T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TAVŞANDA ADİPOSE-DERİVED STEM CELLS VE KİTOSAN İÇEREN SCAFFOLDUN AURİKULAR KARTİLAJ REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL ARAŞTIRILMASI

Dr. Enes GÜNGÖR

Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2024

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TAVŞANDA ADİPOSE-DERİVED STEM CELLS VE KİTOSAN İÇEREN SCAFFOLDUN AURİKULAR KARTİLAJ REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL ARAŞTIRILMASI

Dr. Enes GÜNGÖR

Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ercan KAYA

Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından TTU-2023-2817 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ESKİŞEHİR
2024

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Tavşanda Adipose-Derived Stem Cells Ve Kitosan İçeren Scaffoldun Aurikular Kartilaj Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Deneysel Araştırılması" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımca yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından, 30.12.2022 tarihinde, 922-1 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Dr. Enes GÜNGÖR
Tarih: 29.05.2024
İmza:

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Enes GÜNGÖR'e ait "Tavşanda Adipose-Derived Stem Cells Ve Kitosan İçeren Scaffoldun Aurikular Kartilaj Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Deneysel Araştırılması" adlı çalışma jürimiz tarafından Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 29.05.2024

Jüri Başkanı	Doç.Dr. Ercan KAYA Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı
Üye	Prof.Dr. Ş. Armağan İNCESULU Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı
Üye	Prof.Dr. M. Kezban GÜRBÜZ Kulak Burun Boğaz Anabilim Dalı

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

Prof. Dr. Atilla Özcan ÖZDEMİR
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince tez hocam ve eğitim sorumlum olarak her aşamada bana destek veren Doç. Dr. Ercan KAYA hocama, bilgi ve deneyimleriyle hayatıma ve mesleğime ışık tutarak yetişmemde büyük emeği olan Prof. Dr. Erkan N. ÖZÜDOĞRU, Prof. Dr. Cemal CİNGİ, Prof. Dr. Ş. Armağan İNCESULU, Prof. Dr. Hamdi ÇAKLI, Prof. Dr. M. Kezban GÜRBÜZ, Doç. Dr. M. Özgür PINARBAŞLI hocalarıma, tüm asistan hekim arkadaşlarıma, hem tez sürecimde hem de hayatımın her anında tüm zorluklarda yanımda olan sevgili eşim Hilal GÜNGÖR'e, beni bugünlere getiren ve hep destekleyen sevgili ailem Nedim GÜNGÖR, Yüksel GÜNGÖR ve canım kardeşim Furkan GÜNGÖR'e, histopatolojik değerlendirmelerde bulunan Patoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Deniz ARIK ve Dr. Öğr. Üyesi Funda CANAZ'a, deney sürecindeki desteklerinden dolayı TICAM Sorumlu Veteriner Hekimi Banu NARİN'e, deneyin fotoğraf çekimlerini yapan Dr. Onur ÖZŞAHİN'e, istatistiksel incelemelerdeki katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Muzaffer BİLGİN'e, tez projeme desteklerinden dolayı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne sonsuz teşekkür, sevgi ve saygılarımı sunarım.

ÖZET

Gungor, E. Tavşanda Adipose-Derived Stem Cells ve Kitosan İçeren Scaffoldun Aurikular Kartilaj Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Deneysel Araştırılması, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kulak Burun Boğaz Hastalıkları Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2024. Kartilaj greft gerekebilen septorinoplasti ve septal perforasyon onarımı cerrahilerinde, greft yeterli miktarda ve uygun formda olmayabilir. Geçmişte otolog greft ihtiyacını karşılamayı, kıkırdağın canlılığını ve dayanıklılığını artırmayı amaçlayan PDS Plate, PRP, Hyoluronik asit, büyüme faktörü enjeksiyonları vb. yöntemler denenmiştir. Bu yöntemlerde istenilen verimin alınamaması, araştırmacıları kök hücre bazlı tedavilere yöneltmiştir. Kök hücre bazlı tedavi ile hasarlı kıkırdak dokusu onarılarak defektlerin kapatılabileceği ve rinoplastide greft olarak ihtiyacın giderilebileceği öngörülmektedir. Bu çalışmanın amacı; kartilaj rejenerasyonunda Adipose-Derived Stem Cells ve Kitosan İçeren Scaffold etkinliğinin deneysel araştırılmasıdır. Çalışmada 8 adet beyaz Yeni Zelanda Albino tipi erkek tavşan kullanıldı. Her tavşanın aurikular kartilajında 6 mm çapında dört defekt oluşturuldu. Bu defektler herhangi bir madde uygulanmayan bir kontrol grubu, ADSC, ADSC+KİS, KİS uygulanan üç çalışma grubu olmak üzere toplamda 4 farklı gruba ayrıldı. Deney 10 haftada tamamlandı. Histopatolojik olarak kartilaj viabilite skoru, periferal kondrosit proliferasyonu ve nukleus kaybı incelendiğinde KİS+ADSC uygulamasının rejenerasyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede artırdığı görüldü. Defekt çapı incelemesinde ADSC ve KİS'in tek başına kullanıldığı gruplarda, kontrol grubuna göre anlamlı derecede rejenerasyon gerçekleştiği gözlendi ancak aralarında anlamlı bir fark görülmedi. ADSC ve KİS, birlikte kullanıldığında ise anlamlı derecede bir sinerjistik etki izlenmedi. Çalışmamız, KİS'in aurikular kartilaj rejenerasyonu üzerine etkisini ortaya koyan literatürdeki ilk çalışmadır. Literatürde eklem kıkırdaklarına uygulanan KİS'in tek başına rejenerasyon sağlamadığı gösterilmişken, çalışmamızda perikondriumlu aurikular kartilajda KİS'in tek başına etkili olabileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: ADSC, kıkırdak greft, kıkırdak perforasyonu, septorinoplasti

ABSTRACT

Gungor, E. Experimental Investigation of the Effect of Adipose-Derived Stem Cells and Chitosan-Based Scaffold on Auricular Cartilage Regeneration in Rabbits, Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Otorhinolaryngology, Medical Specialization Thesis, Eskişehir, 2024. In septorhinoplasty and septal perforation repair surgeries that may require a cartilage graft, the graft may not be large enough and of the appropriate form. In the past, methods such as PDS Plate, PRP, Hyoluronic acid, growth factor injections, etc. have been tried to meet the need for autologous grafts and increase the vitality and durability of cartilage. Failure to obtain the desired efficiency in these methods has led researchers to stem cell-based treatments. It is envisaged that the defects can be closed by repairing the damaged cartilage tissue with stem cell-based treatment and the need for a graft in rhinoplasty can be met. The purpose of this study; It is an experimental investigation of the effectiveness of Adipose-Derived Stem Cells (ADSC) and Chitosan-Based Scaffold (CBS) in cartilage regeneration. In the study, 8 white New Zealand Albino type rabbits were used. Four defects with a diameter of 6 mm were created in the auricular cartilage of each rabbit. These defects were divided into four different groups in total: a control group in which no substance was applied, and three study groups in which ADSC, ADSC+CBS and CBS were applied. The experiment was completed in 10 weeks. When cartilage viability score, peripheral chondrocyte proliferation and nucleus loss were examined histopathologically, it was seen that CBS+ADSC application significantly increased regeneration compared to the control group. In the defect diameter examination, a significant regeneration is observe in the groups in which ADSC and CBS were used alone compared to the control group, but no significant difference is observe between them. When ADSC and CBS were used together, no significant synergistic effect was observed. Our study is the first study in the literature revealing the effect of CBS on auricular cartilage regeneration. While it has been shown in the literature that CBS applied to articular cartilages alone does not provide regeneration, our study showed that CBS alone can be effective in the auricular cartilage with perichondrium.

Key Words: ADSC, cartilage graft, cartilage perforation, septorhinoplasty

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Burun Anatomisi	4
2.1.1. Nasus Externus (Eksternal Burun)	4
2.1.2. Cavitas Nasi (İnternal Burun)	5
2.2. Kıkırdak Dokusu Yapısı	6
2.2.1. Genel Yapısı	6
2.2.2. Perikondrium	7
2.2.3. Kıkırdak Dokusu Tipleri	7
2.2.4. Kıkırdak Rejenerasyonu	10
2.3. Adipose-Derived Stem Cells (ADSC)	11
2.4. Kitosan İçeren Scaffold (KİS)	14
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Deney Hayvanı ve Deney Planı	16

3.2. Çalışma Grupları 16

3.3. Anestezi 17

3.4. Cerrahi Öncesi Hazırlık 17

3.5. Cerrahi Prosedür 18

3.5.1. Yağ Dokusunun Eksizyonu ve ADSC'nin Hazırlanması 18

3.5.2. Kitosan İçeren Scaffoldun Hazırlanması 20

3.5.3. ADSC ve KİS'in Aurikular Kartilaja Uygulanması 21

3.6. Histolojik İnceleme Yöntemleri 25

3.6.1. Işık Mikroskobu İçin Parafin Blokların Hazırlanması 25

3.6.2. Histopatolojik İnceleme 25

3.7. İstatistiksel Analiz 27

4. BULGULAR 28

4.1. Histolojik İnceleme Bulguları 28

4.1.1. Kartilaj Viabilite Skorunun İncelenmesi 28

4.1.2. Fibrozis Derecesi 31

4.1.3. Kondrosit Nükleus Kaybı Miktarı İncelenmesi 32

4.1.4. Periferal Kondrosit Proliferasyonunun İncelenmesi 35

4.1.5. Boşluk Çapının İncelenmesi 39

4.1.6. İnflamasyon Varlığı, Tipi ve Şiddetinin Değerlendirilmesi 42

5. TARTIŞMA 44

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 50

KAYNAKLAR 52

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADSC	Adipose-derived stem cells
BMP-2	Bone morfogenetik proteini-2
BMSC	Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
HGF	Hepatosit growth factor
H&E	Hematoksilen & Eosin
İm	İntramuskuler
Kg	Kilogram
KİS	Kitosan içeren scaffold
Mg	Miligram
Mm	Milimetre
PDGF	Platelet derivated growth factor
PDS	Polidioksanon
PRP	Platelet rich plasma
SMAS	Superficial musculer aponeurotic sistem
SVF	Stroma vasküler fraksiyonu
TGF-β	Transforming growth factor beta
TZF	Trombositten zengin fibrin
VEGF	Vascular endothelial growth factor
µm	Mikrometre
%	Yüzde

ŞEKİLLER

Sayfa

2.1 Kıkırdağın genel yapısı ve perikondrium 6

2.2. Hiyalin kıkırdak dokusu 8

2.3. Elastik kıkırdak dokusu 9

2.4. Fibröz kıkırdak dokusu 10

2.5. Emülsifikasyon ve filtreleme yöntemi ile ADSC elde edilmesi 13

RESİMLER

Sayfa

3.1. İntramuskuler yolla tavşanlara anestezinin verilmesi 17

3.2. ADSC elde etmek için sırt bölgesindeki alanın tıraş edilmesi işlemi 17

3.3. Tavşan sırt bölgesinde cilt altı dokular geçildikten sonraki yağ dokusu 18

3.4. Tavşan sırt bölgesinden alınan yağ dokusunun hazırlanması 19

3.5. Yağ kaynaklı kök hücre aparatı SKIN KIT ile ADSC hazırlanması 19

3.6. ADSC'nin otolog transplantasyona hazır hale getirilmesi 20

3.7. Otolog periferik kan ile BST-CarGel'in karıştırılması 20

3.8. Lokal anestezik Prilocain'in subperikondrial alana uygulanması 21

3.9. Cilt insizyonu ve subperikondrial disseksiyon 21

3.10. Kartilaj eksizyonu ve insizyon yerinin suturasyonu 22

3.11. Eksize edilen kıkırdak parça 22

3.12. ADSC ve KİS uygulanması 23

3.13. Sol kulak: 1. grup, sağ kulak distalden proksimale: 2. 3. 4. grup 23

3.14. Sol kulak: 1. grup, sağ kulak: 2. 3. 4. Grup – 10. haftada görüntüsü 24

3.15. Spesmenlerin kesitlere ayrılması işlemi 24

3.16. Kesitlerin numaralandırılarak fiksasyona hazır hale getirilmesi 25

4.1. KİS+ADSC uygulanan, viabilitesi 4 olan bir preparat 29

4.2. ADSC uygulanan, viabilitesi 5 olan bir preparat 30

4.3. KİS uygulanan, viabilitesi 4 olan bir preparat 30

4.4. Kontrol grubunda, viabilitesi 1 olan bir preparat 31

4.5. KİS uygulanan, minimal fibrozis görülen bir preparat 32

4.6. ADSC uygulanan, şiddetli fibrozis görülen preparat 32

Sayfa

4.7. KİS+ADSC uygulanan, kondrosit nukleus kaybı miktarı 2 olan preparat 34

4.8. ADSC'nin uygulandığı, kondrosit nukleus kaybı miktarı 3 olan preparat 34

4.9. KİS'in uygulandığı, kondrosit nukleus kaybı miktarı 2 olan preparat 35

4.10. Kontrol grubunda, kondrosit nukleus kaybı miktarı 4 olan preparat 35

4.11. KİS+ADSC uygulanan, periferal kondrosit proliferasyonu 3 olan preparat 37

4.12. ADSC'nin uygulandığı, periferal kondrosit proliferasyonu 2 olan preparat 37

4.13. KİS'in uygulandığı, periferal kondrosit proliferasyonu 4 olan preparat 38

4.14. Kontrol grubunda, periferal kondrosit proliferasyonu 1 olan preparat 38

4.15. KİS+ADSC uygulanan, 6 mm'lik boşluk çapı 1.5 mm'ye düşen preparat 40

4.16. ADSC'nin uygulandığı, 6 mm'lik boşluk çapı 1 mm'ye düşen preparat 41

4.17. KİS'in uygulandığı, 6 mm'lik boşluk çapı 2 mm'ye düşen preparat 41

4.18. Kontrol grubunda, 6 mm'lik boşluk çapı 6 mm olarak kaldığı preparat 42

4.19. KİS'in uygulandığı, hafif dereceli inflamasyon saptanan bir preparat 43

GRAFİKLER

Sayfa

4.1. Kartilaj viabilite skoru grafiği 28

4.2. Kondrosit nukleus kaybı grafiği 33

4.3. Periferal kondrosit proliferasyonu grafiği 36

4.4. Boşluk çapı grafiği 39

TABLOLAR

Sayfa

3.1. Histopatolojik kıkırdak viabilite skorlaması 26

4.1. Kıkırdak viabilite skoru istatiksel analizi 28

4.2. Fibrozis skoru istatiksel analizi 31

4.3. Kondrosit nukleus kaybı miktarı istatiksel analizi 33

4.4. Periferal kondrosit proliferasyonunun istatiksel analizi 36

4.5. Boşluk çapının istatiksel analizi 39

4.6. İnflamasyon varlığı, tipi ve şiddetinin istatiksel analizi 42

1.GİRİŞ

Burun, temelde solunum ve koku duyusu organı olmasının yanında, vücudun ısı regülasyonunu sağlamasıyla, solunan havayı yabancı cisim ve mikroorganizmalardan arındırıp nemlendirmesiyle, vücuda giren antijenlere verdiği ilk tepkisiyle, yüzün tam ortasında yer almasıyla, sesin kalitesi üzerinde etkisiyle; fonksiyonel ve estetik açıdan vücudun önemli bir organıdır(1, 2). Yüzün tam ortasında yer alan burun, çıkıntılı yapısıyla travmaya açık konumdadır. Nazal travmalarla ya da gelişimsel olarak ortaya çıkan septum ve nazal deviasyonlar, deformiteler ve geçirilmiş cerrahilere bağlı septum perforasyonları nedeniyle; septoplasti, septorinoplasti ve septum perforasyon onarımı operasyonları kulak-burun-boğaz cerrahlarının en sık yaptığı girişimsel işlemlerdendir. Bu operasyonlarda anatomik ya da edinilmiş deformiteleri hem fonksiyonel hem de estetik açıdan düzeltmek amaçlanır.

Septoplasti / septorinoplasti ameliyatlarında, septum kıkırdağının deviye kısımları eksizyonu yapılırken bir yandan da şerit kartilaj çıkarılarak, bu kartilaj grefti ile burnun deformitelerinin düzeltilmesi amaçlanır. Daha önce geçirilmiş operasyonlar, travma vb. nedenlerden ötürü yeterli greft ihtiyacı sağlanamayabilir. Septal kıkırdak yetersiz veya yapısal olarak zayıf olduğunda, burunun başarılı bir şekilde yeniden yapılandırması güçleşir. Bu durumda uzun vadeli tatmin edici fonksiyonel ve estetik sonuçlara ulaşmak için otolog kıkırdak greft kullanmak septoplasti / septorinoplastinin operasyonlarında önemlidir(3). Otolog greft ihtiyacı bu zamana kadar kulak ve kostal kıkırdaklardan sağlanmaktadır. Kulak kıkırdağı, hedef defektlere göre alınabilen ve uyarlanabilen, kolay erişilebilen bir greft materyali kaynağıdır(4). Kostal kıkırdak ise bolluğu, sertliği ve donör bölgesinin kozmetik açıdan daha az kaygı uyandıran bir bölge olmasıyla sıklıkla tercih edilmektedir(5).

Kıkırdak greftlerin dayanıklılığının, formunun muhafaza edilebilmesi yapılan operasyonlarının uzun dönemde tatmin edici sonuçları açısından çok önemlidir. İdeal kıkırdak grefti, burun rekonstrüktif ortamında dış kuvvetlere dayanabilme, uyumlu doku entegrasyonuna ve hızlı iyileşmeye olanak sağlayan biyolojik olarak aktif olma gibi alıcı bölgenin klinik ihtiyaçlarını karşılayacak özelliklere sahip olmalıdır. Donör sahada morbidite yaratmadan hazır ve erişimi kolay olmalıdır. Ayrıca cerrahi açıdan

bakıldığında greft materyalinin hastaların ihtiyaçlarını karşılayacak kadar büyük olması gerekir. Kıkırdak greftler zaman içerisinde emilim ve hacim kaybına uğrama eğilimindedir. Konulan greftin zamanla canlılığının yitirmesi, septumda sağladığı desteğin kaybolmasına ve nazal deformasyona yol açarak revizyon cerrahi ihtiyacı doğurabilir(6).

Kıkırdak greft ihtiyacını karşılamayı, canlılığını ve dayanıklılığını artırmayı ve kıkırdak rejenerasyonunu sağlamayı amaçlayan PDS Plate, PRP, Hyoluronik asit, fasia veya amniyotik zarla sarmak, büyüme faktörü enjeksiyonları vb. yöntemler denenmiştir(7, 8). Bu yöntemlerde maksimum verimin alınamaması, araştırmacıları kök hücre temelli otolog kıkırdak greft üretimi üzerinde yoğunlaşarak ihtiyacın karşılanabileceği konusuna yöneltmiştir. Kök hücre bazlı tedavi ile hasarlı kıkırdak dokusu onarımı, kıkırdak defektlerin kapatılması ve rinoplastide greft olarak ihtiyacın giderilebileceği öngörülmektedir(9).

En yaygın bilinen kök hücre kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliği hücrelerinin toplanması nispeten yüksek morbidite oranları olan acı verici bir prosedürdür. Yağ kaynaklı kök hücreler (Adipose-Derived Stem Cells – ADSC) ise, yağ dokusundan liposuction veya lipektomi yoluyla kolay elde edilebilen, bol miktarda farklılaşmamış mezenkimal kök hücre kaynağıdır ve yüksek proliferatif potansiyele sahip olması nedeniyle oldukça avantajlıdır(10). ADSC'ler aynı zamanda S-100 proteinleri, kollajen tip II ve Transforming growth factor-β (TGF-β)'nın yüksek düzeyde ekspresyonu ile rejenerasyon sağlanabilmektedir(11).

Kemik iliği kaynaklı kök hücreler ile kıkırdak rejenerasyonunun söz konusu olduğu tedavilerde, kök hücrenin sahada çoğalma ve farklılaşmanın sağlanabileceği ortamın oluşturulması için scaffolddan yararlanılmaktadır. Ortopedik cerrahilerde 'mikrokırık tedavisi' ile dizde kemiğe açılan milimetrik deliklerden, kemik iliğindeki kök hücrelerin dejeneratif kıkırdak dokusunun olduğu alana gelerek kıkırdak rejenerasyonu sağlaması amaçlanır(12). Kıkırdak dokusu rejenerasyonunda önemli rol oynayan perikondriumun rejenerasyon hızı düşük olması nedeni ile, hasarlı kıkırdak alanı tam onarılamadan fibrozis gelişebilmekte ve nedbe dokusu oluşmaktadır. Bu yüzden ADSC ile rejenerasyonun sağlanabilmesinde scaffold önem arz etmektedir.

Sunduğumuz çalışmada amacımız, ADSC ve Kitosan İçeren Scaffold (KİS)'un kıkırdak rejenerasyonu ve kıkırdak greft üretimindeki potansiyelini ortaya koymaktır. Bu amaçla tavşan aurikulasında, ADSC ile kıkırdak hücreleri üretmek ve KİS ile birlikte kullanımında kıkırdak rejenerasyonu üzerine etkisini, fonksiyonelliğini; objektif, deneysel olarak, histokimyasal yollarla göstermeyi planladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Burun Anatomisi

Burun, temelde solunum ve koku duyusu organı olmasının yanında, vücudun ısı regülasyonunu sağlamasıyla, solunan havayı yabancı cisim ve mikroorganizmalardan arındırıp nemlendirmesiyle, vücuda giren antijenlere verdiği ilk tepkisiyle, yüzün tam ortasında yer almasıyla, sesin kalitesi üzerinde etkisiyle; fonksiyonel ve estetik açıdan vücudun önemli bir organıdır(1, 2).

