

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SİNOVİYAL SIVI KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN DİZ EKLEMİ TAM KAT KIKIRDAK HASARI
TAMİRİNE ETKİSİ

Dr. Büşra TOKMAK

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2024

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

SİNOVİYAL SIVI KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN DİZ EKLEMİ TAM KAT KIKIRDAK HASARI
TAMİRİNE ETKİSİ

Dr. Büşra TOKMAK

Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIőMANI
Prof. Dr. Ulukan İNAN

Bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 202011A229 nolu proje kapsamında
desteklenmiştir.

ESKİŞEHİR
2024

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Diz Eklemleri Tam Kat Kıkırdak Hasarı Tamirine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından, 28.07.2021 tarihinde, 614-5/28.07.2021 numaralı kararlarla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Büşra TOKMAK

Tarih: 26.06.2024

İmza:

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr Büşra TOKMAK’a ait ”Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Diz Eklemi Tam Kat Kıkırdak Hasarı Tamirine Etkisi” adlı çalışma jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 26.06.2024

Jüri Başkanı Prof. Dr. Ulukan İNAN
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Üye Doç. Dr. Mustafa KAVAK
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Mehmet Nuri KONYA
Afyonkarahisar Sağ. Bil. Üniv. Tıp Fak.
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu’nun / /
Tarih ve / Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Atilla Özcan ÖZDEMİR
Dekan

TEŞEKKÜR

Ortopedi ihtisasına başlarken bana kliniğin kapılarını açan, burada kendimi geliştirmeme, kendi yolumu çizmeme fırsat veren; ihtisasım boyunca da bu yolu aydınlatmaya devam eden başta tez hocam Prof. Dr. Ulukan İnan olmak üzere sevgili hocalarım Prof. Dr. Akın Turgut'a, Prof. Dr. Nusret Köse'ye, Prof. Dr. Abdurrahman Özçelik'e, Prof. Dr. Cüneyd Günay'a, Doç. Dr. Adnan Sevcen'a ve Doç. Dr. Mustafa Kavak'a sonsuz teşekkürler. Tezin yapılmasında büyük emeği olan sevgili abim Op. Dr. Salih Oğuz'a, başladığım ilk günden itibaren bana güzel bir ekibin parçası olduğumu hissettiren tüm uzman abilerime, asistanlık sürecini keyifli hale getiren, birlikte büyüdüğümüz bütün asistan arkadaşlarıma, birlikte çalışmaktan keyif aldığım -hemşiresi, sekreteri ve personeliyle- tüm ortopedi ekibine, tez sürecinde sürekli birlikte çalıştığımız Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kök Hücre Araştırma Merkezine teşekkürlerimi sunarım. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na projeye verdikleri desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Beş yıl boyunca varlığıyla asistanlık hayatıma renk katan sevgili abim Op. Dr. Durmuş Ekin Dinçer'e, tüm hayatım boyunca olduğu gibi asistanlık sürecinde de desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen sevgili anem, babam ve kardeşime; sabrı, özverisi ve ilgisiyle asistanlık sürecini de güzelleştiren sevgili Furkan Ayhan'a en içten teşekkürlerimle...

ÖZET

Tokmak, B. Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Diz Eklemi Tam Kat Kıkırdak Hasarı Tamirine Etkisi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2024. Kıkırdak lezyonları, çağımızın en sık morbidite sebebi hastalığı osteoartritin öncü lezyonlarıdır. Osteoartrite gidişi önlemek için kıkırdak lezyonlarında iyileşmenin sağlanması önemli bir araştırma konusudur. Literatürde hem kök hücre tedavisinin hem eksozom tedavisinin kıkırdak lezyonlarında iyileşmeyi desteklediği yönünde çalışmalar mevcuttur. Biz de çalışmamızda bu iki molekülün rejeneratif etkisinin tam kat kıkırdak hasarında tedavi etkinliklerini değerlendirmeyi, bunları standart tedavi yöntemi olan mikrokırık ile karşılaştırmayı amaçladık. Çalışmamızda 11 adet tavşanın her iki dizi kullanıldı. Tavşanların dizlerinde tam kat kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra postoperatif 0. günde, 4. haftada ve 8. haftada intraartiküler enjeksiyonları yapıldı. 1. gruba sinoviyal sıvı kökenli kök hücrelerden alınan eksozomlar, 2. gruba sinoviyal sıvıdan elde edilen kök hücreler, 3. gruba mikrokırık tedavisi uygulandı. 4. grup pozitif kontrol grubu, 5. grup negatif kontrol grubu, 6. grup Sham kontrol grubu olarak planlandı. 3. Ayın sonunda tüm tavşanlar sakrifiye edildi. Kıkırdak hasarındaki iyileşme ICRS skorlama sistemi, H&E ve IF boyama ile değerlendirildi. Mezenkimal kök hücre ve eksozom ile tedavi edilen grupta iyileşmenin hiyalin kıkırdak niteliğinde olduğu, ICRS skorlarının hasar ve mikrokırık grubundan anlamlı olarak yüksek olduğu izlendi. Eksozom grubunun ICRS skorları kök hücre grubundan bir miktar yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. İki yöntemin de fibröz içeriği düşük natürel kıkırdak yapısında bir iyileşme dokusu sağlayan, etkin tedavi yöntemleri olduğu kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Tam kat kıkırdak hasarı, eksozom, mezenkimal kök hücre, mikrokırık

Destekleyen Kurumlar: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

ABSTRACT

Tokmak, B. Effect of Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells on Repairing Full-Thickness Cartilage Damage in the Knee Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Orthopedics and Traumatology, Eskişehir, 2024.

Cartilage lesions are the precursor lesion of osteoarthritis, which is the most common cause of morbidity. Ensuring the healing of cartilage lesions to prevent the progression to osteoarthritis is important. In our study, we aimed to evaluate the regenerative effects of exosomes and mesenchymal stem cells(MSC) in the treatment of full-thickness cartilage injuries and compare them with the standard microfracture treatment. 11 New Zealand male rabbits were used. Both knees of the rabbits were subjected to full-thickness cartilage injuries after which, the procedure continued with intra-articular injections at day 0, week 4 and week 8. Group 1 received exosomes subtracted from synovial fluid-derived MSC, Group 2 received stem cells derived from synovial fluid, and Group 3 received microfracture treatment. Group 4 served as the positive control group, Group 5 as the negative control group, and Group 6 as the Sham control group. At the end of the 3rd month, rabbits were sacrificed. Healing of cartilage lesions was evaluated using the International Cartilage Repair Society(ICRS) scoring system, H&E staining, and immunofluorescence staining. It was observed that the healing in the group treated with MSC and exosomes was of hyaline cartilage quality, with significantly higher ICRS scores compared to the injury and microfracture groups. Although the ICRS scores of the exosome group were slightly higher than those of the stem cell group, no statistically significant difference was detected. We believe that both methods provide effective treatment modalities that yield a healing tissue with low fibrous content and that resembles native cartilage structure.

Key Words: Full-thickness cartilage injury, exosome, mesenchymal stem cell, microfracture

Supported by: Eskişehir Osmangazi University Scientific Research Projects Coordination Unit

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kıkırdak Dokusunun Anatomik ve Histolojik Özellikleri	2
2.1.1. Kıkırdak Türleri	2
2.1.2. Kondrosit	4
2.2. Kıkırdak Hasarları ve Tiplendirmeleri	5
2.2.1. Klinik Sınıflamalar	5
2.2.2. Histolojik Sınıflamalar	6
2.3. Kıkırdak İyileşmesi ve İnflamatuvar Yanıt	9
2.4. Kıkırdak Hasarlarında Tedavi Alternatifleri	10
2.4.1. Konservatif Tedavi	10
2.4.2. Cerrahi Tedavi	12
2.5. Mezenkimal Kök Hücre	16
2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hasarlı Dokudaki Etkileri	16
2.7. Eksozom Özellikleri ve Tiplendirmesi	18
2.8. Eksozomların Hasarlı Dokudaki Etkileri	20

3.	GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1.	Deney Planı	23
3.2.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması	24
3.2.1.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu	24
3.2.2.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakteri- zasyonu	25
3.3.	Eksozomların Hazırlanması	28
3.3.1.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Eksozom İzolasyonu	28
3.3.2.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Karakterizasyonu	29
3.3.3.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli MKH Eksozomlarının Uptake Analizi	29
3.4.	Deneyin Uygulanması	30
3.4.1.	Tavşanlarda Tam Kat Kıkırdak Hasarı Oluşturulması	30
3.4.2.	Tavşanlarda Mikrokırık Oluşturulması	31
3.4.3.	Tavşan Sinoviyal Sıvı MKH Eksozomların ve Tavşan SS-MKH'lerin Tam Kat Kıkırdak Hasarlı Tavşanlara Nakli	31
3.5.	Sonuçların Değerlendirilmesi	32
3.6.	İstatistiksel Değerlendirme	33
4.	BULGULAR	34
4.1.	Mezenkimal Kök Hücrelerin Değerlendirilmesi	34
4.1.1.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu- nun Değerlendirilmesi	34
4.1.2.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakteri- zasyon Analiz Sonuçları	35
4.2.	Eksozomların Değerlendirilmesi	38
4.2.1.	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Karakterizasyon Sonuçları	38
4.2.2.	Tavşan Sinoviyal Sıvı MKH Eksozomlarının Uptake Analizi	39

4.3.	Histolojik İnceleme Sonuçları	40
5.	TARTIŞMA	52
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	59
	KAYNAKLAR	60



SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin Trifosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
GAG	Glikozaminoglikan
GVHD	Graft versus Host Hastalığı
H&E Boyama	Hematoksilen Eozin Boyama
ICRS	Uluslararası Kıkırdak Tamir Cemiyeti
IF	İmmünofloresan Boyama
IHC	İmmünhistokimya Boyama
IL	İnterlökin
MCP	Monosit Kemotaktik Protein
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NSAİİ	Nonsteroid Antiinflatuar İlaç
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCNA	Prolifere Hücre Nükleer Antijeni
SF	Serum Fizyolojik
TGF- β	Transforme edici büyüme faktör-beta
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü- α
tSS-MKH	Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Kıkırdak Katmanları	3
2.2. Bauer Jackson Sınıflaması	6
2.3. Eksozomların Şematik Gösterimi	19
3.1. PKH67 İle İşaretlenmiş Kök Hücreler	28
3.2. Kıkırdak Dokusunda Punç Biyopsi ve Küret ile Kıkırdak Hasarı Oluşturulması	31
3.3. Kıkırdak Hasarı Oluşturulmuş Tavşanlara Eksozom, MKH ve PBS Uygulaması	32
4.1. Kültürün 8.Gününde Mezenkimal Kök Hücreler	34
4.2. Kültürün 11.Gününde Mezenkimal Kök Hücreler	35
4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Analizi	36
4.4. MKH’lerde CD105, Nestin ve CD45 İmmünofloresan Boyaması	37
4.5. MKH’lerin Farklılaştırma Analiz Sonuçları	38
4.6. Farklılaştırmanın BMP4 ve Osteonektinle İmmünofloresan Boyamayla Gösterilmesi	38
4.7. Eksozomların Flow Sitometri ile İmmunofenotipik Analizi	39
4.8. PKH26 İşaretli Eksozomların Uptake Analizi	40
4.9. Oluşturulan Kıkırdak Hasarlarının Sakrifikasyon Sonrası Makroskopik Görüntüsü	43
4.10. Sakrifikasyon Sonrası Tüm Deney Gruplarının H&E Boyama Sonuçları	44
4.11. Sakrifikasyon Sonrası Tüm Deney Gruplarının Safranin-O/Fast Green Boyama Sonuçları	45
4.12. Tüm Grupların Tip-II,I,X Kollajen, TNF- α ve MMP-3’ün İmmünohistokimyasal Analizi	46
4.13. Tüm Gruplarda Tip-II Kollajenin İmmünoflorasan Analizi	47
4.14. Tüm Gruplarda Tip-X Kollajenin İmmünoflorasan Analizi	48
4.15. Tüm Gruplarda TNF- α ’nın İmmünoflorasan Analizi	49
4.16. Tüm Gruplarda MMP-3’ün İmmünoflorasan Analizi	50

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Outerbridge ve Modifiye Outerbridge Sınıflamaları	5
2.2. Modifiye ICRS Sınıflaması	6
2.3. Mankin Sınıflama Sistemi	7
2.4. Histolojik ICRS II Sınıflama Sistemi	8
3.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması	24
4.1. Akım Sitometri ile Değerlendirilen Yüzey Belirteçleri ve Yüzdeleri	36
4.2. Eksozom Grubunun ICRS Skoru Analiz Sonuçları	41
4.3. Mezenkimal Kök Hücre Grubunun ICRS Skoru Analiz Sonuçları	41
4.4. Mikrokırık Grubunun ICRS Skoru Analiz Sonuçları	42
4.5. Tedavi Gruplarının Karşılaştırmalı ICRS Skoru Analiz Sonuçları	42
4.6. Yüzey Değerlendirmesinin İstatistiksel Analizi	51
4.7. Canlılık Değerlendirmesinin İstatistiksel Analizi	51

1. GİRİŞ

Kıkırdak lezyonları, çağımızın en sık morbidite sebebi olan hastalığı osteoartritin öncü lezyonlarıdır. Kıkırdak dokusunun avasküler yapısı nedeniyle bu lezyonların iyileşme potansiyelleri düşüktür. Günümüzde osteoartritin altın standart tedavisi replasman cerrahileridir. Fakat bu cerrahilerin de kendi komplikasyonlarının olması bizi biyolojik iyileşmenin sağlanması yoluna yönlendirmiştir. Literatürde bu amaçla mikrokırık, mozaikoplasti gibi kıkırdak yüzeyin yenilenmesine olanak tanıyacak teknikler tanımlanmış olsa da istenilen sonuçlara ulaşamamıştır. Mikrokırık tekniğinde oluşan iyileşme dokusunun fibröz yapıda olması erken aşınmasına, bu aşınma da erken dönemde başarısızlığa sebep olmuştur. Mozaikoplasti tekniği ise cerrahi hata payının yüksek olması, donör sahanın kısıtlı olması ve donör sahada morbidite yaratması nedeniyle kullanımı sınırlanmış bir tekniktir. Mezenkimal kök hücreler (MKH), rejeneratif özellikleri gösterilmiş multipotent hücrelerdir (1). İlerleyen çalışmalar mezenkimal kök hücrelerin salgıladıkları büyüme faktörleri ve diğer yolaklarla hasarlı bölgedeki rejenerasyon sürecine yol gösterdiğini; proliferasyon, diferansiyasyon ve bölgedeki matriks üretimi gibi süreçleri düzenlediğini gösterdi (2). Eksozomlar, hücreler arası iletişimi sağlayan, içerisinde mRNA, miRNA gibi nükleik asit ve protein yapılar taşıyan ekstrasellüler kargo vezikülleridir (3). Mezenkimal kök hücrelerin dokudaki rejeneratif etkilerine aracılık ettikleri düşünülmektedir. Kök hücre tedavileri öncelikle GVHD(Graft vs Host Hastalığı), akut böbrek yetmezliği gibi hastalıklarda denenmiş, hasarlı hücrelerin rejenerasyon yeteneklerini artırdıklarının fark edilmesi üzerine diğer alanlarda da kullanılmaya başlanılmıştır. Xiang ve arkadaşlarının 2022 yılında yayınladıkları metaanalizde mezenkimal kök hücrelerin literatürde osteoartrit tedavisinde başarılı olduğundan ve eksozomların da umut vaat edici gözüktüğünden bahsetmiştir (4). Biz de çalışmamızda bu iki molekülün rejeneratif etkisinin tam kat kıkırdak hasarında tedavi etkinliklerini değerlendirmeyi, bunu standart sayılan tedavi yöntemi olan mikrokırık ile karşılaştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kıkırdak Dokusunun Anatomik ve Histolojik Özellikleri

Kıkırdak dokusu, kondrositler ve bu hücrelerden salgılanan matriks yapısından oluşan, bağ dokusundan farklılaşmış bir dokudur. Kıkırdak hacminin %95'inden fazlasını oluşturan matriksin temel yapıtaşları kollajen, hiyaluronik asit ve proteoglikanlardır. Merkezdeki proteoglikanlardan uzanan negatif yüklü glikozaminoglikan yapıların kollajen yan zincirleri ile olan elektrostatik etkileşimi kıkırdağın kopmaya ve yüklenmelere karşı dirençli olmasını sağlar. Tip-II kollajen miktarına oranla yüksek miktarlarda bulunan glikozaminoglikanların negatif elektrostatik yükleri, bazal tabakayı hidrofilik bir hale getirir ve kıkırdağın yüksek su içeriğinin korunmasını sağlar. Bu hidrofilik yapı, ancak periferindeki dokulardan difüzyon yoluyla beslenen kıkırdak dokusunun beslenebilmesi için çok önemlidir.

Kıkırdak doku avaskülerdir. Ancak perikondriumdan, perikondriyumu olmayan eklem yüzey kıkırdaklarında da sinoviyal sıvıdan difüzyon yoluyla beslenebilir. Aynı zamanda lenfatik dolaşıma ve sinir yapılarına da sahip değildir. Düşük beslenme potansiyelleri nedeniyle düşük metabolizmalı hücrelerdir.

Kıkırdak dokusu, çevresindeki dokuların biyomekanik ihtiyaçlarına cevap verecek şekilde hiyalin kıkırdak, fibröz kıkırdak ve elastik kıkırdak olmak üzere 3 gruba farklılaşmıştır.

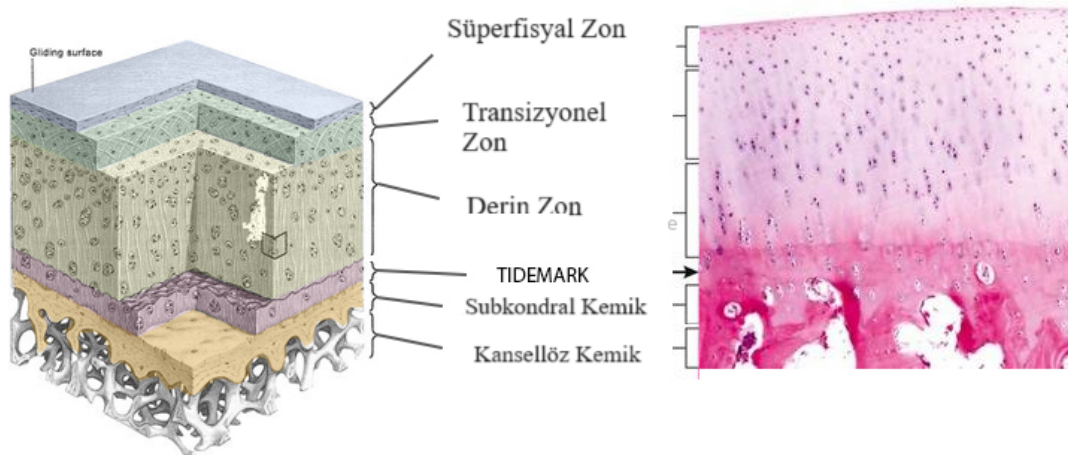
2.1.1. Kıkırdak Türleri

a) Hiyalin Kıkırdak: Hiyalin kıkırdak homojen yapılıdır. Sağlıklı dokuda beyaz-mavimsi renkte camsı olarak görünür ve ismini buradan alır. Embriyonik dönemden itibaren vücudumuzda en yaygın bulunan kıkırdaktır. Erişkin bireylerde büyük hava yollarının yapısını, sternokostal bağlanlatıları ve eklem yüzeylerinin hareketli yüzeyini kaplayan kıkırdakları oluşturur.

Temel yapıtaşını tip-II kollajen oluşturur; ek olarak tip-VI,IX,X,XI kollajene de rastlanır. Tip-IV kollajen hücrelerin matriks ağı tutunmasını artırır, tip-IX kollajen proteoglikanların etkileşimini artırır; tip-X kollajen, kollajenin hegzagonal örgü şeklini sağlar, tip-XI kollajen fibril boyutunu belirler. Bu kollajenler, kıkırdak matrikste yoğun

olarak bulundukları için kıkırdığa özgü kollajenler olarak bilinirler. Merkezdeki tip-II kollajen liflerinin üzerine kovalent bağlarla proteoglikanlar bağlanır, bu proteoglikanlar üzerine nonkovalent bağlarla hiyaluronik asit (daha az olarak diğer glikozaminoglikanlar) bağlanırlar. Oluşan bu proteoglikan kümeleri, hiyaluronik asitin negatif yüklü yapısından dolayı hidrofilik bir zemin oluşturur ve suyu tutar. Bu su içeriği yüksek yapı biyomekanik olarak bir yay gibi davranır, gelen darbelerin absorbe edilmesine ve yüzeye dağıtılmasına elverişli bir yapı oluşturur. Bu özelliğiyle eklem kıkırdaklarının yapısında çok önemli bir görev üstlenir.

Eklem Kıkırdığı: Eklemelerin hareketli yüzeylerini kaplayan hiyalin kıkırdak yapısıdır. Perikondriyumu olmaması ile diğer hiyalin kıkırdaklardan ayrılır. Yetişkin bireylerde yaklaşık 2-5 mm kalınlığa sahiptir. Hücrelerin yönelimi ve kollajen dizilimlerine göre 4 katmandan oluşur(Bkz. Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Kıkırdak Katmanları(5)

Süperfisyal (Tanjansiyel) Zon: Artiküler yüzeye en yakın bölgedir. Yassılaştırmış kondrositler ve yüzeye paralel yerleşmiş yoğun tip-II kollajen demetlerini bulundurmaz.

Ara (Transizyonel) Zon: Süperfisyal zonun hemen altındadır. Matriks içinde rastgele yerleşmiş yuvarlak kondrositler ve oblik, düzensiz kollajen lifleri bulundurmaz.

Derin (Radyal) Zon: Kıkırdığın yüzeyine dik yerleşmiş kondrosit sütunları ve kollajen sütunları içerir.

Kalsifiye Zon: Küçük kondrositler ve kalsifiye olmuş bir matriks bulundurmaz. Radyal zondan dalgalı, kalsifiye bir çizgi olan tidemark (gel git) izi ile ayrılır. Bu hattın üze-

rindeki laküنالarda, kondrositler prolifer olarak eklem yüzeyine doğru göç ederler ve interstisyel büyümeyi sağlarlar.

b) Elastik Kıkırdak: Kulak yapısında, östaki borusunda ve epiglotta bulunur. Hiyalin kıkırdağa yapıca benzer. Ekstra içerdiği elastin molekülü nedeniyle daha esnek bir yapıya sahiptir ve sarımtırak bir renkte görünür.

c) Fibröz Kıkırdak: Kıkırdak dokusu ile bağ dokusu arasında bir yapıdır. Tip-I kolajen ağırlıklıdır. İntervertebral disk yapısında, simphysis pubis yapısında ve bağ kemik bileşkesinde bulunur.

2.1.2. Kondrosit

Kıkırdak hücreleri kendi sentezledikleri matriksin arasında laküna adı verilen boşluklarda bulunurlar. Lakünalar içerisinde sayısı 8'e kadar çıkabilen kondrosit kümeleri bulunur. Granüllü endoplazmik retinakulumdan zengin hücrelerdir.

Kıkırdak dokusu basınca maruz kaldığında ve serbestlendiğinde, su içeriğinde bir pompa etkisi oluşur ve su yer değiştirir. Kan dolaşımına sahip olmayan kıkırdak dokusunda hücrelerin beslenmesi diffüzyon yoluyla olur. Su içeriğindeki bu yer değişikliği diffüzyonu artırarak kıkırdak hücrelerinin beslenmesinin temelini oluşturur. Bu nedenle kıkırdak dokusu belli bir kalınlığa kadar büyüyebilir. Hücrelerin metabolizması yavaştır ve düşük oksijen basıncında yaşamaya adaptedir. Enerjilerini ağırlıklı olarak oksijensiz solunum yaparak sağlarlar. Yavaş metabolizmaları nedeniyle bölünme ve iyileşme potansiyelleri zayıftır.

Kıkırdak dokusunda iyileşme 2 yolla olur: interstisyel büyüme (kıkırdak hücrelerinin bölünerek çoğalması ile) ve apozisyonel büyüme (perikondrium hücrelerinin farklılaşması ile). İnterstisyel büyüme uzun kemiklerin büyümesinde ve enkondral büyümede rol üstlenir. Eklem kıkırdaklarında perikondrium olmadığı için iyileşme sadece interstisyel büyüme ile olur.

2.2. Kıkırdak Hasarları ve Tiplendirmeleri

Kıkırdak hasarları klinik olarak ve histolojik olarak bir çok farklı sınıflandırma sistemi içerisinde değerlendirilir. Bu sınıflandırmaların hepsinin temeli hasarın derinliğidir. Subkondral kemiğe ulaşmayan hasarlar yüzeysel sayılırken; tidemark çizgisini geçen hasarlar tam kat olarak isimlendirilir.

2.2.1. Klinik Sınıflamalar

Outerbridge Artroskopik Sınıflama Sistemi: Kıkırdaktaki hasarın derinliği temel alınarak yapılmış bir sınıflamadır. Sonrasında modifikasyonlar yapılmıştır (6). Tablo 2.1’de sınıflamanın detayları paylaşılmıştır.

