

Derleme

Menisküsün Histolojik Değerlendirme Metodları

Histological Analyses Methods of Meniscus

Savaş AKTAŞ¹

¹Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Mersin

Özet

Deneysel ortopedik çalışmalarda, kırık iyileşme modellerinin değerlendirilmesinde, biyokimyasal, biyomekanik incelemelerin histolojik incelemeler ile desteklenmesi önerilmektedir. Dokuların histolojik değerlendirilmesinde genellikle kalitatif incelemeler yapılırken kantitatif incelemeler sınırlı miktarlarda yapılmakta ya da hiç yapılmamaktadır. Çalışmanın bilimsel geçerliliğinin sağlanması, amaca uygun analitik metodların seçilmesi, değerlendirilecek parametrelerin kantite edilmesi ve bunların yorumlanmasıyla doğrudan ilişkilidir. Bu noktadan yola çıkarak bu derlemede, menisküs dokusunun histolojik preparasyonu ve incelemesinde kullanılacak metodoloji ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Anahtar Sözcükler: menisküs; kantitatif inceleme; histolojik teknikler

Abstract

In the experimental orthopaedic studies, it has been suggested to support biochemical, biomechanics analyses with histological analyses in the evaluation of cartilage healing models. In the histological evaluation of tissues, generally qualitative analyses have been applied, whereas quantitative analyses have been done on a limited scale or have never been done. Providing a scientific validity for the study is directly related to the choice of analytic methods in accordance with the aim, quantitation the parameters evaluated. And their interpretations. From this point of view in this review, it has been attempted to present the methodology that can be applied in the histological. Preparation and analysis of meniscus tissue.

Keywords: meniscus; quantitative evaluation; histologic techniques

Giriş

Fonksiyonel menisküs dokusunun oluşturulmasına yönelik, *in vivo*, *in vitro* ve *ex vivo* çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir. Planlanan çalışmalarda biyokimyasal, biyomekanik incelemelerin histolojik incelemeler ile desteklenmesi önerilmektedir. Bu nedenle çalışma amacına uygun histolojik metodoloji ve değerlendirme yöntemlerinin belirlenmesi çalışmanın önemli bir aşamasını oluşturmaktadır. Menisküsün histolojik değerlendirmesinde; kıkırdak yapısı, hücre morfolojisi ve tipleri, ekstrasellüler matriks morfolojisi, matrikste kollajen liflerin düzenlenişi göz önünde bulundurulmalıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, menisküs dokusunun morfolojik özelliklerini değerlendirmede kullanılabilir semikantitatif ve kantitatif değerlendirme metodları geliştirilmiştir. Bu histolojik değerlendirme yöntemlerinin kalitatif histolojik değerlendirme metodlarıyla birlikte yapılması ile çalışmaların bilimsel geçerliliği artırılmıştır. Bu derlemede menisküs dokusunun histolojisi, histolojik preparasyonu ve kıkırdak iyileşme modellerinde kullanılabilir kalitatif-kantitatif histolojik değerlendirme yöntemleri açıklanmaya çalışılmıştır.

Menisküs Histolojisi

Menisküs dokusu yaklaşık olarak %72 su, %22 kollajen, non-kollajen proteinler, glikozaminoglikanlar ve farklı tipte hücreleri içerir. Hücreler şekillerine, territorial matriksin bulunması veya bulunmamasına göre kondrosit, fibroblast ve ara tip morfolojili hücreler olarak sınıflandırılmıştır. Menisküsün 1/3 kısmında fibroblast ve fibroblast benzeri hücreler yoğun bağ dokusu içerisinde bulunurken, menisküsün orta ve iç kısmında yoğun ekstrasellüler matriks ile çevrelenmiş yuvarlak veya oval şekilli hücreler gözlenir (1,2). Bu hücreler fibroblast ve kondrosit özelliği gösterdiğinden fibrokondrosit olarak da isimlendirilir. Fibrokondrositler toplam doku hacminin %10'unu oluşturacak kadar küçük miktarda olduğundan matrikste seyrek dağılım gösterir (2). Ekstrasellüler matrikste bulunan kollajenin %90'nını tip I kollajen, geri kalanını tip II, tip III, tip V ve tip VI kollajen oluşturur (3,4). Glikozaminoglikanlar kantitatif olarak dokuda çok küçük miktarlarda bulunsalar da dokunun hidrasyonunu, basınca karşı direncini ve elastisitesini sağlama gibi önemli fonksiyonel rolleri vardır (4). Ekstrasellüler matrikste agrekan major proteoglikandır, dekorin, biglikan, versikan, fibromodulin ise minör glikozaminoglikanlardır (2). Proteoglikan makromoleküllerinin büyüklüğü, su tutması ve elektrostatik itme özelliğinin tamamı menisküsün basınca karşı direncini belirler (4). Menisküsün, 2/3'lük dış kısmını dairesel ve ırsal dizimli tip I kollajen lifleri oluşturur. Bu bölge hücrelerin ve tip I kollajenin yoğun olması nedeniyle fibröz doku özelliğindedir. Menisküsün iç kısmı ise hiyalin kıkırdağa benzer, bu bölgede az sayıda hücre

