T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN MODELİNDE ALOE VERA VE SPONGOSTANIN KIKIRDAK DEFEKTİ ÜZERİNDEKİ İYİLEŞTİRME ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Suat ŞAHİN

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Mehmet Sabri BALIK

RİZE-2023

T.C.

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇAN MODELİNDE ALOE VERA VE SPONGOSTANIN KIKIRDAK DEFEKTİ ÜZERİNDEKİ İYİLEŞTİRME ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Suat ŞAHİN

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Mehmet Sabri BALIK

RİZE-2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan hocalarımdan, başta bölüm başkanımız ve tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet Sabri BALIK ve diğer bölüm hocalarımız Dr. Öğr. Üyesi Rıfat ŞAHİN, Dr. Öğr. Üyesi Cengiz KAZDAL ve Uzm. Dr. Sadullah KARA' ya katkılarından ve varlıklarından dolayı teşekkür ederim.

İhtisas eğitimim boyunca beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarıma; Dr. Sinan GÖRMEZ, Dr. İsmail Vehbi İMAMOĞLU, Dr. Şemsettin Can ASAR, Dr. Muhammet Uğur OK, Dr. Ahmet Tunahan YILMAZ, Dr. Eyüp Furkan KARADAĞ, Dr. Emre PALTA, Dr. Muhammet Emin KÜÇÜKAYDIN, Dr. Ufuk AYHAN ve Dr. Tunahan BÜLBÜL'e teşekkür ederim.

Tezin hazırlanmasında ve inceleme kısmında desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet KIVRAK ve Uzm. Dr. Çiğdem ÖZTÜRK' e teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığımız servis ve poliklinik hemşire ve sekreterlerimize, ameliyat hemşire, personel ve anestezi ekibine teşekkür ederim.

Son olarak asistanlık eğitimim boyunca yanımda olan ve desteğini esirgemeyen eşim Ayşenur ŞAHİN, kızım Ela ŞAHİN, annem Semra ŞAHİN, babam Mustafa ŞAHİN, ablam Bengül SEDEF ve kardeşim Betül ŞAHİN' e teşekkür ederim.

Bu uzmanlık tezi Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TTU-2023-1476 numaralı Tıpta Uzmanlık Tez Projesi olarak desteklenmiştir.

ÖZET

Sıçan Modelinde Aloe Vera ve Spongostanın Kıkırdak Defekti Üzerindeki İyileştirme Etkileri

Dr. Suat ŞAHİN

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi

Doç. Dr. Mehmet Sabri BALIK

Amaç: Kondral hasar ve neticesinde ortaya çıkan osteoartrit sıklıkla yaşamın ileri yıllarında meydana gelmektedir. Yaptığımız çalışmada anti-oksidan ve anti-inflamatuar etkinliği olan Aloe Vera ve kollajen içeriği ile bilinen spongostanın, kıkırdak iyileşmesi üzerine etkilerini belirlemeyi hedefledik. **Materyal ve Metod:** Yaptığımız çalışmada 40 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Her grupta 8 adet sıçan olmak üzere 5 farklı grup oluşturuldu. Grupların isimlendirilmesi şu şekilde yapıldı: Sağlıklı kontrol grubu, kontrollü kıkırdak hasarı oluşturulup tedavi verilmeyen grup, kontrollü kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra hasar bölgesine spongostan uygulanan grup, kontrollü kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra hasar bölgesine %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grup ve kontrollü kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra hasar bölgesine %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grup. Sıçanların sakrifikasyon işlemi 6.haftada yapılarak değerlendirme basamağına geçildi. Bu basamakta çalışılan gruplar arasında histopatolojik olarak fark olup olmadığı araştırıldı. **Bulgular:** Histopatolojik olarak karşılaştırdığımız gruplarda hasar skorlarının mankin skorlamasına göre %5 ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grupta belirgin olarak düşük geldiği gözlemlendi. **Sonuç:** Histopatolojik olarak Aloe Vera'nın kıkırdak iyileşme sürecinde bütün basamaklara olumlu etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Aloe Vera, spongostan, kıkırdak iyileşmesi, sıçan, kıkırdak, kondral hasar

ABSTRACT

The Healing Effects of Aloe Vera and Spongostane on Cartilage Defect in Rat Model

Dr. Suat ŞAHİN

Department of Orthopedics and Traumatology Recep Tayyip Erdoğan University Faculty of Medicine Thesis of Specialization in Medicine

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Sabri BALIK

Aim: Chondral damage and the resulting osteoarthritis often occur in later years of life. In our study, we aimed to determine the effects of Aloe Vera, which has anti-oxidant and anti-inflammatory activity, and spongostan, known for its collagen content, on cartilage healing. **Materials and Methods:** 40 Sprague-Dawley rats were used in our study. 5 different groups were created, with 8 rats in each group. The groups were named as follows: Healthy control group, the group where controlled cartilage damage was created and no treatment was given, the group where spongostan was applied to the damage area after controlled cartilage damage was created, the group where spongostan impregnated with 5% Aloe Vera was applied to the damage area after controlled cartilage damage was created, and the group where spongostan impregnated with 20% Aloe Vera was applied to the damage area after controlled cartilage damage was created. . The sacrification of the rats was performed at the 6th week and the evaluation phase was started. In this step, it was investigated whether there were any histopathological differences between the groups studied. **Results:** In the groups we compared histopathologically, it was observed that the damage scores were significantly lower in the groups applied with 5% and 20% Aloe Vera impregnated spongos according to Mankin scoring. **Conclusion:** Histopathologically, it was determined that Aloe Vera had a positive effect on all steps in the cartilage healing process.

Keywords: Aloe vera, spongostane, cartilage healing, rat, cartilage, chondral damage

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR III
ÖZET IV
ABSTRACT V
İÇİNDEKİLER VI
KISALTMALAR VII
ŞEKİLLER LİSTESİ VIII
TABLO LİSTESİ X
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Hiyalin Kıkırdak 4
2.1.1. Hiyalin Kıkırdak Histolojisi 4
2.2. Kondral İyileşme Süreçlerinin Araştırma Modelleri 7
2.3. Kıkırdak Yaralanması Tedavisi 7
2.3.1. Cerrahi Yöntemler 8
2.3.1.1. Onarıcı Cerrahi Yöntemler 9
2.3.1.2. Rejeneratif Cerrahi Yöntemler 10
2.4. Spongostan 10
2.5. Aloe Vera 11
3. MATERYAL METOD 12
3.1. Çalışma Grupları 14
3.2. Anestezi 15
3.3. Deney Modelinin Oluşturulması 16
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi 25
3.4.1. Histopatolojik Değerlendirme 25
3.4.1.1. Histopatolojik Doku Takip İşlemleri 25
3.4.1.2. İstatistiksel Analiz 29
4. BULGULAR 30
4.1. Histopatolojik bulgular 30
4.2. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Analiz Sonuçları 48
5. TARTIŞMA 49

KISALTMALAR

K: kontrol grubu

KD: kontrollü kıkırdak defekti oluşturulan grup

KD+S: kontrollü kıkırdak defekti + spongostan uygulanan grup

KD+%5AVS: kontrollü kıkırdak defekti + %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grup

KD+%20AVS: kontrollü kıkırdak defekti + %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grup

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Eklem kıkırdağının normal ve hasarlı yapısı 3

Şekil 2. Bir proteoglikan agregatının çizimi. Proteoglikan monomerlerinin bağlantı proteinleri aracılığıyla bağlandığı merkezi bir hyaluronik asit zincirinden oluşur. Her monomer, ona bağlı birden fazla glikozaminoglikan içeren bir protein çekirdeğinden oluşur 6

Şekil 3. Hiyaloplazma ila çevrelenmiş kondrositleri gösteren hiyalin kıkırdak H&E boyası(solda). Bölgesel bir anatomiyi gösteren kollajen fibrillerini(sağda) gösterecek şekilde boyanmış hiyalin kıkırdak.....7

Şekil 4. Gruplandırma ve etiketlendirme.....13

Şekil 5. Cerrahi hazırlık.....17

Şekil 6. Sıçan dizi görünecek şekilde cerrahi alanın steril olarak hazırlanması 18

Şekil 7. Femur kondillerine ulaşım için uygulanan rettopatellar insizyon ve sonrasında interkondiler bölgede 1 mm çapında oluşturulmuş kıkırdak defektinin görüntüsü 19

Şekil 8. Parapatellar insizyon ile femur kondillerine ulaşım sonrası interkondiler bölgede 1 mm çapında oluşturulmuş kıkırdak defektinin görüntüsü 20

Şekil 9. İnterkondiler bölgede oluşturulan kıkırdak defektini dolduracak şekilde %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan materyalinin yerleştirilmiş görüntüsü.....21

Şekil 10. İnterkondiler bölgede oluşturulan kıkırdak defektini dolduracak şekilde,%20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan materyalinin yerleştirilmiş görüntüsü.....22

Şekil 11. Dizlerde kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra yara yerlerine pansuman yapılmış olan sıçanların erken postoperatif dönemdeki görünümü 23

Şekil 12. Femur distal yarısı ile birlikte kısmi eksize edilen sıçan femur kondillerinin şematize edlmiş görünümü.....24

Şekil 13. Grup 1'deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü(H&E statinx20) 30

Şekil 14. Grup 1'deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü(H&E statinx400) 31

Şekil 15. Grup 1'deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toluidin Blue stainx20) 32

Şekil 16. Grup 1'deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (Toluidin Blue stainx400) 33

Şekil 17. Grup 1'deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (Safranin O-Green stainx20) 34

Şekil 18. Grup 1'deki işlem yapılmayan sıçana ait normal femoral kondil hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (Safranin O-Greenx400).....35
Şekil 19. Grup 2'deki hasar verilip tedavi verilmeyen sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görüntüsü (H&E stainx100) 36
Şekil 20. Grup 2'deki hasar verilip tedavi verilmeyen sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görüntüsü (Toluidin blue stainx100).....37
Şekil 21. Grup 2'deki hasar verilip tedavi verilmeyen başka bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü(Safranin-O Fast Greenx100).....38
Şekil 22. Grup 3'deki hasar verilip Spongostan uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (H&E stain x100) 39
Şekil 23. Grup 3'deki hasar verilip Spongostan uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x100).....40
Şekil 24. Grup 3'deki hasar verilip Spongostan uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Safranin- O Fast Green stain x100) 41
Şekil 25. Grup 4'deki hasar verilip %5 Aloe Vera uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (H&E stain x100) 42
Şekil 26. Grup 4'deki hasar verilip %5 Aloe Vera uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x100).....43
Şekil 27. Grup 4'deki hasar verilip %5 Aloe Vera uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Safranin- O Fast Green stain x100) 44
Şekil 28. Grup 5'deki hasar verilip %20 Aloe Vera uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (H&E stain x100).....45
Şekil 29. Grup 5'deki hasar verilip %20 Aloe Vera uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x100) 46
Şekil 30. Grup 5'deki hasar verilip %20 Aloe Vera uygulanan bir sıçana ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Safranin- O Fast Green stain x100) 47

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışma grupları 14
Tablo 2. Leica ASP 300 S marka doku takip cihazının doku takibi aşamaları 25
Tablo 3. Hematoksilen Eozin histokimya boyama aşamaları 26
Tablo 4. Safranin O&Fast Green histokimya boyama uygulaması 27
Tablo 5. Toluidine blue histokimya boyama protokolü 28
Tablo 6. Mankin histolojik skorlama yöntemi 29
Tablo 7. Mankin skorlaması toplam skora göre grup kategorileri istatistiksel sonuçlar 48
Tablo 8. Mankin skorlaması toplam skora göre post-hoc ikili karşılaştırma sonuçları 48

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağı, bir sinoviyal eklemin hareket aralığı boyunca kompresyon ve makaslama kuvvetlerini taşımaya iyi adapte olmuş benzersiz ve özelleşmiş bir bağ dokudur(1). Eklem kıkırdağının sağlıklı yapısı, diartrodial eklemlerin yüklenmesi ve hareketi sırasında oluşan kuvvetleri destekleyen ve dağıtan, hemen hemen sürtünmesiz, kayganlaştırıcı ve yük taşıyan bir yüzey sağlar(2).

Eklem kıkırdağı (cartilago articularis), mezenkimal dokudan kaynaklanan kıkırdak dokular (textus cartilagineus) veya daha geniş anlamda destekleyici bağ dokuları grubuna aittir . Bu bir tür hiyalin kıkırdaktır (cartilago hyalina), ancak onu bu türdeki diğer dokulardan ayıran özellik, beslenme ve yenilenme işlevlerine hizmet eden bağlayıcı fibröz bir membran olan perikondriyumun bulunmamasıdır. Eklem kıkırdağı, karmaşık histokimyası, morfolojisi ve mimarisi ile karakterize edilen, önemli mekanik dayanıklılık ve elastikiyete sahip, aynı zamanda herhangi bir kan damarı içermeyen, biyoloji kanunlarına aykırı gibi görünen bir doku türüdür(3). Eklem kıkırdağının basit ama karmaşık mimarisi, kendi kendini onarma konusundaki doğal kapasitesinin yetersiz kalmasına sebebiyet verir(4). Eklem kıkırdağının onarım kapasitesi sınırlı olduğundan ve şimdiye kadar kıkırdak onarımı için herhangi bir ilaç mevcut olmadığından, eklem kıkırdağının fokal hasarı veya erozyonu sıklıkla osteoartrit gibi zayıflatıcı koşullara yol açar(5).

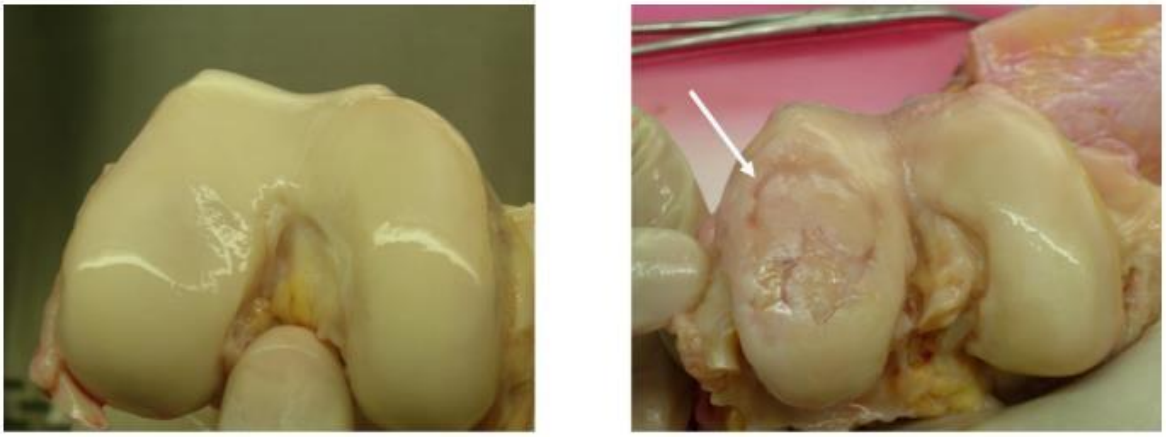
Travma ilişkili, genetik ve dejeneratif değişikliklere bağlı gelişen eklem kıkırdağı yaralanmaları çok yaygındır(6). Eklem kıkırdağının yaralanması ve yaşa bağlı dejenerasyonu, sıklıkla ciddi ağrıya ve sakatlığa yol açar(7). Kıkırdak kusurlarının (osteoartrit, romatoid artrit, intervertebral disk hasarı, diz protezi ameliyatları vb.) yükü, ekonomik ve sosyal açıdan önemlidir ve göz korkutucu sonuçlara yol açabilmektedir (8). Alt ekstremite travmaları anatomik ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle insan kas-iskelet sisteminin en ciddi yaralanmalarından biridir. Diz eklemi yaralanmaları tüm yaralanmaların %14'ünü oluşturmaktadır. Diz eklem kıkırdağının bütünlüğünün ve yapısının bozulmasına yol açan başlıca nedenler, doğrudan ve dolaylı eklem yüzeyleri yaralanmalarıdır(9). Dizde, fokal lezyonlara sıklıkla ön çapraz bağ(ÖÇB) rüptürü sonrası eşlik eden menisküs yaralanması ile rastlanmaktadır. Bu tür lezyonlar eklem yüzeyinin düzgün yapısını bozmakta, komşuluğundaki sağlam dokuda aşırı yüklenmeye sebebiyet vermekte ve sonunda da kıkırdak bozulması riskiyle dokuyu karşı karşıya bırakmaktadır(10).

Fokal kıkırdak kusurları, yaşam kalitesini etkileyen ağrı, şişlik, sertlik, çökme veya dizde kilitlenme gibi semptomlara neden olabilir. Kıkırdağın kendini onarma yeteneği çok sınırlı olduğundan bu kusurların cerrahi tedavisi gerekir. Şayet kıkırdak defektleri tedavi edilmezse hasar ilerleyerek osteoartrite yol açar(11). Hastanın yaşam kalitesi açısından bakıldığında, osteokondral defektler geç evre osteoartrit kadar ağrılı ve zayıflatıcı olabilir(12). Kıkırdak lezyonlarının önemli insidansı ve klinik problemleri nedeniyle, eklem kıkırdağı defektlerine yönelik yeni tedavilere büyük ilgi duyulmaktadır(13). Bu nedenle eklem kıkırdağı yaralanmalarının tüm tedavi yöntemleri, uzun vadede kabul edilebilir yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip bir iyileşme dokusu üretmeyi amaçlamaktadır (14).

Doku hasarının türüne ve onarım yanıtına bağlı olarak üç sınıf kıkırdak ve osteokondral yaralanma tanımlanabilir. Birincisi, eklem yüzeyinde gözle görülür mekanik bozulmaya neden olmayan, ancak kıkırdak hasarına neden olan ve subkondral kemik hasarına neden olabilen eklem yüzeyinde hasardır. İkincisi, eklem kıkırdağıyla sınırlı eklem yüzeyinin mekanik bozulmasıdır. Üçüncüsü, eklem kıkırdağı ve subkondral kemiğin mekanik bozulmasıdır (15). Dizdeki tam kat kıkırdak defektleri yetişkinlerde spor aktivitesi sırasında meydana gelen travmayı takiben yaygın olarak gelişmektedir ve ağrı ve sakatlık ile ilişkilidir(16). Fokal tam kat kıkırdak defektleri normal eklem mekaniğini değiştirebilir ve çevredeki kıkırdak dokusunda bozulmaya neden olarak osteoartroza yol açabilir. Çoğu asemptomatik olduğundan insidans ve prevalansı güvenilir bir şekilde tahmin etmek zor olsa da, artroskopi yapılan hastaların yaklaşık %60'ında kıkırdak lezyonları ve %20'sinde fokal kıkırdak defektleri olduğu daha önce gözlemlenmiştir(17). Çoğunlukla spor veya diğer yoğun aktivitelerle ilişkili olan tam kat kıkırdak lezyonlarının iyileşmediği öne sürülmüştür (18).

Büyük eklemlerin (özellikle diz) eklem kıkırdağı lezyonları yaygındır (19) (Şekil 1). Eklem kıkırdağının travmatik yaralanmaları tipik olarak fiziksel aktif genç hastalarda meydana gelmektedir (20).

Kondrosit fonksiyonu kısmen mekanik uyarılarla düzenlenir; burada orta dereceli yüklenme, matris proteinlerinin sentezi dahil faydalı anabolik tepkileri başlatır. Ancak hızlı ve aşırı yüklenme, kıkırdak matrisinin bozulmasına yol açan hücre ölümünü ve katabolik sinyallenmeyi indükler(21).



Şekil 1. Normal eklem kıkırdağı(sol) ve hasarlı eklem kıkırdağı(sağ)(22).

Eklem kıkırdağı %60 ila %85 sudan oluşur. Katı içeriği kollajenlerden (öncelikle tip II, aynı zamanda tip VI, IX ve XI), proteoglikanlardan(öncelikle agrekan, aynı zamanda dekorin, biglikan ve fibromodulin) ve bir hücre popülasyonundan (kondrositler) oluşan yoğun bir hücre dışı matristen oluşur(23). Avasküler ve anöral özelliklerinden dolayı eklem kıkırdağı, beslenmesini ve oksijen desteğini sağlamak için difüzyona bağımlıdır. Bu durum kendi kendini onarma kapasitesinde sınırlamalara neden olur(24). Hasarlı kıkırdağın yerini sıklıkla yapısal ve işlevsel olarak daha zayıf olan fibröz skar dokusu alır(25).

Eklem kıkırdağının sınırlı içsel rejeneratif kapasitesi nedeniyle, doku restorasyonu ve ağrının hafifletilmesi girişimlerinde cerrahi ve konservatif tedaviler uygulanmıştır. Ancak mevcut tedavi yöntemleri, uzun vadede yeterince iyi sonuçlar vermemiştir(26). Bu nedenle, eklem kıkırdak hasarının hiyalin kıkırdak oluşumunu sağlayarak iyileşmesini sağlamak için, kondrogenezisi uyarıcı olabilecek kollajen içeriği yüksek spongostan ile antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri olan aloe verayı kontrollü oluşturulan sıçan diz eklem kıkırdak hasarı modelinde uygulayarak etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hiyalin Kıkırdak

2.1.1. Hiyalin Kıkırdak Histolojisi

Hiyalin kıkırdak vücutta en çok bulunan kıkırdak türüdür. Embriyoda kemik oluşumundan (enkondral ossifikasyon) sorumludur ve yetişkinlerde kosta kıkırdaklarında, solunum sisteminde (trakea) ve kemiğin eklem yüzeyini kaplayan (eklem kıkırdağında) bulunabilir (27). Hiyalin kıkırdak eklem yüzeylerini kaplayarak yük absorbe etmenin yanı sıra eklem hareketleri sırasında kaymayı kolaylaştırır(28).

Avasküler ve anöral özelliklerinden dolayı eklem kıkırdağı, beslenmesini ve oksijen desteğini sağlamak için difüzyona bağımlıdır ve bu da kendi kendini onarma kapasitesinde sınırlamalara neden olur(29).

