



Otolog kemik iliği aspiratının eklem içi uygulanmasının tam kat menisküs yırtığı iyileşmesi üzerine olan etkileri: Koyunlarda deneysel çalışma*

Fuat DUYGULU¹, Metin DEMİREL², Gültekin ATALAN³, F. Figen KAYMAZ⁴, Yavuz KOCABEY⁵,
Turan Cihan DÜLGEROĞLU¹, Hande CANDEMİR⁶

¹Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Kayseri;

²Kayseri Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Bölümü, Kayseri;

³Cumhuriyet Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi, Veteriner Hekimliği Bölümü, Sivas;

⁴Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara;

⁵Acıbadem Üniversitesi Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Kocaeli;

⁶Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara

Amaç: Bu çalışmada kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreleri ve kemik iliği elemanlarının menisküs yırtığı iyileşmesi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışma planı: Bu çalışma 12 adet 2 yaşında erkek Tahirova cinsi koyun üzerinde gerçekleştirildi. Deneklerin bir dizi deney amaçlı olarak, diğer dizi kontrol grubu olarak kullanıldı. İç menisküste kırmızı-beyaz bölgede uzunlamasına tam kat bir yırtık oluşturulduktan sonra deney grubunda aspire edilmiş otolog kemik iliği materyali yırtık sahasına enjekte edilirken, kontrol grubunda yırtık sahası herhangi bir işlem yapılmadan ikincil iyileşmeye bırakıldı.

Bulgular: Makroskopik değerlendirmede deney grubunda yırtık uçları arasında adezyon ve onarım dokusu oluşumu tespit edildi. Gruplar arasında kollajen fibril oluşumu yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.16$). Yeni damar oluşumu yönünden deney grubu ve kontrol grubu arasında anlamlı farklılık mevcuttu ($p=0.003$). Kesitler hücre sayımı yönünden ve kırıldak plakları oluşumu yönünden deney grubunda anlamlı farklılık bulundu ($p=0.004$ ve $p=0.016$). Kontrol grubunda ışık ve elektron mikroskopik düzeyde onarımı destekleyen bulgu yoktu. Dört ayın sonunda deney grubunda menisküs yırtık bölgesinde kırıldak plakları oluşumu ile giden iyileşmenin açık kanıtları mevcuttu.

Çıkarımlar: Sonuç olarak bu çalışma, ışık ve elektron mikroskopu bulgularının da doğrultusunda, kemik iliğinin menisküs yırtık bölgesine enjeksiyonunun menisküs yırtık modelinde iyileşmeyi artırdığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: Elektron mikroskopisi; kemik iliği; menisküs yırtığı; mezenkimal kök hücre.

Günümüzde menisküs yaralanmaları, ortopedik cerrahların en sık karşılaştıkları sorunlardan biridir. Menisküs fibrokartilaj bir dokudur ve sağlıklı bir diz eklemi

için önemli olan çeşitli fonksiyonlara sahiptir.^[1-3] Son yıllarda, menisküs yırtıklarının uzun yıllar önce kullanılmakta olan total menisektomi girişimi yerine onarıl-

*Bu çalışma 5. Çin Ortopedi Birliği (COA) Kongresi'nde (Chengdu, Çin, 2010) sunulmuştur.

Yazışma adresi: Dr. Fuat Duygulu, Alpaslan Mah. Bahar Cad., Altınoluk Apt. No:30/27, Melikgazi, 38030, Kayseri. Tel: 0533 - 451 82 02 e-posta: fuatduygulu@hotmail.com

Başvuru tarihi: 11.10.2011 **Kabul tarihi:** 27.12.2011

©2012 Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği

Bu yazının çevrimiçi İngilizce versiyonu
www.aott.org.tr adresinde
doi:10.3944/AOTT.2012.2762QR
Karekod (Quick Response Code):



ması ve iyileşmesine izin verilmesi gerektiği yoğun bir şekilde vurgulanmaktadır. Bazı temel çalışmalar kısmi menisektomiye takiben bile diz eklemine eklem temas basıncının arttığını göstermiştir.^[4]

Dizin sekonder osteoartrite gidişini önlemek için çok çeşitli cerrahi rekonstrüksiyon ve onarım yöntemi uygulanmaktadır. Bu yeni teknikler skafold, emilebilir poliüretan skafold, büyüme faktörleri, pediküllü sinovyal flepler, ince barsak submukozası, fibrin yapıştırıcı, otojenik ve allojenik dokular ile fonksiyonel olmayan menisküslerin yerleştirilmesini kapsar. Bununla birlikte, bu tür tedavilerin sonuçları tartışmalıdır.^[5-10]

