



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

İN SİTU KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

**Dr. Burak GÜRER
Uzmanlık Tezi**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Cengiz YILMAZ**

MERSİN-2011



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

İN SİTU KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

**Dr. Burak GÜRER
Uzmanlık Tezi**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Cengiz YILMAZ**

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

MERSİN-2011

TEŞEKKÜR

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirdiğim uzmanlık eğitimim süresince bilgi birikimlerini, tecrübe ve öngörülerini, anlayış ve sabır içinde benden esirgemeyen, uzman olarak yetişmemde büyük katkılarını gördüğüm değerli hocalarım; Prof.Dr. Fehmi KUYURTAR'a, Prof.Dr. F.Volkan ÖZTUNA'a, Doç.Dr. Abtullah MİLCAN'a, Doç.Dr, Metin M. ESKANDARI'e, Doç. Dr. İrfan AYAN'a, Yrd. Doç. Dr. Mehmet Çolak'a;

Tez danışmanım olarak bu çalışmanın ortaya çıkmasında ve her aşamasında, eserin içeriğinin düzenlenmesinde, yürütülmesinde ve tez sonuçlarının yorumlanmasında akademik bilgi ve deneyimleri ile çok değerli ve önemli katkılarda bulunan Doç.Dr. Cengiz YILMAZ'a;

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen birlikte çalıştığım kardeşten yakın çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Turan YAROĞLU'a ve Arş. Gör. Dr. Sertan ÇABUK'a;

Asistanlık eğitimim süresince gece ve gündüzümüzün birlikte geçtiği asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Deniz KALAYCI'a, Dr. Mehmet GÖZLÜGÖL'e, Arş. Gör. Dr. Erdal GEDİKOĞLU'a, Arş. Gör. Dr. Tuncay AKALAN'a, Arş. Gör. Dr. Hüsamettin ŞEN'e;

Histopatolojik incelemeleri ve değerlendirmeleri yapan, M.E.Ü.T.F. Histoloji ve Embrioloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç Dr.Nejat YILMAZ'a ve Arş. Gör. Gökçe Deniz Külekçi'e;

Çalışmaya akademik desteğini esirgemeyen Mersin Üniversitesi Kimya Mühendisliği Öğretim Üyesi Yrd. Doç.Dr. Nimet BÖLGEN'e;

Tüm servis ve ameliyathane hemşire ve personel arkadaşlarıma;

Eğitimimin ilk yıllarından itibaren bana daima yol gösteren, elimden tutan, en kötü ve en güzel anlarımda her zaman yanımda olan, benimle üzülüp benimle sevinen canım aileme;

Hayatıma girdiği günden beri güler yüzünü benden hiçbir zaman esirgemeyen, zor anlarımda hep yanımda olan canımdan çok sevdiğim eşime teşekkür ederim.

Dr.Burak GÜRER

Haziran 2011, Mersin

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
ABSTRACT	6
GİRİŞ VE AMAÇ	7
GENEL BİLGİLER	10
Kıkırdak	10
Eklem Kıkırdağı	11
Eklem Kıkırdağının Histolojisi	12
Kondrosit Yapı ve Fonksiyonları	12
Hücre Dışı Matriks	15
Eklem Kıkırdağının Özellikleri	17
Kıkırdak İyileşmesi	20
Eklem Kıkırdak Lezyonları	21
Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Endikasyonları	22
Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Sınıflaması	23
Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Yöntemleri	25
Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Uygulanan Cerrahi Yöntemler	27
Kıkırdak Doku Mühendisliği	39
Eklem Kıkırdak Lezyonlarında İyileşmenin Değerlendirilmesi	50
GEREÇ ve YÖNTEM	52
BULGULAR	62
TARTIŞMA	68
SONUÇ	75
KAYNAKLAR	77
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	111
ŞEKİLLER ve RESİMLER DİZİNİ	112
TABLolar DİZİNİ	114

ÖZET

5 cm²'den büyük kıkırdak defektlerinin tedavisinde günümüzde altın standart MACI yöntemidir. Ancak bu yöntem için hasta 6 hafta arayla iki defa cerrahi girişim geçirmekte ve yöntem çok pahalıya mal olmaktadır. Tek seansta benzer sonuç verebilecek ucuz bir yöntem ihtiyacı vardır. Bu nedenle 6 haftalık hücre kültürü ve matrikse gömme işlemine gereksinimi ortadan kaldıracak bir yöntem tasarladık. Bu yöntemde amaç in vitro kültür sürecini in vivo ortama taşımaktır. Çalışmamızda, deney (kriyojel) grubunda 6 koyun, MACI grubunda 6 koyun ve kontrol grubunda 2 koyun olacak şekilde 14 adet koyun kullanılmıştır. Koyunların sağ dizlerinin troklea bölgesinden standart boyutlarda kıkırdak örnekleri alınmış ve 15 haftalık izlem sonucunda, tüm koyunların femur distal uçları alınarak makroskopik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak incelenmiştir (Kruskal-Wallis ve Dunn yöntemi). Makroskopik değerlendirmede Deney ve MACI grupları arasında fark görülmemiş ancak iki grupta kontrol grubuna göre anlamlı oranda farklı bulunmuştur. Histomorfometrik incelemede MACI grubu Deney ve Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede iyi tamir skoru göstermiştir. Deney grubundaki iyileşme (ortalama skor: 6,7) kontrol grubuna (ortalama skor: 4) göre daha iyi bulunduysa da aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. İmmünohistokimyasal incelemede Tip II kollajen miktarı Deney grubunda diğerlerine oranla anlamlı olarak fazla tespit edilmiştir. MACI ve Kontrol grupları Tip II kollajen miktarı açısından farklı bulunmamıştır. Tip I kollajen oranı ise her üç grupta benzer ve farksız bulunmuştur. Sonuç olarak, Yeni yöntemle elde edilen kıkırdağın ne kadar süre içerisinde olgunlaşacağı, ne kadar dayanıklı olacağı, defekti tam doldurup doldurmayacağı bilinmemektedir. Ancak laboratuvar imkânlarını kullanmaksızın, tek seansta yapılabilmesi büyük bir avantaj oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Kıkırdak, Kriyojel, İn-vivo Kültür, Koyun Dizi

ABSTRACT

Today in the treatment of >5 cm² cartilage defects gold standard is MACI method. However, this method of surgical intervention for the patient spends twice 6 weeks apart and method is very costly. An inexpensive method that could yield the same result in a single session is needed. For this reason, we have designed a 6-week cell culture and a method to eliminate the need for the process of embedding matrix. In this method, the aim is to move the environment from the process of in-vitro culture to the in vivo culture In our study, the experimental (cryogels) group, six sheep; in MACI group, six sheep; and in the control group two sheep are used a total of 14 sheep. From trochlea region of the right knee of sheep cartilage samples were taken from the standard sizes and As a result of 15-week follow-up, taking all the tips of the distal femur of sheep; then examined with macroscopically histomorphometrically and immunohistochemically.(Kruskal-Wallis and Dunn method) There is no difference between the experimental groups and the MACI group in the macroscopic evaluation but both groups than the control group were significantly different histomorphometric examination of the MACI group, according to the experimental and the control groups showed significantly better score repair Improvement in the experimental group (mean score: 6,7) than the control group (mean score: 4) were found to be better but the difference was not statistically significant Immunohistochemical examination of the amount of type II collagen has been observed in the experimental group significantly more than others MACI and the control groups did not differ in terms of the amount of type II collagen The rate of type I collagen in all three groups were similar and identical. As a result, The new method obtained from the cartilage doesn't known that How long will mature within, How much proof would be and how much fill defects However, the use of laboratory facilities, can be made in a single session is a great advantage

Key words: Cartilage, cryogels, In-vivo culture, Sheep Knee

GİRİŞ VE AMAÇ

Eklem kıkırdağının yapısı, fonksiyonu ve hastalıkları ile ilgili bilgiler ve sinoviyal eklemlerdeki kıkırdak hasarlarının tamir sorunu, ilk kez 1743 yılında, araştırmacı William Hunter tarafından şu sözlerle vurgulanarak özetlenmiştir: “Hipokrat zamanından günümüze kadar standart cerrahi yazarlarının bilgilerini alacak olursak, şu sonucu buluruz; ülsere olmuş bir kıkırdak, ileride mutlaka çok sorunlu bir hastalık oluşturacaktır. Kıkırdak hasar gördüğü zaman, hiçbir zaman iyileşemez.”¹ Bundan sonra 1800’lü yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda, kıkırdak yaralanmalarının iyileşmediği veya kısmen fibröz doku ile iyileştiği ve eklem kıkırdağının - kemik dokusundan farklı olarak- kendi orijinal dokusunu üretemediği gözlemlenmiştir.^{2,3}

Eklem kıkırdağı; sürtünmeyi azaltan ve yüklenmeyi dağıtan, avasküler, sinirden ve lenfatikten yoksun özel bir yapıdır. Kondrositler, kıkırdak matriks aracılığıyla besin maddelerini ve oksijeni difüzyon yoluyla sinovyal sıvıdan alırlar.

Kondroblastlar indiferansiye mezenşim hücrelerinden (hareketle stimüle olurlar) köken alır ve daha sonra lakünler içerisine yerleşerek kondrosit haline gelirler. Kondrositler kendi lakünlerinin içerisinde aramaddenin devamlılığını sağlarlar. Kıkırdak yaralandığında defekte doğru bir miktar matriks akışı olur ama bu defekti doldurabilecek düzeyde değildir. Kondrositler de lakünlerinden çıkıp defekte göç etme özelliğine sahip değildirler. Kemik iliğinde bulunan kök hücreler ise subkondral kemiğin bütünlüğü korunduğu sürece defekte ulaşamazlar. Diğer dokular iyileşirken vasküler bir giriş ve bununla birlikte dokuyu ve matriksi oluşturacak hücrelerin iyileşme bölgesine göçü olur. Ancak kıkırdak iyileşmesinde vasküler bir doku da yoktur. Bu nedenle hücreler başka bir kaynaktan sağlanmalıdır. Bunun bir yolu kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerin (MKH) defekte göçünü sağlamak, bir diğeri de kondrositlerin dışarıdan defekt içine implantasyonu olabilmektedir.⁴ Bu amaçla geliştirilen otolog kondrosit implantasyonunun (ACI) teknik dezavantajları vardır. Bu yöntemde hassas bir hücre süspansiyonu kullanmak gerekir. Periostu su geçirmez bir şekilde kapatmak ve bu nedenle kıkırdağa dikiş geçirmek gerekir. İkinci seansta artrotomi yapmak gerekir ki bu ve periost grefti kullanımı

komplasyonlara açıktır.⁵ Standard tek katman hücre kültüründe kondrositler fenotipik olarak geri farklılaşmaya zorlanmaktadır. Hücre süspansiyonu enjeksiyonu homojen olmayan dağılıma neden olmakta, hücrelerin perios greftinden sızarak kaybı mümkün olmakta ve cerrahi süresi uzun olmaktadır.⁶ 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.^{5,7}

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 olmaktadır.⁸ Üç boyutlu ortamda ise tip II kollajen ve agrekan sentezlemektedirler.^{9,10} Matriks olarak en sık kollajen ve hyaluronan temelli malzemeler kullanılmaktadır.⁷ Hücrelerin eşit dağılımını sağlamak için ilk olarak tip I ve tip III kollajenden oluşan membran kullanılmış, kondrositler bu membran üzerine ekilerek implante edilmişlerdir.¹¹ Kollajen membrana ekilen hücrelerin homojen dağılım gösterdikleri ve kondrosit fenotiplerini korudukları gösterilmiştir.¹²

Hidrojeller, herhangi bir boyuttaki ve biçimdeki defekteri doldurabilmesi ve minimal invazif olması nedeni ile enjekte edilebilen skafoldlar olarak kullanılırlar. Hidrojel besin ve atıkların transportunu desteklemenin yanında 3D bir ortam hazırlayarak hücrelerin homojen dağılmasına ve hücrelerin kondrositik yönde farklılaşması neden olur. Hidrojeller fiziksel veya kimyasal olarak çapraz bağlardan oluşmaktadır. Kimyasal hidrojeller kovalent bağlarla bağlı iken; fiziksel hidrojeller iyonik, hidrojen veya hidrofobik etkileşimlerle bir arada tutunmaktadır.¹³ Katı haline şekil vermek için yüzde 90 oranında suya ihtiyaç duyması, sıvı ve katı olarak çift yönlü reaksiyon verebildiği için diğer maddelerin varlığından etkilenmemesi, yine bileşimindeki yüksek su oranı nedeniyle dayanıklı olması, şeritler halinde inceltilebilmesi, ısıya ve radyasyona karşı dayanıklı olması belli başlı özellikleridir. Hidrojelin toksik madde içermediğine,

bakteri oluşumunu önlediğine ama en önemlisi doku gelişimi için uygun bir ortam oluşturduğuna inanılmaktadır.

5 cm²'den büyük kırıkta defektlerinin tedavisinde günümüzde altın standart MACI yöntemidir. Ancak bu yöntem için hasta 6 hafta arayla iki defa cerrahi girişim geçirmekte ve yöntem çok pahalıya mal olmaktadır. Tek seansta benzer sonuç verebilecek ucuz bir yöntem ihtiyacı vardır. Bu nedenle 6 haftalık hücre kültürü ve matris gömme işlemine gereksinimi ortadan kaldıracak bir yöntem tasarladık. Bu yöntemde amaç in vitro kültür sürecini in vivo ortama taşımaktır.

GENEL BİLGİLER

Kıkırdak

Yetişkinlerde kıkırdak dokusu kemiklerin eklem yüzeylerinde, trakea'da, bronşlarda, burun'da, kulaklarda, larinks'de ve intervertebral disklerde bulunur. Kıkırdak dokuda; hücreler, bağlar ve şekilsiz destek maddesi bulunur. Kıkırdak dokusu hücresel olmayan komponentten zengindir ve kan damarları ile sinirlerden yoksundur.^{14,15}

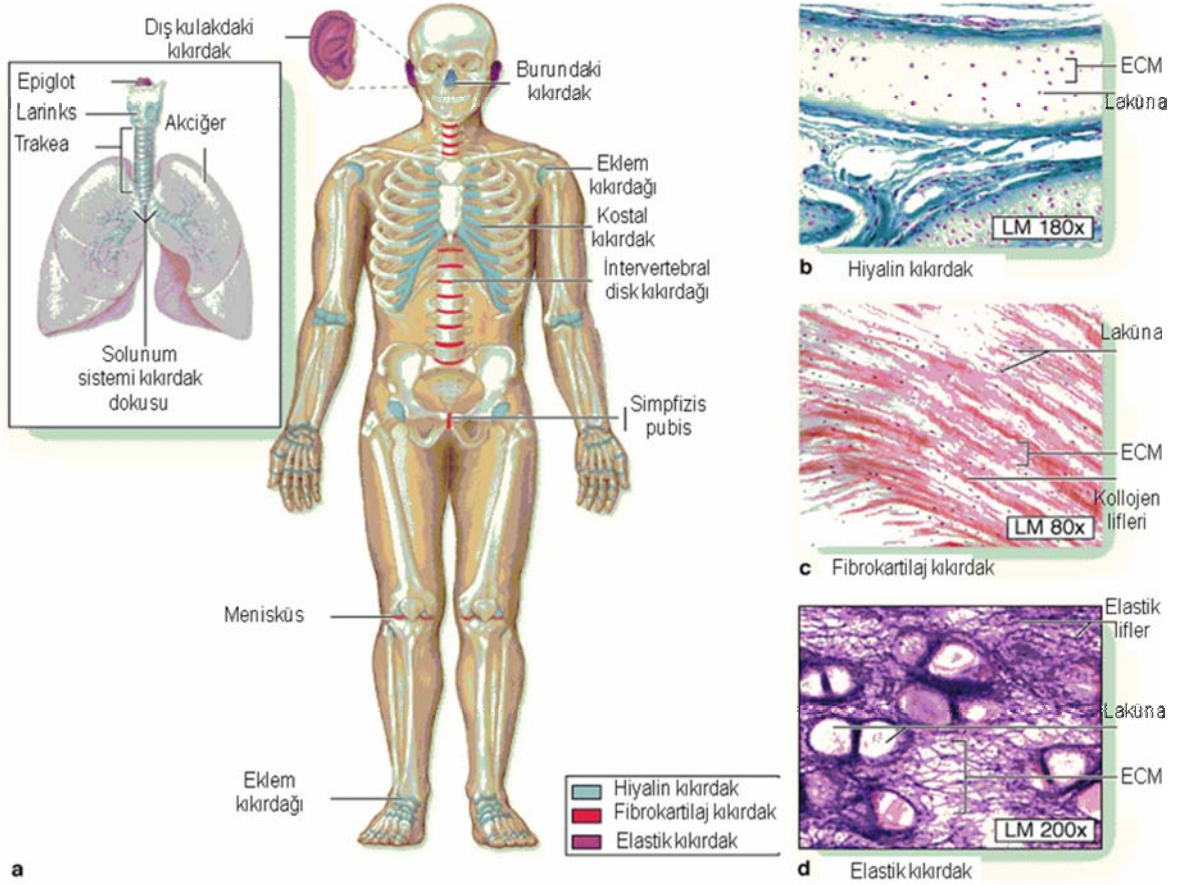
Kıkırdak dokusunun 3 farklı tipi tanımlanmıştır; (Şekil 1)

1-Hiyalin kıkırdak

2-Elastik kıkırdak

3-Fibro-kıkırdak.

Hiyalin kıkırdak; mavi, camsı, pürüzsüz, parlak görünümündedir¹⁶ ve insan vücudundaki kıkırdak yapısının büyük bölümünü oluşturur. Hiyalin kıkırdak; kemiklerin eklem yüzeylerinde, kaburga kemiklerinin iç yüzlerinde, larinks'te, trakea'da ve bronş ağacında bulunur. Hiyalin kıkırdak ayrıca; bebeklerde ve gelişme çağındaki çocukların epifiz bölgelerinde de bulunur. Mezenkimal doku kökenli olan eklem kıkırdağının yapısında hiyalin kıkırdak bulunmaktadır.¹⁷ Elastik kıkırdak; dış kulak yolunda, dış meatus'un duvarlarında, östaki borusunda, epiglottis'te ve larinks'in bir bölümünde bulunur. Elastik kıkırdağın esas fonksiyonu, lümenleri çevirerek onlara esneklik sağlamaktır. Fibro-kıkırdak ise intervertebral disklerin anülüs fibrözlerinde, simfizis pubis'te ve geniş tendonlar ile büyük eklemlerdeki eklem kıkırdakları arasındaki bağlantıda bulunur. Bütün kıkırdak dokuların vücutta çok önemli fonksiyonlarına karşın; doku mühendisliği en çok eklem kıkırdağı ile ilgilenir.¹⁴



Şekil 1: Kıkırdak Dokusunun Tipleri (www.accessmedicine.com)

Eklemlerdeki Kıkırdak

Eklemlerdeki kıkırdak, diartrodial (keseli) eklemlerde ağrısız ve rahat hareket sağlamak amacıyla sürtünmesi az, aşınmaya dayanıklı bir yüzey sağlar. Hücreden fakir, lenfatik ve vasküler yapılardan yoksun ancak kondrositler tarafından üretilmiş bol miktarda ekstrasellüler matriks içeren bir yapıya sahiptir.¹⁸ Kıkırdak pH'sı 7,4'tür.¹⁹

Eklemlerdeki kıkırdak; hayatımız boyunca sürekli olarak mekanik streslere maruz kalır ki; bunlar, kıkırdak dokusunun sağlıklı kalması için gerekli uyarılardır.²⁰ Yük taşımayan kıkırdak incelik ve yumuşak. Yük taşıyan eklemlerdeki yüzey alanlarındaki kıkırdak dokusu, daha kalın ve mekanik olarak daha güçlüdür. Kıkırdak dokusu; farklı yüklenme şekillerine göre, metabolik değişikliklerle uygun cevabı verir.²¹

Eklem Kıkırdağının Histolojisi

Eklem kıkırdağı; kondrositler, su ve hücre dışı matriks bileşenlerinden oluşmaktadır.¹⁹ (Tablo 1)

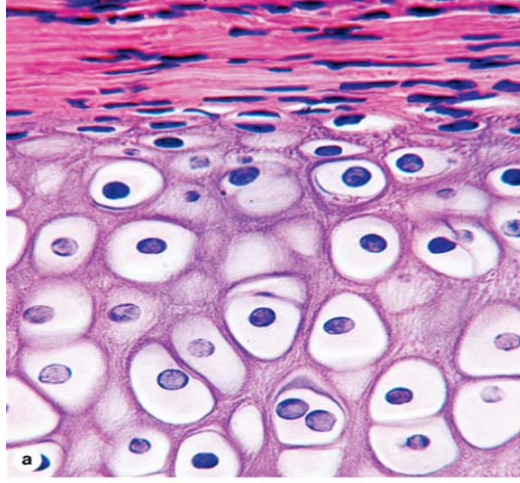
Kondrositler	%5
Hücre dışı matriks	
-Su	%65-80
-Kollojen	%10-20
-Proteoglikan	%10-15
-Diğer bileşenler (Adhesivler ve yağlar)	<5

Tablo 1: Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri

Kondrosit Yapı ve Fonksiyonları

Kondrositler, kıkırdağın yapısal hücreleridir ve enkonral kemikleşmede önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir.²² Kondrositler enerjisini sinovyal sıvıdan hücre dışı matrikse difüzyon yolu ile gelen glukozu kullanarak anaerobik glikoliz ile sağlarlar.