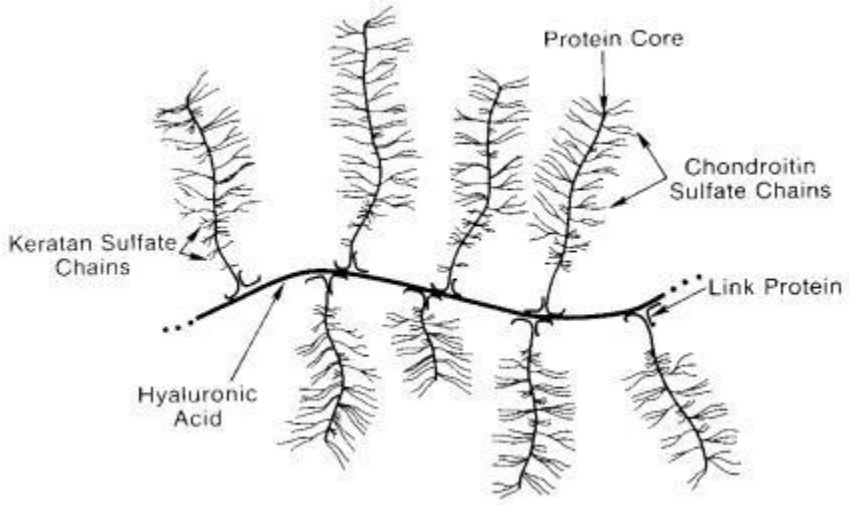
Olgun eklem kıkırdağı, matris biyokimyasal bileşimi ve hücre dağılımındaki farklılıklar ile karakterize edilen farklı bölgelere sahip bölgesel bir yapıya sahiptir(30). Eklem boşluğuna bitişik yüzeyde yüzeysel bölge, eklem yüzeyine paralel uzanan uzun, düzleştirilmiş hücrelerden oluşur. Bitişik altta yatan ara/geçiş bölgesi, biraz daha büyük ve daha yuvarlak kondrositlerden oluşur ve daha rastgele yönlendirilir ve önemli bir matrisle ayrılır. Kıkırdak bölgelerinin en büyüğü olan derin bölge, genellikle eklem yüzeyine dik olarak dikey istifler halinde hizalanmış bulunan çok büyük, yuvarlak kondrositlerden oluşur. Eklem kıkırdağının tabanında subkondral bağlantı, fiziksel stabilite ve altta yatan kemiğe bağlantı sağlar. Eklem kıkırdağı boyunca, öncelikle fibriller halinde organize edilen kollajen II ve multimerik üst yapılar halinde organize edilen agrekandan oluşan bol miktarda hücre dışı matris, dokuya temel gerilme mukavemetini ve elastikiyetini sağlar(31).

Eklem kıkırdağı avaskülerdir. Eklem hareketi ve şok emilimi için gerekli mekanik fonksiyonları sağlayan hücre dışı matrise (ECM) gömülü kondrositlerden oluşur(32). Kondrositler özelleşmiş mezenkimal hücrelerdir(33). Normal fizyolojik koşullar altında kondrositler, ECM bileşenlerinin sentezi ve yıkımı arasında hassas bir denge sağlar, böylece kıkırdağın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünü düzenler(34). Kondrositler, önemli bir fonksiyonel bileşen olarak mekanik destek sağlar ve kıkırdakta ağrısız, pürüzsüz bir artikülasyon sağlar. Kondrositler, glikoprotein, kollajenler, proteoglikanlar ve hiyalüronan sentezleyerek hücre dışı matrisin (ECM) dönüşümünü sürdürmek için metabolik olarak aktif olmak gibi ayırt edici özellikler gösterir. Kondrositler, doku hacminin %10'unu kaplayan daha yüksek matris-hücre hacmine sahiptir ve memeli eklem kıkırdaklarının fonksiyonel özelliği ile ilişkilendirilebilir (35).

Normal fizyolojik şartlarda metabolik olarak aktif kondrositlerin, özellikle eklem kıkırdağındaki toplam kolajen içeriğinin %90-95'ini temsil eden tip II kolajen ve hyaluronan ile büyük agregatlar oluşturabilen en bol proteoglikan agrekan olmak üzere ECM bileşenlerinin sentezinden özel olarak sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sağlıklı kıkırdak, ECM bileşenlerinin kademeli olarak yeniden şekillenmesiyle karakterize edilir ve bu da aynı şekilde esas olarak kondrositler tarafından gerçekleştirilir(36). Kondrositler sadece uygun iskelet gelişimi için temeli sağlamakla kalmaz, kırık iyileşmesi sırasında kemiğin yeniden şekillenmesini ve yenilenmesini de destekler(37).

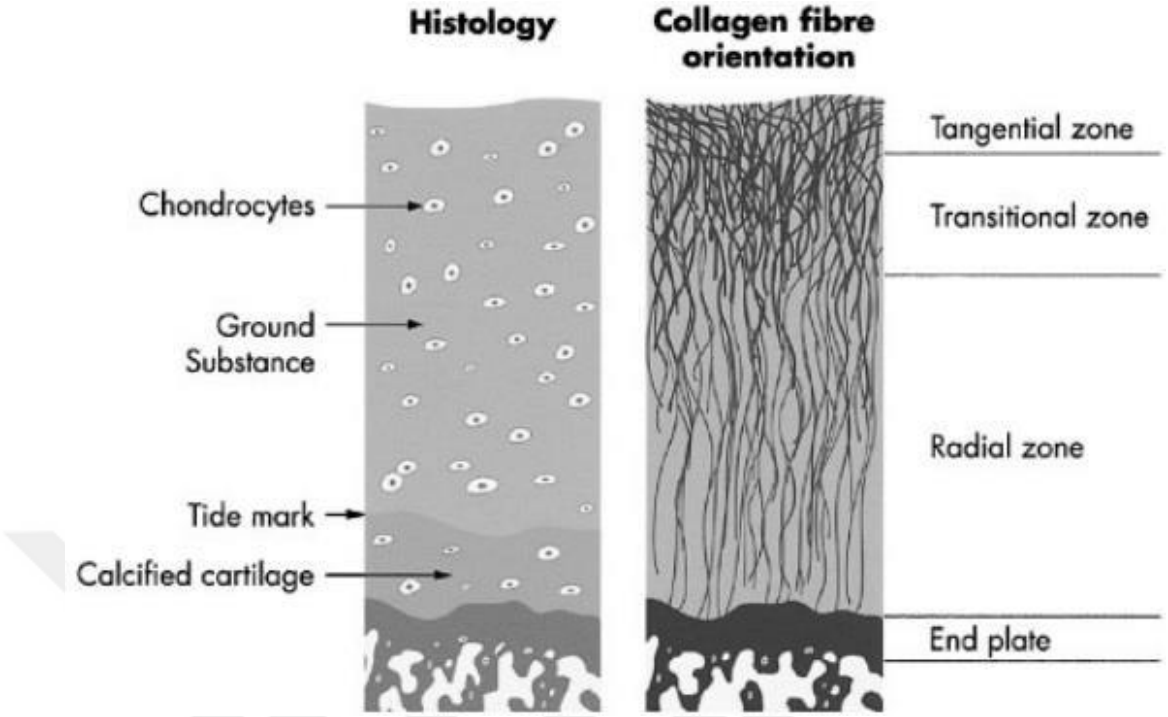
Hiyalin kıkırdak, ECM açısından zengin bir dokudur ve kuru ağırlığının yaklaşık %95'i ECM'den oluşur(38). Kıkırdak ECM, eklemler hareket ettikçe basıncı ve kayma gerilimini dağıtmak için kritik elastik destek sağlayan kıkırdağın biyomekanik özellikleri için gereklidir (39). Kıkırdak ECM; tip II, IX ve XI kollajen moleküllerinden oluşan kollajen fibrillerinden ve agrekan, bağlantı proteini ve glikozaminoglikanlardan oluşan proteoglikanlardan(PG) oluşur(40). Bu bileşenler, hücrelerin ve dokuların gelişimi, bakımı ve büyümesi için yapısal bir iskelenin yanı sıra spesifik ipuçları sağlamak üzere makromoleküler düzeyde birleşir(41).

PG'ler, şişmeyi kısıtlayan ve dokuya gerilmeye karşı direncini veren kolajenin arkad benzeri yapısı tarafından dokuda tutulan bir şişme basıncı oluşturarak, kompresyon yüklemesine karşı kıkırdak direnci sağlar(42). PG, karmaşık bir kimyasal yapıya sahiptir: bir veya daha fazla glikozaminoglikan, agrekanı oluşturan bir protein çekirdeğine bağlanır ve agrekanlar, PG makromolekülünü oluşturan büyük PG agregatlarından oluşan hyaluronana bağlanır. PG boyunca yüklü sülfat ve karboksil gruplarındaki kovalent olmayan bağ, suyu çekebilir(43). Proteoglikan monomerlerinin bağlantı proteinleri aracılığıyla bağlandığı merkezi bir hyaluronik asit zincirinden oluşur. Her monomer, ona bağlı birden fazla glikozaminoglikan içeren bir protein çekirdeğinden oluşur(44) (Şekil 2).



Şekil 2. Bir proteoglikan agregatının çizimi.

Kollajenler, yetişkin eklem kıkırdağının kuru kütlesinin üçte ikisini oluşturan ECM proteinlerinin en bol bulunan ailesidir. Eklem kıkırdağında tip II, IX, X, XI, VI, XII ve XIV kollajen gibi çok sayıda kollajen alt tipi tanımlanmıştır. Eklem kıkırdağı kollajen fibrilleri çoğunlukla tip II kollajenin eşlik ettiği daha az miktarda minör kollajenden oluşur; bunlar, kıkırdağa gerilme mukavemeti sağlar ve olgun matrisin fiziksel özelliklerine katkıda bulunur(45). Kıkırdağın mekanik özellikleri büyük oranda kollajen fibrillerin organizasyonuna bağlıdır(46). Normal yetişkin insan eklem kıkırdağında, kollajen fibril ağı üç farklı katmandan oluşur: fibrillerin çoğunlukla kıkırdak yüzeyine paralel olduğu, eklem yüzeyinin direnç özelliğinden sorumlu yüzeysel bölge; fibrillerin nispeten rastgele dağıldığı orta bölge; ve fibrillerin çoğunlukla kıkırdak yüzeyine dik olarak yönlendirildiği derin bölge (Şekil 3). Normal eklemlerde bu kollajen ağı, doku için yapısal bir çerçeve görevi görerek, gerilme ve kayma mukavemetinin ana kaynağını sağlar(47-48). Hiyalin kıkırdak içindeki derinliğe bağlı olarak kondrosit yoğunluğu, morfolojisi ve gen ekspresyonu da değişiklik gösterir(49-51). ECM bileşenlerinin bu katmanlar içindeki son derece organize dağılımı ve bunların etkileşimleri, eklemin uzun vadeli yük taşıma kapasitesini kolaylaştıran gözenekli ve geçirgen bir doku sağlar(52).



Şekil 3. Hiyaloplazma ile çevrelenmiş kondrositleri gösteren hiyalin kıkırdak H&E boyası (solda). Bölgesel bir anatomiyi gösteren kollajen fibrillerini (sağda) gösterecek şekilde boyanmış hiyalin kıkırdak(53)

2.2. Kondral İyileşme Süreçlerinin Araştırma Modelleri

Deneysel hayvan modelleri, yeni biyomateryal çözümlerin etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmeyi amaçlayan araştırmaların birincil tercihidir(54). Kıkırdak rejenerasyonunun analizi için sıklıkla kullanılan hayvanlar fare, sıçan ve tavşan (küçük hayvan modelleri) veya köpek, koyun, keçi, (mini)-domuz ve attır (büyük hayvan modelleri). İkinci modellerin anatomik ve insan klinik durumunu daha iyi yansıttığına inanılmaktadır ve bu nedenle "Avrupa İlaç Ajansı" (EMA9-13) tarafından klinik öncesi çalışmalar için önerilmektedir(55). Eklem kıkırdağının makroskobik katmanlı yapısı tüm memeli türlerinde ortak olmasına rağmen yine de türe özgü bazı farklılıklar mevcuttur. İnsanlarda kıkırdak dokusu travmasının tedavisine odaklanan deneysel modeller tasarlanırken bunlar dikkate alınmalıdır(56). Yeni kıkırdak implantlarını değerlendirmek için, tercihen medial femoral kondil, lateral femoral kondil ve diz ekleminin trokleasında fokal kıkırdak defektleri oluşturulur(57). Kemik ve eklem kıkırdağı doku

mühendisliğinde tedavi için akılda üç temel hedef vardır: 1) hasarlı dokuyu onarmak 2) hasarlı eklem yüzeyinin veya kemiğin işlevini geri yüklemek ve 3) konakçının biyolojik tepkisini kullanarak etkilenen bölgenin morfolojik ve fonksiyonel özelliklerini tamamen yeniden oluşturmaktır. Şu anda, implante edilen biyomateryallerin bu hedefleri karşılamadaki etkinliği yalnızca in vitro testlerle ve ardından klinik öncesi hayvan modellerine implantasyonla doğrulanabilmektedir(58).

Eklem kıkırdağının hasar görmesi sınırlı bir iyileşme tepkisine neden olur ve sıklıkla eklem çapında osteoartrite (OA) doğru ilerler(59). Osteoartrit ve travmanın neden olduğu kıkırdak bozulması, rejeneratif tıpta hala büyük bir zorluktur. Eklem kıkırdağı (AC) onarımını iyileştirmek için hücre bazlı tedaviler ve/veya hücresiz yaklaşımlar dahil olmak üzere çeşitli yöntemler geliştirilmiştir(60). Geçtiğimiz yirmi yılda değişen derecelerde kıkırdak onarımının rapor edildiği yeni tedavi yöntemleri ortaya çıktı. Ancak tutarlı, olumlu ve tekrarlanabilir klinik sonuçlar hala mevcut değildir (61). Tedavi metodları, genellikle konservatif ve cerrahi tedavi şeklinde ikiye ayrılabilir. Konservatif tedavi, farmakoterapi, çeşitli minimal invaziv cerrahi yöntemler, immobilizasyon, eklem ponksiyonu, fizyoterapi ve vücut kitle indeksinin azaltılmasını içerir. Cerrahi tedaviler ise rejeneratif ve onarıcı olarak iki başlıkta ele alınabilir(62).

2.3. Kıkırdak Yaralanması Tedavisi

Eklem kıkırdağı defektleri, mevcut rekonstrüktif cerrahi seçeneklerin hiçbiri, özellikle daha büyük defektlerde, normal eklem kıkırdağının orijinal biyolojik ve mekanik özelliklerini geri getiremediği için zorlu olmaya devam eden yaygın klinik problemlerdir(63). Sonuçta kıkırdak lezyonların osteoartrite dönüştüğüne inanılmaktadır. Bu nedenle, osteokondral defektler için alternatif tedavilerin geliştirilmesi vazgeçilmezdir(64). Günümüzde mevcut olan çok sayıda tekniğe rağmen, hasar görmüş veya kusurlu kıkırdakların tamamen iyileşmesi ve normal hiyalin kıkırdağın tutarlı bir şekilde yeniden üretilmesi mümkün değildir. Bu nedenlerden dolayı, sürekli ilaç tedavileri ve ikincil ameliyatlar yaygındır ve eklem kıkırdağı lezyonlarına yönelik yeni tedavi yöntemlerinin klinik önemi yüksektir(65).

2.3.1. Cerrahi Yöntemler

Cerrahi yöntemleri onarıcı ve rejeneratif teknikler olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki yöntemdeki amaç hasarlı eklem kıkırdağının yeniden yapılandırılmasıdır. Bu hasarın onarımı, sağlıklı kıkırdak dokusundan farklı histolojiye sahip bir doku ile de yapılabilmektedir. Bu doku,

doku sürekliliğini, orijinal farklılaşmalarını ve tam fonksiyonel kapasitelerini geri getirmeden önce yeniden kıkırdak veya kıkırdak benzeri doku oluşumunu indüklemelidir(66).

2.3.1.1. Onarıcı Cerrahi Yöntemler

Geleneksel kıkırdak onarım yöntemleri temel olarak subkondral drilleme, debridman, mikrokırık cerrahisi, osteokondral greftleme ve otolog kondrosit implantasyonunu içerir. Bu yöntemlerin amacı, onarım ve yeniden yapılanma için çeşitli hücrelerin çoğalmasını ve kondrosite farklılaşmasını sağlamak üzere harekete geçirmektir. Bununla birlikte, onarılan doku genellikle hiyalin kıkırdak yerine fibrokartilajdır ve daha fazla bozulma ve ossifikasyon mümkündür. Bu nedenle genel terapötik etki zayıftır (67-68).

1957'de Smillie tarafından osteokondritis dissekans tedavisi ve 1959'da Pridie tarafından osteoartrit tedavisi için önerilen subkondral drilleme, klinik ortamda eklem kıkırdağı onarımı için yaygın olarak kullanılan bir kemik iliği stimülasyon tekniğidir. Burada standart prosedür, subkondral kemik plakasına belirli bir dairesel kesite sahip birkaç delik açmak için cerrahi bir döner matkap ucu veya bir Kirschner teli ile gerçekleştirilir. Kalsifiye kıkırdak tabakasının titizlikle çıkarılmasının ardından, defektin tabanındaki açıkta kalan subkondral kemik plakası, aletin özel yapım kesici ucu tarafından yaklaşık 10.000 ila 400.000 rpm gibi yüksek bir hızda belirli bir derinliğe kadar delinir (69). Daha sonra ilik bölmesi içindeki basınç, kemik iliği kaynaklı sıvının ve hücrelerin kıkırdak defektini doldurmasını, bir pıhtı oluşturmasını ve fibröz matrisin oluşumu için bir şablon görevi görmesini teşvik eder(70). Drilleme ayrıca intraosseöz basıncı azaltarak ağrıyı hafifletir. Tekniğin dezavantajı drilleme işleminin sağlıklı dokuya termal hasar vermesidir (71).

Eklem debridmanı ilk olarak Magnuson tarafından tarif edilmiştir. Eklemlerin kesilmesini, menisektomiyi, osteofitlerin ve gevşek cisimlerin çıkarılmasını, eklem aşınmalarını ve hatta sinovektomiyi bile içeren geniş bir terimdi(72).

Mikrokırık cerrahisi sırasında kemik iliği boşluğuna erişilene kadar debride edilen kıkırdak kemiği delinerek açılır. Mikrokırık bölgesinde emilen ve yerini fibröz dokularla değiştiren bir hematom oluşur. Ortaya çıkan 'fibrokartilaj' bir miktar semptomatik rahatlama sağlar ancak normal eklem kıkırdağıyla karşılaştırıldığında önemli ölçüde azalmış mekanik özelliklere sahiptir. Mikrokırığın fibrokartilaj oluşumuna neden olduğu mekanizma, bu tekniğin yerleşik kök hücre popülasyonları üzerindeki etkisi veya bunun doku yenilenmesi için nasıl kullanılabileceği hakkında çok az şey bilinmektedir(73).

Osteokondral allograftlar (OCA), olgun, hiyalin kıkırdağı biyolojik, yapısal ve işlevsel olarak uygun bir şekilde restore ederek büyük eklem kıkırdağı defektlerini onarır. Bu tür OCA'lar

geçmişte donörün ölümünden sonraki 7 gün içinde taze olarak implante edilmişti ve geniş bir yelpazedeki eklem patolojilerinin, özellikle hem kemik hem de kıkırdak bileşeni içeren durumların tedavisinde faydalıdır. Biyolojik eklem rekonstrüksiyonlarında osteokondral transplantasyonların kullanımı yirminci yüzyılın başlarında rapor edilmiş olsa da, bu tür taze OCA'ların kullanımı yüzyılın sonuna kadar klinik ilgi ve kullanıma yeniden kavuşmadı(74).

Eklem kıkırdağı kusurlarının onarımı için altın standart hücre tedavisi, uzun vadede iyi sonuçlar veren otolog kondrosit implantasyonudur. Kemik iliğinden veya yağ gibi bağ dokularından elde edilen mezenkimal stromal/kök hücreler (MSC'ler), kıkırdak onarımına alternatif olarak araştırılıyor ve diz osteoartriti olan hastalarda eklem içi uygulama yoluyla deneniyor. Erken aşamadaki klinik çalışmalar güvenlik konusunda hemfikirdir ve etkililik konusunda umut verici bazı bilgiler sağlar, ancak etki mekanizması belirsizliğini koruyor(75).

2.3.1.2. Rejeneratif Cerrahi Yöntemler

Son birkaç yılda geleneksel cerrahi yöntemlere alternatif olarak rejeneratif tıp stratejileri geliştirildi. Doğal kıkırdağa en çok benzeyen özellikleri gösteren yeni bir doku yaratma iddialı bir amaç edinildi. Doku bileşimi ve mimarisi fonksiyonla derinden bağlantılıdır. Bu nedenle yapıyı yeniden yaratma yeteneğinin yenilenme için gerekli olduğuna inanılmaktadır. Rejeneratif tıp, hastalıklar, travma, konjenital kusurlar veya yaşlanma nedeniyle bozulan yapı ve fizyolojik fonksiyonları yeniden sağlamak amacıyla hücrelerin, dokuların veya organların onarımı, yenilenmesi ve değiştirilmesine odaklanan yenilikçi tedavilerin geliştirilmesiyle ilgilenir. Osteokondral greftleme rejeneratif yaklaşımı, hasarlı osteokondral alanın otolog (mozaikoplasti) veya allojenik (allogreft transplantasyonu) (kıkırdak ve kemik) doku ile değiştirilmesinden oluşur. Teknik, otolog prosedürde donör sahası morbiditesi ve greft yetmezliği veya allojenik prosedürde olası hastalık bulaşması ve kısa hücre canlılığı nedeniyle sorunlar ortaya çıkarabilir(76).

2.4. Spongostan

Doku mühendisliği, fonksiyonel insan dokularının yenilenmesine adanmış bir alandır. Vücudun kendine özgü kendi kendini iyileştirme özelliklerine sahip olmasına rağmen, onarımın kapsamı farklı dokular arasında farklılık gösterir ve ayrıca yaralanma veya hastalığın ciddiyeti nedeniyle zayıflayabilir. Klasik paradigma, doku oluşumunu ve konakçı ortamdaki entegrasyonu düzenlemek için biyomateryal yapı iskelelerinin, hücrelerin ve biyoaktif moleküllerin bir

kombinasyonuna dayanır(77). İkame malzemelerle kemik dokusu mühendisliği karmaşık ve dinamik bir süreçtir. Çünkü doğal kemik, benzersiz bir nano ve mikrotopografyayı birleştirerek, sonunda kemiği oluşturmak için kalsiyum biriktiren kök hücrelerin ve osteojenik progenitör hücrelerin vaskülarizasyonunun yanı sıra göçüne ve farklılaşmasına da olanak tanır. Özellikle kemiğin mikro ölçeğinde, kollajen lif katmanlarından oluşan tekrarlanan osteon birimleri, kan damarlarını ve sinirleri içeren merkezi bir kanala olanak sağlar. Nano ölçekli düzeyde, mikrofibrillere birleştirilen üçlü sarmal kollajen molekülleri, 67 ± 5 nm'lik karakteristik tek D periyodikliği ve yaklaşık 30 nm uzunluğunda bir boşluk bölgesi gösterir (78). Spongostan, absorbabl, steril bir domuz jelatini süngerdir. Cerrahinin birçok alanında yaygın olarak kullanılan hemostatik bir malzemedir (79). Spongostan, defektlere implante edilen proteinler veya hücreler için bir iskele görevi görebilir ve zayıf inflamatuar reaksiyona sahip vaskülarize, ince bağ dokusu kapsüllerinin oluşumuyla kendini gösteren olağanüstü bir biyouyumluluk sergiler(80). Domuz derisi kollajeninden elde edilir. Tek başına kullanıldığında kemik yenilenmesi üzerinde bilinen herhangi bir olumlu etkisi yoktur. Kemik büyüme faktörlerini lokal olarak sağlama kapasitesini değerlendiren çok az çalışma vardır. (81). Kolayca temin edilebilir, daha ucuzdur ve doku defektlerini yok edecek şekilde tam olarak uyarlanabilir(82).