Tablo 2.1. Outerbridge ve Modifiye Outerbridge Sınıflamaları

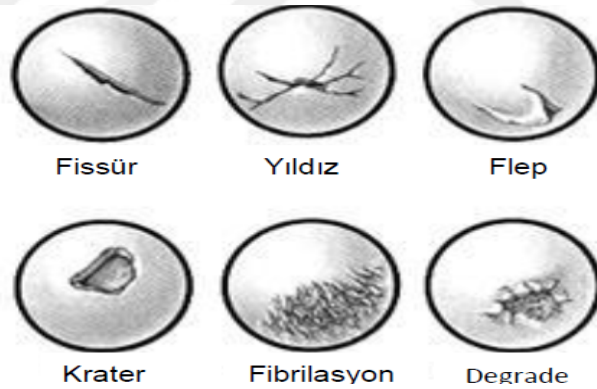
Grade	Outerbridge	Modifiye Outerbridge
Grade 0	Sağlam Kıkırdak	Sağlam Kıkırdak
Grade 1	Yumuşama ve ödem	Yüzey sağlam ve eşlik eden yumuşama ve ödem
Grade 2	Parsiyel Kıkırdak defekti ve Yüzeysel Fissürler (subkondral alana ulaşmaz ve < 1,5 cm)	Kıkırdak kalınlığının %50’sini geçmeyen yüzeysel fissürler,saçaklanmalar
Grade 3	Subkondral kemiğe uzanan fissürler ve 1,5 cm’den daha büyük kıkırdak hasarı	Kıkırdağın %50’sinden daha fazlasının etkilendiği, subkondral kemiğe ulaşmayan derin ülserler ve kondral flepler
Grade 4	Ekspoze Subkondral Kemik	Tam kat kıkırdak hasarı (subkonral kemiğe kadar)

Modifiye ICRS Sınıflama Sistemi: Modifiye ICRS artroskopik sınıflaması, Uluslararası Kıkırdak Tamir Cemiyeti (ICRS) tarafından hazırlanmış ve kıkırdak defektin derinliğini baz alan bir sınıflamadır (7). Tablo2.2’de de görüldüğü üzere kıkırdak hasarları 4 grade’e ayrılmıştır.

Tablo 2.2. Modifiye ICRS Sınıflaması

Grade	ICRS Sınıflaması
Grade 0	Normal kıkırdak
Grade 1a	Yumuşama
Grade 1b	Yüzeyel çatlaklar ve yarıklanmalar
Grade 2	Kıkırdak kalınlığının %50'sini geçmeyen kıkırdak defektleri
Grade 3a	Kıkırdak kalınlığının %50'sinden fazlasını tutan kıkırdak defektleri
Grade 3b	Kalsifiye dokuya kadar uzanan kıkırdak hasarları
Grade 3c	Subkondral kemiği geçmeyen kıkırdak hasarları
Grade 3d	Grade 3 hasar olup delaminasyonun eşlik ettiği kıkırdak hasarları
Grade 4	Ekspoze subkondral kemik, tam kat kıkırdak hasarı

Bauer ve Jackson Sınıflama Sistemi: Sınıflama lezyonun şekline göre yapılmıştır. Tip-I çizgisel fissür, tip-II yıldız şekilli yırtık, tip-III flep şeklinde yırtık, tip-IV subkondral kemiğin görüldüğü krater şeklinde defekt, tip-V kıkırdak ayrışması olmadan liflenme ve tip-VI dejeneratif görünümlü kıkırdak değişikliklerinden ayrılması güç olan degrade görünümlü kıkırdak olarak tariflenmiştir(Bkz. Şekil 2.2) (8).



Şekil 2.2. Bauer Jackson Sınıflaması

2.2.2. Histolojik Sınıflamalar

Tarihsel olarak Mankin ile başlayan kıkırdak lezyonlarının sınıflandırılması O'Driscoll, Wakitani, ICRS gibi sınıflamalarla çeşitlenmeye devam etmiştir. Biz çalışmamızda oluşturduğumuz kıkırdak hasarlarını değerlendirmek için ICRS II skorlamasını kullandık.

Mankin Sınıflama Sistemi: Diğer sınıflamaların öncülü kabul edilen skorlama sistemidir (9). Tablo2.3’de görüldüğü üzere kıkırdak yapısını, hücreleri, boyanmayı ve tidemark çizgisi ile ilişkiyi değerlendirir.

Tablo 2.3. Mankin Sınıflama Sistemi

Mankin Sınıflaması		
I	Yapı	
	Normal	0
	Yüzey Düzensizliği	1
	Pannus ve Yüzey Düzensizliği	2
	Transizyonel Zona Ulaşan Çatlak	3
	Radyal Zona Ulaşan Çatlak	4
	Kalsifiye Zona Ulaşan Çatlak	5
	Tamamen Dezorganize	6
II	Hücreler	
	Normal	0
	Diffüz Hiperselülerite	1
	Klon	2
	Hiposelülerite	3
III	Safranin-O Boyanması	
	Normal	0
	Hafif Azalma	1
	Orta Azalma	2
	Ciddi Azalma	3
	Hiç Boyanma Yok	4
IV	Tidemark Entegrasyonu	
	İntakt	0
	Damarlar Tarafından Çaprazlaşıyor	1

ICRS Skorlama Sistemi:

ICRS skorlama sistemi kıkırdak hasarının derinliğini ve hücre yapısını değerlendiren detaylı bir sınıflamadır. 2010 yılında güncelleme yapılmış, son halini almıştır (10). Çalışmamızda da Tablo2.4’de görüldüğü şekliyle kullanılmıştır.

Tablo 2.4. Histolojik ICRS II Sınıflama Sistemi

			Skor
I	YÜZEY	Düz/sürekli	3
		Düzensiz/sürekli değil	0
II	MATRIKS	Hyalin	3
		Karışık: Hyalin/Fibrokartilaj	2
		Fibrokartilaj	1
		Fibröz doku	0
III	HÜCRESEL DAĞILIM	Sütün yapıda	3
		Karışık: Sütün yapıda/kümeler	2
		Kümeler	1
		Bireysel hücreler/disorganize	0
IV	HÜCRE POPÜLASYON CANLILIĞI	Genelde canlı	3
		Kısmen canlı	1
		%10'dan daha az canlı	0
V	SUBKONDRAL KEMİK	Normal	3
		Remodelling artmış	2
		Kemik nekrozu/Granülasyon dokusu	1
		Ayrılmış/Fraktür/Kallus	0
VII	MATRIKS BOYANMASI (METAKROMAZİ)	Normal	3
		Hafif azalmış	2
		Belirgin azalmış	1
		Boyanma yok	0
VIII	MATRIKSİN TİP-II KOLLAJEN BOYANMASI	Belirgin, güçlü boyanma	2
		Orta derecede boyanma	1
		Boyanma yok	0
IX	MATRIKSİN TİP-I KOLLAJEN BOYANMASI	Boyanma yok	2
		Orta derecede boyanma	1
		Belirgin, güçlü boyanma	0
X	MATRIKSİN TİP-X KOLLAJEN BOYANMASI	Boyanma yok	2
		Orta derecede boyanma	1
		Belirgin, güçlü boyanma	0
XI	TNF- α EKSPRESYONU	Boyanma yok	2
		Orta derecede boyanma	1
		Belirgin, güçlü boyanma	0
XII	MMP-3 EKSPRESYONU	Boyanma yok	2
		Orta derecede boyanma	1
		Belirgin, güçlü boyanma	0
GENEL SKOR			28

2.3. Kıkırdak İyileşmesi ve İnflamatuvar Yanıt

Yaşam boyunca kıkırdak dokusu travmaya maruz kalır ve bu süreçte kıkırdak hücrelerini ve matriksini kaybeder. Kalan matriks ve kıkırdak hücreleri yenilenir ve kıkırdak yeniden şekillenmeye devam ederek yapısını sürdürür. Rejenerasyon süreci, kondrositlerin matriks kompozisyonunu algılayabilme ve yenilenebilme özelliği ile ilgilidir. Sonrasında ihtiyaca uygun matriks proteinlerini sentezleyerek yanıt verirler. Ek olarak matriks de kondrositler için bir sinyal iletici görevi görür. Maruz kalınan basınç kondrositler için biyomekanik, elektriksel ve kimyasal sinyaller oluşturur. Fakat hücreler yaşlandıkça protein sentez hızlarında azalma, bölünme kapasitelerinde yavaşlama olur. Buna bağlı olarak, bu sinyallere verdikleri yanıtlar azalır, kıkırdak yaşla remodelasyon yeteneğini kaybeder ve travmalara daha duyarlı hale gelir.

Genç kıkırdak yapısında bile kondrositler düşük metabolizmalı hücrelerdir. Matriksteki tip-II kollajenin ve proteoglikanların yarı ömürlerinin uzun, yenilenme süreçlerinin de uzun olması da eklendiğinde kıkırdak dokunun rejenerasyonu yavaş bir doku olduğu söylenebilir.

Kıkırdak hasarları, etkilenen kıkırdak bölümünün derecesine göre kısmi/parsiyel ve tam kat kıkırdak hasarları olmak üzere iki tiptir. Kısmi/parsiyel kıkırdak hasarında subkondral kemik hasar görmezken, tam kat kıkırdak hasarında subkondral kemik de hasarlanır. Aslında kısmi/parsiyel hasarlara göre, tam kat kıkırdak hasarları tamir açısından avantajlıdır çünkü tamir kaynağını oluşturacak kan damarları devreye girer. Vaskülarize memeli dokularında hasara yanıt nekroz, inflamasyon ve onarım fazı olmak üzere 3 fazda görülür. Ancak eklem kıkırdağının avasküler bir yapıda olması nedeniyle, travmaya verdiği yanıt değişkenlik gösterir. Vasküler subkondral kemiğe kadar uzanan derin/tam kat kıkırdak hasarı oluşturan bir travma, daha büyük bir klinik öneme sahiptir ve onarımın 3 fazının da (nekroz, inflamasyon ve onarım) gerçekleştiği görülür. Nekroz fazını takiben, zengin vaskülaritesi nedeniyle, subkondral kemikte inflamasyon fazı belirgindir. Ayrıca subkondral kansellöz kemik, onarım fazı için gerekli olan fibroblastlara ve kondroblastlara farklılaşan primitif hücrelerden zengin bir kaynaktır. Böylece subkondral kemiği hasarlayan derin/tam kat kıkırdak hasarlarında fibröz, fibrokartilajinöz veya hyalin kıkırdak benzeri yapı ile karakterize tamir yapıları geli-

şir. Yüzey devamlılığı yeniden düzenlenir. Subkondral kemiğe uzanan derin/tam kat kıkırdak hasarlarında heksozamin içeriğinde ve galaktozamin-glikozamin oranlarında azalma görülür. Ancak daha önemlisi hasardan 5-6 hafta sonra, Tip-I kollajenin sentezinden Tip-II kollajen sentezine doğru bir kayma gözlenir. Onarım dokusu %20 Tip-I kollajenden oluşan hyalin kıkırdağa benzer bir görünüme ulaşır, bu da subkondral kemiğe uzanan hasarlarda, onarım dokusunun fibrokartilaj ve hyalin kıkırdağın bir karışımı olduğunu gösterir. Ancak bu tamir dokuları her ne kadar hyalin kıkırdağa benzese de, normal hyalin kıkırdaktan biyokimyasal ve biyomekanik olarak farklılık gösterir. Oluşan bu kıkırdağın dayanıklılığı yetersizdir. İzleyen aylarda fibrilasyon, yarıklanma ve yoğun dejeneratif değişiklikler oluşmaya başlar ve uzun dönemde, lokalize bir osteoartrit odağı olarak dejenerasyona gider(11).

2.4. Kıkırdak Hasarlarında Tedavi Alternatifleri

Kıkırdak hasarlarının tedavisinde konservatif ve operatif yöntemler kullanılabilir. Konservatif tedavi kilo verme, eklem etrafındaki kasların güçlendirilmesi ve aktivite modifikasyonları ile ekleme binen yükü azaltmayı, sonuç olarak şikayetleri azaltmayı amaçlar. Ortez ve breysler, analjezik ve antiinflamatuvar ilaçlar semptomatik tedavide kullanılan ajanlardır.

2.4.1. Konservatif Tedavi

Kıkırdak hasarının konservatif tedavisinde ilaçlardan, kas güçlendirme amacıyla egzersizlerden ve fizik tedaviden, ekleme binen yükü azaltmak amacıyla kilo modifikasyonundan ve eklem çevresi yumuşak dokunun desteklenmesi için ortez ve breyslerden faydalanılır. Kıkırdak hasarının medikal tedavisinde temel amaç semptomatik düzelmenin sağlanmasıdır.

En sık kullanılan grup non-steroid antiinflamatuvar ilaçlardır(NSAİİ). Hızlı etki gösteren ancak etkisi kısa sürede sonlanan ilaçlardır. Prostaglandin sentezini inhibe ederler. Analjezik ve antiinflamatuvar etki gösterirler. Komorbiditesi olmayan hastalar için oral kullanıma uygun semptomatik tedavi olarak sınıflanmışken, orta yükseklikte komorbiditesi olan hastalar için riskli olarak sınıflanmıştır. Yüksek komorbiditeli hastalara önerilmemektedir. Birinci kuşak NSAİİ'lerin yan etkileri yüksektir. Gastrik ül-

serler ve buna bağlı ölümlerin %33' NSAİİ kullanımına bağlı komplikasyon olarak ortaya çıkmaktadır. İkinci ve üçüncü kuşak NSAİİ ile gastrik yan etkiler %50 azalmıştır. NSAİİ etkisini siklooksijenaz-2 (COX-2)'yi inhibe ederek göstermektedir. NSAİİ tedavisi başlanan hastalarda ek hastalık yoksa gastrik yan etkiler için profilaktik mide koruyucu önerilmemektedir. Orta riskli hastalarda ise non-selektif NSAİİ kullanımında önerilmekte fakat COX-2 selektif NSAİİ kullanan hastalarda önerilmemektedir. Birden fazla komorbiditesi olan, yüksek riskli hastalarda NSAİİ kullanımı önerilmemektedir. Lokal form kullanımının riskleri daha düşük olduğundan özellikle yüksek riskli hastalarda oral kullanıma tercih edilmelidir.

Glikozaminler, özellikle kondroitin-sülfat, hyalin kıkırdağın ana bileşenlerinden biridir. Kıkırdak hasarında, kıkırdak komponentlerinin replase edilmesi ile kıkırdak oluşumunun desteklenmesi tezi ile kullanıma girmiştir. Oral replasman tedavisinin kıkırdak oluşumunu desteklemekte yetersiz olup olmadığı hala tartışmalı bir konudur ancak destek tedavisi olarak kullanımı oldukça yaygındır. Bu ilaçların oral alımlarda emilimi düşüktür ancak tek seferde yüksek dozlarda alındığında emilimin artabileceği ve kanda seviyelerinin önemli ölçüde yükselebileceği bilinmektedir. OARSI'nın (Osteoarthritis Research Society International) 2019 kılavuzuna göre kondroitin preparatlarının osteoartritin ilerlemesini nleme amaçlı kullanımı önerilmemekle birlikte semptomatik tedavi amaçıyla kullanımının yararı hala belirsizdir (12).

Hiyalüronik asit; glikozminoglikon yapıda bir molekül olup yüksek negatif yüklü içeriği nedeniyle yüksek hidrofiliteye sahiptir. Sıvı tutulumu sağlar ve çok absorpsiyonu fonksiyonunun sağlanması için elzemdir. Hem kıkırdak dokuda hem sinoviyal sıvının komponentleri arasında yer alır. Sinovyal sıvı içeriğindeki hiyalüronik asitin azalması, sinoviyal sıvının biyomekanik karakterini değiştirir ve sonuç olarak eklem yüzeyleri arasındaki sürtünme artar, eklem fonksiyonlarında kötüleşmeye sebep olur. Kıkırdak iyileşmesini sağlamasa da tüm eklem boşluğunu doldururarak sürtünmeyi azalttığı sonuç olarak semptomatik bir iyileşme sağladığı dşnlmektedir. İnterartikler kullanımında dördüncü haftada semptomatik etkilerinin başladığını, 8. haftada maksimum etkiye ulaştığını ve 24. haftada etkilerinin ortadan kalktığını bildiren yayınlar olmasına karşın (13) OARSI'nın 2019 kılavuzuna göre etkisi belirsiz olarak sınıflanmıştır (12).

Kortizon, vücutta dehidrojenazlarla kortizole dönüşen bir prohormondur. İntraartiküler kullanımlarında antiinflamatuvar etkisi amaçlanır. Bölgesel inflamasyonu azaltarak hastanın ağrısını azaltır (14). Akut dönem semptomatik tedavide hiyaluronik aside göre daha etkili olduğu düşünülmektedir (12).

2.4.2. Cerrahi Tedavi

Kıkırdak lezyonlarında cerrahi tedavinin amacı sadece semptomlarda rahatlama sağlamak değil, eklem hareketlerinin kazanılmasını sağlamak, gelişecek osteoartrit önüne geçmek ve kıkırdak dokusunun rejenerasyonunu sağlamaktır (15).

Akut kıkırdak lezyonlarında tek parça fragman varlığında bu parçanın fiksasyonu ilk önerilen tedaviyken, kronik lezyonlarda restorasyon ya da replasman teknikleri uygulanabilir. Tedavi seçimini yaparken kıkırdak lezyonun yeri ve büyüklüğü, ekstremitte dizilim bozukluğu olup olmadığı, hastanın yaşı, cinsiyeti, donör sahaların durumu, vücut kitle indeksi ve hastanın fonksiyonel durumu göz önünde bulundurulmalıdır. Cerrahi tedavi yöntemleri kabaca 6 başlık altında toplanmıştır.

A) Kıkırdak Fragmanın Fiksasyonu

Akut yaralanmalarda, fragmanın fiksasyonunun özellikle genç hastalarda iyi sonuç verdiği gösterilmiştir(16). Kıkırdak fragmanın anatomik redüksiyonu ve zeminin hazırlanması tekniğin kritik noktalarıdır. Postoperatif rehabilitasyon kullanılan materyale göre şekillenir. Emilebilir implantlarla da iyi sonuçlar bildirilmiştir, emilemeyen implantların ise 6-8. haftalarda çıkarılması önerilir (17). Materyalden bağımsız olarak fiz hattı açık çocuklarda implantın fizle olan ilişkisine dikkat edilmelidir.

Bu teknikte subkondral kemiğe uzanmayan lezyonların iyileşme oranı daha düşüktür.

B) Debritman ve Lavaj

Küçük lezyonu olan ($<2\text{cm}^2$), fonksiyonel seviyesi düşük, klinik şikayetleri fazla olmayan hastalarda kullanılan palyatif bir yöntemdir. Serbest kıkırdak uçlarının ve serbest kıkırdak fragmanlarının uzaklaştırılması ve eklem yıkama temeline dayanır. Drenajın amacı sinoviyal sıvıdaki inflamatuvar sitokinlerin, kıkırdak fragmanların ve kalsiyum fosfat kristallerinin temizlenmesidir. Debritman sırasında dejenere olmuş kıkırdak kenarları, hasarlı menisküs dokuları, osteofitler ve inflame sinoviyum temizle-

nir. İnflamasyonun ve irritasyonun azalmasıyla geçici bir rahatlama sağlanır (18).

C) Kemik İliği Stimülasyon Teknikleri

Pridie tarafından ilk kez 1959 yılında tanımlanmıştır (19). Subkondral kemik dokusunun açığa çıkarılması ve kemik iliğinden gelen kök hücrelerle iyileşme sağlanmaya çalışılması tekniğin temelini oluşturur. Farklı teknikler tanımlanmıştır. Küçük lezyonlarda ($<2\text{cm}^2$) ve fonksiyonel seviyesi düşük olan hastalarda ya da iyileşme potansiyeli yüksek genç-adolesan hastalarda tercih edilen restoratif bir işlemdir. Kemik iliğini stimüle etmek için farklı teknikler tanımlanmıştır; bu tekniklerin her birinde fibrokartilaj iyileşme sağlanır. Literatürde erken dönem sonuçları çok iyiiken 2 yıllık takiplerinde memnuniyetin azalmasının sebebi fibrokartilaj dokunun, hiyalin kıkırdakla aynı işlevi görememesi olarak açıklanmıştır. Kemik iliği stimülasyonu için literatürde tanımlanmış farklı teknikler mevcuttur:

a) Abrazyon Artroplastisi

Yüzeyel kemiğin shaver ya da burr yardımıyla temizlenmesi işlemidir. Lezyonun periferine ulaşılması fakat sağlam kıkırdak dokunun korunması önerilir. Fokal defektlerden ziyade yaygın dejenerasyonu olan artrotik dizlerde kullanılır.

b) Mikrokirik

İlk kez 1999 yılında Steadman tarafından tanımlanmıştır (20). Hasarlı kıkırdak dokuda delikler açılarak kanlanan subkondral kemik dokunun açığa çıkarılması amaçlanır. İşleme başlarken stabil bir kıkırdak dokusu bulunana kadar lezyon kenarları küret yardımıyla temizlenir. Sarı subkondral kemik dokusu görülene kadar kalsifiye kıkırdak dokusu temizlenmelidir. Artroskopik awl yardımıyla subkondral kemiğe dik, 3-4 mm aralıklı delikler açılır (21). Artroskopik sıvı basıncı 30 mmHg altına düşürülür. Mikrokirik deliklerinden kan ve yağ damlalarının gelmesi işlemin başarılı olduğunu gösterir. Diren kurulmadan yerleştirilir (22).

c)Drilleme

Mikrokirik işleminin drilleme ile yapılmasıdır. Pridie tarafından tanımlanmıştır (19). Kirschner teli ya da 1,5-2 mm'lik driller kullanılır. Isı artışı ve buna bağlı nekroz endişesi olsa da bu konuda dezavantajını gösteren yeterli çalışma yoktur.

d) Augmente Mikrokirik Yöntemleri

Kıkırdak iyileşmesini desteklemek ve defekt alanını stabilize etmek için yukarıdaki

tekniklere ek yöntemler uygulanabilmektedir.

AMIC (Autologous Matrix Induced Chondrogenesis) tekniğinde tip-I ve tip-III kolajen içeren çatı iskelet defekt alanına dikilir (23). Teknik tanımlandıktan sonra Anders ve arkadaşlarının 38 hasta üzerinde yaptığı bir kontrollü çalışmada mikrokırığa bir üstünlüğü gösterilememiştir (24). Başka bir çalışmada da hastadan alınan periferik kandan hazırlanan PRP emdirilmiş poliglikolik asit-hyaluronan çatı ile yapılan onarımların, sadece kemik iliği stimülasyon yöntemlerine göre daha iyi bir kıkırdak iyileşmesi sağladığı gösterilmiştir (25).

D-Osteokondral Nakil

Klasik yüzeysel tamir yöntemlerinde biyomekanik olarak zayıf ve klinik değerlendirmeleri suboptimal olan bir fibrokartilaj dokusu ile iyileşme elde edilir. Mozaikoplasti gibi osteokondral transplantasyon teknikleri, yük taşıyan kıkırdak defektlerinde tekrar bir hiyalin örtü oluşturmayı amaçlar.

Osteokondral transplantasyon tekniklerinin arkasındaki temel fikir küçük, silindirik, birden çok hiyalin kıkırdak segmentinin hasarlı alana mozaik benzeri bir motifte yerleştirilerek yüzey bütünlüğünün tekrar sağlanmasıdır. Greftler görece daha az yük taşıyan patellofemoral eklem yüzeyinden alınır. Transfer edilen hiyalin kıkırdak, fibröz iyileşme dokusuna göre daha uzun ömürlü ve dayanıklı bir iyileşme sağlar (26). Donör sahada ise kemik tünelleri kansellöz kemikle, kıkırdak yüzeyi ise fibrokartilaj doku ile iyileşir.

Endikasyonlar ve Kontraendikasyonlar

Femoral kondilin küçük boyutlu, tek odaklı kıkırdak lezyonları bu cerrahinin temel endikasyonu olsa da; tibiadaki, talustaki, patelladaki, humerus başındaki, femur başındaki kıkırdak hasarlarında da kullanılır. Daha geniş lezyonlarda (özellikle öpüşen lezyonlar varsa) daha kötü klinik sonuçlar elde edilir. Eğer dizde eşlik eden yaralanmalar da varsa (bağ yaralanması, menisküs yaralanması vb) tedavi edilmelidir. Tedavi edilmemeleri halinde kıkırdak dejenerasyonunun hızlanacağı ve daha kötü klinik sonuçlar elde edileceği öngörülebilir (27).

Kontraendikasyonlar, ICRS'in 2021 yılındaki son kılavuzunda göreceli ve kesin kontraendikasyonlar olarak 2 grupta incelenmiştir.

Enfeksiyona ya da tümöre sekonder defektler, yaygın artrit (romatoid ya da dejene-

ratif tip), yeterli donör alan bulunamaması, 50 yaş ve üzeri hastalar, 8 cm^2 üzerindeki defektler, 10 mm'den daha derin osteokondral hasarlanmalar, genel durumu cerrahiye izin vermeyen hastalar kesin kontraendikasyon olarak tanımlanmışken; 40-50 yaş arasındaki hastalar, $4-8 \text{ cm}^2$ arasındaki defektler ve orta - ileri osteoartrit varlığı göreceli kontraendikasyon olarak tanımlanmıştır (28).

İmplantasyon sonrasında hastalara erken hareket egzersizleri ve kas egzersizleri verilmelidir. Hastanın normal hayatına dönmesi 8-10 haftayı, mücadeleli sporlara dönüşü 6 ayı bulmaktadır.

Cerrahi sırasında teknik zorluklar sıklıkla yaşanmaktadır. Greftin istenen seviyenin altında veya üzerinde olması, greft alımı sırasında erken kırılmaların yaşanması sık yaşanan teknik zorluklardan bir kaçıdır. Patellofemoral ağrı, dizde şişlik olması sık karşılaşılan bir komplikasyon değildir.

