

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HİYALİN KIKIRDAĞIN DEĞİŞİK KONAKLARA BİYOLOJİK
TROPİZMİ - HAYVAN DENEYİ**

Dr. Kadir BÜYÜKDOĞAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**2014
ANKARA**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HİYALİN KIKIRDAĞIN DEĞİŞİK KONAKLARA BİYOLOJİK
TROPİZMİ - HAYVAN DENEYİ**

Dr. Kadir BÜYÜKDOĞAN

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mahmut Nedim DORAL**

**2014
ANKARA**

TEŞEKKÜR

Çalışmanın gerçekleştirilmesine katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişilere içtenlikle teşekkür etmek istiyorum.

Sayın Prof. Dr. Mahmut Nedim Doral, tez danışmanım olarak bu çalışmanın ortaya çıkmasında, eserin içeriğinin düzenlenmesinde, yürütülmesinde ve tez sonuçlarının yorumlanmasında akademik bilgi ve deneyimleri ile çok değerli ve kıymetli katkılarda bulunmuştur. Çalışmanın her aşamasında maddi ve manevi desteğini hiç esirgememiş ve bizlere örnek olmuştur.

Sayın Prof. Dr. Mustafa Sargon, Doç. Dr. Saniye Ekinci, Doç. Dr. Banu Ayhan ve Öğr. Gör. Dr. Kemal Kösemehmetoğlu çalışmaya akademik bilgi ve deneyimleri ile katkıda bulunup, cerrahi disseksiyon ve histolojik değerlendirme aşamalarında yoğun ilgi ve desteğini esirgememiştir.

Sayın Dr. Sevilay Karahan, çalışmanın verilerinin biyoistatistiksel değerlendirilmesinde akademik bilgisi ile değerli katkıda bulunmuştur.

Çok kıymetli annem Elmas Büyükdoğan, babam Duran Büyükdoğan, kardeşim Araş. Gör. Dr. Hasan Büyükdoğan ve değerli teyzem Prof. Dr. Meral Kanbak hayatımın her aşamasında olduğu gibi, çalışmam sırasında da yoğun ilgilerini, özverilerini, maddi ve manevi her türlü desteklerini hiç esirgememişler ve her zaman yanımda olmuşlardır.

Değerli asistan arkadaşlarım çalışmanın her aşamasında birer kardeş gibi desteklerini esirgememişlerdir ve özverileri sayesinde bu çalışma ortaya çıkmıştır. Dr. Duygu Gülseren ve Dr. Hacer Neslihan Bildik çalışmanın içeriğinin düzenlenmesinde değerli katkılarda bulunmuştur.

Son olarak, ortopedi ve travmatoloji eğitimimde bana emeği geçmiş ve akademik deneyimleri ile bizi yetiştiren tüm değerli bölüm hocalarıma, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Büyükdoğan K. Hiyalin Kıkırdığın Değişik Konaklara Biyolojik Tropizmi - Hayvan Deneyi -. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Tezi, Ankara 2014. “In vitro” kondrosit kültürü ve proliferasyonu ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen “in vivo” çalışmalar yeterli sayıda değildir. Hipotezimiz, canlılardaki bazı dokuların kondrojenesisini teşvik edebileceği ve artırabileceği idi. Çalışmamızda tavşan modelinde omentum, periton, kas ve aşil paratenonu gibi farklı yumuşak dokuların kondrojenesisini stimülasyon potansiyellerini değerlendirmeyi hedefledik. Etik kurul onayından sonra sonra 45 Yeni Zelanda tavşanın sağ dizlerinden standart boyutta osteokondral greftler alındı. Denekler 5 gruba ayrıldı ve parçalar uygun cerrahi koşullarda omentuma (n=10), peritona (n=10), kas dokusuna (n=10) ve Aşil paratenonuna (n=10) yerleştirildi. Kontrol grubu (n=5) olarak doğal distal femoral kondiler kıkırdak değerlendirildi. Greftler 5 ayın sonunda çıkartılıp histolojik olarak incelendi. Histolojik kesit alanında görülen kondrositlerin kantifikasyonu ışık mikroskopunun “Camera Lucida” sistemi kullanılarak yapıldı. Her bir mikroskopik kesitte kondrositler 200X büyütme altında 0.01mm² lik 10 farklı alanda sayıldı. Elde edilen veriler ile yapılan analiz sonucunda; kontrol grubunun(n=5) ortalama kondrosit sayımı 16,0 ±0,67, omentum grubunun (n=7) 14,4 ±0,97, kas grubunun (n=4) 9,7 ±1,39, paratenon grubunun (n=5) 9,2 ±0,42 ve periton grubunun (n=8) 15,4 ±1,09 olarak bulundu. Paratenon ve kas grubunun ortalama kondrosit sayısı kontrol grubuna ve periton grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu (Kruskal - Wallis testi p <0,001). Omentum ve periton grubundaki kondrosit değerleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değerler arasında anlamlı farklılık saptanmadı (p >0,05). Osteokondral otogreftlerin mezotelyal bölgeye implantasyonu sonrası oluşan dokuların histolojik olarak canlılığını ve hücreliliğini koruduğu gözlemlendi. Elde ettiğimiz verilere dayanarak, hayvanlarda periton ve omentumun osteokondral doku için potansiyel bir in vivo inkübatör olabileceğini öngörebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Kıkırdak, Kondrosit, In vivo kültür, Omentum, Periton

ABSTRACT

Büyükdoğan K. The Biological Tropism of Hyaline Cartilage in Different Hosts -Animal Study-. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Orthopaedics and Traumatology, Ankara 2014. There are several in vitro studies about chondrocyte cultures and proliferation, however, there are not sufficient number of them about in vivo proliferation. Our hypothesis was that, some tissues might promote and enhance condrogenesis in living organisms. We aimed to evaluate the condrogenesis stimulation potential of various types of soft tissues such as omentum, peritoneum, muscle and Achilles paratenon in a rabbit model. 45 New Zealand rabbits were used following the permission of the local ethical committee. Standard sizes of osteochondral grafts were harvested from right knees. Five groups were formed and graft samples were placed securely into the omentum (n=10), peritoneum (n=10), muscle (n=10) and Achilles paratenon tissue (n=10). Control group (n=5) was native distal femoral condylar cartilage. After five months, samples were collected, evaluated histologically and quantification of the chondrocytes was performed by using the camera lucida system of a light microscope. Microscopic sections were counted under 200X magnification at a constant area of 0.01mm² at 10 different areas for each section. The mean number of chondrocytes were 16,0 ±0,67 in control group (n=5), 14,4 ±0,97 in omentum (n=7), 9,7 ±1,39 in muscle (n=4), 9,2 ±0,42 in Achilles paratenon (n=5) and 15.4±1,09 in peritoneum group (n=8) respectively. Mean number of chondrocytes in paratenon and muscle group were meaningfully lower than control and omentum group (Kruskal - Wallis p <0,001). When they were compared omentum and peritoneum groups were not statistically different from control group (p >0,05). After the implantation of osteochondral autografts into the mesothelial sites, grafts sustained their cellularity and viability histologically. The results of this study indicate that omentum and peritoneum may have the potential to be used as an in vivo incubator for osteochondral tissue growth in animals.

Keywords: Cartilage, Chondrocyte, In vivo culture, Omentum, Peritoneum

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Eklem Kıkırdağı	6
2.1.1. Eklem Kıkırdağının Yapısal Bileşenleri	6
2.1.2. Eklem Kıkırdağının Yapısal Anatomisi	10
2.2. Peritonun Yapısı ve Histomorfolojisi	12
2.3. Omentumun Yapısı ve Histomorfolojisi	14
2.4. Paratenonun Yapısı ve Histomorfolojisi	15
2.5. Kas Dokusunun Yapısı ve Histomorfolojisi	16
2.6. Eklem Kıkırdak Lezyonları	17
2.6.1. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Sınıflandırılması	17
2.6.2. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Kliniği ve Radyolojik Değerlendirmesi	19
2.6.3. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Yöntemleri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Anestezi/Analjezi	32
3.2. Cerrahi Teknik	32
3.3. Greftlerin Makroskopik Görüntüsü	38
3.4. Histolojik İnceleme	39
3.5. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Pre-op.	Cerrahi öncesi
Post-op.	Cerrahi sonrası
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
kg	Kilogram
mg	Miligram
µm	Mikrometre
mm	Milimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
BMP	Bone morphogenic protein (Kemik morfojenik protein)
IGF	Insulin-like growth factor (İnsülin benzeri büyüme faktörü)
TGF	Transforming growth factor (Değiştirici büyüme faktörü)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotelial büyüme faktörü)
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblast büyüme faktörü)
HGF	Hepatosit growth factor (Hepatosit büyüme faktörü)
EGF	Epidermal growth factor (Epidermal büyüme faktörü)
PDGF	Platelet derived growth factor (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)
PRP	Platelet rich plasma (Plateletten zengin plazma)
ICRS	International Cartilage Repair Society (Uşuslararası Kıkırdak Tamir Birliği)
dGEMRIC	Delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (Kıkırdağın gecikmiş gadolinyum ile desteklenmiş manyateik rezonans görüntülemesi)

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 2.1. Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri ve dağılımları.	7
Şekil 2.2. Eklem kıkırdağının hücre dışı matriks bileşenleri.	10
Şekil 2.3. Eklem kıkırdağının temel yapısal anatomisi.	11
Şekil 2.4. Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde günümüzde sık kullanılan yöntemler ve biyolojik etkileri.	22
Şekil 2.5. Başarılı bir doku mühendisliği için gerekli unsurlar; Büyüme faktörleri ve mekanik uyarılar, skafoldlar ve uygun hücreler.	27
Şekil 3.1. Cerrahi öncesi hazırlık aşamasından görüntüler: (a) Tavşanın greft alınacak sağ dizinin cerrahi öncesi hazırlığı, (b) cerrahi uygulanacak dizin steril örtü ile örtülmüş şeklinin görüntüsü	33
Şekil 3.2. Femoral kondillere ulaşım için uygulanan cerrahi teknik: (a)Orta hat insizyonu. (b) Medial parapatellar insizyon sonrasında, patellanın laterale sublüksasyonu ve femoral kondillerin ortaya çıkarılması.	33
Şekil 3.3. Osteokondral otogreft, sağ diz: (a) Lateral femoral kondilden subkondral kemik ile birlikte greft alınışı, (b) 5 x 5 x 10 mm boyutlarında standart osteokondral otogreft.	34
Şekil 3.4. (a) Abdominal bölgenin cerrahi öncesi hazırlık görüntüsü, (b) periton ve omentum grubu tavşanlara operasyon boyunca intravenöz hidrasyon verilmesi	35
Şekil 3.5. Osteokondral greftlerin peritona yerleştirilmesi: (a) Peritona greftin yerleştirilmesi için cep hazırlanması, (b) Greftin peritona emilmeyen dikiş ile tespit edilmesi.	35
Şelik 3.6. (a) Orta hat insizyonu sonrası omentumun damarlanmasına zarar verilmeden eksplere edilmesi, (b) greftin omentumda oluşturulan cebe yerleştirilmesi ve tespit edilmesi.	36

- Şekil 3.7.** (a) Aşil paratenonuna ulaşım için uygulanan cerrahi teknik, (b) osteokondral greftlerin aşil paratenona yerleştirilmesi. 36
- Şekil 3.8.** Vastus lateralis kasına yaklaşım: (a) Künt diseksiyon ile kas gövdesinde cep oluşturulması, (b) Greftin kas gövdesine tespiti. 37
- Şekil 3.9.** (a) Peritona yerleştirilen greftin makroskopik görüntüsü; periton ile sıkı bir entegrasyon içinde olduğu görülmekte. (b) Omentuma yerleştirilen greftin makroskopik görüntüsü; omentum tarafından tamamen çevrelenmiş ve damarlanmasının zengin olduğu görülmekte. 38
- Şekil 3.10.** (a) Vastus lateralis kasına yerleştirilen greftin makroskopik görüntüsü, (b) Aşil parateonuna yerleştirilen greftin paratenon tarafından çevrelenmiş olduğu görülmekte. 38
- Şekil 3.11.** (a) Kas 6 örneğinde görülen kemikleşen kıkırdağın görüntüsü, (b) aynı örnekte saptanan ölü kıkırdağın mikroskopik görüntüsü 39
- Şekil 3.12.** Kontrol grubuna ait kontrol 2 örneğinin x100 (a) ve x400 (b) büyütmedeki histolojik görüntüleri. 40
- Şekil 3.13.** Omentum 8 örneğinin histolojik görüntüleri: (a) x100 büyütmedeki, (b) x400 büyütmedeki görüntüleri. Kondrositlerin kolon halinde dizildikleri görülmektedir. 40
- Şekil 3.14.** Periton 8 örneğinin histolojik görüntüleri: (a) x100 büyütme ve (b) x400 büyütmedeki görüntüleri. 41
- Şekil 3.15.** Aşil 3 örneğine ait histolojik görüntüler: (a) x100 büyütme ve (b) x400 büyütmedeki görüntüler. 41
- Şekil 3.16.** Kas 3 örneğine ait histolojik görüntüler: (a) x100 büyütmede ve (b) x400 büyütmedeki görüntüler. 42
- Şekil 3.17.** (a) Periton 5 örneğinin ve (b) omentum 4 örneğinin x400 büyütmede aynı lakün içindeki çift çekirdekli kondrositlerin görüntüsü. 42

- Şekil 3.18.** Peritona yerleştirilen ve kondrosit canlılığını koruduğu görülen periton 5 numaralı örnekte, hiyalin kıkırdağın mezotelyum ile olan ilişkisi. 43
- Şekil 3.18.** (a) ve (b) Histolojik preparatlardaki kondrositlerin Nikon Optiphot (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ışık mikroskobu ile “camera lucida” yöntemi kullanılarak, 200x büyütmede 0.01 mm² lik alanlarda aynı araştırmacı tarafından sayılması. 43
- Şekil 4.1.** Grupların ortalama kondrosit değerlerinin kontrol grubuyla ve kendi aralarındaki karşılaştırması. Paratenon ve kas grubundaki ortalama kondrosit değerleri kontrol ve periton grubundan anlamlı olarak düşük bulundu. 48

TABLolar

	Sayfa No
Tablo 2.2. Kıkırdak rejenerasyonu için kullanılan büyüme faktörleri	30
Tablo 4.1. Kontrol grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.	45
Tablo 4.2. Omentum grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.	45
Tablo 4.3. Kas grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.	46
Tablo 4.4. Periton grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.	46
Tablo 4.5. Paratenon grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.	46

1. GİRİŞ

Eklem kıkırdak lezyonları ve osteoartrit toplumsal bir olgu olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir. En önemli işgücü kaybı nedenleri arasında yer alan bu hastalıklar ekonomiye ciddi bir yük getirmektedir. Günümüzde aktivitenin artması ile ivme kazanan kıkırdak lezyonları, çeşitli bilimsel araştırmalara dayanak oluşturmaktadır. Elde edilen veriler ortopedi bilim dalı ile entegre olmakta ve kaybedilmiş hareketin kazanılmasında ümit vaad etmektedir [1].

Eklem kıkırdağının yapısı ve hastalıkları ile ilgili bilgiler ilk kez 1743 yılında dönemin ünlü anatomist ve doktorlarından William Hunter tarafından şu sözlerle özetlenmiştir. "Hipokrat zamanından günümüze kadar standart Cerrahi Yazarlarının bilgilerini alacak olursak, şu sonucu buluruz; ülsere olmuş bir kıkırdak, ileride mutlaka çok sorunlu bir hastalık oluşturacaktır...hasar gördüğü zaman, hiç bir zaman iyileşemez." [2]. Takip eden yıllarda yapılan araştırmalar da kıkırdak dokusunun yaralandıktan sonra iyileşemediğini veya kısmen fibröz doku ile iyileştiğini, rejenerasyon kapasitesinin olmadığını belirtmiştir [3, 4].

William Hunter'ın tespitinden günümüze kadar, araştırmacıların eklem kıkırdak lezyonlarının tedavisi üzerine çalışmaları giderek artmış ve son zamanlarda ortopedik cerrahlarla birlikte diğer bilimsel disiplinler de bu arayışa dahil olmuştur. Bu lezyonların tedavisinde doğal kıkırdak oluşumunu sağlamak için, debridman, mikrokirik uygulaması, matkap ile delme, otolog ve allojenik osteokondral dokuların transplantasyonu gibi birçok farklı cerrahi prosedür denenmiş ancak bu uygulamalar göreceli olarak daha az sağlamlığa ve esnekliğe sahip fibrokartilaj oluşumu ile sonuçlanmıştır. Çoğu ortopedik cerrah fibrokartilaj ile iyileşmeyi klinik olarak tatmin edici bulmaktadır. Yapılan uzun dönem çalışmalar, kıkırdak lezyonlarının hiyalin kıkırdak ile iyileşmesi gerektiğini, aksi takdirde osteoartritin kaçınılmaz olduğunu ortaya koymuştur [5].

Kondrosit biyolojisinin ve kıkırdak lezyonlarının patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ile ortopedi pratiği artık biyolojik tedavi yöntemleri üzerine yoğunlaşmakta ve çoğu zaman cerrahi prosedürlerle beraber

uygulanmaktadır. Eklem kıkırdağının kendini tamir etme ve rejenerasyon potansiyeli oldukça kısıtlıdır [6]. Bu zorluklar kıkırdağın kendi özel yapısından kaynaklanmaktadır. Eklem kıkırdağı avaskülerdir ve tamir mekanizması için gerekli intrinsik dolaşıma sahip değildir [7]. Kondrositlerin içinde bulunduğu ortam iyileşmeye yardımcı olmaz, lakünelarda sıkışan kondrositler ise hasarlı alana migrasyon gösteremezler. Kondrositlerin sayısı, metabolizması ve matriks üretme potansiyelleri yaş ile birlikte azalır ve apoptoz mekanizması hızlanır [8]. Bu nedenle kıkırdak, kendi orjinal dokusu ile rejenere olmak yerine daha düşük biyomekanik özelliklere sahip fibrokartilaj ile tamir olur [9]. Kıkırdağın bu özelliği nedeniyle, kısıtlılık yaratan ve mekanizması tam aydınlatılmamış ağrıyı engellemek, artroplasti ve artrodez işlemlerine olan ihtiyacı azaltmak ve hiyalin kıkırdağın rejenerasyonunu sağlamak için yenilikçi fikirler ve yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur [10].

Sessiz bir devrim olarak nitelendirilen ve merkezinde kök hücre bulunan doku mühendisliği; hasarlı organların fonksiyonunu devam ettirebilmek, geliştirmek veya yerine koyabilmek için dokuların rejenerasyonunu veya remodelizasyonu ile ilgilenen ve ayrıca implantasyon sonrası in vivo ortamda hastalıklı veya hasar görmüş doku ve organların fonksiyonlarını üstlenebilecek in vitro olarak doku üretimi ve geliştirilmesi olarak tanımlanabilir [11]. Başarılı bir doku mühendisliği işlemi için bir çok farklı unsur göz önünde bulundurulmalıdır. Bunlar implantasyon için uygun hücrelerin seçimi, bu hücrelerin kondrojenik yolak içinde başarılı bir şekilde diferansiasyona ve büyümeye yönlendirilmesi için uygun sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve mekanik uyarıların kullanımı, büyüyen hücrelerin üç boyutlu matriks içinde tutunması ve bu matriksin hasarlı dokuya implantasyon sonrası iyileşme oluncaya kadar devamlılığını koruması olarak sıralanabilir [12].

Kondrositler, kemik iliğinden, sinovya, kas, yağ ve periost dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler ve Wharton jelinden elde edilen hücreler gibi farklı hücre tipleri kıkırdak lezyonlarına implante edilmek için in vitro ortamda çalışılmıştır [13]. Ancak bu hücrelerin başarılı bir şekilde uygun yolağa yönlendirilebilmesi için doğru sinyallerin doğru zamanda ve doğru yerde verilmesi gerekir [14]. Kıkırdak rejenerasyonu ile ilgili farklı büyüme

faktörleri bildirilmiştir. BMP-2, 4, 7, IGF-1 ve TGF-B gibi büyüme faktörleri kültür ortamına viral veya non viral vektörlerle transfer edilmektedir [10]. Üç boyutlu destek ise kıkırdak rejenerasyonunun en önemli ve son basamağıdır. Bu taşıyıcı iskeleler için protein ve karbonhidrat bazlı matriksler ve hidrojeller kullanılmaktadır [15]. In vivo ortamdaki mekanik çevre in vitro kültür ortamından farklılar gösterir. Diz eklemi içinde kıkırdak farklı makaslama kuvvetlerine, kompresyona ve hidrostatik sıvı basıncına maruz kalır ve bu mekanik kuvvetler taşıyıcı iskeletin, hücrelerin veya her ikisinin de rejenerasyon potansiyellerini değiştirebilir [16-18].

Bu prensipler ışığında ortopedi pratiğine giren otolog kondrosit implantasyonu, mozayikplasti veya debridman gibi yöntemlerin başarısızlıkla sonuçlandığı büyük kıkırdak lezyonlarının tedavisinde bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır [19, 20]. Oluşan kartilaj normal hiyalin kıkırdak componentlerini taşımakla beraber süperfisiyel tabakası fibrokartilaj yapısındadır ve bu nedenle neokartilaj, hiyalin benzeri kıkırdak olarak adlandırılmaktadır [21]. Doku mühendisliğinin teknik olarak başarıyla uygulanan bu yöntemi yine de uygulama sonrası yük verme sonucunda çözelti içinde yerleştirilen kondrositlerin lezyondan kaçışını önlemek, ikinci açık cerrahi gerekliliği, ikinci cerrahide artrotomi gerekliliği, artrofibrozis, periosteal hipertrofi, donör saha morbiditesi gibi sorunları henüz aşamamıştır.

Kök hücrelerin kıkırdak dokuya farklılaşmasında çevre dokular da etkilidir [22]. Ancak bu farklılaşmanın nasıl kontrol edildiği ve aşırı büyümenin nasıl engellendiği gibi sorunlar henüz net olarak cevaplanmamıştır. Bu mekanizmanın aydınlatılması ile in vitro ortamda karşımıza çıkan doku mühendisliğindeki hatalar, riskler ve maliyetler büyük oranda azalacaktır.

Artroskopik işlemlerde sıklıkla karşımıza çıkan eklem fareleri eklem içindeki in-vivo kültürler olarak tarif edilebilir [23]. Diz eklemine in vivo kültür ortamı olarak erişkin kemik iliğinden alınan mezenkimal kök hücrelerinin eklem içerisine yerleştirildiği ve diz eklem ortamının kondrogenesis üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada sinoviyal sıvı ve dokunun kondrogenetik farklılaşma için önemli olduğu görülmüştür [24]. Benzer olarak eklem içi

tümöral durumlarda kıkırdak dokuların sinoviyal bağ doku veya sinoviyal zar kökenli olduğu bilinmektedir [25]. Bilge'nin 2009 tarihli Sinovyal Dokunun İn vivo Kıkırdak Kültüründeki Etkisi isimli çalışması, literatürde "sinoviyal doku içerisine yerleştirilen kıkırdak dokusundaki kondrosit sayısındaki artışın camera lucida" yöntemiyle histolojik olarak gösterildiği ve sinoviyal dokunun mükemmel bir kondrogenetik "in-vivo" kültür ortamı olabileceğini gösteren nadir çalışmalardandır [26]. Biz çalışmamızda osteokondral greftlerin implantasyonu için uygun, büyüme faktörlerince zengin olduğu bilinen kas, periton, omentum ve aşil paratenon dokularının osteokondral otogreftlerdeki kondrosit sayıları üzerine olan etkilerini karşılaştırdık [27-29].

Literatürde, sinovya harici dokuların "in-vivo" kültür ortamı olarak canlılığın kendi eklem kıkırdağının büyümesi ve kondrosit sayısı üzerine etkisini inceleyen yeterli yayın bulunmamaktadır. Bu bağlamda yapılan çalışma, greftin proliferasyonuna izin veren, boyut olarak daha elverişli, büyüme faktörlerinden zengin ve implantasyona uygun kas, omentum, periton ve aşil paratenonu dokularının, canlılığın kendi kıkırdağının büyümesi ve kondrosit sayısı üzerine etkisini "**in-vivo**" kültür ortamı olarak inceleyen ilk çalışmalardan biri olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmanın amaçları şunlardır:

Amaç 1: Kas, omentum, periton ve aşil paratenon dokularının kondrosit proliferasyonu üzerine "in- vivo" kültür ortamı olarak rolünü ve etkilerini belirlemek.

Amaç 2: Yük taşıyan eklemlerde, osteoartrit klinik olarak ortaya çıkmadan önce ve dizilim bozukluğu olmaksızın kıkırdak lezyonlarının tedavisinde ucuz, biyolojik ve otolog yeni bir alternatif tedavi yönteminin olabileceği fikrini ortaya koymak.

Çalışmanın hipotezleri şunlardır:

Hipotez 1: Canlılarda kas, omentum, periton ve paratenon gibi yumuşak dokular osteokondral greftlerde kondrogenezisi teşvik edebilir ve artırabilir

Hipotez 2: Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde in-vitro ortamda üretilen kıkırdak doku yerine, canlılığın kendi vücudunda oluşturduğu kıkırdak

dokunun kullanılması hem ucuz hem de kolay uygulanabilecek bir biyolojik tedavi yöntemidir.