bulunurken yüksek oranda proteoglikan ve tip II kollajen bulunur (5) Menisküsün 1/3 dış kısmı vasküler bölgedir, bu alanda damarlarla ilişkili kalın sinir lifleri ve duyuşal reseptörler görülürken, 2/3 iç kısmı ise avasküler bölge olup, burada sinir lifleri ve reseptörler görülmez (6,7).

Işık Mikroskopik Değerlendirme

Dokuların mikroskopik değerlendirilmesinde, doku bütünlüğünün sağlanmış olması ve incelenecek hücresel komponentin korunmuş olması çok önemlidir. Dokuların alınmasından incelemenin yapılmasına kadar her aşamanın ayrı bir önemi olmakla birlikte en önemli aşamanın doku ve hücresel yapının korunduğu, tespit (fiksasyon) aşaması olduğu söylenebilir. Farklı fiksatifler kullanılmakla birlikte menisküs dokusunun fiksasyonunda sıklıkla %10'luk tamponlanmış nötral formalin kullanılmaktadır (8-12). 24-48 saat fikse olan doku, sırasıyla dehidrasyon (sırasıyla %70, %80, %90, %96'lık alkollerle), şeffaflaştırma (ksilol) işleminden geçtikten sonra parafine gömülür. Mikrotom ile 4 µm ile 8 µm arası kalınlıkta alınan kesitler farklı boyalar ile boyanarak morfolojik değerlendirme yapılır (9-14). Histolojik incelemede hematoxilen-eosin boyası (9-12) ile genel morfolojik değerlendirme yapılabilir ancak dokunun farklı komponentlerini gösteren özel boyaların kullanılması araştırmaya katkı sağlayacaktır. Ekstrasellüler matrikste bulunan anyonik proteoglikanların, glikozaminoglikanların yoğun olarak bulunduğu bölgeyi belirlemek ve boyanmanın yoğunluğuna göre değerlendirmek amacıyla toluidin mavisi (8,10,13), safranin-O (10,11,14), alcian mavisi (15-17) kullanılabilir. Boyanmanın yoğunluğuna göre; boyanmanın olmaması (-), normal boyanmanın olması (++++) olarak semi-kantitatif değerlendirme yapılabilir (18). Ayrıca görüntü analiz programları kullanılarak boyanan alan (mm²) ve boyanma yüzdesi kantitatif olarak da hesaplanabilir (11). Ekstrasellüler matrikste histolojik olarak değerlendirilen önemli bir komponentte kollajendir. Kollajenin histokimyasal değerlendirilmesinde van Gieson (14,16,17), masson trikrom (12,16,17), mallory trikrom (16,17), cason trikrom (17) gibi özel boyalar kullanılabilir. Bu boya teknikleri formaldehit ile tespit edilmiş dokularda optimal sonuçlar vermez. Buna karşın zenker solüsyonu, formol-merkuri, bouin solüsyonu veya picro-merkurik alkol gibi tespit solüsyonu kullanıldığında tatmin edici sonuçlar alınabilmektedir (16,17). Bu boyama tekniklerinde genellikle semi-kantitatif sonuçlar verilmektedir. Boyanan kollajenin miktarına göre;

- Dokuda seyrek olarak hafif pozitif boyanma alanlarının görülmesi; 1+
- Dokuda dağılmış olarak orta derecede pozitif boyanma alanlarının görülmesi; 2+
- Dokunun tamamında güçlü pozitif boyanma alanlarının görülmesi; 3+ olarak değerlendirilebilir (12).

Kollajenin semi-kantitatif değerlendirilmesine ek olarak polarizer (ışık kaynağı ve incelenecek örnek arasına konulan) ve analizler (objektif lens ve göz arasına konulan) filtreler kullanılarak geliştirilen polarize ışık mikroskobunda kalitatif inceleme de yapılabilmektedir. İnceleme öncesinde pikrosirius kırmızısı ile boyanan dokuda kollajen dizilimi ve yeni oluşan kollajen ayırt edilebilmektedir (8). Ayrıca araştırmacının amacına göre yapılan histolojik değerlendirmelerde; yeni damar oluşumu, fibroblastik proliferasyon, lökosit infiltrasyonu, granülasyon dokusu oluşumu, dokuda gözlenen yarığa göre menisküs iyileşmesi de değerlendirilebilir. Henning iyileşme kriterlerine (19) göre;

- Menisküs dokusunda iyileşmenin olmaması (%50'den fazla rezidüel yarığın görülmesi)
- Menisküs dokusunda parsiyel iyileşme olması (%10-50 arasında rezidüel yarığın görülmesi)
- Menisküs dokusunda tam iyileşme olması (%10'dan az rezidüel yarığın görülmesi) olarak belirtilmiştir.