Avasküler olan veya değişken vaskülariteye sahip olan kırmızı-beyaz bölgedeki yırtıklarda iyileşme sorunudur. Bu bölgedeki yırtıkları onarıırken, iyileşme potansiyelini artıracak tekniklerin uygulanması yararlıdır.^[11,12] Bu teknikler menisküs ve menisküs yırtığının çevresindeki sinovyumun herhangi bir yanının törpülenmesini, damar kanalları oluşturulmasını, fibrin bir pıhtının yerleştirilmesini ve interkondiler çentiğin mikro kırıklarını kapsar. Bu tekniklerin ortak yönü eklem içine kemik iliği ve kan elemanlarının uygulamasıdır.^[13-16] Çok sayıda çalışma eklem kanını, özellikle de pluripotent kök hücreler ile birlikte ilik elemanlarının eklenmesiyle, menisküs yırtıklarının iyileşme oranlarının arttığını deneysel olarak göstermiştir.^[13,15] Kök hücrelerinin elde edilmesinin kolay olması, neoplastik farklılaşmanın düşük olması ve etik sorunların olmaması nedeniyle üzerinde en fazla araştırma yapılan kök hücre kaynağı kemik iliğidir.^[17]

Kemik iliği aspiratı dönüştürücü büyüme faktörü β (*transforming growth factor*, TGF- β), trombosit-kökenli büyüme faktörü (*platelet-derived growth factor*, PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) gibi büyüme faktörlerinin zengin bir kaynağıdır. Bu büyüme faktörleri alfa granüller içeren trombositler ve mezenkimal kök hücrelerden (MKH) salgılanır.^[18-22]

Bu çalışmanın amacı, kemik iliği kökenli MKH'lerin ve kemik iliği elementlerinin menisküs yırtıklarının iyileşmesine etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve yöntem

Çalışma protokolü Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından gözden geçirildi ve onaylandı (Çalışma No: TT0748). Bu çalışmada, tümü erkek (2 yaşında, ortalama ağırlıkları 35 kg) 12 Tahirova cinsi koyun kullanıldı. Tüm deneklerin her iki dizine de cerrahi uygulandı. Deneklerin bir dizi deney grubunu oluştururken, diğer dizi ise kontrol olarak kullanıldı. Deney grubunda aspire edilmiş otolog kemik iliği

materyali yırtık sahasına enjekte edilirken, kontrol grubunda yırtık sahasına herhangi bir işlem yapılmadan ikincil iyileşmeye bırakıldı.

Ameliyat sonrası ağrıyı azaltmak için ameliyat öncesi epidural anestezi uygulandı. Femur distalinden başlayıp tibial tüberkülün distaline kadar uzanan bir medial parapatellar insizyon yapıldı. Cilt insizyonu aynı hatta mediallyden kapsül açılarak eklem ulaşıldı ve patella laterale sublukse edildi. Her iki grupta iç menisküslerde standart kesi oluşturuldu. Kesiler meniskokapsüller bileşke referans noktası alınarak Kirschner teli ile 12 numaralı bistüri arasında aksiyel planda 3 mm mesafe bulunan özel olarak geliştirilmiş bir enstrüman ile oluşturuldu. Deneklerin hepsinde 10 mm uzunluğunda, bilateral tam kat longitudinal kesi oluşturuldu. Elde edilen tam kat menisküs yırtığının ön boynuzda meniskokapsüller bileşkedeki 3 mm uzaklıkta olmasına dikkat edildi. Oluşturulan yırtık menisküsün kırmızı-beyaz bölgesindeydi.

Cerrahi işlemler deneklerin hepsinde aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi. Kemik iliği 14 gauge kemik iliği aspirasyon iğnesi kullanılarak interkondiler çentikte femur medüller kanalından aspire edildi. Deney grubu menisküslerde oluşturulan yırtık bölgesine 5 cc otolog kemik iliği materyali enjekte edildi. Kontrol grubu menisküsler ise yırtık oluşturulduktan sonra yırtık bölgesine hiçbir işlem yapılmadan sekonder iyileşmeye bırakıldı. Deneklerin diz hareketlerini gerçekleştirebilmelerini sağlamak için herhangi bir eksternal fiksasyon veya alçı uygulaması yapılmadı.

Tüm deneklere ameliyat sonrası dönemde profilaktik antibiyotik tedavisi verildi. Sefkuinom sülfatın (Cobactan® %2.5; İntervet Vet. İlaç. Ltd. Şti. Ayazağa, İstanbul) ilk dozu (1 mg/kg canlı ağırlık) intramusküler olarak cerrahi işlemden 30 dakika önce yapıldı. Aynı doz cerrahi girişimden sonra 3 gün süre ile uygulandı. Ayrıca, ameliyat sonrasında 3 gün boyunca 1 ml/50 kg canlı ağırlık/gün dozunda prokain penisilin G + kristalize penisilin G + streptomisin sülfat (Strepto-Veticilline®; Eczacıbaşı İlaç San. ve Tic. A.Ş., İstanbul, Türkiye) intramusküler yoldan uygulandı. Ameliyat sonrasında non-steroid anti-enflamatuar ve analjezik ilaç olarak 1 ml/45 kg canlı ağırlık dozunda flunixin meglum (Fluvil® Vils An Veteriner İlaçları Tic. San. A.Ş., Ankara, Türkiye) intravenöz yoldan 3 gün süreyle verildi.