2. GENEL BİLGİLER

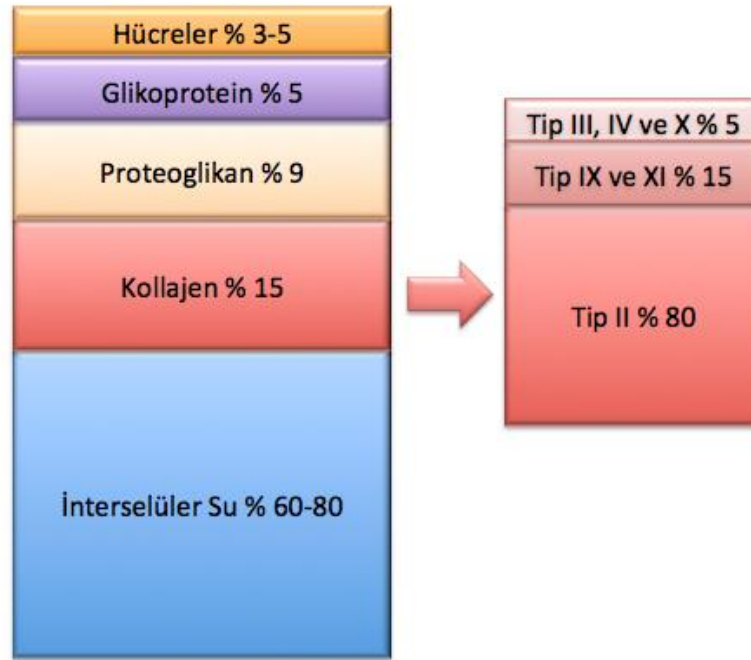
2.1. Eklem Kıkırdağı

Vücudumuzda matriks özelliklerine göre ayrılan, görünüm ve mekanik özellikleri bakımından birbirinden farklı üç tipte kıkırdak bulunmaktadır; fibrokartilaj, elastik kıkırdak ve hiyalin kıkırdak.

Eklem kıkırdağının yapısında mezankimal doku kökenli hiyalin kıkırdak bulunur [30]. Eklem kıkırdağı sürekli yük maruziyeti sonucu zaman içinde farklı davranışlar gösteren viskoelastik yapıya dönüşür. Diartrodial eklemlerde düşük sürtünmeli ve pürüzsüz yüzeyler oluşturarak kayma hareketine izin verir. İşlevleri arasında ekleme binen yükleri iletmek ve bu stresi subkondral kemiğe dağıtmak da bulunur [31]. Eklem kıkırdağı bu işlevlerini yerine getiremediği durumda yapısındaki bozunma ile beraber osteoartrit tablosu oluşur [32]. Eklem kıkırdağının hasarlanması kas iskelet sistemi morbiditelerinin en önemli nedenlerinden birisidir. Eklem kıkırdağının özgün ve karmaşık yapısından dolayı, bu hasarların tedavisi ve restorasyonu hasta ve hekim açısından büyük zorluklar teşkil etmektedir. Eklem kıkırdağının işlevini devam ettirebilmesi, büyük oranda organize mimarisinin devamlılığına ve bütünlüğüne dayanmaktadır [33].

2.1.1. Eklem Kıkırdağının Yapısal Bileşenleri

Eklem kıkırdağı 2-4 mm kalınlığında hiyalin kıkırdaktan oluşur. Diğer dokuların aksine, damar, lenfatik ve sinir doku içermez. Yoğun bir hücre dışı matriks ve bu matriks içine seyrek olarak dağılmış, ileri derecede özelleşmiş kondrosit isimli hücrelerden oluşur. Hücre dışı matriks genel olarak su, kollajen, proteoglikan ve az miktarda kollajen olmayan proteinler ve glikoproteinlerden oluşur (Şekil 2.1.). Bu bileşenler sayesinde kıkırdak, mekanik özelliklerini devam ettirebilmek için hücre dışı matrikste büyük oranda su tutabilir [34].



Şekil 2.1. Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri ve dağılımları.

Kondrositler: Eklem kıkırdağının temel yapısal hücreleridir. İleri derecede özelleşmiş ve metabolik olarak aktif olan kondrositler, hücre dışı matriksin üretiminde, devamlılığının korunmasında ve hasarlanması durumunda tamirinde rol oynar. Kondrositler mezankimal kök hücrelerden oluşur ve eklem kıkırdağının hacminin %2'sini oluşturur [35]. Kan damarları olmadığı için, sinovyal sıvıdan hücre dışı matrikse difüzyon yoluyla gelen glikozu, düşük oksijen konsantrasyonu altında anaerobik olarak metabolize ederler. Kondrositler, kıkırdak içindeki yerleşim yerlerine göre farklı şekil, sayı ve boyutta olabilirler. Üst tabakalarda bulunan kondrositler, daha düz ve küçükken derin tabakalarda bulunan kondrositlere göre daha yoğun görünümde dirler. Her kondrosit etrafında özelleşmiş bir mikroçevre oluşturur ve komşuluğundaki bu hücre dışı matrisin devamlılığında sorumludur. Bu komşu mikroçevrede hapsolan kondrosit, kıkırdağın diğer bölgelerine migre olamaz. Kondrositler kendi aralarında sinyal iletimi ve haberleşme için nadiren hücre-hücre bağlantısı yaparlar. Ancak, büyüme faktörleri, piezoelektirik kuvvetler, mekanik yükler ve hidrostatik basınç gibi birçok farklı uyarana cevap verebilirler [36]. Kondrositlerin replikasyon potansiyelleri

sınırlıdır ve kıkırdak dokusunun yaralanmaya olan cevabında bu etken önemlidir. Kondrositlerin devamlılığı optimum mekanik ve biyokimyasal ortama bağlıdır. Bu kompleks etkileşim kıkırdak dokusunun in vitro ortamda üretimini zor kılmaktadır.

Hücre Dışı Matriks

Normal eklem kıkırdağının ağırlığının %65-80'i interselüler sıvıdan meydana gelir [37]. Kollajenler ve proteoglikanlar geri kalan kuru ağırlığı meydana getirirler (Şekil 2.2). Hücre dışı matrikste ayrıca, düşük miktarda lipid, fosfolipid, kollajen olmayan proteinler ve glikoproteinler de bulunmaktadır.

Su: Hücre dışı matriksin büyük çoğunluğu su tarafından oluşturulur. Eklem kıkırdağının ağırlığının %80'ini oluşturur. Suyun %30'u kollajenler arası interfibriler alanda bulunurken, bir kısmı ise interselüler alanda bulunur. Geri kalan kısım ise matriksin por alanlarında bulunur [38]. Bu doku sıvısında sodyum, kalsiyum, klorid ve potasyum gibi inorganik iyonlar çözünmüş halde bulunur [39]. Göreceli su konsantrasyonu eklem kıkırdağının yüzeyel tabakasında %80 iken, daha derin tabakalarda %65'e kadar düşer. Eklem yüzeyinde ve kıkırdak içindeki sıvı akışı kondrositlere gerekli besin transportunu ve dağılımını sağlamanın yanısıra lubrikasyon işlemi de gerçekleştirir. İnterfibriler alandaki su jel formundadır ve hücre dışı matrikse basınç uygulandığında veya solid matriks kompresyon kuvvetlerine maruz kaldığında, su hücre dışı matriks içine dağılır [37, 40]. Bu sıvı akışına karşı matriks içindeki direnç oldukça büyüktür ve bu nedenle matriks geçirgenliği oldukça düşüktür. Sıvı akışına karşı matriksteki sürtünme direnci ve matriksin suyu basınç altında tutabilmesi gibi iki mekanizmanın kombinasyonu sayesinde eklem kıkırdağı büyük kuvvetler altında işlevini sürdürebilmektedir.

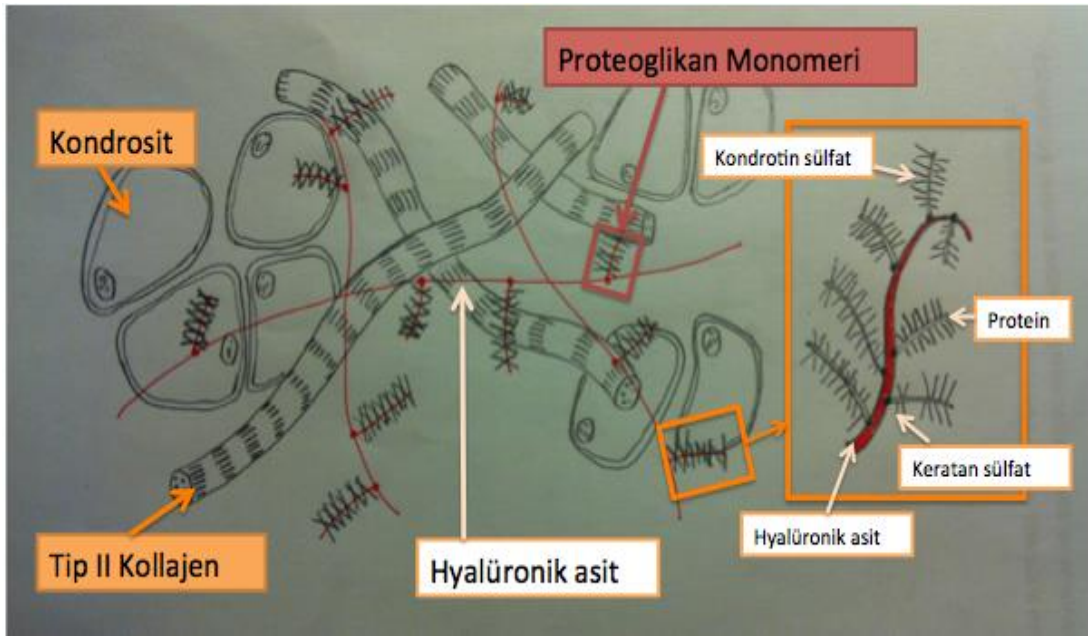
Kollajen: Hücre dışı matrikste en çok bulunan yapısal makromoleküldür ve eklem kıkırdağının kuru ağırlığının %60'ni oluşturur. Hücre dışı matriksteki kollajenlerin %90-95'i tip II kollajendir ve proteoglikan agregatlarla sarılmış fibril ve fiberler oluşturur. Bu fibriller çok fazla miktarda çapraz bağ oluşturur ve birbirine sıkı bir şekilde bağlı kararlı bir ağ meydana

getirir. Tip II kollajenin yarılanma ömrü yaklaşık 25 sene olduğundan meydana gelen ağ çok kararlı yapıdadır. Eklem kıkırdağı matriksinde ayrıca az miktarlarda Tip I, IV, V, IX ve XI kollajen bulunur. Bu minor kollajenlerin görevi tip II kollajen fibril ağını desteklemek ve stabilize etmektir. Minor kollajenlerden en sık tip IX ve XI bulunur. Tip IX kollajen, tip II kollajen ile çapraz bağ yapar ve hücre dışı matrikste bulunan proteoglikanlara bağlanır. Tip IX kollajen ise esas olarak tip II kollajenin fibril çapını düzenler ve örgünün birarada kalmasını sağlar. 29 polipeptid zincirden az olmamak kaydıyla en az 15 farklı tip kollajen saptanmıştır. Kollajen ailesinin bütün tipleri üçlü sarmal yapısında polipeptid zincirlerden oluşur. Bu zincirlerde en sık bulunan aminoasitler glisin ve prolindir. Hidroksiprolin, molekül uzunluğu boyunca sağladığı hidrojen bağları ile stabilize sağlar. Kollajenler üçlü sarmal yapıları sayesinde, makaslama ve tensil kuvvetlere karşı kıkırdak matriksini stabilize ederler [41].

Proteoglikanlar: Proteoglikanlar yüksek oranda glikozillenmiş protein monomerleridir. Eklem kıkırdağında, hücre dışı matriksin ikinci büyük makromolekül grubunu oluştururlar ve yaş ağırlığının %10-15'inden sorumludurlar. Proteoglikanlar protein koruna kovalent bağlarla bağlı bir veya daha çok glikozaminoglikan zincirinden meydana gelir. Bu zincirlerin uzunluğu ve zincirlerdeki monosakkaritlerin sayısı değişkendir. Protein korundan başlayarak uzayan bu zincirler içerdikleri yükler nedeniyle birbirlerini devamlı olarak iterler ve ayırık kalırlar. Eklem kıkırdağının işlevini sürdürebilmesi için agrekan, dekorin, biglikan ve fibromodulin gibi bir çok farklı proteoglikana ihtiyaç duyar. Ağırlık olarak en fazla miktarda bulunan ve boyut olarak en büyük proteoglikan, 100 den fazla kondroitin sülfat ve keratin sülfat zincirine sahip agrekandır. Bu agrekan molekülleri, uzun bir polisakkarit olan hiyalüronik asit zincirine link proteinleri adı verilen küçük glikoproteinler ile bağlanırlar ve bu yapı da "proteoglikan agregatı" adını alır [42]. Agrekandan hücre dışı matriksin interfibriller alanını doldurur ve ozmotik özeliği sayesinde kıkırdağın kompresif kuvvetlere karşı koymasına yardımcı olur. Agrekandan daha küçük boyutta olan dekorin, biglikan ve fibromodulin gibi proteoglikanlar daha düşük miktarlarda bulunurlar. Dekorin ve biglikanda bir veya iki

dermatan sülfat zinciri bulunurken, fibromodulinde birçok keratin sülfat zinciri bulunmaktadır. Dekorin ve fibromodulin, tip II kollajen fibrilleri ile etkileşime geçip fibrilogeneziste rol oynar. Bigilan ise kondrositlerin çevresinde bulunur ve genelde tip VI kollajen ile etkileşim içindedir [33].

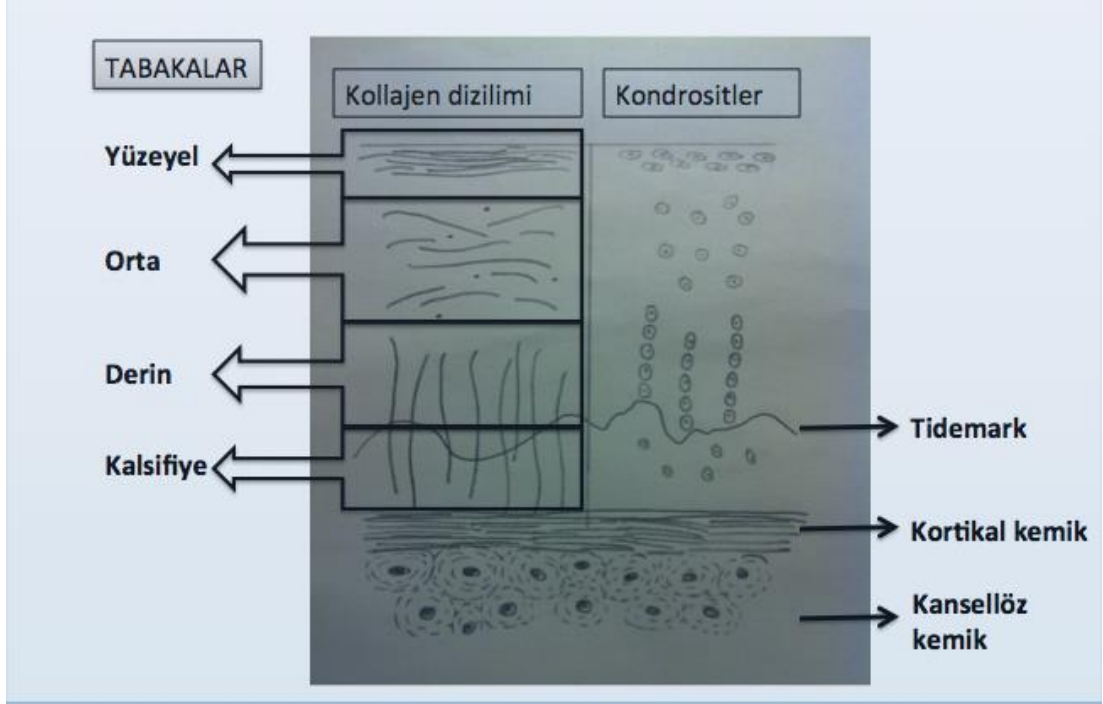
Diğer Matriks Bileşenleri: Kollajen olmayan proteinler arasında kondrositler ve kollajen fibrilleri arasındaki etkileşimden ve hücre dışı matriksin makromoleküler yapısının devamından sorumlu fibronektin, kondronektin ve ankorin gibi adheziv moleküller bulunur.



Şekil 2.2. Eklem kıkırdağının hücre dışı matriks bileşenleri.

2.1.2. Eklem Kıkırdağının Yapısal Anatomisi

Kondrositler ve kollajen lifleri eklem kıkırdağı içinde farklı dizilişlere sahip tabakalar meydana getirirler. Morfolojik ve biyomekanik özellikler bakımından birbirinden farklı olan bu tabakalar; yüzeysel, orta, derin ve kalsifiye tabaka olarak adlandırılır (Şekil 2.3.) [43]. Bu tabakalar kendi içinde 3 alana ayrılabilir; periselüler alan, bölgesel alan ve bölgeler arası alan.



Şekil 2.3. Eklem kıkırdağının temel yapısal anatomisi.

Eklem kıkırdağının en üst tabakası olan yüzeysel tabaka kıkırdak kalınlığının %10-20'sini oluşturur. Sinovyal sıvı ve kıkırdak arasındaki molekül transferini düzenleyen bu tabaka iki farklı katmandan oluşur. Lamina splendens adı verilen üst katman, aselülerdir, ince fibriller içerir ve proteoglikan bakımından fakirdir. Eklem yüzeyini bir film tabakası gibi kaplar ve mekanik zorlama sonucu derin katmandan sıyrılabilir. Derin katman ise yassı kondrositler bakımından zengindir ve yoğun bir kollajen ağ içerir. Kollajen dizilimi eklem yüzeyine paraleldir. Bu tabakadaki fibril dizilimi sayesinde kıkırdak tensil kuvvetlere karşı koyabilmektedir [44]. Yüzeysel tabakanın hasarlanması matriks geçirgenliğini arttırmakta ve kompresyon esnasında matrikse binen yüklerin artışına neden olmaktadır. Bu tabakadaki derin kollajen katmanının hasarlanması, deneysel osteoartrit modellerinde saptanan ilk yapısal değişikliktir [45].

Yüzeysel tabakanın hemen altında bulunan orta (geçiş) tabaka kıkırdak kalınlığının %40-60'nı oluşturur. Yüzeysel ve derin tabaka arasında fonksiyonel ve anatomik köprü görevi üstlenen bu tabakada, kollajen fibrilleri daha kalındır ve proteoglikan miktarı daha fazladır. Kollajenler oblik olarak

dizilmiştir, kondrositler daha sferiktir ve daha az miktarda bulunur. Bu tabaka fonksiyonel olarak kompresif kuvvetlere karşı direnç gösteren ilk tabakadır.

Derin tabaka komresyon kuvvetlerine karşı en çok direnç gösteren tabakadır. Radyal çap olarak en kalın kollajen fibrilleri bu tabakadadır ve eklem yüzeyine dik olacak şekilde dizilmişlerdir. Proteoglikan oranı bu tabakada en üst düzeyde iken, su miktarı ise çok düşüktür. Kondrositler kollajen fibrillere paralel olacak şekilde sütun halinde dizilmişlerdir. Derin tabaka kırık kalınlığının % 30'nu oluşturur.

Tidemark derin tabaka ve kalsifiye tabakayı birbirinden ayırır. Kalsifiye tabaka kırıkdağın kemik dokusuna bağlı kalmasında rol oynar. Derin tabakadaki kollajen fibrilleri subkondral kemiğe tutunmadan sorumludur. Kalsifiye tabakada hücre sayısı azdır ve kondrositler hipertroftir.

Hücre dışı matriks, bu tabakalar haricinde kondrosit komşuluğuna, kollajen fibril çapı ve organizasyonuna ve yapısal bileşenlerine göre 3 farklı alana ayrılır; periselüler alan, bölgesel alan ve bölgeler arası alan. Periselüler matriks kondrosit membranını çevreleyen ince bir tabakadır. Genellikle proteoglikan ve glikoproteinlerden oluşan bu alanın, yük esnasında kırıkdağ içindeki sinyal iletiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir [46]. Periselüler matriksi çevreleyen bölgesel alan ise ince kollajen fibrillerinden oluşan ağ yapısındadır. Nispeten daha geniş olan bu alan, kondrositleri mekanik streslere karşı korumaktadır [47]. Bölgeler arası alan ise en geniş alan olup, eklem kırıkdağının biyomekanik özelliklerinin sağlanmasından sorumludur [48].

2.2. Peritonun Yapısı ve Histomorfolojisi

Periton bazal membran üzerine oturan mezotelyal hücreler ve kan damarı, lenfatik ve sinir uçlarını içeren bağ dokusu ile desteklenmiş, abdominal kaviteyi örten bir yapıdır[49]. Mezotelyal hücreler buldukları alana göre farklı fenotip gösterirler. Parietal peritonda bu hücreler genelde düz ve küçük sitoplazmaya sahipken, visseral peritonda daha büyük, kubik ve organeller açısından daha zangindir [50]. Sitoplazmalarında mezoderm kökenli vimentin ve epitelyum kökenli sitokeratin gibi filamentleri aynı anda

bulundurabilirler [51]. Mezotelyal hücrelerin üzerinde bulunduğu bazal membranın yapısında tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve proteoglikan bulunur. Negatif yüklü bu membran hem makromolekül transportunu düzenlerken hem de tamir mekanizmasında rol alır [52]. Mezotelyal hücrelere destek olan bağ dokusu ise tip I ve III kollajenden, fibrinden ve kolloid jelden oluşur. İçinde çok sayıda fibroblast, mast hücresi ve makrofaj barındıran bu dokunun ana bileşeni ise hyalüronik asittir. Diğer proteoglikanlarla beraber su moleküllerini tutarak jel tabakayı meydana getirirler. Periton aynı zamanda damarlanma açısından da zengindir ve damarlar genelde mezenter bölgesinde yoğunlaşır [53]. Mezotelyal hücrelerin çeşitli görevleri vardır. Peritonun yüzeyler arasında serbestçe hareket edebilmesi için bu hücreler fosfolipid derivelerini salgırlar [54]. Mezotelyal hücreler aynı zamanda VEGF, TGF-B, IGF-1, endotelin-1 ve FGF gibi birçok büyüme faktörü ve sitokin salgırlar [55-59]. Mezotelyal hücreler geniş rejenerasyon kapasitesine sahiptir, cerrahi işlem sonrası veya peritoneal diyaliz sonrası ilk 24 saatte tamir başlar. Bu tamir dokusunu dolduran hücreler yara kenarlarından, makrofaj transformasyonundan ve bağ dokusunda bulunan mezankimal öncü hücrelerin farklılaşması sonucu oluşur [60]. Antienflamatuvar ve immünomodülatör etkilere sahip bu hücreler sitokeratin, vimentin, laminin aktin, ve kollajen gibi hücre dışı matriks komponentlerinin üretiminden, metalloproteinaz inhibitörlerinin, prostoglandin ve prostosiklinlerin sentezinden sorumludur [61]. Mezotelyal hücrelerin geniş bir plasitite özelliği vardır, uygun mikroçevrede çeşitli hücre yolaklarına dönüşüm gösterebilirler [61].

Yapılan çalışmalarda TGF-B, EGF, HGF gibi büyüme faktörlerinin mezotelyal hücreleri fibroblast, miyofibroblast, yağ dokusu, kemik, endotel ve düz kas hücrelerine transforme ettikleri bildirilmiştir [62-64]. Malign mezotelyoma hastalarından alınan biyopsilerde dokuların kemik ve kıkırdak odakları içerdikleri görülmüştür [65]. Ayrıca literatürde intraabdominal malignite veya sklerozan peritonit olmadan da periton dokusunun kıkırdak dokulara dönüşümü ile ilgili kanıtlar vardır [66-68]. Bu nedenle, günümüzde araştırmalar mezotelyal hücrelerin diferansiyasyon kapasiteleri üzerinde

yoğunlaşmakta, doku mühendisliği ile omental, peritoneal, sinir ve damar grefti üretimi planlanmaktadır [62].

