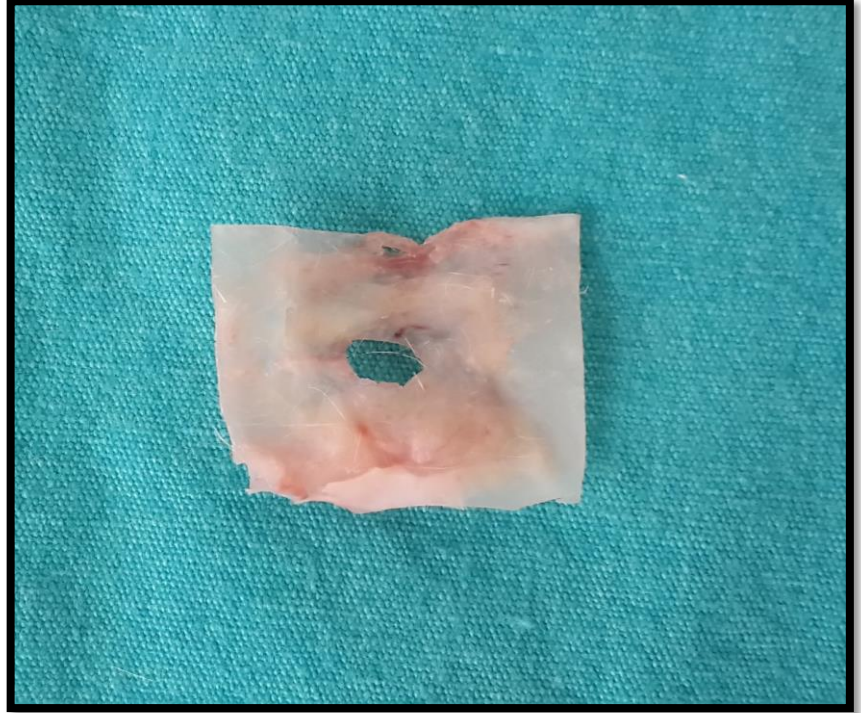
7.1.3. Grup 3, Makroskopik Değerlendirme

EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin Sünger Matriksin (GS-MS-EGF) defekt alanına, perikondrium etkisinden uzaklaştırarak rulo olarak yerleştirildiği Grup 3'te defekt alanının bir miktar küçüldüğü, rulo kenarlarından minimal kalınlaşma şeklinde onarım dokusu oluştuğu, fakat defekt santralinde gelişen yeni onarım dokusunun defekt kenarlarında matriksin temas ettiği yüzeylere göre çok daha ince olduğu gözlemlendi.

Bu görüntü grup yüzey düzensizliği açısından Grup 1 kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydi. Matriksin temas ettiği yüzeylerde çevre kıkırdakla bağlantı bölgelerinde matriks şekline uygun biçimde yaygın fibrozis görüntüsü hakimdi ve bu dokuyla santralde gelişen onarım dokusundan keskin sınırlarla ayrılmaktaydı. (Şekil 42) Matriksin rulo olarak yerleştiği Grup 5 deneklerin kesitlerinde de aynı görünüm mevcuttu.

Grup 3 denek grubu için Pineda histolojik skorlama sonuçlarının tanımlayıcı istatistiksel analizlerine göre defekt doluluğu değerleri ortalama $2,00 \pm 0,57$ olarak derecelendirildi.

Şekil42. Grup3, Denek4, makroskopik görünüm

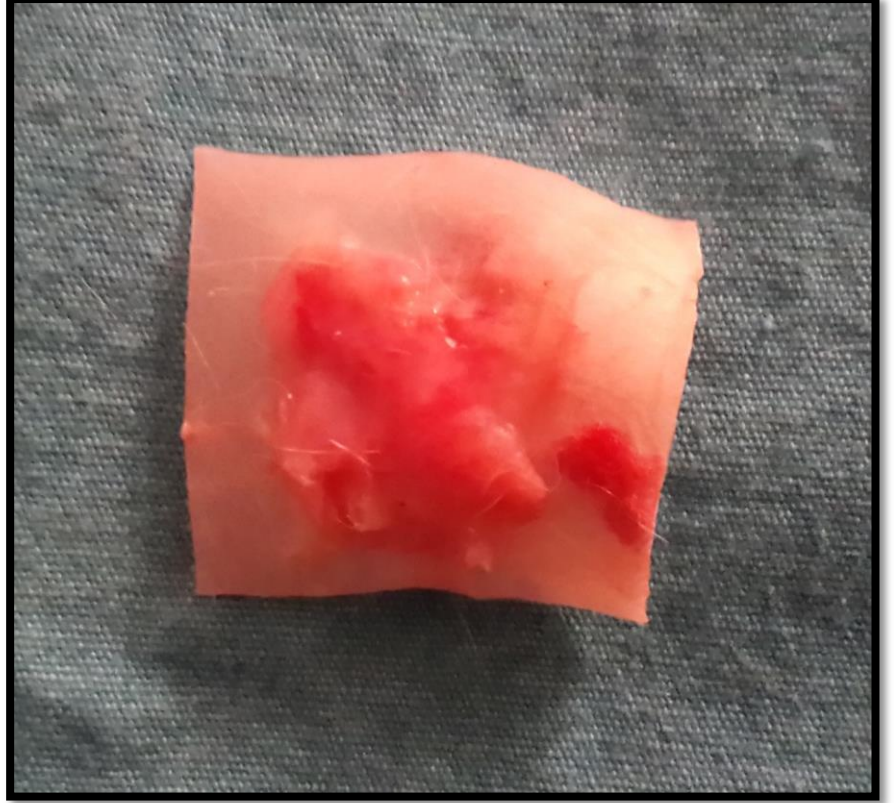


7.1.4. Grup 4, Makroskopik Değerlendirme

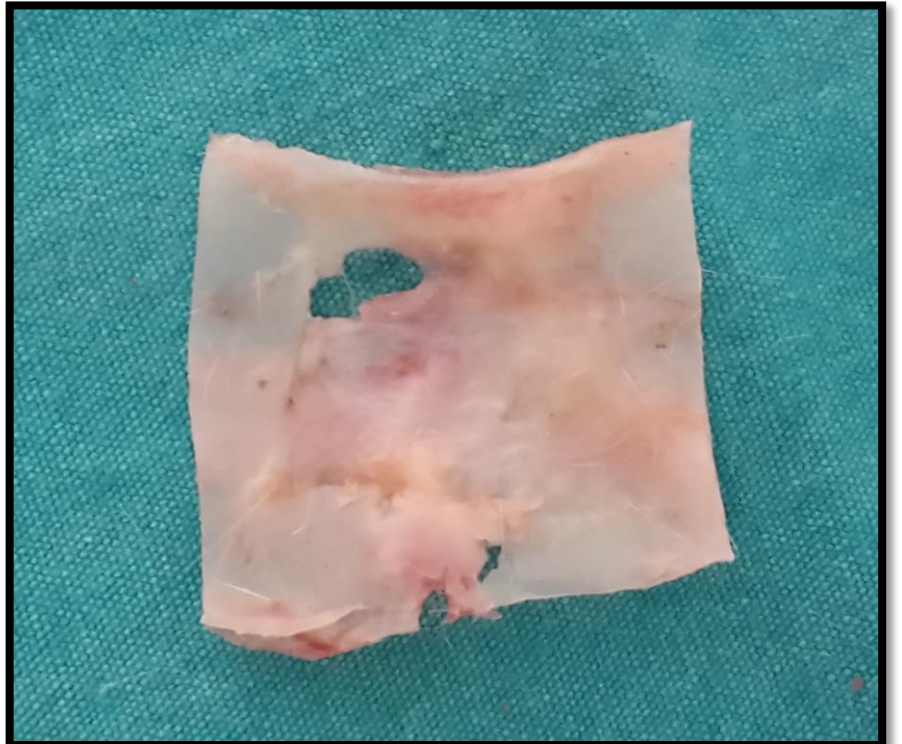
EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin Sünger üzerinde rhBMP 7 kontrollü salınımı gerçekleştiren (GS-MS-EGF-BMP 7) matriksin defekt alanına düz yerleştirildiği Grup 4 ' te perikondrium diseke edildiğinde kotraksiyonun diğer gruplara oranlara çok daha az olduğu görüldü. Defektler hemen hemen tümüyle kıkırdak dokuya benzer alanlar ile doluydu ve düzenli doku ile iyi bir devamlılık vardı. Santral defekt alanının tamamen onarım dokusuyla doldurulduğu, defektin kenarlarıyla onarım dokusunun sınırlarının diğer gruplara göre daha fazla kaybolduğu görüldü. Santralde oluşan yeni dokuda fibrozis ve kemiksi doku diğer gruplara göre çok daha az göze çarpmaktaydı. Oluşan dokunun katlandığında etraf dokuyla bükülgenliği arasında minimal fark olduğu gözlemlendi. (Şekil 43-44)

Grup 4 denek grubu için Pineda histolojik skorlama sonuçlarının tanımlayıcı istatistiksel analizlerine göre defekt doluluğu değerleri ortalama $0,42 \pm 0,53$ olarak derecelendirildi. Tüm denek ve kontrol gruplarını karşılaştırdığımız zaman en iyi sonuçların Grup 4 te olduğu, 1x1 cm'lik defektin neredeyse tüm deneklerde tamamen onarıldığı, yeni oluşan dokunun her bölgeden çevre kıkırdakla bağlantılı olduğu gözlemlendi.

Şekil43.Grup4,Denek1
Makroskobik +Görünüm



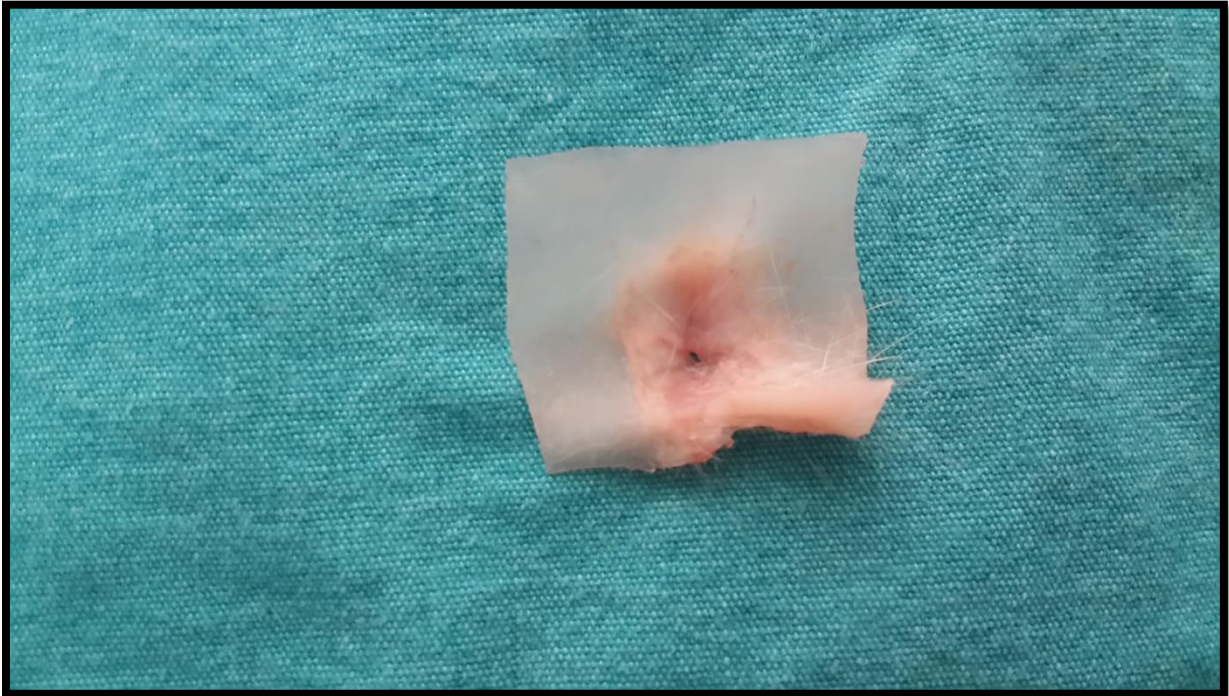
Şekil 44 Grup 4, Denek 6
,Makroskobik görünüm



7.1.5. Grup 5, Makroskopik Değerlendirme

EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin Sünger üzerinde rhBMP 7 kontrollü salınımı gerçekleştiren (GS-MS-EGF-BMP7) matriksin defekt alanına rulo yapılarak yerleştirildiği Grup 5 ' te perikondrium diseke edildiğinde kontraksiyonun yine daha az olduğu görüldü. Santral defekt alanında bir miktar onarım dokusu geliştiği, ama defekt alanını tam dolduramadığı gözlemlendi. Kullanılan doku iskelesinin perikondriuma temas ettiği bölgeler ve çevresinde, diğer alanlara göre daha kalın bir onarım dokusu geliştiği gözlemlendi. Makroskopik olarak en fazla dikkat çeken defektin kenarlarında perikondrium yapısının hipertrofik olduğu, Grup 3 ' teki deneklere benzer şekilde onarım dokusu sınırlarının santraldeki onarım dokusuyla keskin sınırlarla ayrılmasıydı.(Şekil 45)

Grup 5 denek grubu için Pineda skorlama sonuçlarının istatistiksel analizlerine göre defekt doluluğu değerleri ortalama $1,28 \pm 0,4$ olarak derecelendirildi.



Şekil 45: Grup 5, Denek 2, Makroskopik görünüm

7.2. Mikroskopik Değerlendirme Sonuçları

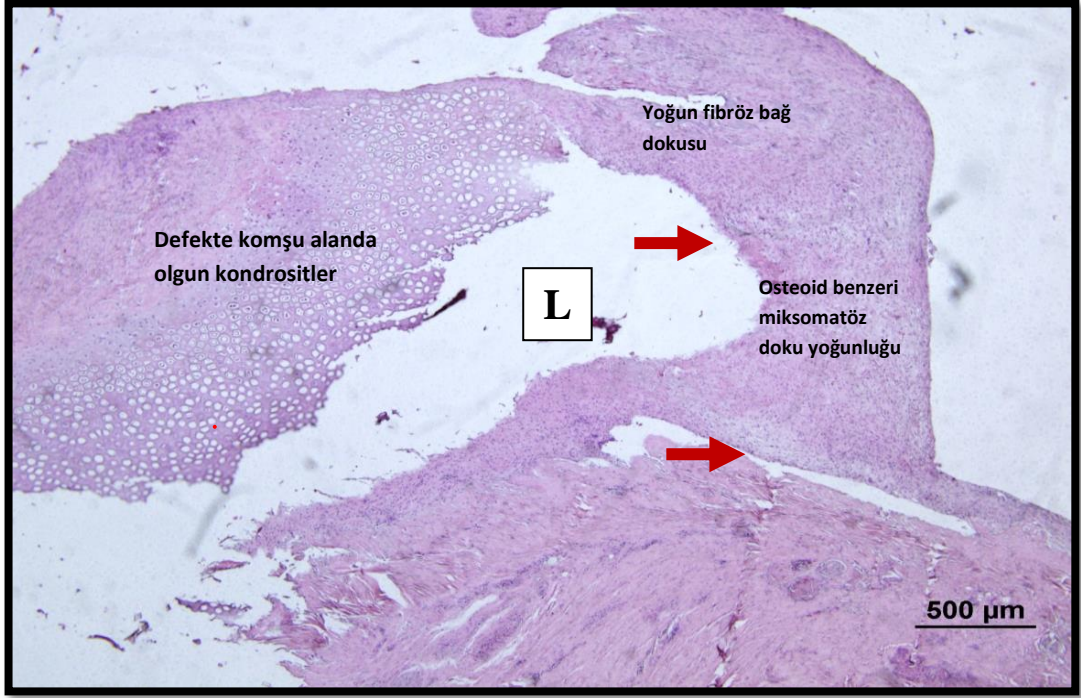
Tüm gruplar aşağıda tek tek irdelendi. Basım sırasındaki magnifikasyonun yanıltıcı olmaması için tüm patoloji resimlerinin sağ alt köşesine bar eklendi. Her preparattaki bar değeri resmin altında belirtildi.

7.2.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirme Sonuçları

7.2.1.1. Grup 1

Kıkırdak defekti oluşturulan deneklere ait hematoksilen- eozin boyalı kıkırdak doku kesitleri incelendiğinde, özellikle sağlam kıkırdak dokusu ile defektin oluşturduğu bölge arasında yoğun fibröz bağ dokusu ve bazı alanlarda özellikle defektin periferinde, perikondriuma komşu bölgelerde az miktarda rejenerasyon gözlemlendi. Defektteki genel alan olarak kondrogenezin en az gözlemlendiği gruptu. Grup 1'de bunun dışında, defektin etraftaki sağlam kıkırdak dokusuna yakın bölgelerde, iyileşme ve az miktarda yeni kıkırdak doku oluşumu dikkati çekti. Yeni oluşan az miktardaki düzensiz görünümlü dokuda fibröz bağ dokusu ve osteoid benzeri miksomatöz doku yoğunluğunun yaygın olduğu ve iyileşme dokusunun büyük bölümünü kapladığı görüldü. Osteoid dokunun içinde lakunlar içinde kondrositlerden çok daha çok osteoblastlara benzeyen hücreler tespit edilmiştir. Baskın olan hücre grubu osteosit ve fibroblastlardı. Defekt yerinin çevre kıkırdakla olan bağlantısının da hemen hemen olmadığı bazı deneklerde ise tek taraflı bağlantı olduğu göze çarptı (Şekil 46-47).

Grup 1. denek grubu için hücre morfolojisi değerleri ortalama $1,71 \pm 0,95$, ve çevre kıkırdak ile bağlantı değerleri ortalama $0,85 \pm 0,37$ olarak derecelendirildi.

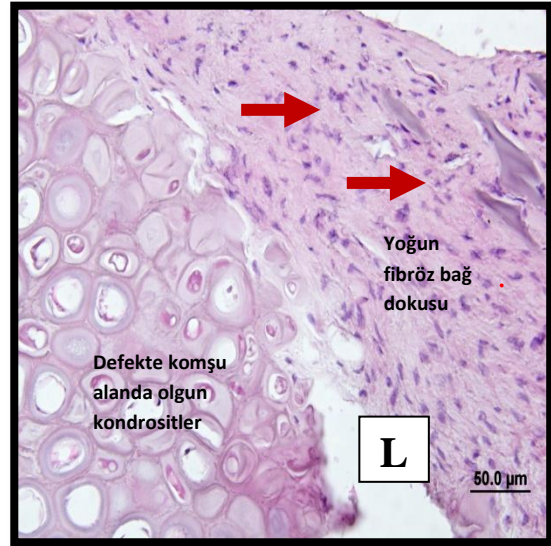
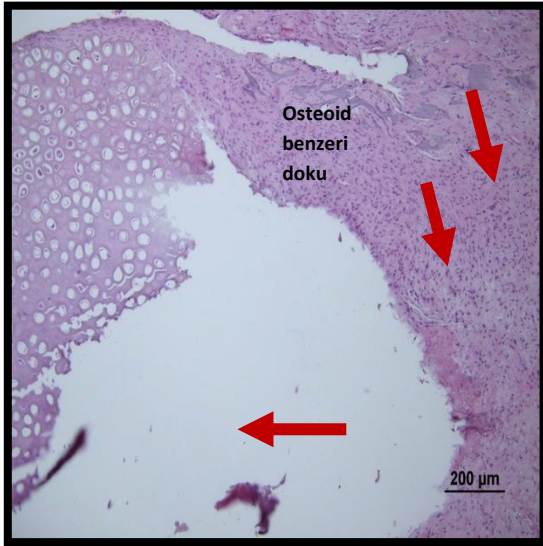


Şekil 46: Grup 1'e ait HE boyalı kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (➔) görülmektedir.

Defekt kenarlarında minimal rejenerasyon gözlenmekte. Defekt merkezinde onarım dokusu oluşmamış.

H&E x4 büyütme. Bar 500µm.



Şekil 47 Grup 1'e ait HE boyalı kesit.

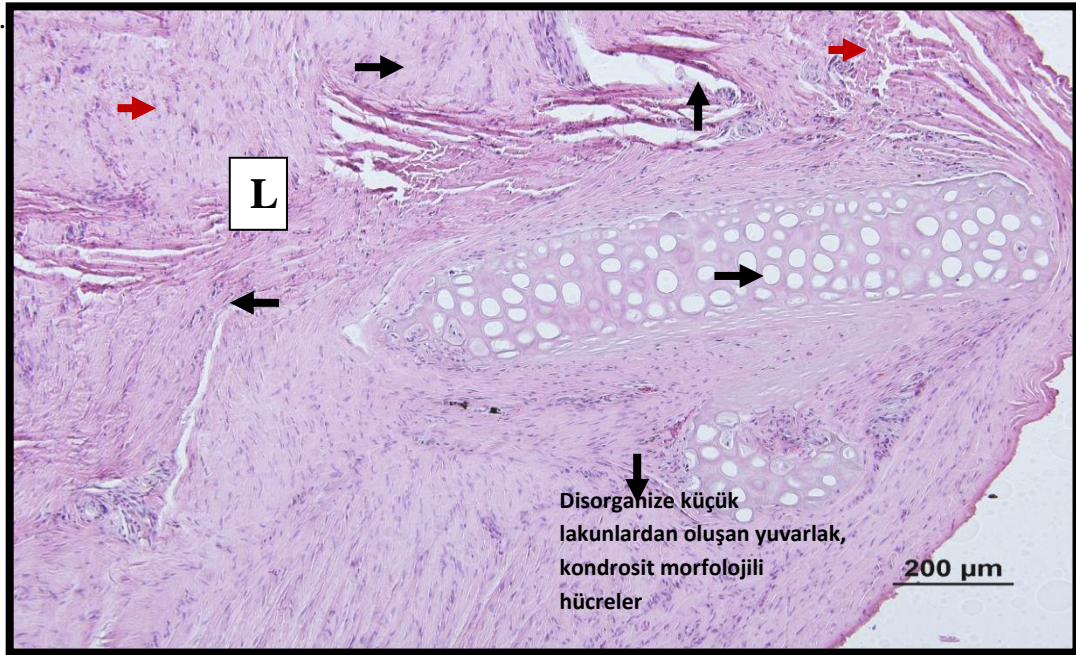
Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (➔) görülmektedir.

H&E x10 büyütme; bar 200 µm, x40 büyütme, bar 50µm.

7.2.1.2. Grup 2

Grup 2'ye ait histolojik görüntüler Grup 1'in görüntülerine göre farklı özellikteydi. Grup 2'de defektlerin histolojik değerlendirmesinde, oluşan yeni dokunun Grup 1'de oluşana göre daha fazla kıkırdak dokuya benzer olduğu dikkati çekti. Bu grupta sadece defekt periferinde değil, aynı zamanda defektin merkez bölgelerinde yeni kıkırdak benzeri doku oluşumu izlendi. Defekt kenarındaki olgun hücrelerle karşılaştırıldığında, daha küçük, daha yuvarlak hücreler benzer hücreler kondrosite benzer morfolojili fakat disorganize dağılım göstermekteydi. Bu hücrelerin defekt alanının tama yakın kısmını kapladığı, ayrıca çevre sağlam kıkırdakla olan bağlantısının da hemen hemen birkaç kenardan olduğu göze çarptı. (Şekil 48,49,50)

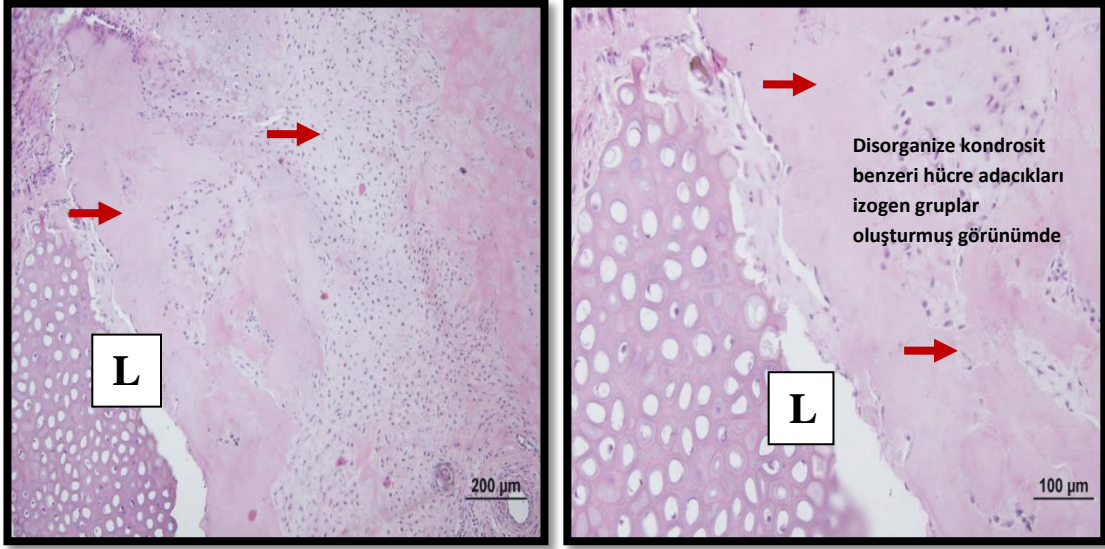
Grup 2. denek grubu için hücre morfolojisi değerleri, ortalama $3,42 \pm 0,53$ ve çevre kıkırdakla ile bağlantı değerleri ortalama $1,28 \pm 0,48$ olarak derecelendirildi.



Şekil 48 :Grup 2'e ait HE boyalı kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (→) görülmektedir.

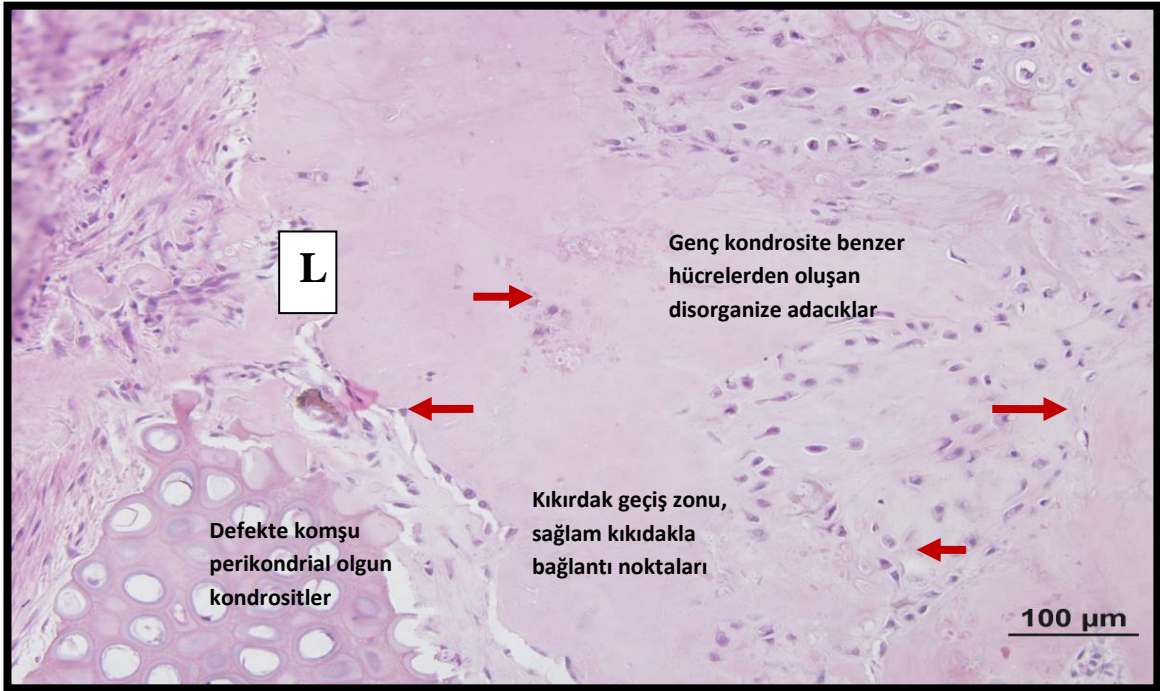
H&E x4 büyütme. Bar 500µm.



Şekil 49: Grup 2'ye ait HE boyalı kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (➡) görülmektedir.

H&E x10 büyütme; bar 200 µm, x20 büyütme, bar 100µm



Şekil 50: Grup 2'e ait HE boyalı kesit.