Burun temel olarak yumuşak doku ve kaslarla örtülü; tabanı aşağıda, tepesi yukarıda piramit şeklinde kıkırdak ve kemiklerden oluşmaktadır. Orta hatta, kranial kavite ile oral kavite arasında konumlanmıştır: süperior labiumun süperiorunda, glabella'nın inferiorunda, cavitas nasi'nin önünde, orbita ve maxiller ön duvarların arasında bulunur. Önde nostriller vasıtasıyla yüze, arkada choanae vasıtasıyla nasofarenkse açılır(13). Burun anatomisi internal ve eksternal olarak iki bölüme ayrılır.

2.1.1. Nasus Externus (Eksternal Burun)

Eksternal burun yapısı piramite benzemektedir. Kemikten oluşan üst kısmı kemik çatı, kıkırdaktan oluşan alt kısım ise kıkırdak çatı olarak isimlendirilir. Kemik çatınasal kemikler, maksillanın frontal procesi ve frontal kemiğin nasal spininden oluşur. Nazal kemiklerin frontal kemik (nazal spin) ile birleştiği yer nazion, üst lateral kartilajlarla birleştiği nokta rhinion (K noktası) olarak tanımlanır. Nazion, kemik radiksin en derin noktasıdır. Kıkırdak piramidi oluşturan kıkırdaklar ise septal, sesamoid, üst lateral (upper lateral) ve alar kartilajlardır.

Septal kartilajın şekli dörtgen olup, asıl olarak burun septumunu oluşturur. Ön tarafta membranöz septumdan, arka tarafta vomer ve etmoid kemiğin lamina perpendikülarisine kadar uzanır. Süperior kısımda üst lateral kartilajlara sıkı sıkıya bağlanarak burun sırtının oluşmasına yardımcı olur. Alt kenarı burun apeksinde columellayı yapar.

Nazal kemiklerin hemen kaudalinde üçgen şeklinde üst lateral kartilajlar bulunmaktadır ve üst kenarları nazal kemiklerin altına girmektedir. Nasal kemiğe ve

alar kartilaja fibröz bantlar ile bağlanır. Upper lateral kartilajların medial kenar kısımları ise nasal septumun üst kenarına bağlanır(14).

Alar kartilajlar burunun üçte birlik alt kısmını oluşturur. Uzantıları olan crus laterale ve crus mediale ile "C" şeklinde bir yapıdır. Alar kartilaj; crus laterale ile burun kanatlarının kartilaj iskeletini, crus medialelerin orta hatta birleşmesi ile colummellayı ve aynı zamanda da burun ucunu (nazal tip) oluşturur ve şekillendirir(15). Nazal tip ve supratip bölgelerinin dayanıklılığını ve estetik yapısını da alar kartilajlar sağlar(16). Alar ve üst lateral kıkırdak arasında, fibroareolar bağ dokusu ve değişken sayıda sesamoid kıkırdaklar bulunabilir(17).

Burunun başlıca önemli kasları; musculus proserus, nazalis, levator labi superioris alaque nasi, depressor septi'dir(18).

Deri ile osseokartilajinöz çerçeve arası yumuşak doku, dört katmandan oluşur: deri altı yağ, superficial musculer aponeurotic sistem (SMAS), derin yağ tabakası ve perikondrium. Burun kasları birbirlerine ve diğer nazal yapılara SMAS ile bağlanır(19). Burun derisi kemik çatı üzerinde oldukça incedir, kıkırdak çatı üzerinde ve kranial bölümde kalınlaşır ve kaudal kısımda sebaseöz niteliği artar.

2.1.2. Cavitas Nasi (İnternal Burun)

Nazal kavite, önde nostrillerden arkadaki koanalara kadar uzanmış olan, septum ile ikiye ayrılmış tüp şeklinde bir oluşumdur. Nazal kavitenin tabanının anterior dörtte üçlük bölümünü maksillanın palatin çıkıntısı, posteriorunu ise palatin kemiğin horizontal çıkıntısı yapar. Tavanını ise frontonazal, etmoidal ve sfenoidal kısımlar oluşturur. Nazal kavite tavanının en üst kısmında, çevresinde olfaktör epitelin bulunduğu etmoid kemiğin kribriform laminası yer alır. Her iki nasal pasajın medialini septum, lateral duvarını da konkalar oluşturur.

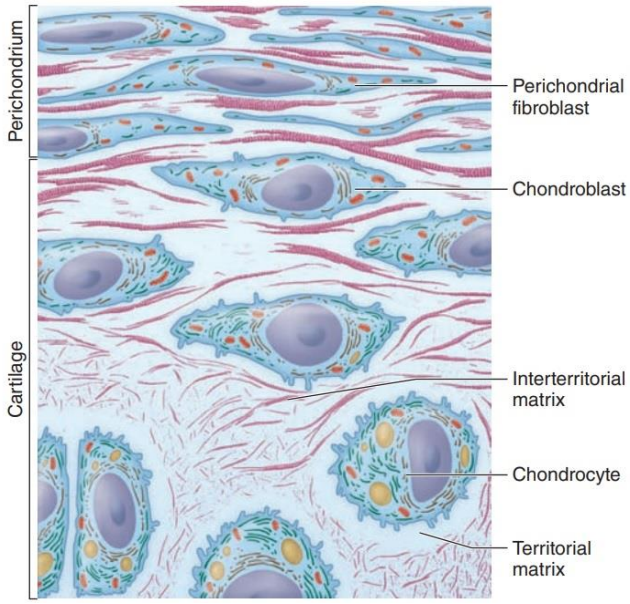
Nazal kavitenin en dar kısmı, üst lateral kartilajların alt kenarları ile septum arasında kalan internal nazal valv bölgesidir. Bu bölge rezistansın en fazla olduğu yerdir. Eksternal nazal valv de; alt lateral kıkırdakların kaudal uç kısımları, buradaki yumuşak doku, membranöz septum ve nostril kenarları ile oluşan bölgedir.

2.2. Kıkırdak Dokusu Yapısı

Kıkırdak ekstraselüler matriksinin kalıcı bir bozulma olmadan dokunun mekanik streslere dayanmasına olanak tanıyan sağlam bir kıvamı vardır. Solunum yolu, kulaklar ve burunda, yumuşak dokuları destekleyen yapıyı oluşturur. Esnekliği ve pürüzsüz, kaygan yüzeyi nedeniyle, iskelet eklemleri içinde yastıklama ve kayma bölgeleri sağlayarak kemik hareketlerini kolaylaştırır.

2.2.1. Genel Yapısı

Kartilaj dokusu, yumuşak dokuları desteklemek için özelleşen bağ dokusudur. Kartilaj dokuları, kondrosit, kondroblast ve bunların sentezlediği proteoglikanlar ve kollajenler, fibrillerden meydana gelen ekstraselüler matriksten oluşur. Ekstraselüler matriks miktarları ve düzenleri, kartilaj tiplerinde farklılık göstermektedir(20). Matriks; kartilaj dokunun esnek olma özelliğini artırıp, fiziksel etkilere karşı kartilaj dokudaki kalıcı oluşabilecek şekil bozukluklarını engeller(21). Kartilaj dokusu öteki destek dokularından farklı olarak, kan damarlarından ve sinirden yoksundur. Matriks kolloidal yapısı burada önem arz eder ve bu yapıyla kondrositlerin beslenmesine olanak sağlar. Matriksi sentezleyip salgılayan kondrositler, matriks içindeki lakuna adındaki çukurlarda yerleşir(22). Tüm kartilaj tiplerinin matriksinde gerilme direnci için kollajen, esneklik için proteoglikanlar ve az miktarda birkaç glikoprotein gibi belli başlı moleküller bulunur(23).



Şekil 2.1. Kıkırdağın genel yapısı ve perikondrium(24)

Tüm kıkırdak türleri sinirlerden, damar desteğinden yoksundur ve kondrositler besinleri çevredeki bağ dokusundaki (perikondrium) kılcal damarlardan difüzyon yoluyla alır. Avasküler bir dokudaki hücrelerden beklenebileceği gibi kondrositler düşük metabolik aktivite sergiler(24).

2.2.2. Perikondrium

Perikondrium, kartilajı çevreleyen, kartilaj ile kartilaj tarafından desteklenen dokular arasında bir arayüz oluşturup, yoğun bağ dokusundan oluşan bir kılıftır(24). Bu tıkız bağ dokusu, insanda eklem kıkırdakları hariç tüm hiyalin kıkırdakları sarar.

Perikondrium mezenşimden gelişmektedir. Perikondriumun dış tarafındaki hücreler fibroblastlara dönüşmekte, fibroblastlar ise kollajenöz yapıda dens karakterde matriks üretmektedir. İç taraftaki hücreler de kondroblast ve prekondroblastlara farklılaşmaktadır. Kartilaj dokusunun apozisyonel büyümesi perikondriumun kondrojenik iç tabakasındaki hücre proliferasyonu ile meydana gelmektedir(25). Kartilaj büyüme ve onarımı için perikondrium çok önemlidir çünkü hem kondrojenik ve hem de osteojenik özelliğe sahiptir(26). Perikondrium tip I kollajen liflerinden zengindir ve yapısında bol miktarda fibroblast bulunur(24).

2.2.3. Kıkırdak Dokusu Tipleri

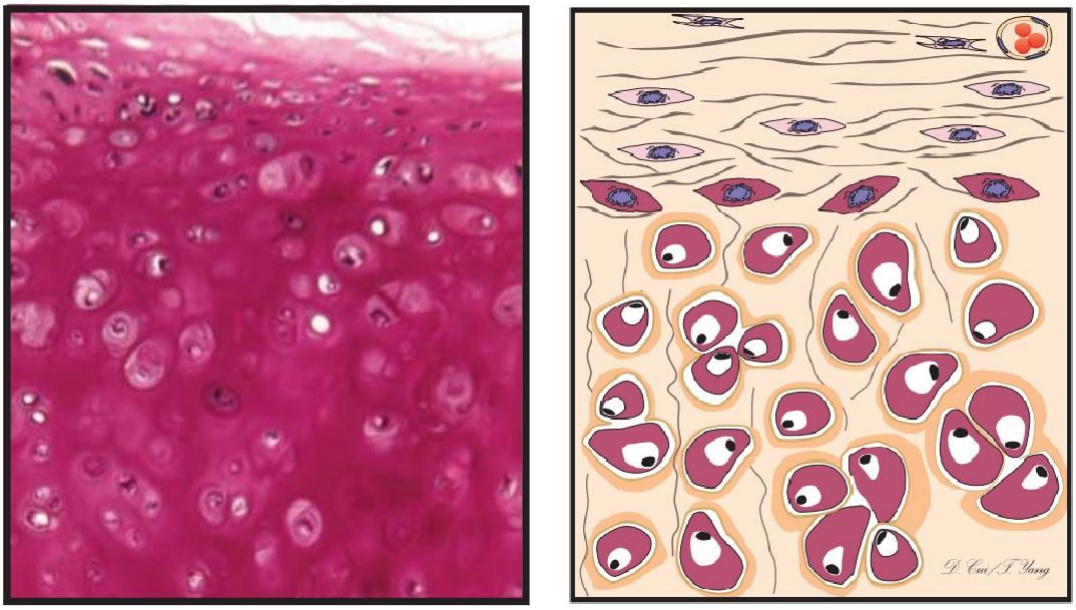
Kartilaj bileşimindeki matriks miktarı ve içerisindeki kollajen ve elastik fibrillerin miktarına göre kartilaj dokusu hiyalin, elastik ve fibröz kartilaj olmak üzere üç farklı tiptedir.

Hiyalin Kıkırdak

İnsan vücudunda en yaygın kıkırdak tipidir. Yapısındaki matriksin, ışığı geçirerek yarı saydam olması sebebiyle ‘hyalos’ yani cam kelimesinden köken alır. Yetişkinlerde hiyalin kartilaj, hareketli eklem eklem yüzeylerinde, solunum yolu duvarlarında (burun, gırtlak, trakea, bronş), sternum ile eklemlendikleri kaburga ventral taraflarında ve epifiz plakalarında bulunur. Epifiz plaklarında uzun kemiklerin boyuna büyümesini sağlar. Embriyoda hiyalin kıkırdak, yavaş yavaş yerini kemiğe bırakan geçici iskeleti oluşturur(24).

Hiyalin kartilaj, açık mavi renktedir, süt benzeri bir görünümdedir. Hiyalin kıkırdağın yapısında yaklaşık olarak %40 oranında Tip 2 kollajen lifli bulunmaktadır.

Bu oran ile ciltteki kollajenin yaklaşık beş katına ulaşmaktadır(20). Kollajen fibrilleri perikondriumdan dokunun derinine doğru uzanır. Hiyalin kıkırdağın elastisitesi çok az olup, yapısındaki kollajen fibriller sayesinde basınca karşı çok dirençlidir. Kondrositleri ovaldir, tek veya birden fazla sayıda lakünler içine konumlanmıştır. Hiyalin kıkırdak metabolizması düşüktür ve rejenerasyonu da oldukça güç olmaktadır(27). Kartilaj hasarı olduğunda perikondriumdaki kondroblastlar hasara uğrayan kısma yönelerek yeni kartilaj oluşumunu sağlarlar. Eklem kıkırdakları haricinde tüm hiyalin kıkırdaklar perikondrium ile örtülüdür.

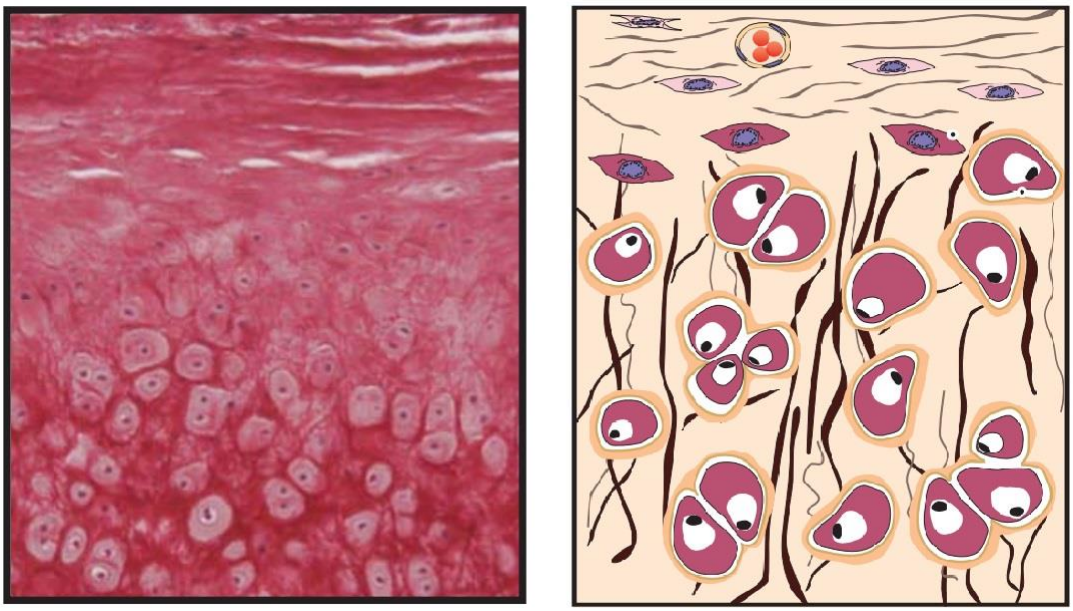


Şekil 2.2. Hiyalin kıkırdak dokusu(28)

Elastik Kıkırdak

Hiyalin kartilaja benzer yapıdadır. Sarımsı renkte olup, kondrositlerin şekilleri de hiyalin kıkırdaktaki kondrositlere benzemektedir ve yine hiyalin kıkırdakta olduğu gibi perikondriuma sahiptir. En önemli özelliği bükülebilme yeteneğidir. Hiyalin kıkırdaktan matriks ve perikondrium yapılarında yoğun elastik lifler olmasıyla farklılık gösterir(23). Elastik lifler, ayrı ayrı hücreler şeklinde veya birkaç adet hücreden oluşmuş izogen gruplar şeklinde bulunur. Kollajen fibriller, hiyalin kartilaj yapısından farklı olarak daha az bulunmaktadır. Elastik kartilajın esnek olmasını sağlayan elastik fibriller matrikste ağ yapmış şekilde dizilirler. Elastik fibriller perikondriumun hemen alt katmanında gevşek şekilde görülür ve özel

boyalarla daha net izlenebilirler. İnsan vücudunda aurikular kartilajda, dış kulak yolu duvarı, östakinin kartilaj kısmı, epiglottis, larinksin küneiform kartilajı elastik kartilaj yapısındadır(21, 24).



Şekil 2.3. Elastik kıkırdak dokusu(28)

Fibröz Kıkırdak

Fibröz kıkırdak, makroskobik olarak bakıldığında grimsi-beyaz renkte görülür. Fibröz kartilaj, tıkız bağ dokusu ile hiyalin kartilaj arasında bir geçiş formundadır. Diğer kıkırdakların aksine perikondrium ile sarılı değildir(21). Fibröz kartilaj tek başına ya da izogen gruplar halinde bulunmakta ve genellikle birbirlerinden kaba tip I kollajen lifler ile ayrılmışlardır. Fibröz kartilaj matriksi çok fazla tip I kollajen içerdiği için asidofildir(22). Matriksinde bolca kollajen içerdiği için de yüksek gerilme direnci gösterir ve insan vücudunda basınca dayanıklı özellikte olması gereken yerlerde bulunur. Embriyonel dönemde fibröz kartilaj yapısına, yetişkinliğe göre daha fazla rastlanmaktadır. Yetişkinlik döneminde ise intervertebral disk, eklem kartilajları, simfizis pubis, tendon-kemik bağlantı yerleri ve femur başı ligamentinde bulunur(21).



Şekil 2.4. Fibröz kıkırdak dokusu(28)

2.2.4. Kıkırdak Rejenerasyonu

Kartilaj metabolik açıdan aktif dokudur ancak içerisinde kondrosit miktarı az olmasından dolayı yapım ve yıkım hızı düşüktür. Bu yüzden tamir kapasitesi sınırlı olup küçük hasarlar bile kalıcı fonksiyon kaybına neden olabilir(29).

Kutanöz yapılarda meydana gelen travmalarda, sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımıyla anjiogenez ve geniş çapta kollajen fibrillerin ve liflerin birikimi gerçekleşir. Skar oluşumu, travmaların ilk 24 saatinde başladığı için, genellikle kartilajların kendini onarmasından daha önce gerçekleşir(30).

Kartilaj gelişmesi interstisyel ve apozisyonel olarak gerçekleşir. Interstisyel olarak mitozla çoğalan kondrositlerle kartilaj dokusunun içinden; apozisyonel olarak da, perikondriumun sahip olduğu kondrojenik aktivitesiyle meydana gelir(24). Her iki çoğalma şekli gelişim çağına dek devam etmektedir. Ancak perikondriumun kondrojenik özelliği nedeniyle herhangi bir kartilaj hasarı durumunda tekrar işlevsel hale geçebilir(31). Kıkırdak oluşumunda ara madde çoğalır. Hücreler tek tek veya gruplar şeklinde ara maddeye dağılırlar. Olgun kartilaj hücreleri olan kondrositler, doku rejenerasyonu gerektiğinde kondroblastlara dönüşerek tekrar sentez yapabilme özelliği kazanırlar(32). Ancak sürekli kesintiye uğrayan matriks üretimi ve hücre

bölünmesi nedeniyle bu yeni sentezlenmiş matriks ve bölünebilen kondrositler defekti kapatmak için yeterli olmaz.

Perikondrium hasara uğramış kartilaj alanında yeni kartilaj dokularını güç bir şekilde ve genellikle de eksik olarak yapmaktadır. Perikondrium olgunlaşmış kartilaja temas ettiği zaman, yeni kartilaj oluşumu inhibe olmaktadır. Ancak yaygın hasara uğramış alanlarda, perikondrium yeni kartilaj oluşturamaz. Bunun sonucunda da defekt yoğun bağ dokusundan oluşan skar dokusu ile kapatılır(22).

2.3. Adipose-Derived Stem Cells (ADSC)

Mezenkimal kök hücreler, ilk olarak kemik iliğinde tanımlanmış olan yetişkin kök hücrelerdir(33). Kök hücreler, kendilerini yenileme yetenekleri ve multipotent özellikleri ile karakterizedir. Kemik iliğinden türetilen kök hücrelerin 1960'lardaki keşiflerinden bu yana tedavi edici, yenileyici özellikleri ile araştırılmaktadır. Kemik iliğinden türetilen mezenkimal kök hücrelerin keşfinden sonra bu hücrelerin aslında hemen her dokudan olduğu anlaşılmış ve tedavi amaçlı olarak; umblical korddan, amniyotik sıvıdan, periferik kandan, diş pulpasından, dermisten ve yağ dokusundan izole edilmiştir(34-36).