2.5. Aloe Vera

Aloe, sağlık açısından sayısız fayda sağlama konusunda uzun bir geçmişe sahiptir. Dünya çapında en sık kullanılan bitkisel ilaçlardan biridir. Aloe'nin 400'den fazla türü vardır. Ancak en popüler ve yaygın olarak kullanılan tür Aloe barbadensis Miller'dir (ayrıca Aloe vera Linne olarak da bilinir, genellikle Aloe vera olarak anılır). (83). Aloe vera, dünya çapında cilt hastalıkları, metabolik hastalıklar, kalp-damar hastalıkları ve kanserlerin önlenmesi veya tedavisinde yaygın olarak kullanılan en popüler şifalı bitkilerden biridir.

Çok sayıda çalışma, aloe yaprağının, immünomodülasyon, antimikrobiyal, antiviral, anti-kanser, anti-inflamatuar özellikler gibi polisakkaritlerin varlığına atfedilen çok sayıda fonksiyona sahip olduğunu bildirmiştir(84). Aloe vera jeli, hücre yüzeyi reseptörlerini uyarma potansiyeline sahip bazı büyüme faktörleri ve vitaminlerden oluşur(85). Aloe vera ve diğer Aloe türleri, az su bulunan bölgelerde yaşamaya adapte olmuş etli ve kserofitik bitkilerdir. Bu bitkiler, bitkinin tedavi edici özellikleri için kullanılan kısmı olan yapraklarında geniş bir su depolama dokusuna sahiptir. Kuru maddedeki en büyük bileşenler (%60) karbonhidratlardır (çözünür şeker ve kompleks polisakkaritler) (86).

Aloe vera bitkisinin parankimal dokusunun müsilajinöz jelinin, etkili anti-inflamatuar, antioksidan aktivite ve doku kültüründe hem doku büyümesini hem de farklılaşmayı destekleyen

bir immün modülatör etki gibi çeşitli farmakolojik ve terapötik aktiviteye sahip birçok fizyolojik olarak aktif bileşene sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca hücre çoğalmasını arttırdığı ve yanık yaralarının tedavisinde uygulamaları olduğu rapor edilmiştir. Dahası, bilim adamları Aloe verada amino asitler, antrakinonlar, enzimler, mineraller, vitaminler, ligninler, monosakkaritler, polisakkaritler, salisilik asit, saponinler ve steroller dahil 150'den fazla besin maddesi keşfettiler (87). Aloe veranın doku yenilenmesi potansiyeli olan, hücre proliferasyonu, hücre dışı matriks sentezi ve mineralizasyonda önemli bir rol oynayan bir biyomolekül olduğu gösterilmiştir (88).

3. MATERYAL METOD

Spongostan ve Aloe Veranın kıkırdak iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmak için deneysel çalışma planlandıktan sonra Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan DeneyleriYerel Etik Kurulu'ndan 14/02/2023 tarih ve 2023/13 karar no ile hayvan deneyi etik kurul onayı alındı. Üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nden TTU- 2023-1476 nolu proje ile çalışma desteği alındıktan sonra 20/01/2023 – 20/04/2023 tarihleri arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde çalışma yürütüldü.

Çalışmada ortalama ağırlığı 280-340 ± 15 gr olan 40 adet Sprague-Dawley cinsi dişi erişkin sıçanlar kullanıldı. Çalışma grupları rastgele oluşturuldu. Her grupta sekiz sıçan ve 5 grup olacak şekilde kafeslere ayrıldı (Tablo 1). Kafesleri üzerine grupları belirten etiketlendirme yapıldı (Şekil 4).

Hayvanlarda korku ve stres ortamı oluşturulmaması amacıyla tüm hayvanlara günlük alışma süreci sonunda işleme başlanıldı. Kıkırdak hasarı oluşturulmadan önce ve sonraki dönemde yem olarak pelet tam sıçan yemi (Bayramoğlu Yem ve Un Sanayi / Erzurum) kullanıldı. Suları daima serbest bırakılmış (ad libitum) olarak verildi. Günlük olarak değiştirildi. Tüm hayvanlar steril, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık deney hayvanları ünitesi ortamında%55-60 nem oranı ve 22±3 °C oda sıcaklığında bakım ve beslenmeye tabitutuldu.



Şekil 4. Gruplandırma ve etiketlendirme

3.1. Çalışma Grupları

Tablo 1. Çalışma grupları

Çalışma grupları	**Çalışma haftaları**
Grup 1 (n=8) Sağlıklı kontrol grubu	6. hafta sakrifiye
Grup 2 (n=8) Kıkırdak defekt grubu	6. hafta sakrifiye
Grup 3 (n=8) Kıkırdak defekt + spongostan grubu	6. hafta sakrifiye
Grup 4 (n=8) Kıkırdak defekt + %5 Aloe vera emdirilmiş spongostan	6. hafta sakrifiye
Grup 5 (n=8) Kıkırdak defekt + %20 Aloe vera emdirilmiş spongostan	6. hafta sakrifiye

3.2. Anestezi

Cerrahi anestezik olarak, 50 mg/kg ketamin HCI (Ketasol%10, Richter Pharma AG, Wels-Austria), 5 mg/kg Xylazine HCI (Rompun %2, Bayer İlaç Sanayi, İstanbul) aynı enjektör içinde kombine olarak intramüsküler yol ile uygulandı (0.4 cc ketamin-0.1 cc rompun).

Tüm denekler aynı cerrah tarafından opere edildi. Anestezi uygunluğu, sıçan derisine uygulanan sıkıştırmaya sıçanların verdiği yanıta göre değerlendirildi.

3.3. Deney Modelinin Oluşturulması

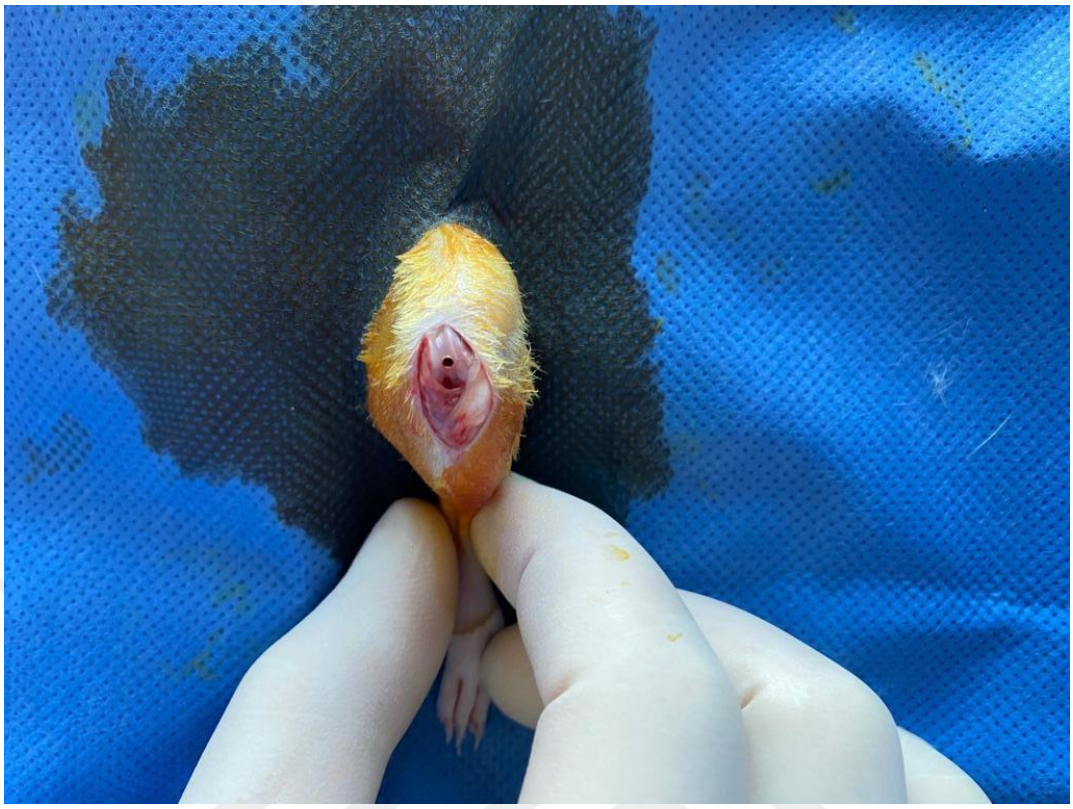
Cerrahi hazırlık sonrası (Şekil 5), sıçanların sağ alt ekstremitesi kasığa kadar traş edildi. Sterilizasyonu sağlamak amacıyla kıkırdak hasarı yapılacak sıçanların sağ alt ekstremiteleri tamamen%10 povidoneiodine solüsyonu ile temizlenip, operasyon sahası açık kalacak şekilde steril örtüler ile örtüldü (Şekil 6). Diz anteriordan vertikal yaklaşık 1,5 cm lik cilt insizyonu yapıldı. Cilt altı ve fasya geçildi. Retropatellar insizyon ile diz eklemine ulaşıldı. Patellar ve kuadriseps tendonları korundu. Mediale ve laterale ekartörler yerleştirilerek cerrahi çalışma sahası açıldı. Distal femur kondil troklear bölgeden termal hasar oluşturulmadan 1 mm çapında ve subkondral kemiğe ulaşan kıkırdak defekti oluşturuldu (Şekil 7). İnsizyon sahası %0,09 NaCl ile yıkanıp katlar 4/0 prolen sütür materyali ile anatomik planlara uygun olarak kapatıldı ve pansuman yapıldı. 3. gruptaki sıçanlarda, oluşturulan 1 mm' lik kıkırdak defektine aynı çap ve ölçüde spongostan materyali yerleştirildi (Şekil 8). İnsizyon sahası %0,09 NaCl ile yıkanıp katlar 4/0 prolen sütür materyali ile anatomik planlara uygun olarak kapatıldı ve pansuman yapıldı. 4. gruptaki sıçanlarda, oluşturulan 1 mm' lik kıkırdak defektine aynı çap, ölçüde ve hacim olarak tamamı olacak şekilde %5 Aloe vera emdirilmiş spongostan materyali yerleştirildi (Şekil 9). 5. gruptaki sıçanlarda, oluşturulan 1 mm' lik kıkırdak defektine aynı çap, ölçüde ve hacim olarak tamamı olacak şekilde %20 Aloe vera emdirilmiş spongostan materyali yerleştirildi (Şekil 10). İnsizyon sahası %0,09 NaCl ile yıkanıp katlar 4/0 prolen sütür materyali ile anatomik planlara uygun olarak kapatıldı ve pansuman yapıldı. Operasyona son verildi. Yara yerleri pansuman sonrası açık bırakıldı (Şekil 11). İnsizyon bölgesi günlük yara yeri pansumanı ile takip edildi.



Şekil 5. Cerrahi hazırlık



Şekil 6. Sıçan dizi görünecek şekilde cerrahi alanın steril olarak hazırlanması



Şekil 7 . Femur kondillerine ulaşım için uygulanan retropatellar insizyon ve sonrasında interkondiler bölgede 1 mm çapında oluşturulmuş kıkırdak defektinin görüntüsü



Şekil 8. İnterkondiler bölgede oluşturulan defekte aynı çap ve ölçüde spongostan materyalinin penset yardımı ile yerleştirilmesi



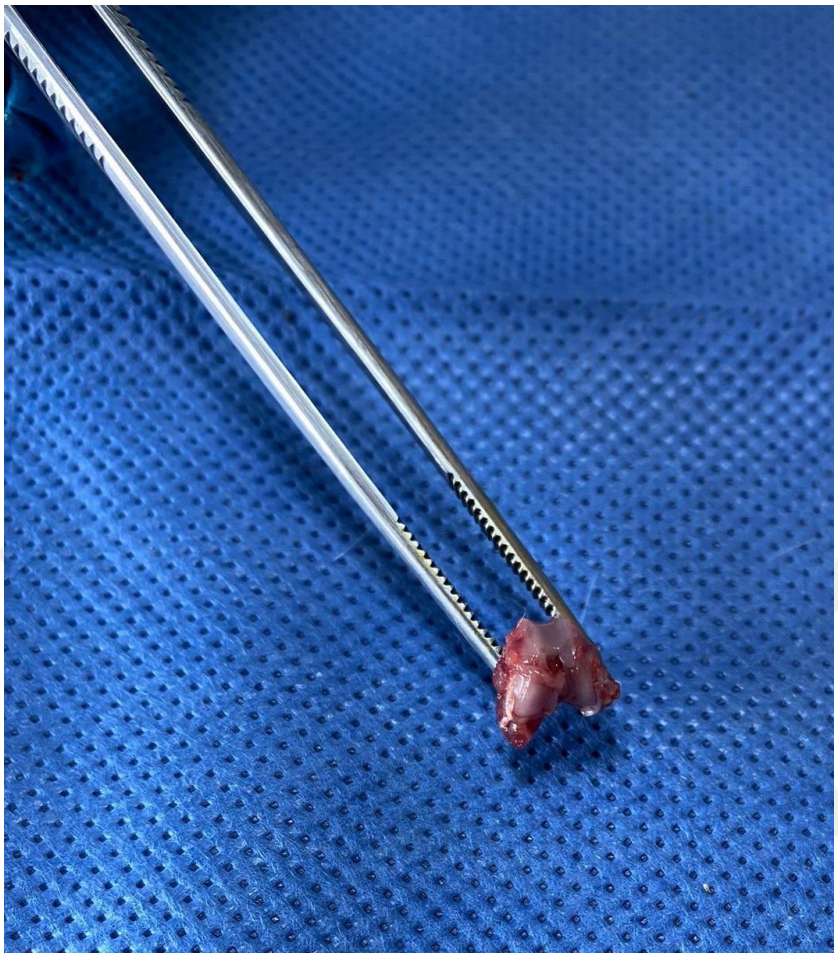
Şekil 9. İnterkondiler bölgede oluşturulan kıkırdak defektini dolduracak şekilde, %5 Aloe vera emdirilmiş spongostan materyalinin yerleştirilmiş görüntüsü



Şekil 10. İnterkondiler bölgede oluşturulan kıkırdak defektini dolduracak şekilde, %20 Aloe vera emdirilmiş spongostan materyalinin yerleştirilmiş görüntüsü



Şekil 11. Dizlerde kıkırdak hasarı oluşturulduktan sonra yara yerlerine pansuman yapılmış olan sıçanların erken postoperatif dönemdeki görünümü



Şekil 12. Femur distal yarısı ile birlikte kısmi eksize edilen sıçan femur kondillerinin görünümü

Cerrahi sonunda tek doz intraperitoneal 40 mg/kg sefazolin sodyum uygulandı. Anajezik olarak metamizol sodyum (Novalgin 1g/2ml IM/IV ampul) intramüsküler olarak uygulandı. Postoperatif dönemde sıçanlara immobilizasyon yöntemi uygulanmadı. Denekler cerrahi işlem sonrası sakrifikasyon sürecine kadar kafes içinde aktif mobilizasyona izin verilerek takip edildi. Her grup takip süresi sonunda (6. haftada) anestezi altında dekapitasyonla sakrifiye edilerek femur kondilleri uyluk distal yarısı ile birlikte kısmi çıkartıldı(Şekil 12). Femoral kondiller diseke edildi. %10 formol solüsyonuna alındı. Histopatolojik inceleme sürecine geçildi.

3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi

3.4.1. Histopatolojik Değerlendirme

3.4.1.1. Histopatolojik Doku Takip İşlemleri

5 farklı sıçan grubuna ait materyaller grupların özellikleri bildirilmeden numara ile kodlanarak patoloji laboratuvarına gönderildi. Cerrahi işlemden hemen sonra %10'luk nötral formaldehite alınan materyaller 24 saat fiksasyon amacıyla bekletildi. Fiksasyon işlemini takiben %8'lik formik asitte alındı. Günlük toplu iğne yardımıyla kontrol edilerek dekalsifikasyon sağlandı. Dekalsifikasyon işlemleri sonrası her bir sıçana ait eklem örneği doku takip kasetlerinde örneklendi. Materyaller otomatik doku takip cihazında (Leica ASP300S) takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklama cihazı (Leica EG1160) ile parafin bloklar oluşturuldu. Parafin bloklardan mikrotom makinası (Thermo Shandon Scientific Finesse ME) ile 4 mikronluk kesitler alındı. Otomatik boyama cihazı (Thermo Shandon Scientific Varistain Gemini Otomatik Boyama Cihazı) ile Hematoksilen Eozin boya ile boyandı.Aşamalar ve süreler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Toludine blue ve Safranin O-Green manuel olarak boyandı. Tüm kesitler manuel olarak lamel ile kapatıldı.

Tablo 2. Leica ASP300 S marka doku takip cihazının doku takibi aşamaları

Aşama	Uygulama ve solüsyonlar	Uygulanan süre
1	%10'luk Nötral Formaldehit	1 saat

2	% 70'lik etanol	45 dk
3	%80'lik etanol	45 dk
4	%90'lık etanol	45 dk
5	%96'lık etanol	2 saat
6	%99,9'luk etanol	90 dk
7	Ksilen	3x1 saat
8	Parafin	2x1 ssat
9	Parafin	1 saat 45 dk

Hematoksilen-Eozin Boyama

Hematoksilen – Eozin boyama kit prosedürüne uygun olarak aşağıdaki tabloda belirtilen aşama ve süreler boyunca uygulandı.

Tablo 3. Hematoksilen – Eozin Histokimya Boyama Aşamaları

Aşama	**Uygulama ve solüsyonlar**	**Uygulanan süre**
1	Ksilen (deparafinizasyon)	2x3 dk
2	Kurutma	1 dk
3	Absolüt etanol	2x3 dk
4	% 96'lık etanol (hidrasyon)	3 dk
5	% 80'lik etanol (hidrasyon)	3 dk
6	% 70'lik etanol (hidrasyon)	3 dk
7	Çeşme suyu	2 dk
8	Mayer's hematoksilen	15 dk
9	Çeşme suyu	2 dk
10	Eozin	75 sn
11	% 96'lık etanol	30 sn

12	Absolü etanol	30 sn
13	Kurutma	1 dk
14	Ksilol	30 dk
15	Entellan ile kapatma ve kurutma	

Safranin O & Fast Green boyama

Eklem yüzey kıkırdağı ve kemik matriksin değerlendirilmesine imkan sunan Safranin O & Fast Green FCF boyası aşağıdaki tabloda verilen protokole göre uygulandı.

Tablo 4. Safranin O & Fast Green Histokimya Boyama Uygulaması

Aşama	Uygulama ve solüsyonlar	Uygulanan süre
1	Ksilol (Deparafinizasyon)	10 dk
2	Hidrasyon (distile suya alma)	2 x 5 dk
3	Weigert's demirli hematoksilen	5 dk
4	Yıkama (distile su ile, boyanın fazlası dokudan tamamen uzaklaşıncaya kadar)	4 x 5 dk
5	% 1'lik asit alkolde bekletme (500 ml %70'lik etanol, 5 ml % 36,5'luk Hidroklorik asit çözeltisi)	2 sn (daldırıp çıkarma)
6	Yıkama (distile su)	2 x 5 dk
7	% 1'lik asetik asit solüsyonunda bekletme	30 sn
8	% 1'lik Safranin solüsyonunda bekletme	30 sn
9	% 95'lik etanolde bekletme	2 x 1 dk

10	Absolüt etanolde bekletme	2 x 1 dk
11	Ksilen ile şeffaflandırma	2 x 5 dk
12	Entellan ile kapatma ve kurutma	

Toluidine Blue Boyaması

Toludine Blue boyamasında kullanılan kimyasallar, uygulama basamakları ve süreler aşağıda tabloda gösterilmiştir.

Tablo 5. Toluidine Blue Histokimya Boyama Protokolü

Aşama	**Uygulama ve solüsyonlar**	**Uygulanan süre**
1	Ksilol (Deparafinizasyon)	10 dk
2	Hidrasyon (distile suya alma)	2 x 5 dk
3	Toluidin blue solüsyonu	2 dk
4	Yıkama (distile su ile, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması amaçlı)	2 x 5 dk
5	% 95'lik etanolde bekletme	2 x 1 dk
6	Absolüt etanolde bekletme	2 x 1 dk
7	Ksilen ile şeffaflandırma	2 x 5 dk
8	Entellan ile kapatma ve kurutma	

Sıçanlara ait eklemlerde eklem kıkırdağında hasar ve iyileşmeyi değerlendirmek üzere hazırlanan Hematoksilen Eozin, Safranin O & Fast Green FCF ve Toludine Blue boyaları ile boyalı kesitler OlympusBX51 mikroskobunda, çalışma grupları bilgisinden kör olarak patoloji uzmanı tarafından incelendi. Histopatolojik sınıflama için Mankin' in histolojik skorlama yöntemi kullanıldı (Tablo 6).