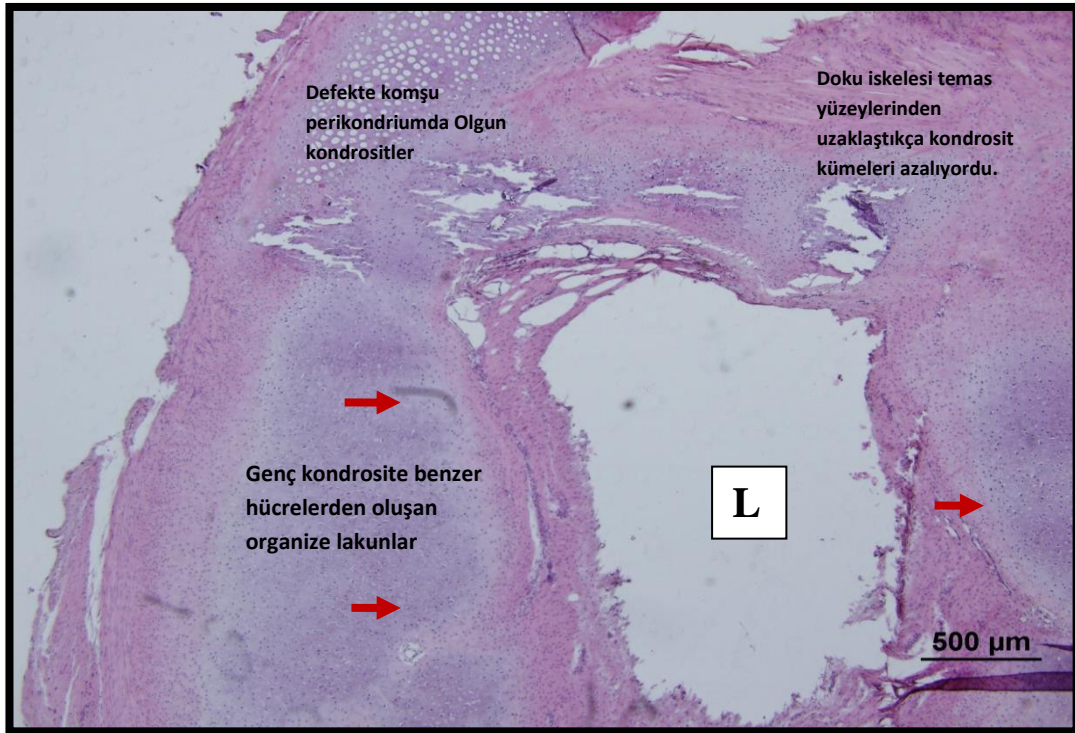
Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku, (➡), %25 ile %75'nin radial dizilim gösteren, çoğunluğu konosit morfolojisinde küçük, yuvarlak hücreler

H&E x4 büyütme. Bar 500µm.

7.2.1.3. Grup 3

Grup 3'e ait histolojik görüntüler Grup 2'deki histolojik görünümlere benzer özellikler göstermekteydi. Oluşan yeni onarım dokusunun Grup 2'deki deneklerde ki gibi kırıldak dokuya benzer şekilde organize oldukları dikkati çekti. Grup 2'deki gibi küçük, yuvarlak, daha ağırlıklı mezenkime benzer hücreler gözlemlendi. Bu küçük hücreler kondrosite benzer morfolojili hücreler olarak yorumlandı. Bu hücrelerin defekt kenarlarını merkeze doğru tama yakın kapladığı, oluşturulan boşluğu grup 2'deki gibi tam kapatamadığı bunun da rulo halinde olan doku iskelesinin yapısından kaynaklandığı düşünüldü. Defekt kenarlarında iyileşme görüldü, ancak merkeze doğru iyileşme dokusunun adacıklar halinde ve perikondrium kenarında kümelenildiği görüldü. Doku iskelesinin temas ettiği bölgelerden uzaklaştıkça, santralde defekt lümenine doğru fibröz dokuda artış olduğu gözlemlendi. Ayrıca çevre sağlam kırıldakla olan bağlantısının da birkaç kenardan olduğu göze çarptı (Şekil 51,52)

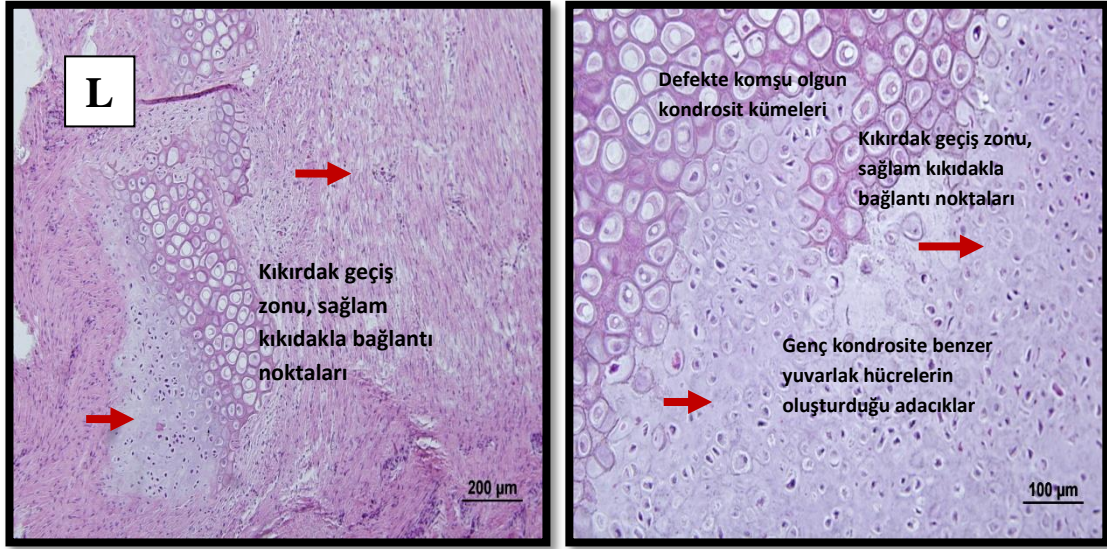
Grup 3 denek grubu için hücre morfolojisi değerleri ortalama $3,42 \pm 0,37$ ve çevre kırıldakla ile bağlantı değerleri * ortalama $1,28 \pm 0,53$ olarak derecelendirildi.



Şekil 51: Grup 3'e ait HE boyalı kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (→) görülmektedir. H&E x4 büyütme. Bar 500µm.

Doku iskelesinin temas ettiği bölgelerde kümeler halinde genç kondrositler yoğun olarak gözlenmektedir.



Şekil 52: Grup 3'e ait HE boyalı kesit.

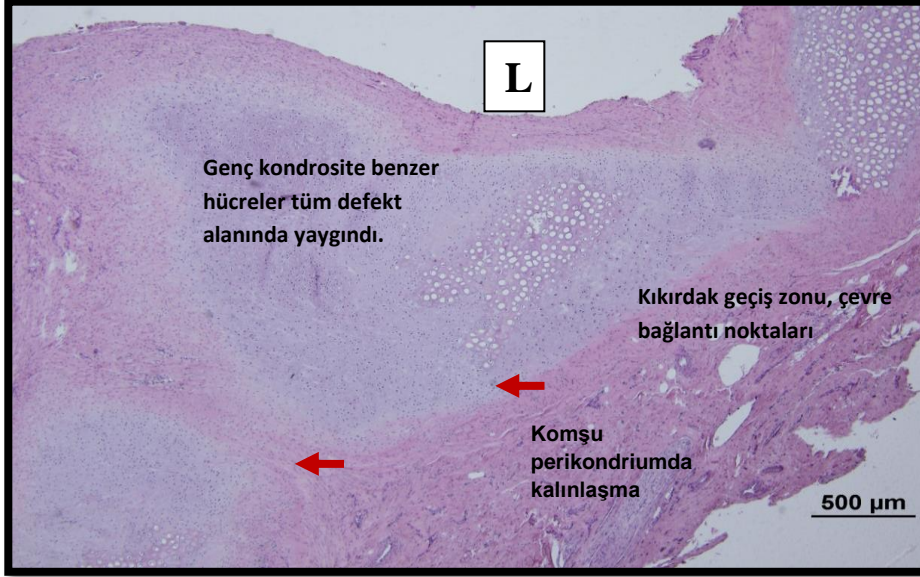
Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (→) görülmektedir.

Doku iskelesinin temas ettiği bölgelerden uzaklaştıkça küçük lakunlu genç kondrosit kümeleri azalmaktaydı.

7.2.1.4. Grup 4

rhBMP-7 immobilize edilmiş EGF ile biyosinyallendirilmiş jelatin doku iskelesinin defekti kaplayacak şekilde düz olarak yerleştirildiği Grup 4'te defektlerde, tüm deneklerde defekt alanında, kıkırdak doku kalınlığını karşılayacak şekilde totale yakın onarım dokusu gözlenmiştir. Yeni oluşan dokunun özellikleri açısından da diğer gruplara göre tüm defekt alanında daha fazla kondrosit adacıkları içerdiği, matriks yapısı açısından da kıkırdak dokuya daha benzer özellikler gösterdiği mikroskopik inceleme ile gösterilmiştir. Büyük lakunalı eski kondrositlerle beraber, benzer yapıllı, ama küçük lakunalı yeni kondrosite benzer hücreler organize lakunlar halinde tüm defekt alanında yaygındı. Ossifikasyon, sadece defekt birleşim hattında görüldü. Neokartilaj dokunun içinde ossifikasyon odağına rastlanmadı. Bu grupta tüm alanda oluşan yeni doku içerisinde yer alan hücrelerin kondrosite benzer şekillerinin yanında, tüm defekt kenarlarının çevre sağlam kıkırdakla olan bağlantısının da tüm taraflarda olduğu göze çarptı. (Şekil 53,54).

Grup 4 denek grubu için hücre morfolojisi değerleri ortalama $3,85 \pm 0,37$ ve çevre kıkırdakla ile bağlantı değerleri ortalama $1,85 \pm 0,37$ olarak derecelendirildi.



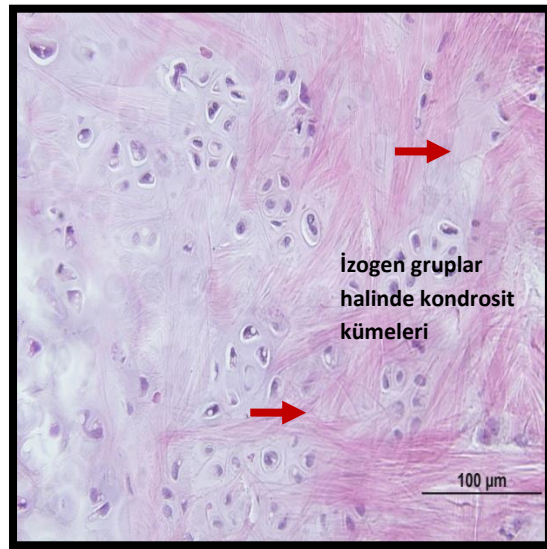
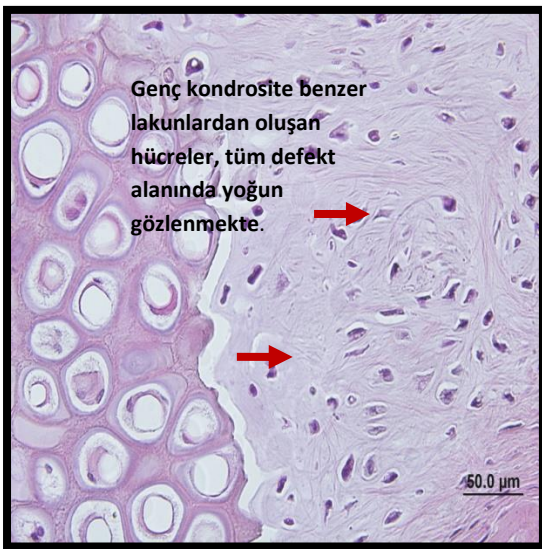
Şekil 53: Grup 4'e ait kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşadoku, kondrosit kümeleri (←) görülmektedir. H&E x4 büyütme. Bar 500µm.

Şekil 54 : Grup 4'e ait kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku, küçük lakunlar halinde yeni kondrosit kümeleri (→) görülmektedir.

H&E x40 büyütme; bar 50 µm, x20 büyütme, bar 100µm.



7.2.1.5. Grup 5

Grup 5'e ait histolojik görüntüler diğer Grup 3 ve 4'teki histolojik görünlere benzer özellikler göstermekteydi. Grup 5'te defektlerin histolojik değerlendirmesinde, oluşan yeni dokunun kıkırdak dokuya benzediği dikkati çaktı. Bu grupta defekt kenarlarında oluşan yeni doku içerisinde yer alan hücrelerin morfolojik olarak kondrositlere çok benzediği gözlenirken, defekt merkezinde daha çok fibroblast proliferasyonu ve fibröz özelliklere sahip onarım dokusu gözlenmekteydi. Defektin kenarlarıyla onarım dokusunun sınırlarının keskin sınırlarla ayrıldığı göze çarpmaktaydı. Bu hücrelerin defekt yerini rulo olarak konulmasına bağlı olarak tamamen kaplayamadığı ve ayrıca çevre sağlam kıkırdakla olan bağlantısının da bazı kenarlarda tam olmadığı göze çarptı. (Şekil 55,56).

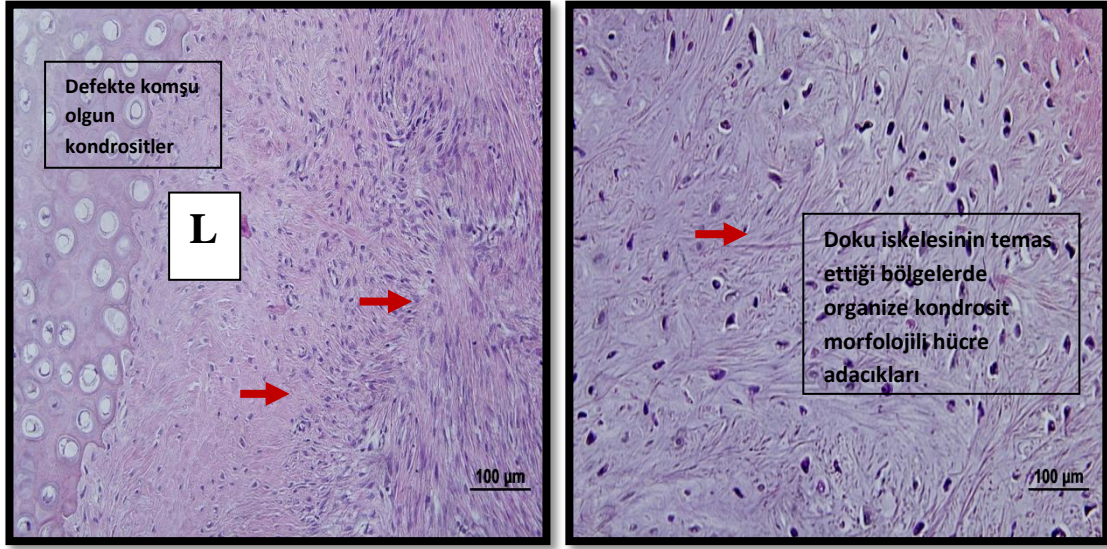
Grup 5 denek grubu için hücre morfolojisi değerleri ortalama $3,71 \pm 0,48$ ve çevre kıkırdakla ile bağlantı değerleri ortalama $1,57 \pm 0,53$ olarak derecelendirildi.



Şekil 55 Grup 5'e ait kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (➔) görülmektedir.

H&E x4 büyütme. Bar 500µm.



Şekil 56 :Grup 5'e ait kesit.

Defekt lümeni (L), yeni oluşan doku (→) görülmektedir.

H&E x40 büyütme; bar 50 µm, x20 büyütme, bar 100µm.

7.2.1.6. HE sonuçlarının skorlanması ve İstatiksel Analizi

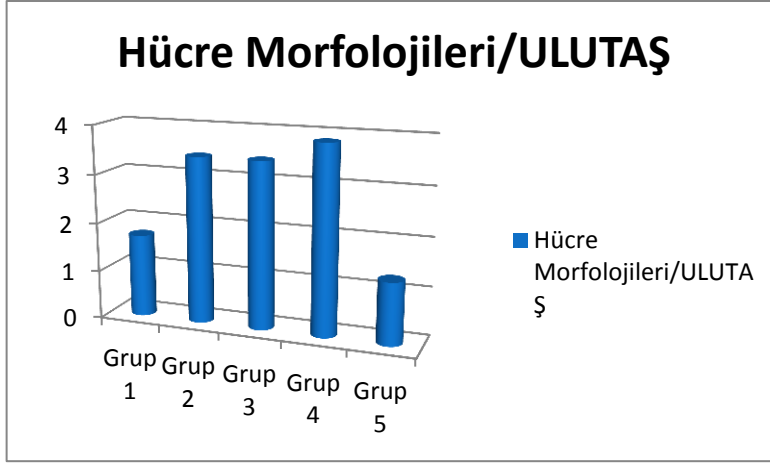
Hematoksilen-Eosin (HE) ile boyanarak kıkırdak hücre morfolojisi ve dağılımı değerlendirilip, kıkırdak geçiş zonu değerlendirilerek morfoloji ve dokunun sağlam doku ile ilişkisi skorlandı. Kesitlere kıkırdak defektlerinde kullanılan histolojik derecelendirme yöntemi uygulanarak, oluşmuş dokunun kalitesi belirlendi. Hücre morfolojileri ve çevre kıkırdak doku ile bağlantı noktalarındaki rejenerasyon için Ulutaş ve arkadaşları tarafından elastik kıkırdak için geliştirilmiş ve 2005 yılında yayınlanmış histolojik derecelendirme yöntemi kullanıldı (13). Ardından sonuçlar semi-kantitatif olarak kritik büyüklükte kıkırdak defekti iyileşmesi için istatistiksel olarak değerlendirildi.(Tablo 21)

Histomorfometrik incelemede Pineda Skorum sistemine göre hücre morfolojisi ve kıkırdak geçiş zonu değerlerine bakıldığında en olumsuz değerler kontrol grubu kabul edilen Grup1 deneklerde, en olumlu sonuçlar ise Grup 4 deneklerdeydi. Hücre

morfolojisi açısından, defekt alanında oluşan onarım dokusu Grup 1 deneklerde kondrosit morfolojisi hücre yoğunluğu yerine osteoblast ve fibroblast benzeri miksamatoz doku yoğunluğundan ibaretti. Grup 1 deneklerde onarım dokusu yüzeyi düzensiz ve çevre kıkırdak dokuyla en fazla 2 noktadan bağlantı içeriyordu. Oysa tüm denek gruplarında en az bir bağlantı noktası vardı ve daha çok kondrosit morfolojili hücre yoğunluğu hakimdi. (Tablo 21-22) Deney grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde hücre morfolojisi olarak istatistiksel olarak anlamlı farklar izlenmedi, fakat kondrosit morfolojili hücrelerin en yoğun gözlemlendiği gruplar Grup 4 ve Grup 5 deneklerdi. Kıkırdak geçiş zonunun devamlılığı en iyi Grup 4 deneklerdeydi. Doku iskelelerinin rulo olarak yerleştirildiği Grup 3 ve Grup 5 te çevre kıkırdak doku bağlantı sayısı, Grup 2 ve Grup 4 e göre anlamlı olarak az olsa da, bağlantı noktalarında kıkırdak geçiş zonu devamlılığı açısından sonuçlar benzerdi.

Tablo 21: Hücre Morfolojisi (ULUTAŞ) özelliklerinin Tanımlayıcı İstatistiksel analizi

Hücre Morfolojisi (ULUTAŞ)	Hücre Morfolojik özellikleriyle skorlama (Tüm deneklerde sırasıyla)	Ortalama ve Standart sapma değerleri
Grup 1	1,1,3,1,2,3,1	1,71±0,95
Grup 2	3,4,3,3,3,4,4	3,42±0,53
Grup 3	3,3,4,3,3,3,3	3,42±0,37
Grup 4	4,4,4,4,4,3,4	3,85±0,37
Grup 5	3,4,4,4,3,4,4	3,71±0,48



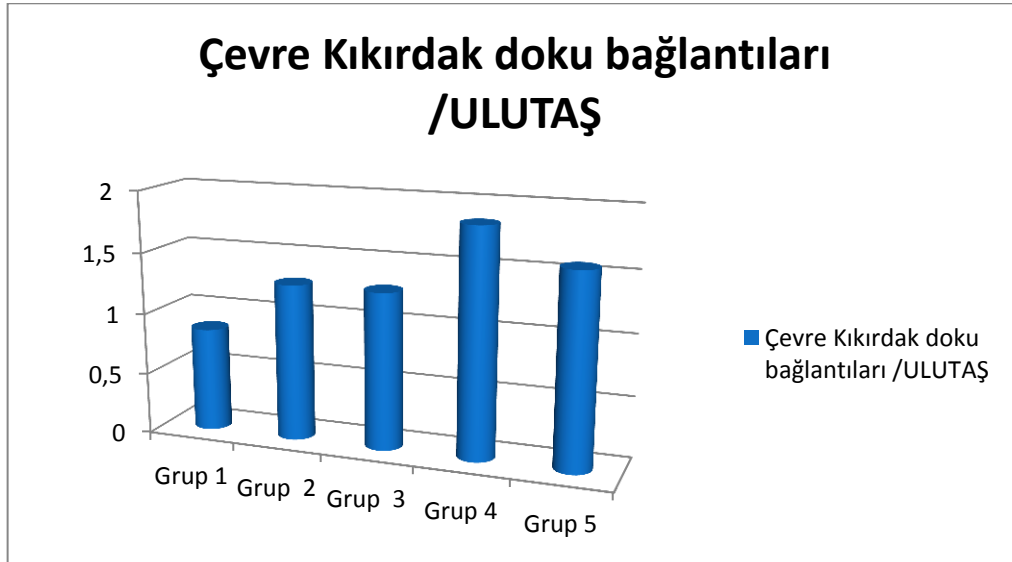
Şekil 57: Skorlama Sistemine göre Hücre Morfolojisi özelliklerinin Gruplararası karşılaştırılması

Tablo 22 :Hücre morfolojisi özellikleriyle grupların Mann Whitney U testi ile istatistiksel karşılaştırılması

HÜCREMORFOLOJİSİ ÖZELLİKLERİ	"P" değeri (Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmalı olarak elde edilmiştir. "P" değeri $\leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.)
Grup 1 -2	0,006
Grup 1-3	0,008
Grup 1-4	0,001
Grup 1-5	0,003
Grup 2-3	0,254
Grup 2-4	0,107
Grup 2-5	0,298
Grup 3-4	0,010
Grup 3-5	0,037
Grup 4-5	0,530

Tablo 23 Ulutaş Histolojk Skorlama Sistemine göre Kıkırdak Geçiş Zonu özelliklerinin İstatiksel analizi

KIKIRDAK GEÇİŞ ZONU ÖZELLİKLERİ (ULUTAŞ)	Kıkırdak geçiş zonu özelliklerine göre skorlama (Tüm deneklerde sırasıyla)	Ortalama ve Standart sapma değerleri
Grup 1	1,1,1,1,1,1,0	0,85± 0,37
Grup 2	1,1,1,2,1,2,1,	1,28±0,48
Grup 3	1,2,1,2,2,1,1	1,28±0,53
Grup 4	2,2,2,2,2,2,1	1,85±0,37
Grup 5	1,2,1,1,2,2,2	1,57±0,53



Tablo 24:Kıkırdak geçiş zon özelliklerine göre grupların Mann WhitneyU testi ile istatistiksel karşılaştırılması

KIKIRDAK GEÇİŞ ZONU ÖZELLİKLERİ	“P” değeri (Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmalı olarak elde edilmiştir. “P” değeri $\leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.)
Grup 1 -2	0,091
Grup 1-3	0,044
Grup 1-4	0,002
Grup 1-5	0,019
Grup 2-3	0,591
Grup 2-4	0,037
Grup 2-5	0,298
Grup 3-4	0,107
Grup 3-5	0,005
Grup 4-5	0,254

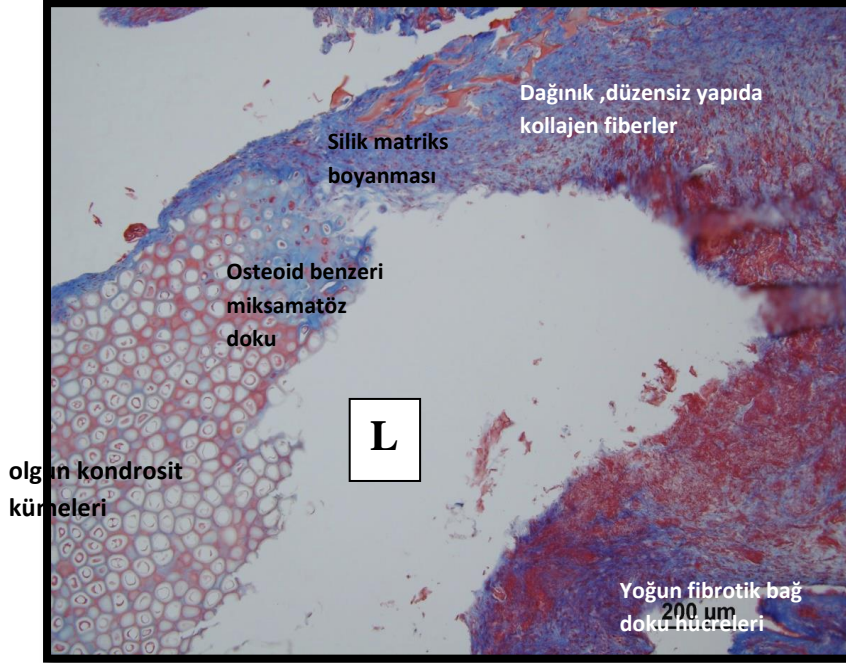
7.2.2. Masson Trikrom Boyama Histolojik Değerlendirme Sonuçları

Bağ dokusunu gözlemlemek, kollajen doku gelişimi ve yaygınlığını incelemek için Masson Trikrom l bağ dokusu boyaması yapıldı. Bu boyama sonucunda nükleuslar siyah, sitoplazma kırmızı, kollajen fibriller ve mukus yapısı mavi görülmektedir. Masson Trikrom boyama ile kollajen fibrillerinin ve kıkırdak dokunun yapı varlığı ile matriks boyanması gösterildikten sonra matriks boyanması için sonuçlar; neokartilaj dokusunun değerlendirilmesi için modifiye edilen Pineda skorumla sistemi kullanılarak derecelendirildi (222). Ardından elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi.

7.2.2.1. Grup 1

Grup 1'deki deneklere ait defektlerin Masson Trikromla boyalı kesitlerinde en çok dikkat çeken defekt kenarlarında kısıtlı miktarda gelişen yeni matriks yapısının çok düzensiz ve silik boyanmış olmasıydı. Yeni kıkırdak doku oluşumunun oldukça sınırlı olduğu, matriks yapısının ise daha çok fibrotik özellikli bağ dokusu olduğu

gözlendi.(Şekil 58,59) Matris yüzeyinde fibroblast ve osteoblastlara benzer hücre grupları yoğunlukta idi. Diğer gruplara göre çok az oranda rastlanan kollajen fibriller yapısı defekt alanında yer yer dağınık ve düzensiz görünümdeydi.

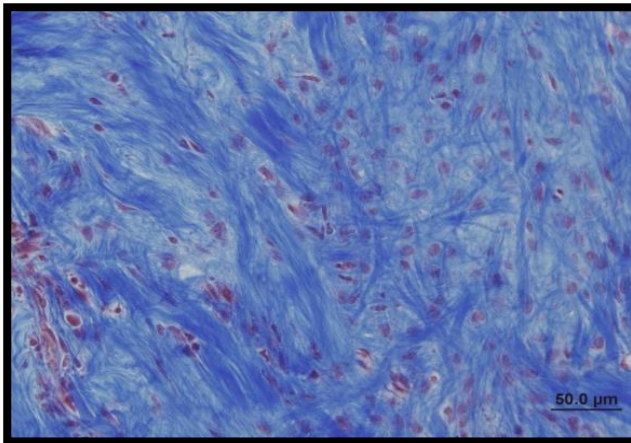


Şekil 58 :Grup 1 'e ait Masson Trikrom boyama kesiti.