Denekler tamamı cerrahi sonrası 16. haftada ketalar anestezisi altında dekapitasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Diz eklemi kapsül ve bağlar kesilerek ortaya çıkarıldı. İç menisküs histopatolojik incelemeler için tam olarak dikkatlice eksizye edildi. Bütün olarak çıkarılan

menisküsler fosfat tamponlu normal serum içeren Petri kutuları içerisine yerleştirildi. Menisküsler yırtık bölgesini içeren iki parçaya ayrıldı. Parçalardan biri ışık mikroskobu için işlenirken, diğer kısmı 1 mm²'lük dilimlerde halinde kesildi ve elektron mikroskobu için işlendi.

Doku örnekleri %10 formalin içinde tespit edildikten sonra dehidrate edildi. Kesit düzlemleri menisküs yırtığı ile doğru açıda olacak şekilde parafin bloklarına gömüldü. Daha sonra parafin bloklardan 4 µ kalınlığında kesitler alınarak Masson trikrom ile boyandı. Preparatlar gruplardan habersiz bir histolog tarafından yeni damar oluşumunda artış, kollajen fibriller, hücre sayısında artış ve kıkırdak plaklarının varlığı açısından ışık mikroskobunda incelendi ve fotoğraflandı.

Okamoto^[23] ile Tsuboi ve Rifkin^[24] tarafından açık yara iyileşmesinin değerlendirilmesi için önerilen makroskopik ve histolojik skor sisteminde re-epitalizasyon, granülasyon dokusu oluşumu, inflamatuvar hücre sayısı, fibroblast sayısı ve yeni damar oluşumu değerlendirilmektedir. Bu çalışmada ise yukarıda belirtilen skor sistemi modifiye edildi. Buna göre kollajen fibril oluşumu, yeni damar oluşumu, hücre sayısı düzeyi ve kıkırdak plak oluşumuna 1 ile 4 arasında puan verildi (Tablo 1)

Transmisyon Elektron Mikroskop (TEM) incelemeleri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapıldı. Alınan doku örnekleri tamponlanmış %2.5 glutaraldehit içinde immersiyon yöntemi tespit edildi. Tespit edilen örnekler fosfat tampon ile yıkandı ve %2 osmiyum tetroksit içinde tekrar tespit edildi. Tekrar fosfat tampon ile yıkandı ve dehidratasyon uygulandı. Plastik bloklar Araldite 6005 Kit ile hazırlandı.

Yarı-ince kesitler (1 µ) metilen mavisi Azure II ile boyandı ve Leica DMR model mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ile incelendi ve Leica DC500 dijital kamera (Leica Camera AG, Solms, Germany) ile fotoğraflandı. Daha sonra incelenmek istenen alan belirlenerek bu bölge kesildi. Bu bölgeden alınan ince kesitler (70 nm) formvar kaplı bakır ızgaralara yüklendi ve otomatik bir boyama makinesinde (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Tüm örnekler gruplardan habersiz bir histolog tarafından menisküslerin ince yapısı açısından Gatan Orius SC-1000 dijital kamera ile donatılmış Jeol JEM 1400 (Tokyo, Japonya) model TEM ile incelendi.

Gruplar arasındaki farklar Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. Menisküs yırtığı iyileşmesinde yeni damar oluşumunun artışı, kollajen fibril olu-

Tablo 1. Okamoto^[23] ile Tsuboi ve Rifkin'in^[24] skorlama sisteminin menisküs yırtığı iyileşme modeli için modifikasyonu.

Kollajen fibril oluşumu		Hücre sayısında artış	
Yok	1	Yok	1
Az	2	Az	2
Orta	3	Orta	3
Kalın	4	Fazla	4
Neovaskülarizasyon		Kıkırdak plakları	
Yok	1	Yok	1
Az	2	Az	2
Orta	3	Orta	3
Fazla	4	Fazla	4

