



T.C.

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**EKLEM KIKIRDAK DEFEKTLERİNE
HÜCREDEN ARINDIRILMIŞ İNSAN PLASENTASI
BİYOÇATISI, MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE PRP
KOMBİNASYONLARININ UYGULANMASI İLE HİSTOLOJİK
İYİLEŞMENİN DEĞERLENDİRİLMESİ - SIÇAN MODELİ**

Dr. Erdi ÖZDEMİR

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

2019

ANKARA



T.C.

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**EKLEM KIKIRDAK DEFEKTLERİNE
HÜCREDEN ARINDIRILMIŞ İNSAN PLASENTASI
BİYOÇATISI, MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE PRP
KOMBİNASYONLARININ UYGULANMASI İLE HİSTOLOJİK
İYİLEŞMENİN DEĞERLENDİRİLMESİ - SIÇAN MODELİ**

Dr. Erdi ÖZDEMİR

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Egemen TURHAN

2019

ANKARA

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi sürecimde üzerimde emeği bulunan ve desteklerini esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. A. Mazhar Tokgözoğlu olmak üzere bütün öğretim üyesi hocalarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez danışmanım olan Prof. Dr. Egemen Turhan'a bana bu değerli tez konusunu vermesinin yanında uzmanlık eğitimimde verdiği katkılardan dolayı çok teşekkür ederim.

Çalışma sürecinde ve özellikle çalışmanın cerrahi bölümünde yardımını esirgemeyen Dr. Abdülsamet Emet'e, zaman ayırıp çalışmada bana yardımcı olan mesai arkadaşlarım Dr. Rıza Mert Çetik, Dr. Cem Çaylı, Dr. Zirvecan Güneş, Dr. Ozan Tuncay'a ve 5 yıllık Ortopedi ve Travmatoloji uzmanlık eğitim sürecimde beraber çalıştığım bütün araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmanın; kök hücre ayağının gerçekleştirilmesini sağlayan Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya ve Uzm. Biyolog Emine Kılıç'a, histoloji ayağını tamamlanmasını sağlayan Prof. Dr. Ali Celalettin Sinan Yürüker ve Uzm. Dr. Ramin Hashimi'ye teşekkür etmek isterim.

Benim bu günlere gelmemde maddi ve manevi büyük emekleri bulunan annem Şükran Özdemir, babam Mehmet Özdemir ve kardeşim Sevgi Esra Özdemir'e, iyi günde kötü günde hep yanımda olan sevgili eşim Dr. Fethiye Damla Menkü Özdemir'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ÖZDEMİR E. Eklem Kıkırdak Defektlerine Hücreden Arındırılmış İnsan Plasentası, Mezenkimal Kök Hücre ve PRP Kombinasyonlarının Uygulanması ile Histolojik İyileşmenin Değerlendirilmesi - Sıçan Modeli-. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Tezi, Ankara 2019. Eklem kıkırdağı hiyalin kıkırdak yapısında olup hasar gördüğü zaman iyileşme kapasitesi oldukça düşük bir dokudur. Henüz optimal bir tedavi yöntemi tanımlanmış olmasa da doku mühendisliği çalışmaları kıkırdak defektleri tedavisinde umut vaat etmektedir. Bu amaçla hücreden arındırılmış insan plasentasının kıkırdak defektlerinin iyileşmesinde etkili bir biyoçatı olabileceği hipotez edilmiştir. Bu etkinin mezenkimal kök hücre ve PRP eklenmesi ile arttırılacağı öngörülmüştür. Etik kurul onayı alınarak çalışmamız sıçan modeli olarak tasarlandı. Denekler her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Bütün gruplarda her iki dize troklea bölgesine 2mm çapında osteokondral defekt oluşturuldu. Kontrol (K) grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. P grubuna sadece hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısı, PK grubuna plasenta biyoçatısı ile birlikte 10^6 mezenkimal kök hücre, PP grubuna plasenta biyoçatısı ile birlikte PRP, PKP grubuna ise plasenta biyoçatısı, 10^6 mezenkimal kök hücre ve PRP birlikte uygulandı. Sıçanlar 12 hafta takip sonrası ötenazi edilerek iyileşme International Cartilage Repair Score-2 skorlama sistemi kullanılarak histolojik olarak incelendi. Veriler istatistiksel olarak incelendiğinde tüm deney gruplarının skorları kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). PKP grubunun skorları deney grupları arasında en yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Elde ettiğimiz sonuçlara göre kıkırdak defektleri iyileşmesinde hücreden arındırılmış insan plasentası etkili bir biyoçatıdır. Plasenta biyoçatısının etkinliği mezenkimal kök hücre ve PRP eklenmesi ile artırılabilir. En fazla etki plasenta biyoçatısı ile birlikte mezenkimal kök hücre ve PRP eklenmesi durumunda görülebilir.

Anahtar Kelimeler: Kıkırdak Defekti, Hücreden Arındırılmış İnsan Plasentası Biyoçatısı, Mezenkimal Kök Hücre, PRP

ABSTRACT

ÖZDEMİR E. Evaluation of Histological Healing of the Articular Cartilage Defects with Application of Decellularised Human Placenta Scaffold, Mesenchymal Stem Cells and PRP Combinations - Rat Model-. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Orthopaedics and Traumatology, Ankara 2019. The articular cartilage is of a hyaline cartilage structure and the healing capacity is very poor when it is damaged. Although an optimal treatment method has not been defined, tissue engineering studies are promising in the treatment of cartilage defects. For this purpose, it has been hypothesized that the decellularized human placenta may be an effective scaffold in repairing of cartilage defects. Its effect could be increased by the addition of mesenchymal stem cells and PRP. Our study was designed as rat model after approval of the ethics committee. The subjects were divided into 5 groups of 7 animals in each group. In all groups, 2 mm diameter osteochondral defect was formed in trochlea regions of their knee, bilaterally. No additional procedure was performed in Control (K) group. Only the decellularized human placenta scaffold was applied to the P group, together with the placental scaffold 10^6 mesenchymal stem cells was applied to the PK group, together with the placental scaffold PRP was applied to the PP group and together with the placental scaffold, 10^6 mesenchymal stem cells and PRP was applied to the PKP group. Rats were histologically evaluated with International Cartilage Repair Score-2 after they were euthanized following 12 weeks of follow-up. After the statistical analysis of the data, the scores of all experimental groups were significantly higher than the control group ($p < 0.05$). The scores of the PKP group were the highest among the experimental groups but not statistically significant ($p > 0.05$). According to our results, the decellularized human placenta is an effective scaffold in the healing of cartilage defects. The efficacy of the placental scaffold can be increased by the addition of mesenchymal stem cells and PRP. The maximal effect can be observed with addition of mesenchymal stem cells and PRP together in combination with placental scaffold.

Key Words: Cartilage Defect, Decellularised Human Placenta Scaffold, Mesenchymal Stem Cell, PRP

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Eklem kıkırdağı	2
2.1.1. Eklem kıkırdağının yapısı ve bileşenleri	3
2.1.2. Eklem Kıkırdağı Tabakaları	5
2.1.3. Eklem Kıkırdağı Metabolizması	7
2.1.4. Eklem Kıkırdağı Biyomekaniği	8
2.2. İnsan Plasentası	9
2.2.1. İnsan Plasentası Yapısı	9
2.2.2. İnsan Plasentası Hücreden Arındırılması ve Kullanım Alanları	10
2.3. Biyoçatı	11
2.4. Kök Hücre ve Uygulamaları	13
2.5. Trombositten Zengin Plazma (PRP)	15
2.6. Eklem Kıkırdağı Yaralanması	18
2.6.1. Kıkırdak Yaralanmalarının Sınıflandırılması	18
2.6.2. Kıkırdağın Yaralanmaya Yanıtı ve Doğal Seyri	20
2.6.3. Eklem Kıkırdağı Lezyonları Tedavisi	22

2.6.3.1. Konservatif Yöntemler	22
2.6.3.2. Cerrahi Yöntemler	23
2.6.3.2.1. Palyatif Yöntemler	23
2.6.3.2.2. Onarıcı (Reperatif) Yöntemler	24
2.6.3.2.3. Canlandırıcı (Rejeneratif/Restoratif) Yöntemler	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Plasentanın hücreden arındırılması	30
3.2. Kök Hücrelerin Üretilmesi	34
3.2.1. Mezenkimal kök hücre izolasyonu ve kültürde çoğaltılması	34
3.2.2. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi (Akım Sitometri Çalışması)	34
3.2.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesi	35
3.2.4. Mezenkimal kök hücre morfolojisi ve çoğalma özellikleri	36
3.2.5. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi	36
3.2.6. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesi	37
3.3. Trombositten Zengin Plazma (PRP) Hazırlanması	39
3.4. Cerrahi işlem	41
3.4.1. Anestezi Uygulanışı	41
3.4.2. Cerrahi Prosedür	41
3.5. Cerrahi İşlem Sonrası Takip ve Ötenazi	45
3.6. Histolojik İnceleme	46
3.7. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

BMP	<i>Bone morphogenic protein</i> (Kemik morfojenik protein)
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
CO ₂	Karbondioksit
DMEM-1g	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium - Low glucose</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAse	Deoksiribonükleik asit yıkıcı enzim
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> (Epidermal büyüme faktörü)
FBS	<i>Fetal bovine solution</i> (Fetal bovin solüsyonu)
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Fibroblast büyüme faktörü)
gr	Gram
HA	Hidroksiapetit
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> (İnsan lökosit antijeni)
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
ICRS-2	<i>International cartilage repair score-2</i>
ICST	<i>International society for cell therapy</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor</i> (İnsulin benzeri büyüme faktörü)
IL	Interlökin

K	Kontrol grubu
kg	Kilogram
L-PRF fibrin)	<i>Leucocyte and platelet rich fibrin</i> (Lökosit ve trombosit zengin)
L-PRP plazma)	<i>Leucocyte and platelet rich plasma</i> (Lökosit ve trombosit zengin)
mg	Miligram
MKH	Mezenkimal kök hücre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
nM	Nanomol
NO	Nitrik oksit
°C	Santigrat derece
P	Hücreden arındırılmış insan plasentası grubu
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> (Trombosit kaynaklı büyüme faktörü)
PGA	Poliglikolik asit
pH	<i>Power of hydrogen</i>
PK	Hücreden arındırılmış insan plasentası + Mezenkimal kök hücre grubu
PKP PRP grubu	Hücreden arındırılmış insan plasentası + Mezenkimal kök hücre +
PLLA	Poli-L-laktik asit

PP	Hücreden arındırılmış insan plasentası + PRP grubu
P-PRF	<i>Pure platelet rich fibrin</i> (Sadece trombositen zengin fibrin)
P-PRP	<i>Pure platelet rich plasma</i> (Sadece trombositen zengin plazma)
PRP	<i>Platelet rich plasma</i> (Trombositen zengin plazma)
RNA	Ribonükleik asit
RNAse	Ribonükleik asit yıkıcı enzim
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCP	Trikalsiyum fosfat
TGF-B	<i>Transforming growth factor</i> (Dönüştürücü büyüme faktörü)
TNF-a	<i>Tissue necrosis factor-a</i> (Doku nekroz faktörü-a)
uG	Mikrogram
uM	Mikromol
USA	<i>United States of America</i> (Amerika Birleşik Devletleri)
VEGF faktörü)	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Vasküler endotelial büyüme faktörü)
W/V	<i>Weight/volume</i> (Ağırlık/hacim)

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 2.1. Eklem kırırdağı ekstraselüler matriks bileşenleri.	5
Şekil 2.2. Eklem kırırdağı tabakaları - tabakalara göre kollajen ve kondrositlerin dizilimi.	7
Şekil 2.3. Outerbridge sınıflaması.	19
Şekil 2.4. ICRS sınıflaması.	20
Şekil 2.5. Tedavi yöntemlerinin sonuçlarının kesişimi.	22
Şekil 2.6. Biyomühendislik triadı.	28
Şekil 3.1. Dokuların PBS içerisinde 24 saat boyunca yıkanması.	30
Şekil 3.2. Dokuların %1 (w/v)'lik SDS içerisinde 24 saat boyunca çalkalanması.	31
Şekil 3.3. Dokuların izopropanol içerisinde bekletilmesi.	31
Şekil 3.4. Dokulardan DNA ve RNA'ların uzaklaştırılması.	32
Şekil 3.5. Dokuların PBS ile yıkanması.	32
Şekil 3.6. Hücreden arındırılmış yapıların petri kaplarına dökülmesi.	33
Şekil 3.7. Hücreden arındırılmış yapıların liyofilize edilmesi	33
Şekil 3.8. Kültür ortamında çoğalan mezenkimal kök hücrelerin " <i>inverted</i> " mikroskoptaki görünümü.	36
Şekil 3.9. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi.	37
Şekil 3.10. Osteojenik vasat içinde uyarılan mezenkimal kök hücrelerin görünümü.	38
Şekil 3.11. Adipojenik vasat içinde uyarılan mezenkimal kök hücrelerin görünümü.	38
Şekil 3.12. Sıçandan intra-kardiyak kan alınması.	39
Şekil 3.13. Alınan kanın 1 ml sodyum glukonat ile karıştırılması.	40
Şekil 3.14. 5 dakika boyunca 1200 devirde santrifüj edilmesi.	40

Şekil 3.15. 1200 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra kapağının takılarak kullanıma hazırlanması.	41
Şekil 3.16. Diz anteriorundan yapılan insizyon.	42
Şekil 3.17. 2mm drill yardımı ile troklea bölgesine açılan osteokondral defekt.	42
Şekil 3.18. Petri kabının içerisinde uygun boyutlarda kesilmiş hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısı ve enjektör içerisinde 10^6 mezenkimal kök hücre.	43
Şekil 3.19. Petri kabı içerisinde hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısı ve mezenkimal kök hücrenin birleştirilmesi.	44
Şekil 3.20. Hücreden arındırılmış insan plasentasının mezenkimal kök hücre ile birleştirildikten sonra osteokondral defekte uygulanmış hali.	44
Şekil 3.21. Ötenazi sonrası uyluk anteriorundan yapılan insizyon ve uyluk kemiğinin diz ve kalça eklemlerinden dezartikülasyonu.	45
Şekil 3.22. ICRS-2 Toplam değerlendirme skoru, 0% fibröz doku. 100% hiyalin kırkırdak.	46
Şekil 4.1. Toplam değerlendirme skorlarının gruplara göre dağılımı.	48
Şekil 4.2. Kontrol grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.	50
Şekil 4.3. K grubu 10x büyütme.	50
Şekil 4.4. P grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.	51
Şekil 4.5. P grubu 10x büyütme.	52
Şekil 4.6. PK grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.	53
Şekil 4.7. PK grubu 10x büyütme.	53
Şekil 4.8. PP grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.	54
Şekil 4.9. PP grubu 10x büyütme.	55

Şekil 4.10. PKP grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması
2.5x büyütme. 55

Şekil 4.11. PKP grubu 10x büyütme. 56

TABLULAR

	Sayfa No
Tablo 3.1. Gruplara göre cerrahi işlem planlanan diz sayıları.	29
Tablo 4.1. Kontrol ve Deney gruplarının histolojik analiz skorları ortalamaları.	47
Tablo 4.2. Kontrol ve Deney gruplarının histolojik analiz skorlarının sıra ortalamaları.	48
Tablo 4.3. Toplam değerlendirme skorlarının gruplara göre istatistiksel analizi.	49

1. GİRİŞ

Eklem kıkırdağı defektleri ortopedi pratiğinde sık görülen bir sorundur. Çoğunlukla travmaya veya dejeneratif sürece bağlı oluşur[1]. Eklem ağrısı, fonksiyon kaybı ve eklem dejenerasyonu ile sonuçlanır. Bu sorunun tedavisi uzun bir süreci kapsamaktadır ve çoğu zaman istenilen başarı ile sonlanmamaktadır[2]. Semptomatik eklem kıkırdağı defektlerinin tedavisi; lezyonun yeri, büyüklüğü ve sayısına göre değişkenlik göstermektedir. Tedavi seçenekleri arasında otolog osteokondral greft transferi, mikrokirik uygulama gibi kemik iliği stimülasyon teknikleri bulunmaktadır[3]. Bu yöntemlerin uzun dönem sonuçlarının iyi olmaması sebebiyle eklem kıkırdağının rejenerasyonunu hedefleyen biyolojik yöntemler araştırılmaktadır[2].

Eklem kıkırdağı histolojik olarak hiyalin kıkırdaktan oluşmaktadır[4]. Kıkırdak yapısı içerisinde damarlanma ve innervasyon olmadığından rejenerasyon kapasitesi oldukça düşüktür[5]. Eğer kıkırdak hasarı subkondral kemiğe ulaşır ise kanlanma sağlanacağı için iyileşme ihtimali artar. Fakat bu iyileşme fibröz kıkırdak şeklinde olur ve dayanıklılığı hiyalin kıkırdağa göre daha düşüktür[6]. Bu yüzden daha dayanıklı olan hiyalin kıkırdak ile iyileşme tedavinin temel amacı olmalıdır.

Eklem kıkırdağının rejenerasyon kapasitesini artırmaya yönelik biyolojik çalışmalar sürmektedir. Bu amaçla kemik iliği, yağ doku, sinovyum, periferik kan ve umbilikal korddan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere dönüşebildiği gösterilmiştir[7]. Başka bir yöntem olarak kıkırdak defektlerine çeşitli materyallerden yapılan biyoçatılar (skafoldlar) uygulanarak rejenerasyon üzerine çalışılmıştır. Biyoçatılar kıkırdak hücrelerinin adezyonu ve proliferasyonu için 3 boyutlu bir ekstraselüler matriks sağlamaktadır[8]. Eş zamanlı olarak biyoçatılar ile kök hücre uygulanmasının rejenerasyon potansiyelini artırabileceği düşünülmektedir[9].

Ekstraselüler matriks, hücreler için proliferasyon ortamı oluşturmalarının yanı sıra hücrelerin davranışlarını da düzenler[10]. Hücreden arındırılmış insan plasentası ekstraselüler matriks açısından oldukça zengindir[11]. Hücreden arındırılmış insan plasentası literatürde cilt defeklerinde, yağ dokuda, karaciğer ve damar

rekonstrüksiyonunda kullanılmıştır[12, 13]. İdeal bir biyoçatı; biyo-uyumlu, biyo-yıkılabilir, hücre göçüne, çoğalmasına ve büyüme faktörü taşınmasına izin veren porözitede, dokuya toksik olmayan yapıda olmalıdır[14]. Hücreden arındırılmış plasentanın bu özellikler göz önüne alındığında iyi bir biyoçatı olabileceği düşünülmüştür.

Kıkırdak rejenerasyonunda görev alan TGF-B, FGF, IGF-1 gibi büyüme faktörleri tanımlanmıştır[4, 15]. Bu büyüme faktörlerin trombositlerin içerisinde mikrozomlarda paketlenmiş halde bulunduğu gösterilmiştir[16]. Trombositten zengin plazma (PRP) otolog kandaki trombositlerin bazal değerlerinin üzerine çıkarılması olarak tanımlanabilir[17]. Trombositlerin konsantre edilmesi ile bu büyüme faktörleri daha yüksek konsantrasyonda uygulanabilir.

Literatürde kıkırdak rejenerasyonun sağlanması üzerine çalışmalar sürmektedir. Yapılan çalışmamız bu konuda hücreden arındırılmış insan plasentasının, mezenkimal kök hücrenin ve PRP'nin kullanıldığı ilk çalışma olması özelliğini taşımaktadır. Çalışmamızın amaçlarından birisi hücreden arındırılmış insan plasentasının kıkırdak rejenerasyonundaki etkinliğini göstermektedir. Bir diğer amacı ise hücreden arındırılmış insan plasentasının; mezenkimal kök hücre ve PRP uygulanması ile kıkırdak rejenerasyonundaki üzerindeki etkinliğin değişimini göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eklem kıkırdağı

Kıkırdak dokusu histolojik görüntüsü ve ekstraselüler matriks özelliklerine göre 3 ana grup altında toplanabilir. Bunlar hiyalin kıkırdak, elastik kıkırdak ve fibröz kıkırdaktır[18].

Eklem kıkırdağı oldukça özelleşmiş bir bağ dokusu olan hiyalin kıkırdaktan oluşmaktadır. Bu hiyalin kıkırdağın kalınlığı 2-4 mm'dir. Hiyalin kıkırdağın temel görevi pürüzsüz ve kaygan bir yüzey oluşturarak yük dağılımını düşük sürtünme katsayılı bir ortamda gerçekleştirmektir. Eklem kıkırdağında damar yapısı, lenf dolaşımı ve innervasyon bulunmaz. Beslenmesini sinovyal sıvı ve subkondral

kemikten basit difüzyon ile sağlamaktadır[19]. Eklem sağlığı açısından eklem kıkırdağının korunması kısıtlı iyileşme kapasitesi olması sebebiyle önemlidir. Eklem kıkırdağının karmaşık yapısından dolayı zarar görmesi halinde hasta ve ortopedisti zor bir süreç bekler. Eklem kıkırdağının fonksiyonunu yerine getirebilmesi için karmaşık yapısının korunması veya yeniden oluşturulması gereklidir[20].

2.1.1. Eklem kıkırdağının yapısı ve bileşenleri

Eklemde kıkırdağı iki ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar ekstraselüler matriks (ECM) ve kondrositlerdir. Yoğun bir ekstraselüler matriks ve bu matriks içine seyrek olarak dağılmış, ileri derecede özelleşmiş kondrosit isimli hücrelerden oluşur. Ekstraselüler matriks genel olarak su, kollajen, proteoglikan ve az miktarda kollajen olmayan proteinler ve glikoproteinlerden oluşur. Bu bileşenler sayesinde kıkırdak, mekanik özelliklerini devam ettirebilmek için ekstraselüler matrikste büyük oranda su tutabilir[20].

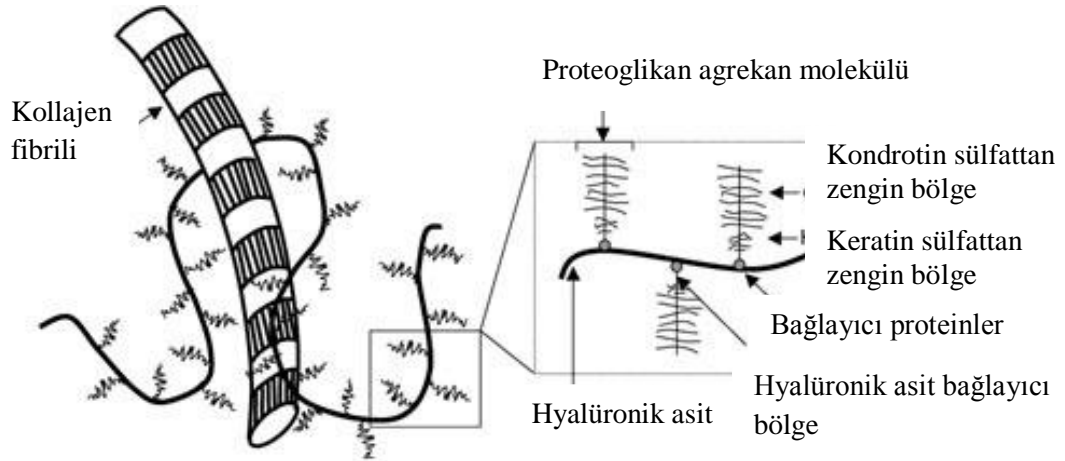
Kondrositler, kıkırdak dokunun temel hücreleridir. Metabolik olarak aktif hücrelerdir. Kollajen, glikoprotein, proteoglikan ve hyalüronan gibi ekstraselüler matriks bileşenlerini sentezlerler[21]. Metabolik aktiviteleri kimyasal ve mekanik çevresel ortamlarından etkilenmektedir. Bunlar arasında en önemlileri anabolik veya katabolik etkileri olabilen sitokinler ve büyüme faktörleridir. Kondrositler mezenkimal kök hücrelerden köken almaktadır[22]. Toplam kıkırdak hacminin % 1-5 arasını oluşturmaktadır. Bu oranın düşüklüğü ekstraselüler matriksin orantısal olarak kıkırdak dokuda daha fazla yer almasından kaynaklanmaktadır[23]. Eklem kıkırdağı avasküler yapıda olduğundan dolayı beslenmeleri eklem yüzeyinden difüzyonla gerçekleşir. Bu yüzden kondrositler düşük oksijen yoğunluğu olan bir ortamda düşük metabolik hızla fonksiyon görürler[24]. Kondrositler ekstraselüler matriksin temel sentezleyicisi olup bu sayede kompresyon, gerilim, sürtünme gibi kuvvetlere direnç gösterilmesini sağlar[22].