MT x4 büyütme. Bar 200µm

Şekil 59 :Grup 1 e ait Masson Trikromla boyama kesiti

MT x20 büyütme. Bar 500µm

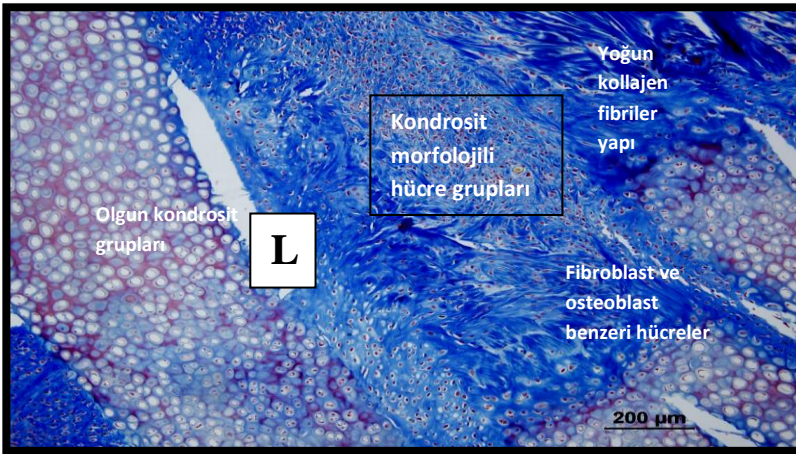


Grup 1. denek grubu için matris boyanma özelliklerine göre değerleri ortalama $3,42 \pm 0,53$ derecelendirildi ve diğer tüm gruplara göre en silik matris boyanma özelliğine sahip olduğu karşılaştırmalı çarpaz istatistiksel testler ile de doğrulandı.

($p \leq 0,05$)

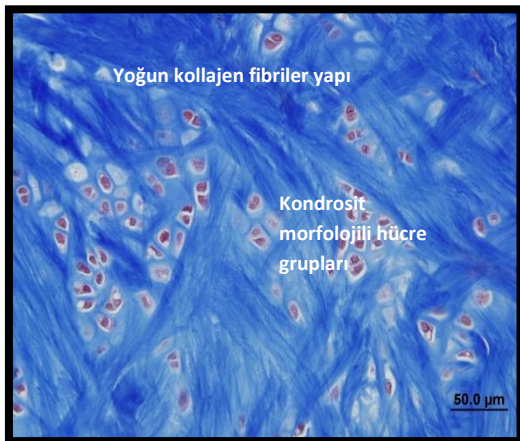
7.2.2.2. Grup 2

Grup 2'deki deneklere ait defektlerin Masson Trikromla boyalı kesitlerinde yeni kırıldak doku oluşumunun defektin totale yakın kısmını kaplayacak kadar iyi olduğu izlendi. Ayrıca matriks boyanması incelendiğinde boyanmanın özellikle defekt kenarlarında olmak üzere oldukça belirgin olduğu gözlemlendi.(Şekil 60,61) Periferden santrale doğru uzanan yoğun kollajen fibriler yapısı dikkat çekiciydi. Kondrosit morfolojili küçük yuvarlak hücreler tüm defekt alanında yaygın olmasına rağmen bazı alanlarda daha yoğun kümeler oluşturdukları gözlemlendi. Defekte komşu perikondrium alanlarında kalınlaşma dikkat çeken başka bir özellikti. Defekt yüzeyinde gözlenen fibroblast ve osteoblast kümeleri çok daha azdı.



Şekil 60 :Grup 2 ye ait Masson Trikrom boyalı kesit,

MT x4 büyütme. Bar 200µm

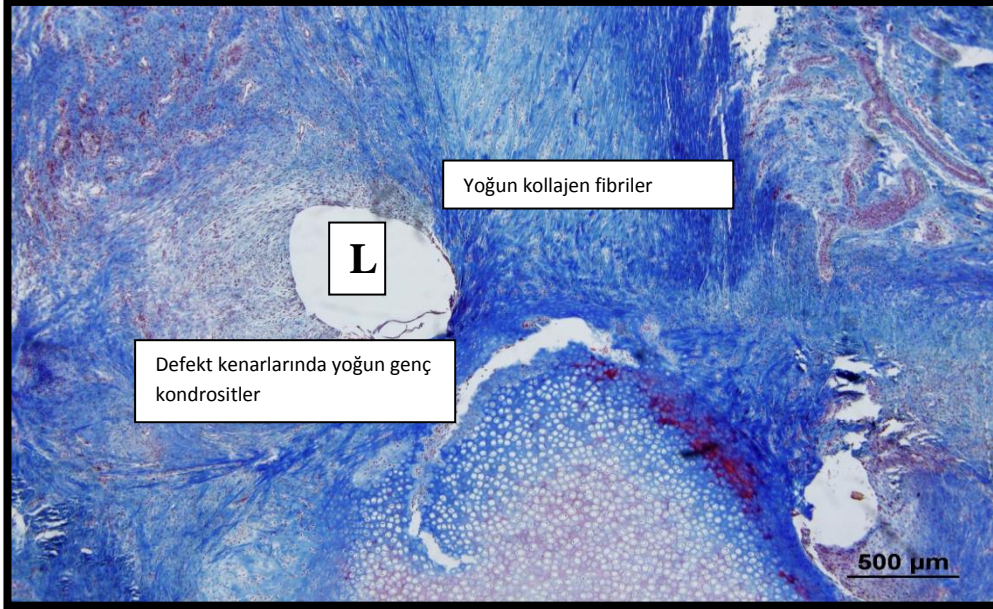


Şekil 61: Grup 2 ye ait Masson Trikrom boyalı kesit, MT x20 büyütme. Bar 500µm

Grup 2. denek grubu için matriks boyanma özelliklerine göre değerleri ortalama $1,00 \pm 0,57$ olarak derecelendirildi.

7.2.2.3. Grup 3

Grup 3'deki deneklere ait defektlerin üçlü bağ dokusu boyası masson trikromla boyalı kesitlerinde doku iskelesinin temas ettiği bölgelerde neokartilaj dokunun yoğun, defekt santralinde ise minimal rejenerasyon olduğu gözlemlendi. Ayrıca matriks boyanması incelendiğinde boyanmanın doku iskelesinin temas ettiği yerlerde oldukça belirgin, defekt merkezine yaklaştıkça boyanmanın silik bir hal aldığı gözlemlendi.(Şekil 62) Bu iki bölge arasında hücre morfolojileri belirgin olarak farklıydı. Periferde kondrosit morfolojili, yuvarlak, küçük hücre grupları yoğun izlenirken, merkeze doğru fibroblast proliferasyonları dikkat çekiciydi.



Şekil 62 :Grup 3'e ait Masson Trikrom boyalı kesit,

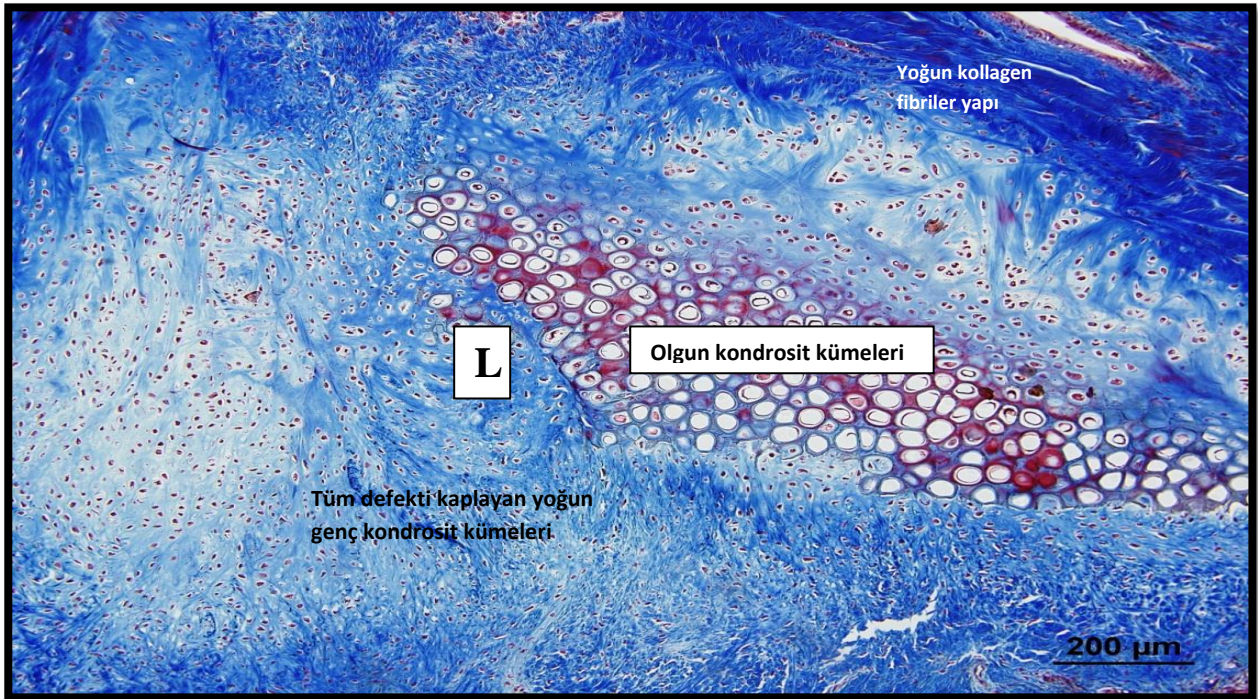
MT x4 büyütme. Bar 200µ

Grup3. denek grubu için matriks boyanma özelliklerine göre değerleri ortalama $1,00 \pm 0,48$ olarak derecelendirildi.

7.2.2.4. Grup 4

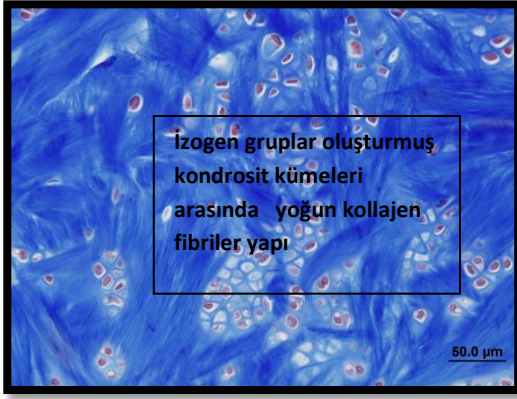
Grup 4'teki deneklere ait defektlerin üçlü bağ dokusu boyalı kesitlerinde yeni oluşan dokuda yer alan kıkırdak benzeri hücrelerin 2'li 3'lü gruplar oluşturarak lakunlar halinde bulunduğu ve kıkırdak dokusu hücreleri olan kondrositlere morfolojik olarak çok benzerlik gösterdiği gözlemlendi. Matriks boyanması incelendiğinde boyanmanın özellikle defektin merkezinde olmak üzere tüm bölgelerde oldukça belirgin olduğu gözlemlendi.(Şekil 63,64,65) Diğer gruplardan farklı olarak osteoblast morfolojili hücrelere çok az rastlandı.

Grup 4 denek grubu için matriks boyanma özelliklerine göre değerleri ortalama $0,42 \pm 0,53$ olarak derecelendirildi. Tüm gruplar arasında en güçlü matriks boyanması özelliğine bu grup sahipti ve bu değer istatistiksel olarak da anlamlıydı.

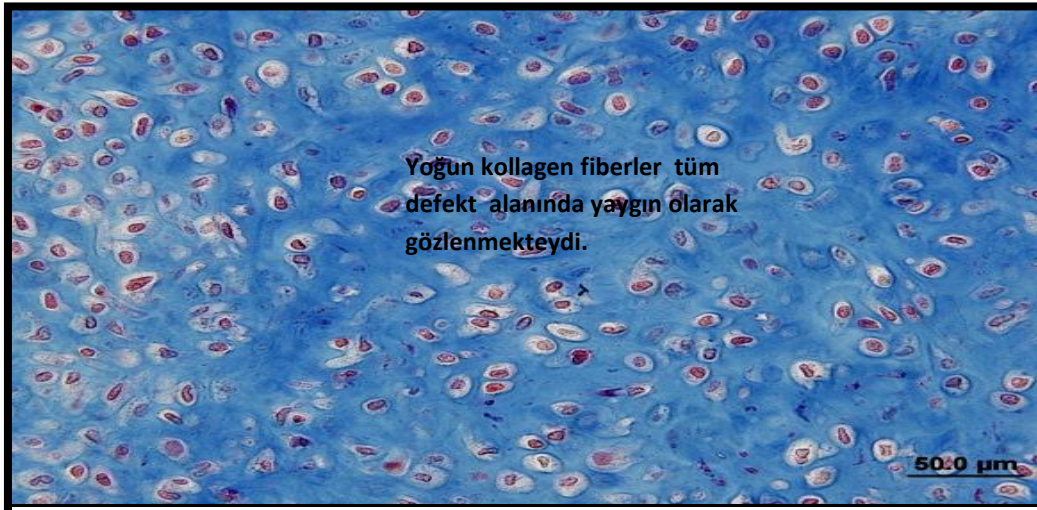


Şekil 63 :Grup 4'e ait Masson Trikrom boyalı kesiti,

MT x4 büyütme. Bar 200µm



Şekil 64:Grup 4 'e ait Masson Trikrom boyalı kesitler

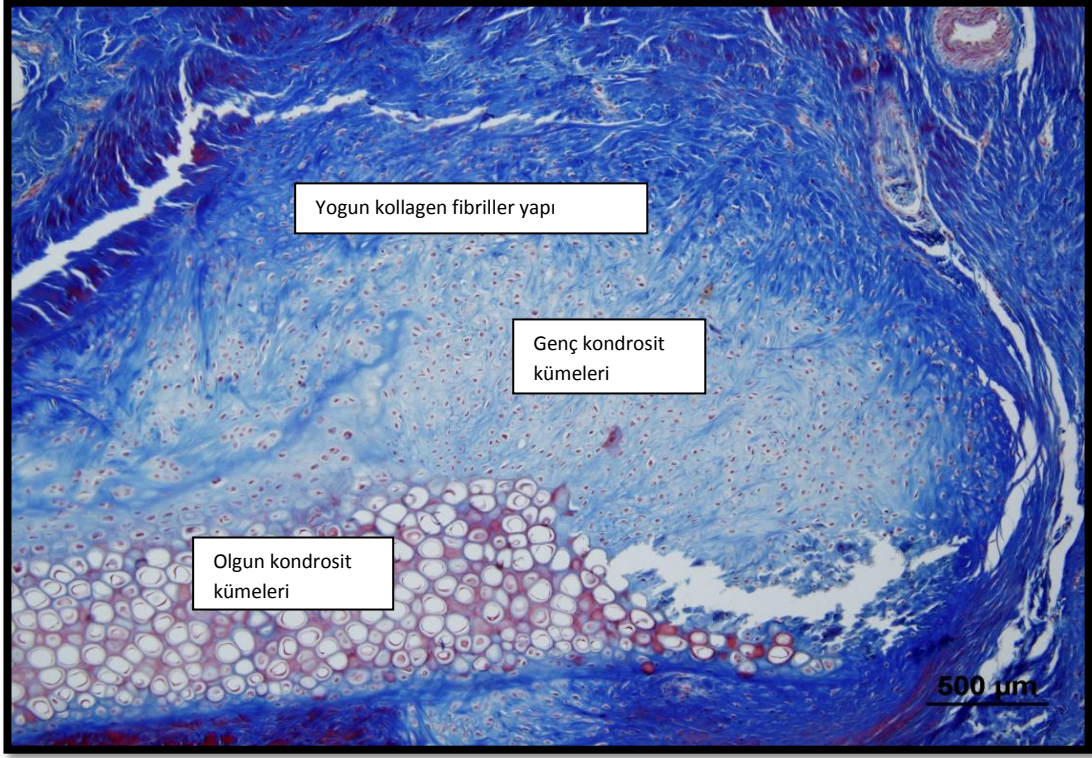


Şekil 65: Grup 4 'e ait Masson Trikrom boyalı kesit

7.2.2.4. Grup 5

Grup 5 'teki deneklere defektlerin üçlü bağ dokusu boyalı kesitlerinde yeni kıkırdak doku oluşumunun, doku iskelesi ve dual büyüme faktörünün yerleştirildiği bölgelerde oldukça iyi olduğu, bu yönüyle Grup 4 denekler ile benzerlik gösterdiği, ayrıca matriks boyanması incelendiğinde boyanmanın defekt kenarlarında oldukça belirgin olduğu gözlemlendi. Doku iskelesi rulo olarak yerleştirildiği için iskelenin olmadığı defektin merkezinde ise kondrosit benzeri hücrelerinin yoğunluğunun az ve matriks boyanmasının oldukça sili olduğu izlendi. (Şekil 66,67)

Grup 5 denek grubu için matriks boyanma özelliklerine göre değerleri ortalama $0,57 \pm 0,53$ olarak derecelendirildi.



Şekil 66: Grup 5' e ait Masson Trikrom boyalı doku kesiti

MT x4 büyütme. Bar 500µm



Şekil 67: Grup 5' e ait Masson Trikrom boyalı doku kesiti

MT x20 büyütme. Bar 100µm

7.2.2.6 Masson Trikrom Boyama Sonuçlarının İstatiksel Analizi

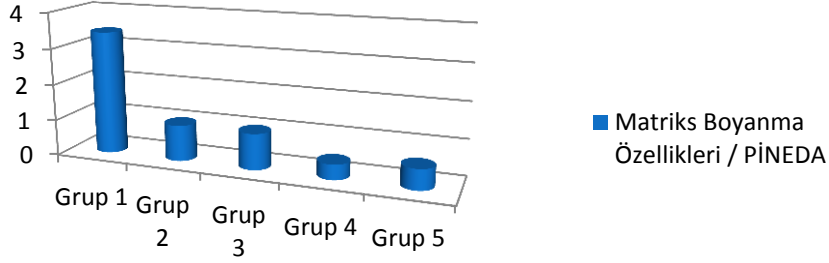
Bağ dokusunu gözlemlemek ve kollajen doku oluşumunu incelemek için Masson Trikrom üçlü bağ dokusu boyaması yapıldı. Masson Trikrom boyama ile kollajen fibrillerinin ve kıkırdak yapının varlığı ile matriks boyanması gösterildikten sonra matriks boyanması için sonuçlar; modifiye Pineda skorlama sistemi kullanılarak derecelendirilmiş(222), ardından elde edilen skorlama sonuçları istatiksel olarak değerlendirilmiştir.

Grup 1 ' e göre Grup 2, Grup 3,Grup 4 ve 5'te Kollajen fibriler yapı miktarının arttığı, en güçlü matriks boyanma özelliğinin ise Grup 4 ' te olduğu gözlemlendi. Diğer denek grupları arasında matriks boyanması açısından istatiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da, Grup 5 deneklerin de matriks boyanmasının diğer deneklere göre daha güçlü olduğu gözlemlendi.(Tablo 25-26) Defektin rulo olarak yerleştirildiği, Grup 3 ve Grup 5 deneklerde de oluşan onarım dokusu miktarı daha az olsa da, onarım dokusundaki matriks boyanma özelliği açısından Grup 2 ve Grup 4 ile sonuçlar benzerdi.

Tablo 25 Matriks boyanma özelliklerine göre grupların skorlaması(PİNEDA)

MATRİKS BOYANMA ÖZELLİKLERİ (PİNEDA)	Matriks boyanma özelliklerine göre skorlama (Tüm deneklerde sırasıyla)	Ortalama ve Standart sapma değerleri
Grup 1	4,4,4,3,3,3,3	3,42± 0,53
Grup 2	1,1,1,2,1,1,0	1,00±0,57
Grup 3	1,1,1,2,1,1,2	1,00±0,48
Grup 4	0,1,0,0,0,1,1	0,42±0,53
Grup 5	1,1,0,1,1,0,0	0,57±0,53

Matriks Boyanma Özellikleri / PİNEDA



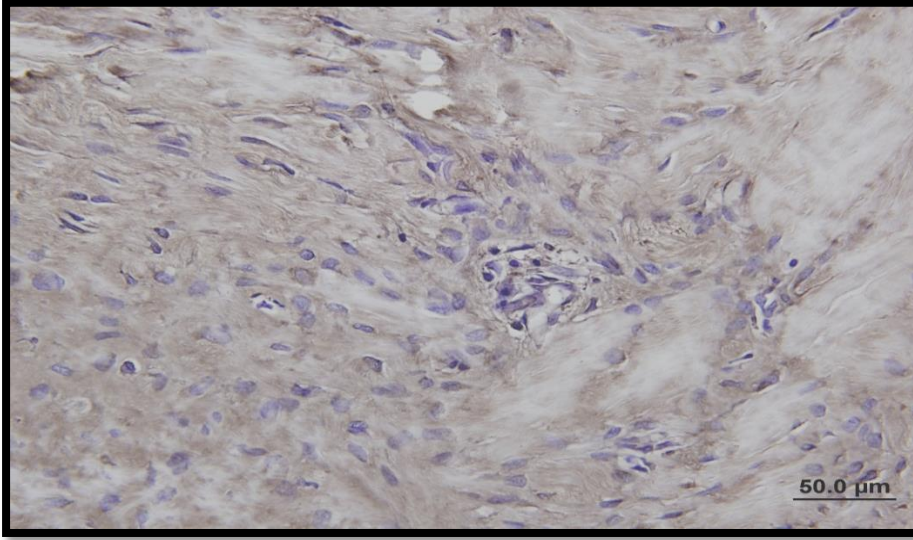
Tablo 26: Matriks boyanma özelliklerine göre grupların Mann Whitney U testi ile istatistiksel karşılaştırılması

MATRİKSBOYANMA ÖZELLİKLERİ(PİNEDA)	"P" değeri (Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmalı olarak elde edilmiştir. "P" değeri $\leq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.)
Grup 1 -2	0,001
Grup 1-3	0,001
Grup 1-4	0,001
Grup 1-5	0,001
Grup 2-3	0,334
Grup 2-4	0,081
Grup 2-5	0,174
Grup 3-4	0,015
Grup 3-5	0,030
Grup 4-5	0,606

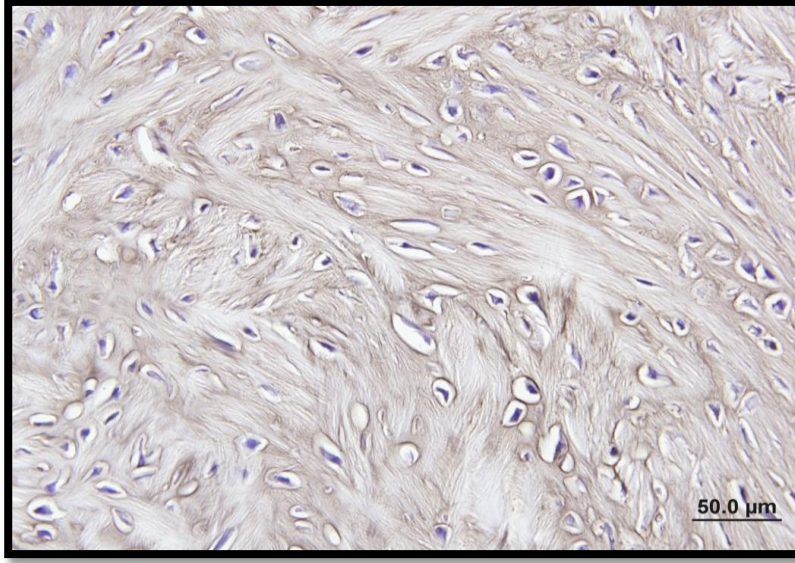
7.2.3. İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Hücrelerdeki Tip-1 prokollajen moleküllerinin varlığını belirlemek için Tip-1 prokollajen Antikor boyaması yapıldı. Gruplar arası Tip-1 prokollajen moleküllerinin dağılımını belirlemek için, kıkırdak dokusunun dört farklı bölgesinde en az 10 ayrı alandan semikantitatif ölçümler yapıldı.

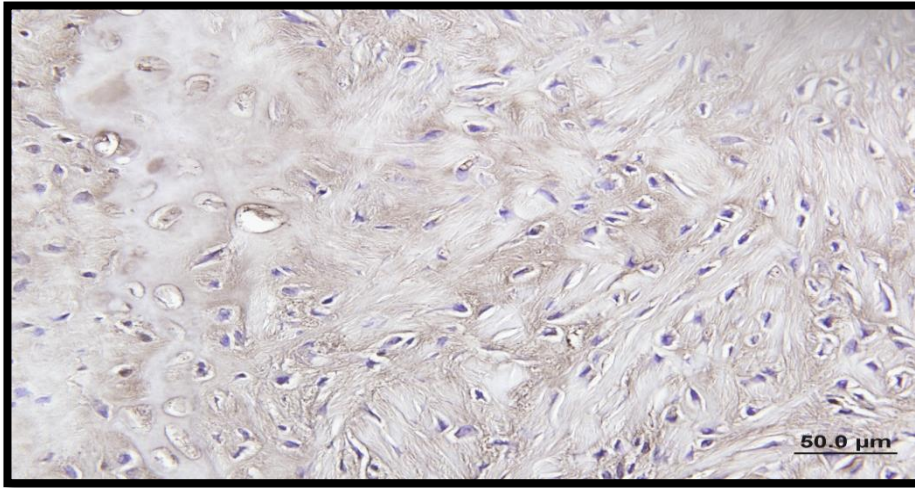
Genç kondrositlerde güçlü prokollajen ekspresyonuna bağlı olarak en güçlü immün pozitif boyanma Grup 4 deneklerde gözlemlendi. Grup 2 ve 5 deneklerde orta-güçlü immünpozitif boyanma gözlenirken, Grup 3 deneklerde daha zayıf boyanma paternine rastlandı. Grup 1 kontrol grubundaki deneklerde ise oldukça zayıf-silik bir boyanma paterni mevcuttu.



Şekil 68 :Grup 1'e ait immunhistokimyasal boyanma doku kesiti(zayıf-orta boyanma)

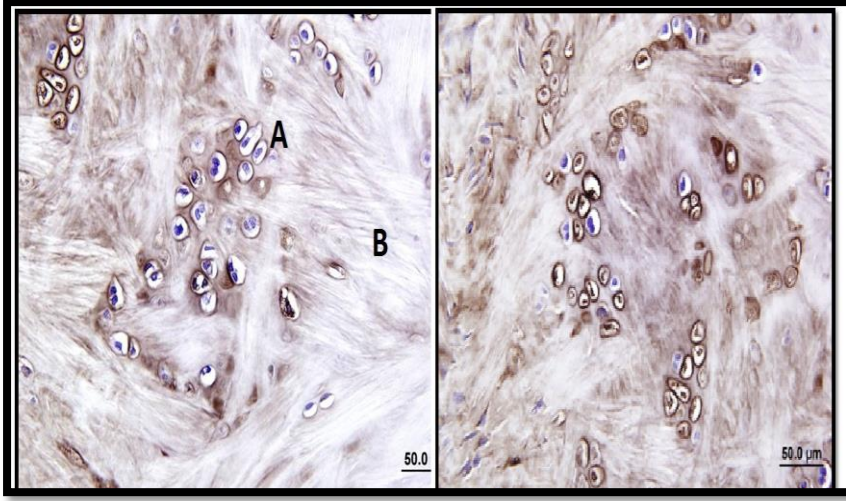


Şekil 69: Grup 2 ' ye ait immünhistokimyasal boyanma doku kesiti(orta-güçlü boyanma)
(Defekti dolduran disorganize az bir kısmı radial dizilim gösteren kondrositlerde orta şiddette Tip-1ekspresyonu .)



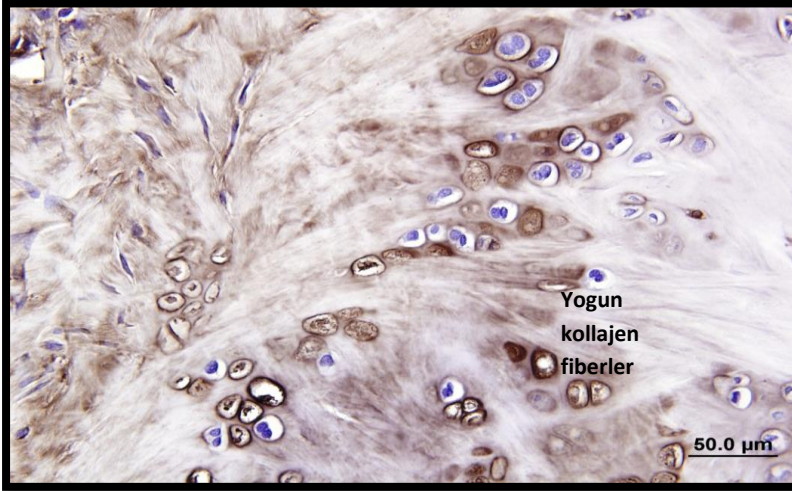
Şekil 70: Grup 3 ' e ait immünhistokimyasal boyanma doku kesiti(orta-zayıf boyanma)

(Defekti dolduran disorganize az bir kısmı radial dizilim gösteren kondrositlerde orta şiddette Tip-1 kollajen ekspresyonu .)