Postoperatif dönem hastaların fonksiyonel değerlendirmesinde %92'lere varan mükemmel-iyi sonuçlar bildirilmiştir (29).

5-Hücre Bazlı Tedaviler

Otolog Kondrosit Transplantasyonu

İşlem donör alanlardan alınan kırıkta hücrelerinin laboratuvar ortamında çoğaltılarak defektli alana geri verilmesi mantığına dayanır. İlk kez 1984 yılında Peterson ve ekibi tarafından tanımlanmıştır (30). İlk basamakta hastadan 200 ile 300 mg arasında kırıkta hücresi toplanır. Kırıkta hücreleri laboratuvar ortamında çoğaltılır. 3-6 hafta sonra açık cerrahi ile hazırlanan hücreler alana implante edilir ve üzeri periost ile örtülür. $>5 \text{ cm}^2$ kullanıldığını bildiren yazarlar mevcuttur. Tekrarlayan cerrahilerden kaçınmak adına Peterson ve arkadaşları tarafından sandviç tekniği tanımlanmıştır (31). İlerleyen dönemlerde periosteal hiperplazi ve periost elde edilmesindeki zorluklar nedeniyle hyaluronon bazlı çatılar geliştirilmiş olsa da bu tedavilerin hiçbiri rutin algoritmada yer alamamıştır.

Kök Hücre Tedavileri

Tezimizin de konusu olan bu tedavi yöntemi Bölüm 2.5 ve 2.6'da detaylı olarak anlatılacaktır.

6-Büyüme Faktörü Bazlı Tedaviler

Kırıkta iyileşmesini sağlamada diğer bir strateji, lokal kırıkta dokusunu indük-

leyerek efektif bir iyileşme dokusu sağlanabilmesidir. Bunun için PRP, IGF-I, TGF-B gibi farklı büyüme faktörü ekstrakteleri denenmiştir. İyi sonuç bildiren yayınlar olsa da henüz faydası kanıtlanmış tedaviler olarak kabul edilmemiştir(29).

2.5. Mezenkimal Kök Hücre

Mezenkimal kök hücreler ilk kez 1991 yılında Caplan ve arkadaşları tarafından küçük bir hücre gövdesi ve bir kaç uzun,ince çıkıntısı olan kök hücre olarak tanımlanmıştır (32). Mezenkimal kök hücreler farklı hücre gruplarına farklılaşabilen (adiposit, osteoblast ve kondroblast) ve kendi kendini yenileyebilen multipotent progenitor hücrelerdir (1). Mezenkimal kök hücreler kemik iliğinde, periferik kanda, sinovyumda, yağ dokusunda hatta sinovyal sıvıda dahi az sayıda bulunurlar (33), (34). Uluslararası Hücre Tedavileri Derneği (ISCT), mezenkimal kök hücreleri tanımlayabilmek için belli standartlar getirmiştir. Buna göre normal hücre kültür şartlarında fibroblast benzeri bir görüntü göstermelidir. MKH'lerin exvivo ortamda osteojenik, kondrojenik ve lipojenik diferansiyasyonu gösterilmelidir. MKH'lerin yüzeylerinde CD73,CD90,CD105 eksprese ettikleri ve CD11b, CD14, CD34, CD45,CD79 VE HLA-DR eksprese etmedikleri tespit edilmelidir (35). Mezenkimal kök hücrelerin kondroblastlara farklılaşabilme özelliği kullanılarak bu hücrelerin sayısının çoğaltılıp hasarlı alana enjekte edilmesi ve bu bölgede iyileşme sağlanması fikri hayvan ve insan deneylerinde denenmiş; başarılı sonuçlar alınmıştır (36), (37).

2.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hasarlı Dokudaki Etkileri

Mevcut araştırmalara göre MKH'ler; immün düzenlemeyi desteklemek için bağışıklık sistemi ile etkileşime girme, periferik doku toleransını iyileştirmek için yaranma bölgesine göç etme, inflamatuvar faktör salınımını önleme, çok yönlü farklılaşma ve çoğalma için yüksek potansiyelin yanı sıra yaralı hücrelerin tamir aktivitesini artırma ve doku onarımını destekleme gibi işlevlere sahiptir (38), (39), (40). MKH'ler, alıcı doku mikroçevresini modüle eden çeşitli büyüme faktörleri salgılamaktadır. Bu büyüme faktörleri neovaskülarizasyon ve immunosupresyon gibi parakrin etkiler göstermektedir. Neovaskülarizasyon, MKH'lerin enjekte edildiği dokuda tamir hızını artıran ve iyileşmeyi sağlayan bir mekanizmadır. Miyokard enfarktüsünde ve se-

rebrovasküler hastalıklarda yapılan çalışmalarda MKH'lerin, neovaskülarizasyon için VEGF(vasküler endotelyal büyüme faktörü) ve HGF(hepatosit büyüme faktörü) salgıladığı görülmüştür. Bu proanjiyojenik ve parakrin etkilerin, MKH'lerin, serebral vasküler hasarların rejenerasyonunu ve erektil disfonksiyonun tedavisini sağladığı belirlenmiştir (41), (42). MKH'lerin çeşitli doku tiplerine farklılaşma yeteneği sınırsız gibi görünmektedir. Bu alandaki ilk çalışmalarda temel hipotez, multipotent kök hücrelerin hasarlı alana gitmesi ve burada çoğalarak iyileşme sağlaması idi. Fakat MKH transplantasyonu yapılan hayvan deneylerinde elde edilen sonuçlara göre, MKH'lerin hedef dokuda %1'den daha az tutunduğu gözlenmiştir (43). Bu durum MKH'lerin biyolojik etkilerine aracılık eden faktörleri belirlemeyi amaçlayan çalışmalar yapılması ihtiyacını doğurmuştur. Mezenkimal kök hücrelerin salgıladıkları büyüme faktörleri ve diğer yolaklarla hasarlı bölgedeki rejenerasyon sürecine yol gösterdiğini; proliferasyon, diferansiyasyon ve bölgedeki matriks üretimi gibi süreçleri düzenlediğini gösterdi (2), (44). 2011 ve 2012 yıllarında Wu ve arkadaşları mezenkimal kök hücrelerin salgıları ile kondrositleri ekstrasellüler matriks salgılaması ve proliferasyonu için stimüle edebildiğini bildirdiler (45). Bu etki mezenkimal kök hücrelerin yağ dokusundan ya da kemik iliğinden alınmasından bağımsız olarak gözlemlendi. Çalışma, mezenkimal kök hücrelerin sekresyonlarının içeriği hakkında detaylı bilgi vermese de devam eden çalışmalarda parakrin etkiyi oluşturan salgıların çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve ekstrasellüler matriks molekülleri olduğu belirlenmiştir (46). Salgılanan moleküller çevre dokunun ihtiyacına göre şekillenmektedir. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kök hücrelerin, inflamasyon varlığında (TNF- α varlığında), İL-6, İL-8, monosit kemotaktik protein (MCP-1) gibi monosit göçünü sağlayacak molekülleri ağırlıklı olarak salgıladıkları bildirildi (47). Mezenkimal kök hücreler, sadece kimyasal yollarla değil, dinamik kompresyon kuvvetleri ile de uyarılabilmekte ve buna uygun bir yanıt oluşturabilmektedirler. Bulunan bu moleküller oluşan yanıtın bir parçası olsa da mezenkimal kök hücrelerin etkilerini açıklamakta yetersiz kalmıştı. 2009 yılında Bruno ve arkadaşları gliserolle indüklenen böbrek yetmezliklerinde mezenkimal kök hücrelerden salgılanan eksozom molekülünden bahsettiler (48). Devam eden süreçte MKH'lerin doku ile iletişimde çok etkili olan bu molekül üzerinde çalışmalar yoğunlaşmıştır.

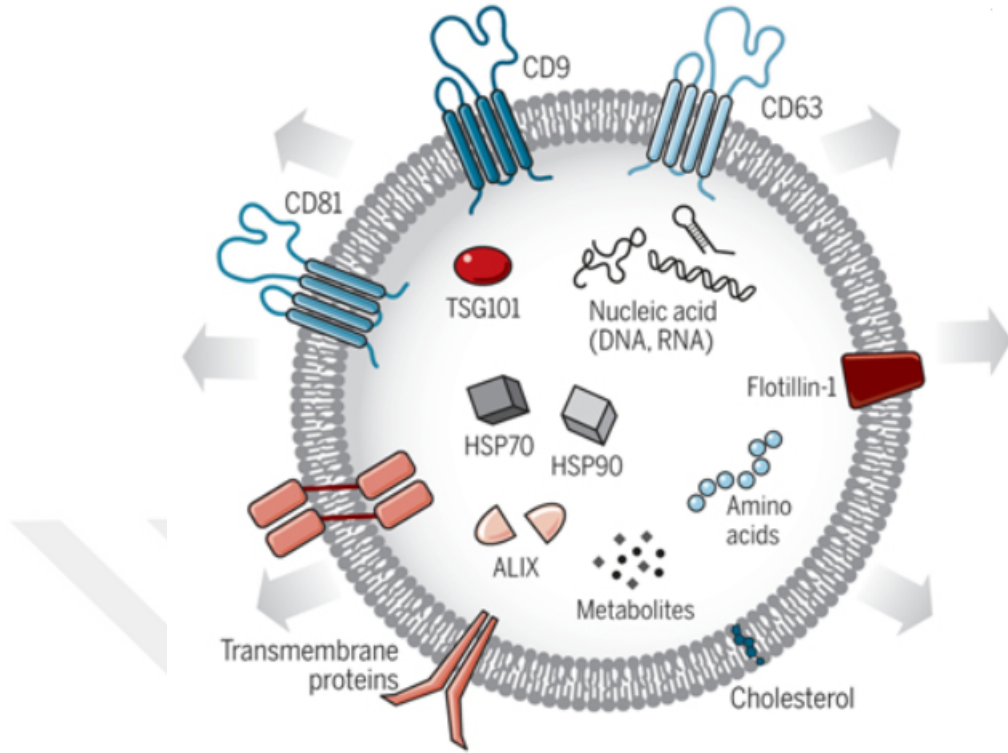
Mezenkimal kök hücre tedavisinde; hücre temelli preparatlar kullanılmasına bağlı

tümör gelişim riski, genomik instabilite riski ve immün reaksiyon riski mevcuttur. Tedavide canlı hücre kullanılmasının mikrovasküler yapılarda tıkanıklık ve pulmoner emboli riski olduğu, nakil edilen hücrelerin bulunduğu yerde farklı bir dokuya dönüşme riskinin olduğu (heterotopik ossifikasyon-kalsifikasyon gibi) literatürde bildirilmiştir. Ayrıca hücrelerin üretimi, viabilitesinin korunması, preparatların taşınması da lojistik ve teknik açıdan problemlidir.

2.7. Eksozom Özellikleri ve Tiplendirmesi

Eksozom ilk defa 1983 yılında Stahl ve arkadaşları tarafından retikülositler üzerinde keşfedildi ve 1987 yılında Johnstone ve arkadaşları tarafından eksozom olarak isimlendirildi (49), (50). Eksozom çift katmanlı lipid membran yapısına sahip multiveziküler cisimlerden oluşan bir yapıdır (51). Hücreler arası iletişimi sağlar ve içerisinde mRNA, miRNA gibi nükleik asitler, lipidler ve protein yapılar taşır. Ekstrasellüler kargo vezikülleridir (3). 30-150 nanometre boyutlarındadır. Mikroveziküllerden 2 major farkı, multiveziküllerin hücre membranından ayrılması ile salgılanmaları ve daha küçük yarıçapa sahip olmalarıdır. Membranlarında Alix, tümör duyarlılık proteini 101 ve tetraspandinleri (CD9, CD63, CD81) içerirler (52).

Vücudumuzda bir çok hücre iletişim için eksozom salgılamaktadır. Kanda, idrarda, BOS'ta ve salyada ekstrakte edilmiştir (54). Eksozomlar hücreler arası iletişimde görevli partiküllerden bir tanesidir. Salgılandıkları hücreden eksositozla ayrılırlar. Bilipit membran yapıları nedeniyle iletişim kurdukları hücreler tarafından endositozla veya füzyonla hücre içine kolayca alınabilirler ya da membranlarında taşıdıkları reseptörlerle hücre mebranına bağlanabilirler (55). Ayrıca bilipid membranlı yapısı sayesinde, sadece büyük miktarlarda kargo yükü taşımakla kalmaz, aynı zamanda yıkıcı enzimler veya kimyasallardan da içeriğini korur (56). Eksozomlar prolifer olamazlar ancak alıcı hücreye büyüme faktörlerini, reseptörleri ve hatta genetik bilgiyi iletebilmektedir. Eksozomlar, ulaştıkları hücrelerde biyolojik tepkilere neden olan antiinflamatuvar, antiapoptotik, antifibrotik, proanjyogenetik, promitotik ve yara iyileştirme etkilerine sahip TGF-1, HGF, FGF ve VEGF dahil olmak üzere bazı sitokinler içerir. Bu veziküller, çeşitli fizyolojik ve patolojik aktiviteleri kontrol eden vezikül aracılı bir taşıma sistemi oluşturur. Eksozomların bu hücrelerarası iletişimi, bilim dünyasında eksozom-



Şekil 2.3. Eksozomların Şematik Gösterimi(53)

ların istenen terapötik molekülün yüklenebildiği, doğal bir ilaç dağıtıcısı olarak kullanılabileceği görüşünü gündeme getirmiştir (57).

Zhu ve arkadaşları 2017 yılında yayınladıkları çalışmalarında sinoviya hücrelerinden elde ettikleri eksozomların kök hücrelerden elde edilenlere göre osteoartrit modelinde daha başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiş (58). Bu nedenle çalışmamızı sinovial hücrelerden elde edilen eksozomlarla planladık.

Hücrel sekresyonlar, kullanıma hazır olarak hücrel içeriklerden daha uygun terapötiklerdir ve zaman kaybı olmaksızın hastalara ulaştırılabilir. Güvenlik riskleri azdır. Çeşitli mekanizmalarla hasarlı dokunun mikroçevresini regüle edebilirler. Ancak hala eksozomların klinikte insanlarda kullanılabilmesi için pek çok araştırma yapılması gereklidir. Öncelikle, eksozomlar ile sağlanan terapötik desteğin süresi araştırılmalıdır. İkinci olarak, biyokimyasal kompozisyonları tam olarak tanımlanmalıdır. Üçüncü olarak, kullanım potansiyelleri belirlenmelidir. Dördüncü olarak, hedef dokudaki etkileri ve etkilenen moleküler yollar açıklanmalıdır. Beşinci olarak, biyodağılımı, biyoaktivitenin süresi ve uzun süreli güvenirliliği araştırılmalıdır. Son olarak da, ölçülebilir ve

süreklilik gösteren kaynak yaratılmalıdır. Eksozomların güvenlik profillerini belirleyecek olan bu çalışmalar sayesinde, nörodejeneratif ve diğer ciddi hastalıkların tedavisinde terapötik potansiyel daha az sınırlı ve daha uygun opsiyonlara sahip olabilecektir (59), (43).

2.8. Eksozomların Hasarlı Dokudaki Etkileri

Mezenkimal eksozomlar kompleks nükleik asit kargosu taşırlar. Bu kompleks genomik materyalle, biyokimyasal etkileşimlerle ya da doğrudan etkisiyle metabolizmanın düzenlenmesine katkı sağlar. Ayrıca ekstrasellüler matriks proteinleri ve enzimlerinden zengin oldukları için ekstrasellüler matriksin düzenlenmesine katkı sağlar.

Mezenkimal kök hücrelerin dokular üzerindeki temel etkisi, doku homeostazisinin sağlanmasıdır. Bu amaçla bulundukları mikroçevre içindeki değişiklikleri algırlar ve buna uygun bir yanıt oluştururlar. Temel işlevi hücreler arası iletişimi sağlamak olan eksozomlar, bu dengenin kurulmasında efektif bir araçtır. Gerek endositozla hücre içine girerek, gerek reseptör-ligant ilişkisi kurarak hücreler arası iletişimi sağlarlar.

Eksozomların karmaşık biyolojik yapıları nedeniyle tüm etkileri anlaşılamamış olsa da Toh ve arkadaşları, 2016 yılında yayınladıkları makalelerinde doku üzerindeki düzenleyici etkilerini kabaca 4 başlık altında toplamışlardır (60):

Biyoenerjetik: Mitokondriler hücrelerin enerji santralleridir. Hasarlı dokularda, azalmış mitokondriyel biyogenez ve azalmış elektron transport zinciri proteinleri görülür. Bu da ATP üretiminin bozulmasına, hücrenin homeostazis sağlama yeteneğinin bozulmasına ve artan oksidatif stresle birlikte inflamatuvar yanıtın tetiklenmesine hatta hücre apoptozuna kadar giden bir süreci başlatır (61). Böyle bir süreçte hücrenin yenilenmesi, iyileşmesi biyoenerji homeostazisinin rejenerasyonuna bağlıdır. Eksozomlar glikolitik yolak enzimlerinden zengin bir protein kargosu taşırlar(fosfoglikorilaz ve pirüvat kinaz gibi glikolitik yolağın enerji üreten basamakları başta olmak üzere) ve hücre içinde ATP üretimini desteklerler. Eksozomların bu etkileri özellikle reperfüzyon hasarı üzerine olan çalışmalarda gözlenmiştir (56). Glikolitik yolak oksidatif yolağa göre çok düşük miktarlarda enerji sağlasa da artmış kapasitesi sayesinde hücrenin enerji ihtiyacını büyük ölçüde karşılar ve glikolitik yolak sonucu oluşan son ve ara ürünler anabolik

süreçler ve oksidatif yıkım süreci için substrat oluşturarak bu yolları desteklerler.

Hücre Sayısı: Yaralanmış kıkırdak dokusunda bir inflamasyon cevabı oluşur. Bu da oksidatif stresin artmasına, hücre apoptozunun hızlanmasına ve sonuç olarak kıkırdak hücrelerinin kaybına ve yapının bozulmasına sebep olur. Kıkırdak yapısının korunabilmesi için hasarlı bölgede hücre proliferasyonu ve ekstrasellüler matriks üretimi artmalıdır. Zhang ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada, eksozomların hücre proliferasyonunu ve dolayısıyla kıkırdak rejenerasyonunu hızlandırdığı gösterildi (62). Hayvan modelinde oluşturulan kıkırdak hasar modelinde 2. haftada PCNA (Prolifere Hücre Nükleer Antijeni) pozitifliği gösterildi.

Bir hücre stres altında olduğunda etrafındaki hücelere tehlikede olduğuna dair sinyal yollar {ekstrasellüler ATP (Adenozin trifosfat), ADP(Adenozin difosfat) örnek olarak verilebilir}. Bu tehlike işaretleri etraf dokularda inflamatuvar yanıt oluşturur ve apoptoz yolağını tetikler. Ekstrasellüler ATP ve ADP apoptotik moleküller olsalar da adenozine kadar parçalandıklarında ERK 1/2 ve ALK fosforilasyonu ile proliferatif etki gösterirler. ATP ve ADP ekstrasellüler matrikste spontan olarak AMP'ye dönüşürler. AMP molekülü bir ekstrasellüler 5'nükleotidaz olan CD73 ile adenozine dönüşür. Eksozomlar sahip oldukları zengin CD73 rezervi ile apoptotik bir molekülü proliferatif etkili hale getirir.

İmmünomodülasyon: İmmün sistem, yaralanmalarda vücudu korumak için özelleşmiş savunma sistemidir. Sadece ilk travma anındaki yanıtta değil sonrasındaki iyileşme sürecinde de aktif olarak rol alır. Kıkırdak yaralanmalarında erken dönemde travma yanıtı olarak İL-1 β , İL-6 ve MMP-3 (Matriks Metalloproteinaz-3) gibi inflamatuvar sitokinler baskın olarak salgılanır. Bu sitokin salgılaması devam ederse sitokinlerin destrüktif etkilerine bağlı olarak apoptoz, kıkırdak hasarı ve eklem hasarı gelişebilir.

Bu inflamatuvar sitokinler, temel olarak makrofaj gibi immün hücrelerden ve sinoviyumdan salgılanırlar. Ding ve arkadaşları 2016 yılında bu süreçte 2 farklı çeşit makrofajın olduğunu gösterdiler (63). M1 makrofajlar başta İL-6 olmak üzere proinflamatuvar sitokinleri salgılayıp lokal inflamasyonu destekler, MKH'lerin kondrosite dönüşümünü baskımlarken; M2 makrofajlar başta İL-10 olmak üzere antiinflamatuvar sitokinleri sal-

gırlarlar ve kırıktdak hücrelerinin yaşam süresini uzatırlar. Eksozomların devam eden çalışmalarda makrofajları M2 yönünde polarize olmaya ittiğı, inflamatuvar sitokin oluşumunu azalttığı hatta osteoartrit gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir (64). Kırıktdak hücrelerinin rejenerasyonunda bu inflamatuvar sürecin regülasyonu önemli görölmektedir.

Eksozomlar salgıladıkları trofik faktörlerle {INF- γ (interferon γ), TGF- β (Transforme edici büyüme faktör-beta), HGF, hemoksijenaz-1, İL-6, prostaglandin E2} immünmodölatör olarak çalışırlar. İmmünomodölasyon etkisi bu moleküllerin hiçbiriiyle definitif olarak ilişkilendirilmese de; eksozomların taşıdıkları çeşitli pro ve antiinflamatuvar sitokinlerin sinerjistik etkisi ile immünmodölatör olarak çalıştığı düşünölmektedir. Allojenik greftlerle yapılan bir çalışmada eksozomların Treg (Regölatur T hücreleri) hücreleri aktive ettiğı görölmüştür (65). Bu da etkilerinin immünsupresif değıl; immünmodölatör olduğı yönünde yorumlanmıştır.

Eksozomal miRNA: Eksozomlar yapılarında 150'den fazla RNA parçacığı taşırlar. Bu mRNA'lar SMAD, AKT, ERK gibi önemli yolakları düzenleyerek etkilerini gösterirler. Örneğın miRNA-125b ve miRNA-320, ADAMTS-4 ve MMP-13 üretimini downregüle ederek ekstrasellüler matriks yıkımını azaltırlar (66).

Eksozomlarda hücre yapısı olmadığı için tümör gelişim riski, genomik instabilite riski, immün reaksiyon, mikrovasküler yapılarda tıkanıklık ve pulmoner emboli riski, nakledilen hücrelerin bulunduğı yerde farklı bir dokuya dönüşme riski gibi (heterotopik ossifikasyon-kalsifikasyon vb) hücreye bağılı komplikasyonlar gözlenmez.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız eksozomların (I. deney grubu), mezenkimal kök hücrelerin (II. deney grubu) ve mikrokırık yönteminin (III. deney grubu) tam kat kıkırdak hasarının tami-rine, dokunun rejenerasyonuna ve erken osteoartrit inflamasyon sürecine olan etkile-rini gözlemlemek ve karşılaştırabilmek amacıyla planlandı. Çalışmamıza başlamadan yapılan güç analizi ile toplam hayvan sayısı 11 olarak belirlendi. Deneysel model ola-rak Yeni Zellanda tipi erkek tavşanlar kullanıldı. Hayvanların her iki dizi de çalışmada kullanıldı. Tavşanlara xylazine 5 mg/kg intramüsküler ve ketamin 50 mg/kg intramüs-küler veteriner eşliğinde uygulanarak anestezi sağlandı. Çalışmamız Eskişehir Osman-gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (HADYEK) tarafından onaylandı. (Ta-rih:28.07.2021, Karar Metni Sayısı: 614-5/2021). Deneklerin cerrahileri, anestezileri ve preoperatif/postoperatif bakımları Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Cerrahi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (TICAM) gerçekleştirildi. 12 hafta sonunda tüm deney ve kontrol grubu hayvanlarına, etik kurallara uygun bir şe-kilde yüksek doz anestezi eşliğinde ötenazi uygulandı.

3.1. Deney Planı

I. Deney grubu: Hayvanların dizlerinde 4 mm'lik dermal punch biyopsi cihazı ile tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. 6×10^6 hücre/ml konsantrasyonda ss-MKH'lerden (sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücreler) elde edilen eksozomlar, 50 µl Phosphate-Buffered Saline (PBS)'te dilüe edilerek kıkırdak hasarının hemen ardından (0. günde), 4.haftada ve 8.haftada olmak üzere (3 kez) intra-artiküler olarak her iki dize enjekte edildi.

II. Deney grubu: Hayvanların dizlerinde 4 mm'lik dermal punch biyopsi cihazı ile tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. 6×10^6 hücre/ml konsantrasyonundaki ss-MKH'ler, 50 µl PBS'te dilüe edilerek kıkırdak hasarının hemen ardından (0. günde), 4.haftada ve 8.haftada olmak üzere (3 kez) intra-artiküler olarak her iki dize enjekte edildi.

III. Deney Grubu: Hayvanların dizlerinde 4 mm'lik dermal punch biyopsi cihazı ile tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. 0,5 mmlik Kirschner telleri ile mikrokırık oluşturu-ldu.

IV. Deney Grubu: Hayvanların dizlerinde 4 mm'lik dermal punch biyopsi cihazı ile tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. Tedavi verilmeyen bu grup, tam kat kıkırdak hasarını oluşturmada başarılı olup olmadığımızı kontrol etmek amacıyla pozitif kontrol grubu olarak kullanıldı.

V. Deney Grubu: Hayvanlara bir işlem yapılmadı. Hasarsız grup, negatif kontrol grubu olarak kullanıldı.

VI. Deney Grubu: Hayvanların dizlerinde 4 mm'lik dermal punch biyopsi cihazı ile tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. Deney grupları ile aynı zamanlarda 3 kez 50 µl PBS enjeksiyonu yapıldı. PBS bazında verilen tedavilerin etkinliklerini PBS'ten alıp almadığını kontrol etmek amacıyla oluşturuldu.