2.3. Omentumun Yapısı ve Histomorfolojisi

Dorsal mezogastriumdan köken alan omentum anatomik olarak iki kısma ayrılır; büyük ve küçük omentum. Midenin önü ve arkasındaki periton *curvatura ventriculi* majör'e gelince birbirine yapıyarak omentum majus'u meydana getirir. Omentum majus ince bir zar halinde transvers kolonu bir önlük gibi halka şeklinde sarar. Transvers kolon, mide ve duodenumun ilk kısmı ile bitişiktir. Küçük omentum ise mide ve karaciğer arasında bulunur ve omental bursanın ön tarafını oluşturur. Histolojik olarak omentum, arasında adipositleri, yumuşak bağ dokusunu ve mononükleer hücreleri bulunduran iki mezotelyal yapraktan oluşur. Yapısında immün sistemde etkili olan ve bakteri eliminasyonundan sorumlu adipoz doku ve görevi tam olarak aydınlatılmamış ancak sıvı transportu ve inflamatuvar reaksiyonlardan sorumlu olduğu düşünülen fenestreli translüsen bölgeler olmak üzere iki farklı doku bulunur [69, 70]. Uzun yıllar boyunca omentumun sadece intraabdominal organlara destek olan bir yağ dokusu olduğu fikri artık değişmiş, yara iyileşmesi, sepsisin önlenmesi ve anjiyojenik faktörlerin üretiminden sorumlu bir **organ** olduğu kabul edilmiştir [71]. Yaralanma sonrası omentumun kan akışı ve bağ dokusu miktarı artmaktadır. Bağ dokusundan kök hücre belirteçleri taşıyan hücreler proliferer olur [72]. VEGF ve FGF gibi anjiyojenik ve kemotaktik faktör üretimi artar, bağ dokusu hücreleri yara alanına doğru migre olur ve doku tamiri başlar [73, 74].

Omental dokular gastrointestinal cerrahide anastamozların korunmasında, perfore ülserlerin tedavisinde ve rezeksiyon sonrası rekonstrüktif amaçlı kullanılmaktadır [75]. Deneysel yara modellerinde omental fleplerin yara alanına transpozisyonu TGF-B kaynaklı neoanjiyogeneze ve yara iyileşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir [76]. Omentumun iskemik dokuları yeniden perfüze edebilme potansiyeli, diğer dokulardan daha yüksek konsantrasyonlarda VEGF üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir [72]. Birçok araştırmada omentum, hücrelerin

büyümesi ve dokuların işlevlerine devam edebilmesi için kültür alanı olarak kullanmıştır. Dalak yaralanmalarında, omentuma yerleştirilen küçük dalak parçaları işlevlerine devam edebilmiş, hiperglisemik farelerde ise omentuma yerleştirilen pankreatik adacıklardan sonra glikoz tolerans testleri normale dönmüştür [77, 78]. Hepatositleri 3 boyutlu skafoldda proliferere etmek için yapılan bir çalışmada ise in vivo olarak maksimum proliferasyon ve damarlanma omentum sahasında gözlenmiştir [79]. Son zamanlarda ise, omentumun embriyonik dokuların maturasyonu için kullanımı gündeme gelmiş, embriyonik böbrek ve pankreas dokularının implantasyonunda başarılı sonuçlar alınmıştır [80, 81]. Gelecekte doku mühendisliği ve kök hücre üzerine araştırmaların artmasıyla omentumun hem kök hücre kaynağı hem de dokuların canlılıklarını devam ettirebilmesi için uygun bir ortam olabileceği düşünülebilir [71].

2.4. Paratenonun Yapısı ve Histomorfolojisi

Gastrokinemius kası soleus kası ile birleşerek aşil tendonunu meydana getirir. Aşil tendonunun fibrilleri vertikal değildir, elongasyona ve gevşemeye izin verecek şekilde 90 derece açıyla spiral oluştururlar [82]. Tenositler ve tenoblastlar tendonun hücresel bileşeninin %90'ını oluştururlar. Geri kalan kısım ise kondrositler, vasküler hücreler, sinovyal hücreler ve düz kas hücrelerinden oluşur. Hücre dışı matriks ise kollajen, elastin, proteoglikan ve kalsiyum gibi organik komponentlerden oluşur [83]. Kollajen fibrilleri paralel demetler halinde dizilir ve sinir, kan damarları ve lenfatiklerle beraber fasikülleri oluşturur [84]. Aşil tendonu, ayak bileği çevresindeki diğer tendonların aksine sinovyal membranla değil, paratenon ile kaplıdır. Fasiküller endotenon ile çevrelenir ve tendonun makroskopik yapısını oluşturur. Endotenon iyi tanımlanmış bir bağ dokusu olan epitenon ile çevrelenir. Epitenon etrafında ise gevşek areolar bağ dokusundan oluşan paratenon bulunur. Mukopolisakkaritlerden zengin olan paratenon, proksimalde kas fasyası distalde ise kalkaneusun periostuyla devamlılık gösterir [85]. Paratenonun dış tabaksı gevşek adipoz areolar dokudan oluşur ve elastik doku gibi geniş hareket aralığı sağlar, iç tabakası ile epitenon

arasında bulunan sıvı ise sürtünmeyi azaltır [86]. Paratenon oldukça vasküler bir yapıdır ve muskületendinoz ve osseotendinoz bileşkelere gelen anastomozlarla aşil tendonunun beslenmesini sağlar [87]. Tendonun yaralanmaya cevabı birbirini takip eden inflamasyon, proliferasyon ve remodelling safhaları ile gerçekleşir. Bu basamaklarda görev alan hücreler intrinsik ve ekstrinsik yollardan köken alır. İntrinsik yolda, tenositler ve endotenondaki fibroblastlar görev alırken, ekstrinsik mekanizmda çevre dokulardaki hücreler görev alır [88]. Aşil paratendinopatisi olan hastaların paratenonunda neoanjiyogenezise ve TGF-B üretiminden sorumlu miyofibroblast ve fibroblastlara rastlanmıştır [89]. Bir başka çalışma ise paratenonunun da tendon gibi progenitör hücrelerden zengin olduğunu ve paratenondaki bu hücrelerin de multipotent olduğu, kondrogenetik, adipogenetik ve osteogenetik özellikleri olduğu bildirilmiştir[90].

2.5. Kas Dokusunun Yapısı ve Histomorfolojisi

İskelet kası genel olarak iki kısımdan meydana gelir; miyofiberler ve çevre bağ dokusu. Miyofiberler sinir uçları ile beraber kontraktil fonksiyona sahipken, çevre bağ dokusu ise kontraksiyon esnasında miyofiberleri çatı gibi örterek, kas dokusuna kan damarlarını ve sinir liflerini iletir. Her miyofiberin çevresi endomizyum olarak adlandırılan bir bağ dokusu ile çevrilidir. İçinde bol kapiller kan ve lenf damarı, sinir sonlanmaları ve hemen hemen bağ dokusundaki tüm hücreleri içerir. Endomizyum içindeki kan damarları oldukça kıvrımlıdır, böylece kas kontraksiyonları sırasındaki boy değişimlerine ayak uydurabilirler. Miyofiberlerin biraraya gelmesiyle kas demetleri oluşur ve etraflarından perimizyum adlı bağ dokusuyla sarılır. Birçok kas demeti ise epimizyum adı verilen bağ dokusu ile sarılarak anatomik kası meydana getirir [91]. İskelet kası yaralanma sonrası, inflamasyon, miyofiber rejenerasyonu ve en son olarak da miyofiber maturasyonu ve skar reorganizasyonu basamaklarını takip ederek iyileşir [92]. Miyofibril rejenerasyonunun son on yıla kadar sadece bazal laminada bulunan satellite hücreler tarafından gerçekleştiği düşünülmekteydi [93]. Yapılan araştırmalar miyofibril rejenerasyonunda görevli başka hücre popülasyonlarının olabileceğini ortaya

koymuştur [93, 94]. Kas kökenli kök hücre olarak adlandırılan bu hücre popülasyonu, rejenerasyon kapasitesine ek olarak satellite hücre havuzunun yeniden dolmasına da yardımcı olmaktadır [95]. Bu kök hücreler aynı zamanda satellite hücrelerden farklı olarak daha geniş bir differensiasyon kapasitesine sahiptir ve farklı embriyonik tabakalardan köken alan dokulara dönüşebilme yeteneği vardır [96]. Yara alanın damarlanması da kas rejenerasyonu açısından önemlidir. Çevre bağ dokudan köken alan ve yara alanına doğru tomurcuklanan kapiller miyofiberler için uygun aerobik ortamı yaratırlar [97]. Ancak yeni rejenere olan miyofiberlerin mitokondrileri küçüktür ve ilk başta anaerobik metabolizmaya sahiptirler, maturasyonları tamamlanınca aerobik metabolizmayı kullanırlar, bu nedenle rejenere olan miyofiberler yeterli oksijenlenme oluncaya kadar büyüme göstermezler [98].

2.6. Eklem Kıkırdak Lezyonları

Eklem kıkırdak lezyonları neden olan faktörlere göre iki farklı fenotipe ayrılırlar; fokal lezyonlar ve dejeneratif lezyonlar. Fokal lezyonlar sınırları belirli olan yaralanmalardır ve genelde travma, osteokondritis disekans veya osteonekroz sonucu oluşur. Dejeneratif lezyonlarda ise demarkasyon hattı belli değildir ve etiolojisinde genellikle ligament instabilitesi, menisküs hasarı veya osteoartrit bulunur [99]. Farklı etiolojik faktörler, yaralanma mekanizmasının değişkenliği ve lezyon fenotipindeki farklılıklar nedeniyle hangi lezyon için tedavi gerektiği ve nasıl tedavi edilmesi konusunda standart tek bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır.

2.6.1. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Sınıflandırılması

Eklem kıkırdak lezyonlarının tariflenmesi ve uygun tedavi yöntemlerinin belirlenmesi için literatürde farklı sınıflama sistemleri bulunmaktadır. Outerbridge tarafından tariflenen sınıflama, basit ve klinik uygulama kolaylığına sahip olduğu için günümüzde en çok kullanılan sınıflamadır [100]. Bu makroskopik sınıflamada kıkırdak lezyonu dört evreye ayrılmıştır; Evre I'de kıkırdakta yumuşama ve ödem, evre II'de fragmentasyon ve 1 cm'den daha az fissür, evre III'de 1 cm'den daha büyük

fissür ve evre IV'de subkondral kemiğe ulaşan erozyon vardır. Bauer ve Jackson lezyonun şekline göre artroskopik sınıflama geliştirmişlerdir. Bu sınıflamada Evre I – IV travmatik, evre V – VI ise dejeneratif lezyonlar olarak sınıflanmıştır [101]. Kıkırdak lezyonları ile ilgili en geniş sınıflama sistemi, ICRS (International Cartilage Repair Society) tarafından yapılmıştır. Kondral ve osteokondral lezyonların daha kesin tarifi, lezyonun şekli, derinliği ve lokalizasyonu göz önüne alınmıştır [102].

Lezyon derinliği, doğal seyrine ve tedavi protokolüne göre parsiyel kalınlık ve subkondral kemiğe uzanım gösteren tam kat olarak iki gruba ayrılabilir [43]. Lezyon derinliğine göre hasarlanan dokunun yaralanmaya cevabı farklı olmaktadır.

Parsiyel kalınlıktaki lezyonlar basit hasar, künt travma ve kondral kırıkları içerir. Bu lezyonlar subkondral kemiğe ulaşmaz. Vasküler yapılar hasarlanmaya dahil olmadığı için enflamasyon reaksiyonu tetiklemez. Hasar alanındaki ve çevresindeki kondrositlerde nekroz ve apopitoz gelişir [103]. Hayatta kalan kondroistler başlangıçta yaralanmayı tedavi etmek için proliferasyon gösterse de, oluşan metabolik ve mitotik aktivite sınırlıdır. Bölünen kondrositler hasarlı dokuya migre olmaz ve oluşan defekti dolduramaz [104].

Subkondral kemiğe uzanım gösteren tam kat lezyonlarda, vasküler dokularda olduğu gibi trifazik enflamasyon cevabı gözlenir. Yaralanmadan hemen sonra yara bölgesinde hematoma oluşur ve hematoma fibrovasküler tamir dokusuna organize olur [105]. Kemik iliğindeki mezankimal kök hücreler yara alanına migre olur ve bulunduğu mikroçevredeki büyüme faktörlerinin etkisiyle kondroblastlara dönüşürler. Yaralanma sonrası 6 – 8 haftada, yara bölgesindeki yeni kondroistler tip II kollajen ve proteoglikan üretimine başlarlar. Yara bölgesinin derinindeki hücreler ise endokondral ossifikasyon gösterir ve subkondral defekti onarırlar. Ancak yeni oluşan hyalin benzeri tamir dokusu, normal kıkırdak dokusunun özelliklerini taşımaz. Bir yılın sonunda hyalin kartilaj dokusu bozunur ve fibrokartilajda olduğu gibi tip I kollajen oranı artar [105]. Devam eden süreçte oluşan tamir dokusunun yüzeyinde fibrilasyon, proteoglikan oranında azalma ve kondrositlerin

ölümüyle beraber dejenerasyon başlamış olur [106].

2.6.2. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Kliniği ve Radyolojik Değerlendirmesi

Eklem kıkırdak lezyonlarının etiolojisinde farklı etkenler bulunsa da gençlerdeki en sık neden travma iken yaşlılarda dejeneratif hastalıklar ön plana çıkar. Her ne kadar çoğu araştırmacı, travmatik lezyonların artritile sonuçlanacağını belirtse de, kıkırdak lezyonlarının doğal seyri hala net olarak aydınlatılamamıştır. Lezyonun artirite ilerlemesi, lezyonun boyutu, yerleşimi, kemik kalitesi ve bulunduğu kompartmandaki artrit derecesiyle ilişkili olduğu gibi hastanın yaşı, ekstremitte dizilimi, eklem stabilitesi ve kilosu da etkilidir [106]. İzole ve 2cm² 'den küçük lezyonların dejenerasyona ilerlemeyeceği ve asemptomatik kalacağı öngörülse de literatürde bu iddiayı kanıtlayacak yeterli veri yoktur [107]. Eklem kıkırdak lezyonları ile ilgili çoğu doğal seyir çalışmaları menisküs veya ön çapraz bağ yaralanması olan hastalarda yapılmıştır [5]. Ayrıca uzun dönem takipli çalışmalarda bile izole kıkırdak lezyonlarının radyografik artirite ilerlemesi çoğu zaman hasta semptomları ile uyumlu olmamaktadır [108].

Semptomatik kıkırdak hasarlarında sinsi eklem ağrılarına efüzyon eşlik edebilir. Kilitlenme veya takılma gibi mekanik semptomlar da ağrı genelde ileryeci ve şiddetlidir. Tam kat kıkırdak lezyonlarının en sık klinik bulgusu eklem faresidir. Eklem fareleri genelde akut yaralanmaya veya şiddetli efüzyonlara eşlik eder[43]. Detaylı fizik muayene ile dizilim bozukluğu, menisküs yırtıkları, ligament instabilitesi ve ekstansör mekanizma problemleri ayırt edilebilir [99]. Fizik muayene ve hikayeden sonra kıkırdak lezyonuna ilişkin şüphe varsa radyolojik görüntüleme tetkikleri kullanılır.

Konvansiyonel radyografiler ile eklem aralığında daralma ve subkondral skleroz saptanabilir ve genelde osteoartritik kaynağı düşündürür. Osteokondritis dissekans da bazen radyografilerde görüntülünebilir ancak kıkırdak lezyonları tam kat dahi olsa konvansiyonel radyografilerde saptanamaz [43]. Kemik sintigrafilerinin kıkırdak lezyonlarındaki yeri ise tartışmalıdır. Artmış sintigrafik aktivite kıkırdak hasarına spesifik değildir ve

eklem stabil duruma geldiğinde tutulum azalacaktır [109].

Manyetik rezonans görüntüleme hem yumuşak dokuyu hem de subkondral kemiği değerlendirebildiği ve çok kesitli görüntüleme imkanı sunduğu için kıkırdak lezyonlarının tanısında sıklıkla kullanılmaktadır. T1 sekanslar ile kıkırdak ve subkondral kemik arasında mükemmel anatomik görüntü elde edilirken, T2 sekanslarda eklem sıvısının yüksek intensitesinden doğan artrografi etkisinden yararlanır. T1 sekansta kıkırdak eklem sıvısından daha yoğun intensitede görülürken, T2 sekanslarda tam tersi görülür [110]. Eklem kıkırdağının glikozaminoglikan içeriğini görüntülemek için, dGEMRIC (delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage) yöntemi kullanıma girmiştir. Glikozaminoglikan içeriği azalmış alanlar indirekt olarak görüntülenir ve kıkırdak hasarını daha net saptayabileceği öngörülmektedir [111].

Eklem kıkırdak lezyonlarının günümüzde tanısız görüntülemesinde ve tedavi uygulamalarında altın standart olarak kabul edilebilecek yöntem ise artroskopik görüntüleme ve uygulamadır [43].

2.6.3. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Yöntemleri

Eklem kıkırdak lezyonlarının tanısı konulduktan sonra tedavi yaklaşımı günümüzde lezyonun özelliklerine, hastanın genel durumu ve beklentilerine göre düzenlenir. Uygun tedavi yöntemi seçilirken hastanın yaşı, kilosu, ekstremitte dizilimi, genel sağlık durumu ve komorbiditeleri göz önüne alınırken, lezyonun yeri ve büyüklüğü, yaralanmadan sonra geçen süre ve geçirilmiş cerrahi işlemler de önemlidir [112]. Eklem mekanik doğası çoğu zaman uygulanan tedavinin başarısında kilit rol oynar. Ekstremitedeki yanlış dizilim, eklem instabilitesi veya menisküs yaralanması olan hastalarda uygulanan tedavi yöntemlerinin başarısız olması daha olasıdır [113].

Eklem kıkırdak lezyonlarının tedavisindeki hedef, lezyonun doğal eklem kıkırdağı olan hyalin kıkırdak ile tedavi edilmesidir [114]. Günümüzde osteokondral otograft transferi, olog kondrosit implantasyonu ve doku mühendisliği ile üretilen kıkırdak benzeri dokunun implantasyonu ile hyalin kıkırdak ile iyileşmeye yakın sonuçlar alınsa da henüz bu amaca

ulaşılamamıştır [19, 115, 116]. Bu yüzden farklı hücre kaynakları, taşıyıcı sistemler, gen tedavileri ve büyüme faktörleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir.

Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan tedaviler konservatif, cerrahi ve gelişmekte olan yeni yöntemler olarak sınıflandırılabilir.

2.6.3.1. Konservatif Yöntemler

Eklem kıkırdak lezyonlarının cerrahi olmayan tedavileri anatomik restorasyonu değil, semptomları hafifletmeyi amaçlar. Eklem çevresindeki kasları güçlendirmeye yönelik fizik tedavi egzersizleri, postür egzersizleri, breysler ve ortezler, eklem içine uygulanan kortikosteroidler ve viskosuplemantasyonlar ve oral kondroprotektif ajanlar semptomlarda rahatlama sağlasa da eklemde yapısal iyileşme sağladıklarına yönelik güçlü kanıtlar bulunmamaktadır [43, 117, 118]. Hyalüronik asitin kondroprotektif, anabolik, analjezik ve anti-inflamatuvar özellikleri olduğu bilinmektedir [119]. Eklem içine uygulanan hyaluronik asit preparatlarının, kortikosteroidlere göre daha uzun süreli rahatlama sağladığı ancak etkilerinin geçici olduğu, 6 ay sonunda semptomların tekrar ortaya çıktığı belirtilmiştir [120].

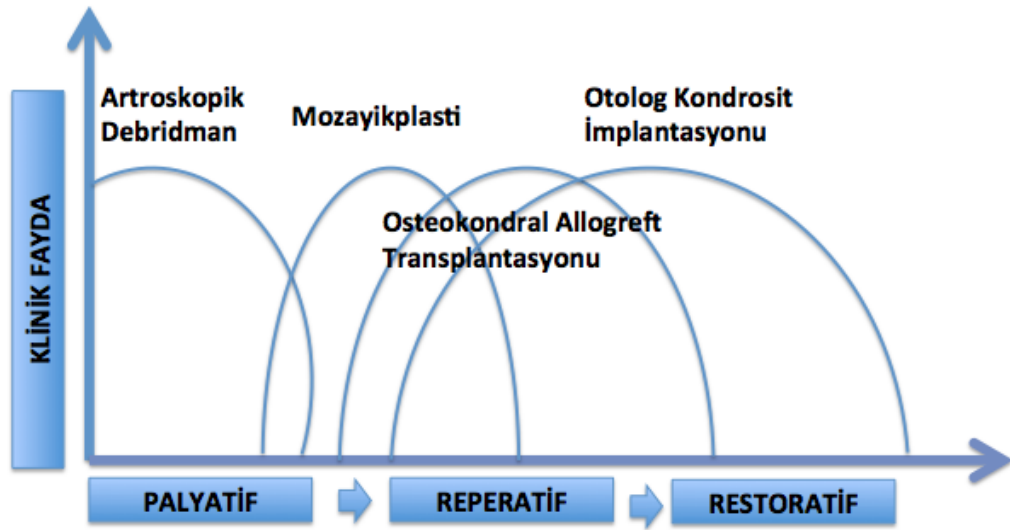
2.6.3.2. Cerrahi Yöntemler

Kıkırdak lezyonlarının cerrahi tedavisinde birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Cerrahi tedaviler kıkırdak lezyonunun tedaviye cevabına göre üç gruba ayrılabilir [121];

1. Palyatif: Lezyon üzerinde biyolojik etkisi yoktur, semptomların giderilmesini amaçlar.

2. Reperatif: Kıkırdak lezyonunun, normal eklem kıkırdağı olan hyalin kartilaj ile değil, daha düşük biyomekanik özelliklere sahip fibrokartilaj ile tamir edilmesini, normal eklem kıkırdağının biyomekanik özelliklerinin bir miktar kazanılmasını ve semptomların giderilmesini hedefler.

3. Restoratif: Kıkırdak lezyonunun hyalin kıkırdak ile tamir edilmesini, normal eklem kıkırdağının biyomekanik ve yapısal özelliklerinin tekrar sağlanmasını amaçlar.



Şekil 2.4. Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde günümüzde sık kullanılan yöntemler ve biyolojik etkileri.

1. Palyatif Yöntemler

Artroskopik Debridmanı: Artroskopik debridman ile eklem içindeki inflamatuvar mediatörler, eklem içi kıkırdak parçacıkları ve sinovya takılıp efüzyon ve ağrıya neden olan kollajen debrisleri uzaklaştırılır. Kıkırdağın debridmanı ile lezyon kenarında takılmaya neden olup mekanik semptomlara yol açan gevşek flep uçları uzaklaştırılır. Bu yöntem genellikle beklentisi düşük, lezyon boyutu küçük ve operasyon sonrası dönemde aktivite kısıtlamasına uygun olmayan hastalarda kullanılır [122]. Doral ve arkadaşlarının çalışmaları sonucunda dejenere eklem kolşisin ve diklofenak ile yıkanması ile kıkırdak proliferasyonunda anlamlı artış olabileceği belirtilmiştir [123, 124].

2. Reperatif Yöntemler

Kemik iliği stimülasyon teknikleri olarak da isimlendirilen bu yöntemler subkondral drilleme, abrazyon artroplastisi ve mikrokırığı içerir. Kemik iliği stimülasyonunun amacı, subkondral kemik altındaki öncül hücrelerin ve sitokinlerin eklem yüzeyine ulaştırılmasını amaçlar.

Abrazyon artroplastisi:1980lerin başında popularize olan bu yöntemle, dejeneratif ekspoze sklerotik lezyonların tedavisi hedeflenir. Yüzeysel ve intrakortikal yapılan abrazyon ile subkondral kemiğe zarar vermeksizin, eklem içindeki hücrelerin vasküler yanıt vermesi hedeflenir [125].

Subkondral drilleme: Pridie tarafından tariflenen bu yöntemde, lezyonun debridmanı sonrası açığa çıkan subkondral kemik yüksek hızlı burr ile delinir. Kemik iliğinden eklem içine doğru gelen hücreler lezyonda pıhtı oluşturur ve tamir mekanizması başlar[126]. Oluşan tamir dokusunun hyalin ve fibrokartilaj komponentleri olduğu belirtilmiştir[126]. Drill esnasında oluşan ısının subkondral kemikte ve çevre kıkırdakta termal nekroza yol açtığı öne sürülse de klinik olarak kanıtlanmış bir sonucu bulunmamaktadır [121].

Mikrokırık: Steadman tarafından tariflenen bu yöntemde drillemenin termal etkilerinden korunarak, fibrin pıhtının tutunması için subkondral kemikte artroskopik olarak tıg yardımı ile 3-4 mm aralıklarda delikler açılır [127]. Bu yöntemde de oluşan tamir dokusunun fibrokartilaj ve hiyalin komponentlerden oluşan hibrid bir doku olduğu gösterilmiştir [99]. Bu yöntemin 40 yaş altı hastalarda faydalı olduğu, semptomların işlemde sonra düzeldiği ancak 18 aydan sonra şikayetlerin tekrar ortaya çıktığı belirtilmiştir [128]. Mikrokırık tekniğinin uzun dönem etkilerini iyileştirmek için farklı uygulamalar geliştirilmiştir. Otolog matriks indüklenmiş kondrogenesis yönteminde (AMIC) standart mikrokırık işlemi uygulandıktan sonra, mezankimal kök hücrelerin lezyona göç etmesini kolaylaştırmak ve tutunmasını sağlamak için aynı seansta hücre içermeyen kollajen matriksler kullanılır [129]. Orta dönem takiplerde başarılı sonuçlar bildirilmiştir [130].