Şekil 71:Grup 4 ' e ait immünohistokimyasal boyanma doku kesiti ,en güçlü immün pozitif boyanma

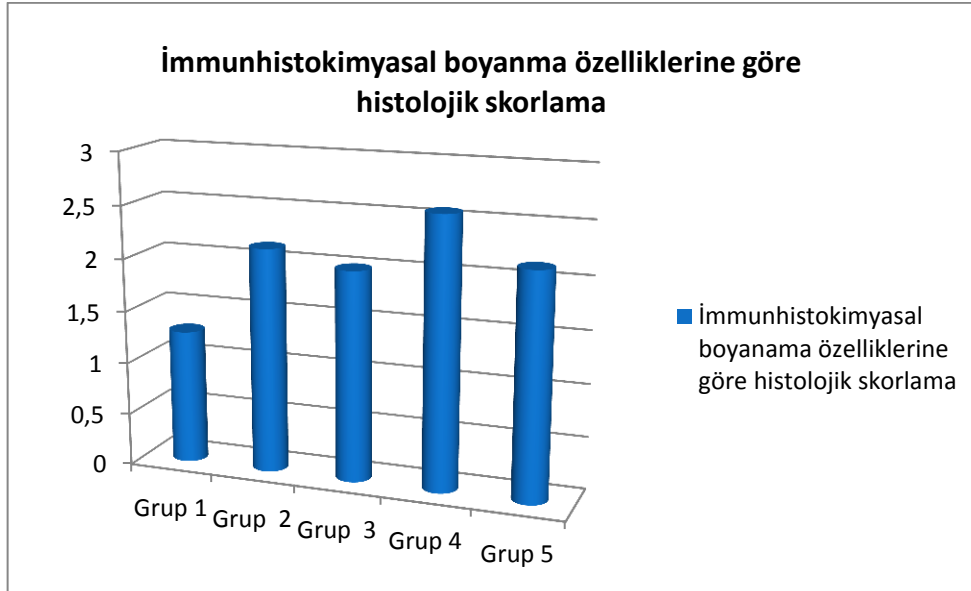
Çoğunluğu radial dizilimde genç kondrositlerin oluşturduğu kuvvetli Tip-1 kollajen ekspresyonu



Şekil 72 :Grup 5' e ait immünohistokimyasal boyanma doku kesiti (genç kondrositlerde orta-güçlü Tip-1 prokollajen ekspresyonu .)

Tablo 27 : Grupların kırkırdak dokusunda Tip1 prokollagen dağılımı

Tip 2 prokollagen ile immün pozitif boyanma	Ortalama değer ve standart sapmaları (Tanımlayıcı istatistiksel testlerle elde edilmiştir.)
Grup 1	1,28± 0,48
Grup 2	2,14± 0,37
Grup 3	2,00 ±0,57
Grup 4	2,57± 0,53
Grup 5	2,14± 0,37



İmmunhistokimyasal boyanma skorlanma sonuçlarına göre, tüm deneklere ait kesitler incelendiğinde, Grup 1 kontrol grubunda immunpozitif boyanma skoru $1,28 \pm 0,48$, düz olarak yerleştirilen EGF ile biyosinyallenmiş doku iskelesi yerleştirilen deneklerin olduğu Grup 2'de $2,14 \pm 0,37$; EGF ile biyosinyallenmiş doku iskelesinin rulo olarak yerleştirildiği Grup 3'te $2,00 \pm 0,57$, EGF ve rhBMP 7'nin dual olarak kontrollü salınımının sağlandığı doku iskelenin düz olarak yerleştirildiği Grup 4' te $2,57 \pm 0,53$ ve aynı iskelenin rulo olarak yerleştirildiği Grup 5 'te $2,14 \pm 0,37$ olarak belirlendi. Tanımlayıcı istatistiksel verilere göre en güçlü ve belirgin immün pozitif boyanmanın Grup 4 ' teki deneklerde olduğu gözlemlendi. (Tablo 27)

İmmunhistokimyasal bulguların skorlanması sonuçları ve tanımlayıcı istatistiksel çalışma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; grupların istatistiksel karşılaştırılmalarında kontrol grubu olarak kabul edilen 1. Grupa diğer gruplar arasında istatistiksel olarak Tip 1 prokollagen immunpozitif boyanması yönünden belirgin farklar olduğu göze çarpmaktadır. Kontrol grubu ve doku iskelesi kullanılmış olan deney grupları karşılaştırıldığında, lümen epitelinde Tip 1 Prokollajen molekülünün dağılımında kontrol grubuna göre, deney gruplarında anlamlı fark vardı ($p < 0,05$). Tüm deney grupları (Grup 1,2,3,4) deneklerin doku kesitleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise Tip 1 Prokollajen molekülünün dağılımında istatistiksel olarak anlamlı farklar gözlenmedi. ($p \geq 0,05$). Kontrol grubuna göre en anlamlı immünpozitif boyanma, rhBMP 7 ve EGF biyomoleküllerinin dual olarak kontrollü salınımlarının sağlandığı ve defektin üzerini örtecek şekilde düz olarak yerleştirilmiş olan doku iskelesinin kullanıldığı Grup 4'teki deneklerde rastlandı ($p:0,04$). Ayrıca immünpozitif boyanma açısından grup 4 'e ait deneklerin kesitleri Tip 2 prokollajen dağılımı açısından tüm gruplara göre daha yoğun olarak boyandığı gözlemlendi.

Tablo 28: İmmunhistokimyasal sonuçlaragöre grupların Mann WhitneyU testi ile istatistiksel karşılaştırılması

İMMUNPOZİTİF BOYANMA	"P" değeri (Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmalı olarak elde edilmiştir. "P" değeri $\geq 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.)
Grup 1 -2	0,005
Grup 1-3	0,002
Grup 1-4	0,004
Grup 1-5	0,005
Grup 2-3	0,593
Grup 2-4	0,107
Grup 2-5	1,00
Grup 3-4	0,081
Grup 3-5	0,593
Grup 4-5	0,107

8. TARTIŞMA

1743 yılında Hunter'ın "Hipokrat zamanından günümüze kadar, kıkırdak yapısının bir kere kaybedilirse bir daha asla yenilenemeyeceği bilinmektedir" açıklaması bilim adamlarını, geçen üç yüz yıl boyunca kıkırdak rejenerasyon kapasitesinin artırılması konusunda çalışmalara teşvik etmiştir. Çeşitli yenileme teknikleri öngörülse de, zarar görmüş avasküler kıkırdak dokunun yerini tam olarak alabildiği bir teknik bulunamamıştır.

Kıkırdak defektlerini onarmak için, günümüze kadar kullanılan yöntemler aşağıdaki şekilde gruplandırılabilir:

1. Kıkırdağın rejenerasyonunu artırıcı mekanik yöntemler
2. Otojen kıkırdak greftleri
3. Perikondrial greft ve flepler, periosteal greftler
4. Allogreftler ve Xenogreftler
5. Alloplastik materyaller, implant ve protez uygulamaları
6. Gen terapisi
7. Hücre kültürü içeren yöntemler
8. Doku mühendisliği çalışmaları

Mekanik yüklenme ve hareket ile kıkırdak dokuda rejenerasyon kapasitesinin tetiklenmesinden yola çıkarak; mikrofraktürler, drille delme, osteotomiler, eklem distraksiyonu gibi mekanik yöntemler geliştirilerek kıkırdak doku defektleri onarılmaya çalışılmıştır. Bu yöntemlerin bir kısmı, halen klinikte kullanılmasına rağmen, neokartilaj dokunun hem yetersiz miktarda oluşu, hem de fibröz dokudan zengin olması klinik kullanımlarını kısıtlamıştır.(35, 141-143).

Kıkırdak defektlerinin onarımında en ideal yöntem, otojen kıkırdak greftleridir(36-38). İmmünolojik ve biyomekanik özellikleri ile çok iyi bir greft materyali olan otojen greftler; kolay şekillendirilebilme, yeni yerlerine kolay adapte olabilme,

doku rejeksiyonuna neden olmama gibi çeşitli avantajlara sahiptir. (36, 39-41). En önemli dezavantajlarından biri zamanla rezorbsiyona uğramaları ve hafızaları nedeniyle şekil bozukluklarına yol açabilmeleridir. Ayrıca donör alan kısıtlaması nedeni ile yeterli kırıkta greft miktarına ulaşmadaki zorluk bu yöntemin diğer dezavantajlarından (43). Kırıkta greftinin ilk klinik kullanımının 1896 yılında König tarafından yapıldığı bilinir (144). Guyuron ve arkadaşları 1994 yılında, deneysel olarak otojen kırıkta greftlerinde canlılık oranlarının %70 ile %90 arasında değiştiğini, ve aynı yıl yayınlanan klinik araştırmalarında ise, canlılığın %87,5 gibi yüksek oranlarda olduğunu bildirdiler (145). Donör sahalarına göre otojen kırıkta greftler septal, auriküler ve kostal kırıkta olarak üç grupta incelenirler. Rekonstrüktif cerrahide temel prensiplerden biri onarım dokusunun mümkün olduğunca orijinaline benzer dokudan elde edilmesidir. Organizmada bulunan üç tip kırıkta dokudan, özellikle elastik kırıkta için yeterli donör alan sağlanamaz. Kırıkta doku donör alanı açısından en büyük kaynak, kosta uçlarından elde edilen hyalin kırıkta duktur. Bu nedenle büyük elastik kırıkta gereksinimi olan durumlarda, defektleri hyalin kırıkta ile onarmak zorunluluğu ortaya çıkmaktadır (59,64). Yeterli miktarda otojen kırıkta greftine ulaşamadığında, allojenik veya xenojenik olarak farklı kaynaklardan elde edilmiş kırıkta greftleri kullanılabilir (76). Fakat doku uyumsuzluğu, kısa sürede rezorbsiyona uğramaları, enfeksiyon riski ve etik sorunlar nedeniyle kullanımları hala tartışmalıdır (43, 45, 46).

Lester'in 1959'da, perikondriumun yeni kırıkta oluşumuna neden olduğunu bildirmesinden sonra, özellikle 1970'lerden sonra kırıkta kaynağı olarak perikondrium greft ve flepleri sıklıkla tercih edilmiş; ancak greftin alınmasındaki ve yerleştirilmesindeki cerrahi zorluklar, defektin doldurulabilmesi için gerekli miktarın önceden bilinmemesi gibi sorunlar nedeniyle kullanım alanları daralmıştır. Bu greftler eklem yüzeylerindeki küçük osteokondral defektlerde başarılıdır (13, 14). Sarı ve arkadaşlarının 2006 yılında tavşanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada perikondrial ve periostal greftler elde edilerek kendi üzerinde büküldükten sonra poş haline getirilmiş, içine kan enjekte edilerek abdominal kas dokusuna gömülmüştür. Zamanla greftlerden düşük kalitede kabul edilen fibrokartilaja benzer doku elde edilmiştir (14). Ulutaş ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınlanan tavşanlar üzerinde yapılmış çalışmasında perikondrial ve periostal greftler elde edilerek tavşan

kulağındaki kıkırdak defekti onarılmıştır. 1x1 cm defektin elastik kıkırdağa benzer dokuyla başarılı şekilde onarıldığı bildirilmiş, periostal ve perikondrial greftler arasında fark bulunmamıştır(13). Tüm çalışmalara rağmen küçük boyutlu perikondrial greftler klinikte yalnızca dejenere diz eklemi yüzeylerinde kullanılabilir (146-148) Greftler sınırlı da olsa viabilite göstermelerine rağmen yöntemin sınırlı verici alan, verici alan morbiditesi ve 2 cm'den fazla defekte uygulanamaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır(149)

Kıkırdak doku onarımında alloplastik materyaller ve çeşitli implantlar da tercih edilen bir başka yöntemdir. Donör alan morbiditesi yaratmaması, sınırsız kaynak oluşturmaları, istenilen şekil ve formatta üretilmelerini gibi avantajları olsa da; sık deformasyon, alerjik ve enflamatuar reaksiyonlar geliştirmeleri nedeniyle klinik kullanımlarından kaçınılmaktadır (45, 47).

Yukarıda bahsedilen yöntemlere alternatif olarak, kondral defektlerin onarımında kullanılan bir diğer yöntem, doku mühendisliği yaklaşımıyla, perikondrium rejenerasyon kapasitelerinin artırılması ve/veya yeni kondroid doku üretme çalışmalarıdır (16).Doku mühendisliği, geleneksel biyomedikal araştırmalardan elde edilen bilgileri, klinikte doku replasmanına uyarlayan özel bir araştırma alanı olarak tanımlanabilir (64). Bu yaklaşımla, cerrahi işlemler sonucunda görülen morbidite ve fibrozis ile gelişen skar gibi sorunlar olmadan, laboratuvar koşullarında kayıp dokuyu rekonstrükte edecek dokular oluşturulmaya çalışılır.

Kıkırdak dokunun avasküler yapısı, sadece kondrositler ve ECM elamanlarından oluşacak şekilde basit bir yapıya sahip olması doku mühendisliği çalışmalarının özellikle bu alanda yoğunlaşmasına neden olmuştur. İlk kez 1977 yılında Green tarafından tanımlanan kıkırdak doku mühendisliğinin ilk klinik uygulama sonuçları 1994'te Brittberg ve ark. tarafından bildirilmiştir(17). Wong VW ve ark ise hazırladıkları derlemede öncü hücrelerin içinde bulunduğu mikroçevre (perikondrium, periost, endotel, epitel vb) ve büyüme faktörleri, uygun bir skafold ile birlikte kombine kullanımının doku mühendisliği için yapı taşı olduğunu vurgulamışlardır (150).

Kıkırdak doku mühendisliğinde temel strateji, dokunun iyileşme potansiyelini hem mekanik, hem de biyolojik açılardan artırma özelliği bulunan çeşitli komponentlerin bir arada kullanılmasıdır. Buradaki komponentler genel olarak iki başlık altında sınıflanabilir. Bunlardan ilki, içinde hücre uygulanmasına ve/veya tutunmasına (perikondrial progenitör hücreler, MSC, kemik iliği) izin verecek özellikte yüksek derecede ve birbiriyle bağlantılı poröz yapıdaki matrikslerdir(skafold). Diğer grubu ise biyosinyal molekülleri (büyüme faktörleri, hormonlar) oluşturur (69). Doku mühendisliğinde bu iki gruptan oluşturulan çeşitli kombinasyonlar aracılığıyla iyileşmenin artırılması amaçlanır. Buradan yola çıkarak kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında bu yaklaşımlar kullanılabilir;(151)

1)Herhangi bir doku iskelesi kullanmadan hücre gruplarının doğrudan hasarın olduğu bölgeye implantasyonu.

2) Otolog hücreler ya da allojenik hücrelerin bir doku iskelesi aracılığıyla defekt alanına implante edilmesi.

3)Kontrollü ilaç salım sistemleri ile doku mühendisliği teknikleriyle geliştirilen doku iskelerinin birleştirilmesi ve perikondrial progenitör hücrelerin etkisiyle kıkırdak doku onarımına gidilmesi.

4) Doku iskelesi-biyosinyal molekülü – gen terapisi modeli ile yeni kıkırdak doku oluşumunun sağlanması.

Kıkırdak doku mühendisliği için esas kısıtlayıcı, uygun hücre kaynağının hala tam olarak tanımlanmamış olmasıdır. Kondrositler, fibroblastlar, kök hücreler ve genetik olarak modifiye edilmiş hücreler kıkırdak onarımı için uygulanabilirlik potansiyelleri bakımından incelenmektedir(18,19). Her hücre kaynağının birbirine görece üstünlükleri ve dezavantajları deneysel çalışmalarla ortaya kinsa da, tüm hücre grupları için asıl kısıtlayıcı; hücrelerin elde edilmesi, karakterizasyonu, kültüre edilmelerindeki teknik zorluklar, dolayısıyla zaman ve maliyet problemleri nedeniyle klinik uygulamaya geçirilememeleridir(21).

Kıkırdak rejenerasyonu çalışmaları öncelikle immatür hayvanlardan izole edilmiş kondrositlere odaklanmıştır. Kondrositlerle yapılan çalışmalardaki seçim

amacı, yetişkin kıkırdakta yaygın bulunması ve ESM üretimi, desteklenmesi ve yeniden yapılandırılmadaki rolleridir. Neonatal ve genç kondrositler yaşlı donörlerden daha hızlı büyüme oranları ve hızlı in vitro çoğalma kapasiteleri ve daha fazla kondrojenik potansiyele sahiptir. Bu özellikleri kondrositlerin çoğaltılması ve ESM den zengin neokartilaj üretmek için avantajlı olmasına rağmen, yaşlı hastalar için klinik ortamda immatür kıkırdağın kullanılması mümkün olmayabilir(59). Donör saha kısıtlılığı da hesaba katıldığında yaşlı hastalar için kullanım alanı daha da sınırlanmaktadır.

Ortopedik cerrahide artiküler defektler için, hücre-polimer modeli ile geliştirilen otolog kondrosit transplantasyonu ile son 20 yıldır kısmen başarılı sonuçlar alınsa da, yetişkin kondrosit kültürlerinin klinikte uygulanmasını engelleyen ciddi dezavantajları mevcuttur. Bu dezavantajlar şu şekilde sıralanabilir (59, 152):

1-Dokulardan hücre elde etmek, gerekli bölgeye transplante etmek zordur.

2 -Yetişkin kondrositler zonal belleğe sahiptir ve yüzeysel kondrositlerden elde edilen kültür kıkırdak, derinde canlılığını yitirmektedir.

3-Monolayer kültürde zamanla dediferansiye olarak kıkırdak özelliklerini kaybetmektedirler,

4-Yetişkin kondrositlerin üremesi sınırlıdır, bireyin yaşı arttıkça üreme azalmakta ve bol miktarda başlangıç hücre gerekmektedir, bu da ciddi verici alan hasarına neden olmaktadır. Yaşlı hastalarda kullanımları kısıtlıdır.

5-Yetişkin hücrelerden yapılan kültür sonuçları tahmin edilemez, avasküler oldukları için yeni ortamda yaşam kapasiteleri düşüktür.

6-Yöntem nedeni ile hastanın immobilizasyon süresi daha uzundur.

7-Tek aşamalı bir prosedür olarak uygulanamaz. Önce hücrelerin izolasyonu, laboratuvar ortamında kültüre edilmesi, sonra gerekli bölgeye transplante edilebilmesi gereklidir, dolayısıyla zaman problemleri.

8- Kullanılan yöntemler maliyetlidir (153, 154).

Kıkırdak doku mühendisliği hücre-polimer modeliyle yapılan son çalışmalar, çok yönlü potansiyele sahip ve dokulardan da bolca izole edilebilen kök hücrelere

odaklanmıştır. Kök hücrelerin iki ana özelliği, pluripotent özelliğini kaybetmeden sınırsız sayıda çoğalabilme ve uygun çevre koşullarında uygun dokuya dönüşebilmeleridir (155). Çevredeki hücrelerden ve ekstraselüler matriksken gelen moleküler sinyaller kök hücrenin genlerine etki etmekte, “kök” özelliklerini uyarmaktadır. Kök hücreler yeni ortamda yerel mikro faktörlerin etkisiyle çoğalmakta ve değişim geçirmektedir(156, 157). Bu konuda ilk çalışmalar Becker ve arkadaşlarına aittir. Kök hücreler embriyonik ve yetişkin kök hücreler olarak iki ana gruba ayrılmaktadır (191,192). Tüm bu özellikler kök hücreler üzerindeki dikkatin artmasına ve bu konuda gittikçe artan sayıda çalışma yapılmasına neden olmuştur(158).

Erickson ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış oldukları çalışma sırasında, insan lipoaspiratından elde edilen kök hücreler *in vitro* ortamda alignat matriks üzerinde çoğaltılmış, daha sonra farelere subkutan plana implante edilmiştir. Farklılaştırılan hücrelerin bol miktarda kıkırdak matriks sentezlediği görülmüştür. (159). Huang ve arkadaşlarının 2004 yılında yayınladıkları benzeri çalışmada da insan lipoaspiratından SVF elde ederek TGF β 1, askorbik asit, insulin ve transferin etkisiyle *in vitro* kültürde kıkırdağa benzeyen milimetrik nodüller oluşturmayı başarmışlardır.(160). Dragoo ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları *in vivo* çalışmada kök hücrelerle tavşan femur başında 3x4 mm çapında tam kat osteokondral defektleri başarılı bir şekilde onarmışlardır(161). Embriyonik kök hücrelerin de BMP 2 ve BMP 4 ile stimüle edildikleri bir çalışmada aktif kondrogenizin sağlandığına dair yayınlar mevcuttur.(162).

Buna rağmen kök hücrelerin klinikte uygulanmasını engelleyen bazı dezavantajları mevcuttur (163-165):

1. Canlıdan elde edilen hücre sayısının yetersiz olması, bu nedenle kök hücreleri kültür ortamında üretme zorunluluğu,
2. İmplantasyon sonrası oluşan hücre apoptozu
3. Onarılan dokudaki vaskülarizasyon problemleri

4.Kök hücrelerin uygun dokuya diferansiye olabilmeleri için, gerekli nişe ihtiyaç duymaları. (Matür dokuda, dışardan verilecek kök hücre, dokunun kendine özgü hücrelerinin klonal tükenmesinden ötürü uygun nişi oluşturamaz.) İnvitro ortamda farklılaştırılmaları için taşıyıcı skafold ve biyosinyal moleküllerine gereksinim duyar.

5. Embriyonik kök hücreler için immünite problemleri, etik sorunlar

6. Kök hücrelerin kontrolsüz kullanımı sonucunda gelişen uygunsuz bölünme potansiyelleri kanserojen etki oluşturabilir. İn vitro ortamda kazanılan başarılar, biyolojik süreç içerisinde, multifaktöriyel uyaranların devreye girmesi sonucunda bu prekanserojen ve karsinojen etkilerinin nasıl ortadan kaldırılacağını gösterememektedir.

7. Tek aşamalı prosedür olarak uygulanamaları, zaman problemleri

8. Yüksek maliyet

Daha önce de belirtildiği gibi, kıkırdak doku mühendisliği yöntemiyle yapay kıkırdak oluşturulması yönünde çok sayıda çalışma olmasına rağmen, henüz fonksiyonel, üç boyutlu yapıların oluşturulması için gerekli hücre organizasyonu ve aktivitelerinin kontrolü, sözü edilen nedenler ile sağlanamadığı için, klinik uygulamaya geçen bir ürün olmamıştır. Tüm hücre gruplarıyla ilgili temel sorun, deneysel çalışmalarda elde edilen başarılı sonuçların klinik pratikte kullanılamamasıdır. Bu nedenlerle, in vitro sonuçlar başarılı olsa da in vivo çalışmalar optimizasyona ihtiyaç duymaktadır. Bu sorunu çözmek amacıyla çalışmalar, perikondrial progenitör hücrelerin davranışlarını tetikleyecek ve kontrol edecek, rejenerasyon hızlanması için gerekli biyoaktif ajanların salımını sağlayabilen multi-fonksiyonel doku destekleri oluşturulması üzerine yoğunlaşmıştır. (7, 18-22) Eğer, herhangi bir hücre kaynağına gerek kalmadan, perikondriumun zaten var olan rejenerasyon kapasitesi bu şekilde artırılabilirse, hem kıkırdak defektlerinin orjinaline uygun onarımı sağlanacak hem de klinik uygulamada kullanılacak hazır biyomalzemeler üretilbilecektir.

Biz de çalışma kapsamında, kontrollü ilaç salınım sistemleri ile doku mühendisliği tekniklerini birleştirerek, uygun makroçevre varlığında perikondrial progenitör hücrelerin rejenerasyon kapasitesinin artırılarak, **ek hücre kaynağına gerek duymadan**, kıkırdak doku oluşumunun sağlanabileceği hipotezini araştırdık. Bu yolla kondral lezyonların tedavisi için klinikte kullanılacak, maliyeti yüksek

olmayan, kolay ulaşılabilir bir implant oluşturmayı hedefledik. Proje kapsamında, biyosinyal molekülleri olarak; kondrogeniz üzerinde en uyarıcı faktör olarak belirlenen BMP 7 ve oluşacak neokartilaj doku içindeki matriks yapısının ana düzenleyicisi olduğu bilinen EGF biyomoleküllerini seçtik. Literatürde daha önce sinerjistik etkilerinin araştırılmadığını bildiğimiz bu moleküllerin aynı matriks yapısından kontrollü salınımlarını sağlayarak kondrogenizdeki etkilerini araştırdık. Bu amaçla, piyasada yara ve yanık örtüsü olarak hazır bulunan EGF ile biyosinyallendirilmiş Jelatin süngerden (NEODERM, ARS Arthro Biyoteknoloji lab.) yararlandık. Maliyetinin çok yüksek olmadığı bilinen, kolay ulaşılabilir hazır biyomalzemenin çalışmamızda doku iskelesi olarak seçilmesinin, çalışma sonuçlarının klinik pratikte kullanılabilirliği açısından büyük avantaj sağlayacağını düşündük. Bizim çalışmamızda koaservasyon yöntemi ile hazırlanan Jelatin mikrokürelere rhBMP7 biyomolekülü immobilize edilerek hazır biyomalzemeye yüklenmiştir. Gerekli görüldüğu taktirde, farklı biyosinyal moleküllerinin de hazır bulunan doku iskelesine immobilize edilmesi, bu moleküllerin de kırık doku rejenerasyonuna olası katkılarını araştırmak için kullanılabilir.

Çalışmamız kapsamında, perikondriumu, hem kondroprogenitör hücre kaynağı, hem de büyüme faktörleri salgılayan mikroçevre görevinde kullandık. Bilindiği üzere; perikondrium, kırık doku yüzeyinde yerleşen ve avasküler kırık doku yapısının beslenmesini sağlayan ince yapıdır. Kondroprogenitör hücrelerden zengin bir kaynak olup mekanik ve inflamatuvar mediatörlere yanıt olarak, yeni kırık doku matriksi oluşturma potansiyeline sahiptir. Tip 1 kollajenden zengindir. İnce iç kambial ve dış fibroz katman olmak üzere iki katmandan oluşur (33,34). O'Driscoll ve Fitzsimmons yaptıkları bir çalışmada dış katmanın fibroblastlar içerdiği ve yara kenarlarını onardığı, iç katmanınsa kondroblastlar içerdiği ve yeni kırık doku oluşumunu sağladığını göstermişlerdir(166). Erişkin kırık doku dokusunun baskın büyüme şekli olan apozisyonel büyüme sırasında perikondriumun içindeki fibroblastlar bölünerek çoğalır ve kondroblastlara farklılanırlar. Kondroblastlar, tip II kollajen dahil kırık doku matriksini salgılar ve kendi etraflarını hücrelerarası madde ile çevreler. Perikondriumun ince kambial katında bulunan kondroblastların salgıladığı TGF β ve FGF2 gibi büyüme faktörleri etkisiyle küçük kırık doku defektlerinin (milimetrik) onarılabilirliği Duynstee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada da

gösterilmiştir(146). 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 (167). 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(189).

Perikondrium etkisiyle milimetrik boyutlarda kıkırdak defektlerinin onarılabildiği fakat perikondriumun rejenerasyon kapasitesinin daha büyük kıkırdak defektlerinin onarımında yetersiz olduğu gösterilmiştir(15). Pribitkin ve ark. ve Özbek ve ark. da yaptığı çalışmada; tavşan kulak kıkırdağında oluşturulan milimetrik boyuttaki kıkırdak defektlerinin perikondrium yardımı ile onarılabildiği, ancak daha büyük defektlerde defektlerde perikondriumun yetersiz kaldığını ifade etmişlerdir(15, 168). Özbek ve ark. yaptıkları in vivo çalışmada perikondrial flep ile kıkırdak doku defektlerinin onarıldıklarını göstermişlerdir(168). Kliniğimizde yapılan önceki çalışmamızda perikondriumun etkisi ile yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerin (ADAS), normal doku rejenerasyonu ile kapatılmayan 2x2 cmlik tavşan kulak kıkırdağı defektlerini onardığını, ancak literatürdeki çalışmalara paralel olarak 2x2 cmlik defektlerde, perikondriumun onarımda yetersiz kaldığı belirlenmiştir(169).

