



T. C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

İN VİVO KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Dr. Yusuf Sertan ÇABUK
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Cengiz Yılmaz

MERSİN-2013



T. C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

İN VİVO KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Dr. Yusuf Sertan ÇABUK
UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Cengiz Yılmaz

Bu tez, BAP-TF CTB (YSÇ) 2010-4 TU kodlu proje olarak Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından desteklenmiştir.

MERSİN-2013

TEŞEKKÜR

Eğitimimde bana büyük emekleri geçen, eğitimim için gereken çaba ve hoŐgörüü fazlasıyla gösteren, gerek insan gerekse cerrah olarak kendilerini örnek aldığım, desteklerini her zaman hissettiğim aynı zamanda tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Cengiz Yılmaz'a;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sabır ve hoŐgörülerini ile beni daima daha iyi bir cerrah olmaya teşvik eden, hekimliğimi tüm yönleri ile geliŐtirmem ve cerrahi sanatının prensiplerini öğrenmemde bana destek olup yetişmemde emeği geçen Sayın Hocalarım Prof. Dr. F. Volkan ÖZTUNA'ya, Prof. Dr. Fehmi KUYURTAR'a, Prof. Dr. Abtullah MİLCAN'a, Prof. Dr. Metin M. ESKANDARI'ye, Doç. Dr. İrfan AYAN'a, Doç. Dr. Mehmet olak'a;

Tezimin histopatolojik incelemelerini yapan M.E.Ü.T.F. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Necat YILMAZ'a;

Birlikte uyumla çalıŐtığım değerli asistan arkadaşlarıma, yardımsever servis ve ameliyathane hemŐirelerine ve tüm hastane personeline;

İlk günden beri güzellikleri de zorlukları da birlikte paylaŐtığım, ilham kaynağım canım eŐim Gonca abuk'a;

Hayatıma farklı bir anlam katan, bana yaşama sevinci veren biricik kızım İlke ağla'ma;

Her zaman benimle olan, yaşamım boyunca sonsuz sevgi ve desteklerini yanımda hissettiğim, varlıklarıyla mutlu olduğum anneciğim Serap ÇABUK, babacığım H. Altan abuk ve kardeŐim Selin ÇABUK'a

Çok teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ VE AMAÇ	7
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. Kıkırdak Histolojisi	11
2.2. Kıkırdak Gelişmesi ve Büyümesi	13
2.2.1. Hyalin Kıkırdak	14
2.2.1.1. Hyalin Kıkırdak Hücreleri	14
2.2.1.2. Hyalin Kıkırdak Matriksi	16
2.2.1.3. Perikondrium	19
2.2.1.4. Eklem Kıkırdağı	19
2.2.1.5. Hyalin Kıkırdağın Beslenmesi	23
2. 2. 1. 6. Retrogressif Değişiklikler	24
2. 2. 1. 7. Rejenerasyon	24
2. 2. 2. Elastik Kıkırdak	25
2. 2. 3. Fibröz Kıkırdak	25
2. 3. Kıkırdak Yaralanma ve İyileşmesi	26
2. 4. Eklem Kıkırdak Lezyonları	28
2. 4. 1. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Endikasyonları	29
2. 4. 2. Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Sınıflandırılması	30
2. 4. 3. Kıkırdak Lezyonlarında Görüntüleme Yöntemleri	33
2. 4. 4. Kıkırdak Lezyonlarında Prognoz ve Prognozu Etkileyen Olası Faktörler	36
2. 4. 5. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Yöntemleri	37
2. 4. 5. 1. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Uygulanan Cerrahi Yöntemler	39
2. 4. 5. 1. 1. Eklem Artroskopik Yıkanması ve Debridmanı	39
2. 4. 5. 1. 2. Kemik İliği Uyarım Yöntemleri	40
2. 4. 5. 1. 3. Osteokondral Otolog Transferi ve Mozaikplasti	42
2. 4. 5. 1. 4. Otolog Kondrosit İmplantasyonu	45
2. 4. 5. 1. 5. Matriks Rehberli Otolog Kondrosit İmplantasyonu	51
2. 4. 5. 1. 6. Kıkırdak Doku Mühendisliği	53
2. 4. 5. 1. 7. Gen Tedavisi	62
2. 4. 6. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında İyileşmenin Değerlendirilmesi	64

	Sayfa No
3. GEREÇ VE YÖNTEM	66
4. BULGULAR	76
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	92
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	133
ŞEKİLLER DİZİNİ	135
TABLolar	136

ÖZET

Kıkırdak yaralanmalarında kullanılan tedavi seçeneklerinde, hücre kültür ortamında üretilen kondrositlere gereksinim duyulur. Klinik uygulamalar iki cerrahi seansta gerçekleştirilir ve maliyetlidir. Eğer kondrositlerin izole edilmesi, çoğalması için uyarılması ve ekstraselüler matriks üretimi tek seansta in vivo olarak başarılabilirse; tedavi tek seansta yapılabilir ve maliyet azaltılabilir.

5 farklı çalışma grubunda, koyun dizlerinde 2,5 cm çapında tam kat kıkırdak defekti oluşturuldu. Bir grupta, oluşturulan defektten elde edilen kıkırdak doku küçük parçalara doğranılarak, defektli alana yerleştirildi ve üzeri kollajen membranla örtüldü (MIV grup). Başka bir grupta, kollajen membrana kullanımdan önce tip II kollajenaz emdirildi. Bir başka grupta kollajen membrana hem kollajenaz hem de büyüme faktörleri emdirildi. Diğer bir grupta; Matriks destekli otolog kondrosit implantasyonu (MACI) iki seansta uygulandı. Son grup ise tedavisiz bırakıldı. 15 haftalık takip sonunda tamir dokuları makroskopik, histomorfometrik ve glikozaminoglikan ile tip II kollajen doku konsantrasyonu açısından biyokimyasal olarak karşılaştırıldı.

MACI ve MIV gruplarında diğer gruplara oranla daha iyi iyileşme görüldü, kendi aralarında ise benzer sonuç verdiler. Kollajenaz veya büyüme faktörü eklenmesi daha iyi sonuç vermedi. Kollajenaz eklenmesinin çevre kıkırdak dokulara zararlı etkisi gözlenmedi.

Anlatılan yöntemle, MACI ile benzer sonuçlar elde etmek mümkündür. Defektli alana mikrokirik uygulanması sonrası membranla çevrilmesinin üstün olup olmadığının gösterilmesi için ileri çalışmalara gereksinim vardır. İnsanlarda benzer şekilde sonuçlar verip vermediğinin görülmesi için yine ileri çalışmalara gereksinim vardır.

"MACI In vivo" tekniği düşük maliyetli ve tek seansta uygulanabilir bir tedavi yöntemidir.

Anahtar Kelimeler: Glikozaminoglikan, Kıkırdak Yaralanmaları, MACI, MIV, Tip 2 kollajen

ABSTRACT

Biologic treatment options for cartilage injuries require chondrocyte expansion using cell culture. Clinical application is accomplished in two surgical sessions and is expensive. If isolation of chondrocytes and stimulus for proliferation and extracellular matrix synthesis can be achieved in vivo, the treatment can be performed in one session and the cost can be reduced.

A 2,5 cm diameter full thickness chondral defect was created in knees of 5 groups of sheep. In one group, some of the chondral tissues obtained from the creation of the defect were diced into small pieces and were placed into the defect and were covered with a collagen membrane (MIV group) . In the other group the collagen membrane was soaked in collagenase prior to usage. In the next group the collagen membrane was soaked in both collagenase and growth factors. Matrix induced autologous chondrocyte implantation (MACI) was applied to another group in two sessions, and the last group was left untreated. After 15 weeks of follow-up repair tissues were compared macroscopically, histomorphometrically, and biochemically for tissue concentrations of glycosaminoglycan and type II collagen.

MACI and MIV groups demonstrated better healing than others and were similar. Addition of collagenase or growth factors did not improve results. Addition of collagenase did not have detrimental effect on the surrounding cartilage.

With the described method, it is possible to obtain comparable results with MACI. Further studies are needed to see if it is superior to membrane coverage over microfracture applied defective area. Further studies are also needed to see if it works similarly in humans.

Low cost and one session application of the “MACI in vivo” technique are appealing.

Key words: Cartilage injuries, Glycosaminoglycan, MACI, MIV, Type II collagen.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağının özelliği, yapısı, fonksiyonu, hastalıkları ile ilgili bilgiler ve bu eklem kıkırdaklarının tamir sorunu ilk kez 1743'de Hunter tarafından dile getirilmiştir. Hunter "Hipokrat zamanından günümüze kadarki bilgiler ışığında, ülser olmuş bir kıkırdak dokusu sorunlu bir hastalık oluşturacaktır. Kıkırdak hasar gördüğünde, hiçbir zaman iyileşemez." sözü ile kıkırdak hastalıklarının tedavisinin ne kadar sıkıntılı bir süreç olduğunu belirtmiştir. 1851'de Paget ise "İnanıyorum ki; insanlarda hiçbir durumda, kaybedilen kıkırdak dokusu kendini yenileyemez veya yaralanmış kıkırdak dokusu iyi biçimlendirilmiş yeni kıkırdak dokusu ile tamir edilemez." diyerek o tarihlerde kıkırdak hastalıklarının zorluğundan ve tedavisinin olanaksızlığından bahsetmiştir. Modern çağ ile beraber kıkırdak doku hastalıklarının tedavilerine yönelik gelişmeler olmuştur. Erich Lexer (Almanya) ve Henri Judet (Fransa), 1900'lerin başında hasarlı eklemlerin yenilenmesinde allogreft doku kullanmaya başladılar^{1,2}. Kıkırdak yaralanmalarının açık tedavisinde; "Ev temizliği" prosedürü 1940'larda Haggart ve Magnuson tarafından yaygınlaştırıldı^{3,4}. Haggart ve Magnuson bu prosedürle eklem ağrısı kaynağı olabilecek hasarlı dokuların çıkarılması gerektiğini öngördüler. Bu amaçla açık sinovektomi, menisektomi, kondroplasti gibi birtakım yöntemler tanımladılar^{3,4}. 1959 yılında Pridie, subkondral drilleme yöntemi ile eklem yenilenmesi için açık bir tekniği tanıttı⁵. Daha sonraki yıllarda artroskopi tekniğinin keşfi ve etkin kullanımıyla beraber kıkırdak cerrahi tedavisinde hızlı gelişmeler oldu. 1980'lerde Lanny Johnson artroskopik abrazyon artroplastisini tanımladı⁶. Friedmann 1984'de abrazyon artroplasti sonuçlarını açıkladı⁷. Steadmann ise 1992'de mikrokirik yöntemini ortaya koydu⁸. Kıkırdak hastalıklarının daha özgün tedavisi, 1965'de Smith'in kondrositleri ilk kez izole etmesi ve büyütmesi ile başlamıştır. Petersen 1984'de tavşan dizlerindeki kıkırdak defektlerinin tedavisinde otolog kondrositleri kullanmıştır. 1987'de İsveç'te otolog kondrosit implantasyonu (ACI) yöntemi tanıtılmış ve insanda yine ilk kez bu yöntem İsveç'te bu tarihte uygulanmıştır. Brittberg ve Peterson insanlar üzerinde ACI yöntemi kullanılarak yaptıkları çalışmalarını 1994 tarihinde yayınlamışlardır⁹. ACI yönteminin bir üst jenerasyonu olan Matriks destekli otolog kondrosit implantasyonu (MACI)

2002'de Almanya'da Dr. Habermeyer ve Dr. Lichtenberg ile Amerika Birleşik Devletleri'nde birkaç merkezde tarif edilerek uygulanmaya başlanmıştır¹⁰.

Sinovyal eklem yüzlerini çevreleyen ve sürtünmeyi azaltarak ağrısız harekete izin veren hyalin kıkırdak, su dolu makromoleküler ağdan oluşmuş bir ekstraselüler matriks içine yerleşik kondrositlerden oluşur. Kondrositler, kıkırdak matriks aracılığıyla besin maddelerini ve oksijeni difüzyon yoluyla sinovyal sıvıdan alırlar. Hyalin kıkırdağın avasküler, anöral ve hiposelüler bir doku olması nedeniyle travmaya olan iyileşme yanıtı oldukça kısıtlıdır¹¹⁻¹³. Kollajen, dokunun gerilme ve makaslama özelliklerini sağlar ve proteoglikanları matriks içinde immobilize eder. Kıkırdağın mekanik davranışı, kollajen, proteoglikan ve interstisyel sıvı komponentlerinin etkileşimine dayanır.

Kıkırdağın avasküler yapısı ve farklılaşmamış hücre yetersizliği nedeniyle, sadece kıkırdağı ilgilendiren yaralanmalar, kanama ve fibrin pıhtısı oluşumunu sağlayamadığından etkili bir iyileşme potansiyeline sahip değildir. Bu durumda sadece kondrositler, sınırlı oranda çoğalarak yaralanma bölgesinde matriks makromoleküllerinin sentezini artırır, fakat yeni matriks ve hücreler, yüzeyi hyalin kıkırdak ile yapılandıramazlar^{14,15}. Kısmi kalınlıktaki kıkırdak yaralanmalarında oluşan onarım dokusu, hyalin benzeri bir yapı da içermesine rağmen önemli oranda fibröz doku da içerir. Fibröz kıkırdaktan oluşan onarım dokusu, çevre sağlam kıkırdak dokuya benzer mekanik özellikleri sağlayamaz.

Kemik iliğinde bulunan kök hücreler ancak subkondral kemiğin bütünlüğü bozulduğunda defekte ulaşım tamir sürecinde görev alabilirler. Damarsal bir ağa sahip olan, kıkırdak doku dışındaki diğer dokuların iyileşme sürecinde, vasküler bir giriş ve bununla birlikte doku ile matriksi oluşturacak hücrelerin iyileşme bölgesine göçü olur. Ancak kıkırdak iyileşmesinde vasküler bir doku yoktur. Bu nedenle hücreler başka bir kaynaktan temin edilmelidir. Bunun bir yolu kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerin (MKH) defekte göç etmesinin sağlanmasıdır. Bir diğer yol ise kondrositlerin dışarıdan defekt içine implantasyonu aracılığıyla gerçekleşebilir¹⁶. Bu amaçla geliştirilen otolog kondrosit implantasyon (ACI) yönteminin bazı teknik dezavantajları vardır. Bu yöntemde hassas bir hücre süspansiyonu kullanmak gerekir. Periostu su

geçirmez bir şekilde kapatmak ve bu nedenle kırıkdağa periostu suture etmek gerekir. ACI'nin ikinci seansında artrotomi yapma gereksinimi doğar ki; periost grefti kullanımı ve artrotomi yapılması komplikasyonlara açıktır¹⁷. Standart tek katman hücre kültüründe kondrositler fenotipik olarak geri farklılaşmaya zorlanmaktadır. Hücre süspansiyonu enjeksiyonu homojen olmayan dağılıma neden olmakta, hücrelerin periost greftinden sızarak kaybı mümkün olmakta ve cerrahi süresi uzun olmaktadır¹⁸. Bu problemlere çözüm amacıyla 1999 yılında MACI tarif edilmiştir. 2002 yılından itibaren ACI'nın ikinci nesli olarak kabul edilen ve üç boyutlu biyobozunur matrikslerin kullanıldığı MACI yöntemi klinik kullanıma girmiştir^{17,19}.

Doku mühendisliği üç ana bölümden oluşur: hücreler, matriks ve büyüme faktörleri. Matriksin görevi hücreleri canlı tutarak eşit dağılımını sağlamak, erken dönemde yeterli biyomekanik destek vermek ve kondrosit farklılaşmasını ve aramada salınımına destek olmaktır. Kondrositler ancak üç boyutlu bir matriks içinde küresel fenotiplerini, yani farklılaşmış morfolojilerini koruyabilmektedirler. Uzun süreli kültür ortamı kondrositlerin fibroblast morfolojisine dönmelerine ve daha çok tip I kollajen sentezlemelerine neden olmaktadır²⁰. Üç boyutlu ortamda ise tip II kollajen ve aggrecan sentezlemektedirler^{21,22}. Matriks olarak en sık kollajen ve hyaluronan temelli malzemeler kullanılmaktadır¹⁹. Hücrelerin eşit dağılımını sağlamak için ilk olarak tip I ve tip III kollajenden oluşan membran kullanılmış, kondrositler bu membran üzerine ekilerek implante edilmişlerdir²³. Kollajen membrana ekilen hücrelerin homojen dağılım gösterdikleri ve kondrosit fenotiplerini korudukları gösterilmiştir²⁴.

Beş cm²'den büyük kırıkta defektlerinin tedavisinde günümüzde altın standart tedavi yöntemi MACI'dir. Ancak, bu yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemle hasta 6 hafta arayla iki defa cerrahi girişim geçirmekte ve yöntem pahalıya mal olmaktadır. Tek seansta gerçekleştirilebilecek ve en az MACI yöntemi kadar iyi sonuç verebilecek ucuz bir yöntem ihtiyacı vardır. Bu yöntemde amaç MACI yönteminde in vitro olarak gerçekleştirilen otolog kondrosit kültür sürecini in vivo ortama taşımaktır. Bu sayede tedavi tek seansta gerçekleştirilebilecek ve maliyet düşürülebilecektir.

MACI yönteminde ilk aşamada kondrositlerin izolasyonu, matriks içerisine gömülmesi ve uygun kültür ortamında çoğaltılması gerekmektedir. Hedeflenen yeni yöntemle kondrosit kültürünün ilk aşaması olan kondrosit izolasyonunun eklem içinde gerçekleştirilmesi, kondrosit kültürünün ikinci aşaması olan inkubatörde hücre çoğaltmanın yine eklem içerisinde gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Ve MACI yönteminin son aşaması olan matrikse gömülü hücrelerin in vivo ortamda kırıkta matriksi üretmesinin denenen yöntemle karşılaştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kıkırdak Histolojisi

Kıkırdak doku, özelleşmiş bir bağ dokusu olup, diğer bütün bağ dokuları gibi üç elemandan meydana gelmiştir: hücreler, lifler ve temel madde. Lifler ve temel madde, hücrelerarası madde ya da matriksi oluştururlar. Kıkırdakta temel madde başlıca proteoglikanlar (kondroitin sülfat) ve glikoproteinlerdir. Kıkırdak matriksi kondroitin sülfat içerdiğinden oldukça sağlam olup, yapısal destek fonksiyonu görmektedir. Kıkırdak matriksinde, aynı zamanda lifler de bulunur ve kıkırdağın esnekliğinden sorumludur.

Kıkırdak, kondrosit denen hücreler ve yoğun bir hücrelerarası maddeden oluşan avasküler bir dokudur. Kıkırdak hacminin %95'inden fazlasını matriks oluşturur. Kondrositler sayıca az olmasına rağmen matriksin üretimi ve devamlılığı için önemlidir.

Matriks içerisinde kan damarları olmadığı için, içeriğindeki fazla miktardaki glikozaminoglikanların tip II kollajen liflere olan oranı, kan damarları içeren çevre bağ doku ile arasında madde difüzyonuna izin verecek düzeydedir. Böylece doku canlılığını koruyabilmektedir.

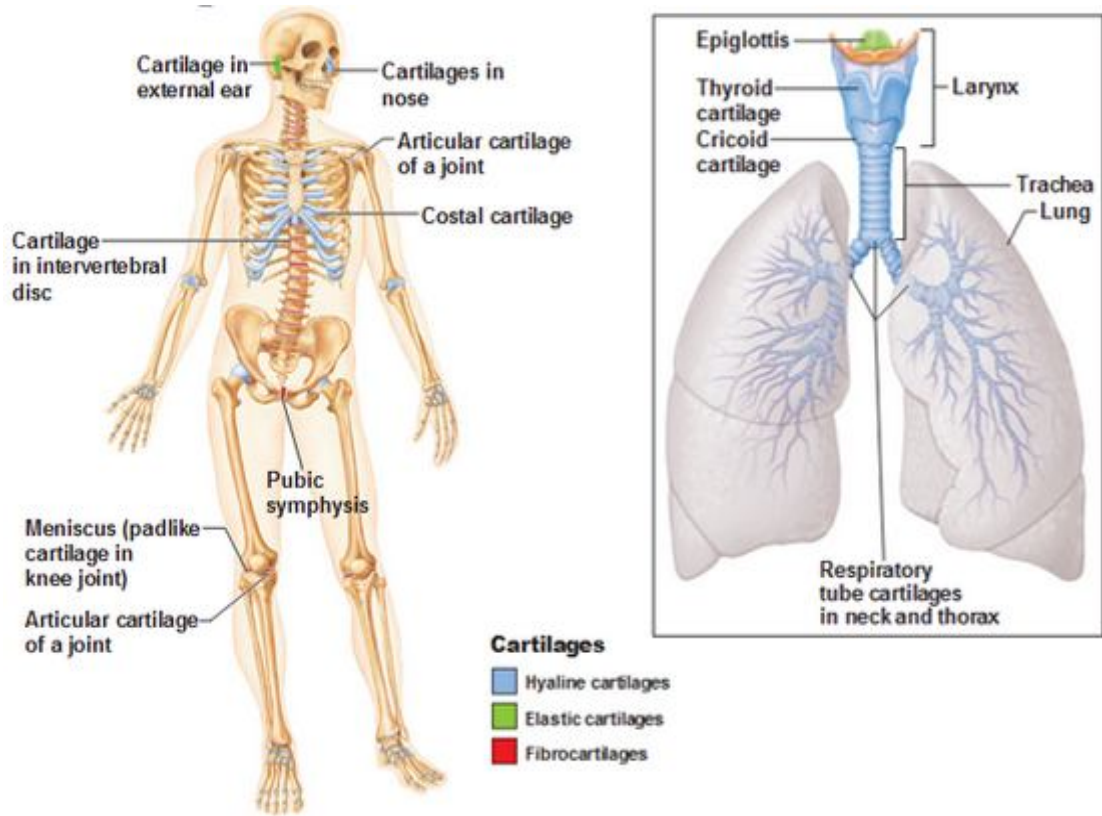
Fötal hayatın erken devrelerinde kıkırdak geçici olarak iskeletin hemen tamamını oluşturur. Yetişkin memelilerde ise kemiklerin artiküler (eklem) yüzeylerinde, tek iskeletsel destek olarak solunum yollarında ve kulağın bazı kısımlarında görülmeye devam eder. Matriks içerisinde kollajen ve elastik liflerin bulunmasına bağlı olarak dokunun gerilme kuvveti veya elastikiyeti artırılmış olur ve dokunun vücudun farklı yerlerindeki mekanik ihtiyaçlara uyumu sağlanır. Liflerin cinsi, fazlalığı veya azlığı ile temel maddenin kimyasal özelliği kıkırdağın sınıflandırılmasında esas alınır. Genel olarak 3 tip kıkırdak görülür (Şekil 1-2):

1-Hyalin kıkırdak

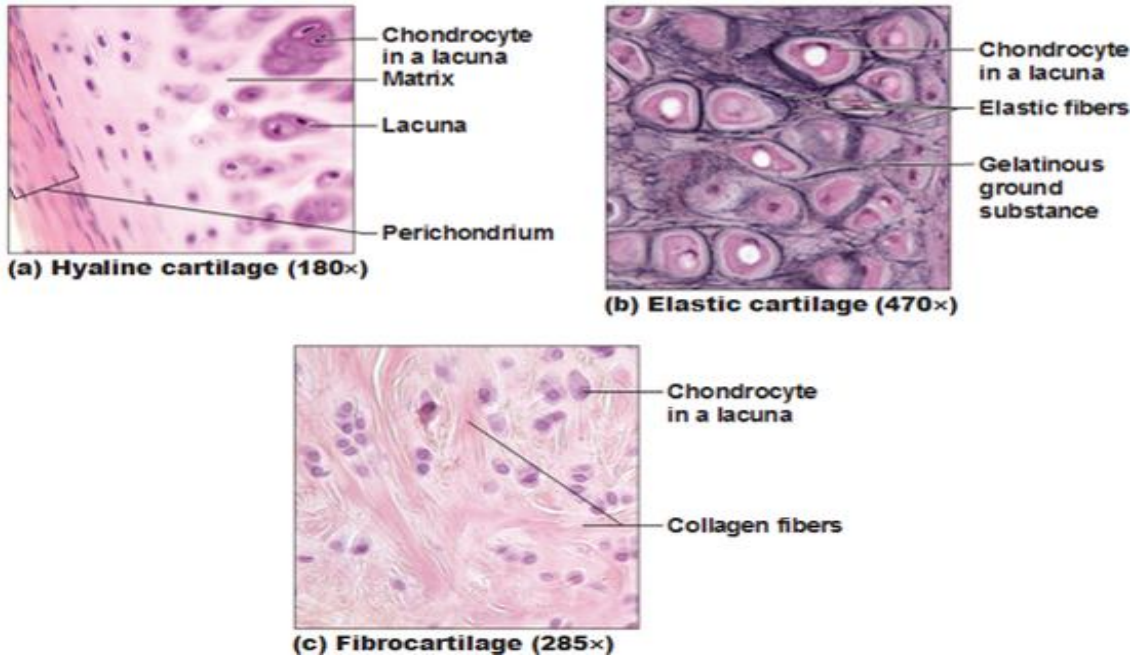
2-Elastik kıkırdak

3-Fibröz kıkırdak

Bunlardan hyalin tip, kıkırdak tipleri arasında en karakteristik ve vücutta en fazla olanıdır. Diğer kıkırdak tiplerine ise belirli bölgelerde rastlanır.



Şekil 1: Kıkırdak Dokusunun Tipleri (www.antranik.org)



Şekil 2: Kıkırdak Dokusunun Tipleri Histolojik Görünümleri (www.antranik.org)

2. 2. Kıkırdak Gelişmesi ve Büyümesi

Diğer destek dokuları gibi kıkırdak dokusu da mezenşimden gelişir. Kıkırdağın gelişeceği bir bölgede mezenşimal hücreler uzantılarını kaybedip yuvarlaklaşır ve sıkıca biraraya gelerek kümeler oluştururlar, aynı zamanda kollajen lifler hücrelerarası madde içerisinde depolanır. Bu şekilde küme oluşturmuş hücre gruplarına kıkırdaklaşma merkezi denir. Hücrelere de artık kondroblast adı verilir. SOX-9 transkripsiyon faktörü, hücrelerin kondroblastlara farklılaşmasını başlatmaktadır. Kondroblastlardan salınan temel madde kollajen lifleri çevirir ve maskeler. Etrafında matriksin oluşmasından dolayı hücreler nisbeten birbirlerinden ayrılır ve gittikçe laküna olarak adlandırılan küçük boşluklar içerisinde yerleşim gösterirler. Daha fazla differansiyasyona uğrayarak olgun bir kıkırdak hücresi ya da kondrosit karakterini kazanırlar. Bu hücreler vakuol, lipid ve glikojen yönlerinden zengin hale geçerler. Genişleyen kıkırdak yığınları etrafındaki mezenşim baskıya uğrar ve kıkırdağın fibröz zarı olan perikondriumu oluşturur. Bu zar bir tarafta kıkırdak ile diğer tarafta ise bağ dokusu ile birleşir. Kan damarları ve sınırlar çevredeki gevşek bağ dokusundan perikondriuma girerler. Kondrositlerin beslenmesi, perikondriumda yerleşen kapillerlerden veya eklem kavitelerindeki sinovyal sıvıdan besinlerin diffüzyonu ile sağlanır. Benzer şekilde artık maddeler de hücrelerden vasküler perikondriuma geçerek uzaklaşırlar. Kıkırdağın daha da büyümesi 2 yolla olur:

- **İnterstisyel (Endogenous) Büyüme:** Bölünme yeteneğine sahip olan, genç kondrositler proliferer olur ve yeni matriks meydana getirirler. Kendi içerisinde genişleme olan bu tip kıkırdak büyümesi, endogenous (interstisyel) kıkırdak büyümesidir ve yalnızca nisbeten genç kıkırdaklarda görülür. Genç kıkırdaklar henüz genişleyerek şekil alabilecek durumdadır. Olgun kıkırdak içerisinde görülen hücre grupları ya da hücre yuvaları interstisyel büyüme durduğunda görülen duruma işaretler. Başlangıçta bölünen kondrositten kaynaklanan yavru hücreler tek bir laküna içerisinde yerleşmişlerdir. Yeni matriks salgılandıkça, hücreler arasında ayrılma görülmekte ve her hücre kendi lakünası içerisinde kalmaktadır. Devam eden matriks salgılaması sonucunda, hücreler birbirinden uzaklaşmaktadırlar. İnterstisyel büyüme uzun kemiklerin uzamalarını

sağlayan epifizyal plaklarda ve endokondral kemik gelişimindeki kıkırdak modelin ortaya çıkışında önemli rol oynar.

- **Appozisyonel (Exogenous) Büyüme:** Kıkırdağın hacmini arttırdığı ikinci tip exogen (appozisyonel) büyüme, perikondriumda ki hücrelerin farklılaşması ile gerçekleşen bir büyüme şeklidir. Aktivite perikondriumun iç tabakasından başlar. Buradaki hücreler hem şekil hem de perikondriumun tip I kollajen içeriğini salgılama fonksiyonu açısından fibroblastları andırırlar. Kıkırdak büyümesi başladığında, hücreler, SOX-9 transkripsiyon faktörün ekspresyonu sayesinde differansiye olurlar; sitoplazmik uzantıları kaybolur, çekirdek yuvarlaklaşır ve sitoplazma miktarı artar. Hücreler kondroblastlara farklılaşmaktadırlar. Kondroblastlar, tip II kollajen dahil kıkırdak matriksini salgılamaktadırlar. Appozisyonel büyüme yetişkin kişilerde ancak kıkırdak onarımının gerektiği durumlarda görülür.

2. 2. 1. Hyalin Kıkırdak

Hyalin kelimesi Yunanca cam anlamına gelen hyalos kelimesinden köken alır. Taze iken, hyalin kıkırdak şeffaf, mavimsi-beyaz yığınlar halindedir²⁵.

Fötüste hemen bütün iskelet hyalin kıkırdaktır, sonradan yerini kemiğe bırakır. Yetişkinde ise fazla hareketlilik gerektiren yerlerde görülür. Yetişkinde hyalin kıkırdağın bulunduğu yerler;

- 1- Eklemlerde (kemiklerin eklem yüzeylerinde)
- 2- Kostal kıkırdaklar
- 3- Burun kıkırdakları
- 4- Larinks kıkırdakları
- 5- Trake ve bronş kıkırdakları

2. 2. 1. 1. Hyalin Kıkırdak Hücreleri

Kıkırdakta 3 tip hücre bulunmaktadır; kondrojenik hücreler, kondroblastlar ve kondrositler. Kondrojenik hücreler, mezenşimal hücrelerden köken alan iğ şekilli hücrelerdir. Ovoid çekirdekleri, 1-2 çekirdekçikleri olan bu hücreler, küçük bir Golgi kompleksi, az sayıda mitokondriyon, biraz granüler endoplazmik retikulum ve bol miktarda serbest ribozomlar içerir. Kondroblastlar, mezenşimal hücrelerden

ve kondrojenik hücrelerden gelişir. Protein sentezi için gerekli organellere sahip bazofilik hücrelerdir. Elektron mikroskopta, zengin granüler endoplazmik retikulum ağı, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyon ve sekretuar vesiküller içerdiği görülür. Kondrositler, matriks içerisinde küçük kaviteletin ya da lakünaların içinde yerleşmiş kıkırdağın yapısal hücreleridir ve enkondral kemikleşmede önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir²⁶. Kondrosit hücreleri genellikle ovoid veya sferikaldir. Eğer birkaç hücre bir arada bulunuyorsa temas yüzeyleri yassılaştırmıştır. Her bir hücre, merkezi yerleşmiş, büyük, sferikal çekirdeğe sahiptir, çekirdekçik ise tek veya daha fazla olabilir. Stoplazma sahip olduğu fazla miktarda serbest ribozomlardan ve nispeten iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikülümünden dolayı orta derece bazofiliktir. Görünüme ince granüller hakimdir. Ek olarak, stoplazmada, büyük hacimli mitokondriyonlar, vakuoller, yağ damlacıkları ve bir miktar glikojen bulunur. Canlı kıkırdakta kondrositler lakünaları tamamen doldurur fakat parafin kesitlerinde fiksasyon ve dehidratasyondan dolayı lakünalarla hücre arasında boşluk görülür; hücre büzüşmüştür, çok ender olarak lakünaların şeklindedir. Yetişkinde kıkırdak dokusu içinde hücreler gruplar halinde bulunabilir. Her bir grup tek bir ana kondrositin ürünüdür. Bir laküna içinde yerleşmiş bir ana hücreden köken almış olan bu hücreler grubuna izogen grup ya da hücreler yuvası denir. Kondrositlerin, izogen gruplar şeklinde bulunmaları yeni bölündüklerinin işaretidir. Yeni bölünmüş bu kondrositler etraflarındaki matriksi salgıladıklarında, birbirlerinden uzaklaşırlar. Bu hücreler ayrıca metalloproteinazları da salgılamaktadırlar. Bu enzim sayesinde kıkırdak matriksi parçalanır, hücreler genişler ve yeniden yerleşirler^{27,28}. Kıkırdak kümesinin periferine doğru hücreler eliptik şekil alır ve yüzeye paralel olarak düzleşir. Fötal kıkırdakta hücreler sıklıkla düzleşmiştir ve hücre yuvaları ender olarak görülür.

Kıkırdak öncülü hücreler, birçok sinyal molekülünden tarafından yönetilen bir yoldan geçtikten sonra kıkırdağa dönüşür. Bu moleküllerden bazıları Indian-hedgehog (Ihh), Kemik morfojenik proteinleri (BMPs), ve Paratiroid-hormon-ilişkili-peptid (PTHrP)'dir^{29,30}.

Kondrositler esas olarak iki işlev yapmaktadır. Kıkırdak dokusunun esas hücresel bölümünü oluştururlar ve enkondral kemikleşme sürecinde, kemik oluşumunda önemli bir rol oynamaktadırlar. Enkondral kemikleşme süreci,

osteoblast ve kondrositler arasındaki yakın ilişkiye de güzel bir örnektir. Bu süreçte, damarsız kıkırdak dokunun yerini; yüksek oranda damarlı, mineralize doku alır ve ileride iskelet elemanlarını oluşturacak mezenkimal öncüllerin embriyogenezdeki başlangıç elemanları buraya yerleşir. Bu mezenkimal yoğunlaşması ile iskelet elemanlarının şekli, osteojenik yolak ve kondrojenik yolak farklılaşmaları sağlanır^{31,32,33}.

Kondrosit fonksiyonları hormon bağımlıdır. Glikozaminoglikan sentezi tiroksin, büyüme hormonu ve testosteron ile artarken; steroid, hidrokortizon ve östrodiol ile azalır. Kıkırdak büyümesi hipofizden salınan somatotropin ile olmaktadır. Bu hormon kıkırdak üzerine direkt etkisi yoktur. Etkisini karaciğerden salınan insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ile yapar³⁴.

2. 2. 1. 2. Hyalin Kıkırdak Matriksi (Hücrelerarası Madde)

Her ne kadar matriks taze durumda iken ve normal fiksasyondan sonra homojen görünürse de, gerçekte fazla miktarda şekilli ve şekilsiz hücrelerarası maddelere sahiptir. Şekilli tip kollajen tarafından simgelenir. Taze materyalde kollajen, etrafındaki temel madde ile ışığı aynı derece kırıldığından görünür halde değildir. Fakat ince kesitlerde polarize mikroskop ile gözlenebilirler, ayrıca tripsin veya dilue alkalilerle muameleden sonra görünür hale geçerler. Elektron mikroskopide ise çok kolay gözlenirler. Kollajen lifler ender olarak demetler halindedir, genellikle keçe gibi örülmüş ince bir ağ oluştururlar. Kollajen lif demetleri yalnızca eklem yüzeylerindeki hyalin kıkırdakta gözlenir. Kıkırdaktaki kollajen tipi deri ve tendondakinden oldukça farklıdır. Üç α -1 proteini içeren triple helikslardan oluşmuştur (tip II kollajen). Hyalin kıkırdakta bulunan kollajen diğer bağ dokularındakinden daha az polimerizedir. Bununla birlikte kıkırdak hücreleri, düşük yoğunluklarda kültürleri yapıldığında, oldukça önemli değişiklikler gösterirler. Bu hücreler tip II kollajen yapımını durdururlar, bunun yerine fibroblastlardaki gibi tip I kollajen yapmaya başlarlar. Dolayısı ile kondrositler fibroblastlara dönüşmüşlerdir. Hücreler tarafından üretilen ekstrasellüler matriks farklılaşmış hücrelerin korunmasına yardımcı olur. Kıkırdağın temel maddesi içerdiği proteoglikanlardan dolayı oldukça bazofildir. Proteoglikanlar büyük bir protein özüne sahip (250.000 molekül ağırlığında) polisakkarit

glikozaminoglikanlardan oluşmuşlardır. Kollajen lifler temel madde içerisine gömülmüşlerdir. Temel madde proteoglikan molekülleri tarafından oluşturulan oldukça yüksek oranda hidrate olan jel benzeri materyallerden oluşmuştur. Kollajen lifler matriks içerisinde organize olmuşlardır ve proteoglikanların akuöz fazları besin maddeleri, düzenleyici maddeler ve metabolitlerin kan ile kıkırdak hücreleri arasında diffüzyonuna müsaade eder. Proteoglikanların, katyonları bağladıklarına inanılmaktadır. Bu yolla su ve elektrolitlerin matriks içindeki taşınmasında önemli rolleri vardır. Çok sayıda uzun dallanma göstermeyen proteoglikanların glikozaminoglikan zincirleri oldukça hidrofildir; böylece hidrate olmuş yerler düşük konsantrasyonlu karbonhidratlar tarafından oluşturulmuştur.