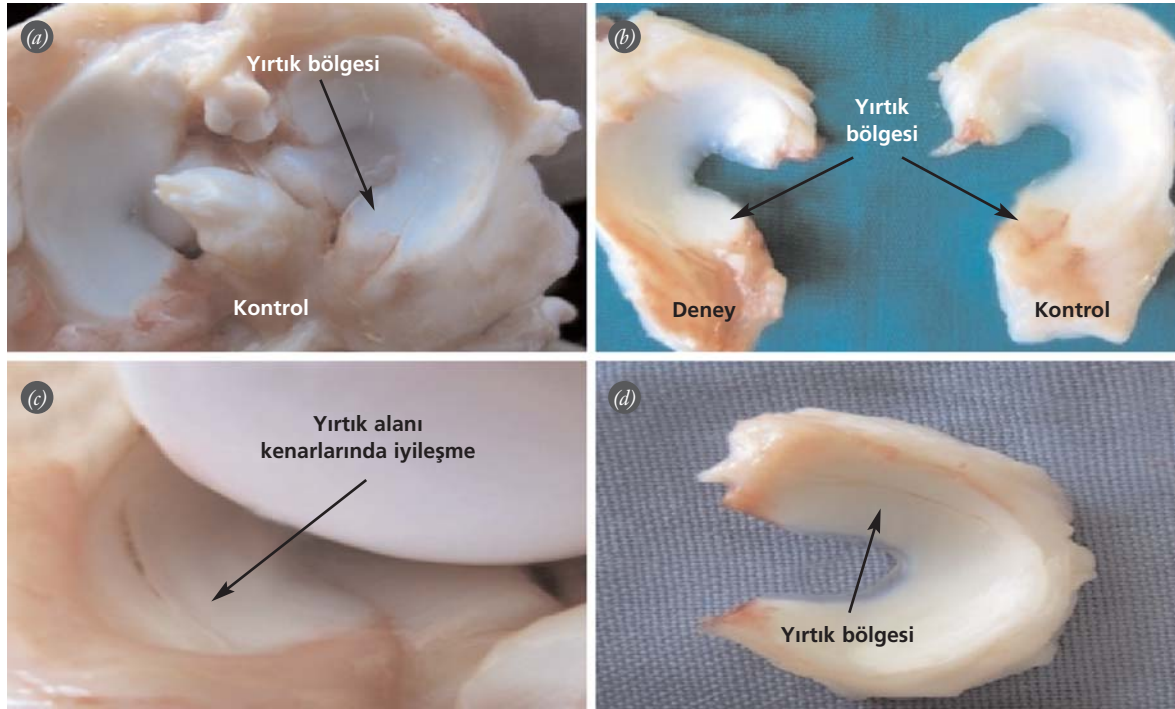
şumu, hücre sayısı artışı ve kıkırdak plak oluşumu gruplar arasında karşılaştırıldı. P<0.05 değeri anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler SPSS for Windows yazılımı (SPSS/PC+ Inc., Sürüm 17.0, Chicago, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Bulgular

Deney ve kontrol grubundaki dizlerde eklem içi sıvının artmış olduğu görüldü. Eklem içi yapılarda fibrozis ve enfeksiyon gözlenmedi. Sinovyal dokunun hipertofik olduğu gözlemlendi. Eklem kıkırdağında herhangi bir değişiklik yoktu. Her iki grupta damarlanmış sinovyal membranın yırtık bölgesine doğru ilerlemiş olduğu görüldü. Deney grubunda, menisküs yırtık bölgesinde kenarları birbirine bağlayan, köprü oluşturan onarım dokusu ve yapışıklık olduğu gözlemlendi. Ancak, kontrol grubunda yırtığın iki kenarı arasında boşluk olduğu görüldü (Şekil 1).

Histolojik incelemelerde, menisküs örneklerinden elde edilen kesitlerde yeni damar oluşumu, kollajen fibriller, hücre sayısında artış ve kıkırdak plaklarının varlığı karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Deney grubunun ışık mikroskobu incelemelerinde, yırtığın giriş bölgesinde iyileşme olduğu ve aynı zamanda derin bölgele- rin de kapsülden göç eden ve menisküs yırtığı bölgesinde çoğalan yeni hücreler tarafından kısmen doldurulduğu görüldü. Kapsüle benzer özellikler sergileyen bu hücreler makroskopik bulguları destekliyordu.

Yırtığın derin bölgelerindeki iyileşme bölgesinin mononükleer hücreler ve çok miktarda fibroblast içeren gevşek bağ dokusu ile kaplanmış olduğu görüldü ve yeni damar oluşumunda artış saptandı. Bunun yanı sıra, bu iyileşme alanında yeni oluşmakta olan granülasyon dokusu vardı. Granülasyon dokusunun organize



Şekil 1. (a) Kontrol grubu menisküsün diz bağları kesildikten sonraki görünümü. (b) Deney ve kontrol grubu menisküsünün femoral ve tibial yüzlerinde sinovyal doku artışı ve damarlanma. (c) Ameliyat sonrası 16. haftada deney grubunda menisküsün makroskopik görünümü ve adezyon oluşumu. (d) Deney grubunda menisküs dokusunda iyileşme ve yırtık alanının kenarları arasında köprüleşme. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

olmaya başladığı ve menisküs dokusu ile devamlılık gösterdiği; ancak, bu iyileşme alanında yeni yapılan kollajenin halen ince ve seyrek olduğu gözlemlendi. Deney grubunda 5 denekte yırtığın en derin bölümünde kırık plaklarının oluştuğu gözlemlendi (Şekil 2).

Sekonder iyileşmeye bırakılan kontrol grubunda yırtık bölgesinin kapanmadığı görüldü. Damarlanmanın normal olduğu ve kollajen fibril yapımının artmadığı gözlemlendi. Bunun yanı sıra, menisküs yırtık bölgesinin granülasyon dokusu ile dolmadığı saptandı.

Gruplar arasında kollajen fibril oluşumunun karşılaştırılması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=0.16$). Deney grubu ile kontrol grubu arasında yeni damar oluşumu açısından anlamlı bir fark vardı ($p=0.003$). Aynı zamanda, deney grubunda kesitlerdeki hücre sayısı açısından anlamlı farklılık vardı ($p=0.004$). Kesitler kırık plak oluşumu açısından değerlendirildiğinde, deney grubunda anlamlı bir fark vardı ($p=0.016$) (Tablo 2).