3. Restoratif Yöntemler

Kıkırdak lezyonlarının biyolojik olarak hiyalin kıkırdak ile tamir edilmesini hedefleyen bu yöntemler, üzerinde en çok araştırma yapılan yöntemlerdir. Osteokondral doku ve hücre transplantasyonunun yanı sıra, araştırmalar günümüzde gen tedavileri, yeni hücre taşıyıcı sistemler, büyüme faktörleri ve biyoreaktörler üzerinde yoğunlaşmıştır.

Otolog Osteokondral Transplantasyon (Mozayikplasti): Hangody ve arkadaşları tarafından popülerize edilen bu yöntem ile, eklem içinde yük taşımayan bölgelerden alınan osteokondral tıkaçlar lezyon alanına sıkıştırma tekniği ile yerleştirilir [131]. Kullanılan greftlerin otolog olması immünolojik riskleri ortadan kaldırırken, lezyon sahasına hiyalin kırıkta yerleştirilmesi de bu yöntemin avantajıdır. Bu tıkaçların histolojik incelemesinde stabil kemik integrasyonu olan ve fibrokartilaj ile çevrelenmiş hiyalin kırıklara rastlanmıştır [132]. Ancak bu yöntem ile donör saha morbiditesi, tıkaçların yüzeyindeki kondrositlerin ölümü ve tıkaçların çevre sağlam dokuya entegre olamaması, çoklu tıkaç kullanıldığında eklem yüzey şeklinin sağlanamaması gibi sorunlar henüz aşılamamıştır [133]. Günümüzde mozayikplasti yöntemi ile genç hastalarda 1 - 4 cm² boyutlu tam kat lezyonlar başarı ile tedavi edilebilmekte ancak lezyon boyutu arttıkça aynı başarı yakalanamamaktadır [134-136].

Osteokondral Allogreft Transplantasyonu: Greft boyutundaki kısıtlamalar ve donör saha morbiditesi, araştırmaları allojenik osteokondral greftler üzerinde yoğunlaştırmıştır [137]. Bu tek basamaklı yöntem ile orta ve büyük boyutlu, tam kat lezyonların, kemik kaybının eşlik ettiği ve daha önceki tedavi yöntemlerinin başarısızlıkla sonuçlandığı lezyonların tedavisi mümkündür [138]. Osteokondral allogreft tekniğinin uzun dönem sonuçlarını etkileyen faktörler arasında canlı kondrositlerin yoğunluğu ve varlığı, bozunmamış hücre dışı matriks ve konak dokuya entegrasyon sayılabilir [139]. Allogreftlerin saklanma yöntemi, kondrosit canlılığı immünolojik riskler ve saklama süresi açısından önemlidir. Kondrosit yoğunluğunun ve canlılığının korunduğu en iyi yöntem donörden 24-72 saat içinde alınmış taze allogreftlerdir [140]. Bu yöntem orta, uzun dönemlerde başarılı sonuçlar gösterse de, immünolojik reaksiyon ve hastalık transmisyonu riskleri, yavaş iyileşme, teknik zorluklar, maliyet ve greft elde edilmesindeki zorluklar henüz aşılamamıştır [141].

Otolog Kondrosit İmplantasyonu: İlk kez 1980li yıllarda hayvan modellerinde gösterilen bu teknik [142], 1994'te klinik olarak Brittberg tarafından uygulanmıştır [19]. Lezyonun hastanın kendi kondrositleri ile

tedavisini amaçlayan bu yöntemde cerrahi işlemler ve in vitro hücre kültür metodları kombine edilir. Eklem yük taşımayan bölgesinden artroskopik olarak alınan kıkırdak biyopsisinden, laboratuvar ortamında kondrositler enzimatik olarak ekstrakte edilir. Kondrositler sonra tek tabaka olarak kültür edilir. İkinci cerrahi açık olarak yapılır, kültür edilen hücreler lezyona yerleştirilir ve hücrelerin lezyondan kaçışını engellemek için üzerine periost dikilir. Bu yöntem ile tedavi edilen hastalarda semptomların gerilediği ve lezyonun hyalin benzeri doku ile dolduğu görülmüştür [143]. Ancak bu yöntemin de kendine ait bazı kısıtlılıkları vardır. İkinci bir açık cerrahi gereksinimi, kondrosit kaybı, tamir dokusunun lezyonun her yerinde aynı olmaması, periost flebinin ayrılması, delamine olması ve geç dönemde hipertrofiye olması gibi sorunlar belirtilmiştir [144-146]. Periosteal flep ile ilgili komplikasyonları engellemek için kondrositler periost yerine kollajen tabaka ile kapatılmış, takiplerde greft hipertrofisinin saptanmadığı belirtilmiştir [147]. Ancak diğer komplikasyonların önlenmesi için yeni tekniklerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir. Günümüzde otolog kondrosit implantasyonu genel olarak, 2 cm²'den daha büyük, ICRS evre III ve IV lezyonları olan 15 ve 55 yaşları arasında operasyon sonrası rehabilitasyon protokollerine mükemmel uyum gösterebilecek yüksek beklentili hastalarda tercih edilmektedir [148]. Otolog kondrosit implantasyonunu mikrokirik ve mozayikplasti ile karşılaştıran randomize kontrollü çalışmalarda, her iki teknikte uzun dönem hastalarda semptomların azaldığı görülmüş ancak radyolojik ve klinik olarak otolog kondrosit implantasyonunun üstünlüğü gösterilememiştir [20, 149-151]. Otolog kondrosit implantasyonu, mozayikplasti ve mikrokirik tekniklerinden daha pahalı bir yöntemdir. Maliyetin büyük kısmını ise in vitro ortamda kültür işlemi tutmaktadır. Günümüzde diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında maliyet-etkinliği sorgulanan bu yöntemin, uzun dönem sonuçlarını içeren ekonomik varsayım modellerinde osteoartrit gidişin engellenmesinde daha başarılı olabileceği ve uzun dönemde maliyet-etkin bir yöntem olabileceği belirtilmiştir [152].

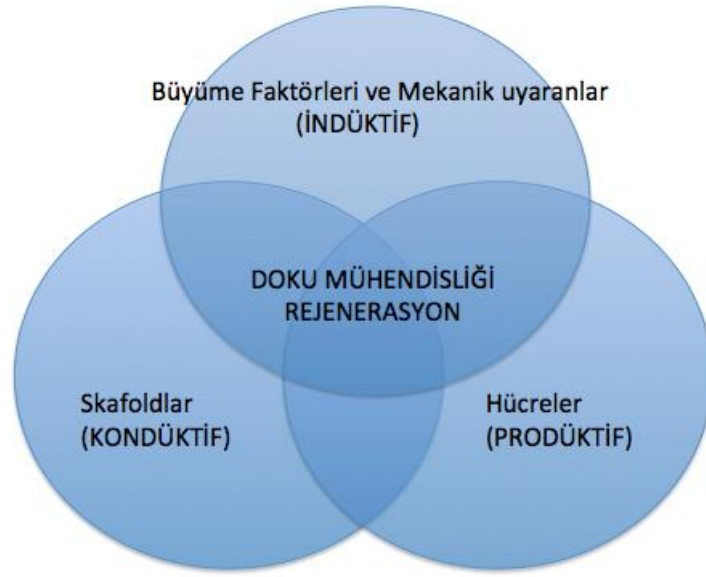
2.6.3.3. Doku Mühendisliği, Mezankimal Kök Hücre, Skafoldlar, Gen Tedavileri, Büyüme Faktörleri ve Biyoreaktörler

Otolog kondrosit implantasyonunda hiyalin kırıldıktan oluşan rejenerasyon dokusunun sağlanamamasının esas nedeni olarak kondrositlerin tek tabakada kültür edilirken farklılaşması ve hücre dışı matriks sentezleme potansiyellerini kaybetmesi gösterilmektedir [153]. Bu nedenle araştırmalar, yeni kuşak otolog kondrosit implantasyonu yöntemleri ve genetik kökenli doku mühendisliği üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Behrens tarafından tariflenen matfiks-indüklenmiş otolog kondrosit implantasyonu, ikinci nesil teknikler arasında gösterilebilir [154]. Bu yöntemle alınan hücreler kültür edildikten sonra, implantasyon öncesi kollajen membrana emdirilir ve implantasyon esnasında trombin ve fibrinden oluşan fibir yapıştırıcılar ile lezyona stabilize edilir. Dikiş ve periost kullanılmaması, daha homojen kondrosit dağılımı ve erken mobilizasyona izin vermesi bu yöntemin avantajları arasında bulunmaktadır [137].

Bu yöntemlerin kısıtlılıklarını gidermek ve işlemleri tek basamak haline getirmek için üçüncü nesil teknikler tasarlanmıştır. Bu tekniklerde kondro-indüktif ve kondro-kondüktif matrikslerin, allojenik hücrelerin kullanımı ve implantasyon öncesi hücre-matriks bileşeninin mekanik olarak optimize edilmesi üzerinde durulur [148]. Dördüncü nesil olarak tariflenen kırıldak tamir teknikleri ise farklı dokulardan alınan kök hücrelerin kullanımını ve gen tedavilerini içerir, eklem kırıkdağının doku mühendisliği ile rejenerasyonunu hedefler [155].

Doku mühendisliği terimi, biyolojik, kimyasal ve mühendislik prensipleri uygulanarak, biyomateryallerin, hücrelerin ve biyolojik faktörlerin kullanılmasıyla yaşıyan dokuların tamiri, restorasyonu ve rejenerasyonu olarak tanımlanabilir.



Şekil 2.5. Başarılı bir doku mühendisliği için gerekli unsurlar; Büyüme faktörleri ve mekanik uyarılar, skafoldlar ve uygun hücreler.

Fonksiyonel bir dokunun doku mühendisliği ile başarılı bir şekilde rejenerasyonu için gerekli unsurlar; uygun hücre seçimi, biyolojik olarak uyumlu ve sağlam skafoldlar ve hücre kaynağının proliferasyonunu, maturasyonunu ve diferansiasyonunu teşvik eden uygun biyoaktif moleküller olarak sıralanabilir [155].

Hücreler: Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan hücrelerin kondrojenik progenitörler olması ve in vivo ortamda uygun proteinlerin sentezi için gen iletim aracı olarak kullanılması gerekir [156].

Kıkırdak lezyonlarının tedavisinde hücre kaynağı olarak otolog kondrositler kullanılmış ancak, donör saha morbiditesi, biyopsi esnasında az sayıda hücre elde edilmesi ve uzun kültür periyotlarında bu hücrelerin fenotiplerini kaybetmesi nedeniyle kullanımları kısıtlanmıştır [157].

Hücre kaynağı olarak diğer bir alternatif ise mezenkimal kök hücrelerdir. Bu hücrelerin, yüksek proliferasyon yeteneği ve kondrosit, adiposit ve osteoblast gibi farklı hücrelere farklılaşma potansiyelleri vardır [158, 159]. Mezenkimal kök hücreler kemik iliğinden başka, iskelet kası,

periost, sinovya, tendon ve yağ dokusunda da bulunur [160-163]. Sinovyanın kondrojenetik potansiyeli uzun zaman önce sinovyal kondromatozis hastalarında gözlenmiştir [10]. Aynı zamanda sinovya, eklem kıkırdağında hasara yol açmadan, artroskopi gibi minimal invaziv yöntemlerle biyopsi yapılmasına izin veren bir dokudur. Sinovyadan elde edilen mezankimal kök hücrelerin, diğer dokulardan elde edilen kök hücrelere göre daha yüksek kondrojenetik ve proliferatif kapasitesi olduğu görülmüştür ve in vivo deneylerde kıkırdak tamirinde etkili olduğu gösterilmiştir [164-166]. Mezankimal kök hücre kaynağı olarak yağ dokusunun, kolay ulaşım, biyopsi esnasında minimal morbidite ve pasaj süresini kısaltmak için yeterli sayıda hücre toplanabilmesi gibi avantajları vardır ancak bu hücrelerin kondrojenetik özellikleri sınırlıdır [167, 168]. Günümüzde popüler olan bir başka hücre kaynağı ise periferik kandan elde edilen mezankimal kök hücrelerdir [169]. Kemik iliğinden köken alan ve dolaşım sisteminde az miktarda bulunan bu hücrelerin kandan kolaylıkla aferez edilmesi mümkündür. Bu hücre kaynağının, en az kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücreler kadar proliferatif ve trofik özellikleri olduğu gösterilmiştir [170].

Skafoldlar: Doku mühendisliği için, hücrelerin tutunması ve proliferasyonu için üç boyutlu destek sağlayacak ve oluşan kıkırdak dokusunu mekanik olarak taşıyabilecek matrisler gerekmektedir. İdeal skafoldun taşıması gereken özellikler; inflamatuvar cevabı tetiklememesi ve biyouyumlu olması, çevre hücreler ve dokulara sitotoksik olmaması, hücre ve biyolojik faktörleri taşıyabilmesinin yanısıra, implante edilen hücrelerin sentezledikleri matrisle yer değiştirebilmesi yani biyoçözünür olması ve taşıdıkları hücreleri ve içindeki biyoaktif faktörleri homojen olarak dağıtabilmesi olarak sıralanabilir. Ayrıca skafoldların hücre integrasyonuna kadar mekanik olarak stabil olması, kolay ulaşılır olması ve çeşitli boyutlardaki lezyonların tedavisine göre uygun şekilde biçimlendirilebilir olması gerekir [171].

Skafoldlar yapısında kullanılan materyallere göre dört gruba ayrılabilir; protein bazlı, karbonhidrat bazlı, sentetik skafoldlar ve ilk üç grubun özelliklerini içeren kompozit skafoldlar [171]. Protein bazlı olanlar arasında

fibrin, kollajen ve jelatin, karbonhidrat bazlı olanlar arasında hyalüronik asit, agaroz, aljinat, polilaktik/poliglolikolik asit ve kitosan sayılabilir [172]. Sentetik skafoldlara ise karbon fiber, Dacron, polibütirik asit ve hidroksiapetitler örnek verilebilir [173].

Yeni nesil skafoldlar arasında biyoaktif skafoldlar ve uzaysal oryante matrisler gösterilebilir. Biyoaktif moleküllerle çapraz bağı yapan skafoldlarda, hücrelerin daha fazla oranda hiyalin matris oluşturdukları görülmüştür [174]. Gelecekte kıkırdak tamirinde doz ve zaman bağımlı çok sayıda faktör kullanımına izin veren skafoldların kullanımı düşünülmektedir. Bir başka gelişme ise, normal kıkırdakta olduğu gibi, hücrelerin skafold içinde kolonlar halinde yerleşimine olanak sağlayan por kanal yapısına sahip hidrojellerin geliştirilmesidir [175].

Büyüme Faktörleri: Hücre kaynağının skafold içinde proliferasyonunu arttıracak ve kondrojenetik diferansiyasyonunu teşvik edecek biyolojik olarak aktif peptidler, doku mühendisliği için üçüncü bileşeni oluşturur (Tablo 2.2). TGF-B kondrojenik diferansiyasyonu indüklerler ve hücre dışı matris üretimini stimüle ederler[176]. IGF-1 matris üretimi üzerinde anabolik etkiye sahiptir, aynı zamanda proteoglikanların degradasyonunda inhibisyona neden olur[177]. BMP-4 ise kök hücrelerin kondrojenik yolağa girmelerinde ve kondrositlere diferansiye olmalarında etkilidir [178].

Büyüme faktörlerinin bu etkileri aynı zamanda ortopedi pratiğinde gittikçe kabul görmekte olan PRP uygulamasına da temel oluşturmuştur. PRP doku rejenerasyonunu arttırmak için kandan alınan büyüme faktörleri konsantrasyonunun basit, ucuz ve maliyet-etkin olarak kullanımı esasına dayanır. PRP tekniğinin güvenli olduğunu, kısa dönemde semptomların gerilediğini ve fonksiyonel iyileşme sağladığını belirten bir çok çalışma vardır [179, 180]. Ancak günümüzde PRP uygulamaları ile ilgili çalışma protokollerinin, hazırlama tekniğinin ve klinik sonuç değerlendirmenin standardizasyonu ile ilgili ortak bir görüş birliği yoktur [181].

Tablo 2.2. Kıkırdak rejenerasyonu için kullanılan büyüme faktörleri

TGF-B	Matriks üretimi ve kondrojenik dönüşüm stimülasyonu
IGF-1	Matriks üretimi stimülasyonu ve kondrositlere anabolik etki
BMP- 2	Matriks üretimi ve turn-over stimülasyonu
PDGF	Mezankimal hücreler için kemotaktik faktör
FGF	Kondrosit proliferasyonu ve matriks üretimin stimülasyonu

Gen Tedavileri : Büyüme faktörleri rekombinan gen tedavisi yöntemleri ile viral veya viral olmayan yöntemlerle in vivo veya ex vivo olarak uygulanır [182, 183]. TGF-B molekülünün retroviral olarak dize transfer edildiği klinik çalışmada ise, yöntemin güvenli olduğu ve 12 ay takip sonunda ağrının gerilediği ve yüksek doz kullanılan grupta ayrıca fonksiyonel iyileşme görüldüğü belirtilmiştir [184]. Rekombinan gen tedavisi ile büyüme faktörlerinin yanısıra, transkripsiyon faktörleri, sinyal iletim molekülleri, apoptozis mekanizması ve proinflamatuvar sitokin inhibisyonu üzerinde de çalışılmaktadır. Bu genlerin transferinde viral vektörlerin kullanılmasının konak DNA'sında mutasyona neden olabileceği ve konak immün sisteminin viral proteinlere karşı tetiklenebileceği gibi çekinceler vardır. Maliyet ve işgücünü azaltmak için bu genlerin in vivo olarak, özellikle sinovyaya transferi üzerinde çalışmalar bulunmaktadır [185]. Bu yöntemlerin çoğu henüz deney aşamasındadır ve klinik kullanıma girmesi için randomize çalışmalarla etkinliklerinin ve güvenilirliklerinin kanıtlanması gerekmektedir.

Biyoreaktörler: Doku mühendisliği ile üretilecek ve içinde hücre, skafold ve büyüme faktörleri bulunan kıkırdak dokusunun, besin transferini ve metabolit değişimini sağlayacak, in vivo fizyolojik koşulları taklit edecek bir ortamda kontrollü olarak kültür edilmesi gerekmektedir [185]. Bu kültür ortamını sağlamak için hücre-skafold ünitlerine mekanobiyolojik aktivasyon sağlayan in vitro biyoreaktörler kullanıma girmiştir. Kondrositler oksijen konsantrasyonunun düşük ve hidrostatik basıncın yüksek olduğu zorlu bir mikroçevrede yaşarlar [186, 187]. Yapılan araştırmalarda in vitro ortamda

Üretilen kondrositlerin hidrostatik basınca ve makaslama kuvvetlerine maruz bırakılması ile fenotiplerini tekrar kazandıkları ve hücre dışı matriks sentezleme potansiyellerinin arttığı belirtilmiştir [188, 189]. Düşük oksijen konsantrasyonunun kültür edilen hücrelerde tip II kollajen üretimini tetiklediği gözlenmiştir [190]. Basınç ve oksijen konsantrasyonlarını düzenleyen biyoreaktörlerin farklı tasarımı özellikleri bulunmaktadır. Hidrostatik biyoreaktörler eklem içinde olduğu gibi hidrostatik kuvvet uygular, dinamik biyoreaktörler ise farklı frekanslarda ve ölçekte kuvvet uygulayabilirler. Hidrodinamik reaktörler besin, gaz ve metabolit transportuna olanak sağlayacak şekilde rotasyon veya farklı yönlerde kuvvet uygulayabilen sistemlerdir. Bu sistemlerin kullanılması ile kontaminasyon riskinin azalacağı ve retilbilirliğin artacağı öngörülmektedir [191].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

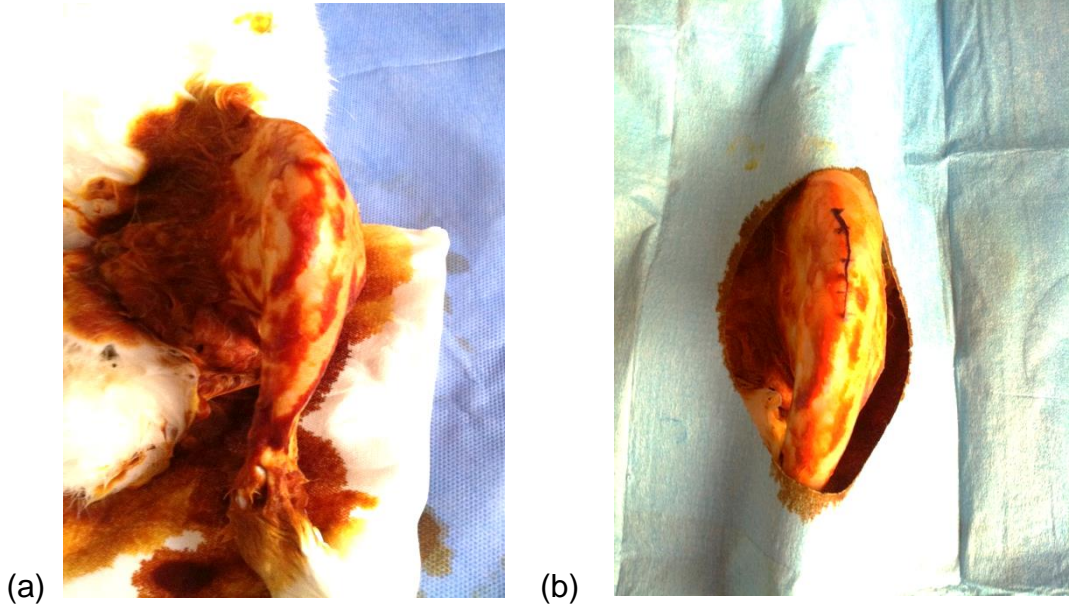
Çalışmaya 45 adet sağlıklı, beyaz Yeni Zelanda türü tavşan temin edilmiştir. Çalışmada ortalama ağırlıkları 2500 gr. (2000-3000 gr.) olan tavşanlar kullanılmıştır. Tavşanların kulakları numaralandırılmış ve sadece sağ dizleri çalışmada kullanılmıştır. Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul' undan 2012/34-05 numaralı izin alındıktan sonra, Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Anestezi/Analjezi

Tavşanlara 5 ay ara ile iki kez, yazının devamında anlatılan standart cerrahi hazırlıklar uygulanmıştır. Cerrahi anestezi için hayvanlara enjekte edilebilir formda 'Ketamin - Ksilazin' karışımı uygulanmıştır. Enjeksiyon siyatik sinir hasarını engellemek için kuadriseps kasına intramüsküler olarak uygulanmıştır. Ketamin dozu 35 mg/kg ve ksilazin dozu 5 mg/kg olarak uygulanmıştır. Post-op bakım aşamasında hayvanların cerrahi işlem sonrası 24 saat boyunca sessiz, ılık ve kuru bir alanda iyileşme sürecini yaşamaları sağlanmıştır. Gastrointestinal hareketliliği sağlamak ve stazi engellemek amacıyla hayvanlara tamamen uyandıklarında yem ve su verilmiştir. Postoperatif analjezi için abdominal bölgeye 5mg/kg meloksikam subkütan olarak uygulanmıştır.

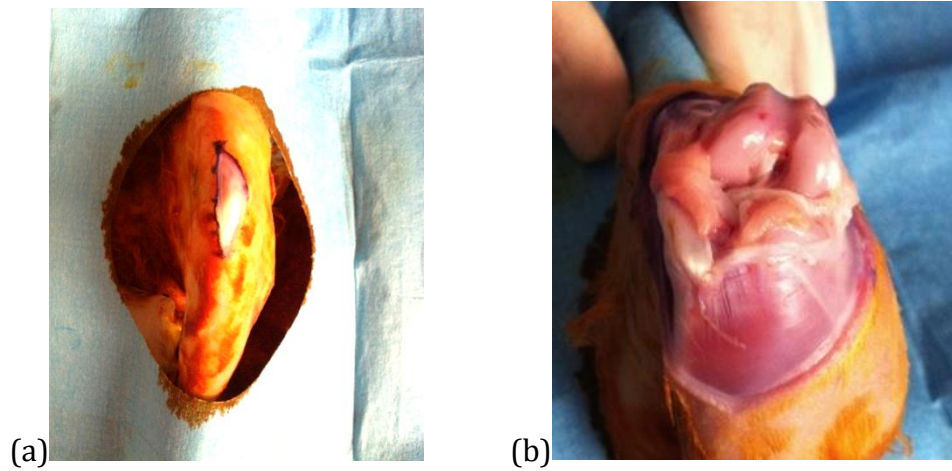
3.2. Cerrahi Teknik

Cerrahi işlemden önce bütün hayvanların sağ dizlerine ve greftlerin yerleştirileceği alanlara standart pre-operatif hazırlıklar uygulanmıştır. Bu amaçla, sağ diz ve otogreftin yerleştirileceği abdominal bölge, vastus kasının üzeri ve aşil tendonunun üzeri tıraş edilmiş, antiseptik uygulandıktan sonra cerrahi örtüler ile örtülerek, aseptik ve uygun izole koşulların elde edilmesi sağlanmıştır.