Ekstraselüler matriksin yaklaşık %65-80'ini su meydana getirmektedir. Bu suyun da büyük çoğunluğu kollajenler arası mesafede bulunmaktadır[25]. İçerisinde sodyum, kalsiyum, klor ve potasyum bulunmaktadır[26]. Suyun konsantrasyonu yüzeyel tabakadan derine ilerledikçe düşer. Bu konsantrasyon farkı sayesinde su

akışı eklem yüzeyinden kıkırdağa olarak besinlerin kondrositlere taşınmasına yardım eder. Kıkırdağın kaygan yapısına katkıda bulunur. Fibriller arasında bulunan su bir jel gibi görev yapar. Kıkırdağa kompresyon kuvveti uygulandığında su ekstraselüler matriks içerisinde dağılmaya çalışır ancak bu dağılıma karşı direnç oldukça yüksektir. Suyun basınç altında ekstraselüler matriks içerisinde dağılabilmesi fakat yüksek direnç sebebi ile ekstraselüler matriks dışarısına çıkamaması sebebi ile eklem kıkırdağı yüklenme kuvvetlerine karşı dayanıklılık özelliğini göstermektedir[20].

Ekstraselüler matriksin kuru ağırlığının yaklaşık %60'ını kollajen oluşturmaktadır. Tip II kollajen hiyalin kıkırdağta %90-95 oranı ile en fazla miktarda bulunan kollajen tipidir. Diğer kollajen tipleri I, IV,V, VI, IX olarak sıralanabilir. Bunlar az miktarda bulunsalar da tip II kollajenin stabilize edilmesinde ve kollajen ağı oluşumunda görev almaktadır. Kollajen üçlü heliks yapısı ile gerilim kuvvetlerine karşı ekstraselüler matriksi stabilize eder[27].

Proteoglikanlar eklem kıkırdağı ekstraselüler matrikste kollajenden sonra ikinci en fazla bulunan makromoleküldür. Proteoglikanlar yüksek oranda glikozillenmiş protein monomerleridir. Biyokimyasal olarak bir adet proteine bağlı bir veya daha fazla glikozaminoglikan zincirinden oluşmaktadır. Eklem kıkırdağı çeşitli proteoglikan moleküllerini barındırır Bu moleküllerden sık bulunanları; aggregan, dekorin, biglikan ve fibromodüldür. Aggregan bu proteoglikanlar arasında en büyük ve ağır olanıdır. 100 adetten fazla kondrotin sülfat ve keratin sülfat zincirini içerebilir. Hyalüronan ile bağlayıcı proteinler aracılığı ile birleşerek büyük proteoglikan kümeleri oluşturabilmektedir. Ekstraselüler matriksin fibriller arası mesafesini doldurarak eklem kıkırdağının ozmotik özelliğini meydana getirir[28]. Bu sayede kompresyon kuvvetlerine karşı eklem kıkırdağı direnç gösterebilir. Kümelenme yapmayan proteoglikanların esas görevi kollajen ile bağlanabilmesidir. Dekorin, biglikan ve fibromodülün bu grupta yer alır ve moleküler yapısı aggregana göre küçük olsa da molar açıdan benzer miktarda bulunmaktadır. Dekorin ve fibromodülün tip II kollajen ile bağlanarak fibrilogeneze ve fibriller arası etkileşimlere yardım etmektedir. Biglikan kondrositlerin çevresinde yer alır ve tip VI kollajen ile etkileşim halindedir[20].



Şekil 2.1. Eklem kıkırdağı ekstraselüler matriks bileşenleri. [29]

Ekstraselüler matriks kondrositlere yakınlığına, bileşenlerine ve organizasyonuna göre üç bölgeye ayrılır. Bunlar periselüler, territoriye ve interterriyoriyel bölgelerdir. Periselüler bölge, kondrositlerin hemen yanında yer alır ve kondrositleri çevreler. Temel olarak proteoglikanlardan oluşur. Bu matriks bölgesi kıkırdak içerisinde sinyal iletimine yardımcı olur. Terriyoriyel matriks, periselüler matriksi çevreler ve çoğunlukla kollajenden oluşur. Hücreler arası iletişimde ve yüklenme kuvvetlerine karşı dirençte görev alır. İnterterriyoriyel matriks ise bu üç bölgenin en geniş alanını kapsamaktadır. Eklem kıkırdağının biyomekanik özelliğinin neredeyse tamamı bu bölge tarafından sağlanmaktadır. Yapısında proteoglikanlar ve kıkırdak tabakalarına göre dizilimi farklılık gösteren kollajenlerden oluşmaktadır[30].

Kollajen yapısı ve ECM ile birlikte kondrositler kıkırdağın tabakalarını meydana getirirler. Bu zonlar yüzeysel, orta, derin ve kalsifiye olmak üzere 4 adettir[31].

2.1.2. Eklem Kıkırdağı Tabakaları

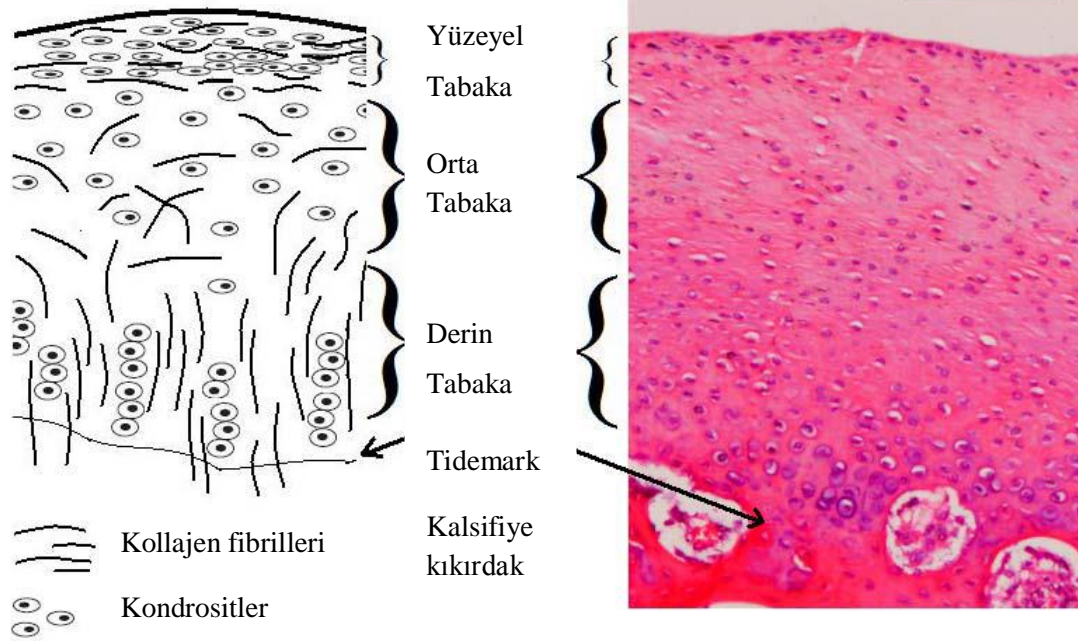
Yüzeysel tabaka toplam eklem kıkırdağının yaklaşık %10-20'lik kısmını oluşturur. Daha derin tabakaları sürtünme kuvvetlerine karşı korur. Bu tabakanın kollajen lifleri sıkı bir biçimde ve eklem yüzeyine paralel olacak şekilde dizilmişlerdir. Daha derin tabakalara oranla daha fazla kollajen miktarına sahip olmasına karşın proteoglikan miktarı daha düşüktür[32]. Yüzeysel tabaka sayıca daha

fazla yassılaşmış kondrosit içermektedir. Bu tabakanın devamlılığı daha derin tabakaların sağlığı açısından önem taşımaktadır. Yüzeyel tabaka direkt olarak sinovyal sıvı ile temas halindedir ve kırıkdağın maruz kaldığı gerilim kuvvetlerine karşı direnç gösterir.

Yüzeyel tabakanın hemen altında yer alan orta tabaka, yüzeyel tabaka ile derin tabaka arasında anatomik ve fonksiyonel açıdan köprü görevi görmektedir. Toplam kırıkdağ kalınlığının %40-60'ını oluşturur. Bu tabakadaki kollajenler daha kalındır ve daha oblik bir yapıda yerleşmişlerdir. Kondrositler daha yuvarlak yapıdadır ve yoğunluğu daha azdır. Fonksiyonel olarak kompresyon kuvvetlerine direnç gösteren ilk tabakadır.

Derin tabaka kompresyon kuvvetlerine karşı eklem kırıkdağının gösterdiği dirençte en büyük paya sahiptir. Eklem kırıkdağının kalınlığının yaklaşık %30'nu oluşturur. Bu tabakadaki kollajen lifleri eklem yüzeyine dik olarak dizilmişlerdir. Kollajen liflerinin kalınlığının ve proteoglikan miktarının en fazla olduğu, su konsantrasyonunun ise en az olduğu tabakadır. Kondrositler de bu tabakadaki kollajenler gibi eklem dik bir biçimde kolumnar yapıda sıralanmıştır.

Derin tabaka ile kalsifiye kırıkdağ *tidemark* ile birbirinden ayrılmaktadır. Derin tabaka, eklem kırıkdağı içerisinde en yüksek proteoglikan miktarına sahip olması sebebi ile kompresyon kuvvetlerine karşı en büyük direnç kuvvetini sağlamaktadır. Kalsifiye kırıkdağ tabakası, derin kırıkdağ tabakasındaki kollajenlerin subkondral kemiğe tutunmasını sağlayarak stabilitesini sağlar. Kalsifiye tabakada hücre sayısı az ve hipertroftir[20, 33].



Şekil 2.2. Eklem kıkırdağı tabakaları - tabakalara göre kollajen ve kondrositlerin dizilimi. [34]

2.1.3. Eklem Kıkırdağı Metabolizması

Erişkinlerde eklem kıkırdağı ekstraselüler matriksi yavaş seyreden bir süreçte sentezler[35]. Ekstraselüler matriks ile subkondral kemiğin vasküler yapıları subkondral plak ile birbirinden ayrılmıştır. Kıkırdak dokunun beslenmesi direkt olarak kan damarları veya lenfatikler yolu ile olmadığından difüzyon ile gerçekleşmektedir. Bu yüzden kondrositlerin temel enerji üretim mekanizması anaerobik metabolizmadır. Bu sentez sürecinde birtakım anabolik sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından süreç düzenlenmektedir[20]. Anabolik faktörlerin en önemlileri transforme edici büyüme faktör (TGF-B), kemik morfojenik proteinleri (BMP) ve insulin benzeri büyüme faktörüdür (IGF-I). Normal kıkırdak dokuda ekstraselüler matriksin sentezi ve yıkımı dengeli olarak yapılmaktadır. IGF-1, TGF-B, fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve BMP ekstraselüler matriks sentezini uyarırken, IL-1, TNF-a, IL-17, IL-18 gibi inflamatuvar sitokinler matriks metalloproteinaz enzim sentezini artırarak ekstraselüler matriks yıkımını sağlamaktadır. Bu etkileri kondrositleri uyararak yapmaktadırlar. Ancak tek başına herhangi bir sitokin veya büyüme faktörü kıkırdak matriksi sentezinde bütün sorumluluğu taşımamaktadır. Kondrositler biyokimyasal veya biyomekanik

faktörlerin hasar verme ihtimaline karşı ekstraselüler matriks tarafından korunmaktadır. Ekstraselüler matriks içerisindeki proteoglikanların ortalama yenilenme süresi 25 yıl, kollajenlerin ise birkaç dekad sürebilmektedir[35].

2.1.4. Eklem Kıkırdağı Biyomekaniği

Eklem kıkırdağı viskoelastik yapıya sahip özelleşmiş bir bağ dokudur. Eklem yüzeyinde pürüzsüz ve kaygan bir yüzey oluşturarak subkondral kemiğe yük dağılımını sağlar. Tekrarlayan yüklenmelere karşı neredeyse yok denecek kadar az miktarda aşınma göstermektedir[36].

Biyokimyasal olarak eklem kıkırdağı iki ana faza ayrılabilir. Bunlar sıvı ve katı fazlardır. Sıvı fazın temel bileşeni sudur, katı fazın ise poröz ve içerisinde sıvı geçişine izin veren ekstreselüler matrikstir. Eklem hareketi sırasında ani yüklemeler ekstreselüler matriks içerisindeki intersiyel sıvı basınç kuvvetinde hızlı bir artışa sebep olur. Bu basınçla beraber intersiyel sıvı ekstraselüler matriksten dışarı yönde bir akışa uğramaktadır. Sıvı akışına karşı ekstraselüler matriks yoğun direnç göstermektedir. Yüklenme kuvveti ortadan kalktığı anda interstisyel sıvı tekrar eski yerine dönmektedir. Eklem kıkırdağının sıvı geçirgenliğinin az olması sebebi ile basınç altındayken ekstraselüler matriksten sıvının dışarı kaçması önlenmektedir[37].

Eklem kıkırdağının viskoelastik yapısından 2 ana mekanizma sorumludur. Bunlar akım bağımlı ve bağımsız şeklindedirler. Akım bağımlı mekanizma interstisyel sıvıya ve bu sıvının akışı esnasındaki direnç kuvvetine dayanmaktadır[38]. Sıvı akışı sırasındaki direnç bifazik viskoelastik davranış şeklinde isimlendirilmiştir[39]. Akım bağımlı mekanizma ise kollajenlerin ve proteoglikanların intrinsik viskoelastik davranışı üzerinden makromoleküler düzeyde gerçekleşmektedir. Bu iki mekanizma eş zamanlı olarak birbirlerine yardımcı olarak çalışmaktadır. İnterstisyel sıvı yüklenme kuvvetlerine karşı direnç göstererek, yüklenme sırasında katı matriks üzerine düşen stresi azaltmaktadır[40]. Eklem kıkırdağı biyomekanik olarak incelendiğinde kuvvetlere karşı esneme ve stres-gevşeme yanıtı göstermektedir. Eklem kıkırdağına sabit ve devamlı bir kuvvet uygulandığında; bir denge noktasına ulaşılan kadar esnemesi devam eder[38]. Biyomekanik özellik olarak eklem kıkırdağını üzerindeki yük arttıkça daha sert bir

dokuya dönüşmektedir. Bu sebepten dolayı tek bir Young modulus değerine sahip değildir[20].

Eklem kırırdağının orta tabakalardaki kompleks yapısı ve dizilimi sayesinde makaslama kuvvetlerine karşı direnç gösterebilmektedir. Farklı yönlerde dizilmiş; fibril içi ve fibriller arası çapraz bağlar sayesinde kollajenler bu direnç kuvvetinin temelini oluşturmaktadır[41].

2.2. İnsan Plasentası

Plasenta, embriyonik ve fetal gelişimi sağlayan, önemli immunolojik özellikleri bulunan dinamik, farklı ve geçici bir organdır. Plasenta doğum sırasında vücuttan atılsa da kök hücre ve ekstraselüler matriks açısından zengin bir yapıya sahiptir. Bu sebepten dolayı rejeneratif tıp alanında oldukça ilgi görmektedir[42].

2.2.1. İnsan Plasentası Yapısı

İnsan plasentası temel olarak trofoblastlar ve stromadan oluşmaktadır. Villöz stroma trofoblastlara destek olmakta ve plasentanın vasküler gelişimi için ortam oluşturmaktadır. Stroma yapısında ekstraselüler matriks (ECM) kritik bir öneme sahiptir. ECM plasenta içindeki kök hücreler tarafından üretilmektedir. Stroma ekstraselüler matriks açısından oldukça zengindir. Birçok tipte kollajen (1,3,4,5,6), laminin, fibronektin ve fibrillin gibi molekülleri içermektedir. Bu makromoleküller; plasenta hücrelerinin büyümesi ve remodeling üzerinde görev almaktadır. Plasenta dinamik bir organ olduğundan ekstraselüler matriks bileşenleri zamanla orantısız olarak değişime uğramaktadır. Bu durumdaki temel sebep olarak plasentanın oksijenasyonun gebeliğin aylarına göre değişim göstermesi ile gen ekspresyonlarındaki değişiklikler görülmektedir[43].

Plasenta ekstraselüler matriksi proteinler 4 ana grupta toplanmaktadır. Bunlar: yapısal proteinler (kollajenler ve elastin), adezyon glikoproteinleri (fibronektin, laminin), glikozaminoglikanlar (hyalüronan) ve proteoglikanlar (versikan, sindekan, heparin sülfat) olarak sıralanmaktadır. ECM büyüme faktörleri için bağlanma bölgeleridir. Büyüme faktörleri böylece sinyal iletimindeki görevlerini göstermektedir[42]. Özellikle kollajen 1 olmak üzere sonrasında fibronektin, vitronektin, tenascin C, osteopontin; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF),

transforme edici büyüme faktörü-B (TGF-B), plateled derived büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) için bağlanma bölgeleri içermektedir[44].

2.2.2. İnsan Plasentası Hücreden Arındırılması ve Kullanım Alanları

Çeşitli dokuların hücreden arındırılmış biçimleri biyolojik materyaller olarak doku mühendisliği amacı ile kullanılmaktadır. Hücreden arındırma işlemleri dokuya göre farklılık göstermektedir. Bu arındırma işlemleri kimyasal, fiziksel ve/veya enzimatik yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Hücreden arındırma işlemi sonrası elde edilecek dokuda tamamen nükleik asitlerden ve hücrelerden temizlenmiş olmalıdır. Aynı zamanda elde edilen dokunun ekstraselüler matriksinin fiziksel ve kimyasal yapısının korunmuş olması gerekmektedir[45]. Hücreden arındırma işlemi sırasında lipofilizasyonda veya sterilizasyon aşamasında kaçınılmaz olarak ECM proteinlerinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Bu durum da direkt olarak doku yanıtını değiştirmektedir[46]. Hücreden arındırma işlemleri literatürde kalp, akciğer, böbrek ve plasenta üzerinde denenmiştir.

Plasenta ECM açısından oldukça zengin bir organdır. Hücreden arındırılmış plasenta daha önce klinik olarak çeşitli yumuşak doku rekonstrüksiyonlarında kullanılmıştır. Lumpektomi uygulanmış hastada yağ doku üzerine etkisi ve geniş cilt defektlerinde yara iyileşmesi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir[47, 48]. Bu uygulamalarda plasental biyoçatı tamamen hücreden arındırılmış olduğundan herhangi bir doku rejeksiyonu veya nekrozu görülmemiştir[48]. Kornea, kalp kapakçığı, karaciğer, damar, akciğer, mesane dokularının kendi ekstraselüler matriksleri özgün dokunun rekonstrüksiyonlarında kullanılmıştır. Zengin ECM içeriği sebebi plasenta evrensel bir biyoçatı özelliği taşımaktadır. Uygulandığı dokudaki büyüme faktörleri aracılığı ile benzer dokuya dönüşebilme potansiyeli bulunmaktadır[49].

Plasentanın doku mühendisliğinde biyolojik içeriğinin yanı sıra temin edilme aşamasının cerrahi bir müdahale gerektirmemesi de önemli bir tercih sebebidir. Plasenta doğum sırasında spontan olarak dışarı atılmaktadır. Bu sebepten herhangi bir donör saha morbiditesine yol açmamaktadır[45].

2.3. Biyoçatı

Biyoçatı (skafold), uygulandığı bölgede hücre tutunmasına izin vererek doku gelişimini sağlayan biyomateryal olarak tanımlanmaktadır[50]. Literatürde birçok materyalden üretilmiş ve farklı dokularda denenmiş çok sayıda biyoçatı bulunmaktadır. Bir biyoçatının doku mühendisliği için uygun olup olmadığını belirleyen birtakım kriterler bulunmaktadır.

Biyouyumluluk bir biyoçatının temel şartlarından birisidir. Hücreler biyoçatıya tutunabilmelidir. Biyoçatı içerisinde fonksiyonlarını gösterebilmeli, göç edebilmeli ve çoğalabilmelidir. Biyoçatı minimum düzeyde immün reaksiyon vermelidir çünkü şiddetli bir inflamatuvar yanıtı sebep olduğu takdirde doku iyileşmesini azaltıcı etki gösterebilir.

İdeal bir biyoçatı biyo-yıkılabilir olmalıdır. Uygulandıkları dokudaki orijinal hücreler zamanla çoğalarak kendi sentezledikleri ekstraselüler matriks ile yer değiştirebilmelidir. Biyoçatılar kalıcı implantlar olarak yerleştirilmezler. Yıkılma süreçlerinde ortaya çıkan toksik olmamalı ve vücuttan atılmaları sırasında diğer organlara zarar vermemelidir[51].

Biyoçatının uygulandığı dokuya benzer düzeyde dayanıklılığa sahip olması gerekmektedir. Bu özellik özellikle ortopedi uygulamalarında zorluk çıkarmaktadır. Biyoçatı uygulandığı dokudaki hedeflenen iyileşme sağlanana kadar mekanik destek olmalıdır. İyileşme süresi kişiler arası farklılık gösterebileceğinden ideal bir biyoçatının dayanıklılığı iyileşme süresini olabildiğince kapsamalıdır. Biyomekanik dayanıklılığı artırılırken biyoçatının poröz yapısının azalması bir dezavantajdır. Poröz yapının azalması hücre hareketini azaltır ve damarlanmayı baskılar. Bu yüzden mekanik dayanıklılık ile poröz yapı arasındaki ince denge biyoçatının uygunluğu açısından önemlidir[52].

Biyoçatının mikro-mimarisi biyolojik fonksiyonların gösterilebilmesi yönünden önemlidir. Yapısal olarak birbirleri ile bağlantılı olan porlar içermelidir. Bu porlar aracılığı ile hücreler biyoçatıya yayılırlar ve dağılmış hücrelerin beslenmeleri sağlanır. Yeterli oranda dağılmış ve uygun beslenmeye sahip hücreler tarafından ekstraselüler matriks sentezlenir. Yine bu por sistemleri aracılığı ile

hücrelerin atık molekülleri mikroçevrede birikmeden tahliye edilir[53]. Poröz yapının varlığının yanında porların çapları da bir biyoçatının uygunluğunu belirler. Por çapı hücrelerin geç edebilmesine izin verecek kadar geniş, mikro-mimarinin yoğunluğunu artıracak kadar dar olmalıdır[54].

Biyoçatılar genellikle doğal polimerler, sentetik polimerler ve seramikler olmak üzere üç ayrı materyalden üretilirler. Bu üç materyal teker teker değerlendirildiğinde birbirlerine göre avantaj ve dezavantajlara sahiptir.

Seramik bazlı biyoçatılara örnek olarak hidroksiapatit (HA) ve tri-kalsiyum fosfat (TCP) gösterilebilir. Biyomekanik olarak sert yapıdadır, elastikliği azdır. Sert ancak kırılabilir olması sebebi ile doku mühendisliği açısından işlenmesi zordur. Kemik doku ile oldukça iyi biyo-uyumluluk gösterirler.

Sentetik polimer biyoçatılardan birkaçı poli-L-laktik asit (PLLA), poliglaktik asit (PGA) ve poli-dl-co-glikolik asit (PLGA)'dır. Sentetik olduklarından mikro-mimarileri oldukça düzgün ayarlanmıştır ancak biyolojik aktiviteleri düşüktür. uygulandıkları doku tarafından kabul edilmeyebilirler[51]. PLLA ve PGA yıkılmaları hidroliz reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon sonucunda karbondioksit meydana gelerek çevre dokudaki pH değerini düşürür ve doku nekrozuna yol açabilir[55].

Doğal polimer biyoçatılar (kollajenler, proteoglikanlar vs) ise biyolojik olarak aktif materyallerdir. Hücreler için yüksek oranda tutunma bölgeleri içerirler ve çoğalmalarını uyarırlar. Biyo-yıkılabilir özellikte olmaları sebebi ile zamanla uygulandıkları dokunun kendi ekstraselüler matriksini sentezlemesine olanak sağlarlar. Doğal polimerlerin homojen bir biçimde biyoçatı olarak elde edilmeleri oldukça zor bir işlemdir. Ayrıca biyomekanik olarak zayıf materyallerdir[51].

Ekstraselüler matriks biyoçatıları bu üç temel biyoçatıya ek olarak son zamanlarda önem kazanmıştır. Doğal polimer biyoçatıların yapısında sıklıkla kollajen, proteoglikanlar, fibrin, laminin, fibronektin bulunmaktadır. Bu moleküller aynı zamanda ekstraselüler matriksin temel bileşenleridir. Doğal ve doğal polimerler biyoçatı olarak yaygın olarak kullanılsa da hücresel mikroçevre (niş) oluşturma özellikleri düşüktür. Bir başka deyişle uygulandıkları bölgede hücresel ve

moleküler organizasyonu yeterli miktarda sağlayamazlar. Ekstraselüler matriksin kendisinin doğal indüktif bir biyoçatı olduğu ve doku-organ rejenerasyonunda kullanılabileceği düşünülmektedir[56].