Hyalin kıkırdak, yüksek konsantrasyonda sülfat grupları içerdiğinden, temel madde bazik boyalar ile boyanmaktadır. Dolayısıyla, boyanmış kıkırdağın gösterdiği bazofili ve metakromazi, sülfatlanmış proteoglikanların dağılımı ve konsantrasyonu hakkında fikir verebilir. Proteoglikanlar, embriyonik kıkırdaklarda her tarafta yaygındırlar, fakat olgun (yetişkin) kıkırdaklarında proteoglikanlar değişik farklı bölgelerde yoğunlaşma gösterirler.

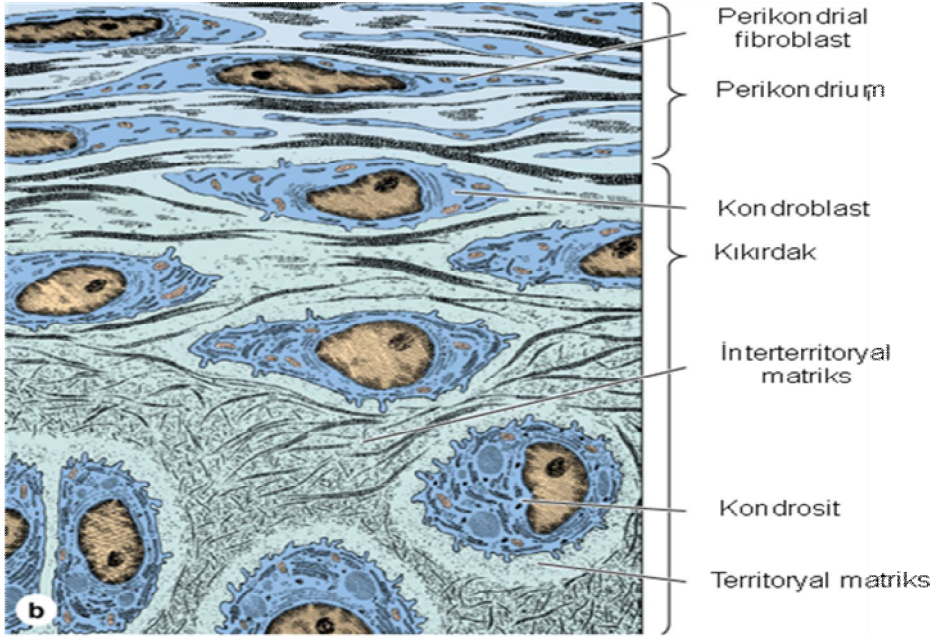
Kondrositleri çevreleyen ekstrasellüler matriks 3 bölgeye ayrılır (Şekil 3).

1- Perisellüler matriks; her bir kondrositi çevreler.

2- Teritoryal matriks; bir tek hücre ya da kondronun perisellüler matriksini çevreler. 50µm genişliğindeki bir bant şeklindedir ve konroidin sülfatça zengin olduğu için PAS (+) boyanır. Bu matriksin dışı ise tip II kollajence zengin, proteoglikanlarca fakirdir.

3- İnterteritoryal matriks; kıkırdağın büyük kısmını oluşturur ve dokunun yapısal özelliklerini verir ve dokuyu korur.

Perisellüler ve teritoryal matriks kondrositlerin interteritoryal bölgeye yapışmasını, yük altında hücrelerin hasardan korunmasını ve mekanik sinyallerin hücrelere ulaşmasını sağlar^{35,36,37}.



Şekil 3: Kondrositleri çevreleyen ekstrasellüler matriks

Kapsüler (periselüler) matriks, kondrositin hemen etrafında çok yoğun olarak boyanmış bir halka şeklinde gözlenir. En fazla konsantrasyonda sülfatlanmış proteoglikanlar, hyaluronan, biglikanlar ve bazı glikoproteinler bu bölgede bulunmaktadır. Kapsüler matrikste tip VI kollajen lifler kondrositlerin etrafını sıkıca örmüşlerdir. Hücre yüzeyindeki integrin reseptörlerine bağlanarak kondrositleri matrikse bağlamaktadırlar. Bu matrikste ayrıca tip IX kollajen de yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Lakünaların hemen çevresinde territorial matriks bulunmaktadır. Bu bölge, kapsüler matriks kadar olmasa da proteoglikanlardan zengindir ve koyu bazofilik boyanır. Toluidin mavisi ile metakromazi gösterir ve PAS pozitifdir. Tip II kollajen liflerinin rastgele düzenlenmiş ağı ile daha az miktarda tip IX kollajen içermektedir. Lakünaların arasında yerleşen matriks ise daha az bazofilik olup, interterritorial matriks adını alır. Proteoglikanların protein kısımları granüler endoplazmik retikülümde yapılıdır. Sülfat grupların eklenmesi ve paketlenme Golgi kompleksinde yapılıdır ve daha sonra salgı vesikülleri halinde salınırlar. Bütün kıkırdaklarda bulunan spesifik proteoglikanlar, kondroitin 4-sülfat, kondroitin 6-sülfat, keratan sülfat ve az miktarda hyaluronik asittir.

2. 2. 1. 3. Perikondrium

Eklem yüzeyleri dışında, kıkırdak perikondrium adı verilen sıkı bağ dokusunda oluşmuş kuvvetli bir tabaka ile kaplıdır. Perikondriumun dış tabakası fibröz tabaka olarak adlandırılır. Tip I kollajen lifler, fibroblastlar ve kan damarları içerir. Perikondriumun iç tabakası kondrojenik tabaka olarak adlandırılır ve daha fazla hücrelidir. Bu tabaka kondrojenik hücreler içerir ve bu hücreler kondroblastlara dönüşürler. Bu şekilde tabakalanma, aktif büyüme olduğunda fark edilebilir. Aktif olarak yeni kıkırdak üretimi olmadığında veya büyümenin çok yavaş olduğu kıkırdakta belirgin değildir.

2. 2. 1. 4. Eklem Kıkırdağı

Hareketli birleşme yerlerinin eklem yüzeylerini kaplayan kıkırdağa eklem kıkırdağı denilmektedir. Eklem kıkırdağı; kondrositler, su ve hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri

Kondrositler	%5
Hücre dışı matriks	
- Su	%65-80
- Kollojen	%10-20
- Proteoglikan	%10-15
- Diğer bileşenler (Adhesivler ve yağlar)	<5

Bütün kıkırdak dokuların vücutta çok önemli fonksiyonları olmasına rağmen; doku mühendisliği en çok eklem kıkırdağı ile ilgilenmektedir³⁸. Eklem kıkırdağının yapısı genellikle hyalin kıkırdağa benzer³⁹. Eklem kıkırdağı, hücreden fakir, lenfatik ve vasküler yapılardan yoksun ancak kondrositler tarafından üretilmiş bol miktarda ekstrasellüler matriks içeren bir yapıya sahiptir⁴⁰. Kıkırdak pH'sı 7,4'tür⁴¹.

Eklem kıkırdağı; hayatımız boyunca sürekli olarak mekanik streslere maruz kalır ki; bunlar, kıkırdak dokusunun sağlıklı kalması için gerekli uyarılardır⁴². Yük taşımayan kıkırdak incelik ve yumuşak. Yük taşıyan eklem

yüzey alanlarındaki kıkırdak dokusu, daha kalın ve mekanik olarak daha güçlüdür. Kıkırdak dokusu; farklı yüklenme şekillerine göre, metabolik değişikliklerle uygun cevabı vermeye çalışır^{43,44,45}.

Yetişkinlerde eklem kıkırdağı nisbeten hücresiz olmakla birlikte, toplam kıkırdak dokunun yaklaşık %2'sini hücreler oluşturmaktadır⁴⁶. Küçük yaşlarda yoğun olan hücre yoğunluğu, yaşla birlikte azalma gösterir, kıkırdak daha baskın hale geçer⁴⁶. Bu azalma 20-30 yaşlar arasında pik yapar ve hücre yoğunluğunun en az olduğu dönem bu yaşlar arasındaki dönemdir. Eklem kıkırdağı için en önemli hücresel kaynak kondrositlerdir. Bütün kondrositler dar bir hücresel bölgeden salınır.

Her ne kadar hyalin kıkırdak yapısına sahip olsa da, eklem kıkırdağı diğer hyalin kıkırdaklardan (nazal ya da trakea kıkırdakları gibi) ayıran bazı özellikleri vardır. Diğer hyalin kıkırdak yapılarında bulunmayan kalsifiye kıkırdaktan başlayarak eklem yüzeyine doğru dikey ilerleyen ve yüzeyde bükülerek paralel seyreden tip II kollajen lifleri organizasyonuna ve bu liflerin arasında kolonlar halinde yerleşmiş sferik hücreler ile yüzeyde yassılaştırmış kondrositler şeklindeki bir mimariye sahiptir. Bu mimari, eklem yükünün taşınabilmesi için özgün bir yapıdır⁴⁷.

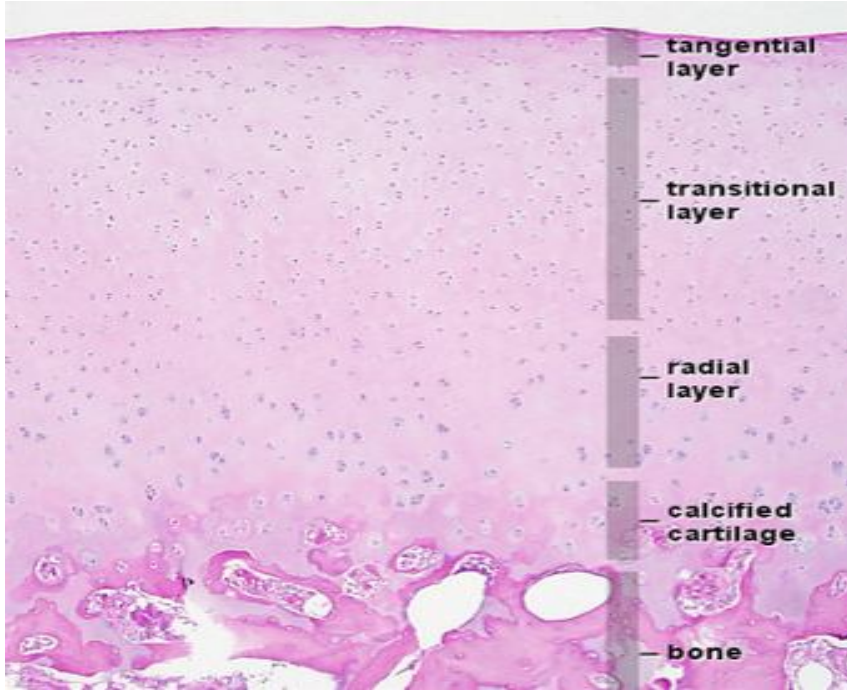
Eklem kıkırdağının hem serbest yüzeyinde hem de tam karşısındaki kemik ile ilişkili yüzeyinde perikondrium bulunmaz. Kıkırdağın perikondriyuma sahip olmadığı alanlarda (özellikle eklem yüzeyi) kıkırdak hücreleri eklem yüzeyini yıkayan sinovial sıvıdan beslenir³⁵. Eklem kıkırdağı, gelişen kemiğin şablonunu oluşturan hyalin kıkırdağın bir kalıntısıdır ve yetişkin hayat boyunca varlığını sürdürür. Yetişkinde 2-5 mm kalınlığındadır ve dört bölgesi vardır^{48,49} (Şekil 4-5):

1) Yüzeyel (tanjansiyel) tabaka: Eklem yüzeyine en yakın, basınca dirençli bölgedir. Çok sayıda uzun yassı kondrositler içermekte ve bu hücreler, serbest yüzeye paralel şekilde düzenlenen yoğunlaşmış tip II kollajen lif demetleri ile sarılmışlardır.

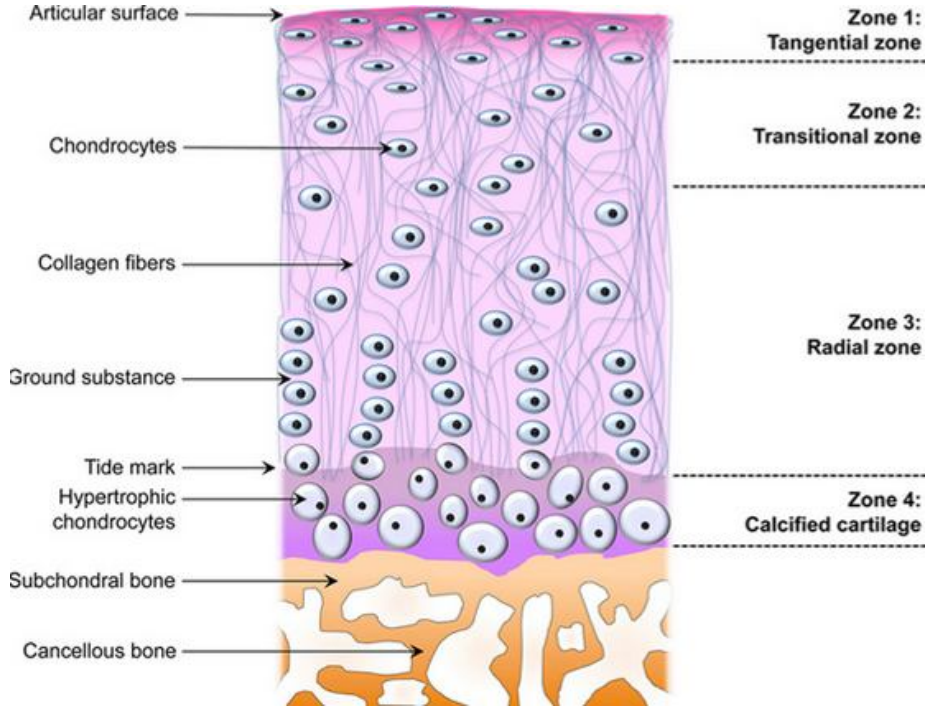
2) İntermediyer (transizyonel) tabaka: Yüzeyel tabaka altında yerleşen ve matriks içerisinde rastgele dağılmış yuvarlak kondrositler içeren bölgedir. Kollajen lifler daha az organizedir ve yüzeye doğru oblik düzenlenmektedirler.

3) Derin (radyal) tabaka: Serbest yüzeye dikey kısa kolonlar şeklinde düzenlenen küçük, yuvarlak kondrositler ile karakterize bir bölgedir. Kollajen lifler, kolonlar arasında ve kemiğin uzun eksenine paralel şekilde sıralanmışlardır.

4) Kalsifiye tabaka: Küçük kondrositler ile birlikte kalsifiye matriksin varlığı ile karakterizedir. Radyal tabakadan düzgün, dalgalı, yüksek oranda kalsifiye bir sınır ile ayrılmıştır. Bu sınır üzerinde, laküna içerisindeki kondrositin proliferasyonu, interstisyel büyüme için yeni hücreler sağlamaktadır. Eklem kıkırdağının yeniden yapılmasında, kondrositler bu bölgeden bağlantı yüzeyine göç etmektedirler. Kalsifiye bölgenin anahtar komponenti hidroksiapatit kristalleridir. Bu bölge çıpa görevi görmektedir.



Şekil 4: Eklem kıkırdağı tabakaları histolojik görünümü (<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au>)



Şekil 5: Eklem Kıkırdağı tabakaları şematizasyonu (<http://www.frontbiosci.org>)

Yüzeyel tabakadan derin tabakaya inildikçe, kondrosit hacmi artarken, kollajen lifleri eklem yüzeyine dik hale gelir^{41,50,51}.

Eklem kıkırdağının yüzeyel tabakasında ki kollajen liflerinin yönü mekanik açıdan çok önemlidir. Kıkırdak yüzeyi sivri bir cisimle delindiğinde doku kollajen lifleri boyunca ikiye ayrılır. Bu da bize dokunun mekanik davranışının yöne bağlılığının bir göstergesidir⁵² (Tablo 2).

Tablo 2. Eklem kıkırdağı tabakalarının özellikleri

Tabaka	Kalınlık(μm)	Özellik	Kollajen Dizilimi	Fonksiyon
Yüzeyel	40	Metabolik aktivite düşük	Horizontal	Gerilmeye karşı
Orta (Geçiş)	500	Metabolik aktivite yüksek	Oblik	Kompresyona karşı
Derin	1000	Kollajen boyutu	Dikey	Kompresyona karşı
Tidemark	5	Bariyer	Yatay	Gerilmeye karşı
Kalsifiye	300	Hidroksiapatit kristalleri	-	Çıpa

2. 2. 1. 5. Beslenme

Genellikle kıkırdak, kan damarlarından, lenfatiklerden ve sinirlerden yoksundur^{38,53}. Dolayısı ile kondrositler perikondriumdaki kan damarlarından diffüzyon yolu ile beslenirler. Bu duruma bağlı olarak kıkırdak hücrelerinde metabolizma olayları yavaş yavaş cereyan eder.

Bazı kıkırdaklar her biri küçük arter ya da arteriol içeren ve dallanma gösteren küçük kanallar ile delinmişlerdir. Bu kıkırdak kanallarının önemliliği hakkında bugün pek bilgimiz yoktur. Önceleri bazı otörler bu kanalların başka yerlere gitmek için kıkırdağı katettiğini öne sürmüşlerdi. Yakın geçmişte ise pek çok otör bu kanalların ilk görevlerini kıkırdağın intertisyel büyümesi ile bağdaştırmışlar ve ikincil olarak da özellikle kıkırdak derin hücrelerinin beslenmesine yardım etmek üzere ilave beslenme kaynağı olabileceklerini öne sürmüşlerdir. Bütün bunlara karşı kıkırdağın perikondrial damarlardan diffüzyonla beslendiğine dair kuşku bulunmamaktadır.

2. 2. 1. 6. Retrogressif Değişiklikler

1- Beslenmenin yetersiz olduğu yaşlılık gibi durumlarda hyalin kıkırdakta hem hücresel hem de matrikse ait retrogressif (gerileyici) değişiklikler ortaya çıkar. Yaşlılık ile birlikte kıkırdak daha az hücresel hale gelir ve proteoglikanların azalması ile birlikte nonkollajenöz proteinlerin artmasına bağlı olarak matriks daha az bazofili gösterir. Kıkırdak şeffaflığını kaybetmeye başlamıştır.

2- Asbestos transformasyonu adı verilen olayda büyük kıkırdak kümeleri içinde kollajen liflere hiçbir şekilde benzemeyen, sıkıca paketlenmiş kaba lifler birikir. İpeğimsi görünümdeki bu lifler, daha geniş bölgelere yayılabilir ve matriksin yumuşamasına ve hatta kavite oluşmasına neden olabilir.

3- Kıkırdak içerisindeki en önemli retrogressif değişiklik kalsifikasyondur. Kalsifikasyon aynı zamanda kıkırdağın kemikleşmesi sırasında da geçici olarak görülebilir. Kalsifikasyonda çok küçük kalsiyum karbonat ve kalsiyum fosfat granülleri, hücrelerarası madde içerisinde depolanır. Depolanma önce hücrelerin etrafında olur, sonradan bütün matrikse yayılır. Granüller büyür ve birleşir dolayısı ile kıkırdak sertleşir ve gevrekleşir. Hücrelerarası madde bu şekilde kalsifiye olduktan sonra, kıkırdağın beslenmesi için gıda maddelerinin diffüzyonuna müsaade edilmez, hücreler ölür ve sonradan da kalsifiye matriks yavaş bir şekilde absorbe olur.

2. 2. 1. 7. Rejenerasyon

Tahribata uğrayan veya yok olan bir kıkırdak bölgesinin rejenerasyon yeteneği oldukça azdır. Gelişimini tamamlamış hyalin kıkırdak dokusu, rejenerasyon özelliği göstermez. Olay ancak perikondriumun aktivasyonu ile sağlanır. Perikondrial bağ dokusu proliferatif olarak hasar olan yeri doldurur. Bu vaskülarize bağ dokusu aşamalı bir şekilde ve appozisyonel büyümeye benzer şekilde kıkırdak dokusuna dönüşür. Olgun kıkırdakta görülen bir yırtılma, çatlama kıkırdak tarafından değil de sıkı fibröz bağ dokusu tarafından tamir olabilir ki, sonradan kemik ile yer değiştirebilir. Kıkırdak hücrelerin harap olması halinde rejenerasyon gücü azalır.

Eklem yüzeylerinde perikondrium bulunmadığı için, bu bölgede gerçek bir rejenerasyon olmaz. Her ne kadar kırık ve kesik yüzeyler primitif fibröz kıkırdak ile onarılsa da olay hyalin kıkırdak rejenerasyonuna ulaşamaz.

Kıkırdak rejenerasyonu bazı durumlarda periost tarafından da yapılabilir. Kemik kırıklarında, bu bölgede daima önce periosttan gelişen bir kıkırdak dokusu oluşur.

2. 2. 2. Elastik Kıkırdak

Bu tip kıkırdak destek ile birlikte elastikiyetin de gerektiği yerlerde; dış kulak, işitme boruları, epiglottis ve larinksin bazı bölümlerinde görülür. Taze iken şeffaf değildir ve içerdiği elastik liflerin ortama hakimiyetinden dolayı sarı renktedir. Hyalin kıkırdağın bir modifikasyonudur, fakat daha opaktır. Hücreleri yağ ve glikojen yönünden hyalin kıkırdak hücrelerine oranla daha fakirdir. Matriksinde çok fazla elastik lif yanında kollajen lifler de bulunur. Kollajen lifler maskelenmiş durumdadır. Elastik liflerin kalınlığı ve miktarı farklıdır. Lifler kıkırdağın iç taraflarında daha geniştir ve daha yoğun paketlenmiştir. Hyalin kıkırdak gibi büyüme gösterir ve perikondrium ile çevrilidir (büyüme hem interstisyel ve hem de perikondriumdan appozisyon ile olur). Elastik kıkırdakta dejenerasyon daha az görülür.

2. 2. 3. Fibröz Kıkırdak

Kuvvetli mukavemet ve desteğin gerektiği yerlerde, intervertebral disklerde, pubis symphysislerde ve diğer bazı eklemlerin intra-artiküler disklerinde bulunur. İlaveten bazı tendon ve ligamentlerin kemiğe bağlı olduğu yerlerdeki kıkırdak ile omuz, kalça eklemlerini sınırlayan kıkırdaklarda da görülürler. Fibröz kıkırdak hiçbir zaman tek başına bulunmaz. Ya aşamalı olarak komşu hyalin kıkırdak ile birleşir veya komşu sıkı fibröz doku ile kaynaşır. Elastik kıkırdağın aksine fibröz kıkırdak hyalin kıkırdağın modifiye olmuş şekli değildir. Dens (sıkı) kollajenöz bağ dokusundan meydana gelmiştir. Lif bandlarının arasında hyalin kıkırdak matriksi bulunur ve bu matriks içindeki hücreleri içeren lakünalar yer alır. Hücreler tek tek veya izogen gruplar halinde olabilir, fakat çoğunlukla kısa sıralar şeklindedir. Kondrositler, hyalin kıkırdaktakilere benzer fakat hücrelerarası madde daha azdır.

Fibröz kıkırdak perikondriuma sahip değildir. Ligament ve eklem kapsüllerinin sıkı bağ dokuları ile yakın ilişkilidir, dolayısı ile kıkırdak ile sıkı bağ dokusu arasında değişici bir yapı olarak düşünülebilir. Genel olarak normal bağ dokusuna benzer bir şekilde gelişir. Başlangıçta çok miktarda fibriller materyal ile birbirlerinden ayrılmış, fibroblastlar bulunur. Sonradan bu hücreler kondrositlere dönüşür ve bunlar da kartilajinöz matriksten oluşmuş ince bir tabaka ile sarılır.

Fibröz kıkırdak hücreleri, çok çeşitli hücrelerarası madde moleküllerini yalnızca gelişimi esnasında değil, aynı zamanda olgun safhada da sentezlemektedir. Bu durum, fibröz kıkırdağın, mekanik güç, beslenme değişiklikleri, hormonlardaki ve büyüme faktörlerindeki değişiklikler gibi çevresel faktör değişikliklerine cevap vermesini sağlamaktadır. Hücrelerarası madde, tip I ve tip II kollajen liflerinin ikisini de içermekte ve bu iki tip arasındaki oran, bölgelere göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin; diz eklemi menisküs bölgesinde çok az tip II kollajen bulunmakta; intervertebral disklerde ise eşit miktarda bulunmaktadır. Bu oran, ayrıca, yaş ile birlikte de değişmektedir. İleri yaştaki bireylerde tip II kollajen miktarı daha fazladır.

2. 3. Kıkırdak Yaralanma ve İyileşmesi

Kıkırdak metabolik olarak aktif bir dokudur. Ancak, kıkırdağın avasküler, anöral ve hiposelüler bir doku olması nedeni ile travmaya olan yanıt oldukça kısıtlıdır. Hücresel düzeyde cevaba rağmen, intrinsek tamir ve küçük lezyonların ilerleyici hasara dönüşmesini engelleme; kısıtlı derecede sağlanabilmektedir^{54,55}. İzole kondral ya da osteokondral lezyonlar ağrının ve fonksiyon kaybının önemli sebeplerinden biridir, sadece bazı durumlarda bu lezyonlar spontan iyileşebilmektedir.

Eklem kıkırdağı hasarı 3 şekilde karşımıza çıkabilir:

1-Eklem kıkırdağı ile sınırlı defektler

2-Eklem kıkırdağının hücrelerine, matriksine ve subkondral bölgeye zarar veren defektler

3-Eklem kıkırdağı ve kemiğin mekanik defektleri

Eklem kıkırdağının yapısı ve fonksiyonu, değişik derecelerdeki direkt veya indirekt travmalarla bozulabilir. Bu travmalara iyileşme yanıtı, travmanın

şiddeti ve derinliğine göre değişir⁵⁶. Travma dışında, eklem kıkırdağında yıkıma yol açan diğer nedenler arasında ise metabolik, genetik, vasküler ve mekanik nedenler sayılabilir¹³. Kıkırdağın tüm katlarını içeren yaralanmalarda, kemiğin de etkilenmesi sonucu osteokondral kırık oluşabilir⁵⁷. İyileşmenin sonucunu etkileyen faktörler arasında; yaş, meslek, aktivite düzeyi, obezite, lezyonun boyutu ve yerleşimi sayılabilir^{11,14}.

Eklem hasarının tipi, hücrelerin tek başına iyileşme yanıtını da belirler⁵⁷. Kondrositlerin matriks içerik değişikliklerine duyarlılığı ve buna cevaben oluşan yeni molekül sentez yeteneği, iyileşme sürecinin önemli temelini oluşturur^{58,59}.

Eklem kıkırdağında iyileşme yanıtını sınırlandıran iki önemli faktör olduğu düşünülmektedir; bunlar yeteri kadar kan desteğinin olmaması ve tamirde görev alan farklılaşmamış hücrelerin eksikliğidir. Kondrositler tamir görevini ancak bazı gerekliliklerin varlığı halinde yerine getirebilir. Kondrositlerin verimli çalışabilmesi için matriks glikoprotein kaybının hücrelerin hızlı çalışmasını engellemeyecek düzeyde olması ve fibriler kollajenlerin sağlam olması gerekmektedir ayrıca matriks hasarına cevap verebilecek düzeyde yeterli kondrosit de ortamda mevcut olmalıdır.

Travma ardından oluşan kıkırdak doku yüzeyel defektlerinden sonra, kondrositler farklılaşır ve sentezleri artar. Bu yeni sentezlenen matriks ve farklılaşan hücreler, doku defekt bölgesini çoğu durumda tam olarak dolduramamaktadır. Eklem kıkırdağının tamir sürecindeki sınırlı kapasitesinin altında yatan sebep, proliferasyon ve matriks sentezinde ani bir durma olmasıdır⁶⁰. Eklem yüzeyinde meydana gelen kalıcı bir hasar, eklem mekanik fonksiyonunu değiştirerek eklem dejenerasyonuna yol açabilir, bu defekt iyileşse bile eklem hareketlerinde kısıtlılığa sebep olabilir^{14,61}.

Travma sonrası üçüncü günde kondrosit hücrelerinin silyalarının uyarılması ile çevre kondrosit hücreleri çoğalmaya ve ekstraselüler matriks sentezlemeye başlarlar, ayrıca tip II kollajen miktarında artış görülür. Subkondral dokudaki ayrışma, eklem kıkırdağının iyileşmesinin sonuçları için kritik öneme sahiptir. Kıkırdak hasarlarından sonra oluşan defektler, özellikle yüzeyel defektler, subkondral kemik alanı genişletir ve defekt bölgesi içine kanama olur. Kısa süre sonra tam kat defektler meydana gelir, hasarlanan

bölgeden kan çıkışı sonucu orada hematomlar oluşur. Hematomun içinde fibrin formları ve fibriler kollajeni bağlayan trombositler mevcuttur. Böylece oradan bazı vazoaktif mediatörler ve büyüme faktörleri salınır; TGF-Beta, trombosit-kökenli büyüme faktörü (PDGF), kemik morfojenik proteinler (BMPs), insülin-benzeri büyüme faktörü I ve II (ILGF-I, ILGF-II) ve diğerleri. Bu büyüme ve farklılaşma faktörleri sayesinde, ilgili bölgede bir tamir dokusu formasyonu ortaya çıkar. Bu aktivasyon inflamatuvar cevabı başlatır ve yara iyileşmesi süreci devam eder^{60,61}.

Kıkırdak tamir ve iyileşme sürecinde de kemik dokusu tamirinde rol oynayan çeşitli faktörler, doğrudan rol oynayabilmektedir. Kıkırdak ve kemik dokularının tamir sürecinde rol alan moleküllerin benzerliği, bu iki doku formlarını birbirine daha da yakınlıktır. Osteokondral bölge defektlerinde, kondral alandaki iyileşme dokusunda; tip-1 kollajen ve non-kollajen proteinler ile kondrosit-benzeri hücreler, matris bileşiminde tip-2 kollajen ve proteoglikanların bulunduğu gözlenmiştir. Defektin daha derin bölgelerindeki hücreler; immatür kemik, fibröz doku ve hiyalin-benzeri kıkırdak üretimini gerçekleştirir⁵⁸. Doku iyileşmesi sürecinin sonucunda; hiyalin kıkırdak ve fibro-kıkırdak formasyonları arasında tipik bir doku oluşumu belirir. Bu yeni oluşum, normal eklem kıkırdağı dokusundan, yapı ve biyomekanik fonksiyon açısından, farklılıklar göstermektedir^{14,60,61}. Normal eklem kıkırdağından daha fazla geçirgen ve daha az sertlikte oluşmuş olan yeni tamir dokusu belirgin şekilde farklıdır. Ayrıca, yeni oluşumda makromolekül artışı olduğundan eklemden daha fazla yapısal hasar meydana gelebilir.

2. 4. Eklem Kıkırdak Lezyonları

Diz eklemine kıkırdak lezyonları, hem görüntüleme yöntemleri^{62,63}, hem de yapılan artroskopiler sırasında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Görüntüleme yöntemleri^{62,63} ve yapılan artroskopiler sırasında diz eklemine kıkırdak lezyonlarına sık sık rastlanmaktadır. Travma, genç atletik bireylerde kıkırdak lezyonlarının en sık sebebi olarak görülürken yaşlı insanlarda bunun sebebi dejenerasyondur. Bir çalışmada otuzbinden fazla artroskopik girişim incelenmiş ve bu girişimlerin %61'inde kıkırdak yaralanması olduğu görülmüştür^{64,65}.

Bunların %19'u odaksal (yaygın olmayan) kondral ya da osteokondral lezyonlar^{64,66} iken Evre III ve IV tek odaksal kıkırdak defekti insidansı %5,2'dir⁶⁷. Akut yaralanmalarda ise bu oranın yükseldiği görülmüştür. Travmatik hemartrozu olan hastaların %20'sinde kıkırdak yaralanması da bulunmaktadır⁶⁸. Radyolojik olarak kıkırdak lezyonu 15-24 yaş arasındaki bireylerde %4-10 arasında iken, bu oran 55 yaşın üzerindekielerde %80'dir. Kıkırdak defektlerinin büyük bir çoğunluğu medial femoral kondilde görülürken (%58-80) bunu patella ve lateral tibia platosu takip eder. Daha az sıklıkta ise lateral femoral kondil, troklea ve medial tibial platoda görülmektedirler⁶⁶.

Ağrı, efüzyon ve mekanik semptomlar, kıkırdak lezyonu olan hastalarda görülmektedir. Ağrının daha çok medial ve lateral tibiofemoral kompartmanda olması, femurda lezyonu olan hastalarda görülür ve yük verme veya aşırı aktivite ile ağrı ortaya çıkarabilir. Ağrının daha çok uzun süre oturma, merdiven inip çıkma ve diz çökme sırasında ortaya çıkması, patellada lezyonu olanlar için özgündür⁶⁹.

2. 4. 1. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Endikasyonları

Kıkırdak yaralanmalarının birçoğu zamanla dejeneratif eklem hastalığına doğru ilerlemektedir⁷⁰. Kıkırdak yaralanmasının adolesan dönemde olduğu ve tedavi görmeyen hastalar takip edildiğinde radyolojik olarak osteoartrit bulgularının 10 yıldan az sürede geliştiği görülebilir⁷¹. Osteokondritis dissekans'lı (OKD) hastalar takip edildiğinde ise %80'inde ikincil gonartroz geliştiği tesbit edilmiştir⁷². Bu durumda kıkırdak yaralanmasının osteoartrite neden olduğu söylenebilmektedir. Her kıkırdak yaralanmasının osteoartrit ile sonuçlanıp sonuçlanmayacağı sorgulanabilir. On mm'den küçük defektlerin çevresindeki sağlam kıkırdakta basınç artışına rastlanmazken defekt 10 mm'den büyük olduğunda sağlam kıkırdağa %64 daha fazla yük binmektedir⁷². Nitekim 10 mm çapındaki bir defektin 14 yıllık takibi sonunda eklem aralığında %50 ya da daha fazla daralma yaptığı görülmüştür⁷³. Kıkırdak yaralanmalarının tedavilerinin denendiği hayvan çalışmalarında oluşturulan defektlerin bir kısmının kendiliğinden iyileştiği görülmüştür. Tedavi uygulanmadan iyileşmeyen defektlerin boyutuna kritik boyut denmektedir. Her hayvan modeli için ayrıca

saptanmış olan bu boyutun insandaki karşılığı tam olarak bilinmemekle birlikte bir çalışmada insandaki kritik boyutun 2 cm² olduğu iddaa edilmiştir⁷⁴. Ancak 2 cm²'den küçük lezyonların da spontan iyileşmediği bilinmektedir. Bu nedenle bu boyutun gerçek anlamda kritik boyut olup olmadığı tartışmalıdır. Burada, iyileşme için etkili tek unsurun defektin boyutu olmadığı belirtilebilir.

Tam kalınlık kırıldak yaralanmalarında kendiliğinden iyileşme görülürken kısmi kalınlık yaralanmalarda iyileşme beklenmemektedir^{75,76}. Bir başka kritik nokta ise yaralanmanın tidemark katmanını geçip geçmemesidir. Tidemark artiküler kırıkdağın derin katmanı ile kalsifiye kırıkdağ arasındaki çizgidir. Bu çizginin derinine inen yaralanmalarda subkondral kemik bütünlüğü bozularak defekt kemik iliği ile iletişime geçmektedir. Kemik iliğinde iyileşmeye yardımcı olabilecek mezankimal kök hücreler bulunmaktadır. Olgun kondrositler etraflarındaki matriksin devamlılığını sağlarlar ve yaralanma durumlarında göç etme, bölünerek çoğalma ve pıhtı oluşturarak iyileşme sağlama gibi davranışlar göstermemektedirler. Bu nedenle tam kat kırıkdağ yaralanmalarında kemik iliği kökenli hücreler tarafından iyileşme sağlanabilmektedir.

