



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

**TAVŞAN DİSTAL FEMUR OSTEONEKROZ MODELİNDE
SİNOVİYAL GREFTLEMENİN ETKİSİ: HAYVAN MODELİNDE
KARŞILAŞTIRMALI ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

Dr Engin Baylar

Ankara,2016



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

**TAVŞAN DİSTAL FEMUR OSTEONEKROZ MODELİNDE
SİNOVİYAL GREFTLEMENİN ETKİSİ: HAYVAN MODELİNDE
KARŞILAŞTIRMALI ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ

Dr Engin Baylar

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İlhami Kuru

Ankara,2016

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA 15/48) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Başkent Üniversitesi kurucusu Sayın Prof Dr Mehmet Haberal'a ve Başkent Üniversitesi Rektörü Sayın Prof Dr Ali Haberal'a

Çalışma hayatımda her zaman bana yol gösteren, tez çalışmamda bana danışman olan Sayın Prof Dr İlhami Kuru'ya

Gerek çalışma hayatımda, tez çalışmamda, gerekse eğitim sürecinde ve özel hayatımda hem değerli bir hocam hem de abim olan, her zaman emeğini ve desteğini gördüğüm Sayın Yrd Doç Dr Orçun Şahin'e

Uzmanlık eğitimim süresince bana mesleğimi sevdiren, hayat görüşüyle bana ışık tutan değerli hocam, bölüm başkanımız Sayın Prof Dr İsmail Cengiz Tuncay'a

Cerrahi disiplini, hastaya bir bütün olarak görmeyi bana öğreten ve her zaman örnek alacağım hocalarım Sayın Prof Dr Hüseyin Demirörs ve Sayın Prof Dr Rahmi Can Akgün'e

Tezimin gerçekleştirilmesinde ve değerlendirilmesindeki değerli katkı ve desteklerinden dolayı Sayın Prof Dr Mehtap Akçıl Ok, Doç Dr Ayşen Terzi, Dr Emine Ebru Deniz, Dr Didem Bacanlı, Adem Kurtçuoğlu ve Sezai Kölçük'e

Uzmanlık eğitimimim ilk yıllarında bana destek olan asistanlığı öğreten Sayın Dr Mehmet Kıral, Dr İbrahim Deniz Canbeyli, Dr Barış Kafa, Dr A. Sinan Sarı, Dr Süleyman Altun ve Dr Mustafa Arık'a

Tıp fakültesinde ilk günden başlayan yorucu hayatımda ve asistanlık hayatım boyunca yanımda olan desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Dr Bahtiyar Haberal'a

Zorlu asistanlık sürecimde yanımda olan, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, tez çalışmamın hem hazırlık hem de deney aşamasında yanımda olan Sayın Dr Javid Mohammedzadeh Azarabadi, Dr Ekin Kaya Şimşek ve Dr Ateş Mahmuti'ye

Üniversiteye başladığım günden beri uzakları yakın eden, türlü zorlukları beraber atlattığım, her şeyimi borçlu olduğum aileme

Her zaman yanımda olan sevgili eşim Belin Demet Baylar'a

en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Çeşitli etyolojik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan osteoartrit artan yaşam sürelerinden de etkilenerak her yıl daha da sık olarak karşımıza çıkan önemli bir sağlık sorunudur. Bu nedenlerden önemli bir tanesi de her yıl yapılan kalça eklem protezlerinin %10'ununu oluşturan osteonekrozdur. Yapısal değişikliklere neden olan bu hastalık erken dönemde tedavi edilmezse geri dönüşsüz olarak dejenerasyona neden olur. Bu nedenle tedavi modaliteleri erken dönem tedavi yöntemleri üstünde yoğunlaşmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, tavşan modelinde oluşturulan osteonekroz onarımında sinoviya grefti uygulamasının kontrol grubuyla karşılaştırarak iyileşme süresindeki etkilerini histopatolojik olarak değerlendirmektir.

Bu amaçla beyaz yeni zellanda cinsi 24 adet tavşan kullanıldı. 24 tavşan 2 gruba ayrıldı. Her iki gruptaki tavşanların sol dizlerine sinovya grefti uygulanırken, sağ dizleri kontrol grubunu oluşturdu. Birinci gruptaki 13 tavşan 6 hafta, ikinci gruptaki 11 tavşan ise 12 hafta boyunca takip edildikten sonra sakrifiye edildi. Takibinde histopatolojik değerlendirme yapıldı.

Sonuç olarak sinovya grefti uygulanan dizlerde, sinoviyum mezenkimal kök hücre kaynağı olarak görev yapmış ve BMP2 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

ABSTRACT

Effect of Synovial Grafts In Osteonecrosis Model of Distal Femur of Rabbit: A Comparative Study In Animal Model

Osteoarthritis due to a variety of etiological factors is an important health problem, which is also affected by increased life expectancy and which is more frequently confronted each year. One of the important reasons for this is the osteonecrosis, which makes up 10% of hip joint prostheses performed every year. This disease, which causes structural changes, causes irreversible degeneration if not treated early. For this reason, treatment modalities focus on early treatment modalities.

Our aim in this study is to evaluate histopathologically the effects of synovia grafting in the repair of osteonecrosis created in the rabbit model with the control group.

For this purpose, 24 rabbits of white new zealand type were used. 24 rabbits were divided into 2 groups. Synovial grafts were applied to the left knees of the rabbits in both groups, while the right knees constituted the control group. 13 rabbits in the first group were sacrificed for 6 weeks and 11 rabbits in the second group were sacrificed for 12 weeks. Histopathological evaluation was performed.

As a result, synovial mesenchymal stem cells were used as a source of synovial graft in the knees and BMP2 levels were statistically significant.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar.....	ix
1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1 Kemik Anatomisi ve Fizyolojisi	3
2.2 Eklem Kıkırdağının anatomisi ve fizyolojisi	8
2.4 Osteonekroz ve Tedavi yöntemleri	14
3. Gereç ve Yöntem.....	20
3.1. Deney hayvanları ve gruplandırma.....	20
Grup I ve II.....	20
4. Bulgular	25
4.1. Çalışma Grupları ve Ortalama Değerler	25
4.2 İstatistiksel değerlendirme	26
5.TARTIŞMA.....	32
6.Sonuç ve Öneriler	37
7.KAYNAKLAR.....	38

KISALTMALAR ve SİMGELER

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
H&E	: Hematoksilen eozin
KİK-MKH	: Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre
MKH	: Mezenkimal kök hücre
ON	:Osteonekroz
OA	: Osteoartrit
PTH	: Paratroid hormon
SDK-MKH	: Sinoviyal doku kökenli mezenkimal kök hücre
SONK	: Dizin spontan osteonekrozu
SS	: Sinoviyal sıvı
TGF- β	: Transforming growth factor beta
°C	: Santigrad derece

ŞEKİLLER

Şekil 1. Kemiğin Sınıflandırılması	3
Şekil 2. Kemiğin Kesitsel Yapısı.....	4
Şekil 4. Kansellöz (Trabeküler Kemik).....	5
Şekil 3. Matür Lamellar Kortikal Kemik.....	5
Şekil 6. Osteoklast'ın fonksiyonu ve kontrolü	6
Şekil 5. Kemik ve Kıkırdak hücrelerinin kökeni.....	6
Şekil 7. Kortikal Kemik Remodelingi	7
Şekil 8. Kemiğin Kanlanması.....	8
Şekil 9. Kondrosite Farklılaşma	9
Şekil 11. Kıkırdak dokusunun tabakaları ve hücre morfolojisi.....	11
Şekil 10. Kıkırdak dokusunun tabakaları	11
Şekil 12. Normal Sinoviyumun Çeşitleri.....	12
Şekil 13. Sinoviyositlerin elektron mikroskopik görünümü.....	13
Şekil 14. Sinoviyal dokunun vasküler ve lenfatik dolaşımı	14
Şekil 15. Dolaşım patofizyoloji döngüsü.....	15
Şekil 16. Osteonekrozun histopatolojik bulguları	17
Şekil 17: Cerrahi öncesi hazırlık	21
Şekil 18: Cilt kesisinin yapılması	21
Şekil 19: Medial parapatellar artrotomi.....	21
Şekil 20: Osteonekroz modeli için osteokondral fragman alınması	21
Şekil 21: Osteonekroz modeli için kullanılan defektli alan.....	21
Şekil 22: Osteonekrozlu fragmanın eklem içine yerleştirilmesi	21
Şekil 23: Diz eklemine kapatılması.....	22
Şekil 24: Sütüre edilmiş diz eklemi.....	22
Şekil 25 : 3,5 mm çapında defekt alanı	22
Şekil 26: Tidemark üzerindeki kıkırdakta %25-75 arası radial zone'da kolon oluşumu.....	22
Şekil 27: Defekt içindeki yarıklar.....	23
Şekil 28: Defekt alanı içerisinde en yoğun olduğu yerde 1 büyük büyütme alanında BMP2 pozitif kondrosit benzeri hücreler (x200)	23
Şekil 29: En yüksek olduğu yerde Ki67 proliferasyon indeksi (x200)	23

Şekil 30: Defekt alanı içerisinde en yüksek olduğu yerde 1 büyük büyütme alanında yeni oluşan kapiller lümenleri (X200).....	23
Şekil 31: Defekt çapının gruplar arası değişimi	29
Şekil 31: KI67 indeksin gruplararası değerlendirilmesi.....	30
Şekil 32: VEGF değerinin gruplararası değerlendirilmesi	30
Şekil 33: BMP2 değerlerinin gruplararası değerlendirilmesi.....	31



TABLÖLAR

Tablo 3.1: Histolojik skorlama sistemi.....	24
Tablo 4.1: Defektlerin gross ve histolojik sonuçların istatistiksel analizi.....	28
Tablo 4.1: Defektlerin patolojik sonuçlarının istatistiksel analizi.....	28



1. Giriş

Osteonekroz (ON); kemiğin matriksinin etkilenmediği, kemiği besleyen damarların doğrudan veya dolaylı olarak hasara uğraması sonucu kemik ve kemik iliğinin iskemik nekrozuya ortaya çıkan durumdur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; subkondral yetmezlik kırıklarının sonucunda kırıkta hasarı olduğu ve subkondral alana giren eklem sıvısı ve kırığa sekonder oluşan ödem nedeniyle ON geliştiği de gösterilmiştir. ON teriminin sinonimleri olarak; avasküler nekroz, spontan osteonekroz, aseptik nekroz ve kemik enfarktüsü terimleri de literatürde kullanılmaktadır. ON, kalça ekleminden sonra en sık olarak diz ekleminde görülür [4].

Diz ekleminde yıkım ve son dönem artrit sebep olan diz osteonekrozu; spontan ya da primer diz osteonekrozu (SONK), sekonder diz osteonekrozu ve post-artroskopik osteonekroz olmak üzere 3 ana alt başlık altında incelenebilir. Yapılan çalışmalarda; SONK 50 yaş üzerindeki hastalarda %3,4-9,4 oranında görülürken, sekonder osteonekroz komorbiditesi olan genç hastalarda görülür. Post-artroskopik osteonekroz ise diz artroskopisi vakalarının yaklaşık %4'ünde görülmektedir. Her yaş aralığında ON görülebilmesi zamanında tanı ve tedavinin önemini arttırmaktadır. Tedavide gecikildiği takdirde ON, dizde kırıkta ve subkondral kemik hasarına sebep olmakta ve bu hasar osteoartrit (OA) ile sonuçlanmaktadır [karim]. Yapılan çalışmalar diz ekleminde osteonekrozu olan hastaların yürüme döngüsünün bozulduğunu göstermektedir. İlerleyen dönemde tabloya eklenen OA ile birlikte ON, hastalarda ciddi sosyolojik, psikolojik ve ekonomik problemlere yol açmakta, iş gücü kaybına ve yüksek maliyetli tedavi gereksinimine neden olmaktadır [17; 20].

Dizinde osteonekroz gelişmiş hastaların tedavisinde ortopedik cerrahlar tarafından birçok farklı cerrahi prosedür kullanılsa da optimal tedavi yöntemi halen tartışılmaktadır. Literatürde kullanılan her bir yöntemin kullanıldığı evreye ve uygulama yöntemine özgü avantaj ve dezavantajları olsa da nekrotik kemik ve üzerindeki kırıkta yüzeyin orijinal hali ile iyileşebilmesinin önünü açan bir cerrahi yöntem henüz mevcut değildir. Erken evre ON hastalarına uygulanan core-dekompresyon cerrahisinin başarısızlık oranları literatürde %10 civarında bildirilmiştir. Erken ve geç evrelerde uygulanabilen otolog veya allojenik osteokondral prosedürlerin başarısızlık oranı düşük olsa da tedaviye getirdiği ek maliyet ve

deneyimli cerrah gereksinimi kullanım alanını kısıtlamaktadır. Tibial osteotomiler ise cerrahi komplikasyonlar nedeniyle uygulanması ve takibi uzun, aşamalı işlemlerdir. Primer tedavi veya diğer yöntemleri başarısızlığı sonucu uygulanan unikompartmantal diz protezi ve total diz protezi cerrahi prosedürleri ise tedavi maliyetini arttırmakta ve cerrahi sonrası rehabilitasyon ve işe dönüş sürecini uzatmaktadır [17]. Tüm bu olumsuzluklar nedeniyle dizde osteonekroz tedavisinde yeni alternatif tedavi yöntemleri düşünülmüş ve otolog kemik iliği hücre implantasyonu, otolog osteoblast kültür implantasyonu, osteoprogenitör hücre greftlenmesi gibi yöntemlere ilgi artmıştır. Fakat bu yöntemler de teknik olarak zor, çok aşamalı, zaman alıcı, pahalı ve komorbiditesi yüksek olan yöntemler olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bu yöntemler ile nekrotik kemik üzerindeki kıkırdak dokusunun hasarı ilk haline geri çevrilememektedir [9].