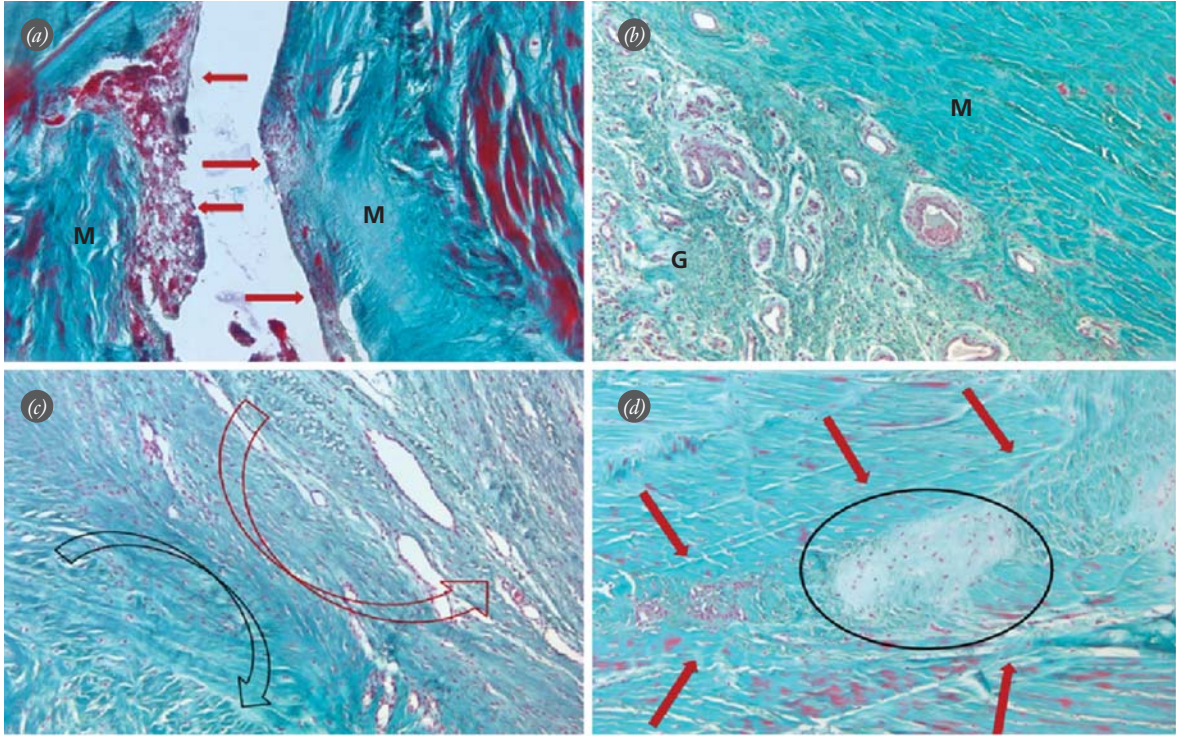
Deney ve kontrol grubunda yırtık bölgesinden uzak alanlarda kollajen lifler birbirlerine paralel olarak düzenlenmişti. Bu alanda kollajenlerin arasına gömülü kondrositler izlendi. Bu bölgenin organel yönünden fa-

kir oluşu ve hücre membranının yaptığı ayaksı çıkıntılar da dikkati çekmekteydi.

Deney grubunda ise, menisküs iyileşme bölgesine yakın kısımlarda iyi gelişmiş organeller ve kondroblastlar dikkati çekti. Bunun yanı sıra, elektron mikroskobu ile yoğun ekstraselüler matriks sentezi ve düzensiz, saçılmış ve uzak yerleşimli yeni oluşmuş kollajen fibrillerin enine çizgilenmesinde azalma olduğu gösterildi. Bu gözlem, bu hücrelerin onarım dokusuna katkısını düşündürmektedir. Özellikle granüllü endoplazmik retikulumlar genişlemiş ve belirgindi. Bu alanda yeni sentezlenmiş düzensiz yerleşimli kollajen fibriller gözlemlendi (Şekil 3).

Tablo 2. Işık mikroskopisi bulgularının iki grup arasında istatistiksel karşılaştırması.