2. 4. 2. Eklem Kırıkdağ Lezyonlarının Sınıflandırılması

Daha önceki yayınlar araştırıldığında kırıkdağ lezyonları iki sisteme dayandırılarak sınıflandırılmaktadır; sayısal ve tanımlayıcı sistem. Sayısal sistemlerin çoğu lezyonları 1'den 4'e veya 0'dan 4'e sınıflandırmıştır. Lezyonun ne kadar ciddi veya büyük olduğu lezyonun aldığı sayısal değer ne kadar yüksek olduğuna bağlıdır. Bazı yazarların aynı anda lezyonun boyutu, derinliği veya yeri gibi ölçütlerle açıklayıcı sistemler geliştirerek lezyonu iyi tanımlamaya çalışmalarına rağmen henüz mükemmel bir sınıflama sistemi ortaya konamamıştır⁷⁷.

Kırıkdağ lezyonları ilk defa 1961 yılında Outerbridge tarafından makroskopik olarak sınıflandırılmıştır⁷⁸. Bu sınıflama sayısal sisteme dayalı bir sınıflamadır ve Maldelbaum tarafından kırıkdağın kalınlığı da değerlendirilerek gözden geçirilmiştir (Tablo 3). Kırıkdağ lezyonları sayısal sınıflandırmaya tabi tutanlar arasında, 1976'da Insall⁷⁹, 1977'de Hungerford ve Ficat⁸⁰, 1982'de

Casscells⁸¹, 1982'de Bandi⁸², 1983'de Beguin and Locker⁸³, 1984'de Bentley and Dowd⁸⁴, 1987'de Dandy⁸⁵, 1989'da Noyes and Stabler⁸⁶'ı görmekteyiz.

Tablo 3. Outerbridge ve Modifiye Outerbridge sınıflaması

Derece	Outerbridge	Modifiye Outerbridge
0	Normal kıkırdak	Kıkırdak sağlam
I	Kıkırdakta yumuşama ve şişlik	Kıkırdakta yumuşama ve kabarıklık
II	Kıkırdakta fragmentasyon ve çatlaklar (<1/2 inch)	Kıkırdak kalınlığının %50'den azında derin ülser, saçaklanma ve çatlak
III	Kıkırdakta fragmentasyon ve çatlaklar (>1/2 inch)	Subkondral kemiği açıkta bırakmayan fakat kıkırdak kalınlığının %50'den fazlasında derin ülser, saçaklanma ve çatlakların olduğu lezyonlar
IV	Subkondral kemiği açıkta bırakan lezyonlar	Subkondral kemiği açıkta bırakan tam kat lezyonlar

Goodfellow ve arkadaşları tarafından tanımlayıcı-açıklayıcı sisteme uyan ilk sınıflama ise 1976 yılında yapılmıştır⁸⁷. Bauer ve Jackson tarafından artroskopik olarak lezyonun şekline göre bir sınıflama 1988 yılında yapılmıştır (Tablo 4)⁸⁸. 1988'de Dzioba⁸⁹, 1993'de Koshino ve Machida⁹⁰, 1996'da Lewandrowski'nin⁹¹ sınıflamaları bu sınıflamayı izlemiştir.

Tablo 4. Bauer ve Jackson sınıflaması

Tip	Şekil
I	Çizgisel
II	Yıldız şeklinde
III	Flep
IV	Krater
V	Saçaklanma
VI	Parçalanma

Günümüzde kıkırdak yaralanmalarının sınıflaması için en sık kullanılan sınıflama sistemi Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği (*ICRS - International Cartilage Research Society*) tarafından önerilen sistemdir (Tablo 5).

Tablo 5. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği artiküler kıkırdak evreleme sistemi

ICRS (Uluslararası kıkırdak araştırma derneği artiküler kıkırdak evreleme sistemi)	
Evre 0	Normal
Evre I	Normale yakın
IA	Yüzeyel lezyon, yumuşama
IB	Yüzeyel çatlaklar, yarıklar
Evre II	Anormal - %50'den daha az derinlikte
Evre III	Şiddetli anormal - %50'den daha fazla derinliğe inen lezyonlar
IIIA	Kalsifiye kıkırdağa kadar
IIIB	Subkondral kemiğe kadar
Evre IV	Şiddetli anormal – Subkondral kemik açıkta

Kıkırdak lezyonlarını histopatoloji baz alınarak skorlayan ve sınıflayan sistemler de mevcuttur. Çeşitli histolojik skorum sistemleri; osteoartrit veya

normal doku analizinde, in vivo tamir doku analizinde, kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılmaktadır, ama sadece birkaçının geçerliliği denetlenmiştir⁹².

- Osteoartritik kıkırdak değerlendirilmesinde: HHGS/Mankin skoru,⁹³ OARSI sistemi⁹⁴.

- Kıkırdak doku tamirinin hayvan deneysel modellerinde değerlendirilmesinde: O'Driscoll skorlama sistemi⁹⁵, Pineda skalası⁹⁶, Wakitani skorlama sistemi⁹⁷.

- Kıkırdak doku tamirinin insanlarda değerlendirilmesi: ICRS Visual Histolojik skoru II⁹⁸.

- Kıkırdak doku mühendisliği değerlendirilmesi: Bern skorlama sistemi⁹⁹.

2. 4. 3. Kıkırdak Lezyonlarında Görüntüleme Yöntemleri

Kıkırdak yüzeylerin görüntülenmesinin temel hedefleri kıkırdak yüzeyinin bütünlüğünü, kıkırdak matriksinin kalınlığını, hacmini ve subkondral kemikle ilişkisini değerlendirmektir. Bu amaçla direkt radyografiden en gelişmiş kesitsel tanı yöntemlerine kadar pek çok metod birlikte kullanılmaktadır. Son yıllarda görüntüleme yöntemleri tanısallık olduğu kadar tedavi sonucunun takibi için de kullanılmaktadır. Manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yüksek çözünürlük, çoklu planda değerlendirme olanağı sağlaması dolayısıyla özellikle ligamentöz ve meniskal yaralanmalar için günümüz radyolojik yöntemleri içinde en güvenilir bilgileri sağlamaktadır¹⁰⁰.

Kıkırdak tek başına hasar görebileceği gibi beraberinde subkondral kemikle beraber hasarlanmış olabilir. Osteokondritis dissekansta (OKD) fragmante kıkırdak avasküler subkondral kemikle birlikte sağlam kemikten kısmen veya tamamen ayrılır. Direkt radyogramda OKD daha ileri yaş grubunda daha çok femur medial kondilinde görülen spontan osteonekroza benzerlik gösterse de bu iki patolojik süreç klinik olarak birbirinden farklıdır^{101,102}. Avasküler kemiğin sağlam kemikle olan ilişkisi ve bu kemiğin üzerindeki kıkırdağın devamlılığı OKD evrelemesinde kullanılmaktadır.

Evre 1 lezyonda kıkırdak bütünlüğü korunmakta ve subkondral kemik sağlam kemikle devamlılık göstermektedir. İntravenöz kontrast madde ile avasküler kemiği çevreleyen granülasyon dokusunda parlaklaşma meydana gelir. Evre 2 lezyonda kıkırdakta fokal defektle birlikte avasküler kemikte kısmi bir ayrılma vardır. Eklem aralığında sıvı varsa T2-ağırlıklı görüntülerde fragmente kemik ile sağlam kemik arasında eklem sıvısına ait sinyal artışı izlenebilir. Ancak eklem sıvısında artış söz konusu değilse avasküler kemiği çevreleyen granülasyon dokusu fragmentasyondan ayrılamaz. Evre 3 lezyonda avasküler kemik üzerindeki kıkırdak ile birlikte sağlam kemikten tamamen ayrılmıştır, ancak stabil özelliktedir. Evre 4 lezyonda ise osteokondral fragman eklem içine doğru yer değiştirmiştir.

Klinik uygulamalarda, doktorlar kıkırdak lezyonun türü hakkında daha fazla bilgi edinme gereksinimi duyarlar. Ayrıca artroskopik girişim öncesi kıkırdak lezyon tiplmesi, lokalizasyonu ve derinliği gibi detayları belirlemek için, en iyi onarım seçeneğini seçmek ve cerrahi sonrası semptomları değerlendirmek için radyolojik görüntüleme yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Bilgisayarlı tomografi (BT) ile birlikte artrografi kullanımı, kıkırdak doku yüzey ve korturu ile kıkırdak tamir dokusu hakkında bilgi verebilir¹⁰³. BT'de kemik yapısının üç boyutlu rekonstrüksiyonu ile birlikte, yararlı bilgiler edinilir.

Kas-iskelet sistemi araştırma alanında kullanılan MRG teknolojisindeki son gelişmeler klinisyenlere yeni olanaklar sağlamıştır. MRG, eklem yapısı ve eklemlerde zaman içinde oluşan değişiklikler hakkında kesin ve güvenilir kantitatif bilgiler vermektedir.

Kıkırdak görüntüleme için kullanılan MRG'nin başlıca avantajları şunlardır:

- Non-invaziv olması
- Tekrarlanabilirlik
- Doğruluk

MRG, kıkırdak doku kaybı izleminde kantitatif ölçüm yapması vesilesi ile kullanılabilir. Ancak şuan MRG üzerindeki araştırmalar daha çok büyük kıkırdak doku yıkımlarına yol açacak kıkırdak hasarlarının tanınması üzerine

yoğunlaşmıştır. Bazı görüntüleme teknikleri erken kıkırdak hasarının gösterilmesinde duyarlıdır. Bunlar; T2 haritalama (T2 mapping), gecikmiş gadolinyum tutan kıkırdak MRG (delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage) (dGEMRIC) ve T1rho'dır.

Yağ baskılı üç boyutlu gradyan eko (3D-GRE)¹⁰⁴ kıkırdak kalınlığı ve kıkırdak yüzeyi hakkında kesin bilgileri sağlar.

T2 ağırlıklı (çift) hızlı spin eko (FSE) (*T2-weighted (dual) fast spin echo*)¹⁰⁴ tekniği yağ baskılı ya da yağ baskılı olmadan kullanılarak hyalin kıkırdak iç yapısının normal ya da anormal olduğu hakkında bilgi verir.

dGEMRIC¹⁰⁵, negatif yüklü bir MR kontrast intravenöz enjeksiyonu sonrası, kontrast maddenin dengeye ulaşmasıyla T1 haritalama yaparak kıkırdak doku içerisinde glikozaminoglikan dağılımını değerlendirir.

Kantitatif T2 MRI¹⁰⁶, eklem kıkırdağının non-invaziv görüntüleme tekniğidir ve hyalin eklem kıkırdağı ve onarım dokusunu ayırt edebilme potansiyeline sahiptir¹⁰⁴. Normal eklem kıkırdağı, T2 sekanslarında subkondral kemikten eklem yüzeyine doğru, tip II kollajen lif matris organizasyon (anizotropi) ile ilişkili olarak sinyal artışı gösterir.

Kalitatif ve kantitatif T2 haritalama, 1.5 Tesla MR görüntüleme kullanılarak, hyalin kıkırdağın kıkırdak onarımı sonrası oluşan fibrokartilaj tamir dokusu ayırımında yardımcı olur¹⁰⁴.

1.5-T MRI'da kıkırdak doku T2 görüntüleme, cerrahi kıkırdak onarım işlemleri sonrası kıkırdak yapısını çalışmak ve ayırt etmek için kullanılabilen non-invaziv bir yöntemdir¹⁰⁶.

Mıknatıslanma transferi (*magnetization transfer, MT*)¹⁰⁷ bir MR görüntüleme şekli olup kıkırdak makromoleküler içeriğine duyarlıdır. Palmieri ve arkadaşları¹⁰⁷, mikrokırık ve otolog kondrosit implantasyonu tedavileri sonrası oluşan kıkırdak tamir dokularını bu yöntemle karşılaştırmışlardır. Hasarlı doku ve onarım işlemleri sonrası oluşan kıkırdak doku arasındaki farklar, manyetizasyon transfer oranı (MTR), olarak ifade edilmektedir, ancak bu oran çok küçüktür ve bu yüzden MT görüntüleme kıkırdak onarım işlemleri sonrası hasarlı ve tamir doku ayırımında ve dolayısıyla postoperatif takiplerde yarar sağlayamamaktadır. Ancak, bir başka çalışmada, 24 aylık takiplerde,

Mıknatıslanma transferi (*magnetization transfer, MT*) kullanılmış ve ACI yönteminde tamir dokusu ile normal kıkırdak dokusu MTR'si benzer sonuç göstermiştir. Bununla beraber mikrokırık kullanılan diğer grupta tamir dokusu ile normal kıkırdak doku arasında MTR açısından anlamlı farklılıklar olduğu gösterilmiştir¹⁰⁷. Ayrıca, T1rho olarak adlandırılan noninvaziv başka bir kıkırdak görüntüleme tekniği, kıkırdak dokuyu kantitatif olarak biyokimyasal ve biyomekanik şekilde değerlendirmek için kullanılabilir¹⁰⁸.

2. 4. 4. Kıkırdak Lezyonlarında Prognoz ve Prognozu Etkileyen Olası Faktörler

Kıkırdak doku defektinin içeriği ve kenarlarının durumu değerlendirildiğinde iyi sınırlanmış, keskin kenarlı defektlerin daha iyi prognozlu olduğu bilinmektedir¹⁰⁹. Lezyonun büyüklüğü, sayısı, derinliği, derecesi, geometrisi ve yeri de prognozu etkileyen diğer faktörlerdir. Birden fazla sayıda, 2 cm²'den büyük, yüksek derece lezyonların dejenerasyon süreci daha hızlıdır³⁶. Kenarları düzensiz ve keskin olmayan, yani kraterin çevresindeki kıkırdak bölgesinin incelendiği lezyonların prognozu daha kötüdür¹⁰⁹. Varus dizilimi gösteren bir dizde medialdeki, valgus dizilimi gösteren bir dizde ise lateraldeki lezyonlar aynı şekilde daha kötü prognoza sahiptirler³⁶. Hastaya ait birçok faktör prognozu etkiler; yaş, kilo, aktivite düzeyi, ailesel ve genetik özellikler, alt ekstremitte dizilimi, menisküslerin ve bağların durumu bunların en önemlileridir³⁶. Olgunun romatolojik alt yapısının varlığı, kollajen doku hastalıklarının bulunması ve obezite gibi kişiye özgü faktörler prognozu negatif etkileyecek diğer faktörlerdir. Kıkırdak lezyonlarında prognostik faktörler Tablo 6'da gösterilmiştir^{110,111}.

Tablo 6: Kıkırdak lezyonlarının doğal seyir sonuçlarına etki edebilecek prognostik faktörler

	Olumsuz faktörler	Olumlu faktörler
Lezyon sayısı	Birden fazla	1
Lezyon yeri	Yüklenme yüzeyi	Yük almayan bölge
Derecesi	3-4	1-2
Büyüklüğü	>2 cm ²	<2 cm ²
Derinliği	Derin	Sığ
Kilo	Obez hasta	Zayıf hasta
Yaş	>40	<40
Bağ dokusu hastalığı	Var	Yok
Aktivite düzeyi	Yüksek	Düşük
Eşlik eden lezyonlar (menisküs, ÖÇB yırtığı)	Var	Yok
Alt ekstremitte dizilimi	Dizilim bozukluğu var	Normal

2. 4. 5. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Yöntemleri

İdeal kıkırdak yaralanması tedavisi, çevresiyle tamamen bütünleşmiş, mekanik olarak işlevsel ve defekt alanında hyalin kıkırdak oluşumu ile sonuçlanmalıdır¹². İdeal kıkırdak yaralanması tedavisinin biyolojik olarak kabul edilebilirliği bazı gereksinimler ortaya çıkarır. Tamir dokusunda, kıkırdak dokusu; defekti kıkırdak benzeri ara maddeyle doldurmuş, eklem yüzey konturunu sağlamış, sağlam çevre kıkırdak ile birleşmiş ve yük taşımaya uygun şekilde sert olmalıdır¹⁶. Tüm tedavi yöntemleriyle hyalin kıkırdak elde etmek mümkün olamamaktadır. Çoğu zaman iyileşme dokusu karışık bir histolojiye sahip olabilmekte ve doku içerisinde birden fazla kıkırdak tipine rastlanabilmektedir. İdeal olan, iyileşme dokusunda artiküler kıkırdak elde etmektir. Artiküler kıkırdak; hyalin kıkırdağın, kolonlar şeklinde hücre dizilimi olan derinlerde radyal, yüzeyde paralel organize olmuş kollajen liflerinden oluşan, bir tidemark ile kalsifiye kıkırdağa ve dolayısı ile subkondral kemiğe bağlı şeklidir. Yani artiküler kıkırdağın hyalin kıkırdak ile içeriği aynı olup organizasyon farkı içermektedir ki tamir yöntemleri ile hyalin kıkırdağın birebir aynısını elde etmek zordur. Hyalin kıkırdak, tip II kollajen ve proteoglikan

aramaddenin sentezlenerek salgılandığı kondrositlerden oluşur. Fibröz kıkırdak ise kondrosit ve fibroblasttan oluşur. Aramadde ağırlıkla tip I kollajenden oluşmaktadır. Fibröz doku fibroblastlardan oluşurken tip I kollajen ağırlıklı aramaddeden oluşur. Bu kıkırdakların yukarıdaki sıraya göre yük kaldırma dayanıklılıkları gelmektedir.

Cerrahi tedavi seçenekleri; palyatif, tamir ve rekonstrüksiyon olmak üzere üç grupta toplanabilir (Tablo 7). Yaşlı ve aktiviteleri yavaşlamış hastalar için debridman ve lavaj palyatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılırken, drilleme, mikrokirik ve abrazyon artroplastisi gibi kıkırdağı stimüle eden tamir edici yöntemler ile otolog kondrosit implantasyonu, oto veya allogreftle mozaikplasti gibi kıkırdağı rekonstrükte eden yöntemler, yaşam kaliteleri yüksek ve faal olan orta yaş grubundaki hastalar için tercih edilmektedir^{113,114,115}.

Günümüzde sıklıkla uygulanan tedavi yöntemlerinin başında gelmektedir. Bu tedaviler sonucunda en iyi ihtimalle fibröz kıkırdak oluşmaktadır. Osteokondral greftler ile yapılan tedavilerde ise hazır oluşmuş artiküler hyalin kıkırdak doku transfer edilmektedir. Daha ileri yöntemlere daha büyük defektlerin tedavisi için ihtiyaç duyulmuştur. Hücre temelli bu yöntemlerin başında otolog kondrosit implantasyonu gelmektedir. Bu yöntemle hyalin benzeri kıkırdak elde edilebilmektedir. Oluşan dokunun kalitesini arttırmak ve iyileşmeyi hızlandırmak için otolog kondrosit implantasyonu matriks rehberli olarak da gerçekleştirilebilmektedir. Son yıllarda kök hücreler kullanılarak iyileşme sağlamaya yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Kök hücrelerin dağılımını ve farklılaşmalarını sağlamak içinse sentetik ya da organik birçok doku iskeleti (çatı, matriks ya da skafold da denmektedir) geliştirilmekte ve denenmektedir¹¹⁶. Yine bu amaçla çeşitli büyüme faktörleri kondrosit çoğalması ve farklılaşması için kullanılmaktadır.

Tablo 7: Artiküler kıkırdak lezyonlarının tedavi seçenekleri⁶⁹

Kıkırdak lezyonlarında kullanılan tedavi yöntemleri		
Tedavi Yöntemi	Endikasyonlar	Sonuç
Artroskopik debridman ve lavaj	Minimal semptomlar	Palyatif
Kemik iliği uyarma teknikleri	Küçük lezyonlar, düşük beklentili hastalar	Reparatif
Osteokondral otoplasti	Küçük lezyonlar, düşük / yüksek beklentili hastalar	Restoratif
Osteokondral alloplasti	Kemik kaybı fazla olan lezyonlar, düşük / yüksek beklentili hastalar	Restoratif
Otolog kondrosit implantasyonu	Yüksek beklentili hastalar, lezyon büyük veya küçük olsun kemik kaybından bağımsız	Restoratif
Genetik mühendislik	Deneysel	Restoratif

2. 4. 5. 1. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Uygulanan Cerrahi Yöntemler

2. 4. 5. 1. 1. Eklem Artroskopik Yıkınması ve Debridmanı

Eklem artroskopik olarak yıkınması ve debridmanı kıkırdak tamir edici etkisinin olmamasına ve kısa etki süreli olmasına rağmen ABD’de en çok yapılan ortopedik ameliyatlarda 3. sırada yer almaktadır¹¹⁷. Bu tedavi türü için uygun olan hastalar, radyografik olarak bulguları çok ilerlememiş, mümkün olduğu kadar genç yaşta olan, dizilim bozukluğu olmayan, mekanik semptomları olan ve şikâyetleri akut gelişen hastalardır. Ameliyat; debridman, parsiyel menisektomi, osteofitlerin alınması, parsiyel sinovektomi, serbest kıkırdak parçalarının ve instabil kıkırdakların temizlenmesi ve nihayetinde dizin içerisinin yıkınmasını içerir^{118,119,120}.

2. 4. 5. 1. 2. Kemik İliği Uyarım Yöntemleri

Subkondral kemiğin bütünlüğünün bozulması ve yeni kırık oluşumunun uyarılması için artroskopik olarak abrazyon, delme (drilleme) ya da mikrokırık gibi kemik iliği uyarı yöntemleri (KİUY) kullanılabilir. Mikrokırık yöntemi tarif edildiğinde endikasyonlar olarak evre IV odaksal ve dejeneratif kırık yaralanmaları belirlenmiştir¹²¹. Son yıllarda söz konusu endikasyonlar odaksal ve sağlam kırık ile çevrelenmiş (kapsanmış) yaralanmalar olarak değişim göstermiştir¹²².

KİUY'nin endikasyonları aktif hastalarda femoral kondillerin, troklea ya da patellanın, semptomatik, odaksal, yüksek evre kondral yaralanmaları ve tesadüfen rastlanan kırık defektleri olarak özetlenebilir¹²³. Kırık defektine dejeneratif eklem hastalığı neden olsa dahi KİUY'nin başarılı olması için defektin odaksal tarzda olması ön şartı bulunmaktadır¹²².

KİUY, çeşitli kliniklerde değişik boyuttaki lezyonlara uygulanmaktadır. Uygulanılabilecek üst sınır 4 cm² olarak ortaya konmuştur¹²³. Buna rağmen birçok yazar tarafından KİUY, ancak 2 cm²'nin altındaki lezyonlara uygun bir tedavi yöntemi olarak belirtilmektedir¹²⁴. Talus için üst sınır 1,5 cm çap olarak belirlenmiştir¹²⁵.

Mikrokırık yöntemi 1997 yılında Steadman ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır¹²⁶. Mikrokırık, artroskopik olarak gerçekleştirilebilir. Steadman'ın tanımladığı orjinal teknikte, mikrokırıkta üç portal kullanılmakla birlikte iki portalden de rahatlıkla kullanılabilir. Artroskopi portalleri defektin yerleşimine göre belirlenmelidir¹²⁷. Öncelikle yapılması gereken instabil kırık parçacıklarının traşlanarak temizlenmesidir. Hasarlı kırık alanı subkondral kemiğe inmeden, kalsifiye kırık zonunu da kapsayacak şekilde debride edilir. Oluşan yeni kırığın subkondral kemiğe daha iyi tutunması, kalsifiye kırık tabakasının kaldırılmasıyla sağlanır¹²⁸. Buna karşın kalsifiye kırık tabakasının korunmasının hyalin kırığa daha yakın kırık tamir dokusu oluşması ile sonuçlandığı ileri sürülmüştür¹²⁹.

Defekt kenarlarından başlayarak, sağlam kırığa yakın bölgede kırığın hemen yanına mikrokırık bizi ile subkondral kemiğe dik olacak şekilde delikler açılır. Mikrokırık bizim konik şekilde olması sayesinde girilen

derinlik kontrol edilebilmekte ve cihazı delikten çıkartmak kolay olabilmektedir. Mikrokırık bizi defekte dik olarak uygulanmalıdır. Bunu sağlamak amacıyla 30, 45 ve 90 derece eğimli bizler bulunmaktadır¹²³. Mikrokırık oluşturma işlemi sırasında çekiç kullanılır ve deliklerin mümkün olduğu kadar birbirlerine yakın olması sağlanır. Çevreden başlayarak defekt ortasına doğru ilerlenir. Deliklerin 3-4 mm aralıklarla açılmasına çalışılır ve aralarındaki duvarın kırılarak birleşmesinden kaçınılır. Deliklerin birleşmesi subkondral kemik plağının biyomekanik desteğini bozabilir. Yetersiz delik yoğunluğu, oluşacak olan kırıkdağın kalitesini ve defekti doldurma miktarını etkiler. Mikrokırık bizi ile oluşturulan deliklerin derinliklerinin 3-4 mm olmasına özen gösterilmelidir¹²¹. Üç-dört mm derinliğe ulaşıldığı, açılan deliklerden yağ damlacıklarının çıktığı gözlemlendiğinde anlaşılır ki, bu da yeterli derinliğe ulaşıldığının göstergesidir¹³⁰.

Mikrokırık tekniği ile vasküler sistemden kaynaklanan pluripotent mezenkimal kök hücrelerinin ve büyüme faktörlerinin defektli bölgeye ulaşması sağlanır. İşlem sonrasında meydana gelen kanama, defektli bölgenin hematoma ile dolması fibrin tıkaç oluşturmaya sağlar. Bunu fibrovasküler bir tamir dokusu olan granülasyon dokusunun gelişimi izler. Mezenkimal kök hücreleri proliferasyon olurlar (çoğalırlar) ve büyüme faktörleri ile çevresel faktörlerin etkisi sonucu kondrositlere dönüşürler. 2-4. haftalarda yapılan histomorfik ölçümlerde oluşan dokunun içinde fibrokartilaj dokusu bulunmamıştır¹³¹. 6-8. haftada fibrokartilaj dokusu ve hyalin benzeri doku görülmeye başlar. Bu doku normal hyalin kırıkdağ dokusundan farklıdır. Oluşan bu fibröz kırıkdağ gerilmeye karşı dirençli olmakla birlikte baskıya karşı hyalin kırıkdağ kadar dayanıklı değildir^{76,132,133}. Sekizinci haftadaki iyileşme dokusu incelendiğinde, tamir dokusunun %29'unun fibröz doku, %30'unun fibrokartilaj, %12'sinin granülasyon, %10'unun lezyon içeriğini doldürmüş olan kemik dokusu ve %12'sinin hyalin benzeri kırıkdağ dokudan oluştuğu görülmüştür¹³¹. Erken dönemde oluşan hyalin kırıkdağın sekizinci aydan sonra fibröz kırıkdağa dönüştüğü deneysel olarak tespit edilmiştir¹³⁴.

Mikrokırık yönteminin önemli avantajları olarak kolay uygulanabilmesi, ucuz olması, ek hazırlık gerektirmemesi, tek aşamalı olması ve diğer girişimlerin ileri uygulamalarını engellememesi sayılabilir¹²⁵.

2. 4. 5. 1. 3. Osteokondral Otolog Transferi ve Mozaikplasti

Osteokondral otolog transferi (*OAT – Osteochondral Autologous Transplantation*) ilk olarak 1993'te Bobic, Matsusue ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır^{135,136}. OAT, 1991 yılında hayvan deneyleri ile başlamış, 1992 yılında standardize ekipmanın geliştirilmesi ile klinik uygulamaya geçilmiş, 1997'de ise klinik sonuçlar ortaya konularak yayınlanmaya başlanmıştır¹³⁷.

Hyalin kıkırdak elde etmekteki zorluklar nedeniyle osteokondral allogreft ya da otogreft uygulamaları geliştirilmiştir. Bu uygulamada amaç, yük binmeyen veya daha az yük bindiği kabul edilen bölgelerden alınan osteokondral greftlerin hasarlı sahaya nakledilmesidir. Otogreft ile kıkırdak birleşmesindeki zorluğun üstesinden kemiğin kemiğe kaynaması ile gelinmiştir¹³⁸. Yeri değiştirilmiş hyalin kıkırdağın devamlılığını sağlayan en önemli etken, hyalin kıkırdağın sağlam bir tidemark ve subkondral kemik ile birlikte transfer edilmiş olduğudur¹³⁵.

Kıkırdak defektinin bir cm'den derin olduğu, yani kemik defektinin de eşlik ettiği yaralanmalarda OAT ilk tercih edilecek yöntemdir¹³⁹. OAT uygulaması için kabul edilen defekt derinliği kıkırdak kalınlığının en az %50'sidir¹⁴⁰. OAT 2 – 6 cm² arası lezyonların tedavisi için uygun bir yöntemdir^{141,142}. Uluslararası Kıkırdak Tamir Derneği'ne göre mozaikplasti uygulanması için defekt boyutunun alt sınırının çapı bir cm olmalıdır¹⁴⁰. Pratikte ise, donör saha komplikasyonlarından kaçınmak için OAT 2 cm çaptan küçük lezyonlara uygulanır¹³⁰. Tek, tam kalınlıkta, 1-2,5 cm arasında çapa sahip kıkırdak defektleri artroskopik osteokondral greftleme ile tedavi edilebilirler⁷⁴. Üç cm²'den büyük, sağlam kıkırdak ile çevrili olmayan, bir cm'den derin defektlerde osteokondral taze ya da taze donmuş allogreft kullanıma endikasyonu da mevcuttur¹⁴³. Diz gibi talus, tibia, humerus, kapitellum ve femur başının kıkırdak yaralanmalarında da OAT uygulanabilmektedir¹⁴⁴.

Mozaikplasti tekniği Hangody ve Karpati tarafından tanımlanmıştır¹⁴⁵. Açık, mini-artrotomi ya da artroskopik olarak gerçekleştirilebilir. Defekt çapı iki cm'den küçükse ve dört - altı greftten daha fazlası gerekmeyecekse artroskopik olarak yapılabilir¹³⁷. Altı mm'lik silindirler artroskopik olarak alınabilecek en büyük greftlerdir. Daha büyük greftlerin kullanımı artrotomi gerektirir ve patella ile donör sahanın temas ihtimalini arttırırlar⁷³.

Altı cm²'den büyük defektlerde mozaikplasti başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bunun bir nedeni bu kadar büyüklüğü yapılandıracak greftin bulunma problemi, bir diğeri de bu defekti dolduracak kadar çok sayıda greftin sıkışarak tespit olmasındaki problemdir¹⁴⁵. Mozaikplasti yine de zorunlu durumlarda 8 – 9 cm²'lik defektlerin tedavisinde de kullanılabilir. Ancak bu durumlarda donör saha morbiditesi yüksek olmaktadır¹⁴⁴.

Osteokondral greftler femur kondillerinin posteriorları, medial femoral kondilin anteromediali, troklea medial ya da laterali, interkondiler çentiğın anterolaterali, patella ya da fibula başından alınabilmektedir^{146,147}. İlk tercih femoral kondilin superolateral çıkıntısıdır.

Diz ekleminde kıkırdak kalınlığı 0,9-3,7 mm arası değişmektedir. En ince bölge interkondiler çentiğın laterali, en kalın bölge ise medial kondilin orta kısmıdır¹⁴². Her ne kadar interkondiler çentik ile troklea distal ve mediali donör saha morbiditesi söz konusu olduğunda greft alınması için daha uygun bölgeler olsa da bu bölgelerde kıkırdak kalınlığı azdır. Kıkırdak kalınlığının femoral kondillerdeki defekt bölgesine uyması açısından yine troklea lateral anterior yüzü önerilmektedir¹⁴⁸.

Mozaikplastide kullanılan osteokondral greft boyutları kullanılan sisteme göre değişiklik göstermektedir. Dört, altı, sekiz mm çapında greftler alınabildiği gibi bunların ara boyutları da mevcuttur. Alınan greftler açılan yuvalardan bir mm kadar büyük olmalıdır ki yerleştirme sırasında sıkı bir tespit mümkün olsun. Küçük çaptaki greftler ile eklem konturu daha iyi şekillendirilebilir¹⁴⁹. Ancak küçük silindirlerin kuvvet ve stabiliteleri daha azdır ayrıca işlemin basamak sayısını artırırlar⁷³. Kondral defektler için 15 mm uzunluğunda greft, osteokondral defektler için 20-25 mm önerilir¹⁴². Bazı setlerde standart greft uzunluğu sekiz mm'dir¹⁵⁰.

Osteokondral greftler tübüler osteotomlar ya da trefinler yardımı ile alınır. Greftlerin eklem yüzüne dik olarak alınması çok önemlidir^{138,151}. Greft alınan saha bir yıl içinde fibröz ve kemik doku karışımı ile dolar. Bu doku bazen hipertrofiye uğrayarak kıkırdak seviyesinin üstüne de çıkabilir^{73,147}.

Tedavinin başarısını belirleyen en önemli etken greftlerin hatasız yerleştirilmesidir. Cerrahın mümkün olduğunca greftin kıkırdak katmanının

derinliğini sağlam kıkırdağın derinliğine uydurmaya çalışması gerekir¹⁵². Dizde ortalama kıkırdak kalınlığı 1,69 mm'dir. Bir mm'den az oynamalarda kıkırdak çevre kıkırdak ile hala temas halindedir ve bu da remodelasyona izin verir¹⁵³. Uygun yerleştirilmeyen greftler çökme ya da fibröz pannus dokusu ile aşırı büyümeye maruz kalabilirler¹¹⁶. Greftler eklem yüzüyle aynı seviyede olmalıdırlar¹⁴⁹. Ek olarak, greftlerin eklem yüzüne göre 1mm yüksek ya da 1mm alçak kalması tepe temas basıncını belirgin şekilde arttırmaktadır¹⁵³. Greftin 0,5 mm yüksek kalması dahi üzerindeki baskıyı %50 arttırır⁷³.

Standart bir uygulamada mozaikplasti ile defekt alanının %60-70'i hyalin, %30-40'ı defekt tabanındaki kemikten köken alan fibröz kıkırdak ile dolar¹³⁷. Defekt alanında artiküler kıkırdak ile kaplanan oranı yükseltmek için ya daha küçük greftler kullanmak ya da greftleri büyüterek örtüştürmek gerekir. Küçük greft kullanımı greftte çökme ile sonuçlanabilir. Greftlerin örtüşmesi, yani sonraki greftin öncekinin bir kısmının yerine geçmesi ile defekt alanının %90-100'ü kaplanabilir. Ancak greftlerin örtüşmesi tespit gücünü azaltacaktır ve rehabilitasyon döneminde bunu akılda bulundurmak gerekir^{154,155}.

Osteokondral greftler 6-14 hafta içerisinde tamamen entegre olmaktadır¹¹⁶. Greftlerdeki kondrositler sinovyal sıvıdan beslendikleri için transplantasyon sonrası kan akımı kesilmiş olsa dahi yaşamlarını ve işlevlerini sürdürürler¹⁵⁶. Greftlerin kemik kısımları arasında kaynama problemi genellikle görülmezken kıkırdak birleşim yerlerinde iyileşme olmaz¹⁵⁷. Osteokondral greftlerin kıkırdağı, ne çevre sağlam kıkırdak ile ne de aralarını dolduran fibröz kıkırdak ile birleşir¹⁰. Birleşim yerleri makroskopik olarak devamlı gibi görünse bile histolojik incelemede yarık olarak kalmaktadır¹⁵⁸. Sağlam tespit olmayan greftlerin aralarından sinovyal sıvı geçişi ve bu nedenle subkondral kist oluşumu gözlemlenebilir¹⁵⁹.

Her ne kadar artiküler kıkırdak ile iyileşme sağlama ihtimali olan tek yöntem olsa da, bir yayında mozaikplastinin zaman içerisinde dejenere olduğu ve kullanılmaya devam edilmesinin yararının şüpheli olduğu bildirilmiştir¹⁵⁸. OAT'nin, kondrosit ihtiva eden doğal hyalin kıkırdak naklini sağlaması yanında hastalık geçişine neden olmaması ve güvenli bir kemik kaynamasını sağlaması gibi avantajları vardır.

2. 4. 5. 1. 4. Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Kondrositler ilk defa Chesterman ve Smith tarafından 1968 yılında izole edilerek kültürde çoğaltılmışlardır¹⁶⁰. Bentley ve Greer 1971 yılında kondrositleri ayırarak kıkırdak yaralanmalarını tedavi etmişlerdir¹⁶¹. Otolog kondrosit implantasyonu (ACI) konsepti Grande ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş, Brittberg tarafından klinik uygulamaya geçilmiştir^{162,163}. 1997'de ACI yöntemi FDA'dan onay almıştır. Bundan sonra Peterson tarafından 11 yıllık sonuçlar yayınlanarak yöntem yaygınlaşmıştır^{164,165}. İlk yılında yöntem otolog kondrosit transplantasyonu olarak anılmış ancak daha sonra isim yanlışı düzeltilerek otolog kondrosit implantasyonu (Autologous Chondrocyte Implantation – ACI) bu terimin yerini almıştır¹⁶⁶.