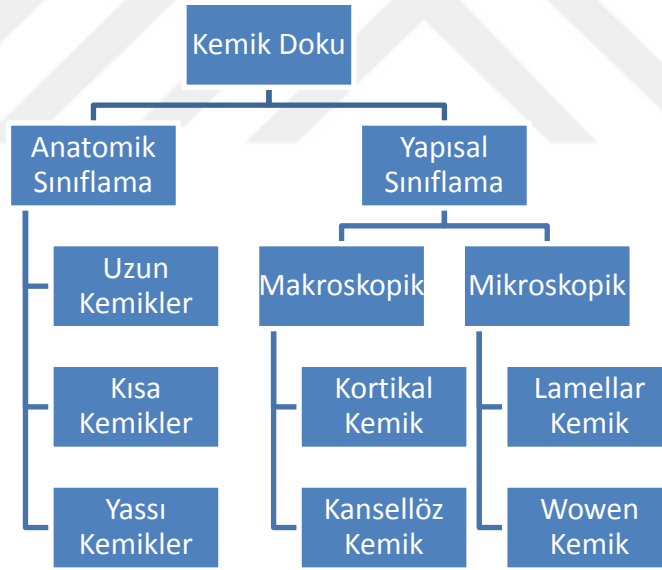
Son yıllarda, doku rejenerasyonu ve birçok hastalığın tedavisinde kök hücrelerin kullanışlı olduğu kanıtlanmıştır. Mezenkimal kök hücreler (MKH) osteoblast, kondroblast, adiposit hatta miyoblasta diferansiye olma yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Kemik, eklem yağı, kıkırdak, snoviyum gibi tüm eklem komponentleri potansiyel olarak MKH'ye sahiptir. Snoviyal membran üzerinde yapılan çalışmalar, snoviyal membranın rejenerasyon kapasitesine sahip olduğunu ve kök hücre kaynağı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Snoviyal dokudan elde edilen MKH'ler üzerinde yapılan çalışmalar bu hücrelerin kemik iliğinden alınan MKH ile aynı fonksiyon ve yapıda olduğunu ayrıca kemik iliği kökenli MKH'lere göre osteogenez açısından daha üstün olduğunu göstermiştir. Son yapılan çalışmalarda sinoviyal sıvının (SS) da tıpkı kemik iliği ve snoviyal dokudakine benzer MKH içerdiğini göstermektedir [12]. Daha önce kliniğimizde hayvan deneyi şeklinde tanımlanarak uygulanan pediküllü snoviya greftlerinin, tam kat kıkırdak hasarı tedavisinde hücre kaynağı olarak kullanılabilmesi ve kıkırdak hasarını hiyalin kıkırdak oluşturarak iyileştirdiği bildirilmiştir [30]. Benzer şekilde snovial dokunun mezenkimal kök hücre göçüne ve farklılaşmasına olanak sağladığı da literatürde bildirilmiştir. Literatürde, kemik dokuda oluşan nekrozun tedavisinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin kullanılması ve etkinliğinin gösterilmesi ile ilgili çalışmalar olsa da snovial doku kaynaklı MKH'lerin kullanımına dair çalışma bulunmamaktadır.

2. Genel Bilgiler

2.1 Kemik Anatomisi ve Fizyolojisi

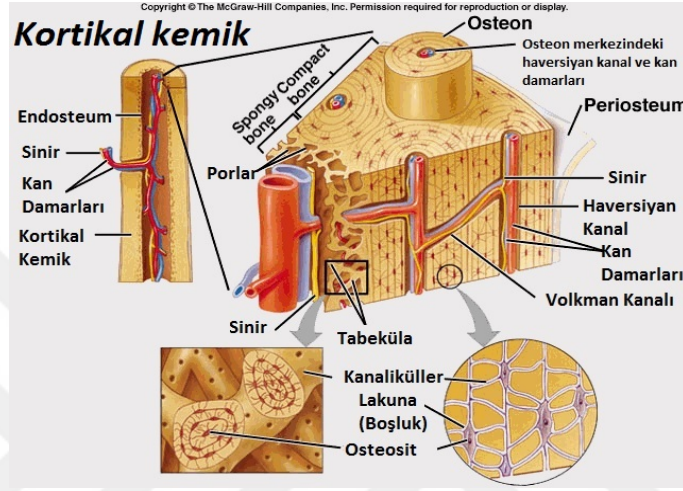
Kemik doku; vücutta organları korumak ve desteklemek, mineral metabolizmasına katılmak ve kemik iliğine ev sahipliği yapmak gibi temel fonksiyonlarını sağlamak üzere şekillenmiş değişik boyutlara sahip olan ve spesifik organizasyon gösteren bir dokudur [1]. Yapısında; kemik iliği, endosteum, periosteum, kan damarları, sinir ve kıkırdak dokusu bulunur [22].

Kemik dokusu anatomisine ve yapısına göre sınıflandırılabilir (Şekil 1). Anatomik olarak kemikler uzun kemikler (örn; femur, tibia, humerus), kısa kemikler (örn; karpal kemikler, tarsal kemikler) ve yassı kemikler (örn; skapula, sternum) olmak üzere 3'e ayrılırlar. Yapısal olarak ise makroskopik (kortikal kemik, kansellöz kemik) ve mikroskopik (lamellar ve woven kemik) olmak üzere 2 ye ayrılırlar.



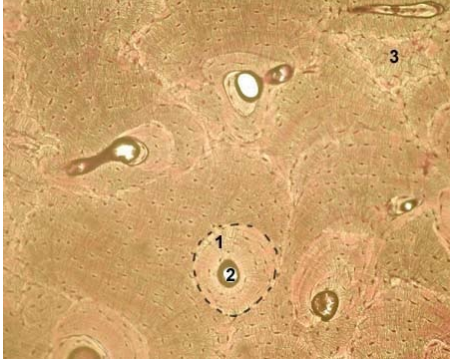
Şekil 1. Kemik Sınıflandırılması

Kortikal kemik, kemiğin sert dış bölümünü oluşturan bölgesidir. İskelet sisteminin %80'ini oluşturur. Sıkıca paketlenmiş osteonlar ve haversiyan sistemden oluşur. Osteonların merkezinde içerisinde arteriol, venül, kapiller, sinir ve muhtemelen lenf dokusu içeren haversian kanalları bulunur. Bu kanallar birbirine veya kemik yüzeye Volkmann kanalları ile bağlanırlar. Osteonların arasını ise interstisyel lamella doldurur (Şekil 2-3).



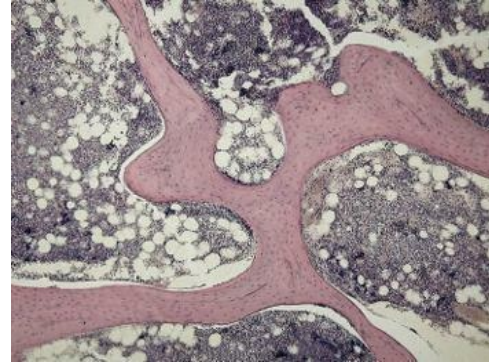
Şekil 2. Kemiğin Kesitsel Yapısı

Kansellöz kemik (spongiöz veya trabeküler kemik); daha az yoğun yapıdadır ve biyolojik olarak kortikal kemiğe göre daha aktiftir. Poroz yapıdadır ve kemik iliğini içerir. Osteon ve haversiyan yapılar bu kemikte bulunmaz [8] (Şekil 4).



Şekil 3. Matür Lamellar Kortikal Kemik

1-Yeni Haversiyen sistem veya osteon, 2-Haversiyen kanal, 3-İnterstisyel Lamella



Şekil 4. Kansellöz (Trabeküler Kemik)

Kansellöz kemik yüksek poroziteye sahiptir ve kemiğin bu alanları kemik iliğini içerir.

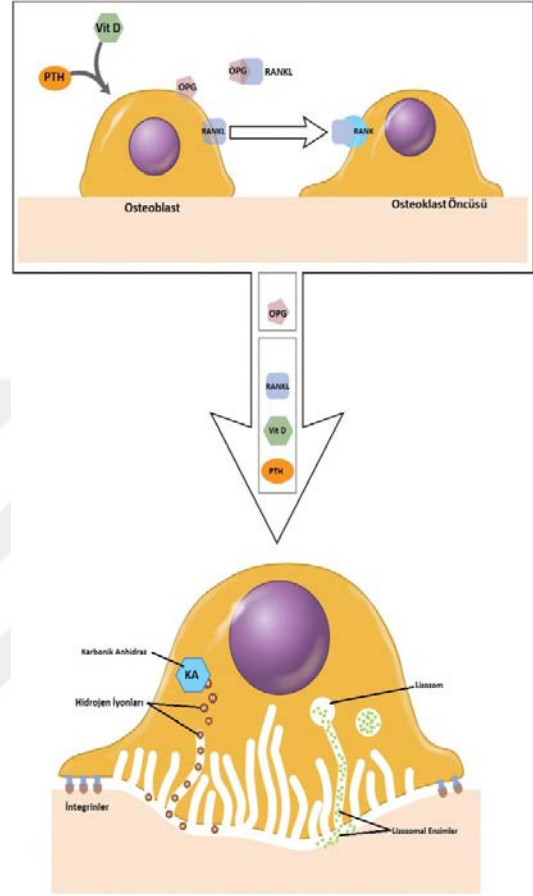
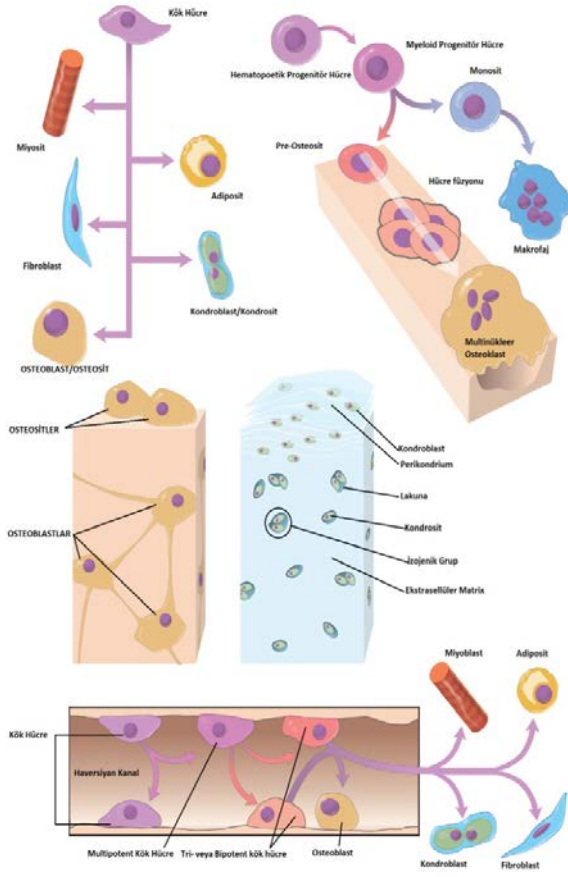
Kemik matriksi ile ilişkili kemik hücreleri; osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar ve osteoprogenitör hücrelerdir. Kemik matriksinin sentez ve degradasyonundan sorumludurlar. Kemiğin iç kısmında, hematopoetik hücreler, stromal hücreler, yağ hücrelerini içeren kemik iliği hücreleri mevcuttur. Dış kısımda ise periosteal yüzey boyunca uzanan periosteal membran hücreleri yer alır [22].

Osteoblastlar; diferansiye olmamış mezenkimal kök hücreden kaynaklanan, immatür osteoid tabakaları arasında yerleşim gösteren küboid hücrelerdir (Şekil 5). Osteoblastların temel 2 görevi mineralize olmamış matriks sentezlemek ve osteoklast aktivitesini düzenlemektir. Bu nedenle salgı yapmakta görevli olan organellerden (örn; golgi cismi, mitokondri vs.) zengindirler. Metabolik olarak daha aktif olan hücreler kemik yüzeye daha yakın yerleşirken, daha az aktif hücreler merkeze yer alır. Osteoblastların aktivitesi Paratiroid Hormon'un (PTH) intermitant salgısı ile düzenlenir.

Osteositler; osteoblastların kendi ürettikleri yeni organize matriks tarafından çevrilmesi ile oluşurlar. Olgun iskeletin %90'ını oluştururlar. Sitoplazmik uzantıları ile kanaliküller içerisinden birbirleri ile iletişim halindedirler. Ekstrasellüler kalsiyum ve fosfor dengesinin korunmasında önemli rol oynarlar.

Osteoklastlar; hematopoetik kök hücreden köken alan multinükleer dev hücreli yapıya sahiptirler. En önemli fonksiyonu kemik resorpsiyonunu sağlamalarıdır. Bu resorpsiyonu Howship lakünası adı verilen alanlarda fırçamsı kenarları aracılığı ile sahip oldukları enzimler ile oluşturdukları asidik ortamda gerçekleştirirler. Kemik yapımı ve

yıkımı, yıkımın daha hızlı gerçekleştiği bir döngü ile gerçekleşir. Osteoblastla, ekspres ettikleri RANKL aracılığı ile osteoklast üzerindeki RANK'ı uyararak kemik yıkımının kontrolünü sağlar. (Şekil 6)



Şekil 5. Kemik ve Kıkırdak hücrelerinin kökeni

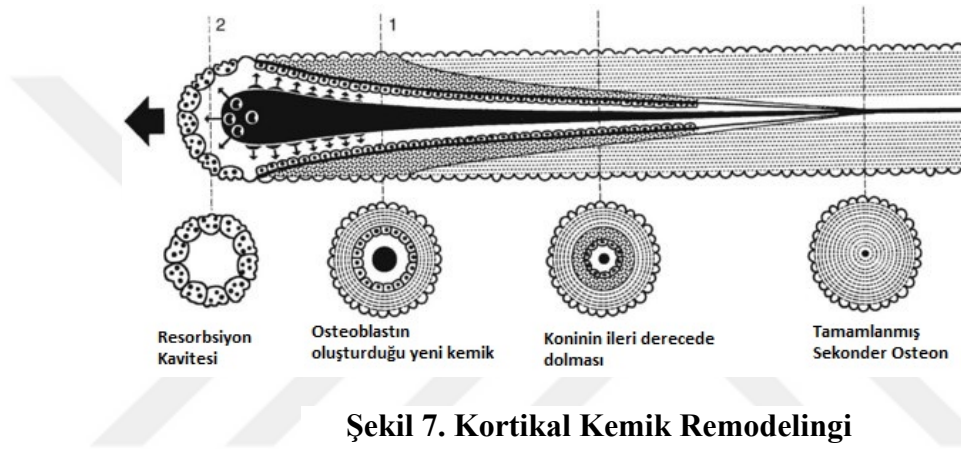
Şekil 6. Osteoklast'ın fonksiyonu ve kontrolü

Osteoprogenitör hücreler, mezenkimal kök hücrelerden köken alırlar. Farklılaşmalarında çevresel uyarılar önemli rol oynarlar. Oksijen basıncının yüksek ve gerilme kuvvetinin az olduğu ortamda osteoblastlara dönüşürler. Orta kuvvetteki gerilme ve düşük oksijen basıncı varlığında ise kondroblastlara farklılaşırlar. Yüksek gerilme kuvvetinde ise fibröz doku oluştururlar. Haversiyen kanalların içinde, endosteum ve periosteumda yer alırlar.

Kemik doku %40 oranında organik ve %60 oranında inorganik komponentlerden oluşur. Organik komponentlerin %90'ını kollajen oluştururken, proteoglikanlar, matriks proteinleri veya non-kollajenöz proteinler (osteokalsin, osteonektin, osteopontin) ve

sitokinler ile büyüme faktörleri buna eşlik ederler. İnorganik (mineral) komponentler ise kalsiyum hidroksiapatit ve osteokalsiyum fosfat gibi tuzlarıdır.

Kortikal ve kansellöz kemik, yaşam boyu osteoklastik ve osteoblastik aktivitenin devamlı döngüsü ile remodele olur. Remodeling mekanik strese cevap olarak gelişir (Wolff's Kanunu). Kortikal kemik remodelingi osteoklastların yıkımını osteoblastların osteoid yaparak takip ettiği tünel açma yöntemi ile gerçekleşir (Şekil 7). Kansellöz kemik remodelinginde ise önce osteoklastlarca kemik yıkılır, sonrasına ise osteoblastlar bu bölgeye yerleşerek yeni kemik oluşturur.