Değişkenler	Deney (n=12) Medyan (25-75)	Kontrol (n=12) Medyan (25-75)	P
Kollajen fibril oluşumu	3 (2.5-4)	3 (2.5-3)	0.16
Yeniden damarlanma	4 (3-4)	3 (2-3)	0.003
Hücre sayısında artış	3 (3-3.5)	3 (2-2.5)	0.004
Kırık plakları	1 (1-2)	1 (1-1)	0.016



Şekil 2. (a) Deney grubuna ait bir ışık mikroskopisi örneği. Göç eden ve prolifere olan hücrelerin oluşturduğu granülasyon dokusu kırmızı oklarla işaretlenmiştir. M: menisküs. D4 x200 Masson trikrom. (b) G: Kama şeklindeki yırtık bölgesinin derinlerinde hücre infiltrasyonu, damarlanma ve kollajen yapımında artışın izlendiği granülasyon dokusu. M: menisküs. D4 x100 Masson trikrom. (c) Deney grubuna ait mikrofilim. Siyah ok: menisküs, Kırmızı ok: Granülasyon dokusunda hücre infiltrasyonu ve damarlanmada artışın yanı sıra, ince kollajen fibrilleri (yeni oluşmuş) izlenmektedir. D2a x100 Masson trikrom. (d) Kama şeklindeki yırtık bölgesindeki (kırmızı oklar) granülasyon dokusu içinde yeni oluşan kıkırdak adacıkları siyah daire ile işaretlenmiştir. D2 x100 Masson trikrom. [Bu şekil, derginin www.aott.org.tr adresindeki çevrimiçi versiyonunda renkli görülebilir]

Elektron mikroskop incelemesi ile kontrollerin menisküslerinde intrinsik onarım düşündürülen bir kanıt gözlenmedi. Kontrol grubunda menisküs iyileşme bölgesi yakınında dejenere kondrositler gözlemlendi.

Tartışma

Avasküler olan veya değişken vaskülariteye sahip kırmızı-beyaz bölgedeki yırtıklarda iyileşme sorunludur. Bu bölgedeki yırtıkları onarıırken, iyileşme potansiyelini arttıracak tekniklerin uygulanması yararlıdır.^[11-15] Bu çalışmada kemik iliği aspiratının kırmızı-beyaz bölgedeki menisküs dokusunun iyileşmesine katkısının değerlendirilmesi için menisküs yırtığının bu bölgede oluşturulması sağlandı.

Doku onarımı için kemik kaynaklı MKH'lerin nakledilmesi gelecek vaat eden bir alternatiftir. Bu hücrelerin osteojenik, kondrojenik veya adipojenik dokular gibi birçok farklı dokuya dönüşebildikleri iyi bilinmektedir.^[17]

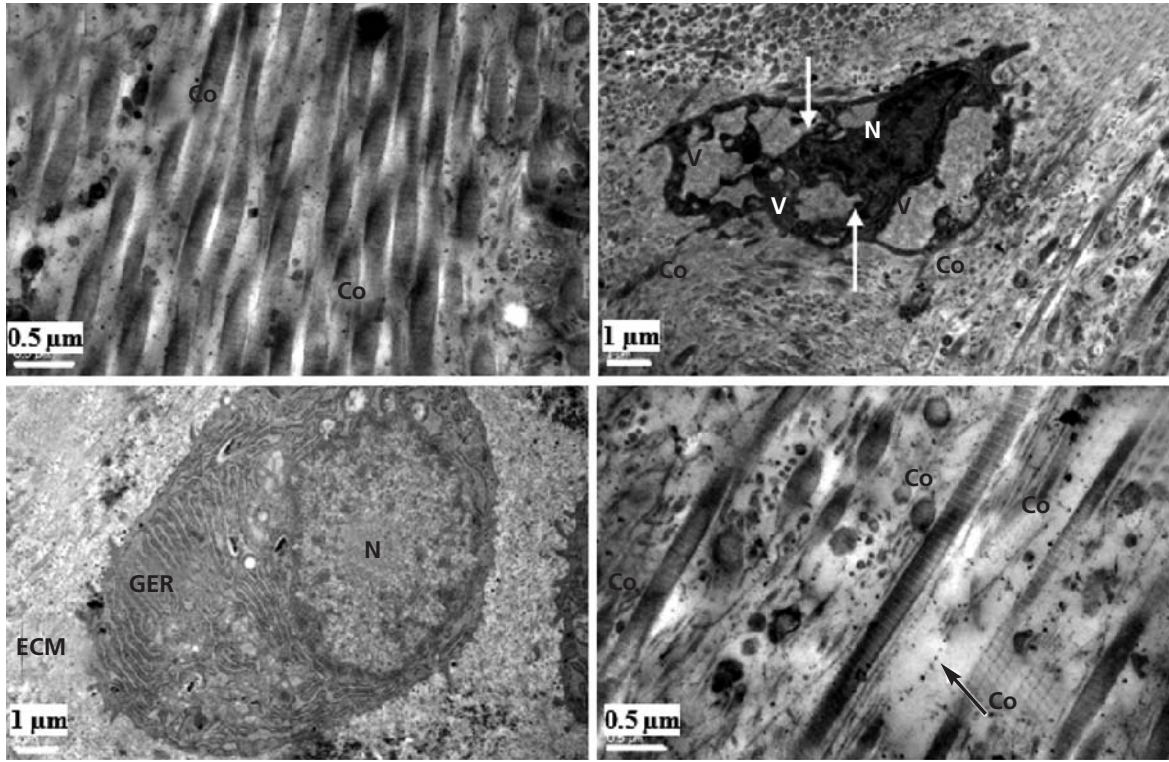
Centeno ve ark.,^[25] MKH'leri insan üzerinde ilk uygulayan araştırmacılar ve hasarlı menisküs ve kıkırdak

hacminde manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile anlamlı artış olduğunu göstermişlerdir.