Yağ dokusundaki mezenkimal kök hücreler olan ADSC'ler, ilk olarak 2001 yılında tanımlandı ve o tarihten bu zamana doku mühendisliği ve rejenerasyon için hücre kaynağı olarak araştırılmaktadır(37).

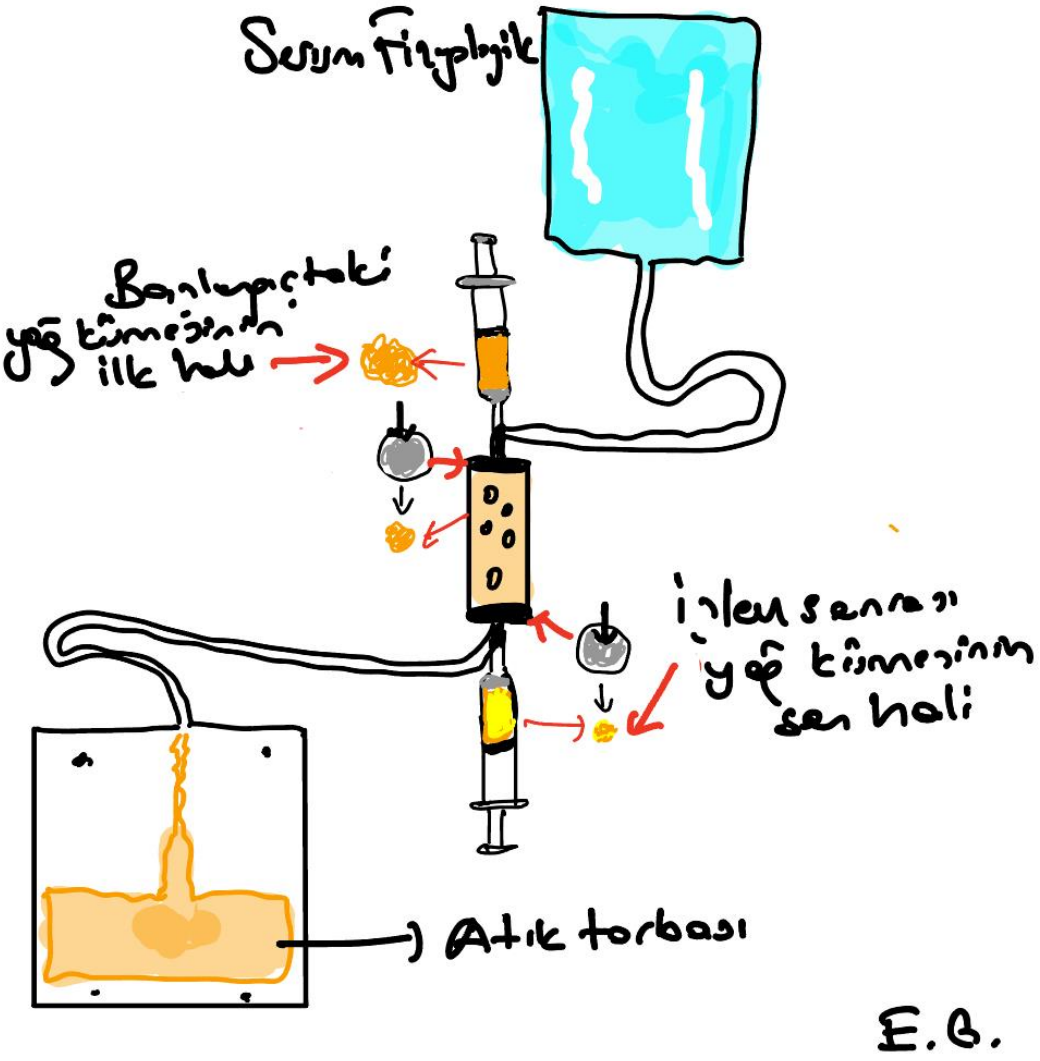
ADSC kaynağı genellikle deri altı yağ dokusu olmaktadır ve karın, uyluk ve koldaki deri altı yağ dokusundan izole edilebilir. İnsan vücudunda bol miktarda yağ dokusu olması nedeni ile yüksek miktarda kök hücre elde edilebilir. ADSC'lerin elde edilmesi, kemik iliğinden kök hücre elde edilmesi işlemine kıyasla daha az acı verici ve morbiditesi düşük bir yöntemdir. Deri altından yağ dokuları lipoaspirasyon yoluyla kolaylıkla elde edilebilir ve bu yöntem adipositlere zarar verirken ADSC'lerin fonksiyonunu etkilemez(38).

Zuk ve arkadaşları(34) 2001 yılında yağ dokusundan ADSC'leri izole etmek için bir yöntem geliştirdi. Yağ dokuları kıyıldıktan sonra kollajenaz tip II ile enzimatik sindirime tabi tutuluyor. Santrifüjden sonra elde edilen stroma vasküler fraksiyonu (SVF) adı verilen petelle elde ediliyor. Bir mililitre SVF'de yaklaşık 2 ila

6 milyon hücre elde edilebilmektedir. SVF, ADSC'leri, endotel hücrelerini, endotel progenitör hücrelerini, perisitleri, düz kas hücrelerini, lökositleri ve eritrositleri içerir(39).

Hem aspire edilen hem de eksize edilen yağ dokuları için, yağ dokusundan kök hücre verimi kemik iliğinden daha yüksektir. Aspire edilen bir gram yağ dokusu yaklaşık 3,5 x 10^5 ila 1 x 10^6 ADSC üretir. Bu, bir gram kemik iliği aspiratından izole edilen 500 ila 5 x 10^4 kemik iliği kaynaklı multipotent kök hücreler ile karşılaştırıldığında oldukça fazladır(40). Bununla birlikte, liposuction ile elde edilmiş yağ dokusundan ayrıştırılan ADSC veriminin, bütün olarak eksize edilmiş yağ dokusundan izole edilenin yaklaşık yarısı kadar olduğu rapor edilmiştir(41). ADSC'ler serum ve dimetilsülfoksit içeren bir ortamda kolayca dondurularak saklanabilir ve ayrıca çoğalması ve farklılaşması, uzun bir süre boyunca dondurularak korunduğu kriyoprezervasyon işleminden de etkilenmez(42).

Adipoz dokusundan ADSC'leri izole etmenin bir diğer şekli ise emülsifikasyon ve filtreleme yöntemdir. Lipoaspiratın şırıngalar arasında karıştırılıp, ürününün filtrelenerek gerçekleştirilmektedir. İlk aşama, tercihen kadınlarda uyluğun yan tarafından, tercihen erkeklerde ise karından adipoz dokunun toplanmasını içeren liposuction işlemidir(43). Adipoz doku, 1 mm yan portlu liposuction kanülü kullanılarak yaklaşık 40-50 ml aspirat alınarak toplanır. İkinci aşama, adipoz dokunun birbirine bağlı iki adet 10 cc'lik şırınga arasında kaydırılmasıyla elde edilen yağın emülsifikasyonunu içerir. Emülsifikasyon ve filtreleme aşaması tamamlandığında ortaya çıkan ürün, yüksek kaliteli mezenkimal kök hücreler açısından zengin, herhangi bir canlı adiposit içermeyen, kullanıma hazır yarı saydam bir sıvıdır(44).



Şekil 2.5. Emülsifikasyon ve filtreleme yöntemi ile ADSC elde edilmesi

ADSC'lerin yağ dokusu içindeki lokalizasyonu henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır, ancak ADSC'lerin, yağ dokusunun damar yapısında olduğu ileri sürülmektedir(45). ADSC'lerin damardaki konumunun endotel ve adipositlerin arasındaki arayüzde olduğu ve ADSC'lerin hem vasküler yapıyı destekleme hem de adiposit oluşturma yeteneğine sahip olduğu sonucuna varan çalışmalar da mevcuttur(46).

ADSC'ler büyüme ve çoğalma özelliği ile osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik veya nörojenik hücrelere farklılaşabilir(47). ADSC'lerin

spesifik büyüme faktörlerinin salgılanması yoluyla doku rejenerasyonunun bir aracısı olduğu da düşünülmektedir. ADSC'ler, temel fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1, hepatosit büyüme faktörleri (HGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü -β1 (TGF-β1) gibi birçok büyüme faktörü salgılar(48). ADSC'lerden salgılanan bu faktörler, hasarlı dokunun iyileşmesini teşvik eder. Ayrıca, ADSC'ler çeşitli türde büyüme faktörü reseptörlerini de eksprese eder ve bu reseptörler büyüme faktörlerine duyarlıdır. Bu sayede ADSC'ler doku yenilenmesine aracılık eder. Nakledilen dokular, başlangıçtaki damar sisteminin eksikliği nedeniyle nakilden hemen sonra hipoksiye maruz kalır ve apoptoz geçirme eğilimi gösterir. Burada ADSC'ler tarafından salgılanan VEGF, b-FGF ve HGF seviyeleri önem kazanır, salgılanan bu faktörlerin anjiogenezi indüklemesi ile hipoksiyi düzelttiği tespit edilmiştir(49).

ADSC'ler trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) reseptörleri α ve β'nın yanı sıra VEGF, HGF, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve bFGF reseptörlerini de eksprese eder. VEGF göçü artırır ve kondrojenik farklılaşmayı teşvik eder(50). Kondrojenik farklılaşma için bunlar önemli ekstraselüler matrix genleri Col2a1 ve Acan, Col9a1, Col27a1 ve Matn1'dir(51).

Vaskülarize olmayan bir alanda ADSC'ler, kondrojenik farklılaşma potansiyele ve yüksek proliferatif kapasiteye sahip uygun bir hücre tipi olarak kabul edilmiştir(52). Çeşitli çalışmalar, ADSC'lerin kondrojenik sürecinin, dönüştürücü büyüme faktörü-β1 (TGF-β1) ve kemik morfogenetik proteini-2 (BMP-2) kullanılarak başarılı bir şekilde yürütülebileceğini göstermiştir(52). Ek olarak, ADSC'ler tarafından salgılanan eksozomlar da biyolojik bir katkı maddesi olarak kıkırdak rejenerasyonu, hücre göçünü ve farklılaşmayı destekleyebilir(53).

Yapılan çalışmalarda, ADSC'lerin kondrojenik yeteneğinin kemik iliği kaynaklı kök hücrelerden (BMSC) daha düşük olduğu, ancak ADSC'lerin BMSC'lerden daha büyük bir proliferatif kapasiteye sahip olduğunu gösterilmiştir(54, 55).

Ayrıca kitosan, fibrin, atelokolajen ve hücresizleştirilmiş kıkırdak bazlı birçok biyomateryal yapı iskelesi, ADSC'lerin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve

farklılaşmasını destekleyebilecek 3 boyutlu bir kültür ortamı sağlamak üzere taşıyıcı olarak kullanılmak üzere araştırılmaktadır(56).

2.4. Kitosan İçeren Scaffold (KİS)

Kıkırdak rejenerasyonu için bir diğer umut verici yöntem biyomateryal bazlı doku mühendisliğidir. Kıkırdak doku mühendisliğinde rejenerasyon için iskele(scaffold) önemli rol oynar; kıkırdak ekstraselüler matriks benzeri mimariyi, uygun mekanik desteği ve biyokimyasal ipuçlarını sağlayabilen bir scaffold tasarlanması; hücre büyümesi ve kıkırdak spesifik ekstraselüler matriks üretimini teşvik etmek için önemlidir(57).

Doğal bir katyonik polisakkarit olarak kitosan, liyofilizasyon işlemi yoluyla scaffold imalatında sıklıkla kullanılmıştır(58). Kıkırdak ekstraselüler matriksinde bulunan glikozaminoglikanlara kimyasal-yapısal benzerliğinin, kıkırdak spesifik bir matrisin sentezini iyileştirdiği kanıtlanmıştır(58, 59). Kondrositler tarafından yeni salgılanan kondroitin sülfatlar, pozitif yüklü kitosan ve negatif yüklü glikozaminoglikanların iyonik komplekslerinin oluşumu yoluyla KİS tarafından yakalanarak ve glikozaminoglikan hidrolizinden de korunmuş olur(60).

Kıkırdak rejenerasyonu için uygulanan KİS'in biyolojik işlevselliğinin, özellikle de pro-kondrojenik potansiyelinin nasıl artırılacağı da önemlidir. Bunun için daha önce kondroitin sülfat, hyaluronik asit ve transforming growth faktör-beta (TGF-β) gibi biyomolekülleri KİS'e yüklenerek kondrojenik aktivite indiklenmiştir(61). Bunun aksine kıkırdak hücresizleştirilmiş matris ile birleştirilmiş scaffoldun kıkırdak matris oluşumunu önemli ölçüde desteklediğini, dolayısıyla herhangi bir eksojen büyüme faktörü kullanmadan kondrojenezi indüklediğine dair kanıtlar da vardır(62, 63).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) 30/12/2022 tarihli ve 922-1/2022 kayıt numaralı onayı ile gerçekleştirildi. Takip süreci, tüm cerrahi ve ötenazi işlemleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (TICAM) uygulanmıştır.

3.1. Deney Hayvanı ve Deney Planı

Planladığımız hayvan modelinde 8 adet sağlıklı Beyaz Yeni Zelanda Albino erkek tavşan kullanıldı. Tavşanların ağırlığı 2500-4000gr, yaşları da 3-4 ay arasındaydı. Tavşanlar, 22 ± 2 C sıcaklıkta ve 12'şer saat karanlık ve aydınlık ortamın sağlandığı kafeslerde (Radon marka tavşan kafesi) barındırılarak takip edildi. Deney sürecinde, sanayi tarafından üretilen yem, taze sebze ve su ile beslenmesi sağlandı.

3.2. Çalışma Grupları

8 adet tavşan kullanıldığı çalışmada, her tavşanın aurikular kartilajında 6 mm çapında dört defekt oluşturuldu. Bu defektler herhangi bir madde uygulanmayan bir kontrol grubu, ADSC, ADSC+KİS, KİS uygulanan üç çalışma grubu olmak üzere toplamda 4 farklı gruba ayrıldı. 4 ayrı grupta da, 8 tavşanın aynı anda cerrahi işlemleri yapılarak, aynı zaman diliminde çalışma gerçekleştirildi.

Grup 1- Aurikuladan kıkırdak çıkarılıp, yerine herhangi bir madde eklenmeden kapatıldı.

Grup 2- Aurikuladan kıkırdak çıkarılıp, çıkarılan kıkırdak boşluğuna yalnızca KİS enjekte edilerek kapatıldı.

Grup 3- Aurikuladan kıkırdak çıkarılıp, çıkarılan kıkırdak boşluğuna ADSC ve KİS enjekte edilerek kapatıldı.

Grup 4- Aurikuladan kıkırdak çıkarılıp, çıkarılan kıkırdak boşluğuna yalnızca ADSC enjekte edilerek kapatıldı.

3.3. Anestezi

Tavşanların genel anestezisi intramuskuler yolla 35 mg/kg Ketamin HCL (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 8 mg/kg Ksilazin HCl (Rompun, Bayer, Almanya) enjeksiyonuyla yapıldı. Anestezinin derinliği ekstremite çekme cevabına bakılarak ölçüldü. Gereklilik halinde başlangıçtaki dozun bir bölü üçü oranda tekrarlayan ilaç uygulaması yapılarak anestezi devamlılığı sağlandı.



Resim 3.1. İntramuskuler yolla tavşanlara anestezinin verilmesi

3.4. Cerrahi Öncesi Hazırlık

Anestezinin derinliği istenilen düzeye ulaştıktan sonra ADSC elde etmek için planlanan tavşan sırt paravertebral bölgesi ve kıkırdak çıkarılarak enjekte edilecek ADSC ve KİS için aurikula ventral yüzünde yeterli cerrahi alan tıraş edildi.



Resim 3.2. ADSC elde etmek için sırt bölgesindeki alanın tıraş edilmesi işlemi

Cerrahi sahalar Povidone-Iodine (Batticon Antiseptik Solüsyon, Adeka, İstanbul-Türkiye) solüsyonu ile boyandı. Cerrahi sahalar steril örtüler ile örtüldü. Cerrahi alana tıraş yapıldıktan sonra, post-op ağrıyı azaltmak amacıyla insizyon alanına lokal anestezi olarak Prilocain (Citanest %2, Astra Zeneca, İstanbul-Türkiye) uygulandı.

3.5. Cerrahi Prosedür

Deney iki cerrahi aşamada gerçekleşti. İlk aşama tavşan sırt paravertebral bölgesindeki yoğun yağ dokusunun, ADSC üretimi amacıyla çıkarılmasıdır. İkinci aşama ise aurikula ventral yüzündeki eşit boyutta kıkırdakların çıkarılarak ADSC ve KİS'in uygulanmasıdır.

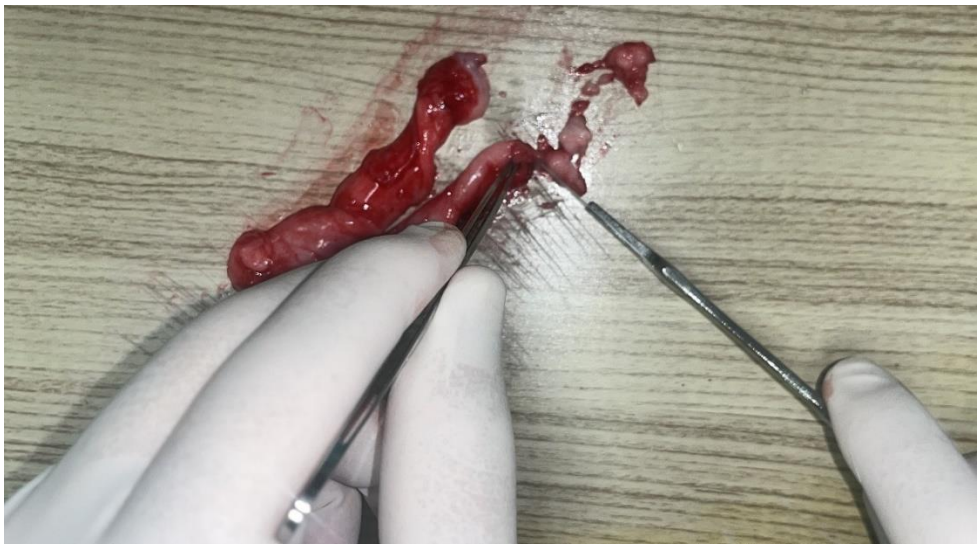
3.5.1. Yağ Dokusunun Eksizyonu ve ADSC'nin Hazırlanması

Tavşan sırt paravertebral bölgesindeki yoğun yağ dokusundan ADSC üretmek amacıyla, tıraş edilen bölgeye bistüri yardımı ile insizyon yapıldı. Cilt ve cilt altı dokular geçilerek yağ dokusuna ulaşıldı.



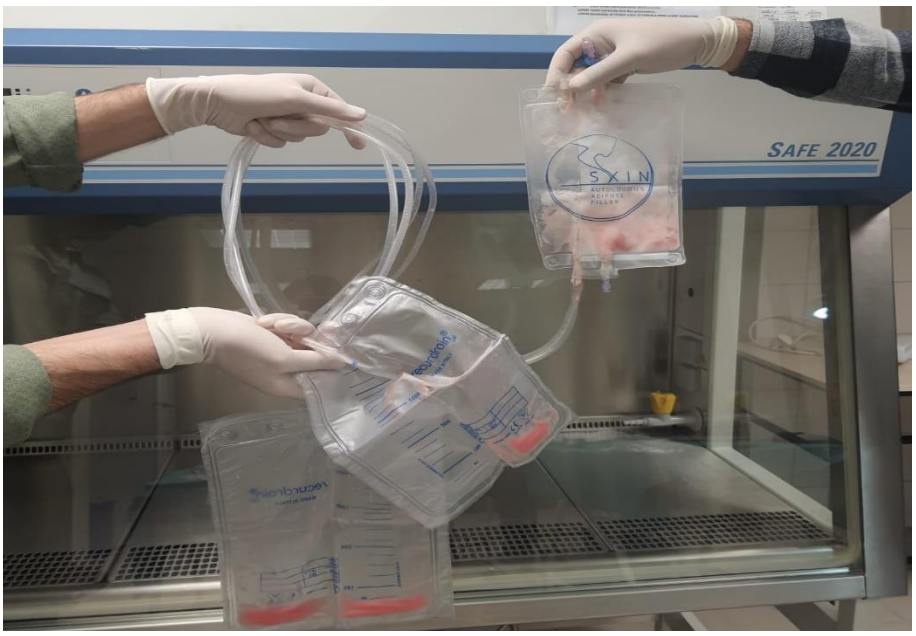
Resim 3.3. Tavşan sırt bölgesinde cilt altı dokular geçildikten sonraki yağ dokusu

Y şeklindeki yağ dokusunun tamamı tüm deney tavşanlarından enblock şekilde çıkarıldı. Çıkarılan yağ dokusu, ADSC üretim sistemine uygun hale getirilmek amacıyla bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrıldı.