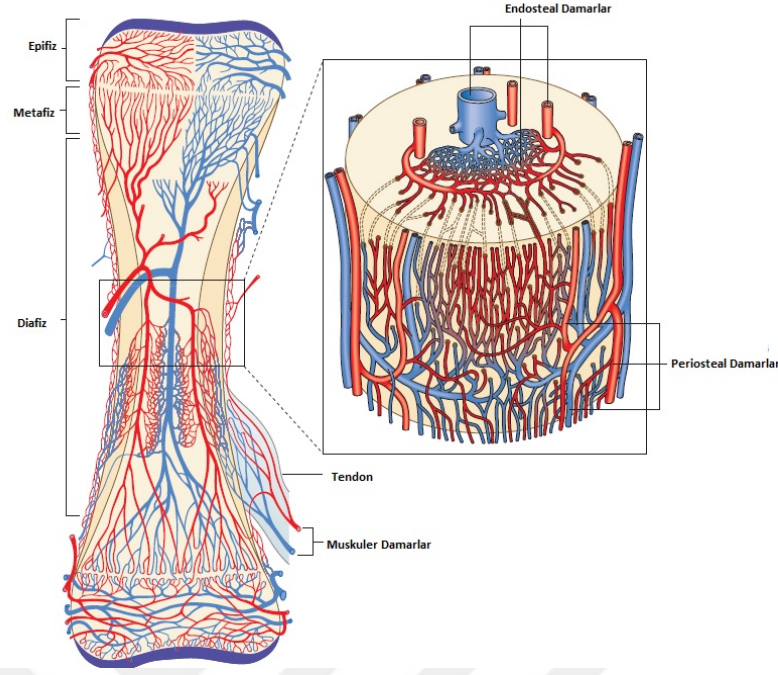
Şekil 7. Kortikal Kemik Remodelingi

Kemik doku, kardiyak output'un %5 ila %10'unu alır. Uzun kemikler 3 kaynaktan beslenirler;

1) Sistemik arterlerden çıkan dallar; diafizyal korteksten nutrisyonel foramen aracılığı ile medüller kanala girer ve asendan ve desendan dallar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 8). Daha ileriki dallar endosteal kortekse ulaşırlar ve matür diafizyal korteksin iç 2/3'ünü haversiyen sistem aracılığı ile beslerler. Bu sistemde kan basıncı yüksektir. Kortikal kemiğin %60'ı nutrisyonel arterler yolu ile beslenir.

2) Metafizyal-epifizyal sistem; periartiküler vasküler pleksuslardan kaynaklanır.

3) Periosteal sistem; Matür diafizyal korteksin dış 1/3'ünü besleyen kapillerleri içerir. Bu sistemde kan basıncı düşüktür.



Şekil 8. Kemiğin Kanlanması

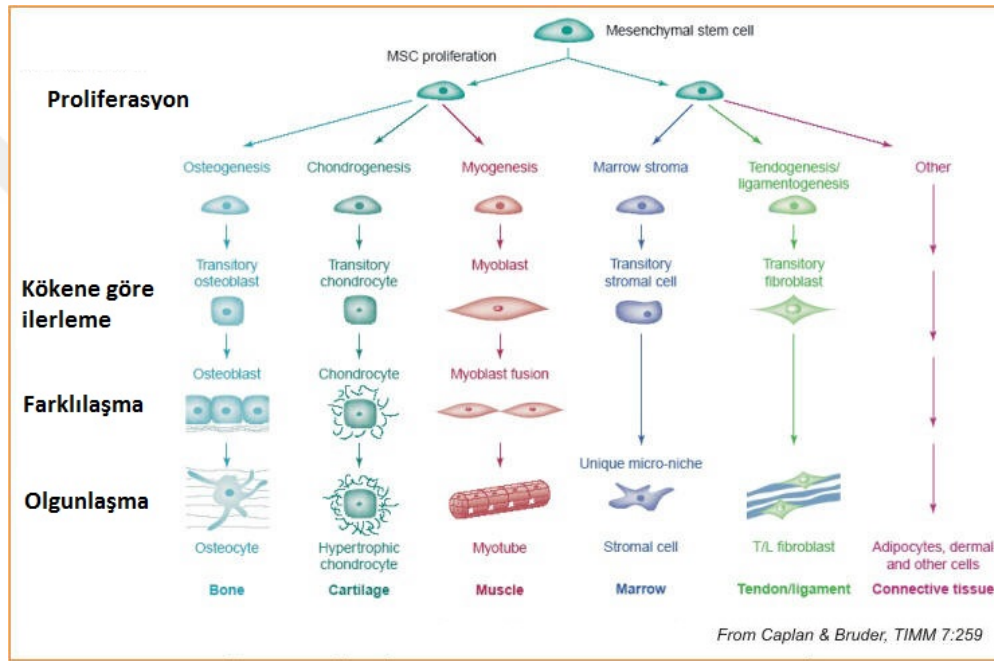
Fizyolojik olarak akım yönü basıncın yüksek olduğu iç kısımdaki nutrisyonel arteriyel sistemden düşük olduğu dış kısımdaki periosteal sisteme doğrudur (Sentrifugal). Kırık gibi nutrisyonel arteriyel sistemin bloke olduğu durumlarda ise kan akışı tersine döner (Sentripedal). İmmatür ve gelişmekte olan kemikte de periosteal sistemin vaskülerizasyonu nedeniyle sentripedal dolaşım hakimdir. Matür kemikte venöz kan akımı ise sentripedaldir. Kortikal kapillerler venöz sinüzoidlere drene olarak dolaşıma katılırlar. Hipoksi, hiperkapni ve sempatektomi gibi durumlarda kan akım artar. Kemik iyileşmesinde majör faktör kemiğin kanlanmasıdır [18].

2.2 Eklem Kıkırdağının anatomisi ve fizyolojisi

Eklem kıkırdağı yani hyalin kıkırdak, kompresif yüklenmeye ve snovial eklemlerdeki harekete bağlı olarak oluşan makaslama kuvvetlerine karşı iyi adapte olmuş çok yönlü ve benzersiz bir dokudur. Erişkinlerde; eklem yüzeyininin medialini ve derin köşelerini de içine alan, kompleks yapıda ve bol miktarda ekstrasellüler matriks üreten, kendi fiziksel stabilitesi için subkondral birleşim bölgesi ile birlikte altındaki kemik dokuya bağlanan kompleks ve çok bölgeci bir yapılanma gösterir [8]. Hyalin kıkırdak dokusu; avasküler, anöral ve alenfatiktir. Oksijen ve besinleri snovial sıvıdan diffüzyon yolu ile alırlar. Hipoksik kıkırdağın travmalardan sonra iyileşmesi bu sebeple zordur. Direk

travma, alttaki kemik yapının kaybı, normal yapılanmayı bozan genetik defektler ve kimyasal-enzimatik problemler kırıkta homeostazını bozan başlıca etkenlerdir.

Hyalin kırıktağın yapısının %75'i sudan oluşur. Yüzeysel tabakalarda daha fazladır. Beslenme ve kayganlığın sağlanmasından sorumludur. Kollajen ise yapının %15'ini oluşturur. Eklem kırıktağına tensil kuvvetlere karşı dayanıklılık ve sertlik sağlar. %10 oranında bulunan proteoglikanlar ise kompresif güçlere karşı dayanıklılık, ekstrasellüler matriksin turgor basıncını ve yapısal birlikteliği sağlarlar.



Şekil 9. Kondrosite Farklılaşma

Ayrıca kırıktağın poroz yapısından da sorumludurlar. Kondrositler tarafından salgılanırlar [18]. Kondrositler; ekstrasellüler matriksin sentezlenmesi, idame ettirilmesi ve tamiri için özelleşmiş metabolik olarak yüksek derecede aktif olan, kırıktağın dokunun temel hücreleridir. Eklem kırıktağının %2'sini oluştururlar ve mezenşimal kök hücreden kaynaklanırlar. (Şekil 9) Buldukları bölgeye göre sayıları, şekilleri, boyutları değişir. Yüzeysel bölgedeki kondrositler derin yerleşimli kondrositelere göre daha düz, küçük ve yüksek dansitelidirler. Her bir kondrosit özelleşmiş bir mikroçevre içerisinde sentezinden kendisinin sorumlu olduğu ekstrasellüler matrix içinde tuzaklanmış halde bulunur. Nadiren diğer kondrositlerle hücresel uzantılarla temas halindedir. Kondrositlerin replikasyon potansiyeli düşüktür ve hasarlanmaya karşı iyileşme cevapları yetersizdir. Kondrositlerin canlılığı içinde bulunduğu mikroortam ve mekanik çevreye bağlıdır [28].

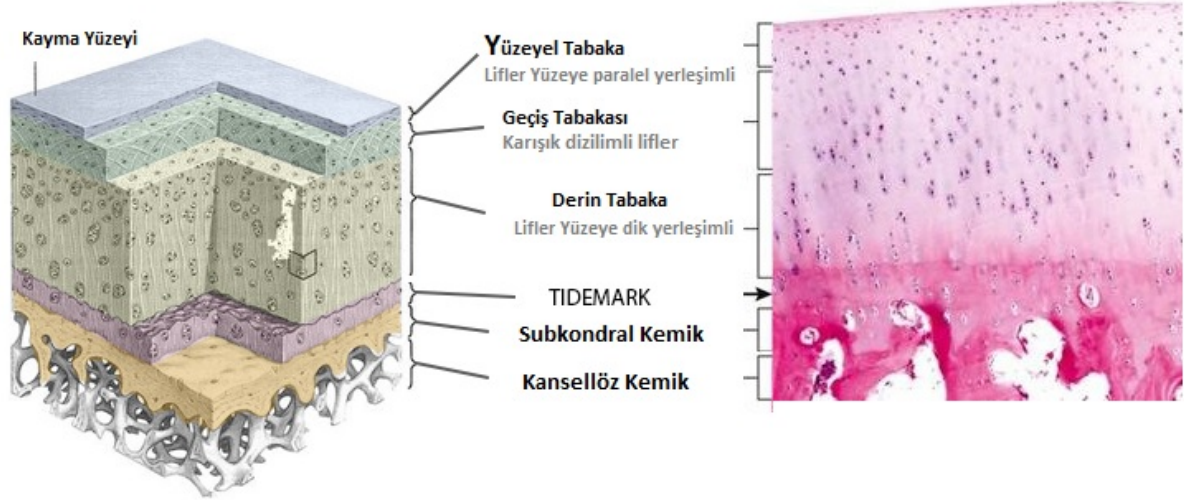
Kıkırdakta; eklem yüzeyinden subkondral kemiğe kadar olan alanda kondrositlerdeki ve matriksdeki morfolojik değişiklikler 4 tabakanın ortaya çıkmasına neden olur.

1) Yüzeyel tabaka (Süperfisiyal Zon); En ince tabaka olup kendine özgü iki katmandan oluşur. Eklem yüzeyinde küçük polisakkaritlerden oluşmuş ince fibriller yer alır. Bu katın yüzeyinde hücre bulunmaz. Hücre içermeyen bu alana “lamina splendens” adı verilir. Yüzeyin hemen altında uzun ve ince kondrositlerin eklem yüzeyine paralel olarak yerleştiği bölgede kollajen içeriği daha fazla ve proteoglikan içeriği ise daha azdır. Yüzeyel tabaka diffüzyon yolu ile beslenen kıkırdağın snovial sıvıdan aldığı besin maddelerinin de kontrol edildiği yerdir. Bu tabakanın su tutma özelliği daha fazla olup fibrillerin yapısı nedeniyle germe kuvvetine karşı dirençlidir. Bu katta oluşan bozukluk mekanik direncin değişmesiyle birlikte inflamatuvar ve immün yanıtı oluşumuna ve sonucunda osteoartrite sebep olur (Şekil 10-11).

2) Geçiş Tabakası (Transizyonel Zon); Hücrelerin ve matriks morfolojisinin yüzeyel tabaka ile derin tabaka arasındaki geçişi nedeniyle bu şekilde isimlendirilir. Bu bölgedeki hücrelerin sentez yapan organelleri gelişmiştir. Daha kalın lifli kollajen ve proteoglikan konsantrasyonu daha yüksek olan kollajen sentezleyen hücreler sferoidiktir (Şekil 10-11).

3) Derin Tabaka (Radyal Zon); Eklem yüzeyine dik olarak yerleşmiş, kolonlar oluşturan sferoidal kondrositlerden oluşur. En yüksek proteoglikan yoğunluğu ve en kalın kollajen fibrilleri bu tabakada yer alır. Kollajen fibrilleri tidemark'ı geçerler ve kıkırdak yapısına dik yerleşimlidirler. Bu sayede makaslama kuvvetlerine karşı direnç gösterirler (Şekil 10-11).

4) Kalsifiye Kıkırdak Tabakası; Subkondral kemik ile derin tabakayı birbirinden ayıran ince bölgedir. Bu bölgedeki hücreler kalsifiye kıkırdak ile çevrili ve metabolik olarak çok daha az aktiftir [28] (Şekil 10-11).



Şekil 10. Kıkırdak dokusunun tabakaları

Kıkırdak Tabakaları				
Tabaka	Genişlik (µm)	Karakteristik	Kollajen Oryantasyonu EM'da hücre tabaka içinde	Fonksiyon
Yüzeysel Tabaka	40	↓ Metabolik Aktivite En yüksek [H ₂ O] En yüksek (Lumbricin) Yassı Kondrositler	Tanjansiyel 	Makaslama kuvvetine karşı koyar
Geçiş Tabakası ve Derin tabaka	500 – 1000	↑ Metabolik Aktivite ↑ Hücre Boyutu ↑ Kollajen boyutu ↑ Proteoglikan En düşük [H ₂ O]	Oblik-Vertikal 	Kompresif kuvvetlere karşı koyar
Kalsifik Tabaka (Tidemark'tan başlar)	300	Ca ⁺⁺ Kristalleri (Hidroksiapatit) Tip 10 Kollajen		Makaslama kuvvetine karşı ankor görevi görür

Şekil 11. Kıkırdak dokusunun tabakaları ve hücre morfolojisi

C, Sitoplazma; EM, elektron mikroskobu; IF, ara flaman; N, nükleus

2.3 Sinoviyal Anatomi ve Fizyoloji

Sinoviyum; diartodal eklemlerin iç boşluğunu, tendon kılıfı ve bursaları saran yumuşak dokudur. Hücrelerin devamlı yüzey tabakasından oluşan intima ve altta yatan dokuyu içeren subintimadan oluşur. İntimada makrofaj ve fibroblastlar yer alırken

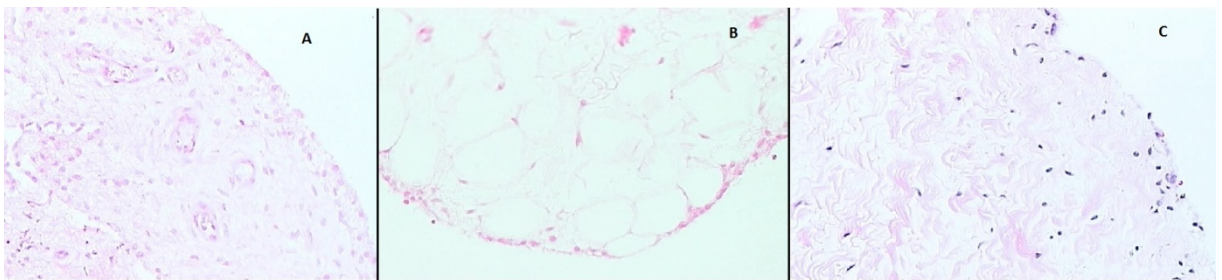
subintima kan damarları, lenfatikleri, bekleyen fibroblastları ve kollajenöz matriksi infiltr eden hücreleri içerir. İntimal yüzeylerin arasında hyaluronandan zengin az miktarda sıvı bulunur. Böylece iki doku arasında yapışkan olmayan bir yapı oluşur.