ACI'nın ölü boşluk bırakmaması, allojenik doku kullanılmaması ve donör saha morbiditesi olmaması gibi avantajları yanında iki ayrı girişim gerektirmesi, açık cerrahi gerektirmesi, pahalı olması, laboratuara transport gerektirmesi ve kıkırdak oluşumu ile kıkırdak olgunlaşmasının zaman alması gibi dezavantajları vardır^{76,167,168,169}.

ACI; femoral kondiller, troklea ya da patellanın ICRS (International Cartilage Research Society) evre III ve IV kıkırdak yaralanmalarının tedavisinde endikedir. Onbeş-55 yaşlar arasındaki hasta grubuna uygulanabilmektedir²³. Kırk yaş üstünde kemik iliği uyarı yöntemleri yerine ACI yöntemini tercih etmek daha iyi sonuç verir¹⁷⁰. İki cm²'den küçük defektlerin tedavisinde ilk tercih mikrokırık ya da osteokondral otolog transfer (OAT) yöntemleridir. İki-12 cm² büyüklüğündeki tam kat kıkırdak defektlerinin tedavisinde ACI yöntemi kullanılabilir. 2.5-3 cm²'den büyük defektler ACI yöntemi ile tedavi edilmelidirler^{163,171,172,173,174}. İki cm²'den büyük defekti ve yüksek aktivite seviyesi olan hastalarda ilk tedavi seçeneği ACI yöntemidir¹⁷⁵. İyi çevrenmemiş büyük defektlerin ikinci seçenek tedavisi yine ACI yöntemidir¹⁷⁶.

ACI; diz, ayak bileği, omuz ve dirseğe uygulanabilmektedir. ACI yöntemi, çocuklardaki kondral yaralanmalarda en fazla sonuç bildirilmiş ve en çok tercih edilmiş yöntemdir¹⁷⁷.

ACI'nın ilk basamağını, eklem artroskopik olarak muayene edilmesi ve üretmek üzere kıkırdak doku alınarak laboratuara gönderilme aşaması

oluşturmaktadır. Kıkırdak doku femoral kondil proksimallerinden yani trokleanın medial ya da lateral kenarından ya da interkondiler çentik çevresinden alınabilir^{154,169,178}. 140-500 mg arası ağırlıkta, 0,5x1-1x2cm'lik 3-4 şerit şeklinde kıkırdak dokusu bir halka uçlu artroskopik küret yardımı ile alınır^{154,164,166,169,179,180}. Alınan parçalar kas, bağ ya da kemik dokudan ayrılarak 1-3 mm³'lük parçalara doğranır ve transfer solüsyonuna atılır^{164,169}. Bazı laboratuvarlar kıkırdak parçalarının laboratuvarda doğranmasını tercih etmektedirler. Ancak 1 mm³'lük parçalara ayrılmış kıkırdağın transport sırasında daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir¹⁶¹. Kıkırdağın derin katmanlardan alınmasına özen gösterilir çünkü en fazla kondrosit buralarda yerleşmektedir¹⁵⁹. Dokular %0,9'luk NaCl içerisinde oda sıcaklığında laboratuvara gönderilir. Birçok hücre kültürü laboratuvarı hücre besiyeri olarak otolog serum kullanmaktadır. Bu nedenle laboratuvar çalışanları, kıkırdak doku ile birlikte otolog serum da istemektedirler. Otolog serum elde etmek için hastadan ameliyat öncesi 9 ml'lik 10 tüpe kan alınır. Otuz dakika pıhtılaşması beklenir ve bir saat içerisinde santrifüj yapılır (15 dak, 1000-1300 devir). Serum filtrelenerek ayrılır ve -4⁰C- -8⁰C'de dondurularak laboratuvara gönderilir. Alınan dokuda yaklaşık olarak 2-3x10⁵ hücre vardır. Kıkırdak sağlam dokudan alınmalıdır.

Laboratuvara ulaşan kıkırdak dokular fosfat tamponlu salin (pH=7,2) ile yıkanır ve tripsin, kollajenaz ve hyaluronidaz kullanarak enzimatik ayrıştırmaya tabi tutulur. Ayrılan hücreler hücre kültürü yöntemleri kullanılarak üretilir. Üretmek üzere alınan miligram kıkırdak başına düşen kondrosit sayısı yaşla değişmemektedir¹⁸¹. Kültür sırasında hastanın kendisinden alınan serum kullanılabilir¹⁷⁹. Otolog serumun hücre kültüründe kullanılması fetal bovine seruma göre daha hızlı çoğalma sağlamaktadır¹⁸². Hücrelerin ekim sırasında yoğun olması istenen bir şeydir. Mililitrede 20-100 milyon arası hücre, bir matriks içerisinde farelerin ciltaltına yerleştirildiğinde kıkırdak oluşturabilmektedir. Bu nedenle ideali mililitrede 30 milyon hücre implante etmektir¹⁸³. Çeşitli ürünlerde değişik hücre sayıları verilmektedir. 3,2-12x10⁶ arasında hücre sağlayan laboratuvarlar vardır^{154,166,169,179,181}. Ortalama implante edilen hücre sayısı ise 4. 5 milyondur^{164,171}. Bu miktarda hücre yaklaşık iki-üç haftada üretilmektedir¹⁶⁴. Hazırlanan hücreler süspansiyon halinde 4⁰C

sıcaklıkta saklanır¹⁶⁶. Üretilmiş hücrelerin dondurularak daha uzun süre saklanması denenmiş ancak donan hücrelerde implant olarak etkinlik kaybı gözlenmiştir¹⁷⁹. Alınan kıkırdak dokunun, ya da üretilmiş kondrositlerin normal oda sıcaklığında yedi güne kadar bekletilmelerinin, hücrelerin canlılıklarına ya da çoğalma potansiyellerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir¹⁸⁴. 10 cm²'ye kadar büyüklükteki her defekt için yaklaşık 12 milyon hücre içeren bir solüsyon üretilmesi önerilir. Hazırlanan hücre süspansiyonlarının bir kalite kontrol protokolünden geçmesi gerekir. Bu protokol laboratuardan laboratuara göre değişmektedir. Genellikle hücre süspansiyonları, sterilite (bakteri ve mantar tesbiti), endotoxin varlığı, hücre canlılığı (%85'ten fazla olması beklenir), hücre sayısı ve hücrelerin ikiye katlanma zamanı açısından incelenerek teslim edilir^{167,178,185}.

Biyopsi ile implantasyon arası süre dört-altı hafta kadar olabilmekle birlikte cerrah ve hasta tarafından belirlenecek uygun bir zaman aylarca da beklenebilir¹⁸⁶. Genellikle üç-beş hafta içerisinde ikinci girişim artrotomi uygulanarak yapılır¹⁷⁹. Medial parapatellar artrotomi yapılabilir. Medial kondil lezyonları için subvastus yaklaşım kullanılabilir¹⁸⁶. Defekt tabanı ve kenarları sağlam kıkırdağa kadar temizlenir¹⁸⁷. Debridmanın yeterli yapılması oluşan kıkırdağın sağlam bir kıkırdağa ve subkondral kemiğe tutunabilmesi için önemlidir. Debridmanda radikal olmak konservatif olmaya tercih edilir.

Periost grefti almadan önce defekt boyutları ölçülür. En iyisi bir eldiven kâğıdı ya da alüminyum folyo ile şablon çıkarmaktır. Çevreden 1-2 mm büyük olacak şekilde bir şablon kesilir. Bu şablon periost üzerine yerleştirilir ve çevresinden bistüri ile kesilerek greft alınır. Fazladan bırakılan pay periostun alındıktan sonraki çekme payıdır¹⁷⁸. Kondiller için periost grefti alınacağı zaman hesaplanan büyüklükten 2mm daha büyük, troklea ya da patella için alınacağında ise defekttan 3mm daha büyük greft alınır. Periost tibia proksimalinin medialinden alınabilir. Pes anserinus ve medial kollateral yapışma yerlerinin 2 parmak distalinde tibia posterior sınırının hemen anteriorundan ayrı bir insizyon yapılır. Cilt altı yağ dokusunun künt disseksiyonu sonrası periosta kolayca ulaşılabilir. Şablon periost üzerine yerleştirilir ve 15 numara bistüri ile çevresi kesilir. Periost elevatörü ile kaldırılır. Üzerinde fasya ya da yağ dokusu

olmamasına dikkat edilir¹⁷⁸. Periost tibiadan sıyrılırken kambiyum tabakasını tam alabilmek için mümkün olduğunca kemiğe yakın sıyrılmalıdır¹⁸⁸. Periostun uygun şekilde alınması teknik olarak zordur. Üzerindeki katmanların da birlikte alınması fibröz aşırı büyüme ihtimalini artırır. Periostun sadece kendisinin alınması bu yüzden önemlidir¹⁸⁹.

Periost grefti yerine tip I ve tip III domuz kollajeninden oluşan çift katmanlı membran da (Chondrogide - Geizlich Pharma, Wolhusen, İsviçre ya da Restore-DePuy, Warsal, ABD) kullanılabilir^{166,179}. ACI'nın tip I/III kollajen membran kullanılarak yapılan şekline ACI-C ismi verilmektedir¹⁹⁰. Bu membranın kullanılmasının sonucunda kalsifikasyon ya da hipertrofiye hiç rastlanmamıştır¹⁹¹. Tip I/III kollajen gibi biyobozunur kollajen şerit Bioseed C (Biotissue, Freiburg, Almanya) ile de benzer sonuçlar alınmıştır¹⁹². Bioseed-C ile dört yıllık takiplerde iyi sonuçlar elde edilmiştir¹⁹³. Tip II kollajen ile yapılan deneysel çalışmalardan beklenen başarı elde edilememiştir¹⁹⁴.

Periost greftinin kambiyum tabakası subkondral kemiğe bakacak şekilde yerleştirilir¹⁵⁴. Üç-dört mm aralıklarla 6/0 vicryl ile sağlam kıkırdağa dikişler atılır¹⁷⁹. ACI-C için tip I/III kollajen membranın düzgün katmanı mekanik sağlamlık sağlar ve dikilebilmesine olanak verir. 6/0 vicryl ile 3 mm aralıklarla suture edilir.

Periost grefti çevre kıkırdakla aynı seviyede ve defekt içinde kalmalı, sağlam kıkırdağın üzerine çıkan yama gibi olmamalıdır. Düğümler ne periost üzerinde, ne de sağlam kıkırdak üzerinde olmalı, tam birleşim yerinde durmalıdırlar. Aksi halde her iki dokuya da zarar verebilirler¹⁸⁸.

Periost kenarları fibrin yapıştırıcı ile mühürlenir. Fibrin yapıştırıcı ile viral enfeksiyon geçiş ihtimalini düşünerek sadece dikiş kullanıp, izotonik enjeksiyonu ile sıvı kaçışını kontrol ettikten sonra hücre suspansiyonu enjekte eden cerrahlar da vardır¹⁵⁴. Enjeksiyon için 18 gauge plastik intraket ve insülin (ppd) enjektörü kullanılır. Her tüp yaklaşık 10-12 milyon hücre içerir ki bu miktar 10cm²'lik bir defekt için yeterlidir¹⁷⁸. Debride edilmiş defekt santimetrekarelerine en az 1 milyon hücre verilmesi önerilmektedir¹⁹⁵. Son dikiş atıldıktan sonra, fibrin yapıştırıcı ile mühürlenmesi sağlanır^{179,187}. Enjeksiyon sonrası diz tam ekstansiyona getirilerek greftin karşı tarafla temas etmediği doğrulanır¹⁷⁸.

ACI dayanıklı bir iyileşme dokusu sağlar¹⁶⁴. Periostun kondrositlerin çoğalmasını destekleyici parakrin etkisi vardır. Ayrıca periost ekilmiş kondrositlere mekanik bariyer oluşturur. ACI sonrası yapılan histolojik incelemelerde periostun hyalin benzeri bir katman altında fibröz kıkırdağa dönüşmüş artıkları gözlenebilmektedir¹⁸⁹. ACI sonrası oluşan rejenerasyon dokusu hyalin kıkırdağın tüm özelliklerini taşımaktadır. Yapı taşları aynı olmakta ancak mimarisinde farklılıklar görülebilmektedir¹⁹¹. Oluşan tamir dokusu hyalin kıkırdak benzeri niteliktedir. Ancak hyalin kıkırdakta olduğu gibi tamir dokusunda kolonlar halinde kondrosit dizilimi görülmez. Bunun yerine osteoartritte görülen kümeler halinde kondrosit birikimlerine rastlanır. Bu da dokunun olgunlaşmamış olduğunun göstergesidir. Bir çalışmada post-operatif birinci yıldaki incelemelerde ise tamir dokusunda kolonlar halinde kondrosit dizilimine yer yer rastlanmaktadır¹⁹⁶.

Kollajen dağılımı değerlendirildiğinde dokuların %65'i fibröz kıkırdak ağırlıklı, %15'i hyalin, %17'si karışık ve %3'ü fibröz doku ağırlıklıdır. İlerleyen zamanla beraber kıkırdak olgunlaşması devam etmektedir. İkinci yılda yapılan incelemede kondrositlerin halen olgunlaşmadıkları, yeteri kadar tip II kollajen sentezlemedikleri, hala olgunlaşma sürecinde oldukları ve oluşmuş kıkırdağın da halen fibröz doku ile karışık kıkırdaktan oluştuğu tesbit edilmiştir¹⁹⁷. Üçüncü ile beşinci yıllar arası yapılan incelemelerde olgunlaşma sürecinin halen devam ettiği görülmüştür¹⁹⁸. ACI sonrası oluşan dokunun ortalama kalınlığı 2,9 mm olarak ölçülmüştür¹⁹⁸. Enjekte edilen kondrositler yerçekimi etkisiyle defekt pozisyonuna göre altta kalan bölgede birikerek buradan tamire başlarlar¹⁹⁸. Altıncı ayda yapılan histolojik incelemelerde yüzeysel kısımların fibröz kıkırdak, derin tabakaların ise hyalin kıkırdak özelliği gösterdiği saptanmıştır^{154,199}.

Kondrositlerin en fazla tutunma oranı ilk 24 saatte gerçekleşmektedir. İmplant edilen hücrelerin dördüncü haftaya kadar ancak %14'ü yaşamakta, sonra sayıca artış göstermektedirler²⁰⁰. Deneysel çalışmalar kemik morfojenik proteinlerin kondrosit çoğalması ve aramada sentezi üzerinde pozitif etkisi olduğunu göstermişse de bu proteinlerin tümör başlatma ve ilerletme potansiyelleri nedeniyle henüz klinik kullanımları mevcut değildir²⁶.

Cinsiyet, defekt büyüklüğü, defektin yerleşimi ya da defektin sayısının ve ek yaralanmaya yönelik girişimlerin sonuç üzerine etkisi görülmemiştir. Etkili olan tek unsur yaralanma ile tedavi başlangıcı arasındaki süre olmuştur. Bir yıldan daha kısa sürede tedavi olanlarda başarı şansı daha fazla bulunmuştur¹⁷⁸.

ACI'nın 11 yıla kadar olan takiplerinde femoral kondilin tek defektlerinde %85-92 arası, patellofemoral eklemden ise %58-76 arası başarılı klinik sonuç elde edilmiştir. Ortalama başarı oranı %85 civarındadır^{164,167,171,178,183,185,201}. Medial femoral kondildeki lezyonların tedavi sonucu lateral femoral kondil ve trokleadaki lezyonların tedavi sonucuna oranla daha kötüdür¹⁶⁰.

ACI'ya bağlı komplikasyon insidansı %3,8'dir²⁰². En sık görülen komplikasyonlar yeni oluşan kıkırdak hipertrofisi (%5), yeni oluşan kıkırdak ile çevre kıkırdak yetersiz birleşmesi (%4), greft oluşma kusuru ya da yetersiz oluşması (%3) ve delaminasyon, yani yeni oluşan kıkırdak subkondral kemikten ayrılmasıdır (%3)^{195,202}.

ACI girişiminden sonra hastaların tekrar bir cerrahi geçirme ihtimali yüksektir. Tekrar girişim geçirme oranları %17 ile 57 arası geniş bir aralıkta bildirilmektedir^{176,195,203,204}. Yaşın ileri olması ya da defekt büyüklüğü ile revizyon insidansı arasında bağlantı yoktur¹⁹⁵. En fazla tekrar cerrahi gerektiren sorun periostun hipertrofisi ya da ayrılmasıdır¹⁶⁷. Periost hipertrofisi hastaların %22'si ile 40'ı arasında görülmekte, bunların da %13-19'u semptomatik olmaktadır²⁰³. Hipertrofinin nedeni, periostun sürtünme ile uyarılması ve aşağıdan gelen yeni kıkırdak ilerletmesi olduğu düşünülmektedir²⁰³. Önceden iyi olan dizde takılma ile ağrı ve efüzyon periost hipertrofisini düşündüren bulgulardır.

Kıkırdak birleşme kusuru en sık medial femoral kondilde, en az patellada görülür. Neden olarak patelladaki makaslama kuvvetlerinin birleşme üzerinde uyarıcı etkisi olabileceği öngörülmektedir¹⁹⁵.

ACI-C'de hipertrofi %3-10, birleşme kusuru %25 oranında görülmektedir²⁰⁵. Kollajen membran kullanımında işin içinde periosttaki gibi mezankimal kök hücreler ve büyüme faktörleri olmadığından hipertrofi beklenmemektedir. Komplikasyon oranları karşılaştırıldığında ACI'da %27, ACI-C'de %12 olarak bulunmuştur¹⁹⁵.

2. 4. 5. 1. 5. Matriks Rehberli Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Otolog kondrosit implantasyonunun (ACI) ; hücre süspansiyonu kullanmak, periostu su geçirmez bir şekilde kapatmak ve bu nedenle kırıkdağa dikiş geçirmek ve ikinci seansta artrotomi yapmak gibi teknik dezavantajları vardır¹⁷. Standart tek katman hücre kültüründe kondrositler fenotipik olarak geri farklılaşmaya zorlanmaktadır. Hücre süspansiyonu enjeksiyonu homojen olmayan dağılıma neden olmakta, hücrelerin periost greftinden sızarak kaybı mümkün olmakta ve cerrahi süresi uzun olmaktadır¹⁸. Bu problemlere çözüm amacıyla 1999 yılında matriks rehberli otolog kondrosit implantasyonu (MACI – Matrix-guided Autologous Chondrocyte Implantation) tarif edilmiştir. 2002 yılından itibaren ACI'nın ikinci nesli olan ve üç boyutlu biyobozunur matrikslerin kullanıldığı MACI yöntemi klinik kullanıma girmiştir^{17,19}.

Fibrin yapıştırıcı; fibrin ve trombin varlığında fibrinojenin polimerizasyonu ile oluşur. Şekil verilebilen, sitotoksitesisi olmayan, biyoyumlu ve biyobozunur bir maddedir. Fibrin yapıştırıcı kondral ve osteokondral fragmanların tespitinde kullanılmaktadır²⁰⁶ Tespit gücü başta yetersiz görünmekle birlikte zamanla artmaktadır²⁰⁷. Fibrin yapıştırıcı elde edebilmek için 70 - 110 mg/ml fibrinojen 3000 KIE/ml aprotinin, 4 IE trombin ile 40 mmol/L kalsiyum klorid karıştırılır ve iki karışım 37⁰C'ye kadar ısıtılır. Bu iki karışımın karıştırılması ile yapıştırıcı elde edilir²⁰⁷.

MACI cerrahi tekniğinin ilk aşaması ACI ile aynıdır. Yüz ml otolog kan ile birlikte 5x10 mm boyutunda kırıkdağ doku alınarak laboratuara gönderilir. Üç-dört hafta içerisinde otolog serum ve büyüme faktörleri de kullanılarak 15-20 milyon hücre üretilir. Domuz kaynaklı tip I/III iki katmanlı kollajen membranın santimetrekaresi başına canlılığı %85'in üzerinde olan en az 1 milyon hücre ekilmelidir^{21,65,208}. Defekt ACI'da olduğu gibi hazırlanır. Kanama kontrolü yapılır. Alüminyum folyo ya da eldiven kâğıdı ile defektin şablonu çıkarılır. İmplant şablon şeklinde kesilir. İmplantı kesmek ve yerleştirmek için uygulanan manipülasyonun tutunmuş hücrelere zarar vermediği gösterilmiştir²⁰⁹. Fibrin yapıştırıcı ile hücreli retiküler pürüzlü kısım subkondral kemiğe bakacak şekilde yapıştırılır. Üç dakika boyunca basınç uygulayarak yapışma beklenir. Gerekirse

dikiş ile kuvvetlendirilebilir²¹⁰. Dize birkaç defa fleksiyon ve ekstansiyon yaptırılarak implatın stabilitesi kontrol edilir²¹¹.

MACI'de ameliyat sırasında implantın kesilerek şekillendirilmesi gerekir. Bu sırada kesilen kenarlardaki hücreler atılmaktadır. Bu değerli hücrelerin atılmasını engellemek için ameliyat sırasında membrana hücre ekme işlemi tarif edilmiştir. Bu yöntemde 1 milyon hücre içeren süspansiyon ve tip I/III kollajen membran ameliyat masasına alınır. Membran kuru haliyle şablona uygun kesilir. Poroz yüzeyine bir kap içerisinde hücre süspansiyonu dökülür ve 10 dakika beklenerek hücrelerin membrana tutunması sağlanır. Poroz ve hücreli yüzey defekte bakacak şekilde yerleştirilir. Membran fibrin yapıştırıcı ve gerekirse birkaç dikiş ile etraf dokuya tespit edilir. Dikiş atılacaksa içeriden dışarıya doğru atılır. Bu yöntem ACI-Cs ismi verilmiştir. Bu yöntem ile hücreler kültür ortamında ekilmelerine göre daha homojen dağılmaktadırlar^{212,213}.

MACI artroskopik olarak da uygulanabilir. Bunun için defekt boyutları artroskopik olarak ölçülür. İmplant ölçülen boyutlarda kesilir ve düzgün yüzey işaretlenir. Hücreli kısım içte kalacak şekilde katlanarak ekleme sokulur. Sıvı akışı kesilir ve içerideki sıvı boşaltılır. İmplant defekte yerleştirilir. Bir spinal iğne ile implant altına fibrin yapıştırıcı enjekte edilir. Membran altından kabarcıklar geldiği görülür. Probla membrana baskı yaparak beklenir. İmplantın taşan kısımları punch ile alınır. Fleksiyon ekstansiyon hareketleri ile stabilite kontrol edilir²¹⁴. Beş cm²'ye kadar olan defektlerde MACI artroskopik olarak uygulanabilmektedir²¹⁵.

MACI'de tedavi sonrası altıncı ayda histolojik olarak hyalin kıkırdak oluşmaya başlar²¹⁶. Altıncı ayda yapılan histolojik incelemeler %75 oranında hyalin kıkırdak içeriğinin varlığını göstermektedir. Kıkırdağın olgunlaşması 18 ay kadar sürmektedir. Bu süre sonunda üçüncü defa artroskopi yapılarak biyopsi alınan hastalarda hyalin kıkırdağa rastlanmış, fibröz kıkırdağa ise rastlanmamıştır²¹⁷. Buna karşın MACI sonrası hastaların %25'inde hyalin kıkırdak, %42'sinde fibröz kıkırdak, %33'ünde de karışık kıkırdak gösteren yaygın da mevcuttur²¹⁸.

ACI-C ve MACI'de periost kullanılarak uygulanan ACI'lara göre daha fazla birleşme kusuru görülmektedir. Delaminasyon ise en az MACI'de

görülmektedir¹⁹⁵. Matrislerin kullanıldığı yöntemlerde iyileşme dönemi boyunca zaman zaman efüzyon atakları gelişebilmektedir²¹⁹. Sentetik malzemelere karşı geç inflamatuvar yanıt oluşma riski vardır²²⁰. Periost kullanımına bağlı hipertrofi sık görülen bir komplikasyondur. MACI ile bu komplikasyonun insidansı düşmüştür. ACI'da %26 olan hipertrofi insidansı, MACI'de %5 olarak belirlenmiştir^{195,210}.

2. 4. 5. 1. 6. Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kıkırdak doku mühendisliği hastalık veya travma sonucu oluşan doku veya organ kaybının onarımının veya yeniden yapılmasının sağlanması için güncel bir seçenek olarak tanımlanmıştır. Doku mühendisliğinde temel yaklaşım hücrelerin, skafoldların ve sinyal faktörlerinin tek başlarına ya da birlikte kullanılmasına dayanmaktadır.

Kıkırdağın yeniden yapılması ve onarımı için hücre tabanlı tedavi yeni değildir. Otolog kondrosit transferi (ACT) klinik olarak hem kraniyofasiyal hem de eklem kıkırdak defektlerinde kullanılmıştır. 1987 tarihinden beri, ACT dünya çapında 12,000 den fazla hastada, tam kalınlık kıkırdak defektlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır²²¹. Bu yaklaşım, minimal invaziv bir tarzda hastanın kıkırdağından küçük biyopsiler almayı, alınan dokudan kondrositleri izole etmeyi ve hücreleri in vitro büyütmeyi kapsamaktadır. Bu hücreler daha sonra yeni kıkırdak dokusu üretmek için, periost veya membran altında kıkırdak defekt bölgesine yerleştirilir. Kıkırdak dokusunun düşük hücre yoğunluğundan dolayı ACT'de en önemli sorun; biyopsi sonucu elde edilen hücrelerin az sayıda olmasıdır. Kıkırdak doku mühendisliğinde araştırmalar sonucunda ilerlemeler olmakta; yeni teknikler, yeni hücre kaynakları ve yeni biyomateryaller bu sorunların üstesinden gelmek ve onarımın kalitesini artırmak için araştırılmaktadır.

- Hücre Kaynağı: Kıkırdak doku mühendisliği için uygun hücre kaynağı hala tam olarak tanımlanmamıştır. Kondrositler, fibroblastlar, kök hücreler ve genetik olarak modifiye edilmiş hücreler kıkırdak onarımı için uygulanabilirlik potansiyelleri bakımından halen incelenmektedir (Tablo 8).

Tablo 8: Kıkırdak doku mühendisliği için uygun hücre kaynakları

Kondrosit	Kök Hücreler
Artiküler	Kemik iliği kaynaklı
Aurikuler	Adipoz doku kaynaklı
Kostal	Kas kaynaklı
Nasoseptal	Sinovya kaynaklı
	Periost kaynaklı
	Embriyonik

Kondrositler; doğal kıkırdakta bulunduğu ve kıkırdak ECM'sindeki rolleri geniş olarak çalışıldığı için en çok tercih edilen hücre kaynağıdır. Kondrositler, yuvarlak bir morfolojide olup tip II kollajen ve sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAGs) gibi ECM moleküllerinin sentezinden sorumludurlar. Kondrositler, matris metalloproteinazlar (MMPs) ve doku inhibitör metalloproteinazlarını (TIMPs) içeren anabolik ve katabolik süreçlerin dengesi sayesinde kıkırdak matrisini korur ve yeniden şekillendirirler. Kıkırdak onarımında hücre kaynağı olarak kullanılmaları için bu özelliklerinin korunması önemlidir.

Kıkırdak doku mühendisliği için büyük zorluklardan biri de defekt bölgesini doldurmak için yeterli sayıda hücre elde etmektir.

Eklem kıkırdak dokusunun sadece %5-10'unu kondrositler oluşturur, bu nedenle öncesinde büyütülüp çoğaltılmaları gerekir. Maalesef, tek katmanlı kültürlerde büyüme kondrositlerin farklılaşmasında bozukluğa neden olur, bu da azalmış proteoglikan sentezi ve tip II kollajen salınımıyla, artmış tip I kollajen salınımına neden olur. Kollajenler, integrinler, büyüme faktörleri, matris modülatörleri, src homolog kollajen (SHC) gibi sinyal proteinlerinin aktivasyonu ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (Erk1/2)'in salınımındaki değişiklikler kondrositlerin farklılaşma bozukluğuna eşlik eder ve geri dönüşümsüz olarak farklılaşmamış hücreler için erken dönemde marker veya sinyal olarak kullanılırlar^{222,223,224,225,226,227}.

Agaroz, aljinat boncuk ve fibrin yapıştırıcı gibi üç boyutlu kültürler artmış aggrekan üretimi ve tip II kollajen salınımı sayesinde kondrositler fenotipini koruyabilirler^{228,229,230}.

Eklem kıkırdağı; hücresel morfoloji, biyomekanik bileşim ve yapısal özellikler bakımından birbirinden farklı olan tabakalardan oluşmaktadır. Yüzeysel, orta ve derin tabakalardan oluşan anizotropik bir dokudur²³¹. Her tabaka yapı ve işlevsel olarak çeşitlilik gösterir ve farklı uyarılara farklı cevaplar vererek farklı proteinler sentezlerler. Her tabakadan izole edilen kondrositin farklı büyüme oranları, farklı gen ekspresyonları ve farklı biyosentez seviyeleri vardır. Örneğin, yüzeysel tabakadan izole edilen kondrositler artmış yüzeysel bölge proteini sentezlerken (SZP), orta ve derin tabakadaki kondrositler artmış tip II kollajen salınımına neden olurlar. Tabakalar arasında derinlik arttıkça GAG ve kollajen salınımında artış gözlenir^{232,233}. Bu da derin tabakayı yüzeysel tabakaya kıyasla mekanik özellik bakımından daha sağlam yapar. Tipik olarak, kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında hayvanlardan elde edilen homojen hücre karışımları kullanılır. Bu kondrositler yüksek miktarda ECM sentezler ancak bölgesel organizasyon bakımından eksiktirler. Bu nedenle günümüzde bölgesel organizasyonu sağlayabilmek için çok tabakalı hidrojel ve porlu gradyent scaffoldları içeren metotlar araştırılmaktadır.

İki tabakalı poli etilen oksit diakrilat (PEODA)²³⁴ ve çok tabakalı poli etilen glikol diakrilat (PEGDA)²³⁵ hidrojeller, eklem kıkırdağı kondrosit subgruplarının büyümesine yardımcı olmak için üretilmiştir. Çoklu katmanların ardışık fotopolimerizasyonunun kullanımıyla, hücre grupları 3D yapılarıdaki katmanlara başından sonuna kadar dağıtılabilir. Bu çok katmanlı yapılar doğal kıkırdaktakine benzer hücre ve ECM dağılım paterni ortaya koyar²³⁵.

Eklem kıkırdağının toplanmasındaki donör morbiditesi, eklem kıkırdağının düşük mitotik ve biyoaktivitesi klinik kullanımını kısıtlamıştır. Bu kısıtlamalarla birlikte, aurikular, nazoseptal ve kostal kıkırdağı kapsayan vücudumuzdaki diğer potansiyel hücre kaynakları da araştırılmaktadır.

Aurikular kıkırdak; kulak ve epiglottiste bulunan elastik bir kıkırdaktır. Eklem kıkırdağına kıyasla aurikular kıkırdakda kondrositlerin ikiye katlanma zamanı ve hücre proliferasyonu dört kat hızlı bulunmuştur²³⁶.

Nazoseptal kıkırdak, kraniyofasiyal ve plastik cerrahi uygulamalarında dikkat çeken hiyalin bir kıkırdaktır. Yetişkin nazal kondrositlerinde yüksek oranlı kollajen II/I ve GAG birikimi olan matriks mevcuttur. Ayrıca, nazal kondrositler tek tabakada eklem kondrositlerden dört kat daha hızlı proliferasyon olurlar²³⁷.

Kondrosit kaynaklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, inek nazal, eklem, kostal ve aurikular kondrositleri poli (L-lactide-ε-caprolactone) scaffoldlarda 4 hafta büyütüldü. Büyüme oranları ve gen ekspresyonları hücre tipiyle farklılık gösterdiği tespit edildi. Tip II kollajen ve aggrecan salınımının en fazla kostal kondrositlerde olduğu ve onu sırasıyla nazoseptal, eklem ve aurikular kondrositlerin takip ettiği görüldü. Aurikular kondrositler en geniş çapa sahipken kostal kondrositlerin en kalınları olduğu görüldü²³⁸. Başka bir çalışmada ise büyüme faktörlerinin aurikular, nazal ve kostal kondrositler üzerine etkileri araştırılmış ve büyüme faktörü eklendikten sonra bütün hücre tiplerinde artmış proliferasyon ve GAG/DNA içeriği ile artmış tip II kollajen ekspresyonu olduğu gösterilmiştir²³⁹.

Cilt, doku mühendisliği için minimal invaziv, göreceli olarak bol fibroblast kaynağı sunar. Kıkırdak defektinde poli laktik asit (PLA) ağ üzerine direkt fibroblast transferinin fibröz doku gelişimiyle sonuçlanmasına rağmen, uygun koşullar altında kültürlendikleri zaman fibroblastlar tekrar kondrositik fenotipe yönlendirilebilirler²⁴⁰. Demineralize kemik varlığında ya da laktik asit varlığında cilt fibroblastları aggrecan ve tip II kollajen gibi kıkırdak özellikli matriks proteinleri üretirler²⁴¹.

Kök hücreler, pluripotent hücrelerdir, farklılaşma olmaksızın her dokuya dönüşebilmektedir. Değişik koşullarda değişik hücrelere dönüşebilme özelliğine sahiptirler. Bu nedenle klinik denemeleri de çekince oluşturmaktadır. 1998 yılında, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin TGF- β1 varlığında kültüre edildiğinde kondrogenesis sağladığı bulunmuştur²⁴². Kondrosite dönüşme potansiyeli olan kök hücreler mezankimal kök hücrelerdir (MKH). MKH'ler kemik iliği, sinovyal membran, epidermis ve adipoz dokudan elde edilebilmektedir^{243,244,245,246}. Kemik iliğindeki her 105 hücreden biri MKH'dir²⁴⁷. Kök hücreleri için birinci rezervuar kemik iliği olsa da, periost, kas, fetal kemik

iliği, karaciğer ve kan gibi dokularda da kök hücreleri olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konmuştur.

Kemik iliği kaynaklı kök hücreleri (BMSCs), çeşitli kültür şartlarında kondrogenezise uğrar. In vitro kültür için, TGF-B ilavesi genellikle kültür metodundan ya da scaffolddan bağımsız olarak kondrogenezi uyarır ama yine de, kondrogenezisin derecesi scaffoldda bağımlıdır²⁴⁸.

İn vitro koşullarda yapılan bir çalışmada, PGA da kültüre edildikten sonra fareye implante edilen soğukda korunmuş insan BMSCs'leri 10 hafta sonra kıkırdığa benzer doku ürettiği görüldü²⁴⁹. BMSC'lerin dezavantajı ürettikleri matriksin mekanik bütünlüğüdür. Uzun dönemli agaroz kültürde, BMSC-yüklü jellerde kondrogenezis gözlenmiştir; ancak üretilen matriksin miktarı ve mekanik özellikleri aynı kişinin kondrositleri tarafından üretilenden daha düşük düzeydedir²⁵⁰.

Adipoz kaynaklı kök hücreler (ADSC); daha düşük yaşlanma seviyeleri ve istikrarlı büyümesiyle uzun süre kültürü yapılabilir²⁵¹. Bu hücreler immünfloresan ve flowsitometriyle tespit edildiği kadarı ile mezenşim kökenlidir ve TGF- β , askorbat ve deksametazon varlığında kondrositlere farklılaşabilme yeteneğindedir²⁵².

FGF-2 ve BMP-6 gibi büyüme faktörlerinin kullanımı da ADSC'lerin kondrogenezisini etkilemektedir. FGF-2, hücre proliferasyonunu artırırken tek başına BMP-6'da aljinat kültürlerde tip II kollajen ile agregan ekspresyonunu artırır^{253,254}. Kondrogenezise gitme özelliklerine rağmen, kemik iliği gibi diğer kaynaklardan izole edilen kök hücrelere kıyasla ADSC'lerin daha düşük kondrojenik potansiyelleri olduğu gösterilmiştir^{255,256,257}.