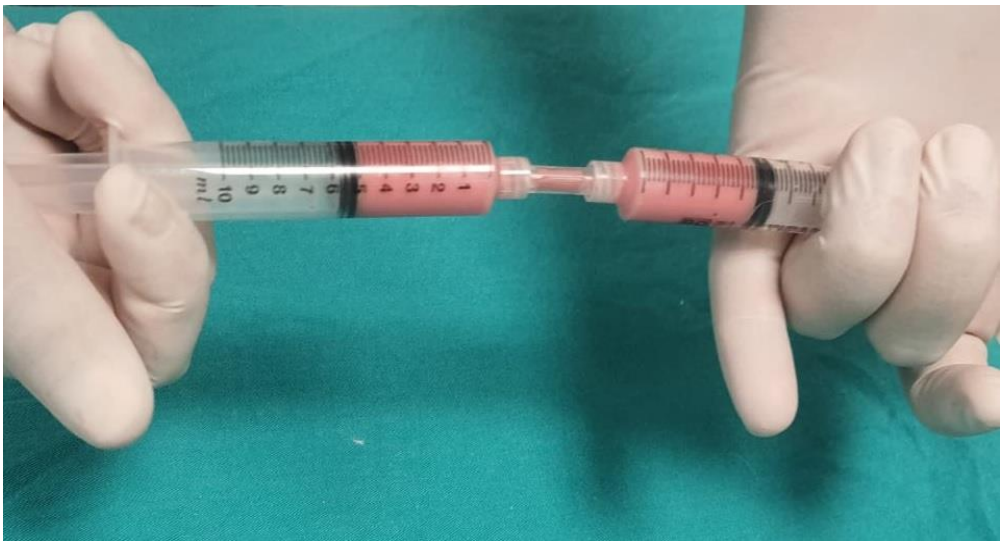
Resim 3.4. Tavşan sırt bölgesinden alınan yağ dokusunun hazırlanması

ADSC üretim sistemine uygun büyüklükte parçalara ayrılan yağ dokusu, yağ kaynaklı kök hücre aparatı SKIN KIT (İNTRAFARMA, İtalya) içerisinden geçirildi.



Resim 3.5. Yağ kaynaklı kök hücre aparatı SKIN KIT ile ADSC hazırlanması

Sistem içerisinde yağ dokusu yıkanarak kan, bağ dokusu ve diğer atıklardan arındırıldı. Yağ kümesi boyutları yaklaşık 0,3 ila 0,8 mm'ye kadar düşürüldü ve yaklaşık olarak 3 ml'lik ADSC otolog transplantasyona hazır hale getirildi.



Resim 3.6. ADSC'nin otolog transplantasyona hazır hale getirilmesi

3.5.2. Kitosan İçeren Scaffoldun Hazırlanması

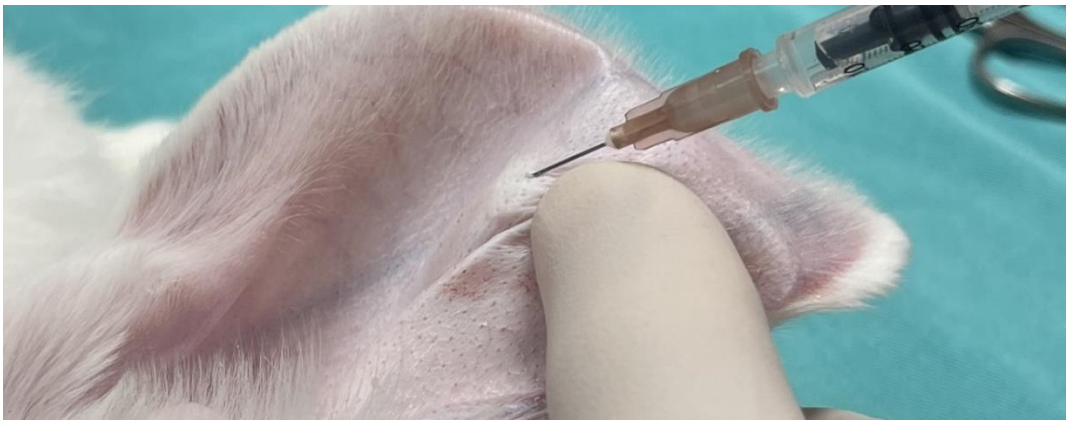
Tavşan santral aurikular arterlerinden 3 ml kan alındı. Kanama yerine bası uygulanarak kanama durduruldu. Ardından KİS için BST-CarGel (Piramal Life Sciences, Bio-Orthopaedic Division, ABD) taze, otolog tam periferik kanla 3:1 oranında (kan:BST-CarGel) manuel olarak karıştırıldı ve kullanıma hazır hale getirildi.



Resim 3.7. Otolog periferik kan ile BST-CarGel'in karıştırılması

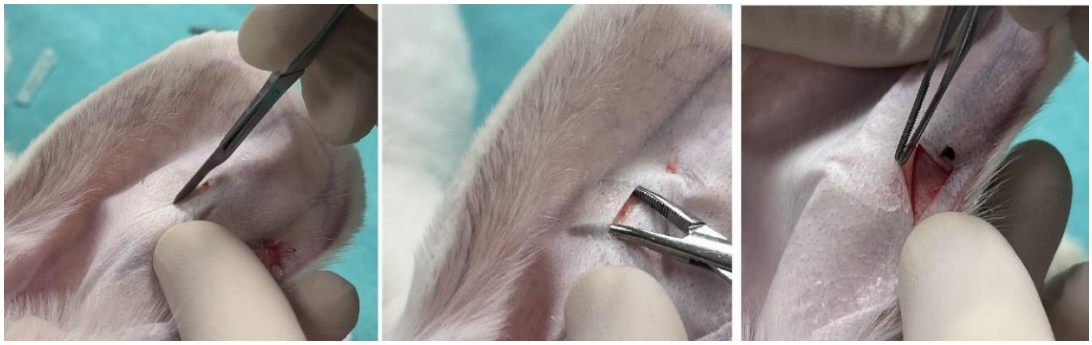
3.5.3. ADSC ve KİS'in Aurikular Kartilaja Uygulanması

Tavşanların her iki kulağında aurikular kartilaja uygulanmak istenen maddeler hazır hale getirildikten sonra, kartilaj üzerindeki cerrahi aşamaya geçildi. Kanama olmaması ve kartilaj beslenmesinin bozulmaması için aurikula üzerinde cerrahi işlemin yapılacağı damarsız ve kıvrımlarının az olduğu alanlar seçildi. Lokal anestezik ilaç Prilocain (Citanest %2, Astra Zeneca, İstanbul-Türkiye) subperikondrial olarak alana uygulandı.



Resim 3.8. Lokal anestezik Prilocain'in subperikondrial alana uygulanması

Lokal anesteziğin uygulandığı kulak ventral yüzünde kıkırdak kıvrımlarının az olduğu yere yaklaşık 1 cm'lik cilt ve cilt altı insizyonlar yapıldı. Cilt flepleri nazik bir şekilde eleve edildi ve subperikondrial diseksiyon yapılıp kartilaja ulaşıldı.



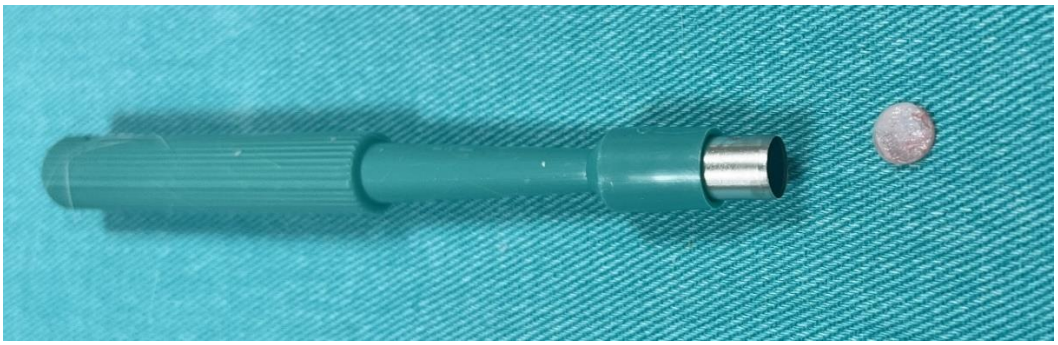
Resim 3.9. Cilt insizyonu ve subperikondrial diseksiyon

Kıkırdaklara subperikondrial elevasyon yapıldıktan sonra, her grupta eşit miktarda kıkırdak eksizyonu yaparak standardize etmek amacıyla 6 mm çapında punch biyopsi (KAI MEDICAL, Kai industries co.ltd, Japonya) aletiyle delik açılıp, içerisinde kalan kartilaj perikondriumu yerinde bırakılarak dışarı alındı. Alan serum fizyolojik ile temizlendi, spanç yardımı ile kurulandı ve insizyona 4-0 Polyglactin 910 (VICRYL; Ethicon Inc.) ile suturasyon yapıldı.

Literatürde, kendiliğinden rejenerasyonu önlemek için 3 mm'lik bir çap, kritik büyüklükteki defekt olarak kabul edilmiştir(64). Bu yüzden 6 mm çapında punch biyopsi aleti kullandık.

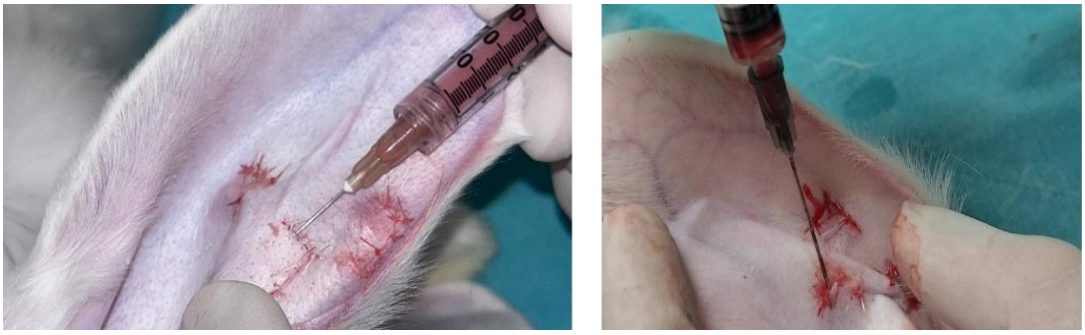


Resim 3.10. Kartilaj eksizyonu ve insizyon yerinin suturasyonu



Resim 3.11. Eksize edilen kıkırdak parça

Kıkırdak eksizyonu her grup için aynı şekilde tekrarlandı. 1. grup her tavşanın sol kulağında, 2. 3. ve 4. grup ise her tavşanın sağ kulağında planlandı. İtina ile yapılan suturasyon sonrası her grup için hazırlanan ADSC ve KİS, kıkırdak defektlere deney gruplarına uygun olarak enjektör yardımıyla 1'er ml uygulandı.



Resim 3.12. ADSC ve KİS uygulanması

Tavşanın sağ kulağında 2. 3. ve 4. gruplar, distalden proksimale doğru aynı sırada uygulandı. Tüm hayvanlarda aynı numaralandırma sistemi kullanıldı. İşlem sırasında grupların birbiri ile ve kontrol grubu ile karışarak yanlış sonuç vermemesi amacıyla aralarında en az birer cm mesafelik sağlam cilt ve eleve edilmemiş perikondirum bırakıldı ve kontrol grubu ayrı kulakta planlandı.



Resim 3.13. Sol kulak: 1. grup, sağ kulak distalden proksimale: 2. 3. 4. Grup

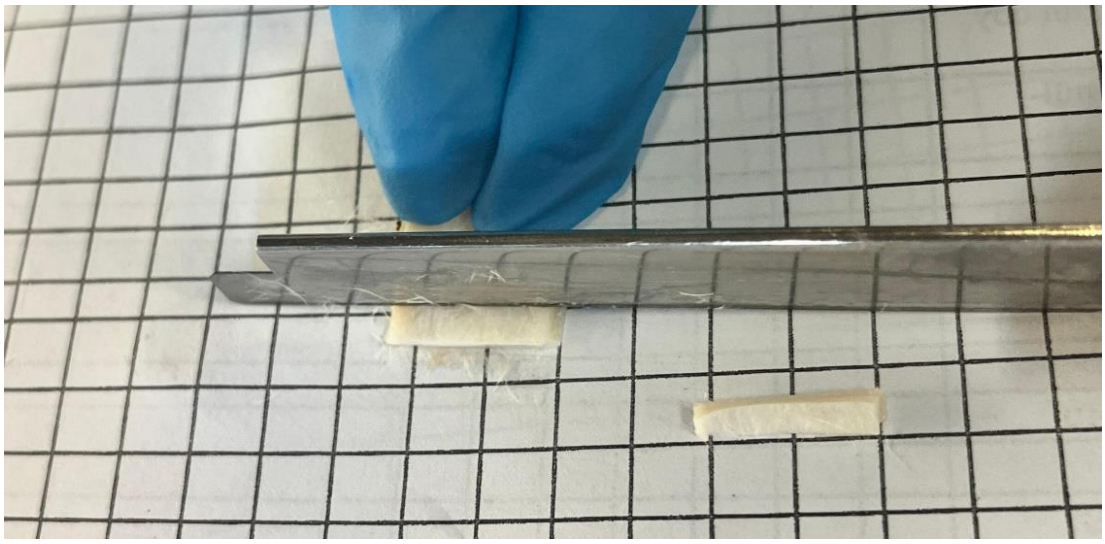
Antibiyotik profilaksisi için cerrahi sonrası dönemde tavşanlara intamuskuler (im) olarak 50 miligram (mg) / kilogram (kg) dozda bir kez seftriakson (Rocephin Im 1 gr, Roche) uygulandı. Postoperatif dönemde cerrahi sahada insizyon yerlerinde

ayrılma, yara yeri enfeksiyonu, hematom, perforasyon gibi bir komplikasyon gözlemlenmedi.

Hayvan modelleri üzerinde geçmişte yapılan çalışmalarda, genel olarak kıkırdak rejenerasyonun 8 ila 12 haftada gözlemlenmesi nedeni ile çalışmanın 10. haftada tamamlanması kararlaştırıldı(65-68). Deney hayvanlarının tamamına 10. hafta sonunda letal dozda (150 mg/kg) tiopental sodyum ile sakrifikasyon yapıldı. Aurikulaların cerrahi işlem yapılan kısımları, sakrifikasyondan hemen sonra kesilerek gruplara ayrıldı ve numara verildi. Alınan spesmenlerin %10 formaldehit ile fiksasyonu yapıldı ve patolojik incelemeye kadar uygun şartlarda muhafaza edildi.



Resim 3.14. Sol kulak: 1. grup, sağ kulak: 2. 3. 4. Grup – 10. Haftada görüntüsü



Resim 3.15. Spesmenlerin kesitlere ayrılması işlemi



Resim 3.16. Kesitlerin numaralandırılarak fiksasyona hazır hale getirilmesi

3.6. Histolojik İnceleme Yöntemleri

3.6.1. Işık Mikroskobu İçin Parafin Blokların Hazırlanması

Malzemeler sırasıyla statik bir vakumlu doku izlem cihazında ve parafin terminalinde dereceli alkollerden geçirildi ve rutin bir yöntem kullanılarak parafine gömüldü. Kızaklı mikrotom bıçağı kullanılarak parafin bloklardan 3-4 µm kalınlığında kesitler elde edildi.

3.6.2. Histopatolojik İnceleme

Çalışmanın histopatolojik hazırlıkları ve değerlendirilme işlemleri ESOGÜ Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı bünyesinde gerçekleştirildi. Histopatolojik değerlendirmelerin tümü deneyimli iki patolog tarafından yapıldı. Hazırlanmış kesitler Hematoksilen ve Eozin ile boyandı. Preparatlara grup isimleri yerine farklı harf ve sayılar yazılarak kodlanma yapıldı. Patologlara preparatların hangi gruba ait olduğu söylenmedi. Preparatlar rastgele şekilde patologlara verildi. Histopatolojik incelemeden önce bu şekilde grupların bilgileri kodlanarak, patolojik inceleme sırasında oluşabilecek subjektif değerlendirmelerin önüne geçilmesi amaçlandı.

Hazırlanan doku örnekleri ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Kartilajın mikro yapısı, kartilaj viabilitesi ve beraberinde uygulandığı ADSC ve KİS sonrası oluşan doku reaksiyonları değerlendirildi. Numuneler yedi parametre ile incelendi.

1. Histopatolojik kıkırdak viabilite skoru

2. Fibrozisin olup olmadığı ve şiddeti

3. Kondrositlerin nükleus kayıpları

4. Periferal kondrosit proliferasyonu

5. Defektlerin fiziki ölçümü

6. İnflamasyonun var olup olmadığı, tipi ve şiddet derecesi

7. Yabancı cisim reaksiyonu incelemesi

Histopatolojik kıkırdak viabilite skoru geçmişte Cakmak ve ark.(69) çalışmasında kullandığı skorlama sistemiyle derecelendirildi. (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. Histopatolojik kıkırdak viabilite skorlama tablosu

Histopatolojik Kıkırdak Viabilite Skoru	Skorlama
Normal-canlı kıkırdak dokusu	Altı
Kıkırdakta fokal rezorbsiyon	Beş
Kıkırdakta multi-fokal rezorbsiyon	Dört
Kıkırdakta yaygın rezorbsiyon	Üç
Kıkırdakta rezorbsiyon ile beraber fokal ossifikasyon	İki
Kıkırdakta rezorbsiyon ile beraber multi-fokal ossifikasyon	Bir
Yaygın ossifikasyon	Sıfır

Kondrosit nukleus kaybı ve periferal kondrosit proliferasyonu skorlama parametreleri:

%0-%25 arası: 1 puan

%25-%50 arası: 2 puan

%50-%75 arası: 3 puan

%75 ve üzeri: 4 puan

Fibrozisin olup olmadığı ve şiddetinin derecesi; minimal(1), orta(2) ve şiddetli(3) şeklinde değerlendirilerek puanlandı.

İnflamasyonun olup olmadığı, akut ya da kronik, inflamasyon tipi tip-1 ve tip-2 şeklinde değerlendirildi. İnflamasyonun şiddeti hafif(1 puan), orta(2 puan) ve şiddetli(3 puan) şeklinde puanlandı.

Kartilaj defekti fiziksel ölçümleri ise kartilajlarda yapılan 6 mm çapındaki deliğin mikroskopik ölçülmesiyle yapıldı. Deney sonucu gözlenen değişikliklerin skorları not edilip sonrasında da istatiksel olarak analiz edildi.

Yabancı cisim reaksiyonu var ya da yok olarak değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Analiz

Preparatlardaki histopatolojik kıkırdak viabilite skorları, inflamasyonun var olup olmadığı, varsa tipi ve şiddeti, fibrozisin varlığı ve ne şiddette olduğu, kondrosit nükleus kaybı, periferik kondrosit proliferasyonu ve defektin fiziki ölçüm parametreleriyle tüm gruplar karşılaştırıldı. Parametrelerin gruplar arası farklılığını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Gruplar arası farklılığın belirlenmesinde Tukey testi, çoklu karşılaştırma testi olarak kullanıldı. Analizlerin tamamı SPSS 21.0 paket programı ile gerçekleştirildi ve $p<0.05$ olasılık değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Hayvan deneyi modelimiz planladığımız gibi 8 hayvan ile tamamlandı. 10 haftalık takipte ölen hayvan olmadı ve hayvanlarda herhangi bir hastalık bulgusu gözlenmedi.

4.1. Histolojik İnceleme Bulguları

Çalışmada tüm parametreler KİS (grup 2), KİS + ADSC (grup 3) ve ADSC (grup 4) gruplarında değerler birbirleri ile ve kontrol (grup 1) grubuyla karşılaştırıldı.

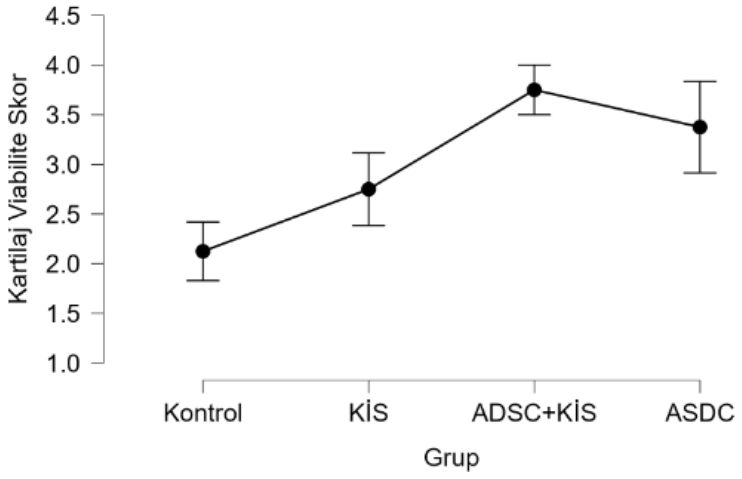
4.1.1. Kartilaj Viabilite Skorunun İncelenmesi

Kıkırdak viabilite skoru Çakmak ve ark. geçmişte çalışmalarında kullandığı şekilde belirlendi(69).