Tablo 3.1. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Grup	Kıkırdak Hasarı	Hayvan Sayısı	Uygulanan Tedavi
I.Grup Eksozom Grubu	Var	3	Eksozom Preparatı
II.Grup Mezenkimal Kök Hücre Grubu	Var	3	Mezenkimal Kök Hücre Preparatı
III.Grup Mikrokırık Grubu	Var	2	Mikrokırık
IV.Grup Pozitif Kontrol Grubu	Var	1	Yok
V.Grup Negatif Kontrol Grubu	Yok	1	Yok
VI.Grup Sham Grubu	Var	1	PBS

Ötenazi sonrasında tüm deney ve kontrol grubu hayvanlarının femur distali ve tibia proksimali çıkarıldı. Dokular, parafin bloklara gömülme üzere %10'luk formaldehit içeren kaplara aktarıldı.

3.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Hazırlanması

3.2.1. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

Hayvanların diz eklemine 3 ml izotonik tuz solüsyonu (SF) enjekte edildi ve diz birkaç kez hareket ettirildikten sonra içerisinde sinoviyal sıvı bulunan SF solüsyonu geri çekildi. Sinoviyal sıvının orijinal volümü, toplam hacminden 3 ml izotonik tuz solüsyonu çıkarılarak hesaplanıp not edildi. Enjektörün içerisindeki sinoviyal sıvı ve izotonik tuz solüsyonu 15 ml'lik konik tabanlı tüplere steril kabin içerisinde aktarıldı.

Üzerine 2 ml içerisinde %10 oranında penisilin-streptomisin içeren HBSS(Hank dengeli tuz solüsyonu) (Invitrogen) eklenerek 300 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp pellete 5 ml içerisinde %10 FBS (fetal inek serumu), %0.2 primosin (Invitrogen), %1 (ml/ml) Glutamax (Sigma) bulunan DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) besiyeri eklenerek tekrar santrifüj edildi. Pellet besiyeri ile resüspanse edilerek T25 kültür flasklarına ekilerek 37 °C sıcaklıkta, %5 O₂ ve %5 CO₂ içeren atmosferli inkübatörde tutununcaya kadar kültür edildi. Her gün mikroskopik olarak takip edilip, tutunduktan sonra 3 günde bir besiyeri değiştirildi, %70-80 konfluent olunca kültür kabından tripsin-EDTA ile kaldırılarak yeni kültür kaplarına 1/3 oranında bölünerek ekildi. Daha önce ön çalışma amaçlı izole ettiğimiz sinoviyal sıvı mezenkimal kök hücrelerin, kültüre alındıktan sonra 5. günde kültür kabına tutundukları belirlenmişti.

3.2.2. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

a) Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Analizi

Sinoviyal sıvıdan izole ettiğimiz hücrelerin MKH'lere özgü karakteristik özellikleri taşıyıp taşımadığını belirlemek için karakterizasyon analizleri gerçekleştirdik. 3. pasaja kadar kültür edilen MKH'ler, yüzey belirteçleri bakımından CD73, CD90, CD105, CD45 ve CD34 antikorları ile akım sitometri (flow sitometri) analizine alındı.

Bunun için pasaj 3'e gelmiş olan hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldıktan sonra kültür medyumunu içeren tüplere aktarılıp santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pellet resüspanse edilip sayıldıktan sonra 1×10^6 /ml olacak şekilde kendi medyumunda süspanse edildi. Hücreler daha sonra, belirlenen hücre yüzey işaretçilerine özel fluorescein isothiocyanate (FITC)—, phycoerythrin (PE) ve PerCP— konjuge monoklonal antikorları; CD73, CD90, CD105, CD45, CD34 antikorları ile oda ısısında (karanlıkta) 45 dakika inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ilave edilip 5 dakika süreyle 500 xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pelet $400/\mu\text{l}$ yıkama solüsyonunda resüspanse edildikten sonra FACSCalibur (BD Biosciences) cihazında okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

b) Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunohistokimyasal Analizi

Sinoviyal sıvıdan izole ettiğimiz hücrelerin immunofenotipik karakterizasyon analizleri için hücreler, immunositokimyasal işaretleme yapılarak analize alındı. Bunun için CD105, Nestin ve CD45 ile immunofloresan (İF) işaretlemler yapıldı. İF işaretlemlerinde ise hücreler metanolle fikse edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS’de 30 dakika inkübe edildi ve Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilüe edildi. Primer antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3X2 dakika yıkama işleminden sonra immunfluoresans çalışmalar için uygun fluoresans (FITC, TR) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Son olarak nükleer boya içeren kapatma medyum (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Fluoresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

c) Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırma Analizi

Bir başka karakterizasyon analizi olarak hücreler farklılaştırma kültür ortamına alındı ve SS-MKH’ler kemik, kıkırdak ve adipoz hücre hatlarına farklılaştırmak üzere uygun sürelerde kültür edildi. Farklılaştırma sonrasında adipojenik hücreler Oil Red-O boyası, osteojenik hücreler Alirazin Red-S boyası, kondrojenik hücreler de Alcian Blue boyası ile gösterilerek elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterinde oldukları doğrulanmaya çalışıldı.

Adipojenik Farklılaşma

Kültür kabına cm^2 ’sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen MKH’leri; içinde %10 FBS, 0.5 mM isobutil-metilksantin, 10^6 M deksametazon, 10 µg/ml insülin, 200 µM indometazin ve %1 penisilin-streptomisin bulunan MEM (Minimum Essential Medium) kültür medyumunda iki hafta kültüre edildi ve kültür sonrası hücre içi biriken lipidlerin, Oil Red-O histolojik boyaması yapılarak pozitifliği gösterildi.

Osteojenik Farklılaşma

Kültür kabının cm^2 ’sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen MKH’leri; 100 nM deksametazon, 0.05 µM askorbat-2-fosfat, 10 mM beta-gliserofosfat, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren MEM kültür medyumunda 4 hafta boyunca kültüre

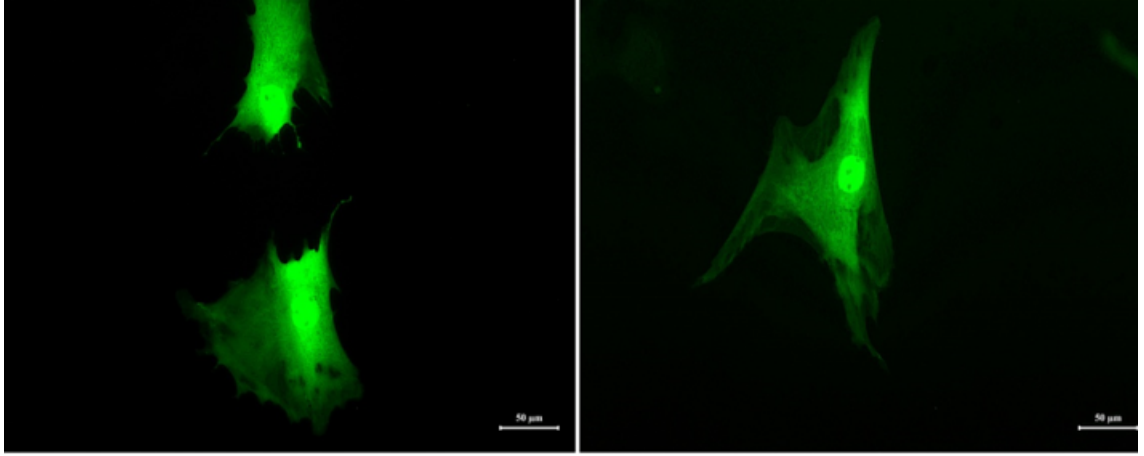
edildi. Ayrıca osteojenik farklılaşma Alizarin Red-S ile boyandı ve bu histolojik boyamanın pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterildi. Farklılaşmış ve farklılaşmamış MKH hücrelerinde osteonektin ve BMP4 proteinleri, immunofluoresan işaretleme ile belirlendi.

Kondrojenik Farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma mikropellet solüsyon kültür tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Özetle 5×10^6 adet hücre peleti, 15 ml'lik konik tabanlı tüpte (Corning) ve 10×10^6 adet hücre peleti ise 10 mm'lik tek kuyucuklu petride gözün ortasına küçük damlacık halinde koyularak kültür edildi. 37 °C'de 2 saat yapışmaları için beklendikten sonra hücreler, 10 ng/ml transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1; Biosource PHG0021), 50 µg/ml askorbat-2-fosfat (Wako Chemicals, Richmond, VA, USA), 0.1 µM dek-sametazon (Sigma-Aldrich, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), 100 µg/ml sodyum piruvat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 40 µg/ml proline (Merck, Darmstadt, Germany), 50 mg/ml ITS premix (BD-Biosciences, Bedford, MA), %1 Penisilin-streptomisin (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) içeren yüksek glikoz DMEM kültür medyumuna ile 2 hafta kültüre edildi. 2 haftalık kültür sonrası petride bulunan pellet kullanılarak, kondrojenik farklılaşma kıkırdak matriksinde bulunan fosfatlı proteoglikanlar Alcian Blue boyaması yapılarak belirlendi. Fotoğrafları çekildikten sonra tüpteki pellet ile birlikte %4 paraformaldehit ya da %10 formalin ile fikse edilip parafine gömüldü ve 5 µm'lik kesitler alındı. Kesitlerde kondrojenik farklılaşma, histokimyasal olarak tekrar Alcian Blue ile gösterildi.

d) Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin PKH67 ile İşaretlenmesi

Mezenkimal kök hücreler “genel hücre zarı etiketleme için PKH67 yeşil floresan hücre bağlayıcı kiti” (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılarak PKH67 lipofilik yeşil floresan boya ile boyandı. Prosedür üreticinin protokolüne göre yapıldı. 1 µl PKH 67 boyası içeren MKH/PBS süspansiyonuna 100 µl seyreltici C ilave edildi. MKH ve boya örnekleri hazırlandı ve 4 dakika hafifçe karıştırıldı. Fazla boya PBS yıkaması ile uzaklaştırıldı. PKH67 ile boyanmış mezenkimal kök hücreler floresan mikroskop kullanılarak görüntülendi (Bkz. Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Tam Kat Kıkırdak Hasarlı Tavşanların Dizine Enjekte Edilen PKH67(yeşil) İşaretli MKH'ler (Scale bar: 50 μ m).

3.3. Eksozomların Hazırlanması

3.3.1. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerden Eksozom İzolasyonu

6×10^6 sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücre, 6 adet T175 kültür kabına ekildi. Başlangıçta %70 konfluensiye ulaşınca kadar hücreler %10 FBS içeren L-DMEM medyumunda çoğaltılıp mikroskopik kontrolleri yapıldı. Konfluensiye ulaştıklarında medyum değişimi yapıldı ve bundan 48 saat sonra hücrelerin kültür medyumunu toplandı, hücre ve debrisinden kurtulmak için hücre medyumunu $2000 \times g$ 'de 30 dakika santrifüj edildi. Hücreden arındırılmış kültür medyumunu içeren süpernatant, pelleti bozmadan yeni bir tüpe aktarıldı. İzolasyon için gerekli hacimde hücreden yoksun kültür medyumunu yeni bir tüpe aktararak üzerine 1/2 hacimde total eksozom izolasyonu (Invitrogen) reaktant eklendi. Homojen bir karışım oluşuncaya kadar kültür medyum/reaktant karışımı vorteks ile veya pipetleme ile karıştırıldı. Örnekler $2-8^{\circ}C$ 'de gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, örnekler $10.000 \times g$ 'de 1 saat $2-8^{\circ}C$ 'de santrifüj edildi. Süpernatant aspirasyon ile atıldıktan sonra, eksozomlar tüpün alt kısmındaki pellette bulundu. Pelletin 1xPBS ile resüpsansiyonu yapıldı ve diğer analizler için hazır hale getirildi. Her yapılan izolasyondan sonra eksozomlar akım sitometri ile yüzey belirteçleri açısından analiz ile karakterize edildi. Literatürde izole edilmiş eksozomların bir haftaya kadar $2-8^{\circ}C$ 'de, $-20^{\circ}C$ 'de 6 ay, $-80^{\circ}C$ 'de daha uzun

süre stabil ve güvenli saklanabildiği bilgisi mevcuttur. Bizim deneyimiz için yaklaşık 2 ay -80°C 'de saklanması yeterli oldu ve uygun kaliteyi sağladı (67).

3.3.2. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Karakterizasyonu

Her izolasyon sonrası eksozomların bir kısmı eksozomlara özgü yüzey belirteçleri olan CD9, CD81 ve CD63 ile akım sitometrik analize alındı. Bu basamakta mikrokürecikler kullanılarak eksozomlar görünür hale gelecek şekilde katı bir yüzeye sabitlendi. CD81 antikoruna sabitlenmiş immünomanyetik küreciklerin yardımıyla eksozomlar görünür hale getirildi (Exosome-Human CD81 Flow Detection Reagent, Invitrogen). Mikrokürecikler üzerinde bulunan eksozomlar akım sitometri analizine uygun şekilde CD63 ve CD9 ile işaretlenerek CD81 yüzey belirteci taşıyan eksozomların diğer eksozom belirteci taşıma oranları sayısal olarak ölçüldü. Negatif kontrol olarak serum ve hücre içermeyen bazal besiyeri, benzer deney aşamalarından geçirilerek elde edilmiş örnekler cihaz okumalarında kullanıldı. 300 μl PBS içerisindeki eksozomlar, belirlenen hücre yüzey işaretçilerine özel floressein izotiyosiyanat(FITC)-, fikoeritrin (PE) ve PerCP-konjuge monoklonal antikorları, CD9 ve CD63 antikorları ile oda ısısında (karanlıkta) 45 dakika inkübe edildi.

Yıkama solüsyonu ilave edilip 30 dk süreyle 2000 xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Pelet 400 μl yıkama solüsyonunda resüspanse edildikten sonra FACS-Calibur (BD Biosciences) cihazında okutuldu. Cell Quest programında (BD Biosciences) analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.3.3. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli MKH Eksozomlarının Uptake Analizi

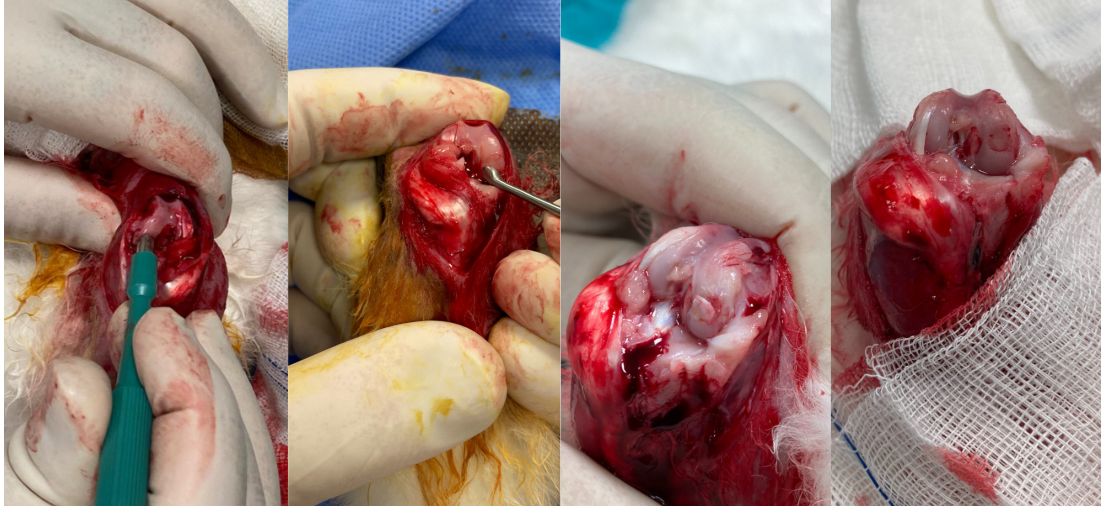
Eksozomların fonksiyonelliğini karakterize etmek ve mezenkimal kök hücreler tarafından sitoplazma içine alındıklarını gözlemlemek için izole edilen eksozomların membranları etiketleme amacıyla 'PKH26 kırmızı floresan hücre bağlayıcı kiti (Sigma-Alrich, Almanya)' kullanılarak PKH26 lipofilik kırmızı floresan boya ile etiketlendi. Prosedür üreticinin protokolüne göre yapıldı. Kısaca, 1 μl PKH26 boyası içeren eksozom/PBS süspansiyonuna 100 μl dilüent C ilave edildi. Eksozom ve boya örnekleri hazırlandı ve 4 dakika hafifçe karıştırıldı, fazla boya PBS yıkaması ile uzaklaştırıldı.

PKH26 etiketli eksozomlar, in vitro uptake analizi için izole edilmiş kök hücreler ile birlikte kültürlendi. Floresan mikroskop kullanılarak 3 saatlik ortak kültürden sonra örnekler gözlemlendi.

3.4. Deneyin Uygulanması

3.4.1. Tavşanlarda Tam Kat Kıkırdak Hasarı Oluşturulması

9-12 aylık Yeni Zellanda türü tavşanlarda artiküler tam kat kıkırdak hasarı oluşturulması için; tavşanların işlem öncesi anestezi protokolü veteriner hekim gözetiminde xylazine 5 mg/kg intramusküler ve ketamin 50 mg/kg intramusküler maksimum dozlar olacak şekilde uygulandı. 50 mg/kg sefazolin sodyum ile cerrahi profilaksi yapıldı. Uygun anestezi işlemi sonrasında her tavşanın her iki dizine saha temizliği (tüy temizliği ve steril boyanma işlemi) povidon iyot ve %75'lik alkol çözeltisi ile yapıp steril örtülerle kapatıldı. Dize 6 cm'lik anterior cilt insizyonu ile girilip medial parapatellar yaklaşım ile patella kemiği lateralize edilip eklem açıldı. Ardından femur medial kondili ekartörler ile görünür hale getirildi. Literatürde kıkırdak hasarı yapmak için pek çok yöntem bulunmaktadır (68), (69). Biz çalışmamızda kıkırdak hasarı için mekanik yöntem kullandık. 4 mm çapında bir dermal punch ve küretle defekt oluşturulması planlandı. Bunun için 4 mm çapında dermal punch tavşan femoral kondil kıkırdağının kalınlığı kadar (yaklaşık 1mm) manuel olarak ilerletildi. Kıkırdak hasarının tam kat oluşabilmesi için subkondral dokuya kadar ilerlendi. Sonrasında yüzeyde kalan kıkırdak doku subkondral kemiğe kadar küretle temizlendi(Bkz. Şekil3.2). İşlem sonrası eklem kapsülü 3-0 poliglaktin emilebilir sütürler ile, cilt ise 3-0 sentetik polyester eriyebilen sütür ile kapatıldı. Cerrahi bölge uygun koşullarda kapatıldıktan hemen sonra 26 gauge iğne ile patellar ligamentin medial tarafından eklem içine doğru intraartiküler hücre nakilleri yapıldı(Bkz. Şekil3.3). Operasyon sonrası tüm tavşanlar için standart antibiyotik ve analjezik uygulandı. Tavşanların kafeste serbestçe yürümelerine izin verildi. Enfeksiyon profilaktisi için 30 mg/kg/gün sefazolin 3 gün boyunca uygulandı.



Şekil 3.2. Kıkırdak Dokusunda Punç Biyopsi ve Küret ile Kıkırdak Hasarı Oluşturulması

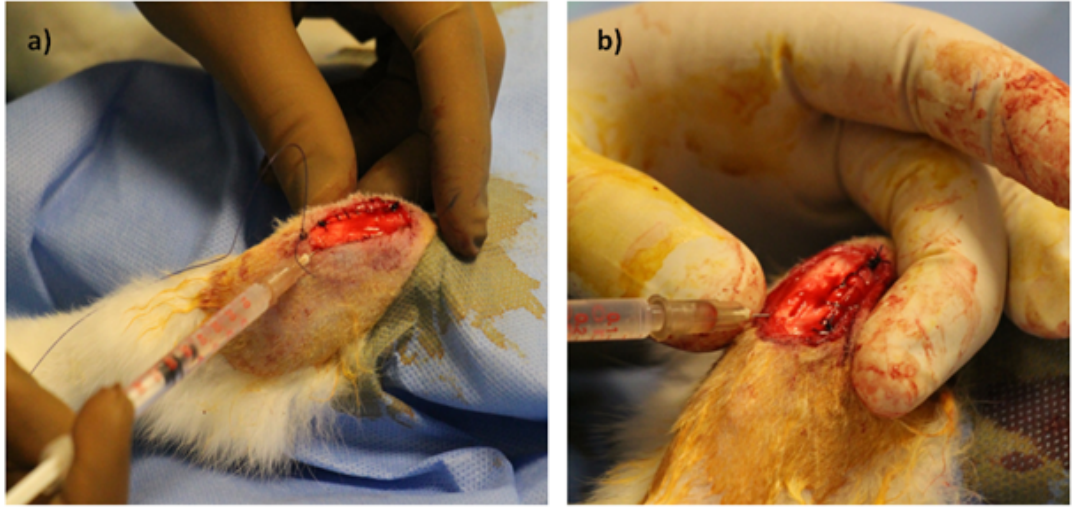
3.4.2. Tavşanlarda Mikrokırık Oluşturulması

III. deney grubundaki hayvanlara tam kat kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra 0,5 mm'lik Kirschner telleri yardımıyla 2 mm derinliğinde mikrokırıklar oluşturuldu. Enjeksiyon yapılmadı. Kalan prosedürler I. ve II. grupla aynı devam etti.

3.4.3. Tavşan Sinoviyal Sıvı MKH Eksozomların ve Tavşan SS-MKH'lerin Tam Kat Kıkırdak Hasarlı Tavşanlara Nakli

I.Deney grubu: Tam kat kıkırdak hasarı oluşturulmuş 3 adet tavşanın her iki dizine; PKH-26/kırmızı ile işaretlediğimiz, 6×10^6 adet sinoviyal sıvı kökenli mezenkimal kök hücreden elde edilen eksozomlar, 50 μ l PBS'te dilüe edilerek kıkırdak hasarının hemen ardından (0. günde), 4.haftada ve 8.haftada olmak üzere 3 kez enjekte edildi.

II.Deney grubu: Tam kat kıkırdak hasarı oluşturulmuş 3 adet tavşanın her iki dizine, PKH-67/yeşil ile işaretlediğimiz 6×10^6 adet tSS-MKH, 50 μ l PBS'te dilüe edilerek kıkırdak hasarının hemen ardından (0. günde), 4.haftada ve 8.haftada olmak üzere 3 kez enjekte edildi.