Sinoviyum mikroskopik olarak subintimal tabakanın yapısı ve içeriğine bağlı olarak fibröz, areolar ve adipoz olmak üzere 3 temel tipte bulunur (Şekil 12).

1) Areolar tip; normal sinoviyumun en çok özelleşmiş formudur ve bazen villus içerebilir. Genellikle yüzeyde 2 veya 3 kat olarak devamlı sıralanmış hücreler bulunur. Bu hücreler kapillerler, daha küçük arterioller ve venüller ve mast hücreleri ile birlikte bulunurlar. Lenfatik doku, normal sinoviyal dokunun yapısında subintimal doku ve fibröz tabakalarda hemen her zaman görülür. Sınırlar ise damarlara eşlik eder. Normal sinoviyumun bağ doku matriksi, fibriler yapıda tip 1 kollajenden oluşur. Sinoviyum daha fazla serbest harekete izin vermek için ligament, periost ve tendon gibi altında bulunan dokular ile gevşek bağlantı yapar.

2) Adipoz tip; yağ yastıkcıklarında izlenir. Komplet intimal hücre tabakasına ve yüzeysel kapillerlere sahiptir. Adipoz tipte görülen villiler merkezi arteriyoller ve venüller içerirler

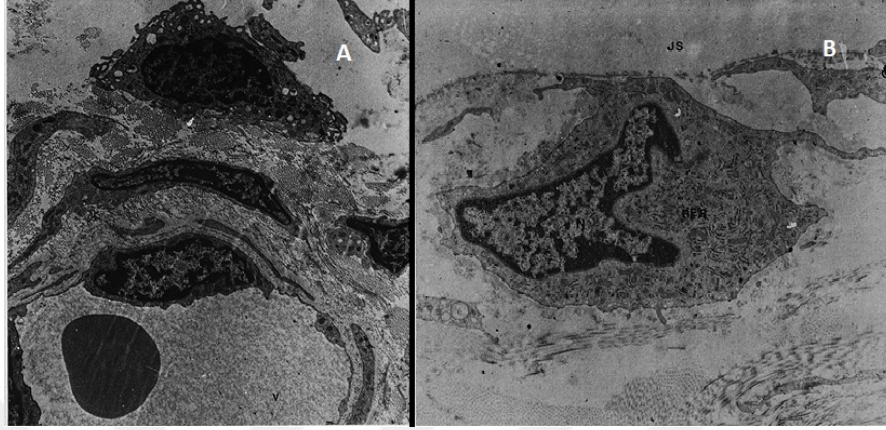
3) Fibröz tip; tanınması oldukça zor olan tiptir. Aralıklı sıralanan hücre tabakası içerir [27].



Şekil 12. Normal Sinoviyumun Çeşitleri

A; Areolar formda sinoviyal doku (H&E Boyama), B; Adipoz formda sinoviyal doku (H&E Boyama), C; Fibröz formda sinoviyal doku (H&E Boyama)

Elektron mikroskopik incelemelerde snoviyal dokunun makrofaj benzeri tip A sinoviyositler ve fibroblast benzeri tip B sinoviyositler olmak üzere 2 tip sinoviyositten oluştuğu görülmüştür. (Şekil 13) Tip A hücreler kemik iliğinden kökenli olup ve fagositozdan sorumlu iken tip B hücreler lumbricin içeren sinoviyal sıvıyı üretirler [19].



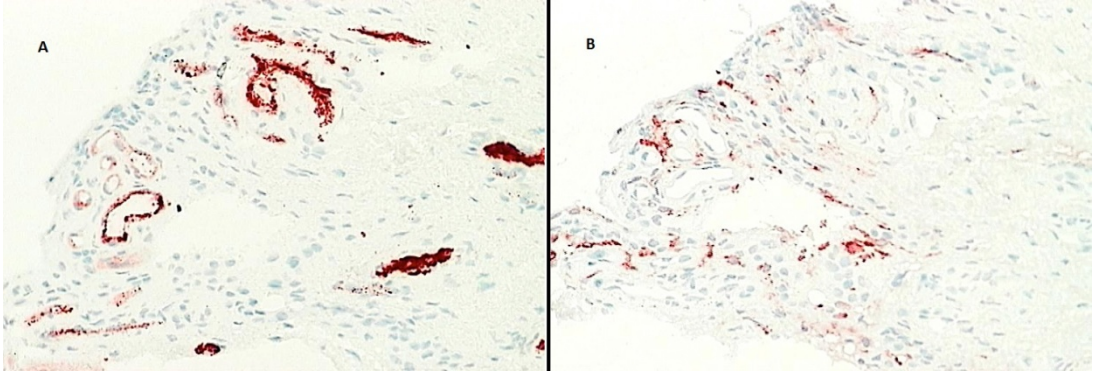
Şekil 13. Sinoviyositlerin elektron mikroskopik görünümü

A; Elektron mikroskopik görüntü tip A sinoviyal hücrenin görünümü.(Orijinal büyütme x9000), B; Elektron mikroskopta tip B sinoviyal hücrenin görünümü. (Orijinal büyütme x18000)

Tip A sinoviyositler makrofajlar gibi mikrovillus ve mikropikallara sahiptirler. Bu hücreler inflamatuvar süreçlerde çoğalırlar ve salgıladıkları pro-inflamatuvar sitokinler yoluyla kırıkta destrüksiyonuna ayrıca salgıladıkları “transforming growth faktör-beta (TGF- β) ve “bone morfogenetic protein” (BMP)-2 ve BMP-4 ile osteofit formasyonunun oluşmasına neden olurlar. Bu hücreler CD163 ve CD68 pozitifler ve spesifik olmayan esteraz aktivitesi gösterirler. Tip B sinoviyositler kırıkta ekstrasellüler matriksinin temel bileşeni olan hiyalüronik asit (HA) ve glikozaminoglikan (GAG) sentezinden sorumlu CD44 pozitif hücrelerdir. Eklem sıvısının kayganlığını sağlayan lumbricin de yine bu hücreler tarafından sentezlenir.

Snoviyum, pro- ve anti-inflamatuvar nöropeptitleri içeren nosiseptif duyu innervasyona sahiptir. Eklem kapsülünün stratum fibrozumunda ve yanındaki konnektif dokuda sona eren duyu sinirleri mekanoreseptör olarak görev yaparlar.

Sinoviyal membran, yüzeysel snoviyal tabaka ile altındaki yağ dokusu arasındaki dar boşlukta yer alan; yoğun, yüzeysel kapiller ağı içerir ve bu ağ pencere yapıdadır. Derin snoviyal venüller ve kapillerler ise pencere içermez. Eklem kapsülünün fibröz kısımlarında ise kapillerler sayıca azdır ve devamlılığı çeşitlilik gösterir.



Şekil 14. Sinoviyal dokunun vasküler ve lenfatik dolaşımı

A; Normal sinoviyum (x200 büyütme), vasküler ağı göstermek için faktör 8 ile boyanmış (kırmızı), B; Normal sinoviyum (x200 büyütme), lenfatik ağı göstermek için LYV-1 antikoruna ile boyanmış (kırmızı)

Sinoviyum; geniş yama tarzında, serbestçe anastomoz yapan, poligonal patern gösteren geniş lenfatik ağı sahiptir. Sinoviyal membranın daha fibröz olan alanlarında, eklem kıkırdak sınırına bakan yüzeylerinde lenfatik ağ zayıflar, lenfatik damarlar inceler, sıklığı azalır ve anastomozlara daha az rastlanır. Kan kapillerlerinin tersine, bu ince lenf damarları eklem sınırına kısa mesafede kör olarak sonlanırlar [19].

Sinoviyal membran sinoviektomi sonrasında iyileşmeyi sağlayan intrinsik aktiviteye sahiptir ve sinoviyal kondromatozis gibi sinoviyal doku içinde çok sayıda kıkırdağımsı nodüle sebep olan patolojiler araştırmacılar arasında sinoviyal membran kökenli mezenkimal kök hücrelerin olabileceği fikrini uyandırmıştır. Sinoviyal membrandan elde edilen mezenkimal kök hücreler, sinoviyal doku kökenli mezenkimal kök hücre (SDK-MKH) olarak adlandırılır ve bu hücreler kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ile aynı fenotipik ve fonksiyonel özelliklere sahiptir fakat farklı genler ifade ederler. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin (KİK-MKH) aksine SDK-MKH'ler yaştan bağımsız olarak çoğalma hızını ve koloni formasyonu oluşturma potansiyellerini korurlar. Diğer tüm mezenkimal kökenli kök hücrelerin arasında sinoviyal doku kökenli olan mezenkimal kök hücreler en yüksek kondrogeniz potansiyeline sahiptir. Diğer bir yandan periostium, kemik iliği ve sinoviyal kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteogeniz özelliklerinin yine diğerlerine göre daha üstün olduğu gösterilmiştir [7].

2.4 Osteonekroz ve Tedavi yöntemleri

Osteonekroz (ON); kemiğin matriksinin etkilenmediği, kemiği besleyen damarların doğrudan veya dolaylı olarak hasara uğraması sonucu kemik ve kemik iliğinin iskemik nekrozuya ortaya çıkan durumdur. ON teriminin sinonimleri olarak; avasküler nekroz, spontan osteonekroz, aseptik nekroz ve kemik enfarktüsü terimleri de literatürde

kullanılmaktadır. 40-50 yaş aralığında ve erkeklerde kadınlara oranla 4 kat daha fazla görülür. Hemen hemen her kemik tutulabilmekte ve tutulan kemikleri farklı bölgeleri (epifiz, diyafiz, metafiz) etkilenebilmektedir. Klinik bulguları; iskemik nekroz alanın büyüklüğü, subkondral kemiğe ve eklem yüzüne yakınlığı belirler.

Osteonekroz oluşumunun merkezinde vasküler patolojiler ve iskemi rol oynar. Osteonekroza sebep olan iskemi, vasküler yapıların doğrudan travma ile hasarlanması, pıhtı sonucu damarların tıkanması ve ekstrasvasküler bası (kemik içi basıncın artması, kemik iliğinde yağ dokusunun artışı veya hipertrofisi) ile ortaya çıkabilir [26] (Şekil 15).

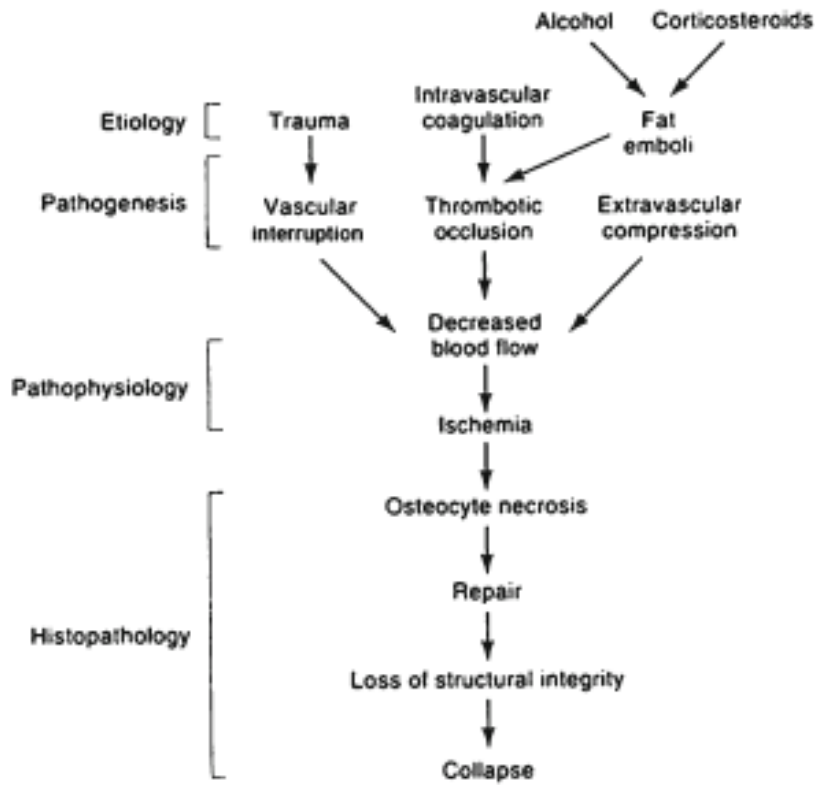


Fig. 3 Unified concept of circulatory pathophysiology. Diverse etiologies contribute to ischemia and necrosis (reprinted with permission from Wolters Kluwer/LWW)

Şekil 15. Dolaşımsal patofizyoloji döngüsü

Kemik iliğinde yağ hücrelerinin arttığı ve adiposit hipertrofisine neden olduğu durumlar, ekstrasvasküler interosseöz basıncı artıran iki temel klinik faktördür. Buna sıklıkla kortikosteroid kullanımı ve alkol alımının neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca lipid depo hastalıklarında da bu durum izlenmektedir.

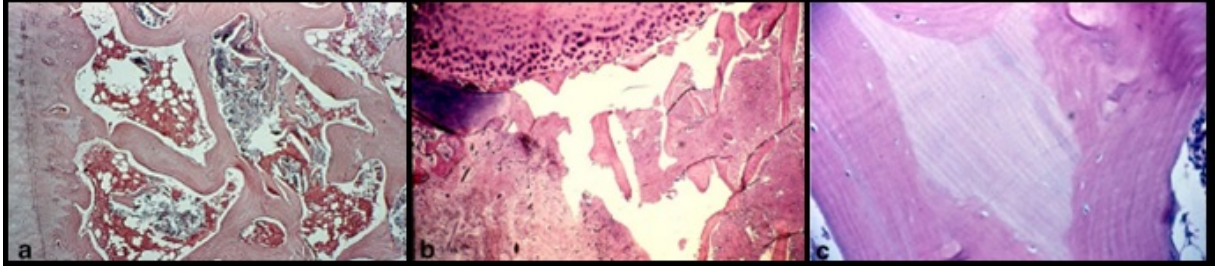
Osteonekroz hastalarında yapılan çalışmalarda kemik içi basınç venöz staza ve venöz akımda obstrüksiyon sonucu yüksek olarak ölçülmüştür. Normal kemik iliği basıncı ortalama 15 mmHg iken 30mmHg üzerindeki değerler anormal olarak değerlendirilir. Kemik içine uygulanan 5ml saline infüzyonunun venöz sistemde strese neden olduğu izlenmiştir. Basınçtaki değişiklik önce 10 mmHg civarında artmakta ve tekrar normal aralığa dönmektedir. ON da ise bu stres 30 mmHg ve üzerinde kalıcı basınç artışı oluşturmaktadır. Bu durumun aksini iddia eden yayınlar da mevcuttur. İnterosseöz basınç artışı ON gelişiminde potansiyel katkısı olan, non-spesifik sekonder bir faktördür.

