



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜÇ BOYUTLU BİYOYAZICI İLE ÜRETİLEN GRADYAN
HİDROJEL DOKU İSKELESİNİN TAVŞAN DİZİ
OSTEOKONDRAL DEFEKT MODELİNDE REJENERASYON
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Emin Süha DEDEOĞULLARI

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2023**



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ÜÇ BOYUTLU BİYOYAZICI İLE ÜRETİLEN GRADYAN
HİDROJEL DOKU İSKELESİNİN TAVŞAN DİZİ
OSTEOKONDRAL DEFEKT MODELİNDE REJENERASYON
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Emin Süha DEDEOĞULLARI

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI:
PROF. DR. MEHMET AYVAZ**

**ANKARA
2023**

TEŞEKKÜR

Beş yıllık uzmanlık eğitimim boyunca bana destek olan, mesleğimi bütün incelikleriyle öğreten, üzerimde emeği olan başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Ahmet Mazhar Tokgözoğlu olmak üzere bütün öğretim üyelerimize,

Bu çalışmanın başlatılmasından son haline gelmesine kadar her adımda desteğini esirgemeyen, tez öğrencisi olmaktan büyük gurur ve keyif duyduğum, çok değerli bir hoca olmasının yanında çok iyi bir ağabey olan Prof. Dr. Mehmet Ayvaz’a,

Böyle bir çalışmanın varlığını mümkün kılan ve bana değerli vakitlerini ayıran Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü’nden Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu ve Biyomühendislik Anabilim Dalından Doç. Dr. Soner Çakmak’a,

Çalışmanın gerek laboratuvar gerekse de cerrahi aşamalarında çok emekleri olan Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Doktora öğrencileri Sema Coşkun ve Serdar Onat Akbulut’a; çalışmanın histolojik ve radyolojik değerlendirmelerini gerçekleştiren Prof. Dr. Sevil Çaylı, Dr. Öğr. Üyesi Gülben Akcan ve Dr. Öğr. Üyesi Arda Büyüksungur’a,

Cerrahi işlemler boyunca yardımını esirgemeyen değerli meslektaşım Dr. Melih Oral’a; 5 yıllık uzmanlık eğitimim sürecinde birlikte çalışma ayrıcalığına sahip olduğum tüm araştırma görevlisi meslektaşlarıma ve diğer sağlık personeli arkadaşlarıma,

Bu günlere gelmemde maddi ve manevi hiçbir desteği esirgemeyen sevgili annem Nurten Dedeoğulları, babam Faruk Dedeoğulları, kardeşim Enes Dedeoğulları’na; her koşulda yanımda olan ve beni hep destekleyen, çok sevdiğim eşim Rumeysa Dedeoğulları’na,

Sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 1003 programı kapsamında desteklenmiştir. (Proje No: 218E003)

ÖZET

Dedeoğulları, E.S., Üç Boyutlu Biyoyazıcı ile Üretilen Gradyan Hidrojel Doku İskelesinin Tavşan Dizi Osteokondral Defekt Modelinde Rejenerasyon Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023. Doku mühendisliği osteokondral defektlerin (OKD) tedavisinde yaratıcı çözümler sunmaktadır. Üç boyutlu (3-B) biyoyazıcı teknolojisi sayesinde osteokondral dokuyu taklit edebilecek biyomalzemeler üretmek mümkündür. Bu tezin amacı 3-B biyoyazıcı ile üretilen doku iskelelerinin tavşan dizi OKD modeline implantasyonu ve iyileşmedeki etkinliğinin belirlenmesidir. Kitosan temelli doku iskelesi 3-B biyoyazıcı kullanılarak mikroekstrüzyon tekniğiyle gradyan yapıda üretilmiştir. Kıkırdak doku için peptit amfifilleri, kemik doku için nano-hidroksiapatit ve bor katkılı nano-hidroksiapatit kullanılmıştır. Rejeneratif etkinliği arttırmak için insan umbilikal kord mezenkimal kök hücreleri doku iskeleleri içerisine eklenmiştir. In-vivo deneylerde New Zealand White cinsi erkek tavşanlar kullanılmış olup negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK), hücreli hidrojel gradyan iskele (HGİ) ve hücreli hidrojel gradyan iskele (h-HGİ) deney grupları oluşturulmuştur. Post-op 6. ve 12. hafta analizlerinde makroskopik skorlama, mikro BT ve histolojik değerlendirme kullanılmıştır. Makroskopik skorlamada 6. ve 12. haftalarda en düşük ortalama NK grubunda görülürken, en yüksek ortalama PK grubunda görülmüştür. On ikinci haftada HGİ ve h-HGİ grupları PK grubuna yakın sonuçlar vermiştir. HGİ ve h-HGİ gruplarının 12. haftada kemik hacmi/doku hacmi oranı ve kemik mineral dansitesi değerlerinin PK grubundan da yüksek olduğu görülmüştür. Histolojik incelemede; en iyi iyileşme bulguları PK grubunda ikinci olarak ise h-HGİ grubunda gözlenmiştir. h-HGİ grubunda hiyalin benzeri kıkırdak oluşumu gözlenmiştir ancak sonuçlar heterojendir. HGİ grubunda negatif kontrol grubuna kıyasla çok daha iyi kollajen sentezi görülmüştür. Sonuç olarak üretilen doku iskelesi OKD tedavisinde defekt dolumu açısından başarılı sonuçlar göstermiştir. MKH eklenerek iskelenin rejeneratif potansiyeli arttırılmıştır.

Anahtar kelimeler; Osteokondral defekt, gradyan, 3-B yazıcı, doku iskelesi, tavşan
TÜBİTAK 1003 Programı Proje No: 218E003

ABSTRACT

Dedeogullari, E.S., Regenerative Effects of 3-D Bioprinted Gradient Hydrogel Scaffold in Rabbit Knee Osteochondral Defect Model, Hacettepe University Faculty of Medicine, Orthopaedics and Traumatology Thesis, Ankara 2023.

Tissue engineering offers creative solutions in the treatment of osteochondral defects (OCD). Thanks to 3-D bioprinting technology, it is possible to produce tissue scaffolds that can mimic osteochondral tissue. The aim of this study is to implant the 3-D bioprinted scaffold into the rabbit knee OCD model and determine its effectiveness in healing. Chitosan-based tissue scaffold was produced in a gradient structure using microextrusion technique with a 3-D bioprinter. Peptide amphiphiles were used to mimic cartilage tissue, nano-hydroxyapatite and boron-doped nano-hydroxyapatite were used to mimic bone tissue. To increase regenerative efficiency, human umbilical cord mesenchymal stem cells were added to the scaffold. New Zealand White male rabbits were used in in-vivo experiments, and negative control (NK), positive control (PK), acellular hydrogel gradient scaffold (HGI) and cellular hydrogel gradient scaffold (h-HGI) experimental groups were formed. Macroscopic scoring, micro CT and histological evaluation were used in post-operative 6th and 12th week analyses. In macroscopic scoring, the lowest mean was seen in the NK group at the 6th and 12th weeks, while the highest mean was seen in the PK group. At the twelfth week, the HGI and h-HGI groups gave results similar to the PK group. It was observed that the bone volume/tissue volume ratio and bone mineral density values of the HGI and h-HGI groups were higher than the PK group at the 12th week. In histological examination; The best recovery findings were observed in the PK group and second in the h-HGI group. Hyaline-like cartilage formation was observed in the h-HGI group, but the results were heterogeneous. The HGI group showed much better collagen synthesis compared to the negative control group. As a result, the tissue scaffold produced showed successful results in terms of defect filling in the OCD treatment. By adding MSC, the regenerative potential of the scaffold was increased.

Keywords; Osteochondral defect, gradient, 3-D printer, tissue scaffold, rabbit

TUBITAK 1003 Program Project No: 218E003

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Osteokondral Doku	4
2.1.1. Eklem Kıkırdığı	5
2.1.2. Subkondral Kemik.....	6
2.2. Osteokondral Doku Fizyolojik Özellikleri.....	7
2.3. Osteokondral Defektler (OKD).....	7
2.4. Osteokondral Defektlerin Tedavisi	8
2.5. Osteokondral Doku Mühendisliği.....	10
2.5.1. Doku İskeleleri	11
2.5.2. Hücreler	12
2.5.3. Biyoaktif Moleküller	13
2.6. Osteokondral Doku Mühendisliğinde 3-B Biyoyazıcı Kullanımı	15
2.6.1. Biyo-mimetik (Biomimicry).....	15
2.6.2. Otonom Montaj (Autonomous self assembly)	15
2.6.3. Mini-doku Yapı Blokları	16
2.7. Hayvan Osteokondral Defekt Modelleri.....	18
2.7.1. Kemirgenler (Rodentler)	19
2.7.2. Tavşan	20
2.7.3. Büyük Hayvanlar.....	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Hayvan Modeli ve Gruplar	22
3.2. Gradyan Doku İskelelerinin Üretimi	25

3.2.1. İnsan Umbilikal Kord Mezankimal Kök Hücreleri ile Yapılan Çalışmalar	25
3.3. Üç Boyutlu Biyoyazdırma İşlemi	26
3.4. <i>In-vivo</i> Deneyler	27
3.4.1. Tavşan Dizinde Osteokondral Defekt (OKD) Oluşturulması	27
3.4.2. Deneklerin Sakrifiye Edilmesi ve Distal Femurların Diseksiyonu	29
3.5. Yeni Kıkırdak ve Kemik Oluşumunun Değerlendirilmesi	30
3.5.1. Makroskopik Skolama	30
3.5.2. Mikro BT	31
3.5.3. Histolojik Analizler	32
3.6. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR	38
4.1. DAPI ve <i>Live/Dead Assay</i> Analizi	38
4.2. <i>In vivo</i> Deneyler	40
4.2.1. Makroskopik Skolama	40
4.2.2. Mikro BT	42
4.2.3. Histolojik Bulgular	44
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
7. KAYNAKLAR	65

SİMGE VE KISALTMALAR

3-B	: Üç boyutlu
ATR	: Zayıflatılmış toplam yansıma
B-nHAp	: bor katkılı nano-hidroksiapatit
BM-MKH	: kemik iliği kökenli mezankimal kök hücreler
BMP	: kemik morfogenik proteinleri
BrdU	: 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU)
BSA	: bovin serum albümin
BT	: bilgisayarlı tomografi
BV	: kemik hacmi
°C	: santigrat
CaCl ₂ .2H ₂ O	: Kalsiyum klorür dihidrat
CAD	: <i>computer aided design</i>
ChS-NPs	: Kondroitin sülfat nano-partikülleri
cm	: santimetre
cm ²	: santimetre kare
CO ₂	: Karbon dioksit
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	: Dulbecco-Phosphate buffered saline
E	: Glutamik asit
EthD-I	: etidyum homodimer-I
FBS	: fetal bovine serum
FGF	: fibroblast büyüme faktörü
FITC	: floresin izotiyosiyanat
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometre
G	: gauge
g	: gram
GAG	: glukozaminoglikan
GP	: disodyum hidrat
H&E	: hematoksilin-eozin

HGI	: hücre içermeyen hidrojel gradyan iskele
h-HGI	: hücre içeren hidrojel gradyan iskele
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HRP	: streptavidin-horseradish peroksidaz
hUC-MKH	: insan umbilikal kord mezankimal kök hücre
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü,
ICRS	: International Cartilage Repair Society
iv	: intravenöz
im	: intramusküler
K	: Lizin
Kalsein AM	: Kalsein-asetoksimetil Ester, Di-asetat
KCl	: Potasyum klorür
Kg	: kilogram
KMD	: kemik mineral dansitesi
kol-I	: kollajen tip I
kol-II	: kollajen tip II
kPa	: kilopascal
L	: litre
MACI	: matrix induced chondrocyte implantation
mg	: miligram
Mg ⁺²	: magnezyum
MgCl ₂ .6H ₂ O	: Magnezyum klorür heksahidrat
mL	: mililitre
µL	: mikrolitre
mM	: milimol
mm	: milimetre
mm ³	: milimetre küp
MRG	: manyetik rezonans görüntüleme
m/z	: kütle/yük
NaCl	: Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	: Sodyum fosfat monobazik monohidrat
NaHCO ₃	: Sodyum bikarbonat

nHAp	: nano-hidroksiapatit
NK	: negatif kontrol
nm	: nanometre
OKD	: Osteokondral defekt
PA	: Peptit Amfifil
Pa.s	: Paskal-saniye
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PEG	: Poli-etilen glikol
PFA	: paraformaldehit
pH	: <i>potential of hydrogen</i>
PK	: pozitif kontrol
PLA	: Poli-laktik asit
PLGA	: poli(laktik-ko-glikolik asit)
RoI	: Region of Interest
rpm	: dakikadaki devir sayısı
SBF	: Simulated body fluid
SEM	: taramalı elektron mikroskobu
sc	: subkütan
SHC	: sodyum bikarbonat
stl	: <i>stereolithography</i>
TGF	: transforme edici büyüme faktörü
TV	: doku hacmi
UV	: ultraviyole
VoI	: Volume of Interest
v/v	: hacim/hacim
w/v	: ağırlık/hacim
w/w	: ağırlık/ağırlık

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. Osteokondral dokunun yapısı.	4
Şekil 2.2. Eklem kırırdağı hücre dışı matriksi.....	6
Şekil 2.3. Osteokondral ünitenin gradyan yapısı ve fizyolojik özellikleri.....	7
Şekil 2.4. Outerbridge sınıflaması	8
Şekil 2.5. Doku iskelesi dizaynları.	12
Şekil 2.6. Biyoyazıcı teknikleri.....	18
Şekil 3.1. Çalışma iş akışı özeti.	24
Şekil 3.2. (a) 3-B biyoyazıcı kartuşlarındaki farklı biyomürekkepler, (b) gradyan sistem tasarımı.....	27
Şekil 3.3. (a) Cerrahi boyama ve örtme, (b) cilt kesisi sonrası fasya ve kapsül görünümü, (c) patellanın laterale disloke edilmesi sonrası femoral trokleanın görüntüsü.....	28
Şekil 3.4 (a) Punch ile defekt oluşturulması, (b) boş defekt, (c) pozitif kontrol grubunda dokunun tekrar defekte yerleştirilmesi, (d) doku iskelesinin defekte yerleştirilmesi.....	29
Şekil 3.5. (a) Sakrifikasyon sonrası eklem, (b) femur kesisi, (c) distal femur spesimeni.....	30
Şekil 4.1. 3-B Biyoyazıcı kullanılarak üretilen gradyan yapıdaki hidrojel iskele.	38
Şekil 4.2. hUC-MKH içeren B-nHAp formülasyonlarına ait Live/Dead floresan görüntüleri	39
Şekil 4.3. hUC-MKH içeren B-nHAp formülasyonlarına ait DAPI floresan görüntüleri	39
Şekil 4.4. Defekt alanlarının 6. ve 12. hafta sonundaki makroskopik görüntüleri	41
Şekil 4.5. ICRS makroskopik skora 41	41
Şekil 4.6. Defekt alanlarının 6. ve 12. hafta sonundaki Mikro BT görüntüleri	43
Şekil 4.7. Ortalama BV/TV (%) oranı	43
Şekil 4.8. Kemik mineral dansite ortalaması	44
Şekil 4.9. Altı haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı koronal kesitler	45

Şekil 4.10. Altı haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı aksiyel kesitler	46
Şekil 4.11. On iki haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı koronal kesitler	47
Şekil 4.12. On iki haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı aksiyel kesitler	48
Şekil 4.13. O'Driscoll histolojik skollama sonuçları.....	49
Şekil 4.14. ICRS histolojik skollama sonuçları	50
Şekil 4.15. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Safranin-O/Fast-green boyalı kesitler	51
Şekil 4.16. Altı haftalık takiplerde gruplara ait Masson Tri-krom boyalı kesitler.....	52
Şekil 4.17. On iki haftalık takiplerde gruplara ait Masson Tri-krom boyalı kesitler	53
Şekil 4.18. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Agrekan İmmünfloresan (FITC (yeşil işaretli), DAPI (mavi)) boyama kesitleri.....	54
Şekil 4.19. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Kollajen tip 1 İmmünfloresan (FITC (yeşil işaretli), DAPI (mavi)) boyama kesitleri	55
Şekil 4.20. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Kollajen tip 2 İmmünfloresan (Texas Red (kırmızı), DAPI (mavi)) boyama kesitleri.....	56
Şekil 4.21. On iki haftalık takipte gruplara ait BrdU boyalı kesitler	57

TABLÖLAR**Sayfa**

Tablo 2.1. Türlerin yaş, kıkırdak özellikleri ve defekt boyu karşılaştırılması.	19
Tablo 3.1. Deney gruplarına ait bilgiler.	23
Tablo 3.2. ICRS makroskopik skörlama cetveli.....	31
Tablo 3.3. ICRS histolojik skörlama sistemi.....	34
Tablo 3.4. O'Driscoll histolojik skörlama sistemi	35
Tablo 4.1. Gruplara ait ortalama ICRS ve O'Driscoll histolojik skörları.	49



1. GİRİŞ

Osteokondral doku temel olarak iki kısımdan oluşmaktadır: subkondral kemik ve eklem kıkırdığı (1). Bu yapının yaralanması her yaş grubunda görülebilen bir durumdur. Yaralanma mekanizması değişiklik göstermekle birlikte akut travmalar, tekrarlayan mikro-travmalar, vasküler problemler ve yaşla birlikte görülen osteoartrit etiyolojide en sık karşılaşılan nedenlerdir. Bu patolojinin varlığı hastalarda ağrı, eklemden hareket kısıtlılığı, deformite gelişimi gibi semptomlara neden olabilir (2).

Osteokondral defektlerin (OKD) tedavisi; yaş, defektin yeri, çapı ve derinliği gibi faktörlere göre değişiklik göstermektedir (3). Cerrahi tedavi seçenekleri palyatif, onarıcı ve restore edici olarak üç ana başlıkta toplanmaktadır (4). Artroskopik debridman, kondroplastik, lavaj gibi palyatif tedavilerde amaç hastada semptomatik iyileşme olup defektin olduğu bölgede yeni doku oluşumu indüklenmemektedir (5-7). Mikro kırık, abrazyon artroplastisi, subkondral 'drilleme' gibi onarıcı tedavi seçenekleriyle defekt bölgesinde yeni doku oluşumu ve iyileşme amaçlanmaktadır (8-11). Osteokondral otograft/allograft transplantasyonu, mozaikplastik, otolog kondrosit implantasyonu gibi restore edici yöntemlerle defekt bölgesine sağlıklı kıkırdığın transferi veya kondrositlerin implantasyonu ile yeni kıkırdak oluşumu hedeflenmektedir (12-17). Ancak bu yöntemlerle elde edilen tedavi başarısı sınırlıdır ve kendilerine göre dezavantajları vardır (3). Donör bölgede ağrı, enfeksiyon, kanama, cilt problemleri ve iyatrojenik kırık otograft alırken karşılaşılabilecek komplikasyonlardır. Allograftın ise pahalı olması, kolay ulaşılabilir olmaması, hastalık taşıma riski olması, immün reaksiyona neden olma riski gibi dezavantajları mevcuttur. Bu nedenlerle OKD tedavisinde farklı seçeneklere ihtiyaç duyulmaktadır. Ara yüzey doku mühendisliğiyle üretilen doku iskeleleri bu alanda yenilikçi ve etkili çözümler getirmektedir (18).

Doku mühendisliği bir dokunun veya organ sisteminin fonksiyonlarını yenileyen, koruyan veya iyileştiren biyolojik ikamelerin geliştirilmesinde, mühendislik ve yaşam bilimleri temel ilkelerini uygulayan disiplinler arası bir alandır (19). Son yıllarda doku mühendisliği sayesinde osteokondral doku onarımında umut vadeden seçenekler ortaya çıkmıştır (20). Günümüzde 3-B yazıcılar, genom

düzenleme teknolojileri, immün-modülasyon gibi gelişmeler sayesinde doku mühendisliği daha da gelişim göstermektedir.

Birçok farklı dizaynda osteokondral doku iskelesi mevcuttur: monofazik, bifazik, multi-fazik ve gradyan sistemler (21). Bunlar arasında bifazik doku iskeleleri yüzeydeki kıkırdak dokuyu ve derindeki kemik dokuyu taklit etmeleri nedeniyle doku yenilenmesinde oldukça etkilidir. Ancak bifazik doku iskelelerinde zaman zaman instabilite ve çevre dokuya yeterince entegre olamama gibi sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu nedenle her katmana uyum sağlamayı amaçlayan gradyan sistemler geliştirilmektedir (22).

3-B yazdırma sürecinde doğru materyal (biyo-mürekkep) seçimi çok önemlidir (23). Kullanılan materyallerin biyo-uyumlu olmalarının yanı sıra istenilen mekanik ve fonksiyonel özellikleri de sergilemeleri gerekmektedir. Aynı zamanda 3-B yazdırma sürecine de uygun olmalıdır. Üç boyutlu yazıcılarda çoğunlukla doğal polimerler (aljinat, jelatin, kollajen, kitosan, fibrin ve hyaluronik asit vb.) veya sentetik moleküller (polietilen glikol, PEG vb.) kullanılmaktadır (24). Doku iskelesi üretiminde entegre edilecek hücrenin seçimi de dikkat edilmesi gereken diğer bir faktördür. Temel olarak kullanılan hücreler progenitör ve farklılaşmış hücreler olarak iki ana grupta toplanır. Mezenkimal kök hücreler progenitör gruba, kondroblast ve osteoblastlar ise farklılaşmış hücre grubuna örnek olarak verilebilir. Her iki hücre grubunun da başarılı olduğunu belirten yayınlar mevcuttur (25-27).

Doku mühendisliğinde üretilen yeni materyallerin klinik kullanım öncesinde güvenilirlik, uygulanabilirlik ve etkinlik açısından hayvanlarda denenmesi gerekmektedir. Klinik çalışmalar öncesinde uygun hayvan modellerinde insan semptomlarının simüle edilmesi çok önemlidir. OKD modellerinde eklem hacminin cerrahiye uygun olması nedeniyle sıklıkla tavşan diz eklemi tercih edilmektedir (28).

Proje kapsamında 3-B biyoyazıcı ile üretilen hidrojel gradyan doku iskelesinde biyomürekkep olarak subkondral kısımda bor-katkılı nano-hidroksiapatit (B-nHAp) içeren kitosan, kıkırdak kısımda peptit amfifil (PA) kullanılmıştır. Gradyan yapının gereği olarak subkondral kemikten kalsifiye kıkırdağa doğru gidildikçe biyomürekkepteki B-nHAp oranı azalırken, kalsifiye kıkırdaktan yüzey kıkırdağa gidildikçe PA oranı artış göstermiştir. Ayrıca kondrojenik, osteojenik ve adipojenik farklılaşma potansiyeli bulunması ve kolay ulaşılabilir olması nedeniyle insan

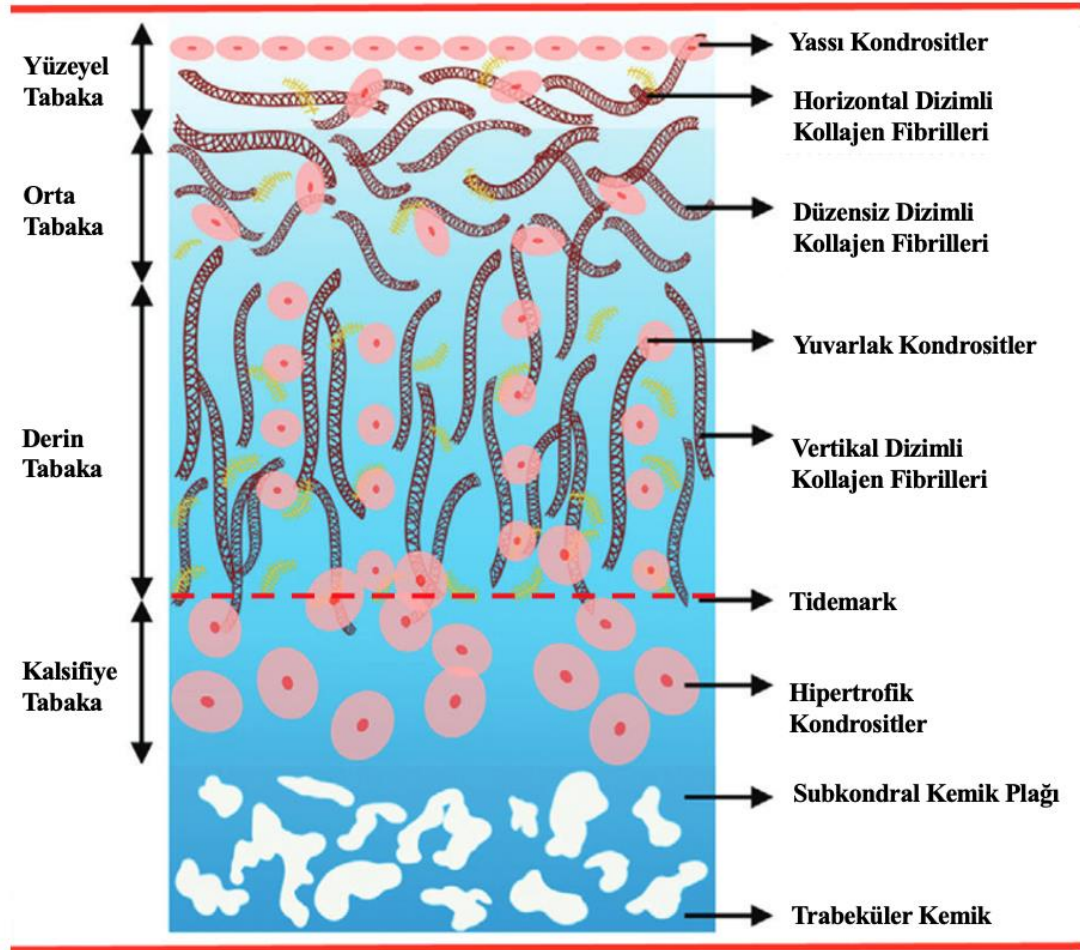
umbilikal kord mezenkimal kök hücreleri (hUC-MKH) iskeleye eklenmiştir (25). Çalışmamızın amacı özgün nitelikleri olan gradyan doku iskelesinin tavşan dizi OKD modelindeki iyileşme etkinliğinin radyolojik ve histolojik olarak araştırılmasıdır. Hipotezimiz, hidrojel iskele gruplarının OKD dolumunda etkili olacağı, iyileşme dokusunun çevre sağlıklı doku morfolojisine benzeyeceği, niceliksel testlerde negatif kontrol grubundan daha yüksek değerler, pozitif kontrol grubuna ise yakın değerler göstereceği yönündedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Osteokondral Doku

Osteokondral ünite; üstte eklem kıkırdağı, ortada kıkırdak-kemik arayüzü ve altta subkondral kemikten oluşmaktadır (1). Kıkırdak kısım da kendi içinde 4 tabakadan oluşmaktadır: yüzeysel bölge, orta bölge, derin bölge ve kalsifiye bölge. Kalsifiye ve kalsifiye olmayan bölge *tidemark* denilen sınırla ayrılmaktadır. Subkondral kemik ise subkondral kemik plağı ve trabeküler kemik olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1).



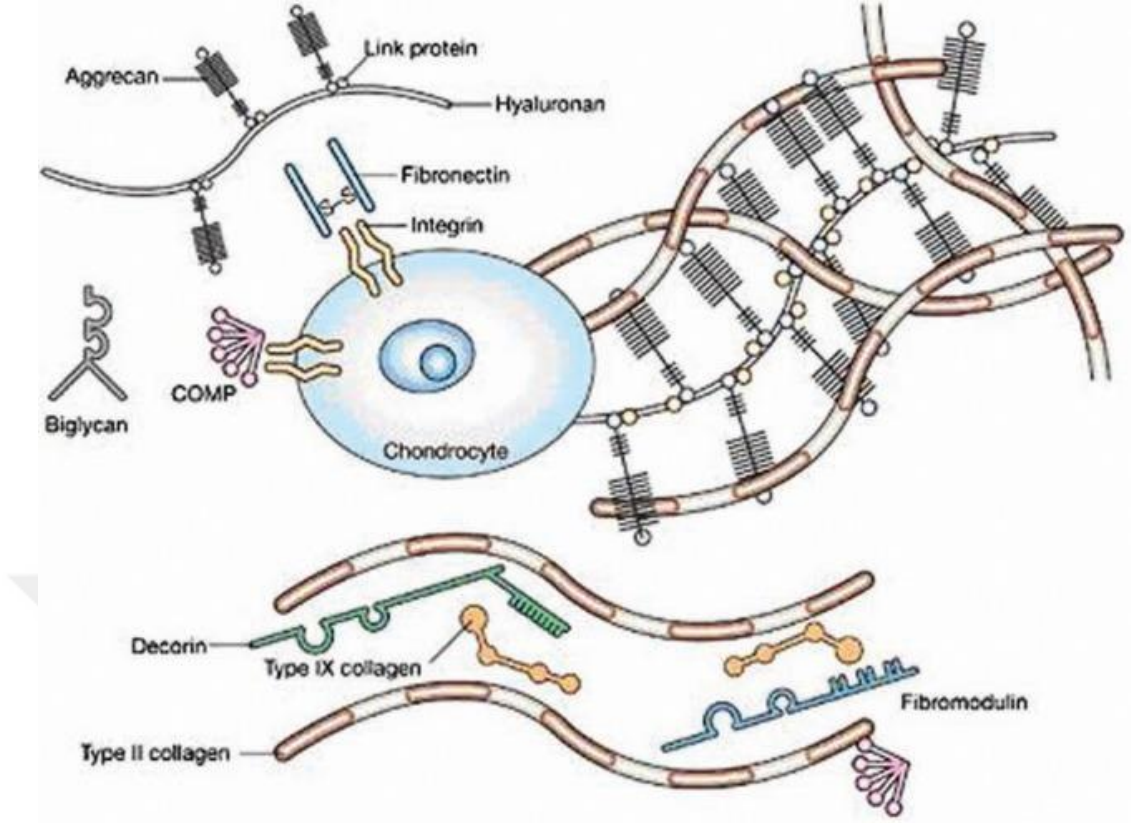
Şekil 2.1. Osteokondral dokunun yapısı, (1)'den değiştirilmiştir.