Ekstraselüler matriks biyoçatısı; allojenik veya ksenojenik dokulardan elde edilerek deselülerize edilerek hazırlanmaktadır. Diğer biyoçatılara göre üstün olduğu noktalar bulunmaktadır. Uygulanma anında mimarisi ve esnekliği ile mekanik gücü sentetik ve naturel polimerlere göre daha yüksektir. Üç boyutlu yapısı sayesinde mekanik kuvvet sağlamasına ek olarak hücrelerin göçünü, hücre döngüsünü düzenlemektedir. Bu mekanotransdüksiyon özelliğinin yanında fibril yapısı sayesinde büyüme faktörleri ve sitokinlere bağlanma noktaları sağlayarak hücrelerin fonksiyonlarını düzenler. Ekstraselüler matriks biyoçatısı bu biyomekanik ve biyokimyasal özellikleri ile doku rejenerasyonu için önemle gerekli olan doğal bir mikroçevre (niş) oluşturmaktadır. İdeal biyoçatının özellikleri arasında bulunan biyo-uyumluluk, biyo-yıkılabilirlik özelliklerine sahiptir. Ayrıca immünolojik özellikleri oldukça düşüktür. Deselülerizasyon işlemi sırasında hücrelerin tamamen ortadan kaldırılması ve geride kalan ekstraselüler matriksin son derece az antijenik olması sebebi ile immünolojik reaksiyon neredeyse hiç vermezler. Bahsedilen avantajlarından ötürü ekstraselüler matriks biyoçatıları umut vadeden biyomateryallerdir[57].

2.4. Kök Hücre ve Uygulamaları

Kök hücreler kendini yenileme özelliği bulunan, özelleşmiş alt sıra hücrelere dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre gruplanırlar. Pluripotent hücreler insan vücudundaki hemen hemen her hücreye dönüşebilme kapasitesine sahiptir. Multipotent hücreler ise daha belirli alt sıra hücrelere dönüşebilmektedir. Bu yetenekleri sayesinde rejeneratif tıp uygulamalarında oldukça ilgi görmektedirler. Kıkırdak rejenerasyonu göze alındığında farklı tipte kök hücrelerin kullanılabileceğini bilmek gereklidir[58].

Embriyonik kök hücreler 5 günlük blastokistlerden köken almaktadır[59]. Embriyonik kök hücre olarak nitelendirilebilmek için, pluripotent hücre kökenli olmalı, normal karyotipe sahip olmalı, embriyonik fazda sürekli olarak

çoğalabilmeli, spontan olarak üç embriyonik germ tabakalarına (ektoderm, mezoderm, endoderm) farklılaşma yeteneğine sahip olmalıdır[60]. Mezenkimal kök hücreler ise geniş bir yelpazede mezenkimal dokulara (mezodermal, non-epitelyal, non-hematopoetik) farklılaşma gösterebilen hücreler olarak nitelendirilirler. Kemik iliği, beyin, karaciğer, kemik, retina, yağ doku, sinovyal doku, amniotik sıvı, umbilikal kord ve plasentadan izole edilebilirler[61, 62].

İnsan embriyonik kök hücreler pluripotent özelliktedir. Embriyonik kök hücrelerin kondrositlere in-vitro ortamda dönüşebileceği gösterilmiştir[58]. Ayrıca fibrin glue içerisine yerleştirilmiş embriyonik kök hücrelerin in-vivo ortamda (domuz dizi osteokondral defekt modeli) hyalin kıkırdak rejenerasyonu ve entegrasyonu gösterdiği sonucuna varılmıştır[63]. Fakat literatürde farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin immün sistemi baskılanmış farelerde teratoma oluşturduğu gösterilmiştir. Bu yüzden embriyonik kök hücrelerin hedef dokuya farklılaştırıldıktan sonra uygulanması veya farklılaşmamış hücrelerin çıkarılması önerilmektedir[64, 65].

Mezenkimal kök hücreler; multipotent, anti-inflamatuvar ve immunmodülatör özelliklerinden dolayı kıkırdak rejenerasyonunda uzun zamandır ilgi görmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için Uluslararası Hücre Terapi Topluluğu (ISCT) tarafından kriterler belirlenmiştir. Bu kriterler; üç farklı mezodermal alt sraya (osteoblastlar, kondrositler, adipositler) farklılaşabilmesi, CD73, CD90, CD105 pozitif olması ve HLA-DR negatif olmasıdır[66]. Mezenkimal kök hücrelerin in-vitro ortam çalışılması sonucunda IGF-1, VEGF, IGF-2, FGF gibi parakrin faktörleri salgıladıkları gösterilmiştir. Fakat in-vitro ortamdaki bu faktörlerin etkileri in-vivo ortama kısmen yansıtılabilmektedir. Mezenkimal kök hücreler sentez yeteneklerinin yanı sıra immunolojik özelliklere de sahiptir. Son çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin oldukça az non-immunojenik olduğu ve bireyler arasında herhangi bir immun reaksiyon yaratmadan kullanılabileceğine yönelik kanıtlar bulunmuştur. İn-vivo ve in-vitro ortamda anti-inflamatuvar ve immunsupresif yetenekleri olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerini immün hücrelerin maturasyonunu engelleyerek yaparlar. Ayrıca TGF-B, NO, prostoglandin E-2, IL-10 gibi anti-inflamatuvar sitokinler sentezlerler[67].

Eklem kıkırdağı içerisinde mezenkimal kök hücrelerinin bulunduğu gösterilmiş olsa da bu hücrelerin kıkırdak hasarına karşı rejenerasyon kapasiteleri yetersizdir. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin in-vitro ortamda transforme edici büyüme faktörü-B3 (TGF-B3) ve deksametazon varlığında kondrositlere dönüştüğü ve kondrositlerle ilişkili genleri taşıdığı gösterilmiştir[68]. Başka bir çalışmada nanofibröz skafold ile kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin büyüme faktörlerinin varlığında kondrositlere farklılaştığı gösterilmiştir[69]. Mezenkimal kök hücreler kondrositlere dönüşümü sırasında TGF-B1 ile uyarıldığında tip 2 kollajen ve agrekan sentezi için gerekli mRNA sentezi artar. Kemik iliğinden köken alan mezenkimal kök hücrelerin yanı sıra; yağ dokudan, sinovyal sıvıdan ve umbilikal korddan köken alan mezenkimal kök hücrelerin başarılı bir şekilde kondrositlere dönüşebildiği gösterilmiştir[58].

İnsan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, insan klinik çalışmalarında daha güvenli kullanımının sağlanması için hayvan modellerinde in-vivo ortamdaki davranışları çalışılmıştır. İnsan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin immun sistemleri sağlam olan hayvan modellerine uygulandığı çalışmalarda immunojenik rejeksiyon saptanmamıştır[70]. Tavşan modelinde oluşturulan kıkırdak defektine insan mezenkimal kök hücre uygulanması sonrası hiyalin benzeri kıkırdak oluştuğu literatürde rapor edilmiştir[71].

2.5. Trombositten Zengin Plazma (PRP)

Vücudun normal kan havuzunda bulunan trombositler; kan pıhtılaşmasında görevlerinin yanı sıra çeşitli büyüme faktörleri salgılayarak yaralanan dokudaki iyileşme sürecinde katkı sağlamaktadırlar. Trombositler büyüme faktörleri, immunojenik moleküller, enzimler ve inhibitörleri gibi sayısı 1100'den fazla olan protein içermektedir. Biyoaktif moleküller trombositler içerisindeki a-granüllerinde bulunmaktadır[72]. Bu proteinler iyileşme kapasitesi bulunan hasarlı dokudaki hücrelerde mitogenezi uyarırlar ayrıca dokunun damarlanmasını artıran angiogenezi de artırır. Trombositten zengin plazma, normal sınırlardan daha yüksek miktarda trombosit konsantrasyonuna sahip plazma olarak tanımlanabilir. PRP, normal trombosit değerinin ortalama 4-5 katı miktarda trombosit içermektedir. Bu yüksek orandaki trombosit konsantrasyonu teorik olarak yüksek ortamdaki büyüme faktörü

konsantrasyonunu artırarak iyileşme aşamasına destek olur. PRP içerisinde bulunan büyüme faktörlerinden bazıları: *platelet-derived growth* faktör (PDGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF-B), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve epitelial growth faktörü (EGF)'dür. Büyüme faktörlerinin %70'i ilk on dakika içerisinde neredeyse tamamı ise ilk bir saat içerisinde trombositlerden salgılanmaktadır. Vücudun doğal proteinlerini içermesi ve sentetik olmaması yönünden avantajlıdır[73]. Literatürde yapılan in-vitro çalışmalarda trombositlerden salgılanan büyüme faktörleri ile hücrelerin mitojenik, kemotaktik ve sentez yetenekleri arasında doz-yanıt ilişkisi olduğu gösterilmiştir[74]. Ancak bu doz-yanıt ilişkisi çoğu büyüme faktörü için lineer değildir. Bazı büyüme faktörleri için doz yükseldikçe etki artarak bir noktada sabit kalmakta, bazılarında ise maksimum doza ulaşıldığında inhibisyon göstermektedir. Bu doz-yanıt ilişkisi büyüme faktörü tipi ve hücre tipine bağlı olduğundan optimum trombosit konsantrasyonu belirsizliğini korumaktadır[74-76].

PRP, lökosit ve fibrin içeriğine göre 4 ayrı aileye bölünmüştür.

(1) *Pure Platelet Rich Plasma* (P-PRP): Lökositten fakir plazma olarak da isimlendirilebilir. İçeriğinde minimal düzeyde lökosit barındırır ve aktivasyonu sonrası fibrin ağı oranı düşüktür. Elde edilen ürün sıvı veya jel şeklinde olabilmektedir. Bu sayede uygulanacak bölgeye bağlı olarak enjekte edilebilir veya jel formu kullanılabilir. Hazırlanışı sırasında plazmaferez gibi laboratuvar gereksinimi olduğundan günlük kullanımı pratik değildir.

(2) *Leukocyte and Platelet Rich Plasma* (L-PRP): Hazırlanan ürün lökositleri ve aktivasyon sonrası düşük düzeyde fibrin ağını içermektedir. Bu gruba dahil ürünler de sıvı veya jel formunda kullanılabilir. Ticari olarak en sık kullanılan PRP alt tipidir.

(3) *Pure Platelet Rich Fibrin* (P-PRF): Lökositten fakir fibrin olarak isimlendirilebilir. İçeriğinde yüksek oranda fibrin ağı içermesinin yanında lökosit içermemektedir. Sadece jel formunda bulduklarından enjeksiyon ürünü olarak kullanılamazlar. Güçlü fibrin matriksi sayesinde katı fazda uygulanabilirler.

(4) *Leokocyte and Platelet Rich Fibrin* (L-PRF): İçeriği lökositler ve yüksek oranda fibrin ağından oluşmaktadır. Ucuz bir yöntemdir. Cam tüplerde antikoagülan kullanılmadan santrifüjle elde edilir. Oluşan materyal trombositten zengin fibrin matriks katı fazda kullanılabilir.

PRP'nin alt aileleri farklı içeriklere sahip olduklarından önemlidir. Bu içerikleri sayesinde kullanım alanları farklılık göstermektedir. PRF'ler katı yapılarından dolayı oral, maksillofasyal cerrahide ve cilt ülserlerinde tercih edilirler. PRP'ler ise enjekte edilebilir formları sayesinde ortopedik uygulamalarda daha sıklıkla kullanılırlar[77].

PRP'nin son ürünü içerisinde lökosit bulunup bulunmaması gerektiği literatürde tartışma konusudur. Lökositler inflamasyonun erken döneminde bakterilerin ve hücrel debrisin ortadan kaldırılmasında görev alırlar. Lökosit içeren PRP kullanılması sonrası enfekte yumuşak doku yaralanmalarında bakteri oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Ancak, bazı çalışmalarda PRP içerisindeki lökosit arttıkça IL-1B, TNF-a, IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinlerinin konsantrasyonlarının arttığı gösterilmiştir. Bunların yanı sıra nötrofiller metalloproteazlar salgılayarak reaktif oksijen ürünlerini ortaya çıkararak akut inflamatuvar cevapta kas hasarı yaratabilirler. Bu pozitif ve negatif etkileri tüm dokular ve tüm klinik durumlar için genellenemez[72]. Lökositlerin avantajlı olduğu durumların varlığı gözardı edilemez. Lökositler inflamatuvar hücreler olmalarına ek olarak farklı kemokinler, anti-inflamatuvar sitokinler ve opioid peptidler (b-endorfin, metenkefalin ve dinorfin-a) ile anti-nosiseptif etkiye de sahiptir. Bu sayede klinik olarak ağrının azalmasını sağlarlar[77].

Moleküler düzeyde osteoartrit gibi dejeneratif durumlarda PRP'nin kondrosit ve sinovisitleri stimule ederek kırıldak matriksi oluşumuna yardım ettiği in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir[78]. Ayrıca tip 2 kollajen ve proteoglikan sentezini artırdığı gösterilmiştir[79]. Bu anabolik etkinin TGF-B üzerinden olduğu düşünülmektedir. TGF-B'nin kemik iliği kök hücrelerinin kondrositlere dönüşümünde gerekli olduğu bulunmuştur[80]. 2013 yılında yapılan bir 21 adet in-vivo ve in-vitro araştırmanın dahil olduğu meta-analiz çalışmada; PRP'nin kondrosit çoğalmasını, proteoglikan sentezini ve tip 2 kollajen depolanmasını arttırdığı

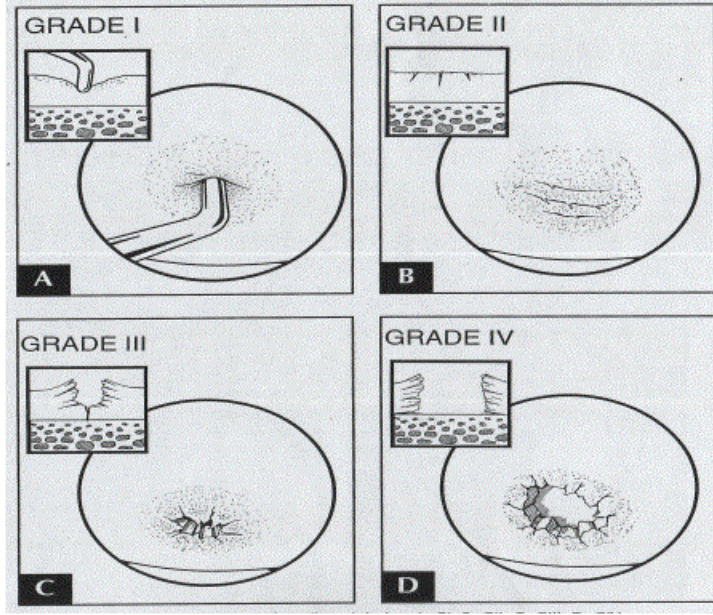
görülmüştür. Ayrıca beş adet çalışmada ise mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaştığı gösterilmiştir[81].

2.6. Eklem Kıkırdağı Yaralanması

Eklem kıkırdağı defektleri, fokal kondral hasarlardan ilerleyici dejeneratif hastalığa uzanan geniş bir yelpazeye sahiptir[82]. Dejeneratif kıkırdak defektleri çoğunlukla sınırları belirsiz yaralanmalardır. Ligament dengesizliği, menisküs yaralanmaları veya osteoartrite bağlı gelişirler. Fokal kıkırdak defektlerinin ise sınırları daha belirgindir. Travma, osteokondritis dissekans gibi nedenlere bağlı ortaya çıkarlar. Literatürde osteokondral yaralanmalara bazı yazarlar tarafından belirli travmaya bağlı veya travma öyküsü olmayanlar şeklinde gruplandırılmaktadır[83].

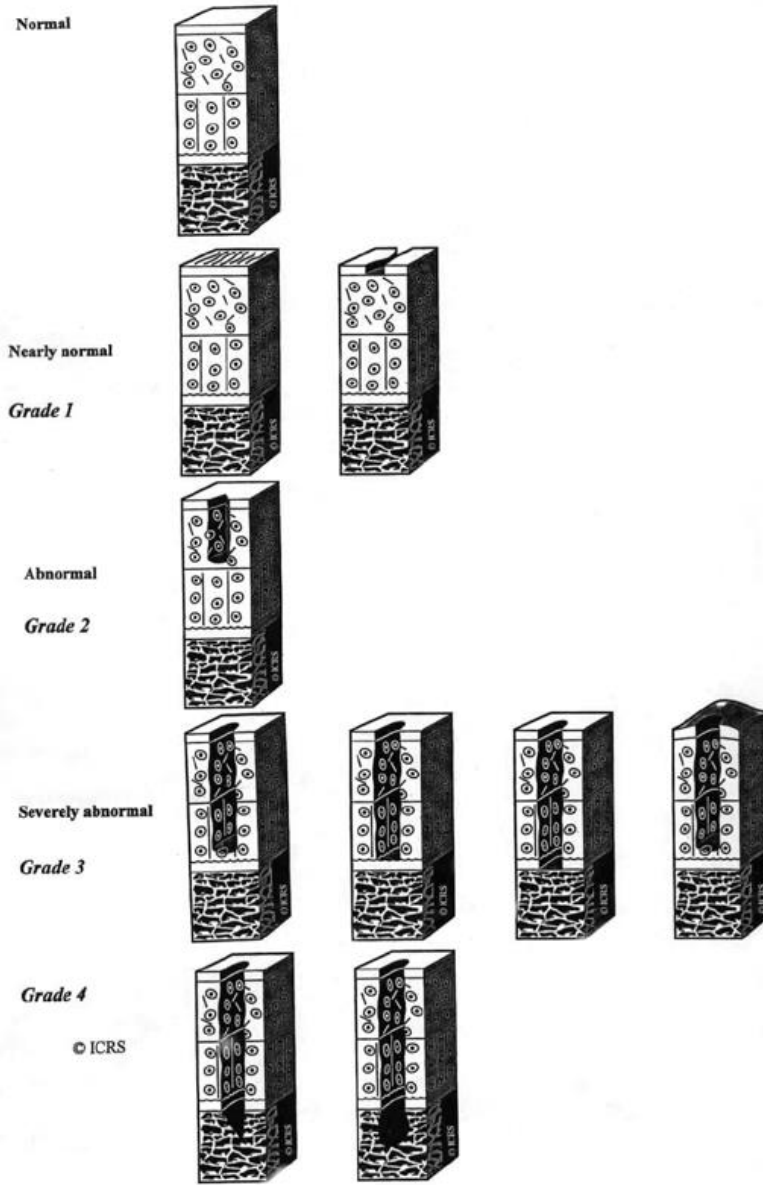
2.6.1. Kıkırdak Yaralanmalarının Sınıflandırılması

Kıkırdak defektlerinin sınıflaması için günümüzde sıklıkla kullanılan iki sınıflanma sistemi; Outerbridge sınıflaması ve ICRS (*International Cartilage Repair Society*) sınıflamasıdır[84]. Outerbridge sınıflama sistemi 4 evreye ayrılmıştır. Evre 1 de kıkırdak yüzeyinde yumuşama ve şişme görülmektedir. Evre 2 ve 3'te kıkırdak yüzeyinde parçalanma (fragmentasyon) ve fissürleşme görülmektedir. Bu parçalanma ve fissürleşme 1cm'den küçük ise evre 2, 1 cm'den büyük ise evre 3 olarak sınıflandırılır. Evre 4'te ise kıkırdak defekti subkondral kemiğe ulaşmıştır[85].



Şekil 2.3. Outerbridge sınıflaması. Outerbridge, R.E., *The etiology of chondromalacia patellae*. J Bone Joint Surg Br, 1961. 43-b: p. 752-7. [85]

2003 yılında yayınlanan ICRS sistemi defektin yüzey alanının yanı sıra derinliğini de hesaba katmaktadır. Bu yönü ile Outerbrigde sınıflamasına üstünlük sağlamaktadır. ICRS sistemi 4 evreye ayrılmıştır. Eğer kıkırdak intakt yüzeye sahip fakat fibrilasyon ve/veya yumuşamaya sahip ise evre 1a, bu bulguların yanı sıra yüzeyel laserasyonlar ve fissürler bulunuyor ise evre 1b olarak sınıflandırılır. Evre 2 de defekt derinleşmektedir fakat bu derinlik kıkırdak derinliğinin %50'sinden azını oluşturur. Evre 3'te derinlik toplam kıkırdak kalınlığının %50'sini geçer. Evre 3 kendi içerisinde 4 alt gruba ayrılır. Kalsifiye tabakaya ulaşmamış ise evre 3a, ulaşmış ise evre 3b, kalsifiye tabakayı geçmiş ancak subkondral kemiğe ulaşmamış ise evre 3c, kıkırdak yüzeyinde kabarcıklar var ise evre3d olarak sınıflandırılırlar. Evre 4'te ise defekt subkondral kemiğe ulaşaral tam kat osteokondral defekt şeklini alır[86].



Şekil 2.4. ICRS sınıflaması. Brittberg, M. and C.S. Winalski, *Evaluation of cartilage injuries and repair*. J Bone Joint Surg Am, 2003. 85-A Suppl 2: p. 58-69. [86]

2.6.2. Kıkırdağın Yaralanmaya Yanıtı ve Doğal Seyri

Eklem kıkırdağının yaralanmaya olan yanıtı; yaralanmanın şiddetine ve derinliğine bağlıdır. Düşük enerjili ve yüzeysel yaralanmalar, eklem kıkırdağında hücresel ve matriks düzeyinde hasarlanma yaparak dejenerasyon kaskadını aktive eder. Ancak bu dejenerasyon sürecinde eklem yüzeyinde görülebilir bir değişiklik meydana getirmezler. Daha şiddetli yaralanmalar eklem yüzeyinde görülebilir

fissürlere ve parsiyel kırıkta kayıplarına yol açarlar. Tam kat yaralanmalarda ise subkondral kemik de hasar görmektedir[87].

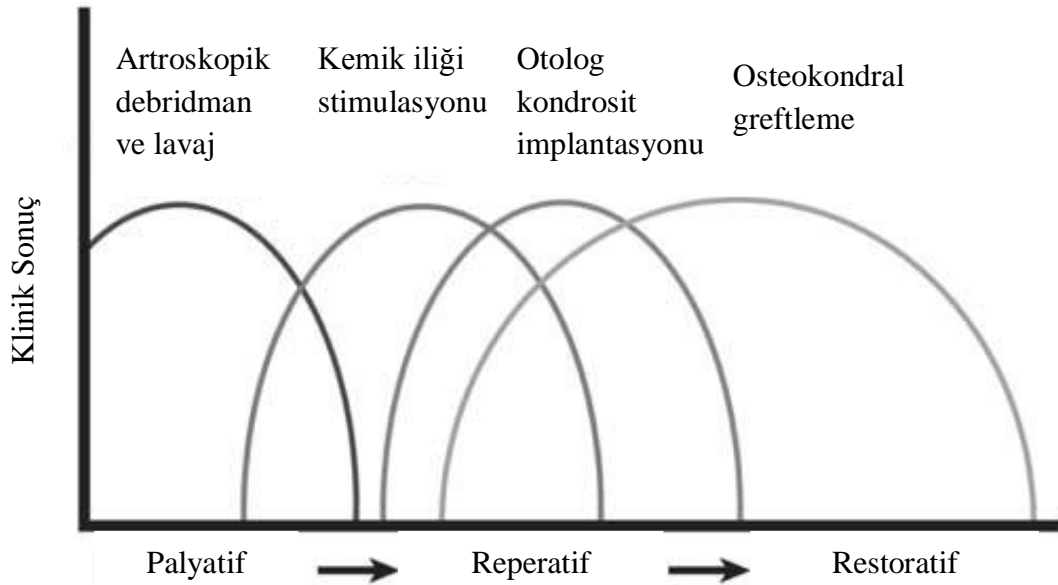
Yüzeysel yaralanmalar ile eklem kırıktağının mikroskopik anatomisi ve fizyolojisi bozulabilir. Bu yaralanmalar kırıktağın kaybına sebep olmadan görülebilir. Yüzeysel yaralanma kondrositlere zarar vererek onarım gerekli olan için metabolik kapasitelerini kısıtlar, proteoglikan konsantrasyonunu azaltır, hidrasyonu artırır ve kollajenlerin fibriler organizasyonunu bozar[88, 89]. Yüzeysel yaralanma sonucu proteoglikanların kaybolması, su konsantrasyonunun yükselmesi, eklem kırıktağının sertliğinin azalması ve hidrolik geçirgenliğinin artması eklem yüzeyine uygulanan kuvvetlerin subkondral kemiğe daha yüksek oranda iletilmesine sebep olur. Subkondral kemiğin yüksek oranda kuvvete maruz kalması sonucu kendisinin sertliği artar. Böylece darbe kuvvetlerinin kısmen hasarlanmış kırıktağın doku üzerindeki şiddeti artış gösterir. Bu kısır döngü ile yüzeysel kırıktağın hasarlarının parsiyel kalınlıkta kırıktağın hasarlarına dönüştüğü düşünülmektedir[87].