Tablo 6. Mankin histolojik skorlama yöntemi

Yapı	**Skor**
Normal	0
Yüzey düzensizlikleri	1
Pannus	2
Transizyonel zona yarık	3
Radyal zona yarık	4
Kalsifiye zona yarık	5
Tümden disorganizsyon	6
Tidemark/ sınır integritesi	
İntakt	0
Kan damarları tarafından geçilmiş	1
Proteoglikan boyanması	
Normal	0
Hafif azalma	1
Orta derecede azalma	2
Ciddi azalma	3
Hiç boyanmama	4
Hücresellik	
Normal	0
Diffüz hiperselülarite	1
Cloning	2
Hiposelülarite	3

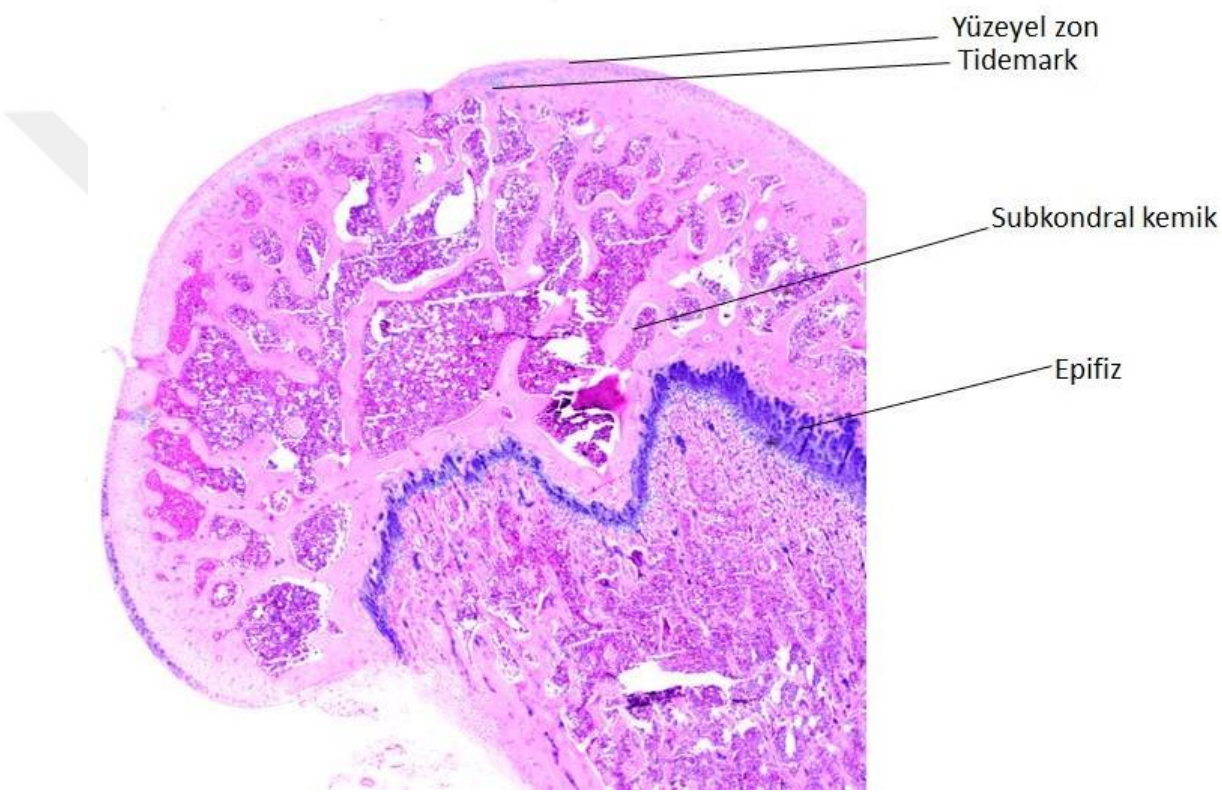
3.4.1.2. İstatistiksel Analiz

Analizler sonucu elde edilen tüm veriler Jamovi 2.4.6 istatistik programı kullanılarak hesaplandı. Çalışma gruplarının TBARS ve Toplam Tiyol Grubu değerlerinin dağılımını belirlemek için Kolmogorov-Smirrnov testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla bağımsız grupların değerlendirilmesinde Kruskal-wallis testi ve ardından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu belirlemek için post-hoc test olarak Bonferroni testi yapıldı. Elde edilen değerler aritmetik ortalama ± standart sapma (x±S.D) olarak ifade edildi. Elde edilen değerler median (çeyrekler arası aralık) olarak ifade edildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda p değeri <0.05 anlamlı olarak seçildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik bulgular

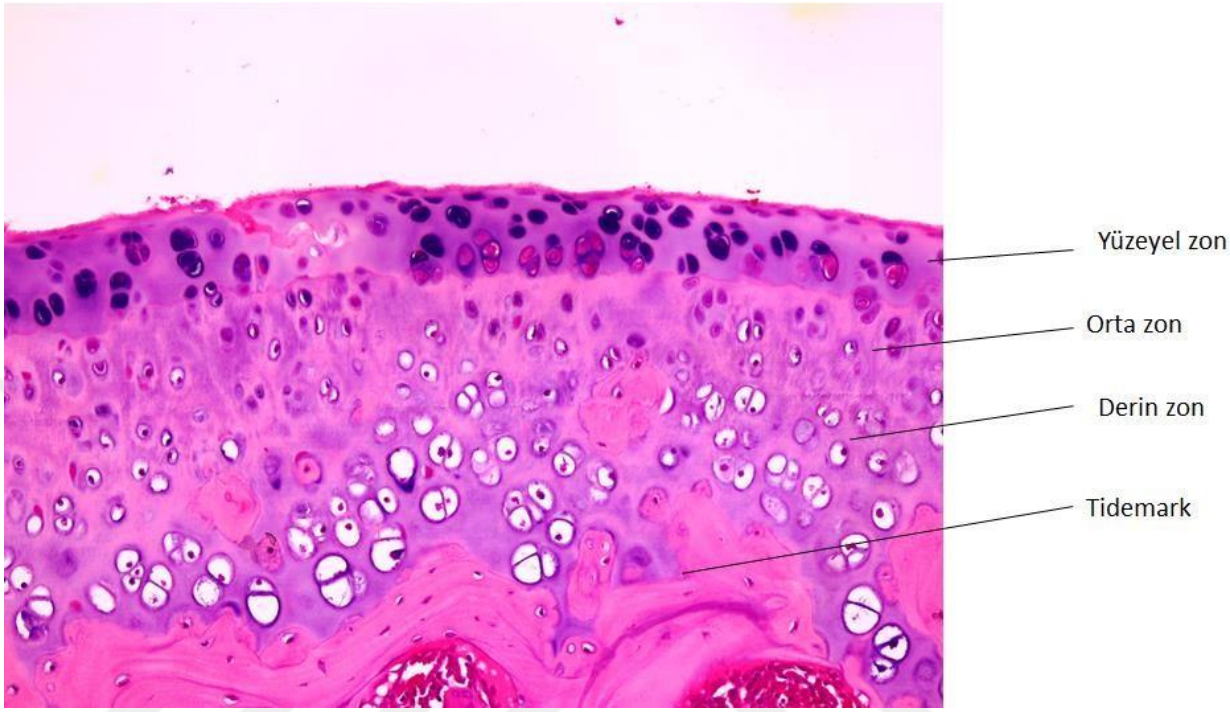
Diz eklemi kıkırdak dokusuna ait kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde kontrol grubundaki normal yapıda olan hiyalin kıkırdak dokusu görülmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. Grup 1 deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&Estainx20)

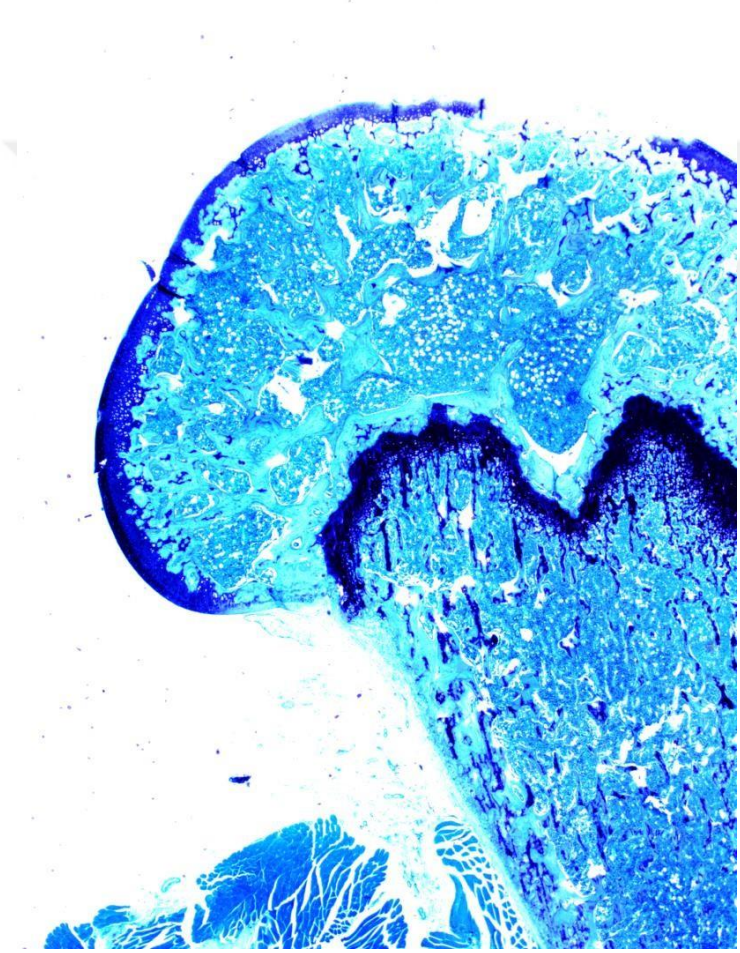
Normal yapıdaki hiyalin kıkırdak dokusunda kondrositler metabolik ihtiyaçlarına göre kıkırdağın farklı tabakalarında farklı yerleşim gösterirler. Buna göre kondrositler kıkırdağın yüzeyel bölgesinde disk şeklinde izlenirken, geçiş bölgesinde yuvarlak şekil kazanır. Derin bölgesinde (radyal bölge) ise dikey bir şekil alırlar. Yüzeyel zonda yer alan kondrositlerin derin zon kondrositlerinden farklı oranlarda proteoglikan ve agrekan sentezlemesi sayesinde farklı şekillerde maktriks kompozisyonu oluşturulur. Bu sayede farklı yüklerin emilmesi, dağıtılması sağlanır. Derin kıkırdak zonundan sonra başlayan kalsifiye bölgenin sınırına tidemark

denilmektedir (Şekil 14). Tidemark ve kalsifiye zon subkondral kemiğe mekanik gücün iletimini sağlamaktadır.

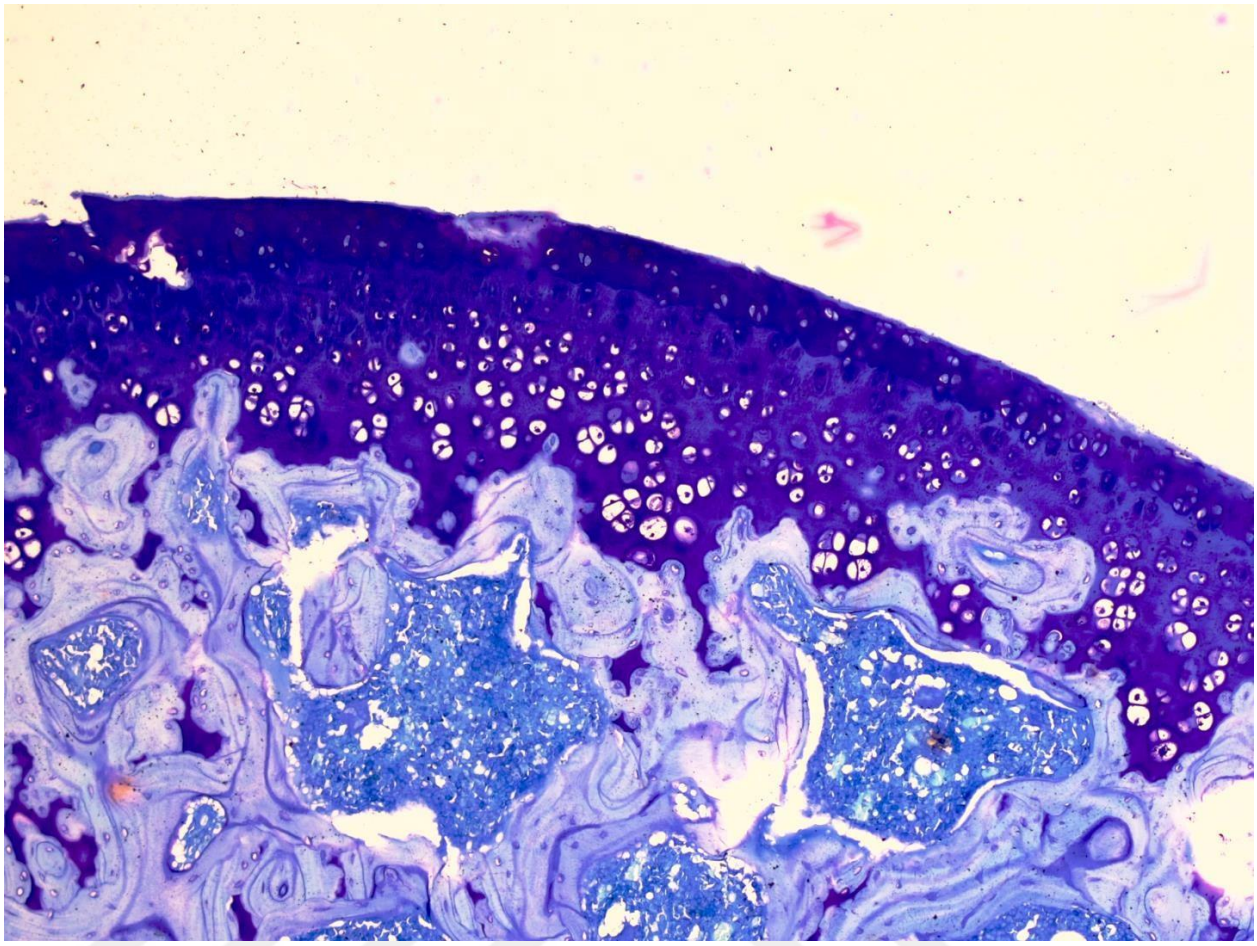


Şekil 14. Grup 1'deki işlem yapılmayan sıçan femoral kondilinin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görüntüsü (H&E stain*400) .

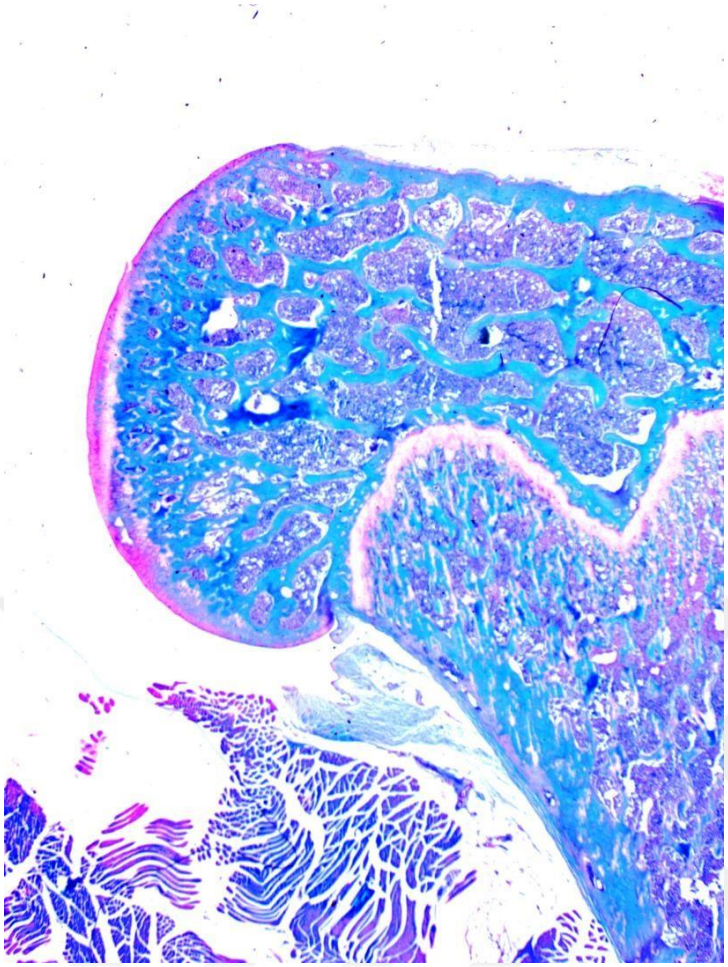
İşlem uygulanmayan sıçanlara ait eklemde normal proteoglikan boyanmasının değerlendirildiği Toluidin blue ve kıkırdağın tidemark sınır integritesinin değerlendirildiği safranin O- Fast Green boyama örnekleri Şekil 15-18'da gösterilmiştir.



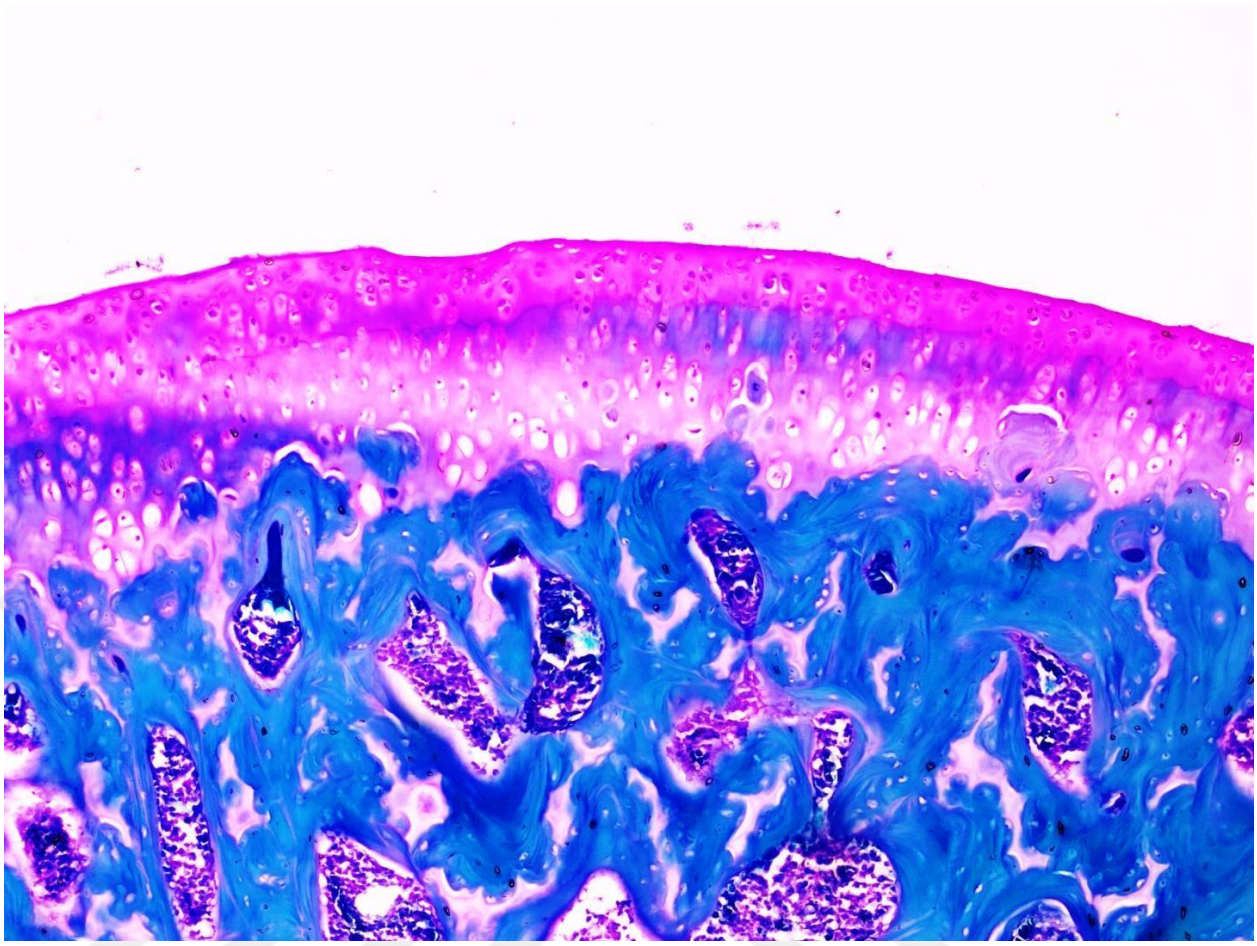
Şekil 15. Grup 1'deki işlem yapılmayan rata ait femoral kondilin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x20)



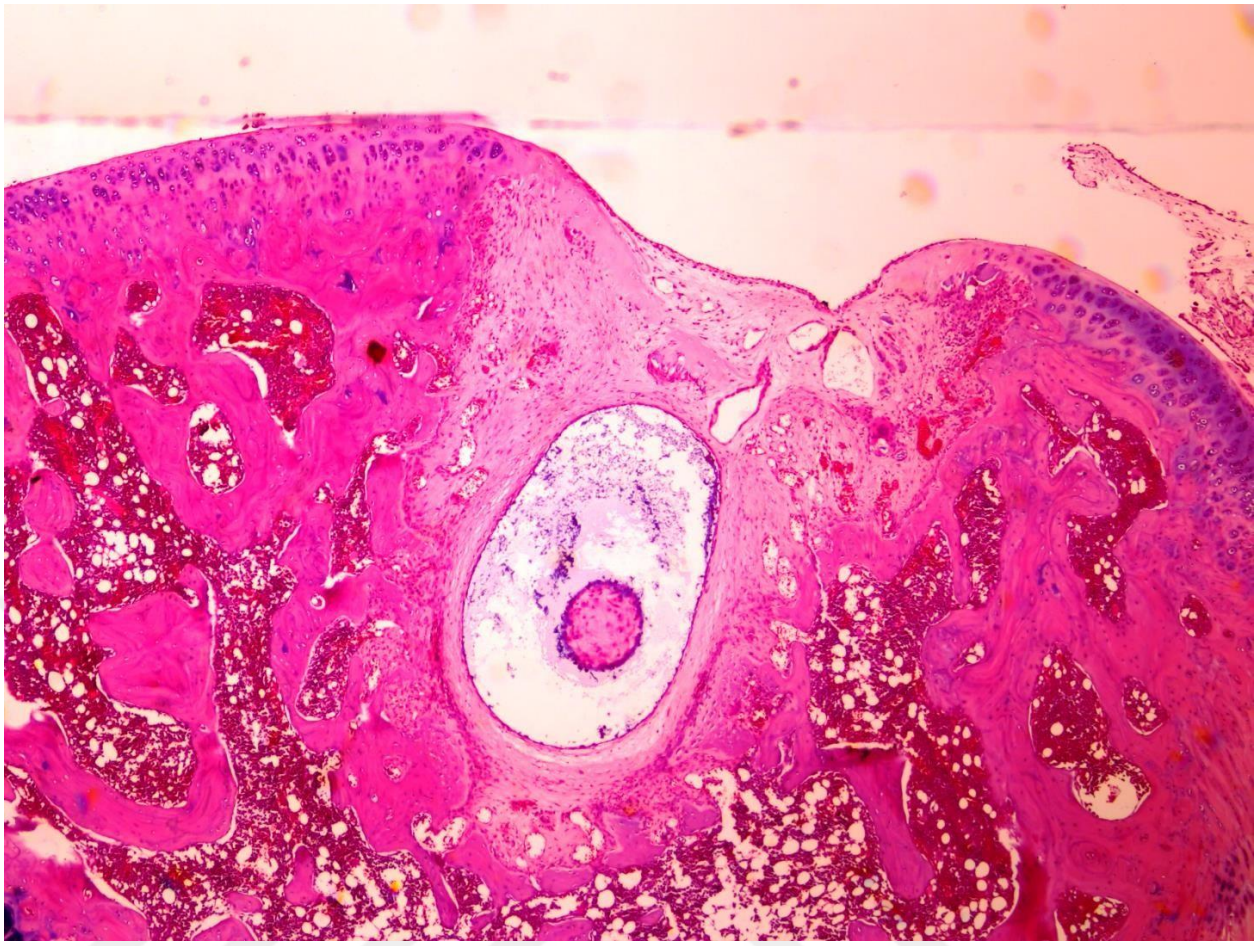
Şekil 16. Grup 1'deki işlem yapılmayan rata ait femoral kondilin hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x400).