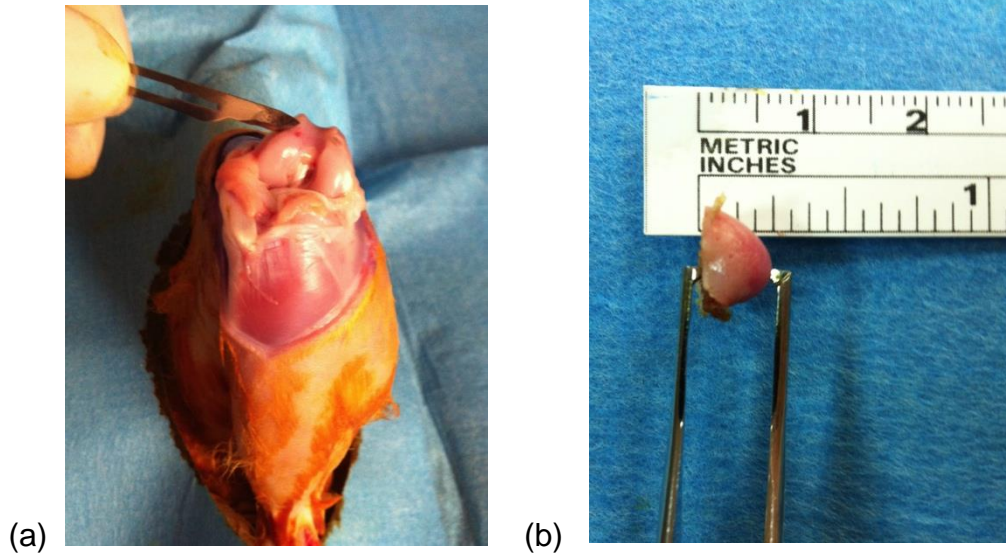
Şekil 3.1. Cerrahi öncesi hazırlık aşamasından görüntüler: (a) Tavşanın greft alınacak sağ dizinin cerrahi öncesi hazırlığı, (b) cerrahi uygulanacak dizin steril örtü ile örtülmüş şeklinin görüntüsü

Cerrahi teknik olarak orta hat cilt insizyonu kullanılmıştır. Medial parapatellar yaklaşım ile yapılan artrotomi sonrasında femoral kondil yüzeyi ortaya çıkarılmıştır (Şekil 3.2. (a) ve (b)).



Şekil 3.2. Femoral kondillere ulaşım için uygulanan cerrahi teknik: (a)Orta hat insizyonu. (b) Medial parapatellar insizyon sonrasında, patellanın laterale sublüksasyonu ve femoral kondillerin ortaya çıkarılması.

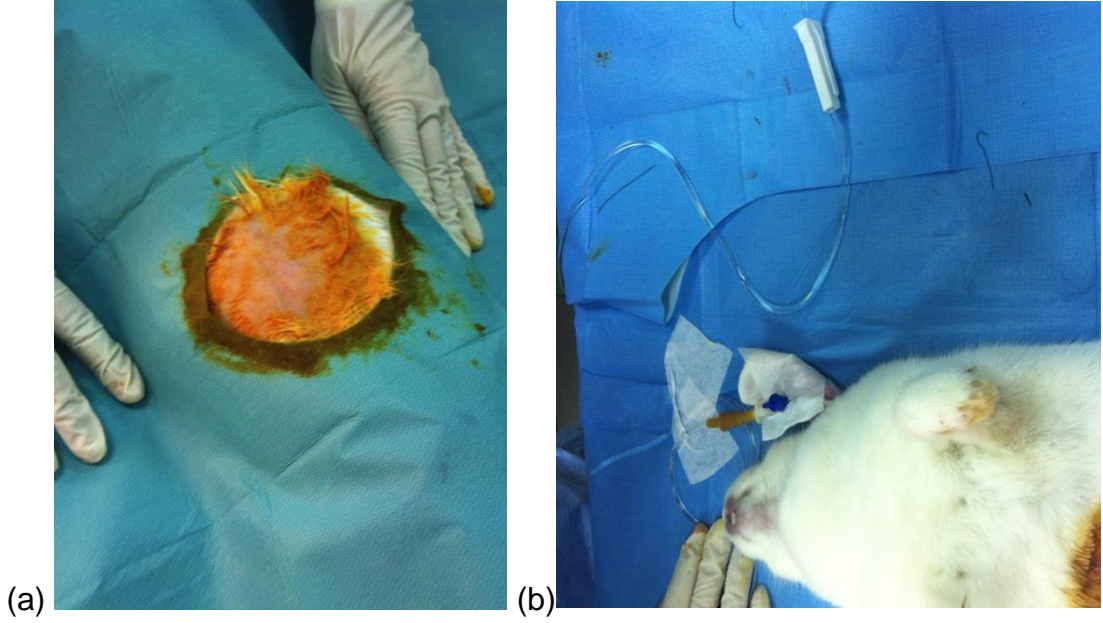
Tavşanların sağ dizlerinden lateral femoral kondilden subkondral kemik ile birlikte 5 x 5 x 10 mm boyutlarında standart osteokondral örnekler alınmıştır (Şekil 3.3. (a), (b)).



Şekil 3.3. Osteokondral otogreft, sağ diz: (a) Lateral femoral kondilden subkondral kemik ile birlikte greft alınışı, (b) 5 x 5 x 10 mm boyutlarında standart osteokondral otogreft.

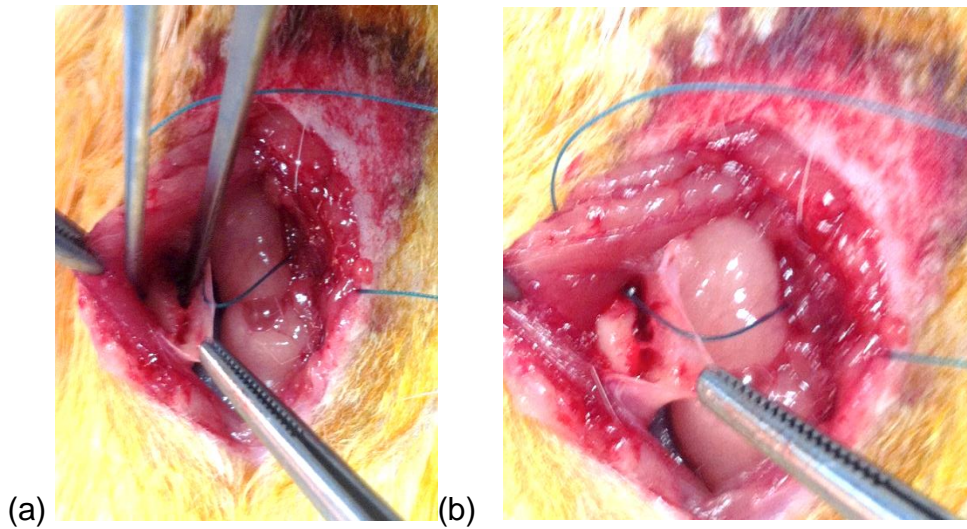
Kapsül, ciltaltı ve cilt sırasıyla uygun şekilde yaklaştırılıp, insizyon ile kapatılmıştır. Alınan örnekler implante edilinceye kadar serum fizyolojik ile ıslatılmış, steril spançlarda bekletilmiştir. Kontrol grubu olan 5 tavşandan alınan örnekler formol solüsyonunda saklanmıştır Kıkırdak büyümesi için kontrol grubuyla karşılaştırılacak örnekler ise aynı seansta peritona, omentuma, aşil paratenona ve vastus lateralis kasına yerleştirilmiştir.

Omentum ve peritona yerleştirilecek greftler için abdominal bölge tıraş edilmiş, antiseptik uygulandıktan sonra standart orta hat insizyonu kullanılmış, ksifoidin altından yaklaşık 5 cm insizyon ile abdominal bölge explore edilmiştir (Şekil 3.4 (a)). Tavşanların kulaklarından açılan damar yolu ile operasyon boyunca serum fizyolojik ile intravenöz hidrasyon uygulanmıştır (Şekil 3.4 (b)).



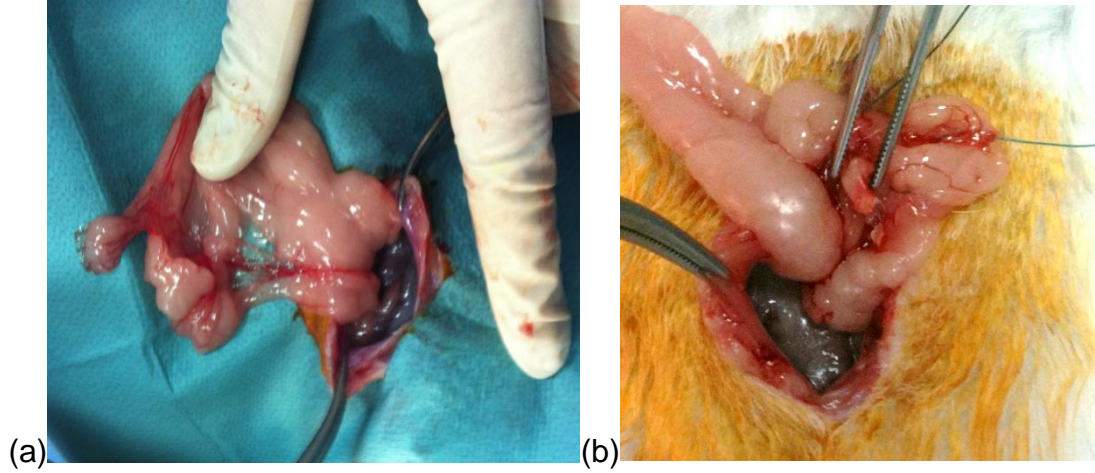
Şekil 3.4. (a) Abdominal bölgenin cerrahi öncesi hazırlık görüntüsü, (b) periton ve omentum grubu tavşanlara operasyon boyunca intravenöz hidrasyon verilmesi

Greftler peritona orta hat insizyonu ile ulaşıldıktan sonra peritonda oluşturulan bir cebe renkli, emilmeyen dikiş ile tespit edilmiştir (Şekil 3.5 (a) ve (b)).



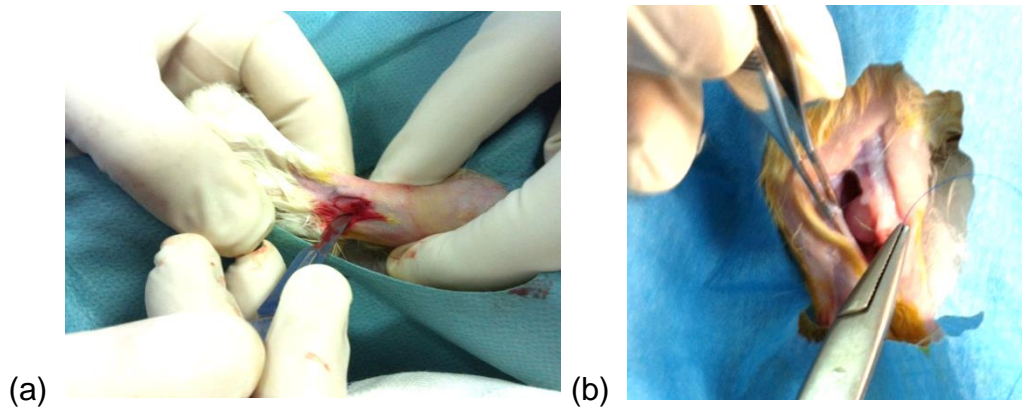
Şekil 3.5. Osteokondral greftlerin peritona yerleştirilmesi: (a) Peritona greftin yerleştirilmesi için cep hazırlanması, (b) Greftin peritona emilmeyen dikiş ile tespit edilmesi.

Omentuma yerleştirilecek greftler aynı orta hat insizyonu ile omentumun eksplorasyonunu takiben, omentumun vaskülarizasyonunu bozmadan oluşturulan bir cebe emilmeyen, renkli dikişler ile tespit edilmiştir (şekil 3.6 (a) ve (b)).



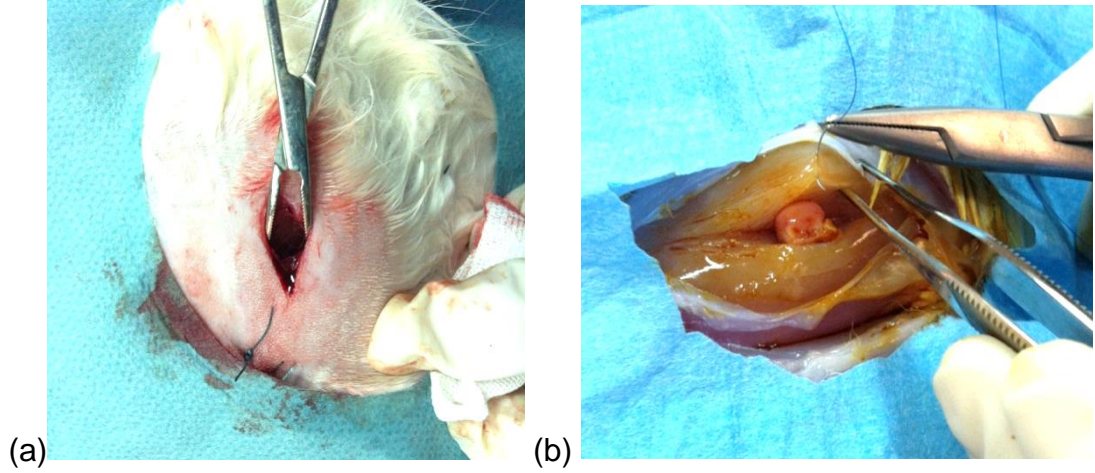
şekil 3.6. (a) Orta hat insizyonu sonrası omentumun damarlanmasına zarar verilmeden eksplere edilmesi, (b) greftin omentumda oluşturulan cebe yerleştirilmesi ve tespit edilmesi.

Aşil paratenonuna, orta hat insizyonu kullanılarak ulaşılmış, greftler aşil tendonuna zarar vermeden paratenona emilemeyen renkli dikişler ile tespit edilmiştir (şekil 3.7. (a) ve (b)).



şekil 3.7. (a) Aşil paratenonuna ulaşım için uygulanan cerrahi teknik, (b) osteokondral greftlerin aşil paratenona yerleştirilmesi.

Vastus lateralis kasına, kasın palpe edilen gövdesi üzerinden ortalama 3 cm insizyon kullanılarak girilmiştir. Kasın gövdesi künt diseksiyon ile açılmış, greftler renkli emilemeyen dikişler ile kasa tespit edilmiştir (Şekil 3.8 (a) ve (b)).



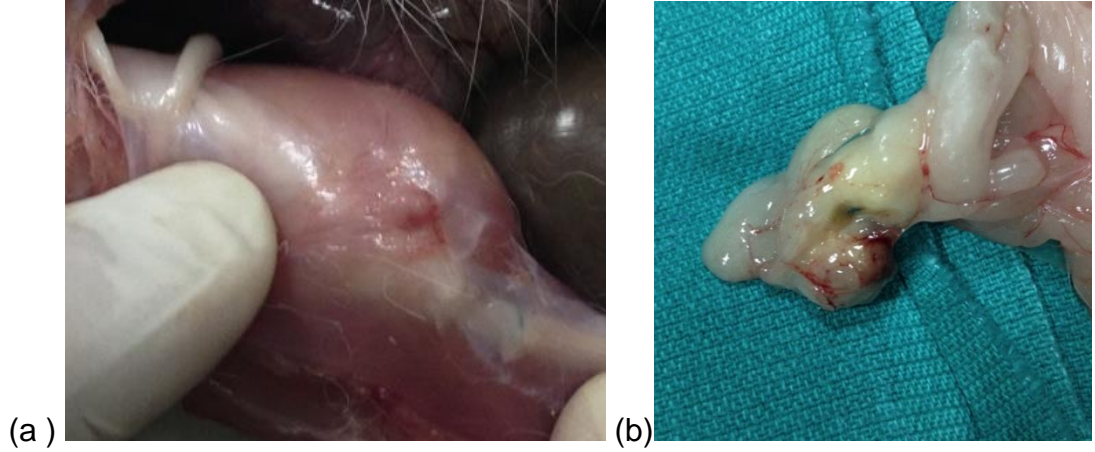
Şekil 3.8. Vastus lateralis kasına yaklaşım: (a) Künt diseksiyon ile kas gövdesinde cep oluşturulması, (b) Greftin kas gövdesine tespiti.

Cerrahi sonrası yara yerleri anatomik olarak kapatılmıştır. Operasyon sonrası 1 hafta süreyle yara yerleri steril pansumanlarla izlenmiştir. Tavşanlara immobilizasyon uygulanmamıştır. Hayvanların hiçbirinde yüzeysel enfeksiyon bulgusu saptanmamıştır. 5 ay süreyle takip edilmesi planlanan tavşanlardan, omentum grubundan 1, aşil paratenon grubundan 2 ve kas grubundan 2 tavşan çalışma süresini tamamlayamadan exitus olmuş ve çalışmaya dahil edilmemiştir.

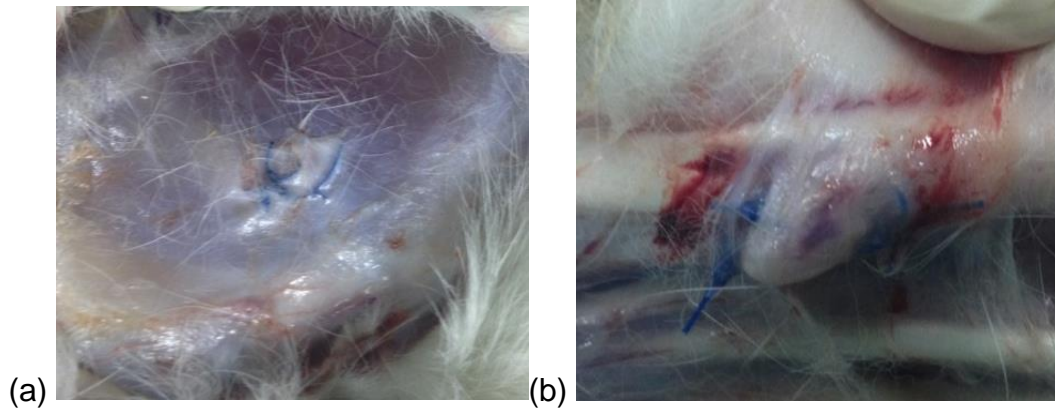
Omentum grubundan 9 tavşan, periton grubundan 10 tavşan, aşil grubundan 8 tavşan ve kas grubundan 8 tavşan 5 ay süreyle izole laboratuvar koşullarında izlenmiştir. 5 ayın sonunda greftlerin yerleştirildiği alanlar aynı insizyon ve cerrahi yaklaşım kullanılarak açılmıştır. Kıkırdak dokular renkli dikiş kılavuzunda bulunmuştur. Post-op örnekler incelenmek üzere alınarak diz eklemi kapatılmıştır.

3.3. Greftlerin Makroskopik Görüntüsü

Tavşanlardan alınan otogreftlerin post-op görüntüsü, çevre doku ile olan entegrasyonu ve damarlanması değerlendirilmiştir (Şekil 3.9 (a), (b) ve Şekil 3.10 (a), (b)).



Şekil 3.9. (a) Peritona yerleştirilen greftin makroskopik görüntüsü; periton ile sıkı bir entegrasyon içinde olduğu görülmekte. (b) Omentuma yerleştirilen greftin makroskopik görüntüsü; omentum tarafından tamamen çevrelenmiş ve damarlanmasının zengin olduğu görülmekte.

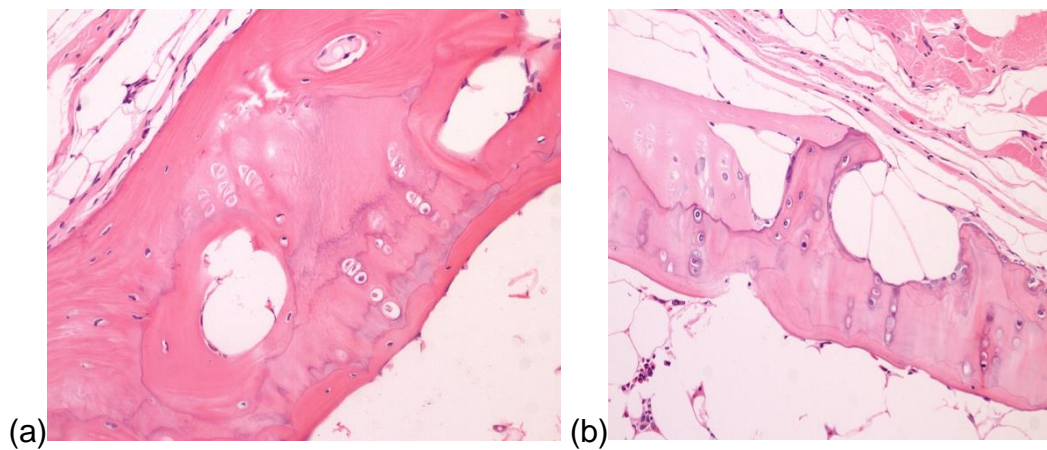


Şekil 3.10. (a) Vastus lateralis kasına yerleştirilen greftin makroskopik görüntüsü, (b) Aşil parateonuna yerleştirilen greftin paratenon tarafından çevrelenmiş olduğu görülmekte.

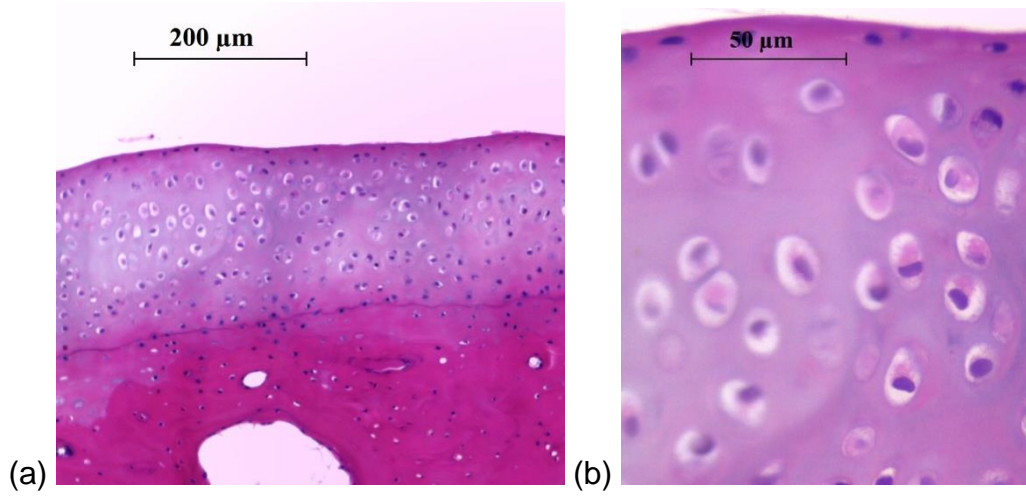
3.4. Histolojik İnceleme

Post-op doku örnekleri yapılan anatomik diseksiyon sonrası %10'luk tamponlu formaldehit çözeltisinde 1 hafta bekletildikten sonra, %10'luk formik asit çözeltisinde 1 gün süreyle dekalsifikasyon işlemine tabi tutuldu. Makroskopik olarak kıkırdak ile uyumlu olabilecek alana dik olarak kesit yapıldı ve osteokondral dokunun yarısı rutin parafin doku hazırlama tekniğine uygun şekilde hazırlandı. Örnekler, 5µm kalınlıkta kesitleri alındıktan sonra, Hematoksilen-Eozin boyası ile boyanmıştır. Doku örnekleri, Nikon Optiphot (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ışık mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 3.10 (a), (b), Şekil 3.11 (a), (b), Şekil 3.12 (a), (b), Şekil 3.13 (a), (b), Şekil 3.14 (a), (b)).

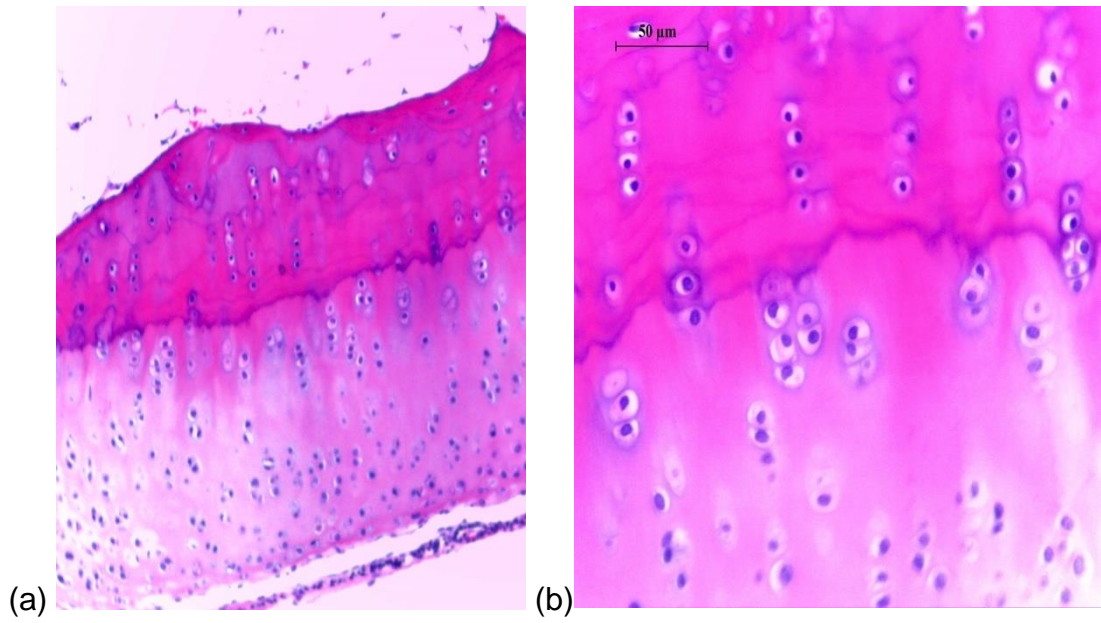
Histolojik incelemeye alınan kesitlerden kas grubunda 4, periton grubunda 2, omentum grubunda 2 ve paratenon grubunda 3 örnekte canlı hiyalin kıkırdağa rastlanmadı. Bu durumun greftin degrade olmasından, kıkırdağın kemikleşmesinden, histolojik takip esnasında kesitlerin ilgili bölgeyi içermemesi veya cerrahi teknik esnasında yapılan hatalardan kaynaklanabileceği düşünüldü. Bu nedenle kas grubundan 4, paratenon grubundan 3, omentum grubundan 7, periton grubundan 8 örnek istatistiksel değerlendirmeye alındı.