Parsiyel kırıktağın defektlerine verilen fizyolojik yanıtta kırıktağın dokunun avasküler yapısı önemli bir engel oluşturmaktadır. Parsiyel kırıktağın yaralanması sonucu travma bölgesinde kanama ve fibrin pıhtısı oluşumu görülmez. Bu yüzden bir inflamatuvar yanıt da fizyolojik olarak başlatılamaz. Fizyolojik yanıt ancak kondrositler tarafından çoğalma ve ekstraselüler matriks sentezinin artırılması şeklinde verilmektedir. Fakat yeni sentezlenen ekstraselüler matriks ve çoğalan kondrositler eklem yüzeyini yeniden oluşturmaya yetmez[89].

Tam kat eklem kırıktağın yaralanmaları subkondral kemiğe penetre olmaktadır. Bu sayede hasarlanmış bölgeye hücreler ve kan dokusu ulaşabilmektedir. Böylelikle teorik olarak bu tip yaralanmalar daha yüksek oranda iyileşme kapasitesine sahiptir[90]. Yaralanma bölgesinde meydana gelen kanama hematoma oluşumuna ve kök hücre göçüne izin vermektedir. Ancak bu mekanizma ile kondrositler tarafından; hiyalin kırıktağın göre daha düşük sertlikte, daha düşük direnç özellikli ve daha kötü aşınma katsayısı bulunan fibrokırıktağın meydana gelmektedir[91].

2.6.3. Eklem Kıkırdağı Lezyonları Tedavisi

Kıkırdak lezyonlarının tedavisi için birçok yöntem tanımlanmıştır. Bu yöntemler uygulanırken lezyonların büyüklüğü, derinliği, hastanın yaşı ve daha önce denenen tedavi şekilleri göz önüne alınmalıdır. Tedavi öncesinde hastaların ekstremiteleri bütün olarak ele alınmalıdır. Herhangi bir dizilim bozukluğunun bulunması, ligament yetersizliği ve menisküs patolojisinin tedavi sırasında ihmal edilmesi, kıkırdak için uygulanan tedavinin erken dönemde başarısızlığı ile sonuçlanabilir[92]. Eklem kıkırdağı lezyonları tedavisindeki temel amaç hiyalin kıkırdağın elde edilmesidir. Osteokondral otogreft transferi, otolog kondrosit implantasyonu gibi restoratif yöntemler ve rejeneratif tıp ile hiyalin benzeri kıkırdak üretilebilmiş olsa da tam olarak hiyalin kıkırdak üretilmesi başılamamıştır[93]. Eklem kıkırdağı lezyonlarının tedavisi konservatif yöntemler, cerrahi yöntemler ve doku mühendisliği çalışmaları şeklinde gruplandırılabilir.



Şekil 2.5. Tedavi yöntemlerinin sonuçlarının keşişimi. [87]

2.6.3.1. Konservatif Yöntemler

Cerrahi olmayan yöntemler kıkırdak lezyonlarına bağlı semptomları kontrol altına alabilmek veya eklem kıkırdağının dejenerasyon sürecini uzatmak amacı ile kullanılmaktadır. Farmakolojik ve non-farmakolojik olarak sınıflandırılabilirler. Non-farmakolojik yöntemler sıcak-soğuk uygulamalar, breys kullanılması, fizik

tedavi, yük vermeme veya zorlayıcı aktivitelerin azaltılması gibi aktivite modifikasyonları olarak sıralanabilir. Farmakolojik yöntemlerden başlıcaları anti-inflamatuvar ilaçlar, analjezikler, viskosuplementasyonlar ve lokal steroid uygulamalarıdır[94]. Mevcut, konservatif yöntemler ile sadece geçici olarak ağrı kontrolü sağlanabilir. Bu yöntemlerin uzun dönemde hastalığın doğal seyrine etki ettiği gösterilememiştir[95].

2.6.3.2. Cerrahi Yöntemler

Eklem kıkırdağı lezyonlarının cerrahi tedavisinde birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin başarısı eklem kıkırdağı defektinin yerine, büyüklüğüne, şekline, derinliğine, hastanın yaşına ve aktivite seviyesine göre değişmektedir. Cerrahi yöntemler palyatif, onarıcı (reperatif) ve canlandırıcı (rejeneratif/restoratif) olarak gruplandırılır. Bu grupların klinik olarak sonuçları birbirleri ile kesişim halindedir. Klinik pratiği sıklıkla palyatif yöntemler ve onarıcı yöntemler oluşturmaktadır[84].

2.6.3.2.1. Palyatif Yöntemler

Artroskopik lavaj ve Debridman: Eklem içerisindeki inflamasyon ve mekanik irritasyonun giderilmesini hedeflemektedir. Debridman ile fibrile olmuş kıkırdak yüzeyleri düzeltilir, eklem hareketini engelleyen osteofitler alınır ve inflamatuvar sinovyum dokusu temizlenir. Lavaj ile kıkırdak yüzeyleri yıkanarak sinovit miktarı ve kalsiyum fosfat kristalleri azaltılır. Bu yöntem ile uzun süreli yarar sağlanamasa da seçili hasta grubunda semptomatik fayda sağlanır[92]. Literatürdeki çalışmalara göre bu yöntemin en etkili olduğu hasta grubu lokalize mekanik semptomları bulunan, dizilim bozukluğu olmayan ve cerrahi geçirmemiş hastalardır[96]. Ayrıca konservatif yöntemlerle karşılaştırıldığında artroskopik debridman ve lavajın fonksiyonel sonuçları daha iyi olarak rapor edilmiştir. Bu yüzden fiziksel aktivitesi düşük hastalarda mantıklı bir tercihtir ancak uzun dönemde sorunu ortadan kaldırmayacağı bilinmelidir[97, 98].

2.6.3.2.2. Onarıcı (Reperatif) Yöntemler

Onarıcı (reperatif) yöntemlerin ortak amacı eklem kıkırdağındaki hasarlı bölgeye tamir özelliği bulunan hücrelerin yeterli miktarda ulaşmasını sağlamaktır. Bu hedefe ulaşmak için kemik iliği penetre edilerek kıkırdak defekti alanında kanamaya sebep olunur. Kemik iliğine ulaşılan delikler mikrokırık, drilleme ve abrazyon artroplastisi yöntemleri ile açılmaktadır. Bu yöntemler sonucu elde edilen kıkırdak defektlerindeki tedavinin temel amacı olan hiyalin kıkırdağın aksine fibröz kıkırdak olup tip 1 kollajen açısından zengindir. Fibröz kıkırdak biyomekanik olarak zayıf olduğundan herhangi bir ekstremitte dizilim bozukluğunun düzeltilmesi önerilmektedir. Kemik iliği stimülasyon teknikleri olarak da isimlendirilen bu grupta abrazyon artroplastisi, subkondral drilleme ve mikrokırık uygulanması yöntemleri bulunmaktadır[94].

Abrazyon Artroplastisi: Teknik olarak tam kat kıkırdak defektinin sınırlarındaki stabil olmaya kıkırdak debride edildikten sonra subkondral kemiğe abrazyon işlemi 4.5 mm'lik burr yardımı 2 mm derinliğinde uygulanır. Kapiller yatak bu seviyeden yeterli oranda kanamaya sebep olur[99]. 1980'li yıllarda popülerize olan bu yöntemin literatürdeki sonuçları değişkendir. Bu yöntem için en uygun hasta grubu ekstremitte dizilim bozukluğu olmayan ve yüksek hareket talebi bulunmayan hastalardır[83].

Subkondral Drilleme: Literatürde 1959 yılında Pridie tarafından tarif edilmiştir. Tekniğinde subkondral kemiğin yüksek hızlı drill yardımı ile delinmesi sonucu kanama ve pıhtı elde edilerek iyileşme mekanizması başlatılmış olur. En önemli dezavantajlarından birisi drilleme sırasında açığa çıkan ısının termal osteonekroza sebep olma potansiyelidir. İyileşme dokusu büyük oranda fibrokıkırdak yapısında olsa da hiyalin benzeri kıkırdak elde edildiği de rapor edilmiştir[83].

Mikrokırık Uygulama: Kemik iliği stimülasyon teknikleri arasında literatürde en fazla uygulanan tipidir. Felsefesi diğer kemik iliği stimülasyon tekniklerinde olduğu gibi subkondral kemiğin perfore edilmesi ile kök hücreler, büyüme faktörleri gibi kemik iliği bileşenlerinin kıkırdak defektine dökülmesini sağlamaktır. Kemik iliği bileşenleri zamanla remodele olarak fibrokıkırdağa

dönüşmektedir[100]. Endikasyonu, <2 cm², etrafı normal kıkırdak ile çevreli, kemik kaybı olmayan, fokal evre 3-4 kıkırdak lezyonlarıdır. Tekniğindeki ilk aşama defektin çevresindeki stabil olmayan kıkırdığın debridmanıdır. Sonrasında teknik için tasarlanmış *awl* yardımı 2-3 mm aralıklarla 2-4 mm derinliğinde delikler açılır[101]. Bu yöntem ile drillemenin termal etkilerinden korunmuş olunur. İyileşme dokusu fibrokıkırdak ile hyalin benzeri kıkırdığın hibridi olarak rapor edilmiştir. Kemik iliği stimülasyon teknikleri arasında komplikasyon oranı en düşük ve hyalin benzeri kıkırdak oranı en yüksek olanıdır. Fakat iyileşme dokusu zamanla fibrokıkırdak oranı daha da artarak dejenerasyona uğraması kaçınılmazdır[34]. Cerrahi sonrası devamlı pasif eklem hareketin ve kısıtlı yük verilmesinin sonuçlar üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir[102]. Literatürde 11 yıllık takip sonucu fonksiyonel sonuçlarının iyi olduğu rapor edilmiştir[103].

2.6.3.2.3. Canlandırıcı (Rejeneratif/Restoratif) Yöntemler

Eklem kıkırdığı defekterinin canlandırıcı tedavisi hasarlı bölgeye sağlam yapıda kıkırdığın transfer edilmesini veya hasarlı bölgede yeniden kıkırdak doku üretilmesini kapsamaktadır. Literatürde uygulanan eklem kıkırdığı transfer yöntemleri; osteokondral otogreft transferleri (mozaikplasti), osteokondral allogreft transferleridir. Yeniden kıkırdak üretilmesi konusunda otolog kondrosit implantasyonu ve doku mühendisliği çalışmaları bulunmaktadır[33].

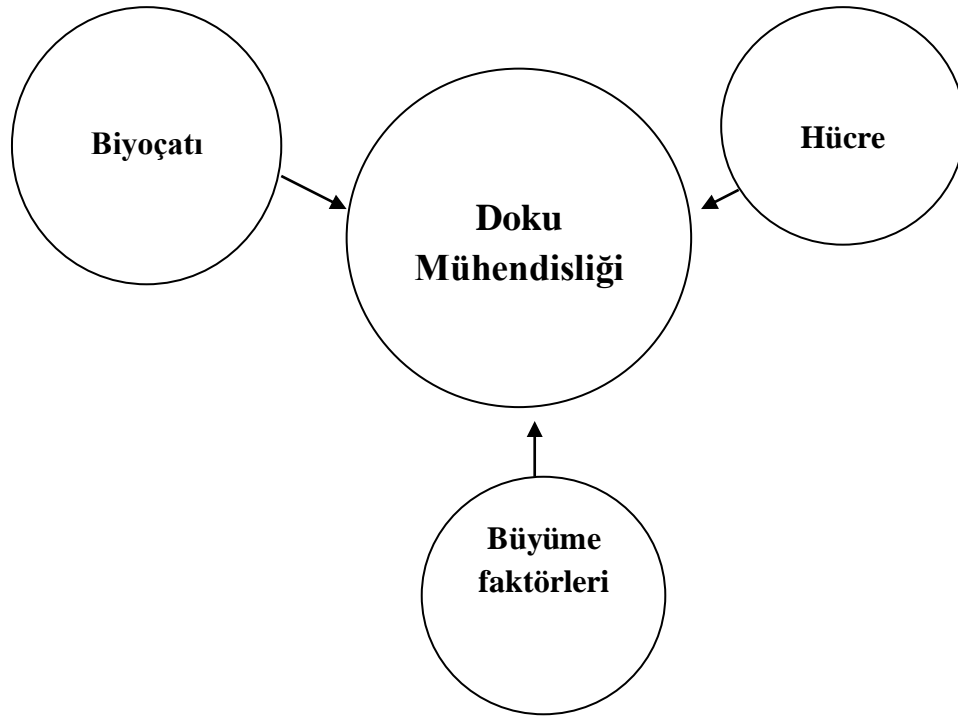
Osteokondral Otogreft Transferi (Mozaikplasti): Diz ekleminde bulunan daha az yük taşıyan bölgelerden alınan osteokondral tıkaçların daha çok yük taşıyan hasarlı bölgeye transfer edilmesi işlemidir[104]. Diz ekleminin üç boyutlu yapısı göz önüne alındığında donör sahadan alınan kıkırdığın yüzeyi ile transfer edilecek bölgenin yüzey uyumunun benzerliği tedavinin başarısını belirleyen temel faktörlerden birisidir. Literatürdeki yüzey uyumunun değerlendirildiği biyomekanik çalışmada 0.5 mm dışarıda olan greftlerin 0.5mm daha gömülmüş greftlere göre daha fazla kuvvet altında kaldığı gösterilmiştir. Bu yüzden önerilen tıkaçların kıkırdak yüzeyi ile aynı hizada bırakılması olsa da dışarıda bırakılmasından daha fazla gömülmesi önerilmektedir[87]. Bu yöntem ile hasarlı bölgeye bir veya birden fazla tıkaç transfer edilebilir. Alından greftin genişliği 2.5mm ile 10mm arasında değişmektedir. Eğer birden fazla tıkaç kullanılır ise tıkaçlar arasındaki alan

fibrokıkırdak ile iyileşme gösterir. Bu tekniğin kullanımındaki kısıtlayıcı basamak donör sahanın yeterliliğidir. Literatürde 4 cm² üst sınırına kadar uygulanabilmektedir[105]. Hangody ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 83 hastanın ikincil artrokopilerinde 69 hastada hiyalin kıkırdağın korunduğu fakat 14 hastada ise dejenere olduğu görülmüştür[106]. Literatürde osteokondral tıkaçların yüzeyinde hiyalin kıkırdak devamlılığını korur iken tıkaçlar çevresinde fibrokıkırdak olduğu rapor edilmiştir. Literatürde fonksiyonel sonuçlarının iyi olduğu rapor edilmektedir[107].

Osteokondral Allogreft Transferi: Osteokondral allogreft transferlerinin prensipleri otogreftler ile benzerdir. Elde edildikleri kaynak açısından farklılık göstermektedir. Donör saha morbiditesi bulunmadığı otogreftlemedeki geniş defektlere uygulanamama gibi temel kısıtlayıcı basamak aşılmış olur. Geniş defektlere uygulanma avantajı getirirse de kadavradan alındığı için bulaşıcı hastalıklar ve immonojenik reaksiyon potansiyeli gibi dezavantajlara sahiptir. Allogreftlerin dondurulmasından dolayı kondrositleri canlılığının devamı tartışma konusudur[108]. Literatürde orta-uzun dönem sonuçları cesaret verici olsa da greft temin edilmesi, tam olarak uygun boyutta greft bulunması ve teknik olarak zor olması bu tekniğin yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir[109].

Otolog Kondrosit İmplantasyonu: Otolog kondrositlerin hiyalin kıkırdak oluşturmak amacı ile kıkırdak defektine implante edilmesidir. 2-10 cm² boyutlarında,subkondral plağı zarar görmemiş, iyi sınırlı semptomatik kıkırdak defetlerinde tercih edilebilecek bir yöntemdir. Genellikle artroskopik debridman, kemik iliği stimülasyon teknikleri ve osteokondral otogreft transferi gibi tedavilerin başarısız olduğu durumlardan sonra uygulanması önerilmektedir. Tekniği iki aşamalı cerrahi gerektirmektedir. İlk aşamada eklem artroskopik olarak değerlendirilir ve bu sırada minimal düzeyde yük taşıyan bölgedeki normal kıkırdak dokudan tam kat biyopsi alınır. Alınan biyopsi in-vitro ortamda kültüre edilerek çoğaltılır[92]. Kültür ortamında kondrositler farklılaşabilir ve tip 2 kollajen sentez yeteneklerini geridönüşebilir şekilde azaltabilirler[110]. Kültürdeki kondrositlerin biyosentetik aktiviteleri ile kültüre yerleştirilen hücre sayısı ile lineer bir ilişki vardır. Bu yüzden biyopsi sırasında alınan hücre sayısı önemli olsa da başarılı implantasyon için

gereken hücre sayısı tam olarak bilinmemektedir[111]. İkinci aşamasında kültür ortamında üretilen kondrositler kıkırdak defektinde skar dokusu debride edildikten sonra implante edilir. Sonrasında tibiadan alınan periost implante edilen kondrositlerin üzerine sıkı bir şekilde dikilerek hücre kaçıışı engellenir. İmplant edilen kondrositler maturasyon sürecinde proliferatif faz, matris üretimi fazı ve maturasyon fazından geçmektedirler. Hastaların uyumu, maturasyon sürecinin bozulmaması için oldukça önemlidir. Erken dönemde, hücre organizasyonunun sağlanması devamlı pasif hareket uygulanır. İlk 4-6 hafta arası matris üretimi aşamasında yük vermeden mobilizasyon önerilir. Maturasyon fazına geçtikçe kontrollü olarak yük verilmeye başlanır[92]. Maturasyon süreci bir ile iki yıl arasında değişmektedir. Tekniğin ilk kullanılmaya başlandığı zamanlarda periost greftinin hipertrofiye bağlı ikincil artroskopik cerrahiler %20-25 oranında gerekliydi[112]. Periost yerine sentetik kollajen membranların kullanıma geçmesi ile bu oranın %5 ve altına indiği rapor edilmiştir[113]. Bu teknik sonucunda elde edilen kıkırdak dokusunun karakterinin öngörülemez olması endişe yaratmaktadır. Literatürde otolog kondrosit implantasyonu uygulanan 20 hastanın ikinci yıllarında ikincil artroskopi yapıldığı bir çalışmada, histolojik olarak 13 hastada hyalin ve hyalin benzeri kıkırdak görülürken 7 hastada da fibröz veya fibro-hyalin kıkırdak karışımı rapor edilmiştir[114].



Şekil 2.6. Biyomühendislik triadı. [51]

Rejeneratif Tıp ve Doku Mühendisliği: Literatürde eklem kırıkdağı defektleri için uygulanan yöntemler sonucu öngörülebilir başarıda hiyalin kırıkdağı üretilmesi gerçekleştirilemediğinden bu amaç için araştırmalar devam etmektedir. 1990'lı yıllardan günümüze uzanan zaman diliminde doku mühendisliği interdisipliner bir araştırma alanıdır. İçerisinde mühendislik, materyal bilimi, biyoloji ve kimya gibi disiplinleri barındırarak hasar görmüş dokuların, geliştirdiği biyolojik materyallerle eski fonksiyonlarını görmelerini sağlamayı amaçlar. Doku mühendisliğinin başarısı hücreler, büyüme faktörleri ve biyoçatı (skafold)'lara bağlıdır. Bu üç bileşene doku mühendisliğinin triadı denmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma 36 adet 300 gr ve üzeri, Wistar albino cinsi erkek sıçan ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan 2017/48-07 numaralı izin belgesi alınmıştır. Çalışma mali olarak Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi tarafından THD-2018-16887 proje numarası ile desteklenmiştir.

Çalışmada sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrılarak incelenmiştir. 1. grup (K) kontrol grubudur. 2. gruba (P) sadece hücreden arındırılmış edilmiş insan plasentaı uygulanmıştır. 3. gruba (PK) hücreden arındırılmış edilmiş plasenta ile birlikte kök hücre uygulanmıştır. 4. gruba (PP) hücreden arındırılmış edilmiş plasenta ile birlikte PRP uygulanmıştır. 5 gruba (PKP) da hücreden arındırılmış plasenta+PRP+kök hücre uygulanmıştır. Hayvan sayısını azaltabilmek için sıçanların her iki dizine de cerrahi işlem uygulanmıştır. 1 adet sıçandan PRP hazırlanabilmesi için uygun anestezi altında 15ml intra-kardiyak kan alınarak ötenazi uygulanmıştır.

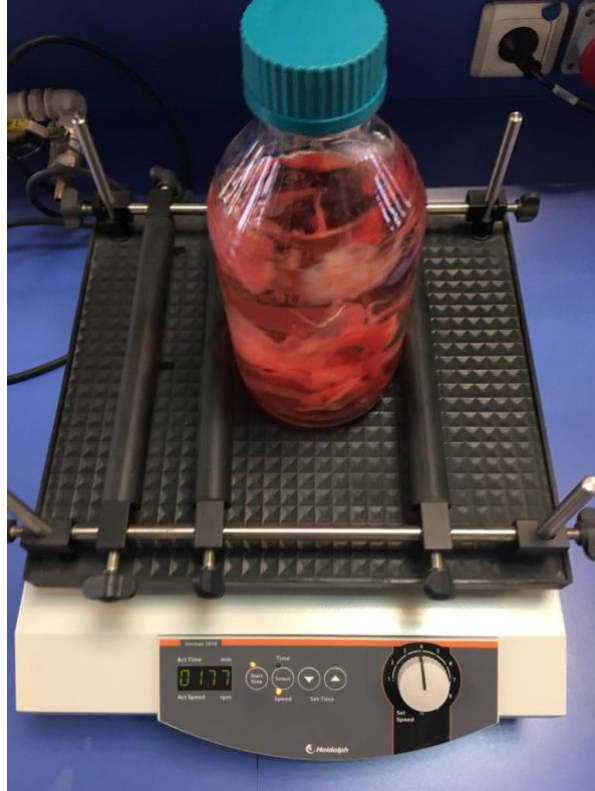
Grup	Örnek sayısı
Kontrol grubu (K)	14
Sadece hücreden arındırılmış insan plasentaı biyoçatısı (P)	14
Hücreden arındırılmış insan plasentaı biyoçatısı + Kök hücre (PK)	14
Hücreden arındırılmış insan plasentaı biyoçatısı + PRP (PP)	14
Hücreden arındırılmış insan plasentaı biyoçatısı + Kök hücre + PRP (PKP)	14

Tablo 3.1. Gruplara göre cerrahi işlem planlanan diz sayıları.

Çalışmanın süreci plasentaın hücreden ayrılarak biyoçatının oluşturulması, kök hücrelerin çoğaltılması ile başlamıştır. Biyoçatı ve kök hücrelerin hazırlanmasını takiben cerrahi prosedür uygulanmış ve hayvanlara 12. haftada ötenazi uygulanarak histolojik inceleme yapılmıştır.

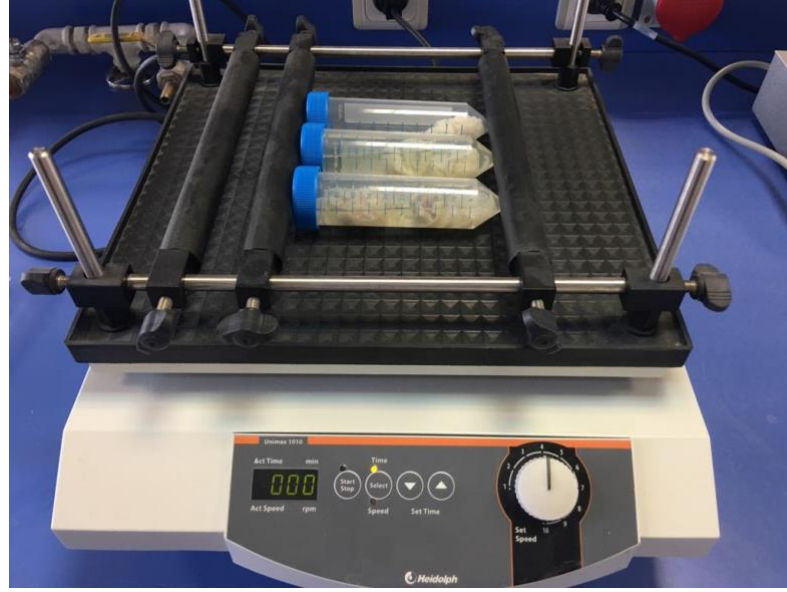
3.1. Plasentanın hücreden arındırılması

Çalışmada daha önceden farklı deneylerde kullanılan plasenta parçası kullanılmıştır. -80 °C'den alınan doku parçaları ilk olarak derin dondurucuya (-20 °C) daha sonra da buzdolabına (+4°C) konularak dereceli olarak çözündürülmüştür. Daha sonra çözündürülen dokular 1 litrelik şişe içerisinde hazırlanan ve aralıklı olarak 24 saat içerisinde 3 kere değiştirilen PBS içersine alınarak 24 saat boyunca çalkalamalı karıştırıcıda çalkalanmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Dokuların PBS içerisinde 24 saat boyunca yıkanması.

Bu aşamadan sonra dokular %1 (w/v)'lük sodyum dodesil sülfat (SDS) içersine alınarak sabit çalkalama hızında 24 saat boyunca çalkalamaya bırakılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Dokuların %1 (w/v)'lik SDS içerisinde 24 saat boyunca çalkalanması.