Kondrositler, bir matriksle çevrili laküna içine yerleşik hücrelerdir. Kıkırdağın yüzeyinde yassılaştırmış, daha derin bölgedekiler ise yuvarlak şekildedir. (Şekil 2) Yuvarlak şeklindeki hücreler tek olarak ya da kondronlar içinde birkaç tanesinin kümelenmesi şeklinde bulunurlar. Küme oluşturdukları zaman bunlara izogen gruplar denir. Kondrositler belirgin nukleoluslu, iri bir nukleusa sahiptir. Genç kondrositler açık boyanan sitoplâzmaya, bol mitokondri, geniş bir granüllü endoplazmik retikuluma, iyi gelişmiş Golgi kompleksine ve bol glikojen içerirken; yaşlı kondrositlerde, aktivite daha düşük olup, organellerde belirgin azalma vardır. Ancak bu hücrelerde serbest ribozom boldur, kondroblastlara dönüşebilme durumunda aktif protein sentezi yaparlar. Yapısında bulunan endoplazmik retikuluma ve iyi gelişmiş Golgi kompleksi ile Tip2 kollajen, proteoglikanlar, hylüronik asit, kondronektin, kıkırdak yıkım enzimleri(metalloproteinazlar) ile yıkım önleyici enzimlerin(metalloproteinaz doku inhibitörü) sentezlerler.^{23,24}



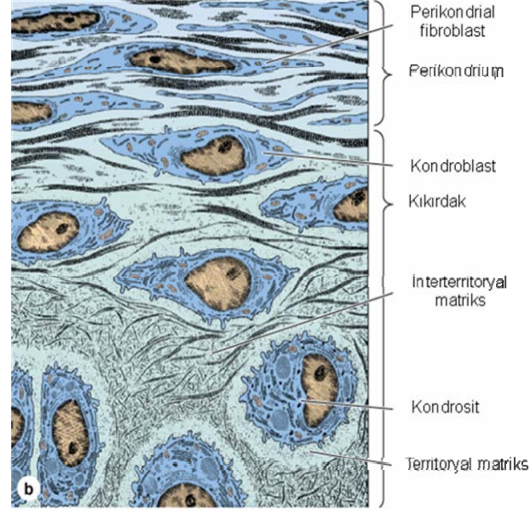
Şekil 2: Kondrositlerin laküna içindeki şekilleri

Perikondrium; kıkırdağı çevreleyen bağ dokusudur. Tip 1 kollajenden zengindir. Perikondriumda bulunan hücreleri fibroblastlardan ayırt etmek zordur. Bunlar, kıkırdak oluşumu sırasında yeni hücre kaynağı olarak iş görür. Matrisi, sentezleme kapasitesindeki hücresel bir iç tabaka ile fibriller bir dış tabakadan oluşur. Dıştaki fibrilli tabaka mekanik destek, koruma ve diğer yapılara tutunmayı sağlarken; içteki hücresel tabaka kıkırdağın büyümesi sırasında yeni kıkırdak hücrelerini oluşturur. Bu yüzden kondrojenik tabaka olarak da bilinir. Perikondrium vasküler bir tabaka olmasının yanında sinir ve lenf damarında bulunur; kan damarlarının taşıdığı besinler kıkırdak hücrelerini besler. Kıkırdağın perikondriyuma sahip olmadığı alanlarda (özellikle eklem yüzeyi) kıkırdak hücreleri eklem yüzeyini yıkayan sinovial sıvıdan beslenir.²³

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

- 1- Perisellüler matris; her bir kondrositi çevreler,
- 2-Teritoriyal matris; bir tek hücre ya da kondronun perisellüler matrisini çevreler. 50µm genişliğindeki bir bant şeklindedir ve kondronun sülfatça zengin olduğu için PAS(+) boyanır. Bu matrisin dışı ise Tip II kollajence zengin, proteoglikanlarca fakirdir.
- 3- İnterteritoriyal matris; 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.^{23,25,26}



Şekil 3: Kondrositleri çevreleyen ekstrasellüler matriks

Kondrositler hem mezoderm kökenli olabilir (örneğin kaburga ve vertebra kıkırdakları), hem de ektoderm kökenli olabilir (kranial kıkırdaklar gibi); fakat endodermden gelişmez. Kıkırdağa dönüşebilme potansiyeline sahip kök hücreler erişkin yaşamda da vücutta bulunur ve kallus formasyonu, osteofit formasyonu ya da ektopik kıkırdak gibi durumlarda kondrositlere dönüşürler. Kıkırdak öncülü hücreler, birçok sinyal molekülü 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.^{27,28}

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.^{29,30,31}

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 yapar.³²

Hücre Dışı Matriks

Su: Eklem kıkırdağının yaş ağırlığının %65-80'ini oluşturur. Bu durum kıkırdağın sıkıştırma ve zorlamalara karşı neden dirençli olduğunu ortaya koyar. Eklem kıkırdağındaki su dağılımı homojen değildir, derin bölgelerde %65 iken yüzeysel bölgelerde %80'dir. Osteoartritte eklem su içeriği %90'lara kadar çıkar. Su içeriğinin artışı, geçirgenliğin artmasına, dayanıklılığın azalmasına ve elastisitenin Young modülüsünde azalmaya neden olur.^{19,33}

Kollajen: Eklem kıkırdağının yaş ağırlığının %10-20'si iken, kuru ağırlığının %50'sini oluşturur. Eklem kıkırdağı 7 farklı tip kollajen içerir. Tip 2, 9, 11 temel yapıyı oluştururken küçük oranlarda da tip 3, 6, 12, 14 bulunur.^{32,34}

Kollajen Tip 2

Eklem kıkırdağında baskın olan kollajenidir. Kollajen içeriğinin %90-95'inin içerir. Üçlü Heliks glikoprotein yapısında olup 425 kDa molekül ağırlığındadır. Tip 2 kollajen tensil güç sağlar. Bu tensil güçten yapısındaki glisin, prolin, hidroksprolin ve hidrojen bağları sorumludur. Hidroksprolin yalnızca kollajende bulunur ve idrardaki ölçümleri kemik döngüsü değerlendirilmesinde kullanılır. Kondrosit adezyonunu destekler ve hücrelerin fenotipik farklılaşmasına yardımcı olur.

Kollajen Tip 9

FACIT (Fibril associated collogens with interrupted triple helices) diye adlandırılan kollajen ailesindedir. 222 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Kollajen fibriller ve diğer makromoleküller arasındaki bağlantıyı sağlar.

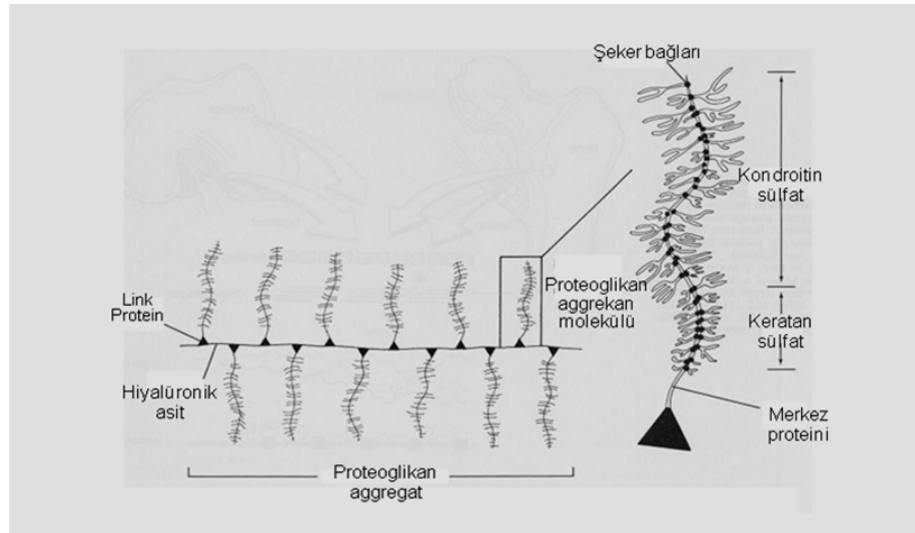
Kollajen Tip 11

Minör fibriler kollajendir. 545 kDa ağırlığındadır. Tip 2 kollajenin fibril çapını düzenler ve kollajen örgünün bir arada tutulmasını sağlar.^{14,19}

Kollajen tip X encondral kemikleşme sırasında sadece hipertrofik kondrositler tarafından üretilir. Tip X kollajen, kıkırdak dokusunun kalsifikasyonu ile ilişkilidir ve tip X kollajendeki genetik defekt durumunda Schmid's metafizyel kondrodisplazisi izlenir.¹⁹

Proteoglikan: Eklem kırdağının yaş ağırlığının %10-15'idir. Proteoglikanlar GAG'lar olarak bilinen alt ünitelerden oluşur ve kondrositler tarafından yapılarak ekstrasellüler matrikse salgılanırlar. Bir proteoglikan monomeri, bir merkez (kor) proteinden ve buna kovalent olarak bağlanmış bol miktardaki GAG (kondroitin-4 sülfat, kondroitin-6 sülfat ve keratan sülfat) oluşur. (Şekil 4) Keratan sülfat miktarı yaşla birlikte artarken, Kondroitin -4-sülfat konsantrasyonu yaşla birlikte azalır ve Kondroitin-6-sülfat konsantrasyonu yaşla birlikte değişmez. Kompresif güç sağlarlar.³³

GAG; proteoglikan aggregan molekül oluşturmak için, protein çekirdeğe bir şekerle birleşerek ağ yapmak zorundadır. Aggregan molekülü; 205 kDa molekül ağırlığında olup içeriğinin %87 kondroitin sülfat, %6 keratan sülfattır. Kemiklerde bulunmaz. Hiyalüronan ile etkileşim içindedir ve yüksek osmotik basınçtan sorumludur. Bağlantı proteinleri(Link protein); glikoprotein yapıda olup 45 kDa molekül ağırlığındadır ve aggregan molekülleri ile hyaluronik asiti bağlar. Hiyalüronan ise yüksek moleküler kütleli polisakkariddir. Glukoronik asit ve N-asetil glukozamin'in ko-polimer(yardımcı polimer)idir. Dokuların birçoğunda bulunur. Hücrelerin plazma membranlarında sentezlenir. Yüksek turn-over oranına sahiptir. Doku gelişmesi ve farklılaşması sürecinde önemli role sahiptir. Su ve plazma proteinleri dengesinde rol oynar.^{35,36}



Şekil 4: Proteoglikan agregatı

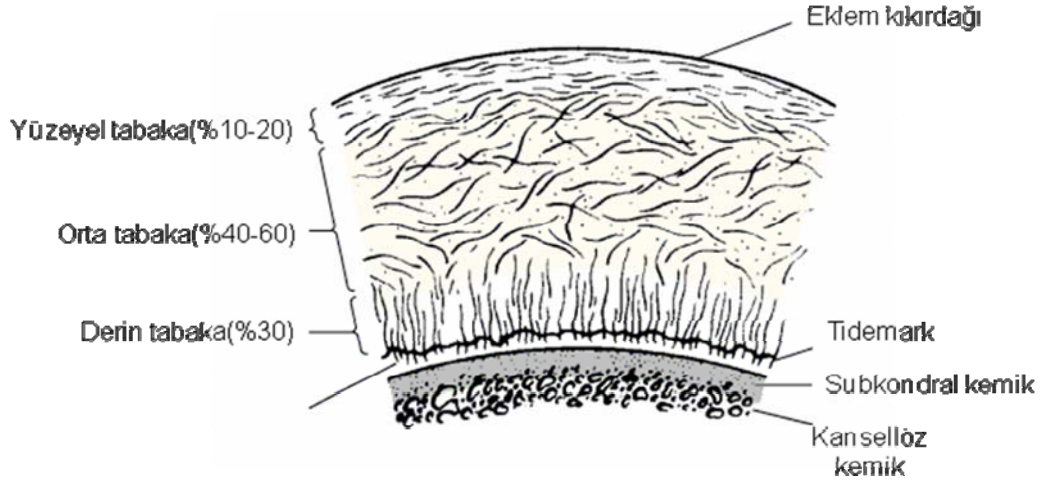
Kıkırdak matriksinde anchorin CII, tenaskin, fibronektin küme oluşturmayan ve kollajen olmayan proteinler de bulunur. Bunlar kondrositler ile kollajen fibrilleri arasındaki etkileşimden sorumludurlar.

Eklem Kıkırdağının Özellikleri

Eklem kıkırdağı; tabakalar halinde yerleşmiş bir yapıya sahiptir. Yetişkinlerde eklem kıkırdağı genellikle hücresiz olmakla birlikte, toplam kıkırdak dokunun yaklaşık %2'sini hücreler oluşturmaktadır.³⁷ Küçük yaşlarda yoğun olan hücre yoğunluğu, yaşla birlikte azalma gösterir, kıkırdak daha baskın hale geçer.³⁷ 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 yapıdır.³⁸

Eklem kıkırdağı; hücresel morfoloji, biyomekanik bileşim ve yapısal özellikler bakımından birbirinden farklı olan dört tabakadan oluşmaktadır: Yüzeyel tabaka, orta tabaka, derin tabaka ve kalsifiye olmuş kıkırdak tabaka. (Şekil 5) ^{14,39} Derin tabaka ile kalsifiye olmuş kıkırdak tabaka arasında "tidemark" adı verilen bir geçiş bariyeri bulunmaktadır.



Şekil 5: Eklem kıkırdağı tabakaları

Yüzeyel tabaka, sinoviyal sıvı ile temas halindedir. Yüzeyel tabaka ile orta tabaka arasında hücre yoğunluğu daha azdır. Orta tabakanın histomorfolojik yapısı incelendiğinde, daha tipik bir hiyalin kıkırdak yapısı gözlenmektedir. Orta ile kalsifiye olmuş kıkırdak tabaka arasında derin tabaka yer almaktadır. Kalsifiye olmuş kıkırdak tabakasının damarlanması iyi değildir, bu sebeple re-modeling (yeniden yapılanma) süreci, damarlanması iyi olan alanlardaki kadar iyi gerçekleşmemektedir. Bu kıkırdak tabakası, hücre yoğunluğunun en az olduğu tabakadır. Aggrekan içeriği ve fibril çapı, derin tabakada maksimum seviyededir, kollajen içeriği ise yine derin tabakada en az orandadır. Kalsifiye zondaki kondrositler, genellikle hipertrofik fenotipe sahiptir. Böylece kırık iyileşmeleri sürecindeki farklılaşmalar daha kolay sağlanmaktadır. Hipertrofik hücrelerin bir diğer sonucu da, tip 5 kollajen sentezinin artırılması ve ekstraselüler matriksin kalsifiye edilmesidir. Kalsifiye kıkırdak ile sub-kondral kemik arası, düz bir bölgedir. Subkondral trabeküler kemik, bu düz bölgenin hemen altında yerleşmiştir. Subkondral kemiğin yapı ve görünümü, eklem içine ve yoğunluğuna kritik önemde bağımlıdır. Re-modeling ile subkondral kemik yoğunluğu değişebilmektedir. Subkondral trabeküler kemik, doğal yapısında homojen ve izotropik değildir. Subkondral düzlük ve trabeküler kemik, benzer yapılarına rağmen farklı şekilde organize olmuşlardır. Bu sayede mekanik etkilerde farklı yollardan adaptasyon sağlamaktadırlar.^{40,41}

Yüzeyel tabaka yüksek konsantrasyonda kollajen fibrilleri içerir ve bunlar birbirlerine dik açıda yani eklem yüzeyine paralel düzenlenmiştir. Metabolik aktivitesi düşüktür. Makaslama kuvvetlerine karşı koyar. Orta tabakada kollajen fibrilleri oblik olarak düzenlenmiştir. Bu bölgenin metabolik aktivitesi yüksektir ve daha çok kompresif güçlere karşı koyar. Derin tabakada ise kollajen fibrilleri vertikal yani ekleme dik olarak düzenlenmiştir. Bu bölge de kollajen boyutları artmıştır ve kompresif güçlere karşı koyar. Tidemark bölgesinde kollajen fibrilleri ilk bölgede olduğu gibi horizontaldir. Bu bölgenin 2 fonksiyonu vardır. Makaslama kuvvetlerine karşı korumak ve bariyer görevi görmek. Tidemark zonu çocuklardan ziyade erişkinlerde daha iyi görünür. Bu bölgeden kıkırdak kökenli eksostoz gelişmez. Kalsifiye bölgenin anahtar komponenti hidroksiapatit kristalleridir. Bu bölge çıpa görevi görmektedir. Yüzeyel bölgeden derin bölgeye inildikçe, kondrosit hacmi artarken, kollajen lifleri eklem yüzeyine dik hale gelir.^{19,42,43}

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 göstergesidir.⁴⁴ (Tablo 2)

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	Vertikal	Kompresyona karşı
Tidemark	5	Bariyer	Horizontal	Gerilmeye karşı
Kalsifiye	300	Hidroksiapatit kristalleri	-	Ankor

Tablo 2:Eklem kıkırdağı tabakalarının özellikleri

Kıkırdak İyileşmesi

Kıkırdak, metabolik olarak aktif bir dokudur. Hücre aktivitesine rağmen, kıkırdak dokuda intrinsek tamir ve küçük lezyonların ilerleyici hasara dönüşmesini engelleme; ancak kısıtlı oranda sağlanabilmektedir.^{45,46} İzole kondral ya da osteokondral lezyonlar ağrının ve fonksiyon kaybının önemli sebeplerinden biridir ve sadece bazı durumlarda bu izole lezyonlar kendiliğinden iyileşebilmektedir.

Eklem kıkırdağı hasarı 3 tipte olabilir;

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 hasarının tipi, hücrelerin tek başına iyileşme yanıtını da içerir.⁴⁷ Kondrositlerin matriks içeriği değişikliklerine duyarlılığı ve yeni molekül sentez yeteneği, iyileşme sürecinin önemli temelini oluşturur.^{48,49}

Eklem kıkırdağında iyileşme yanıtını sınırlandıran iki önemli faktör olduğu düşünülmektedir; yeteri kadar kan desteğinin olmaması ve tamirde görev alan farklılaşmamış hücrelerin eksikliğidir. Matriks glikoprotein kaybının hücrelerin hızlı çalışmasını engellemeyecek düzeyde olduğu durumlarda, fibriller kollajenlerin sağlam olduğu durumlarda ve matriks hasarına cevap verebilecek düzeyde yeterli kondrosit olması durumunda kondrositler tamir görevini üstlenebilir.

Yüzeysel defektlerden sonra, kondrositler farklılaşır, sentezleri artar. Çoğu vakada, yeni sentezlenen matriks ve farklılaşan hücreler, doku defekt bölgesini tam olarak doldurmamaktadır. Eklem kıkırdağının tamir sürecindeki sınırlı kapasitesinin altında yatan sebep, proliferasyon ve matriks sentezinde ani bir durma olmasıdır.⁵⁰ Eklem yüzeyinde meydana gelen kalıcı bir hasar, eklem mekanik fonksiyonunu değiştirebilir ve eklem dejenerasyonuna yol açarak, bu defekt iyileşse bile eklem hareketlerinde kısıtlılık olmasına yol açabilir.^{15,51}

Hasarlanmadan 3 gün sonra kondrosit hücrelerinin silyalarının uyarılması ile çevre kondrosit hücreleri proliferasyon olma ve ECM sentezlemeye başlarlar ve tip 2 kollajende artış görülür. Eklem kıkırdağının iyileşmesinin sonuçları, subkondral dokudaki ayrışmaya kritik önemde bağımlıdır. Defektler, özellikle yüzeysel defektler subkondral kemik alanını genişletir, defekt bölgesi içine

kanama olur. Kısa süre sonra tam kat defektler meydana gelir, hasarlanan bölgeden kan çıkışı sonucu orada hematomlar oluşur. Hematom'un 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.^{50,51}

Kemik dokusu tamirinde rol oynayan çeşitli faktörler, kırıkta tamir ve iyileşme sürecinde de direkt olarak rol oynayabilmektedir. İki dokunun tamir sürecinde rol alan moleküllerin benzerliği, kemik ve kırıkta formlarını birbirine daha da yakın kılmaktadır. Osteokondral bölge defektlerinde, kondral alandaki iyileşme dokusunda; kondrosit-benzeri hücreler, matriks bileşiminde tip-2 kollajen ve proteoglikanlar ile tip-1 kollajen ve non-kollajen proteinler bulunduğu gözlenmiştir. Defektin daha derin bölgelerinde yerleşmiş hücreler; immatür kemik, fibröz doku ve hiyalin-benzeri kırıkta üretimi yapar.⁴⁸ Doku iyileşmesi sürecinin sonucunda; hiyalin kırıkta ve fibro-kırıkta formasyonları arasında tipik bir doku kompozisyonu ortaya çıkar. Bu yeni oluşmuş doku formasyonu, yapı ve biyomekanik fonksiyon açısından, normal eklem kırıkta dokusundan farklılıklar göstermektedir.^{15,50,51} Yeni oluşmuş doku, normal eklem kırıkta göre belirgin şekilde geçirgen ve az sertliktedir. Yeni dokuda ayrıca makromolekül artışı da olduğu için eklemde daha fazla yapısal hasarla da sonuçlanabilir.

Eklem Kırıkta Lezyonları

Diz eklemine kırıkta lezyonları, hem görüntülenme yöntemleri,^{52,53} hem de yapılan artroskopiler sırasında sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Genç atletik bireyler de kırıkta lezyonlarının en sık sebebi travma iken yaşlı insanlarda ise dejenerasyondur. Otuzbinden fazla artroskopik girişimin incelendiği bir çalışmada bu girişimlerin %61'inde kırıkta yaralanmasına rastlanmıştır.^{54,55} Bunların %19'u odaksal (yaygın olmayan) kondral ya da osteokondral lezyonlardır.^{54,56} Evre III ve IV tek odaksal kırıkta defekt insidansı ise %5,2'dir.⁵⁷ Akut yaralanmalarda ise bu oran yükselmektedir. Travmatik hemartrozu olan hastaların %20'sinde kırıkta yaralanması da vardır.⁵⁸ 15-24

yaş arasındaki bireylerde %4-10 arasında radyolojik olarak kıkırdak lezyonu bulunurken, 55 yaşın üzerindekilerde bu oran %80'dir. Kıkırdak defektlerinin büyük bir çoğunluğu medial femoral kondilde görülür (%58 – 80). Bunu patella ve lateral tibia platosu takip eder. Daha az sıklıkta ise lateral femoral kondil, troklea ve medial tibial platoda görülürler.⁵⁶

Kıkırdak lezyonu olan hastalarda ağrı, efüzyon ve mekanik semptomlar olmaktadır. Femurda lezyonu olan hastalarda ağrı daha çok medial ve lateral tibiofemoral kompartmanda iken, yük verme veya aşırı aktivite ile ağrı ortaya çıkarabilir. Patellada lezyonu olanlarda ise ağrı daha çok uzun süre oturma, merdiven inip çıkma ve diz çökme sırasında ortaya çıkar.⁵⁹

Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Endikasyonları

Kıkırdak yaralanmalarının birçoğu zamanla dejeneratif eklem hastalığına ilerlemektedir.⁶⁰ Adolesan dönemde kıkırdak yaralanması olup tedavi görmeyen hastalar takip edildiğinde 10 yıldan az sürede radyolojik olarak osteoartrit bulgularının geliştiği görülebilir.⁶¹ Osteokondritis dissekans'lı (OKD) hastalar takip edildiğinde ise %80'inde ikincil gonartroz geliştiği tesbit edilmiştir.⁶² Bu durumda kıkırdak yaralanmasının osteoartrite neden olduğu söylenebilmektedir. Her kıkırdak yaralanmasının osteoartrit ile sonuçlanıp sonuçlanmayacağı merak edilebilir. On mm'den küçük defektlerin çevresindeki sağlam kıkırdakta basınç artışına rastlanmamıştır. Ancak defekt 10 mm'den büyük olduğunda çevre sağlam kıkırdağa %64 daha fazla yük binmektedir.⁶² Nitekim 10 mm çapındaki bir defektin 14 yıllık takibi sonunda eklem aralığında %50 ya da daha fazla daralma yaptığı görülmüştür.⁶³ 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 bilinmemektedir. Bir çalışmada insandaki kritik boyutun 2 cm² olduğu iddia edilmiştir.⁶⁴ Ancak 2 cm²'den küçük lezyonların da spontan iyileşmediği bilinmektedir. Bu nedenle ya bu boyut gerçek anlamında kritik boyut olmayabilir ya da iyileşme için etkili tek unsur defektin boyutu değildir.