Şekil 17. Grup 1'deki işlem yapılmayan rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görünümü (Safranin O-Green stain x20)

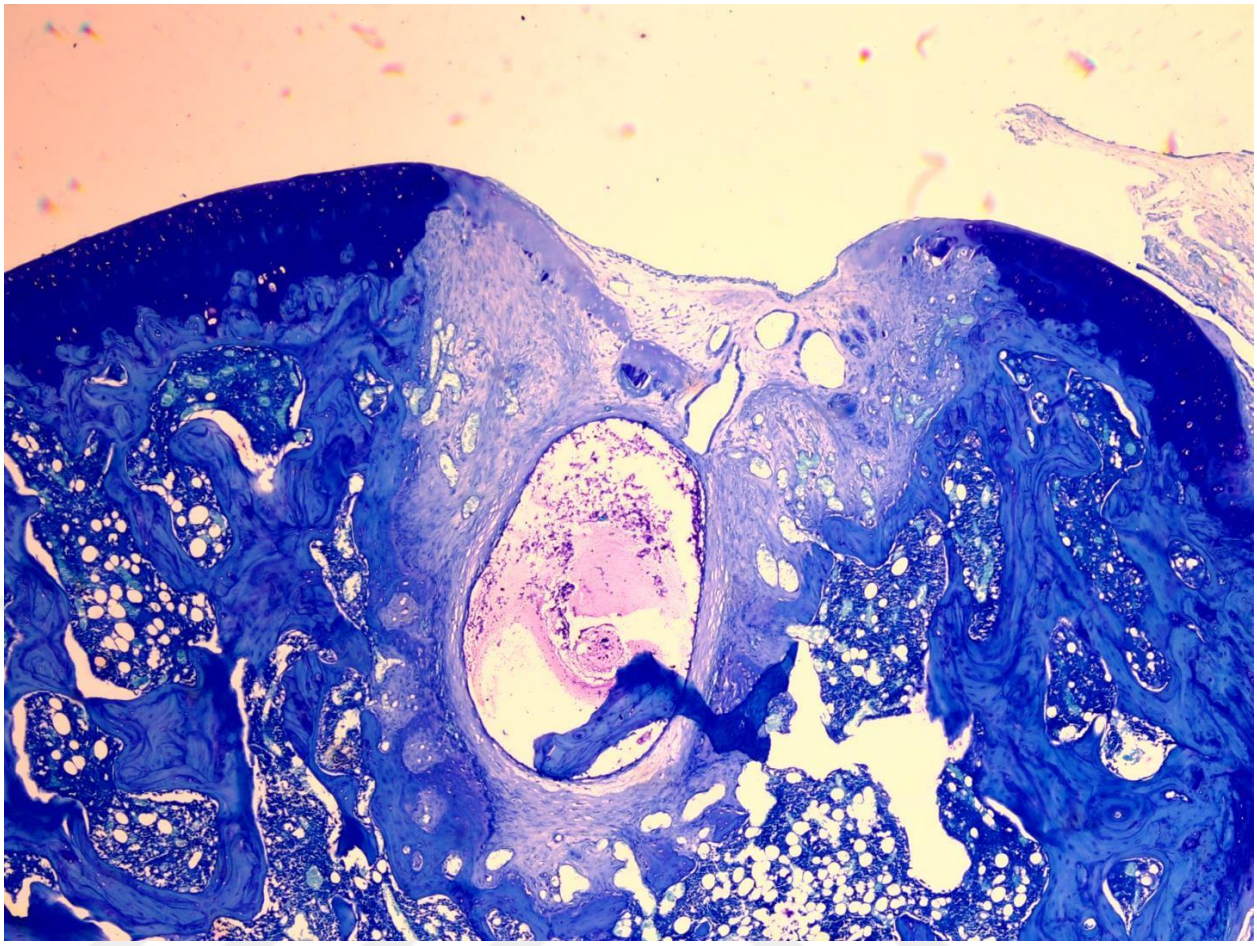


Şekil 18. Grup 1'deki işlem yapılmayan rata ait normal femoral kondil hyalin kıkırdak dokusunun histopatolojik görünümü (Safranin-O Fast Green stain x400)

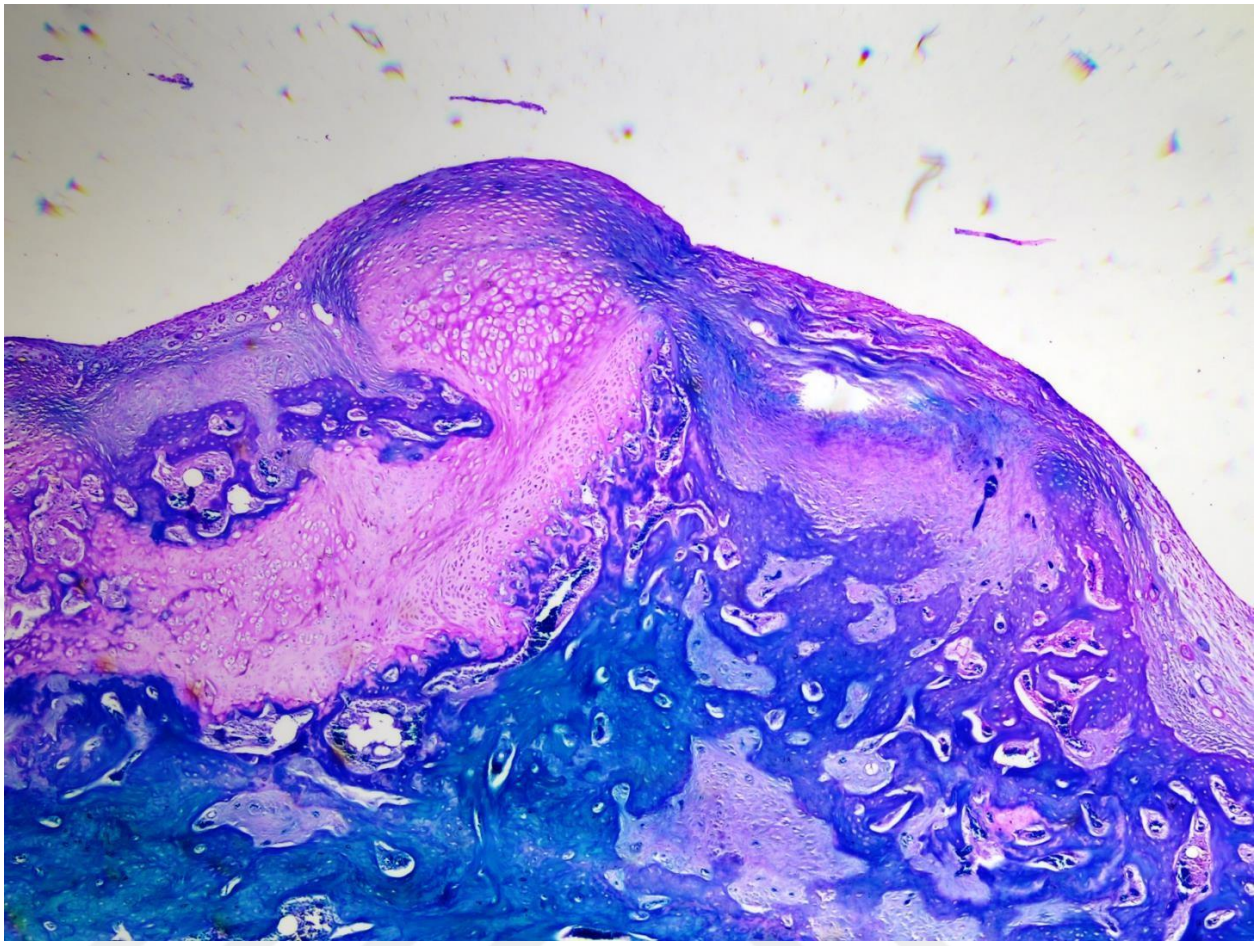


Şekil 19. Grup 2'deki hasar verilip tedavi verilmeyen rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (H&E x100)

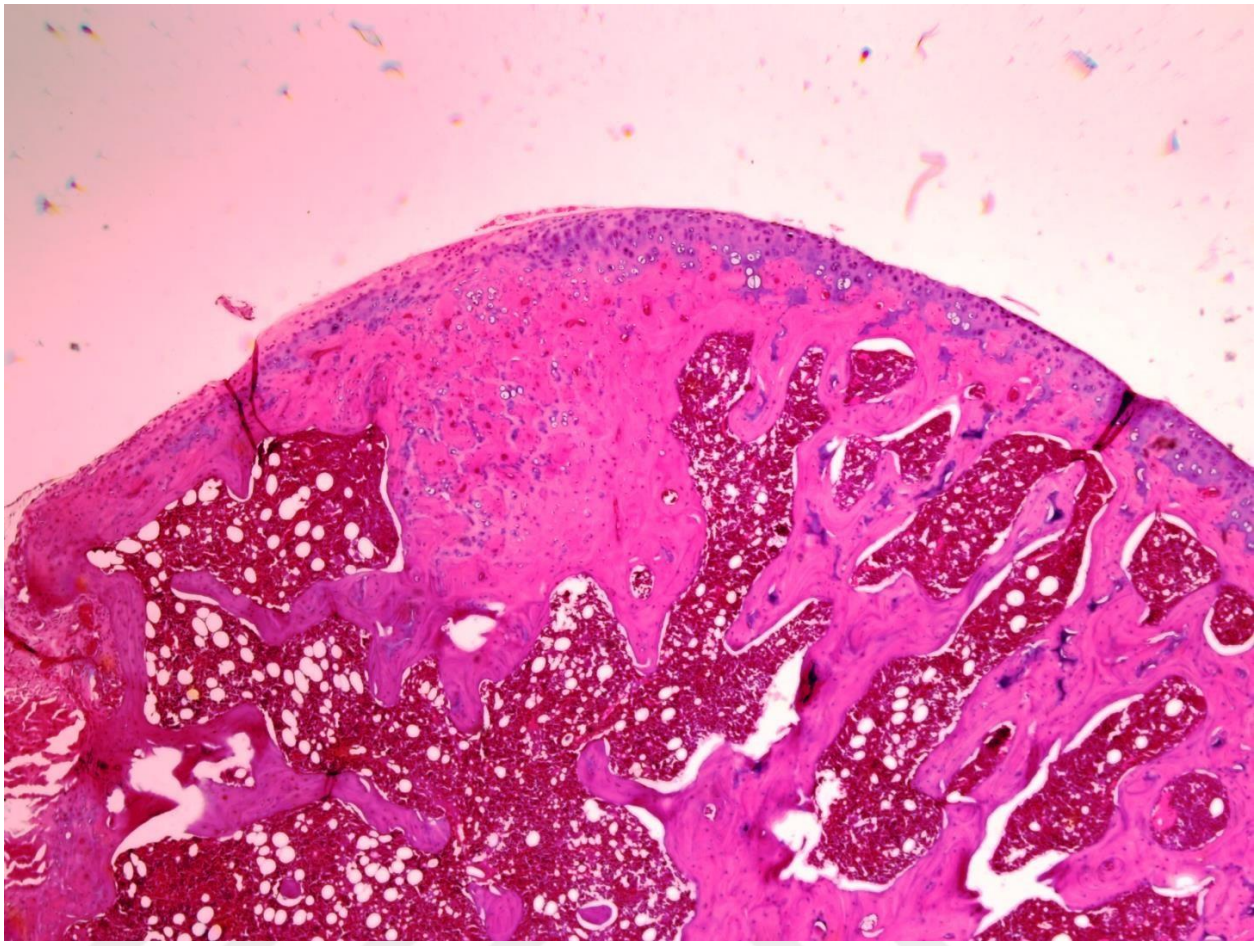
Eklem yüzeyinde hasar oluşturulup tedavi verilmeyen sıçanlara ait örneklerde kıkırdak yapısının eklem yüzeyinin bozulduğu, kıkırdak tabakanın inceldiği ve hücresel yoğunluğun azaldığı, kıkırdak yapının disorganize olduğu görüldü. Kondrosit sayısında azalmalar ve yer yer hücreselliğin subkondral kemiğe kadar ortadan kalktığı görülmektedir (Şekil 19). Proteoglikan boyanmasının neredeyse hiç olmadığı izlendi (Şekil 20). Safranin O Fast Green boyamada Tidemark sınır integritesinin bozulduğu görülmüştür (Şekil 21).



Şekil 20. Grup 2'deki hasar verilip tedavi verilmeyen rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x100)

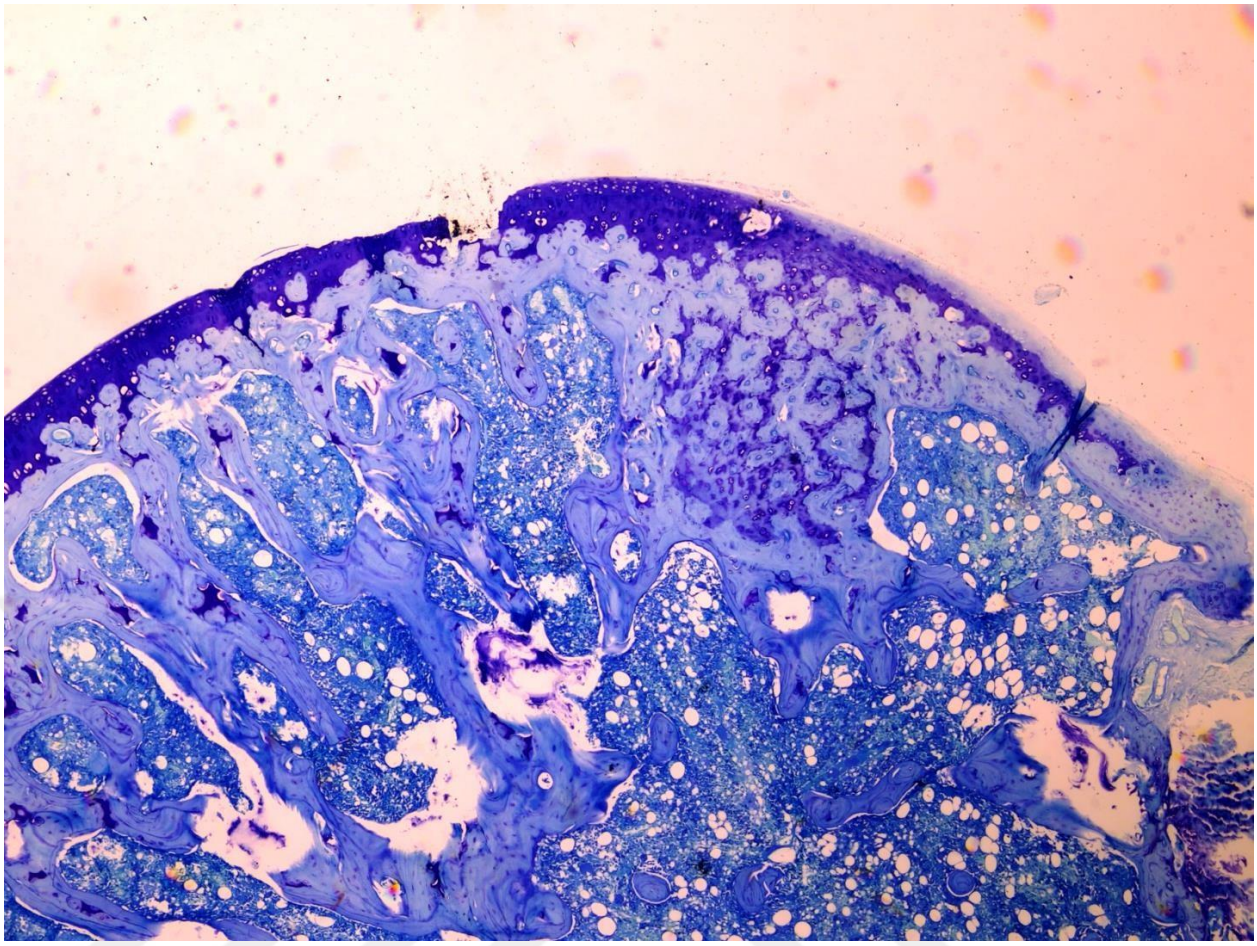


Şekil 21. Grup 2'deki hasar verilip tedavi verilmeyen başka bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Safranin- O Fast Green stain x100)

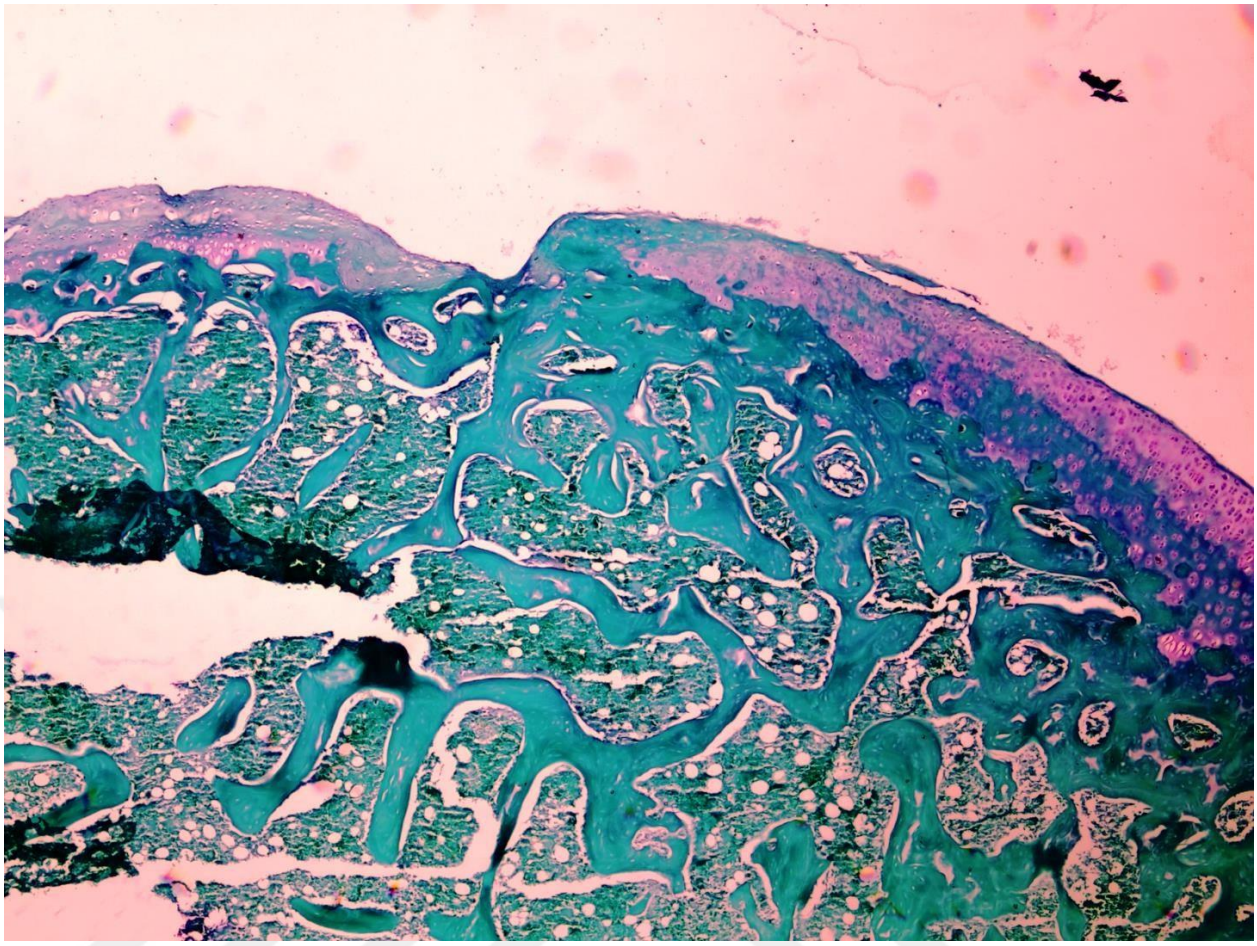


Şekil 22. Grup 3'deki hasar verilip Spongostan uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (H&E stain x100)

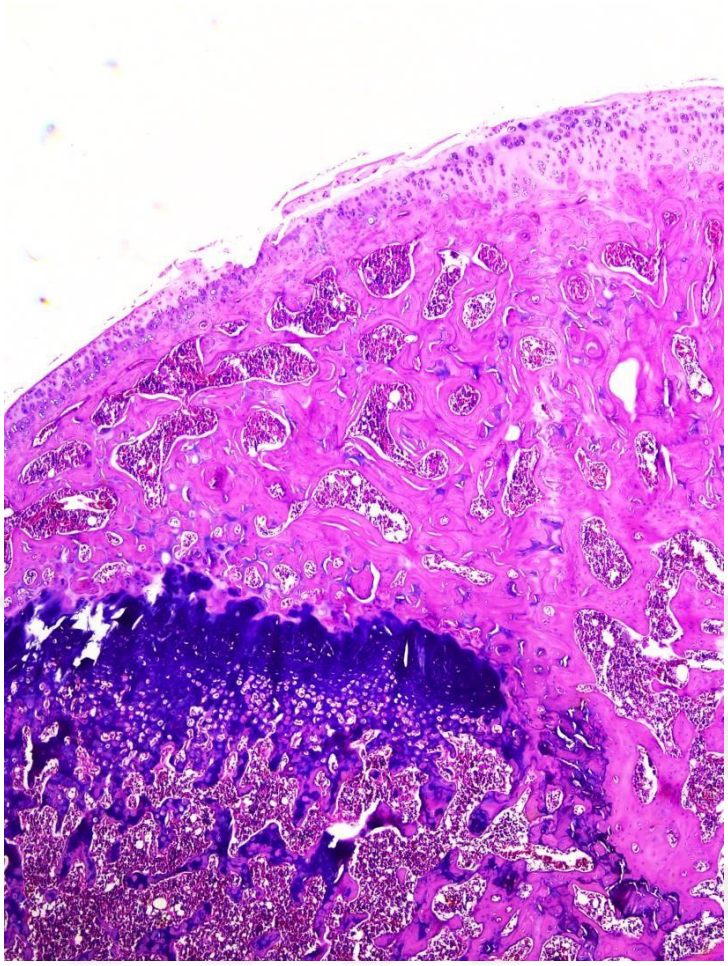
Hasar oluşturulup spongostan uygulanan sıçana ait örneklerde ise hiç tedavi verilmeyen gruba kıyasla yapısal iyileşmenin hafif orta düzeyde başladığı, hücreselliğin arttığını (Şekil 22), proteoglikan boyanmasının hafif-orta derecede olduğunu (Şekil 23), tidemark sınır integritesinin yer yer korunduğunu görmekteyiz (Şekil 24).