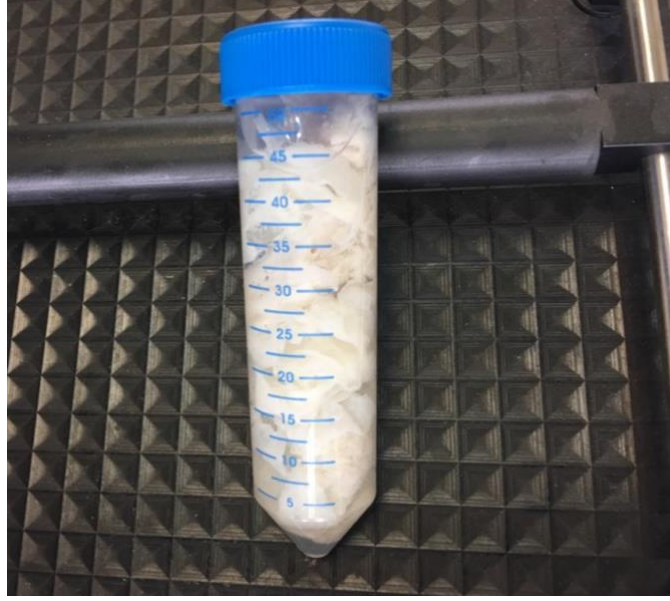
Daha sonra SDS çözeltisinden çıkarılan dokular PBS çözeltisi ile en az 3 kez yıkanarak dokuların içerisinde kalan fazla SDS ortamdan uzaklaştırılmıştır. Bundan sonra doku içerisindeki lipidlerin uzaklaştırılması için PBS içerisindeki dokular ayrı tüplere alınarak 48 saat boyunca izopropanol içerisinde bekletilmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Dokuların izopropanol içerisinde bekletilmesi.

Dokular izopropanol çözeltisinden alındıktan sonra en az 3 kez PBS ile yıkanmış ve son aşamaya geçilmiştir. Son aşamada dokularda kalan DNA ve

RNA'lar uzaklaştırılmıştır. Bunun için dokular tek bir tüpe alınarak DNase ve RNase enzim karışımında 37°C 'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Dokulardan DNA ve RNA'ların uzaklaştırılması.

Son olarak dokular PBS içerisinde yıkanarak petri kaplarına dökülür ve 48 saat boyunca liyofilize edilmiştir (Şekil 3.5., Şekil 3.6. ve Şekil 3.7.).



Şekil 3.5. Dokuların PBS ile yıkanması.



Şekil 3.6. Hücreden arındırılmış yapıların petri kaplarına dökülmesi.



Şekil 3.7. Hücreden arındırılmış yapıların liyofilize edilmesi

3.2. Kök Hücrelerin Üretilmesi

3.2.1. Mezenkimal kök hücre izolasyonu ve kültürde çoğaltılması

Çalışma kapsamında 2016/03 toplantı ve 01 Karar numaralı etik kurul kararı ile araştırmalarda kullanılmak üzere sağlıklı kemik iliği nakli donörlerden elde edilen ve arşivimiz cryostoklarında izole edilerek mononükleer hücreler kullanılmıştır. Sekiz yaşında, bayan, sağlıklı kemik iliği vericisinden elde edilen -196C'de saklanan mononükleer hücreler 37C'deki su içerisinde çözülerek T-75 doku kültür kabına 20×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve 10 ml büyüme besi yeri (DMEM-LG, %10 fetal bovine serum, %1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin) içerisinde 37C, %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler 4. pasaja gelene kadar hücre kültürüne devam edilerek adezyon gösteren fibroblastoid hücreler elde edilmiştir.

Mononükleer hücrelerin izolasyonunu takiben hücreler 25 cm² flasklarda 4×10^5 hücre/cm² olacak şekilde %10 FBS (*Gibco*, USA), %1 Penisillin-streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren DMEM-LG (*Biological Industries*, İsrail) içeren 5 ml medyum ile 37° C, %5 CO₂ ve nemli ortamında kültüre konulmuştur. Kültürler 24–48 sonrasında taze medyumla değiştirilerek flask tabanına yapışmayan hücreler uzaklaştırılmıştır. Her gün düzenli olarak inverted mikroskopla kontrol edilerek 3–4 günde bir kültür ortamı değiştirilerek kültüre devam edilmiştir. Hücreler 7–12 gün içerisinde flasksın yüzeyini %70–80 kapladığı zaman %0.25 oranında hazırlanan Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırılmıştır. Sonraki pasajlarda 4×10^3 hücre/cm² olacak şekilde 75 cm² lik flasklara ekim yapılarak hücreler geliştirildi. Bu şekilde 3. pasaja kadar çoğalma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Mezenkimal kök hücrelerin immüfenotiplendirilmesi (Akım Sitometri Çalışması)

İnsan kemik iliğinden izole edilen hücreler akım sitometri cihazında antikorlar ile tanımlanmıştır. Antikor paneli olarak; CD29 (*e-bioscience*, USA), CD34 (*BD Biosciences*, USA), CD44 (*e-bioscience*, USA), CD45 (*BD Biosciences*, USA), CD73 (*BD Biosciences*, USA), CD90 (*BD Biosciences*, USA), CD105 (*e-bioscience*, USA), CD146 (*BD Biosciences*, USA) kullanılarak Navios (*Beckman Coulter*, USA) akım sitometri cihazı ile analizler yapılmıştır.

3.2.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesi

Mezenkimal kök hücrenin adipojenik ve osteojenik hücre serilerine farklılaşma potansiyelini değerlendirmek için hücre kültür ortamına gerekli olan uyarılar eklenmiştir. Farklılaşmaya yönlendirilmiş olan hücreler morfolojik olarak ve histokimyasal boyamalarla değerlendirilmiştir.

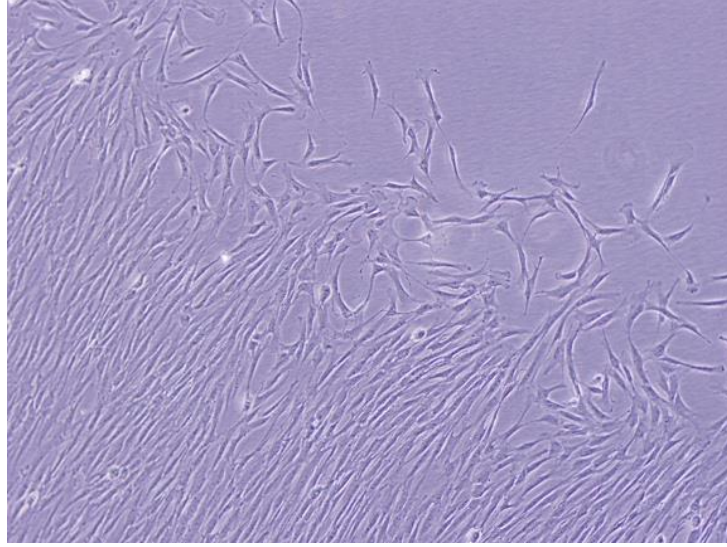
Osteoblast Hücre Farklılaşması: Tripsinize edilmiş olan MKH'ler 9,6 cm²'lik propilen petri kaplarına 2x10³ hücre/cm² olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, petri kapları için %60–70 oranında kapladığı zaman, DMEM-LG (*Biological Industries*, İsrail) içerisine %10 FBS (*Gibco*, USA), 100 nM dexamethasone (*Sigma*, USA), 10 mM beta glycerophosphate (*Sigma*, USA) ve 0,2 mM ascorbic acid (*Sigma*, USA) ilave edilerek hazırlanmış olan osteoblast farklılaşma medyumu petrilerdeki hücrelere 2'şer ml ilave edilmiş ve 30 gün süresince 3-4 gün aralıklarla kültür ortamı değiştirilerek takip edilmiştir. Süre bitiminde farklılaşması beklenen hücreler Alizarin Kırmısı S (*Sigma*, USA) boyası ile boyanarak farklılaşma potansiyeli analiz edilmiştir.

Adiposit Hücre Farklılaşması: Tripsinize edilmiş olan MKH'ler 9,6 cm² lik propilen petri kaplarına 2x10³ hücre/cm² olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler, petri kapları için %90–100 oranında kapladığı zaman, DMEM-LG (*Biological Industries*, İsrail) içerisine %10 FBS (*Gibco*, USA), 1µM dexamethasone (*Sigma*, USA), 60 µM indomethacine (*Sigma*, USA), 500 µM IBMX (*Sigma*, USA) ve 5 µg/ml insulin (*Sigma*, USA) ile hazırlanmış olan farklılaşma ortamı konularak farklılaşma yapılmıştır. Otuz gün süresince 3–4 gün aralıklarla medyumu değiştirilerek takip edilmiştir. Bu süre sonunda farklılaşan hücreler Oil Red O (*Sigma*, USA) boyası ile boyanarak tespit edilmiştir.

MKH kültürlerinin Fe ile işaretlenmesi: Flask içerisindeki hücreler konfluent hale getirildikten sonra 50 ug/ ml endorem (Endorem: ferumoxide ile işaretli magnetik işaretli) ve 0,375 ug/ml poly-L-Lysine ile 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler PBS ile 3 kez yıkanacak ve %0,25 Tripsin/EDTA ile yapışan hücreler kaldırılmış ve trypan mavisi ile canlılık/hücre sayısı bakılmıştır. Her bir sıçan için 1x10⁶ hücre olacak şekilde PBS içerisinde uygulama için hazırlanmıştır.

3.2.4. Mezenkimal kök hücre morfolojisi ve çoğalma özellikleri

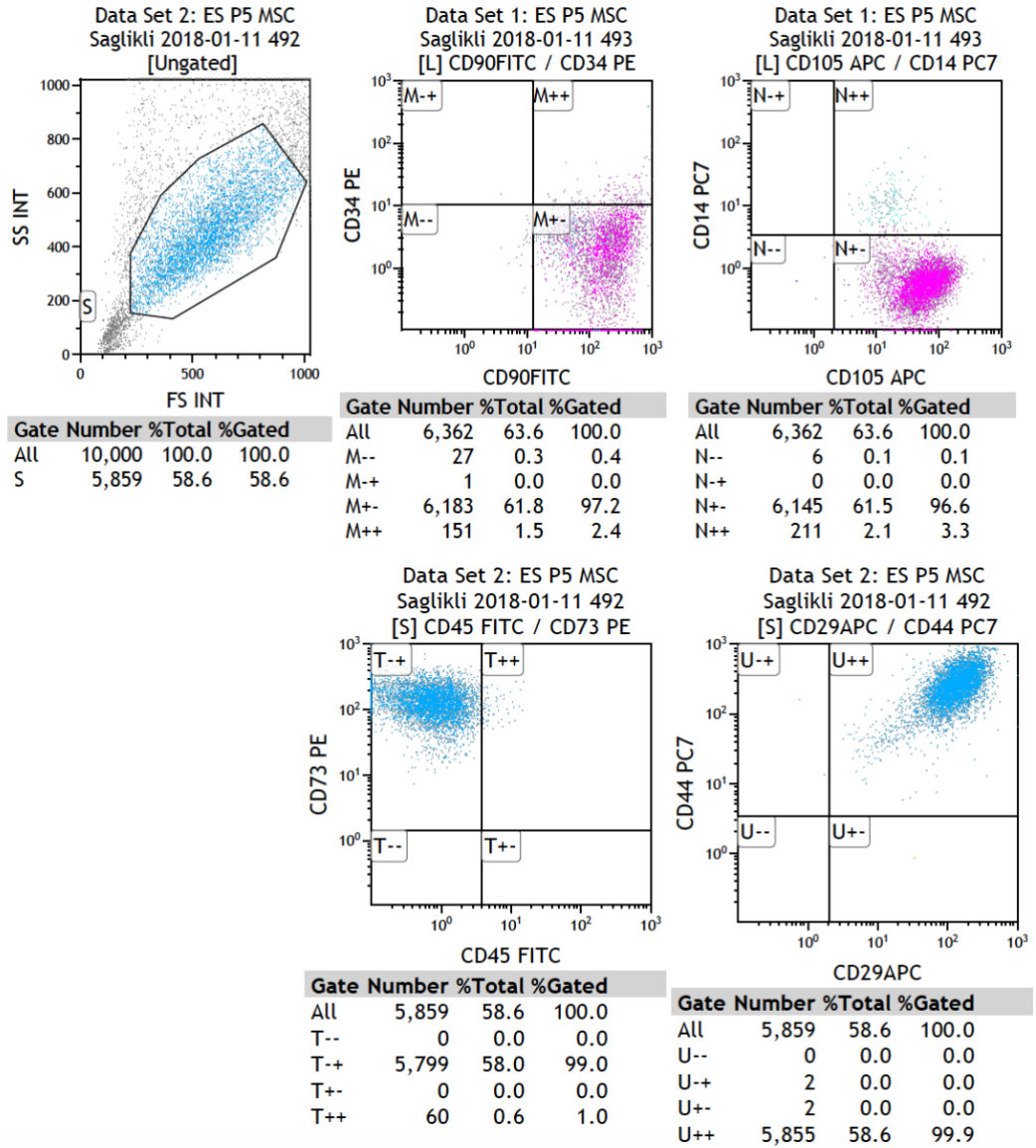
Mononükleer hücreler 25 cm²'lik flasklarda (T25) kültür ortamına konulduktan 48 saat sonra adezyon gösteren iğsi yapıda hücreler gözlenmiştir.



Şekil 3.8. Kültür ortamında çoğalan mezenkimal kök hücrelerin “*inverted*” mikroskoptaki görünümü. (B:10x büyütme)

3.2.5. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi

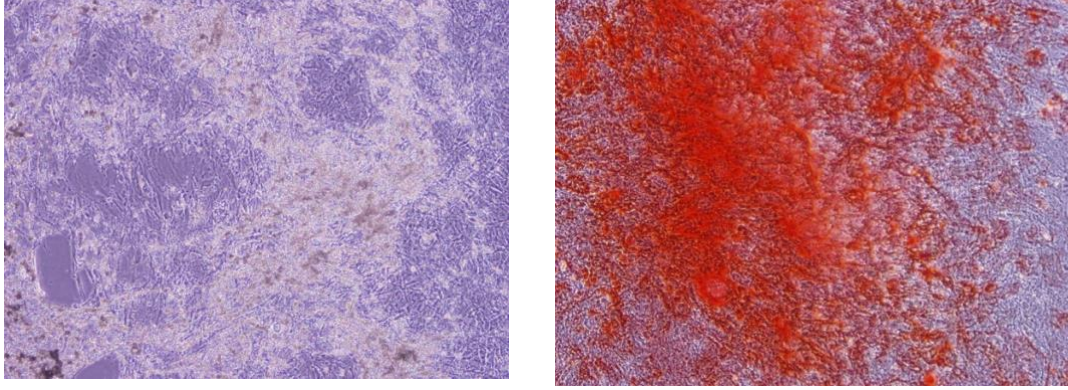
Mezenkimal kök hücreler Pasaj 5’de akım sitometri ile hücre büyüklüğü ve granülaritesine göre değerlendirilmiş ve homojen bir hücre popülasyonu elde edilmiştir. Hücrelerin adezyon moleküllerine özgü CD105, CD90, CD73, CD29 ve CD44 yüzey antijenlerinin ekspresyonu %97 üzeri pozitif olduğu ve hematopoetik kökenli hücrelere özgü CD14, CD 45 ve CD34 lerin ise negatif oldukları gözlenmiştir.



Şekil 3.9. Mezenkimal kök hücrelerin immüfenotiplendirilmesi.

3.2.6. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesinin değerlendirilmesi

Osteojenik farklılaşma: Kültür kaplarında yaklaşık olarak 7 gün sonra küçük koyu renkte depolanmalar görüldü ve kültürün ilerleyen günlerinde bunlar giderek artmıştır. Yirmi bir günün sonunda, kültür kabı çok sayıda amorf depolanmalar ile kaplanmış ve hücreler açıkça görülmüştür. Mezenkimal kök hücrelerin in vitro osteojenik potansiyelleri 21 günün sonunda yapılan Alizarin red boyası ile boyanan kalsiyum mineralizasyonunun gösterilmesi ile tespit edilmiştir.

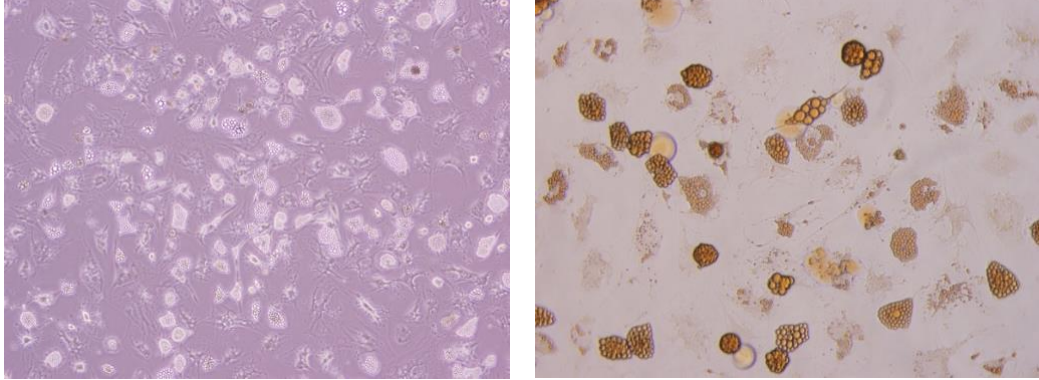


A

B

Şekil 3.10. Osteojenik vasat içinde uyarılan mezenkimal kök hücrelerin görünümü. (A: Alizari red boyası ile boyanmış osteojenik hücreler 10x, B: Alizari red boyası ile boyanmamış osteojenik hücreler 10x)

Adipojenik farklılaşma: Kültürler, adipojenik vasat içinde farklılaşmaya konulduktan 21 gün sonra Oil Red O boyası ile boyandılar ve kırmızıya boyanan çok sayıda homojen lipit damlacıkları görülmüştür.



A

B

Şekil 3.11. Adipojenik vasat içinde uyarılan mezenkimal kök hücrelerin görünümü. (A: Oil Red O boyası ile boyanmış adipojenik hücreler 10x, B: Oil Red O boyası ile boyanmamış adipojenik hücreler 20x)

3.3. Trombositten Zengin Plazma (PRP) Hazırlanması

Trombositten zengin plazma (PRP) hazırlanması için 1 adet sıçandan 10 ml kan intrakardiyak olarak alınmıştır. Kan alınmasının ardından sıçana ötenazi işlemi uygulanmıştır.



Şekil 3.12. Sıçandan intra-kardiyak kan alınması.

Alınan kana 1ml sodyum glukonat antikoagülan ilave edildikten sonra 1200 devirde 5 dakika santrifüj edilerek eritrositler ayrıştırılmıştır.

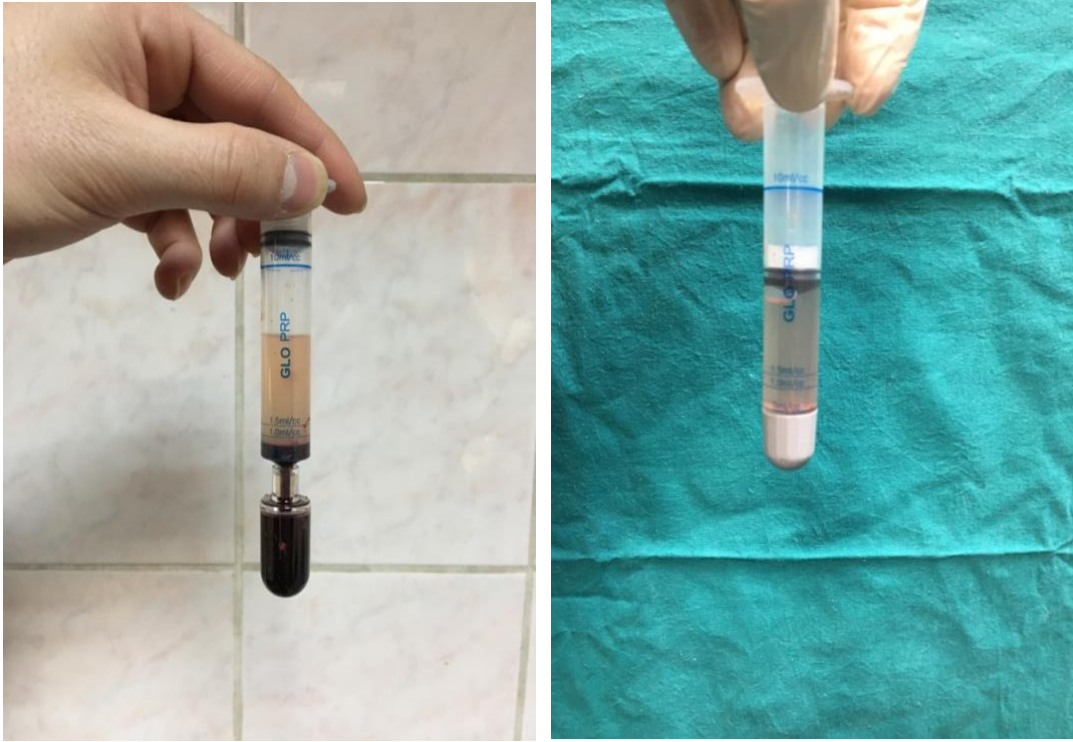


Şekil 3.13. Alınan kanın 1 ml sodyum glukonat ile karıştırılması.

Eritrositler ayrıştırıldıktan sonra tekrar 1200 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Kapağı yerleştirilerek cerrahi işlem sırasında kullanıma hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.14. 5 dakika boyunca 1200 devirde santrifüj edilmesi.



Şekil 3.15. 1200 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra kapağının takılarak kullanıma hazırlanması.

3.4. Cerrahi işlem

3.4.1. Anestezi Uygulanışı

Cerrahi öncesi sıçanlara anestezi için ksilazin ve ketamin karışımı hazırlanmıştır. Karışımın dozu 35 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylazine olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan enjekte edilebilir karışım sıçanlara intraperitoneal yolla verilmiştir.

3.4.2. Cerrahi Prosedür

Sıçanlarda uygun anestezi sağlandıktan sonra diz anterior hat insizyonu ile cilt ve cilt altı doku geçilmiştir. Diz eklemlerine medial parapatellar yaklaşım ile artrotomi uygulanarak troklea bölgesi ortaya çıkarılmıştır. Tüm gruplarda ortak olarak troklea bölgesi 2 mm drill yardımı ile 3 mm derinliğinde osteokondral hasar oluşturulmuştur.

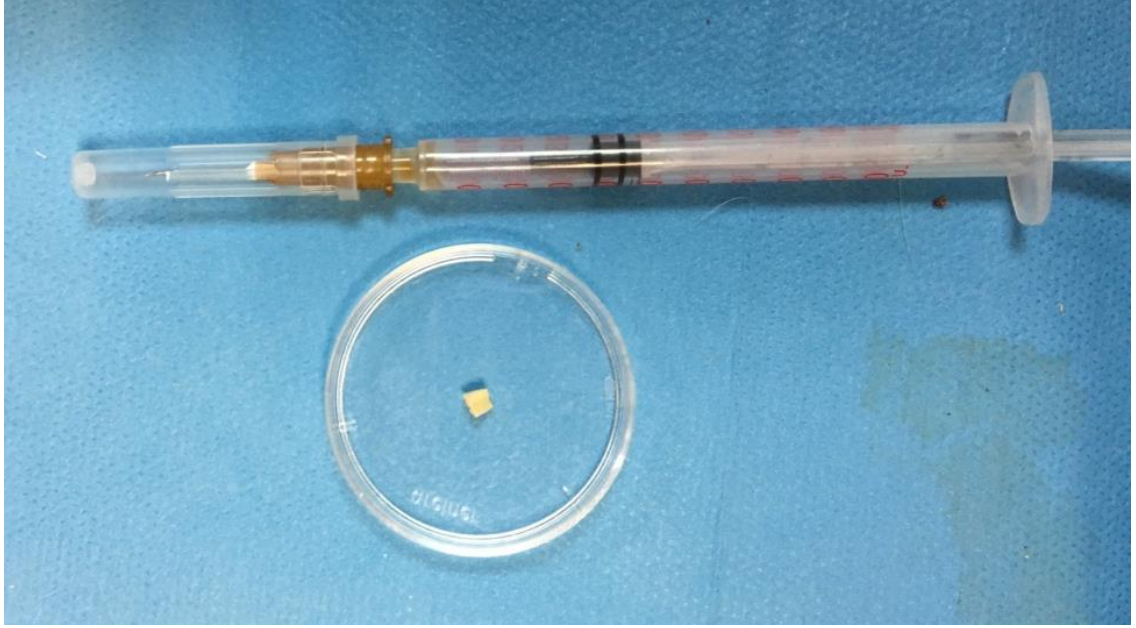


Şekil 3.16. Diz anteriorundan yapılan insizyon.