İyileşme alanındaki inflamatuvar hücreler (polimorfonükleer lökositler, lenfositler, doku makrofajları) ise inflamatuvar hücre skalasına göre (20);

- Değerlendirme alanında inflamatuvar hücre bulunmaması: 0
- 1-10 arası inflamatuvar hücre bulunması; 1
- 10-20 arası inflamatuvar hücre bulunması; 2
- 20 veya daha fazla inflamatuvar hücre bulunması; 3 olarak değerlendirilir.

Buna ek olarak değerlendirme sırasında her bir hücre tipi için ayrı ayrı skala yapılarak akut veya kronik inflamasyon yanıtı da saptanabilir.

Işık mikroskopi değerlendirme yöntemlerinden bir diğeri immunohistokimyasal inceleme yöntemidir. Bu yöntemde işaretlenmiş antikorlar kullanılarak hücre ve dokuda araştırılmak istenen protein veya peptit gösterilir. Temel olarak antijen-antikor etkileşiminden faydalanılarak direkt işaretleme veya ikincil işaretleme tekniği ile antikorun bağlandığı bölgeler tanımlanır (20). Immunohistokimya, rutin formaldehit içeren fiksatiflerle tespit edilmiş parafin kesitlere, fikse edilmemiş ve fikse edilmiş kriyostat kesitlere, fikse edilerek rezine gömülmüş materyalden alınmış yarı ince ve ince kesitlere uygulanabilir (21). Sıklıkla tespit solüsyonu olarak aldehit grubu (paraformaldehit, formaldehit, glüteraldehit) fiksatifler kullanılmaktadır (16).

Menisküs dokusunda immunohistokimyasal olarak; kollajen tipleri, non kollajenöz proteinler ve proteoglikanlar gösterilebilir. İncelenecek yapının farklı epitoplarına karşı oluşturulmuş çok sayıda poliklonal ve monoklonal antikorlar kullanılabilir.

İmunohistokimyasal değerlendirmeler genellikle kalitatif ve semi-kantitatif yapılmaktadır. Bu değerlendirmelerde;

1. İmmun işaretlenen bölgenin pozitif veya negatif boyanma olarak tanımlanması
2. İşaretlenmenin tipi ve dağılımının (hücre nükleusu, hücre sitoplazması, ekstrasellüler

matriks) belirlenmesi

3. Manuel skorlama sistemleri kullanılarak pozitif boyanan hücre sayısı ve boyanma yoğunluğu (-, +, ++, +++ olarak)
4. Görüntü analiz programları kullanılarak boyanma genişliği ve yoğunluğu incelenmektedir (22).

Kültüre menisküs hücrelerinde ve menisküs dokusunda yapılan bazı çalışmalarda; tip I (8,14,15,23), II (8,14,15,23), IV (14,23), V (23) ve VI kollajen (14,23), agrekan (8), perlekan (8), proteoglikan 4 (24), substans P (SP) (7) ve protein gene product (PGP9.5) nöropeptiti (7) (mekanoreseptörler ve duyu reseptörleri belirlemede) immunohistokimyasal olarak gösterilmiş ve yukarıda belirtilen değerlendirme yöntemleri kullanılmıştır. Benzer olarak Marsano ve ark. (14) yaptığı çalışmada menisküs dokusunda kollajen immün işaretlenmesinin lokalizasyonunu ve yoğunluğunu semi-kantitatif değerlendirmiş ve:

- Matrikste boyanmanın olmaması; (-)
- Matrikste bölgesel boyanmanın olması (matriksin < %50'sinden azı); (-/+)
- Matriksin yaygın fakat zayıf boyanmanın olması (matriksin > %50'sinden fazlası); (+/-)
- Matriksin güçlü boyanması; (+) olarak belirtmiştir.

Kollajenin immunohistokimyasal incelenmesinden farklı olarak McDougall ve ark. (25) çalışmalarında immunohistokimyasal işaretleme tekniği ile vaskülarizasyonu değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar medial kollateral ligamentte anti-trombomodulin antikorunu ile damar endotelini işaretleyip X200 büyütmede 40 farklı alanda damarları (anti-trombomodulin antikorunu ile işaretlenen endoteli içeren) saymışlardır. Buna göre oluşturulmuş semi-kantitatif değerlendirilmede:

- Alanda damar gözlenmemesi; -
- Birkaç damar gözlenmesi; 1+
- Birçok damar gözlenmesi; 2+
- Çok fazla damar gözlenmesi; 3+ olarak kabul etmişlerdir.