2.1.1. Eklem Kıkırdağı

Eklem kıkırdağı temel olarak hiyalin kıkırdak yapısındadır. Hücre dışı matriksi tip II kollajen fiberler, proteoglikanlar ve sudan oluşmaktadır (29). Tip II kollajen dışında, az miktarda tip VI, IX, XI kollajen de bulunmaktadır. Proteoglikanlar temelde agrekan bileşiklerinden oluşmaktadır. Bileşikler hyaluronan zincirleri ve agrekan monomerlerinden oluşur (Şekil 2.2). Keratan sülfat ve kondroitin sülfat gibi glukozaminoglikan (GAG) zincirleri ve bazı proteinler de monomerlere bağlı haldedir. GAG zincirleri negatif yüklü olmaları nedeniyle hücre dışı matrikste su tutarak eklem kıkırdağının dayanıklılığına katkı sağlar (30, 31). Matür kıkırdak dokusu damar ve sinir yapıları içermemektedir, sinoviyal sıvı tarafından beslenmektedir.

Eklem kıkırdağındaki 4 tabaka farklı matriks içeriğine sahiptir. Yüzeyel tabakada paralel dizilen yassı kondrositler ve yüksek kollajen miktarı (tip II ve IX) pürüzsüz bir eklem yüzü sağlamaktadır (1). Bu tabaka sinoviyal sıvı ile temas halinde olup kıkırdağın, eklem hareketleri sırasında oluşan makaslama, gerim ve kompresyon gibi güçlere dayanmasında katkı sağlar (32). Orta tabaka yüzeyel ve derin tabaka arasında anatomik ve fonksiyonel bir köprü görevi görmektedir. Eklem kıkırdağının hacminin %40-60'ını oluşturan orta tabakadaki düzensiz kollajen fibrilleri ve kondrositler sayesinde kompresif güçlere direnç göstermektedir (32). Derin tabakada ise yuvarlak kondrositler ve dikey yerleşimli kollajen fibrilleri bulunmaktadır (1). Bu sayede kompresif güçlere en çok direnç gösteren tabakadır. En kalın kollajen fibrilleri, en yoğun proteoglikan konsantrasyonu ve en düşük su oranı derin tabakadadır (32).

Kıkırdaktan subkondral kemik dokusuna geçerken ince bir kalsifiye kıkırdak tabakası mevcuttur. *Tidemark* derin tabakayla kalsifiye kıkırdak tabakasını ayıran sınırdır. Kalsifiye kıkırdak tabakası derin tabakadaki kollajen fibrillerini subkondral kemiğe bağlama görevini üstlenir (1). Bu tabakada hücre yoğunluğu az olup kondrositler hipertroftiktir.



Şekil 2.2. Eklem kıkırdağı hücre dışı matriksi (33).

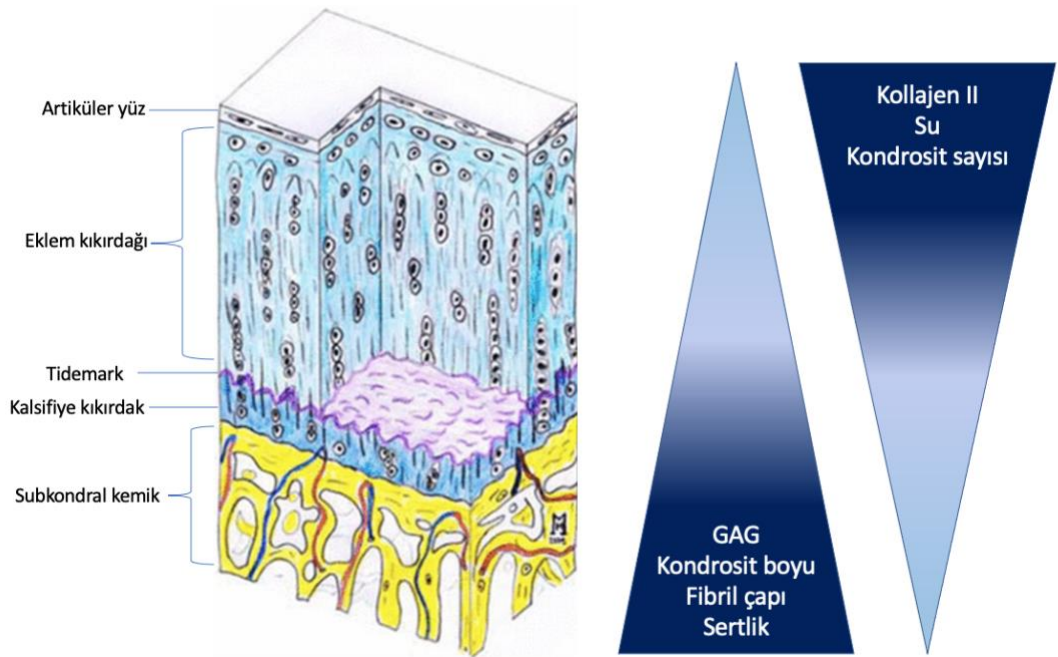
2.1.2. Subkondral Kemik

Yapısındaki subkondral kemik plağı daha kompakt yapıda olup kalsifiye kıkırdak tabakasına komşudur. Trabeküler kemik ise medüller kanala yakın olup 3-boyutlu (3-B) yapısında organize trabeküler yapılar içermektedir. Aralarda ise kemik iliği ve damarlar bulunmaktadır. Subkondral kemiğin temel görevi yükü eklemden kemiğe aktarmak ve kıkırdağa destek olmaktır (1). Bu süreçte subkondral kemik plağı yapısal destek sağlarken, trabeküler kemik elastisite ve şok emilimi sağlamaktadır (34).

Subkondral kemik organik ve inorganik moleküllerden oluşmaktadır. Organik kısımda temel olarak tip I kollajen, proteoglikanlar, GAG'lar ve su bulunmaktadır. İnorganik kısımda ise büyük oranda hidroksiapatit kristalleri bulunmaktadır. Organik moleküller yapıya elastisite sağlarken, inorganik hidroksiapatit katılık sağlamaktadır (35).

2.2. Osteokondral Doku Fizyolojik Özellikleri

Osteokondral ünitenin kendine has gradyan yapısı eklem birçok fonksiyonel özellik kazandırmaktadır. Eklem kıkırdak yüzünden kemiğe doğru; tip I kollajen ve hidroksiapatit miktarı kademeli artar, tip II kollajen ve su miktarı azalır, kompresyon ve elastik modülüs artar, hidrostatik basınç ve viskoz modülüs azalır, kan damarları, geçirgenlik ve porozite artar, difüzyon potansiyeli azalır, glikoz ve oksijen artar (Şekil 2.3) (1).

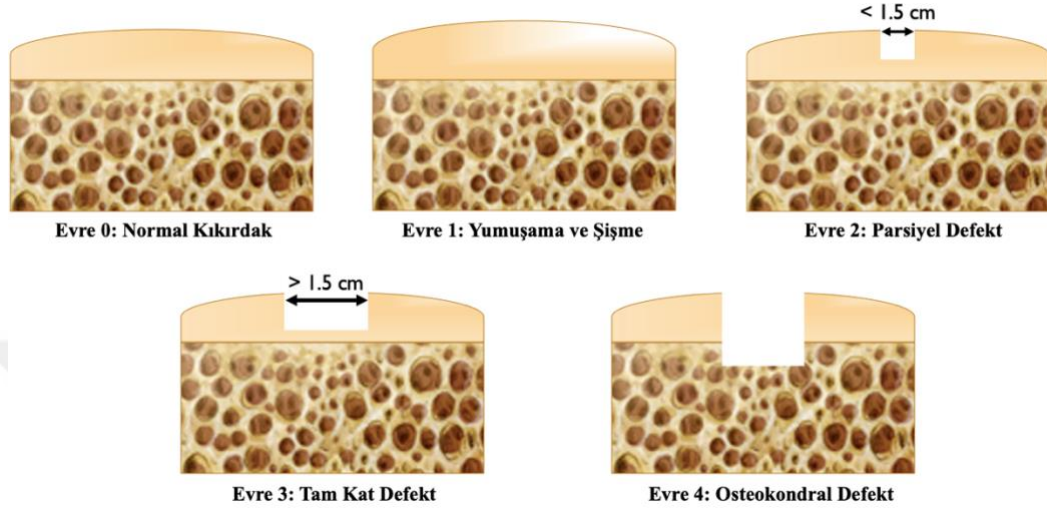


Şekil 2.3. Osteokondral ünitenin gradyan yapısı ve fizyolojik özellikleri (35).

2.3. Osteokondral Defektler (OKD)

Osteokondral yapının parsiyel veya tam kat defektleri her yaşta görülebilmektedir. Bu defektlerin oluşumunda akut travmalar, tekrarlayan mikro-travmalar, vasküler olaylar ve özellikle yaşlanmayla görülen dejeneratif süreçler başlıca nedenlerdendir (36). Kıkırdak dokunun avasküler olması nedeniyle bu defektlerin spontan iyileşmesi oldukça zordur (37). Defektin çapına ve derinliğine göre klinikte uygulanan farklı tedavi yöntemleri mevcuttur. Outerbridge sınıflaması eklem kıkırdak hasarının boyutuna ve derinliğine göre yapılan bir sınıflama olup tedavide yol göstericidir (38, 39). Bu sınıflamada; evre 0 sağlıklı kıkırdak, evre 1 kıkırdakta

yumuşama ve şişme, evre 2 defekt kıkırdakta sınırlı ve çapı 1.5 cm'den küçük, evre 3 defekt kıkırdakta sınırlı ve çapı 1.5 cm'den büyük, evre 4 subkondral kemiğe uzanan defekt şeklinde tarif edilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Outerbridge sınıflaması (39, 40).

2.4. Osteokondral Defektlerin Tedavisi

Günümüzde OKD tedavisinde debridman/kondroplasti, mikro-kırık, otolog kondrosit implantasyonu, otogreft/allogreft kıkırdak transplantasyonu gibi cerrahi yöntemler kullanılmaktadır.

Kondroplastide defekt debride edilerek sınırları pürüzsüz hale getirilir. Bu yöntemde amaç sürtünmeyi azaltarak semptomatik rahatlama sağlamaktır. Kanıt düzeyi yetersiz olmakla birlikte daha çok evre 2-3 defektlere uygulanması önerilmektedir (5). Kıkırdak dokusunun iyileşmesi amaçlanmamaktadır.

Mikro-kırıkta amaç subkondral kemikte delikler açarak kemik iliğini uyarmak ve mezankimal kök hücrelerin yüzeye çıkmasını sağlamaktır (41). Bu şekilde defekte kemik ve fibröz kıkırdak benzeri bir iyileşme dokusu olmaktadır. Ancak fibröz kıkırdak, hiyalin kıkırdağın mekanik özelliklerini göstermemektedir. Bu yöntemle erken dönemde semptomatik rahatlama olabilmesine rağmen uzun dönemde etkili olmamaktadır. On sekiz çalışmadan 1830 kondral defektin dahil edildiği bir derlemede, mikro-kırık sonrası başarısızlık oranı 5 yılda %11-27, 10 yılda %6-32 olarak belirtilmiştir (42). Bu derlemedeki 2 çalışma kontrol artroskopisi (*second-look*)

sonuçlarını bildirmiş olup defekt alanında iyi entegrasyon gösteren fibröz kıkırdak doku gözlenmiştir. Mikro-kırık küçük defektler ve post-operatif beklentisi düşük hastalar için önerilmektedir (9).

Osteokondral otogreft transplantasyonu ve mozaikplasti gibi yöntemlerle defektin, yük taşımayan anatomik bölgelerden (lateral femoral kondil gibi) alınan otogreftlerle doldurulması mümkündür. Bu yöntemlerle defekt direkt olarak hiyalin kıkırdak dokusuyla kapanmış olur ancak aralarda kalan boşluklar çoğunlukla fibröz kıkırdak dokusuyla dolmaktadır. Doğru hasta seçimiyle uzun dönemde başarılı olabilen bir tedavi yöntemidir. Kırk hastalık randomize kontrollü bir çalışmada; 18-50 yaş arası hastalarda femoral kondil veya trokleada, 2-6 cm² büyüklüğünde, semptomatik, tam kat kondral defektlerde mikro-kırık ve mozaikplasti cerrahilerinin sonuçlarını karşılaştırmışlardır (13). Beş, on ve minimum on beş yıllık takip periyotlarında Lysholm diz skorlarında mozaikplasti yapılan grupta mikro-kırık yapılan gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek skor artışı gözlenmiştir. Özellikle 40 yaş üstü, kadın, 3 cm²'den büyük defektler başarıyı olumsuz etkileyen faktörlerdir (43). Cerrahi tekniğin zor olması, donör bölgede morbiditeye (ağrı, enfeksiyon, kırık gibi) sebep olabilmesi bu tedavinin dezavantajlarındandır.

Özellikle büyük defektlerin doldurulmasında osteokondral allo-greftler de bir seçenektir. Taze, taze donmuş, kriyo kadavra dokuları kullanılabilir. Kriyo ve taze donmuş dokuların dondurulması işlemleri kondrositlerin büyük çoğunluğunun kaybına neden olabilmektedir (43). Kısa raf ömrü ve pahalı olması da bu yöntemin diğer dezavantajlarındandır.

Otolog kondrosit implantasyonu ise iki aşamalı bir prosedürdür. İlk aşamada sağlıklı kıkırdak dokusundan biyopsi alınarak kondrositler işleme tabi tutulmaktadır. Hücre kültüründe büyütülen kondrositler ortalama 4 hafta sonra defekte enjekte edilmektedir (44). Kondrositlerin defekt bölgesinde kalmaları için de biyolojik bir örtü kullanılmaktadır. Bu tekniğin ilk jenerasyonunda periost örtüsü kullanılmaktayken ikinci jenerasyonda hayvan kaynaklı kollajen zarlar kullanılmaya başlanmıştır. Üçüncü jenerasyon teknikte, MACI (*matrix induced chondrocyte implantation*), ise kondrositler *in-vitro* ortamda kollajen matriksle birleştirilmektedir. MACI, evre 3-4, 2 cm²'den büyük defektler için önerilmektedir (3). Otolog kondrosit implantasyonu tekniklerin gelişmesiyle daha başarılı hale gelmektedir. İkinci ve üçüncü jenerasyon

otolog kondrosit implantasyonlarını karşılaştıran bir çalışmada, iki yöntemde de fonksiyonel skorlarda anlamlı artış, 1 yıl sonra yapılan kontrol artroskopide iyi-mükemmel ICRS skorları ve alınan biyopsilerde %36-44 hiyalin kıkırdak oluşumu elde edildiği bildirilmiştir (45). Ancak uzun dönem sonuçlarını gösteren kanıt düzeyi yüksek çalışmalara ihtiyaç vardır. Yöntemin 2 kere cerrahi işlem gerektirmesi, pahalı olması, her merkezde uygulanabilir olmaması dezavantajları arasındadır.

OKD tedavisinde bir diğer tedavi seçeneği ise biyo-materyallerin kullanılmasıdır. Günümüzde seçilmiş hasta gruplarında kullanımda olan birkaç farklı tasarım ve içerikte biyomalzeme mevcuttur (46). Verdonk ve ark. 38 hastalık vaka serisinde, tip I kollajen ve hidroksiapatit içeren trifazik bir iskele olan MaioRegen'in (Fineramica, Italy) sonuçlarını paylaşmıştır (47). İki yıllık takipte tatmin edici klinik sonuçlar ve MRG'de defekte dolum olduğunu, %5,3 hastada başarısızlıkla sonuçlandığını belirtmişlerdir. Aynı iskeleyle yapılan başka bir çalışmada 2.5 yıllık takipte %20 başarısızlık oranı, yetersiz kıkırdak ve kemik onarımı bildirilmiştir (48). Klinik kullanımda olan başka bir doku iskelesi Agili-C (CartiHeal, Israel) hücre içermeyen aragonit bazlı bir iskeledir (46). Kon ve ark. Agili-C ile yaptıkları kontrollü klinik çalışmada 12 aylık takip sonunda %84 hastada defektin $\frac{3}{4}$ 'ünün dolduğunu belirtmişlerdir (49). Kullanımda olan sınırlı sayıdaki doku iskelesinin her yerde ulaşılabilir olmaması, pahalı olması, çelişkili ve az sayıda klinik sonuçlarının olması gibi dezavantajları mevcuttur.

OKD'lerin çapına, derinliğine ve hasta özelliklerine göre birçok farklı tedavi yöntemi mevcuttur. Ancak her yöntemin kendi için dezavantajı olması araştırmacıları sürekli yeni tedavi yöntemleri bulmaya itmiştir. Doku mühendisliği osteokondral defektlerin tedavisinde umut verici bir yöntem olarak son yıllarda giderek yaygınlaşmaktadır.

2.5. Osteokondral Doku Mühendisliği

Osteokondral doku mühendisliği bileşenleri temel olarak doku iskeleleri, hücreler ve biyoaktif moleküllerden oluşmaktadır:

2.5.1. Doku İskeleleri

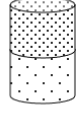
Doku iskeleleri monofazik, bifazik veya trifazik olabilmektedir. Monofazik iskeleler homojen karakter göstermekteyken, bifazik ve trifazik iskelelerle subkondral kemik ve kıkırdığın farklı özellikleri taklit edilmeye çalışılmaktadır (Şekil 2.5).

Monofazik iskeleler tek bir materyalden oluşup yapısı homojendir. Ayrıca tek fazlı iskelelerde tek bir çeşit hücre ve/veya biyoaktif molekül olup yapısı fiziksel, kimyasal ya da biyolojik içeriği malzeme boyunca değişiklik göstermez (21). Doğal osteokondral dokunun her katmanda farklı mikro-çevreye sahip olduğu dikkate alındığında monofazik iskelelerle kısıtlı bir iyileşme sağlanabilmektedir. Chu ve ark. (50) tavşan osteokondral modelinde perikondrosit yüklü PLA (polilaktik asit) monofazik iskele kullanmışlar ve uzun dönem sonuçlarını yayınlamışlardır. Bu çalışma sonunda defekt büyük ölçüde kıkırdak benzeri bir iyileşme dokusuyla dolmuştur. Ancak subkondral kemik katmanında yeterli mikro çevre oluşmamıştır.

Bifazik ve multi-fazik doku iskeleleriyle osteokondral yapının farklı tabakaları taklit edilmeye çalışılmaktadır. Bu tasarımlarda kıkırdak doku için yumuşak polimerler ve hidrojel kullanılabilmektedir. Subkondral kemik doku için ise katı materyaller tercih edilebilir (1). Günümüzde farklı dizayn ve içeriğe sahip birçok bifazik ve multi-fazik doku iskelesi üretilmektedir ve bir kısmı umut vadeden sonuçlar vermiştir. Chen ve ark. (51) tarafından üretilen bifazik doku iskelesi başarılı sonuçlar vermiştir. Bu iskelede üst katmanda kollajen, alt katmanda ise kollajen/PLGA (poli(laktik-ko-glikolik asit)) kullanılmıştır. Aynı zamanda kemik iliği kökenli mezankimal kök hücreler (BM-MKH) iskeleye eklenmiştir. Çalışma sonunda defekt bölgesinde oluşan iyileşme dokusunun pürüzsüz bir yüzey oluşturduğu ve çevre dokuya entegre olduğu görülmüştür. Histolojik incelemelerde de kıkırdak ve kemik katmanlarında çevre dokulara benzer iyileşme dokuları olduğu görülmüştür.

Osteokondral ünitenin biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla doku iskeleleri de bu yönde geliştirilmeye çalışılmaktadır. Son yıllarda osteokondral ünitenin yapısı boyunca gösterdiği kademeli değişime uyum sağlayacak gradyan doku iskeleleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Gradyan doku iskelelerinde temel olarak fiziksel yapısının, içeriğinin veya biyoaktif molekül dozlarının malzeme boyunca süreklilik içerecek şekilde değişim göstermesi amaçlanmaktadır. Örneğin gözenek büyüklüğü kıkırdaktan kemiğe geçerken azalma gösterebilmektedir. Büyük gözenekler

kondrogenez için daha uygun ortam sağlarken, küçük gözenekler ise kemik dokuda daha iyi mekanik stabilite sağlamaktadır (52, 53). Radhakrishnan ve ark. (54) tarafından geliştirilen nHAp/ChS-NPs (nano-hidroksiapatit/Kondroitin sülfat nanopartikülleri) gradyan hidrojel, hiyalin kırıkta iyileşmesinde ve subkondral kemik mineralizasyonunda başarılı sonuçlar göstermiştir.

Doku iskelesi modeli	Dizayn	Özellik
Monofazik		Tüm katmanlar malzeme, geometri, biyoaktif ajan, hücre, por yapısı vb. özellikler açısından homojendir
Bifazik		Genellikle kırıkta doku ve kemik doku için üretilmiş iki farklı katman olup katmanlar kendi içinde homojendir
Trifazik		Genellikle kırıkta doku, arayüz ve kemik doku için üretilmiş üç farklı katman olup katmanlar kendi içinde homojendir
Gradyan		Sınırları keskin katman ayrımı olmayıp, her seviyede farklı içerik, por mimarisi, hücre çeşidi, biyoaktif ajan konsantrasyonu vb. barındırır

Şekil 2.5. Doku iskelesi dizaynları.

2.5.2. Hücreler

Kırıkta dokunun kendini tamir edebilme yeteneği çok kısıtlıdır (55). Dokunun rejenerasyon kapasitesini arttırabilmek için doku iskelesi modellerine mezenkimal kök hücrelerin (MKH) eklenmesi birçok çalışma tarafından önerilmektedir (56-59). Osteokondral doku iskelelerinde genellikle iki tip hücre kullanılmaktadır: progenitör ve farklılaşmış hücreler (21). Progenitör (öncül) hücreler, kök hücreler olup birçok farklı hücre tipine farklılaşma potansiyeline sahiptir. Farklılaşmış hücreler ise matür dokunun temel hücrelerini oluşturma yeteneğine sahip hücrelerdir; kırıkta için kondroblastlar, kemik için osteoblastlar örnek olarak verilebilir.

Doku mühendisliğinde kullanılabilecek birçok hücre kaynağı mevcuttur: eklem kırıktaından elde edilen kondrositler, kemikten elde edilen osteoblastlar, kemik iliği kökenli kök hücreler, umbilikal kord kökenli kök hücreler, eklem sıvısı

kökenli kök hücreler, vb. (21). Bu hücre kaynakları allogreft kaynaklı olabileceği gibi *ksenogreft* kaynaklı da olabilmektedir. Literatürde kondrosit kullanılan osteokondral doku iskeleleriyle başarılı sonuçlar elde edilmiştir (60). Ancak kondrosit elde etme işleminin zahmetli olması, elde edilen hücre sayısının az olması, çoğalma yeteneğinin düşük olması nedeniyle MKH kullanımı giderek yaygınlaşmıştır (61). MKH kondrojenik, osteojenik, adipojenik farklılaşma ve yüksek proliferasyon kapasitesine sahiptir. Ayrıca lokal biyokimyasal uyarıcılara cevap vererek doku iyileşmesi için gerekli büyüme faktörlerini üretebilmektedir (61). Duan ve ark. (62) ürettikleri PLGA bazlı bifazik iskelede, tavşan BM-MKH kullanmışlardır. Oluşturdukları tavşan OKD modelinde iskeleleri implante etmişlerdir. Yirmi dört haftalık takip süresi sonunda hücre içeren doku iskelesi kullanılan grupta histolojik skorlar sağlıklı dokuya yakın bulunmuştur.

Son zamanlarda non-invaziv elde edilebilmesi, çok sayıda hücre içermesi ve hipo-immünojenik özellikleri nedeniyle insan umbilikal kord mezankimal kök hücreleri (hUC-MKH) de kullanılabilmektedir (63). Park ve ark. (64) ürettikleri hyaluronik asit temelli hidrojelde hUC-MKH kullanmışlardır. On altı haftalık takip sonrası hücreli hidrojellerde hücresizlere göre daha üstün doku rejenerasyonu görülmüştür.

2.5.3. Biyoaktif Moleküller

Kemik ve kıkırdak dokusunun yenilenmesi sürecinde biyoaktif moleküller hücre bölünmesini, migrasyonunu, farklılaşmasını ve matürasyonunu uyarır. Bu nedenle çeşitli biyoaktif moleküller doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Mineraller, biyolojik büyüme faktörleri, hücre içi sinyal molekülleri biyoaktif moleküllere örnek olarak verilebilir (1).

Wang ve ark. (65) tarafından *ex-vivo* şartlarda yüksek doz Mg^{+2} iyonlarının kök hücrelerde kondrogenezi ve osteogenezi uyardığı gösterilmiştir. Birçok çalışmada büyüme faktörlerinin osteokondral doku iyileşmesinde etkili olduğu bulunmuştur. İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF), kemik morfogenezik proteinleri (BMP), fibroblast büyüme faktörü (FGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF) literatürde kullanılan bazı biyoaktif moleküllerdendir. Gugjoo ve ark. (66) yaptıkları çalışmada IGF-1 ve TGF- β 1 içeren hidrojelleri tavşan OKD modeline yerleştirmişlerdir.

Büyüme faktörü içeren grupta oluşan iyileşme dokusunun proteoglikan miktarı, hücre dizilimi ve subkondral kemik oluşumu açısından gelişme gösterdiğini belirtmişlerdir.

Kemik, temel olarak hidroksiapatit, tip I kollajen ve diğer suda çözünmüş organik moleküllerden oluşan; kompleks ve hiyerarşik bir yapıya sahiptir. Hidroksiapatit kemiğin ana inorganik bileşenidir. Kimyasal olarak sentezlenen nano-hidroksiapatit (nHAp) ise biyo-uyumlu olması ve kemiğe yüksek oranda entegre olabilmesi nedeniyle kemik ilişkili doku mühendisliğinde sıkça kullanılmaktadır (67). Ancak kırığa karşı düşük direnç, düşük yorulma dayanımı ve kırılabilirlik gibi mekanik özellikleri hidroksiapatitle ilgili karşılaşılan problemlerdendir. nHAp/polimer bazlı bileşikler bu problemlere etkili çözümler getirebilmektedir (68). nHAp/kitosan bileşiği kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kitosanın por oluşturma, anyonlara bağlanma, anti bakteriyel ve biyo-çözünür özellikleri birçok çalışmada gösterilmiştir. Bunların yanında nHAp/kitosan bileşikler daha güçlü mekanik özellikler göstererek doğal kemik yapısını taklit edebilmektedir (67). Tamai ve ark. (69) hidroksiapatit/poli-d, l-laktik asit (PLA)/polietilen glikol (PEG)/kemik morfogenetik protein 2 (BMP-2) içeren doku iskelesini tavşan OKD modeline yerleştirmiştir. Altıncı haftada defekte tama yakın iyileşme bildirmişlerdir. Bu çalışmada erken dönemde bile hidroksiapatit doku iskelesinin porları içinde belirgin kemik doku oluşumu gözlenmiştir. Başka bir *in-vivo* çalışmada nHAp/kitosan bileşiği yalnızca kitosan içeren iskeleye göre daha üstün kemik iyileşmesi sağlamıştır (70). Bu çalışmada da tavşan OKD modeli kullanılmıştır.

Bor da osteokondral doku iskelesi üretiminde kullanılabilecek biyoaktif bir maddedir. Gök ve ark. (71) tarafından yapılan bir çalışmada tavşan OKD modelinde eklem içi borik asit enjeksiyonunun etkileri incelenmiştir. Tedavi grubunda kontrol grubuna göre hem makroskobik hem de mikroskobik analizlerde daha iyi iyileşme gözlenmiştir. Başka bir çalışmada ise borun OKD uygulamalarındaki antioksidan etkisi vurgulanmıştır (72). Gümüşderelioğlu ve ark. (73) bor katkılı kitosan nano-partikülleri içeren doku iskelesiyle yaptıkları çalışmada, borun pre-osteoblastik hücrelerde farklılaşmayı ve çoğalmayı uyarak osteoindüktif özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise bor katkılı nHAp kaplı kitosan doku iskelelerinin *in vitro* özellikleri incelenmiştir (74). Hücre kültür deneyleri sonucunda iskeleden salınan borun öncü hücrelerde çoğalmayı ve osteoblastik farklılaşmayı

arttırdığı belirtilmiştir. *In-vivo* şartlarda yapılan bir çalışmada ise sıçanlarda parietal kemik defekti oluşturularak farklı içeriklerdeki hidrojel implantları edilmektedir (75). İyileşme makroskobik, histolojik ve mikro BT ile değerlendirilmiştir. Dört aylık takip süresinin sonunda bor katkılı nHAp içeren hidrojel grubunda en yüksek oranda mineralize matriks oluşumu ve histolojik iyileşme skoru bildirilmiştir.