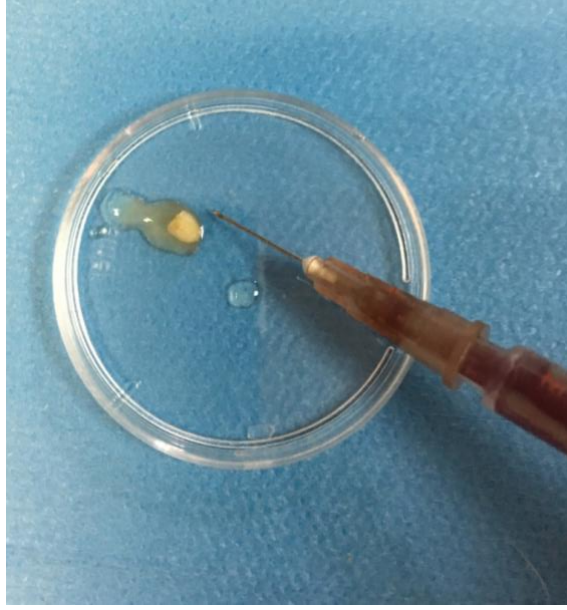


Şekil 3.17. 2 mm drill yardımı ile troklea bölgesine açılan osteokondral defekt.

Osteokondral defekt oluşturulduktan sonra kontrol grubunda (K) herhangi bir uygulama yapılmadan diz eklemi kapatılmıştır. Hücreden arındırılmış insan plasentası grubunda (P) açılan defekte, öncesinde uygun boyutlarda kesilmiş hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısı yerleştirilerek diz eklemleri kapatılmıştır. Hücreden arındırılmış insan plasentası ve kök hücre grubunda (PK) aynı boyutlardaki plasenta biyoçatısı bir petri kabı içerisinde her bir diz için ayrı ayrı 10^6 mezenkimal kök hücre birleştirilerek açılan osteokondral defekt içerisine yerleştirilmiştir. Hücreden arındırılmış insan plasentası ve PRP grubunda (PP) aynı boyutlarda kesilmiş plasenta biyoçatısı ile PRP ile birleştirilerek osteokondral defetin içerisine yerleştirilmiştir. Son olarak hücreden arındırılmış insan plasentası, kök hücre ve PRP (PKP) grubunda aynı şekilde kesilen plasenta biyoçatısı ile PRP ve 10^6 mezenkimal kök hücre petri kabında her diz için ayrı ayrı birleştirilerek osteokondral defektin içerisine yerleştirilmiştir.



Şekil 3.18. Petri kabının içerisinde uygun boyutlarda kesilmiş hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısı ve enjektör içerisinde 10^6 mezenkimal kök hücre.



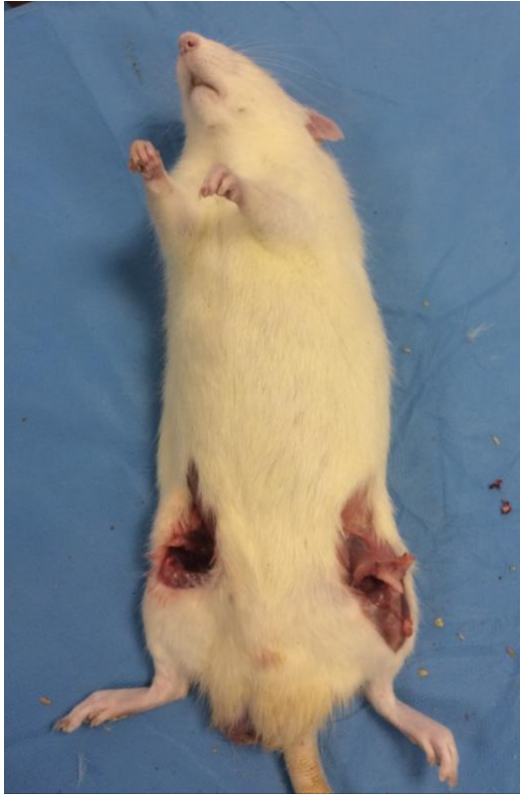
Şekil 3.19. Petri kabı içerisinde hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısı ve mezenkimal kök hücrenin birleştirilmesi.



Şekil 3.20. Hücreden arındırılmış insan plasentasının mezenkimal kök hücre ile birleştirildikten sonra osteokondral defekte uygulanmış hali.

3.5. Cerrahi İşlem Sonrası Takip ve Ötenazi

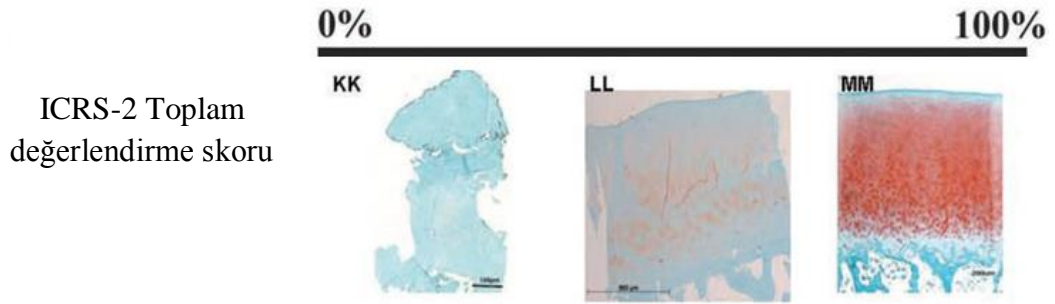
Sıçanların cerrahi sonrası bakım ve takipleri Hacettepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Her gruba ait sıçanlar aynı kafeste takip edilmişlerdir. Sıçanlar 12 hafta takip edilmiştir. Deneysel sırasında kontrol (K) ve hücreden arındırılmış insan plasentasından (P) birer adet hayvan kaybedilmiştir ancak sonrasındaki 12 haftalık takip süreçlerinde deneklerde kayıp yaşanmamıştır. Deneklerde herhangi bir komplikasyon gözlenmemiştir. Deneklere ötenazi uygulanarak uyluk anteriorundan yapılan insizyon ile uylukları diz ve kalça eklemlerinden dezartiküle edilmiştir. Sonrasında sadece diz bölgesi kalacak şekilde spesmenler küçültülerek histolojik inceleme için hazırlanmıştır.



Şekil 3.21. Ötenazi sonrası uyluk anteriorundan yapılan insizyon ve uyluk kemiğinin diz ve kalça eklemlerinden dezartikülasyonu.

3.6. Histolojik İnceleme

Alınan doku örnekleri, tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda 48 saat süre ile fikse edildikten sonra otomatik doku takip cihazında sırası ile alkol, ksilen ve parafinden geçirildikten sonra yatay pozisyonda olacak şekilde parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklara gömülen dokulardan mikrotom cihazı ile 5 mikron kalınlığında 100 adet seri kesit alındı. Elde edilen seri kesitler, deparafinizasyon yapıldıktan sonra Masson's Trichrome ve Hematoxylin-Eosin boyası ile boyanarak ışık mikroskobunda incelenmek üzere hazırlandı. Preperatlar *Leica D6B upright reserve* ışık mikroskobunda *DFC 7000 dijital color kamera* ile incelenerek görüntüleri dijital ortama kaydedilmiştir. Histolojik skorlar, *International Cartilage Repair Score-2* (ICRS-2)'de tanımlanan parametrelerin görsel analog skalasına göre hesaplanmıştır[115].



Şekil 3.22. ICRS-2 Toplam değerlendirme skoru, 0% fibröz doku. 100% hiyalin kıkırdak. [115]

3.7. İstatistiksel Analiz

Her bir grup için ICRS-2 toplam değerlendirme skorları hesaplanmıştır. Bulunan skorların ortalama değerleri Kruskal-Wallis testi ile analiz edilerek birbirleri ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir. Değerlendirmede güven aralığı 0.05 olarak kabul edilmiştir. Veriler bilgisayar ortamında SPSS v23 ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Sıçanlar cerrahi işlem sonrası 12 haftalık takip edildikten sonra ötenazi uygulanarak elde edilen dokularda ICSR-2 toplam değerlendirme skorları hesaplanmıştır. Deney sırasında kontrol (K) grubundan ve plasenta (P) grubundan birer sıçan kaybedildiğinden bu iki grupta 12'şer diz, PP grubunun histolojik değerlendirilmesinde iki hayvanın preparatları skora için yeterli olmadığından 10 adet diz, PK ve PRP grupların kayıp yaşanmadan 14'er diz histolojik değerlendirmeye alınmıştır.

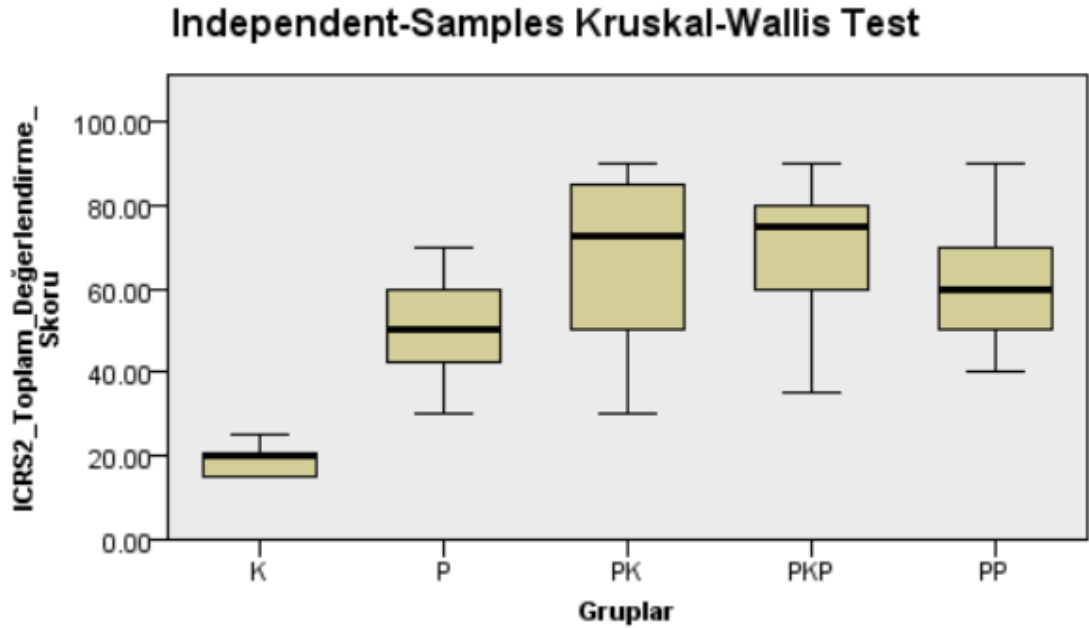
ICRS-2 Toplam Değerlendirme Skoru	Kontrol (K) Grubu (n=12)	Plasenta (P) Grubu (n=12)	Plasenta ve Kök Hücre (PK) Grubu (n=14)	Plasenta, Kök Hücre ve PRP (PKP) Grubu (n=14)	Plasenta ve PRP (PP) Grubu (n=10)
1L	15	30	90	75	50
1R	20	40	90	80	55
2L	20	55	70	75	50
2R	20	60	50	75	60
3L	15	70	75	80	90
3R	20	60	30	80	80
4L	20	50	50	70	
4R	20	45	70	40	
5L	15	50	30	35	
5R	15	60	70	30	
6L	20	40	85	90	40
6R	25	45	85	90	60
7L			90	75	70
7R			75	60	70
Ortalama	18,75	50,4	68,5	68,2	62,5

Tablo 4.1. Kontrol ve Deney gruplarının histolojik analiz skorları ortalamaları.

Verilerin toplam değerlendirme skorları alındığında kontrol grubunun (K) ortalaması 18.75 ± 3.1 , plasenta grubunun (P) ortalaması 50.4 ± 11.1 , plasenta + kök hücre grubunun (PK) ortalaması 68.5 ± 20.8 , plasenta + PRP grubunun (PP) ortalaması 62.5 ± 15.1 , plasenta + kök hücre + PRP (PKP) grubunun ortalaması ise 68.2 ± 19.5 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1.). Veriler gruplar içerisinde normal dağılım göstermediğinden Kruskal-Wallis testi ile sıra ortalamaları karşılaştırılmıştır. Sıra ortalaması (*mean rank*) K grubunda 6.5, P grubunda 27.21, PK grubunda 42.11, PP grubunda 36.6 ve PKP grubunda 42.36 olarak hesaplanmıştır.

Gruplar	N	ICRS-2 Toplam Değerlendirme Skorları Sıra Ortalamaları (<i>Mean rank</i>)
K	12	6.5
P	12	27.21
PK	14	42.11
PKP	14	42.36
PP	10	36.6

Tablo 4.2. Kontrol ve Deney gruplarının histolojik analiz skorlarının sıra ortalamaları.



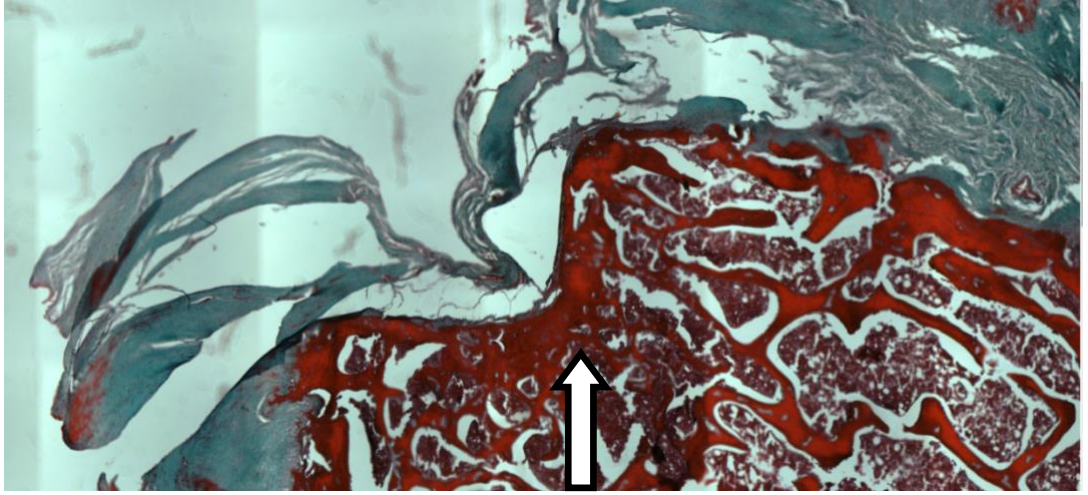
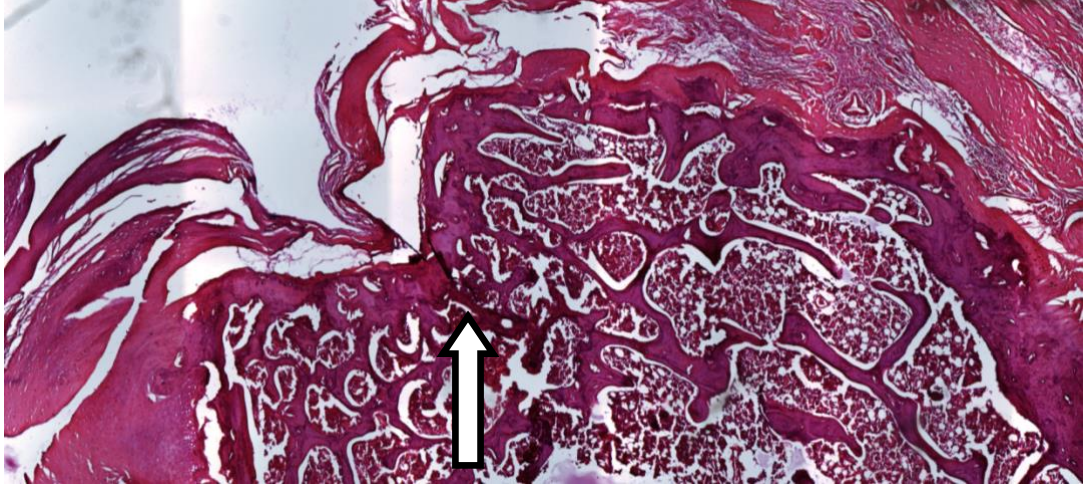
Şekil 4.1. Toplam değerlendirme skorlarının gruplara göre dağılımı.

Deney grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; P grubun ($p:0.048$), PP grubunun ($p:0.001$), PK grubunun ($p<0.001$) ve PKP grubunun ($p<0.001$) toplam değerlendirme skorları istatistiksel anlamlı olarak kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür,

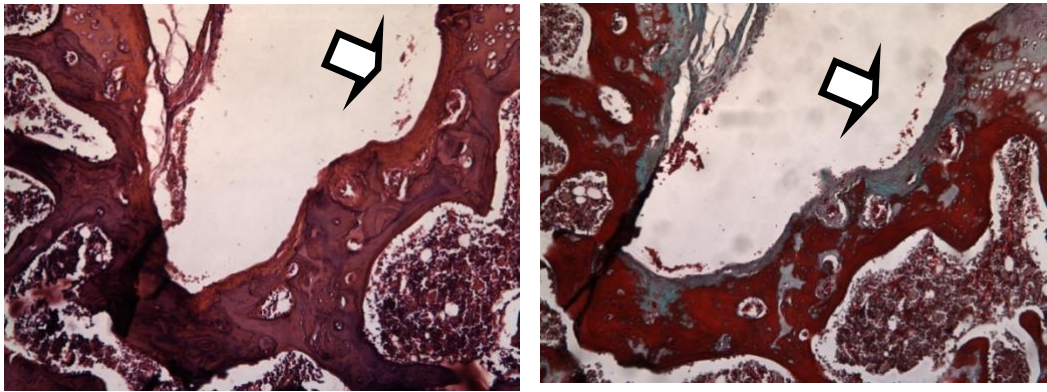
Deney grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında PK, PP ve PKP grubunun toplam değerlendirme skorlarının P grubuna göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Ancak PK, PP ve PKP gruplarının ortalama toplam değerlendirme skoru P grubuna göre yüksek olmasına karşı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). PKP grubunun toplam değerlendirme skoru PK ve PP grubuna göre yüksek bulunmuştur fakat bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). PP ve PK grupları arasında toplam değerlendirme skorları açısından anlamlı fark gösterilememiştir ($p>0.05$).

Kontrol grubu ile Deney gruplarının karşılaştırılması	Test istatistiği	Standart hata	Standart test istatistiği	Sig.	Adj. Sig.
K-P	-20.708	7.338	-2.822	0.005	0.048*
K-PP	-30.100	7.696	-3.911	0.000	0.001*
K-PK	-35.607	7.071	-5.036	0.000	0.000*
K-PKP	-35.857	7.071	-5.071	0.000	0.000*
Deney gruplarının kendi aralarında karşılaştırılması					
P-PP	-9.392	7.696	-1.220	0.222	1.000
P-PK	-14.899	7.071	-2.107	0.035	0.351
P-PKP	-15.149	7.071	-2.142	0.032	0.322
PP-PK	5.507	7.442	0.740	0.459	1.000
PP-PKP	5.757	7.442	0.774	0.439	1.000
PK-PKP	-0.250	6.794	-0.037	0.971	1.000

Tablo 4.3. Toplam değerlendirme skorlarının gruplara göre istatistiksel analizi.

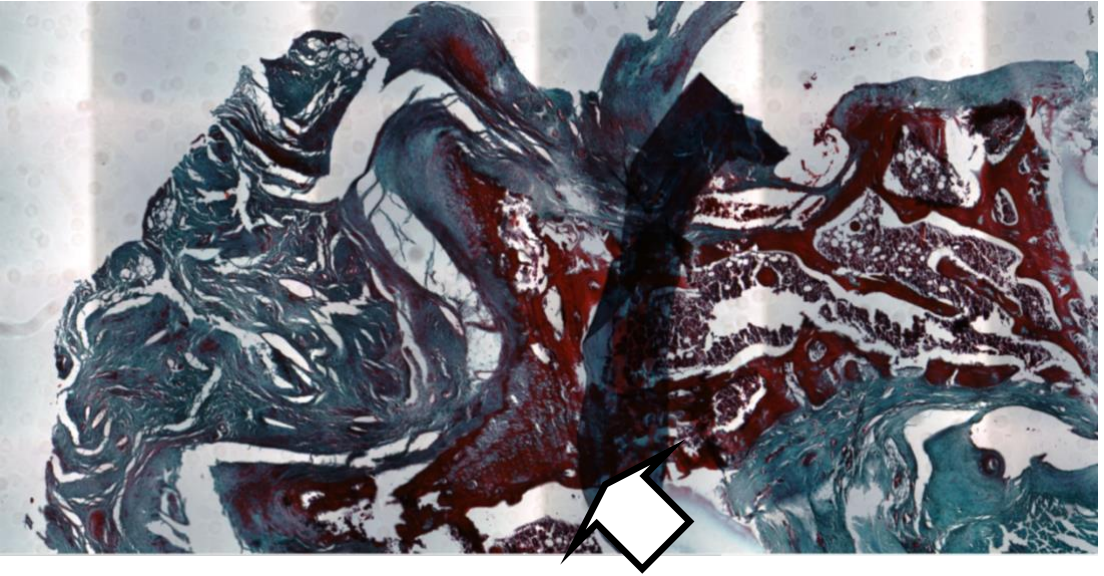
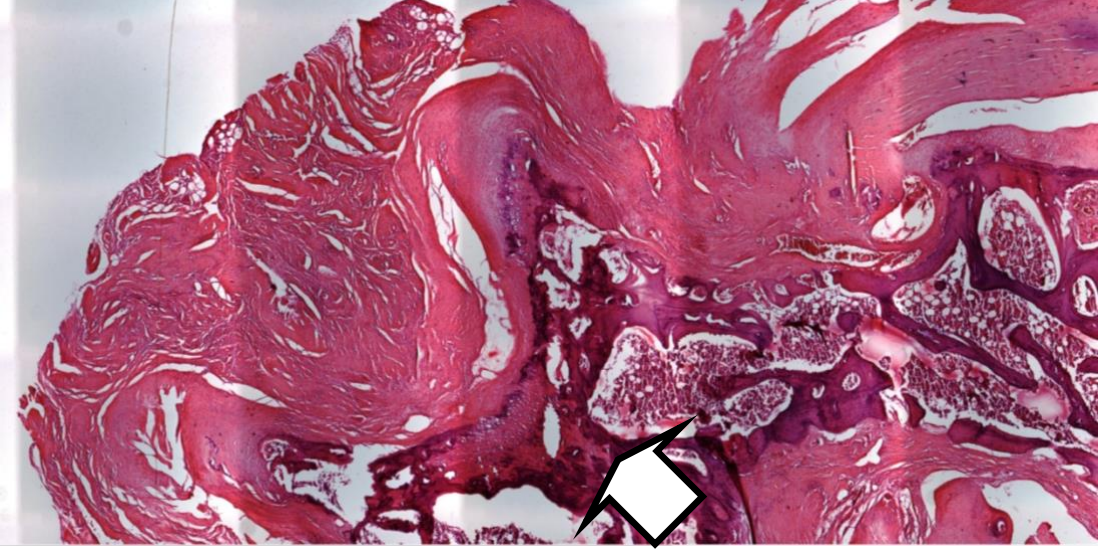


Şekil 4.2. Kontrol grubunun Hematoksilin- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.

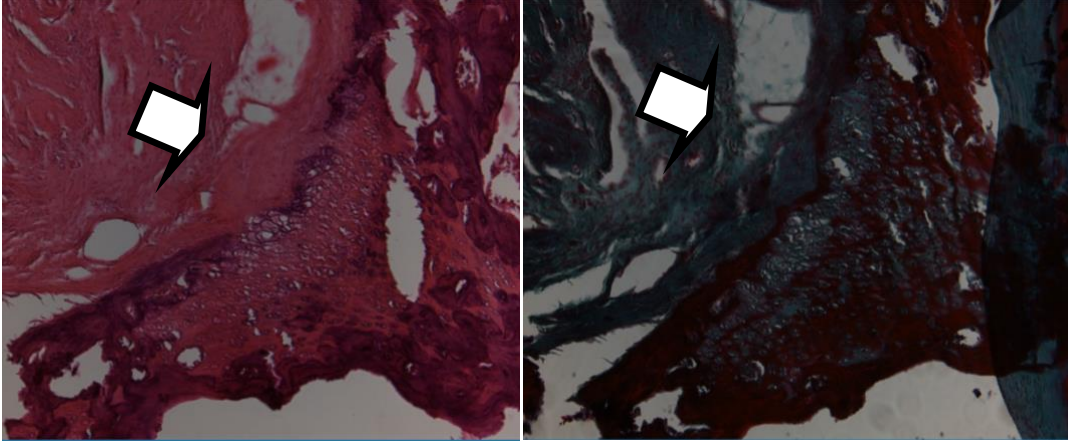


Şekil 4.3.K grubu 10x büyütme.

Cerrahi işlem sırasında oluşturulan defekt kontrol grubunda doğal iyileşmeye bırakılmıştır. 12 haftanın sonunda minimal düzeyde kıkırdak oluşumu izlenmiştir.