Bu değerlendirme skorunu referans alan Peterson ve ark. (26) menisküs iyileşmesi çalışmalarında anti-faktör VIII antikorunu kullanarak damar endotelini işaretlemişlerdir. Kantitatif değerlendirmede görüntü analiz programı ile pozitif boyanmanın olduğu alandan seçilen 5 bölgede (toplam alan μm^2 olarak) immün işaretlenen endotelial hücreler sayılıp gruplar arasında karşılaştırma yapmışlardır.

Menisküs yaralanmaları önemli ortopedik sorunlardan biridir. Özellikle avasküler bölgede olan menisküs yaralanmaları kötü prognozlu olup yetersiz iyileşme ile sonuçlanmaktadır. Günümüzde zedelenme sonrası fonksiyonel menisküs dokusunun tekrar oluşturulabileceği etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu nedenle son yıllarda yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve biyolojik menisküs yapısını oluşturmak için doku mühendisliği teknolojileri

Tablo 1. Polimer ve dokunun kalitatif derecelendirmesi (27)

Hematoksilen-Eosin ile matris boyanması	Grade 1 Açık kırmızı Grade 2 Kırmızı Grade 3 Koyu kırmızı/pembe
İç kısma genişleyen dokunun belirgin tabiatı	Grade 0 İnflamatuar doku Grade 1 İnflamatuar ve fibröz Grade 2 Fibröz doku
Vasküler dokunun iç kısma büyümesi	Grade 0 Vasküler doku yok Grade 1 Az miktarda Grade 2 Fibrovasküler doku
Hücre tabakasının, kapsül yapısının kalınlığı	Grade 0 Gözlenmemesi Grade 1 5 tabakaya kadar Grade 2 10 tabakaya kadar Grade 3 15 tabakaya kadar Grade 4 15 tabakadan fazla
İnflamatuar hücre tipinin dağılımı	Grade 0 İnflamasyon yok Grade 1 Birkaç makrofaj ve dev hücre bulunan hafif inflamasyon Grade 2 Birçok makrofaj ve dev hücre bulunan, fakat PMN lökosit bulunmayan inflamasyon Grade 3 Grade 2 deki gibi orta inflamasyon fakat birkaç PMN lökosit Grade 4 Ağır inflamasyon, çok fazla sayıda makrofaj, dev hücre ve PMN lökosit
Polimerin parçalanması/dağılımı	Grade 0 Dağılıma belirtisi yok Grade 1 Sudan Black ile boyanma yoğunluğunun azalması Grade 2 Polimerin parçalanması Grade 3 Polimersiz alanlar

kullanılarak birçok çalışma yapılmaktadır. Tienen ve ark. (27) tarafından yapılan çalışmada, polimer implantasyonu sonrası menisküs dokusu histolojik olarak değerlendirilmiştir (Tablo 1).

Bir başka çalışmada Tienen ve ark. (15) menisküs zedelenmesinin olduğu alanda implantasyon işlemi sonrası iyileşmeyi;

- İyileşme yanıtının olmaması; iyileşme yok
- Lezyon alanının en azından %50'sinin yeni oluşan doku ile dolması; kısmi iyileşme
- Lezyon alanının en azından %75'inin yeni oluşan doku ile dolması; iyileşme olarak değerlendirilmiştir.

Ayrıca implant-defect bölgesinde implanta doğru genişleyen dokunun yüzdesi ve hücresel fenotipi (fibroblastik, kondroblastik) belirlenmiş, proteoglikan ve tip II kollajen sentezi incelenmiştir. Görüntü analiz programı aracılığıyla;

- 200 µm mesafede implant merkezi boyunca geçen 2 kesitte tip II kollajen antikorlu ile işaretli toplam implant yüzeyi (%)

- 200 µm aralıklarda 3 kesitte implantın toplam çevresinin menisküs dokusu ile temas ettiği mesafe (%) ve toplam implant yüzeyinde, genişleyen dokunun alanı (%) olarak hesaplanmıştır.

Kobayashi ve ark. (28) menisküs organ kültürü çalışmasında alıcı doku ve greft arasında iyileşmeyi; alıcı doku ve grefti çevreleyen hücrelerin bulunmasına, ekstrasellüler matris sentezinin yapılmasına, her iki doku arasında matris ile birleşmenin olmasına ve her iki doku arasında bütünlüğün oluşmasına göre histolojik olarak değerlendirmiş ve semi-kantitatif skorlama yapmıştır. Bu skorlamada;

- İki doku arasında mesafenin bağ doku ile devamlılığının olması; 2
- Dokular arasında bazı etkileşimler olmasına rağmen, bağlantılı alanların olmaması; 1
- Dokular arasında farkedilebilir bir değişikliğin olmaması; 0 olarak puanlanmıştır.