2.6. Osteokondral Doku Mühendisliğinde 3-B Biyoyazıcı Kullanımı

3-B biyoyazdırma, biyolojik yapıların katman katman üretimi için “biyomürekkep (bioink)” denilen materyalleri kullanan eklemeli (additive) bir üretim çeşididir. Biyomürekkepler biyo-uyumlu olup hücreler, büyüme faktörleri, biyomolekülleri içerebilmektedir (1). Son yıllarda 3-B biyoyazdırma doku mühendisliği alanında giderek geniş yer bulmaktadır. Konvansiyonel üretim yöntemlerine kıyasla, osteokondral doku iskelelerine 3-B biyoyazdırmayla doğal doku içeriğine ve fiziksel yapısına benzer özellikler kazandırılmaktadır.

3-B biyoyazdırma için temel olarak üç farklı yaklaşım mevcuttur: Biyo-mimetik, otonom montaj, mini-doku yapı blokları.

2.6.1. Biyo-mimetik (Biomimicry)

Bu yöntemde doku veya organ sistemlerinin hücresel ve hücre dışı özelliklerini taklit etmek amaçlanır. Bu yöntemin başarılı olması için dokuların mikro düzeyde taklit edilmesi önemlidir. Bu nedenle mikro-çevreyi, fonksiyonel ve destek hücrelerini, hücre dışı matriksin elemanlarını iyi anlamak gerekmektedir. Fizyolojik olarak doğal dokulara benzerlik gösteren biyomateryaller bu yöntemle üretilmektedir (76).

2.6.2. Otonom Montaj (Autonomous self assembly)

Bu yöntemde embriyolojik organ gelişimi rehber olarak kullanılır. Öncü hücreler uygun hücre sinyalleriyle kendi hücre dışı matriksini üretmektedir ve fonksiyonel hale gelmektedir. Otonom montaj yöntemine, öncü hücreleri içeren kürelerin kullanılarak histogenez indüklenmesi örnek olarak verilebilir (77).

2.6.3. Mini-doku Yapı Blokları

Bu yöntemde organların en küçük fonksiyonel birimlerinin, örneğin: böbrek nefronu, üretilmesi amaçlanmaktadır. Daha sonra üretilen mini-dokular birleştirilerek büyük organ sistemlerinin oluşturulması amaçlanmaktadır. Üretilen vasküler yapıların sonrasında birleştirilerek geniş bir vasküler ağ oluşturulması bu yönetime örnek olarak verilebilir (78).

3-B biyoyazdırma işlemi temelde 5 aşamadan oluşmaktadır:

- 1) 3-B görüntüleme (MRG, BT, vb.): Üretilecek dokunun tam olarak boyut ve 3-B yapısı bu şekilde elde edilmektedir.
- 2) 3-B modelleme: Üretilecek dokunun 3-B modeli yazılım yardımıyla çizilerek 3-B biyoyazıcıya uyumlu formata getirilmektedir.
- 3) Biyomürekkep üretimi: Biyomürekkepler genellikle bir biyo-uyumlu malzeme, hücreler ve biyoaktif moleküllerden oluşmaktadır. Üç boyutlu yazdırma sürecinde doğru materyal (biyomürekkep) seçimi çok önemlidir. Kullanılan materyallerin biyo-uyumlu olmalarının yanı sıra istenilen mekanik ve fonksiyonel özellikleri de sergilemeleri gerekmektedir. Aynı zamanda 3-B biyoyazdırma sürecine de uygun olmalıdırlar (1). Üç boyutlu biyoyazıcılarda çoğunlukla doğal polimerler (aljinat, jelatin, kollajen, kitosan, fibrin ve hyaluronik asit vb.) veya sentetik moleküller (polietilen glikol, PEG vb.) kullanılmaktadır. Doğal polimerlerin avantajı hücre dışı matrikse benzerlik göstermeleri ve kendiliğinden biyoaktif olmalarıdır. Sentetik polimerlerin ise amaca yönelik olarak spesifik fiziksel özellikleri ayarlanabilmektedir. Ancak biyo-uyumluluklarının düşük olması, toksik yıkım ürünleri oluşturmaları ve biyo-çözünme sırasında mekanik özelliklerini kaybetmeleri dezavantajları arasındadır (79).
- 4) Yazdırma: 3-B biyoyazıcılar yazılıma yüklenen dizayna uygun şekilde viskoz sıvı kıvamındaki biyomürekkebi katman katman işlemektedir. Birçok farklı türde 3-B biyoyazıcı mevcuttur. Bunlar; inkjet, mikro-ekstrüzyon, lazer destekli yazıcı olarak sıralanabilir (Şekil 2.6).

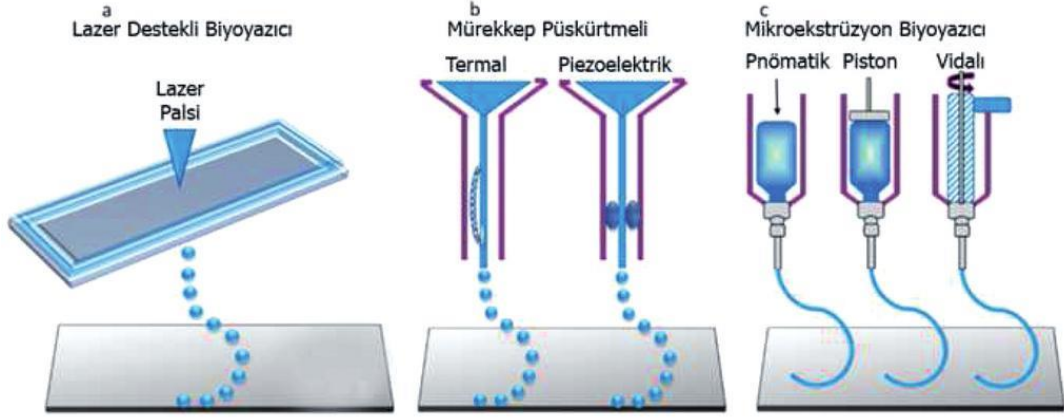
Inkjet biyoyazıcılar birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Belirli hacimdeki sıvı, kontrollü olarak damlacık halinde yazdırılmaktadır. Damlama için termal veya akustik kuvvetler kullanılabilir. Ucuz ve

kolay ulaşılabilir olması, yüksek çözünürlükte hızlı yazdırma yapabilmesi inkjet sistemlerinin avantajlarından (79). Ayrıca damlacıkların boy ve yoğunlukları değiştirilerek katmanlar arasında gradyan geçiş sağlamak da mümkün olabilmektedir. Materyal ve hücreleri termal ve mekanik strese maruz bırakması, damlacıkların farklı boyutlarda olabilmesi, nozülün sık tıkanması bu biyoyazıcıların dezavantajlarından (79).

Ekstrüzyon biyoyazıcılar damlama sistemi yerine biyomürekkebin sürekli akışıyla çalışmaktadır. Ekstrüzyon genellikle pnömatik veya mekanik (piston veya vida) dağıtıcılarla sağlanmaktadır (79). Pnömatik sistemlerdeki sıkıştırılmış gaz hacmine ulaşmada gecikmeler olabileceği için mekanik sistemler akış üzerinde daha direkt kontrol sağlayabilmektedir. Bazı modellerdeki çoklu yazdırma başlıkları sayesinde aynı anda birden fazla biyomateryal kullanılabilir (80). Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcıların en büyük avantajı yüksek hücre yoğunluğuyla ve yüksek viskozitedeki biyomürekkeplerle yazdırma yapabilmesidir. Basıncın düşürülmesi ve nozül çapının büyütülmesiyle hücre canlılığı da arttırılabilmektedir (81).

Lazer destekli biyoyazıcılar biyomürekkebin ilettilmesinde bir lazer kaynağı kullanmaktadır. İlk olarak metallerin ilettilmesi için geliştirilen bu sistem, biyolojik materyallere de uygulanmaya başlanmıştır (82). Bu sistemle yüksek çözünürlükte yazdırma yapmak mümkündür ve nozül kullanmadığı için sık sık tıkanma gibi bir problemi yoktur. Bu avantajlarına karşın; pahalı olması, göreceli düşük akış hızına sahip olması, yazdırma sürecinin meşakkatli olması, lazerin buharlaştırma etkisi nedeniyle biyomateryalin metal partikülleriyle kontaminasyon riskinin olması bu sistemin kullanımını kısıtlamaktadır (83).

- 5) Katılaştırma: Yazdırma sürecinde akışkan yapıda olan biyomürekkeplerin sonrasında katı yapısını kazanması gerekmektedir. Çapraz bağlama olarak da bilinen bu işlem ısı, ultraviyole (UV) ışınları veya spesifik kimyasallar kullanılarak yapılabilmektedir (1).



Şekil 2.6. Biyoyazıcı teknikleri (84).

2.7. Hayvan Osteokondral Defekt Modelleri

Biyomalzemeler insanlarda kullanılmaya başlamadan önce, etkin ve güvenli bir şekilde çalıştığından emin olmak için hem *in vitro* hem de *in vivo* şartlarda test edilmelidir. Bu nedenle uygun bir hayvan modeli oluşturmak, biyomalzemelerin mekanik özelliklerini ve biyouyumluluğunu değerlendirirken vazgeçilmez bir adımdır (85). Denetleyici kurumlar da yeni üretilen biyomalzemelerin klinik kullanımdan önce hayvan çalışmalarının yapılmasını zorunlu tutmaktadır.

Test modeli olarak belirli bir hayvan türünün seçilmesi için çeşitli faktörlerin dikkate alınması gerekir. Her şeyden önce, seçilen hayvan modeli, insanlara hem fizyolojik hem de patofizyolojik benzerlikler göstermelidir (85). İkinci olarak, denek olarak kullanılacak hayvanların operasyona ve post-operatif takibe uygun olmaları gerekmektedir (86). Satın alma ve bakım maliyetleri, kolay temin edilebilme, kafes yaşamına kolay adapte olması ve bakım kolaylığı diğer seçim kriterleri arasında sayılabilir (87). Bunların dışında test edilecek biyomalzemenin boyutu, hayvan başına kullanılacak olan biyomalzeme sayısı, deneyin süresi ve potansiyel biyolojik yanıtlar açısından türlerin farklılıklarının da dikkate alınması gerekmektedir (88).

OKD modelinde küçük hayvan olarak sıçan ve tavşan kullanılırken; büyük hayvan olarak köpek, domuz, koyun, keçi ve at kullanılmaktadır. Her hayvanın kendine özgü avantaj ve dezavantajları olabilmektedir. Küçük hayvanların ucuz olması, temininin ve bakımının kolay olması, anestezi ve cerrahisinin göreceli kolay olması başlıca avantajlarıdır. Ancak diz hacimlerinin küçük olması kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Büyük hayvanların diz hacimleri insana yakın olmasına karşın,

pahalı olmaları, daha kompleks anestezi ve cerrahi prosedür gerektirmeleri ve etik kurul onayı sürecindeki zorluklar dezavantajlarından (28).

Deney hayvanı OKD modellerinde önem verilmesi gereken diğer bir faktör kritik defekt boyudur. Kritik defekt boyu spontan iyileşmenin beklenmediği en küçük defekt çapı olarak tanımlanmaktadır. Kritik defekt boyu türlere göre değişiklik göstermektedir (89, 90). Tablo 2.1’de farklı türlere ait kritik defekt boyları verilmiştir.

Tablo 2.1. Türlerin yaş, kıkırdak özellikleri ve defekt boyu karşılaştırılması (28).

Tür	İskelet olgunluğu yaşı	Kıkırdak kalınlığı	Kıkırdak hacmi	Kritik defekt boyu	Yaygın defekt ölçüleri
Sıçan	7 ay	0.1 mm	2.17 mm ³	1.4 mm	1.0-2.0 mm
Tavşan	9 ay	0.25-0.75 mm	53 mm ³	3.0 mm	3.0-5.0 mm
Köpek	12-24 ay	0.95 mm	82.39 mm ³	4.0 mm	10-12 mm
Domuz	18 ay	1.5 mm	107.47 mm ³	6.3 mm	8-10 mm
Koyun	2-3 yıl	0.45 mm	359.54 mm ³	7.0 mm	6-13 mm
Keçi	2-3 yıl	1.1 mm	251.65 mm ³	6.0 mm	6-12 mm
At	2-4 yıl	1.75 mm	334.73 mm ³	9.0 mm	10 mm
Maymun	10 yıl	0.5-0.7 mm	-	-	2.0-4.0 mm
İnsan	18-22 yıl	2.35 mm	552.25 mm ³	-	-

2.7.1. Kemirgenler (Rodentler)

Fare ve sıçan gibi kemirgenler, üreme ve barınma koşullarının kolay olması, laboratuvar koşullarında çoğaltılarak biyolojik değişkenliğin azaltılması ve ucuz olmaları nedeniyle çalışmalarda tercih edilmektedir (91). İmplant biyo-çözünürlüğü ve güvenliği hakkında değerli veriler elde edilebilirken diz hacminin küçük ve kıkırdak tabakasının ince olması nedeniyle doku iskelelerinin kıkırdak onarımı değerlendirmeleri için sınırlı sonuçlar vermektedir (91). Ancak yine de literatürde sıçan OKD modeliyle yapılmış çalışmalar mevcuttur. Xu ve ark. (92) kitosan/kitosan- β -Trikalsiyum fosfat içerikli çift katmanlı doku iskelesini, erişkin sıçanlarda trokleada oluşturdukları 1.5 mm çap ve 3.0 mm derinliğindeki defektlere implante etmişlerdir. Bu çalışmada 280-300 g arası, erkek, Sprague Dawley cinsi sıçanlar kullanılmıştır. Hayvanlar 6. ve 12. haftalarda kurban edilmiştir. Doku iyileşmesinin değerlendirilmesinde ICRS makroskopik skorlama, mikro-bilgisayarlı tomografi (BT) ve histolojik analiz yapılmıştır (92).

2.7.2. Tavşan

Tavşanlar küçük hayvanlar arasında diz hacimlerinin göreceli büyük olması nedeniyle OKD modeli çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (93). Tavşanlar iskelet olgunluğuna ortalama 9 ayda ulaşırken, deneylerde genellikle 3-8 aylık tavşanlar tercih edilmektedir. Biyomalzeme çalışmalarının büyük bir bölümünde deney süresi 16 haftaya kadar seçilmiş olup takip süresi 1 yıla kadar uzayan sınırlı sayıda çalışma da mevcuttur (94). Tam yük taşıyan modeller için medial femoral kondil, parsiyel yük taşıyan defektler içinse troklea seçilmektedir (94). Literatürdeki benzer modellerde defekt boyu olarak 3-5 mm çap ile 2-5 mm derinlik sıklıkla kullanılmaktadır (28). Levingstone ve ark. (95) tip I kollajen, tip II kollajen, hyaluronik asit ve hidroksiapatit içeren multi-fazik doku iskelesi için 9 aylık, 2.8-3.6 kg aralığında değişen, dişi Yeni Zelanda Beyaz tavşanları kullanmışlardır. Femur medial kondilde 3 mm çapında, 5 mm derinliğinde OKD oluşturmuşlardır. İskeleler defektlere *press-fit* şekilde implante edilmiştir. Hayvanlar 12. haftada sakrifiye edilerek iyileşmenin değerlendirilmesi için ICRS makroskopik skorlaması, mikro-BT ve histolojik analiz yapılmıştır. Bir başka çalışmada ise Gong ve ark. (96) interlökin-4 yüklü, 3-B biyoyazdırılmış, bifazik doku iskelesi için 2.5-3.0 kg aralığında, erkek, Yeni Zelanda Beyaz tavşanları kullanmışlardır. Bu çalışmada takip süresi olarak 8. ve 16. haftalar seçilmiştir. İyileşme ICRS makroskopik skorlama, mikro-BT, biyomekanik testler ve histolojik analiz ile değerlendirilmiştir. Her iki çalışmada da negatif kontrol grubu olarak boş defekt kullanılmıştır, pozitif kontrol grubu kullanılmamıştır.

OKD çalışmalarında birçok avantajı olan tavşan diz eklemine, insanla ayrıldığı mekanik, histolojik ve kimyasal özellikleri de mevcuttur. İnsanlar tam yük verir pozisyondayken diz ekstansiyonda kilitli dururken, tavşanların arka ayakları sürekli olarak tam fleksiyonda durmaktadır (97). Tavşanlarda daha yüksek metabolik aktivite ve defekt bölgesinde daha yüksek yoğunlukta pluripotent kök hücre ve kondrosit görülmektedir (98). Tavşan femoral medial kondildeki KMD (kemik mineral dansitesi) değeri insan kemik plakasıyla benzer (1.19 g/cm^3 ve 1.17 g/cm^3) olmasına karşın 3 mm derinlikte tavşanda 0.65 g/cm^3 iken insanda 0.36 g/cm^3 'tür. Kemik hacmi/doku hacmi (BV/TV) ise tavşan femoral medial kondilinde $\%58 \pm 10$

iken insanda 33 ± 13 'tür (99). *In-vivo* çalışmalardan elde edilen sonuçları kliniğe uyarlarken bu farklılıklar dikkate alınmalıdır.

2.7.3. Büyük Hayvanlar

Kısa (8-12 haftalık) çalışmalar, biyomateryalin defekt içindeki biyoyumluluğu, erken hücrel yanıtı ve kalıcılığı hakkında bilgi sağlamak için kullanılabilir. İyileşmenin tamamlanması, uzun dönem etkileri, çevredeki sağlıklı kıkırdak ve subkondral kemikle olan entegrasyonunu değerlendirmek için ise daha uzun çalışmalar (6-12 ay) gerekebilir (94). Uzun takip süresi gerektiren çalışmalarda genellikle büyük hayvan deney modelleri tercih edilmektedir. OKD modeli için köpek, domuz, koyun, keçi ve at gibi büyük hayvan modelleri kullanılmaktadır. Farklı türlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada insan diz anatomisine en çok benzerlik gösteren model keçi dizi olmuştur (100).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen hayvan çalışmaları için KOBAY DHL. A.Ş. Yerel Etik Kurulu tarafından onay alınmıştır (ETİK KURUL Onay No: 317).

Çalışmamızda 3-B biyoyazıcı ile üretilen gradyan yapıdaki hidrojel doku iskelesi, tavşan dizi OKD modeline implante edilmiştir. Kitosan bazlı hidrojel doku iskelesinde kıkırdak bölge için yüzeyden derine gittikçe yoğunluğu azalan peptit amfifiller (PA), subkondral bölge için derine gittikçe yoğunluğu artan bor katkılı nano-hidroksiapatit (B-nHAp) kullanılmıştır. Kitosan doğada bolca bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilen bir polisakkarittir. Biyo-uyumlu, biyo-çözünür, hücre dışı matrikse benzemesi, anti-mikrobiyal, non-toksik özellikleri nedeniyle bu tez çalışmasında kitosan tercih edilmiştir (101). Peptit amfifiller ise içerdikleri amino asit sekansı sayesinde kıkırdak GAG'larına benzer kimyasal yapısı ve nano-fibröz morfolojisi nedeniyle hidrojin kıkırdak kısmında biyoaktif molekül olarak kullanılmıştır (21). İskelenin yapısal dayanıklılığını, osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerini arttırmak amacıyla B-nHAp kullanılmıştır. Ülkemizde geniş rezervleri bulunan bor minerali de iyileşmeyi uyarıcı, yapısal destek sağlaması ve antioksidan özellikleri nedeniyle hidrojel yapısına katılmıştır. İnsan umbilikal kord mezankimal kök hücreleri (hUC-MKH) de hidrojele entegre edilmiştir.

3.1. Hayvan Modeli ve Gruplar

In-vivo deneylerde *proof of concept* çalışmaları için uygun olan tavşan türü seçilmiştir. Diz hacminin sıçandan büyük olması, cerrahi işlemleri daha kolay yapmaya imkan sağlamaktadır. Büyük hayvanlara göre daha düşük maliyetli olması, beslenme ve barınma koşullarının kompleks olmaması da göz önünde bulundurulmuştur. 32 adet, 6 aylık, 2-3 kg aralığında, erkek, Yeni Zelanda Beyaz tavşanı kullanılmıştır. Denek sayısını azaltmak amacıyla her iki diz eklemi çalışmaya dahil edilmiştir. OKD modeli için literatürde sıklıkla kullanılan troklear bölge defekt için seçilmiştir. Bu bölgenin femoral kondillere göre daha kalın kıkırdağa sahip olması da avantajdır. Takip süresi olarak 6 ve 12. haftalar belirlenmiştir. Her takip periyodu için 4'er deney grubu oluşturulmuştur. Altıncı hafta sonunda kısa dönem sonuçlar elde

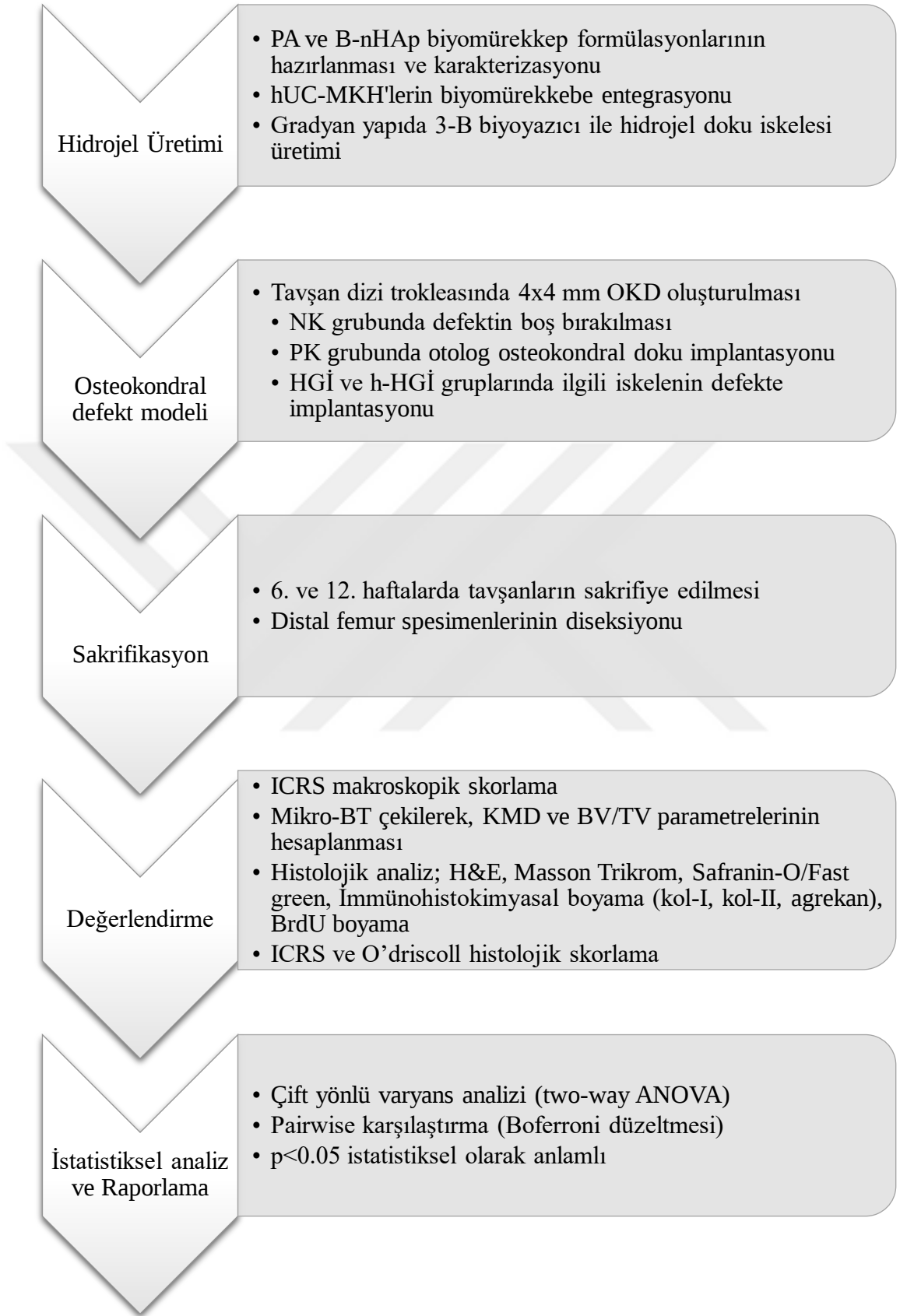
edilmiş olup 12. hafta sonunda iyileşmenin büyük ölçüde tamamlanması beklenmektedir.

Deney grupları: negatif kontrol (NK), pozitif kontrol (PK), hücre içermeyen hidrojel gradyan iskele (HGİ) ve hücre içeren hidrojel gradyan iskele (h-HGİ) olarak belirlenmiştir. Deney gruplarına ait detaylar Tablo 3.1’ de verilmiştir.

Tablo 3.1. Deney gruplarına ait bilgiler.

Gruplar	Yapılan işlem	Diz Sayısı
6. Hafta		
Negatif Kontrol (NK)	Defekt boş bırakılacak	8
Pozitif Kontrol (PK)	Çıkarılan doku otogreft olarak tekrar yerleştirilecek	8
Hücreless Hidrojel Gradyan İskele (HGİ)	Defekte gradyan özellik gösteren MKH içermeyen hidrojel doku iskelesi yerleştirilecek	8
Hücreli Hidrojel Gradyan İskele (h-HGİ)	Defekte hUC-MKH implante edilmiş olan hidrojel doku iskelesi yerleştirilecek	8
12. Hafta		
Negatif Kontrol (NK)	Defekt boş bırakılacak	8
Pozitif Kontrol (PK)	Çıkarılan doku otogreft olarak tekrar yerleştirilecek	8
Hücreless Hidrojel Gradyan İskele (HGİ)	Defekte gradyan özellik gösteren MKH içermeyen hidrojel doku iskelesi yerleştirilecek	8
Hücreli Hidrojel Gradyan İskele (h-HGİ)	Defekte hUC-MKH implante edilmiş olan hidrojel doku iskelesi yerleştirilecek	8

G*Power programı (Erdfelder, Faul, & Buchner, 1996) ile yapılan güç analizinde %80 güç elde edebilmek için her grupta 6 diz olması gerektiği bulunmuştur. Olası denek kayıplarına karşı her gruba 8 adet diz atanmıştır. Toplamda 64 adet diz blok randomizasyon yöntemiyle gruplara rastgele dağıtılmıştır. 6. ve 12. haftalarda hayvanlar kurban edilerek iyileşme dokuları makroskopik, radyolojik ve histolojik parametrelerle incelenmiştir. Çalışmaya ait iş akış şeması Şekil 3.1’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Çalışma iş akışı özeti.

3.2. Gradyan Doku İskelelerinin Üretimi

Gradyan doku iskelelerinin üretimi, karakterizasyonu ve *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu yürütücülüğünde tamamlanan TÜBİTAK 1003 – 218E003 projesi kapsamında kullanılan yöntemler uygulanmıştır (102). Özetle;

Bor içeren nano hidroksiapatit (B-nHAp) partikülleri Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu ve araştırma grubu tarafından geliştirilen mikrodalga destekli biyomimetik yöntem ile sentezlenmiştir (74). Sentez için normal plazmada bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarının 10 katı konsantrasyona sahip yapay vücut sıvısı 10X SBF (simulated body fluid) kullanılmıştır (103).

Peptit amfifiller (PA), katı-faz peptit sentezi yöntemiyle sentezlenmiş olup Peptideam (Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Sentezlenen PA'lara hidrofilik baş grubu olarak bazik Lizin (K) ve asidik Glutamik asit (E) konjuge edilmiştir. Bu sekanslar kıkırdak hücre dışı matriksini taklit edebilen amino asit dizilerine sahiptir.

Gradyan formülasyonlarının hazırlanmasında doğada en çok bulunan doğal polimerlerden biri olan kitosan, osteojenik farklılaşmayı destekleyen B-nHAp ve kondrojenik farklılaşmayı destekleyen peptit amfifiller kullanılmıştır. Yine belirtilen TÜBİTAK Projesinde, gradyan formülasyonun optimizasyonu ve karakterizasyonu tamamlanmıştır.

3.2.1. İnsan Umbilikal Kord Mezankimal Kök Hücreleri ile Yapılan Çalışmalar

In vivo deneylerde hUC-MKH kullanılmıştır. Bu amaçla, hücre kültürü çalışmalarında Doku Biyoteknoloji Kök Hücre, Biyobanka ve Doku Mühendisliği Laboratuvarından (Türkiye) temin edilen *Wharton* jölesinden izole edilmiş fibroblastik hUC-MKH temin edilmiştir. Hücre kültürü sonrası, hücreler %10 B-nHAp içeren biyomürekkep formülasyonları ile iki yollu vana yardımıyla karıştırılmıştır. Formülasyonunun içerisinde $\sim 2 \times 10^6$ /mL hücre bulunacak şekilde biyomürekkepler hazırlanmıştır. Elde edilen hücre entegre edilmiş biyomürekkep 3-B biyoyazıcı kartuşlarına aktarılmıştır.

4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) Boyama

hUC-MKH'lerin 3-B yazım işlemi sonrası canlılıklarını değerlendirmek amacıyla DAPI boyaması gerçekleştirilmiştir. DPBS ile yıkama işlemi sonrası fiksasyon için %4'lük paraformaldehit (PFA) çözeltisi kullanılmıştır. Sonrasında Triton X-100 çözeltisinde 5 dk. bekletilerek hücrelerin hücre zarı geçirgenliği artırılmıştır. Beş dk. DAPI solüsyonunda bekletilen hücrelerin çekirdeği boyandıktan sonra BSA ile yıkanmıştır. Sonuçlar floresan mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

Canlı/Ölü Hücre Boyama

Hücre canlılık analizlerinde, *Live/Dead® Viability/Cytotoxicity* kiti (Life Technologies, ABD) kullanılmıştır. Bu yöntemde etidyum homodimer-I (EthD-I) ve kalsein AM boya çözeltileri kullanılmaktadır. Kalsein AM normalde floresan özellikte olmayıp canlı hücreler tarafından kalsein'e dönüştürülmesi sonucu floresan hale gelmektedir. Ölü hücrelerde ise EthD-I boyası fonksiyonunu yitirmiş hücre zarından geçerek nükleik asitlere bağlanır ve güçlü floresan sinyal verir. Bu boyamalar sonucunda floresan mikroskobu altında canlı hücreler güçlü yeşil, ölü hücreler ise kırmızı sinyal vermektedir.