Ayrıca; Haverich ve arkadaşlarının yaptığı, hücre implantasyonları yapılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, perikondrium kaynaklı progenitor hücreler (PPC) kök hücrelere alternatif olarak incelenmiş ve daha elastik ve daha proliferatif sonuçlar elde edilmiştir. Bunu burada varolan kök hücrelere kanıt olarak (CD44 ve CD90 +) göstermişlerdir. Çalışmada auriküler kaynaklı PPC ler (ePPC) trakeal PPC (tPPC) ve MKHler (KİKKH) karşılaştırılmış, PPC, MKH ile karşılaştırılabilir bir proliferatif davranış göstermiştir. Kondrojenik uyarıma bakıldığında diferansiyasyon stimülasyonundan bağımsız bir şekilde, Kollajen I ekspresyonu tüm hücre tiplerinde benzer iken, tPPC ve MSC ile karşılaştırıldığında ePPC kollajen II, agrekan ve COMP un daha yüksek ekspresyonu ile sonuçlanmıştır (170).

Perikondrium rejenerasyon kapasitesi mekanik ve inflamatuvar mediatörlere yanıt olarak, siklik yüklenme ve hareketle arttırılabilir. Skoog ve ark, yaptıkları çalışmada perikondriumun altındaki kıkırdaktan ayrılmasının, kontakt inhibisyonu ortadan kaldırdığını ve bu sayede yeni kıkırdak oluştuğunu göstermişlerdir(9, 10). Verwoerd ve ark tarafından yapılan çalışmada, perikondriumun travmaya cevap olarak yüksek miktarlarda farklı morfolojiye ve büyüme potansiyeline sahip kıkırdak doku geliştirdiği gösterilmiştir(171). Özellikle cerrahi diseksiyonda, defekt kenarlarında, kıkırdağın tam kat kesildiği sırada perikondrium ve kıkırdak dokunun hasarlandığı ve bu hasara yanıt olarak perikondriumun büyüme faktörleri salgıladığı bilinmektedir. Bu salgılanan biyoaktif moleküller aracılığıyla perikondrium iç tabakasındaki fibroblastlar kondroblastlara farklılanarak Tip 2 kollajen dahil matriks sentezi yapar(172). Haberal ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise perikondriumun travmaya cevabının sadece yeni kıkırdak oluşumu değil aynı zamanda ossifikasyon da olduğu bulunmuştur. Haberal ve ark. cerrahi girişim sırasında perikondriumun altından çalışmanın ossifikasyonu engelleyebileceğini savunmuşlardır (173).

Bu nedenle çalışmamızda, kıkırdak defekti oluştururken, perikondrium ve üzerindeki cilt ayrılmadan kıkırdak üzerinden kompozit flep (perikondrokütanöz) olarak kaldırılmıştır. Bizim çalışmamızda da özellikle kontrol grubunda, histomorfolojik değerlendirmede kıkırdak doku gelişiminin yanı sıra ossifikasyon da gözlenmiştir, farklı bir deyişle perikondrium altında çalışılarak kıkırdak dokuya müdahale edilse bile, kıkırdak hasar bölgelerinde bir miktar ossifikasyon gözlenebilir. Yine de bu sonuca varmadan önce cerrahi sırasında minimal de olsa perikondrium hasarının oluşabileceği göz ardı edilmemelidir.

Kıkırdak doku rejenerasyonu üzerine önceki deneysel çalışmalarda, deney hayvanı olarak sıklıkla mice, immünsuprese ratlar ve tavşanlar tercih edilmiştir. Üç hayvan grubunun da yapılacak olan deneysel çalışmaya göre görece olarak avantaj ve dezavantajları vardır. Birden fazla cerrahi girişim gerektiren deneysel çalışmalarda, anestezi dayanıklılığının yüksek olması, boyut olarak küçük olmaları

nedeniyle cerrahi manüplasyonlarının ve bakımlarının kolay olması nedeniyle ratlar tercih edilmektedir. Özellikle doku mühendisliği ve kök hücre çalışmalarında yabancı doku reddi az olduğu ve allojenik transplantasyona izin verdiği için immünsuprese ratlar sıklıkla kullanılmıştır. Kıkırdak defekt onarım üzerine yapılan rat çalışmalarının asıl kısıtlayıcısı kıkırdak doku hacimlerinin küçük olması ve görece rejenerasyon kapasitelerinin yüksek olmasıdır. Tavşan filogenetik olarak rat ve micelara göre daha gelişmiş bir hayvandır. Genel anestezi dayanıklılığı göreceli olarak daha düşüktür, ayrıca hayvan bakım ve barınma işlemleri daha zordur. Fakat kıkırdak doku hacminin ve cerrahi girişim uygulanacak organın yapısal büyüklüğü açısından manüplasyona daha çok izin vermekte, bu nedenle klinik model olarak kullanılabilirliği daha fazladır. Plastik, Estetik ve Rekonstruktif Cerrahi uygulamaları açısından elastik kıkırdak açısından zengin olması nedeniyle perikondrium rejenerasyon kapasitesinin arttırılmaya çalışıldığı doku mühendisliği çalışmalarının neredeyse tamamında tavşan kulak bölgesi tercih edilmiştir. Ortopedik olarak dejeneratif artrite yönelik yürütülen deneysel çalışmalarda ise diz eklem yüzey defektleri tercih edilmektedir. Biz de dual büyüme faktörü kullanarak hazırladığımız doku iskelesinin yerleştirilmesinde sağladığı kolaylık ve perikondrium rejenerasyon kapasitesinin insan modeline yakınlığı açısından çalışmamızda doku hacmi yeterli kabul edilen tavşan kulak bölgesi üzerinde çalıştık.

Çalışma bulgularının klinik olarak uygulanabilmesi için her yaş grubuna hitap etmesi gereğinden yola çıkarak, çalışmamızda 1-1,5 yaş aralığında (2,5-3,5 kg) erişkin hayvanlar tercih ettik. Oysa önceki çalışmaların çoğunda, doku rejenerasyonu ve yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu, 2-6 aylık genç deney hayvanlarında çalışılmış ve oluşan dokunun daha immatür olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca literatür incelendiğinde yapılan çalışmalarda, tüm gruplar aynı cins olmak üzere cinsiyet farklılığının sonuçlar üzerine anlamlı etkileri olmadığı anlaşılmış, bakım kolaylığı nedeniyle çalışmamızda 18 adet, erkek tavşan kullanılmıştır.

Kıkırdak defekti modellerinde deneyin sağlıklı sonuç verebilmesi ve denenen yöntemin gerçekten başarılı ya da başarısız olduğu sonucuna varılabilmesi için defektin spontan olarak iyileşmediğinin bilinmesi gereklidir. Her ne kadar bu amaçla kontrol grupları kullanılsa da, kendiliğinden iyileşmenin olmadığı bilinen modeller

tercih edilmelidir. Konu ile ilgili kritik boyut defekt kavramı ortaya atılmıştır. Yani, hangi çaptan büyük defektlerde perikondrium etkisiyle spontan onarım olmaz? Bu konuda dikkat çeken yayınların açıklaması şu şekildedir: Defektin spontan iyileşmesi için kritik defekt boyutu diye birşey yoktur. Kritik boyut defektin derinliğidir. Kalsifiye kıkırdağı geçmeyen derinlikteki defektlerde iyileşme olmaz ya da çok sınırlı olur, oysa kalsifiye kıkırdağın zarar gördüğü durumlarda iyileşme fibröz doku ya da fibröz kıkırdak ağırlıklı olarak gerçekleşmektedir (174). Ancak bu görüşlere karşın kritik boyutun varlığını savunan yazarlar da vardır. Örneğin tavşanlarda, keçilerde ve atlarda 3 mm'den küçük defektlerin hyalin ya da fibröz kıkırdak ile spontan iyileştiği (175, 176) keçilerde ve köpeklerde ise 6 mm'ye kadar olan troklear defektlerin spontan iyileştiği (177, 178) bildirilmiştir. Koyun için belirlenen kritik boyut çapı ise 6 mm'dir, (179) Literatürdeki çalışmalarda çoğunlukla 3-5 mm lik defektlerde çalışılırken, bizim çalışmamızda tavşan kulağında oluşturulan ve daha öncede spontan kapanmanın gözlenmediği belirtilen 10 mm x10 mm defektler oluşturuldu ve bu çapta bir defektin perikondrium etkisiyle spontan iyileşmediği, kontrol grubu ile de doğrulanmıştır. Çalışmamızda Grup 1 Kontrol grubu için Pineda histolojik skorlama sonuçlarının tanımlayıcı istatistiksel analizlerine göre defekt doluluğu değerleri ortalama $3,71 \pm 0,48$ olarak derecelendirilerek, tüm deney gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuş ($p \leq 0,05$) olup, bu sonuç da literatürle uyumlu olarak doğru kritik boyutta defekt oluşturduğumuzu doğrulamıştır.(Tablo 22)

Deneysel amaçlı oluşturulan kıkırdak defektleri genellikle daire şeklindedir. Bazı çalışmalarda uygulanacak tedavi ya da implant şekline özel, üçgen ya da kare gibi defekt şekilleri de yaratılmıştır (180, 181). Çalışmamızda komşu perikondrium temas yüzeylerinin değiştirilmesiyle gelişecek rejenerasyon kapasitesi de karşılaştırılmak istendiği için, kare şeklinde defekt oluşturulmuştur. Böylece perikondriumla temas eden yüzeyin her kenarda eşit olarak dağılımına olanak sağlanmış, histolojik kesitlerin alınması sırasında herhangi bir eşitsizlik olması ve bu durumun sonuçları etkilemesi önlenmiştir.

Trakeal defektler, eklem yüzeylerindeki kondral kayıplar veya mikrotia gibi konjenital defektlerde ihtiyaç duyulan neokartilaj boyut, şekil, konum ve derinliği

farklıdır. Kullanılan doku iskelelerinin şekillendirilebilir ve üç boyutlu olması, her türlü kondral defekt için kullanılabilirliği açısından avantaj sağlar. Bu amaçla çalışma kapsamında kullanılan doku iskeleleri, şekillendirilebilir mekanik özelliklere sahip olarak fabrike edilmiştir. Ayrıca, farklı kondral defektlerde kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla defekt yüzeyine, hem düz hem de rulo yapılarak yerleştirilmiştir. Oluşan neokartilaj doku ve çevre kıkırdak bağlantıları değerlendirildiğinde, rulo yapılarak yerleştirilen Grup 3 ve Grup 5 defektlerin santralinde neokartilaj doku gelişmediği, oysa defekt yüzeyine temas eden tüm yüzeylerde, doku iskelesinin şekline uygun olarak kondrogenezin yönlendiği gözlenmiştir. Böylece, hazırladığımız doku iskelelerinin farklı anatomik bölgelerdeki defektler için, farklı şekil, boyut ve derinlikte kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bu da çalışmamızın kliniğe uygulanabilirliğinin bir belirtisi olarak kabul edilebilir (182).

Tavşanlarda yürütülen kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarına ait literatür incelendiğinde, cerrahi işlemlerin tamamlanmasından histopatolojik değerlendirme için deneklerin sakrifikasyonu için geçen sürenin aktif kondrogenez süreci açısından en az 6 hafta olması gerektiği, farklı doku iskelesi ve/veya biyosinyal molekülleri kullanılan çalışmalarda ise bu sürenin 6 hafta ile 12 hafta arasında tutulduğu gözlenmiştir(183). Kondroprogenitör hücreler için kendi matriksini oluşturma hızı yaklaşık 6-8 haftadır(184).Çalışmalardaki süre farklılığı; farklı biyosinyal moleküllerinin reseptör etkileşimleri ile kondrogenez aktiveleştirme zamanlarının farklılığı, kullanılan matriks yapılarındaki hücre tutunma oranlarındaki değişimler, matriks fabrikasyon yöntemleri, degradasyon sürelerinin farklılığı, çarpaz bağlayıcı ajanın sağladığı matriks stabilizasyonları oranlarının değişkenliği, kontrollü salınım teknolojilerinin zamanlamaya etkileri gibi birçok faktörün etkileşiminden kaynaklanmaktadır (185, 186). Ayrıca, kullanılan biyosinyal moleküllerinin özgül doku içersindeki anlık ölçümlerinin yapılamaması, yarılanma ömürlerinin çok kısa oluşu, bu faktörlerin allosterik yapılarının özgül ligandlarıyla bağlanma eşiğinin konsantrasyonları açısından değerlendirilmesindeki olanaksızlıklar, önceki deneysel çalışmaların sunmuş olduğu zaman aralıklarında farklılıkların meydana gelmesine sebep olmaktadır (182). Tez kapsamında yapılan çalışma, büyüme faktörü etkisinde kulak kıkırdak hasarlarının iyileşmesi olarak genel bir perspektife indirgenirse, yapılan çalışmaya benzer literatürde birkaç çalışma mevcuttur.

Hong ve ark. jelatin doku iskelesi destekli BMP 2 ile yürüttükleri deneysel çalışmada bu sürenin kondral defektler için 8 hafta, osteokondral defektler için 12 hafta olması gerektiğini belirtmişlerdir (187).

Hollinger ve ark. ise tavşanlarda kondral defektler için, BMP 2 ile destekledikleri jelatin hidrojel kullanılan ve farklı zaman dilimlerinde oluşan neokartilaj dokuyu karşılaştırdıkları bir çalışmada, 6 haftalık bekleme süresinin yeterli olduğu kanıtına varmışlardır (188).

Özgenel ve ark. ise yaptıkları çalışmada (189) tavşan kulak kıkırdağında 20 mmx20 mm'lik bir defekt alanındaki kıkırdak gelişimini 8 haftalık (2ay) bir sürede incelemişlerdir. 2 aylık sonuçlarda ince tabakalı bir yeni kıkırdak yapısı ortaya koymuşlardır, fakat elastik belirteçler hakkında çalışma yapılmamıştır.

Bos ve ark. yaptıkları çalışmada (190) tavşan kulağından oluşturdukları 6 mm'lik hasar alanında oluşan büyüme faktörü etkilerini 28 günlük çalışma ile incelemişlerdir. Bos ve ark. buradaki amacı kıkırdak iyileşmesinde erken dönemde ortaya çıkan büyüme faktörü ve matriks değişimlerini ortaya koymaktır. Yaptıkları çalışmada TGF- β 1, TGF- β 3 ve EGF büyüme faktörlerinin 3 günden itibaren anlamlı şekilde arttığını ortaya koymuşlardır.

Bu bilgiler doğrultusunda, biz de çalışmamızda cerrahi işlemler sonrasında, histopatolojik incelemelere kadar geçen süreyi, tüm gruplarda sekiz hafta olarak belirledik. Çünkü progenitor hücrelerin kendi matriksini sentezleme hızı olarak 6 haftalık bekleme süresinin yeterli olduğu birçok deneysel çalışmada bildirilmiş olmasına rağmen, daha yaşlı progenitor hücrelerle yapılan çalışmalarda matriks sentezinin 8 haftaya kadar uzadığını belirten çalışmalara rastladık. Fakat çalışmamızın zayıf noktalarından biri tüm gruplarda tek bir zaman diliminde çalışmaktı; deney grupları ve hayvan sayısı artırılarak farklı zaman dilimlerini içeren gruplar oluşturulması çalışmamızı daha güçlü kılabilirdi.

Kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımlarında; hücre dışı matriksi taklit ederek, kondroprogenitor hücrelere ve büyüme faktörlerine yapısal destek ve rezervuar oluşturan, öncül hücrelerin yapışması ve proliferasyonu için ideal üç boyutlu ortam

sağlayan doku iskeleleri temel ögelerden biridir. Gözenekli yapıdaki bu üç boyutlu malzemeler, yüzeyine penetre olan öncü hücrelerin ve biyosinyal moleküllerinin koordinasyonunu ve kolonizasyonunu da destekleyerek hücrelerin üç boyutta migrasyonunu, salınımını ve yayılımını indükler (191).

Artiküler kartilaj defektlerinde yapılan bazı çalışmalar; sinoviyal hücrelere, herhangi bir taşıyıcı sistem olmadan doğrudan enjeksiyonla TGF β 1 ve BMP 2 gibi büyüme faktörlerinin aktarılması ile sinovyum inflamasyonu, eklem fibrozisi ve osteofit gelişimi sonucu kırıldak yıkımıyla sonuçlanmıştır (192).

Doku iskelelerinin doğal doku ve organların yapısını büyük ölçüde taklit edebilecek özellikte olması, doku mühendisliğinin önemle üzerinde durduğu konuların başında gelmektedir. Bu doğrultuda, iskele tasarımında uygulanacak yöntemlerin ve fabrikasyon aşamasında kullanılacak olan malzemelerin mutlaka taşınması gereken temel özellikler tanımlanmıştır (193).

(1) Kullanılan yöntem, yeni şekillenen dokunun integrasyonunu ve vaskülarizasyonu desteklemek amacıyla, doku iskelesinin gözenekli yapıda ve gözenekleri arasında bağlantıların olmasını sağlayabilmeli, ayrıca istenilen şekil ve boyutlarda iskele hazırlanabilmesine izin vermelidir.

(2) Seçilen malzeme, biyouyumlu ve bozunur özellikte olmalı, malzemenin bozunma hızı yeni şekillenmekte olan dokunun hızıyla dengede olmalı ve bozunma sonunda açığa çıkan yan ürünler toksik olmamalıdır. İdeal matriks, progenitör hücreler kendi çevrelerini oluşturana kadar destek sağlayan geçici bir çatı olmalıdır. Kondroprogenitör hücreler için ise, kendi matriksini oluşturma hızında yani yaklaşık 6-8 hafta içinde rezorbe olmalıdır (184, 194).

(3) Hazırlanan doku iskelesi; hücre yapışması, farklılaşması, çoğalması ve hücre göçü için uygun yüzey kimyası ve yüzey topografisine sahip olmalıdır.

(4) Yeni doku oluşumunun ilk aşamalarında yapısal bütünlüğünü muhafaza edebilmeli, yeterli mekanik dayanıma sahip olmalıdır.

Kıkırdak yenilenmesinde hücre taşıyıcı matriks tasarımında çeşitli sentetik ve doğal biyobozunur polimerler kullanılmıştır. Araştırılan doğal polimerlerden birkaçı; aljinat, agaroz, fibrin, hiyalüronik asit, kollajen, jelatin, kitosan, kondroidin sülfat ve selüloz'dur. Doğal polimerler, sıklıkla yüzey reseptörleri sayesinde hücrelerle etkileşerek, hücre fonksiyonunu direkt olarak düzenleyebilmektedir. Fakat bu etkileşimler esnasında bu polimerlerin immün cevapta artışa yol açabileceği ve bu sayede kullanılan biyomateryal için vücutta antijenite oluşabileceği gösterilmiştir (49).

Sentetik materyaller, doğal polimerlere göre mekanik ve degradasyon karakteristiği açısından da farklılık göstermektedir. Bugüne kadar araştırılmış sentetik polimerlerden birkaçı; polilaktik asit, poliglolik asit, polilaktik-glikolik asit, polietilen oksit, polipropilen oksit, polietilen glikol ve poliüretanlardır (140,(195) Sentetik polimerler, daha fazla kontrollü ve davranışları belirlenebilirdir, polimerin kimyasal ve fiziksel özellikleri modifiye edilerek mekanik ve degradasyon karakteristikleri değiştirilebilir. Bununla birlikte, sentetik polimerlerde özellikli olarak birleştirilmedikçe yapışma, hücre sinyali, yönlendirilmiş degradasyon ve matriks remodelingi gibi direk hücre skafold etkileşimlerinin yararı yoktur. Buna ek olarak, yapının degradasyonu ile toksik veya iltihabik bir cevap ortaya çıkarabilirler. Yoğun ve çok yönlü sürmekte olan çalışmalardan da anlaşılacağı gibi, kıkırdak doku mühendisliğinde hangi ağın daha üstün olduğu henüz kesinleşmemiştir. Her materyalin avantaj ve dezavantajları mevcuttur (140).

Doku iskelesi matriks tasarımında, şüphesiz en çok kullanılan biyomalzeme kondrositleri bir arada tutan ve yapısal direncin en önemli sağlayıcısı olan doku matriks elemanı Kollajendir. Tip I kollajen fibroblastik hücre morfolojisini uyarmakta ve hücreleri bu yönde yönlendirerek fibröz aramadde üretmektedir. Tip II kollajen ise kondroblastik morfolojiyi uyarak GAG (glukozaminoglikan) aramadde üretmeye

yönlendirir. Kollajen yapıdaki matrikslerin ayrıca kollajen sentezini de uyardığı tespit edilmiştir(230).

Doğal polimerlerin kondral defektlerin tedavisinde kullanılması fikrini ilk kez ortaya atan Speer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, tavşan diz eklemlerinde oluşturulan osteokondral kayıplarda sünger formunda kollajen kullanılmış ve onarım dokusunun orijinal eklem kıkırdağına benzer özellikler taşıdığı bildirilmiştir.(196)

Fujisata ve arkadaşlarının farelerde kollajen sünger üzerinde, b FGF ile gerçekleştirdikleri bir başka çalışmada da kollajen sünger yapıda matrikslerin kartilaj doku rejenerasyonu için çok uyumlu olduğu bildirilmiştir (197).

Ancak Kollajen izolasyonunun teknik olarak zor ve pahalı olması klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Bu problemin aşılması için ise, son yıllarda kollajen yerine, kolajenin denatüre hali olarak bilinen Jelatin kullanımına başvurulmuştur (198).

Jelatin yapılı yapay matrikslerin, kondrositlerin çoğalmasını, yuvarlak morfoloji almasını ve kıkırdak matriks moleküllerinin ekspresyonu ile proteoglikanların artmış uzaysal birikimini ve tip II kollajen sürekli ekspresyonunu uyardığı bilinmektedir(7). Doku mühendisliği uygulamalarında jelatinin doku destek malzemesi olarak seçilmesinde biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kolaylıkla kontrol edilebilmesi, biyouyumluluğu, antibakteriyal ve hidrofilik özellikleri ve enzimatik olarak parçalanabilmesi gibi parametreler en önemli nedenlerdir (214). Antijenik özellik taşımaz ve immunojenik değildir. Kolay jelleşme özelliğine sahip olduğundan hidrojel hazırlamasında çok yaygın kullanılır. Jelatin polimeri de, Kollajen gibi, doğal ve/veya sentetik pek çok polimerle uyuşabilir ve bu polimerlerle aynı çözücüde çözünebilir özellikte olduğundan dolayı, olarak karışım şeklinde hazırlanan (kompozit) doku iskelelerinin üretiminde de sıklıkla kullanılır(151,199, 200).

Jelatinin biyomalzeme olarak kullanılması, kıkırdak doku mühendisliği açısından pek çok avantaj sağlamaktadır. Ancak düşük mekanik özellik gibi bir dezavantaja da sahiptir (199, 201). Bu da uygulamalardaki alanlarını kısıtlar. Fakat yan zincirlerinde çok fazla sayıda fonksiyonel gruplara sahip olmasından dolayı kolaylıkla modifiye edilebilir ve bu şekilde mekanik özellikleri geliştirilebilir (214). Jelatinin ultraviyole ve gama ışınlanması yoluyla fiziksel çapraz bağlanması sağlanabilir. Ayrıca jelatin kolayca kimyasal olarak da çapraz bağlanabilir. Çapraz bağlanmasıyla termal ve mekanik kararlılığı arttığı için uzun süreli biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir. Genellikle çapraz bağlayıcı olarak bifonksiyonel ajanlar olarak bilinen GA (Glutaraldehit) , diizosiyanat, karbodiimidler, poliepoksi bileşikleri kullanılabilir (202) .

GA, özellikle enzimlerin kovalent immobilizasyonunda sıklıkla kullanılan bifonksiyonel bir reaktiftir. Özellikle jelatin, kollajen, kitosan gibi biyolojik moleküllerle birlikte glutaraldehit ile çapraz bağlar oluşturması esasına dayalı immobilizasyon yöntemi oldukça kullanılır (214). Yöntem kolay uygulanabilir olması dışında, immobilize sistemin termal, işlevsel ve aynı zamanda da depo kararlılığını artırması bakımından tercih edilmektedir. GA mikroorganizmalar için kısmen toksik etki göstermesine rağmen biyoaktif sisteme kazandırdığı avantajlardan dolayı %1'in altındaki derişimlerde GA kullanılarak toksik etki en aza indirilerek, immobilizasyonlar da gerçekleştirilebilmektedir (203).

Günümüzde, yapılan pek çok çalışmanın sonucunda, jelatin temelli biyomateryaller üzerinde oluşturulan kondrogenez için anabolik faktörlerin kontrollü salınımlarının kondrogenezi desteklediği, elde edilen neo-kıkırdak yapının kalitesinin geliştirildiği, yapının implante edildiği bölgelerdeki dokularla entegre olduğu ve klinik araştırmalarda kullanılmak üzere uzun süreli kıkırdak doku onarımları için uygun oldukları düşünülmektedir (237).

Guo ve ark.'nın, üç boyutlu jelatin matriks aracılığıyla TGF- β 1 aktarımı yaptıkları çalışmalarında da kondrositlerin küresel morfolojilerini korudukları ve kıkırdağa özgü ECM bileşenlerini yüksek miktarda salgıladıkları gözlenmiştir ((204, 205).

Doku iskelelerinin sahip olması gereken önemli fiziksel özellikler (gözeneklilik, mekanik dayanım) ve hasara özgü geometriye sahip doku iskelelerinin hazırlanması, tercih edilen fabrikasyon yönteminin teknolojik altyapısına ve başarısına büyük ölçüde bağlıdır. Doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri geleneksel yöntemler ve serbest katı hal yöntemleri olarak iki grupta toplanmaktadır. Geleneksel yöntemlerden kaynaklanabilen yetersiz gözeneklilik kontrolü ve iskele geometrisi, serbest katı hal üretim yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Fiber bağlama, elektro-eğirme, çözücü-dökümü/parçacık uzaklaştırma, faz ayrımı (koaservasyon) ve dondurarak kurutma sıklıkla kullanılan yöntemlerdir. Bu üretim yöntemleri doku formasyonunu etkileyerek skafoldun mimarisini değiştirir ve GF 'lerin enkapsülasyonu için kullanılabilir.

Süngerler, özellikleri por boyutu, porozite ve ara bağlantılarına bağlı olan poröz skafoldlardır. Por boyutu ve bağlantıları hücre infiltrasyonu ve göçü, matriks birikimi ve dağılımı ve besin ve atık alışverişinde etkili iken, porozite, hücre yapışması için yüzey alanını belirler. Bugüne kadar, porojen süzdürme, dondurarak kurutma, gaz ile köpüklenme gibi çeşitli yöntemler de dahil olmak üzere, süngerleri üretmek için kullanılsa da; spesifitesi yüksek por yüzey alanına sahip, 3 boyutlu, kalın doku iskeleleri üretebilmek için dondurarak- kurutma yöntemi sık tercih edilir ((187). Bu yöntem de hazırlanan polimer çözeltileri uygun şartlar altında dondurulup, daha sonra liyofilize edilmektedir. Liyofilizasyon işlemiyle polimer çözücüsü uzaklaştırılarak porlu doku iskeleleri elde edilmiş olur. (187).

Çalışma kapsamında, hazır doku iskelesi olarak kullanılan, piyasada hazır ticari ürün olarak bulunan, NEODERM (ARS Arthro Biyoteknoloji lab.)dondurarak-kurutma yöntemi ile Jelatin sünger formunda hazırlanan bu biyomalzemenin stabilizasyonu için çarpaz bağlayıcı ajan olarak GA kullanılmıştır.

Bu parametrelerle hazırlanan Jelatin doku iskelelerinin daha fazla içsel bağlantıya, daha büyük gözenek boyutuna ve uygun biyobozunurluk hızına sahip olduğu gösterilmiştir. Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin içsel

bağlantılı gözeneklere sahip olmasının, hücrelerin yayılması ve besin maddelerinin taşınımı açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir(206). Ayrıca doku iskelelerinde gözeneklerin çok küçük olması durumunda, gözeneklerin hücreler tarafından tıkandığı; bunun da hücre penetrasyonunu ve ESM oluşumunu engellediği bilinmektedir (207).

Bugüne kadar, poli (α -hidroksi esterler), poliglaktin/poly-dioksanon, kitosan, ipek fibroin, HA, kollajen ve jelatin dahil olmak üzere çok sayıda malzeme, kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında sünger yapılı skafoldlar imal etmek için kullanılmıştır.