Geçirilen travmalar sonucu oluşan direkt veya indirekt vasküler hasarın osteonekroza sebep olabileceği gösterilmiştir. Femur boynunun intrakapsüler kırığı subkondral kemiğin damar desteğine zarar vererek femur başında yüksek oranda osteonekroza neden olmaktadır.

İntravasküler oklüzyon, ON'a neden olan faktörlerden bir diğeridir. Hemoglobinin beta zincirinde meydana gelen genetik mutasyon sonucu fizyolojik stres altında eritrositlerde anormal şekil değişikliğinin intravasküler oklüzyona sebep olduğu orak hücreli anemi hastalarında yapılan prospektif çalışmalarda %11-37 oranında ON bildirilmiştir. Birçok çalışmada osteonekroz görülen hastalarda hiperkoagülabilitate (hipofibrinolizis ve trombofili) bulgularının eşlik ettiği gösterilmiştir. Jones ve ark, değerlendirdikleri osteonekroz olgularının %82'sinde en az bir koagülasyon anomalisi saptamışlardır [15]. Koagülopatilerde kemikteki mikrodolaşım tromboza çok duyarlı olduğundan kortikosteroid ve alkol alımı bu durumun açığa çıkmasını kolaylaştırmaktadır [26].

Kemik iliğinde yağ hücrelerinin arttığı ve adiposit hipertrofisine neden olduğu durumlar, ekstrasvasküler interosseöz basıncı artıran iki temel klinik faktördür. Buna sıklıkla kortikosteroid kullanımı ve alkol alımının neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca lipid depo hastalıklarında da bu durum izlenmektedir.

Osteonekroz, tipik hücre ölümü ve kemik rezorpsiyon ve formasyonu ile giden kompleks süreç ile karakterizedir. Erken dönemde intersitisyel kemik ödemi takiben hematopoetik hücre ve adiposit nekrozu ile karakterizedir. (Şekil 16)



Şekil 16. Osteonekrozun histopatolojik bulguları

A; Nekrotik osteositleri gösteren boş lakünalar ve intersitisyel ödemin izlendiği nekrotik kemik iliği, B; Parsiyel olarak rezorbe olmuş trabeküle ilerleyen subkondral kırık, C; Ölü kemiğin laminasyonu

Osteosit nekrozu anoksiden yaklaşık olarak 2-3 saat sonra görülür fakat histolojik değişiklikler 24-72 saatten önce görünür hale gelmez. Kemik iliğinin yağ hücreleri ise canlılıklarını 2-5 gün koruyabilirler. Bu evrede subkondral kemiği tutan iskemik olaydan eklem kıkırdağındaki hücreler etkilenmez ve snovial sıvıdan beslenmeye devam ederler [15]. İskemik nekrozu inflamatuar süreç takip eder. Bunun sonucunda vaskülarizasyon ve mezenkimal kök hücre göçü gerçekleşir. Nekrotik kemiği, fibrovasküler doku çevreler ve sınırlar. Takip eden evrede ölü kemik rezorbe edilir ve yeni kemik dokusu sentezlenir. Bu dönemde gerçekleşen ölü kemiğin resorpsiyonu, yeni kemik oluşumu ve nekrotik alanlar görüntüleme bulgularının oluşmasına neden olur. Osteoklastlar nekrotik dokuyu ortadan kaldıran ana hücrelerdir. Nekrotik kemik dokusunun trabeküler kemik ya da spongiöz kemik olmasına göre rezorpsiyon süreci farklılık gösterir. Nekrotik kemik rezorbe edildikten sonra osteoblastlar tarafından yeni kemik oluşturulabileceği gibi nekrotik kemik tamamen rezorbe edilmeden yeni kemik dokusu üzerine oturtularak da tamir yapılabilir. Subkondral kemikte bu süreç daha yavaştır. Rezorpsiyon hızla yapılırken, yeni kemik yapımı daha yavaş olur. Zayıflayan bu alanda kırılma ve ayrışmalar görülebilir. Bunun sonucunda eklem kıkırdağı çöker, kıkırdak beslenmesi ve eklem uyumu bozulur [26].

Diz osteonekrozu ilk olarak Ahlbäck ve arkadaşları tarafından 1960'lı yıllarda dizin spontan osteonekrozunu olarak tanımlanmıştır. 60 yaş üstü, minör travma sonrası veya artmış fiziksel aktiviteye bağlanmıştır ancak sonraki çalışmalar ile bu durumun her hasta için uygun olmadığı görülmüştür. Son çalışmalar önceden diz osteonekrozu olarak tanımlanan patolojileri üçe ayırmaktadır;

- Sekonder ON
- Spontan ON
- Postartroskopik ON

Her bir ON tipi son dönem artrite ilerleyecek potansiyele sahiptir. Bununla birlikte etyoloji, ilgili risk faktörleri, prognoz ve tedavi yaklaşımları her tip için farklılık göstermektedir. Diz ON için birçok tedavi algoritması önerilmiştir. Ancak bu algoritmalar kısıtlı retrospektif çalışmalarla desteklenmiştir ve farklı sınıflama sistemleri ve altta yatan farklı etyolojiler nedeniyle uygun tedavi yönteminin seçimi ile ilgili bilgilerimiz kısıtlıdır. Diz osteonekroz tedavisinde konservatif tedavi, core dekompresyon, osteokondral grefleme, artroskopik debridman, drilleme ve mikrokırık yöntemleri ve artroplasti yöntemleri kullanılmaktadır.

1) Konservatif Tedavi; dizin spontan ON'unda ilk olarak yük vermeme, non-steroid anti inflamatuvar ilaç gibi konservatif tedaviler seçilir. Kalçada Sekonder ON olan hastalarda bifosfonat, iloprost ve antikoagülanların kullanımının faydaları raporlanmış olsa da diz için henüz yeterli araştırma bulunmamaktadır. Sekonder ON'un konservatif olarak takip edildiğinde %80 oranında ilerlediği gösterilmiştir. Erken dönem osteonekroz konservatif tedaviden fayda gördüğünü bildiren çalışmalar olsa da konservatif tedavi sekonder ON hastalarında önerilmemektedir.

2) Eklem Koruyucu Prosedürler

a) **Core-dekompresyon:** Çökme öncesi erken evre ON tedavisinde core-dekompresyon uygulaması ile artroplasti uygulamasını geciktirilebilir. ON olup daha subkondral çökme oluşmamış hastalarda core-dekompresyon yapılabilir. Core-dekompresyonun tedavi edici etkisinin, kemik iliğindeki basıncı düşürmesi ve vasküleriteyi artırarak sağlıklı kemik gelişimini sağlaması olduğu düşünülmektedir. Subkondral kemikte çökmesi olan hastalarda ise core-dekompresyonun faydası görülmemiştir.

b) **Osteokondral Greft Uygulaması:** Erken evre diz ON'unda subkondral kemik ve eklem kıkırdağını desteklemek için kullanılmaktadır. Sekonder ON'da ise altta yatan sistemik hastalıklarına bağlı azalmış kemik iyileşme potansiyelinden dolayı osteokondral greflerin kullanılmasından kaçınılmaktadır. Yapılan çalışmalarda subkondral çökme olan hastaların, osteokondral otolog greftleme ve mozaikplastiden fayda gördüğü bildirilmiştir.

c) **Artroskopik debridman, drilleme ve mikrokırık uygulaması:** Dizin ON'nda artroskopi lezyonların tanımlanmasında ve eşlik eden patolojilerin tedavisinde

kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda dizde spontan osteonekroz tedavisinde ilk olarak artroskopi yapılmasını önermektedir. Debriman, drilleme ve mikrokırık uygulaması sonrasında tipik olarak ilk ay ekleme yük verilmemesi önerilir. Akgun ve arkadaşları spontan ON'u olan 26 hastaya artroskopik mikrokırık uygulamış ve %96 hastada klinik düzelme bildirmişlerdir.

d) **Artroplasti Uygulaması:** Erken evrede tedaviye rağmen birçok hasta ileri evre ON'a ve sonuç olarak son dönem artrit ilerlemektedir. Bu nedenle total diz artroplastisi (TDA) subkondral kemik çökmesi olan veya eklem koruyucu tedavilere cevap vermeyen hastalarda kullanılan bir yöntemdir. Sıklıkla her iki femoral kondil de etkilendiği için unikondiler diz artroplastisi (UDA) önerilmemektedir. Ayrıca eklem içi yaygın tutulum unikondüler implant stabilitesini de bozmaktadır. Ancak UDA yapılan hastalarda olumlu sonuçlar bildiren yayınlar da mevcuttur.

3) Mezenkimal kök hücre tedavileri; Osteonekrotik eklemlerin sağaltımı için bir çok cerrahi prosedür geliştirilse de hastalığın tedavisinde kür sağlayabilecek tek bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Bu nedenle son yıllarda nekrotik kemiğin biyolojik rejenerasyonunu sağlayan yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Son dönemde yayınlanan mezenkimal kök hücre, osteoblast hücre kültürü ve kemik iliği konsatresi uygulamalarının sonuçları, osteonekroz tedavisinde bu yöntemler üzerindeki çalışmaları arttırmaktadır [12]. Goodman ve ark. 40 adet osteonekrozlu diz üzerinde yaptıkları ve ortalama takip süresinin 5 yıl olduğu çalışmada hastalara debridman ve iliak kristadan aldıkları osteoprogenitör hücre grefti uygulamışlar ve takip boyunca hiçbir hastanın ileri cerrahi girişim gereksinimi olmadığını bildirmişlerdir [10]. Gangji ve ark. femur başında osteonekrozu olan 24 kalça eklemine yaptıkları otolog kemik iliği hücre implantasyonunun sonucunda ağrı ve eklem içi semptomlarında ciddi azalma ve subkondral kırık evresinde gerileme bildirmişlerdir [9]. Birçok benzeri çalışma literatürde mevcut olsa da sinoviyal doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kullanıldığı çalışma bulunmamaktadır. Daha önce kliniğimizce hayvan deneyi şeklinde tanımlanarak uygulanan pedinküllü snoviya greftlerinin, tam kat kırık hasarı tedavisinde hücre kaynağı olarak kullanılabileceği ve kırık hasarını hiyalin kırık oluşturarak iyileştirdiği bildirilmiştir [30]. Benzer şekilde snovial dokunun mezenkimal kök hücre göçüne ve farklılaşmasına olanak sağladığı ve kemik iyileşmesinde rol aldığı bildirilmektedir.

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Deney hayvanları ve gruplandırma

DA15/48 no'lu ve "Tavşan Distal Femur Osteonekroz Modelinde Sinovyal Greftlemenin Etkisi: Hayvan Modelinde Karşılaştırmalı Çalışma" başlıklı araştırma projemizi gerçekleştirebilmek için Başkent Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 11/01/2016 tarih ve 16/02 sayılı karar ile izin alındı.

Başkent üniversitesi hayvan laboratuvarından temin edilen erişkin tip yaşları 1,5 ile 2 yaş arasında, ağırlıkları yaklaşık 2kg ile 3kg arasında olan 26 adet yeni zellanda beyaz tavşan ırkı kullanılarak(6) 2 ana çalışma grubu oluşturuldu. I. grupta 13 tavşan 6 hafta, II. grupta 11 tavşan 12 hafta takip edildi. Her iki grupta tavşanların sol dizlerinden rounger yardımı ile alınan kemik parçasında Seung Hwan Hong ve arkadaşları tarafından tanımlanan osteonekroz modeli ile osteonekroz oluşturulduktan sonra pediküllü sinovya grefti uygulandı. Sağ dizler kontrol grubunu oluşturup sadece osteonekroz (ON) oluşturularak eklem içinde serbest olarak bırakıldı.

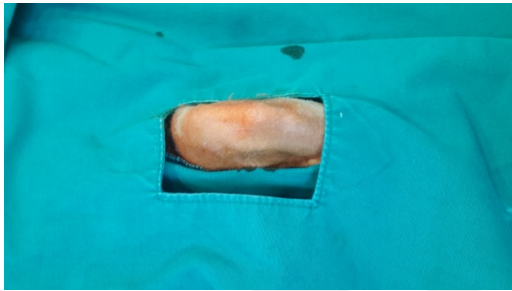
Tavşanlara intramüsküler 45 mg/kg dozda ketamin ve 5 mg/kg xyilasine verilerek anestezi uygulandı. Batticon solüsyon ile steril yıkama ve örtünmeyi takiben her iki dize medial parapatellar artrotomi ile girilerek patella laterale deviyeye edildi ve femoral kondiller açığa çıkarıldı. Medial femoral kondilin yük taşımayan kısmında tam kat, kansellöz kemik ile birlikte kemik ve kıkırdak çıkarıldı.

Grup I ve II

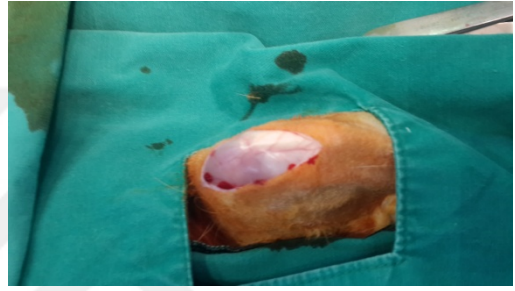
Her tavşan ketamin ile uyutulduktan ve steril bir şekilde boyanıp örtüldükten sonra supin pozisyonda tibial tüberkülden başlayıp patellanın üst kutbundan 3 cm yukarıya uzanan orta hat cilt kesisi yapıldı. Kesi hattından cilt altı doku ayrıldı ve oluşturulan medial cilt flebi sayesinde quadriceps tendonu, patellanın ve pateller tendonunun medial kenarı ortaya çıkarıldı. Daha sonrasında medial parapateller, kapsüler kesi yapılarak patella laterale disloke edildi ve femoral kondile ulaşıldı. Suprakondiler bölgeden rounger yardımı ile osteotomi yapıldı. İzole edilen femur kondil parçası sırasıyla sıvı nitrojen (-196 C) ve 37 C 'de 4'er dakika bekletildi ve bu işlem 3 kez tekrarlandı [12]. I. ve II. gruptaki 26 tavşanın sol dizlerinden alınan tam kat kemik ve kıkırdak parça alındıktan sonra

artrotominin medial parçasının iç yüzünden pediküllü sinoviyal greft serbestleştirildi. ON oluşturulan parça alındıktan sonra serbestleştirilmiş olan pediküllü sinovya içine konularak 6/0 prolen sutur ile dikildi. Diseke edilen kas ve ligamentler onarıldı ve kesi uygun katlar halinde 3/0 poliglikan ile kapatıldı. (Şekil 17-24)

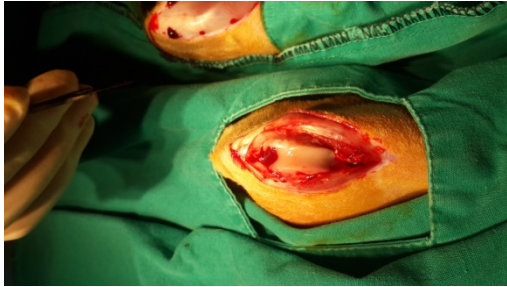
Tavşanlar anestezi etkisinden kurtulup uyanana dek izole edildi. Daha sonra normal günlük aktivitelerini yapacak şekilde kafeslerine alındı. Tavşanlara herhangi bir hareket kısıtlılığı uygulanmadı. Ameliyat sonrası ilk beş gün, günde tek doz subkutan olarak yapılan Baytril-K %5 solüsyonu ile profilaksi yapıldı.