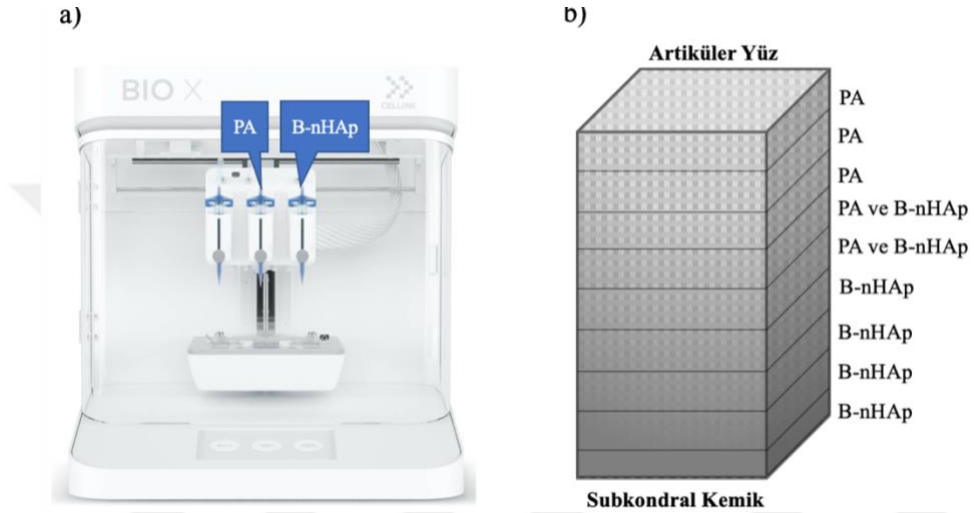
5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) ile işaretleme

Hidrojel doku iskelesindeki hUC-MKH varlığının implantasyon sonrası takip edilebilmesi amacıyla hücreler kültürün 3. gününde BrdU (BD Pharmingen, NJ, ABD) antikoru ile işaretlenmiştir. Hücrelerin üzerinde bulunan kültür ortamı uzaklaştırılarak %10 v/v'lik BrdU stok çözeltisi filtrelenerek eklenmiştir. 37 °C'de 3 saatlik inkübasyon sonrası BrdU içeren hücre kültür ortamı uzaklaştırılarak hücreler DPBS ile yıkanmıştır.

3.3. Üç Boyutlu Biyoyazdırma İşlemi

3-B biyoyazıcı (Cellink BioX, İsveç) ile tavşan OKD modelinde kullanılmak üzere steril koşullarda 4x4 mm boyutlarda hidrojel doku iskeleleri üretilmiştir (Şekil 3.2.a). Gradyan yapının dizaynı gereği subkondral kemikten kıkırdağa doğru

Kitosan/B-nHAp ve Kitosan/PA bileşiklerinin kademeli ve süreklilik içerecek şekilde oluşturulması için Şekil 3.2b'daki gibi örnek sistem tasarımı yapılmıştır. Hidrojel doku iskelesinin gözenekli yapısını korumak amacıyla yazım işlemi Pluronic® F127 destek çözeltisi (Sigma-Aldrich, Almanya) içerisine yapılmıştır. Üretilen hidrojel doku iskeleleri spatül yardımıyla destek çözeltisinden alınarak tavşan OKD modeline implantasyona hazır hale gelmiştir.



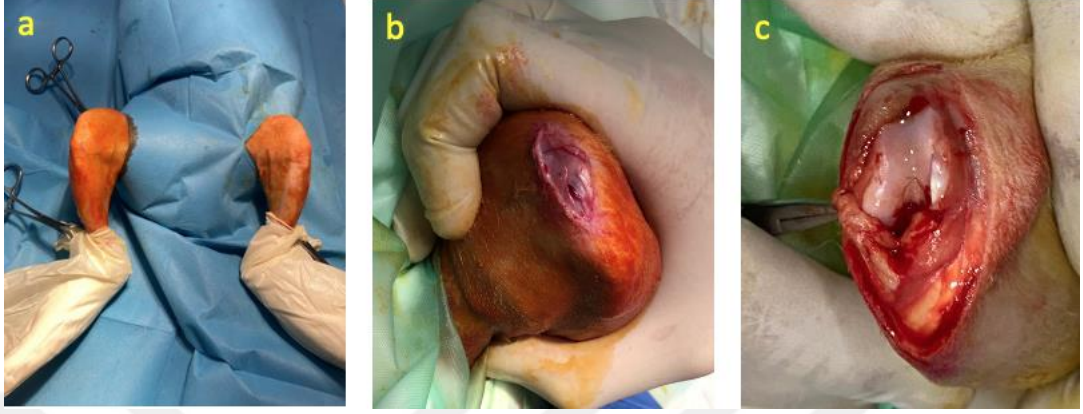
Şekil 3.2. (a) 3-B biyoyazıcı kartuşlarındaki farklı biyomürekkepler, (b) gradyan sistem tasarımı.

3.4. In-vivo Deneyler

3.4.1. Tavşan Dizinde Osteokondral Defekt (OKD) Oluşturulması

Cerrahi işlemler hayvanların üretildiği laboratuvarında gerçekleştirilmiş olup ek bir adaptasyon sürecine ihtiyaç duyulmamıştır. Cerrahi işlemler 2 Ortopedi ve Travmatoloji asistan doktoru tarafından veteriner hekim gözetiminde gerçekleştirilmiştir. Tavşanlara 5 mg/kg ksilazin hidroklorür ve 50 mg/kg ketamin hidroklorür, intramusküler yolla verilerek anestezi indüksiyonu sağlanmış ve ihtiyaç halinde 25 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg diazepam enjeksiyonuyla anestezinin idamesi sağlanmıştır. Anestezi indüksiyonu sonrası tavşanların her iki diz çevresi tıraş edilmiştir. Povidon-iyodin solüsyonuyla bilateral alt ekstremiteler boyanarak steril örtülerle örtülmüştür (Şekil 3.3.a). Orta hat insizyonu ile cilt ve cilt altı dokular geçilmiştir (Şekil 3.3.b). Fasya ve kapsül kompleksi medial parapatellar yaklaşımla açılarak kapsül kesisi proksimalde vastus medialis kası içine, distalde tibial tüberkül

medialine kadar uzatılmıştır. Alt ekstremitte tam ekstansiyona alınarak patella laterale disloke edilerek troklea görülmüştür. (Şekil 3.3.b-c).



Şekil 3.3. (a) Cerrahi boyama ve örtme, (b) cilt kesisi sonrası fasya ve kapsül görünümü, (c) patellanın laterale disloke edilmesi sonrası femoral trokleanın görüntüsü.

4 mm çapında steril *punch* biyopsi üzerinde 4 mm derinlik cetvelle ölçülerek işaretlenerek femoral trokleada 4x4 mm boyutunda bir adet OKD oluşturulmuştur (Şekil 3.4.a). Defekt içerisi steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra NK grubunda boş bırakılmıştır (Şekil 3.4.b). PK grubunda *punch* içerisindeki osteokondral doku çıkarılarak defekte tekrar implante edilmiştir (Şekil 3.4.c). HGİ ve h-HGİ gruplarında defektlere ilgili doku iskeleleri kondral-osteal oryantasyonuna dikkat edilerek implante edilmiştir (Şekil 3.4.d). Patella redükte edilerek eklem hareket açıklığı kontrol edilmiş ve doku iskelelerinin defekt içerisinde stabil olduğu görülmüştür. Cerrahi alan 20 ml steril serum fizyolojik ile yıkanarak kanama kontrolü yapılmıştır. Kapsül ve fasya kompleksi 3/0 vicryl suture ile, cilt altı dokular 4/0 vicryl suture ile, cilt 4/0 monocryl suture kullanılarak subkütiküler sürekli şekilde primer dikilmiştir. Povidon iyodin solüsyonuyla steril pansuman yapılmıştır. Aynı işlemler karşı diz için de tekrarlanmıştır. Hayvanlar tekli kafeslere alınarak veteriner hekim gözetiminde ayılmaya götürülmüştür.

Post-operatif 0., 1. ve 2. günlerde 10 mg/kg meperidin sc, 1 mg/kg ketoprofen im, 10 mg/kg enrofloksasin im olarak uygulanmıştır. Tavşanların takibi günlük olarak veteriner hekim tarafından yapılmıştır. Takipte %10'dan fazla kilo kaybı, stres

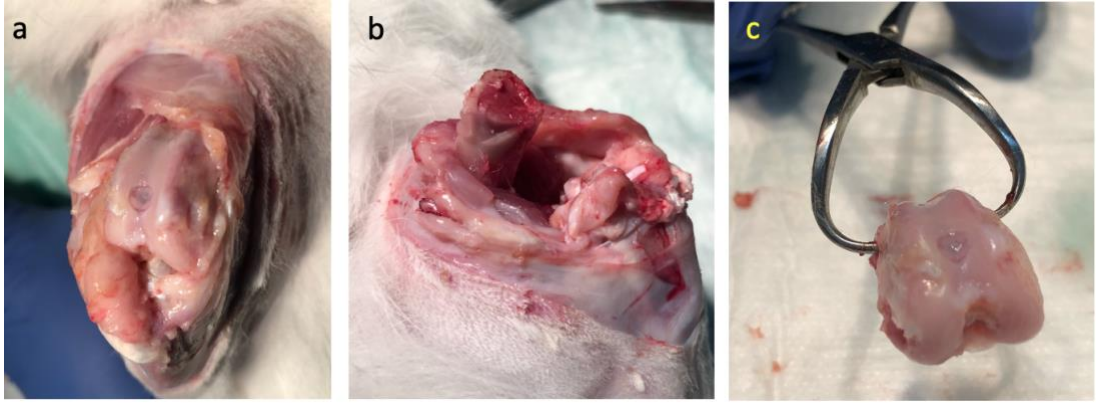
belirtileri, enfeksiyon bulguları gösteren tavşanlar veteriner hekim kararıyla çalışmadan çıkarılarak sakrifiye edilmiştir.



Şekil 3.4 (a) *Punch* ile defekt oluşturulması, (b) boş defekt, (c) pozitif kontrol grubunda dokunun tekrar defekte yerleştirilmesi, (d) doku iskelesinin defekte yerleştirilmesi.

3.4.2. Deneklerin Sakrifiye Edilmesi ve Distal Femurların Diseksiyonu

6. ve 12. haftanın sonunda ilgili gruplardaki tavşanlara 5 mg/kg ksilazin hidroklorür im ve 50 mg/kg ketamin hidroklorür im verilerek anestezi indüksiyonu sağlanmasını takiben 100 mg/kg pentobarbital iv verilerek ötenazi uygulanmıştır. Bilateral diz çevresi tıraş edilerek povidon-iyodin solüsyonu ile boyanması sonrası eski insizyon skarı üzerinden yapılan kesi ile cilt ve cilt altı dokular geçilmiştir. Fasya ve kapsül medial parapatellar yaklaşımlar açılarak ekleme ulaşılmıştır (Şekil 3.5.a). Diz ekstansiyona alınarak patella laterale disloke edilmiştir. Distal femur üzerine yapışık olan kas ve bağlar sıyrılması sonrası mini el testeresiyle diz ekleminin 3 cm proksimalinden femur osteotomisi yapılmıştır (Şekil 3.5.b). Çıkarılan spesimen fiksatif olarak formalin çözeltisi içeren steril patoloji kabına alınmıştır (Şekil 3.5.c). Örnekler en az 5 gece +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Geri kalan dokular biyolojik atık imha protokolüne uygun olarak imha edilmiştir.



Şekil 3.5. (a) Sakrifikasyon sonrası eklem, (b) femur kesisi, (c) distal femur spesimeni.

3.5. Yeni Kıkırdak ve Kemik Oluşumunun Değerlendirilmesi

3.5.1. Makroskopik Skorlama

Gözle görülür morfolojik özelliklerin değerlendirilmesi için ICRS (*International Cartilage Repair Society*) makroskopik skorlama sistemi kullanılmıştır (Tablo 3.2). Gruplara kör iki araştırmacı tüm spesimenleri bağımsız olarak skorlamıştır. Araştırmacılar arası tutarlılık için 6. ve 12. hafta gruplarının değerleri karşılaştırılarak *two-way mixed- consistency intraclass* korelasyon analizi yapılmıştır. Her iki zaman dilimi için de yüksek korelasyon değeri (sırasıyla 0,817 ve 0,924) bulunması nedeniyle sonuçlar raporlanırken iki araştırmacının verdikleri skorların ortalaması kullanılmıştır.

Tablo 3.2. ICRS makroskopik skorlama cetveli (104).

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

3.5.2. Mikro BT

Fikse edilen spesimenler Hacettepe Üniversitesi İleri Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (HÜNİTEK) getirilerek mikro BT çekimleri yapılmıştır. Çekim için 16 MP Bruker Skyscan 1272 tarayıcı cihazı kullanılmıştır. Femur shaftı tarama düzlemine dik olacak şekilde spesimenler örnek haznelere yerleştirilmiştir. 45 µm voksel çözünürlükte tarama yapılmıştır. Kemiklerin 3-B'lu görselleri CTVol programı ile mikro BT analizlerinin “.rec” dosyaları ile elde edilmiştir. Tüm görsellerde %75 kamera yaklaşma açısı değeri kullanılmış olup ışık ayarları tüm görsellerde neredeyse aynı olacak şekilde düzenlenmiştir. Yeni kemik oluşumu ve

mineralizasyonu CTAn (Bruker, Belçika) programı ile analiz edilmiştir. Defekti içeren alan olan RoI (*Region of Interest*) belirlenmiş ve RoI içerisinde VoI (*Volume of Interest*) elde edilmiştir. VoI kullanılarak BV/TV (kemik hacmi/doku hacmi, %) ve kemik mineral yoğunluğu (KMD, g.cm^{-3}) değerleri tespit edilmiştir. Kemik hacmi (BV), VoI yani defektin bulunduğu hacim içerisindeki trabeküler kemiğin hacmini ifade etmektedir. Doku hacmi (TV), medüller VoI'nin toplam hacmini ifade etmektedir. KMD ise biyolojik bir dokudaki hacimsel hidroksiapatit (HAp) yoğunluğunu ifade etmektedir. Grupların BV/TV ve KMD değerlerinin ortalaması standart sapmalarıyla birlikte sonuçlar kısmında verilmiştir.

3.5.3. Histolojik Analizler

Sakrifikasyon sonrası alınan diz örnekleri %10'luk tamponlu formol solüsyonu içerisine alınmıştır. En az 48 saat fiksasyon sonrası diz örnekleri %8'lik formik asit çözeltisi ile dekalsifikasyona tabi tutulmuştur. Yaklaşık 36 gün sonra dekalsifiye olan spesimenler rutin histolojik takibe alınarak 2 saat su ile yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilmek için önce 1 saat %75'lik alkole alınmıştır. Alkol yenilenerek tekrar 1 saat %75'lik alkole alınmıştır. Daha sonra %96'lık alkolde 1 saat bekletildikten sonra tekrar %96'lık alkol yenilenerek gece boyu bekletilmiştir. Bir sonraki gün %100'lük alkole alınarak 1 saat bekletilmiş ve yine alkol yenilenerek %100'lük alkolde 1 saat daha bekletilmiştir. Dokunun şeffaflaşması amacıyla dereceli artan alkol uygulaması sonrası dokular ksilene alınmıştır. Örnekler, doku büyüklüğü ve hacmine bağlı olarak 30 dakikayı geçmeyecek şekilde ksilende bekletilmiştir. Ksilen sonrası 3 saat parafinde tutulmuştur. Sonrasında metal gömme kapları ile ekleme 120°'lik açı ayarlanarak dikkatli bir şekilde plastik kasetler yardımıyla doku sabitlenerek parafine gömülmüştür. Parafine gömülmüş olan diz dokularından, eklem başlangıcından sonuna kadar en az 45 kesit olacak şekilde hem koronal düzlemde hem de sagittal düzlemde 5 μm kalınlığında şekilde seri kesitler alınmıştır. Histokimya ve immünohistokimya öncesi preparatlar 1 gece boyunca etüvde 60°C'de bekletilerek parafinleri uzaklaştırılmış ve boyanmaya hazır hale getirilmiştir. Alınan kesitler deparafinizasyon sonrası rutin hematoksilin eozin (H&E) boyama ile boyanmıştır.

Kıkırdak ve subkondral kemik ayırımını yapabilmek için Safranin-O/Fast-green boyaması yapılmıştır. Alınan kesitlerin arasından her 3 ila 5 kesitten biri seçilerek

deparafinize olan slaytlar hidrate edilmiştir. Kesitler, Weigert'in demirli hematoksilin solüsyonunda 10 dakika boyunca bekletilmiştir. Akar su altında 10 dakika yıkadıktan sonra fast-green solüsyonuyla 5 dakika boyanmıştır. Kesitler, 10 – 15 saniyeden fazla olmamak üzere %1'lik asetik asit solüsyonu ile hızlı bir şekilde durulandıktan sonra %0,1 safranin-O solüsyonunda 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Sonrasında, örnekler her birinde 2 dakika kalacak şekilde %95 etil alkol, %100'lük etil alkolden geçirilip, en az 30 dakika ksilen ile parlaklaştırılıp entellan ile kapatılmıştır.

Kollajen miktarının tayini için kesitler Masson tri-krom (anilin mavili) ile de boyanmıştır. Deparafinize edilen slaytlar hidrate edilmiştir. Önce demirli hematoksilinde 10 dakika bekletilmiş ve sonra yıkanmıştır. Pikrik asit ile 5 dakika farkedirilmiş. Biebrich kırmızı asit fuksin solüsyonunda 10-15 dakika bekletilmiştir. Fosfomolibdik-fosfotungstik asit ile de 10 dakika bekletilmiştir. Kesitler durulamadan anilin mavisi solüsyonuna aktarılıp 15 dakika bekletilmiştir. Akar suda 1 dakika yıkama sonrası dehidrate edilip, ksilen sonrası preparatlar entellan ile kapatılmıştır.

Boyanan kesitler ışık mikroskopunda (Olympus BX43, Hamburg, Almanya) incelenmiş; 2X ve 4X altında fotoğraflanmıştır. Doku iyileşmesinin değerlendirilmesinde ICERS ve O'Driscoll histolojik skorum sistemi kullanılmıştır (Tablo 3.3 ve Tablo 3.4).

Tablo 3.3. ICRS histolojik skrolama sistemi (104)

ICRS Histolojik Sınıflaması		
I	Yüzey	
	Düzgün/devamlı	3
	Düzensiz/devamsız	0
II	Matriks	
	Hyalin	3
	Karma:Hyalin/fibrokartilaj	2
	Fibrokartilaj	1
	Fibröz doku	0
III	Hücre dağılımı	
	Sütun	3
	Sütun/ küme karışık	2
	Küme	1
	Tek tek hücreler/dezorganize	0
IV	Canlı hücre popülasyonu	
	Sıklıkla canlı	3
	Kısmen canlı	1
	<%10 canlı	0
V	Subkondral kemik	
	Normal	3
	Artmış remodelling	2
	Kemik nekrozu/granulasyon dokusu	1
	Zemin detaş, kırık veya callus mevcut	0
VI	Kıkırdak mineralizasyonu (kalsifiye kıkırdak)	
	Normal	3
	Anormal/uygunsuz yer	0

Tablo 3.4. O'Driscoll histolojik skrolama sistemi (105).

ÖZELLİK	Skor
Baskın Dokunun Yapısı	
<u>Hücre morfolojisi</u>	
Hyalin eklem kıkırdağı	4
Tam farklılaşmamış mezenkim	2
Fibröz doku veya kemik	0
<u>Matriksin Safranin-O ile boyanması</u>	
Normal veya normale yakın	3
Orta	2
Hafif	1
Yok	0
Yapısal Özellikler	
<u>Yüzey düzgünlüğü</u>	
Düzgün ve bütünlüğü tam	3
Yüzeyel horizontal laminasyon	2
Fissürler: Kalınlığın % 25 – 100'ü kadar	1
Şiddetli bozulma ve fibrillasyon	0
<u>Yapısal bütünlük</u>	
Normal	2
Hafif bozulma ve kistler	1
Şiddetli disintegrasyon	0
<u>Kalınlık</u>	
Normal komşu kıkırdağın % 100'ü	2
Normal kıkırdağın % 50 – 100'ü	1
Normal kıkırdağın % 50 >	0
<u>Komşu kıkırdak ile bağlılık</u>	
Heriki tarafı da bağlı	2
Tek tarafı bağlı veya her iki tarafı kısmen bağlı	1
Bağlı değil	0
Dejenerasyon Nedeniyle Oluşan Hücresel Değişikliklerin Olmaması	
<u>Hiposelülerite</u>	
Normal selülerite	3
Hafif hiposelülerite	2
Orta hiposelülerite	1
Şiddetli hiposelülerite	0
<u>Kondrosit kümelenmesi</u>	
Yok	2
Hücrelerin % 25 >	1
Hücrelerin % 25 – 100'ü	0
<u>Komşu kıkırdakta dejeneratif değişikliklerin olmaması</u>	
Normal selülerite, hücre kümelenmesi yok, normal boyanma	3
Normal selülerite, hafif hücre kümelenmesi, orta boyanma	2
Hafif veya orta hiposelülerite, hafif boyanma	1
Şiddetli hiposelülerite, boyanma çok az veya yok	0
Toplam	0 - 24

İmmünohistokimyasal Boyama

Doku bloklarından alınan doku kesitlerinde her 3 kesitten biri ayrı bir adeziv lama alınıp kesitlerde agrekan (Bioss, BS-11655R), kollajen tip I (kol-I) (Bioss, BS-10423R) ve kollajen tip II (kol-II) (Bioss, BS-0709R) immünfloresan yöntemi ile boyanmıştır. İmmünfloresan çalışmalar için, deparafinizasyon sonrası ksilol uygulanıp, dehidratasyon sonrası sitrik asit ile mikrodalgada kaynatma yöntemi ile antijen geri döndürme yapılmıştır. Sonra endojen peroksidaz aktivitesini inaktive etmek için %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edilmiş ve 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandıktan sonra, istenmeyen antijenik bölgelerin bloklanması için 30 dakika BSA-PBS ile muamele edilmiştir. Primer antikorlar belirlenen dilüsyonlarda hazırlanmış olup, doku üzerine damlatılmış ve gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkanıp, 1 saat oda ısısında uygun FITC (floresin izotiyosiyanat)/Texas Red işaretli sekonder antikorlarla muamele edilmiş ve tekrar 5 dakika süreyle PBS ile yıkanmıştır. Son aşamada dokular kapatma solüsyonu ile kapatılmış ve mikroskop (Olympus BX53) altında görüntülenmiştir.

BrdU Boyama

BrdU analizi için adeziv lamlara (Microcult, Türkiye) 4 µm kalınlığında seri kesitler alınmış ve deparafinize edilmiştir. Deparafinize edilmiş olan kesitler rehidrate edilip, antijen geri kazanımı için (pH 6.0) 10 mM sitrat tamponu içerisinde mikrodalga fırında kaynatılmıştır. 30 dakika boyunca %3'lük hidrojen peroksit ile inaktive edilmiştir. Kesitler daha sonra spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için bir protein bloke edici (Ultra V Block, TA-125-UB; Thermo Fisher Scientific, Japonya) ile 30 dakika inkübe edilmiştir. Kesitler üzerinde monoklonal anti-BrdU (STJ22838, 1:50, St John's Laboratory) birincil antikoru gece boyunca 4°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün kesitler PBS içinde yıkanmış ve biyotinlenmiş UltraVision Plus Anti-Polyvalent, HRP (streptavidin-horseradish peroksidaz) (kod: 14896; Thermo Fisher Scientific, Japonya) ile 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS ile üç yıkamadan sonra antijen-antikor kompleksleri, 30 dakika boyunca bir streptavidin-peroksidaz kompleksi (TA-125-HL; Thermo Fisher, Japonya) ile muamele edilmiştir. Bağlı HRP enzimi, aminoetil karbazol (AEC, kod: 001122) (Thermo Fisher Scientific, Japonya) kromojeni ile kesitler geliştirilmiştir. Mayer's hematoksilen (Beslab, Türkiye) ile zıt

boyanmış ve su bazlı permount (Fisher Chemicals, Springfield, NJ, ABD) ile kapatılmıştır. Fotoğraflar Olympus (Nussloch, Almanya) marka BX43 model ışık mikroskopunda, DP74 model kamera ile çekilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analiz

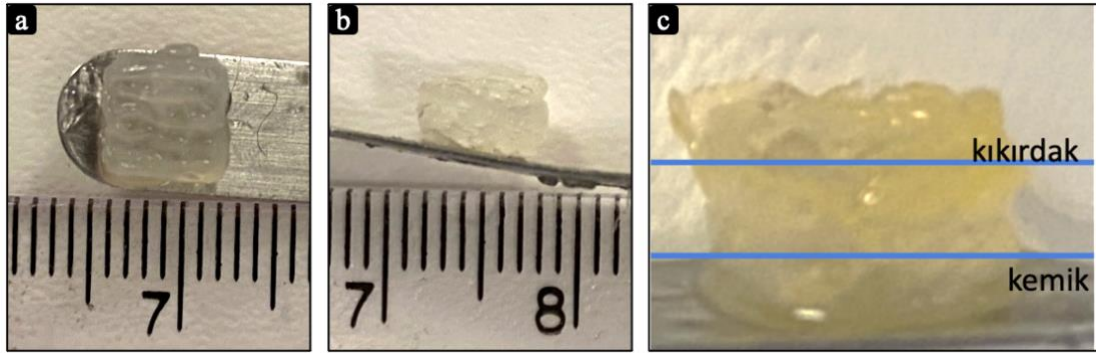
Araştırmacılar arası tutarlılık için 6. ve 12. hafta gruplarının değerleri karşılaştırılarak *two-way mixed-consistency intraclass* korelasyon analizi yapılmıştır. Her iki zaman dilimi için de yüksek korelasyon değeri (sırasıyla 0,817 ve 0,924) bulunması nedeniyle sonuçlar raporlanırken iki araştırmacının verdikleri skorların ortalaması kullanılmıştır.

ICRS makroskopik skarlama, BV/TV oranı, KMD, ICRS histolojik skarlama ve O'Driscoll histolojik skarlama değerleri ortalama (standart sapma) şeklinde belirtilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümlerde çift yönlü varyans analizi (*two-way ANOVA*) testi kullanılmıştır. Anlamlı fark bulunan gruplarda Bonferroni düzeltmesiyle birlikte *pairwise* karşılaştırma yapılmıştır. İstatistiksel testler SPSS v23. Programı kullanılarak yapılmıştır. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Tez çalışmamızda kullanılan hidrojel doku iskelesine ait sentez ve karakterizasyon sonuçları TÜBİTAK proje sonuç raporu (Proje no: 218E003) ve Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu ve ekibinin önceki çalışmalarında detaylıca verilmiştir (74, 75, 103, 106). Ayrıca *in vitro* çalışmaların sonuçları Sema Coşkun'un tez çalışmasında yayınlanacaktır.

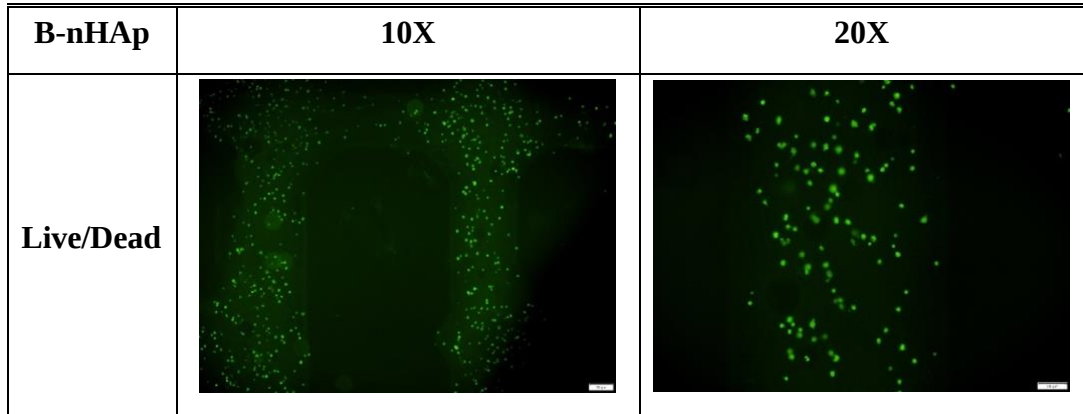
3-B biyoyazıcıda üretilen hidrojel doku iskelesinin bir örneği Şekil 4.1'de verilmiştir.