Tam kalınlık kıkırdak yaralanmalarında kendiliğinden iyileşme olabilmektedir. Bunun yanında kısmi kalınlık yaralanmalarda iyileşme beklenmez.^{65,66} Yaralanmanın tidemark katmanını geçip geçmemesi bir başka

kritik noktadır. Tidemark artiküler kıkırdağın derin katmanı ile kalsifiye kıkırdak 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. Yaralanma durumlarında göç etme, bölünerek çoğalma ve pıhtı oluşturarak iyileşme sağlama gibi davranışlar göstermemektedirler. Bu nedenle tam kat kıkırdak yaralanmalarında kemik iliği kökenli hücreler tarafından iyileşme sağlanabilmektedir.

Eklem Kıkırdak Lezyonlarının Sınıflandırılması

Daha önceki yayınlar incelendiğinde kıkırdak lezyonlarının sınıflandırılması 2 sisteme ayrıldığı görülür; sayısal ve tanımlayıcı sistem. Sayısal sistemlerin çoğu lezyonları 1'den 4'e veya 0'dan 4'e sınıflandırmıştır. Lezyonun aldığı sayısal değer ne kadar yüksekse lezyon o kadar ciddi veya büyüktür. Bazı yazarlar lezyonu iyi tanımlamak için aynı anda lezyonun boyutu, derinliği veya yeri gibi ölçütlerle açıklayıcı sistemler geliştirmelerine rağmen henüz mükemmel bir sınıflama sistemi bulunamamıştır.⁶⁷

Kıkırdak lezyonları ilk defa 1961 yılında Outerbridge tarafından makroskopik olarak sınıflandırılmıştır.⁶⁸ Bu sınıflama sayısal sisteme uyan bir sınıflamadır ve Maldelbaum tarafından kıkırdağın kalınlığı da değerlendirilerek modifiye edilmiştir.(Tablo 3) Daha sonra kıkırdak lezyonları 1976'da Insall⁶⁹, 1977'de Hungerford ve Ficat⁷⁰, 1982'de Casscells⁷¹, 1982'de Bandi⁷², 1983'de Beguin and Locker⁷³, 1984'de Bentley and Dowd⁷⁴, 1987'de Dandy⁷⁵, 1989'da Noyes and Stabler⁷⁶ tarafından sayısal olarak sınıflandırılmıştır.

Derece	Outerbridge	Modifiye Outerbridge
0	Normal kıkırdak	Kıkırdak sağlam
I	Kıkırdakta yumuşama ve şişlik	Kıkırdakta yumuşama ve kabarıklık
II	Kıkırdakta fragmantasyon ve çatlaklar (<1/2 inch)	Kıkırdak kalınlığının %50'den azında derin ülser, saçaklanma ve çatlak
III	Kıkırdakta fragmantasyon 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

Tablo 3: Outerbridge ve Modifiye Outerbridge sınıflaması

Tanımlayıcı-açıklayıcı sisteme uyan ilk sınıflama ise 1976 yılında Goodfellow ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.⁷⁷ Daha sonra 1988 yılında Bauer ve Jackson tarafından artroskopik olarak lezyonun şekline göre bir sınıflama yapılmıştır.⁷⁸ (Tablo 4) Bu sınıflamayı 1988'de Dzioba⁷⁹, 1993'de Koshino ve Machida⁸⁰, 1996'da Lewandrowski'nin⁸¹ sınıflamaları takip etmiştir.

Tip	Şekil
I	Çizgisel
II	Yıldız şeklinde
III	Flap
IV	Krater
V	Saçaklanma
VI	Degrading

Tablo 4: Bauer ve Jackson sınıflaması

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

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

Tablo 5: Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği artiküler kıkırdak evreleme sistemi

Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Tedavi Yöntemleri

İdeal kıkırdak yaralanması tedavisi çevresiyle tamamen bütünleşmiş, mekanik olarak işlevsel ve defekt alanında hyalin kıkırdak oluşumu ile sonuçlanmalıdır.⁸² Biyolojik olarak kabul edilebilir tamirde, kıkırdak dokusu; defekti kıkırdak benzeri ara maddeyle doldurmuş olmalı, eklem yüzey konturunu sağlamış olmalı, sağlam çevre kıkırdak ile birleşmiş olmalı ve yük taşımaya uygun şekilde sert olmalıdır.⁴ Tüm tedavi yöntemleriyle hyalin kıkırdak elde etmek mümkün değildir. Çoğu zaman iyileşme dokusu karışık bir histolojiye sahip olmakta ve doku içerisinde birden fazla kıkırdak tipine rastlanmaktadır. İdeali artiküler kıkırdak elde etmektir. Artiküler kıkırdak hyalin kıkırdağın kolonlar şeklinde hücre dizilimi ve derinlerde radyal, yüzeyde paralel organize olmuş kollajen liflerinden oluşan ve bir tidemark ile kalsifiye kıkırdak ve dolayısı ile subkondral kemiğe bağlı şeklindedir. Yani hyalin kıkırdak ile içeriği aynı olup organizasyon farkı içermektedir ki tamir yöntemleri ile bunu elde etmek zordur. Hyalin kıkırdak tip II kollajen ve proteoglikan aramadde sentezleyerek

salgılayan kondrositlerden oluşur. Fibröz kıkırdakta ise hem kondrosit hem de fibroblast bulunur. Bu nedenle aramada ağırlıkla tip I kollajenden oluşur. Fibröz doku ise fibroblastlardan oluşur ve tip I kollajen ağırlıklı aramada sahipdir. Bu kıkırdakların yük altında dayanıklılıkları da yukarıdaki sıraya göre düşmektedir.

Cerrahi tedavi seçeneklerini; palyatif, tamir ve rekonstrüksiyon olmak üzere üç grupta toplamak mümkündür. (Tablo 6) Aktivitesi düşük ve yaşlı hastalarda, debridman ve lavaj palyatif bir tedavi yöntemi iken aktivitesi ve yaşam kalitesi yüksek olan orta yaşdaki hastalarda ise 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 tercih edilmektedir.^{83,84,85}

Günümüzde sıklıkla uygulanan tedavi yöntemlerinin başında kemik iliği uyarı yöntemleri gelmektedir. Bu tedaviler sonucunda en iyi ihtimalle fibröz kıkırdak oluşmaktadır. Osteokondral greftler ile yapılan tedavilerde ise hazır oluşmuş artiküler hyalin kıkırdak 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 denenmektedir.⁸⁶

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 otogreft	Küçük lezyonlar, düşük / yüksek beklentili hastalar	Restoratif
Osteokondral allogreft	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

Tablo 6: Artiküler kıkırdak lezyonlarının tedavi seçenekleri⁵⁹

Eklem Kıkırdak Lezyonlarında Uygulanan Cerrahi Yöntemler

Eklemin Artroskopik Yıkanması ve Debridmanı

Kıkırdak tamir edici etkisinin olmamasına ve kısa etki süreli olmasına rağmen ABD’de en çok yapılan ortopedik ameliyatlar içinde 3.sırada yer alır.⁸⁷ Radyografik olarak bulguları çok ilerlememiş, mümkün olduğu kadar genç yaşta olan, dizilim bozukluğu olmayan, mekanik semptomları olan ve şikâyetleri akut olan hastalar seçilmelidir. Ameliyat debridman, parsiyel menisektomi, osteofitlerin alınması, parsiyel sinovektomi, serbest kıkırdak parçalarının ve instabil kıkırdakların temizlenmesi ile sonunda diz içinin yıkanmasını içerir.^{88,89,90}

Kemik İliği Uyarım Yöntemleri

Subkondral kemiğin bütünlüğünün bozulması ve yeni kıkırdak oluşumunun uyarılması için artroskopik olarak abrazyon, delme (drilleme) ya da mikrokırık gibi kemik iliği uyarı yöntemleri (KİUY) kullanılabilir. Mikrokırık yöntemi tarif edildiğinde endikasyon olarak evre IV odaksal ve dejeneratif kıkırdak yaralanmaları belirlenmiştir.⁹¹ Son yıllarda endikasyonları odaksal ve

sağlam kıkırdak ile çevrelenmiş (kapsanmış) yaralanmalar olarak değişim göstermiştir.⁹²

KİUY'nin endikasyonları aktif hastalarda femoral kondillerin, troklea ya da patellanın, semptomatik, odaksal, yüksek evre kondral yaralanmaları ve tesadüfen rastlanan kıkırdak defektleri olarak özetlenebilir.⁹³ Kıkırdak defektinin nedeni dejeneratif eklem hastalığı olsa dahi KİUY'nin başarılı olması için defektin odaksal tarzda olması ön şarttır.⁹²

KİUY çeşitli kliniklerde değişik boyuttaki lezyonlara uygulanmaktadır. Uygulanılabilecek üst sınır 4 cm² olarak belirlenmiştir.⁹³ Buna rağmen birçok yazar tarafından ancak 2 cm²'nin altındaki lezyonlara uygun bir tedavi yöntemi olarak bildirilmektedir.⁹⁴ Üst sınır talus için 1,5 cm çap olarak belirlenmiştir.⁹⁵

Mikrokırık yöntemi 1997 yılında Steadman ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir.⁹⁶ Mikrokırık artroskopik olarak gerçekleştirilir. Steadman'ın tarif ettiği orjinal teknikte üç portal kullanılmakla birlikte iki portalden de rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir. Artroskopi portalleri defektin yerleşimine göre belirlenmelidir.⁹⁷ Öncelikle instabil kıkırdak parçacıkları traşlanarak temizlenir. Hasarlı kıkırdak alanı subkondral kemiğe inmeden, kalsifiye kıkırdak zonunu da kapsayacak şekilde debride edilir. Kalsifiye kıkırdak tabakasının kaldırılması oluşan yeni kıkırdağın subkondral kemiğe daha iyi tutunmasını sağlar.⁹⁸ Buna karşın kalsifiye kıkırdak tabakasının korunmasının hyaline daha yakın kıkırdak oluşması ile sonuçlandığı savunulmuştur.⁹⁹

Defekt kenarlarından başlayarak, sağlam kıkırdağa yakın bölgede kıkırdağın hemen yanına mikrokırık bizi ile subkondral kemiğe dik olacak şekilde delikler açılır. Mikrokırık bizinin 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 bizi mevcuttur.⁹³ Mikrokırık oluşturma işlemi sırasında çekiç kullanılır ve deliklerin mümkün olduğu kadar birbirlerine yakın olması sağlanır. Çevreden başlayarak defekt ortasına doğru ilerlenir. Delikler 3 – 4 mm aralıklarla açılır ve aralarındaki duvarın kırılarak birleşmesinden kaçınılır. Deliklerin birleşmesi subkondral kemik plağının biyomekanik desteğini bozabilir. Yetersiz delik yoğunluğu oluşacak olan kıkırdağın kalitesini ve defekti doldurma miktarını etkiler. Derinlikleri 3 - 4 mm olmalıdır.⁹¹ Açılan deliklerden yağ

damlacıklarının çıktığı gözleendiğinde 3 – 4 mm, yani yeterli derinliğe ulaşılmış demektir.¹⁰⁰

Mikrokirik tekniğı 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 oluşturmasını sağlar. Bunu fibrovasküler bir tamir dokusu olan granülasyon dokusunun gelişimi izler. Mezenkimal kök hücreleri proliferasyon olurlar ve büyüme faktörleri ve çevresel faktörlerin etkisiyle kondrositlere dönüşürler. 2-4. Haftalarda yapılan histomorfik ölçümlerde oluşan dokunun içinde fibrokartilaj dokusu tespit edilememiştir.¹⁰¹ 6-8. haftada fibrokartilaj dokusu ve hyalin benzeri doku görülmeye başlar. Bu doku normal hyalin kıkırdak dokusundan farklıdır. Oluşan bu fibröz kıkırdak gerilmeye karşı dirençli olmakla birlikte baskıya karşı hyalin kıkırdak kadar dayanıklı değildir.^{66,102,103} 8.haftadaki iyileşme dokusu incelendiğinde %29'nun fibröz doku, %30'nun fibrokartilaj, %12'sinin granülasyon, %10'nun lezyon içeriğini doldurmuş olan kemik dokusu ve %12'sinin hyalin benzeri kıkırdak dokudan oluştuğı görülmüştür.¹⁰¹ Erken dönemde oluşan hyalin kıkırdağın sekizinci aydan sonra fibröz kıkırdağına dönüştüğü deneysel olarak gösterilmiştir.¹⁰⁴

Kolay uygulanabilmesi, ucuz olması, ek hazırlık gerektirmemesi, tek aşamalı olması ve diğer girişimlerin ileri uygulamalarını engellememesi önemli avantajlarıdır.⁹⁷

Osteokondral Otolog Transferi ve Mozaikplasti

Osteokondral otolog transferi (OAT – Osteochondral Autologous Transplantation) ilk olarak 1993'te Bobic ve Matusue tarafından tarif edilmiştir.^{105,106} 1991 yılında hayvan deneyleri ile başlamış, 1992 yılında standardize ekipmanın geliştirilmesi ile klinik uygulamaya geçilmiş, 1997'de ise klinik sonuçlar yayınlanmaya başlamıştır.¹⁰⁷

Hyalin kıkırdak elde etmekteki zorluklar nedeniyle osteokondral allogreft ya da otogreft uygulamaları geliştirilmiştir. Bu uygulamada amaç, yük binmeyen veya daha az yük bindiğı kabul edilen bölgelerden alınan osteokondral greftlerin hasarlı sahaya nakledilmesidir. Otogreft ile kıkırdak birleşmesindeki zorluğun üstesinden kemiğın kemiğe kaynaması ile gelinmiş olmaktadır.¹⁰⁸ Yeri değiştirilmiş hyalin kıkırdağın devamlılığını sağlayan en önemli neden, sağlam bir tidemark ve subkondral kemik ile birlikte transfer edilmiş olmasıdır.¹⁰⁵

Kıkırdak defektinin bir cm'den derin olduğu, yani kemik defektinin de eşlik ettiği yaralanmalarda OAT ilk tercih edilecek yöntemdir.¹⁰⁹ OAT uygulaması için kabul edilen defekt derinliği kıkırdak kalınlığının en az %50'sidir.¹¹⁰ OAT 2 – 6 cm² arası lezyonların tedavisi için uygun bir yöntemdir.^{111,112} Uluslararası Kıkırdak Tamir Derneği'ne göre mozaikplasti için defekt boyutu alt sınırı bir cm çaptır.¹¹⁰ Pratikte ise donor saha komplikasyonlarından kaçınmak için 2 cm çaptan küçük lezyonlara uygulanır.¹⁰⁰ Tek, tam kalınlık, 1-2,5 cm arasında çapa sahip kıkırdak defektleri artroskopik osteokondral greftleme ile tedavi edilebilir.⁶³ Üç cm²'den büyük, sağlam kıkırdak ile çevrili olmayan, bir cm'den derin defektlerde osteokondral taze ya da taze donmuş allogreft kullanılma endikasyonu da mevcuttur.¹¹³

OAT, diz gibi talus, tibia, humerus, kapitellum ve femur başının kıkırdak yaralanmalarında da uygulanabilmektedir.¹¹⁴

Mozaikplasti tekniği Hangody ve Karpati tarafından tarif edilmiştir.¹¹⁵ Açık, mini-artrotomi ya da artroskopik olarak gerçekleştirilebilir. Defekt çapı 2 cm'den küçükse ve dört - altı greftten daha fazlası gerekmeyecekse artroskopik olarak yapılabilir.¹⁰⁷ Altı mm'lik silindirler artroskopik olarak alınabilecek en büyük greftlerdir. Daha büyüğü artrotomi gerektirir ve patella ile donor sahanın temas ihtimalini arttırmaları.⁶³

6 cm²'den büyük defektlerde mozaikplasti başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bunun bir nedeni bu kadar greftin bulunma problemi bir diğeri de bu defekti dolduracak kadar çok sayıda greftin sıkışarak tespit olmasındaki problemdir.¹¹⁵ Mozaikplasti yine de zorunlu durumlarda 8 – 9 cm²'lik defektlerin tedavisinde de kullanılabilir. Ancak bu durumlarda donor saha morbiditesi yüksek olmaktadır.¹¹⁴

Osteokondral greftler femur kondillerinin posteriorları, medial femoral kondilin anteromediali, troklea medial ya da laterali, interkondiler çentiğin anterolaterali, patella ya da fibula başından alınabilmektedir.^{116,117} İlk tercih femoral kondilin superolateral çıkıntısıdır.

Diz ekleminde kıkırdak kalınlığı 0,9 – 3,7 mm arası değişmektedir. En ince bölge interkondiler çentiğin laterali, en kalın bölge ise medial kondilin orta kısmıdır.¹¹² Her ne kadar interkondiler çentik ve troklea distal ve mediali donor 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 önerilmektedir.¹¹⁸

Mozaikplastide kullanılan osteokondral greft boyutları kullanılan sisteme göre değişiklik göstermektedir. Dört, 6, 8 mm çapında greftler alınabildiği gibi bunların ara boyutları da mevcuttur. Alınan greftler açılan yuvalardan 1 mm kadar büyük olmalıdır ki yerleştirme sırasında sıkı bir tespit mümkün olsun. Küçük çaptaki greftler ile eklem konturu daha iyi şekillendirilebilir.¹¹⁹ Ancak küçük silindirlerin kuvvet ve stabiliteleri daha azdır ve işlemin basamak sayısını artırırlar.⁶³ Kondral defektler için 15 mm uzunluğunda greft, osteokondral defektler için 20 - 25 mm önerilir.¹¹¹ Bazı setlerde standard greft uzunluğu 8 mm'dir.¹²⁰

Osteokondral greftler tübüler osteotomlar ya da trefinler yardımı ile alınır. Greftlerin eklem yüzüne dik olarak alınması çok önemlidir.^{108,121} Greft alınan saha bir yıl içinde fibröz ve kemik doku karışımı ile dolar. Bu doku bazan hipertrofiye uğrayarak kıkırdak seviyesinin üstüne de çıkabilir.^{63,117}

Tedavinin başarısını belirleyen en önemli etken greftlerin hatasız yerleştirilmesidir. Cerrahın mümkün olduğunca greftin kıkırdak katmanının derinliğini sağlam kıkırdağın derinliğine uydurmaya çalışması gerekir.¹²² 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 verir.¹²³ Uygun yerleştirilmeyen greftler çökme ya da fibröz pannus dokusu ile aşırı büyümeye maruz kalabilirler.⁸⁶ Greftler eklem yüzüyle aynı seviyede olmalıdırlar.¹¹⁹ Ek olarak, greftlerin eklem yüzüne göre bir mm yüksek ya da bir mm alçak kalması tepe temas basıncını belirgin şekilde arttırmaktadır.¹²³ Greftin 0,5 mm yüksek kalması dahi üzerindeki baskıyı %50 artırır.⁶³

Standard bir uygulamada mozaikplastisi ile defekt alanının %60 – 70'i hyalin, %30 – 40'ı defekt tabanındaki kemikten köken alan fibröz kıkırdak ile dolar.¹⁰⁷ 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.^{124,125}

Osteokondral greftler 6-14 hafta içerisinde tamamen entegre olmaktadır.⁸⁶ Greftlerdeki kondrositler sinovyal sıvıdan beslendikleri için transplantasyon sonrası kan akımı kesilmiş olsa dahi yaşamlarını ve işlevlerini sürdürürler.¹²⁶ Greftlerin kemik kısımları arasında kaynama problemi genellikle görülmezken kıkırdak birleşim yerlerinde iyileşme olmaz.¹²⁷ Osteokondral greftlerin kıkırdağı ne çevre sağlam kıkırdak ile ne de aralarını dolduran fibröz kıkırdak ile birleşmezler.¹²⁸ Birleşim yerleri makroskopik olarak devamlı görünse bile histolojik incelemede yarık olarak kalmaktadır.¹²⁹ Sağlam tespit olmayan greftlerin aralarından sinovyal sıvı geçişi ve bu nedenle subkondral kist oluşumu gözlenebilir.¹³⁰

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 bildirilmiştir.¹²⁹ OAT, kondrosit ihtiva eden doğal hyalin kıkırdak naklini sağlaması yanında hastalık geçişine neden olmaması ve güvenli bir kemik kaynamasının olması gibi avantajları vardır.

Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Kondrositler ilk defa Chesterman ve Smith tarafından 1968 yılında izole edilerek kültürde çoğaltılmışlardır.¹³¹ Bentley ve Greer 1971 yılında kondrositleri ayırarak kıkırdak yaralanmalarını tedavi etmişlerdir.¹³² Otolog kondrosit implantasyonu konsepti Grande ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş Brittberg tarafından klinik uygulamaya geçilmiştir.^{133,134} 1997'de yöntem FDA onayı almıştır. Bundan sonra Peterson tarafından 11 yıllık sonuçlar yayınlanarak yaygınlaşmıştır.^{135,136} İlk yılında yöntem otolog kondrosit transplantasyonu olarak anılmış ancak daha sonra isim yanlışı düzeltilerek otolog kondrosit implantasyonu (Autologous Chondrocyte Implantation – ACI) bu terimin yerini almıştır.¹³⁷

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 ve olgunlaşmasının zaman alması gibi dezavantajları vardır.^{66,138,139,140}

ACI, femoral kondiller, troklea ya da patellanın ICRS (International Cartilage Research Society) evre III ve IV kıkırdak yaralanmalarının tedavisinde

endikedir. Onbeş – 55 yaşlar arasına uygulanabilmektedir.¹¹ Kırk yaş üstünde kemik iliği uyarı yöntemleri yerine ACI tercih etmek daha iyi sonuç verir.¹⁴¹ İki cm²'den küçük defektlerin tedavisinde ilk tercih mikrokirik ya da osteokondral otolog transferdir (OAT). İki – 12 cm² büyüklüğündeki tam kat kıkırdak defektlerinin tedavisinde ACI kullanılabilir. 2.5 – 3 cm²'den büyük defektler ACI ile tedavi edilmelidirler.^{134,142,143,144,145} İki cm²'den büyük defekti ve yüksek aktivite seviyesi olan hastalarda ilk seçenek tedavi ACI'dır.¹⁴⁶ İyi çevrelenmemiş büyük defektlerin ikinci seçenek tedavisi ACI'dır.¹⁴⁷

ACI; diz, ayak bileği, omuz ve dirseğe uygulanabilir. Çocukluk kondral yaralanmalarında en fazla sonucu bildirilmiş ve en çok tercih edilen yöntemdir.¹⁴⁸

ACI'nın ilk basamağı eklemde artroskopik muayenesi ve üretilecek üzere kıkırdak doku alınarak laboratuara gönderilmesidir. Kıkırdak doku femoral kondil proksimallerinden yani trokleanın medial ya da lateral kenarından ya da interkondiler çentik çevresinden alınabilir.^{124,140,149} 140 – 500 mg arası ağırlıkta, 0,5 X 1 cm - 1 X 2 cm'lik üç – dört şerit şeklinde kıkırdak dokusu bir halka uçlu artroskopik küret yardımı ile alınır.^{124,135,137,140,150,151} Alınan parçalar kas, bağ ya da kemik dokudan ayrılarak 1 – 3 mm³'lük parçalara doğranır ve transfer solüsyonuna atılır.^{135,140} Bazı laboratuvarlar kıkırdak parçalarının laboratuarda doğranmasını tercih etmektedirler. Ancak 1 mm³'lük parçalara ayrılmış kıkırdağın transport sırasında daha dayanıklı olduğu gösterilmiştir.¹⁵² Kıkırdağın derin katmanlardan alınmasına özen gösterilir çünkü en fazla kondrosit buralarda yerleşmektedir.¹⁵⁰ Dokular %0,9'luk NaCl içerisinde oda sıcaklığında laboratuvara gönderilir. Birçok hücre kültürü laboratuvarı hücre beslemek için otolog serum kullanmaktadır. Bu nedenle kıkırdak doku ile birlikte 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 -4- -8°C'de dondurularak laboratuara gönderilir. Alınan dokuda 2 - 3 X 10⁵ hücre vardır. Kıkırdak sağlam dokudan alınmalıdır.

Laboratuara 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

değişmemektedir.¹⁵³ Kültür sırasında hastanın kendinden alınan serum kullanılabilir.¹⁵⁰ Otolog serumun hücre kültüründe kullanılması fetal bovine seruma göre daha hızlı çoğalma sağlamaktadır.¹⁵⁴ Hücrelerin ekim sırasında yoğun olması istenen bir şeydir. Mililitrede 20 – 100 milyon arası hücre bir matriks içerisinde farelerin ciltaltına yerleştirildiğinde kıkırdak oluşturmaktadır. Bu nedenle ideali mililitrede 30 milyon hücre implante etmektir.¹⁵⁵ Çeşitli ürünlerde değişik hücre sayıları verilmektedir. $3.2 - 12 \times 10^6$ arasında hücre sağlayan laboratuvarlar vardır.^{124,137,140,150,153} Ortalama implante edilen hücre sayısı ise 4.5 milyondur.^{135,142} Bu miktarda hücre yaklaşık iki – üç haftada üretilmektedir.¹³⁵ Hazırlanan hücreler süspansiyon halinde 4 derece sıcaklıkta saklanır.¹³⁷ Üretilmiş hücrelerin dondurularak daha uzun süre saklanması denenmiş ancak donan hücrelerde implant olarak etkinlik kaybı gözlenmiştir.¹⁵⁰ Alınan kıkırdak dokunun, ya da üretilmiş kondrositlerin normal oda sıcaklığında yedi güne kadar bekletilmelerinde hücrelerin canlılığına ya da çoğalma potansiyellerine etkisi olmadığı gösterilmiştir.¹⁵² 10 cm^2 '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 laboratuvara göre değişmektedir. Genellikle sterilite (bakteri ve mantar tesbiti), endotoxin varlığı, hücre canlılığı (%85'ten fazla olması beklenir) ve hücre sayısı ikiye katlanma zamanı açısından incelenerek teslim edilir.^{135,138,156}

Biyopsi ile implantasyon arası süre dört - altı hafta kadar olabilmekle birlikte cerrah ve hasta tarafından belirlenecek uygun bir zaman aylarca da beklenebilir.¹⁵⁷ Genellikle üç - beş hafta içerisinde ikinci girişim artrotomi uygulayarak yapılır.¹⁵⁰ Medial parapatellar artrotomi yapılabilir. Medial kondil lezyonları için subvastus yaklaşım kullanılabilir.¹³⁷ Defekt tabanı ve kenarları sağlam kıkırdağa kadar temizlenir.¹⁵⁸ 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 payıdır.¹⁴⁹ Kondiller için periost grefti alınacağına 2

mm daha büyük, troklea ya da patella için alınacağında defektten 3 mm 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 edilir.¹⁴⁹ Periost tibiadan sıyrılırken kambiyum tabakasını tam alabilmek için mümkün olduğunca kemiğe yakın sıyrılmalıdır.¹⁵⁹ Periostun uygun şekilde alınması teknik olarak zordur. Üzerindeki katmanların da birlikte alınması fibröz aşırı büyüme ihtimalini artırır. Periostun sadece kendisinin alınması bu yüzden önemlidir.¹⁶⁰

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.^{137,150} ACI'nın tip I/III kollajen membran kullanılarak yapılan şekline ACI-C ismi verilmektedir.¹⁶¹ Bu membranın kullanılması ile kalsifikasyon ya da hipertrofiye hiç rastlanmamıştır.¹⁶² Tip I/III kollajen gibi biyobozunur kollajen şerit Bioseed C (Biotissue, Freiburg, Almanya) ile de benzer sonuçlar alınmıştır.¹⁶³ Bioseed-C ile dört yıllık takiplerde iyi sonuçlar elde edilmiştir.¹⁶⁴ Tip II kollajen ile yapılan deneysel çalışmalardan beklenen başarı elde edilememiştir.¹⁶⁵

Periost greftinin kambiyum tabakası subkondral kemiğe bakacak şekilde yerleştirilir.¹²⁴ Üç – 4 mm aralıklarla 6/0 vicryl ile sağlam kıkırdağa dikişler atılır.¹⁵⁰ ACI-C için tip I/III kollajen membranın düzgün katmanı mekanik sağlamlık sağlar ve dikilebilmesine olanak verir. 6/0 vicryl ile 3 mm aralıklarla dikilir.

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 verebilirler.¹⁵⁹

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 vardır.¹²⁴ Enjeksiyon için 18 gauge plastik intraket ve ppd

enjektörü kullanılır. Her tüp yaklaşık 10 – 12 milyon hücre içerir ki bu miktar 10 cm²'lik bir defekt için yeterlidir.¹⁴⁹ Debride edilmiş defekt santimetrekaresine en az 1 milyon hücre verilmesi önerilmektedir.¹⁶⁶ Son dikiş atılır ve fibrin yapıştırıcı ile mühürlenir.^{150,158} Enjeksiyon sonrası diz tam ekstansiyona getirilerek greftin karşı tarafla temas etmediği doğrulanır.¹⁴⁹

ACI dayanıklı bir iyileşme dokusu sağlar.¹³⁵ Periostun kondrositlerin çoğalmasını destekleyici parakrin etkisi vardır. Ayrıca ekilmiş kondrositlere mekanik bariyer oluşturur. ACI sonrası yapılan histolojik incelemelerde periostun hyalin benzeri bir katman altında fibröz kıkırdağa dönüşmüş artıkları gözlenebilmektedir.¹⁶⁰ ACI sonrası oluşan rejenerasyon dokusu hyalin kıkırdağın tüm özelliklerini taşımaktadır. Yapı taşları aynı olmakta ancak mimarisinde farklılıklar gelişmektedir.¹⁶² Oluşan tamir dokusu hyalin benzeridir. Ancak hyalin kıkırdaktaki gibi kolonlar halinde kondrosit dizilimi görülmez. Bunun yerine osteoartritte görülen kümeler halinde kondrosit birikmelerine rastlanır. Bu da dokunun olgunlaşmamış olduğunun göstergesidir. Bir yıl sonraki incelemelerde ise kolonlar halinde dizilime yer yer rastlanmaktadır.¹⁶⁷

Kollajen dağılımı değerlendirildiğinde dokuların %65'i fibröz kıkırdak ağırlıklı, %15'i hyalin, %17'si karışık ve %3'ü fibröz doku ağırlıklıdır. İlerleyen zamanla 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 edilmiştir.¹⁶⁸ Üçüncü ile beşinci yıllar arası yapılan incelemelerde olgunlaşma sürecinin halen devam ettiği görülmüştür.¹⁶⁹ ACI sonrası oluşan dokunun ortalama kalınlığı 2,9 mm olarak ölçülmüştür.¹⁶⁹ Enjekte edilen kondrositler yerçekimi etkisiyle defekt pozisyonuna göre altta kalan bölgede birikerek buradan tamire başlarlar.¹⁶⁹ Altıncı ayda yapılan histolojik incelemelerde yüzeyel kısımların fibröz kıkırdak derin tabakaların ise hyalin özelliği gösterdiği saptanmıştır.^{124,170}

Kondrositlerin en fazla tutunma oranı ilk 24 saatte gerçekleşmektedir. İmplant edilen hücrelerin dördüncü haftaya kadar ancak %14'ü yaşamakta, sonra sayıca artış göstermektedirler.¹⁷¹ Deneysel çalışmalar kemik morfojenik proteinlerin kondrosit çoğalması ve aramadde sentezi üzerinde pozitif etkisi olduğunu göstermişse de bu proteinlerin tümör başlatma ve iletme potansiyelleri nedeniyle henüz klinik kullanımları mevcut değildir.¹¹

Cinsiyet, defekt büyüklüğü, yerleşimi ya da sayısının ve ek yaralanmaya yönelik girişimlerin sonuç üzerine etkisi görülmemiştir. Etkili olan tek unsur yaralanma ile tedavi arasındaki süre olmuştur. Bir yıldan daha kısa sürede tedavi olanlarda başarı şansı daha fazla bulunmuştur.¹⁴⁹

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.^{135,138,142,149,155,156,172} Medial femoral kondildeki lezyonların tedavi sonucu lateral femoral kondil ve trokleadakilere oranla daha kötüdür.¹⁶¹

ACI'ya bağlı komplikasyon insidansı %3.8'dir.¹⁷³ En sık görülen komplikasyonlar yeni oluşan kıkırdığın hipertrofisi (%5), yeni oluşan kıkırdak ile çevre kıkırdığın yetersiz birleşmesi (%4), greft oluşma kusuru ya da yetersiz oluşması (%3) ve delaminasyon, yani yeni oluşan kıkırdığın subkondral kemikten ayrılmasıdır (%3).^{166,173}

ACI girişiminden sonra hastaların tekrar bir cerrahi geçirme ihtimali yüksektir. Tekrar girişim geçirme oranları %17 ile 57 arası geniş bir aralıkta bildirilmektedir.^{147,166,174,175} Yaş ya da defekt büyüklüğü ile revizyon insidansı arasında bağlantı yoktur.¹⁶⁶ En fazla tekrar cerrahi gerektiren sorun periostun hipertrofisi ya da ayrılmasıdır.¹³⁸ Periost hipertrofisi hastaların %22'si ile 40'ı arasında görülmekte, bunların da %13 -19'u semptomatik olmaktadır.¹⁷⁴ Hipertrofinin nedeni, periostun sürtünme ile uyarılması ve aşağıdan gelen yeni kıkırdığın iteklemesi olduğu düşünülmektedir.¹⁷⁴ 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 öngörülmektedir.¹⁶⁶

ACI-C'de hipertrofi %3 - 10, birleşme kusuru %25 oranında görülmektedir.¹⁷⁶ 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 bulunmuştur.¹⁶⁶

Matriks Rehberli Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Otolog kondrosit implantasyonunun (ACI); hücre süspansiyonu kullanmak, periostu su geçirmez bir şekilde kapatmak ve bu nedenle kıkırdağa

dikiş geçirmek ve ikinci seansta artrotomi yapmak gibi teknik dezavantajları vardır.⁵ Standard 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 olmaktadır.⁶ 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.^{5,7}

Fibrin yapıştırıcı; fibrin ve trombin varlığında fibrinojenin polimerizasyonu ile oluşur. Şekil verilebilen, sitotoksitesi olmayan, biyoyumlu ve biyobozunur bir maddedir. Fibrin yapıştırıcı kondral ve osteokondral fragmanların tespitinde kullanılmaktadır.¹⁷⁷ Tespit gücü başta yetersiz görünmekle birlikte zamanla artmaktadır.¹⁷⁸ Fibrin yapıştırıcı elde edebilmek için 70 - 110 mg/ml fibrinojen 3000 KIE/ml aprotinin ile 4 IE trombin 40 mmol/L kalsiyum klorid karıştırılır ve iki karışım 37⁰C'ye kadar ısıtılır. Bu iki karışımın karıştırılması ile yapıştırıcı elde edilir.¹⁷⁸

MACI cerrahi tekniğinin ilk aşaması ACI ile aynıdır. Yüz ml otolog kan ile birlikte 5x10 mm boyutunda kıkırdak 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.^{9,55,179} 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 gösterilmiştir.¹⁸⁰ Fibrin yapıştırıcı ile hücreli retiküler pürüzlü kısım subkondral kemiğe bakacak şekilde yapıştırılır. Üç dakika boyunca basınç uygulayarak yapışma beklenir. Gerekirse dikiş ile kuvvetlendirilebilir.¹⁸¹ Dize birkaç defa fleksiyon - ekstansiyon yaptırılarak implantın stabilitesi kontrol edilir.¹⁸²

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. Fibrin yapıştırıcı ve gerekirse birkaç dikiş ile 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.^{183,184}

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 edilir.¹⁸⁵ Beş cm²'ye kadar olan defektlerde MACI artroskopik olarak uygulanabilmektedir.¹⁸⁶

MACI'de altı ayda histolojik olarak hyalin kıkırdak oluşmaya başlar.¹⁸⁷ Altıncı ayda yapılan histolojik incelemeler %75 oranında hyalin kıkırdak içeriği göstermektedir. Kıkırdağın olgunlaşması 18 ay kadar sürmektedir. Bu süre sonunda üçüncü defa artroskopi yapılarak biyopsi alınan hastalarda hyalin kıkırdağa rastlanmış, fibröz kıkırdağa ise rastlanmamıştır.¹⁸⁸ Buna karşın MACI sonrası hastaların %25'inde hyalin, %42'sinde fibröz kıkırdak, %33'ünde de karışık kıkırdak gösteren yaygın da mevcuttur.¹⁸⁹

ACI-C ve MACI'de periost kullanılarak uygulanan ACI'lara göre daha fazla birleşme kusuru görülmektedir. Delaminasyon ise en az MACI'de görülmektedir.¹⁶⁶ Matrislerin kullanıldığı yöntemlerde iyileşme dönemi boyunca zaman zaman efüzyon atakları gelişebilmektedir.¹⁹⁰ Sentetik malzemelere karşı geç inflamatuvar yanıt oluşma riski vardır.¹⁹¹ 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.^{166,181}

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 başına ya da birlikte kullanılmasını içermektedir.

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 den beri, ACT dünya çapında 12,000 den fazla hastada, tam kalınlık kıkırdak defektlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır.¹⁹² 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, yeni teknikler, hücre kaynakları ve biyomateryaller bu sorunların üstesinden gelmek ve onarımın kalitesini artırmak için kullanılmaktadır.

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 7)

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

Tablo 7: Kıkırdak doku mühendisliği için uygun hücre kaynakları

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 senteziyle karakterizedirler. Kondrositler, matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve doku inhibitör metalloproteinazlarını (TIMPs) içeren anabolik ve katabolik süreçlerin dengesi sayesinde kırık dokuyu matriksini korur ve yeniden şekillendirir. Kırık dokunun onarımında hücre kaynağı olarak kullanılması için bu özelliklerinin korunması önemlidir. Kırık dokunun mühendisliği için büyük zorluklardan biri de defekt bölgesini doldurmak için yeterli sayıda hücre elde etmektir.

Eklem kırık 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, matriks modülatörleri, src homolog kollajen (SHC) gibi sinyal proteinlerinin aktivasyonu ve hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (Erk1/2)'ın salınımındaki değişiklikler kondrositlerin farklılaşma bozukluğuna eşlik eder ve geri dönüşümsüz olarak farklılaşmamış hücreler için erken dönemde marker veya sinyal olarak kullanılır.^{193,194,195,196,197,198}

Agaroz, aljinat boncuk ve fibrin yapıştırıcı gibi üç boyutlu kültürler artmış agregan üretimi ve tip II kollajen salınımı sayesinde kondrosit fenotipini koruyabilirler.^{199,200,201}

Eklem kırık dokusu; hücre morfolojisi, biyomekanik bileşim ve yapısal özellikler bakımından birbirinden farklı olan tabakalardan oluşmaktadır. Yüzeyel, orta ve derin tabakalardan oluşan anizotropik bir dokudur.²⁰² Her tabaka yapı ve işlevsel olarak çeşitlilik gösterir ve farklı uyarılara cevap vererek farklı proteinler sentezler. Her tabakadan izole edilen kondrositin farklı büyüme oranları, gen ekspresyonu ve biyosentez seviyeleri vardır. Örneğin, yüzeyel tabakadan izole edilen kondrositler artmış yüzeyel 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.^{203,204} Bu da derin tabakayı yüzeyel tabakaya kıyasla mekanik özellik bakımından daha sağlam yapar. Tipik olarak, eklem kırık dokunun mühendislik çalışmalarında hayvanlardan homojen hücre karışımlarını kullanır. Bu kondrositler yüksek miktarda ECM sentezler ancak bölgesel organizasyondan

eksiktirler. Bu nedenle günümüzde bölgesel organizasyonun sağlayabilmek için çok tabakalı hidrojel ve porlu gradyent scaffoldları içeren metotlar araştırılmaktadır.

İki tabakalı poli (etilen oksit) diakrilat (PEODA)²⁰⁵ ve çok tabakalı poli (etilen glikol) diakrilat (PEGDA)²⁰⁶ hidrojjeller, eklem kıkırdağı kondrosit subgruplarının büyümesine yardımcı olmak için üretilmiştir. Çoklu katmanların ardışık fotopolimerizasyonunun kullanımıyla, hücre grupları 3D yapılarıdaki katmanlara başından sonuna kadar dağıtılabılır. Bu çok katmanlı yapılar doğal kıkırdaktakine benzer hücre ve ECM dağılım paterni ortaya koyar.²⁰⁶

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 kıkırdakta kondrositlerin 2'e katlanma zamanı ve hücre proliferasyonu 4 kat hızlı bulunmuştur.²⁰⁷

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 4 kat daha hızlı proliferolurlar.²⁰⁸

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 agrekan 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 görüldü.²⁰⁹

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 gösterilmiştir.²¹⁰

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 yönlendirilebilirler.²¹¹ Demineralize kemik varlığında ya da laktik asit varlığında cilt fibroblastları aggregan ve tip II kollajen gibi kıkırdak özellikli matriks proteinleri üretirler.²¹²

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- β 1 varlığında kültüre edildiğinde kondrogenezis sağladığı bulunmuştur.²¹³ Kondrosite dönüşme potansiyeli olan kök hücreler mezankimal kök hücrelerdir (MKH). MKH'ler kemik iliği, sinovyal membran, epidermis ve adipoz dokudan elde edilebilmektedir.^{214,215,216,217} Kemik iliğindeki her 105 hücreden biri MKH'dir.²¹⁸ 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 bağımlıdır.²¹⁹

In vitro koşullarda yapılan bir çalışmada, PGA da kültüre edildikten sonra fareye implante edilen soğukda korunmuş insan BMSCs'leri 10 hafta sonra kıkırdağa benzer doku ürettiği görüldü.²²⁰ 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 düzeydedir.²²¹

Adipoz kaynaklı kök hücreler (ADSC); daha düşük yaşlanma seviyeleri ve istikrarlı büyümesiyle uzun süre kültürü yapılabilir.²²² Bu hücreler immünfloresan ve flowsitometriyle tespit edildiği kadarı ile mezenşim kökenlidir ve TGF- β , askorbat ve deksametazon varlığında kondrositlere farklılaşabilme yeteneğindedir.²²³

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

arttırır.^{224,225} Kondrogenezise gitme özelliklerine rağmen, kemik iliği gibi diğer kaynaklardan izole edilen kök hücrelere kıyasla ADSC'lerin daha düşük kondrojenik potansiyelleri olduğu gösterilmiştir.^{226,227,228}

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 gözükmemektedir. 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 göstermiştir.²²⁹

Skafoldlar

Skafoldlar; kıkırdak yenilemesinde hücre iletimi amacıyla kullanılmaktadırlar. Skafoldlar, kıkırdak 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 kıkırdak dokusu ile yapışma ve birleşme özelliklerine sahip olmalı, hücrelerin içerisine yerleştirilmesine uygun olmalı ve defekt yerinin mekanik bütünlüğünü sağlayabilmelidir.^{230,231} Skafold yıkımı enzimatik veya hidrolitik şekilde olabilmektedir.