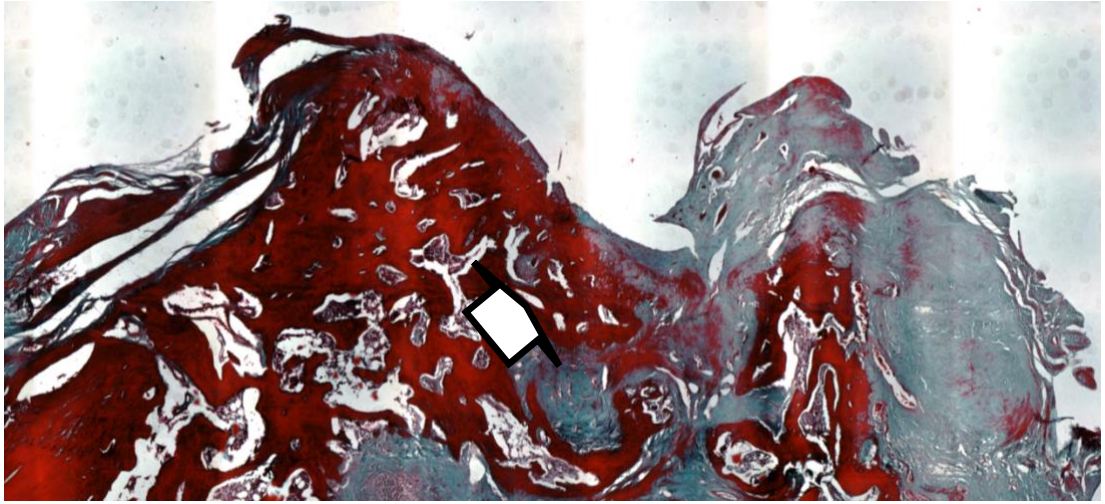
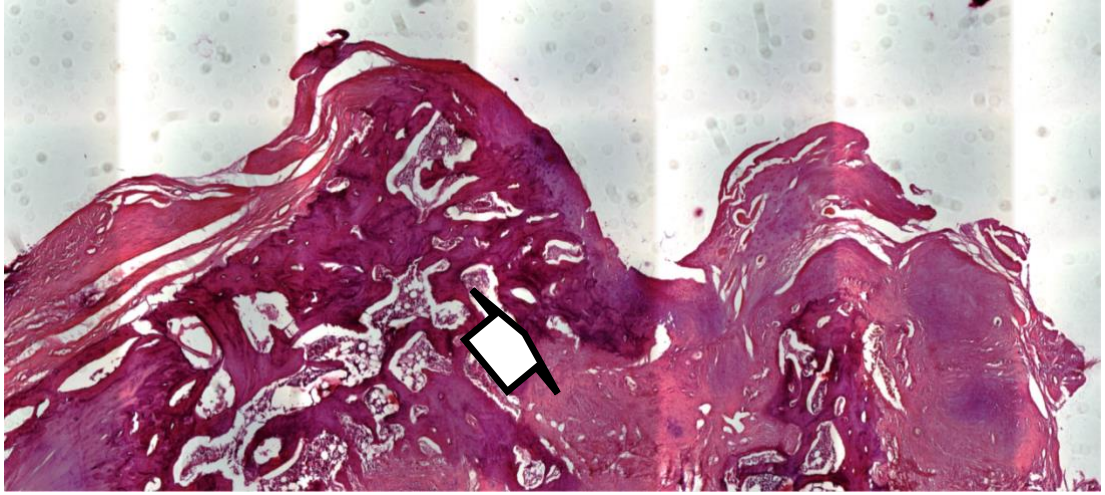


Şekil 4.4. P grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.

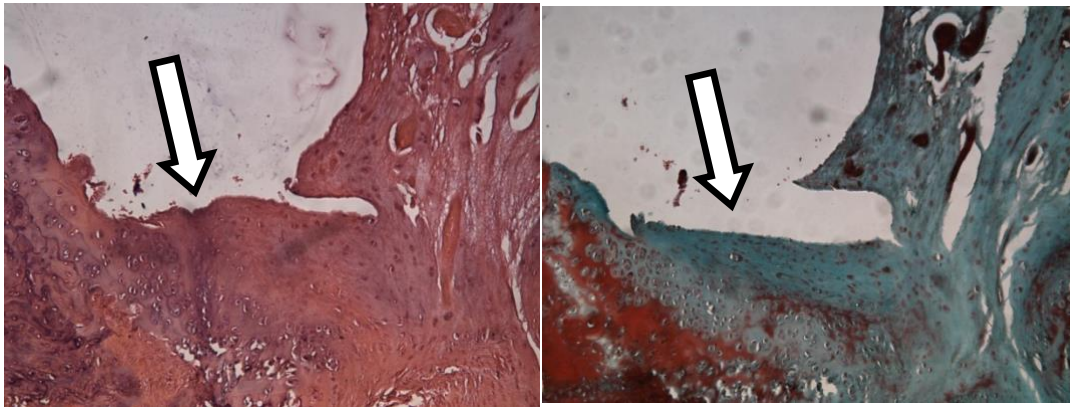


Şekil 4.5. P grubu 10x büyütme.

Deney sırasında oluşturulan defekte, plasenta hücreden arındırılmış biyoçatı olarak eklendiğinde kıkırdak yapımının başlamış olduğu izlenmiştir. Fakat kıkırdak gelişiminin iyi olduğunu belirten; kondrositlerin lakuna içerisinde tek tek ve birbirlerinden ayrı olarak izlenmediği görülmüştür. Bu grupta kondrositlerin dörtlü izogen gruplar halinde bulunduğu yani kondrosit intramembranöz çoğalma evresinde olduğu izlenmiştir. Dolayısıyla bu grupta kıkırdak matriks yapısal olarak oldukça geridir. Bu grup; kök hücre ve PRP eklenmiş gruba göre gelişme açısından zamansal olarak daha geri bir evrededir. Fakat hücre morfolojisi izlendiğinde hücrelerin kendi lakunalarını yapmaya başladığı görülmüştür ancak buna rağmen PRP ve kök hücre eklenen grupların gerisinde olduğu izlenmiştir.

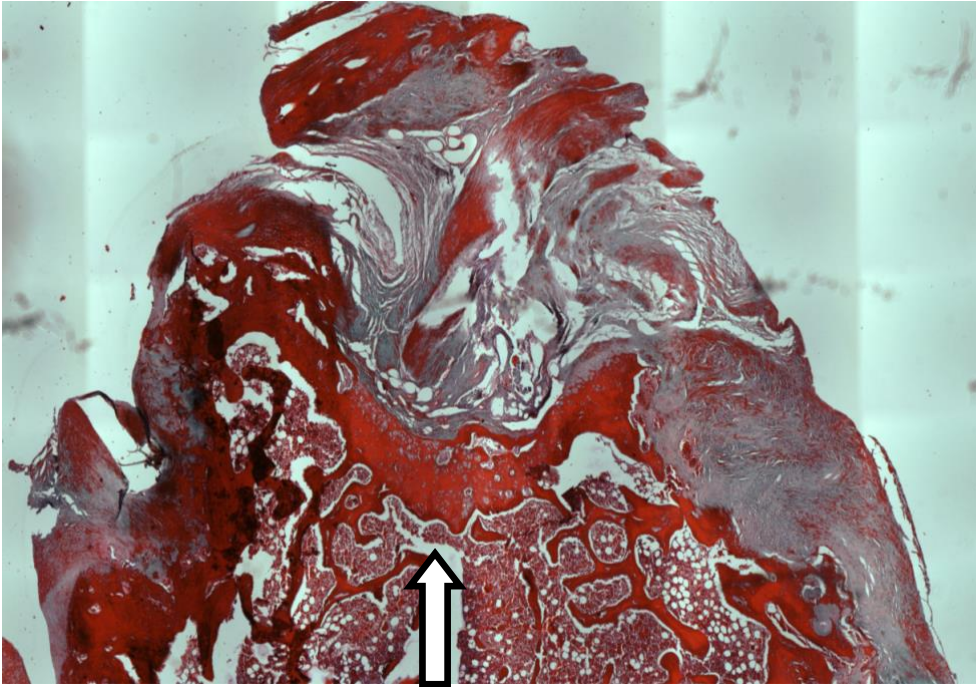
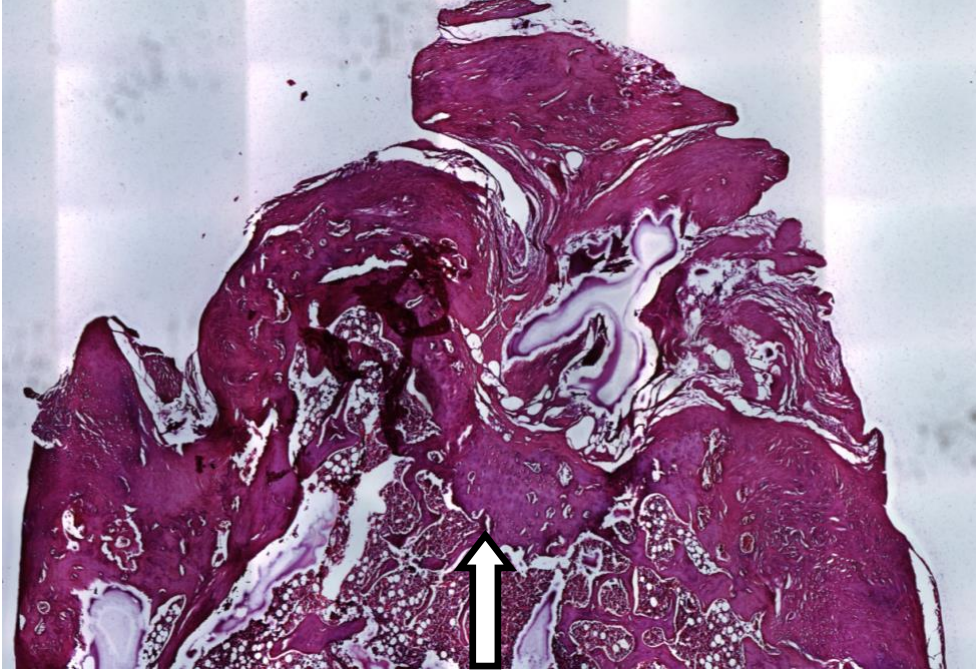


Şekil 4.6. PK grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikróm ile boyanması 2.5x büyütme.

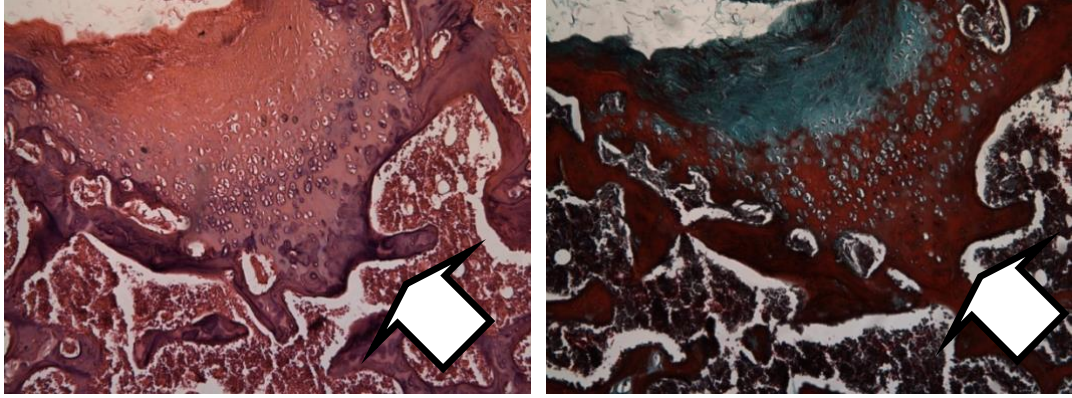


Şekil 4.7. PK grubu 10x büyütme.

Plasental biyoçatıya mezenkimal kök hücre eklenmesi kondrosit yapımını artırdığı görülmüştür. Fakat PP grubuyla karşılaştırıldığında hem kondrosit çoğalmasında hem de matriks yapımında az da olsa geride olduğu izlenmiştir.

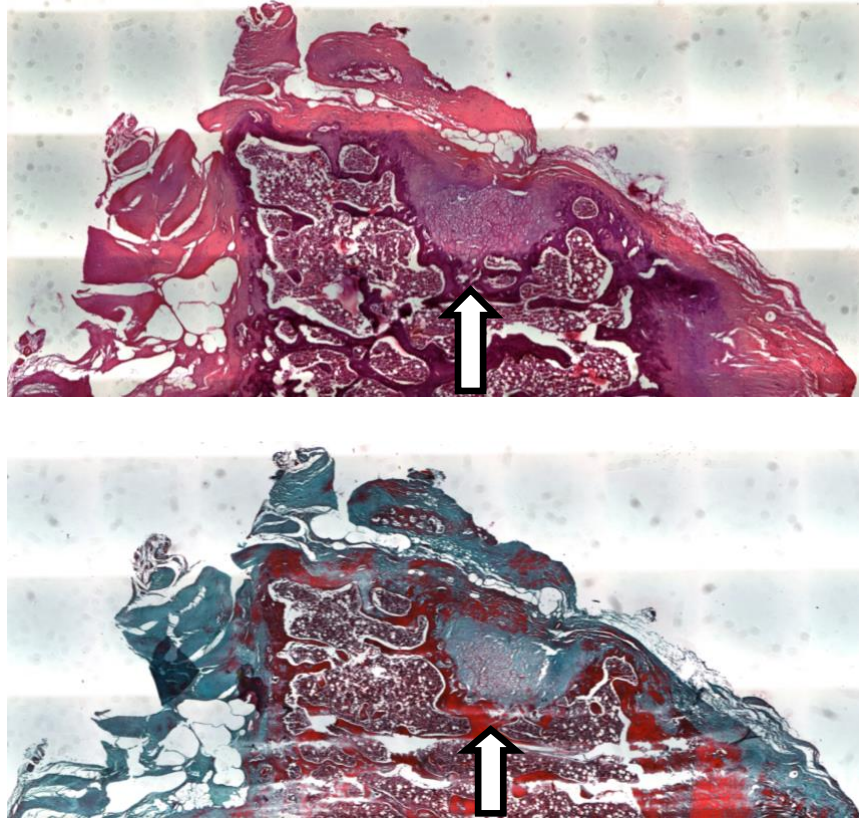


Şekil 4.8. PP grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.

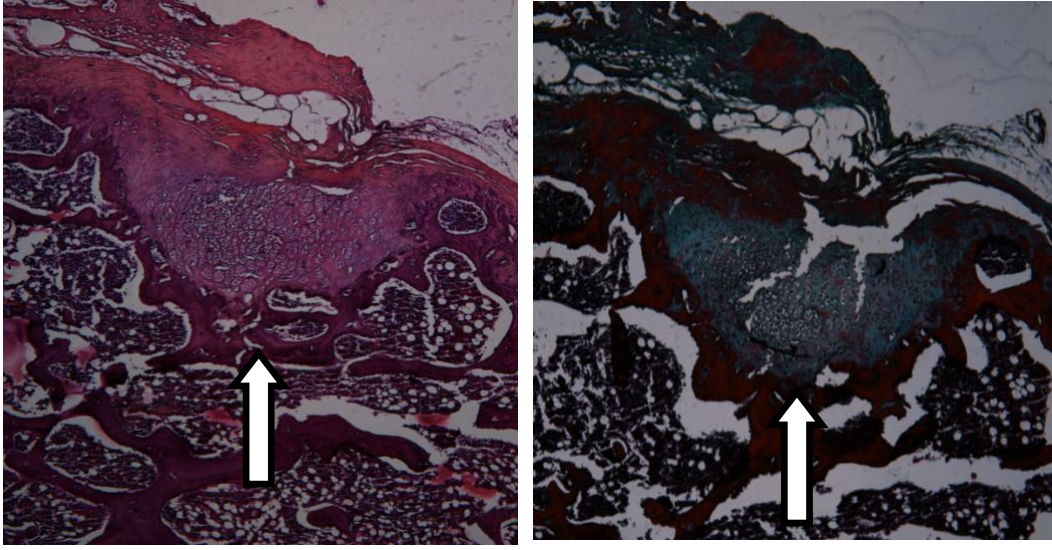


Şekil 4.9. PP grubu 10x büyütme.

Plasental biyoçatıya PRP eklendiğinde tek başına plasenta eklenmiş gruba göre kondrosit kümelenmesinin azaldığı yani kondrosit çoğalmasını stimüle ettiği anlaşılmıştır. Ayrıca hücre gelişmişliğini ifade eden; kondrositlerin gelişmiş lakunalar içerisinde izlenmesi bu grupta önemli ölçüde artmıştır. Bu grupta kıkırdak yapımının daha ileri seviyesini ifade eden matriks yapımı oldukça ilerlemiştir.



Şekil 4.10. PKP grubunun Hematoksilen- Eosin ve Masson's Trikrom ile boyanması 2.5x büyütme.



Şekil 4.11. PKP grubu 10x büyütme.

PKP grubunda hem mezenkimal kök hücre eklenerek potansiyel kondrosit sayısına takviye yapması hem de PRP'nin mitojen ve matriks yapımını uyarıcı etkisi sebebiyle en kısa zamanda en gelişmiş kıkırdak yapımı seviyesine ulaşılmıştır. Bu grupta erişkin kıkırdak histolojisine benzer biçimde kondrositler gelişkin lakunaları içerisinde tek tek izlenmiştir. Ayrıca bu grupta lakunalar etrafında sülfatlı glikozaminoglikanlardan zengin metakromatik teritoryal matriks, kıkırdak matriks ve lakunalar arası kollajenden zengin ve glikozaminoglikandan fakir interteritoryal matriks gelişimi izlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Eklem kırırdağı; damarlanmasının olmaması, metabolizmasının yavaş olması gibi yapısal özelliklerinden dolayı yaralanma sonrası yenilenme kapasitesi oldukça düşük bir dokudur[5]. Bu durumdan dolayı eklem kırırdağı hasarı oluştuktan sonra hastalar ve ortopedistler için tedavisi zor olan bir sorun haline dönüşmektedir. Bu sorunun çözülebilmesi için literatürdeki tanımlanmış yöntemlerin hiçbirisi ile eklem kırırdağının orijinal yapısı olan hiyalin kırırdak elde edilememiştir[2]. Günümüzde hiyalin kırırdak rejenerasyonu için doku mühendisliği çalışmaları ön plana çıkmaktadır.

Doku mühendisliğini için temelde üç ana bileşen gereklidir. Doku mühendisliğinin triadı olarak isimlendirilen bu bileşenler uygun bir biyoçatı, kök hücre ve büyüme faktörleridir[51]. Çalışmamız da biyomühendisliğin triadı dikkate alınarak tasarlanmıştır. Literatürde biyoçatı olarak hücreden arındırılmış insan plasentası eşliğinde mezenkimal kök hücre ve PRP'nin beraber kullanıldığı ilk çalışma olması yönünden önemlidir.

Kırırdak rejenerasyonu zor ve oldukça özelleşmiş bir doku olduğundan yeniden üretilebilmesi için uygun ortam (niş) oluşturulmasının bu süreçte kritik bir yer sahibi olduğu düşünülmüştür[56]. Bu ortamın sağlanması için biyoçatı olarak hücreden arındırılmış insan plasentası düşünülmüştür. Hücreden arındırılmış biyoçatıların kendi orijinal dokularına dönüşebildiği literatürde rapor edilmiştir. İnsan plasentası ise içeriğindeki ekstraselüler matriksin zengin olmasından dolayı evrensel bir biyoçatı olarak seçilmiştir[49]. Bu amaçla kırırdak defektlerinde kullanımı daha önceden rapor edilmemiş olup potansiyel olarak etkili olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızın sonucunda plasenta tek başına, osteokondral defektlerde kırırdak oluşumunu arttırdığı istatistiksel anlamı olarak gösterilmiştir. P grubunun histolojik incelemesinde kondrositlerin lakunalar içerisinde izogen dördümlü gruplar halinde olduğu ve kırırdak rejenerasyonunun başladığı görülmüştür. Bu sürecin kırırdak rejenerasyonun intramembranöz çoğalma aşamasında olduğu izlenmiş olup kırırdak rejenerasyonunun erken safhasında olduğu söylenebilir. Hücreden arındırılmış insan plasentasının kırırdak rejenerasyonu için uygun bir ortam hazırladığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde mezenkimal kök hücrelerin kondrositlere dönüşebildiği gösterilmiştir[58]. Kök hücre uygulamalarının bir biyoçatı eşliğinde kullanılması ile etkinliklerinin artırılabilceği düşünülmüştür. Çalışmamızda hücreden arındırılmış insan plasentası eşliğinde mezenkimal kök hücre kullanıldığı grubun skorlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür. Kıkırdak dokunun içerisinde kendi kök hücreleri bulunmaktadır[68]. Bu kök hücrelerin yanında deney sırasında oluşturulan osteokondral defektlerden de kök hücreler hasarlı alana ulaşmıştır. Ancak kıkırdak hasarının iyileşmesinin doğal seyrinde bulunan bu hücrelerin yanına, çalışmamızda eklenen mezenkimal kök hücreler ile kıkırdak rejenerasyon potansiyelinin artırıldığı söylenebilir. Artırılan iyileşme potansiyel ile de histolojik olarak anlamlı sonuç elde edilmiştir.

Doku mühendisliğinin üçüncü ayağı olan büyüme faktörleri uygulamaları ile kök hücrelerin kondrositlere dönüştüğü ve matriks sentezinin artırıldığı literatürde rapor edilmiştir[80]. Günümüzde popüler olarak PRP bu büyüme faktörlerinin kaynağı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır[81]. Çalışmamızda; hücreden arındırılmış insan plasentası ile birlikte PRP kullanılarak ortamdaki büyüme faktörü miktarının artırılacağı ve kıkırdak rejenerasyon sürecine etkili olacağı düşünülmüştür. Çalışmamızın histolojik analizinde PP grubunda kondrositlerin kümeleşmeden ziyade gelişmiş lakunalar içerisinde olduğu görülmüştür. Bu durum kıkırdak yapımının ileri safhasında olduğunu göstermiştir. Kıkırdak defektli alana hücreden arındırılmış biyoçatı ile PRP uygulanması kıkırdak yapımını uyarmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PP grubunun histolojik skorları istatistiksel anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hücreden arındırılmış insan plasentası ile birlikte PRP uygulanması kıkırdak iyileşmesinde etkili olmuştur.

Çalışmamızda kıkırdak rejenerasyonu için en uygun ortam olarak hücreden arındırılmış insan plasentası ile birlikte uygulanan mezenkimal kök hücre ve PRP ile sağlanacağı düşünülmüştür. Bu grupta kök hücrelerin üç boyutlu biyoçatı yapısı içerisine dağılacığı ve PRP'nin sağlayacağı büyüme faktörleri ile kıkırdak rejenerasyonu artacağı öngörülmüştür. PKP grubunda erişkin eklem kıkırdağındaki gibi kondrositler lakunalar içerisinde tek tek izlenmiştir. Ayrıca lakunalar etrafında sülfatlı glikozaminoglikanlardan zengin metakromatik teritoryal matriks, kıkırdak

matriks ve lakünalar arası kollajenden zengin ve glikozaminoglikandan fakir interteritoryal matriks gelişimi izlenmiştir. PKP grubunun histolojik analizine bakıldığında iyileşme skorlarının kontrol grubu ve diğer deney gruplarına göre yüksek olduğu görülmüştür. PKP grubunda diğer gruplara göre en gelişmiş kıkırdak histolojisine daha hızlı bir şekilde ulaşılmıştır. PKP grubunun diğer gruplara üstün olması kıkırdak rejenerasyonu için uygun ortamın(niş) ne kadar önemli olduğunu bir kez daha göstermiştir.

Kıkırdak iyileşmesinde tek başına hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısının kullanımının kıkırdak iyileşmesine katkısı olmakla beraber daha yavaş seyretmektedir. Fakat bu biyoçatıya kök hücre eklenmesi durumunda iyileşmeyi zamansal anlamda hızlandırdığı gözlemlenmiştir. Bu iyileşme mevcut dokuda bulunan kök hücrelere takviye olarak eklenen kök hücrelerin kondrosite dönmesi ile açıklanabilir. Bu anlamda hücreden arındırılmış plasenta kök hücreleri kondrositlere dönüştürme kapasitesi açısından başarılı olarak izlenmiştir. Hücreden arındırılmış plasenta üzerine PRP eklenmesi yerel kök hücreleri uyarıp kondrosit ve kıkırdak matriks yapımını artırmakta başarılı olduğu izlenmiştir. PKP grubunda PRP'nin hücre gelişimine olan pozitif etkisi; hem yerel kök hücreler hem de dışarıdan eklenen kök hücreler üzerine olmuştur. Ayrıca PKP grubu hem hücre sayısı hem de fonksiyonel olarak diğer gruplara üstündür ve diğer tüm guruplara göre daha iyi kıkırdak iyileşmesi izlenmiştir. Çalışmamızda hücreden arındırılmış plasentanın etkisinin sadece çatı olarak olmadığı, kök hücrelerin kondrositlere evrilmesine olanak sağlaması açısından iyi bir malzeme olduğu söylenebilir. Çalışmamızın sonuçları ile hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısı kıkırdak rejenerasyonu için uygun bir biyoçatı olduğu hipotezi desteklenmiştir. Bu biyoçatının etkinliğinin mezenkimal kök hücreler ve PRP ile etkisinin artırılacağı gösterilmiştir. En büyük etkinin ise mezenkimal kök hücre ile PRP'nin birlikte kullanılması sonucu elde edildiği gösterilmiştir.