Embriyonik kök hücreler (ESCs); blastokist safhasındaki embriyonun iç hücre kitlesinden elde edilmektedir. Bu hücreler pek çok hücre tiplerine farklılaşma yeteneğindedir. ESC'lerin saflaştırmasındaki zorluklar klinik kullanımlarını engellemektedir. Bu hücre kaynağı yetişkin hücrelere göre daha az immünojenik olduklarından doku mühendisliği için ümit verici bir kaynak gibi gözükmektedir. Bu hücreler aynı zamanda hızlı hücresel büyüme yeteneği ve mezenkimal hücrelere yüksek farklılaşma özelliğine sahiptirler. Kondrogenezis için, ESC'ler farklılaşmadan önce embriyonik cisim (EB) aggregasyon

safhasından geçmelidir. İnsan ESC'leri ile yapılan bir çalışma, insan ESC kaynaklı EB'lerin kondrojenik indüksiyondan hipertrofik maturasyona kadar kondrogenezis yeteneği olduğunu göstermiştir²⁵⁸.

- **Skafoldlar:** Skafoldlar; kırıkta yenilemesinde hücre iletimi amacıyla kullanılmaktadırlar. Skafoldlar, kırıkta doku üretimi için ideal bir 3 boyutlu ortam sağlamaktadır. İdeal bir skafold; bozulmayı yönlendirebilmeli ve kontrol edebilmeli, hücre farklılaşmasını ve ekstraselüler matriks üretimini desteklemeli, besinlerin ve artık maddelerin difüzyonuna izin vermeli, doğal kırıkta dokusu ile yapışma ve birleşme özelliklerine sahip olmalı, hücrelerin içerisine yerleştirilmesine uygun olmalı ve defekt yerinin mekanik bütünlüğünü sağlayabilmelidir^{259,260}. Skafold yıkımı enzimatik veya hidrolitik şekilde olabilmektedir.

Bugüne kadar, kırıkta tamirinde skafold işlevi görmesi için birçok doğal ve sentetik madde denenmiştir. Araştırılan doğal polimerlerden birkaçı; aljinat, agaroz, fibrin, hiyalüronik asit, kollajen, jelâtin, kitosan, kondroidin sülfat ve selüloz'dur. Doğal polimerler, sıklıkla yüzey reseptörleri sayesinde hücrelerle etkileşerek, hücre fonksiyonunu direkt olarak düzenleyebilmektedir. Fakat bu etkileşimler esnasında bu polimerlerin immün cevapta artışa yol açabileceği ve bu sayede kullanılan biyomateryal için vücutta antijenite oluşabileceği gösterilmiştir. Sentetik materyaller, doğal polimerlere göre mekanik ve degradasyon karakteristiği açısından da farklılık göstermektedir. Bugüne kadar araştırılmış sentetik polimerlerden birkaçı; polilaktik asit, poliglikolik asit, polilaktik-glikolik asit, polietilen oksit, polipropilen oksit, polietilen glikol polipropilen fumarat ve poliüretanlardır^{261,262,263}. Sentetik polimerler; direkt olarak hücre-skafold etkileşiminde rol oynamamaktadır buna karşın adezyon, hücre sinyalleşmesi, yıkım ve matriks biçimlenmesinde sentetik polimerler rol oynayabilmektedir. Skafoldlar; hidrojeller, süngerler ve fibröz ağlar olmak üzere üç sınıfta incelenmiştir.

- **Hidrojeller:** Hidrojeller; hücrelerin ve biyoaktif ajanların iletişim halinde olmasını sağlayan şişebilen ağlardır. Herhangi bir boyuttaki defektleri kolaylıkla kapatabilmek için enjekte edilebilen hidrojeller minimal invazif bir şekilde

uygulanabilir. Hidrojeller besinlerin ve artık maddelerin difüzyonuna izin verirken hücrelerin 3 boyutlu yapı içinde homojen dağılmasını sağlar²⁶⁴.

Hidrojeller ya fiziksel ya da kimsayal olarak çaprazbağlı jellerdir. Kimyasal çaprazbağlı jeller kovalent bağli iken fiziksel çaprazbağlı jelleri ise iyonik, hidrojen bağli veya hidrofobik etkileşimler gibi ikincil güçler bir arada tutar. Molekül ağırlığı, makromer konsantrasyonu, çapraz yöntemi, çapraz bağ yoğunluğu ve ağ boyutu gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri hidrojelin şişme oranını, mekanik gücünü, hücre canlılığını ve bozulma oranını belirler²⁶⁵.

Polietilenglikol (PEG); göreceli olarak hareketsiz bir polimer olup kondrogenezi destekler. PEG hidrojellere parçalanabilir laktik asitlerin eklenmesi ile hücre proliferasyonu ve ECM sentezi arttırılabilir²⁵⁹.

Kıkırdak doku rejenerasyonunda kullanılan bir diğer polimer olan hiyaluronik asit kıkırdağa özgün lineer bir polisakkarittir. Keratin sülfat ve kondroitin sülfatın bağlanması için temel bir molekül olarak görevi yapar ve hiyalürinidaz enzim ile yıkıma uğrar. HA; hücre çoğalması, morfolojisi, enflamasyon ve yara iyileşmesi gibi hücresel süreçlerde bir rol oynadığı gibi hücre yüzeyinde bulunan reseptörleri (CD44, CD54 ve CD168) sayesinde biyoaktif skafold olarak görev yapar²⁶⁶. HA metakrilat grupları ile modifiye edilebilir. Bu sayede hidrojelin şişme oranı ve hücre canlılığı azalırken, makromer konsantrasyonları, kompresyon modülüsü ve bozulma süresi artar²⁶⁷.

Fibrin yapıştırıcı doğal bir polimer olup trombin ve fibrinojenin polimerizasyonu ile oluşur. Doku yapıştırıcı olarak iyi biyouyumluluk gösterir ve integrin bağlayıcıları ile hücre-matriks etkileşimini kolaylaştırır²⁶⁸. Otolog kandan yapıldığı için doğal bir skafold görevi görür. Tek dezavantajı uygulandığında büzülmeye eğimli olmasıdır. Son zamanlarda fibrin jelin üç hafta boyunca sabit kalmasını sağlamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır²⁶⁹.

Tip 1 kollajen skafoldlar; tam kat kıkırdak defektlerinin otolog kondrosit transferi ile tedavisinde kullanılmıştır²⁷⁰. Aljinat; kahverengi deniz yosunlarında bulunan polianyonik polimerlerdir ve iki değerlikli katyonlarla çapraz bağlanarak kararlı jel haline gelebilir. Aljinat boncuk ve hidrojeller kondrosit genişlemesini ve kök hücrelerin uyarılması için kullanılmaktadır^{271,272}. Son zamanlarda,

araştırmacılar hibrid skafoldlar oluşturmak için aljinat jelleri sentetik adezyon peptitleri ile veya diğer materyallerle modifiye etmeye alışmaktadırlar^{273,274}.

Agaroz; asya yosunlarında üretilmiş ve soğutuldunda katılaşabilen lineer polisakkarittir. Agarozu sık kullanılmasının nedeni hücrelere uygulanacak mekanik yükleri aktarabildiğinden, deformasyon oluşturacak yüklenmelerde kondrosit cevabını ölçebilmek içindir²⁷⁵.

Kitosan bir biyosentetik polisakkarit olup eklem bacaklıların dış iskeletinde bulunan kitinden türevmiştir. Oda sıcaklığında sıvı iken ve fizyolojik sıcaklıklarda bir jel şeklinde dir. Kitosan; biyouyumlu, in vivo şartlarda lizozim ile yıkılabilen, büyüme faktörleri ve adezyon proteinleri ile etkileşime girebilen yarı kristal polimerdir^{276,277}.

- **Süngerler:** Süngerler; poroz skafoldlar olup özellikleri deliklerin boyutuna, gözenekliliğe ve bağlanırlığa göre değişir. Gözeneklilik; hücre adezyonu ile yüzey alanını belirlerken, deliklerin boyutu ve bağlanırlılık ise, hücre infiltrasyonunu, göçünü, matriks depolanmasını ve dağılmasını, besin ve atık değişimini etkiler²⁷⁸. Bugüne kadar sünger üretmek için birkaç yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemler skafoldun mimarisini etkilemiş ve bu sayede skafoldun doku formasyonu değiştirilerek ve büyüme faktörleri kullanılabilir hale gelmiřtir²⁷⁹.

Yine bugüne kadar doku mühendisliğinde birçok sünger kullanılmıştır. Bunlardan birkaçı; poli-alfa-hidroksi esteri, aljinat, poliglaktin/polidioksanon, kitosan, silk fibroin, HA, kollajen ve jelâtidir. Poli-1,8 oktanediol sitrat-POC yeni bir elastomer ürünü olup, eriyebilir şekilde üretildi ve in vitro ortamda kondrosit büyümesini desteklediği görüldü²⁸⁰. Bu POC materyali ile kompresif yüklenme sonucu oluşan deformasyonların tamamen onarılması mümkün hale geldi. Buna ek olarak emilebilir poliglaktin/polidioksanon ise, tam kat kırıkta defektlerinde kullanıldı ve kırıkta dokusunda hızlı iyileşmeyi ve birleşmeyi sağladığı gösterildi²⁶¹. Kitosan; donma-kurutma ve liyofilizasyon işleminden sonra sünger şekline dönüşebilir²⁸¹.

- **Meşler:** Meşler; dokunmuş veya dokunmamış liflerden oluşan ağlardır. Dokunmamış meşler; geniş boş hacmi ve yüzey alanı sayesinde hücre rejenerasyonunu daha rahat sağlarken, dokunmuş meşler daha sağlamdır. En

sık kullanılan meşler poli- α -hidroksi esterleridir. Bu meşler 1990'lerden beri kullanılmaktadır. Bunların içinde en iyi bilinenleri PLA, PGA ve kopolimer olan PLGA'dır. PGA bu grubun en hidrofilik olanı olup tamamen doğal yollardan metabolize olabilmektedir. Diğer taraftan PLA ise yapında metil grubu olduğundan hidrofobiktir ve geç metabolize olur. PGA ve PLA'nın kopolimeri olan PLGA ise mekanik ve metabolize olma bakımından en iyisidir. Shin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kopolimer içine PGA ve PLA %50'li %50 katıldığında yıkımın daha hızlı olduğunu ama PGA'nın %75 ve PLA'nın %25 katıldığında ise yıkımın yavaşladığını göstermişlerdir²⁸².

Poliester skafoldlar, tip II kollajen ve HA gibi biyolojik ajanlar ile modifiye edilebilirler. Tip II kollajen bağlanmış PLLA/PLGA konak doku infiltrasyonu ve kapsül oluşumunu engelleyerek inflamatuvar yanıtı azaltırken, kondrosit çoğalmasını ve GAG depolanması artmıştır. PLGA yüzeyine HA bağlanması ise GAG ve kollajen sentezini arttırmıştır^{283,284}. Ayrıca tavşanlarda yapılan bir çalışmada PLGA skafold içine ekilen MKH'lerin 12 hafta sonra parlak, beyaz hiyalin kıkırdak oluşturduğu gösterilmiştir²⁸⁵.

Sellüloz ve HA türevleri gibi doğal materyaller fibröz skafold olarak kabul edilmişlerdir. Dokunmamış selüloz'a kalsiyum fosfat eklendiğinde hücrelerin daha iyi tutunduğu gösterilmiştir²⁸⁶.

- **Uyarıcı Faktörler:** Doku mühendisliği triadının üçüncü parçası olarak uyarıcı faktörler 2 gruba ayrılmaktadır:

- **Büyüme Faktörleri ve Etkileri**

TGF- β , FGF, BMP ve IGF gibi birçok büyüme faktörü ve HA, kondroitin sülfat ve insülin gibi diğer çözünebilir faktörlerin, kıkırdak doku mühendisliğine etkileri araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda, TGF- β ailesi üyelerinin kıkırdak gelişiminde majör rol oynadığı gösterilmiştir. TGF- β ailesi üyeleri, kıkırdak farklılaşmasını sağladığı, embriyonik ve yetişkin MKH'lerde kıkırdak üretimini ve ekstrasellüler matriks sentezini arttırdığı için yaygın olarak kullanılmaktadırlar²⁸⁷.

TGF- β 1'in öncü hücreler arasındaki etkileşiminden sorumlu iken, TGF- β 2'nin hipertrofik farklılaşmadan ve TGF- β 3'ün de MKH farklılaşmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bir diğer büyüme faktörü olan IGF-1,

proteoglikanların üretimi ve tip2 kollajene dönüşümündeki analobik metabolizmada görev almaktadır^{288,289,290}.

FGF-2, yara iyileşmesinde görevli bir mitojendir. Kondrositlerin tek tabaka haline genişlemesini ve çoğalmasını artırır bu sayede ekstraselüler matriks birikimi artarken ve iyileşmede hızlanmış olur^{291,292,293,294,295}.

BMPler, hem kondrogenezisi, hem de osteogenezisi etkiler ve implant bölgesinde osteokondral birleşmeye yardımcı olduğu için in vivo osteokondral defekt çalışmalarında kullanılabilir. Bu morfojenik proteinler, kondrosit farklılaşmasını ve ekstraselüler matriks kompozisyonunu düzenleyebilmektedir. Özellikle, BMP-2 ve BMP-7'nin kondrositlerde ve öncü hücrelerde matriks üretimini arttırdığı gösterilmiştir. BMP-2; TIMP-1, Sox 9, tip II kollajen ve aggregan üretimlerini artırır, BMP-7 ise proteoglikandan zengin ekstraselüler matriks üretimini artırırken ve skafoldlara fibroblast girişini azaltır²⁹⁶.

2. 4. 5. 1. 7. Gen Tedavisi

Gen tedavisi; viral veya viral olmayan vektörler kullanılarak özel genlerin eklem içerisine doğrudan in-vivo veya dolaylı ex-vivo şekillerde yerleştirilmesini içerir^{297,298,299}. Doğrudan in-vivo yaklaşım, vektörün doğrudan eklem boşluğuna yerleştirilmesi ile olurken; ex-vivo yaklaşımda, vücut dışında genetik yapısı değiştirilmiş hücrelerin vücuda yeniden transferi vardır³⁰⁰.

Hem viral (retrovirüs, adenovirüs gibi) hem de viral olmayan (polimerler ve lipozomlar) ajanlar kullanılabilir. Viral vektörler tipik olarak daha hızlı transfeksiyon gücüne sahip olmakla beraber, daha fazla güvenlik riski taşımaktadır. viral olmayan ajanlar ise daha düşük transfeksiyon gücüne rağmen, daha güvenilirdir. FuGen 6, eklem kondrositlerinde güvenle kullanılabilen bir non-viral ajandır ve bu ajanın IGF-1 ile birlikte kullanıldığında etki gücü %35 arttığı gösterilmiştir³⁰¹.

Transfekte edilen skafoldlarda artmış proliferasyon oranları ve tip II kollajenler ile aggregan artışı gösterilmiştir. Ayrıca, PGA süngerlerle yapılan çalışmalarda, sadece 6 haftada yara iyileşmesi ve defektlerin giderilebildiği gösterilmiştir³⁰². Kıkırdak rejenerasyonu için gen tedavisi henüz çok yeni olmakla beraber, daha iyi araştırmalarla geliştirilebilecek bir tedavi modelidir.

- **Hidrostatik Basınç:** Eklem boşluğunda kırıkdağlar, azalmış oksijen ve aralıklı hidrostatik basınç etkisinde bulunur. İn vitro şartlarda da aynı durum yaratılarak kırıkdağ üretilebileceği düşünülmüştür. Düşük oksijen yoğunluğu (%5) proliferasyonu ve tip II kollajen salınımını ve kırıkdağ spesifik matriks proteini sentezini artırır³⁰³. Kondrositler; 10 MPa basınçta ve 1 Hz'de, günde 4 saat ve haftada 5 gün süreyle tutulduğu zaman; 8 haftada kollajen üretimi artarken ve GAG kaybının azaltıldığı gözlenmiştir³⁰⁴. Bu çalışmalar sonucunda; 0,1 MPa basıncın Sox 9 ve aggrecan madde; 10 MPa basıncın ise tip II kollajen üretimi için ideal basınç değerleri olduğu gösterilmiştir³⁰⁵.

- **Dinamik Kompresyon:** Dinamik kompresif yüklemelerin; kondrosit ve kök hücreler üzerine uyarıcı etkisi olduğunu gösteren önemli kanıtlar bulunmaktadır. Kondrositler kompresif yüklenmelerde sıkışabilmekte ve davranış değişikliği göstermektedirler. Tek bir kez yüklemekten sürekli yüklenmeye kadar değişen birçok yüklenme denenmiştir³⁰⁶. Yüklenme rejimlerinin hücre tipine, ekim yoğunluğuna ve skafolda en uygun hale getirilmesi gerekmektedir. Dinamik kompresif yüklenmeler; agaroz jelde kondrositleri olumlu yönde uyarırken, doku yapıştırıcı jelde etkili olmadığı gösterilmiştir³⁰⁷.

Katabolik ve anabolik etki olarak yeni matriks sentezini artırarak yeniden yapılanmayı sağlar³⁰⁸. Uniaksiyel olarak yapılan tek yüklenmenin (1 kPa, 1 Hz, 30 min) proteoglikan ve kollajen sentezini artırdığı ve mekanik özellikleri geliştirdiği gösterilmiştir³⁰⁹. Ayrıca büyüme faktörleri ile yüklenme arasında sinerjistik etki olduğu görülmektedir. Mauck ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada agaroz jele uygulanan yüklenmeye TGF- β ve IGF eklenmesi ile kollajen içeriğinin ve proteoglikan sentezinin arttığı gösterilmiştir³¹⁰.

- **Biyoreaktörler:** Biyoreaktörler, kırıkdağın in vitro ortamda hızlı büyümesini ve gelişmesini sağlamakla görevlidir. Besin transportu ve hidrodinamik bir ortam sağlanarak kırıkdağ spesifik matriks proteinlerinin sentezine olanak sağlarlar Poroz skafoldlara ekilmiş dinamik hücrelerin daha hızlı tutunduğu ve daha iyi hücre dağılımını olduğu görülmüştür. Bu etkiler

skafold bağımlı olmakla beraber, statik kültürle karşılaştırıldığında artmış hücre proliferasyonu ve biyokimyasal içerik gözlenmiştir³¹¹. Uzun süreli in-vitro kültürlerde düşük makaslama kuvveti ekstraselüler matriks üretimini ve birikimini uyarırken, yüksek makaslama kuvveti ise GAG birikimini baskılamaktadır. Genel olarak, yüksek hücre yoğunluklarında; hücre-hücre etkileşimlerinin daha iyi olması sebebiyle GAG konsantrasyonları da yüksek bulunurken, düşük hücre yoğunluğu olan biyoreaktör kültürlerinde başarısız sonuçlar elde edilmiştir. Şu ana kadar araştırılmış biyoreaktörlerden birkaçı şunlardır: bir paralel biyoreaktör, dönen duvarlı biyoreaktör ve konsantrik silindir biyoreaktör. Yakın zamanda yeni bir dalgalı duvarlı biyoreaktör geliştirilmiş ve bu biyoreaktörle yapılan çalışmalarda artmış kondrosit proliferasyonu ve ekstraselüler matriks depolanması gösterilmiştir. IGF-1 gibi bazı büyüme faktörlerinin de biyoreaktörlere eklenmesi ile oluşturulacak kombinasyonların da kullanılabileceği belirtilmiştir^{312,313,314}.

2. 4. 6. Eklem Kıkırdak Lezyonlarında İyileşmenin Değerlendirilmesi

Kıkırdak iyileşmesinin değerlendirilmesinde görüntüleme yöntemleri, klinik skorlar, artroskopik inceleme gibi dolaylı ve biyomekanik, histolojik ve biyokimyasal yöntemler gibi doğrudan yöntemler vardır³¹⁵. Radyolojik görüntüleme yöntemleri tamir dokusunun durumunu ve kompozisyonunu değerlendirerek biyomekanik, histolojik ve biyokimyasal yapısı hakkında fikir verir. İnvazif olmamaları en büyük avantajlarıdır. Her ne kadar MR görüntüleri son yıllarda gelişen sekanslar sayesinde kıkırdağın durumunu başarı ile yansıtırsa da kıkırdak yaralanmalarında hala altın standard artroskopik prob ile muayenedir³¹⁶. Klinik skorlar hastaların ameliyat sonrası semptom ve işlevsel durumlarının objektif değerlendirilmelerine ve karşılaştırılmalarına olanak verir. Tamir dokusunun yapısı ya da zamana karşı dayanıklılığı konusunda bilgi vermezler. Artroskopik inceleme sırasındaki değerlendirmelerin karşılaştırılabilir olması amacıyla skorlama sistemleri geliştirilmiştir. ICRS ve OAS (Oswestry Artroskopi Skoru) kıkırdak tamirlerinin değerlendirilmesinde güvenilir ve tekrarlanabilir bulunmuştur³¹⁷.

Kıkırdak tedavi yöntemlerinin sonuçlarını değerlendirmede ICRS ve OAS puanlamaları doğrulanmış yöntemlerdir³¹⁸. Bunlara ek olarak Diz Yaralanması ve Osteoartrit Çıktı Skoru (Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score-KOOS) da önerilen doğrulanmış skorlardandır. Değerlendirmede Lysholm diz skoru, Tegner skalası, WOMAC osteoartrit indeksi, Cincinnati skoru ve SF36 gibi genel ya da hastalığa özel skorlar destekleyici olarak kullanılabilir^{120,174}. Skorlamanın ameliyat öncesinde bir defa ve ameliyat sonrasında yılda bir defa yapılarak kaydedilmesi önerilmektedir¹⁷⁵.

Eklem kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan tüm tedavi yöntemlerin de kıkırdak dokunun orijinal kıkırdak alıcı sahası ile bütünleşmesi sorun olabilmektedir. Alıcı doku ile bütünleşme iki şekilde olmaktadır; vertikal ve lateral³¹⁹. Vertikal bütünleşme genellikle sorunsuz gerçekleşirken, lateral bütünleşme kronik bir sorun olmaktadır³²⁰. Bu bütünleşme sürecini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının etik kurallara uygunluğu, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 2010/41 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Çalışma Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Tıbbi Cerrahi Araştırma Ünitesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan denekler dış merkezden temin edilmiştir. Yaşları 1-2 arasında değişen 19 adet koyun kullanılmış, çalışma süresince özel bir ağılda tutulmuş ve kısıtlama yapılmadan standart koyun yemi ve su ile beslenmiştir. Koyunlar 5 farklı grupta toplanmıştır:

1. 4 koyun 'MACI in vivo' (MIV grup) grubunda,
2. 4 koyun MIV+kollajenaz grubunda,
3. 4 koyun MIV+kollajenaz+büyüme faktörleri (BF) grubunda,
4. 4 koyun MACI grubunda,
5. 3 koyun ise kontrol grubunda

kullanılacak şekilde kulaklarında bulunan seri numaralarına göre numaralandırılmıştır. Denek sayısı önceki benzer çalışmalardan edinilen sonuçlar üzerinde yapılan güç analizi sonucu %95 güvenilirlik aralığı verebilecek minimum denek sayısı olarak belirlenmiştir.

Anestezi/Analjezi

MACİ grubundaki deneklere 2 kez, kalan diğer 4 gruptaki deneklere ise 1 kez, aşağıdaki standart cerrahi hazırlıklar uygulanmıştır. Cerrahiden 30 dk önce 10 ml ciltaltı cefquinom (Cobactan LA %7,5, Türkiye) antibiyotik profilaksisi yapılmış ve postoperatif 3 gün boyunca devam edilmiştir. Cerrahi anestezi amacıyla deneklerin kuadriceps kasına önce 0,3 mg/kg intramusküler olarak ksilazin (Rompun, Bayer, Kanada) 15 dakika sonra 2 mg ketamin (Ketalar, Phizer W. Lambert, Türkiye) kullanılmıştır. Cerrahi girişim sırasında anestezi derinliği kalp hızı ya da kan basıncı yöntemi kullanılarak takip edilmiştir. Postoperatif bakım aşamasında hayvanların 24 saat boyunca sessiz ve ılık bir alanda iyileşme sürecini geçirmeleri sağlanmış ve analjezi için 8 cc intramusküler metamizol (Dolarjin, Türkiye) uygulaması yapılmıştır.

Cerrahi Teknik

Anestezi uygulaması sonrası bütün hayvanların sağ dizlerine standart hazırlıklar uygulanmıştır. Bu amaçla, dizler ekstansiyona getirilmiş, traş edilmiş, antiseptik solüsyon uygulanmış ve cerrahi örtüler ile örtülerek, aseptik koşullar sağlanmıştır.

Tüm koyunların sağ dizlerine orta hat insizyonu ile girilerek medial parapatellar artrotomi ile diz eklemlerine ulaşılmıştır. Troklea santral kısmına bistüri ve küret yardımı ile çapı 2,5 cm olan (yaklaşık 5 cm²'lik) daire şekilli, derinliği subkondral kemiğe ulaşan (kalsifiye kıkırdak tabakanın çıkarılmasına özen gösterilerek) kıkırdak defekti oluşturulmuştur. Deney gruplarına uygulanan işlemler aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 6).

1. MİV Grubu: 4 koyun bu gruba dahil edilmiştir. Bu gruptaki deneklerde, denek dizlerine yapılan cerrahi sonrası alınan kıkırdak doku, hassas terazide ölçülerek 200 mg'lık kısım ayrılmıştır. Bu kıkırdak doku bistüri yardımıyla 1 mm³lük küçük parçalar halinde doğranmıştır. Kıkırdak dokunun alındığı kısımda defekt tabanı, kemikten kanama olmamasına dikkat edilerek subkondral kemiğe kadar tekrar küretlenmiştir. Defekt içerisi fibrin yapıştırıcı (Tisseel, Baxter, U.S.A.) doldurularak elde edilen 1 mm³lük kıkırdak parçaları homojen dağılacak şekilde yerleştirilmiştir. Ardından işlemde kullanılacak olan tip I/III kollajen membran (Chondrogide - Geistlich Pharma, Wolhusen, İsviçre) defekt boyut ve seklinde kesilerek pürüzlü yüzeyi defekt tabanına bakacak şekilde kapatılmış, işlem sonrası 5 dakika beklenmiştir. Membranın taşan kısımları makasla traşlanarak patella redükte edilmiştir. Dizin hareketi ile membranın stabilitesi kontrol edilmiş ve diz serum fizyolojik ile yıkanarak sütüre edilmiştir. Deneklerin sağ arka ayaklarının altına tırnaktan tel geçirmek suretiyle tenis topu bağlanmış, bu ekstremiteye yük vermeleri engellenmiştir. 6 hafta sonunda tenis topları çıkartılmış ve koyunların serbest hareket etmelerine izin verilmiştir. 15 haftalık takip süresi sonrasında koyunlar sakrifiye edilip, femur distal kısımları önce fotoğraflanmış, ardından eksize edilerek, histolojik ve biyokimyasal açıdan inceleme için hazırlanmıştır.

2. MİV+ Kollajenaz Grubu: Bu denek grubuna 4 koyun dahil edilmiştir. İlk gruba (MİV grubu) benzer işlemler uygulanmış ancak farklı olarak defekt tabanına, 1 mm³'lük kıkırdak parçaları yerleştirildikten sonra yapıştırılan kollajen membran uygulama öncesi 30 dk boyunca %0,2'lik tip II kollajenaz solüsyonunda (Biochrom AG, Berlin, Germany) bekletilmiş ve sonunda tip II kollajenaz emdirilmiş şekilde uygulanmıştır.

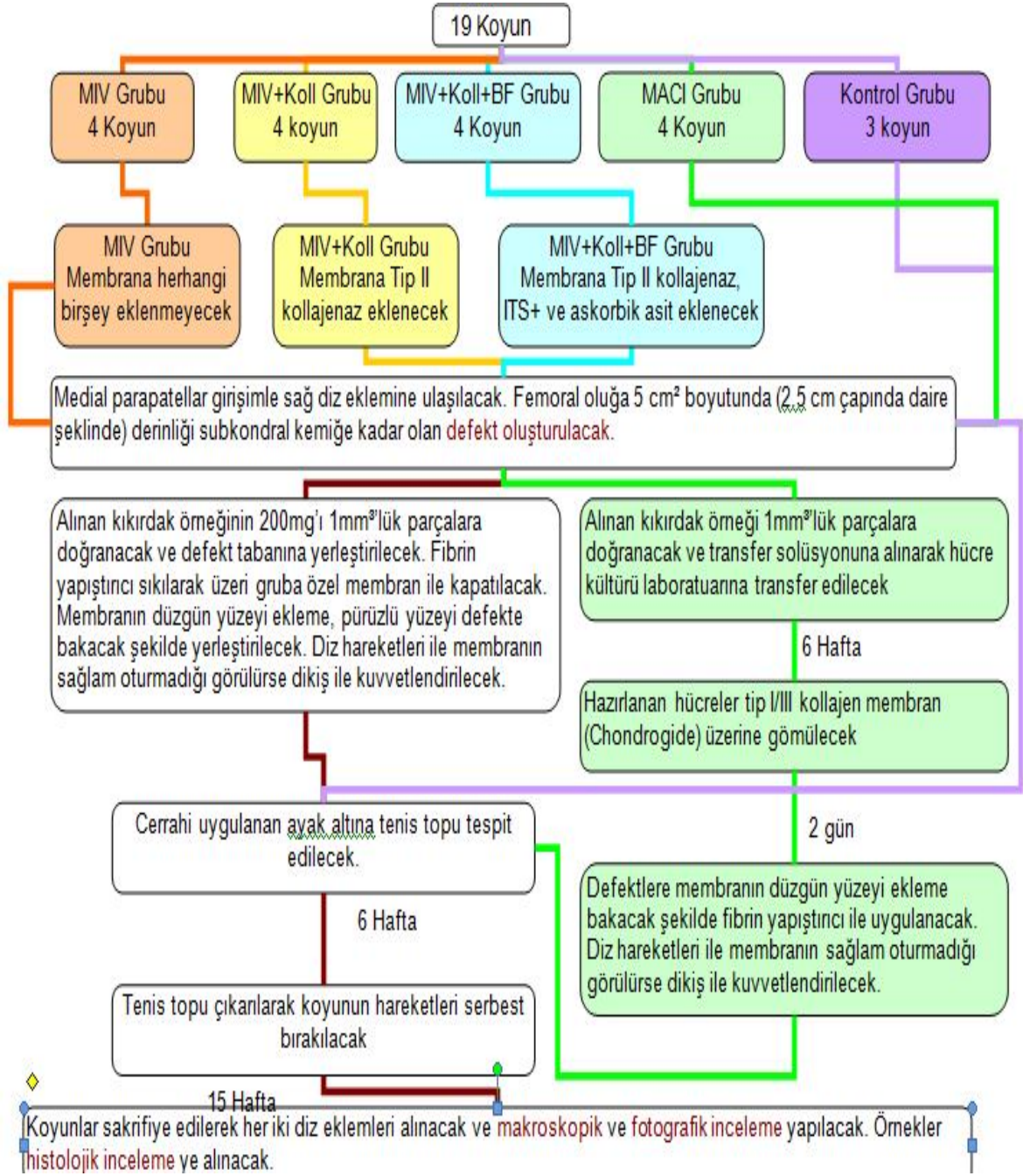
3. MİV+ Kollajenaz + Büyüme Faktörü (BF) Grubu: Deney grubunda 4 adet koyun kullanılmıştır. MIV + Kollajenaz + BF grubunda yukarıdaki MİV+ Kollajenaz grubuna ek olarak kollajen membrana Insulin (1 g/L) – Transferrin (0,55 g/L) – Selenyum (0,00067 g/L) (ITS solution 1% (v/v), Gibco, Invitrogen, NY) ve askorbik asit 50 µg/mL (0,4mL solution, Gibco, Invitrogen, NY) emdirilmiştir.

4. MACİ Grubu: 4 koyun MACİ grubu olarak ayrılmış çıkan kıkırdak parçalar 1mm³ lük parçalar halinde doku transfer solüsyonuna atılarak hücre kültürü laboratuvarına nakledilmiştir.

- **Hücre Kültürü:** Dokular steril PBS ile yıkanıp her parça Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 10% FBS, 1% penicillin – streptomycin, 1% amphotericine B, 2,5% L-glutamine (Biochrom AG, Berlin)) içeren 15 mL'lik falcon tüplerine yerleştirilmiştir. %0,5 kollajenazla 48 saat muamele edilmiş ve her parça bir kültür kabına ekilmiştir. Kültür kaplarına DMEM (10% FBS, 1% penicillin – streptomycin, 1% amphotericine B, 2,5% L-glutamine (Biochrom AG, Berlin) destekli) eklenmiş ve 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. Flasklar konfluense ulaşana dek her 3 - 4 günde bir mediumla beslenmiştir. Süreç sonunda tüm tüplerdeki hücreler tripsinaz ile kaldırılmış, trypan mavisini ile viabilite testi yapılmış ve santrifüj yapılarak pellet haline getirilmiştir. Hücre pelleti 2,5 cm çapında daire şeklinde kesilmiş ve sterilize edilmiş tip I/III kollajen membran (Chondrogide - Geistlich Pharma, Wolhusen, İsviçre)'in pürüzlü tarafına yerleştirilerek 48 - 36 saat daha inkübe edilmiştir. Denek başına ekilen hücre sayısı yaklaşık olarak 2.000.000 (iki milyon) olmuştur.

İkinci uygulama için MACİ grubu deneklere tekrara preoperatif hazırlıklar uygulanmış ve eski medial parapatellar insizyon kullanılarak sağ dizleri açılmıştır. Defekt tabanı, kemikten kanama olmamasına dikkat edilerek subkondral kemiğe kadar tekrar küretlenmiştir. Gelişen kanamalar adrenalini kompres ile durudurularak işleme devam edilmiştir. Defekt tabanına fibrin yapıştırıcı (Surgicell Baxter, ABD) sürülerek MACİ implantının pürüzlü tarafı defekte ve düzgün tarafı eklem boşluğuna bakacak şekilde yerleştirilmiş ve en az 5 dakika beklenmiştir. Membranın taşan kısımları makasla traşlanarak patella redükte edilmiştir. Dizin hareketi ile membranın stabilitesi kontrol edilmiş ve diz serum fizyolojik ile yıkanarak kapatılmıştır. Deneklerin sağ arka ayaklarının altına tırnaktan tel geçirmek suretiyle tenis topu bağlanarak bu ekstremiteye yük vermeleri engellenmiştir. Tenis topları 6 hafta sonra çıkarılarak koyunların hareketi serbest bırakılmıştır. Toplam takip süresi 15 haftayı tamamlayan koyunlar sakrifiye edilerek femur distalleri fotoğraflanmış, femur distalleri eksize edilerek, histolojik ve biyokimyasal açıdan inceleme için hazırlanmıştır.

5. Kontrol Grubu: Kontrol grubunda ise; bu grupta bulunan 3 koyunun tek bir seansta sağ dizlerine defekt uygulanmış, başka ek bir işleme maruz bırakılmamışlardır. 6 hafta yük vermeden mobilize olmaları için sağ ayaklarının altına tenis topu bağlanarak, 6 hafta sonrasında serbest harekete izin verilmiştir. Yine 15 haftalık takip süreci sonunda sağ dizler fotoğraflanarak sakrifiye edilmiştir. Histolojik ve biyokimyasal incelemeler için sağ femur distalleri eksize edilmiştir.



Şekil 6. Deneysel çalışma algoritması

Makroskopik Değerlendirme

19 denek belirtilen süreler sonunda sakrifiye edilmiş. Femur distalleri eksize edilerek öncelikle makroskopik olarak değerlendirilmeye alınmıştır. Bu aşamada puanlama için Rudert tarafından önerilen skorlama sistemi kullanılmıştır (Tablo 9)

Tablo 9: Kıkırdak iyileşme makroskopik değerlendirilmesi için puanlama sistemi.

Kriter	Skor	Makroskopik Özellikler
Doluluk	1	Komşu kıkırdak yüzeyinin önemli oranda aşağısında
	2	Komşu kıkırdak yüzeyiyle aynı seviyede, merkezi çökme
	3	Komşu kıkırdak yüzeyiyle aynı seviyede
Renk	1	Kahverengi veya sarı
	2	Beyaz
	3	Komşu kıkırdakla aynı renkte
Yüzey	1	Pürüzlü
	2	Düzgün, pürüzsüz

Histolojik Değerlendirme

Histolojik inceleme yapılırken sadece defekt alanı çalışmaya dahil edilmemiş, aynı zamanda defekt bölgesine denk gelen kontralateral diz troklear bölgeden ve dizin defekt karşısına denk gelen patellar bölge kıkırdak dokusundan örnekleme yapılmıştır. Deney gruplarında, defekt alanı dışında, kontralateral diz troklear bölge kıkırdak doku ve aynı taraf diz patelladaki sağlam kıkırdak dokunun çalışmaya dahil edilme sebebi tip II kollajenazın eklem kıkırdağına yapabileceği etkinin değerlendirilmesidir. Bu amaçla bu dokularda kıkırdak kalınlığı, hücre yoğunluğu, katman kalınlıkları, tip II kollajen miktarı ve hücre dizilimi histolojik olarak karşılaştırılmıştır. Örnekler %10'luk nötral formaldehit içeren kaplar içerisine konulmuş, bir gecelik formaldehit tespit işlemi

ardından rutin takip işlemine sokulmuştur. Rutin takip işleminde dokular sırasıyla alkol, ksilol ve parafin solüsyonlarında bekletilmişlerdir. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki kesitler hematoksilin eosin ve safranin-o histokimyasal boyaları ile boyanmıştır. Preparatların ışık mikroskopik düzeyde (Nikon Eclipse 80i) incelenmiş, Nikon dijital kamera, DS-L1) dijital kamera yardımı ile fotoğrafıma işlemi yapılmıştır. Işık mikroskopik değerlendirmede semikantitatif modifiye O'Driscoll histomorfometrik skorlama sistemi kullanılmıştır^{292,293}(Tablo 10).