Bugüne kadar, kıkırdak 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.^{232,233,234} 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 sağlar.²³⁵

Hidrojeller ya fiziksel ya da kimsyal 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 belirler.²³⁶

Polietilenglikol (PEG); göreceli olarak hareketsiz bir polimer olup kondrogenezi destekler. PEG hidrojellere parçalanabilir laktik asitlerin eklenmesi ile hücre proliferasyonu ve ECM sentezi artırılabilir.²³⁰

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 yapar.²³⁷ HA metakrilat grupları ile modifiye edilebilir. Bu sayede hidrojelin şişme oranı ve hücre canlılığı azalırken, makromer konsantrasyonları, kompresyon modülüsü ve bozulma süresi artar.²³⁸

Fibrin yapıştırıcı doğal bir polimer olup trombin ve fibrinojenin polimerizasyonu ile oluşur. Doku yapıştırıcı olarak iyi biyoyumluluk gösterir ve integrin bağlayıcıları ile hücre-matriks etkileşimini kolaylaştırır.²³⁹ Otolog kandan yapıldığı için doğal bir skafold görevi görür. Tek dezavantajı uygulandığında

büzülmeye eğimli olmasıdır. Son zamanlarda fibrin jelin 3 hafta boyunca sabit kalmasını sağlamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır.²⁴⁰

Tip 1 kollajen skafoldlar; tam kat kırıkta defektlerinin otolog kondrosit transferi ile tedavisinde kullanılmıştır.²⁴¹ Aljinat; kahverengi deniz yosunlarında bulunan polianyonik polimerlerdir ve 2 değerlikli katyonlarla çapraz bağlanarak kararlı jel haline gelebilir. Aljinat boncuk ve hidrojeller kondrosit genişlemesini ve kök hücrelerin uyarılması için kullanılmaktadır.^{242,243} Son zamanlarda, araştırmacılar hibrid skafoldlar oluşturmak için aljinat jelleri sentetik adezyon peptitleri ile veya diğer materyallerle modifiye etmeye çalışmaktadırlar.^{244,245}

Agaroz; asya yosunlarında üretilmiş ve soğutulduğunda katılaşabilen lineer polisakkarittir. Agarozu sık kullanılmasının nedeni hücrelere uygulanacak mekanik yükleri aktarabildiğinden, deformasyon oluşturacak yüklenmelerde kondrosit cevabını ölçebilmek içindir.²⁴⁶

Kitosan bir biyosentetik polisakkarit olup eklem bacaklıların dış iskeletinde bulunan kitinden türemiştir. Oda sıcaklığında sıvı iken ve fizyolojik sıcaklıklarda bir jel şeklindedir. Kitosan; biyoyumlu, in vivo şartlarda lizozim ile yıkılabilen, büyüme faktörleri ve adezyon proteinleri ile etkileşime girebilen yarı kristal polimerdir.^{247,248}

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 etkiler.²⁴⁹ 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 gelmiştir.²⁵⁰

Yine bugüne kadar doku mühendisliğinde birçok sünger kullanılmıştır. Bunlardan birkaçı; poli (alfa-hidroksi esteri), alginat, poliglaktin/polidioksanon, kitosan, silk fibroin, HA, kollajen ve jelâttir. Poli(1,8 oktanediol sitrat-POC) yeni bir elastomer ürünü olup, eriyebilir şekilde üretildi ve in vitro ortamda kondrosit büyümesini desteklediği görüldü.²⁵¹ 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 kıkırdak dokusunda hızlı iyileşmeyi ve birleşmeyi sağladığı gösterildi.²³² Kitosan; donma-kurutma ve liyofilizasyon işleminden sonra sünger şekline dönüşebilir.²⁵²

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 ester)'leridir. Bu meşler 1990'lardan 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 yapısında 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 göstermişlerdir.²⁵³

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.^{254,255} Ayrıca tavşanlarda yapılan bir çalışmada PLGA skafold içine ekilen MKH'lerin 12 hafta sonra parlak, beyaz hiyalin kıkırdak oluşturduğu gösterilmiştir.²⁵⁶

Sellüloz ve HA türevleri gibi doğal materyaller fibröz skafold olarak kabul edilmişlerdir. Dokunmamış selüloz'a kalsiyum fosfat eklendiğinde hücrelerin daha iyi tutunduğu gösterilmiştir.²⁵⁷

Uyarıcı Faktörler

Doku mühendisliği triadının üçüncü parçası olarak uyarıcı faktörler 2 gruba ayrılmaktadır büyüme faktörleri ve mekanik uyaranlar.

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 kırıkta üretimini ve ekstrasellüler matriks sentezini arttırdığı için yaygın olarak kullanılmaktadırlar.²⁵⁸

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.^{259,260,261}

FGF-2, yara iyileşmesinde görevli bir mitojendir. Kondrositlerin tek tabaka haline genişlemesini ve çoğalmasını artırır bu sayede ekstrasellüler matriks birikimi artarken ve iyileşmede hızlanmış olur.^{262,263,264,265,266}

BMPler, hem kondrogenезisi, hem de osteogenезisi etkiler ve implant bölgesinde osteokondral birleşmeye yardımcı olduğu için in vivo osteokondral defekt çalışmalarında kullanılabilir. Bu morfojenik proteinler, kondrosit farklılaşmasını ve ekstrasellüler 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 2 kollajen ve agrekan üretimlerini artırır, BMP-7 ise proteoglikandan zengin ekstrasellüler matriks üretimini artırırken ve skafoldlara fibroblast girişini azaltır.²⁶⁷

Gen Tedavisi

Gen tedavisi; viral veya viral olmayan vektörler kullanılarak özel genlerin eklem içerisine doğrudan in-vivo veya dolaylı ex-vivo şekillerde yerleştirilmesini içerir.^{268,269,270} Doğrudan in-vivo yaklaşım, vektörün doğrudan eklem boşluğuna yerleştirilmesi ile olurken; ex-vivo yaklaşımda, vücut dışında genetik yapısı değiştirilmiş hücrelerin vücuda yeniden transferi vardır.²⁷¹

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 gösterilmiştir.²⁷²

Transfekte edilen skafoldlarda artmış proliferasyon oranları ve tip2 kollajenler ile agrekan artışı gösterilmiştir. Ayrıca, PGA süngerlerle yapılan çalışmalarda, sadece 6 haftada yara iyileşmesi ve defektlerin giderilebildiği

gösterilmiştir.²⁷³ Kıkırdak rejenerasyonu için gen tedavisi henüz çok yeni olmakla beraber, daha iyi araştırmalarla geliştirilebilecek bir tedavi modelidir.

Hidrostatik Basınç

Eklem boşluğunda kıkırdaklar, azalmış oksijen ve aralıklı hidrostatik basınç etkisinde bulunur. İn vitro şartlarda da aynı durum yaratılarak kıkırdak üretilbileceği düşünülmüştür. Düşük oksijen yoğunluğu (%5) proliferasyonu ve tip2 kollajen salınımını ve kıkırdak spesifik matriks proteini sentezini artırır.²⁷⁴ 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 gözlenmiştir.²⁷⁵ Bu çalışmalar sonucunda; 0,1 MPa basıncın Sox 9 ve aggrecan madde; 10 MPa basıncın ise tip2 kollajen üretimi için ideal basınç değerleri olduğu gösterilmiştir.²⁷⁶

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 denenmiştir.²⁷⁷ 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 gösterilmiştir.²⁷⁸

Katabolik ve anabolik etki olarak yeni matriks sentezini artırarak yeniden yapılanmayı sağlar.²⁷⁹ Uniaksiyel olarak yapılan tek yüklenmenin (1 kPa, 1 Hz, 30 min) proteoglikan ve kollajen sentezini arttırdığı ve mekanik özellikleri geliştirdiği gösterilmiştir.²⁸⁰ 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 gösterilmiştir.²⁸¹

Biyoreaktörler

Biyoreaktörler, kıkırdağın in vitro ortamda hızlı büyümesini ve gelişmesini sağlamakla görevlidir. Besin transportu ve hidrodinamik bir ortam sağlanarak kıkırdak 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 gözlenmiştir.²⁸² 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 silindirik 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.^{283,284,285}

Eklem Kıkırdak Lezyonlarında İyileşmenin Değerlendirilmesi

Kıkırdak iyileşmesini değerlendirilmesinde görüntüleme yöntemleri, klinik skorlar, artroskopik inceleme gibi dolaylı ve biyomekanik, histolojik ve biyokimyasal yöntemler gibi doğrudan yöntemler vardır.²⁸⁶ 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 muayenedir.²⁸⁷ 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 bulunmuştur.²⁸⁸

Kıkırdak tedavi yöntemlerinin sonuçlarını değerlendirmede ICRS ve OAS puanlamaları doğrulanmış yöntemlerdir.²⁸⁹ 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.^{91,145} Skorumanın ameliyat öncesinde bir defa ve ameliyat sonrasında yılda bir defa yapılarak kaydedilmesi önerilmektedir.¹⁴⁵

Eklem kıkırdak lezyonlarının tedavisinde kullanılan tüm tedavi yöntemlerin de kıkırdak dokunun orijinal kıkırdak alıcı sahası ile bütünleşmesi sorun olabilmektedir. Alıcı doku ile bütünleşme 2 şekilde olmaktadır; Vertikal ve Lateral.²⁹⁰ Vertikal bütünleşme genellikle sorunsuz gerçekleşirken, lateral bütünleşme kronik bir sorun olmaktadır.²⁹¹ Bu bütünleşme sürecini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının etik kurallara uygunluğu, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) tarafından 2010/46 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 14 adet koyun kullanılmış, çalışma süresince özel bir ağılda tutulmuş ve kısıtlama yapılmadan standart koyun yemi ve su ile beslenmiştir. Deney grubunda 6 koyun, MACİ grubunda 6 koyun ve kontrol grubunda 2 koyun olacak 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

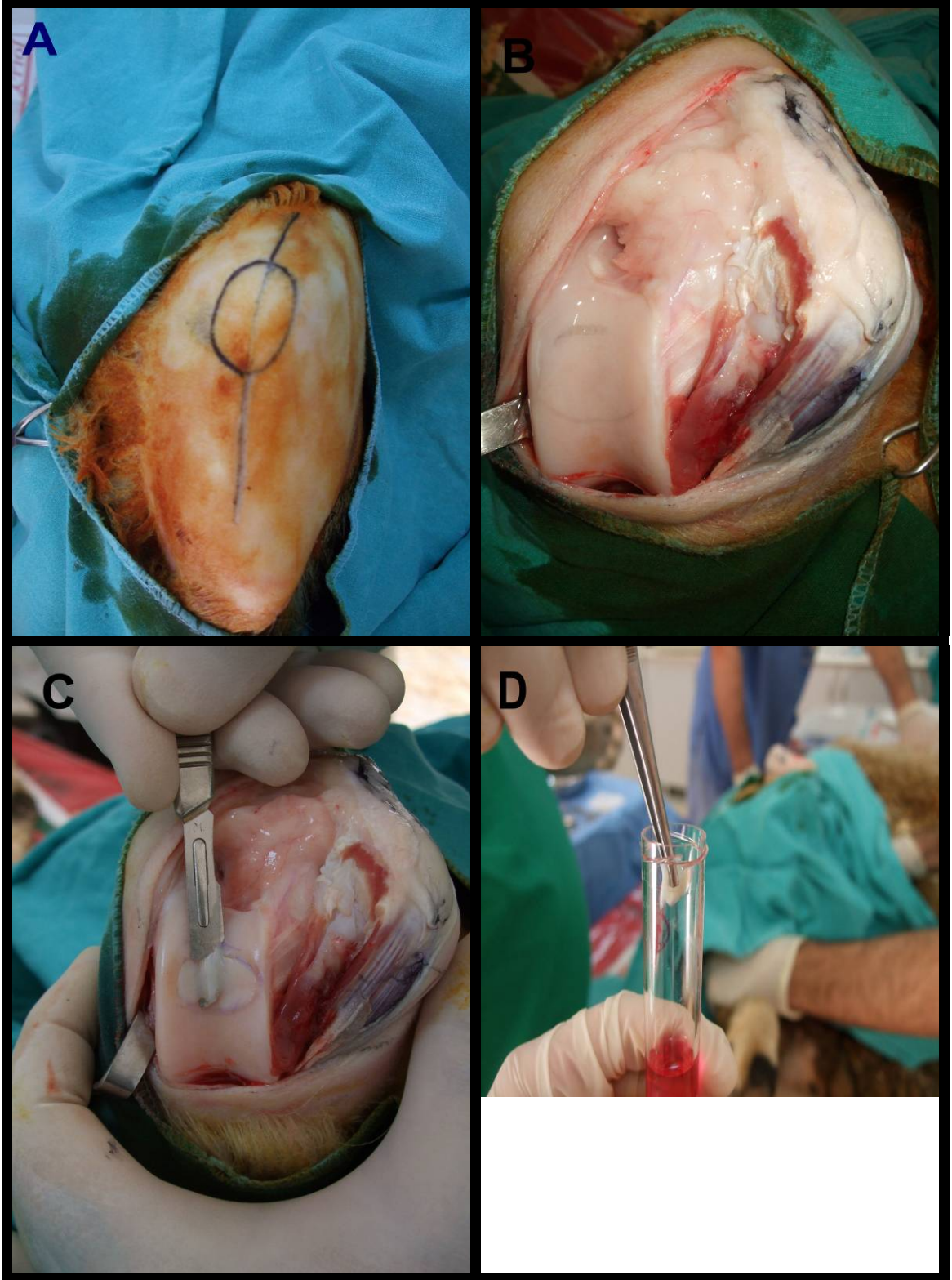
MACİ grubuna 2 kez, deney ve kontrol gruplarına ise 1 kez, aşağıdaki standart cerrahi hazırlıklar uygulanmıştır. Cerrahiden 30 dk önce 10 ml ciltaltı cefquinom (Cobactan LA %7,5, Türkiye) antibiyotik profilaksisi yapılmış ve postoperatif 3 gün boyunca devam edilmiştir. Cerrahi anestezi amacıyla deneklerin kuadriiceps 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. Post-operatif 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 zen gösterilerek) kıkırdak defekti oluşturulmuştur. (Resim 1)



Resim 1: Cerrahi teknik; a) Orta hat insizyon ve medial parapatellar yaklaşım, b) troklear defektin boyutları, c) bistüri yardımıyla defektin oluşturulması, d) kıkırdak parçaların transfer solüsyonuna alınması

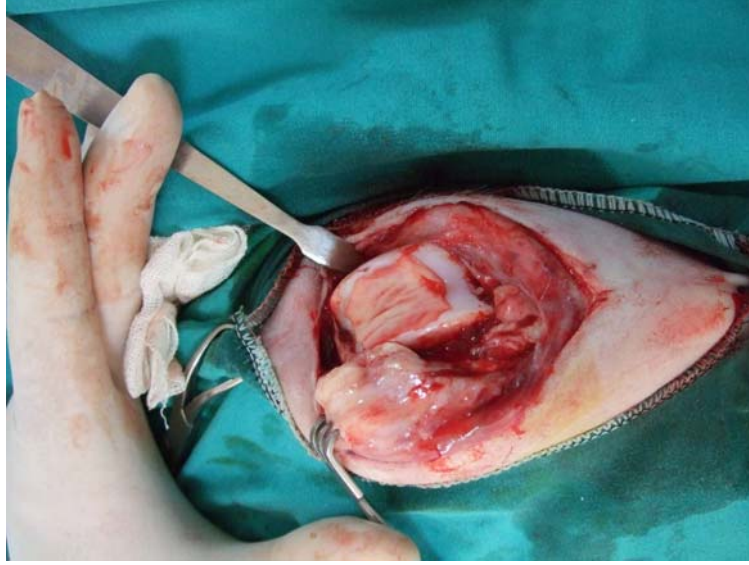
MACİ Grubu

6 koyun MACİ grubu olarak ayrılmış çıkan kırık 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 kollajenzla 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 mavisi 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.

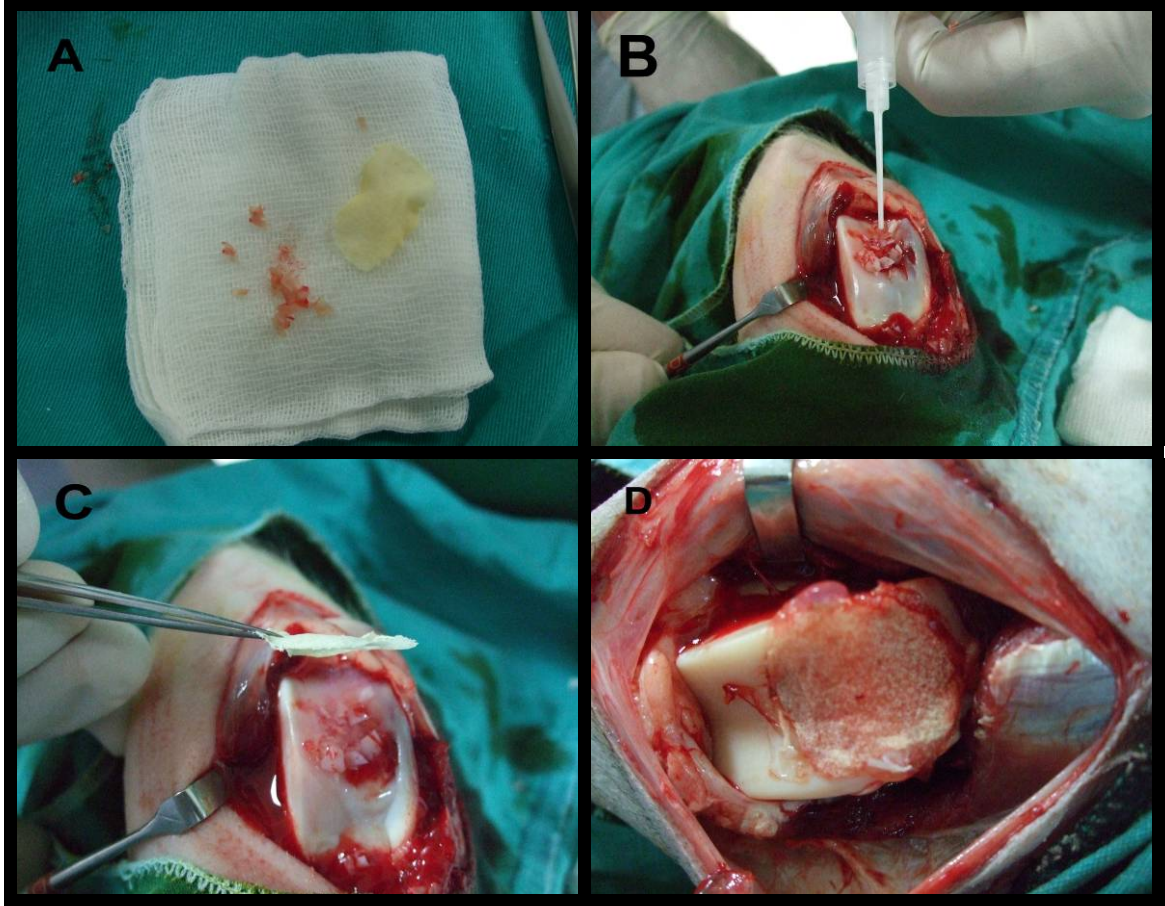
İkinci uygulama için MACİ grubu deneklere tekrara preoperatif hazırlıklar uygulanmış ve eski medial parapatellar insizyon kullanılarak sağ dizleri açılmıştır. Defekt tabanı, kemikten kanama olmamasına dikkat edilerek subkondral kemiğe kadar tekrar küretlenmiştir. Gelişen kanamalar adrenalini kompres 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, ekize edilmiş ve histolojik inceleme için hazırlanmıştır.(Resim 2)



Resim 2: MACI uygulanmış defekt

Deney Grubu

İn vivo doku mühendisliği için deney grubunda bulunan 6 koyunun sağ dizlerine kıkırdak defekti uygulanarak defekttten elde edilen kıkırdak doku 1 mm³'lük parçalara ayrılmıştır. İn vivo şartlarda hücre kültürü ortamı yaratabilmek amacıyla tip II kollajenaz emdirilmiş kollajen kriyojel kullanılmıştır. Kriyojeller; jelatin, distile su ile çözünerek (30 dakika, 200 rpm) hazırlanan % 6 (w/v) konsantrasyonda polimer çözeltisi ile çapraz bağlayıcı olarak kullanılan distile su ile % 6 (v/v) konsantrasyonda hazırlanan glutraldehit çözeltisi karıştırılmış ve kriyojenik koşullarda (-16°C) 16 saat süre ile kriyojelleşme gerçekleştirilmiş ve hazırlanmıştır. Oda sıcaklığına gelmesi beklenen kriyojeller şekil verme işleminin ardından hücreler için toksik etki yaratmaması için glutraldehitin fazlasını uzaklaştırmak amacıyla 3 periyotda toplam 1 saat distile su ile karıştırarak yıkama gerçekleştirilmiştir. 1mm³'lük kıkırdak parçalarından 140 - 200 mg ağırlık edecek kadarı (10-12 adet) defekt içerisine aralıklı olarak yerleştirilmiştir. Defekt tabanına fibrin yapıştırıcı sürülerek implant defekt içerisine tespit edilmiştir. Fleksiyon ekstansiyon hareketleri boyunca implantın stabil olduğu gözlemlendikten sonra diz katlar halinde kapatılmış ve deneklerin sağ arka ekstremitelerine yük vermemeleri için ayağının altına tenis topu bağlanmıştır. 6. haftadan sonra top çıkarılarak hayvanlar serbest bastırılmış ve 15. hafta sonunda sakrifiye edilerek kıkırdak iyileşme bölgesi fotoğraflanmış ve histolojik inceleme için eksize edilmiştir. (Resim 3)



Resim 3: Deney grubunda cerrahi uygulama; a) Kıkırdak parçaları ve kriyojel, b) kıkırdak parçalarının defekt içine yerleştirilmesi ve fibrin yapıştırıcı ile tespit, c) kollajenaz emdirilmiş kriyojelin defekt üzerine yerleştirilmesi, d) uygulama sonunda görünüm.

Kontrol Grubu

Kontrol grubuna ise sadece tek girişimde defekt uygulanmış, 6 hafta yük vermeden mobilize olması için sağ ayaklarının altına tenis topu bağlanmış, sonrasında serbest harekete izin verilmiş ve 15 hafta sonucunda sakrifiye edilerek fotograflanmış ve histolojik inceleme için eksize edilmiştir.