Şekil 17: Cerrahi öncesi hazırlık
Deney hayvanının dizi traş edildikten sonra steril şekilde boyanıp örtüldü.



Şekil 18: Cilt kesisinin yapılması
Diz eklemi üzerine longitudinal cilt kesisinin yapılması



Şekil 19: Medial parapatellar artrotomi



Şekil 20: Osteonekroz modeli için osteokondral fragman alınması



Şekil 21: Osteonekroz modeli için kullanılan defektli alan



Şekil 22: Osteonekrozlu fragmanın eklem içine yerleştirilmesi
Siyah ok: Diz eklemine yerleştirilmiş fragman



Şekil 23: Diz eklemine kapatılması

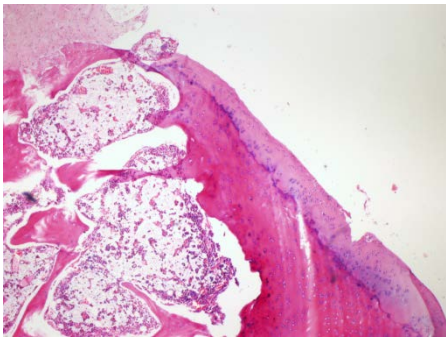


Şekil 24: Sütüre edilmiş diz eklemi

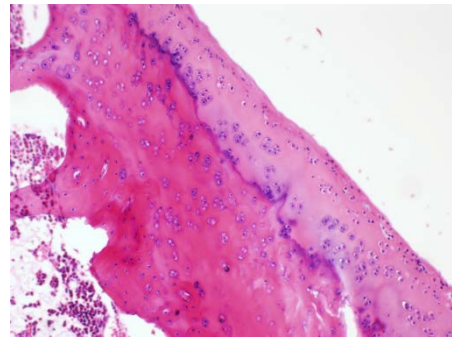
3.2. Histopatolojik yöntem

Histolojik ve immünohistokimyasal inceleme için, her diz en-bloc olarak çıkartılarak %10 formaldehit solüsyonunda 24 saat fikse edildikten sonra 8 saat %10'luk formik asitle dekalsifiye edildi. Parafin takip sonrası parafin bloklardan 5 micron kalınlıkta kesitler alındıktan sonra etüvde 40 dakika 70 derecede bekletildi. Daha sonra xylene ve takiben %96'lık alkolden iki kez geçirilerek deparafinize edildi. Kesitlerin tamamı rutin hematoxilen-eozin boyası (şekil 25-27) ile BMP2 (Şekil 28), Ki67 (Şekil 29) ve VEGF (Şekil 30) immünohistokimyasal boyası ile boyandı.

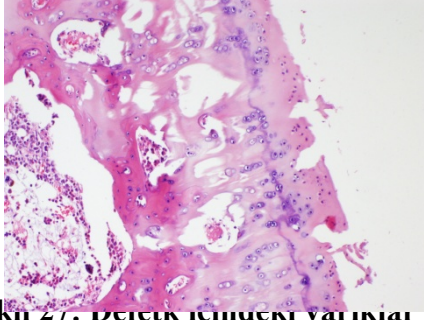
VEGF ve Ki67 immünohistokimyasal boyaları kullanıma hazır şekilde gönderilmiş olup BMP2 antikoru 1:250 oranında %1'lik sığır serum albümini ile dilüe edildikten sonra kullanıldı. Negatif ve pozitif kontrol için VEGF ve BMP2 antikorları için insan plasentası, Ki67 antikoru için insan tonsil dokusu kullanılmıştır. Histolojik ve immünohistokimyasal boyayla boyanmış kesitler bir ışık mikroskobu (Olympus BX51) ile değerlendirilerek görüntüler renkli dijital Olympus DP72 kamera ile kaydedilmiştir.



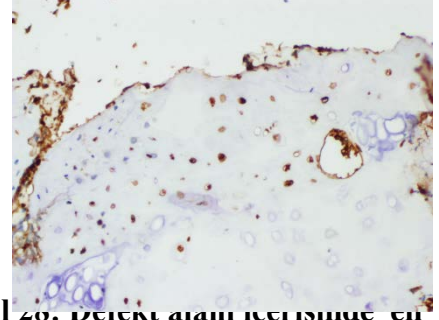
Şekil 25 : 3,5 mm çapında defekt alanı
(H&E, x20, 6 hafta sağ 12).



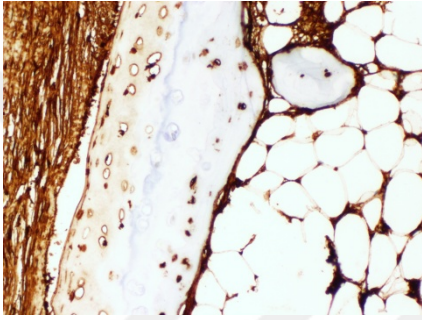
Şekil 26: Tidemark üzerindeki kırıkta %25-75 arası radial zone'da kolon oluşumu
(H&E, x40, 6 hafta sağ 12).



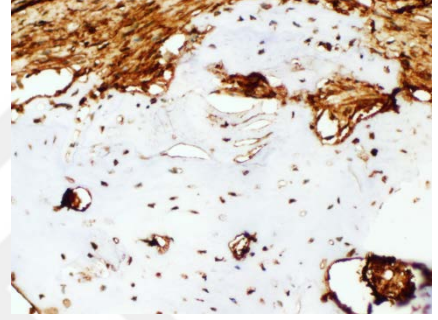
Şekil 27: Defekt içindeki yarıkları (H&E, x40, 6 hafta sağ 4).



Şekil 28: Defekt alanı içerisinde en yoğun olduğu yerde 1 büyük büyütme alanında BMP2 pozitif kondrosit benzeri hücreler (x200)



Şekil 29: En yüksek olduğu yerde Ki67 proliferasyon indeksi (x200)



Şekil 30: Defekt alanı içerisinde en yüksek olduğu yerde 1 büyük büyütme alanında yeni oluşan kapiller lümenleri (X200)

Tablo 3.1: Histolojik skorlama sistemi

EKLEM KIKIRDAK DEFEKTLERİNDE HİSTOLOJİK SKORLAMA SİSTEMİ

Kategori	Skor
1. Orjinal eklem kıkırdak yüzeyine göre defekt dolun oranı	
%111-125	1
%91-110	0
%76-90	1
%51-75	2
%26-50	3
<%25	4
2. Çevre eklem kıkırdağı ile tamir dokusunun integrasyonu	
Normal devamlılık ve integrasyon	0
Azalmış hücre sayısı	1
Bir tarafta boşluk	2
İki tarafta boşluk	3
3. Tidemark üzerindeki kıkırdağın Safranin-O-Fast Green ile boyanması	
Normal	0
Hafif azalmış	1
Orta derecede azalmış	2
Belirgin Azalmış	3
Boyanma yok	4
4. Tidemark üzerindeki kıkırdağın hücre morfolojisi	
Normal	0
Kondrositlerin büyük kısmı yuvarlak ise	
%75 den fazla radial zone'da kolon oluşumu	0
%25-75 arası radial zone'da kolon oluşumu	1
<%25 radial zone'da kolon oluşumu (disorganize)	2
%50 Kondrosit morfolojisine sahip yuvarlak hücre	
%75 den fazla radial zone'da kolon oluşumu	2
%25-75 arası radial zone'da kolon oluşumu	3
<%25 radial zone'da kolon oluşumu (disorganize)	4
Çoğu iğsi yapıda (fibroblast benzeri hücreler)	5
5. Tüm defektin yapısı (sınırlar hariç)	
Normal	0
1-3 küçük defekt	1
1-3 büyük defekt	2
>3 büyük defekt	3
Defekt içinde yarıklar	4
6. Yüzey yapısı	
Normal	0
Hafif düzeyde fibrilasyon ve düzensizlik	1
Orta düzeyde fibrilasyon ve düzensizlik	2
Belirgin düzeyde fibrilasyon ve bozulma	3
7. Subkondral kemik yer değişim oranı	
a) Yeni kemik orjinal tidemark'ın altındaysa	
%90-100	0
%75-89	1
%50-74	2
%25-49	3
<%25	4
b) Yeni kemik orjinal tidemark'ın üzerinde ise	
%90-100	0
%75-89	1
%50-74	2
%25-49	3
<%25	4
8. Tidemark'ın yeniden oluşturulması	
Tam	0
%75-89	1
%50-74	2
%25-49	3
<%25	4

Not: Bütün kategorilerde alınan puan ne kadar yüksekse kıkırdak iyileşmesi o kadar kötüdür

4. Bulgular

4.1. Çalışma Grupları ve Ortalama Değerler

Çalışmamızda toplam 26 adet tavşanın 13'ü altı hafta, geri kalan 13'ü ise toplam oniki haftalık takip gruplarına alınmıştır. Grup2'de iki adet tavşan septik artrit nedeniyle ex olmuştur. Sonuç olarak son analizde grup1'de toplam 13 tavşan (13 diz), grup2 'de ise 11 tavşan (11 diz) çalışmaya dahil edilmiştir. Bütün sol dizler çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen ve takip sürelerini tamamlayan bütün tavşanların sağ dizleri kontrol grubu olarak (13+11= 24 diz) analiz edilmiştir. Bütün tavşanlara post-operatif dönemde serbest hareket tanınarak tam yük ile mobilize olmalarına izin verilmiştir. Uygun bakım ve profilaktik antibiyotik sonrası bütün tavşanlarda tam yara iyileşmesi sağlanmış ve çalışmaya dahil olan tavşanlar takip sürelerini tamamlamıştır.

Gruplar içerisinde histopatolojik inceleme sonucunda elde edilen ortalama değerler ve kontrol grubu değerleri histopatolojik parametrelere göre şu şekildedir:

1. Orijinal eklem kırık yatağına göre defekt doluluk oranları (DDO) grup1 için ortalama 1.69(min=1*max=3). Grup2 için ortalama 1.90 (min=1*max=3) ve kontrol grubu için ortalama 1.66 (min=0*max=3)

2. Tamir dokusu integrasyonu (TDI) oranları grup1 için ortalama 2.15 (min=1*max=3). Grup2 için ortalama 2.27 (min=1*max=4) ve kontrol grubu için 2.04 (min=1*max=3)

3. Tidemark üzerindeki hücre morfolojisi oranları grup1 için ortalama 1.61 (min=1*max=2). Grup2 için ortalama 2.36 (min=1*max=4) ve kontrol grubu için 1.83 (min=0*max=4)

4. Tüm defektin yapısı oranları grup1 için ortalama 2.53 (min=1*max=4). Grup2 için ortalama 1.81 (min=1*max=4) ve kontrol grubu için 2.04 (min=1*max=4)

5. Yüzeyin yapısı oranları grup1 için ortalama 2.30 (min=1*max=3). Grup2 için ortalama 2.09 (min=1*max=3) ve kontrol grubu için 1.70 (min=1*max=3)

6. Subkondral kemik yerdeğişim oranları grup1 için ortalama 3.69 (min=2*max=4). Grup2 için ortalama 2.81 (min=1*max=4) ve kontrol grubu için 2.87 (min=1*max=4)

7. Tidemark'ın yeniden oluşturulmasına göre oranları grup1 için ortalama 2.53 (min=1*max=3). Grup2 için ortalama 2.63 (min=2*max=3) ve kontrol grubu için 2.12 (min=1*max=4)

Gruplar içerisinde defekt çapı ve immunohistokimyasal incelemeye göre ortalama değerler ve kontrol grubu değerleri histopatolojik parametrelere göre şu şekildedir:

1. Defekt çapı oranları grup1 için ortalama 1.65 (min=1*max=3). Grup2 için ortalama 2.40 (min=1.5*max=3) ve kontrol grubu için 2.35 (min=1*max=4)

2. Ki67 indeksi oranları grup1 için ortalama 59.23 (min=40*max=80). Grup2 için ortalama 65 (min=55*max=75) ve kontrol grubu için 58.95 (min=45*max=75)

3. VEGF oranları grup1 için ortalama 1.92 (min=0*max=3). Grup2 için ortalama 1.36 (min=1*max=3) ve kontrol grubu için 1.08 (min=0*max=3)

4. BMP2 (%) oranları grup1 için ortalama 46.92 (min=20*max=75). Grup2 için ortalama 71.81 (min=60*max=85) ve kontrol grubu için 55.70 (min=40*max=87)

4.2 İstatistiksel değerlendirme

Gruplar arası histopatolojik değerlendirme, gross değerlendirme ve immunohistokimyasal inceleme ile elde edilen değerler, istatistiksel olarak grup1 ile 2 ve çalışma grupları ile kontrol grubu arasında karşılaştırılmıştır.

Tüm değişkenler için normal değişim testi (Shapiro-Wilks) ve gruplar içerisinde homojenlik testi (Levene) sonuçları istatistik olarak anlamlı bir fark tespit etmemiştir. Bu sebeple kontrol grubu dahil çalışma grupları birbiri ile karşılaştırılabilir bulunmuştur.

Histopatolojik inceleme için exact ki-kare testi ile istatistik değerlendirme yapılmış, gross patoloji ve immonohistokimyasal inceleme için tek değişkenli (univariate) varyans analizi (F testi) kullanılmıştır.

Histolojik inceleme sonuçları değerlendirildiğinde skorlama sistemine göre; kontrol grubu ile çalışma grupları arasında kırıkta defekt dolum oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p= 0.035$). Buna karşın çalışma grupları arasında (6. ve 12. hafta takip sonuçları) defekt dolumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p=0.76$). Çalışma sonucunda sinoviyal dokunun defekt dolumuna anlamlı derecede yardımcı olduğu, buna karşın 6. ve 12. hafta takip süreleri arasında anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir.

Kontrol ve çalışma grupları arası çevre eklem kırıktağı ile tamir dokusunun integrasyonu incelendiğinde, kontrol grubu ile çalışma grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.584$). Çalışma grupları arasında değerlendirme yapıldığında ise bu integrasyon dokusunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p=0.487$). Çalışma sonucunda sinoviyal dokunun tamir doku integrasyonu açısından anlamlı derecede yardımcı olduğu, buna karşın 6. ve 12. hafta takip süreleri arasında anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir.

Kontrol ve çalışma grupları arasında tidemark üzerindeki kırıktağın hücre morfolojisi arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır ($p=0.276$). Çalışma grubu için bakıldığında gruplar arası fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0.069$). Çalışma sonucunda sinoviyal dokunun kırıktağın hücre morfolojisi üzerine herhangi bir etki etmediği bulunmuştur.

Kontrol ve çalışma grupları arasında tüm defektin yapısı açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir, ($p=0.156$). Çalışma grupları arasında ise istatistiksel olarak defekt yapısı açısından fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0.253$). Sonuç olarak sinoviyal dokunun defekt yapısına direkt olarak etki etmediği tespit edilmiştir.

Kontrol ve çalışma grupları arasında yüzeyin yapısı açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0.329$). Çalışma grupları arasında ise istatistiksel olarak yüzeyin yapısı açısından fark anlamlı bulunmamıştır ($p=0.436$). Sonuç olarak sinoviyal dokunun yüzeyin yapısına direkt olarak etki etmediği tespit edilmiştir.