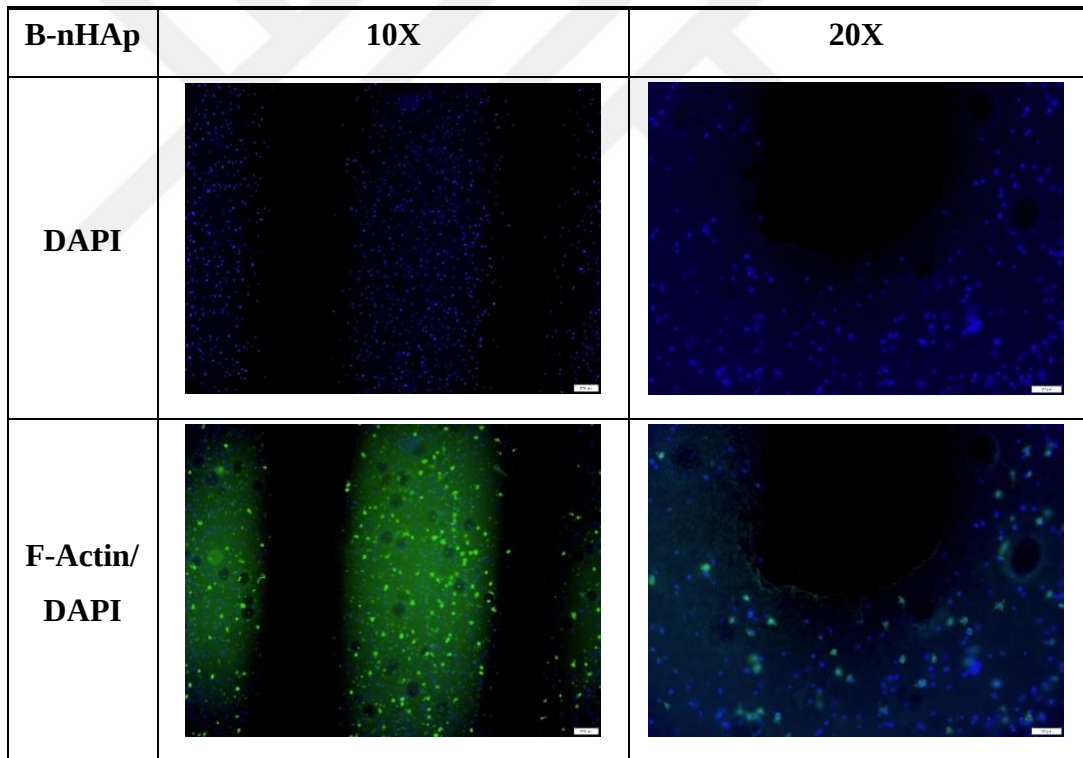
Şekil 4.1. 3-B biyoyazıcı kullanılarak üretilen gradyan yapıdaki hidrojel iskele (102).

4.1. DAPI ve *Live/Dead* Assay Analizi

Yapılan DAPI ve *Live/Dead* boyamalarıyla, biyomalzemelerin ve 3-B biyoyazım sürecinin hUC-MKH'ler üzerine etkileri değerlendirilmiştir. hUC-MKH içeren B-nHAp formülasyonlarının *Live/Dead* Assay analizinde yeşil floresan sinyal veren canlı hücrelerin oldukça yoğun olduğu, kırmızı floresan sinyal veren kırmızı hücrelerin neredeyse hiç olmadığı görülmüştür (Şekil 4.2). Benzer şekilde DAPI boyamalara ait floresan mikroskop görüntülerinde yüksek miktarda canlı hücre çekirdekleri olduğu görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. hUC-MKH içeren B-nHAp formülasyonlarına ait *Live/Dead* floresan görüntüleri (102).



Şekil 4.3. hUC-MKH içeren B-nHAp formülasyonlarına ait DAPI floresan görüntüleri (102).

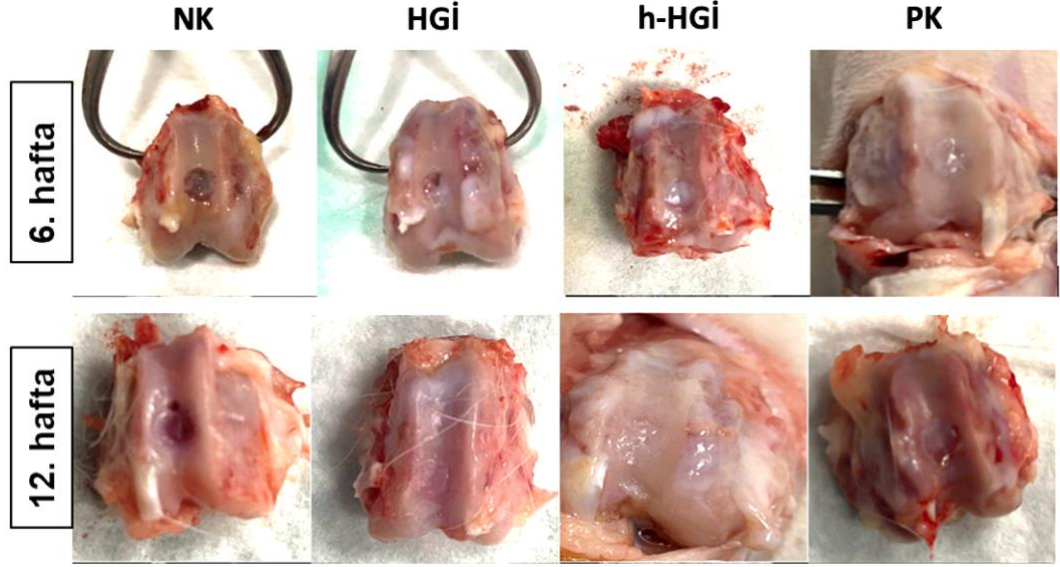
4.2. *In vivo* Deneyler

Deneyler sırasında 6 hayvan çalışma dışı bırakılmıştır. Bu 6 hayvandan 3'ü enfeksiyon bulguları gösterirken diğer 3'ü sebebi bilinmeyen ölüm nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır. Enfeksiyon tanıları veteriner hekimle birlikte konulmuştur. Ölen hayvanların post-mortem muayeneleri veteriner hekim tarafından yapılmış olup patoloji aydınlatılamamıştır. Bu hayvanların dizlerinde anormal bulgulara rastlanmamıştır. Enfeksiyon nedeniyle çalışmadan çıkarılan hayvanlar arasında gruplar açısından bir yatkınlık saptanmamıştır. 20 no'lu tavşanın sağ dizi PK, sol dizi h-HGİ; Y1 no'lu tavşanın sağ dizi NK, sol dizi PK; Y2 no'lu tavşanın sağ dizi HGİ, sol dizi h-HGİ grubundadır.

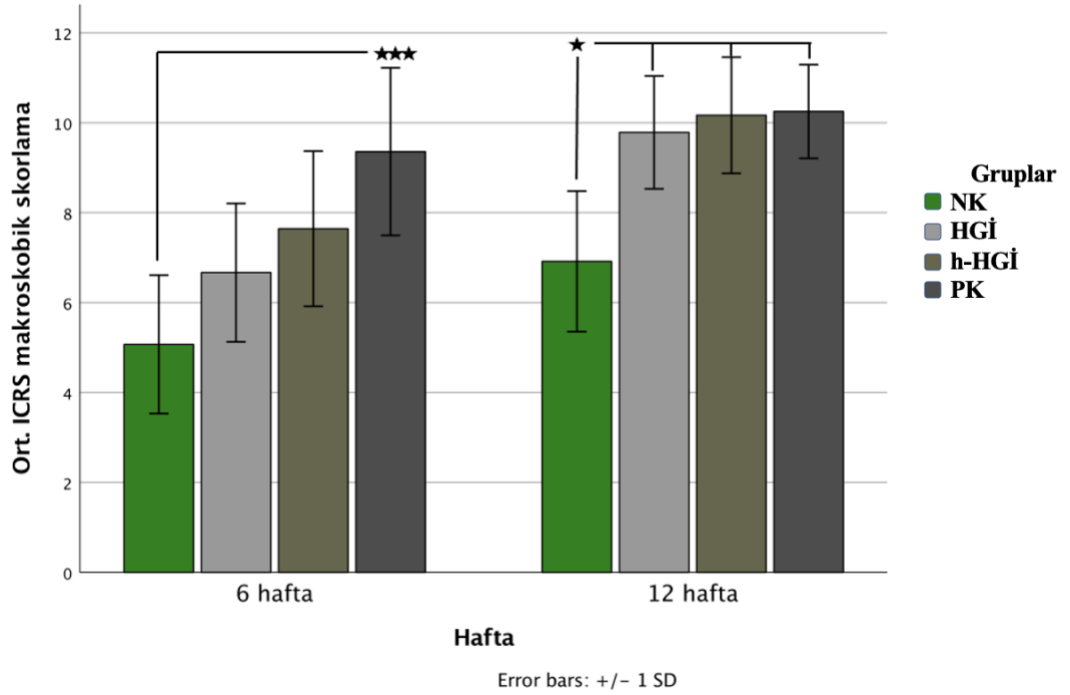
4.2.1. Makroskopik Skorlama

Makroskopik olarak gruplar içinde heterojen bulgular gözlenmiştir (Şekil 4.4). Genel olarak defekt alanında; NK grubunda mor renkli, mat, yüzeye göre belirgin çökmüş, yüzeyinde büyük çatlak ve fissürler olan, çevre sağlıklı dokuya benzerlik göstermeyen, defektin tamamını doldurmayan yeni doku oluşumu gözlenmiştir. PK grubunda çevre sağlıklı dokuya benzer renk ve parlaklıkta, belirgin basamaklanma oluşturmamayan iyileşme özellikleri gözlenmiştir. h-HGİ grubunda beyaz/pembe renkli, parlak, çevre sağlıklı dokuya entegre olabilmemiş, belirgin basamaklanma oluşturmamayan iyileşme bulguları gözlenmiştir. HGİ ve h-HGİ gruplarında bazı deneklerde merkezde tekli fissür oluşumu görülmüştür.

6. haftada NK grubunun ortalama ICRS makroskopik skoru $5,07 (\pm 1,54)$, PK grubunun ortalama skoru $9,36 (\pm 1,86)$, h-HGİ grubunun ortalama skoru $7,64 (\pm 1,73)$, HGİ grubunun ortalama skoru $6,67 (\pm 1,54)$ olarak bulunmuştur. 12. haftada NK grubunun ortalama ICRS makroskopik skoru $6,92 (\pm 1,56)$, PK grubunun ortalama skoru $10,25 (\pm 1,04)$, h-HGİ grubunun ortalama skoru $10,17 (\pm 1,29)$, HGİ grubunun ortalama skoru $9,79 (\pm 1,25)$ olarak bulunmuştur. ICRS makroskopik skorlama skalasına göre 12. haftada alınan skorlar PK, h-HGİ ve HGİ gruplarında “normale yakın”, NK grubunda ise “anormal” olarak sınıflandırılmıştır. Hiçbir denek tam puan olan 12 almamıştır. Tüm gruplarda 6.haftadan 12.haftaya doğru ortalama skorlarda artış görülmüştür (Şekil 4.5). Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tek grup HGİ grubu olmuştur ($p=0,006$).



Şekil 4.4. Defekt alanlarının 6. ve 12. hafta sonundaki makroskopik görüntüleri. NK: Negatif Kontrol, HGI: hücre içermeyen hidrojel gradyan iskele, h-HGI: mezankimal kök hücre içeren hidrojel gradyan iskele, PK: Pozitif Kontrol



Şekil 4.5. ICRS makroskopik skoru. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)

4.2.2. Mikro BT

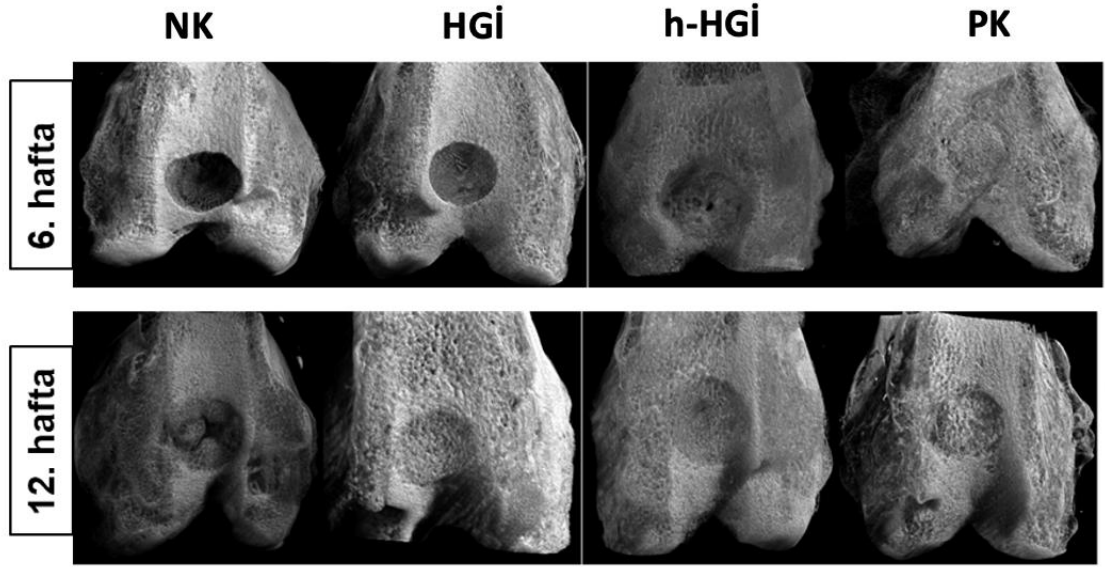
6. haftada NK grubunda defektin büyük bölümünün boş olduğu görülmüştür. HGİ grubunda NK grubuna göre daha fazla defekt dolumu izlenmesine karşın yüzeye göre depresyon görülmüştür. h-HGİ grubunda yüzeye yakın seviyeye kadar defekt dolumu izlenmiştir. Bu grupta oluşan yeni dokunun yüzeyinde küçük boyutta fissür oluşumları görülmüştür. PK grubunda otolog greftin defektin tamamını doldurduğu, çevre dokuyla aynı seviyede ve iyi entegre olmuş olduğu görülmüştür. 6. haftadan 12. haftaya gelindiğinde NK grubunda defektin hala belirgin seviyelenme gösterdiği ve yüzeyde büyük fissür oluşumları izlenmiştir. h-HGİ, HGİ ve PK gruplarına defektin tama yakın dolduğu, pürüzsüz görünümde, çevre dokuya entegre yeni doku oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.6).

6. hafta ortalama BV/TV oranı, gruplarda sırasıyla: NK grubunda $24,26 (\pm 3,1)$, PK grubunda $31,62 (\pm 4,4)$, h-HGİ grubunda $28,61 (\pm 3,4)$, HGİ grubunda $26,61 (\pm 3,4)$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

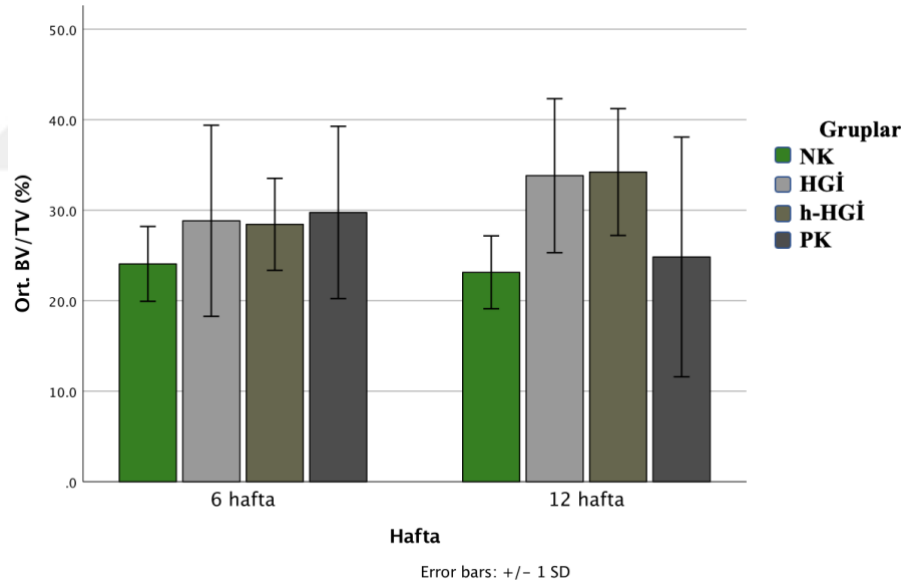
12. hafta ortalama BV/TV oranı, gruplarda sırasıyla: NK grubunda $26,37 (\pm 3,8)$, PK grubunda $27,54 (\pm 5,5)$, h-HGİ grubunda $35,16 (\pm 4,2)$, HGİ grubunda $34,31 (\pm 4,2)$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.7).

KMD değerleri 6.haftada NK grubunda $0,21 \pm 0,12 \text{ g.cm}^{-3}$, PK grubunda $0,30 \pm 0,07 \text{ g.cm}^{-3}$, HGİ grubunda $0,24 \pm 0,12 \text{ g.cm}^{-3}$, h-HGİ grubunda $0,23 \pm 0,13 \text{ g.cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

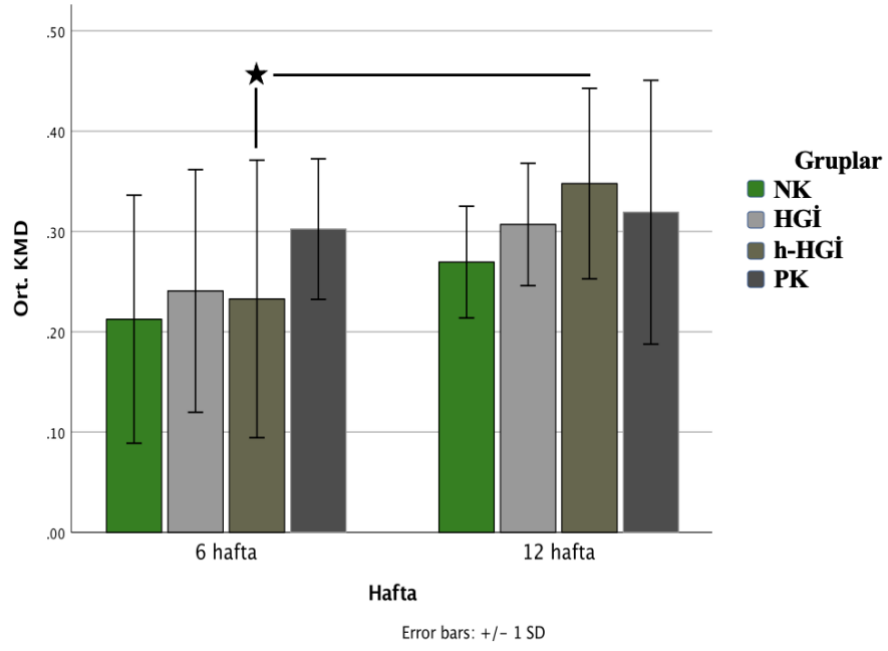
KMD değerleri 12.haftada NK grubunda $0,26 \pm 0,05 \text{ g.cm}^{-3}$, PK grubunda $0,32 \pm 0,13 \text{ g.cm}^{-3}$, HGİ grubunda $0,30 \pm 0,06 \text{ g.cm}^{-3}$, h-HGİ grubunda $0,34 \pm 0,09 \text{ g.cm}^{-3}$ olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). h-HGİ grubunda KMD değeri 6. haftadan 12. haftaya anlamlı artış göstermiştir ($p= 0,03$) (Şekil 4.8).



Şekil 4.6. Defekt alanlarının 6. ve 12. hafta sonundaki Mikro BT görüntüleri.



Şekil 4.7. Ortalama BV/TV (%) oranı. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)



Şekil 4.8. Kemik mineral dansite ortalaması. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

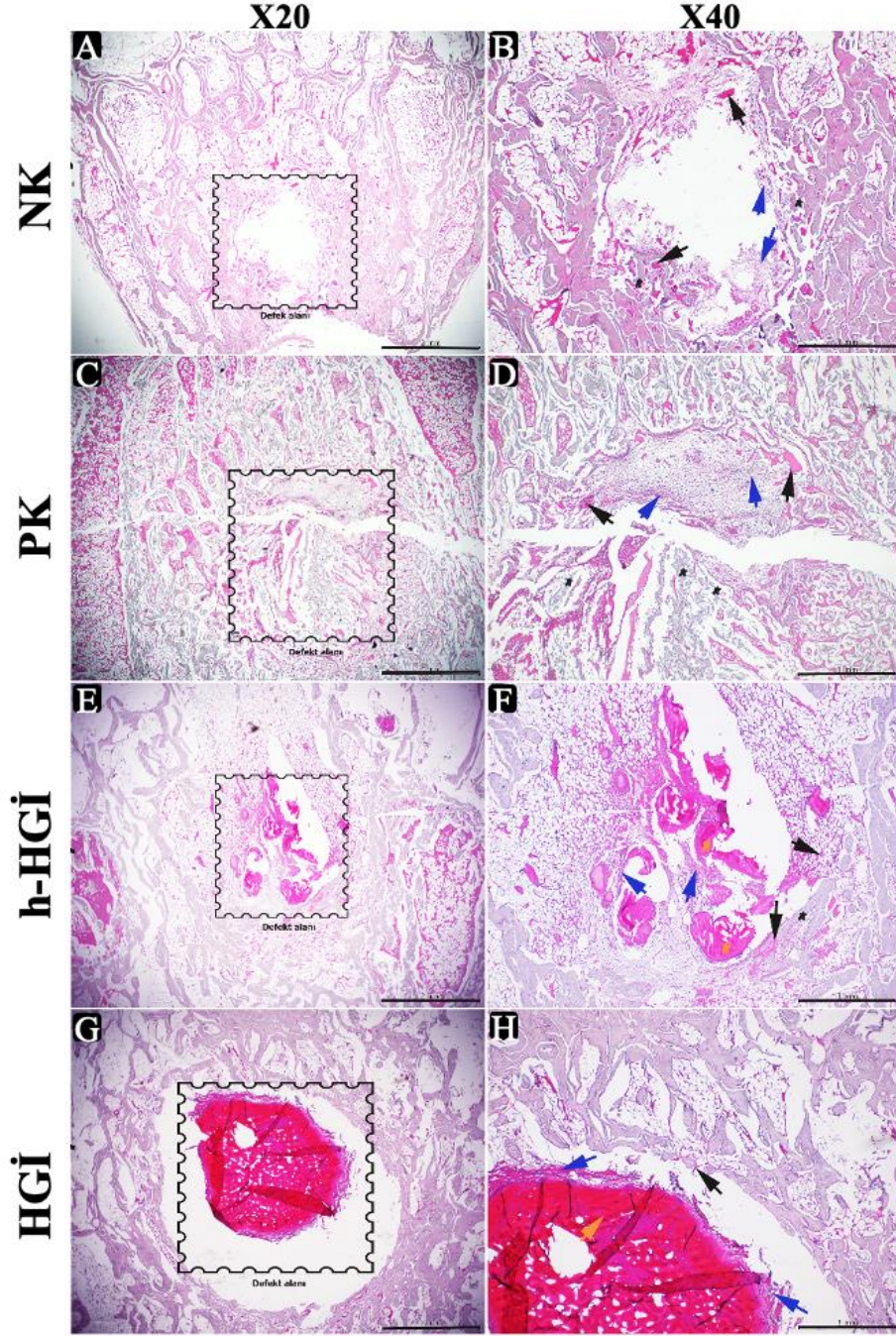
4.2.3. Histolojik Bulgular

H&E Boyama

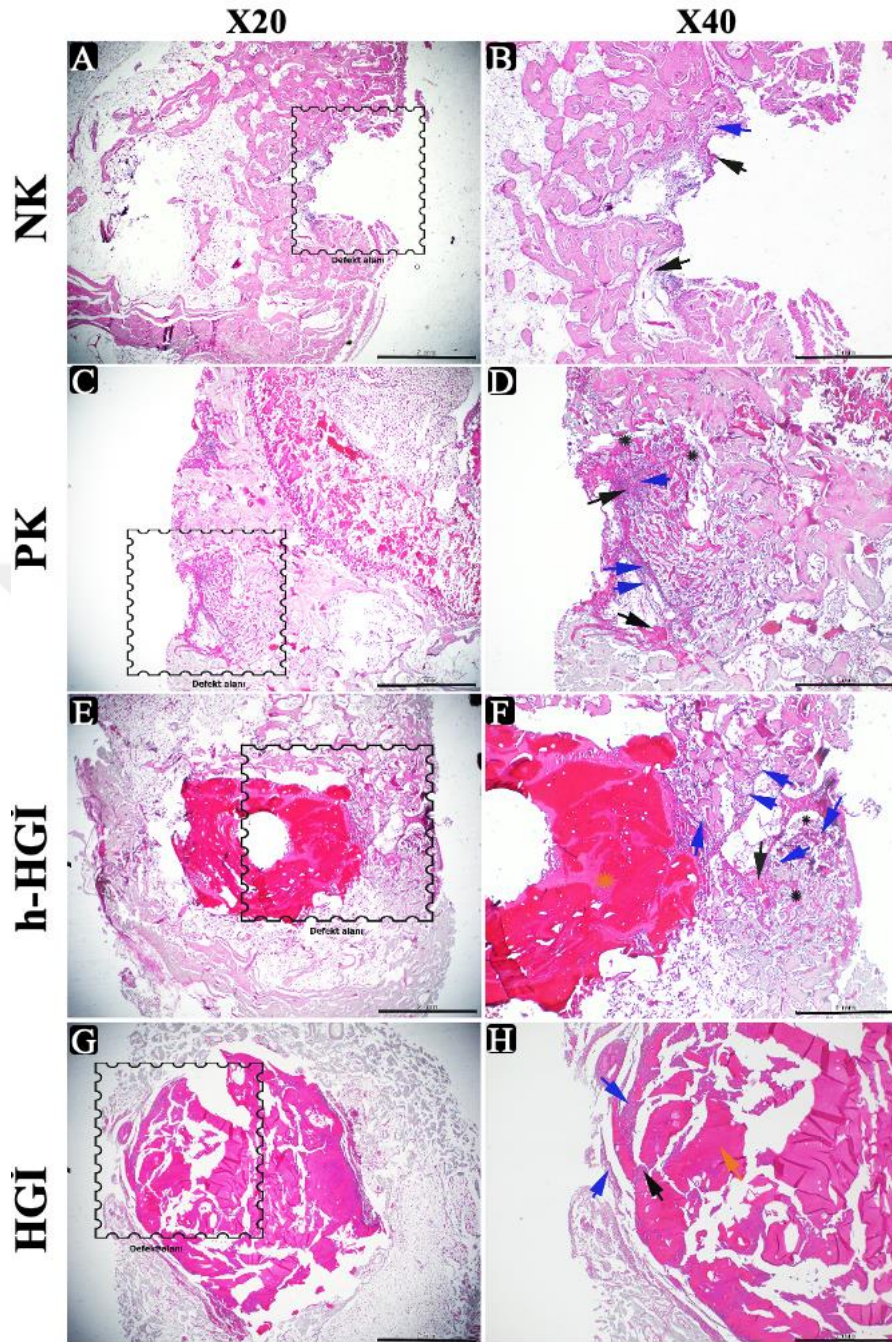
Altı haftalık takip sonrası H&E boyalı preparatlar incelendiğinde NK grubunda defekt alanının koronal ve aksiyel düzlem kesitleri boyunca kapanmadığı görülmüştür. Defekt alanında kan adacıkları, ve kollajen gözlemlense de yeni kemik doku oluşumu gözlemlenmemiştir. PK grubunda defekt alanının koronal düzlem kesitleri boyunca %75'den fazlasının kapandığını ve alanda yeni kemik doku oluşumu gözlenmiştir. h-HGİ grubunda defekt alanının %25'den fazlasının kapandığı ve alanda yeni kemik oluşumu olduğu gözlenmiştir. HGİ grubunda defekt alanında koronal düzlem kesitlerinde sadece hidrojel iskele ve iskeleyi çevreleyen kollajen doku varlığı gözlemlenmiştir. Defekt alanında belirgin yeni kemik doku oluşumu gözlemlenmemiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

12. hafta gruplardaki H&E boyalı koronal düzlem kesit preparatları incelendiğinde 6 haftalık gruplara oranla defekt bölgesinin kapanması ve yeni kemik doku oluşumunun çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. NK grubunda defekt alanında %10 oranında yeni kemik oluşumu gözlemlenmiştir. PK grubunda defekt alanının %100 kapandığını ve yeni kemik oluşumunun çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. h-HGİ grubunda defekt bölgesinin %75'ten fazlasının kapandığı ve