Makroskopik Değerlendirme

Tüm grupların deney sonu makroskopik değerlendirmesi Rudert ve arkadaşları tarafından belirlenen ölçütlere göre yapılarak skorlandırılmıştır. (Tablo 8)

Kriter	Puan	Makroskopik özellikler
Dolma	1	Çevre kıkırdak seviyesinin belirgin altında
	2	Çevre kıkırdak ile aynı seviyede, santral depresyon
	3	Çevre kıkırdak ile aynı seviyede
Renk	1	Kahverengi ya da sarı
	2	Beyaz
	3	Çevre kıkırdak ile aynı
Yüzey	1	Pürüzlü
	2	Düzdün

Tablo 8: Defektin makroskopik değerlendirme kriterleri ²⁹²

Histolojik Değerlendirme

Histolojik inceleme için defekt alanından, defekt distali sağlam kıkırdak dokudan ve kontrolateral diz troklear bölgeden örnekleme yapılmıştır. Deney grubunda sağ troklear oluşun sağlam kısmından ve kontrolateral diz troklear oluşundan alınan dokular tip II kollajenazın eklem kıkırdağına yapabileceği etkinin değerlendirilmesi amacıyla edinilmiş olup 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 fast green histokimyasal boyaları ile boyanmıştır. (Tablo 9)

Kategori	Puan
1. Hakim dokunun doğası	
<i>Hücresel morfoloji</i>	
Hyalin artiküler kıkırdak	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 kıkırdağın %100'ü	2
Normal kıkırdağın %50-100'ü	1
Normal kıkırdağın %0-50'si	0
<i>Komşu kıkırdağa yapışma</i>	
Greftin iki ucunda yapışma	2
Tek uçta ya da her iki uçta kısmi yapışma	1
Yapışma yok	0
3. Dejenerasyonun hücresel 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 kıkırdakta 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
Kıkırdak kalınlığının %25'inden az	2
Kıkırdak kalınlığının %25-50'si	1
Kıkırdak kalınlığının %50'sinden fazla	0
5. Osteokondral greft üzerinde fibröz doku tabakası varlığı	evet/hayır
6. Subkondral kemiğin alıcı ile kaynaması	evet/hayır

Tablo 9: Modifiye O'Driscoll Skorum Sistemi ^{293,294}

İmmünohistokimyasal İşaretleme

Mikrotomla adheziv lamlara 5µm kalınlığında alınan kesitlere uygulanan işlemler aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 60 0C etüvde 1 saat bekletildikten sonra oda ısısında 3X10 dakika ksilolden geçirildi.
2. Rehidratasyon işlemi için derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suya alındı.
3. Fiksasyon ve parafine gömülmekten kaynaklanan antijen maskelenmesini ortadan kaldırmak için tripsin (pH: 7,6) içinde 37oC (Bio-Optica Milano Spa®) 30 dakika muamele edildi.
4. Bu işlemden sonra taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3X5 dakika yıkandı.
5. Distile suda %12,5'luk hazırlanmış hidrojen peroksit (H2O2) ile endojen

peroksidaz aktivitesinin yok edilmesi için 10 dakika inkübe edildi.

6. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.

7. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyamasını engellemek için Novocastra TM Protein Block ile 8 dakika inkübe edildi.

8. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırılarak yıkama yapılmadan PBS içinde %0.5'lik sığır serum albumin (BSA) ile sulandırılmış Tip I Kollajen (Anti-tip I Kollajen, Abcam; ab6308, 1/300) ve Tip II Kollajen (Anti-tip II Kollajen, Abcam; ab34712, 1/50) primer antikorlar damlatıldı. Kesitler nemlendirilmiş kapalı bir kap içinde oda ısısında 1 gece inkübe edildi.

9. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.

10. Biotin ile bağlanmış polyvalent sekonder antikor (Scyteck®) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.

11. PBS ile 3X5 dakika yıkandı.

12. Streptavidin peroksidaz enzim reagenti ile 10 dakika inkübe edildi.

13. PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

14. Peroksidaz süstratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 3-5 dakika inkübe edildi.

15. Distile suda 5 dakika yıkandı.

16. Hematoksilen ile 5-10 saniye zıt boyama yapıldı.

17. Akarsuda berraklaşana kadar yıkandı.

18. Kesitler derecesi artan alkollerden geçirilerek dehidrate edildi.

19. Ksilolden 3x5 dakika geçirildi.

20. Entellan ile kapatıldı.

Negatif kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen %0,5 PBS-BSA damlatıldı. Daha sonra protokole aynı şekilde devam edildi.

Tüm dokular, Olympus® BX50 (Olympus GmbH, Almanya) ışık mikroskobu ile incelenerek aynı mikroskoba eklenmiş Nikon® Coolpix5000 dijital kamera (Nikon Corp. Tokyo, Japonya) ile resimleri çekildi.

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

İstatistiksel Analiz

Üç grubun makroskopik inceleme skorları, histomorfometrik skorları ve immünohistokimyasal sonuçları Kruskal-Wallis ve Dunn yöntemi kullanılarak karşılaştırılmış farkların anlamlı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Tüm analizler için SPSS istatistik analiz yöntemi (standart sürüm 16,0, SPSS, Chicago, IL) kullanılmıştır. 0.05'den düşük bulunan p değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

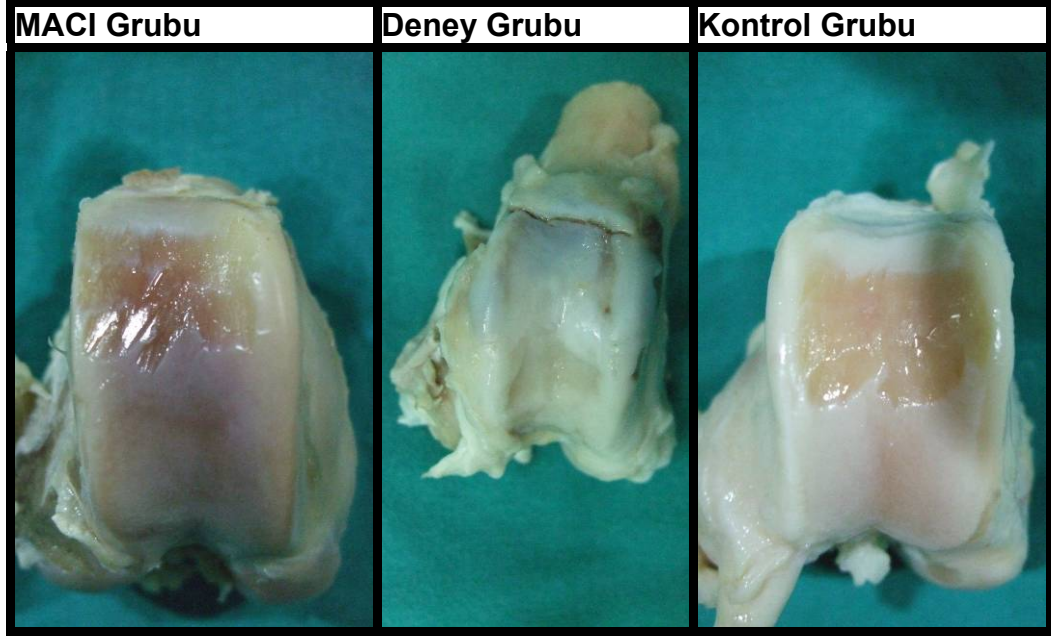
BULGULAR

Makroskopik inceleme

MACİ grubunda 8, deney grubunda 8 ve kontrol grubunda 2 adet olmak üzere toplam 14 koyunun trokleası makroskopik olarak Rudert ve arkadaşları tarafından belirlenen ölçütlere göre skorlandırıldı (Resim 4) (Tablo 10). Sonuçlar, nonparametrik ölçümler ve düşük denek sayısı nedeniyle Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiş ve 0.05'ten küçük p değeri anlamlı kabul edilmiştir.

Grup ve Tavşan numarası	Dolma	Renk	Yüzey	Toplam
MACİ Grubu				
I	2	3	1	6
II	3	3	2	8
III	2	2	1	5
IV	2	3	2	7
V	3	2	2	7
VI	2	3	1	6
Ortalama				6,5
Deney Grubu				
I	3	3	2	8
II	2	2	1	5
III	2	3	1	6
IV	2	3	2	7
V	2	2	1	5
VI	2	2	2	6
Ortalama				6,17
Kontrol Grubu				
I	1	1	1	3
II	1	2	1	4
Ortalama				3,5

Tablo 10: Tüm grupların makroskopik olarak değerlendirilmesi



Resim 4: Makroskopik görünüm

Makroskopik değerlendirmede Deney, MACI ve kontrol grupları arasında fark görölmemiştir.

Histolojik inceleme

Histomorfometrik inceleme

Işık mikroskopik değerlendirmede semikantitatif modifiye O'Driscoll histomorfometrik skarlama sistemi kullanılmıştir.(Tablo 11)

Kategori	MACİ Grubu						Deney Grubu						Kontrol Grubu	
	I	II	III	IV	V	VI	I	II	III	IV	V	VI	I	II
1. Hakim dokunun doğası														
Hücrel morfoloji	2	2	2	2	2	2	0	0	2	2	0	2	0	0
2. Yapısal özellikler														
Yüzey düzenliliği	2	3	2	3	2	2	2	0	2	1	2	1	0	1
Yapısal bütünlük	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Kalınlık	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
Komşu kırıkdağa yapışma	1	1	1	1	0	2	1	0	1	0	1	1	1	0
3. Dejenerasyonun hücrel değişikliklerinden bağımsızlık														
Hiposellülarite	1	2	2	2	1	3	1	0	0	0	1	1	1	1
Kondrosit gruplaşması	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0
4. Komşu kırıkta dejeneratif değişikliklerden bağımsızlık														
Hücrel özellikler	2	2	2	2	2	2	1	0	0	2	0	1	1	0
Fibrilasyon	2	2	2	2	2	2	1	0	1	2	1	1	1	1
5. Osteokondral greft üzerinde fibröz doku tabakası varlığı														
Evet: 1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hayır: 0														
6. Subkondral kemiğin alıcı ile kaynaması														
Evet: 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hayır: 0														
TOPLAM	12	15	14	15	11	16	8	1	7	9	7	8	4	4
ORTALAMA	13,83						6,67						4	

Tablo 11: Tüm grupların histomorfometrik incelenmesi

Histomorfometrik incelemede MACİ grubu Deney ve Kontrol gruplarına göre anlamlı derecede iyi tamir skoru göstermiştir. Deney grubundaki iyileşme (ortalama skor: 6.7) kontrol grubuna (ortalama skor: 4) göre daha iyi bulunduysa da aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

İmmünohistokimyasal inceleme

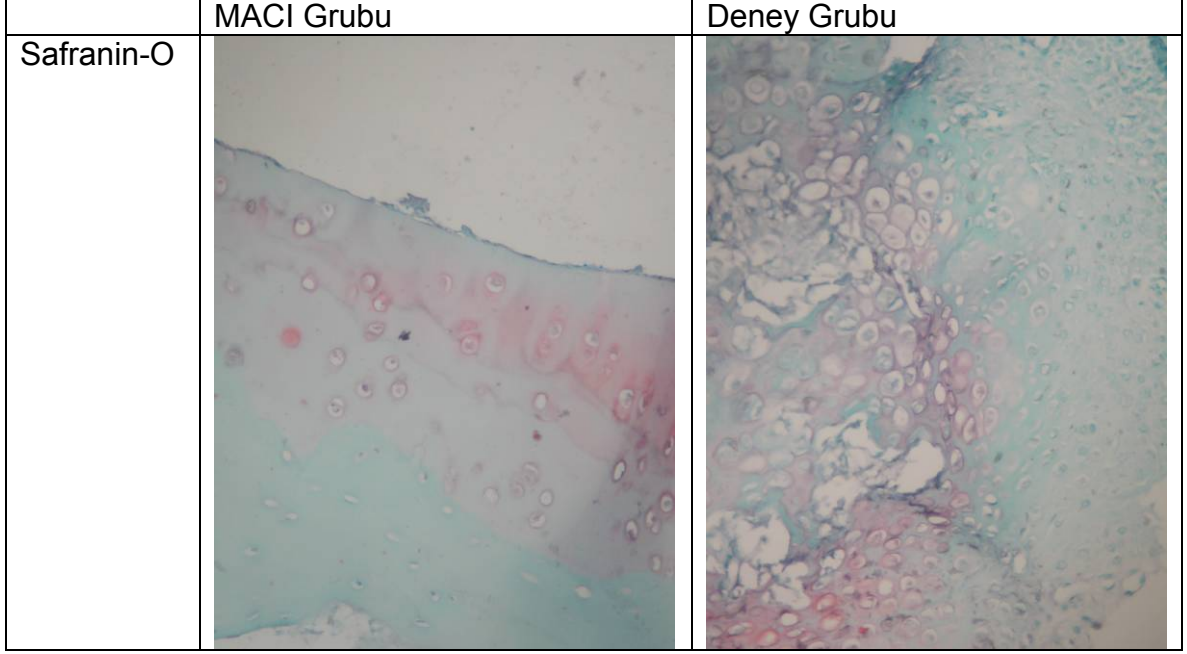
Dokularda gelişen kırıkdağın yapısını belirlemek amacıyla hyalin kırıkdağ göstergesi olan tip I ve tip II kollajen içeriği immünohistokimyasal olarak tesbit edilmiştir.(Tablo 12)

Grup ve Tavşan numarası	Tip I Kollajen	Tip II Kollajen
MACİ Grubu		
I	3	2
II	3	1
III	3	1
IV	3	1
V	2	2
VI	3	1
Deney Grubu		
I	2	3
II	3	2
III	3	2
IV	3	2
V	2	3
VI	3	2
Kontrol Grubu		
I	3	1
II	3	1

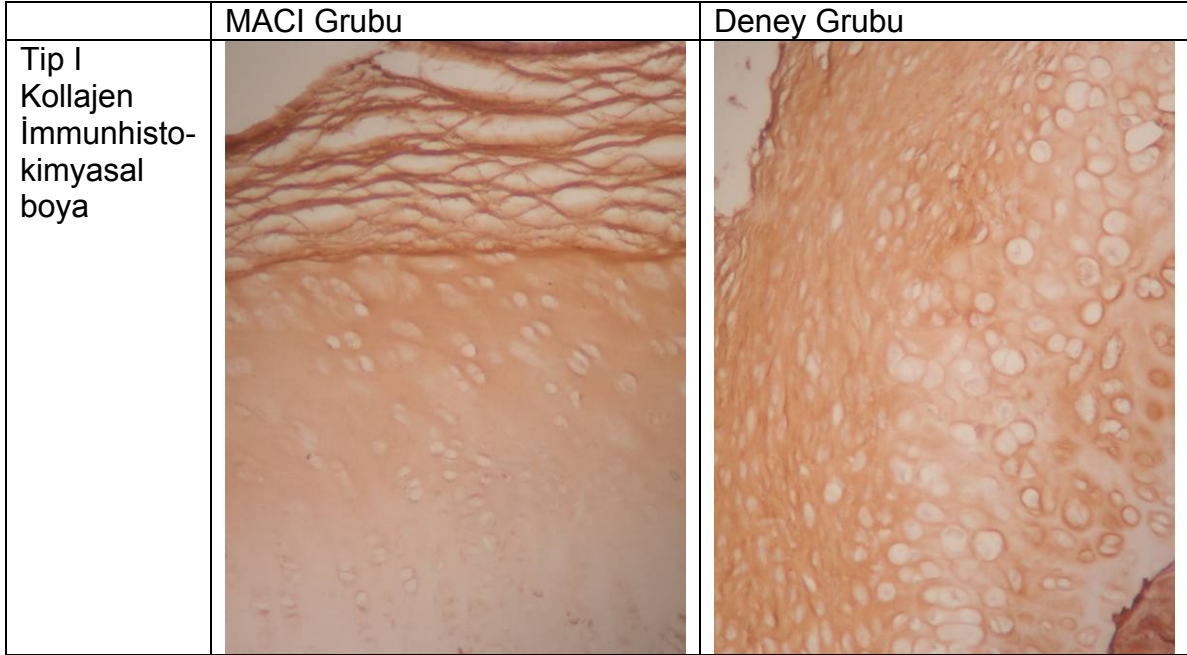
Tablo 12: Tüm grupların immünohistokimyasal incelemesi

İmmünohistokimyasal incelemede Tip II kollajen miktarı Deney grubunda diğerlerine oranla anlamlı olarak fazla tesbit edilmiştir. MACİ ve Kontrol grupları Tip II kollajen miktarı açısından farklı bulunmamıştır. Tip I kollajen oranı ise her üç grupta benzer ve farksız bulunmuştur.

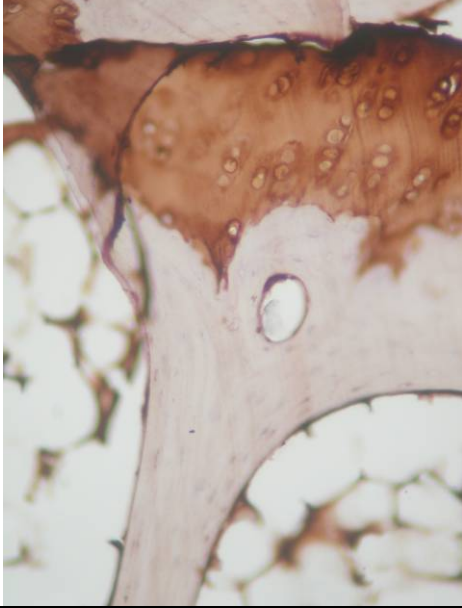
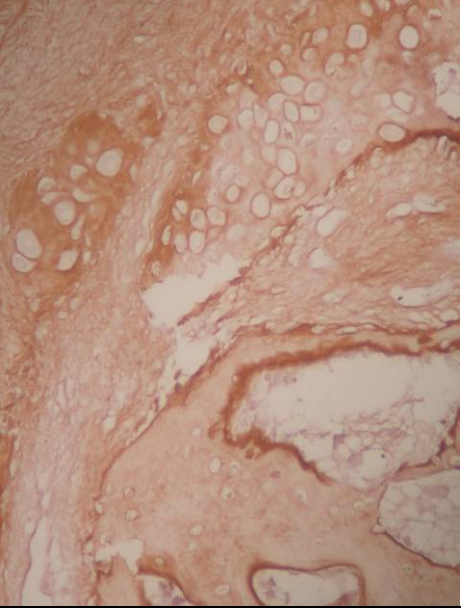
Defekt çevresindeki sağlam kıkırdağın değerlendirilmesinde kontrolateral sağlam kıkırdağa kıyasla makroskopik ya da histolojik açıdan herhangi bir fark bulunmamıştır.



Resim 5: MACI ve Deney grubunun Safranin-O boyası ile X60 büyütmelerdeki histolojik görüntüleri.



Resim 6: MACI ve Deney grubunun Tip I Kollajen İmmunhistokimyasal boyası ile X60 büyütmelerdeki histolojik görüntüleri.

	MACI Grubu	Deney Grubu
Tip II Kollajen İmmunhistokimyasal boya		

Resim 7: MACI ve Deney grubunun Tip II Kollajen immunhistokimyasal boyası ile X60 büyütmelerdeki histolojik görüntüleri.

TARTIŞMA

Artiküler kıkırdak, diartrodial eklemlerde ağrısız ve rahat hareket sağlamak amacıyla sürtünmesi az, aşınmaya dayanıklı bir yüzey sağlar. Hücreden fakir, lenfatik ve vasküler yapılardan yoksun ancak kondrositler tarafından üretilmiş bol miktarda ekstrasellüler matriks içeren bir yapıya sahiptir.¹⁸

Artiküler kıkırdağın avasküler yapısı, düşük hücre yoğunluğu ve mitoz aktivitesindeki yetersizliği yaralanmalar sonrası iyileşmesini engellemektedir.¹⁵ Yaralanma sonucu oluşan defekt ya hiç iyileşmemekte ya da fibröz doku veya fibröz kıkırdak olarak iyileşmektedir.⁵⁹ İyileşme dokusunda 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 tutmaktan uzaktır.^{151,295,296} Kıkırdağın iyileşme problemi vücudun tamir yanıtını destekleyecek yöntemlerin yaygın olarak araştırılmasına neden olmuştur.²⁹⁷

Otolog kondrosit implantasyonunun (ACI); hücre süspansiyonu kullanmak, periostu su geçirmez bir şekilde kapatmak ve bu nedenle kıkırdağa dikiş geçirmek ve ikinci seansta artrotomi yapmak gibi teknik dezavantajları vardır.⁵ Standard 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 olmaktadır.⁶ 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.^{5,7}

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 olmaktadır.⁸ Üç boyutlu ortamda

ise tip II kollajen ve aggrekan sentezlemektedirler.^{9,10} Matrikse hücrelerin tutunması gerekir. Tutunmayan hücreler defekt içerisinde duramayarak kaybolacaktır. Ayrıca tutunmayan hücreler çoğalamaz ve aramada üretemezler.⁴ Matriksler ve kıkırdak aramaddesi hücreleri defekt içerisinde destekleyecek yapısal çatılar oluşturmaktadır.⁴ Matriks olarak en sık kollajen ve hyaluronan temelli malzemeler kullanılmaktadır.⁷ Hücrelerin eşit dağılımını sağlamak için ilk olarak tip I ve tip III kollajenden oluşan membran kullanılmış, kondrositler bu membran üzerine ekilerek implante edilmişlerdir.¹¹ Kollajen membrana ekilen hücrelerin homojen dağılım gösterdikleri ve kondrosit fenotiplerini korudukları gösterilmiştir.¹²

Hücelere ya da büyüme faktörlerine dayalı tedavilerde iyileşme ilerleyene kadar hücrelerin ya da büyüme faktörlerinin defekt içerisinde tutulmalarını sağlayacak matrikslere ihtiyaç vardır. Bu amaçla kemik matriksleri, kollajenler, hyaluronan, fibrin, karbon fiberler, poroz polilaktik asit, politetrafloroetilen poliester ve bunlara benzer birçok polimer denenmiştir.¹⁵¹ İdeal matriks, hücreler kendi çevrelerini oluşturana kadar destek sağlayan geçici bir çatı oluşturmaktadır. Kondrositlerin kendi matriksini oluşturma hızında yani birkaç ay içerisinde yok olması gerekir.^{11,298} 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, toksik olmamalı ve inflamasyonu uyarmamalıdır.⁴ Tip I kollajen fibroblastik hücre morfolojisini uyarmakta ve hücreleri bu yönde yönlendirerek fibröz aramada ürettirmektedir. Tip II kollajen ise kondroblastik morfolojiyi uyarak GAG (glukozaminoglikan) aramada üretmeye yönlendirir. Bir matriksin por büyüklüğü azaldıkça (<50 mikrometre) sağlamlığı artar, ancak hücreleri daha çok fibroblastik morfolojiye yönlendirir.²⁹⁹

Ticari formları bulunan iskeletlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada jel sistemlerinin daha homojen hücre dağılımı sağladığı, daha fazla tip II kollajen salgılanımını desteklediği bildirilmiştir. Membran tipi iskeletlerde hücreler birden fazla tabakalar halinde yerleşmektedirler. Ancak jel sistemlerinin mekanik özellikleri defekt tedavisinde problem yaratabilmektedir.³⁰⁰

5 cm²'den büyük kıkırdak defektlerinin tedavisinde günümüzde altın standard MACI yöntemidir. Ancak bu yöntem için hastanın 6 hafta arayla iki defa cerrahi girişim geçirmesi, maliyetinin oldukça yüksek olması (yaklaşık

11000 TL) ve Sağlık Bakanlığı tarafından özel izin alınması gerekliliği bu ameliyatın uygulanmasında karşılaşılan en büyük sorunlardır. Tek seansta benzer sonuç verebilecek ucuz bir yönteme ihtiyaç vardır. Bu nedenle 6 haftalık hücre kültürü ve matrikse gömme işlemine gereksinimi ortadan kaldıracak bir yöntem tasarladık. Bu yöntemde in vitro kültür süreci in vivo ortama taşınmaktadır. Bu yöntemin MACI kadar başarılı olması halinde hastalar tek ameliyat geçirerek tedavi olabilecek ve olgu başına en az 10000 TL tasarruf sağlanabilecektir.