Tablo 10. Modifiye O'Driscoll Skorlama Sistemi

Kategori	Puan
1. Hakim dokunun doğası	
<i>Hücrel morfoloji</i>	
Hyalin artiküler kırkırdak	4
Kısmen farklılaşmış mezankim	2
Fibröz doku ya da kemik	0
2. Yapısal özellikler	
<i>Yüzey düzenliliği</i>	
Düzgün ve sağlam	3
Yüzeyel yatay laminasyon	2
Fissürler: kalınlığın %25-100'ü	1
Belirgin bozulma, fibrilasyon dahil	0
<i>Yapısal bütünlük</i>	
Normal	2
Hafif bozulma, kistler dahil	1
Belirgin bozulma	0
<i>Kalınlık</i>	
Normal komşu kırkırdığın %100'ü	2
Normal kırkırdığın %50-100'ü	1
Normal kırkırdığın %0-50'si	0
<i>Komşu kırkırdığa yapışma</i>	
Greftin iki ucunda yapışma	2
Tek uçta ya da her iki uçta kısmi yapışma	1
Yapışma yok	0
3. Dejenerasyonun hücrel değişikliklerinden bağımsızlık	

<i>Hiposellülarite</i>	
Normal sellülarite	3
Hafif hiposellülarite	2
Orta hiposellülarite	1
Şiddetli hiposellülarite	0
<i>Kondrosit gruplaşması</i>	
Gruplar yok	2
Hücrelerin %25'inden az	1
Hücrelerin %25-100'ü	0
4. Komşu kırıkta dejeneratif değişikliklerden bağımsızlık	
<i>Hücresel özellikler</i>	
Normal sellülarite, gruplaşma yok	3
Normal sellülarite, hafif gruplaşma	2
Hafif ya da orta hiposellülarite	1
Şiddetli hiposellülarite	0
<i>Fibrilasyon</i>	
Fibrilasyon yok	3
Kırıkta kalınlığının %25'inden az	2
Kırıkta kalınlığının %25-50'si	1
Kırıkta kalınlığının %50'sinden fazla	0
5. Osteokondral greft üzerinde fibröz doku tabakası varlığı	evet/hayır
6. Subkondral kemiğin alıcı ile kaynaması	evet/hayır

Dokularda gelişen kırıktağın yapısını belirlemek amacıyla hyalin kırıktağın göstergesi olan tip I ve tip II kollajen içeriği immünohistokimyasal olarak tesbit edilmiştir.

Biyokimyasal Değerlendirme

5 farklı grupta, koyunlar sakrifiye edildikten sonra işlem yapılan dizin femur distali, defekli bölgenin karşısına denk gelen patella ve kontralateral dizde defekt oluşturulan kısma denk gelen bölge örneklem için alınmıştır. Bu

bölgelerden alınan örneklerin yarısı histolojik inceleme için ayrılmıştı. Kalan diğer yarısı glikozaminoglikan (GAG) ve tip II kollajen konsantrasyonu ölçülebilmesi için, GAG ve tip II kollajen ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) kitleri temin edilene kadar biyokimyasal incelemede kullanılmak üzere -80°C 'de saklanmıştır.

Biyokimyasal inceleme için ayrılan doku örnekleri, GAG ve tip II kollajen ELISA kitleri temin edilince, işlem yapmadan bir gece önce -80°C 'den çıkartılarak çözünmesi amacı ile 4°C 'de bekletilmiştir. Dokular çözüldükten sonra, örneklerin yarısı tip 2 kollajen konsantrasyonu, diğer yarısı ise GAG konsantrasyonu ölçülmesi için bölüştürülmüştür.

- **Kollajen Tip 2**

- **Doku Homojenizasyonu:** 100 mg doku 1 ml fosfat tamponu (pH=7,4) kullanılarak homojenize edildikten sonra hücre membranının yıkılması için -20°C'de 1 gece saklanmıştır. Homojenat 5000 devirde 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant çalışma için alınmıştır.

- **Yöntem:** Kollajen tip II (Col II), ELISA yöntemiyle CUSABIO ELISA kitleri kullanılarak çalışılmıştır (Kollajen tip II katalog no: CSB-EQ027291SH). ELISA plakalarındaki kuyucuklar Col II'ye spesifik antikor ile kaplıdır. Örnekler ve standartlar kuyucuklara pipetlenmiş ve immobilize antikora bağlanması sağlanmıştır. Kuyucukların yıkanmasıyla bağlanmamış maddeler uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklara Col II'ye spesifik biotinlenmiş antikor eklenmiştir. Kuyucukların tekrar yıkanmasından sonra kuyucuklara avidin konjuge Horseradish Peroksidaz (HRP) dahil edilmiştir. Bağlanmamış avidin-enzim reaktifinin yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra kuyucuklara substrat solusyonunun eklenmesiyle, başlangıçta bağlanan Col II'nin miktarı oranında renk değişikliği oluşması beklenmiştir.

Stop solusyonunun eklenmesiyle maviden sarıya renk değişikliği olmaktadır ve rengin yoğunluğu 450 nm'de ölçülmüştür.

• Sulfate Glikozaminoglikan

- **Doku örneklerinin Hazırlanması:** 50 mg doku'ya 1 ml ekstraksiyon tamponu (15 mg papain içeren pH'ı 6,4 olan 0,2 M sodyum fosfat tamponu) eklenmiş ve 65°C'de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 10000 devirde 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant çalışma için alınmıştır.

- **Yöntem:** Sulfate Glikozaminoglikan (sGAG) , Blyscan Sulfate Glikozaminoglikan Assay kiti kullanılarak kantitatif dye-binding yöntemle çalışılmıştır.

Tüplere 100 µl örnek ve standartlar pipetlendikten sonra 1 ml Blyscan dye reaktifi eklenerek 30 dakika mekanik çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Bu sürede sGAG-dye kompleksi oluşmuştur.

12000 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant dökülmüş, altta kalan pellete ise bağlanan dye'in çözülmesi için 0,5 ml dissociation (çözünme) reaktifi eklenmiştir. Vorteks ile karıştırıldıktan sonra 200 µl plate alınarak 656 nm'de absorbansları okunmuştur. Daha sonra standart eğri kullanılarak konsantrasyon hesaplanmıştır.

İstatistiksel Değerlendirme

Makroskopik değerlendirme skorları, histomorfometrik skorlar ve tip II kollajen ile GAG konsantrasyonu açısından biyokimyasal değerler 5 farklı grupta istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Dağılımda benzerlik gösteren gruplar Kruskal-Wallis yöntemi kullanılarak belirlendi, farklılık gösteren gruplar ise Mann-Whitney U metodu ile tespit edildi. Anlamlılık düzeyinin 0,05 seviyesinde kalması için Bonferroni ayarı kullanıldı. Grup içi karşılaştırmalar, Wilcoxon işaretli sıra testi (Wilcoxon signed rank test) kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler SPSS (SPSS 16.0, Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. $P < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Takip periodu esnasında; 1. grup (MİV Grubu), 3. grup (MİV+ kollajenaz+ BF Grubu) ve 4. grup (MACİ Grubu)'tan 1'er adet koyun deneyden bağımsız sebeplerle ölmüş dolayısı ile toplam denek sayısı 19'dan 16'ya düşmüştür. Makroskopik skora, histomorfometrik skora ve tip II kollajen ile GAG konsantrasyonu açısından biyokimyasal değerlendirme sonuçları aşağıda (Tablo 11) listelenmiştir.

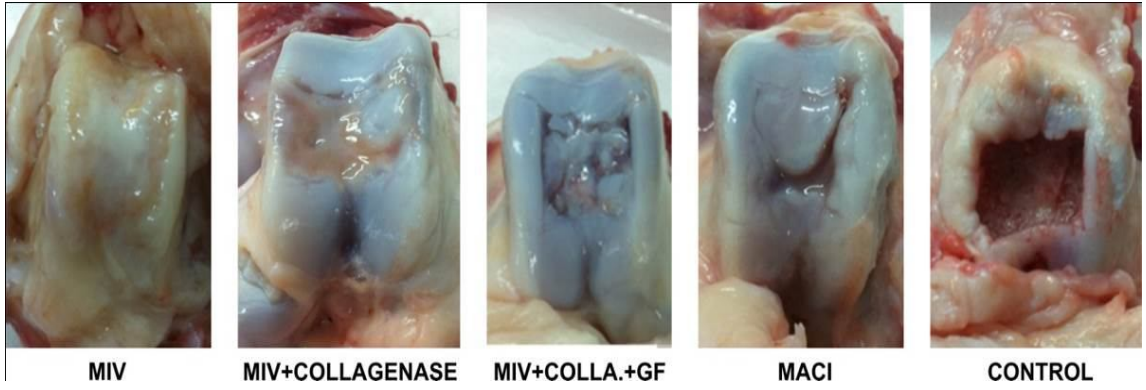
Tablo 11: Sonuçların özeti¹. Defektli alanın histomorfometrik skorlaması.² Kontralateral dizden troklear bölgeden alınan sağlam kıkırdak histomorfometrik skorlaması.³ İpsilateral bölge patellar kıkırdak dokunun histomorfometrik skorlaması.⁴ Defektli alan kıkırdak dokunun GAG konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$).⁵ Kontralateral dizden troklear bölgeden alınan sağlam kıkırdak dokunun GAG konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$).⁶ İpsilateral bölge patellar kıkırdak dokunun GAG konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$).⁷ Defektli alan kıkırdak dokunun tip II kollajen konsantrasyonu (ng/mL).⁸ Kontralateral dizden troklear bölgeden alınan sağlam kıkırdak dokunun tip II kollajen konsantrasyonu (ng/mL).⁹ İpsilateral bölge patellar kıkırdak dokunun tip II kollajen konsantrasyonu (ng/mL).¹⁰ Grup ortalama değerleri.

Denek No	MİV				MİV+KOLLAJENAZ				MİV+KOLLAJENAZ+BF				MACİ				KONTROL				
	1	2	3	ORT ¹	5	6	7	8	ORT	9	11	12	ORT	14	15	16	ORT	17	18	19	ORT
Makroskopik Skor	8	7	4	6	6	5	5	5	5	3	5	3	4	7	5	4	5	3	3	3	3
Histolojik skor: Lezyon ¹	10	8	8	9	6	8	7	7	7	8	8	7	8	10	9	8	9	2	2	2	2
Histolojik skor: Sağlam ²	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Histolojik skor: Patella ³	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
GAG Lezyon ⁴	11.5	11.7	11.3	11.50	11.0	12.2	11.6	10.9	11.43	10.8	9.9	7.6	9.43	11.8	12.1	11.9	11.93	10.4	10.5	10.4	10.43
GAG Sağlam ⁵	9.9	10.7	10.1	10.23	9.5	10.0	12.6	10.9	10.75	9.8	11.3	9.7	10.27	10.2	10.3	9.9	10.13	11.7	11.4	11.8	11.63
GAG Patella ⁶	11.0	10.9	10.8	10.90	11.5	11.9	10.8	11.0	11.30	11.8	10.6	11.9	11.43	11.6	11.0	11.8	11.47	11.5	11.4	11.4	11.43
Kollajen tip II: Lezyon ⁷	22.5	34.7	20.6	25.93	9.2	10.0	8.6	8.0	8.95	7.5	6.7	6.4	6.87	41.8	40.0	41.5	41.10	2.5	2.4	2.5	2.47
Kollajen tip II: Sağlam ⁸	9.0	9.3	7.3	8.53	12.6	6.7	6.7	8.9	8.73	11.3	6.3	8.8	8.80	6.7	6.2	9.4	7.43	8.3	8.5	8.0	8.27
Kollajen tip II: Patella ⁹	8.4	7.9	7.8	8.03	8.9	9.2	7.7	8.6	8.6	7.9	8.6	9.1	8.53	8.	7.8	8.2	8.30	8.5	8.6	8.8	8.63

Makroskopik İnceleme

Makroskopik inceleme için 2 araştırmacı (CY, YSÇ), birbirinden bağımsız olarak preparatları incelemiş ve puanlamıştır. Daha sonra iki araştırmacının ortalama puan değeri kaydedilmiştir.

Gruplar, makroskopik olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunda iyileşme bulgusu gözlenmemiştir. 1. grup (MİV grubu), 2. grup (MİV + kollajenaz grubu) ve 4. grup (MACİ grubu) diğer iki grup olan 3. grup (MİV + kollajenaz + BF grubu) ve 5. grup (kontrol grubu)'dan daha yüksek skorlar almışlardır ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Belirtildiği üzere değerlendirme iki farklı gözlemci tarafından yapılmış, gözlemciler arası güvenilirlik kappa değeri 0,84 olarak hesaplanmıştır. Grupların makroskopik görünümü Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7: Örneklerin makroskopik görünümü. Kontrol grubunda iyileşme gözlenmemiştir. Diğer grumlarda, iyileşme bulguları saptanmıştır. MİV, MİV + Kollajenaz ve MACİ grupları BF eklenen gruba göre daha yüksek puan almışlardır.

Histolojik ve Biyokimyasal İnceleme

Dağılım analizi histomorfometrik skorlarda ($p=0,018$), GAG konsantrasyonlarında ($p=0,018$) ve tip II kollajen konsantrasyonlarında ($p=0,006$) sonuçlarını verdi. Ayrıca farkların kökeni ikili karşılaştırmalarla istatistiksel olarak analiz edildi.

Histolojik kesitler; iki farklı araştırmacı tarafından bağımsız olarak, modifiye O'Driscoll Puanlama Sistemi kullanılarak puanlanmıştır ve her bir

örnek için on kesit kullanılmış ve bu kesitlerin aldığı puanların ortalaması alınmıştır.

Histomorfometrik olarak MİV grubu (skor=9), MACİ grubu (skor=9) ile en yüksek ortalama puanı aldılar. Bu skor, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı görüldü ($p=0,018$). Ancak, MİV ve MACİ gruplarının sonuçları diğer iki grup sonuçlarıyla karşılaştırılınca istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,064$ ve $p=0,197$). Diğer iki tedavi grubu da, tedavi edilmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek skorlar aldılar (MİV + Kollajenez grubu için $p=0,026$, MİV + Kollajenez + BF grubu için $p=0,034$).

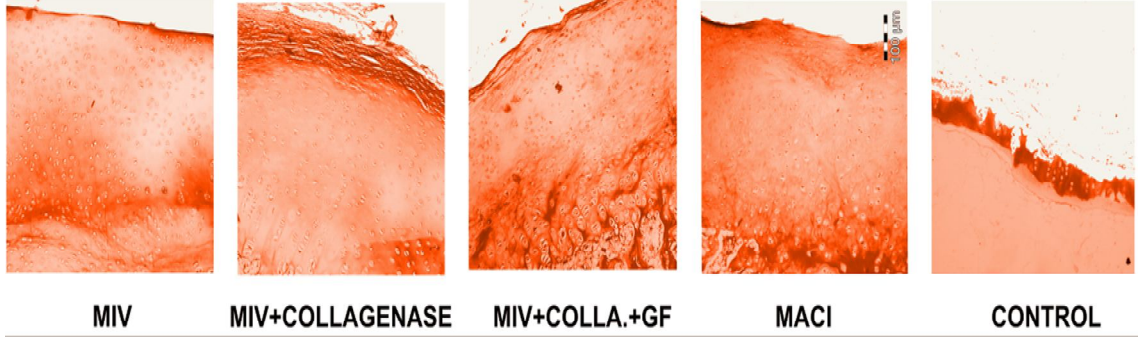
Gruplar içerisinde lezyon oluşturulan bölgedeki kıkırdak doku sonuçları ile sağlam kıkırdak doku sonuçları kıyaslanmak istendiğinde, sıra puanları düşük olmasına rağmen, geçerli bir istatistik karşılaştırma küçük örneklem boyutu nedeniyle yapılamadı. Puanlama işlemi iki farklı araştırmacı tarafından gerçekleştirildi. Gözlemciler arası güvenilirlik kapa değeri 0,84 olarak hesaplandı.

En yüksek doku GAG konsantrasyonu MACİ, MİV ve MİV + kollajenez gruplarında ölçüldü. Bu gruplar ve kontrol grubu arasındaki farklar anlamlı bulundu (sırasıyla $p = 0,046$, $p = 0,046$, $p = 0,032$). MİV + kollajenez + BF grubunda GAG konsantrasyonu kontrol grubuna (istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı) oranla daha düşük ölçüldü. GAG doku konsantrasyonu açısından MACİ, MİV ve MİV + kollajenez grupları arasında fark yoktu. Lezyonlu kısımlardan alınan örneklerdeki GAG konsantrasyonları, aynı deneğin sağlam kıkırdak dokularından (aynı taraf patella ve karşı taraf femoral oluktan alınan örnekler) alınan örneklerdeki GAG konsantrasyonlarından daha yüksekti; ancak örneklem boyutunun küçük olması sebebiyle farkı ortaya koyacak geçerli bir istatistiksel karşılaştırma yapılamadı.

En yüksek tip II kollajen konsantrasyonları MACİ grubunda ölçüldü. MACİ grubunda, MİV grubu hariç ($p=0,05$), diğer tüm gruplara oranla tip II kollajen konsantrasyonu anlamlı derecede yüksek bulundu (kontrol grubu için $p=0,046$, MİV + Kollajenez grubu için $p=0,034$, MİV + Kollajenez + BF için $p=0,034$). MİV grubu, tip II kollajen konsantrasyonu açısından kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p=0,046$), MİV + kollajenez grubuna göre ise yüksek

bulunmuştur ($p=0,034$). MİV + kollajenaz grubunda tip II kollajen konsantrasyonu kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek çıkmıştır ($p=0,032$). MİV + kollajenaz grubunun tip II kollajen konsantrasyonu açısından MACİ ($p=0,034$) ve MİV gruplarına ($p=0,034$) göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir; buradan ortama kollajenaz eklenmesinin olumsuz etkisinin olabileceği sonucuna varılabilir. Ortama büyüme faktörü solüsyonunun eklenmesi sonuçları etkilememiştir, MİV + kollajenaz + BF grubu tip II kollajen konsantrasyonu açısından kontrol grubuna ($p=0,046$) göre anlamlı derecede yüksek değerlere sahipken, diğer gruplara ($p=0,034$) göre ise anlamlı derecede düşük değerlere sahiptir. Kontrol grubunda tip II kollajen konsantrasyonu, lezyonlu kısımdan alınan örneklerde aynı deneğin sağlıklı kısmından alınan örneklerle göre 3 - 4 kat daha düşüktür. MACİ grubunda ise tip II kollajen konsantrasyonu, lezyonlu kısımdan alınan örneklerde yine aynı deneğin sağlıklı kısmından alınan örneklerle göre yaklaşık 5 kat daha yüksektir. Bu oran MİV grubu için üç kattır. MİV + kollajenaz grubunda ise aynı denekten, lezyonlu ve sağlam alandan alınan örneklerde tip II kollajen konsantrasyonu açısından benzer sonuçlar elde edilmiştir. BF eklenen grupta ise aynı kontrol grubunda olduğu gibi tip II kollajen miktarı sağlam kıkırdaktan alınan örnekte lezyonlu örneğe göre daha yüksek sonuç vermiştir. Aynı hayvanın sağlam kıkırdak dokuları arasındaki karşılaştırmalar, örneklem büyüklüğünün yetersiz olması nedeniyle geçerli istatistiksel sonuçlar vermemiştir.

Deneklerde, ipsilateral patella ve karşı taraf femoral oluktan elde edilen sağlam kıkırdak örnekleri makroskopik, histomorfometrik ve biyokimyasal olarak karşılaştırılmıştır. GAG ve tip II kollajen doku konsantrasyonları, kalınlıklar, makroskopik ve mikroskopik görünümler açısından bir farklılık saptanmamıştır. Grupların histolojik mikroskopik görünümleri Şekil 8'de verilmiştir.



Şekil 8: Safranin O boyası kullanılarak örneklerin mikroskopta büyütülmüş histolojik görüntüleri. Kontrol grubunda çok seyrek iyileşme dokusu görülüyor. MİV ve MİV + kollajenaz grupları olgun sütunlu kıkırdak yapısı gösteriyor. MİV + kollajenaz grubunda görülen iyi biçimli kıkırdak yapısı lezyon boyunca homojen olarak seçilemiyordu, ama adacıklar biçiminde preparatların değişik alanlarında görüldü. Bunun aksine MİV grubunda, lezyonlu alan boyunca iyi biçimli kıkırdak yapıları homojen bir şekilde dağılmıştı. MİV + kollajenaz + BF grubu yüzeyinde kollajen membran kalıntıları ile beraber seçilen daha az organize olmuş bir görüntü mevcuttu. MACİ grubunda ise daha az organize ama tatmin edici kalınlıkta iyileşme izlendi. Lezyon alanı boyunca homojen olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA

Kıkırdak dokusu avasküler, anöral ve hiposelüler bir doku olması nedeni ile, travmaya olan yanıt oldukça kısıtlıdır. Hücresel düzeyde cevaba rağmen, intrensek tamir ve küçük lezyonların ilerleyici hasara dönüşmesini engelleme kısıtlı derecede sağlanabilmektedir^{54,55}.

Yaralanma sonucu oluşan defekt ise ya hiç iyileşmemekte ya da fibröz doku veya fibröz kıkırdak olarak iyileşmektedir⁶⁹. Tamir dokusunda eklem kıkırdağının esas içeriği olan hyalin kıkırdak da bulunabilmektedir. Ancak daha çok tip II kollajenin hâkim olduğu hyalin kıkırdak yerine Tip I kollajen yoğunluklu fibröz kıkırdak oluşur ki bu kıkırdak tipi mekanik ve aşınma özellikleri açısından hyalin kıkırdağın yerini tutamamaktadır^{180,321,322}. Kıkırdağın iyileşme problemi vücudun tamir yanıtını destekleyecek yöntemlerin yaygın olarak araştırılmasına neden olmuştur³²³.

Kıkırdak lezyon tedavi yöntemlerinden ACİ'nin ölü boşluk bırakmaması, allojenik doku kullanılmaması ve donör saha morbiditesi olmaması gibi avantajları yanında iki ayrı girişim gerektirmesi, açık cerrahi gerektirmesi, pahalı olması, laboratuara transport gerektirmesi ve kıkırdak oluşumu ile kıkırdak olgunlaşmasının zaman alması gibi dezavantajları vardır^{76,167,168,169}. Standart tek katman hücre kültüründe kondrositler fenotipik olarak farklılaşmaya zorlanmaktadır. Hücre süspansiyonu enjeksiyonu homojen olmayan dağılıma neden olmakta, hücrelerin periost greftinden sızarak kaybı mümkün olmakta ve cerrahi süresi uzun olmaktadır¹⁸. Bu problemlere çözüm amacıyla MACİ yöntemi tarif edilmiştir. ACİ'nin ikinci nesli olarak tarif edilen ve üç boyutlu biyobozunur matrikslerin kullanıldığı MACİ yöntemi klinik kullanıma girmiştir^{17,19}.

Kıkırdak doku mühendisliği, kıkırdak dokusunun hastalara nakledilmek üzere laboratuvar koşullarında veya in vivo olarak oluşturulmasıyla uğraşan bilim dalıdır. Doku mühendisliğinin ilgi alanlarını üç ana başlık altında inceleyebiliriz: Hücreler, matriks ve büyüme faktörleri. Matriksin görevleri, kondrositleri canlı tutarak bu hücrelerin eşit dağılımını sağlamak, erken dönemde bu hücrelere yeterli biyomekanik destek vermek ve kondrosit farklılaşması ile aramada salınımına destek olmaktır. Kondrositler ancak üç

boyutlu bir matriks içinde küresel fenotiplerini, yani farklılaşmış morfolojilerini koruyabilmektedirler. Uzun süreli kültür ortamı kondrositlerin fibroblast morfolojisine dönmelerine ve dolayısıyla daha çok tip I kollajen sentezlemelerine neden olmaktadır²⁰. Üç boyutlu ortamda ise tip II kollajen ve aggregan sentezlemektedirler^{21,22}. Hücrelerin matrikse tutunması gerekir. Tutunmayan hücreler defekt içerisinde duramayarak kaybolacaktır. Ayrıca tutunmayan hücreler çoğalamayıp ve aramaddede üretemeyeceklerdir⁵⁴. Matriksler ve kıkırdak aramaddesi hücreleri defekt içerisinde destekleyecek yapısal çatılar oluşturmaktadır⁵⁴. Matriks olarak en sık kollajen ve hyaluronan temelli malzemeler kullanılmaktadır³²⁴. Hücrelerin eşit dağılımını sağlamak için ilk olarak tip I ve tip III kollajenden oluşan membran kullanılmış, kondrositler bu membran üzerine ekilerek implante edilmişlerdir²³. Kollajen membrana ekilen hücrelerin homojen dağılım gösterdikleri ve kondrosit fenotiplerini korudukları gösterilmiştir²⁴.

Kıkırdak lezyon tedavilerinde eğer hücreler ve büyüme faktörleri kullanılacaksa, iyileşme için hücrelerin ya da büyüme faktörlerinin defekt içerisinde tutunmalarını sağlayacak matrikslere ihtiyaç vardır. Bu amaçla kemik matriksleri, kollajenler, hyaluronan, fibrin, karbon fiberler, poroz polilaktik asit, politetrafloroetilen poliester ve bunlara benzer birçok polimer denenmiştir¹⁸⁰. İdeal bir matriks dokusundan beklenen hücreler kendi çevrelerini oluşturana kadar destek sağlayıcı geçici bir çatı oluşturmalarıdır. Kondrositlerin ise kendi matriksini sentezleyip oluşturduktan sonra yani birkaç ay içerisinde yok olması beklenir^{23,325}. İdeal matriks ayrıca iyi tespit edilebilmeli, hücreleri koruyabilecek mekanik güce sahip olmalı, sitotoksik olmamalı, hücre tutunmasına uygun olmalı, biyobozunur olmalı ve yeni kıkırdak remodele oldukça matriksin yerini alabilmeli ve inflamasyonu uyarmamalıdır¹⁶. Tip I kollajen, fibroblastik hücre morfolojisini uyarmakta ve hücreleri bu yönde yönlendirerek fibröz aramaddede üretmektedir. Tip II kollajen ise kondroblastik morfolojiyi uyarak GAG (glukozaminoglikan) aramaddede üretmeye yönlendirir. Bir matriksin por büyüklüğü azaldıkça (<50 mikrometre) sağlamlığı artar, ancak hücreleri daha çok fibroblastik morfolojiye yönlendirir³²⁶. Kıkırdak lezyon tedavilerinde eklem kıkırdağına en benzer dokuyu elde etmek amaçlanır. Eklem kıkırdağı içeriği

hyalin kıkırdak içeriğine benzemektedir. Hyalin kıkırdak dokusu da yapısal olarak tip II kollajen ve GAG ihtiva etmektedir. Biz de çalışmamızda biyokimyasal olarak tip II kollajen ve GAG konsantrasyonlarını ölçerek bu içeriği ne kadar elde edebildiğimizi sorguladık.

Tavşan, kıkırdak iyileşme konusunda yapılan çalışmalarda en sık kullanılan deney hayvanıdır. Tavşanlar, cerrahi girişim ve örneklerin manipulasyonu için yeterli büyüklüğe sahip ve bu büyüklük için diğer hayvanlarla kıyaslandığında daha ekonomik çözümler oluşturmaktadır³²⁷. Tavşan dizinden alınan 3,5 mm çapındaki kıkırdak dokudan kondrosit üretilmesinde kıkırdak doku yetersizliğine bağlı %50 başarısızlık bildirilmiştir³²⁷. Bu nedenle doku mühendisliği gibi bol kondrosite ihtiyaç duyulan deneylerde model olarak daha büyük hayvanların kullanılması önerilmektedir³²⁷. Daha büyük hayvanların ayrıca cerrahi kolaylığı ve artroskopik girişim imkânı da olabilmektedir. Kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları, alan olarak daha büyük kusurlarda çözüm bulmaya çalışır, dolayısıyla bu tür çalışmalar daha bol miktarda kıkırdak doku gerektirirler. Daha büyük ya da birden fazla defekt için koyun, keçi ya da köpek kullanılabilir. Uluslararası Kıkırdak Araştırmaları Topluluğu (International Cartilage Repair Society-ICRS) kıkırdak defekt modeli olarak keçiyi tavsiye etmektedir³²⁸. Benzer ağırlıktaki koyunun, keçiye oranla daha büyük dize sahip olduğu bilinmektedir, ayrıca koyunların dizlerinin büyüklük, yapı ve iyileşme kapasitesi yönleriyle insan dizine daha çok benzediği bazı çalışmalarda belirtilmiştir^{328,329}. Biz de, koyun modelinin biyokimyasal, biyomekanik, histolojik ve yüzey ince yapısı bakımından insandaki kısmi kalınlık kıkırdak yaralanmalarını başarı ile taklit etmesinden dolayı çalışmamızda denek olarak koyunu tercih ettik^{330,331,332}. 3 mm'den daha küçük çaptaki kıkırdak defektleri kendiliğinden iyileşme eğilimindedir^{333,334}. Daha büyük hayvanlarda, kıkırdak defektlerinde spontan iyileşme sınırı için kritik sınır 6 mm çapa kadar artmaktadır³³⁵. Koyunlarda yapılan çalışmalardan bilindiği kadarıyla 6 mm çapından daha küçük büyüklükteki kıkırdak lezyonlarının spontan iyileştiği bilinmektedir^{336,337}. Bizim çalışmamızda bu bilgiler göz önünde bulundurularak çapı 25 mm olan ve alan olarak yaklaşık 5 cm²'ye tekabül eden defekt oluşturulmuştur. Kendiliğinden bir iyileşmenin olmadığı yaptığımız çalışmada

kontrol grubu ile de teyit edilmiştir. ACİ ve MACİ yöntemleri için endikasyon 2 cm²'den büyük kıkırdak defektleridir³³⁸. 2-5 cm²'lik kıkırdak defektlerinde alternatif tedavi yöntemi OAT'dir³³⁹. Ancak 5cm² üzerindeki kıkırdak lezyonlarında OAT yapılması önerilmemektedir, dolayısıyla ACİ ve MACİ 5cm²'den büyük defektlerde tek çözüm seçeneğidirler. Doğal olarak biz de çalışmamızda yaklaşık 5cm² büyüklüğünde kıkırdak defekti oluşturmayı hedefledik.

Deneysel hayvan modellerinde ortopedik çalışmalar için ağırlık taşıma özelliğinden de ötürü genellikle diz eklemi tercih edilmektedir. Dizde defekt yerleşimi için kullanılacak alanlar troklear oluk, medial ve lateral femoral kondiller, troklear çıkıntı ve patellar eklem yüzeyidir³²⁷. Bunların içerisinde en sık medial femoral kondil ve troklear oluk tercih edilmektedir. Troklear oluk daha düz ve geniş bir yüzey sağladığı, cerrahi olarak kolay ulaşılabildiği ve patellar kıkırdak kadar kalınlıkta kıkırdağa sahip olduğu için tarafımızca tercih edilmiştir^{47,340}. Ancak, patellofemoral yüklenme oranı yüksek olsa da femoral kondillerdeki aksiyel yüklenmenin aksine, troklear olukta kıkırdağa gelen yük makaslama yönündedir⁴⁷. Bu nedenle troklear defektler kondiler defektlerden daha iyi iyileşmektedir³³⁷. Köpek ve keçilerde 6 mm'lik bir defektde troklea yerleşiminde spontan iyileşme görüldüğü ancak aynı boyuttaki defektin medial femoral kondil yerleşiminde iyileşmenin olmadığı bildirilmiştir^{337,341,342}. Trokleada gerçekleşen iyileşme kondil defektlerine kıyasla daha az hyalin kıkırdak, daha çok fibröz doku ve daha az GAG içeriği ile gelişmektedir^{343,344,345}.

Patella, dizdeki en kalın kıkırdağın bulunduğu yüzeydir. Özellikle kondrosit üretilmesi üzerine planlanan ya da benzeri çalışmalarda patella tercih edilmektedir³⁴⁶. Kondrosit üretmek için doku troklear çıkıntılardan elde edilebilmektedir³⁴⁷. Otolog osteokondral greftler ise yine troklear çıkıntılardan alınabildiği gibi, patellar oluktan, karşı diz femoral kondilinden, aynı kondilin kranialinden ya da karşı kompartmandan edinilebilmektedir^{348,349,350}. Ancak bir yandan da eklem kıkırdağında kıkırdak defekti oluştururken aynı zamanda sağlıklı kıkırdak doku da elde etmiş oluruz. Deneysel çalışmamız esnasında başka bir yerden sağlam kıkırdak doku alıp donör saha morbiditesi oluşturmaktansa, kıkırdak defekti oluşturulan bölgeden alınan kıkırdak doku

verici doku olarak kullanılmıştır. MACİ yöntemi için örnek verecek olursak, yeterli miktarda kondrosit üretimi sağlayabilmek için yaklaşık 140-200 mg kıkırdak doku ihtiyacı vardır^{351,352,353,354,355}.

Kıkırdak doku tamirleri için yapılan çalışmalarda oluşturulan defektler genellikle daire şeklindedir. Bazı çalışmalarda uygulanacak tedavi ya da implant şekline özel, üçgen ya da kare gibi defekt şekilleri yaratılmıştır^{356,357}. Kendi çalışmamızda daire şeklinde defekt oluşturmayı tercih ettik.

Deneyimizde klinik senaryo benzerini oluşturmak ve yöntemler arasında karşılaştırma yapabilmek için hem MACİ grubunda hem de MİV grubunda eşit miktarlarda kıkırdak dokusu kullanılmıştır. Fazla olarak artan dokular kullanılmamıştır. Klinik senaryoya uygun olarak; MACİ grubuna iki cerrahi seans, MİV grubuna ise tek cerrahi seans uygulanmıştır. Klinik senaryoya benzetilebilmesi açısından bütün tedavi yöntemlerinin iki seansta yapılması düşünülebilir. Bu amaçla ilk seansta defekt oluşturulacak, ikinci seansta ise yapılması düşünülen tedavi prosedürleri uygulanarak, MİV grubu da dahil olmak üzere, deneyin yaralanma ve tedavi şeklinde iki farklı aşamada gerçekleşen klinik senaryoya benzetilmesi sağlanabilecektir. Ancak biz çalışmamızda hem klinik senaryoyu sağlayabilmek hem de takip sürelerini kısaltabilmek amacı ile ikinci kez operasyona alınan deneklerin kıkırdak defekt bölgelerini debride edip tazeleyerek yeni oluşmuş kıkırdak hasarına benzetmeye çalıştık.

Literatürde kıkırdakla ilgili çalışmalar incelendiğinde, immobilizasyondan yararlanılmadığı görülmektedir^{358,359,360,361}. Denek hayvanı olarak köpekler kullanıldığında, immobilizasyon için eksternal fiksator veya dizi belirli bir süre fleksiyonda tutan ortopedik alçı atel kullanıldığı belirtilmiştir^{362,363}. Maymun deneyinde ise daha özenli bir iyileştirme programı uygulanmış ve cerrahi sonrası 2 hafta 70° fleksiyonda alçı ile immobilizasyon uygulanarak sonrasında tam yük taşıma ve haftada üç defa sedasyon altında hareket arkının %85'ini kazanana kadar pasif egzersiz yapılmıştır³⁶⁴. Koyunların immobilizasyonu için daha çok tercih edilen yöntem ise ağıl boyutlarının küçültülmesidir^{365,366}. Biz çalışmamızda, ağırlık verilmesini önleyen ama bu esnada mobilizasyona ve eklem hareketlerine izin veren eski ve başarılı bir yöntemi kullandık. Bu yöntemde, tenis topu opere edilen arka ekstremitenin altına tırnaktan tel

geçirmek suretiyle bağlanmış, bu sayede ekstremitenin ağırlık taşınması engellenmiş, aynı zamanda cerrahi girişim sonrasında tamir edilen tendonların 6 hafta süre ile dinlenmesi sağlanmıştır³⁶⁷. Tenis topları 6 hafta sonra çıkartılarak koyunların hareketi serbest bırakılmıştır³⁶⁷.