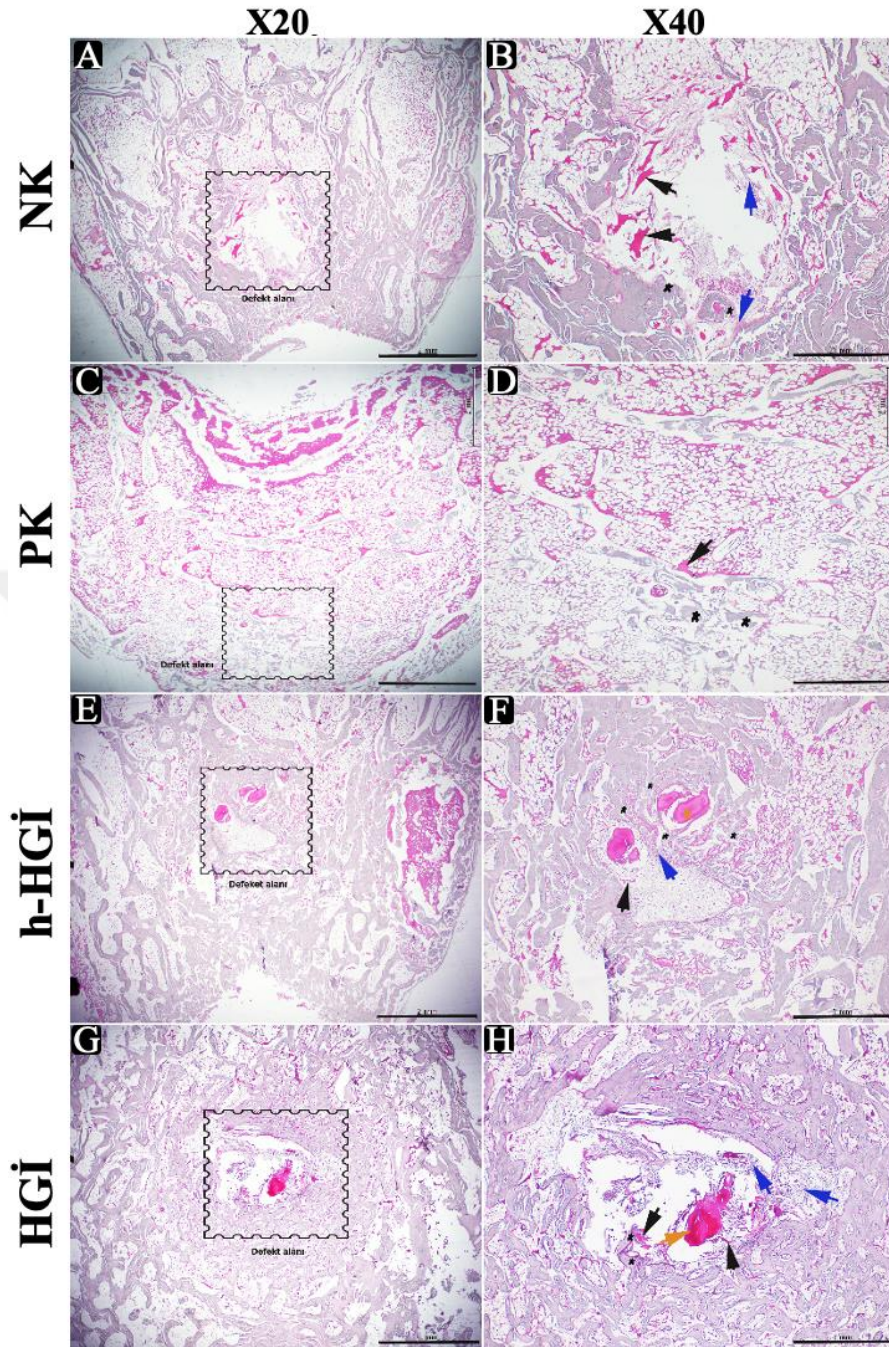
yeni kemik doku oluşumunun 6. haftaya göre çok daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. HGİ ve h-HGİ gruplarında 12 hafta sonunda hidrojel iskele kalıntıları defekt alanında izlenmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



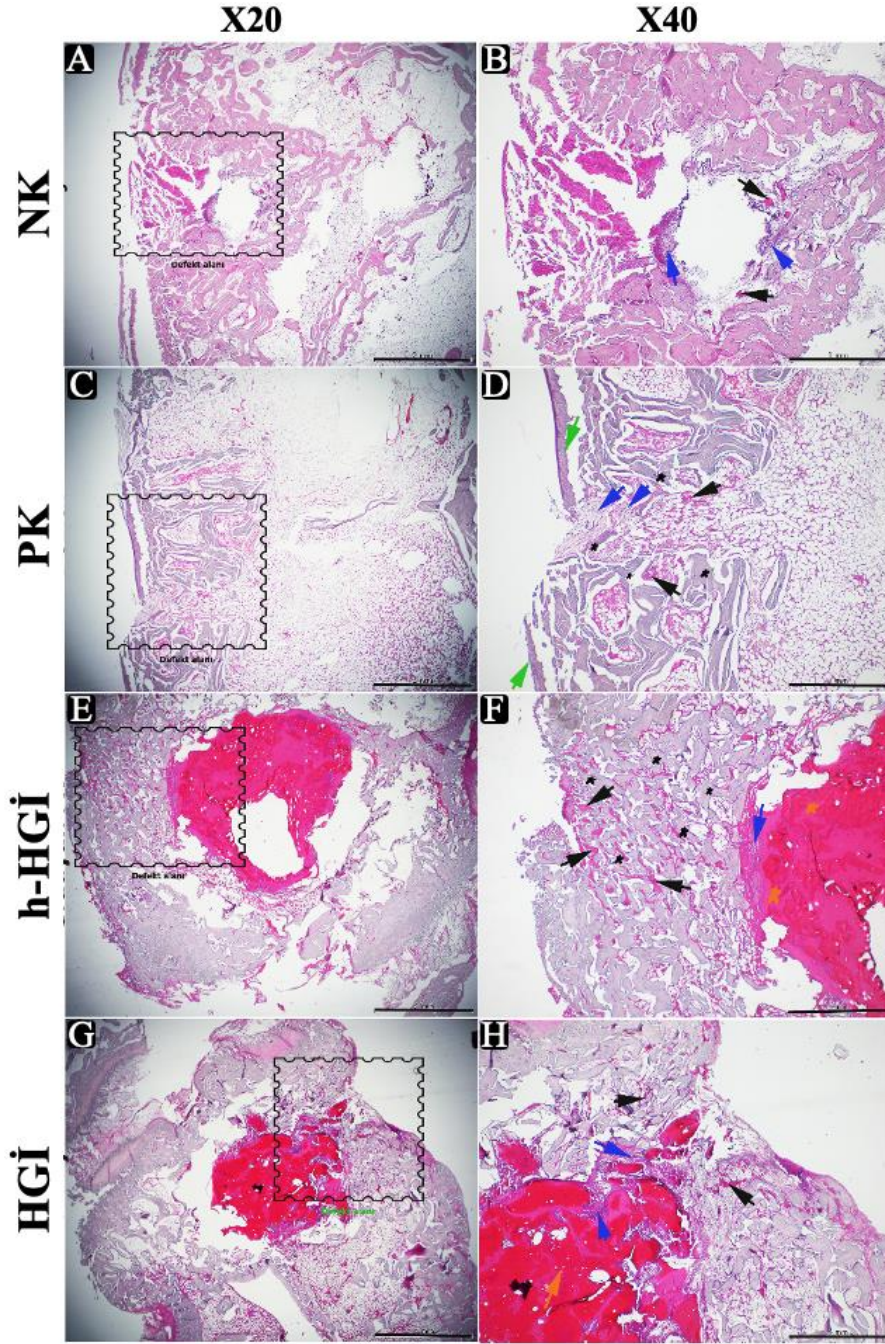
Şekil 4.9. Altı haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı koronal kesitler. *Kan adacıkları (siyah ok), kollajen lif (mavi ok), defekt bölgesinde oluşmuş kemik (yıldız) ve hidrojel iskele kalıntısı (turuncu ok) gösterilmiştir.*



Şekil 4.10. Altı haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı aksiyel kesitler. Kan adacıkları (siyah ok), kollajen lif (mavi ok), defekt bölgesinde oluşmuş kemik (yıldız) ve hidrojel iskele kalıntısı (turuncu ok) gösterilmiştir.



Şekil 4.11. On iki haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı koronal kesitler. Kan adacıkları (siyah ok), kollajen lif (mavi ok), defekt bölgesinde oluşmuş kemik (yıldız) ve hidrojel iskele kalıntısı (turuncu ok) gösterilmiştir.



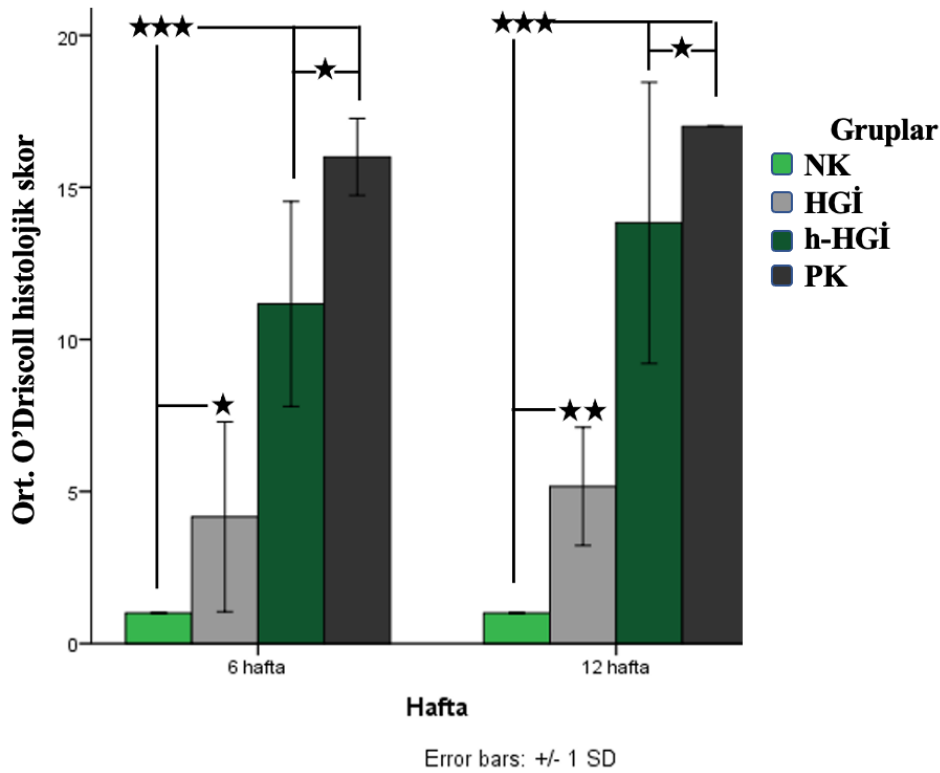
Şekil 4.12. On iki haftalık takipte gruplara ait H&E boyalı aksiyel kesitler. *Kan adacıkları (siyah ok), kollajen lif (mavi ok), defekt bölgesinde oluşmuş kemik (yıldız), kıkırdak doku (yeşil ok) ve hidrojel iskele kalıntısı (turuncu ok) gösterilmiştir.*

Çalışma grupları arasında en iyi iyileşme ve kemik oluşumu PK grubunda gözlemlenmiştir. h-HGI grubu PK grubuna yakın bulgular göstermiştir. HGI grubu NK grubundan kollajen sentezi açısından çok daha iyi sonuç gösterse de yeni kemik

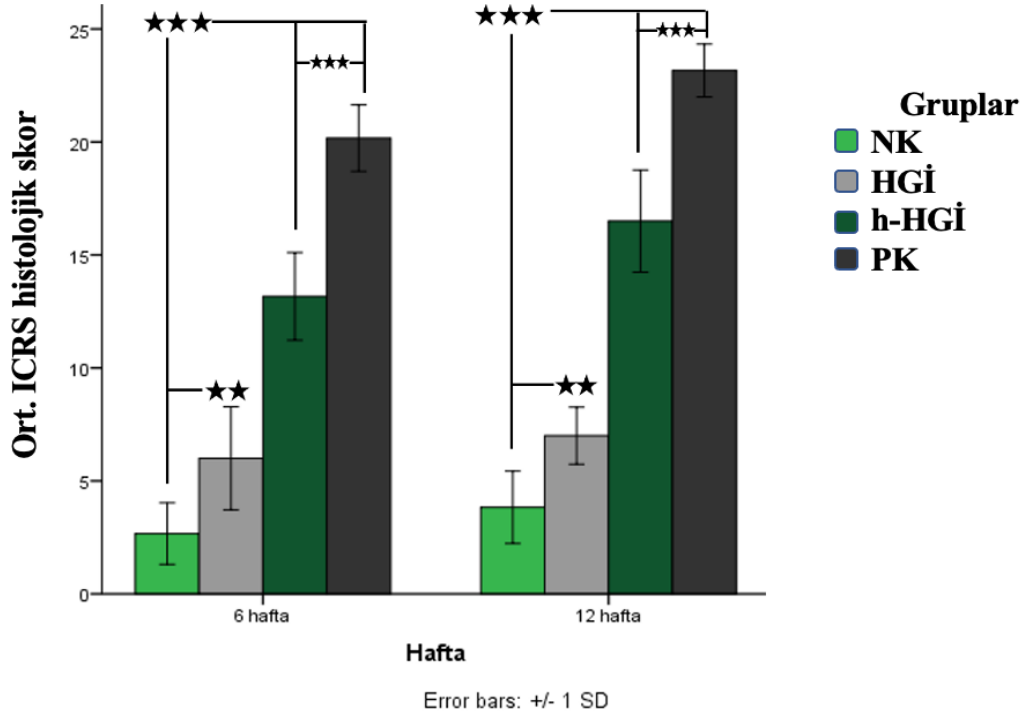
oluşumu bakımından benzer histopatoloji göstermektedir. H&E boyalı preparatlar üzerinden yapılan ICRS ve O'Driscoll histolojik skora sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. Hem 6. Haftada hem 12. Haftada ortalama skorlar yüksekten düşüğe; PK, h-HGİ, HGİ, NK, şeklinde sıralanmıştır. Tüm gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

Tablo 4.1. Gruplara ait ortalama ICRS ve O'Driscoll histolojik skorları.

Grup	6. hafta		12. hafta	
	ICRS	O'Driscoll	ICRS	O'Driscoll
NK	2,66 ± 0,7	1 ± 0	3,83 ± 0,7	1 ± 0
HGİ	6 ± 0,7	4,17 ± 3,12	7 ± 0,7	5,17 ± 1,94
h-HGİ	13,16 ± 0,7	11,17 ± 3,37	16,5 ± 0,7	13,83 ± 4,62
PK	20,16 ± 0,7	16 ± 1,26	23,16 ± 0,7	17 ± 0



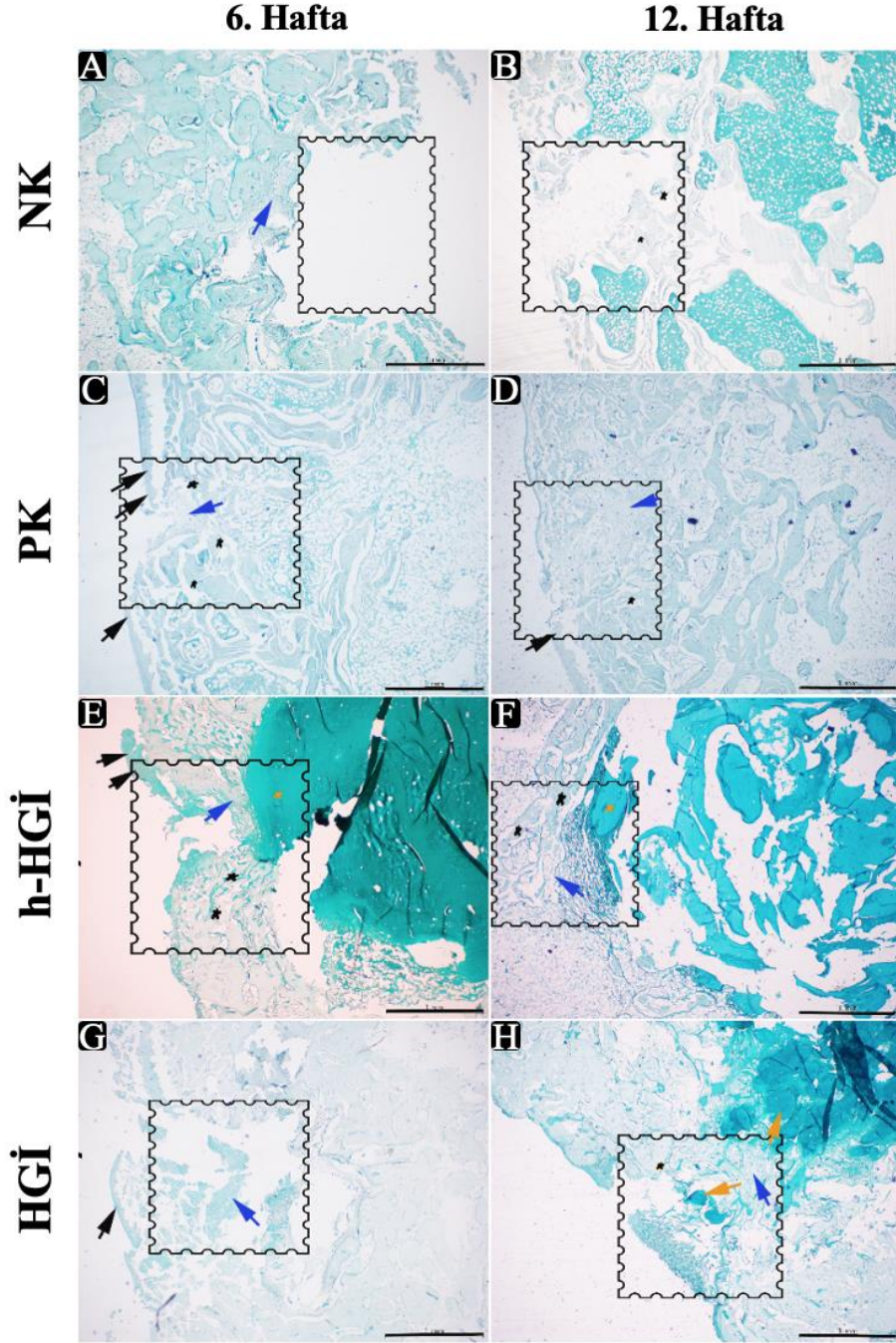
Şekil 4.13. O'Driscoll histolojik skora sonuçları. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)



Şekil 4.14. ICRS histolojik skorlama sonuçları. (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Safranin-O/Fast-Green Boyaması

Preparatlar incelendiğinde, subkortikal kemik ve yeni oluşan kemikte fast-green solüsyonu ile yeşil boyama gözlenmiştir. NK grubu gece boyu bekletilmesine rağmen, safranin-o ile histolojik olarak gözlemlense de kıkırdak tabakada boyanma gözlemlenememiştir. PK, h-HGI, HGI gruplarında histolojik olarak kıkırdak doku oluşumu gözlemlenmiştir. İskele grupları bazik bileşenler içerdiği ve diğer boyalarda (H&E ve Masson tri-krom) olduğu gibi boyalardaki asidik boyalar ile boyandıkları dikkati çekmiştir (Şekil 4.15).

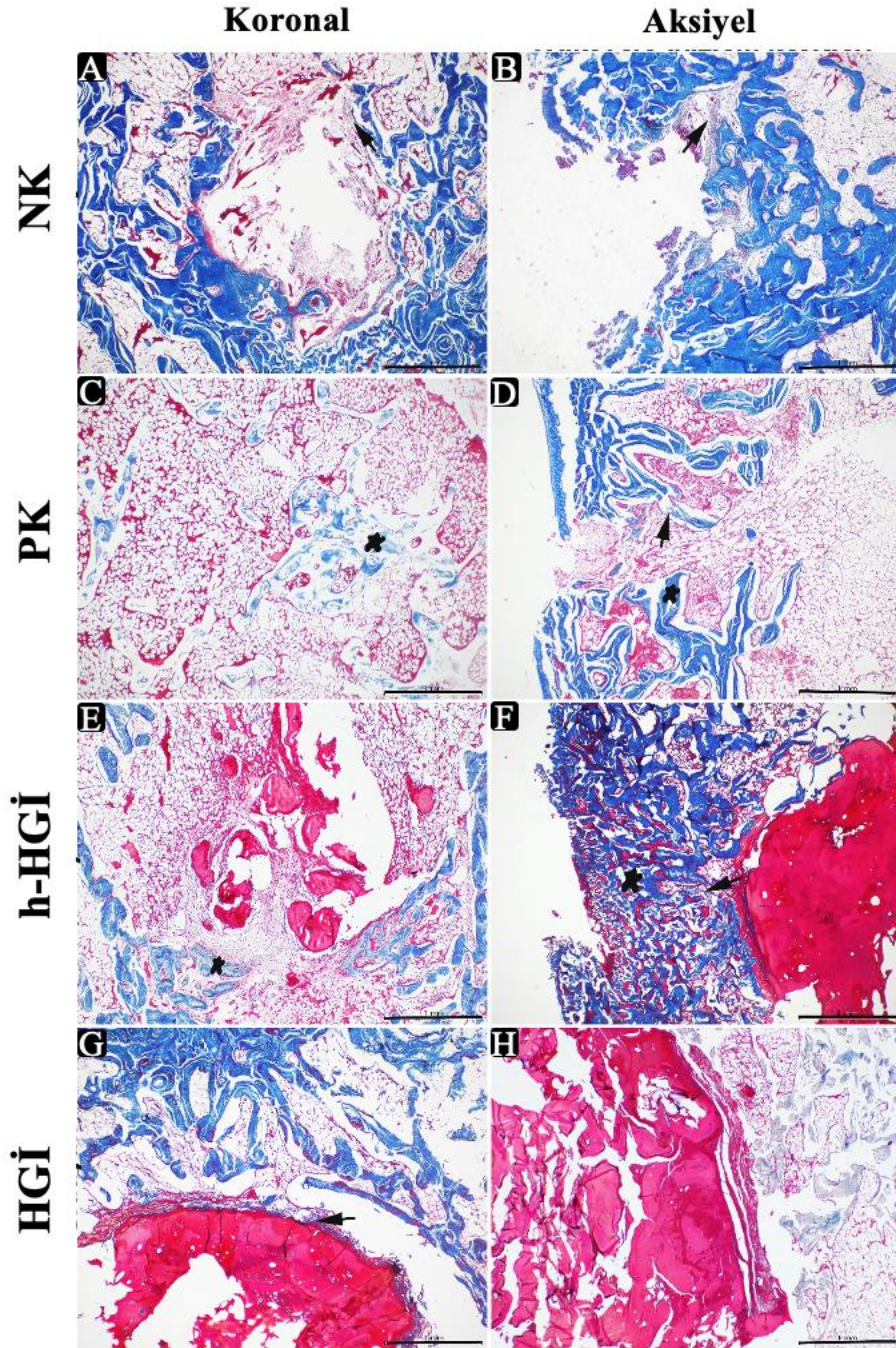


Şekil 4.15. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Safranin-O/Fast-green boyalı kesitler. Kollajen (mavi ok), kırık doku (siyah ok), yeni oluşmuş kemik doku (siyah yıldız), hidrojel iskele kalıntısı (turuncu yıldız ve turuncu ok) ile gösterilmiştir. (X40)

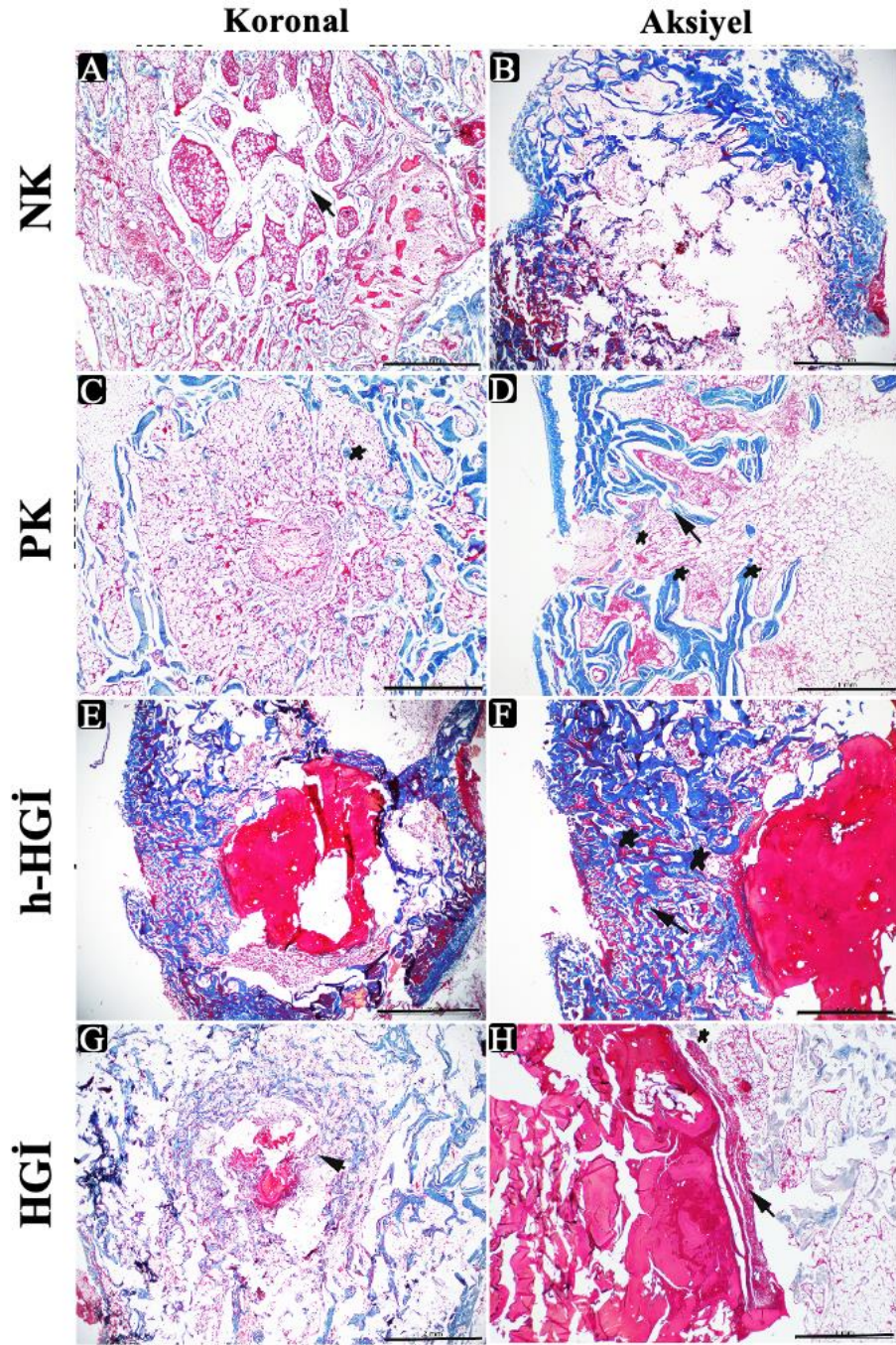
Masson Tri-Krom Boyaması

6. hafta Masson tri-krom boyalı koronal ve aksiyel kesitler incelendiğinde kollajen sentezinin PK ve h-HGİ gruplarında daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. 12

haftalık takipli gruplarda 6 haftalık gruplara kıyasla tüm gruplar açısından kollajen sentezinin göreceli olarak arttığı gözlemlenmiştir. 12. hafta kesitlerinde kollajen sentezinin PK ve h-HGİ gruplarında diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).