Tavşan, kıkırdak defekti modeli için en sık tercih edilen hayvandır. Cerrahi girişim ve örneklerin manipulasyonu için yeterli büyüklüğe sahip ve bu büyüklük için diğer hayvanlarla kıyaslandığında daha ekonomik çözüm oluşturmaktadır.³⁰¹

Tavşan dizinden alınan 3,5 mm çapındaki kıkırdak dokudan kondrosit üretilmesinde doku yetersizliğine bağlı %50 başarısızlık bildirilmiştir.³⁰¹ Bu nedenle doku mühendisliği gibi bol kondrosite ihtiyaç duyulan deneylerde model olarak daha büyük hayvanların kullanılması önerilmektedir.³⁰¹ Daha büyük hayvanların ayrıca cerrahi kolaylığı ve artroskopik girişim imkânı da olabilmektedir. Tavşan dizinde oluşturulabilecek defekt çapı ortalama 4 mm kadardır. Daha büyük ya da birden fazla defekt için koyun, keçi ya da köpek kullanılabilir. Uluslararası Kıkırdak Araştırma Topluluğu (ICRS – International Cartilage Research Society) kıkırdak iyileşmesi modeli olarak keçiyi önermektedir.³⁰² Ancak koyun, aynı ağırlıktaki keçiye oranla daha büyük dize sahiptir ve bu nedenle artroskopik girişimler daha rahat gerçekleştirilebilmektedir. Bunların yanında koyun edinmek daha kolaydır ve koyun dizi insan dizine boyut, yapı ve tamir kapasitesi açısından benzerdir.^{302,303,304} Koyun modelinin biyokimyasal, biyomekanik, histolojik ve yüzey ince yapısı bakımından insandaki kısmi kalınlık kıkırdak yaralanmalarını başarı ile taklit etmesinden dolayı biz çalışmamızda bu modeli tercih ettik.³⁰²

Deneysel hayvan modellerinde ortopedik çalışmalar için genellikle diz eklemi tercih edilmektedir. Dizde defekt yerleşimi için kullanılacak alanlar troklear oluk, medial ve lateral femoral kondiller, troklear çıkıntı ve patellar eklem yüzeyidir.³⁰¹ 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.³⁸ Ancak, patellofemoral yüklenme oranı yüksek olsa da femoral kondillerdeki aksiyel yüklenmenin aksine, troklear olukta kıkırdağa gelen yük makaslama yönündedir.³⁸ Bu nedenle troklear defektler kondiler defektlerden daha iyi iyileşmektedir.³⁰⁵ Köpek ve keçilerde 6 mm'lik bir defektin troklea yerleşiminde spontan iyileşme görüldüğü ancak aynı boyuttaki defektin medial femoral kondil yerleşiminde iyileşmenin olmadığı bildirilmiştir.^{305,306,307} Trokleada gerçekleşen iyileşme kondil defektlerine kıyasla daha az hyalin kıkırdak, daha çok fibröz doku ve daha az GAG içeriği ile gelişmektedir.^{308,309,310}

Dizdeki en kalın kıkırdak patellanın eklem yüzeyinde bulunmaktadır. Özellikle kondrosit üretilmesi üzerine planlanan ya da benzeri çalışmalarda bu bölge tercih edilmektedir.³¹¹ Kondrosit üretmek için doku troklear çıkıntılardan edinilebilmektedir.³¹² Otolog osteokondral greftler ise yine troklear çıkıntılardan alınabildiği gibi, patellar oluktan, karşı diz femoral kondilinden, aynı kondilin kranialinden ya da karşı kompartmandan edinilebilmektedir.^{293,303,313} Çalışmamızda defekt yaratılma sırasında edinilen kıkırdaklar sağlam kıkırdak olduğundan bunlar donör olarak kullanılmış ve ek bir kıkırdak kaynağına ihtiyaç duyulmamıştır. Ancak deney grubunda defekt yapılırken elde edilen kıkırdakların tümünün kullanılması yerine otolog kondrosit implantasyonu ya da MACI için alınması önerilen 140 – 200 mg kadar kıkırdak kullanılarak klinik senaryo taklit edilmiştir.^{124,135,137,140,150,151}

Kıkırdak defekti modellerinde deneyin sağlıklı sonuç verebilmesi ve denenen yöntemin gerçekten başarılı ya da başarısız olduğu sonucuna varılabilmesi için defektin spontan olarak iyileşmediğinin bilinmesi gereklidir. Her ne kadar bu amaçla kontrol grupları kullanılsa da kendiliğinden iyileşmenin olmadığı bilinen modeller tercih edilmelidir. Konu ile ilgili kritik boyut defekt kavramı ortaya atılmıştır. Yani, hangi çaptan büyük defektlerde spontan iyileşme olmaz? Bu konuda dikkat çeken yayınların açıklaması şu şekildedir: Defektin spontan iyileşmesi için kritik defekt boyutu diye birşey yoktur. Kritik boyut defektin derinliğidir. Kalsifiye kıkırdağı geçmeyen derinlikteki defektlerde iyileşme olmaz ya da çok sınırlı olur, oysa kalsifiye kıkırdağın zarar gördüğü durumlarda iyileşme fibröz doku ya da fibröz kıkırdak ağırlıklı olarak gerçekleşmektedir.³¹⁴ Ancak bu görüşlere karşın kritik boyutun varlığını

savunan yazarlar da vardır. Örneğin tavşanlarda, keçilerde ve atlarda 3 mm'den küçük defektlerin hyalin ya da fibröz kıkırdak ile spontan iyileştiği^{315,316} keçilerde ve köpeklerde ise 6 mm'ye kadar olan troklear defektlerin spontan iyileştiği^{306,307} bildirilmiştir. Koyun için belirlenen kritik boyut çapı ise 6 mm'dir.^{305,317} Mevcut çalışmada defekt çapı 25 mm olarak belirlenmiş ve spontan iyileşme olmadığı kontrol grubu ile doğrulanmıştır.

Deneysel amaçlı yaratılan defektler genellikle daire şeklindedir. Bazı çalışmalarda uygulanacak tedavi ya da implant şekline özel, üçgen ya da kare gibi defekt şekilleri yaratılmıştır.^{318,319} Bizim çalışmamızda daire şeklinde defekt oluşturulmuştur.

Literatürde tavşanlar üzerinde yapılan çoğu deneyde immobilizasyona gerek duyulmamıştır.^{292,293,320,321,322} Köpeklerde ise immobilizasyon yöntemi olarak ya 10 gün süreli eksternal fiksator uygulaması ya da 3 hafta süreli dizi 90 derece fleksiyonda tutan alçı atel ile immobilizasyon tercih edilmiştir.^{312,323} 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 3 defa sedasyon altında hareket arkının %85'ini kazanana kadar pasif egzersiz yapılmıştır.³²⁴ Koyunlarda daha çok tercih edilen ağıl boyutlarını daraltarak 1 hafta kadar aktivite kısıtlaması olmuştur.^{309,313} Çalışmamızda, daha önce koyunlarda başarıyla uygulanmış olan ve yük vermeden mobilizasyonu sağlayan bir yöntem kullanılmıştır.³²⁵ Bu yöntemle göre koyunların arka ayaklarının altına tırnaktan tel geçirmek suretiyle tenis topu bağlanmış ve bu ekstremiteye yük vermeleri engellenmiştir. Tenis topları 6 hafta sonra çıkarılarak koyunların hareketi serbest bırakılmıştır.³²⁵

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 oluşturur.⁷ Pürüzlü yüzey ise hücre tutunmasına ve çoğalmasına olanak verecek matriks özelliğindedir. Kıkırdak matriksi oluştukça bozunur.³²⁶ Hücre ekilerek pazarlanan hali MACI'dir. (Verigen, Leverkusen, Almanya)¹⁷⁹ Tip I/III

kollajen membranda hücre farklılaşması hyaluronana kıyasla daha geç, tip II kollajen sentezi daha az olmakta, ancak hücre dizilimi doğal kıkırdağa daha çok benzemektedir. Hyaluronan ve jelâtin de ise hızlı farklılaşma ve yüksek miktarda tip II kollajen sentezi olur. Fakat hücre dağılımı doğal kıkırdağa benzemez.³²⁷

Hyalüronik asit bazlı bir skafold olan Hyalograft C, artroskopik uygulama sonucunda üzerine bir dikiş gerektirmeden, hyalin kıkırdak dokusu ile tamir sonucunda yüksek klinik başarı ile kullanılmaktadır, fakat uzun dönem takipleri bulunmamaktadır.^{328,329}

Çalışmamızda kullanılan jelatin kriyojenik koşullarda polimerize edilmiş bir kriyojeldir. Temel yapısını Tip I kollajen oluşturmaktadır. Kullanımındaki amaç kıkırdak parçalarını defekt içerisinde tutmak, Tip II kollajenaz salarak kondrosit izolasyonu ve kondrositlerin matriks devamlılığını sağladıkları fazdan, proliferatif faza geçmelerini sağlamak ve defekt içerisinde hücre kültürü koşullarını meydana getirerek iyileşmeye katkıda bulunmaktır. Her ne kadar histomorfometrik olarak oluşan iyileşme dokusunun kalitesi MACI'ye oranla düşük bulduysa da, bu yöntem ile makroskopik olarak en az MACI kadar defekt doluşu ve MACI'den ve kontrol grubundan daha fazla Tip II kollajen sentezi tesbit edilmiştir. Tip II kollajen içeriğinin üstün olması biyokimyasal olarak bu iyileşme dokusunun hyalin kıkırdağa daha yakın olduğunu göstermektedir. Histolojik incelemede deney grubunda mozaik bir görüntüden çok homojen bir dağılım dikkati çekmekteydi ki, bu kollajenazın yerleştirilen kıkırdak parçalarının erimesinde ve kondrositlerin in vivo izole edilmesinde etkili olduğunu göstermektedir. Kriyojele emdirilmiş kollajenazın eklem defekt dışındaki sağlam kıkırdağın zarar vermesi yöntemin en büyük çekincelerinden birini oluşturmaktaydı. Sağlam kıkırdaktan alınan doku örneklerinin kontrolateral dizden farklı olmaması da kollajenazın gerek kriyojel tarafından sınırlandırılmış, gerekse de seyrelerek diğer kıkırdak bölgelerine etki edememiş olduğunu göstermektedir. Kondrosit hücre kültürlerinde genellikle büyüme faktörleri de kullanılmaktadır. Bu faktörler kondrosit proliferasyonunu uyarmaktadır. Çalışmada birden fazla değişkenin etkisinin denenmesi uygun olmayacağından ve sonuçların yorumlanması mümkün olmayacağından bu faktörler eklenmemiştir. Ancak büyüme faktörlerinin de kriyojel aracılığıyla salınabilmesinin histomorfometrik skorları yükseltebileceği kanısındayız.

Kıkırdak iyileşmesi zaman alan bir süreçtir. İyileşme olduktan sonra bile tamir dokusu zaman içerisinde dejenere olabilmektedir. Bu nedenle takip süresi ne kadar uzun olursa denenen tedavi yönteminin etkinliği konusunda o kadar güvenilir bir sonuca varılabilir. Ancak uzun takip süreleri iş gücü ve çalışmanın maliyeti açısından her zaman mümkün olamamaktadır. Yine takip süresi içerisinde denek kaybı da artmakta ve bu da sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Köpekler üzerinde yoğun kıkırdak araştırmaları gerçekleştirmiş bir grup, iyileşme dokusunun çoğunun cerrahi sonrası 15 haftada gerçekleştiğini ve bu nedenle 15. hafta değerlendirilmesinin önemli olduğunu savunmaktadır.³²³ Tavşanlar üzerinde yapılmış deneylerde en az 8 hafta en fazla 52 hafta sonunda ötenazi uygulanarak değerlendirme yapılmıştır.^{320,321,330,331} Ancak çalışmaların çoğunda, her ne kadar yetersiz olduğu onaylansa da, 12 hafta takip sonucu değerlendirmeye geçilmiştir.^{332,333,334}

Köpeklerde yapılan çalışmalarda ise takip süreleri 12 hafta ile 52 hafta arası değişmekle birlikte 15 haftada sonlandırılan araştırmalar çoğunluktadır.^{38,312,335,336} Koyunlarda da durum benzer olup en az 12 hafta takip gerçekleştirilmiş olup 6-12 aylık takipler sıklıdır.^{309,313,318,337} Bizde bu çalışmaları temel alarak toplam takip süremizi 15 hafta olarak belirledik.

Yeni yöntemle elde edilen kıkırdağın ne kadar süre içerisinde olgunlaşacağı, ne kadar dayanıklı olacağı, defekti tam doldurup doldurmayacağı bilinmemektedir. Ancak laboratuvar imkânlarını kullanmaksızın, tek seansta yapılabilmesi büyük bir avantaj oluşturmaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kıkırdak mezenşimden köken alan kondrosit, kondroblast ve su yüklü matriksten oluşan özelleşmiş konnektif yapıya sahip bir dokudur. Vücutta yumuşak dokuya destek veren, eklem yüzeyinin sürtünmesini azaltan ve mekanik darbelerin emilimi gibi görevlere sahiptir. Bu derece önemli görevleri olan kıkırdak dokunun hasarlarında veya eksikliğinde oluşabilecek deformite ve fonksiyon kaybı, ağır patolojileri de beraberinde getirebilmektedir.

Diz eklem kıkırdak lezyonları, etyolojisi ne olursa olsun, klinikte semptomatik veya sıklıkla asemptomatik şekillerde karşımıza çıkmaktadırlar. Eğer tedavi edilmezlerse, insan hayatını olumsuz şekilde etkileyen osteoartrit ile sonuçlanabilirler. Dolayısıyla, kıkırdak lezyonlarının şekline, derinliğine, büyüklüğüne ve hastanın yaşına, beklentilerine göre uygun şekilde tedavi edilmeleri gereklidir. Kıkırdak lezyonlarında ideal tedavi yöntemi, orijinal hiyalin kıkırdak doku ile biyolojik iyileşme ve entegrasyon sağlanarak, hastanın ağrısının azaltılmasını ve tekrar fonksiyonel bir eklem kazanmasını amaçlar. Sadece mozayikplasti, otolog kondrosit implantasyonu ve doku mühendisliği teknikleri ile bu hedefe yaklaşılmıştır. Fakat ne yazık ki, şu ana kadar tarif edilmiş tedavi yöntemlerinin hiçbirinde uzun dönemde ideal hiyalin kıkırdak amacına ulaşılamamıştır.

Kıkırdak iyileşmesinin en büyük problemi iyileşmeyi sağlayacak hücrelerin bulunmamasıdır. Kondrositler kendi lakünlerinin içerisinde aramaddenin devamlılığını sağlarlar. Kıkırdak yaralandığında defekte doğru bir miktar matriks akışı olur ama bu defekti doldurabilecek düzeyde değildir. Kondrositler de lakünlerinden çıkıp defekte göç etme özelliğine sahip değildirler. Kemik iliğinde bulunan kök hücreler ise subkondral kemiğin bütünlüğü korunduğu sürece defekte ulaşamazlar. Diğer dokular iyileşirken vasküler bir giriş ve bununla birlikte dokuyu ve matriksi oluşturacak hücrelerin iyileşme bölgesine göçü olur. Ancak kıkırdak iyileşmesinde vasküler bir doku da yoktur. Bu nedenle hücreler başka bir kaynaktan sağlanmalıdır. Bunun bir yolu kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerin (MKH) defekte göçünü sağlamak, bir diğeri de kondrositlerin dışarıdan defekt içine implantasyonudur.

“Canlının kendi vücudunda oluşturduğu kıkırdağı biz, yine canlının kıkırdak lezyonlarının tedavisinde in-vivo ortamda oluşturabilir miyiz?” sorusuna

cevap bulmak amacıyla, kriyojelin “in-vivo” kültür ortamı olarak kıkırdak dokunun büyümesi üzerine etkisi hakkında yapılmış olan bu çalışmanın sonunda iki önemli sonuç elde edilmiştir:

1. Kriyojel grubu, MACI grubu ile karşılaştırıldığında; makroskopik olarak birbirlerine yakın iyileşme elde edilmiştir.
2. Kriyojel grubunda MACI grubuna göre tip II kollajen içeriğinin üstün olması biyokimyasal olarak bu iyileşme dokusunun hyalin kıkırdağa daha yakın olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın yukarıda belirtilen iki sonucundan yola çıkarak; şu an “in-vitro” kültür ortamlarında üretilen ve maliyeti çok yüksek olan eklem kıkırdak dokusunun, kriyojel matriks kullanılarak, canlının kendi “in-vivo” ortamında üretilmeye başlanabileceği fikrinin güçlendiği söylenebilir. Bu teknik ile kıkırdak lezyonlarının tedavi yöntemleri arasına yakın gelecekte, maliyeti düşük, etkin, mini-artrotomi veya artroskopik olarak kolay uygulanabilir alternatif bir tedavi seçeneği katılabileceğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak, bu deneysel çalışma, kriyojelin yeni kıkırdak oluşumu üzerine etkisini araştıran ilk örnek olması açısından önemlidir, ancak konunun daha iyi anlaşılması için daha ileri deneysel ve klinik araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Hunter W. Of the structure and diseases of articular cartilages. *Philos Trans R Soc London* 1743;42:514-521
2. Keith A. The anatomical and physiological principles underlying the treatment of injuries to muscles, nerves, bones & joints. London: H. Frowde, Oxford University Press; 1919. The origin of our knowledge concerning articular cartilage in health and disease: sayfa 290-303
3. Paget J. Healing of cartilage. *Classics of orthopaedics*. Philadelphia: Lippincott; 1976. sayfa 276-277
4. Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, et al. Matrices for cartilage repair. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S271-9
5. Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, et al. Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15(5):610-9.
6. 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.
7. 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.
8. 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.)
9. 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
10. 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.

11. Gikas PD, Bayliss L, Bentley G, Briggs TW. An overview of autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91(8):997-1006.
12. 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.
13. Chung C, Burdick A.J. Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60(2008) 243-262
14. Meyer U, Wiesmann HP. *Bone and Cartilage Engineering*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 2006
15. Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982;64: 460-466.
16. Freemont AJ, Hoyland J. Lineage plasticity and cell biology of fibrocartilage and hyaline cartilage, *European Journal of Radiology*, cilt 57: 32-36, 2006
17. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic Histology* Appleton and Lange, 1995, Eighth Edition, sayfa 124-131.)
18. 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.
19. Miller MD. *Review of Orthopaedics Fifth Edition* Saunders Elsevier, 2008; sayfa 39.
20. Stockwell RA. Cartilage failure in osteoarthritis: Relevance of normal structure and function. A review. *Clinical Anatomy* 1991;4: 161-191.
21. Hall AC, Horwitz ER, Wilkins RJ. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* 1996;81: 535-545.
22. Hunziker, EB. Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. *Microsc Res Rech* 28(6):505-19, 1994
23. Mescher, LA. *Junqueira's Basic Histology, Twelfth Edition, Chapter 7 Cartilage*, 2010
24. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Schwarz EM, Rosier R, O'Keefe RJ. Articular Cartilage Biology. *J Am Acad Orthop Surg* 2003;11:421-430.
25. 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
26. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr Course Lect 47:477-486, 1998
 27. Juppner, H. Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development. *Pediatr Nephrol* 14(7):606-11, 2000.
 28. Katagiri, T. And Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* 8(3):147-59, 2002
 29. 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.
 30. 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.
 31. Klein TJ, Schumacher BL, Schmidt TA, et al. Tissue engineering of stratified articular cartilage from chondrocyte subpopulations. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(8):595–602.)
 32. Eyre, D. Collagen of articular cartilage, *Arthritis Res.*, 4:30 ,2002
 33. Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A. Articular cartilage structure, composition, and function. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, editors. *Orthopedic basic science: biology and biomechanics of the musculoskeletal system.* Rosemont (IL) American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999. p. 444– 70.
 34. Mandler M, Eich-Bender SG, Vaughan L, Winterhalter KH, Bruckner P. Cartilage contains mixed fibrils of collagen types II, IX, and XI. *J. Cell Biol* 108(1):191-7, 1989
 35. Watanabe H, Yamada Y, Kimata K. Roles of aggrecan, a large chondroitin sulfate proteoglycan, in cartilage structure and function. *J Biochem (Tokyo)* 124:687–693, 1998
 36. Bayliss MT, Osborne D, Woodhouse S, Davidson C. Sulfation of chondroitin sulfate in human articular cartilage. The effect of age,

37. Stockwell RA, Meachin G. In Freeman MAR. (ed.) Adult Articular Cartilage, 2nd edn. Pitman Medical, Tunbridge Wells, 69-144, 1979
38. Breinan HA, Hsu HP, Spector M. Chondral Defects in Animal Models: Effects of Selected Repair Procedures in Canines. Clin Orthop. 39:219-230, 2001
39. Browne JE, Branch TP. Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. J Am Acad Orthop Surg 2000;8:180-189.
40. 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
41. 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.
42. Eyre DR, Weis MA, Wu J. Articular cartilage collagen: An irreplaceable framework?, European Cells and Materials, 12:57-63, 2006
43. 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.
44. Ateshian GA, Hung CT. The natural synovial joint properties, Proceedings of Institute of Mechanical Engineers. Part J: Journal of Engineering Tribology, 120:657-670, 2006
45. Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, Sah RL, Goomer R, Amiel D. Matrices for cartilage repair. Clin Orthop Relat Res. 2001; 271-9
46. Roughley PJ. Articular cartilage and changes in arthritis: noncollagenous proteins and proteoglycans in the extracellular matrix of cartilage. Arthritis Res. 2001; 3:42-7
47. 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
48. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular Cartilage, I. Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. J Bone Joint Surgery. Am 1997; 600-11

49. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte-matrix interactions in maintaining and repairing articular cartilage. *Biorheology* 2000; 37(1-2),129-40
50. 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
51. 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) American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1999. p. 472– 88.
52. 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.
53. 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.
54. 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
55. Gikas PD, Bayliss L, Bentley G, Briggs TW. An overview of autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Br* 2009;91(8):997-1006.
56. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. 2002;18(7):730-4.
57. 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.
58. 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.
59. Campbell CJ. The Healing of Cartilage Defects. *Clin Orthop*. 64: 45-63, 1969

60. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop*. 2003;(407):215-27.
61. Prakash D, Learmonth D. Natural progression of osteo-chondral defect in the femoral condyle. *The Knee*. 2002;9(1):7-10.
62. 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.
63. Coons DA, Barber FA. Arthroscopic osteochondral autografting. *The Orthopedic clinics of North America*. 2005;36(4):447-58.
64. 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.
65. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop*. 1997;(342):254-69.
66. Bobic V, Noble J. Articular cartilage--to repair or not to repair. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82(2):165-6.
67. Giurea M, Aichroth PM, Duri Z. Classification of articular cartilage lesions of the knee at arthroscopy, *The Knee*, 5, 159-164, 1998
68. Outerbridge RE. The etiology of chondromalacia patellae. *J Bone Jt Surg* 1961;43B:752-757
69. Insall J, Falvo KA, Wise DW. Chondromalacia patellae. A prospective study. *J Bone Surg* 1976;58A:1-8.
70. Ficat RP, Philippe J, Hungerford DS. Chondromalacia patellae: a system of classification. *Clin Orthop* 1979;144:55-62.
71. Casscells SW. Chondromalacia of the patella. *J Pediatr Orthop* 1982;2:560-564.
72. Bandi W. Chondromalacia of the patella. Etiology and pathogenesis, clinical aspects, therapy and prognosis. *Z Unfallmed Berufskr* 1982;75:155-160.