Şekil 3.3. Kıkırdak Hasarı Oluşturulmuş Tavşanlara Eksozom, MKH ve PBS Uygulaması

3.5. Sonuçların Değerlendirilmesi

Çalışmanın bu aşamasında Hematoksilen&Eozin ve Safranin-O/fast green ile histokimyasal boyanmış kesitlerde tam kat kıkırdak hasarlı dokunun tamiri ve rejenerasyonuna yönelik histolojik inceleme yapıldı. Bunun için %10'luk nötral formalinde fiske edilen dokular, %10 nitrik asit çözeltisinde 3 gün boyunca dekalsifiye edildi. Dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi ve parafine gömüldü. 2-3 µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen&Eozin, Safranin-O/fast green ile histokimyasal boyanmış ve kollajen tip-I,II ve X, TNF- α , MMP-3 antikorları ile immunositokimyasal(IHC) ve immunofloresan(IF) işaretlenmiş parafin doku kesitlerinde tamir, rejenerasyon ve inflamasyon üzerine MKH'lerin ve eksozomların etkisi kontrol ve mikrokırık grupları ile karşılaştırılarak incelendi. Tam kat kıkırdak hasarının histolojik değerlendirmesinde Modifiye ICRS Görsel Histolojik Değerlendirme Skalası kullanıldı(10). Buna göre hasar; yüzey, matriks, hücresel dağılım, hücre popülasyon canlılığı, subkondral kemik, matriks boyanması (metakromazi) açısından Hematoksilen&Eozin ve Safranin-O/Fast green boyaması ile değerlendirildi. İmmunohistokimyasal analiz için, Ultravision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) ve ABC Staining System immunohistokimya kitleri kullanıldı. Hücreler PBS'le yıkandıktan sonra metanolle 20 dk fikse edildi. PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok (Normal Sera) serum

içeren PBS’de 30 dakika inkübe edilerek verilen uygun dilüsyon oranlarında hazırlanan primer antikorlar eklenip oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkama işleminden sonra immunohistokimyasal kit prosedürü aynen uygulanıp son aşamada AEC kromojenle [AEC (RED) Substrat Kit] enzim kompleksi görünür hale getirildi, Hematoksilen, Gills Formulation 2 ile çekirdek zıt boyaması gerçekleştirilip kurutulan preparatlar Crystal Mounting Medium ile kapatılıp Leica DM 2500 Microsystems ışık mikroskopunda analiz edilip görüntülendi (Negatif kontroller için, aynı yöntem uygulanmış fakat primer antikor yerine PBS kullanılmıştır). İmmunofloresan analizlerde ise hücreler metanolle fiske edilip PBS ile yıkandıktan sonra, %1.5 normal blok serum içeren PBS’de 30 dakika inkübe edildi ve Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilüe edilen primer antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 2 saat süreyle inkübe edildi. PBS ile 3X2 dakika yıkama işleminden sonra immunfloresan çalışmalar için uygun floresan (FITC, TR) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi, son aşama nükleer boya içeren kapatma medyum (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldı. Floresan mikroskopta (Leica DI 2500 Microsystems) incelenerek fotoğraflandı.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

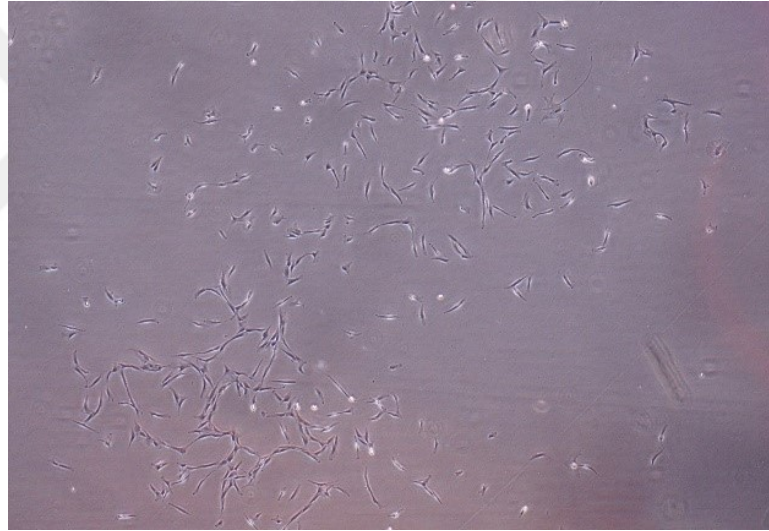
Nümerik değişkenlerin gruplara göre normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk normalite testi ile değerlendirildi, değişkenlerin normal dağılım göstermediği tespit edildi ve nonparametrik testlerin kullanılması planlandı. Kruskal Wallis testi kullanıldı ve anlamlı farklılık saptanan parametrelere grupların ikişerli karşılaştırması için Dunn’s Testi uygulandı. İstatistiksel olarak anlamlılık değeri %95 güven aralığı için $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Tüm analizler IBM SPSS Statistics Version 25 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

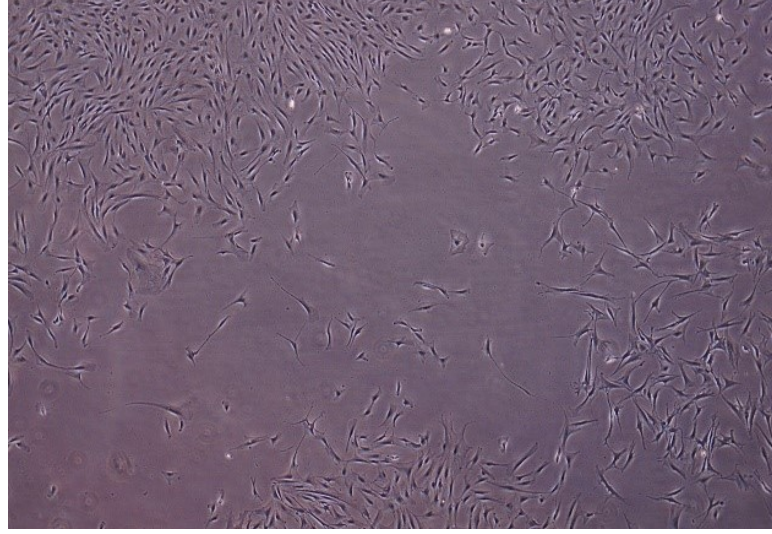
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Değerlendirilmesi

4.1.1. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonunun Değerlendirilmesi

İzole ettiğimiz mezenkimal kök hücreler, kültüre alındıktan sonra 3. günde kültür kabına tutundu. Karakterizasyon ve eksozom eldesi için gereken sayıya kadar kültür edildi. Kültür sırasında günlük olarak ışık mikroskopik incelemeleri ve fotoğraf çekimleri yapıldı. İzole edilen hücrelerin faz-kontrast mikroskobu ile yapılan ışık mikroskopik incelenmelerinde (Bkz. Şekil 4.1) yıldız şekilli geniş veya daha çok fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğu görüldü.



Şekil 4.1. İzole Edilen ve Kültüre Alındıktan Sonra 8. Günde Kültür Kabına Tutunmuş Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Faz-kontrast Mikroskopik görüntüleri. MKH'ler Geniş, Yıldız Şekilli Geniş veya Daha Çok Fibroblast-benzeri Morfolojide Gözlendi(Scale bar=200 μ m).



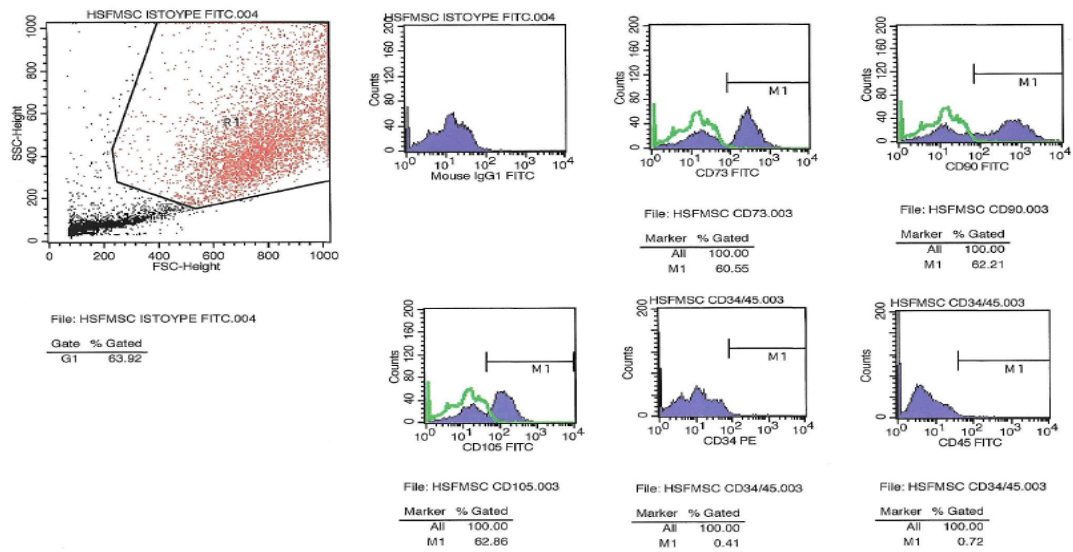
Şekil 4.2. İzole Edilen ve Kültüre Alındıktan Sonra 11. Günde Kültür Kabına Tutunmuş Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Faz-kontrast Mikroskopik Görüntüleri. MKH'ler Geniş, Yıldız Şekilli Geniş veya Daha Çok Fibroblast Benzeri Morfolojide Gözlendi(Scale bar=200 μ m).

4.1.2. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyon Analiz Sonuçları

a) Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Analiz Sonuçları

Sinoviyal sıvıdan izole ettiğimiz hücrelerin MKH'lere özgü karakteristik özellikleri taşıyıp taşımadığını belirlemek için karakterizasyon analizleri gerçekleştirdik. Bunlardan ilkinde hücreler akım sitometri ile immunofenotipik analize alındı. Bunun sonucunda flow sitometri cihazında elde edilen bulgulara MKH'lerin CD90 (%62.21), CD73 (%60.55) ve CD105'i (%62.86) pozitif; CD45 (%0.72) ve CD34'ü (%0.41) negatif olarak eksprese ettiğini belirledik(Bkz. Şekil 4.3). Elde edilen MKH'lerin yüzey belirteçleri bakımından CD73, CD90, CD105 pozitif ve CD45, CD34 negatif eksprese ettiğini belirledik(Bkz. Şekil 4.1). Böylece elde edilen kök hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterinde olup olmadığı test edilmiş oldu.

ISCT tarafından belirlenen kriterlere uygun olarak elde edilen hücrelerin MKH olduğu ispatlanmış oldu (35).



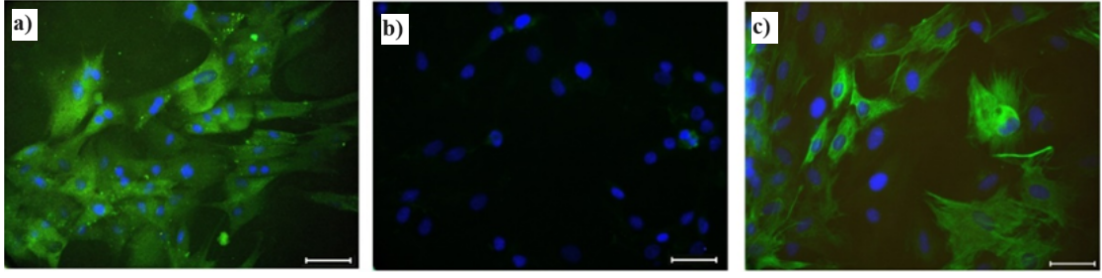
Şekil 4.3. Üçüncü pasajda Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım Sitometri ile Gerçekleştirilen İmmunofenotipik Analizlerinde CD90(%62.21), CD73(%60.55) ve CD105'i (%62.86) pozitif; CD45(%0.72) ve CD34'ü (%0.41) negatif olarak belirlendi.

Tablo 4.1. Akım Sitometri ile Değerlendirilen Yüzey Belirteçleri ve Yüzdeleri

Antikor/ Belirteç İsmi	Yüzde Değeri
CD90	%62.21
CD73	%60.55
CD105	%62.86
CD45	%0.72
CD34	%0.41

b) Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunositokimyasal Analiz Sonuçları

İmmunositokimyasal bulgulara CD105 ve Nestin'i pozitif eksprese ettikleri; CD45'i ise negatif olarak eksprese ettikleri teyit edildi(Bkz. Şekil 4.4). Bu bulgular bize sinoviyal sıvıdan elde edilen hücrelerin, MKH özelliklerine sahip olduğunu gösterdi ve bu hücreleri MKH olarak nitelememizi sağladı.



Şekil 4.4. MKH’lerde İmmüno Floresanın Temsili Panelleri. MKH’ler CD105 (yeşil) (a), Nestin (yeşil) (c) İçin Pozitif ve CD45 (yeşil) (b) İçin Negatif İzlendi. Çekirdekler DAPI (mavi) (a-c) ile Boyandı. (Scale barlar:50 µm).

c) Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaştırma Analiz Sonuçları

Mezenkimal kök hücrelerin multipotent potansiyellerini test etmek amacıyla farklılaşma analizleri yapıldı.

Adipojenik Farklılaşma Sonuçları

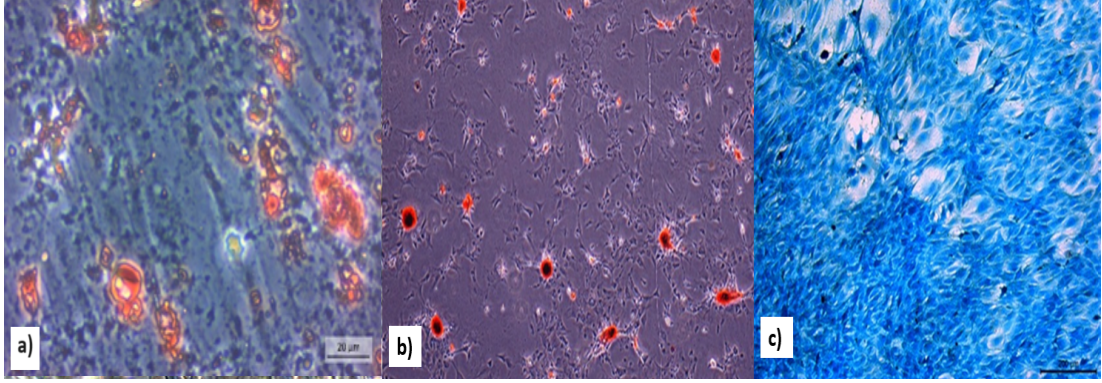
Mezenkimal kök hücreler yöntem kısmında detaylı anlatıldığı şekilde, adipojenik farklılaşmaya elverişli kültür ortamında kültüre edildiler. Kültür sonrası Oil Red-O histolojik boyaması yapılarak hücre içi biriken lipidlerin pozitifliği mikroskopik olarak gösterildi(Bkz. Şekil 4.5).

Osteojenik Farklılaşma Sonuçları

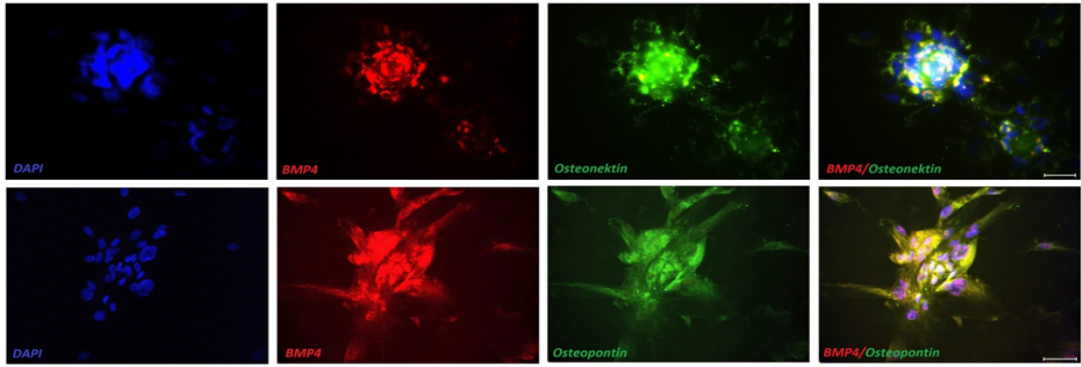
Mezenkimal kök hücreler yöntem kısmında detaylı anlatıldığı şekilde, osteojenik farklılaşmaya elverişli kültür ortamında kültüre edildi. Ayrıca osteojenik farklılaşma Alizarin Red-S ile boyandı ve bu histolojik boyamanın pozitifliği mikroskopik incelemelerle gösterildi(Bkz. Şekil 4.5). Farklılaşmış ve farklılaşmamış mezenkimal kök hücrelerde osteonektin ve BMP4 proteinleri immüno fluoresan işaretlenerek belirlendi(Bkz. Şekil4.6).

Kondrojenik Farklılaşma Sonuçları

Mezenkimal kök hücreler, yöntem kısmında detaylı anlatıldığı şekilde, kondrojenik farklılaşmaya elverişli kültür ortamında kültüre edildiler. Kıkırdak matriksinde bulunan fosfatlı proteoglikanlar Alcian Blue boyaması yapılarak belirlendi. Fotoğrafları çekildikten sonra tüpteki pelet ile birlikte %4 paraformaldehit ya da %10 formalin ile fikse edilip parafine gömüldü ve 5 µm’lik kesitler alındı. Kesitlerde kondrojenik farklılaşma, histokimyasal olarak tekrar Alcian Blue ile gösterildi(Bkz. Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Farklılaştırma İndüksiyonu Sonrası MKH'lerin Görüntüleri. a) Adipojenik Farklılaşma İçin Tipik Olan Hücre İçi Lipit Damlacıkları Oil Red-O ile Pozitif Boyandı. b) Osteojenik Farklılaşma Sonrası Mineral Nodüller Alizarin Red-S ile Boyandı. c) Kondrojenik Farklılaştırma Sonrası Alcian Blue Pozitif İzlenen Ekstrasellüler Matriks (Scale bar: a:20 μ m, b ve c:200 μ m).



Şekil 4.6. MKH'lerin karakterizasyonu için osteojenik farklılaştırma analizleri.

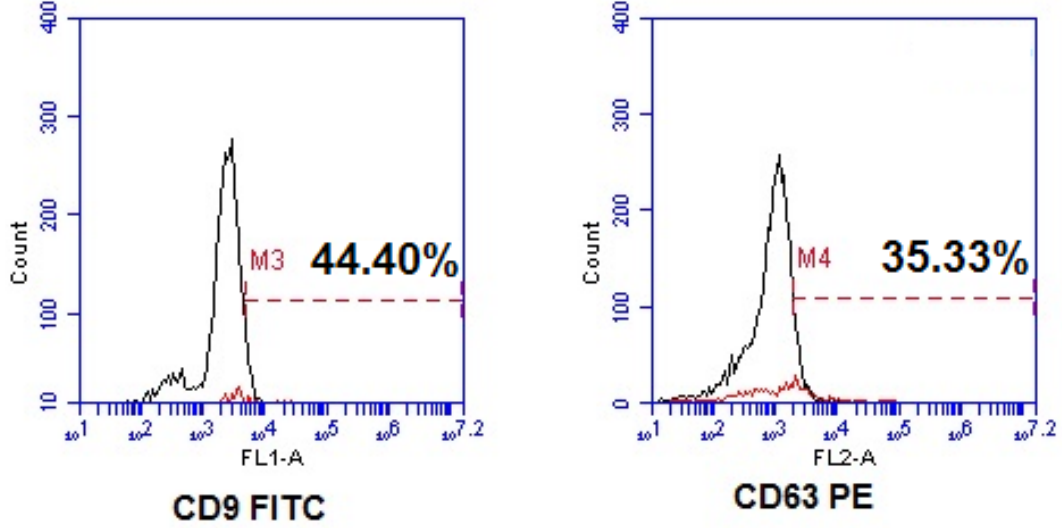
MKH'lerin osteojenik farklılaşma kültür koşullarında kültürün 4.haftasında farklılaşma sonrası osteojenik belirteçler olan BMP4 (kırmızı) ve Osteonektin (yeşil) ile immunofloresan olarak pozitif işaretlenmesi. Çekirdekler DAPI ile mavi olarak izlenmekte. (Scale barlar: 50 μ m).

4.2. Eksozomların Değerlendirilmesi

4.2.1. Tavşan Sinoviyal Sıvı Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Akım Sitometri ile İmmunofenotipik Karakterizasyon Sonuçları

İzole edilmiş eksozomların karakterizasyonu, eksozoma özgü floresein izotiyosiyanat (FITC)-konjuge CD9 ve fikoeritrin (PE)-konjuge CD63 yüzey belirteçleri için flow sitometrisi analizi kullanılarak yapıldı. Bu belirteçler, sinoviyal sıvıdan üretilen mezenkimal kök hücre eksozomlarının karakterizasyonu için önemlidir. Elde edilen sonuçlara göre, CD9 (%44.40) ve CD63 (%35.33) değerleri %10'un üzerinde olduğu

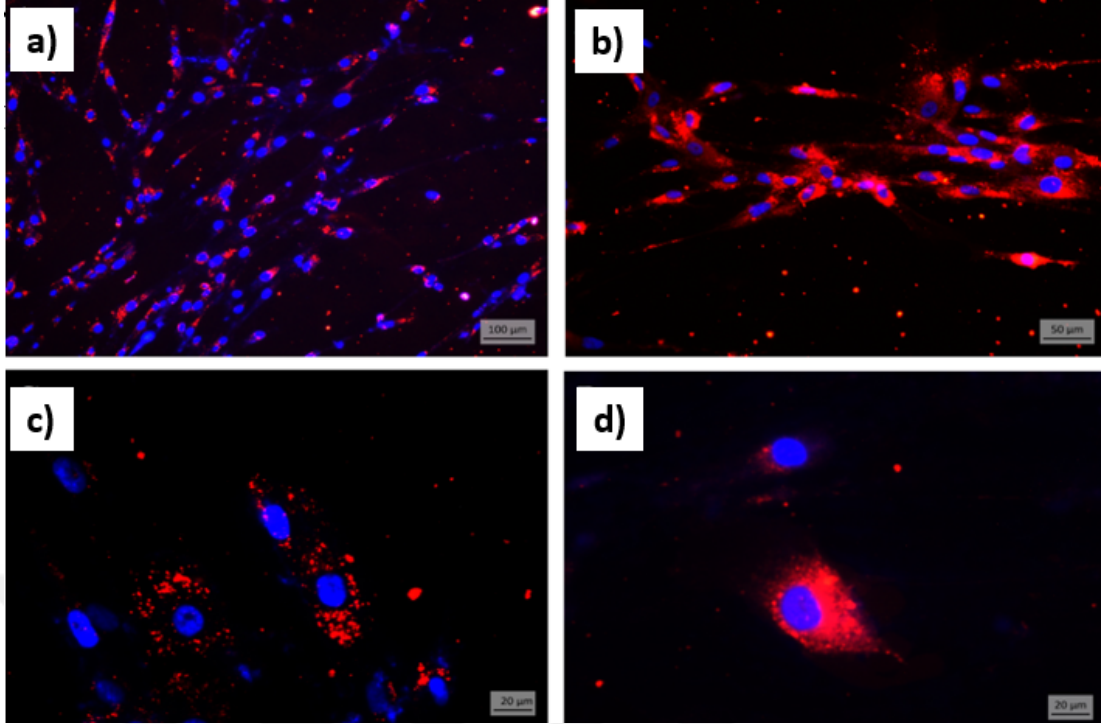
için pozitif olarak değerlendirildi(Bkz. Şekil 4.7). İzole edilen veziküllerin eksozom özelliğinde olduğuna karar verildi.



Şekil 4.7. MKH’lerden Elde Edilen Eksozomların Flow Sitometri ile Gerçekleştirilen İmmunofenotipik Analizleri. MKH Eksozomlarının Yüzey Belirteçlerinden CD9 (%44.40) ve CD63 (%35.33) Pozitif İzlendi.

4.2.2. Tavşan Sinoviyal Sıvı MKH Eksozomlarının Uptake Analizi

Mezenkimal kök hücreler tarafından eksozom alımını araştırmak için, eksozomlar PKH26 kırmızı floresan boya ile etiketlendi. Eksozomlar etiketledikten sonra, kök hücrelerle birlikte kültüre edildiler. Sonuçta, hücrelerle sadece 3 saatlik ortak kültürden sonra elde edilen bulgulara, eksozomların mezenkimal kök hücre içine alındığı ve çekirdeği çevreleyen sitoplazmik bölgelerde lokalize olduğu izlendi(Bkz. Şekil 4.8). Böylece eksozomların fonksiyonel olarak karakterizasyonu yapılmış oldu.



Şekil 4.8. Hücre Uptake Analizi ile MKH'lerden İzole Edilen Eksozomların Fonksiyonel Karakterizasyonu. a: Eksozomların MKH'lerle Ortak Kültürünün Başlangıcında Hücrelerin Dışında Gözlenen Hücre Dışı Eksozomlar. b-d: MKH'ler Tarafından Eksozom alımı, 3 Saatlik Ortak Kültürden Sonra PKH26(kırmızı) ile Gösterilmiştir. Hücre Çekirdekleri DAPI Boyası(mavi) ile Etiketlendi. Scale bars: a 100 µm; b 50 µm; c and d 20 µm.

4.3. Histolojik İnceleme Sonuçları

Eksozom grubundaki (I. Grup) 3 tavşanın her iki dizinde tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. 3 kez eksozom enjekte edildi. Sakrifikasyon sonrası yapılan histolojik incelemede ICRS skorunun median değeri 21,50 (Q1=20, Q3=22) olarak bulundu.

MKH grubundaki (II. Grup) 3 tavşanın her iki dizinde tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. 3 kez MKH enjekte edildi. Sakrifikasyon sonrası yapılan histolojik incelemede ICRS skorunun median değeri 18 (Q1=17, Q3=28) olarak bulundu.

Mikrokırık grubunda (III. Grup) 2 adet tavşanın her iki dizinde tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. Sonrasında mikrokırık uygulaması yapıldı. Sakrifikasyon sonrası yapılan histolojik incelemede ICRS skorunun median değeri 13 (Q1=10, Q3=15.5) olarak bulundu.

Pozitif kontrol grubundaki (IV. Grup) tavşanın her iki dizinde tam kat kıkırdak hasarı oluşturuldu. Sakrifikasyon sonrası yapılan histolojik incelemede ICRS skorunun

median değeri 5.5 (Q1=4, Q3=7) olarak bulundu.

Negatif kontrol grubundaki (V. Grup) tavşanın dizlerine herhangi bir müdahalede bulunulmadı. Sakrifikasyon sonrası yapılan histolojik incelemede ICRS skorunun median değeri 28 (Q1=28, Q3=28) olarak bulundu.

Sham kontrol grubundaki (VI. Grup) tavşanın her iki dizinde tam kat kırıkta hasarı oluşturuldu ve deney grupları ile aynı zamanlarda PBS solüsyonu enjekte edildi. Sakrifikasyon sonrası yapılan histolojik incelemede ICRS skorunun median değeri 10 (Q1=8, Q3=12) olarak bulundu.

Pozitif ve negatif kontrol grupları arasındaki farklılık ($p=,000$) anlamlı olarak saptandı; bu veri tam kat kırıkta hasarının başarılı bir şekilde oluşturulduğu; deneysel modelin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği şeklinde yorumlandı.

Eksozom ile tedavi edilen grubun (I. grup) histolojik inceleme sonuçlarının, sham grubuna (VI. Grup) göre, pozitif kontrol grubuna (IV. Grup) göre ve mikrokırık grubuna (III. Grup) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı. Negatif kontrol grubu (V. Grup) ile aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (Bkz. Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Eksozom Grubunun ICRS Skoru Analiz Sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar		p Değeri
I. Grup (Eksozom)	IV. Grup (Hasar)	,000
I. Grup (Eksozom)	VI. Grup (PBS)	,006
I. Grup (Eksozom)	V. Grup (Hasarsız)	1,00

Mezenkimal kök hücre ile tedavi edilen grubun (II. grup) histolojik inceleme sonuçlarının, pozitif kontrol grubuna (IV. Grup) göre anlamlı olarak yüksek olduğu saptandı. Negatif kontrol grubu (V. Grup) ile, sham grubu (VI. Grup) ile ve mikrokırık grubu (III. Grup) ile aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı (Bkz. Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Mezenkimal Kök Hücre Grubunun ICRS Skoru Analiz Sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar		p Değeri
II. Grup (Kök Hücre)	IV. Grup (Hasar)	,022
II. Grup (Kök Hücre)	VI. Grup (PBS)	,488
II. Grup (Kök Hücre)	V. Grup (Hasarsız)	,151

Mikrokırık ile tedavi edilen grubun (III. grup) histolojik inceleme sonuçlarının, negatif kontrol grubuna (IV. Grup) göre anlamlı olarak düşük olduğu saptandı. Pozitif kontrol grubu (V. Grup) ile ve sham grubu (VI. Grup) ile aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı(Bkz. Tablo4.4).