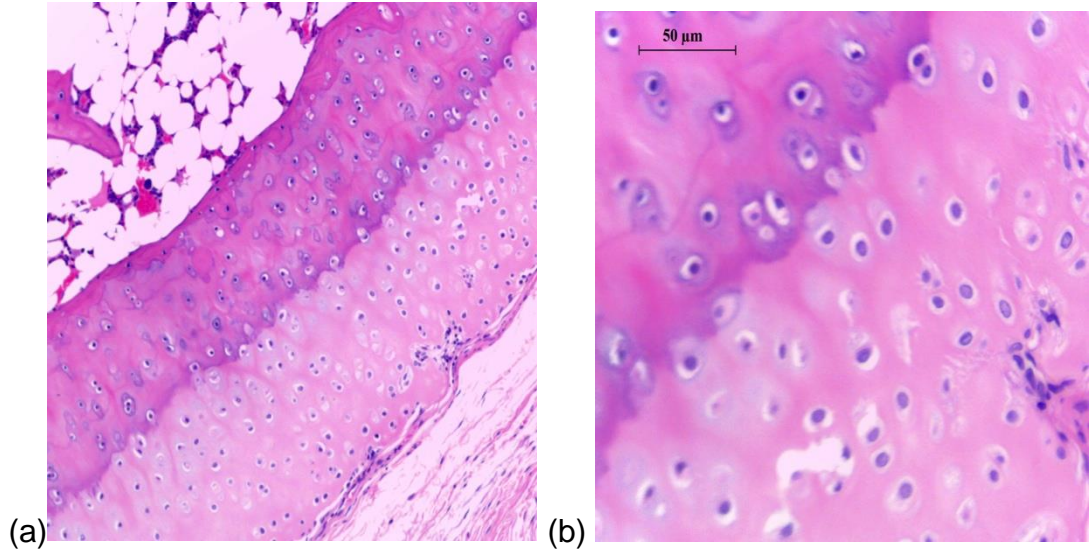
Şekil 3.11. (a) Kas 6 örneğinde görülen kemikleşen kıkırdağın görüntüsü, (b) aynı örnekte saptanan ölü kıkırdağın mikroskopik görüntüsü



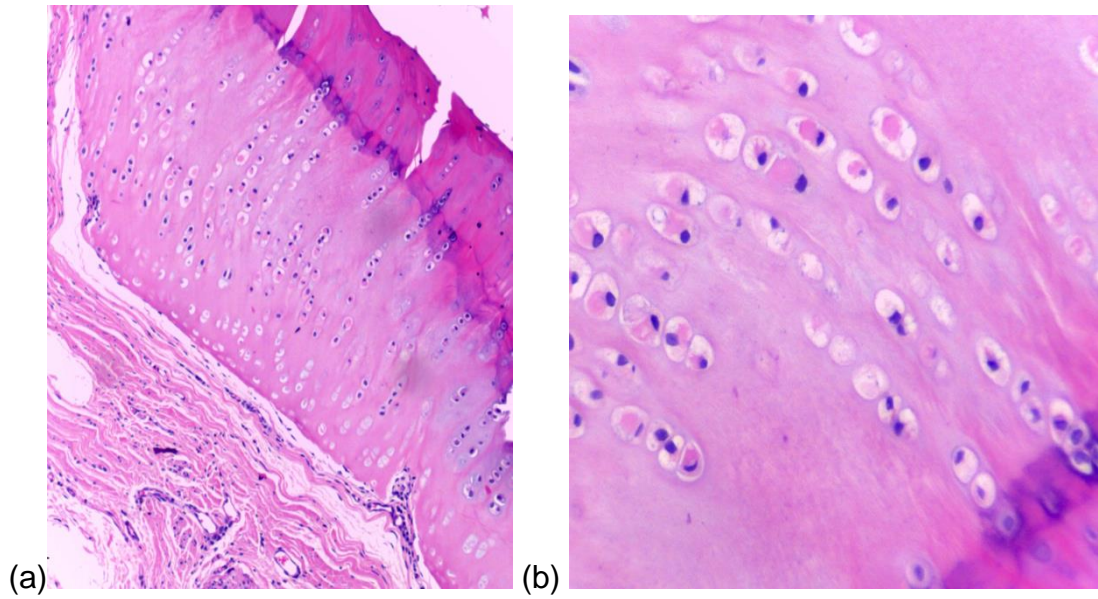
Şekil 3.12. Kontrol grubuna ait kontrol 2 örneğinin x100 (a) ve x400 (b) büyütmedeki histolojik görüntüleri.



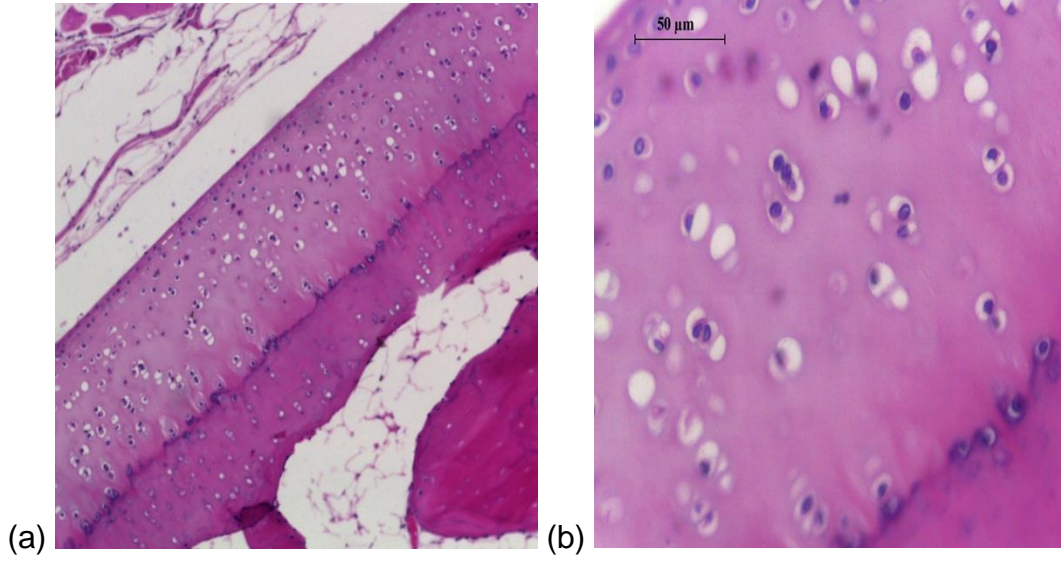
Şekil 3.13. Omentum 8 örneğinin histolojik görüntüleri: (a) x100 büyütmedeki, (b) x400 büyütmedeki görüntüleri. Kondrositlerin kolonlar halinde dizildikleri görülmektedir.



Şekil 3.14. Periton 8 örneğinin histolojik görüntüleri: (a) x100 büyütme ve (b) x400 büyütmedeki görüntüleri.

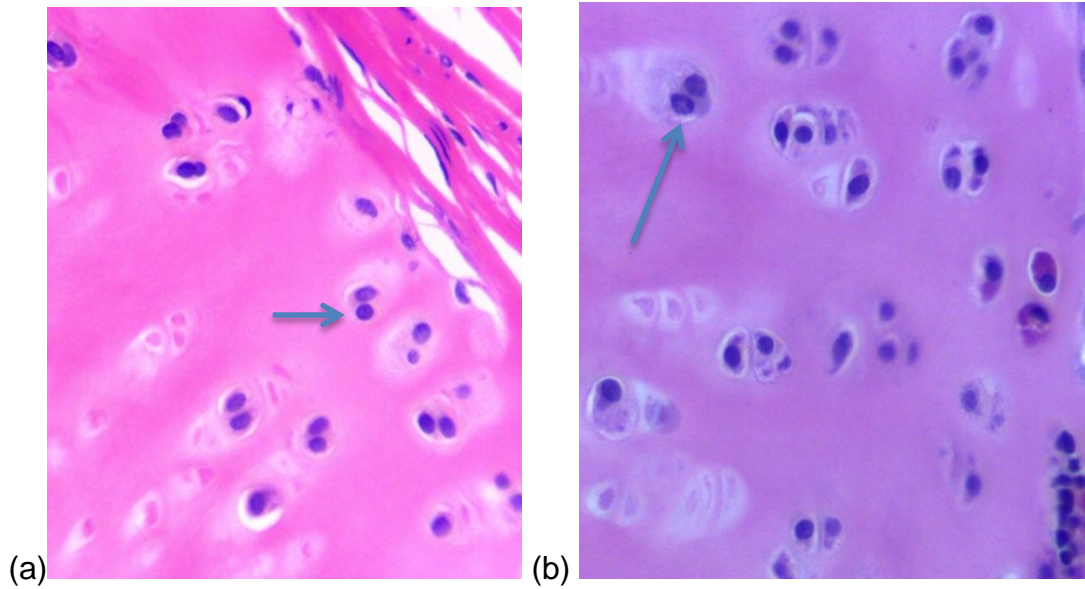


Şekil 3.15. Aşil 3 örneğine ait histolojik görüntüler: (a) x100 büyütme ve (b) x400 büyütmedeki görüntüler.

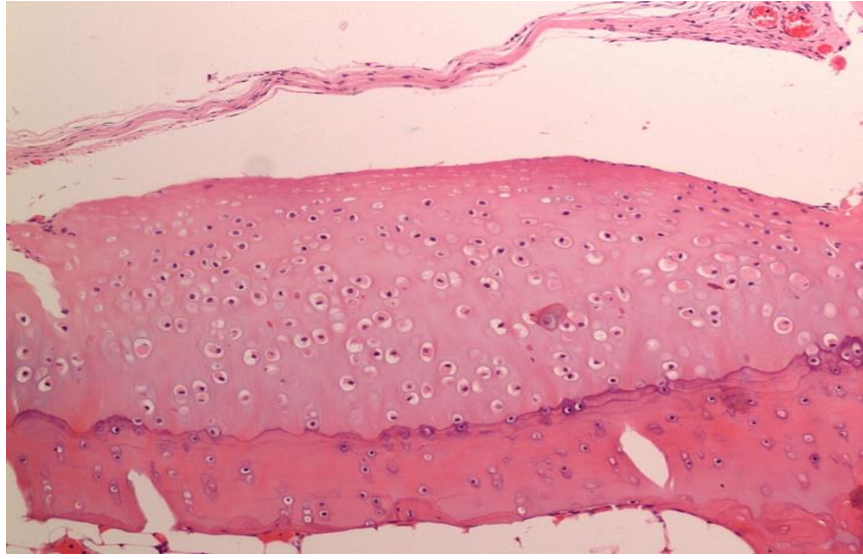


Şekil 3.16. Kas 3 örneğine ait histolojik görüntüler: (a) x100 büyütmede ve (b) x400 büyütmedeki görüntüler.

Örneklerde peritona yerleştirilen greftlerde (periton 5, 6 ve 8 numaralı örneklerde) yer yer aynı laküna içerisinde çift çekirdekli kondrositler izlendi ve bu bulgu kondrosit proliferasyonu olarak değerlendirildi (Şekil 4.1 (a) ve (b)).



Şekil 3.17. (a) Periton 5 örneğinin ve (b) omentum 4 örneğinin x400 büyütmede aynı lakün içindeki çift çekirdekli kondrositlerin görüntüsü.



Şekil 3.18. Peritona yerleştirilen ve kondrosit canlılığını koruduğu görülen periton 5 numaralı örnekte, hyalin kıkırdağın mezotelyum ile olan ilişkisi.

Kondrosit saptanan örneklerin histolojik olarak hyalin kıkırdak doku özelliklerine sahip olup olmadıklarına bakıldı ve bu çalışmada kondrositlerin kantitatif analizleri ışık mikroskopunun "camera lucida" sistemi kullanılarak yapıldı [192-194] [26]. Her bir mikroskopik kesitte yaşayan kondrositler x200 büyütme altında 0.01mm^2 lik 10 farklı alanda sayıldı (Şekil 3.18 (a) ve (b)).



(a)



(b)

Şekil 3.18. (a) ve (b) Histolojik preparatlardaki kondrositlerin Nikon Optiphot (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ışık mikroskobu ile "camera lucida" yöntemi kullanılarak, 200x büyütmede 0.01 mm^2 lik alanlarda aynı araştırmacı tarafından sayılması.

3.5. İstatistiksel Analiz

Kıkırdak dokusunun net olarak değerlendirilebildiği örnekler ise, konusunda uzman bir anatomist tarafından incelenmiştir. Kontrol grubu (n=5) ile omentum (n=7), periton (n=8), aşil paratenonu (n=5) ve kas grubunun (n=4) kondrosit sayımlarının ortalama değerleri arasındaki fark Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tüm analizler için IBM SPSS istatistik paket programı (standart sürüm 21.0, SPSS, Chicago, IL) kullanılmıştır. 0.05 den düşük bulunan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

5 aylık izlem sonunda ilk cerrahilerinde omentum, periton, vastus lateralis ve aşil paratenonuna yerleştirilen greftler çıkartılmıştır. Otogreftler mikroskopik olarak değerlendirilmiş, yaşayan kondrositlerin kantifikasyonu camera lucida yöntemi ile yapılmış ve kaydedilmiştir (Tablo 4.1 - 4.5)

Tablo 4.1. Kontrol grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.

Örnek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort	SS±
Kontrol 1	16	16	15	15	15	16	18	13	13	16	15,3	1,49
Kontrol 2	15	16	15	14	16	17	14	15	17	18	15,7	1,33
Kontrol 3	15	16	20	16	15	17	15	16	15	14	15,9	1,66
Kontrol 4	16	14	16	14	15	16	17	18	20	16	16,2	1,8
Kontrol 5	15	22	18	17	16	18	15	20	14	16	17,1	2,4

Tablo 4.2. Omentum grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.

Örnek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort	SS±
Omentum 1	12	11	15	12	14	15	14	13	15	14	13,5	1,43
Omentum 8	15	17	15	15	16	15	15	16	15	17	15,6	0,84
Omentum10	12	11	14	13	10	14	15	14	13	15	13,1	1,66
Omentum 5	17	16	15	14	16	17	16	15	16	15	15,7	0,94
Omentum 9	15	14	15	12	13	15	16	14	14	13	14,1	1,19
Omentum 6	12	10	13	15	14	15	16	17	18	16	14,6	2,4
Omentum 4	13	15	11	12	15	14	13	16	17	18	14,4	2,2

Tablo 4.3. Kas grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.

Örnek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort	SS±
Kas 3	13	13	18	9	12	10	12	11	7	12	11,7	2,9
Kas 5	8	10	12	10	8	9	10	9	8	9	9,3	1,25
Kas 2	8	8	10	7	9	8	7	8	9	10	8,4	1,07
Kas 4	9	12	10	10	10	9	10	8	10	9	9,7	1,05

Tablo 4.4. Periton grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.

Örnek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort	SS±
Periton 2	16	16	17	15	15	18	17	15	18	16	16,3	1,15
Periton 5	16	15	16	18	18	15	18	15	17	18	16,6	1,34
Periton 6	15	14	15	15	15	16	16	15	15	14	15	0,66
Periton 4	18	13	12	18	15	17	16	15	18	15	15,7	2,11
Periton 8	14	16	17	15	14	16	17	18	15	15	15,7	1,33
Periton10	15	15	14	16	18	14	15	14	16	18	15,5	1,50
Periton 9	13	11	12	12	16	18	15	13	10	10	13	2,62
Periton 1	18	13	12	18	15	17	16	15	18	15	15,7	2,11

Tablo 4.5. Paratenon grubuna ait örneklerin histolojik olarak kaydedilen kondrosit sayıları ile ilgili ölçüm değerleri.

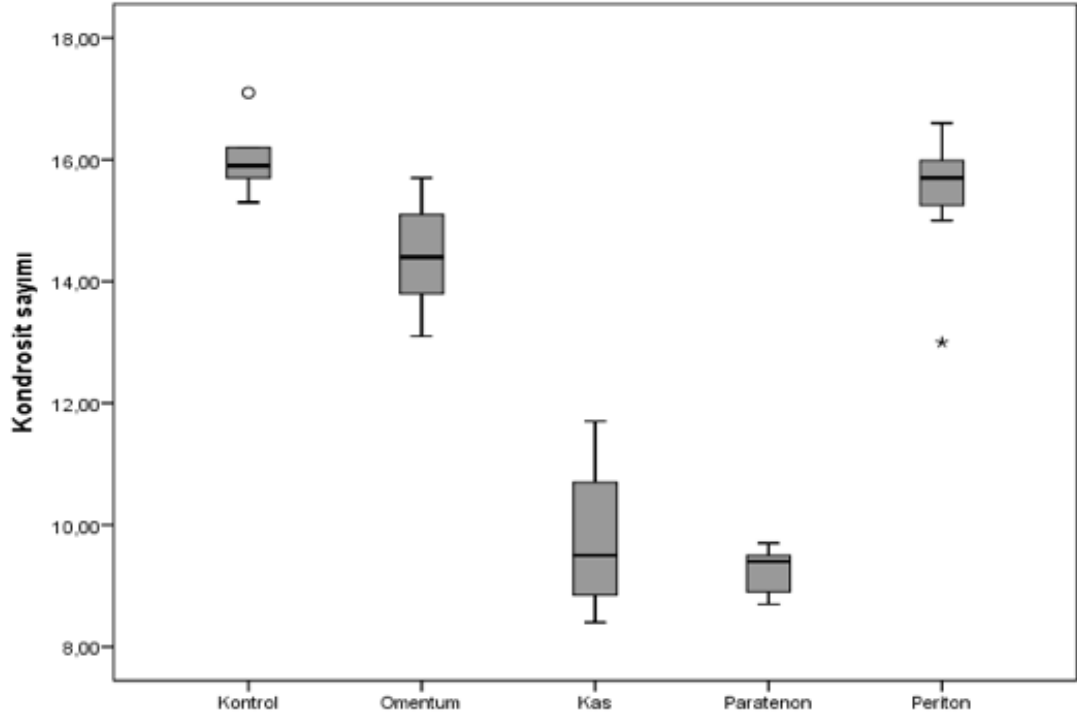
Örnek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Ort	SS±
Paratenon 3	11	9	8	11	13	11	8	9	8	9	9,7	1,70
Paratenon 4	12	11	8	9	8	9	8	9	8	7	8,9	1,52
Paratenon 2	10	7	9	11	8	7	10	9	8	8	8,7	1,33
Paratenon 5	11	10	8	8	9	13	10	9	8	8	9,4	1,64
Paratenon 6	10	9	8	9	9	11	13	10	9	7	9,5	1,64

Elde edilen değerler ile yapılan analiz sonucunda; kontrol grubunun ortalama kondrosit sayımı 16,04 \pm 0,67, omentum grubunun ortalama kondrosit sayımı 14,42 \pm 0,97, kas grubunun ortalama kondrosit sayımı 9,77 \pm 1,39, paratenon grubunun ortalama kondrosit sayımı 9,24 \pm 0,42 ve periton grubunun ortalama kondrosit sayımı 15,43 \pm 1,09 olarak bulunmuştur.

Gruplar kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında;

- Paratenon grubundaki kondrosit sayısının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdiği bulunmuştur (p=0,004).
- Aynı farklılık paratenon ve periton grubu arasında da bulunmuştur (p=0,010). **Paratenon grubundaki örneklerin kondrosit sayımları, kontrol ve periton grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.**
- Paratenon grubu ile kas ve omentum grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır (p >0,05).
- Kas grubundaki kondrosit sayımlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür (p=0,012).
- Kas grubundaki değerler periton grubuyla karşılaştırıldığında, kas grubuna ait değerlerdeki düşüklüğün istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p=0,034). **Kas grubundaki örneklerin kondrosit sayımları, kontrol ve periton grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.**
- Kas grubundaki değerler ile omentum ve paratenon grubundaki değerler arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p >0,05).
- **Omentum grubundaki kondrosit değerleri, kontrol ve periton grubu ile karşılaştırıldığında değerler arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (p >0,05).**

- Periton grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise, kondrosit değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$).



Şekil 4.1. Grupların ortalama kondrosit değerlerinin kontrol grubuyla ve kendi aralarındaki karşılaştırması. Paratenon ve kas grubundaki ortalama kondrosit değerleri kontrol ve periton grubundan anlamlı olarak düşük bulundu.

5. TARTIŞMA

Eklem kıkırdak lezyonları artroskopik uygulamalarda asemptomatik olarak sıklıkla karşımıza çıkmaktadır [195]. Bu lezyonlar ilk saptandıklarında küçük boyutlarda olup, diz biyomekaniğini bozmuyor olabilirler. Ancak bunların doğal seyirleri literatürde tüm açıklığı ile ortaya konmamıştır. Bir çok araştırmacı tedavi edilmeyen bu lezyonların osteoartrite dönüşebileceğini belirtse de doğal seyirde lezyon büyüklüğünün ve konumunun, hasta performansının, ekstremitte diziliminin ve eklem stabilitesinin bu seyri etkileyebileceğini düşünmektedir [196]. Bu lezyonlar erken dönemde tedavi edilmezlerse hyalin kıkırdak ile iyileşme potansiyellerini kaybedecek ve erken dönemde osteoartrit gelişmesine neden olabilecektir [197]. Dejeneratif ve büyük boyutlu lezyonların tedavisinde eklem replasman cerrahileri ağrıyı azaltmakta, geçirmekte ve eklem fonksiyonunu tekrar kazandırmakta başarılıdır, ancak aşınma, gevşeme, enfeksiyon ve protez çevresi meydana gelen kırıklar nedeniyle bu protezlerin sağkalımı kısıtlıdır [198, 199]. Bu nedenle daha genç, aktif ve semptomatik fokal kondral defekte sahip olan hastalarda artroplasti iyi bir seçenek olmayabilir. Bu tür durumlarda "**biyolojik**" tedavi yöntemleri özenle seçilmiş hastalarda endikasyonlara uygun kullanıldığında günümüzde daha ilgi çekici olmaya başlamıştır [200].

Güncel konseptte kıkırdak lezyonlarının tedavisindeki teknikler konservatif ve cerrahi olarak iki ana başlıkta toplanmaktadır. Konservatif yöntemler anatomik restorasyonu değil, semptomları hafifletmeyi amaçlar. Cerrahi yöntemlerden palyatif ve reparatif tekniklerin kullanımında ise lezyonun normal eklem kıkırdağı ile değil daha düşük biyomekanik özelliklere sahip fibrokartilaj ile iyileştiği görülmüştür [99].

Restoratif teknikler lezyonların eklem kıkırdağın doğal yapısı olan hyalin kıkırdak ile tamir edilmesini amaçlar. Bu teknikler arasında otolog veya allojenik osteokondral greftleme, otolog kondrosit implantasyonu ve doku mühendisliği prensipleri ile geliştirilen taşıyıcı skafoldlar, büyüme faktörleri, gen mühendisliği ve biyoreaktörler sayılabilir.

Skafold teknolojisinin gelişmesi ile beraber ikinci nesil kırıkta implantasyon teknikleri gelişmiştir. Protein, karbonhidrat veya sentetik polimerlerden üretilen skafoldlar hücrelere tutunma ve büyüme için üç boyutlu çevre sağlamakta, tamir dokusu gelişinceye kadar iskelet görevi görmekte, hücreleri lezyona homojen şekilde yaymakta ve tamir için gerekli biyoaktif molekülleri lokal çevreye kontrollü olarak yaymaktadır [201]. Aynı zamanda hücrelerin lezyondan kaçışını engellediği gibi, lezyona fibroblastların invazyonunu engelleyen bariyer görevi de görmektedir [202]. Kondrositlerde tek tabakada proliferasyon olurken görülen fenotip kaybı ve hücre dışı matriks sentezleme potansiyeli kaybının da bu üç boyutlu desteklerle engellenebileceği öngörülmüştür [153]. Çalışmamızda kondral greftler yerine osteokondral greftleri kullanmamızın nedeni, subkondral kemiğin hem kondrosit metabolizmasının devamı için progenitör hücreler içermesi hem de kırıkta yapısal destek sunmasından kaynaklanmaktadır [26].