Şekil 4.16. Altı haftalık takiplerde gruplara ait Masson Tri-krom boyalı kesitler. Kollajen yapıları (siyah ok), kemik doku (siyah yıldız) ile gösterilmiştir. (X40)

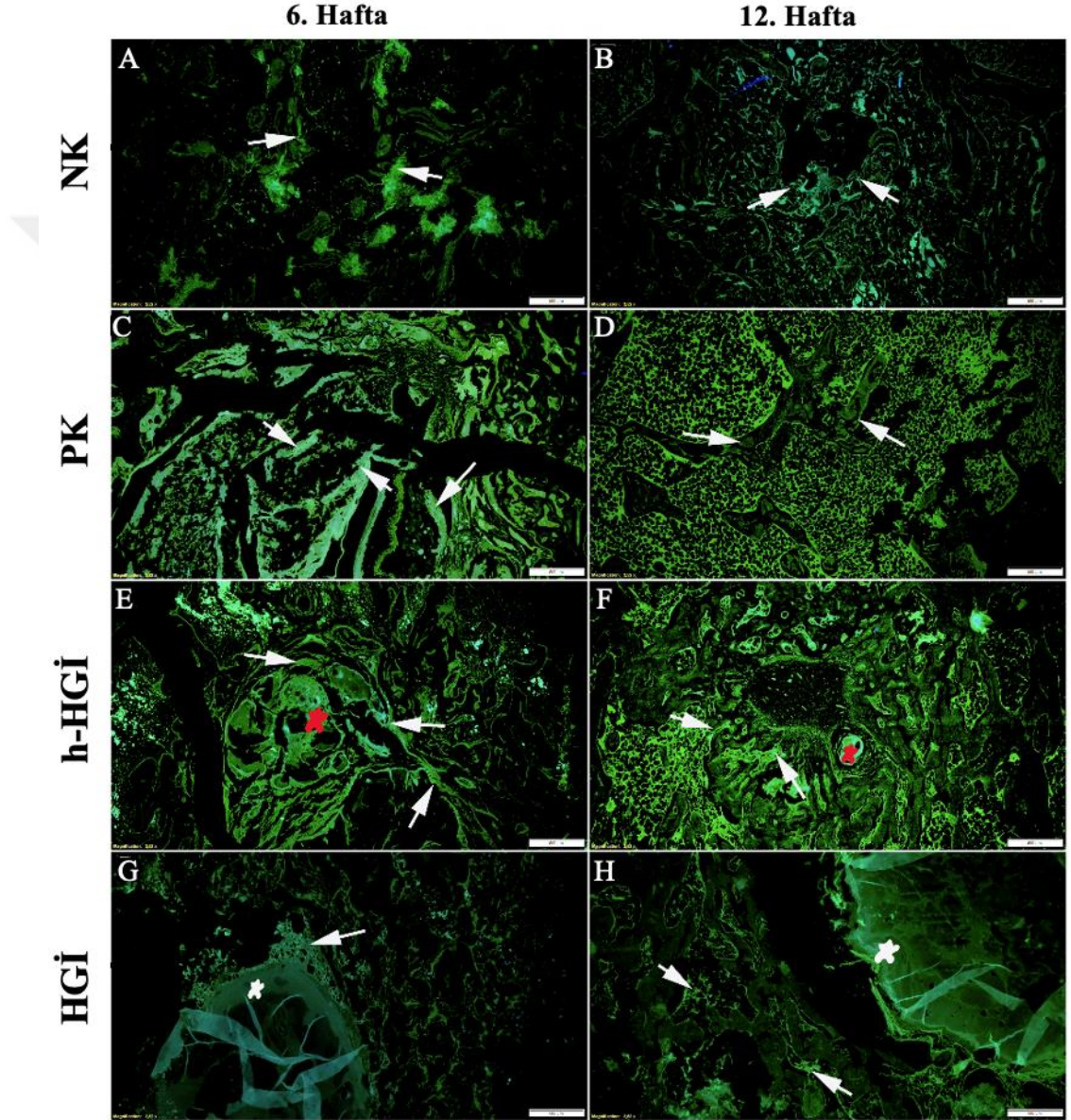


Şekil 4.17. On iki haftalık takiplerde gruplara ait Masson Tri-krom boyalı kesitler. *Kollajen yapıları (siyah ok), kemik doku (siyah yıldız) ile gösterilmiştir. (X40)*

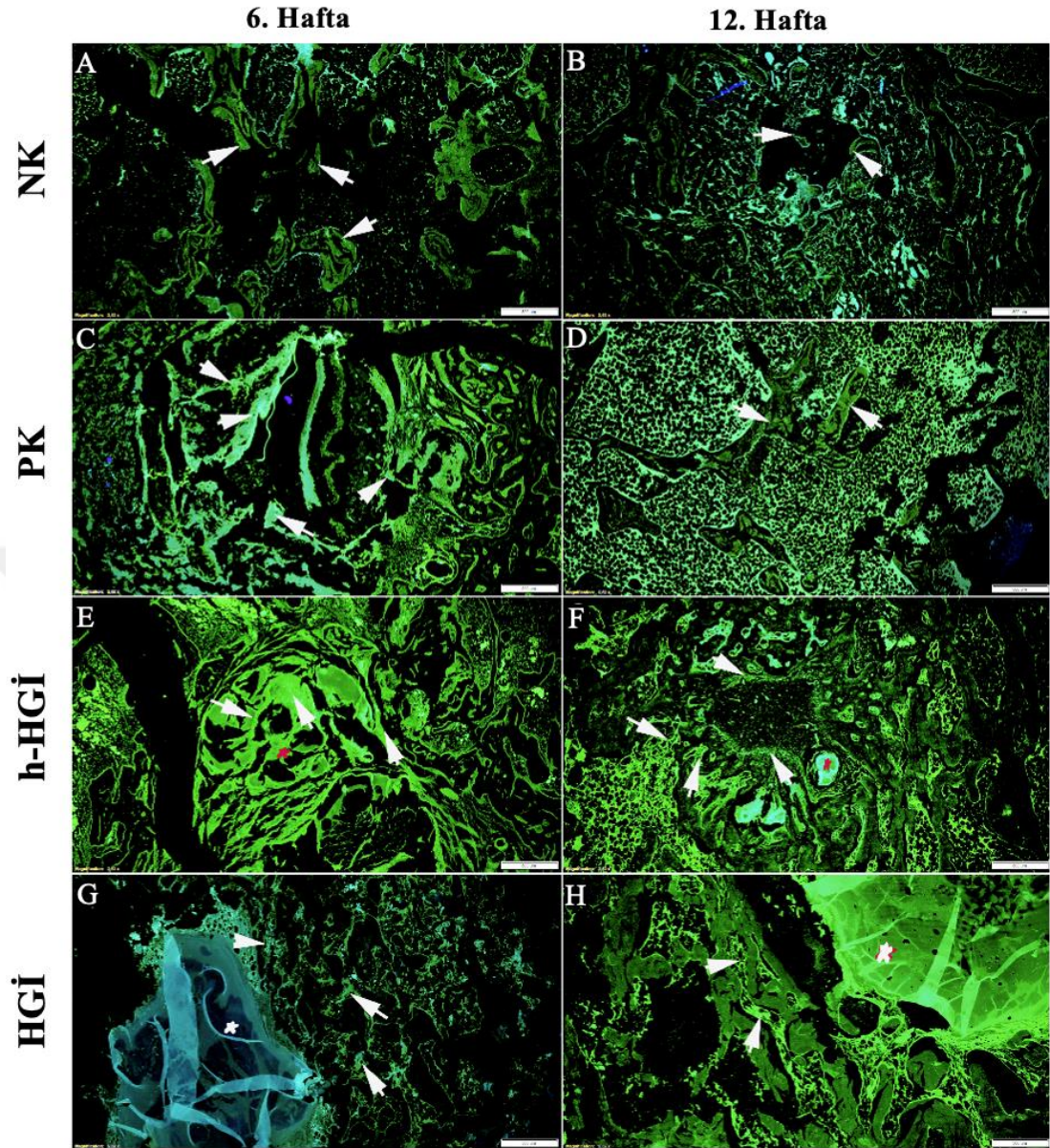
İmmüno Floresan Boyama

Preparatlar incelendiğinde 6 haftalık takip sonrası agrekan, kollajen tip 1 ve kollajen tip 2 immün boyalı preparatlarda NK grubuna kıyasla PK ve h-HGİ gruplarında immün ifadenin belirgin şekilde çok daha fazla olduğu görülmüştür.

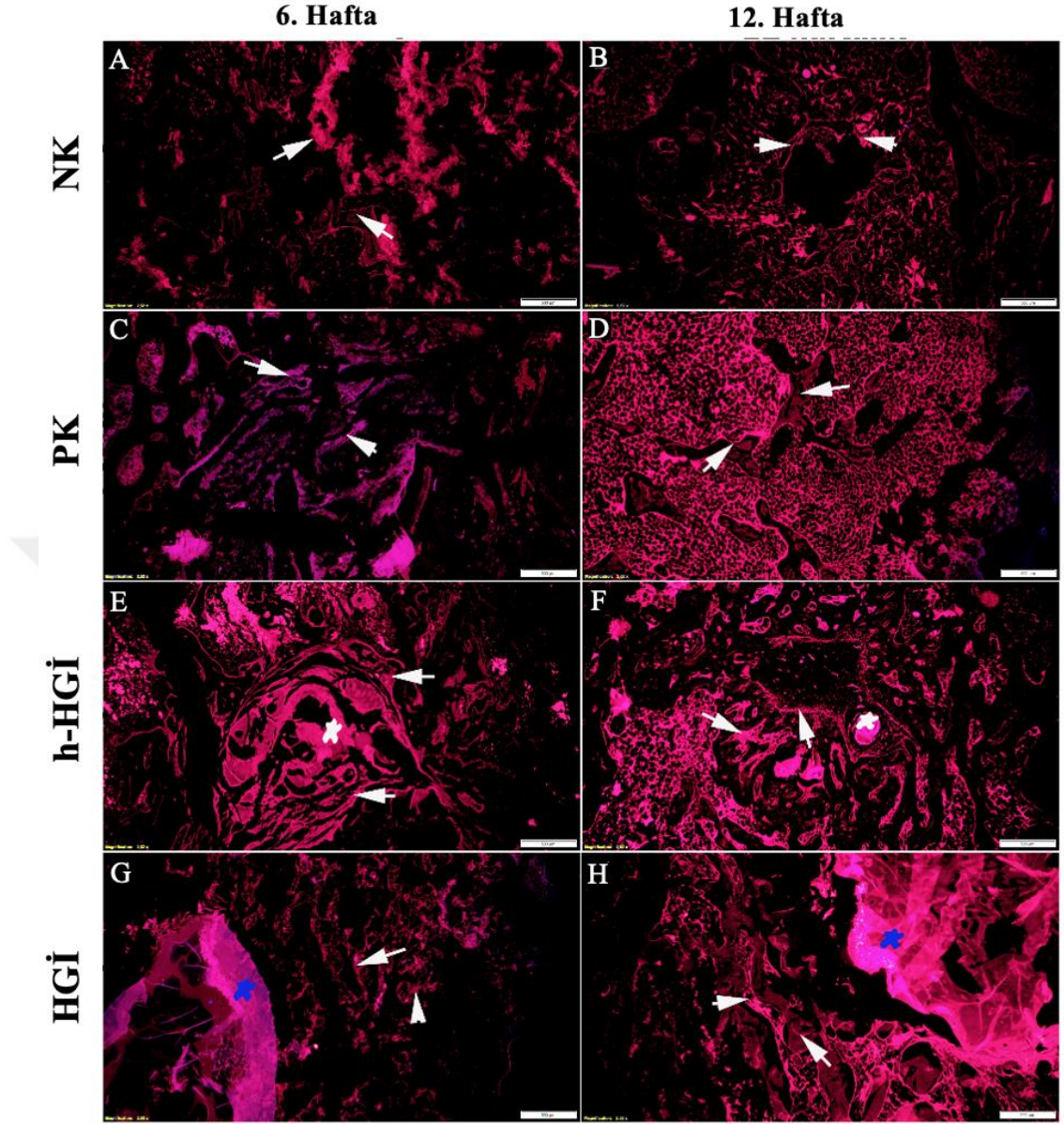
(Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). 12 haftalık gruplar ile 6 haftalık gruplar karşılaştırıldığında agrekan, kollajen tip 1 ve kollajen tip 2 immün boyalı preparatlarda ifadelenmenin artış gösterdiği gözlemlenmiştir. PK ve h-HGİ gruplarındaki yoğun kollajen tip 2 ifadelenmesi oluşan kıkırdak dokunun hiyalin benzeri özellikte olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.18. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Agrekan İmmünfloresan (FITC (yeşil işaretli), DAPI (mavi)) boyama kesitleri. *Agrekan ifadelenme (beyaz ok), hidrojel iskele kalıntısı (mavi, kırmızı, beyaz yıldız) ile gösterilmiştir. (X40)*



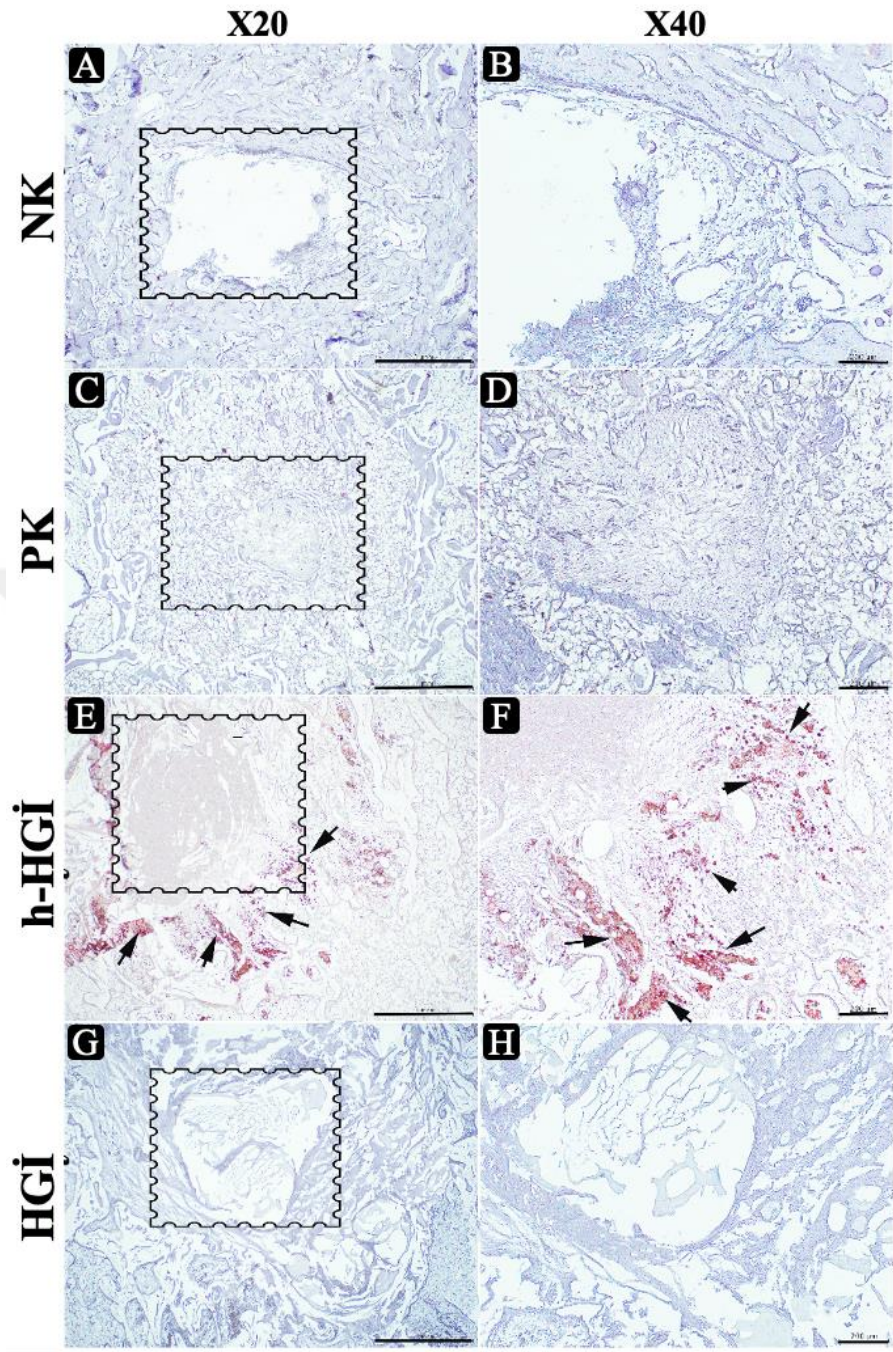
Şekil 4.19. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Kollajen tip 1 İmmünfloresan (FITC (yeşil işaretli), DAPI (mavi)) boyama kesitleri. *Kollajen tip 1* ifadelenme (beyaz ok), hidrojel iskele kalıntısı (mavi, kırmızı, beyaz yıldız) ile gösterilmiştir. (X40)



Şekil 4.20. Altı ve on iki haftalık takiplerde gruplara ait Kollajen tip 2 İmmüno Floresan (Texas Red (kırmızı), DAPI (mavi)) boyama kesitleri. *Kollajen tip 2 ifadenme (beyaz ok), hidrojel iskele kalıntısı (mavi, beyaz yıldız) ile gösterilmiştir. (X40)*

BrdU Boyaması

Hidrojel iskele üzerindeki hUC-MKH'lerin varlığını devam ettirdiklerini göstermek için BrdU işaretleme yapılmıştır. Preparatlar incelendiğinde sadece h-HGI grubunda kahverengi pozitif boyanma olduğu görülmüştür (Şekil 4.21). BrdU ile işaretlenen MKH'lerin çoğunun defekt alanı periferine göç etmiş olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.21. On iki haftalık takipte gruplara ait BrdU boyalı kesitler. Tüm gruplarda defekt alanları kare ile gösterilmiştir. *BrdU pozitif hücreler kahverengi boyanmıştır. (siyah ok)*

5. TARTIŞMA

Tavşan dizi OKD modelinde gradyan yapıda, mezankimal kök hücre içeren, özgün özellikleri olan ve mikro-ekstrüzyon 3-B biyoyazıcı ile üretilen hidrojel doku iskelesinin iyileşme üzerine olan etkilerinin incelendiği bu çalışmada; h-HGİ grubunda elde edilen yeni kemik ve kıkırdak oluşumunda birçok parametrede NK grubuna kıyasla anlamlı üstünlük görülmüştür; PK grubuna yakın sonuçlar elde edilmiş olup, çalışma hipotezi doğrulanmıştır.

Çalışma kapsamında üretilen doku iskelelerinin ekstrüzyon tabanlı 3-B biyoyazıcı ile üretilmesi, gradyan özellik taşıması, canlı mezenkimal kök hücre içermesi ve bu iskelelerde biyoaktif molekül olarak bor ve peptit amfifillerin kullanılması nedeniyle üretilen iskeleler bu alandaki birçok teknolojiyi içerisinde barındırmaktadır ve yenilikçi çözümler sunmaktadır.

Yapılan DAPI ve *Live/Dead* boyamaları 3-B biyoyazıcı ile üretilen doku iskelelerindeki canlı hücrelerin yoğun, ölü hücre sayısının ise çok az olduğu göstermiştir. Sonuç olarak, kullanılan biyomalzemelerin (kitosan, B-nHAp, Pluronic® F127) ve biyo-yazım sürecindeki parametrelerin hücre canlılığı üzerine herhangi bir olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir.

PK grubu olarak otolog osteokondral doku implantasyonu işlemi yapılması çalışmanın özgünlüğünü arttırmaktadır. Literatürde benzer hayvan çalışmalarında PK grubuna rastlanmamıştır. Otolog osteokondral doku transferi klinikte güncel olarak kullanılmakta olan bir metot olup etkinliği farklı çalışmalarda gösterilmiştir (107-110). Bu yöntemde elde edilen hiyalin kıkırdak ile iyileşme tedavinin en önemli avantajlarından biridir (111). Çalışma gruplarının bu dizaynı sayesinde gradyan doku iskelesi grupları klinikte altın standart uygulamalardan biri olan bir cerrahi yöntemle karşılaştırılmıştır.

Osteokondral ünite, kendi içlerinde farklı yapısal seviyeler barındıran iki temel katmandan oluşmaktadır: kıkırdak ve subkondral kemik. Her seviyede ana makro-moleküler içerik, hücre dizilimi ve perfüzyon kapasiteleri farklılık göstererek özgün fonksiyonlar göstermesine neden olur (112). Güncel literatürde yaygın olarak kullanılan birçok doku iskelesi materyali, kök hücre çeşidi ve biyoaktif molekül olmasına rağmen ideal bir dizayn ortaya konulamamıştır. Osteokondral ünitenin bu

sıra dışı yapısını taklit etme amacıyla gradyan doku iskeleleri giderek popülerleşmektedir. 3-B yazıcılar ise katman-katman yazdırma teknolojisiyle araştırmacıların gradyan iskeleler tasarlamasına olanak sağlar (23). Osteokondral üniteyi taklit edebilmek amacıyla çalışmamızda kullandığımız doku iskelesi de 3-B biyoyazıcı ile üretilmiş olup gradyan özelliği her katmanda farklı konsantrasyon ve içerikteki biyoaktif molekül dizaynıyla kazandırılmıştır. Literatürde gradyan doku iskelelerinin OKD modelinde monofazik iskelelere göre daha iyi iyileşme etkisi gösterdiğini belirten çalışmalar mevcuttur (113, 114). Idaszek ve ark. 3-B biyoyazıcı ile ürettikleri jelatin metakrilamid, hyaluronik asit, kondroitin sülfat ve insan kökenli MKH içeren gradyan iskeleyi sıçan OKD modeline implante etmişlerdir (115). Gradyan iskele grubunun negatif kontrol grubuna göre daha üstün rejenerasyon gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda implante edilen hidrojel doku iskelesi güçlü osteojenik etkiler göstermiştir. HGİ ve h-HGİ grupları 12. haftada PK grubundan yüksek KMD ve BV/TV oranına sahiptir. Shi ve ark. dopamin-modifiye-aljinat ve kitosan-hidroksiapatit bileşenleri içeren gradyan yapıdaki kemik doku iskelesinin osteojenik etkilerini tavşan femoral defekt modelinde çalışmışlardır (116). Gradyan iskelenin mükemmel osteojenik aktivitesi olduğunu ve gradyan yapıda olmayan iskeleye göre daha iyi bir kemik rejenerasyonu sağladığını belirtmişlerdir. Hidroksiapatitin osteojenik etkileri literatürde genişçe araştırılmıştır (117-120). Ayrıca kitosanın da doğal hücre dışı matrikse benzer bir mikro çevre sağlayarak osteokondüktif etkiler gösterdiği bilinmektedir (121). Kitosan ve hidroksiapatitin kombine edilmesi hem mineralizasyon sürecini hem de kemik oluşumu sinyal yollarını uyararak doku iskelelerinin osteojenik etkilerini daha da güçlendirmektedir (122).

Bor mineralinin de kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkileri mevcuttur (74, 123, 124). Gümüşderelioğlu ve ark. borik asit enkapsüle edilmiş kitosan nanopartiküllerinin kemik rejenerasyonu üzerine in-vitro etkilerini araştırmışlardır (73). Borun kontrollü salınımının pre-osteoblast hücrelerinin çoğalmasında ve osteojenik farklılaşmasında anlamlı etkisi olduğunu bulmuşlardır. Benzer şekilde Gizer ve ark. hücre kültüründe yaptıkları çalışmada bor katkılı nHAp bileşiklerinin MKH'lerde alkalen fosfataz aktivitesini artırarak osteojenik farklılaşmayı arttırdığını bildirmişlerdir (125). Moleküler etkileri daha detaylı incelemek üzere yaptıkları

transkriptom analizinde bir katkı bileşiklerin Wnt, TGF- β ve stres sinyal yolları reseptör genlerine etki ettiklerini belirtmişlerdir (125). Çalışmamız kapsamında üretilen doku iskelesinin osteal katmanlarında kitosan ve B-nHAp kullanımı defekt bölgesindeki kemik rejenerasyonunu güçlendirmiştir.

h-HGİ grubu NK grubuna göre daha üstün kırıkta rejenerasyonu göstermiştir. Makroskopik ve histolojik bulgulara bakıldığında h-HGİ grubunda 12. haftada defekt yüzeyinin tama yakın kırıkta benzeri yeni dokuyla dolduğu görülmüştür. İmmünohistokimyasal çalışmalarda görülen yoğun tip II kollajen sinyali oluşan yeni kırıkta dokusunun histopatolojik olarak hiyaline benzediğine işaret etmektedir. Hidrojeldaki peptit amfifillerin kondral rejenerasyon etkisi mevcuttur. Yang ve ark. polipeptit yapıdaki hidrojel iskeleyi tavşan troklea OKD modeline implante etmişlerdir (126). Hidrojel grubunda defektin doğal kırıkta benzer özellikteki dokuyla dolarak kondral iyileşmenin hızlandığını tespit etmişlerdir. Ayrıca hidrojel grubun negatif kontrol grubuna göre daha yüksek makroskopik ve histolojik ICRS skorları olduğunu bildirmişlerdir. Yazarlar, polipeptit hidrojinin uygun biyo-çözünürlük, mükemmel biyo-uyumluluk ve düşük immünojenite özellikleriyle başarılı bir OKD onarımı gerçekleştirdiği sonucuna varmıştır. Peptit amfifillerin doku mühendisliğindeki kullanımı giderek artmakta olup, yapısındaki oligopeptitlerin aminoasit sekansları değiştirilerek farklı özellikler kazandırmak mümkündür (127). Tez çalışmamızdaki gradyan hidrojelde de kullanılan K-PA ve E-PA sekanslarının hücre dışı matrikste yer alan proteoglikanların içindeki GAG zincirlerini taklit ederek kondrojenik hücre farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (128). İmmünohistokimyasal boyamalarda h-HGİ grubunda görülen güçlü agrekan ve kol-II sinyalleri de PA içeriğinin hücre dışı matrikse benzer bir mikro-çevre oluşturarak kırıkta iyileşmesine katkı sağladığını düşündürmüştür.

Grup içi heterojenite olmasına karşın çalışmamızdaki bazı hidrojel iskele implante edilen deneklerde defektin merkez bölgesinde fissür oluşumu gözlenmiştir. Bu bulgu literatürde sinoviyal sıvı basıncıyla açıklanmaya çalışılmıştır. Hiyalin kırıkta oluşumu için, mikro-çevredeki bazı mekanik koşulların sağlanması gerekmektedir (129). Hidrostatik basınç kondrojenik farklılaşmayı uyarmaktadır ancak fizyolojik sınırların üzerindeki basınçlar doku rejenerasyonunda olumsuz etki gösterebilir (130, 131). Levingstone ve ark. hyaluronik asit, hidroksiapatit, tip I ve II

kollajen içerikli multi-fazik doku iskelesini tavşan OKD modeline implante etmişlerdir (95). Doku iskelesi gruplarında rejenerasyon bölgesinde yer yer yüzeyden basamaklanma, fissür oluşumu ve subkondral kist oluşumu gözlemlenmiştir. Bu bulguları cerrahi sonrası sinoviyal hipertrofiye sekonder oluşan sinoviyal sıvı basıncına bağlamışlardır.

Osteokondral doku mühendisliğinde hücre kullanımı ve kullanılacak hücrenin kaynağı hala tartışma konusudur. Hidrojel doku iskelemizde hUC-MKH kullanılmıştır. hUC-MKH'ler non-invaziv olarak elde edilebilmektedirler ve birçok çalışmada osteokondral doku rejenerasyonunda etkili oldukları gösterilmiştir. Gelişmiş hücre aktivitesi ve çoğalma becerisi olan hUC-MKH'ler aynı zamanda düşük immünöjeniteye sahiptirler (132). Zheng ve ark. 3-B biyoyazdırılmış polikaprolakton-hidroksiapatit içerikli hUC-MKH ekilmiş doku iskelesinin rejenerasyon etkilerinin tavşan modelinde araştırmışlardır (133). Sonuçta hücre yüklü iskelelerin hücresiz iskelelere göre anlamlı olarak kemik ve kıkırdak iyileşmesini desteklediğini belirtmişlerdir. You ve ark. tavşan OKD modelinde, tedavide kıkırdak partiküller enkapsüle edilmiş insan amniyotik MKH yüklü levhaların sadece kıkırdak partiküllerine kıyasla daha yüksek makroskopik ve histolojik skorlar gösterdiğini bildirmişlerdir (134). Çalışmamızda da h-HGİ grubu, NK ve HGİ gruplarına göre daha üstün kondrojenik iyileşme göstermiştir.

6. ve 12. haftalarda h-HGİ grubunun BrdU pozitif boyanması hUC-MKH'lerin *ksenojenik* ortamda hayatta kaldıklarını göstermektedir. İlginç şekilde, hücrelerin iskelenin periferik bölgelerine göç ettiği görülmüştür. Kıkırdak avasküler bir doku olup perikondriumdan beslenir (29). Diz eklemi gibi perikondrium içermeyen bölgeler sinovyal sıvı ve subkortikal kemikten beslenir. Eklem içi cerrahi işlem sonrası sinovyal sıvının azalması ve subkondral kemiğin de iyatrojenik olarak hasarlanması ile iskelenin kıkırdak dokuya denk gelen kısmındaki hücrelerin yeterli besin kaynağı olmadığı düşünülmüştür. Defekt bölgesinde yeni oluşmuş damarlar görülmesine karşın, hUC-MKH'lerin besin kaynağına yönelmeye programlı davranışları nedeniyle perifere doğru göç etmiş oldukları düşünülmüştür.

Hidrojel iskelelerin difüzyon kapasitesi inorganik madde yoğunluğu, ortam sıcaklığı, pH, porozite gibi birçok faktöre bağlıdır (135). Hidrojel içeriğindeki inorganik madde yoğunluğu arttıkça difüzyon zorlaşmaktadır (136). İdeal por

büyüklüğü ise tartışmalıdır. Mandal ve ark. 3-B ipek fibroin iskelelerle yaptıkları *ex-vivo* çalışmada, insan dermal fibroblastların iskele üzerindeki göç hareketlerini takip etmişlerdir (137). Merkezden periferik doğru hücre göçü gözlemleyen araştırmacılar bunun doku iskelesindeki elverişli poroziteyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Tez çalışmamızda kullanılan hidrojel iskelenin de hücre göçü için elverişli bir geometriye sahip olduğu söylenebilir ancak difüzyon kapasitesinin belirlenmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Toplamda 6 denek çalışmadan çıkarılmıştır. Üç tavşan cerrahi sonrası stres nedeniyle erken dönemde eksitus olmuştur. Diğer üç tavşan dizlerindeki enfeksiyon bulguları nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır. Enfeksiyon bulguları gösteren dizlerden 2 tanesi PK, 2 tanesi h-HGİ, 1 tanesi HGİ ve 1 tanesi NK grubuna aittir. Enfeksiyon bulgusu gösteren dizlerde belirgin bir yönelim gözlenmemiştir. Gruplar arasındaki dengeli dağılım doku iskelelerinin enfeksiyon açısından risk faktörü oluşturduğu ihtimalini azaltmaktadır. Ancak hem PK grubunda hem de iskele grubunda negatif kontrole grubuna göre daha fazla sayıda enfeksiyon gözlenmiştir. Bunun bir nedeni bu grupların cerrahi sürelerinin daha uzun olması olabileceği düşünülmüştür. Literatürde uzamış cerrahi sürenin hayvanlarda cerrahi alan enfeksiyonu açısından bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir (138).