Fortier ve ark.,^[26] tam kat kıkırdak hasarının atlarda kıkırdak yaralanması modelinde tedavi sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Tam kat kıkırdak hasarına kemik iliği konsantresi uygulamış ve kemik iliği konsantresinin hasarın iyileşmesi üzerinde tek başına mikro-kırıktan daha üstün olduğunu göstermişlerdir.

Birçok erişkin dokusu, travma, hastalık ve yaşlanma sonrası yenilenme kapasitesine sahip kök hücre kapasitesine sahiptir. Erişkin kemik iliği de, kemik, kıkırdak, kas, bağ, tendon, adipoz ve stroma gibi mezenkimal dokuların rejenerasyonuna katkıda bulunan MKH'leri içerir.^[27] Pitenger ve ark., multipotent insan MKH'lerinin izolasyonu, çoğaltılması ve özelliklerini bildirmişlerdir.^[17]

MKH'ler hayvan deneylerinde kıkırdak rejenerasyonu ve insan modellerinde kemik rejenerasyonu anlamında başarılı olmuştur.^[28-30] Caplan ve Dennis,^[31] MKH'lerin, benzer mekanizmalarla menisküs rejenerasyonunu trofik şekilde güçlendirdiğini bildirmişlerdir.



Şekil 3. (a) Deney grubunda kollajen liflerin paralel yerleşimi (Co). Uranil asetat-kurşun sitrat x40,000. (b) Kontrol grubundan bir örnekte dejenere kondrosite ait mikrofilm. N: kondrosit çekirdeği, V: vakuol, Co: kollajen fibriller, Ok: Perinükleer halo. Uranil asetat-kurşun sitrat x15,000. (c) Deney grubuna ait mikrofilimde iyi gelişmiş granüllü endoplazma retikulumu izlenmektedir. N: kondroblast çekirdeği, ECM: hücre dışı matrisi, GER: granüllü endoplazmik retikulum. Uranil asetat-kurşun sitrat x15,000. (d) Deney grubuna ait kesitte yeni oluşmuş kollajen liflerin birbirlerinden uzak dağınık ve düzensiz yerleşimi. Ok: kollajen fibrillerdeki enine çizgilenme. Uranil asetat-kurşun sitrat x40,000.

Çalışmamızdaki koyun modelinde dört aylık izlem, yırtık bölgesinde oluşan onarım dokusunun olgunlaşması ya da dejenerasyonunu görmek için yeterli bir süre idi. Bu çalışmada kemik iliğinden köken alan MKH'lerin, menisküs yırtığı bölgesindeki onarım sürecine katkısını daha iyi değerlendirmek için birincil onarım yapmadık.

Onarım dokusunun menisküs iyileşme bölgesinde normal dokuya deney grubunda daha iyi entegre olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda, yırtık bölgesinde bir boşluk bulunduğu ve bu boşluğun kapsülden göç eden hücrelerin oluşturduğu bir doku ile dolduğu ancak bu dokunun menisküye entegre olmadığı görüldü.

Deney grubunda anlamlı seviyede yeniden damarlanma ($p=0.003$), hücre sayısı artışı ($p=0.004$) ve kırık plak oluşum ($p=0.016$) bulguları mevcuttu. Bu çalışmadaki TEM bulguları, makroskopik ve ışık mikroskopik bulguları desteklemektedir. Işık mikroskopisinde görülen kırık adacıkları oluşumu, TEM'de iyi gelişmiş organelleri ve ökromatik çekirdekleri ile aktif kondroblast hücrelerinin varlığı gözlemi ile desteklenmek-

tedir. Bu hücrelerin granüllü endoplazmik retikulumları genişlemiş ve belirgindi. Bu yapıdaki kondroblast hücreleri, hücrede protein sentezinin aktif olduğunu ve onarım dokusuna katkıda bulunduğunu gösterir. Hücre çevresinde yoğun hücre dışı matrisi sentezi ve yeni sentezlenmiş düzensiz yerleşimli kollajen fibrillerin gözlenmesi de bu katkıyı desteklemektedir.

Deney grubunda, dört ay sonra beş denekte kırık dokusunun oluşumu ile birlikte iyileşmenin açık kanıtları mevcuttu. Kontrol grubunda ise, makroskopik ve histopatolojik olarak iyileşme olmadığı görüldü. Bu çalışmanın sonuçları, menisküs yırtıklarının, kemik iliğinden köken alan MKH ve ilik elemanlarının eklem içi enjeksiyonu ile tedavi edilebilme şansına sahip olduğunu gösterdi.

Eklem içine birlikte uygulanan olog kemik iliği aspiratı ve ilik elemanlarının menisküs yırtığında iyileşmeyi uyardığı ve doku yenilenmesine katkı yaptığı ışık ve elektron mikroskopisi bulguları ile desteklenmektedir.