Şekil 23. Grup 3'deki hasar verilip Spongostan uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x100)

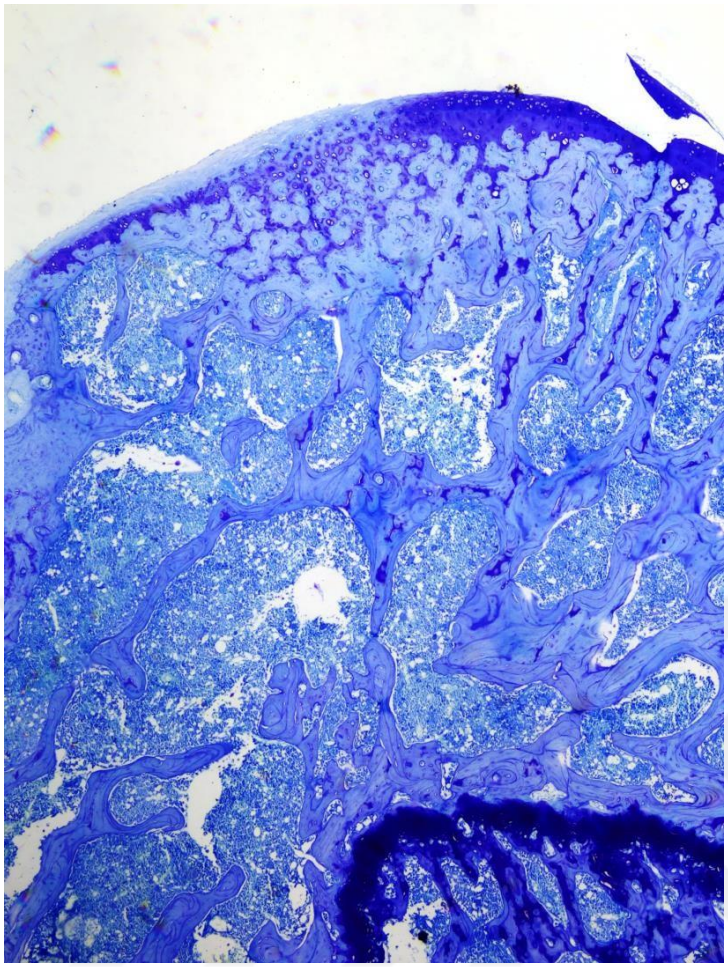


Şekil 24. Grup 3'deki hasar verilip Spongostan uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Safranin- O Fast Green stain x100)

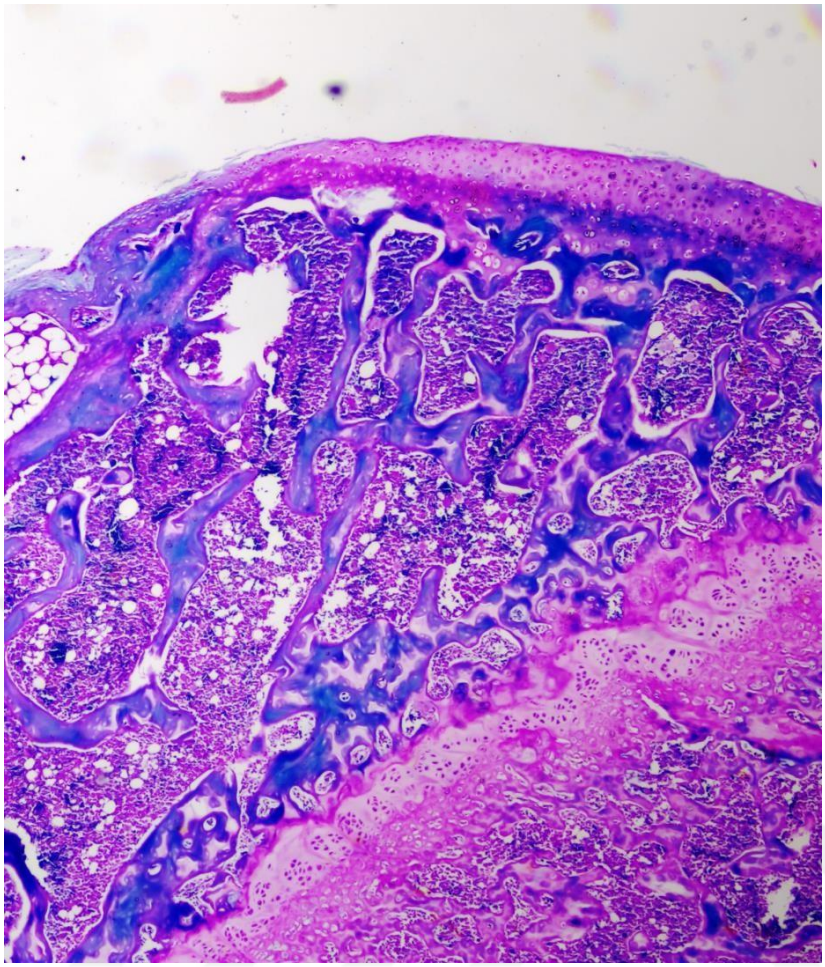


Şekil 25. Grup 4'deki hasar verilip %5 Aloe Vera uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (H&E stain x100)

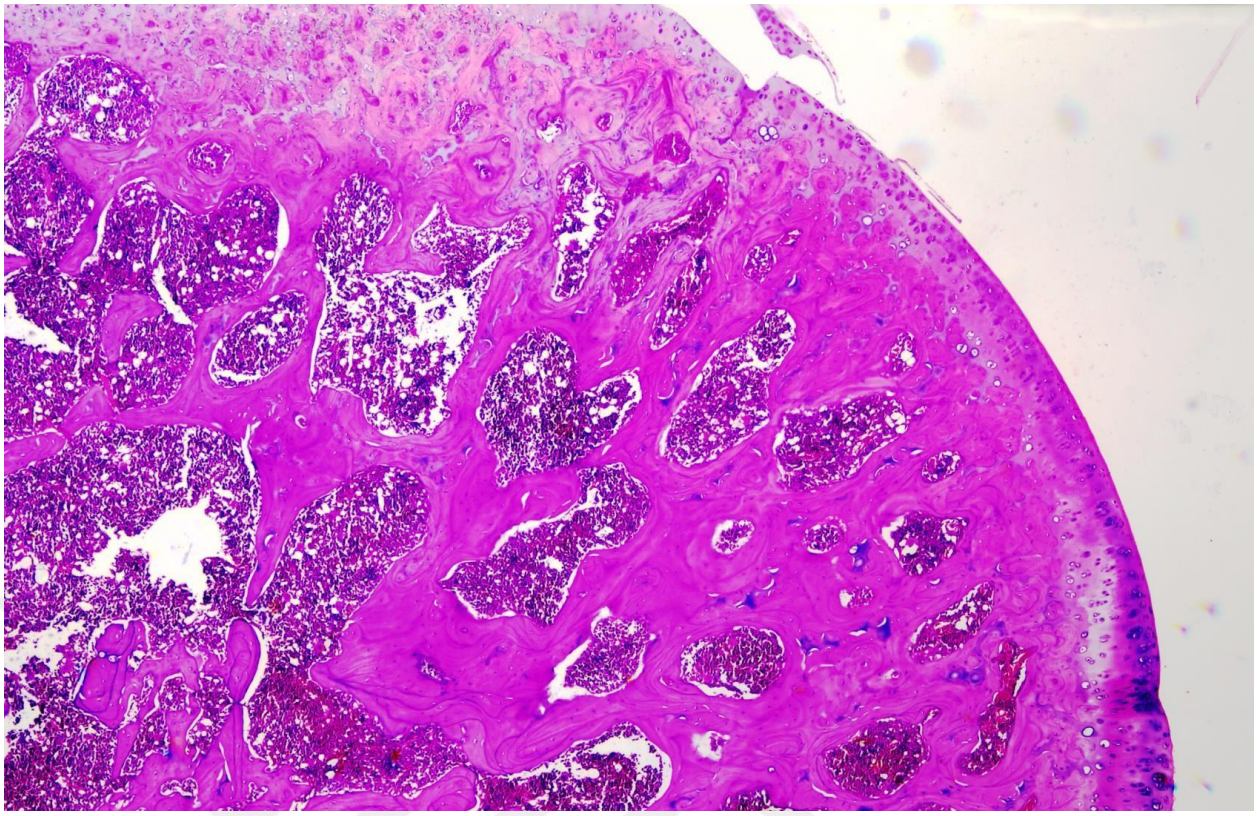
%5 aleo vera uygulanan sıçanlara ait örneklerde ise eklem yüzeyinin yer yer hafif düzensiz alanlar izlense de normale yakın bir düzene ulaştığını görmekteyiz. Kıkırdak yapısı normale yakın olarak iyileşmiş görünümdedir, hücresellik yer yer artmıştır (Şekil 25). Proteoglikan boyanmasında yer yer hafif azalmalar izlenmiştir (Şekil 26). Tidemark sınır integritesi intaktır (Şekil 27).



Şekil 26. Grup 4'deki hasar verilip %5 Aloe Vera uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x100)

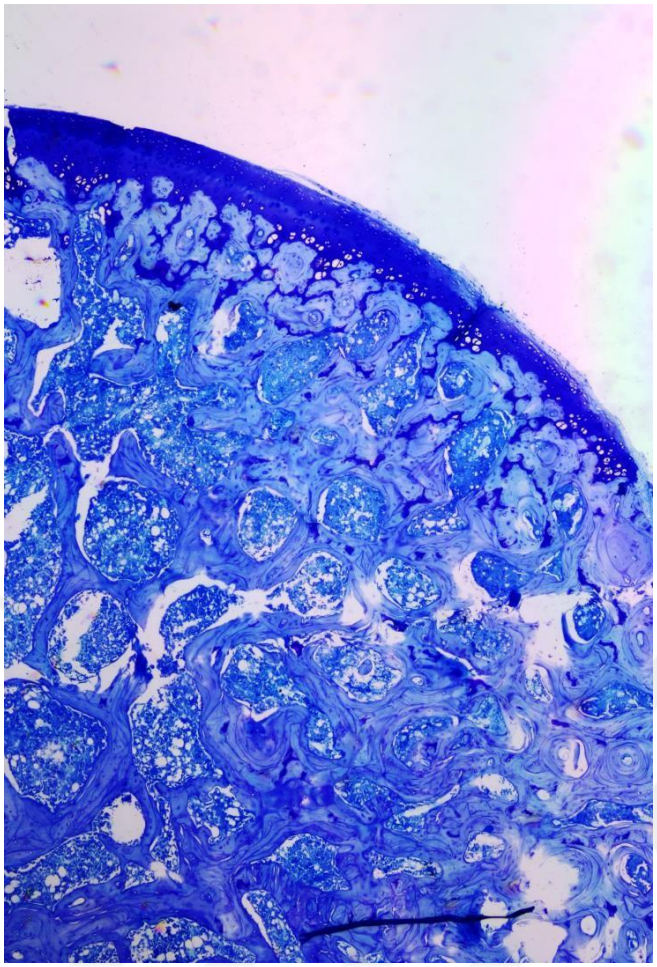


Şekil 27. Grup 4'deki hasar verilip %5 Aloe Vera uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Safranin- O Fast Green stain x100)

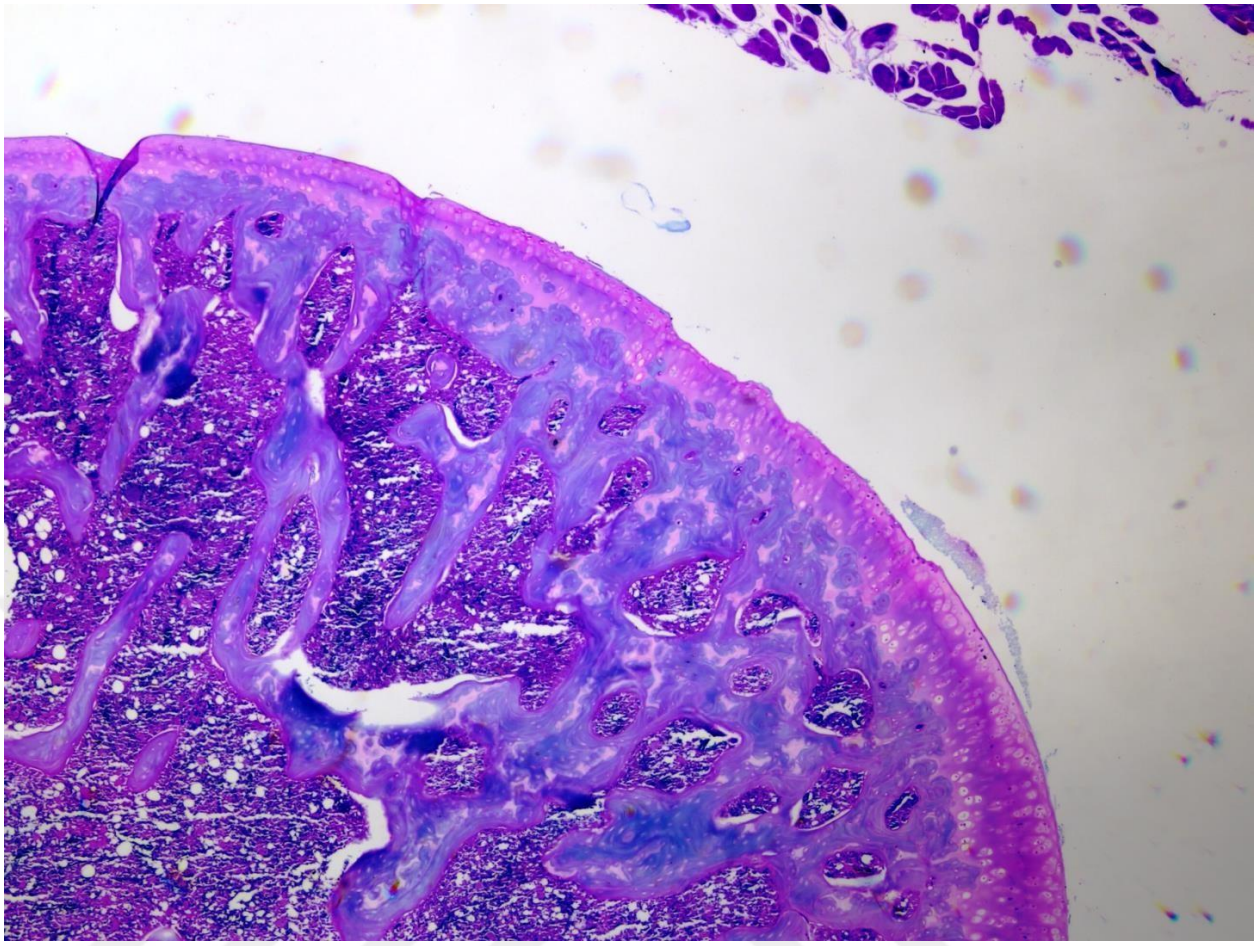


Şekil 28. Grup 5'deki hasar verilip %20 Aloe Vera uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (H&E stain x100)

%20 aloe vera uygulanan sıçanlara ait örneklerde ise eklem yüzeyinin normal bir görünüm kazandığı görülmüştür. Hücresellik normale yakındır, kıkırdak düzenlenimi sağlıklı sıçan yapılarına benzerdir (Şekil 28). Proteoglikan boyanması normal sıçanlara benzer şekilde izlenmiştir (Şekil 29). Tidemark sınır integritesi korunmuştur (Şekil 30).



Şekil 29. Grup 5'deki hasar verilip %20 Aloe Vera uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Toluidin Blue stain x100)



Şekil 30. Grup 5'deki hasar verilip %20 Aloe Vera uygulanan bir rata ait femoral kondil hiyalin kıkırdağın histopatolojik görünümü (Safranin- O Fast Green stain x100)

Sonuç olarak hasar verilip işlem yapılmayan ratlarda eklem yüzeyinde kıkırdak yapının tamamen bozulduğu, hücre dizelenmesinin normal düzenini kaybettiğini, kıkırdak yapıdan subkondral kemiğe kadar hücreselliğin azaldığını, proteoglikan boyanmasının neredeyse ortadan kaybolduğunu, tidemark sınır integritesinin bozulduğu görülmüştür (Şekil 19-21).

Hasar verilip spongostan uygulanan ratlara ait eklem kesitlerinde ise iyileşme bulgularının yavaş yavaş başladığını, hücreselliğin arttığını, proteoglikan boyanmasının orta yoğunlukta olduğunu, tidemark sınır integritesinin yer yer tekrar sağlandığını izlemekteyiz (Şekil 22-24).

%5'lik ve %20'lik Aloe vera uygulanan ratlara ait eklem yüzeylerinde yer yer düzensizlikler izlense de eklem yüzeyini oluşturan kıkırdak yapı normale yakın bir görünüme yaklaşmıştı. Yer yer hücreselliğin izlendiği alanların yanısıra normosellüler bir görünüm hakimdi. Proteoglikan boyanması bazı alanlarda azalsa da çoğu alanda normal boyanma mevcuttu. Tidemark sınır integritesi tekrar inşa edilmişti (Şekil 25-30).

4.2. Histopatolojik Bulguların İstatistiksel Analiz Sonuçları

Mankin skor için; yapılan istatiksel analiz sonucunda verilerin normal dağılıma uymadığı belirlendi (p>0.05). K, KD, KD+S, KD+%5AVS ve KD+%20AVS gruplarının sonuçları Kruskal-wallis testine göre değerlendirildi, gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi(p<0,001)(Tablo 7). Ardından grup kategorileri arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için post-hoc ikili karşılaştırma testi yapıldı(Tablo 8).

Tablo 7. Mankin skorlaması toplam skora göre grup kategorileri istatistiksel sonuçlar

One-Way ANOVA (Non-parametric)

Kruskal-Wallis			
	X^2	df	p
TOPLAM SKOR	34.8	4	<.001

Tablo 8. Mankin skorlaması toplam skora göre post-hoc ikili karşılaştırma sonuçları

Dwass-Steel-Critchlow-Fligner pairwise comparisons

Pairwise comparisons- TOPLAM SKOR			
		W	**p**
1	2	4.85	0.005
1	3	4.99	0.004
1	4	5.04	0.003
1	5	4.90	0.005
2	3	-4.48	0.013
2	4	-4.69	0.008
2	5	-4.62	0.010
3	4	-3.88	0.048
3	5	-4.78	0.006
4	5	-3.34	0.126

Grup 1: Kontrol grubu(K), **Grup 2:**Kıkırdak hasarı oluşturulan grup(KD), **Grup 3:** Kıkırdak hasarı oluşturulan ve Spongostan uygulanan grup(KD+S), **Grup 4:** Kıkırdak hasarı oluşturulan ve %5 Aloe vera emdirilmiş spongostan uygulanan grup(KD+%5AVS), **Grup 5:** Kıkırdak hasarı oluşturulan ve %20 Aloe vera emdirilmiş spongostan uygulanan grup(KD+%20AVS).

Yapılan Kruskal-Wallis testi sonucuna göre Toplam skor değişkeni bakımından grup kategorileri düzeyinde anlamlı bir farklılık olduğu belirlendi ($p<0.001$).

Toplam skor değişkeni bakımından grup kategorileri arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için post-hoc ikili karşılaştırma testi yapıldı. Bu teste göre Grup 2(KD), Grup 3(KD+S), Grup 4(KD+%5AVS) ve Grup 5(KD+%20AVS)'te Grup 1(K)'e göre anlamlı fark olduğu belirlendi.

Grup 3(KD+S), Grup 4(KD+%5AVS) ve Grup 5(KD+%20AVS)'te Grup 2(KD)'ye göre anlamlı fark olduğu belirlendi.

Grup 4(KD+%5AVS) ve Grup 5(KD+%20AVS)'te Grup 3(KD+S)'e göre anlamlı fark olduğu belirlendi.

Grup 4(KD+%5AVS) ve Grup 5(KD+%20AVS) arasında ise anlamlı fark olmadığı görüldü.

5. TARTIŞMA

Eklem kıkırdağının içsel onarım kapasitesi herkesin bildiği gibi zayıftır. Kıkırdak yüzeyinde kusurlara neden olan fokal travma, genellikle orijinal kıkırdağın altındaki dokuyla onarılır. Yeni dokunun kıkırdağa ne kadar benzeyeceği defektin türüne, yaşına, boyutuna ve anatomik konumuna göre belirlenir. Bu yetersiz onarım dokusu daha sonra Osteoartrit(OA)'e yol açabilir (89-90). 60 yaş ve üzeri erişkinlerde diz OA prevalansının erkeklerde yaklaşık %10, kadınlarda ise %13 olduğu tahmin edilmektedir. OA dünya çapında engellilikle geçirilen yılların önde gelen nedenlerinden biridir. OA, yıllık en az 89,1 milyar ABD doları tutarında bir ekonomik yüke neden olmaktadır. Yüksek gelirli ülkelerde gayri safi yurt içi hasılanın %1 ila %2,5'i arasındadır. Bu maliyetin çoğunluğunu diz ve kalça eklemi protezleri oluşturmaktadır (91). Şu anda OA'nin tıbbi tedavisi, cerrahi tedavileri ve eklem içi enjeksiyon, ilaç tedavisi ve fizik tedavi gibi cerrahi olmayan tedavileri içermektedir. Ancak eklem yapılarının tahribatını tersine çevirmek hala zordur. Bu nedenle ağrıyı hafifletmek, işlevi iyileştirmek ve hastalığın ilerlemesini geciktirmek için ideal bir yöntem bulmak klinik açıdan büyük önem taşımaktadır(92).