Tavşan yürüme biyomekaniği insandan çok farklıdır (28). Örneğin tavşanların doğal pozisyonunda dizler derin fleksiyondadır. Türler arası farklılar bulguların kliniğe uygulanabilirliği açısından kısıtlılıklar getirmektedir. Yine de yeni üretilen biyomalzemelerin klinikte kullanılabilmesi için *in-vivo* ve *in-vitro* koşullarında etkilerinin ve güvenliklerinin test edilmesi gerekmektedir (85). Bu nedenle doku iskelelerinin biyo-uyumluluk ve mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde uygun bir hayvan modeli çalışması vazgeçilmez bir adımdır. Diğer bir kısıtlılık, tavşanların kemik yapım-yıkım metabolizmaları hızlı olup 6. ve 12. haftalık takipler erken ve göreceli olarak orta dönem sonuçları temsil etmektedir. 12. hafta spesimenlerin histolojik analizinde biyo-çözünme süreci tamamlanmamış hidrojel iskeleye ait kalıntılar gözlenmiştir. Literatürde benzer hayvan çalışmalarında biyomalzemenin çözünmesinin 2 yıla kadar sürebildiği vurgulanmıştır (139). 6. haftadan 12. haftaya doğru daha yüksek oranda biyo-çözünüm ve daha iyi rejenerasyon görülmüştür. Bu nedenle daha uzun takip süreli çalışma dizaynlarıyla daha yüksek etkiler görüleceği

düşünülmüştür. *In vivo* deneyler sırasında post-op dönemde 6 adet tavşan (n=12 diz) çalışmadan çıkarılması nedeniyle gruplardaki denek sayısı azalmıştır. KMD ve BV/TV gibi bazı parametreler tedavi grupları lehine oransal olarak üstün bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Denek sayısı arttırılarak istatistiksel olarak anlamlı fark elde edileceği öngörülmüştür.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Osteokondral defektlerin tedavisi zordur ve mevcut yöntemler bazı potansiyel riskler barındırmaktadır. Doku mühendisliği bu alanda yenilikçi çözümler getirmektedir. Klinikte kullanıma giren doku iskelesi sayısı da her geçen gün artmaktadır (140). Bu iskelelerle kısa dönemde iyi sonuçlar elde edildiği bildirilse de (141-143) , doğal osteokondral üniteyi taklit edebilecek yeni dizaynlara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda kullanılan 3-B yazdırılmış hidrojel doku iskelesi; özgün özellikleriyle bu alandaki ihtiyaca cevap vermek üzere tasarlanmıştır. Bu iskele gradyan yapıda olup kırıkta bölgede peptit amfifil-kitosan bileşikler yoğun olarak yer alırken, kemik bölgede derinleştikçe bor-nanohidroksiapatit-kitosan bileşiğinin yoğunluğu artmaktadır. Ayrıca rejeneratif potansiyeli arttırmak amacıyla hUC-MKH'ler biyomürekkepe entegre edilmiştir.

Bu çalışmada hUC-MKH yüklü hidrojel doku iskelesinin *in-vivo* rejenerasyon etkileri tavşan dizi OKD modelinde araştırılmıştır. Grup içi farklılar gözlense de, hücre yüklü doku iskelesi grubunun doğal osteokondral üniteye benzer özellikler göstererek kemik ve kırıkta rejenerasyonunu desteklediği görülmüştür. Makroskopik, radyolojik ve histolojik parametreler değerlendirildiğinde hücre yüklü doku iskelesi grubunda negatif kontrol grubundan üstün, pozitif kontrol grubuna yakın skorlar elde edilmiştir. Bu yeni ve özgün gradyan yapıdaki hidrojel doku iskelesi OKD tedavisinde umut verici bir etkinlik göstermiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Zhou L, Gjvm VO, Malda J, Stoddart MJ, Lai Y, Richards RG, et al. Innovative Tissue-Engineered Strategies for Osteochondral Defect Repair and Regeneration: Current Progress and Challenges. *Adv Healthc Mater.* 2020:e2001008.
2. Rodriguez-Merchan EC, SpringerLink (Online service). Articular cartilage defects of the knee diagnosis and treatment. Milano: Springer Milan : Imprint: Springer; 2012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/978-88-470-2727-5>.
3. Howell M, Liao Q, Gee CW. Surgical Management of Osteochondral Defects of the Knee: An Educational Review. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2021;14(1):60-6.
4. McNickle AG, Provencher MT, Cole BJ. Overview of existing cartilage repair technology. *Sports Med Arthrosc Rev.* 2008;16(4):196-201.
5. Anderson SR, Faucett SC, Flanigan DC, Gmabardella RA, Amin NH. The history of radiofrequency energy and Coblation in arthroscopy: a current concepts review of its application in chondroplasty of the knee. *J Exp Orthop.* 2019;6(1):1.
6. Spahn G, Hofmann GO, von Engelhardt LV. Mechanical debridement versus radiofrequency in knee chondroplasty with concomitant medial meniscectomy: 10-year results from a randomized controlled study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24(5):1560-8.
7. Gharaibeh M, Szomor A, Chen DB, MacDessi SJ. A Retrospective Study Assessing Safety and Efficacy of Bipolar Radiofrequency Ablation for Knee Chondral Lesions. *Cartilage.* 2018;9(3):241-7.
8. Miller BS, Briggs KK, Downie B, Steadman JR. Clinical Outcomes following the Microfracture Procedure for Chondral Defects of the Knee: A Longitudinal Data Analysis. *Cartilage.* 2010;1(2):108-12.
9. Goyal D, Keyhani S, Lee EH, Hui JH. Evidence-based status of microfracture technique: a systematic review of level I and II studies. *Arthroscopy.* 2013;29(9):1579-88.
10. Gao L, Goebel LKH, Orth P, Cucchiaroni M, Madry H. Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Dis Model Mech.* 2018;11(6).

11. Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, et al. Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *J Orthop Res*. 2009;27(11):1432-8.
12. Pareek A, Reardon PJ, Maak TG, Levy BA, Stuart MJ, Krych AJ. Long-term Outcomes After Osteochondral Autograft Transfer: A Systematic Review at Mean Follow-up of 10.2 Years. *Arthroscopy*. 2016;32(6):1174-84.
13. Solheim E, Hegna J, Strand T, Harlem T, Inderhaug E. Randomized Study of Long-term (15-17 Years) Outcome After Microfracture Versus Mosaicplasty in Knee Articular Cartilage Defects. *Am J Sports Med*. 2018;46(4):826-31.
14. Bentley G, Biant LC, Carrington RW, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85(2):223-30.
15. Thomas D, Shaw KA, Waterman BR. Outcomes After Fresh Osteochondral Allograft Transplantation for Medium to Large Chondral Defects of the Knee. *Orthop J Sports Med*. 2019;7(3):2325967119832299.
16. Chahal J, Gross AE, Gross C, Mall N, Dwyer T, Chahal A, et al. Outcomes of osteochondral allograft transplantation in the knee. *Arthroscopy*. 2013;29(3):575-88.
17. Gikas PD, Bayliss L, Bentley G, Briggs TW. An overview of autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Br*. 2009;91(8):997-1006.
18. Jacob G, Shimomura K, Nakamura N. Osteochondral Injury, Management and Tissue Engineering Approaches. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:580868.
19. Oliveira JM, Pina S, Reis RL, San Roman J, SpringerLink (Online service). Osteochondral tissue engineering : challenges, current strategies, and technological advances. 1 online resource (ix, 511 pages) p.
20. Smith BD, Grande DA. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nat Rev Rheumatol*. 2015;11(4):213-22.
21. Cakmak S. Osteokondral Doku Mühendisliği. *Natural and Applied Science Journal*. 2018;1(1):9-22.
22. Zhang B, Huang J, Narayan RJ. Gradient scaffolds for osteochondral tissue engineering and regeneration. *J Mater Chem B*. 2020;8(36):8149-70.

23. Daly AC, Freeman FE, Gonzalez-Fernandez T, Critchley SE, Nulty J, Kelly DJ. 3D Bioprinting for Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater.* 2017;6(22).
24. Doyle SE, Snow F, Duchi S, O'Connell CD, Onofrillo C, Di Bella C, et al. 3D Printed Multiphasic Scaffolds for Osteochondral Repair: Challenges and Opportunities. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22).
25. Wang L, Zhao L, Detamore MS. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in a sandwich approach for osteochondral tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5(9):712-21.
26. Lee JC, Lee SY, Min HJ, Han SA, Jang J, Lee S, et al. Synovium-derived mesenchymal stem cells encapsulated in a novel injectable gel can repair osteochondral defects in a rabbit model. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(19-20):2173-86.
27. Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, et al. Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(5):1109-18.
28. Meng X, Ziadlou R, Grad S, Alini M, Wen C, Lai Y, et al. Animal Models of Osteochondral Defect for Testing Biomaterials. *Biochem Res Int.* 2020;2020:9659412.
29. Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I, Rodeo SA. Basic Science of Articular Cartilage. *Clin Sports Med.* 2017;36(3):413-25.
30. Bajpayee AG, Grodzinsky AJ. Cartilage-targeting drug delivery: can electrostatic interactions help? *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(3):183-93.
31. Han EH, Chen SS, Klisch SM, Sah RL. Contribution of proteoglycan osmotic swelling pressure to the compressive properties of articular cartilage. *Biophys J.* 2011;101(4):916-24.
32. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health.* 2009;1(6):461-8.
33. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2006;2(7):373-82.

34. Goyal D, Goyal A, Adachi N. Subchondral Bone: Healthy Soil for the Healthy Cartilage. In: Gobbi A, Espregueira-Mendes J, Lane JG, Karahan M, editors. *Bio-orthopaedics: A New Approach*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. p. 479-86.
35. Madry H, van Dijk CN, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18(4):419-33.
36. Yan LP, Oliveira JM, Oliveira AL, Reis RL. Current Concepts and Challenges in Osteochondral Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *ACS Biomater Sci Eng*. 2015;1(4):183-200.
37. Izadifar Z, Chen X, Kulyk W. Strategic design and fabrication of engineered scaffolds for articular cartilage repair. *J Funct Biomater*. 2012;3(4):799-838.
38. Slattery C, Kweon CY. Classifications in Brief: Outerbridge Classification of Chondral Lesions. *Clin Orthop Relat Res*. 2018;476(10):2101-4.
39. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Joint Surg Br*. 1961;43-B:752-7.
40. Outerbridge RE. Further Studies on the Etiology of Chondromalacia Patellae. *J Bone Joint Surg Br*. 1964;46:179-90.
41. Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. [The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint]. *Orthopade*. 1999;28(1):26-32.
42. Orth P, Gao L, Madry H. Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2020;28(3):670-706.
43. Solheim E, Hegna J, Oyen J, Harlem T, Strand T. Results at 10 to 14 years after osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee. *Knee*. 2013;20(4):287-90.
44. Armoiry X, Cummins E, Connock M, Metcalfe A, Royle P, Johnston R, et al. Autologous Chondrocyte Implantation with Chondrosphere for Treating Articular Cartilage Defects in the Knee: An Evidence Review Group Perspective of a NICE Single Technology Appraisal. *Pharmacoeconomics*. 2019;37(7):879-86.
45. Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RW, Flanagan AM, Briggs TW, et al. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous

chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(5):640-5.

46. Kluyskens L, Debieux P, Wong KL, Krych AJ, Saris DBF. Biomaterials for meniscus and cartilage in knee surgery: state of the art. *J ISAKOS.* 2022;7(2):67-77.

47. Verdonk P, Dhollander A, Almqvist KF, Verdonk R, Victor J. Treatment of osteochondral lesions in the knee using a cell-free scaffold. *Bone Joint J.* 2015;97-B(3):318-23.

48. Christensen BB, Foldager CB, Jensen J, Jensen NC, Lind M. Poor osteochondral repair by a biomimetic collagen scaffold: 1- to 3-year clinical and radiological follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016;24(7):2380-7.

49. Kon E, Robinson D, Verdonk P, Drobic M, Patrascu JM, Dulic O, et al. A novel aragonite-based scaffold for osteochondral regeneration: early experience on human implants and technical developments. *Injury.* 2016;47 Suppl 6:S27-S32.

50. Chu CR, Douchis JS, Yoshioka M, Sah RL, Coutts RD, Amiel D. Osteochondral repair using perichondrial cells. A 1-year study in rabbits. *Clin Orthop Relat Res.* 1997(340):220-9.

51. Chen G, Sato T, Tanaka J, Tateishi T. Preparation of a biphasic scaffold for osteochondral tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C.* 2006;26(1):118-23.

52. Di Luca A, Szlajak K, Lorenzo-Moldero I, Ghebes CA, Lepedda A, Swieszkowski W, et al. Influencing chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in scaffolds displaying a structural gradient in pore size. *Acta Biomater.* 2016;36:210-9.

53. Di Luca A, Ostrowska B, Lorenzo-Moldero I, Lepedda A, Swieszkowski W, Van Blitterswijk C, et al. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Sci Rep.* 2016;6:22898.

54. Radhakrishnan J, Manigandan A, Chinnaswamy P, Subramanian A, Sethuraman S. Gradient nano-engineered in situ forming composite hydrogel for osteochondral regeneration. *Biomaterials.* 2018;162:82-98.

55. Seo SS, Kim CW, Jung DW. Management of focal chondral lesion in the knee joint. *Knee Surg Relat Res.* 2011;23(4):185-96.

56. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(2):146-50.
57. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002;10(3):199-206.
58. Haleem AM, Singergy AA, Sabry D, Atta HM, Rashed LA, Chu CR, et al. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage*. 2010;1(4):253-61.
59. Wong KL, Lee KB, Tai BC, Law P, Lee EH, Hui JH. Injectable cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in varus knees with cartilage defects undergoing high tibial osteotomy: a prospective, randomized controlled clinical trial with 2 years' follow-up. *Arthroscopy*. 2013;29(12):2020-8.
60. Xie X, Zhang Q, Zhou T, Ma Q, Liao J. The Review of Nanomaterials Inducing the Differentiation of Stem Cells into Chondrocyte Phenotypes in Cartilage Tissue Engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7):600-7.
61. Deng Z, Jin J, Wang S, Qi F, Chen X, Liu C, et al. Narrative review of the choices of stem cell sources and hydrogels for cartilage tissue engineering. *Ann Transl Med*. 2020;8(23):1598.
62. Duan P, Pan Z, Cao L, Gao J, Yao H, Liu X, et al. Restoration of osteochondral defects by implanting bilayered poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds in rabbit joints for 12 and 24 weeks. *J Orthop Translat*. 2019;19:68-80.
63. Park YB, Ha CW, Kim JA, Rhim JH, Park YG, Chung JY, et al. Effect of Transplanting Various Concentrations of a Composite of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid Hydrogel on Articular Cartilage Repair in a Rabbit Model. *PLoS One*. 2016;11(11):e0165446.
64. Park YB, Ha CW, Kim JA, Han WJ, Rhim JH, Lee HJ, et al. Single-stage cell-based cartilage repair in a rabbit model: cell tracking and in vivo chondrogenesis of

human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid hydrogel composite. *Osteoarthritis Cartilage*. 2017;25(4):570-80.

65. Wang J, Witte F, Xi T, Zheng Y, Yang K, Yang Y, et al. Recommendation for modifying current cytotoxicity testing standards for biodegradable magnesium-based materials. *Acta Biomater*. 2015;21:237-49.

66. Gugjoo MB, Amarpal, Abdelbaset-Ismael A, Aithal HP, Kinjavdekar P, Pawde AM, et al. Mesenchymal stem cells with IGF-1 and TGF- β 1 in laminin gel for osteochondral defects in rabbits. *Biomed Pharmacother*. 2017;93:1165-74.

67. Venkatesan J, Kim SK. Nano-hydroxyapatite composite biomaterials for bone tissue engineering--a review. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(10):3124-40.

68. Rajula MPB, Narayanan V, Venkatasubbu GD, Mani RC, Sujana A. Nano-hydroxyapatite: A Driving Force for Bone Tissue Engineering. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021;13(Suppl 1):S11-S4.

69. Tamai N, Myoui A, Hirao M, Kaito T, Ochi T, Tanaka J, et al. A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(5):405-17.

70. Zhang X, Zhu L, Lv H, Cao Y, Liu Y, Xu Y, et al. Repair of rabbit femoral condyle bone defects with injectable nanohydroxyapatite/chitosan composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(8):1941-9.

71. Gok S, Ozan F, Akay E, Yamak K, Kayali C, Altay T. Effect of boric acid on cartilage formation of osteochondral defects in rabbit knee: An experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2021;27(5):504-9.

72. Korkmaz M, Turkmen R, Demirel HH, Saritas ZK. Effect of Boron on the Repair of Osteochondral Defect and Oxidative Stress in Rats: an Experimental Study. *Biol Trace Elem Res*. 2019;187(2):425-33.

73. Gumusderelioglu M, Tuncay EO, Kaynak G, Demirtas TT, Aydin ST, Hakki SS. Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds. *J Trace Elem Med Biol*. 2015;31:120-8.

74. Tuncay EO, Demirtas TT, Gumusderelioglu M. Microwave-induced production of boron-doped HAp (B-HAp) and B-HAp coated composite scaffolds. *J Trace Elem Med Biol*. 2017;40:72-81.

75. Calis M, Demirtas TT, Vatansever A, Irmak G, Sakarya AH, Atilla P, et al. A Biomimetic Alternative to Synthetic Hydroxyapatite: "Boron-Containing Bone-Like Hydroxyapatite" Precipitated From Simulated Body Fluid. *Ann Plast Surg.* 2017;79(3):304-11.
76. Ingber DE, Mow VC, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, et al. Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue Eng.* 2006;12(12):3265-83.
77. Kasza KE, Rowat AC, Liu J, Angelini TE, Brangwynne CP, Koenderink GH, et al. The cell as a material. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(1):101-7.
78. Mironov V, Visconti RP, Kasyanov V, Forgacs G, Drake CJ, Markwald RR. Organ printing: tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials.* 2009;30(12):2164-74.
79. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773-85.
80. Smith CM, Stone AL, Parkhill RL, Stewart RL, Simpkins MW, Kachurin AM, et al. Three-dimensional bioassembly tool for generating viable tissue-engineered constructs. *Tissue Eng.* 2004;10(9-10):1566-76.
81. Chang R, Nam J, Sun W. Effects of dispensing pressure and nozzle diameter on cell survival from solid freeform fabrication-based direct cell writing. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(1):41-8.
82. Barron JA, Ringeisen BR, Kim H, Spargo BJ, Chrisey DB. Application of laser printing to mammalian cells. *Thin Solid Films.* 2004;453-454:383-7.
83. Guillotin B, Guillemot F. Cell patterning technologies for organotypic tissue fabrication. *Trends Biotechnol.* 2011;29(4):183-90.
84. Bülbül A, KÜÇÜK S. An Overview of Three Dimensional Bioprinting and Organ Printing. *Turkiye Klinikleri Journal of Health Sciences.* 2020;5:702-18.
85. Li Y, Chen SK, Li L, Qin L, Wang XL, Lai YX. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials. *J Orthop Translat.* 2015;3(3):95-104.
86. Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials.* 2004;25(9):1697-714.

87. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1-10.
88. Neyt JG, Buckwalter JA, Carroll NC. Use of animal models in musculoskeletal research. *Iowa Orthop J.* 1998;18:118-23.
89. Katagiri H, Mendes LF, Luyten FP. Definition of a Critical Size Osteochondral Knee Defect and its Negative Effect on the Surrounding Articular Cartilage in the Rat. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017;25(9):1531-40.
90. Du Y, Liu H, Yang Q, Wang S, Wang J, Ma J, et al. Selective laser sintering scaffold with hierarchical architecture and gradient composition for osteochondral repair in rabbits. *Biomaterials.* 2017;137:37-48.
91. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):105-15.
92. Xu D, Cheng G, Dai J, Li Z. Bi-layered Composite Scaffold for Repair of the Osteochondral Defects. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2021;10(8):401-14.
93. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng.* 1998;8(1):1-9.
94. Moran CJ, Ramesh A, Brama PA, O'Byrne JM, O'Brien FJ, Levingstone TJ. The benefits and limitations of animal models for translational research in cartilage repair. *J Exp Orthop.* 2016;3(1):1.
95. Levingstone TJ, Thompson E, Matsiko A, Schepens A, Gleeson JP, O'Brien FJ. Multi-layered collagen-based scaffolds for osteochondral defect repair in rabbits. *Acta Biomater.* 2016;32:149-60.
96. Gong L, Li J, Zhang J, Pan Z, Liu Y, Zhou F, et al. An interleukin-4-loaded bi-layer 3D printed scaffold promotes osteochondral regeneration. *Acta Biomater.* 2020;117:246-60.
97. Madry H, Ochi M, Cucchiaroni M, Pape D, Seil R. Large animal models in experimental knee sports surgery: focus on clinical translation. *J Exp Orthop.* 2015;2(1):9.
98. Hunziker EB. Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop Relat Res.* 1999(367 Suppl):S135-46.

99. Chevrier A, Kouao AS, Picard G, Hurtig MB, Buschmann MD. Interspecies comparison of subchondral bone properties important for cartilage repair. *J Orthop Res.* 2015;33(1):63-70.
100. Proffen BL, McElfresh M, Fleming BC, Murray MM. A comparative anatomical study of the human knee and six animal species. *Knee.* 2012;19(4):493-9.
101. Ibrahim H, El-Zairy E. Concepts, Compounds and the Alternatives of Antibacterials. 2015.
102. Gumusderelioglu M. Ara Yüzey Doku Mühendisliği için Gradyan Özellikli Biyomürekkep Formülasyonlarının Geliştirilmesi, İn-Vitro ve İn-Vivo Etkinliklerinin Belirlenmesi. Project Report. TUBITAK; 2022. Report No.: 218E003 Contract No.: 218E003.
103. Tolga Demirtas T, Kaynak G, Gumusderelioglu M. Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10xSBF-like solution by microwave irradiation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;49:713-9.
104. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:45-57.
105. O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 1986;68(7):1017-35.
106. Coskun S, Akbulut SO, Sarikaya B, Cakmak S, Gumusderelioglu M. Formulation of chitosan and chitosan-nanoHAp bioinks and investigation of printability with optimized bioprinting parameters. *Int J Biol Macromol.* 2022;222(Pt A):1453-64.
107. Filardo G, Kon E, Perdida F, Tetta C, Di Martino A, Marcacci M. Arthroscopic mosaicplasty: long-term outcome and joint degeneration progression. *Knee.* 2015;22(1):36-40.
108. Filardo G, Kon E, Di Matteo B, Di Martino A, Marcacci M. Single-plug autologous osteochondral transplantation: results at minimum 16 years' follow-up. *Orthopedics.* 2014;37(9):e761-7.

109. Filardo G, Kon E, Perdisa F, Balboni F, Marcacci M. Autologous osteochondral transplantation for the treatment of knee lesions: results and limitations at two years' follow-up. *Int Orthop*. 2014;38(9):1905-12.
110. Astur DC, Arliani GG, Binz M, Astur N, Kaleka CC, Amaro JT, et al. Autologous osteochondral transplantation for treating patellar chondral injuries: evaluation, treatment, and outcomes of a two-year follow-up study. *J Bone Joint Surg Am*. 2014;96(10):816-23.
111. Nakagawa Y, Mukai S, Yabumoto H, Tarumi E, Nakamura T. Serial Changes of the Cartilage in Recipient Sites and Their Mirror Sites on Second-Look Imaging After Mosaicplasty. *Am J Sports Med*. 2016;44(5):1243-8.
112. Oliveira J, Pina S, Reis R, San Roman J. Osteochondral Tissue Engineering Challenges, Current Strategies, and Technological Advances: Challenges, Current Strategies, and Technological Advances 2018.
113. Ansari S, Khorshidi S, Karkhaneh A. Engineering of gradient osteochondral tissue: From nature to lab. *Acta Biomater*. 2019;87:41-54.
114. Kang H, Zeng Y, Varghese S. Functionally graded multilayer scaffolds for in vivo osteochondral tissue engineering. *Acta Biomater*. 2018;78:365-77.
115. Idaszek J, Costantini M, Karlsen TA, Jaroszewicz J, Colosi C, Testa S, et al. 3D bioprinting of hydrogel constructs with cell and material gradients for the regeneration of full-thickness chondral defect using a microfluidic printing head. *Biofabrication*. 2019;11(4):044101.
116. Shi D, Shen J, Zhang Z, Shi C, Chen M, Gu Y, et al. Preparation and properties of dopamine-modified alginate/chitosan-hydroxyapatite scaffolds with gradient structure for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(8):1615-27.
117. Zhang JC, Lu HY, Lv GY, Mo AC, Yan YG, Huang C. The repair of critical-size defects with porous hydroxyapatite/polyamide nanocomposite: an experimental study in rabbit mandibles. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(5):469-77.
118. Rogowska-Tylman J, Locs J, Salma I, Wozniak B, Pilmane M, Zalite V, et al. In vivo and in vitro study of a novel nanohydroxyapatite sonocoated scaffolds for enhanced bone regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019;99:669-84.

119. Raucci MG, Demitri C, Soriente A, Fasolino I, Sannino A, Ambrosio L. Gelatin/nano-hydroxyapatite hydrogel scaffold prepared by sol-gel technology as filler to repair bone defects. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(7):2007-19.
120. Yousefi A, Oudadesse H, Akbarzadeh R, Wers E, Lucas-Girot A. Physical and Biological Characteristics of Nanohydroxyapatite and Bioactive Glasses used for Bone Tissue Engineering. *Nanotechnology Reviews*. 2014;3.
121. Pattnaik S, Nethala S, Tripathi A, Saravanan S, Moorthi A, Selvamurugan N. Chitosan scaffolds containing silicon dioxide and zirconia nano particles for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2011;49(5):1167-72.
122. Oftadeh MO, Bakhshandeh B, Dehghan MM, Khojasteh A. Sequential application of mineralized electroconductive scaffold and electrical stimulation for efficient osteogenesis. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(5):1200-10.
123. Cayir Bozoglu U, Kiremitci A, Yurtsever MC, Gumusderelioglu M. Peek dental implants coated with boron-doped nano-hydroxyapatites: Investigation of in-vitro osteogenic activity. *J Trace Elem Med Biol*. 2022;73:127026.
124. Arslan A, Cakmak S, Gumusderelioglu M. Enhanced osteogenic activity with boron-doped nanohydroxyapatite-loaded poly(butylene adipate-co-terephthalate) fibrous 3D matrix. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018;46(sup2):790-9.
125. Gizer M, Kose S, Karaosmanoglu B, Taskiran EZ, Berkkan A, Timucin M, et al. The Effect of Boron-Containing Nano-Hydroxyapatite on Bone Cells. *Biol Trace Elem Res*. 2020;193(2):364-76.
126. Yang M, Zhang ZC, Yuan FZ, Deng RH, Yan X, Mao FB, et al. An immunomodulatory polypeptide hydrogel for osteochondral defect repair. *Bioact Mater*. 2023;19:678-89.
127. Cakmak S, Cakmak AS, Kaplan DL, Gumusderelioglu M. A Silk Fibroin and Peptide Amphiphile-Based Co-Culture Model for Osteochondral Tissue Engineering. *Macromol Biosci*. 2016;16(8):1212-26.
128. Tumbas Y. Three Dimensional Glycosaminoglycan Mimetic Peptide Amphiphile Hydrogels For Regenerative Medicine Applications: İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi; 2015.

129. Tamaddon M, Wang L, Liu Z, Liu C. Osteochondral tissue repair in osteoarthritic joints: clinical challenges and opportunities in tissue engineering. *Biodes Manuf.* 2018;1(2):101-14.
130. Correia C, Pereira AL, Duarte AR, Frias AM, Pedro AJ, Oliveira JT, et al. Dynamic culturing of cartilage tissue: the significance of hydrostatic pressure. *Tissue Eng Part A.* 2012;18(19-20):1979-91.
131. Elder BD, Athanasiou KA. Hydrostatic pressure in articular cartilage tissue engineering: from chondrocytes to tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2009;15(1):43-53.
132. Majore I, Moretti P, Stahl F, Hass R, Kasper C. Growth and differentiation properties of mesenchymal stromal cell populations derived from whole human umbilical cord. *Stem Cell Rev Rep.* 2011;7(1):17-31.
133. Zheng P, Hu X, Lou Y, Tang K. A Rabbit Model of Osteochondral Regeneration Using Three-Dimensional Printed Polycaprolactone-Hydroxyapatite Scaffolds Coated with Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells and Chondrocytes. *Med Sci Monit.* 2019;25:7361-9.
134. You Q, Liu Z, Zhang J, Shen M, Li Y, Jin Y, et al. Human Amniotic Mesenchymal Stem Cell Sheets Encapsulating Cartilage Particles Facilitate Repair of Rabbit Osteochondral Defects. *Am J Sports Med.* 2020;48(3):599-611.
135. Offeddu GS, Mohee L, Cameron RE. Scale and structure dependent solute diffusivity within microporous tissue engineering scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2020;31(5):46.
136. Guan X, Avci-Adali M, Alarcin E, Cheng H, Kashaf SS, Li Y, et al. Development of hydrogels for regenerative engineering. *Biotechnol J.* 2017;12(5).
137. Mandal BB, Kundu SC. Cell proliferation and migration in silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials.* 2009;30(15):2956-65.
138. Weese JS. A review of post-operative infections in veterinary orthopaedic surgery. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2008;21(2):99-105.
139. Tortorici M, Petersen A, Duda GN, Checa S. The Degradation of Synthetic Polymeric Scaffolds With Strut-like Architecture Influences the Mechanics-dependent Repair Process of an Osteochondral Defect in Silico. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:846665.

140. Tamaddon M, Gilja H, Wang L, Oliveira JM, Sun X, Tan R, et al. Osteochondral scaffolds for early treatment of cartilage defects in osteoarthritic joints: from bench to clinic. *Biomater Transl.* 2020;1(1):3-17.
141. Di Martino A, Perdisa F, Filardo G, Busacca M, Kon E, Marcacci M, et al. Cell-Free Biomimetic Osteochondral Scaffold for the Treatment of Knee Lesions: Clinical and Imaging Results at 10-Year Follow-up. *Am J Sports Med.* 2021;49(10):2645-50.
142. Bekkers JE, Bartels LW, Vincken KL, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Articular cartilage evaluation after TruFit plug implantation analyzed by delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC). *Am J Sports Med.* 2013;41(6):1290-5.
143. Joshi N, Reverte-Vinaixa M, Diaz-Ferreiro EW, Dominguez-Oronoz R. Synthetic resorbable scaffolds for the treatment of isolated patellofemoral cartilage defects in young patients: magnetic resonance imaging and clinical evaluation. *Am J Sports Med.* 2012;40(6):1289-95.