Birinci ve ikinci nesil otolog kondrosit implantasyonlarının en önemli dezavantajları bu işlemlerin iki basamaklı olmasıdır. Bu yöntemlerin kısıtlılıklarını gidermek ve işlemi tek basamak haline getirmek için tasarlanan yeni nesil teknikler, kondro-indüktif ve kondro-kondüktif matriksler, allojenik hücrelerin kullanımı, gen tedavisi ve implantasyon öncesi hücre-matriks bileşenin mekanik olarak optimize edilmesi üzerinde durur [148, 155]. Henüz bu tekniklerin uzun dönem sonuçları bulunmamaktadır. Çalışmamızın tekniği de iki basamaklıdır ancak allojenik değil, otolog dokular kullanılmıştır.

Doku mühendisliği ile üretilecek ve içinde hücre, skafold ve büyüme faktörleri bulunan kırıkta dokusunun, besin transferini ve metabolit değişimini sağlayacak, in vivo fizyolojik koşulları taklit edecek bir ortamda kontrollü olarak kültür edilmesi gerekmektedir [185]. Kondrositler oksijen konsantrasyonunun düşük ve hidrostatik basıncın yüksek olduğu zorlu bir mikroçevrede yaşarlar [186, 187]. Yapılan araştırmalarda in vitro ortamda üretilen kondrositlerin hidrostatik basınca ve makaslama kuvvetlerine maruz bırakılması ile fenotiplerini tekrar kazandıkları ve hücre dışı matriks sentezleme potansiyellerinin arttığı belirtilmiştir [188, 189]. Düşük oksijen konsantrasyonunun kültür edilen hücrelerde tip II kollajen üretimini tetiklediği

gözlenmiştir [190]. Bu nedenle hücre yüklü skafoldlarda ex vivo olarak kondrosit fenotipini kazandıran ve matris sentezini artıran mekanobiyolojik aktivasyon için biyoreaktörler yeni nesil kondrosit implantasyon tekniklerinde kullanıma girmiştir. Hidrostatik, dinamik ve hidrodinamik gibi farklı tipleri bulunan biyoreaktörlerin kullanımı ile bu skafoldların çoğaltılabilirliği ve kontaminasyon riskinin azaltılabilirliği belirtilmiştir [191]. Bu bulgulara dayanarak tasarlanan "Neocart" tekniğinde otolog kondrosit implantasyonunun kültür basamağı hidrostatik biyoreaktör içinde yapılmaktadır. Yöntemin kısa dönemde güvenli olduğu belirtilse de etkinliğinin kanıtlanması için daha uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır [203]. Çalışmamızda kas grubundaki örneklerin kondrosit sayımlarının düşük çıkması, bu dokuların zengin damarlanma ve yüksek oksijen konsantrasyonunun kondrosit metabolizması üzerindeki negatif etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Birinci ve ikinci nesil otolog kondrosit implantasyon tekniklerinin yetersizlikleri arasında erişkin hastalardan alınan ve zaten hipoksik, asidik, reaktif oksijen radikallerinden zengin ve besin konsantrasyonu az olan hasarlı ve yaşlı eklemden elde edilen kondrositlerin sayıca az olması ve uzun in vitro kültürlerde fenotiplerini kaybetmesi gösterilmiştir [157]. Erişkin kondrositlerin bu kısıtlılıkları araştırmaları kondrositlere diferansiye olabilen hücre kaynağı arayışlarına yöneltmiştir [185]. Embriyonik kök hücrelerin ve indüklenmiş pluripotent hücrelerin sahip oldukları birçok farklı dokuya dönüşme ve kendilerini yenileyebilme potansiyelleri nedeniyle kırık lezyonlarının tedavisinde kondrogenetik hücre kaynağı olarak kullanılmaları gündeme gelmiştir [204, 205]. Ancak embriyonik kök hücrelerin insan embriyosundan elde edilmesi ile ilgili etik çekinceler ve immün reaksiyon riski, indüklenmiş pluripotent hücrelerde ise teratom formasyonu ve olası tümörojenik gen integrasyonu ile ilişkili çekinceler bulunmaktadır [206, 207]. Embriyonik hücreler ile ilgili araştırmalar çok erken safhadadırlar ve henüz klinik uygulamaya geçmemiştir. Günümüzde üzerinde en çok araştırma yapılan hücre kaynağı kötü huylu olmayan ama farklı dokulara diferansiye olma potansiyeli taşıyan mezankimal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök

hücreler kemik iliğinden başka, iskelet kası, periost, sinovya, tendon ve yağ dokusunda da bulunur [160-163]. Mezankimal hücre kaynağı olarak yağ dokusunun biyopsi esnasında minimal morbidite ile çok sayıda hücre elde edilmesi gibi avantajları vardır ancak bu hücrelerin kondrojenetik özellikleri kısıtlıdır [167, 168]. Kandan kolaylıkla aferez edilmesi mümkün olan periferik kan kök hücrelerinin en az kemik iliği kaynaklı mezankimal kök hücreler kadar proliferatif ve trofik özellikleri olduğu gösterilmiştir [170]. İskelet kasından elde edilen kök hücrelerin geniş diferansiyasyon kapasitesi olduğu ve kırıldak tamirinde aday olabileceği belirtilmiştir ancak kondrojenik potansiyelleri cinsiyet bağımlıdır, erkeklerden elde edilen hücrelerin rejenerasyon kapasitesi daha yüksek bulunmuştur [208]. Sinovyadan elde edilen mezankimal kök hücrelerin, diğer dokulardan elde edilen kök hücrelere göre daha yüksek kondrojenetik ve proliferatif kapasitesi olduğu görülmüş, in vivo deneylerde kırıldak tamirinde etkili olduğu gösterilmiştir [164-166]. Periton ve omentumun yapısındaki mezotelyal hücrelerin de geniş plasitite özellikleri vardır, uygun mikroçevrede çeşitli hücre yolaklarına dönüşüm gösterebilirler [61]. Yapılan çalışmalarda TGF-B, EGF, HGF gibi büyüme faktörlerinin mezotelyal hücreleri fibroblast, miyofibroblast, yağ dokusu, kemik, kırıldak, endotel ve düz kas hücrelerine transforme ettikleri bildirilmiştir [62-64, 66-68]. Omentum ve periton grubundaki greftlerin kondrosit sayısının fazlalığının, mezotelyal hücrelerin bu özelliklerinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Sinovyal dokunun doğrudan kırıldakın proliferasyonu ve büyümesi üzerine in-vivo etkisini gösteren çalışmada, sinovyaya implante edilen osteokondral otogreftlerin camera lucida ile yapılan histolojik incelemesinde patellar tendonun arkasına implante edilen otogreftlere göre kondrosit sayısında anlamlı artış bulunmuştur [26]. Literatürde, sinovya harici dokuların "in-vivo" kültür ortamı olarak canlıların kendi eklem kırıldakının büyümesi ve kondrosit sayısı üzerine etkisini inceleyen yayın bulunmamaktadır. Bu bağlamda, yapılan çalışma kas, omentum, periton ve aşil paratenonu dokularının canlıların kendi kırıldakının büyümesi ve kondrosit sayısı üzerine etkisini "in-vivo" kültür ortamı olarak inceleyen ilk çalışma özelliği

taşımaktadır.

Bu çalışmanın sonucu olarak kas ve aşil paratenonuna yerleştirilen osteokondral otogreftlerin kondrosit sayısında kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalma vardır. Paratenon grubundaki azalma, aşil paratenonundaki sinovisitlerin osteokondral greftlere canlılığını sürdürmesi için gerekli besin difüzyonunu sağlayamaması ile açıklanabilir. Zaten sınırlı olan perfüzyon ve difüzyon dengesi greftlerin beslenmesi için yeterli olmayabilir [86, 209-211]. Tendonların mekonobiyolojik ortamı kondrositlerin yaşaması için gerekli mekanik uyarıları veremeyebilir çünkü tendonlarda kompresyon kuvvetleri yerine tensil kuvvetlerin hakim olduğu fonksiyonel bir yapıları vardır ve in vivo olarak aşil tendonu vücutta en fazla tensil yüklenmenin görüldüğü tendondur [212]. Ancak kondrositlerin besin difüzyonu ve canlılıklarını korumaları için kompresif kuvvetlerin gerekliliği literatürde bildirilmiştir [213, 214]. Literatürde kompresif ve tensil kuvvetlerin kondrosit metabolizması üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışmada proteoglikan üretiminin tensil kuvvet uygulanan ve hiç kuvvet uygulanmayan grupta azaldığı belirtilmiştir [215]. Çalışmamızda paratenon grubundaki örneklerin kondrosit sayılarının düşük olmasını, kompresyon kuvvetlerinin ve greftlerin beslenmesi için yeterli difüzyon ortamının olmaması ile ilişkilendirdik.

Kas grubunda görülen kondrosit miktarındaki azalma ise iskelet kasında oldukça yüksek olan oksijen konsantrasyonuna ve kondrositlerin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli difüzyon ortamının bulunmamasına bağlandı. Yüksek oksijen konsantrasyonunda oluşan reaktif oksijen radikalleri kondrositlerin antioksidan kapasitesini aşabilir ve bu durum kondrosit ölümü ve matriks dejenerasyonu ile sonuçlanabilir [7]. Yüksek oksijen konsantrasyonu altında kondrositler tarafından matriks metalloproteinaz üretiminde artış, kollajen ve proteoglikan sentezinde azalma bildirilmiştir [216]. Aynı zamanda düşük oksijen konsantrasyonu altında mezankimal hücrelerin kondrojenik fenotip kazandıkları ve kondrositlerin tip II kollajen üretimini oksijenden fakir ortamda artırdıkları literatürde belirtilmiştir

[190, 217]. Çalışmamızda damarlanma açısından zengin olan kasta, hiyalin kıkırdak zaman içinde degrade olmuş, histolojik örneklerde coğrafik olarak yer yer kemikleşmeye rastlanmıştır.

Mezotelyum kökenli periton ve omentuma yerleştirilen osteokondral greftlerdeki kondrosit miktarlarının, kas ve paratenon grubuna göre daha iyi korunmuş olduğu görüldü. Omentum grubunun ortalama kondrosit değerlerinin yüksek olmasına rağmen, istatistiksel verilere göre anlamlı çıkmamasının nedeni olarak, örnek grubunun sayıca az olması düşünüldü. İntraabdominal bölgedeki greftlerin başarısını açıklamak için mezotelyumun da sinovya, plevra ve perikardiyum gibi mezankim kökenli olması ve esasen salgı yapan seröz membran yapısında olduğunu belirtmek gerekir [218]. Periton grubundaki kondrositlerin canlılığını sürdürebilmesine neden olarak mezotelyumun kendine ait biyoaktif molekül ve sinovyal doku gibi interstisyel sıvı salgılaması düşünülmektedir. Bu ortamın kondrositlere difüzyon için uygun çevre oluşturduğu düşünülebilir. Literatüre baktığımız zaman antienflamatuvar ve immün modülatör etkileri olan mezotelyal hücrelerin, TGF-B, IGF-1 ve FGF gibi birçok büyüme faktörünün ve metalloproteinaz inhibitörlerinin üretiminden sorumlu olduğu görülmektedir [56-59, 61]. Gotloib ve arkadaşlarının çalışmasında peritoneal mezotelyumdaki mezankimal kök hücre miktarının sinovyal sıvıda bulunan kök hücrelerden çok daha fazla sayıda olduğu belirtilmiştir [219]. Bizler de kondrosit canlılığının korunduğu örneklerde, mezotelyal hücrelerin kantitatif ve fonksiyonel olarak incelenmesinin, kıkırdak proliferasyonu ile bağlantılı olabileceği ve bu ilişkiyi değerlendirilmesinin ileride yapılacak çalışmalara zemin olacağını düşünmekteyiz. Ayrıca literatürde intraabdominal kötü huylu tümör veya sklerozan peritonit olmadan da periton dokusunun kıkırdak dokulara dönüşümü ile ilgili kanıtlar vardır [66-68]. Mezotelyal dokuların kondrogenetik potansiyellerinin anlaşılması için daha uzun dönemli çalışmalara gereksinim vardır. Birçok araştırma omentumu, hücrelerin büyümesi ve dokuların işlevlerine devam edebilmesi için kültür alanı olarak kullanmıştır. Splenik dokuların ve pankreatik adacıkların omentuma yerleştirildikten sonra fonksiyonlarına devam ettiği belirtilmiştir [77, 78]. Üç boyutlu skafoldlara

yerleştirilen hepatosit ve ince bağırsak hücrelerini, proliferetmek ve damarlanmanın sağlanması için in vivo olarak değişik dokulara yerleştirilmiş ve maksimum damarlanma omentumda sağlanmıştır [79, 220]. Embriyonik dokuların maturasyonu için de omentumun kullanımı gündeme gelmiş, embriyonik böbrek ve pankreas dokularının implantasyonunda başarılı sonuçlar alınmıştır [80, 81]. Omentumun in vivo inkübatör olarak kullanımı ve umut vaat edici sonuçları, omentumun hızlı bir şekilde dokulara damarlanma sağlaması ve omental damarların yerleştirilen dokuya adapte olabilme potansiyeline bağlanabilir. Çalışmamızda omentuma yerleştirilen greftlerin makroskopik olarak omental doku ile tamamen sarıldığı ve damarlanmasının zengin olduğu görülmüştür. Omentum greftlerinin canlılığı, omental mezotelyal yaprakların sinovya gibi seröz membran olmasına ve kıkırdak dokusunun beslenmesi için bu zengin kapiller ağına uygun difüzyon ortamı sağlamasına bağlanabilir. Aktive olmuş omentumda, normal omentuma göre daha fazla oranda VEGF, FGF, kemotaktik faktörler ve progenitör hücreler bulunmuştur [72]. Omentumun in vivo inkübatör olarak kullanımı in vitro ortamdaki uzun kültür süresini azaltabilir ve dokuların büyümesi için gerekli hacim, besin, oksijen ve biyoaktif molekül desteği sağlayabilir ancak omentum hücre spesifik bir ortam değildir. Bu nedenle kompleks dokuların rejenerasyonu yerine, kıkırdak dokusu gibi tek hücre tipine sahip dokuların inkübasyonunun daha kontrol edilebilir ve gerçekçi olacağı düşünülebilir [221]. Gelecekte hücre-skafold ünitelerinde hücrelerin beslenmesi ve proliferetmek için gerekli kapiller oluşumun sağlanmasında, omentumun yaşayan bir **biyoreaktör** olarak değerlendirilmesinin uygun olacağı inancındayız.

Literatürde bir ilki oluşturacak olan bu çalışmanın sonucu olarak mezotelyumun ve omentumun osteokondral greftlerin canlılıklarını sürdürülebilmesi için gerekli ortamı sağlayabildikleri gösterilmiştir.

Literatüre çalışmamızın yapacağı katkı ile mezotelyum ve omentum dokularının kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılabilecek, yaşayan bir **biyoreaktör** potansiyeline sahip olduğu öngörülebilir. Sonuç olarak eklem kıkırdak lezyonlarının tedavisinde, lezyonların hiyalin kıkırdak ile

rejenerasyonu ve tamir dokusunun çevre kıkırdağa entegrasyonu hedefine, otolog hücre bazlı tedaviler ile bir adım daha yaklaşıldığı görülmüştür.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Farklı etiyojilerden kaynaklanan eklem kıkırdak lezyonları klinikte sıklıkla karşımıza çıkmaktadır ve uygun şekilde tedavi edilmezlerse osteoartrit ile sonuçlanabilir. Günümüze kadar tarif edilmiş ve sıklıkla kullanılan tedavi yöntemleri henüz eklem kıkırdak lezyonlarının hiyalin kıkırdak ile rejenerasyonunu ve tamir dokusunun normal kıkırdak ile entegrasyonunu başaramamıştır. Bu nedenle doku mühendisliği prensipleri bu lezyonların tedavisinde uygulanmaya başlanmıştır. Doku mühendisliğinin başarılı olabilmesi için moleküler, hücresel ve fizyolojik olarak lezyonun biyolojik altyapısının anlaşılması gerekir. Doku mühendisliğini basitçe embriyonik başkalaşım basamaklarını taklit etmek şeklinde değerlendirmek yanlış olacaktır çünkü erişkin hücrelerin mikroçevresi embriyodan tamamen farklıdır ve çoğu işlemi başarısız kılacak aktif bir immün sistem bulunmaktadır [9].

Sadece kıkırdak lezyonlarının tek başına osteoartrite neden olabileceği fikri artık kabul görmemektedir. Osteoartrit kıkırdak lezyonlarına göre daha geniş coğrafik yayılım gösteren ve enflamatuvar doğaya sahip bir hastalıktır. Bu nedenle doku mühendisliği ile osteoartritte görülen kompleks geometriye sahip lezyonların tedavisi henüz akılcı görülmemektedir [222].

Kıkırdak lezyonlarının doku mühendisliği ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi için öncelikle uygun hücre kaynağı bulunmalıdır. Günümüzde araştırmalar farklı dokulardaki mezankimal hücreler, embriyonik hücreler ve erişkin kondrositler üzerinde yoğunlaşmıştır. Hücrelere kondrojenik fenotip kazandıracak ve proliferasyonunu sağlayacak uygun büyüme faktörlerinin ne zaman ve hangi konsantrasyonlarda verileceği henüz belli değildir ve standart protokoller henüz oluşmamıştır. Hücrelerin lezyonda tutunması ve büyümesi için uygun mikroçevre sağlayacak, aynı zamanda difüzyon için uygun poroziteye ve mekanik dayanıklılığa sahip skafoldların üretimi gerekmektedir. Son olarak mekanik ortamın, implante edilen hücrelerin kondrojenik diferansiasyonu için kilit rol oynadığı unutulmamalıdır.

Çalışmamız kas, omentum, periton ve aşil paratenonu dokularının canlılığının kendi kıkırdağının büyümesi ve kondrosit sayısı üzerine etkisini “in-

vivo” kültür ortamı olarak inceleyen ilk çalışma olarak kabul edilebilir. Osteokondral greftlerin omentum ve peritonda beş ay gibi uzun bir süre canlılıklarını koruyabilmesi bu bölgelerin kondrositlerin yaşaması için uygun biyolojik ortam oluşturduğunu gösterdi. Sinovyadan daha geniş bir alan, zengin büyüme faktörleri ve vaskülarite sağlayan bu bölgeler, son zamanlarda mezotelyal hücrelerin plastisite ve immün modülatör etkileri ile de araştırmalarda öne çıkmaktadır. Henüz aşılmamış bir sorun olan skafold içinde homojen beslenme problemini çözmek için hücre-skafold ünitelerine endotelizasyon sağlamak için bu bölgelerin kullanılabileceğini öngörebiliriz. Ayrıca in vivo olarak omentum ve periton üzerinden verilecek biyoaktif maddelerin zamanlama ve doz parametreleri göz önüne alınarak bu bölgelerin uygun birer in vivo inkübatör olarak kullanımı da gelecekte düşünülebilir.

Çalışmanın eksik yönleri arasında; kültür sahası olarak kullanılan dokuların kırıkta matriks üzerine olan etkileri immünohistokimyasal olarak incelenmemiş ve implante edilen greftlerin mekanik özellikleri değerlendirilmemiştir. Fakat bu çalışma ileride yapılabilecek mekanik ve immünohistokimyasal çalışmalara yönelik ilk basamağı teşkil edebilir.

Omentumun ve mezotelyumun ileride oto-biyoreaktör olarak kullanılması için nasıl bir altyapı oluşturulması gerektiğinin önemli mesajlardan biri olacağı inancındayız.

İnsanoğlu kendi kırıktağını kendi biyolojik ortamında geliştirir.

KAYNAKLAR

1. Buckwalter JA. Integration of science into orthopaedic practice: implications for solving the problem of articular cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:1-7.
2. Hunter W. Of the structure and diseases of articular cartilages. *Philos Trans R Soc London* 1743. 42: p. 514-521.
3. Keith A. The anatomical and physiological principles underlying the treatment of injuries to muscles, nerves, bones & joints. London: H. Frowde, Oxford University Press, 1919. The origin of our knowledge concerning articular cartilage in health and disease: p. 290-303.
4. Paget J. Healing of cartilage. *Classics of orthopaedics.* Philadelphia: Lippincott: p. 276-277.
5. Shelbourne KD, Jari S, Gray T. Outcome of untreated traumatic articular cartilage defects of the knee: a natural history study. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:8-16.
6. Fosang AJ, Beier F. Emerging Frontiers in cartilage and chondrocyte biology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2011;25:751-66.
7. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005;13:643-54.
8. Horton WE Jr, Feng L, Adams C. Chondrocyte apoptosis in development, aging and disease. *Matrix Biol.* 1998;17:107-15.
9. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospective. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:432-463.
10. Kessler MW, Grande DA. Tissue engineering and cartilage. *Organogenesis.* 2008;4: 28-32.
11. Nerem R, Sahe H, Kelley CA, McNicol LA. Symposium Summary. *AnnNYAcadSci,* 2002. 961: p. 386-91.

12. Langer R, Vacanti JP. *Tissue Engineering Science* 1993; p. 260.920-6.
13. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues. *Arthritis Rheum*, 2005; 52:8521-9.
14. Nerem RM. Cell-based therapies: from basic biology to replacement, repair, and regeneration. *Biomaterials*. 2007;28:5074-7.
15. Kim HT, Zaffagnini S, Mizuno S, et al. A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: Gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2006; 36:765-73.
16. Malaviya P, Nerem RM. Fluid-induced shear stress stimulates chondrocyte proliferation partially mediated via TGF- β 1. *Tissue Engineering Science*. 2002;8: 581-90.
17. Hu JC, Athanasiou KA. The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs. *Tissue Engineering Science*. 2006; 12:1337-44.
18. Hunter CJ, Imler SM, Malaviya P, et al. Mechanical compression alters gene expression and extracellular matrix synthesis by chondrocytes cultured in collagen I gels. *Biomaterials* 2002; 23:1249-59.
19. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331:889-895.
20. Bentley G, Biant LC, Carrington RW, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*. 2003; 85:223-230.
21. Cole BJ, D'amato M. Autologous chondrocyte implantation. *Operative Techniques in Orthopaedics*, 2001. 11(2): p. 115-131.

22. Caplan AI, Bruder SP., Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21th century. *Trends Mol Med.* 2001;7:259-264.
23. Barrie HJ. Intra-articular loose bodies regarded as organ cultures in vivo. *J Pathol.* 1978;125:163-169.
24. Chen J, Wang C, Lü S, et al. In vivo chondrogenesis of adult bone-marrow- derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2005; 319:419-438.
25. Saotome K, Tamai K, Koguchi Y, et al. Growth potential of loose bodies: an immunohistochemical examination of primary and secondary synovial osteochondromatosis. *Journal of Orthopaedic Research.*1999;17:73-79.
26. Bilge O, Doral MN, Atesok K, et al. The effects of the synovium on chondrocyte growth: an experimental study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:1214-23.
27. Grounds MD. Towards understanding skeletal muscle regeneration. *Path Res Pract* 1991;187:1-22.
28. Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philosophical Transactions Royal soc. B. Biological Sci.* 1998; 353:821-830.
29. Duffy FJ Jr, Seiler JG, Gelberman RH, et al. Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surgery Am.* 1995;20:645-649.
30. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology* Appleton and Lange, 1995. Eighth Edition: p. 124-131.
31. Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM. Cartilage Substitutes: Overview of Basic Science and Treatment Options. *J Am Acad Orthop Surg* . 2001;9:37-52.

32. Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol*. 1996;81:535-545.
33. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports Health*. 2009;1:461-468.
34. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage, part 1: tissue design and chondrocyte-matrix interaction. *J Bone Joint Surg Am*. 1997(79): p. 600-611.
35. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part I: basic science, historical perspective, patient evaluation and treatment options. *Am J Sports Med*. 2005; 33:295-306.
36. Buckwalter JA, Hunziker E, Rosenberg L, et al. Articular cartilage: composition and structure. In: Woo SLY, Buckwalter JA, eds. *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. Park Ridge, IL. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1988: p. 405-425.
37. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*.1992;13:67-97.
38. Maroudas A, Wachtel E, Grushko G, et al. The effects of osmotic and mechanical pressure on water and partitioning in articular cartilage. *Biochem Biophys Acta*. 1991;1073:285-294.
39. Linn FC, Sokoloff L. Movement and composition of interstitial fluid of cartilage. *Arthritis Rheum*.1965;8: 481-494.
40. Mow VC, Kuei SC, Lai WM, et al. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiments. *J Biomech Eng*. 1980;102:73-84.
41. Maroudas A. Physiochemical properties of articular cartilage. In: Freeman MAR, ed. *Adult Articular Cartilage*. Kent, United Kingdom: Cambridge University Press, 1979: p. 215-290.