Tablo 4.1. Kıkırdak viabilite skoru istatiksel analizi

	Kontrol (1) ort.±ss	**KİS (2)** ort.±ss	**KİS+ADSC (3)** ort.±ss	**ADSC (4)** ort.±ss	**p***	**Çoklu Karşılaştırma p****
Kartilaj Viabilite Skoru	2,13±0,83	2,75±1,04	3,75±0,71	3,38±1,30	**0,015**	**1 – 3: 0,014**

* Tek Yönlü Varyans Analizi
** Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi



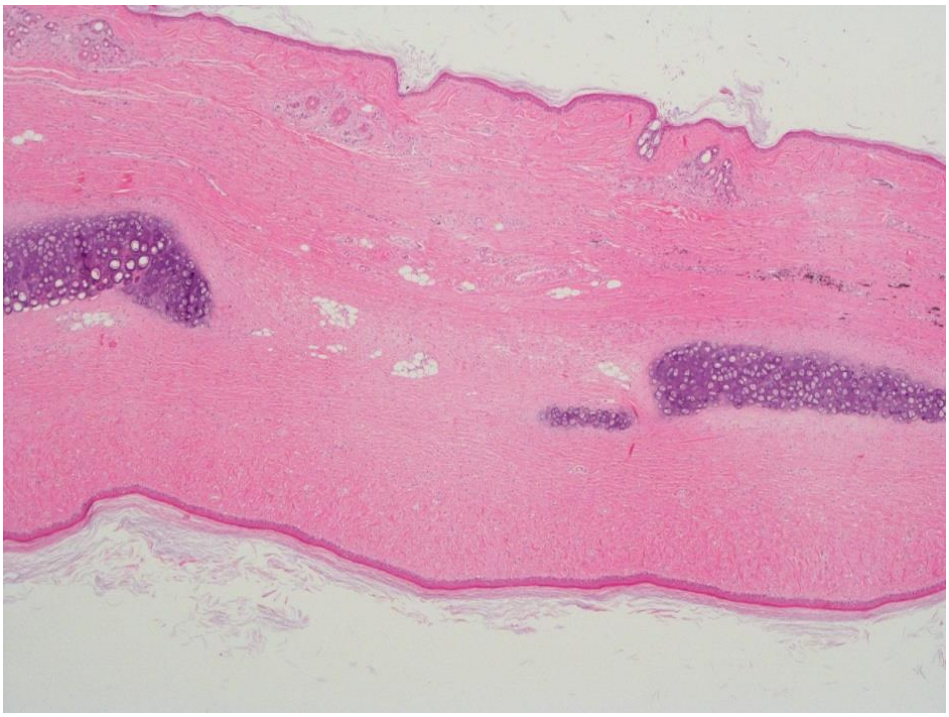
Grafik 4.1. Kıkırdak viabilite skoru grafiği

Kıkırdak viabilite skoru değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu belirlenmiştir (p=0.015).

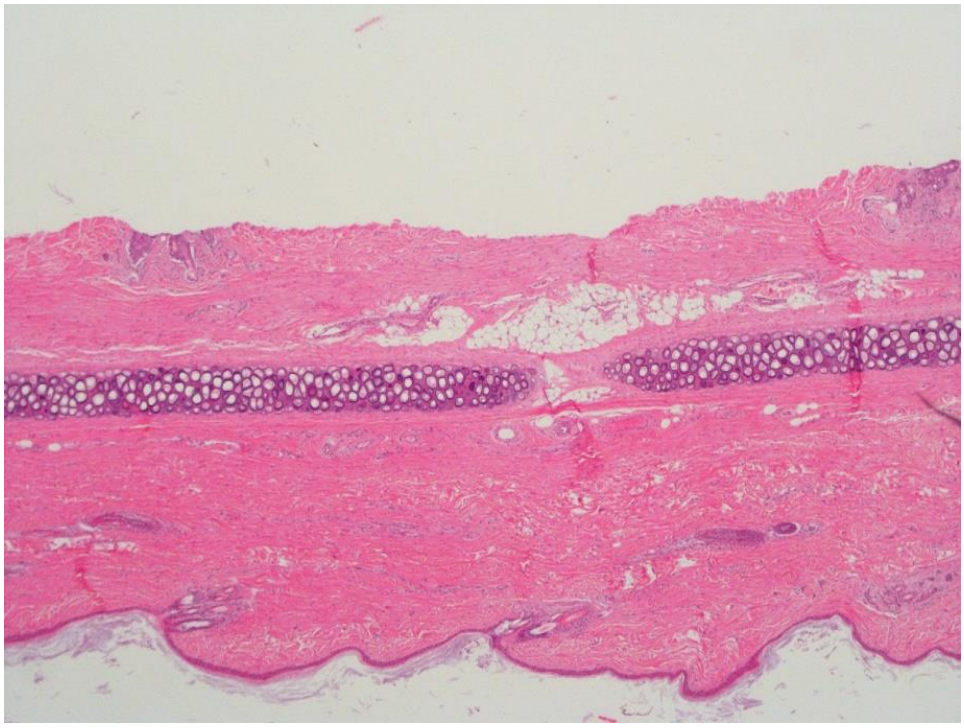
Histopatolojik kartilaj viabilite skoru, istatiksel analizi sonucunda KİS+ADSC uygulanan grup (grup 3) ile kontrol grubu (grup 1) arasında anlamlı derecede fark elde edildi (1-3: p=0.014). Her iki grup karşılaştırıldığında KİS ve ADSC birlikte kullanıldığı grupta kıkırdak viabilite skorunun istatiksel olarak anlamlı derecede yükseldiği görüldü.

En yüksek viabilite skorları, KİS ve ADSC (grup 3) birlikte kullanımında saptandı. Yalnızca bu grupta, iki deney hayvanının viabilite skoru 5 olduğu görüldü.

Yalnızca KİS (grup 2) veya yalnızca ADSC (grup 4) uygulanan gruplarda ise histopatolojik kartilaj viabilite skorunun kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı olmasa dahi; kontrol grubuna göre viabilite skorunun yüksek olduğu saptandı. (KİS+ADSC (3,75) > ADSC (3,38) > KİS (2,75) > kontrol (2,13)).



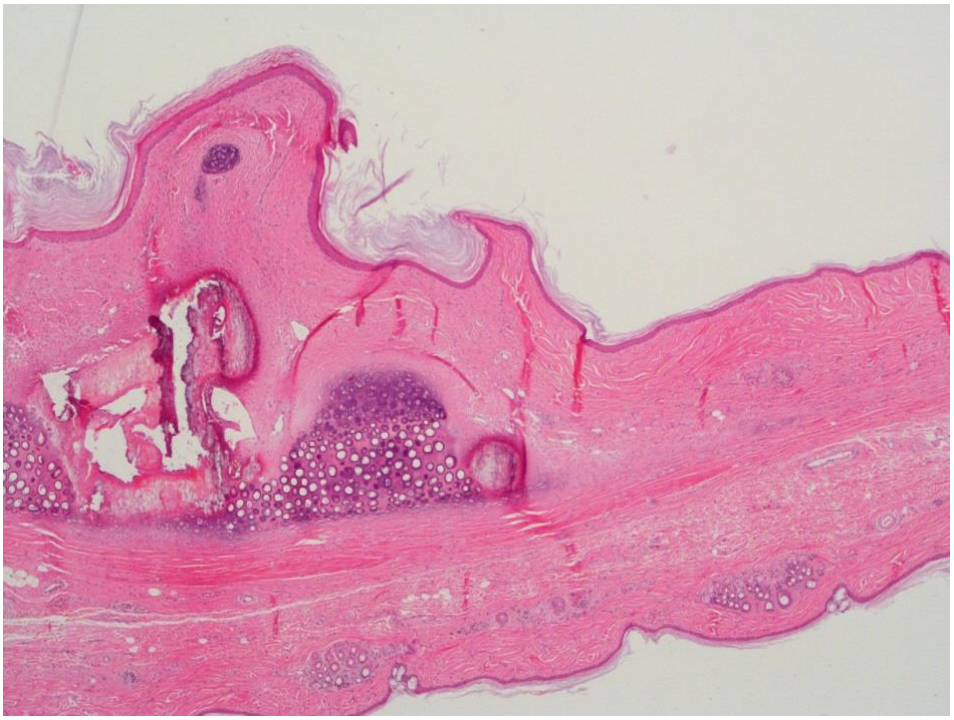
Resim 4.1. KİS+ADSC uygulanan, viabilitesi 4 olan bir preparat (H&E, x40)



Resim 4.2. ADSC uygulanan, viabilitesi 5 olan bir preparat (H&E, x20)



Resim 4.3. KİS uygulanan, viabilitesi 4 olan bir preparat (H&E, x40)



Resim 4.4. Kontrol grubunda, viabilitesi 1 olan bir preparat (H&E, x20)

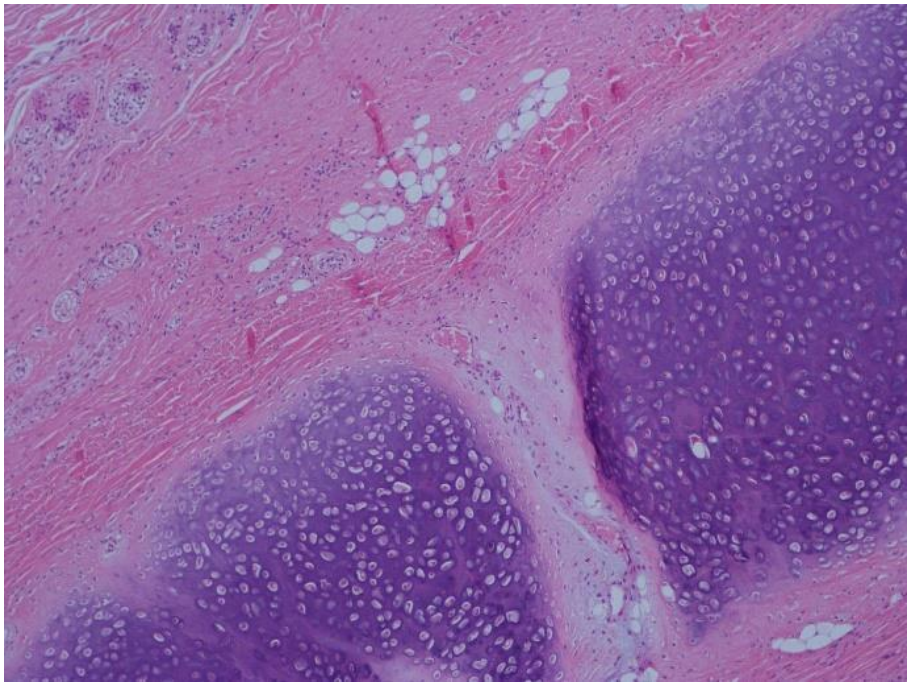
4.1.2. Fibrozis Derecesi

Fibrozis varlığı incelendiğinde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p=0,964). Tüm gruplarda çoğunlukla minimal dereceli fibrozis görüldü, yalnızca bir preparatta şiddetli fibrozis izlendi.

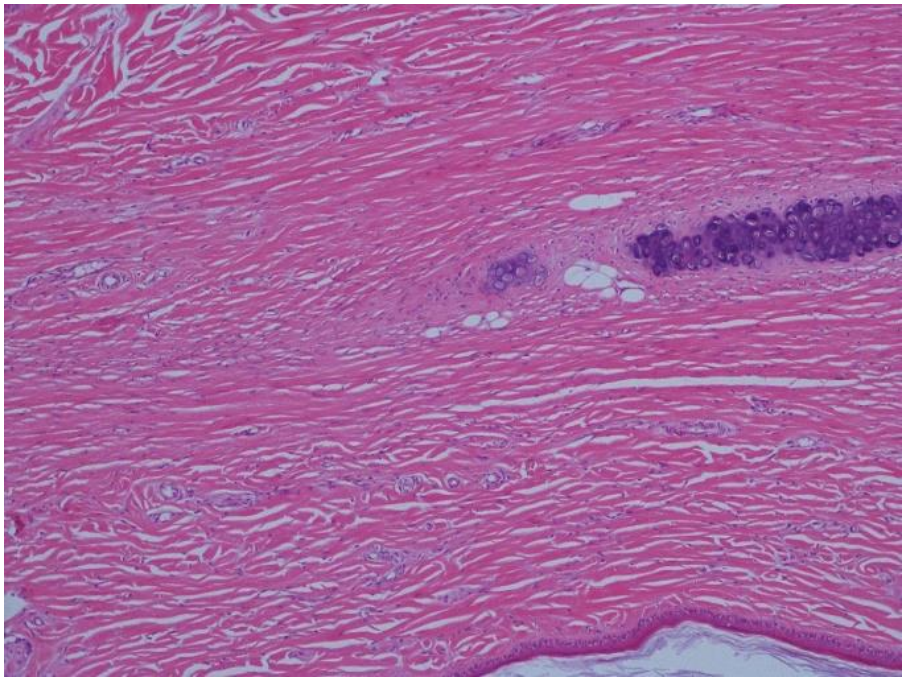
Tablo 4.2. Fibrozis skoru istatiksel analizi

	Kontrol (1) ort.±ss	**KİS (2)** ort.±ss	**KİS+ADSC (3)** ort.±ss	**ADSC (4)** ort.±ss	**p***	**Çoklu Karşılaştırma p****
Fibrozis	1,37±0,51	1,37±0,52	1,37±0,74	1,50±0,53	0,964	-

* Tek Yönlü Varyans Analizi
** Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi



Resim 4.5. KİS uygulanan, minimal fibrozis görülen bir preparat (H&E, x100)



Resim 4.6. ADSC uygulanan, şiddetli fibrozis görülen preparat (H&E, x100)

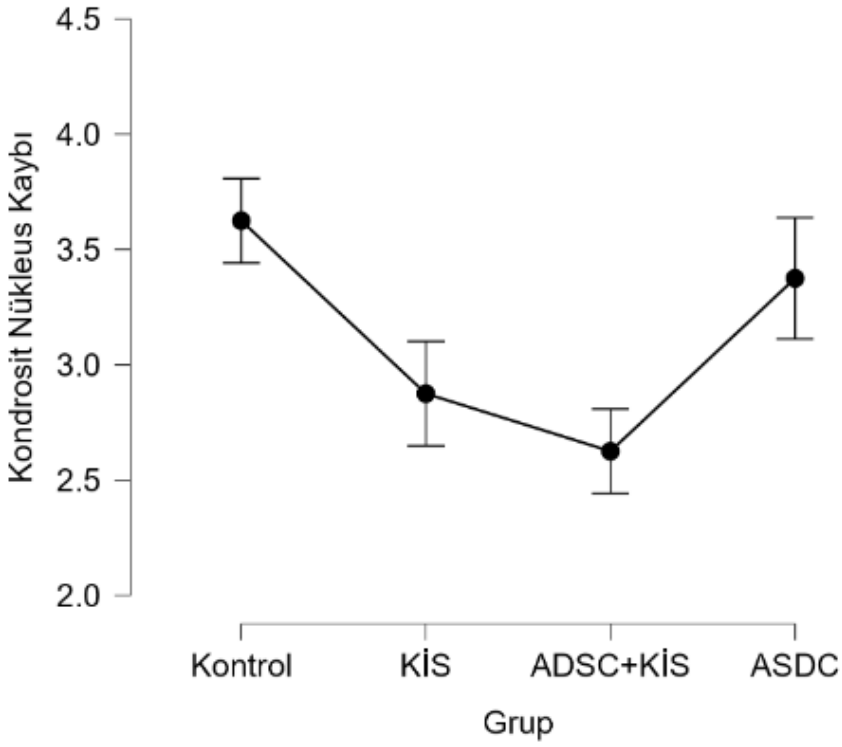
4.1.3. Kondrosit Nukleus Kaybı Miktarı İncelemesi

Histopatolojik kondrosit nukleus kaybı miktarı değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu belirlenmiştir (p=0.011).

Tablo 4.3. Kondrosit nukleus kaybı miktarı istatiksel analizi

	Kontrol (1) ort.±ss	**KİS (2)** ort.±ss	**KİS+ADSC (3)** ort.±ss	**ADSC (4)** ort.±ss	**p***	**Çoklu Karşılaştırma p****
Kondrosit Nükleus Kaybı	3,62±0,51	2,87±0,64	2,62±0,51	3,37±0,74	**0,011**	**1 – 3: 0,014**

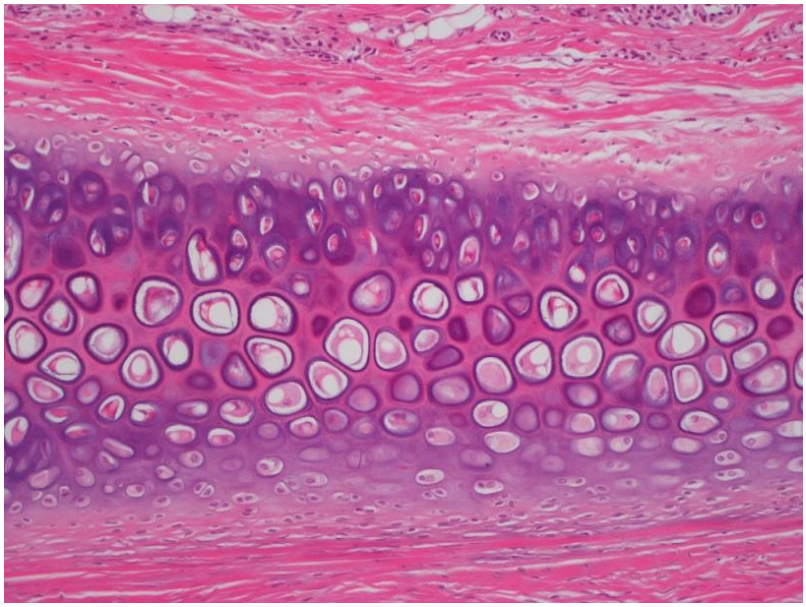
* Tek Yönlü Varyans Analizi
** Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi



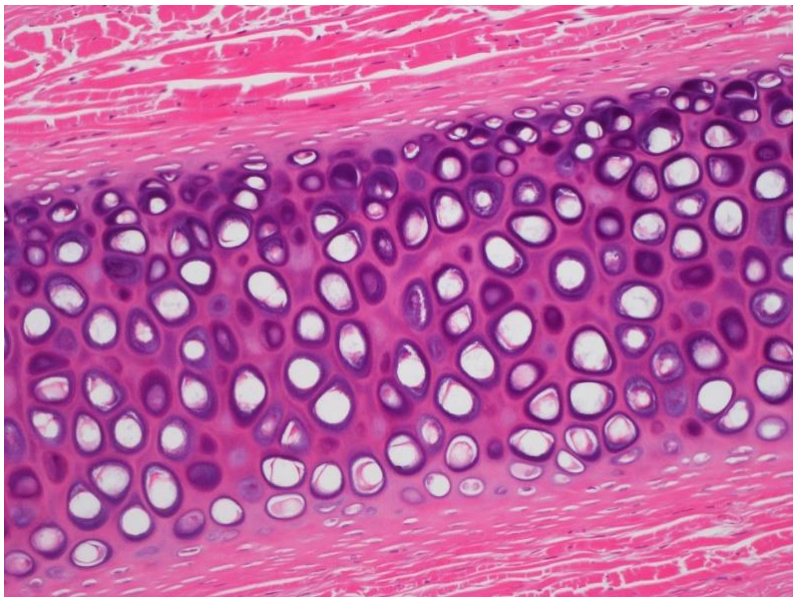
Grafik 4.2. Kondrosit nukleus kaybı grafiği

Histopatolojik kondrosit nukleus kaybı miktarının, istatiksel analizi sonucunda KİS+ADSC uygulanan grup (grup 3) ile kontrol grubu (grup 1) arasında anlamlı derecede fark elde edildi (1-3: p=0.014). Her iki grup karşılaştırıldığında KİS ve ADSC birlikte kullanımı sonrası histopatolojik kondrosit nukleus kaybı miktarında istatiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu görüldü. En düşük kondrosit nukleus kaybı, KİS ve ADSC (grup 3) birlikte kullanımında saptandı.

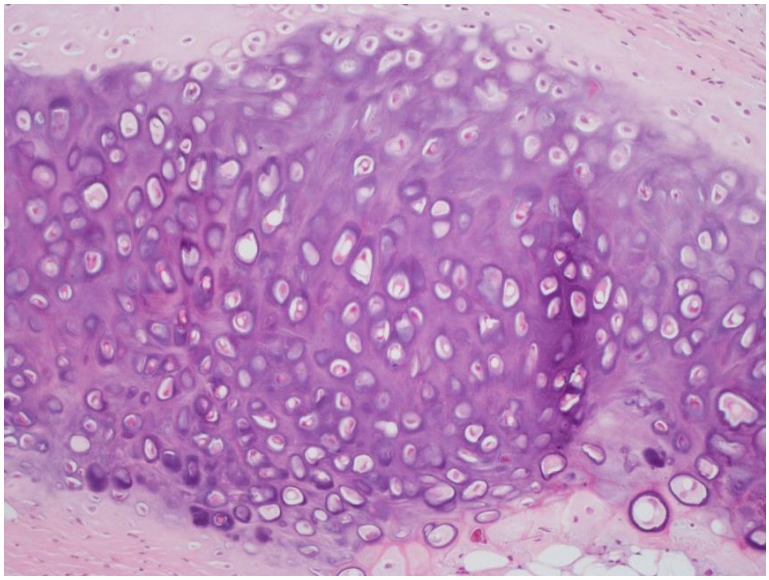
Yalnızca KİS (grup 2) veya yalnızca ADSC (grup 4) uygulanan gruplarda ise kondrosit nukleus kaybı miktarının kendi aralarında ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı olmasa dahi; kontrol grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. (Kontrol (3,62) > ADSC (3,37) > KİS (2,87) > KİS+ADSC (2,62)).