Rodeo ve ark. (9) otolog menisküs trasplant çalışmasında; implant bölgesinde mevcut hücrelerin

Tablo 2. Histolojik puanlama sistemi (9)

Mevcut hücrelerin yapısal ve sayısal niteliği	
Asellüler görünüm	0
İnkomplet olarak hücrelerin yeniden çoğalmaya başlaması	1
Normal hücresel görünüm	2
Yoğun olarak görülen hücre tipi	
Mononükleer veya inflammatuar hücrelerin görülmesi	0
Fibroblastların görülmesi	1
Fibrokondrositlerin görülmesi	2
Kollajenin düzenlenişi	
Düzensiz görünüm	0
İyi düzenlenmiş görünüm	1
Matris morfolojisi	
Kondromukoid dejenerasyon görülmesi	0
Fibröz görünüm	1

niteliğine, baskın hücre tipine, kollajen düzenlenişi ve matriks morfolojisine göre oluşturulmuş puanlama tablosu (0-6 arası) kullanmışlardır (Tablo 2).

Zhang ve ark. (29) menisküs implant çalışmasında Schreiber ve ark. (30) tarafından oluşturulmuş histolojik değerlendirme skalasını değiştirerek kullanmışlardır (Tablo 3).

Elektron Mikroskopik Değerlendirme

Ultrastrüktürel incelemeler, geçirmeli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscopy: TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscopy: SEM) ile hücre-hücre, hücre-matriks etkileşimini ve tüm bu yapıların iki-üç boyutlu düzenlenişini, kompozisyonunu değerlendirmek amacıyla yapılır (22). Elektron mikroskopik incelemelerde kullanılan fiksatiflerin doku penetrasyon hızı yavaş olduğundan alınan doku büyüklüğünün 1mm^3 'ü geçmemesi gerektiği önerilmektedir. Postmortem değişikliklerin en hassas belirteçleri mitokondriyon ve endoplazmik retikulumdaki değişikliklerdir. Bu organellerde osmotik dengesizlikte görülen şişme belirtileri, kan akımının kesilmesinden birkaç dakika sonra başlamaktadır. Bu nedenle dokunun en kısa sürede alınıp fiksatife konması çok önemlidir. Standart protokolda; proteinleri fikse etmek için %1.5-4 gluteraldehitte 2-6 saat primer fiksasyon ve bunu takiben lipidleri korumak için %1 osmium tetroksit ile 60-90 dakika sekonder fiksasyon yapılmaktadır. Etkin fiksasyonun elde edilmesi için fiksatifin pH'sının, tampon solüsyonu ile 7.2-7.6 aralığına getirilmesi ve osmolitesinin 300-330 mOsm olması gerekmektedir. Otolitik değişiklikleri engellemek için ise fiksasyonunu $+4^\circ\text{C}$ de yapılması önerilmektedir (16,31). Sıklıkla çalışmalarda %2-2.5 konsantrasyonda kullanıldığı belirtilmiştir (10,14). Doku fikse edildikten sonra, sırasıyla dehidrasyon (artan derecede alkoller), şeffaştırma (1,2-epoksipropan) işleminden geçirilir ve rezine gömülür. Ultramikrotom 70 nm kalınlığında alınan kesitler uranyl asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanarak TEM ile incelenir. SEM incelemeleri için dokuların fiksasyonu ve dehidrasyonundan sonra kurutulması (critical point drying) gerekmektedir. Bu işlemde kurutma cihazı (critical point dryer) yardımıyla dokudaki su veya solvent, dokuda büzüşme olmaksızın uzaklaştırılmış olur daha sonra incelenecek doku yüzeyi altın-karbon ile kaplanır (16,31).

Elektron mikroskopi incelemelerinde hücre morfolojisi, sitoplazma ve nükleus özellikleri, organellerin yapısal değişiklikleri tanımlanabilir. Sıklıkla literatürde hücresel özelliklere ek olarak menisküs dokusunun önemli komponenti olan kollajen liflerin kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirildiği gözlenmiştir. Normal menisküs dokusundaki kollajen liflerin çapı 50-100 nm arasında olup, bunlar yoğun paketler olarak gözlenirler (10). Shibuya (10) allojenik menisküs transplantasyonu çalışmasında menisküs

dokusunda kollajen liflerinin çapını karşılaştırmışlardır. 20-50 nm çapındaki kollajen lifler F1, 50-100 nm çapındaki kollajen lifler F2 olarak gruplandırılmış ve F1/F2 oranı hesaplanmıştır. "Gelber ve ark. (32)". menisküs dokusundan alınan longitudinal ve transvers kesitlerde 400 kollajen lif, X19000 büyütmede görüntülemişler ve elektronik digital cetvel yardımıyla kollajen çapları ölçmüştür. Ayrıca Tablo 4 de görülen 5 değişikene göre grade 1: 0-2 puan, grade 2: 3-4 puan, grade 3: 5-7 puan olarak derecelendirmişlerdir.