Tablo 4.4. Mikrokırık Grubunun ICRS Skoru Analiz Sonuçları

Karşılaştırılan Gruplar		p Değeri
III. Grup (Mikrokırık)	IV. Grup (Hasar)	1,000
III. Grup (Mikrokırık)	VI. Grup (PBS)	1,000
III. Grup (Mikrokırık)	V. Grup (Hasarsız)	,001

Çalışmamızda temel aldığımız 3 tedavi yöntemi karşılaştırıldığında, eksozom grubunun ICRS median değeri 21,50 (Q1=20, Q3=22) iken; MKH grubunun ICRS median değeri 18 (Q1=17, Q3=28), mikrokırık grubunun median değeri 13 (Q1=10, Q3=15.5) olarak bulundu. Eksozom ve MKH gruplarının sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi($p=1.00$). Eksozom grubunun sonuçları istatistiksel olarak anlamlı şekilde mikrokırık grubunun sonuçlarından daha iyi bulunmuşken ($p=.025$), MKH grubu ile mikrokırık grubu arasında anlamlı bir farklılık görülmedi($p=1.00$)(Bkz. Tablo4.5).

Tablo 4.5. Tedavi Gruplarının Karşılaştırmalı ICRS Skoru Analiz Sonuçları

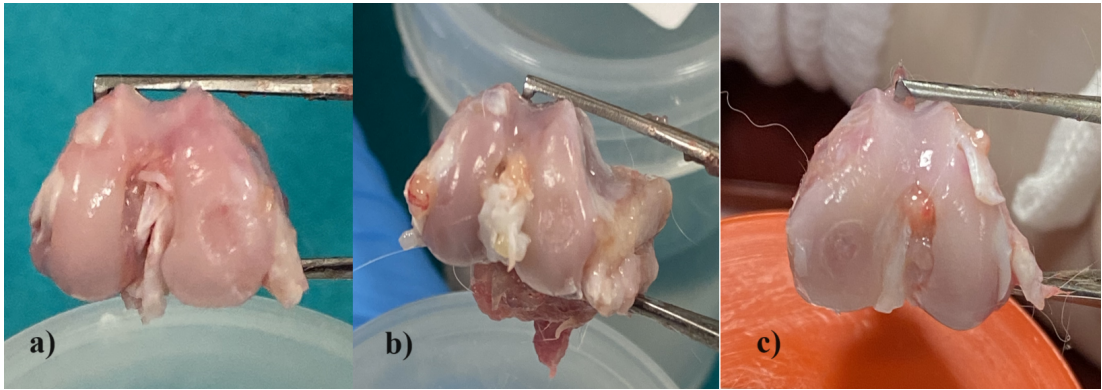
Karşılaştırılan Gruplar ve Median Değerleri				p Değeri
Grup	Median Değeri	Grup	Median Değeri	
I. Grup (Eksozom)	21.50	II. Grup (Kök Hücre)	18	1.00
I. Grup (Eksozom)	21.50	III. Grup (Mikrokırık)	13	0.25
II. Grup (Kök Hücre)	18	III. Grup (Mikrokırık)	13	1.00

Negatif kontrol grubu eklem kıkırdığının Hematoksilen&Eozin ve Safranin-O boyaması ile histolojik analizi yapıldığında, doku yüzeyinin düz ve sürekli olduğu, matrisin hyalin kıkırdak yapıda olduğu, hücresel dağılımın sütun yapıda olduğu, hücrelerin genelde canlı olduğu, subkondral kemiğin, kıkırdığın mineralizasyonunun ve matris boyanmasının normal olduğu gözlemlendi(Bkz. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11; 1. satır).

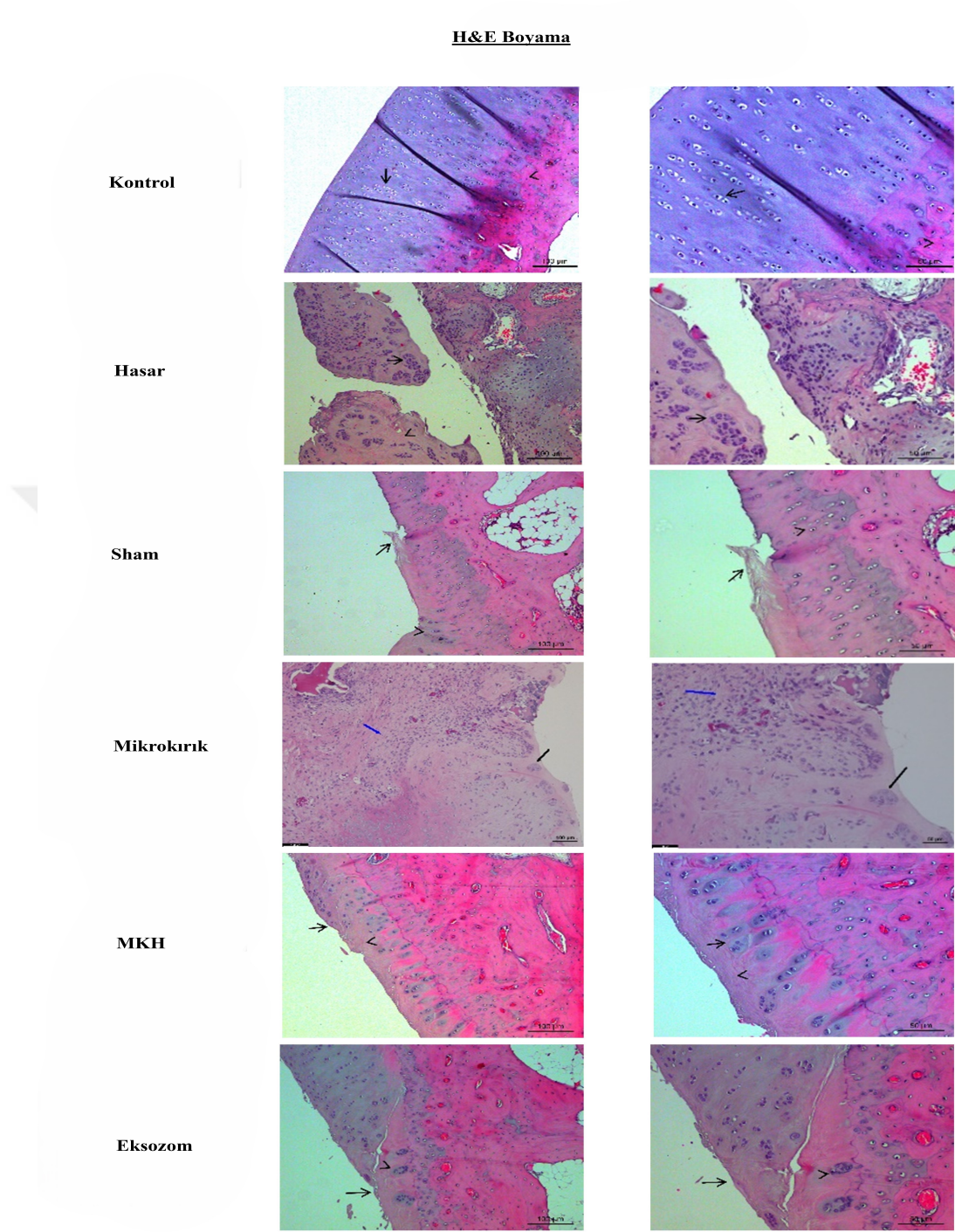
Hem eksozom grubunda hem kök hücre grubunda, doku yüzeyinin düz ve sürekli olduğu, matriksin yer yer yarıklanmalar olsa da daha çok hyalin kırıkdağ yapıda olduğu, hücresel dağılımın nadiren karışık kümeler halinde ve daha çok sütun yapıda olduğu, hücrelerin genelde canlı olduğu gözlemlendi(Bkz. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11; 5 ve 6. satırlar). Süperfizyal tabakada orta derecede ve orta tabakada belirgin, güçlü boyanma gösteren kollajen tip-II immunopozitif, kondrositler görüldü(Bkz. Şekil 4.13). Süperfizyal ve orta tabakada genelde kollajen tip-I immunonegatif kondrositler yaygın olmakla birlikte, orta tabakada nadiren orta derecede Kollajen tip-I immunopozitif boyanan kondrositler de izlendi. Süperfizyal ve orta tabakada genelde TNF- α , MMP-3 immunonegatif kondrositler yaygın olmakla birlikte, süperfizyal tabakada nadiren orta derecede TNF- α ve MMP-3 immunopozitif boyanan kondrositler de izlendi(Bkz. Şekil 4.15 ve Şekil 4.16).

Hasar grubunda, doku yüzeyinin düzensiz olduğu ve sürekli olmadığı, matriksin fibrokartilaj yapıda olduğu, hücresel dağılımın kümeler halinde olduğu, hücrelerin kısmen canlı olduğu, subkondral kemikte granülasyon dokusu olduğu, kırıkdağın mineralizasyonunun yeterli olmadığı ve matriks boyanmasının belirgin olarak azaldığı gözlemlendi.

Sham grubunda, doku yüzeyinin düzensiz olduğu ve sürekli olmadığı, matriksin fibrokartilaj yapıda olduğu, hücresel dağılımın bireysel ve disorganize yapıda olduğu, hücrelerin kısmen canlı olduğu, subkondral kemikte granülasyon dokusu olduğu, kırıkdağın mineralizasyonunun yeterli olmadığı ve matriks boyanmasının belirgin olarak azaldığı gözlemlendi(Bkz. Şekil 4.10 ve Şekil 4.11; 3. satır).

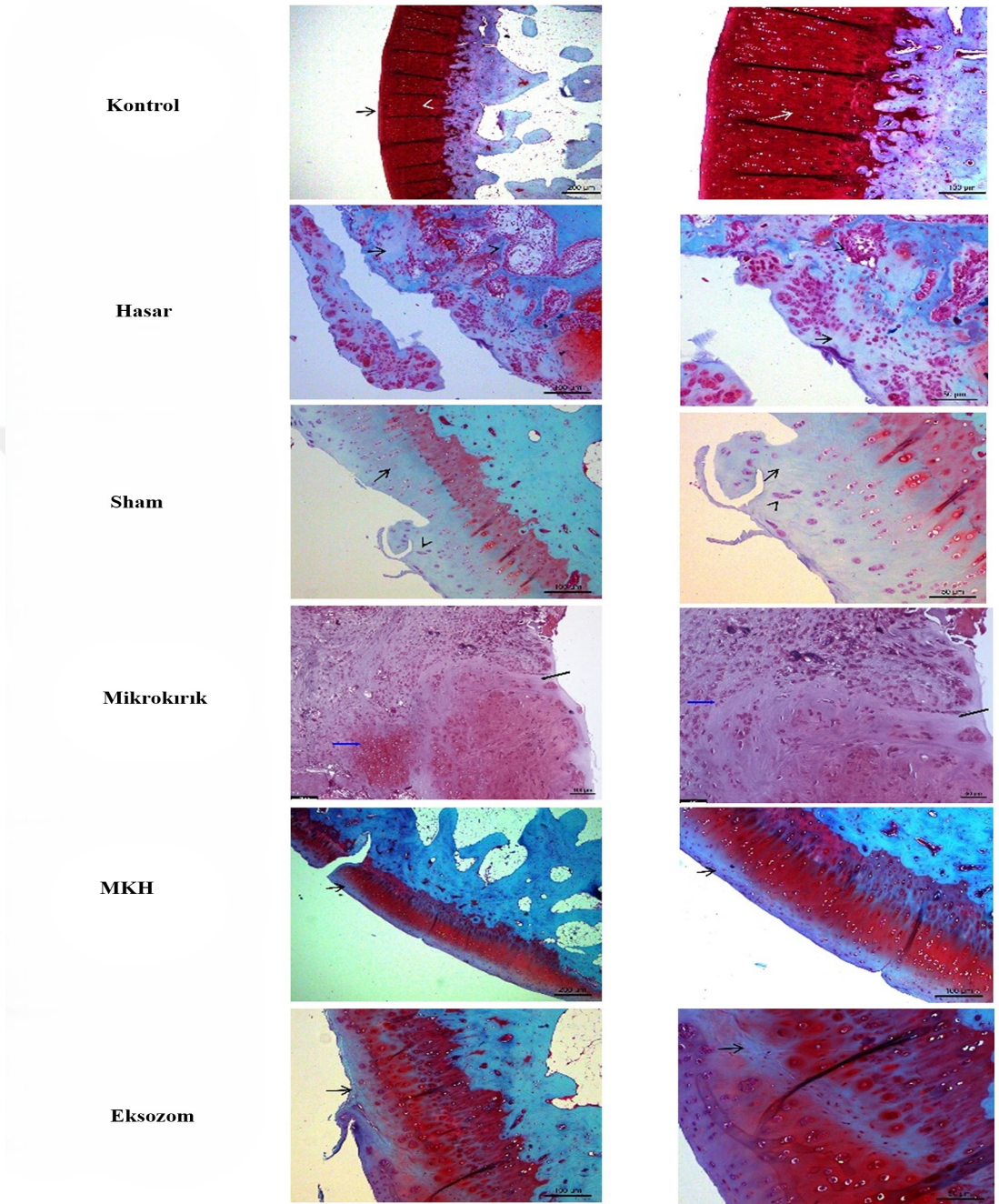


Şekil 4.9. a-Eksozom Grubu, b- MKH Grubu, c- Mikrokırık Grubu

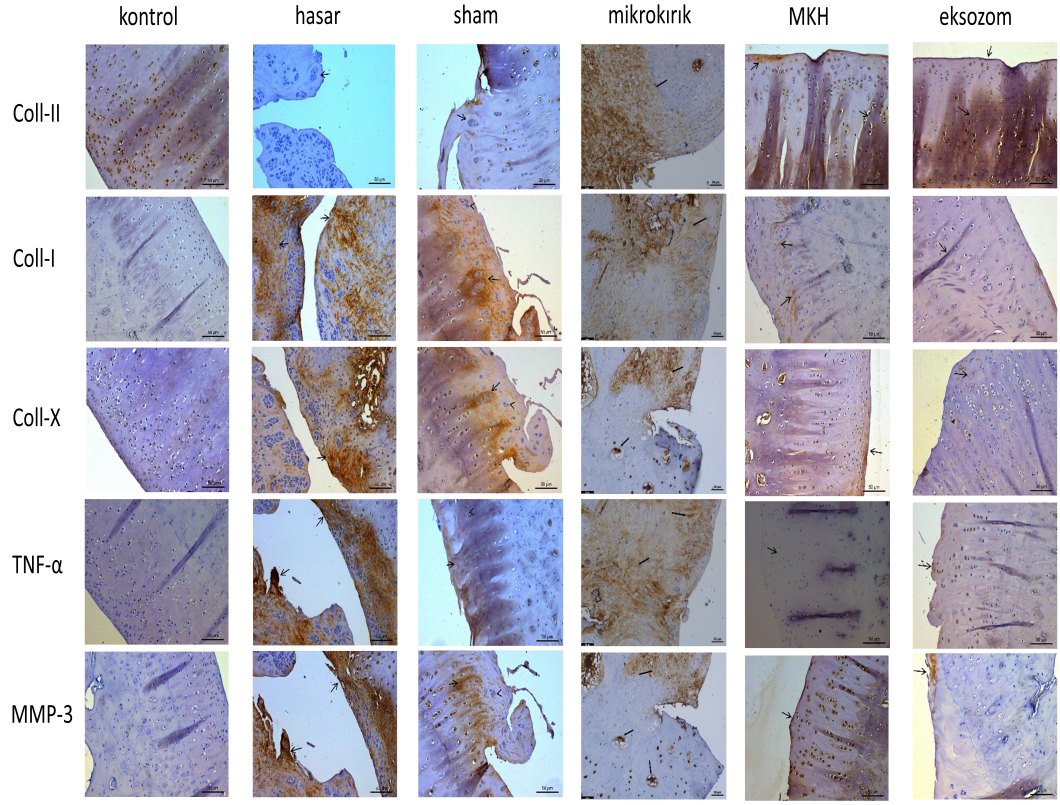


Şekil 4.10. Kontrol, Hasar, Sham, Mikrokırık, MKH ve Eksozom Gruplarında Eklem Kıkırdagının H&E Boyama Görüntüleri Sunulmaktadır. Kontrol Grubundaki Düzenli Sütunlar Halinde Hiyalin Kıkırdak Yapısına Benzer Bir Histoloji, MKH ve Eksozom Gruplarında İzlenmişken Mikrokırık Grubunda Kümeler Halinde Fibröz Dokudan Zengin İyileşme Dokusu Oklarla Gösterilmiştir. (Ölçü çubukları: 100 µm).

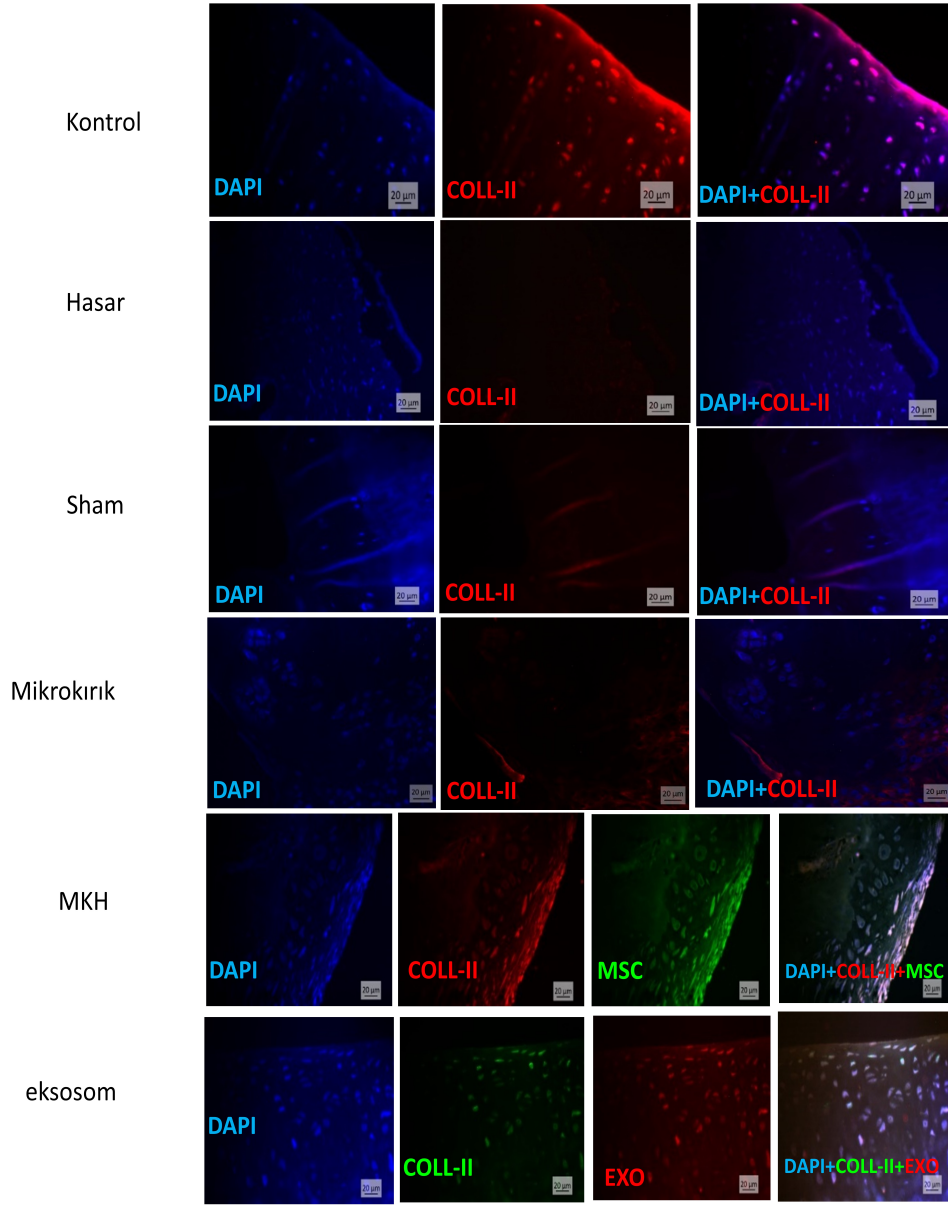
Safranin O/fast Green Boyama



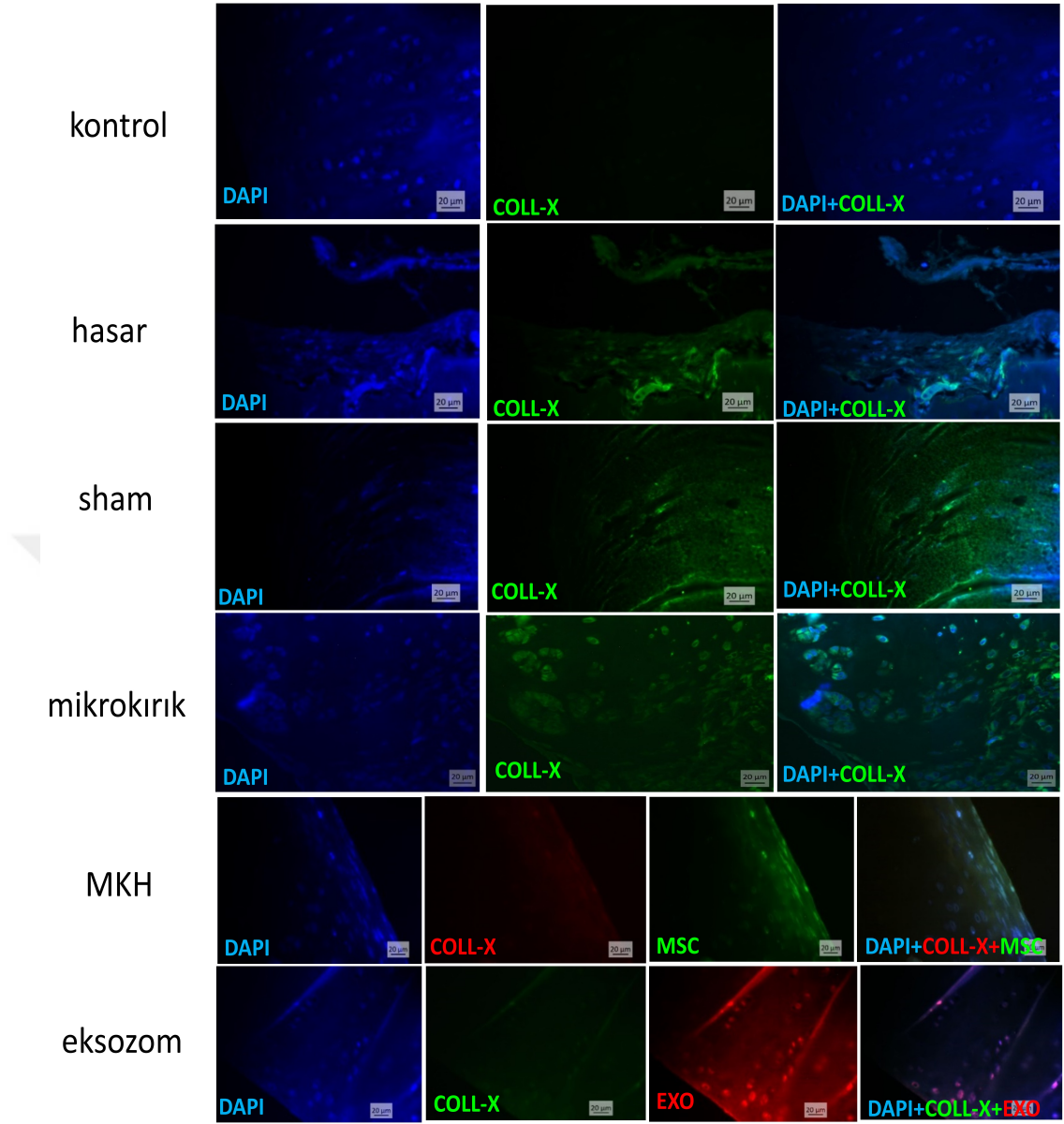
Şekil 4.11. Kontrol, Hasar, Sham, Mikrokırık, MKH ve Eksozom Gruplarında Eklem Kıkırdağının Safranin O/Fast Green Boyama Görüntüleri Sunulmaktadır. Hasar Grubundaki Belirgin Safranin-O boyama kaybı, Proteoglikanların Azaldığını Göstermektedir. MMP'ler Tarafından GAG'ların Yıkımı Başlatıldığı için Bu Boyanma Kaybı Degradasyonun Erken Belirtisi Olarak Yorumlandı. MKH ve Eksozom Uyguladığımız Gruplarda Negatif Kontrol Grubuna Benzer Şekilde Yeniden Safranin-O Boyanmasını Belirlememiz Dokunun Normale Dönmeye Başladığını Göstermektedir(Ölçü Çubukları: 100 µm).