Xio ve ark. tarafından domuz aurikular defekt bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışmada, kitosan ve jelatin polimerlerinden dondurarak –kurutma yöntemi ile çeşitli bileşimlerle sünger yapıda skafoldlar hazırlanmış ve bu skafoldların kıkırdak doku mühendisliği için kullanılabilirliği araştırılmıştır. Hazırlanan sfakold yapıları üzerinde defekt alanına otolog kondrosit implantasyonları yapılmış, 10 hafta sonunda gelişen neokartilaj dokuda güçlü Tip 2 kollajen ekspresyonu saptanmış ve toplam GAG içeriği doğal kulak kıkırdağında bulunanın % 90'ı kadar bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda jelatin temelli sünger skafoldların kondrosit adezyonu, migrasyonu ve proliferasyonunu kolaylaştırdığı, kitosan bazlı sünger skafoldların da GAG yapısına benzerliklerinden ötürü ESM sentezini arttırdığı savunulmuştur (199).

Kıkırdak doku mühendisliğinin diğer önemli bileşeni biyosinyal molekülleridir. Hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması, farklılaşması veya göçü gibi hücre içi düzenlemeleri yapan bu proteinler rejenerasyonu hızlandırmak veya indüklemek için kullanılabilir. Bu moleküller yalnızca hücre farklılaşmasını değil aynı zamanda gen ifadesi düzenlenişini de etkilemektedirler. Ayrıca hücrelerin metabolik aktivitesine etki ederek anabolik ve katabolik süreçlerin dengelenmesinde merkezi bir rol oynarlar (118,119).

Son yıllarda doku mühendisleri, kıkırdak dokusunun onarımını çeşitli yönlerden destekleyen morfojenetik proteinler, büyüme ve transkripsiyon faktörleri gibi biyosinyal moleküller üzerinde derinlemesine çalışarak sürekli yeni bir faktörün etki mekanizmasını ortaya çıkarmaktadırlar. Kondrogenezde etkili olduğu birçok çalışmayla gösterilmiş olan biyoaktif moleküller TGF- β , FGF, EGF, BMP ailesi ve IGF gibi bir dizi büyüme faktörü; bağımsız veya sinerjistik olarak, hücre tipi ve kültür koşullarına bağlı olarak araştırılmıştır. Bu faktörler dışında VEGF, PDGF, Wnt3a ve Wnt7a gibi birçok biyomolekülün de kondrogeneze yardımcı olduğu bilinmektedir, fakat in vivo etkilerinin minimal olması nedeniyle güncel kartilaj rejenerasyon çalışmalarının dışında tutulmaktadır (208-211).

Biyosinyaller hücre kültür ortamında destekleyici olarak kullanılabilceği gibi çeşitli yöntemlerle doku iskelelerine immobilize edilebilir ve/veya yüklenebilirler. Böylelikle, doku iskeleleri vücuda implante edildiklerinde, hasarlı bölgedeki hücrelere de etki edebilmeleri planlanmaktadır. Ayrıca bu faktörlerin farklı mezenkimal dokulara enjeksiyonuyla da in vivo kıkırdak doku oluşumu uyarılmıştır (233).

Mekanik olarak hasarlanan kıkırdak dokuda tetiklenen rejenerasyon ile büyüme faktörleri ilavesinin sinerjistik bir etkiye sahip olduğu da düşünülmektedir. Mauck ve arkadaşları agaroz jel ile yaptıkları bir çalışmada, uyarıcı yanıtın TGF- β 1 ve IGF eklenmesiyle arttırılabildiğini, proteoglikan ve kollajen içeriğinin artarak denge agregat modülü içerdiğini göstermişlerdir (212). Başka bir çalışmada ise büyüme faktörlerinin aurikular, nazal ve kostal kondrositler üzerine etkileri araştırılmış ve büyüme faktörü eklendikten sonra bütün hücre tiplerinde artmış proliferasyon ve GAG/DNA içeriği ile artmış tip II kollajen ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (213).

BMP 'ler büyüme faktörleri arasında özel bir öneme sahiptir. Mevcut doku hücrelerini progenitör hücrelere dönüştürme yeteneğine sahip tek morfojen büyüme faktörü ailesidir (167). BMPler, hem kondrogenezisi, hem de osteogenezisi etkilediği ve osteokondral birleşmeye yardımcı olduğu için in vivo osteokondral defekt çalışmalarında sıklıkla kullanılır. Bu morfojenik proteinler, kondrosit farklılaşmasını ve ekstraselüler matriks kompozisyonunu düzenleyebilmektedir. Yeteri kadar deneysel

çalışma olmasa da, osteokondral defektlerin tedavisi için, özellikle BMP 7 umut vericidir (214,235)

Çalışma kapsamında kontrollü salınımı sağlanan biyosinyal moleküllerinden biri olan BMP 7'nin osteojenik regülasyondaki etkileri çok iyi bilinmektedir. Rekombinant DNA teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde rhBMP 7 (OP-1) kemik hasarlarında kullanılabilecek ilk ticari ürün olarak piyasaya sürülmüştür (Stryker, ABD). Son yıllarda en büyük rolünün kıkırdak ve perikondrium oluşumunda, olduğuna dair çalışmalar ile kıkırdak doku rejenerasyonunu tetikleyen "gold standart" büyüme faktörü olarak belirlenmiştir(130). Kondrositlerin migrasyonu, çoğalması ve farklılaşmasının en önemli uyarıcısıdır. Proteoglikandan zengin ESM sentezini güçlü bir şekilde uyarırken, kompozisyonun düzenlenmesinde de anahtar moleküldür(131). Ayrıca IL 1, IL 6, IL 8 gibi sayısız katabolik sitokininin etkisini azaltarak kartilaj degradasyonunu önleyici etkileri de bilinmektedir (170, 132). Literatürde rhBMP 7 biyomolekülünün hiyalin kıkırdak oluşumunu desteklediğini gösteren birçok deneysel çalışma vardır (215).

Ekstrasellüler matriksteki proBMP 7 ile fibrillin-1 proteini birbirini etkilemekte ve bu sebeple proBMP7'nin hedefi ekstrasellüler fibrillin mikrofibrilleri olmaktadır (216). Fibrillin-1 olmadan da TGF β ve BMP 7 'nin aktiviteleri çok yüksektir; bu da, fibrillin- 1 eksprese edilen dokularda büyüme regülasyonunun bozulmasına yol açar(176). Ayrıca BMP 7'nin kıkırdak hücrelerinde kolajen tip II, kolajen tip VI, aggrecan, fibronektin, hyaluronan sentezini indüklediği açıklanmıştır(217, 218). Yapılan çalışmalarda kıkırdak hücrelerinde BMP7 yolağı baskılandığında hücrede agrekan ve proteoglikan sentezinin dramatik olarak düştüğü gözlemlenmiştir (219).

Bu çalışmaların yanında Cho ve ark, yaptıkları çalışmada oluşan bir kıkırdak hasarından 1 gün sonra hasar bölgesinde BMP 2 aktivitesinin arttığını, hasar bölgesinde BMP 14 aktivitesinin 7 gün sonunda tepe noktaya ulaştığı ve BMP 3, BMP 4 ve BMP 7'nin kıkırdak hasarının tamiri için aktivitelerinin 14. gün sonunda bile yüksek düzeyde bulduklarını göstermişlerdir (220).

rh BMP 7 ile yapılan bir tavşan kartilaj defekt modelinde, kemik ve kıkırdak doku için son derece uyarıcı bir molekül olmasına rağmen, defekt alanında osteofit formasyonu gelişmemiş, bu da kontrolsüz bir fibroblast formasyonuna yol açmadığı şeklinde yorumlanmıştır (221). Doku iskelesi destekli çalışmalarda, skafoldlara fibroblast girişini azaltarak defekt alanında fibrozisi azalttığını gösteren yayınlar mevcuttur(167).

Çalışma kapsamında kullanılan diğer biyosinyal molekülü olan, EGF'nin kondrojenizdeki etkileri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Kondrosit proliferasyonu ile kondrojenizin tetiklenmesini, sellülarite artışı sağlar.
- Kondrositlerin fizyolojik koşullarda diziliminin düzenlenmesinde en önemli moleküllerdendir.
- Kartilaj matriks sentezinde stimülasyon, katabolik degradasyonda ise inhibisyon sağlar (128).

2007 yılında Gümüşderelioğlu tarafından yürütülen bir çalışmada RGD, EGF ve BMP 6 biyosinyalleri aynı doku iskelesinin biyosinyalizasyonunda kullanılarak karşılaştırılmış; en yüksek glikozaminoglikan ve DNA içeriği artışı EGF ile biyosinyallendirilen doku iskelelerinde bulunmuştur (222).

Kondrojenik anabolik özellikli olarak bilinen bu biyomoleküllerin, kıkırdak defektlerinin onarım sürecine ait çalışmalarda, birlikte, kombine kullanılmasına dair çalışmalar kıkırdak doku mühendisliği açısından oldukça popüler yaklaşımlardır. Sözü geçen büyüme faktörlerinin birlikte kullanıldığında, birbirlerinin gen ekspresyonlarını arttırdığı, kondrosit migrasyon ve proliferasyonunun tetiklendiği, in vitro protein üretiminin, kartilaj matriks sentezinin, ortaya çıkan sinerjistik etkiyle daha fazla uyarıldığı, tek kullanımlarına göre daha aktif bir kondrojeniz süreci geliştiği literatürde bir çok çalışmada gösterilmiştir (109,170,24).

Fakat hangi kondrojenik anabolik faktörün birlikte kontrollü salınımıyla en aktif kondrogenezin sağlanacağına dair net bir sonuca ulaşılamamıştır. Olası sinerjistik etkileri araştırmak için hayvan modellerinde çalışmalar hızla devam etmektedir.

Hücre büyümesi ve çoğalması olaylarının başlamasında temel rolü üstlenen büyüme faktörlerinin doğal süreçte olduğu gibi zamanlamalarının taklit edilerek ortama bu aralıklarla verilmesinin klasik uygulamalarda olduğu gibi bir anda verilmelerine göre çok daha etkili olacağı düşünülmüştür. Ancak doku mühendisliğinde büyüme faktörlerinin doğal bulunma sürelerinin taklit edilerek ortama zamana bağlı bir şekilde sunulması etkin bir biyomimetik yaklaşım olacağı halde, literatürde birden fazla biyoaktif molekülün aynı destek matrisinden salınımı gerçekleştirerek çok fonksiyonlu yapılar elde edilmesi konusunda fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır.

Chubinskaya ve ark. 2003 yılında, artiküler defektler için aljinat matrisi üzerinde BMP 7 ve IGF 1 in dual salınımlarını sağlamışlardır. Sözü edilen anabolik faktörlerin defekt alanına tek tek uygulandıkları gruplara göre, kombine salınım gerçekleştirilen grupta, hem kondrosit proliferasyonunun hem de proteoglikan sentezinin anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir (25).

Kim ve ark. nın 2007 yılında gerçekleştirdiği kapsamlı çalışmada ise, mezenkimal kök hücreler üzerinde, kondrogenez üzerine en etkili olduğu bilinen BMP ailesinin 3 üyesi (BMP 2, BMP 6, BMP 7) ile TGF β 2'nin ayrı ayrı kombine salınımlarıyla kondroid doku elde edilmeye çalışılmıştır. En fazla kondroid doku eldesi BMP 7 ve TGF β 2 moleküllerinin beraber kullanıldığı grupta sağlanmış olmasına rağmen, tüm kombine gruplarda tek molekül kullanılan gruplara göre anlamlı derecede kartilaj rejenerasyonunun arttığı bildirilmiştir (223). BMP 7 ve TGF β 2 biyomoleküllerinin kondrogenezdeki sinerjistik etkileri Lim SM ve ark.'nın 2009 yılında hidrojel yapılı matrisi üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada da gösterilmiştir (26).

2005 yılında Holland ve ark. IGF1 ve TGF β 1 kondrojenik büyüme faktörlerini, polietilen glikol fumarat yapıda hazırladıkları hidrojel matriks üzerinde jelatin mikrokürelere immobilize ederek osteokondral defektlere yerleştirmiş, kondrogeniz için olumlu sonuçlar elde etmişlerdir (27). Bu iki biyomolekülün dual kullanıldığında, kartilaj rejenerasyonunda gösterdiği, olumlu sinerjistik etkiler Elisseeff J ve ark. tarafından yapılan çalışmada da bildirilmiştir (133).

Schmidt ve ark. ise deneysel osteokondral defekt modelinde, aynı matriks üzerine yerleştirdikleri IGF 1 ve PDGF moleküllerinin, hem kondrosit kültürü üzerinde hem de asellüler onarım seçeneğinde, kartilaj rejenerasyonu üzerindeki sinerjistik etkilerini araştırmışlardır. Kondrosit kültürleri kullandıkları gruplarda, dual kullanımla daha fazla ve daha düzenli bir kartilaj matriks sentezi gerçekleştiğini; hücre kullanmadan doğrudan defekt alanına yerleştirilen grupta ise kondrosit migrasyon ve proliferasyonunun daha fazla uyarıldığına dair olumlu sonuçlarını 2006 yılında yayınlamışlardır(224).

Çok yönlü etki, farklı faktörlerin birlikte aktarılmasıyla da oluşabilir. Örneğin, anabolik bir büyüme faktörü ile (örneğin IGF-1), katabolik reaksiyon gösteren sitokinlerin bir inhibitörünün (örneğin IL-1) birlikte kullanılmasıyla; bir yandan matriks parçalanması kontrol altına alınırken diğer yandan hasar görmüş kıkırdak matrisinin yeniden yapılandırılması sağlanmıştır (225).

Büyüme faktörlerinin sinerjistik etkiyle kondrogenizi daha aktif bir şekilde uyardığı bilgisinden yola çıkarak, özellikle PDGF, VEGF, TGF-B, FGF ve EGF gibi birçok büyüme faktörünü bir arada barındıran olog trombosit zengin plazma, kıkırdak defekt onarım sürecini araştıran birçok çalışmada kullanılmış ve olumlu sonuçları bildirilmiştir (226). PRP ile benzer şekilde, kemik iliği aspirasyon materyalinin santrifüjü ile edilen otojen içerik, özellikle PDGF ve TGF B1 olmak üzere büyüme faktörleri açısından zengindir. Osteokondral defekt oluşturulan havyan modellerinde yapılan olog konsantre kemik iliği aspirasyon materyali (BMC) ile mikrofraktür ile onarım karşılaştırma çalışmalarında, BMC uygulanan gruplarda kondrogenizinin aktif bir şekilde uyarıldığı, neokartilaj dokusunun ise orijinal hyalin

kıkırdak modeliyle uyumlu olduğu gösterilmiştir (191). Bu olumlu etkinin nedenleri arasında BMC içinde yoğun bulunan PDGF ve TGF β 1' in sinerjistik etkileri olabileceği gösterilmiştir.

Bulunan az sayıdaki çalışmaların bir kısmı da kemik doku mühendisliği çalışmalarıdır. BMP 2 ve TGF β 3' n aljinat hidrojellerden kombine salınımı (227), BMP 2 ve VEGF'in jelatin mikroküreler içerisine hapsedilmesinin ardından aynı gözenekli matriks içerisinden kontrollü salınımı (228) , BMP 2 ve IGF 1'in iki katmanlı çapraz bağlı jelatin kaplamalardan salınımı(229) gerçekleştirilmiş; bu faktörlerin tek başına salınımına kıyasla kemik rejenerasyonundaki pozitif etkileri bildirilmiştir.

Biz de bu bilgiler işığında, literatürde daha önce sinerjistik etkilerinin araştırıldığına rastlamadığımız; kondrogenез üzerinde en uyarıcı faktör olarak belirlenen rhBMP 7 ve neokartilaj doku içindeki matriks yapısının ana düzenleyicisi olan EGF biyomoleküllerinin aynı matriks üzerinde kontrollü salınımlarını sağlayarak kondroid doku eldesini araştırdık.

Bilindiği üzere, biyosinyal molekülü kullanılan doku mühendisliği çalışmalarının en önemli kısıtlayıcısı, bu moleküllerin çok düşük derişimlerde etkin, bozunmaları ve parçalanmaları görece hızlı, frajil moleküler yapıda olmalarıdır. Çoğu proteinin in vivo ortamda yarılanma ömürlerinin kısa olması, etkilerinin kısa sürmesine neden olmaktadır. Böylece hasarın olduğu bölgeye terapötik dozda ulaştırılabilmeleri için yüksek miktarda ve tekrarlanarak verilmesi gerekmektedir. Bu durum, hem tedavi maliyetlerinde artışa neden olmakta, hem de hedeflenen organlar için terapötik olan bu doz, hedeflenmeyen organlarda hasara yol açabilmektedir (192). Rekombinant proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlardan yoksun oldukları, böylece gerekli konformasyonu kazanmalarının ve tedavide etkin olmalarının g olduğu unutulmaması gereken başka bir problemdir (230).

İşte rekombinant proteinlerin tüm bu sınırlayıcı etkilerinin üstesinden gelebilmek için ilgili biyosinyal moleküllerinin bir taşıma sisteminin içinde bulunmaları, bölgede

yavaş ve uzun süreli kontrollü salınım yapabilmeleri açısından gereklidir. Doku büyümesinin lokal etkili büyüme hormonları ile sinyallenmesine olanak tanıyan kontrollü salım teknolojileri doku mühendisliğinin çarpıcı gelişmelerindedir. Büyüme faktörlerinin taşıyıcı sistemler içerisine hapsedilmesi ve kontrollü salımlarının sağlanması hem biyoaktif faktörü kullanım alanında lokalize edecek, hem bozunmadan koruyacak hem de gerekli miktarın süre içerisinde kontrollü bir şekilde ortama sağlanmasını gerçekleştirerek kullanılan toplam miktarın ve maliyetin azaltılmasında etkili olacaktır. Ayrıca mikro/nano boyutlu olan bu yapıların ulaşılması zor bölgelere gidebilmesi ve oluşabilecek yan etkileri engellemesi açısından da taşınım sistemleri gereklidir (231).

Taşıyıcı sistem olarak en çok kullanılan yapılar arasında hidrojel, mikroküre, nanokapsül ve lipozom bulunmaktadır (136). Hidrojeller, su ile etkileştiklerinde çözünmeyen ancak suyu emerek şişebilen, üç boyutlu polimerik ağsı yapılardır. Hidrojeller biyosinyal molekülü taşınmasını destekler ve enkapsüle ettikleri hücreleri üç boyutlu homojen ortamda süspansederler. Fizyolojik koşullara benzer şekilde taşıdıkları moleküllere, mekanik yükleri ileterek kontrollü kuvvet uygulama yeteneğine sahiptirler. Mekanik özellikleri, çapraz bağlama yoğunluğu ile değiştirilebilse de sınırlı mekanik özellikleri nedeniyle, kırık doku mühendisliği çalışmalarında, biyosinyal molekülü taşınmasından ziyade hücre enkapsülasyonu için kullanılmaktadır (232). Bu sorunun üstesinden gelebilmek için son yıllarda hidrojeller üzerine, biyosinyal molekülü yüklenmiş mikroküre formülasyonları yerleştirilmektedir. Bu nedenle son bu konuda yapılan son çalışmalar, bölgesel organizasyonu yeniden oluşturacak katmanlı hidrojeller üzerinde mikroküre sistemleri içeren poröz skafoldlar üzerinde yoğunlaşmıştır (59). PLGA, PEG, OPF, HA gibi polimerik malzemelerden oluşan, hidrojeller üzerinde kollajen, jelatin, kitosan, fibrin, alginat polimerlerinden hazırlanan mikroküreler sıklıkla tercih edilen taşıyıcılardır. Böylece hem hücre enkapsülasyonu, hem de gerekli sinyalin hasarlı bölgede uzun süreli ve kontrollü salımı gerçekleştirilebilmektedir.

Guo ve ark., tavşanlarda MSC ler ile osteokondral defekte yönelik yaptıkları bir çalışmada, hücre taşıyıcı sistem olarak OPF (oligo (poli (etilen glikol) fumarat) polimerinden hazırladıkları hidrojel üzerine, fabrikasyon sürecinde TGF β 1 yüklü

jelatin mikroküreler yerleştirmişler ve defekt alanına implante etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda elde ettikleri olumlu sonuçlar ile kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında hücre enkapsülasyonu için OPF hidrojellerin uygun bir taşıyıcı sistem olduğunu, fakat biyosinyal molekülünün taşınması için jelatin mikrokürelerle immobilize edilmesini önermişlerdir (233). Başka bir çalışmada ise, TGF β 1 ve IGF 1 yüklü PLGA mikroküreler polimer/hücre konsantrasyonu ile karıştırılmış ve fotopolimerizasyon ile hidrojel yapısı oluşturulmuştur. 2 hafta sonunda GAG ve hücre yoğunluğunda belirgin bir artışa rastlanmıştır(234). Literatürde olumlu sonuçları bildirilen başka bir çalışmada ise TGF β 1, PEOA (Poli (Etilen Oksit) Diakrilat) ve fibrinden oluşan hidrojel içine dahil edilmiştir. Bu sistemlerden biyomoleküllerin salınım profilleri, bozunma ve yayılma özelliklerine göre belirlenir. Sözü edilen bu çalışmalarda da, büyüme faktörü salınımının matris çapraz bağlanma yoğunluğu ve/veya mikrokürelerin büyüklüğündeki varyasyonlar ile kontrol edilebildiğinin üzerinde durulmuştur.

Hidrojellerin aksine, diğer 3 taşıyıcı sistem küresel formdadır. Lipozomlar, hücre zarına benzeyen lipid tabakalarından oluşan küresel yapılardır. Hidrofilik ve hidrofobik malzemelerin her ikisini de kapsülleyebilmektedirler. Biyobozunur olmaları ve toksik olmamaları nedeniyle dikkatleri üzerine çeken ilk biyosinyal taşıma sistemlerinden olan lipozomlar, düşük mekanik dayanıma sahip olmaları ve kararsızlıkları nedeniyle klinik kullanımda zorluk çıkarmaktadırlar.

Hidrojel ve lipozomlara ait bu yetersiz mekanik özellikler nedeniyle, doku mühendisliği çalışmalarında biyosinyal taşınımı için, mikroküre formülasyonları, son yılların en gözde yaklaşımı olmuştur (235).

Literatürde ilk kez 1960'larda Chang tarafından taşıyıcı sistem olarak tasarlanan mikroküreler, 1980 'lerde Franklin Lim ve Anthony M. Sun tarafından Tip 1 Diyabet tedavisinde klasik yöntemlere alternatif olarak öne sürülmüştür (236). Mikroküreler, etkin maddeyi moleküler düzeyde partiküller halinde taşıyan, farklı fizikokimyasal özelliklere ve birkaç mikrondan mm boyutlarına kadar değişen çap dağılımına sahip, monolitik yapıdaki mikro taşıyıcılar olarak tanımlanabilir.

Wang ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yayınlanan bir çalışmada, PLGA ve ipek kompozitinden oluşan mikrokürelere rhBMP 2 ve rh IGF 1 yüklenmiş, ardından bu mikrokürelere aljinat jel iskelelere yüklenmiştir. Üretilen iskelelerin insan mezenkimal kök hücreleri (MKH) üzerindeki osteojenik ve kondrojenik farklılaşması incelenmiştir. Deney sonucunda, yüklü mikrokürelere biyosinyallerin kontrollü olarak salındığı ve mikrokürelere büyüme faktörü taşınımı için ideal sistem olduğu sonucuna varılmıştır (237).

Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisine yönelik olarak Garbayo ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) yüklü mikropartiküller sıçan striatumuna enjekte edilmiştir. İn vivo ortamda 5 haftadan fazla bir süre, mikrokürelere GDNF salındığını ve mikrokürelere protein salınımı için uygun sistemler olduğu belirtilmiştir (238).

Kim ve arkadaşları ise, TGF β 1 biyomolekülünü kitosan mikrokürelere yüklemiş ve elde edilen mikrokürelere gözenekli kitosan doku iskelelerine gömerek, TGF β 1'in kontrollü olarak hasar bölgesine salınmalarını sağlamışlardır. Çalışmanın sonucunda kondrosit proliferasyonunun ve matris sentezinin arttığı, sözü edilen büyüme faktörünün defekt bölgesine yeterli olarak ulaştırılabildiği ifade edilmiştir (74).

Biz de çalışmamız sırasında, kullandığımız biyosinyal moleküllerinin kullanımlarındaki sınırlayıcı etkilerinden kaçınmak için, literatürde gösterilmiş olumlu özellikleriyle doku mühendisliği çalışmalarında ideal kontrollü taşıyıcı sistem olarak kabul edilen mikrokürelere tercih ettik. Bu amaçla laboratuvar şartlarında hazırladığımız jelatin mikrokürelere EGF ve rh BMP 7 biyomoleküllerini yükledik. Jelatin sünger yapısındaki hazır doku iskelemize immobilize ederek uzun ve sürekli salınımlarını sağladık. Böylece büyüme faktörlerinin çok kısa olan yarı ömürleri nedeniyle, yüksek dozlarda kullanılmasından kaynaklanan toksik etkilerle karşılaşmadık, hem de çalışmamızın maliyetini önemli ölçüde azalttık.

Literatür incelendiğinde, kontrollü salınım sistemlerinden mikrokürelerin taşınması gereken özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir (217):

- Etkin maddeyi kontrollü bir şekilde hedef bölgeye etkin maddenin yapısı ve aktivitesini değiştirmeden salmalı,
- İn-vitro ve in-vivo koşullarda dayanıklı olmalı,
- Etkin madde yapısı ve aktivitesi üzerinde değişikliğe neden olmamalı,
- Düşük dozda etkin madde kullanımına olanak sağlamalı ve buna bağlı olarak toksisiteyi azaltmalı,
- Biyolojik sistemle uyumlu bir yapı göstermeli,
- Biyolojik olarak parçalanabilmeli ve parçalanma ürünleri toksik olmamalı,
- Düşük dozlara rağmen yüksek etki sağlamalıdır (217).

Bu amaçlarla, kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında, mikroküre hazırlanmasında sıklıkla kullanılan polimerler; kollajen, jelatin, kitosan, fibrin ve alginattır (238).

Günümüzde, yapılan pek çok çalışmanın sonucunda, dayanıklı yapısı nedeniyle Jelatin mikroküre formülasyonları için sıkça kullanılmaktadır. Jelatin temelli biyomateryaller ile hazırlanan mikrokürelerle, anabolik faktörlerin kontrollü salınımlarının kondrojenizi desteklediği, elde edilen neokartilaj yapının kalitesinin geliştirildiği, yapının implante edildiği bölgelerdeki dokularla entegre olduğu ve klinik araştırmalarda kullanılmak üzere uzun süreli kıkırdak doku onarımları için uygun oldukları düşünülmektedir (239, 240). Ayrıca taşıdığı amino grupları nedeniyle sahip olduğu pozitif yük, negatif polimerler veya yüzeylerle etkileşimde bulunabilmekte, metal iyonlarıyla şelat oluşturarak mikrokürelerin çapraz bağlanmasını sağlamaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında kontrollü salınımı sağlamak üzere mikroküre formülasyonlarının jelatin temelli hazırlanmasına karar verilmiştir.

Laboratuvar şartlarında mikroküre hazırlama yöntemlerinden ise, sıklıkla polimerleşme, çözücü buharlaştırma, koaservasyon, püskürterek kurutma ve püskürterek dondurma teknikleri kullanılır (241).

Çalışma kapsamında, biyosinyal faktörlerinin taşınımı ve salınımı sağlayan mikroküreler koaservasyon yöntemi ile hazırlanmıştır.

Koaservasyon, bir polimer çözeltisinden herhangi bir etki ile polimerin çözünürlüğünün azalarak polimerce zengin damlacıkların ortamdaki ayrılıp, ortamları karışmayan ayrı bir faz oluşturması olarak tanımlanabilir. Bu yöntemde, polimer çözeltisi soğutulduktan sonra ayrılmış olan fazı çözücü yapıdan uzaklaştırılır ve geriye kalan polimerlerce zengin faz katılarak doku iskelesini oluşturur. Koaservasyon tekniğinin diğer tekniklere göre kolay hazırlanması, porlu yapıyı sağlaması, biyoyumluluğu sağlayan mekanik özellikleri sağlaması nedeniyle çalışma kapsamında tercih edilmiştir.

Hazırlanan mikrokürelerin doku iskelelerine yüklenmesi için çözeltiliye karıştırma (242), doku iskelesine emdirme (243) ve füzyon (244) gibi farklı teknikler kullanılmaktadır. İlk teknikte, doku iskelesini üretmek üzere oluşturulan çözeltiliye, mikroküreler belirli oranlarda eklenmekte ve daha sonra doku iskelesi üretimine geçilmektedir. Emdirme (embedding) tekniğinde, mikroküreler ya doku iskelesinin farklı bölgelerine enjekte edildikten sonra doku iskelesi kurutulmakta ya da doku iskelesinin tüm yüzeyi ıslatılmış mikroküreye batırılma suretiyle mikrokürelerin iskele içlerine girmesi sağlanmaktadır. Son teknik olan füzyon ise emdirme ile benzer özellikte olup, uçucu bir sıvı ile ıslatılan mikrokürelerin iskelelere yüklenmesi yöntemidir.