Chondrogide (Geistlich Pharma, Wolhusen, İsviçre) domuz kaynaklı tip I ve tip III kollajenden oluşan iki katmanlı bir membrandır. Tip I kollajenden oluşan düzgün ve tip III kollajenden oluşan pürüzlü yüzeyleri vardır. Düzgün yüzey sıvılara geçirgen ancak hücrelere değildir. Bu yüzey hücrelerin kaybını engellerken inflamatuvar proteinlerin tamir bölgesine girmesine karşı bariyer de oluşturur¹⁸. Pürüzlü yüzey ise hücre tutunmasına ve çoğalmasına olanak verecek matriks özelliğindedir. Kıkırdak matriksi oluştuğunda bozunur³⁶⁸. Hücre ekilerek pazarlanan hali MACİ'dir. (Verigen, Leverkusen, Almanya)²⁰⁸. Tip I/III kollajen membranda hücre farklılaşması hyalüronana kıyasla daha geç, tip II kollajen sentezi daha az olmakta, ancak hücre dizilimi doğal kıkırdağa daha çok benzemektedir. Hyalüronan ve jelâtinde ise hızlı farklılaşma ve yüksek miktarda tip II kollajen sentezi olur. Fakat hücre dağılımı doğal kıkırdağa benzemez³⁶⁹.

Hyalüronik asit bazlı bir skafold olan Hyalograft C, artroskopik uygulama sonucunda üzerine bir dikiş gerektirmeden, hiyalin kıkırdak dokusu ile tamir sonucunda yüksek klinik başarı ile kullanılmaktadır, fakat uzun dönem takipleri bulunmamaktadır^{370,371}.

MACİ'nin orijinal tanımında çift katmanlı I ve III kollajen membran kullanılmaktadır³⁷². Membranın pürüzlü yüzleri gevşek bir yapıya sahiptir. Hücrelerin yapışması, proliferatif olması ve matriks üretimi için bu membran uygun bir yüzey ihtiva eder. Membranın düzgün yüzeyi ise yoğun bir yapıya sahiptir, bu yapı beslenme için besin maddelerinin geçişine izin verirken hücre kaybına imkan vermez¹⁹. Bu çalışmada, orijinal MACİ implantı üretmek için yapılandırılan membran kullanıldı. Kıkırdak dokuların üç boyutlu olarak daha iyi homojen dağılımını sağlayacak diğer maddeler kullanılabilir ancak bu çalışma için değişkenleri asgari sayıda tutmaya çalıştık.

Matür kondrositleri, proliferatif fazdaki kondrositlere dönüştürmekteki en önemli aşama matriks dokunun kaldırılmasıdır³⁷³. Hücre kültür laboratuvarlarında bu aşama tip II kollajenaz enzimi ile aşılanır. Enzim kollajenleri denatüre eder ve

bunun sonucu olarak kondrositler etraf matris dokudan serbestlenmiş olurlar. Uygun koşullar sağlandığında bu kondrositler yüzeyde yeterli miktara ulaşmaya kadar çoğalmaya başlarlar. İn vitro ortamda sağlanan uygun koşullar aynı zamanda in vivo ortamda da sağlanabilmektedir. Ancak esas problem kondrositleri buldukları matris dokudan izole etmekte yaşanmaktadır. Biz çalışmamızda, tip I / III kollajen membranı tip II kollajenaz solüsyonuna batırdık. Bunu yapmamızdaki amaç, gerçekten tip II kollajenaz solüsyonu doku parçalarına etki ederek kollajeni parçalayıp kondrositlerin çoğalmasına ve matris dokularının üretimlerine izin veriyor mu sorusuna cevap aramaktır.

Büyük kırıkta defektleri tedavisinde en başarılı teknik MACİ yöntemi olduğundan, yaptığımız deney sonuçlarını bu yöntemle karşılaştırmayı tercih ettik^{374,375}. Çalışmamızda, beklendiği gibi kontrol grubunda kayda değer herhangi bir iyileşme görülmedi. Tedavi grupları içerisinde en başarılı sonuçlar ise MACİ grubunda elde edilmiştir. Kırıkta doku parçalarının sadece kollajen membranla çevrildiği MİV grubunda ise yine iyi sonuçlar elde edilmiştir. Makroskopik ve histomorfometrik olarak MACİ ve MİV grupları benzer sonuçlar vermiştir. MACİ ve MİV gruplarındaki lezyonlu dokuların GAG konsantrasyonları açısından karşılaştırılmalarında yine benzer sonuçlar alınmıştır ve yine bu gruplardaki lezyonlu dokular aynı deneklerden alınan sağlıklı dokularla da karşılaştırılmış, tamir dokularındaki GAG konsantrasyonları sağlıklı dokulardan daha yüksek bulunmuştur. Bu bahsedilen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ancak şunu da belirtmek gerekir ki sınırlı örneklem büyüklüğü nedeniyle istatistiksel karşılaştırmalar çok güvenilir olmamaktadır. MACİ ve MİV gruplarında tip II kollajen konsantrasyonları sağlam kırıkta doku ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede fazla (3-6 kat) bulunmuştur. MACİ grubunda MİV grubuna göre tip II kollajen konsantrasyonu yüksek bulunmasına rağmen bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ortama kollajenaz eklenmesi beklenen etkiyi göstermemiştir. Kollajenaz eklenen gruplarda makroskopik ve histomorfometrik olarak daha kötü sonuçlarla karşılaşılmıştır. Yine kollajenaz eklenen grupların tamir dokuları GAG konsantrasyonu açısından diğer gruplarla ve sağlıklı dokularla benzer sonuçlar vermesine rağmen, tip II kollajen konsantrasyonu açısından anlamlı belirgin düşük değerler

görülmüştür. Böyle bir sonucun, eklediğimiz kollajenaz solüsyonunun yeni oluşan kıkırdak dokuları da olumsuz etkilediğinden kaynaklandığını düşünüyoruz. Yine kollajenaz eklenen grupta, deneklerin patellasından alınan örnekler,ki buradan alınan örnekler lezyona yerleştirilen membranın karşı yüzüyle temas etmektedir, karşı dizden alınan örnekler ile karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı bir fark gösterilememiştir. Dolayısıyla bu sonuçlardan kollajenaz solüsyonunun etraftaki diğer kıkırdak dokulara kısa dönem olumsuz etkileri olmadığı çıkarımını yapabiliriz.

Büyüme faktörleri, hücre kültürlerinde kondrosit çoğalmasını teşvik etmek ve hızlandırmak için yaygın olarak kullanılırlar. En sık kullanılan büyüme faktörü solüsyonları; insulin, transferrin, selenyum ve askorbik asitten oluşan ITS + askorbik asit solüsyonudur^{376,377}. Çalışmamızda hücre kültürü için tavsiye edilen konsantrasyonlar kullanılmıştır^{376,377}. Tedavi grupları arasında büyüme faktörü kullanılan tedavi grubu en kötü sonuçları vermiştir. Büyüme faktörü eklenen grupta hem GAG konsantrasyonları hem de tip II kollajen konsantrasyonları diğer çalışma gruplarına ve sağlam kıkırdak dokularına göre düşük çıkmıştır. Reaktiflerin biri veya kombinasyonu bu olumsuz etkiye sebep olmuş olabilir ama tam mekanizmanın anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Kıkırdak lezyonlarının iyileşmesi zaman almaktadır. Deneysel çalışmalarda kıkırdak iyileşmesi için takip sürelerini 6 ile 52 hafta arasında değişken şekilde gösteren çalışmalar mevcuttur^{335,340,362,365,366,378,379}. Uzun takip süreleri, iyileşme oranını ve sağlamlığını değerlendirmek için daha iyi olsa da, bu her zaman mümkün olamamaktadır. Kıkırdak doku iyileşmesi üzerine köpeklerde çalışan bir grup yazar minimum takip süresini 15 hafta olarak tavsiye etmişlerdir³⁸⁰. Bizim çalışmamızda 15. haftada sonuçlandırılmıştır. Daha uzun takip süresi daha iyi iyileşme sonuçları verebileceği gibi dejenerasyon ve olumsuz sonuçlar da çıkartabilirdi.

Çalışmamızın en zayıf yanı örneklem büyüklüğünün küçük olmasıdır. Deneysel çalışmada büyük deney hayvanlarının kullanılma zorunluluğu daha büyük kaynaklar gerektirmektedir. Hem ekonomik hem de etik değerler göz önünde bulundurulunca çalışmada daha büyük örneklem için yeterli denek

kullanılmadı ve bu da çalışmamızda istatistiksel değerlendirmede zorluklar oluşturdu.

Çalışmamızın sonucunda MİV tekniğinin MACİ yöntemi ile benzer sonuçlar verdiğini gözlemledik. MİV tekniğinin klinik kullanımı durumunda, tek bir cerrahi oturumda MACİ yöntemine kıyasla daha az maliyetle kıkırdak lezyonlarını tedavi etmek mümkün olacaktır. Kıkırdak lezyonlarının onarımı için tek oturumda gerçekleştirilebilecek diğer bazı seçenekler de vardır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanlardan bir tanesi defektli alanın debride edilip mikrokirik yönteminin uygulanması ve sonrasında ise üzerinin sentetik veya kollajen membranla örtülmesidir³⁸¹. Literatürde bu yöntemin başarısını da yetersizliğini de gösteren çalışmalar mevcuttur ama yine de bu yöntem sıklıkla tercih edilmektedir^{381,382}. Araştırmanın bir sonraki basamağı bahsedilen bu yöntemle çalıştığımız yöntemin karşılaştırılması olabilir.

Maliyet konusunda ise 5 cm²'den büyük kıkırdak defektlerinin tedavisinde, MACİ yöntemine alternatif yöntem olarak gördüğümüz ve hatta MACİ yönteminin bazı dezavantajlarını kaldıracağını ileri sürdüğümüz MİV yöntemi aynı zamanda ekonomik olması açısından da MACİ yöntemine tercih edilebilecektir. MACİ yöntemi için hastalar 6 hafta arayla iki defa cerrahi girişim geçirmektedir. Bu ülkemiz koşulları düşünüldüğünde, cerrahide kullanılacak malzemeler, işgücü kaybı, yatak ücreti vs. gibi konular maliyeti oldukça yüksek tutmaktadır (yaklaşık 15000 TL) ve ayrıca Sağlık Bakanlığı tarafından özel izin alınması gerekliliği bu ameliyatın uygulanmasında karşılaşılan en büyük sorunlardır. MİV yöntemi tek seansta benzer sonuç verebilecek ucuz bir yöntem olarak düşünülerek tasarlanmıştır. Bu nedenle 6 haftalık hücre kültürü ve matrikse gömme işlemine gereksinimi ortadan kaldırmak hedeflenmiştir. Bu yöntemde in vitro kültür süreci in vivo ortama taşınmaktadır. Bu yöntemin MACİ kadar başarılı olması halinde hastalar tek ameliyat geçirerek tedavi olabilecek ve olgu başına en az 10000 TL tasarruf sağlanabilecektir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar özetlenecek olursa;

1. Kıkırdak dokusunun travmaya yanıtı avasküler, anöral ve hiposelüler bir doku olmasından ötürü oldukça kısıtlıdır.
2. ACI ve MACI 5 cm²'den büyük kıkırdak defektlerinde tek çözüm seçeneğidir.
3. ACI yönteminin ölü boşluk bırakmaması, allojenik doku kullanılmaması ve donör saha morbiditesi olmaması gibi avantajları yanında iki ayrı girişim gerektirmesi, açık cerrahi gerektirmesi, pahalı olması, laboratuara transport gerektirmesi ve kıkırdak oluşumu ile kıkırdak olgunlaşmasının zaman alması gibi dezavantajları vardır. Bu problemlere çözüm amacıyla MACI yöntemi tarif edilmiştir.
4. MACI yönteminin de bazı dezavantajları vardır. MACI yöntemi hem iki farklı seansta gerçekleşmekte hem de yüksek maliyete sebep olmaktadır.
5. MİV tekniğinin klinik kullanımı durumunda, tek bir cerrahi oturumda MACI yöntemine kıyasla daha az maliyetle kıkırdak lezyonlarını tedavi etmek mümkün olabilir.
6. Kıkırdak lezyonlarının onarımı için tek oturumda gerçekleştirilebilecek başka seçenekler de vardır. Bunlar arasında en yaygın kullanılanlardan bir tanesi defektli alanın debride edilip mikrokirik yönteminin uygulanması ve sonrasında ise üzerinin sentetik veya kollajen membranla örtülmesidir. Araştırmanın bir sonraki basamağı bahsedilen bu yöntemle çalıştığımız yöntemin karşılaştırılması olabilir.

KAYNAKLAR

1. Lexer E. Substitution of whole or half joints from freshly amputated extremities by free-plastic operation. Surg Gynecol Obstet 1908; 6: 601-607.
2. Judet H. Essai sur la greffe es tissus articulaires. Comp Rend Acad D Sciences 1908; 146: 193-196. Eloesser L, Implantation of Joints, Ca State J Med, 1913;11(12): 485-91
3. Haggart GE. Surgical treatment of degenerative arthritis of the knee joint. JBJS 1940; 22-B: 717-729.
4. Magnuson PB. Joint debridement: surgical treatment of degenerative arthritis. Surg Gynecol Obstet 1941; 73: 1-9
5. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. JBJS. 1959; 41-B: 618-619.
6. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty: historical and pathologic perspective: present status. Arthroscopy 1986; 2: 54-69
7. Friedman MJ, Berasi CC, Fox JM, Del Pizzo W, Snyder SJ, Ferkel R. Preliminary results with abrasion arthroplasty in the osteoarthritic knee. Clin Orthop 1984; 182: 200-205.
8. Steadmann JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ, Microfracture: Surgical Technique and rehabilitation to treat chondral defects, Clin Orthop Relat Res. 2001;(391 Suppl):S362-9.
9. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L., Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J. Med. 1994; 6;331(14): 889-95.
10. Kircher J, Patzer T, Magosch P, Lichtenberg S, Habermeyer P. Osteochondral autologous transplantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the shoulder: results at nine years. J Bone Joint Surg Br 2009;91(4):499-503.

11. Setton LA, Elliott DM, Mow VC. Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *OsteoarthritisCartilage* 1999;7(1):2-14.
12. Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A. Articular cartilage structure, composition and function. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, eds. *Orthopaedic basic science: biology and biomechanics of the musculoskeletal system*. 2nd ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2000.p.443-70.
13. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003;11(6):421- 30.
14. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg [Am]* 1982;64(3):460-6.
15. Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA. Articular cartilage repair and osteoarthritis. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, eds. *Orthopaedic basic science: biology and biomechanics of the musculoskeletal system*. 2nd ed. Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2000.p.471-88.
16. Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, et al. Matrices for cartilage repair. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S271-9
17. Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, et al. Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15(5):610-9.
18. Selmi TA, Verdonk P, Chambat P, et al. Autologous chondrocyte implantation in a novel alginate-agarose hydrogel: outcome at two years. *J Bone Joint Surg Br* 2008;90(5):597-604.
19. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17(6):561-77.
20. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84(4):571-8.)

- 21.** Manfredini M, Zerbinati F, Gildone A, Faccini R. Autologous chondrocyte implantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique. *Acta orthopaedica Belgica*. 2007;73(2):207-18
- 22.** Galois L, Freyria AM, Grossin L, et al. Cartilage repair: surgical techniques and tissue engineering using polysaccharide- and collagen-based biomaterials. *Biorheology*. 2004;41(3-4):433-43.
- 23.** Gikas PD, Bayliss L, Bentley G, Briggs TW. An overview of autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91(8):997-1006.
- 24.** Gigante A, Bevilacqua C, Ricevuto A, Mattioli-Belmonte M, Greco F. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15(1):88-92.
- 25.** Freemont AJ, Hoyland J. Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage, *European Journal of Radiology*, cilt 57: 32-36,2006
- 26.** Hunziker, EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Rech* 28(6):505-19,1994
- 27.** Mescher, LA. Junqueira's Basic Histology, Twelfth Edition, Chapter 7 Cartilage, 2010
- 28.** Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular Cartilage Biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003;11:421-430.
- 29.** Juppner, H. Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatr Nephrol* 14(7):606-11,2000.
- 30.** Katagiri, T. And Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 8(3):147-59,2002.
- 31.** Schumacher BL, Hughes CE, Kuettner KE, Caterson B, Aydelotte MB. Immunodetection and partial cDNA sequence of the proteoglycan, superficial zone protein, synthesized by cells lining synovial joints. *J Orthop Res* 1999;17(1):110– 20.

- 32.** Schumacher BL, Block JA, Schmid TM, Aydelotte MB, Kuettner KE. A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage. *Arch Biochem Biophys* 1994;311(1):144–52.
- 33.** Klein TJ, Schumacher BL, Schmidt TA, et al. Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(8):595–602.
- 34.** Eyre, D. Collogen of articular cartilage, *Arthritis Res.*, 4:30,2002.
- 35.** Mescher, LA. Junqueira's Basic Histology, Twelfth Edition, Chapter 7 Cartilage, 2010
- 36.** Buckwalter JA, Rosenberg LC, Hunziker EB. Articular cartilage: composition, structure and response to injury, and methods of facilitating repair. In: Ewing JW (ed) *Articular cartilage and knee joint function: basic science and arthroscopy*. Raven Press, New York, (1990) p 19–56
- 37.** Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect* 47:477-486, 1998.
- 38.** Meyer U, Wiesmann HP. *Bone and Cartilage Engineering*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2006
- 39.** Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology* Appleton and Lange, 1995, Eighth Edition, p.124-131.
- 40.** Tibesku CO, Szuwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, Van Aken H, Fuchs S. Hyaline Cartilage Degenerates after Autologous Osteochondral Transplantation. *J Orthop Res.* 22: 1210-1214, 2004.
- 41.** Miller MD. *Review of Orthopaedics Fifth Edition* Saunders Elsevier,2008; sayfa39.
- 42.** Stockwell RA. Cartilage failure in osteoarthritis: Relevance of normal structure and function. A review. *Clinical Anatomy* 1991;4: 161-191.
- 43.** Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* 1996;81: 535-545.

- 44.** Hunziker, E.B. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10(6):432-63, 2002.
- 45.** Mow VC, Proctor CS, Kelly MA. Biomechanics of articular cartilage. In: Nordin M, Frankel VH, editors. *Basic biomechanics of the musculoskeletal system*. Philadelphia Lea & Febiger; 1989. p. 31– 57.
- 46.** Stockwell RA, Meachin G. In Freeman MAR. (ed.) *Adult Articular Cartilage*, 2nd edn. Pitman Medical, Tunbridge Wells, 69-144, 1979.
- 47.** Breinan HA, Hsu HP, Spector M. Chondral Defects in Animal Models: Effects of Selected Repair Procedures in Canines. *Clin Orthop*. 39:219-230, 2001.
- 48.** Meyer U, Wiesmann HP. *Bone and Cartilage Engineering*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2006.
- 49.** Browne JE, Branch TP. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg* 2000;8:180-189.
- 50.** Eyre DR, Weis MA, Wu J. Articular cartilage collagen: An irreplaceable framework?, *European Cells and Materials*, cilt12:57-63, 2006
- 51.** Wong M, Wuethrich P, Egli P, Hunziker E. Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *J Orthop Res* 1996;14(3):424– 32.
- 52.** Ateshian GA, Hung CT. The natural synovial joint properties, *Proceedings of Institute of Mechanical Engineers. Part J: Journal of Engineering Tribology*, cilt 220:657-670, 2006.
- 53.** Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64: 460-466.
- 54.** Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, Sah RL, Goomer R, Amiel D. Matrices for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res*. 2001; 271-9.

- 55.** Roughley PJ. Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Res.*2001; 342-7.
- 56.** Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med* 2005;33(2):295-306.
- 57.** Buckwalter JA, Hunziker EB, Rosenberg LC. Articular Cartilage: Composition and Structure. Woo S.L., Buckwalter J.A.(ed) *Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues*. American Academy of Orthopaedics Surgeons, 1988; 405-25.
- 58.** Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular Cartilage, I. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *J Bone Joint Surgery*. Am 1997; 600-11.
- 59.** Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 2000; 37(1-2),129-40.
- 60.** Buckwalter JA, Mow VC. Cartilage Repair in Osteoarthritis. In Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, Mankin HJ (ed.). *Osteoarthritis: Diagnosis and Management* 2nd edn. W.B. Saunders, Philadelphia, 1991;71-107.
- 61.** Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA. Articular cartilage repair and osteoarthritis. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, editors. *Orthopedic basic science: biology and biomechanics of the musculoskeletal system*. Rosemont (IL)7 American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999. p. 472–88.
- 62.** Recht MP, Kramer J, Marcelis S, Pathria MN, Trudell D, Haghghi P, Sartoris DJ, Resnick D. Abnormalities of articular cartilage in the knee: analysis of available MR techniques. *Radiology* 1993;187:473-478.
- 63.** Potter HG, Linklater JM, Allen AA, Hannafin JA, Haas SB. Magnetic resonance imaging of articular cartilage in the knee. An evaluation with use of fast-spin-echo imaging. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:1276-1284.

64. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997;13:456-460
65. Gikas PD, Bayliss L, Bentley G, Briggs TW. An overview of autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91(8):997-1006.
66. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. 2002;18(7):730-4.
67. Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, et al. Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*. 2008;75(5):382-6.
68. Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, Butler DL. Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62(5):687-95, 757.
69. Campbell CJ. The Healing of Cartilage Defects. *Clin Orthop*. 64: 45-63, 1969.
70. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop*. 2003;(407):215-27.
71. Prakash D, Learmonth D. Natural progression of osteo-chondral defect in the femoral condyle. *The Knee*. 2002;9(1):7-10.
72. Kock NB, Smolders JM, van Susante JL, et al. A cadaveric analysis of contact stress restoration after osteochondral transplantation of a cylindrical cartilage defect. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;16(5):461-8.
73. Coons DA, Barber FA. Arthroscopic osteochondral autografting. *The Orthopedic clinics of North America*. 2005;36(4):447-58.
74. Nehrer S, Chiari C, Domayer S, Barkay H, Yayon A. Results of chondrocyte implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: a preliminary study. *Clin Orthop*. 2008;466(8):1849-55.

- 75.** Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop*. 1997;(342):254-69.
- 76.** Bobic V, Noble J. Articular cartilage--to repair or not to repair. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82(2):165-6.
- 77.** Giurea M, Aichroth PM, Duri Z. Classification of articular cartilage lesions of the knee at arthroscopy, *The Knee*, 5, 159-164, 1998.
- 78.** Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Jt Surg* 1961;43B:752-757.
- 79.** Insall J, Falvo KA, Wise DW. Chondromalacia patellae. A prospective study. *J Bone Surg* 1976;58A:1-8.
- 80.** Ficat RP, Philippe J, Hungerford DS. Chondromalacia patellae: a system of classification. *Clin Orthop* 1979;144:55-62.
- 81.** Casscells SW. Chondromalacia of the patella. *J Pediatr Orthop* 1982;2:560-564.
- 82.** Bandi W. Chondromalacia of the patella. Etiology and pathogenesis, clinical aspects, therapy and prognosis. *Z Unfallmed Berufskr* 1982;75:155-160.
- 83.** Dougados M, Ayrat X. Proposition d'un score des lesions cartilagineuses du genou par la Societe Francaise d'Arthroscopie. *Acta Orthop. Belg.* 1994;60:suppl. I.
- 84.** Bentley G, Dowd G. Current concepts of etiology and treatment of chondromalacia patellae. *Clin Orthop* 1984;189: 209-228.
- 85.** Dandy D. *Arthroscopic Management of the Knee*. New York: Churchill Livingstone, 1987.
- 86.** Noyes FR, Stabler CL. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* 1989;17: 505-513.
- 87.** Goodfellow J, Hungerford DS, Zindel M. Patello-femoral joint mechanics and pathology, I: functional anatomy of the patello-femoral joint. *J Bone Jt Surg* 1976;58B:287-290.

- 88.** Bauer MD, Jackson RW. Chondral lesions of the femoral condyles, a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy* 1988;4:97-102.
- 89.** Dzioba RB. The classification and treatment of acute cartilage lesions. *Arthroscopy* 1988;4:72-80.
- 90.** Koshino T, Machida J. Grading system of articular cartilage degeneration in osteoarthritis of the knee. *Bull Hosp Jt Dis* 1993;53:4146.
- 91.** Lewandrowsky KU, Ekkernamp A. Classification of articular cartilage Lesions of the Knee at Arthroscopy. *Am J Knee Surg* 1996;9:121-129.
- 92.** Rutgers M, van Pelt MJ, Dhert WJ, Creemers LB, Saris DB. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Jan; 18(1):12-23. Epub 2009 Sep 2.
- 93.** Mankin HJ, Dorfman H, Lippiello L, Zarins A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am*. 1971;53:523-537.
- 94.** Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006;14: 13-29.
- 95.** O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am*. 1986;68:1017(10)35.
- 96.** Pineda S, Pollack A, Stevenson S, Goldberg V, Caplan A. A semiquantitative scale for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat (Basel)*. 1992;143:335:e40.
- 97.** Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76:579-592.

- 98.** Mainil-Varlet P, Van Damme B, Nestic D, Kuntsen G, Kandel R, Roberts S. A new histology scoring system for the assessment of the quality of human cartilage repair: ICRS II. *Am J Sports Med.* 2010 May;38(5):880-890:Epub 2010 Mar 4.
- 99.** Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP. Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9(Suppl A):S6-15.
- 100.** Arkun R, Imaging of articular cartilage. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41 Suppl 2:32-42.
- 101.** McCauley TR, Recht MP, Disler DG. Clinical imaging of articular cartilage in the knee. *Semin Musculoskelet Radiol* 2001;5(4):293-304.
- 102.** Bohndorf K. Osteochondritis (osteochondrosis) dissecans: a review and new MRI classification. *Eur Radiol* 1998;8(1):103-12.
- 103.** Lecouvet FE, Dorzée B, Dubuc JE, Vande Berg BC, Jamart J, Malghem J. Cartilage lesions of the glenohumeral joint: diagnostic effectiveness of multidetector spiral CT arthrography and comparison with arthroscopy. *Eur Radiol.* 2007 Jul;17(7):1763-1771:Epub 2006 Dec 21.
- 104.** Trattng S, Domayer S, Welsch GW, Mosher T, Eckstein F. MR imaging of cartilage and its repair in the knee—a review. *Eur Radiol.* 2009 Jul;19(7):1582-1594:Epub 2009 Mar 13. Review.
- 105.** Potter HG, Chong le R. Magnetic resonance imaging assessment of chondral lesions and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2009 Feb;91(suppl 1):126-131.
- 106.** White LM, Sussman MS, Hurtig M, Probyn L, Tomlinson G, Kandel R. Cartilage T2 assessment: differentiation of normal hyaline cartilage and reparative tissue after arthroscopic cartilage repair in equine subjects. *Radiology.* 2006 Nov;241(2):407-414.
- 107.** Palmieri F, De Keyzer F, Maes F, Van Breuseghem I. Magnetization transfer analysis of cartilage repair tissue: a preliminary study. *Skeletal Radiol.* 2006 Dec;35(12):903-908.

- 108.** Wheaton AJ, Dodge GR, Elliott DM, Nicoll SB, Reddy R. Quantification of cartilage biomechanical and biochemical properties via T1rho magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 2005 Nov;54(5):1087-1093.
- 109.** Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, Micheli L, Mosely JB Jr, Erggelet C, et al. Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med* 1998;26(6):853-61.
- 110.** Akseki D, Pınar H, Öziç H. Cartilage defects of the knee joint: evaluation, classification, and natural course. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41 Suppl 2:25-31.
- 111.** Binnet MS, Basarir K., Aydın M. Kıkırdak Defektlerinde günümüz tedavi yaklaşımları. *Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol-Special Topics* 2011;4(1)S:13.
- 112.** Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP. Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop.* 2008;466(4):952-62.
- 113.** Freedman BK, Fox JA, Cole BJ. Knee Cartilage: Diagnosis and Decision Making, In: Miller Cole, ed. *Textbook of Arthroscopy.* Philadelphia: WB Saunders;2004.p555-67.
- 114.** Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of cartilage defects. *Orthopaedics* 1997;20:525-38.
- 115.** Sgaglione NA, Miniaci A, Gillogly SD, Carter TR. Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee. *Arthroscopy* 2002;18:9-32.
- 116.** Pearce SG, Hurtig MB, Clarnette R, et al. An investigation of 2 techniques for optimizing joint surface congruency using multiple cylindrical osteochondral autografts. *Arthroscopy* 2001;17(1):50-5.
- 117.** Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, et al. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N.England J. Medicine* 2002;347:81-8.

- 118.** Jackson RW, Dieterichs C. The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up. *Arthroscopy* 2003;19:13-20.
- 119.** Cain EL, Clancy WG. Treatment algorithm for osteochondral injuries of the knee. *Clin Sports Med* 2001;20:321-42.
- 120.** Ritchie P, McCarty EC. Surgical management of cartilage defects in athletes. *Clin Sports Med* 2005;24:163-74.
- 121.** Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S362-9.
- 122.** Millett PJ, Huffard BH, Horan MP, Hawkins RJ, Steadman JR. Outcomes of full-thickness articular cartilage injuries of the shoulder treated with microfracture. *Arthroscopy* 2009;25(8):856-63.
- 123.** Mithoefer K, Williams RJ, Warren RF, et al. Chondral resurfacing of articular cartilage defects in the knee with the microfracture technique. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88 Suppl 1:294-304.
- 124.** Zantop T, Petersen W. Arthroscopic implantation of a matrix to cover large chondral defect during microfracture. *Arthroscopy* 2009;25(11):1354-60.
- 125.** Van Bergen CJ, de Leeuw PA, van Dijk CN. Treatment of osteochondral defects of the talus. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur*. 2008;94(8 Suppl):398-408.
- 126.** Steadman JR, Rodkey WG, Singelton SB, Briggs KK. Microfracture technique for full thickness chondral defects: technique and clinical results. *Oper Techn Orthop*. 1997;7:300-307.
- 127.** Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13(3):213-21.
- 128.** Frisbie DD, Morisset S, Ho CP, et al. Effects of calcified cartilage on healing of chondral defects treated with microfracture in horses. *Am J Sports Med* 2006;34(11):1824-31.

129. Bae DK, Yoon KH, Song SJ. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy* 2006;22(4):367-74.
130. Cole BJ, Lee SJ. Complex knee reconstruction: articular cartilage treatment options. *Arthroscopy* 2003;19 Suppl 1:1-10.
131. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop* 2003;215-27.
132. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, et al. Histological assessment of cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:45-7.
133. Jakobsen R, Engebretsen L, Slauterbeck JR. An analysis of the quality of cartilage repair studies. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:2232-9.
134. Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58(2):230-3.
135. Bobić V. Arthroscopic osteochondral autograft transplantation in anterior cruciate ligament reconstruction: a preliminary clinical study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1996;3(4):262-4.
136. Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993;9(3):318-21.
137. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1997;5(4):262-7.
138. Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, et al. Multiple osteochondral arthroscopic grafting (mosaicplasty) for cartilage defects of the knee: prospective study results at 2-year follow-up. *Arthroscopy* 2005;21(4):462-70.
139. Gross AE. Repair of cartilage defects in the knee. *The journal of knee surgery*. 2002;15(3):167-9.

- 140.** Gautier E, Kolker D, Jakob RP. Treatment of cartilage defects of the talus by autologous osteochondral grafts. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84(2):237-44.
- 141.** Hangody L, Ráthonyi GK, Duska Z, et al. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A Suppl:65-72.
- 142.** Thaunat M, Couchon S, Lunn J, et al. Cartilage thickness matching of selected donor and recipient sites for osteochondral autografting of the medial femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15(4):381-6.
- 143.** Gross AE. Cartilage resurfacing: filling defects. *The Journal of arthroplasty*. 2003;18(3 Suppl 1):14-7.
- 144.** Hangody L, Füles P. 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:25-32.
- 145.** Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, et al. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice. *Orthopedics*. 1998;21(7):751-6.
- 146.** Ohlendorf C, Tomford WW, Mankin HJ. Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res* 1996;14(3):413-6.
- 147.** Ahmad CS, Guiney WB, Drinkwater CJ. Evaluation of donor site intrinsic healing response in autologous osteochondral grafting of the knee. *Arthroscopy* 2002;18(1):95-8.
- 148.** Outerbridge HK, Outerbridge RE, Smith DE. Osteochondral defects in the knee. A treatment using lateral patella autografts. *Clin Orthop* 2000;(377):145-51
- 149.** Barber FA, Chow JC. Arthroscopic chondral osseous autograft transplantation (COR procedure) for femoral defects. *Arthroscopy* 2006;22(1):10-6.

- 150.** Chow JC, Hantes ME, Houle JB, Zalavras CG. Arthroscopic autogenous osteochondral transplantation for treating knee cartilage defects: a 2- to 5-year follow-up study. *Arthroscopy* 2004;20(7):681-90.
- 151.** Terukina M, Fujioka H, Yoshiya S, et al. Analysis of the thickness and curvature of articular cartilage of the femoral condyle. *Arthroscopy* 2003;19(9):969-73.
- 152.** Agneskirchner JD, Brucker P, Burkart A, Imhoff AB. Large osteochondral defects of the femoral condyle: press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002;10(3):160-8.
- 153.** Nakagawa Y, Suzuki T, Kuroki H, et al. The effect of surface incongruity of grafted plugs in osteochondral grafting: a report of five cases. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15(5):591-6.
- 154.** Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(2):185-92.
- 155.** Haklar U, Tuzuner T, Uygur I, Kocaoglu B, Guven O. The effect of overlapping on the primary stability of osteochondral grafts in mosaicplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;16(7):651-4.
- 156.** Makino T, Fujioka H, Terukina M, et al. The effect of graft sizing on osteochondral transplantation. *Arthroscopy* 2004;20(8):837-40
- 157.** Leo BM, Turner MA, Diduch DR. Split-line pattern and histologic analysis of a human osteochondral plug graft. *Arthroscopy* 2004;20 Suppl 2:39-45.
- 158.** Lane JG, Tontz WL, Ball ST, et al. A morphologic, biochemical, and biomechanical assessment of short-term effects of osteochondral autograft plug transfer in an animal model. *Arthroscopy* 2001;17(8):856-63.

- 159.** Kock NB, Van Susante JL, Buma P, Van Kampen A, Verdonschot N. Press-fit stability of an osteochondral autograft: Influence of different plug length and perfect depth alignment. *Acta orthopaedica*. 2006;77(3):422-8.
- 160.** Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br* 1968;50(1):184-97.
- 161.** Bentley G, Greer RB. Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature*. 1971;230(5293):385-8.
- 162.** Grande DA, Singh IJ, Pugh J. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *The Anatomical record*. 1987;218(2):142-8.
- 163.** Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England journal of medicine*. 1994;331(14):889-95.
- 164.** Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 2002;30(1):2-12.
- 165.** Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl:17-24.
- 166.** Jones DG, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(11):2502-20.
- 167.** Browne JE, Anderson AF, Arciero R, et al. Clinical outcome of autologous chondrocyte implantation at 5 years in US subjects. *Clin Orthop* 2005;(436):237-45.
- 168.** Baums MH, Heidrich G, Schultz W, et al. Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(2):303-8.

- 169.** Dozin B, Malpeli M, Cancedda R, et al. Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. 2005;15(4):220-6.
- 170.** Minas T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S349-61.
- 171.** Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000;(374):212-34.
- 172.** Gillogly SD, Voight M, Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *The Journal of orthopaedic and sports physical therapy*. 1998;28(4):241-51.
- 173.** Minas T, Peterson L. Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clinics in sports medicine*. 1999;18(1):13-44, v-vi.
- 174.** Vanlauwe J, Almqvist F, Bellemans J, et al. Repair of symptomatic cartilage lesions of the knee: the place of autologous chondrocyte implantation. *Acta orthopaedica Belgica*. 2007;73(2):145-58.
- 175.** Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *The American journal of knee surgery*. 2000;13(1):41-50.
- 176.** Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L, et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89(10):2105-12.
- 177.** Micheli LJ, Moseley JB, Anderson AF, et al. Articular cartilage defects of the distal femur in children and adolescents: treatment with autologous chondrocyte implantation. *Journal of pediatric orthopedics*. 2006;26(4):455-60.
- 178.** Gillogly SD, Myers TH. Treatment of full-thickness chondral defects with autologous chondrocyte implantation. *Orthop Clin North Am* 2005;36(4):433-46
- 179.** Bentley G, Biant LC, Carrington RW, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85(2):223-30.