Sağ dizlerin gruplara arası subkondral kemik yerdeğişim oranı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır, p değeri= $0.484 > 0.05$. Sol dizler için bakıldığında gruplar arası fark önemli çıkmış $p=0.015 < 0.05$. Diz ayrımı yapmadan gruplar arası fark da önemli çıkmıştır $p=0.02 < 0.05$.

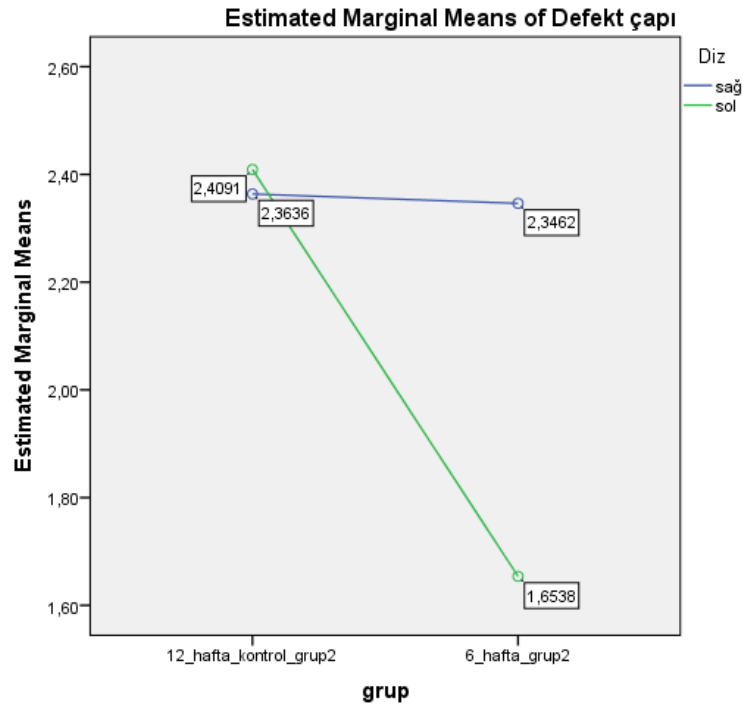
Tablo 4.1: Defektlerin gross ve histolojik sonuçların istatistiksel analizi

	Grup1 ile Grup 2	Çalışma grupları ile kontrol grubu
Kıkırdak yüzeyine göre defekt doluluk oranı	$p=0.76$	$p=0.035$
Çevre eklem kıkırdağı ile tamir dokusunun integrasyonu	$P=0.487$	$P=0.584$
Tidemark üzerindeki kıkırdağın hücre morfolojisi	$P=0.069$	$P=0.276$
Tüm defektin yapısı	$p=0.253$	$P=0.156$
Yüzey yapısı	$P=0.436$	$P=0.329$
Subkondral kemik yerdeğişim oranı	$P=0.015$	$P=0.484$
Tidemark'ın yeniden oluşturulması	$P=0.827$	$P=0.329$

Gross inceleme sonucunda defekt çapları değerlendirildiğinde kontrol grubu ve çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0.074$). Aynı şekilde grup1 ve grup2 arasında defekt çapları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında yine anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0.132$). Sonuç olarak bütün tavşanlardaki defekt çapları homojen ve karşılaştırılabilir olarak belirlenmiştir.

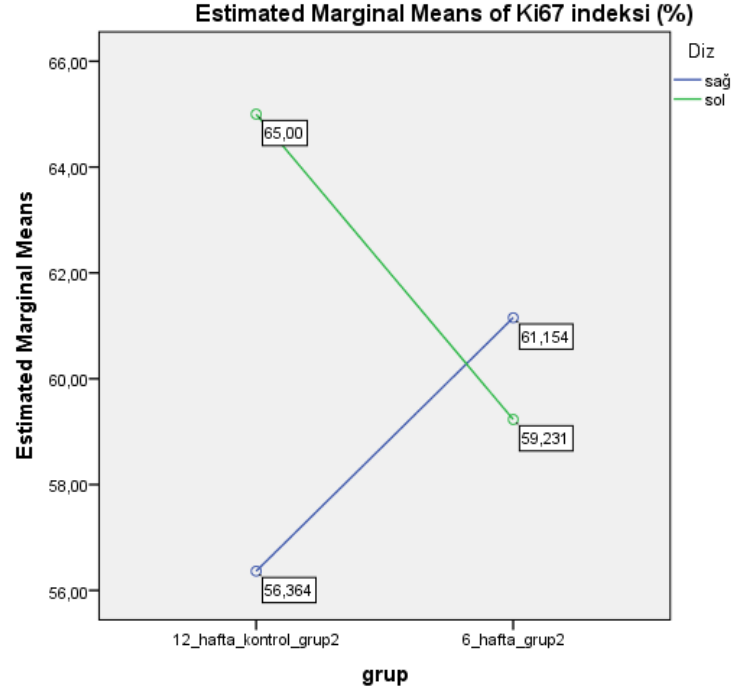
Tablo 4.1: Defektlerin patolojik sonuçlarının istatistiksel analizi

	Grup1 ve Grup2	Çalışma Grubu ile kontrol grubu
Defekt Çapı	$p= 0.074$	$p= 0.132$
Ki67	$p= 0.858$	$p=0.222$
VEGF	$p=0.655$	$p=0.024$
BMP2	$p=0.000$	$p=0.332$



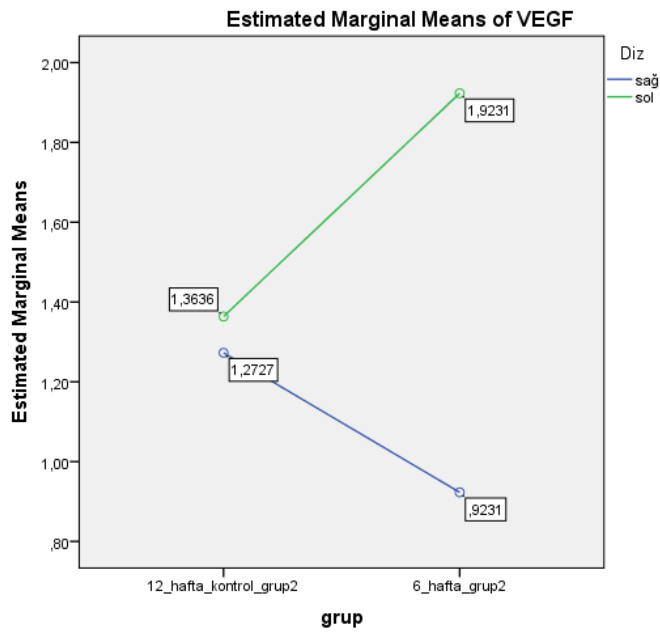
Şekil 31: Defekt çapının gruplar arası değişimi

İmmünohistokimyasal inceleme ile Ki67 indeksi, VEGF, BMP2 (%) değerleri istatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Ki67 indeksi esas alındığında, kontrol grubu ve çalışma grupları arasında ve benzer şekilde grup1 ve grup2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Sırası ile $p=0.858$, $p=0.222$). Sonuç olarak sinoviyal dokunun osteonekrozda Ki67 üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir.



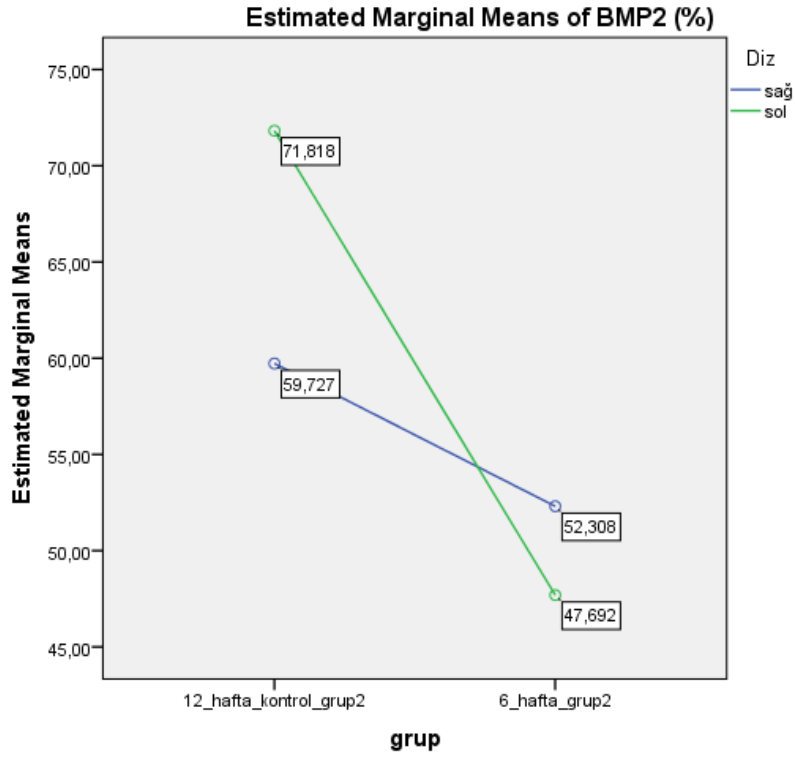
Şekil 31: Kİ67 indeksin gruplararası değerlendirilmesi

VEGF değerleri benzer şekilde karşılaştırıldığında kontrol grubu ile çalışma grupları arasında farkın anlamlı olmadığı ($p=0.655$) buna karşın grup1 ile grup2 arasında VEGF açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir ($p=0.024$). Sonuç olarak sinoviyal dokunun zaman bağımlı olarak VEGF değerlerini anlamlı etki ettiği tespit edilmiştir.



Şekil 32: VEGF değerinin gruplararası değerlendirilmesi

Son olarak BMP2 (%) istatistiksel olarak karşılaştırıldığında kontrol grubu ile çalışma grupları arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Bu bulguya ek olarak grup1 ve grup2 arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p = 0.034$). Sonuç olarak Sinoviyal dokunun yüksek oranda BMP2(%)'ini arttırdığı tespit edilmiştir.



Şekil 33: BMP2 değerlerinin gruplararası değerlendirilmesi

5.TARTIŞMA

Kemik dokusunun canlılığını kaybetmesi sonucu oluşan osteonekroz çok ciddi bir klinik durumdur ve etkili bir şekilde tedavi edilmesi gerekmektedir. Bunun nedeni ilerleyici bir hastalık olması ve erken tedavi edilmediği takdirde zaman içinde subkondral kırıklara ve çökmelere neden olarak sekonder osteoartrit gelişimine neden olması ve buna bağlı olarak da tıbbi harcamalara önemli bir yük getirmesidir. Osteoartrit, günümüzde artan yaşam süreleri ile gittikçe daha sık görülen bir hastalık haline gelmiştir ve bir kez oluştuktan sonra geriye dönük tedavisi mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bu hastalığa neden olabilecek etyolojik faktörlerden bir tanesi olan osteonekrozun erken evrede tanı ve tedavisi çok önemlidir. Bu sayede ileri dönemde gerekecek artroplasti gibi yüksek maliyetli tedavi modalitelerinin önüne geçilebilecektir. İşte bu nedenlerden dolayı, uzmanlık tezi kapsamında çalıştığımız bu bilimsel araştırmanın önemi, hem sinoviyum kullanarak osteonekroz tedavisinde farklı bir yaklaşım sunmak hem de ileride gerçekleştirilecek farklı in-vivo ve klinik çalışmalara öncülük etmesidir. Bu araştırmanın bir başka önemi ise, mezenkimal doku kaynağı olarak sinoviyum kullanılarak, daha düşük maliyetlerle kök hücre tedavilerinin ve doku mühendisliği ile birlikte üretilebilecek olan yapay kemik skafoldlarının in-vivo olarak kullanılmasının önünü açacaktır. Bu nedenle biz de bu konuyu ele alarak sinoviyal dokunun olası osteonekroz iyileştirici etkisini ortaya koyabilmek için deneysel bir hayvan modeli geliştirdik ve sinoviyum greftinin, kontrol grubu ile karşılaştırılarak tavşan modelinde osteonekroz iyileşme potansiyelini değerlendirmeyi amaçladık.

Osteonekroz, hücre ölümü patterni ve kemik rezorpsiyon ve formasyonunu oluşturan kompleks bir tamir mekanizması ile karakterizedir. Yapısal bütünlüğü bozan ve subkondral kırığa neden olan osteonekrozun kendisi değil, tamir mekanizmasının rezorpsiyon fazıdır [26].

Osteonekroz genellikle ileri yaşta görülmesine rağmen, çeşitli etyolojik faktörlere bağlı her yaşta meydana gelebilmektedir. Bir çok son dönem osteoartritli hastanın ise tanısı konulmamış osteonekroza sekonder olduğu düşünülmektedir [18]. Osteonekroz ve osteoartrit yaygın görülen ve tıbbi harcamalara ciddi yük getiren hastalıklardır [25]. Osteonekroz prevelansı tam olarak bilinmemekle beraber sadece ABD’de her yıl ortalama 30.000 kişi yeni tanı almaktadır [14]. ABD’de total kalça artroplastilerinin %10’unun

nedeni olarak gösterilmektedir. Erken dönemde eklem koruyucu tedavileri başarılı sonuç veren bu hastalık, eğer tanı ve tedavi edilmezse yıkıcı sonuçlara neden olmaktadır [15]. Birçok farklı tedavi yönteminin olmasına rağmen en iyi tedavi modalitesinin ne olduğuna dair halen fikir birliğine varılamamıştır. Bu nedenden dolayı biz de bu tez çalışmamızda bu tartışmalı tedavi modalitesi üstüne, farklı bir yaklaşım ile deneysel bir çalışma yapmayı planladık. Oluşturduğumuz hayvan modelinde, Seung Hwan Hong'un tariflediği şekilde ON oluşturulduktan sonra, mezenkimal kök hücre kaynağı olarak sinoviyum içerisindeki mezenkimal kök hücrelerin osteonekroz tamirinde kullanılabilmesini amaçladık.

Literatüre baktığımızda osteonekroz tedavisi için pek çok farklı araştırma bulunmasına rağmen, temel olarak tedavi seçeneklerinin konservatif ve cerrahi tedaviler olarak ayrıldığı görülmektedir. Hiroshi Nakayama'nın yaptığı bir çalışmada koshino stage I olan 30 hasta prospektif olarak incelendiğinde görülmüştür ki erken evre dizin osteonekrozu % 80 oranında konservatif tedaviye cevap vermektedir [20]. Buna rağmen osteonekrozun tedavisinde en uygun tedavi modalitesinin ne olduğu halen tartışmalıdır.

Günümüzde osteonekroz (ON) tedavisinde sıklıkla core-dekompresyon kullanılmakla beraber, Jay R Lieberman'ın yaptığı çalışma göstermiştir ki diz ON'unda core-dekompresyon yapılan hastaların %19.9'unda ikinci kez cerrahiye veya diz artroplastisine ihtiyaç duyulmuştur [17]. Bu çalışma göstermiştir ki core-dekompresyon başarılı bir cerrahi yöntem olmasına rağmen lezyonun büyüklüğü cerrahinin başarı oranını kısıtlamaktadır. Bununla birlikte kemik greftleme prosedürleri sonucunda, femur başının tersine dizde hem subkondral çökme öncesi hem de çökme sonrası başarılı sonuçlar elde edilmiştir [17].