Çalışmamızda, hem matriks tasarımında hem de mikroküre tasarımında, öncül malzeme olarak kollajenin denatüre formu olan Jelatin polimeri kullanılarak koaservasyon tekniği ile çeşitli aşamalardan geçirilmiş, birbiriyle bağlantılı çok sayıda pordan oluşan bir yapıya sahip, polimetrik özellikte, jelatin mikrokürelerden oluşan matriks elde edilmiş; biyosinyal moleküllerinin immobilizasyonu sonrasında jelatin

mikrokürelerin doku iskelelerine yüklenmesi için ise, uygulama kolaylığı açısından embedding yöntemi tercih edilmiştir.

Bu işlemler sonucunda yüksek elastik özelliğe sahip jelatin mikroküreler içeren Jelatin Süngerler elde edilmiştir. Hazırlanan bu iskelenin önemli bir avantajı, sıvı ortamlarda hızla şişebilmesidir. Jelatin sünger yapısındaki bu doku iskeleleri için şişme çalışmaları örneklerin 37°C'de Dulbecco fosfat tampon çözeltisinde (DPBS, pH=7.4) rehidrasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Şişme testlerinin sonucunda elde edilen şişme oranları 27-40 arasında değişmektedir. GS-MS-EGF iskelerinin şişme oranları daha düşüktür. EGF ve BMP 7 koimmobilizasyonu ile hazırlanan Jelatin sünger (GS-GM-EGF-BMP 7) gözenek boyutlarının ve içsel bağlantılarının bağlı olarak daha büyük olmasından dolayı şişme oranları daha yüksektir. Şişme prosesinin 3 dakika içerisinde hızlı bir şekilde tamamlandığı belirlenmiştir. Dakikalar içinde gerçekleşen ve çıplak gözle de farkedilebilen bu genişlemenin oranı %300'den fazla olarak ölçülmüştür. Bu özelliği sayesinde kırıkta defekt zeminine yerleştirildikten sonra defektin geometrik yapısına uyum sağladığı gibi, ek olarak çeşitli faktörler (büyüme faktörleri, proteinler) için de taşıyıcı görevi görebilmektedir.

Çalışmamız kapsamında, hazırladığımız bu doku iskelelerinin genişerek şekillendirilebilir özelliğinden faydalanarak, Grup 3 ve Grup 5 deneklerde rulo haline getirerek defekt zeminine yerleştirdik. Perikondrium temas yüzeyini azalttığımız bu gruplarda, aynı doku iskelesinin düz olarak defekt zeminine yerleştirildiği gruplardan istatistiksel olarak anlamlı oranda daha az kartilaj benzeri doku elde ettik. Elde ettiğimiz yeni onarım dokusu, sadece doku iskelesinin temas ettiği bölgelerde yoğunlaşmıştı. Santrale gidildikçe defekt doluluğu oranı ve matriks boyanma özelliği azalmaktaydı. Doku iskelesinin temas etmediği bölgelerde ise neredeyse hiç yeni onarım dokusu oluşmamıştı. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda da defekt santralinde Tip 1 kollajen ekspresyonuna rastlanmayan bölgeler çoğunlukta idi. Oysa defekt zeminine, defekt şeklinde düz olarak doku iskelesi yerleştirilen gruplarda tüm defekt alanlarında yeni onarım dokusu, tüm alanlarda Tip 1 Kollajen ekspresyonu gözlenmekteydi. Bu sonuç, kullanılan doku iskelelerinin şekillendirilebilir ve üç boyutlu olduğunu göstermektedir. Bu özelliğin her türlü kondral defekt için klinik kullanılabilirlik açısından avantaj sağlayacağını düşünmekteyiz. Çünkü, trakeal

defektler, eklem yüzeylerindeki kondral kayıplar veya mikrotia gibi konjenital defektlerde, ihtiyaç duyulan neokartilaj boyut, şekil, konum ve derinliği farklıdır.

Doku mühendisliğinde doku iskelesinin morfolojik ve mekanik özellikleri, in vitro ortamda veya in vivo implantasyon sırasında yapısal olarak kararlı ve dayanıklı olmasını sağlaması açısından önemlidir. Buna ek olarak, tasarlanmış doku içerisindeki hücrelerin biyolojik işleyiş ve fonksiyonlarını önemli ölçüde etkilemektedir (245). Dolayısıyla, doku iskeleleri uygulama sırasında yenilenecek dokunun özelliğine göre belli bir gerilime maruz kalır ve kullanılacak bu doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının belirlenmesi gereklidir. Ayrıca, mekanik özellikler, oluşan dokuda spesifik hücre fonksiyonlarını da etkilemektedir. Bu amaçla, çalışma kapsamında hem hazır olarak kullandığımız EGF ile biyosinyallenmiş Jelatin Sünger (NEODERM, ARS Arthro) ve hem de rhBMP 7 immobilize ettiğimiz jelatin mikrokürelerle hazırladığımız dual büyüme faktörü taşıyan Jelatin sünger yapısındaki doku iskelesinin çalışmamıza uygunluğu açısından mekanik özelliklerini test ettik.

Biyomekanik testler sonucu her iki doku iskelesinde elde ettiğimiz elastik modül değerleri literatürle uyumlu değerlerdi ve bu sonuçlar çalışmamızda oluşturacağımız defekte yerleştirilen doku iskelesinin kolay şekillendirilebilir olması açısından önemliydi. GS-MS-EGF doku iskelelerinde elastik modül değerleri biraz daha düşük bulundu. Elde edilen değerlerle GS-MS-EGF doku iskelelerinin, GS-MS-EGF-BMP7 süngerlere göre daha yumuşak ve kırılğan olduğu, fakat çalışmamızda kullanılış şekilleriyle bu farkın sonuçları etkilemeyeceği sonucuna varıldı.

Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin porlu ve bu porların birbirleriyle bağlantılı olması hücrelerin göçü; besin maddelerinin ve hücrel atıkların transferi açısından oldukça önemlidir (244,245). Özellikle 100-150 µm boyutundaki gözenekler hücrelerin doku iskelesinin iç kısımlarına doğru ilerlemesine olanak sağlamaktadır(246). Tüm bu nedenlerden dolayı doku iskelesi eldesinde kullanılan tekniğin por, por boyutu, por dağılımı ve porların birbirleriyle olan bağlantısı açısından tutarlı olması gereklidir (244). Bir kıkırdak hücresi in-vivo koşullarda yaklaşık olarak

30-40 mikrometre boyutlarındadır. Fakat bu hücreler tek bir düzlemde teker teker bulunmazlar bir lakün içerisinde küme halindedirler. Bu nedenle 100-300 mikronluk gözenekler kıkırdak gelişimi için oldukça idealdir. Çalışmamızda kullanılan doku iskelerinin hazırlanması için kullanılan dondurarak kurutma tekniği ile 100 µm boyutunda gözeneklerin elde edilmesi mümkündür(247). Bu yöntemde, dondurma prosesi sırasında, çözelti içerisinde buz kristalleri oluşmakta ve daha sonra bu kristaller liyofilizasyon ile uzaklaştırılarak porlu bir yapı elde edilmektedir. Oluşan yapının por boyutu, dondurma hızı ile değiştirilebilmektedir. Seol ve arkadaşları, 100-200 µm boyutunda porlara sahip kitosan doku iskelelerini dondurarak kurutma yöntemi ile elde etmişler, dondurma hızını değiştirerek por boyutunu 400 µm ye çıkarmışlardır. Farklı por boyutuna sahip bu iskelelerin kemik ve kıkırdak doku mühendisliğindeki uygunluklarını araştırmışlar ve tüm gruplar için olumlu sonuçlar elde etmişlerdir (248).

Bu çalışmada hazırlanan hücre üzerinde toksik etki göstermeyen bu formülasyonların kondroprogenitör hücrelerin yapışması ve proliferasyonunu sağlayabilecek uygunlukta por özellikleri ve mekanik dirence sahip oldukları gösterilmiştir.

Hazırlanan doku iskelerinin SEM analizleri sonucunda, mikroküre yapılarının her iki doku iskelesi üzerinde homojen dağılım gösterdikleri, kümelenme oluşturmadıkları, küreselliklerini korudukları gösterildi. Yerleştirildikleri defekt alanının tüm yüzeyine eşit miktarda biyosinyal molekülünü taşıyabilirlikleri test edildi. SEM analizleri sonucunda, GS-MS-EGF-BMP 7 olarak isimlendirilen doku iskelesinin yüzey yapısının, GM-EGF mikrokürelere göre daha pürüzlü olduğu ama küreselliğini yitirmediği gözlemlendi. Taşıdığı dual biyosinyal molekülü ve rhBMP7 molekülünün embedding yöntemi ile iskeleye immobilize edilmiş olması nedeniyle daha pürüzlü bir yapıya sahip olduğu gözlemlendi.

Bu bilgilerin doğrultusunda, çalışmamızda perikondriumun tek başına onaramadığı literatürde gösterilmiş olan olan 1x1 cmlik defekt oluşturulan alana, perikondrial kondrogenitör hücrelerin tutunmasına ve ortama lokal olarak eklenen ek

biyosinyal faktörlerinin taşınmasına olanak sağlayan biyoyumlu bir doku iskelesi yerleştirilmiş ve devamlılığı bozulan kırıldak doku hasarıyla tetiklenen rejenerasyon kapasitesi arttırılmaya çalışılmıştır.

Sadece perikondrium etkisiyle kırıldak rejenerasyonu araştırılan kontrol grubunda (Grup 1) oluşturulan defektin santral alanlarında minimal doku rejenerasyonu olduğu, oluşan yeni dokuda makroskopik olarak da gözlenebilen fibrozis ve ossifikasyonun hakim olduğu gözlenmiştir. Oysa tüm denek gruplarında, doku iskelesinin temas ettiği tüm defekt alanlarında totale yakın yeni doku oluşumu izlenmiş ve defektin onarım miktarı tüm gruplarda kontrol grubundan istatistiksel olarak daha fazla olarak gözlenmiştir.

Grup 1 de, defekt alanının çevre kırıldakla olan bağlantısının da hemen hemen olmadığı bazı deneklerde ise tek taraflı bağlantı olduğu göze çarptı. Oysa biyosinyal molekülü kullanılmış olan tüm denek gruplarında defekt alanı ve sağlam kırıldak doku arasındaki geçiş zonu en az iki bölgeden bağlantı içeriyordu. Ayrıca Grup 1 deneklerde az miktarda oluşan onarım dokusu, tüm deney gruplarına daha silik matriks boyanması ve daha zayıf immün pozitif boyanma özelliğine sahipti. Bu bulgular literatür bilgileriyle uyumlu bulunarak perikondriumun tek başına 1x1 cm'lik defekt alanını onaramayacağı sonucuna varıldı.

Ayrıca hazırlanan doku iskelelerinin yumuşak ve şekillendirilebilir yapısının sağladığı avantajla, defekt alanlarına düz (Grup 2 ve 4) ve 3 mm kalınlığında rulolar halinde (Grup 3 ve 5) perikondriumla temas yüzeyleri değiştirilerek yerleştirildi. Böylece perikondrium etkisi uzaklaştırıldığında kırıldak rejenerasyon kapasitesinin etkilenme oranlarının karşılaştırılma şansı elde edildi. Histomorfolojik sonuçlara bakıldığında, aynı özelliklere sahip doku iskelesi defekt alanını kaplayarak; komşu perikondrium tüm yüzeylerine temas edecek şekilde yerleştirildiğinde (Grup 2 ve 4), rulo olarak yerleştirilen gruplara göre (Grup 3 ve 5) makroskopik olarak daha fazla onarım dokusu elde edildi. Mikroskopik incelemelerde hem defekt doluluk alanı oranı, hem de çevre kırıldak doku bağlantı bölgeleri oranı istatistiksel olarak anlamlı kabul

edilecek düzeyde fazlaydı. Oysa doku iskelesinin rulo yapılarak yerleştirildiği gruplarda, doku iskelesinin komşu perikondriuma temas ettiği bölgelerden merkeze doğru gelişen bir onarım dokusu mevcuttu ve defekt santrali boş olarak gözlenmekteydi(Grup 3 ve Grup 5).

Deney grupları, hücre morfolojisi açısından kendi aralarında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklar izlenmedi, fakat kondrosit morfolojili hücrelerin en yoğun gözlendiği gruplar dual biyosinyal molekülü uygulanan Grup 4 ve Grup 5 deneklerdi.

Kıkırdak geçiş zonunun devamlılığında en iyi, dual büyüme faktörü immobilize edilen iskelenin defekt alanına düz olarak yerleştirildiği Grup 4 deneklerdeydi. Doku iskelelerinin rulo olarak yerleştirildiği Grup 3 ve Grup 5 te çevre kıkırdak doku bağlantı sayısı, Grup 2 ve Grup 4 e göre anlamlı olarak az olsa da, bağlantı noktalarında kıkırdak geçiş zonu devamlılığı açısından sonuçlar benzerdi.

Ancak hem mikroskopik incelemeler, hem de immunhistokimyasal sonuçlara göre dual büyüme faktörü kullanılan gruplarla ortama tek tek verilen gruplar arasında neokartilaj dokusundaki hücre morfolojisi ve matriks boyanması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Başka bir deyişle aynı doku iskelesi üzerinde EGF ve rh BMP 7 biyomoleküllerinin defekt alanlarına kontrollü salınımının dual olarak sağlanmasıyla, tek başlarına verilmelerinin neokartilaj dokunun kalitesi üzerinde sinerjistik etki sağlamadığı, sadece defekt doluluğu oranları ve sağlam kıkırdakla bağlantı noktaları sayısının arttırabildiğini göstermektedir.

Bizim çalışmamızda defekt alanında oluşan yeni onarım dokusunun immunhistokimyasal incelemesi Tip 1 prokollajen ekspresyonu ile değerlendirilmiştir. Tip 1 prokollajenin neokartilaj dokusunda varlığı, perikondrial öncü hücrelerin defekt alanına migrasyonu ve adezyonun uyarıldığı ve kondroblastların proliferasyonun gerçekleştiğinin önemli belirteçlerindedir. Gauss ve ark.'nın yapmış olduğu

çalışmada, Tip 1 kollajen ekspresyonunun kondrosit fenotipinin stabilitesini göstermesinin yanı sıra hücre -hücre ve hücre- matriks etkileşimini işaret ettiği ortaya konmuştur(249). Frenkel ve ark.; tavşan aurikular defekt modelinde iyileşme dokusunda Tip 1 ve Tip 2 kollajen seviyelerini karşılaştırdıkları invivo çalışmada, Tip 1 kollajen ekspresyonunun erken dönemde artmaya başladığını, 6 haftada ise Tip 1 ve Tip 2 kollajen ekspresyonlarının eş zamanlı artış gösterdiğini, 24 haftada ise Tip 2 Kollajen ekspresyonunda artış devam ederken Tip 2 Kollajen miktarındaki azalmanın dikkat çekici olduğunu belirtmişlerdir. (250) EGF 'in kolajen sentezi (ağırlıklı olarak kolajen tip I) üzerindeki etkileri göz önüne alındığında tez kapsamında erken dönemde ortaya çıkan kollajen Tip I sentezi daha kolay açıklanabilir (251).

Tip 1 prokollajen ekspresyonu, perikondrial öncü hücrelerin defekt alanına migrasyonu ve adezyonunun gerçekleştiği, kondroblastların proliferasyonu ile başlayan kondrogenез sürecinin en önemli belirteçlerindedir, fakat oluşan kıkırdak dokunun tipini belirleyemez. Oysa neokartilaj dokusunun hangi tip kıkırdak dokuya yönelimi olduğunun bilinmesi hangi tip defektlerde tercih edilmesi gerektiğini belirleyecektir. İmmünohistokimyasal olarak Tip 1/Tip 2 kollajen oranı, Elastin, Fibrilin 1, Agrekan moleküllerinin araştırılması elastik kıkırdağa yönelimi belirlemek için anahtar moleküllerdir ve çalışmamızın devamında immünohistokimyasal olarak araştırılmaları planlanmıştır.

Çalışmamızın en önemli kısıtlayıcılarından biri, oluşan onarım dokusunun elastisitesini belirleyecek olan biyomekanik özelliklerinin araştırılmamış olmamasıdır. Kıkırdak doku rejenerasyonu periferden merkeze doğru azalarak devam ettiği için, neokartilajın santralinden sağlam kıkırdak bağlantı noktalarına uzanan bölgelerden alınan örneklerle gerçekleştirilen germe testleri ile elastik kıkırdağa yönelim belirlenebilir.

Çalışmamızda tüm deney gruplarında kullanılarak, kondrogenез süreci için olumlu sonuçları ortaya çıkarılmış temel matriks yapısı EGF ile desteklenmiş Jelatin Süngerdir. Piyasada yara-yanık örtüsü olarak (NEODERM, ARS Artro Biyoteknoloji

Lab.) hazır bulunmaktadır. Düşük maliyetli, son derece biyouyumlu ve üzerinde farklı biyomoleküllerin kontrollü salınımlarına izin verecek şekilde fabrike edilmiş, tamamen şekillendirilebilir olan bu biyomalzemenin, ilerleyen dönemlerde farklı kartilaj rejenerasyonu çalışmalarında kullanımı mümkün olacaktır. Fakat öncelikle, bu malzeme ile oluşturulan onarım dokusunun; otojen kıkırdak greftleriyle benzer sonuçlara yol açıp açmadığı karşılaştırmalı çalışmalarla ortaya konmalıdır. Yapılacak böyle bir çalışmada, otojen kıkırdak greftleri ile benzer mekanik ve histokimyasal özellikler saptanırsa; kolay ulaşılabilir klinikte kullanımı mümkün olan bir yapay kıkırdak modeli için temel oluşturulabilir. Bu yöntemle oluşturulan kıkırdak doku, rekonstrüksiyonda büyük yenilik getireceği gibi doku mühendisliği için komplike dokular oluşturulmasına önemli katkılar sağlayacaktır Böylece 1743 yılında William Hunter' ın "Hipokrat zamanından günümüze kadar, kıkırdak yapısının bir kere kaybedilirse bir daha asla yenilenemeyeceği bilinmektedir" sözü 300 yıl sonra tarihe karışmış olacaktır.

9. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Doku iskelesi kullanılan tüm deney gruplarında, sadece perikondrium etkisiyle kıkırdak onarımının araştırıldığı Grup 1 kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha fazla neokartilaj doku oluşmuştur. Oluşan neokartilaj dokunun matriks boyanma özelliği, kıkırdak geçiş zon özellikleri, hücre morfolojisi, immunhistokimyasal özelliği Grup 1 deneklerde diğer deney gruplarına göre anlamlı derecede olumsuz olduğu da eklenirse, tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre kıkırdak dokuya benzer, mekanik olarak da daha güçlü yeni doku oluşturulduğu söylenebilir.
2. Uygun skafold ile ortama lokal ve kontrollü olarak verilen EGF ve rh BMP 7 ile oluşan tam kat kıkırdak defekti gruplarında, makroskobik olarak daha fazla onarım dokusu gözlene de, histolojik ve immunhistokimyasal sonuçlar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır. Makroskopik düzeyde orijinale yakın seviyede iyileşme görülse de, oluşan kıkırdak benzeri dokunun kalite özellikleriyle ilgili anlamlı farklar gözlenmemiştir.
3. Aynı doku iskelesinin defekt üzerine rulo yapılarak, perikondrium etkisinin uzaklaştırılarak yerleştirildiği gruplarda, iskelenin temas etmediği yüzeylerde neokartilaj gelişimi diğer deney gruplarına göre daha azdır. Bu sonuç, iskeleye tutunan perikondrial progenitör hücrelerin onarımın temel basamağını oluşturduğunu göstermektedir.

4. Şekillendirilebilir özellikte prefabrike edilmiş olan doku iskelerinin defekt alanına rulo olarak yerleştirildiği gruplarda, yeni onarım dokusu matriksin temas ettiği bölgelerde gelişmiş, defekt santralinde yeni onarım dokusuna rastlanmamıştır. Bu özellik, çalışma kapsamında hazırlanan matriks yapısıyla farklı boyut, şekil ve derinliklerde olabilen kırıkta defektleri onarımı yapılabileceğini göstermektedir.
5. Sonuç olarak tez kapsamında kulak kırıkta bölgesinde oluşturulan hasarın iyileştirilmesi için perikondrial rejeneratif hücrelerin belirli bir süre normal metabolizmalarına ek EGF ve BMP 7 sentezi sağlayacak ve kırıkta iyileşme sürecini hızlandıracak, uygun kırıkta gelişimini sağlayacak biyouyumlu Jelatin doku iskelelerinin kullanıldığı bir doku mühendisliği çalışması gerçekleştirilmiştir, Oluşan neokartilaj dokusunun hangi tip kırıkta oluşumuna yöneliminin saptanması için daha fazla immünohistokimyasal ve biyomekanik araştırmaya ihtiyaç vardır.
6. Gerçekleştirilen tez kapsamında, elde ettiğimiz sonuçlar, tavşanlarda uygun biyosinyal molekülleri ve uygun skafold kullanımı ile perikondrial progenitör hücrelerin ek hücre kaynağına gerek duymadan kırıkta defektlerini onarılabileceğini kanıtlamaktadır. Oluşan dokunun kalitesi ve mekanik özelliklerinin değerlendirildiği daha ileri araştırmalarla desteklendiği takdirde, klinik uygulamaya geçirilebilen hazır bir implant oluşturulması için temel oluşturabilir. Böylece hücre-polimer modeliyle gerçekleştirilen kırıkta doku mühendisliği uygulamalarının klinikte kullanımına ait kısıtlayıcıların önüne geçilmiş olacaktır. In-vitro ortamda üretilen kırıkta doku yerine, canlının kendi perikondrium rejenerasyon kapasitesi artırılarak kırıkta doku oluşturulması hem ucuz, hem de kolay uygulanabilecek bir tedavi yöntemi olarak

düşünülebilir. Kullanılan matriks yapısının ticari ürün olarak üretilmiş bir biyomalzeme olması bu açıdan büyük avantaj sağlayacaktır.

10.KAYNAKLAR

1. Özgentaş H, Erol O, Gürsu KG. Sekonder Arteriyel Perikondrial Fleplerde Kıkırdak Rejenerasyonu. *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk Plast Surg)*. 2014;4(1).
2. Brent B. Repair and grafting of cartilage and perichondrium. *Plastic Surgery Philadelphia: Saunders*. 1990:559.
3. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas: Mcgraw-hill medical New York*; 2010.
4. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing. An overview. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995 Oct;28(5):847-64.
5. Georgiade GS, Georgiade NG, Riefkohl R, Barwick WJ, Weatherley-White R. *Textbook of Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery. Annals of Plastic Surgery*. 1993;30(6):571.
6. Khan W, Malik A, Hardingham T. Stem cell applications and tissue engineering approaches in surgical practice. *Journal of perioperative practice*. 2009;19(4):130-5.
7. Chang C-H, Kuo T-F, Lin C-C, Chou C-H, Chen K-H, Lin F-H, et al. Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin–chondroitin–hyaluronan tri-copolymer scaffold: a porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials*. 2006;27(9):1876-88.
8. LESTER CW. Tissue replacement after subperichondrial resection of costal cartilage: Two case reports. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1959;23(1):36-54.
9. Ohlsén L, Skoog T, Sohn SA. The pathogenesis of cauliflower ear: an experimental study in rabbits. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*. 1975;9(1):34-9.
10. Skoog T, Ohlsen L, Sohn SA. Perichondrial potential for cartilagenous regeneration. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1972;6(2):123-5.
11. Lester CW. Tissue replacement after subperichondrial resection of costal cartilage: two case reports. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull*. 1959 Jan;23(1):49-54.
12. Ohlsén L. Cartilage regeneration from perichondrium. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 1978;62(4):507-13.
13. Ulutas K, Menderes A, Karaca C, Ozkal S. Repair of cartilage defects with periosteal grafts. *Br J Plast Surg*. 2005 Jan;58(1):65-72.
14. Sari A, Tuncer S, Ayhan S, Elmas C, Ozogul C, Latifoglu O. What wrapped perichondrial and periosteal grafts offer as regenerators of new tissue. *J Craniofac Surg*. 2006 Nov;17(6):1137-43.
15. Pribitkin EA, Ambro BT, Bloeden E, O'Hara BJ. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft. *Laryngoscope*. 2004 Sep;114(9 Pt 2 Suppl 102):1-19.
16. Stokes D, Liu G, Dharmavaram R, Hawkins D, Piera-Velazquez S, Jimenez S. Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors. *Biochem J*. 2001;360:461-70.
17. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994 Oct 6;331(14):889-95.

18. Lee S-H, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(4):339-59.
19. Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical reviews*. 2001;101(7):1869-80.
20. Ahsan T, Nerem R. Bioengineered tissues: the science, the technology, and the industry. *Orthodontics & craniofacial research*. 2005;8(3):134-40.
21. Lanza R, Langer R, Vacanti JP. *Principles of tissue engineering*: Academic press; 2011.
22. Sun H, Liu W, Zhou G, Zhang W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of cartilage, tendon and bone. *Frontiers of medicine*. 2011;5(1):61-9.
23. Thomson RC, Shung AK, Yaszemski M, Mikos AG. Polymer scaffold processing. *Principles of tissue engineering*. 2000;2:251-62.
24. van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF- β 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1998;6(5):306-17.
25. Loeser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2003;48(8):2188-96.
26. Lim SM, Oh SH, Lee HH, Yuk SH, Im GI, Lee JH. Dual growth factor-releasing nanoparticle/hydrogel system for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(9):2593-600.
27. Holland TA, Tabata Y, Mikos AG. Dual growth factor delivery from degradable oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2005;101(1):111-25.
28. Chang TM. Semipermeable microcapsules. *Science*. 1964;146(3643):524-5.
29. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
30. Chandar N, Viselli S, Yanık B. *Hücre ve moleküler biyoloji: Lippincott's illustrated reviews serisinden: Nobel Tıp Kitabevleri*; 2012.
31. Buckwalter J, editor. Current understanding of osteoarthri. AAOS 66th Annual Meeting 1999.
32. Mollenhauer JK, KE. *Articular Cartilage*. Dee R, editor: McGraw-Hill, Health Professions Division; 1997.
33. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect*. 1998;47:477-86.
34. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*. 1998;47:487-504.
35. Agneskirchner JD, Brucker P, Burkart A, Imhoff AB. Large osteochondral defects of the femoral condyle: press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2002 May;10(3):160-8.
36. Elahi MM, Jackson IT, Moreira-Gonzalez A, Yamini D. Nasal augmentation with Surgicel-wrapped diced cartilage: a review of 67 consecutive cases. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Mar;111(3):1309-18; discussion 19-21.
37. Gurley JM, Pilgram T, Perlyn CA, Marsh JL. Long-term outcome of autogenous rib graft nasal reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Dec;108(7):1895-905; discussion 906-7.
38. Adamson PA. Grafts in rhinoplasty: autogenous grafts are superior to alloplastic. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000 Apr;126(4):561-2.