Flüoresans Mikroskopik ve Konfokal Mikroskopik Değerlendirme

Flüoresans mikroskobu ultraviyole ışığı altında belirli moleküllerin flüoresans verme kabiliyetini değerlendirir. Bu nedenle araştırılan protein veya peptidin immunoflüoresans işaretleme tekniğiyle gösterilmesi gerekmektedir. İmmunohistokimyasal teknikte olduğu gibi bu teknikte de temel mekanizma antijen-antikor etkileşimi üzerine kurulmuştur (16,33). Farklı eksitasyon ve emisyon dalga boylarına sahip flüorokromlar (floresin izotiosiyanat, rodamin, fikoeritrin, akridin oranj, teksas kırmızısı) ile konjuge edilmiş antikorlar kullanılır (16,21,33).

İncelenecek dokuların dondurulması ve sonrasında alınan kriyo kesitlerde bu tekniğin optimum sonuçlar verdiği saptanmıştır (16,33). Bu nedenle dokuların fiksasyonunda; sıvı nitrojen (-190°C), sıvı nitrojen ile soğutulmuş isopental (2-metilbutan) (-150°C), kuru buz (-70°C), karbondioksit gazı (-70°C) gibi ajanlar kullanılmaktadır (33). Sıklıkla flüoresans mikroskopik incelemeler sonrasında yapılan değerlendirmeler kalitatif olmaktadır (34,35). Hücre morfolojisi ve lokalizasyonu araştırılan molekülün-yapının ekstraselüler matrikste bulunması, bulunmaması ve dağılımı gibi kalitatif parametreler kullanılmakla birlikte semikantitatif sonuçlarda verilebilmektedir (16,25).

Dokuların histolojik değerlendirilmesinde doku takip yöntemleri mutlaka kullanılmalıdır. Ancak kullanılan kimyasal malzemeler ve fiziksel şartlar minimalde olsa hücresel şişme, büzüşme, görüntü artefaktına neden olabilmektedir. Geliştirilen konfokal laser mikroskopi inceleme tekniği ile bu sorunlar ortadan kaldırılmış ve dokuların *in vivo* şartlarda incelenmesi sağlanmıştır (36). Konfokal mikroskopunda laser ve bilgisayar kullanılarak hücre ve dokuların üç boyutlu görüntüsü oluşturulur. Sistem ile dokudan yaklaşık 1 μm kalınlığında optik kesitler alınır ve aynı fokal düzlemde bulunan pek çok nokta taranır, bilgisayar bu noktaları kullanarak bir görüntü oluşturur (37). İncelemeler tampon solüsyonuna alınan dokuda yapılabileceği gibi flüoresans boyalar (akridin oranj, akriflavin/kalsein-AM, floresin) eklenmiş besiyelerinde inkübe edilmiş hücrelerde ve dokularda da yapılabilmektedir. Dokunun kompozisyonuna bağlı olarak doku yüzeyinden 150-300 μm derinliğine kadar olan alanda hücre morfolojileri,

Tablo 3. Menisküs İyileşmesi Histolojik Puanlama Skalası (29)

Doku iyileşmesinin özelliği	Puan
Baskın olan dokunun yapısı	
Tipik fibröz kırkırdak	5
%50 den fazla fibröz kırkırdak	4
%50 fibröz kırkırdak/%50 fibröz doku	3
%50 den fazla fibröz doku	2
Fibröz doku	0
Matriksin toluidin mavisi ile boyanması	
Normal boyanma	3
Orta	2
Hafif	1
Boyanma yok	0
Yüzey	
Düz ve intakt yüzey	3
Yüzeysel laminasyon	2
Hafif bozulma	1
Ağır bozulma	0
Bütünlük	
Normal yapı	2
Hafif bozulma	1
Ağır bozulma	0
Kalınlık	
Bitişik dokunun %75-100 ü	2
%50-74 ü	1
%0-49 u	0
Alıcı dokuya tutunma	
Tutunmuş	2
Kısmi tutunma	1
Tutunma yok	0
Defekte iyileşme dokusu	
Normal hücre morfolojisi ve matriks boyanması	3
Hücre kümelenmesi ve normal matriks boyanması	2
Hücre dejenerasyonu ve azalmış matriks boyanması	1
Ağır hücrel deenerasyon, matrikste zayıf boyanma veya boyanma yok	0
Komşu alıcı doku	
Normal hücre morfolojisi ve matriks boyanması	3
Hücre kümelenmesi ve normal matriks boyanması	2
Azalmış matriks boyanması	1
Matrikste zayıf boyanma veya boyanma yok	0
Tamamen sağlıklı kırkırdak hücre sayısı	
Normal fibröz kırkırdaka benzer	3
Normal fibröz kırkırdaka göre hafif azalmış	2
Normal fibröz kırkırdaka göre oldukça azalmış	1
Hemen hemen kırkırdak hücresi yok	0
Matriks gözenekliliği	
Gözenekli kalın matriks	5
Bir miktar gözenekli kalın matriks	4
Çok gözenekli yarı kalınlıkta matriks	3
Gözenekli matriks	2
Fibröz matriks	0
Maksimum puan	31