OA'nın bir alt tipi olan travma sonrası osteoartrit (PTOA), eklem içi kırık, bağ yaralanması veya eklem içindeki diğer kıkırdak (eklem veya menisküs) yaralanmaları gibi eklem yaralanmalarından sonra gelişir. Tüm semptomatik OA vakalarının yaklaşık %12'sini oluşturur. İdiyopatik OA'den farklı olarak PTOA, orantısız bir şekilde genç popülasyonda fonksiyonel

sakatlığın bir nedenini temsil eder, çünkü birincil yaralanmaların genç bireylerde meydana gelme olasılığı daha yüksektir(93).

Kıkırdak lezyonu olan hastaların tedavisi hekimler için zor bir görev olmaya devam etmektedir. Kıkırdak lezyonlarını ele almak için birden fazla tedavi seçeneği mevcuttur(94). Ancak bu yöntemlerin çoğunun komplikasyonları veya yan etkileri vardır. Bu nedenle zararlı olmayan daha iyi tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır(95). Çeşitli büyüme faktörleri ve yapı iskeleleri ile veya bunlar olmadan gerçekleştirilen eklem kıkırdağı kusurlarının mezenkimal kök hücre bazlı onarımı, hayvan modellerinde yaygın olarak denenmiştir. Embriyonik ve yetişkin kök hücreleri ve indüklenmiş pluripotent kök hücreleri içeren kök hücrelerin de eklem kıkırdağı yüzey rejenerasyonu için cazip hücre kaynakları olduğu rapor edilmiştir. Nanomalzemelere dayalı son araştırmalar, fonksiyonel mekanik uyumlu iskeleler, çok katmanlı iskeleler ve eklem kıkırdağı yüzey rejenerasyonu için ECM iskeleleri dahil olmak üzere iskelelerle ilgili çeşitli çalışmalar geliştirilmiştir. Kıkırdak ve osteokondral defektlerdeki hayvan modellerinin sürekli olarak iyileştirilmesi, optimal eklem kıkırdağı yüzeyi rejenerasyonu için doku mühendisliğindeki daha fazla ilerlemeyi destekleyen fırsatlar sağlar(96). Fokal defekt oluşumu, eklem destabilizasyonu veya kondrotoksik ajanların enjeksiyonu dahil olmak üzere eklem kıkırdağının doğrudan yaralanması, hayvan modellerinde kıkırdak kaybını ve osteoartriti indüklemek için yaygın bir yöntemdir (97-100).

Kıkırdak hasarlarının kalıcı tedavisi klinisyenler ve hastalar açısından çok önemlidir. Bu nedenle, çalışmamızda anti oksidan ve anti-inflamatuar etkinliği olan AloeVeranın ve kıkırdağın yapısında yüksek oranda kollajen bulunduğundan iyileşme döneminde içeriğindeki kollajenden faydalanmak için spongostan kullandık. Bu maddelerinkıkırdak iyileşmesi üzerine biyokimyasal ve histopatolojik etkilerini araştırdık. Literatür incelememizde benzer çalışma ile karşılaşmadık. Çalışmamız alanında öncüdür.

Subkondral plakadaki yüzeysel defektler fibrokartilaj dokusu ile kısmen iyileşebilir. Fibrokartilaj, hyalin kıkırdak ile tendonlar ve bağlar gibi yoğun düzenli bağ dokusu arasında bir geçiş dokusudur. Kollajen açısından çok zengindir ancak kondrositlerin sayısı çok azdır ve kalın kollajen lifleriyle aynı hizadadır. Hiyalin kıkırdaktan farklı olarak fibrokartilaj, tip II'ye ek olarak yüksek düzeyde tip I kollajen ve yalnızca küçük bir temel madde bileşeni içerir. Yapıca kollajenden bu farklılıkları nedeniyle normal eklem hiyalin kıkırdağına göre mekanik özellikleri zayıftır. Bu nedenle hasarlı eklem kıkırdağı dejenerasyona yatkın olur (101-102).

Osteokondral defektlerin tedavisine yönelik mevcut iyi tanımlanmış yöntemler arasında drilleme, otolog kondrosit implantasyonu ve osteokondral allogreftleme yer alır. Bu tedavi seçenekleri, hem tip I hem de tip II kollajeni içeren, kıkırdak ile karşılaştırıldığında gücü ve

esnekliği azalmış olan fibrokartilajın oluşmasıyla sonuçlanır. Fibrokartilaj skar dokusunun sürtünme katsayısı da kıkırdaktan daha yüksektir, bu da kıkırdağın pürüzsüz yüzeyine göre hareketi engelleyebilir ve daha erken dejenerasyona yol açabilir(103). Bu nedenle onarım yöntemlerinin çoğu osteokondral defektleri doğal onarımından daha fazla iyileştirmez.

Kıkırdak kusurları tipik olarak mükemmel daireler olmasa da, kıkırdağın iyileştirici özelliklerini incelemek için kullanılan genel prosedür, zımba delikleri gibi küre şeklindeki kusurları içerir. Bazı çalışmalar yara kontraksiyonunun yaranın büyüklüğüne bağlı olduğunu, yara şeklinin ise iyileşme oranını etkilemediğini bildirmiştir. Ancak bazı çalışmalar da, küre şeklindeki yaraların, içbükey geometriye sahip yaralara kıyasla daha iyi bir iyileşme kapasitesi sergilediğini göstermiştir(104).

Hayvan modelleri, yeni kıkırdak onarım prosedürlerinin faydalarının ve potansiyel sorunlarının değerlendirilmesinde büyük değer taşımaktadır(105). Kıkırdak kusur araştırmalarında kullanılan birçok hayvan modeli bulunmaktadır. Keçi veya at gibi büyük hayvan modelleri, kemirgen veya tavşan gibi daha küçük hayvan modellerine kıyasla insana daha çok benzeyebilir. Ancak daha büyük türlerde ilk deneyleri yapmak genellikle mali açıdan mümkün veya pratik değildir. Bu nedenle, araştırmanın ilk aşamaları için küçük bir hayvan modelinin seçilmesi genel olarak kabul görmektedir. Bununla birlikte, eklem kıkırdağı rekonstrüksiyon tekniğinin son klinik öncesi değerlendirmesi, büyük bir hayvan modelinde doğrulama gerektirebilir(106). Hayvan boyutu kabaca eklem boyutuna ve kıkırdak kalınlığına karşılık gelir. Bu iki faktör, insan hastalıklarına yönelik modelleme uygulamalarında yararlılığın belirlenmesinde önemlidir. Farklı boyutlardaki kondral ve osteokondral lezyonların onarımından çok şey öğrenilebilmesine rağmen, insan kıkırdak defektlerinin ortalama hacmi yaklaşık 550 mm3'tür ve tedavi gerektiren insan kıkırdak lezyonlarının çapı genellikle 10 mm veya daha fazladır. Şu anda mükemmel bir klinik öncesi hayvan modelinin mevcut olmadığı göz önüne alındığında, mevcut hayvan modellerinin faydalarının ve sınırlamalarının dikkate alınmasının önemli olduğu açıktır. Sıçan modeli, fareyle benzer ekonomik avantajlara sahipken, daha büyük boyutları, kıkırdak kusurlarının oluşturulmasını içeren çalışmaların fizibilitesini ve tekrarlanabilirliğini artırır(107-108). Bu nedenle çalışmamızda sıçanlar tercih edildi. İyileşme potansiyelleri yaşla birlikte giderek azalacağı için genç sıçanlar tercih edildi. Ameliyat sonrası tüm sıçanlara kısıtlama uygulanmadan serbest harekete izin verildi.

Aynı yaş ve ağırlıkta rat seçimine ve aynı şartlar altında bakım ve beslenmelerine dikkat edilerek iyileşme potansiyeli tüm kıkırdaklar için aynı seviyeye getirildi.

Sıçanların altı haftalık takibi süresince yapılan gözlemlerde yeme ve suya ulaşımda herhangi bir sorun yaşanmadı. Tüm sıçanlar her iki ayak üzerine kalkarak yeme ulaşabildi.

Cerrahi olarak kapatılan cilt insizyonlarında da rüptür izlenmedi. Çalışma planlanırken hayvan uygulamalarında eklem kıkırdak dejenerasyonu ve hasarı oluşturmanın birden fazla yönteminin olduğu görülmüştür. Bu yöntemleri kimyasal ve mekanik olarak ikiye ayırabiliriz. Biz kıkırdakta kimyasal yol ile hasar oluşturmanın uyguladığımız spongostan ve Aloe Vera ile etkileşime girebileceğini düşündük. Bu yüzden mekanik hasar mekanizmasını tercih ettik.

Aloe Vera ve spongostanın ayrı ayrı veya birlikte eklem kıkırdağı hasarı tedavisinde, fokal olarak kullanımındaki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Bu sebeple çalışmamız özgündür.

Çalışmanın tüm aşamalarında bütün sıçanlara standart uygulama yaptık. Elde edilen sonuçlarda objektif olmayı sağladık. Sıçanların sakrifikasyonu sonrası elde edilen kıkırdakların histopatolojik değerlendirmesinde bir skorlama sistemi olan Mankin sınıflaması kullanılmıştır. Bu yöntem kıkırdak sağlığını geniş anlamda belirlemek için genellikle toplam puan olarak kullanılır(109). Bu sınıflamada hasar skorlamasında yapı, tidemark/sınır integritesi, proteoglikan boyanması ve hücresellik kriterleri değerlendirilmiştir.

Grupları kıkırdağın histopatolojik yapısı açısından karşılaştırdığımızda en az skorun cerrahi geçirmeyen grupta olduğu görülmektedir. En yüksek skor ise sadece kıkırdak defekti yapılan grupta görülmektedir. Sadece spongostan uygulanan grupta, %5 ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruplara göre yapı skoru daha yüksektir. %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grupta yapı skoru %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruba göre daha yüksektir. Kıkırdak dokusunun histopatolojik yapısındaki katmanlarda sadece spongostan, %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruplarda iyileşmenin tama yakın olduğu görülmüştür.

Gruplar arasında karşılaştırılan diğer parametre ise sınır integritesi (bütünlüğü) dir. Bu skor sıfır ve bir puan olmak üzere iki adet kriterden oluşmaktadır. Cerrahi geçirmeyen gruptaki sıçanların tümünde bu skor sıfır olarak gösterilmiştir. Sadece kıkırdak hasarı oluşturulan gruptaki sıçanların tamamında bu skor bir puan olarak gösterilmiştir.Sadece spongostan uygulanan grupta, %5 ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruplara göre bu skor daha yüksektir. %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grupta bu skor %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruba göre daha yüksektir.

Gruplar arasında karşılaştırılan diğer parametre ise proteoglikan boyanmasıdır. Proteoglikan boyanması skoru en düşük cerrahi geçirmeyen grupta görülürken en yüksek skor ise sadece kıkırdak defekti oluşturulan grupta görülmüştür. Sadece spongostan uygulanan grupta, %5 ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruplara göre bu skor daha

yüksektir. %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grupta bu skor %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruba göre daha yüksektir.

Gruplarda son olarak kıyaslanan parametre hücreselliktir. Hücresellik skorunun cerrahi uygulanmayan grupta en düşük olduğu görülürken skorun en yüksek olduğu grup ise sadece kıkırdak hasarı oluşturulan grup olduğu saptanmıştır. %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan gruptaki hücresellik skoru sadece spongostan uygulanan gruptaki ile aynı çıkmıştır. %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uygulanan grupta ise bu skor sadece spongostan uygulanan gruptan ve %5 Aloe Vera uygulanan gruptan daha düşüktür. Bu skorlama bize spongostanın ve Aloe Veranın kondrogenezisi indüklediğini ayrıca AloeVera oranı arttıkça kondrogenezisin arttığını göstermektedir.

Bu sonuçlara bakarak spongostan ve Aloe Veranın kıkırdak iyileşmesinde olumlu etki yaptığı görüldü. Histopatolojik mankin skorlamasına göre kontrollü kıkırdak defekti oluşturarak sadece spongostan, %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uyguladığımız gruplarda sadece kıkırdak hasarı oluşturduğumuz gruba göre anlamlı bir iyileşme görülmektedir. Yine mankin skorlamasına göre, kıkırdak iyileşmesinde %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan uyguladığımız gruplarda, kontrollü kıkırdak defekti oluşturarak sadece spongostan uyguladığımız gruba göre anlamlı bir iyileşme görülmektedir. %5 Aloe Vera emdirilmiş spongostan ve %20 Aloe Vera emdirilmiş spongostan grupları arasında ise diğer gruplara kıyasla Mankin skorlaması toplam skora göre yapılan istatistiksel çalışmada anlamlı fark olmadığı görüldü.

Spongostan'ın kemik iyileşmesi için bir kök hücre veya büyüme faktörü taşıyıcısı olarak uygulanabilirliği daha önce yapılan çalışmalarda saptanmış olup(110) biz de çalışmamızda benzer şekilde kıkırdak hasarının iyileşmesinde olumlu etkileri olduğunu saptadık.

Spongostan ve Aloe Vera'nın mekanik anlamda etkisinin görülmesi için biyomekanik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Bizim çalışmamızda kıkırdak iyileşmesi çalışmalarına uygun olarak 6. haftada değerlendirme yapılmıştır. Aloe Vera ve spongostanın kıkırdak dokusundaki iyileştirici etkisini göz önüne aldığımızda çalışmamızın kıkırdak hasarını takiben 6 haftadan daha uzun sürecek çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir Çünkü kıkırdak hasarı sonrası tipik olarak oluşan fibrokartilaj dokusu zamanla dejenere olur(111).

Sonuç olarak, histopatolojik mankin skorlamasına göre spongostan ve Aloe Veranın kıkırdak iyileşmesinde olumlu etkilerinin olduğunu gözlemledik. Daha geniş çaplı çalışmalar ve insan çalışmalarıyla bu olumlu etkilerin desteklenmesine ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

Kıkırdak hasarının tedavisinin günümüzde ortopedik cerrahlar için en zor klinik problemlerden biri olduğu göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızın sonuçlarının araştırmacılara çalışmalarında destek olacak öncü bir çalışma olabileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Decker RS, Koyama E, Pacifici M. Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions. Curr Osteoporos Rep. 2015 Dec;13(6):407-14. doi: 10.1007/s11914-015-0290-z. PMID: 26408155; PMCID: PMC4624030.

2. Wilusz RE, Sanchez-Adams J, Guilak F. The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. Matrix Biol. 2014 Oct;39:25-32. doi: 10.1016/j.matbio.2014.08.009. Epub 2014 Aug 27. PMID: 25172825; PMCID: PMC4198577.

3. Żylińska, B., Sobczyńska-Rak, A., Lisiecka, U., Stodolak-Zych, E., Jarosz, Ł., & Szponder, T. (2021). Structure and Pathologies of Articular Cartilage. *In vivo (Athens, Greece)*, *35*(3), 1355–1363. https://doi.org/10.21873/invivo.12388

4. Rim, Y. A., Nam, Y., & Ju, J. H. (2020). The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *International journal of molecular sciences*, *21*(7), 2358. https://doi.org/10.3390/ijms21072358

5. Abe, K., Yamashita, A., Morioka, M., Horike, N., Takei, Y., Koyamatsu, S., Okita, K., Matsuda, S., & Tsumaki, N. (2023). Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nature communications*, *14*(1), 804. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36408-0

6. Zheng M. (2022). Stem Cells Promote the Regeneration of Knee Joint Degenerative Bone and Articular Cartilage. *Journal of healthcare engineering*, *2022*, 9533211. https://doi.org/10.1155/2022/9533211 (Retraction published J Healthc Eng. 2022 Nov 24;2022:9804096)

7. Decker R. S. (2017). Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Seminars in cell & developmental biology*, *62*, 50–56. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.10.005

8. Chen, S., Fu, P., Wu, H., & Pei, M. (2017). Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell and tissue research*, *370*(1), 53–70. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2613-0

9. Tkachenko, A. S., Maksymova, O. S., Korenkov, O. V., Voznyi, A. P., & Tkach, G.F.(2021). Structure of the knee articular cartilage after the femur and tibia extra-articular ınjury. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)*, *74*(8), 1863–1868.

10. Heckelsmiller, D. J., James Rudert, M., Baer, T. E., Pedersen, D. R., Fredericks, D. C., & Goetz, J. E. (2017). Changes in Joint Contact Mechanics in a Large Quadrupedal Animal Model After Partial Meniscectomy and a Focal Cartilage Injury. *Journal of biomechanical engineering*, *139*(5), 0545011–0545015. https://doi.org/10.1115/1.4036148

11. Vonk, L. A., Roël, G., Hernigou, J., Kaps, C., & Hernigou, P. (2021). Role of Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation with Spheroids in the Treatment of Large Chondral Defects in the Knee: A Systematic Review. *International journal of molecular sciences*, *22*(13), 7149. https://doi.org/10.3390/ijms22137149

12. Katagiri, H., Mendes, L. F., & Luyten, F. P. (2017). Definition of a Critical Size Osteochondral Knee Defect and its Negative Effect on the Surrounding Articular Cartilage in the Rat. *Osteoarthritis and cartilage*, *25*(9), 1531–1540. https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.05.006

13. Gillogly, S. D., Voight, M., & Blackburn, T. (1998). Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*, *28*(4), 241–251. https://doi.org/10.2519/jospt.1998.28.4.241

14. Kazemi, D., Fakhrjou, A., Dizaji, V. M., & Alishahi, M. K. (2014). Effect of autologous platelet rich fibrin on the healing of experimental articular cartilage defects of the knee in an animal model. *BioMed research international*, *2014*, 486436. https://doi.org/10.1155/2014/486436

15. Buckwalter J. A. (2002). Articular cartilage injuries. *Clinical orthopaedics and related research*, (402), 21–37. https://doi.org/10.1097/00003086-200209000-00004

16. Zevenbergen, L., Gsell, W., Chan, D. D., Vander Sloten, J., Himmelreich, U., Neu, C. P., & Jonkers, I. (2018). Functional assessment of strains around a full-thickness and critical sized articular cartilage defect under compressive loading using MRI. *Osteoarthritis and cartilage*, *26*(12), 1710–1721. https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.08.013

17. Yildiz, E., Ersen, A., Yener, E., Comunoglu, N., & Sen, C. (2021). The Effect of Intraarticular Insulin on Chondral Defect Repair. *Cartilage*, *13*(2_suppl), 684S–691S. https://doi.org/10.1177/1947603520938462

18. Martinez-Carranza, N., Hultenby, K., Lagerstedt, A. S., Schupbach, P., & Berg, H. E. (2019). Cartilage Health in Knees Treated with Metal Resurfacing Implants or Untreated Focal

Cartilage Lesions: A Preclinical Study in Sheep. *Cartilage*, *10*(1), 120–128. https://doi.org/10.1177/1947603517720260

19. Zazgyva, A. M., Gurzu, S., Jung, I., Nagy, Ö., Mühlfay, G., & Pop, T. S. (2015). S53P4 bioactive glass and fibrin glue for the treatment of osteochondral lesions of the knee - a preliminary in vivo study in rabbits. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, *56*(3), 1085–1090.

20. Salonius, E., Meller, A., Paatela, T., Vasara, A., Puhakka, J., Hannula, M., Haaparanta, A. M., Kiviranta, I., & Muhonen, V. (2021). Cartilage Repair Capacity within a Single Full-Thickness Chondral Defect in a Porcine Autologous Matrix-Induced Chondrogenesis Model Is Affected by the Location within the Defect. *Cartilage*, *13*(2_suppl), 744S–754S. https://doi.org/10.1177/19476035211030988

21. Bartell, L. R., Fortier, L. A., Bonassar, L. J., Szeto, H. H., Cohen, I., & Delco, M. L. (2020). Mitoprotective therapy prevents rapid, strain-dependent mitochondrial dysfunction after articular cartilage injury. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, *38*(6), 1257–1267. https://doi.org/10.1002/jor.24567

22. Krishnan Y, Grodzinsky AJ. Cartilage diseases. Matrix Biol. 2018 Oct;71-72:51-69. doi: 10.1016/j.matbio.2018.05.005. Epub 2018 May 24. PMID: 29803938; PMCID: PMC6146013.

23. Schenker, M. L., Mauck, R. L., Ahn, J., & Mehta, S. (2014). Pathogenesis and prevention of posttraumatic osteoarthritis after intra-articular fracture. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, *22*(1), 20–28. https://doi.org/10.5435/JAAOS-22-01-20

24. Chen, S., Fu, P., Wu, H., & Pei, M. (2017). Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell and tissue research*, *370*(1), 53–70. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2613-0

25. Decker R. S. (2017). Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Seminars in cell & developmental biology*, *62*, 50–56. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.10.005

26. Kwon, H., Paschos, N. K., Hu, J. C., & Athanasiou, K. (2016). Articular cartilage tissue engineering: the role of signaling molecules. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, *73*(6), 1173–1194. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2115-8

27. Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. (2017). Basic Science of Articular Cartilage. *Clinics in sports medicine*, *36*(3), 413–425. https://doi.org/10.1016/j.csm.2017.02.001

28. Ibragimova, S. I., Medvedeva, E. V., Romanova, I. A., Istranov, L. P., Istranova, E. V., Lychagin, A. V., Nedorubov, A. A., Timashev, P. S., Telpukhov, V. I., & Chagin, A. S. (2021). Implantation of Various Cell-Free Matrixes Does Not Contribute to the Restoration of Hyaline Cartilage within Full-Thickness Focal Defects. *International journal of molecular sciences*, *23*(1), 292. https://doi.org/10.3390/ijms23010292

29. Chen, S., Fu, P., Wu, H., & Pei, M. (2017). Meniscus, articular cartilage and nucleus pulposus: a comparative review of cartilage-like tissues in anatomy, development and function. *Cell and tissue research*, *370*(1), 53–70. https://doi.org/10.1007/s00441-017-2613-0

30. Jiang, Y., & Tuan, R. S. (2015). Origin and function of cartilage stem/progenitor cells in osteoarthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, *11*(4), 206–212. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.200

31. Decker R. S. (2017). Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Seminars in cell & developmental biology*, *62*, 50–56. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.10.005

32. Abe, K., Yamashita, A., Morioka, M., Horike, N., Takei, Y., Koyamatsu, S., Okita, K., Matsuda, S., & Tsumaki, N. (2023). Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nature communications*, *14*(1), 804. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36408-0

33. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, et al. Articular cartilage biology. J Am Acad Orthop Surg 2003;11(6):421–30.