- 180.** Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop* 2002;(402):21-37.
- 181.** Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S337-48.
- 182.** Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(3):R560-8.
- 183.** Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl:17-24.
- 184.** Yilmaz BC, Yilmaz C, Yilmaz NS, Balli E, Tasdelen B. Optimal transport time and conditions for cartilage tissue samples and expanded chondrocyte suspensions. *Orthopedics*. 2010;33(1):25-9.
- 185.** Micheli LJ, Browne JE, Erggelet C, et al. Autologous chondrocyte implantation of the knee: multicenter experience and minimum 3-year follow-up. *Clinical journal of sport medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*. 2001;11(4):223-8.
- 186.** Gillogly SD. Treatment of large full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *Arthroscopy* 2003;19 Suppl 1:147-53.
- 187.** Halbrecht JL, Klick BC. Improvement in bone homeostasis following autologous chondrocyte implantation of the knee. *Orthopedics*. 2006;29(1):61-9.
- 188.** Baums MH, Heidrich G, Schultz W, et al. The surgical technique of autologous chondrocyte transplantation of the talus with use of a periosteal graft. *Surgical technique*. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89 Suppl 2:170-82.
- 189.** Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop* 1999;(367 Suppl):S147-55.

- 190.** Krishnan SP, Skinner JA, Bartlett W, et al. Who is the ideal candidate for autologous chondrocyte implantation? *J Bone Joint Surg Br* 2006;88(1):61-4.
- 191.** Briggs TW, Mahroof S, David LA, et al. Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85(7):1077-83.
- 192.** Erggelet C, Kreuz PC, Mrosek EH, et al. Autologous chondrocyte implantation versus ACI using 3D-bioresorbable graft for the treatment of large full-thickness cartilage lesions of the knee. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2009.
- 193.** Kreuz PC, Müller S, Ossendorf C, Kaps C, Erggelet C. Treatment of focal degenerative cartilage defects with polymer-based autologous chondrocyte grafts: four-year clinical results. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(2):R33.
- 194.** Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu H, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res* 2003;21(2):272-81.
- 195.** Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, et al. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med* 2008;36(11):2091-9.
- 196.** Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop* 1996;(326):270-83.
- 197.** Grigolo B, Roseti L, De Franceschi L, et al. Molecular and immunohistological characterization of human cartilage two years following autologous cell transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(1):46-57.
- 198.** Roberts S, Menage J, Sandell LJ, Evans EH, Richardson JB. Immunohistochemical study of collagen types I and II and procollagen IIA in human cartilage repair tissue following autologous chondrocyte implantation. *The Knee*. 2009;16(5):398-404.

- 199.** Briggs TW, Mahroof S, David LA, et al. Histological evaluation of chondral defects after autologous chondrocyte implantation of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85(7):1077-83.
- 200.** Kamarul T, Selvaratnam L, Masjuddin T, et al. Autologous chondrocyte transplantation in the repair of full-thickness focal cartilage damage in rabbits. *Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong)*. 2008;16(2):230-6.
- 201.** Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *The American journal of knee surgery*. 2000;13(1):41-50.
- 202.** Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ, et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(3):503-7.
- 203.** Henderson I, Gui J, Lavigne P. Autologous chondrocyte implantation: natural history of postimplantation periosteal hypertrophy and effects of repair-site debridement on outcome. *Arthroscopy* 2006;22(12):1318-1324.e1.
- 204.** Zaslav K, Cole B, Brewster R, et al. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med* 2009;37(1):42-55.
- 205.** Haddo O, Mahroof S, Higgs D, et al. The use of chondrocyte membrane in autologous chondrocyte implantation. *The Knee*. 2004;11(1):51-5.
- 206.** Kaplonyi G, Zimmerman I, Frenyo AD, Farkas T, Nemes G. The use of fibrin adhesive in the repair of chondral and osteochondral injuries. *Injury*. 1988;19(4):267-72.
- 207.** Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van Der Linden AJ. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 1990;72(6):1003-7.
- 208.** Cherubino P, Grassi FA, Bulgheroni P, Ronga M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg* 2003;11(1):10-5.

- 209.** Gille J, Ehlers E, Okroi M, Russlies M, Behrens P. Apoptotic chondrocyte death in cell-matrix biocomposites used in autologous chondrocyte transplantation. *Annals of anatomy* 2002;184(4):325-32.
- 210.** Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, et al. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87(5):640-5.
- 211.** Behrens P, Ehlers EM, Köchermann KU, et al. [New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging results with autologous chondrocyte implantation]. *MMW Fortschritte der Medizin*. 1999;141(45):49-51.
- 212.** Lubowitz JH, Poehling GG. Saving our cells: advances in tissue engineering for focal cartilage defects. *Arthroscopy* 2009;25(2):115-6.
- 213.** Steinwachs M. New technique for cell-seeded collagen-matrix-supported autologous chondrocyte transplantation. *Arthroscopy* 2009;25(2):208-11.
- 214.** Ronga M, Grassi FA, Bulgheroni P. Arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of a chondral defect in the tibial plateau of the knee. *Arthroscopy* 2004;20(1):79-84.
- 215.** Petersen W, Zelle S, Zantop T. Arthroscopic implantation of a three dimensional scaffold for autologous chondrocyte transplantation. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2008;128(5):505-8.
- 216.** Zheng M, Willers C, Kirilak L, et al. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue engineering*. 2007;13(4):737-46.
- 217.** Brun P, Dickinson SC, Zavan B, et al. Characteristics of repair tissue in second-look and third-look biopsies from patients treated with engineered cartilage: relationship to symptomatology and time after implantation. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(6):R132.
- 218.** Anders S, Schaumburger J, Schubert T, Grifka J, Behrens P. [Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation (MACT). Minimally invasive

technique in the knee]. *Operative Orthopädie und Traumatologie*. 2008;20(3):208-19.

219. Nehrer S, Chiari C, Domayer S, Barkay H, Yaron A. Results of chondrocyte implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: a preliminary study. *Clin Orthop* 2008;466(8):1849-55.

220. Munirah S, Samsudin OC, Chen HC, et al. Articular cartilage restoration in load-bearing osteochondral defects by implantation of autologous chondrocyte-fibrin constructs: an experimental study in sheep. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89(8):1099-109.

221. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation, *European Journal of Radiology* 57 2006-p 24–31.

222. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Baisch A, Sadick H, Verse T, Kluter H, Hormann K, Riedel F. Expression of collagen and fiber-associated proteins in human septal cartilage during in vitro dedifferentiation, *International Journal of Molecular Medicine* 14 (2004) 1015–1022.

223. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Sadick H, Baisch A, Hormann K, Riedel F. In vitro analysis of differential expression of collagens, integrins, and growth factors in cultured human chondrocytes, *Otolaryngology- Head and Neck Surgery* 134 (2006) 510–515.

224. Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Heller T, Sadick H, Hormann K, Riedel F. In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture, *International Journal of Molecular Medicine* 17 (2006) 301–307.

225. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Deml M, Sadick H, Hormann K, Riedel F. In-vitro analysis of the expression of TGF beta-superfamily members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture, *Cellular & Molecular Biology Letters* 10 (2005) 345–362.

- 226.** Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Naim R, Schafer C, Sadick H, Hormann K, Riedel F. Human chondrocytes differentially express matrix modulators during in vitro expansion for tissue engineering, *International Journal of Molecular Medicine* 16 (2005) 509–515.
- 227.** Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, De Souza P, John T, Shakibaei M. Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc–Erk interaction and apoptosis, *Osteoarthritis and Cartilage* 12 (2004) 448–458.
- 228.** Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix, *Journal of Orthopaedic Research* 10 (1992) 745–758.
- 229.** Homicz MR, Chia SH, Schumacher BL, Masuda K, Thonar EJ, Sah RL, Watson D. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture, *Laryngoscope* 113 (2003) 25–32.
- 230.** Lin Z, Willers C, Xu JA, Zheng MH. The chondrocyte: biology and clinical application, *Tissue Engineering* 12 (2006) 1971–1984.
- 231.** Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations, *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2005) 425–432.
- 232.** Darling EM, Hu JCY, Athanasiou KA. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression, *Journal of Orthopaedic Research* 22 2004 1182–1187.
- 233.** Hidaka C, Cheng C, Alexandre D, Bhargava M, Torzilli PA. Maturation differences in superficial and deep zone articular chondrocytes, *Cell and Tissue Research* 323 2006 127–135.
- 234.** Sharma B, Williams CG, Kim TK, Sun DN, Malik A, Khan M, Leong K, Elisseeff JH. Designing zonal organization into tissueengineered cartilage, *Tissue Engineering* 13 (2007) 405–414.
- 235.** Kim TK, Sharma B, Williams CG, Ruffner MA, Malik A, McFarland EG, Elisseeff JH. Experimental model for cartilage tissue engineering to regenerate

the zonal organization of articular cartilage, *Osteoarthritis and Cartilage* 11 2003 p653–664.

236. Van Osch GJVM, Mandl EW, Jahr H, Koevoet W, Nolst-Trenite G, Verhaar JA. Considerations on the use of ear chondrocytes as donor chondrocytes for cartilage tissue engineering, *Biorheology* 41 (2004) 411–421.

237. Kafienah W, Jakob M, Demarteau O, Frazer A, Barker MD, Martin I, Hollander AP. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: comparison of adult nasal and articular chondrocytes, *Tissue Engineering* 8 (2002) 817–826.

238. Isogai N, Kusahara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures, *Tissue Engineering* 12 (2006) 691–703.

239. Tay AG, Farhadi J, Suetterlin R, Pierer G, Heberer M, Martin I. Cell yield, proliferation, and postexpansion differentiation capacity of human ear, nasal, and rib chondrocytes, *Tissue Engineering* 10 (2004) 762–770.

240. Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model, *Arthroscopy* 23 (2007) 178–187.

241. Yates KE, Forbes RL, Glowacki J. New chondrocyte genes discovered by representational difference analysis of chondroinduced human fibroblasts, *Cells Tissues Organs* 176 (2004) 41–53.

242. Johnstone B, Hering TM, Caplan AL, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells, *Experimental Cell Research* 238 (1998) 265–272.

243. English A, Jones EA, Corscadden D, et al. A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis. *Rheumatology* 2007;46(11):1676-83.

244. Concaro S, Hildner F, Peterbauer A, et al. Human adipose-derived stem cells contribute to chondrogenesis in coculture with human articular chondrocytes. *Tissue engineering. Part A.* 2009;15(12):3961-9.

- 245.** Nimura A, Muneta T, Koga H, et al. Increased proliferation of human synovial mesenchymal stem cells with autologous human serum: comparisons with bone marrow mesenchymal stem cells and with fetal bovine serum. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(2):501-10.
- 246.** Gnecci M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2009;482:281-94.
- 247.** Rosset P, Coipeau P. [What's new in fundamental research: osteogenesis and stem cells]. *Revue de chirurgie orthopédique et réparatrice de l'appareil moteur*. 2007;93(4 Suppl):2S55-8.
- 248.** Coleman RM, Case ND, Guldberg RE. Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors, *Biomaterials* 28 (2007) 2077–2086.
- 249.** Pang YG, Cui PC, Chen WX, Gao PF, Zhang HZ. Quantitative study of tissue-engineered cartilage with human bone marrow mesenchymal stem cells, *Archives of Facial Plastic Surgery* 7 (2005) 7–11.
- 250.** Mauck RL, Yuan X, Tuan RS. Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture, *Osteoarthritis and Cartilage* 14 (2006) 179–189.
- 251.** Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies, *Tissue Engineering* 7 (2001) 211–228.
- 252.** Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JL, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Molecular Biology of the Cell* 13 (2002) 4279–4295.
- 253.** Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 343 (2006) 644–652.

- 254.** Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6, *Arthritis and Rheumatism* 54 (2006) 1222–1232.
- 255.** Huang JL, Kazmi N, Durbhakula MM, Hering TM, Yoo JU, Johnstone B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison, *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2005) 1383–1389.
- 256.** Im GL, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13 (2005) 845–853.
- 257.** Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells, *Arthritis and Rheumatism* 48 (2003) 418–429.
- 258.** Toh WS, Yang Z, Liu H, Heng BC, Lee EH, Cao T. Effects of culture conditions and bone morphogenetic protein 2 on extent of chondrogenesis from human embryonic stem cells, *Stem Cells* 25 (2007) 950–960.
- 259.** Bryant SJ, Anseth KS. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 64A (2003) 70–79.
- 260.** Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003;5:235-238.
- 261.** Barnewitz D, Endres M, Kruger L, Becker A, Zimmermann M, Wilke I, Ringe J, Sittinger M, Kaps C. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts, *Biomaterials* 27 (2006) 2882–2889.
- 262.** Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL. Nanofiber technology: designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1413-1433.

- 263.** Geutjes PJ, Daamen WF, Buma P, Feitz WF, Faraj KA, van Kuppevelt TH. From molecules to matrix: construction and evaluation of molecularly defined bioscaffolds. *Adv Exp Med Biol* 2006;585:279-295.
- 264.** Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels, *Journal of Biomedical Materials Research* 59 (2002) 63–72.
- 265.** Bryant SJ, Anseth KS. The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels, *Biomaterials* 22 (2001) 619–626.
- 266.** Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair, *Wound Repair and Regeneration* 7 (1999) 79–89.
- 267.** Burdick JA, Chung C, Jia XQ, Randolph MA, Langer R. Controlled degradation and mechanical behavior of photopolymerized hyaluronic acid networks, *Biomacromolecules* 6 (2005) 386–391.
- 268.** Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (2005) 1894–1904.
- 269.** Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepferich A, Blunk T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering, *Biomaterials* 28 (2007) 55–65.
- 270.** De Franceschi L, Grigolo B, Roseti L, Facchini A, Fini M, Giavaresi G, Tschon M, Giardino R. Transplantation of chondrocytes seeded on collagenbased scaffold in cartilage defects in rabbits, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 75A (2005) 612–622.
- 271.** Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds, *Biomaterials* 25 (2004) 3211–3222.
- 272.** Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290 (2002) 763–769.

- 273.** Connelly JT, Garcia AJ, Levenston ME. Inhibition of in vitro chondrogenesis in RGD-modified three-dimensional alginate gels, *Biomaterials* 28 (2007) 1071–1083.
- 274.** Iwasaki N, Yamane ST, Majima T, Kasahara Y, Minami A, Harada K, Nonaka S, Maekawa N, Tamura H, Tokura S, Shiono M, Monde K, Nishimura SI. Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan, *Biomacromolecules* 5 (2004) 828–833.
- 275.** Mauck RL, Soltz MA, Wang CCB, Wong DD, Chao PHG, Valhmu WB, Hung CT, Ateshian GA. Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels, *Journal of Biomechanical Engineering-Transactions of the Asme* 122 (2000) 252–260.
- 276.** Sechriest VF, Miao YJ, Niyibizi C, Westerhausen-Larson A, Matthew HW, Evans CH, Fu FH, Suh JK. GAG-augmented polysaccharide hydrogel: a novel biocompatible and biodegradable material to support chondrogenesis, *Journal of Biomedical Materials Research* 49 (1999) 534–541.
- 277.** Subramanian A, Lin HY. Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 75A (2005) 742–753.
- 278.** Bhardwaj T, Pilliar RM, Grynblas MD, Kandel RA. Effect of material geometry on cartilagenous tissue formation in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research* 57 (2001) 190–199.
- 279.** Hile DD, Amirpour ML, Akgerman A, Pishko MV. Active growth factor delivery from poly(D,L-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO₂, *Journal of Controlled Release* 66 (2000) 177–185.
- 280.** Kang Y, Yang J, Khan S, Anissian L, Ameer GA. A new biodegradable polyester elastomer for cartilage tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 77A (2006) 331–339.

- 281.** Nettles DL, Elder SH, Gilbert JA. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering, *Tissue Engineering* 8 (2002) 1009–1016.
- 282.** Shin HJ, Lee CH, Cho LH, Kim YJ, Lee YJ, Kim LA, Park KD, Yui N, Shin JW. Electrospun PLGA nanofiber scaffolds for articular cartilage reconstruction: mechanical stability, degradation and cellular responses under mechanical stimulation in vitro, *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 17 (2006) 103–119.
- 283.** Hsu SH, Chang SH, Yen HJ, Whu SW, Tsai CL, Chen DC. Evaluation of biodegradable polyesters modified by type II collagen and Arg-Gly-Asp as tissue engineering scaffolding materials for cartilage regeneration, *Artificial Organs* 30 (2006) 42–55.
- 284.** Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, Park TG. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 1925–1933.
- 285.** Uematsu K, Hattori K, Ishimoto Y, Yamauchi J, Habata T, Takakura Y, Ohgushi H, Fukuchi T, Sato M. Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells and a three-dimensional poly-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold, *Biomaterials* 26 (2005) 4273–4279.
- 286.** Muller FA, Muller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 3955–3963.
- 287.** Rosier RN, O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE. Transforming growth factor beta: an autocrine regulator of chondrocytes, *Connective Tissue Research* 20 (1989) 295–301.
- 288.** Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ, Danielson KG, Hall DJ, Tuan RS. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 41227–41236.

- 289.** Gooch KJ, Kwon JH, Blunk TR, Langer R, Freed LE, Vunjak- Novakovic G. Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage, *Biotechnology and Bioengineering* 72 (2001) 402–407.
- 290.** Roberts AB, Kondaiah P, Rosa F, Watanabe S, Good P, Danielpour D, Roche NS, Rebbert ML, Dawid IB, Sporn MB. Mesoderm induction in *Xenopus laevis* distinguishes between the various TGF-beta isoforms, *Growth Factors* 3 (1990) 277–286.
- 291.** Martin I, Suetterlin R, Baschong W, Heberer M, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation, *Journal of Cellular Biochemistry* 83 (2001) 121–128.
- 292.** Miot S, De Freitas PS, Wirz D, Daniels AU, Sims TJ, Hollander AP, Mainil-Varlet P, Heberer M, Martin I. Cartilage tissue engineering by expanded goat articular chondrocytes, *Journal of Orthopaedic Research* 24 (2006) 1078–1085.
- 293.** Schmal H, Mehlhorn AT, Zwingmann J, Muller CA, Stark GB, Sudkamp NP. Stimulation of chondrocytes in vitro by gene transfer with plasmids coding for epidermal growth factor (hEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF), *Cytherapy* 7 (2005) 292–300.
- 294.** Stevens MM, Marini RP, Martin I, Langer R, Shastri VP. FGF-2 enhances TGF-beta 1-induced periosteal chondrogenesis, *Journal of Orthopaedic Research* 22 (2004) 1114–1119.
- 295.** Veilleux N, Spector M. Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro, *Osteoarthritis and Cartilage* 13 (2005) 278–286.
- 296.** Park Y, Sugimoto M, Watrin A, Chiquet M, Hunziker EB. BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel, *Osteoarthritis and Cartilage* 13 (2005) 527–536.

- 297.** Evans CH, Gouze JN, Gouze E. Osteoarthritis gene therapy. *Gene Ther* 2004;11:379–389.
- 298.** Chen AC, Nagrampa JP, Schinagl RM, Lottman LM, Sah RL. Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro. *J Orthop Res* 1997;15: 791-802.
- 299.** Saraf A, Mikos AG. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006) 592–603.
- 300.** Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* 2008;39:97-113.
- 301.** Madry H, Kaul G, Cucchiarini M, Stein U, Zurakowski D, Remberger K, Menger MD, Kohn D, Trippel SB. Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I), *Gene Therapy* 12 (2005) 1171–1179.
- 302.** Grande DA, Mason J, Light E, Dines D. Stem cells as platforms for delivery of genes to enhance cartilage repair, *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 85A (2003) 111–116.
- 303.** Scherer K, Schunke M, Sellckau R, Hassenpflug J, Kurz B. The influence of oxygen and hydrostatic pressure on articular chondrocytes and adherent bone marrow cells in vitro, *Biorheology* 41 (2004) 323–333.
- 304.** Hu JC, Athanasiou KA. The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs, *Tissue Engineering* 12 (2006) 1337–1344.
- 305.** Miyanishi K, Trindade MCD, Lindsey DP, Beaupre GS, Carter DR, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Dose- and time-dependent effects of cyclic hydrostatic pressure on transforming growth factor-beta 3-induced chondrogenesis by adult human mesenchymal stem cells in vitro, *Tissue Engineering* 12 (2006) 2253–2262.
- 306.** Davisson T, Kunig S, Chen A, Sah R, Ratcliffe A. Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage, *Journal of Orthopaedic Research* 20 (2002) 842–848.

- 307.** Hunter CJ, Mouw JK, Levenston ME. Dynamic compression of chondrocyte-seeded fibrin gels: effects on matrix accumulation and mechanical stiffness, *Osteoarthritis and Cartilage* 12 (2004) 117–130.
- 308.** De Croos JNA, Dhaliwal SS, Gryn timer MD, Pilliar RM, Kandel RA. Cyclic compressive mechanical stimulation induces sequential catabolic and anabolic gene changes in chondrocytes resulting in increased extracellular matrix accumulation, *Matrix Biology* 25 (2006) 323–331.
- 309.** Waldman SD, Couto DC, Gryn timer MD, Pilliar RM, Kandel RA. A single application of cyclic loading can accelerate matrix deposition and enhance the properties of tissue-engineered cartilage, *Osteoarthritis and Cartilage* 14 (2006) 323–330.
- 310.** Mauck RL, Nicoll SB, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering, *Tissue Engineering* 9 (2003) 597–611.
- 311.** Freed LE, Marquis JC, Vunjaknovakovic G, Emmanuel J, Langer R. Composition of cell-polymer cartilage implants, *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994) 605–614.
- 312.** Hu JC, Athanasiou KA. Low-density cultures of bovine chondrocytes: effects of scaffold material and culture system, *Biomaterials* 26 (2005) 2001–2012.
- 313.** Gemmiti CV, Guldb erg RE. Fluid flow increases type II collagen deposition and tensile mechanical properties in bioreactor-grown tissue engineered cartilage, *Tissue Engineering* 12 (2006) 469–479.
- 314.** Saini S, Wick TM. Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development, *Biotechnology Progress* 19 (2003) 510–521.
- 315.** Schachar NS, Novak K, Muldrew K, Zernicke RF, McGann LE. Articular cartilage joint surface reconstruction techniques. *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 1999;4(6):457-61.

- 316.** Riyami M, Rolf C. Evaluation of microfracture of traumatic chondral injuries to the knee in professional football and rugby players. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2009;4:13.
- 317.** Smith GD, Taylor J, Almqvist KF, et al. Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy* 2005;21(12):1462-7.
- 318.** Van den Borne MP, Raijmakers NJ, Vanlauwe J, et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis and cartilage / OARS*. 2007;15(12):1397-402.
- 319.** Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW. Cartilage integration: Evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *European cells and materials* 2008;16:26-39.
- 320.** Tognana E, Chen F, Padera RF, Leddy HA, Christensen SE, Guilak F, Vunjak-Novakovic G, Freed LE. Adjacent tissues (cartilage, bone) affect the functional integration of engineered calf cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:129-138.71.
- 321.** Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular Cartilage II: Degeneration and Osteoarthrosis, Repair, Regeneration and Transplantation. *J Bone Joint Surg*. 79A:612-632, 1997.
- 322.** Buckwalter JA, Mow VC. Cartilage Repair in Osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, (eds) *Osteoarthritis: Diagnosis Andmanagement*. Saunders, Philadelphia, pp: 71-107, 1992.
- 323.** Sah RL, Klein TJ, Schmidt TA, Albrecht DR, Bae WC, McGowan KB, Temple MM, Jadin KD, Schumacher BL, Chen AC, Sandy JD. Articular Cartilage Repair, Regeneration, and Replacement. In: Koopman WJ, (eds) *Arthritis and Allied Conditions. A Textbook of Rheumatology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp: 2277-2301, 2004.

- 324.** Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2009;17(6):561–77.
- 325.** Bell E. Strategy for the selection of scaffolds for tissue engineering. *Tissue engineering*. 1995;1(2):163-79.
- 326.** Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, et al. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*. 1998;19(24):2313-28.
- 327.** An YH, Friedman RJ. Animal Models of Articular Cartilage Defect. In: An YH, Friedman RJ, (eds) *Animal Models in Orthopaedic Research*. CRC Press LLC, Boca Raton, pp: 309 - 325, 1999.
- 328.** Lu Y, Markel MD, Swain C, Kaplan LD. Development of partial thickness articular cartilage injury in an ovine model. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2006;24(10):1974–82.
- 329.** Siebert CH, Schneider U, Sopka S, Wahner T, Miltner O, Niedhart C. Ingrowth of osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2006;126(4):247–52.
- 330.** Lu Y, Markel MD, Swain C, Kaplan LD. Development of Partial Thickness Articular Cartilage Injury in an Ovine Model. *J Orthop Res*. 24:1974-1982, 2006.
- 331.** Siebert CH, Schneider U, Sopka S, Wahner T, Miltner O, Niedhart C. Ingrowth of Osteochondral Grafts under the Influence of Growth Factors: 6-Month Results of an Animal Study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 126:247-252, 2006.
- 332.** Stuetzle H, Hallfeldt K, Keßler S, Schweiberer L. Experimentelle Und Klinische Ergebnisse Mit Teildemineralisierter Knochenmatrix. In: Schnettler R, Markgraf E, (eds) *Knochenersatzmaterialien Und Wachstumsfaktoren*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp: 85-89, 1997.

- 333.** Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clinical orthopaedics and related research*. 1972;82(253-62):253–62.
- 334.** Butnariu-Ephrat M, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clinical orthopaedics and related research*. 1996;330(330):234–43.
- 335.** Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, et al. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*. 1998;19(24):2313–28.
- 336.** Shahgaldi BF, Amis AA, Heatley FW, McDowell J, Bentley G. Repair of cartilage lesions using biological implants. A comparative histological and biomechanical study in goats. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 1991;73(1):57–64.
- 337.** Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2001;83-A(1):53–64.
- 338.** Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001;(391 Suppl):S337–48.
- 339.** Cole BJ, Lee SJ. Complex knee reconstruction: articular cartilage treatment options. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2003;19 Suppl 1:1–10.
- 340.** Breinan HA, Hsu HP, Spector M. Chondral defects in animal models: effects of selected repair procedures in canines. *Clinical orthopaedics and related research*. 2001;39(391 Suppl):S219–30.
- 341.** Huibregtse BA, Samuels JA, O’Callaghan MW. Development of a Cartilage Defect Model of the Knee in the Goat for Autologous Chondrocyte Implantation Research. *Trans Orthop Res Soc*. 25:797, 1999.

- 342.** Breinan HA, Minas T, Barone L, Tubo R, Hsu HP, Shortkroff S, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Histological Evaluation of the Course of Healing of Canine Articular Cartilage Defects Treated with Cultured Autologous Chondrocytes. *Tissue Eng.* 4:1998.
- 343.** Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of Cultured Autologous Chondrocytes on Repair of Chondral Defects in a Canine Model. *J Bone Joint Surg.* 79A:1439-1451, 1997
- 344.** Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, Buschmann MD. Chitosan-Glycerol Phosphate/Blood Implants Improve Hyaline Cartilage Repair in Ovine Microfracture Defects. *J Bone Joint Surg.* 87A:2671-2686, 2005.
- 345.** Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. Effects of Lesion Size and Location on Equine Articular Cartilage Repair. *Can J Vet Res.* 52:137-146, 1988.
- 346.** Aroen A, Heir S, Loken S, Reinholt FP, Engebretsen L. Articular Cartilage Defects in a Rabbit Model, γ -irradiation Retention Rate of Periosteal Flap Cover. *Acta Orthop.* 76:220-224, 2005.
- 347.** Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Martin SD, Spector M. Effects of Harvest and Selected Cartilage Repair Procedures on the Physical and Biochemical Properties of Articular Cartilage in the Canine Knee. *J Orthop Res.* 18:790-799, 2000.
- 348.** Siebert CH, Schneider U, Sopka S, Wahner T, Miltner O, Niedhart C. Ingrowth of osteochondral grafts under the influence of growth factors: 6-month results of an animal study. *Archives of orthopaedic and trauma surgery.* 2006;126(4):247–52.
- 349.** Nam EK, Makhsous M, Koh J, Bowen M, Nuber G, Zhang L-Q. Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model. *The American journal of sports medicine.* 2004;32(2):308–16.

- 350.** Pearce SG, Hurtig MB, Clarnette R, Kalra M, Cowan B, Miniaci A. An Investigation of 2 Techniques for Optimizing Joint Surface Congruency Using Multiple Cylindrical Osteochondral Autografts. *Arthroscopy*. 17:50-55, 2001.
- 351.** Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2003;85-A(2):185–92.
- 352.** Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *The American journal of sports medicine*. 30(1):2–12.
- 353.** Jones DG, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2006;88(11):2502–20.
- 354.** Bentley G, Biant LC, Carrington RWJ, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 2003;85(2):223–30.
- 355.** Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clinical orthopaedics and related research*. 2002;(402):21–37.
- 356.** Tytherleigh-Strong G, Hurtig M, Miniaci A. Intra-Articular Hyaluronan Following Autogenous Osteochondral Grafting of the Knee. *Arthroscopy*. 21:999-1005, 2005
- 357.** Kuroki H, Nakagawa Y, Mori K, Ohba M, Suzuki T, Mizuno Y, Ando K, Takenaka M, Ikeuchi K, Nakamura T. Acoustic Stiffness and Change in Plug Cartilage over Time after Autologous Osteochondral Grafting: Correlation between Ultrasound Signal Intensity and Histological Score in a Rabbit Model. *Arthritis Res Ther*. 6:R492-504, 2004.
- 358.** Mendelson S, Wooley P, Lucas D, Markel D. The effect of hyaluronic acid on a rabbit model of full-thickness cartilage repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004;(424):266–71.

- 359.** Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, et al. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous mesenchymal cells derived from bone marrow. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2004;43(8):980–5.
- 360.** Cohen SB, Meirisch CM, Wilson HA, Diduch DR. The use of absorbable co-polymer pads with alginate and cells for articular cartilage repair in rabbits. *Biomaterials*. 2003;24(15):2653–60.
- 361.** Rudert M, Wilms U, Hoberg M, Wirth CJ. Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2005;125(9):598–608.
- 362.** Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Martin SD, Spector M. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2000;18(5):790–9.
- 363.** Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu H-P, Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2003;21(2):272–81.
- 364.** Gill TJ, McCulloch PC, Glasson SS, Blanchet T, Morris EA. Chondral Defect Repair after the Microfracture Procedure: A Nonhuman Primate Model. *Am J Sports Med*. 33:680-685, 2005.
- 365.** Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E, Sun J, Chevrier A, Shive MS, et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. 2005;87(12):2671–86.
- 366.** Pearce SG, Hurtig MB, Clarnette R, Kalra M, Cowan B, Miniaci A. An investigation of 2 techniques for optimizing joint surface congruency using multiple cylindrical osteochondral autografts. *Arthroscopy : the journal of*

arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association. 2001;17(1):50–5.

367. Schlegel TF, Hawkins RJ, Lewis CW, Turner AS. An in vivo comparison of the modified Mason-Allen suture technique versus an inclined horizontal mattress suture technique with regard to tendon-to-bone healing: a biomechanical and histologic study in sheep. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons et al.* 16(1):115–21.

368. Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Annals of anatomy* 2000;182(4):303-10.

369. Schlegel W, Nürnberger S, Hombauer M, et al. Scaffold-dependent differentiation of human articular chondrocytes. *International journal of molecular medicine.* 2008;22(5):691-9.

370. Marcacci M, Zaffagnini S, Kon E. Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002;10:154-159.

371. Gobbi A, Kon E, Berruto M, Francisco R, Filardo G, Marcacci M. Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with Hyalograft-C: a clinical, arthroscopic and histologic review. *Am J Sports Med* 2006;34:1763-1773.

372. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, David L, Pringle J, Bayliss M, et al. The use of chondroglide membrane in autologous chondrocyte implantation. *The Knee.* 2004;11(1):51–5.

373. Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clinical orthopaedics and related research.* 2001;(391 Suppl):S337–48.

- 374.** Bartlett W, Skinner JA, Gooding CR, Carrington RWJ, Flanagan AM, Briggs TWR, et al. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* 2005;87(5):640–5.
- 375.** Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *The Knee.* 2006;13(3):194–202.
- 376.** Gregory C, Drockop D. Fundamentals of culture and characterization of mesenchymal stem / progenitor cells (MSCs) from bone marrow stroma. In: Freshney R, Stacey G, Auerbach J, editors. *Culture of human stem cells.* New Jersey: Interscience; 2007. page 207 – 233.
- 377.** Freshney I. Serum-free media culture of animal cells. *A manual of basic technique.* 5th ed. New Jersey: John Wiley & Sons Inc.; 2005. page 129 – 143.
- 378.** Glenn RE, McCarty EC, Potter HG, Juliao SF, Gordon JD, Spindler KP. Comparison of fresh osteochondral autografts and allografts: a canine model. *The American journal of sports medicine.* 2006;34(7):1084–93.
- 379.** Tytherleigh-Strong G, Hurtig M, Miniaci A. Intra-articular hyaluronan following autogenous osteochondral grafting of the knee. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association.* 2005;21(8):999–1005.
- 380.** Zantop T, Petersen W. Arthroscopic implantation of a matrix to cover large chondral defect during microfracture. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association.* 2009;25(11):1354–60.
- 381.** Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matrix. *Biomaterials.* 2005;26(17):3617–29.

382. Nam EK, Makhsous M, Koh J, Bowen M, Nuber G, Zhang L-Q. Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model. *The American journal of sports medicine*. 2004;32(2):308–16.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MACI	: Matriks destekli otolog kondrosit implantasyonu
MIV	: MACI in vivo
MKH	: Mezenkimal kök hücre
ACİ	: Otolog kondrosit implantasyon
IHH	: Indian-hedgehog
BMPs	: Kemik morfojenik proteinleri
PTHrP	: Paratiroid-hormon-ilişkili-peptid
IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-I
IGF-II	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-II
PDGF	: Trombosit-kökenli büyüme faktörü
OKD	: Osteokondritis dissekans
ICRS	: Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
BT	: Bilgisayarlı tomografi
dGemric	: delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage
FSE	: Fast spin echo
MT	: Miknatıslanma transferi
MTR	: Manyetizasyon transfer oranı
KİUY	: Kemik iliği uyarı yöntemleri
OAT	: Osteokondral otolog transferi
GAG	: Glikozaminoglikan
MMPs	: Matriks metalloproteinazlar
TIMPs	: Doku inhibitör metalloproteinazları
SHC	: SRC homolog kollajen
ECM	: Ekstraselüler matriks
PEODA	: Poli (etilen oksit) diakrilat
PEGDA	: Poli (etilen glikol) diakrilat
PLA	: Poli laktik asit
BMSCs	: Kemik iliği kaynaklı kök hücreleri
ADSCs	: Adipoz kaynaklı kök hücreler

ESCs	: Embriyonik kök hücreler
EB	: Embriyonik cisim
PEG	: Polietilenglikol
BMP	: Kemik morfojenik protein
OAS	: Oswestry Artroskopi Skoru
HADYEK	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
BF	: Büyüme Faktörleri
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1 (Kıkırdak Dokusunun Tipleri)	12
Şekil 2 (Kıkırdak Dokusunun Tipleri Histolojik Görünümleri)	12
Şekil 3 (Kondrositleri çevreleyen ekstrasellüler matriks)	18
Şekil 4 (Eklem Kıkırdağı tabakaları histolojik görünümü)	21
Şekil 5 (Eklem Kıkırdağı tabakaları şematizasyonu)	22
Şekil 6 (Deneysel çalışma algoritması)	70
Şekil 7 (Örneklerin makroskopik görünümü)	77
Şekil 8 (Safranin O boyası kullanılarak örneklerin mikroskopta büyütülmüş histolojik görüntüleri)	80

TABLULAR

	Sayfa No
Tablo 1 (Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri)	19
Tablo 2 (Eklem kıkırdağı tabakalarının özellikleri)	22
Tablo 3 (Outerbridge ve Modifiye Outerbridge sınıflaması)	31
Tablo 4 (Bauer ve Jackson sınıflaması)	32
Tablo 5 (Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği artiküler kıkırdak evreleme sistemi)	32
Tablo 6 (Kıkırdak lezyonlarının doğal seyir sonuçlarına etki edebilecek prognostik faktörler)	37
Tablo 7 (Artiküler kıkırdak lezyonlarının tedavi seçenekleri)	39
Tablo 8 (Kıkırdak doku mühendisliği için uygun hücre kaynakları)	54
Tablo 9 (Kıkırdak iyileşme makroskopik değerlendirilmesi için puanlama sistemi)	71
Tablo 10 (Modifiye O'Driscoll Skorlama Sistemi)	72
Tablo 11 (Sonuçların özeti)	76