Bu çalışmanın zayıf yönü maksimum MKH konsantrasyonunu elde etmek için hücre izolasyonu ve kemik

iliği kökenli kök hücrelerin ön kültürünün yapılamamasıdır. Bununla birlikte, bu tekniğin etkili olduğunu göstermek için başka deneysel ve klinik çalışmalara gerekسينim vardır.

Çalışmamızda, ışık ve elektron mikroskopisi bulgularının da desteklediği gibi, menisküs yırtığının iyileşme potansiyeli deney grubunda daha iyi idi. Sonuç olarak, menisküs yırtığı bölgesine uygulanan kemik iliği aspiratı iyileşme sürecini hızlandırmaktadır.

Çıkar Örtüşmesi: Çıkar örtüşmesi bulunmadığı belirtilmiştir.

Kaynaklar

- Walker PS, Erkman MJ. The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1975; (109):184-192.
- Cox JS, Nye CE, Schaefer WW, Woodstein IJ. The degenerative effects of partial and total resection of the medial meniscus in dogs' knees. *Clin Orthop Relat Res* 1975;(109):178-83.
- Paletta GA Jr, Manning T, Snell E, Parker R, Bergfeld J. The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and pressures in the human knee. A biomechanical study. *Am J Sports Med* 1997;25:692-8.
- Roos H, Laurén M, Adalberth T, Roos EM, Jonsson K, Lohmander LS. Knee osteoarthritis after meniscectomy: prevalence of radiographic changes after twenty-one years, compared with matched controls. *Arthritis Rheum* 1998;41:687-93.
- Pavlovich RI. Hi-frequency electrical cautery stimulation in the treatment of displaced meniscal tears. *Arthroscopy* 1998; 14:566-71.
- McCarty EC, Marx RG, DeHaven KE. Meniscus repair: considerations in treatment and update of clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(402):122-34.
- Rath E, Richmond JC. The menisci: basic science and advances in treatment. *Br J Sports Med* 2000;34:252-7.
- Stone KR, Steadman JR, Rodkey WG, Li ST. Regeneration of meniscal cartilage with use of a collagen scaffold. Analysis of preliminary data. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79:1770-7.
- Verdonk R. Alternative treatment for meniscal injuries. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79:866-73.
- Verdonk R, Verdonk P, Huyse W, Forsyth R, Heinrichs EL. Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for treatment of partial meniscal lesions. *Am J Sports Med* 2011;39:774-82.
- Van Trommel MF, Simonian PT, Potter HG, Wickiewicz TL. Different regional healing rates with the outside-in technique for meniscal repair. *Am J Sports Med* 1998;26:446-52.
- Miller MD, Warner JJP, Harner CD. Meniscal repair. In: Fu FH, Harner CD, Vince KG, (eds). *Knee surgery*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994. p. 615-30.
- Ishimura M, Ohgushi H, Habata T, Tamai S, Fujisawa Y. Arthroscopic meniscal repair using fibrin glue. Part 1: Experimental study. *Arthroscopy* 1997;13:551-7.
- Angele P, Johnstone B, Kujat R, Zellner J, Nerlich M, Goldberg V, et al. Stem cell based tissue engineering for meniscus repair. *J Biomed Mater Res A* 2008; 85:445-55.
- Izuta Y, Ochi M, Adachi N, Deie M, Yamasaki T, Shinomiya R. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells: experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. *Knee* 2005;12:217-23.
- Arnoczky SP, Warren RF, Spivak JM. Meniscal repair using an exogenous fibrin clot. An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 1988;70:1209-17.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
- Huang AH, Motlekar NA, Stein A, Diamond SL, Shore EM, Mauck RL. High-throughput screening for modulators of mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Ann Biomed Eng* 2008;36:1909-21.
- Indrawattana N, Chen G, Tadokoro M, Shann LH, Ohgushi H, Tateishi T, et al. Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:914-9.
- McCarrel T, Fortier L. Temporal growth factor release from platelet-rich plasma, trehalose lyophilized platelets, and bone marrow aspirate and their effect on tendon and ligament gene expression. *J Orthop Res* 2009;27:1033-42.
- Potier E, Ferreira E, Dennler S, Mauviel A, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, et al. Desferrioxamine-driven upregulation of angiogenic factor expression by human bone marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2008;2:272-8.
- Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008;22:432-8.
- Okamoto Y, Shibasaki K, Minami S, Matsushashi A, Tanioka S, Shigemasa Y. Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J Vet Med Sci* 1995;57:851-4.
- Tsuboi R, Rifkin DB. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *J Exp Med* 1990;172:245-51.
- Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells. *Medical Hypotheses* 2008;71:900-8.
- Fortier LA, Potter HG, Rickey EJ, Schnabel LV, Foo LF, Chong LR, et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *J Bone Joint Surg Am* 2010;92:1927-37.
- Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992;13:81-8.
- Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:3464-74.
- Luyten FP. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004;16:599-603.
- Zellner J, Mueller M, Berner A, Dienstknecht T, Kujat R, Nerlich M, et al. Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus. *J Biomed Mater Res A* 2010;94:1150-61.
- Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-84.