34. Musumeci, G., Castrogiovanni, P., Trovato, F. M., Weinberg, A. M., Al-Wasiyah, M. K., Alqahtani, M. H., & Mobasheri, A. (2015). Biomarkers of Chondrocyte Apoptosis and Autophagy in Osteoarthritis. *International journal of molecular sciences*, *16*(9), 20560–20575. https://doi.org/10.3390/ijms160920560

35. Phull, A. R., Eo, S. H., Abbas, Q., Ahmed, M., & Kim, S. J. (2016). Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview. *BioMed research international*, *2016*, 1879837. https://doi.org/10.1155/2016/1879837

36. Riegger, J., & Brenner, R. E. (2020). Pathomechanisms of Posttraumatic Osteoarthritis: Chondrocyte Behavior and Fate in a Precarious Environment. *International journal of molecular sciences*, *21*(5), 1560. https://doi.org/10.3390/ijms21051560

37. Hallett, S. A., Ono, W., & Ono, N. (2019). Growth Plate Chondrocytes: Skeletal Development, Growth and Beyond. *International journal of molecular sciences*, *20*(23), 6009. https://doi.org/10.3390/ijms20236009

38. Sutherland, A. J., Converse, G. L., Hopkins, R. A., & Detamore, M. S. (2015). The bioactivity of cartilage extracellular matrix in articular cartilage regeneration. *Advanced healthcare materials*, *4*(1), 29–39. https://doi.org/10.1002/adhm.201400165

39. Shi, Y., Hu, X., Cheng, J., Zhang, X., Zhao, F., Shi, W., Ren, B., Yu, H., Yang, P., Li, Z., Liu, Q., Liu, Z., Duan, X., Fu, X., Zhang, J., Wang, J., & Ao, Y. (2019). A small molecule promotes cartilage extracellular matrix generation and inhibits osteoarthritis development. *Nature communications*, *10*(1), 1914. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09839-x

40. Abe, K., Yamashita, A., Morioka, M., Horike, N., Takei, Y., Koyamatsu, S., Okita, K., Matsuda, S., & Tsumaki, N. (2023). Engraftment of allogeneic iPS cell-derived cartilage organoid in a primate model of articular cartilage defect. *Nature communications*, *14*(1), 804. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36408-0

41. Fitzgerald J. (2020). WARP: A Unique Extracellular Matrix Component of Cartilage, Muscle, and Endothelial Cell Basement Membranes. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)*, *303*(6), 1619–1623. https://doi.org/10.1002/ar.24087

42. Henao-Murillo, L., Pastrama, M. I., Ito, K., & van Donkelaar, C. C. (2021). The Relationship Between Proteoglycan Loss, Overloading-Induced Collagen Damage, and Cyclic Loading in Articular Cartilage. *Cartilage*, *13*(2_suppl), 1501S–1512S. https://doi.org/10.1177/1947603519885005

43. Wang, Q., Yang, Y. Y., Niu, H. J., Zhang, W. J., Feng, Q. J., & Chen, W. F. (2013). An ultrasound study of altered hydration behaviour of proteoglycan-degraded articular cartilage. *BMC musculoskeletal disorders*, *14*, 289. https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-289

44. Newman AP. Articular cartilage repair. Am J Sports Med. 1998 Mar-Apr;26(2):309-24. doi: 10.1177/03635465980260022701. PMID: 9548130.

45. Luo, Y., Sinkeviciute, D., He, Y., Karsdal, M., Henrotin, Y., Mobasheri, A., Önnerfjord, P., & Bay-Jensen, A. (2017). The minor collagens in articular cartilage. *Protein & cell*, *8*(8), 560–572. https://doi.org/10.1007/s13238-017-0377-7

46. Mansfield, J. C., Mandalia, V., Toms, A., Winlove, C. P., & Brasselet, S. (2019). Collagen reorganization in cartilage under strain probed by polarization sensitive second harmonic generation microscopy. *Journal of the Royal Society, Interface*, *16*(150), 20180611. https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0611

47. Wei, H., Gibbs, E., Zhao, P., Wang, N., Cofer, G. P., Zhang, Y., Johnson, G. A., & Liu, C. (2017). Susceptibility tensor imaging and tractography of collagen fibrils in the articular cartilage. *Magnetic resonance in medicine*, *78*(5), 1683–1690. https://doi.org/10.1002/mrm.26882

48. Mansfield, J.C.; Peter Winlove, C. A multi-modal multiphoton investigation of microstructure in the deep zone and calcified cartilage. J. Anat. 2012, 220, 405–416.

49. Grogan, S.P.; Duffy, S.F.; Pauli, C.; Koziol, J.A.; Su, A.I.; D'Lima, D.D.; Lotz, M.K. Zone-specific Gene Expression Patterns in Articular Cartilage. Arthritis Rheum. 2013, 65, 418–428. [CrossRef] [PubMed]

50. Schuurman, W.; Gawlitta, D.; Klein, T.J.; ten Hoope, W.; van Rijen, M.H.P.; Dhert, W.J.A.; van Weeren, P.R.; Malda, J. Zonal Chondrocyte Subpopulations Reacquire Zone-Specific Characteristics during in Vitro Redifferentiation. Am. J. Sports Med. 2009. [CrossRef] [PubMed]

51. Amanatullah, D.F.; Yamane, S.; Reddi, A.H. Distinct patterns of gene expression in the superficial, middle and deep zones of bovine articular cartilage. J. Tissue Eng. Regen. Med. 2014, 8, 505–514.

52. Gilbert, S. J., Bonnet, C. S., & Blain, E. J. (2021). Mechanical Cues: Bidirectional Reciprocity in the Extracellular Matrix Drives Mechano-Signalling in Articular Cartilage. *International journal of molecular sciences*, *22*(24), 13595. https://doi.org/10.3390/ijms222413595

53. Jeffrey DR, Watt I. Imaging hyaline cartilage. Br J Radiol. 2003 Nov;76(911):777-87. doi: 10.1259/bjr/51504520. PMID: 14623778.

54. Żylińska, B., Silmanowicz, P., Sobczyńska-Rak, A., Jarosz, Ł., & Szponder, T. (2018). Treatment of Articular Cartilage Defects: Focus on Tissue Engineering. *In vivo (Athens, Greece)*, *32*(6), 1289–1300. https://doi.org/10.21873/invivo.11379

55. Ruediger, T., Horbert, V., Reuther, A., Kumar Kalla, P., Burgkart, R. H., Walther, M., Kinne, R. W., & Mika, J. (2021). Thickness of the Stifle Joint Articular Cartilage in Different Large Animal Models of Cartilage Repair and Regeneration. *Cartilage*, *13*(2_suppl), 438S–452S. https://doi.org/10.1177/1947603520976763

56. Żylińska, B., Silmanowicz, P., Sobczyńska-Rak, A., Jarosz, Ł., & Szponder, T. (2018). Treatment of Articular Cartilage Defects: Focus on Tissue Engineering. *In vivo (Athens, Greece)*, *32*(6), 1289–1300. https://doi.org/10.21873/invivo.11379

57. Ruediger, T., Horbert, V., Reuther, A., Kumar Kalla, P., Burgkart, R. H., Walther, M., Kinne, R. W., & Mika, J. (2021). Thickness of the Stifle Joint Articular Cartilage in Different Large Animal Models of Cartilage Repair and Regeneration. *Cartilage*, *13*(2_suppl), 438S–452S. https://doi.org/10.1177/1947603520976763

58. Trachtenberg, J. E., Vo, T. N., & Mikos, A. G. (2015). Pre-clinical characterization of tissue engineering constructs for bone and cartilage regeneration. *Annals of biomedical engineering*, *43*(3), 681–696. https://doi.org/10.1007/s10439-014-1151-0

59. Fisher, M. B., Belkin, N. S., Milby, A. H., Henning, E. A., Bostrom, M., Kim, M., Pfeifer, C., Meloni, G., Dodge, G. R., Burdick, J. A., Schaer, T. P., Steinberg, D. R., & Mauck, R. L. (2015). Cartilage repair and subchondral bone remodeling in response to focal lesions in a mini-pig model: implications for tissue engineering. *Tissue engineering. Part A*, *21*(3-4), 850–860. https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2014.0384

60. Zhang, Z., Li, L., Yang, W., Cao, Y., Shi, Y., Li, X., & Zhang, Q. (2017). The effects of different doses of IGF-1 on cartilage and subchondral bone during the repair of full-thickness articular cartilage defects in rabbits. *Osteoarthritis and cartilage*, *25*(2), 309–320. https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.09.010

61. Gao, L., Goebel, L. K. H., Orth, P., Cucchiarini, M., & Madry, H. (2018). Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Disease models & mechanisms*, *11*(6), dmm034280. https://doi.org/10.1242/dmm.034280

62. Fox SM: Multimodal management of canine osteoartritis. CRC Press, Taylor&Francis Group, 2nd edition, Boca Raton, 23-150, 2017.

63. Cucchiarini, M., Madry, H., Guilak, F., Saris, D. B., Stoddart, M. J., Koon Wong, M., & Roughley, P. (2014). A vision on the future of articular cartilage repair. *European cells & materials*, *27*, 12–16. https://doi.org/10.22203/ecm.v027sa03

64. Bothe, F., Deubel, A. K., Hesse, E., Lotz, B., Groll, J., Werner, C., Richter, W., & Hagmann, S. (2019). Treatment of Focal Cartilage Defects in Minipigs with Zonal Chondrocyte/Mesenchymal Progenitor Cell Constructs. *International journal of molecular sciences*, *20*(3), 653. https://doi.org/10.3390/ijms20030653

65. Fernandes, T. L., Shimomura, K., Asperti, A., Pinheiro, C. C. G., Caetano, H. V. A., Oliveira, C. R. G. C. M., Nakamura, N., Hernandez, A. J., & Bueno, D. F. (2018). Development of a Novel Large Animal Model to Evaluate Human Dental Pulp Stem Cells for Articular Cartilage Treatment. *Stem cell reviews and reports*, *14*(5), 734–743. https://doi.org/10.1007/s12015-018-9820-2

66. Pochwalski M, Urbanowska E and Wojtowicz A: Tissue engineering. Aplication in dentistry. Platelet rich plasma. Part I. Nowa Stomatologia 1-2: 17-22, 2000

67. Wang, Z. J., An, R. Z., Zhao, J. Y., Zhang, Q., Yang, J., Wang, J. B., Wen, G. Y., Yuan, X. H., Qi, X. W., Li, S. J., & Ye, X. C. (2014). Repair of articular cartilage defects by

tissue-engineered cartilage constructed with adipose-derived stem cells and acellular cartilaginous matrix in rabbits. *Genetics and molecular research : GMR*, *13*(2), 4599–4606. https://doi.org/10.4238/2014.June.18.2

68. Ye, K., Traianedes, K., Robins, S. A., Choong, P. F. M., & Myers, D. E. (2018). Osteochondral repair using an acellular dermal matrix-pilot in vivo study in a rabbit osteochondral defect model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, *36*(7), 1919–1928. https://doi.org/10.1002/jor.23837

69. Gao, L., Goebel, L. K. H., Orth, P., Cucchiarini, M., & Madry, H. (2018). Subchondral drilling for articular cartilage repair: a systematic review of translational research. *Disease models & mechanisms*, *11*(6), dmm034280. https://doi.org/10.1242/dmm.034280

70. Zlotnick, H. M., Locke, R. C., Stoeckl, B. D., Patel, J. M., Gupta, S., Browne, K. D., Koh, J., Carey, J. L., & Mauck, R. L. (2021). Marked differences in local bone remodelling in response to different marrow stimulation techniques in a large animal. *European cells & materials*, *41*, 546–557. https://doi.org/10.22203/eCM.v041a35

71. Shah RN, Shah NA, Del Rosario MM, Hsieh C, Nuber G and Stupp SI: Supramolecular design of self-assembling nanofibers for cartilage regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 107: 3293- 3298, 2010.

72. Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin*, *87*, 77–95. https://doi.org/10.1093/bmb/ldn025

73. Murphy, M. P., Koepke, L. S., Lopez, M. T., Tong, X., Ambrosi, T. H., Gulati, G. S., Marecic, O., Wang, Y., Ransom, R. C., Hoover, M. Y., Steininger, H., Zhao, L., Walkiewicz, M. P., Quarto, N., Levi, B., Wan, D. C., Weissman, I. L., Goodman, S. B., Yang, F., Longaker, M. T., … Chan, C. K. F. (2020). Articular cartilage regeneration by activated skeletal stem cells. *Nature medicine*, *26*(10), 1583–1592. https://doi.org/10.1038/s41591-020-1013-2

74. Bugbee, W. D., Pallante-Kichura, A. L., Görtz, S., Amiel, D., & Sah, R. (2016). Osteochondral allograft transplantation in cartilage repair: Graft storage paradigm, translational models, and clinical applications. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, *34*(1), 31–38. https://doi.org/10.1002/jor.22998

75. De Bari, C., & Roelofs, A. J. (2018). Stem cell-based therapeutic strategies for cartilage defects and osteoarthritis. *Current opinion in pharmacology*, *40*, 74–80. https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.03.009

76. Roseti, L., Desando, G., Cavallo, C., Petretta, M., & Grigolo, B. (2019). Articular Cartilage Regeneration in Osteoarthritis. *Cells*, *8*(11), 1305. https://doi.org/10.3390/cells8111305

77. Lee, E. J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*, *42*(2), 323–337. https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6

78. Vordemvenne, T., Wähnert, D., Koettnitz, J., Merten, M., Fokin, N., Becker, A., Büker, B., Vogel, A., Kronenberg, D., Stange, R., Wittenberg, G., Greiner, J. F., Hütten, A., Kaltschmidt, C., & Kaltschmidt, B. (2020). Bone Regeneration: A Novel Osteoinductive Function of Spongostan by the Interplay between Its Nano- and Microtopography. *Cells*, *9*(3), 654. https://doi.org/10.3390/cells9030654

79. Ozdol, C., Alagoz, F., Yildirim, A. E., Korkmaz, M., Daglioglu, E., Atilla, P., Muftuoglu, S., & Belen, A. D. (2015). Use of Spongostan™ for Prevention of Cranial Subdural Adhesions Following Craniotomy in an Experimental Rabbit Model. *Turkish neurosurgery*, *25*(5), 707–711. https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.10891-14.1

80. Cegielski, M., Izykowska, I., Podhorska-Okolow, M., Zabel, M., & Dziegiel, P. (2008). Development of foreign body giant cells in response to implantation of Spongostan as a scaffold for cartilage tissue engineering. *In vivo (Athens, Greece)*, *22*(2), 203–206.

81. Arias-Gallo, J., Chamorro-Pons, M., Avendaño, C., & Giménez-Gallego, G. (2013). Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using spongostan and Bio-Oss as protein carriers. *The Journal of craniofacial surgery*, *24*(5), 1507–1514. https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e31828f2469

82. Cegielski, M., Dziewiszek, W., Zabel, M., Dziegiel, P., Izycki, D., Zatoński, M., & Bochnia, M. (2008). Experimental application of xenogenous antlerogenic cells in replacement of auricular cartilage in rabbits. *Xenotransplantation*, *15*(6), 374–383. https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2008.00497.x

83. Guo, X., & Mei, N. (2016). Aloe vera: A review of toxicity and adverse clinical effects. *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews*, *34*(2), 77–96. https://doi.org/10.1080/10590501.2016.1166826

84. Liu, C., Cui, Y., Pi, F., Cheng, Y., Guo, Y., & Qian, H. (2019). Extraction, Purification, Structural Characteristics, Biological Activities and Pharmacological Applications of Acemannan, a Polysaccharide from *Aloe vera*: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(8), 1554. https://doi.org/10.3390/molecules24081554

85. Rasoulian, B., Almasi, A., Hoveizi, E., Bagher, Z., Hayat, P., Joghataei, M. T., Rezayat, S. M., & Tavakol, S. (2019). Strong binding active constituents of phytochemical to

BMPR1A promote bone regeneration: In vitro, in silico docking, and in vivo studies. *Journal of cellular physiology*, *234*(8), 14246–14258. https://doi.org/10.1002/jcp.28121

86. Werawatganon, D., Rakananurak, N., Sallapant, S., Prueksapanich, P., Somanawat, K., Klaikeaw, N., & Rerknimitr, R. (2014). Aloe vera attenuated gastric injury on indomethacin-induced gastropathy in rats. *World journal of gastroenterology*, *20*(48), 18330–18337. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18330

87. Selvakumar, M., Pawar, H. S., Francis, N. K., Das, B., Dhara, S., & Chattopadhyay, S. (2016). Excavating the Role of Aloe Vera Wrapped Mesoporous Hydroxyapatite Frame Ornamentation in Newly Architectured Polyurethane Scaffolds for Osteogenesis and Guided Bone Regeneration with Microbial Protection. *ACS applied materials & interfaces*, *8*(9), 5941–5960. https://doi.org/10.1021/acsami.6b01014 (Retraction published ACS Appl Mater Interfaces. 2018 Apr 11;10 (14):12068)

88. Soares, I. M. V., Fernandes, G. V. O., Larissa Cordeiro, C., Leite, Y. K. P. C., Bezerra, D. O., Carvalho, M. A. M., & Carvalho, C. M. R. S. (2019). The influence of Aloe vera with mesenchymal stem cells from dental pulp on bone regeneration: characterization and treatment of non-critical defects of the tibia in rats. *Journal of applied oral science : revista FOB*, *27*, e20180103. https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0103

89. Decker R. S. (2017). Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Seminars in cell & developmental biology*, *62*, 50–56. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.10.005

90. Ahern, B. J., Parvizi, J., Boston, R., & Schaer, T. P. (2009). Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis and cartilage*, *17*(6), 705–713. https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.11.008

91. Primorac, D., Molnar, V., Rod, E., Jeleč, Ž., Čukelj, F., Matišić, V., Vrdoljak, T., Hudetz, D., Hajsok, H., & Borić, I. (2020). Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes*, *11*(8), 854. https://doi.org/10.3390/genes11080854

92. Chen, L., Ye, L., Liu, H., Yang, P., & Yang, B. (2020). Extracorporeal Shock Wave Therapy for the Treatment of Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed research international*, *2020*, 1907821. https://doi.org/10.1155/2020/1907821

93. Wang, L. J., Zeng, N., Yan, Z. P., Li, J. T., & Ni, G. X. (2020). Post-traumatic osteoarthritis following ACL injury. *Arthritis research & therapy*, *22*(1), 57. https://doi.org/10.1186/s13075-020-02156-5

94. McCoy, B., & Miniaci, A. (2012). Osteochondral autograft transplantation/mosaicplasty. *The journal of knee surgery*, *25*(2), 99–108. https://doi.org/10.1055/s-0032-1322508

95. Atik, O. S., & Sezgin, E. A. (2020). Is There a Role for Photobiomodulation in Treating Damaged Articular Cartilage Due to Injury or Degeneration?. *Photobiomodulation, photomedicine, and laser surgery*, *38*(1), 1–2. https://doi.org/10.1089/photob.2019.4666

96. Lin, P. B., Ning, L. J., Lian, Q. Z., Xia, Z., Xin, Y., Sen, B. H., & Fei, N. F. (2010). A study on repair of porcine articular cartilage defects with tissue-engineered cartilage constructed in vivo by composite scaffold materials. *Annals of plastic surgery*, *65*(4), 430–436. https://doi.org/10.1097/SAP.0b013e3181d6e38b

97. Niall A. Smyth, Christopher D. Murawski, Lisa A. Fortier, Brian J. Cole, John G. Kennedy. 2013. Platelet-Rich Plasma in the Pathologic Processes of Cartilage: Review of Basic Science Evidence. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery 29:8, 1399-1409.

98. Jason C. Tank, Dennis S. Weiner, Robin Jacquet, Dylan Childs, Todd F. Ritzman, Walter I. Horne, Richard Steiner, Melanie A. Morscher, William J. Landis. 2013. The effects of hypothyroidism on the proximal femoral physis in miniature swine. Journal of Orthopaedic Research n/a-n/a.

99. Tun Yuan, Li Zhang, Kuifeng Li, Hongsong Fan, Yujiang Fan, Jie Liang, Xingdong Zhang. 2013. Collagen hydrogel as an immunomodulatory scaffold in cartilage tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterialsn/a-n/a.

100. Aimee Claire Kok, Gabrielle J. M. Tuijthof, Steven Dunnen, Jasper Tiel, Michiel Siebelt, Vincent Everts, C. Niek Dijk, Gino M. M. J. Kerkhoffs. 2013. No Effect ofHole Geometry in Microfracture for Talar Osteochondral Defects. Clinical Orthopaedics and Related Research® .

101. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. Clin Orthop Relat Res. 2002;(402):21–37. PMID:

102. Armiento, A. R., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2019). Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair?. *Advanced drug delivery reviews*, *146*, 289–305. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.015

103. Tuan, R. S., Chen, A. F., & Klatt, B. A. (2013). Cartilage regeneration. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, *21*(5), 303–311. https://doi.org/10.5435/JAAOS-21-05-303

104. Serel, S., Çerkez, C., Işılgan Alpat, S. E., Yiğit, P., Can, B., & Göktürk, H. (2020). Non-significant Effects of The Geometric Shape of Autologous Cartilage Grafts on Tissue Healing: An Animal Study. *Aesthetic plastic surgery*, *44*(5), 1845–1853. https://doi.org/10.1007/s00266-020-01904-x

105. Kinner, B., Capito, R. M., & Spector, M. (2005). Regeneration of articular cartilage. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, *94*, 91–123. https://doi.org/10.1007/b100001

106. Ahern, B. J., Parvizi, J., Boston, R., & Schaer, T. P. (2009). Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis and cartilage*, *17*(6), 705–713. https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.11.008

107. Chu, C. R., Szczodry, M., & Bruno, S. (2010). Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, *16*(1), 105–115. https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2009.0452

108. Ahern, B. J., Parvizi, J., Boston, R., & Schaer, T. P. (2009). Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis and cartilage*, *17*(6), 705–713. https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.11.008

109. Afara, I. O., Prasadam, I., Moody, H., Crawford, R., Xiao, Y., & Oloyede, A. (2014). Near infrared spectroscopy for rapid determination of Mankin score components: a potential tool for quantitative characterization of articular cartilage at surgery. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*, *30*(9), 1146–1155. https://doi.org/10.1016/j.arthro.2014.04.097

110. Wähnert, D., Koettnitz, J., Merten, M., Kronenberg, D., Stange, R., Greiner, J. F. W., Kaltschmidt, C., Vordemvenne, T., & Kaltschmidt, B. (2021). Spongostan™ Leads to Increased Regeneration of a Rat Calvarial Critical Size Defect Compared to NanoBone® and Actifuse. *Materials (Basel, Switzerland)*, *14*(8), 1961. https://doi.org/10.3390/ma14081961

111. Armiento, A. R., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2019). Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair?. *Advanced drug delivery reviews*, *146*, 289–305. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.015