Tablo 4. Meniskal Kollajen Yapı Skorlama Sistemi (31)

	0 puan	1 puan	2 puan
Kollajen liflerin düzensiz görülmesi-harabiyeti/ Bantlaşmanın kaybolması	Hafif	Orta	Ağır
Lifler arası ödem	Var	Yok	-
Paketlenme	Yüksek yoğunluk	Orta	Düşük yoğunluk
Bantlaşma	Var	Yok	-
Lif çaplarında düzensizlik	Düşük	Yüksek	-

hücredeki volüm değişiklikleri, canlılık oranı, kollajen ve elastik liflerin morfolojisi-düzenlenişi, damarlar ve sinir sonlanmaları değerlendirilebilir (25,35,38-40).

Sonuç olarak, menisküs dokusunda çeşitli histolojik preparasyon ve değerlendirme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu nedenle planlanan çalışmalarda, çalışmanın amacına uygun histolojik preparasyonun belirlenmesi, kalitatif değerlendirme yöntemlerinin kantitatif değerlendirme yöntemleriyle desteklenmesi göz önünde bulundurulmalıdır.

Kaynaklar

- Ghadially FN, Lalonde JM, Wedge JH. Ultrastructure of normal and torn menisci of the human knee joint. *J Anat* 1983;136(4):773-91.
- McDevitt CA, Webber RJ. The ultrastructure and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop* 1990;252:8-18.
- Cheung HS. Distribution of type I, II, III and V in the pepsin solubilized collagens in bovine menisci. *Connect Tissue Res* 1987;16(4):343-56.
- Herwig J, Egner E, Buddecke E. Chemical changes of human knee joint menisci in various stages of degeneration. *Ann Rheum Dis* 1984;43(4):635-40.
- Adams JS, Athanasiou KA. The knee meniscus: a complex tissue of diverse cells. *Cel Mol Bioeng* 2009;2(3):332-40.
- Day B, MacKenzie WE, Shim SS, Leung G. The vascular and nerve supply of the human meniscus. *Arthroscopy* 1985;1(1):58-62.
- Mine T, Kimura M, Sakka A, Kawai S. Innervation of nociceptors in the menisci of the knee joint: an immunohistochemical study. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120(3-4):201-4.
- Melrose J, SmitSh S, Cake M, Read R, Whiteloc J. Comparative spatial and temporal localisation of perlecan, aggrecan and type I, II and IV collagen in the ovine meniscus: an ageing study. *Histochem Cell Biol* 2005;124(3-4):225-35.
- Rodeo SA, Seneviratne A, Suzuki K, Felker K, Wickiewicz TL, Warren RF. Histological analysis of human meniscal allografts: a preliminary report. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82(8):1071-82.
- Shibuya S. Meniscus transplantation using a cryopreserved allograft. Histological and ultrastructural study of the transplanted meniscus. *J Orthop Sci* 1999;4(2):135-41.
- Chevrier A, Nelea M, Hurtig MB, Hoemann CD, Buschmann MD. Meniscus structure in human, sheep, and rabbit for animal models of meniscus repair. *J Orthop Res* 2009;27(9):1197-203.
- Abdel-Hamid M, Hussein MR, Ahmad AF, Elgezawi EM. Enhancement of the repair of meniscal wounds in the red-white zone (middle third) by the injection of bone marrow cells in canine animal model. *Int J Exp Path* 2005;86(2):117-23.
- Roberts S, Menage J, Sandell LJ, Evans EH, Richardson JB. Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *The Knee* 2009;16(5):398-404.
- Marsano A, Wendt D, Raiteri R, Gottardi R, Stolz M, Wirz D, Daniels AU, Salter D, Jakob M, Quinn TM, Martin I. Use of hydrodynamic forces to engineer cartilaginous tissues resembling the non-uniform structure and function of meniscus. *Biomaterials* 2006;27(35):5927-34.
- Tienen TG, Heijkants RGJC, Buma P, Groot JH, Pennings AJ, Vetha RPH. A porous polymer scaffold for meniscal lesion repair-a study in dogs. *Biomaterials* 2003;24(14):2541-8.
- Bacroft JD, Gamble M. Theory and practise of histological techniques. 6th Ed., New York: Churchill Livinstone, 2008:53,146, 433, 641.
- Kiernan JA. Histological and histochemical methods: theory and practise. 3rd Ed., Boston: Butterworth Heinemann, 1999:144-86.
- Welsing RT, van Tienen TG, Ramrattan N, Heijkants R, Schouten AJ, Veth RP, Buma P. Effect on tissue differentiation and articular cartilage degradation of a polymer meniscus implant: a 2-year follow-up study in dogs. *Am J Sports Med* 2008;36(10):1978-89.
- Henning CE, Lynch MA, Yearout KM, Vequist SW, Stallbaumer RJ, Decker KA. Arthroscopic meniscal repair using an exogenous fibrin clot. *Clin Orthop* 1990;252:64-72.
- Tunney MM, Patrick S, Gorman SP, Nixon JR, Anderson N, Davis RI, Hanna D, Ramage G. Improved detection of infection in hip replacements: a currently underestimated problem. *J Bone Joint Surg* 1998;80(4):568-72.
- Demir R. Histolojik Boyama Teknikleri. Ankara: Palme, 2001:296.
- An. YH, Martin KL. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. New Jersey: Humana, 2003:295-314,411-39.
- Naumann A, Dennis JE, Awadallah A, Carrino DA, Mansour JM, Kastenbauer E, Caplan AI. Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *J Histochem Cytochem* 2002;50(8):1049-58.
- Schumacher BL, Schmidt TA, Voegtline MS, Chen AC, Sah RL. Proteoglycan 4 (PRG4) synthesis and immunolocalization in bovine meniscus. *J Orthop Res* 2005;23(3):562-8.