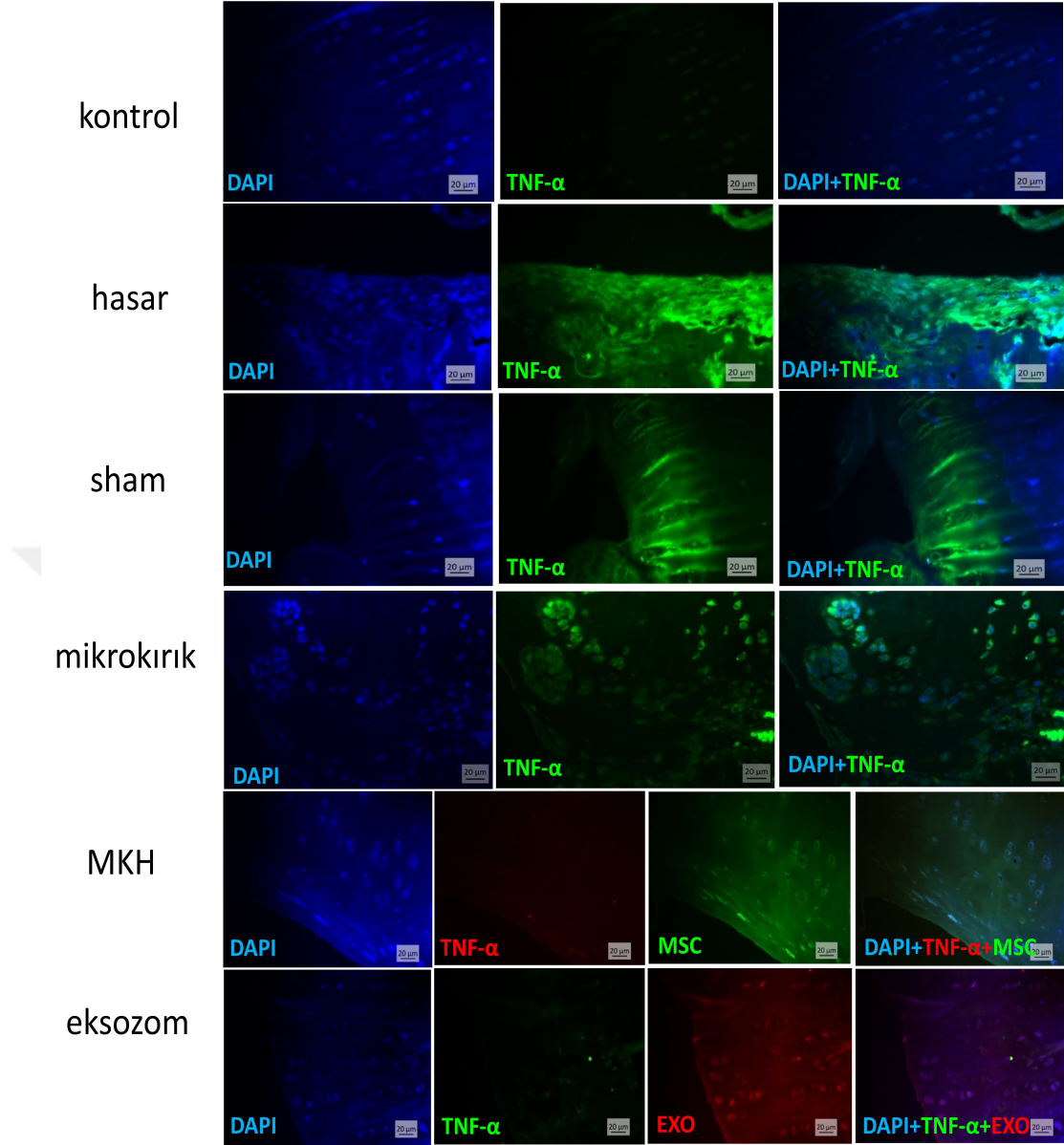
Şekil 4.12. Kontrol, Hasar, Sham, Mikrokırık, MKH ve Eksozom Gruplarında Eklem Kıkırdağının Tip-II,I,X Kollajen, TNF- α ve MMP-3 Boyaması ile İmmunohistokimyasal Analizi. (Ölçü Çubukları: 50 μ m.)



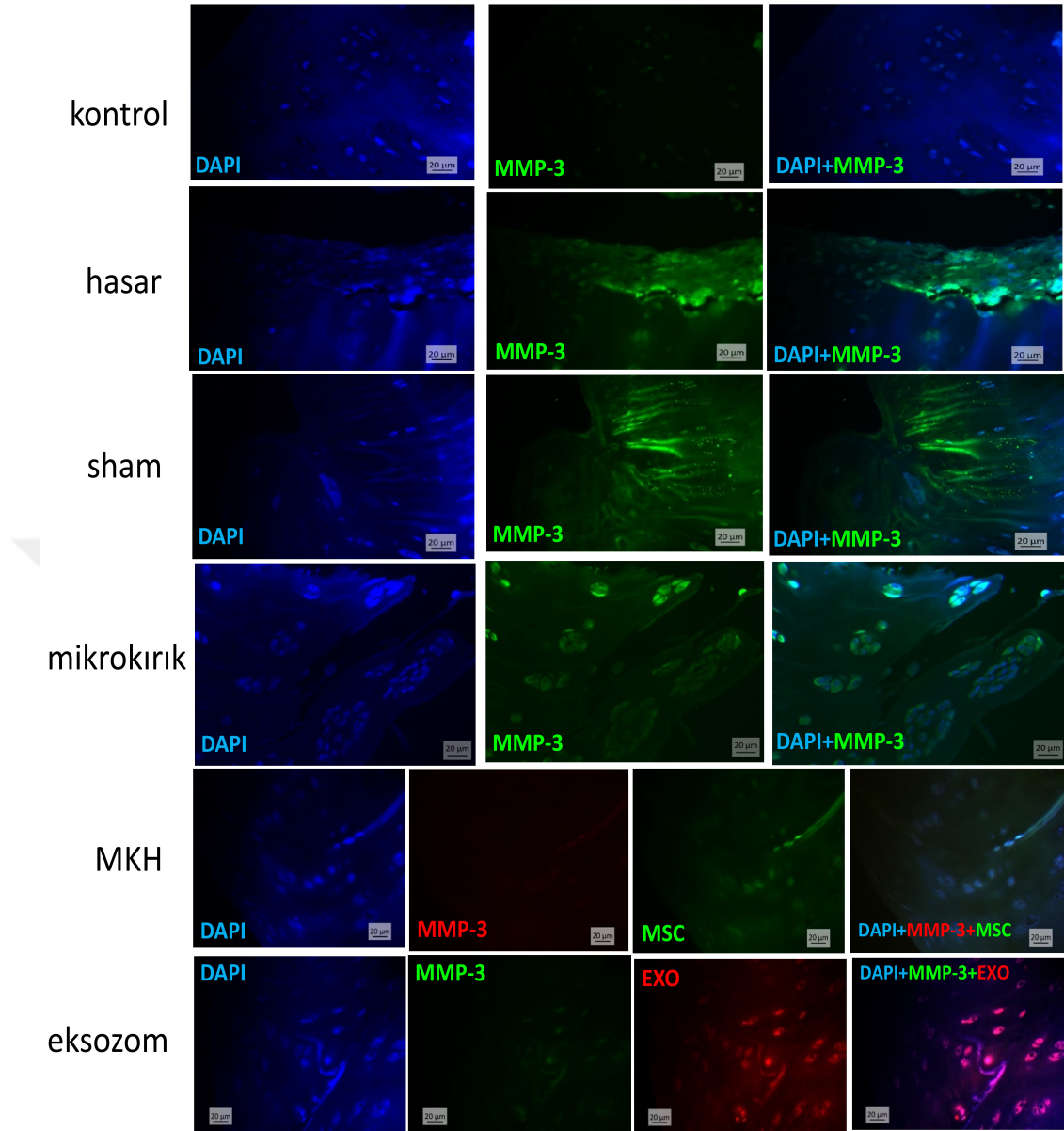
Şekil 4.13. Kontrol, Hasar, Sham, Mikrokırık, MKH ve Eksozom Gruplarında Eklem Kıkırdağının Tip-II Kollajen Boyaması ile İmmunofloresan Analizi. 1. Satırda Normal Bir Kıkırdak Yapısındaki Tip-II Kollajen Boyanmasını Görmekteyiz. İkinci, Üçüncü ve Dördüncü Satırlarda (Hasar, Sham, Mikrokırık Gruplarında) Zayıf Boyanma İzlerken Beşinci ve Altıncı Satırdaki MKH ve Eksozom Gruplarında Tekrar Sağlam Kıkırdak Dokusuna Benzer Biçimde Tip-II Kollajen Üretimine Bağlı Boyanma Görmekteyiz. Hücre Çekirdekleri Mavi DAPI boyası ile Boyanmıştır. (Ölçü Çubukları: 20 µm.)



Şekil 4.14. Kontrol, Hasar, Sham, Mikrokirik, MKH ve Eksozom Gruplarında Eklem Kıkırdağının Tip-X Kollajen Boyaması ile İmmunofloresan Analizi. Tip-X Kollajen Kıkırdak Degradasyonu ile Ortaya Çıkmaktadır. Hasar, Sham ve Mikrokirik Gruplarında Görülen Boyanmayı; Kontrol Grubuna Benzer Şekilde MKH ve Eksozom Gruplarında Görmememiz Burada Yıkımın Azaldığına İşaret Etmektedir. (Ölçü Çubukları: 20 µm.)



Şekil 4.15. Kontrol, Hasar, Sham, Mikrokırık, MKH ve Eksozom Gruplarında Eklem Kıkırdağının TNF- α Boyaması ile İmmunofloresan Analizi. TNF- α İnflamasyona Katılan Majör Proinflamatuvar Sitokindir. Hasar, Sham ve Mikrokırık Gruplarında Görülen TNF- α Boyanması Hem MKH Grubunda Hem Eksozom Grubunda Çok Düşük Olduğu Görüldü. Bu Gruplarda İnflamasyonun Dengelendiğini Düşünmek Mümkündür. (Ölçü Çubukları: 20 μ m.)



Şekil 4.16. Kontrol, Hasar, Sham, Mikrokirik, MKH ve Eksozom Gruplarında Eklem Kıkırdağının MMP-3 Boyaması ile İmmunofloresan Analizi. MMP-3 Aktivasyonu ile Kıkırdaktaki Ekstraselüler Matriks Degrade olur, Kollajen Yıkılır ve Kıkırdak Hasarı Artar. Hem MKH Grubunda Hem Eksozom Grubunda MMP-3 ile Boyanmanın Çok Daha Düşük Olduğu Görüldü. Burada Kıkırdak Hasarının Sınırlandığını Düşünmek Mümkündür. (Ölçü Çubukları: 20 µm.)

ICRS skorunun parametreleri alt başlık olarak tek tek değerlendirildiğinde, eklem yüzey düzgünlüğünün negatif kontrol grubunda diğer tüm gruplardan anlamlı bir şekilde farklı ($p<0.05$) olduğu görüldü(Bkz. Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Yüzey Değerlendirmesinin İstatistiksel Analizi

Karşılaştırılan Gruplar		p Değeri
I. Grup (Eksozom)	V. Grup (Hasarsız)	,000
II. Grup (Kök Hücre)	V. Grup (Hasarsız)	,000
III. Grup (Mikrokırık)	V. Grup (Hasarsız)	,000

İstatistiksel analizde hiçbir tedavi yönteminin yüzey düzgünlüğü bakımından sağlıklı kıkırdak dokusu ile benzer yapı göstermediğini bulmuştuk. Fakat incelemelerimizde eksozom ve MKH gruplarında hiyalin kıkırdağa daha yakın, inflamatuvar yanıtı daha düşük bir doku iyileşmesi izlenmişti. Bu durumu yüzey değerlendirmede kullanılan 2 birimli değerlendirme sisteminin yetersizliği ile açıklamanın daha doğru olacağı kanaatindeyiz.

Hücrel canlılığın her 3 tedavi grubunda da pozitif kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklı ($p<0.05$) olduğu görüldü(Bkz. Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Canlılık Değerlendirmesinin İstatistiksel Analizi

Karşılaştırılan Gruplar		p Değeri
I. Grup (Eksozom)	IV. Grup (Hasar)	,000
II. Grup (Kök Hücre)	IV. Grup (Hasar)	,000
III. Grup (Mikrokırık)	IV. Grup (Hasar)	,000

5. TARTIŞMA

Kıkırdak dokusu, düşük oksijen basıncı altında yaşayan, metabolizma hızları düşük kondrositlerden oluşur. Bu nedenle iyileşme ve kendini yenileyebilme potansiyeli düşük bir dokudur. Kıkırdak lezyonları çağımızın en sık morbidite sebebi olan osteoartritin öncü lezyonlarıdır. Kıkırdak dokusunun yapısı nedeniyle de tedavi yanıtları düşük lezyonlardır. Bu nedenle özellikle ileri osteoartritin günümüzdeki altın standart tedavisi artroplastik cerrahileridir. Artroplastinin kendine has komplikasyonlarının olması, erken evre hastalarda endikasyonu olmaması, protezin ömrünün kısıtlı olması, hastaların bu tip major cerrahi işlemlerden çekincelerinin olması gibi sebepler bizi biyolojik iyileşmenin sağlanmasına yönlendirmektedir. Özellikle erken evre lezyonlarda hedeflenen biyolojik iyileşme için çeşitli teknikler (mikrokirik, drilleme, osteokondral nakiller...) geliştirilmiş olmasına karşın hedeflenen iyileşme dokusunun bu yöntemlerle elde edilememiş olması yeni tedavilerin araştırılmasını gerektirmiştir (70).

Kök hücre tedavileri öncelikle GVHD, akut böbrek yetmezliği gibi hastalıklarda denenmiş, hasarlı hücrelerin rejenerasyon yeteneklerini artırdıklarının fark edilmesi üzerine diğer alanlarda da kullanılmaya başlanılmıştır. MKH'ler kondrositlerin ekstrasellüler matriks sentezi ve proliferasyonunu destekler, hücre fonksiyonları için homeostatik mikroçevrenin korunmasında destek sağlar. MKH'ler hasar bölgesine göç ederler, proliferasyon olurlar ve matriks komponentlerini de sentezlemeye başlarlar (71). Ayrıca salgıladıkları büyüme faktörleri ve diğer yolaklarla hasarlı bölgedeki rejenerasyon sürecine yol gösterir; proliferasyon, diferansiyasyon ve bölgedeki matriks üretimi gibi süreçleri düzenler (2), (44). Xiang ve arkadaşları 2022 yılında yayınladıkları metaanalizde mezenkimal kök hücrelerin literatürde osteoartrit tedavisinde başarılı olduğundan ve eksozomların da umut vaat edici gözüktüğünden bahsetmiştir (4). Biz de çalışmamızda kök hücre tedavisi ile hiyalin kıkırdağa daha yakın, düzgün yüzeyli bir kıkırdak iyileşme sağlanabildiğini gösterdik. Femoral kondilde tam kat kıkırdak hasarı oluşturduğumuz tavşanlarımızın MKH uygulamasından sonraki 12. haftadaki histolojik incelemelerinde doku yüzeyinin düz ve sürekli olduğu, matriksin karışık yani hyalin ve fibrokartilaj yapıda olduğu, hücresel dağılımın karışık, yani sütun yapıda ve kümeler halinde olduğu, hücrelerin genelde canlı olduğu, subkondral kemikte granülasyon

dokusu olduğu, kıkırdığın mineralizasyonunun normal olduğu ve matriks boyanmasının hafif azaldığı gözlemlendi(Bkz. Şekil 4.10). Tip-II kollajen ile yaptığımız immunhistokimya ve immunofloresan boyamalarında hasar kontrol gruplarında boyanma görmezken MKH grubumuzda tip-II kollajenle boyanma izledik. Bu bize iyileşmenin fibröz skar dokusundan ziyade kıkırdak dokusunun ekstrasellüler matriksi ile uyumlu olduğunu gösterdi. Tip-I kollajen ile yaptığımız immunhistokimya ve immunofloresan boyamalarında hasar kontrol gruplarında yoğun boyanma görülürken kök hücre grubumuzda boyanmanın çok daha az olduğu görüldü. Skar dokusunun yoğunluğunun daha az olduğu yönünde yorumlandı. TNF- α , MMP-3 gibi proinflamatuvar sitokinlerin immunhistokimya ve immunofloresan boyamalarında ise hasar grubunda yüksek tutulum görülürken kök hücre grubumuzda boyanmanın çok daha düşük olduğu görüldü. Kök hücre verilen grupta inflamatuvar fazın yavaşladığı ve onarım fazına geçildiği gözlemlendi(Bkz. Şekil 4.13, 4.15, 4.16). Bu bulgular hasarın iyileşme trendinde olduğunu göstermektedir.

Eksozomlar, 2015 yılında yılında Yanez ve arkadaşlarının miyokard infarktüsünde rejeneratif etkilerinden bahsetmesinin ardından; dejeneratif süreçlerde kullanılabilecek bir tedavi alternatifi olarak görülmeye başlanmıştır (72). Eksozomlar ekstrasellüler matriks protein ve enzimlerinden zengin oldukları için, ekstrasellüler matriks homeostazisini düzenleyebilir (62). Mezenkimal kök hücre tedavisinin dokudaki iyileştirici etkilerinin, hasarlı dokuya rejenere olabilme özelliklerinden ziyade hasarlı dokuda sağladığı immünregülasyon ve mevcut hücreleri indüklemeye yeteneğine bağlı olduğu düşünülmektedir (60). Bu etkilerini eksozomlar aracılığı ile sağladığı düşünüldüğünde; eksozomlar hücresiz nanot tedavi partikülleri olarak hayli iyi bir tedavi seçeneği olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Zhang ve arkadaşları 2016 yılında yayınladıkları makalelerinde kıkırdak hasarı oluşturdıkları sıçanlarda eksozom tedavisinin, tedavi vermedikleri hayvanlara göre yüzeyi daha düzgün, hiyalin kıkırdak yapısına daha benzer bir iyileşme dokusu ile tamir olduğunu bildirmişler (62). Biz öncelikle örneklerimizde PKH26 boyası ile işaretlenmiş eksozomlarımızı değerlendirdik ve immunofloresan görüntülemeye eksozomların hücreler tarafından tutulduğunu gözlemledik(Bkz. Şekil 4.13). Femoral kondilde tam kat kıkırdak hasarı oluşturduğumuz tavşanlarımızın eksozom uygulamasından sonraki 12. haftadaki histolojik incelemelerinde doku yü-

zeyinin düz ve sürekli olduğu, matriksin karışık, yani hyalin ve fibrokartilaj yapıda olduğu, hücresel dağılımın karışık, yani sütun yapıda ve kümeler halinde olduğu, hücrelerin genelde canlı olduğu, subkondral kemikte granülasyon dokusu olduğu, kıkırdığın mineralizasyonunun normal olduğu ve matriks boyanmasının hafif azaldığı gözlemlendi(Bkz. Şekil 4.10). Tip-II kollajen ile yaptığımız immunhistokimya ve immunofloresan boyamalarında hasar kontrol gruplarında boyanma göremezken eksozom grubumuzda tip-II kollajenle boyanma izledik. Bu bize iyileşmenin fibröz skar dokusundan ziyade kıkırdak dokusunun ekstrasellüler matriksi ile uyumlu olduğunu gösterdi. Tip-I kollajen ile yaptığımız immunhistokimya ve immunofloresan boyamalarında hasar kontrol gruplarında yoğun boyanma görülürken eksozom grubumuzda boyanmanın çok daha az olduğu görüldü. Skar dokusunun yoğunluğunun daha az olduğu yönünde yorumlandı. TNF- α , MMP-3 gibi proinflamatuvar sitokinlerin immunhistokimya ve immunofloresan boyamalarında ise hasar grubunda yüksek tutulum görülürken eksozom grubumuzda boyanmanın çok daha düşük olduğu görüldü. Eksozom verilen grupta inflamasyon fazının yavaşladığı ve onarım fazına geçildiği gözlemlendi(Bkz. Şekil 4.13, 4.15, 4.16). Bu bulgular hasarın iyileşme trendinde olduğunu göstermektedir.

Hasar grubunda belirlediğimiz belirgin Safranin-O kaybı; proteoglikanların azaldığı, MMP'ler tarafından GAG'ların yıkımı başlatıldığı için degradasyonun erken belirtisi olarak yorumlandı. Bu, proteoglikanların sentezinden sorumlu olan kondrositlerin, hasara bağlı nekrozundan kaynaklanabilir. Zira ışık mikroskopik incelememizde bu bilgiyi destekleyen piknotik nükleuslu kondrositlere rastlanmıştır. MKH ve eksozom uyguladığımız gruplarda 12 hafta sonra kıkırdak dokusunda yeniden Safranin-O boyanmasını belirlememiz, kondrositlerin varlığıyla proteoglikan içeriğinin artması, GAG'ların yeniden sentezlenmeye başlaması ve dokunun normale dönmeye başladığını göstermektedir. Hipersellülarite ile ekstrasellüler matriksin yeniden sentezlenmeye başlaması; birbiri ile uyumlu ilerleyen ve tamirin başladığını gösteren bulgulardır(Bkz. Şekil 4.11). Bu veriler ışığında MKH ve eksozom uygulanan gruplar karşılaştırıldığında tamir ve rejenerasyon açısından eksozomların en az MKH'ler kadar etkili olduğu belirlenmiştir.

Tip-II kolajen, hyalin kıkırdakta bulunan temel bileşendir ve sağlıklı eklem kıkırdığının stabilitesinin korunmasında ve biyolojik işlevlerini yerini getirebilmesinde

temel rolü üstlenir. İyileşen yeni kıkırdakta Tip-II kolajen ne kadar fazla ise biyomekanik gücü o kadar fazladır ve orijinal eklem kıkırdağına o kadar benzerlik gösterir. Fazaeli ve arkadaşlarının sıçan ve tavşanlarda osteokondral defektler üzerinde eksozomların onarıcı etkilerinin incelendiği bir çalışmada, iyileşme dokusunun yüksek düzeyde tip-II kollajen içeren hiyalin kıkırdak dokusu ile olduğu görülmüştür. Konservatif tedavi edilen yaralanmalarda ise bir bağışıklık onarım fenotipinin olduğu gözlenmiştir (57). Çalışmamızda, MKH ve eksozom tedavisi uygulanan gruplarda kondrosit belirteci (Tip-II kollajen) ekspresyonunda önemli bir artış ve iyileşme dokusunda normal kıkırdağa benzer tipik hiyalin özellikler izlenmiştir(Bkz. Şekil 4.13).

İnflamasyonda $TNF-\alpha$ ve MMP-3 artışı gözlenir. $TNF-\alpha$ inflamasyona katılan majör proinflamatuvar sitokindir. MMP-3 aktivasyonu ile kıkırdaktaki ekstraselüler matriks degrade olur, kollajen yıkılır ve kıkırdak hasarı artar. Kıkırdak hasarını gösteren önemli bir katabolik faktördür. Tip-X kollajen kondrosit hipertrofisine neden olur. Eklem kıkırdağının matriksinde eksprese edilir. Süperfizyal zonda özellikle proliferen olan kondrositlerin kümelerinin etrafında gözlenir. İnsanda osteoartritte eklem kıkırdağında yüzey fibrilasyonu ve osteofitik oluşumlarla izlenir (73). Çalışmamızın sonuçlarına göre, hem MKH grubunda hem eksozom grubunda $TNF-\alpha$, MMP-3 gibi proinflamatuvar sitokinlerin immunhistokimya ve immunofloresan boyamalarında boyanmanın çok daha düşük olduğu görüldü(Bkz. Şekil 4.13, 4.15, 4.16). MKH'lerin ve eksozomların farklılaşma ve tamir için yüksek potansiyelinin yanı sıra immün regülasyonu desteklemek için bağışıklık sistemi ile etkileşime girme, periferik doku toleransını iyileştirmek için yaralanma bölgesine göç etme, inflamatuvar faktör salınımını önleme, doku onarımını destekleme ve yaralı hücrelerin aktivitesini artırma özelliklerine sahip olduğunu gösterdi. no Çalışmamızın hasar, sham ve mikrokırık gruplarında, fibrokartilaj doku paterni ile birlikte yüksek oranda Tip-I ve Tip-X kollajen, $TNF-\alpha$ ve MMP-3 izlendi. GAG belirgin derecede azalmıştı. Yüzey düzensizdi. Dejeneratif değişiklik belirtisi olarak da hiposellülarite ve kondrosit kümeleşmeleri vardı. Hasar, sham ve mikrokırık grupları hasarsız grupla karşılaştırıldığında, düşük oranda Tip-II kollajen ekspresyonuna eşlik eden artmış Tip-I kollajen ,Tip-II kollajen Tip-X kollajen, $TNF-\alpha$ ve MMP-3 pozitifliği gözlemlendi.

MKH ve eksozom gruplarında ise kıkırdak matrisindeki Tip-II kollajen pozitifli-

ğinin arttığı hatta negatif kontrol grubu ile benzer olduğu görüldü. MKH ve eksozom uygulaması sonrası hücre migrasyonu, farklılaşması ve profilerasyonu artar. Buna bağlı olarak matriks sentezinin arttığı, MKH ve eksozomların immün yanıtı modüle ettiği, mikroçevreyi rejenerasyona uygun hale getirdiği ve daha az proinflatuar fenotipe doğru kaydırıldığı gözlemlendi.