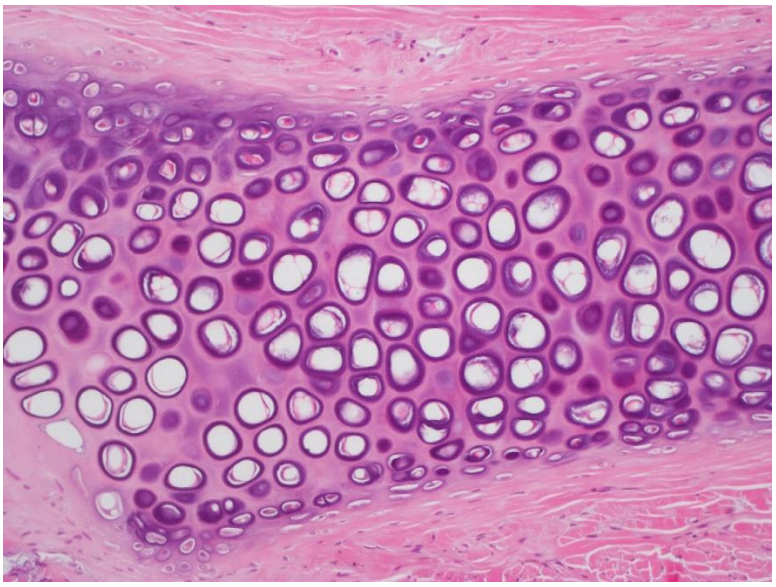
Resim 4.7. KİS+ADSC uygulanan, kondrosit nukleus kaybı miktarı 2 olan bir preparat (H&E, x20)



Resim 4.8. ADSC uygulanan, kondrosit nukleus kaybı miktarı 3 olan bir preparat (H&E, x20)



Resim 4.9. KİS uygulanan, kondrosit nukleus kaybı miktarı 2 olan bir preparat (H&E, x20)



Resim 4.10. Kontrol grubunda, kondrosit nukleus kaybı miktarı 4 olan bir preparat (H&E, x20)

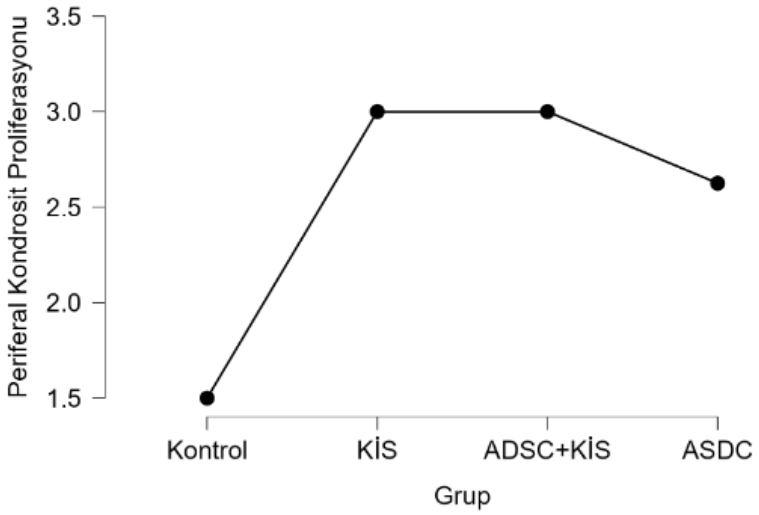
4.1.4. Periferal Kondrosit Proliferasyonunun İncelenmesi

Histopatolojik periferal kondrosit proliferasyonu değerlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu belirlenmiştir (p=0.004).

Tablo 4.4. Periferal kondrosit proliferasyonu istatiksel analizi

	Kontrol (1) ort.±ss	**KİS (2)** ort.±ss	**KİS+ADSC (3)** ort.±ss	**ADSC (4)** ort.±ss	**p***	**Çoklu Karşılaştırma p****
Periferal Kondrosit Proliferasyonu	1,50±0,53	3,00±0,92	3,00±0,53	2,62±1,18	**0,004**	**1 – 2: 0,007** **1 – 3: 0,008**

* Tek Yönlü Varyans Analizi
** Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi

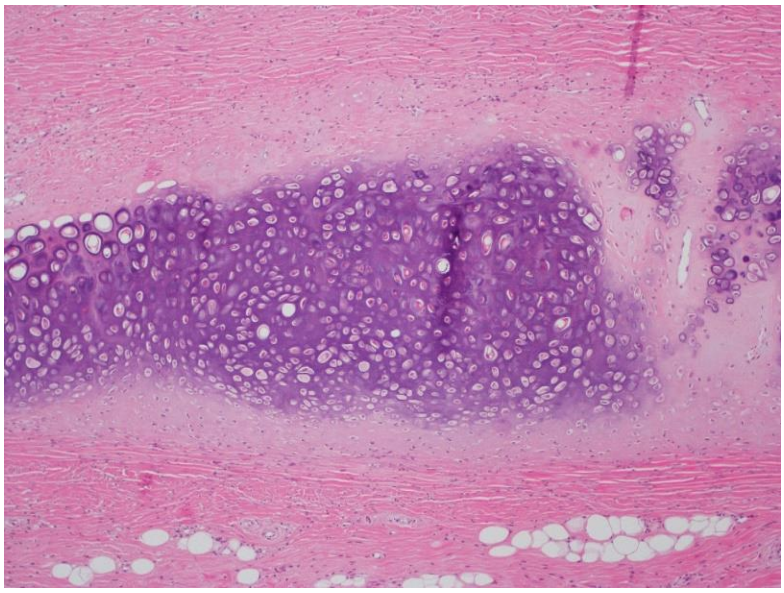


Grafik 4.3. Periferal kondrosit proliferasyonu grafiği

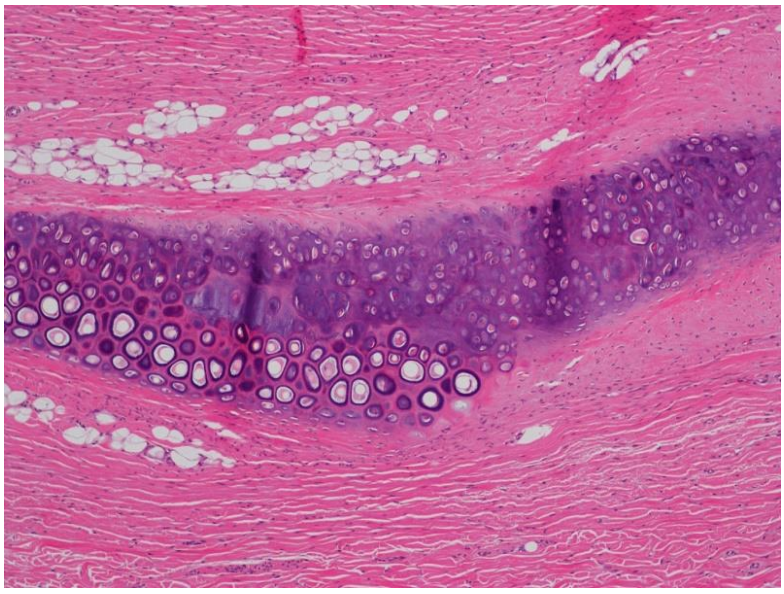
Histopatolojik periferal kondrosit proliferasyonu değerlerinin istatiksel analizi sonucunda, KİS+ADSC uygulanan grup (grup 3) ile kontrol grubu (grup 1) arasında ve yalnızca KİS uygulanan grup (grup 2) ile kontrol grubu (grup 1) arasında anlamlı derecede fark elde edildi (1-3: p=0,008, 1-2: p=0,007). Her iki grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KİS ve ADSC birlikte kullanımı ve yalnızca KİS kullanımı sonrası histopatolojik periferal kondrosit proliferasyonu değerleri istatiksel olarak anlamlı derecede yükselme olduğu saptandı.

En yüksek periferal kondrosit proliferasyonu değerleri, KİS ve ADSC (grup 3) birlikte kullanımında ve yalnızca KİS uygulandığında (grup 2) saptandı.

Yalnızca ADSC (grup 4) uygulanan gruplarda ise histopatolojik periferal kondrosit proliferasyonu değerlerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatiksel olarak anlamlı olmasa dahi; kontrol grubuna göre periferal kondrosit proliferasyonu değerlerinin yüksek olduğu saptandı. (KİS+ADSC (3,00) = KİS (3,00) > ADSC (2,62) > kontrol (1,50)).



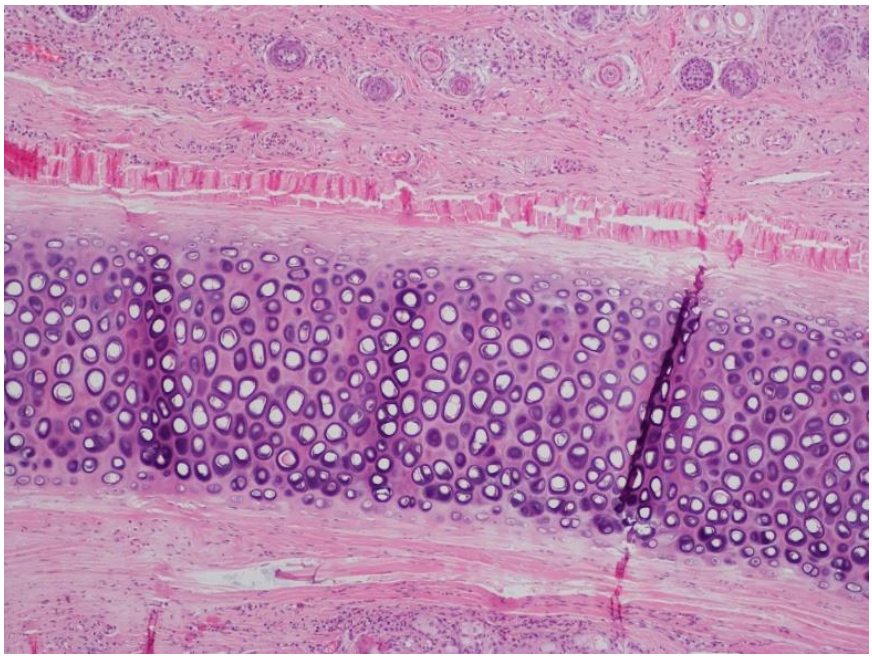
Resim 4.11. KİS+ADSC'nin uygulandığı, periferal kondrosit proliferasyonu 3 olan bir preparat (H&E, x10)



Resim 4.12. ADSC'nin uygulandığı, periferal kondrosit proliferasyonu 2 olan bir preparat (H&E, x10)



Resim 4.13. KİS'in uygulandığı, periferal kondrosit proliferasyonu 4 olan bir preparat (H&E, x10)



Resim 4.14. Kontrol grubunda, periferal kondrosit proliferasyonu 1 olan bir preparat (H&E, x10)

4.1.5. Boşluk Çapının İncelenmesi

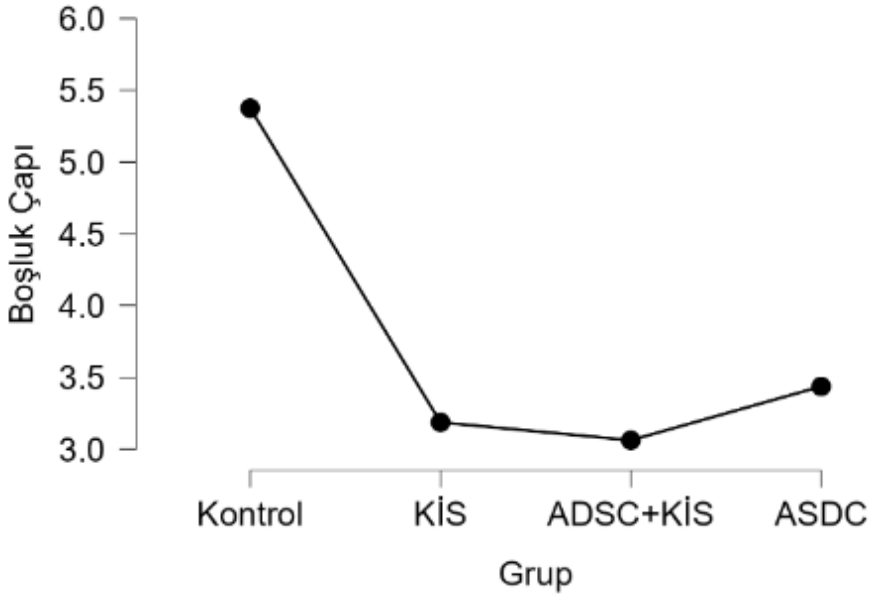
Histopatolojik boşluk çapının incelemesinde, değerlerin gruplar arası karşılaştırılmasında en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

Tablo 4.5. Boşluk çapının istatiksel analizi

	Kontrol (1) ort.±ss	**KİS (2)** ort.±ss	**KİS+ADSC (3)** ort.±ss	**ADSC (4)** ort.±ss	**p***	**Çoklu Karşılaştırma p****
Boşluk Çapı	5,37±0,51	3,18±1,03	3,06±0,90	3,43±1,45	**<0,001**	**1 – 2: 0,001** **1 – 3: <0,001** **1 – 4: <0,001**

* Tek Yönlü Varyans Analizi
** Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi

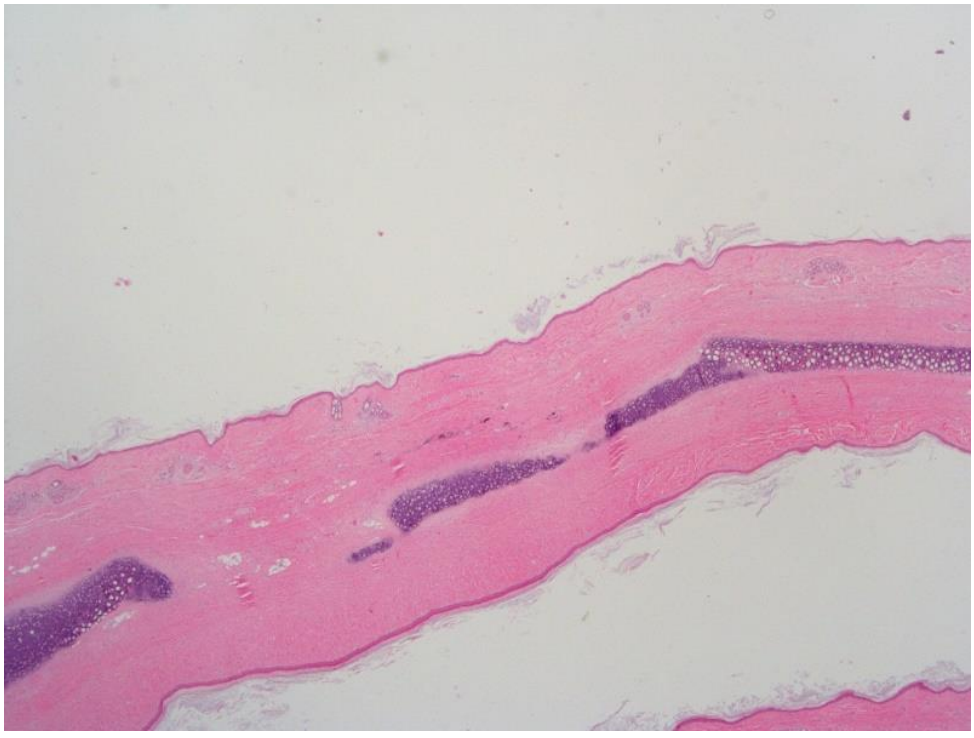
Boşluk çapı, kontrol grubunda %10.5, KİS grubunda %47, ADSC+KİS grubunda %49, ADSC grubunda %42.83 oranında azaldı. (6 mm'den boşluk çapı çıkarılıp, 6 mm'ye oranlanarak hesaplanmıştır.)



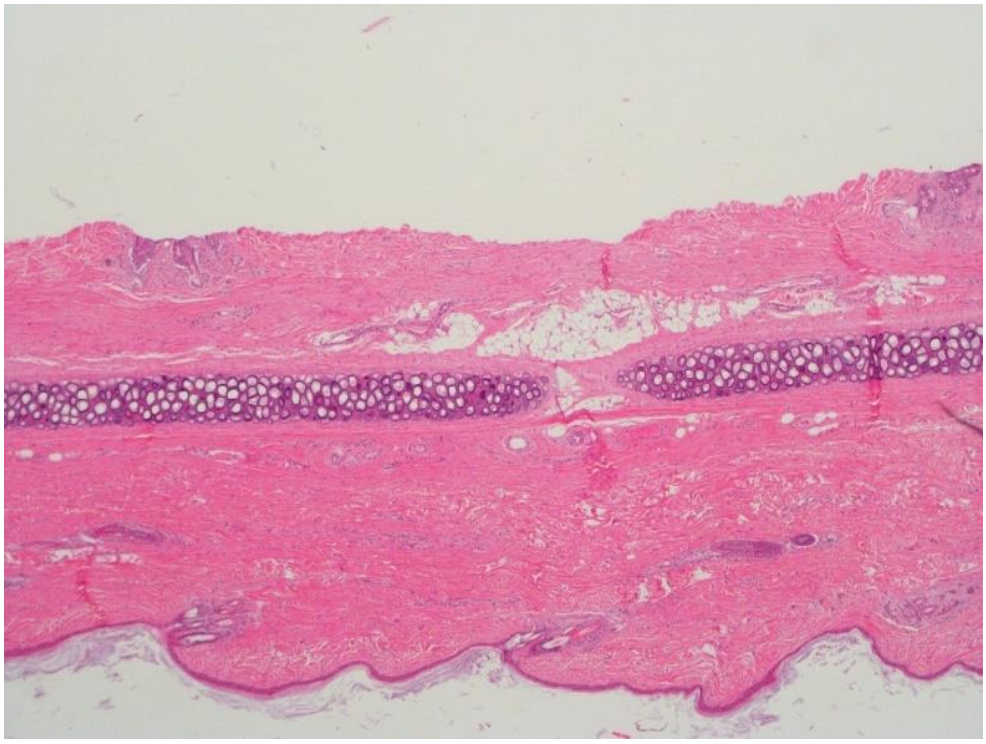
Grafik 4.4. Boşluk çapı grafiği

Histopatolojik boşluk çapının incelemesinde, istatiksel analizi sonucunda tüm çalışma gruplarında (grup 2, 3 ve 4) ile kontrol grubu (grup 1) arasında anlamlı derecede fark elde edildi (1-2: $p=0.001$, 1-3: $p<0.001$, 1-4: $p<0.001$). Üç çalışma grubu da karşılaştırıldığında KİS ve ADSC'nin birlikte veya ayrı ayrı uygulanması sonrasında oluşturulan 6 mm'lik boşluğun istatiksel olarak anlamlı derecede küçüldüğü saptandı. Ancak çalışma gruplarının (grup 1, 2 ve 3) kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi. ($p>0.05$)

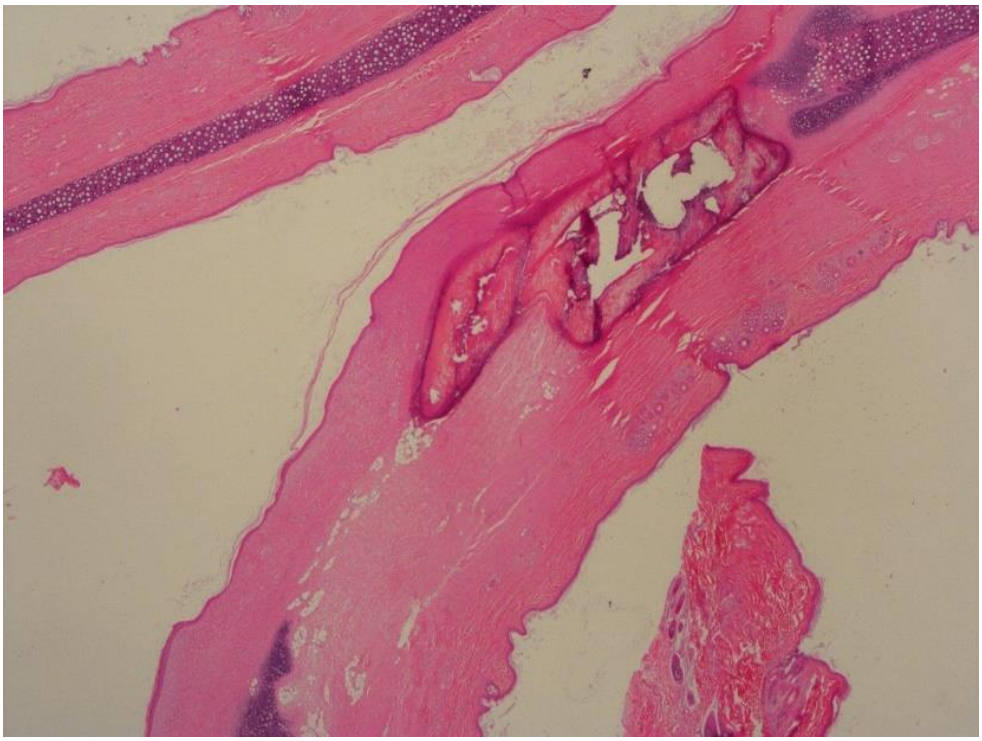
6 mm'lik boşluk çapının KİS uygulamasında 2 mm'ye, ADSC+KİS uygulamasında 1.5 mm'ye, ADSC uygulamasında ise 1 mm'ye kadar düştüğü preparatlar görüldü. Boşluk çapının ortalama değeri en düşük KİS+ADSC'de (grup 3) olduğu izlendi. (Kontrol (5.37) > ADSC (3,43) > KİS (3,18) > KİS+ADSC (3,06)).