42. Buckwalter JA, Rosenberg L, Hunziker EB. Articular Cartilage and Knee Joint Function: Basic Science and Arthroscopy. 1990. New York, NY: Raven Press.
43. Browne JE, Branch TP. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg.* 2000;8:180-189.
44. Roth V, Mow VC. The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg Am.* 1980;62:1102-1117.
45. Guilak F, Ratcliffe A, Lane N, et al. Mechanical and biochemical changes in the superficial zone of articular cartilage in canine experimental osteoarthritis. *J Orthop Res.*1994;12: 474-484.
46. Eggli PS, Herrmann W, Hunziker EB, et al. Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats. *Anat Rec.* 1985;211: 246-257.
47. Szirmai JA. Structure of cartilage. In: Engel A, Larsson T, eds. *Aging of Connective and Skeletal Tissue.* Stockholm, Sweden: Nordiska, 1969: p. 163-200.
48. Mow VC, Guo XE. Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies. *Annu Rev Biomed Eng.* 2002;4:175-209.
49. Di Paolo N, Sacchi G. Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int.*, 2000. 20(Suppl 3): p. 5-96.
50. Di Paolo N, Sacchi G, Del Vecchio MT, et al. State of art on autologous mesothelial transplant in animals and humans. *Int J Artif Organs.* 2007;30:456-476.
51. Wu YJ, Parker LM, Binder NE, et al. The mesothelial keratins: a new family of cytoskeletal proteins identified in cultured mesothelial cells and non keratinizing epithelia. *Cell.* 1982;31: 693-703.
52. Di Paolo N, Sacchi G. Anatomy and physiology of the peritoneal membrane. *Contrib Nephrol.* 1990;84:10-26.

53. Gotloib L, Shustak A, Bar-Sella P, et al. Heterogeneous density and ultrastructure of rabbit's peritoneal microvasculature. *Int J Artif Organs*. 1984;7:123-125.
54. Pfeiffer CJ, Pfeiffer DC, Misra HP. Enteric serosal surface in the piglet: a scanning and transmission electron microscopic study of the mesothelium. *J Submicrosc Cytol*. 1987;19: 237-246.
55. Mandl-Weber S, Cohen CD, Haslinger B, et al. Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*. 2002;61: 570-578.
56. Offner FA, Feichtinger H, Stadlmann S, et al. Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1. *Am J Pathol*. 1996;148:1679-1688.
57. Lee TC, Zhang Y, Aston C, et al. Normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines express insulin-like growth factor I and associated molecules. *Cancer Res*. 1993;53:2858-2864.
58. Kimura I, Sakamoto Y, Shibasaki M, et al. Release of endothelins and platelet-activating factor by a rat pleural mesothelial cell line. *Eur Respir J*. 2000;15:170-176.
59. Cronauer MV, Stadlmann S, Klocker H, et al. Basic fibroblast growth factor synthesis by human peritoneal mesothelial cells: induction by interleukin-1. *Am J Pathol*. 1999;155:1977-84.
60. Witkowicz J. Mesothelial cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn*. 2008;118:307-13.
61. Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(4): p. 621-42.
62. Herrick SE, Mutsaers SE. The potential of mesothelial cells in tissue engineering and regenerative medicine applications. *Int J Artif Organs*, 2007. 30;6:527-40.

63. Yang AH, Chen JY, Lin JK. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int.* 2003;63:1530-9.
64. Wada AM, Smith TK, Osler ME, et al. Epicardial/Mesothelial cell line retains vasculogenic potential of embryonic epicardium. *Circ Res.* 2003;92: 525-31.
65. Donna A, Betta PG. Differentiation towards cartilage and bone in a primary tumour of pleura. Further evidence in support of the concept of mesodermoma. *Histopathology.* 1986;10:101-8.
66. Lemeshev Y, Lahr CJ, Denton J, et al. Heterotopic bone formation associated with intestinal obstruction and small bowel resection. *Ala J Med Sci.* 1983;20: 314-317.
67. Wilson JD, Montague CJ, Salcuni P, et al. Heterotopic mesenteric ossification ("intraabdominal myositis ossificans"): report of five cases. *Am J Surg Pathol.* 1999;23:1464-1470.
68. Fadare O, Bifulco C, Carter D, et al. Cartilaginous differentiation in peritoneal tissues: A report of two cases and a review of the literature. *Mod Pathol.* 2002;15:777-780.
69. Wilkosz S, Ireland G, Khwaja N, et al. A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anat Embryol (Berl),* 2005;209:251-261.
70. Van Vugt E, Van Rijthoven EA, Kamperdijk EW, et al. Omental milky spots in the local immune response in the peritoneal cavity of rats. *Anat Rec.* 1996;244: 235-245.
71. Collins D, Hogan AM, O'Shea D, et al. The omentum: anatomical, metabolic, and surgical aspects. *J Gastrointest Surg.* 2009;13:1138-46.
72. Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, et al. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. *Cell Tissue Res* 2007;328:487-497.

73. Bikfalvi A, Alterio J, Inyang AL, et al. Basic fibroblast growth factor expression in human omental microvascular endothelial cells and the effect of phorbol ester. *J Cell Physiol* 1990;144:151-158.
74. Singh AK, Patel J, Litbarg NO, et al. Stromal cells cultured from omentum express pluripotent markers, produce high amounts of VEGF, and engraft to injured sites. *Cell Tissue Res.* 2008;332:81-88.
75. Maeda A, Ebata T, Kanemoto H, et al. Omental flap in pancreaticoduodenectomy for protection of splanchnic vessels. *World J Surg.* 2005;29:1122-1126.
76. Oloumi MM, Derakhshanfar A, Molaei M, Tayyebi M. The angiogenic potential of autogenous free omental graft in experimental tibial defects in rabbit: Short-term preliminary histopathological study. *J Exp Anim Sci*, 2006. 43(3): p. 179-187.
77. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM, et al. Regeneration of splenic autotransplants. *Ann Hematol*, 2002;81:622-626.
78. Kin T, Korbitt GS, Rajotte RV. Survival of islets in omental pouch. *Am J Transplant.* 2003;3: 281-5.
79. Lee H, Cusick RA, Utsunomiya H, et al. Effect of implantation site on hepatocytes heterotopically transplanted on biodegradable polymer scaffolds. *Tissue Engineering Science.* 2003;9:1227-1232.
80. Rogers SA, Lowell JA, Hammerman NA, et al. Transplantation of developing metanephroi into adult rats. *Kidney Int.* 1998;54:27-37.
81. Rogers SA, Liapis H, Hammerman MR. Normalization of glucose post-transplantation of pig pancreatic anlagen into non-immunosuppressed diabetic rats depends on obtaining anlagen prior to embryonic day 35. *Transpl Immunol.* 2005;14:67-75.
82. Alexander RM, Bennet-Clark HC. Storage of elastic strain energy in muscle and other tissues. *Nature.* 1977;265:114-17.

83. Jozsa L, Kannus P. Human tendon: anatomy, physiology and pathology. Champaign: Human Kinetics, 1997.
84. O'Brien M. The anatomy of the Achilles tendon. *Foot Ankle Clin.* 2005;10: 225-38.
85. Williams JG. Achilles tendon lesions in sport. *Sports Med.* 1986; 3:114-35.
86. Kvist M, Józsa L, Järvinen MJ, et al. Chronic Achilles paratenonitis in athletes: a histological and histochemical study. *Pathology.* 1987;19:1-11.
87. Paavola M, Kannus P, Järvinen TA, et al. Achilles tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84:2062-76.
88. James R, Kesturu G, Balian G,, et al. Tendon: Biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am.* 2008;33:102-112.
89. Ohberg L, Alfredson H. Ultrasound guided sclerosis of neovessels in painful chronic Achilles tendinosis: pilot study of a new treatment. *Br J Sports Med.* 2002;36:173-5.
90. Mienaltowski MJ, Adams SM, Birk DE. Regional differences in stem cell/progenitor cell populations from the mouse achilles tendon. *Tissue Eng Part A.* 2013;19:199-210.
91. Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports.* 2000;10: 321-325.
92. Kalimo H, Rantanen J, Järvinen M. Muscle injuries in sports. *Baillieres Clin Orthop,* 1997(2): p. 1-24.
93. Chargé SB, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004;84:209-238.

94. Dreyfus PA, Chretien F, Chazaud B, et al. Adult bone marrow–derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol.* 2004;164:773-779.
95. LaBarge MA, Blau HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell.* 2002;111:589-601.
96. Deasy BM, Huard J. Gene therapy and tissue engineering based on muscle- derived stem cells. *Curr Opin Mol Ther.* 2002;4:382-389.
97. Józsa L, Réffy A, Demel S, et al. Alterations of oxygen and carbon dioxide tensions in crush-injured calf muscles of rat. *Z Exp Chir.* 1980;13:91-94.
98. Järvinen TA, Järvinen TL, Kääriäinen M, et al. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med.* 2005;33:745-64.
99. Craig W, David JW, Ming HZ. A current review on the biology and treatment of the articular cartilage defects (part I & part II). *J Musculoskelet Res,* 2003. 7((3&4)): p. 157–181.
100. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patella. *J Bone Joint Surg Br.* 1961;43:752-757.
101. Bauer M, Jackson RW. Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy.* 1988;4:97-102.
102. Brittberg M, Winalski CS. Evaluation of cartilage injury and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:58-69.
103. Tew SR, Kwan AP, Hann A, et al. The reactions of articular cartilage to experimental wound- ing: Role of apoptosis. *Arthritis Rheum.* 2000;43: 215-225.
104. Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair. *Clin Orthop and Rel Res,* 2001(391(suppl)): p. S108-S115.
105. Nehrer S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop.* 1999;365:149-162.

106. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, et al. Articular Cartilage Biology. *J Am Acad Orthop Surg*. 2003;11: 421-430.
107. Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, et al. Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med*. 1998;26:853-861.
108. Messner K, Maletius W. The long-term prognosis for severe damage to weight-bearing cartilage in the knee: A 14-year clinical and radiographic follow-up in 28 young athletes. *Acta Orthop Scand*. 1996;67:165-168.
109. Dye SF, Chew MH. The use scintigraphy to detect increased osseous metabolic activity about the knee. *Instr Course Lect*. 1994;43: 453-469.
110. Chung CB, Frank LR, Resnick D. Cartilage imaging techniques: current clinical applications and state of the art imaging. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;391:370-378.
111. Bashir A, Gray ML, Boutin RD, et al. Glycosaminoglycan in articular cartilage: in vivo assessment with delayed Gd(DPTA)(2-)-enhanced MR imaging. *Radiology*. 1997;205:551-558.
112. Krishnan SP, Skinner JA, Bartlett W, et al. Who is the ideal candidate for autologous chondrocyte implantation ? *J Bone Joint Surg Br*. 2006; 88:61-64.
113. Coventry MB. The effect of axial alignment of the lower extremity on articular cartilage of the knee. in : Ewing JW (ed). *Articular Cartilage and Knee Joint Function*. Raven Press, New York, 1990: p. 311-317.
114. Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, et al. Present status and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:115-122.
115. Outerbridge HK, Outerbridge AR, Outerbridge RE. The use of a lateral patellar autologous graft for the repair of a large osteochondral defect in the knee. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:65-72.

116. Ochi M, Uchio Y, Tobita M, et al. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial organs*. 2001;25:172-179.
117. Heybeli N, Doral MN, Atay OA, et al. Intra- articular sodium hyaluronate injections after arthroscopic debridement for osteoarthritis of the knee: a prospective, randomized, controlled study. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2008;42:221-227.
118. Brief AA, Maurer SG, Di Cesare PE. Use of glucosamine and chondroitin sulfate in the management of osteoarthritis. . *J Am Acad Orthop Surg*. 2001;9:71-78.
119. Watterson JR, Esdaile JM. Viscosupplementation: therapeutic mechanisms and clinical potential in osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg*. 2000;8:277-84.
120. Trigkilidas D, Anand A. The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain. *Ann R Coll Surg Engl*. 2013;95:545-51.
121. Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. *Acta Orthop Belg*. 2011;77:709-726.
122. Owens BD, Stickles BJ, Balikian P, et al. Prospective analysis of radiofrequency versus mechanical debridement of isolated patellar chondral lesions. *Arthroscopy*. 2002;18:151-155.
123. Tetik O, Doral MN, Atay AO, et al. Influence of irrigation solutions combined with colchicine and diclofenac sodium on articular cartilage in a rat model. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2004;12:503-509.
124. Doral MN. Artroskopik yıkama sıvısında kullanılan kolşisin ve diklofenak sodyum'un diz eklemi erken dejeneratif artritindeki etkileri. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 1990(24): p. 38-42.
125. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty. 1996(In: McGinty JB, Caspari RB, Jackson RW, Poehling GG (eds) *Operative arthroscopy*, 2nd edn. Philadelphia, Lippincott-Raven): p. 427-446.

126. Pride AH. The method of resurfacing osteoarthritic knee. *J Bone Joint Surg [Br]*, 1959(41): p. 618-623.
127. Steadman JR, Rodkey WG, Singleton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results. *Operat Tech Orthop*, 1997(7): p. 300-307.
128. Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, et al. Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy*. 2006;11:1180-1186.
129. Benthien JP, Behrens P. Autologous matrix-induced chondrogenesis (AMiC) : combining microfracture and a collagen i/iii matrix for articular cartilage resurfacing. *Cartilage*. 2010;1:65-68.
130. Gille J, Schuseil E, Wimmer J, et al. Mid- term results of autologous matrix-induced chondrogenesis for treatment of focal cartilage defects in the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010;18:1456-1464.
131. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, et al. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*. 1998;21:751-756.
132. Hangody L, Kish G, Karpati Z. Osteochondral plugs: autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of focal chondral and osteochondral articular defects. *Operat Tech Orthop*, 1997(7): p. 312.
133. Huntley JS, Bush PG, McBirnie JM, et al. Chondrocyte death associated with human femoral osteochondral harvest as performed for mosaicplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87:351-360.
134. Marcacci M, Kon E, Delcogliano M, et al. Arthroscopic autologous osteochondral grafting for cartilage defects of the knee: prospective study results at a minimum 7-year follow-up. *Am J Sports Med*. 2007;35:2014-21.
135. Seo SS, Kim CW, Ha DJ, Choi JS, Kim HJ, Lee CR., Autogenous osteochondral grafting for treating osteochondral defect of the femoral

- condyle of the knee joint. *J Korean Orthop Assoc.*, 2009(44): p. 301-310.
136. Hangody L, Ráthonyi GK, Duska Z, et al. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2004; 86:65-72.
 137. Falah M, Nierenberg G, Soudry M, et al. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *Int Orthop.* 2010;34:621-30.
 138. Cole BJ, Pascual-Garrido C, Grumet RC. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91: 1778-1790.
 139. Pallante AL, Chen AC, Ball ST, et al. The in vivo performance of osteochondral allografts in the goat is diminished with extended storage and decreased cartilage cellularity. *Am J Sports Med.* 2012;40:1814-1823.
 140. Bugbee WD, Convery FR. Osteochondral allograft transplantation. *Clin Sports Med.* 1999;18:67-75.
 141. Sherman SL, Garrity J, Bauer K, et al. Fresh osteochondral allograft transplantation for the knee: current concepts. *J Am Acad Orthop Surg.* 2014;22:121-33.
 142. Grande DA, Pitman MI, Peterson L, et al. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 1989;7: 208-218.
 143. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, et al. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med.* 2002;30:2-12.
 144. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, et al. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 1997;79:1439-51.

145. Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res.* 2000;374:212-34.
146. Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res.* 1999;367:147-55.
147. Steinwachs M, Kreuz PC. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy.* 2007;23:381-7.
148. Hettrich CM, Crawford D, Rodeo SA. Cartilage repair: third-generation cell-based technologies--basic science, surgical techniques, clinical outcomes. *Sports Med Arthrosc.* 2008;16:230-235.
149. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am.* 2007;89:2105-12.
150. Saris DB, Vanlauwe J, Victor J, et al. Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med.* 2008;36:235-46.
151. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, et al. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85:185-192.
152. Clar C, Cummins E, McIntyre L, et al. Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess.* 2005;9:1-82.
153. Pelttari K, Lorenz H, Boeuf S, et al. Secretion of matrix metalloproteinase 3 by expanded articular chondrocytes as a predictor of ectopic cartilage formation capacity in vivo. *Arthritis Rheum.* 2008; 58:467-474.

154. Behrens P, Bitter T, Kurz B, et al. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI) - 5 year follow-up. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;13:194-202.
155. Kessler MW, Ackerman G, Dines JS, et al. Emerging technologies and fourth generation issues in cartilage repair. *Sports Med Arthrosc.* 2008;16:246-254.
156. Gates CB, Karthikeyan T, Fu F, et al. Regenerative medicine for the musculoskeletal system based on muscle-derived stem cells. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16:68-76.
157. Magne D, Vinatier C, Julien M, et al. Mesenchymal stem cell therapy to rebuild cartilage. *Trends Mol Med.* 2005;11:519-526.
158. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature.* 1999;401:390-394.
159. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2003;69:250–256.
160. Bi Y, Ehrchiou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *J Nat Med.* 2007;13:1219-1227.
161. Deasy BM, Jankowski RJ, Huard J. Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. *Blood Cells Mol Dis.* 2001;27:924-933.
162. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering Science.* 2001;7:211-228.
163. Yokoyama A, Sekiya I, Miyazaki K, et al. In vitro cartilage formation of composites of synovium-derived mesenchymal stem cells with collagen gel. *Cell Tissue Res.* 2005;322:289-98.

164. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, et al. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem.* 2006;97:84-97.
165. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2521-2529.
166. Li Q, Tang J, Wang R, et al. Comparing the chondrogenic potential in vivo of autogeneic mesenchymal stem cells derived from different tissues. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2011;39: 31-8.
167. Helder MN, Knippenberg M, Klein-Nulend J, et al. Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine. *Tissue Engineering Science.* 2007;13:1799-1808.
168. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 2007;327: 449-462.
169. Chong PP, Selvaratnam L, Abbas AA, et al. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2012;30:634-642.
170. Cesselli D, Beltrami AP, Rigo S, et al. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circ Res.* 2009;104:1225-1234.
171. Safran MR, Kim H, Zaffagnini S. The use of scaffolds in the management of articular cartilage injury. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16:306-11.
172. Kim HT¹, Zaffagnini S, Mizuno S, et al. A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2006;36:765-773.

173. Barnes CP, Sell SA, Boland ED, et al. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1413-1433.
174. Chou CH, Cheng WT, Lin CC, et al. TGF-beta1 immobilized tri-co-polymer for articular cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;77:338-48.
175. Zehbe R, Libera J, Gross U, et al. Short-term human chondrocyte culturing on oriented collagen coated gelatine scaffolds for cartilage replacement. *Biomed Mater Eng.* 2005;15:445-454.
176. Fortier LA, Barker JU, Strauss EJ, et al. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469:2706-2715.
177. Fortier LA, Lust G, Mohammed HO, et al. Coordinate upregulation of cartilage matrix synthesis in fibrin cultures supplemented with exogenous insulin-like growth factor-I. *J Orthop Res.* 1999;17:467-74.
178. Hatakeyama Y, Tuan RS, Shum L. Distinct functions of BMP4 and GDF5 in the regulation of chondrogenesis. *J Cell Biochem.* 2004;91:1204-17.
179. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, et al. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2011;19:528-535.
180. Kon E, Buda R, Filardo G, et al. Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18:472-479.
181. Sheth U, Simunovic N, Klein G, et al. Efficacy of autologous platelet-rich plasma use for orthopaedic indications: a meta-analysis. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:298-307.
182. Heyde M, Partridge KA, Oreffo RO, et al. Gene therapy used for tissue engineering applications. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59:329-350.

183. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:339-359.
184. Ha CW, Noh MJ, Choi KB, et al. Initial phase I safety of retrovirally transduced human chondrocytes expressing transforming growth factor-beta-1 in degenerative arthritis patients. *Cytotherapy.* 2012;14:247-56.
185. Tuan RS, Chen AF, Klatt BA. Cartilage regeneration. *J Am Acad Orthop Surg.* 2013; 21:303-11.
186. Silver IA. Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1975;271:261-72.
187. Afoke NY, Byers PD, Hutton WC. Contact pressures in the human hip joint. *J Bone Joint Surg Br.* 1987;69:536-41.
188. Hu JC, Athanasiou KA. The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs. *Tissue Eng.* 2006;12:1337-44.
189. Malaviya P, Nerem RM. Fluid-induced shear stress stimulates chondrocyte proliferation partially mediated via TGF-beta1. *Tissue Eng.* 2002;8:581-90.
190. Domm C, Schünke M, Christesen K, et al. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10:13-22.
191. Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, et al. State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: A focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5:36-51.
192. Sargon MF, Mas N, Senan S, et al. Quantitative analysis of myelinated axons of commissural fibers in the rat brain. *Anat Histol Embryol.* 2003;32:141-144.

193. Sargon MF, Celik HH, Kapakin S, et al. Quantitative analysis of myelinated axons of commissural fibers in the cat brain. *Neurosciences*. 2004;9: 447-451.
194. Sargon MF, Celik HH, Aksit MD, et al. Quantitative analysis of myelinated axons of corpus callosum in the human brain. *Intern J Neuroscience*. 2007;117:749-755.
195. Curl WW, Krome J, Gordon ES, et al. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 1997;13:456-460.
196. Safran MR, Seiber K. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee. *J Am Acad Orthop Surg*. 2010;18:259-66.
197. Maletius W, Messner K. The effect of partial meniscectomy on the long-term prognosis of knees with localized, severe chondral damage. A twelve-to- fifteen-year followup. *Am J Sports Med*. 1996;24:258-262.
198. Essner A, Herrera L, Hughes P, et al. The influence of material and design on total knee replacement wear. *J Knee Surg*. 2011;24:9-17.
199. Naudie DD, Ammeen DJ, Engh GA, et al. Wear and osteolysis around total knee arthroplasty. *J Am Acad Orthop Surg*. 2007;15:53-64.
200. Batty L, Dance S, Bajaj S, et al. Autologous chondrocyte implantation: an overview of technique and outcomes. *ANZ J Surg*. 2011;81:18-25.
201. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, et al. Cartilage tissue engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol*. 2006;18:64-73.
202. Frenkel SR, Toolan B, Menche D, et al. Menche D, Pitman MI, Pachence JM., Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*. 1997;79:831-836.
203. Crawford DC, DeBerardino TM, Williams RJ 3rd. NeoCart, an autologous cartilage tissue implant, compared with microfracture for treatment of distal femoral cartilage lesions: an FDA phase-II prospective, randomized clinical trial after two years. *J Bone Joint Surg Am*. 2012,94:979-89.

204. Guzzo RM, Gibson J, Xu RH, et al. Efficient differentiation of human iPSC-derived mesenchymal stem cells to chondropro- genitor cells. *J Cell Biochem.* 2013;114:480-490.
205. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1187-1194.
206. Keller G. Embryonic stem cell differentiation: Emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev.* 2005;19:1129-1155.
207. Yamashita A, Liu S, Woltjen K, et al. Cartilage tissue engineering identifies abnormal human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2013;3:1978-1983.
208. Matsumoto T, Kubo S, Meszaros LB, et al. The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells: implications for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3809-3819.
209. Kannus P, Józsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am.* 1991;73:1507-25.
210. Vailas AC, Tipton CM, Laughlin HL, et al. Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1978;44:542-6.
211. Floridi A, Ippolito E, Postacchini F. Age-related changes in the metabolism of tendon cells. *Connect Tissue Res.* 1981;9:95-7.
212. Wren TA, Yerby SA, Beaupré GS, et al. Mechanical properties of the human achilles tendon. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2001;16: 245-51.
213. Lee DA, Bader DL. Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. *J Orthop Res.* 1997;15:181-8.

214. Valhmu WB, Stazzone EJ, Bachrach NM, et al. Load-controlled compression of articular cartilage induces a transient stimulation of aggrecan gene expression. *Arch Biochem Biophys.* 1998;353:29-36.
215. Kamineni S et al. Chondrocyte response to tensile and compressive cyclic loading modalities. *Journal of Musculoskeletal Research*, 2012. 15(01): p. 1250006.
216. Ströbel S, Loparic M, Wendt D, et al. Anabolic and catabolic responses of human articular chondrocytes to varying oxygen percentages. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R34.
217. Babur BK, Ghanavi P, Levett P, et al. The interplay between chondrocyte redifferentiation pellet size and oxygen concentration. *PLoS One.* 2013;8:e58865.
218. Dobbie JW. Serositis: Comparative analysis of histological findings and pathogenetic mechanisms in non bacterial serosal inflammation. *Perit Dial Int.* 1993;13:256-269.
219. Gotloib L, Gotloib LC, Khrizman V. The use of peritoneal mesothelium as a potential source of adult stem cells. *Int J Artif Organs.* 2007;30:501-12.
220. Levin DE, Sala FG, Barthel ER, et al. A "living bioreactor" for the production of tissue-engineered small intestine. *Methods Mol Biol.* 2013;1001:299-309.
221. Suh S, Kim J, Shin J, et al. Use of omentum as an in vivo cell culture system in tissue engineering. *Asaio J.* 2004;50:464-7.
222. Mobasher A, Kalamegam G, Musumeci G, et al. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas.* 2014;78:188-198.