73. Dougados M, Ayrat X. Proposition d'un score des lésions cartilagineuses du genou par la Société Française d'Arthroscopie. *Acta Orthop. Belg.* 1994;60:suppl. I.
74. Bentley G, Dowd G. Current concepts of etiology and treatment of chondromalacia patellae. *Clin Orthop* 1984;189: 209-228
75. Dandy D. *Arthroscopic Management of the Knee*. New York: Churchill Livingstone, 1987.
76. Noyes FR, Stabler CL. A system for grading articular cartilage lesions at arthroscopy. *Am J Sports Med* 1989;17: 505-513.
77. 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.
78. Bauer MD, Jackson RW. Chondral lesions of the femoral condyles, a system of arthroscopic classification. *Arthroscopy* 1988;4:97-102.
79. Dzioba RB. The classification and treatment of acute cartilage lesions. *Arthroscopy* 1988;4:72-80.
80. Koshino T, Machida J. Grading system of articular cartilage degeneration in osteoarthritis of the knee. *Bull Hosp Jt Dis* 1993;53:4146.
81. Lewandrowsky KU, Ekkernamp A. Classification of articular cartilage Lesions of the Knee at Arthroscopy. *Am J Knee Surg* 1996;9:121]129.
82. 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.
83. 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
84. Minas T, Nehrer S. Current concepts in the treatment of cartilage defects. *Orthopaedics* 1997;20:525-38
85. 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
86. 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.

87. 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.
88. 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.
89. Cain EL, Clancy WG. Treatment algorithm for osteochondral injuries of the knee. *Clin Sports Med* 2001;20:321-42
90. Ritchie P, McCarty EC. Surgical management of cartilage defects in athletes: *Clin Sports Med* 2005;24:163-74
91. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S362-9.
92. 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.
93. 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.
94. Zantop T, Petersen W. Arthroscopic implantation of a matrix to cover large chondral defect during microfracture. *Arthroscopy* 2009;25(11):1354-60.
95. 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.
96. 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.
97. 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.

98. 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.
99. Bae DK, Yoon KH, Song SJ. Cartilage healing after microfracture in osteoarthritic knees. *Arthroscopy* 2006;22(4):367-74
100. Cole BJ, Lee SJ. Complex knee reconstruction: articular cartilage treatment options. *Arthroscopy* 2003;19 Suppl 1:1-10.
101. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop* 2003;215-27
102. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, et al. Histological assessment of cartilage repair. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85:45-7
103. Jakobsen R, Engebretsen L, Slauterbeck JR. An analysis of the quality of cartilage repair studies. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87:2232-9
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. Gross AE. Repair of cartilage defects in the knee. *The journal of knee surgery*. 2002;15(3):167-9.

110. 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.
111. Hangody L, Ráthonyi GK, Duska Z, et al. Autologous osteochondral mosaicplasty. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A Suppl:65-72.
112. 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.
113. Gross AE. Cartilage resurfacing: filling defects. *The Journal of arthroplasty*. 2003;18(3 Suppl 1):14-7.
114. 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.
115. 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.)
116. Ohlendorf C, Tomford WW, Mankin HJ. Chondrocyte survival in cryopreserved osteochondral articular cartilage. *J Orthop Res* 1996;14(3):413-6.
117. 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.
118. Outerbridge HK, Outerbridge RE, Smith DE. Osteochondral defects in the knee. A treatment using lateral patella autografts. *Clin Orthop* 2000;(377):145-51
119. Barber FA, Chow JC. Arthroscopic chondral osseous autograft transplantation (COR procedure) for femoral defects. *Arthroscopy* 2006;22(1):10-6.
120. 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.

121. 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.
122. 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.
123. 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.
124. 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.
125. 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
126. Makino T, Fujioka H, Terukina M, et al. The effect of graft sizing on osteochondral transplantation. *Arthroscopy* 2004;20(8):837-40
127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. 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.

131. 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.
132. Bentley G, Greer RB. Homotransplantation of isolated epiphyseal and articular cartilage chondrocytes into joint surfaces of rabbits. *Nature*. 1971;230(5293):385-8.
133. 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.
134. 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.
135. 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.
136. 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.
137. Jones DG, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(11):2502-20
138. 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.
139. 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.
140. 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.
141. Minas T. Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop* 2001;(391 Suppl):S349-61.

142. 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.
143. 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.
144. Minas T, Peterson L. Advanced techniques in autologous chondrocyte transplantation. *Clinics in sports medicine*. 1999;18(1):13-44, v-vi.
145. 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.
146. Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *The American journal of knee surgery*. 2000;13(1):41-50.
147. 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.
148. 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.
149. Gillogly SD, Myers TH. Treatment of full-thickness chondral defects with autologous chondrocyte implantation. *Orthop Clin North Am* 2005;36(4):433-46
150. 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.
151. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Orthop* 2002;(402):21-37.
152. 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.
153. 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.

- 154.**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.
- 155.**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.
- 156.**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.
- 157.**Gillogly SD. Treatment of large full-thickness chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *Arthroscopy* 2003;19 Suppl 1:147-53.
- 158.**Halbrecht JL, Klick BC. Improvement in bone homeostasis following autologous chondrocyte implantation of the knee. *Orthopedics*. 2006;29(1):61-9.
- 159.**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.
- 160.**Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop* 1999;(367 Suppl):S147-55
- 161.**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.
- 162.**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.
- 163.**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.
- 164.**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.
- 165.** 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.
- 166.** 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.
- 167.** 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.
- 168.** 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.
- 169.** 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.
- 170.** 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.
- 171.** 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.
- 172.** Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *The American journal of knee surgery*. 2000;13(1):41-50.
- 173.** 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.
- 174.** 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.

175. 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.
176. Haddo O, Mahroof S, Higgs D, et al. The use of chondroglue membrane in autologous chondrocyte implantation. *The Knee*. 2004;11(1):51-5.
177. 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.
178. 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.
179. 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.
180. 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.
181. 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.
182. 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.
183. Lubowitz JH, Poehling GG. Saving our cells: advances in tissue engineering for focal cartilage defects. *Arthroscopy* 2009;25(2):115-6.
184. Steinwachs M. New technique for cell-seeded collagen-matrix-supported autologous chondrocyte transplantation. *Arthroscopy* 2009;25(2):208-11.
185. 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.

- 186.**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.
- 187.**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.
- 188.**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.
- 189.**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.
- 190.**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.
- 191.**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.
- 192.**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.
- 193.**Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Baisch A, Sadick H, Verse T, Kluter H, Hormann K, Riedel F. Expression of collagen and fiberassociated proteins in human septal cartilage during in vitro dedifferentiation, International Journal of Molecular Medicine 14 (2004) 1015–1022.
- 194.**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
- 195.**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.
- 196.** 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.
- 197.** 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
- 198.** 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.
- 199.** 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
- 200.** 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.
- 201.** Lin Z, Willers C, Xu JA, Zheng MH. The chondrocyte: biology and clinical application, *Tissue Engineering* 12 (2006) 1971–1984
- 202.** Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations, *Journal of Orthopaedic Research* 23 (2005) 425–432.
- 203.** Darling EM, Hu JCY, Athanasiou KA. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression, *Journal of Orthopaedic Research* 22 2004 1182–1187.
- 204.** Hidaka C, Cheng C, Alexandre D, Bhargava M, Torzilli PA. Maturational differences in superficial and deep zone articular chondrocytes, *Cell and Tissue Research* 323 2006 127–135.

- 205.** 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.
- 206.** 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.
- 207.** 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.
- 208.** Kafienah W, Jakob M, Demartean 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.
- 209.** Isogai N, Kusuhara 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.
- 210.** 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.
- 211.** Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model, *Arthroscopy* 23 (2007) 178–187.
- 212.** 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.
- 213.** 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
- 214.** 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.

- 215.**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.
- 216.**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.
- 217.**Gnecchi 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.
- 218.**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.
- 219.**Coleman RM, Case ND, Guldberg RE. Hydrogel effects on bone marrow stromal cell response to chondrogenic growth factors, *Biomaterials* 28 (2007) 2077–2086.
- 220.**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
- 221.**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
- 222.**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
- 223.**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
- 224.**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.
- 225.**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.
- 226.**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.
- 227.**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.
- 228.**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.
- 229.**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.
- 230.**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.
- 231.**Tuli R, Li WJ, Tuan RS. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003;5:235-238.
- 232.**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.

- 233.** 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.
- 234.** 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.
- 235.** 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.
- 236.** Bryant SJ, Anseth KS. The effects of scaffold thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly(ethylene oxide) hydrogels, *Biomaterials* 22 (2001) 619–626.
- 237.** Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair, *Wound Repair and Regeneration* 7 (1999) 79–89.
- 238.** 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.
- 239.** Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3 (2005) 1894–1904.
- 240.** 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.
- 241.** 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
- 242.** 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.

- 243.** 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.
- 244.** Connelly JT, Garcia AJ, Levenston ME. Inhibition of in vitro chondrogenesis in RGD-modified three-dimensional alginate gels, *Biomaterials* 28 (2007) 1071–1083.
- 245.** 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.
- 246.** 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.
- 247.** 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.
- 248.** 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.
- 249.** Bhardwaj T, Pilliar RM, Gryn timer MD, Kandel RA. Effect of material geometry on cartilagenous tissue formation in vitro, *Journal of Biomedical Materials Research* 57 (2001) 190–199.

- 250.**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
- 251.**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.
- 252.**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.
- 253.**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.
- 254.**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.
- 255.**Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, Park TG. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 26 (2005) 1925–1933.
- 256.**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.
- 257.**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

- 258.** 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.
- 259.** 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.
- 260.** 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.
- 261.** 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.
- 262.** 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.
- 263.** 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.
- 264.** 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), *Cytotherapy* 7 (2005) 292–300.
- 265.** 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.

- 266.** 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
- 267.** 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.
- 268.** Evans CH, Gouze JN, Gouze E. Osteoarthritis gene therapy. *Gene Ther* 2004;11:379–389.
- 269.** 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.
- 270.** Saraf A, Mikos AG. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews* 58 (2006) 592–603.
- 271.** Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* 2008;39:97-113.
- 272.** Madry H, Kaul G, Cucchiari 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.
- 273.** 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
- 274.** 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.
- 275.** Hu JC, Athanasiou KA. The effects of intermittent hydrostatic pressure on self-assembled articular cartilage constructs, *Tissue Engineering* 12 (2006) 1337–1344.

- 276.** 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.
- 277.** 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
- 278.** 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.
- 279.** 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
- 280.** 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
- 281.** 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.
- 282.** Freed LE, Marquis JC, Vunjaknovakovic G, Emmanuel J, Langer R. Composition of cell-polymer cartilage implants, *Biotechnology and Bioengineering* 43 (1994) 605–614
- 283.** Hu JC, Athanasiou KA. Low-density cultures of bovine chondrocytes: effects of scaffold material and culture system, *Biomaterials* 26 (2005) 2001–2012.

- 284.** Gemmiti CV, Gulberg RE. Fluid flow increases type II collagen deposition and tensile mechanical properties in bioreactor-grown tissueengineered cartilage, *Tissue Engineering* 12 (2006) 469–479.
- 285.** 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
- 286.** 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.
- 287.** 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.
- 288.** 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.
- 289.** 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.)
- 290.** 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.
- 291.** 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
- 292.** 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. Arch Orthop Trauma Surg. 125:598-608, 2005
- 293.** Nam EK, Makhsous M, Koh J, Bowen M, Nuber G, Zhang LQ. Biomechanical and Histological Evaluation of Osteochondral Transplantation in a Rabbit Model. Am J Sports Med 32:308-316, 2004.
- 294.** Strauss EJ, Goodrich LR, Chen CT, Hidaka C, Nixon AJ. Biochemical and Biomechanical Properties of Lesion and Adjacent Articular Cartilage after Chondral Defect Repair in an Equine Model. Am J Sports Med. 33:1647-1653, 2005
- 295.** Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular Cartilage II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration and Transplantation. J Bone Joint Surg. 79A:612-632, 1997.
- 296.** Buckwalter JA, Mow VC. Cartilage Repair in Osteoarthritis. In: Moskowitz RW, Howell DS, Goldberg VM, (eds) Osteoarthritis: Diagnosis and Management. Saunders, Philadelphia, pp: 71-107, 1992.
- 297.** 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.
- 298.** Bell E. Strategy for the selection of scaffolds for tissue engineering. Tissue engineering. 1995;1(2):163-79
- 299.** 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
- 300.** Gavénis K, Schmidt-Rohlfing B, Mueller-Rath R, Andereya S, Schneider U. In vitro comparison of six different matrix systems for the cultivation of human chondrocytes. In vitro cellular & developmental biology. Animal. 2006;42(5-6):159-67.

- 301.**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.
- 302.**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
- 303.**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
- 304.**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.
- 305.**Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous Repair of Full-Thickness Defects of Articular Cartilage in a Goat Model. A Preliminary Study. J Bone Joint Surg. 83A:53-64, 2001
- 306.**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.
- 307.**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.
- 308.**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
- 309.**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.
- 310.**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
- 311.**Aroen A, Heir S, Loken S, Reinholt FP, Engebretsen L. Articular Cartilage Defects in a Rabbit Model, Retention Rate of Periosteal Flap Cover. *Acta Orthop.* 76:220-224, 2005
- 312.**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.
- 313.**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
- 314.**Fuller JA, Ghadially FN. Ultrastructural Observations of Surgically Produced Partial Thickness Defects in Articular Cartilage. *Clin Orthop.* 86:193-205, 1972
- 315.**Butnariu-Ephrat M, Robinson D, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Resurfacing of Goat Articular Cartilage by Chondrocytes Derived from Bone Marrow. *Clin Orthop.* 330:234-243, 1996.
- 316.**Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The Repair of Large Osteochondral Defects. An Experimental Study in Horses. *Clin Orthop Relat Res.* 82:1972.
- 317.**Shahgaldi BF, Amis AA, Heatley FW, McDowell J, Bentley G. Repair of Cartilage Lesions Using Biological Implants. *J Bone Joint Surg.* 73B:57-64, 1991.

- 318.** Tytherleigh-Strong G, Hurtig M, Miniaci A. Intra-Articular Hyaluronan Following Autogenous Osteochondral Grafting of the Knee. *Arthroscopy*. 21:999-1005, 2005
- 319.** 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.
- 320.** Mendelson S, Wooley P, Lucas D, Markel D. The Effect of Hyaluronic Acid on a Rabbit Model of Full-Thickness Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res*. 424:266-271, 2004
- 321.** Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T. Repair of Articular Cartilage Defects in Rabbits Using CdmP1 Gene-Transfected Autologous Mesenchymal Cells Derived from Bone Marrow. *Rheumatology (Oxford)*. 43:980-985, 2004
- 322.** 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*. 24:2653-2660, 2003
- 323.** Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Spector M. Effects of a Cultured Autologous Chondrocyte-Seeded Type I Collagen Scaffold on the Healing of a Chondral Defect in a Canine Model. *J Orthop Res*. 21:272-281, 2003.
- 324.** 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
- 325.** 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. *J Shoulder Elbow Surg* 2007;16:115-121.

- 326.** 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.
- 327.** 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.
- 328.** Marcacci M, Zaffagnini S, Kon E. Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002;10:154-159.
- 329.** 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.
- 330.** Nakanishi T, Kawasaki K, Uchio Y, Kataoka H, Terashima M, Ochi M. Ag-041r, a Cholecystokinin-B/Gastrin Receptor Antagonist, Stimulates the Repair of Osteochondral Defect in Rabbit Model. *Eur J Pharmacol*. 439:135-140, 2002
- 331.** Tuncay IC, Ozdemir BH, Demirors H, Karaeminogullari O, Tandogan NR. Pedunculated Synovium Grafts in Articular Cartilage Defects in Rabbits. *J Invest Surg*. 18:115-122, 2005
- 332.** Mason JM, Breitbart AS, Barcia M, Porti D, Pergolizzi RG, Grande DA. Cartilage and Bone Regeneration Using Gene-Enhanced Tissue Engineering. *Clin Orthop Relat Res*. 379 Suppl:S171-178, 2000
- 333.** Hattori K, Takakura Y, Ohgushi H, Habata T, Uematsu K, Yamauchi J, Yamashita K, Fukuchi T, Sato M, Ikeuchi K. Quantitative Ultrasound Can Assess the Regeneration Process of Tissue-Engineered Cartilage Using a Complex between Adherent Bone Marrow Cells and a Three-Dimensional Scaffold. *Arthritis Res Ther*. 7:552-559, 2005.

- 334.**Hattori K, Takakura Y, Morita Y, Takenaka M, Uematsu K, Ikeuchi K. Can Ultrasound Predict Histological Findings in Regenerated Cartilage? *Rheumatology (Oxford)*. 43:302-305, 2004
- 335.**Glenn RE Jr, McCarty EC, Potter HG, Juliao SF, Gordon JD, Spindler KP. Comparison of Fresh Osteochondral Autografts and Allografts: A Canine Model. *Am J Sports Med*. 34:1084-1093, 2006
- 336.**Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Chondrocyte-Seeded Collagen Matrices Implanted in a Chondral Defect in a Canine Model. *Biomaterials*. 19:2313-2328, 1998
- 337.**Lu Y, Hayashi K, Hecht P, Fanton GS, Thabit G 3rd, Cooley AJ, Edwards RB, Markel MD. The Effect of Monopolar Radiofrequency Energy on Partial-Thickness Defects of Articular Cartilage. *Arthroscopy*. 16:527-536, 2000

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MACI	: Matrix-guided Autologous Chondrocyte Implantation
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
ACI	: Otolog Kondrosit İmplantasyonu
PAS	: Periyodik asit shift
BMP	: Kemik morfojenik proteinleri
PTHrP	: Paratiroid-hormon-ilişkili-peptid
Ihh	: Indian-hedgehog
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
kDa	: Kilodalton
FACIT	: Fibril associated collogens with interrupted triple helices
GAG	: Glikozaminoglikan
ECM	: Ekstrasellüler Matriks
PDGF	: Trombosit-kökenli büyüme faktörü
ICRS	: Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği
KİUY	: Kemik iliği uyarı yöntemleri
OAT	: Osteokondral otolog transferi
MMP	: Matriks metalloproteinazlar
TIMP	: Doku inhibitör metalloproteinazlarını
SZP	: Yüzeyel bölge proteini
PEODA	: Poli (etilen oksit) diakrilat
PEGDA	: Poli (etilen glikol) diakrilat
PLA	: Poli laktik asit
BMSC	: Kemik iliği kaynaklı kök hücre
ADSC	: Adipoz kaynaklı kök hücreler
ESC	: Embriyonik kök hücreler
EB	: Embriyonik cisim
PEG	: Polietilenglikol
OAS	: Oswestry Artroskopi Skoru
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekiller	Sayfa No
Şekil 1 (Kıkırdak Dokusunun Tipleri)	11
Şekil 2 (Kondrositlerin laküna içindeki şekilleri)	13
Şekil 3 (Kondrositleri çevreleyen ekstrasellüler matriks)	14
Şekil 4 (Proteoglikan agregatı)	16
Şekil 5 (Eklem kıkırdağı tabakaları)	18

RESİMLER DİZİNİ

Resimler	Sayfa No
Resim 1 (Cerrahi teknik)	53
Resim 2 (MACI uygulanmış defekt)	55
Resim 3 (Deney grubunda cerrahi uygulama)	56
Resim 4 (Makroskopik görünüm)	63
Resim 5 (MACI ve Deney grubunun Safranin-O boyası ile X60 büyütmelelerdeki histolojik görüntüleri)	66
Resim 6 (MACI ve Deney grubunun Tip I Kollajen İmmunhistokimyasal boyası ile X60 büyütmelelerdeki histolojik görüntüleri)	66
Resim 7 (MACI ve Deney grubunun Tip II Kollajen İmmunhistokimyasal boyası ile X60 büyütmelelerdeki histolojik görüntüleri)	67

TABLolar DİZİNİ

Tablolar	Sayfa No
Tablo 1 (Eklem kıkırdağının yapısal bileşenleri)	12
Tablo 2 (Eklem kıkırdağı tabakalarının özellikleri)	19
Tablo 3 (Outerbridge ve Modifiye Outerbridge sınıflaması)	24
Tablo 4 (Bauer ve Jackson sınıflaması)	24
Tablo 5 (Uluslararası Kıkırdak Araştırma Derneği artiküler kıkırdak evreleme sistemi)	25
Tablo 6 (Artiküler kıkırdak lezyonlarının tedavi seçenekleri)	27
Tablo 7 (Kıkırdak doku mühendisliği için uygun hücre kaynakları)	40
Tablo 8 (Defektin makroskopik değerlendirme kriterleri)	57
Tablo 9 (Modifiye O'Driscoll Skorlama Sistemi)	59
Tablo 10 (Tüm grupların makroskopik olarak değerlendirilmesi)	62
Tablo 11 (Tüm grupların histomorfometrik incelenmesi)	64
Tablo 12 (Tüm grupların immunhistokimyasal incelemesi)	65