Resim 4.15. KİS+ADSC'nin uygulandığı, 6 mm'lik boşluk çapının 1.5 mm'ye düştüğü saptanan bir preparat örneği (H&E, x20)



Resim 4.16. ADSC'nin uygulandığı, 6 mm'lik boşluk çapının 1 mm'ye düştüğü saptanan bir preparat örneği (H&E, x20)



Resim 4.17. KİS'in uygulandığı, 6 mm'lik boşluk çapının 2 mm'ye düştüğü saptanan bir preparat örneği (H&E, x20)



Resim 4.18. Kontrol grubunda, 6 mm'lik boşluk çapının 6 mm olarak kaldığı saptanan bir preparat örneği (H&E, x20)

4.1.6. İnflamasyon Varlığı, Tipi ve Şiddetinin Değerlendirilmesi

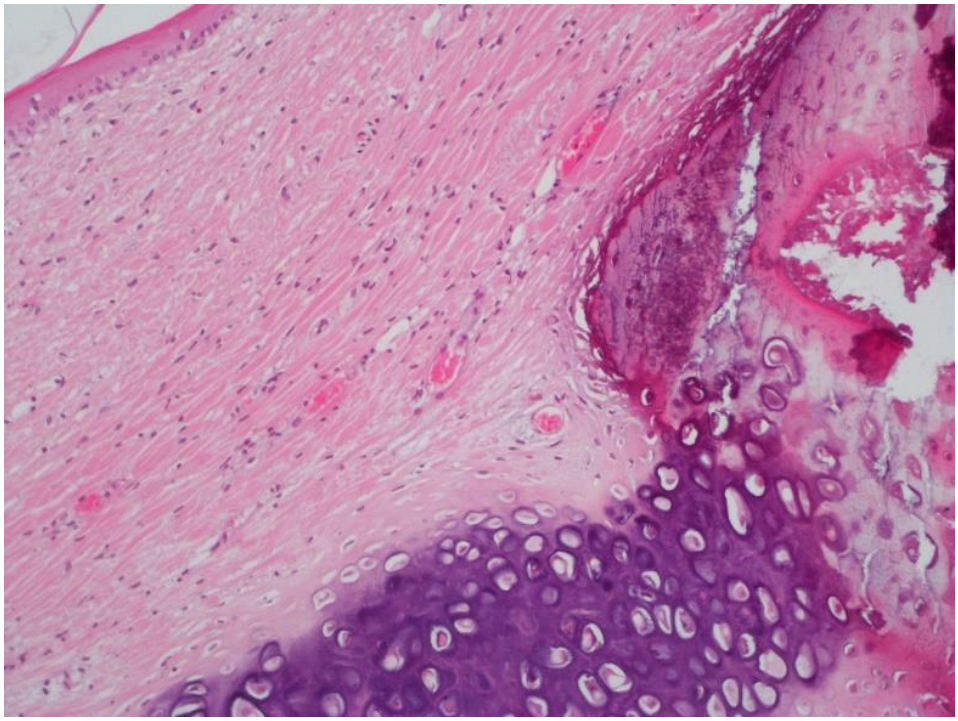
İnflamasyon tipi ve şiddeti incelendiğinde gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p=1.000, p=0,580).

Tablo 4.6. İnflamasyon varlığı, tipi ve şiddetinin istatiksel analizi

	Kontrol (1) ort.±ss	**KİS (2)** ort.±ss	**KİS+ADSC (3)** ort.±ss	**ADSC (4)** ort.±ss	**p***	**Çoklu Karşılaştırma p****
İnflamasyon Tipi	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00	1,000	-
İnflamasyon Şiddeti	1,12±0,35	1,12±0,35	1,00±0,00	1,00±0,00	0,580	-

* Tek Yönlü Varyans Analizi
** Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi

İnflamasyon tipine bakıldığında (tip 1 / tip 2) tüm gruplarda tip 2 inflamasyon görüldü. KİS+ADSC ve yalnızca ADSC uygulanan gruplarda (grup 3 ve 4) tüm preparatlarda minimal inflamasyon izlendi. KİS uygulanan grupta (grup 2) ve kontrol grubunda (grup 1) genel olarak hafif inflamasyon izlendi ancak her iki grupta yalnızca birer preparatta orta dereceli inflamasyon görüldü.



Resim 4.19. KİS'in uygulandığı, hafif dereceli inflamasyon saptanan bir preparat (H&E, x20)

Hiçbir preparatta yabancı cisim reaksiyonu ve herhangi bir enfeksiyon bulgusu (ciltte eritem, akıntı vs.) gözlemlenmedi.

5.TARTIŞMA

Kıkırdağın canlılığını ve dayanıklılığını artırmak, rejenerasyona uygun ortam hazırlamak için kök hücre temelli tedavi yöntemleri ve scaffoldun yararı araştırılmaya devam etmektedir. Literatürde, tavşanlarda allojenik kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerle indüklenen kondrositlerle; kıkırdak defektlerinin pürüzsüz ve çevre dokuyla benzer renge sahip bir şekilde tamamen onarılabileceği gösterilmiştir(70). Ayrıca mikrotiası olan insanda, aurikula kıkırdağı ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin bir scaffolda ekilerek; normale yakın esneklikte, rekonstrüksiyona uygun kıkırdak üretilebileceği de gösterilmiştir(71).

Kök hücre temelli tedavi başarılarının giderek artması ve kullanım alanının genişlemesi; kemik iliğine alternatif olarak toplanması sırasında nispeten daha düşük morbiditesi olan, hastaya daha az acı veren, daha kolay elde edilebilen ve bol miktarda farklılaşmamış mezenkimal kök hücre kaynağı olan ADSC'ler üzerinde çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Tavşanlar üzerinde, ADSC ile kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin kıyaslandığı deneysel çalışmalar, kıkırdak rejenerasyonda ADSC'nin daha yüksek proliferasyon gösterdiğini ortaya koymuştur(72, 73). Buna ek olarak, lipoaspiratın ameliyathanede hemen işlenip uygulanabilmesine olanak sağlayan mekanik SVF yöntemiyle üretilen ADSC'nin kıkırdak rejenerasyonu sağladığının kanıtlanması; bu yöntemin cerrahlar tarafından benimsenerek iskelet sisteminin farklı bölgelerinde kıkırdak rejenerasyonu sağlamak amacıyla rutin olarak kullanılmasının önünü açmıştır(74, 75). Literatürde, ADSC'nin sağladığı kartilaj rejenerasyonun klinik etkisi; osteoartriti olan hastaların dizlerine uygulanan ADSC tedavisinin klinik sonuçları ile gösterilmiştir(11, 76-78). Koh ve arkadaşları(77) , diz osteoartriti olan 30 yaşlı hastada, artroskopik cerrahilerde eklem içi ADSC enjeksiyonu tedavisinin neredeyse tüm hastaların takiplerinde klinik olarak anlamlı iyileşme sağladığını ortaya koymuştur. Jo ve arkadaşları(76) ise, osteoartritik dize ADSC'nin eklem içi enjeksiyonunun, olumsuz olaylara neden olmadan, diz ekleminin fonksiyonunu düzelterek ağrısını iyileştirdiğini ve eklem kıkırdağının yenilenmesiyle kıkırdak kusurlarını azalttığını; yaptıkları klinik, radyolojik, artroskopik ve histolojik değerlendirmeler ile göstermiştir.

Oh ve arkadaşları(79), gerçekleştirdiği hayvan deneyi modelinde, tavşan aurikulasında 15 x 15 mm'lik defektler oluşturdu. Bu defektlerde 0, 2 ve 4. günde üçer kez ADSC uygulanan çalışma grubu ile kontrol grubunu, 4 haftalık gözlem sonrası karşılaştırdı. Kontrol grubunda 13,0 ± 1,52 mm'lik bir açıklık kalmışken, çalışma grubunda defektin 1,5 ± 1,78 mm'ye kadar düştüğünü tespit ederek; ADSC'nin kontrol grubuna göre, kıkırdak defektinde anlamlı derecede (p=0,008) rejenerasyon sağladığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda kıkırdakta oluşturulan 6 mm çapında defektlere, 10 haftalık gözlem sonrası, kontrol grubunda 5,37±0,51 mm iken, birer kez ADSC uyguladığımız çalışma grubunda 3,43±1,45 mm'ye kadar düştü. Oh ve arkadaşlarına benzer şekilde, ADSC ile kıkırdak rejenerasyonunun sağlandığı çalışmamızda, istatiksel olarak anlamlı bir sonuç ortaya elde edildi($p<0,001$). Oh ve arkadaşları, kıkırdak defektinde ortalama %90 oranında (13,5 mm / 15 mm) kapanma saptamışken, biz çalışmamızda defekt çapının ortalama %42 oranında (2.47 mm / 6.00 mm) kapandığını gözlemledik. Oh ve arkadaşları, ADSC uygulamasını günaşırı üç kez tekrarlayarak bizim bir kez ADSC uyguladığımız çalışma grubumuzdan çok daha yüksek bir oran elde etmişlerdir. Deneyimizde ADSC + KİS uyguladığımız çalışma grubunda ise oluşturulan defektin çapı 3,06 ± 0,90 mm'ye düştü ve kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildi($p<0,001$). ADSC + KİS uyguladığımız defektte ortalama %49 oranında (2.94 mm / 6.00 mm) kapanma sağlandı ve bu oran tek başına ADSC uyguladığımız gruptan daha yüksekti ancak istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Oh ve arkadaşlarının yalnızca ADSC'yi gün aşırı üçer kez uyguladıklarında elde ettikleri ortalama %90'lık kapanma oranını, deneyimizde birer kez uyguladığımız ADSC + KİS grubunda da elde edemedik. Burun operasyonlarında greft ihtiyacını karşılamayı amaçlayarak planladığımız deneyde, ADSC'yi yalnızca ameliyat sırasında kullanmak KBB cerrahi pratiğinde daha uygulanabilir bir yöntemdir. Bu nedenle çalışmamızda, ADSC'yi yalnızca bir kez uygulayarak kıkırdak rejenerasyonu üzerine etkisini ortaya koymayı planladık.

Tu ve arkadaşları(80), tavşan aurikular kıkırdak üzerinde oluşturdukları hayvan deneyi modelinde, perikondriumun korunduğu kıkırdağı, perikondriumun çıkarıldığı kıkırdak ile karşılaştırdığında; dolaşımın daha hızlı yenilendiğini, daha çok kondrositin hayatta kaldığını ve daha fazla kıkırdak rejenerasyonu

gerçekleştiğini istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.001$) bir şekilde ortaya koymuştur. Duynstee ve arkadaşları(81) ise, perikonriumun kıkırdak rejenerasyonu üzerine etkisini inceledikleri tavşan modellerinde; 3 mm çapında kıkırdak eksize edilerek oluşturulan defektlerin perikondriumun korunduğu, perikondriumun sadece yüzeysel fibröz kısmı çıkarıldığı ya da perikondriumu tamamen çıkarıldığı üç grupta rejenerasyonu karşılaştırmıştır. İlginç bir şekilde, perikondriumun tamamının korunduğu örnekte kıkırdak defekti fibröz doku ile dolmuş ve bunun da kıkırdak rejenerasyonunu engellediğini tespit etmişlerdir. Perikondriumun sadece yüzeysel kısmı çıkarıldığında yeni bir kıkırdak dokusu oluştuğunu; buna karşılık, perikondrium tamamen çıkarıldığında ise kıkırdağın tek başına hiçbir rejenerasyon belirtisi göstermediğini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda kıkırdak defektlerin perikondriumunu her iki tarafta tamamen koruduk. Tüm deney gruplarında fibrozis tespit ettik ancak çoğunlukla minimal dereceliydi. Kontrol grubunda, perikondriumu korunmuş 6 mm çapındaki kıkırdak eksize edilerek oluşturulan boşluğun ortalama %90'lık bölümünde (5.37 mm / 6.00 mm) kıkırdak rejenerasyonu görülmedi. Kontrol grubunda perikondrium, tek başına belirgin kıkırdak rejerenasyonu sağlayamamışken; defekt içerisine uygulanan ADSC ve KİS'in tüm çalışma gruplarında kıkırdak rejenerasyonu sağlayarak kıkırdak defektini kapattığını istatiksel olarak anlamlı şekilde ortaya koyduk ($p<0,001$).

Can ve arkadaşları(82) , tavşan aurikulasında yaptıkları deneysel çalışmada, travmatize edilmiş perikondriumun kartilaj üzerinde soyulmadan bırakılması sonrasında greft etrafında ossifikasyonun geliştiğini gözlemlemişlerdir. Perikondriumu tamamen koruduğumuz çalışmamızda, kıkırdak üzerinden perikondriumu nazikçe eleve ederek travmatize etmemeye çalıştık ancak histopatolojik inceleme sonuçları ossifikasyon oluşumunu tamamen engelleyemediğimizi gösterdi. Tüm preparatları histolojik inceleme sırasında ossifikasyonu ve kıkırdak canlılığını değerlendirdiğimiz kartilaj viabilite skoru ile puanladık. ADSC + KİS uygulandığı çalışma grubunda viabilite skoru 3,75±0,71 geldi ve bu sonuç kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0.014$). ADSC + KİS grubunda, fokal ve multifokal ossifikasyona daha az rastlanmışken, kontrol grubundaki preparatlarda daha fazla ossifikasyon oluşarak viabilite skorunun düştüğü görüldü. ADSC'nin KİS ile birlikte kullanılmasının

rejenerasyonu istatiksel olarak anlamlı derecede artırırken, bir yandan da ossifikasyonu azalttığını ortaya koyduk.

Bahrani ve arkadaşları(83), tavşan aurikulasında 2 x 2 cm'lik kıkırdak parçayı çıkararak yerine ADSC enjekte ettiği çalışmada; üç, dört, beş ve altı aylık sürelerde kıkırdak rejenerasyonunu incelemiştir. Üçüncü ayda defekt bölgesinde küçük yeni kıkırdak adacıkları, dördüncü ayda doğal kıkırdak kalıntısıyla devam eden bir çizgi halinde düzenlenmiş ve henüz olgunlaşmamış bir yeni kıkırdak kütlesi, beşinci ayda yeni kıkırdağın kıkırdak boşluğunu doldurmak için olgun bir plaka oluşturmaya çalıştığı, altıncı ayda ise doğal kıkırdaktaki boşluğu tamamen dolduran iyi biçimlendirilmiş olgun kıkırdak plakaları gözlemlemişlerdir. Deneyimizde çizgi halinde düzenlenmiş kıkırdak kütlesi ADSC çalışma grubunda 10. haftada gözlemlenmiştir. Mason ve arkadaşları(65), tavşanda kıkırdak rejenerasyonu üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada 8 ve 12 haftalık takip sonucunda tam ve tama yakın kıkırdak rejenerasyonu tespit etmişlerdir. Trzeciak ve arkadaşları(84), otolog kondrosit transplantasyonu yaptıkları kıkırdakta 8 ve 12 haftadan sonra anlamlı bir değişiklik görmemiş ve en iyi sonuçlar nakil sonrası 8. haftada elde edildiğini bildirmişlerdir. Literatür taramamıza göre Bahrani ve arkadaşlarının çalışması dışında tavşan aurikulasında 6 aya kadar artarak devam eden kıkırdak rejenerasyonu sonucu bulunamamıştır.

Xu ve arkadaşları(85), Trombositten Zengin Fibrin (PRF) ve ADSC kombinasyonunun kıkırdak rejenerasyonu üzerine etkisini, hayvan deneyi modelinde incelemişlerdir. Kontrol, ADSC, PRF ve ADSC+ PRF olmak üzere her dört grupta, tavşan aurikulasında 5 x 5 mm'lik kıkırdak defektler oluşturarak, uyguladıkları maddelerin rejenerasyona etkisini bir, iki ve üçüncü ayda kontrol etmişlerdir. İlginç bir şekilde, ADSC'nin tek başına kıkırdak rejenerasyona etkisini (birinci ayda: %7.4, ikinci ayda: %9.3, üçüncü ayda: %15.4), literatürdeki benzer hayvan deneyi çalışmaları ve bizim sonuçlarımızın (%42.83) aksine oldukça düşük bulmuşlardır(79, 83). Deneyin sonlandığı üçüncü ayda, defektlerdeki ortalama onarımı kontrol grubunda %1.68, ADSC grubunda %15.4, PRF grubunda %32, ADSC+ PRF grubunda %89.37 olduğunu gözlemlemişlerdir. ADSC+ PRF'nin kontrol grubuna göre, kıkırdak defektinde anlamlı derecede ($p<0,001$) rejenerasyon sağladığını ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda kıkırdakta oluşturulan 6 mm çapında defektlerde, 10

haftalık gözlem sonrası, kontrol grubunda %10.5, ADSC grubunda %42.83, KİS grubunda %47, ADSC+KİS grubunda %49 oranında kıkırdağın onarıldığını; ADSC ve KİS'in tek başına ve birlikte kullanımlarında, kontrol grubuna göre kıkırdak rejenerasyonunun istatiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığını gözlemledik($p<0,001$). ADSC uygulamasının etkisinin, Xu ve arkadaşlarının çalışmasındaki sonuçlarından oldukça yüksek olduğunu gördük (%42.83 - %15.4) ancak KIS'in ADSC ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etkisini, PRF'nin ADSC ile kombinasyonu kadar yüksek saptamadık (%49 - %89.37). PRF'yi tek başına uygulandıklarında elde ettikleri sonuçlar, çalışmamızda tek başına uyguladığımız KİS ile karşılaştırıldığında ise, KİS'in kıkırdak onarımı daha yüksek olduğu görüldü (%47 - %32).

Zhang ve arkadaşları(86), Poli(L-glutamik asit) ve kitosan bazlı kompleks scaffoldun (PLGA/KIS) ADSC ile birlikte kullanımının kıkırdak rejenerasyonu üzerine etkisini, tavşanda eklem kıkırdağına oluşturdukları 4 mm çapında defektin onarımını inceleyerek ortaya koymuşlardır. Kontrol grubuna yalnızca PLGA/KIS, çalışma grubuna ise in vitro ortamda ADSC-PLGA/KIS inkübasyonu yaptıktan sonra tavşan femur trokleasına uygulamışlardır. Kontrol grubunda defektin fibröz doku ile doldurulduğunu ve hiçbir onarım bulunamadığını; çalışma grubunda ise 12 haftanın sonunda, defekt ve normal doku arasındaki arayüzün ayırt edilemeyecek düzeyde, kıkırdağın rejenere olduğunu hatta subkondral kemiğin de onarılarak yeni kıkırdakla iyi bir şekilde bütünleştiğini ortaya koymuşlardır. Zhang ve arkadaşları, çalışmalarında ADSC+PLGA/KIS'in tama yakın sağladığı onarımı ile, çalışmamızda ADSC+KİS grubumuzda %49'luk oranında rejenerasyona göre daha iyi bir sonuç elde etmişlerdir. Zhang ve arkadaşlarının aksine, boşluk çapı karşılaştırılması ve periferal kondrosit rejenerasyonu parametrelerimizde, KIS ve KIS+ADSC grupları arasında istatiksel olarak anlamlı sonuç elde edemedik ($p>0,05$). Ayrıca KIS'in kontrol grubumuzdan anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) yüksek kıkırdak rejenerasyonu ortaya konulmuşken, Zhang ve arkadaşları tek başına PLGA/KIS'in rejeneratif etkisini görememiştir. Bu durumun troklear eklem kıkırdağının aurikuladan farklı tipte ve perikondriumdan yoksun olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşündük.

Odabas ve arkadaşları(87), yaptıkları hayvan deneyinde Kemik Morfogenetik Protein-7 (BMP-7)'nin ve kriyojel scaffoldun kıkırdak rejenerasyonu üzerinde etkisini göstermişlerdir. Tavşan aurikulasında oluşturdukları 15 x 15 mm

kıkırdak defektlerine, kontrol, yalnızca scaffold, primer kondrositlerle tohumlanmış scaffold, genetiği değiştirilmiş (BMP-7 eksprese eden plazmidi taşıyan) kondrositlerle tohumlanmış scaffold uygulamak üzere dört grupta gerçekleştirmişlerdir. Çalışmamıza benzer şekilde tüm perikondrium ve vasküler bölgeleri korumak için özen göstermişlerdir. 4 aylık takip sonrasında tüm gruplarda çeşitli miktarlarda kıkırdak adacıklarının oluşumu sergilenmişken, yine çalışmamızda olduğu gibi defektlerin içinde kalsifiye odaklar ortaya çıkmıştır. Kondrositlerle tohumlanmış scaffold gruplarında, tek başına uygulanan scaffolda göre anlamlı derecede rejenerasyon olduğunu göstermişlerdir.