Çalışmamızın temel amaçlarından biri olarak MKH ve eksozom tedavileri ICRS skorları ile karşılaştırıldığında; eksozom grubunun sonuçlarının mikrokırık grubunun sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğunu ($p=.025$) fakat kök hücre grubunun sonuçlarının, mikrokırık grubunun sonuçlarına göre yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=1.00$). Kök hücre ve eksozom tedavileri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da; eksozom grubunun ICRS skorlarının [$Q2=21,50$ ($Q1=20$, $Q3=22$)], kök hücre grubuna [$Q2=18$ ($Q1=17$, $Q3=28$)] göre bir miktar daha yüksek olduğu görüldü. Her iki tedavi yönteminin ICRS skorlarının da hasar grubuna göre anlamlı derece yüksek olduğu görüldü ($p=.000$, $p=.022$).

Çalışmamızın sonuçlarına göre eksozom tedavisinin en az kök hücre tedavisi kadar etkili olduğunu gözlemledik. Hatta istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile eksozom grubumuzun [$Q2=21,50$ ($Q1=20$, $Q3=22$)] ICRS skorlarının kök hücre grubumuza [$Q2=18$ ($Q1=17$, $Q3=28$)] göre daha yüksek olduğunu bulduk. Aynı mekanizma üzerinden etki eden bu iki tedavi yönteminde eksozom lehine bu küçük farkı görmüş olmamızın olası sebeplerini şu şekilde sıralayabiliriz:

1)Bu alanda yapılan çalışmalarda maksimum tedavi yanıtını sağlayacak mezenkimal kök hücre miktarı, eksozom miktarı, bir kök hücrenin intraartiküler ortamda salgıladığı eksozom ve diğer iletişim moleküllerinin miktarları henüz kantitatif bir şekilde tanımlanamamıştır. Bu nedenle çalışmamız literatür verilerine dayanarak planlanmış olsa da verilen tedavi dozlarının denk olmaması böyle bir sonuca sebep olmuş olabilir.

2)Zhang ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları araştırmalarında mezenkimal kök hücrelerle yaptıkları çalışmalarda immün yanıt oluşabileceği; daha optimal sonuçlar alabilmek için desensitizasyon ya da immünsupresyon yapılması gerekebileceğinden söz etmişler (74). Mezenkimal kök hücrelerin zıt immün etki oluşturmadığı ile ilgili de literatürde yayınlar mevcuttur (75). Zhang ve arkadaşları 2016 yılındaki yayınlarında ise eksozom tedavisinde böyle bir immün yanıt görmediklerinden söz etmişler (62).

Bizim çalışmamızda hayvanlarımızın hiçbirine immümsupresyon verilmedi. Aradaki küçük farkı eksozom molekülünün immünregülatuar etkinliğinin yüksek olması şeklinde yorumlayabileceğimiz gibi, MKH antijenik yapısının oluşturduğu immün yanıtı sekonder oluşan inflamasyonun etkisi olarak da yorumlamak mümkündür.

3) Mezenkimal kök hücreler, kıkırdak hücrelerinin aksine yüksek protein üretim hızına sahip, metabolizma hızları yüksek hücrelerdir. Diz eklemi gibi düşük oksijen basınçlı bir iyileşme ortamında MKH'lerin etkinliklerini tam gösterememiş olmaları eksozom grubunda ICRS skorlarının daha iyi olmasını açıklayabilecek teorilerden bir diğeridir.

4) Mezenkimal kök hücrelerin salgıladıkları eksozom içerikleri çevrelerinden gelen etkilere göre değişebilmektedir. Xu ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında LPS'ye (lipopolisakkarit - proinflamatuvar bir işlev görür) maruz bırakılan MKH'lerin eksozom içeriklerinin daha potent bir antiinflamatuvar yapıya sahip olduklarını göstermişler (76). I. deney grubunda kullanılan eksozomlar ve II. deney grubunda kullanılan MKH'ler aynı rezervden elde edilmiş olsalar bile bir kök hücre grubu besiyerinde salgı yaparken diğerinin intraartiküler, halihazırda proinflamatuvar sitokinlerden zengin bir ortamda salgı yapıyor olması farklı potensite içerik üretmelerine; bu durum da farklı tedavi yanıtları alınmış olmasına sebep olmuş olabilir.

5) Yan ve arkadaşları 3 boyutlu hücre kültüründe yetişen, basınca maruz kalan kök hücrelerin eksozomlarının; hücre kültüründe kıkırdak iyileşmeyi desteklemede daha başarılı olduğunu göstermişler (77). Bu açıdan düşünülecek olursa eklem içinde sürekli kompresyon-dekompresyon siklusuna maruz kalan kök hücre ile, besi yerinde serbest takip edilen hücrenin salgı profilinin de potensinin de değişebileceğini düşünebiliriz.

Tüm bu teoriler eksozom tedavisinde aldığımız yüksek ICRS skorlarını açıklamada rol sahibi gözükseler de; elimizdeki verilerle hem eksozom tedavisinin hem kök hücre tedavisinin kıkırdak hasarında etkin tedaviler olduğunu söylemek mümkündür. İki tedavi yönteminin karşılaştırılması için ileri çalışmalar bize daha fazla bilgi verecektir.

Mikrokirik tedavisi ilk kez 1999 yılında Steadman tarafından tanımlandığında müdahale edilmeyen olgulara göre daha yüksek bir klinik rahatlama ve iyileşme dokusu elde edildiği bildirilmiştir (20). Araştırmalar devam ettikçe 2 yıl içinde klinik şikayetlerin geri döndüğü görülmüştür (29). Bu klinik kötüleşmede, elde edilen iyileşme doku-

sunun hyalin kıkırdak yapısında değil, fibröz skar dokusu şeklinde olması suçlanmıştır. Biz çalışmamızdaki mikrokırık grubunu incelediğimizde, doku yüzeyinin düzensiz olduğu ve sürekli olmadığını, matriksin hyalin ve fibrokartilaj karışık bir yapıda olduğunu, hücresel dağılımın bireysel ve disorganize olduğunu, hücrelerin canlı olduğunu, kondrositlerin yer yer kümeler halinde veya sütun yapıda karışık bir görünümde olduğunu, subkondral kemikte remodellingte artış olduğunu, kıkırdağın mineralizasyonunun yeterli olmadığını ve matriks glikozaminoglikan boyanmasının azaldığını gözlemledik(Bkz. Şekil 4.11). Kollajen tip-I immunhistokimyasal ve immunofloresan boyanmasında süperfizyal tabakada ve fibrokartilaj matrikste belirgin, güçlü boyanma gösteren immunopozitif disorganize bireysel kondrositler görüldü. Bu literatürde daha önce bahsedilen skarla iyileşme ile uyumlu olarak yorumlandı. Kollajen-II immunofloresan boyanmasında immunonegatif kondrositler izlendi(Bkz. Şekil 4.13).

Mikrokırık tedavisi, uzun yıllar boyunca altın standart tedavi olarak görülmüş olsa da fayda bazında hücre bazlı tedavilerin gerisinde kalmıştır. Fakat kombine tedavilerin içinde (mikrokırık + eksozom ya da mikrokırık + kök hücre) tedaviye katkı sağlayıp sağlamayacağı sonraki araştırmaların konusu olacaktır.

Çalışmamız kontrol grupları da dahil edilerek planlanan bir hayvan çalışması olup, eksiklerini değerlendirecek olursak:

- 1) Hayvan sayımızın sınırlı olması nedeniyle gruplarımız nonparametrik dağılım gösterdi. Daha yüksek hayvan sayısı ile daha güvenilir sonuçlar elde edilebilirdi.
- 2) Takiplerimiz 3 ay süre ile planladı ve tüm hayvanlarımız 3. ayında sakrifiye edildi. Daha uzun takip ve aralıklı sakrifikasyonlarla tedavi hızını ve sonuçlarını değerlendirmek daha güvenli olabilirdi.
- 3) Tedavilerin etkinlikleri tek başlarına değerlendirildi. Kombine tedavilerin dahil edildiği tedavi grupları, klinik uygulama için yol gösterici olabilirdi.
- 4) Elde edilen eksozom miktarı besiyerine ekilen kök hücre sayısı üzerinden değerlendirildi. Moleküler bazda yapılan ölçüm yöntemleri ile daha kantitatif bir değerlendirme yapılabilirdi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sinoviyal sıvıdan elde edilen eksozom tedavisi de kök hücre tedavisi de kıkırdak hasarında hiyalin kıkırdak dokusu ile iyileşmeyi sağlayan etkili tedavi yöntemleridir. Mikrokırık tedavisi ise skar dokusu ile iyileşmeyi sağlayan diğer tedavi yöntemlerine göre daha az etkili bir tedavi yöntemidir. Eksozom tedavisi hücresel bir yapı içermemesi nedeniyle güvenli; etkinlik olarak da kök hücre tedavisine nazaran daha yüksek ICRS skorları bulunmuş olması nedeniyle etkili bir tedavi alternatifi olarak karşımızdadır.

İlerleyen dönemlerde gelişen teknolojinin de yardımıyla daha kantitatif ölçüm yöntemleriyle tedavi dozları hakkında daha net kriterler koymak mümkün olacaktır. Hayvan deneylerinde iyi sonuçlar alınan bu tedavi yöntemlerinin insanlarda yapılan randomize kontrollü çalışmalara ihtiyacı devam etmektedir. Hem eksozomların, hem kök hücrelerin diğer tedavi yöntemleri ile kombine tedavi şekillerinin (skafoldlarla desteklenmeleri, mikrokırık tedavisiyle birleştirilmesi, eklem içi diğer enjeksiyon materyalleri ile birleştirilmesi gibi) değerlendirmesi de ileri çalışmalara konu olabilir. Kök hücreden salgılanan eksozomların çeşitliliği ve içeriği kök hücrenin bulunduğu ortama, mekanik ya da biyolojik tetikleyicilere bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla tedavi öncesinde ya da tedavi sırasında intraartiküler olarak kök hücrelerin indüklenmesi, tedavi sonrasındaki rehabilitasyon ve yük verme programının tedaviye etkisi yine ilerleyen çalışmalar için konu olmaya adaydır.

KAYNAKLAR

1. Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S., Marshak D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*. 1999; 284 (5411): 143–147.
2. Silva Meirelles L., Fontes A. M., Covas D. T., Caplan A. I. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009; 20 (5-6): 419–427.
3. Chen T. S., Lai R. C., Lee M. M., Choo A. B. H., Lee C. N., Lim S. K. Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic acids research*. 2010; 38 (1): 215–224.
4. Xiang X.-N., Zhu S.-Y., He H.-C., Yu X., Xu Y., He C.-Q. Mesenchymal stromal cell-based therapy for cartilage regeneration in knee osteoarthritis. *Stem cell research & therapy*. 2022; 13: 1–20.
5. Ross M. H., Pawlina W. *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
6. Outerbridge R. E., Outerbridge H. The etiology of chondromalacia patellae. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2001; 389: 5–8.
7. Årøen A., Løken S., Heir S., Alvik E., Ekeland A., Granlund O. G., Engebretsen L. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *The American journal of sports medicine*. 2004; 32 (1): 211–215.
8. Bauer M., Jackson R. Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1988; 4 (2): 97–102.
9. Mankin H. J., Dorfman H., Lippiello L., ZARINS A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips: II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *JBJS*. 1971; 53 (3): 523–537.

10. Mainil-Varlet P., Van Damme B., Nesic D., Knutsen G., Kandel R., Roberts S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *The American journal of sports medicine*. 2010; 38 (5): 880–890.
11. Wakitani S., Goto T., Pineda S. J., Young R. G., Mansour J. M., Caplan A. I., Goldberg V. M. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *JBJS*. 1994; 76 (4): 579–592.
12. McAlindon T. E., Bannuru R., Sullivan M., Arden N., Berenbaum F., Bierma-Zeinstra S., Hawker G., Henrotin Y., Hunter D., Kawaguchi H. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2014; 22 (3): 363–388.
13. Bannuru R., Natov N., Dasi U., Schmid C., McAlindon T. Therapeutic trajectory following intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis–meta-analysis. *Osteoarthritis and cartilage*. 2011; 19 (6): 611–619.
14. Bannuru R. R., Natov N. S., Obadan I. E., Price L. L., Schmid C. H., McAlindon T. E. Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis. *Arthritis Care & Research*. 2009; 61 (12): 1704–1711.
15. Heir S., Nerhus T. K., Røtterud J. H., Løken S., Ekeland A., Engebretsen L., Årøen A. Focal cartilage defects in the knee impair quality of life as much as severe osteoarthritis: a comparison of knee injury and osteoarthritis outcome score in 4 patient categories scheduled for knee surgery. *The American journal of sports medicine*. 2010; 38 (2): 231–237.
16. Uchida R., Toritsuka Y., Yoneda K., Hamada M., Ohzono K., Horibe S. Chondral fragment of the lateral femoral trochlea of the knee in adolescents. *The Knee*. 2012; 19 (5): 719–723.
17. Adachi N., Deie M., Nakamae A., Okuhara A., Kamei G., Ochi M. Functional and radiographic outcomes of unstable juvenile osteochondritis dissecans of the knee treated with lesion fixation using bioabsorbable pins. *Journal of Pediatric Orthopaedics*. 2015; 35 (1): 82–88.

18. Livesley P., Doherty M., Needoff M., Moulton A. Arthroscopic lavage of osteoarthritic knees. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*. 1991; 73 (6): 922–926.
19. Pridie K. A method of resurfacing osteoarthritic knee joint. *J. Bone J. Surg. Br.* 1959; 41: 618–619.
20. Steadman J., Rodkey W., Briggs K., Rodrigo J. The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Der Orthopade*. 1999; 28 (1): 26–32.
21. Knutsen G., Engebretsen L., Ludvigsen T. C., Drogset J. O., Grøntvedt T., Solheim E., Strand T., Roberts S., Isaksen V., Johansen O. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee: a randomized trial. *JBJS*. 2004; 86 (3): 455–464.
22. Mithoefer K., Williams III R. J., Warren R. F., Potter H. G., Spock C. R., Jones E. C., Wickiewicz T. L., Marx R. G. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique: surgical technique. *JBJS*. 2006; 88 (1): 294–304.
23. Benthien J. P., Behrens P. The treatment of chondral and osteochondral defects of the knee with autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC): method description and recent developments. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy*. 2011; 19: 1316–1319.
24. Anders S., Volz M., Frick H., Gellissen J. Suppl 4: a randomized, controlled trial comparing autologous matrix-induced chondrogenesis (AMIC®) to microfracture: analysis of 1-and 2-year follow-up data of 2 centers. *The open orthopaedics journal*. 2013; 7: 133.
25. Siclari A., Mascaro G., Kaps C., Boux E. A 5-year follow-up after cartilage repair in the knee using a platelet-rich plasma-immersed polymer-based implant. *The Open Orthopaedics Journal*. 2014; 8: 346.

26. Outerbridge H., Outerbridge A., Outerbridge R. The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *JBJS*. 1995; 77 (1): 65–72.
27. Gudas R., Kalesinskas R. J., Kimtys V., Stankevicius E., Toliussis V., Bernotavicius G., Smailys A. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2005; 21 (9): 1066–1075.
28. Brittberg m., Gobbi A., Imhoff A., Kon E., Madry H. *Cartilage Repair Clinical Guidelines*. DJO, 2013.
29. Azar F. M., Canale S. T., Beaty J. H. *Campbell's operative orthopaedics*. Elsevier Health Sciences, 2020.
30. Peterson L. Chondrocyte transplantation. An experimental model in the rabbit. *Trans Orthop Res Soc*. 1984; 30: 218.
31. Jones D. G., Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. *JBJS*. 2006; 88 (11): 2501–2520.
32. Caplan A. I. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*. 1991; 9 (5): 641–650.
33. Ando W., Kutcher J. J., Krawetz R., Sen A., Nakamura N., Frank C. B., Hart D. A. Clonal analysis of synovial fluid stem cells to characterize and identify stable mesenchymal stromal cell/mesenchymal progenitor cell phenotypes in a porcine model: a cell source with enhanced commitment to the chondrogenic lineage. *Cytotherapy*. 2014; 16 (6): 776–788.
34. De Bari C., Dell'Accio F., Tylzanowski P., Luyten F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*. 2001; 44 (8): 1928–1942.
35. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. Minimal criteria for defining

- multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 2006; 8 (4): 315–317.
36. Sekiya I., Muneta T., Horie M., Koga H. Arthroscopic transplantation of synovial stem cells improves clinical outcomes in knees with cartilage defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2015; 473: 2316–2326.
 37. Fu W.-L., Zhou C.-Y., Yu J.-K. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *The American journal of sports medicine*. 2014; 42 (3): 592–601.
 38. Ryu J.-S., Jung Y.-H., Cho M.-Y., Yeo J. E., Choi Y.-J., Kim Y. I., Koh Y.-G. Co-culture with human synovium-derived mesenchymal stem cells inhibits inflammatory activity and increases cell proliferation of sodium nitroprusside-stimulated chondrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014; 447 (4): 715–720.
 39. Coulson-Thomas V. J., Coulson-Thomas Y. M., Gesteira T. F., Kao W. W.-Y. Extrinsic and intrinsic mechanisms by which mesenchymal stem cells suppress the immune system. *The ocular surface*. 2016; 14 (2): 121–134.
 40. Barry F., Murphy M. Mesenchymal stem cells in joint disease and repair. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013; 9 (10): 584–594.
 41. Huang Z., Ren P.-G., Ma T., Smith R. L., Goodman S. B. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine*. 2010; 51 (3): 305–310.
 42. Yoon C.-H., Hur J., Park K.-W., Kim J.-H., Lee C.-S., Oh I.-Y., Kim T.-Y., Cho H.-J., Kang H.-J., Chae I.-H. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2005; 112 (11): 1618–1627.

43. Yeo R. W. Y., Lai R. C., Zhang B., Tan S. S., Yin Y., Teh B. J., Lim S. K. Mesenchymal stem cell: an efficient mass producer of exosomes for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2013; 65 (3): 336–341.
44. Pickarski M., Hayami T., Zhuo Y., Duong L. T. Molecular changes in articular cartilage and subchondral bone in the rat anterior cruciate ligament transection and meniscectomized models of osteoarthritis. *BMC musculoskeletal disorders*. 2011; 12: 1–14.
45. Wu L., Prins H.-J., Helder M. N., Blitterswijk C. A., Karperien M. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Engineering Part A*. 2012; 18 (15-16): 1542–1551.
46. Sze S. K., Kleijn D. P., Lai R. C., Tan E. K. W., Zhao H., Yeo K. S., Low T. Y., Lian Q., Lee C. N., Mitchell W. Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2007; 6 (10): 1680–1689.
47. Lee M. J., Kim J., Kim M. Y., Bae Y.-S., Ryu S. H., Lee T. G., Kim J. H. Proteomic analysis of tumor necrosis factor- α -induced secretome of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of proteome research*. 2010; 9 (4): 1754–1762.
48. Bruno S., Grange C., Deregibus M. C., Calogero R. A., Saviozzi S., Collino F., Morando L., Busca A., Falda M., Bussolati B. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. 2009; 20 (5): 1053.
49. Harding C., Stahl P. Transferrin recycling in reticulocytes: pH and iron are important determinants of ligand binding and processing. *Biochemical and biophysical research communications*. 1983; 113 (2): 650–658.
50. Johnstone R. M., Adam M., Hammond J., Orr L., Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262 (19): 9412–9420.

51. F  vrier B., Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*. 2004; 16 (4): 415–421.
52. Olver C., Vidal M. Proteomic analysis of secreted exosomes. *Subcellular Proteomics: From Cell Deconstruction to System Reconstruction*. 2007; 99–131.
53. Kalluri R., LeBleu V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020; 367 (6478): eaau6977.
54. Chettimada S., Lorenz D. R., Misra V., Dillon S. T., Reeves R. K., Manickam C., Morgello S., Kirk G. D., Mehta S. H., Gabuzda D. Exosome markers associated with immune activation and oxidative stress in HIV patients on antiretroviral therapy. *Scientific reports*. 2018; 8 (1): 7227.
55. Bei H. P., Hung P. M., Yeung H. L., Wang S., Zhao X. Bone-a-petite: engineering exosomes towards bone, osteochondral, and cartilage repair. *Small*. 2021; 17 (50): 2101741.
56. Lai R. C., Yeo R. W. Y., Tan K. H., Lim S. K. Mesenchymal stem cell exosome ameliorates reperfusion injury through proteomic complementation. *Regenerative medicine*. 2013; 8 (2): 197–209.
57. Fazaeli H., Kalhor N., Naserpour L., Davoodi F., Sheykhhasan M., Hosseini S. K. E., Rabiei M., Sheikholeslami A. A Comparative Study on the Effect of Exosomes Secreted by Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose and Bone Marrow Tissues in the Treatment of Osteoarthritis-Induced Mouse Model. *BioMed research international*. 2021; 2021 (1): 9688138.
58. Zhu Y., Wang Y., Zhao B., Niu X., Hu B., Li Q., Zhang J., Ding J., Chen Y., Wang Y. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem cell research & therapy*. 2017; 8 (1): 1–11.
59. Dorronsoro A., Fern  ndez-Rueda J., Fechter K., Ferrin I., Salcedo J. M., Jakobsson E., Trigueros C. Human mesenchymal stromal cell-mediated immunoreg-

- ulation: Mechanisms of action and clinical applications. *Bone marrow research*. 2013; 2013 (1): 203643.
60. Toh W. S., Lai R. C., Hui J. H. P., Lim S. K. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: implications for osteoarthritis treatment. 2017; 67: 56–64.
 61. Vaamonde-García C., Riveiro-Naveira R. R., Valcárcel-Ares M. N., Hermida-Carballo L., Blanco F. J., López-Armada M. J. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism*. 2012; 64 (9): 2927–2936.
 62. Zhang S., Chu W., Lai R., Lim S., Hui J., Toh W. Exosomes derived from human embryonic mesenchymal stem cells promote osteochondral regeneration. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016; 24 (12): 2135–2140.
 63. Ding J., Chen B., Lv T., Liu X., Fu X., Wang Q., Yan L., Kang N., Cao Y., Xiao R. Bone marrow mesenchymal stem cell-based engineered cartilage ameliorates polyglycolic acid/polylactic acid scaffold-induced inflammation through M2 polarization of macrophages in a pig model. *Stem cells translational medicine*. 2016; 5 (8): 1079–1089.
 64. Zhang J., Rong Y., Luo C., Cui W. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes prevent osteoarthritis by regulating synovial macrophage polarization. *Aging (Albany NY)*. 2020; 12 (24): 25138.
 65. Zhang A., Moshirfar M., Khalifa Y. M. Deep Vein Thrombosis Following Descemet Stripping Automated Endothelial Keratoplasty. *JAMA ophthalmology*. 2013; 131 (9): 1233–1234.
 66. Meng F., Zhang Z., Chen W., Huang G., He A., Hou C., Long Y., Yang Z., Liao W. MicroRNA-320 regulates matrix metalloproteinase-13 expression in chondrogenesis and interleukin-1 β -induced chondrocyte responses. *Osteoarthritis and cartilage*. 2016; 24 (5): 932–941.

67. Zhang Y., Bi J., Huang J., Tang Y., Du S., Li P. Exosome: a review of its classification, isolation techniques, storage, diagnostic and targeted therapy applications. *International journal of nanomedicine*. 2020; 6917–6934.
68. Yoshioka M., Kubo T., Coutts R. D., Hirasawa Y. Differences in the repair process of longitudinal and transverse injuries of cartilage in the rat knee. *Osteoarthritis and Cartilage*. 1998; 6 (1): 66–75.
69. Mendelson S., Wooley P., Lucas D., Markel D. The effect of hyaluronic acid on a rabbit model of full-thickness cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. 2004; 424: 266–271.
70. Trofa D. P., Hong I. S., Lopez C. D., Rao A. J., Yu Z., Odum S. M., Moorman III C. T., Piasecki D. P., Fleischli J. E., Saltzman B. M. Isolated osteochondral autograft versus allograft transplantation for the treatment of symptomatic cartilage lesions of the knee: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Sports Medicine*. 2023; 51 (3): 812–824.
71. Burke J., Kolhe R., Hunter M., Isales C., Hamrick M., Fulzele S. Stem cell-derived exosomes: a potential alternative therapeutic agent in orthopaedics. *Stem Cells International*. 2016; 2016 (1): 5802529.
72. Yáñez-Mó M., Siljander P. R.-M., Andreu Z., Bedina Zavec A., Borràs F. E., Buzas E. I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of extracellular vesicles*. 2015; 4 (1): 27066.
73. Sahebjam S., Khokha R., Mort J. S. Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3^{-/-} mice. *Arthritis & Rheumatism*. 2007; 56 (3): 905–909.
74. Zhang S., Jiang Y. Z., Zhang W., Chen L., Tong T., Liu W., Mu Q., Liu H., Ji J., Ouyang H. W. Neonatal desensitization supports long-term survival and functional integration of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in rat joint cartilage without immunosuppression. *Stem Cells and Development*. 2013; 22 (1): 90–101.

75. Vangsness Jr C. T., Jack Farr I., Boyd J., Dellaero D. T., Mills C. R., LeRoux-Williams M. Adult human mesenchymal stem cells delivered via intra-articular injection to the knee following partial medial meniscectomy: a randomized, double-blind, controlled study. *JBJS*. 2014; 96 (2): 90–98.
76. Xu R., Zhang F., Chai R., Zhou W., Hu M., Liu B., Chen X., Liu M., Xu Q., Liu N. Exosomes derived from pro-inflammatory bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce inflammation and myocardial injury via mediating macrophage polarization. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2019; 23 (11): 7617–7631.
77. Yan L., Wu X. Exosomes produced from 3D cultures of umbilical cord mesenchymal stem cells in a hollow-fiber bioreactor show improved osteochondral regeneration activity. *Cell biology and toxicology*. 2020; 36: 165–178.