Çalışmamız literatüre göre rejeneratif yöntemler grubuna dahildir[84]. Bu grupta yer alan diğer iki ana yöntem mozaikplasti ve otolog kondrosit implantasyonudur. Bu yöntemler sonucu elde edilen bizim çalışmamızda da olduğu gibi hiyalin benzeri kıkırdaktır[107, 114]. Mozaikplasti beraberinde donör saha

morbiditelerini getirmektedir. Bu sebepten dolayı uygulanabileceği yüzey alanı kısıtlıdır[105]. Bizim çalışmamız gibi doku mühendisliği yöntemleri ile benzer kalitede kıkırdak üretilbileceği gibi hastalar donör saha morbiditelerinden ve kullanım yüzey alanı kısıtlamasından kurtarılabilir. Bir diğer yöntem olan otolog kondrosit implantasyonu iki aşamalı bir cerrahi gerektirmektedir[92]. Yine bu yöntemin zaman içerisindeki gelişiminde biyoçatı ile beraber kullanımının sonuçları iyileştirdiği ve komplikasyonlarını azalttığı gözlemlenmiştir[113]. Bu yöntem sonucunda da büyük çoğunlukla hiyalin benzeri kıkırdak elde edilmektedir[114]. Bu faktörler göz önüne alındığında benzer özellikteki kıkırdak elde edilmesi daha zor ve maliyetli bir süreç gerektirmektedir. Bizim çalışmamızın kliniğe uyarlanması durumunda hastalar iki aşamalı cerrahiden kurtulabilir ve in-vitro ortamda çoğaltılan kondrositler in-vivo ortama alınabilir.

Kemik iliğinin stimülasyonunu hedefleyen onarıcı (reperatif) yöntemler ile amaç hasarlı bölgeye kök hücrelerin ulaşmasını sağlamaktır. Ancak bu yöntemlerde elde edilen kıkırdak çoğu zaman fibrokıkırdak özelliğindedir[94]. Kemik iliğinden hasarlı bölgeye ulaşan kök hücreler inflamasyonu başlatarak iyileşme sürecine girerler[100]. Ancak bu yöntemde ortamda hücrelerin davranışlarını düzenleyecek bir biyoçatı yoktur. Kök hücreler tarafından kendi ortamlarını düzenleyecek büyüme faktörleri ortama salınsa da hiyalin kıkırdak üretilmesi mümkün olmamaktadır[34]. Bizim çalışmamızda hücreden arındırılmış plasenta osteokondral defekte yerleştirildiğinde iyileşmenin başladığı fakat geriden geldiği görülmüştür. Hücrelerin tutunacağı bir biyoçatı varlığında kemik iliğindeki kök hücreler ile yavaş da olsa daha kaliteli kıkırdak üretilir. Bizim çalışmamızda kullanılan yöntem ile reperatif yöntemlerle üretilen kıkırdağa göre daha kaliteli kıkırdak elde edilmesi mümkündür.

Çalışmamızın birtakım kısıtlılıkları mevcuttur. İlk olarak elde edilen dokunun biyomekanik özellikleri değerlendirilmemiştir. Biyomekanik değerlendirme ile elde edilen kıkırdak dokunun dayanıklılığı ölçülebilir. İncelenecek denek sayısı, hayvanların her iki dizine de cerrahi yapılarak artırılmaya çalışılmıştır. Ancak gruplardaki denek sayısı daha da artırılarak daha anlamlı sonuçlara ulaşılabilir. Uygulanan kök hücrelerin sayısı her bir denek için 10^6 olarak belirlense de bu sayı optimize edilememiştir. Sıçan modeline uygulanan insan mezenkimal kök

hücrelerinin davranışı konusunda endişe duyulsa da literatür ile paralel olarak immunojenik rejeksiyon reaksiyonu gözlenmemiştir ve hedef hücre olan kondrositlere dönüşümü gerçekleştirmiştir[70]. Son olarak uygulanan biyoçatı, kök hücre ve PRP akut bir lezyona uygulanmıştır. Kronik lezyonlardaki iyileşme kapasitesini belirlemek için ayrı bir çalışma gereksinimi vardır.

Çalışmamız, kırıkta defektlerinde hücreden arındırılmış insan plasentası biyoçatısının, mezenkimal kök hücrelerin ve PRP'nin kullanıldığı ilk çalışma olması ile literatüre katkı sağlamıştır. Çalışmamız sonucunda elde edilen hücreden arındırılmış insan plasentasının kırıkta rejenerasyonu için iyi bir skafold olduğu ve etkisinin mezenkimal kök hücre ve PRP ile artırılabilceğinin gösterilmesi ile hiyalin kırıkta üretilmesi açısından önemli bir adım atılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Eklem kırıkdağı hasarları tedavisi ortopedistler için önemli bir sorundur. Özellikle genç yaşta gelişen kırıkdağ hasarlarının tedavisi için biyolojik çözüm arayışları günümüz literatürünün temelini oluşturmaktadır. Bu amaçla doku mühendisliği çalışmaları ile hiyalin kırıkdağın üretilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre kırıkdağ rejenerasyonu için en önemli gereklilik uygun ortamın(niş) sağlanmasıdır. Bu ortam tek başına biyoçatı, kök hücre, PRP uygulamalarından ziyade birlikte uygulanmaları ile daha başarılı olarak oluşturulabilir. Hücreden arındırılmış plasenta biyoçatısı, kök hücreleri kondrositlere döndürme kapasitesi açısından başarılı bulunmuştur. Hücreden arındırılmış insan plasenta biyoçatısının kırıkdağ rejenerasyonunda etkili bir biyoçatı olduğu görülmüştür. Hücreden arındırılmış insan plasentasının kırıkdağ rejenerasyonundaki etkinliği mezenkimal kök hücre ve PRP'nin ayrı ayrı uygulanması ile artırıldığı gösterilmiştir. Fakat bu etki en çok hepsinin beraber uygulanması ile görülmüştür.

Doku mühendisliği triadı kullanılarak başarılı bir kırıkdağ rejenerasyonu elde edilen bu yöntem ile hiyalin kırıkdağ üretilmesine daha da yaklaşılmıştır. Tam olarak hiyalin kırıkdağ için gerekli olan kök hücre sayısı, büyüme faktörlerinin konsantrasyonu halen belirsizliğini korumaktadır. Uygun biyoçatı seçilmesi, bu ortamın uygun miktardaki kök hücre ve büyüme faktörü konsantrasyonu ile zenginleştirilmesi ile hiyalin kırıkdağın üretilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lories, R.J. and F.P. Luyten, *The bone-cartilage unit in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(1): p. 43-9.
2. Makris, E.A., et al., *Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(1): p. 21-34.
3. Lamplot, J.D., K.A. Schafer, and M.J. Matava, *Treatment of Failed Articular Cartilage Reconstructive Procedures of the Knee: A Systematic Review*. Orthop J Sports Med, 2018. **6**(3): p. 2325967118761871.
4. Tatari, H., *[The structure, physiology, and biomechanics of articular cartilage: injury and repair]*. Acta Orthop Traumatol Turc, 2007. **41 Suppl 2**: p. 1-5.
5. Fosang, A.J. and F. Beier, *Emerging Frontiers in cartilage and chondrocyte biology*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2011. **25**(6): p. 751-66.
6. Simon, T.M. and D.W. Jackson, *Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options*. Sports Med Arthrosc Rev, 2018. **26**(1): p. 31-39.
7. Fisher, J.N., et al., *The Application of Stem Cells from Different Tissues to Cartilage Repair*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 2761678.
8. Ge, Z., et al., *Functional biomaterials for cartilage regeneration*. J Biomed Mater Res A, 2012. **100**(9): p. 2526-36.
9. Kazemnejad, S., et al., *Current State of Cartilage Tissue Engineering using Nanofibrous Scaffolds and Stem Cells*. Avicenna J Med Biotechnol, 2017. **9**(2): p. 50-65.
10. Hoshiba, T., et al., *Decellularized matrices for tissue engineering*. Expert Opin Biol Ther, 2010. **10**(12): p. 1717-28.
11. Leonel, L., et al., *Decellularization of placentas: establishing a protocol*. Braz J Med Biol Res, 2017. **51**(1): p. e6382.
12. Hoshiba, T., et al., *Decellularized Extracellular Matrix as an In Vitro Model to Study the Comprehensive Roles of the ECM in Stem Cell Differentiation*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 6397820.
13. Flynn, L., et al., *Adipose tissue engineering with naturally derived scaffolds and adipose-derived stem cells*. Biomaterials, 2007. **28**(26): p. 3834-3842.
14. Khaled, E.G., et al., *Tissue engineering for bone production- stem cells, gene therapy and scaffolds*. Open Orthop J, 2011. **5 Suppl 2**: p. 289-95.
15. Goldring, M.B., *Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012. **4**(4): p. 269-85.

16. Heijnen, H.F.G., et al., *Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and α -Granules*. 1999. **94**(11): p. 3791-3799.
17. Hall, M.P., et al., *Platelet-rich plasma: current concepts and application in sports medicine*. J Am Acad Orthop Surg, 2009. **17**(10): p. 602-8.
18. Mescher, A.L., *Cartilage*, in *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 15e*. 2018, McGraw-Hill Education: New York, NY.
19. Carballo, C.B., et al., *Basic Science of Articular Cartilage*. Clin Sports Med, 2017. **36**(3): p. 413-425.
20. Sophia Fox, A.J., A. Bedi, and S.A. Rodeo, *The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function*. Sports Health, 2009. **1**(6): p. 461-8.
21. Archer, C.W. and P. Francis-West, *The chondrocyte*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(4): p. 401-4.
22. Akkiraju, H. and A. Nohe, *Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration*. J Dev Biol, 2015. **3**(4): p. 177-192.
23. Bhosale, A.M. and J.B. Richardson, *Articular cartilage: structure, injuries and review of management*. Br Med Bull, 2008. **87**: p. 77-95.
24. Poole, C.A., *Articular cartilage chondrons: form, function and failure*. J Anat, 1997. **191** (Pt 1): p. 1-13.
25. Maroudas, A., et al., *The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1073**(2): p. 285-94.
26. Linn, F.C. and L. Sokoloff, *MOVEMENT AND COMPOSITION OF INTERSTITIAL FLUID OF CARTILAGE*. Arthritis Rheum, 1965. **8**: p. 481-94.
27. Eyre, D., *Collagen of articular cartilage*. Arthritis Res, 2002. **4**(1): p. 30-5.
28. Poole, A.R., et al., *Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2002. **61 Suppl 2**: p. ii78-81.
29. Moreland, L.W., *Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action*. Arthritis research & therapy, 2003. **5**(2): p. 54-67.
30. Eggli, P.S., et al., *Matrix compartments in the growth plate of the proximal tibia of rats*. Anat Rec, 1985. **211**(3): p. 246-57.
31. Decker, R.S., E. Koyama, and M. Pacifici, *Articular Cartilage: Structural and Developmental Intricacies and Questions*. Curr Osteoporos Rep, 2015. **13**(6): p. 407-14.

32. Mow, V.C. and X.E. Guo, *Mechano-electrochemical properties of articular cartilage: their inhomogeneities and anisotropies*. *Annu Rev Biomed Eng*, 2002. **4**: p. 175-209.
33. Harris, J. and D. Flanigan, *Management of Knee Articular Cartilage Injuries*. 2011.
34. Matsiko, A., T.J. Levingstone, and F.J. O'Brien, *Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair*. *Materials* (Basel, Switzerland), 2013. **6**(2): p. 637-668.
35. Sandell, L.J. and T. Aigner, *Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis*. *Arthritis Res*, 2001. **3**(2): p. 107-13.
36. Buckwalter, J.A., *Articular cartilage: injuries and potential for healing*. *J Orthop Sports Phys Ther*, 1998. **28**(4): p. 192-202.
37. Ateshian, G.A., et al., *Finite deformation biphasic material properties of bovine articular cartilage from confined compression experiments*. *J Biomech*, 1997. **30**(11-12): p. 1157-64.
38. Mow, V.C., M.H. Holmes, and W.M. Lai, *Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review*. *J Biomech*, 1984. **17**(5): p. 377-94.
39. Mow, V.C., et al., *Biphasic Creep and Stress Relaxation of Articular Cartilage in Compression: Theory and Experiments*. *Journal of Biomechanical Engineering*, 1980. **102**(1): p. 73-84.
40. Hayes, W.C. and A.J. Bodine, *Flow-independent viscoelastic properties of articular cartilage matrix*. *J Biomech*, 1978. **11**(8-9): p. 407-19.
41. Setton, L.A., et al., *Mechanical properties of canine articular cartilage are significantly altered following transection of the anterior cruciate ligament*. *J Orthop Res*, 1994. **12**(4): p. 451-63.
42. Lobo, S.E., et al., *The Placenta as an Organ and a Source of Stem Cells and Extracellular Matrix: A Review*. *Cells Tissues Organs*, 2016. **201**(4): p. 239-52.
43. Chen, C.P. and J.D. Aplin, *Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblasts and the effect of oxygen*. *Placenta*, 2003. **24**(4): p. 316-25.
44. Martino, M.M., et al., *Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing*. *Science*, 2014. **343**(6173): p. 885-8.
45. Leonel, L., et al., *Decellularization of placentas: establishing a protocol*. *Braz J Med Biol Res*, 2018. **51**(1): p. e6382.
46. Badylak, S.F., D.O. Freytes, and T.W. Gilbert, *Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function*. *Acta Biomater*, 2009. **5**(1): p. 1-13.
47. Flynn, L., J.L. Semple, and K.A. Woodhouse, *Decellularized placental matrices for adipose tissue engineering*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **79**(2): p. 359-69.

48. Choi, J.S., et al., *Full-thickness skin wound healing using human placenta-derived extracellular matrix containing bioactive molecules*. *Tissue Eng Part A*, 2013. **19**(3-4): p. 329-39.
49. Burgkart, R., et al., *Decellularized kidney matrix for perfused bone engineering*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2014. **20**(7): p. 553-61.
50. Chan, B.P. and K.W. Leong, *Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations*. *Eur Spine J*, 2008. **17 Suppl 4**(Suppl 4): p. 467-79.
51. O'Brien, F.J., *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*. *Materials Today*, 2011. **14**(3): p. 88-95.
52. Hutmacher, D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. *Biomaterials*, 2000. **21**(24): p. 2529-43.
53. Ko, H.C., B.K. Milthorpe, and C.D. McFarland, *Engineering thick tissues--the vascularisation problem*. *Eur Cell Mater*, 2007. **14**: p. 1-18; discussion 18-9.
54. O'Brien, F.J., et al., *The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds*. *Biomaterials*, 2005. **26**(4): p. 433-41.
55. Liu, H., E.B. Slamovich, and T.J. Webster, *Less harmful acidic degradation of poly(lactico-glycolic acid) bone tissue engineering scaffolds through titania nanoparticle addition*. *International journal of nanomedicine*, 2006. **1**(4): p. 541-545.
56. Burdick, J.A., et al., *Acellular biomaterials: an evolving alternative to cell-based therapies*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(176): p. 176ps4.
57. Sheng, Y., et al., *Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2017. **12**(3): p. 233-246.
58. Kalamegam, G., et al., *A Comprehensive Review of Stem Cells for Cartilage Regeneration in Osteoarthritis*. *Adv Exp Med Biol*, 2018. **1089**: p. 23-36.
59. Bongso, A., *Blastocyst culture for deriving human embryonic stem cells*. *Methods Mol Biol*, 2006. **331**: p. 13-22.
60. Pera, M.F., B. Reubinoff, and A. Trounson, *Human embryonic stem cells*. *J Cell Sci*, 2000. **113 (Pt 1)**: p. 5-10.
61. Budd, E., et al., *The Potential of microRNAs for Stem Cell-based Therapy for Degenerative Skeletal Diseases*. *Current Molecular Biology Reports*, 2017. **3**(4): p. 263-275.
62. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons, *Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(4): p. 313-9.
63. Manunta, A.F., et al., *The use of embryonic cells in the treatment of osteochondral defects of the knee: an ovine in vivo study*. *Joints*, 2016. **4**(2): p. 70-9.

64. Saito, T., et al., *Hyaline cartilage formation and tumorigenesis of implanted tissues derived from human induced pluripotent stem cells*. Biomed Res, 2015. **36**(3): p. 179-86.
65. Aldahmash, A., et al., *Teratoma formation in immunocompetent mice after syngeneic and allogeneic implantation of germline capable mouse embryonic stem cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(10): p. 5705-11.
66. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
67. Schmitt, A., et al., *Application of stem cells in orthopedics*. Stem Cells Int, 2012. **2012**: p. 394962.
68. Mackay, A.M., et al., *Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow*. Tissue Eng, 1998. **4**(4): p. 415-28.
69. Wise, J.K., et al., *Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on oriented nanofibrous scaffolds: engineering the superficial zone of articular cartilage*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(4): p. 913-21.
70. Lo Monaco, M., et al., *Stem Cells for Cartilage Repair: Preclinical Studies and Insights in Translational Animal Models and Outcome Measures*. Stem Cells Int, 2018. **2018**: p. 9079538.
71. Yan, H. and C. Yu, *Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model*. Arthroscopy, 2007. **23**(2): p. 178-87.
72. Arnoczky, S.P. and S. Sheibani-Rad, *The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know*. Sports Med Arthrosc Rev, 2013. **21**(4): p. 180-5.
73. Hussain, N., H. Johal, and M. Bhandari, *An evidence-based evaluation on the use of platelet rich plasma in orthopedics - a review of the literature*. SICOT J, 2017. **3**: p. 57.
74. Mooren, R.E., et al., *The effect of platelet-rich plasma in vitro on primary cells: rat osteoblast-like cells and human endothelial cells*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(10): p. 3159-72.
75. Wang, H.-L. and G. Avila, *Platelet rich plasma: myth or reality?* European journal of dentistry, 2007. **1**(4): p. 192-194.
76. Ranly, D.M., et al., *Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(9): p. 2052-64.
77. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives*. Muscles, ligaments and tendons journal, 2014. **4**(1): p. 3-9.

78. Kazemi, D. and A. Fakhrjou, *Leukocyte and Platelet Rich Plasma (L-PRP) Versus Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) For Articular Cartilage Repair of the Knee: A Comparative Evaluation in an Animal Model*. Iranian Red Crescent medical journal, 2015. **17**(10): p. e19594-e19594.
79. Zhu, Y., et al., *Basic science and clinical application of platelet-rich plasma for cartilage defects and osteoarthritis: a review*. Osteoarthritis and Cartilage, 2013. **21**(11): p. 1627-1637.
80. Gaissmaier, C., J.L. Koh, and K. Weise, *Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair*. Injury, 2008. **39 Suppl 1**: p. S88-96.
81. Smyth, N.A., et al., *Platelet-rich plasma in the pathologic processes of cartilage: review of basic science evidence*. Arthroscopy, 2013. **29**(8): p. 1399-409.
82. Merkely, G., J. Ackermann, and C. Lattermann, *Articular Cartilage Defects: Incidence, Diagnosis, and Natural History*. Operative Techniques in Sports Medicine, 2018. **26**(3): p. 156-161.
83. Willers, C., D. J. Wood, and M.-H. Zheng, *A current review on the biology and treatment of articular cartilage defects (Part I & Part II)*. Vol. 07. 2003. 157-181.
84. D, J. and D. C, *Management of Knee Articular Cartilage Injuries*, in *Modern Arthroscopy*. 2011.
85. Outerbridge, R.E., *The etiology of chondromalacia patellae*. J Bone Joint Surg Br, 1961. **43-b**: p. 752-7.
86. Brittberg, M. and C.S. Winalski, *Evaluation of cartilage injuries and repair*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 58-69.
87. Alford, J.W. and B.J. Cole, *Cartilage restoration, part I: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options*. Am J Sports Med, 2005. **33**(2): p. 295-306.
88. Lohmander, L.S., et al., *Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury*. Arthritis Rheum, 1989. **32**(11): p. 1434-42.
89. Mankin, H.J., *The response of articular cartilage to mechanical injury*. J Bone Joint Surg Am, 1982. **64**(3): p. 460-6.
90. Goldberg, V.M. and A.I. Caplan, *Biologic restoration of articular surfaces*. Instr Course Lect, 1999. **48**: p. 623-7.
91. Nehrer, S., M. Spector, and T. Minas, *Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures*. Clin Orthop Relat Res, 1999(365): p. 149-62.
92. Lewis, P.B., et al., *Basic science and treatment options for articular cartilage injuries*. J Orthop Sports Phys Ther, 2006. **36**(10): p. 717-27.
93. Wakitani, S., et al., *Present status of and future direction for articular cartilage repair*. J Bone Miner Metab, 2008. **26**(2): p. 115-22.

94. Simon, T.M. and D.W. Jackson, *Articular cartilage: injury pathways and treatment options*. Sports Med Arthrosc Rev, 2006. **14**(3): p. 146-54.
95. Marcacci, M., G. Filardo, and E. Kon, *Treatment of cartilage lesions: what works and why?* Injury, 2013. **44 Suppl 1**: p. S11-5.
96. Harwin, S.F., *Arthroscopic debridement for osteoarthritis of the knee: predictors of patient satisfaction*. Arthroscopy, 1999. **15**(2): p. 142-6.
97. Ike, R.W., et al., *Tidal irrigation versus conservative medical management in patients with osteoarthritis of the knee: a prospective randomized study*. Tidal Irrigation Cooperating Group. J Rheumatol, 1992. **19**(5): p. 772-9.
98. Merchan, E.C.R. and E. Galindo, *Arthroscope-guided surgery versus nonoperative treatment for limited degenerative osteoarthritis of the femorotibial joint in patients over 50 years of age: A prospective comparative study*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 1993. **9**(6): p. 663-667.
99. Sansone, V., et al., *Long-term results of abrasion arthroplasty for full-thickness cartilage lesions of the medial femoral condyle*. Arthroscopy, 2015. **31**(3): p. 396-403.
100. Steadman, J.R., W.G. Rodkey, and J.J. Rodrigo, *Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects*. Clin Orthop Relat Res, 2001(391 Suppl): p. S362-9.
101. Freedman, K.B., S.J. Nho, and B.J. Cole, *Marrow stimulating technique to augment meniscus repair*. Arthroscopy, 2003. **19**(7): p. 794-8.
102. Kon, E., et al., *Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years*. Am J Sports Med, 2009. **37**(1): p. 33-41.
103. Steadman, J.R., et al., *Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up*. Arthroscopy, 2003. **19**(5): p. 477-84.
104. Minas, T., *Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee*. Clin Orthop Relat Res, 2001(391 Suppl): p. S349-61.
105. Hangody, L., et al., *Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results*. Injury, 2008. **39 Suppl 1**: p. S32-9.
106. Hangody, L. and P. Fules, *Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-A Suppl 2**: p. 25-32.
107. Hangody, L., et al., *Clinical experiences with autologous osteochondral mosaicplasty in an athletic population: a 17-year prospective multicenter study*. Am J Sports Med, 2010. **38**(6): p. 1125-33.
108. Torrie, A.M., et al., *Osteochondral allograft*. Current reviews in musculoskeletal medicine, 2015. **8**(4): p. 413-422.

109. Sherman, S.L., et al., *Fresh osteochondral allograft transplantation for the knee: current concepts*. J Am Acad Orthop Surg, 2014. **22**(2): p. 121-33.
110. Benya, P.D. and J.D. Shaffer, *Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels*. Cell, 1982. **30**(1): p. 215-24.
111. C. Chen, A., et al., *Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro*. Vol. 15. 1997. 791-802.
112. Moyad, T.F., *Cartilage Injuries in the Adult Knee: Evaluation and Management*. Cartilage, 2011. **2**(3): p. 226-236.
113. Gooding, C.R., et al., *A prospective, randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered*. Knee, 2006. **13**(3): p. 203-10.
114. Henderson, I., et al., *Autologous chondrocyte implantation for treatment of focal chondral defects of the knee--a clinical, arthroscopic, MRI and histologic evaluation at 2 years*. Knee, 2005. **12**(3): p. 209-16.
115. Mainil-Varlet, P., et al., *A New Histology Scoring System for the Assessment of the Quality of Human Cartilage Repair: ICRS II*. The American Journal of Sports Medicine, 2010. **38**(5): p. 880-890.