Leslie ve arkadaşları(88), mikroaljinatlı ADSC'lerin kıkırdak rejenerasyonu üzerindeki etkisini tavşan aurikulasında kıkırdaklara 3 mm'lik defektler oluşturarak; kontrol, parçalanmayan mikroaljinat, ADSC + parçalanmayan mikroaljinat, ADSC + parçalanabilir mikroaljinat, otogreft olmak üzere beş grupta deneysel çalışmayla incelemişlerdir. 12 haftanın sonunda kontrol ve otogreft grubunda belirgin kıkırdak rejenerasyonu görülmezken, en yüksek kıkırdak rejenerasyonu ADSC + parçalanmayan mikroaljinat içeren grupta yaklaşık olarak %30 oranında gözlemlemişlerdir ve bu oran diğer çalışma gruplarında da %10-20 arasında izlenmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde ortalama kıkırdak rejenerasyonu %50'nin altında kalmıştır. Tüm çalışma gruplarında aynı zamanda %20-40 oranında immatür kemik oluşumu ile iyileşme görüldüğünü ortaya koymuşlardır. Bu sonuçlar, çalışmamızda tüm gruplarda karşımıza çıkabilen multifokal veya fokal kemik oluşumlarıyla düşen viabilite skorularını destekleyici şekilde benzerlik göstermektedir ve doku mühendisliği ile kulak kıkırdağı defektlerinde kemik oluşumuna ilişkin diğer raporlarla tutarlıdır(89). ADSC'lerin kıkırdak rejenerasyon modellerinde kullanılırken bu kök hücrelerin multipotent olduğu bir çok hayvan modelinde vurgulanmamıştır (Zhang ve ark.(86), Xu ve ark.(85), Bahrani ve ark.(83), Oh ve ark.(79)). Sonuçlarımızda olduğu gibi, Leslie ve arkadaşlarının da görmezden gelmediği ossifikasyon, ADSC'lerin multipotent olduğunu ve kondrojenik, osteojenik ve adipogenik soylar boyunca farklılaşabildiğini göstererek; gelecekteki deney metotlarında dikkate alınması gerektiğini ortaya koymuştur.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

ADSC ve KİS'in, burun operasyonlarında kıkırdak greft ihtiyacını karşılamak ve greftin canlılığını, dayanıklılığını artırmak üzere kullanılabileceği hipotezini kurduğumuz çalışmamız, aurikular kıkırdakta ADSC ve KİS'in etkisini karşılaştırması ve birlikte kullanıldığındaki sinerjik etkiyi incelemesiyle literatürde ilktir.

Çalışmamız neticesinde histopatolojik kartilaj viabilite skoru istatiksel analiz sonucunda sadece KİS+ADSC uygulanan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede fark elde edildi (p=0.014). En yüksek viabilite skorları, KİS ve ADSC birlikte kullanımında saptandı, iki preparatta viabilite skoru 5 olduğu görüldü. Periferal kondrosit proliferasyonu değerlerinin istatiksel analizi sonucunda, KİS+ADSC uygulanan ve yalnızca KİS uygulanan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede fark elde edildi (p=0,008, p=0,007). Kondrosit nukleus kaybı miktarı, istatiksel analizi sonucunda KİS+ADSC uygulanan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede fark elde edildi (p=0.014). Histopatolojik olarak kıkırdaksız kalan boşluk çapının incelemesinde, istatiksel analizi sonucunda tüm çalışma gruplarında ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede fark elde edildi (p<0.001) ve en dar çap ADSC+KİS grubunda görüldü. Tüm gruplarda tip 2 inflamasyon görüldü ve nerdeyse tüm preparatlarda minimal inflamasyon izlendi. Hiçbir preparatta perforasyon, yabancı cisim reaksiyonu ve herhangi bir enfeksiyon bulgusu gözlemlenmedi.

ADSC ve KİS, birlikte kullanıldığında sinerjistik etki ile rejenerasyonu artırdığını gördük ancak bu etki yalnızca ADSC veya yalnızca KİS ile karşılaştırıldığında hiçbir histopatolojik incelemede istatiksel olarak anlamlı bir sonuç vermedi. Hayvan sayısının az olması istatiksel olarak anlamlı bir sonuç çıkmamasına neden olmuş olabilir. Deney tavşanı sayılarının artırılarak yapılan bundan sonraki çalışmalar için, daha farklı ve istatiksel olarak da anlamlı sonuçlar elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Yalnızca KİS uygulamasının tavşan aurikulasında kartilaj rejenerasyonuna etkisini gösteren çalışma literatürde mevcut değildir. KİS üzerine yapılan çalışmalar daha çok eklem kıkırdağı üzerinde kıkırdak rejenerasyonuna odaklanmıştır ve bu

çalışmalarda tek başına KİS'in kıkırdak rejenerasyonunu anlamlı derecede artırmadığı gösterilmiştir. Ancak çalışmamızdaki KİS uygulaması ile ADSC'ye benzer düzeyde rejenerasyon gösterilmiştir ve istatiksel olarak aralarında anlamlı fark ortaya koyulamamıştır. Bu durumun troklear eklem kıkırdağının aurikuladan farklı tipte ve perikondriumdan yoksun olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşündük. Yalnızca KIS uygulamasını KIS+ADSC ile kıyasladığımızda da aralarında anlamlı bir fark elde edemedik. Bu sonuç ADSC eklenmesinin rejenerasyona anlamlı bir katkıda bulunmadığını gösterdi. Sonuç olarak KIS'in tek başına perikondrium kaynaklı büyüme faktörleri ve kondroblastlara uygun çoğalma ortamı sağlayarak kıkırdak rejenerasyonu için tek başına etkili olabileceği gösterilmiştir.

ADSC ve KİS'in diğer baş boyun bölgelerinde greft ihtiyacını karşılamak ve rejenerasyon üzerinde potansiyelini ortaya koymak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Larenks cerrahilerinde, otolojik vb. girişimlerde de etkinliğinin ortaya konulması yeni tedavi yöntemlerinin önünü açabilir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatüre farklı bilgiler sunmaktadır. Sonuçlarımızın gelecekte yapılacak araştırmalara ön bilgi ve yön vermesinin yanı sıra farklı bir bakış açısı kazandırması açısından da faydalı olduğuna inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Walker A, Surda P, Rossiter M, Little S. Nasal function and dysfunction in exercise. J Laryngol Otol. 2016;130(5):431-4.
2. Patel RG. Nasal Anatomy and Function. Facial Plast Surg. 2017;33(1):3-8.
3. Antohi N, Isac C, Stan V, Ionescu R. Dorsal nasal augmentation with "open sandwich" graft consisting of conchal cartilage and retroauricular fascia. Aesthet Surg J. 2012;32(7):833-45.
4. Cochran CS, DeFatta RJ. Tragal cartilage grafts in rhinoplasty: a viable alternative in the graft-depleted patient. Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;138(2):166-9.
5. Moshaver A, Gantous A. The use of autogenous costal cartilage graft in septorhinoplasty. Otolaryngol Head Neck Surg. 2007;137(6):862-7.
6. Rosenberger ES, Toriumi DM. Controversies in Revision Rhinoplasty. Facial Plast Surg Clin North Am. 2016;24(3):337-45.
7. Temiz A, Kazikdas KC, Ergur B, Tugyan K, Bozok S, Kaya D, et al. Esterified hyaluronic acid improves cartilage viability in experimental tracheal reconstruction with an auricular graft. Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;143(6):772-8.
8. Dodge-Khatami A, Backer CL, Holinger LD, Mavroudis C, Cook KE, Crawford SE. Healing of a free tracheal autograft is enhanced by topical vascular endothelial growth factor in an experimental rabbit model. J Thorac Cardiovasc Surg. 2001;122(3):554-61.
9. Wang M, Yu L. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with decellularized cartilage ECM: a novel approach to nasal septum perforation repair. Med Hypotheses. 2014;82(6):781-3.
10. Sembronio S, Tel A, Tremolada C, Lazzarotto A, Isola M, Robiony M. Temporomandibular Joint Arthrocentesis and Microfragmented Adipose Tissue Injection for the Treatment of Internal Derangement and

Osteoarthritis: A Randomized Clinical Trial. J Oral Maxillofac Surg. 2021;79(7):1447-56.

11. Kasir R, Vernekar VN, Laurencin CT. Regenerative Engineering of Cartilage Using Adipose-Derived Stem Cells. Regenerative Engineering and Translational Medicine. 2015;1(1):42-9.

12. Holt K, Sorhaindo M, Coady C, Wong IH. Arthroscopic Treatment of Medial Femoral Knee Osteochondral Defect Using Subchondroplasty and Chitosan-Based Scaffold. Arthrosc Tech. 2019;8(4):e413-e8.

13. Nihat Ç. Otolaryngology, Baş ve Boyun Cerrahisi. Nobel Tıp Kitabevleri1999. p. 153-260.

14. KOÇ C. Kulak Burun Boğaz Hastalıkları ve Baş Boyun Cerrahisi. 3 ed. Güneş Tıp Kitabevleri2019. 391-3 p.

15. Oneal RM, Beil Jr RJ, Schlesinger J. Surgical anatomy of the nose. Otolaryngol Clin North Am. 1999;32(1):145-81.

16. Kucukguven A, Konas E. Fine-Tuning of the Supratip in Rhinoplasty: An External Approach. Aesthetic Plast Surg. 2022;46(6):2938-46.

17. Greenlund LK, Tan SR, Dresner HS. Nasal Sesamoid Cartilages: Fact or Fiction? An Anatomical Study of the Lateral Nasal Ala. Ann Otol Rhinol Laryngol. 2023;132(11):1438-42.

18. Konschake M, Fritsch H. Anatomical mapping of the nasal muscles and application to cosmetic surgery. Clin Anat. 2014;27(8):1178-84.

19. Davis RE, Wayne I. Rhinoplasty and the nasal SMAS augmentation graft: advantages and indications. Arch Facial Plast Surg. 2004;6(2):124-32.

20. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing. An overview. Otolaryngol Clin North Am. 1995;28(5):847-64.

21. Akay MT. Genel Histoloji 4ed. Palme Yayıncılık 1999 15-20 p.

22. Junqueira L, Carneiro J. Temel histoloji Text&Atlas. Nobel Tıp Kitabevi İstanbul 2009. 128 p.

23. Ross M, Pawlina W. Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 6 ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2011. 198-216 p.

24. Junqueira LC. Basic Histology & Embryology. 15. ed2018. p. 131.

25. Standring S. Gray's Anatomy. 48 ed: Elsevier; 2008. 132-3 p.

26. Ozdemir R, Ulusoy MG, Kocer U, Karaaslan O, Sahin B, Culha E, et al. Evaluation of osteogenic and chondrogenic activities of prefabricated periallografts. J Craniofac Surg. 2005;16(6):1015-22.

27. Brent B. Repair and grafting of cartilage and perichondrium. McCarthy JG. Plastic surgery. Philadelphia: W.B Saunders Company1990. 559-82 p.

28. Dongmei C. Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations. Lippincott Williams & Wilkins2010. 82 p.

29. Meyer U, Wiesmann H. Bone and cartilage engineering. Springer-Verlag Berlin.2010. 33-4. p.

30. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. Arthritis Res. 2002;4 Suppl 3(Suppl 3):S63-8.

31. van Osch GJ, Brittberg M, Dennis JE, Bastiaansen-Jenniskens YM, Erben RG, Konttinen YT, et al. Cartilage repair: past and future--lessons for regenerative medicine. J Cell Mol Med. 2009;13(5):792-810.

32. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Martin SD, Spector M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. J Orthop Res. 2000;18(5):790-9.

33. 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(5411):143-7.

34. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001;7(2):211-28.

35. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 2000;109(1):235-42.

36. Haniffa MA, Wang XN, Holtick U, Rae M, Isaacs JD, Dickinson AM, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. J Immunol. 2007;179(3):1595-604.

37. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002;13(12):4279-95.

38. Fraser J, Wulur I, Alfonso Z, Zhu M, Wheeler E. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. Cytotherapy. 2007;9(5):459-67.

39. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. Cytotherapy. 2004;6(1):7-14.

40. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organs. 2003;174(3):101-9.

41. Eto H, Suga H, Matsumoto D, Inoue K, Aoi N, Kato H, et al. Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. Plast Reconstr Surg. 2009;124(4):1087-97.

42. Gonda K, Shigeura T, Sato T, Matsumoto D, Suga H, Inoue K, et al. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term cryopreservation. Plast Reconstr Surg. 2008;121(2):401-10.

43. La Padula S, Ponzo M, Lombardi M, Iazzetta V, Errico C, Polverino G, et al. Nanofat in Plastic Reconstructive, Regenerative, and Aesthetic Surgery: A Review of Advancements in Face-Focused Applications. J Clin Med. 2023;12(13).

44. Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. Plast Reconstr Surg. 2013;132(4):1017-26.

45. Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. Cytometry A. 2010;77(1):22-30.

46. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. Circ Res. 2008;102(1):77-85.

47. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. J Atheroscler Thromb. 2006;13(2):77-81.

48. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. Curr Stem Cell Res Ther. 2010;5(2):103-10.

49. Bhang SH, Cho SW, Lim JM, Kang JM, Lee TJ, Yang HS, et al. Locally delivered growth factor enhances the angiogenic efficacy of adipose-derived stromal cells transplanted to ischemic limbs. Stem Cells. 2009;27(8):1976-86.

50. Song SY, Chung HM, Sung JH. The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration. Expert Opin Biol Ther. 2010;10(11):1529-37.

51. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrugghe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev. 2002;16(21):2813-28.

52. Zhang J, Liu Y, Chen Y, Yuan L, Liu H, Wang J, et al. Adipose-Derived Stem Cells: Current Applications and Future Directions in the Regeneration of Multiple Tissues. Stem Cells Int. 2020;2020:8810813.

53. Zhang C, Wang G, Lin H, Shang Y, Liu N, Zhen Y, et al. Cartilage 3D bioprinting for rhinoplasty using adipose-derived stem cells as seed cells: Review and recent advances. Cell Prolif. 2023;56(4):e13417.

54. Li CY, Wu XY, Tong JB, Yang XX, Zhao JL, Zheng QF, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):55.

55. Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M. Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. Int J Stem Cells. 2014;7(2):135-42.

56. Kurzyk A, Ostrowska B, Święszkowski W, Pojda Z. Characterization and Optimization of the Seeding Process of Adipose Stem Cells on the Polycaprolactone Scaffolds. Stem Cells Int. 2019;2019:1201927.

57. Shen Y, Xu Y, Yi B, Wang X, Tang H, Chen C, et al. Engineering a Highly Biomimetic Chitosan-Based Cartilage Scaffold by Using Short Fibers and a Cartilage-Decellularized Matrix. Biomacromolecules. 2021;22(5):2284-97.

58. Zhang Y, Yu J, Ren K, Zuo J, Ding J, Chen X. Thermosensitive Hydrogels as Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. Biomacromolecules. 2019;20(4):1478-92.

59. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. Biomaterials. 2000;21(24):2589-98.

60. Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, Westerhausen-Larson A, Matthew HW, Evans CH, et al. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis. J Biomed Mater Res. 2000;49(4):534-41.

61. Choi B, Kim S, Lin B, Wu BM, Lee M. Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering. ACS Appl Mater Interfaces. 2014;6(22):20110-21.

62. Chen W, Xu Y, Li Y, Jia L, Mo X, Jiang G, et al. 3D printing electrospinning fiber-reinforced decellularized extracellular matrix for cartilage regeneration. Chemical Engineering Journal. 2020;382:122986.

63. Lim T, Tang Q, Zhu Z-Z, Feng Y, Zhan S, Wei X-J, et al. A decellularized scaffold derived from squid cranial cartilage for use in cartilage tissue engineering. J Mater Chem B. 2020;8(20):4516-26.

64. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. Osteoarthritis and Cartilage. 2009;17(6):705-13.

65. Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA. Cartilage and bone regeneration using gene-enhanced tissue engineering. Clin Orthop Relat Res. 2000(379 Suppl):S171-8.

66. Zhao Z, Wang Y, Yin B, Li X, Hao R, Li Z, et al. Defect-adaptive Stem-cell-microcarrier Construct Promotes Tissue Repair in Rabbits with Knee Cartilage Defects. Stem Cell Rev Rep. 2023;19(1):201-12.

67. Schüller GC, Tichy B, Majdisova Z, Jagersberger T, van Griensven M, Marlovits S, et al. An in vivo mouse model for human cartilage regeneration. J Tissue Eng Regen Med. 2008;2(4):202-9.

68. Lee JW, Kim YH, Kim SH, Han SH, Hahn SB. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and its clinical applications. Yonsei Med J. 2004;45 Suppl:41-7.

69. Cakmak O, Bircan S, Buyuklu F, Tuncer I, Dal T, Ozluoglu LN. Viability of crushed and diced cartilage grafts: a study in rabbits. Arch Facial Plast Surg. 2005;7(1):21-6.

70. Cheng Y, Cheng P, Xue F, Wu KM, Jiang MJ, Ji JF, et al. Repair of ear cartilage defects with allogenic bone marrow mesenchymal stem cells in rabbits. Cell Biochem Biophys. 2014;70(2):1137-43.

71. Zhang L, He A, Yin Z, Yu Z, Luo X, Liu W, et al. Regeneration of human-ear-shaped cartilage by co-culturing human microtia chondrocytes with BMSCs. Biomaterials. 2014;35(18):4878-87.

72. Hassan TA, Maher MA, El Karmoty AF, Ahmed ZSO, Ibrahim MA, Rizk H, et al. Auricular cartilage regeneration using different types of mesenchymal stem cells in rabbits. Biological Research. 2022;55(1):40.

73. Khalilifar MA, Baghaban Eslaminejad MR, Ghasemzadeh M, Hosseini S, Baharvand H. In Vitro and In Vivo Comparison of Different Types of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. Cell J. 2019;21(2):150-60.

74. Jurgens WJ, Kroeze RJ, Zandieh-Doulabi B, van Dijk A, Renders GA, Smit TH, et al. One-step surgical procedure for the treatment of osteochondral defects with adipose-derived stem cells in a caprine knee defect: a pilot study. Biores Open Access. 2013;2(4):315-25.

75. Di Matteo B, El Araby MM, D'Angelo A, Iacono F, Nannini A, Vitale ND, et al. Adipose-Derived Stem Cell Treatments and Formulations. Clin Sports Med. 2019;38(1):61-78.

76. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. Stem Cells. 2014;32(5):1254-66.

77. Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, Kim YS, Yeo JE. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 2015;23(5):1308-16.

78. Koh YG, Choi YJ, Kwon OR, Kim YS. Second-Look Arthroscopic Evaluation of Cartilage Lesions After Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees. Am J Sports Med. 2014;42(7):1628-37.

79. Oh S-J, Park H-Y, Choi K-U, Choi S-W, Kim S-D, Kong S-K, et al. Auricular Cartilage Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells in Rabbits. Mediators of Inflammation. 2018;2018:4267158.

80. Tu T-Y, Yang A-H, Fan C-C. Short-Term Effects of Perichondrium Preservation on Chondrocyte Survival and Chondrogenesis of Auricular Cartilage Grafted in Rabbit Tympanic Bullae. Audiology and Neurotology. 2008;13(4):239-46.

81. Duynstee ML, Verwoerd-Verhoef HL, Verwoerd CD, Van Osch GJ. The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. Plast Reconstr Surg. 2002;110(4):1073-9.

82. Haberal Can I, Atilla P, Cakar AN, Onerci M. An animal study on cartilage healing using auricular cartilage as a model. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2008;265(3):307-11.

83. Bahrani H, Razmkhah M, Ashraf MJ, Tanideh N, Chenari N, Khademi B, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells into ear auricle cartilage in rabbits. The Journal of Laryngology & Otology. 2012;126(8):770-4.

84. Trzeciak T, Kruczyński J, Jaroszewski J, Lubiatowski P. Evaluation of Cartilage Reconstruction by Means of Autologous Chondrocyte Versus Periosteal Graft Transplantation: An Animal Study. Transplantation Proceedings. 2006;38(1):305-11.

85. Xu F, Yang Y, Yang T, Dai T, Shao X, Xu H, et al. The use of allogenic adipose-derived stem cells in combination with platelet-rich fibrin for the treatment of cartilage defects in rabbit ear. Am J Transl Res. 2018;10(6):1900-7.

86. Zhang K, Zhang Y, Yan S, Gong L, Wang J, Chen X, et al. Repair of an articular cartilage defect using adipose-derived stem cells loaded on a polyelectrolyte complex scaffold based on poly(l-glutamic acid) and chitosan. Acta Biomater. 2013;9(7):7276-88.

87. Odabas S, Feichtinger GA, Korkusuz P, Inci I, Bilgic E, Yar AS, et al. Auricular cartilage repair using cryogel scaffolds loaded with BMP-7-expressing primary chondrocytes. J Tissue Eng Regen Med. 2013;7(10):831-40.

88. Leslie SK, Cohen DJ, Hyzy SL, Dosier CR, Nicolini A, Sedlaczek J, et al. Microencapsulated rabbit adipose stem cells initiate tissue regeneration in a rabbit ear defect model. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(7):1742-53.

89. Christophel JJ, Chang JS, Park SS. Transplanted tissue-engineered cartilage. Arch Facial Plast Surg. 2006;8(2):117-22.