39. Acarturk S, Gencil E. The spreader-splay graft combination: a treatment approach for the osseocartilaginous vault deformities following rhinoplasty. *Aesthetic Plast Surg.* 2003 Jul-Aug;27(4):275-80.
40. Erol OO. The Turkish delight: a pliable graft for rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg.* 2000 May;105(6):2229-41; discussion 42-3.
41. Raghavan U, Jones NS, Romo T, 3rd. Immediate autogenous cartilage grafts in rhinoplasty after alloplastic implant rejection. *Arch Facial Plast Surg.* 2004 May-Jun;6(3):192-6.
42. Gammert C, Masing H. [Long term experience of using preserved cartilage in reconstructive surgery of the nose (author's transl)]. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg).* 1977 Aug;56(8):650-6.
43. Velidedeoglu H, Demir Z, Sahin U, Kurtay A, Erol OO. Block and Surgicel-wrapped diced solvent-preserved costal cartilage homograft application for nasal augmentation. *Plast Reconstr Surg.* 2005 Jun;115(7):2081-93; discussion 94-7.
44. Elves MW. A study of the transplantation antigens on chondrocytes from articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br.* 1974 Feb;56(1):178-85.
45. Demir Z, Velidedeoglu H, Sahin U, Kurtay A, Coskunfirat OK. Preserved costal cartilage homograft application for the treatment of temporomandibular joint ankylosis. *Plast Reconstr Surg.* 2001 Jul;108(1):44-51.
46. Clark JM, Cook TA. Immediate reconstruction of extruded alloplastic nasal implants with irradiated homograft costal cartilage. *Laryngoscope.* 2002 Jun;112(6):968-74.
47. Welling DB, Maves MD, Schuller DE, Bardach J. Irradiated homologous cartilage grafts. Long-term results. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1988 Mar;114(3):291-5.
48. Risbud MV, Sittinger M. Tissue engineering: advances in *in vitro* cartilage generation. *TRENDS in Biotechnology.* 2002;20(8):351-6.
49. Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Advanced drug delivery reviews.* 2008;60(2):243-62.
50. Seda Tigli R, Karakecili A, Gumusderelioglu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Sep;18(9):1665-74.
51. Wu L, Gonzalez S, Shah S, Kyupelyan L, Petrigliano FA, McAllister DR, et al. Extracellular matrix domain formation as an indicator of chondrocyte dedifferentiation and hypertrophy. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014 Feb;20(2):160-8.
52. Benoist-Lasselin C, de Margerie E, Gibbs L, Cormier S, Silve C, Nicolas G, et al. Defective chondrocyte proliferation and differentiation in osteochondromas of MHE patients. *Bone.* 2006;39(1):17-26.
53. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *Journal of Orthopaedic Research.* 1992;10(6):745-58.
54. Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL, et al. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *The Laryngoscope.* 2003;113(1):25-32.
55. Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng M-H. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue engineering.* 2006;12(7):1971-84.
56. Wang Z, Peng J. Articular Cartilage Tissue Engineering: Development and Future: A Review. *Journal of Musculoskeletal Pain.* 2014;22(1):68-77.

57. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005;23(2):425-32.
58. Darling EM, Hu JC, Athanasiou KA. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression. *Journal of Orthopaedic Research*. 2004;22(6):1182-7.
59. Hidaka C, Cheng C, Alexandre D, Bhargava M, Torzilli PA. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes. *Cell and tissue research*. 2006;323(1):127-35.
60. Kim T-K, Sharma B, Williams C, Ruffner M, Malik A, McFarland E, et al. Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate the zonal organization of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003;11(9):653-64.
61. van Osch GJ, Mandl EW, Jahr H, Koevoet W, Nolst-Trenité G, Verhaar JA. Considerations on the use of ear chondrocytes as donor chondrocytes for cartilage tissue engineering. *Biorheology*. 2004;41(3):411-21.
62. Kafienah We, Jakob M, Démarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I, et al. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes. *Tissue engineering*. 2002;8(5):817-26.
63. Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, et al. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue engineering*. 2006;12(4):691-703.
64. Yates KE, Forbes RL, Glowacki J. New chondrocyte genes discovered by representational difference analysis of chondroinduced human fibroblasts. *Cells Tissues Organs*. 2004;176(1-3):41-53.
65. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 1998;238(1):265-72.
66. English A, Jones EA, Corscadden D, Henshaw K, Chapman T, Emery P, et al. A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis. *Rheumatology*. 2007;46(11):1676-83.
67. Hildner F, Concaro S, Peterbauer A, Wolbank S, Danzer M, Lindahl A, et al. Human adipose-derived stem cells contribute to chondrogenesis in coculture with human articular chondrocytes. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(12):3961-9.
68. Nimura A, Muneta T, Koga H, Mochizuki T, Suzuki K, Makino H, et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis Rheum*. 2008;58(2):501-10.
69. Gnecci M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol*. 2009;482:281-94.
70. Rosset P, Coipeau P. [What's new in fundamental research: osteogenesis and stem cells]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 2007;93(4 Suppl):2S55-8.
71. Şenköylü A, Korkusuz F. Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları.
72. Freed L, Vunjak-Novakovic G, Langer R. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *Journal of cellular biochemistry*. 1993;51(3):257-64.
73. LeBaron R, Athanasiou K. Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2575-87.

74. Vunjak-Novakovic G, Martin I, Obradovic B, Treppo S, Grodzinsky A, Langer R, et al. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *Journal of Orthopaedic Research*. 1999;17(1):130-8.
75. Freed L, Marquis J, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Emmanual J. Composition of cell-polymer cartilage implants. *Biotechnology and bioengineering*. 1994;43(7):605-14.
76. Bock G, Goode J. *Tissue engineering of cartilage and bone*. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: J. Wiley; 2003.
77. Hunziker E. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2002;10(6):432-63.
78. Solchaga LA, Temenoff JS, Gao J, Mikos AG, Caplan AI, Goldberg VM. Repair of osteochondral defects with hyaluronan-and polyester-based scaffolds. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(4):297-309.
79. Im G-I, Shin Y-W, Lee K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005;13(10):845-53.
80. Takagi M, Fukui Y, Wakitani S, Yoshida T. Effect of poly DL-lactic-co-glycolic acid mesh on a three-dimensional culture of chondrocytes. *J Biosci Bioeng*. 2004;98(6):477-81.
81. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, et al. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1997;38(2):95-104.
82. Ponticciello MS, Schinagl RM, Kadiyala S, Barry FP. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(2):246-55.
83. Itay S, Abramovici A, Nevo Z. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res*. 1987;220:284-303.
84. Homminga GN, Buma P, Koot HW, van der Kraan PM, van den Berg WB. Chondrocyte behavior in fibrin glue in vitro. *Acta Orthop Scand*. 1993;64(4):441-5.
85. Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1894-904.
86. Lee CR, Grad S, Gorna K, Gogolewski S, Goessl A, Alini M. Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis. *Tissue Eng*. 2005;11(9-10):1562-73.
87. Haisch A, Loch A, David J, Pruss A, Hansen R, Sittinger M. Preparation of a pure autologous biodegradable fibrin matrix for tissue engineering. *Med Biol Eng Comput*. 2000;38(6):686-9.
88. Chubinskaya S, Hurtig M, Rueger DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop*. 2007;31(6):773-81.
89. Kaps C, Bramlage C, Smolian H, Haisch A, Ungethum U, Burmester GR, et al. Bone morphogenetic proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion and destruction. *Arthritis Rheum*. 2002;46(1):149-62.
90. Park Y, Sugimoto M, Watrin A, Chiquet M, Hunziker EB. BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(6):527-36.
91. Oshin AO, Stewart MC. The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2007;20(3):151-8.

92. Connelly JT, Garcia AJ, Levenston ME. Inhibition of in vitro chondrogenesis in RGD-modified three-dimensional alginate gels. *Biomaterials*. 2007;28(6):1071-83.
93. Genes NG, Rowley JA, Mooney DJ, Bonassar LJ. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys*. 2004;422(2):161-7.
94. Fan Z, Chubinskaya S, Rueger DC, Bau B, Haag J, Aigner T. Regulation of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic adult human articular chondrocytes by osteogenic protein-1. *Clin Exp Rheumatol*. 2004;22(1):103-6.
95. Chung C, Mesa J, Randolph MA, Yaremchuk M, Burdick JA. Influence of gel properties on neocartilage formation by auricular chondrocytes photoencapsulated in hyaluronic acid networks. *J Biomed Mater Res A*. 2006;77(3):518-25.
96. Liu Y, Shu XZ, Prestwich GD. Osteochondral defect repair with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in an injectable, in situ, cross-linked synthetic extracellular matrix. *Tissue Eng*. 2006;12(12):3405-16.
97. Subramanian A, Lin HY. Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation. *J Biomed Mater Res A*. 2005;75(3):742-53.
98. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(10):845-53.
99. Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res*. 2002;59(1):63-72.
100. Karadag E, Saraydin D, Gueven O. Cationic Dye Adsorption of Acrylamide/Itaconic Acid Hydrogels in Aqueous Solutions. *Polymers for Advanced Technologies*. 1997;8(9):574-8.
101. Öztöp HN, Saraydin D, Karadağ E, Çaldıran Y, Güven O. Influence of some aromatic amino acids on the swelling behavior of acrylamide/maleic acid hydrogel. *Polymer Bulletin*. 1998;40(4-5):575-81.
102. Duran S, Şolpan D, Güven O. Synthesis and characterization of acrylamide–acrylic acid hydrogels and adsorption of some textile dyes. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. 1999;151(1):196-9.
103. Bryant SJ, Anseth KS. The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly (ethylene oxide) hydrogels. *Biomaterials*. 2001;22(6):619-26.
104. Woodfield TB, Malda J, De Wijn J, Peters F, Riesle J, van Blitterswijk CA. Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique. *Biomaterials*. 2004;25(18):4149-61.
105. Shin HJ, Lee CH, Cho IH, Kim Y-J, Lee Y-J, Kim IA, et al. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2006;17(1-2):103-19.
106. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Atlas and Text of Histology*: Wolters Kluwer Health; 2012.
107. Kauma S. Cytokines in implantation. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1999;55:31-42.
108. Giannobile W. The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*. 1996;67(5):545-53.
109. O'Driscoll SW, Recklies A, Poole A. Chondrogenesis in periosteal explants. An organ culture model for in vitro study. *The Journal of Bone & Joint Surgery*. 1994;76(7):1042-51.

110. Delrieu I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS letters*. 2000;468(1):6-10.
111. Isogai N, Morotomi T, Hayakawa S, Munakata H, Tabata Y, Ikada Y, et al. Combined chondrocyte–copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005;74(3):408-18.
112. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. 2001.
113. Gluckman P, Breier B, Davis S. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *Journal of dairy science*. 1987;70(2):442-66.
114. McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *Journal of Surgical Research*. 1988;45(1):145-53.
115. Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *Journal of Biological Chemistry*. 1962;237(5):1555-62.
116. Carpenter G. Epidermal growth factor. *Tissue growth factors*: Springer; 1981. p. 89-132.
117. Fernandez-Lloris R, Vinals F, Lopez-Rovira T, Harley V, Bartrons R, Rosa J, et al. Induction of the Sry-related factor SOX6 contributes to bone morphogenetic protein-2-induced chondroblastic differentiation of C3H10T1/2 cells. *Molecular Endocrinology*. 2003;17(7):1332-43.
118. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
119. Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*. 2005;16(3):329-45.
120. McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft). *International orthopaedics*. 2007;31(6):729-34.
121. Heldin C-H, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. 1997;390(6659):465-71.
122. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 2003;113(6):685-700.
123. Haÿ E, Lemonnier J, Fromigué O, Marie PJ. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(31):29028-36.
124. Reddi AH, Reddi A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20(5):341-2.
125. Carreira A, Lojudice F, Halcsik E, Navarro R, Sogayar M, Granjeiro J. Bone Morphogenetic Proteins Facts, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of dental research*. 2014;0022034513518561.
126. McDonald NQ, Hendrickson WA. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*. 1993;73(3):421-4.
127. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, McCarrel TM, Cole BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2011;469(10):2706-15.
128. Klein-Nulend J, Louwse R, Heyligers I, Wuisman P, Semeins C, Goei S, et al. Osteogenic protein (OP-1, BMP-7) stimulates cartilage differentiation of human and goat perichondrium tissue in vitro. *Journal of biomedical materials research*. 1998;40(4):614-20.

129. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Current opinion in genetics & development*. 1996;6(4):432-8.
130. Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(50):18023-7.
131. Hurtig M, Chubinskaya S, Dickey J, Rueger D. BMP-7 protects against progression of cartilage degeneration after impact injury. *Journal of Orthopaedic Research*. 2009;27(5):602-11.
132. Takegami K, Thonar EJ, An HS, Kamada H, Masuda K. Osteogenic protein-1 enhances matrix replenishment by intervertebral disc cells previously exposed to interleukin-1. *Spine*. 2002;27(12):1318-25.
133. Işıklan N, İnal M, Yiğitoğlu M. N-Vinil-2-Pirolidon Aşılanmış Sodyum Aljinat Kopolimerlerden Nifedipinin Kontrollü Salım Formülasyonlarının Hazırlanması.
134. Hsu HP, Zanella J, Peckham S, Spector M. Comparing ectopic bone growth induced by rhBMP-2 on an absorbable collagen sponge in rat and rabbit models. *Journal of Orthopaedic Research*. 2006;24(8):1660-9.
135. Jansen J, Vehof J, Ruhe P, Kroeze-Deutman H, Kuboki Y, Takita H, et al. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *Journal of Controlled Release*. 2005;101(1):127-36.
136. Tan ML, Choong PF, Dass CR. Recent developments in liposomes, microparticles and nanoparticles for protein and peptide drug delivery. *Peptides*. 2010;31(1):184-93.
137. Nastruzzi C, Pastesini C, Cortesi R, Esposito E, Gambari R, Menegatti E. Production and in vitro evaluation of gelatin microspheres containing an antitumour tetra-amidine. *Journal of microencapsulation*. 1994;11(3):249-60.
138. Han J, Zhou Z, Yin R, Yang D, Nie J. Alginate–chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: preparation and characterization. *International journal of biological macromolecules*. 2010;46(2):199-205.
139. Esposito E, Cortesi R, Nastruzzi C. Gelatin microspheres: influence of preparation parameters and thermal treatment on chemico-physical and biopharmaceutical properties. *Biomaterials*. 1996;17(20):2009-20.
140. Wan Y, Wu H, Wen D. Porous-Conductive Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering, 1. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4(9):882-90.
141. Burkart A, Imhoff AB. [Therapy of cartilage damage--more current than ever]. *Unfallchirurg*. 2001 Sep;104(9):797.
142. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK. Microfracture to treat full-thickness chondral defects: surgical technique, rehabilitation, and outcomes. *J Knee Surg*. 2002 Summer;15(3):170-6.
143. Muller B, Kohn D. [Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method]. *Orthopade*. 1999;28(1):4-10.
144. Yılmaz S, Erçöçen AR, Can Z, Yenidünya S, Edah N, Yormuk E. Viability of diced, crushed cartilage grafts and the effects of Surgicel (oxidized regenerated cellulose) on cartilage grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2001;108(4):1054-60.
145. Rudderman RH, Guyuron B, Mendelsohn G. The fate of fresh and preserved, noncrushed and crushed autogenous cartilage in the rabbit model. *Annals of Plastic Surgery*. 1994;32(3):250-4.
146. Duynstee ML, Verwoerd-Verhoef HL, Verwoerd CD, Van Osch GJ. The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Sep 15;110(4):1073-9.

147. Bouwmeester SJ, Beckers JM, Kuijjer R, van der Linden AJ, Bulstra SK. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop*. 1997;21(5):313-7.
148. Upton J, Sohn SA, Glowacki J. Neocartilage derived from transplanted perichondrium: what is it? *Plast Reconstr Surg*. 1981 Aug;68(2):166-74.
149. van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1439-41.
150. Wong VW, Rustad KC, Longaker MT, Gurtner GC. Tissue engineering in plastic surgery: a review. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2010;126(3):858-68.
151. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43.
152. VASARA A. Autologous Chondrocyte Transplantation.
153. Zhang Y. Tissue Engineering eines Osteochondralen Konstruktes zum Ersatz des proximalen Interphalangealgelenkes 2001.
154. Lee C, Grodzinsky A, Hsu HP, Martin S, Spector M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *Journal of Orthopaedic Research*. 2000;18(5):790-9.
155. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2008;2(4):169-83.
156. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(4):568-84.
157. Zhao L-R, Duan W-M, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Experimental neurology*. 2002;174(1):11-20.
158. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, Qiao J, Yan Z, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2005;9(4):929-39.
159. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(2):763-9.
160. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2004;113(2):585-94.
161. Drago JI, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk PA, et al. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue engineering*. 2007;13(7):1615-21.
162. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Müller PK, Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of development*. 2000;92(2):193-205.
163. Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue engineering*. 2006;12(5):1137-42.
164. Griffith CK, Miller C, Sainson RC, Calvert JW, Jeon NL, Hughes CC, et al. Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue engineering*. 2005;11(1-2):257-66.
165. Lee E, Hui J. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 2006;88(7):841-51.
166. O'Driscoll SW, Recklies AD, Poole AR. Chondrogenesis in periosteal explants. An organ culture model for in vitro study. *J Bone Joint Surg Am*. 1994 Jul;76(7):1042-51.

167. Tu T-Y, Yang A-H, Fan C-C. Short-term effects of perichondrium preservation on chondrocyte survival and chondrogenesis of auricular cartilage grafted in rabbit tympanic bullae. *Audiology & neuro-otology*. 2007;13(4):239-46.
168. Ozbek S, Kahveci R, Kahveci Z, Filiz G, Ozcan M, Sirmali S. Effect of lyophilized heterologous collagen on new cartilage formation from perichondrial flaps in rabbits: an experimental study. *Ann Plast Surg*. 2003;50(5):528-34.
169. Salmanov A. Perikondrium Etkisiyle Yağ Dokusu Kaynaklı Yetişkin Mezenşimal Kök Hücrelerden Kıkırdak Elde Edilmesi: (Tavşanlar Üzerinde Deneysel Çalışma). İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2010.
170. Derks M, Sturm T, Haverich A, Hilfiker A. Isolation and chondrogenic differentiation of porcine perichondrial progenitor cells for the purpose of cartilage tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2013;198(3):179-89.
171. Verwoerd C, Verwoerd-Verhoef H, Meeuwis C, Van der Heul R. Wound healing of autologous implants in the nasal septal cartilage. *ORL*. 1991;53(5):310-4.
172. Alakbarov V. Kıkırdak defektlerinin onarımında yağ greftleri kullanımı. Bursa: Uludağ Üniversitesi; 2013.
173. Can İH, Atilla P, Çakar AN, Önerci M. An animal study on cartilage healing using auricular cartilage as a model. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2008;265(3):307-11.
174. Fuller J, Ghadially F. Ultrastructural observations on surgically produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clinical orthopaedics and related research*. 1972;86:193-205.
175. Butnariu-Ephrat M, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clinical orthopaedics and related research*. 1996;330:234-43.
176. CONVERY FR, AKESON WH, KEOWN GH. The Repair of Large Osteochondral Defects An Experimental Study in Horses. *Clinical orthopaedics and related research*. 1972;82:253-62.
177. Breinan H, Hsu H-P, Spector M. Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001;391:S219-S30.
178. Breinan H, Minas T, Barone L, Tubo R, Hsu H-P, Shortkroff S, et al. Histological evaluation of the course of healing of canine articular cartilage defects treated with cultured autologous chondrocytes. *Tissue engineering*. 1998;4(1):101-13.
179. Siebert CH, Schneider U, Sopka S, Wahner T, Miltner O, Niedhart C. Ingrowth of osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2006;126(4):247-52.
180. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, et al. Preclinical studies for cartilage repair recommendations from the international cartilage repair society. *Cartilage*. 2011;2(2):137-52.
181. Kuroki H, Nakagawa Y, Mori K, Ohba M, Suzuki T, Mizuno Y, et al. Acoustic stiffness and change in plug cartilage over time after autologous osteochondral grafting: correlation between ultrasound signal intensity and histological score in a rabbit model. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(6):R492.
182. Babensee JE, McIntire LV, Mikos AG. Growth factor delivery for tissue engineering. *Pharmaceutical research*. 2000;17(5):497-504.
183. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and tissue research*. 2012;347(3):613-27.

184. Gikas P, Bayliss L, Bentley G, Briggs T. An overview of autologous chondrocyte implantation. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 2009;91(8):997-1006.
185. Freed LE, Engelmayer GC, Borenstein JT, Moutos FT, Guilak F. Advanced material strategies for tissue engineering scaffolds. *Advanced materials*. 2009;21(32-33):3410-8.
186. Schreiber R, Ilten-Kirby B, Dunkelman N, Symons K, Rekettye L, Willoughby J, et al. Repair of osteochondral defects with allogeneic tissue engineered cartilage implants. *Clinical orthopaedics and related research*. 1999;367:S382-S95.
187. Hong L, Tabata Y, Yamamoto M, Miyamoto S, Yamada K, Hashimoto N, et al. Comparison of bone regeneration in a rabbit skull defect by recombinant human BMP-2 incorporated in biodegradable hydrogel and in solution. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1998;9(9):1001-14.
188. Hollinger JO, Schmitt JM, Buck DC, Shannon R, Joh SP, Zegzula HD, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. *Journal of biomedical materials research*. 1998;43(4):356-64.
189. Özgenel GY, Filiz G, Özcan M. Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits. *British journal of plastic surgery*. 2004;57(5):423-8.
190. Bos P, Van Osch G, Frenz D, Verhaar J, Verwoerd-Verhoef H. Growth factor expression in cartilage wound healing: temporal and spatial immunolocalization in a rabbit auricular cartilage wound model. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2001;9(4):382-9.
191. Sachlos E, Czernuszka J. Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*. 2003;5(29):39-40.
192. Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury*. 2008;39(1):97-113.
193. Murugan R, Ramakrishna S. Design strategies of tissue engineering scaffolds with controlled fiber orientation. *Tissue engineering*. 2007;13(8):1845-66.
194. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, de Souza P, John T, Shakibaei M. Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc–Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004;12(6):448-58.
195. Madurantakam PA, Cost CP, Simpson DG, Bowlin GL. Science of nanofibrous scaffold fabrication: strategies for next generation tissue-engineering scaffolds. 2009.
196. SPEER DP, CHVAPIL M, Vorz RG, HOLMES MD. Enhancement of healing in osteochondral defects by collagen sponge implants. *Clinical orthopaedics and related research*. 1979;144:326-35.
197. Fujisato T, Sajiki T, Liu Q, Ikada Y. Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold. *Biomaterials*. 1996;17(2):155-62.
198. Huang Y, Onyeri S, Siewe M, Moshfeghian A, Madihally SV. In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005;26(36):7616-27.
199. Xia W, Liu W, Cui L, Liu Y, Zhong W, Liu D, et al. Tissue engineering of cartilage with the use of chitosan-gelatin complex scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2004;71(2):373-80.
200. Chang CH, Lin FH, Lin CC, Chou CH, Liu HC. Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin–calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2004;71(2):313-21.

201. Kang H-W, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999;20(14):1339-44.
202. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*. 2002;23(24):4827-32.
203. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 2004;37(5):790-806.
204. Lien S-M, Ko L-Y, Huang T-J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2009;5(2):670-9.
205. Guo T, Zhao J, Chang J, Ding Z, Hong H, Chen J, et al. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor- β 1 for chondrocytes proliferation. *Biomaterials*. 2006;27(7):1095-103.
206. Salgado A, Coutinho O, Reis R. Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression. *Tissue engineering*. 2004;10(3-4):465-74.
207. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Annals of biomedical engineering*. 2004;32(1):148-59.
208. Gaissmaier C, Koh JL, Weise K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury*. 2008;39(1):88-96.
209. Fiedler J, Röderer G, Günther KP, Brenner RE. BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2002;87(3):305-12.
210. Quintana L, zur Nieden NI, Semino CE. Morphogenetic and regulatory mechanisms during developmental chondrogenesis: new paradigms for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2008;15(1):29-41.
211. Shi S, Mercer S, Eckert GJ, Trippel SB. Growth factor regulation of growth factors in articular chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(11):6697-704.
212. Mauck RL, Nicoll SB, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering. *Tissue engineering*. 2003;9(4):597-611.
213. Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, Pierer G, Heberer M, Martin I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes. *Tissue engineering*. 2004;10(5-6):762-70.
214. Hayashi M, Muneta T, Ju Y-J, Mochizuki T, Sekiya I. Weekly intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibits osteoarthritis progression. *Arthritis Research and Therapy*. 2008;10(5):R118.
215. Raghunath J, Salacinski HJ, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Current opinion in biotechnology*. 2005;16(5):503-9.
216. Gregory KE, Ono RN, Charbonneau NL, Kuo C-L, Keene DR, Bächinger HP, et al. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(30):27970-80.
217. Masuda K, Takegami K, An H, Kumano F, Chiba K, Andersson G, et al. Recombinant osteogenic protein-1 upregulates extracellular matrix metabolism by rabbit annulus fibrosus and nucleus pulposus cells cultured in alginate beads. *Journal of Orthopaedic Research*. 2003;21(5):922-30.

218. Flechtenmacher J, Huch K, Thonar EJ, Mollenhauer JA, Davies SR, Schmid TM, et al. Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 1996;39(11):1896-904.
219. Oshin A, Stewart M. The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair. *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology*. 2007;20(3):151.
220. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2002;17(3):513-20.
221. Badlani N, Oshima Y, Healey R, Coutts R, Amiel D. Use of bone morphogenetic protein-7 as a treatment for osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®]. 2009;467(12):3221-9.
222. Tıǧlı RS, Karakeçili A, Gümüşderelioǧlu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18(9):1665-74.
223. Kim H-J, Im G-I. Combination of transforming growth factor-beta2 and bone morphogenetic protein 7 enhances chondrogenesis from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*. 2008;15(7):1543-51.
224. Schmidt M, Chen E, Lynch S. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on *in vivo* cartilage healing and repair. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2006;14(5):403-12.
225. Haupt JL, Frisbie DD, McIlwraith CW, Robbins PD, Ghivizzani S, Evans CH, et al. Dual transduction of insulin-like growth factor-I and interleukin-1 receptor antagonist protein controls cartilage degradation in an osteoarthritic culture model. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005;23(1):118-26.
226. Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre J, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(5):910-3.
227. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance *in vivo* bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone*. 2004;35(2):562-9.
228. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*. 2008;43(5):931-40.
229. Raiche A, Puleo D. In vitro effects of combined and sequential delivery of two bone growth factors. *Biomaterials*. 2004;25(4):677-85.
230. Gelse K, Schneider H. Ex vivo gene therapy approaches to cartilage repair. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(2):259-84.
231. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The Lancet*. 1999;354:S32-S4.
232. Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly (ethylene glycol) hydrogels. *Journal of biomedical materials research*. 2002;59(1):63-72.

233. Guo X, Park H, Young S, Kretlow JD, Van den Beucken JJ, Baggett LS, et al. Repair of osteochondral defects with biodegradable hydrogel composites encapsulating marrow mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Acta biomaterialia*. 2010;6(1):39-47.
234. Elisseeff J, McIntosh W, Fu K, Blunk T, Langer R. Controlled-release of IGF-I and TGF- β 1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research*. 2001;19(6):1098-104.
235. Medina OP, Zhu Y, Kairemo K. Targeted liposomal drug delivery in cancer. *Current pharmaceutical design*. 2004;10(24):2981-9.
236. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*. 1980;210(4472):908-10.
237. Wang X, Wenk E, Zhang X, Meinel L, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Growth factor gradients via microsphere delivery in biopolymer scaffolds for osteochondral tissue engineering. *Journal of Controlled Release*. 2009;134(2):81-90.
238. Garbayo E, Montero-Menei C, Ansorena E, Lanciego J, Aymerich MS, Blanco-Prieto MJ. Effective GDNF brain delivery using microspheres—a promising strategy for Parkinson's disease. *Journal of Controlled Release*. 2009;135(2):119-26.
239. Solorio LD, Vieregge EL, Dhami CD, Dang PN, Alsberg E. Engineered cartilage via self-assembled hMSC sheets with incorporated biodegradable gelatin microspheres releasing transforming growth factor- β 1. *Journal of Controlled Release*. 2012;158(2):224-32.
240. Young S, Wong M, Tabata Y, Mikos AG. Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*. 2005;109(1):256-74.
241. Kang S-W, Jeon O, Kim B-S. Poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres as an injectable scaffold for cartilage tissue engineering. *Tissue engineering*. 2005;11(3-4):438-47.
242. Tan H, Wu J, Lao L, Gao C. Gelatin/chitosan/hyaluronan scaffold integrated with PLGA microspheres for cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2009;5(1):328-37.
243. Li B-Z, Wang L-J, Li D, Bhandari B, Li S-J, Lan Y, et al. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. *Journal of food engineering*. 2009;92(3):250-4.
244. Jaklenec A, Wan E, Murray ME, Mathiowitz E. Novel scaffolds fabricated from protein-loaded microspheres for tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(2):185-92.
245. Saraf A, Mikos AG. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58(4):592-603.
246. Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Müller R, Griffith LG. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue engineering*. 2001;7(5):557-72.
247. Arpornmaeklong P, Suwatwirote N, Pripatnanont P, Oungbho K. Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan–collagen sponges. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2007;36(4):328-37.
248. Seol Y-J, Lee J-Y, Park Y-J, Lee Y-M, Rhyu I-C, Lee S-J, et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology letters*. 2004;26(13):1037-41.
249. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, Müller P. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. 1977.
250. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, Pitman MI, Pachence JM. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*. 1997;79(5):831-6.

251. Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, Eckes B, Krieg T. Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF- β 1. FEBS Journal. 2005;272(24):6297-309.