25. McDougall JJ, Yeung G, Leonard CA, Sutherland C, Bray RC. Adaptation of post-traumatic angiogenesis in the rabbit knee by apposition of torn ligament ends. *J Orthop Res* 2000;18(4):663-70.
26. Petersen W, Pufe T, Starke C, Fuchs T, Kopf S, Neumann W, Zantop T, Paletta J, Raschke M, Becker R. The effect of locally applied vascular endothelial growth factor on meniscus healing: gross and histological findings. *Arch Orthop Trauma Surg* 2007;127(4):235-40.
27. Tienen TG, Heijkants RG, Buma P, Groot JH, Pennings AJ, Veth RP. Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes. *Biomaterials* 2002;23(8):1731-8.
28. Kobayashi K, Fujimoto E, Deie M, Sumen Y, Ikuta Y, Ochi M. Regional differences in the healing potential of the meniscus-an organ culture model to eliminate the influence of microvasculature and the synovium. *The Knee* 2004;11(4):271-8.
29. Zhang H, Leng P, Zhang J. Enhanced meniscal repair by overexpression of hIGF-1 in a full-thickness model. *Clin Orthop Relat Res* 2009;467(12):3165-74.
30. Schreiber RE, Ilten-Kirby BM, Dunkelman NS, Symons KT, Rekettye LM, Willoughby J, Ratcliffe A. Repair of osteochondral defects with allogeneic tissue engineered cartilage implants. *Clin Orthop Relat Res* 1999;367 Suppl:382-95.
31. Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. 4th Ed., Cambridge:Cambridge University, 2000:8-17.
32. Gelber PE, Gonzalez G, Lloreta JL, Reina F, Caceres E, Monllau JC. Freezing causes changes in the meniscus collagen net:a new ultrastructural meniscus disarray scale. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;16(4):353-9.
33. Polak JM, Van Noorden S. Immunocytochemistry. 3rd Ed., UK: BIOS, 2003:16-48.
34. Yamasaki T, Deie M, Shinomiya R, Yasunaga Y, Yanada S, Ochi M. Transplantation of meniscus regenerated by tissue engineering with a scaffold derived from a rat meniscus and mesenchymal stromal cells derived from rat bone marrow. *Artif Organs* 2008;32(7):519-24.
35. 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. *The Knee* 2005;12(3):217-23.
36. Jones CW, Keogh A, Smolinski D, Wu JP, Kirk TB, Zheng MH. Histological assessment of the chondral and connective tissues of the knee by confocal arthroscopy. *J Musculoskeletal Res* 2004;8(2-3):75-86.
37. Ross MH, Gordon IK, Pawlina W. Histology a Text and Atlas. 6th Ed., Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins, 2011:17-18.
38. Wilusz RE, Weinberg JB, Guilak F, McNulty AL. Inhibition of integrative repair of the meniscus following acute exposure to interleukin-1 *in vitro*. *J Orthop Res* 2008;26(4):504-12.
39. Upton ML, Gilchrist CL, Guilak F, Setton LA. Transfer of macroscale tissue strain to microscale cell regions in the deformed meniscus. *Biophys* 2008(4);95:2116-24.
40. Campo-Ruiz V, Patel D, Anderson RR, Delgado-Baeza E, Gonzalez S. Evaluation of human knee meniscus biopsies with near-infrared, reflectance confocal microscopy. A pilot study. *Int J Exp Path* 2005;86(5):297-307.