Literatürde osteonekroz tedavisinde farklı alternatifleri karşılaştırmak için birçok farklı hayvan modeli oluşturulmuştur. Bu modellerden en çok kullanılanı ise tavşanlar ile oluşturulan modellerdir. Tavşanların temini kolay, cerrahi sonrası takipleri ve bakımları zor olmayıp maliyetleri düşüktür. Yapılan çalışmalarda farklı modellerde oluşturulan hasarlı bölge çapı değişkenlik göstermektedir. Bu da elde edilen sonuçların karşılaştırılabilir olmasına engel olmaktadır. Yine bu çalışmalarda ortalama takip sürelerinin 16 hafta ile sınırlı olması uzun dönem sonuçların değerlendirilememesine neden olmaktadır [21]. Bu nedenlerden dolayı, literatürdeki hayvan deneylerindeki çalışma gruplarından elde edilen veriler, homojen bir bilgi havuzu oluşturamamakta ve bu nedenle

çalışmalar arası karşılaştırmalı sonuçlar elde etmek zor olmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan tavşan cinsi, sayısı, oluşturulan lezyon büyüklüğü ve cerrahi sonrası takip süresi ise temel olarak literatürdeki çalışmalar ile karşılaştırılabilir düzeydedir.

Dejeneratif hastalıklarda ve yaralanmalarda kök hücre temelli tedaviler son zamanlarda umut verici olarak görünmektedir. Seung'un yaptığı deneysel çalışmada ON oluşturulan tavşanlarda MKH yerleştirilen grupta trabeküler kemik oluşumu, vaskülerite ve yeni kemik iliği oluşumu saptanmıştır [12]. 2002'de Hernigou ve Beaujean femur başı osteonekroz tedavisinde, kemik iliği konsantratını yeni ve başarılı bir tedavi olarak sundular [11]. Gangji ve ark'larının yaptığı prospektif çalışmada osteonekrozu olan hastalar iki grupta incelenmiş ve birinci gruba core-dekompresyon ikinci gruba ise core-dekompresyon ve otolog kemik iliği uygulamıştır. 60. ayda ikinci grupta kırık evresine ilerleme anlamlı olarak daha az olarak bulunmuştur [9]. Bu çalışma sonucunda otolog kemik iliği implantasyonunun osteonekroz tedavisindeki etki mekanizmasının, MKH kaynaklı mı yoksa kemik iliğinin dolaylı olarak anjiogenez ve osteoindüktif etkisinden mi olduğu tam olarak anlaşılamamıştır [3]. Bir başka çalışmada sunulan vakada ise MKH kültürü kullanarak olağanüstü sonuçlar elde ettiler [16].

Mezenkimal kök hücrelerin in-vivo osteojenik farklılaşması tam olarak anlaşılamamış olsa da, MKH'lerin in-vitro osteojenik farklılaşması iyi bir şekilde tanımlanmıştır [2]. Yani bilindiği kadarı ile mezenkimal kök hücreler osteoblast ve osteositlere dönüşerek kemik doku oluşumunda rol oynayabilmektedirler. Mezenkimal kök hücre için periost, adipozdoku ve kemik iliği gibi pek çok farklı kaynak daha önceki çalışmalarda kullanılmıştır. Sinoviyal dokunun da aynı şekilde mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılabilmesi yine farklı çalışmalarda belirtilmiştir. Mezenkimal kök hücreler osteojenik, kondrojenik ve adipojenik differansiyasyon yeteneğine sahip hücrelerdir [23]. Bu nedenle, kök hücrelerin migrasyonu ve differansiyasyonu ile osteojenik özelliklerinden faydalanılarak osteosit hücresi üretebilmek mümkündür. Küçük miktarda sinoviyal dokunun yeteri kadar kök hücre sağlayabildiği de yine literatürdeki çalışmalarda vurgulanmıştır .

Sinoviyal hücrelerin mezenkimal kök hücreler gibi osteojenik potansiyellere sahip oldukları gösterilmiştir [6]. Cosimo ve ark insan dizinden aldıkları sinoviyumu, doku kültür plaklarında deksametazon, beta-gliserofosfat ve askorbik asit varlığında takip ettiler.

Tüm osteojenik kültürlerde alkalen fosfataz seviyelerinde artış olduğu ve osteogenezisin olduğu alizarin kırmızı boyama ile gösterildi. Ayrıca sinoviyumun kıkırdak, kemik, adipöz doku ve kas dokusuna multipotent farklılaşmasını göstermişlerdir [6].

Elena Jones ve ark'larının yaptığı bir çalışma, yeni oluşan kemiğin kökeninin, implante edilen hücrelerin matürasyon durumuna bağlı olduğunu göstermiştir [13]. Osteoblast implante ettiklerinde direkt olarak intramembranöz ossifikasyon gözlenirken mezenkimal kök hücre (MKH) implante ettiklerinde endokondral ossifikasyon gözlenmiştir [29]. MKH'lerin kemik onarımında kullanılmasında esas gerekçe direkt olarak osteoprogenitör ve osteoblast üretmelerine dayanmaktaydı. MKH osteogenezi aynı zamanda bone morfojenik protein 2 (BMP2) veya diğer osteoindüktif büyüme faktörlerinin tanımlanmasıyla daha da ilerledi.

MKH'lerin periost, kemik iliği, sinoviyum, trabeküler kemik ve sinoviyal sıvıda bulunduğu belirtilmiştir [6]. Zheng ve ark sinoviyum kökenli MKH'lerin in-vivo ve in-vitro osteogenezini değerlendiren deneysel bir çalışma yaptılar. Bu çalışma sonucunda sinoviyum kökenli MKH'lerin hem in-vitro hem de in-vivo olarak osteoblastlara dönüşebildiğini gösterdiler [32]. Chen ve ark yaptıkları klinik bir araştırmada mezenkimal kök hücre kullanarak femur başı osteonekrozu olan hastaları takip etmiş, 12. ve 24. ay MRI sonuçları nekrotik doku hacminin anlamlı olarak azaldığını göstermiştir [5].

Biz de bu nedenle çalışmamızda, osteonekroz tedavisinde sinoviyal dokuyu mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanmayı amaçladık. Hipotezimizde, sinoviyumun kök hücre kök hücre kaynağı olacağı ve osteonekroz oluşturulan kemik dokunun sinoviya ile örtülmesinden sonra osteonekrozlu dokuya kök hücre göçü ve kemik doku farklılaşması olacağını kurguladık. Kök hücrelerin osteojenik farklılaşma özelliği sayesinde kemik defektinde osteoblast oluşmasını ve bu sayede de matür osteositlerin osteonekrotik dokunun yerini almasını planladık. Osteonekroz tedavisinde uygun doku ve hücre kaynağı kolay ulaşılabilir, yüksek miktarda üretilebilir ve osteojenik potansiyele sahip olmalıdır. Tüm bu etkenler değerlendirildiğinde sinoviyal membrandan elde edilen mezenkimal kök hücreler, diğer kök hücrelere göre daha üstündür [6; 24; 31].

Sinoviyal membran kökenli mezenkimal kök hücreler multipotent özelliklidir. Bu nedenle osteonekroz tedavisi yanında, uygun şartlar altında kas ve kıkırdak hasarı olan hastalarda da kullanılabilirler.

Yukarıda özetlenen nedenlerden dolayı bizde çalışmamızda sinoviya kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin bu osteojenik özelliklerinden faydalanmak istedik. Bu nedenle sinoviyanın iyi bir mezenkimal kök hücre kaynağı olduğunu düşünmekteyiz. Özellikle diz eklemi gibi büyük sinoviyal eklemlerde fokal kemik hasarlarının tedavisinde kolay ulaşılabilir olması, flap hazırlama için özel donanım ve tekniğe ihtiyaç duyulmaması ve bol olarak bulunması ile geniş defektlere bile uygulanabilmesi ile sinoviyanın diğer mezenkimal kök hücre kaynakları ile karşılaştırıldığında daha avantajlı olduğunu düşünmekteyiz.

6.Sonuç ve Öneriler

- Osteonekroz ve buna bağlı olarak osteoartrit giderek daha sık olarak görülmektedir.
- Osteonekroz tedavisinde birçok yeni yöntem geliştirilmektedir. Bu yöntemlerden biri mezenkimal kök hücre kullanılmasıdır. Bu çalışmada tavşan modelinde mezenkimal kök hücre kaynağı olarak sinoviya kullanılarak osteonekroz üzerine etkisi gösterilmeye çalışılmıştır.
- Defekt yapısı değerlendirildiğinde gruplararası fark anlamlı çıkmamıştır.
- Subkondral kemik yerdeğişim oranı üzerine sinoviya greftlemenin sonuçları 6. ve 12. hafta değerlendirildiğinde anlamlı çıkmıştır. Kontrol grubunda ise bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu durumda sinoviya greftinin osteonekroz tedavisinde kullanılabileceği söylenebilir.
- Tidemark'ın yeniden oluşturulması üzerine değerlendirildiğinde sonuçlar 6. ve 12. haftada anlamlı çıkmamıştır.
- Doku rejenerasyonu açısından değerlendirildiğinde gruplararası , 6. ve 12. haftada sonuçlar anlamlı çıkmıştır.
- Çalışmamızın kısıtlamaları olarak takip süresinin kısıtlılığı ve denek hayvan sayısının azlığı söylenebilir. Diğer kısıtlamalar ise deney sonrası biyomekanik değerlendirmenin yapılamamış olması, immünoflorasan boyama ile ayrıntılı histolojik değerlendirme yapılamaması, farklı anatomik bölgelerde sinoviyal dokunun etkisinin değerlendirilememesi, mezenkimal kök hücre markerları, osteosit ve yeni kalsiyum oluşumunu gösterecek özel boyamalar kullanılamamış olmasıdır. İleride sayılan durumlar göz önünde bulundurularak daha kapsamlı çalışmalar yapılmalıdır.

7.KAYNAKLAR

- 1 Bielby R, Jones E, McGonagle D (2007) The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*, 38 Suppl 1:S26-32
- 2 Birmingham E, Niebur GL, McHugh PE, Shaw G, Barry FP, McNamara LM (2012) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European cells & materials*, 23:13-27
- 3 Bostrom MP, Asnis P (1998) Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research*(355 Suppl):S124-131
- 4 Breer S, Oheim R, Krause M, Marshall RP, Amling M, Barvencik F (2013) Spontaneous osteonecrosis of the knee (SONK). *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*, 21(2):340-345
- 5 Chen C, Qu Z, Yin X, et al. (2016) Efficacy of umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head: A three-year follow-up study. *Molecular medicine reports*, 14(5):4209-4215
- 6 De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism*, 44(8):1928-1942
- 7 De Sousa EB, Casado PL, Moura Neto V, Duarte ME, Aguiar DP (2014) Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem cell research & therapy*, 5(5):112
- 8 Decker RS, Koyama E, Pacifici M (2015) Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. *Current osteoporosis reports*, 13(6):407-414
- 9 Gangji V, De Maertelaer V, Hauzeur JP (2011) Autologous bone marrow cell implantation in the treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head: Five year follow-up of a prospective controlled study. *Bone*, 49(5):1005-1009
- 10 Goodman SB, Hwang KL (2015) Treatment of Secondary Osteonecrosis of the Knee With Local Debridement and Osteoprogenitor Cell Grafting. *The Journal of arthroplasty*, 30(11):1892-1896
- 11 Hernigou P, Beaujean F (2002) Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clinical orthopaedics and related research*(405):14-23

- 12 Hong SH, Shetty AA, Kim SJ, Kim YS, Choi NY, Kim NH (2013) Treatment of osteonecrosis in the knee joint of a rabbit using autologous cultured osteoblasts. *The Journal of surgical research*, 185(2):861-868
- 13 Jones E, Yang X (2011) Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury*, 42(6):562-568
- 14 Jones LC, Hungerford DS (2004) Osteonecrosis: etiology, diagnosis, and treatment. *Current opinion in rheumatology*, 16(4):443-449
- 15 Karim AR, Cherian JJ, Jauregui JJ, Pierce T, Mont MA (2015) Osteonecrosis of the knee: review. *Annals of translational medicine*, 3(1):6
- 16 Kim SJ, Bahk WJ, Chang CH, Jang JD, Suhl KH (2008) Treatment of osteonecrosis of the femoral head using autologous cultured osteoblasts: a case report. *Journal of medical case reports*, 2:58
- 17 Lieberman JR, Varthi AG, Polkowski GG, 2nd (2014) Osteonecrosis of the knee - which joint preservation procedures work? *The Journal of arthroplasty*, 29(1):52-56
- 18 Mont MA, Marker DR, Zywił MG, Carrino JA (2011) Osteonecrosis of the knee and related conditions. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 19(8):482-494
- 19 Moskalewski S, Osiecka-Iwan A, Jankowska-Steifer E, Hyc A (2014) Synovial membrane asks for independence. *Folia morphologica*, 73(4):395-398
- 20 Nakayama H, Iseki T, Kanto R, Daimon T, Kashiwa K, Yoshiya S (2016) Analysis of risk factors for poor prognosis in conservatively managed early-stage spontaneous osteonecrosis of the knee. *The Knee*, 23(1):25-28
- 21 Nehrer S, Spector M, Minas T (1999) Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clinical orthopaedics and related research*(365):149-162
- 22 Ogura H, Ohya K (1995) [Physiology and pharmacology of hard tissues--effect of chemicals on the formation and the resorption mechanism of tooth and bone]. *Nihon yakurigaku zasshi. Folia pharmacologica Japonica*, 105(5):305-318
- 23 Okolicsanyi RK, Camilleri ET, Oikari LE, et al. (2015) Human Mesenchymal Stem Cells Retain Multilineage Differentiation Capacity Including Neural Marker Expression after Extended In Vitro Expansion. *PloS one*, 10(9):e0137255

- 24 Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and rheumatism*, 52(8):2521-2529
- 25 Schindler OS (2011) Current concepts of articular cartilage repair. *Acta orthopaedica Belgica*, 77(6):709-726
- 26 Shah KN, Racine J, Jones LC, Aaron RK (2015) Pathophysiology and risk factors for osteonecrosis. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 8(3):201-209
- 27 Smith MD (2011) The normal synovium. *The open rheumatology journal*, 5:100-106
- 28 Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA (2009) The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, 1(6):461-468
- 29 Tortelli F, Tasso R, Loiacono F, Cancedda R (2010) The development of tissue-engineered bone of different origin through endochondral and intramembranous ossification following the implantation of mesenchymal stem cells and osteoblasts in a murine model. *Biomaterials*, 31(2):242-249
- 30 Tuncay IC, Ozdemir BH, Demirors H, Karaeminogullari O, Tandogan NR (2005) Pedunculated synovium grafts in articular cartilage defects in rabbits. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 18(3):115-122
- 31 Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I (2007) Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and tissue research*, 327(3):449-462
- 32 Zheng W, Yang M, Wu C, Su X (2016) [Experimental Study on Osteogenesis of Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells in Vitro and in Vivo]. *Zhongguo xiu fu chong jian wai ke za zhi = Zhongguo xiufu chongjian waike zazhi = Chinese journal of reparative and reconstructive surgery*, 30(1):102-109